

細胞増殖にともなう増殖関連分子および遺伝子の変化と
非アイソトープ性標識を用いて光線顕微鏡下にそれらを観察する方法について

難波紘二・松尾 晃

広島大学総合科学部保健体育講座

(1990.10.31受理)

**Review Article : Molecular and genetic changes associated
with cell proliferations and methods for visualizing these processes
by light microscopy with the aid of non-isotopic labeling.**

Koji NANBA and Akira MATSUO

Department of Health Science, Faculty of Integrated Arts & Sciences,
Hiroshima University, Hiroshima

Abstract

A combination of enzyme histochemistry and immunology opened a new era of cyto- and histochemistry, i. e. enzyme immuno-histochemistry. With this newer technique, it became possible to visualize under the ordinary microscope a number of gene products as long as appropriate antibodies against these were available.

In this review, the authors tried first to summarize the current knowledge on the molecular and cytologic events associated with cell proliferations. These included the chromatin changes during S and M phases, nucleolar alterations by the action of the nucleolar organizer region (NOR), and various growth factors, receptors and intracellular information transmitting systems for the cell proliferation.

Secondly, various histo- and cytochemical methods for visualization of these molecules were reviewed with regard to their principles, advantages and disadvantages and technical feasibilities. The discussions and considerations were illustrated by the microscopic photographs by the alkaline phosphatase-labeled avidin-biotin method followed by hexazotized new fuchsin coloration technique developed by one of the authors.

Thirdly, a combination of enzyme immunohistochemistry and recently developed techniques of molecular biology, i. e. DNA hybridization and DNA amplification with polymerase chain reaction (PCR), was discussed in theory and practice. The combination of DNA hybridization method and enzyme immunohistochemistry resulted in the *in situ* hybridization (ISH) method, and it was demonstrated that the method worked beautifully when used in conjunction with alkaline

phosphatase-labeling and new fuchsin coloration with methylgreen counterstain.

The PCR method was superb for the *in vitro* amplification of a gene and its detection. For its application to ISH, however, there were several basic problems to be solved and these were discussed together with future prospects of its potential applicabilities.

I. はじめに

動物のかたちと構造をより詳細に知りたいという欲求が、解剖学、組織学、細胞学への発展をうながし、技術的にはルーベ、光線顕微鏡、電子顕微鏡の開発をもたらした。他方、はたらきを知りたいという欲求は、生理学、生化学、分子生物学への発展をうながし、それを可能にするさまざまな技術を生みだしてきた。

しかし、元來かたちとはたらきは一体をなすものであり、形態のなかに機能を見たいという欲求は、時代を通じて常に存在した。それが生理解剖学、組織化学、細胞化学などと呼ばれる学問である。

本稿では細胞の増殖という動的な過程について、それに関連する分子および遺伝子の変化について知見を要約し、このような機能的作用を形態学的にとらえるための方法とその具体例および将来的展望について述べる。

最初に細胞増殖に伴う細胞の形態的および分子レベルでの変化を要約し、ついで、これらの変化を免疫反応を媒介としてとらえる免疫組織化学 (immunohistochemistry, IHC) 法、その発展型である酵素免疫組織化学法について述べる。遺伝子の検出には、遺伝子プローブの hybridization 法と目標とする遺伝子の増幅が必要であり、その方法としての *in situ* hybridization (ISH) 法および polymerase chain reaction (PCR) 法について原理と方法を述べ、最後に IHC 法、ISH 法、PCR 法の組み合わせにより何が可能なのかを考察する。

この研究の三分の二については、著者らの技術は確立しているが、残り三分の一についてはまだ未完成であることをあらかじめお断りしておきたい。

II. 細胞増殖に伴う細胞の変化^{1,2,3)}

A. 細胞増殖とは

成人したヒトの体は、約60兆個の様々な形態を持った細胞から成り立っているが、これらの細胞は、適切な細胞増殖の調節を受けながら身体全体を一定の状態に保っている。その増殖様式には、1) 創傷治癒における繊維芽細胞や血管内皮細胞、部分切除後の残存肝の肝細胞などのように、親細胞が二つの娘細胞に分裂し、その娘細胞がまた親細胞になって、増殖を続けるもの、2) 血球系細胞のように増殖しながら分化していくもの、3) 上皮細胞のように基底部の細胞が分裂を繰り返し、補充を行っていくもの、などがある。まれには、組織や臓器の性状の形態限界を超えて増殖するものもあり、これは良性腫瘍や癌としてヒトの体を蝕むようになる。

こういった増殖様式に違いはあるが、細胞は一定の段階をふんで増殖していく。それが細胞周期であり、そこで重要なことは遺伝子の複製と分配の過程である。前者を細胞周期のS期 (synthesis) と呼び、後者をM期 (mitosis) と呼ぶ。(図1)

M期を終えて次のS期までの間をG₁期と呼び、S期からM期までをG₂期と呼ぶ。Gはギャップの意味である。M期以外の期間は、分裂から分裂までの間という意味で間期 (interphase) とも呼ばれる。これをG₀期と称することもある。M、G₁、S、G₂の各時期の区分がはっきりしているのが、真核細胞の増殖の特徴である。真核細胞とは、核膜につつまれた核をもつ細胞で、細菌のような核のない原核細胞と区別される。M、S、G₂を足した時間は、

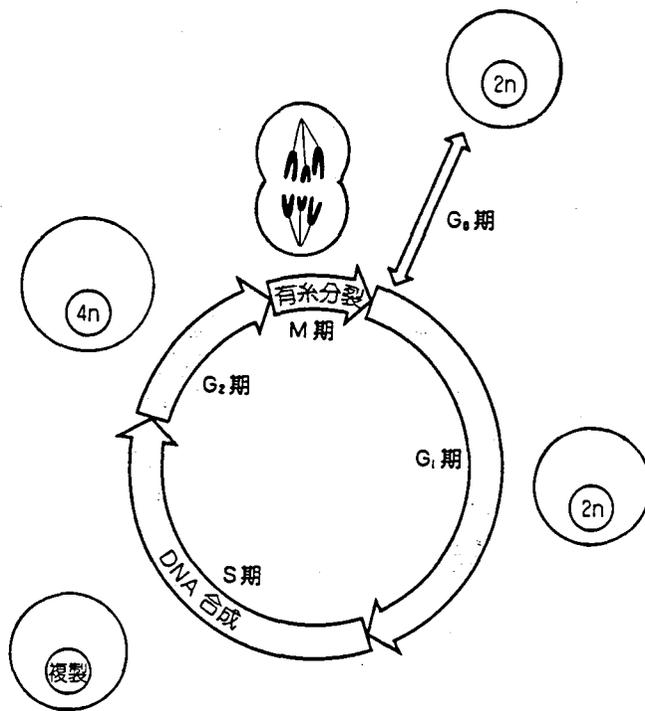


図1. 細胞周期. 増殖細胞は細胞周期とよばれるサイクルをまわっている。
 体の大部分の細胞は増殖を停止し、G₀期とよばれる状態になっている。
 (文献3)より一部修正)

動物の種や臓器により一定しており、このため細胞増殖の調節においては、G₁期が重要な役割を果たしている。

1. 細胞増殖のそれぞれの過程

S期

間期のDNAは、核内の塩基性タンパクであるヒストンと結合してクロマチン（染色質）と呼ばれる数珠状構造（ヌクレオソーム）をなしている。S期に入ると、DNA合成に関わる酵素群（DNA polymerase）の働きにより、DNA合成が始まる。DNA合成は、一つのDNA分子に数千から数万ある複製単位（レプリコン）毎に複製が始まる。このため超微形態学的に複製の過程が泡構造として観察できる。

DNA複製はまずユークロマチン（正染色質、転写活性の高い部位）から始まり、S期後期になってヘテロクロマチン（異染色質、転写の不活性な部位）の複製が始まる。細胞学的にはヘテロクロマチンは塩基性色素でよく染まり、光線顕微鏡で顆粒状あるいは網目状に見えるので、俗に核クロマチンと呼ばれている。

M期

M期は、便宜上、前期（prophase）、前中期（prometaphase）、中期（metaphase）、後期（anaphase）、終期（telophase）の5つの段階にわけられている。

前期 (prophase)

間期に分散していたクロマチンのヌクレオソームは、ゆっくりと凝縮し、染色質フィラメント、染色質糸の段階をへて、形の定まった分裂期染色体を形成するにいたる。間期染色体のヌクレオソームの長さは平均約2 cmあり、ヌクレオソームの圧縮により、染色質フィラメントのループ構造をへて、もとのDNAの長さからすると1万分の1に凝縮されている。各染色体は、これに先立つS期に複製されて2本の姉妹染色体となっており、姉妹染色体どうしはそれぞれの染色体の中央部にある、セントロメアとよばれる領域でたがいに付着している。染色体が凝縮する間に核小体が分散し始め、徐々に消失する。核小体は染色体の短腕に存在する核小体形成体 (nucleolar organizer region, NOR) の集合により形成されているので、染色体の分散は必然的に核小体の消失をもたらす。ヒトのNORは第13,14,15,21,22染色体に位置し、合計10個存在する⁴⁾。

前期のはじめに、細胞骨格 (cytoskeleton) の一部をなしていた細胞質微小管 (microtubules) が消失し、これを構成していたタンパク分子チューブリンの大量のプールが生じる。これらの分子は分裂装置の主要因子、つまり紡錘体 (mitotic spindle) の形成に再使用される。紡錘体は主として微小管からなる双極性の繊維状構造で、まず核の周辺で会合を始める。この紡錘体形成の中心となるのは、中心小体 (centriole) で直径は約0.2 μm である。細胞にはもともと1対の中心小体があり、S期の直前に複製されて2対となる。それぞれの対は分裂中心の一部となり、そこが星状体 (aster) の中心となって、放射状に並んだ微小管群を形成する。2個の星状体は、はじめは核膜のそばに並んで存在しているが、前期の終わりまでにこの1対の星状体を結ぶ極微小管の束 (光線顕微鏡で見える極糸, polar fibers) が急速にのびて、ふたつの星状体を核に沿って急速に押し離していく。こうして、双極性の紡錘体が形成される。なお前期では核膜は残存している。

前中期 (prometaphase) と中期 (metaphase)

前中期には、核膜の消失がおり、それにつづいてはっきりした紡錘体が急速に出現する。核膜はこわれて膜の断片となり、小胞体 (endoplasmic reticulum) の小片と区別がつかなくなるが、その断片は有糸分裂の間をつうじて、紡錘体の周辺に残っている。核の外側にあった紡錘体は、この時期になると核の存在した領域に入る。動原体 (kinetochore) とよばれる特殊な構造がセントロメアの両側に生じ、そこに動原体糸または動原体微小管とよばれる特別な一群の微小管が付着する。これらの繊維は、各染色体の両側面からたがいに逆方向に、紡錘体極に向かって放射状にのび、両極の紡錘体から発する微小管とスライディング・タンパクの作用で相互作用し、互いに中心体または動原体に到達するのを助ける。

前中期での動きの結果、染色体はセントロメアがすべて一つの平面上に並ぶように整列する。この面を赤道面という。染色体は紡錘体極の中間に並び、染色体の長軸は紡錘体の長軸と直角に配置する。各染色体には対になった動原体があり、そこに付着した繊維が紡錘体の両極に向かって引っ張り、染色体は赤道面上に保たれている。(図2)

後期 (anaphase)

分裂中期で赤道面に並んだ染色体は後期において一斉に両極に分離・移動する。後期はまたA、Bの2つのステージに分けられる。後期Aには、染色体は動原体微小管が短縮することによって中心小体に引っ張られるようにして移動する。この間、両極に位置する中心小体間の距離は一定のまま動原体微小管が短くなり、その結果、染色体が中心小体側に分離・移行する。後期Bでは、中心小体間の微小管が伸長することによって極間の距離が増大し、二極に分かれつつある染色体

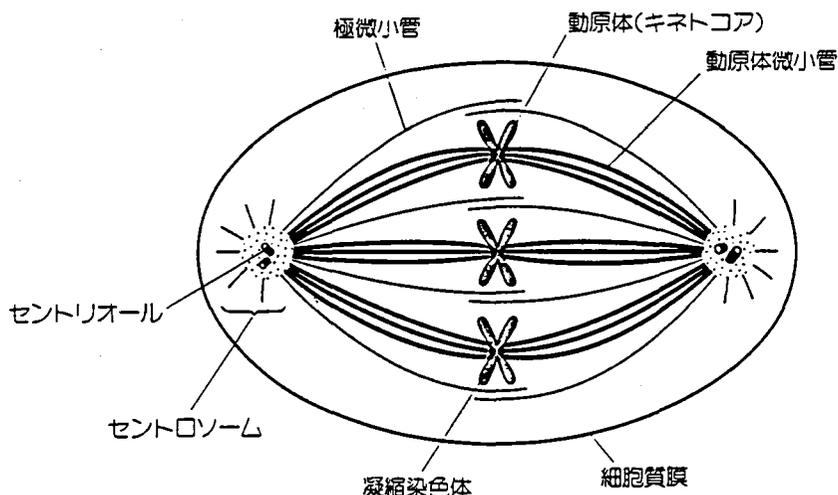


図2. M期の紡錘体の構造と凝縮染色体 (文献3) より引用)

がさらに引き離される。この結果、ふたつの中心小体を長軸として細胞は楕円形を呈するにいたる。(図2)

終期 (telophase)

分離した娘染色体が極に到達すると、動原体系が消失する。極糸(微小管の束)はさらに伸び続け、これまで細胞質内に分散していた核膜断片が娘染色体のまわりに再集合し、新しい核膜が再形成される。各染色体の凝縮していたクロマチンの巻戻しと分散が起こり、核小体がふたたびあらわれ始める。これは染色体上に存在する NOR の共同作用の結果である。

細胞質分裂 (cytokinesis)

細胞質は普通、後期の後半(後期B)または終期のいずれかの時期に分裂する。2個の娘核の間で、細胞中央部の膜にそって収縮環(contractile ring)が形成され、紡錘体の長軸に垂直に内側に向かって陥入し、分裂溝(cleavage furrow)を形成する。この溝は徐々に深くなって、紡錘体残存物の細い束に接するようになる。こうしてできたせまい橋部、つまり中央体(mid-body)はしばらく残っているが、さらにせばまって最後には消失し、完全に分離した2個の娘細胞となる。

2. 増殖時のオルガネラの形態的变化・オルガネラキネシス

ミトコンドリアなどの細胞内小器官には DNA や核をもつものがあり、独自の核分裂やオルガネラキネシスが存在する。比較的大きな器官である植物細胞の色素体や粘菌のミトコンドリアでは、その形態やしきみがかなりよく調べられており、植物ごとに定まった、様々のタイプの増殖、分裂様式が報告されている。しかし、動物細胞などのミトコンドリアは細胞分裂に際して、娘細胞に引き継がれていくが、その数的配分は核遺伝子のように厳密にコントロールされていない。ヒトのミトコンドリア DNA については1981年にその全塩基配列が決定されている⁵⁾。ミトコンドリアは自己複製のための環状 DNA をもち、この複製過程は細胞の周期とは同期していない。ミトコンドリアの複製は、中間期に個々のミトコンドリアに関してはランダムに行われる。しか

し、結果として細胞分裂前には、その数は終期における数の2倍になっている。

なお、細胞当りのミトコンドリアの数は細胞の種類により著しく異なる。

B. 細胞増殖関連分子

細胞周期の概要については上述したが、これが実際に作動するにあたっては、細胞増殖因子が密接にからんでいる。細胞の増殖や成長・分化に関わる因子について Gospodarawicz (1976)⁶⁾ は、「*in vivo, in vitro* において動物細胞の成長を促進するものであって、栄養物質でないもの」という定義を下している。細胞の増殖因子(成長因子)として、最初に発見されたのは、Cohenら(1954)^{7,8)}による神経成長因子(NGF)である。その後、今日までに30種類を超える増殖因子が発見され、そのほかにも受容体蛋白、情報伝達系物質、増殖細胞抗原などが同定されている。大まかな分類をすれば、1) ホルモンなどを含む増殖因子、2) 受容体群、3) 情報伝達系物質、4) その他(増殖関連抗原など)に分けられる。また、癌遺伝子産物も同様に同定されている。それらの物質がどのような機序ではたらくかはここではふれないが、目的物質の性質を知ることが、後述の免疫組織化学的法の応用の成否に関わる重要なことである。(表1)

表1. 癌遺伝子産物の機能的分類

	c-onc	ヒト染色体座	機能・産物	関連疾患・特徴
増殖因子	c-sis hst/KS int-2	22p12-13 11q13 11q13	PDGF-β FGF FGF	食道癌、胃癌、乳癌での増幅
レセプター	erb B-1 erb B-2 c-fms	7p11-13 17q21 5q31-32	TPK, EGF-R TPK, EGFR 類縁 TPK, CSF-1-R	扁平上皮癌、神経膠芽腫 乳癌、胃管状腺癌、卵巣癌での増幅 骨髄性白血病、絨毛癌
非受容体型 チロシンキナーゼ	c-abl c-src-1 c-yes-1 c-fgr	9q34 20q12-13 18q21 1p34-36	TPK TPK TPK TPK	慢性骨髄性白血病の Ph + 染色体 転座部位 B細胞でEBV陽性の時、発現
セリン・スレオ ニンキナーゼ	c-mos c-raf-1	8q11-22 3p25	S/T-PK S/T-PK	精巣に発現、卵成熟に関与 胃癌、肝癌、肺癌
ras 遺伝子群 (GTP結合蛋白)	c-Ha-ras-1 c-Ki-ras-1 c-N-ras	11p15 12p12 1p22/1p11-13	GTPase GTPase GTPase	消化管癌、白血病 点突然変異による膀胱癌、大腸癌、 大腸腺腫など 急性骨髄性白血病、急性リンパ性 白血病(点突然変異)
核蛋白	c-myc N-myc L-myc c-myb c-fos c-erb A c-jun	8q24 2p24-23 1p32 6q15-24 14q21-24 17q21 17q21	DNA結合蛋白 DNA結合 AP-1と共役 甲状腺ホルモンレ セプター AP-1	肺小細胞癌、乳癌での増幅 神経芽細胞腫 急性骨髄性白血病、B細胞リンパ 腫
未分類	bcl-1 bcl-2 dbl lea	11q13 18q21 11q13	小胞体膜タンパク ヒト白血球 共通抗原	濾胞性Bリンパ腫染色体転座部 Bリンパ腫染色体転座部 びまん性Bリンパ腫 胎児肝、Bリンパ腫

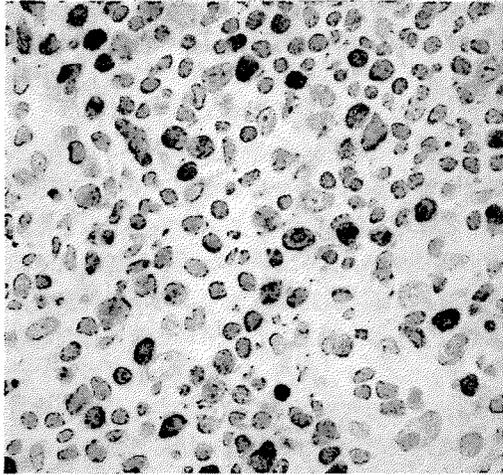


写真1：リンパ節凍結切片のKi-67に対する反応。増殖細胞の核は濃く染まっている。ヘマトキシリン核染色（×480）

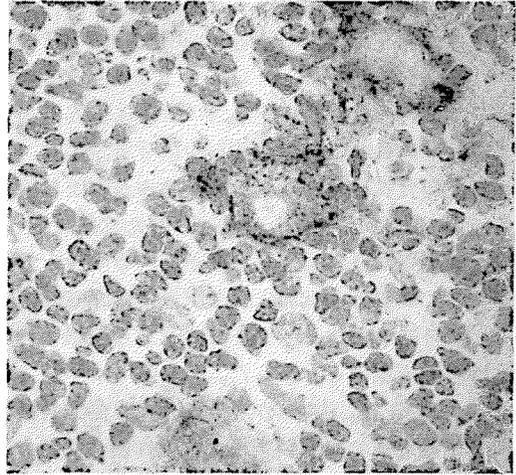


写真2：リンパ節凍結切片中のトランスフェリン・レセプター陽性の組織球。多くは膜表面にあるが、一部は細胞質内に取り込まれている。ヘマトキシリン核染色（×690）

写真1はG₁期以後の細胞核に出現する抗原と反応するKi-67抗体（モノクローナル）⁹⁾を用いて、リンパ節のリンパ球を切片上で染色したのものである。細胞分裂像は見えないが、濃く染まっている核が10%程度みられ、これらは細胞増殖の過程にある。Ki-67の認識する分子については、今日のところ不明であるが、この抗体はG₀期以外の細胞核と反応するもっとも広いスペクトラムをもつ抗体であることが、経験的に確かめられている¹⁰⁾。

トランスフェリン・レセプター¹¹⁾は、G₁期に細胞質の増大、つまりS期に先行し細胞内小器官等の合成の亢進に伴い、トランスフェリン¹²⁾の取り込みの必要性が生じるとともに膜表面に発現される。しかしマクロファージのように本来鉄代謝に関与している細胞では、G₀期においても発現されている。（写真2）

Ⅲ. 細胞増殖関連分子及びその遺伝子の形態学的可視化について

細胞の増殖に関わる分子（増殖因子やそのレセプター、増殖抗原など）とそのアミノ酸配列をコードする遺伝子の存在を組織形態学的に可視化することは、生物学や医学の発展に重要な意義を持っている。生物学的な増殖機構の解明だけでなく、特に医学的応用、病理組織診断の分野ではかなり頻繁に行われるようになっている^{13,14,15)}。生体内でうまく調節されている細胞が異常に増殖する場合、つまり腫瘍や癌において指標となり得る分子の存在が組織中にみとめられ、かつ細胞形態の特徴が確認できることが、病理組織化学に大きな貢献をもたらしている。

前者の増殖因子や増殖関連抗原、癌遺伝子産物などを形態学的にその場所で（*in situ*）可視化する方法には、抗原に対する抗体の特異的な結合、すなわち抗原抗体反応（免疫反応）を用いた免疫組織化学的方法（immunohistochemical method, 以下IHC法）が有効である。もちろん、本法が有効な場合は1) 検出を目的とする物質が抗原性を有し、2) それに対して良質の抗体をつくることが可能であること、さらに、3) その物質が形態観察用標本の作製過程で失われることなく、十分量の抗原性が維持される場合に限られる。増殖関連分子のなかでも糖鎖を有する糖蛋白質などは、糖鎖に特異的に結合するレクチン¹⁸⁾を用いた検出が可能であるが、レクチンとの結合後の可視化にいたる反応法などは抗原抗体法とほぼ同様であり、詳細はここでは取り上げな

い。

また、特定の塩基配列をもった遺伝子の形態学的検索には *in situ* hybridization 法が確立されつつある。

A. 免疫組織化学的検出法

1930年代に始まった抗原・抗体タンパクに可視的マーカーを結合させ、顕微鏡下で見ようとする試みは、1942年に Coons らの蛍光抗体法¹⁹⁾が成功を納めてから、今日までに各種蛍光色素、アイソトープ、酵素、フェリチン、コロイド金などのマーカーが開発され、光線顕微鏡や電子顕微鏡下での観察を可能にした¹⁴⁾。特に酵素抗体法の開発²⁰⁾は、蛍光顕微鏡のような特殊な装置を必要とせず、アイソトープのような取扱いの危険性もすくないために、今日の免疫組織化学の隆盛を呼ぶ原因ともなった。

前述のように、本法が有効なのは目的物質の抗原性とそれに特異的な抗体が存在し、その物質の抗原決定基の形態観察用標本の作製過程での流失や変性が起こらない場合に限られる。このことは、本法の応用に際しては、その目的とする抗原物質と使用する抗体や反応法の性質をいかに良く理解することが重要であることを示している。

1. 抗体について

目標分子の抗原構造と結合する抗体については、その結合反応の特異性 (specificity, 近縁物質との交叉反応性の程度)、親和性 (affinity) および力価 (titer) のいかに、免疫染色の成功のカギをにぎる重要な要素である¹³⁾。免疫染色で用いる抗体には大別すると、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体 (MoAb) とがあり、それぞれ長所短所をもっている。ポリクローナル抗体は一般には抗血清とも呼ばれ、マウスやウサギに抽出精製物質を免疫して得られる血清もしくはその免疫グロブリン分画である。これは認識する抗原決定基が複数であり、したがって免疫染色に用いた場合に、目的分子に結合する抗体の数も比較的多くなる (従って親和性と力価は高い) が、切片上に似かよった抗原決定基を持つ物質が存在することによる交叉反応 (cross reaction) が起こりやすい (従って特異性が低くなる)。

これに対して Köhler & Milstein ら (1975)²¹⁾によるハイブリドーマ技術の確立によってもたらされたモノクローナル抗体は、認識する抗原決定基 (エピトープ) が単一のために特異性は高いが、感度 (親和性, 力価) の点で劣ることがある。そのために例えば酵素抗体法では、後述の PAP 法, ABC 法などを利用して総合的な検出感度を上げる工夫がなされている。むしろ, MoAb の場合でも抗体のスクリーニングがきちんと行われていないと, 偶然にも他の物質と同じ抗原決定基が存在すれば, 完全な共通反応 (co-reaction) を生じ得る。また, 通常のパラフィン切片ではホルマリン等の固定剤, 脱水剤あるいは熱処理の過程で, 抗原によっては変性するものもある。そこで市販抗体では, 逆にホルマリン等を用いて変性させた後の抗原を感作に用いて力価を高めたものもある。したがって MoAb と従来のポリクローナル抗体の利用に際しては, 抗原と抗体の特徴をよくつかんで用いることが重要である。

また, 特に市販ポリクローナル抗体の場合, ロットによって, 力価などに差が認められる場合があり, 注意を要する。

2. 標識法と未標識法

組織または細胞レベルにおける抗原抗体反応は, そのままではもちろん抗体の存在は見えないので, なんらかの標識マーカーを必要とする。主なものには, 蛍光色素, 酵素, フェリチン, コ

ロイド金などがある。抗原と反応させる前に抗体をマーカーで標識しておくのが標識法である。標識法は直接標識した抗体を用いるために、マーカーが反応の途中ではずれない限り、その所在は確実に抗原抗体反応の部位を示す。この点で特異性が高いが、標識による抗体活性の低下が少なからずあり、1抗体当り標識できるマーカー量に限界があるために感度の点で劣る。一次抗体を標識しておくのを直接法と呼び、二次抗体以後に標識抗体を用いるものを間接法と呼ぶ。間接法の変法として多段階法がある。直接法は一般的に感度が低いため、免疫電顕法など超微形態を観察する場合や蛍光抗体法を除いてはあまり用いられていない。

免疫染色に先だつてあらかじめ標識抗体を用意せず、標本内の抗原と結合した抗体を何らかの方法で、その場で標識するのが未標識法である。標識法よりも検出感度を上げることができ、標識による抗体の活性低下を避けられるのが特長であるが、抗原と結合した抗体のみを選択的に標識する過程での特異性が問題になる。

未標識法において用いられるマーカーは標識法の場合と変わりはなく、主な方法には PAP (peroxidase-antiperoxidase) 法²²⁾、プロテイン A (protein A) 法²³⁾ およびビオチン・アビジン法²⁴⁾、ABC (avidin-biotin complex) 法²⁵⁾ などがある。

3. 蛍光抗体法について

蛍光色素を標識マーカーとしたものが蛍光抗体法¹⁹⁾である。

主な蛍光色素には、緑色蛍光を発するイソチオシアン酸フルオレイセン (FITC) と橙色蛍光を発するイソチオシアン酸テトラメチルローダミン (RITC) の2種類があり、この両方を用いた二重染色もよく行われている。蛍光は紫外線によって励起された電子がもとの軌道に戻る際に発するもので、励起光を照射すると色素は一定の波長を持った蛍光を発するが、その光は目に見えて減衰していく。この点が蛍光抗体法の1つの弱点となっているが、他のマーカーにない特色として、微量抗原などが高コントラストで検出できるという利点がある。また暗い背景に明るく輝く蛍光は、きわめて印象的である。しかし、組織や細胞によっては自己蛍光を発する場合があり、フィルターの組合せによりこれをカットしなければならない、蛍光抗体法は蛍光顕微鏡という高価な特殊光学装置を用いなければならない、また作製標本が永久標本として保存できないので、そのつど写真撮影をしておく必要がある、などの欠点がある。

4. 酵素抗体法について

酵素タンパクを抗体標識のマーカーとして用いるのが酵素抗体法である。免疫染色に用いられる標識酵素にはおもにペルオキシターゼ (POX)²⁶⁾ やアルカリフォスファターゼ (ALP)²⁷⁾、グルコースオキシターゼ (GO)²⁸⁾ がある。

酵素がマーカーとしての機能を発揮するのはその酵素活性によってであり、したがって酵素抗体法による免疫染色法の特長は抗原抗体反応と酵素組織化学反応の2段階えになることである。酵素活性は最終的には発色性の不溶性沈着物として検出されるので、その後抗原と抗体の結合が解離しても、染色像は変わらず、標本の永久保存が可能となる (図3)。さらに染色標本が通常の光線顕微鏡を使って観察できることなど、簡便性にも優れている。

他方、酵素抗体法の問題点としては、組織内に含まれる内在性の POX や ALP が非特異的染色をもたらすことがあり、その活性を失活させなければならない。GO は植物細胞のみに存在する酵素で、動物細胞を対象とする場合には、このような問題は生じない。ただし発色カップラーとして用いられるテトラゾリウム塩類は、粗大顆粒状沈着物を生じ、細胞レベルでの反応の局在性はきわめて悪い。

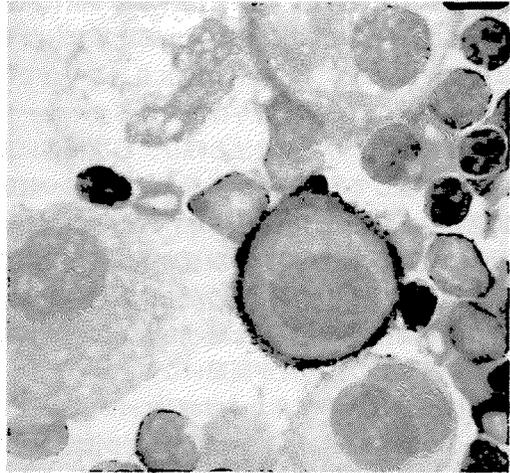
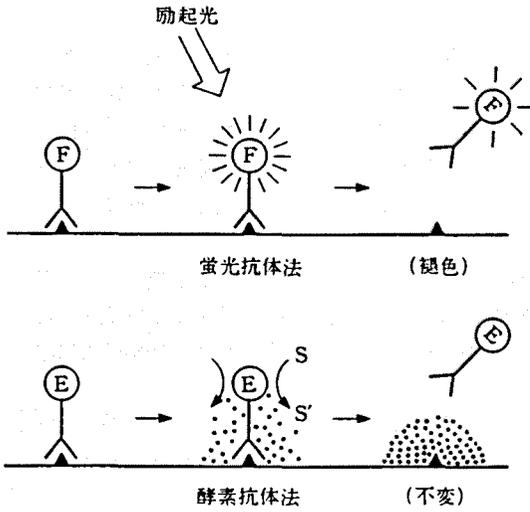


写真3：CD30が膜表面に陽性の反応性中皮細胞。
ヘマトキシリン核染色 (×1200)

図3. 蛍光抗体法と酵素抗体法における可視化の原理の違い (文献16)より引用)

写真3は、肝硬変患者の腹水中に出現する反応性中皮細胞をCD30を認識するKi-1抗体 (MoAb) を用い、ALP標識 avidin-biotin法²⁹⁾で染めたものである。微絨毛を含め中皮細胞の細胞膜表面に限局した反応が認められる。周囲のマクロファージやリンパ球には全く共通反応がみられない。

5. 免疫電顕法について³⁰⁾

電子顕微鏡を使えば、透過像や走査像において抗原物質の所在を超微構造の上に捉えることができる。現在、行われている免疫電顕法は、

- ①4~6 μ mの固定後凍結切片上で抗原抗体反応を行う pre-embedding 法,
- ②超薄樹脂切片上で抗原抗体反応を行う post-embedding 法,

の二つの方法に大別される。①はIgG FabあるいはIgG Fab'を用いた酵素標識抗体法と組み合わせ、②はPOXをマーカーとして用いるPAP法やABC法、protein A gold法³¹⁾などと組み合わせ用いられている。

免疫電顕法は、特に細胞膜や細胞内小器官内の抗原局在の観察に優れている。

6. 対照 (コントロール) のとりかた

免疫染色の結果が陽性反応を示した場合、目的抗原の存在が直ちに証明されたと判断することはできない。それは、免疫染色に用いる免疫グロブリンあるいは酵素等の標識、架橋剤として用いるビオチン、アビジンなどはいずれも抗原抗体反応によらずとも、組織や細胞標本と種々の機序によって結合し得るからである。しかも酵素抗体法の場合は内因性酵素の阻害に失敗する可能性もあり得る。また染色性が弱く特異的に染まっているのか、単なるバックグラウンドすなわち非特異的吸着によるものなのか判断ができない場合もある。そのために、その陽性像が確かに抗原抗体反応の結果に基づくという証拠をそろえる必要が求められる。実験には必要に応じて、陰性対照法 (negative control) もしくは陽性対照法 (positive control) を加えて行うことが求めら

れる。

陰性対照法の原理は、その反応系の抗体活性や抗原活性を意図的に低下あるいは消失させると、それに相関して染色性が低下ないしは消失することを証明するものである。PAP法やビオチン-アビジン法などの一次抗体が非標識である系では、一次抗体を除いた残りの段階を標本と反応させ、それが標本と結合しないことを確認するというかたちでの陰性対照法がよく用いられている。

陽性対照法とは、免疫染色の結果が陰性であった場合に、それが目的の抗原が存在しなかったため、用いた抗血清や標識抗体には欠陥はなく、また反応条件や手技にも問題のないことを示すために行われるものである。すなわち、あらかじめ検出を目的とする抗原と同じ抗原が確実に含まれている標本に、同じ抗体で同一の条件下に免疫染色を行い、予測どおり陽性像が得られることを確認する。実際には、各種抗原が含まれているのがはっきりした未染標本を作製・保存しておくという方法がとられている。

7. 免疫組織化学の実際

ここでは、簡便性や汎用性の点から酵素抗体法を中心に、標本作製法、反応法、発色法について大略を述べる。

7-1. 標本作製法

組織化学では、組織の経時変化（自己融解）をさける、可溶性成分の拡散を防ぐ、組織形態を保持する、などのために固定操作を要する。また、IHCでは特定の抗原構造に結合する抗体によってその局在を明らかにするので、標本作製の過程で目的とする物質の抗原性が失われてしまうとその意味をなさなくなる。したがって最初の標本作製は最も注意が払われなければならない。

染色用標本には組織標本と細胞標本があり、前者にはパラフィンや合成樹脂に包埋した組織切片、凍結切片などがあり、後者には塗抹・捺印標本、培養細胞（単層培養細胞、浮遊細胞）などがある。組織標本は固定→薄切→ガラススライドへの接着、細胞標本は、ガラススライドへの接着→固定という操作を受けるわけであるが、目的物質にとって、適・不適の固定法があり、現在までに様々な工夫が積み重ねられてきた。

(固定液)

固定液には、蛋白凝固剤と架橋剤の2種類のものがあり、前者にはメタノール、アセトン、5%酢酸/エタノールなどが、後者にはホルムアルデヒド (FA)、グルタルアルデヒド (GA)、*p*-ベンゾキノンなどがあり、両者を併用することも多い。小さな抗原などは架橋剤による固定で最もよく保存される。FAはGAより架橋力が弱く、IHCのためにはGAよりよい架橋剤で、細胞膜に浸透性を与え、制限された架橋のために免疫反応を阻害しにくい。市販のホルマリン液 (37% FA 溶液) はIHCに有害と思われるメタノールを安定剤として含むので、解重合された単量体のパラホルムアルデヒド (PFA) をもとにしてFAを作製して使うべきである³²⁾。架橋剤による過度の固定は、抗原をマスクしてしまうので注意を要する。なおマスクされた抗原を掘り出す (エッチング) のに、トリプシンやペプシン、プロテナーゼ Kなどが用いられることがある³³⁾。

(組織標本作製法)

パラフィン切片は包埋まではおろか抗体反応までの過程で様々な薬品や加熱の処理を受け、最も抗原性を失い易い。また、脂溶性抗原には使用できない。したがって新たに免疫染色用標本を作製する際には、抗原に応じた固定・脱水法を選択するなどの点に留意することが望まれる。一般には10%ないし20%の緩衝ホルマリン中で、半日から2日ほどの固定が行われているが、強度

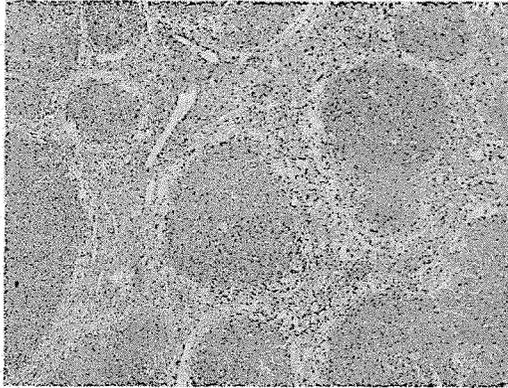


写真4：CD20陽性のB細胞の集合からなる悪性リンパ腫。ヘマトキシリン核染色（×30）

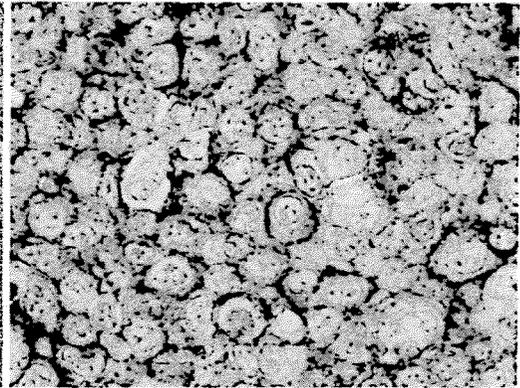


写真5：同一標本の拡大。リンパ腫細胞膜の陽性反応がみられる。陰性のT細胞がかなりまじっている。ヘマトキシリン核染色（×300）

の固定は抗原性の低下をもたらしやすい。

写真4にホルマリン固定パラフィン包埋材料で濾胞性リンパ腫をL26抗体で染めたものを示す。陽性細胞が小結節を形成している。L26抗体（MoAb）は日本で開発されたのもので、PanB抗原（CD20）を認識するもっとも有用な抗体として世界的に評価されている。

写真5はその強拡大でB細胞の膜によく限局した反応がみられ、反応陰性のT細胞や組織球との鑑別は容易である。

凍結切片は、パラフィン切片に比べて形態の保存の程度はやや落ちるが、抗原の移動、流出、失活は最小限に抑えられ、ある種のリンパ球表面抗原などはこの方法でないと同定できない。代表的な作製法には、未固定凍結法、PLP固定凍結法、PFA固定凍結法などがある。いずれもO.C.T. Compoundに包埋して、急速凍結を行う。

AMeX包埋法は、ホルマリン固定パラフィン包埋切片と同様な形態を保ち、通常のパラフィン切片では同定できない多くの抗原を検出できる包埋法である³⁴⁾。

これら樹脂包埋試料は、マイクロームで3~5 μ mの切片にした後、卵白などで処理したスライドグラスに貼付した後、よく伸展させる。気泡ができた場合は、その部分に非特異的染色をもたらすことが多いので気をつける。スライド用コーティング剤には卵白アルブミンの他にグルタルアルデヒド（GA）、ゼラチンなどがあるが、パラフィン切片に対して、抗原性の賦活化のためにタンパク分解酵素処理を行うことが多く、これらの接着剤では剥離をきたす恐れがあるので、ネオブレンやpoly-D-lysineなどが用いられる。アミノ酸ポリマーの場合、スライドは長期保存ができない欠点がある。

（細胞標本作製法）

塗抹・捺印標本：末梢血等の場合には直接ガラススライドに塗抹し、急速風乾後、適切な固定処理が行われる。組織や臓器の断面からの捺印標本も同様に処理する。血液等の場合、比重遠心法を利用して特定の細胞群だけを選別後、塗抹標本作製することも行われている。

写真6に捺印標本のCD3染色の例を示す。CD3はT細胞表面に存在する分子（T3）で、T細胞レセプターと共同して働き、抗原認識に必要な分子である³⁵⁾。材料はT細胞性リンパ腫で大型の腫瘍細胞と小型の正常T細胞が陽性だが、混在するB細胞は陰性である。

培養細胞標本：接着性の培養細胞は必要に応じて風乾するか、あるいはすぐさま固定作業に入

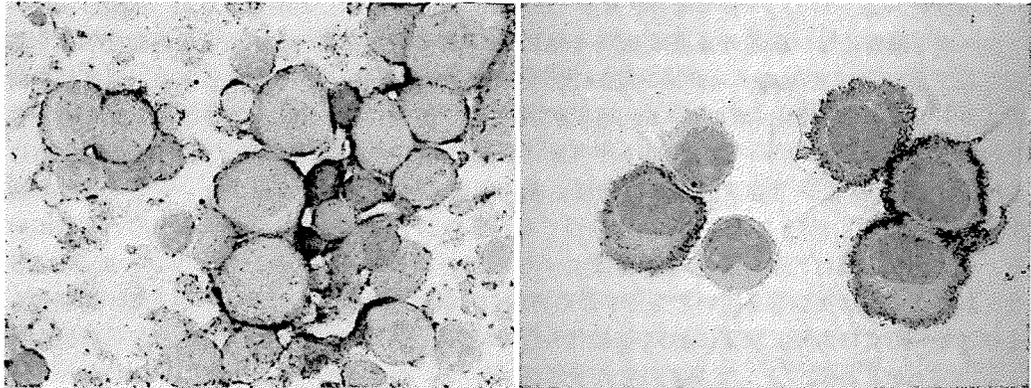


写真6：リンパ節の捺印標本のCD3に対する反応。ヘマトキシリン核染色（×900）

写真7：有毛細胞白血病のCD20に対する反応。細胞遠心標本。ヘマトキシリン核染色（×1000）

る。浮遊細胞等はPBSで洗った後、コーティングしたガラススライドにCytospinを用いて遠心力で貼りつける。Cytospinがない場合でも、浮遊固定後に自然沈澱を利用して接着させる方法もある³⁶⁾。また、遠心して適度に濃縮した細胞懸濁液を塗抹してもよい。

写真7は有毛細胞白血病の脾臓から比重遠心法で抽出した有核細胞を、Cytospinを用いてガラススライドに貼つけたのち、L26抗体で染めたものである。白血病細胞表面の毛状突起に陽性反応がみられ、混在する小型リンパ球は陰性である。

組織部位や目的物質において望ましい固定・処理法があるので、標本に応じた処理を確定してマニュアル化しておくことが必要である。

7-2. 抗体反応

図4に筆者らの用いているALP標識 avidin-biotin法の模式図を示す。抗体の希釈率は抗体過剰域でありうる限度内で出来るだけ希釈したものが用いられ、これによってその抗体に多少とも混入している交叉反応性抗体による染色性が減弱し、また免疫グロブリン自体の非特異的な組織結合性が減少する。

また、抗原との反応は反応温度にかかわらず、ほぼ30分～1時間で飽和に達する³⁷⁾。

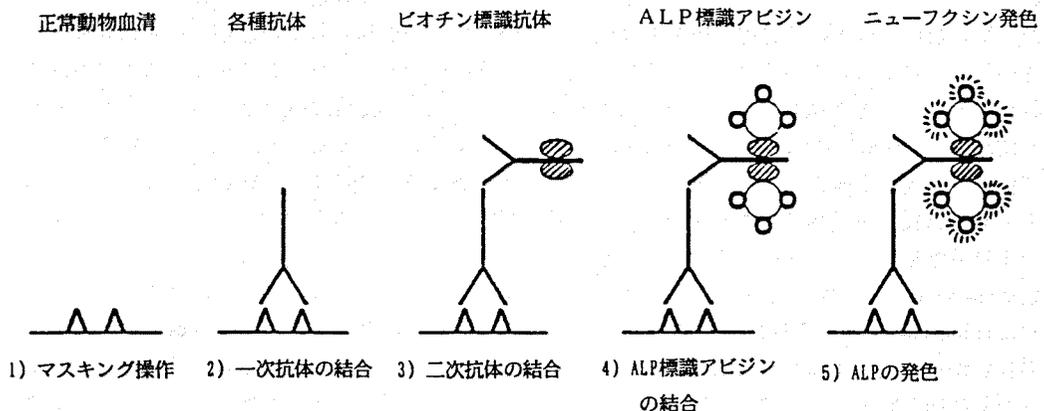


図4. ALP標識 avidin-biotin法（難波法）の反応模式図（文献76）より引用）

7-3. 発色

マーカー酵素には、前述のようにPOXやALPが主に用いられている。前者は過酸化水素を基質として用い、ジアミノベンチジン(DAB)を酸化させる反応(褐色産物を形成、発癌性の問題あり³⁸⁾)で、後者は、ナフトール-AS-リン酸やナフトール-AS-BI-リン酸等のナフトール体を基質として用い、ファースト レッド TR(赤色反応産物をつくる、ただし有機溶媒に溶ける)、ニューフクシン(有機溶媒に溶けない赤色反応産物をつくる)や、ファースト ブルー BBN(有機溶媒に溶ける青色反応産物をつくる)等のジアゾニウム系の発色剤が用いられている。この論文で掲げた免疫染色の写真はすべてALPを標識とし、発色にはナフトール-AS-BI-リン酸とニューフクシンを用いてある。この方法の特徴はカラーコントラストがよく、局在性もすぐれている点にあり、次第にPOX法に代りひろく用いられつつある。

7-4. 非特異的染色の防止

内因性酵素の阻害

組織によっては標識として用いるPOXやALPを内因性に保有している。例えば、ALPはある種の腫瘍細胞だけでなく血管内皮やいくつかの上皮細胞で活性がみられる。これら内因性の酵素活性を阻害するために、POX法では過酸化水素で、ALP法ではL-レバミソールで処理を行う。正常のマクロファージには若干のALP活性があるが、写真3では、L-レバミソール処理のため、これは完全に抑制されている。POX法を用いた場合の難点は、固定後の一次抗体反応前に酵素活性を阻害するために、少なからず抗原活性を損なうことである。この欠点を補うために基質液にアジ化ナトリウム(NaN₃)を加えて、内因性酵素を阻害する方法もとられている。ALP法の場合は、酵素反応を行うときに阻害すればよいので、それまでの抗体反応には何ら支障はない。しかし、腸管上皮や子宮内膜に存在する腸型ALPアイソザイムに対してはレバミソールは無効である。その理由は標識用ALPが仔ウシの腸管由来だからである。L-フェニルアラニン、腸管型ALPの阻害剤であるから、これを用い標識ALPを例えば腸管型アイソザイムに変えれば、この点はクリアできる。パラフィン切片の場合は、固定包埋処理の段階で熱によりALPが失活しているため、内因性ALPの阻害操作は必要ない。

8. 限界と問題点

IHC法は物質の検出、同定法として優れた方法であるが、決して万能ではなく、またいくつかの問題点を内含している。例えば、未だすべての物質に対して特異抗体の作製が成功するにはいたっていない。IgMは分泌型と膜型では膜接着部の一次構造が異なっているが、後者に対する抗体の作製は目下のところ成功していない。他方、感度の向上や、より広範な検索によりこれまで特異的とされてきた抗体にも新たな交叉反応が明らかになる場合もある^{39,40,41)}。例えば、CD15を認識するLeuM1やCD30を認識するKi-1抗体がそうである。また、すべての抗原物質について標本内固定法が確立されているわけでもない。また免疫染色法によって検出し得ても、それはあくまで物質の抗原構造(エピトープ)の一部を捉えているに過ぎないのであって、そこに完全な生理活性をもった分子としての物質が存在することを保証するものではない。すなわち免疫染色が陽性の時、物質そのものを証明したのではなく、正確にはその物質の抗原性(immunoreactivity)を検出したと表現すべきなのである。さらに言うところ抗原性の存在証明はその物質がその場で生産されたことを証明するものではない。アルブミンやIgGのような低分子タンパクは固定時の二次的浮遊により体液中から細胞内に移行することが証明されている。言い換えると、抗原性は物質によってはきわめて不安定であり、加熱や固定液の作用を受け、経時的に

容易に変化し、抗原性を減弱、消失することが多く、物質の存在そのものと必ずしも平行しないのである。さらに、たとえ抗原性が保持されていても、抗体が接近しにくいような位置あるいは状態にあれば必ずしも免疫染色によって検出されるとは限らない。逆に *in vivo* では存在しない物質が検出されることもある。したがって、免疫染色が陰性の場合には陽性の場合ほどの説得性をもってその物質の不在を主張するまでには至らないし、陽性の場合でもその解釈には慎重を要する。

B. *in situ* ハイブリダイゼーション法

スライドガラスに接着した細胞試料の上で核酸-核酸ハイブリッドを形成させ、特定の塩基配列の局在部位を明らかにする *in situ* ハイブリダイゼーション法（以下 ISH）は、1969年、Gall と Pardue によって初めて報告された⁴³⁾。当初は細胞中のウイルスゲノムの証明⁴⁴⁾や、染色体上におけるリボゾーム RNA 遺伝子座の決定など、単位細胞当り多数のコピーを有し、なおかつプローブとなる DNA あるいは RNA が精製可能な場合にのみ可能な解析法であったが、その後、細菌のプラスミドを利用した cDNA のクローニング技術の発達とともに、その応用範囲は次第に広がり、現在では、生体に存在するさまざまな生理活性物質、修飾・分解酵素、受容体タンパクの mRNA の細胞内局在の検出をはじめ、ウイルスの検出や染色体上の遺伝子マッピング⁴⁶⁾などに次々と応用されている。

IHC 法においてはしばしば偽陽性、あるいは固定その他の処置により偽陰性の結果が問題になるのに対して、核酸構造はきわめて安定で、ISH ではそのようなことは見られない。また、IHC 法によれば、もしもタンパクを産生していなければ、陰性になってしまうが、ISH 法では抗原を発現していないプロウイルスなども検出できる、という利点がある。

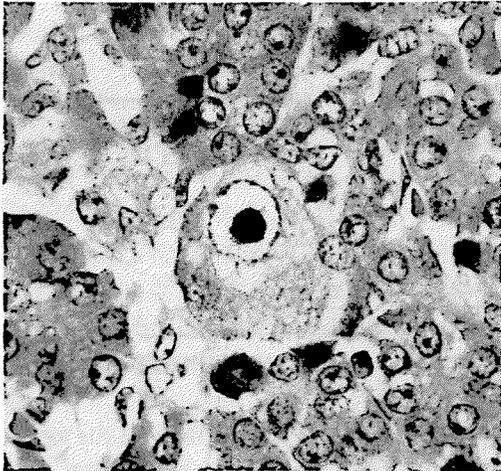


写真 8 : CMV に感染した脾臓の上皮細胞. HE 染色 (×600)

サイトメガロウイルス (CMV) はヒトにひろく感染する DNA ウイルスの一種で、写真 8 のように感染細胞の核内に巨大核小体まがいの封入体を形成し、細胞も巨大化する。興味深いことに、CMV の感染を受けた細胞は正常には存在しない CD15 (hapten X) を発現する。写真 9 はこれを LeuM1 抗体 (MoAb) を用いて証明したものである。封入体の部分は陰性で、細胞質が陽性となっている。

1. ISH 法における非アイソトープ標識の利点

これまで、感度の点からおもにアイソトープ標識プローブを用いて、オートラジオグラフィによってハイブリダイゼーションを可視化させる方法が用いられてきた。しかし、アイソトープは核種によって長短はあるが、飛程 (^3H で $1\sim 3\ \mu\text{m}$, ^{32}P で $10\sim 15\ \mu\text{m}$) を有しているために、目的とする DNA や mRNA と現像銀粒子との間に、不可避的に解離をもたらす。また、感度については ^3H では、約 2~3 カ月、 ^{32}P では数日間の乳剤曝露期間を必要とする。したがってアイソトープ標識においては、感度か解像力のどちらかを犠牲にしなければ

ばならなくなる。

これに対して非アイソトープ標識の ISH は、分解能が優れており、ピンポイントにプローブの局在を示すことが可能である。これまでは感度が低いといわれてきたが、非アイソトープ標識プローブを用いても、遺伝子が10コピー以上あれば検出が可能である、という報告もある⁵⁵⁾。

また、非アイソトープ標識を用いた場合の利点には、

- ①特異性の高い抗体が作製でき、非特異的ノイズの問題も少ないこと（標識マーカーの検出に抗原抗体反応を用いる場合）、
- ②標識による hybridization 効率の低下が少ないこと、
- ③操作が簡便でかつ安全に取り扱えること、
- ④プローブに半減期はなく長時間安定で貯蔵がきくこと、
- ⑤プローブの可視化は、前述の免疫組織化学的方法が可能で、迅速にその結果が得られること、などがあげられる。

2. 原理 (図5)

DNA や RNA は、4 種類の塩基すなわちアデニン(A)とチミン(T, RNA ではウラシル(U)), そしてグアニン(G)とシトシン(C)との間の水素結合により相補鎖 (ハイブリッド) を形成する。この二本鎖結合は極めて特異的で、プローブとして用いる DNA や RNA の長さやその GC 含量などの条件に応じて、溶液の pH や塩濃度、formamide 濃度や温度を変えることによって、不必要な雑種形成を抑え、目的とする遺伝子または cDNA にうまく結合させることが可能となる。

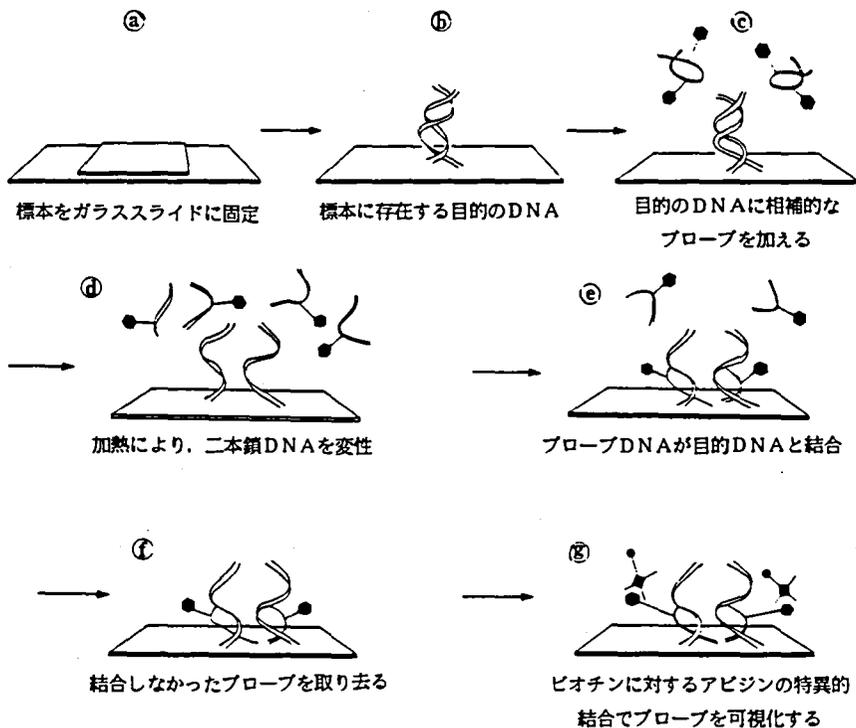


図5. *in situ* ハイブリダイゼーション法の原理

3. 一般的注意

ISH での標的分子である DNA や RNA は、それぞれ DNase と RNase によって分解される。したがって、組織中に既に混入している DNase や RNase の活性をできるだけ抑えるとともに、これらの酵素の実験系への不必要な混入を極力避ける必要がある。DNase 活性の阻害はオートクレーブ (120℃, 25min) や EDTA を添加するなどして、RNase 活性の阻害は、ガラス器具なら乾熱滅菌処理 (180℃, 2~3hr) し、その他はジエチルピロカーボネート (DEP, 0.1~0.2%, RT, 20min) などのエステル化剤処理をおこなう。汗や唾液中には RNase が含まれているので、実験中は常時ゴム手袋を使用して無駄口を控える。実験室を常に清潔にしておくことはもちろんである。また、ガラスなどへのプローブの吸着による損失を防ぐために、ピペット、カバーガラスなどはシリコナイズして、疎水化しておいたほうが良い。他方、DNA を標的とする場合には細胞内の RNA は、RNase により除去する必要がある。

表 2. ISH に利用される非アイソトープ標識マーカー

標識物質	標識方法	特筆すべき点	参考文献
Biotin	nick translation 法, random primer 法		47)
	photo-biotin acetate による光反応		48)
	polymerase chain reaction 法		69)
HRP		分子量大	
DNP	dinitrobenzaldehyde との化学反応		49)
AAF	2-acetyl aminofluorene などとの化学反応	発癌性	50)
Sulfon	o-metylyl hydroxylamine と bisulfite による化学反応		51)
T-T dimer	紫外線照射による物理的反応		52)
Hg/SH-hapten		Hg, KCN の使用	

4. プローブの作製・標識法

非アイソトープ標識法としては、スルホン化法、ビオチン化法、ジニトロフェニール (DNP) 法、5'-プロモデオキシウリジン (BrdU) 法、T-T dimer 法などがある (表 2)。標識分子は、出来るだけ小さいものの方がハイブリダイゼーションを阻害しなくてすむと思われる。その点では T-T dimer 法が最適だと考えられる⁵²⁾が、現在、T-T dimer に対する市販抗体はなく、研究室での作製が必要となる。現在、もっとも多く用いられているのはビオチン化プローブであろう。ビオチン化プローブの標識法には、ニックトランスレーション法やプライマー伸長法、フォトビオチンを使った方法や polymerase chain reaction (PCR) 反応を用いたものまでである。用いるプローブの至適長は、組織への浸透性や非特異的反応の有無から、数100base から 1 kb 以下のものが一般的に用いられている。

5. *in situ* ハイブリダイゼーションの実際

5-1. ISH (DNA) 法

ISH (DNA) の各操作でのポイントを述べる。おもに N-myc や c-myc などの癌遺伝子増幅のみられる腫瘍の例や特定のウイルス DNA の検出に用いられている。

5-2. 標本の作製および前処理

組織切片及び塗抹標本・培養細胞ともに、免疫染色の場合と同様な標本作製方法が用いられるが、いくつか注意すべき点があるのでそれについて述べる。

(接着) ISH 法は、急激な温度変化を伴う操作を含んでおり、組織の膨張なども起こりやすく、特にパラフィン切片ではスライドガラスからの組織剥離が起こりやすい。したがって、組織標本の作製の際には、パラフィン切片・培養細胞ともにコーティング剤を塗布したガラススライドを用いる必要があるが、免疫染色の場合に用いられる卵白アルブミンやゼラチンなどでは、蛋白分解酵素による前処理の過程で同時に分解をきたすことがあり、そのために poly-L (D)-lysine, ネオブレン, 水酸化ケイ素 (シラン) 等の接着剤で処理したガラススライドを用いる必要がある⁵⁷⁾。特にネオブレンやシランは、接着力もつよく非特異的染色などの少ないコーティング剤である⁶¹⁾。

(固定) DNA は、核の中にあるので、ISH を行うには、核酸の露出・固定を行わなくてはならない。固定法には、周囲の蛋白を変性・凝固させ、物理的に核酸を固定するか、あるいは核酸と周囲の蛋白質とを架橋するかの二通りの方法がある。前者の固定液としては、エタノール/酢酸 (3:1) が、後者としてはパラホルムアルデヒド (PFA) やグルタルアルデヒド (GA) などが使用されている。しかし、GA は強力な架橋を形成するためにむしろハイブリダイゼーションを阻害する、と考えられている。

現在、もっとも良好な結果が得られ、広く用いられている固定液は 4% PFA/PBS である。

(前処理)

蛋白架橋剤による固定標本では標的核酸の露出を促す目的で、塩酸処理・熱処理・酵素処理などの種々の前処理を必要とするが、固定の種類・強度などによって微妙なさじ加減を必要とし、過度の処理はかえってシグナルの減少をまねくおそれもあり、標本に応じていくつかの固定条件を使い分けることも求められる。

実際には、

- ① 脱パラ後、0.2N HCl (RT, 30min) の処理でヒストンをはじめとする塩基性蛋白質を除去し、核酸を露出させる。
- ② PBS で軽く洗い、proteinase K (100 μ g/1ml 1 \times TE) (37 $^{\circ}$ C, 10min) 処理する。この操作でも核酸の周囲の蛋白質を消化・除去する。proteinase K 溶液は、使用の30分前から37 $^{\circ}$ C にしておき、混入の疑われる RNase や DNase の消化をおこなっておく。
- ③ PBS で洗浄後、100~200 μ l の RNase (DNase free) で (37 $^{\circ}$ C, 1hr, 湿室) 処理する。
- ④ PBS で軽く洗浄後、4% PFA/PBS で後固定 (RT, 5min) する。これによって露出した核酸分子を再び組織に固定させ、また損傷した組織そのものも再固定する。
- ⑤ 2mg/ml グリシン/PBS で洗浄し、余分なアルデヒド基を中和する。
- ⑥ エタノール上昇系列で脱水、乾燥させる。

RNase は、10mg/ml の濃度で 10mM Tris-HCl (pH7.6), 15mM NaCl に溶かし、100 $^{\circ}$ C の沸騰水中で15分間処理し、そのまま常温に下がるのを待って、小分けして-20 $^{\circ}$ C で保存する。使用時 PBS で、100倍希釈して用いる。

5-3. ハイブリダイゼーション

- ① 切片の載ったスライドガラス上にハイブリダイゼーション溶液をかけ、適当な大きさのカバーガラスをかける。その後、周囲をペーパーバンドで密閉する。
- ② 92 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C くらいにした恒温槽で切片とプローブを同時に変性させる。
- ③ 氷上で急冷する。
- ④ 37~42 $^{\circ}$ C で1昼夜反応させる。

[hybridization 溶液の作製法]

切片 1 枚当たり：

20× Standard sodium citrate (SSC)	2 μ l
10% dextran sulfate	2 μ l
formamide	10 μ l
10mg/ml サケ精子 DNA	0.8 μ l
2 μ g/ml ビオチン化プローブ	2 μ l
蒸留水	3.2 μ l

サケ精子 DNA は、プローブ DNA とともに混合相を形成し、プローブ同士の annealing をふせぐ。市販のもの、もしくは蒸留水に溶かしてソニケーターで揃断化し、少量ずつ エッペンドルフチューブに分注し、 -20°C で保存しておく。dextran sulfate はプローブの局所の実効濃度を増大するとともに network 形成の促進に役立つ。同様の目的で、ポリエチレングリコールなども用いられている。

ハイブリダイゼーションの温度は、DNA のハイブリダイズする速度が最大になる値を設定する。実際には、 T_{m50} (2 本鎖 DNA の 50% 量が解離する温度；融解温度) をもとに決めるのであるが、溶液中における T_{m50} は、50ヌクレオチドを越えるプローブ DNA に対して、

$$T_{m50} = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6 \log M + 0.41 (\% G + \% C) - 500/n - 0.61 (\% \text{formamide})$$

M ；ハイブリダイゼーション溶液のイオン強度 (mol/l)

n ；プローブの最小のもの鎖長

という経験的な実験式が得られており、混合相においては、 T_{m50} より 25°C 低い温度で DNA のハイブリダイゼーション速度が最大になることが知られている⁵³⁾。ただし、*in situ* ハイブリダイゼーションにおいては、この温度より、 5°C 程度低い方が、ハイブリダイゼーション効率がよいという指摘がある⁶⁰⁾。この T_{m50} は、プローブの標識率によっても変わってくるので、厳密な実験を行うときは、研究室で標識を行ったプローブは、融解曲線を求めておくことが求められる。

5-4. 洗浄

ハイブリダイゼーション後の洗浄は、非特異的な結合をしたプローブを除く重要な操作である。洗浄液の塩濃度と温度が重要で、塩濃度が低いほど、また温度が高いほど形成されたハイブリッドの解離がおこりやすくなる。ただし、過度の洗浄は、形態の損傷も引き起こす可能性を持っているので注意が必要である。

- ①ペーパーボンドを剥して 2× SSC 中に 30 分間程放置し、自然にカバーガラスが剥がれるのを待つ。
- ② 50% formamide (FA) / 2× SSC 中で 37°C 1 時間洗浄
- ③ 50% FA / 1× SSC 中で 37°C 1 時間洗浄
- ④ 1× SSC 中で 37°C 1 時間洗浄

上記の方法でも、まだ非特異的の反応がみられる場合は、より厳しい条件で洗浄をおこなう。つまり、塩濃度を下げるか formamide 濃度を上げるかの方法を取る。例えば④の後に 0.1% SSC で短時間洗浄するとよい。

5-5. 発色

プローブに対する抗体反応または avidin-biotin 反応などを用いて、プローブを酵素で標識し、酵素組織化学的手法で発色する。標識酵素の発色には、avidin もしくは streptavidin を介した反

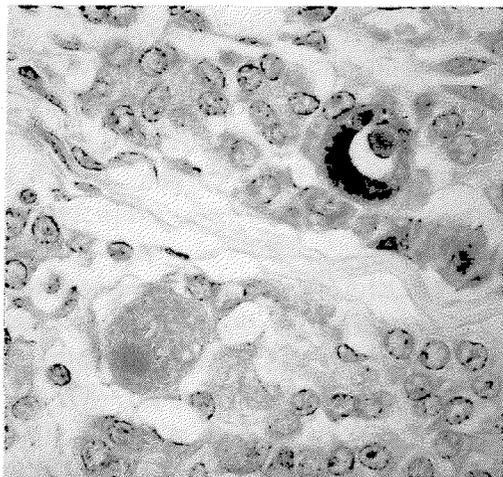


写真9：CMV感染巨細胞のCD15に対する反応。脾臓。ヘマトキシリン核染色（×600）

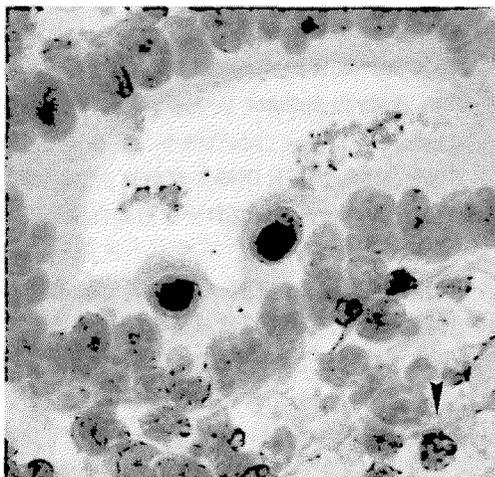


写真10：ISH法によるCMVのDNAの証明。核内封入体が陽性。ヘマトキシリン核染色（×720）

応を用いることができる。発色にはDAB反応やALP反応がよく用いられている。

写真10はCMV感染を受けた細胞中のウイルスDNAを、ENZO社のビオチン化プローブを用いてISH施行後、ALP-avidinを結合させ、発色したものである。写真9と異なり、核内封入体が陽性となっている。またHE標本である写真9では封入体と核膜のあいだに明輪がみられるが、写真10ではこの部分にもビリオンが散在していることがわかる。矢印のリンパ球の核には点状の陽性反応がみられ、これは封入体形成の前段階と考えられる。

5-6. コントロールについて

ISH法においても、コントロールが必要である。陰性コントロールは用いるプローブとGC含量が同様なものが良いが、実際にはむずかしいので、同じくらいの長さの各種プラスミドのDNAなどが用いられている。陽性コントロールは確実に陽性となる切片を用いる。また、可能ならばサザンブロット法やドットブロット法で、目的のDNAの存在・増幅などが確認できたらよい。また、プローブの発色に酵素抗体法を用いた場合には、ハイブリダイゼーション溶液からプローブのみを除いた陰性対照標本の作製も必要である。

6. ISH (mRNA) 法

mRNAを検出する場合は、核酸の変性が不必要なこと、パラフィン切片ではRNAが断片化されていることが多いので凍結切片もしくはAMeX包埋切片を用いる必要があること、mRNAの流失・分解などに気をつけて慎重な固定・標本作製をおこなうことなどが考えられる。その他の操作はほぼDNAの場合と同様である。また、目的のmRNAによっては、断片化したプローブを用いた方が特異性を保ち、不要な雑種形成を抑えるためにはよい場合もある。コントロールには、シグナルがDNase処理で消えず、またRNase処理で消えることを確かめる必要がある。

7. 免疫染色との二重染色

ISH (mRNA) 法とIHC法を併用すれば、特定の組織・細胞の遺伝子の転写産物と翻訳産物の

様態の比較が可能となる。すなわち ISH で転写をチェックし、IHC で翻訳をチェックするわけである。この併用法を用いれば、両者の特異的染色結果の検定のみならず、細胞内に局在しているタンパク物質が、細胞への取り込みによる単なる貯留によるものか、実際にその細胞で産生されたものかの検証ができる⁵⁴⁾。この場合には、ハイブリダイゼーション過程でタンパク質の抗原性失活が生じるので、免疫染色→ISH の順で行わなければならない。これらの手法によって、腫瘍化したリンパ球では、免疫遺伝子に再構成が生じているもの、転写が生じているもの、転写は生じているが翻訳が起こっていないもの、転写・翻訳がおこなわれタンパクの産生を生じているものなど、種々の場合があることが判明してきている。

CMV 感染にともない細胞に新たに CD15 が発現されることを写真 9 に示したが、この部位にピリオンが存在しないことは写真 10 から確からしく思える。CD15 はオリゴ糖であり、この合成はゴルジ装置で生じるが、CMV 感染にともないこれが生じる機序は不明である。この点の解明にも ISH と IHC の二重染色は有力な手段となりうると思われる。

上記の他にも 2 種類の異なるプローブを用いての 2 重染色も可能である。また、透過または走査トンネル電子顕微鏡を用いた電顕的应用も考えられている^{62,63)}。

8. 問題点・欠点

非アイソトープ標識 ISH の欠点は、まだシングルコピーの DNA を検出するには至っていないことである。ヒト遺伝子の約半分はシングルコピー遺伝子からなっており、シングルコピー遺伝子の変異による疾病には、 β -サラセミア^{64,66)}、嚢胞性繊維症 (cystic fibrosis)⁷⁰⁾ などいくつか知られている。マーカーの標識率を高めすぎるとハイブリダイゼーションの阻害を生じやすくなり、長いプローブを用いると組織への浸透性が低くなってしまいうので、やはり感度には限界がある。したがって現在では、癌遺伝子などで遺伝子そのものの増幅 (amplification) がある場合や、遺伝子の反復配列がある場合、あるいは量的に多いウイルス DNA や mRNA などの検出にしか、応用することができない。しかし人工的に目標とする遺伝子を増幅してやると、これを ISH で検出することが可能となる。このための方法として次に述べる PCR 法がある。

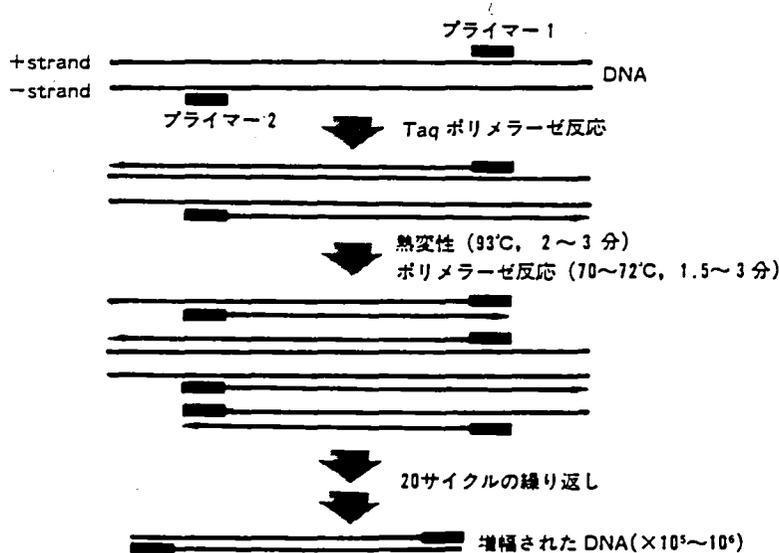


図 6. PCR 法の原理

PCR 法の応用と将来性

PCR 法 (polymerase chain reaction) は, Saiki ら (1985)⁶⁴⁾ が, *in vitro* において DNA 断片を 2 つのオリゴヌクレオチドプライマーと 4 つのヌクレオチド, 及び熱耐性 *taq* polymerase⁶⁵⁾ を用いて, DNA の変性 (denature), DNA とプライマーのアニール (annealing), DNA 鎖の複製 (duplication) を行い, その操作を 30~50 回繰り返すことによってプライマーで挟んだ部位の DNA 断片を数 10 万~数 100 万倍に増やすことを可能にした技術である (図 6)。これによってこれまでのようにプラスミドを利用してクローン化せずに, 目的の DNA 断片を迅速に増幅できるようになった。1988 年に Shibata ら⁶⁷⁾ が, パラフィン切片をキシレンによる脱パラフィン, エタノール遠沈後, 細胞から DNA を抽出することなしに, エッペンドルフチューブ内で PCR を行ったことは, 組織化学的な応用の可能性をも示唆するものである。これまでにも *in vitro* で PCR を用いて, 癌遺伝子の増幅や点突然変異, 転座, プロウイルスなどの有無が調べられているが^{73,74)}, 組織切片上で PCR 反応が行えるようになれば, 標識オリゴヌクレオチド プローブによって ISH を行うことによって, これまで検出不可能であったシングルコピー遺伝子の可視化も非アイソトープ法によって出来ることになろう。つまり, 今まで主に *in vitro* で調べられてきた, 癌細胞や白血病細胞での遺伝子の転座・欠失などを, その細胞形態と同時に観察することが可能になるだろう。

最近カリフォルニアの Lawrence Livermore 研究所の Gray らはプローブ DNA を PCR で増幅し, 染色体上に多数ある反復塩基配列部に一括してハイブリッド形成させるというやり方で, PCR と ISH 法を結びつける方法を開発した^{69,75)}。シングルコピー遺伝子の可視化にはその逆の方法の開発が必要なのである。

IV. おわりに

細胞形態学と機能学を結びつけようとする試みは, 最近 10 年間の免疫組織化学法 (IHC) と遺伝子工学の進歩により, 今やまったく新しい展開をみせようとしている。多種多様な抗体の作製により, 多くの細胞表面および細胞内の分子を直接に光線顕微鏡下に観察することが可能となってきたし, 遺伝子それ自体を見る方法も原理的に可能となってきた。

本論文では事例に即して, 免疫組織化学的手法の原理と応用法を ALP 標識 avidin-biotin 法を中心として展望し, ついで核酸の *in situ* hybridization (ISH) 法, PCR 法による遺伝子の増幅の原理と応用を概説し, IHC 法, PCR 法, ISH 法の結合により, 遺伝子とその発現過程を形態学的に可視化できる見通しを述べた。

参考文献:

- 1) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. D.: Molecular Biology of The Cell. (中村桂子, 松原謙一監訳) pp. 611-671, 教育社, 東京, 1987
- 2) 井出利憲: 細胞増殖のしくみ. 共立出版, 東京, 1989
- 3) 岡田善雄 (編): 細胞の増え方. 岩波書店, 東京, 1990
- 4) Hernandez-Verdun, D.: The nucleolar organizer regions. Biol. Cell, 49: 191-202, 1983
- 5) Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R. and Young, I. G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature, 290: 457-465, 1981
- 6) Gospodarowicz, D. and Moran, J. S.: Growth factors in mammalian cell culture. Ann. Rev. Biochem., 45, 531-558, 1976

- 7) Cohen, S., Leve-Montalcini, R. and Hamburger, V. : A nerve growth-stimulating factor isolated from sarcomas 37 and 180. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)* , 40 : 1014-1018, 1954
- 8) Cohen, S. : Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neurocytotoxic antiserum. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)* , 46 : 302-311, 1960
- 9) Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H. and Stein, H. : Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* , 31 : 13-20, 1983
- 10) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U. and Stein, H. : Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* , 133 : 1710-1715, 1984
- 11) Enns, C. A. and Sussman, H. H. : Similarities between the transferrin receptor proteins on human reticulocytes and placentae. *J. Biol. Chem.* 256 : 12620-12623, 1981
- 12) Neuman, R. E. and Tytell, A. A. : Iron replacement of lactalysate and embryo extract in growth of cell cultures. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 107 : 876-880, 1961
- 13) Bullock, G. R. and Petrusz, P. : *Techniques in Immunochemistry*. Vol. 1, 366. Academic Press, New York, 1982
- 14) van Noorden, S. and Polak, J. M. : *Immunocytochemistry : Practical applications in pathology and biology*. p. 11, Wright PSG, Bristol, 1983
- 15) Mukai, K. and Rosai, J. : *Immunohistochemistry in diagnostic histopathology. : Its contributions and limitations*. *Bas. Appl. Histochem.* 25 : 153-158, 1981
- 16) 平野寛, 川上明, 横山正夫 (編) : マニュアル実験組織化学. pp. 242-279 丸善, 東京 1987
- 17) Tijssen P. : *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. (Ed. Burdon, R. H. and van Knippenberg, P. H.) (石川栄治監訳) pp. 407-457, 東京化学同人, 東京, 1989
- 18) Goldstein, I. J., Huges, R. C., Monsigny, M. Osawa, T. and Sharon, N. : What should be called a lectin? *Nature* 285 : 66, 1980
- 19) Coons, A. H., Creech, H. J., Jones, R. N., Berliner, E. J. : The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 45 : 159-170, 1942
- 20) Nakane, P. K., Pierce, G. B. : Enzyme-labeled antibodies : Preparation and application for the localization of antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14 : 929-931, 1966
- 21) Köhler, G. and Milstein, C. : Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* , 256 : 495-497, 1975
- 22) Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Cuculis, J. J. and Meyer, H. G. : The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase anti-horseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* 18 : 315-333, 1970.
- 23) Spater, H. W., Poruchynsky, M. S., Quintana, N. Inoue, M. and Novikoff, A. B. : Immunocytochemical localization of gamma-glutamyltransferase in rat kidney with protein A-horseradish peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)* , 79 : 3547-3550, 1982
- 24) Guesdon, J-L., Ternynck, T. and Avrameas, S. : The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 27 : 1131-1139, 1979
- 25) Hsu, S-M., Raine, L. and Fanger, H. : Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* 29 : 557-580, 1981

- 26) Adams, J. C. : Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J. Histochem. Cytochem.* 29 : 775, 1981
- 27) Mason, D. Y. and Sammons, R. E. : Alkaline-phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labeling of cellular constituents. *J. Clin. Pathol.* 454-460, 1978
- 28) Rathlv, T. and Franks, G. F. : New procedure for detecting antinuclear antibodies using glucose-oxidase immunoenzyme technique. *Am. J. Clin. Pathol.* 77 : 705-709, 1982
- 29) 難波紘二, 青木 潤, 佐々木なおみ : アルカリフォスファターゼ標識抗体法における発色法の検討— New fuchsin 発色による高精度, 高カラーコントラスト永久標本の作製. *病理と臨床*, 5 : 333-339, 1987
- 30) 長村義之, 渡辺慶一 : 免疫電顕法— pre-embedding method と post-embedding method —. *病理と臨床*, 6臨時増刊号) : 20-33, 1988
- 31) Roth, J. : The preparation of protein A-gold complexes with 3 nm and 15 nm gold particles and their use in labelling multiple antigens on ultrathin sections. *J. Histochem.* 14 : 791-801, 1982
- 32) Farr, A. G. and Nakane, P. K. : Immunohistochemistry with enzyme labeled antibodies. : a brief review. *J. Immunol. Methods* 47 : 129-144, 1981
- 33) Brozman, M. : Immunohistochemical analysis of formaldehyde and trypsin or pepsin-treated material. *Acta Histochem. (Jena)* 63 : 251-260, 1978
- 34) Sato, Y., Mukai, K., Watanabe, S., Goto, M. and Shimosato, Y. : The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. *Am. J. Pathol.* 125 : 431-435, 1986
- 35) Krissansen, G. W., Owen, M. J., Verbi, W., Crumpton, M. J. : Primary structure of the T3 γ subunit of the T3/T cell antigen receptor complex deduced from cDNA sequences : evolution of the T3 γ and δ subunits. *EMBO J.* 5 : 1799-1808, 1986
- 36) 原田孝之, 森川 茂, 伊藤元彦 : 自然沈澱法による簡便な細胞塗抹標本作製法. 免疫実験操作法 (10) (日本免疫学会, 編) pp.2933-2937, 金沢 1975
- 37) Waku, H., Kawaoi, A. and Shikata, T. : A solid-phase immunoassay system for quantitative evaluation of peroxidase conjugates and the immune reaction in the immunoperoxidase technique. *Nihon Univ. J. Med.* 25 : 343-357, 1983
- 38) Tubbs, R. R. and Sheibani, K. : Chromogens for immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 29 : 684, 1981
- 39) Lane, D., Koprowski, H. : Molecular recognition and future of monoclonal antibodies. *Nature*, 296 : 200-202, 1982
- 40) Polak, J. M., Van Noorden, S. : *Immunocytochemistry. Modern Methods and Applications.* Wright, Bristol, 1986.
- 41) Tsutsumi, Y. : Leu 7 immunoreactivity as histochemical marker for paraffin-embedded neuroendocrine tumors. *Acta Histochem. Cytochem.* 17 : 15-21, 1984
- 42) Okano, T., Kawaoi, A., Shikata, T., Dobashi, K., Okumura, H. : Study on antigenicity of human chorionic gonadotropin (hCG) : Factors which effect on hCG immunohistochemistry. *Acta Histochem. Cytochem.* 13 : 317-327, 1980
- 43) Gall, J. G. and Pardue, M. L. : Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)*, 63 : 378-383, 1969
- 44) Brahic, M. and Haase, A. T. : Detection of viral sequences of low reiteration frequency by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)*, 75 : 6125-6129, 1978

- 45) Rudkin, G. T. and Stollar, B. D. : High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 265 : 472-473, 1977
- 46) Landegent, J. E. in de Wal Jansen, N., van Ommen, G-J. B., Baas, F., de Vijlder, J. J. M., van der Ploeg, M. : Chromosomal localization of a unique gene by non-autoradiographic in situ hybridization. *Nature*, 317 : 175-177, 1985
- 47) Singer, R. H. and Ward, D. C. : Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using in situ hybridization with a biotinlated nucleotide analog. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)* 79 : 7331-7335, 1982
- 48) Forster, A. C. : Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labeling of DNA and RNA with a novel reagent ; photobiotin. *Nucleic Acids Res.* 13 : 745-761, 1985
- 49) Shroyer, K. R. and Nakane, P. K. : Use of DNP-labeled cDNA for in situ hybridization. *J. Cell Biol.*, 97 : 377, 1983
- 50) Tchen, P. Fuchs, R. P. P., Sage, E. and Leng, M : Chemically modified nucleic acids as immunodetectable probes in hybridization experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A)* 81 : 3466-3470, 1984
- 51) Hopman, A. H. N. Wiegant, J. and van Duijn, P. : A new hybridocytochemical method based on mercurated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligand. *Histochemistry*, 84 : 169-178, 1986
- 52) Nakane, P. K., Moriuchi, T., Koji, T., Tanno, M. and Abe, K. : In situ localization of mRNA using thymine-thymine dimerized cDNA. *Acta Histochem. Cytochem.*, 20 : 229-243, 1987
- 53) Meinkoth, J. and Wahl, G. : Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, 138 : 267-284, 1984.
- 54) Gee, C. E., Chen, C-L, C., and Roberts, J. L. : Identificaton of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature*, 306, 374-376, 1983
- 55) Burns, J., Graham, A. K., Frank, C., Flemming, K. A., Evans, M. F. and McGee, J. O'D. : Detection of low copy human papilloma virus DNA and mRNA in routine paraffin sections of cervix by non-isotopic in situ hybridization. *J. Clin. Pathol.*, 40 : 858-864, 1987
- 56) van den Brink, W., van der Loos, C., Volkens, H., Lauwen, R., van den Berg, F., Houthoff, H-J. and Das, P. K. : Combined β -galactosidase and immunogold/silver staining for immunohistochemistry and DNA in situ hybridization. *J. Histochem. Cytochem.*, 38 : 325-329, 1990
- 57) Przepiorka, D. and Myerson, D. : A single-step silver enhancement method permitting rapid diagnosis of cytomegalovirus infection in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections by in situ hybridization and immunoperoxidase detection. *J. Histochem. Cytochem.* 34 : 1731-1734, 1986
- 58) 佐藤雄一, 津田 均, 藤田 伸, 広橋説男 : 病理における腫瘍マーカーおよび遺伝子異常の検索法. *病理と臨床*, 8 (臨時増刊号) : 432-453, 1990
- 60) 小路武彦, 中根一穂 : 免疫組織化学的 in situ hybridization の技法と応用. *病理と臨床*, 6 (臨時増刊号) : 88-94, 1988
- 61) 川島徹他 : スライドに対する切片接着剤の検討—シラン コーティング スライドの使用経験—. *病理と臨床*, 8 : 413-415, 1990
- 62) Webster, H. deF., Lamperth, L., Favilla, J. T., Lemke, G., Tesin, D. and Manuelidis, L : Use of a biotinylated probe and in situ hybridization for light and electron microscopic localization of P₀ mRNA in myelin-forming Schwann cells. *Histochemistry*, 86 : 441-444, 1987
- 63) Binder, M., Tourmente, S., Roth, J., Renaud, M. and Geheing, W. J. : In situ hybridization at the electron microscope level : localization of transcripts on ultrathin sections of Lowicryl K4M-embedded tissue using

- biotinylated probes and protein A-gold complexes. *J. Cell Biol.*, 102 : 1646-1653, 1986
- 64) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and Arnheim, N. : Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-1354, 1985
- 65) Erlich, H. A., Gelfand, D. H., Saiki, R. K. : Specific DNA amplification. *Nature*, 331 , 461-462, 1988
- 66) Imprim, C. C., Saiki, R. K., Erlich, H. A. and Teplitz, R. L. : Analysis of DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by enzymatic amplification and hybridization with sequence-specific oligonucleotides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 142 : 710-716, 1987
- 67) Shibata, D. K., Arnheim, N., Martin, W. J. : Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.*, 167 : 225-230, 1988
- 68) Shibata, D., Tokunaga, M., Sasaki, N. and Nanba, K. : Detection of human T-cell leukemia virus type I proviral sequences from fixed tissues of seropositive individuals. *Am. J. Clin. Pathol.*, (in press)
- 69) Weier, H-U., G., Seagraves, R., Pinkel, D. and Gray, J. W. : Synthesis of Y chromosome-specific labeled DNA probes by in vitro DNA amplification. *J. Histochem. Cytochem.*, 38 : 421-426, 1990
- 70) Lench, N., Stanier, P., Williamson, R. : Simple non-invasive method to obtain DNA for gene analysis. *Lancet*, 1 : 1356-1358, 1988
- 71) Uhara, H., Sato, Y., Mukai, K., Akao, I., Matsuno, Y., Furuya, S., Hoshikawa, T., Shimosato, Y., and Saida, T. : Detection of Epstein-Barr virus DNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease using the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81 : 272-278, 1990
- 72) Goelz, S. E., Hamilton, S. R. and Vogelstein, B. : Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 130 : 118-126, 1985
- 73) Ou, C-Y., Kwok, S., Mitchell, S. W., Mack, D. H., Sninsky, J. J., Krebs, J. W., Feorino, P., Warfield, D., Schochetman, G. : DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science*, 239 : 295-297, 1988
- 74) Imagawa, D. T., Lee, M. H., Wolinsky, S. M. et al. : Human immunodeficiency virus type 1 infection in homosexual men who remain seronegative for prolonged periods. *N. Engl. J. Med.*, 320 : 1458-1462, 1989
- 75) Gray, J. W., Pinkel, D., Tkachuk, D., Trask, B., Sasaki, K. and Lucas, J. : Molecular cytogenetic detection of chromosome aberrations. *Proc. Jpn. Cancer Ass.* 49 : 50, 1990
- 76) 青木 潤, 山本津由子, 小浦康則, 折崎久美子, 前田雄司, 佐々木なおみ, 難波紘二 : 免疫染色における標識酵素と発色法の検討—アルカリホスファターゼ法とペルオキシターゼ法の比較—. *共済医報*, 39 : 463-469, 1990