

## 2. 組織細胞化学シリーズ (若手研究者へのヒント)

## 免疫電子顕微鏡法の基礎 (3)

小澤 一史 松崎 利行

日本医科大学大学院医学研究科生体制御形態科学

## 2. Histochemistry Series

## The Fundamentals of Immunoelectron Microscopy (3)

Hitoshi Ozawa and Toshiyuki Matsuzaki

Department of Anatomy and Neurobiology, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

## Abstract

Immunohistochemistry is concerned with the detection of specific biological substances at the light and electron microscopic levels with antibodies labeled with visible markers, such as horseradish peroxidase and colloidal gold. In particular, the immunohistochemistry of electron microscopy has provided much morphological and biological information. Immunoelectron microscopy can be classified into three methods, i.e., pre-embedding, postembedding, and nonembedding methods, on the basis of the step during which the immunoreaction is applied to the biological specimens. Each method has both advantages and disadvantages, so we should select the method according to the biological purpose. An overview of immunoelectron microscopy is given, and several electron micrographs using immunohistochemical techniques are shown.

(日本医科大学医学会雑誌 2009; 5: 215-220)

**Key words:** immunoelectron microscopy, pre-embedding method, nanogold method, post-embedding method, non-embedding method

## はじめに

ホルモンや神経伝達物質, その他の細胞や組織を構成する成分の局在を, 生命の重要な機能の一つである「免疫反応」, すなわち抗原と抗体の特異的な結合反応を利用してとらえ, これを目で確かめられるようにする(可視化)方法(図1)のうち, その反応を電子顕微鏡レベルで観察しようというのが, 免疫電子顕微鏡法 immunoelectron microscopy である。免疫電子顕

微鏡法は, 免疫細胞化学の反応をどの段階で行うかによって, 次の3つの方法に大別される。

- (1) 包埋前免疫反応法 Pre-embedding method
- (2) 包埋後免疫反応法 Post-embedding method
- (3) 無包埋免疫反応法 Non-embedding method  
(凍結超薄切片法 Cryo-ultramicrotomy)

これらの方法には, それぞれの長所と短所があり, それぞれの特徴を持っている。したがって, その特徴を理解した上で, 目的に応じた, 適当な方法を選択することが重要である。

Correspondence to Hitoshi Ozawa, Department of Anatomy and Neurobiology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan

E-mail: hozawa@nms.ac.jp

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

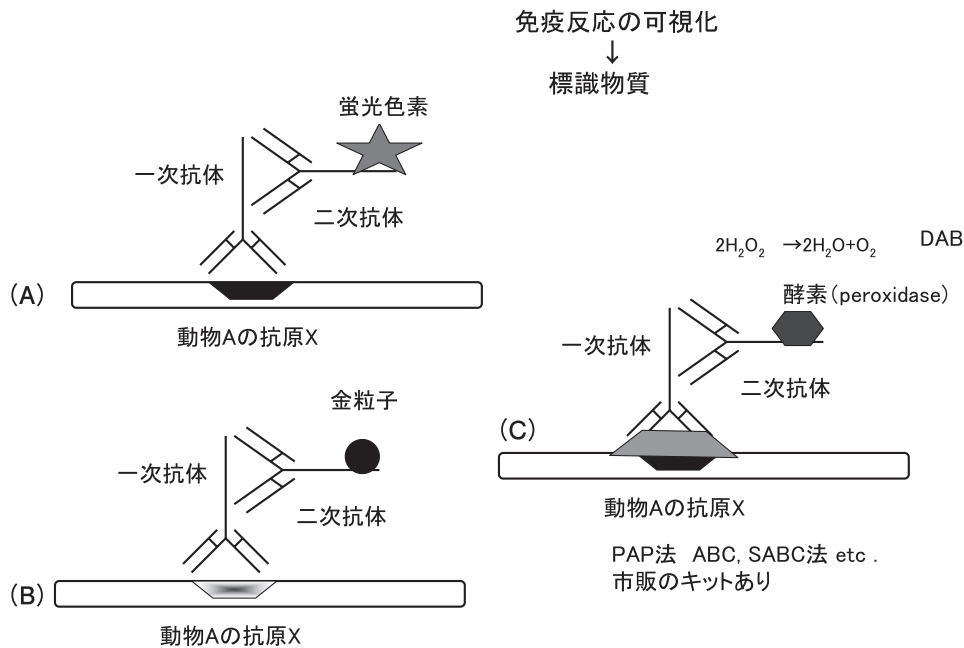


図1 免疫反応の可視化方法を示した模式図。このうち、電子顕微鏡レベルでは (B) の金コロイド標識、(C) の酵素反応沈殿物標識による可視化が一般的である。

包埋前反応法は小胞体、ゴルジ装置内腔などの小器官内の抗原もよく検出するが、逆に分泌果粒などの、本来、抗原密度が高いところがかえって染まりにくいということが生じることもある。包埋前反応法は、組織内、細胞内に抗体分子が浸透しやすいように、サポニン、Titon X-100などの界面活性剤で、膜に微小の孔を開ける操作をするために、時として自然状態では膜に包まれて存在する抗原が細胞基質中に漏れ出し、抗原が局限している場所以外の領域が反応してしまうようなことがある。すなわち、偽の陽性反応 (false positive) が起こる可能性があるが、試薬のうまい使い方で、この短所を抑え、非常によく抗原の局在を示すことができる。なお、界面活性剤の影響で、微細構造にやや乱れが生じ、包埋後反応法に比べると、超微細構造像が若干劣る傾向がある。

包埋後反応法は、通常の電子顕微鏡観察のための固定、包埋した材料を用いて、超薄切片作製の後に、その切片上で免疫反応を行うものである。この方法では、非常にきれいな超微細構造とともに免疫反応を得ることができるが、抗原によっては、通常の固定、特にグルタルアルデヒドやオスミウム酸によってかなり抗原性が失われ、あるべき反応が出ないという結果を示すこともある (false negative)。したがって、ホルムアルデヒドの単独、あるいはグルタルアルデヒドの濃度を下げ、ホルムアルデヒドの混合で補うなどの工夫が必要なことがある。この方法は、超薄切片上で免

疫反応を行うので、包埋剤の内部まで抗体が浸み込むことができず、切片の表面に表出している抗原のみが抗体と結合するので、反応感度の面では、免疫前抗体法に比べると劣る。例えば、ペプチドホルモン産生細胞や神経ペプチド産生ニューロンなどでは、当然、これらのペプチド分子が粗面小胞体やゴルジ装置の内腔に存在するはずであるが、これらの部分の反応はかなり低い。この欠点は、重合性のプラスチック樹脂包埋剤に変わり、LR Whiteなどの親水性包埋剤を用いることにより、ある程度改良することができるが、これらの樹脂は、オスミウム酸固定をした試料ではうまく重合ができないので、膜成分の描出に難点があり、像のコントラストが低下するといった欠点もある。一方、包埋後免疫反応法の利点的応用として、同一切片で2種類、3種類といった抗原に対する反応を同時に検出することができる。また、包埋前反応法と包埋後反応法の組み合わせによる多重標識もできる。

免疫細胞化学の感度と精度を上げ、かつ十分な超微細構造も保存する方法として、無包埋免疫反応がある。これは凍結切片法の免疫細胞化学への応用である。低濃度のグルタルアルデヒドで短時間固定した試料を瞬間凍結して、凍結超薄切片を作製する。この切片を用いて免疫細胞化学を行う。この場合、包埋していない試料で免疫反応を行うので、抗体は切片内部まで容易に浸透し、抗原のあるべき場所で十分な免疫反応が起こる。この反応後に、オスミウム酸固定を行い、

親水性の樹脂で軽く包埋することで、電子線に対する切片強度を高め、超微細構造の保存、特に単位膜 unit membrane の像が保たれ、明瞭に観察することができる。ただし、装置のセッティング、切片作製技術の習得に修練などの問題があり、汎用されるまでには至っていない。

### 免疫電子顕微鏡法の原理とポイント

免疫電子顕微鏡法は探索物質を抗体が探し出して、特異的に結合し、抗体に結合した標識物質（あるいは標識物質を介して生じた化学現象）を電子顕微鏡によって見出すということである。このために必要なステップは、以下のようなことである。

a) 局在を求める物質に対して特異的な1次抗体の準備

b) 組織あるいは細胞と1次抗体との反応

c) 1次抗体に対して特異的な2次抗体の反応。この場合に、2次抗体にはこの反応（まとめて免疫反応という）を可視化するための標識物質がついていることが必要

d) 上記の反応が終わった試料を電子顕微鏡で観察する。

免疫電子顕微鏡法を効率よく、的確に行うためには(1) 組織あるいは細胞内の抗原を保存すること、(2) よい抗体を使うこと、(3) 微細構造を十分に保つよう工夫することの3点が重要なポイントとなる。

抗体が目的抗原を正確に認識し、抗原のある場所を、微細構造の上で正確に同定することが免疫電子顕微鏡法のねらいである。したがって、抗原は抗体と反応しやすい状態、つまり、抗原が十分に保持されていることになっていることが重要なわけである。抗原をとらえる抗体は、十分に抗原と結合する力を有する、反応性のよい、高質の抗体であることが望まれる。一方、その反応した部位がよくわかるように構造が保持されなければならない。この抗原、抗体、構造といった3つの要素が常に揃うことが理想である。しかし、特に抗原性の保持と、微細構造の維持は相反する課題であり、一方を優先すると他方が好ましくない状態となる。結局、この妥協点をいかに求めるかが免疫電子顕微鏡法のもっとも難しい点である。

### 包埋前免疫反応法 pre-embedding method

電子顕微鏡観察試料作成の経過において、固定、脱水、包埋と進むにつれて抗原性の失活が起こる。した

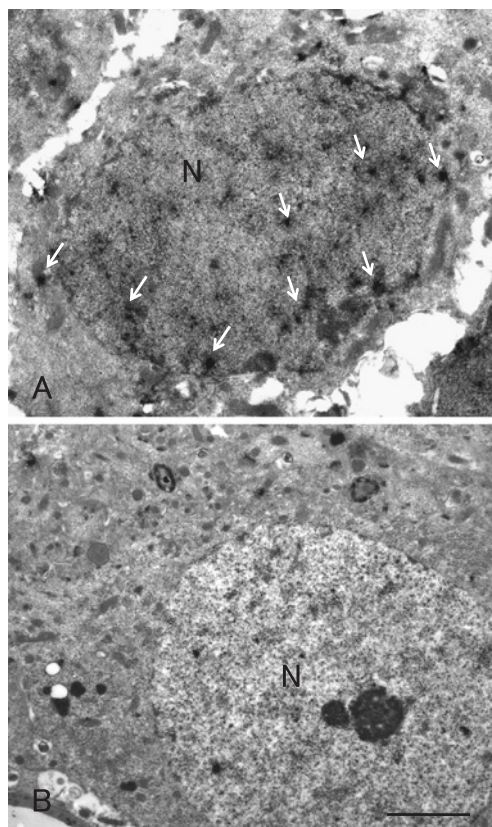


図2 (A) ラット海馬歯状回細胞におけるグルココルチコイド受容体の細胞内局在を包埋前免疫反応法で観察した電子顕微鏡像。矢印で示す、DAB反応の沈着物質が、歯状回細胞の核内に免疫反応として観察される。(B) 免疫反応コントロール群。(A)で観察されるDABの反応沈着物は観察されない。N; nucleus. Bar = 1 μm

がって、包埋する前に免疫染色を行う包埋前免疫反応法は、包埋後に免疫染色を行う包埋後免疫反応法に比べて、抗原性の保存がよく、免疫反応は良好であることが多い。また、オスミウム酸による後固定も行われ、微細構造の保持も比較的よい。ただ、抗体が高分子蛋白であるために組織への浸透が難しく、そのためにはサポニン、Triton 100-Xなどの界面活性剤を用いて、浸透を高める作業が必要である。この作業は、若干、細胞構造に影響を与えることがあるので、やや“粗い”像を観察することがある。また、場合によっては自然状態では膜に包まれて存在する抗原が細胞基質中に流れ出し、拡散による偽の免疫陽性反応 (false positive) が起こりやすい。このため、免疫反応産物が抗原の周囲に拡散して沈着することがあり、微小領域における局在検出には不向きの場合がある。しかし、試薬の使い方をうまくすれば、この短所を抑えて、非常によく抗原の局在を示すことができる。PAP法<sup>1</sup>やStreptoavidin-biotin法<sup>2</sup>を用い、diaminobenzidine



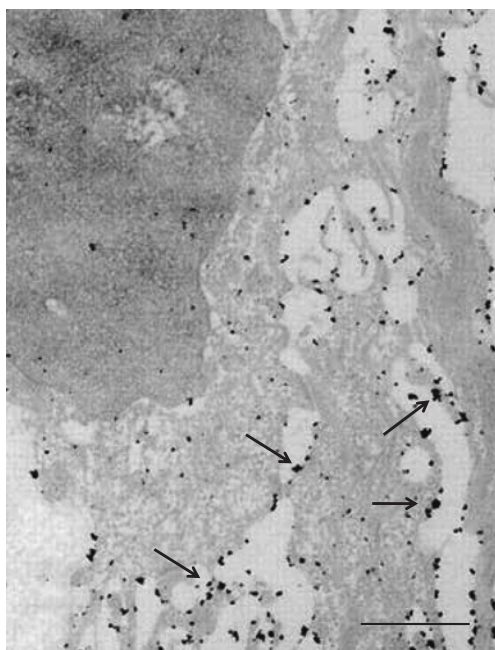


図3 ナノゴールド法（銀増感を行っている）によって同定された、皮膚における Aquaporin-3 (AQP3) の免疫反応（矢印）。Bar = 1  $\mu$ m

(DAB) の沈着標識によって可視化する酵素抗体法が、一般的に用いられる包埋前免疫反応法の可視化の方法である（図2）。

包埋前免疫反応法と包埋後免疫反応法の間的位置に置いて考えることができる方法が、直径1.4nmの金粒子を二次抗体に結合させて用いるナノゴールド Nanogold 法である。これは抗体に極小の金粒子をラベルし、これを方法的には包埋前反応法のステップで反応させ、さらに銀増感することによってコントラストを強め、明瞭にそのラベルを電子顕微鏡下で観察することができることを利用する方法である<sup>3</sup>。包埋前反応法の反応しやすさと包埋後反応法の明瞭な反応のラベリングを合体させた方法といえよう（図3）。

#### 包埋後免疫反応法 post-embedding method

包埋後免疫反応法は樹脂包埋後、超薄切片を作製し、その超薄切片上で免疫反応を行うものである。通常、コロイド金を標識物質として用いる（図4）。抗体の組み合わせ、コロイド金の大きさを変えることにより、二重、三重の免疫染色ができ、一度に複数の異なる抗原の探索もできる<sup>45</sup>。オスミウム酸を用いる固定を組み合わせることにより、膜構造がシャープに観察され、微細構造を美しく描出することもできる。また、切片処理の段階で、抗原の流出が起きにくく、偽の陽性反応 false positive が起きづらい。しかし、

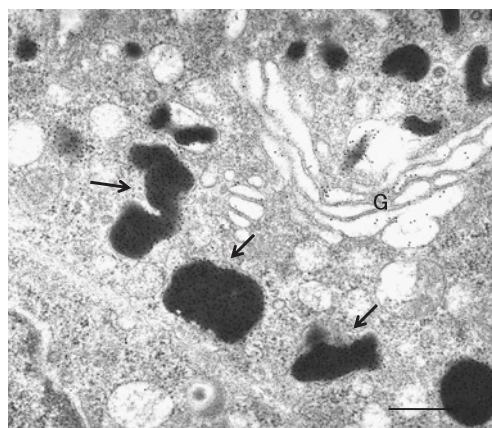


図4 包埋後免疫反応法によって観察した、ラット下垂体前葉プロラクチン (PRL) 細胞。矢印で示す顆粒に、免疫陽性反応を示す金粒子が多数観察される。G：ゴルジ装置 Bar = 1  $\mu$ m

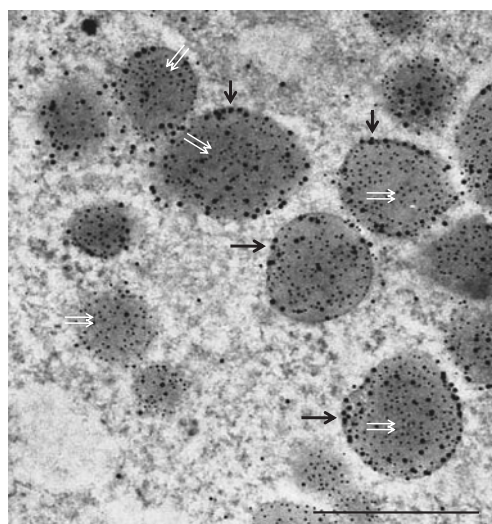


図5 LR White 包埋した試料を使って超薄切片を作製し、裏表を用いて、二重免疫組織化学を行った電顕像。5 nm の金粒子で標識されたプロラクチン (PRL) (白矢印) と 15 nm の金粒子で標識されたセクレトグラニン I (SgI) (黒矢印) が一つの分泌顆粒に共存している様子が観察される。特に、SgIは顆粒膜に沿って、PRLはその内部に存在する様子がわかる。Bar = 200 nm

オスミウム酸固定、脱水、包埋過程は抗原性を著しく失活させる。これらを防ぐために、特に抗原性の失活に影響を与えるオスミウム酸固定を除いて、グルタルアルデヒド単独、あるいはグルタルアルデヒドの濃度を下げて、パラホルムアルデヒドで補うなど、固定液の諸条件設定に工夫が必要な場合が多い。包埋後免疫反応法は、超薄切片上で反応させるため、切片の表面に表出している抗原のみが抗体と反応するので、どうしても免疫反応の感度が落ちるわけである。した

グリッドの両面を用いた二重免疫標識

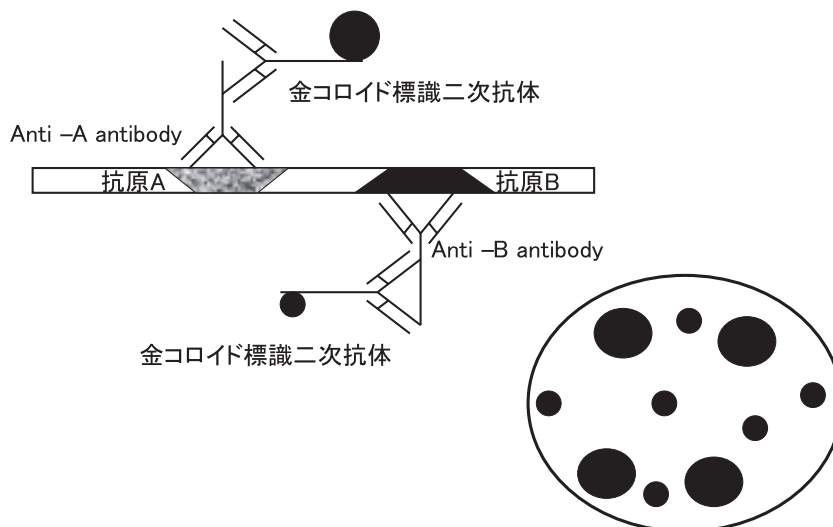


図6 グリッドの両面を用いて行う二重標識免疫電子顕微鏡法の模式図. 大きさの異なった金粒子を標識することによって, 別々の免疫反応を区別する.

がって, ホルモン分泌細胞の分泌顆粒や, 神経伝達物質を含む神経分泌小胞などに含有される密度の高い抗原を同定するような場合には, 非常によく微細構造と抗原同定が同時に得られるが, 抗原性の低い, びまん性に存在する物質の場合には, 本来あるべき反応が, 逆で出ないという偽の免疫陰性反応 false negative が生じることがある. 超薄切片上の抗原をより露出し, 反応性を高める目的で, 切片のエッチングが推奨される. これは, 電顕観察用グリッド (メッシュ) に採取した超薄切片を1~3%のメタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液, あるいは5~10%程度の過酸化水素溶液に反応させ, 抗原をより露出させる操作である. 包埋後免疫反応法の感度と精度を高めるために, 低温脱水, 親水性樹脂 (LR White, Lowicry K4M など) を用いた包埋を行うこともある<sup>6</sup> (図5, 6).

無包埋免疫反応法 Non-embedding method :

凍結超薄切片法

凍結超薄切片法は, 軽く固定した試料, あるいは無固定の試料を急速に凍結し, 包埋剤を用いずに専用の低温装置を付けた電顕用マイクロトームを用いて凍結超薄切片を作製し, その切片上で免疫反応を行うものであり, 微細構造の保持, 抗原性の保持ともに最も優れている. その反応過程から無包埋免疫反応法 Non-embedding method と呼ばれる. しかし, 専用機器が高額であること, 凍結超薄切片の作製が技術的に熟

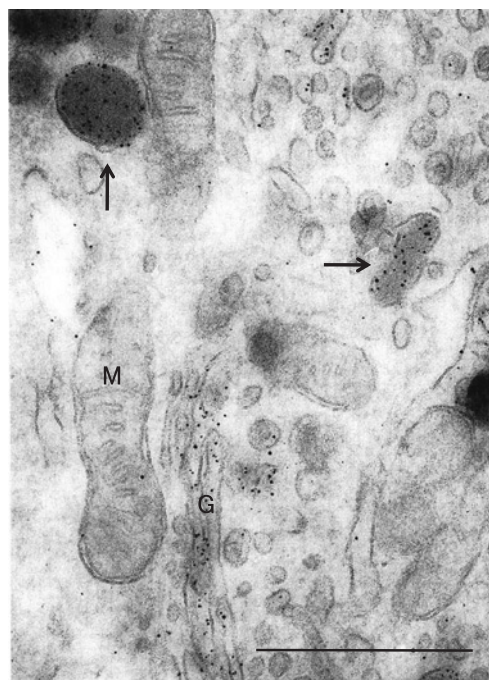


図7 凍結超薄切片を用いた下垂体前葉のプロラクチン細胞におけるプロラクチン免疫反応像. 分泌顆粒 (矢印) のみならずゴルジ装置 (G) 上にも反応が認められる. M;ミトコンドリア Bar = 500 nm

練を要すること, 観察範囲が限定されることなどから広く汎用されるとは言い難いが, 微少な抗原の同定には優れた力を発揮する. また, 免疫反応の終わった超薄切片をさらに樹脂包埋する方法により, コントラス

トのよい超微細構造も得られる (図7)<sup>7-9</sup>。

凍結超薄切片法では、固定も強固なものというよりも、軽い固定で十分に対応でき、筆者らは先に紹介したピクリン酸も加わった固定液 (4% パラフォルムアルデヒド-0.5~1% グルタルアルデヒド-0.2% ピクリン酸を含む0.1M リン酸緩衝液) で細切した試料を2時間ほど固定している。また、水分を多く含む組織や遊離細胞の場合には、固定後、ウシ血清アルブミン、ゼラチンなどの包埋すると、免疫反応にも影響を与えず、薄切も容易になることが多い。

#### おわりに

かつては免疫電子顕微鏡法は「名人芸」的な要素が強かったが、現在では、ごく普通の手技として応用されている。生命現象が生じる場において、しかも微細構造上で物質の発現をとらえるという意味で、非常に意味深い観察結果を与えてくれる。これらの手技をマスターすることにより、より多くの情報を得ることができるので、電子顕微鏡技術の中でも是非、身につけて頂きたい方法である。ただし、いろいろな成書や講習会を利用するだけでなく、正しい、効率的な技術を身につけるために、必ず熟練者の指導を直接受けることを強く勧める。今後、免疫電子顕微鏡法がより普及し、多くの研究者の研究発展に、生命科学の進展に貢献することを心から願う次第である。

#### 文 献

1. Steinberger LA: Immunocytochemistry. 1979; Wiley Medical Pub, New York.
2. Ozawa H, Miyachi M, Tsuchiya S, Morris JF, Kawata M: Annexin-1 (Lipocortin-1)-immunoreactivity in the folliculo-stellate cells of rat anterior pituitary: The effect of adrenalectomy and corticosterone treatment on its subcellular distribution. *J Neuroendocrinol* 2002; 14: 621-628.
3. Danscher G: Histochemical demonstration of heavy metals. *Histochemistry* 1981; 71: 1-16.
4. Roth J: The protein A-gold technique—a quantitative approach for antigen localization on thin sections. In *Techniques in immunocytochemistry*. Vol. 1. 1982; pp 108-133, Academic Press.
5. Roth J: The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. In *Techniques in immunocytochemistry*. Vol. 2. 1983; pp 218-284, Academic Press.
6. Ozawa H, Picart R, Barret A, Tougard C: Heterogeneity in the pattern of distribution of the specific hormonal product and secretogranins within the secretory granules of rat prolactin cells. *J Histochem Cytochem* 1994; 42: 1097-1107.
7. Tokuyasu KT: Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. *J Microscopy* 1986; 143: 139-149.
8. Tanaka S, Kurosumi K: Application of ultracyromicrotomy to immunocytochemical studies of subcellular localization of pituitary hormones. *J Clin Electron Microscopy* 1987; 20: 5-6.
9. Keller GA, Tokuyasu KT, Dutton AH, Singer SJ: An improved procedure for immunoelectron microscopy; ultrathin plastic embedding of immunolabeled frozen sections. *Proc Nat Acad Sci USA* 1984; 81: 5744-5747.

(受付: 2009年8月14日)

(受理: 2009年9月9日)