

PI-25

腸骨リンパ節細胞を用いたモノクローナル抗体作製における細胞融合方法の検討

佐渡 義一

重井医学研究所

演者はラットならびにマウスの腸骨リンパ節を用いてモノクローナル抗体を作製する方法を報告してきた。抗原エマルジョンの注射は尾根部筋肉内に1回でよく、免疫にかかる期間は、従来の脾臓細胞を用いる方法（脾臓法）が1ヶ月以上必要なのに対して、2週間後から融合に使用可能である。また、脾臓法に比べて約10倍の効率で目的の融合細胞が得られる。このように腸骨リンパ節法は従来の方法に比べて簡単で、迅速で、高効率である。しかし、研究現場のモノクローナル抗体の作製においては、さらに多くの候補陽性融合細胞が望まれることが多い。そこで腸骨リンパ節から得られた感作B細胞とミエローマ細胞との融合方法について検討した。ポリエチレングリコールを用いる方法（PEG法）、電気融合法による方法、センダイウィルス外膜蛋白質を用いる方法（HVJ-E法）の3種類の方法を比較検討した。

抗原としてオポアルブミンを用い、複数のラットまたはマウスに抗原エマルジョンを注射し、17日後に腫大腸骨リンパ節を取り出し、プール後、分注して、凍結保存した。この凍結保存した細胞を解凍後、それぞれの方法でSP2マウスミエローマ細胞との融合を行った。96穴培養プレートに播かれた融合細胞は8日後または9日後にエライザを行って陽性ウェルの数を調べた。得られた融合効率の結果は従来の脾臓細胞を用いた方法とよく似た結果であった。効率、確実性という点では電気融合法が優れ、PEG法の約3倍（マウス）から6倍（ラット）の効率であった。HVJ-E法は、効率はPEG法と同程度かそれ以上であった。電気融合法を用いることにより1匹のマウスから採取できる細胞数、 2×10^7 の7乗個、でも十分な陽性融合細胞が得られるようになった。このことはモノクローナル抗体の作製技術がさらに確実、容易になったことを意味する。

PI-26

免疫電顕包埋後染色における高感度検出法

山下 修二

慶応義塾大学医学部電子顕微鏡研究室

【目的】包埋後染色法における検出感度の向上のために1) 加熱による抗原の賦活化と、2) 抗体の希釈溶液を検討した。【方法】組織を4%ホルムアルデヒド、2.5 mM塩化カルシウム、1.25 mM塩化マグネシウム/0.1 M HEPES (pH 7.4) で室温2時間固定後、pHを8.5にした同固定液で一晩固定した。緩衝液の浸透圧はグルコースを加えて、300–330 mOsmに調整した。組織をジメチルホルムアミドで脱水し、LR-Whiteに包埋した。超薄切片を20 mM Tris-HCl (pH 9.0) 中で95°C、1.5時間加熱し抗原の賦活化を行った後、金コロイド標識抗体法を用いて免疫組織化学反応を行なった。一次抗体は1% BSA/ PBS、Can Get Signal A 溶液 (Toyobo) またはB溶液で希釈し、金コロイド標識抗体はB溶液で希釈した。反応後、切片を0.05%タンニン酸+2%グタルアルデヒド/0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 5.5) で4分間、更に1%四酸化オウスイウム/0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) で2分間処理し、酢酸ウラニウム (2分間) とクエン酸鉛 (30秒間) で電子染色した。【結果および考察】1) 加熱処理によってVEGF、ER alpha、PNCA、beta-actin、beta-catenin、E-cadherin、occludin、caveolin、Tom20の反応は顕著に増強した。2) Can Get Signal AやBで希釈した一次抗体と標識抗体を用いることによって、大部分の上記抗体の反応は更に増強され、加熱のみでは検出できなかったClaudin-5も検出が可能であった。本法によって包埋後染色法によって多くの抗原の検出が可能であること、また光顕レベルで加熱による賦活化が可能な抗原は、電顕レベルでも同様に検出できることが明らかになった。