原

著

グリコーゲンを認識するモノクローナル抗体の作製と 免疫組織学的観察

馬 場 麻 人

東京医科歯科大学歯学部口腔解剖学教室（指導：一條 尚教授，山下靖雄教授）

(1993年3月16日 受付)

Production of Monoclonal Antibody That Recognizes Glycogen and Its Application for Immunohistochemistry

Otto Baba

Department of Oral Anatomy, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Directors : Prof. Takashi Ichijo and Prof. Yasuo Yamashita)

In this study, I made a monoclonal antibody, using the mandibular condylar cartilage as antigen. By light microscopic immunocytochemical observations, this antibody reacted with the chondrocytes both in the mandibular condyle and the costal cartilage, hepatocytes and skeletal muscle cells. By electron microscopic immunocytochemical observations, reaction products (gold particles) were seen on the glycogen particles in the chondrocytes. Further, by dot blotting assay, this antibody was found to react directly with the purified glycogen. Meanwhile, all these reactions disappeared after α -amylase digestion.

These results indicate that this antibody specifically recognizes glycogen or glycogen-related sugar chains. Therefore, I think that this antibody is very much useful for detecting the glycogen instead of the PAS reaction, since PAS reaction is not a specific method to detect the glycogen.

I. 緒 言

下顎頭軟骨は寺島¹⁾の層区分に準ずれば、頂部から下顎枝方向に向かい線維層、線維下細胞層、骨軟骨プロゲニタ細胞層、軟骨芽細胞層、軟骨細胞層、肥大細胞層、さらには軟骨内骨化により骨が形成される骨化層に層区分される。これらの層区分は、下顎頭軟骨の軟骨細胞の発生、分化、発育に基づくものであり、軟骨細胞は分裂による増殖、軟骨基質の産生、肥大細胞への分化、軟骨細

胞の変性あるいは死滅と軟骨基質の石灰化という一連の過程を連続して、その細胞形態を変化させながら行っている。

このような下顎頭軟骨に対して組織化学的方法により、発生あるいは分化にかかわると考えられる物質の局在について検索し、形態的变化とあわせて、発生、分化の制御機構を明らかにすることが試みられてきた。

このような研究としては、PAS (Periodic Acid-Schiff) 染色^{2,3)}や酸性ホスファターゼ^{3,4)}、アルカ

リホスファターゼ^{3,4)}, K-pyroantimonate⁵⁾などの酵素活性の検出, レクチンの特異的結合による糖の検出, 抗体あるいは抗血清を利用した S-100 Protein⁶⁾, chondromodulin-I (ChM-I) の局在の検索⁷⁾, *in situ* による ChM-I の mRNA の発現の局在の検索⁷⁾などの報告がある。

一方, モノクローナル抗体の作製技術は近年普遍的な技術として確立しており, さらに未精製の組織を抗原として用いモノクローナル抗体を作製し, これらの抗体によって組織中の抗原物質を同定することにより, ある組織に特異的な物質を検索しようという試みもなされている。

この方法では, 得られたモノクローナル抗体が既知の物質を認識するものであっても, この抗体を未精製抗原より既知の抗原性を除くことに用い, さらに新しい抗体を作製することが可能であると考えられる。

今回, 下顎頭軟骨の発生, 分化の過程に発現する物質に特異的な抗体を作製し, それを用いた免疫組織化学的方法により軟骨細胞の分化, 発生機構を解明する目的で, ラットの下顎頭全体をホモジナイズしたものを抗原として用い, モノクローナル抗体の作製を試みた。

実際に今回得られたモノクローナル抗体 (IV58B6) を用いて免疫組織化学的観察を行うと, 下顎頭の軟骨細胞や肝細胞などに免疫陽性物質の局在が観察され, その局在よりこのモノクローナル抗体は, グリコーゲンあるいはグリコーゲンを構成する糖鎖の一部を認識していると推察された。

免疫電顕による観察では, 細胞内のグリコーゲンと同定される顆粒上に免疫陽性物質の局在を示す金粒子のマーカーを認め, さらにドットブロットの実験から, このモノクローナル抗体はグリコーゲンを認識していることが示唆された。

以上の実験結果から, モノクローナル抗体 (IV58B6) はグリコーゲンまたはグリコーゲンを構成するグルコース糖鎖の一部を認識する抗体であり, 糖解析に非常に有効であると考えられる。

II. 実験材料および方法

1. モノクローナル抗体の作製

2 週齢の Wistar 系ラットよりエーテル麻酔下で下顎を摘出し, 軟骨内骨化部位を含めた下顎頭軟骨部をモノクローナル抗体の作製における抗原材料として採取し, 凍結保存した。下顎頭軟骨 20 個をダルベッコ加塩燐酸緩衝液 (D-PBS) 400 μ l 中でホモジナイズしたものを抗原とした。

抗原溶液に等量の Freund の完全アジュバントを加えエマルジョンを調整し, 2 匹の Balb/c マウスの腹腔内に各 400 μ l 注射し, 初回免疫を行った。さらに 3 週および 5 週間後に 400 μ l の抗原溶液に等量の Freund の不完全アジュバントを加えてエマルジョンを調整し, 400 μ l 腹腔内注射し 2 匹に追加免疫を行った。

2 週齢のラット下顎頭軟骨を, 0.1M 燐酸緩衝液 (pH7.4) で緩衝した 4% パラホルムアルデヒド固定液で 4℃24 時間固定し, 0.18M saccharose を添加した 8% EDTA (pH7.4) で 1 週間脱灰後, 凍結切片を作製した。

最終免疫より 3 日後にマウス眼角部より採血を行い, 分離した血清を一次抗体として用いて凍結切片と反応させた。その後ビオチン標識抗マウス IgG, IgA, IgM 混合ヤギ抗体と反応させ, ABC kit (Vector 社) を用い, 0.05% DAB (3, 3'-diamino-benzidine tetra-hydrochloride) を 0.1M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) に溶解し, 0.003% 過酸化水素を加えた溶液で発色し, 下顎頭軟骨組織と反応するマウスの抗体の形成を調べた。

下顎頭軟骨と反応するマウスの脾臓を麻酔下で取り出した後, 脾細胞を採取し, RPMI 1640 培地中で 1.0×10^7 個/ml となるように脾細胞浮遊液を調整した。また NS-1 細胞 (P3/NS-1/1-Ag4-1 マウス骨髓腫細胞) は RPMI 1640 培地中で 1.0×10^6 個/ml となるように細胞浮遊液を等量, すなわち脾細胞数と NS-1 細胞数が 10 対 1 となるように混和した後, 遠心し培地を除去し, ポリエチレングリコール 4000 (Merck 社) を用いて細胞融合を行った。融合細胞を培地で洗浄後, RPMI 1640 基

本培地に 2 %HAT (SIGMA 社), 10%BM-Con-dimed H1 (Boehringer Mannheim 社), 15%ウシ胎児血清, 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール, 100unit/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを添加した HAT 培地を用い 5×10^6 個/ml となるように細胞浮遊液を調整した。0.1 ml/well の割合で細胞浮遊液を 96 穴マイクロプレートに分注後, 37°C, 空气中に 5 %になるように炭酸ガスを添加し, 湿度飽和の培養器内で培養した。

培養 2 週間後よりハイブリドーマが増殖して, コロニーを形成しているウェル中のハイブリドーマを, 細胞数が 1 から 5 個/well となるように HAT 培地を用いて希釈を行い, 再び 96 穴マイクロプレートに分注して, クローニングを行った。

さらに培養 2 週間後に well 内の細胞コロニーが 1 個のものについてスクリーニングを行った。スクリーニングは免疫組織学的方法を用いた。2 週齢のラット下顎頭をエーテル麻酔下で採取し, 0.1M 磷酸緩衝液 (pH7.4) で緩衝した 4 %パラホルムアルデヒドで室温で 24 時間固定した。さらに 0.18M ショ糖を添加した 8 %EDTA (pH7.4) を用い 4°C で 1 週間脱灰後, 通法に従いアルコール脱水, キシレン透徹, パラフィン包埋を行い 4 μ m に薄切した切片を作製した。脱パラフィン後の切片にハイブリドーマ培養上清中の抗体を一次抗体として反応させ, 二次抗体としてビオチン標識抗マウス IgG, IgA, IgM 混合ヤギ抗体を用い, ABC kit (Vectstain[®], Vector 社) と DAB により発色させ, 下顎頭軟骨細胞と反応する抗体を産生するハイブリドーマを得た。その後限界希釈法を用いてクローニングをくり返し, モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得た。

2. モノクローナル抗体のサブクラスの決定

得られたモノクローナル抗体 (IV58B6) のサブクラスは Inno-lia mouse MAB iso-typing kit (Innogenetics 社) を用いて決定した。

抗原として精製されたマウス IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgA, IgE が吸着したストリップを使用した。モノクローナル抗体 (IV58B6) 産

生ハイブリドーマの培養上清 0.4ml を Kit 中の磷酸緩衝液を主体とした試料緩衝液 0.8ml で希釈し, その後室温で 30 分間ストリップと反応させた。kit 中の洗浄用緩衝液で 1 分間ずつ 3 回洗浄後, アルカリフォスファターゼで標識されたラット抗マウス Ig 抗体を室温で 15 分間反応させた。再び洗浄後, 基質液である 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate を kit 中の緩衝液で 100 倍に希釈し, 室温で 15 分反応し, 0.1M 硫酸で発色反応を停止し, 乾燥後観察を行った。

3. 光顕的免疫組織化学による観察

出生直後, 2, 4, 12 週齢の Wistar 系ラットの下顎頭および各組織 (肝臓, 脾臓, 脾臓, 消化管, 肋骨, 骨格筋, 心臓, 胸腺, 精巣, 精囊) を 0.1M 磷酸緩衝液 (pH7.4) で緩衝した 4 %パラホルムアルデヒド固定液を用い, 室温で 24 時間固定した。さらに石灰化した組織は 0.18M ショ糖を添加した 8 %EDTA (pH7.4) により 4°C で 1 週間脱灰後, 通法に従いパラフィンに包埋した。その後 4 μ m で薄切し, 2 %シラン (3-aminopropyl-triethoxy-silane) で処理したスライドガラスに切片を貼付した。

脱パラフィン後, トリプシン (4unit/ml 0.05M 磷酸緩衝液 pH7.6) で 37°C, 30 分間酵素処理を行い, PBS で洗浄後, 0.3%過酸化水素メタノールを用いて室温で 40 分間内因性ペルオキシダーゼ阻止処理を行った。さらに非特異的な反応を除くために ABC Kit 中に含まれる正常ウマ血清により室温, 30 分間ブロッキングを行った。

免疫組織化学的染色は PBS で 5 倍に希釈した培養上清中に含まれるモノクローナル抗体 (IV58B6) を一次抗体として用い, 室温で 30 分間反応させた。二次抗体はビオチン標識抗マウス IgM 抗体を 250 倍希釈したものを室温 30 分間反応させ, ABC Kit (Vector 社) と DAB により室温で 2 分間発色を行った。その後メチレングリーンを用いて核染を行った。

4. PAS 染色

免疫染色で用いた下顎頭, 肝臓, 肋骨, 骨格筋, 心筋のパラフィン切片と隣接する切片を脱パラ

フィン後トリプシン処理 (4unit/ml) を免疫染色と同じ条件で行い蒸留水で5分間洗浄した。さらに0.1%過ヨウ素酸を5分間反応させ、Schiff 試薬で15分間染色を行い、10%重亜硫酸ナトリウム水で3分間3回洗浄してPAS染色を行った。さらに、ヘマトキシリンあるいはメチレングリーンで核染を行った。

5. α -アミラーゼ処理

出生直後、4、12週齢のラットの下顎頭および肝臓の両組織で脱パラフィン後、トリプシン処理を行い、0.002M 酢酸カルシウム緩衝液 (pH6.0) に溶解した α -アミラーゼ (20unit/ml, 生化学工業) を用いて37℃で酵素消化試験を行った。 α -アミラーゼの消化時間は0, 15, 30, 45分, 1, 3, 6, 9, 12, 15時間とした。酵素消化試験後、PBSで10分間3回洗浄し、その後モノクローナル抗体 (IV58B6) を用いた免疫染色ならびにPAS染色を行った。さらにその他の組織 (肋骨、骨格筋、心臓) については、1時間の α -アミラーゼ消化試験を行い同様に免疫染色とPAS染色を行った。

6. 免疫電顕組織化学による観察

4週齢のラットをネンブータル麻酔下で、0.1M 燐酸緩衝液 (pH7.4) で緩衝した4%パラホルムアルデヒド固定液を用いて左心室より灌流固定した。その後、下顎頭を摘出し、同固定液で4℃12時間浸漬固定後、通法に従いアルコール脱水を行いエポキシ樹脂 (Epon812) に包埋し、ダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製した。

免疫染色は、超薄切片を室温においてPBSで5分間3回洗浄後、1%ウシ血清アルブミンを含むPBS (BSA-PBS) でさらに洗浄した後、5%正常ヤギ血清を含む1%BSA-PBSで30分間非特異的反応を抑制するためのブロッキングを行った。その後モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ (IV58B6) の培養上清原液を4℃20時間反応させ、1%BSA-PBSで5分間5回洗浄した。さらにビオチン標識抗マウスIgMヤギ抗体 (Vector Lab 社) を1%BSA-PBSで100倍希釈し、室温で2時間反応させた後、BSA-PBSで5分間3回洗浄した。その後BSA-PBSで100倍希

釈した直系15nmのコロイド金を標識したストレプトアビジン (EY Labo 社) を室温で2時間反応させ標識した。さらにBSA-PBSで5分間3回洗浄後、蒸留水で洗浄し、酢酸ウランで8分間、クエン酸鉛で4分間電子染色を行い、日立HU-12A型透過電子顕微鏡で観察を行った。

7. ドットプロット

1) グリコーゲンを抗原としたドットプロット
グリコーゲンを0.1mg/mlの濃度になるように100℃の蒸留水に溶解したものを原液とし、1, 5, 25, 125, 625, 3125, 15625倍の希釈系列をニトロセルロース膜上に吸着後乾燥固着させた。このニトロセルロース膜を0.1% Tween20 (和光純薬) 添加の0.1M 加塩トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) (T-TBS) を用いて室温で30分間洗浄後、さらに3%ウシ血清アルブミンを含むTBSで37℃12時間ブロッキングを行った。

その後モノクローナル抗体 (IV58B6) 産生ハイブリドーマの培養上清を50倍にTBSで希釈し、反応させた。さらにT-TBSで室温で10分間3回洗浄後、ビオチン標識抗マウスIgMヤギ抗体 (Vector 社) を2,500倍にTBSで希釈し、室温で30分間反応させた。その後10倍に希釈したアビジン・ビオチン複合液体 (Vectstain[®], Vector 社) を用い、DABにて発色を行った。

2) α -アミラーゼ消化試験を行った後のドットプロット

抗原の希釈系列を吸着させたニトロセルロース膜に0.002M 酢酸カルシウム緩衝液に溶解した α -アミラーゼ (100U/ml) を用いて、37℃12時間消化試験を行った。T-TBSで室温で10分間3回洗浄後、同じ条件でモノクローナル抗体 (IV58B6)、二次抗体を反応させ、ABC Kit, DAB を用いて発色を行った。

III. 結 果

1. モノクローナル抗体 (IV58B6) のサブクラス
モノクローナル抗体 (IV58B6) のサブクラスを調べるために、マウス用タイピングキットを使用して免疫染色を行った。タイピングキットのマウ

スの各サブタイプの免疫グロブリンを固着したストリップ上で、IgM を表すバンドにのみ発色反応が認められた。したがって、今回作製したモノクローナル抗体 (IV58B6) のサブクラスは IgM であることが判明した。

2. モノクローナル抗体 (IV58B6) による光顕的免疫組織化学的観察

1) 下顎頭軟骨

(1) 下顎頭軟骨の層区分および軟骨細胞の形態

出生直後、2 週齢および 4 週齢のラットの下顎頭軟骨は下顎頭頂部から下顎頭頸部の軟骨内骨化部位に向かって、①主に扁平な細胞質に乏しい細胞からなる線維性結合組織である線維層および線維下層、②比較的大きな丸い核をもち多角形を示す骨軟骨プロゲニタ細胞層、③トルイジンブルー染色で弱い異染色性を示す基質に取り囲まれた紡錘形の細胞からなる軟骨芽細胞層、④トルイジンブルー染色で強い異染色性を示す基質に取り囲まれ、円形の核と楕円形から円形の外形をもつ軟骨細胞層、そして⑤軟骨細胞が肥大化し明るい細胞質をもつか、または変性したり崩壊した細胞が存在する肥大細胞層、さらに⑥血管の侵入がみられ、軟骨内骨化により骨組織が形成される骨化層に区別されている。

出生直後のラットの下顎頭では肥大細胞層が下顎頭軟骨の多くの部分を占めており、軟骨内骨化が認められる領域は、下顎枝の長軸方向に対してほぼ下顎頭の中央位に位置している。また 2 週齢と 4 週齢の下顎頭軟骨部を比較すると、細胞層の構成要素は同じであるが、4 週齢のほうが軟骨細胞層、肥大細胞層が下顎頭全体に占める割合がより低下している。

12 週齢の下顎頭では、下顎頭頂部より観察すると、2, 4 週齢において線維層に相当する層が、下顎頭軟骨全層に対して、その相対的な厚みが増大している。この最表層は 2, 4 週齢よりも線維性の基質が豊富であり細胞数は少なく、その外形は扁平なものよりも卵円形を示すものが多く認められる。

骨軟骨プロゲニタ細胞層と軟骨芽細胞層に相当

する層は、両層の明瞭な相異は観察されず、外形が球形または卵円形の細胞で構成されている。一方、軟骨細胞層、肥大細胞層はその全層に対する割合が減少している。肥大軟骨細胞の大きさは減少しており、軟骨細胞層と肥大細胞層の明瞭な区分は困難となっている (図 1)。

(2) 免疫組織化学的観察

4 週齢のラット下顎頭軟骨では軟骨芽細胞層、軟骨細胞層、肥大細胞層の軟骨細胞全体に今回作製したモノクローナル抗体を用いた免疫染色で、陽性反応を示す DAB による発色が観察された (図 2)。

軟骨芽細胞層においては、扁平な細胞質の両端もしくは片側に限局して局所的に強い発色が認められた。発色部位の中央には組織作製もしくは染色の過程において細胞成分の流出によって生じたと考えられる人口空隙が観察され、その部位では空隙の周囲を取り囲むようにリング状に強い発色が観察された (図 5)。軟骨細胞の分化が進むに従い、軟骨細胞の外形は卵円形と変化し、核は偏位するようになり、反対極の細胞質に軟骨芽細胞で認められたリング状の発色が認められるほかに、核を除いた細胞質全体に発色が観察されるようになった (図 6)。

さらに肥大軟骨細胞へと分化するに従い細胞質全体に強い発色が認められるが、軟骨内骨化部位に近づくにつれ軟骨細胞の細胞質の発色は減少し、軟骨小腔開放部位の肥大軟骨細胞の細胞質には発色が認められなくなった。しかし開放していると思われる軟骨小腔内に存在する変性死滅した肥大軟骨細胞の一部に発色が認められる場合も観察された (図 7)。

軟骨基質、あるいは軟骨性骨梁に骨芽細胞により骨組織が添加されている部位の軟骨基質に発色は認められなかった。

軟骨小腔開放部位では侵入している血管、骨芽細胞、破骨細胞、新生した骨基質には発色は認められなかった。

一方、免疫染色のコントロールとして、ハイブリドーマの培養に用いた増殖培地を一次抗体の代

わりに用いて、免疫染色を行った下顎頭では、DABの発色を認めなかったことから、これらの免疫組織化学による発色はモノクローナル抗体による免疫組織学的反応の結果生じたものであることが証明された(図3)。

2週齢のラットの下顎頭での免疫染色では、各細胞層の軟骨細胞の発色のパターンは4週齢と同じであった。

出生直後のラットの下顎頭でも軟骨芽細胞層から軟骨細胞層、肥大細胞層の軟骨細胞の細胞質にDABの発色が認められ、各軟骨細胞の発色様式は4週齢と同様であった。また、軟骨内骨化部位では軟骨基質、骨基質、骨芽細胞、破骨細胞に発色が認められないが、骨細胞の細胞質に発色を観察することができた(図8)。

12週齢の下顎頭を本抗体を用いて免疫染色すると、軟骨細胞層と肥大細胞層のみにDABによる発色が観察された。軟骨細胞層ではプロゲニタ層に近い分化の程度が低いと考えられている領域の軟骨細胞には、細胞質に1ないし2個の限局した顆粒状の発色が認められた。しかし、成熟した軟骨細胞では細胞質全体に発色が観察された。肥大軟骨細胞層の軟骨細胞でも細胞質全体に発色を認めたが、軟骨小腔開放部位と隣接する領域の肥大細胞は発色は減弱するかもしくは消失していた。また軟骨基質、開放部位の骨基質、骨芽細胞、破骨細胞、骨髄の細胞、血管には発色を認めなかった(図9)。

2) 肝臓

肝臓においては週齢にかかわらず、肝細胞の核の周囲の細胞質全体に広い範囲で斑点状、あるいはリング状のモノクローナル抗体によるDABの発色が認められた。また発色が認められる細胞と発色が認められない細胞は肝臓内で混在しており、それらの細胞間の局在は観察されなかった。小葉間結合組織や血管、胆管には反応を認めなかった(図17)。

3) その他の組織

肋骨においては、将来骨化する軟骨と骨化しない永久軟骨とが存在する。永久軟骨部位では軟骨

細胞の核を除いた細胞質全体にDABによる発色が認められ、一部リング状の発色部位も観察された(図21)。永久軟骨を包む軟骨膜に発色は観察されなかった。

一方、骨化する部位の軟骨では軟骨小柱の軟骨芽細胞より軟骨細胞そして肥大軟骨細胞までの細胞質にDABによる発色を認めた(図22)。軟骨芽細胞では核の両側もしくは片側の細胞質に限局してリング状あるいは点状の発色が認められ、軟骨細胞へと分化するに従い細胞質全体に小顆粒状の発色が観察された。また細胞質中の数箇所に特に強い発色領域をもつ細胞も観察された。

肥大軟骨細胞も発色は細胞質全体に観察されるが、軟骨小腔開放部位に近い領域では、発色が減弱するか、もしくは消失していた。

出生直後のラット頭部ではモノクローナル抗体(IV58B6)を用いた免疫染色による軟骨細胞の発色が下顎頭軟骨以外に頭蓋底軟骨、メッセル軟骨(図20)に観察され、その反応は軟骨細胞の細胞質全体にやや弱く観察された。

骨格筋(図25)、心筋では筋細胞の細胞質中に散在性に小顆粒状発色を認めた。出生直後の筋細胞では、その細胞質全体に強く一様の発色を認めた。しかし筋間の脂肪細胞を含む結合組織あるいは脈管、神経組織には陽性反応を認めなかった。

脾臓、脾臓、消化管、胸腺、精細管、精囊上皮には免疫組織化学での陽性反応は認められなかった。

3. PAS 染色

1) 下顎頭

出生直後、2、4週齢のラットの下顎頭では、軟骨芽細胞層より肥大細胞層までの下顎頭軟骨の軟骨細胞の細胞質にPAS反応陽性物質が観察された。

軟骨芽細胞では、扁平な細胞質の核の両側もしくは片側に顆粒状または顆粒の集合体としてPAS反応陽性物質が存在していた。軟骨細胞層から肥大軟骨細胞層にいたる領域の軟骨細胞では細胞質全体に散在して観察された(図4)。しかし軟骨内骨化部位に近接している肥大細胞では、PAS

染色での細胞質の染色性はかなり減弱して観察された。

軟骨芽細胞層の軟骨細胞のうちで、やや分化の進んだと考えられる細胞が存在する領域に認められる軟骨基質から、軟骨細胞層、肥大細胞層、軟骨小腔開放部位、そして軟骨内骨化が生じている領域の軟骨基質にはPAS陽性物質が認められた。

下顎頭に付着している骨格筋にはPAS陽性物質が筋細胞の細胞質にび漫性に存在しているのが観察された。

2) 肝臓

肝臓の肝細胞の細胞質中には顆粒状を示す多数のPAS陽性物質が散在しているのが観察された(図19)。

これらのPAS陽性反応物質は小葉間結合組織およびそこに含まれる血管、胆管などには認められなかった。

3) その他の組織

骨化が生じない肋骨の永久軟骨部では、軟骨細胞の細胞質全体に弱いPAS陽性反応が認められた(図23)。軟骨内骨化が生ずる部位の軟骨では、軟骨芽細胞から肥大軟骨細胞にいたるまでの種々の発育分化段階の軟骨細胞から構成されている軟骨小柱の各軟骨細胞の細胞質全体にPAS陽性物質が観察された(図24)。この陽性物質は、軟骨芽細胞層から成熟軟骨細胞層に軟骨細胞が分化が進むに従い、その染色性が次第に増加し、さらに肥大軟骨細胞層へと分化するに従い減弱する傾向が観察された。しかし、軟骨小腔開放部位の軟骨細胞の細胞質にはPAS陽性物質は観察されなかった。

肋軟骨の軟骨基質や軟骨内骨化が生じている部位では、石灰化軟骨基質に強いPAS陽性反応が観察された。

骨格筋、心筋ではその筋細胞の細胞質に散在性に顆粒状のPAS陽性物質が観察されたが、その染色性は軟骨細胞の細胞質内に認められたPAS陽性物質と比較すると微弱であった(図26)。

4. α -アミラーゼ消化試験後の免疫組織化学的観察

1) 下顎頭

(1) 出生直後

15分間の α -アミラーゼ消化試験を行った下顎頭切片にモノクローナル抗体で免疫染色を行うと、軟骨芽細胞層から肥大細胞層の軟骨細胞にDABによる発色は観察されるが、 α -アミラーゼ消化試験を行っていない免疫染色におけるDABの発色に比較すると、各軟骨細胞層の軟骨細胞の発色は全体に低下していた(図10)。消化試験45分間では、軟骨芽細胞層と軟骨細胞層だけに免疫反応陽性物質が認められ、これらの細胞での発色はさらに著しく低下していた(図11)。消化試験3時間において、軟骨細胞に認められた免疫反応による発色は大部分が消失し(図12)、消化試験6時間以上では、完全に消失していた。

(2) 4週齢

消化試験30分間で免疫反応陽性物質を示す発色は、軟骨芽細胞層の軟骨細胞に観察されるが、軟骨細胞層の軟骨細胞におけるDABの発色は著しく低下していた(図13)。

しかし α -アミラーゼ消化試験時間が3時間の切片において、軟骨芽細胞層の細胞質での免疫反応による発色は消失せずに観察された(図14)。しかし6時間以上の α -アミラーゼ消化試験では免疫反応は完全に消失した(図15)。

(3) 12週齢

α -アミラーゼ消化試験30分で、下顎頭の免疫陽性物質を示す発色は観察されなかった(図16)。

2) 肝臓

出生直後の肝臓では、 α -アミラーゼ消化試験時間が15分、4週齢および12週齢の肝細胞においては、30分間で免疫反応による発色は完全に消失し、肝細胞には免疫反応が認められなくなった(図18)。

3) その他の組織

免疫組織化学的にモノクローナル抗体と反応した肋軟骨の軟骨細胞、横紋筋細胞では、1時間の α -アミラーゼ消化試験を行った後に免疫染色を

行ったが、すべての組織で免疫反応による発色は消失していた。

5. α -アミラーゼ消化試験後のPAS染色

1) 下顎頭

出生直後および12週齢のラット下顎頭軟骨の切片では、消化試験15分間で下顎頭軟骨の各層の軟骨細胞のPAS陽性物質は認められなくなった。

4週齢の下顎頭軟骨においては、消化試験30分間で成熟軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層のPAS陽性物質の反応は消失したが、軟骨芽細胞層の軟骨細胞にはPAS陽性物質が細胞質内にわずかに残存していた。しかし、この軟骨芽細胞に認められたPAS陽性物質も45分間の α -アミラーゼ消化試験を行うことにより、PAS陽性物質は完全に消失し観察されなくなった。

しかし、軟骨基質のPAS陽性物質は α -アミラーゼ消化試験後も減弱することなく観察された。

2) 肝臓

出生直後、4週齢および12週齢のラットの肝臓で α -アミラーゼ消化試験を15分間行うことにより、肝細胞の細胞質内に散在して認められたPAS陽性物質は完全に消失し観察されなかった。

3) その他の組織

肋骨の軟骨細胞における細胞内のPAS陽性物質は、1時間の α -アミラーゼ消化試験後、消失し観察されなくなるが、軟骨基質におけるPAS反応は消化試験が行われた後も減弱することなく観察された。

横紋筋に観察されたPAS陽性物質も同様に1時間の α -アミラーゼ消化により消失し、観察されなくなった。

6. 免疫電顕組織化学的観察

下顎頭軟骨における軟骨芽細胞層から軟骨細胞層にかけての軟骨細胞は、扁平な細胞質をもち、その細胞質の両極にグリコーゲン顆粒と固定される顆粒の集積を認める。このような細胞を免疫電顕的に観察すると、細胞質の両端に認められる大きな顆粒の集積の一部には、試料作製の過程で流失したと考えられる像が観察されるが、残存し

ている顆粒上には抗原の局在を示す多くの金粒子が認められた。さらに細胞質中に散在するグリコーゲン顆粒上にも金粒子が観察された(図27, 28)。

また成熟軟骨細胞においては、大きなグリコーゲン顆粒の集積がなくなり、細胞の外形が紡錘形から卵円形そして球形になっている。これらの軟骨細胞の細胞質中には発達した粗面小胞体が観察され、小さなグリコーゲン顆粒の集積が散在性に細胞質内に観察され、それらの顆粒上にも金粒子が観察された(図29, 30)。

肥大細胞層では、軟骨細胞の外形は多数の突起をもつ多角形を示し、細胞質内の小器官は減少し、細胞質内には少数のグリコーゲン顆粒の小さな集積が広く散在しており、それらには金粒子が観察された(図31)。

一方、軟骨基質上には金粒子は観察されなかった(図32)。

また、ハイブリドーマの培養上清に用いた培地をモノクローナル抗体の代わりに反応させた免疫電顕におけるコントロールでは、金粒子は軟骨細胞のグリコーゲン顆粒に認められなかった(図33)。

7. グリコーゲンを抗原としたドットプロット

グリコーゲンを抗原とした希釈系列にモノクローナル抗体(IV58B6)を用いた免疫染色を行った結果、希釈系列の1倍から3,125倍までに発色が認められ、希釈倍率に比例して発色は減弱し、希釈倍率15,625倍では発色が認められなかった。また抗原を除いたコントロールでは発色が観察されなかった。

一方、 α -アミラーゼ(100unit/ml)で37℃において、12時間消化したグリコーゲンの各希釈系列に対してモノクローナル抗体(IV58B6)で免疫染色を行ったものでは、全希釈系列に発色が観察できなかった(図34)。

IV. 考 察

1. モノクローナル抗体 (IV58B6) の認識するエピトープについて

モノクローナル抗体 (IV58B6) を用いて免疫染色を行うとその免疫陽性反応は、軟骨細胞、肝細胞で観察された。また隣接切片での PAS 染色の結果と比較すると、免疫陽性物質が認められる局在部位と一致して PAS 陽性物質の局在が観察された。

α -アミラーゼ消化試験を行った切片に対して、モノクローナル抗体 (IV58B6) を用いた免疫染色では、免疫陽性物質は同部位における PAS 陽性物質と比べ α -アミラーゼ消化に対する抵抗性が一般的に強く、陽性物質の完全な消失に要する時間に差異が認められた。また、免疫染色および PAS 染色において消化試験で陽性物質が消失するために必要な時間は、観察した各組織においても異なった。 α -アミラーゼによる各時間の消化試験で、免疫染色および PAS 染色における陽性反応産物は基本的には消失し、観察されなくなった。

PAS 染色において、 α -アミラーゼ消化試験で陽性所見が消失することは、動物体内ではこれらの陽性物質がグリコーゲンであることを示唆している。したがって本研究から、モノクローナル抗体 (IV58B6) がグリコーゲンもしくはグリコーゲンを構成しているグリコースからなる糖鎖を認識していることが推察される。

森田ら²⁾は出生直後から70日齢のラットにおいてグリコーゲンの下顎頭軟骨における局在について観察した。光顕的にはグリコーゲンは下顎頭において関節腔に面する扁平な細胞を有する細胞層以外のすべての層で観察され、分化の初期では細胞質の一部に限局して存在するが、成熟するに従いグリコーゲンの蓄積が増加し細胞質全体に認められるようになり、軟骨細胞の肥大化に伴いその量は減少することを報告している。また森田ら²⁾は電顕的观察で、増殖層においてグリコーゲン顆粒が顆粒状構造を形成し、細胞質内に散在して存在していることを観察した。さらに軟骨細胞の成

熟に伴い、その量が著しく増加して特徴的な顆粒構造物の集合体 (グリコーゲンプール) を形成し、肥大化するに従い、グリコーゲン顆粒が減少して、細胞質内に散在性に観察され、軟骨内骨化部位ではグリコーゲン顆粒がほとんど消失することを報告している。

今回の電顕的免疫組織化学的观察においても、森田らの観察に認められた軟骨細胞内のグリコーゲン顆粒やグリコーゲン顆粒の集合体上にモノクローナル抗体の認識する抗原の局在を示す金粒子が多数観察された。この免疫電顕における観察結果もモノクローナル抗体 (IV58B6) の認識するエピトープがグリコーゲンもしくはグリコースからなる糖鎖である可能性を示唆するものである。

α -アミラーゼによる酵素消化試験で免疫陽性反応が減弱もしくは消失することや、下顎頭軟骨細胞と肝細胞において消化試験による陽性物質の消失に要する時間が異なること、さらに、下顎頭軟骨内における各軟骨細胞層における α -アミラーゼに対する抵抗性が異なることが本研究で観察された。このことは、モノクローナル抗体 (IV58B6) が認識するエピトープを含む糖鎖の三次構造が各組織によって、あるいは同一の組織においても、分化の程度によって、異なることを意味していると考えられる。

現在、抗原あるいは抗原決定基が、タンパク質もしくはアミノ酸配列でなくとも抗体が産生されることが明らかとなっている。

Kumlien ら⁸⁻¹⁰⁾は、尿中の限界デキストリンすなわち $\text{Glc}\alpha$ 1-6 $\text{Glc}\alpha$ 1-4 $\text{Glc}\alpha$ 1-4 Glc に対する抗体を $\text{Glc}\alpha$ 1-6 $\text{Glc}\alpha$ 1-4 $\text{Glc}\alpha$ 1-4 Glc に 2-(2-methoxycarbonylethylthio) ethyl を介して、keyhole limpet hemocyanin (KLH) あるいは bovine serum albumin (BSA) と結合したものを抗原として、 $\text{Glc}\alpha$ 1-6 $\text{Glc}\alpha$ 1-4 $\text{Glc}\alpha$ 1-4 Glc をも認識するモノクローナル抗体を作製している。

今回、本研究で作製したモノクローナル抗体 (IV58B6) もグルコース糖鎖を認識していると考えられる。しかし抗原が精製されていない生体材料で

あることから α -アミラーゼの消化試験だけでは、グルコース糖鎖の一部を認識していることは推測できるが、どのような糖鎖単位を認識しているかは限定できない。

しかし、モノクローナル抗体 (IV58B6) の認識しているエピトープは α -アミラーゼ消化試験から、グリコーゲンの糖鎖の一部、すなわち、グルコースの α 1 $\rightarrow$ 4 結合と α 1 $\rightarrow$ 6 結合の両者の結合をもつ糖鎖の一部であると推察される。この推察はグリコーゲンを抗原としたドットプロットの実験、すなわち、グリコーゲンがモノクローナル抗体 (IV58B6) を用いた免疫化学的反応によって観察されることと、これらの陽性反応が α -アミラーゼ消化試験により消失することからも支持されと考えられる。

2. グリコーゲンのラット体内での分布

グリコーゲンは動物体のエネルギー源であるグルコースの重合体であって、その貯蔵物体である。そして、それは肝臓においてグルコースより合成され貯蔵され、また必要に応じてグルコースに分解され各器官に分配される。

各器官では再びグリコーゲンに合成貯蔵され、必要に応じ消費される¹¹⁾。したがって、グリコーゲンは体内のさまざまな組織に観察され、各領域でエネルギー源として、あるいは組織構築の材料として蓄積、消費されている。

1) 下顎頭軟骨内での局在

Greenspan ら¹²⁾は、出生直前から18日齢のラットにおいて凍結切片を用いて種々の組織化学的検索を行った。PAS 染色によるグリコーゲンの局在についての観察では、増殖層に接する領域の軟骨細胞内に小顆粒を観察した。さらに分化とともに次第にその大きさ、量を増加させ、肥大細胞層で最大となり、軟骨内骨化が生じるとともに消失することを報告している。

また、Greenspan ら¹²⁾は、ミトコンドリアの酵素の活性が最大にいたるレベルでグリコーゲンの蓄積量が最大になると報告している。さらにグリコーゲンはムコ多糖合成に関与しており、また石灰化以前に軟骨細胞にグリコーゲンが観察されな

くなることから、グリコーゲンは直接石灰化に関与せず軟骨基質の合成あるいはエネルギー源として蓄えられていると考えた。

Silbermann ら^{5,13)}は、胎齢18日、出生直後および6, 9日齢のマウスについて凍結切片のPAS染色による光顕的観察とグルタルアルデヒドとオスミウム固定のEpon812包埋切片による過ヨウ素酸メセナミン銀法による光顕的、電顕的観察を行い、森田 (1982) のラットを用いた観察と同様なグリコーゲンの局在を観察している。

本研究における免疫組織化学的観察結果は、下顎頭におけるグリコーゲンの局在に関する報告とほぼ一致していた。

2) その他の組織でのグリコーゲンの局在

Marcini¹⁴⁾はヒト、ラット、ウサギ、ブタ、ニワトリの肝臓、骨格筋、喉頭軟骨、脂肪組織、膈および子宮の上皮、皮膚、糖尿病患者の腎臓、胎盤およびニワトリのglycogenic organについて、Zenker's 固定液およびアルコール添加のBouin's 固定液と凍結乾燥法による固定を行い、ヨード法による染色を行い、グリコーゲンの検出について報告している。この報告では、肝細胞、胆管、軟骨細胞、脂肪細胞、膈上皮、子宮上皮、皮膚、筋線維の周囲などにグリコーゲン陽性反応が観察されている。

下顎頭以外の軟骨では、Goel ら³⁾がニワトリとマウス胎児で、Daimon¹⁵⁾がニワトリ胎児の後肢原基の成長板で、軟骨の分化に従う軟骨細胞内のグリコーゲンの増加を観察している。

さらに、Scott ら¹⁶⁾は、ラット脛骨成長板における前骨芽細胞内のグリコーゲンの局在について観察を行っている。

ヒトでは象牙質を形成する象牙芽細胞にグリコーゲンの蓄積を観察している¹⁷⁾。

肝臓では、古くよりヨード法、PAS 染色などによって、グリコーゲンの存在が知られている。また、電顕的に肝臓内でのグリコーゲン粒子の構造についての検討がなされてきた。基本的にはグリコーゲンの γ 粒子が集まって β 粒子をつくり、その β 粒子が集まって α 粒子そしてロゼットを形

成していると考えられている¹¹⁾。

さらに肝臓の各葉間の局在差¹⁸⁾、食餌とグリコーゲン蓄積の相関¹⁹⁾、小葉内での局在の差¹⁹⁾、年齢による細胞内蓄積量の差²⁰⁾などの報告がなされている。

このような肝臓におけるグリコーゲンの分布は、モノクローナル抗体 (IV58B6) による免疫染色を行った肝臓における免疫組織化学的観察結果と一致しており、下顎頭の観察結果が過去の報告と一致していることとあわせて、エピトープがグリコーゲンもしくはグリコーゲンを構成する糖鎖の一部であるという推察を支持するものである。

3. モノクローナル抗体 (IV58B6) の免疫組織化学的利用の意義およびその応用の可能性

グリコーゲンの組織上での検出には以前より種々の方法が試みられてきた。

Driessen²¹⁾による Iodine Methods, The Bauer-Feulgen Method²²⁾, Silver Methods²³⁾, The Periodic Acid-Schiff Method²⁴⁾, The Lead Tetra-Acetate-Schiff Method²⁵⁾, Best's Carmine Method²⁶⁾, Fluorescent Methods²⁷⁾などの各種の染色法が開発されてきた。しかしながら、これらの方法はグリコーゲンのみを特異的に認識して検出するわけではなく、唾液やジアスターゼすなわち α -アミラーゼ処理による陽性反応の消失という対照を必要としている。またグリコーゲンは水溶性であるため、固定、脱水、包埋などの過程においてグリコーゲンの消失、流失などの人工的な局在の変化が生じる可能性が発生しやすいと考えられている。

また近年では、PA-TCH-(TSC)-OS, PA-TCH-(TSC)-SP 反応などが電顕的グリコーゲンの検索に利用されるようになってきた^{28,29)}。しかしこの反応も α -アミラーゼによる酵素消化試験を併用することが必要となっている。

さらに糖鎖の解析には、糖鎖に特異的に結合するレクチンを用いた組織化学的方法も考えられているが、グリコーゲンあるいはグルコースのみからなる糖鎖に特異的に結合するレクチンは報告がなされていない³⁰⁾。

今回作製したモノクローナル抗体 (IV58B6) を用いた免疫組織化学的方法では、グリコーゲンまたはグリコーゲンを構成するグルコースよりなる糖鎖のみを特異的に認識すると考えられるため、組織内でのグリコーゲンの局在を、 α -アミラーゼ消化試験などを用いることなく検出することができる点が利点と考えられる。

またモノクローナル抗体 (IV58B6) による免疫染色法では、その染色の過程において、PAS 染色における過ヨウ素酸のような酸化、加水分解などの化学的修飾を必要とせず、直接抗原であるグリコーゲンあるいはグリコーゲンを構成する糖鎖と結合するため、免疫組織化学的観察において使用する抗体もしくは発色剤に工夫を加えることにより、PAS 染色に比較してより良好な感度で結果が得られるものと推察される。

本抗体による免疫組織化学的観察は、凍結切片のみならずパラフィン切片においても可能であり、さらには免疫電顕への応用ができることから、グリコーゲンの体内分布の変化における観察や組織の発生分化におけるグリコーゲンの局在などの観察に利用でき、組織学的、病理学的観察に広く利用できるものと考えられる。

V. 結 論

ラットの下顎頭を免疫原として、マウスモノクローナル抗体を作製した。そのうち下顎頭のみでなく、さまざまな組織に免疫陽性反応が現れるモノクローナル (IV58B6) 抗体を得た。本抗体は免疫染色、PAS 染色、ドットプロットの結果よりグルコース糖鎖の一部を認識することが示唆された。本抗体を用いた免疫組織化学的観察では、下顎頭において軟骨芽細胞層から肥大細胞層の軟骨細胞で免疫陽性物質の局在が認められた。今回の検索により、モノクローナル (IV58B6) 抗体はグリコーゲンの免疫組織に対応でき、グリコーゲンの局在の検索に非常に有用であると思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始ご懇切なご指導ならびに

ご校閲を賜りました一條 尚教授ならびに山下靖雄教授に謹んで感謝の意を表します。また本研究に際し、当初より多大なご助言、ご教示をいただきました寺島達夫助教授に心から感謝の意を表します。

また、種々のご援助、ご協力いただきました本学口腔解剖学教室の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

本研究の要旨の一部は、第34回歯科基礎医学会総会、第10回日本骨代謝学会総会にて発表した。

文 献

- 1) 寺島多実子：兎胎仔下顎頭の構造に関する観察。口病誌 52：348-396, 1985.
- 2) 森田修一：ラット下顎頭軟骨の生後発育に関する微細構造学的、細胞化学的研究。日矯歯誌 41：171-201, 1982.
- 3) Goel, S. C. and Jurand, A.: Electron microscopic studies in developing. Demonstration and distribution of glycogen in chick and mouse epiphyseal cartilage. J. Embryol. exp. Morph. 28: 153-162, 1972.
- 4) 大越基弘, 清水和幸, 出口敏雄, 岡 達：生長期ラットの顎関節に関する組織化学的研究。口科誌 20：393-397, 1971.
- 5) Silbermann, M. and Lewinson, D.: An electron microscopic study of the premineralizing zone of the condylar cartilage of the mouse mandibule. J. Anat. 125: 55-70, 1978.
- 6) Tajima, Y., Yokose, S., Takenoya, M., Kanda, K. and Utsumi, N.: Immunocytochemical of S-100 protein in rat mandibular condyle cartilage. Archs. Oral Biol. 36: 875-879, 1991.
- 7) 鈴木不二男：細胞外マトリックスと細胞増殖・分化。代謝 29：905-917, 1992.
- 8) Lundblad, A., Schroer, K. and Zopf, D.: Affinity purification of a glucosecontaining oligosaccharide using a monoclonal antibody. J. Immunol. Methods. 68: 217-226, 1984.
- 9) Kumlien, J., Frejd, T., Magnusson, G., Zopf, D. and Lundblad, A.: A new non-equilibrium enzyme linked immuno-sorbent assay for a glycogen-derived urinary tetrasaccharide. Glycoconjugate J. 3: 85-94, 1986.
- 10) Kumlien, J., Gronberg, G., Nilsson, B., Mansson, O., Zopf, D. and Lundblad, A.: Structural and immunochemical analysis of three alpha-limit dextrin oligosaccharides. Arch. Biochem. Biophys. 269: 678-689, 1989.
- 11) 武内忠男：現代病理学大系 2A 細胞・組織の基本病変 I, 第1刷。東京, 1990, 中山書店, 353-372.
- 12) Greenspan, J. S. and Blackwood, H. J. J.: Histochemical studies of chondrocyte function in the cartilage of the mandibular condyle of the rat. J. Anat. 100: 615-626, 1966.
- 13) Silbermann, M. and Frommer, J.: Demonstration and distribution of glycogen in the secondary cartilage of the developing mandibular condyle. Light and electron microscopic study. Israel J. Med. Sci. 10: 753-764, 1974.
- 14) Marcini, R. E.: Histochemical study of glycogen in tissues. Anat. Rec. 101: 149-159, 1948.
- 15) Daimon, T.: The presence and distribution of glycogen particles in chondrogenic cells of the tibiotarsal anlage of developing chick embryos. Calcified Tiss. Res. 23: 45-51, 1977.
- 16) Scott, B. L. and Glimcher, M. J.: Distribution of glycogen in osteoblast of the fetal rat. J. Ultrastruct. Res. 36: 565-586, 1971.
- 17) Frank, R. M.: Etude au microscope electronique de l'odontoblaste et du canalicule dentinaire humain. Arch. Oral Biol. 11: 179-199, 1966.
- 18) Corrin, B. and Aterman, K.: The Pattern of glycogen distribution in the liver. Am. J. Anat. 122: 57-72, 1968.
- 19) Welsh, F. A.: Distribution of glycogen within the liver lobule. J. Histochem. Cytochem. 20: 112-115, 1972.
- 20) Phillips, M. J., Unakar, N. J., Doornewaard, G. and Steiner, J. W.: Glycogen depletion in the newborn rat liver an electron microscopic and electron histochemical study. J. Ultrastruct. Res. 18: 142-165, 1967.
- 21) Driessen, A.: Zur Glykogenfärbung. Z. allg. Path. Anat. 16: 129-131, 1905.
- 22) Bauer, H.: Z. Mikroskopisch-chemischer Nachweis von Glykogen und einigen Polysacchariden. Z. Mirk. Anat. Forsch. 33: 143, 1933.
- 23) Mitchell, A. J. and Wislocki, G. B.: Selective staining of glycogen by ammoniacal silver nitrate; new method. Anat. Rec. 90: 261, 1945.
- 24) Macmanus, J. F. A.: Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain. Tech. 23: 99-108, 1948.
- 25) Shimizu, N. and Kumamoto, T.: A leadtetraacetate-Schiff method for polysaccharides in tissue sections. Stain. Tec. 27: 97, 1952.
- 26) Best, F.: Über Karminfärbung des Glykogens und der Kerne. Z. Wiss. Mikrosk. 23: 319-322, 1906.
- 27) StoWard, P. J.: Studies in fluorescence histochemistry. J. Roy. Micr. Soc. 87: 247, 1967.
- 28) Geyer, G.: Handbuch der Histochemie (Hera-

usgeg. von Graumann, W. und Neumann, K.),
Bd. I. Allgemeine Methodik Teil 3, Gustav
Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1977, 3
-115.

29) 山田和順：ムコ多糖の組織細胞化学的研究。蛋

白質 核酸 酵素 17：775-790, 1972.

30) 辻 勉, 大沢利昭：レクチンとその糖結合特
異性。蛋白質核酸酵素 28：118-131, 1983.

- 図1 3週齢の下顎頭軟骨のトルイジンブルー染色(×75)
線維層(A), 線維下細胞層(B), 骨軟骨プロゲニタ細胞層(C), 軟骨芽細胞層(D), 軟骨細胞層(E), 肥大細胞層(F), 軟骨小腔開放部位(G)までの各層が観察される
- 図2 4週齢の下顎頭軟骨にモノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×50)
軟骨芽細胞層, 軟骨細胞層, 肥大細胞層の軟骨細胞に免疫反応の発色が観察される
- 図3 4週齢の下顎頭軟骨の免疫染色のコントロール(×50)
免疫反応による発色は観察されない
- 図4 4週齢の下顎頭軟骨のPAS染色(×50)
軟骨芽細胞層から肥大細胞層までの軟骨細胞および軟骨基質にPAS陽性物質が観察される
- 図5 図2の線維層から軟骨細胞層までの領域の拡大(×300)
軟骨芽細胞と軟骨細胞に免疫反応による発色が観察される
- 図6 図2の軟骨細胞層から肥大細胞層の領域の拡大(×300)
軟骨細胞および肥大軟骨細胞の両方に発色が観察される
- 図7 図2の肥大細胞層より軟骨小腔開放部位までの領域の拡大(×300)
肥大軟骨細胞および一部の軟骨小腔が開放していると思われる部位の変性した細胞質に発色が観察される
- 図8 出生直後の下顎頭軟骨にモノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×100)
軟骨芽細胞層から肥大細胞層までの軟骨細胞と周囲の筋に発色が観察される
- 図9 12週齢の下顎頭軟骨にモノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×50)
軟骨細胞層および肥大細胞層に発色を認めるが, その領域は下顎頭の全層に対して狭くなっているのが観察される
- 図10 出生直後の下顎頭軟骨に15分間の α -アミラーゼ消化を行い, モノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×200)
軟骨芽細胞層から肥大細胞層までの軟骨細胞に発色を認めるが, 発色は未消化のものに比較し低下している
- 図11 出生直後の下顎頭軟骨に45分間の α -アミラーゼ消化を行い, モノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×200)
軟骨芽細胞と軟骨細胞に発色を認めるが, α -アミラーゼ15分間に比べてさらに低下している
- 図12 出生直後の下顎頭軟骨に3時間の α -アミラーゼ消化を行い, モノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×200)
発色がほとんど観察されない
- 図13 4週齢の下顎頭軟骨に30分間の α -アミラーゼ消化を行い, モノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×50)
軟骨細胞層の発色が著しく低下しているのが観察される
- 図14 4週齢の下顎頭軟骨に3時間の α -アミラーゼ消化を行い, モノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×50)
軟骨芽細胞層細胞に弱い反応が観察される, しかし他の領域の反応はほぼ消失している
- 図15 4週齢の下顎頭軟骨に9時間の α -アミラーゼ消化を行い, モノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×50)
免疫反応による発色は観察されない
- 図16 12週齢の下顎頭軟骨に30分間の α -アミラーゼ消化を行い, モノクローナル抗体(IV58B6)を用いた免疫染色(×50)
免疫反応による発色は観察されない
- 図17 4週齢の肝臓にモノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×500)
肝細胞の細胞質に顆粒状に発色が観察される
- 図18 4週齢の肝臓に30分間の α -アミラーゼ消化後, モノクローナル抗体(IV58B6)を反応させた免疫染色(×500)
ほぼ発色が観察されなくなっている
- 図19 4週齢の肝臓のPAS染色(×500)
肝細胞の細胞質内に顆粒状にPAS陽性物質が観察される

- 図20 出生直後のメッケル軟骨にモノクローナル抗体 (IV 58B6) を反応させた免疫染色 (×350)
軟骨細胞質に発色が観察される
- 図21 12週齢肋軟骨永久軟骨部位にモノクローナル抗体 (IV58B6) を反応させた免疫染色 (×300)
軟骨細胞の細胞質全体あるいはリング状に DAB による発色が観察される
- 図22 12週齢肋軟骨軟骨内骨化部位にモノクローナル抗体 (IV58B6) を反応させた免疫染色 (×300)
軟骨芽細胞層から肥大軟骨細胞層の各層の軟骨細胞に発色が観察される
- 図23 12週齢肋軟骨永久軟骨部位の PAS 染色 (×300)
軟骨細胞の細胞質に弱く PAS 陽性物質が観察される
- 図24 12週齢肋軟骨軟骨内骨化部位の PAS 染色 (×300)
軟骨芽細胞層から肥大細胞層の各軟骨細胞に PAS 陽性物質が観察される
- 図25 2週齢の骨格筋にモノクローナル抗体 (IV58B6) を反応させた免疫染色 (×300)
筋細胞中に散在性に顆粒状の発色を認める
- 図26 2週齢の骨格筋の PAS 染色 (×300)
筋細胞中 PAS 陽性物質を弱くび漫性に観察する
- 図27 4週齢の下顎頭軟骨の軟骨芽細胞層より軟骨細胞層の領域の軟骨細胞にモノクローナル抗体 (IV58B6) を反応させた免疫電顕像 (×16,000)
グリコーゲン顆粒と同定されうる顆粒の集積上に免疫陽性を示す多数の金粒子が観察される
- 図28 図27のグリコーゲンの集積部の拡大像 (×30,000)
- 図29 成熟軟骨細胞に対するモノクローナル抗体 (IV58B6) を反応させた免疫電顕像 (×7,500)
発達した粗面小胞体をもつ細胞質中のグリコーゲンと考えられる散在する顆粒上に金粒子が観察される
- 図30 図30の細胞細胞質の拡大像 (×32,000)
- 図31 肥大軟骨細胞に対するモノクローナル抗体 (IV58B6) を反応させた免疫電顕像 (×8,000)
細胞内器官に乏しい細胞質内に散在するグリコーゲンと考えられる顆粒上に金粒子が観察される
- 図32 軟骨基質に対するモノクローナル抗体 (IV58B6) を反応させた免疫電顕像 (×14,000)
軟骨基質中には金粒子は観察されない
- 図33 図27と同領域に散在する軟骨細胞の免疫電顕のコントロール (×13,000)
免疫陽性を示す金粒子は観察されない
- 図34 グリコーゲンを抗原としたモノクローナル抗体 (IV 58B6) を反応させたドットプロット
右が α -アミラーゼ未消化の抗原希釈系列, 左が α -アミラーゼ消化の抗原希釈系列である。上方からコントロール, 1 倍より15,625倍の抗原が吸着されている。
未消化群では1~3,125倍までに発色が減弱しながら認められ, 15,625倍では認められない。消化群では発色は認められない

図 1 ~ 4

図 5 ~ 8

図 9 ~ 12

図13～16

図17～20

図21～24

図25～28

図29～32

図33～34