

2. 組織細胞化学シリーズ (若手研究者へのヒント)

光学免疫組織化学の基礎：固定と凍結切片を用いた蛍光免疫組織化学 (1)

瀧澤 俊広

日本医科大学大学院医学研究科分子解剖学

2. Histochemistry Series

Light Microscopic Immunohistochemistry: Fixation and Immunofluorescence
Microscopy Using Cryostat-sections (1)

Toshihiro Takizawa

Department of Molecular Anatomy and Medicine, Nippon Medical School

Abstract

Histochemistry, especially immunohistochemistry, is a powerful and diverse set of methods for obtaining spatial and temporal information concerning the expression and distribution of biomolecules in situ. In this technical note, we describe procedures for fixation and immunofluorescence microscopy using cryostat sections.

(日本医科大学医学会雑誌 2009; 5: 136-140)

Key words: fixation, immunohistochemistry, immunofluorescence microscopy

はじめに

今回は、1) 免疫組織化学を行うための試料固定のポイントと、2) 光学顕微鏡レベル、特に凍結切片(クリオスタット切片)を用いた蛍光免疫組織化学の基本技術について解説します。

免疫組織化学を行うための試料固定

試料作製過程で「固定」が最も大切である

どのように特異抗体で免疫染色を上手く行っても、最初の固定が適切でなければ、正確な局在解析を行うことはできません。例えば、マウス肝臓を固定する際、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ません。デ

ンタルワックスの板上で、摘出した肝臓に固定液を少量垂らし、両刃のカミソリでスライスし、さらに必要ならばマッチの軸状に細切し(ここまで臓器を取り出してから5分以内)、その後、固定液の入ったピーカーに移して浸漬固定を行います(必要ならば、浸漬固定前に短時間、還流固定を行います)。スライス(少なくとも2~3ミリの厚さ)、またはマッチ棒の軸状にする理由は、できう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す。「固定において、生体から臓器を取り出して5分以内の細切完了」が大切で、いくら綺麗なマッチの軸状の形に切り出せても、時間がかかるとは、死後変化のアーチファクトの局在、構造を観察することとなります。手術や検査材料においても、可能な限り新鮮な試料から、すばやい固定のための切り出しと浸漬固定を行います。臨床の先生方から「手術材料をとりあえず-80℃

Correspondence to Toshihiro Takizawa, Department of Molecular Anatomy and Medicine, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: t-takizawa@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

のフリーザーに保存してあるので何とかならないか」と相談を受けますが、保存する前のひと手間を加えておくことが大切です。

固定液の選択

免疫組織化学のためにどの固定液を選択するかは誰もが悩むところです。万能の固定液はありません。光顕レベルの解析だけでなく、将来の電子顕微鏡レベルの解析にも耐えうる最も弱い固定（目的とする標的分子がどこに局在しているのか判断できる超微形態が保存され、かつ、免疫染色のための抗原性が保持されている条件）は、4% パラフォルムアルデヒド（PFA）による室温2時間浸漬固定と考えられます¹。対象とする個々のサンプルで多少異なりますが、目安としてこの固定条件を基準にします。この固定条件で、光顕レベルの反応が十分確認できれば、次に同じ固定条件で免疫電顕も進めることが可能です。また、形態的解析の主眼が免疫電顕であったとしても、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す。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ません。超微形態の保存がよいグルタルアルデヒドを少量添加するか否かについては、一般に、グルタルアルデヒドで固定した試料で検出に適した抗体が少ないため、PFA 単独固定を勧めます。また、使用する抗体が、PFA 固定した試料に適さないものも多々あります。その場合は、未固定包埋試料（新鮮な試料を凍結包埋剤に包埋・凍結した試料）からクリオスタット切片を作製し、アセトン固定またはメタノール固定（4℃、または-20℃で5~10分間）を施した後、免疫組織化学を行います。やり直しのきかない貴重な試料を免疫組織化学用に固定包埋する場合は、1) 未固定で包埋するとともに、2) 4%PFA 固定した試料も同時に準備する二段構えの試料調製をした方がよいでしょう。

PFA 固定液は、作り置きをせず、必ず使用当日（いたしかたない場合は、前日の夕方）に作製し、使用します。また、固定した試料は、（できればその日のうちに）速やかに緩衝液で洗浄した後、光顕レベルの場合は蔗糖浸漬、コンパウンドに包埋し、凍結保存します。固定後、緩衝液中に放置しておくと、PFA 固定した試料が萎える（可逆性であり、固定効果が失われる）ので、緩衝液中で長く放置しないほうがよいでしょう。

実質臓器の固定

(1) 固定液の作製（*1 参照）。

(2) デンタルワックス上での試料細切（Fig. 1）：最初の5分以内で細切を完了させる。

(3) 固定：ビーカー中（50 mL~固定液/サンプル）で固定：室温、2時間。固定液量ですが、例えば、小豆ほどの総体積量の試料あたりに50 mLの固定液は無駄のように思えますが、固定液がサンプルに影響されず（萎えず）、十分固定してくれるための必要な目安量です。

(4) 包埋の課程に進みます。

浮遊細胞の固定

(1) 固定液の作製（*1 参照）

(2) 自分の必要とする細胞を1.5 mL マイクロチューブへ回収します。

(3) 例 PBS 洗浄（卓上小型遠心機で数秒遠心後、上清を廃棄し、約 1.2 mL PBS で懸濁）：×3 回。カルシウム、マグネシウム、グルコースが入っていない pH 7.4 のリン酸緩衝生理食塩水を PBS^{-/-/-}と記しますが、本稿では PBS として略記します。

(4) 固定液（約 1.2 mL）に懸濁のまま固定：室温、2時間。

(5) 手早く冷 PBS（4℃）で1~2回洗浄：PBS に長く放置しておくペレットになりにくくなるので注意。

(6) ゼラチン溶解後 37℃ に温めておいた 10% ゼラチン-PBS（300 bloom；product No. G2500, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）で、(5) の上清を捨てたペレットに加え懸濁し、再び手早く卓上小型遠心機で遠心してペレットにした後、氷冷して固化します。

(4) の固定中、遠心してペレットのまま固定する方法もありますが、PFA ではペレットが十分固まらないため、固定後、ゼラチンで固化させます。

(7) 包埋（蔗糖浸漬）の課程へ進みます。

培養細胞の固定

(1) 24 穴マルチプレート内で 11~13 mm-径（厚さ No. 1）の丸カバーガラス（必要ならば事前にポリ-L-リジンなどのコーティングを行います）に細胞を培養します。

(2) 固定液の作製

(3) PBS 洗浄：×2 回

(4) 固定液（約 1~2 mL/well）を入れて固定：室温、2時間

(5) 冷 PBS（4℃）で3回洗浄後、免疫染色の過程へ進みます。



Fig. 1 デンタルワックス上での試料細切. アセトン洗浄した両刃のカミソリ刃 (埃が入らないように 100 mm 径培養皿に保管) を 2 つに折り, さらに片端を鋭角に折り, 細切用の刃, 2 枚を用意します. 2 枚の刃をすり合わせるよう (隙間を作らないように) 試料を薄く (少なくとも 2~3 ミリ厚に) スライスします. 押し切るのではなく, 引き切ります.

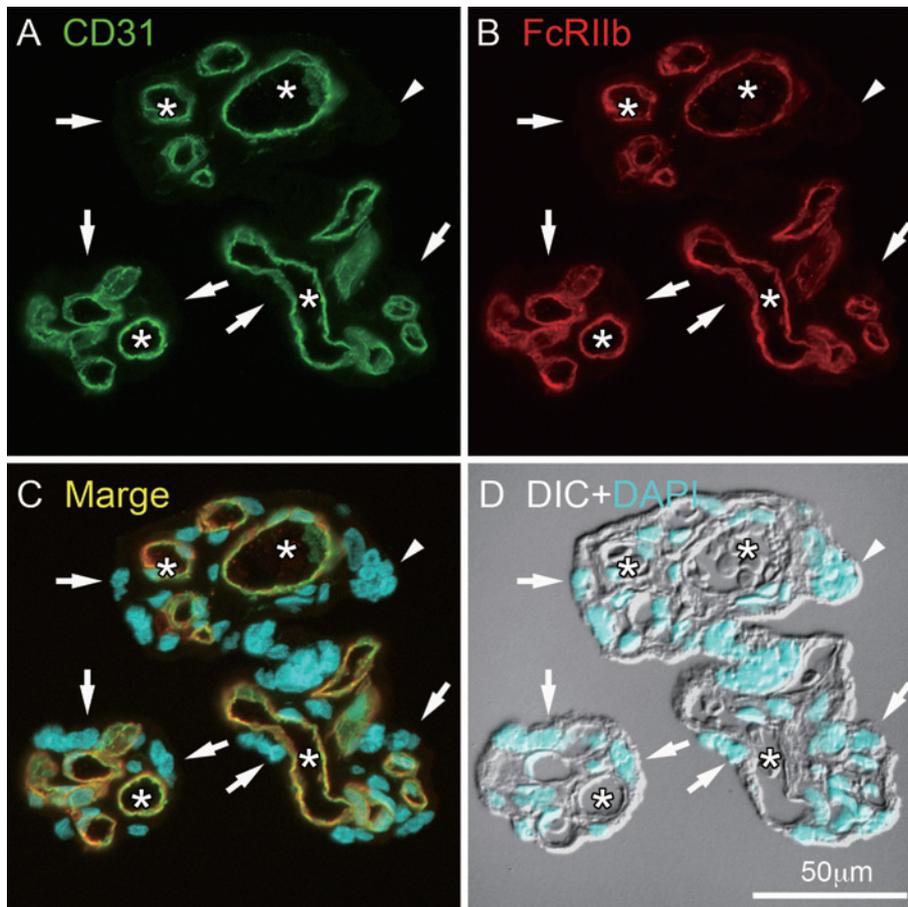


Fig. 2 クリオスタット切片を用いた蛍光免疫染色. ヒト満期胎盤組織における CD31 と IIb 型 Fc γ 受容体 (FcRIIb) の二重染色像. CD31 の局在をマウス抗ヒト CD31 モノクローナル抗体—ヤギ抗マウス Alexa-488 標識二次抗体 (パネル A 中の緑), FcRIIb をウサギ抗ヒト FcRIIb 抗体—ヤギ抗ウサギ Alexa-594 標識二次抗体 (パネル B 中の赤) で可視化してあります. 合成したパネル C と微分干渉像 (DIC) のパネル D から胎盤絨毛組織内の CD31 で染色された胎児血管内皮細胞 (*) に FcRIIb が特異的に陽性であることがわかります. 矢印は絨毛表面を覆っている栄養膜合体体層, 矢尻は syncytial knotting.

***1: 固定液 (4%PFA-PBS, pH 7.4) の作製法**

PFA 固定液は、保存により萎えてしまう (固定効果の低下) ため、当日 (もしくは、前日の夕方) に作製したものを使用します。

(1) 100 mL ビーカーを用意。

(2) 4 g の PFA (例: Cat. No. 104005, Merck, Darmstadt, Germany) を、ビーカーに直接計り採ります。

(3) 100 mL PBS を加え、スターラーで攪拌 (玉がないように懸濁) します。

(4) 懸濁しながら、ウォーターバスまたはガスバーナーで 70°C に温め、液が完全に透明になるまで攪拌します (70°C 以上にはあげないこと! 70°C 以上に温度を上げると、これによっても固定液が萎えるので (固定効果が失活する) ので、目を放さないことが大切です)。

(5) 室温まで冷まします。

固定実質臓器の包埋と凍結

(1) 固定終了後、冷 PBS (4°C) で洗浄 (固定液を捨て (デカンタして)、およそ同量 (50 mL/サンプル) の PBS を注ぎ入れる)。

(2) 蔗糖浸漬:

10% 蔗糖-PBS: 15 分, 4°C

15% 蔗糖-PBS: 15 分, 4°C

20% 蔗糖-PBS: 60 分, 4°C

(3) 包埋直前に、少量 (例えば 35-mm 径培養皿を用いて) のクリオスタット用包埋剤 (例: サクラファインテック社ティッシュ・テック O.C.T. コンパウンド) に馴染ませます。

(4) 小さなガラスバイアルを型にして、アルミホイールの筒を作製し、(3) の試料を入れ、クリオスタット用包埋剤を試料が隠れる程度に入れ、サンプルが筒の底の中心にきていることを確認して (必要ならばピンセットで微調整する)、液体窒素中、またはドライアイス・アセトン液 (デュワー瓶の中でアセトンにドライアイスを加えたもの; 溶液作製時、ドライアイス少量ずつ加えないと、突沸するので注意) 中で凍結させます。凍結する際は、コンパウンドの高さと凍結液の高さをそろえて (あまり深く入れすぎて、急速に凍結させると、包埋した試料に亀裂が入ることがあります)、デュワー瓶の中で試料の入ったアルミホイールの筒をゆすりながら (凍結液と試料の入ったアルミホイール間で気泡が発生し、熱伝導が低下するため) 凍結させます (しばらくすると試料の周りで一過性に泡が立ちますので、それが落ち着けば、試料凍結が完了した目安となります)。

(5) クリオスタット切片を作製するまで、-80°C フリーザーに保存。

注: 未固定包埋試料を作製する際は、新鮮な試料に対して、すばやく (3) からの包埋過程を行います。

免疫染色の手順

(1) クリオスタット切片 (5- μ m 厚) の作製: 2% シラン (3-aminopropyltriethoxysilane) でコートしたスライドガラス、または 11~13 mm 径の丸カバースライドに切片を回収します。丸カバースリップに回収すると、24 穴マルチプレート内で免疫染色のブロッキングと PBS 洗浄の操作が行えます。その反面、ピンセットでカバースライドを割らないよう扱いに注意が必要です。

(2) 切片の風乾: 必要な枚数の切片が切り終わるまで、扇風機の微風程度で風乾させます。

(3) PBS 洗浄: 2 分 \times 3 回。1 回に 2 分間、冷 PBS に漬け、その後、PBS を捨て、新しい冷 PBS を加え漬ける操作を 3 回行う。

(4) ブロッキング: 1 次抗体を作製する間、次のブロッキング液に漬けておきます。室温で約 30~60 分。1% ウシアルブミン-5% (二次抗体由来動物種の) 正常血清-PBS-0.05% アジ化ナトリウム。ブロッキング液のストックを作製する際、防腐剤としてアジ化ナトリウムを入れておきます。

(5) 一次抗体反応: 37°C で 30 分間反応: 室温 (22°C) 反応の場合、2 時間程度、4°C 反応の場合は一晩 (8 時間以上) の反応が目安です。一次抗体、二次抗体ともにブロッキング液と同じ組成液で抗体を希釈します。

(6) PBS 洗浄: 2 分 \times 4 回。

(7) ブロッキング: 室温で 2 分~ (二次抗体を作製する間、漬けておいてよい)。

(8) 二次抗体反応: 37°C で 30 分間反応: 現在は、明るく退色しづらい蛍光試薬 (例: Invitrogen 社 Alexa Fluor 色素) が入手可能です。

(9) PBS 洗浄: 2 分 \times 3 回。

(10) DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)-PBS: 室温で 15 分染色。

ストック液は、5 mg/mL になるように DAPI を蒸留水で溶解後、100 mL ずつ分注して -80°C に保存し、使用するストック 1 本は 4°C、遮光保存しておきます。使用時にストック液を 2,500~5,000 倍に PBS で希釈して使用します。

(11) PBS 洗浄: 2 分 \times 5 回。

(12) 退色防止剤入り封入剤 (例: Invitrogen 社プロロングゴールド退色防止剤) で封入します。

(13) 可能ならば, 十分な退色効果を得るため, 一晚放置 (封入剤を十分硬化) させます。

蛍光免疫顕微鏡による観察と画像取得

ひと昔前は, 購入した長巻きの高感度白黒ロールフィルムをパトローネに詰め, 撮影, 現像を行っていたため非常に手間がかかり, また, たくさんの画像取得も難しい状況でした。現在は, 優れた蛍光試薬と高感度かつ高解像度の Charge Coupled Device (CCD) カメラによるデジタル画像取得が可能となっています。しかし, 蛍光免疫染色した標本の永久保存は難しいので (退色および劣化は起こりえます), 標本作製した後できる限りたくさんの画像の取得を行います。ハードディスクの容量もテラの時代が到来しており, 本人の努力次第で, 定量的画像解析を考慮に入れた十分なデータの取得が可能です。

(1) 低倍から高倍へと観察および画像取得を行います。

(2) 退色防止剤を使用していても退色は避けられません。最小限の観察 (照射) 時間にとどめ, 撮影部位を決め, 画像取得を優先します。画像の定量解析の場合, オートでなくマニュアル・モード (一定の露出時間) で撮影していきます。

(3) 必要な蛍光像のみだけでなく, 組織内のどこに目的とする分子が局在しているのか, 場所のオリエンテーションをつけるために, 微分干渉像 (または位相差像) と核染色 (DAPI または Hoechst 33342 など) も同じ視野で撮影しておきます (Fig. 2)。

(4) 画像解析ソフト (モレキュラーデバイス社 MetaMorph など) で様々な画像解析を行うことが可能です。

(5) データのバックアップ。ハードディスクだけでなく, DVD-R などにバックアップ, できれば同じものを2枚作成し保管しておきます。

Fig. 2 は, クリオスタット切片を用いたヒト満期胎盤組織の蛍光免疫染色像を示しています。CD31 は血管内皮細胞のマーカーとしてよく用いられます。胎盤組織における IIb 型 Fc γ 受容体 (FcRIIb) の局在は, CD31 で可視化された胎児血管内皮細胞に陽性であることがわかります。免疫抑制性に機能する FcRIIb は, 生体内の血管内皮細胞には発現しておらず, 通常, 免疫細胞に発現しています。FcRIIb が胎盤の胎児血管内皮細胞に発現していることは, 胎児・新生児の受動免疫を解明する上で大変興味深い所見です²。

謝辞: 研究遂行にご協力をいただいた竹下俊行教授 (日本医科大学産婦人科学講座), 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いたします。また, 本研究の一部は, 文部科学省科研費, 私学助成の補助を受けた。

文 献

1. Takizawa T, Robinson JM: Correlative microscopy of ultrathin cryosections in placental research. In *Methods in Molecular Medicine, Placental and Trophoblast: Methods and Protocols*, (Soares MJ, Hunt JS, eds), Vol. 121: 2006; pp 351-369, Humana Press, Totowa, NJ.
2. Mishima T, Kurasawa G, Ishikawa G, Mori M, Kawahigashi Y, Ishikawa T, Luo S-S, Takizawa T, Goto T, Matsubara S, Takeshita T, Robinson JM, Takizawa T: Endothelial Expression of Fc Gamma Receptor IIb in the Full-term Human Placenta. *Placenta* 2007; 28: 170-174.

(受付: 2009年3月4日)

(受理: 2009年3月18日)