

## テクニカルノート

# 神経組織を対象とした包埋前免疫電顕法

篠田 晃

山口大学医学部第二解剖学教室 宇部市南小串1丁目1番1号 (〒755-8505)

**Key words :** 電子顕微鏡、免疫組織化学、ガラクトシデース、ペルオキシデース、  
二重染色法

### はじめに

免疫電顕法は、免疫組織化学を電顕レベルでの解析に適用したもので、1) 目的とする抗原の微細構造レベルでの局在部位の同定、2) 微細領域における抗原の定量、さらに3) 多重染色の場合には抗原間あるいは抗原を提示している微細構造間の関係解明を目的としている。しかし、光顕レベルでの免疫組織化学法や通常の電顕法が手軽で重要な手法として確立している一方で、免疫電顕法は上述の目的を十分満足させる安定した手法として広く浸透しているとは言い難く、免疫反応性と微細形態の保持の狭間で相変わらずジレンマに苛まれている。

現行の免疫電顕法は、1) 包埋前免疫電顕法、2) 包埋後免疫電顕法、3) 非包埋免疫電顕法(凍結超薄切片法)の三つの方法に大きく分類できる。一般的に言えることは、包埋前免疫電顕法は厚切り切片を免疫反応させるので、抗体の浸透性が悪く粒子状マーカーを使いにくく、非特異反応も起きやすいため、抗原の局在性と定量性で劣るが、光顕観察との相関ができ、また、四酸化オスミウムで膜系を強く後固定できるのでシャープな電顕像が得られる<sup>1)</sup>。一方、包埋後免疫電顕法や非包埋免疫電顕法では超薄切片で反応させるので、抗体の浸透性の問題は少なく、金コロイドなど粒子状マーカーが使える、抗原の局在性と定量性で優れるが、光顕観察との相関が

難しく、四酸化オスミウムが使い辛いので微細構造の保持が悪い<sup>2)</sup>。それぞれに利点と欠点があり目的に応じて使い分ける必要があるが、ここでは、私共の教室で現在行っている包埋前免疫電顕法の実際を神経系を対象に紹介する。

### 脳組織での包埋前免疫電顕法の利点と問題点

神経組織、特に脳組織などの高度に不均質な組織の電顕解析では、光顕観察との相関ができないと、何処を見ているのか分からない上に、免疫反応陽性領域が選定できないので、超薄切片上だけでは、免疫反応がうまく行っているのか、非特異反応なのか、或いは本来ないところなのか判定し難く、結局無駄に終わることも少なくない。そのため、神経組織の解析には、厳密な局在性や定量性を追及しない限り、スライドに偏平包埋し光顕観察ができる包埋前免疫電顕法が有利と考えられる<sup>3)</sup>。

粒子状マーカーを使わず、主に酵素によるdiffuseな基質の呈色反応を利用する包埋前免疫電顕法では、抗原の細かな局在(例えば、細胞内マトリックス、細胞骨格系線維、シナプス小胞やその他の小胞など微小構造への局在)について確信を持てる情報を得るのは難しいが、大まかな局在(例えば、ニューロン、グリア、或いは細胞外構造への局在や、細胞内であれば小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、ライソゾーム、核、核膜、細胞膜など比較的大きな構造への局在)を得ることはできる<sup>1,3)</sup>。大まかな局在が得られると言ってもそれはある程度の微細構造

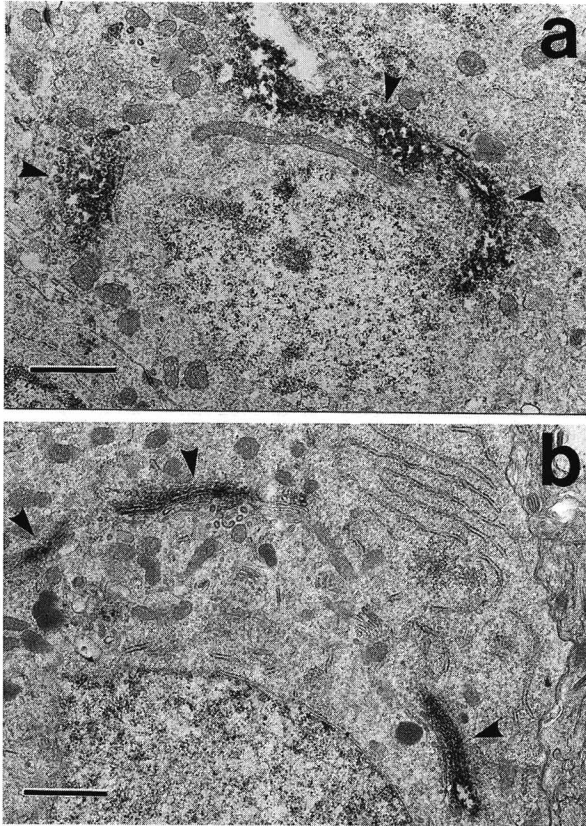


図1. 成獣雄ラットの腹側淡蒼球のニューロンにおける抗PAX抗体免疫反応陽性構造の電顕像. a) 0.08% グルタルアルデヒド/4% パラホルムアルデヒド固定液と50 $\mu$ mの厚切り切片を用い, メタノールや界面活性剤を使用しない通常行われる包埋前免疫電顕像. DAB反応産物(矢頭)は細胞質内で何らかの構造に沈着を示すようであるが, 微細形態の保持が良くないため何処に局在しているのかわからない. b) 1.0% グルタルアルデヒド/4% パラホルムアルデヒド固定液と30 $\mu$ mの切片を用い, メタノールと界面活性剤で処理を行った包埋前免疫電顕像. 微細形態の保持が良いため, DAB反応産物(矢頭)が細胞質内でゴルジ装置に局在することがはっきりとわかる. a,b両者を比較せよ. bar = 1 $\mu$ m.

が保持されていることが前提である. 脳は他の組織に比して柔らかく, 特に発達段階のものは形態維持が困難で, 免疫反応性を向上させる処理を施すと組織の微細形態が崩れてしまう. 微細形態を保持するための電顕用の固定や処理を施すと抗体の浸透性の阻害と非特異反応の増加を引き起こし免疫反応性は低下する. 免疫反応性が低下する主なる原因は, 1) グルタルアルデヒドなど強い固定液の使用, 2) 厚い切片の使用(免疫電顕用試料では一般に50 $\mu$ m程度のもを使う教室が多い), 3) 微細形態保持のため, 界面活性剤等による処理の省略によることが挙げられる. いずれも抗体の浸透性を著しく低下

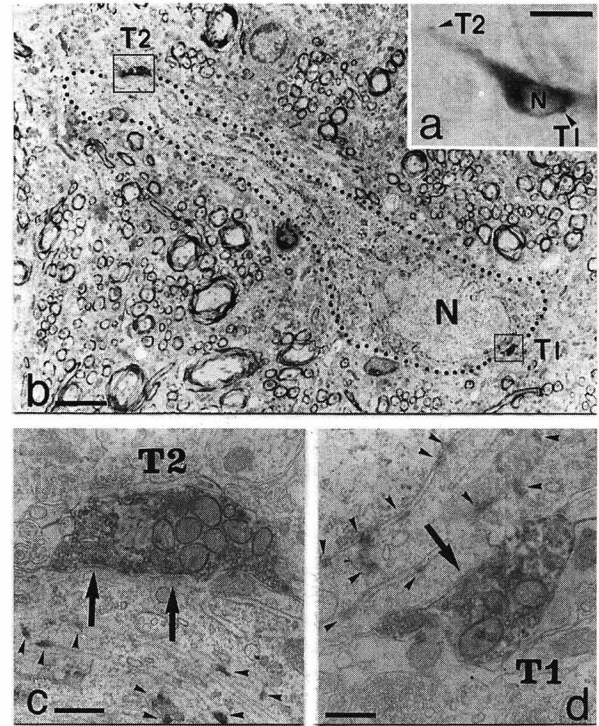


図2. 若年雄ラット仙髄中間外側核のアセチルコリン性副交感系節前ニューロン(N)へのアドレナリン性入力(T1,T2)を証明するPAP-BAG免疫電顕二重染色法<sup>5)</sup>. (それぞれの合成酵素ChAT, PNMTに対するモノクローン抗体とポリクローン抗体使用)(a):エポンでスライドガラス上に扁平包埋した後の光顕像. ChAT陽性の節前神経細胞(N)はIbGa反応により青緑色を呈し, PNMT陽性線維(T1,T2)はDAB反応により黒褐色を呈している. (b): (a)と関連した電顕像. 節前ニューロン(点線)には, ChAT陽性を示す多くの電子密度の高いIbGa反応産物が沈着. (c), (d): T2,T1の拡大像. PNMT陽性反応を示す神経線維ボタン(T1,T2)が, IbGa反応産物(矢頭)の沈着したChAT陽性節前細胞の細胞体(d)と樹状突起(c)に, 直接, シナプス結合(矢印)を作り入力する. bars = 20 $\mu$ m (a), 5 $\mu$ m (b), 0.5 $\mu$ m (c-d).

させると思われるが, グルタルアルデヒドは, 通常の免疫組織化学用固定液の主体を成すパラホルムアルデヒドに比べて膜系を含む構造保持能に優れる反面, 抗体の抗原まで侵入する余地を少なくしている. さらに残余のアルデヒド基がかなり多く, これが非特異的吸着を増加させ, とりわけ抗体の浸透の障害になっている. (なお, 高濃度グルタルアルデヒドを使っても包埋後電顕法の超薄切片では免疫反応が検出できるので, これにより重大な抗原変性を来しているとは考えにくい.)

包埋前免疫電顕法で得ようとする情報は, 光学顕微鏡観察で局在が窺われる免疫陽性構造が, 概ね電

顕レベルで観察される構造の何にあたるのか、その構造が周辺の微細構造とどのような関係にあるのかという内容である。さらに多重染色を使った場合は、異種の抗原関連構造の関係（例えば異なった神経伝達物質を持った入出力のシナプス関係）の解析も可能となる。そのためには、光顕との相関だけでなく、なるべく通常の電顕像に近い微細構造の保持も目指さねばならない。多くの教室で包埋前免疫電顕に使われている低濃度グルタルアルデヒド(0.05-0.1%)の固定液では微細構造の保持は悪く、実際上、満足の行くものではない(図1a)。私共は、0.5%以上のグルタルアルデヒド固定による包埋前免疫電顕法を実現するために、組織内残余の過剰アルデヒドを水素化ホウ素ナトリウムでブロックし、一方、抗体の浸透性を上げるために、30 $\mu$ m以下で作成したヴィブラトーム切片をメタノールで前処理し、さらに界面活性剤を使用するというタブーを行っている<sup>2,3)</sup>。その結果、比較的良好的な微細構造の保持と良好的な免疫反応性を得ている(図1b)。以下にその方法を記す。

### 光顕相関型免疫電顕法

#### 組織の固定

4% paraformaldehyde + 0.1-1.0% glutaraldehyde / 0.1M PB (pH7.4) :

150-200 ml/100 g で経心臓性に灌流固定。

脳を取り出し、目的とする部位をブロックとして切り出す。

同じ固定液で30分から1時間程度後固定する。

#### ヴィブラトームによる切片作成

0.1 M PBの中で25-30 $\mu$ mのヴィブラトーム切片を作成

浮遊法にて、0.02 M PBSで洗浄 (10分 3回)。

#### 前処置

20% NGS / 0.02 M PBS (2時間)

0.3% Triton X / 0.05% NGS / 0.02 M PBS  
(10分 3回)

30% methanol/DDW (5分)

1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 50% methanol / DDW  
(30分 - 1時間)

30% methanol/DDW (5分)

0.3% Triton X / 0.05% NGS / 0.02M PBS (5分)

0.05% NGS / 0.02 M PBS (10分 3回)

1.0% sodium borohydride / DDW (30分 - 1時間)

0.3% Triton X / 0.05% NGS / 0.02 M PBS

(15分 3回)

#### 免疫反応

第一抗体による免疫反応 (4℃, 1 - 3日) :

抗XラビットIgG抗体

/ 0.3% Triton X / 0.1% sodium azide /

0.05% NGS / 0.02 M PBS

0.3% Triton X / 0.05% NGS / 0.02 M PBSによる

洗浄 (10分 3回)

第二抗体による免疫反応 (4℃, 1日) :

抗ラビットIgGビオチン化ヤギ抗体 /

0.05% NGS / 0.02 M PBS

0.05% NGS / 0.02 M PBS (10分 2回),

0.02 M PBSによる洗浄 (10分 1回)

アビチン-ペルオキシダーズ / 0.02M PBSによる反応 (4℃, 1日)

0.05 M Tris-HCl buffer (pH.7.4) による洗浄

(15分 3回)

0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 0.03% DAB / 0.05 M Tris-HCl

bufferによる呈色反応 (15分)

(あるいは、0.0006% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 0.6% nickel

ammonium sulfate / 0.02% DAB / 0.05 M Tris-HCl buffer による15分程度の呈色反応)

0.05M Tris-HCl buffer (pH.7.4) による洗浄

(15分 1回)

0.02 M PBSによる洗浄 (15分 2回)

#### オスミウム後固定/脱水/EPON包埋

1% OsO<sub>4</sub> / 0.1 M PB 1時間

DDW 5分 2回

50% ethanol 10分

1.5% uranyl acetate / 70% ethanol 40分

80% ethanol 10分

90% ethanol 10分

95% ethanol 10分

99% ethanol 10分

100% ethanol 10分 2回

propylene oxide 10分 2回

propylene oxide : EPON (1:1) 3時間

シリコンコートしたスライドガラスとカバーガラスの間で偏平エポキシ包埋。

恒温槽に三日間インキュベーション (60℃)。

光学顕微鏡観察

恒温槽から取り出して光学顕微鏡観察。

目的の部位をフォーカスを変えながら写真撮影。

目的の部位を切り出し、エポン柱にアロンアルファで接着。

さらに超薄切片用にトリミングと面出しをして、光顕用描画装置でスケッチ。

#### 超薄切片作成／電顕観察

ウルトラマイクロトームにて超薄切片作成：シルバーゴールドよりも少し厚めに作成。

無染色あるいは短時間（1分）のクエン酸鉛による電子染色。

電顕観察，撮影。

#### PAP-BAG免疫電顕二重染色法

神経系では異なった神経伝達物質を持った二つの系の分布関係やその間でのシナプス結合の有無を解析することは殊更に重要な課題である。そのため光顕—電顕相関型免疫二重染色法として開発されたのが、PAP法とビオチン-アビチン-β-ガラクトシデース反応を併用したPAP-BAG免疫電顕二重染色法である<sup>4,5)</sup>。IbGa (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) を基質としたβガラクトシデースの酵素反応によって青緑色に呈色させることで、DAB反応による茶褐色反応と区別しようというもので、重要な点は、共に反応産物が比較的アルコールに安定で電顕レベルでも反応が同定できることである(図2)。オスミウムで黒化されたDAB反応産物は、電顕レベルでは電子密度の高い細かな沈着物として観察されるが、IbGa反応はオスミウムで黒化されることがなく青緑色を保ち、電顕下では多くの場合直径約40 nmの円形から約40 x 200 nmの棒状の毛羽立った高電子密度結晶構造として認められる(図2b-d)。これにより電顕レベルでもDABとIbGaの反応産物は容易に判別がなされる<sup>6,7)</sup>。注意すべき点は、青緑色の反応産物は脱水／エポン包埋の際にプロピレンオキシドで消滅することで、それに代えてアセトンを用いるが、それでもなるべく1時間以内で切り上げた方が良い。先述した免疫電顕法とは染色の過程と脱水／包埋の過程が少し異なるだけなので、その過程のみ以下に記す。

免疫二重染色（二種類の抗原X,Yを同時に検出する。）

第一抗体混合液による免疫反応（1-3日）：

抗XマウスIgG抗体+抗YラビットIgG抗体  
／0.3% Triton X / 0.1% sodium azide /  
0.05% NGS / 0.02 M PBS

0.05% NGS / 0.02 M PBSによる洗浄（10分3回）

第二抗体混合液による免疫反応（1日）：

抗マウスIgGヤギ抗体+抗ラビットIgGビ  
オチン化ヤギ抗体  
／0.1% sodium azide / 0.05% NGS / 0.02M  
PBS

0.05% NGS / 0.02 M PBS（10分2回），0.02 M  
PBSによる洗浄（10分1回）

PAP-AG混合液による反応（1日）：

PAPマウスIgG+アビチン-β-ガラクトシ  
デース / 0.02 M PBS

0.05 M Tris-HCl buffer (pH.7.4) による洗浄  
（15分3回）

0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 0.03% DAB / 0.05 M Tris-HCl  
buffer による呈色反応（15分）

0.05 M Tris-HCl buffer (pH.7.4) による洗浄  
（15分1回）

0.02 M PBSによる洗浄（15分3回）

IbGa反応液 (A : B = 1 : 45)による呈色反応：  
37℃，8-24時間

A : 2% IbGa / dimethylformamide

B : 0.9 mM MgCl<sub>2</sub> / 3 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> / 3 mM  
K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> / 0.02 M PBS

0.02M PBSによる洗浄（15分3回）

脱水／EPON包埋

50-100% ethanol 脱水の過程までは同じ

acetone 5分

acetone : EPON (1:1) 1時間

シリコンコートしたスライドガラスとカバーガ  
ラスの間で偏平エポン包埋。

恒温槽に三日間インキュベーション（60℃）。

#### おわりに

神経組織など高度に不均質で柔らかい組織を免疫電顕法で解析するには、免疫反応性の向上だけでなく、光顕との相関、微細構造の保持という三つの目的を満たす事が必要となる。これらを満足させるよう私共の教室で行っている包埋前免疫電顕法を紹介

した。また、脳内での異なった系の複雑な関係を解明するために開発してきたPAP-BAG免疫電顕二重染色法についても紹介した。これらの方法は、神経系以外でも光顕との相関を必要とする複雑で柔らかい組織に有効な解析手段となると思われる。参考になれば幸いである。

#### 参考文献

- 1) Shinoda, K., Nagano, M., Osawa, Y. An aromatase-associated cytoplasmic inclusion, the "stigmoid body", in the rat brain.: II. Ultrastructure (with a review of its history and nomenclature). *J. Comp. Neurol.* 1993; **329**:1-19.
- 2) Nagano, M., Shinoda, K. Coexistence of the stigmoid body and estrogen receptor in some neuronal groups involved in rat reproductive functions. *Brain Res.* 1994; **634**:296-304.
- 3) Shinoda, K., Nagano, M., Osawa, Y. Neuronal aromatase expression in preoptic, strial and amygdaloid regions during late prenatal and early postnatal development in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1994; **343**:113-129.
- 4) Kohno, J., Shinoda, K., Kawai, Y., Ohuchi, T., Ono, K., Shiotani, Y. Interaction between adrenergic fibers and intermediate cholinergic neurons in the rat spinal cord: A new double-immunostaining method for correlated light and electron microscopic observation. *Neuroscience* 1988; **25**: 113-121.
- 5) Kohno, J., Shinoda, K., Kawai, Y., Peng, Y., Ono, K., Shiotani, Y. Direct adrenergic input to sacral autonomic neurons: Using a double-immunostaining method at the light and electron microscopic levels. *Brain Res.* 1988; **461**:158-161.
- 6) Kohno, J., Shinoda, K., Kawai, Y., Peng, Y., Ono, K., Shiotani, Y. Enkephalin fibers synapse on cholinergic neurons in the rat sacral intermediolateral nucleus: A double-immunostaining at the light and electron microscopic levels. *Neuroscience* 1989; **28**:487-494.
- 7) Shinoda, K., Nagano, M., Fujioka, A., Sasaki, H. J. Kohno Direct inputs of enkephalinergic fibers to the intermediolateral nucleus in the rat thoracic spinal cord. *Med. J. Kinki Univ.* 1995; **20**:13-15.