

免疫電顕法

千葉大学大学院医学研究院腫瘍病理学

梅宮敏文

はじめに

通常の病理診断では、基本染色であるヘマトキシリン・エオジン（H・E）染色に加えて、特殊染色や免疫染色が病理補助診断として有効利用されている。電子顕微鏡（電顕）観察においても免疫染色が応用され、一般的に「免疫電顕」と呼ばれている。電顕は光顕観察に比べて、細胞の超微細形態情報が得られ、さらに免疫電顕を応用することにより、より確定的な情報が得られる場合が多い。ここでは免疫電顕法と技術的注意点を中心に解説する。

免疫電顕¹⁾

光顕での免疫染色は、組織や細胞における物質（抗原）の局在を、その抗原に対する特異抗体を用いて免疫組織化学的手法により、可視化させる方法である。免疫電顕も基本的には光顕での免疫染色法と同じ原理であるが、1．プレエンベディング法、2．ポストエンベディング法、3．凍結超薄切片法と大きく分けて3つの方法がある。免疫電顕を行なう際、技術的な問題点として1．細胞構造の保存、2．抗原性の保持、3．抗体の浸透性に注意しなければならない。これは免疫染色と同様に、固定剤の選択が重要なポイントとなることを意味する。

1. プレエンベディング(Pre-embedding)法

樹脂包埋に先立って免疫染色を行なう方法である。ペルオキシダーゼ標識法が一般的である。免疫染色方法は、通常の光顕レベルとほとんど同じで、免疫染色間接法がABC法を行なう(図1)。ただし、免疫染色の陽性部位は凍結切片の表面からせいぜい20 μ m～30 μ m ぐらいしか染色されないため、超微形態保存と染色性の良い部位を選ぶ必要がある。

【 Pre-embedding 法の手順 】

組織を4%パラホルムアルデヒドやPLP固定する。固定条件は、目的とする抗原や用いる抗体の特異性、組織や細胞の微細形態を保持しうる最良の固定液を選択する。

50 μ m～60 μ mのクリオスタット切片、または凍結厚切り切片を作製する。

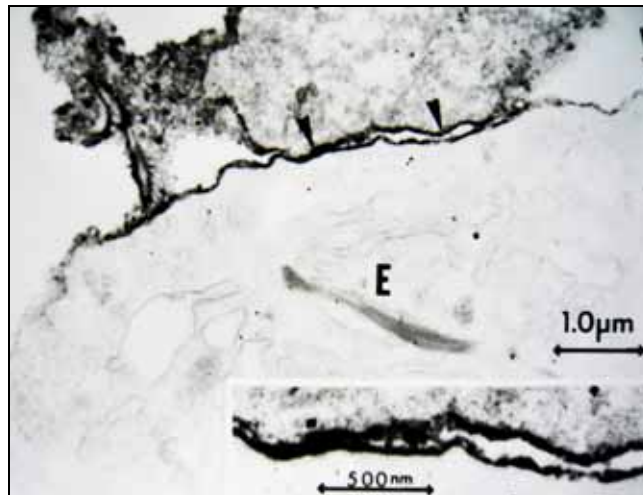
二次抗体と同様の正常血清、ウシ血清アルブミンなどで非特異反応をブロッキングする。

一次抗体を適正濃度に希釈して、冷蔵庫内で数時間から数日間インキュベートする。組織や細胞内への抗体の浸透をよくするため、室温よりは冷蔵庫内で長時間作用させたほうがよい。

洗浄後、間接法ならば、ペルオキシダーゼ標識二次抗体とインキュベートする。

洗浄後、DAB反応を行う。

四酸化オスミウム処理をして、通常のエポキシ包埋超薄切片を作製して、透過電顕で観察する。(図1)



**図 1 免疫電顕(Pre-embedding)法
免疫染色間接法、PLP 固定**

培養細胞における抗 ICAM-1 抗体 (Clone:BBIG-I1) の
発現

接着部 (矢頭) に ICAM-1 の強い反応を認める。

2. ポストエンベディング (Post-embedding) 法

試料を樹脂包埋の後、超薄切片を作製し、その超薄切片で免疫染色を行なう方法である。コロイド金標識法²⁾ やフェリチン標識法³⁾ のような粒子による標識法が主流である。細胞小器官や細胞内顆粒成分の証明には最適な手法であり (図 2)、例えば、異なるサイズのコロイド金を使うことにより、2重染色も可能である。注意点として、超薄切片をのせるグリッドは、銅製ではなくニッケル製を使用することを薦める。

【 Post-embedding 法の手順 】

固定法はプレエンベディング法に準じ、抗原性保持のため四酸化オスミウム処理は行なわない。

細切した試料を、エタノール、ジメチルホルムアミドなどで脱水し、ビームカプセルやゼラチンカプセルに Lowicryl K4M、LR White など包埋し、低温紫外線重合させる。

通常の手順で超薄切片を作製し、ニッケルグリッドに拾う。

二次抗体と同様の正常血清、ウシ血清アルブミンなどでブロッキングする。

一次抗体をインキュベートさせ、洗浄後、コロイド金標識プロテイン A をインキュベートする。

洗浄後、電子染色をして、透過電顕で観察する。(図 2)

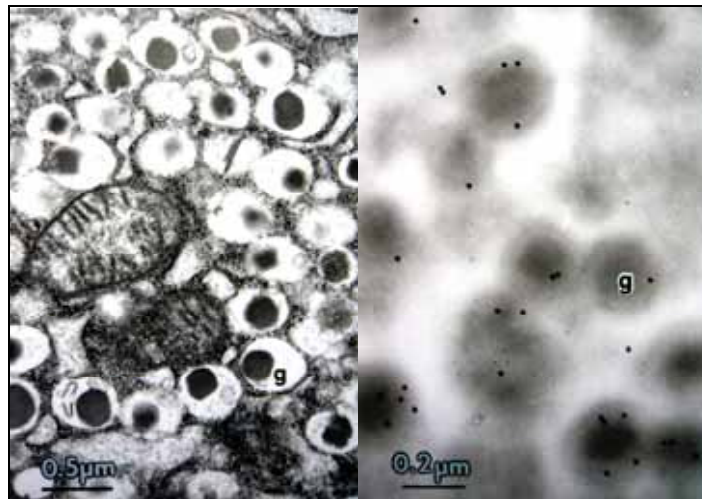


図2 免疫電顕(Post-embedding)法
免疫染色間接法、PLP 固定

transgenic mice の脾臓ラ島の B 細胞顆粒 (左)

抗 IAPP(islet amyloid polypeptide)ウサギポリクローナル抗体のコロイド金(5 nm) 標識法 (右): B 顆粒のみに標識されている。

3. 凍結超薄切片法

樹脂包埋超薄切片の代わりに、ウルトラミクロトームにクライオキットを装着して凍結超薄切片を作製し、免疫染色に用いる方法である。未包埋凍結超薄切片で免疫染色を行なうので、免疫染色の信頼性が高く、感度も良い⁴⁾。

参考文献

- 1) 梅宮敏文：病理組織診断における電子顕微鏡検査、医学検査 47：1179～1187, 1998
- 2) Roth J *et al.* : *J histochem Cytochem* 26：1074～1081, 1978
- 3) 平野 寛：レクチン法による組織化学的研究、電子顕微鏡 22：163～186, 1988
- 4) 高田邦明：金コロイド免疫電顕法 3 凍結超薄切片法、実験医学 8：102～110, 1990