

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

論文要旨

藤森 修

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5nm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、1ml。B液：ブ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、10 nm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と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ブロモハイ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。ブロモハイドロキノンはハイ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5nm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ことで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。