

共焦点レーザー走査顕微鏡による免疫染色の観察

防衛医科大学校臨床検査医学

廣井 禎之、河合 俊明

はじめに

共焦点レーザー走査顕微鏡は 1955 年に Minsky らにより発明された共焦点光学系と、近年のレーザー技術及びコンピューター技術の発達により完成された新しい顕微鏡システムである。本顕微鏡システムはその名のとおり、共焦点光学系をもち、レーザー光を光源とし、試料上を走査させて結像させる顕微鏡のことであり、検出可能なものは蛍光色素と金属である。また、生きた組織や細胞を対象とすることもできる。本顕微鏡により免疫染色標本を観察する上での利点は被写界深度の極端に浅い断面での観察ができること、そしてそれら像の重ね合わせにより被写界深度の深い像が得られる事である。本稿では、レーザー顕微鏡の特徴と免疫染色の観察について述べる。

【共焦点レーザー走査顕微鏡の特徴】

1) 共焦点(共焦点光学系)とは(図 1)

試料内の焦点のあった像のみを検出する機構で、検出器の前面に共焦点ピンホールを設けているのが特徴である。このピンホールは試料内の焦点のあった面のみの像(光)が通過する位置、すなわち共焦点位置に置かれており、焦点面以外からの迷光(少し上下にずれた焦点面以外の光)をカットする。これにより被写界深度の極端に浅い像が得られることとなる。

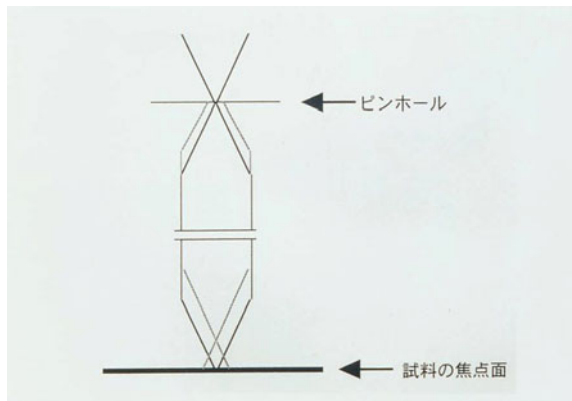


図 1 共焦点のシェーマ

検出器前にピンホールを設け、試料内の焦点のあった面のみの像(光)、すなわち共焦点の像のみを検出する。

2) レーザーとは

レーザー(LASER)とは、light amplification by stimulated emission of radiation (輻射の誘導放出による光増幅)の頭文字をとった略語であり、光を増幅して誘導放出を利用した原子系または分子系の電磁波増幅器、または発振器による光のことをさす。

レーザーは半導体レーザーとガスによるレーザーとがあり、顕微鏡にはガスによるレーザーが用いられている。レーザーはガスをガラス管に詰め共振させて、単一波長の光を取り出すことにより得られる。したがってレーザーの種類は用いるガスに依存し、波長 (nm) とガス名で呼ばれている。いくつかを例にあげると 488 アルゴン (Ar) レーザーは、Fluorescein isothiocyanate (FITC) やニッケル、コバルトなどの検出の際に用いられる。543 ヘリウムネオン (HeNe) レーザーは、ローダミン、テキサスレッド等の検出、及び 364 アルゴン (Ar) レーザーは、UV レーザーとも呼ばれており 4,6-diamino-2-phenylindole (DAPI) 等の検出の際に用いられている。

検出可能なものは蛍光色素(蛍光励起)と金属(反射光)で目的により使用するレーザーを選択する。

レーザーは動作周波数（振動）が光の領域にあり、周波数がマイクロ波の 10²~10³ 倍で、ほぼ位相の揃った光である。そしてレーザーの光学的特徴としては単色性にすぐれ、輝度温度が高く、指向性が良いことがあげられる。

3) 走査とは

レーザーは対物レンズにより絞られ、スポットとして試料に照射される。スポットにより得られる光は線ではなく点であり、標本の全体像を把握するため試料上を走査させる。また、開口数の大きなレンズほど小さく絞りこむことが可能であり、スポットとして照射することにより、分解能が向上し、その被写界深度は浅くなる。

4) 共焦点レーザー走査顕微鏡の特徴

共焦点レーザー走査顕微鏡は、被写界深度が浅く（縦、深さ方向の解像力が良い）、分解能にすぐれているのが特徴である。さらにコンピューターと組み合わされているため、0.3 μm~0.4 μm 間隔での断層像の観察やそれらを組み合わせた重ね合せ画像を作製することも可能である（図2）。

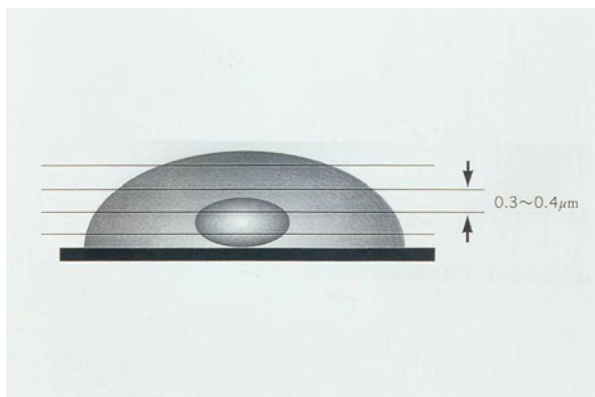


図 2 共焦点レーザー走査顕微鏡の縦（深さ）方向の解像力

0.3 μm~0.4 μm 間隔での断層像の観察が可能であり、これら断層像の序列を見たり、重ね合せ像を作ったり、重ね合せ像を横から見たり断面像を観察することができる。

【共焦点レーザー走査顕微鏡観察のための免疫染色技術】

レーザー顕微鏡により検出可能なものは蛍光か金属であり、免疫グロブリンそのものを検出することはできない。よって蛍光か金属を検出物質として用いた免疫染色法が必須である。具体的には、蛍光抗体法か酵素抗体法であるが、酵素抗体法の場合は用いる酵素はペルオキシダーゼで、ニッケル DAB かコバルト DAB 等の金属を含んだ液で発色させることが条件である。尚、標本作製に用いるスライドガラスやカバーガラスは通常の病理標本作製に使用しているものをそのまま用いて問題はない。酵素抗体法での核染色はメチルグリーン染色を推奨する（自家蛍光をもつ色素や、色素に金属の入っているものは使用してはならない）。封入剤は非水溶性封入剤でも、水溶性封入剤でもどちらでもかまわない。蛍光抗体法の場合は水溶性封入剤を用いるが、この場合には蛍光退色防止剤 1,4-diazabicyclo-[2,2,2] octane (DABCO) 等の入った封入剤を使用することが大切である。

【共焦点レーザー走査顕微鏡による免疫染色の観察】

1) 蛍光抗体法①

本顕微鏡により分解能の優れた染色像が得られる。1例として絨毛癌における HCG 免疫染色を提示する（図3）。HCG は FITC で緑に、核は Propidium iodide (PI) で赤く染色した。HCG の局在および核クロマチンのパターンが鮮明に観察可能である。また、位相差層を重ねると立体的な組織像となる（図4）。余談だが本顕微鏡は FISH における染色体異数性の観察にも優れる。特に細胞診標本では、縦方向全てにフォーカスの合った像が得られるため、いわゆるピント面の違うシグナルの存在も明確に表現することが可能である（図5）。

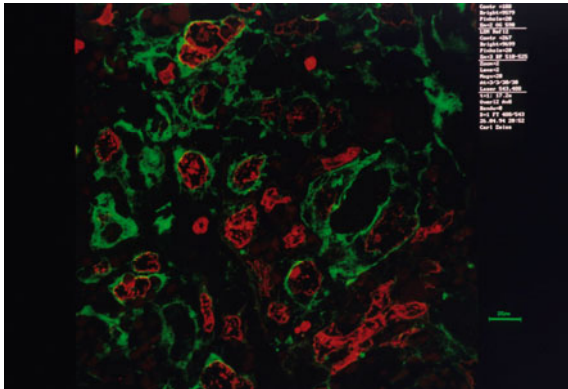


図3 肺の絨毛癌、抗HCG抗体（ポリクローナル）による免疫染色（蛍光抗体法）
HCGはFITCで緑に、核はPIで赤く染色した。分解能の良い組織像である。

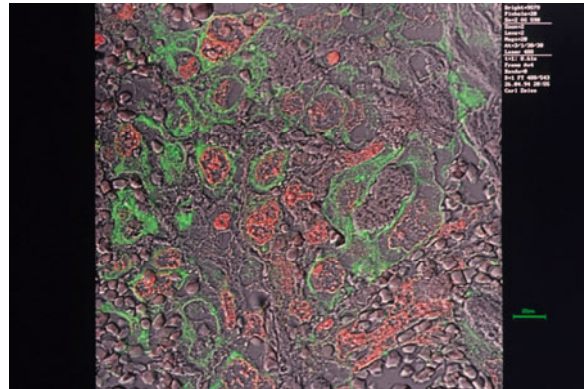


図4 図3の組織像に位相差像を重ね合わせた組織像
立体的な組織像である。

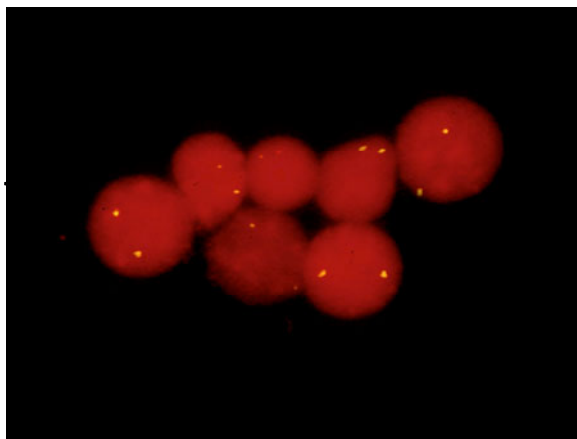


図5 FISHにおける17番染色体セントロメアの検出 肺腺癌
全てのシグナルにフォーカスの合った像が得られる。

2) 蛍光抗体法②

約 $7\mu\text{m}$ の脳組織、GFAP（6F2）蛍光抗体法の顕微鏡像を提示する。ピンホールを入れない組織像では全ての突起にフォーカスが合わず、突起の走行は不鮮明である。（図6）。断層像の序列によりCT像を思わせる断面像が観察できる（図7）。そしてそれらを重ね合わせると全ての突起にフォーカスの合った被写界深度の深い免疫染色像を得ることが出来る（図8）。

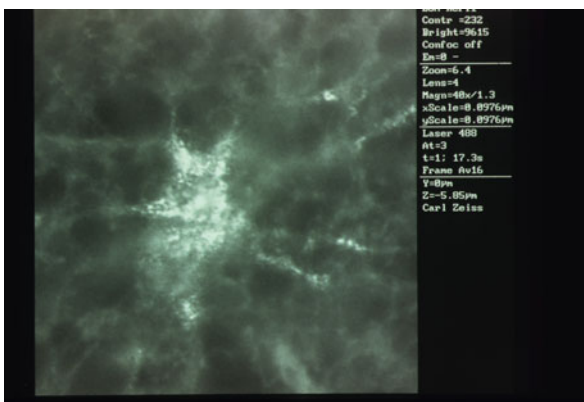


図6 約 $7\mu\text{m}$ の脳組織、GFAP（6F2）免疫染色（蛍光抗体法）
ピンホールを入れない組織像では全ての突起にフォーカスが合わず、突起の走行は不鮮明である。

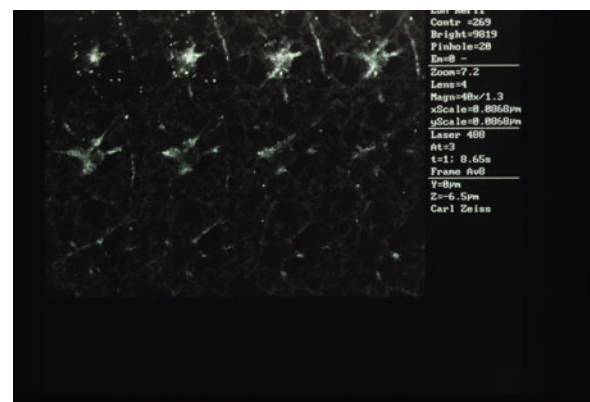


図7 図6の断層像の序列
断層像の序列によりCTを思わせる組織像が観察できる。

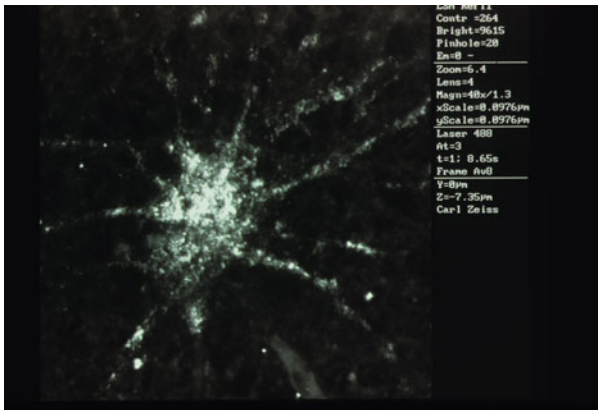


図8 図6の重ね合わせ像

全ての突起にフォーカスの合った被写界深度の深い組織像である。

3) 酵素抗体法

細胞診標本に施した免疫染色の観察（酵素抗体法、コバルト DAB 発色）

細胞診標本は細胞重積があり、3次元であることが特徴である（図9）。細胞診標本での免疫染色において、平面的に配列した部位ではほぼ全ての腫瘍細胞が陽性を示すのに立体的な部位では陽性細胞と陰性の細胞が混在することが経験される。肺小細胞癌腫瘍擦印細胞診標本での p53 免疫染色（DO7）を提示する（図10、11）。染色条件は、1次抗体室温 2時間、2次抗体およびストレプトアビジンは 30分である。本細胞集塊の断層像の序列および断面像では、細胞集塊の深部（スライドガラス面および細胞集塊中心部）に反応の見られないことが確認される（図12、13）。染色条件を変え、1次抗体 4℃1晩、2次抗体およびストレプトアビジンを室温 3時間で反応させた標本では、細胞集塊の底部まで反応が確認された。細胞診標本における免疫染色では、抗体の到達深度を考慮した判定を意識する必要があるものと思われる（図14、15、16）。

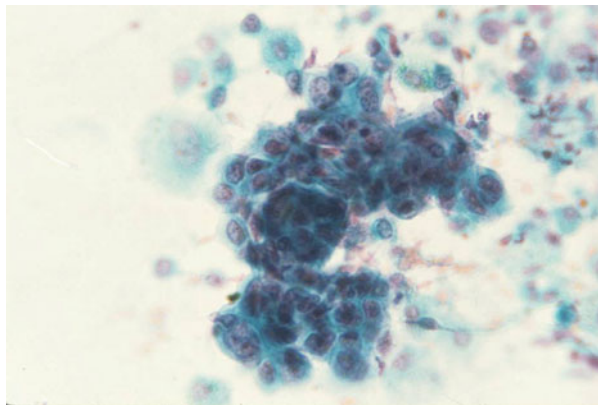


図9 肺腺癌腫瘍擦印細胞診標本

細胞診標本は細胞重積があり、3次元であることが特徴である。

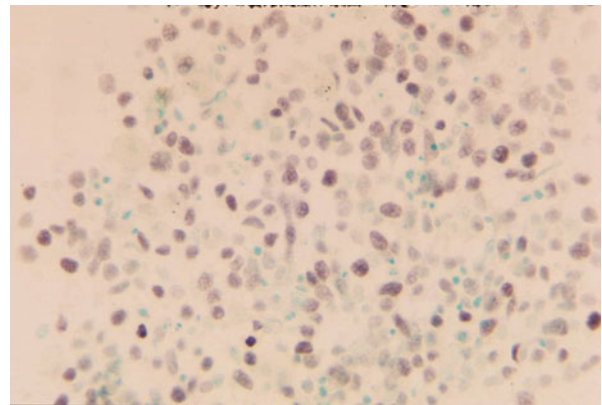


図10 肺小細胞癌腫瘍擦印細胞診標本

抗 p53 蛋白抗体（DO7）による免疫染色（ニッケル DAB）発色、メチル緑核染色。ほぼ単層に塗抹された部位。ほぼすべての腫瘍細胞の核内に陽性を認める。

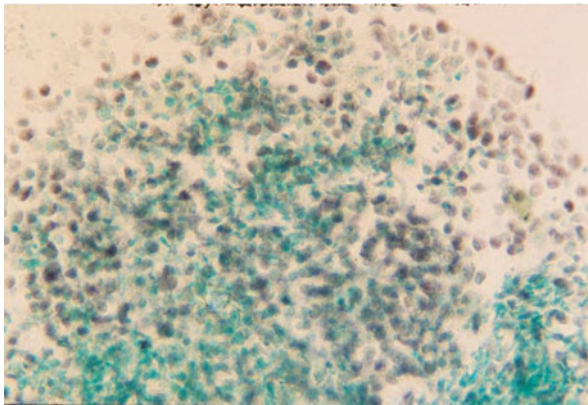


図 11 図 10 と同じ標本の別視野
重積性の腫瘍細胞塊の部分。陽性細胞と陰性の細胞が認められる。

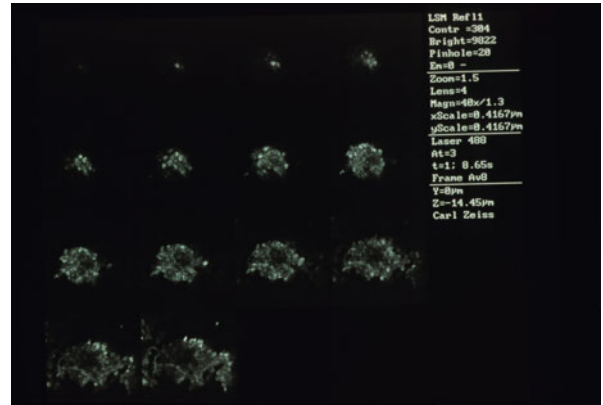


図 12 同部位の断層像の序列
細胞集塊の深部（スライドガラス面および細胞集塊中心部）に反応の見られないことが確認される。

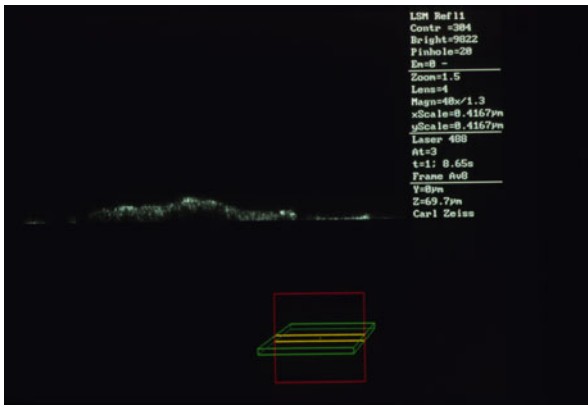


図 13 同細胞集塊の断面像
細胞集塊の表面部にのみ反応が認められる。抗体が細胞集塊最深部にまで浸透していないことを示唆する。

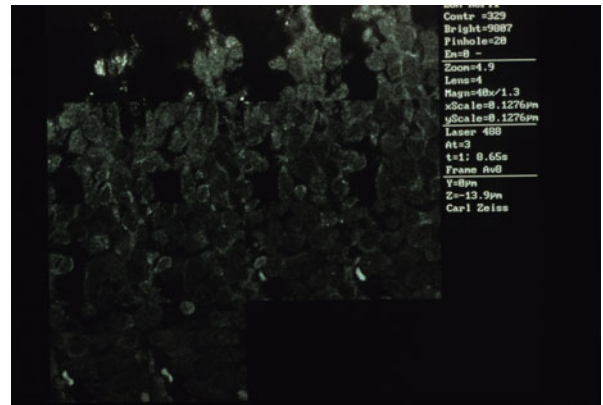


図 14 肺小細胞癌、p53 免疫染色（図 10～13 と同一症例）
1 次抗体 4℃、1 晩、ビオチン化 2 次抗体及びペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン室温 3 時間。3 次元画像処理による断層像の序列。
最深部まで反応が見られる。

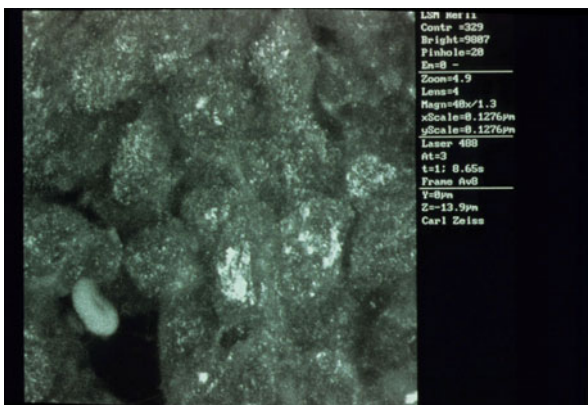


図 15 図 14 の重ね合せ像
ほぼすべての腫瘍細胞が陽性を示している。p53 蛋白陽性部位はクロマチン顆粒に一致している。

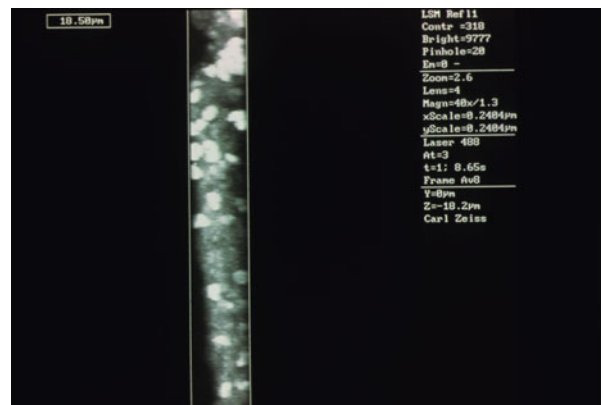


図 16 図 14、15 の細胞集塊を 3 次元画像処理による細胞集塊の断面像
細胞集塊のほぼ全層に発色が見られる。

その他の応用

H&E 染色の切片厚の計測が可能である。エオジン自家蛍光があるため、特に手を加えることなく厚さ計測に供することができる。さらに厚さムラ等も明確に現す (図 17)。

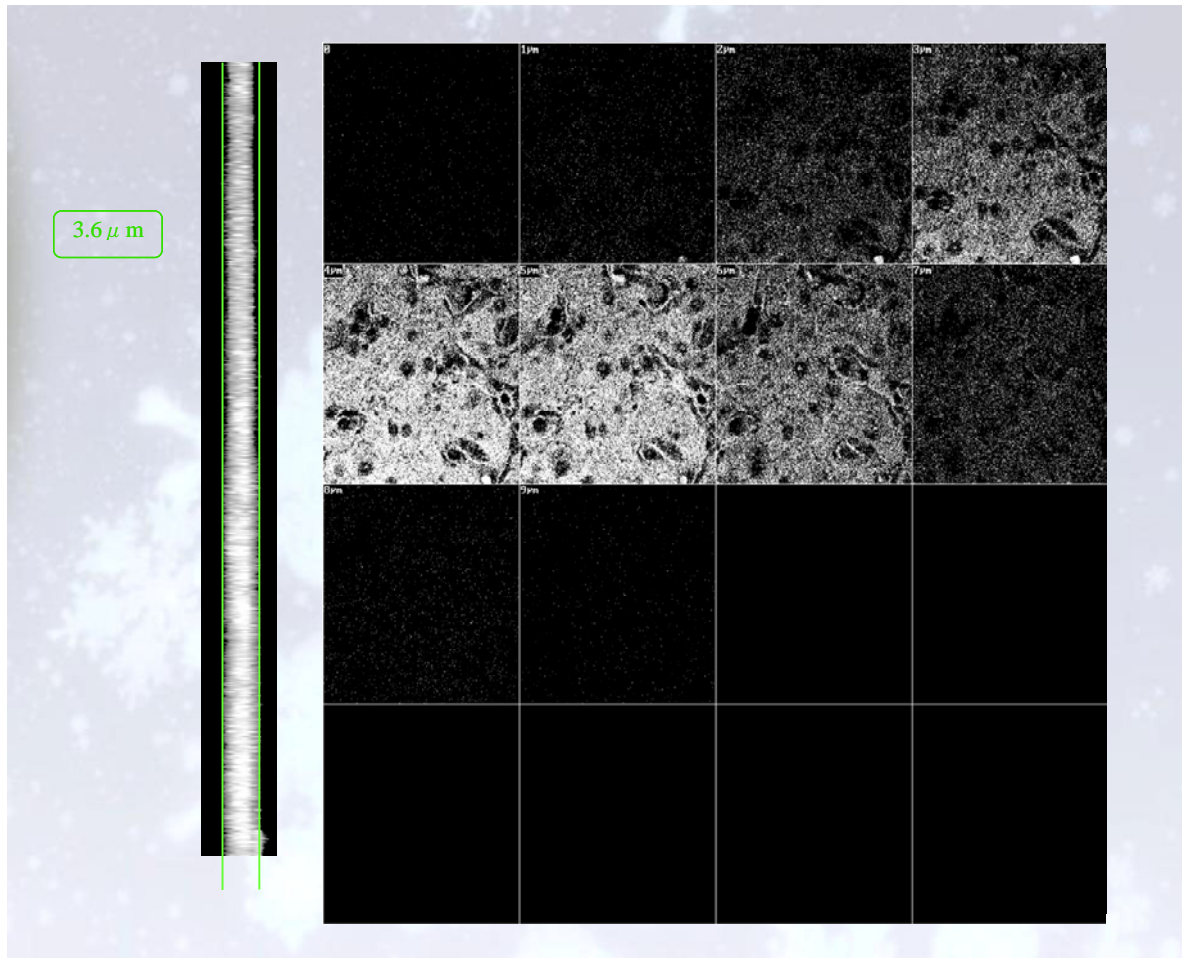


図 17 共焦点レーザー走査顕微鏡観察のその他の応用

H&E 染色の切片厚計測

エオジン自家蛍光があるため、H&E 染色標本は、そのまま共焦点レーザー走査顕微鏡で観察可能である。切片の厚さ、さらに厚さムラ等も明確に現す。

おわりに

現代のハイテク技術により免疫染色の観察にも幅が出てきた。本顕微鏡による免疫染色の組織像は、我々により正確なデータをもたらしてくれる。共焦点レーザー走査顕微鏡を有効に活用し、より深みのある観察を行い、新しい発見ができることを期待している。