

# 免疫電子顕微鏡法の実際

新潟大学電子顕微鏡共同研究室

行田 正晃

地味な内容や成功率の低さなどからか、誰もやりたがらない免疫電顕法。私が行っている方法や、その経験からわかることを簡単にまとめてみた。

## ■免疫電子顕微鏡法とは？

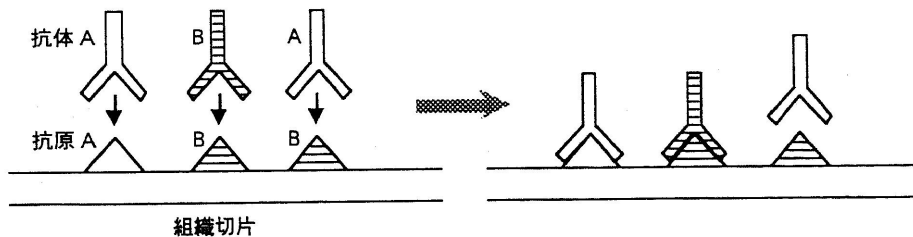
免疫電顕法（免疫電子顕微鏡法）とは、電顕法（電子顕微鏡法）と免疫組織化学を組み合わせたものである。もっと簡単に言ってしまうと、組織に存在する抗原の場所を電顕でわかりやすく見せることが免疫電顕法ということになる。

通常の電顕法では抗原を見ようとしても見えない。そこで電顕で見ることができる標識物をくっつけて、抗原の場所を明らかにすることが免疫電顕法のねらいだ。

## ■抗原抗体反応

組織や細胞には様々な抗原がある。そこに抗体をかけると、ある抗原だけに結合する。例えば、抗体Aは抗原Aだけに特異的に結合するし、抗体Bは抗原Bだけに特異的に結合する。

この抗原と抗体の特異的な結合を抗原抗体反応と呼んでいる。免疫電顕法はこのことを利用して行われる。



## ■良い免疫電顕法

通常の電顕法の場合は、組織の死後変化が少なく構造のわかりやすい像が良いものだと言えると思う。そして免疫電顕法の場合では「電顕法と同等の組織像」と「組織抗原の存在場所のみに標識物が観察できるもの」が理想だろう。ただし、そのような理想の免疫電顕法はまだ無い。

通常は固定剤で組織の成分は不動化されるが、その固定剤によって抗原は装飾され抗原と結合しなくなる。だからといって固定を弱めると組織の構造が崩れてしまう。理想の免疫電顕法は無理。

抗原の場所を明確に示すことができ、その周囲の組織がある程度保持されていれば、とりあえずは良い免疫電顕法だと言えると思う。

## ■非特異的反応

抗体は、目的の組織抗原だけに結合してくれればよいのだが、関係の無いところにくっついてしまうことがある。これを非特異的な反応という。組織から切片を切り出したときの表面の荒れ具合なのか、抗原が別な場所に移動してしまったのか、理由は全くわからないがこの非特異反応は多少起こる。

いままでの経験で必ず非特異反応が出るのは、赤血球だ。切片上に非特異反応を軽減するための処理などを行っても防げなかった。そこで動物から組織を取り出す前に赤血球を除くことができる場合は、できるだけ灌流を行うようにしている。

## ■組織の摘出

灌流とは、血管に緩衝液を流して血液を流し出してしまうことだ。輸液セットで緩衝液の入った容器を高い場所に設置し、目的の臓器に応じた血管の経路を考えて注入するのが一般的なようだ。私は簡単に済ませたいという理由から輸液セットではなく、シリンジを使用して注入していることが多い。

赤血球を除くだけならば灌流するだけでよい。この後に固定をするが、ムラのないようすみやかに固定したいと考えているので、続けて灌流固定も行う。固定液は4%パラホルムアルデヒドが個人的な標準となっているが、この固定液がよいというわけではない。使用する抗体などによりいくらでも固定液は換える。

ここからは Pre-embedding、Post-embedding、UltraCryo のうち、どの方法をとるかで処理が違ってくる。

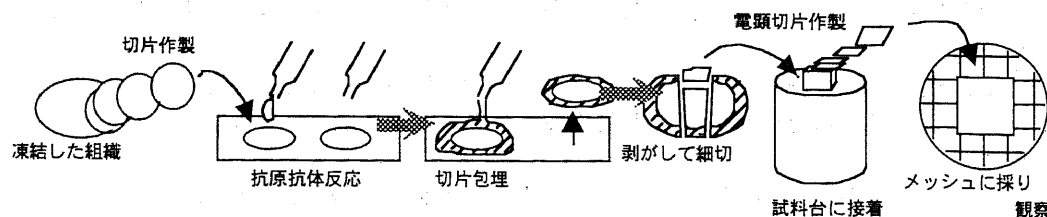
## ■Pre-embedding

この方法は、電顕包埋の前に抗原抗体反応を行う技法である。

固定した組織を凍結させ、それからクリオスタットで比較的厚めの凍結切片をつくる。組織の凍結のとき、氷のダメージで微細構造が壊されるといわれているので、20%ショ糖を組織に浸透させてから凍結する。ただし低倍率の像で良い場合はこの処理をしなくても、氷のダメージは気づかないだろう。

作製した凍結切片に抗体を載せ、抗原抗体反応を行う。抗体自体に標識物がついていればこの時点で可視化できるのだが、普通は標識物などついていない。そこで結合した抗体（一次抗体）に対する抗体（二次抗体）を反応させる。二次抗体に標識物のついたものを使用すれば、目的の抗原の局在が観察できる。

抗原抗体反応を終えた切片を2.5%グルタルと1%オスミウムで後固定し、エタノール脱水後に電顕包埋する。このブロックから、電顕用の切片を作製し観察する。

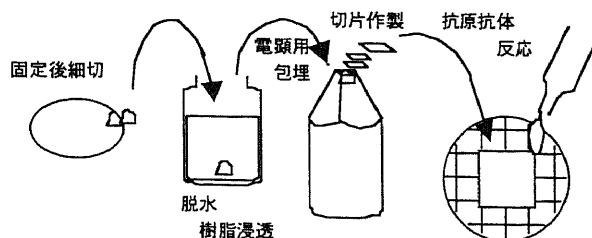


成功した場合、細胞などの膜に存在する抗原は、標識物が高密度に連続して確認されるのでわかりやすい。ごくわずかな部位の場合や、高倍率での観察の場合はよほど組織保持がよく

ないとわかりづらい。どちらかというと低倍率、広範囲の抗原局在に向いている方法だと思う。凍結切片のほんの少しのキズやめくれなどでも非特異的反応がおきやすいようだ。

## ■ Post-embedding

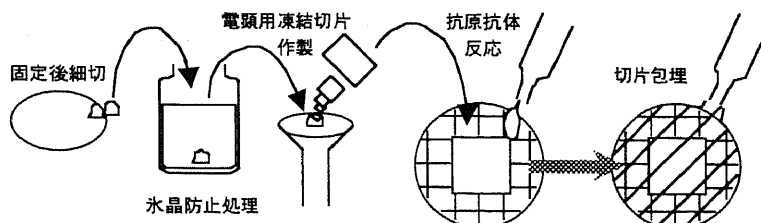
固定後の組織を脱水、樹脂包埋する。このブロックから電顕用切片を作製する。この電顕用切片上で抗原抗体反応を行なう。



この方法は一度ブロックを作ってしまうとある程度の期間は保存ができるし、切片を作ってしまうと後の操作は特に技術を必要としないので簡単だ。欠点は、高密度の抗原抗体反応が難しいことだ。大きな理由は、抗原が固定から包埋までの操作で流出したり、その操作に要する時間の問題からも失われやすく、そしてどんなに切片を厚くしても抗原抗体反応が有効なのは表面だけということだろう。

## ■ UltraCryo

この方法は Pre-embedding と Post-embedding を組み合わせたような方法だ。固定後の組織は、氷晶防止処理をした後、凍結される。この凍結ブロックから、電顕用の超薄切片を作製しこの切片上で抗原抗体反応をおこなう。抗原抗体反応を終えたら切片を包埋して観察する。



この方法は Post-embedding に近い手順で、Pre-embedding に近い抗原抗体反応性をもっている。そのため高密度な抗原抗体反応が可能だが、技術的に難易度の高い手法である。100nm 以下の厚さの電顕用凍結切片を作製するのは、通常の電顕用切片より困難だ。またその切片を包埋までの操作で崩してしまいやすい。

## ■ 簡単には成功しない

免疫電顕法は組織や目的の抗原や使用する抗体などに合わせて、各操作の条件を検討し、何度も試行錯誤しなければ満足のできる結果は得られない。私の場合も、数ヶ月で満足のできる写真が取れたものもあるし、1年以上取り組んでもうまくいかずに結局あきらめたものもある。免疫電顕法は普通は失敗から始まるものと考えて間違い無い。