

アガロースに包埋しブロック状にしたのちに、50%DMSO で凍結割断し、0.1%四酸化オスミウムで 48 時間オスミウム浸軟処理を行った。この方法により、細胞内の可溶性タンパク質のみが溶かされて、培養細胞の切断面で細胞内膜系を走査電顕で明瞭に観察できるようにした(図1)。

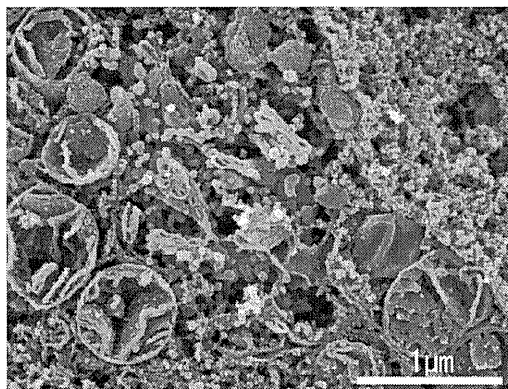


図1 HeLa 細胞の細胞内膜系の走査電顕像

②同一標本の光顕・走査電顕相補解析法の開発

動物を 0.5%グルタルアルデヒドと 0.5%パラホルムアルデヒドの混合液で前固定した後、組織を取り出し、ショ糖液に漬けたのちに凍結、凍結ウルトラトームにより、凍結切片標本とし、免疫組織化学的手法によりゴルジ装置を染色した。一方、その隣接標本を、オスミウム浸軟法で処理し、走査電顕標本とした。この手法により、光学顕微鏡で同定した細胞のゴルジ装置や他の細胞内膜系を走査電顕像と相補比較することができるようになった(図2)。今後はこの方法をモデルマウスに応用する予定である。

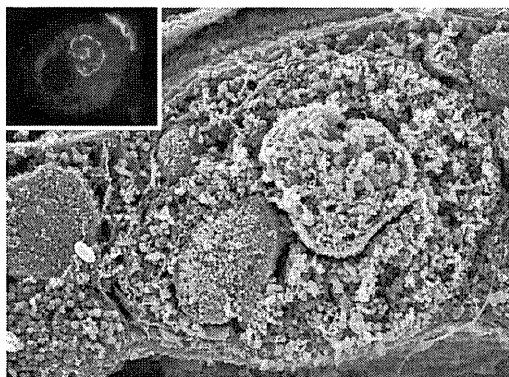


図2 光顕像(左上)と走査電顕像との相補観察。ゴルジ装置は TGM38 で蛍光免疫染色してある。

③ヒトの病理標本の走査電顕観察手法

ヒトの病理標本の固定は 20%ホルマリンで固定しているために、通常のオスミウム浸軟法では、細胞内の可溶性タンパク質の溶解がうまくいかないため細胞内膜系の走査電顕観察ができない。そこで、このような標本に対して主に 0.1%オスミウムによる浸軟時間について検討し、ヒトの脊髄標本でも利用可能な条件を見出した(図3)これにより、今後はヒトの病理標本における運動ニューロンの諸形態を解析できる可能性が開けた。

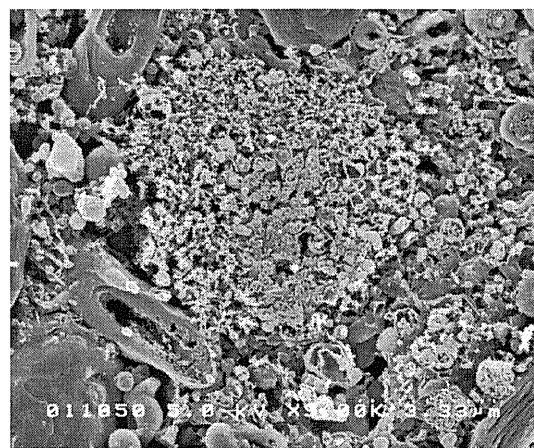


図3 ヒト病理標本の脊髄走査電顕像

D. 研究発表

1. 論文発表

Koga D, Nakajima M, Ushiki T: A useful method for observing intracellular structures of free and cultures cells by scanning electron microscopy. J Electron Microsc (in press, 2011).

2. 学会発表

甲賀、中島、牛木: 培養細胞の細胞内立体観察に適した走査電顕オスミウム浸軟法の開発。日本顕微鏡学会大 67 回学術講演会、2011 年 5 月 15-17 日、福岡

E. 知的財産権の出願・登録状況(予定含む)

とくになし

F. 健康危険情報

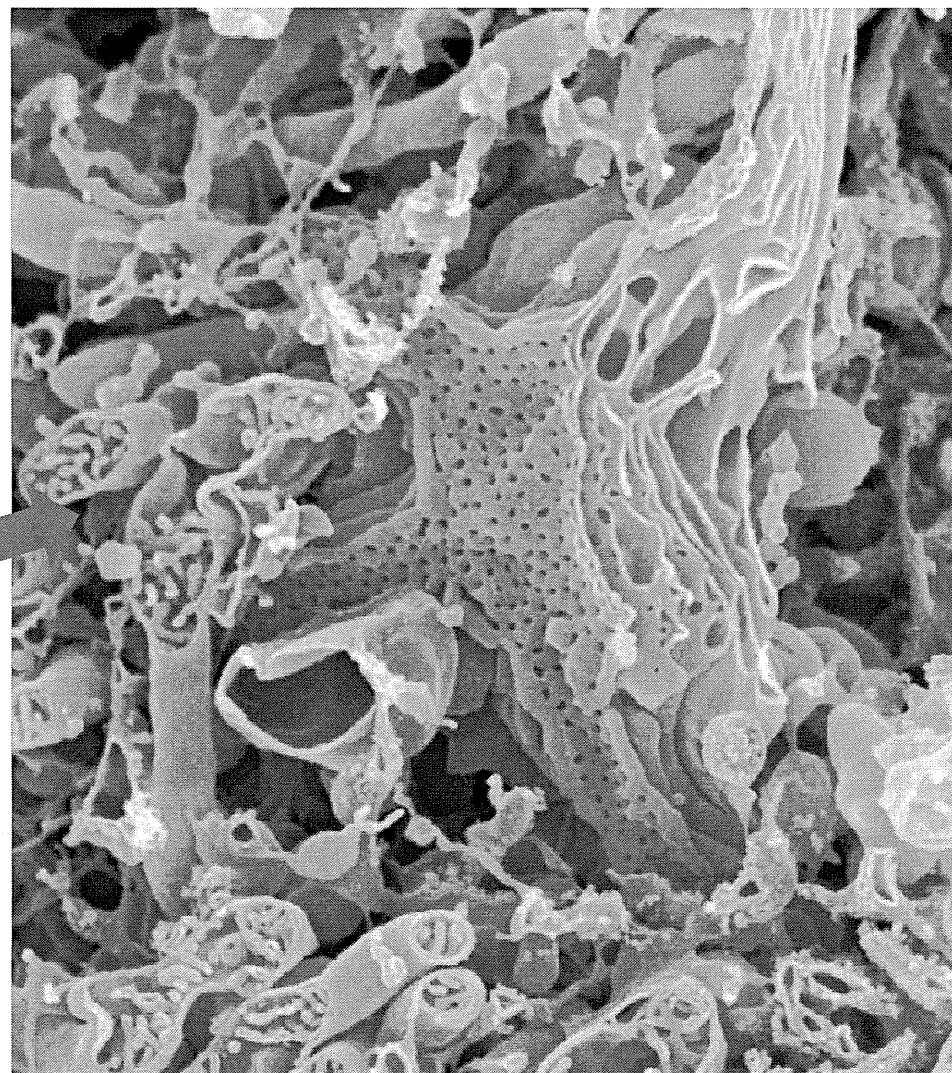
とくになし

同一標本の光顕・走査電顕相補解析法の開発

研究分担者: 牛木辰男、甲賀大輔(新潟大学)



ラットの組織片(下垂体)の凍結切片免疫蛍光染色像(左上)とその隣接標本のオスミウム浸軟走査電顕層



光顕と対比しながら、細胞内のゴルジ装置や小器官の三次元構造解析ができる。

Ⅲ 研究成果の刊行に 関する一覧表

小野寺理

1. 【ALS-臨床と分子病態研究の進歩】 家族性ALS ALS10(遺伝性ALS-TDP)の臨床と病理(解説/特集)
2. 今野卓哉, 石原智彦, 西澤正豊, 小野寺理 Clinical Neuroscience(0289-0585)29巻9号 Page1019-1021 (2011.09)

牛木辰男

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Koga D, Nakajima M, Ushiki T	A useful method for observing intracellular structures of free and cultured cells by scanning electron microscopy.	J Electron Microsc			In press

高橋 均

1. Piao Y, Hashimoto T, Takahama S, Kakita A, Komori T, Morita T, Takahashi H, Mizutani T, Oyanagi K (2011) Survival motor neuron (SMN) protein in the spinal anterior horn cells of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res 1372: 152-159
2. Mori F, Tanji K, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K (2011) Enhancement of native and phosphorylated TDP-43 immunoreactivity by proteinase K treatment following autoclave heating. Neuropathology 31: 401-404
3. Toyoshima Y, Tanaka H, Shimohata M, Kimura K, Morita T, Kakita A, Takahashi H (2011) Spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) is associated with TDP-43 pathology. Acta Neuropathol 122: 375-378
4. Ince PG, Highley JR, Kirby J, Wharton SB, Takahashi H, Strong MJ, Shaw PJ (2011) Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. Acta Neuropathol 122: 657-671
5. Soma K, Fu Y-J, Wakabayashi K, Onodera O, Kakita A, Takahashi H (2012) Co-occurrence of argyrophilic grain disease in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathol Appl Neurobiol 38: 54-60

山中邦俊

K. Yamanaka, Y. Sasagawa, and T. Ogura. Recent advances in p97/VCP/Cdc48 cellular functions. Biochem. Biophys. Acta, 1823: 130-137 (2012)

