

オートラジオグラフィーの活用例について

新潟大学医学部病理学第二講座 百崎 進

オートラジオグラフィーとは

一般の組織学や組織化学的な方法では、組織の構造や化学物質の局在を知ることではできますが、時間的経緯における変化、現象を知ることは困難です。生体内での化学物質がたどる代謝経路あるいは細胞の増殖や動きを時間的、かつ形態学的に追跡するのにオートラジオグラフィーが威力を発揮します。方法と原理を模式図にしたのが図1です。放射性同位元素を生体内に投与し、時間を追って、目的の組織を取り出し、組織標本を作製し、その上に感光材料をかぶせて、放射性同位元素によって感光させ、還元銀を現像し、それに重なった組織像とを同時に観察することによって標識された物質あるいは細胞を同定することができます。

おもに多く用いられる放射性同位元素（ラジオアイソトープ）は ^3H （トリチウム）、 ^{14}C （炭素）、 ^{32}P （りん）、 ^{35}S （硫黄）、 ^{125}I 、 ^{131}I （ヨウ素）、 ^{45}Ca （カルシウム）などがあります。これらは主に β 線を放射するものです。放射線のエネルギーと放射線の半減期を表1に示しました。目的に応じてこれらの放射性同位元素を選択いたします。

今回私たちは ^3H （トリチウム）を使用しました。（トリチウム）についても少し説明いたします。トリチウムは水素の同位体の一つで、三重水素ともいい、放射最大エネルギーは0.018 MeV（メガエレクトロンボルト）で、半減期は12.3年と長く大気中の水素や雨水の中にも含まれているものです。放射性同位元素を使つての研究は数多く行われています。具体的には放射性同位元素をアミノ酸などにくっつけて使用します。（標識するという）例えばロイシンにトリチウムを標識し、生体内に投与し、膵臓で蛋白合成に際してこれが組み込まれていく経路を見ることができます。放射線というと何かこわい感じがしますがこのトリチウムは β 線を放射するもので、 β 線はイオン化が弱く、軽くて分子にぶつかる度に曲がる電子の流れで、乳剤に当たると感光させます。エネ

表1 主なラジオアイソトープ

	放射最大エネルギー (MeV)		半減期
^3H	β 線	0.018	12.3年
^{14}C	β 線	0.155	5568年
^{32}P	β 線	1.710	14.3日
^{35}S	β 線	0.167	87.1日

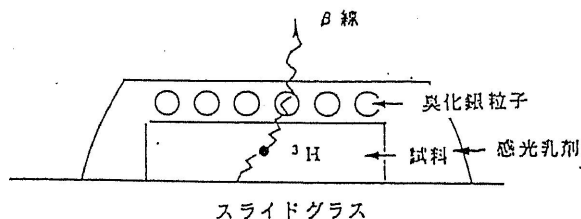


図1 オートラジオグラフィーの原理

ルギーが小さいので放射線の散らばりが少なく、局在を正確に示すという利点があります。とはいえ放射性ですので当然使用に際しては新潟大学放射線障害予防規則にもとずき医学部動物実験施設RI施設で動物を管理し、トリチウムサイミジン ($^3\text{H}-\text{Thy}$) についても同施設内で取り扱いました。組織標本作製については脳研究所RI施設を使わせていただきました。私たちの実験はサイミジンにトリチウムを標識し、マウスに投与します。サイミジンはDNA合成のために利用されますので細胞分裂の盛んな臓器においてDNA合成細胞、増殖細胞をつきとめることができます。

トリチウムサイミジン オートラジオグラフィーの実験への応用

私たちはマウスの肝臓のマクロファージをクロドロネート封入りポソームを注射することで枯渇させ、その後の肝組織内におけるマクロファージの回復過程を検討しています。この際に、トリチウムサイミジン ($^3\text{H}-\text{Thy}$) を用いた光顕オートラジオグラフィーで増殖細胞をみています。図2は感光、現像しました銀粒子を模式図にしたものです。

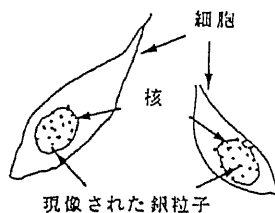


図2 感光・現像した細胞像

デIPPINGに際して準備するもの

- 感光乳剤NR-M2 (コニカ) 他にコタック社製有り
- デIPPING皿
- 恒温浴槽
- 乾燥用暗箱
- 乾燥剤 (シリカゲル)
- ピーカー 注射器
- 蒸留水
- 暗室

実験方法

1. クロドロネート投与後3、5、7、10日目にサイミジンを投与し1時間後に屠殺。マウスは8週令体重30グラム前後に対して1メガベクレルを投与。1時間くらいで不要なサイミジンはおしっことして体外に流れ出てしまいます。
 2. 肝臓を採取し、PLP液で固定、O.C.Tコンパウンドで包埋
-70℃で凍結 (保存)。クリオスタットで薄切、組織標本作製
 3. 酵素抗体反応 (免疫染色)
 4. 感光乳剤塗抹、乾燥 (暗室内操作)
 5. 1~2週間後現像、定着、水洗。これも暗室内操作
 6. 核染 (メチルグリーン)、水洗、脱水、透徹、封入、観察
- 今回は免疫染色の過程は省きまして、オートラジオグラフィの部分の行程を主にお話いたします。

組織標本（切片）へのディッピング（感光乳剤の塗布）

1. 乳剤はアルミ缶のまま40～50℃に加温（恒温浴槽を使用します）
2. 乳剤を蒸留水で1.5～2倍に希釈しディッピング壺に入れる。
3. 標本を乳剤に5秒ぐらい浸漬し、引き上げ濾紙の上で垂直に立て、2～3回ノックして余液を取る。
4. 乾燥暗箱に垂直に立て1昼夜乾燥（遮光する。）
5. チェンバーに入れ替え乾燥剤を敷いた箱に入れ密封包装（遮光する。）
ここで感光、露光します。
6. 1週間or2週間後に現像（感光不足の場合はさらに日数を延ばすことができます）
7. 後染色（核染）　メチルグリーン
8. 脱水、透徹、封入、観察

6番まではすべて暗室で行います。図3はディッピング方法を図式したものです。

※感光乳剤の取り扱い方・・・（NR-M2）は紙の箱の中にアルミ缶が入っており、その中にポリの容器があり、その中に感光乳剤がゲル状に入っています。保存（有効期間5℃で3ヶ月間）

※感光乳剤のとかし方・・・40～50度に温めて液状として、注射器を使って必要量を取り蒸留水で1.5～2倍に希釈します。私たちは43℃1.5倍で使用、だいたい6～8ミクロンの膜が出来ます。

※安全光・・・サクラ暗室ガラスNO3に20Wの電球で距離1mで約15分位でしたらカブリもでません。私たちは安全を期して10ワットの前に紙を置き直接、光が届かないようにして行いました。

※ディッピング法の特徴・・・大量の標本を短時間で処理できる。解像力も良い。ディッピング法の他に組織標本にレントゲンフィルムを直接張り合わせてする方法もあります。

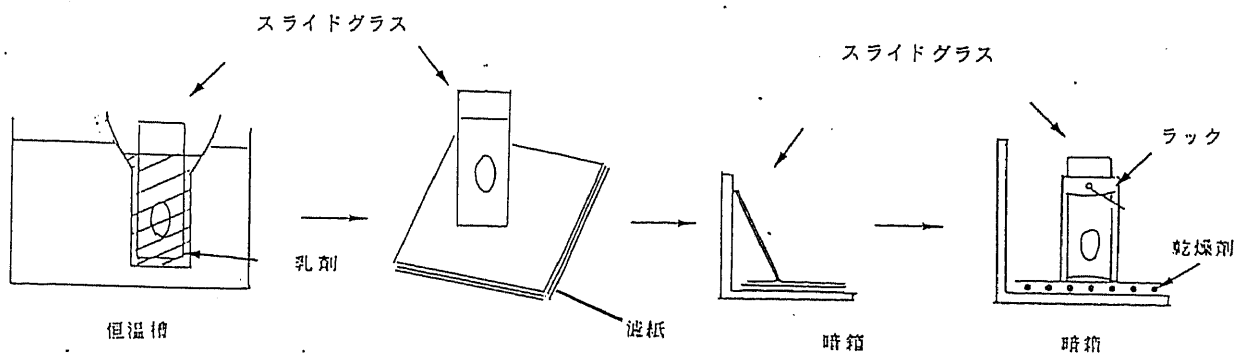


図3 ディッピングの方法

標本作製

凍結切片 (パラフィン切片も可)

切片はできるだけ薄くしたほうが解像力も上がります。

注意といたしまして固定液及び使用する溶液でラジオアイソトープの流失や、移動しないものを使用しなければなりません。

染色、これはH. E染色や特殊染色のことでまずこれらの染色をした標本に乳剤を塗布するか、感光、現像、定着後に染色するかのどちらでも出来ると言うことです。

現像・・・写真現像と同様です。

現像液 コニカドールX・・・温度 20℃ 時間 7分 他にもフジやコダックの現像液も可能

定着 コニフィックスで10分 フジのスーパーフジフィックスも可能
(停止液は不用) 酸性停止液は乳剤膜中に気泡を発生することがあります。

水洗 30分

まとめ オートラジオグラフィー施行上の注意

1. 正確なRIの投与
2. きれいな標本の作製
3. 乳剤の取扱い上の注意 保管上の注意
4. 現像での注意・・・ポジコン標本を入れておくと良いです。
5. 結果の評価上の注意 細胞内に銀粒子が20個以上有るものだけをカウントする。
6. その他の標識法との比較 (BrdU、蛍光抗体法など)

現在RIを用いない物質、細胞の標識法が広く利用されていますが、オートラジオグラフィーは免疫組織化学とあわせて施行するのに適しており、私どもは重宝しております。

おわりに

以上、オートラジオグラフィーの活用例について手技を略述いたしました。稿を終えるにあたり新潟大学病理学教室 第2教室内藤 眞教授をはじめ教室の方々のご指導をいただき深く感謝申し上げます。