

W2-2

急速凍結法と膜裏打ち構造の免疫エッチングレプリカ：免疫細胞化学から免疫分子化学へ

白倉 治郎、諸根 信弘、西沢 祐治
名古屋大学 大学院医学系研究科 機能形態学講座
細胞生物学

急速凍結法は言うまでもなく物理固定であるが、その利用には大きく分けて二つの意味合いがある。ひとつは生理現象の瞬間的な捕捉であり、もうひとつは無水晶凍結により微細構造を機能状態のまま保存するための方法である。前者の意味合いでの急速凍結はすでに20世紀初頭からEroenkeらにより行われている。一方、後者は凍結置換法やエッチングレプリカ法の発達過程で強く求められた。常識的に考えれば急速凍結は両方の意味合いを兼ね備えるものであるが、実際には難しく一般的にはならなかった。フラクチャーレプリカ法では化学固定後グリセリン溶液で凍結すれば無水晶となるため長い間そして現在でも用いられている。しかし、エッチングにはグリセリンが使用できないこと、また生理状態の構造変化を追及するためにHeuserらにより20年ほど前から急速凍結法が使われるようになってきた。エッチングレプリカ法は電子顕微鏡で細胞骨格や膜の表面を観察するための唯一の方法と言っても過言ではなく、この方法と免疫標識を組み合わせれば細胞骨格と膜との相互関係を具体的に解明することが出来る。切片と異なり免疫抗体により認識した分子を観察できることになるため、我々は免疫分子化学と呼んでいる。エッチングレプリカの場合フラクチャーレプリカとは白金蒸着状態が全く異なるためレプリカ回収後の免疫標識は困難である。そこで、我々は膜を機械的に剥ぎ、裏打ち構造を露出させる方法を用いた。カバーガラスに接着性を増すためにアルシアンブルーやポリリジンで処理し、細胞に接触し膜を採取する。その後0.25%グルタルアルデヒドで固定し、免疫標識を行い、急速凍結した。このようにして、アクチン、スペクチリン、アデューシン、Arp2/3、CRMP-2などをエッチングレプリカ上で同定することができた。また、100-140枚の傾斜像からコンピュータートモグラフを用いて裏打ち構造の三次元分子構築を明らかにした。

W2-3

生体内凍結技法によるマウス小脳の免疫組織細胞化学的解析法

大野 伸一¹⁾、ゼア ザグレブ²⁾、寺田 信生¹⁾、
大野 伸彦¹⁾、藤井 靖久¹⁾、馬場 健¹⁾
山梨大学 大学院医学工学総合研究部 解剖学第1教室¹⁾
山梨大学 大学院医学工学総合研究部 歯科口腔外科学講座²⁾

【目的】通常の生物試料作製法では、処理過程での形態学的変化が起こる。この変化を避けるために新鮮無固定試料を急速凍結や加圧凍結し、試料作製して検討することも行われてきた。しかし臓器によっては、循環血流の影響を強く受け、生体から試料を切除することによる形態変化が避けられないことがある。すでに“生体内凍結技法”を開発し、生理的機能に対応した臓器の形態変化を明らかにしてきた。今回、生体内凍結試料の免疫組織細胞化学的応用について報告する。

【材料と方法】i) ネンブータル麻酔下マウスを2%パラフォルムアルデヒド (PF)、あるいは2%PF+0.25%グルタルアルデヒド灌流固定後、速やかに小脳を摘出し、急速凍結ディープエッチング法でレプリカ膜試料を作製した。ii) 新鮮無固定の小脳組織を急速凍結後、上記同様にレプリカ膜を作製した。iii) ネンブータル麻酔下マウスの小脳を生体内凍結後、型のごとく凍結置換固定した超薄切片試料と上記同様のレプリカ膜を作製した。iv) 一部の急速凍結試料と生体内凍結試料は、2%PF含有アセトン中で凍結置換固定後パラフィン包埋し、抗カルビンディン (CB) 抗体と抗pCREB抗体等の光顕免疫染色を行った。v) 比較のために従来の2%PF固定、アルコール脱水、パラフィン包埋試料を作製し、同様に免疫染色を行った。

【結果】i) 新鮮無固定試料の急速凍結では、神経細胞やグリア細胞間隙の消失と各細胞膜の接着がしばしば認められた。ii) 灌流固定試料の急速凍結では、その細胞間隙は保持されたが、髄鞘の形態変化等が著明であった。iii) 生体内凍結試料では、細胞間隙が保持された。さらにCBとpCREB等の光顕免疫染色では、それぞれプルキンエ細胞と顆粒細胞核内に多量の免疫反応産物が局在しているのが見られた。iv) しかし、従来のパラフィン包埋試料では、CBの局在性と抗原性は極端に低下した。また、pCREBの核内免疫反応産物はほとんど確認できなかった。

【結論】種々の凍結試料による形態学および免疫組織細胞化学的所見を比較すると“生体内凍結技法”により、生理的機能状態下にある神経細胞内蛋白成分の局在と瞬時の形態変化像との関連性を解析することが可能と思われる。