

## ラットリンパ球の光学顕微鏡的、免疫組織化学的検索のための Methacarn 固定法

杉原 佳子, 津嘉山朝達, 真鍋 俊明

リンパ球表面抗原の多くはホルマリン固定パラフィン包埋材料では失活することが多く、凍結切片材料を使用せざるを得ないとされている。しかし、凍結切片法では組織、細胞の形態の保存性が悪いなど欠点も多い。パラフィン包埋材料でリンパ球表面抗原の組織化学的検索と形態学的観察が同時にしかも満足いく程度にできる固定法を見つけ出す目的で、今回我々はマウス抗ラットリンパ球抗体 (MRC OX6, W3/13, W3/25, MRC OX8) を使用し、Methacarn 法と AMeX 法を凍結切片法と比較し検討してみた。その結果、いずれの方法でも抗原性は保存されるが、組織、細胞の形態の保存性が最も優れていたのは Methacarn 法であることがわかった。また、用いる抗体によって、固定法を選択しなければならないことも明らかとなった。

(昭和63年10月4日採用)

### Methacarn Fixation for Histological and Immunohistochemical Studies of Rat Lymphoid Tissues

Keiko Sugihara, Chotatsu Tsukayama and Toshiaki Manabe

Most lymphocyte surface antigens are known to be lost during the processes of formalin fixation and paraffin embedding. Therefore, frozen section materials are believed to be the most suitable for the detection of antigens in the tissues, using monoclonal antibodies. A major disadvantage of frozen section materials, however, is the poor preservation of cell or tissue morphology. In order to find good fixatives for both immunohistochemical and histological studies, we compared Methacarn and AMeX-fixed, paraffin-embedded tissue sections with frozen tissue sections. These sections were immunohistochemically stained by the ABC method using mouse anti-rat monoclonal antibodies (MRC OX6, W3/13, W3/25 and MRC OX8). Almost all antigens were preserved well in either fixation material. Among them, the sections fixed in Methacarn gave the best results for histologic, cytologic and immunohistochemical study. In addition, it was clearly shown that a fixation method should be selected according to the antibodies used. (Accepted on October 4, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 15 (1): 6-12, 1989

**Key Words** ① Immunohistochemistry ② Lymphocyte ③ Lymphoid tissue  
④ Fixation ⑤ Methacarn

## 緒 言

現在、ヒトをはじめ数種の実験動物において多数のリンパ球表面抗原に対するモノクローナル抗体が作製されている。<sup>1),2)</sup> リンパ球表面抗原の多くは、ホルマリン固定パラフィン材料では既に失活していることが多く、通常は凍結材料を使用せざるを得ない。しかし、凍結切片材料では組織、細胞の保存性が悪く、光学顕微鏡的に細胞の同定が困難である。加えて、使用する器具や装置、それを使いこなす技術等にもいろいろな問題点を有している。<sup>1)-3)</sup> ヒトの場合、ホルマリン固定、パラフィン包埋材料にも適用可能な細胞膜抗原に対する抗体が作られ、利用可能となりつつあるが、いまだ分化、成熟の段階を認識する膜抗原を詳しく検索するためには十分でなく、凍結切片材料を使用せざるを得ないのが現状である。実験動物の場合には事情はさらに悪く、抗体の種類はヒトほど豊富ではなく、ほとんどすべて凍結切片材料にのみ使用可能である。一方、最近では固定、包埋方法の改良、開発が進み、細胞の形態像をある程度まで保たせ、かつ、抗原性をも保存させ得るようになってきている。そこで、これら既報告方法のうち、Methacarn (Methanol-Carnoy) 固定法と AMeX (Aceton-methylbenzoate-xylene) 固定法を選び、固定後のパラフィン包埋材料でラットのリンパ球の形態学的観察とその表面抗原の検索が同時に、しかも満足のいく程度に得られるか否かを、従来の凍結切片法と比較しつつ検討してみた。

## 材料および方法

ウィスターラット(体重平均 200 g, 雌)を使用した。ラットはネブタールの腹腔内注射にて麻酔し、直ちに脾臓を摘出し、厚さ 3 mm に細切した。細切した組織片は一部を Methacarn 固定液に、一部を AMeX 固定液にて固定し、さらに一部を凍結した。各固定法は以下のごとくである。

Methacarn 固定法 (Table 1): メタノール,

Table 1. Methacarn method

1.	組織の細切(厚さ 3~4 mm)	
2.	Methacarn 液(メタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1)にて固定	18~24時間 (72時間まで可能)
3.	メタノール I	2~3時間
4.	メタノール II	4時間
5.	安息香酸メチル I	3時間
6.	安息香酸メチル II	1時間
7.	キシレン	1時間
8.	パラフィン I	1時間
9.	パラフィン II	1時間
10.	パラフィン III	9時間
11.	パラフィン包埋	

クロロホルム、酢酸を 6:3:1 の割合で混合したものが Methacarn 固定液である。細切した脾臓は直ちにこの固定液内に入れられ、常温にて 18~72 時間固定した。固定液量を入れる組織量の少なくとも 20 倍以上は用いた。脱水はメタノールにて 2~3 時間、メタノールを交換して再び 4 時間行った。続いて、安息香酸メチルに 3 時間、さらに安息香酸メチルを交換して 1 時間、キシレンに 1 時間浸透した後、通常用いるパラフィン(硬パラフィン(58~60°C)と軟パラフィン(56~58°C)の混合)に 1 時間、パラフィンを交換して 1 時間、さらにパラフィンを交換して約 9 時間浸透し、パラフィン包埋をしてブロックを作製した。パラフィン材料を 1 μm に薄切し、アルブミンスライドに貼付した。

AMeX 法 (Table 2): 細切した組織片をあらかじめ 4°C に冷やしておいたアセトンに入れ、-20°C で一昼夜固定した。脱水は 4°C のアセトンに移して 15 分間、次いで室温のアセ

Table 2. AMeX method

1.	組織の細切(厚さ 2~3 mm)	
2.	アセトン固定(-20°C)	一昼夜
3.	アセトン脱水(4°C→室温)	15分間
4.	安息香酸メチル	30分間
5.	キシレン	30分間
6.	パラフィン(58~60°C)	2時間
7.	パラフィン包埋	

トンに交換して15分間行った。続いて、安息香酸メチルで30分間、キシレンで30分間浸透した後、硬パラフィン(58~60°C)の中で2時間浸透し、パラフィン包埋をしブロックを作製した。このパラフィン材料を1 $\mu$ mに薄切し、アルブミンスライドに貼付した。

凍結法：組織片をアルミフォイル等で作ったボードに入れ、凍結組織包埋剤(OCT compound, ティッシュテックII社)を加えた後、液体窒素で急速に凍結した。次にクリオスタットを用いて厚さ4 $\mu$ mに薄切し、アルブミンスライドに貼付した。スライドガラスに貼付した切片は直ちに室温で約30分間風乾し、4°Cに冷やしておいたアセトンに入れ、室温にて30分間固定した。続いてアセトンより取り出し、再び30分間風乾した。

免疫組織化学：Serotec社(Bicester, England)のマウス抗ラットモノクローナル抗体である抗ラット、マウスIa(MRC OX6)、抗ラット胸腺細胞(W3/13)、抗ラットヘルパーT細胞(W3/25)、抗ラットサブプレッサーT細胞(MRC OX8)を一次抗体として使用した。MRC OX6は、Bリンパ球、dendritic cell、マクロファージ、そして一部の上皮細胞と反応する。また、W3/13は、Tリンパ球、NK細胞、stem cellのマーカーとされ、Bリンパ球と反応しないことより、Tリンパ球とBリンパ球の鑑別に用いられている。W3/25は、ヘルパーT細胞と、MRC OX8はサブプレッサーT細胞と反応し、これらの間には交叉反応はないとされている。

免疫組織学的検索は酵素抗体法間接法、ABC法(Avidin-biotin peroxidase complex method)を使用した。詳細な手順はTable 3に示す。なお、凍結切片においては、内因性ビオチン活性が問題になる可能性があるため、過酸化水素水にて処理後、0.01~0.1%のアビジンPBS溶液を、洗浄後続いて0.001~0.01%のビオチンPBS溶液を各15分ずつ反応させ、内因性ビオチン活性を消去した。また、抗体の特異性を確かめるために、一次抗体や二次抗体の代わりにPBSを使用して操作を行った。

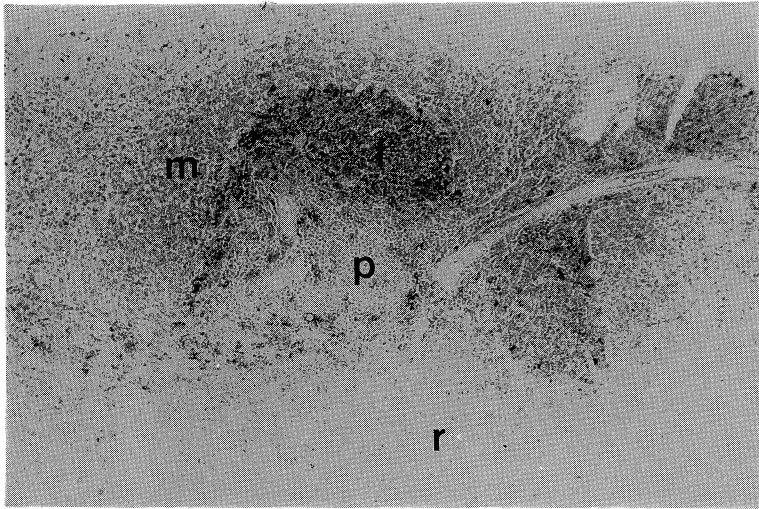
Table 3. Avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method

1. 脱パラフィン, 脱キシレン		
2. 内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止	30分	(10% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 加メタノール)
3. 洗浄		
4. 正常ウマ血清 (50倍希釈)	室温	30分
5. 一次抗体	室温	30分
6. 洗浄 (PBS)	室温	5分 3回
7. ビオチン化二次抗体 (200倍希釈)	室温	30分
8. 洗浄 (PBS)	室温	5分 3回
9. ABC complex (100倍希釈)	室温	30分
10. 洗浄 (PBS)	室温	5分 3回
11. DAB 反応		
12. 洗浄		
13. 核染色 (カラッチのヘマトキシリン)		
14. 脱水, 透徹, 封入		

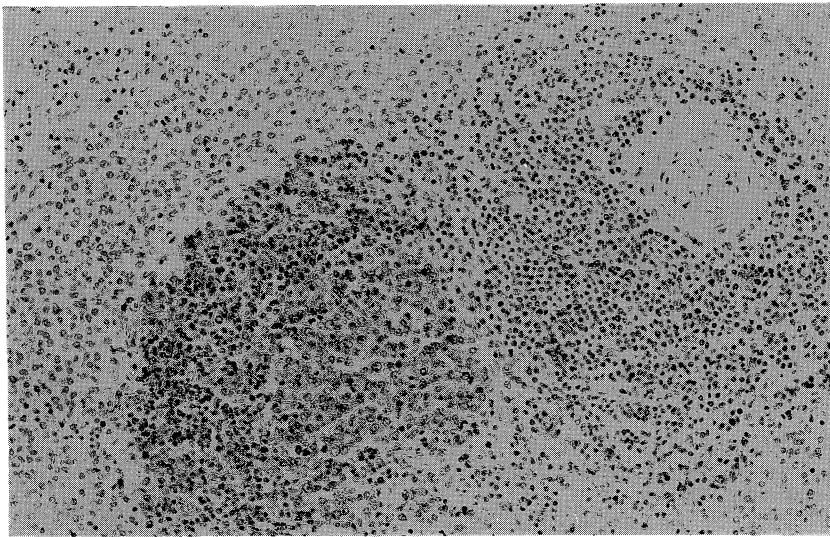
## 結 果

MRC OX6 は凍結切片では、リンパ濾胞(follicle)と辺縁帯(marginal zone)に強く染まり、脾動脈周囲(periarterolar lymphocyte sheath; PALS)の細胞はほとんど陰性であった。赤脾髄ではごく少数のリンパ球が陽性となった。しかし、全体に共染が強かった。Methacarn法やAMeX法による材料では、凍結切片と同様の染色性が得られた(Fig. 1)。しかし、Methacarn法では、暗殻(mantle zone)は芽中心(germinal center)に比べ、染色性が弱かった。W3/13はいずれの方法においても脾動脈周囲、赤脾髄の一部のリンパ球が陽性となり、リンパ濾胞内の細胞はほとんど染まらなかった(Fig. 2)。MRC OX8ではいずれの方法においても、脾動脈周囲の一部のリンパ球が陽性となった(Fig. 3)。W3/25では、従来の報告では脾動脈周囲のリンパ球が陽性となるはずであるが、<sup>4)</sup>凍結切片においては共染が強くなり、陽性細胞の判定が困難であり、他の方法においては陽性細胞がほとんどみられなかった。

細胞、組織の形態の保存状態は、AMeX法は凍結材料に比べると良好ではあるが、Methacarn法はさらに数段優れており、ホルマリン固定材料に劣らず、細胞の同定、詳細な観察が十分行えた。また、同時にヘマトキシリン・エ



**Fig. 1A.** A Methacarn-fixed section of the rat spleen for MRC OX6. Almost all the lymphocytes in the follicle (f) and the mantle zone (m), as well as a few lymphocytes in the red pulp (r) show positive reactions. The staining is absent in the majority of cells in the periarteriolar lymphocyte sheath (PALS; p). (ABC method,  $\times 100$ )



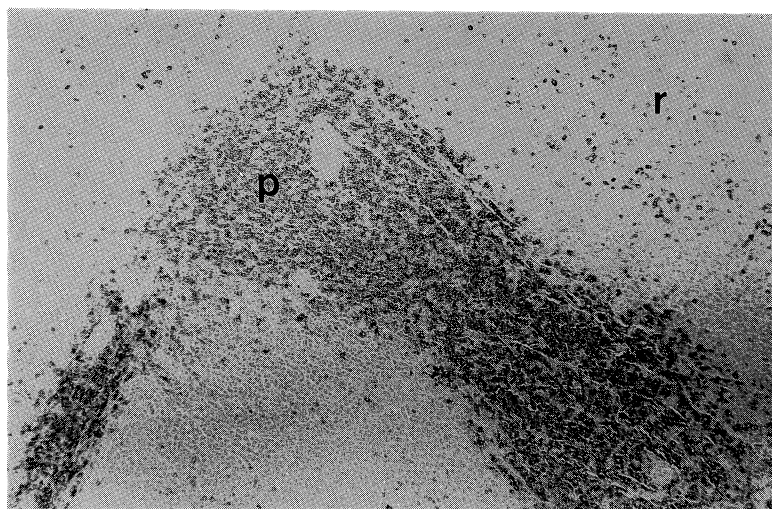
**Fig. 1B.** Note that nuclear details are clearly seen. ( $\times 250$ )

オジン染色を行うことによって、より詳しい観察が可能であった。

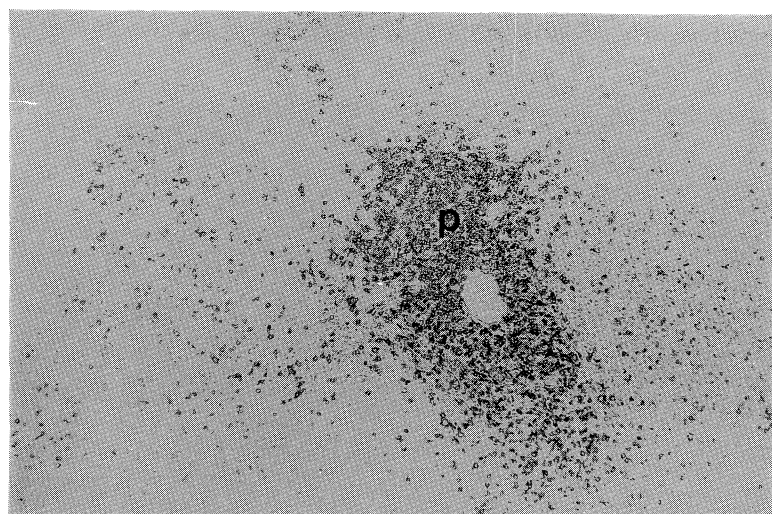
固定から包埋までに必要とした時間は凍結切片法では1~2時間、Methacarn法では約2.5日、AMeX法では約1.5日であった。Methacarn法は約14~15時間にわたって、1~4時間ごとの試薬の交換が必要であった

が、AMeX法では固定後は約4時間でパラフィンブロックが作製できた。薄切はMethacarn法、AMeX法ともいずれもパラフィン包埋材料であるため、通常通り行えた。しかし、AMeX法によるパラフィン材料は伸展器にて乾燥を行うと、組織片が崩壊してしまうことが多かった。

抗原性の保持はMethacarn法ではパラフィ



**Fig. 2.** A Methacarn-fixed section of the rat spleen for W3/13. Lymphocytes in the PALS (p) and scattered cells in the red pulp (r) show immunoreactivity. (ABC method,  $\times 100$ )



**Fig. 3.** A Methacarn-fixed section of the rat spleen for MRC OX8. Some lymphocytes in the PALS (p) show positive reactions. (ABC method,  $\times 100$ )

ンブロック、常温保存で少なくとも9か月は全く低下していなかった。

以上の事実をふまえ、凍結法と比較し、利点、欠点をまとめたのが **Table 4** である。

### 考 察

光学顕微鏡レベルで免疫組織学的検索を行う場合、その利用する組織片の状態によって大き

く二つの方法に大別できる。すなわち、凍結切片法とパラフィン切片法である。凍結切片法は抗原性の保持がよく、電顕レベルでの抗原の局在観察を同時に行えるという利点を有しているが、細胞、組織の保存性は良いとは言い難い。また凍結切片作製のためには特殊な器具、装置が必要であり、その技術修得は困難である。さらに、組織の保存、保管が困難で抗原性保存のためには deep freezer ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) が必要とされる。それに対して、パラフィン切片法の利点、欠点は凍結切片法のそれと反対で、細胞、組織の保存性は良く、器具、装置も特別のものを必要としないが、抗原性の保持に問題がある。ただ、パラフィン切片作製に欠かせないアルコール脱水、キシレン処理などの有機溶媒の使用により膜の脂質の破壊がおり、かえって巨大な分子から成る標識抗体が細胞の隅々までに十分浸透し

得る場合もある。したがって、電顕観察を同時に行う場合や非常に微弱な抗原性しか有しない物質の局在観察を行う場合を除いては、パラフィン切片法をもっと応用すべきであろう。<sup>5),6)</sup>

現在、Peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法や Avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法などによる検出感度の上昇や、多種多様な抗体の開発に伴い、パラフィン切片法にて数多くの抗原の局在を知ることができるようになって

**Table 4.** Comparison of Methacarn, AMeX method and frozen method

	Methacarn 法	AMeX法	凍結法
組織・細胞の形態の保存	良好	やや不良	不良
抗原性の保持	良	良	良
固定から包埋までの時間	約3日間	約1.5日間	1~2時間
固定温度	常温	-20°C	-80°C
抗原性の保存期間	常温、パラフィン包埋にて少なくとも9か月	4°Cにて3年以上	deep freezerにて2か月

た。しかし、リンパ球表面抗原は特にホルマリン固定パラフィン切片では失活していることが多く、一部の抗体を除いては現在もなお凍結切片法が優れた方法とされている。

パラフィン切片法開発のためには二つの取り組み方がある。第一は通常ホルマリン固定パラフィン切片でも使用できる抗リンパ球抗体を開発することであり、第二は既知の抗リンパ球抗体が使用できる固定法を開発、改良することである。第一の手段を取るならばその開発研究には多大の時間、費用、研究者の数を必要とするであろう。今回我々が試みたのは第二の方法である。これにも同様の研究開発が必要であるが、我々はまず既知の抗体と既知の固定法の組合せを試してみた。それはマウス抗ラットモノクローナル抗体 (MRC OX6, W3/13, W3/25, MRC OX8) の使用と Methacarn 法, AMeX 法の組合せである。

Methacarn 固定法は 1969年、Puchtlerらにより開発されたもので、内皮細胞や上皮細胞の myofibrils の保存を目的としており、免疫組織化学的な検索は対照としたものではなかった。<sup>7)</sup> しかし、Mitchell は Methacarn 固定法の変法によるパラフィン切片法で myoglobin, glial fiber acidic protein, keratin, myosin, laminin, prostatic acid phosphatase, alpha-fetoprotein, carcinoembryonic antigen 等の抗原に対する免疫組織化学的検索が可能であることを報告した。<sup>8)</sup> 残念なことに彼の研究では多くのリンパ球表面抗原の検出は不可能であったとさ

れている。一方、1986年、Sato らは AMeX 法を発表し、この固定法でヒトのリンパ球表面抗原に対する抗体のほとんどが良好な形態保存のもとで染色できるとした。<sup>6), 9)</sup>

今回我々の研究ではラットのリンパ球に対するモノクローナル抗体 MRC OX6, W3/13, W3/25, MRC OX8 を使う場合には Methacarn 固定法, AMeX 固定法で十分形態観察と免疫組織学的検索ができることが明らかになった。さらに、両方法をいままでの凍結切片法と比較してみると次のような結果が得られた。つまり、組織、細胞形態の保存では AMeX 法は従来の凍結切片法よりやや良好ではあったが、Methacarn 法はさらに数段優れ、ホルマリン固定材料に劣らないほどであった。したがって、免疫染色にて陽性の細胞の同定や詳細な観察が可能と考えられ、ヘマトキシリン・エオジン染色を同時に行うことによってより正確な観察ができると考えられた。パラフィン法の最も弱点である抗原性の保持は両者とも克服できたようであった。Mitchell は Methacarn 法変法にてヒトのリンパ球表面抗原は検索できないと報告していたので、Methacarn 法原法・パラフィン切片にてヒトのリンパ球表面抗原をも検索してみた。一部その抗原性が保持されていたものもあったが、全く検出できないものもみられた。したがって今回の検討を通してラットのリンパ球表面抗原の検索が可能であったのは Methacarn 法原法と変法の違いではなく、抗体の質によるものと考えたい。

固定から包埋までの時間は Methacarn 法は長く、試薬の交換のため、長時間拘束される。しかし、AMeX 法での固定は -20°C、脱水は 4°C と低温であるのに対し、Methacarn 法はすべて常温で処理することができるため、自動包埋装置等を利用すれば時間の問題は解決できよう。

抗原性の保存については Methacarn 法では常温、パラフィンブロックにて9か月までは確認できており、全く抗原性の低下は認められていない。一般にパラフィンブロックでは抗原性は保持されるといわれているので、この場合もかなり長期間保持できると思われる。また、

AMeX 法は4°Cにて保存している組織では3年たってもその抗原性は低下しないようである。<sup>6)</sup>

以上のことより、ラットのリンパ球表面抗原の検索には、凍結切片法、AMeX 法より Methacarn 法によるパラフィン切片が最も優れており十分利用できると思われる。しかし、ヒトのある種のリンパ球表面抗原の検索は Methacarn 法では不可能であったことより、抗体の種類、動物の種類等によって利用する固定法を選ばなければならないのも事実であろう。

今回、我々は既報告方法のうち Methacarn 法と AMeX 法について、ラットのリンパ球の形態観察とその表面抗原の検索が同時にしかも満足いく結果が得られるか否かについて検討した。その結果、ラットのリンパ球の光学顕微鏡的、免疫組織学的検索のためには、Methacarn 固定法が適当であることが明らかになった。

なお、本研究は昭和62年度川崎医科大学プロジェクト研究費(82-808)を使用して行われた。

## 文 献

- 1) 堤 寛, 和泉伸一: 市販品として入手可能な抗体リスト(ヒト・動物). 渡辺慶一, 中根一穂編: 酵素抗体法. 改訂版. 東京, 学際企画. 1986, pp. 251-279
- 2) 高見 剛, 菊地浩吉: T・Bリンパ球およびそれらのサブセット関連抗原の免疫組織化学 A. リンパ腫およびその関連疾患. 病理と臨床 6: 239-250, 1988
- 3) Hall, P. A., Stearn, P. M., Butler, M. G. and D'Ardenne, A. J.: Aceton/periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) fixation and improved morphology of cryostat sections for immunohistochemistry. *Histopathology* 11: 93-101, 1987
- 4) Barclay, A. N.: The localization of populations of lymphocytes defined by monoclonal antibodies in rat lymphoid tissues. *Immunology* 42: 593-600, 1981
- 5) 渡辺慶一, 中根一穂編: 酵素抗体法. 改訂版. 東京, 学際企画. 1986, pp. 37-121
- 6) 佐藤雄一, 向井 清, 広橋説雄: パラフィン切片法を使用した免疫組織化学. 病理と臨床 6: 66-76, 1988
- 7) Puchtler, H., Waldrop, F. S., Meloan, S. N., Terry, M. S. and Conner, H. M.: Methacarn (Methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations. *Histochemistry* 21: 97-116, 1970
- 8) Mitchell, D., Ibrahim, S. and Gusterson, B. A.: Improved immunohistochemical localization of tissue antigens using modified Methacarn fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 491-495, 1985
- 9) 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