

単クローン抗体によるアルカリフォスファターゼの 免疫組織化学的研究

服部 淳夫 吉田 豊 金子 愛子
札幌医科大学病理学第2講座 (主任 森 道夫 教授)

Study on Immunohistochemical Localization of Alkaline Phosphatase by the Monoclonal Antibodies

Atsuo HATTORI, Yutaka YOSHIDA and Aiko KANEKO

Department of Pathology (Section 2), Sapporo Medical College
(Chief: Prof. M. Mori)

Alkaline phosphatase [E. C. 3. 1. 3. 1.] (ALP) is one of the most extensively studied enzymes in histochemistry and biochemistry. The enzyme has been implicated in the maintenance of intracellular concentration of phosphate for the formation of bone and in the processes of absorption and transport of various substances across cell membrane. However, the essential role and functions of ALP are still not fully understood.

To elucidate the relation between the activity and the localization of the enzyme within the cell, monoclonal antibodies were produced against the ALP from full term rat placenta. The extracted and purified ALP was used as an antigen for the production of both polyclonal and monoclonal antibodies. The polyclonal antibody was raised in rabbit. The monoclonal antibodies were obtained by the hybridoma technique by screening the supernatants with enzyme-linked immunosorbent assay. Two monoclonal antibodies, 3A2 and 4C1, were used in the present study. After the enzyme-monoclonal antibody mixture was centrifuged, the remaining activity of the supernatant decreased according to the amount of the monoclonal antibodies added. Furthermore the mixture, when electrophoresed in polyacrylamide disc gel, was unable to enter the gel because of the formation of the immune complexes. The specificity of the two monoclonal antibodies was thus confirmed. An immunohistochemical study by the antibody 3A2 revealed that the enzyme molecules were located both in the plasma membrane and the cytoplasm of syncytial trophoblasts and in the cytoplasm of giant trophoblasts in placenta. These results were similar to those obtained by conventional histochemistry and immunohistochemistry using the polyclonal antibody except for the cytoplasmic localization in the two types of trophoblast detected by 3A2. However, the monoclonal antibody, 4C1, was shown to be localized in the nuclei of the trophoblasts. The results indicate that ALP or related molecules exist not only in the cell membrane, which has been reported as the main site of the enzyme, but also in the cytoplasm and the nucleus. The significance of the results is discussed in relation to the synthesis of ALP molecules and expression of the enzyme activity in the cell.

(Received July 13, 1984 and accepted July 23, 1984)

Key words: Monoclonal antibodies, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Alkaline phosphatase, Immunohistochemistry

1 緒 言

アルカリフォスファターゼ [E. C. 3.1.3.1.] (ALP と略す) は、アルカリ領域で、リン酸モノエステル結合を水解する酵素で、生化学的、組織化学的に小腸粘膜微絨毛、腎尿管上皮刷子縁、肝細胞の毛細胆管壁、胆管上皮、胎盤栄養膜細胞や骨芽細胞、破骨細胞などに強い活性を示すことが知られている。ALP は物質の輸送、吸収等に関係すると考えられ、生体内の種々の物質間のリン酸残基の移動を触媒している可能性が推測されている。しかし、本酵素の本質的な機能についてはいまだ不明な点が多い。

ALP の細胞内局在について、従来多くの報告は細胞膜に局在するとしており、1960年代、生化学的手法で HeLa 細胞の核に ALP 活性が存在するという報告¹⁾があったが、細胞膜が混在した可能性が Fishman²⁾によって指摘されて以来、核や細胞内における ALP の存在は疑問視され、もし存在したとしてもその活性は弱いと考えられている。同じ頃、組織化学的にも、核内に ALP の反応産物を認める報告³⁻⁵⁾が相次いだが、これらの報告では ALP の検出に Gomori 法を用いている。Gomori 法は遊離したリン酸を Ca で不溶化して局所にとどめ、これをリン酸コバルトに置換した後に硫化アンモニウムを反応させて、黒色の硫化コバルトとして観察する方法で、反応産物の拡散や金属塩の非特異的沈着等が生じやすいため安定性に欠けるので、核内 ALP の存在はその特異性に関して必ずしも肯定されているとは言い難い。しかし、Tokumitsu *et al.*⁶⁾は、ALP 産生培養細胞である HeLa 細胞を電顕組織化学的に検討し、基質液中に界面活性剤を加えることによって、処理前には活性が認められなかった小胞体腔や核膜にも活性を証明し、ALP 活性が、マスクされた状態で細胞内に存在する可能性を示唆している。また彼等は薬剤で ALP 産生を誘導すると、ALP が小胞体、ゴルジ装置と細胞膜に証明されることから、ALP の細胞内合成、輸送過程を推測している⁷⁾。異種抗血清を用いた ALP の免疫組織化学でも、細胞をサポニン処理すると、細胞膜にしか認められなかった ALP 蛋白が、小胞体、ゴルジ装置、核膜や糸粒体にも認められるようになることも報告されている⁸⁾。一方、渡辺ら⁹⁾は、異種抗血清を用いてラット小腸上皮における ALP 蛋白の細胞内局在を免疫組織化学的に検討し、組織化学的に活性の局在をみない細胞内小器官にも ALP 蛋白の局在を見出している。

このように ALP の生理機能とともにその蛋白分子の

細胞内局在と活性の発現機構との関連についても、いまだに一定の見解が得られていない。ALP に対する単クローン抗体を用いた解析は、これらの問題に対する効果的な手段となり得るものと考えられる。そこで、ラット胎盤より ALP を抽出精製し、単クローン抗体を作製し、得られた二種の抗体を用いて免疫組織化学的に ALP の局在を検討した。その結果、単クローン抗体 3A2 は、酵素組織化学、異種抗血清による免疫組織化学と同様に細胞膜に局在を示す他、細胞質内にも分布することが明らかになった。一方、単クローン抗体 4C1 では、核内に ALP の局在を認めた。これらの結果について、若干の考察を加え報告する。

2 実験方法

2.1 ALP の精製

妊娠 20 日目の Wistar 系雌ラットより胎盤を摘出し、以下の実験に用いた。Sugiura *et al.*¹⁰⁾の方法に準じて、胎盤のホモジネートを等量の N-ブタノールと混和後、10,000×g、4℃30分遠沈し、酵素抽出液に等量のアセトンを加え混和し、10,000×g、4℃30分遠沈後の沈渣を凍結乾燥した。これを 0.02 M Tris-HCl (pH 8.6) に溶解後、DEAE-cellulose (DE-52, Whatman 社) column chromatography, Sephacryl S-300 (Pharmacia 社) column chromatography により ALP を精製した。蛋白量の測定は Lowry *et al.*¹¹⁾の方法に従い比色定量した。ALP の活性は、Felix and Fleisch¹²⁾による p-ニトロフェノールリン酸を基質とし、反応産物である p-ニトロフェノールを 405 nm で比色定量する方法 (Method A) と、β-グリセロリン酸を基質とし、反応後に放出されるリン酸を、660 nm で比色定量する方法¹³⁾ (Method B) で測定した。得られた ALP 酵素蛋白を異種抗血清作製、単クローン抗体作製の為の免疫用、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 用に用いた。

2.2 抗体の作製

2.2.1 異種抗血清の作製

2.1 で得られた抗原 (精製 ALP) 100 μg を Freund complete adjuvant とともに家兎皮下に 2 週間隔で免疫し、4 回目の免疫後 1 週間て屠殺し抗血清を得た。DEAE-cellulose column chromatography により抗血清から IgG を分離し、以下の実験に用いた。

2.2.2 単クローン抗体の作製

2.1 で得られた抗原 10 μg を Freund complete adjuvant とともに、1 週間隔で 2 回、BALB/c マウスの腹腔内に免疫し、3 週目に最終免疫を行った。最終

免疫3日後に、脾臓を取り出し、脾細胞 1×10^8 個とBALB/cマウス由来骨髄腫細胞株NS-1細胞 1×10^7 個をKöhler and Milstein¹⁴⁾の方法に準じてポリエチレングリコール#4000(Merck社)を用い細胞融合させた。非免疫BALB/cマウス脾細胞 1×10^8 個をfeeder細胞として混じた10%ウシ胎児血清(FCS)加HAT medium(hypoxanthine 1×10^{-4} M, aminopterin 4×10^{-7} M, thymidine 1.6×10^{-5} M in RPMI-1640培養液)にハイブリドーマを浮遊し、1mlずつ24穴プレート(Caster社)に分注した。5%CO₂, 37°Cの培養器で10日間培養しハイブリドーマを選択した。その後3日間隔で、10%FCS加HT-medium(hypoxanthine 1×10^{-4} M, thymidine 1.6×10^{-5} M in RPMI-1640培養液)を用いて培養液交換を行い、細胞増殖のみられる穴の培養上清をELISA法にてスクリーニングし、ALP蛋白と反応する抗体を産生するハイブリドーマを選択した。限界希釈法にてクローニングし、単クローン抗体産生細胞株として継代培養した。得られた細胞株3A2, 4C1の培養上清を集め、60%飽和硫酸で塩析後、遠心分離し、沈渣を0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(PBS pH 7.4)に溶解し、PBSに対し透析後、抗体として用いた。

2.3 ELISA法の設定

ELISA法には種々の方法があるが、本実験には、抗体検出系として広く利用されている抗原抗体複合体に標識抗体を結合させる間接法を用いた。ポリスチレン製96穴のimmunoplate(Nunc社)に2.1の可溶性精製ALP(5 μ g/ml)を50 μ l滴下し、室温、湿箱内で2時間吸着させた後、1%ウシ血清アルブミン(BSA)PBS溶液で各穴を満たし最低30分間室温に放置する。各穴の溶液を除き、PBSにて数回軽く洗浄し、試料となるハイブリドーマ培養上清を50 μ l加え、4°C、12時間反応させた。反応後、0.05% Tween 20加PBS(PBS-Tween)にて3回洗浄後、希釈したhorse radish peroxidase(HRP)標識抗マウスIgウサギ抗体(HRP-Ab, DAKO社)を50 μ l、各穴に加え、4°C、90分反応させた。さらにPBS-Tweenにて3回洗浄後、基質として0.01% H₂O₂含有0.1Mリン酸クエン酸緩衝液(pH 5.0)に溶解したo-phenylene diamine(OPD, 片山化学)0.4mg/mlを100 μ lずつ各穴に加え、室温暗所にて静置、反応させた。反応停止には、50 μ l 4N-H₂SO₄液を加え、コロナMTP-12型マイクロプレート光度計(コロナ社)を用いて500nmにおける各穴の吸光度absorbance difference(AD)を測定した。対照試料としては、抗原を加えずに、1% BSAの

みを吸着させたもの、抗体を加えずにPBSのみのもの、10% FCS加RPMI-1640培養液を用いた。

2.3.1 OPDの濃度と反応時間の設定

Immunoplateに1,000倍から100,000倍希釈したHRP(Type II, Sigma社)溶液をそれぞれ50 μ l注入し、種々の濃度のOPDを含む基質液にて反応させ、反応時間を30分から180分まで設定して、ADを測定した。

2.3.2 HRP標識抗体の至適濃度の設定

種々の濃度のマウスIgG(DAKO社)PBS溶液50 μ lにて、各穴を被い、HRP標識抗マウスIgウサギ抗体を100倍から2,000倍希釈し反応発色後、ADを測定した。同時に0.1% BSAの標識抗体への添加効果について検討した。

2.4 単クローン抗体の特異性の検討

2.4.1 免疫沈降反応による酵素活性の測定

ALPに2.2.2で得られた抗体を加え、4°C、12時間反応後、10,000 \times g 30分遠沈し、上清のALP活性をMethod Bにより測定した。対照として抗体を加えないALPのみについても同様の処理をし上清の活性を測定し、これに対する比活性を求めた。

2.4.2 免疫反応物のディスク電気泳動

ALP(80 μ g)と2.2で得られた抗体を種々の濃度で加え、37°C、1時間反応後、Davis¹⁵⁾の方法に準じて、7.5%ポリアクリルアミドゲルによるディスク電気泳動後、飯野¹⁶⁾の方法に従いALP活性染色を施した。

2.5 異種抗血清及び単クローン抗体による免疫組織化学染色

抗原の組織内分布を免疫組織化学染色により検索した。ラットの胎盤を細切後、冷アセトン固定パラフィン包埋切片を作成し、以後の染色に使用した。ベンゼンによる脱パラフィン後、0.6% H₂O₂メタノール溶液に浸し、内因性ペルオキシダーゼ阻止後、PBSにて洗浄、各単クローン抗体を4°C、12時間反応させPBSにて5分3回洗浄後、ELISAで用いたHRP標識抗体を正常ラット血清にて吸収し、40倍希釈して、切片と30分反応させた。標識抗体の反応前に非免疫家兎血清を15分反応させ、非特異的吸着の減少をはかった。同様に切片をPBSにて5分3回洗浄後、ペルオキシダーゼ反応基質液(0.01% H₂O₂加3, 3'-diaminobenzidine溶液pH 7.6)中で1-2分反応させた。PBSにて洗浄後、メチルグリーンにて核染、脱水、透徹、封入後鏡検した。異種抗血清は、Sternberger *et al.*¹⁷⁾の方法に従ってPAP法にて行った。

2.6 酵素組織化学染色

Burstone¹⁸⁾によるアゾ色素法により、Naphthol-AS-BI-phosphate (Sigma 社)を基質としALP 活性染色を、アセトン固定胎盤切片に施した。

3 成 績

3.1 ラット胎盤 ALP の精製

Table 1 に各抽出過程におけるALP の蛋白量および総活性、比活性を示す。活性の測定はMethod A によった。最終精製ALP の比活性は胎盤ホモジネートに比べ約850倍に上昇した。Fig. 1 は精製ALP の7.5% ポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動像の蛋白染色とALP 活性染色像を示す。蛋白は一本の線として見られ、酵素活性がその部分に一致して認められた。

3.2 異種抗血清

得られた家兎血清及びDEAE-cellulose column chromatography により分離したIgG は、それぞれdouble immunodiffusion¹⁹⁾により抗原と一本の沈降線を形成した。

3.3 ELISA 法の設定

3.3.1 ELISA 法におけるOPD の濃度及び反応時間

Fig. 2 は、HRP の濃度と基質液中のOPD の濃度の相関を示す。0.001 unit/ml のHRP の濃度下では、0.2 mg/ml 以上のOPD が存在すれば、およそAD 0.7 を得ることができる。実行上AD は0.5 から1.0 以上でないといけないので0.4 mg/ml にOPD の濃度を定めた。Fig. 3 はOPD の濃度を0.4 mg/ml とし、OPD とHRP との反応時間によるAD の変化を示す。この結果から反応時間を50分に設定した。

3.3.2 HRP 標識抗体の至適濃度

Fig. 4 は、HRP 標識抗体の各希釈段階における0.1% BSA を加えたものと、加えないものとの、immunoplate にあらかじめ吸着させたBSA への非特

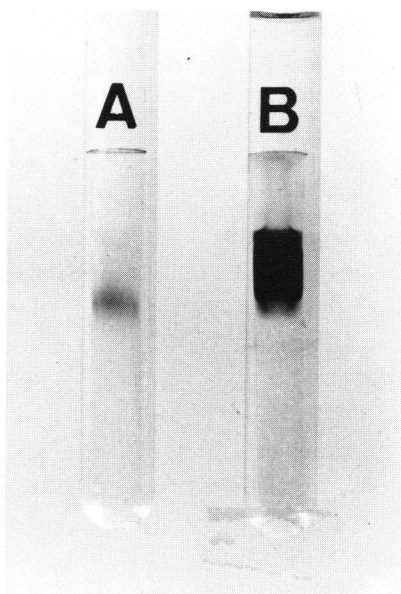


Fig. 1 Polyacrylamide gel disc electrophoresis of purified alkaline phosphatase.

A: Protein staining with Coomassie Brilliant Blue.

B: Enzyme activity staining with 0.07% α -naphthyl phosphate, 0.1% Fast Blue RR salt, 5 mM MgCl₂ in 0.1 M veronal buffer (pH 9.3).

異的吸着をみたもので、BSA を加えない標識抗体は、非特異的に強くBSA へ吸着した。0.1% BSA を加えても、AD 0.1 程度の発色が認められる。Fig. 5 は、種々の濃度のマウスIgG と標識抗体の希釈度との関係を示したもので、100倍では、マウスIgG の計測領域が狭く、又、2,000倍では、充分なAD が測定できず、したがって実行上、標識抗体は0.1% BSA 加500倍希釈とした。この条件で検出可能なマウスIgG は0.075 μ g/ml 以上となる。

Table 1 Purification of rat placental alkaline phosphatase.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity* (units)	Specific activity (units/mg protein)
1. Placenta homogenate	5010	4425	0.88
2. Butanol extract	735	7300	9.93
3. DEAE-cellulose	246	6216	25.27
4. Sephacryl S-300	30	4059	135.30
5. CM-cellulose	2.3	1774	771.30

* The activity was measured by Method A. One unit of enzyme activity was defined as 1 μ mol of p-nitrophenol released per 10 min at 37°C.

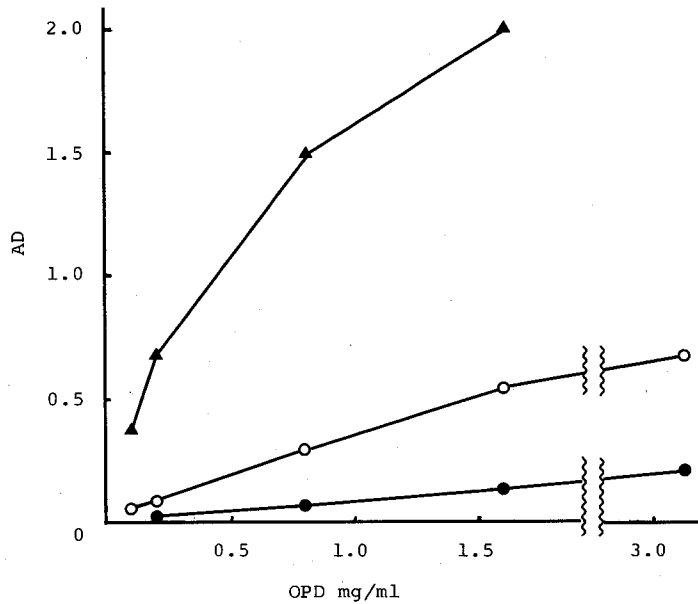


Fig. 2 Relationship between concentration of o-phenylenediamine(OPD) and horseradish peroxidase activity. Reaction medium contained OPD dissolved in 0.1 M phosphate-citrate buffer(pH 5.0) containing 0.01% H_2O_2 and horseradish peroxidase.

▲—▲, 0.001 unit/ml; ○—○, 0.0001 unit/ml;
●—●, 0.00001 unit/ml.

One unit of horseradish peroxidase forms 1.0 mg of Purpurogallin from Pyrogallol in 20 seconds.

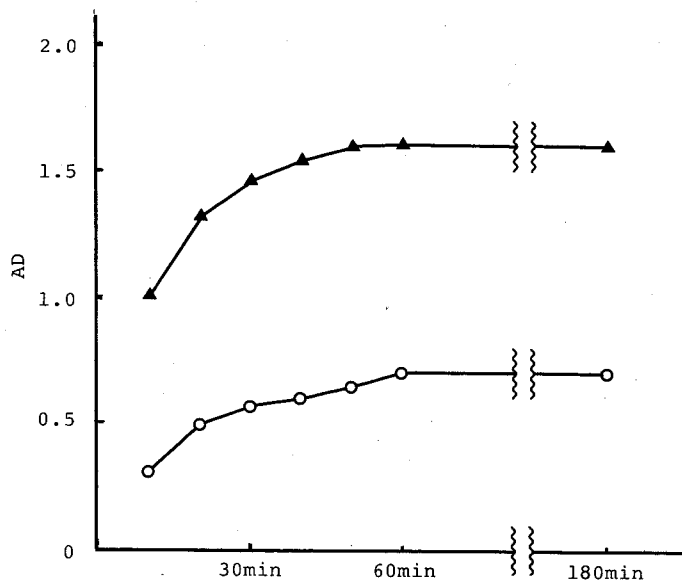


Fig. 3 Time course of reaction of horseradish peroxidase with OPD. Concentration of OPD was 0.4 mg/ml.

▲—▲, 0.001 unit HRP/ml; ○—○, 0.0001 unit HRP/ml.
HRP: horseradish peroxidase

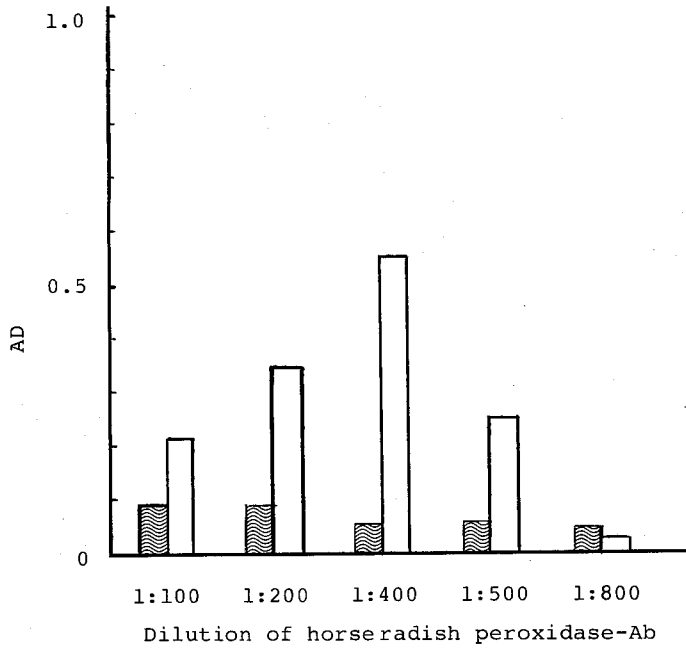


Fig. 4 Nonspecific binding of horseradish peroxidase-conjugated rabbit immunoglobulins to mouse immunoglobulins (horseradish peroxidase-Ab) with and without BSA to BSA-coated wells.
 □, without BSA; ▨, with BSA.

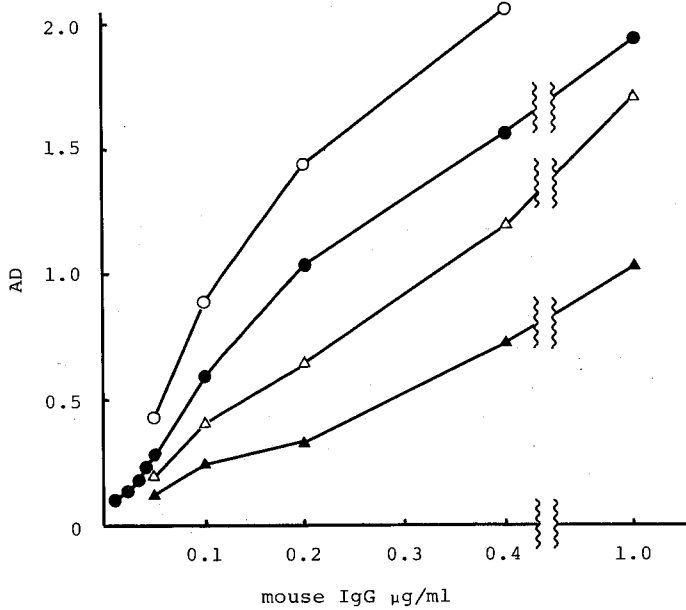


Fig. 5 Binding of horseradish peroxidase-Ab to mouse IgG at different concentrations. Dilution of horseradish peroxidase-Ab.
 ○—○, 1:100; ●—●, 1:500;
 △—△, 1:1000; ▲—▲, 1:2000.

3.3.3 ELISA 法による抗体産生ハイブリドーマの判定

以上の ELISA 法の設定条件にてスクリーニングした結果を Fig. 6 に示す。ELISA 法で陽性と判定された抗体産生ハイブリドーマ培養上清の AD は、3A2 では、0.8 から 0.9 を示し、4C1 では、0.5 から 0.7 を示し、

肉眼的にも反応液は着色を呈し容易に判定可能であった。

3.4.1 免疫沈降反応による酵素活性の測定

2.4.1 に従い、上清の残存活性を測定すると、上清の活性は 3A2 の添加量に応じて 80% まで活性減少を示し、4C1 では 65% まで減少を示した (Fig. 7)。抗体を加え

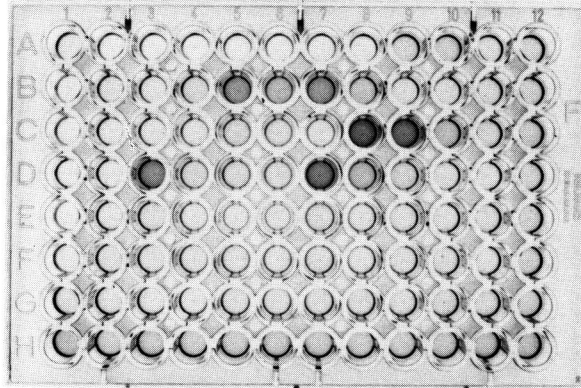


Fig. 6 Detection of the monoclonal antibodies in the hybridoma supernatants by ELISA. Note that the wells B-5, 6, 7 (4C1) and C-8, 9, D-3, 7 (3A2) are strongly positive indicating high production of the antibodies.

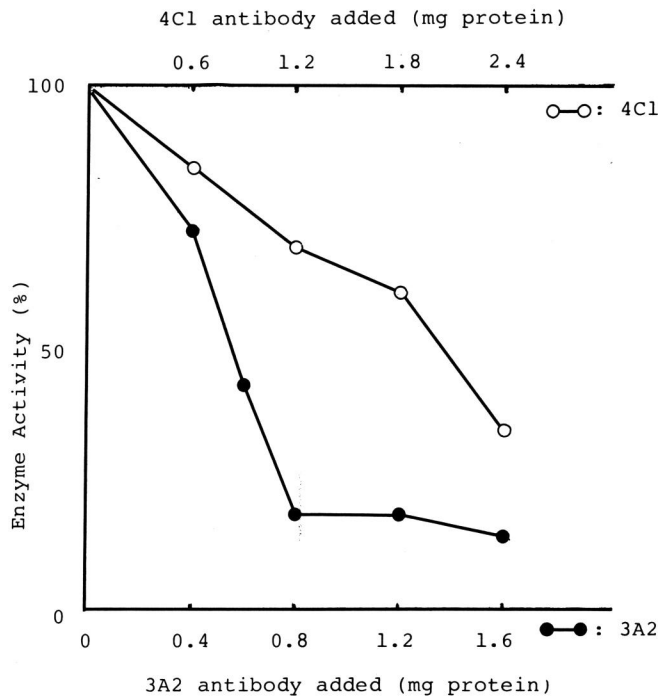


Fig. 7 Residual activity in the supernatant by binding of monoclonal antibodies to the enzyme. The various amounts of monoclonal antibodies were added to 0.5 ml of ALP (100 μ g protein), and final volume was made to 1.0 ml with PBS. The activity was measured by Method B.

ない対照では、遠沈操作で活性の減少はみられなかった。また、抗体自体にも活性はみられなかった。

3・4・2 抗原抗体複合物の電気泳動

2・4・2に従いALPに抗体を加え、反応させた複合物の7.5%ポリアクリルアミドディスク電気泳動後の活性染色では、異種抗血清、単クローン抗体3A2、4C1いずれの抗体を加えても、抗体を加えないALPの場合と比較し、活性帯は、減少もしくは消失した (Fig. 8)。

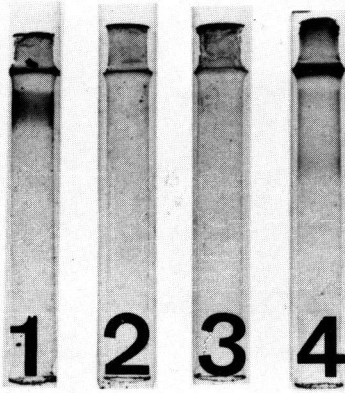


Fig. 8 Disc gel electrophoresis of alkaline phosphatase (ALP) and ALP-antibody complex. The gels were stained for ALP activity as described in Fig. 1.

1, ALP (80 μ g); 2, ALP and anti-ALP rabbit IgG (100 μ g) mixture; 3, ALP and 3A2 monoclonal antibody (1 mg protein) mixture; 4, ALP and 4C1 monoclonal antibody (2.5 mg protein) mixture.

3・5 免疫組織化学及び酵素組織化学染色

胎盤のアセトン固定切片における免疫組織化学染色で、単クローン抗体3A2は、合体栄養細胞の主とし

て細胞膜に陽性に染色され、細胞質も弱いながら陽性に染色された。また、巨細胞の細胞質にび漫性に陽性染色を認め、一部細胞膜にも弱陽性に染色された。一方、単クローン抗体4C1は、合体細胞及び巨細胞の核と反応し、び漫性に染色された。これらの染色において血球成分は染色されなかった。対照として、単クローン抗体を除いて以後同様の反応を行ったもの、非免疫正常マウス血清を適当希釈したものでは、陽性染色を認めなかった。異種抗血清を用いたPAP法では、合体栄養細胞の、主として細胞膜が陽性に染色され、この点では3A2とほぼ同様の結果を示した。しかし、細胞質の染色は非常に弱かった。巨細胞は、いずれも陰性であった (Fig. 9)。アセトン固定パラフィン包埋切片のALP酵素組織化学染色では、ALP活性は合体栄養細胞の細胞膜に強く染色された。他の細胞には活性は認めなかった。Table 2はこれらの結果をまとめたものである。

4 考 察

4・1 単クローン抗体について

Köhler and Milstein¹⁴⁾によって開発されたハイブリドーマにより得られる単クローン抗体は、従来の異種抗血清の持つ種々の問題点を解決したと言える。即ち、1)免疫原となる抗原分子には多種多様な抗原決定基が存在し、2)異種抗体には、これらに対応した多種の抗体が含まれる。そのため、3)特異的抗体を得るには十分な吸収操作を行わなければならない、4)特異性と親和力の雑多な集合物としての抗体が得られるのみである、などの問題点があった。この点、単クローン抗体は抗原分子の一つの抗原決定基に対する抗体であるので特異性が高く、均一な親和力を有し均一なクラスのみ抗体が得られるという長所を有する。

Table 2 Localization of the enzyme in placenta.

Localization Detection methods	Giant cells			Syncytial trophoblasts		
	plasma membrane	cytoplasm	nucleus	plasma membrane	cytoplasm	nucleus
Histochemistry	+-	-	-	+++	-	-
Polyclonal antibody	-	-	-	++	+-	-
Monoclonal antibody (3A2)	+-	+	-	++	+	-
Monoclonal antibody (4C1)	-	-	++	-	-	++

-, negative; +-, weakly positive; +, moderately positive;
++, strongly positive; +++, very strongly positive.

4.2 ELISA 法について

単クローン抗体の作製にあたり、いかに簡便に、しかも短時間に抗体産生ハイブリドーマを同定するかが問題である。我々は、Engvall *et al.*²⁰⁾により開発されたELISA法を利用し、抗体産生の判定を行ない、特異性を検討した。抗原が細胞表面抗原の様なもの場合、細胞障害試験、即ち、色素除去法²¹⁾や標的細胞を放射性物質で標識して cytolysis によって放出される放射性物質の放射活性を測定する方法²²⁾がある。しかし、いずれも補体結合性のある IgM、及び IgG₂しか検出できず、後者は放射性物質をみつかることと、測定機器が高価であるなどの欠点がある。一方、細胞あるいは、組織片を用いて間接蛍光抗体法、酵素抗体法により抗体産生を判定する方法も、判定できる試料の数が限られることや、感度の点に問題が残る。蛍光抗体法で fluorescence-activated cell sorter (FACS) により、分離する方法²³⁾や、radioimmunoassay (RIA) などの高感度、鋭敏な方法²⁴⁾もあるが、後者は放射性物質をみつかるという問題点がある。これらに比べELISA法は、簡便、迅速であり、二次抗体によっては抗体のいかなるサブクラスをも検出できるという利点がある。即ち、ELISA法はRIAにおける放射性物質の代わりに酵素 (peroxidase やアルカリフォスファターゼなど) で標識した二次抗体を使用し、基質と酵素の反応による産物の量で、間接的に試料を定性、定量する方法で、RIAと同程度の感度を示すことも知られており²⁵⁾、比色計の値と肉眼による判定が比較的良く正の相関を示し、特別な測定機器がなくても、陽性、陰性の判定は、3・3・3の如く (Fig. 6)、十分可能である。一度に多数の検体を取りあつかることができる点もハイブリドーマ培養上清の抗体産生をスクリーニングする場合の大きな長所となる。

4.3 単クローン抗体の特異性について

得られた単クローン抗体 3A2、4C1 は、いずれも ELISA 法により抗体産生の判定がなされ、抗原に特異的に反応するクローン化されたハイブリドーマの産生する抗体で、ELISA 法において HRP 標識抗体との反応で、AD 0.5 以上の発色を示し、肉眼的にも容易に判定可能であった。また、いずれの抗体も、ALP との反応による免疫反応物を遠沈することにより、上清の残存活性が、加えた抗体の量に応じて減少することから (Fig. 7)、酵素活性をもつ抗原を抗体が認識していることを示すものと考えられる。また、免疫反応物の電気泳動像の ALP 活性染色においても、抗体を加えることによって活性帯が減少ないし消失すること (Fig. 8)は、

これらの抗体が抗原と結合し、抗原抗体複合物が生じ、抗原の分子量や荷電が変化した結果と考えられる。従って、いずれの単クローン抗体も ALP 蛋白(あるいはこれと共通の epitope を有する蛋白)を特異的に認識していると考えられる。

4.4 ALP の細胞内局在について

単クローン抗体 3A2 による ALP 蛋白の免疫組織化学によって、通常の酵素組織化学や異種抗血清による免疫組織化学染色で示される、ALP 蛋白の細胞膜における局在の他に、細胞質内にも ALP がびまん性に存在することが示された (Fig. 9)。Tokumitsu *et al.*⁶⁾は、HeLa 細胞の TCRC-1 細胞株について、異種抗血清による ALP 蛋白の細胞内局在を検討し、通常の免疫組織化学的方法では細胞膜にしか存在しなかった反応産物が、抗体反応液中にサポニンを加えることによって、細胞膜の他に細胞質内にも陽性となることを報告している。このような結果は ALP 蛋白分子が細胞内に存在はしているが、抗原基が何らかの理由によりマスクされており、サポニン処理によって露出する可能性を示している。また、彼等は、この細胞に prednisolone や sodium butyrate を作用させて酵素を誘導すると、ALP が細胞膜とゴルジ装置の一部に認められるようになり、さらに、サポニン処理によってゴルジ装置、粗面小胞体、核膜にも活性が認められるようになることを報告している^{6,7)}。これらの事実は、細胞内 ALP の活性が、通常はマスクされており、活性を利用する酵素組織化学的方法では認識できないことを示唆している。3A2 を用いた免疫組織化学的染色により検出された細胞質内 ALP は、酵素活性としては認められない ALP 蛋白分子が特異的抗原抗体反応により検出されたものと考えられる。

4.5 核内 ALP について

一方、単クローン抗体 4C1 では、ALP は核内に陽性に染色された。核内 ALP 蛋白の存在については古くから論議があり、Danielli³⁾や Cox and Macleod⁴⁾、Rogers⁵⁾、El-Fiky *et al.*²⁶⁾による酵素組織化学的検索では、核に ALP 活性が存在するという報告がなされたが、いずれも金属塩法を用いており、反応産物の核への非特異的吸着の可能性を残しているため定説とはなっていない。生化学的にも、Griffin *et al.*¹⁾や Wilson and Ahmed²⁷⁾による細胞内各小器官の画分の酵素活性の検索で、核画分にも活性が認められたというが、細胞膜成分の混入という意見が強く²⁸⁾、以来、核における ALP 活性の存在に関しては否定的な見解が多く、もし存在したとしても細胞膜のそれに比べはるかに弱いも

のとされている。しかし、前述の Tokumitsu *et al.*⁶⁾, Tokumitsu and Fishman⁹⁾ は、異種抗血清による免疫組織化学と酵素組織化学染色で、細胞をサポニン処理することにより、核膜に ALP 蛋白及び活性を証明している。我々の 4C1 による核内陽性所見は、すべてび慢性で、明瞭な円周性の染色態度とは異なっており核膜の染色とは考え難い。

免疫組織化学的に核内 ALP の存在を報告するのは、本研究がはじめてである以上、その意義については推測の域を出ないが、Sela and Sachs²⁸⁾ は、ハムスター胎児由来の正常線維芽細胞は ALP 活性が高いが、これを腫瘍ウイルスなどでトランスフォームさせると、ALP 活性は著しく低下し、DNA 合成の促進、軟寒天内でのコロニー形成などの性質を獲得することを報告している。このことについて彼等は、DNA の前駆体である細胞内 d-TMP が ALP により加水分解をうけ、その濃度が低下することにより、細胞増殖が抑制されている可能性を指摘している。また、近年、c-AMP による細胞内情報発現の制御機構が次第に明らかになりつつあり、c-AMP と連動して c-AMP dependent protein kinase が蛋白をリン酸化し、各種酵素活性を制御する機構が存在することが判明しつつある。このような情報発現の基本的な機構に関連して興味あるのは、Kranias *et al.*²⁹⁾ の報告で、核内に存在する RNA polymerase II が c-AMP dependent protein kinase によってリン酸化されて活性化され、逆にリン酸化された活性型 RNA polymerase II に外来の ALP を作用させると、リン酸基がはずれるとともに活性が低下し m-RNA の合成が低下するという結果を得ている。この事実は、ALP がリン酸化蛋白質を基質としリン酸残基を水解し得ること、ALP が kinase と逆の作用を示すことにより DNA からの情報発現(transcription)の制御に関与するという可能性を示すものである。このような結果を考察すると、ALP 関連蛋白が核に存在し、細胞機能に役割を果たしている可能性が考えられるが、この点を確認するためには今後詳細な生化学的研究と、抗原の解析が必要と思われる。

5 結 論

ラット胎盤 ALP を抽出精製し、異種抗血清、単クローン抗体を作製し、ALP 蛋白の細胞内局在を免疫組織化学的に検討し、あわせて、酵素組織化学的に ALP の活性局在と比較検討し以下の結果を得た。

1) ラット胎盤より ALP を分離精製し、比活性 850 倍の酵素蛋白を得た。

- 2) 精製 ALP を抗原として家兎に異種抗血清を作製し、IgG 分画を得た。得られたウサギ IgG は Ouchterlony 法により単一の沈降線を形成した。
- 3) 同様に精製 ALP を抗原として単クローン抗体の産生判定のスクリーニングを行うために ELISA 法を設定した。本法の設定条件では抗体量 0.075 $\mu\text{g/ml}$ 以上の抗体が検出可能で、肉眼的にも反応液の着色の濃淡により、陽性陰性の判定は容易であった。
- 4) ELISA 法により抗体産生ハイブリドーマを得、うち 3A2, 4C1 の二種の特異抗体を本研究に用いた。
- 5) これら二種の単クローン抗体と抗原酵素との反応液の遠沈上清の酵素活性は、加えた抗体の量に応じて減少した。
- 6) 同様の反応液の 7.5%ポリアクリルアミドディスク電気泳動後の酵素活性染色で、抗原のみの場合に見られる酵素活性帯の消失ないし減少をみ、その特異性が確認された。
- 7) 単クローン抗体 3A2 による免疫組織化学染色では、ALP は胎盤栄養膜合胞細胞の細胞膜に強く、細胞質に弱く染色され、また栄養膜巨細胞の細胞質にび慢性に陽性の染色を認めた。
- 8) 異種抗血清による免疫組織化学染色では、ALP は合胞細胞の細胞膜に強く染色され、これは酵素組織化学染色による活性局在と同様であった。
- 9) しかし単クローン抗体 4C1 では、ALP 蛋白は合胞細胞、巨細胞の核にび慢性に染色された。
- 10) 以上の結果より、ALP 蛋白は従来細胞膜がその活性局在及び蛋白分子の局在と考えられていたが、本研究により、細胞膜のみならず、細胞質及び核にも存在する可能性が示唆された。

謝 辞

御指導、御校閲いただいた本学病理学第二講座森道夫教授に深謝の意を表し、本研究に際し、御協力いただいた本学病理学第一講座松浦晃洋博士ならびに第二講座の諸先生、研究補助員の方々に感謝します。

文 献

1. Griffin, M. J., Cox, R. P. and Grujic, N.: A chemical method for the isolation of HeLa cell nuclei and the nuclear localization of HeLa cell alkaline phosphatase. *J. Cell Biol.* **33**, 200-203 (1967).
2. Fishman, W. H.: Perspectives on alkaline phosphatase isozymes. *Am. J. Med.* **56**, 617-650

- (1974).
3. Danielli, J. F.: The calcium phosphate precipitation method for alkaline phosphatase, In: Danielli, J. F.: *General Cytochemical Methods*. Vol. 1, 423-444, Academic Press Inc. New York (1958).
 4. Cox, R. P. and Macleod, C. M.: Alkaline phosphatase content and the effects of prednisolone on mammalian cells in culture. *J. Gen. Physiol.* **45**, 439-485 (1962).
 5. Rogers, K. T.: Studies on chick brain of biochemical differentiation related to morphological differentiation and onset of function. III. Histochemical localization of alkaline phosphatase. *J. Exp. Zool.* **145**, 49-59 (1960).
 6. Tokumitsu, S., Tokumitsu, K. and Fishman, W. H.: Intracellular alkaline phosphatase activity in cultured human cancer cells. *Histochemistry* **73**, 1-13 (1981).
 7. Tokumitsu, S. and Fishman, W. H.: Alkaline phosphatase biosynthesis in the endoplasmic reticulum and its transport through the Golgi apparatus to the plasma membrane. *J. Histochem. Cytochem.* **31**, 647-655 (1983).
 8. Tokumitsu, S., Tokumitsu, K. and Fishman, W. H.: Immunocytochemical demonstration of intracytoplasmic alkaline phosphatase in HeLa TCRC-1 cells. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 1080-1087 (1981).
 9. 渡辺慶一, 名倉 宏, 長村義之, 小松遵至, 和泉伸一, 吉村真一, 武市光市: 酵素抗体法の医, 生物学への応用, 渡辺慶一編, 酵素抗体法—理論, 手技解説とその応用—, 119-141, 学際企画 東京 (1981).
 10. Sugiura, M., Hirano, K., Iino, S., Suzuki, H. and Oda, T.: Purification and properties of human liver alkaline phosphatase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **23**, 2369-2375 (1975).
 11. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951).
 12. Felix, R. and Fleisch, H.: The pyrophosphatase and $(Ca^{2+}-Mg^{2+})$ -ATPase activity of purified calf bone alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* **350**, 84-94 (1974).
 13. Kaneko, A.: Studies on two types of alkaline phosphatase in rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **64**, 785-794 (1968).
 14. Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
 15. Davis, B. J.: Disc electrophoresis-II Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404-427 (1964).
 16. 飯野四朗: アルカリフォスファターゼアイソエンザイム. 月刊 *Medical Technology* 編: 電気泳動のすべて. 182-186 (1981).
 17. Sternberger, L. A., Hardy Jr. 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-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**, 315-333 (1970).
 18. Burstone, M. S.: Histochemical demonstration of phosphatases in frozen sections with naphthol AS-phosphates. *J. Histochem. Cytochem.* **9**, 146-153 (1961).
 19. Ouchterlony, Ö. and Nilsson, L. Å.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis, In: Weir, D. M.: *Handbook of experimental immunology*. Vol. 1/3, Chapter 19. Blackwell Scientific Publication, Oxford (1978).
 20. Engvall, E., Jonsson, K. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. *Biochim. Biophys. Acta* **251**, 427-434 (1971).
 21. Mittal, K. K., Mickey, M. R., Singal, D. P. and Terasaki, P. I.: Serotyping for homotransplantation. XVIII Refinement of microdroplet lymphocyte cytotoxicity test. *Transplantation* **6**, 913-927 (1968).
 22. 菊地浩吉: ^{51}Cr 標識細胞障害試験. 日本免疫学会編, 免疫実験操作法, A 349-351 (1972).
 23. Locken, M. R. and Herzenberg, L. A.: Analysis of cell populations with a fluorescence-activated cell sorter. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **245**, 163-171 (1975).
 24. Stocker, J. W. and Heusser, C. H.: Method for binding cells to plastic: Application to a solid-phase radioimmunoassay for cell-surface antigens. *J. Immunol. Methods* **26**, 87-95 (1979).
 25. Ishikawa, E. and Kato, K.: Ultrasensitive enzyme immunoassay. *Scand. J. Immunol.* **8** (Suppl. 7), 43-55 (1978).
 26. El-Fiky, S. M., Fahmy, T. Y. and Abdo, S. E.: Karyometrical and cytochemical studies of Harding-Passey melanoma and Horing-Mitchely kidney tumor. III. Cytochemistry of some hydroly-

- tic enzymes. *Acta Histochem. (Jena)* **42**, 115-120 (1972).
27. Wilson, M. J. and Ahmed, K.: Presence of androgen control of an alkaline phosphatase in the nucleus of rat ventral prostate. *Biochim. Biophys. Acta* **429**, 439-447 (1976).
28. Sela, B. and Sachs, L.: Alkaline phosphatase activity and the regulation of growth in transformed mammalian cells. *J. Cell Physiol.* **83**, 27-34 (1974).
29. Kranias, E. G., Schweppe, J. S. and Jungmann, R. A.: Phosphorylative and functional modifications of nucleoplasmic RNA polymerase II by homologous adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase from calf thymus and by heterologous phosphatase. *J. Biol. Chem.* **252**, 6750-6758 (1977).

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学病理学第2講座 服部淳夫

Explanation of figures

Fig. 9

- 9-A; Immunoperoxidase staining of a placenta section. Plasma membrane of trophoblasts and cytoplasm of giant cells were stained positively with monoclonal antibody 3A2. (×200)
- 9-B; Immunoperoxidase staining of a placenta section. Nuclei of trophoblasts and giant cells were stained positively with monoclonal antibody 4C1. (×200)
- 9-C; Immunoperoxidase staining of a placenta section. Plasma membrane of trophoblasts was stained strongly with conventional polyclonal antibody. (×200)
- 9-D; Enzyme histochemistry of a placenta section. The activity was confined to plasma membrane of the syncytial trophoblasts. (×200)

