酵素抗体法による抗核抗体の染色パターンについて 蛍光抗体法との比較検討

名古屋市立大学医学部第二内科

松 本 美 富 士

A COMPARATIVE STUDY ON NUCLEAR STAINING PATTERNS OF ANTINUCLEAR FACTORS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS, USING FLUORESCENT LABELED ANTIBODY AND PEROXIDASE LABELED ANTIBODY TECHNIQUES

Yoshifuji MATSUMOTO

The Second Department of Internal Medicine, Nagoya City University Medical School

(Director: Prof. Kiyoharu Takikawa)

概要 全身性紅斑性狼瘡における抗核抗体 (ANF) の染色パターンにかんして、蛍光抗体法、酵素抗体法を用いて比較検討を行ない、併せて酵素の標識法についても検討を加えた。その結果、酵素抗体法によるANFの染色パターンは蛍光抗体法のそれと一致せず、相互に一定の関連性を有しなかつた。新たに酵素抗体法による染色パターンを以下の五つのタイプに分類を試みた。1) diffuse type, 2) perinuclear type, 3) flecked type, 4) fine granular type, 5) thready type. これら染色パターンの由来を抗体側以外に核の側からの考察が必要と思われる。また、酵素抗体法では患者血清希釈によるパターンの変化や、固定条件の差による影響はなかつた。酵素の標識には精製抗体に glutaraldehyde を用いるのが、標識液の収量、感度、保存性で優れているが、蛍光抗体法の方が感度、保存性で酵素抗体法に比して、はるかに優れていた。

緒 言

全身性紅斑性狼瘡 (SLE) の病因は現在のところ、自己免疫現象によるものと一般に考えられているが、最近SLEとRNA型ウイルスとの関連が注目されてきている¹⁾²⁾。しかし、病因が何であれ抗核抗体 (ANF)、中でも抗DNA抗体の存在がSLEに特徴的であり、疾患の予後、経過に重要な因子となることは変わりがない。ANFの検査法として従来から蛍光抗体法間接法が広く用いられている。ANFの染色パターンにも種種のタイプが観察され、パターンの相違の由来が、

〔昭和46年12月9日受稿〕

各種核抗原に対する抗体の差によるものであり、それぞれの染色パターンがどの核抗原に対する抗体によるものかも明らかにされている^{3)~5)}。

一方、Nakane⁶⁾らによつて酵素標識抗体法が開発され、光顕のみならず電顕レベルにも応用できる標識抗体法として注目された。その後Avrameas⁷⁾によつて酵素の抗体への標識法が改良されたとはいえ、まだ一般に広く使われるには問題が少なからずあるようである。また、酵素標識抗体法によるANFの染色パターンにかんする研究はいまだあまりみられない。今回、著者は酵素標識抗体法によるANFの染色パターンを蛍光抗体法の

それと比較検討を加え、新たに前者の方法による独自のANFの染色パターンの分類を試み、さらに酵素の抗体への標識法についても検討を行なった。

材料および方法

材料： 臨床的にSLEと診断されたANF陽性の24例の患者血清と、対照として正常人血清5例を用いた。血清希釈は患者血清を原液とし生理的食塩水にて倍数希釈を行なった。抗血清は成熟家兎に形のごとくFreund's complete adjuvantと共にNBC社製の3回結晶化ヒト γ -globulinで免疫し、抗ヒト γ -globulin血清を得た。抗体蛋白量は沈降曲線より求め、血清1ml中に2.2mg含有していた。得られた抗血清は免疫電気泳動にて用いた抗原であるヒト γ -globulinと特異的であることを確認した。ANFの染色のための核材料はこの実験シリーズで同一正常人の末梢血液塗抹標本を用い、固定は95%、70%、45%各々の濃度のメタノールまたは、エタノールおよび100%アセトンにて5分、15分、30分、60分を行なった。

染色法： 蛍光、酵素標識抗体法とも間接であるので、塗抹標本をまず患者血清にて37°C、30分反応後、冷磷酸緩衝生理的食塩水(PBS)にて十分洗浄後、再び蛍光あるいは酵素標識抗ヒト γ -globulin抗体液で反応させるが、蛍光標識抗体法の場合は室温で2時間反応させる。その後glycerol bufferにて封入を行ない検鏡する。酵素標識抗体法の場合は酵素標識抗ヒト γ -globulin抗体液で室温にて1時間反応させた後、さらに酵素染色を行なわなければならない。酵素としてperoxidaseを用いる場合はKarnovsky⁹⁾らの方法で5分間3,3'-diaminobenzidineと過酸化水素からなる反応液中で染色を行ない型のごとく脱水、封入し検鏡する。peroxidase染色液はその都度新しく調整する必要がある。対照染色としては患者血清の代りに、正常人血清を用いる場合、抗原であるヒト γ -globulinにて吸収した標識液で染色を行なう場合、さらにヒト末梢血液塗抹標本を直接peroxidase染色のみを行なう場合の三種類を行なった。前二

者の反応は陰性であつた。三番目の対照染色は血球由来の内因性peroxidaseと赤血球のみが弱く反応を示した。末梢血液塗抹標本は血球が機械的障害を受けやすく変性、崩壊がみられる。それらの血球のANFの染色パターンは変化するので、鏡検上、完全に血球の形態が保たれているもののみについて検討を行なった。

標識法： 抗体への蛍光色素の標識法はMcDevitt⁹⁾らの方法によつた。得られた標識液はF/Pモル比2.0以下のもののみ使用した。酵素標識にはp,p'-difluoro-m,m'-dinitrophenyl sulfone(FNPS)とglutaraldehydeの両者をbifunctional reagentとして用いた。FNPSの場合はNakane⁹⁾らの方法に準じて行なった。すなわち、まず家兎抗血清より34%硫酸塩析法にて γ -globulin分画に落とし、この粗 γ -globulin分画をpH10.0、0.5M炭酸緩衝液中で蛋白量50mgに対しhorse radish peroxidase(Sigma chemical Company, type 2, RZ 1.37)50mgを溶解し、0.5%FNPS 0.25mlをさらに加えて標識を行なった、その後酵素標識抗体液の精製のためにSephadex G-200によるゲルろ過を行ない、図1のごとく280m μ 、およびperoxidaseの最大吸光度波長403m μ の吸光度曲線を得、両者の最初のピ

図1. Sephadex G-200 によるゲルろ過法の吸光度曲線

ークが重なる分画を濃縮し使用に供する。bifunctional reagentとしてglutaraldehydeを用いる場合はAvrameas¹⁰⁾の方法で行なった。その概要は以下のごとくである。すなわち、まず2.5%glutaral-

dehydeによる抗原蛋白であるヒト γ -globulinの不溶性immunoabsorbentを作製、このimmunoabsorbentに家兎抗血清中の抗ヒト γ -globulin抗体を吸着させる。吸着された抗体以外の血清蛋白はPBSにて十分に洗い流す。その後glycine-HCl buffer (0.1M, pH 2.8)で吸着されている特異抗体をimmunoabsorbentより溶出する。これらの操作はカラム法にて行なつた。このようにして得られた精製特異抗体は適当量に濃縮した後、1%glutaraldehydeによる酵素、すなわちperoxidaseの標識を行なうが、条件は0.1M, pH 6.8 磷酸緩衝液中で、酵素と抗体の重量比2:1である。反応時間は室温2時間で行なつた。その後4°C, 30分, 10,000rpmの遠心沈殿を行ない、その上清を使用する。蛍光、酵素標識抗体液については抗体の特異性、抗体活性を免疫電気泳動で確認し、その酵素活性は免疫電気泳動上の沈降線にperoxidase染色を行なつて確認した。これら標識液はすべて蛋白量0.5mg/mlに調整されている。蛋白定量はmicro-Kjeldahl法にて行なつた。

実験結果

1. 酵素標識液の検討

酵素標識にFNPSとglutaraldehydeを用いたが、いずれの場合も染色上陽性所見が得られ、bifunctional reagentの差による染色パターンの相違は認められなかつた。しかし多少の差がみられるものもあるが、まったく他のパターンに変化するほどでなかつた。標識液の感度については、おのおのの標識液の抗体蛋白量は一定になっているが、標識液の作製から使用時までの時間的差も関連して厳密に感度の比較は出来ない。表1に示すごとく、蛍光抗体法でのANFの抗体価は酵素抗体法でのそれよりも常に高い値を示す。また蛍光抗体法で陽性であつても酵素抗体法では陰性のものが4例あつた。酵素の標識法の差によつてもANFの抗体価は変わってくる。すなわちFNPSによる抗体価はglutaraldehydeによるそれよりも低いか等しい。標識液として得られる抗体蛋白量もglutaraldehydeによる場合の方がはるかに多

く、損失が少い。標識液の安定性にかんしては蛍光標識液は凍結保存すれば少なくとも1年間は安定した結果が得られる。酵素標識ではFNPSによる場合は凍結保存しても3カ月経れば失活してしまうが、glutaraldehydeの場合は少なくとも3カ月間は安定した結果が得られた。

2. 固定による変化

本実験で用いた固定液、濃度、固定時間の差による染色パターンの変化は認められなかつた。しかし短時間、低濃度のアルコールやアセトン固定では標本をPBSで洗浄する際剥がれやすくなるので不適當である。

3. 血清希釈による影響

蛍光抗体法で認められるとき血清希釈による染色パターンの変化は、酵素標識抗体法では他のタイプに変化するほどのものではない。ただ希釈倍数が大きくなるときは多少様相を異にすることもあり、また白血球由来のperoxidaseの反応の方がかえつて強く現われることもある。

4. 染色パターンのタイプ

24例の患者血清を用いて得られた酵素標識抗体法によるANFの染色パターンには種々のタイプが観察されるが、形態的には以下のタイプに分類することができた。すなわち、1) diffuse type (図2-A) 核全体が均質に反応を示すもの。2) perinuclear type (図2-B) 核の周囲のみが反応を示し、核内は弱く反応する場合も、反応を示さない場合もある。蛍光抗体法でのshaggy type様のものも観察されたが、このタイプに含めた。また核周辺が反応を示すといつても均等に反応を示す場合と、顆粒状の場合があつた。3) flecked type (図2-C) 核と細胞質の境界が上記のタイプほど明瞭でなく、核が斑点状の反応塊の集まりとしてみられるもので、このタイプは血球が変性崩壊を受けた場合にも観察されるが、形態的に完全な血球においても認められた。4) fine granular type (図2-D) やはり核全体が反応を示すが、よく見ると小さな顆粒の集合からなり立っているもので、分節核白血球がこのタイプを示すこと

表 1. 蛍光抗体法, 酵素抗体法による抗核抗体
の抗体価

FITC : 蛍光抗体法			FNPS : 酵素抗体法 (FNPS による標識)		GLUTAR : 酵素抗体法 (Glutaraldehyde による標識)		
Sample	FITC	FNPS	GLUTAR.	Sample	FITC	FNPS	GLUTAR.
1	16	2	4	13	128	32	32
2	256	64	128	14	16	8	8
3	64	32	32	15	64	16	16
4	32	4	16	16	32	4	8
5	32	8	16	17	64	8	16
6	64	16	16	18	256	64	64
7	16	4	4	19	16	4	4
8	512	64	128	20	128	32	64
9	128	32	32	21	16	—	—
10	32	4	8	22	8	—	—
11	64	16	32	23	8	—	—
12	128	32	64	24	16	—	—

図 2—A. Diffuse type

図 2—B. Perinuclear type

図 2—C. Flecked type

図 2—D. Fine granular type

図 2—E. Thready type

図 2. 酵素抗体法による抗核抗体の染色パターンの種々のタイプ

はなく、単核球にのみ認められる。5) thready type (図2-E) 核、細胞質の境界は明瞭でdiffuse typeに似ているが核内に粗い糸で織つたような紋様を認めるものである。以上五つのタイプに分類を行なつたが、すべてが明瞭に五つの内のいずれかに分類できるものばかりでなく、中には中間型を示す場合もある。これらは形態的に特徴のより強い方へ分類を行なつた。表2は全例のタイプを示したもので、表にみるごとく各々の患者血清は一つのタイプのみを示す場合もあるが、同一血清で二、三のタイプが同時に観察される場合もあった。また明らかに血球の種類によつてタイプがはつきり異なることもあつた。例えば、リンパ球はdiffuse typeであるが、分節核白血球はflecked typeを示す場合などがある。あるいは、リンパ球は陽性であるが分節核白血球は陰性の場合もみられた。しかし逆の場合は今回の実験では認められなかつた。

5. 蛍光抗体法による染色パターンとの関係

蛍光抗体法によるおのおのの染色パターンは表2に示すごとくである。蛍光抗体法と酵素標識抗体法での染色パターンを比較した場合に両者の間に一定の関連性はないようであつた。表3はそ

表2. 蛍光抗体法, 酵素抗体法による抗核抗体の染色パターン

SAMPLE	FITC: 蛍光抗体法 ENZYME: 酵素抗体法	
	FITC	ENZYME
1	DIFFUSE	DIFFUSE
2	DIFFUSE	DIFFUSE
3	DIFFUSE	FINE GRANULAR, THREADY
4	DIFFUSE	THREADY
5	PERIPHERAL, DIFFUSE	FLECKED, FINE GRANULAR, DIFFUSE
6	DIFFUSE	DIFFUSE
7	DIFFUSE	DIFFUSE, FLECKED
8	PERIPHERAL, DIFFUSE	PERINUCLEAR, DIFFUSE
9	DIFFUSE	DIFFUSE
10	SPECKLED	DIFFUSE
11	PERIPHERAL, SHAGGY, DIFFUSE	DIFFUSE
12	DIFFUSE	DIFFUSE, FLECKED
13	DIFFUSE	FINE GRANULAR
14	PERIPHERAL	DIFFUSE
15	DIFFUSE	FLECKED
16	DIFFUSE	DIFFUSE
17	PERIPHERAL, SHAGGY	PERINUCLEAR
18	PERIPHERAL, SHAGGY	PERINUCLEAR, FLECKED
19	DIFFUSE	THREADY, DIFFUSE
20	PERIPHERAL, DIFFUSE	DIFFUSE, FINE GRANULAR
21	DIFFUSE	—
22	PERIPHERAL	—
23	DIFFUSE	—
24	SPECKLED	—

表3. 蛍光抗体法, 酵素抗体法による抗核抗体の染色パターンの相関関係

FITC: 蛍光抗体法 ENZYME: 酵素抗体法	
FITC	ENZYME
DIFFUSE	DIFFUSE
PERIPHERAL	PERINUCLEAR
SHAGGY	FLECKED
SPECKLED	FINE GRANULAR
NUCLEOLAR	THREADY

の関係を表わしたものである。蛍光抗体法でのdiffuse typeは酵素標識抗体法ではすべてのタイプの反応となつて現われる。

考 案

ANFの蛍光抗体法間接法による染色パターンについてはdiffuse, peripheral(shaggy), speckled, nucleolar typeと4または5のタイプに分類されている。またおのおののタイプと核抗原との関係も明らかである⁸⁾⁹⁾、従つてANFの検査では、単に陽性、陰性というだけでなく、また抗体価のみでなく、どのパターンに属するかを判別することが重要である。何故ならばperipheral, shaggy typeは抗DNA抗体の存在を意味し⁸⁾、その抗体価が高く、血清補体価が低下している場合には腎合併症が活動性の状態にあることを十分推測させる¹¹⁾。同一患者の同一時期のANFは一つのパターンのみでなく表2にみるごとく種々のタイプが混在する。このことはSLEにおいてDNAに対する抗体のみでなく、その他の核抗原に対する抗体も生じることから考えれば当然である。SLEの治療や経過によつてパターンが変化することはしばしば認められることである。またDNAに対する抗体は治療によつてなかなか消失しにくいものである。他の核抗原に対する抗体は臨床症状の改善とともに低下、消失してくるのとは対照的である。以上のことよりANFの染色パターンはSLEの経過、予後を知る上に大きな要因となつている。

ところで、酵素標識抗体法でのANFの染色パターンを蛍光抗体法のそれと比較した場合、表

2, 3にみるように互に一定の関連性がない。このことは酵素標識抗体法での染色パターンの由来が蛍光抗体法のごとく、単に核構成々分の抗原性の違いだけによるものでないことを示している。すなわち、抗核抗体と反応する側である核そのものについての考慮が必要のようである。例えば反応基質としての血球を考えると、血球の種類による核構築の違い、各血球についてもその成熟度の差による核酸代謝、核蛋白代謝の違いなどが染色パターンに影響を与えているのかも知れない。あるいは、今回はわずか24例の患者血清で比較を行なったが、今後例数を増加すれば蛍光抗体法との間に一定の関係がみ出されるかもしれない。あるいはまた反応操作上の人工的産物である影響（抗原、抗体反応を可視的にするために蛍光色素でなく、酵素を標識に用いたことの影響）も加味されているのかもしれない。しかし、いずれにしても染色パターンが蛍光抗体法のそれと異なることは今回の研究より明らかである。その由来について上記の点を考慮してさらに検討が必要と思われる。

患者血清を希釈した場合に染色パターンの変化が蛍光抗体法においては認められるが、これは血清中に種々の核抗原に対する抗体が存在する場合、ある核抗原に対する抗体は他の核抗原に対する抗体の作用を抑制するが、血清希釈によつてその抑制作用が弱められる結果、隠れていた抗体の作用が表面化しその抗体に対するパターンが新たに出現するためであると考えられている⁹⁾。例えば、peripheral, shaggy typeはspeckled, diffuse typeの反応の出現を抑制し、diffuse typeはspeckled typeを抑制するなどである。しかし酵素標識抗体法を用いた場合には、患者血清希釈によるANFの染色パターンの変化は多少認められることもあったが、パターンがまったく他のタイプに変化することはなかった。このことから酵素抗体法での染色パターンの由来を核抗原の違いによる抗体の差だけに基づくとはいえない。

ANFの反応基質としてヒト末梢血液塗抹標本

以外にラット、マウス、ヒト等の肝・腎・睪丸組織が用いられるが、種属、臓器間における染色パターンには差がない。また固定法にかんしても、未固定、アルコール、アセトン、グルタルアルデヒド固定など種々あるが、大差がないようである。ただBeck⁸⁾は長時間の固定は核をclumpingに陥らせdiffuse, speckled type間の鑑別を蛍光抗体法では困難にすると述べているが、今回の実験からはそのような現象は認められなかった。染色法が間接法であるので、出来るだけ非特異的の反応をさけることが重要であるから、そのために標本が十分にPBSによる洗浄にたえるような固定が必要である。低濃度、短時間固定は標本を剝がれやすくするので、一般に塗抹標本の固定に用いられるような95%アルコール15分～30分の固定がよいと考える。

標識抗体の作製にかんしては、蛍光抗体法ではすでに方法論が確立されているのであまり問題はないようである。しかし酵素標識抗体法では未だ一定した方法が確立されていない。今回、FNPSとglutaraldehydeを用いて標識を行なったが、bifunctional reagentとしてこの二つが広く用いられている。標識抗体の最終収量、感度、保存性にかんしては精製抗体にglutaraldehydeを用いる方が、優れている。感度についてはAvrameas⁷⁾のヒッジの感作脾臓を用いた実験では、酵素標識抗体法の方が2倍感度が優れていると述べているが、今回の実験では蛍光抗体法の方がやはり感度、保存性で優れていた。これは酵素標識抗体法の場合は抗体活性の安定性だけでなく、最終的反応として染まるには酵素の活性も保たれている必要があるためだと思われる。またFNPSの方がglutaraldehydeよりも抗体、酵素の両方の活性に対して障害性が強いようである。

酵素標識抗体法では抗原抗体反応によらない内因性の酵素による反応が出る。例えば標識酵素としてperoxidaseを用い、核材料として末梢血液塗抹標本を用いた場合は白血球の顆粒、特に好酸球の顆粒は強く反応する。またperoxidaseそのも

の反応にはよらないが酵素反応基質液が3,3'-diaminobenzidineと過酸化水素からなる場合には、ヘモグロビンの反応で赤血球表面が全体に弱い反応を示す¹²⁾。これら非特異的反応(抗原抗体反応によらない反応)は酵素標識液が優れていれば特異的反応よりはるかに弱いので容易に区別出来るが、必ず対照として用いた材料の標本中の内因性酵素の染色の有無、部位、強さを対比して特異的反応と見誤らないようにしなければならない。染色操作の段階でPBSによる洗浄が不十分の場合には標識液が正常細胞表面に非特異的に物理的に吸着したり、障害細胞の細胞質にも吸着することがあるので¹³⁾注意を要する。

蛍光抗体法ではfluorescein isothiocyanateとtetramethyl rhodamine isothiocyanateを併用することによつて同時に二種の抗原あるいは抗体を検索できるが、酵素標識抗体法でも種々の酵素¹⁴⁾、同じ酵素でも異なつた反応基質¹⁵⁾を用いるとか、蛍光抗体法との併用¹⁶⁾、フェリチン抗体法との併用¹⁷⁾などによつて同時に二種以上の抗原、抗体の検索が可能であり、しかも電顕レベルまで探求できる。

酵素抗体法は組織レベルや電顕レベルでは標識液の透過性といつたような問題があるが、蛍光抗体法のごとく紫外線照射によつて蛍光が退色するようなことがなく、半永久標本が得られることや、蛍光顕微鏡といつた装置も必要なく、反応操作も蛍光抗体法以上に煩雑でないなどの点よりこれから広く用いられるべき新しい標識抗体法と考える。

今回行なつたANFの検索のために酵素標識抗体法を用いた場合、反応の感度、特異性や染色性および再現性の上から満足すべき結果であつた。反応の感度では蛍光抗体法に劣るが、臨床的にはANFの抗体価が低い場合はあまり意味がなく、ある程度以上の抗体価を示す場合に診断に役立つ、そのような例ではもちろん酵素標識抗体法でも陽性である。従つてANFの陽性、陰性の判定や、経過を追うのに役立つことから臨床的に有用

であると考える。また今後、酵素標識抗体法によるANFの染色パターンの由来が解明されれば蛍光抗体法におけるごとくSLEの病態を知る上に大きな指標となりえるので今後の研究がまたれる。

結 論

酵素標識抗体法、蛍光抗体法を用いて24例のSLE患者血清による抗核抗体の染色パターンについて検討を加えて以下の結論を得た。酵素の抗体への標識にはFNPSを用いるよりもglutaraldehydeを用いる方が標識液の収量、感度、保存性の点で優れていた。しかし蛍光抗体法に比して反応の感度、標識液の保存性は劣つていた。抗核抗体の染色パターンは蛍光抗体法による従来のパターンと異なるので酵素標識抗体法による染色パターンを、1) diffuse type, 2) perinuclear type, 3) flecked type, 4) fine granular type, 5) thready typeの五つのタイプに新たに分類を試みた。これら五つのタイプと蛍光抗体法によるタイプとの間には一定の関連性は見出されなかつた。固定条件の違いや、患者血清希釈による染色パターンの変化は酵素標識抗体法では認められなかつた。酵素標識抗体法でみられる抗核抗体の染色パターンの由来としては核抗原の差に基づく抗体の違いによるという機転以外に別の要因を考慮しなければならない。このように酵素標識抗体法による染色パターンの由来について解明すべき点はあるが、少なくともSLEの診断上抗核抗体陽性、陰性の判別および抗体価の追求に十分使用出来る点より臨床的に有用な新しい抗核抗体の検索法と考える。

文 献

- 1) Kawano, K. et al.: Virus-like structures in lupus erythematosus, N. Engl. J. Med. 281: 1228, 1969. —2) Haas, J.E. & Yunis, E.J.: Tubular inclusions of systemic lupus erythematosus, Exp. Mol. Pathol., 12: 257, 1970. —3) Beck, J.S.: Variations in the morphological patterns of autoimmune nuclear fluorescence, Lancet, 1: 1203, 1961. —4) Casals, S.P. et al.: Specific nuclear reaction patterns of antibody to DNA in lupus

- erythematosus sera, *J. Lab. clin. Med.*, 62: 625, 1963. —5) Tan, E.M.: Relation of nuclear staining patterns with precipitating antibodies in systemic lupus erythematosus, *J. Lab. clin. Med.*, 70: 800, 1967. —6) Nakane, P.K.: Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens, *J. Cell Biol.*, 33: 307, 1967. —7) Avrameas, S.: Immuno-enzyme Techniques: Enzymes as markers for the localization of antigens and antibodies, *Int. Rev. Cytol.*, 27: 349, 1970. —8) Graham, R.C. & Karnovsky, M.J.: The early stages of absorption of injected horse radish peroxidase in proximal tubules of mouse kidney; Ultrastructural cytochemistry by new technique, *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 291, 1966. —9) McDevitt, H.O. et al.: Purification and analysis of fluorescein labeled antisera by column chromatography, *J. Immunol.*, 90: 634, 1963. —10) Avrameas, S.: Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde: use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies, *Immunochemistry*, 6: 43, 1969. —11) Schur, P.H. & Sandson, J.: Immunologic factors and clinical activity in systemic lupus erythematosus, *N. Engl. J. Med.*, 278: 533, 1968. —12) Gomorri, G.: *Microscopic Histochemistry*, P. 162, Univ. Chicago Press, Chicago, 1952. —13) Leduc, E.H. et al.: Ultrastructural localization of intracellular immunoglobulins in plasma cells and lymphoblasts by enzyme-labeled antibodies, *J. Histochem. Cytochem.*, 17: 211, 1969. —14) Avrameas, S. & Leduc, E.H.: Detection of simultaneous antibody synthesis in plasma cells and specialized lymphocytes in rabbit lymphnode, *J. Exp. Med.*, 131: 1137, 1970. —15) Nakane, P.K.: Simultaneous localization of multiple antibody method; a study on pituitary glands of the rat, *J. Histochem. Cytochem.*, 16: 557, 1968. —16) Gullien, P.: Specificity of antibodies in single cells after immunization with antigen bearing several antigenic determinants: Study with a new paired staining technique, *Immunology*, 18: 483, 1970. —17) Bernhard, W. & Avrameas, S.: unpublished observations.