

〔原著〕 松本歯学 5 : 181~190, 1979

## 走査電子顕微鏡によるマウス顎下腺の細胞内構造の観察

佐原紀行

松本歯科大学 口腔解剖学第2教室 (主任 鈴木和夫 教授)

赤羽章司

松本歯科大学 電子顕微鏡室 (主任 赤羽章司 学士)

### Scanning Electron Microscopic Study of Intracellular Structures of the Mouse Submandibular Gland.

NORIYUKI SAHARA

*Department of Oral Anatomy, Matsumoto Dental College*

*(Chief: Prof. K. Suzuki)*

SHOJI AKAHANE

*Laboratory of Electron-microscope, Matsumoto Dental College*

*(Chief: B. Sc. S. Akahane)*

#### Summary

A variety of procedures have been employed to prepare soft tissues and cells to observe their intracellular structures by the scanning electron microscope. However, their procedures often unsatisfactory because of artifact caused by shearing forces and other reasons.

The present study attempt to examine successful procedure for intracellular structures of mouse submandibular glands. After cryofracture was used, mild ion-etching (700V) or low-pH, hypotonic solution (without ion-etching) method was applied for disclose intracellular structures of their cells.

Ion-etching specimens were examined by three different fixations and effect of ion-etching time.

Specimens fixed with paraformaldehyde and glutaraldehyde resulted in better ion-etching effect than those fixed with osmium tetroxide. Successful result for disclose

intracellular structures was obtained from paraformaldehyde and glutaraldehyde fixation, and ion-etching specimens for 10–15 minutes.

Without ion-etching method did not get good results in submandibular glands in present study.

## 結 言

最近, 走査電子顕微鏡を用いた研究が多くみられるようになってきた。

試料作製法が透過電子顕微鏡にくらべ比較的容易なこと, 光学顕微鏡にくらべ高倍率でしかも試料を立体的に観察できることにあると思われる。

従来行なわれている走査電子顕微鏡による観察では, 試料の表面の観察だけに限られ, 走査電子顕微鏡を用い, 透過電子顕微鏡と同じように, 細胞内部の諸構造を観察しようとする試みは, まったくないといってもよいほどであった<sup>1) 2) 3)</sup>。

それは透過電子顕微鏡にくらべ走査電子顕微鏡の分解能が劣ること, さらには試料作製法にさまざまな問題点があったからである。

しかし, 臨界点乾燥法<sup>4) 5)</sup>, イオンエッチング法<sup>6) 7) 8)</sup>, イオンスパッタコーティング法<sup>9)</sup>, などの試料作製技術が開発される一方, 走査電子顕微鏡の分解能も向上し, 肝臓<sup>10) 11)</sup>, 腎臓<sup>12) 13) 14)</sup>, 膵臓<sup>14)</sup>, などの細胞内構造を走査電子顕微鏡で観察した報告などがみられるようになった。

だが, 走査電子顕微鏡で細胞内構造を観察するためには, すべての問題点が解決したわけではない。より良い像を得るためには, 試料の割断方法, 割断面から内部構造を割出する方法などに依然として問題が残されている。

本実験では割断方法として凍結割断法, 割出方法では, イオンエッチング法, イオンエッチングを行わず低 pH, 低調液処理による方法を用い, 観察例の少ない顎下腺組織の細胞内構造の観察に適した固定, 割断法, 割出法について多少の検討を加え, 走査電子顕微鏡により, 細胞内構造を観察したので報告する。

## 実験材料および実験方法

試料には, 50 日齢雄マウス (ddy 系) の顎下腺を使用した。

マウスは実験前日, 1 日間絶食させ, クロロホルム麻酔下で, 生理的食塩水にて灌流, 血液を除

いた後, 顎下腺を採取した。

試料は, 10%ホルマリン, 2.5%グルタルアルデヒド, 2.5%グルタルアルデヒドと1%オスミウム酸による二重固定を, それぞれ2時間行った。固定後, エタノール系列で脱水, 100%エタノール中で試料をゼラチンカプセル (リリー社 NO. 2) 中にいれ, 凍結割断器 (Eiko TF-1) を用い割断した。凍結割断後, 酢酸イソアミルに置換し, 臨界点乾燥装置 (日立 HCP-1) を用い乾燥した。

それぞれの固定による試料の割断面に対するイオンエッチング効果を調べるためイオンスパッタリング装置 (Eiko IB-3) により, 真空度  $5 \times 10^{-2}$  Torr, 印加電圧 700 V で 5 分, 10 分, 15 分, 20 分, 25 分, 30 分間, イオンエッチングを施した。

さらに一部の試料は, 田中らによる低 pH, 低調液処理による割出法<sup>15)</sup>を参考にし, イオンエッチングすることなく, 細胞内構造の割出を行なった。その方法は次のようなものである。

生理的食塩水で灌流, さらに Mc Ilvain 液 (pH 5.8) の 10 倍液で灌流後, 顎下腺を採取した。グルタルアルデヒドで 3 時間固定後, 20% DMSO (ディメチルスルホキシド) 液に 1 晩, さらに 50% DMSO 液に 6 時間浸漬した。試料は凍結割断後, 水洗し, DMSO 液を除去し 1%オスミウム酸で 2 時間後固定, エタノール系列で脱水後, 酢酸イソアミルに置換し, 臨界点乾燥した。

上記のすべての試料は臨界点乾燥後, 金イオンスパッタコーティングを施し, 走査電子顕微鏡 (日本電子 JEM-100B・ASID および, 日本電子 JXA-733) を用い観察した。

## 実験成績

凍結割断 (Cryofracture) について

100%エタノール中で凍結割断して得られた試料の割断面は, どのような固定液による試料でも, 一樣に平滑な割断面を得ることができた。割断面は組織的構造には左右されることなく, 終末部でも導管部でも, それを構成している細胞の割断像

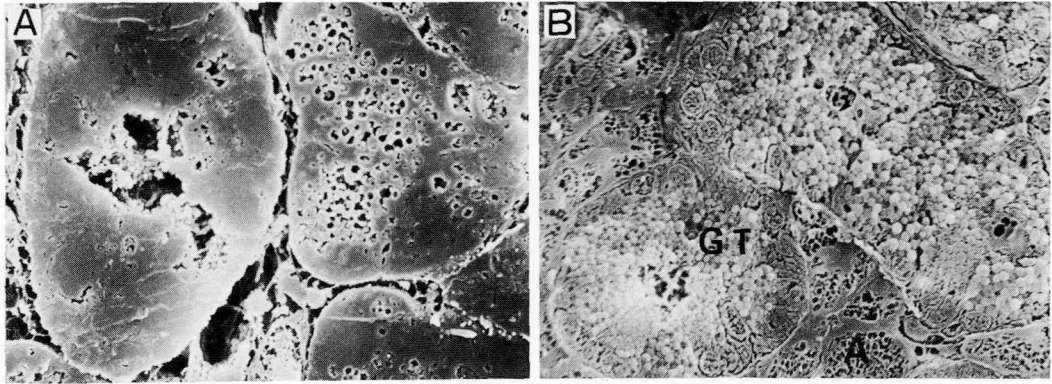


Fig.1 : Cryofracture surface of male mouse submandibular gland.

(A) Non ion-etching specimen. The exposed surface is flat and smooth.

(B) Ion-etching specimen for 15 minutes. Intracellular structure is disclosed by ion-etching. The granular tubular portion (GT) and acinar cells portion (A) can be recognized.

Both specimens fixed with glutaraldehyde. ×800

を得ることができ、顎下腺組織の細胞の観察で有効であった。

イオンエッチング効果について

イオンエッチングを施し、細胞内部構造を剖出した試料で、10%ホルマリン、2.5%グルタルアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド—1%オスミウム酸二重固定による、エッチング効果を比較してみると、グルタルアルデヒド—オスミウム酸二重固定した試料では、30分間以上のイオンエッチングを行なったのにもかかわらず、割断面にはエッチング効果を認めるのが困難であった。一方、グルタルアルデヒド、ホルマリン固定による試料は、5分間のイオンエッチングでエッチング効果が現われた。そしてこれらの固定による試料では、10~15分間のイオンエッチングを行なったものが、顎下腺組織の細胞内構造を観察するのに最も適しているという結果が得られた (Fig. 1)。

しかしホルマリン固定の試料はグルタルアルデヒド固定のものより、試料の変化、収縮が少なからず認められ、固定時間、脱水処理についても検討する必要性があった。

イオンエッチングによって得られた像

割断面を低倍率で観察すると、ラットやマウスなどの顎下腺に特徴的な、多量の分泌顆粒を含む顆粒管部の間に、4~8個ぐらいの漿液細胞からなる終末部が存在し、その他、介存部、線条部な

どの導管の割断面が観察できた<sup>16)17)</sup>、そして、それぞれの部位を構成している細胞は、割断により細胞内部が露出しているのが認められる (Fig. 2)。

顆粒管部では、上皮細胞内の大きささまざまな大きさの分泌顆粒がイオンエッチングにより剖出され、細胞の基底部には、核の割断像が認められる。核の周囲には、ゴルジ装置、小胞体、短かい基底細胞膜の陥入なども観察することができる (Figs. 3, 4)。

上皮細胞の管腔側では、分泌顆粒がそのままの形で管腔内に突出している分泌像が観察されたが、イオンエッチングのため、透過電子顕微鏡で観察される上皮細胞の微突起は消失していた (Fig. 5)。

線条部の上皮細胞では、この細胞に特徴的な長い基底細胞膜の陥入が認められ、それに並んだ多数のミトコンドリアを観察できた (Figs. 6, 7)。

介在部の上皮細胞は30分間のイオンエッチングにもかかわらず、他の細胞に比べ細胞内の構造が露出されず、わずかに核の存在が認められるほどだった。このことは、介在部の上皮細胞はイオンエッチングに対する耐性が強いものと考えられる。

終末部の漿液性の分泌細胞では、球型の核の周囲には、よく発達した小胞体が観察され、ドーム状に細胞面から突出していた核では、多数の核孔

が認められた。しかしイオンエッチングのためか、細胞内に多量に存在するはずの漿液性分泌顆粒は消失してしまい、円形の空胞が細胞内に多数認められたにすぎなかった (Figs. 8, 9)。

顆粒管部の分泌顆粒が明瞭に剖出されたのに比べ、漿液性分泌顆粒はイオンエッチングに対して耐性がないものと考えられる。これは透過電子顕微鏡での観察などで見られる電子密度の違いとも関係があると思われる。

イオンエッチングを行わず、低 pH, 低調液処理で剖出を行なった試料

田中らは、イオンエッチングによる人工産物、微細な構造の破壊などをさけるため、イオンエッチングを行わず、細胞内構造を剖出する方法を考え、肝臓や膵臓の細胞内構造を観察し、よい結果を得ているが、本実験で使用したマウス顎下腺組織では、剖出の状態が不十分で良い結果を得られなかった。しかし、イオンエッチングを行なった試料の像と比較すると、細胞に与える影響も少なく、今後、顎下腺組織に適した DMSO 液の濃度、浸漬時間を検討する必要があると思われた。

### 考 察

走査電子顕微鏡で細胞内構造を立体的に観察することが多く行なわれているが、得られた像も満足できるものは少なく、試料作製方法にもまだ多くの問題点が残されている。

細胞内構造を走査電子顕微鏡で観察するためには、まず平滑な組織、細胞の断面を作ることが第一の問題である。

現在まで断面法にはさまざまな方法が用いられてきたが、Freeze Fracture<sup>18)</sup>、Cryofracture<sup>19) 20) 21) 22)</sup>、Frozen resin cracking<sup>23)</sup>、Styrene resin cracking<sup>24)</sup> などがその代表的なものである。

最も早くから用いられた Freeze Fracture 法はフリーズレプリカ法の試料をそのまま凍結乾燥し、走査電子顕微鏡で観察する方法であるが、氷晶により人工産物が起りやすく、現在ではあまり用いられていない。

本実験で用いた Cryofracture 法では、どのような固定液の試料でも、一様に均一で平滑な断面を得られ、断面による組織および細胞の変化などが少なく、断面法としてすぐれていると思われる。この方法は断面時の包埋液の違いはあるが、

現在さかんに用いられている方法である。しかし顎下腺のような比較的均一な組織構造をもった試料では簡単でよいが、断面の方向性が必要な試料、また、ごく限られた部位の断面を得ようとする場合、狙ったように試料を断面することが非常に困難であるという欠点がある。

この欠点を解決しようと田中らは Frozen resin cracking, Styren resin cracking 法を始めた。

この方法は液状の樹脂を包埋剤として固化、断面するもので、この方法を用いれば、時間的にも余裕があり、良く狙って試料を断面することができ、1 mm<sup>3</sup> 程度の試料を断面することができる。だが、試料の大きさは限られてしまい、臓器レベルでの大きな試料を断面しようとする場合には不便である。

断面法に関しては、現在の時点において、得られる断面に微妙な違いはあるが、Cryofracture, Styren resin cracking が観察に適した断面を得られる最良の方法であろう。

断面により得られた断面から細胞内構造をいかに鮮明に、正確に剖出するかも、走査電子顕微鏡で細胞内構造を観察しようとするためには重要な問題である。この剖出法には、大きく分けると、イオンエッチングを行う方法、イオンエッチングをしないで剖出を行う方法の二つの方法がある。

現在では、ほとんどの研究ではイオンエッチングで細胞内構造を剖出する方法が用いられている。しかしこの方法にも cone figures と呼ばれる人工産物が生じやすい、エッチングにより微細構造が破壊されやすいなどの種々の難点があり、使用電圧、使用ガスなどについて多くの検討がなされている。

生物試料の場合、Haggis<sup>19)</sup> などが行なった高電圧、高真空状態での初期のエッチングではなく、軽いガス (He や N<sub>2</sub>) を用い、印加電圧も 300~500 V 位でエッチングしたほうが良い結果が得られることがわかり<sup>25)</sup>、田中らは resin cracking 法による断面に、真空度  $5 \times 10^{-2}$  Torr, 印加電圧 400 V で膵臓の細胞にイオンエッチングを行ない良い結果を得ている<sup>8)</sup>。

本実験では印加電圧 700 V でイオンエッチングを行ない、時間的なエッチング効果を検討しただけであるが、漿液性の分泌顆粒の消失、微突起の

消失などの変化が認められ、印加電圧に関しても、顎下腺組織の剖出に適した電圧の検討の必要性がある。

また、切断面にイオンエッチングを行ない細胞内構造を剖出しようとする試料では、特にその固定法も重要である。本実験では、10%ホルマリン、2.5%グルタルアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド—1%オスミウム酸二重固定について、比較検討しただけであるが、オスミウム酸を固定液に使用した場合、エッチング効果が認められず、このような剖出法の固定液には適していない。結果のよかったアルデヒド系の固定液でも、固定の状態によってエッチング効果も変わってくるので、固定液の濃度、浸潤時間などについても検討しなくてはならない。

現在の状況では、走査電子顕微鏡を用い細胞内構造を観察することは、まだ補助的な方法にすぎず、特にイオンエッチングを行なった切断像を観察する時には、エッチング操作、その他の人工産物などのため、細胞内構造の変化の可能性が考えられるので、常にイオンエッチングをしない切断像と比較検討するべきである。また走査電子顕微鏡のみにより観察するのではなく、切断した同一切断面を持った試料を包埋、薄切し、透過電子顕微鏡で観察し両方で得られた像を比較することが理想的である。

緒言でも述べたように、現在では走査電子顕微鏡の分解能が向上し、特にフィールドエミッション走査電子顕微鏡では20数Åまで高められ、今後走査電子顕微鏡による細胞内微細構造の観察がさかんになると思われる。そして従来透過電子顕微鏡によって得られた連続切片の像を、再構築する方法で得られる立体的像を、直接観察することができ、細胞内の諸構造や、それらの機能的つながりを解明するのに、走査電子顕微鏡による細胞内構造の観察方法は、有効な方法になるであろう。

## 結 論

細胞内構造を走査電子顕微鏡で立体的に観察しようとする試料作製法には、さまざまな方法があるが、本実験では cryofracture 法で切断後、イオンエッチングする方法、イオンエッチングをせず、低 pH、低調液処理による方法で切断面から細胞内構造を剖出し、走査電子顕微鏡を用いマウス顎

下腺組織を観察した。

イオンエッチングを行なう試料では、顎下腺組織に適した固定、エッチングの時間を検討した。

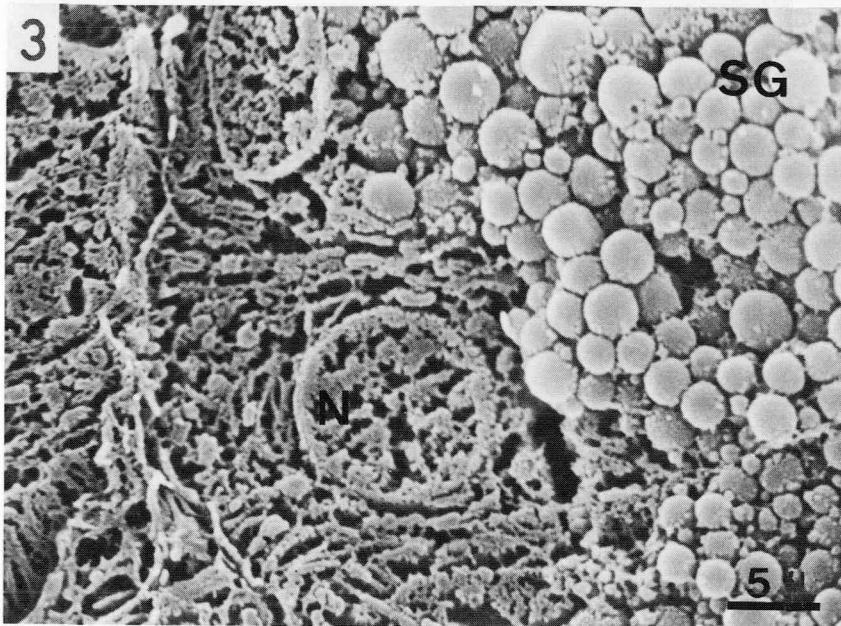
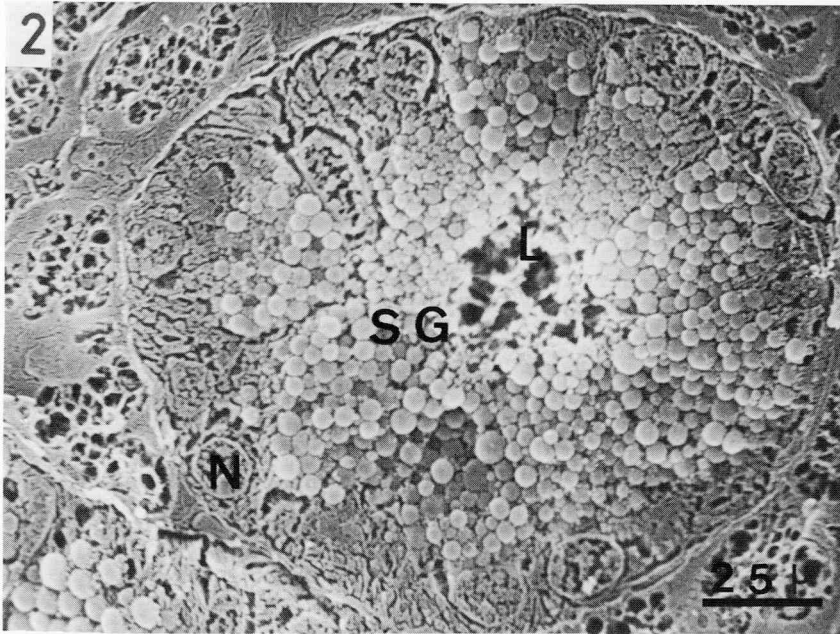
10%ホルマリン、2.5%グルタルアルデヒドで固定した試料を10~15分間のイオンエッチングを行なったものが、本実験では最も観察に適していた。オスミウム酸を固定液に使用した試料は、イオンエッチングにより細胞内構造を剖出する方法には不適當であった。

低 pH、低調液処理による剖出法では、剖出状態が不十分で、あまり良い結果が得られなかった。使用液の濃度、浸潤時間にさらに検討の余地がある。

## 文 献

- 1) Christenhuss, R. Büchner, Th. & Pfeiffer, R. A. (1967) Visualization of human somatic chromosomes studies by scanning electron microscopy. *Nature*, 216: 379—380.
- 2) Neurath, P. W & Ampola, M. G. (1967) Scanning electric microscopy of chromosomes. *Lancet*. 7530: 1366—1367.
- 3) Makita, T & Sandborn, E. B. (1971) Identification of intracellular component by scanning electron microscopy. *Exptl. Cell. Res.* 67: 211—214.
- 4) Anderson, T. F. (1955) Electron microscopy of microorganisms. in *Physical techniques in biological research III*. G. Oster and A. W. Pollister (eds.) Academic press. New York. 177—240.
- 5) Cohen, A. L., Marlow, D. P. & Garner, G. E. (1968) A rapid critical point method using fluorocarbons (Freons) as intermediate and transition fluids. *J. Microscopie*. 7: 331—342.
- 6) Hodges, G. M., Muir, M. D., Sella, C. & Johnson, J. S. (1972) The effect of radio-frequency sputter ion etching and ion-beam etching on biological material: a scanning electron microscope study. *J. Microscopy*, 95: 455—461.
- 7) Fulker, M. J., Holland, L. & Hurely, R. E. (1973) Ion etching of biological material. in *Scanning electron microscopy*. O. Johai and I. Corvin (eds.) Chicago, IIT Research Institute. 379—386.
- 8) Tanaka, T., Iino, A. & Naguro, T. (1976) Scanning electron microscopic observation on intracellular structures of ion-etched materials. *Arch. histol. jap.* 39: 165—175.
- 9) 赤 屈 宏 (1977) 医・生物試料へのイオンスパッタリングの応用. *細胞*, 9(2): 54—61.

- 10) Stanley, E. H., Brooks, M. D. & Haggis G. H. (1973) Scanning electron microscopy of rat's liver. application of freeze-fracture and freeze drying techniques. *Laboratory Investigation*, **29** : 60—64.
- 11) Layden, T. J., Schwarz, J. & Boyer, J. L. (1976) Scanning electron microscopy of the rat liver. studies of the effect of tauroolithocholate and other models of cholestasis. *Gastroenterology*, **69** : 724—738.
- 12) Siew, S. (1974) SEM studies of the human kidney. in *Scanning electron microscopy*. O. Johari and I. Corvin. (eds.), *Proceeding of the Seventh Annual scanning electron microscopy symposium*. IIT Research Institute. Chicago. 738—744.
- 13) Andrew, P. E., Don, A. H. & William, G. D. (1978) SEM of the proximal tubule of the adult rabbit kidney. *Anat. Rec.* **191** : 397—414.
- 14) Tokunaga, J., Edanaga, M. & Fujita, T. (1974) Freeze cracking of scanning electron microscope specimens. a study of the kidney and spleen. *Arch. histol. jap.* **37** : 165—182.
- 15) 田中敬一, 小沢 建, 名黒知徳, 鹿島 譲 (1977) 低 pH. 低調液処理による走査電顕生物試料作製法. 日本電子顕微鏡学会第33回学術講演会講演予稿集, 136.
- 16) Caramia, F. (1966) Ultrastructure of mouse submaxillary gland. I. sexual differences. *J. Ultrastructure research* **16** : 505—523.
- 17) Materazzi, G. & Vitaioli, L. (1969) Observation on the formation of secretion by the cells of the "convoluted granular tubules" of the submandibular gland of the rat. *J. Anat.* **105** : 163—170.
- 18) Boyde, A. (1974) Freezing, freeze-fracturing and freeze-drying in biological specimen preparation for the SEM. in *Scanning electron microscopy*. O. Johari and I. Corvin. (eds.) Chicago. IIT Research Institute. 1043—1046.
- 19) Haggis, C. H. (1970) Cryofracture of biological material. in *Scanning electron microscopy*. O. Johari and I. Corvin. (eds.) Chicago. IIT Research Institute. 99—104.
- 20) Lim, D. J. (1971) Scanning electron microscopic observation on non-mechanically cryofractured biological tissue. in *Scanning electron microscopy*. O. Johari and I. Corvin. (eds.) Chicago. IIT Research Institute. 257—264.
- 21) Nemanic, M. K. (1972) Critical point drying, cryofracture, and serial section. in *Scanning electron microscopy*. O. Johari and I. Corvin. (eds.) Chicago. IIT Research Institute. 279—304.
- 22) Humphreys, W. J. Spurlock, B. O. & Johnson, J. S. (1974) Critical point drying of ethanol-infiltrated, cryofractured biological specimens for scanning electron microscopy. in *Scanning electron microscopy*. O. Johari and I. Corvin (eds.) Chicago IIT Research Institute. 275—282.
- 23) Tanaka, K. (1972) Frozen resin cracking method for scanning electron microscopy of biological materials. *Naturwissenschaften*. **59** : 77.
- 24) Tanaka, K., Iino, A. & Naguro, T. (1974) Styren resin cracking method for observing biological materials by scanning electron microscopy. *J. Electron Microsc.* **23** : 267—275.
- 25) Fujita, T., Naguro, T. & Hattori, A. (1973) A simple method of ion-etching for biological materials. an application to blood cells and spermatozoa. *Arch. histol. jap* **36** : 3. 195—204.



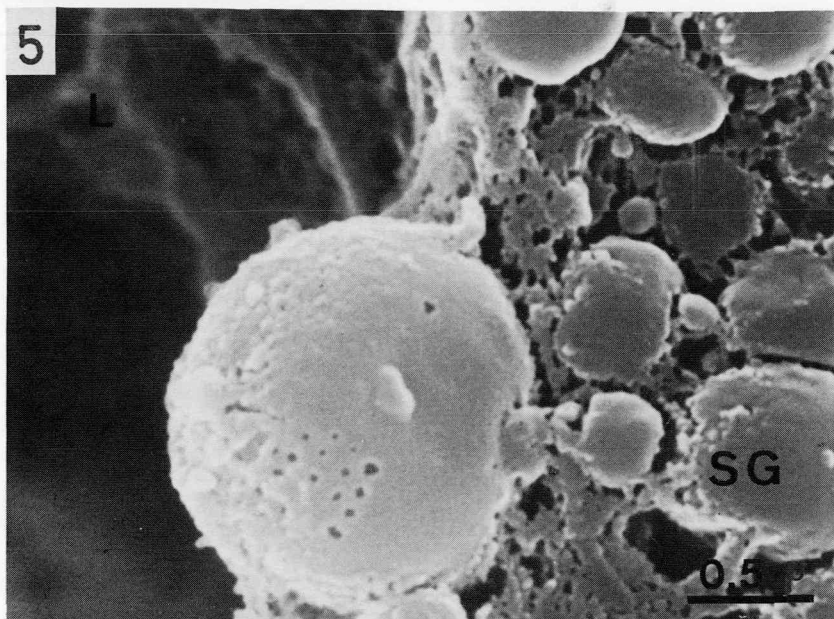
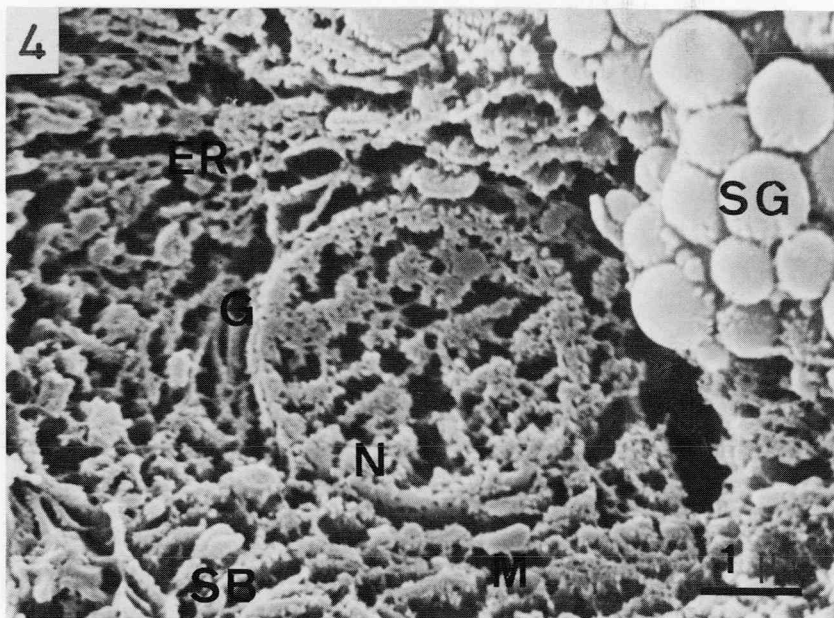
**Fig.2 :** Low magnification of fracture surface of granular tubular portion.

Numerous secretory granules (SG) are observed in the epithelial cells lining wall of the tubuli. Basal portion of their cells also can be seen fractured nucleus (N). Lumen (L).  
15 minutes ion-etching.  $\times 2,300$

**Fig.3 :** Intracellular structures of the granular portion cells.

Numerous secretory granules (SG) nucleus (N) and other structures are clearly disclosed by ion-etching. 15 minutes ion-etching.  $\times 6,800$





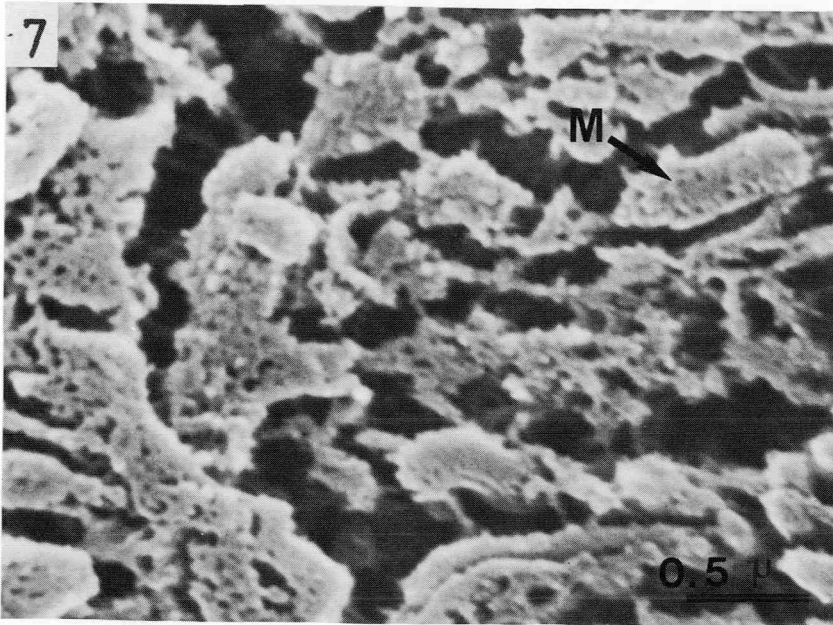
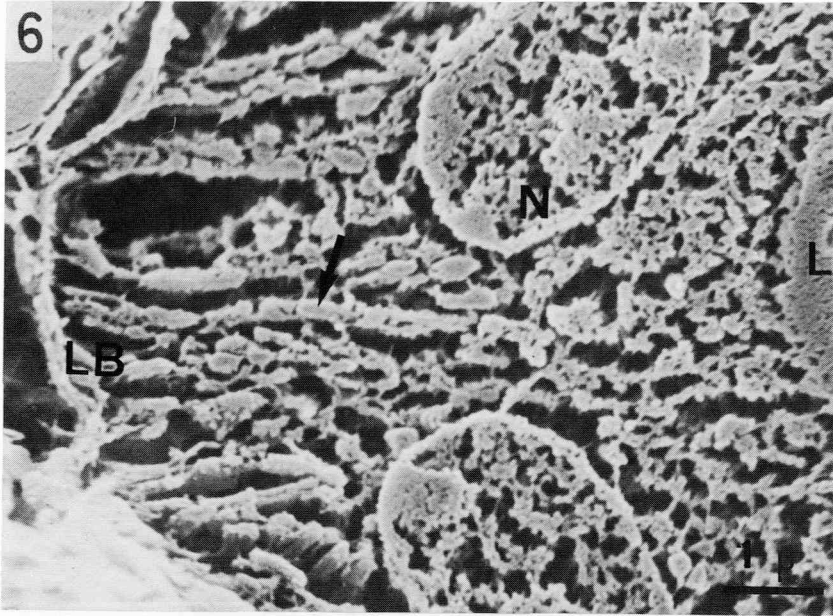
**Fig.4** : Basal portion of the granular tubular cell.

Intracellular structures of cell are observed. Secretory granules (SG), Nucleus (N), Endoplasmic reticulum (ER), Golgi body (G), Short basal infolding (SB).  $\times 11,000$

**Fig.5** : Luminal portion of the granular tubular cell.

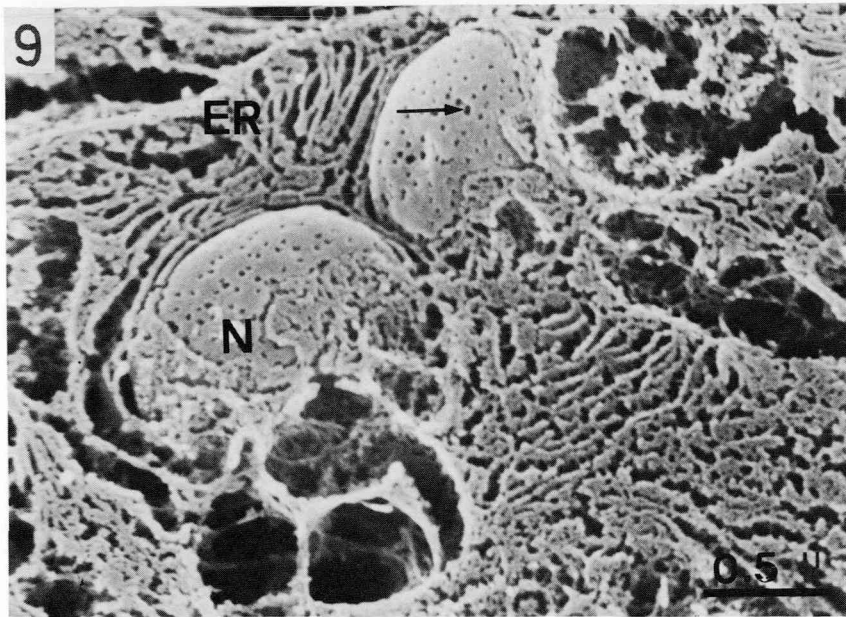
Secretory granule (SG) is erupted in to the lumen in the typical exocrin fashion. (L) lumen.  $\times 33,000$





**Fig.6 :** Cryofracture of striated duct cells of the mouse submandibular gland. Parallel long basal infolding (LB) are observed at basal portion of their cells, and numerous mitochondria (arrowed) arranged radially with respect to the lumen (L). Nucleus (N). 15 minutes ion-etching.  $\times 11,000$

**Fig.7 :** Mitochondria (M) in the striated duct cell. 15 minutes ion-etching.  $\times 33,000$



**Fig.8** : Cryofracture of the acinar portion of the mouse submandibular gland.

Spherical nucleus (N) and endoplasmic reticulum (ER) surrounding them are observed.

But serous granules are fallen by ion-etching (arrowed). 15 minutes ion-etching.  $\times 11,000$

**Fig.9** : Nucleus and endoplasmic reticulum of the serous cell of the mouse submandibular gland.

Nucleus (N). Endoplasmic reticulum (ER). Nucleus pores (arrowed) 15 minutes ion-etching.

$\times 33,000$