岡大医短紀要，6：55～61，1995
Bull Sch Health Sci, Okayama Univ
（原　著）

# 各種固定用緩衝液が与える電子顕微鏡像への影響

赤塚和也

## 要　　約

生物学的あるいは生化学的な緩衝液を使用して作製された電子顕微鏡試料と従来の電子顕微鏡用として使用されている緩衝液で作製した試料とで電子顕微鏡像から比較検討した。

HEPES緩衝液で作製した試料の電子顕微鏡像は，従来の電子顕微鏡に用いられている緩衝液で作製した試料から得られた電子顕微鏡像と非常によく似た像を示し，このHEPES緩衝液は電子顕微鏡の固定用緩衝液として使用できることが認められたが，その他（PIPES，MOPS緩衝液）の緩衝液ではあまりにも細胞内の可溶性物質が溶出しすぎて使用に耐えなかった。

電子顕微鏡学研究において使用されうる固定用緩衝液は細胞内のオルガネラの保持が余りにも良い場合には，その微細構造の解析が困難になり，程々に細胞内の可溶性物質が溶出した方が解析がし易くなると思われ，この様な観点から，今回使用したHEPES緩衝液は生物学的あるいは生化学的な研究から引き続き電子顕微鏡用の試料を作製する際，同じ緩衝液が使用できることが認められた。

**キーワード**：電子顕微鏡，微細構造，肝細胞，カコジル酸緩衝液，HEPES緩衝液

## はじめに

従来，電子顕微鏡学的研究に使用されている緩衝液には，Millonigのリン酸緩衝液，カコジル酸緩衝液ならびにSorensenの緩衝液などが常用され，電子顕微鏡像として良好な結果を得ている。しかし，それに対して生化学的あるいは，分子生物学的研究などで使用されている緩衝液については，一般の電子顕微鏡用の緩衝液として応用された報告はほとんどなく，超薄凍結切片法において浮遊細胞系をゼラチンゲルに包埋し，凍結切削する場合にはHEPES緩衝液を使用した方が良好であるとの徳安らの報告[1]があるのみである。従来，生化学あるいは分子生物学の分野で使用されてきた緩衝液は細胞内あるいは組織内の構成成分を本来の機能などを保持したままの状態で分離・抽出に応用されてきた。

著者らは細胞培養あるいは細胞，組織の構成成分の分析のために使用された，生化学あるいは分子生物学の分野での緩衝液を用いて，電子顕微鏡用の試料作製を行なえばより良好な電子顕微鏡像が得られるのではないかと思われ，また試料作製前に用いた緩衝液と同じ緩衝液がしようできれば，試料に与える種々の障害が緩和されるのではないかとの想定で，まず何故，電子顕微鏡の分野に応用されないのか，また，従来使用されてきた電子顕微鏡用緩衝液と生物学的あるいは生化学的緩衝液との間に電子顕微鏡像において違いがあるのか，電子顕微鏡像において大きな違いがないとすれば使用する緩衝液の濃度に依存するのか等を検討した。

## 材料と方法

1）使用緩衝液

電子顕微鏡的観察に常用されている緩衝液はMillonigのリン酸緩衝液（最終濃度0.1M，pH 7.2），カコジル酸緩衝液（最終濃度0.1M，pH7.2）

岡山大学医療技術短期大学部衛生技術学科

とSorensenの緩衝液（最終濃度0.1M，pH7.2）の3種類の緩衝液を使用した。

生物学的あるいは生化学的緩衝液として，HEPES緩衝液（最終濃度0.1M，pH7.2），PIPES緩衝液（最終濃度0.1M，pH7.2）およびMOPS緩衝液（最終濃度0.1M，pH7.2）の3種類を使用した。

2）試料

組織系として，ラットの肝臓を使用し，培養細胞系としてはHeLa細胞の単層培養を使用し，更に浮遊細胞系として白血球を用いた。

3）電子顕微鏡用試料作製

ラットの肝臓；2％グルタールアルデヒドを含む各々の緩衝液を調整し，これら緩衝液の中で組織を細切した後，改めて2％グルタールアルデヒド液で4℃，1時間前固定した。その後，8％蔗糖を含む緩衝液で4℃，20分間3回洗浄し，2％オスミウム酸で4℃，1時間後固定した。固定後，アルコール系列で脱水し，EPON812のエポキシ樹脂で包埋した。試料はウルトラミクロトームで薄切後，超薄切片を酢酸ウラニルと鉛の二重染色を施し，H-7100（HITACHI）で観察した。

培養細胞；10％ウシ胎児血清を添加したMEM培地で4日間培養したHeLa細胞をラバーポリスマンで剝離し，スピッツ管で2,500rpm，10分間遠心しペレットにした後，2％グルタールアルデヒド液で10分間軽く固定し，ペレットをパラフィルム上に出してから，細切し，改めて，先の固定液で4℃，30分間の前固定をした。以後の操作過程は組織の試料作製法に準じて行なった。

浮遊細胞系；健常者静脈血から分離した白血球を採取した後，定法に従って実施した。

## 結果と考察

6種類の緩衝液の濃度は材料と方法にも記載しているが，今回は電子顕微鏡用緩衝液の濃度に一律に統一して，3種類の試料（組織，培養細胞，浮遊系細胞）を作製し，電子顕微鏡学的観察を行ない，特に核膜の状態，ミトコンドリアの超微形態ならびに細胞内に存在する顆粒等の状態に重点を置いて比較検討した。

総体的に6種類の緩衝液を使用して作製した試料についての電子顕微鏡像では，粗面小胞体の保持は全ての系で良好に保たれているように認められたが，その他のオルガネラについては緩衝液による相違が見受けられた。以下に各緩衝液における所見を述べる（図1）。

Millonig緩衝液を用いた場合（A-a，b，c），組織系のラット肝臓細胞（A-a）と浮遊系細胞の白血球細胞（A-c）内の核の状態は良好で，核膜についても明瞭に観察できた。さらにミトコンドリアについては楕円形に薄切され，内部のクリステの二重膜も明瞭に観察できる。これに対して，培養細胞系であるHeLa細胞（A-b）は電子顕微鏡像が全体的に不明瞭で核と細胞質との境界も不鮮明であった。一般的にこのMillonig緩衝液は細胞の膜系を観察する場合によく常用される緩衝液で，培養細胞系であるHeLa細胞内のミトコンドリアの膜およびクリステについて注目するとその形態は明瞭に認識できる。

Sorensen緩衝液（B-a，b，c）の場合もMillonig緩衝液と同様リン酸が基になった緩衝液であるが，3種類の細胞系に共通する点は比較的膜系が明瞭に観察されることである。しかし個々のオルガネラについて詳細に観察してみると核の保持は組織系である肝臓細胞（B-a）と培養細胞系であるHeLa細胞（B-b）では良好であるが，浮遊細胞系の白血球細胞（B-c）ではその内部の保持が多少悪いように思われる。ミトコンドリアについても培養細胞系のHeLa細胞と浮遊細胞系の白血球細胞においては多少膨化傾向が認められ，形もさまざまで内部の構造においてアーチファクトと思われる所見すなわち，ミトコンドリアの内部の崩壊が認められる。さらに粗面小胞体については先のMillonig緩衝液での像と比較すると，このオルガネラの微細構造の保持はあまりよくないと思われる。

カコジル酸緩衝液（C-a，b，c）を使用したとき，全ての細胞系について電子顕微鏡像は比較的良好で，核，ミトコンドリアさらに粗面小胞体などの構造の保持も良いように思われる。組織系の肝臓細胞においては細胞内の顆粒物質が流出して

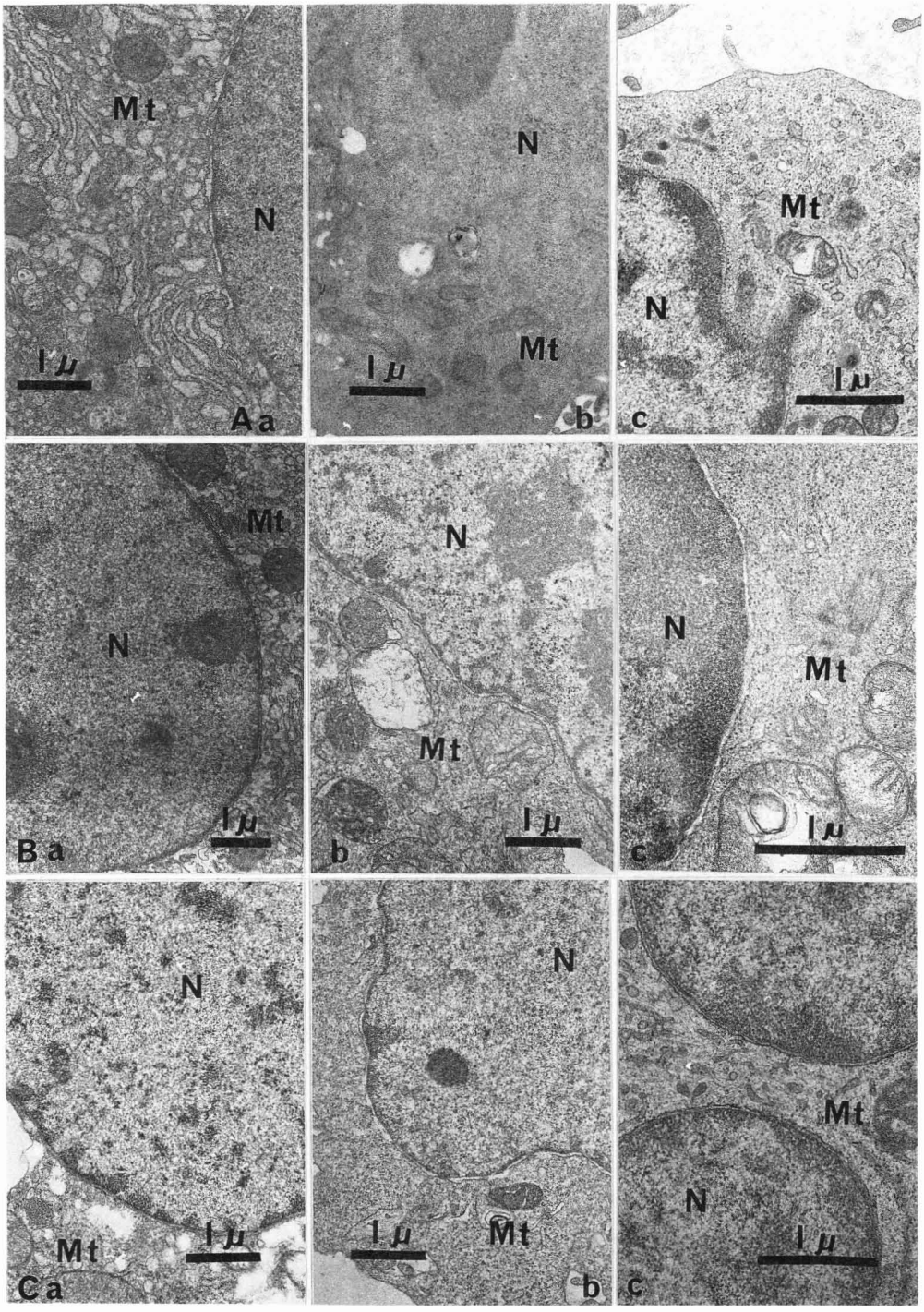


**図1**　電顕用固定緩衝液による像の相違

定法の電顕用固定液の濃度で作製した電子顕微鏡像を示す。A は Millonig の緩衝液(0.1M, pH7.2)で固定した。B は Sorensen 緩衝液(0.1M, pH7.2)。C はカコジル酸緩衝液(0.1M, pH7.2)。電子顕微鏡像は全て左から肝細胞(a), HeLa 細胞(b)と白血球(c)である。

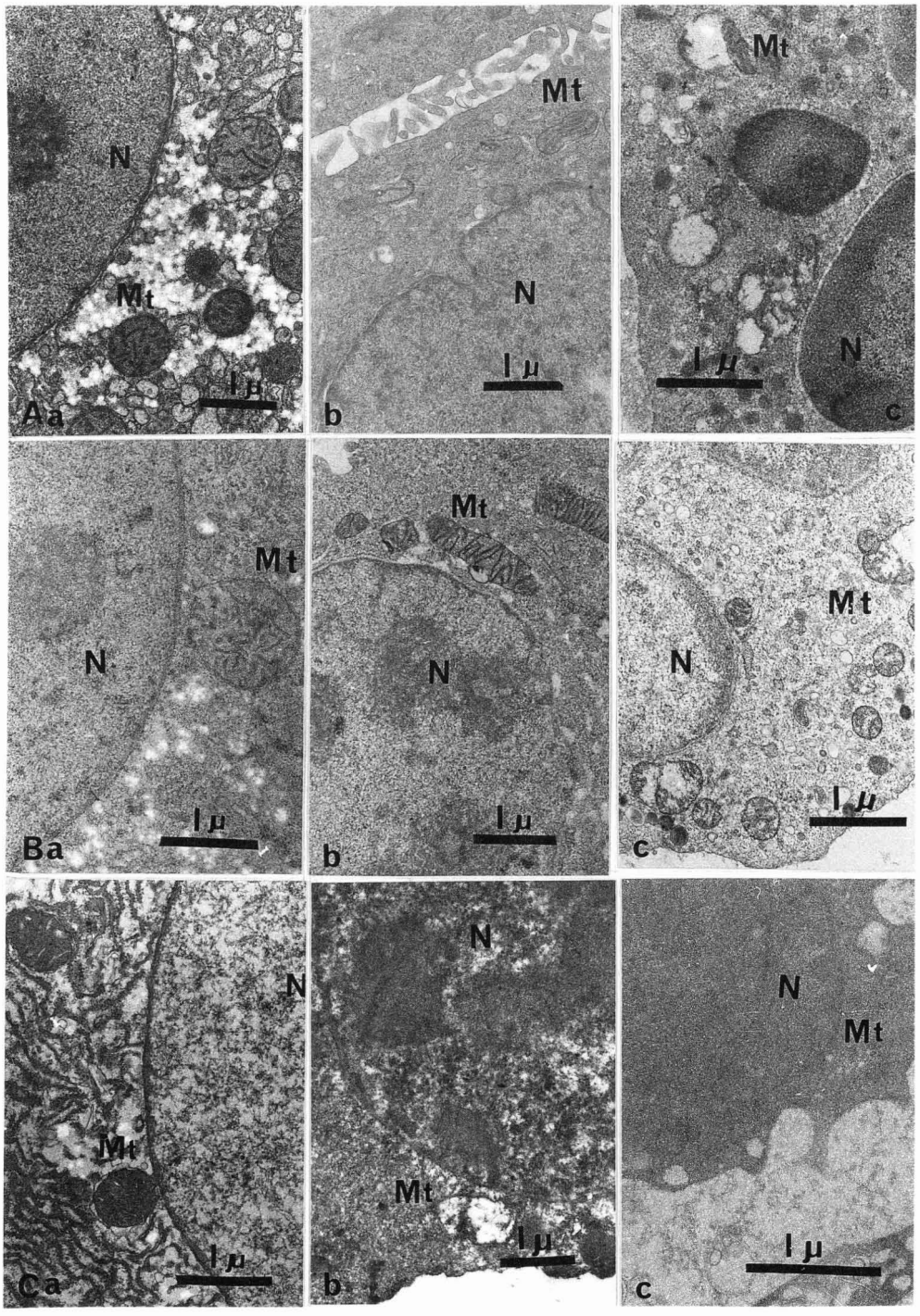


**図2**　生物学的あるいは生化学学的緩衝液で固定した像の相違

生物学的あるいは生化学的緩衝液で，電顕用緩衝液と同じ濃度に調整して作製した電子顕微鏡像を示す。A は MOPS 緩衝液(0.1M，pH7.2)で固定した。B は HEPES 緩衝液(0.1M，pH7.2)で固定。C は PIPES 緩衝液(0.1 M，pH7.2)で作製した。電子顕微鏡像は左から肝細胞(a)，HeLa 細胞(b)と白血球(c)である。

いる像が認められるが，培養細胞系の HeLa 細胞（C-b）と浮遊系細胞系の白血球細胞（C-c）ではグリコーゲン顆粒や粗面小胞体に付随するリボゾーム等の細胞内顆粒がより鮮明に認められる。また白血球では今までの緩衝液で認められなかったマイクロフィラメントが明瞭に観察されている。詳細に観察して，その相違を強いて述べれば，ミトコンドリアの形と内部の微細構造において認めることができる。特に白血球内のミトコンドリアについては多少アーチファクトと思われる像が認められた。

上記の緩衝液は全て電子顕微鏡用の常用緩衝液での所見であるが，以下については生物学的あるいは生化学的緩衝液についての所見を述べることにする（図2）。

MOPS 緩衝液（A-a，b，c）では肝臓細胞（A-a）において Millonig 緩衝液とよく似た所見が認められるが，HeLa 細胞（A-b）と白血球（A-c）ではあまりにも細胞内のオルガネラが詰まりすぎて，逆に電子顕微鏡像としては不鮮明になっている。白血球においてはミトンドリアにアーチファクトと思われる所見が認められる。

HEPES 緩衝液（B-a，b，c）についても細胞内部からの可溶性成分の流出が比較的少なく，細胞内構造の保持がよいように思われるが，核膜を観察すると核内部と核膜との間隙がほとんど認められない。この所見は HEPES 緩衝液における特徴なのかもしれない。ミトコンドリアについては，特に HeLa 細胞（B-b）に特徴が認められ，形も細長くクリステの構造も非常に密になっている。この状態は肝臓細胞（B-a）でもよく似た所見が認められる。

PIPES 緩衝（C-a，b，c）では HeLa 細胞（C-b）と白血球（C-c）において不鮮明な像が認められ，細胞内の微細構造が不鮮明ではっきりしない。それに対して，肝臓細胞では細胞内部に存在する顆粒物質が試料作製中に溶出したような像として認められ，さらに粗面小体の間隙がより狭く，またミトンドリアの内部構造が今まで観察してきたミトンドリアの内部構造とは異なり，電子密度が高くなっているのが認められる。

6種類の緩衝液で試料を作製し電子顕微鏡学的観察した結果を要約すると（表-1），電子顕微鏡用試料作製において，全ての条件を満たす緩衝液

**表1**　各種緩衝液が及ぼす電子顕微鏡像の比較

| | | Millonig b. | Sorensen b. | Cacodylate b. | MOPS b. | HEPES b. | PIPES b. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 組織系 | 核膜 | 2重膜が明瞭<br>間隙が広い | 2重膜が明瞭<br>間隙が狭い | 2重膜が明瞭 | 2重膜が明瞭<br>間隙が広い | 2重膜が明瞭<br>間隙が狭い | 2重膜が膨張 |
| | ミトコンドリア | 膜系は明瞭 | 膜系は明瞭 | 膜系は明瞭<br>多少膨化 | 膜系は明瞭<br>多少膨化 | 膜系は明瞭<br>多少膨化 | 膜系が不明瞭<br>アーチファクトを認める |
| | 細胞内顆粒 | 適度に保持 | 適度に保持 | 溶出の傾向 | 溶出の傾向 | 多少溶出の<br>傾向 | 溶出の傾向 |
| 培養細胞系 | 核膜 | 2重膜が<br>不明瞭 | 2重膜が明瞭 | 2重膜が明瞭 | 2重膜が多少<br>不明瞭 | 2重膜が明瞭<br>間隙が狭い | 2重膜が<br>不明瞭 |
| | ミトコンドリア | 膜系は不明瞭<br>多少縮少傾向 | 膜系は明瞭<br>膨化傾向で<br>多少破壊を<br>認める | 膜系は明瞭 | 膜系は明瞭 | 膜系は明瞭 | 膜系は不明瞭 |
| | 細胞内顆粒 | 過度に保持 | 適度に保持 | 適度に保持 | 過度に保持 | 適度に保持 | 過度に保持 |
| 浮遊細胞系 | 核膜 | 2重膜は明瞭 | 2重膜は明瞭 | 2重膜は明瞭 | 2重膜が<br>不鮮明 | 2重膜はやや<br>不鮮明 | 2重膜が<br>不鮮明 |
| | ミトコンドリア | 膜系は明瞭 | 膜系は明瞭<br>多少膨化傾向<br>破壊も認める | 膜系は明瞭<br>多少膨化傾向<br>破壊も認める | 膜系が不明瞭<br>膨化傾向で<br>破壊も認める | 膜系は明瞭 | 膜系が不明瞭 |
| | 細胞内顆粒 | 適度に保持 | 適度に保持 | 適度に保持 | 適度に保持 | 適度に保持 | 過度に保持 |

はなく，その目的によって緩衝液を使い分ける必要があると思われる。例えば，膜系や細胞骨格などの研究目的ではカコジル酸緩衝液がよく，その他，感染症や病理学的研究においてはMillonig緩衝液，Sorensen緩衝液の様なリン酸緩衝液ならびにHEPES緩衝液などを使用すると良いと思われる。HEPES緩衝液では細胞内のオルガネラ例えば，核膜やミトコンドリアの膜などの間隙が狭くなるという特徴が認められる。生物学的あるいは生化学的緩衝液は細胞に与える毒性などから一般に使用されている濃度は0.02Mである。今回の実験ではすべて電子顕微鏡用の濃度に調整して実験を実施したが，生物学的あるいは生化学的緩衝液としては多少濃度が高すぎた傾向もあり，今後，この生物学的あるいは生化学的緩衝液を従来の0.01-0.1Mの濃度から電子顕微鏡用濃度，即ち最終濃度を0.1Mまで希釈して，再検討を行なう必要があると思われる。またMOPS緩衝液で認められたHeLa細胞と白血球の所見は電子顕微鏡像としてはあまりにも細胞内オルガネラの構造の保持が良すぎて，細胞内の微細構造が把握できないという皮肉な結果を得た。この様なことから，電子顕微鏡像においては，細胞内可溶性物質の適度の溶出が電子顕微鏡像に透明感を与え，細胞内微細構造を分析するには不可欠なことであると思われる。今回の所見から電子顕微鏡用試料作製の前に使用した緩衝液を使って次のステップに進むとすれば，HEPES緩衝液が電子顕微鏡用試料作製に応用できると思われる。MOPS緩衝液は特に組織系での試料を作製する際には応用できると思われるが，さらに検討の余地が残され，PIPES緩衝液は応用は難しいように思われる。今回の試料で肝臓細胞において細胞内容物が溶出したような所見が随所に見られたが，これは切り出しからグルタールアルデヒド固定にはいるまでの時間が長すぎたために細胞内の可溶性物質が溶出したものと思われる。この問題を解決するためには組織を切り出し，できるだけ短時間に2％グルタールアルデヒド固定液に入れ，細切した後，改めて所定の時間再固定を実施すれば，このような所見は最小限に押さえられるものと思われる。また同じ試料を同じ条件で作製した試料において，細胞内オルガネラの超微細構造の形態が異なっている点については超薄切片法における試料作製中に起きるアーチファクトがその大きな要因になると思われ，この要因で真の細胞の姿を捕まえていないと言うことを示唆しているように思われる。この点を解消するためには最近開発され，使用され始めた凍結試料作製法[1,2,3,4]を用いて検討すれば，より真の姿に近い形で細胞内微細構造の観察が可能になるものと思われ，今後の検討課題である。

## 結　　語

電子顕微鏡用緩衝液で試料作成したものを対照にし生物学的または生化学的緩衝液で試料を作成したもとの電子顕微鏡像を比較検討した。

生物学的あるいは生化学的緩衝液ではHEPES緩衝液が他の緩衝液と較べると細胞内の微細構造がよく保持され，電子顕微鏡像も従来使用されてきた緩衝液によく似た像を示した。PIPES緩衝液では，細胞内のオルガネラの保持が良すぎて逆に像としては不鮮明であった。

電子顕微鏡学研究において使用されうる固定用緩衝液は細胞内のオルガネラの保持が余りにも良い場合には，その微細構造の解析が困難になり，程々に細胞内の可溶性物質が溶出した方が解析がし易くなると思われ，この様な観点から，今回使用したHEPES緩衝液は生物学的あるいは生化学的な研究から引き続き電子顕微鏡用の試料を作製する際，同じ緩衝液が使用できることが認められた。

## 文　　献


1）徳安清輝；免疫超薄凍結切片法．第48回日本電子顕微鏡学会学術講演会予稿集 64-75，1992.

2）Tokuyasu KT：A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. J Cell Biol 57：551-565, 1973.

3）Tokuyasu KT：Immunochemistry on frozen sections. Histochem J 12：381-403, 1980.

4）Tokuyasu KT：Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. J Microscopy 143：845-853, 1986.

# The effects of various fixating buffer soution in the electron microscopic observations

Kazuya Akatsuka

**Abstract**

The effects of buffers fixating biological or biochemical materials on the ultrastructures of intracellar organera were examined in electron microscopic observations.

HEPES buffers were evaluated for retention of the ultrastructures intracellular organella in comparison with PIPES, and MOPS buffers. It has been shown that the image of electron microscopic observations resembled closely to ordinary fixating buffers (Millonig, Sorencen, and cacodylate buffers) for electron microscopic materials. On PIPES buffers, the image of electron microscopic observations was indistinct because too much intracellular soluble sabstances were remained in cells.

On the electron microscopic study, it may be suitable to make materials adequately permeable by removing intracellular soluble substrances with buffers. In this point of view, HEPES buffers can be used as a fixating buffer in electron microscopic observations.

**Key words**: electron microscopy, ultrastructure, liver cell, cacodylate buffer, HEPES buffer

School of Health Sciences, Okayama University