PGP9.5に対する免疫組織化学的染色（間接酵素法）

＜1日目＞

1. 凍結切片作成（30μm）　←表皮厚の測定には、10μm厚でHE染色

厚いので切片にしっかり密着してないと、染色時に剥げるので要注意。

1. 風乾（室温、十分に）
2. かん流固定しているので固定は不要。冷アセトンにて固定（-4℃、10分）しても問題はない。
3. 0.5％TritonX-100 in PBS　30分
4. 洗浄×3回　（しっかり洗浄しないと、染まらないので要注意）
5. 内因性ペルオキシダーゼ抑制（0.3％H2O2 メタノール、30分）

バックグラウンドが強い場合は、4の前に、風乾した状態で直接内因性ペルオキシダーゼ抑制をすると、よいかも。

1. PBSで洗浄（5分、1～2回）
2. 1～5％ウシアルブミンPBSにてブロッキング（30分）
3. 1次抗体反応（4℃、over-night）

希釈倍率・・・1000～2000倍

　　すべて5％ウシアルブミンPBSまたはPBSで希釈すること

※シェーカーによる拡散はしないほうがよい。拡散すると切片が剥げる。

1. 2次抗体作成

　希釈倍率・・・1000倍

＊拡散後、正常ラット血清を1次抗体と同量を加える

→　4℃でover-night

　　　　＊かん流固定しているから、血清はいれなくても染まりはあまり変わらないはず。

＜2日目＞

1. PBS洗浄（5分、3回）　←　やさしく。
2. 2次抗体反応（室温、60分）
3. PBS洗浄（5分、3回）　←　やさしく。
4. ABC液反応（室温、30分）

＜ABCキット使用＞

　　　　PBS 2.5ml　＋　A液 1滴　＋　B液 1滴

　　　　＊使用30前に作成すること。保存は不可。

1. PBS洗浄（5分、3回）
2. DAB発色

　　　　0.05M Trisバッファー 100ml ＋ DAB 10mg ＋ 30% H2O210μl

※顕微鏡で神経線維の発色を確認してから発色を停止すること。切片が厚いから、容易に確認することができる。

表皮層は必ず黒く発色してしまうから気にしない

1. 蒸留水（数分）
2. 脱水、透徹、封入

コツ

* 切片にTritonX-100が残っていると、抗体が切片に浸透しにくくなるので、しっかり洗浄すること。
* 剥げるのをいかに防ぐかが一番の重要点。50％は切片作成時に決まる（少しでも切片が浮いていれば、そこから必ず剥げていく）。
* 少し剥げても、丁寧に扱っていけばなんとかなる。剥げて折れ曲がっていても、封入時にピンセットで整えて、無理矢理にでもカバーガラスかぶせてしまえば、意外に綺麗に観察できる。

＜解析＞

200倍5画面、表皮層が横向きになるよう撮影

画面右端から左端までの表皮下50μｍの領域（帯状の領域）にある陽性線維をカウント。

表皮下50μｍの領域で2つに枝分かれるものは、2とカウント。表皮層内で枝分かれしているものは1とカウント

カウント数を0.3451で除して、毎mmあたりの陽性神経数を算出。いまのところ、これを神経密度と表現している。

切片面と平行に走る陽性神経は容易に判断できるが、切片と垂直に陽性神経は点状にみえるため、判断しにくい。