

## 技術研修発表会報告

### 抗プロラクチン抗体を用いた免疫電顕法の手法に関して

実験教育支援センター 竹内有次

#### 1. 実験目的

タンパク質は生体機能を担う分子機能を有します。特に情報の伝達には非常に重要な役割を担っています。今回、我々は情報伝達機構のひとつである内分泌系の情報伝達機構に関して新たな作用機構を分子生物学手法および免疫電顕法を用いて、明らかにすることを試みた。今回の発表では、その免疫電顕法の手法を用いてマウスプロラクチンの局在を検出するための手技を中心に報告する。

#### 2. 実験方法

- 1) 実験動物 マウス (Balb/c) 8週令 (雄)
- 2) 固定液 Zamboni 固定液
- 3) 固定方法 灌流固定 + 浸漬固定
- 4) 手 技 0.1MPB (pH7.2)300ml . . . . 灌流  
Zamboni fix 500ml . . . . 灌流  
組織の摘出 . . . 気管、肺、脳下垂体 (Control)  
Zamboni fix (浸漬固定) 4 24hr  
Rinse 0.1MPB (pH7.2)
  - 1) 免疫組織化学用 . . . . パラフィン包埋
  - 2) 免疫電顕用試料作成 (Pre-Embedding 法)
- 5) Pre-Embedding 法
  1. 薄切 (50 ~ 100  $\mu$ m) . . . . マイクロスライサー使用
  2. Rinse 0.1MPB
  3. 第1抗体 抗マウスプロラクチン抗体 (200 $\times$ ) 4 8時間
    - \* 使用抗体種 (m-PRL-Rabbit) (m-PRL レセプター抗体: ペプチド抗体)
    - \* Control 吸収抗体使用
  4. Rinse 0.1MPB
  5. 第2抗体 anti-Rabbit-HRP (200 $\times$ ) 4 4時間
  6. Rinse 0.1MPB
  7. DAB 反応
  8. Rinse 0.1MPB
  9. Pos-fix 2%OsO<sub>4</sub>/PB 氷令 2時間

10. Rinse 0.1MPB

11. エボン倒立包埋後重合

6) 準超薄切作製 ミクロトーム (ライヘルト社)

染色 トルイジンブルー (カウンターStain)

7) 超薄切作製

染色 3%酢酸ウラニウム 20分

洗 浄

### 3. 反応結果

抗マウス抗体陽性 肺胞2型上皮細胞、無繊毛細胞 (クララ細胞)

抗マウスレセプター抗体陽性 無繊毛細胞の微絨毛 (マイクロビライ)

### 4. 結果

従来、プロラクチン (内分泌系) の伝達機構は、下垂体を介して標的器官 (オートクライン) へ作用すると考えられていた。今回の実験にて、その標的器官とされている組織においても、プロラクチンを合成する機構があることを証明するために、分子生物学的手法 (ノザンプロット法等) の他に、免疫電顕法の手法を用いてその局在を検索した。これまでに、乳腺においてはその機構が証明されていたが、今回の実験にて、気管の無繊毛細胞および肺胞2型上皮細胞の細胞質にその局在を証明した。また、他の組織としては、脳脈絡層上皮細胞、脳室上皮細胞、腎臓の介在細胞に局在を認めた。

\* 上記の実験は、慶應義塾大学医学部解剖学教室にて在職中に行った実験結果である。