

## 筋骨格系の組織細胞における免疫組織化学と蛍光標識の方法

田巻弘之<sup>1,2</sup>, 奥谷謙吾<sup>3</sup>, 荻田太<sup>3</sup>, 早尾啓志<sup>1</sup>,  
中川弘毅<sup>2</sup>, 桐本光<sup>2</sup>, 大西秀明<sup>1,2</sup>, 山本智章<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>新潟医療福祉大学理学療法学科

<sup>2</sup>新潟医療福祉大学運動機能医科学研究所

<sup>3</sup>鹿屋体育大学スポーツ生命科学系

<sup>4</sup>新潟リハビリテーション病院

【背景】組織や細胞の顕微鏡観察において、特定の構成要素を区別するための染色技術は極めて重要な手法である。顕微鏡観察される組織細胞においては、そのままではほぼ単色の世界であるが、適切な色付けを施すことにより鮮やかな細胞の世界が広がる。また同じサンプルでも、ある染色法ではそこには「何もない」と判定されるものが、ある別の染色法では明らかに何か（タンパク質等）の存在が観察でき、想像で描いていたそれらの真の姿を少し垣間見る喜びが得られる。本研究報告では、筋骨格系の組織細胞を対象に、免疫組織化学の手法を用いて染色を行い、特に蛍光標識（蛍光色素）により標的とする構造やタンパク質の局在を可視化する蛍光イメージングの魅力について報告する。

【方法】F344系雄性ラットの骨格筋、脊髄並びに骨組織を対象に、主に免疫組織化学の手法を用いて各種組織細胞の蛍光イメージングを実施した。ネンプタール麻酔下で前脛骨筋(TA)、長趾伸筋(EDL)、ヒラメ筋(Sol)、脊髄(L<sub>4</sub>-L<sub>6</sub>)、脛骨を採取した。骨格筋及び脊髄は、凍結組織切片作製用包埋剤を用いて液体窒素で冷却したイソペンタン(-160℃)で急速凍結した後、クリオスタットで凍結切片(10-30μm)を作成した。骨組織は、パラフィン包埋切片用と凍結切片用の2方法を用いた。パラフィン包埋用は、4%パラホルムアルデヒド固定後、エチレンジアミン四酢酸で脱灰し、水洗、エタノール脱水を経て包埋した。凍結切片用は、Kawamotoら(2000)の粘着フィルム法に準じ、イソペンタンで急速凍結した骨組織を5%CMCゲルで包埋凍結しブロックを作成した。薄切面に粘着フィルム(Cryofilm, Finetec)を貼付し、切片(6-10μm)を作成した。各々切片を乾燥後、パラフィン包埋切片は抗原賦活化処理を施し、0.1Mリン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、5%正常血清及び1%TritonX-100を含むPBSにて1時間室温でインキュベートした。各種一次抗体を使用し、2.5%正常血清及び0.3%TritonX-100を含むPBSで希釈して、4℃にて16-20時間インキュベートした。次にPBSで洗浄後、二次抗体(anti-mouse IgG antibody Alexa Fluor 488 conjugated (1:250), anti-rabbit IgG antibody Alexa Fluor 555/568 conjugated (1:250))を2.5%正常血清及び0.1%TritonX-100を含むPBSにて希釈し、室温で遮光して1時間インキュベートした。PBSで洗浄後、DAPI付加退光防止マウント剤(Vectashield Mounting Medium with DAPI, Vector Lab)にて封入した。多重蛍光染色を行った切片は、蛍

光顕微鏡(BX-60, Olympus)にて観察し、同顕微鏡に設置されたCCDカメラ(DP72, Olympus)及び画像撮影解析ソフト(CellSens, Olympus, Image-Pro Premier, Media Cybernetics)にて撮影、解析した。また、蛍光色素やトレーサーを用いたイメージングでは、calcein, alizarin complexone, evans blue dye, fast blue, fluoro-goldを使用した。

本研究は、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議, 2006)を遵守して、新潟医療福祉大学及び鹿屋体育大学動物実験委員会の倫理審査の承認を得て実施した。

【結果】骨格筋においては、筋細胞(筋線維)膜及び基底膜がanti-dystrophin antibody, anti-laminin antibodyにより可視化され、またanti-collagen I / III antibodyにより筋線維の周りを囲むように結合組織性膜が観察された。その内部ではanti-slow skeletal myosin heavy chain antibodyによりいわゆる遅筋線維が瀰漫性に観察された。また過度な伸張性収縮刺激を与えた骨格筋では、膜透過性の増大によるevans blue陽性の筋線維が観察され、desminで同定したZ線の一部損傷が観察された。骨組織においては、DMP1陽性の骨細胞が認められ、細い細胞突起まで可視化できた。

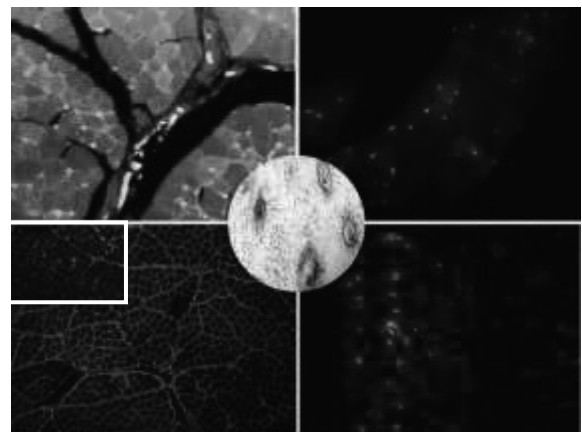


図1 各種免疫組織染色イメージ。

【考察】蛍光多重染色では、各組織の構成要素の構造や位置関係を鮮やかに同定することが可能であったが、いわゆる蛍光ばけやフェード現象と共に定量化が課題となる。共焦点顕微鏡を用いない場合、明瞭な画像を得るためには被写界深度を高める画像処理技術も必要と考えられた。またevans blue dyeは機械的刺激による筋損傷初期の簡易マーカーとして意義を有する可能性が考えられた。

【結論】蛍光法においては定量化が困難であるが、免疫組織化学は一般染色では観察しがたい標的(タンパク質)もしくは細胞の構造や局在を可視化する有用な方法である。

【謝辞】本研究の一部は、科学研究費(基盤研究(B), (C))及び新潟医療福祉大学研究奨励金により実施された。