免疫電顕によるラット肝細胞アクチンの局在 —Lowicryl K4M 低温包埋法を用いて—

加知 一友 岡上 武 太田 正治 金岡 彦治
奥野 忠雄 瀧野 辰郎* 森岡 宏行**

最近著者らは、透過電顕と走査電顕を用い in situ で肝細胞の3種のサイトスケルトンを観察し、その存在様式と相互関係を報告した¹⁾。各サイトスケルトンの局在や相互関係をより明確にするためには、免疫電顕による各サイトスケルトンの同定が必須である。しかし、従来の免疫電顕法では抗原性や超微形態の保持に少なからず問題点が残されていた。われわれは Carlemalm ら²⁾の開発した包埋剤 Lowicryl K4M に試料を低温包埋し、超薄切片に protein A-gold 法³⁾を用い、免疫電顕的に正常ラット肝細胞におけるアクチンの局在を観察しえたので報告する。

対象と方法：Wistar 系雄性ラット3匹を使用した。細切した肝組織を0.1M リン酸緩衝液加1%グルタルアルデヒド (pH 7.4) で2時間室温固定し、同緩衝液で洗浄した。固定後の肝組織を30%エタノールで30分間(0℃)、50%エタノールで60分間(-20℃)、70%エタノール、90%エタノール、100%エタノールで各60分間(-35℃)脱水後、50%K4M・50%エタノール、67%K4M・33%エタノール、100%K4M に各60分間(-35℃)浸漬し、最後に100%K4M に包埋し、-35℃で紫外線により重合させた。超薄切片を作成し、ニッケルグリッドに載せ、免疫染色に供した。

超薄切片は1%卵白アルブミン含有0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS pH 7.4) に5分間浸漬した後、5,000倍希釈マウス抗アクチンモノクローナル抗体 (IgM 分画, Amersham 社) と1時間反応させ、PBS で洗浄後、ヤギ抗マウス IgM 抗体 (Cappel 社) と30分間反応させた。さらに、PBS で洗浄後、protein A-gold (金粒子の直径15nm, Janssen 社) と30分間反応させた。これらの免疫染色はいずれも室温で施行した。蒸留水で洗浄し、酢酸ウラニールと鉛の二重染色の後、日立 H-500H 型透過電子顕微鏡で観察した。

なお、対照として次の2種類の試料を作成した。①アクチン (Sigma 社) で吸収した抗アクチン抗体と反応させ、その後、抗マウス IgM 抗体、protein A-gold と反応させた。②抗アクチン抗体を省略し、抗マウス IgM 抗体、protein A-gold と反応させた。さらに、ELISA 法により抗アクチン抗体の特異性を検定した。

結果：Lowicryl K4M に低温包埋された試料は抗原性、組織の超微形態ともに良好に保たれていた。また、標識に用いた金粒子は高電子密度を呈するため、酢酸ウラニールと鉛の染色後も背景と明瞭に区別できた。

ラット肝細胞ではアクチンの局在を示す金粒子は毛細胆管微絨毛、毛細胆管周囲および類洞側微絨毛に多く認められた。また、細胞境界に沿って細胞膜直下にも多数の金粒子が存在していた (Fig. 1)。核、ミトコンドリア、小胞体にはほとんど金粒子を認めなかった。毛細胆管付近を高倍率で観察すると、金粒子は毛細胆管微絨毛および毛細胆管周囲に局限して存在しており、毛細胆管内腔にはまったく観察されなかった。対

Fig. 1 Immunocytochemical localization of actin in rat hepatocyte embedded in Lowicryl K4M. Gold particles are mainly present at the bile canalicular region. $\times 6,800$

* 京都府立医科大学第3内科

** 同 電子顕微鏡室

Fig. 2 A : Magnified detail of the bile canalicular region in rat hepatocyte. Gold particles are observed on the microvilli and at the pericanalicular region but absent in the bile canalicular lumen. $\times 19,000$ B : Control section with actin-adsorbed anti-actin. Very few gold particles are seen on the cell. $\times 20,000$

照としてアクチンによる吸収試験を行うと、前述の金粒子による標識はほとんど存在しなかった (Fig. 2)。また抗アクチン抗体を省略して染色しても同様の結果であった。

なお、ELISA の結果、アクチンを結合させたマイクロタイタープレートでのみ DAB により褐色に発色し、抗体の特異性を確認した。

考察：超薄切片上で抗原の局在を明らかにするためには、適切な固定を行った上で脱水包埋に伴う抗原性

の低下を最少にしなければならない。今回、この目的で Lowicryl K4M 低温包埋法²⁾を採用した。本剤は低温で包埋および紫外線照射下重合が可能なアクリル・メタクリル混合包埋剤である。Lemanski ら⁴⁾はこの包埋剤を用いて超薄切片上で α アクチニンの局在を観察した。Lowicryl K4M に低温包埋された試料はアクチンの抗原性、組織の超微形態ともに良く保たれており、protein A-gold 法³⁾を用いることによりアクチンの肝細胞内局在を明瞭に描出しうる。従来、電顕レベルでアクチンの局在を証明するためにグリセリン処理後に heavy meromyosin (HMM) を用いる方法がとられていたが、今回著者らの用いた方法は超微形態の保持やその局在の描出により有利である。

電顕的観察や HMM 修飾から、アクチン線維は細胞膜直下、特に毛細胆管部に多いとされている。本法でもアクチンは毛細胆管微絨毛および毛細胆管周囲に多く、細胞境界に沿って細胞膜直下にも検出された。さらに、類洞側微絨毛にも認められた。

本法では抗体や標識物質を超薄切片上で直接反応させるため、en bloc での免疫染色と異なり、抗体や標識物質を組織に浸透させる必要がない。また、隣接切片で他の抗原の染色を行ったり、同一切片上の複数の抗原を異なる大きさの金粒子で標識することが可能である。従って、本法は 2 種類のサイトスケルトンの相互関係の研究にきわめて有用で、応用範囲も広く、今後この方面の有力な研究手段となるものと考えられる。

索引用語：免疫電顕、アクチン、Lowicryl K4M 低温包埋法

文 献

- 1) Okanoue T, et al: Hepatology 5: 1—6, 1985
- 2) Carlemalm E, et al: J. Microscopy 126: 123—143, 1981
- 3) Roth J, et al: J. Histochem Cytochem 26: 1074—1081, 1978
- 4) Lemanski L. F, et al: J. Histochem Cytochem 33: 515—522, 1985

Immunocytochemical localization of actin in rat hepatocyte embedded in Lowicryl K4M at low temperature

Kazutomo KACHI, et al*

* Third Department of Internal Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine (Kyoto)