

## 包埋前免疫染色を用いた光電子相関顕微鏡法の開発

\*近藤照義、\*\*金丸孝昭、\*\*\*西 健太郎、\*\*\*矢住 京、\*\*\*松岡洋平、  
\*\*\*\*太田啓介、\*\*\*\*\*中村桂一郎、\*\*\*\*\*森本景之、\*\*\*磯部信一郎

Development of pre-embedding immunostaining methods for correlative light and electron microscopy

\*Teruyoshi KONDO, \*\*Takaaki KANEMARU, \*\*\*Kentaro NISHI, \*\*\*Takashi YAZUMI, \*\*\*Youhei MATSUOKA,  
\*\*\*\*Keisuke OHOTA, \*\*\*\*\*Kei-ichiro NAKAMURA, \*\*\*\*\*Hiroyuki MORIMOTO, \*\*\*Shinichiro ISOBE

### Abstract

Correlative light and electron microscopy (CLEM) is an excellent approach for imaging the spatial distribution of specific molecules at the level of cellular ultrastructure. The present study reports two novel methods for CLEM using pre-embedding immunofluorescence staining. These methods involve staining of specimens in the same manner as conventional pre-embedding immunohistochemistry, but provide optimal ultrastructural preservation and resolution. This strategy exploits the fluorescent property of new fluorescent dyes, Fluolids, which retain fluorescence even after OsO<sub>4</sub> fixation and resin-embedding. In the first method, we performed high resolution CLEM using Fluolid Orange combined with nanogold. Using this method, a lysosomal enzyme, cathepsin D, was detected by granular fluorescent staining in renal tubule cells and nanogold particles were found to be localized within lysosomes. In the second method, we performed double immunofluorescence CLEM using Fluolid Red and Fluolid Green. Using this method, diffuse immunofluorescence of Iba1, a macrophage/monocyte lineage-specific calcium binding protein, was observed throughout the cytoplasm of macrophages. In contrast, immunoreactivity against CD68, a lysosome/endosome-associated membrane glycoprotein, was detected as granular fluorescence in the cytoplasm of macrophages corresponding to the clusters of lysosomes or endosomes observed by electron microscopy. These novel methods for CLEM using pre-embedding immunofluorescence staining can provide improved ultrastructural information of the cells, cell organelles, and associated molecules compared to the conventional methods.

**Key words** : pre-embedding immunostaining, correlative light and electron microscopy, new fluorescent dyes  
キーワード : 包埋前免疫染色、光電子相関顕微鏡法、新規蛍光色素

---

\*九州保健福祉大学 保健科学部 臨床工学科、宮崎県延岡市吉野町1714-1

\*Department of Clinical Engineering, School of Health Science, Kyushu University of Health and Welfare, 1714-1 Yoshinomachi, Nobeoka-city, Miyazaki, 882-8508, JAPAN

\*\*九州大学病院 中央形態分析室、福岡県福岡市東区馬出3-1-1

\*\*Department of Morphology Core Unit, Kyushu University Hospital, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka-city, Fukuoka, 812-8582, JAPAN

\*\*\*九州産業大学 生命科学部、福岡県福岡市東区松香台2-3-1

\*\*\*Department of Life Science, Faculty of Life Science, Kyushu Sangyo University, 2-3-1 Matsukadai, Higashi-ku, Fukuoka-city, Fukuoka, 813-8503, JAPAN

\*\*\*\*久留米大学 医学部 先端イメージング研究センター、福岡県久留米市旭町67

\*\*\*\*Advanced Imaging Research Center, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume-city, Fukuoka, 830-0011, JAPAN

\*\*\*\*\*久留米大学 医学部 解剖学講座 顕微解剖・生体形成部門、福岡県久留米市旭町67

\*\*\*\*\*Division of Microscopic and Developmental Anatomy, Department of Anatomy, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume-city, Fukuoka, 830-0011, JAPAN

\*\*\*\*\*産業医科大学 第2解剖学教室、福岡県北九州市八幡西区医生ヶ丘1-1

\*\*\*\*\*Second Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of Occupation and Environmental Health, 1-1 Iseigaoka, Yahatanishi-ku, Kitakyushu-city, Fukuoka, 807-8555, JAPAN

## 緒言

細胞・組織の構造はそれらの機能と密接に関係しており、細胞・組織の構造を詳細に把握することは、それらの機能を理解するうえで重要である。光学顕微鏡（光顕）は広い視野の範囲で、多くの細胞・組織の形態や特定分子の分布を短時間で観察することができるが、細胞・組織の微細構造や特定分子の微細局在を観察することは不可能である。一方、電子顕微鏡（電顕）は細胞・組織の微細構造や特定物質分子の微細局在を高解像度で観察可能であるが、高倍率になるほど試料の一部しか観察しておらず、広い視野の範囲を観察するには長時間を要する。

光顕及び電顕レベルで、特定物質分子の組織内での分布や細胞小器官における微細局在を特定するためには、抗原である特定分子とその抗体との抗原抗体反応を利用した免疫染色法が用いられる。光顕レベルの免疫染色では、異なる波長の蛍光色素をプローブとした多重蛍光免疫染色法が、その手法が容易であることから頻繁に用いられる。また、電顕レベルの免疫染色には、樹脂に包埋する前の生物試料で抗原抗体反応を行った後、樹脂包埋・超薄切片作製を行う包埋前免疫染色法、樹脂に包埋した生物試料の超薄切片上で抗原抗体反応を行う包埋後免疫染色法、樹脂包埋は用いず生物試料の凍結超薄切片上で抗原抗体反応を行う凍結超薄切片法（無包埋免疫染色法）などがある<sup>1)</sup>。

近年、形態学領域で光電子相関顕微鏡（CLEM）法という新たな顕微鏡観察手法が考案され注目を浴びている<sup>2)</sup>。CLEM法とは光顕を用いて生物試料の広範囲を短時間で観察・写真撮影し、同一部位を電顕にて高倍率の観察・写真撮影を行い、両顕微鏡から得られた画像を比較し相関をとる観察法である。広範囲の組織構築や抗原などの特定分子の組織内分布から、高い空間分解能で細胞小器官レベルでの特定分子の微細な細胞内局在の情報が得られ、病理診断を行う上で非常に有効な手法である。

今回は、蛍光色素としてジアゾール型有機EL系色素を応用した新規蛍光色素Fluolid<sup>®</sup>と免疫染色法の手法が簡便で微細構造の保持が良好な包埋前免疫染色法を組合せ、抗原可視化のための標識プローブとしてFluolid Orange 標識 Nanogold<sup>®</sup>-Streptavidin を用いた高分解能 CLEM 法及び標識プローブとしてFluolid Red と Fluolid Green を用いた免疫二重染色 CLEM 法の新しい2種類の病理診断法の開発を行った。

## 材料と方法

SD系雄性ラット（6週齢）を混合麻酔薬（メドミジン0.375 mg/kg、ミダゾラム 2 mg/kg、ブトルファノール

2.5 mg/kg）の腹腔内投与による深麻酔のもとで、左側腎臓の腎動静脈を非外傷性クリップで45分間閉塞した。クリップを解放し再灌流を行い、虚血再灌流後2日目に腎臓及び十二指腸の固定を行った<sup>4,5)</sup>。本研究は九州保健福祉大学動物実験管理委員会の承認の下に行われた。

### 1. Fluolid Orange 標識 Nanogold<sup>®</sup>-Streptavidin の作製

Fluolid Orange 標識 Nanogold<sup>®</sup>-Streptavidin（図1）の作製は、Nanogold<sup>®</sup>-Streptavidin 溶液（Nanoprobes社）と Fluolid Orange 溶液を混合し、両者をアミド結合させた後、混合液を NAP5 カラムに流すことにより、Fluolid Orange 標識 Nanogold<sup>®</sup>-Streptavidin の精製を行った。

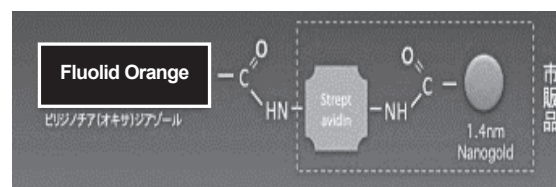


図1. Fluolid Orange 標識 Nanogold<sup>®</sup>-Streptavidin の構造。

### 2. Fluolid の蛍光に対する脱水処理の影響

ペントバルビタール（150 mg/kg）で深麻酔下のラットから十二指腸を摘出した後、4%パラフォルムアルデヒド固定液で固定した。厚さ10 $\mu$ mの凍結切片を作製し、抗Iba1ウサギポリクローナル抗体で一晩反応を行った。Iba1はマクロファージ/単球の細胞質に存在するカルシウム結合タンパク質である<sup>6)</sup>。次にbiotin 標識抗ウサギ抗体で反応させ、更に、Fluolid Red 標識streptavidin、Fluolid Orange 標識streptavidin、Fluolid Green 標識streptavidin のいずれかで反応を行った。一部の試料はグリセロール・リン酸緩衝液（1:1）を滴下しカバーガラスで封入、残りの試料はエタノール系列（70~100%）で脱水後、グリセロール・100%エタノール（1:1）を滴下しカバーガラスで封入した。

### 3. Nanogold<sup>®</sup>-Streptavidin 標識 Fluolid Orange を用いた高分解能 CLEM 法

腎臓を4%パラフォルムアルデヒド-0.05%グルタルアルデヒド固定液で固定後、厚さ70 $\mu$ mのマイクロスライサー切片を作製し、抗カテプシンDウサギポリクローナル抗体で5日間反応を行った。カテプシンDはライソゾームに含まれるプロテアーゼの一種である。次にbiotin 標識抗ウサギ抗体で反応させ、更に、TSA biotin detection kitで免疫染色の増強後、Fluolid Orange 標識 Nanogold<sup>®</sup>（径1.4 nm）-Streptavidin で反応を行った。微細構造を保持するために1% グルタルアルデヒドで再固定し、Goldenhance<sup>™</sup> EM Kitで増感処理（1.4 nmの微細金粒子を電顕観察可能にするため金粒子の径を増大）を施し、

更に電顕観察の際にコントラストを上昇させるため0.5%四酸化オスミウムで後固定を行った。試料をエタノール系列で脱水後、Durcupan樹脂で熱重合（60℃, 24時間）による包埋を行った。厚さ100 nmの超薄切片を作製しアドレス付きグリッドに張り付けた後、蛍光顕微鏡（オリンパス BX50）で観察・写真撮影を行った。次に、グリッドを透過型電顕（日立HT7700）に装填し、蛍光顕微鏡で写真撮影を行った同一部位を写真撮影し、Photoshopで蛍光像と電顕像を重ね合わせ、CLEM観察を行った。

#### 4. Fluolid RedとFluolid Greenを用いた免疫二重染色CLEM法

上述の高分解能CLEM法と同様にして、腎臓を固定し、厚さ70 μmのマイクロスライサー切片を作製した。抗Iba1ウサギポリクローナル抗体と抗CD68マウスモノクローナル抗体の混合液で5日間反応を行った。CD68はマクロファージ/単球のライソゾーム・エンドゾームの膜に局在するタンパク質である<sup>7)</sup>。次に、biotin標識抗マウス抗体で反応し、更にFluolid Red標識抗ウサギ抗体とFluolid Green標識streptavidinの混合液で反応を行った。その後、微細構造を保持するために1%グルタルアルデヒドで再固定し、更に、0.5%四酸化オスミウムで後固定を行った。試料をエタノール系列で脱水後、Durcupan樹脂を用いた熱重合（60℃, 24時間）及びLR White樹脂を用いた低温重合（-20℃, 20分間）または熱重合（60℃, 24時間）による包埋を行った。準超薄切片（300 nm）を作製しグリッド付きカバーガラスに張り付けた後、倒立型共焦点レーザー顕微鏡（オリンパスFV-1000）で観察・写真撮影を行った。次に、カバーガラスを高分解能電界放出型走査電顕（日立S-800）を用いて観察し、共焦点レーザー顕微鏡で写真撮影を行った同一部位を写真撮影し、Photoshopで蛍光像と電顕像を重ね合わせ、CLEM観察を行った。

細胞・組織の一般的な微細構造の観察には、準超薄切片（300 nm）を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色した後、高分解能電界放出型走査電顕（日立S-800）を用いて観察した。

## 結果

### 1. Fluolidの蛍光に対する脱水処理の影響

十二指腸をIba1の抗体を用いて免疫染色を行うと、Iba1免疫活性を示すマクロファージ/単球が粘膜固有層に多数観察され、時々、粘膜上皮内に進入しているものも認められた（図2）。Fluolid Red、Fluolid Orange、Fluolid Greenの蛍光は、免疫染色後、脱水せずにグリセロール・リン酸緩衝液で封入した標本（図2A）と比較して、エタノール脱水後、グリセロール・100%エタノールで封入した標本（図2B）では、Fluolidの蛍光強

度の顕著な増加が認められた。標識プローブとしてFluolid Redを用いた例を図2に示す。

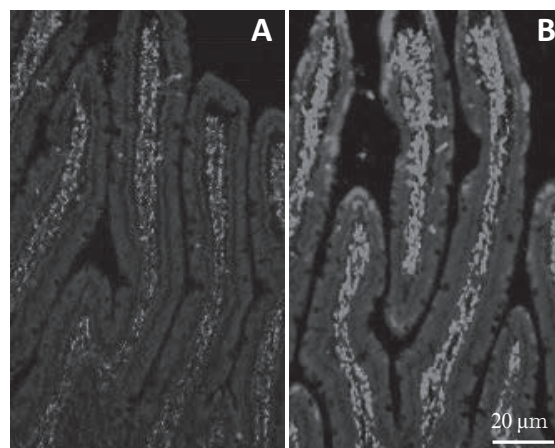


図2. Fluolid Redの蛍光強度に対するエタノール脱水の影響。擬似カラーでは、Iba1免疫活性は赤色で表示されている。

### 2. 高分解能CLEM法

虚血再灌流障害を受けた腎臓を低倍率で観察すると、尿細管上皮にカテプシンDの免疫活性を示す顆粒状の蛍光が豊富に観察された（図3A）。更に中程度の倍率に拡大すると、顆粒状の蛍光を発する構造物は、上皮細胞の細胞質に多数認められた（図3B,C,D）。高倍率の観察では、輪郭が不明瞭な顆粒状の蛍光を発する構造物（図4B）は、その内容物が中等度の電子密度を示すライソゾームであり（図4A,C）、その内容物には免疫活性を示す金粒子が多数局在していた（図4D）。

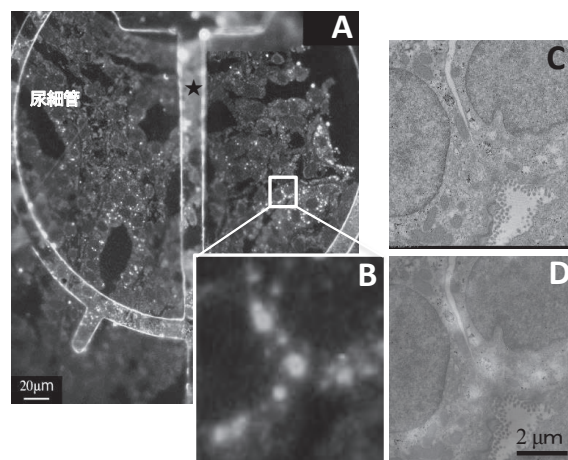


図3. 虚血再灌流障害腎の尿細管上皮におけるCathepsin D免疫活性の局在。

A：尿細管の低倍率電顕像。B：Aの枠の中倍率拡大像。C：Bと同一部位の電顕像。D：BとCの重ね合わせ像。★はCLEM観察で蛍光像と電顕像を重ねる際のLandmarkとなるグリッドの影。擬似カラーでは、Cathepsin D免疫活性は黄色で表示されている。

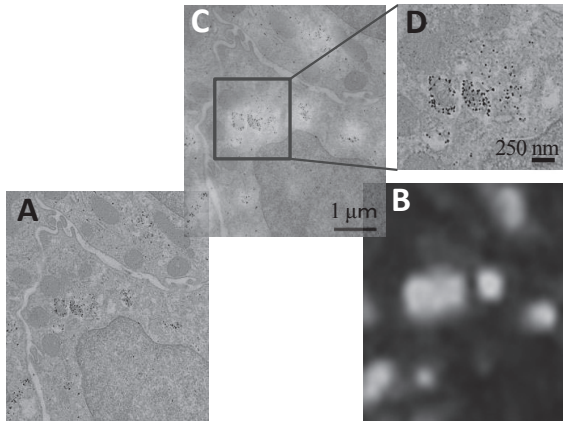


図4. 尿細管上皮細胞における Cathepsin D 免疫活性の局在. A: 尿細管上皮細胞の中倍率拡大像. B: Aの蛍光像. C: AとBの重ね合わせ像. D: Cのライソゾームを拡大した高倍率電顕像. 黒い点は金粒子を示す. 擬似カラーでは、Cathepsin D 免疫活性は黄色で表示されている.

### 3. Fluolidの蛍光に対するDurcupan樹脂及びLR White樹脂の影響及び共焦点レーザー顕微鏡での免疫二重染色試料の観察

Fluolid Red及びFluolid Greenは、Durcupan樹脂包埋及びLR White樹脂包埋の熱重合を行うと、蛍光はほとんど認められなくなったが（データ未発表）、LR White樹脂包埋の低温重合では、両者の蛍光は残存していた。図5は、マクロファージ/単球のマーカであるIba1とCD68の二重染色を行い、Iba1はFluolid Redで、CD68はFluolid Greenで可視化を行ったLR White樹脂準超薄切片の共焦点レーザー顕微鏡像である。Fluolid Red及びFluolid Greenの励起波長と蛍光波長を、蛍光シグナルのクロストーク（蛍光の漏れこみ）が起らないように励起フィルターと吸収フィルターで調節した後、Fluolid Redで可視化された切片をFluolid Redの励起波長で観察すると蛍光シグナルが得られたが（図5A）、Fluolid Greenの励起波長で観察すると全く蛍光シグナルは得られなかった（データ未発表）。また、Fluolid Greenで可視化された切片をFluolid Greenの励起波長で励起すると蛍光シグナルが得られたが（図5B）、Fluolid Redの励起波長で観察すると全く蛍光シグナルは得られなかった（データ未発表）。Fluolid Red及びFluolid Greenの蛍光像を重ね合わせると、Fluolid Redの蛍光シグナルのみ発する細胞、Fluolid Greenの蛍光シグナルのみ発する細胞、両者の蛍光シグナルを発する細胞が区別され（図5C,D）、両色素のクロストークが認められない十分な蛍光強度の写真を撮影することができた。

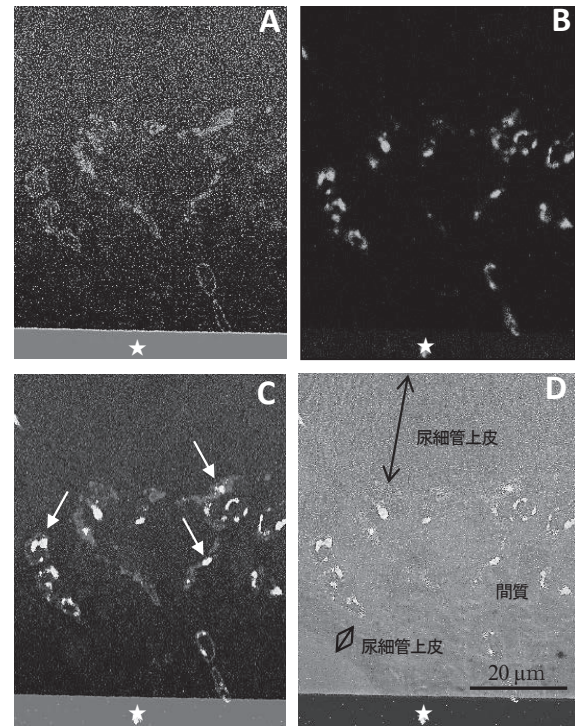


図5. 虚血再灌流障害腎におけるIba1とCD68の分布. A: Iba1をFluolid Redで可視化. B: CD68をFluolid Greenで可視化. C: AとBの重ね合わせ像. D: Cと位相差像の重ね合わせ像. 矢印はIba1とCD68の共存を示す. ★はCLEM観察で蛍光像と電顕像を重ねる際のLandmarkとなるグリッドの影. 擬似カラーでは、Iba1免疫活性は赤色、CD68免疫活性は緑色で表示されている.

### 4. LR White樹脂包埋超薄切片を用いた微細構造の電顕観察

LR White樹脂のようなアクリル系樹脂は、電顕観察に通常用いられるエポキシ系樹脂と比較して、微細形態保持が悪くコントラストも低下することが報告されているので、LR White樹脂が今回のCLEM観察に適用できるか検討を行った。低温重合でLR White樹脂に包埋した試料の準超薄切片を反射電子モードで観察・撮影すると、電子染色された高電子密度の部分は白く、電子染色されていない低電子密度の部分は黒い像として撮影されるが（図6A）、オリジナル反射電子像を白黒反転した像では、超薄切片を透過電鏡で観察したのと同様な像を得ることができた（図6B）。今回のLR White樹脂準超薄切片の観察では、細胞及び細胞小器官の微細形態保存やコントラストは良好で、尿細管間質に分布しているマクロファージの細胞質には小型の細胞小器官であるライソゾームやエンドゾームを観察することができた（図6）。

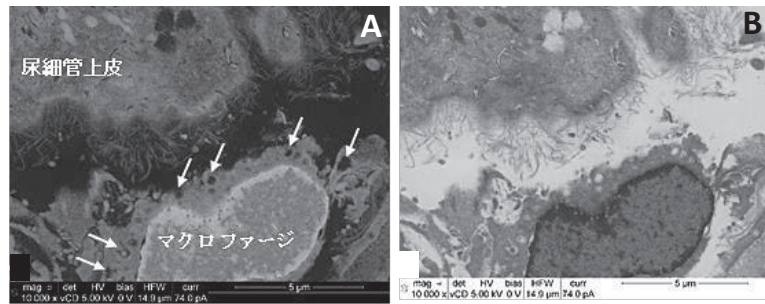


図6. 虚血再灌流障害腎のマクロファージ.  
 A：オリジナル反射電子像. B：Aの白黒反転像. 尿細管周囲の間質にマクロファージが存在し、矢印はライゾゾームまたはエンドゾームを示す. 白黒反転像は透過電子像を示すようになる.

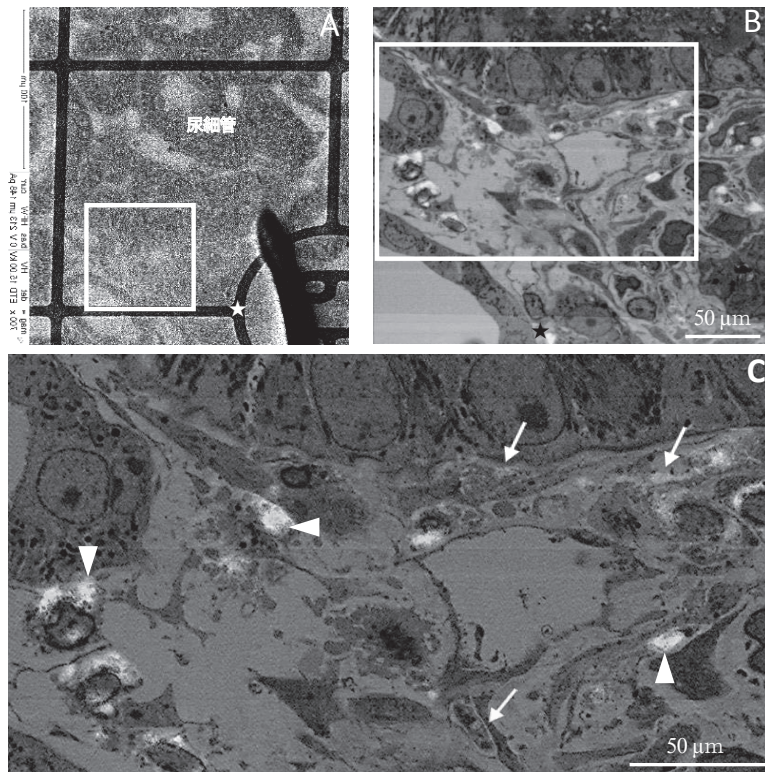


図7. 虚血再灌流障害腎におけるIba1とCD68の局在.  
 A：低倍率のオリジナル反射電子像の白黒反転像. B：Aの枠を拡大し、蛍光像と重ね合わせた像. C：Bの枠を拡大した像. ★はCLEM観察で蛍光像と電顕像を重ねる際のLandmarkとなるグリッドの影. 擬似カラーでは、Iba1免疫活性(矢印)は赤色、CD68免疫活性(矢頭)は緑色で表示されている.

### 5. Fluolid Red及びFluolid Greenを標識プローブとした包埋前免疫二重染色法によるCLEM観察

虚血再灌流後、尿細管周囲の間質に多数のIba1とCD68の免疫活性を示すマクロファージ/単球が観察されるようになった(図7A,B)。Iba1の免疫活性は細胞内にびまん性の弱い蛍光として(図7Cの矢印)、CD68の免疫活性は細胞内に顆粒状の強い蛍光として認められた(図7Cの矢頭)。Iba1免疫活性を示す細胞の一部にCD68の免疫活性が観察された。

### 考察

新規蛍光色素Fluolidはジアゾール型有機EL系蛍光色素として開発され、ジアゾール骨格の側鎖を変えることで蛍光波長の異なる色素を合成することができ、リンカーを変えることで蛍光強度を向上させることができる<sup>8)</sup>。今回は、蛍光波長の異なるFluolid Orange、Fluolid Red、Fluolid Greenの3種類を免疫染色のプローブとして用いた。Fluolidは、免疫染色用として市販されている蛍光色素と異なり、1) 脱水状態や固体状態でも強い蛍光を発すること、2) 長時間の光照射、高熱、pH変化に安定であること、3) stockes shift (最大励起波長と最大蛍光波長との差) が大きいことなどの蛍光特性を有している<sup>9)</sup>。脱水状態や固体状態でも強い蛍光を発する蛍光特性を利用して、これまでに脊髄グリア細胞の免疫染色<sup>9)</sup>及び腎臓の近位尿細管に存在する微絨毛のレクチン組織化学的染色<sup>9)</sup>にFluolidを用いたCLEM法が行われたが、これらの研究では走査電顕を用いた3次元構造解析が行われたのみで、細胞内の微細構造の観察は行われていない。本研究において、電顕試料を作製する際に膜の構造保持やコントラストの増強のために用いられる四酸化オスミウム固定によってFluolidの蛍光は減衰するが、エタノール系列による脱水処理によって減衰した蛍光は回復することが明らかとなった。本研究ではこの特徴を利用して、微細形態観察に有効な四酸化オスミウム固定を行う包埋前免疫染色を用いたCLEM法にFluolidを応用した。四酸化オスミウム固定に耐性を示す蛍光色素を用いて包埋前免疫染色を行うCLEM法は、著者らの知る限り本研究が初めてである。

電顕レベル免疫染色の包埋前免疫染色法は、樹脂包埋する前に免疫染色を行うため抗原性の保持に優れており、包埋後免疫染色法より感度が高い<sup>1)</sup>。凍結超薄切法も、試料が無包埋状態で免疫染色を行うので抗原の保存や抗原の露出が良好で高感度であるが、高価な凍結超薄切片作製用ウルトラミクロトームを必要とし、高度な技術の習熟も必要である<sup>10)</sup>。一方、包埋前免疫染色法は、抗体

が試料の表層から深層まで浸透し免疫染色が試料の全層で行われておれば、通常用いられる超薄切片作製用ウルトラミクロトームで試料を包埋した樹脂の超薄切片を作製するだけで、CLEM観察が随時可能である<sup>11)</sup>。

市販のNanogold<sup>®</sup>(径1.4 nm)-StreptavidinにFluolid Orangeを標識し、FluolidとNanogoldの2種類の標識体を有するプローブを作製し、ライソゾームのマーカーであるカテプシンDの包埋前免疫染色を行った。Fluolidは先述したようにstockes shiftが大きいので、吸収フィルターとしてロングパスフィルターを用い幅広い波長の蛍光シグナルを得ることによって、厚さの薄い超薄切片でも強い蛍光を発することができる。しかしFluolidの蛍光は大小の顆粒状の蛍光として観察され、カテプシンDの厳密な微細局在はやや不明瞭であった。そこで免疫染色後、径1.4 nmの金粒子をGoldenhance<sup>™</sup> EM Kitで増感処理<sup>10)</sup>、金粒子の径を10~20 nmに増加させると金粒子の観察が容易になった。更に、包埋用樹脂に微細構造の保持が良好なエポキシ系樹脂のDurcupan<sup>12)</sup>を用いることにより、金粒子がライソゾーム内に多数認められ、カテプシンDのライソゾーム内の局在が明瞭となった。以上のことより、Fluolid Orange標識Nanogold<sup>®</sup>-StreptavidinとDurcupanの組合せを用いた包埋前免疫染色法は、高分解能CLEM法を行うのに有効であることが明らかとなった。

Fluolid Red、Fluolid Greenの蛍光は、励起フィルターと吸収フィルターを調節することによって蛍光シグナルのクロストークを排除し、鮮明な蛍光分離画像を取得することができた。しかし、両蛍光色素はFluolid Orangeと異なりDurcupan包埋によって蛍光が消失したので、包埋樹脂としてLR Whiteを用いた。蛍光消失の原因は未だ明確ではないが、予備実験の結果、Durcupan包埋の際に用いる重合加速剤DMP-30の還元作用によるものと推測される。LR Whiteは、Durcupanなどのエポキシ系樹脂と比較して微細形態の保持及び超薄切片(厚さ100 nm以下)の作製が劣るとされているので<sup>13)</sup>、今回は切片作製が容易な厚い準超薄切片(厚さ300 nm)を作製し、カバーガラスに張り付けて観察を行った。透過電顕で厚い準超薄切片を観察すると、コントラストが悪く微細形態が不明瞭な画像しか撮影できないので、数十万倍の倍率での観察が可能な高分解能電界放出型走査電顕を用いて、厚い準超薄切片の観察を行った。高分解能電界放出型走査電顕の加速電圧を低くし、切片の表面を絞った電子線で走査すると、切片表面から反射してくる電子線を検出し、その画像を白黒反転することによって超薄切片を透過電顕で観察したのと同様な像を取得すること

ができた。今回のLR White樹脂切片の観察では、細胞膜や細胞小器官の微細形態の保持は良好であり、マクロファージに存在する小型のライソゾームやエンドゾームを観察することができた。Iba1とCD68の免疫二重染色標本のCLEM観察を行うと、マクロファージの細胞質に存在することが知られているIba1の蛍光シグナルは、細胞質にびまん性に観察され、マクロファージのライソゾーム・エンドゾームの膜に局在することが知られているCD68の蛍光シグナルは、ライソゾーム・エンドゾームが豊富に見られる細胞質内に顆粒状の蛍光として観察された。以上の観察結果から、Fluolid RedとFluolid Greenは包埋前免疫二重染色法によるCLEM観察に応用できることが明らかとなった。

### 結論

本研究において、Fluolid Orange 標識Nanogold<sup>®</sup>-Streptavidinを用いた高分解能CLEM法及びFluolid Red とFluolid Greenを用いた免疫二重染色CLEM法が、蛍光像と電顕像を相関させる新たなCLEM法として確立された。これらのCLEM法は、試料作製のための高価な装置を必要とせず、また手法も煩雑ではなく、病理診断を行う上で非常に有効な手法である。

### 謝辞

本研究は、QOL研究機構保健科学研究所の研究費より助成を受けたものである。

### 引用文献

1. de Paul, A. L., Mukdsi, J. H., Petiti, J. P., et al.: Immunoelectron microscopy: A reliable tool for the analysis of cellular processes. In Applications of immunocytochemistry. Rijek, Croatia, pp. 65-96, 2012.
2. Randall, T., Schirra, Jr., Peijun, Z.: Correlative fluorescence and electron microscopy. *Curr. Protoc. Cytom.* 70:12.36.1-12.36.10, 2014.
3. Gorohmaru, H., Thiemann, T., Sawada, T., et al.: Preparation of 4,7-Dihetaryl-1,2,5-oxadiazolo[3,4-c]pyridines as Red Fluorescent Materials. *Heterocycles.* 56: 421-431, 2002.
4. Ventura, C. G., Coimbra, T. M., De Campos, S. B., et al.: Mycophenolate Mofetil Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13: 2524-2533, 2002.
5. Cocchiaro, P., Fox, C., Tregidgo, N. W., et al. : Lysosomal protease cathepsin D; a new driver of apoptosis during acute kidney injury. *Sci. Rep.* 6: 27112; 2016.
6. Köhler, C. : Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell Tissue Res.* 330: 291-302, 2007.
7. Song, L., Lee, C., Schindler C. : Deletion of the murine scavenger receptor CD68. *J. Lipid Res.* 52: 1542-1550, 2011.
8. Wuxiuer, D., Zhu, Y., Ogaeri, T., et al. : Development of pathological diagnostics of human kidney cancer by multiple staining using new fluorescent Fluolid dyes. *Biomed. Res. Int.* 2014: 437871, 2014.
9. Kanemaru, T., Hirata, K., Takasu, S.-I., et al. : A fluorescence scanning electron microscope. *Ultramicroscopy.* 109: 344-349, 2009.
10. Kusumi, S., Koga, D., Watanabe, T., et al. :Combination of a cryosectioning method and section scanning electron microscopy for immuno-scanning electron microscopy. *Biomed. Res. (Tokyo)* 39: 21-25, 2018.
11. Burgoyne, T., Lane, A., Laughlin, W. E., et al. :Correlative light and immuno-electron microscopy of retina tissue cryostat sections. *PLOS ONE* 13: e0191048, 2018.
12. Fu, Z., Peng, D., Zhang, M., et al. :mEosEM withstands osmium staining and Epon embedding for super-resolution CLEM. *Nat. Methods.* 17: 55-58, 2020.
13. Kim, D., Deerinck, T. J., Sigal, Y. M., et al. :Correlative stochastic optical reconstruction microscopy and electron microscopy. *PLOS ONE* 10: e124581, 2015.