

経済産業省委託事業：

「低炭素社会を実現する超軽量・高強度革新的融合材料プロジェクト(NEDO 交付金以外分)

ナノ材料の安全・安心確保のための国際先導的安全性評価技術の開発」

③ナノ材料の有害性試験・評価のための基盤技術の開発

(a-1)ナノ材料の体内分布及び生体反応分布の定量化技術の開発

ナノ材料の体内分布及び生体反応分布の 定量化技術の技術解説書

2016年3月

国立研究開発法人産業技術総合研究所

分析計測標準研究部門

山本和弘 吉田智子 林田津安子

第1章 はじめに

透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscopy; TEM) はサブナノメートルの高い空間分解能を有し、元素分析も可能であることから、ナノ材料の計測解析技術として最も有力な計測手法である。一方、ナノ材料の安全性研究の観点からは、動物試験において光学顕微鏡を用いた動物組織の病理検査が広く行なわれている。TEM は極めて狭い局所的な領域の計測手法であることから、光学顕微鏡のような広域視野の計測手法と組み合わせて TEM 計測を行なう事で通常の病理検査と整合性を確保した解析が可能となる。

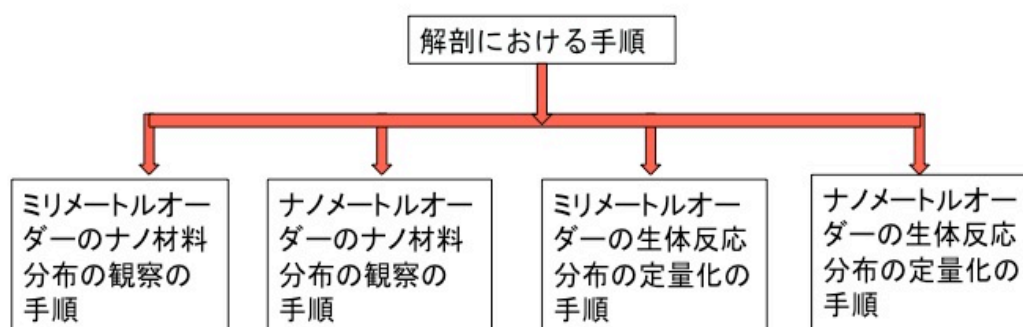
本技術解説書ではナノ材料の吸入暴露試験および気管内投与試験を行なったラットの肺組織を対象に、光学顕微鏡によるミリメートルオーダーの肺組織の広視野の観察から蛍光 X 線分析を用いてナノ材料の分布を調べる手法、および TEM によりサブナノメートルオーダーの高分解能で観察する手法を解説する。また肺に取り込まれたナノ材料は肺胞マクロファージに貪食される事が知られているが、肺胞マクロファージを免疫組織学的解析することによりナノ材料に対する反応を知る事ができる。そこでレーザー共焦点顕微鏡を用いたミリメートルオーダーの広視野の生体反応分布の定量化観察と透過型電子顕微鏡を用いた高分解能の生体反応分布の定量化観察する手法を解説する。

本技術において観察試料調製が一番重要である。生物組織は生命活動の停止とともに自己融解により微細構造が変化してしまう。透過型電子顕微鏡観察ではサブナノメートルオーダーで組織の微細構造を維持した観察試料調製が必要である。一方で、広範囲の光学顕微鏡観察のために袋状の柔らかい臓器である肺全体を薄切化する必要がある。さらに、免疫組織学的解析を行うために抗原抗体反応を失活させないプロセスであることが必要である。以上の要求を満たす観察試料調製プロトコルを開発することがポイントとなる。

第2章 全体の流れ

ナノ材料の吸入暴露試験および気管内投与試験を行なったラットの肺組織を対象として、動物個体の有効利用を鑑み、ミリメートルオーダーの広視野計測からサブナノメートルオーダーの高分解能計測まで広く対応できる試料調製方法を開発した。本試料調製方法により、解剖後の肺組織において抗原抗体反応を失活させずに微細構造を保持するマイルドな処理が可能となった。

全体の流れとして、ナノ材料の吸入暴露試験および気管内投与試験後のラットの『解剖における手順』に従い肺組織を処理した後、『ミリメートルオーダーのナノ材料分布の観察の手順』、『ナノメートルオーダーのナノ材料分布の観察の手順』、『ミリメートルオーダーの生体反応分布の定量化の手順』、『ナノメートルオーダーの生体反応分布の定量化の手順』に従い必要な解析を行なう。解剖後の肺組織の連続切片を用いる事により、肺のほぼ同一の部位に関してナノ材料分布や生体反応分布の定量化を行なう事が可能となる。



第3章 解剖における手順

1. 適用範囲

ここに示す解剖手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露や気管内投与による動物試験において、ナノ粒子を吸入又は投与された肺組織の顕微鏡試料の調製に適用する。

2. 引用規格

なし

3. 用語、定義及び記号

3.1 固定

生命活動の停止によるタンパク質の変性を停止させて、生きている状態に近い形態に保つ処理。化学的固定と物理的固定に大別される。

3.2 化学的固定

化学反応によって、細胞内のタンパク質や脂質を安定化することによって構造形態を保持する方法。アルデヒド基による蛋白間の架橋構造により変性凝集させるアルデヒド系固定剤や酸化還元反応により蛋白凝集をさせる重金属系固定剤などを用いる。

3.3 物理的固定

物理的に組織の生体活動や細胞内の水の移動を瞬時に凝固させることによって、生きている状態に近い形態を保持する方法。急速に極低温にする急速凍結法と加圧下で水の凝固速度を遅延しながら凍結する高圧凍結法がある。

3.4 緩衝液

生物組織は pH に敏感なため、酸や塩基を加えたり濃度が変化しても pH が大きく変化しないようにした溶液。生物組織の電子顕微鏡試料調製では、リン酸緩衝液やカコジル酸緩衝液が一般的。

4. 装置及び材料

4.1 解剖道具一式

ラットの解剖に用いる道具として、はさみ、ピンセット、鉗子等を用いる。

4.2 チューブポンプ

シリコンなどの軟質チューブをローラーでしごいて液体を送液するポンプ。代表的な製品としてアトー社のペリスタポンプがある。

4.3 加圧シリンジ

肺胞等の細胞の内外に空気を含む組織では固定液などの液を組織に浸透させるために固定環境を加圧または減圧することが有効である。肺組織では肺胞腔をつぶさないため加圧法が有効であり、一定時間シリンジを加圧するために用いる。

4.4 試薬

- ・リン酸緩衝液（以下, PB と表記） 0.1mol に濃度調製する。
- ・パラフォルムアルデヒド（以下, PFA と表記）固定液 0.1mol リン酸緩衝液を溶媒として4%に濃度調製する。

（注釈）

電子顕微鏡試料調整のための PFA 固定液はパラフォルムアルデヒド粉末から出来るだけ解剖直前に調整する。粉末の PFA を蒸留水に溶かして調整する場合、PFA は室温では 溶けにくいので約 70°C に温め、1 規定 水酸化ナトリウム水溶液をすこしずつ入れて粉末 PFA が溶け残るか溶け残らないか位の所で水酸化ナトリウム水溶液を入れるのをやめる（あまり入れ過ぎると pH が アルカリ性になりすぎるため）。解け残った PFA 粒子を除去するため、ろ紙でろ過する。その後蒸留水を加えて 8 %PFA 溶液を調整。8 %PFA 溶液と同量の 0.2 mol PB を混合して、4 %PFA/0.1 mol PB 400mL を作製する。これらの作業は局所排気設備で行う。

5. 手順

5.1 ラットの麻酔

- ・ラットに麻酔をかける。

5.2 開胸

- ・ラットを開胸する。

5.3 肺の膨張

- ・4%PFA/0.1 mol PB パックを、肺から約 50cm の高さにセットする。
- ・気管に 4%PFA/0.1 mol PB パックにつながったチューブをつなぎ、その水圧で徐々に気道から 4% PFA /0.1 mol PB 固定液を注入する。
- ・十分に肺が膨らんだら気道を結さくする。

5.4 灌流固定

- ・肺動脈の中に針が出るように、右心房に注射針を刺して保持する。
- ・チューブポンプを用いて 0.1 mol PB を 10mL/分の流速で灌流させる。右心耳を切り心臓から血液を排出させる。
- ・右心耳からの液が透明になってきたら（およそ 100mL (10 分)、チューブポンプの灌流液を 0.1 mol PB から 4%PFA/0.1 mol PB に切り替える。4% PFA /0.1 mol PB の灌流作業は局所排気設備で行い、右心耳から排出された 4% PFA /0.1 mol PB は廃液として回収する。
- ・100mL (10 分) 灌流したら、灌流固定をやめる。

5.5 肺の摘出

- ・気管を結さくし、肺胞内を固定液で満たした状態のまま、食道、血管等を切断し、肺を摘出する。

5.6 浸漬固定

- ・4% PFA /0.1 mol PB 固定液を満たしたシリンジに肺を入れ、加圧しながら浸漬固定をする (4℃、2 時間)。シリンジ先端は封止して、シリンジには空気抜き穴を開けておく。加圧器の写真を図 1 に示す。またシリンジを加圧していない

状態を図 2 (a) に、加圧した状態を図 2 (b) に示す。加圧することにより肺中に固定液が浸透し、沈んでいる事がわかる。

5.7 組織洗浄

・固定後 2 時間経過したら、4°C の 0.1 mol PB 液で組織の洗浄を行う。この際、肺を各葉に切り分け、洗浄液と固定液が置換されやすくする。10 分ごとに交換を 4 回、15 分ごとに交換を 2 回、1 時間ごとの交換を 2 回行なう。

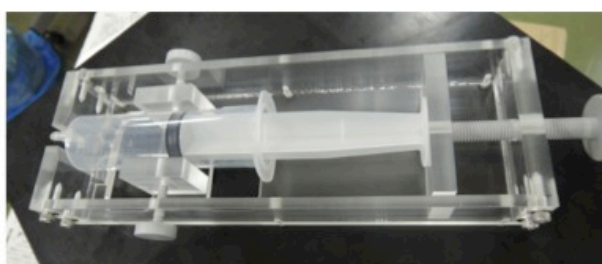


図 1 加圧シリンジ

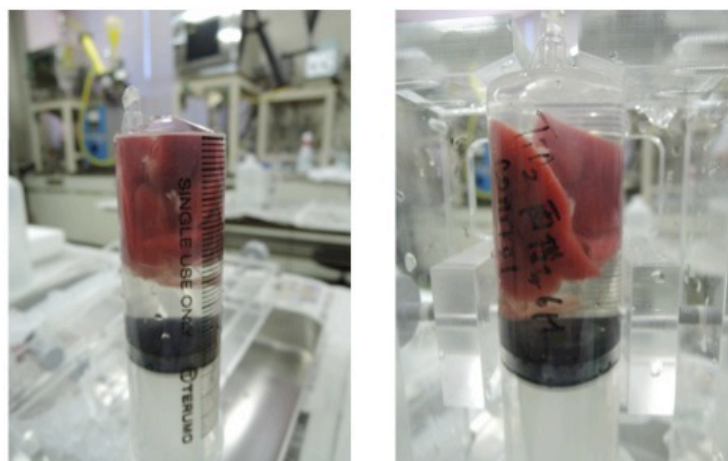


図 2 加圧していない状態の肺 (左) と加圧状態の肺 (右)

第4章 ミリメートルオーダーのナノ材料分布の観察の手順

ミリメートルオーダーの肺組織の広視野の観察からナノ材料の分布を分析するため、肺組織の通常の光学顕微鏡切片プレパラートを用いた分析手法を検討した。光学顕微鏡切片プレパラートを用いた分析が可能になれば、光学顕微鏡で病理診断した切片をそのまま用いてナノ材料の分布計測が可能となるため、病理との直接的な比較ができる。二酸化チタンや二酸化シリコン等の金属酸化物ナノ粒子を対象とし、金属の元素マッピング手法を検討した。分析手法として、電子線をプローブとした手法とX線をプローブとした手法が考えられるが、生物組織切片も絶縁性であるために電子線照射によるチャージアップ現象が問題となる。チャージアップを防止するためには、金属やカーボン薄膜をコーティングする事により表面に導電性を付与する必要がある。チャージアップ防止のための金薄膜コーティングを行なったところ、十分なチャージアップ防止のためには金薄膜膜厚を厚くする必要があり光学顕微鏡観察に支障があった。そこでX線プローブによる試料との相互作用により発生した蛍光X線のエネルギー分析を行う手法分析を選択した。X線をコリメーターで収束する事により分析の空間分解能を向上させる事が可能である。現状技術で最小径である10 μ m径のコリメーターを用いてX線を収束して光学顕微鏡切片プレパラートに照射して、蛍光X線分析および元素マッピングを行なう。

1. 適用範囲

ここに示す手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内投与試験において、ナノ粒子を吸入又は投与された肺組織の光学顕微鏡切片試料の蛍光X線分析に適用する。

2. 引用規格

なし

3. 用語、定義及び記号

3.1 蛍光X線分析

X線を試料に照射した時に発生する蛍光X線のエネルギーと強度から、物質の成分元素や組成を分析する手法。蛍光X線は元素毎にそのエネルギーが固有の

ため元素分析が可能となる。X線は物質を透過する能力が高く、固体、液体、粉体を非破壊で分析することが可能。

3.2 氷晶防止処理

凍結時、組織中での氷の結晶化の防止効果、さらに組織と包埋剤の間にできる亀裂防止のための処理。

3.3 凍結包埋

生物試料の包埋の際に加熱や有機溶媒による脱水を行わないため、抗原の反応性が失われにくいという利点がある。凍結の際に氷晶が生じるのを防ぐための処理後に凍結用コンパウンドに組織片を包埋し、 -90°C に冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液中で凍結する。

3.4 凍結切削

凍結した組織標本を低温状態で薄切する手法。

4. 装置及び材料

4.1 蛍光 X 線分析装置

収束した X 線を試料に照射して試料より発生した蛍光 X 線のエネルギーと強度を分析する装置。X 線の収束径が小さいほど空間分解能が高い分析が可能となる。実施例で用いた蛍光 X 線分析装置（堀場製作所製モデル XGT-7200V）は X 線を $10\mu\text{m}$ 径まで収束できる。

4.2 凍結包埋装置

イソペンタン等の有機溶剤を -90°C に保持するための装置。（例えば Leica 社 UT2000F）

4.3 凍結切削装置

凍結包埋した組織ブロックを冷温状態で薄切りする装置。(例えば Leica 社クリオスタット、Thermo 社クリオスタット)

4.4 試薬

- ・ 0.1mol リン酸緩衝液(PB)
- ・ ショ糖
- ・ 凍結用コンパウンド (例えばサクラファインテック社 O.C.T. コンパウンド、Thermo 社 NEG50)

5. 手順

観察試料を通常のガラスプレパラート上に保持した光学顕微鏡切片を用いる。ガラスプレパラートは表面処理無しのものを用い、肺試料切片にカバーガラスはかけない。

解剖後の肺試料から観察試料を調製する場合は、パラホルムアルデヒドで固定した肺は柔らかいために、そのままでは光学顕微鏡切片に切削することは困難である。そこで肺組織を凍結して切片を調製する手法を用いた。以下に手順を示す。

5.1 試料トリミング

- ・ カミソリを用いて組織を冠状断に約 5 mm 厚にスライスする。

5.2 洗浄

- ・ 0.1mol PB で攪拌、20 分保持。これを 3 回繰り返す。

5.3 氷晶防止処理

- ・ 10%ショ糖-0.1mol PB 混合液で攪拌、2 時間保持。
- ・ 20%ショ糖-0.1mol PB 混合液で攪拌、2 時間保持。
- ・ 30%ショ糖-0.1mol PB 混合液で攪拌、一晩保持。(試料が沈むまで)

5.4 置換

- ・凍結用コンパウンド 室温 浸漬 30分～2時間保持する。

5.5 脱気

- ・真空中で脱気、凍結用コンパウンド室温 浸漬 30分～2時間保持。

5.6 凍結包埋

- ・新しい凍結用コンパウンドを治具に充填し、 -90°C に冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液（混合比 3:8）中に浸漬して凍結する。

5.7 凍結切削

- ・クリオスタットにて -20°C 、 $8\mu\text{m}$ 厚にて切削
- ・表面処理（MAS コーティング等）したスライドガラスに貼り付け
- ・風乾

6. 実施例

二酸化チタンナノ粒子分散液を気管内投与して3日後のラット肺組織の光学顕微鏡切片を調製した。包埋剤であるパラフィンは除去し、光学顕微鏡観察のための染色は行っていない。図1に左肺切片の光学顕微鏡像を示す。光学顕微鏡像より気管支から細気管支、末端の肺胞にいたるまでの様子がわかり、また一部に炎症が生じていることがわかる。この光学顕微鏡切片プレパラートに $10\mu\text{m}$ に収束したX線を照射して発生したチタンのL線（ 526eV ）の蛍光X線強度をマッピングし、図2に示す。マッピングにおけるX線スポットピッチは $60\mu\text{m}$ とした。図1および図2の比較から、二酸化チタンナノ粒子が気管支に留まるのではなく周辺の肺胞まで侵入すること、二酸化チタンナノ粒子が肺内の局所的に多く取り込まれていることがわかる。さらに詳細な二酸化チタンナノ粒子の局在分布を調べるために、光学顕微鏡観察において炎症が見られた部位についてチタンのマッピングを行った。図3にチタンのマッピングを行った炎症部位の光学顕微鏡像を、図4にチタンのL線（ 526eV ）の蛍光X線強度マッピング像を示す。X線の収束径は $10\mu\text{m}$ 、X線走査ピッチは $10\mu\text{m}$ である。二酸化チタンは炎症部分に多く分布していることがわかる。これより、気管内投与された二酸化チタンナノ粒子は肺胞マクロファージにより貪食され、貪食したマクロファエー

ジが集簇して炎症を形成していることが推測される。また各測定点での蛍光X線スペクトルの相対強度から二酸化チタンの定量分布を知ることができる。この計測手法を用いて光学顕微鏡観察と組み合わせることにより、肺組織における二酸化チタンナノ粒子の局在部位を詳細に調べることができる。

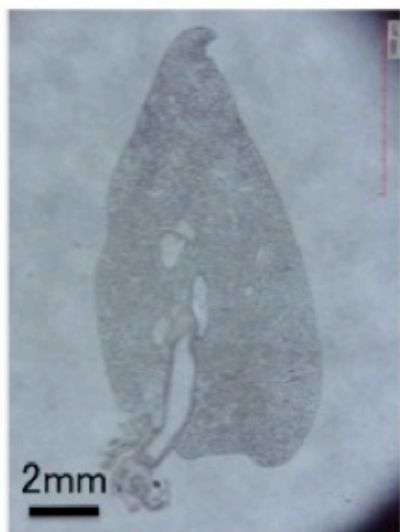


図1 ラット肺の光学顕微鏡像

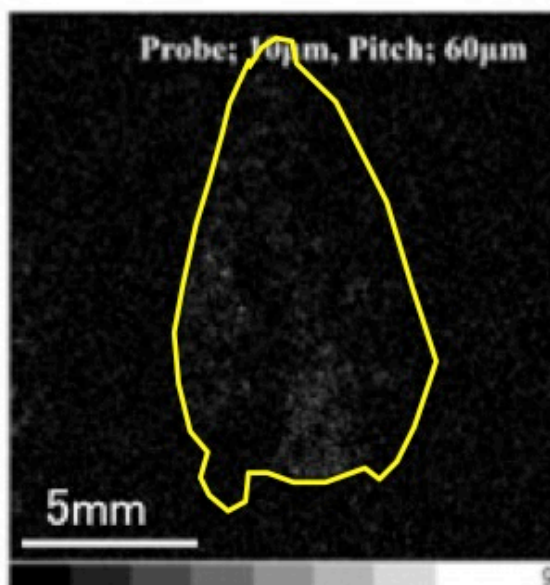


図2 図1のチタンマッピング像

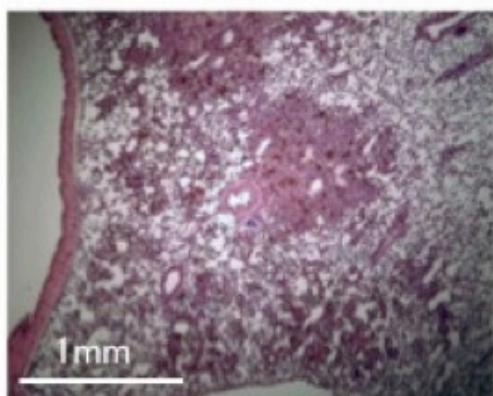


図3 ラット肺の光学顕微鏡像

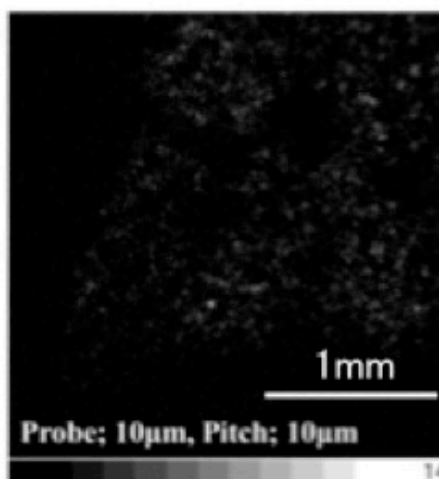


図4 図3のチタンマッピング像

第5章 ナノメートルオーダーのナノ材料分布の観察の手順

はじめに

細胞や生体組織へのナノ粒子の取り込み、組織細胞の形態観察によるダメージの有無、他の組織への移行及び体外への排出を調べることは、安全性試験の結果を判断する上で重要である。透過型電子顕微鏡 (Transmission electron microscope; TEM) は空間分解能が高く、形態や組成分析、結晶構造解析等が可能であるために、ナノ粒子の計測において最も有効な計測手法である。また試料を透過した電子の電子線エネルギー損失分光 (Electron energy loss spectroscopy; EELS) により試料の元素分析や元素マッピングも可能である。

ここでは、ナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内投与試験を行なったラット肺組織を透過型電子顕微鏡で観察するための試料調製手順を示す。生体組織は、生命活動が停止した直後から刻々と変化するもので、いかに生きている状態の組織の微細構造を維持して透過型電子顕微鏡試料として調製するかが重要なポイントとなる。

1. 適用範囲

ここに示す手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内投与試験において、解剖直後にパラフォルムアルデヒドによる固定を行なった後、0.1mol リン酸緩衝液で洗浄したラット肺組織に適用する。

2. 引用規格

なし

3. 用語、定義及び記号

3.1 固定

生命活動の停止によるタンパク質の変性を停止させて、生きている状態に近い形態に保つ処理。化学的固定と物理的固定に大別される。

3.2 化学的固定

化学反応によって、細胞内のタンパク質や脂質を安定化することによって構

造形態を保持する方法。アルデヒド基による蛋白間の架橋構造により変性凝集させるアルデヒド系固定剤や酸化還元反応により蛋白凝集をさせる重金属系固定剤などを用いる。

3.3 物理的固定

物理的に組織の生体活動や細胞内の水の移動を瞬時に凝固させることによって、生きている状態に近い形態を保持する方法。急速に極低温にする急速凍結法と加圧下で水の凝固速度を遅延しながら凍結する高圧凍結法がある。

3.4 緩衝液

生物組織は pH に敏感なため、酸や塩基を加えたり濃度に変化しても pH が大きく変化しないようにした溶液。生物組織の電子顕微鏡試料調製では、リン酸緩衝液やカコジル酸緩衝液が一般的。

3.5 トリミング

樹脂包埋した生物試料ブロックの切断面を整形して薄切しやすくする作業。

4. 装置及び材料

4.1 ウルトラマイクロトーム

樹脂に包埋した生物組織をダイヤモンドナイフによって、厚さ 100 nm 以下の薄さに切削する装置。

4.2 恒温槽

60 °C の一定温度に保持することができるもの。

4.3 試薬

0.1 mol リン酸緩衝液 (PB)

1 % 四酸化オスミウム - 0.1 mol リン酸緩衝液

エタノール - 水混合液

n-ブチルグリシジルエーテル

n-ブチルグリシジルエーテル - エポキシ樹脂混合液

エポキシ樹脂

5. 調製方法

生物細胞や組織を透過型電子顕微鏡で観察するためには、生きている組織をそのままの状態に保存しなければならない。この処理を固定という。固定には化学的処理による方法と物理的固定法があるが、ここでは、化学的固定法による手順を示す。固定した生物細胞や組織は水分を含有するために、透過型電子顕微鏡の真空環境下に導入できない。さらに、透過型電子顕微鏡で組織を観察するためには、100 nm 以下の切片にしなければならないため、組織を樹脂に包埋する必要があるが、樹脂は水との親和性が低いことから、直接樹脂を組織内に浸透させることは困難である。以上から、一旦水からアルコールに置換した後に、樹脂に置換するのが一般的である。

5.1 肺組織の後固定

4°Cの1% 四酸化オスミウム - 0.1 mol リン酸緩衝液に浸し、2時間保持。

5.2 肺組織の洗浄

蒸留水で洗浄する。10分後に交換を2回行う。

5.3 肺組織の脱水処理

- ・ 50 %エタノール - 50 %水混合液中で攪拌、4°Cで5分間保持。これを3回繰り返す。
- ・ 70 %エタノール - 30 %水混合液中で攪拌、4°Cで5分間保持。液を交換後に攪拌、10分保持。
- ・ 80 %エタノール - 20 %水混合液中で攪拌、4°Cで5分間保持。液を交換後に攪拌、10分保持。
- ・ 90 %エタノール - 10 %水混合液中で攪拌、4°Cで15分間保持。これを2回繰り返す。
- ・ 95 %エタノール - 5 %水混合液中で攪拌、15分間保持。これを2回繰り返す。
- ・ 100 %エタノール中で攪拌、30分間保持。これを2回繰り返す。

5.4 肺組織の樹脂包埋

- ・ n-ブチルグリシジルエーテルで攪拌、15 分間保持。これを 2 回繰り返す。
- ・ 50 % n-ブチルグリシジルエーテル - 50 %エポキシ樹脂混合液中で攪拌、2 時間保持。
- ・ 33 % n-ブチルグリシジルエーテル - 67 %エポキシ樹脂混合液中で攪拌、1 晩保持。
- ・ エポキシ樹脂液中で攪拌、7 時間保持。
- ・ 真空中で脱気処理。
- ・ 60 °C 恒温槽で 48 時間以上保持し、エポキシ樹脂を硬化。

5.5 超薄切片の調製

- ・ 切削する試料が 0.5 mm 角となるようにトリミング。
- ・ ウルトラマイクロトームでダイヤモンドナイフによって 50~100 nm 厚さに切片を調製。
- ・ 親水化処理した透過型電子顕微鏡用グリッドに切片を載せる。

5.6 超薄切片の染色及び補強

- ・ 必要に応じて、2 %酢酸ウラン水溶液及び鉛染色液で染色する。
- ・ 必要に応じて、カーボン薄膜を蒸着して補強する。

6. 実施例

通常の病理診断は光学顕微鏡像により広範囲な視野を観察して行なわれる。光学顕微鏡で観察した同一の組織試料から電子顕微鏡観察が可能になれば、病理診断により特定した部位のナノレベルの解析によりナノ材料との相関を知ることができる。そこで光学顕微鏡観察後に電子顕微鏡用試料を観察した。

光学顕微鏡観察には樹脂包埋した肺試料をダイヤモンドナイフで広範囲を薄片化して作製した。図 1 に酸化ニッケルナノ粒子の吸入暴露試験 1 ヶ月後のラット左肺の光学顕微鏡像を示す。さらに図 1 中の黒線で囲った部分を切り出して、ウルトラマイクロトームにより超薄切片に切削し、銅メッシュ (200 メッシュ) 上に保持した。薄片化した試料は必要に応じて酢酸ウラニル溶液および鉛溶液による染色を行った。

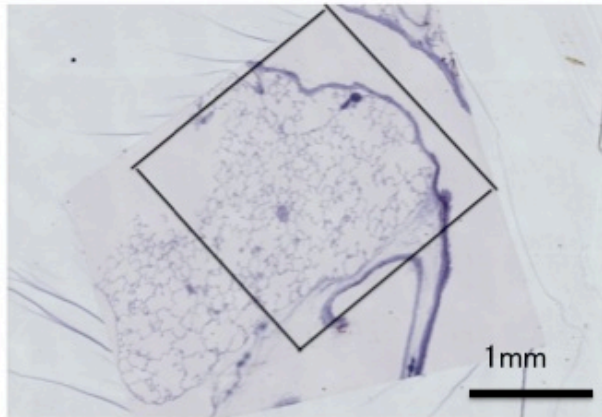


図1 酸化ニッケルナノ粒子吸入暴露1ヶ月後のラット左肺の光学顕微鏡像

図2に肺胞マクロファージの透過型電子顕微鏡像を示す。マクロファージの核、ミトコンドリアや小胞等の細胞内小器官が見られる。また矢印で示した箇所には酸化ニッケルナノ粒子がわかる。本手法を用いることにより、光学顕微鏡によるミリオーダーの観察と透過型電子顕微鏡によるナノオーダーの観察を組み合わせた観察が可能となる。

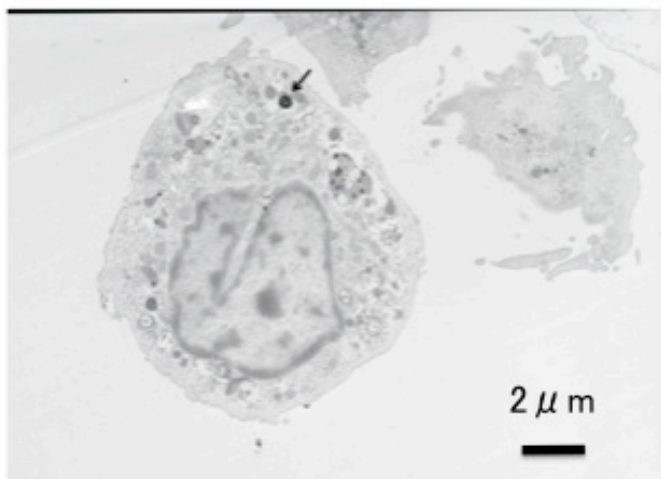


図2 光学顕微鏡試料から切り出した部位の透過型電子顕微鏡像

図3(a)に酸化ニッケルナノ粒子を気管内投与したラットの肺胞マクロファージの透過型電子顕微鏡像を示す。細胞の微細構造は明瞭に保持されており、黒

色粒子が存在していることがわかる。電子線エネルギー損失分光法によるニッケルのマッピング像を図 3(b) 示す。黒色粒子とニッケルのマッピング像は良く一致することから、肺胞マクロファージに取り込まれた黒色粒子は酸化ニッケルであると判定される。

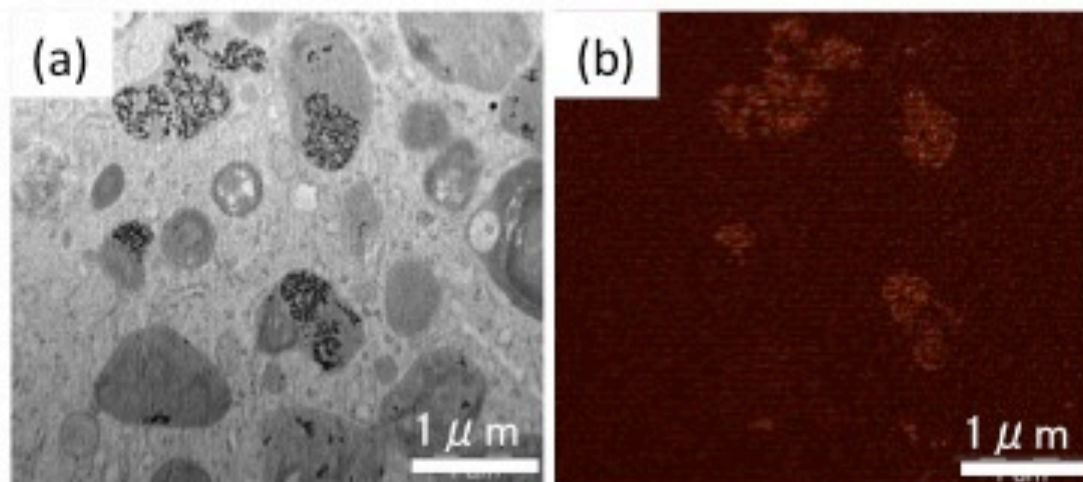


図 3 マクロファージに取り込まれた酸化ニッケルナノ粒子(a)とニッケルの元素マッピング像(b)

第6章 ミリメートルオーダーの生体反応分布の定量化の手順

はじめに

ミリメートルオーダーの肺組織全体の広視野の観察から、炎症部位を特定して免疫組織学的な生体反応解析との対応を調べるため、肺組織の光学顕微鏡切片プレパラートを用いた免疫組織学的解析手法を検討した。光学顕微鏡切片プレパラートを用いた分析が可能になれば、光学顕微鏡で病理診断した切片をそのまま用いてナノ材料の生体反応解析が可能となるため、病理との直接的な比較ができる。

従来の研究から、肺に取り込まれたナノ粒子は肺胞マクロファージに貪食されることが知られている。近年、マクロファージは炎症性マクロファージ(M1)と抗炎症性マクロファージ(M2)に分類されている。これらマクロファージの活性化状態を知ることができれば、そのマクロファージが炎症の進行状態なのか終熄状態であるのかが明らかになる。そこでM1マクロファージの炎症性メディエーターに注目して、免疫組織学的解析手法を開発した。M1マクロファージの表面レセプターの一つであるToll様受容体4(Toll like receptor; TLR4)の産生がナノ粒子投与量と相関がある、との報告があるためTLR4に注目した。TLR4はリポ多糖をリガンドとする受容体である。

抗原抗体反応を失活させないために組織の固定はパラフォルムアルデヒドによる灌流固定を行なった。詳細は解剖手順に記載する。

1. 適用範囲

ここに示す手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内投与試験において、解剖直後にパラフォルムアルデヒドによる固定を行なった後、0.1mol リン酸緩衝液で洗浄したラット肺組織に適用する。

2. 引用規格

なし

3. 用語、定義及び記号

3.1 氷晶防止処理

凍結時、組織中での氷の結晶化の防止効果、さらに組織と包埋剤の間でできる亀裂防止のための処理。

3.2 凍結包埋

生物試料の包埋の際に加熱や有機溶媒による脱水を行わないため、抗原の反応性が失われにくいという利点がある。凍結の際に氷晶が生じるのを防ぐための処理後に凍結用コンパウンドに組織片を包埋し、 -90°C に冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液中で凍結する。

3.3 凍結切削

凍結した組織標本を低温状態で薄切する手法。

3.4 ブロッキング

抗原抗体反応の前に、他種の血清を切片にかけて、標的タンパク質以外のタンパク質をブロックして、非特異的反応を防ぐ処理。

3.5 免疫染色

抗体を用いて、組織標本中の抗原を検出する組織学（組織化学）的手法。標識された一次抗体を用いる直接法と一次抗体に対し標識された二次抗体を反応させる間接法がある。

3.6 一次抗体染色

組織標本中の抗原に対して抗体を含む液を一定時間反応させることによって抗原と抗体を結合させるための処理。

3.7 二次抗体染色

3.6の抗体を抗原として、色素や蛍光色素、金コロイド等のマーカーで標識された抗体を結合させる処理。

4. 装置及び材料

4.1 凍結包埋装置

イソペンタン等の有機溶剤を -90°C に保持するための装置。(例えば Leica 社 UT2000F)

4.2 凍結切削装置

凍結包埋した組織ブロックを冷温状態で薄切りする装置。(例えば Leica 社クリオスタット、Thermo 社クリオスタット)

4.3 試薬

- ・ 0.1mol リン酸緩衝液 (PB)
- ・ ショ糖
- ・ 凍結用コンパウンド (例えば サクラファインテック社 O.C.T. コンパウンド、Thermo 社 NEG50)
- ・ 2%ウシ血清アルブミン-10%正常ヤギ血清-0.01%TritonX-0.1mol PB 水溶液 (ブロッキング溶液)
- ・ 抗 TLR4-ウサギ ポリクロナール抗体ブロッキング溶液
- ・ FITC 標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体ブロッキング溶液
- ・ 封入剤 (例えば Thermo 社 PermaFluor、Merck 社 Entellan® new)

5. 調製方法

解剖後にパラフォルムアルデヒドで固定した肺は柔らかいため、そのままでは光学顕微鏡切片に切削することは困難である。そこで肺組織を凍結して切片を調整する手法を用いた。以下に手順を示す。

5.1 試料トリミング

- ・ カミソリを用いて組織を冠状断に約 5 mm 厚にスライスする。

5.2 洗浄

- ・ 0.1mol PB で攪拌、20 分保持。これを 3 回繰り返す。

5.3 氷晶防止処理

- ・ 10%シヨ糖-0.1 mol PB 混合液で攪拌、2 時間保持。
- ・ 20%シヨ糖-0.1 mol PB 混合液で攪拌、2 時間保持。
- ・ 30%シヨ糖-0.1 mol PB 混合液で攪拌、一晩保持。(試料が沈むまで)

5.4 置換

- ・ 凍結用コンパウンド 室温 浸漬 30 分~2 時間保持する。

5.5 脱気

- ・ 真空中で脱気、凍結用コンパウンド室温 浸漬 30 分~2 時間保持。

5.6 凍結包埋

- ・ 新しい凍結用コンパウンドを治具に充填し、-90°Cに冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液(混合比 3:8)中に浸漬して凍結する。

5.7 凍結切削

- ・ クリオスタットにて-20°C、8 μ m 厚にて切削
- ・ 表面処理(MAS コーティング等)したスライドグラスに貼り付け
- ・ 風乾

5.8 ブロッキング

- ・ 2%ウシ血清アルブミン-10%正常ヤギ血清-0.01%TritonX-0.1mol PB 水溶液に浸し、室温 30 分保持。

5.9 一次抗体染色

- ・ 抗 TLR4-ウサギ ポリクロナール抗体ブロッキング溶液(200 倍希釈)に浸し、4°Cで一晩保持。

5.10 二次抗体染色

- ・ FITC 標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体ブロッキング溶液(500 倍希釈)に浸し、室温で 2 時間保持する。

5.11 洗浄

- ・ 0.1 mol PB で 20 分浸漬保持。これを 3 回繰り返す。

5.12 封入

- ・封入剤にて封入、乾燥させる。

6. 実施例

ラットを用いて酸化ニッケルナノ粒子の気管内投与試験を行った。気管内投与試験終了1ヶ月後に解剖して肺を摘出し、顕微鏡観察試料を調整した。酸化ニッケルナノ粒子 0.2mg を気管内投与して1ヶ月後のラットの肺組織のトルイジンブルー (TB) 染色した切片の光学顕微鏡像、および光学顕微鏡像中の A および B 領域 (気管支近く) の TLR4 蛍光標識した蛍光顕微鏡像を図 1 に示す。気管内投与した肺組織では気管支近傍において、肺胞マクロファージが明瞭に蛍光染色されており、肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージの蛍光強度比を比較すると、気管内投与した肺組織の肺胞マクロファージが強い蛍光を発していることがわかる。

蛍光強度から TLR4 産生を定量評価する事ができる。そのためには入射光 (水銀ランプやレーザー光) の強度を一定に揃える必要がある。標準発光ビーズ等を用いて入射光強度を同じにして測定を行なう。

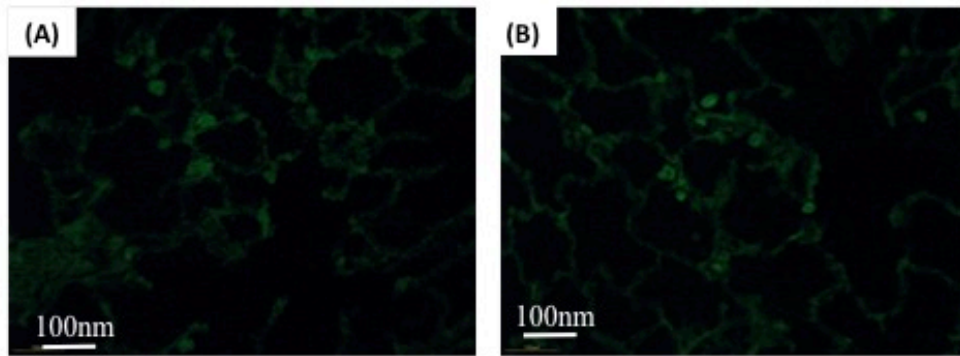
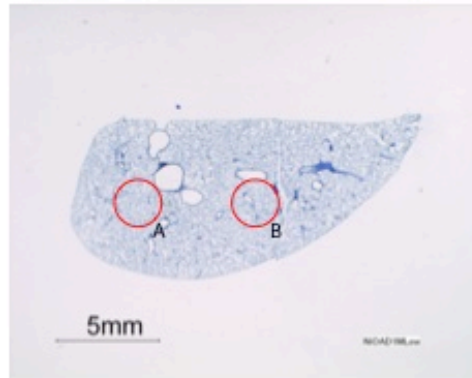


図1 酸化ニッケルナノ粒子を気管内投与して1ヶ月後のラットの肺組織の光学顕微鏡像、および光学顕微鏡像中のAおよびB領域のTLR4蛍光標識した蛍光顕微鏡像

第7章 ナノメートルオーダーの生体反応分布の定量化の手順

はじめに

透過型電子顕微鏡を用いてナノレベルの生命反応の定量化技術を開発するために、光学顕微鏡による免疫組織学的解析による生体反応解析と同様の手法を検討した。対象は前述のようにM1マクロファージの表面レセプターであるTLR4である。光学顕微鏡観察ではFITC蛍光色素を標識として用いたが、透過型電子顕微鏡観察では金コロイド標識を用いる。金コロイドは真空中で電子線照射によっても安定であるため、肺胞マクロファージに付着した金コロイドの解析を行なう事でTLR4産生部位の解析が可能となる。

試料調整方法は前述の光学顕微鏡による免疫組織学的解析手法の1次抗体染色まで同一であり、2次抗体染色から透過型電子顕微鏡用に手順が変わる。グルタルアルデヒドおよび四酸化オスミウム水溶液による後固定を行い、肺組織の微細構造を維持した後、電子線照射に強いエポキシ樹脂に置換する。

1. 適用範囲

ここに示す手順は、ラットを用いたナノ粒子の吸入暴露試験もしくは気管内投与試験において、解剖直後にパラフォルムアルデヒドによる固定を行なった後、0.1mol リン酸緩衝液で洗浄したラット肺組織に適用する。

2. 引用規格

なし

3. 用語、定義及び記号

3.1 氷晶防止処理

凍結時、組織中での氷の結晶化の防止効果、さらに組織と包埋剤の間にできる亀裂防止のための処理。

3.2 凍結包埋

生物試料の包埋の際に加熱や有機溶媒による脱水を行わないため、抗原の反応性が失われにくいという利点がある。凍結の際に氷晶が生じるのを防ぐための処理後に凍結用コンパウンドに組織片を包埋し、 -90°C に冷却したイソペンタン-ヘキサン混合液中で凍結する。

3.3 凍結切削

凍結した組織標本を低温状態で薄切する手法。

3.4 ブロッキング

抗原抗体反応の前に、他種の血清を切片にかけて、標的タンパク質以外のタンパク質をブロックして、非特異的反応を防ぐ処理。

3.5 免疫染色

抗体を用いて、組織標本中の抗原を検出する組織学（組織化学）的手法。標識された一次抗体を用いる直接法と一次抗体に対し標識された二次抗体を反応させる間接法がある。光学顕微鏡と電子顕微鏡の相関を調べるため間接法を用いた。

3.6 一次抗体染色

組織標本中の抗原に対して抗体を含む液を一定時間反応させることによって抗原と抗体を結合させるための処理。

3.7 二次抗体染色

3.6の抗体を抗原として、色素や蛍光色素、金コロイド等のマーカーで標識された抗体を結合させる処理。

4. 装置及び材料

4.1 凍結包埋装置

イソペンタン等の有機溶剤を -90°C に保持するための装置。（例えば Leica 社 UT2000F）

4.2 凍結切削装置

凍結包埋した組織ブロックを低温状態で薄切りする装置。（例えば Leica 社 クリオスタット、Thermo 社 クリオスタット）

4.3 試薬

- ・ 0.1mol リン酸緩衝液 (PB)
- ・ ショ糖
- ・ 凍結用コンパウンド (例えばサクラファインテック社 O.C.T. コンパウンド、Thermo 社 NEG50)
- ・ 2%ウシ血清アルブミン-10%正常ヤギ血清-0.01%TritonX-0.1mol PB 水溶液 (ブロッッキング溶液)

- ・ 抗 TLR4-ウサギ ポリクロナール抗体ブロッッキング溶液
- ・ FITC 標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体ブロッッキング溶液
- ・ 5nm 金コロイド標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体
- ・ 1 % 四酸化オスミウム - 0.1 mol リン酸緩衝液
- ・ エタノール -水混合液
- ・ エポキシ樹脂

5. 調製方法

解剖後にパラフォルムアルデヒドで固定した肺は柔らかいため、そのままでは光学顕微鏡切片に切削することは困難である。そこで肺組織を凍結して切片を調整する手法を用いた。以下に手順を示す。

5.1 試料トリミング

- ・ カミソリを用いて組織を冠状断に約 5 mm 厚にスライスする。

5.2 洗浄

- ・ 0.1mol PB で 攪拌、20 分保持。これを 3 回繰り返す。

5.3 氷晶防止処理

- ・ 10%ショ糖-0.1mol PB で攪拌、2 時間保持。
- ・ 20%ショ糖-0.1mol PB で攪拌、2 時間保持。
- ・ 30%ショ糖-0.1mol PB で攪拌、一晩保持。(試料が沈むまで)

5.4 置換

- ・凍結用コンパウンド室温 浸漬 30分～2時間保持

5.5 脱気

- ・真空中で脱気、凍結用コンパウンド室温 浸漬 30分～2時間保持

5.6 凍結包埋

- ・新しい凍結用コンパウンドを治具に充填し、 -90°C に冷却したでイソペンタン-ヘキサン混合液（混合比 3:8）中に浸漬して凍結する。

5.7 凍結切削

- ・クリオスタットにて -20°C 、 $8\mu\text{m}$ 厚にて切削
- ・表面処理（MAS コーティング等）したスライドガラスに貼り付け
- ・風乾

5.8 ブロッキング

- ・2%ウシ血清アルブミン-10%正常ヤギ血清-0.01%TritonX-0.1molPB 水溶液に浸し、室温 30分保持。

5.8 一次抗体染色

- ・抗TLR4-ウサギ ポリクロナール抗体ブロッキング溶液（20倍希釈）に浸し、 4°C で一晩保持。

5.9 二次抗体染色

- ・5nm 金コロイド標識-抗ウサギ IgG ヤギ抗体（20倍希釈）に浸し、室温 2時間保持。

5.10 後固定

- ・2.5%グルタルアルデヒド水溶液に浸し、15分保持

5.11 後後固定

- ・1%四酸化オスミウム水溶液に浸し、30分保持。

5.12 脱水

- ・ 50 %エタノール - 50 %水混合液中で攪拌、10 分間保持。
- ・ 70 %エタノール - 30 %水混合液中で攪拌、10 分間保持。
- ・ 80 %エタノール - 20 %水混合液中で攪拌、10 分間保持。
- ・ 90 %エタノール - 10 %水混合液中で攪拌、10 分間保持。これを 2 回繰り返す。
- ・ 95 %エタノール - 5 %水混合液中で攪拌、10 分間保持。これを 2 回繰り返す。
- ・ 100 %エタノール中で攪拌、10 分間保持。これを 3 回繰り返す。

5.13 包埋

- ・ EPON812 混合樹脂を充てんしたビームカプセルを試料上に被せて包埋する。
- ・ 60 °C 恒温槽で 48 時間以上保持し、エポキシ樹脂を硬化させる。

5.14 超薄切片の調整

- ・ 切削する試料が 2 mm 角となるようにトリミング。
- ・ ウルトラマイクロトームでダイヤモンドナイフによって 50~100 nm 厚さに切片を調製。
- ・ 親水化処理した透過型電子顕微鏡用グリッドに切片を載せる。

5.15 超薄切片の染色及び補強

- ・ 必要に応じて、2 %酢酸ウラン水溶液及び鉛染色液で染色する。
- ・ 必要に応じて、カーボン薄膜を蒸着して補強する。

6. 実施例

ラットを用いて酸化ニッケルナノ粒子の吸入暴露試験を行った。吸入暴露試験終了 1 ヶ月後に解剖して肺を摘出し、顕微鏡観察試料を調製した。

図 1 (a) にラット左肺の肺胞マクロファージ像を示す。凝集物近傍の拡大像を図 1 (b) に示す。写真中矢印部分に粒径 20nm 程度の粒子が凝集しており、酸化ニッケルナノ粒子が貪食されている事がわかる。吸入暴露試験チャンバー中の酸化ニッケルエアロゾルは 100nm 程度に凝集していることがわかっており、この肺胞マクロファージに貪食された粒子は形態から酸化ニッケルナノ粒子であると判断できる。図 1 (a) に示した肺胞マクロファージの端部の拡大像を図 1 (c) に示す。マクロファージ端部には矢印で示すように黒いナノ粒子が観察され

る。これは2次抗体の金コロイド標識であり、表面レセプターであるTLR4の産生を示している。この金標識粒子を数的にカウントすることにより、TLR4の産生量を定量的に評価することができる。

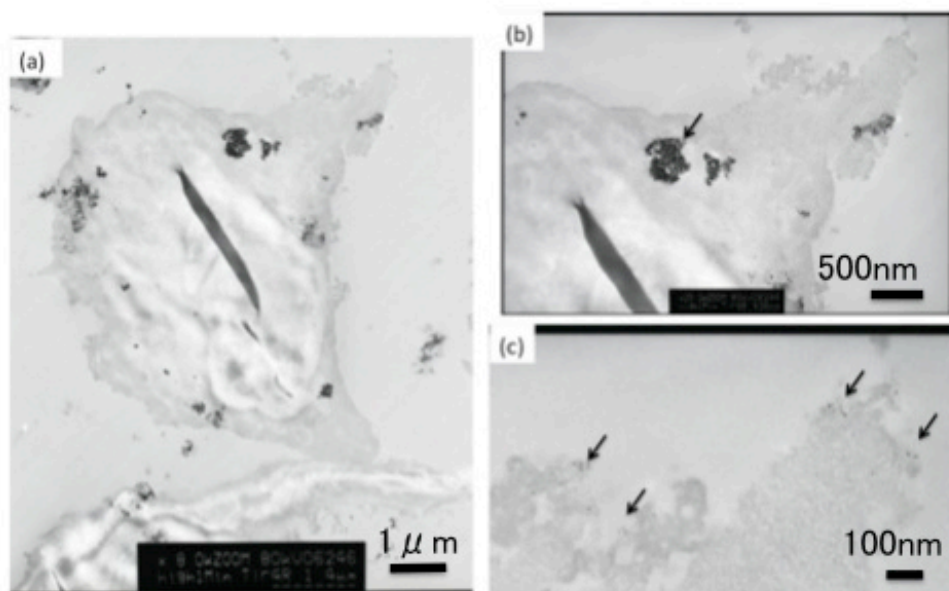


図1 酸化ニッケルナノ粒子吸入暴露1ヶ月後のラット左肺の肺胞マクロファージ(a)と(a)拡大像(b)、マクロファージ端部の拡大像(c)