

新しい光顕免疫染色法 (Protein A gold-silver染色法)

の開発に関する研究

藤 森 修



新しい光顕免疫染色法 (Protein  
A gold-silver 染色法) の開発に  
関する研究

藤 森 修

# 目 次

序 論	1
材料と方法	4
組織材料	4
抗体その他の免疫関連試薬	5
現像試薬	6
抗体の力価の検定	7
試験染色	7
現像液	8
10nm-PAGとインスリン抗体による染色	9
5nm-PAGとインスリン抗体による染色	9
卵白アルブミン処理の効果に関する検討	10
蒸留水に関する検討	10
グルカゴン抗体、ソマトスタチン抗体 およびPP抗体を用いるPAGS染色法の検討	10
対照染色	11
酵素抗体法との二重染色の試み	11
他の現像液との比較検討	12
結 果	13
I. 染色条件	13
抗体の標準力価	13
試験染色の結果	14
インスリン抗体およびPAGの濃度と現像時間	
1. 10nm-PAGを用いた場合	14
2. 5nm-PAGを用いた場合	15
卵白アルブミン処理の効果	16
蒸留水の純度の影響	17
グルカゴン抗体、ソマトスタチン抗体、PP抗体による染色 およびイヌ、サル、ヒトの膵組織を用いた染色	
1. 10nm-PAGを用いた場合	18
2. 5nm-PAGを用いた場合	18
Protein A gold-silver 染色法	19
対照染色の結果	20
現像ならびに現像液に関する検討の結果	20
ヨード処理の効果について	22
現像減力液の効果について	23
II. 染色結果	23
考 察	25
結 論	33
謝 辞	34
図および写真の説明 (Legends to Figures)	35
文 献	38
図、表および写真	45

## 序 論

免疫組織化学染色法は、特定の可視物質を標識した抗体を用いて組織細胞中あるいは組織切片上の単一物質（抗原）を抗原抗体反応を用いて特異的に検出するもので、機能形態学的な研究の手段として近年ますますその重要性を増して来ており、種々の光顕的および電顕的免疫染色法が開発され獣医学、医学、歯学、生物学など多数の分野で基礎的ならびに応用的研究や臨床診断学等に活用されている。光顕レベルの免疫染色法は蛍光抗体法[25, 29, 42]の開発に始まり、酵素抗体法[37, 56]、Peroxidase-anti-peroxidase法（PAP法）[52, 58]、Avidin-biotin peroxidase complex法（ABC法）[22, 58]などが開発確立されて実用化され、それぞれに長所・短所はあるものの一応完成された方法として広く利用されている。他方、電顕的免疫組織化学における染色技術についても種々の試みがなされ、フェリチン抗体法[24]や酵素抗体法[34, 38]は一応の成果をあげてきたが、いずれの方法も比較的繁雑で安定した結果を得にくいという欠点があった。しかし最近に至り、コロイド金を標識物質とした金コロイド抗体法やプロテインAゴールド（以下、PAGと略）法などの金コロイド法が開発され、電顕的免疫組織化学の分野ではこれらの方法が汎用されつつあるのが現状である。

コロイド金は負に荷電した親水性コロイドで塩化金酸を還元することによって得られ、異なった還元剤を用いることにより大きさの異なる金コロイド粒子を作ることができる[27]。金コロイド粒子は免疫グロブリン[11]、酵素[7, 32]、レクチン[28, 45, 46]、多糖類[28]などの種々の分子と結合し、かつ結合した分子の生物学的活性を失活させないという特性を有している[27]。また金コロイド粒子はそれ自身、電顕的に可視であるのでこれを標識物質とすればそれをそのまま観察できるという利点もある。

金コロイド抗体法は、免疫グロブリン（IgG）に金コロイド粒子を標識

し二次抗体として用いるもので、FaulkとTaylor [11]によって電顕的免疫組織化学の染色法として開発された。本法は従来の酵素抗体法などに比べて極めて簡便で安定した結果が得られる優れた方法であって、透過型電顕のみならず走査型電顕による電顕的免疫組織化学[27]の有効な染色技術として普及しつつある。しかし動物種によってIgGと金コロイド粒子との結合の強度に相違があるらしく、標識抗体法としてはこの点で一定の限界があった。これを改善するために考案されたのがPAG法である。

プロテインAは黄色ブドウ球菌の細胞壁に含まれる分子量 42,000 の塩基性蛋白で、ウサギ、モルモット、マウス、ブタ、サル、ヒトなど多くの動物のIgG-Fcフラグメントと特異的に結合する能力を有している[12,20]。PAG法はプロテインAと金コロイドの両者の特性を利用して、プロテインA・金コロイド複合体即ちPAGを二次抗体の代りに使用する免疫染色法である。

PAG法はRomanoとRomano [43]により電顕的免疫染色法として開発され、Rothら [47]の研究によって広範な実用性を持つ方法として確立された技術で、その後金粒子の大きさを均一化したPAG液の作製[50]、二重染色法の開発[1,19]などについて種々の改良が加えられ、電顕免疫組織化学的研究に活用されて現在に至っている[2,3,48]。Roth [44]は上述の如く電顕的染色技術として用いられているPAG法を初めて光顕免疫染色法として使用した。即ちPAGがピンクの色調を呈することを利用して、ラット脾臓においてA細胞あるいはB細胞をいずれも高濃度の一次抗体とPAGを用いて淡いピンク色に染色することに成功した。この研究によってPAGが光顕免疫染色法にも活用できることが明らかになったが、その最終反応産物の発色が淡いため周囲の組織との間に十分なコントラストが得られず、かつ高い濃度の一次抗体とPAGを用いる必要があるなどの欠点が目立ち、日常的な光顕免疫染色法としては実用性に欠けるものであった。金コ

ロイド抗体法においても、それを光顕レベルで使用するため同様な試みが Geogheganら [18] と Guら [21] によってなされたが、結果的には P A G 法と同様、反応産物の鮮明度や抗体の濃度などの難点のため実用性に欠けるものであった。

金コロイド法のこれらの欠点を改善するため、標識金コロイド粒子を物理現像によって写真化学的に増感し光顕免疫染色法とする試みが、金コロイド標識抗体法を用いて Holgateら [26] と Springallら [51] のグループによってなされた。Holgateら [26] の immunogold-silver 染色（以下、I G S S）法は、ツェンカー液固定のヒト扁桃を組織材料とした I g G の免疫組織化学的検出の研究に際して開発された方法であるが、非特異的反応が極めて強く起こるためほとんど実用にはならない方法であった。Springallら [51] は Holgateら [26] の方法を改良した I G S S 法を開発して、ブアン液または 10 % ホルマリン液固定のラットおよびブタの種々の組織を材料として主にペプチドホルモンを検出し一応の成果をあげたが、方法そのものは非特異的反応の程度や染色操作の繁雑さ等に関して多くの問題点を含んでいた。またこれら両グループによって開発された方法において興味ある点は、両者が一致してルゴール液による切片の前処理の必要性を指摘していたことである。即ち両 I G S S 法ともに脱パラフィン後、ルゴール液浸漬を行なわないと免疫染色の陽性反応はまったく見られず [26, 51]、Holgateら [26] はルゴール液即ちヨード処理はツェンカー固定による水銀除去のほかに、抗原と金粒子の相互作用を促進するためにも必要なのであろうと述べている。上述の如く、I G S S 法は染色法として解決されるべき多くの問題点を含んでいたが、その後これらを検討した研究は理論的にも方法論的にも見られず、I G S S 法を用いた若干の応用研究 [13, 61] はいずれも上述両グループの I G S S 法を基本技術として利用したものであった。

この度著者は、金コロイド抗体法よりも適用性が広いPAG法に物理現像法を併用した光顕免疫染色法の開発を試み、これを日常的に活用し得る確実な免疫染色法として確立するため種々の検討を行なった[14,16]。とりわけ硫化銀法により生体内重金属の検索を行なった著者の経験[17,35]では、従来組織化学的方法において利用されてきた物理現像液[4,9,40,53,54,60]はいずれも現像能力、現像液の寿命、自己触媒作用による非特異的反応の出現などの点で満足できるものではなかったのもので、本研究では物理現像液の改良を行なった。本改良物理現像液では、従来の組織化学的研究に使用されてきた物理現像液の基本であるL ü p p o - C r a m e r [31]とT i m m [53, 54]の現像液を基にして、還元剤としてハイドロキノンの代りにより強力なブロモハイドロキノンを用い、保護コロイドであるアラビアゴムは超遠心によって精製して用いるので、現像力が強くかつ自己触媒作用が極めて少ない優れた物理現像液が得られた。本改良物理現像液を使用してPAGによる光顕免疫染色法の開発を試み種々の検討を行なった結果、操作が簡便で非特異的反応が少なく、反応の感度、特異性、増強性に優れた新しい光顕免疫染色法-Protein A gold-silver (以下、PAGSと略)染色法-を確立することができた。さらに本染色法と酵素抗体法を組み合わせ二重染色を試みた結果優れた所見を得ることができた。以上の結果から、本研究において開発、確立したPAGS染色法は、高い特異性、強い増強性、広い応用性などを有する光顕免疫染色法であって、酵素抗体法に勝るとも劣らない染色技術として選択し得る方法であると考えられる。

## 材 料 と 方 法

### 組織材料

本研究では組織材料としてラット(Wistar系、雄5例)、イヌ(雑

種、雄 5 例)、日本ザル(以下、サルと略、雄 4 例)およびヒト(男性 2 例、女性 2 例、いずれの例も成獣または成人)の膵臓を採取して用いた。膵組織の採取部位は膵尾部とし、ヒトの膵臓は病理解剖体から採取、その他の動物の膵臓はネンブータル麻酔下で放血殺後、いずれも可及的速やかに採取した。これらの膵組織は細切してブアン液中にて 4℃で 18 時間振盪固定した。固定の後 70%、80%、90%、95%、99%、100%のエタノール系列によって脱水し、ベンゾールで透徹後パラフィンに包埋、厚さ 4  $\mu$  のパラフィン切片を作製して接着剤なしでスライドガラスに貼付し免疫染色に供した。

#### 抗体その他の免疫関連試薬

本研究においては以下にあげる 4 種類の抗体を一次抗体として使用した。即ち、抗ブタ・インスリン-モルモット抗体 (Lot No. 023, DAKO, USA)、抗ブタ・グルカゴン-ウサギ抗体 (Lot No. 0010, Miles, USA)、抗ブタ・ソマトスタチン-ウサギ抗体 (Lot No. 024, DAKO)、抗ヒト・パンクレアティック・ポリペプチド-ウサギ抗体(以下、PP抗体と略。Lilly laboratoriesのDr. Chanceの好意による。Lot No. 615-1054B-248-19)である。

PAGはE・Y・Laboratories (USA)の製品で金粒子の直径が5~7 nm(以下、5 nm-PAGと略。Lot No. 020612)のものと10~15 nm(以下、10 nm-PAGと略。Lot No. 022607)のものを用了。

間接酵素抗体法には、horseradish peroxidase(以下、HRPと略)標識抗モルモットIgG-ウサギ抗体 (Lot No. 15301, Cappel laboratories, USA)とHRP標識抗ウサギIgG-ヤギ抗



体 (Lot No. 0542、医学生物学研究所) を二次抗体として使用し、発色には diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB と略。同仁化学、Lot No. B835826) を用いた。

抗体の特異性を検定するための吸収試験には、次にあげる抗原を用いそれぞれに対応する抗体の吸収を行なった。インスリン (Lot No. 113F-0262, Sigma, USA)、グルカゴン (Lot No. 84F-0551, Sigma)、ソマトスタチン (Lot No. 24F-01891, Sigma)、パンクレアティック・ポリペプチド (以下、PP と略。Dr. Chance の好意による。Lot No. 615-1054B200-8)。

後述の対照染色 (2) で行なう PAG の阻止試験には、未標識のプロテイン A (Lot No. 54F-6832, Sigma) を用いた。

緩衝液としては pH 7.4、0.01M の磷酸緩衝食塩液 (以下、PBS と略、食塩濃度 0.9%) または、pH 7.4、0.01M の磷酸緩衝液 (以下、Buffer と略) を使用し、抗体および PAG の希釈には 1% ウシ血清アルブミン加磷酸緩衝食塩液 (以下、BSA-PBS と略) を使用した。また非特異的反応の一要因となり得る抗体および PAG の組織への非特異的結合を阻止する目的で、切片に卵白アルブミン PBS 溶液による前処理を施した。ウシ血清アルブミンは Sigma (Lot No. 94F-0055)、卵白アルブミンは和光純薬 (Lot No. 018-09882) のものを用いた。

## 現像試薬

物理現像液は下記の試薬を使用して調製した。即ちアラビアゴム (Lot No. 016-00025)、硝酸銀 (Lot No. 194-00832)、乳酸銀 (Lot No. 197-00822)、クエン酸 (Lot

No. 035-03495) は和光純薬、ハイドロキノン (Lot No. 760603)、クエン酸ナトリウム (Lot No. 711728) は片山化学、ブロモハイドロキノン (Lot No. 04768) は関東化学の製品をそれぞれ使用した。

定着液はフジフィルムのスーパー・フジフィックスを用いた。

### 抗体の力価の検定

本研究で使用する各抗体の力価の指標として、免疫染色法として一般的な間接酵素抗体法 [37, 56] によりラットの膵臓を用いて免疫染色を行ない、そこで得られた各抗体の最適希釈倍率をそれぞれの抗体の標準力価とした。なお HRP 標識二次抗体の濃度は、抗モルモットーウサギ抗体は 320 倍希釈で、抗ウサギーヤギ抗体は 160 倍希釈で使用した。また一次抗体および標識二次抗体の反応時間はそれぞれ 60 分および 30 分として行なった。

### 試験染色

染色の各段階を詳細に検討するための概略の諸条件値の範囲を設定する目的で、インスリン抗体：400 倍希釈、10nm-PAG：40 倍希釈の濃度により試験染色を行なった。試験染色によって得られたデータに基き、染色の各段階の条件値の範囲を設定した上でさらに詳細な検討を加え、最適の染色条件を検索することを試みた。

#### 一試験染色の染色手順一

以下の染色操作により暫定的な P A G S 染色を行ない、さらに良好な染色結果を得るための諸条件を検討した。

1. 切片をキシロールにて脱パラフィンし、アルコール系列を通して水とした後 P B S 中で 3 回 (各 5 分間、計 15 分) 洗浄する。

2. 切片周囲のPBSを拭い、湿箱中にて1%卵白アルブミンPBS溶液を作用させる。
3. 卵白アルブミン液をガーゼなどで吸い取り一次抗体を滴下し、湿箱中で60分組織切片と反応させる。
4. PBSにて一次抗体を洗い落とし、さらにPBS中で3回（各10分間、計30分）洗浄する。
5. 操作2と同様にして1%卵白アルブミン液を作用させる。
6. 卵白アルブミン液をガーゼなどで吸い取り、PAGを滴下して湿箱中にて60分作用させる。
7. BufferにてPAGを洗い落とし、さらにBuffer中で3回（各10分間、計30分）洗浄する。
8. 改良物理現像液により20℃、暗黒中で現像する。
9. 5分間流水水洗を行なって現像液を十分に洗い流し、5倍に希釈した定着液で1分定着した後再び流水にて10分洗浄する。
10. Kernechtrot 液にて3～5分核染色を行ない、流水中で10分水洗して過剰の染色液を十分に洗い落とす。
11. アルコール系列にて脱水、キシレンを通して透徹し、ビオライトまたはバルサムにて封入する。

## 現像液

PAGS染色に使用する物理現像液は下記の方法で調製した[14,16]。

A 液：20%アラビアゴム水溶液	45 ml
10%硝酸銀水溶液	1 ml
B 液：ブロモハイドロキノ	200 mg
クエン酸	300 mg
蒸留水	15 ml

アラビアゴム液は溶解後、一晚冷蔵庫内に静置して粗大な浮遊物を沈殿させた後さらに上清を冷凍遠心機にて0℃、18,000rpm、30分間の超遠心を行ない微細な不純物を除いて精製し、最終上清を冷蔵庫内に保存した。現像液は、使用時にA、B両液を作製しすばやく混合して調製した。

現像は20℃の水を入れた小型ジャー中に染色ビンを浸して温度を保ちながら、暗室または暗箱を用いて設定した暗黒中に行なった。現像中暗室内では必要に応じて安全灯を点灯した。また暗箱を用いる場合には通常の実験室内に置いて現像を行なった。

#### 10nm-PAGとインスリン抗体による染色

インスリンの有効力価と試験染色で得られた基礎的な成績をもとに、10nm-PAGの濃度は40倍、80倍、160倍、320倍、640倍の5段階の希釈倍率、インスリン抗体の濃度は400倍、800倍、1,000倍、2,000倍、4,000倍、6,000倍、8,000倍、10,000倍まで8段階の希釈倍率を設定し、各希釈倍率のPAGとインスリン抗体をそれぞれ組み合わせて20分から5分ごとに90分までの現像を行ない、10nm-PAGとインスリン抗体の各々の最適濃度と至適現像時間を検討した。

#### 5nm-PAGとインスリン抗体による染色

試験染色と10nm-PAGを用いた染色により検討した成績から、5nm-PAGとインスリン抗体で染色する場合の諸条件の値を設定した。5nm-PAGの濃度は80倍、160倍、320倍、640倍、1,280倍の5段階の希釈倍率を、インスリン抗体の濃度は2,000倍、4,000倍、8,000倍、10,000倍、20,000倍、30,000倍、40,000倍の7段階の希釈倍率を設定し、5nm-

PAGとインスリン抗体の各希釈倍率を組み合わせ、20分から5分ごとに120分までの現像を行ない、最適濃度と至適現像時間を検討した。

なおPAGおよび抗体の作用時間は試験染色と同様いずれも60分に限定して行なった。

#### 卵白アルブミン処理の効果に関する検討

非特異的な免疫染色を防止するための卵白アルブミンPBS溶液による処理は、いずれの濃度で、何分の処理が適当かを調べるために1%、5%および10%の各濃度の溶液を用いてそれぞれ15分、30分、45分および60分作用させ、効果的に非特異的反応を防止するための条件を検討した。

#### 蒸留水に関する検討

蒸留水に関しては、通常使用されている銅製の蒸留器から得られる蒸留水、これをさらにガラス蒸留器を通して得られるガラス再蒸留水、ガラス再蒸留水をさらに脱イオンして得られる脱イオンーガラス再蒸留水の3種類を用いて現像液および緩衝液を作成し、蒸留水の純度の相違が染色結果に及ぼす影響を検討した。

#### グルカゴン抗体、ソマトスタチン抗体およびPP抗体を用いるPAGS染色法の検討

他の膵島ホルモン抗体を用いてPAGS染色法を行なうための最適条件を調べるために、ラットの膵組織で得られたインスリン抗体による染色条件を基準にしてグルカゴン抗体、ソマトスタチン抗体およびPP抗体でラットの膵組織を染色し、それぞれの抗体とPAGの最適希釈倍率および作用時間を検討した。現像時間はインスリン抗体による染色法で決定した最適時間と同一に設定した。



イヌ、サルおよびヒトの膵組織を用いるPAGS染色法の検討

他の動物の膵組織に対してPAGS染色法を適用するために、ラットの膵組織を使用して得られた条件下でイヌ、サルおよびヒトの膵組織を用い4種の膵島ホルモン抗体による染色を行なった。この場合の現像時間も、インスリン抗体による染色法で決定した最適時間と同一にして現像を行なった。

#### 対照染色

PAGS染色の特異性を調べるために、すべての抗体について以下の対照染色を行ない検討した。

対照染色(1)： 一次抗体をそれぞれの特異抗原で吸収した吸収抗体に置換してPAGS染色を行なった(吸収試験)。吸収抗体は、PP抗体では $1\mu\text{g}$ の抗原を $10\mu\text{l}$ の未希釈抗体に、その他の抗体ではそれぞれ $100\mu\text{g}$ の抗原を $100\mu\text{l}$ の未希釈抗体に溶解したものを $4^{\circ}\text{C}$ で一晩静置して作製し、その上清を使用した。

対照染色(2)： 一次抗体反応の後で未標識のプロテインA( $1\text{mg}/1\text{ml}$ 、BSA-PBS溶液)を作用させてあらかじめ一次抗体のFcフラグメントをブロックした後、PAGを作用させて物理現像を行なった(阻止試験)。

対照染色(3)： 物理現像を省いて全染色操作を行なった。

対照染色(4)： 物理現像だけを行なった。

#### 酵素抗体法との二重染色の試み

PAGS染色法が広範囲に活用可能な染色法であることを確かめるため、ラットの膵組織にて本染色法と酵素抗体法との二重染色を試みた。即ち第一次染色はグルカゴン抗体を用いてPAGS染色法を、第二次染色はインスリン抗体を用いて間接酵素抗体法[37,56]をそれぞれ行ない膵島細胞を染

色した。

#### 他の現像液との比較検討

H o l g a t e ら [26] が I G S S 法にて使用した D a n s c h e r [4] の現像液、ならびに S p r i n g a l l ら [51] が I G S S 法にて使用した M o e r e m a n c e ら [33] の現像液をそれぞれ P A G S 染色法にも適用して、著者の処方 of 現像液と比較した。上記二種の現像液の組成は下記の通りである。

#### D a n s c h e r の現像液

50 %	アラビアゴム水溶液	60 ml
25.5 % クエン酸	23.5 % クエン酸ナトリウム水溶液	10 ml
5.7 %	ハイドロキノン水溶液 (0.85 g/15 ml)	15 ml
0.07 %	乳酸銀水溶液 (0.11 g/15 ml)	15 ml

#### M o e r e m a n c e の現像液

3 % クエン酸 - 2.8 % クエン酸ナトリウム水溶液	85 ml
ハイドロキノン	850 mg
0.07 % 乳酸銀水溶液 (0.11 g/15 ml)	15 ml

なお D a n s c h e r [4] の現像液では、アラビアゴム水溶液は溶解後 5 日間冷蔵庫内に静置し、上清をガーゼで濾過したものを使用しているが、本研究では原法通りの現像液の他に、アラビアゴム溶液を遠心精製した 20 % アラビアゴム水溶液と置き換えた現像液 (改良 D a n s c h e r 現像液) も

用いて現像力の比較を行なった。

またH o l g a t eら [26] とS p r i n g a l lら [51] がI G S S法に不可欠な操作として指摘しているルゴール処理が本染色法にどのような影響を及ぼすものかを検討するために、ルゴールによる前処理を施した染色も試みた。

S p r i n g a l lら [51] がI G S S法で非特異反応や過現像を消す目的で使用した下記の処方から成る現像減力液も、必要により使用することとした。

#### 現像減力液

7 . 5 %	フェリシアンカリ水溶液	0 . 3	m l
2 0	% チオ硫酸ナトリウム水溶液	1 . 2	m l
	蒸 留 水	6 0	m l

## 結 果

### I . 染色条件

#### 抗体の標準力価

本研究で用いた各抗体について、ラットの膵組織を用いて間接酵素抗体法で染色して得られる標準力価はインスリン抗体：2 , 0 0 0 倍、グルカゴン抗体：1 , 0 0 0 倍、ソマトスタチン抗体：1 , 0 0 0 倍、P P 抗体：2 , 0 0 0 倍であった [T a b . 1] 。

## 試験染色の結果

インスリン抗体：400倍、10nm-PAG：40倍の希釈を用いてラットの膵島を試験的に染色した場合、45～50分間の物理現像によって明瞭な反応を示すPAGS染色像が得られた。試験染色で得られた反応は黒色の強い反応産物を生じ周囲組織とのコントラストも良好で本染色法の有用性を示唆していた [Fig.2]。しかし本試験染色はインスリン抗体を標準力価に比べて高い濃度で使用しているため、高倍希釈の抗体を用いて感度を高める必要があった。また得られた反応もやや強すぎる傾向があって個々の細胞の判別がしにくい点もあり、さらに検討・改良して以下の結果を得た。

### インスリン抗体およびPAGの濃度と現像時間

試験染色の結果を基礎として検討したPAGS染色法における10nm-PAG、または5nm-PAGの濃度とインスリン抗体濃度の最適の組み合わせと現像時間の関連性は以下の通りであった。

#### 1. 10nm-PAGを用いた場合

インスリン抗体と10nm-PAGの併用による染色において、最も適当な条件はPAGの希釈倍率80倍、インスリン抗体の希釈倍率2,000倍 [Tab. 2] で、現像時間は60～70分であった。

PAGの濃度が40倍希釈で、インスリン抗体濃度が400倍希釈の場合には45～50分の現像で、また800倍および1,000倍希釈の場合55～60分の現像で黒色の強い反応産物が得られた。これらの反応ではやや過現像の状態にあったが、適当な強さの反応で現像を打ち切る場合至適現像時間の幅がそれほど広くないので、適当な反応が得られる時期を逸することがあった。抗体濃度が2,000倍希釈の場合には、60～70分の現像で概ね適当な強さの反応が得られた。4,000倍以上の希釈抗体を用いると90分の現像では反応は弱く、8,000倍以上の希釈抗体では反応は完

全に陰性であった。

PAGの濃度が80倍希釈の場合には、400倍、800倍、1,000倍の各希釈抗体では50～60分、2,000倍希釈の抗体では60～70分の現像でそれぞれ適度な強さの反応が得られた。このうち2,000倍希釈の抗体の場合には至適現像時間に幅があるので、反応結果の判定が容易であり均一な反応強度が得られた。4,000倍希釈の抗体では反応は極めて弱く6,000倍希釈の抗体ではほとんど陽性反応が得られなかった。

PAGの濃度が160倍希釈になると反応は急に弱くなり、90分の現像で抗体濃度が400倍希釈の場合でも特異的反應の強度は充分でなく、2,000倍希釈の抗体では反応は極めて弱く、4,000倍希釈ではほとんど陽性反応は得られなかった。またPAG濃度が320倍および640倍希釈の場合には、抗体濃度が400倍希釈の染色においてのみ極めて弱い反応が得られるにすぎなかった。

一般に抗体ならびにPAGの濃度が低くなるにしたがって、陽性反応が現われるのに長い現像時間を要しかつ反応産物が黒化度を増すのにも長時間が必要であった。

## 2. 5nm-PAGを用いた場合

5nm-PAGとインスリン抗体の併用による染色の場合は、PAGの希釈倍率が320倍、インスリン抗体の希釈倍率が10,000倍〔Tab. 2〕、現像時間80～90分の組み合わせが最適条件であった。

PAGの濃度を80倍希釈で染色した場合、抗体の濃度2,000倍、4,000倍希釈で60分前後、また8,000倍、10,000倍希釈では70分前後、20,000倍希釈では90分前後の現像時間により適度な反応強度が得られたが外分泌部など周囲組織に非特異的な銀粒子の軽度な沈着が認められた。それより高倍希釈の抗体では120分の現像によっても反



応は比較的弱かった。

PAGの濃度が160倍希釈の場合、抗体の希釈倍率が2,000倍および4,000倍では70分前後、8,000倍および10,000倍では70～80分の現像で適度な反応強度が得られたが、20,000倍では120分の現像でも反応強度はやや不足であった。それより高倍希釈の抗体では120分の現像でも反応は極めて弱かった。2,000倍および4,000倍希釈の抗体を用いた染色では弱いながらも非特異的反応が臍島周囲や外分泌部に認められた。

PAGの希釈倍率が320倍の場合には、2,000倍、4,000倍の希釈抗体では70～80分、8,000倍、10,000倍の希釈抗体では80～90分の現像で適度な反応強度が得られたが、20,000倍希釈の抗体では120分現像しても反応の強度は弱かった。30,000倍、40,000倍の希釈抗体では極めて弱い反応を認めるだけであった。2,000倍、4,000倍希釈の抗体を用いた場合、臍島周囲に弱い非特異的反応が認められた。

PAGの希釈倍率が640倍の場合には、抗体の希釈倍率が2,000倍および4,000倍で120分の現像を行なった場合に適度な反応強度が得られたが、8,000～20,000倍希釈の抗体を用いた場合では120分の現像時間でも反応は十分な強度が得られず、さらに高希釈の抗体を用いる場合には反応は痕跡的かあるいは陰性であった。

PAG濃度が1,240倍希釈の場合には、2,000倍希釈の抗体を用いて染色を行なっても、120分の現像では極めて弱い反応が認められるにすぎなかった。

#### 卵白アルブミン処理の効果

10nm-PAGを用いてPAGS染色を行なう場合、一次抗体反応の前

に 60 分、PAG 反応の前に 15 分、切片に 1% 卵白アルブミン溶液による処理を行なえば非特異的反應の防止に充分な効果があった。しかしこれより短いアルブミン処理時間では、時間が短いほど非特異反應が認められた。卵白アルブミンの濃度を 5% に上げた場合には一次抗体反應の前に 15 分、PAG 反應の前に 15 分のアルブミン処理で効果があったが、10% の濃度の卵白アルブミン処理を行なうと、いずれの段階のアルブミン処理を 15 分で行なっても非特異的反應とともに特異的反應も抑えられ、充分な染色強度を得るためには現像時間を延長しなければならなかった。

5nm-PAG を用いる染色の場合には、1% の卵白アルブミン処理では効果が弱く、組織全体に黒色微細顆粒状の非特異的反應が瀰漫性に認められた。これに対し PAG の希釈倍率 160 倍ないし 320 倍で 8,000 倍以上の高希釈の抗体を用いた染色において、一次抗体反應の前に 30 分、PAG 反應の前に 15 分、それぞれ 5% 卵白アルブミン溶液で処理を行なうと、至適現像時間を越えて現像を行なっても非特異的反應を防止することができた。10% 卵白アルブミン液による処理の場合には、至適濃度よりも濃い希釈の抗体と PAG を用いる染色でも非特異的反應は効果的に抑えられたが、同時に特異的反應も抑えられる傾向が認められ、適当な強度の反應を得るには現像時間を延長する必要があると認められた。

一般には抗体および PAG の濃度が高いほど非特異的反應が起こりやすく、このような非特異的反應を抑えるにはアルブミン処理の時間を長くする必要があった。

#### 蒸留水の純度の影響

純度の異なる 3 種の蒸留水（通常の蒸留水、ガラス再蒸留水、脱イオン-ガラス再蒸留水）を用いて、それぞれ現像液ならびに緩衝液を作製して染色結果を比較検討したが、蒸留水の純度の相違によって生じた差

は認められず、通常の蒸留水により何ら支障なく十分に目的を達成できることが判明した。

グルカゴン抗体、ソマトスタチン抗体、P P 抗体による染色およびイヌ、サル、ヒトの膵組織を用いた染色

上述の結果を基準にして、他の膵島ホルモン抗体とラットの膵組織を用いて染色を行なった結果、下記のような条件により良好な染色結果を得ることができた〔T a b . 2 〕。また他の動物種の膵組織を用いて4種類の抗体により染色を行なった場合も、ラットの場合と同様の条件で染色に成功した。

#### 1 . 1 0 n m - P A G を用いた場合

すべての動物種の膵臓について、インスリン抗体ではラットの場合同様の条件で最適な結果が得られた。即ち抗体濃度2, 0 0 0 倍希釈、P A G 濃度8 0 倍希釈の条件が最適であった。

その他の抗体については対象組織の動物種の相違に関係なく、P A G の濃度は4 0 倍希釈、これに対する抗体の濃度はグルカゴン抗体およびソマトスタチン抗体が2, 0 0 0 倍希釈、P P 抗体は5, 0 0 0 倍希釈が適当であったが、抗体の作用時間はインスリン抗体の場合に比較してやや長く、7 0 ~ 9 0 分が適当であった。

#### 2 . 5 n m - P A G を用いた場合

1 0 n m - P A G の場合と同様、すべての動物種の膵臓について、インスリン抗体ではラットの場合と同様の条件、即ち抗体濃度1 0, 0 0 0 倍希釈、P A G 濃度3 2 0 倍希釈で最適な結果が得られた。

その他の抗体でも用いた組織の動物種に関係なくP A G の濃度は1 6 0 倍希釈、抗体の濃度はグルカゴン抗体では4, 0 0 0 倍希釈、ソマトスタチン

抗体では8,000倍希釈、P P抗体では20,000倍が最適であった。  
また抗体の作用時間は80～90分が適当であった。

#### Protein A gold-silver 染色法

上述の所見を総合して検討した結果、以下に示す方法がP A G S染色法の基本的染色要領として確立された。

1. 切片を脱パラフィンする。
2. P B Sにて洗浄する。(P B S中で洗浄、3回、各5分計15分)
3. 5%卵白アルブミン液にて湿箱中で30分処理する。(切片周囲のP B Sを拭って切片上に滴下する)
4. 一次抗体と湿箱中で60～90分反応させる。(卵白アルブミン液をガーゼなどで吸い取り、切片上に適当な希釈の抗体を滴下する)
5. P B Sにて洗浄する。(P B Sで抗体を流し去り、P B S中で3回、各10分計30分洗浄する)
6. 5%卵白アルブミン液にて湿箱中で15分処理する。
7. P A Gと湿箱中で60分反応させる。(10nm-P A G: 40～80倍希釈、5nm-P A G: 160～320倍希釈)
8. Bufferにて洗浄する。(BufferでP A Gを流し去り、さらにBuffer中で3回、各10分計30分洗浄する)
9. 暗黒中で20℃にて物理現像を行なう。現像の結果の判定を行なうには、現像液より切片を出し流水で1分水洗し検鏡する。現像が不十分の場合には蒸留水で洗った後、再度現像液に戻して現像を行なう。
10. 流水中で5分水洗する。
11. 写真用定着液(5倍希釈したもの)で1分定着する。
12. 流水中で10分水洗する。

13. Kernechtrot 液で軽く核染色する。

14. 流水中で5分水洗する。

15. エタノール脱水、キシロールで透徹後、ビオライトまたはバルサムで封入する。

#### 対照染色の結果

PAGS 染色法の特異性を確認するために行なった4種の対照染色、即ち（1）一次抗体をそれぞれの特異抗原で吸収して染色を行なった吸収試験、（2）PAGの一次抗体Fcフラグメントへの結合をあらかじめ未標識プロテインAでブロックして染色を行なった阻止試験、（3）物理現像を省いて染色を行なった染色、（4）切片に物理現像のみを行なった染色では、いずれにおいても反応産物は認められなかった。

#### 現像ならびに現像液に関する検討の結果

PAGS 染色法においては、金粒子の大きさ、抗体およびPAGの濃度、卵白アルブミンの濃度等によって至適現像時間は異なった。上記の最適条件、即ち10nm-PAG：80倍希釈-インスリン抗体：2,000倍希釈の染色系では現像開始後約25分で反応産物が出現し始め、現像の進行にしたがいしだいにその強度を増強し60～70分程度で適当な反応強度が得られた。至適現像時間を越えて現像を行なうと反応産物の黒化度はやや加速度的に増強していった。5nm-PAG：320倍希釈-インスリン抗体：10,000倍希釈の染色系では現像開始後約40分で反応産物が現われ始め、現像の進行とともにしだいに黒化度を増し80～90分程度で適当な反応強度となり、それ以後は10nm-PAGの場合より緩徐ながらも加速度的に反応産物の黒化が進行していった。

現像液の調製を安全灯点灯下の暗室で行ない現像も暗室内で引続き行なっ



た場合と、現像液の調製を蛍光灯点灯下の室内で行ない室内に設置した簡易暗箱中で現像を行なった場合とを比較しても、両者の現像結果に相違は認められなかった。

現像液の自己分解能を検索するために現像液に切片を入れずに放置すると、現像液は20℃の暗黒中で3時間以上、60 luxの微量な拡散光のもとで2時間以上安定しており、いずれも自己分解による非特異的な銀粒子の析出は認められなかった。切片を現像すると現像液の自己分解は若干早まるようであり、現像を長くしすぎると切片上に非特異的な銀粒子の沈着を認めることがあったが、少なくとも90分までの現像時間では60 luxの拡散光の条件下でも暗室内での現像と同様の結果が得られた。

これに対して、Danscher [4]、Moeremansら [33]、改良Danscherの3種類の現像液をPAGS染色法に適用した場合には次のような結果が得られた。

Danscher [4] の現像液を用いた場合には、10 nm-PAG : 80 倍希釈-インスリン抗体 : 2,000 倍希釈の染色系でも、5 nm-PAG : 320 倍希釈-インスリン抗体 : 10,000 倍希釈の染色系でも十分な強度の反応産物は得られず、90分の現像でも10 nm-PAGの染色系では弱い反応を、5 nm-PAGの染色系では極めて弱い反応をそれぞれ認めるにすぎなかった。現像開始後光顕的に反応産物を認めるに至る時間は10 nm-PAGの染色系で約50分、5 nm-PAGの染色系で約70分であり、また反応産物が増して行く速度は極めて緩徐であった。その上現像液の自己分解が液の調製後50ないし60分で起こり始め、現像が長時間にわたると切片全体に非特異的な銀粒子の沈着が認められるので現像時間を延長することもできなかった。現像液の自己分解は液の調製を蛍光灯下の室内で行なう場合にはさらに早まり、本現像液を使用する場合すべての操作を暗室内で行なう必要があった。

Moeremansら [33] の現像液を用いた場合には、10nm-PAG、5nm-PAGのいずれの染色系でも可視反応産物はまったく得られなかった。現像液の調製ならびに現像操作をともに暗室内で行なっても、現像液は10分以内に自己分解を起して黒化し、約20分後に全黒化して使用不能となった。このため切片を90分間現像液に浸漬しても反応産物はまったく認められなかった。

改良Danschere現像液を用いた場合には、90分の現像で10nm-PAG、5nm-PAGのいずれの染色系でも原Danschere現像液を用いた場合よりやや強い色調の反応産物が認められたが、著者の現像液を用いた場合よりも弱い色調の反応であった。しかし原Danschere現像液に比べると液の自己分解は起こりにくく非特異的な反応はほとんど認められなかった。

#### ヨード処理の効果について

切片を脱パラフィン後ルゴール液で処理した場合、著者の現像液を用いる染色では現像時間が大幅に短縮され、10nm-PAG：80倍希釈ーインスリン抗体：20,000倍希釈の染色系では10分、5nm-PAG：320倍希釈ーインスリン抗体：10,000倍希釈の染色系では15分で反応産物はそれぞれ適当な色調に到達した。しかしこれらの系では現像の進行が早すぎるので反応産物の適正な色調をチェックする時間的余裕が短く、それを逸するとすぐに過現像となり臍島が黒く塗りつぶされた様相を呈した。また適正な色調で現像を中止しても、切片全体に微細～細顆粒状の銀粒子が瀰漫性に強く沈着するのが認められた。Danschere [4] の現像液を用いた場合には、10nm-PAGの染色系で20分、5nm-PAGの染色系で30分で反応産物の適当な色調が得られたが、同時に過現像に陥りやすく強い非特異的な反応も認められた。このような状況は改良

D a n s c h e r 現像液を用いた場合にもまったく同様に認められた。一方、ルゴール処理を行なわない場合には増感を示さなかった Moeremansら[33]の現像液を用いた染色では、10nm-PAGの染色系は4分、5nm-PAGの染色系は6分で強い黒色の反応産物が得られた。しかしこの場合にも必ず非特異的な銀粒子の沈着が認められ、その上他の現像液に比べて現像の進行が極端に早いため過現像に陥る傾向が強かった。

## 現像減力液の効果について

ヨード処理によって引き起こされる過現像や非特異的銀沈着を消すため、Springallら[51]のIGSS法に従い現像後に切片を一枚ずつ時折検鏡しながら現像減力液で処理すると、銀粒子の消退は減力開始後2分ないし3分後に比較的急激に起こるので、むしろ現像不足の状態に陥り易かった。同様に、非特異的反応を消す目的で減力を行なうと非特異的反応のみならず特異的反応も消えてしまい、極めて弱い反応即ち現像初期の状態に戻ってしまうか、あるいは反応は完全に消失して陰性になった。

## II. 染色結果

本研究で開発確立したPAGS染色により得られた結果は下記の通りである。

10nm-PAGを用いたPAGS染色[Fig.3]と、5nm-PAGを用いたPAGS染色[Fig.4]の間には染色所見において明らかな相違は認められなかった。即ちいずれのサイズのPAGを用いた染色の結果においても、免疫反応陽性部位には物理現像によって金粒子上に析出した金属銀による黒色の反応産物が同様に沈着していた[Figs.2-22]。さらに反応陽性部位を強拡大で観察すると反応産物は顆粒状の沈着物として認められた[Fig.5]。その

上非特異的反應もほとんど認められず、反應産物と周囲組織とのコントラストも明瞭であり識別しやすかった[Figs.2-22]。

ラットの膵島では、各抗体による陽性細胞の分布や量的比率には規則性が認められ、一個の膵島中に占める割合はインスリン陽性細胞 [Fig.6]が最も高く、膵島中心部に存在していた。グルカゴン陽性細胞[Fig.7] は比較的少なく、膵島の辺縁部において1ないし2～3層に膵島を取り囲むように分布しているのが認められた。ソマトスタチン陽性細胞[Fig.8] ならびにP P陽性細胞[Fig.9] はともに極めて少なく、膵島辺縁部に散在していた。

イヌの膵島においては、各抗体陽性細胞の分布は個々の膵島により異なりラットの膵島で認められたような規則的な配列は認められなかった。一般にイヌの膵島において量的に優位な細胞はインスリン陽性細胞[Fig.10]またはグルカゴン陽性細胞[Fig.11]のいずれかで、ソマトスタチン陽性細胞[Fig.12]は比較的少ないが、稀に多くの陽性細胞が認められる膵島もあった。P P陽性細胞[Fig.13]は極めて少なく、むしろ外分泌部に介在して散在することが多かった。

サルの膵島では、各抗体陽性細胞の分布に顕著ではないが一定の規則性を有する傾向が認められた。即ち量的に最も多数を占める細胞はインスリン陽性細胞 [Fig.14] で島中心部に存在することが多く、次いで多いグルカゴン陽性細胞 [Fig.15] は膵島辺縁部に分布することが多かった。ソマトスタチン陽性細胞 [Fig.16] とP P陽性細胞[Fig.17]はいずれも少なく膵島内に散在しているにすぎなかった。

ヒトの膵島では、各抗体陽性細胞の分布に明瞭な規則性は認められなかった。しかし一般にインスリン陽性細胞[Fig.18]は量的に優位を占めており、グルカゴン陽性細胞[Fig.19]は個々の膵島によってその数に顕著な相違が見られた。ソマトスタチン陽性細胞 [Fig.20] とP P陽性細胞 [Fig.21] は極めて少数であった。

ラット膵組織においてグルカゴン抗体とインスリン抗体を用いて行なった P A G S 染色法と酵素抗体法による二重染色の染色所見では、前者による黒色の反応産物と後者による茶褐色の反応産物とが鮮やかな対比を示し、膵島中心部でインスリン陽性細胞が茶褐色に、膵島辺縁部でグルカゴン陽性細胞がインスリン陽性細胞を取り囲むように黒色にそれぞれ染色されていた [Fig.22]。また本二重染色法においては染色後通常の脱水・封入を行なうことが可能であった。

## 考 察

従来主として電顕的免疫組織化学に利用されていた P A G 法に物理現像法を適用することにより、微量なコロイド金粒子を光顕的に可視化する新しい光顕免疫染色法 - P A G S 染色法 - を開発した。

試験染色の結果から、P A G S 染色法では強く明瞭な反応産物が得られ、染色操作も比較的簡便であることが判明し、本染色法が光顕免疫染色法としての有用性を備えていることが強く示唆された。試験染色で得られた染色像は他の染色法に比較しても反応産物の色調の強さ、鮮明度などの点で優れていた。しかし試験染色で得られた結果によればその反応はむしろ強すぎる傾向があり、また免疫染色法に要求される基本条件、即ち、できるだけ高希釈の抗体を用いて適度な反応を得ることを考えると、試験染色では抗体および P A G の濃度が比較的高いのでこれらをさらに検討して改善する必要があると考えられた。

まず初めに、試験染色の操作に準拠して 10nm-P A G を用いる染色の条件について検討した。その結果一次抗体および P A G の希釈倍率、反応産物の色調、反応の判定の容易さ、非特異的反応の有無などを根拠に、インス



リン抗体：2,000倍、10nm-PAG：80倍で現像時間60～70分の条件が最適と決定された。試験染色の強すぎる反応に比較すると、この条件下の染色では反応産物の強度は弱まり観察しやすい色調であった。試験染色の結果にくらべて反応産物の色調が適度に弱くなったことおよび長い現像時間を必要としたことに関しては、一次抗体およびPAGを高希釈で使用するので、抗原に間接的に結合している金粒子の量が減少しその密度が低くなった結果、最終反応産物の量が減少して色調が薄くなり、かつ現像による可視化までにさらに長時間を要するためと解釈された。これに反して試験染色では結合している金粒子の密度が高く、そのため反応産物の量も多くなって染色強度が強くなり現像時間も短くて済んだものと思われる。

PAGに限らず一般に金コロイド標識物質は金粒子の径が小さいほど感度が高いとされている[59]。それは金粒子の径が大きいほど金コロイド標識物質の結合は相互に物理的に妨害されて立体障害が起こるためと説明される。そこで本研究では染色法の感度をさらに向上させるため市販のPAGのうち最も金粒子の径の小さい5nm-PAGを用いて染色を試みた。その結果5nm-PAGを用いた染色ではその感度が飛躍的に上昇した。検討した組み合わせの中から10nm-PAGによる染色の場合と同様の基準でインスリン抗体：10,000倍、5nm-PAG：320倍、現像時間80～90分の条件が最適と決定し、この条件で10nm-PAGを用いた染色と同様の染色結果を得ることができた。この場合現像時間がさらに長くなったのはPAGの金粒子の直径が半減したため、現像による可視化までに時間を要したものと考えられた。

卵白アルブミンによる切片の前処理は、抗体およびPAGの組織に対する非特異的な結合を防止するのに必須の処置であった。この処置において卵白アルブミン溶液の濃度が低いほど、また処理時間が短いほど非特異的反応は強く認められた。即ち10nm-PAGの染色では1%の溶液で一次抗体反

応の前に1時間、PAG反応の前に15分の処理により、また5nm-PAGの染色では5%の溶液でそれぞれ30分および15分の処理により非特異的反応は防止できたが、これらの濃度ならびに処理時間の相違はおそらくは金粒子の大きさの相違によるPAGの感度に起因するものと考えられた。卵白アルブミン溶液の濃度と処理時間がPAGのサイズによって相違するという不都合を解消するには、いずれのサイズのPAGにおいても有効な条件を設定することが望ましいと考えられた。またいずれのサイズのPAGを用いた染色でも卵白アルブミンの濃度を10%にして処理を行なうと処理時間の長さに応じて現像の所要時間が延長されたが、卵白アルブミン濃度を上げすぎるとIgGの抗原認識あるいはプロテインAの抗体Fcフラグメント認識に時間を要するのかも知れない。一般に免疫染色においては非特異的反応を防止するため正常山羊血清を使用する[34,37]が、本法においてはプロテインAがIgGのFc部分を認識するので、プロテインAの山羊IgGに対する結合力は無いかあるいは弱い[45]というものの、山羊血清を使用することは避けるのが適当と考えられる。

Dansch er [4]、Holgate ら [26]、Springall ら [51] は物理現像法に使用する蒸留水について脱イオン・ガラス蒸留水を使用することが必須と述べている。一般に用いられる銅製蒸留器で得られる蒸留水には極めて微量ながら金属が含まれている（平沢製作所、私信）とされているが、本研究における蒸留水に関する検討の結果によれば通常の蒸留水を使用しても染色結果にとくに影響は認められなかった。しかし蒸留水に金属その他の不純物が含まれていればそれによって自己触媒作用が誘発され、現像液の劣化を招き非特異的に金属銀が析出する可能性を生じる。このようにして析出した金属銀が組織切片上に沈着し非特異的反応として観察され得ることは充分考えられるため、不純物とくに金属を完全に除去する目的でガラス蒸

留水またはガラス再蒸留水を用いることが推奨されるべきであろう。

P G A S 染色法においてコロイド金粒子を光顕的に可視化するために用いられる物理現像法は、従来生体内重金属を組織化学的に検出する方法に活用されていたものである[4-6,8,9,10,39,40,41,49,53-55,60]。一般的な化学現像法がハロゲン化銀を現像主薬によって還元し金属銀として潜像上に析出させる現像法であって、銀イオンは乳剤中（フィルム、印画紙）に存在するのに対し、物理現像法は銀イオンが現像液中に含まれており、現像主薬により現像液中のハロゲン化銀を還元して金属銀として潜像上に析出させる現像法である。浜野ら[23]によれば白金、金および銀などの金属は銀イオンの還元を触媒する（現像核となる）性質があり、それ自身が physical development speck となってそれ自身の表面に金属銀を析出させるという。P A G S 染色法においては、コロイド金粒子が写真化学の分野でいわれるこの physical development speck の役割を果たしているものと考えられる。

重金属の組織化学的検出に関する研究に関連して物理現像液は多くの研究者によって改良の試みがなされてきた[4,35,40,60]。しかしながらこれらの物理現像液でも、比較的短時間で現像液の自己触媒作用に基く金属銀の非特異的な析出が常に起こっていた。本研究においてP A G S 染色法に使用した物理現像液は、L ü p p o - C r a m e r [31]およびT i m m [53-55] の物理現像液を改良したものであって、ハイドロキノンを経過したブロモハイドロキノンを置き換え、アラビアゴム溶液は超遠心によって極めて微細な不純物をも除去し精製したものを使用している。ブロモハイドロキノンはハイドロキノンと比較して還元力が著しく強い[30]ので現像力は飛躍的に向上し、かつ自己触媒作用も長時間にわたり起こることがないので現像時間を延長することも可能であった。自己触媒作用のこのような改善は主としてアラビアゴムを精製することによって得られたものと考えられ、未精製のアラビアゴムを使用する場合には現像液の寿命は明らかに短縮された。

H o l g a t e ら [26] により I G S S 法に利用された D a n s c h e r [4] の現像液においては、銀イオン供給物質として硝酸銀の代りに乳酸銀を使用し、その上保護コロイドであるアラビアゴムの濃度を高くして使用しているという特徴がある。この現像液は D a n s c h e r が組織内重金属に関して行なった一連の研究 [4-6, 8, 9] に際し、従来の硝酸銀による物理現像液においては金属銀の非特異的析出が顕著であるため、それを回避するため力の弱い現像液を処方しようとする目的から生まれたものである [4]。乳酸銀は硝酸銀に比較してイオンの供給力が弱く [4]、また高濃度のアラビアゴムは銀イオンの還元を抑えるので所期の目的通りに現像力を弱くすることができた。しかし D a n s c h e r の現像液においてはなお自己触媒作用による非特異的な金属銀の沈着が比較的強いので、切片をゼラチンで被覆して銀の非特異的沈着を予防し、現像完了後微温湯でゼラチン膜を溶解するという操作を余儀なくされている [4-9]。P A G S 染色法に D a n s c h e r の現像液を適用しても満足な結果が得られなかったのは、その弱い現像力と自己触媒作用のためであろう。しかし D a n s c h e r [4] 現像液の処方においてアラビアゴム溶液を著者による精製 20% アラビアゴム溶液に置き換えた液（改良 D a n s c h e r 現像液）によって現像を行なうと弱いながらも D a n s c h e r 原液によるよりもよい結果が見られたのは、アラビアゴムの純度が改善された結果自己触媒作用が抑制され非特異的反応も抑えられるとともに、アラビアゴムの濃度が低いため銀イオンが円滑に供給されて固有の現像作用が発揮されたためと考えられる。

S p r i n g a l l ら [51] が開発した改良 I G S S 法に使用されている M o e r e m a n s ら [33] の現像液は、その処方から D a n s c h e r [4] 現像液よりアラビアゴムを除いたものと考えられるが、保護コロイドを欠くために現像速度は早いですが自己触媒作用も極めて強い現像液である。本研究において P A G S 染色法に M o e r e m a n s 現像液を適用しても反応の増感

が認められなかったのは、微量な金粒子上に光顕的に可視化し得る量の金属銀が沈着する前に自己触媒作用により液の現像力が劣化してしまうものと考えられる。本現像液は免疫電気泳動法においてセルローズアセテート膜上の蛋白分画を金コロイド標識抗体を用いて染色する方法に適用するため考案されたもの[33]であって、この場合の金コロイド標識抗体の濃度についての記載はないが、増感なしでも淡いピンク色に見える程度の濃度との記述があるのでかなり濃い濃度で使用しているらしく、そのため短時間の現像でも増感されたものと考えられる。この場合の使用目的に照らし合せると、その染色結果には顕微鏡レベルの厳密さは要求されていないので、本現像液を組織化学的染色に適用するのは多分に問題を含んでいる。

I G S S 法において H o l g a t e ら [26]、S p r i n g a l l ら [51] が必須の処理としているルゴール処理を P A G S 染色法に適用すると、現像時間は約 6 分の 1 に短縮され反応産物の密度も高くなって色調も濃くなったが、同時に強い非特異的反応が観察された。しかしルゴール処理およびチオ硫酸ナトリウム溶液による脱ヨード処理後の流水水洗において、水洗時間が長くなる程現像時間の短縮ならびに反応産物の増強もしだいに認められなくなり、水洗を 12 ～ 18 時間行なうとルゴール処理を施さない場合と同様の現像時間が必要となって非特異的反応も認められなくなった。改良 D a n s c h e r 現像液を用いてルゴール処理を施した場合にも現像時間は短縮され、かつ反応産物の強度も増強されており、非特異的反応も顕著であった。D a n s c h e r [4] 現像液を用いた場合でも同様に短時間の現像で強い反応産物の強度と著明な非特異的反応を認めた。また本染色法に適用してもまったく反応産物が認められなかった M o e r e m a n s [33] の現像液を用いた場合でも、ルゴール処理を行なうと短時間の現像で反応産物と非特異的反応が見られた。本研究で開発確立した P A G S 染色法においてはルゴール処理を行なわなくても反応の強い増感が得られ、また I G S S 染色

法に関する著者の同様の研究においても同様の結果が得られている[15]。従って、ルゴール処理即ちヨードはH o l g a t eら[26]が考えたような抗原と金粒子の結合を強める作用を示すことはなく、現像の際銀イオンの還元を促進するような効果を与えるものと考えられた。即ちチオ硫酸ナトリウムでの脱ヨード処理および水洗の後にも、切片に微量に残留していたヨードが現像を促進するため短時間の現像でも強い増感が起こるものと推定され、水洗を長くすればヨードが流失するので現像促進効果も失われるものと思われた。しかし過度に急激な現像の進行は適当な現像強度を逸する傾向となり、金属銀の不均等な沈着による非特異的反応を招来する[3]。さらに不必要な還元物質は現像液の自己触媒作用を惹起し現像液の劣化を早めることにもなるので、過現像や非特異的反応の原因となりやすいこのような処理を物理現像法に適用することは本来避けることが望ましい。

S p r i n g a l lら[51]は過現像や非特異的反応を減弱させるため、現像の後に現像減力液を使用して過剰の、ないしは非特異的な金属銀の除去を試みているが、減力液による処理は結果的に非特異的反応のみならず特異的反応をも消してしまうので染色の目的に矛盾することになる。このような処理を行なうよりも、むしろ過現像や非特異的反応を起こさない物理現像液によって染色を行なうことが優先的に考慮されるべきである。

P A G S 染色法では、ラットの膵島においてグルカゴン抗体、ソマトスタチン抗体、P P 抗体による染色に適用しても、またイヌ、サル、ヒトの膵組織を用いた4種の膵島ホルモン抗体による染色に適用しても、いずれの場合も優れた染色結果を得ることができた。インスリン抗体の作用時間に比較して他の抗体の作用時間にやや長い時間を要したのは、プロテインAのF c フラグメントとの結合能力は兎のI g Gに対するよりもモルモットのI g Gに対する方が強いためと考えられた。

P A G S 染色法においては間接酵素抗体法によって算出した各抗体の標準

力価に比べ、いずれの抗体による免疫染色でも高い希釈倍率の抗体を用いることが可能であり、本染色法は感度の高い鋭敏な方法であることが明らかであった。また対照染色の結果は本染色法の反応産物が抗原局在部位に特異的に認められること証明しており、抗原に間接的に結合している金粒子を物理現象によって著しく増感していることは明白で、本染色法の特異性が高いことを示していた。さらに本染色法と酵素抗体法の組み合わせによる二重染色も可能であることは、PAGS染色法の優れた有用性を示唆していると思われる。即ち現在主に用いられている光顕的免疫二重染色法には酵素抗体法があり、発色剤としてDABと $\alpha$ -ナフトールの2種を用いる方法[36,57]が汎用されている。しかしこの二重染色法では $\alpha$ -ナフトールから得られる反応産物がエタノール、キシロールに可溶性であるため、通常の脱水・封入は不可能という欠点があった。しかしながらPAGS染色法と酵素抗体法による二重染色法では脱水・封入が可能であり、かつその染色所見においてもPAGS染色による黒色の反応産物と酵素抗体法による茶褐色の反応産物は色調の対比がよく、同一切片上で2種の抗原の局在を検出するのに極めて優れた方法であることが判明した。

PAGS染色法は間接酵素抗体法と同様一種の間接法であり、一次抗体ー標識二次因子ー標識物質の発色の3段階の反応からなっている。間接酵素抗体法では二次抗体に標識されたパーオキシダーゼをDABで可視化するのに対し、本法ではプロテインAに標識されたコロイド金粒子の周囲に物理現象により金属銀を沈着させて可視化する[Fig.1] 点が異なっている。本染色法の最終反応産物は顆粒状で濃い黒色を呈するが、酵素反応のような時間の経過に伴う反応産物の拡散はなく、周囲組織とのコントラストも極めて鮮明であった。また本法では写真化学反応に由来する外因性の非特異的反応のみならず、酵素抗体法における内因性パーオキシダーゼのような内因性反応物質がないので非特異的反応が起こる可能性は極めて少なく、内因性反応物

質の除去操作が不必要であるため染色操作も簡便である。さらに特筆すべき利点として、プロテインAが種々の動物のIgG-Fcフラグメントに特異的に結合する能力を有するので[12,20]、使用する一次抗体が家兎血清あるいはモルモット血清であっても二次因子としてはPAG一種類を用いるだけでよいという点があげられる。抗体およびPAGの高い希釈倍率と合せて考慮すると、本法は他の光顕免疫染色法と比較して明らかに経済的な染色法であるといえる。

以上のことから本研究で開発したPAGS染色法はその特異性、感受性、増強性、可視性のいずれに関しても極めて優れており、しかも広い範囲に応用し得る技術で、光顕免疫組織化学において有力な手技として普遍的に活用できるものと考ええる。

## 結 論

免疫電顕染色法として普及しているプロテインAゴールド法に物理現像法を適用して新しい光顕免疫染色法の開発を試み、反応の特異性、感受性、増強性および可視性に優れたProtein A gold-silver 染色法を開発、確立した。本染色法は下記の特徴を備えている。

1. 非特異的反応が少なく、反応産物の拡散もないので反応は極めて特異的である。
2. 感受性が高く、酵素抗体法と比較して高希釈の抗体を使用できるので経済的である。
3. 高い能力の現像液を使用するので反応の増強性が優れており、高希釈の抗体を用いても強い反応が得られる。



4. 反応産物の色調は黒で周囲組織とのコントラストが良好である。
5. プロテインAは複数の動物種のIgG-Fcフラグメントと特異的に結合する能力を有するため、使用する一次抗体の免疫動物種を1種に限定しない。
6. 本法を酵素抗体法と組み合わせて二重染色を行なうことが可能であって、応用範囲も広い。この組み合わせによる二重染色法では2種類の色調の対比が鮮明でしかも通常の脱水・封入操作が可能なので、酵素抗体法による従来の二重染色法と比較しても極めて優れた方法である。
7. 本法における最終反応は写真化学反応であるが暗室を使用する必要はなく、簡易暗箱を用いれば室内で染色が可能であり、染色操作は酵素抗体法のそれに比べてむしろ簡便である。

以上の特徴を有するProtein A gold-silver 染色法は光顕免疫染色法として広く活用できる可能性を持っている。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、終始御指導と御助力を賜りました大分医科大学解剖学教室、中村三雄教授ならびに名古屋市立大学医学部第二解剖学教室、山田和順教授に深甚なる謝意を表します。また御懇切なる御助言と御校閱を賜った麻布大学獣医学部第一病理学教室、野村靖夫教授に深謝いたします。

## Legends to Figures

Fig. 1. Schematic representation of protein A gold-silver staining method. Tissue section is incubated with primary antibody and subsequent protein A gold. Gold particles introduced to antigenic sites are visualized as black shades by the physical development.

Figs. 2-21. Pancreatic islets immunostained for insular hormones with the protein A gold-silver staining method and counterstained with Kernechtrot.

Fig. 2. Rat pancreatic islet stained with anti-insulin serum diluted 1:400 and protein A gold of 10 nm particle size diluted 1:40. x 260.

Fig. 3. Rat pancreatic islet stained with anti-insulin serum diluted 1:2000 and protein A gold of 10 nm particle size diluted 1:80. x 260.

Fig. 4. Rat pancreatic islet stained with anti-insulin serum diluted 1:10,000 and protein A gold of 5 nm particle size diluted 1:320. x 260.

Fig. 5. A higher magnification of the rat pancreatic islet stained for insulin with 10 nm gold particles. The reaction products are visualized distinctly as fine particles of black shades. x 1,300.

Fig. 6. Rat pancreatic islet stained for insulin with 5 nm

gold particles. x 260.

Fig. 7. Rat pancreatic islet stained for glucagon with 5 nm gold particles. x 260.

Fig. 8. Rat pancreatic islet stained for somatostatin with 5 nm gold particles. x 260.

Fig. 9. Rat pancreatic islet stained for pancreatic polypeptide with 5 nm gold particles. x 260.

Fig.10. Dog pancreatic islet stained for insulin with 10 nm gold particles. x 260.

Fig.11. Dog pancreatic islet stained for glucagon with 10 nm gold particles. x 260.

Fig.12. Dog pancreatic islet stained for somatostatin with 10 nm gold particles. x 260.

Fig.13. Dog pancreatic islet stained for pancreatic polypeptide with 10 nm gold particles. x 260.

Fig.14. Monkey pancreatic islet stained for insulin with 5 nm gold particles. x 260.

Fig.15. Monkey pancreatic islet stained for glucagon with 5 nm gold particles. x 260.

Fig.16. Monkey pancreatic islet stained for somatostatin with 5 nm gold particles. x 260.

Fig.17. Monkey pancreatic islet stained for pancreatic polypeptide with 5 nm gold particles. x 260.

Fig.18. Human pancreatic islet stained for insulin with 5 nm

gold particles. x 260.

Fig.19. Human pancreatic islet stained for glucagon with 5 nm gold particles. x 260.

Fig.20. Human pancreatic islet stained for somatostatin with 5 nm gold particles. x 260.

Fig.21. Human pancreatic islet stained for pancreatic polypeptide with 5 nm gold particles. x 260.

Fig.22. Rat pancreatic islet double-immunostained for glucagon and insulin with the protein A gold-silver staining and immunoperoxidase methods respectively. (Counterstained with Kernechtrot). x 280.

## 文 献

- [ 1] Bendayan,M.(1982). Double immunocytochemical labeling applying the protein A-gold technique. J.Histochem.Cytochem. 30,81-85.
- [ 2] Bendayan,M.,Roth,J.,Perrelet,A., and Orci,L.(1980). Quantitative immunocytochemical localization of pancreatic secretory proteins in subcellular compartments of the rat acinar cell. J.Histochem.Cytochem. 28,149-160.
- [ 3] Bendayan,M.,and Zollinger,M.(1983). Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissue applying the protein A-gold technique. J.Histochem.Cytochem. 31,101-109.
- [ 4] Danscher,G.(1981). Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. Histochemistry 71,1-16.
- [ 5] Danscher,G.(1981). Light and electron microscopic localization of silver in biological tissue. Histochemistry 71,177-186.
- [ 6] Danscher,G.,Hall,E.,Fredes,K.,Fjerdingsstad,E.,and Fjerdingsstad,E.J.(1975). Heavy metals in the amygdala of the rat : zinc,lead and copper. Brain Research 94,167-172.
- [ 7] Danscher,G. and Nørsgaard,J.O.R.(1983). Light microscopic visualization of colloidal gold on resin-embedded tissue. J.Histochem. Cytochem. 31,1394-1398.
- [ 8] Danscher,G.,Obel,J.,and Thorlacius-Ussing,O.(1980) Electron microscopic demonstration of metals in rat mast cells. Histochemistry 66,293-300.
- [ 9] Danscher,G., and Zimmer,J.(1978). An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of

- heavy metals in biological tissues. *Histochemistry* 55,27-40.
- [10] Falkmer,S.,and Pihl.,E.(1968). Structural lability of zinc-containing secretion granules of pancreatic  $\beta$ -cells after exposure to hydrogen sulphide. *Diabetologia* 4,239-243.
- [11] Faulk,W.P., and Taylor,G.M.(1971). An immunocolloid method for the electron microscope. *Immunochemistry* 8,1081-1083.
- [12] Forsgren,A. and Sjöquist,J.(1966). 'Protein A' from *S.aureus*. I. Pseudoimmune reaction with human  $\gamma$ -globulin. *J.Immunol.* 97, 822-827
- [13] Fritz,P.,Hoenens,J.,Schenk,J.,Mischlinski,A.,Grau,A.,Saal,J.G., Tuzcek,H.V.,Hulthaupt,H., and Pfeleiderer,G.(1986). Colour development of immunogold-labelled antibodies for light microscopy. *Histochemistry* 85,209-214.
- [14] Fujimori,O. An efficient protein A gold-silver staining method for light microscopic immunohistochemistry. *Z.Mikrosk.Anat. Forsch.* (in press)
- [15] Fujimori,O. A routine immunogold-silver staining method for detection on tissue antigens in light microscopy. (in preparation)
- [16] Fujimori,O., and Nakamura,M.(1985). Protein A gold-silver staining method for light microscopic immunohistochemistry. *Arch.histol.jap.* 48,449-452.
- [17] Fujimori,O., Tsukise,A., and Yamada,K. Histochemical demonstration of zinc in the rat epididymis using a sulphide-silver method. *Histochemistry* (in press)
- [18] Geoghegan,W.D.,Scillian,J.J., and Ackerman,G.A.(1978). The detection of human B lymphocytes by both light and electron

- microscopy utilizing colloidal gold labeled anti-immunoglobulin. Immunological Communications 7, 1-12.
- [19] Geuze, H.J., Slot, J.W., van der Ley, P.A., and Scheffer, R.C.T. (1981). Use of colloidal gold particles in double labeling immunoelectron microscopy of ultrathin frozen sections. J. Cell Biol. 89, 653-665.
- [20] Goding, J.W. (1978). Use of staphylococcal protein A as immunological reagent. J. Immunol. Methods 20, 241-253.
- [21] Gu, J., Mey, J.D., Moeremans, M., and Polak, J.M. (1981). Sequential use of the PAP and immunogold staining methods for the light microscopical double staining of tissue antigens. Its application to the study of regulatory peptide in the gut. Regulatory Peptide 1, 365-374.
- [22] Guesdon, J.-L., Ternynck, T., and Avrameas, S. (1979). The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic technique. J. Histochem. Cytochem. 27, 1131-1139.
- [23] 浜野 裕司・須賀 恒夫 (1978). 現像処理, 日本写真学会編 写真工学の基礎-銀塩写真篇, コロナ社, 東京, 299-322.
- [24] 浜島義博 (1975). フェリチン抗体法, 浜島・京極 免疫組織学 3版, 医学書院, 東京, 215-237.
- [25] 浜島義博・安田健次郎 (1971). 蛍光抗体法・酵素抗体法, 医学書院, 東京, 3-62.
- [26] Holgate, C.S., Jackson, P., Cowen, P.N., and Bird, C.C. (1983). Immunogold-silver staining: New method of immunostaining with enhanced sensitivity. J. Histochem. Cytochem. 31, 938-944.
- [27] Horisberger, M. (1981). Colloidal gold: A cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and

- scanning electron microscopy. Scanning electron microscopy 11.  
9-31, 1981.
- [28] Horisberger, M., and Rosset, J. (1977). Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 25, 295-305.
- [29] 川生 明 (1983). 図説 蛍光抗体法, ソフトサイエンス社, 東京, 1-41.
- [30] Lee, W. E., and Brown, E. R. (1977). The developing agents and their reactions. In : James, T. H. (ed) *Theory of photographic process.* MacMillan, New York, London, 291-334.
- [31] Lüppo-Cramer, H. (1914). Neue Untersuchungen zur Theorie der photographischen Vorgagen. *Photographische Korrespondenz* 640, 28-34.
- [32] Mace, M. L., Van, N. T., and Conn, P. N. (1977). Electron microscopic localization of DNA-dependent RNA polymerase binding sites of DNA using enzyme immobilized on colloidal gold. *Cell Biol. Intern. Rep.* 1, 527-533.
- [33] Moeremans, M., Daneels, G., Dijck, A. V., Langanger, G., and Mey, J. D. (1984). Sensitive visualization of antigen-antibody reactions in dot and blot immune overlay assays with immunogold and immunogold/silver staining. *J. Immunol. Methods* 74, 353-360.
- [34] 名倉 宏・小松 遼至 (1985). 電顕酵素抗体法の染色手技. 渡辺・中根 酵素抗体法 (改訂版), 学際企画, 東京, 137-167.
- [35] Nakamura, M., Fujimori, O., Fujii, S., and Shimada, T. (1982). An improved sulphide silver method using hydroquinone derivatives in physical developer. *Proc. Japan Acad.* 58, ser. B, 323-326.
- [36] Nakane, P. K. (1968). Simultaneous localization of multiple tissue



- antigens using the peroxidase-labeled antibody method ; a study on pituitary glands of the rat. *J.Histochem.Cytochem.* 16,557-560.
- [37] Nakane,P.K.(1975). Recent progress in the peroxidase-labeled antibody method. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 254,203-211.
- [38] Nakane,P.K., and Pierce, G.G.(1966). Enzyme-labeled antibodies : preparation and application for localization of antigens. *J.Histochem.Cytochem.* 14,929-931.
- [39] 大塚長康・朝子 恭・片岡 昭 (1965). 各種ホ乳類の海馬領域における亜鉛について. *解剖学雑誌* 40,267-273.
- [40] Pihl,E.(1967). Ultrastructural localization of heavy metal by a modified sulphide-silver method. *Histochemie* 10,126-139.
- [41] Pihl,E.,and Falkmer,S.(1967). Trials to modify the sulphide-silver method for ultrastructural tissue localization of heavy metals. *Acta Histochem.* 27,34-41.
- [42] Riggs,J.L.,Seiwald,R.J.,Burckholter,J.H.,Downs,C.M., and Metcalf,T.J.(1958). Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum. *Amer.J.clin.Path.* 34,1081-1097.
- [43] Romano,E.L., and Romano,M.(1977). Staphylococcal protein A bound to colloidal gold : A useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy. *Immunochimistry* 14,711-715.
- [44] Roth,J.(1982). Application of immunocolloids in light microscopy. Preparation of protein A-silver and protein A-gold complexes and their application for localization of single and multiple antigens in paraffin sections. *J.Histochem.Cytochem.* 30,691-696.
- [45] Roth,J.(1983). Application of immunocolloids in light microscopy. II. Demonstration of lectin-binding sites in paraffin

- sections by the use of lectin-gold or glycoprotein-gold complexes. *J.Histochem.Cytochem.* 31,547-552.
- [46] Roth,J.,and Binder,M.(1978). Colloidal gold, ferritin and peroxidase as markers for electron microscopic double labeling lectin techniques. *J.Histochem.Cytochem.* 26,163-169.
- [47] Roth,J.,Bendayan,M.,and Orci,L.(1978). Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A gold complex. *J.Histochem.Cytochem.* 26,1074-1081.
- [48] Roth,J.,Ravazzola,M.,Bendayan,M., and Orci,L.(1981). Application of the protein A-gold technique for electron microscopic demonstration of polypeptide hormones. *Endocrinology* 108,247-253.
- [49] Schell,V.H.,and Horstein,O.P.(1974). Über den histochemischen Nachweis von Zink im menschlichen Nebenhoden. *Acta Histochem.* 48,232-256.
- [50] Slot,J.W., and Geuze,H.J.(1981). Sizing of protein A colloidal gold probes for immunoelectron microscopy. *J.Cell Biol.* 90,533-536.
- [51] Springall,D.R.,Hacker,G.W.,Grimelius,L., and Polak,J.M.(1984). The potential of the immunogold-silver staining method for paraffin sections. *Histochemistry* 81,603-608.
- [52] Sternberger,L.A.,Hardy,P.H.,Jr.,Cuculis,J.J., and Meyer,H.G.(1970). The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry : preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase) and it use in identification of spirochetes. *J.Histochem.Cytochem.* 18,315-333.
- [53] Timm,F.(1958). Zur Histochemie des Ammonshorngebietes. *Z.Zell-*

forsch. 48,548-555.

- [54] Timm,F.(1958). Zur Histochemie der Schwermetalle. Das Sulfid-Silber-Verfahren. Deut.gericht.Med. 46,706-711.
- [55] Timm,F.,and Schulz,G.(1966). Hoden und Schwermetalle. Histochemie 7,15-21.
- [56] 堤 寛 (1985). パラフィン切片による光顕的酵素抗体法. 渡辺・中根 酵素抗体法 (改訂版), 学際企画, 東京, 72-88.
- [57] 堤 寛 (1985). 光顕的酵素抗体法染色における特殊技法. 渡辺・中根 酵素抗体法 (改訂版), 学際企画, 東京, 88-101.
- [58] 堤 寛 (1985). その他の光顕的免疫組織化学. 渡辺・中根 酵素抗体法 (改訂版), 学際企画, 東京, 102-121.
- [59] 内田 隆 (1984). ホルモン産生細胞のためのプロテインA・金コロイド法について. 細胞, 16,52-59.
- [60] Voigt,G.E.(1959). Untersuchungen mit der Sulfidsilbermethode an menschlichen und tierischen Bauchspeicheldrüsen(unter besonderer Berücksichtigung des Diabetes mellitus und experimenteller Metallvergiftungen). Virchows Arch.path.Anat. 322,295-323.
- [61] Waele,M.D.,Mey,J.D.,Renmans,W.,Labeur,C.,Reynaert,P.H., and Camp,B.V.(1986). An immunogold-silver staining method for detection of cell-surface antigens in light microscopy. J.Histochem.Cytochem. 34,935-939.

Tab.1 Optimal dilutions of primary antisera for immunoperoxidase method

Antiserum	dilution
Insulin	1:2000
Glucagon	1:1000
Somatostatin	1:1000
P P	1:2000

Tab.2 Optimal concentrations of primary antisera and PAG for the protein A gold-silver staining method

ANTI-SERUM PAG	INSULIN ★	GLUCAGON •	SOMATOSTATIN •	PANCREATIC POLYPEPTIDE •
P A G ø 10 nm	2000 80	2000 40	2000 40	5000 40
P A G ø 5 nm	10000 320	4000 160	8000 160	20000 160

★: raised in guinea pig

•: raised in rabbit

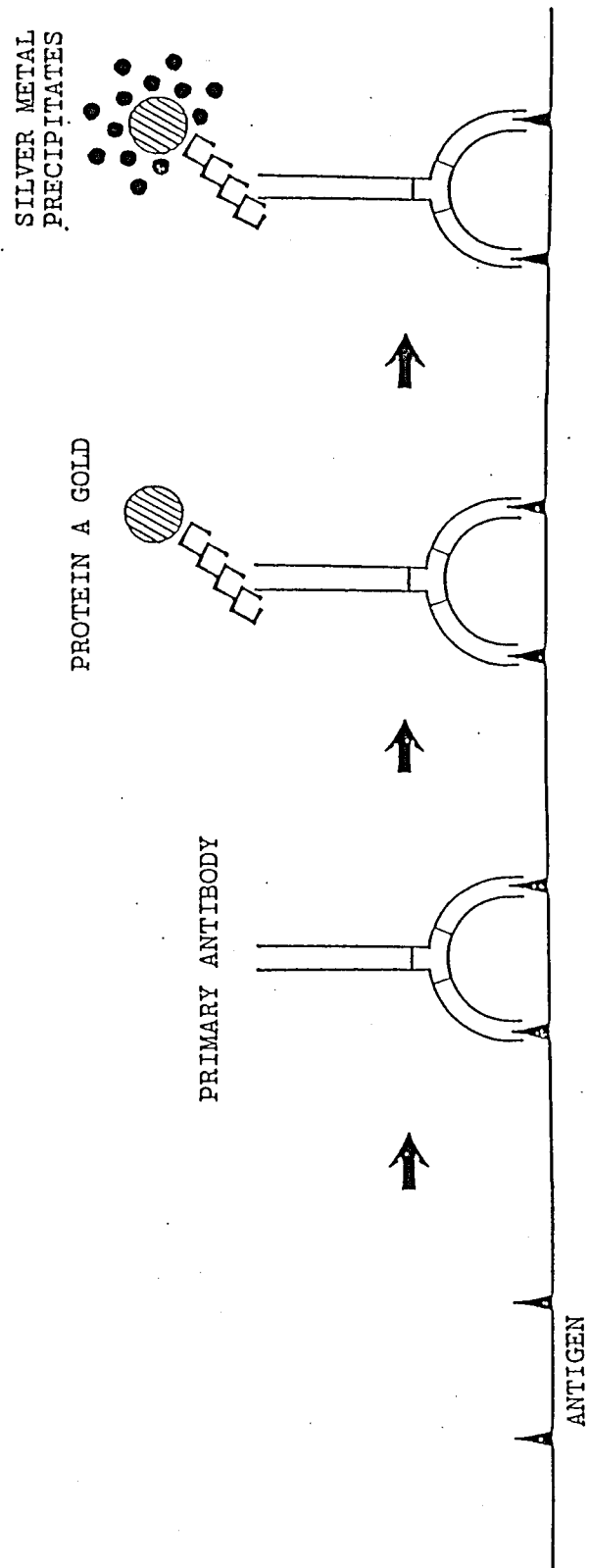
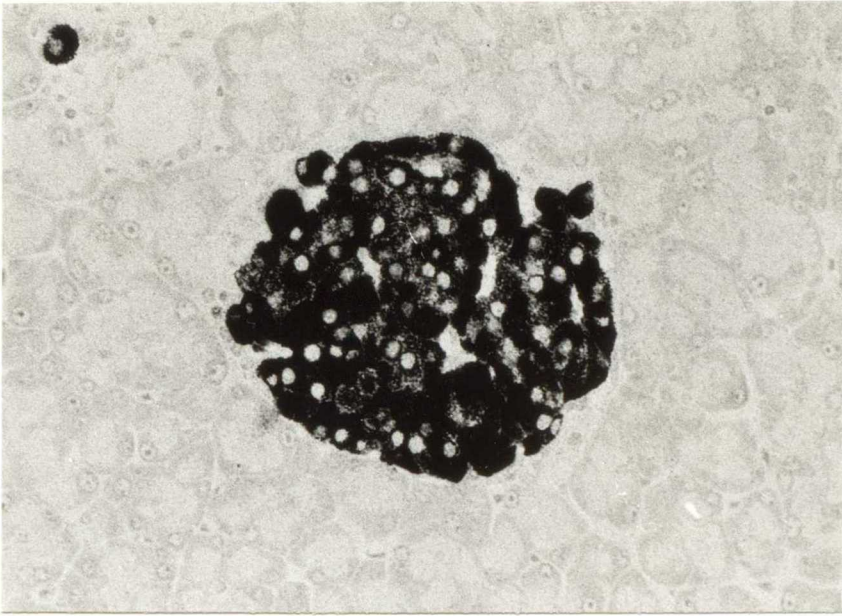
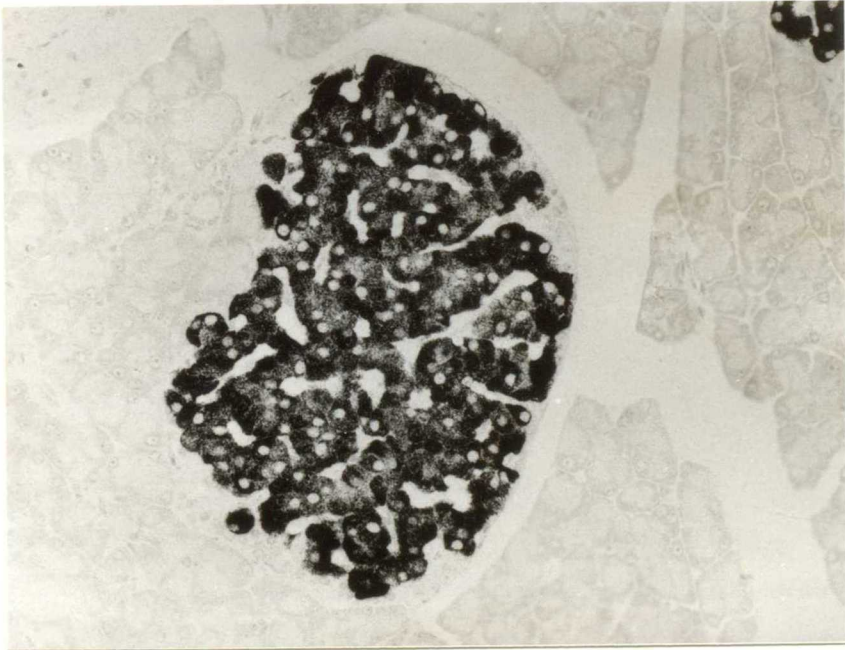


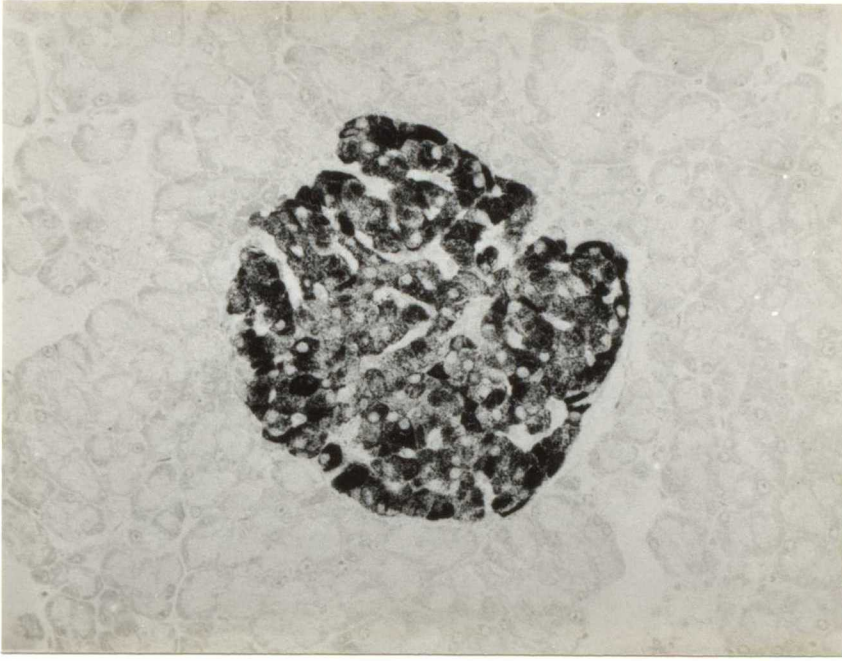
Fig.1 Schematic representaion of PAGS method



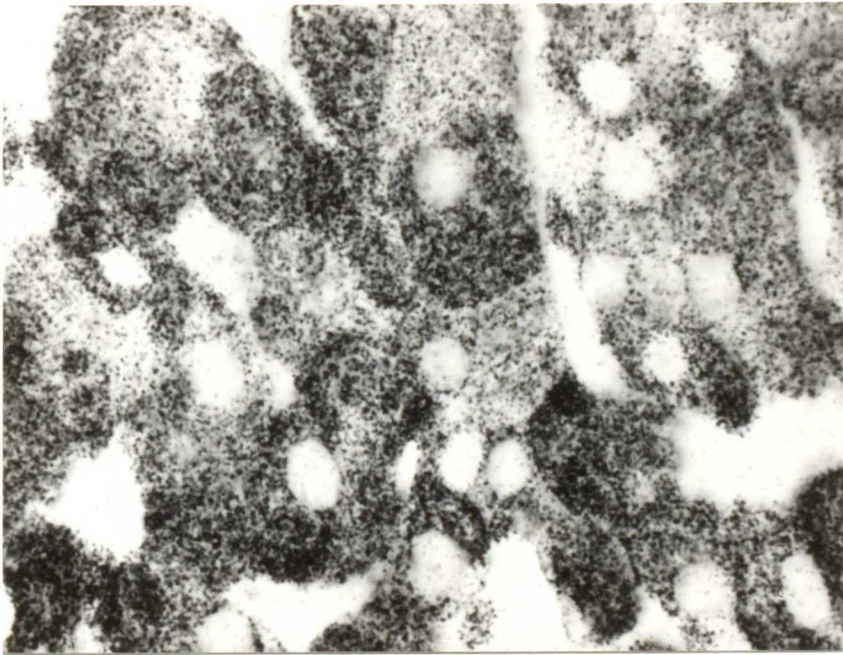
F i g . 2



F i g . 3

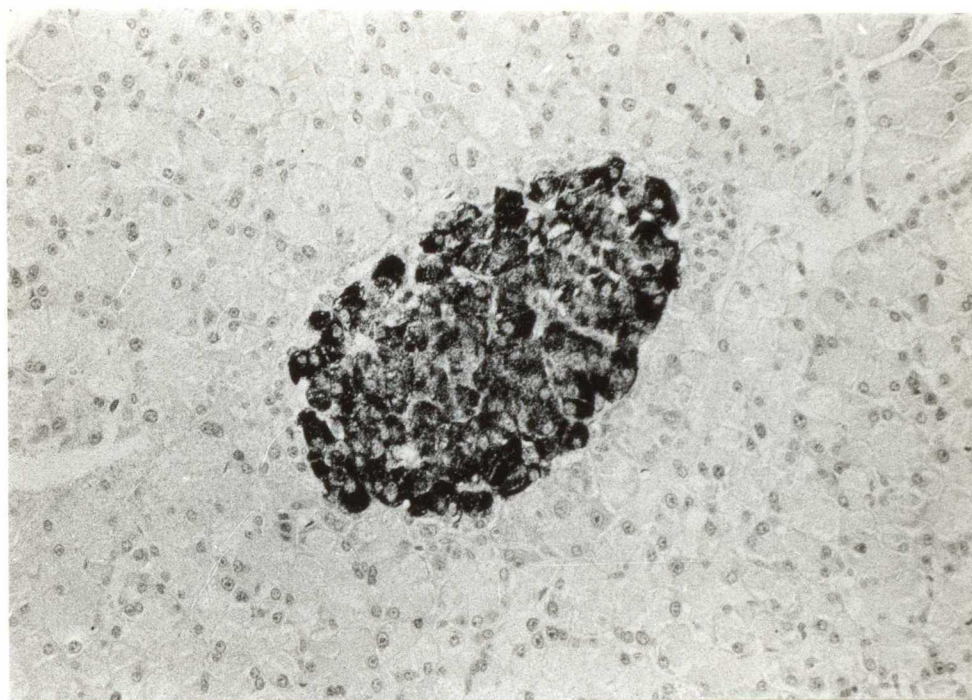


F i g . 4

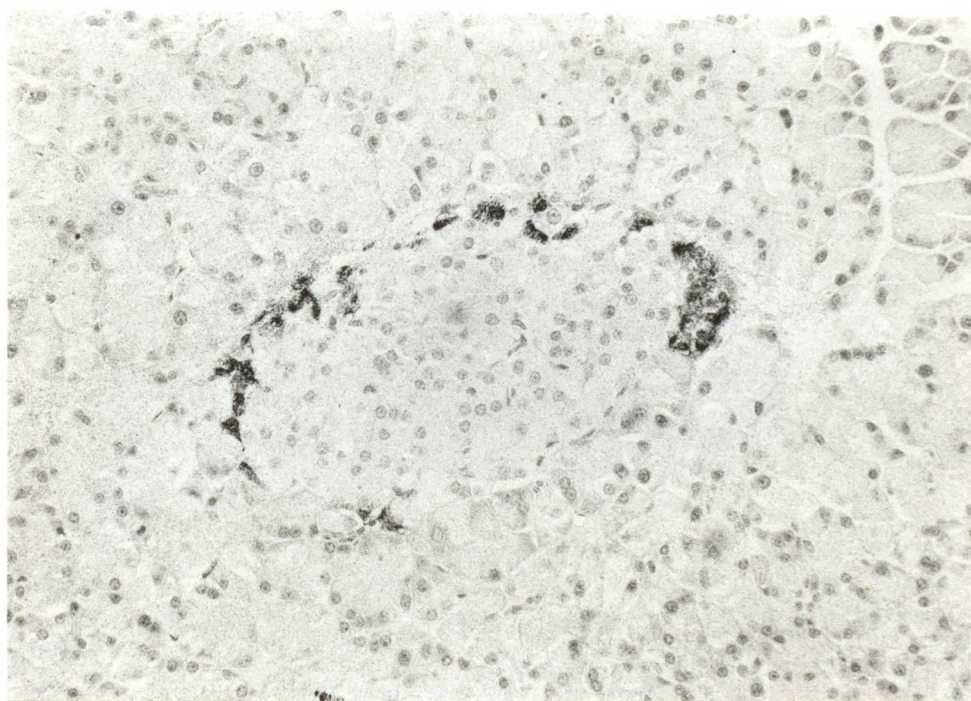


F i g . 5



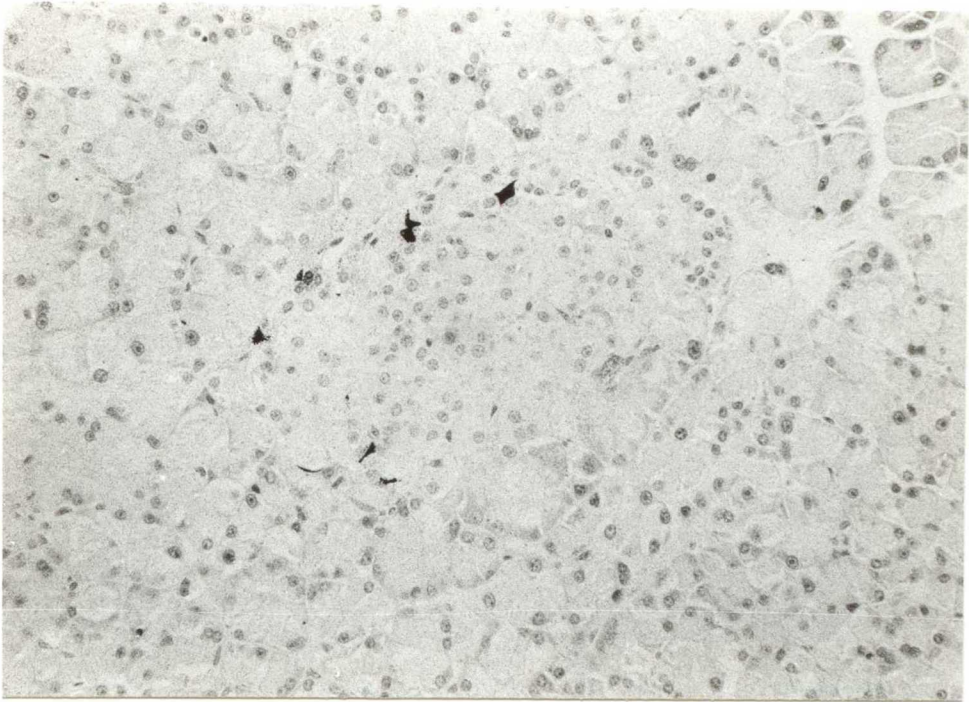


F i g . 6

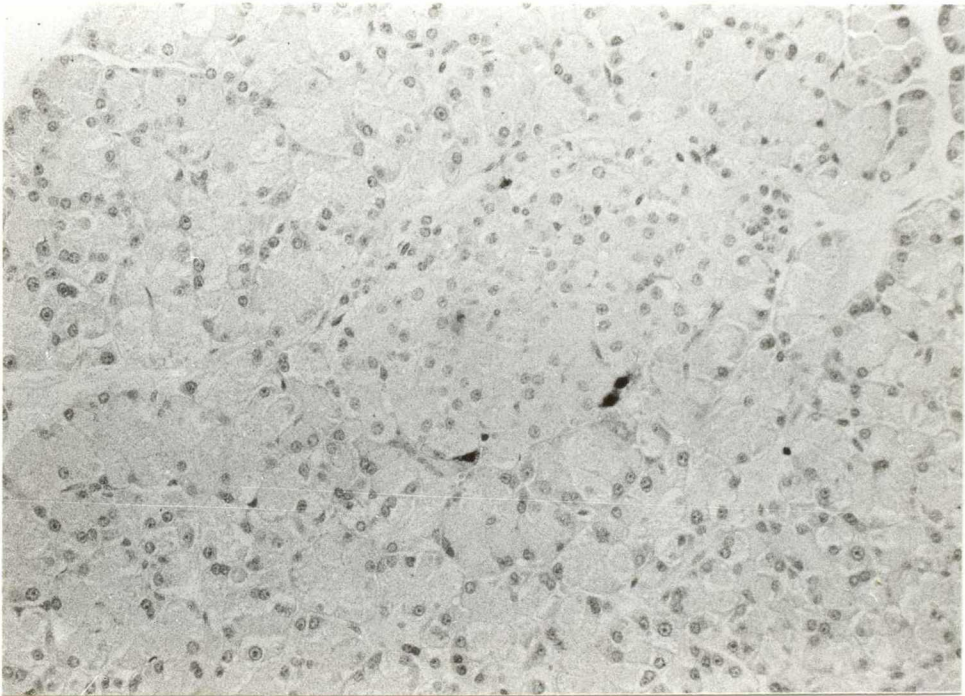


F i g . 7

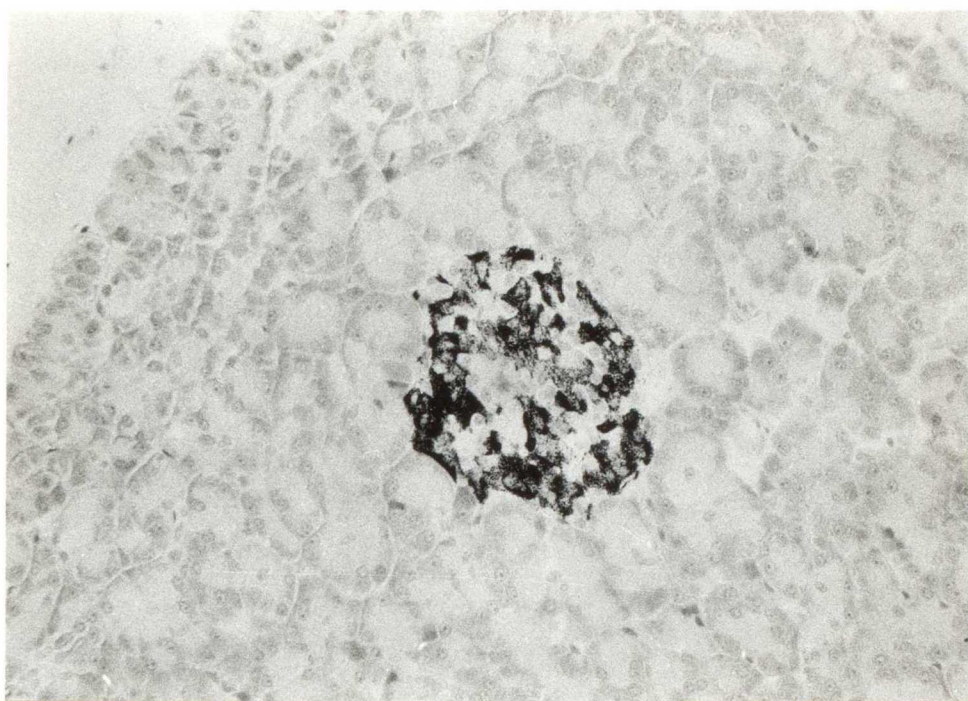




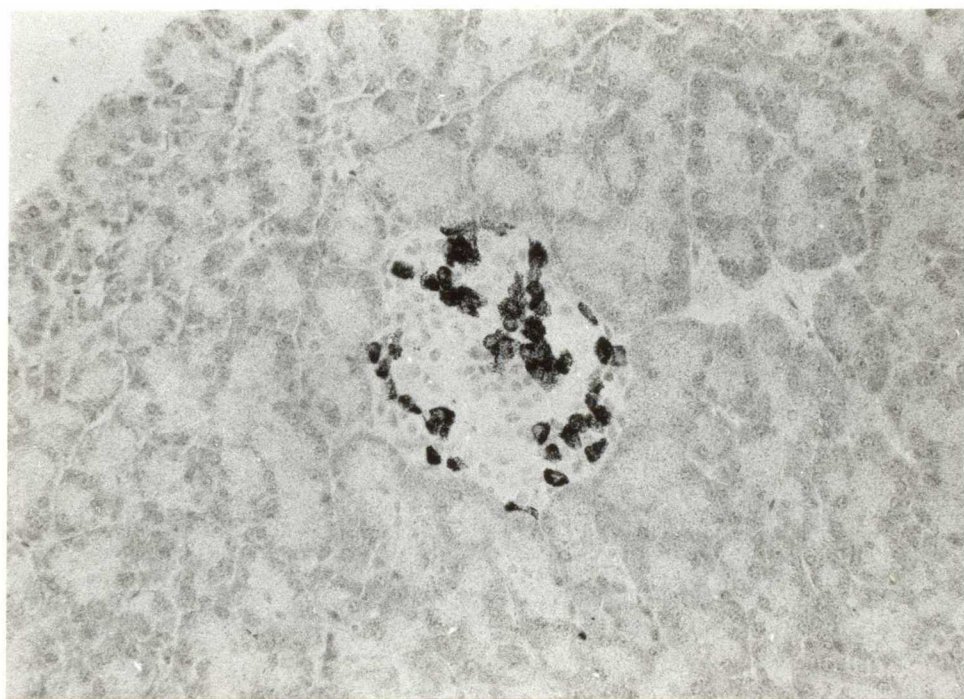
F i g . 8



F i g . 9

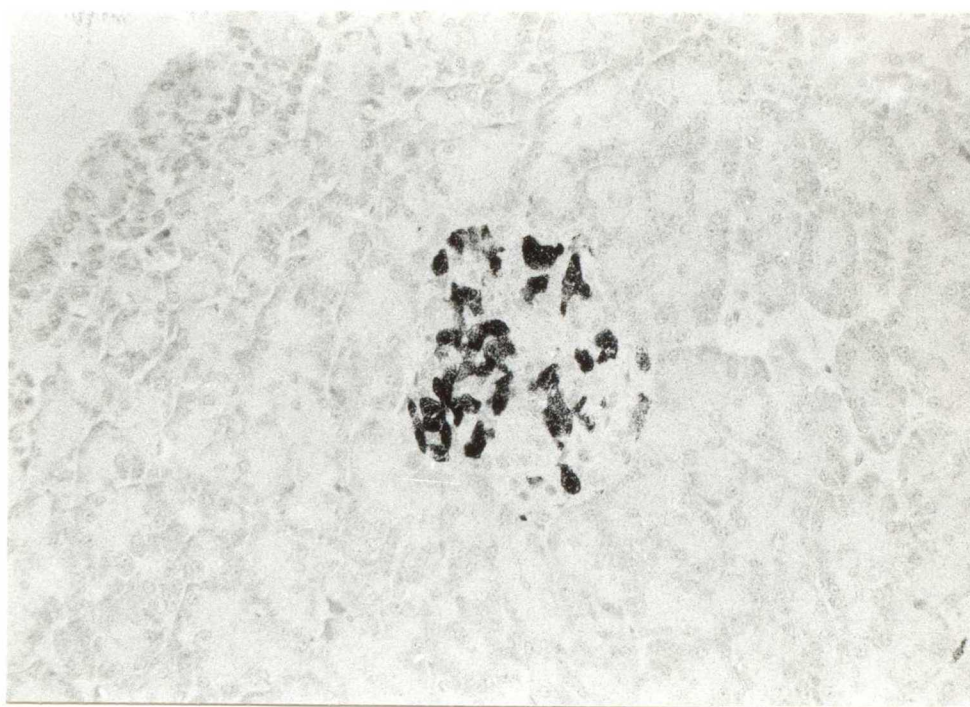


F i g . 1 0

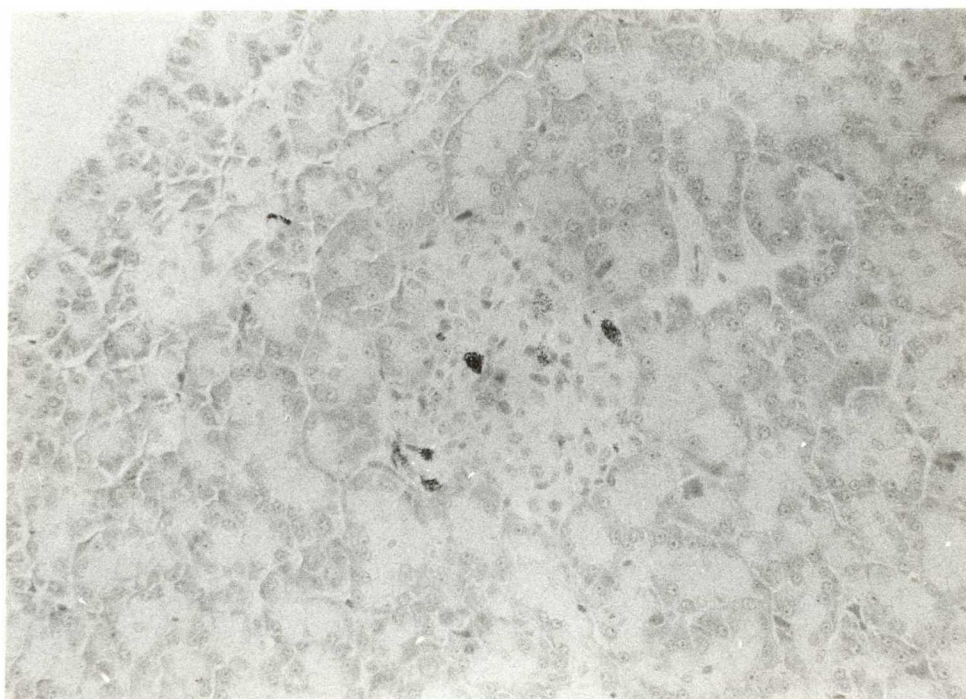


F i g . 1 1





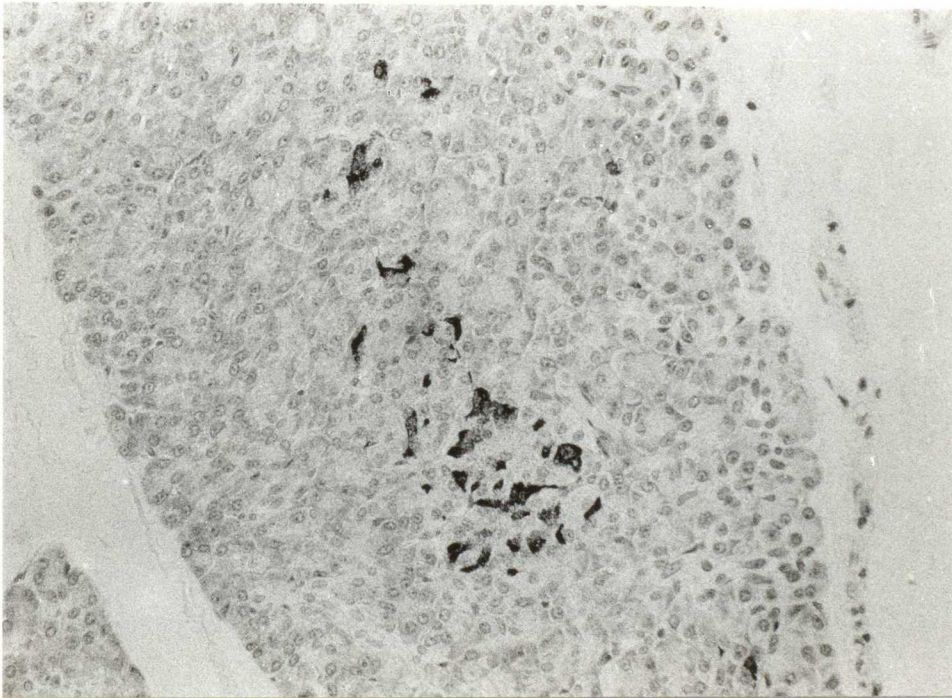
F i g . 1 2



F i g . 1 3

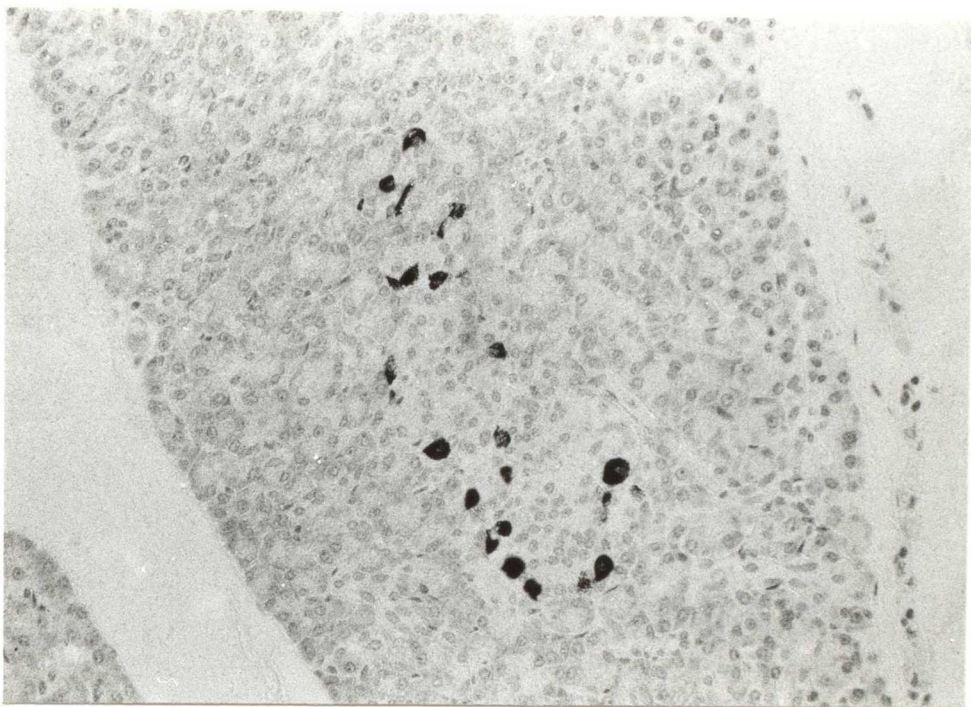


F i g . 1 4

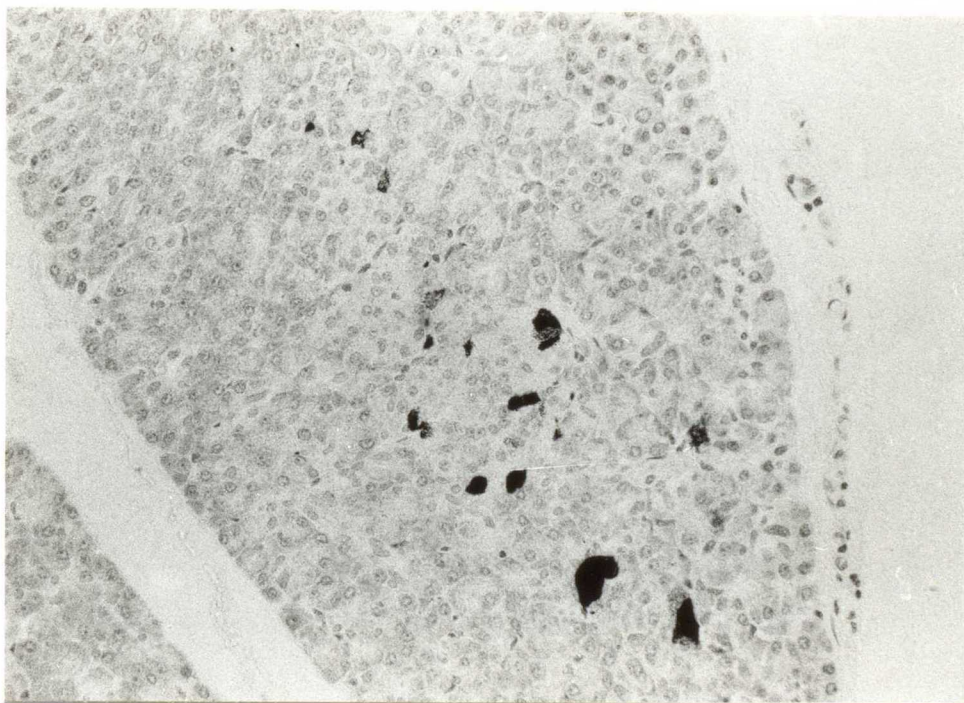


F i g . 1 5

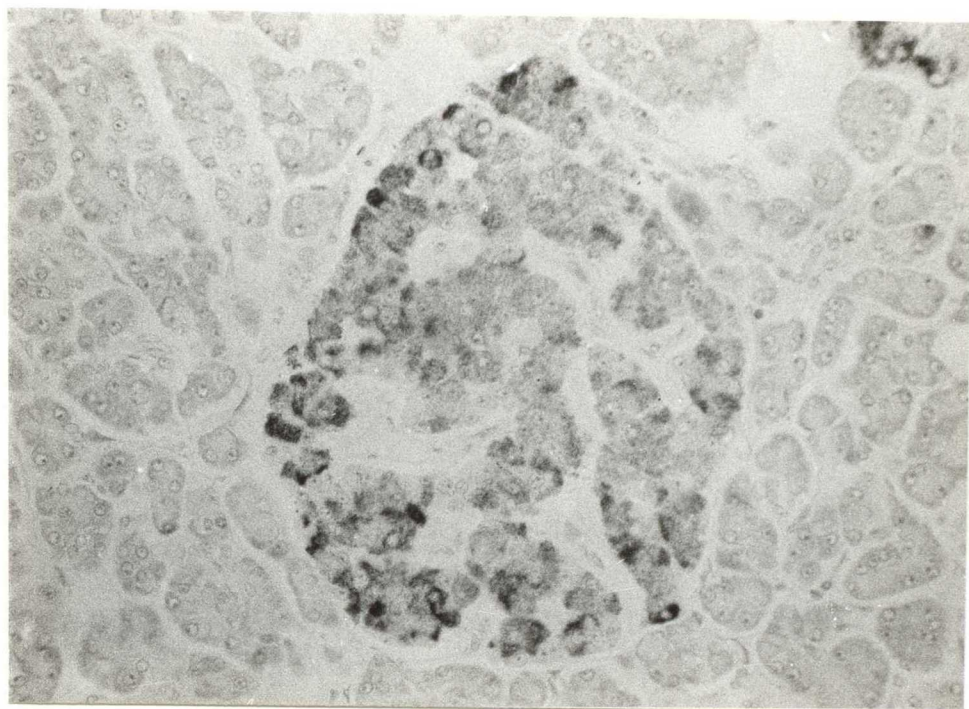




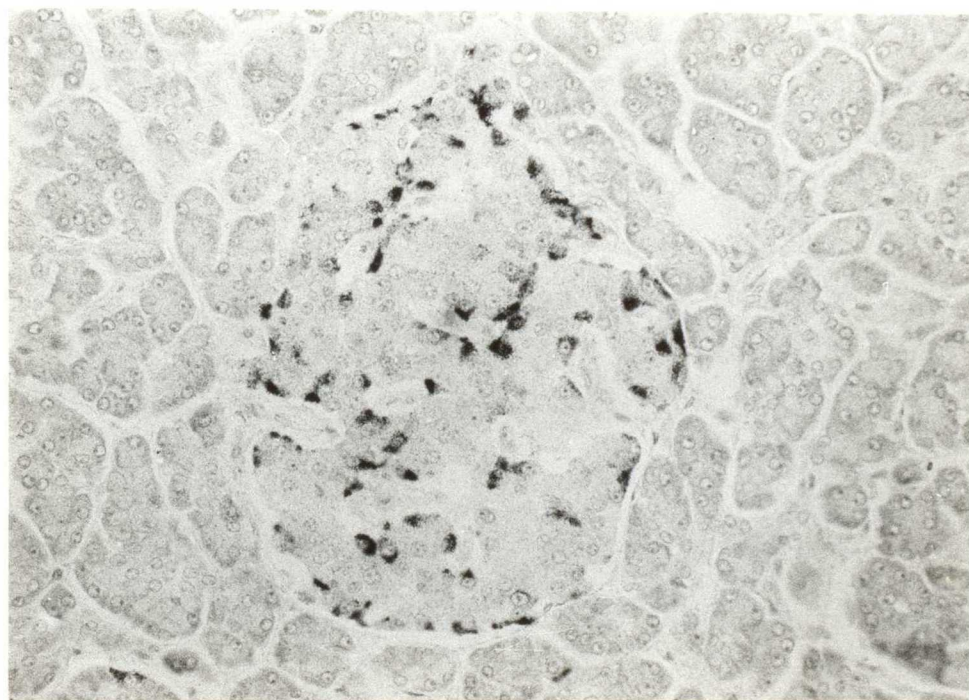
F i g . 1 6



F i g . 1 7

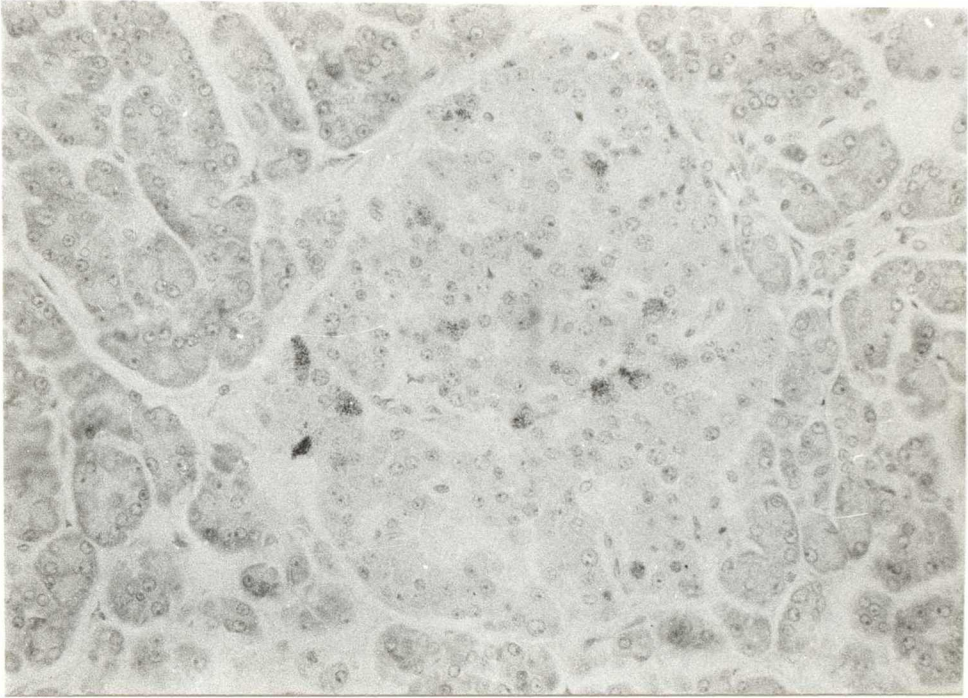


F i g . 1 8

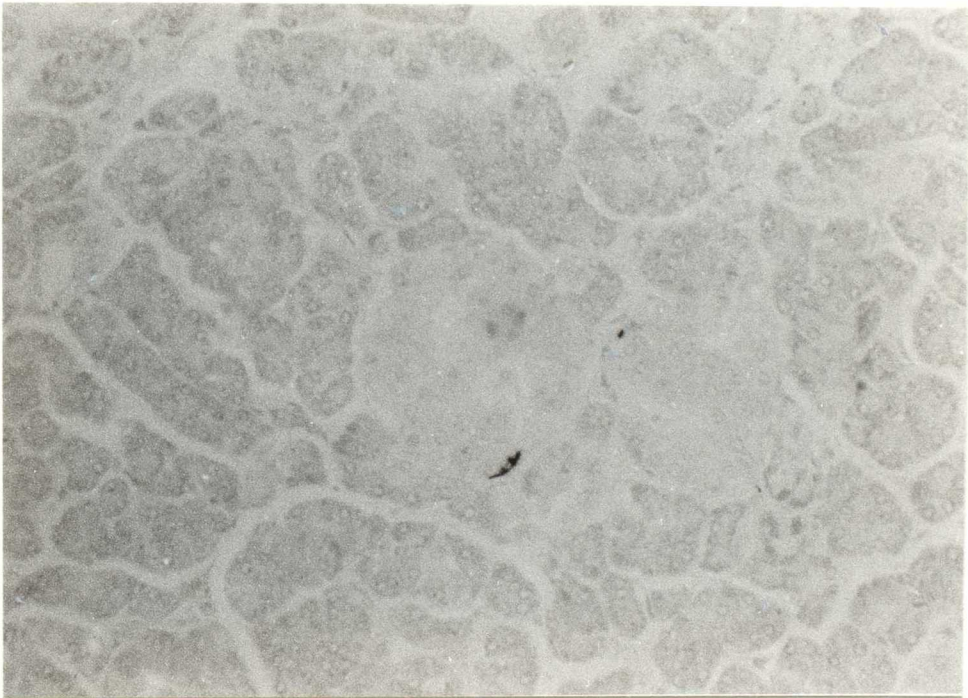


F i g . 1 9

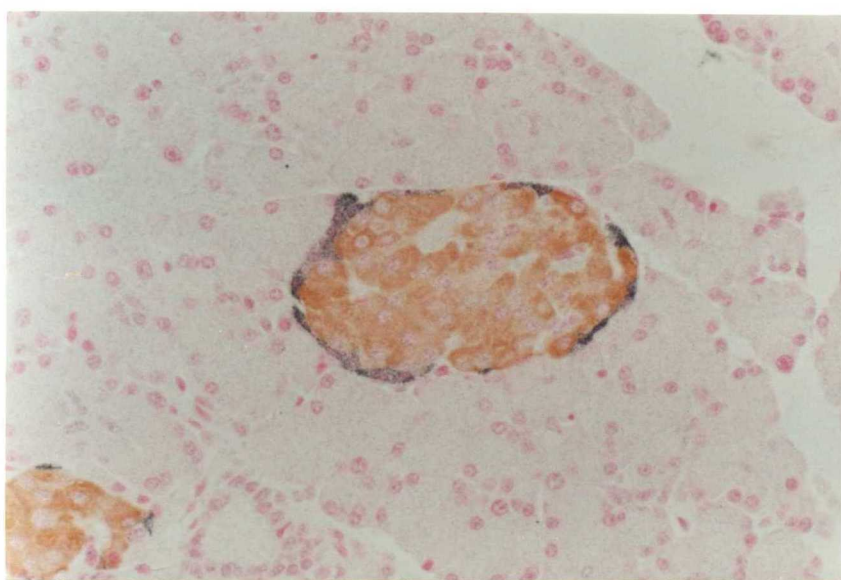




**F i g . 2 0**



**F i g . 2 1**



**F i g . 2 2**