

電顕的カルシウム検出法の検討

小 沢 英 浩 矢 嶋 俊 彦 小 林 茂 夫

新潟大学歯学部口腔解剖学第2教室 (主任 小林茂夫教授)

(昭和47年5月8日受付)

An investigation of the methods for studying calcium
localization by means of electron microscopy

Hidehiro OZAWA., Toshihiko YAJIMA & Shigeo KOBAYASHI

Department of 2nd Oral Anatomy, Niigata University School of Dentistry
(Director : Prof., Shigeo Kobayashi)

序

微細構造学的に、電子顕微鏡下で電解質を観察しようとする試みは、Komnick (1962)¹⁾ がウミツバメの Salz Drüse 中に Na^+ と Cl^- をそれぞれ potassium antimonate と乳酸銀 (または酢酸銀) を用いて検出して以来、多数の研究者によって各種電解質の検出が報告されている²⁾³⁾。

カルシウムについても、Pease et al⁴⁾, Costantin et al⁵⁾ (1965)らが ammonium oxalate をカルシウム固定試薬として用い、筋小胞体中に calcium oxalate の不溶性沈澱物を観察して以来、鉛法⁶⁾⁷⁾, potassium antimonate 法⁸⁾, Cass-collidine buffer 法⁹⁾などが試みられているがこれらの方法についての基礎的な比較検討はほとんど行なわれていない。

そこで著者らは、硬組織石灰化機構の微細構造学的研究の一環として、硬組織における細胞の役割を、カルシウム輸送、調節など、電解質代謝の面から検索するために、このたび、その基礎実験として、従来の電顕的カルシウム検出法と、著者らによる改良法のカルシウム固定効果を、歯胚に取り込ませた⁴⁵Ca の流出量測定実験で求め、あわせてそれらの固定法で電顕的にカルシウムを検出した時に生ずる微細構造上の問題点について、電顕所見をもとに比較検討したので報告する。

材料と方法

実験材料には生後7日の Wister 系ラット (体重13.8~15.2g 平均14.5g) の上顎第1, 第2臼歯々胚を用い, I, 各種固定液の歯胚における⁴⁵Ca 固定効果の測定, II, それらの固定液で固定した歯胚ならびに、小腸上皮におけるカルシウムの吸収を電顕的に観察し、比較検討した。

I 各種固定液による歯胚に取り込まれた⁴⁵Caに対する固定効果の比較測定

⁴⁵CaCl₂ (0.5N HCl 溶液) を 37°C の生食水に溶かし、体重 1g 当り 10 μ Ci を腹腔内に注射した。注射後、歯胚ならびに血液中の⁴⁵Ca の経時的変化を測定するために、注射後1時間までは10分ごとに、その後は3時間まで30分ごとに屠殺し、歯胚の摘出と同時に心臓よりの採血を行なった。各種固定法による⁴⁵Ca 固定効果の測定のためには注射後30分と60分後に摘出した末固定の歯胚 (control) と、各種固定液で固定し、ethanol 脱水した歯胚を用いた。また各固定液、脱水用 ethanol は、それぞれ 5 ml を 1 回に用い、使用後、その 0.5 ml の⁴⁵Ca activity を測定し、各液への流出総⁴⁵Ca activity を求めた。採血した血液中の⁴⁵Ca を含め、⁴⁵Ca activity の測定のためには、各試料を直径 2.5 cm のステンレス製試料皿に取り、6 N 硝酸 0.1 ml を添加して溶解した後 Photore-

flector lamp で乾燥し，次いでアセトン・セメンドインで固定して，gas flow counter (Aloka 製 TR式 TDC 6 W) で測定した。なお，試料は 1 mg/cm^2 以下であったので，自己吸収による補正は必要としなかった。

また予備実験で，脱水時での ^{45}Ca の流出は 70% ethano でわずかに認められたのみで，高濃度 ethanol ではほとんど認められなかったので，各種固定法によるカルシウム固定能は，実際には次の近似式より求めた。

$$\text{カルシウム固定能 (\%)} = \frac{\text{固定後の歯胚総 } ^{45}\text{Ca activity}}{\text{固定液への流出} + \text{固定後の歯胚総 } ^{45}\text{Ca activity}} \times 100$$

^{45}Ca 固定のために用いた各種固定法は次のごとくである。

- 1) oxalate 法¹⁰⁾
- 2) K-antimonate- OsO_4 法⁸⁾
- 3) K-antimonate 単独固定法¹¹⁾
- 4) Ca-phosphate buffer 法
- 5) Na-phosphate buffer 法
- 6) glutaraldehyde- OsO_4 混合固定法¹²⁾
- 7) Ca-s-collidine buffer 法⁹⁾

1) oxalate 法¹⁰⁾

5% glutaraldehyde と 0.0125M ammonium oxalate を含んだ 0.14M veronal acetate buffer pH7.4 で 2 時間，4°C で固定し，固定後同buffer に 0.025M ammonium oxalate を加えた液で 2.5 時間洗滌した。次いで 2% OsO_4 と 0.025M ammonium oxalate を含んだ veronal acetate buffer 液で 1 時間後固定し，直ちに ethanol 脱水を行なった。

2) K-antimonate- OsO_4 法⁸⁾

2% potassium antimonate (potassium pyroantimonate) $\text{K}[\text{Sb}(\text{OH})_6]$ 水溶液 pH9.5 を 2% OsO_4 水溶液と等量に混合した溶液 pH7.2~7.4 を固定液として用い，2 時間，4°C で固定した後，ethanol 脱水を行なった。

3) K-antimonate 単独固定法¹¹⁾

1% potassium antimonate を固定液として用い，室温で 2 時間固定した。

4) Ca-phosphate buffer 法

0.1M Na-phosphate buffer pH7.4 に 2.5% の割合に glutaraldehyde を加え，この溶液に 50ppm の CaCl_2 を加えたものを固定液として用い，2 時間，4°C で固定後，50 ppm の CaCl_2 と 1% OsO_4 を含んだ 0.1M Na-phosphate buffer 溶液，pH7.4 で 1 時間後固定をし，ethanol 脱水を行なった。

5) Na-phosphate buffer 法

0.1M Na-phosphate buffer pH7.4 で緩衝した 2.5% glutaraldehyde で 2 時間，4°C で前固定を行ない，同じ buffer solution で緩衝した 1% OsO_4 で 1 時間，4°C で後固定をして ethanol 脱水した。

6) glutaraldehyde- OsO_4 混合固定法¹²⁾

0.1M veronal acetate buffer pH7.4 で緩衝した 2.5% glutaraldehyde と 2% OsO_4 の混合液で 2 時間，4°C で固定し，0.25M sucrose で 15 分間洗滌後，ethanol，脱水を行なった。

7) Ca-s-collidine buffer 法⁹⁾

0.1M s-collidine buffer pH7.2 で緩衝した 1.5% OsO_4 に 5 mM CaCl_2 を加えたものを固定液とし，2 時間，4°C で固定後，ethanol 脱水した。

なお脱水は全て冷 ethanol (4°C) 70%，80%，90%，95%，100%) で各 15 分ずつ行なった。

II 各種固定法による電顕的カルシウム検出の比較検討

材料は I と同様生後 7 日の Wister 系ラット，上顎第 1，第 2 臼歯々胚と，実験的にカルシウムを経口投与した成熟ラットの小腸上皮を用いた。

固定は I で用いた固定法のうち，K-antimonate 単独固定法を除いた 6 種で行ない，電顕用試料とした。歯胚は全て未脱灰のまま固定を行なったが，control として，0.1M cacodylate buffer pH7.2 で緩衝した 2.5% glutaraldehyde で 4°C，2 時間固定した試料を 10% EDTA pH7.2，あるいは 10% EGTA pH7.2 で，4°C，3~5 日間脱灰した後，各種カルシウム固定液で後固定した歯胚を用いた。また実験的に成熟ラットに 1% Ca-gluconate 2 ml を経口投与し，5，10，20，30 分後に各種固定液で固定した。この control と

しては、経口的に純水を投与した小腸上皮を用い、同じ固定を行なった。

以上の固定試料は、Iと同様、ethanol 脱水後 Epon 樹脂に包埋し、LKB ultratome (ultra-tome III 8800), du Pond の Diamond Knife で薄切片を作成し、無染色、鉛単染色 (pH12.0) または酢酸ウランと鉛の2重染色を施し、日立 HU-IIDS 型電子顕微鏡、加速圧 75KW で観察した。

結果ならびに考察

歯胚に取り込まれた ^{45}Ca に対する各種固定液のカルシウム固定能を比較検討するために、注射

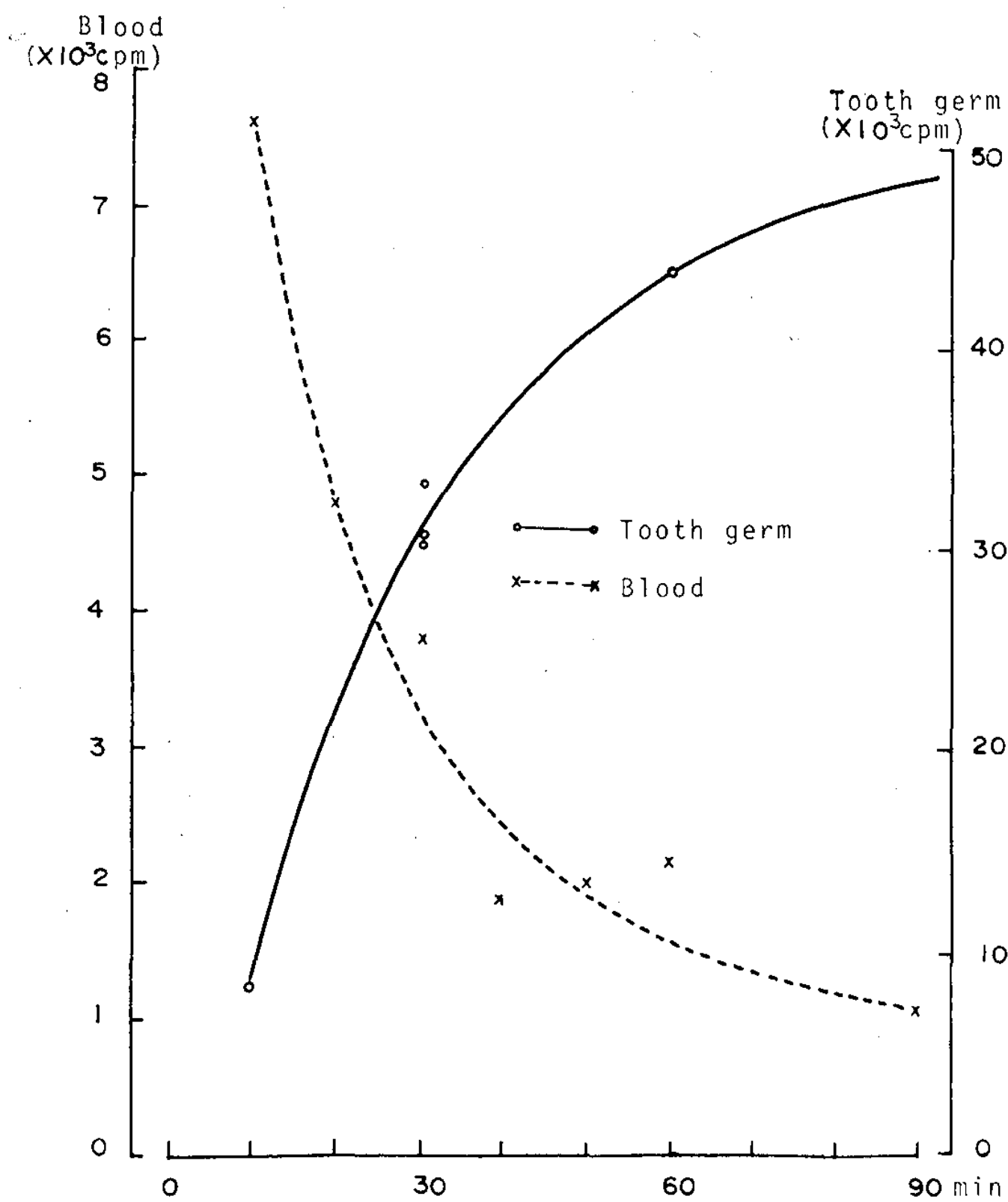


図1 ^{45}Ca 投与後の歯胚ならびに血中の ^{45}Ca activity の経時的変化

後の血中 ^{45}Ca 濃度と歯胚中の ^{45}Ca を、注射後10分から90分まで、それぞれ摘出した歯胚と採血液について、gas flow counter で測定した結果は、図1のごとくである。この測定結果から明らかかなように、経時的に血中の ^{45}Ca activity は減少するが、歯胚では逆に増加し、30分後では 30,000cpm, 60分後では 45,000cpm と、歯胚中へ著しい ^{45}Ca の集積を示している。この結果から、注射後30分の歯胚をカルシウム固定能の測定実験

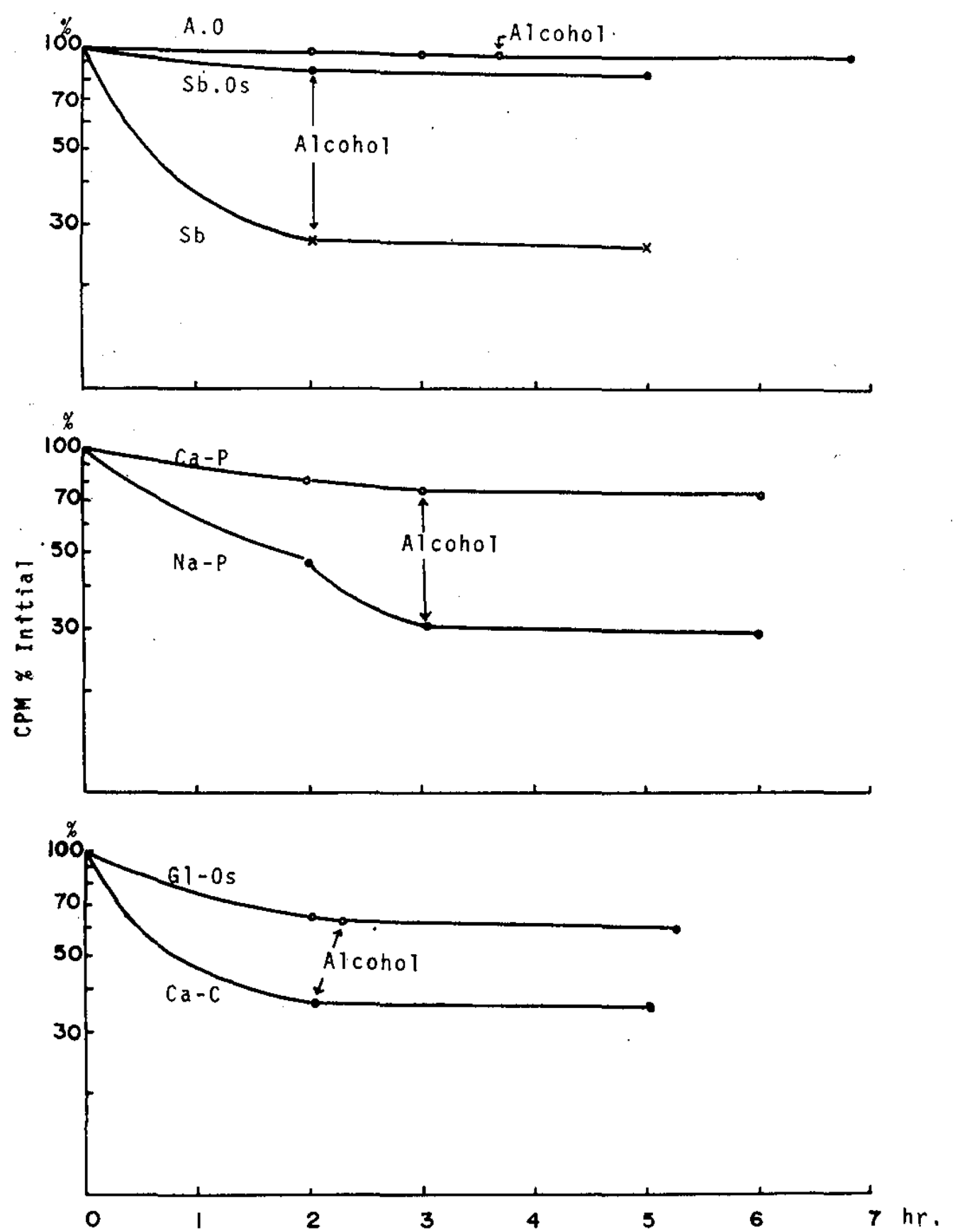


図2: 各種固定法による歯胚固定操作中の残留 ^{45}Ca の比較

- A.O: Ammonium Oxalate 法
- SbO₅: K-antimonate-OsO₄ 法
- Sb: antimonate 単独固定法
- Ca-P: Ca-phosphate buffer 法
- Na-P: Na-phosphate buffer 法
- Gl-Os: Glutaraldehyde-OsO₄混合固定法
- Ca-C: Ca-s-collidine buffer 法

に用いることとし、 $^{45}\text{CaCl}_2$ 腹腔内投与後、30分の歯胚 (M_1, M_2) を摘出し、各種固定液で固定を行なった。固定、脱水操作中に流出する ^{45}Ca を測定した結果は図2のごとくである。この図は、各種固定法を行なった際に、 ^{45}Ca の流出は主としてその固定液中にみられ、ethanol, 脱水中にはほとんど ^{45}Ca の流出は生じないことを示している。この結果は Fishman ら¹³⁾が骨格筋に取り込まれた ^{45}Ca を、oxalate を含んだ formalin で固定し、ethanol 脱水を行なった実験結果とほぼ一致し、カルシウムを固定する際には、固定液の選定や使用法による影響が大きく、ethanol 脱水過程ではほとんどカルシウムの流出は問題にならないことを物語っている。図3は、以上の結果をもとに各種固定法のカルシウム固定能を比較図示

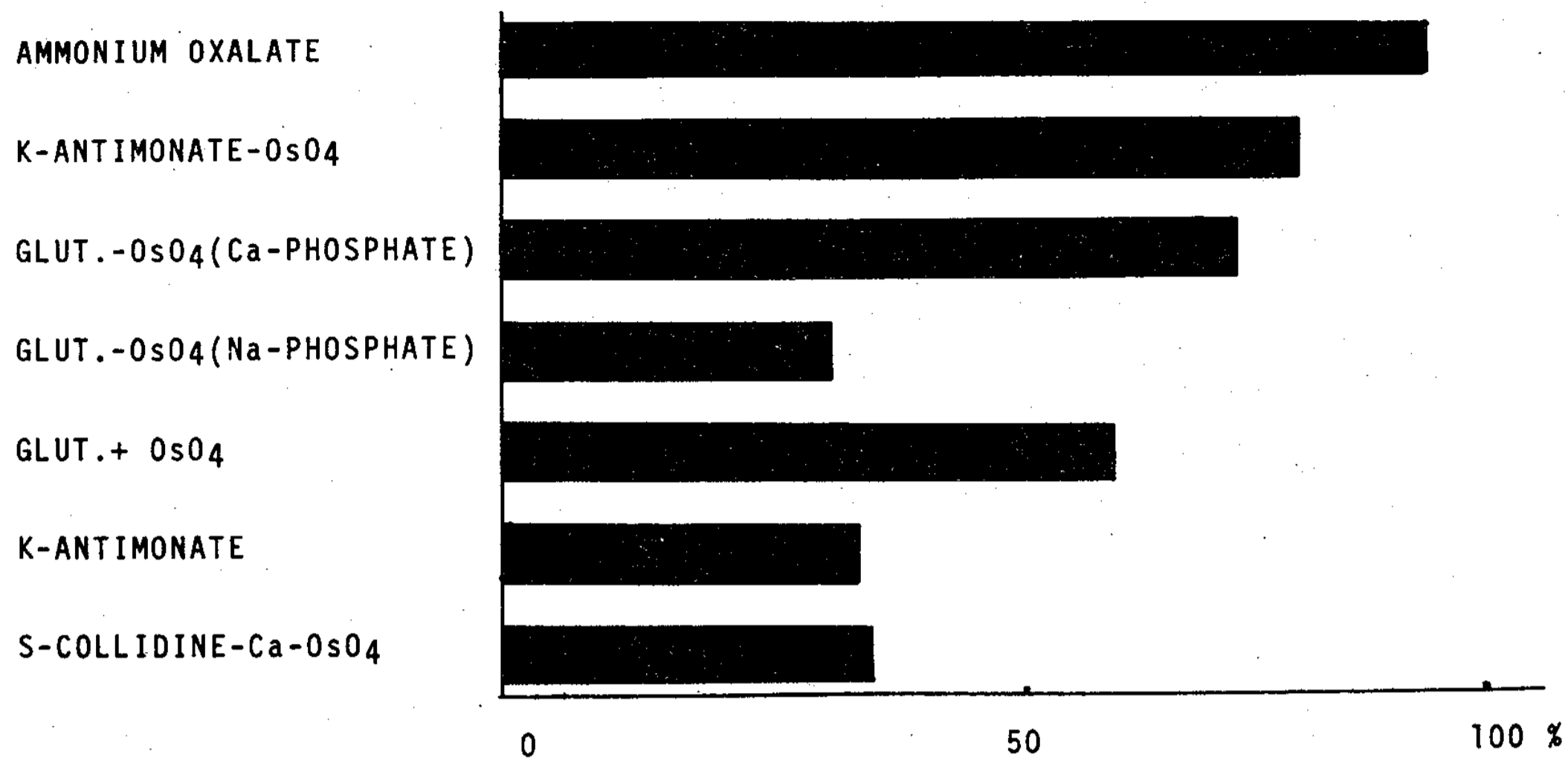


図3 各種固定法のカルシウム固定能の比較

したもので、oxalate 法が ^{45}Ca 流出を約 5% 以内に押え、最も有効で、次いで、K-antimonate- OsO_4 法、Ca-phosphate buffer 法、glutaraldehyde- OsO_4 混合法などがよく、K-antimonate 単独固定や、Na-phosphate buffer 法、Martin, Matthews ら⁹⁾ がカルシウム固定のために用いている Ca-s-collidine buffer 法などの、カルシウム固定能はあまりよくなかった。

Oxalate 法は従来、光顕的に溶性カルシウムを固定する方法として知られており¹⁴⁾、4% ammonium oxalate と 25% neutral formalin の等量混合液として用い、カルシウムを不溶性の calcium oxalate として沈澱させて、組織内のカルシウムの証明を行なったものである。電顕的にこの方法を取り入れ、改良して用いたのは Pease et al⁴⁾、Costantin et al.⁵⁾ でいずれも筋組織中の Ca^{++} を筋収縮機構との関連において検出しようと試みている。電顕的電解質検出法の生みの親でもある Komnick¹⁰⁾ もカエルの腹筋中にこの方法で Ca^{++} を検出し、Pease ら⁴⁾ と同様 sarcoplasmic reticulum、ならびに terminal cisternae 中に calcium oxalate の沈澱物を観察している。

oxalate 法のすぐれたカルシウム固定能については、前述のごとく Fishman ら¹³⁾ も骨格筋に取り込まれた ^{45}Ca に対して、その流出量を測定して実証しており、Gay ら¹⁵⁾ も鳥の卵管粘膜上皮細胞中における投与した ^{45}Ca の局在、動態を

光顕オートラジオグラフィーで追跡するために、 ^{45}Ca を固定する目的で Freez-sulstitution と併用した oxalate 法を用い、良い結果を示している。このようにオートラジオグラフィーと併用する場合などは、oxalate 法のもつすぐれたカルシウム固定能のために有効であるが、電顕的検出法として用いる場合には反応生成物である calcium oxalate の電子濃度があまり高くないので、その有効性が低められている。つまり、calcium oxalate の電子濃度は、oxalate 自身ほとんど電子線散乱能を持たないために、結合するカルシウムの濃度に依存しており、従って、カルシウム固定能やカルシウムとの反応特異性がすぐれているにもかかわらず、カルシウム濃度が十分に高く、限局性の場合にのみ電顕的に検出可能となるためである。実際、直接その反応を電顕下で観察するためには、筋小胞体中のような限局性で、しかも比較的カルシウム濃度の高いところでも、無染色で観察するか、包埋用樹脂なども電子線透過性のよいものを使用する等の工夫が必要とされており⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾、細胞中に散在性に局在するカルシウムや、RNP 顆粒など osmiophilic な構造物などと混在する場合には検出が困難になる欠点を有している。

図4、5は oxalate 法で固定したラットの象牙芽細胞の一部であるが、この細胞頂部に出現する Golgi 体由来の小体 (dense body) には、電子濃度の高い微細顆粒状、ないしは針状結晶状の反

応物が観察される。これらの反応物は EDTA, EGTA で脱灰処理後は消失し (図7), 同時に K-antimonate-OsO₄ 法でも同様な強い反応を示す顆粒がこの小体中に出現することから (図8), これらの反応物はカルシウム由来のものと考えられる。このようにカルシウムの高濃度に集積する場所では calcium oxalate の反応は観察し易い。しかし, 図6は同じ象牙芽細胞の Golgi 体, およびその周辺細胞質と細胞間隙の一部を示したものであるが, 他のカルシウム固定法 (図9, 10, 11, 14, 15, 17) で, Golgi 体や細胞間隙にみられたような反応は全く観察されない。このことは oxalate の高いカルシウム固定能から考えると Golgi 体, 細胞間隙に局在したカルシウムも, 恐らく calcium oxalate として固定されてはいるがカルシウムの濃度が十分な電子度を与える程高くないために, 同じ固定液中の OsO₄ によって固定された比較的高い電子濃度をもつ細胞構成々分によって, 反応が mask された状態になっているためと推測される。

このようなカルシウム固定試薬の低電子濃度の欠点を補い, 散在性に, 低濃度に局在するカルシウムも電顕的に検出する目的で用いられた方法が **K-antimonate-OsO₄** 法である。このカルシウム固定能は約85~90%で (図2, 3), oxalate法に比べやや劣るが, calcium antimonate の不溶性沈澱物は, antimony のもつ高い電子線散乱能のために, 微量なカルシウムでも, 高い電子濃度の小顆粒として観察することが可能である。従って極めて小さい, 直径100Å以下の反応顆粒でも, OsO₄ によって固定された細胞構成々分よりは一般に電子濃度が高く, 反応物として検出される可能性をもっている。

potassium antimonate は元来, Komnick¹⁾ によって Na⁺ の電顕的検出に用いられたものであるが, Ca⁺⁺ と結合し, 高い電子濃度をもつ不溶性沈澱物を生ずるところから, Legato [ら⁸⁾ によって, 犬の心筋でのカルシウム検出に用いられたのが最初の報告である。この方法によるとカルシウムは, oxalate 法で報告されていたように⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾, 筋小胞体中のみならず, 筋線維の I-band

にも散在性に calcium antimonate の微細な反応物として検出される。しかしながら, K-antimonate-OsO₄ 法ではこのように微細な反応物でも電顕で観察できる利点を有する一方, 非特異的な反応も生じ易い欠点も持っている。すなわち, antimonate はカルシウムに対してのみ特異的に結合するのではなく, Na⁺ と結合し, Na-antimonate の不溶性沈澱をも生ずる可能性もあり, 従ってカルシウムに対する反応特異性を高めるためにはさまざまな control 実験を必要とする。後述のようにこの点が K-antimonate-OsO₄ 法の欠点になっている。

図8~11は K-antimonate-OsO₄ 法で固定したラット歯胚の象牙芽細胞の一部である。図8は図4, 5と同様, 象牙芽細胞頂部にみられる Golgi 体由来の小体 (dense body) であるが, 極めて強い反応がその小体中に観察される。反応は小体中に直径50~700Å位までの大小様々の顆粒構造として認められ, oxalate 法による所見 (図4, 5) と考え合せると, この小体中には高濃度のカルシウムが集積することが推測できる。図10, 11は同じ細胞の Golgi 体の部分であるが, 反応は Golgi cisternae, Golgi vesicles および Golgi vacuoles 中にもみられ, 細胞頂部に集まる小体の起源と考えられる vacuoles 中にも, 特異的に電子濃度の高い小顆粒の集積が antimonate による反応生成物として認められる。またこれらの反応物は細胞間隙や mitochondria 中にも観察される (図9)。しかしこれらは EDTA や EGTA で処理した後の歯胚では, ほとんど観察されない。このように K-antimonate-OsO₄ 法によれば oxalate 法では検出されなかった微量のカルシウムも, 微小顆粒として電顕的に可視化し得る可能性も示されたわけであるが, その反応特異性については, 今後さらに検討の必要があろう。図12, 13はラットの腸管に Ca-gluconate を投与し, 小腸の吸収上皮からのカルシウム吸収過程を観察するために K-antimonate-OsO₄ 法で固定し, antimonate による反応のカルシウム依存性を確かめた例である。Ca-gluconate の代わりに, 純水を投与した control の小腸上皮では反応はほとん

どみられなかったが、Ca-gluconate を投与すると図12, 13に示すごとく、小顆粒の反応生成物は上皮細胞の microvilli 中、大小の vesicles 中、mitochondria 中ならびに Golgi 体中にもみられ、基底部細胞間隙中にも時間の経過と共に観察される。しかし control でほとんど反応物がみられなかった事実は、K-antimonate-OsO₄ 法では小腸上皮に生理的に存在する量の Ca⁺⁺, Na⁺ を電顕的に検出することが検出限界を越えているために不可能であることを示している。

カルシウム固定能が K-antimonate-OsO₄ 法に次いで良く、⁴⁵Ca の流出率が約25%で(図2, 3) しかも微細構造の維持が最も良好な結果を示したのは **Ca-phosphate buffer** 法である。図14, 15はこの方法で固定した象牙芽細胞の Golgi 体で、K-antimonate-OsO₄ 法の場合と同じく、Golgi cisternae, Golgi vesicles ならびに Golgi 体由来の vacuoles 中に高電子濃度の微細顆粒が観察される。EDTA 処理後、同じ方法で固定した歯胚では(図16)、Golgi 体中の微細顆粒は全く認められない。この方法による反応生成物は、象牙芽細胞の細胞間隙にも認められ(図17)、K-antimonate-OsO₄ 法で得られた所見とも一致するが、この反応も、EDTA 処理をした場合には認められなかった。

この Ca-phosphate buffer 法の固定液は、Na-phosphate buffer で緩衝した Glutaraldehyde 溶液に CaCl₂ を加えたもので、このカルシウム固定作用は固定液中の Ca, P により組織細胞内のカルシウムを metastable の状態に保ち、固定操作中におけるカルシウムの流出を防ぐと共に、組織内で amorphous な calcium phosphate の核を形成し、不溶性の沈澱物を作ることによるものと考えられる。従って生じた反応物の本体は calcium phosphate で、その電子濃度は局所のカルシウム濃度に依存するわけである。しかし電子濃度がカルシウム依存性である点は、oxalate 法も同様であり、カルシウム固定能やカルシウム結合力はむしろ Ca-phosphate 法よりはすぐれているにもかかわらず、Ca-phosphate 法では Golgi 体や細胞間隙に反応物が認められ

(図14, 15)、oxalate 法では検出できなかった(図6)点については次のように考えられる。

Ca-phosphate buffer 法で固定した歯胚の切片を無染色で観察すると、鉛染色を施した場合と異なり、Golgi 体中や細胞間隙中の微細な反応生成物は Calcium phosphate の低電子濃度のために、ほとんど電顕下に認めることはできない。この事実は、鉛染色が微細な顆粒状沈澱物である calcium phosphate の電子濃度を特異的に高めている可能性を物語っており、次のように解釈できる。すなわち、生じた calcium phosphate の沈澱は、切片上で鉛染色(pH 10~12)を施すことにより、Pb と Ca の置換反応が起き、その結果、電子濃度の低い calcium phosphate が、不溶性で電子濃度の高い lead phosphate となって、電顕的に可視化されるためと考えられる。

一方 oxalate 法の場合には calcium と oxalate の結合が calcium と phosphate の結合に比べて強く、従って oxalate の沈澱物は鉛染色を行なっても容易に Ca と Pb の置換が起らないことが推測される。そのために、鉛による電子染色を施した場合には Ca-phosphate buffer 法でのみ微量なカルシウムの反応が観察される結果となるのであろう。このようなカルシウム検出のための金属置換法は、光顕的にも古くから用いられている方法で、たとえば組織中のリン酸カルシウムに硝酸銀を作用させると、カルシウムは本来の結合から切り離されてその部分は重金属陽イオンに置換される $[Ca_3(PO_4)_2 + 6 AgNO_3 = 2 Ag_3PO_4 + 3 Ca(NO_3)_2]$ 。この場合、カルシウムが重金属に置換される条件として、陰イオンと結合してできた重金属塩はもとのカルシウム塩より一層不溶性である必要があるとされている¹⁴⁾。電顕的にも鉛を用いて固定中に Ca と Pb の置換反応を起させる方法も報告されており⁶⁾⁷⁾、その結果は鉛の極めて高い電子濃度のために有効な手段となっている。

Ca-s-collidine buffer 法も固定液中に Ca Cl₂ を加えてカルシウムの流出を少なくしようという点では Ca-phosphate buffer 法と類似するが、Matthews ら⁶⁾の方法によった結果は、図2, 3

のごとくカルシウム固定能は約40%で、電顕的にも反応は極めて少なく有効ではなかった。

以上の結果から、電顕的にもカルシウムの局在を把握する可能性が示されたわけであるが、それらのカルシウム局在を細胞生理機構に結びつけるためには、さらに解決しなければならない幾つかの問題が残されている。例えば検出されたカルシウムがイオン性か結合性かの問題、あるいは反応時に生じ易い dislocation, diffusion に対する処置法、さらには反応特異性の確認法などがあげられる。最後にこれらの諸点について考察を加えたい。

検出したカルシウムが結合性のものであるか否かについての形態学的な判定は非常に困難で、用いるカルシウム固定液のカルシウムに対する結合力や、カルシウムがどのような形で protein, polysaccharide, lipid などと結合しているかにも依り、単純には結論は導びけない。さきに述べたように Legato ら⁸⁾も K-antimonate-OsO₄ 法で筋細胞内のカルシウム局在を観察しながら、I-band にみられるカルシウム反応は、troponin と結合した結合性のカルシウムであろうことを論じており、それらは小胞体中のカルシウムのように sucrose などによる灌流洗滌などで容易に流され得ないものであることも示している。本研究の場合でも、K-antimonate 単独固定の結果は(図2, 3), K-antimonate-OsO₄ 固定の場合と比較してカルシウム固定能は悪く、約60%の ⁴⁵Ca は流出してしまう結果になっている。このことは K-antimonate によってカルシウムは固定されるが K-antimonate 自身タンパク固定能がほとんどないために、結合性のカルシウムはタンパク質等の流出と共に消失してしまうものと考えられる。一般に細胞内のカルシウムイオン濃度は平均 10⁻⁷M 位とされ、カルシウム輸送や調節の盛んな硬組織の細胞などでは、取り込まれたカルシウムの多くは protein 等と結合し mitochondria 内, Golgi 体内, lysosome 中などの calcium packaging system 中に貯えられるか¹⁶⁾, 小腸上皮におけるように Ca-binding protein によって結合されて transport される場合が多いとされている¹⁷⁾¹⁸⁾。

従って、カルシウムを固定する際にはカルシウム自身の固定のみならず、結合基質となっている protein, polysaccharide, lipid などの固定にも十分に注意を払う必要がある。glutaraldehyde-OsO₄ 混合固定が、glutaraaldehyde について OsO₄ で固定する2重固定に比べカルシウム固定能がよいのも(図2, 3)前者は1stepで固定を完了し得るためにタンパク、脂質共固定性がよく、従ってカルシウムの流出も少ないものと考えられる。

次いで、固定液のカルシウムに対する反応特異性であるが、厳密には1stepの固定でカルシウムのみを特異的に固定する方法はない。従って特異性を高めるにはさまざまな control を用いる必要があり、そのいくつかについてはすでに述べた通りである。本研究で用いたカルシウム固定法のなかで、非特異性反応が最も問題になるのは K-antimonate-OsO₄ 法である。この方法は、反応生成物の電子濃度が高く、カルシウム固定能もすぐれており、他の方法では検出できないような微量のカルシウムも、電子濃度の高い小顆粒として検出できる利点を有している反面、Na⁺, Mg⁺⁺ なども反応するという欠点も持っている。この非特異性を除くために、EDTA, EGTA, などの前処理法や、切片上での EGTA 処理法などを併用しているが十分な方法とはいえない。

また、反応生成物の大きさによって Na⁺ と Ca⁺⁺ を区別することもある程度は可能であるが⁸⁾ これも局所イオン濃度の多寡によって、反応顆粒の大きさは異なるため、目安にとどまる。電顕的オートラジオグラフィとの併用は、高い特異性を得る点ではよいが、⁴⁵Caのβ線のようにenergyの大きな isotope では得られた結果の分解能が低いために(約1,500~3,000Åの分解能)、個々の反応顆粒については論じ得ない。X-ray micro-analyzer (XMA) を電顕切片に応用して、反応生成物の元素分析を直接行なおうとする報告も近年なされつつあるが¹¹⁾¹⁹⁾²⁰⁾, これも XMA の検出感度がまだ充分でないため、電顕レベルまでの分解能は得られず、補助的手段にすぎない。しかしながら、最近、透過型電顕に XMA を装着した型

の元素検出器が英国で開発され (EMMA 4型), 電顕レベルの微小部分についての元素分析がなされつつある²¹⁾⁽²²⁾。分解能もそのすぐれた検出感度により 300~500Å にまで達しており, mitochondria 中の顆粒や, 細胞膜レベルでの元素分析までなされているのは注目に値する。

また, freeze-drying 法も年々改良され, 電顕的にも充分使用可能な切片がこの方法で得られる可能性が示されている今日²³⁾, 電解質細胞化学の最も大きな難点であった電解質の diffusion や dislocation の防止もあながち不可能とは考えられず, 生理機能に直結した微細構造学的な研究もさらに進歩するものと思われる。

以上の結果考察をもとに, 電顕レベルでの電解質細胞化学の方法を EMX や非分散検出法などを導入することにより今後さらに検討改良を加えるつもりである。

要 約

電顕的にカルシウムを検出する目的で, 各種の電顕的カルシウム固定法について次のような検討を行なった。

1) ⁴⁵Ca を投与したラットの歯胚を用い, 固定脱水操作中に流出する ⁴⁵Ca を gasflow counter で測定し, 各種固定液のカルシウム固定能の検討を試みた。その結果 oxalate 法, K-antimonate-OsO₄ 法, Ca-phosphate buffer 法の順で, ⁴⁵Ca 固定能が良いことを確かめた。

2) それぞれの固定液で固定した歯胚や Ca-gluconate を投与したラットの小腸上皮を電顕的に観察し, 1) の結果と比較検討した。その結果, a) oxalate 法はカルシウム濃度が高い場合にのみカルシウムを可視化でき, 電顕的オートラジオグラフィ法との併用の場合には効果的であること, b) K-antimonate-OsO₄ 法は微量のカルシウムでも電顕的に可視可能であるが, 反応特異性が低いため, control を十分に考慮する必要があること, c) Ca-phosphate buffer 法は Ca 固定能はやや低い, 鉛による電子染色で比較的微量なカルシウムも可視化でき, 微細構造の維持と共に有効な方法であることが確かめられた。

3) 将来, カルシウムを細胞生理機能と直結させた研究を行なう際の方法論上の問題点をあげ, 考察を行なった。

稿を終るにあたり, ⁴⁵Ca activity の測定に御協力, 御助言をいただいた, 放射性同位元素中央研究室々長, 清水泰二教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Komnick, H: Elektronenmikroskopische Lokalisation von Na⁺ und Cl⁻ in Zellen und Geweben. Protoplasma, **55**: 414-418, 1962.
- 2) 小沢英浩: 電顕的電解質検出法—その概念と問題点—。歯界展望, **38**: 1059-1066, 1971.
- 3) 小沢英浩: 電顕的電解質検出法「歯の研究法」(須賀昭一他編)医歯薬出版, 82-105, 1972. (印刷中)
- 4) Pease, D. C., D. J. Jenden & J. N. Howell: Calcium uptake in glycerol-extracted rabbit psoas muscle fibers. II. Electron microscopic localization of uptake sites. J. Cell and Comp. Physiol. **65**: 141-154, 1965.
- 5) Costantin, L. L., Franzini-Armstrong & R. J. Podolovsky: Localization of calcium-accumulating structures in striated muscle fibers. Science, **147**: 158-160, 1965.
- 6) Carasso, N et P, Favard: Mise en évidence du calcium dans les myonemes pedonclaires de cilies peritriches. J. Microscopie, **5**: 759-770, 1966.
- 7) 辻井 禎: II 貝殻および真珠形成機序の研究, アコヤガイの真珠袋および外套膜上皮細胞のカルシウムの電子顕微鏡的検出について。「硬組織研究」(荒谷真平他編)医歯薬出版, 431-442, 1969.
- 8) Legato, M. J & G. A. Langer: The subcellular localization of calcium ion in mammalian myocardium. J. Cell Biol., **41**: 401-423, 1969.
- 9) Matthews, J., J. H. Martin, J. A. Lynn & E. J. Collins: Calcium incorporation in the developing cartilaginous epiphysis. Calc. Tiss. Res., **1**: 330-336, 1968.

- 10) Komnick, H: Histochemische Calcium-Lokalisation in der Skelettmuskulatur des Frosches. *Histochemie*, **18**: 24-29, 1969.
- 11) Tandler, C. J., C. M., Libanati & C. A. Sanchis: The intracellular localization of inorganic cations with potassium pyroantimonate. *Electron microscope and microanalysis. J. Cell Biol.*, **45**: 355-366, 1970.
- 12) 黒住一昌: グルタルデヒド, オスミウム混合固定法. 「電子顕微鏡試料技術集」(日本電子顕微鏡学会関東支部編) 誠文堂新光社, 303-304, 1970.
- 13) Fishman, D. A & M. G. Gershon: A method for studying intracellular movement of water-soluble isotopes prior to radioautography. *J. Cell Biol.*, **21**: 139-143, 1964.
- 14) 佐野 豊: 「組織学研究法」第2版(南山堂) 616頁, 1968.
- 15) Gay, C. V & H. Schraer: Autoradiographic localization of calcium in the mucosal cells of the avian oviduct. *Calc. Tiss. Res.*, **7**: 201-2201, 1971.
- 16) Talmage, R. V: Morphological and physiological considerations in a new concept of calcium transport in bone. *Am. J. Anat.*, **129**: 467-476, 1970.
- 17) Wasserman, R. H., R. A. Corradino & A. N. Taylor: Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.*, **243**: 3978-3986, 1968.
- 18) Wasserman, R. H & A. N. Taylor: Vitamin D-dependent calcium-binding protein. Response to some physiological and nutritional variables. *J. Biol. Chem.*, **243**: 3987-3993, 1968.
- 19) Lane, B. P & E. Martin: Electron probe analysis of cationic species in pyroantimonate precipitates in Epon-embedding tissue. *J. Histochem. Cytochem.*, **17**: 102-106, 1969.
- 20) Mizuhira, V., S. Shiina., K. Miake., M. Ishida., H. Nakamura., H. Yotsumoto & T. Namae: Comparative examination between the chemical and physical methods to the demonstration of the ionic localization in the tissues. I. In the case of potassium antimonate method. Twenty-ninth annual EMSA meeting. 408-409, 1971.
- 21) Hall, T. A., H. J. Höhling & E. Bonucci: Electron probe X-ray analysis of osmiophilic globules as possible site of early mineralization in cartilage. *Nature*, **231**, 535-536, 1971.
- 22) Herman, L., T. Sato & B. A. Weavers: An investigation of the pyroantimonate reaction for sodium localization using the analytical electron microscope, EMMA-4. Twenty-ninth annual EMSA meeting. 406-407, 1971.
- 23) Christensen, A. K: Frozen thin sections of fresh tissue for electron microscopy, with a description of pancreas and liver. *J. Cell Biol.*, **51**: 772-804, 1971.

付 図 説 明

図4~7 ラットの象牙芽細胞, oxalate 法

図4 象牙芽細胞の細胞頂部で, 多数の電子濃度の高い小体 dense body (DB) が観察される。dense body 中には顆粒状ないしは針状の反応生成物がみられる。象牙前質中には膠原線維 (CO) が観察され, 中には長軸方向に針状結晶構造を有するものもある (矢印)。

×21,000

MVB: multi vesicular bodies

図5 細胞頂部の dense body (DB) で, 内部には微細顆粒の他に, 長軸方向に一致して針状の反応生成物がみられる。 ×45,000

図6 同じ細胞の Golgi 体 (G) とその周辺部細胞質, ならびに細胞間隙 (矢印) を示す。反応生成物はほとんど観察されない。 ×16,000

図7 EDTA で脱灰後, oxalate 法で固定した象牙芽細胞の一部で, dense body (DB) 中の顆粒状反応物は消失し, 膠原線維上の結晶様構造もみられない。 ×45,000

図8~11 ラット象牙芽細胞, K-antimonate-OsO₄ 法

図8 象牙芽細胞頂部に集積した dense body (DB) 中にみられる antimonate による反応生成物で, 50~700Å 位までの高い電子濃度をもった微細の集積として観察される。

×31,000

図9 象牙芽細胞間隙 (矢印) にみられる反応生成物, mitochondria (M), dense body (DB) 中にも顆粒状の反応物が認められる。

×45,000

図10 Golgi 体 (G) とその周辺部細胞質で, 反応物は Golgi cisternae, Golgi vacuoles 中に強く認められ, Golgi 体由来の dense body (DB) にも顆粒状反応の強い集積がみられる。

×16,000

図11 Golgi 体の拡大で, 微細な反応物が Golgi cisternae, Golgi vacuoles (GV) に認められ, Golgi 体週辺の coated vesicles (矢印) 中や r-ER (ER) 中にも反応物が観察される。Dense bodies (DB) 中にはさらに集積した顆粒がみられる。 ×45,000

図12. 13 Ca-gluconate 投与後のラット小腸上皮細胞 K-antimonate-OsO₄ 法

図12 小腸上皮の microvilli (MV) 中には吸収した Ca による多数の顆粒状反応物が観察される。mitochondria (M) 中や vesicles (矢印) 中にも Ca による微小顆粒がみられる。

×45,000

図13 取り込んだ Ca による反応物は, mitochondria (M) 中, Golgi cisternae 中, Golgi vacuoles (G) 中, ならびに細胞膜の内側に沿っても認められる。 ×21,000

図14~17 ラットの象牙芽細胞, Ca-phosphate buffer 法

図14 Golgi cisternae (G) 中に特異的に観察される微細顆粒状の反応物, coated vesicles (CV) 中にも粗大な反応物がみられる。

×80,000

図15 Golgi vacuoles (GV, GV') 中にも 100Å 位の微細な反応物が観察され, dense body (DB) 中にはさらに多数の反応物が存在する。

×80,000

図16 EDTA で脱灰処理を施した後, Ca-phosphate 法で固定したもので, Golgi 体 (G) 中の反応物は Golgi cisternae, Golgi vacuoles (GV) 中とも消失し観察されない。

×80,000

図17 象牙芽細胞の細胞間隙にみられた反応物 (矢印) N: 核

×45,000

