

# 凍結技法と免疫組織化学： 分子の局在を知りたい、ここ一番の 凍結超薄切片法

## Ultrathin Cryosections for Light and Electron microscopy

龍澤 俊 広  
Toshihiro Takizawa

<sup>a</sup> 日本医科大学・解剖学講座(分子解剖学)

**要 旨** 凍結超薄切片 (50 ~ 100 nm 厚) を用いた光顕および電顕レベルの免疫組織化学法の技術ポイントについて紹介する。凍結超薄切片を用いた免疫電顕像の可視化に、還元オスミウム後固定とポリビニールアルコール-酢酸ウラン・クエン酸鉛を用いたポジティブ染色法もあわせ紹介する。凍結超薄切片を用いた免疫蛍光顕微鏡法および免疫電顕法は、複雑な組織構築内での生体分子の局在、相互関係を解明する上で有用な顕微鏡法である。

**キーワード**：凍結超薄切片, 免疫組織化学, 免疫電顕, p230, z 軸方向空間分解能

### 1. はじめに

はじめて免疫電顕を行おうとした時、たくさんのやり方があり、どの様な方法にも一長一短があり、このやり方で全て上手くいくという方法はない。完璧な免疫電顕法はないが、1) 同じ固定条件で光顕レベルから電顕レベルまで一貫した解析が可能であること、2) 抗原性の保持がよいこと、3) 切片への抗体の浸透性がよいこと等の利点から、凍結超薄切片を用いた免疫電顕、いわゆる「徳安法」に関連した技術を紹介する。

凍結超薄切片法は、通常の樹脂包埋標本の薄切を行うウルトラミクロトームに凍結槽 (クライオチャンバー) を装着し、その中で凍結させた試料から超薄切片を作製する方法である。徳安は、作製された凍結切片を蔗糖滴の表面に接着させて、チャンバー外 (常温) に回収する方法を開発した。その手法を用いた免疫電顕法による生体分子の局在解析は、1980 ~ 1990 年代の細胞生物系の一流雑誌を席卷し、徳安法として用いられるようになった<sup>1)</sup>。

### 2. 凍結超薄切片を用いた免疫組織化学的解析法のポイント

図 1 には、凍結超薄切片を用いた解析法の流れを示した。この試料作製過程において、ポイントとなる技術について解説する。

#### 2-a 細胞・組織の固定：試料作製過程の中で固定が最も大切である

どの様に凍結超薄切片を上手く作製しても、また、特異抗体で免疫染色を上手く行っても、最初の固定が適切に行われなければ、正確な局在解析を行うことはできない。例えば、動物臓器を材料として固定する際、大きなブロックのまま固定液に漬けても (浸漬固定)、ブロックの中心部では十分な固定が行われない。とりあえず凍結させたり、固定液に漬けておけば何とかなる式では、チャンピオンデータは得られない。組織化学解析ができるように固定に一手間かけてやるのが大切である。臓器を取りだし、固定液を垂らしたデンタルワックス上で 1 mm 厚程度にスライスし、さらにマッチの軸状に細切して (ここまで臓器を取り出しから 5 分以内)、浸漬固定を行う。脳組織のように、生体から取り出す際に、時間を要する組織に関しては、必要ならば、浸漬固定前に短時間 (5 ~ 10 分間)、還流固定を行う。スライス、またはマッチの軸状にする理由は、出来る限り均一に固定された試料から、さらに必要な場所を切り出せるようにするためである。「生体から臓器を取り出してから 5 分以内」が大切で、いく

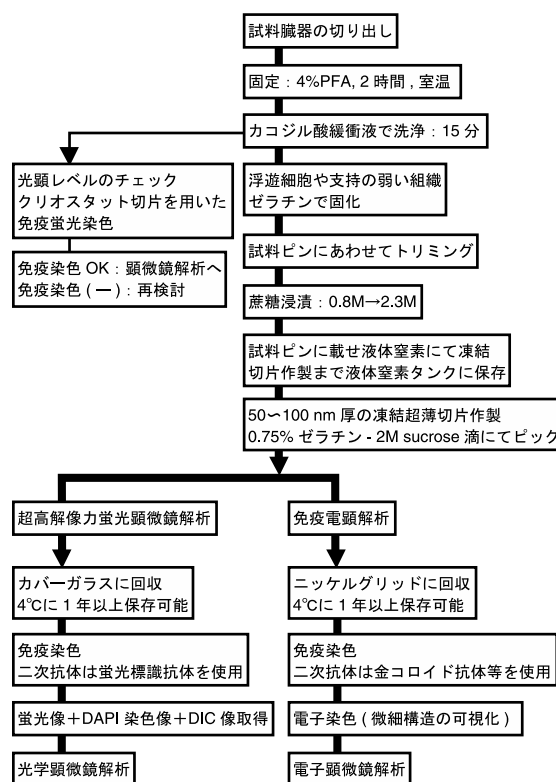


図 1 凍結超薄切片を用いた免疫組織化学的解析法。

<sup>a</sup> 〒 113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5  
TEL: 03-3822-2131  
E-mail: t-takizawa@nms.ac.jp  
2008 年 3 月 12 日 受付

ら綺麗なマッチの軸状の形に切り出せても、時間がかかっている。死後変化のアーティファクトの局在、構造を観察することになる。浮遊細胞に関しては、1.5 ml マイクロチューブで懸濁したかたちで固定し、洗浄後、ゼラチンで固定させる。

固定液の選択は誰しも悩むところであるが、筆者は、4% パラフォルムアルデヒド固定、室温 2 時間を基準としている。これ以上固定を弱くすると、光顕レベルで免疫反応が陽性に検出できても、電顕レベルで観察する際、超微形態の保存が悪く、分子の局在判断が困難となる。超微形態の保存のため、パラフォルムアルデヒド固定液にグルタルアルデヒドを少量添加する方法もあるが、一般にグルタルアルデヒドにより抗原性が失われることが多く、最初の基準固定液としては、パラフォルムアルデヒド単独固定液を勧める。

#### 2-b 凍結切片を作製する前に行う光顕レベルでのチェック

免疫電顕で、ある生体分子の細胞内局在を解析しようとする時、いきなり免疫電顕を行わず、“光顕レベル”で検出ができるのかどうか確認することが大切である。光顕レベルで検出できない分子の局在を、電顕レベルで検出することはできない。その際、免疫電顕試料作製時に余った試料（免疫電顕と同じ固定条件となる）を、OCT コンパウンド等に包埋し、5 μm 厚程度のクリオスタット切片を作製、免疫染色し検討を行う。

#### 2-c 超薄切片作製

面出し後、温度を下げ（ナイフ温度 -110 ~ -125°C、試料温度 -120 ~ -130°C）、ガラスナイフの刃の中央から左の部位（良刃の部位）を順次使用し（または、ダイヤモンドナイフを使用し）、凍結超薄切片を作製する。ナイフ温度が試料温度より 5 ~ 10°C ほど高めの範囲で、試料の薄切に一番最適な温度条件を決める。2つの温度差がありすぎると切片は圧縮され、なさ過ぎるとバリバリの割れた切片となる。「切削方向に厚縮されないフラットな切片（試料の面とほぼ同じかたちの切片）」の作製を試みる。徳安法の原法では、フラットにならずとも、しわの寄った切片を 2.3 M 蔗糖滴に回収し、その表面張力で、しわを伸展させることができると記載されているが<sup>1)</sup>、パラフォルムアルデヒド単独の弱い固定であるため、2.3 M 蔗糖滴を使用すると、その表面張力により、切片の微細構造が破壊され、免疫染色の非特異的反応を起こす<sup>2)</sup>。厚縮されないフラットな切片を作製し、表面張力を下げたピックアップ液（ゼラチン-蔗糖液）で回収することが大切である。

#### 2-d ピックアップ液 (0.75% ゼラチン-2.0 M 蔗糖-0.05% NaN<sub>3</sub>) の作製法

- ①. 室温の 2.3 M 蔗糖液に 0.05% の濃度になるよう NaN<sub>3</sub> を加え溶解させる。
- ②. 100 ml ビーカーに 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) 6.5 ml を壁面に付けないように計り採る。
- ③. 377 mg のゼラチンをビーカーに加え、60°C のウォーターバス内で溶解させる。どの硬さ (bloom) のゼラチン (300 bloom; product No. G2500, Sigma) を選ぶのかは大変重要

である。

- ④. 43.5 ml の 2.3 M 蔗糖液をスターラーで攪拌しながら、3 回ぐらいに分け加え、溶解させる。細かな泡を作らないよう、ゆっくりと攪拌させる。
- ⑤. 60°C のウォーターバス内で保温しながら、使用する。

#### 2-e 切片の回収

白金ループ（ループ外径が電顕グリッドの直径より小さめのループを作製する）でピックアップ液を取り、ナイフの近く（右側面の近く）で冷却し、凍結直前にピックアップ滴を軽く接着させるか、切片真上の極近傍に持つてくることにより切片が飛びピックアップ滴表面に付着する（いわゆるフライ）方法で回収する。回収中、ピックアップ滴を通して（凍結するまでは透明であるため）、どの様に切片が接着したか確認できるため、フラットの切片がそのまま接着された切片のみ回収する。大きさにもよるが、よい切片一枚をピックアップ滴中央に回収したほうがよい。

ピックアップ液がクライオチャンバー内でどのくらいの時間で凍結するかはチャンバー内の温度に依存する。-120°C 前後では、5 秒ほどで凍結するため、白金ループをチャンバー内に入れたら、ためらわず、自分でカウントしながら、凍結直前に切片を回収する。チャンバーより白金ループを取りだし、ピックアップ滴が解凍したら（数秒~数十秒ぐらい）、グリッドに真上から白金ループを接着させ、1~2 秒待った後、ループを離す。回収後、白金ループは、毎回、洗浄用蒸留水 (95°C) にディップして洗浄する。

グリッドに回収した切片は、4°C にて少なくとも 1 年は（抗原性が落ちずに）保存可能である。毎回免疫電顕のために切片を作製せずとも、切り貯めておいて、必要な際に免疫電顕を行うことが可能である<sup>3,4)</sup>。

#### 2-f 免疫染色：グリッドの洗浄

ブロッキングや抗体反応後の PBS 洗浄等は、マイクロチューブ立て (0.5 ml チューブスタンド, 家田貿易) を利用して、覆ったパラフィルムに、ディスボピペットの膨らみ (bulb) の部位を用いて押しつけて凹みを作り、洗浄滴の系列を作り、連続する処理を行う (図 2)。各液滴間の移動は、消磁性精密ピンセット (style 5) で行う。

#### 2-g 免疫染色：簡易免疫染色箱の作製法

抗体反応は 100 mm 径のプラスチック培養皿を使用する。直径に合わせて切り抜いたパラフィルムを敷き、8 等分して使用する (図 3)。上ぶたの内側には、70 mm 径の濾紙を蒸留水で湿らせ貼り付け、湿箱とする (図 3)。抗体液量は、グリッドあたり 25 ~ 50 μl で十分である。37°C で反応させる際は、熱の伝導性をよくするために、パラフィン伸展器（または、ホットプレート）に蒸留水を適量垂らし、その上に培養皿をおく。

#### 2-h 金粒子のサイズ選択

金粒子は、単染色ならば 5-nm 金粒子を用いたほうがよい。二重標識には 5- と 10-nm 金粒子を用いる。より大きい金粒子は観察し易いが、標識密度が落ちるため、避けたほうがよい。

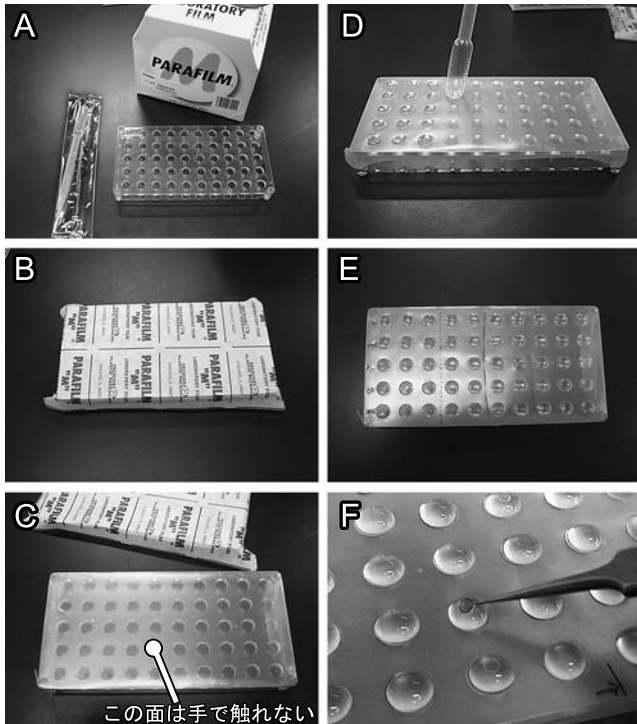


図2 免疫染色における洗浄滴系列の作製法. マイクロチューブ立て、パラフィルム、ディスボピペットを用意する (A). チューブ立てをパラフィルムで覆い (B, C)、ピペットの膨らみで凹みを作り (D)、洗浄滴の系列を作る (E, F).

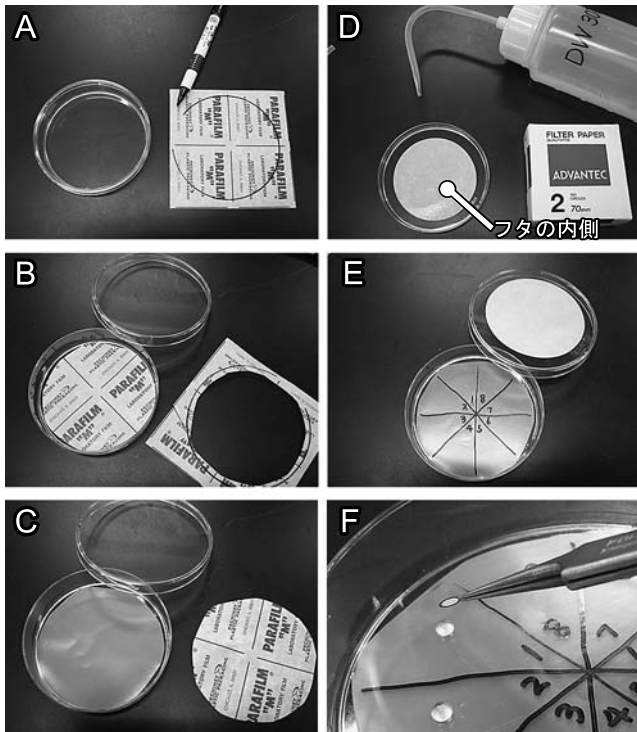


図3 免疫染色における免疫染色箱の作製法. 100 mm 径のプラスチック培養皿、パラフィルムを用意する (A). 直径に合わせて切り抜いたパラフィルムを敷き (B, C)、8等分して使用する (E, F). 上ぶたの内側には濾紙を蒸留水で湿らせ貼り付ける (D).

浸透性の優れた凍結超薄切片でも、金粒子標識抗体の切片への浸透は悪く、また、金粒子の立体障害のことも考え合わせると、小さい径の金粒子が望ましい<sup>5)</sup>。1-nm の金粒子も大変有効であるが、銀増感処理を必要とする<sup>4,5)</sup>。

## 2-i 電子染色 (ポジティブ染色法)

還元オスmium固定の後、ウランと鉛で染色しながらポリビニールアルコール (PVA) で包埋してやることにより、通常の樹脂包埋のポジティブ染色に近い像を得ることができる<sup>4,6)</sup>。組織全体の微細構造の把握が容易であり、分子の局在を明瞭に解析できる (図4)<sup>7)</sup>。

- ①. 還元オスmium固定: ドラフト内で、2%オスmium—1.6%フェロシアン化カリウム—0.1 M カコシル酸緩衝液、pH 7.4 で、室温、15 分間固定
- ②. 蒸留水洗浄: 1 分×3 回
- ③. 0.8%酢酸ウラン—1.6% PVA 洗浄: 1 分間×1 回
- ④. 0.8%酢酸ウラン—1.6% PVA 染色: 15 分×1 回
- ⑤. 2% PVA 洗浄: 10 秒×1 回
- ⑥. 0.0015%クエン酸鉛—2% PVA 洗浄: 1 分×1 回
- ⑦. 0.0015%クエン酸鉛—2% PVA 染色: 15 分×1 回
- ⑧. グリッドの乾燥

白金ループ (グリッド周辺に僅かに隙間ができるくらいのループを用意) で引き上げ、徳安が記載しているように、ループを逆転させ (液面を上に向ける)、三角状に切った硬質濾紙 (Whatman 社, Grade 50) の先端に近い片縁をループの根元に当てて、最初凸レンズ状をした小滴上面の水位が次第に下がり凹レンズ状となり、その中央の凹んだ面がグリッド中央に達したら、液を取り除くことを止め、放置 (室温で自然乾燥) する<sup>1)</sup>。乾燥していることを確認し、先の細い精密ピンセット (style SS tweezers) で、グリッドとループ間の乾燥した PVA 薄膜のグリッド辺縁を周回するように破り、グリッドを回収する。

他の超微形態可視化法として、メチルセルロース—酢酸ウランによるネガティブ様染色法もよく使用される方法である<sup>8)</sup>。低~中倍像での微細構造の把握がしにくい、高倍で細胞内小器官を観察することは可能である。メチルセルロースは保存と使用を 4°C で行う必要があり、やや扱いにくい<sup>1)</sup>。

## 2-j 超高解像力蛍光顕微鏡解析の勧め

近年、蛍光顕微鏡の進歩により、特に共焦点レーザー顕微鏡による光学切片を用いて、組織や細胞における生体分子の局在や動態が解析されている。しかし、生物試料における実際の光学切片の厚さは約 500 nm 程であり、細胞内での詳細な分子の局在や相互関係に関する情報を得ることは難しい<sup>9)</sup>。蛍光試薬や冷却 CCD カメラの技術革新により、免疫電顕用の凍結超薄切片 (50 ~ 100 nm 厚) を蛍光顕微鏡法に用いて、光顕レベルで、高解像力の分子局在解析、発現定量解析を行うことが可能である<sup>4,9~11)</sup>。凍結超薄切片の一部をグリッドだけでなく、カバーガラスに回収するひと手間をかけるだけで (図1)、非常に多くの情報を得ることができ、免疫電顕と併せ、この解析を行うことを勧める。

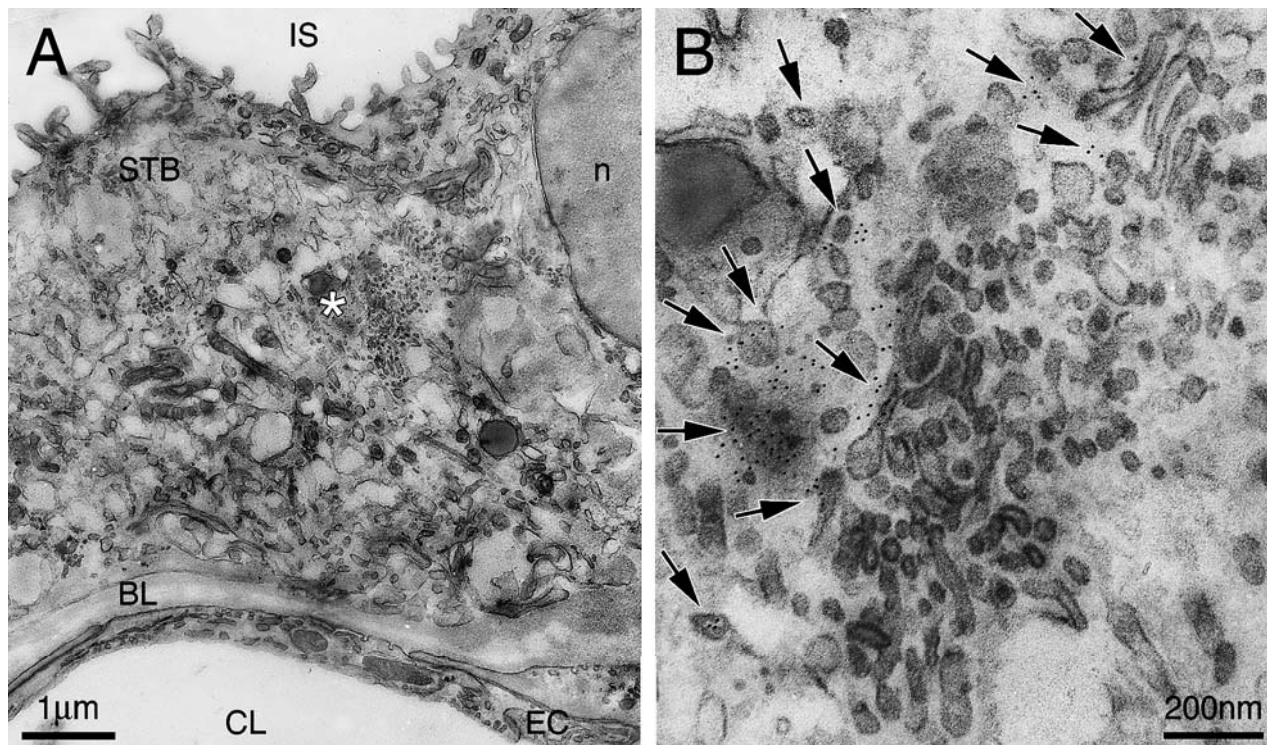


図4 凍結超薄切片による p230 の免疫電顕像。(A) 還元オスミウム固定—ポリビニールアルコール包埋 (ポジティブ染色) によるヒト胎盤絨毛組織像。絨毛間腔 (IS); 栄養膜合胞体 (STB); 基底膜 (BL); 胎児血管内皮細胞 (EC); 血管内腔 (CL); 核 (n)。 (B) パネル A 中の☆印で示した部位の高倍像。trans-Golgi に p230 の局在を示す 5-nm 径の金粒子 (→) が観察される (文献 7 より許可を得て転載)。

### 3. おわりに

論文中の方法に記載されていない、その行間にあるミツについて触れた。これから免疫電顕をはじめようと考えている研究者、免疫電顕がうまくいかず悩んでおられる研究者皆様の、お役に立てたら幸いである。培養細胞の凍結超薄切片法については割愛したが、Oorschot らの優れた論文を参照されたい<sup>12)</sup>。

### 謝 辞

本研究に、ご助言、ご協力をいただいた John M. Robison 教授 (米国オハイオ州立大学)、竹下俊行教授 (日本医科大学)、小澤一史教授 (日本医科大学)、松原茂樹教授 (自治医科大学)、屋代隆教授 (自治医科大学)、日本医科大学解剖学講座 (分子解剖学) の教員・技術員の方々に深謝申し上げます。また、本研究の一部は、科学研究費補助金を受けて行われた。

### 文 献

1) 徳安清輝: 第 6 回電顕サマースクール実行委員会 (編), 電子顕微鏡 基礎技術と応用 1995 ~ 試料作製の先端技術~, 学際企画, 東京, 1995, p. 40-50

2) Takizawa, T. and Robinson, J.M.: *J. Histochem. Cytochem.*, **42**, 1157-1159 (1994)  
 3) Griffith, J.M. and Posthuma, G.: *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 57-62 (2002)  
 4) Takizawa, T. and Robinson, J.M.: *Methods Mol. Med.*, **121**, 351-369 (2006)  
 5) Takizawa, T. and Robinson, J.M.: *J. Histochem. Cytochem.*, **42**, 1615-1623 (1994)  
 6) Takizawa, T., Anderson, C.L. and Robinson, J.M.: *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 31-39 (2003)  
 7) Takizawa, T. and Robinson, J.M.: *J. Nippon Med. Sch.*, **71**, 306-307 (2004)  
 8) Liou, W., Geuze, H.J. and Slot, J.W.: *Histochem. Cell Biol.*, **106**, 41-58 (1996)  
 9) Mori, M., Ishikawa, G., Luo, S.S., Mishima, T., Goto, T., Robinson, J.M., Matsubara, S., Takeshita, T., Kataoka, H. and Takizawa, T.: *Biol. Reprod.*, **76**, 164-172 (2007)  
 10) Takizawa, T., Anderson, C.L. and Robinson, J.M.: *J. Immunol.*, **175**, 2331-2339 (2005)  
 11) Tsukamoto, H., Yoshitake, H., Mori, M., Yanagida, M., Takamori, K., Ogawa, H., Takizawa, T. and Araki, Y.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 229-238 (2006)  
 12) Oorschot, V., de Wit, H., Annaert, W.G. and Klumperman, J.: *J. Histochem. Cytochem.*, **50**, 1067-1080 (2002)