

走査型電子顕微鏡を用いた魚類普通筋細胞外マトリックス観察試料作製 における固定方法の検討

郭 菲菲^{*1}, 梁 佳^{*2}, 宮崎里帆^{*2}, 王 俊杰^{*2}, 谷山茂人^{*2}, 橘 勝康^{*2}

Preparation of the extracellular matrix of fish ordinary muscle for scanning electron microscopy

Feifei GUO^{*1}, Jia LIANG^{*2}, Riho MIYAZAKI^{*2}, Junjie WANG^{*2}, Shigeto TANIYAMA^{*2}
and Katsuyasu TACHIBANA^{*2}

Aldehydes are the most common prefixation reagents to prepare specimens for scanning electron microscopy. In this study, scanning electron microscopic observations were made on the morphology of the extracellular matrix of carp ordinary muscle prepared using various prefixation reagents and fixation times. The structure of collagen fibers and its networks in extracellular matrix were more clearly observed on day 5 than on day 2, when prefixation solution A (4% paraformaldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) was used, although honeycomb structure were not preserved during both periods. Prefixation of the extracellular matrix with solution B (2.5% glutaraldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) on days 2 and 5 preserved honeycomb structure with rough network, and some cellular debris remained. Prefixation of the extracellular matrix with solution C (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) on day 5 preserved fine honeycomb structure with fine network without any cellular debris.

These results suggested that prefixation for 5 days with solution C (2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde, 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) is the most suitable method of preparing extracellular matrix of fish ordinary muscle for scanning electron microscopy.

Key Words : パラホルムアルデヒド paraformaldehyde, グルタルアルデヒド glutaraldehyde,
普通筋 ordinary muscle, 前固定 prefixation, 走査型電子顕微鏡 scanning electron microscopy

動物組織中の細胞外マトリックスは、膠原線維（コラーゲン線維）と弾性線維（エラスチン）で構成され、光学顕微鏡による観察法では、エラスチカ・ワンギーソン法で染め分けて観察することが可能である。^{1, 2)} しかしながら、動物細胞における細胞外マトリックスの主体を成す膠原線維の立体構造を観察する事は出来ない。膠原線維の立体構造を観察するためには走査型電子顕微鏡を用いたアルカリ・水浸軟法³⁾ が用いられ、肝臓や副腎などのコラーゲン線維の観察に利用されている。ところで、魚筋肉の死後変化の一つに、致死後に時間の経過に伴い魚筋肉の弾力が低下し、歯ごたえが速やかに

に失われる軟化現象がある。⁴⁻¹¹⁾ この軟化現象を解明するために、Ando らは走査型電子顕微鏡（Scanning electron microscope, SEM）観察から筋内膜の主要成分である膠原線維の構造変化を報告している。^{10, 11)} しかしながら、哺乳動物で用いられているアルカリ・水浸軟法をそのまま魚類筋肉に適用するには必ずしも十分な検討が成されているとはいえない。また、電子顕微鏡観察のための試料作製方法においてその固定液は観察像の良否に大きく影響を及ぼすとされている。¹²⁾ 本研究では、魚筋肉軟化現象のメカニズム解明の一環として、走査型電子顕微鏡を用いた魚類筋肉組織の細胞外

* 1 大連海洋大学水産及生命学院

College of fisheries and Life Science, Dalian Ocean University

* 2 長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

Graduate School of Fisheries Science & Environmental Studies, Nagasaki University

マトリックス観察試料作製における適切な前固定薬剤とその処理時間の検討を行った。

試料と方法

試料

小型の養殖コイ（5尾）を試料魚とした。試料魚を延髄刺殺により即殺後、失血させ、体側線に沿って背部普通筋から切り出したブロック（2×2×8 mm）を試料筋肉とした。

前固定液と処理時間

前固定液には5種類、すなわち前固定液 A（4%パラホルムアルデヒド、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2）、前固定液 B（2.5%グルタルアルデヒド、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2）、前固定液 C（2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、0.1 M リン酸緩衝液 pH 7.2）、前固定液 D（飽和ピクリン酸水：中性ホルマリン：氷酢酸（15：5：1）の混合溶液）²⁾、前固定液 E（70%エタノール）を用いた。それぞれの前固定液による処理時間は室温にて2日間または5日間とした。

試料筋肉の固定と普通筋細胞外マトリックスの抽出

試料筋肉を速やかにそれぞれの前固定液5 ml で2日間または5日間室温にて緩やかに振とうしながら前固定した。次に、各前固定液を2 M 水酸化ナトリウム溶液に交換し、4日間振とうさせて細胞要素を除去し細胞外マトリックスを抽出した。なお、この間4回水酸化ナトリウムを交換した。次いで純水にて緩やかに洗浄後、1%タンニン酸溶液で2時間、1%オスミウム酸溶液で2時間、後固定を行った。

走査型電子顕微鏡観察試料の作製

後固定の終了した各試料を常法に従って上昇メタノールで脱水、メタノール中で液体窒素を用いて凍結し、マイクローム用メスにて筋線維と垂直方向に切断した。切断試料をt-ブタノールで置換し、凍結乾燥装置（JFD-320、日本電子製）で凍結乾燥した。各乾燥試料を試料台に貼付後、銀ペーストにて導電処理を施し、オートファインコータ（JFC-1600、日本電子製）で金パラジウム蒸着（30 mA、60 sec）を行い、走査型電子顕微鏡（JSM-6380、日本電子製）を用いて加速電圧15 kV で観察した。

結果と考察

試料を前固定液 A, B, C で2日間または5日間前固定後、細胞外マトリックス抽出を行い、SEM 観察試料の作製法に従って観察試料を得た。一方、試料を前固定液 D, E で前固定した場合、固定中の試料はそれぞれ赤褐色または白色を呈し、いずれも切り出した形を保っていた。しかしながら、D, E で前固定した試料ともに2 M 水酸化ナトリウム溶液による細胞要素の除去と細胞外マトリックスの抽出中に、肉眼的には溶解して完全に消失し、SEM 観察のための試料を調

製することができなかった。

そこで、前固定液 A, B, C で2日間または5日間前固定したコイ背部普通筋の SEM 観察試料を SEM にて観察したところ、前固定液 A および C で2日間前固定した SEM 像では、水酸化ナトリウム処理によって筋細胞要素は全体的にきれいに除去され、細胞外マトリックス（膠原線維）が観察された。しかし、一部に大きく穴が空いた様相や立体構造が弱々しい様相が観察され、前固定が十分でなかったと考えられた。前固定液 A および C で5日間前固定した SEM 像では、いずれも膠原線維の立体構造がきれいなハニカム状に観察されたが、前固定液 A は前固定液 C で得られた立体構造に比べて若干崩れているようであった。一方、前固定液 B で2日間前固定した SEM 像では、筋細胞要素は全体的に十分除去されずに残存箇所が多数認められ、膠原線維の立体構造は不明瞭であった。前固定液 B で5日間前固定により作製した試料の SEM 像では2日間前固定した試料の SEM 像より比較的きれいなハニカム状の立体構造が観察されたが、筋細胞の要素が十分除去されていない残存した像が多数観察された（Fig. 1）。

前固定液 A および C で2日間前固定して作製した試料の SEM 像において膠原線維ハニカムの膜面の構造を観察したところ、膜面における膠原線維のネットワーク構造は粗く、前固定液 A および C で5日間前固定して作製した SEM 像では、膠原線維のネットワーク構造は密に観察された。一方、前固定液 B で2日間前固定して作製した SEM 像では、膠原線維のネットワーク構造は明瞭には観察されず、筋細胞要素が幾分残存しているようであった。前固定液 B で5日間前固定して作製した SEM 像では、膠原線維のネットワークは粗く観察された（Fig. 2, 3）。

本研究で検討した5種類の前固定液うち、前固定液 D（ブアン液）、アルデヒド系を含まない前固定液 E でコイ背部普通筋を前固定したところ、いずれも水酸化ナトリウム処理による細胞要素除去の段階で、肉眼的に魚筋肉は溶解し、洗浄操作で流失した。このことからピクリン酸を主成分とする前固定液 D とエタノールを主成分とする前固定液 E はある程度の固定力はあるものの、その固定力は比較的弱く、細胞外マトリックスの組織が十分に固定されず、前固定後に水酸化ナトリウム処理したことで、他の細胞要素と共に溶解流失したと考えられた。

アルデヒド系固定液である4%パラホルムアルデヒドを主成分とする前固定液 A では、2日間よりも5日間前固定して作製した試料の SEM 像にて、膠原線維は明瞭に、そのネットワーク構造も密に観察されたことから前固定液期間は2日間より5日間が適していると考えられた。しかしながら、前固定5日間でもハニカム状の立体構造は維持できておらず、これらの観察結果はパラホルムアルデヒドは浸透力が高いものの、その固定力が弱いことに起因するものと考えられた。¹³⁻¹⁵⁾ 2.5%グルタルアルデヒドを主成分とする前固定液 B では、5日間前固定した SEM 像でも、筋細胞要素は点在するほど残存し、膠原線維のハニカム状の立体構造は維持されているものの、そのネットワーク構造は粗く観察された。このこと

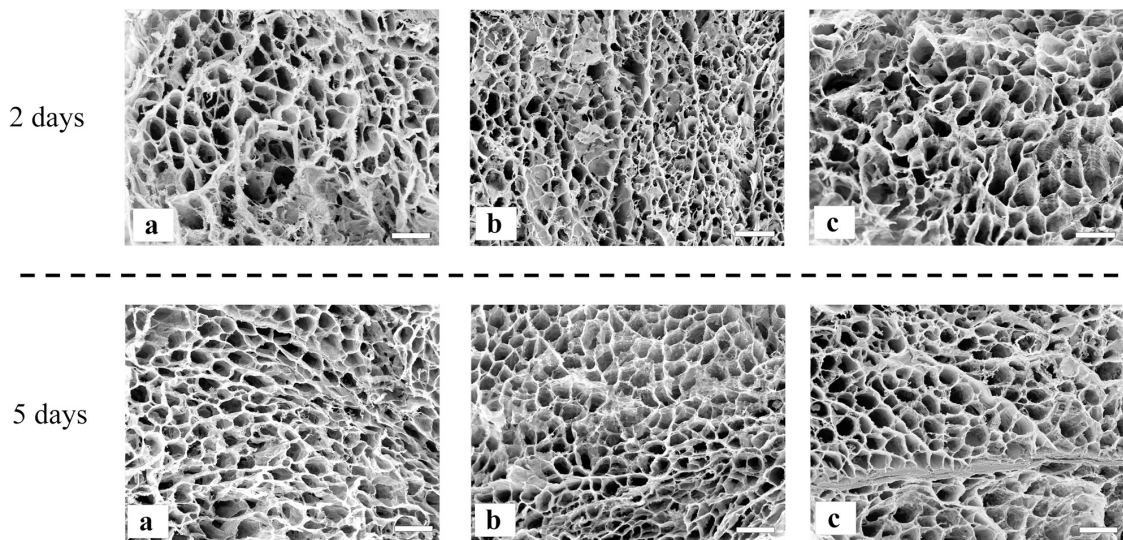


Fig.1 Scanning electron micrographs of carp ordinary muscle connective tissue prefixed by different reagents for 2 or 5 days.

Carp ordinary muscle were prefixed by different reagents (a: 2% paraformaldehyde, b: 2.5% glutaraldehyde, c: 2% paraformaldehyde, and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) for 2 or 5 days. The prefixed samples were immersed in 2 M NaOH solution for 4 days at room temperature to expose the collagen fibrillar network and post fixed with 1% tannic acid and 1% osmium tetroxide. The connective tissue samples were prepared with freeze fracturing method using methanol and liquid nitrogen. The samples for scanning electron micrograph were substituted by t-butanol, then freeze-dried and coated with gold and palladium by an ion coater. The samples were observed using SEM at 15 kV. Bars represent 200 μm.

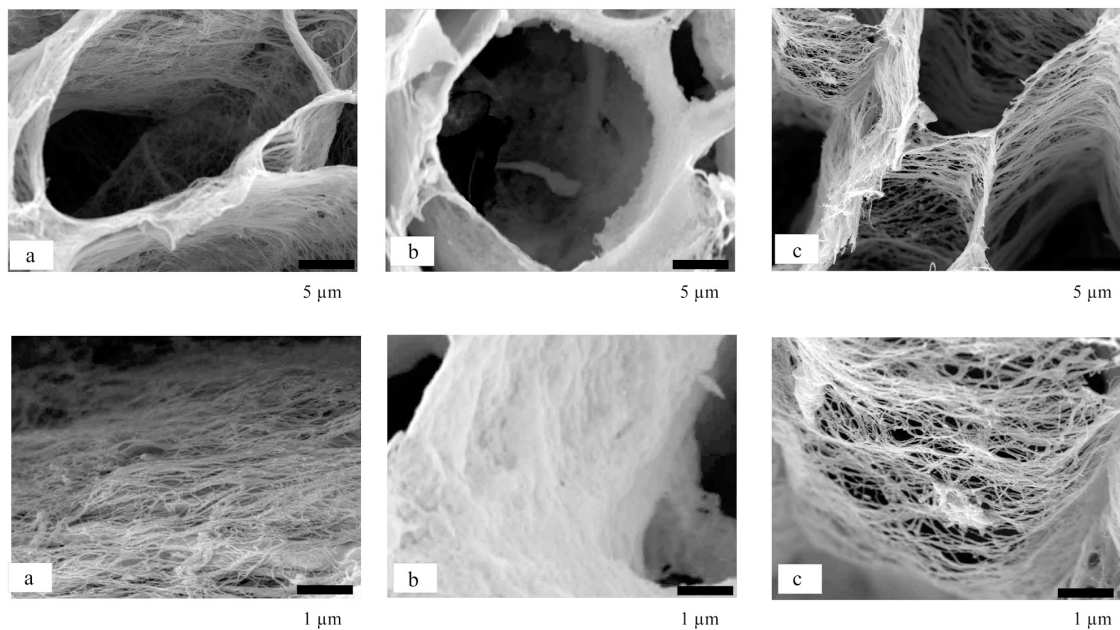


Fig.2 Scanning electron micrographs of carp ordinary muscle connective tissue prefixed by different reagents for 2 days.

Carp ordinary muscle were prefixed by different reagents (a: 2% paraformaldehyde, b: 2.5% glutaraldehyde, c: 2% paraformaldehyde, and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) for 2 days. The prefixed samples were immersed in 2 M NaOH solution for 4 days at room temperature to expose the collagen fibrillar network and post fixed with 1% tannic acid and 1% osmium tetroxide. The connective tissue samples were prepared with freeze fracturing method using methanol and liquid nitrogen. The samples for scanning electron micrograph were substituted with t-butanol, then freeze-dried and coated with gold and palladium by an ion coater. The samples were observed using SEM at 15 kV. Bars represent 5 μm or 1 μm.

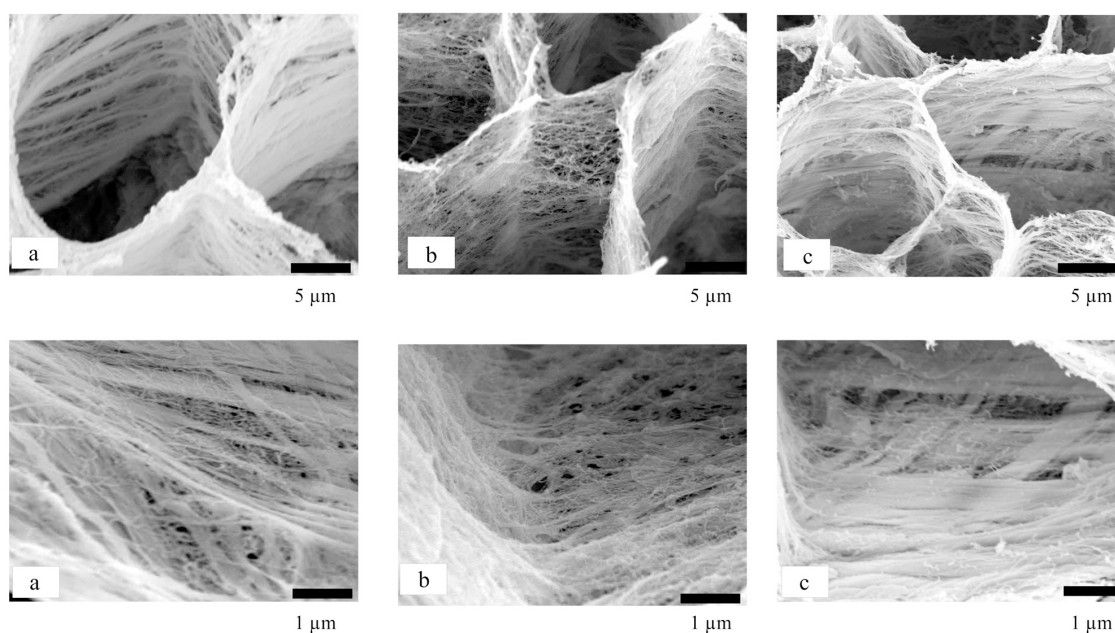


Fig.3 Scanning electron micrographs of carp ordinary muscle connective tissue prefixed by different reagents for 5 days.

Carp ordinary muscle were prefixed by different reagents (a: 2% paraformaldehyde, b: 2.5% glutaraldehyde, c: 2% paraformaldehyde, and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.2) for 5 days. The prefixed samples were immersed in 2 M NaOH solution for 4 days at room temperature to expose the collagen fibrillar network and post fixed with 1% tannic acid and 1% osmium tetroxide. The connective tissue samples were prepared with freeze fracturing method using methanol and liquid nitrogen. The samples for scanning electron micrograph were substituted by t-butanol, then freeze-dried and coated with gold and palladium by an ion coater. The samples were observed using SEM at 15 kV. Bars represent 5 μm or 1 μm.

は、グルタルアルデヒドは固定力が強いものの浸透力が弱いことに起因する¹⁵⁾ものと考えられ、前固定液 B は固定時間にかかわらず、魚筋肉の細胞外マトリックス観察試料の前固定に適していないと考察された。一方、パラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドの混合液である前固定液 C では、5 日間前固定により作製した SEM 像にて、膠原線維は明瞭に、その立体構造もハニカム状をきれいに維持しており、ネットワークも密に観察された。このことは、ホルムアルデヒドの浸透力の強さとグルタルアルデヒドの固定力の強さ¹³⁻¹⁵⁾双方の特徴が大きく影響したと考えられた。

以上のことから、本研究において、魚類普通筋細胞外マトリックスの SEM 観察のための適切な前固定液は、パラホルムアルデヒドとグルタルアルデヒドを混合した2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で、その前固定時間は5日間が適していると考えられた。

参考文献

- 1) 日本顕微鏡学会関東支部 (編) : 新・走査電子顕微鏡, 共立出版, 東京, 259-270 (2011).
- 2) 影山圭三, 渡辺陽之輔: 病理組織標本の作り方, 医学書院, 東京, 22, 98-99, (1981).
- 3) 田坂周治: 岡山医誌, 104, 561-569 (1992).
- 4) 安藤正史: 日水誌, 62, 555-558 (1996).
- 5) 安藤正史: 日水誌, 66, 904-905 (2000).
- 6) K. Sato and M. Ando: J. Agric. Food Chem., 45, 343-348 (1997).
- 7) K. Sato: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52, 1595-1600 (1986).
- 8) M. Ando, H. Toyohara and M. Sakaguchi: J. Sci. Food Agric., 55, 589-597 (1991).
- 9) M. Ando, H. Toyohara, Y. Shimizu and M. Sakaguchi: Nippon Suisan Gakkaishi, 59, 1073-1076 (1993).
- 10) M. Ando, H. Toyokara and M. Sakaguchi: Nippon Suisan Gakkashi, 58, 567-570(1992).
- 11) M. Ando, Y. Yoshimoto, K. Inabu, T. Nakagawa and Y. Makinodan: Fish. Sci., 61, 327-330 (1995).
- 12) T. S. Reese and M. J. Karnovsky: J. Gell Biol., 34, 207-217 (1967).
- 13) K. G. Helander: Biotech. Histochem., 69, 177-179 (1994).
- 14) D. Hopwood: Histochem. J., 4, 267-303 (1972).
- 15) P. M. Hardy, A. C. Nicholls and H. N. Rydon: J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 2270-2278 (1972).