newly developed techniques of enzyme-labelled antibody method

酵素抗体法の最新技術

part II

medical technology

炎症 VOL.2 NO.1
WINTER 1982

名倉 宏*, 長谷川英章・小松遵至**

Hiroshi Nagura*, Hideaki Hasegawa・Noriyuki Komatsu**

生体の構造機能, およびそれらの病的変化の検索も, 近年細胞内小器官レベルまで細分されて行われるようになり, 種々の生物活性を有する物質の局在も電顕レベルで観察したいという要望が高まっている。

組織細胞が有する物質の局在を, 直接抗原抗体反応を利用して電顕レベルで観察を可能にしたのが, 1959年 Singerにより考案されたところの抗体をフェリチンで標識する方法(フェリチン抗体法)で, そのときまで, 光学顕微鏡レベルにとどまっていた免疫組織においても, 電子顕微鏡による観察が可能になった。しかし, フェリチン-抗体複合物の分子が大きく細胞内の抗原局在観察には必ずしも適さなかった。その後, Nakane による酵素標識抗体法(enzyme labelled antibody method)の創案により, 物質の細胞内小器官単位での局在観察がはじめて可能となり, その超微形態変化と物質組成や機能変化との関連を, より詳細に解明することができるようになった。

Nakane の酵素抗体法による光顕観察と, 電顕観察との染色原理については, 基本的にはまったく違いはなく, 本稿の part I に述べたとおりであり, それを参照されたい。したがって, 電顕レベルでの酵素標識抗体法(以下電顕酵素抗体法)を行う重要なポイントも,

① 特異性が高く, 力価もすぐれた抗体を用いること

② 抗原の厳密な不動化(immobilization)と微細構造の保持および抗原性の保存が可能な固定液の選択にあるが, 電顕酵素抗体法ではよりきびしい条件が要求されることはいうまでもない。さらに,

③ 電顕酵素抗体法では, 細胞内小器官レベルでの正確な抗原局在を追求するがその最大の目的であるから, 標識抗体が小器官のすみずみまで満遍なく浸透し, 抗原抗体反応が正しく行われることが必須である。

本稿では, この電顕酵素抗体法の手技の実際と, その実施にあたって留意すべき点を述べ, あわせて筆者らの研究室での種々の抗原物質の観察結果を供覧する。

電顕酵素抗体法の手技の実際

(1) 組織の採取と固定操作

電顕酵素抗体法を用い, 電子顕微鏡で組織細胞を観察する目的は, 第一に生体を構成する組織細胞ならびに物質の局在を超微形態レベルでより正確にとらえるためであり, そのため, 組織細胞構造を保存し, かつ検出すべき抗原物質の移動や消失を極力小さくすることに細心の注意を払うことが肝要である。すなわち, もっとも理想的な固定とは“selective preservation of cell structures and components for subsequent study (Gorsh)”であり, さらに免疫組織化学の場合にはできるだけその抗原性を保存するという条件も満足させなければならない。この意味でも, 電顕酵素抗体法のよしあしは固定により決まるといっても過言ではない。

現在なお, 腎生検(図8)などは多くの場合, 未固定の組織で免疫組織化学的観察が行われているが, こうした観点からも一部の例外を除き厳につしむべき観察法といわざるをえない。また細胞や組織の構造あるいはそこに存在している物質のなかで, なにを観察しようとしているか, その目的に応じて組織採取法, 固定法および固定液を選択しなければならない。それらの詳細については, part I に述べたが, 一般に McLean-Nakane の PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde)¹⁾を用いることにより良好な結果を得ている。

(2) 凍結切片作成

固定操作につづく, 固定液の洗浄と凍結ならびに凍結切作成の操作は光顕用切片のそれと基本的に同じである。最近, 凍結超薄切片法²⁾が開発され, 直接凍結超薄切片上で抗原抗体反応を施行することが可能となり, 電顕酵素抗体法やフェリチン抗体法にとって, 理想的な方法と考えられるが, 凍結超薄切片作成装置が未完で, 高価な点と高度の技術を要することから, まだ一部の研究者によって試みられているにすぎない。樹脂包埋された組織の超薄切片上で, 抗原抗体反応を行う樹脂超薄切片法(post-embedding method)³⁾については後述する。

(3) ペルオキシダーゼ標識抗体による抗原抗体反応

このステップの基本操作も, 光顕の場合と同じで, 大別して抗原抗体反応を一段でおさえる直接法と, 二段で

* Department of Pathology and **Cell Biology Research Laboratory, Tokai University School of Medicine *東海大学医学部病理学教室, **同共利研細胞生物部門

行う間接法とがある。凍結切片法の場合、6 μ 切片上で標識抗体を反応させた後、その切片から電顕用の超薄切片を作成するので、その標識抗体が組織切片中に十分かつ満遍なく浸透し、細胞内小器官を含めた細胞内で抗原抗体反応が十分正しく行われている必要がある。そのため、反応時間は一次・二次抗体とも2～12時間を要する。（反応時間が6時間を越える場合、抗原性、ペルオキシダーゼの酵素活性、ならびに組織細胞の微細構造保持のため4°Cで反応させることが望ましい）。

また、標識抗体の組織細胞内への浸透性をよくするため、標識される抗体のIgGの分子を小さくすることが考えられ、Mitaniらは、IgGのFab'フラグメントにペルオキシダーゼを標識することにより、いまだ免疫組織化学的に検出不可能とされていたミトコンドリア内の抗原蛋白の検出に成功している（図10）⁴⁾。間接法の場合も、一次抗体に検出すべき抗原に対する抗体のIgGのFab'フラグメントを用い、二次抗体として、一次抗体を作成した動物のIgGのFab'に対する抗血清よりつくったペルオキシダーゼ標識抗体（Fab'）を用い、理想的な結果を得ている⁵⁾。表1は、用いた抗体の分子の大きさと抗原物質を検出可能な小器官との関係を示したものである。

近年、標識抗体法の一つにAvidin-Biotin法が用いられはじめたが、この最大の利点は、BiotinはビタミンHで分子量が244と非常に小さく、抗体にFab'を用いた場合、Biotin-酵素、Biotin-抗体、Avidinのおおの分子の量が7万以上とならず、組織細"内"のあらゆる場所に浸潤可能であり、今後、電顕免疫組織化学法に用いられたい方法である。ただ、染色結果の判定上、肝実質細胞や白血球に内在性Biotinが存在することに留意しなければならないが、現在、有効な阻止方法が開発されていないのが現状である。

（4）グルタルアルデヒドによる再固定

抗原抗体反応を終了した後、10%ショ糖添加PBSで抗原と反応せず、残存している抗体を十分洗い落とし、1%グルタルアルデヒドで再固定を行う。凍結切片のグルタルと再固定は、PBSで1%に稀釈したものを用い、4°C10分間行っている。固定後は、固定液の洗浄を十分行うことが必要で、これが組織切片内に残存するとペルオキシダーゼの酵素活性の低下ばかりでなく、つぎのステップのGraham-Karnovsky液による反応を障害する。この操作は、抗原抗体反応により抗原局在部位に沈着した標識抗体を、より確実に不動化するとともに組織の固定を一層確実にするため行うものである。

細胞質（cytosol）に局在する抗原蛋白（肝細胞内のグルタチオンペルオキシダーゼなど）では、再固定を行っても、抗原抗体複合物の不動化はまだ十分とはいえず、筆者らは、グルタルアルデヒド再固定の後、DAB液

表1 抗体の大きさと検出可能な抗原の局在部位

抗 体		抗原の局在**
1. 直接法	Fab'-HRP	ミトコンドリアを含むすべての細胞内小器官
2. 直接法	F(ab') ₂ -HRP	分泌顆粒、粗面小胞体 Golgi 装置
3. 直接法	IgG-HRP	細胞膜表面、細胞膜が破壊された場合のみ、粗面小胞体など
4. 間接法	一次：Fab' 二次：Fab'-HRP*	ミトコンドリアを含むすべての細胞内小器官
5. 間接法	一次：F(ab') ₂ 二次：F(ab') ₂ -HRP*	分泌顆粒、粗面小胞体、Golgi 装置
6. 間接法	一次：IgG*** 二次：F(ab') ₂ -HRP*	分泌顆粒、粗面小胞体、Golgi 装置

* 一次抗体と同種の動物のF(ab')₂をつくり、これに対する抗体のFab'またはF(ab')₂にHRPを標識した。

** 凍結切片法で、一次、二次反応とも6～12時間とした。

*** 浸透性がよくないので、6 μ 切片、20時間以上の反応時間が望ましい。

に浸漬する前に、つぎのような1%ゼラチン処理操作を加えることにより、満足すべき結果を得ている⁷⁾。

① 1%ゼラチン液/0.1M（リン酸緩衝液）に2～3分間浸す。

② ドライヤーで急速に乾燥（加温しない）

③ 2%グルタルアルデヒド/PBSで10分間再固定

④ 冷 PBS で十分洗浄

（5）diaminobenzidine（DAB）による標識酵素の酵素細胞化学反応

ペルオキシダーゼの染色法は光顕の場合と同様、Graham-Karnovsky法を用いる。電顕酵素抗体法の場合は、基質のH₂O₂を除いたDAB液（incomplete Graham-Karnovsky solution）に1%のdimethylsulfoxide（DMSO）を添加したもので、室温30分反応させた後、洗浄することなくH₂O₂を加えたDAB液（complete-Graham-Karnovsky solution）で5～10分間反応させる二段階法を行っている。

このpre-incubationは、DABの浸透がH₂O₂より、ながく時間がかかるので、あらかじめDABをよく浸み込ませておく必要があるためである。

（6）オスミウム酸による後固定

DAB反応の後組織切片をPBSで洗浄、0.1～0.05Mリン酸緩衝液で2%に稀釈したオスミウム酸で室温1時間反応させる。その結果、HRPの反応産物が不溶性のDABとなって細胞組織内に沈着した部位にオスミウム酸が反応して、オスミウムブラックとなり、電子顕微鏡

下で観察可能なコントラストが得られるようになる。

(7) 脱水, 樹脂包埋

反応の終わった組織切片ののったスライドグラスを光顕用の染色カゴに入れ, 50%, 70%, 90%, 95%, 100%のエタノール系列で脱水を行う。脱水時間は, 室温で各ステップ5分間ずつ, 100%エタノールは3回おのおの10~30分以上が望ましい。エタノール脱水後, アセトンやQY-1などの置換剤は省略し, エポキシ樹脂を満たしたゼラチンカプセルを逆さにして, エタノールがまだスライドグラスに残っている状態で切片の上にかぶせる。樹脂の重合比, 重合時間は通常電顕の場合に準じて行いが, やや硬目のほうがよく, 筆者らの研究では Quetol 12を使用した場合, 3:7の混合比で, 60°C 2~3日の重合時間で薄切可能なブロックを得ている(図1)。

(7) 超薄切片作成と電顕観察

重合の終わった樹脂ブロックは, ガスバーナーでスライドグラスの下面より10秒程度加熱することにより, 容易にガラス面よりはがすことができる(図1)。この操作により, 組織切片は樹脂側に移る。この方法で作製されたブロックは, 図2のように光学顕微鏡下で直接観察可能であり, 厚切り切片作成の必要はない。

顕微鏡下で目的とする位置にマークをつけ, 余分部分をグラインダーやヤスリで削り落とし, 実体顕微鏡下でトリミングを行う。こうして得られたブロックから超薄切片を作成するが, その基本操作は通常電顕ブロックの場合と同様に行う。

超薄切片は, 必ず無染色のまま電顕観察を行い, 組織細胞内での反応産物の局在を確認し, その後, 必要に応じて電子染色を施すことが望ましい。無染色でもやや厚目の切片で, 低加速電圧, 絞り径の縮小によりかなり良好なコントラストが得られるが, 組織細胞の超微構造と抗原蛋白の局在部位との関連が要求される場合には, ごく短時間鉛染色(Satoの鉛染色法で30秒~1分間)を行っている。

以上の電顕酵素抗体法の手技の概略を解説したが, その操作手順を表2に示す。

樹脂超薄切片法³⁾

凍結切片上で抗原抗体反応を行うかわりに, 電子顕微鏡用の超薄切片上でそれを行うのが, この樹脂超薄切片法(pre-embedding method)である。この場合, 凍結融解による組織破壊や細胞質内物質の流れだしがないので, 超微形態の保存がきわめてすぐれており, かつ, どの細胞内小器官にある抗原物質も切片上に露出しているため抗体の浸み込みも問題にならず, IgGにペルオキシダーゼを標識した抗体を使っても peroxidase antiperoxidase method (PAP法)を利用した免疫電顕法でも利用できる。しかし, 樹脂包埋までの課程で抗原性が失活

図1 樹脂の重合の終わったブロック①をスライドグラスよりガスバーナーの加熱②によって剥がす③。

図2 光学顕微鏡下で樹脂ブロック(▶)の観察が可能である。

されやすく, 蛋白性抗原の場合はほとんど用いることができず, ペプチドホルモンのように比較的分子の小さいペプチドの局在観察に適している。超薄切片の作成の操作は, 通常の電顕用ブロック包埋とはほぼ同様に考えてよい。また, DABの浸み込みに問題がないので, 光顕の

表2 酵素標識抗体法（直接法, 間接法）による
電顕標本作成手技

- (1) アルブミン塗布スライドグラスに6~12 μ の凍結切片をのせる。
- (2) 30分間, 室温で風乾
- (3) 冷10% ショ糖加 PBS で5分間ずつ3回洗浄
- (4) 10非感作ヤギ血清（標識抗体が家兎でつくられている場合は家兎血清）を毛細管ピペットで切片上にのせ, 湿室（moisture chamber）中で10分間室温で反応
- (5) 冷10% ショ糖加 PBS で1回軽く洗浄
- (6)* 一次抗血清（Fab' または F(ab')₂）を毛細管ピペットで切片の上にのせ, 湿室中で4°C 6~18時間反応
- (7) *冷10% ショ糖加 PBS で10分間ずつ5回以上洗浄（6~12時間洗浄が望ましい）
- (8) *同様にペルオキシダーゼ標識二次抗体（HRP-Fab' または HRP-F(ab')₂）を湿室中で4~6時間反応
- (9) 冷10% ショ糖加 PBS で10分間ずつ3回洗浄
- (10) 冷1% グルタルアルデヒド（PBS で希釈）で4°C 5~10分間再固定
- (11) 冷PBS（以下の操作からショ糖を加えない）で5分ずつ5回以上, 十分洗浄
- (12) H₂O₂ を添加しない DAB 液（incomplete Graham-Karnovsky's solution）に1% DMSO を加えたものに30分間, 室温で浸漬
- (13) 洗浄することなく DAB-H₂O₂（Graham-Karnovsky's solution）で5~10分間反応
- (14) 冷PBS で5分間ずつ3回洗浄
- (15) 2% OsO₄（リン酸緩衝液でpH 7.4）で1~2時間, 室温固定
- (16) 冷PBS で洗浄後, 型どおりエタノール脱水, 樹脂包埋

* 直接法の場合は, (6)の一次抗体のかわりに (8)のようにペルオキシダーゼ標識抗体（HRP-Fab' または HRP-F(ab')₂）を反応させ, (9)以下の操作にすむ。

場合と同様 DAB 反応は1ステップでよい。酵素抗体間接法による操作の手順は表3に示すとおりである。

培養細胞の電顕酵素抗体法

培養細胞系を使った免疫電顕法はウイルス学の領域で, 主としてフェリチン抗体法を用いて行われてきた。しかし細胞質内への標識抗体の浸透が, その細胞を蛋白分解酵素や界面活性剤で破壊しないかぎり, ほとんど期待できないフェリチン抗体法では, ウイルス蛋白の細胞内局在を厳密に観察することはきわめて困難といわざるをえない。その点, いままで紹介してきた電顕酵素抗体法は, 培養細胞系を用いたウイルス感染細胞の免疫組織化学的研究にもっともすぐれた手技の一つであろう（図9）⁹⁾。また, このことは培養細胞系での肝細胞や形質細胞, あるいは種々の腫瘍細胞の蛋白合成, ならびに運搬の機構の解明に, 従来行われてきた電顕オートラジオグラフィ法に加え, 電顕酵素抗体法の導入が期待される所

表3 樹脂超薄切片法の操作手順

- (1) 型どおり固定, 樹脂包埋超
- (2) 薄片作製, ニッケルグリッドにのせる。
- (3) 10%過酸化水素水で10分間, 室温で処理
- (4) 1% BSA 添加 PBS で洗浄
- (5) 湿室内でパラフィルム上に一次抗血清を1滴滴下, その上にグリッドを浮遊させ, 30分間反応
- (6) 1% BSA 添加 PBS で洗浄
- (7) (5)と同じ要領でペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応
- (8) 1% BSA 添加 PBS で洗浄
- (9) DAB-H₂O₂ 液*で反応
- (10) 1% BSA 添加 PBS で洗浄
- (11) 2%オスミウム酸で後固定
- (12) 十分洗浄の後切片を乾燥, 鏡検

* 光顕の場合と同様 20 mg DAB/100ml/H₂O+0.05% H₂O₂

以である。

培養細胞の免疫化学組織的観察は, 普通,

① 単層培養細胞 (monolayer) を PLP で固定の後, ラバースクレーパー (rubber scraper) で掻き集めたもの, あるいは浮遊培養細胞の固定したものを遠沈してペレットをつくり, これを part I で述べた手順に従って, OCT compound に包埋, 凍結切片を作成する方法⁹⁾

② dish slide (Lab Tek-三光純薬), またはカバーガラス（培養びん中に静置された短ざく型のカバーガラス）上に単層培養されたものをそのまま固定, 洗浄を行い, 酵素抗体染色を施す方法が行われている。

①の場合, 以下の操作も本稿の凍結切片法の手技に準じて行うことができるが, ②のごとく dish slide 上の単層培養細胞に直接標識抗体を反応させる場合, その細胞内浸透がきわめてわるく, 原則として特異抗体は Fab' しか用いることができなく, 反応時間も12時間以上必要になる。それでも, なお標識抗体の浸透が十分でない場合, dish slide の裏面（細胞が付着していない側）よりフロンガスを噴霧して急速に冷凍, 融解することにより, 良好な浸透性を得ている。この場合, 凍結融解による微細構造の破壊を防ぐため, あらかじめ凍結切片作成の場合と同様に, dish slide にのった培養細胞を10% ショ糖加 PBS, 15% ショ糖加 PBS, 20% ショ糖加 PBS で十分浸漬の後凍結融解操作をすることが望ましい。抗原抗体反応後は型どおり, グルタル固定, DAB 反応, オスミウム酸後固定, アルコール脱水を経て, 樹脂を満たしたゼラチンカプセルを直接 monolayer の上に逆さにかぶせ重合させる（表4）。

電顕酵素抗体法と電顕酵素組織化学法との重染色¹⁰⁾

電顕酵素抗体法の場合, 究極的にはペルオキシダーゼ

表 4 培養細胞の電顕酵素抗体法による観察法の操作手順

(1)	単層培養の場合、培養器より培養液を捨て、冷 PBS で 3 回洗浄、浮遊培養細胞の場合は 800～900rpm で 5～10 分間軽く遠沈、培養液を捨て、同様に 3 回冷 PBS で洗浄
(2)	PLP を培養器中に加え、4°C で 30 分～1 時間固定
(3)	単層培養の場合は、固定液中で rubber scraper で細胞をかきとり、その細胞浮遊液をプラスチック遠沈管中で遠沈、固定液を捨てる。
(4)	10% ショ糖加 PBS 中に浮遊させる。
(5)	1,000～1,200 rpm で遠沈、上清を捨て、再度 10% ショ糖加 PBS 中に浮遊させ、2 時間 4°C で静置
(6)	以下(5)と同様に、15% ショ糖加 PBS、20% ショ糖加 PBS、5% グリセリン添加 20% ショ糖加 PBS 中で浮遊遠沈を繰り返す。
(7)	2000rpm で遠沈、上清を捨て、ペレットの上に OCT-compound を静かに重畳する。
(8)	スパーテルを遠沈管壁とペレットの間にさしこみ、OCT-compound をペレットの中に浸み込ませる。
(9)	ドライアイスエタノール中に遠沈管を入れ迅速に凍結を行う。
(10)	遠沈管をハンマーで壊し、OCT-compound 中に凍結されたペレットをとりだす。
(11)	凍結された OCT-compound を適当な長さに切断し、アルミホイルでつくった包埋容器中に入れ、周囲に OCT-compound を満たし再凍結
(12)	凍結切片を型どおり作成

の酵素組織化学的検出法に依存しているわけであるから、他の酵素組織化学との重染色が理論的に可能である。筆者らは、免疫グロブリンや secretory component とアルカリフォスファターゼや、酸フォスファターゼをそれぞれ電顕酵素抗体法と Tranzer の金属塩法、または Novikoff 法により、電顕レベルで同一切片上での観察に成功している。すなわち、超微形態レベルでの抗原蛋白の局在と酵素活性を同時に観察することを可能にした(図 7)。

酵素抗体法単独の場合と同様の手順で、PLP で固定された組織について、凍結切片法で酵素抗体染色を行い、緩衝液で十分洗浄の後、酵素活性染色を施し、引きつづき二段階の DAB 反応を行っている。表 5 はその操作手順である。

細胞膜表面抗原やレセプターの電顕酵素抗体法

リンパ球、マクロファージ、あるいは種々の腫瘍細胞の細胞膜抗原の識別、および種々の受容体(receptor)の検出を、その細胞の微細構造観察と同時に行うことは、ながい間免疫学や内分泌学領域の夢であった。

玉置らは、マウス脾臓、リンパ節、胸腺あるいは胎児肝を用い、それらを緩衝液中で遊離細胞とし、未固定のまま Nakane の酵素抗体間接法に準じ、4°C で抗原抗体

表 5 電顕酵素抗体法と酵素組織化学との重染色法

(1)	凍結切片を冷 10% ショ糖加 PBS で洗浄
(2)	標識抗体で室温、3～5 時間反応
(3)	冷 10% ショ糖加 PBS で十分洗浄
(4)	1% グルタルアルデヒド (in PBS) で 4°C 10 分間固定
(5)	冷 PBS (このステープよりショ糖は加えなくてもよい)
(6)	冷 tris-maleate buffer (0.1 M, pH 7.4) で 3 回、計 30～60 分間洗浄
(7)	アルカリフォスファターゼ反応 (Tranzer 法)、室温、5～15 分間
(8)	冷 tris-HCl buffer (0.05M, pH 7.6) で 3 回、計 30～60 分間洗浄
(9)	二段階の DAB 反応の後、オスミウム酸固定、脱水、樹脂包埋

表 6 細胞膜抗原の電顕酵素抗体法による観察手法

(1)*	遊離細胞(組織の場合、5% fetal calf serum 添加 PBS 中ではなくして遊離細胞とする)を冷 PBS (pH 7.2) で十分洗浄
(2)*,**	試験管内で、第一抗体 (Fab' または F(ab') ₂) を細胞 1×10 ⁷ 個に対して 0.1ml 添加、4°C 30 分間反応
(3)*	冷 PBS で 3 回洗浄
(4)*	ペルキンダマーゼ標識第二抗体 (HRP-Fab' または HRP-F(ab') ₂) と 4°C 30 分間反応
(5)*	冷 PBS で 3 回洗浄
(6)	2% グルタルアルデヒドで 4°C 20 分間固定
(7)	冷 PBS で 3 回洗浄
(8)	H ₂ O ₂ 添加 DAB 溶液で室温 5 分間反応
(9)	冷 PBS で洗浄
(10)	試料を試験管から電顕用ビームカプセルに移し、2% オスミウム酸(リン酸緩衝液で pH 7.4) で 1 時間室温固定。
(11)	PBS 洗浄、脱水、エボン包埋

* アジ化ナトリウムを添加してもよい。

** fisher tube 管を使用するとよい。

反応を行った後、グルタルアルデヒドで固定、DAB 反応を行うことにより、種々の細胞膜抗原の検出に満足すべき結果を得ている¹¹⁾。

この際、留意すべき点は、生細胞で抗原抗体反応を行うため、Fc レセプターとの非特異結合の防止や、capping の阻止であり、そのために抗体との反応は、0～4°C で行うとともに、抗体には Fab' もしくは (Fab')₂ を用いることが肝要であり、必要に応じて反応洗浄の各ステップにアジ化ナトリウムを添加している。

筆者らも、この方法を応用し、B 細胞系の表面免疫グロブリン (surface immunoglobulin) や、リンパ球表面の HLA の検出に成功している。また前項で述べた酵素組織化学との重染色も同様に可能である。表 6 は、その

図3 電顕酵素抗体法による免疫グロブリン産生細胞 (IgA) の観察
IgA が粗面小胞体(er)および核周囲腔(Ps)に局在するが、ゴルジ装置(G)には認められない¹³⁾. (×7,000)

図4 酵素抗原法による免疫グロブリン産生細胞の観察
抗 HRP 抗体が形質細胞の粗面小胞体(er) および核周囲腔 (Ps) に染色される¹³⁾. (×5,000)

図5 proteiloosing syndrome 患者十二指腸の生検組織
IgA が腸管上皮細胞間隙に貯留されている (►). (×10,000)

図 6 肝細胞における補体 (C₄) の局在
補体は粗面小胞体 (er) および核周囲腔 (Ps) に認められ、肝細胞で産生されることが証明された¹⁵⁾.
(×17,000)

図 7 肝臓における IgA 蛋白と酸フォスファターゼ活性の重染色
IgA は、肝細胞の類洞およびディッセ腔 (Ds) に面した細胞膜表面 (→) に認められるが、肝細胞内に取り込まれた (IgA) は、酸フォスファターゼとともに染色され (▶), 細胞内消化を受けることが示唆された¹⁶⁾. (×20,000)

図 8 腎生検組織 (IgA 腎症) の IgA 染色
PLP 固定後、型どおり電顕酵素抗体法で観察した。IgA はメサンギウム細胞 (N) 周囲の matrix に認められる (▶)¹⁷⁾. (×16,000)

図9 BHK 培養細胞における newcastle disease virus (NDV) の NP 蛋白の局在
NP は、細胞質内に封入体を形成 (NP) し、出芽部位 (▶) に観察される⁸⁾。
(A : $\times 20,000$, B : $\times 30,000$)

図10 正常ラット副腎皮質細胞内の adrenodoxin reductase のミトコンドリア局在 (▶)⁴⁾
($\times 30,000$) (東海大病理, 渡辺慶一教授提供)

表7 酵素抗原法による抗体産生細胞観察の手技

(1) HRP で動物を免疫し血清抗体価が十分あがった後、目的のリンパ節などを採取	(8) 1% グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4) で4°C 10分間後固定
(2)* PLP または4% パラホルムアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4) で4°C 3時間固定	(9) PBS で3回, 30分間洗浄
(3)* 洗浄することなく1% グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4) で4°C 30分~1時間固定	(10) H ₂ O ₂ を添加しない1% DMSO 添加 DAB 溶液 (incomplete Graham-Karnovsky 溶液) で室温, 30分間反応
(4)* 冷 PBS で洗浄, 3回交換4°C 12時間~1夜	(11) 洗浄することなく H ₂ O ₂ 添加 Graham-Karnovsky 溶液で5~10分間室温で反応
(5)* 組織切片 (マイクロチョッパーなど) 20~40 μ 作成	(12) PBS で3回30分間洗浄
(6)** 10~20 μ g HRP/ml/PBS に浸漬, 4°C 6~12時間	(13) 2% オスミウム酸 (0.1M リン酸緩衝液で室温1時間固定)
(7) 冷 PBS で3回30分間洗浄	(14) 型どおり脱水, 樹脂包埋

* 凍結切片法の場合グルタルアルデヒド固定を行うことなく、型どおり10%, 15%, 20% ショ糖加 PBS で洗浄後、グリセリン処理、OCT-compound に包埋、凍結切片を作成する (part I 表1参照)。この場合には PLP, パラホルムアルデヒド固定は6時ぐらいが望ましい。

** 凍結切片法の場合2~3時間で十分である。

操作手順の概略を示したが、詳細は玉置らの著書を参考にされたい。

走査型免疫電顕法

以上述べてきた電顕酵素抗体法は、すべて透過型電顕を用いた観察法であるが、最近、Nakane & Hartmanにより走査型電顕による電顕酵素抗体法が紹介された¹²⁾。これは、酵素抗体法による染色を施した6 μ 凍結切片を超薄切片にすることなく、そのまま走査型電顕による観察を可能にした画期的な方法で、今後、日常の病理組織検索や、免疫学領域での種々の膜抗原の検出などに飛躍的な発展をとげるものと思われる。その原理の概略は、backscattered electron imaging を利用し、酵素抗体法によって染色された抗原蛋白の局在を検出する方法で、ペルオキシダーゼ標識抗体の局在部位に沈着したところのDABのポリマーに結合したオスミウム酸に対する反射電子(backscattered electron)をdetectorで検出するわけである。詳細は、Nakane & Hartmanの原著を参照されたい。

酵素抗原法による抗体産生細胞の観察法¹³⁾

抗体産生細胞内における特異抗体の局在観察は、いまままで紹介してきた電顕酵素抗体法による局在観察のほか、酵素抗原法が用いられている。すなわち、外来酵素、たとえば、植物性ペルオキシダーゼ(HRP)あるいは*E. coli*のアルカリフォスファターゼ(ALP)を抗原として動物を免疫し、抗HRPあるいは抗ALPを産生している抗体産生細胞を含むリンパ組織を抗原である酵素液に浸漬させ、その結果、抗体局在部位に沈着した抗原酵素の局在を酵素組織化学的に検出する方法である。現在では、主としてHRPが抗原として用いられている。

本法では、ある特定の抗原(この場合はHRP)に対する特異抗体蛋白を産生する抗体産生細胞のみを特異的に染めだすことが可能であり(図4)、このHRPが普通接種された動物にとってまったくはじめての抗原である場合、抗体産生のごく初期像から観察できる利点があり、無菌動物などを使った免疫反応の研究にも匹敵する研究手段になりうる。この点は、他の免疫組織化学ではなしえなく、感染、免疫学の研究にもっと利用されてよい方法と考えている。その操作手順は表7に示すが、詳細は筆者らの著書を参照されたい。

おわりに

以上、電顕酵素抗体法を中心とした染色手技の実際と、その留意すべき点の概略を筆者らの経験¹⁴⁾およびそれぞれの分野の専門家の業績から紹介するとともに、染色例を供覧した(図3~10)。本稿の枚数の関係で十分述べきれなかった点は、それぞれの原著、著書を参照さ

れたい。最後に、この酵素標識抗体法が炎症、免疫領域の研究にもっとも利用されることを切望している。(part Iの図2と図3が逆になっていますので訂正いたします)。

渡辺慶一教授ならびに Paul K. Nakane 教授のご指導に深謝いたします。

文 献

- McLean, I.W., Nakane, P.K.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative: a new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1077-1083, 1974.
- Tokuyasu, K.T.: A technique for ultracyotomy of cell suspensions and tissues. *J. Cell Biol.* 57: 551-565, 1973.
- 長村義之: 電顕酵素抗体法の細胞生物学・病理学への応用. *細胞* 11: 230-243, 1979.
- Mitani, F., Ishimura, Y., Izumi, S., Watanabe, K.: Immunohistochemical localization of adrenotoxin and adrenodoxin reductase in bovine adrenal cortex. *Acta Endocrinol.* 90: 317-327, 1979.
- Nagura, H., Brandtzaeg, P., Nakane, P.K., Brown, W.P.: Ultrastructural localization of J chain in human intestinal mucosa. *J. Immunol.* 123: 1044-1050, 1979.
- Guesdon, J., Ternynck, T., Avrameas, S.: The use of Avidin-Biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27: 1131-1139, 1979.
- 小松遵至: ラット肝 Glutathione Peroxidase (GSH-PO) 局在の電顕酵素抗体法による観察. *細胞* 11: 209, 1979.
- Nagai, Y., Yoshida, T., Hamaguchi, M., Nagura, H., Hasegawa, H., Yoshimura, S., Watanabe, K.: Morphogenesis of paramyxoviruses: Localization of the structural proteins of Newcastle disease virus and Sendai virus to subcellular or ganellas of infected cells by ultrastructural immunocytochemistry. (submitted.)
- Nagura, H., Nakane, P.K., Brown, W.R.: Translocation of dimeric IgA through neoplastic colon cells *in vitro*. *J. Immunol.* 123: 2359-2368, 1979.
- 長谷川英章, 名倉 宏, 渡辺慶一, 生越喬二, 三富利夫: 胃粘膜化生上皮細胞の免疫組織化学と酵素組織化学. *消化器と免疫* Vol. 5. 医歯薬出版, 1980, p 64-70.
- 玉置憲一, 垣生園子: T細胞の抗原分化と超微形態. *新版日本血液学全書* (9), 丸善, 1981, p 1-16.
- Nakane, P.K., Hartman, A.L.: Immunocytochemical localization of intracellular antigens with SEM. (in press)
- 渡辺慶一, 名倉 宏: 抗体産生像の超微形態. *新版日本血液学全書* (9), 丸善, 1981, p 197-220.

- 14) 渡辺慶一(編): 酵素抗体法—理論・手技解説とその応用—, 学際企画, 1981.
- 15) 名倉 宏, 渡辺慶一, 長谷川英章, 吉村真一, 杉本栄一: ヒト生梗肝における補体(C₃, C₄)の局在とその病理学的意義. 消化器と免疫 Vol. 7, 医歯薬出版, 1981, p 87-92.
- 16) 名倉 宏, 長谷川英章, 堤 寛, 小林邦彦, 渡辺慶一: ヒト肝生検組織における IgA の局在とその病理学的意義. 消化器と免疫 No. 8, 医歯薬出版, 1982, (印刷中).
- 17) Komatsu, N., Nagura, H., Watanabe, K., Nomoto, Y., Kobayashi, K.: Immunocytochemical evidence for mesangial deposits of J chain-linked polymeric IgA in IgA nephropathy. (submitted).