

螢光抗体法・酵素抗体法

日本大学教授

浜島義博

北里大学教授

安田健次郎

医学書院

螢光抗体法・酵素抗体法

日本大学教授

浜島 義博

北里大学教授

安田 健次郎

医学書院

螢光抗体法・酵素抗体法

¥ 16,000

1971年12月15日 第1版1刷

著者 ^{はま} 濱 ^{しま} 島 ^{よし} 義 ^{ひろ} 博
 ^{やす} 安 ^だ 田 ^{けん} 健 ^じ 次 ^{ろう} 郎

発行者 株式会社 医学書院

取締役社長 金原 一郎

本社 東京都文京区本郷5-29-11

(電) 811-1101 振替東京96693

大阪出張所 大阪市北区梅田町46

桜橋第一ビル (電) 345-5830

九州出張所 福岡市大学通1-1 (電) 64-0945

間沢美術製版・三美印刷株式会社・有限会社長野製本工場

万一落丁乱丁など不良品がございましたら、お書込、捺印などの有無にかかわらず、直ちに新品とお取替いたします。もし必要なメモなどお書込のために新品との交換をご希望にならない場合は、ご送本下されば、直ちに修理訂正の上、ご返知いたします。修理期間中(約1週間)に代替品をご入用の節はお申し越し次第お送り申し上げます。

3047-10416-0305

690602	1395	452202
260615	3998
510603	2245	711125
.....



ALBERT H. COONS 教授 (ハーバード大学)

序 文

蛍光抗体法も今では十分に熟し切った方法として安定、確立したものとなってきている。これは過去 20 数年におよぶ多くの人々の改良努力の結果に依るものであるが、それだけにこの方法もすでに歴史的なものとなってきたわけである。

1966 年以來の中根らの酵素抗体法の出現で、今では免疫組織学の方向が、蛍光顕微鏡の時代から光学顕微鏡、電子顕微鏡と、より簡便な、かつより経済的な方面に移り変わりつつあってその進歩の跡がうかがえるのである。しかしながら、その原理は未だ COONS 教授の発想からは一步も出ていないということは注目されてよいことであろう。

過去 1/4 世紀にわたってさまざまな免疫組織学的手法が考え出され、試みられ、そして応用への途を開こうと努力されてきたが、その多くは蛍光抗体法に勝るものが出現しなかった。このことは蛍光抗体法がいかに基本的に優秀なものであり、洗練されたものであるかを物語るに十分であるといえよう。ただその中でも、酵素抗体法だけは光学顕微鏡で観察でき、かつ永久標本を残せるという魅力のある点、ここに取り上げるに十分な価値のあるものと考えられたのである。もっとも、この方法はなお免疫組織学のキーポイントである特異染色像の証明に今一步未熟な点が存在するけれども、将来性のある意味からもこの小書に蛍光抗体法と並べて成書にした次第である。

蛍光抗体法、酵素抗体法などの免疫組織学的手法も、初期の目的は生体内で展開される変化を形態学的に観察するという点にある。したがって、その証明された物質、たとえばここに IgG を証明したとか、ここにウイルス抗原を証明したというだけのことでは、今や十分な説明とはならない時代が到来していると考えなければならない。換言すれば、そこに存在する IgG とは、あるいはウイルス抗原とは、生物学的に何を意味する局在であるのか、さらに一步、二歩とその存在する理由あるいはその奥にひそむ現象を、より深く追究することこそ必要とされる時代となってきたのである。

本文の中では紹介しなかったが、FITC を用いた蛍光抗体法に光学顕微鏡で観察することのできる簡便な特殊干渉フィルターがごく最近開発された (RYGAARD, OLSEN 1971, KRAFT 1970)。これは FITC の励起波長が $490\text{ m}\mu$ であることを利用して、極力この波長のみが通過するような (KP 490 干渉フィルターの $490\text{ m}\mu$ 透過度は 85~92%) フィルターを作ったものである。これによれば、一般の光学顕微鏡のタングステンランプで十分で、その光線に含まれる短波長の中で $490\text{ m}\mu$ だけを利用することができるわけで、普通の光学顕微鏡で蛍光抗体法の観察ができる時代がやってきたというわけである。つまり、強烈な光線を出す紫外線水銀ランプでなくてもよく、それだけに顕微鏡観察中の FITC の fading (褪色) も著しく少ない利点がある。わが国では千代田光学で目下この種干渉フィルターの改良が試みられているが、なお明るさの

点で今一つ満足できない状態であるので、今後より改良が望まれる。いずれにしても螢光抗体法がこのように光学顕微鏡で観察することができるとなると、これは光学領域における一種の革命ともいい得るであろう（次頁口絵写真参照）。

このような日進月歩の、過去 20 数年にわたる螢光抗体法、酵素抗体法を中心とした医学領域における研究業績を振り返って見ると、その範囲の広大なこと、医学生物学的な考え方が著しく掘り下げられたことなど、その貢献の顕著なることに驚きを感じるのである。ここにその一部ではあるが螢光抗体法出現によって獲得された数々の項目を整理してみたのが本拙著である。医学生物学領域における真理の追究がいかように変遷してきたかを本書より見出しただくことができるならば、著者の本懐に勝るものはありません。

本拙著に掲載された研究には文部省科学研究費に負うところが大きく、ここに改めて感謝の意を捧げます。

また、本書出版にあたりその費用の一部に対して日本大学出版助成金の御援助を賜りましたことを衷心より御礼申し上げます。さらにわが国の免疫組織学の発展の門を開いていただいた思師鈴江懐京大名誉教授に深甚の謝意を表するとともに、本書の上梓にあたり絶大なる協力を賜った医学書院長谷川泉氏をはじめ編集部の諸氏の努力に敬意を払います。また貴重なかつ、すばらしいカラー写真をご提供くださった諸先生方および文献整理、原稿清書などに長期間尽力して下さった田口佳子、湯浅伊都子両嬢に心から御礼申し上げます。

RYGAARD, J. and OLSEN, W. 1971 Determination of characteristics of interference filters. "Defined immunofluorescent staining". *Ann. New York Acad. Sci.* **177**, 430-433.

KRAFT, W. 1970 Ein neues FITC-Erregerfilter für die Routine fluoreszenz. *Leitz-Mitt. Wiss. U. Techn.* **5**, 41.

1971年10月

著 者

目次

螢光抗体法

第1章 手技の実際	3
螢光抗体法のすぐれた点, 限界点	3
螢光色素	5
1. 螢光色素の性質	5
2. 螢光色素の選択	8
抗体グロブリンの標識と精製	16
1. 標識の方法	16
2. すぐれた螢光抗体液を得るための純化 (非特異染色因子除去)	19
螢光抗体の性状	25
1. 抗体価の変化	25
2. 螢光抗体液の吸収スペクトル	27
3. 螢光スペクトルおよび励起スペクトル	29
4. 螢光抗体液の蛋白定量およびモル比	32
5. 螢光抗体液の一般的性質	36
螢光抗体法の資料作製	37
1. 新鮮試料の凍結	38
2. 切片の作り方	38
3. 固定	42
4. 切片の保存	43
螢光抗体による染色法	43
1. 対照の取り方	44
2. 交叉反応	46
3. 染色の方法	46
螢光顕微鏡	49
1. 励起光源の種類	50
2. フィルター	53
3. コンデンサー	55
4. 螢光一位相差組合法	56
5. 写真撮影	57
螢光定量・螢光偏光	58
1. 螢光定量—顕微螢光測光法	58
2. 螢光偏光	61
病理学への応用	61

第2章 免疫病理	63
免疫グロブリン母地	63
1. 免疫グロブリン母地	63
2. 胎生期における免疫グロブリン母地	67
3. 分泌性 IgG 機構	69
4. 免疫グロブリンの腸管系母地	70
5. IgE, γ E	74
6. IgD	74
7. ポリペプチド鎖	74
8. 熱グロブリン	80
9. 凍グロブリン	80
10. 口蓋扁桃の免疫機構	81
11. アロタイプ	87
12. 免疫コンプレックス	88
13. 免疫学的寛容	91
14. 過敏性	92
15. 血清病	94
16. 肥胖細胞	94
自己免疫 —自己免疫理論批判—	95
1. 自己免疫とは? —自己免疫の条件—	95
2. 交叉免疫と自己免疫	102
2. 甲状腺炎と自己免疫	103
腎疾患	104
1. 基底膜病変の免疫組織学	104
2. 実験的腎炎における免疫組織学	124
3. 腎炎病因の一, 二論点	126
交叉反応性理論	133
1. リウマチ心炎	133
2. ヒト表皮抗原と白血球	134
3. 糖尿病患者血清内の甲状腺濾胞上皮抗体の証明	135
4. 細菌多糖類と交叉反応性	135
全身性ループスエリテマトーデス (SLE)	140
1. 結合織病こんにちの問題点	140
2. 結合織病における免疫学の立場	141
3. 結合織由来抗原	141
4. 全身性エリテマトーデス (SLE) と抗核抗体	142
5. 結合織病を発する純系マウスのウイルス粒子の証明	150
6. エリテマトーデスとミクソウイルス	151
慢性関節リウマチと免疫コンプレックス血管炎	160
結節性動脈周囲炎	166
Sjögren 症候群	167
Behçet 症候群	168
甲状腺炎	168
消化管系疾患	170
1. 消化管上皮抗原と悪性貧血	170
2. 感染症	171

3. ウイルス性虫垂炎	172
4. 蛋白喪失性胃腸症	176
5. 潰瘍性大腸炎	176
肝臓疾患 —機能形態学の限界—	179
1. 材料の採取	179
2. 固定法	180
3. 肝炎関係への応用例	182
4. 肝組織抗原	184
5. ルポイド肝炎と平滑筋抗体	184
6. 肝臓と蛋白	185
糖尿病	187
1. インシュリン	187
2. グルカゴン	188
血球の免疫病理	189
1. 血液型	189
2. 赤血球	190
3. 白血球	191
4. ヘモグロビン	192
5. 栓球, 血小板抗体	193
胸腺と筋無力症	194
脳神経系疾患	196
1. ウイルス感染	196
2. Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE, DAWSON's encephalitis)	196
3. ミクソウイルス感染と実験的水頭症	197
4. 脳神経成分の抗原性	197
5. アレルギー性脳脊髄炎	198
皮膚	199
1. 皮膚特異抗原性の問題	199
2. 皮膚にみられる免疫グロブリンの局在	199
3. 天疱瘡	200
4. 皮膚腫瘍	201
5. 接触性皮膚炎	202
6. 微生物感染	202
7. 皮膚神経	202
アミロイドーシス	203
サルコイドーシス	203
伝染性単核症	206
動脈硬化症	207
移植免疫	208
1. 同種移植臓器の免疫組織学	208
2. 実験動物同種移植の免疫組織学	210
第3章 組織内抗原	214
蛋白	214
1. 抗原局在	214
2. 血漿蛋白	215

8 目次

3. 血清アルブミン	216
4. フィブリン・フィブリノーゲン	217
5. プロトロンビン	221
6. セルロプラスミン	221
7. リポ蛋白	222
8. ハプトグロビン	222
9. トランスフェリン	223
10. α -Foetoprotein	223
11. Native antigens	223
12. 胎児組織に特有な抗原	225
13. 悪性化における臓器特異性の変化	226
14. 組織培養と組織特異性抗原	227
ホルモン	227
1. 下垂体ホルモン	227
2. ゴナドトロピン	229
3. 副腎	230
4. 副甲状腺	233
5. パロチン	233
酵素	234
生殖	253
1. 精子抗原, アレルギー性睾丸炎	253
2. 卵巣	254
3. 染色体	254
4. 胎盤	255
5. 胎児抗原, 胎児ウイルス感染, 胎児の発育	255
第4章 腫瘍	258
腫瘍免疫	258
1. 悪性腫瘍の臓器特異性抗原喪失	258
2. 腫瘍抗原	259
ヒト腫瘍	260
1. ヒト消化管腫瘍	260
2. ヒトリンパ腫 —Burkitt リンパ腫—	261
3. ヒト白血病	262
4. ヒト子宮頸部がん	262
5. ヒト皮膚腫瘍	263
動物腫瘍	264
1. ウイルスによる腫瘍	264
2. 発がん剤による動物腫瘍	264
第5章 微生物・医動物	267
ウイルス	267
1. ウイルス診断	267
2. アルボウイルス	271
3. ピコルナウイルス群	280
4. 狂犬病ウイルスおよびその他の神経系疾患ウイルス	283
5. インフルエンザウイルス群	285

6. パラミクソウイルス群	288
7. 天然痘ウイルス群	293
8. アデノウイルス群	295
9. ヘルペスウイルス群	296
10. レオウイルス群	300
11. 植物、動物の感染ウイルス	300
P-L 群ウイルス	305
1. Miyagawanella 病ウイルス	305
2. オーニソシスウイルス	306
3. トラコーマ病原体	306
リケッチア	308
1. 発疹チフスリケッチア	308
2. 恙虫病リケッチア	309
3. Q熱リケッチア	310
4. 流行性腺熱リケッチア	311
微生物学	311
1. 微生物学への蛍光抗体法の応用	311
2. 化膿球菌	311
3. グラム陽性菌	317
4. コリネバクテリア	318
5. マイコバクテリア	319
6. 単球性リステリア	320
7. 放線菌類	321
8. 腸管グラム陰性菌	323
9. 小グラム陰性菌	329
10. マイコプラズマ	334
11. ブタ類丹毒症	335
12. <i>Mimae</i>	335
13. <i>Malleomyces pseudomallei</i>	336
14. スピロヘータ類	336
医真菌学	340
原虫類	346
1. アメーバ	346
2. 腔トリコモナス	347
3. トリパノゾーマ	347
4. マラリア原虫	348
5. ライシュマニア	350
6. 顕毛原虫	350
7. トキソプラズマ	350
8. 辺縁性アナプラズマ	352
寄生虫	352
1. 住血吸虫	352
2. <i>Toxocara</i>	353
3. <i>Strongylus</i>	354
4. 旋毛虫	354
5. 矮小条虫	354

酵素抗体法

1. 酵素抗体法の原理	357
2. 標識の方法	358
3. 酵素抗体液の純化	358
4. 固定の方法	359
5. 呈色反応	359
酵素抗体法術式	360
1. 抗体の標識法	360
2. 標識抗体の精製	361
3. 免疫染色法 (間接法)	362
4. 電子顕微鏡レベルで使用する場合 (間接法)	363
5. 間接法の変法	363
酵素抗体法の利点と限界	366
参考文献	373
索引	623

螢光抗体法

第1章 手技の実際

螢光抗体法のすぐれた点、限界点 (文献: 375頁)

螢光抗体法が普及しはじめてからすでに約20年、いまではこの方法も多くの人々の努力によって随分と洗練された方法となってきた。いまや各国の研究室において幅広く使われていることは衆知の事実である。

この螢光抗体法のもつ原理、つまりその持ち味というものが形態学レベルでの物質の証明に抗原-抗体特異反応というものを活用したというところに存在するので、こんにちではこの原理にもとづいた応用方法として免疫電子顕微鏡法とか、放射性同位元素抗体法、酵素抗体法などの免疫組織学的方法がつつぎと案出されてきている。

螢光抗体法の出現による医学分野への貢献は極めてその範囲が広く、まず各種ウイルス抗原の宿主細胞内増殖過程の追求に応用されたのをはじめとして、組織レベルで展開される免疫現象なかならず自己免疫の解明、蛋白、酵素、ホルモンなどの細胞内局在、腫瘍細胞内ウイルス抗原の局在、微生物類の証明……など、光学顕微鏡で観察される形態と機能との結びつきを知る上に飛躍的な前進を遂げたことは否定できない。

さてそこで、螢光抗体法がこんにち世界中でこれほどまでに普及したのはとりもなおさず目的物、検索物を特異的に証明できるという魅力にあるのである。科学者が研究に打ちこんで現象の探究を行ないうるのもいうなれば未知の事象に対してその特殊性を特異的に見出そうとする努力に他ならない。たしかにたとえそれが小さな事象であっても自分の力、みずからの手で新しい事実を見出したときの喜びというものは研究者のもっとも生き甲斐を感じる瞬間なのである。このような楽しみをわれわれに与えてくれる一つの方法、それが螢光抗体法である。つまり、目的とする物質の証明を顕微鏡下でわれわれの目にはっきりと特異的に示してくれるからである。

それではその特異反応とはいかなるものであろうか。その代表的なものは何といっても免疫学領域にみられる抗原と抗体の反応であろう。自然界にはこのほかに特異反応と考えられるものが存在することと思われるが、今のところはこの抗原抗体反応こそその代表とみなされている。この特異反応なるものの証明はかつて長い間試験管内の技として免疫血清学の主役として君臨していたのであるがこれを組織形態学のレベルに誘導したのがこの螢光抗体法であり、そしてこれはそのあとに輩出してきた免疫電顕法や酵素抗体法、放射性同位元素標識法などの出現をも促し、いうなれば免疫組織学の尖兵の役割を果たした大きな価値を有しているということでも別の意味の価値が存在する。

数年前、大阪での癌学会で現版大学長の釜洞醇太郎教授と話していた際、教授はわたくしに

4 螢光抗体法

次のようなことを述べられたことを記憶している。「ほくも今までに免疫電顕法やアイソトープの方法などいろいろの免疫組織学の方法を使ってみたが、特異性決定の問題となるとやはり螢光抗体法が一番信頼できるね」。この短い同学長の言葉は現時点での的確な表現なのであってこれ以上の蛇足をあえて必要としないであろう。

それではこの螢光抗体法の真の価値とはどこにあるのであろうか。これを端的に分析してみよう。

螢光抗体法のすぐれた点

- 1) 螢光色素で標識*された抗体グロブリンが抗体としての反応部に障害が及ばないこと (COONS ら 1950, REINER 1930)。
- 2) 螢光色素による標識が isothiocyanate になってから非常に手軽に、簡単になされるようになったこと (RIGGS ら, 1958)。
- 3) 非特異染色などの不安のない螢光抗体液の純化も簡単になされるようになったこと。
- 4) 螢光抗体液の適正基準が色素蛋白モル比で定めることができること。
- 5) 併重染色 (double staining) ができるので1組織内で2種類の異なった物質の特異的鑑別も可能である。
- 6) ウイルス抗原のような、今までは試験管で中和抗体とか補体結合反応などの間接的証明しかできなかったものが、これによって組織学的に観察できるようになったこと。
- 7) 間接法 (sandwich method) を使うことによって患者血清中の自然発生抗体を検索することができる。
- 8) 螢光吸収度を指標とし、また旋光法 (WEBER, 1952) を用いることによって1個の細胞内に存在する抗原の量とか抗体の量の絶対値を測定する可能性があること。
- 9) 顕微鏡下での背景が暗視野であるために特異的に反応する螢光部位のコントラストが極めく、反応部と非反応部とが明瞭に区別され得る。
- 10) 得た所見が特異反応であるとの裏付けが次の方法で簡単になし得る。すなわち、用いた螢光抗体液中の抗体成分を、相対する抗原を以て予め完全に吸収してから染めた場合、螢光陽性であった同じ箇所が陽性とならないことから前者が特異反応であると決定することができる (吸収法)。また別の方法として、あらかじめ非螢光抗体でもって切片内の抗原と反応させておいて次に螢光抗体液で染めても、抗原はすでに先の抗体と反応してしまっているから螢光を示さない (阻止法)。つまり目的物が特異的に反応しているという裏付けが得られる。
- 11) 適切な処置によって得られた患者、材料から病原体などの迅速な決定が可能である。
- 12) パラフィン切片という簡易な方法が広い範囲で使用、しかもこれは組織のコントラストが非常によいので螢光陽性部位の組織学的、細胞学的理解がしやすい。
- 13) 精製した螢光抗体液は凍結で数年間保存が可能である。

まだこのほかにもいろいろと螢光抗体法のすぐれた点があるが、これらのすぐれた点こそことにち広い研究領域で応用されている所以である。しかしながらこれにも、いかなる手技手法にも限界のあるように次にかかげるようなさまざまな欠点が含まれているので、その使用に当たっては十分にその限界をわきまえて行なうべきことは当然である。

* わが国では、いつから使われだしたのか知らないが標識することをラベルと呼ぶ人が多いがこの呼称は正当ではない。英語の label はレイブルと発音してラベルとは読めないし、独語では markierten でこれもラベルとは表現しない。妙な日本語ができたものである。

蛍光抗体法の限界

- 1) 蛍光抗体法による所見の観察は蛍光顕微鏡によってなされるために細胞組織の微細構造まで観察することができない。
- 2) 細胞の種類決定、鑑別が困難なときがある。
- 3) 蛍光抗体法では酵素抗体法 (NAKANE ら 1966, NAKANE と PIERCE 1967, STERNBERGER 1967) のように永久標本が作れない。
- 4) 抗体に標識したのは色素である。したがって色素であるからにはどの色素もがもっている一般の性質も備わっているわけで、その一つが pH の差による染色性の変動である。つまり、蛍光抗体法によって特異染色が正確に得られるのは pH が中性のときのみであって、これがアルカリ性か酸性かに傾くと、非特異染色性が強く出現する。
- 5) 写真の取り直しができない。観察する蛍光が、強力な紫外線光によって発する 2 次励起光を見ているために、その発生した 2 次励起光のエネルギーの消失が早い。したがって同じ箇所を長時間紫外線を当てていると蛍光が消褪してしまい、同じ場所の写真の撮り直しができない。
- 6) フィルター系の選択を誤ると特異染色と非特異染色と鑑別しがたいことがある。
- 7) 白血球ことに好酸球の顆粒は物理学的染色親和性が高いために非特異的に陽性に出ることがある。
- 8) 壊死組織、角化組織がときに非特異的に蛍光を発しやすいので十分にコントロール標本と比較しなければならない。
- 9) 目的物の局在や分布を観察することはできても、その証明された目的のもつ奥にひそむ生物学的意味づけとか、生物学的なダイナミックなパターンの立証が困難である。

以上のように蛍光抗体法にもさまざまな限界点が存在する。このことは、いかなるすぐれた方法にでも厳しい限界というものがあるように、この蛍光抗体法においてもわれわれはその限界の中にしばられているものである。したがって、要はその限界を正しくわきまえているということである。

蛍光色素 (文献: 376 頁)

1. 蛍光色素の性質

1 分子または 1 原子の物質が、十分なエネルギーの 1 光量子を吸収したとき、その物質の基底状態 (ground state) は、異なった電子配列をもって励起状態 (excited state) に達する。これが蛍光の原則であり、そしてこの蛍光波長は吸収光の波長よりも常に大である (Stoke's law)。顕微鏡下で蛍光によって細胞内に存在する材料 (抗原物質あるいは抗体) を観察せんとする蛍光抗体法には、その色素の発蛍光性が、吸収された励起光の吸収部分における強度の高いものほど推奨されるわけである。Fluorescein の主なる吸収ピークは、490 m μ において、またその励起は 525 m μ にあり、350 m μ ないし 420 m μ 間の蛍光の吸収は非常に低い。しかし 280 および 325 m μ において小さいピークを示す (図 1, 2)。

a. 量子収率

どの蛍光色素でも、その励起光吸収部における強度の高いものほど賞用されるわけであるが、その光の強度は、量子の流れに対する総蛍光強度の比を尺度として表わされる。すなわち量子収率 (quantum yield) である。蛍光色素の性能を論ずる場合、この量子収率は大切な要素