II-E-P-46

BrdU/IdU二重免疫染色法を用いた細胞動態の解析

佐藤靖、伊藤隆明、蟹沢成好

(横浜市立大学医学部・病理)

BrdUとIdUとで標識された組織の二重免疫染色法による細胞動態の解析は、非放射線性で簡便なために、顕微鏡で多用されつつある。我々は、抗BrdU特異抗体(Br-3)と抗BrdU/IdU抗体(IU-4)による二重免疫染色法を用いて、生後発育期の小腸陰窩上皮の細胞動態を解析した。また、Epon包埋厚切り切片的BrdU/IdU二重染色も試み、連続した超薄切片像との対比を行った。

生後0日～4週齢のマウスにIdUとBrdUを2-3時間の間隔で投与し、BrdU投与後1時間後に屠殺し、近位空腸を採取した。組織は、4%パラホルムアルデヒドで室温で4時間固定し、Epon及びパラフィンに包埋し、それぞれ1及び4 μ m切片を作製した。Epon切片には各種脱Epon処理を施したが、sodium methoxideによる方法で最も良好な染色結果が得られた。パラフィン及びEpon切片は、はじめにBr-3抗体を用いてABC法により染色し、続いてIU-4抗体でbiotin標識化alkali-phosphataseを用いてABC法に準じて免疫染色を行った。これによりS期標識率(LI)、S期時間(Ts)及び細胞周期時間(Tc)を求めた。尚、Tsは(IdUとBrdUの投与間隔) $\times$ (BrdU単独陽性細胞数+BrdU/IdU二重染色細胞数)/(IdU単独陽性細胞数)で、TcはTs/LIにより算定した。

II-F-P-47

非蛍光プローブによるConfocal Laser Scanning Microscope(CLSM)の組織化学への応用

伊東丈夫、小松遵至、宇都宮洋才、

長村義之、渡辺慶一

東海大・医・共利研細胞生物、同・病態診断系病理学

CLSMの免疫組織化学的観察への応用例はすでに数多く報告されている。しかし現在共焦点での観察は、蛍光プローブの使用が必要条件となっている。先に我々は、免疫組織化学に於ける非蛍光プローブ(オスミウムブラック)を用いた共焦点観察の有用性を報告した。今回、更にCLSMの新たな可能性を検討するため、重金属であるオスミウムの金属反射を及び、マイクロチョッパーによる40 μ mの厚さの切片(形態の保持が良好)を使用し反射共焦点モードで、細胞内小器官(ゴルジ装置等)の共焦点観察及び3次元立体構築を試みた。【材料・方法】マウスの肝臓を①4酸化オスミウムで48時間固定を行い、②マイクロチョッパーで40 μ mの切片を作製後、樹脂包埋したのち、CLSM(Zeiss)で反射共焦点モードで観察した。【結果及び考察】ゴルジ装置は明瞭に確認されたが、細胞の膜構造は不明瞭であった。ゴルジ装置の3次元立体構築は可能であったが、膜成分の厳密な抽出が不十分であり、これは膜に結合したオスミウムの量的な問題かと考えられた。現在この点について検討中である。