



Title	基本顕微構造解析法 I・II
Author(s)	井上, 芳郎; Inoue, Yoshiro
Citation	北海道大学大学院医学研究科 脳科学専攻 神経機能学講座・分子解剖学
Issue Date	2000
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/330
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	learning object
File Information	Taro12-metho.pdf



基本顕微構造解析法

- [1] 光学顕微鏡のための標本の作成法
- [2] 電子顕微鏡のための標本の作成法
- [3] 免疫組織化学染色法
- [4] その他特殊な染色法

大学院医学研究科 脳科学専攻
神経機能学講座・分子解剖学

< 基本顕微構造解析法の概説 >

生物の構造は視覚によって検索する。従って、肉眼から顕微鏡を使用するまで、構造を解析する細かさ（分解能）によって、解析法がことなる。

分解能：視覚による分解能は、現在では機械の精度があがり、もっと高くなっているが、理解しやすい数字としてあげる。

- 1) 肉眼で観察できる分解能 0.2 mm (1/1000m)
- 2) 光線顕微鏡で観察できる分解能 0.2 μ m (1/1000mm)
- 3) 電子顕微鏡で観察できる分解能 0.2 nm (1/1000 μ m)
- 4) 原子間力顕微鏡

本コースでは中枢神経系を対象とした、光線顕微鏡（一般的な光学顕微鏡）及び電子顕微鏡による解析法を学ぶが、一般の組織にも十分応用できる。

< 一般目標 >

- 1) 動物の脳・脊髄の光学顕微鏡用の標本及び電子顕微鏡用の標本の作成法を修得する。
- 2) 可視光線による光学顕微鏡及び電子顕微鏡の使用法を修得する。
- 3) 脳脊髄を含めて、主もな組織に対する特殊な染色法を理解する。

< 行動目標 >

- 1) 動物の組織を目的の応じて固定し、摘出し、包埋する事が出来る（無固定・凍結法を含む）。
 - 2) 様々なタイプの光学顕微鏡用切片を目的に応じて作成出来るか、又は作成法を説明できる。
 - 3) 様々なタイプの光学顕微鏡用の染色（化学染料を使用した方法）を目的に応じて行うことが出来る。
 - 4) エポン樹脂を使用した電子顕微鏡切片を作成できるか、又は作成法を説明できる。
 - 5) 光学顕微鏡を正確に使用し、写真などによる資料を作ることができる。
 - 6) 電子顕微鏡を正確に使用し、写真などによる資料を作ることができる。
 - 7) 基本的な細胞の構造、細胞小器官、組織については上皮組織、筋組織、結合組織、神経組織の概略を説明できる。
- 5) 6) 7) については研究に入った時点で説明する。

[1] 光学顕微鏡のための標本の作成法

光学顕微鏡で観察するためには組織を薄切する事が不可欠である。そのために以下の方法がある。

- 1) 組織を凍結してミクロト - ムで薄切して観察する。
 - 2) 組織を凍結しないでそのまま薄切して観察する。
 - 3) 組織をパラフィンに包埋してミクロト - ムで薄切して観察する。
 - 4) 組織をセロイジンに包埋して薄切して観察する。
 - 5) 組織を樹脂に包埋して薄切して観察する。
- (特殊な方法としては培養細胞を観察、血液などmp塗抹標本を観察する、等がある。)

参考文献：佐野 豊著：「組織学研究法」南山堂 1965

(組織学の試料作成法の教科書として、代表的な名著)

1 組織を凍結してミクロト - ムで薄切する。

1) 組織の処理法

- (1) 無処置で凍結させる。
- (2) 固定した後、凍結させる。固定法は2)を参照。

凍結切片の最大の難点は凍結によって組織の中に氷の結晶が出来て、組織の構造を破壊することである。そのために結晶が出来ないように処置をすることが多い。

- ・氷結防止として固定した組織塊を30%グルコ - ス液に底に沈むまで浸漬する。

2) 凍結法

急速に凍結する必要があるが、光顕レベルでは、以下の方法が用いられる。

- (1) ドライアイス粉末状にしてその中に取り出した組織を入れて凍結する。
- (2) ドライアスをアセトンにいれて、-80度位の冷剤をつくり、その中に金属棒などを入れて冷やし、その上に組織を載せて凍結する。或いは、イソプロピルアルコールを入れた容器を入れて冷やし、冷えたらその中に組織を落とす。冷剤に直接入れることはない。
- (3) ドライアイス・アセトン冷剤の代わりに液体窒素を使用しても良いが、光顕レベルではその必要は少ない。液体窒素を使った電顕用の急速凍結装置はある(写真参照)。
- (4) 凍結用のスプレーを吹きかけて、急冷凍結する。
- (5) 脳の鍍銀法などでは凍結切片用のミクロト - ムの凍結組織台の上に、組織を載せて、凍結させたり、クリオスタットの凍結台の上で凍結させてから切る方法もある。

3) 切片作成法

- (1) クリオスタットで薄切する。切片はミクロト - ムのある冷凍庫内でスライドガラスに張り付ける。

クリオスタットは冷凍庫の中にミクロト - ムを入れて切る装置で、中央研究部超微形態

部門、分子解剖学分野、生体構造解析学分野等にあり、使用を開放している。

(2) 凍結切片用マイクロームで薄切する。

電気による冷却凍結装置をユング型のマイクロームに装着して室温で薄切する。この装置は分子解剖学分野で使用できる。切片は染色の目的に応じて蒸留水等に蓄える。

また、炭酸ガスボンベからのガスを噴射することで組織台を冷却して薄切する(ザルトリウス型マイクローム)。

ライカ製クリオスタット



中央研究部、生体構造解析学分野 所蔵

クリオスタット(ブライト社) 分子解剖学分野 所蔵

急速組織凍結装置 分子解剖学分野 所蔵



電気凍結マイクローム 分子解剖学分野所蔵
(electric freeze microtome)



2 組織を凍結しないでそのまま薄切する方法

無固定もしくは固定してマイクロスライサー (Dosaka 日本製)、ビブラトーム (Oxford 英国製)、Leica VT1000S (ドイツ製) を使って切る。神経細胞を *in vivo* で標識したあとで観察する方法としてよく使用される。ナイフとしてはカミソリの刃を使用する。一般にはフェザーの鋼性両刃 (青刃) を折って使用する。

固定すれば、10 μ m 厚の切片の作成も可能である。

< 使用目的 >

- ・免疫組織化学 (光顕レベル) で使用される。
- ・免疫電顕の pre-embedding 法で使用される。
- ・脳脊髄の電子顕微鏡包埋の時に、0.8mm 位の厚みの連続的に包埋する時に使われる。
- ・脳脊髄のスライス標本を用いた生理学・薬理学的な研究に使用される。
- ・逆行性、順行性に標識されたニューロンを観察するとき、その標本を電子顕微鏡資料に作製するとき使用される。

Microslicer 2000 (Dosaka 堂阪製)

分子解剖学分野 所蔵



LeicaVT2000S

生体構造解析学分野 所蔵



3 組織をパラフィンに包埋してミクロト - ムで薄切する方法。

手順は以下の通りである。

- 1)組織の固定 fixation
- 2)組織の脱水 dehydration
- 3)組織の透徹 cleaning
- 4)組織のパラフィン浸透 infiltration
- 5)組織のパラフィン包埋 embedding
- 6)パラフィン切片の作成法 sectioning

1) 組織の固定：灌流固定

マウスを深くエ - テルで麻酔して、開胸し、右心房を切開して灌流液の排出口をつくる。左心室から固定液を注入する。針はツベルクリン針を用い、ペリスタポンプを使って灌流する。成熟マウスではポンプは最初血液が洗い流されるまで最高目盛、その後中間目盛で50cc 位注入する。幼若のものはその大きさの程度に応じて適切にやる。抜脳後同じ固定液で浸漬固定する。通常は一晩(overnight と言う)。

「Tissue-Teck」のケ - スを使用すると包埋まで資料の流失を防げる。

2) 組織の脱水(時間は組織の大きさによる)

目的に応じて脳脊髄を切り出す。

良く振盪することが肝要である。「Tissue-Teck」のケ - スごとアルコールの容器に入れ。て組織の水分をアルコールに置換する。組織片が小さいときは時間を短くして良い。

70%エチルアルコール - - - 12時間位(小指大くらいの大きさの時の目安)

80%エチルアルコール - - - 12時間位

90%エチルアルコール - - - 12時間位

95%エチルアルコール - - - 12時間位

100%エチルアルコール - - 24時間位(3回代える)

脱水の時、アルコールの温度を36 くらいに保つヒトもいる。



脱水用のアルコール壺と
36 恒温槽

3) 組織の透徹(時間は組織の大きさによる)

脱水用のアルコールを除去し、キシロールに置換する。

キシロ - ル(xylol or xylene) - - 6 時間位(3 回代える)

* その他の透徹剤(benzol, テレピン油など)もあるから、キシロールで巧くいかない時に方法の本を読んで検討する。

4) 組織のパラフィン浸透を使用する。

キシロールを除去して、パラフィンを組織に浸透する行程である。

下に挙げた時間は目安で、浸透の時間は組織の大きさによる。

(1)キシロ - ル(1)+パラフィン(1)の混合液 - - 40° C、一晩

キシロ - ル - パラフィン混合液用の専用オ - ブンを使用すること。

(2)パラフィン - - 3 時間(組織が大きいとき真空オ - ブンを使用する事がある)

(3)パラフィン - - 3 時間(組織が大きいとき真空オ - ブンを使用する事がある)

(4)パラフィン - - 3 時間(組織が大きいとき真空オ - ブンを使用する事がある)

*パラフィン:

パラフィンは融点が低いものを軟パラフィン、温度が上がるにつれて硬パラフィンと呼ぶ。好みに応じて適当な温度のパラフィンを使用してきたが、現在はパラフィンにプラスチックを混ぜた包埋剤(パラポラスト、ヒストセックなど)が一般に使用される。これを大きな容器に融かしておき、浸透用のパラフィン、パラフィン、パラフィンの系列と包埋用パラフィンを別容器に作る。パラフィン用の恒温器(60 位)内で処理する。パラフィン恒温器は防爆のものが望ましい。

5) 組織のパラフィン包埋

包埋用パラフィンで包埋する。専用のステンレススチールの容器に包埋する。

60 以上にしたステンレススチールの容器に包埋用のパラフィンを注ぎ、その中に方向性を考えて組織片を沈める。急速に冷たい水あるいは冷凍庫で冷やした金属板で冷却する。冷蔵庫に保存する。1 晩、冷蔵庫で十分冷却すると容易に取り出せる。



包埋用のステンレススチール皿と包埋用の組織かご(TissueTick)

<分子解剖学 所蔵のパラフィン包埋装置>

上) キシロール・パラフィン浸透用 オープン (約 40)

真空オープン (パラフィン包埋用 60)



エポン硬化用オープン (60)



パラフィン包埋用オープン (60)
融かしたパラフィンを保存する。

6) パラフィン切片の作成法

<パラフィン切片を作成する手順>

- (1) スライドガラスの用意
- (2) 切片の薄切
- (3) 切片の貼付

(1) スライドガラスの用意 (クリオスタット切片を作成するときの準備と同じである)
一般には新しいスライドガラスは洗う必要はない。

一般的には切片を接着させるものを塗布する。

- 1) 卵白グリセリンを塗付する方法
 - 2) ゼラチンを塗付する方法
 - 3) 卵白アルブミンを塗付する方法
 - 4) オルガノシランを塗布する方法
- がある。目的に応じて使用する。

* 卵白グリセリンの作り方。

卵を割って卵白のみを取り出す。良くかき混ぜて泡を立て、10枚重ねのガゼでこす。等量のグリセリンを加えて良くかき混ぜて冷蔵庫に小分けして保存する。切る度毎に小指につけてスライドガラス上に薄く延ばす。

* ゼラチンスライドの作り方。

200ccの蒸留水に5gmのゼラチンを入れ、温浴50でスタラで攪拌して溶かし、0.5gmのクロム明礬を加えて溶かし、蒸留水を加えて全量1000ccにします。室温に冷却した後濾過する。洗剤でよく洗ったスライドガラスを枠に入れ、蒸留水で更に洗浄して乾かないうちにゼラチン液に10分ほど入れ、40の孵卵器にて1昼夜乾燥させる。スライドケースに移して保存する。

* 卵白アルブミンスライドの作り方

卵1個を割って卵白のみを取り出す。蒸留水500ccに入れて攪拌器(スタラ)で良く混ぜあわせながらアンモニア原液を1cc加える。濾紙で濾して卵白アルブミン液を作る。洗剤でよく洗ったスライドガラスを枠に入れ、蒸留水で更に洗浄して乾かないうちに卵白アルブミン液に10分ほど入れ、40の孵卵器にて1昼夜乾燥させる。スライドケースに移して保存する。

* オルガノシラン - スライドの作り方

in situ hybridization 法や剥がれやすい切片の時に利用

【準備】

- 1) スライドガラスを洗浄し、乾燥する。
- 2) オルガノシラン (3-Aminopropyl-triethoxysilane) 40ml を Aceton で 1000ml に稀釈する (4% オルガノシラン)。

ることが大切である。

スライドに貼った切片は標本箱に保存し、埃が付かないよう保存する。



ライカ回転式マイクロームとパラフィン伸展槽

ライカ滑走式マイクロームと
パラフィン伸展槽



ユング型マイクローム

* 以上の機器は分子解剖学分野、生体構造解析学分野に常備している。

(1) パラフィン切片の染色法

手順

- 1) 脱パラフィン
- 2) 染色
- 3) 脱水・透徹・封入



< 脱パラフィン用のガラス壺・アルコール系列とキシロール >

1) 脱パラフィン

まず、パラフィンを取除く。

即ち、パラフィン包埋の逆の手順である。

時間は大まかな基準である。

キシロ - ル	5 分	キシロ - ル	5 分
100%エタノ - ル	5 分	100%エタノ - ル	5 分
95%エタノ - ル	5 分	90%エタノ - ル	5 分
80%エタノ - ル	5 分	70%エタノ - ル	5 分
蒸留水	5 分		

2)染色

詳細は染色法を参照。

神経組織における基本的な染色法

- 1.ヘマトキシリン・エオシン染色
- 2.ニッスル染色(トルイジン青染色)
- 3.クリュバ・パレラ染色(Kruver-Barrera 染色)
- 4.免疫組織化学染色

3)脱水・透徹・封入

脱パラフィンの逆の手順である。

蒸留水	5 分位
70%エタノ - ル	5 分位
80%エタノ - ル	5 分位
90%エタノ - ル	5 分位
95%エタノ - ル	5 分位
100%エタノ - ル	5 分位
100%エタノ - ル	5 分位
キシロ - ル	5 分位
キシロ - ル	5 分位

カバ - ガラスをかけてエンテラン・ニュー - で封入。

カバ - ガラスに封入剤がつかないようにする。

染色用のガラス壺と脱水用のアルコール系列が入ったガラス壺



(4)染色法

1.ヘマトキシリン・エオシン染色(H-E 染色)：最も一般的な二重染色法

Mayer's hematoxylin 液(市販されている) - - 5分

水道の流水に 30分

蒸留水で洗淨

1% eosin 水溶液 - - 染色状態に応じて時間を変える(一般には 1-2分)。

(エオシンがよく染まらないときはエオシンに酢酸を 1滴加える。)

蒸留水で eosin を落として脱水、透徹、封入する。

70%-80%アルコールでエオシンは急速に脱色する。早めに濃度の高いアルコールへ移す。

2.ニッスル染色(トルイジン青染色)：神経細胞の染色法

1% toluidine blue 水溶液 - - 5分

蒸留水で洗淨

脱水、透徹、封入する。

70%-80%アルコールで急速に脱色する。早めに濃度の高いアルコールへ移す。

3.クリュバ・バレラ染色(Kruver-Barrera 染色)：神経細胞と髄鞘の二重染色法

脱パラフィン 95% アルコ - ルで止める。

luxol fast blue 液に浸漬して 56 で overnight する。

室温に戻して、95% アルコ - ルに入れる。

蒸留水中で軽く洗って 0.05% 炭酸リチウム水溶液に入れて脱色(『分別』とも言う)する。

10-20 秒(時間はその時により、もっと長くなる事もある)。

さらに 70% アルコ - ルに入れて脱色する。 と の操作で髄鞘のみ青く染る。他は無色になる。落とし過ぎないように注意して、蒸留水に入れて脱色を止める。もし不十分であれば と を繰り返す。蒸留水で十分洗淨する。

0.1% クレシルエヒト紫液(トルイジン青染色や H-E 染色でもよい)でニッスル染色をする。37 で 5-6分。

95% アルコ - ルを数回通して脱色する。

100% アルコ - ルで完全に脱水し、透徹、封入する。

* ニッスル染色の代わりにヘマトキシリン・エオシン染色や P A S 染色をしても良い。

* ルクソ - ルファスト青液の作り方：

luxol fast blue----- 1gm

95% ethyl alcohol-----1000cc

10% 酢酸(acetic acid)--- 5cc

1年以上使用できる。

* クレシルエヒト紫液の作り方

cresylecht violet(Chroma 製が良い)---0.1%水溶液を作っておく。

使用時に 0.1% クレシルエヒト紫液 30cc に 10% 酢酸水溶液を 5 滴加えて濾過する。この液はあまり長持ちしない。

*大型マイクローム（テトランダー型マイクロームとライツ型滑走マイクローム）
いずれも大きな脳（ヒトやサル、ネコなどの）の切片を作るときに使用される。
いずれも分子解剖学分野で所蔵している。

テトランダー型大型マイクローム(人脳のパラフィンブロックがのっている。)



ライツ型大型滑走マイクローム



4 セロイジンに包埋してミクロトームで薄切する。

大きい組織の連続切片を作成するときに使用される。特に、脳の連続切片にはよく使用されるが、薄い切片を作成することは難しく、30-50 μm 位の切片で資料を作成する。セロイジンはセルロース様の物質でエーテル・アルコールの等量溶液に溶かして使用する。市販名はセデュコール（メルク社製）である。火気は厳禁である。

手順

- 1)組織の固定
- 2)組織の脱水
- 3)組織の置換
- 4)組織のセロイジン浸透
- 5)組織のセロイジン包埋

(1) セロイジン包埋法

1)組織の固定

パラフィン包埋法と同じである。

*脱灰：骨を含むときには EDTA 溶液（市販している）で脱灰を行う。

2)組織の脱水(時間は組織の大きさによる)

良く振盪することが肝要である。網ケ - ス（Tissue-Teck のケ - ス）を使用すると包埋まで資料の流失を防げる。ケースごとアルコールの容器に入れる。

マウスの脳では：

70%エチルアルコール - - - 12 時間位

80%エチルアルコール - - - 12 時間位

90%エチルアルコール - - - 12 時間位

95%エチルアルコール - - - 12 時間位

100%エチルアルコール - - 24 時間位(3 回代える)

大きい脳（人脳、サル、ネコなどの脳）では大きさに応じて 3 日、5 日と長くする。

3)組織のセロイジン浸透

エーテル・アルコール（1：1）に浸漬 1 日くらい

2 %セロイジン 1 週間

4 %セロイジン 1 週間

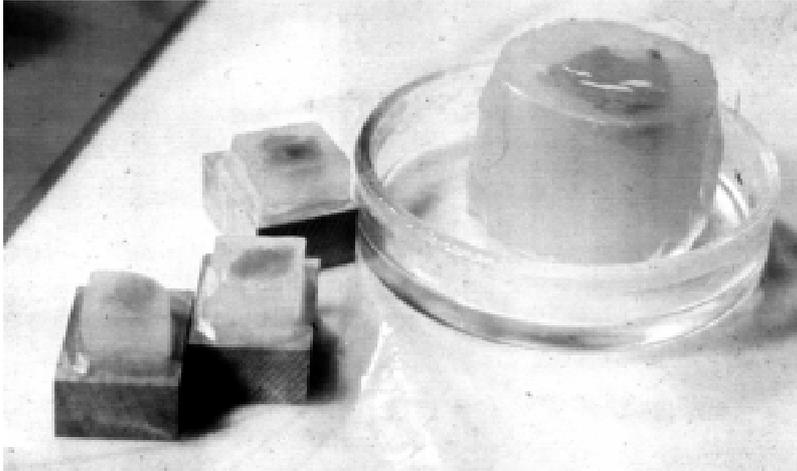
8 %セロイジン 1 週間

大きい脳（人脳、サル、ネコなどの脳）では大きさに応じて 3 日、5 日と長くする。

4)セロイジン硬化：

容器のなかに 8%セロイジンを入れ、その中に組織塊を沈め、デシケーター内で徐々に自

然とエーテルアルコールを揮発させ、堅くなったら、その後クロロフォルムガスで硬化する。時間は組織の大きさによる。



セロイジンブロック（右）とパラフィンブロック（左）

5)組織の保存

容器毎あるはセロイジンを容器から切り出して、70%アルコールに入れておく。

(2)セロイジン切片の薄切

手順

- 1)セロイジン包埋した組織をブロック台に固定する。
- 2)セロイジン切片の薄切とナンバーリング
- 3)セロイジン切片の保存

1)セロイジン包埋した組織をブロック台に固定

- a.包埋するときにブロック台に付けて包埋する。
- b.ブロック台（エポナイトが望ましい、木はだめ）にアロンアルファーで接着する。パラフィン包埋などで使用した Tissue-Tec のプラスチック籠を利用することもできる。

2)セロイジン切片の薄切とナンバーリング

- a.滑走型マイクロトームを使用する。大型のマイクロトームが望ましい。
- b.刷毛で常に70%アルコールでブロックを浸しながら、マイクロトームの上で切片を伸ばして切る。大体30 μ m位からもっと厚い切片を連続的に作る。
- c.切片の大きさより一回り大きい和紙片を作り、一定の方向に切片を1枚ずつ和紙片に張り付けて、70%アルコールに蓄える。
- d.切り終わったらそのまま蓄えてもいいし、和紙から1枚ずつ剥がして、墨で余白のセロイジンのところに番号をふる。セロイジンが乾きかけた時を見計らって細筆で番号をふる。

3)セロイジン切片の保存

番号をふった切片はそのまま70%アルコールの中に蓄えて必要の応じて染める。この

時に染色法を考えて、奇数と偶数に分けて蓄える等工夫する必要がある。

(2) セロイジン切片の染色法

*ヘマトキシリン・エオシン染色

マイヤーのヘマトキシリンを10倍ほど(セロイジンに色が付かない濃度を経験的に決める)に希釈し、染めたい切片を浸漬しておく。パラフィン切片を染める時の濃度のヘマトキシリンを使用するとセロイジンが濃染して見苦しくなる。

自分の日程に合わせて切片を水洗、色出しをし、1%エオシン液に浸漬し(5分くらい)70%アルコールで脱色分別して95%アルコールへいれ以下の要領で脱水・封入する。

1. 切片を70%アルコールに蓄える。

2. 95%アルコールに移す。

3. 100%アルコールにすばやく通す。

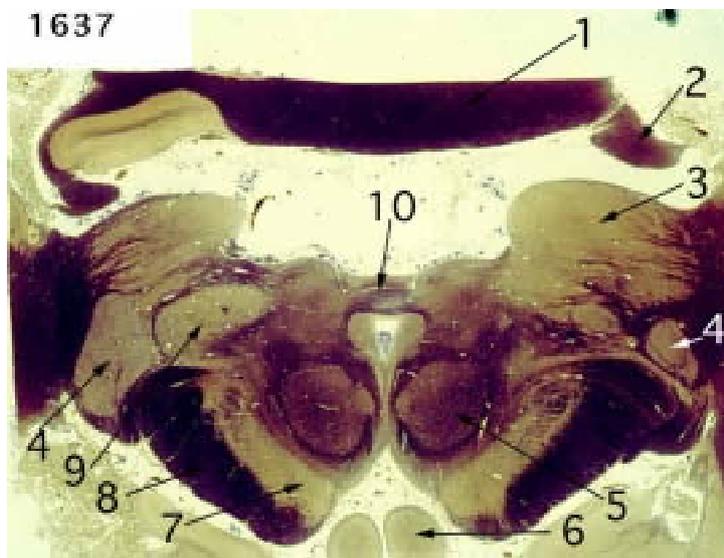
もたもたしているとセロイジンが溶けてしまう。

4. キシロ-ル+アルコール1:1にさっと通す。

5. キシロ-ルに2回入れる。

切片は白くなってはいけない。

6. キシロ-ルを出来るだけきってエンテラン-ニューウに封入する。



セロイジン切片(連続切片1637枚目、ヒト中脳上丘・間脳境界部、髄鞘染色)

[2] 電子顕微鏡のための標本作成法

エポン樹脂 (epon 812 or quetol 812) に包埋してガラスナイフやダイヤモンドナイフで切ることで薄い切片を作成することが可能であり、電子顕微鏡用切片 (超薄切片) だけでなく、光学顕微鏡的にも解像度の高い資料 (準超薄切片) が得られる利点がある。

参考文献：

永野俊雄監訳：「透過電子顕微鏡生物試料作成ハンドブック」丸善、東京

原本：Hayat MA, "Basic techniques for transmission electron microscopy" Academic Press 1986

手順：

- 1)組織の固定 fixation
- 2)組織の脱水 dehydration
- 3)組織の置換 replacement
- 4)組織の樹脂の浸透 infiltration
- 5)組織の樹脂包埋 embedding

(樹脂としてはエポン 812 が一般的であるが、生産の関係もあり、他の樹脂で代替えることが多い)

1 組織の固定

1) 灌流固定

4%paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer(またはさらに 0.5%glutaraldehyde を加える)で灌流固定する。抜脳後同じ固定液に浸漬する。時間は case by case であるが、overnight が一般的である。その後、osmic acid 後固定するために細説する。ブロックの大きさは小さい程良いが神経組織の様に部位が重要な意味をもつときは面積を広く、厚さを薄く (0.5mm から 0.8mm 位)する。マイクロスライサーを使用すると良い。あまり薄いと固定は良いがぼろぼろに壊れてしまい部位が分からなくなるし、又、厚いと次のオスミウム酸後固定では大きいと固定されない (せいぜい表面から 1mm 位までしか固定されない)。

目的に応じて、2.5%glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer 液やその他の緩衝液を用いた固定液が使用される。灌流固定しないで、臓器を直ぐ取り出して固定液内で細切 (1mm 角以内)して固定することもあるが、神経系では出来ない。

固定液の作り方

8%paraformaldehyde 水溶液を作る。

重量比で 8%になるように paraformaldehyde を蒸留水に混ぜ (ここでは溶けない) 60-70 位のお湯で湯煎してスタ - ラを回転させて溶かす。30 分以上かけても溶けない時は、1 規定位の NaOH 水溶液をゆっくり 1 滴ずつ滴下して透明になるまで入れる (通常、1,2 滴で溶ける)。冷蔵庫内で長期間保存できる。

0.2M phosphate buffer を 2 リットル作成する。冷蔵庫内で比較的長期間保存できる。
約 1.5 リットルの蒸留水を容器に入れておく。

Na₂HPO₄ · 12H₂O-----116.0gm NaH₂PO₄ · 2H₂O-----11.84gm

を入れ、溶かした後 2 リットルにする。

pH の調整は必要に応じて 0.2M の Na₂HPO₄ · 12H₂O(酸性側の時)と NaH₂PO₄ · 2H₂O
(アルカリ側の時)を作っておき調整する。

この 2 つの液を 1 : 1 の割合で混じて 4%paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer を
作る。

固定から以下の操作は「ペニシリン瓶」を容器にして、液量は 4cc を基準として使用する。
る。

2) オスミウム酸後固定

上記の固定が終了したら、リン酸緩衝液でアルデヒドを洗い落としす。3 度ほど液をか
えて 1 時間くらいで洗う。

1% osmic acid in 0.1M phosphate buffer にて後固定する(2 時間から 1 晩)。オスミウム酸
は猛烈な粘膜刺激性があるから吸込まないようにする事。気管支炎、角膜上皮の剥離を起
こすので、操作は必ずドラフトの中で操作する。

オスミウム酸は高価であり、また、有毒性が高いので出来るだけ少量で固定する。一般
にはペニシリンビンを使用して、1 ビン 4cc 以下が基準である。

固定液の作り方

2%osmic acid 水溶液を用意する。アンプルに入ったオスミウム酸をアンプルを割って
ガラスごと、よく洗浄したビンにいれた蒸留水に溶かす。アンプルもきれいに洗浄する
必要がある。指紋などつけないように注意する。乱暴に溶かすとガラス片が出て使用で
きなくなるので 1 週間くらい冷蔵庫内でゆっくり溶かす。

先の 0.2M phosphate buffer に 1 : 1 に溶かして 1% osmic acid in 0.1M phosphate buffer
を作る。

2) 脱水(時間は組織の大きさによる)

洗浄することなくアルコール脱水に入る。

50%エタノール 5分 - 70%エタノール 5分 -

80%エタノール 5分 - 90%エタノール 5分 -

95%エタノール 5分 -

100%エタノール (マイクロシュ - プで完全脱水したアルコ - ル) 5分 -

100%エタノール 5分 -

100%エタノール 5分 -

3) 置換(パラフィン包埋の時の透徹に相当する) - - 30 分が目安。

QY-1 で置換する。3 回液を替える。匂いの強い有機溶媒であるので必ずドラフトの中
で行う。

QY-1() 10分 - QY-1() 10分 -
QY-1() 10分 -

4) 包埋

エポン樹脂に包埋する。

樹脂の処方は次頁にある。

(1) QY-1 + エポン樹脂(1:1)60分 - over night (一晩) してよい

(2) エポン樹脂() 60分 エポン樹脂() 60分

エポン樹脂を浸透させるために、37-40 に電球で暖める。

50 を越えると急速に硬化するから注意を要する。

(3) エポン樹脂に包埋(60 24-48 時間)

目的に応じて、シリコン平板包埋、ゼラチンカプセル、ポリカプセルを使用する。

専用の乾燥したオ - プンを使用する。

出来れば、標本の内容を紙片に鉛筆で書き込み一緒に包埋する。

重合中のオ - プンに水蒸気を発生するものを入れてはならない。

乾燥したところで保存する。

* 緩衝液の作り方

(1) 0.1mol 燐酸緩衝液 phosphate buffer(P B、pH7.4)の作り方

20 リットル作成する。

約 15 リットルの蒸留水を容器に入れておく。

Na₂HPO₄· 12H₂O-----580.0gm NaH₂PO₄· 2H₂O-----59.2gm

を入れ、溶かした後 20 リットルにする。

pH の調整は必要に応じて 0.1M の Na₂HPO₄· 12H₂O(酸性側の時)と NaH₂PO₄· 2H₂O(アルカリ側の時)を作っておき調整する。

* P B S の時、NaCl を 170gm 入れる。

(2) Millonig's Buffer の作り方

A,B,C 液を作る。

A:NaH₂PO₄· 2H₂O(2.26%)-----2000ml

B:NaOH(2.25%)----- 500ml

C:glucose(5.4%)----- 200ml

それを次の式に合せて D 液を作り

D=A(1660ml)+B(340ml)

最終的に緩衝液に調合する。

*Buffer(2000ml)=D(1800ml)+C(200ml)

* エポキシ樹脂の処方

注意 1 :

Laft(日本では串田)が初めて発表した時、Epon812、MNA、DDSA 3つの樹脂を処方して、A樹脂とB樹脂を作って、A Bの両樹脂の混合比で樹脂の硬度を決めた。それを重量成分に換算したのが次の表である。比重の重い順に静に充填して行くと層に別れる。硬化剤を入れてすばやくかつ十分にかき混ぜる。スタ - ラ - をつかっても良い。その時は気泡が発生するからこれを真空ポンプで除く。かき混ぜる事を怠ると重合むらができる。また、乾燥している日が実験日として望ましい。

最初の方法ではエポキシ樹脂(エポキシ樹脂)は Epon812 であるが、Quetol812 や Poly/Bed812 などの代替品がある。いずれも同じように使用できる包埋剤である。

(「日新 EM 株式会社」からカタログを取り寄せると便利である。

〒160-0007 東京都荒木町 23-9、tel 03(3355)3001、fax 03(3353)2888)

注意 2 :

また、こぼすと時間と共に重合してべたべたになるから必ず、汚した時は 100%アルコールで良く拭取る事。特に秤には計量用の大きいデスポの皿を乗せ、天秤台を汚さないようにする。また、間違えて汚した時は必ず 100%アルコールですぐ拭取る事。

注意 3 :

樹脂を作る時は容器として使い捨ての尿カップを使用する。樹脂は必要最小限の量を作るが誤差を考慮して 50 グラムを最小とする。残った樹脂はエポキシのロケットを作るか、冷蔵庫に入れて後で接着剤代りに使う。

注意 4 :

作る量はペニシリン瓶 1 本につき、QY-1 + エポキシ樹脂(1:1)用に 2cc、エポキシ樹脂() と エポキシ樹脂() に各 4cc で包埋までに 10cc(約 10gm)必要になる。さらに包埋用にエポキシ樹脂が必要になる。カプセルに入れる時は、1 カプセル 0.8cc である。1 ピンに 10 個の組織片であれば $10\text{cc} + 0.8 \times 10 = \text{約 } 20\text{cc}$ 必要になる。

(1) A : B = 3 : 7 (硬)

MNA	35.5gm	MNA	17.75 gm
Quetol 812	50.5gm	Quetol 812	25.25gm
DDSA	13.9gm	DDSA	6.95gm
計	100.0gm	計	50.0 gm
DMP-30(硬化剤)	1.5gm	DMP-30	0.75 gm

(2) A : B = 4 : 6 (普通)

MNA	31.3gm	MNA	15.65gm
QUETOL 812	49.7gm	QUETOL 812	24.85gm
DDSA	19.0gm	DDSA	9.5 gm
計	100.0gm	計	50.0 gm
DMP-30	1.5gm	DMP-30	0.75 gm

* エポキシ樹脂を使用したガラス器具の洗浄法

- 1) 雑巾紙で出来るだけエポキシ樹脂を拭き取る。
- 2) 100%エチルアルコールの入った容器に3 - 4日つける。
- 3) 手がやっと入るくらい加温したハイアライS水溶液(濃度は2%位)を超音波洗浄器に入れてアルコール容器から出したガラス器具を洗浄する。1時間くらい。器具の中のアルコールは元の容器中に戻す。
- 4) 洗浄器からガラス器具を取り出して加温した新しいハイアライS水溶液に入れて1昼夜位おく。
- 5) 流水で水洗する。
- 6) 器具の中にほこりが入らないようにふせて乾燥させる。
乾燥器に入れても可、自然乾燥でも可。

(3) 樹脂切片の薄切

手順

- 1) ガラスナイフを作成する。
- 2) ブロックのトリミング
- 3) 厚切り切片の作成
- 4) 超薄切片の作成

1) ガラスナイフを作成する。

ガラスナイフの作成は市販されているガラス棒を利用し、LKB社製のナイフメーカーで作成する。幅6mm, 8mmの2種類はLKB社製でよいが、幅10mmのガラス棒は割ることが出来ないため三慶社製のナイフメーカーを使用する。

ガラスナイフには接着テープで水を入れるポートを作る。

LKB社製のナイフメーカー

(中央研究部超微形態部門 所蔵)



三慶社製のナイフメーカー

(分子解剖学分野 所蔵)



出来上がったガラスナイフと
ダイヤモンドナイフの例



2) ブロックのトリミング

ブロックのトリミングはカミソリを使用するがシック社製の片刃が最も良い。大まかにはグラインダーやヤスリを使用して円錐形に削り、実体顕微鏡下にカミソリを使用して削る。

3) 厚切り切片的作成

更にミクロト - ムにガラスナイフを取り付けてブロックの面出しを行いさらに希望する部位をカミソリでトリミングする。1 μ m から 2 μ m 厚の光顕用切片 (準超薄切片 semithin sections) をガラスナイフか厚切り用のダイヤモンドナイフで作成する (超薄切片用は厚切りには絶対使用しないこと)。光顕用切片は常に 1% 位のトルイジン青 (1% 硼砂液に溶かしたもの。作り方参照) で加温染色しながら染色する。光顕下で超薄切片にする目的の部位を探す。

現在、金属製の面削り用のナイフがあり、それで面を出して後に厚切り用のダイヤモンドナイフで光顕用の切片を作り、その後、ダイヤモンドナイフを超薄用に替えて電子顕微鏡用の切片を作成する。

* トルイジン青による加温染色

1 . 1% 硼砂 (sodium borate) 水溶液を作る (硼酸ではない!!)

2 . 1g のトルイジン青を 100cc の蒸留水に溶かす。濃いときには 1% トルイジン青 (硼砂水溶液) で適時希釈する。

* 樹脂が強アルカリ性であるためにアルカリ性の染色液の必要がある。一般の H-E 染色は使用できない。

3 . 染色液は時々濾過すること。

4 . スライドガラスに張り付けた切片上に染色液を滴下し、ホットプレート上で徐々に加温する。さわって熱く感じるくらい。沸騰させてはならない。30 秒くらい。切片の性質によるので切片毎に経験的に時間を決める。

5 . 蒸留水でよく洗い、乾燥させる。

6 . ニュウエンテランを使ってカバーガラスをかけ封入する。

(封入しないときは対物レンズに no-cover lens を使用して検鏡)。

4) 超薄切片的作成

超薄切片を作成する部位が決まったら、超薄切片用のダイヤモンドナイフに替えて切片を作成する。

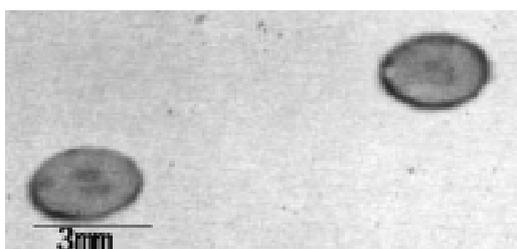
ダイヤモンドナイフのポートに水を張る。水の量は照明光が反射して白っぽく見える量にする。若干表面張力で窪んだ状態が良い。盛り上がった状態では切ることが不可能。

切片の厚さは切片の干渉光による。切片を集める道具として、自分の睫毛（眉毛ではない）を抜いて、竹串の先に張り付ける。先端の細さが理想的である。

切片をメッシュに拾い上げる準備として：

- a.メッシュを脱脂する（エーテル+アルコール）。一般には 150 メッシュを使用する。
- b.必要に応じて膜を張る（基本顕微構造解析法 のレベル）。
- c.必要に応じて染色後、切片にカーボン蒸着を行う（基本顕微構造解析法 のレベル）。
- d.メッシュを挟むピンセットは専用のものを用意する。

銅メッシュ



5)超薄切片の染色

*ウラン液 - 水洗 - 鉛液 - 水洗 - 乾燥の順である。

水洗の水は精製水を使い、必ず新しい、ゴミなどが全くない水を使用する。

作成後は必ず一晩静置する。冷蔵庫で保管する。

a.酢酸ウラニル水溶液(1%)で染色。10分くらい。

ウランは国際規制物質であるので、水溶液を作るときには使用簿に必ず記入する。使用後のウラン水溶液も瓶に入れて保存しておく。

*脱水の過程でブロック染色する方法もある。0.5 - 2.0%水溶液に脱水前に1時間位浸漬するか、脱水の時に50%エタノールに酢酸ウランを溶かして染色する。

b.佐藤氏混合鉛液で後染色。2分くらい。

空気中の炭酸ガスを吸収して、炭酸鉛の沈殿物が付着して汚染することが多いので素早く染色することが肝要である。

鉛の染色液はその他に多くの方法がある。自分の好みと汚れが少ないものを選ぶ。

* 佐藤氏混合鉛液の作り方

原著：

Sato T:

"A modified method for lead staining of thin section." J Electron Microsc, 16: 193, 1967

1) 4%水酸化ナトリウム水溶液を作る。

2) 容器に精製水 90cc を入れ、スターラーでゆっくり攪拌。

3) 硝酸鉛 1.5g、酢酸鉛 1.5g、クエン酸鉛 1.5g を入れる。

- 4) クエン酸ソーダ 3.0g を入れる。白く濁る。
- 5) 4%水酸化ナトリウム水溶液を 24ml を入れる。透明になる。
- 6) 最後に精製水 40ml を加えて、濾紙で濾過する。
- 7) 1 晩放置してから、使用する。冷蔵庫内に保存する。
- 8) 空気中の炭酸ガスを吸って白濁すると使えなくなるので保存に十分注意する

中央研究部の透過型電子顕微鏡



* 電子顕微鏡の観察法には透過型電子顕微鏡を使用するほかに、組織の表面をみる走査型電子顕微鏡がある。この資料の作成法については、生体機能形態学分野（旧解剖学第三講座）の研究テーマになっているので、そこで相談してください。

* その他に物質の表面を微細に観察する方法として原子間力顕微鏡があります。これも生体機能形態学分野（旧解剖学第三講座）の研究テーマになっているので、そこで相談してください。

[5] 免疫組織化学染色法

1 概念

標的分子（主として蛋白質）に結合する抗体を用いて、その分子を可視化する方法。抗原抗体反応という特異性の高い方法を用いるので特定の分子のみを同定することが可能である。

2 原理

標的分子を抗原とした特異抗体を用いて、生きた組織や培養細胞、固定した組織切片上において抗原抗体反応を行い、分子に結合した抗体を直接または間接的に標識して、分子の検出を行う。

3 目的

1) 最も一般的な免疫組織化学の活用法は、標的分子の局在を明らかにする事である。分子の局在を明らかにすることにより、分子の機能、分子を発現している細胞の機能・活動状態・分化度などを推測することが可能となる。

2) マーカー分子の免疫組織化学を行うことにより、細胞の形態を観察することができる。

小脳プルキンエ細胞に多く含まれる、calbindin, IP3 受容体蛋白質、protein kinase C などの免疫組織化学を行うことにより、プルキンエ細胞全体が染色され、プルキンエ細胞の分布、樹状突起の形態、軸索の走行、さらには終末の分布を明らかにすることができる。

3) 細胞内器官を構成する分子の免疫組織化学を行うことにより、細胞内の構造を可視化する事ができる。

微小管を構成する分子 tubulin の免疫組織化学を行うことにより、微小管の構造を観察することができる。

神経終末に多く含まれる分子 synaptophysin の免疫組織化学を行うことにより、神経終末を可視化できる。

4) 細胞の種類を同定することができる。

星状膠細胞内の中間径フィラメント（グリア線維）を構成する分子 GFAP (glial fibrillary acidic protein) の免疫組織化学を行うことにより、星状膠細胞を同定することができる。

抑制性神経伝達物質である GABA の合成酵素 GAD (glutamic acid decarboxylase) の免疫組織化学を行うことにより、抑制性ニューロンの細胞体および終末を同定することができる。

4 免疫組織化学的染色操作の流れ 手順は以下の通りである。

1) 組織の調整や切片の作成を行う。

2) 組織の染色性を増加するために、抗原性の賦活化を行う。

3) 抗体の非特異的結合を防止するためにブロッキングを行う。

- 4) 一次抗体（標的分子と結合する抗体）を反応させる。
- 5) 組織・切片を洗浄後、二次抗体を反応させる。
（以後の手順は、免疫組織化学の方法により異なる。）
- 6) 酵素抗体法の場合は、発色操作を行う。
- 7) 顕微鏡にて観察する。

以下、各ステップについて、詳しく説明する。

5 組織の調整、切片の作成

組織の種類、研究の目的、抗体の性質など様々なケースに応じて異なる。
試行錯誤の上、固定操作・包埋法・切片作成法などを選択・決定する必要がある。
培養組織、培養細胞ならば、カバースリップ上で反応を行う。

1) 固定操作

(1) 無固定標本

固定操作によって、抗原性が著しく失われる場合に選択される方法である。

（切片を使用する際）組織を凍結したのちクリオスタットにて凍結切片を作成し、オルガノシランなどをコーティングしたスライドグラスに塗付する。

1次抗体反応後、固定操作を行う場合が多い。

組織像の質が低下する場合が多い。

(2) 固定標本

抗体の種類によって、固定法（固定液の種類、固定時間など）を選択する。

一般的にはホルマリン溶液が使用されるが、糖鎖を保持する場合には（PLP 液 periodate-lysine-paraldehyde）、固定により抗原性が失われる場合には、プアン液や酢酸などマイルドな固定法が用いられる。

2) 包埋 詳細は、光学顕微鏡のための標本の作製法参照のこと

パラフィン包埋

エポン包埋 準超薄切片を作成し、脱エポン操作後に、免疫組織化学を行う。

3) 切片作成

クリオスタット

マイクロスライサー

マイクロトーム など

6 抗原性の賦括化

生体内に埋没した抗原を表面に露出するためにさまざまな工夫が成される。

1) メタノール処理

100%メタノールに30分程度浸漬する。

細胞膜の脂質が溶出し、膜蛋白の露出、細胞内への抗体の移行が促進されると言われている。

2) マイクロウエーブ法

専用の機械を用いる場合と、通常の電子レンジを用いる場合がある。

電子線を組織に照射することにより（理由は依然不明であるが）蛋白質同志の集団が解離し、抗原が露出するとされている。

抗体濃度の低下、バックグラウンドの低下、反応時間の短縮を行うことができるとされている。

3) ペプシンなどの蛋白分解酵素処理

希塩酸にペプシンを加え、切片を反応する。

蛋白質を部分的に分解する事により、絡み合った膜蛋白質のなかに埋もれる抗原決定基を露出する。

組織の破壊が激しく、電子顕微鏡観察には向かない。

4) 煮沸法

熱湯に組織を入れ、数分間煮沸する。

その後、切片を作成し、免疫組織化学を行う。

7 一次抗体入手方法

1) 市販の抗体を購入する。

目的の物質に結合する抗体を、業者の Web site、カタログなどを検索し、注文・購入する。

2) 論文の著者に依頼し入手する。

3) 自ら作成する。詳細は後述する。

抗原の調整 動物に免疫 血液の採取と抗体の精製 抗体のチェック モノクローナル抗体の作成

4) 業者に抗体の作成を委託する。 抗体価のチェックまで委託する場合が多い。

(1) 蛋白質を指定して、全て委託する。

(2) 合成するペプチドを指定して、免疫を委託する。

(2) 抗原を送って、免疫を委託する。

など、幾種類かの選択肢がある。

8 一次抗体の種類 抗体の種類によって、作成法・用途が異なる。

1) モノクローナル抗体

単一種類の免疫グロブリンであり、特異性に優れる。

細胞培養によって、抗体を得ることが出来るので、大量・無限に採取することが可能である。

ポリクローナル抗体に比べ、抗体力価が低い場合が多い。

抗原認識部位が必ずしも、免疫組織化学に都合の良い部位とは限らない。

作成が非常に手間である。

2) ポリクローナル抗体

様々な抗原決定基を認識する抗体が含まれるので、感度・力価が高い。
別の物質との交叉性反応の有無を確認する必要がある。
場合によっては、カラム等による精製の必要がある。

9 一次抗体の作成

1) 抗原の調整

目的とする物質の種類、予算、研究室の設備に合わせていずれかの方法を選択する。
各々の方法は、以下に列挙するような特徴と欠点を持つ。

(1) 業者の Web site および試薬カタログなどで検索し、市販されている物質を(抗原として)購入する。

低分子量の物質(ステロイドホルモン、神経伝達物質など)、ペプチド(数個のアミノ酸から構成される

ペプチドホルモンなど)、ホルモン(高分子量)、成長因子など市販されている物質があり、抗原として用いることができる。

(2) 標的分子(蛋白質)を生体試料、培養細胞などより精製する。

蛋白質の全長を生体にある(糖鎖やチスルフィド結合を持ち、末端アミノ酸の修飾やリン酸化された)形で免疫するので、免疫組織化学に有用な抗体を作成できる可能性が最も高い。

蛋白質を精製する手技を持つ必要がある。

完全に精製できない場合に、出来上がった抗血清に夾雑物に対する抗体が含まれる可能性が残る。

神経伝達物質受容体のように、互いに相同性が高い物質が沢山存在する場合、複数の蛋白質を認識する(交

叉性のある)抗体が産生される可能性が高い。

(3) アミノ酸配列の明らかな部分のペプチドを合成し、担体(キャリア)蛋白質に結合させて免疫する。

合成を業者に委託することが可能で、最も簡便な調整法である。

特異性の高い狭い領域を狙ってペプチドをデザインすることにより、相同性の高い蛋白質それぞれに特異

的な抗体を作成することができる。

リン酸化蛋白質を認識する抗体を作成する場合事ができる。業者にリン酸かペプチドの合成を依頼する。

ペプチドの合成のために1本あたり、10数万円程度の費用がかかる。

抗原性の有る部位、特性の高い領域を慎重に選ぶ必要がある。

免疫組織化学に適する抗体が出来ない場合が多いので、慎重に抗体をチェックする必要がある。

(4) PCR 法により目的とする物質の遺伝子の一部分または全長を増幅する。または、遺伝子ライブラリーよりクローニングする。標的分子の遺伝子を大腸菌、カイコなどに強制発現させて、蛋白質を得る。

遺伝子クローニングを行う事の出来る研究室で有れば、安価な方法である。

遺伝子操作のテクニックを必要とする。

2) 動物に免疫する。

(1) ウサギ

最も一般的な免疫動物である。

1 匹の動物で免疫組織化学に十分量の抗血清を得ることが出来る。

何度も部分採血可能なので、抗体価のチェックが簡便である。

(2) モルモット

作成した抗体は、ウサギで作成した別の抗体との二重染色を行う事ができる。

マウス、ラットの物質を抗原とする場合、アミノ酸配列が似ているため、抗原性を持たない場合がある。

(3) マウス

モノクローナル抗体を作成するときに用いる。

マウス、ラットの蛋白質を抗原とする場合、モルモットの蛋白質とアミノ酸配列が似ているため、抗原性を持たない場合がある。

(4) 羊

抗体を大量に作成することが出来る。

ウサギ、マウス等で作成した抗体との二重・三重染色が可能である。

マウス、ラットの蛋白質に対する抗体を作る場合には、強い抗原性を示す事が多い。

大量の抗原を用意する必要がある。

(5) その他

馬、ニワトリなどが使用される場合もある。

3) 血清を精製する。

(1) 血清をそのまま使用する。

生体より精製した蛋白質を抗原として免疫した場合高力価であり、そのまま使用できる場合がある。

(2) 担体 (キャリア) 蛋白質を吸収する。

担体蛋白質 (MBP (maltose binding protein) , GST (glutathione-S-transferase) , KLH (keyhole limpet hemocyanin) など) に対する抗体が多く含まれているので、免疫組織化学のバックグラウンドが高くなる傾向にある。したがって、抗血清をそれぞれの担体を架橋したカ

ラムに通して吸収する法が望ましい。

(3) 抗血清をアフィニティーカラムにて精製する。

免疫に用いた抗原を架橋したセファロースカラムを用いて、血清を精製する。

ペプチドを抗原とした場合、非特異的抗体が出来やすいので、必ず行うべきである。

4) モノクローナル抗体の作成

(1) マウス・ラットに免疫を繰り返す。

(2) 脾臓またはリンパ節の細胞を採取する。

(3) ポリエチレングリコールを用いて、リンパ球と骨髄腫細胞とを細胞融合する。

(4) HAT (hypoxanthine aminopterin and thymidine) 培地で培養し、細胞融合した細胞のみを選択する。

(5) 培養上清を用いて抗体チェックを行い、目的の抗体を産生する細胞株を選択する。

(6) 限界希釈法などにより、単一株のハイブリドーマを選択する(クローニング)。

(7) 抗体を採取する。

細胞の培養上清をそのまま使用する。

マウス、ラット、ヌードマウスの腹腔に細胞を移植し、腹水の形で抗体を採取する。

5) 抗体のチェック

(1) ウェスタン・ブロット(免疫ブロット)解析を行う。

予想される分子量に単一バンドを示す事を確認する。

(場合によって、複数の陽性バンドを見る場合もある。)

相同性が高く、しかも分子量が近い物質を区別する抗体を作成する場合には、二次元に展開した電気泳動ゲルを転写したフィルターを用いてウェスタンブロットを行う必要がある。

(2) 実際に免疫組織化学を行って確認する。

ウェスタンブロットで陽性のバンドが検出されても、免疫組織化学に適さない場合は多い。

シグナルが検出された場合、in situ hybridizationの結果と照合し、分布を比較検討する必要がある。

(3) 吸収試験を行う。

免疫に使用した抗原を一次抗体に加えた上で、ウェスタンブロットおよび免疫組織化学を行い、シグナルが消失することを確認する。

10 可視化の方法

標識物質を様々な方法で可視化し、観察できる形にする。

1) 標識物質の種類によって、酵素抗体法と蛍光抗体法にわかれる。

(1) 酵素抗体法 標識物質はペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素

を用いる。

発色は、酵素反応にて行う。

(2) 蛍光抗体法 標識物質に FITC (fluorescein isothiocyanate)、ローダミン、テキサス赤等を用いる。

切片を蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡などで観察する。

2) 標識法の違いによって直接法と間接法に分かれる。

(1) 直接法

一次抗体自身に酵素または蛍光色素を標識する方法。

同一動物で作成された抗体による二重・三重染色を行う場合に有用である。

感度が低い。

標識に手間がかかる。

(2) 間接法

1次抗体を作製した動物の免疫グロブリンに結合する抗体(二次抗体)を標識する。

市販されている標識抗体を購入して使用することができる。

3) 間接法には、二抗体法、三抗体法(PAP: peroxidase anti-peroxidase method)、ABC法(avidin biotin complex method)などがある。

各社からキットが市販されている。

(1) 二抗体法

最も単純な間接法である。

様々な励起波長をもつ蛍光色素を標識した二次抗体が市販されており、二重染色を行うことが出来る。

増幅を行わないので、酵素反応を行う場合には感度が低い。

(2) PAP法

ペルオキシダーゼとペルオキシダーゼに対する抗体(抗ペルオキシダーゼ抗体)の混合液(PAP溶液)を反応させる。

DAB(diaminobenzidine)反応にて発色する。

ABC法との二重染色を行うことが出来る。

(3) ABC法

二次抗体に植物凝集素であるビオチンを標識する。

ビオチンと結合性のあるアビジンとペルオキシダーゼを多数結合させた巨大分子(ABC液)を用いる。

ビオチン標識二次抗体を反応後、ABC液を反応させる。

ABC液にて増幅を行うので、感度が著しく高い。

様々な工夫を凝らしたキットが市販されており、最も普及している方法である。

1 1 発色基質

1) Diaminobinazidine

茶色に染色される。

コバルト、ニッケルなどの金属イオンを混合することにより、黒・青などの色にすることも可能である。

電子顕微鏡標本になる。

発ガン性が有るので、取り扱いに注意を要する。

2) アルカリフォスファターゼ基質

Diaminobenztizine との二重染色を行うために、様々な色（赤・紫中心）の基質が販売されている。

酵素は長い時間活性を保つため、感度を無限に（近く）高めることが可能である。

3) 蛍光色素

FITC、ローダミン、テキサスレッド、Cy2、Cy3、Cy5 などの様々な励起波長を持つ色素がある。

簡便に二重・三重染色を行うことが出来る。

観察を手早く行わないと、褪色する。

永久標本にならない。

1 2 電子顕微鏡的観察

免疫組織化学と包埋の順序によって、pre-と post-embedding の 2 つに分かれる。

1) post-embedding 法

免疫組織化学を行った後、再包埋して電子顕微鏡切片を作成する手法。

免疫組織化学反応を得る手段として、DAB 法・金コロイド銀増感法などがある。

(1) DAB 法

光学顕微鏡観察と同様に DAB 反応を行い、その後 epon に包埋して、電子顕微鏡切片を作成・観察する。

光学顕微鏡で反応の成否を確認してから包埋するので、安心して実験を行うことが出来る。

酵素反応であるため抗体の認識した位置の周囲に免疫反応産物が拡散し、細かい部位の特定が難しい。

(2) 金コロイド銀増感法

金コロイド標識した二次抗体を用いて間接法にて免疫組織化学を行う。

銀増感キットを用いて、金コロイドの周囲に銀粒子を沈着させて反応を増感する。

エポンに包埋し、薄切して電子顕微鏡観察を行う。

免疫反応産物が拡散しないので、標的分子の局在を正確に特定できる。

DAB に比べてコントラストが強く、観察が容易である。

DAB 反応との二重染色が可能である。

銀増感反応の際に非特異的反応が生じやすく、熟練を要する。

銀増感液の浸透が悪いので、観察は切片表面に限られる。

2) pre-embedding 法

epon、Lowicryl などに組織を包埋する。

電子顕微鏡切片を作成する。

超薄切片上で免疫組織化学を行い、金コロイド標識二次抗体を使用する。

分子の局在が点として示される。

post embedding では表面に露出しにくかった抗原決定基が表面に露出されるので、受容体等の膜蛋白の局在を研究する際には威力を発揮する。

金コロイドの粒子の大きさを変える事によって、2重染色を行うことができる。

DAB 反応を行った切片を使用すれば、DAB と金コロイドの二重染色を行うことができる。

pre-embedding 法に比べて、反応感度が著しく低い。

バックグラウンドが高く、極めて熟練を要する。

包埋条件の善し悪しが免疫反応に影響を与えるので、条件設定が極めて難しい。

3) 凍結超薄切片

液体窒素で冷却したチャンパーの中に於いて、超薄切片を作成する。

作成した切片上で免疫組織化学を行い、金コロイド粒子として観察する。

包埋操作を行わないので、抗原性が失われにくい。

感度が高い一方で非特異的反応も強く、観察結果の観察が難しくなる場合がある。

切片操作に熟練を要する。

1 3 免疫組織化学の実際

市販の抗体(抗 GAD 抗体)に対する抗体を用いた小脳の免疫組織化学の例を紹介する。

1) 切片の準備 光学顕微鏡のための標本の作製法参照

2) 免疫組織化学

(1) ブロッキング

0.03% H₂O₂ を含むメタノール液に 30 分間浸漬して、内因性ペルオキシダーゼを阻害する。

リン酸緩衝液 (pH 7.4) にて洗浄

3% 正常ヤギ血清と反応し、非特異的吸着をブロッキングする。

(2) 一次抗体の反応

4000 倍に希釈した抗 GAD 抗体 (ケミコン社製) を 1 夜室温にて反応。

(抗体の希釈濃度は条件を様々に振って検討する。)

(3) ABC 法 (ニチレイ社製のキットを使用)

リン酸緩衝液で洗浄

ビオチン標識抗ウサギ IgG を反応する。(室温 2 時間)

リン酸緩衝液で洗浄

ABC 液を反応する。(室温 2 時間)

リン酸緩衝液で洗浄

(4) DAB 反応 (発色)

DAB 反応液

50mg diaminobenzidin

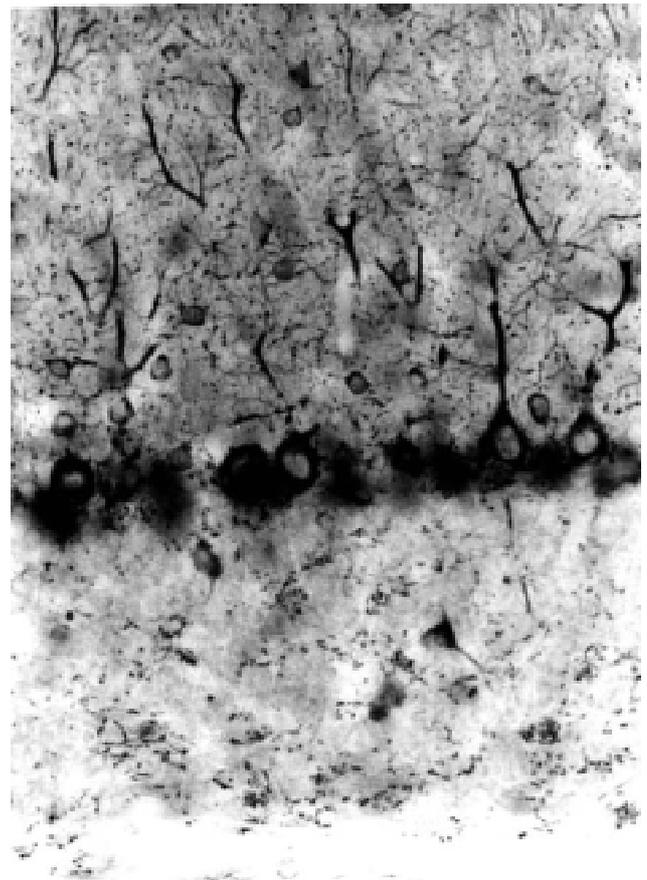
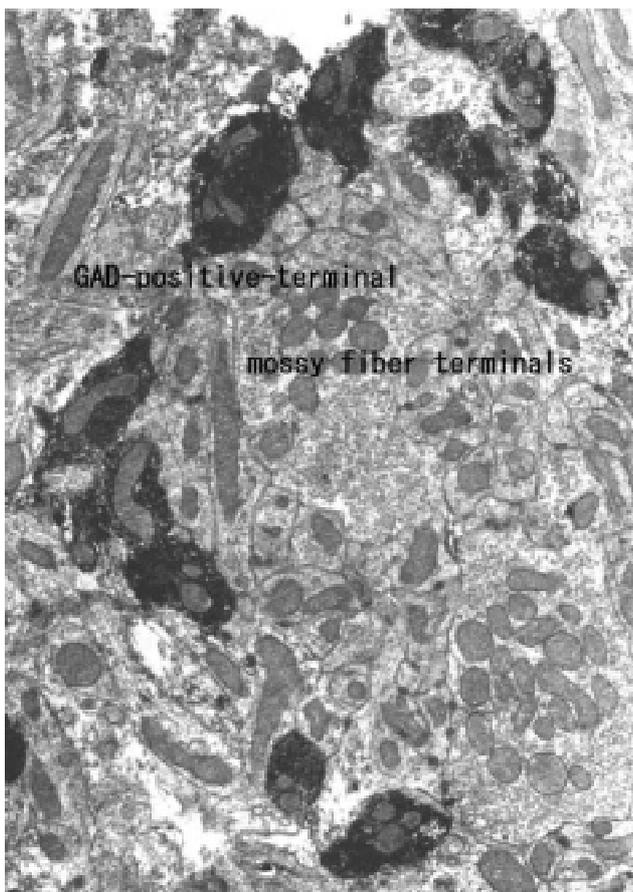
100ml PBS

33 μ l H₂O₂ (30%) の反応液を調整

ときどき顕微鏡で観察しながら、適当なところで反応を停止する。

(5) 脱水・透徹・封入

写真：右写真は GAD (グルタミン酸脱炭酸酵素) に対する免疫組織化学染色。プルキンエ細胞細胞体、樹状突起及び分子層、顆粒細胞層の GABA ニュ - ロンと GABA 終末が陽性になっている。左写真は右標本の電顕写真 (post-embedding 法) で、顆粒細胞層の小脳系球体の終末 (ゴルジ細胞の終末) が陽性に染まっている。



<免疫組織化学に関する最近の文献>

- 1) 脳科学実験マニュアル 本間研一 福島菊郎(編) 北海道大学図書刊行会
- 2) 無敵のバイオテクニカルシリーズ 特別編 脳神経研究の進めかた 真鍋俊他 森寿片山正寛(編) 羊土社
- 3) 細胞工学 別冊 抗ペプチド抗体実験プロトコール ペプチド合成からタンパク質機能解析まで 大海忍 辻村邦夫 稲垣昌樹 秀潤社
- 4) 神経生物学のための遺伝子導入発現研究法 吉川和明(編) シュプリンガー・フェアラーク東京

[4] その他特殊な染色法

1 in situ ハイブリダイゼーション法

細胞内の mRNA の局在を証明する方法として現在分子生物学的な研究には欠かせない方法である。形態学的研究を行っている分子解剖学分野、生体構造解析学分野ではその技術を公開しているが、対象となる組織、分子によって使われる方法、例えばアイソトープを使うべきか、免疫組織化学染色法を使う方が良いか、また、所見の解釈の仕方など研究の段階で相談する方が早い。

参考文献：http://www.bioweb.ne.jp/content/ziken_betsu/postgenom00.html

2 BrDU 法

細胞の系譜を調べる上で、細胞分裂の状況を把握する必要がある時に使われる。一般には放射性同位元素のトリチウムを細胞分裂の間期に取り込ませて、切片を染色した上で写真現像して、放射性同位元素が固定されている場所を観察する方法が用いられた。この方法はアイソトープを使う施設が必要である。

現在、アイソトープを使わない方法として、BrDU法が開発されてよく利用されている。トリチウムの代わりに BrDU(bromodiuridine)を使うが、染色法に難しいところがあるので、染色の経験者と相談するとよい。

(生体構造解析学分野 山田恵子特別研究員 kyamada@med.hokudai.ac.jp)

3 最近の話題 - 物質をリアルタイムで可視化する方法 -

GFP 遺伝子の導入標的分子遺伝子の前後に green fluorescence protein (GFP:クラゲ由来の緑色の蛍光を発する分子)遺伝子を結合させ、細胞または組織、受精卵に遺伝子導入する。遺伝子が安定して取り込まれた場合、導入された標的分子は GFP とともに1つなかりで翻訳され、蛍光顕微鏡下で GFP の蛍光として同定することができる。したがって、生きた組織や培養細胞および生体そのものの中に於ける分子の動きを、リアルタイムで観察する事が可能である。しかしながら、実験の際には、(1) GFP が与える標的物質および導入された細胞への影響 (2) 遺伝子の過剰発現による物質動態の変化などを考慮する必要があるため、結果の解釈には慎重を期すべきである。