

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：13501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659093

研究課題名(和文) 生体内凍結技法による血管内流動赤血球膜内粒子および膜骨格構造の超微形態学的解析

研究課題名(英文) Ultrastructural analyses of intramembranous particles of flowing erythrocytes and their membrane skeletal structures by in vivo cryotechnique

研究代表者

大野 伸一 (OHNO, Shinichi)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：50109170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：生体内凍結技法により虚血と酸欠の無い動物臓器組織を作製し、エッチングレプリカ法と走査型電顕法で解析した。マウス腎臓における流動赤血球膜のレプリカ膜では、流速方向に伸展し、膜内粒子が直線的に配列した。走査型電顕法では、大動脈内流動赤血球は楕円状だが、下大静脈内では円盤状であった。また肝類洞内では種々の形態像だが、心停止時には円盤状となった。肺臓の凍結切片を膜骨格蛋白抗体で免疫染色すると、毛細血管内では不規則形態であった。吸気時には血管内皮細胞と接着して、ガス交換機能状態と考えられた。小腸と肺臓の血行動態を量子ドット注入で検索すると、動物各臓器の微小環境が赤血球の機能形態像に影響していた。

研究成果の概要(英文)：We frozen living animal organs in vivo to analyze tissues and cells without ischemia and anoxia for deep-etching method and scanning electron microscopy (SEM). Mouse kidney organs were frozen, and replica membranes of flowing erythrocytes were prepared, showing their extension along long axis, and intramembranous particles were linearly arranged. By SEM, they took ellipsoidal shapes in aorta, but were discoid-shaped in inferior vena cava. In liver sinusoids, they presented variously shaped images, being changed into discoid-shapes due to cardiac arrest. They were immunostained in alveolar capillaries for membrane skeletal proteins, showing irregular shapes. They were often adhered to blood vessel endothelium, showing dynamic images which efficiently performed gas exchange. We also performed the cardiac arrest to check hemodynamics of lungs and small intestines with quantum dot injection, and microenvironments of living animal organs were involved in morphofunctions of erythrocytes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：生体内凍結技法 流動赤血球機能的形態像 膜骨格関連蛋白 膜内粒子 エッチングレプリカ法 走査電顕法 蛍光量子ドット 組織内微小環境

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の大野伸一は、以前より急速凍結ディープエッチング法により、ヒト赤血球膜骨格におけるスペクトリン構造配列を高解像力で三次元的に解析してきた[J Anat 185:415-420 (1994). Virchows Arch A Pathol Anat 422:73-80 (1993). J Anat 180:315-320 (1992)]. さらにその後の研究で、採血静止状態の赤血球は、典型的な両側陥凹円盤状態であったが、赤血球の二分割時に両側より圧平すると赤血球膜骨格スペクトリン分子構造は、陥凹部を中心に同心円状の配列をとることが判明した(J Anat 190:397-404, 1997)。また、採血赤血球に流体力学的ストレスを人工的に負荷すると、赤血球膜内粒子が、伸張した赤血球長軸方向に配列することもその後発表した(Microsc Res Tech 69:291-295, 2006)。

一方、我々はすでに生体内の流動赤血球形態は、大動脈、下大静脈、肝類同、脾索、肺胞壁毛細血管内においては、楕円状、不整形、両側陥凹円盤状など、種々の血行動態や赤血球加齢の影響により、ダイナミックに変化していることを明らかにした(Histol Histopathol 16:123-129, 2001. J Anat 197:199-205, 2000. J Electron Microsc 47:67-72, 1998. J Anat 193:73-79, 1998)。

以上のことより、従来考えられていた採血静止状態の両側陥凹円盤状赤血球形態は、生体内の各種臓器内での流速に依存してダイナミックに変化し、その際に赤血球膜イオンチャネルと膜骨格構造の関連性が重要であることが推測された。以上が本研究の背景である。

2. 研究の目的

本研究は、生きた動物生体内の流動赤血球形態変化に伴う赤血球膜内粒子と膜骨格構造の動態を機能分子形態学的に明らかにすることである。我々は、すでに生体内凍結技法(J Neurosci Meth 138:89-95, 2004. Virchows Arch 427:519-527, 1996)とディープエッチング法(Microsc Res Tech 69:291-295, 2006. Int Rev Cytol 166:181-230, 1996)の研究解析システムを確立しているために、ネブタール麻酔下マウスの各種臓器内の流動赤血球形態を、直接に生体内凍結して検討することにした。さらに赤血球膜内粒子と膜骨格構造の超微形態学的変化をスペクトリン、バンド3、グリコフォリン等の抗体を使用した独自のレプリカ免疫電顕法(Histochem Cell Biol 121:255-259, 2004. Histochem Cell Biol, 112:443-445, 1999)で明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者の大野伸一が独自に開発した“生体内凍結技法”を使用して、生きた実験動物(マウス)生体内流動赤血球膜内粒子と膜骨格構造を電顕レプリカ免疫

染色法を用いて、高解像力で機能分子形態学的解析をする。さらに、光顕レベルの免疫染色法も併用する。

(1) 生体内凍結技法の施行:

握持部と、その長軸方向に突出した刃を備え、その近傍にイソペンタン・プロパン混合凍結用寒剤液(-193℃)を流出する穴と、凍結液を供給するための流出容器とからなる生体内凍結装置をすでに独自に開発している。刃および凍結用寒剤液流出容器は、握持部に着脱自在になるよう装着されている。

握持部を操作して寒剤液で凍結した生体内組織を、凍結切断して摘出できるようにする。以上の～を特徴とする装置による最新の生体内凍結技法である。

(2) 生体内凍結-レプリカ法と免疫電顕法による検討:

次に本装置を使用して、マウス各種臓器内流動赤血球を生体内凍結後切断し、電子顕微鏡で観察するための試料を作製する。液体窒素中で冷却液化したイソペンタン・プロパン混合寒剤液(-193℃)を凍結液保存容器内で作成する。同時に、上記の生体内凍結装置の刃部を液体窒素に漬けて十分に冷却しておく。この準備をした上でマウスをネブタール麻酔下で脳、肝、腎、脾、小腸、大動脈、下大静脈などを露出させる。すみやかに液体窒素冷却された刃部で組織の一部を凍結切断すると、同時にその切断面に凍結液流出容器からイソペンタン・プロパン混合寒剤液を供給し、生体内において完全に凍結させる。さらに液体窒素を追加して、凍結試料の温度上昇を防止しながら液体窒素内で摘出後、液体窒素内で保存する。保存中の組織試料を現有設備エイコー社製FD-3ASエッチング装置用ホルダーに凍結切断面を上にして固定する。さらに組織表面に凍結切断を加えて、ディープエッチング(-95℃, 10⁻⁷Torr)により、氷を昇華させる。白金を斜め上方(25°)より回転蒸着し、さらに炭素を蒸着してレプリカ膜を作製する。試料を取り出し、家庭用漂白剤で組織を溶解させてレプリカ膜を蒸留水洗浄後グリッドに載せる。電顕観察には現有設備Hitachi H-7500を使用し、±5°の角度で2枚のステレオ写真を撮影し、各種臓器内流動赤血球膜の微細構造を検討する。一部のレプリカ膜試料は、SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)処理により赤血球膜蛋白の一部をレプリカ膜に付着させたまま試料を回収する。さらにスペクトリン、バンド3、グリコフォリン等の免疫染色をレプリカ膜上で行なう。免疫金染色により可視化処理したレプリカ膜をグリッドに載せて検索する。

(3) 凍結置換固定法と包埋後免疫電顕法による検討:

生体内凍結したマウス各種臓器を凍結置換固定して検索する。組織を上記同様に生体内凍結する。凍結組織を摘出し、現有設備ライカ凍結置換装置を使用して-80℃に冷

却した四酸化オスミウム含有アセトン中で、凍結置換固定をする。温度を徐々に室温まで上昇させた後、合成樹脂に包埋する。型のごとく超薄切片を作製して、ウランと鉛二重染色後に電顕観察する。一部の生体内凍結試料は、パラフォルムアルデヒドあるいはアセトン単独凍結置換固定後に低温樹脂包埋する。超薄切片作製後にスペクトリン、バンド3、グリコフォリン等の免疫染色をする。

(4) 走査型電顕法での検討：

組織を上記と同様に生体内凍結する。凍結組織を摘出し、-80 に冷却した四酸化オスミウム含有アセトン中で、凍結置換固定をする。

温度を徐々に上昇させた後、t-ブチルアルコールに入れて凍結乾燥する。白金パラジウムをイオン Sputter でコーティングして現有設備走査型電顕 Hitachi S-4500 で検索する。一部の生体内凍結試料は、-150 に冷却された Cryo-stage を装着した Hitachi S-4500 のステージに直接に載せる。わずかにエッチングを行ない、金蒸着(5nm)後、低加速電圧で観察する。

(5) 凍結切片による多重免疫染色法：

生体内凍結後、現有設備液体窒素タンクで保存の各臓器内流動赤血球を凍結置換固定して、ライカ凍結ミクロトームで凍結切片作製を行ない、スペクトリン、バンド3、グリコフォリン等の抗体で多重免疫染色し、現有設備ライカ共焦点レーザー顕微鏡で観察する。

(6) 生体内血流変化による赤血球の形態学的検討：

薬剤投与や心停止などにより、各種臓器内血流動態を変化させ、上記同様の方法で各種臓器内の流動赤血球形態像を検索する。以上により生体内微小環境が赤血球の機能形態に与える因子を解析できる。

4. 研究成果

(1) 新たに開発した生体凍結装置のイソペンタン・プロパン混合寒剤液(-193)貯蔵タンクと液体窒素貯蔵タンク(-196)から、液体窒素冷却メス刃で肝臓と腎臓を切り込むと同時に、フットスイッチを踏むことにより、その混合寒剤液(-193)をノズル先端より流出させて、麻酔下動物(マウス)臓器を容易に凍結できることが明らかとなった。その後、凍結臓器は液体窒素中で保存する。

(2) そこで、ネプタール麻酔下マウスの肝臓、小腸と腎臓を、冷却メス刃で凍結切断と同時にイソペンタン・プロパン混合寒剤で、同様に生体内凍結して、凍結切断装置FD-3AS用ホルダーに凍結切断面を上にして固定した。さらに組織試料表面を冷却メス刃(液体窒素温度-196)で凍結切断を加えて、ディープエッチング(-95 、10-7Torr、10~20分)により、氷を昇華させて、白金の回転蒸着(2nm)により、レプリカ膜を作製した。各臓器血管内流動赤血球は、長軸方向に伸展して、凍結切断した赤血球膜内粒子が、直線的に配列していた。これらの膜内粒子は、主にバンド3蛋白抗体により免疫染色された。また、赤血

球膜裏面には、スペクトリンの網状構造も確認できた。

(3) 生体内凍結 - 凍結置換固定試料(約-80 に冷却したパラフォルムアルデヒド化学固定剤含有アセトン中)の低温樹脂包埋切片では、バンド4.1蛋白およびスペクトリン蛋白は赤血球膜直下に局在し、バンド3蛋白は、赤血球膜上にみられた。以上のように、麻酔下マウス生体内臓器血管内の流動赤血球の機能形態学的特徴を解析できた。

(4) 走査型電顕法での検討： 各種臓器組織を上記と同様に生体内凍結した。凍結試料組織を切断摘出し、-80 に冷却した四酸化オスミウム含有アセトン中で、24時間、凍結置換固定した。温度を徐々に上昇させた後、t-ブチルアルコールに入れて凍結乾燥した。白金パラジウムをイオン Sputter でコーティングして走査型電顕で検索した。一部の生体内凍結試料は、エッチングを行ない、金蒸着(5nm)後、走査型電顕で観察した。以前より、マウス各種臓器内流動赤血球の形態変形能は、酸素運搬機能を考慮すると、重要であると言われている。しかし、生きた動物臓器内流動赤血球の形態像は十分に解明されていなかった。特に太い血管内(大動脈)や肝類洞内での形態学的解析は、従来の電顕用浸漬固定法や灌流固定法では困難であった。本研究により、大動脈内流動赤血球は楕円状形態像をとるが、流速の遅い下大静脈内流動赤血球は、両側陥凹円盤状であった。また肝類洞内流動赤血球は、流体力学的乱流による影響のために、種々の形態像を呈していた。以上のように生体内各臓器での赤血球の機能的形態像が明らかとなった。

(5) 凍結切片による多重免疫染色法： 生体内凍結後、各臓器内流動赤血球をパラフォルムアルデヒド含有アセトン中で凍結置換固定して、凍結切片作製を行ない、膜結合蛋白等の抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。生きたマウス肺胞壁毛細血管内流動赤血球は、膜骨格蛋白スペクトリンで免疫染色すると、その形態像を容易に可視化できた。一方、アクアポリン1で毛細血管の内皮細胞を免疫染色することにより、種々の流動赤血球が、肺胞吸気時に血管内皮細胞と接着しており、ガス交換機能を効率よく行う形態像がとらえられた。

(6) この生体内凍結技法により、虚血と酸欠状態を引き起こすことなく、生きた動物臓器組織を凍結し、その臓器組織を三次元的ディープエッチングレプリカ法と走査型電顕試料で解析できた。次いで虚血・再灌流マウスモデル作製試料を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。麻酔下マウス肺臓を生体内凍結 - 凍結置換固定して凍結切片作製を行ない、膜結合蛋白等の抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。生きたマウス肺胞壁毛細血管内流動赤血球は、膜骨格蛋白スペクトリンで免疫染色すると、その不規則形態像を可視化できた。さらに種々の流動赤血球が、

肺胞吸気時に血管内皮細胞と接着しており、ガス交換機能を効率よく行う形態像と考えられた。さらに人工呼吸器装着などにより、麻酔下マウスの心肺機能停止を経時的に起こさせて、小腸および肺臓の血行動態を量子ドット注入で検索することにより、生きた動物生体内各臓器の微小環境が、赤血球の機能形態像に關与することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Yurika Saitoh, Nobuo Terada, Nobuhiko Ohno, Akiei Hamano, Nobuo Okumura, Takashi Jin, Ikuo Saiki, Shinichi Ohno, Imaging of thrombosis and microcirculation in mouse lungs of initial melanoma metastasis with in vivo cryotechnique., *Microvasc. Res.*, 査読有, 91, 2014, 73-83
DOI: 10.1016/j.mvr.2013.11.004

大野 伸一, 寺田 信生, 齋藤 百合花, 大野 伸彦, 齋藤 成, 藤井靖久, 動物生体内臓器の凍結技法 - 光イメージング解析の機能形態学的意義 [基礎医学的研究から臨床診断学応用への挑戦], *医学生物学電子顕微鏡技術学会誌*, 査読有, 27 巻, 2 号, 2013, 61-63

Jiaorong Chen, Nobuo Terada, Yurika Saitoh, Zheng Huang, Nobuhiko Ohno, Shinichi Ohno, Detection of MAPK signal transduction proteins in an ischemia/reperfusion model of mouse intestine using in vivo cryotechnique, *Histochem. Cell Biol.*, 査読有, 140(4), 2013, 491-505
DOI: 10.1007/s00418-013-1113-x

Nobuo Terada, Yurika Saitoh, Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno, Kayoko Fujishita, Schuichi Koizumi, Shinichi Ohno, Visualization of ATP with luciferin-luciferase reaction in mouse skeletal muscles using an "in vivo cryotechnique". *Microsc. Microanal.*, 査読有, 18(5), 2012, 1030-1036
DOI: 10.1017/S1431927612001316

Yurika Saitoh, Nobuo Terada, Sei Saitoh, Nobuhiko Ohno, Takashi Jin, Shinichi Ohno, Histochemical analyses and quantum dot imaging of microvascular blood flow with pulmonary edema in living mouse lungs by "in vivo cryotechnique". *Histochem. Cell Biol.*, 査読有, 137(2), 2012, 137-151
DOI: 10.1007/s00418-011-0892-1

[学会発表](計12件)

齋藤 百合花, 寺田 信生, 大野 伸彦, 大野 伸一, 生体内凍結技法による悪性黒色腫初期転移肺における血小板凝集と肺血行動態の定量的解析法, 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014年3月29日, 自治医科大学(栃木県)

齋藤 百合花, 寺田 信生, 大野 伸彦, 大野 伸一, 生体内凍結技法による移植癌初期転移マウス肺組織の微小循環解析, 日本顕微鏡学会第38回関東支部講演会, 2014年3月8日, 日本女子大学目白キャンパス(東京都)

大野伸一, 生体内凍結で広がるバイオイメージングの世界: 基礎医学研究から臨床診断応用へ挑戦, 第2回先端計測勉強会(招待講演), 2014年3月4日, 日立製作所中央研究所(東京都)

Bao Wu, Nobuhiko Ohno, Yurika Saitoh, Yiqin Bai, Zheng Huang, Shinichi Ohno, Morphofunctional Analyses of blood vessel permeability in living mouse thymus tissues with "in-vivo cryotechnique", 第1回東アジア顕微鏡学会議, 2013年10月16日, ラディソンブルホテル(中国重慶市)

齋藤 百合花, 寺田 信生, 大野 伸彦, 大野 伸一, 生体内凍結技法によるマウス癌肺転移モデル誘導性凝固亢進状態と血行動態の可視化法, 第73回日本解剖学会中部支部学術集会, 2013年10月6日, 山梨大学甲府キャンパス(山梨県)

齋藤 百合花, 寺田 信生, 大野 伸彦, 大野 伸一, 生体内凍結技法による種々病態下マウス肺組織内循環動態の可視化法, 第45回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2013年9月13日, アクロス福岡(福岡県)

大野 伸一, 寺田 信生, 齋藤 百合花, 大野 伸彦, 齋藤 成, 藤井 靖久, 動物生体内臓器の凍結技法-光イメージング解析の機能形態学的意義 [基礎医学的研究から臨床診断応用への挑戦], *医学生物学電子顕微鏡技術学会第29回学術講演会および総会(招待講演)*, 2013年6月9日, 神奈川歯科大学(神奈川県)

齋藤 百合花, 寺田 信生, 大野 伸彦, 河嶋 英里, 大野 伸一, 凍結技法によるメラノーマ転移毛細血管内血栓形成のバイオイメージング, 日本顕微鏡学会第69回学術講演会, 2013年5月20日, ホテル阪急エキスポパーク(大阪府)

大野 伸一, 大野 伸彦, 齋藤 百合花,

寺田 信生、生きた動物臓器を探索する生体内凍結技法の基礎と応用、日本顕微鏡学会第 69 回学術講演会（招待講演）、2013 年 5 月 20 日、ホテル阪急エキスポパーク（大阪府）

大野 伸一、寺田 信生、齊藤 百合花、大野 伸彦、動物生体内臓器の機能分子形態像を探索：光イメージング法と凍結技法の融合、第 37 回日本顕微鏡学会関東支部講演会（招待講演）、2013 年 3 月 6 日、東京大学本郷キャンパス（東京都）

大野 伸一、寺田 信生、齊藤 百合花、大野 伸彦、動的細胞組織の光イメージングと機能形態像の融合、公益社団法人日本顕微鏡学会バイオメディカルニュー・マイクロスコ・ブ分科会平成24年度シンポジウム講演会(BMNM2013)(招待講演)、2013年3月5日、帝京大学板橋キャンパス（東京都）

大野 伸一、凍結で広がる形態学の新世界：基礎医学的研究から臨床応用へ挑戦、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会（会頭ランチョン講演）（招待講演）、2012 年 3 月 27 日、山梨大学甲府キャンパス（山梨県）

〔図書〕（計 2 件）

Shinichi Ohno, Nobuo Terada, Nobuhiko Ohno, Yasuhisa Fujii, CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS、Scanning electron microscopy for the life sciences、2012、196-210

大野 伸一 寺田 信生、大野 伸彦、齊藤 百合花、齊藤 成、藤井 靖久、日本組織細胞化学会編、組織細胞化学 2012、2012、1-10

〔その他〕

ホームページ等

http://erdb.yamanashi.ac.jp/rdb/A_Display.Scholar/3_50/643ABBA678892E05.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 伸一（OHNO, Shinichi）
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号：5 0 1 0 9 1 7 0

(2) 研究分担者

寺田 信生（TERADA, Nobuo）
信州大学・医学部・教授
研究者番号：6 0 2 9 3 4 6 1
（削除：平成 24 年 4 月 18 日）

齊藤 成（SAITOH, Sei）

山梨大学・医学工学総合研究部・助教
研究者番号：1 0 4 5 6 4 4 4

齊藤 百合花（SAITOH, Yurika）
山梨大学・医学工学総合研究部・助教
研究者番号：0 0 5 3 0 0 9 9