

氏 名 (本籍)	ふじ もり おさむ 藤 森 修 (富山県)
学 位 の 種 類	獣医学博士
学 位 記 番 号	乙第263号
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 教授 野 村 靖 夫 (副査) 教授 江 口 保 暢 教授 小 林 好 作

論 文 内 容 の 要 旨

プロテインAゴールド (PAG) 法は主として電顕免疫組織化学の染色法として用いられている方法であり、種々の動物のIgG-Fcフラグメントと結合する能力をもつプロテインAの性質を利用し、抗原-一次抗体反応部位において一次抗体のFcフラグメントにプロテインAを結合させ、これに標識されているコロイド金粒子を電子顕微鏡下で観察して抗原の局在を間接的に検索するものである。PAG法は電顕免疫組織化学の有効な染色技術として多用されているが、これを光顕免疫組織化学の染色法として応用する試みもなされ、Roth (1982) によって開発された光顕的 PAG 染色法は一応の成果を上げてはいるが、用いる一次抗体および PAG の濃度が高く、反応産物の色調も淡いため広く利用され得る方法ではなかった。この度著者は PAG 法を光顕免疫組織化学染色の有効な方法として活用するために、PAG法に物理現像法を併用し従来の光顕的 PAG 染色法の欠点を改善した新しい染色法の開発を試みた。なお染色法の開発に当たっては、従来の物理現像液にみられる非特異的な金属銀の析出等の問題点を改善した物理現像液を考案した。

組織材料にはブアン液にて固定したラット、イヌ、サルおよびヒトの膵尾部の組織をパラフィン切片として用い、一次抗体には抗インスリン・モルモット血清及び抗グルカゴン、抗ソマトスタチン、抗膵ペプチドのウサギ血清、計4種を使用、PAGは金粒子の径が10nm および 5 nm の2種類を用いた。本染色法に使用する改良物理現像液の組成は以下の通りである。A液: 20%精製アラビアゴム水溶液, 45ml。10%硝酸銀水溶液, 1 ml。B液: プロモハイドロキノン, 200mg。クエン酸, 300mg。蒸留水, 15ml。現像液は使用時にA, B両液を混合して作成し、現像は20℃の暗黒中で行なった。対照染色としては吸収試験および阻止試験を行なって染色の特異性を検討し、さらに現像液の特性を比較するために他の物理現像液を用いた染色も試みた。

ラットの膵臓で、抗インスリン抗体と金粒子の径10nm の PAG を用いて行なった Protein A gold-silver (PAGS) 染色の結果によれば、膵島中心性に黒色の強い反応を示す細胞集団が認められ、対照染色の結果からこれらの反応産物はインスリン分泌細胞に特異的に反応していることが明かであった。即ち物理現像を施すことにより抗原局在部位に結合する金粒子に金属銀を沈着させ、これを黒色の反応産物として光顕的に可視化することが可能になった。その染色所見では反応産物と組織とのコントラストは極めて鮮明であり、本染色法が反応の増強性と反応産物の可視性に優れた方法であることを示唆していたが、反応の強度はむしろ強すぎる傾向にあり、使用した一次抗体及び PAG の濃度も比較的高濃度であるため、適度な染色強度と

高い感度を有する染色法とするためにさらに改良を行なった。また一般的な免疫染色法として活用されるためには幅広い適用性が要求されるので、このことについて検討するために他の抗体を用いる免疫染色および他の動物組織を用いる免疫染色、さらに酵素抗体法との組み合わせによる二重染色も行なった。その結果、10nm の PAG を用いる染色ではインスリン抗体濃度：2000 倍、PAG 濃度：80 倍で 70～80 分の現像により適度な反応強度が得られ、かつ非特異反応の極めて少ない PAGS 染色が可能であった。さらに本染色法の感度を向上させるために金粒子の径が 5 nm の PAG を用いて染色を試みたところ、本染色法の感度は飛躍的に向上した。また他の膵島ホルモン抗体を用いてラットの膵島で本染色法による免疫染色を試みたところ、いずれの抗体を用いた染色においてもインスリン抗体による染色と同様の優れた染色結果を得ることができた。さらに各膵島ホルモン抗体を用いてイヌ、サルおよびヒトの膵島について染色を試みても同様の結果を得ることができた。現在免疫染色法として最も一般的な間接酵素抗体法などの immunoperoxidase 法と比較すると、本染色法では用いる一次抗体および二次抗体に相当する PAG の希釈倍率では同等あるいは数倍の感度を有し、またコントラストの高い黒色顆粒状の強い反応産物はその可視性の点においてむしろ優れていた。さらに PAGS 染色法と酵素抗体法を組み合わせる A 細胞と B 細胞の二重染色を試みたところ、A 細胞は PAGS 染色法によって黒色に、B 細胞は酵素抗体法によって茶褐色に染め分けられ、両染色法による反応産物は色調の対比が明瞭で、相互の識別が容易であった。その上、 α -ナフトールと DAB を発色剤として使用する酵素抗体法による従来の二重染色法とは異なり、本二重染色法では通常の脱水、封入が可能であり標本の保存性が高かった。

なお対照染色では、各抗体を対応する抗原で吸収した吸収試験と PAG の一次抗体への結合をブロックした阻止試験はともに反応が陰性であり、本染色法の有する高い特異性が確認された。

改良物理現像液にかえて、物理現像液として代表的な Danscher の現像液およびその一変法である Moeremans の現像液を PAGS 染色法に適用して現像液の比較を行なったところ、2 種の現像液のいずれを用いても本染色法特有の染色結果は得られず、改良現像液は現像力の強さと現像力の持続性ならびに非特異反応が少ないなどの点で他の物理現像液に比べ優れていることが裏付けられた。従って本染色法の特徴である反応の強い増強性と高い特異性は改良物理現像液の特性に起因するものである。本現像液では還元剤としてプロモヒドロキノンを使用し、保護コロイドのアラビアゴムを超遠心によって精製して用いている。プロモヒドロキノンはヒドロキノンに比較して極めて強い還元力を有しているため本現像液の現像力は著しく高まり、かつ精製アラビアゴムを用いることで現像液の自己触媒作用が抑えられて非特異的な金属銀の析出を長時間にわたって防止できた。これらのことが、極めて微量な金粒子を光顕的に可視化するために必要な、強い現像力と長時間の現像を可能にしたものと考えられた。

本研究において確立された 10nm または 5 nm の PAGS を用いる PAGS 染色法の基本的染色要領は下記に示す通りである。

1. 切片を脱パラフィンする。
2. 0.01 M 磷酸緩衝食塩液 (PBS) にて 5 分間 3 回、計 15 分洗浄する。
3. 5% 卵白アルブミン PBS 溶液にて湿箱中で処理する。30 分。
4. 一次抗体と湿箱中で 60～90 分反応させる。
5. PBS で抗体を洗い流し、さらに PBS 中で 10 分 3 回、計 30 分洗浄する。

6. 5%卵白アルブミン PBS 溶液にて湿箱中で15分処理する。
7. PAG 液と湿箱中で60分反応させる。
8. 0.01 M 磷酸緩衝液 (PB) にて PAG を洗い流し、さらに PB 中で10分3回、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、現像液より切片を取り出し流水で1分水洗し検鏡して行なう。現像が不充分の場合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. 5倍に希釈した写真用定着液にて1分定着する。
12. 流水中で10分水洗する。
13. ケルンエヒトロートで軽く核染色する。
14. 流水中で5分水洗する。
15. エタノールで脱水、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。

本染色法は従来の光顕免疫染色法と比較すると反応の増強性、特異性、感度ならびに反応産物の可視性が優れた染色方法であり、染色操作も簡便で、使用する一次抗体および PAG を高希釈で用いるため経済性の高い有用な方法である。さらに大きな特徴として、プロテイン A が数種の動物の IgG-Fc フラグメントに結合する能力を有するので染色に用いる一次抗体の作成動物を一種に限定しないという利点があげられ、また本染色法と酵素抗体法とを組み合わせると既存の方法より優れた二重染色法も可能である。以上、本研究で開発した PAGS 染色法は多くの優れた特徴を有する染色法であり、光顕免疫染色法として普遍的に活用し得る技術であると考えられる。

論 文 目 録

Ultrastructural studies of the pancreatic polypeptide cell of the rat with special reference to pancreatic regional differences and changes induced by alloxan diabetes.

Nakamura, M., Shimada, T. and Fujimori, O.

Acta anat. vol. 108, 193-201, 1980.

An improved sulphide silver method using hydroquinone derivatives in physical developer.

Nakamura, M., Fujimori, O., Fujii, S. and Shimada, T.

Proc. Japan Acad., vol. 58, ser. B, 323-326, 1982.

Light and electron microscopic studies on the cytological changes in the rat pancreatic islets induced by sodium diethyl dithiocarbamate (DEDTC) administration.

Nakamura, M., Fujimori, O., Shimada, T. and Kitamura, H.

Acta anat. vol. 119, 86-93, 1984.

Protein A gold-silver staining method for light microscopic immunohistochemistry

Fujimori, O. and Nakamura, M.

Arch. histol. jap. vol. 48, 449 - 452, 1985.

Light and electron microscopic studies on capillaries of the goat cardiac muscle with special reference to the topographical relationship between the vessels and Purkinje fibers.

Shimada, T., Kitamura, H., Fujimori, O. and Itose, M.

Acta anat. vol. 124, 127 - 132, 1985.

ゲルカゴノーマ担癌ハムスターにおける脾島B細胞の形態的および機能的変化

浜口和之, 藤森 修, 中村三雄, 小野順子, 山口啓輔, 横川 泰, 高木良三郎

癌の臨床, vol. 31, 464 - 467, 1985.

Microencapsulation of pancreatic islets. A technique and its application to culture and transplantation.

Hamaguchi, K., Tatsumoto, N., Fujii, S., Okeda, T., Nakamura, M., Fujimori, O. and Takaki, R.

Diabetes research and clinical practice vol. 2, 337 - 345, 1986.

Histochemical demonstration of zinc in rat epididymis using a sulphide-silver method.

Fujimori, O., Tsukise, A. and Yamada, K.

Histochemistry vol. 88, 469 - 473, 1988.

An efficient protein A gold-silver staining method for light microscopic immunohistochemistry.

Fujimori, O.

Zeitschrift fur mikroskopisch-anatomische Forschung (accepted)

The histochemistry of glycoconjugates in the goat nasolabial skin with special reference to eccrine glands.

Tsukise, A., Fujimori, O. and Yamada, K.

Acta anat. (accepted)

論文審査の結果の要旨

電顕的免疫組織化学染色に用いられている Protein A gold (PAG) は, Roth(1982)によつて初めて光顕免疫組織化学染色に使用されたが, 一次抗体と PAG を高濃度で使用する割には, 反応産物の色調が淡く, まだ実用的な方法とはなっていない。本論文は, PAG と改良した物理現像液を組み合わせた, 新しい光顕

的免疫染色法としての Protein A gold-silver 染色法 (PAGS 染色法) の開発とその特性を記述したものである。

本研究に用いられた材料は、ブアン固定、パラフィン包埋のラット、イヌ、サルおよびヒトの膵臓組織切片：抗インスリン-モルモット血清、抗グルカゴン、抗ソマトスタチン、抗膵ペプチドのウサギ血清の計4種の抗体：粒子径の異なる2種の PAG；20%精製アラビアゴム液を保護コロイドとする硝酸銀とプロモハイドロキノンを主剤とする現像剤より成る改良物理現像液である。

基本的な染色手順は、下記の通りである。

- 1) 脱パラフィン
- 2) 0.01 M 磷酸緩衝食塩液 (PBS) で、5分づつ3回、計15分洗浄。
- (3) 5%卵白アルブミン-PBS 溶液処理、30分。
- (4) 1次抗体と60~90分反応させる。
- 5) PBS で抗体を洗い流し、さらに PBS で10分づつ3回、計30分洗浄。
- (6) 5%卵白アルブミン-PBS 溶液処理、15分。
- (7) PAG と60分反応させる。
- 8) 0.01 M 磷酸緩衝液 (PB) で、PAG を洗い流し、さらに PB で、10分づつ、3回、計30分洗浄。
- 9) 遮光し、20℃で物理現像。*
- 10) 流水で、5分間水洗。
- 11) 5倍希釈の写真用定着液で、1分間定着。
- 12) 流水で、10分間水洗。
- 13) Kernechtrot で、核染色。(軽く)
- 14) 流水で、5分間水洗。
- 15) エタノールで脱水、キシロールで透徹、ビオライトまたはバルサムで封入。

(註) 番号を () でかこんだステップは、全て湿潤箱中で実施。

* 物理現像の結果の判定には、切片を現像液より取り出し、流水で1分間水洗した後、鏡検。現像が不十分な場合は、蒸留水で洗った後、再び現像液へ。

対照染色としては、吸収試験と阻止試験を行って、免疫組織化学的反応の特異性を検討し、加えて物理現像液の特性の比較を行った。

著者は、まずラットの膵臓を抗インスリン抗体と10nm-PAG で染色し、改良物理現像液で現像して膵島に黒色の強い反応を示す細胞集団を見出し、対照染色と対比して、その反応が、インスリン分泌細胞に一致していると結論した。このラット膵臓組織の染色が、PAGS 染色法の基本となったが、酵素抗体法における抗体濃度を参考としたところ一次抗体および PAG の濃度が比較的高かったため、PAG の金粒子に対する銀粒子の沈着が塊状となり、細部の観察に不都合であった。そこで適当な染色強度を保ちつつ、より高い感度を得るための改良がなされ、併せて適用範囲についての検討も行われた。

10nm-PAG を用いた染色では、2000倍希釈の抗インスリン抗体と80倍希釈の PAG を用いた場合、70~80分間の物理現像で適当な色調の反応産物が得られ、非特異反応は極めて少なかった。さらに 5 nm-PAG を用いた染色では、感度が飛躍的に向上した。他の膵島ホルモンに対する抗体を用いて、ラット膵島を染め

た場合、また各種膵島ホルモンに対する抗体を用いてイヌ、サルおよびヒト膵島を染めた場合にも抗インスリン抗体でラット膵島を染めた場合と同様の明瞭な黒色反応産物が得られ、適用範囲拡大の可能性が示唆された。

間接酵素抗体法と比較すると PAGS 染色法は、一次抗体および二次抗体に相当する PAG の希釈倍率で、同等ないし数倍の感度を有し、コントラストの強い黒色顆粒状反応産物は、その可視性に優れていた。

PAGS 染色法と酵素抗体法を組み合わせた膵島の二重染色では、A 細胞と B 細胞が反応産物の色の違いから極めて容易に識別出来たほか、通常の脱水、封入も可能であった。

各抗体を対応する抗原で吸収した吸収試験と PAG の一次抗体への結合を未標識プロテイン A でブロックした阻止試験では、反応は陰性となり、PAGS 染色法の特異性が確認された。

改良物理現像液のかわりに Danscher の現像液とその変法である Moeremans の現像液を PAGS 染色法に適用してみたが、PAGS 染色特有の染色結果は得られなかった。

著者は、この PAGS 染色法の特徴である免疫組織化学的反應の著しい増強と高い特異性を改良物理現像液の特性に帰し、極めて強い還元力を有するプロモハイドロキノンによる現像力の増強と超遠心によって精製したアラビアゴムを保護コロイドとして用いたことによる自己触媒作用の抑制、非特異的金属銀析出防止が、極めて微量の金粒子を可視化するために必要な長時間にわたる物理現像を可能にしたと考察している。

以上の如く、PAGS 染色法は、免疫組織化学的反應の増強性、特異性、感度、反応産物の可視性などの点で優れた特徴を有し、染色操作も大して煩雑ではなく、抗体や PAG を高希釈で使用できるので経済的でもある。さらにプロテイン A が、数種の動物の IgG-Fc フラグメントと結合する能力を有するため、一次抗体作成動物を限定せず、酵素抗体法との二重染色も容易で、応用範囲拡大の可能性が大いと考えられる。

従って、著者による新しい光顕的免疫染色法 (Protein A gold-silver 染色法) の開発は様々な分野における機能形態学的研究に対して、新しい研究手段を提供するもので、獣医学博士の学位を授与するにふさわしい業績であると考えらる。