

## 組織染色における固定法と染色溶媒の検討

後藤 仁志、野地 亮太

京都府立医科大学 生物学教室

### 要約

免疫組織化学染色は、組織の構造や特定のタンパク質の局在・分布を解析するために欠かすことのできない手法である。本手法においては、組織構造を保持し、さらに組織中のタンパク質抗原を適切に保持することが肝要である。このため、これまでに様々な組織固定法が開発されてきたが、近年グリオキサールを用いた組織固定法が、良好な免疫染色像が得られることから着目されている。本論文では、発生期の脳組織を薄切した切片を材料として、グリオキサールを用いた固定法と従来汎用されてきたホルマリン固定との差異を比較・検討したので報告する。また、染色に用いる緩衝液についても染色像に影響することが経験的に知られており、あわせて体系的に検討したので報告する。

### 導入

免疫組織化学法を含めた組織学では、様々な組織固定法が用いられてきた。固定法には、アルデヒド基を有する化学物質、アルコール、あるいは酸によって化学的に組織中のタンパク質を固定する方法がある。また、迅速に組織を固定するための瞬間凍結法やマイクロウェーブを用いた熱固定法といった物理的な固定法も存在し、サンプリング後、直ちに分解が始まる代謝産物の検出などに有用であるが [1]、手法の煩雑さや特殊な機器が必要となることなどから一般的ではない。

現在汎用されている化学物質による組織固定法では、適切な組成に調製した化学物質（固定液）に組織を直接浸漬、もしくは固定液を直接血流に灌流させる方法がとられる。後者は血管中に固定液が流れるため、より迅速に固定液が組織に浸透する。我々が良く用いる胎仔組織の固定には、胎仔個体のサイズが微小であることから、発生段階や実験者の手技によっては灌流固定法が困難な場合もあるが、組織構造の保存という点からは、できる限り灌流固定による固定法を試みるのが望ましいと考えられる。

化学物質を用いた固定液には、目的に応じてアルデヒド基を有する化学物質、アルコール、および酸を適切な割合で混合した固定液が用いられる。固定液の選択は、経験的に観察したい物質の保存に適したものを使用することが重要である。例えば、ホルムアルデヒドと酢酸、およびピクリン酸の混合溶液であるブアン固定液（終濃度はそれぞれ 9%, 5%, 0.9%）は、軟骨組織等の構造を良く保存するが、赤血球等は溶解してしまうことが知られている。我々の研究室では、脳組織を研究材料として用いることが多く、通常の組織固定には PBS 中に溶解した 4% パラフォルムアルデヒド (PFA) を用いている。PFA 中のホルマリンが持つアルデヒド基は、タンパク質同士を架橋する役割がある。また、2 つのアルデヒド基を持つグルタルアルデヒドは、ホルマリンよりアルデヒド基を多く持つため強力な固定剤であるが、ホルマリンと比較して分子量が大きいため組織への浸潤性が悪いこと、また組織中のグルタルアルデヒドが自家蛍光を生じることから、免疫染色を蛍光で検出する場合の障壁となる。更に、用いるグルタルアルデヒド濃度によっては、組織が過固定となり、抗体が組織中に浸潤しないことがしばしば認められる。

グリオキサールは 2 つのアルデヒド基を持つ化学物質であり、その分子量が比較的小さいため、組織への浸潤性が良好であることが予想される。近年になって、グリオキサールを用いた固定法が、汎用されてきたホルマリン固定よりも良好に抗原の抗体認識性を高めることが報告された [2, 3]。これらの報告でも、従来用いられているホルマリンと比較して、グリオキサールがより迅速に細胞内に浸潤するという実験データが示されている。このことは、分解の早い抗原の固定に有用である可能性を示す。

固定した組織は薄切して免疫化学染色に用いることが多い。適切な免疫染色のためにはサンプル中の抗原を抗体で認識し、標識した二次抗体により抗原の局在の可視化を行うことが重要である。組織固定は、そもそもタンパク質の高次構造を変性させるものであるため、組織中の抗原は染色に用いる抗体がアクセスできない高次構造をとっている可能性がある。そこで、マイクロウェーブや酸、あるいはプロテアーゼなどで切片を処理し、抗原の立体構造を抗体が認識しやすいように変化させる（賦活化）手法が開発されてきた。抗原の賦活化法については、これまでに膨大な知見が蓄積されているので別稿に譲ることとし、本論文では染色時に用いる溶媒（緩衝液）の影響について検討する。染色時には、通常リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) やリン酸緩衝液が切片の洗浄や抗体の希釈のために用いられる。こういったときに用いる溶媒も、染色

性を決定する重要なファクターの一つである。例えば、免疫組織化学の染色性を亢進する試薬として、TOYOBO 社から販売されている Can Get Signal は、抗体を希釈して切片とインキュベートする時に用いられる。この試薬の組成は明らかではないが、おそらく抗原・抗体反応を促進する物質が含まれており、抗体の組織中への浸潤性を亢進することでシグナルの増強に寄与するものと考えられる。一方で、PHEM 溶液は、緩衝剤や EGTA からなる緩衝液で調製が簡便だけでなく、コスト面でも優れている [4]。PHEM 溶液は、細胞染色で洗浄・抗体とのインキュベーションに用いると、PBS を用いた時と比較して染色性を亢進することが報告されている [5] が、免疫組織学的染色において定性的に検討した報告は少ない。

筆者たちは、発生期における細胞内代謝関連の抗原、および細胞種のマーカーなどで組織染色を行うことが多い。そこで、本研究では①組織中において、直ちに分解されやすい代謝産物であるグリコーゲンとその代謝関連酵素、②細胞種のマーカー、および③細胞内小器官のマーカーについて着目し、グリオキサールを用いた組織固定方法および染色に用いる染色溶媒（バッファー）の影響を検討した。また、一個体から調製した複数の組織切片を、免疫組織化学や *in situ* hybridization (ISH) 法といった異なる組織染色に使い分けることも多いため、固定法が ISH 法のシグナルに及ぼす影響も併せて解析した。

## 手法

### ①固定液の調整

・4% PFA 固定液：パラホルムアルデヒド粉末（ナカライテスク）を終濃度が 8% となるように 2 倍濃度の PBS 中に加熱・溶解し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。使用時に蒸留水で 2 倍希釈とし、終濃度 4% となるように調製した。固定液の pH はおよそ 7.35 であった。

・グリオキサール・酢酸固定液：40% グリオキサール溶液（ナカライテスク）と酢酸（ナカライテスク）がそれぞれ 4%、0.8% となるように PBS 中に希釈し、塩酸で pH4.0 に調整した。

・グリオキサール・酢酸・エタノール固定液：グリオキサール、酢酸、およびエタノールがそれぞれ 4%、0.8%、20% となるように PBS 中に混合した。pH は塩酸で 4.0 に調整した。

・PFA・中性グリオキサール固定液：イオン交換樹脂 Amberlite IRA-410 (Cl)

25 g をあらかじめ NaOH で活性化した後に、水で平衡化し、15 mL の 40% グリオキサール溶液を加えて、室温一時間攪拌した。樹脂より溶出したグリオキサール溶液の pH を測定するとおよそ pH7.0 であった。これを、0.1 M リン酸緩衝液中に終濃度 12% となるように希釈し、-20°C で保存した。固定には 4%PFA、1% グリオキサールとなるように調製して用いた。

## ②灌流固定

ICR 系統の妊娠マウスは清水実験材料より購入した。母獣を過剰量のバルビツール酸系麻酔の投与により安楽死させて胎仔を取り出し、実体顕微鏡下で心臓より灌流固定を行った。脳組織を摘出後、灌流固定に用いた固定液と同じ溶液中に脳を浸漬し、4°C 一晩後固定を行った。固定液を除いた後、20% ショ糖を含む PBS 中に組織を浸漬し一晩置換を行った。組織は OCT コンパウンド (Sakura Finetek, Japan) 中に包埋し、クリオスタット (Leica CM1860) 中で冠状断平面で 20 $\mu$ m の厚さに薄切した。本動物実験は、本学動物実験委員会で承認されている (承認番号: M2022-208)。

## ③免疫組織化学染色

切片を 0.1% Tween20 を含む PBS (以下 PBST と呼ぶ) 中で 5 分間洗浄した後に、1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBST 溶液中で室温、1 時間インキュベートした。その後に、抗体を PBST 溶液中に希釈し切片と 4°C、一晩インキュベートした。切片は、PBST 溶液で洗浄し、洗浄後に蛍光で標識された二次抗体 (Alexa Fluor 488 -IgG or Alexa Fluor 594-IgG, Thermo Fischer, USA) と 1 時間インキュベートした。洗浄後スライドガラスに封入した。また、PHEM 溶液を用いた染色では、PBST 溶液を用いる代わりに全ての段階で PHEM 溶液 (60 mM Pipes (pH6.9), 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Tween20) を用いた。画像は、蛍光顕微鏡 (Olympus BX51) およびコンフォーカル顕微鏡 (Olympus FV-1000) にて撮像した。用いた一次抗体の種類は表 1 中に示した。

## ④ ISH 法による染色

ISH による染色は、過去の文献の手法通りに行った [6]。プローブには、マウス

Ldha 配列 (NM\_010699: nt139-1137) を pBluescript ベクターに挿入したものを鋳型とし、DIG RNA labeling system (Sigma, USA) を用いて調製した。

## 結果

胎生 17 日齢のマウスを 4%PFA (PFA)、3% グリオキサール +0.8% 酢酸 (GA)、および 3% グリオキサール +0.8% 酢酸 +20% エタノール (GAE) の固定液を用いて灌流固定し、それぞれ切片を作製した。GAE で固定したサンプルは、特に形態の維

表 1 固定法と染色溶媒が及ぼす影響

抗体	抗体情報	固定	染色溶媒	シグナル強度	抗体	抗体情報	固定	染色溶媒	シグナル強度
anti-glycogen	mouse IgM Baba et al., (1994)	PFA	PBST	++	anti-GFAP	rabbit IgG Nittobo	PFA	PBST	++
			PHEM	+++				PHEM	+++
		GA	PBST	+			GA	PBST	+
			PHEM	+			PHEM	+	
GAE	PBST	+	GAE	PBST	-				
	PHEM	+	PHEM	-					
anti-GAA	rabbit IgG ThermoFischer	PFA	PBST	+	anti-GFAP	mouse IgG clone (GA5) Sigma	PFA	PBST	-
			PHEM	-				PHEM	+
		GA	PBST	+(*)			GA	PBST	+
			PHEM	+(*)			PHEM	+	
GAE	PBST	+(*)	GAE	PBST	-				
	PHEM	+(*)	PHEM	-					
anti-TOM20	rabbit IgG Proteintech	PFA	PBST	++	anti-NG2	rabbit IgG Millipore	PFA	PBST	-
			PHEM	+++				PHEM	-
		GA	PBST	+			GA	PBST	+
			PHEM	+			PHEM	++	
GAE	PBST	-	GAE	PBST	+				
	PHEM	-	PHEM	+					
anti-Giantin	rabbit IgG Abcam	PFA	PBST	+	anti-PDGFR $\alpha$	goat IgG RnD Systems	PFA	PBST	++
			PHEM	+				PHEM	++
		GA	PBST	+++			GA	PBST	+++
			PHEM	+++			PHEM	+++	
GAE	PBST	+++	GAE	PBST	+++				
	PHEM	+++	PHEM	+++					
anti-LAMP1	rat IgG clone(1D4B) eBiosciences	PFA	PBST	+++	anti-Olig2	rabbit IgG Millipore	PFA	PBST	+
			PHEM	+++				PHEM	+
		GA	PBST	-			GA	PBST	+++
			PHEM	-			PHEM	+++	
GAE	PBST	-	GAE	PBST	+++				
	PHEM	-	PHEM	+++					
anti-Arl13b	rabbit IgG Sigma	PFA	PBST	-			PFA	PBST	+
			PHEM	-				PHEM	+
		GA	PBST	+++			GA	PBST	+++
			PHEM	+			PHEM	+++	
GAE	PBST	++	GAE	PBST	+++				
	PHEM	+	PHEM	+++					

+/-: + の個数はシグナルの強度を、- はシグナルが検出されなかったことを示す。

\*: 非特異的なシグナルが観察されたことを示す。

持状態が悪く、切片が破損することがしばしば認められた。我々の研究室で頻繁に免疫染色に用いている抗体を数種類選択し、シグナル強度におよぼす固定方法と染色溶媒の影響を解析した（表 1）。

PBST 溶液を用いた免疫染色法によって、組織中のグリコーゲンを、その特異的抗体を用いて検出した。その結果、PFA で固定した切片において、一番シグナル強度が強かった（図 1）。GA や GAE 固定では微弱なシグナルしか検出されなかった。次に、同じ個体から調製した切片を、PHEM 溶液を用いて染色した。その結果、PFA 固定においては PHEM 溶液を用いて染色を行うと PBST 溶液を用いて染色した時と比較して、広い領域で陽性シグナル（粒子）が観察された。しかし、GA や GAE 固定では PBST 溶液を用いた時と比べて、シグナルの強さに変化はなかった。これらのことから、グリオキサール固定はグリコーゲンの染色固定には適当でないことが示された。グリオキサール溶液の強い酸性が抗原性の減弱に関与している可能性が考えられる。そこで、胎生 14 日齢のマウスを 4%PFA 固定液、4% PFA に 0.8% 酢酸を加えた固定液、および 4%PFA に中性の 1.0% グリオキサールを混合した溶液を用いてそれぞれ固定し、PHEM 溶液を用いて染色した。その結果、固定液への酢酸の添加によりシグナルが減弱すること、中性グリオキサールの添加はほぼ染色性に影響しないことが明らかとなった。

酸性グルコシダーゼ（GAA）はリソソーム内においてグリコーゲン顆粒を分解する酵素である。GAA を固定法と染色溶媒を変えて染色を行った。その結果、PFA 固定

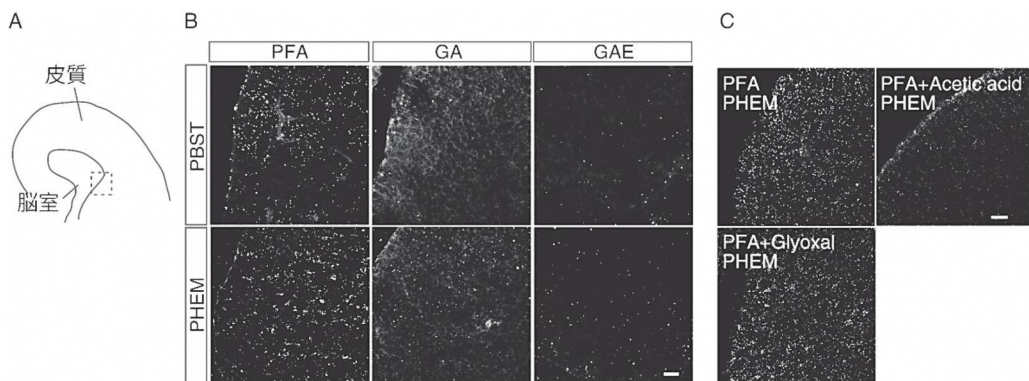


図 1 Glycogen の染色における固定法と染色溶媒の影響 A 胎生 17 日齢の大脳皮質領域の模式図。四角で囲んだ領域を蛍光顕微鏡で撮像した。B グリコーゲン抗体での染色 C 胎生 14 日齢のグリコーゲン抗体での染色 スケールバー :20  $\mu$ m

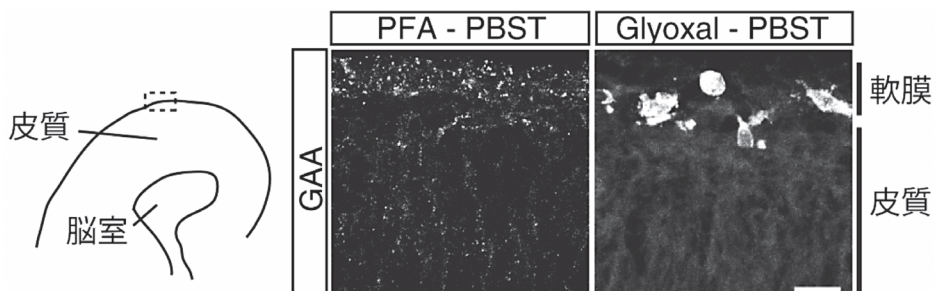


図2 GAAの染色における固定法の影響 左図：胎生17日齢の大脳皮質領域の模式図。四角で囲んだ領域を蛍光顕微鏡で撮像した。スケールバー：20 $\mu$ m

において、PBST溶液を用いて染色した時には脳表層にリソソーム様の顆粒状の染色像が認められたが（図2中）、同じ固定法でもPHEM溶液を用いて染色した時には顆粒状の染色像は認められなかった（表1）。さらに、グリオキサールを用いた固定法では、脳表層を覆う軟膜の細胞に強い陽性細胞が認められた（図2右）。GAAのmRNAをISH法で検出した時には、表層にこのような強い染色像は認められない（data not shown）ことから、非特異的なシグナルであると考えられた。

続いて発生期に良く用いられる細胞マーカーの染色像を解析した。オリゴデンドロサイトのマーカーとして認められるNG2、およびPDGFR $\alpha$ を染色した。その結果、GA固定を行ったサンプルでNG2およびPDGFR $\alpha$ の最も強い染色像が認められた（表1）。NG2は、PFAによる固定時間が長くなると免疫染色による染色シグナルが減弱することが報告されている[7]。GA固定では、一晚PFA固定したサンプルよりも強いシグナルが認められたが、過固定のためか短時間で固定したものよりシグナル強度が減弱していた。また、オリゴデンドロサイト系譜細胞の別のマーカーであるOlig2はGA固定およびGAE固定で強いシグナルが認められた。

グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）は、アストロサイトのマーカーとして知られており、発生期には左右の皮質を結ぶ軸索束である脳梁の形成に働くグリア細胞のマーカーとして使用される。Indusium griseumは、そういったグリア細胞が局在する部位の一つである。GFAPに対するポリクローナル抗体を用いて染色すると、この領域においてPFA固定でPHEM溶液を用いた時に最も強いシグナルが得られた（図3）。しかし、同じGFAPに対するモノクローナル抗体を用いて染色を行うと、GA固定を行った時のみシグナルが観察された。このことはPFA固定では、賦活化を行わない条件下ではモノクローナル抗体で認識される抗原がマスクされていることを示

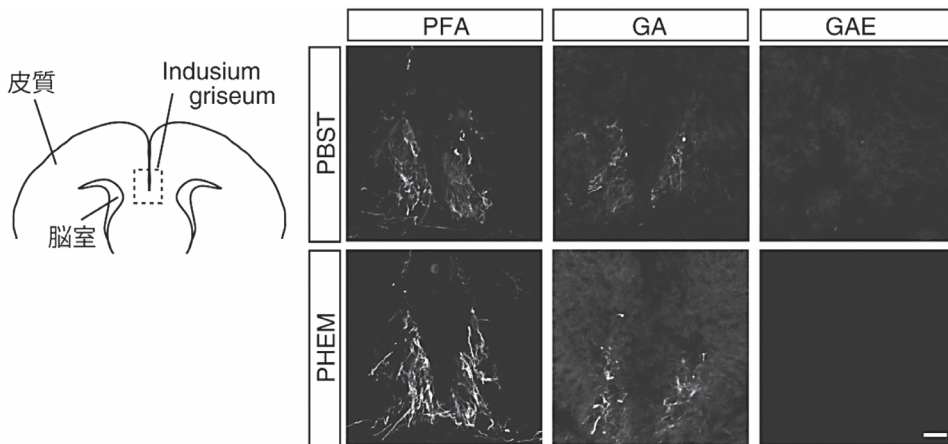


図3 GFAPの染色における固定法の影響 左図：胎生17日齢の大脳皮質領域の模式図。四角で囲んだ領域を蛍光顕微鏡で撮像した。スケールバー：20  $\mu$ m

していると考えられる。

さらに、細胞内小器官のマーカーに対する免疫染色を行った。その結果、リソソームやミトコンドリアのマーカー（LAMP1 および TOM20）は PFA 固定で良好なシグナルが認められ、ゴルジ体や繊毛のマーカー（Giantin および Arl13b）は GA 固定の方が強いシグナルを示した。また、染色に用いた溶媒による差は一部の抗体では認められたが、劇的な差異は認められなかった。これらの結果から、他のマーカーは検討していないものの、細胞小器官あるいは抗原ごとに異なる固定方法が最適であることを示している。

最後に ISH 法による染色を行った。Ldha のプローブを用いて mRNA の染色を行った。4%PFA 固定を行った切片では、強いシグナルが認められたが、GA 固定および GAE 固定では、微弱な mRNA のシグナルしか検出できなかった。このことは、酸性 pH が mRNA の組織中での保持に影響しているためと考えた（図 4B）。実際に、PFA に酢酸を添加した固定液を用いた場合、ISH シグナルの減弱が認められた（図 4C）。

## 考察

本論文では、免疫組織化学染色における組織固定法と、染色に用いる溶媒の検討を行った。その結果、固定法について PFA 固定が好ましいものや GA 固定が好ましいものが混在していた。GAE 固定は組織の構造が不良となることが多く、本固定でのみシグナルが観察される事例もなかったことから、PFA 固定および GA 固定を目的に応



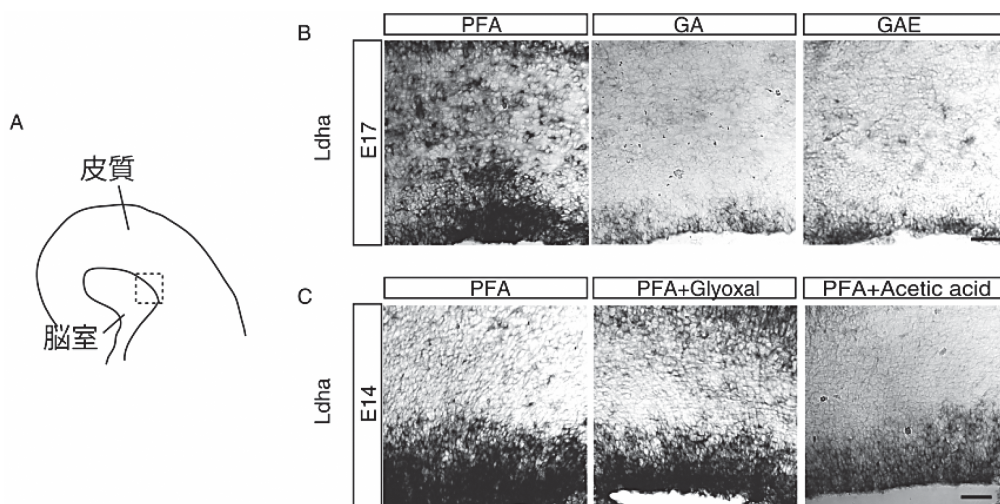


図4 固定法がISHのシグナルにおよぼす影響の解析 A: 観察した脳領域 B: 各固定法により調製した(B)胎生17日齢および(C)胎生14日齢の脳切片におけるLdhaのISH法による染色。スケールバー:50 $\mu$ m

じて使い分けるのが良いと考えられる。個体の活動停止後すぐに分解が始まるグリコーゲンの染色性について、PFA固定液への中性グリオキサールの添加は効果が認められなかった。しかし、この固定法により代謝産物の量が保存されているかを確定するためには生化学的手法によるより詳細な検討が必要であると考えられる。また、染色溶媒においてもPHEM溶液が染色強度に関して優れている抗体もあったが、ほとんどの抗体に関しては染色強度に差がなく、PHEM溶液では染色がうまくいかない場合も見られた。今回は、組織切片の抗原賦活化を試さない条件で染色強度を比較したため、陽性像が得られなかった組織切片においても抗原を賦活化することで免疫陽性となる可能性がある。また、同一個体から得られた切片を用いてISH法によるmRNAの検出も行う場合は、従来から用いてきたPFAによる固定法が第一選択肢として優れていると考えられる。

また、特定の抗体においてはGA固定により偽陽性となる染色像が認められた。今回の結果からは、ある抗原を染色したい場合はあらかじめ固定法や染色条件を決定する必要があるが、可能な限りノックアウトマウスの切片を対象として用いるなどのネガティブコントロールの検討が重要であると考えられた。脳の発生学分野においては、CRISPR/Cas9などのゲノム編集法が一過的な遺伝子導入法により簡便に行えることから、抗体染色のバリデーション方法としても有用であると考えられる。

## 謝辞及び利益相反

本研究を行うにあたりお世話になった京都府立医科大学特任教授の小野勝彦先生、京都府立医科大学生物学教室の野村真先生（現・京都工芸繊維大学兼任）、および矢崎真理子氏に御礼申し上げます。また、抗グリコーゲン抗体を供与いただいた、徳島大学馬場麻人教授に深謝申し上げます。開示すべき利益相反はありません。

## 参考文献

1. Kong, J., et al., *Brain glycogen decreases with increased periods of wakefulness: implications for homeostatic drive to sleep*. J Neurosci, 2002. **22** (13): p. 5581-7.
2. Richter, K.N., et al., *Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy*. EMBO J, 2018. **37** (1): p. 139-159.
3. Konno, K., et al., *Glyoxal fixation: An approach to solve immunohistochemical problem in neuroscience research*. Sci Adv, 2023. **9** (28): p. eadf7084.
4. Sobue, K., Y. Fujio, and K. Kanda, *Tumor promoter induces reorganization of actin filaments and caldesmon (fodrin or nonerythroid spectrin) in 3T3 cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85** (2): p. 482-6.
5. <https://www.ptglab.co.jp/news/blog/immunofluorescence-tips-for-immunostaining-cultured-cells/>
6. 細胞内エネルギー代謝における代謝修復経路とその破綻 *Studia humana et naturalia*, 2022. (56): p.43-54.
7. Pfeiffer, F., A. Sherafat, and A. Nishiyama, *The Impact of Fixation on the Detection of Oligodendrocyte Precursor Cell Morphology and Vascular Associations*. Cells, 2021. **10** (6).