

研究速報

蛍光抗体法による胎児血色素の検出

名古屋大学医学部産科婦人科学教室

教授 石塚直隆, 講師 森下宗司
助手 加納泉, 大学院学生 友田豊

蛍光抗体法は1942年 Coons ら¹⁾によつて始められて以來、長足の進歩を示しあらゆる生物学的諸分野の研究に応用されている。この蛍光抗体法とは切片上(細胞上あるいは組織切片上)において抗原たりうるすべての物質、たとえば細菌、ウイルス、ホルモン、酵素等を免疫反応によつて検出する組織免疫学である。その方法は特異抗体に蛍光色素をラベルしてこれを切片上におくと、この標識抗体は細胞上あるいは組織上の抗原と免疫反応を起すので蛍光顕微鏡下ではこの部分に蛍光が認められ、目的とする物質の検出が可能となる。一方、胎児血色素(Hb F)と成人血色素(Hb A)との抗原性については Darrow ら²⁾によつてその差異が認められて以來、その後の研究においても證明されるので³⁾⁴⁾、このHb Fにたいする特異抗体を蛍光抗体法に用いれば、赤血球内あるいは造血臓器内のHb Fの検出が可能と思われる。赤血球内のHb Fを検出する方法は Betke ら⁵⁾によつて考案され我々も検討を加えてすぐれた方法であることをすでに発表した⁶⁾、臓器のHb Fを特異的に検出する方法は現在までない。このため蛍光抗体法により組織内のHb Fを検出する基礎として赤血球内Hb Fを特異的に検出する方法を検討して、これに成功したので以下に報告する。

実験材料および方法

蛍光抗体法は免疫反応の種類によつて直接法、間接法および補体法とあるが、ここでは直接法を用いた。

1) 特異抗体の作製

Hb Fを Freundの Adjuvant と混合し Emulsion とし家兎に4~5回免疫した。得られた抗血清はHb Aにて繰り返し吸収しHb F特異抗体とした。

2) 蛍光色素を抗血清にラベル

Marshall ら⁷⁾の方法によつて Fluorescein Isothiocyanateを抗血清にラベルした。

3) 血液スメヤーの作製

臍帯血、成人血の赤血球を生理的食塩水で洗滌後、生理的食塩水に浮遊させ、これよりスメヤーを作り、乾燥後、アセトン、メタノール混合液で固定した。

4) 染色操作

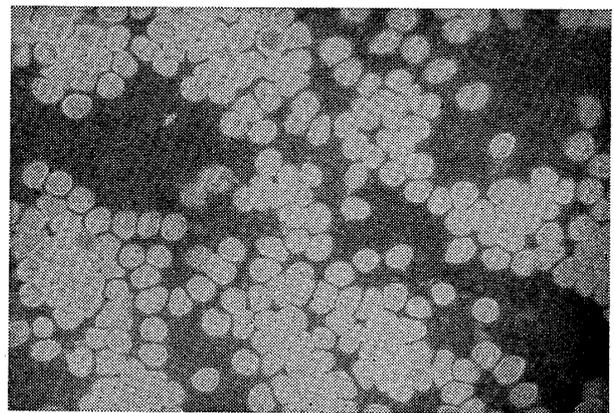
このスメヤーに標識抗体を滴下して37°Cにて30分間反応させた後、PBSにて洗滌し、グリセリン、PBS混合液で封入した後、これを蛍光顕微鏡(Reichert製Fluorex)下で検鏡した。

実験成績

1) 臍帯血赤血球のスメヤー

図1に示すように胎児赤血球は蛍光を發してあざやかに染色されている。

図1 臍帯血赤血球の蛍光顕微鏡写真(×400)



2) 成人赤血球スメヤー

図2の如く成人赤血球は染色されていない。

3) 臍帯赤血球と成人赤血球の混合スメヤー

図3に示すように胎児赤血球は蛍光を發して染色されているが、成人赤血球は染色されていない。

図2 成人赤血球の蛍光顕微鏡写真(×400)

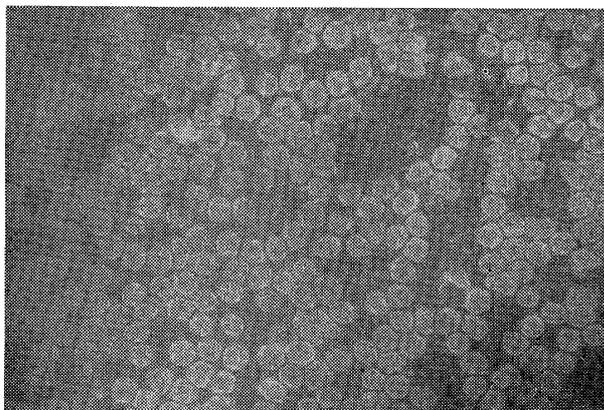
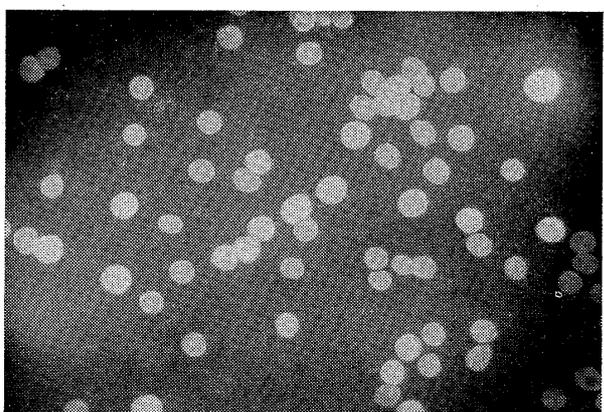


図3 臍帯血赤血球と成人赤血球の混合スマヤーの蛍光顕微鏡写真(×400)



考 察

蛍光抗体法は生物学的研究にすぐれた方法であるが、次の二つの点をよく検討することが必要である。その一つは非特異的反応であり、他の一つは広範囲の交叉反応で、実験結果の解釈を困難にすることがある。この問題を解決するためには用いる抗血清を出来るだけ特異性が高く抗体価の高いものを用意し、さらに適当な対照をおくことによつて解決するより他に方法がない。Hb F と Hb A の抗原性は明らかに異なっているが、Hb F 抗体の抗体価はさして高くなく、ことにHb Fにより繰り返し吸収することによつてその抗体価は著しく低下する。このため我々は Hb F を Adjuvant とともに注射し抗体価

の高い Hb F 抗血清を作り、ほぼその使用目的を達することが出来た。非特異的な染色については検出せんとする Hb F が赤血球内に含有されており、その形状がはつきりしているため障碍とはならなかつた。

臍帯血スマヤーの赤血球は蛍光色素によつてあざやかに染色され、蛍光を發しているが、一方成人血スマヤーの赤血球には蛍光が認められない。この実験成績より Hb F 含有の赤血球が染色されていると考えられるが、蛍光顕微鏡の状態によつて検査物がかなり異つた像を呈し蛍光を見逃すことがあるので、図3に示すような実験を行つて染色の特異性を確認した。この実験ではまったく同一条件の染色方法、および同一の蛍光顕微鏡操作により臍帯血と成人血の混合したスマヤーの赤血球が蛍光を發するものと發しないものに染め分けられた。

このように蛍光抗体法で Hb F を特異的に検出できたことにより、その応用はきわめて多方面にわたることになる。すなわちこの方法は赤血球の胎盤通過の問題、Hb F の産生部位、産生時期、Hb F 合成の機序、Hb F より Hb A への転移の機構、さらに遺伝分子病の解明に大いに役立つと思われる。

結 語

蛍光抗体法により赤血球内 Hb F を特異的に検出することが出来た。この方法は従來の Hb F 検出方法に比較して更に広い応用範囲を持つすぐれた方法と考えられる。

文 献

- 1) Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. and Berliner, E.: J. Immunol., 45, 157 (1942).
 - 2) Darrow, R.R., Nowakovsky, S., and Austin, M.H.: Arch. Pathol., 30, 873 (1940).
 - 3) Chernoff, A.: Blood, 8, 399 (1953).
 - 4) 内藤道興: 日法誌, 15, 450 (1961).
 - 5) Kleihauer, E., Braun, H., and Betke, K. Klin: Wschr., 15, 637 (1957).
 - 6) 石塚直隆, 加納 泉, 友田 豊: 日産婦誌, 14, 632 (1962).
 - 7) Marshall, J.D., Eveland, W.C., and Smith, C.W.: Soc. Exptl. Biol. Med., 98, 898 (1958).
- (No. 1648 昭38・9・2 受付)