

# 免疫電子顕微鏡法におけるエクソソーム試料作製条件の検討

三重大学自然科学系技術部

○黒澤俊人, 小川覚

kurosawa@bio.mie-u.ac.jp

## 1. はじめに

エクソソームとは脂質二重膜を有し、エンドゾームに由来して細胞外に放出される直径 50 nm から 150 nm 程度の細胞外小胞である。近年、エクソソームは細胞間の情報を伝達する役割を担い、様々な病気に関わっていることが示唆されている。そこで血液中のエクソソームの存在を確認するために、電子顕微鏡撮影が必要となる。2017年3月に医学系研究科の研究室からエクソソームの電子顕微鏡撮影依頼を受け、金コロイドによる免疫電子顕微鏡法を用いた撮影を試みた。様々な試料作製方法があり、当初の方法では上手く行かず、各方面から指導や助言をいただき、何とかエクソソームの免疫電子顕微鏡撮影像を得ることができた。本報告では新たに電子顕微鏡撮影に挑戦したその試行錯誤の過程を紹介する。

## 2. 免疫電子顕微鏡法

免疫電子顕微鏡法とは、抗原と抗体の特異反応を利用して、目的とする抗原の局在を電子顕微鏡レベルで明らかにする免疫化学的方法である。今回はヒト CD9 を抗原とし一次抗体は Anti-CD9 を、二次抗体は金コロイド標識抗体を使用する間接法で観察を行った。

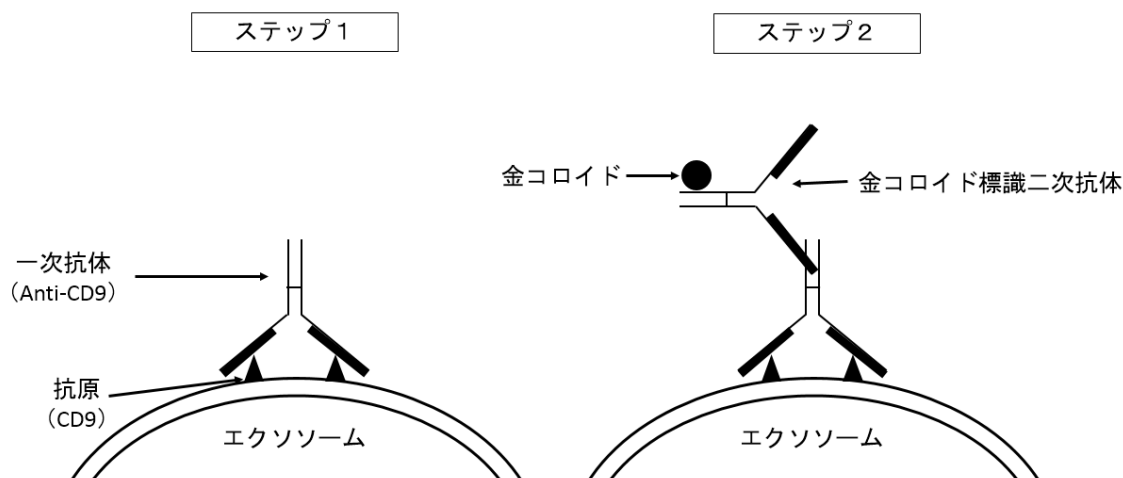


図1 金コロイド免疫電子顕微鏡法の原理

ネガティブ染色法とは観察物質そのものを染色するのではなく、物質の周囲を染色剤で取り囲む状態にし、透過型電子顕微鏡で観察すると、物質そのものは染まらないため白く（明るく）見え、周囲が染色剤で覆われるため暗くなることで物質を強調させて観察する手法である。観察物質は陰影像として観察されるためネガティブ染色法と言う。染色剤には酢酸ウラニルやリンタングステン酸などが用いられる。

## 3. グリッドの処理

グリッド：透過型電子顕微鏡で試料を観察するときに用いる直径約 3 mm、厚さ 10~50 μm の円形の金属網。光学顕微鏡のスライドガラスに相当する。通常は安価な銅製のグリッドを用いるが、今回は免疫電子顕微鏡撮影であり、水溶液に浮かべて抗体反応や洗浄を行うため長時間水溶液に接することにな

る。銅製では一部が腐食しコンタミとなることがあるため、ニッケル製（300メッシュ）のグリッドを用いた。

支持膜の作製：0.5%フォルムバル液にスライドガラスを浸してから取り出すとガラス面に薄膜が形成される。薄膜を水面に浮かべ、グリッドを貼り、その後乾燥させた。

カーボン蒸着：真空蒸着装置を用いて電極間にカーボンを着し、通電加熱し、カーボンを蒸着させた。カーボン支持膜は2~10 nm と薄く、電子線照射に強く安定性も高いので高倍率の観察に向いている。

親水化処理：試料との接着性を良くするために、イオンスパッタ装置の陽極にグリッドを並べ、親水化処理を行った。この処理でグリッド表面はエッチングされ、親水性となる。

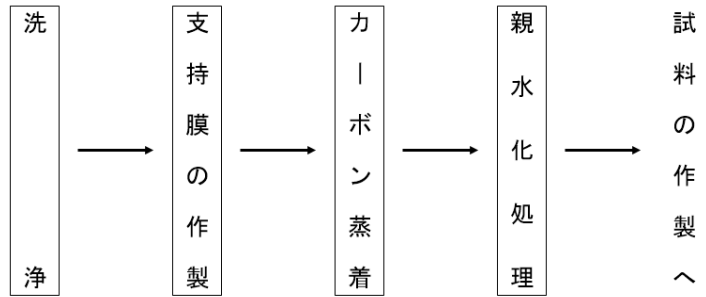


図2 グリッドの処理

#### 4. 試料作製条件の検討

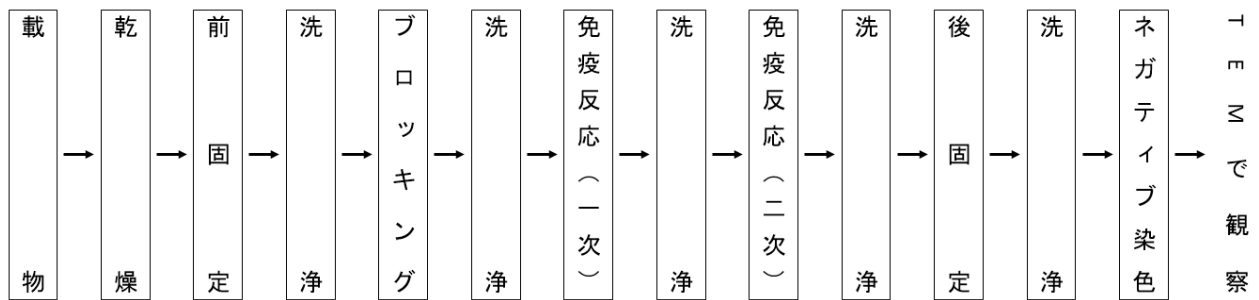


図3 試料作製の手順（検討前）

当初の試料作製の手順（図3）では目的とするエクソソームの免疫電子顕微鏡撮影像を得ることはできなかった（図5）。そこで我々はそれぞれの試料作製の手順について以下の条件による検討を行った。

表1 試料作製条件と結果

手順	条件と結果		
乾燥	乾燥あり ×	乾燥なし ○	
洗浄液	リン酸緩衝液 ○	D-PBS(-) ○	蒸留水 △
前固定	パラフォルムアルデヒド △		
後固定	グルタルアルデヒド ○		
免疫反応時間（一次）	30 min △	60 min ○	
免疫反応時間（二次）	60 min △	120 min ○	
二次抗体	1 nm 金コロイド ×	10 nm 金コロイド ○	
染色剤	酢酸ウラニル ○	リンタングステン酸 ○	

#### 5. 観察結果

試料作製手順について表1のとおり一つ一つ条件を変えて電子顕微鏡撮影を行った結果、図4に示す手順で試料を作製することで、金コロイドが免疫反応によりエクソソームに付着した像を撮影すること

ができた (図 6)。

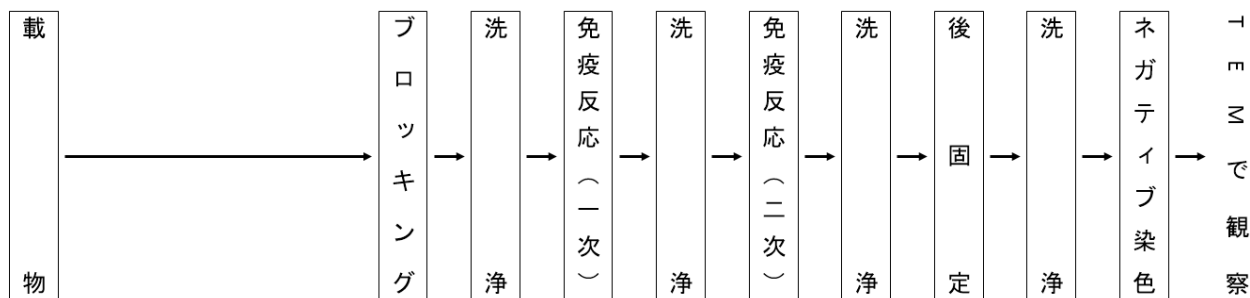


図 4 試料作製の手順 (検討後)

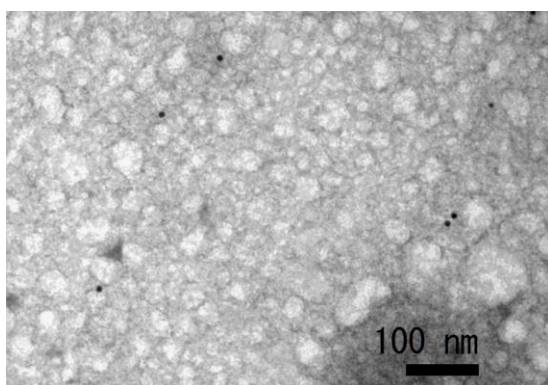


図 5 試料作製 (検討前)

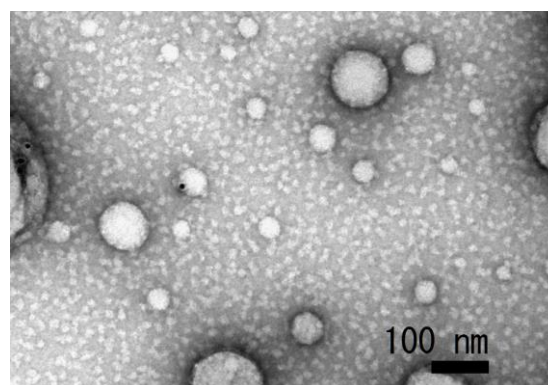


図 6 試料作製 (検討後)

## 6. おわりに

我々にとって免疫電子顕微鏡撮影という新たなチャレンジであり、当初はどのような結果が出るのか、そもそも結果が出ないのではないかと不安な気持ちでの出発であったが、約1年間にわたり金コロイド免疫電子顕微鏡法の様々な条件を検討し、トライアルアンドエラーを繰り返したことで一定の成果を得ることができた。しかし、今回検討した試料作製条件でも常に安定してエクソソームの免疫電子顕微鏡撮影像が得られるわけではないので、他の条件が寄与していることも考えられる。今後も試料作製手順や条件について見直しを繰り返し、安定して画像が得られるよう努力していきたい。

## 謝辞

三重大学大学院医学系研究科環境分子医学分野の及川伸二准教授、小嶋みどり様をはじめとする研究室の皆様、神経再生医学・細胞情報学分野の溝口明教授、王淑杰講師、生物資源学研究科先端養殖管理工学研究室の一色正准教授をはじめとする研究室の皆様には多大なご支援とご協力をいただきました。厚く御礼を申し上げます。

## 参考文献

- 1) 電顕入門ガイドブック (社) 日本顕微鏡学会 2004年
- 2) 電子顕微鏡生物試料作製法 改訂2版 (社) 日本電子顕微鏡学会 関東支部
- 3) 染色・バイオイメーjing実験ハンドブック 細胞や組織の形態・遺伝子・タンパク質を観るための染色法と顕微鏡観察のすべて 編集/高田邦昭 斎藤尚亮 川上速人 (株) 羊土社
- 4) エクソソームハンドブック コスモ・バイオ株式会社