

蛍光抗体液の簡易調製法について

金沢大学医療技術短期学部衛生技術科

谷 島 清 郎

(昭和47年8月21日受付)

蛍光抗体法には、直接法、間接法、補体法などの方法があるが、このうち通常よく用いられるのは間接法である。間接法は、直接法に比べて蛍光が強く、また被検血清を中間層におき、これに対する二次抗体に標識して反応させるため、いちいち被検血清を標識する必要がないなどの利点がある。しかし、反応が二段階となるため、これに介在し関与する反応因子が多く、目的外の反応の介入が起りやすい。とくに、自己免疫、腫瘍免疫に関する諸因子を患者血清から検索する際には、異性抗原、組織適合性抗原の混入が問題となる。

その点、直接法は、抗原と患者血清中の標識抗体とを直接反応させるので、特異性が著しく高い。ところが、この方法では、患者血清ごとに標識抗体を用意せねばならないから、その調製には、できるだけ簡単で、少量の抗血清を用いて迅速に行える方法が望まれる。

著者は、前報¹⁾²⁾で、蛍光標識法として、標識時の温度、pH、蛍光色素と抗体蛋白との混合割合などの諸条件、精製法として、臓器粉末吸収法やDEAEセルロースクロマトグラフィによる分画法を検討し、非特異的蛍光のない蛍光抗体液を収量よく得る条件を基礎的に吟味した。本報告は、これを基礎にして簡易調製法を検討し、非特異的蛍光のない蛍光抗体液を、少量の抗血清で簡単迅速に、収量よく得られる条件を明らかにし、併せて、その臨床検査面への適用を試みようとしたものである。

実験材料及び方法

I. 抗血清の作製

1/3飽和硫安塩析により分離したラットの γ -グロブリン10mgを、Freund Adjuvantと共に家兔の肢蹠皮下及び背部皮下に1週間毎に計3回注入して免疫し、重層法により抗原希釈1万倍以上に達して後

採血した(家兔-抗ラット γ -グロブリン抗血清)。

II. 蛍光抗体液の簡易調製法

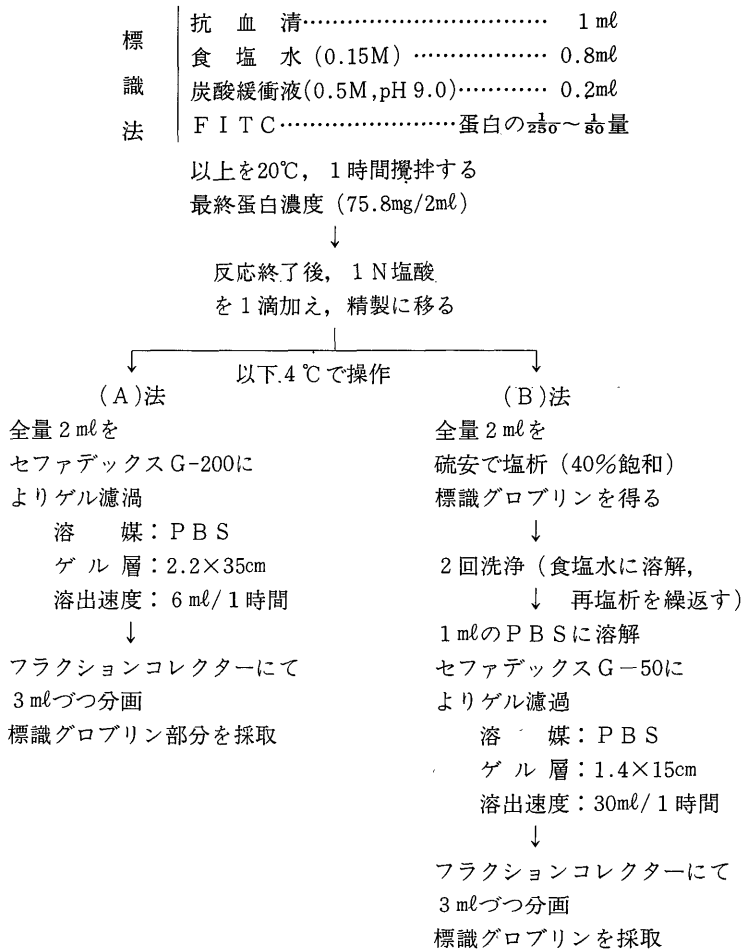
(A)法、抗血清を血清のまま、これに直接蛍光色素を結合する方法をとり、その後の精製法として、セファデックスG-200を用いたゲル濾過を行い、標識された抗血清グロブリンを分画採取すると同時に、反応にあずからないで残った遊離色素をも除去する方法。(B)法、同じく血清に蛍光色素を標識した後、硫安塩析法によって標識された抗血清グロブリンとアルブミンとを分画し、後、セファデックスG-50を用いたゲル濾過によって遊離の色素と硫安を除去する方法。

以上の二つの方法の実際を図1に示した。この場合、標識法は、Marshallの原法³⁾を基準とし、標識時の抗血清量は1ml、反応温度20°C、pH9.0、反応時間1時間、最終蛋白濃度約3.8%で、色素蛋白混合割合は多くの場合1/80を使用した。抗血清は、家兔-抗ラット γ -グロブリン抗血清を使用し、蛍光色素は、米国BBL製のフルオレセイン・イソチオシネート(FITC)のイソメルIである。セファデックスによるゲル濾過は、G-50についてはGoldsteinやSpendloveの方法⁴⁾⁵⁾、G-200についてはFlodin等、その他の方法^{6)~8)}を参照して行った。

一部の実験では、Rinderknecht及びWolf等の方法⁹⁾¹⁰⁾を参照し、上記B法の中で、FITCを加えるとき、予めその20倍量のセライトを混合しておく実験も行った(セライト法)。標識反応終了後は、3000回転、15分間遠心してセライトを除いた。またB法の中で、標識時の最終蛋白濃度を生食水で1%に調製する点だけを違えて、他は同様に行う実験も行った(1%法)。また簡易法を従来の方法と比較するため、予め1mlの血清よりグロブリンを分離精製し、B法と同じ条件でFITCを標識し、セファデックスG-50を通す方法を行った(グロブリン法)。

A Simple and rapid method for preparation of fluorescein-labeled antibody. **Kiyoo Tanishima**, Department of Paramedicine, School of Medicine, Kanazawa University.

図1 蛍光抗体液の簡易調製法



PBS: リン酸緩衝食塩水, 0.01M, pH7.2, 0.15M NaCl

III. SLEにおける抗核抗体の証明

SLE患者血清について, 上記B法を適用し, 長沢の方法¹¹⁾に従って, 正常マウス腎の凍結切片及び正常ヒト血液塗沫標本を直接法で染色した. 患者血清は, 金沢大学医学部付属病院中央検査部より分与を受けた. 対照として, FITCを標識しない元の患者血清による阻止試験, 及び正常ヒト血清に蛍光標識した液で染色した.

その他, 蛍光抗体液の臓器粉末による吸収, DEAEセルロースクロマトグラフィによる分画 (DEAE法), 色素蛋白結合比 (F/P比) の測定, 抗体価の測定, 組織染色法, セルローズアセテート膜電気泳動法などは, すべて先の報告¹²⁾に従って行った. 蛍光顕微鏡は, 日本光学の蛍光顕微鏡装置SUR-F型を使用した.

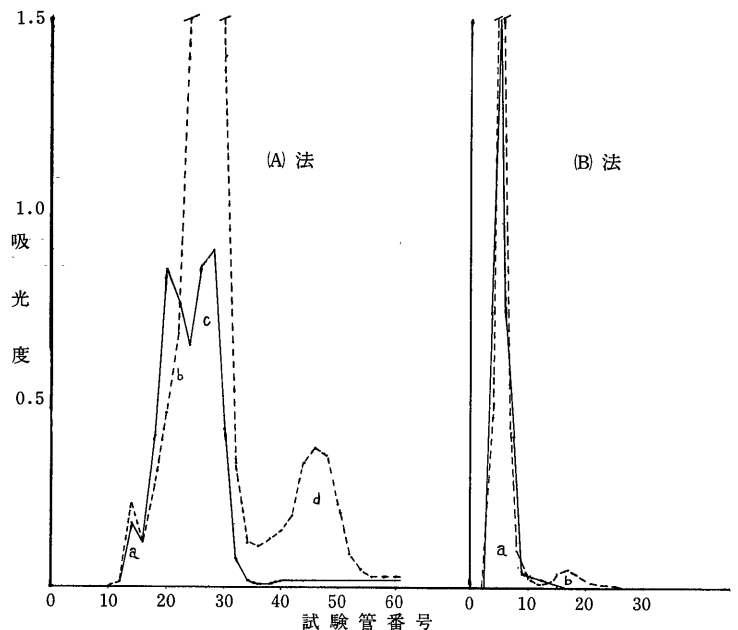
実験成績

I. 簡易調製法の比較

上記のA, B両法におけるゲル濾過の結果, フラクションコレクターにより得られた各分画について, FITC量と蛋白量を測定し, グラフにしたのが図2である. 各分画の電気泳動による性状やF/P比についても示されている.

この結果, A法では, 標識された抗血清は, セファデックスG-200によりa, b, cの三つの蛋白に分れ, dは蛋白を含まぬところから, 標識にあずからなかった遊離のFITCとみなしてよく, 蛋白よりもおくれで溶出するから完全に除去される. しかし, 電気泳動法によって, 蛋白成分を調べると, 図2の写真に示したようにグロブリンのピークと目されるaとbにはアルブ

図2. 蛍光抗体液の簡易調製法におけるゲル濾過のパターン



家兎-抗ラットγグロブリン抗血清にFITCを標識した場合について、(A)はセファデックスG-200のパターン、(B)はセファデックスG-50のパターン。実線は蛋白に対するFolin法の吸光度、破線はFITCに対する495mμの吸光度。

ミンがかなり含まれている。そのF/P比は 2.7×10^{-3} となっているが、cの部分のF/P比が 9.2×10^{-3} であるから、これがかなり混入しているものと思われる。これに対し、B法では、硫酸塩析によってアルブミンを予め除いてからゲル濾過を行っているので、蛋白のピークはaのみであり、電気泳動的にもグロブリン分画のみであった。F/P比は 1.5×10^{-3} であり、A法のaとbの部分のF/P比より低い。遊離のFITCはやはりおくらせて溶出し、完全に除去される。

全操作を終えるのに要する時間は、A法では48時間、B法では4時間あれば十分であった。

以上の結果から、蛍光抗体液調製の迅速簡便法としては、FITCを直接血清そのものに標識した後、硫酸塩析により標識グロブリンを分画し、セファデックスG-50を通して精製するというB法の方が適当であるといえる。

II. (B)法における標識法の検討

B法の標識法を検討するため、図1の上段標識法の部分を一部変え、あとB法通り行ったのが(セライト法)、(1%法)、従来の方法である(グロブリン法)の各方法である。これらの各方法で得られた蛍光抗体液の収量や性状を比較したのが表1である。この表からわかるように、標識法を種々変えて蛍光抗体液を調製しても、その収量、性状には差が認められず、FITCを加えずにB法と同じ操作を4°Cで行った対照のそれらとやはり差がみられない。ただ、セライト法では、F/P比が他の方法に比べてやや低くなっている。

次に、B法について、色素蛋白混合割合を種々変えて比較したのが表2である。色素蛋白混合割合1/250~1/80では、得られた蛍光抗体液の収量と抗体価にはほとんど差が認められないが、F/P比では、FITCの割合が多くなるにつれて大きな値となっている。

表3は、表2に示す三種の混合割合で得られた蛍光抗体液の組織染色性を比較したものである。即ち、ラットのγ-グロブリンをマウス尾静脈より注入し、その腎を凍結切片とし、表2の三種の蛍光抗体液で染色して腎糸球体に集積したラットγ-グロブリンの染色性を観察した。この場合、非特異的蛍光を除去するため、

各蛍光抗体液とも、最終的に得られたものをリン酸緩衝液PBSにて蛋白濃度3mg/mlに調整し、これを原液として希釈する方法、及び臓器粉末で吸収する方法をとり、非特異的蛍光除去の程度を蛍光顕微鏡下に検した。

表1 (B)法による蛍光抗体液の収量と性状に対する標識法の影響

標識法の種類	収量(mg)	F/P比	抗体価
(B) 法	27.6	1.5×10 ⁻³	128
セライト法	25.8	0.8×10 ⁻³	64
1 % 法	30.5	1.5×10 ⁻³	128
グロブリン法	27.6	1.3×10 ⁻³	128
対 照	27.4	—	128

まず、希釈法では、色素蛋白混合割合を1/250, 1/125にしてB法により調製した蛍光抗体液は、原液を1/4に希釈すれば非特異的蛍光は消失するが、特異蛍光の方も弱くなる。1/80では、非特異的蛍光がもっとも強く、これを1/8まで希釈しなければ消失しないが、その時の特異蛍光はかなり強く残っていて十分使用できることがわかった。

これらの蛍光抗体液を、希釈せず原液のまま臓器粉末により吸収すると、非特異的蛍光を十分に除去する

表2 (B)法による蛍光抗体液の収量と性状に対する色素蛋白混合割合の影響

色素蛋白混合割合	収量(mg)	F/P比	抗体価
1/250	27.0	0.5×10 ⁻³	64
1/125	27.6	1.5×10 ⁻³	128
1/80	30.4	2.4×10 ⁻³	64

標識法の種類の説明は本文。各法における色素蛋白混合割合、反応温度、反応時間は一定でそれぞれ1/250, 20℃, 1時間。対照とは、(B)法においてFITCを加えず、反応温度4℃で同じ操作を行なった場合。収量は、抗血清1mlより出発して得られた蛍光抗体液の蛋白量。抗体価は、蛋白濃度3mg/mlの蛍光抗体液を希釈して重層法により得られた最高稀釈倍数。

調製法における他の条件は一定(反応温度20℃, 反応時間1時間)。収量、抗体価の表示は表1と同じ。

表3 (B)法による蛍光抗体液の組織染色性

蛍光抗体液の稀釈倍率	色素蛋白混合割合					
	1/250		1/125		1/80	
原液	spe	non	spe	non	spe	non
	+	+	++	+	+++	++
2	+	+	++	+	+++	++
4	±	-	+	-	++	±
6	-	-	+	-	++	+
8	-	-	±	-	++	-
10	-	-	±	-	+	-
原液を臓器粉末で吸収したもの	+	-	++	-	+++	-

原液とは、最終的に得られた蛍光抗体液の蛋白量を3mg/mlとしたもの。speは特異蛍光、onは非特異蛍光。+~+++の表示は、蛍光の程度を示すもので、+++が強度の輝やける緑黄色調の蛍光、±は識別困難なもの、その中間の+数はそれぞれ中間色調の蛍光を意味する。-は無蛍光。

ことができた。

Ⅲ. 血清のまま螢光色素を標識した螢光抗体液の特性

表4は、B法により血清のまま直接標識した螢光抗体液と、予めグロブリンを分画してから標識する従来通りのグロブリン法により標識した螢光抗体液について、臓器粉末による吸収の前後でF/P比を測定し比較した成績である。また、図3は、上記の二者の螢光抗体液をそれぞれDEAE-法により分画し、F/P比の異なる四つのグループに分けて、各収量の割合を比較した成績である。

表4から明らかなように、血清のまま標識した螢光抗体液においては、臓器粉末による吸収の前後で、F/P比の値の変化は比較的小さい。これに反し、分離したグロブリンに標識した場合は、臓器粉末で吸収すると、吸収前の値の半分の値のF/P比となる。

図3では、血清のままで標識した場合、DEAE-法による分画前のF/P比が 1.9×10^{-3} であったものが、分画後も、やはりその前後の値、 $1.5 \sim 2.9 \times 10^{-3}$ のもの収量が多く、それ以下の値のもの合わせて比較的低いF/P比のところ均質に結合したのことが多いことを示している。これに対し、グロブリンに標識した場合は、分画前のF/P比は血清のまま標識した場合とあまり変わらないのに、分画後は、F/P比の極端に高い部分と、極端に低い部分とが多量に収獲され、色素と蛋白の結合が不均一であるといえる。

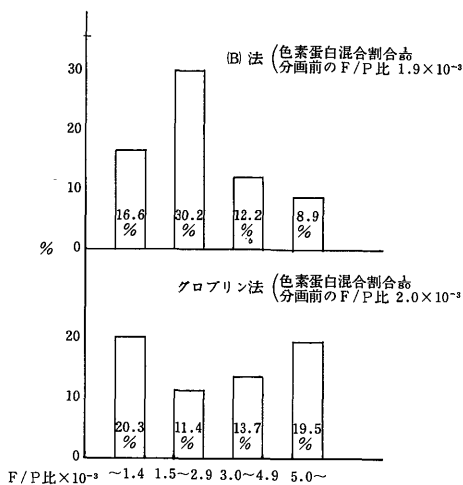
Ⅳ. 臨床検査への適用

以上、動物の抗血清を用いて得られた成績を、臨床診断面における検査に適用できるかどうかを検討するため、螢光抗体法による検査の有効性がほぼ確定しているSLEの患者における抗核抗体の証明を例にとっ

表4 (B)法による螢光抗体液のF/P比に対する臓器粉末吸収の影響

標識法の種類 () 内は色素蛋白混合の割合	臓器粉末による吸収前のF/P比	吸収後のF/P比
血清のまま標識(1/60)	2.4×10^{-3}	1.6×10^{-3}
同上 (1/125)	1.5×10^{-3}	1.2×10^{-3}
同上 (1/250)	0.5×10^{-3}	0.4×10^{-3}
グロブリンに標識(1/25)	1.3×10^{-3}	0.6×10^{-3}

図3. (B)法による螢光抗体液の DEAE-セルロースクロマトグラフィによる分画とその収量



縦軸の百分率は、分画前の総蛋白に対する各分画のものである。

て試みた。

表5は、臨床上SLEと診断された患者1例の血清を、簡易調製法のB法に従って蛍光標識し、直接法で検した結果である。標識時の色素蛋白混合割合は1/80で、得られた蛍光抗体液のF/P比は 2.9×10^{-3} であった。これについて、臓器粉末により吸収した場合としない場合に、それぞれ希釈を行って染色すると、吸収しない場合は8倍に希釈してもなお非特異的蛍光が残り、16倍で消失するが、同時に特異蛍光の方もほとんど認められなくなった。吸収した場合は、4倍希釈で非特異的蛍光は消失するが、やはり特異蛍光も弱くなり判定に困難を感じる。

間接法も平行して行って見たが、同患者血清を希釈して中間層におき、蛍光標識した抗ヒト免疫グロブリンGで後染色すると、血清希釈128倍以上でも明らかに陽性という判定が可能であった。

考 察

蛍光抗体直接法は、関与する反応因子が少ないので、特異性の点ではもっとも優れた方法である。しかし、臨床上、少量の患者血清中の諸因子や抗体を直接法で正確に検出しようとするときには、血清ごとに蛍光液を調製せねばならず、その上簡単迅速に行いうる方法でなければならない。したがって、間接法のように動物に作製された多量の抗ヒト免疫グロブリンに蛍光色素を結合するときのような取扱いは適当でない。そこで、本文で示したような二つの簡易調製法を工夫し、検討した。簡易調製法については、これまでもいくらかの報告はあるが、それらはすべて、間接法に

おける動物に作製された多量の抗血清を用いて行う場合のものであり⁵⁾⁹⁾¹²⁾¹³⁾、色素結合のときの時間短縮を計ったり、精製過程を簡略化するものであって、本実験のような臨床診断面における直接法に利用する蛍光抗体液の簡易調製法は未だみられない。

少量の抗血清（患者血清）に直接蛍光標識を行ってから、セファデックスG-200を通すA法では、血清中のアルブミンとグロブリンを完全に分離することができず、その分離にかなり時間を要し、また、この標識アルブミンが非特異的蛍光の原因になるという所見がえられた。そこで、抗血清に直接蛍光標識した後に、硫酸塩析を行ってグロブリンを採取してから、セファデックスG-50を通すB法を行うと、迅速簡便に非特異的蛍光の少ない求める分画を得ることができた。この場合、最初の標識時における反応温度を20°C、pHを9.0としたのは、著者の別報¹⁾²⁾で検討したものを参照して選定した。また、蛍光色素と血清との反応時間については、室温約30分間でほとんどのFITCと蛋白の結合が完了するので⁵⁾¹⁴⁾これを基準に作用時間1時間とした。この条件で、所要時間を4時間に短縮することができた。

従って、このB法について、色素蛋白混合割合を種々加減し、1:80とした場合に、ゲル濾過後の蛍光抗体液を8倍まで希釈するか、あるいは希釈しないで臓器粉末で直ちに吸収すると、非特異的蛍光も除かれ、きれいな染色結果が得られた。この成績はSpendloveの成績⁵⁾と一致する。

ところで、このB法では、抗血清に直接蛍光標識する方法をとったが、これを、従来のように予めグロブ

表5 SLE患者血清より(B)法で得られた蛍光抗体液によるヒト血液塗沫標本の染色

臓器粉末で吸収した場合 蛍光抗体液の希釈			臓器粉末で吸収しない場合 蛍光抗体液の希釈		
原液*	spe*	non*	原液*	spe*	non*
原液*	++	++	原液*	++	++
2	+	+	2	++	++
4	±	-	4	++	++
8	-	-	8	+	+
			16	±	-
			32	±	-
			64	-	-

*印の表示は表3と同じ

リンを分離してから標識するグロブリン法と比較したところ、著しい差のあることが解った。即ち、グロブリンに標識した場合よりも、血清のまま標識したB法の方が、同じ量のFITCを用いても均一なF/P比をもつ螢光抗体液が得られることがわかった。この理由として次のことが考えられる。即ち、おそらく血清中のアルブミンがFITCと結合し易いため¹⁵⁾、これと速やかに反応してグロブリンに対する過結合を抑制し、全体として均一な結合をグロブリンにもたらしものと考えられる。一方、血清のまま標識するのに、よくセライトが使用され、本実験でもこれを試みたが、たしかにセライトは、その吸着性によって、FITCの過結合を抑える効果があり、上記のようなアルブミンの作用はセライトに類似していると思われた。

以上のような利点を有するB法も、精製過程をゲル濾過だけにとどめている以上、その後の非特異的蛍光の除去のために、どうしても希釈法や臓器粉末吸収法を行わねばならない。この点、臨床検査への適用について問題が残る。間接法では簡単に測定できる力価の測定が、直接法ではかなり難しいこと、患者血清中の求める抗体が低力価のときには、直接法が不適当なこと、臓器粉末で非特異的蛍光を除くとき組織抗体が吸着除去されるおそれのあることなどである。したがって、間接法を行って流血抗体を検出したら、さらに直接法(B法)で確めるという併用がのぞましい。その際1ml以下の少量の高力価の抗血清(非組織抗体含有)を標識するには、B法が簡単であり、かつ収量も多いので推奨される。

結 語

迅速、簡便で、しかも少量の抗血清で行える螢光抗体液の簡易調製法について検討した。

1. 抗血清に血清のまま直接螢光色素を標識し、後硫酸塩析法でグロブリン分画を得る。その後セファデックスG-50を用いたゲル濾過を行い、得られた螢光抗体液を臓器粉末で吸収するか、または希釈することにより非特異的蛍光を除去する。この方法は、1ml以下の少量抗血清を標識するのに有用である。

2. この簡易調製法の標識条件は、次のような場合に、染色に理想的なF/P比 2.0×10^{-3} 附近の螢光抗体液が得られた。即ち、反応温度 20°C 、pH9.0、反応時間1時間で、色素蛋白混合割合を1:80とした

時である。

予め抗血清からグロブリンを分画して標識する通常の方法よりも均一なF/P比をもつ螢光抗体液が得られ、その理由を検討し、臨床面への適用について考察を加えた。

稿を終るにのぞみ、御指導、御校閲いただきました金沢大学医学部医動物学教室の太田五六助教授に深謝致します

文 献

- 1) 谷島清郎：金沢大能登臨海実年報, 3, 30 (1963).
- 2) 谷島清郎：金沢大能登臨海実年報, 4, 97 (1964).
- 3) Marshall, J. D., Eveland, W. C. & Smith, C. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98, 898 (1958).
- 4) Goldstein, G., Spalding, B. H. & Hunt, JR. W. B. : ibid, 111, 416 (1962).
- 5) Spendlove, R. S. : ibid, 122, 580 (1966).
- 6) Flodin, P. & Killander, J. : Biochem. Biophys. Acta, 63, 403 (1962).
- 7) Rivera, J. V., Toro-Goyco, E. & Matos, M. L. : Am. J. Med. Sci., 249, 371 (1965).
- 8) Bates, H. A., Bankole, R. O. & Swaim, W. R. : Blood, 34, 430 (1969).
- 9) Rinderknecht, H. : Nature, 193, 167 (1962).
- 10) Wolf, P. L., Pearson, B., Rosenblatt, M., Vazquez, J. & Jarkowski, T. : Am. J. Clin. Path., 43, 47 (1965).
- 11) 長沢俊彦：臨床検査, 11, 113 (1967).
- 12) Riggs, J. L., Loh, P. C. & Eveland, W. C. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 105, 655 (1960).
- 13) Gordon, M. A., Edwards, M. R. & Tompkins, V. N. : ibid, 109, 96 (1962).
- 14) Fromhagen, L. H. : J. Immunol., 95, 442 (1965).
- 15) 進藤由二監修：免疫学・アレルギー学実験法, 553頁, 東京, 文光堂, 1971.

Abstract

A simple and rapid method for preparation of fluorescein-labeled antibody solution was examined by using rabbit anti-rat gamma globulin sera and its clinical application was made for a practical purpose.

Whole antiserum	1 ml
Saline 0.15M	0.8ml
Carbonate-bicarbonate buffer 0.5M, pH9.0	0.2ml
Fluorescein isothiocyanate	1 / 80mg of Whole serum proteins
Final protein concentration	3.8%

Reaction mixture was stirred for 1 hour at 20°C and then the mixture was adjusted to pH7.0 and salted out with 2/3 volume of saturated ammonium sulfate. Resultant precipitate was dissolved with a saline to original volume and applied to column of Sephadex G-50 with phosphate buffered saline (PBS), 0.01M, pH7.2. Fractions of first protein peak with 2.0 to 3.0×10^{-3} of F/P ratio were absorbed with mouse liver powder or diluted appropriately with PBS for the purpose of elimination of nonspecific fluorescence, if needed.

When gamma globulins were isolated from sera before coupling with fluorescein isothiocyanate (FITC) followed by gel filtration with Sephadex G-50, lesser homogeneous conjugate was obtained than that of the above-mentioned procedure. It was also found that when sera was conjugated with FITC and then column of Sephadex G-200 was applied without precipitation of gamma globulin with ammonium sulfate, resultant eluate showed marked nonspecific fluorescence because of the presence of conjugated albumin in it.

Direct conjugation of sera with FITC, isolation of gamma globulin from the conjugate and then gel filtration of the globulin produced the best result among many simple and rapid procedures tested.
