

# 細胞・組織の染色技術

伊 東 丈 夫

## Tissue and Cell Staining Technology

Johbu ITOH

The diameter of animal cells are about 10–20  $\mu\text{m}$  in size, it is the minimum size of about 1/5 which can be seen by human eyes, and is very small complicated and transparent and colorless. It is difficult to clarify the molecule structure and composition, and it is still more difficult to solve work of the cell ingredient. As a method of making these possible, it is the power of experiment technology. One of the technologies which accomplish the basis also in it is the staining technology. Discovery and development of a staining agent (colorant) were conjointly made with development of the microscopy in the second half of the 19th century, and cell structures became clear for the first time. This report is introduced simply about the histological, immunohistochemical-cytochemical staining method, and the new technique of green fluorescence protein and quantum dots.

**Key words:** histochemical staining, fluorophore, green fluorescent protein, quantum dot, microscopy

動物細胞の大きさは、およそ 10~20  $\mu\text{m}$  で、肉眼視できる最小の約 5 分の 1 のサイズであり、非常に小さく複雑かつ無色透明である。その構造や分子組成を明らかにすることは、そのままでは困難であり、その細胞成分の働きを解明することはなおさら困難である。これらを可能にするものは、実験技術の力である。常に新しい実験法（技術）を開発・導入しながら、形態学・組織化学・細胞化学・細胞生物学は発展してきた\*1。

その中でも、根幹をなす技術のひとつが染色法である。19 世紀後半の顕微鏡の発達と相まって染色剤（着色剤）の発見・開発がなされ、はじめて細胞構造が明らかになったのである。その後、電子顕微鏡と染色技術（方法）の双方の発達により、はじめて細胞内微細構造の把握が可能となったわけである。

観察対象が生きている細胞・組織かあるいは、固定された細胞・組織かにより、染色方法・観察方法も自ずと異な

ってくる。

今回は、一般的な組織・細胞の染色方法、免疫組織化学染色方法と、近年の新しい手法（蛍光タンパク質、量子ドット）について簡単に紹介する（分子化学的な染色方法は他の項に譲る）。

### 1. 細胞の構造

細胞の中には、核をはじめとする種々の細胞内小器官といわれる器官が存在し（図 1）、それぞれを顕微鏡で観察するためには、それぞれに特異的に染色される色素（化学的染色、物理的染色、免疫染色など）を用いて染色する必要がある。

### 2. 光学顕微鏡標本の作製法、染色法<sup>1)</sup>

#### 2.1 顕微鏡標本作製の概略

図 2 にその手順を示す。

東海大学医学部教育・研究支援センター細胞科学部門（〒259-1193 伊勢原市望星台） E-mail: itohj@is.icc.u-tokai.ac.jp

\*1 組織化学とは、組織学的構造を基盤にして、組織のどこの部分に何がどのような状態で存在するのか、細胞化学は、細胞のどこに何がどのように存在するかを明らかにするものである。

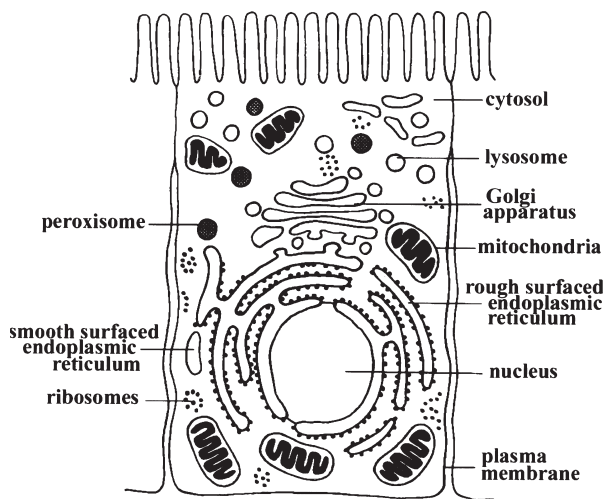


図1 小腸吸収上皮細胞の模式図。

手順：臓器摘出 (tissue resected)→切り出し (cutting out)→固定 (fixation)→脱水 (dehydration)→包埋 (embedding)→薄切 (sectioning)→染色 (staining)→封入 (mounting)→観察 (observation)。

電子顕微鏡 (電顕) も光学顕微鏡 (光顕) も基本的には同じステップである。

## 2.2 固定<sup>2)</sup>

固定とは、組織細胞の基本構造を構成しているタンパク質 (糖質、脂質も含めて) を、水、有機溶媒に不溶化し、組織中各種分解酵素を失活させ、それ以上組織細胞が変性しないように安定化させることである。なおかつ免疫組織化学では、観察しようとするターゲットが、抗原性を失わず、その場に正確にとどまる (proper immobilization) ことが要求される。したがって、目的とするものが何なのか、観察は、光学顕微鏡かレーザー顕微鏡か電子顕微鏡かにより固定液の選択が異なる。

### 2.2.1 代表的な固定法の種類 (光学顕微鏡)

#### (1) 一般的な固定液

ホルマリン固定液 (formaldehyde) —最も一般的で応用範囲が広い固定液である。アルデヒドでアミノ基の架橋による固定。

#### (2) タンパク系抗原 (分子量 2~3 万以上のもの)

タンパク質のアミノ基を架橋により固定する方法—パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, PFA)。

#### (3) 糖タンパク系抗原

酵素タンパクや免疫グロブリンの糖鎖を固定する方法—

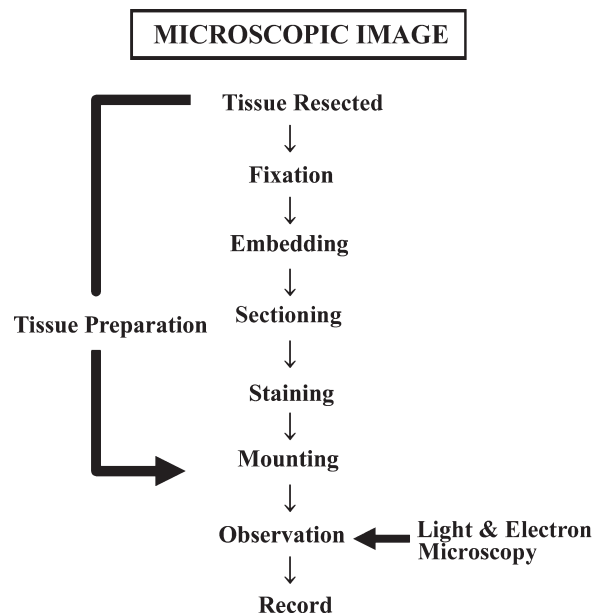


図2 標本作製ステップ。

periodate-lysin-paraformaldehyde (PLP)。

#### (4) ポリペプチド系抗原

各種ポリペプチド系ホルモンがこれに属し、タンパクより分子量の小さいこれらのポリペプチドは、タンパクより流出しやすい一方、アルデヒド、酸の影響に対して抵抗が強い。浸透力の強いピクリン酸とアルデヒドの混合液がよいとされる。

ブアン固定 (Bouin's 固定)—パラフィン切片用。

ザンボニ固定 (Zamboni's 固定)—凍結切片用。

## 2.3 染色の種類<sup>3)</sup>

染色方法は、大まかに化学反応に基づく化学染色と、物理的に結合する物理染色に分けられる。抗原抗体反応を利用する免疫組織細胞化学は、大別すると前者の化学染色の範疇である。次におおのこの代表的な染色をあげる。

化学染色—HE 染色, PAS 染色, Feulgen 反応, メチルグリーン染色, 鍍銀法, 免疫反応など。

物理染色—アザン染色, コンゴレッド染色, 脂肪染色など。

### 2.3.1 染色の原理

代表的な染色法についてその原理と染色性を示す (図3)\*2。

#### (1) HE 染色 (Hematoxylin and Eosin staining)

ヘマトキシリンはヘマトキシロンという樹木より抽出された天然色素で、水に溶けにくくアルコールに溶けやすい。

\*2 染色色素について一色素を水溶液とした場合、その有する基により、負または正に荷電する。その荷電状態により酸および塩基性色素に分ける。負が酸性、正が塩基性。酸性色素：細胞質の染色に適す。OH, COOH, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>OH などの基を有する。エオジン, オレンジ G, 酸性フクシンなど。塩基性色素：核, 粘膜, 神経要素, 特殊分泌顆粒の染色に用いる。NH<sub>2</sub>, NHCH<sub>3</sub>, NH などの基を有する。ヘマトキシリン, メチレン青, トルイジン青, チオニン, 塩基性フクシン, メチル緑など。直接染料のトリパン青, 油性色素のズダン系などは上記分類にあてはまらない。

色素自体は無色ないし淡黄色であるので、酸化剤を用いて赤色のヘマトリンにする。ヘマトリンは生体構成成分と強く結合できないため、媒染剤を添加しヘマアラウンとする。このヘマアラウンは正に帯電しているため、組織内の負に帯電している部分、リン酸基やカルボキシル基を多く含む部分に結合し、具体的には、細胞核を青紫色に染める。

酸性色素であるエオジンの色素分子は、水溶液中では負に帯電している。したがって、組織中の正に帯電している部分に結合するが、組織構成成分は全般に等電点がやや低く (pH 3.5~5.5)、エオジン水溶液中では負に帯電している。そこで、酢酸などの酸を少量加えると、組織成分がより正に帯電し、負のエオジンが結合しやすくなる。具体的には、細胞質を赤橙色に染める。

HE (Hematoxylin-Eosin) 染色—ヘマトキシリン：青 (核)、エオジン：薄赤～ピンク色 (細胞質)。

#### (2) アザン染色 (Azan 染色)

この染色は膠原線維と筋線維を染め分ける染色法で、酸性色素の分子量 (分散度) の差に基づき、分子量の大きい色素は粗な組織、分子量の小さい色素は密な組織に吸着されることを利用している。

膠原線維は粗構造で間隙が広く、筋線維では密構造で間隙が狭い。大色素分子 (アニリン青) は拡散速度が遅く、一部正帯電の  $\text{NH}_3$  基をもち親水性に乏しいので吸着性が大きく、粗構造の広い間隙に入り小色素分子を押し退けて定着する (膠原線維：アニリン青；青色)。一方、小色素分子 (負電荷アゾカルミン G、オレンジ G) は拡散速度が速く、密構造に入る。また、密構造は酸性媒液で正に帯電するので、いっそう解離しにくくなり大色素分子を排斥する (筋線維：負電荷アゾカルミン G、オレンジ G；赤色)。したがって、この染色は分子の大きさの異なる酸性色素が、それぞれの組織のもつ構造上の差異に対する親和性を利用したものといえる。

色素の分子量—ピクリン酸 < オレンジ G < アゾカルミン G < 酸性フクシン < アニリン青。

アザン染色—アゾカルミン：赤 (核、赤血球)、オレンジ G：黄赤 (分泌顆粒、コロイド)、アニリン青：青 (膠原線維、粘液)。

#### (3) 過ヨウ素酸シッフ (periodic acid Schiff reaction (PAS)) 染色

組織切片の多糖類の 1,2-グリコールの水酸基が過ヨウ素酸で酸化されると、アルデヒドを生じる。これにシッフ試薬が結合し、赤紫色に呈色する反応により検出する方法である。その頭文字をとって PAS 反応と呼ばれる。

PAS (periodic acid Schiff) 染色—塩基性フクシンを

含むシッフ液：紫紅～赤紅 (多糖類)、過ヨウ素酸で糖をアルデヒドにし、シッフ試薬をつける。

#### (4) ギムザ染色 (Giemsa stain)

血液および骨髓塗抹標本の普通染色法の中で最も基本的な染色である。ギムザ液は塩基性色素 (メチレン青、アズール青など) と酸性色素 (エオジン) との混合物である。アズール II は、好塩基性物質 (核の DNA、細胞質の RNA、アズール顆粒など) を青紫色に染める。エオジンは、好酸性物質 (ヘモグロビン、好酸性顆粒など) を赤橙色に染める。血球の中の物質および構造は、この両色素に染色されて、各血球に特徴的な染色像を呈する。

色素—塩基性色素：メチレン青 (自然分解してアズール II も生成)、酸性色素：エオジン。

#### (5) ズダン III 染色

アゾ色素 (ズダン III、オイル赤 O、ズダン黒など) は、無極性かつ脂溶性であるため、組織に触れると組織内脂質という溶媒に溶け込み、結果として脂肪染色ができる。

色素—ズダン III or IV：橙～赤 (脂肪滴)、ズダン黒：黒 (脂肪滴)。

#### (6) 免疫組織化学染色<sup>2)</sup>

酵素抗体法染色、蛍光抗体法が代表的なものである (詳細は 4 章)。

### 3. 鏡検方法<sup>1)</sup>

#### 3.1 染色標本の光学顕微鏡観察

従来の光学顕微鏡の観察方法として、

- 透過光観察
- 位相差顕微鏡
- 微分干渉法
- 暗視野観察法

などがあげられる。それぞれ、染色物質 (組織・細胞) の染色態度をとらえたり (透過光観察)、位相の違いをとらえたり (位相差、微分干渉)、反射散乱光をとらえ画像化する方法である。

#### 3.2 新しい観察方法

次のような非線形光学顕微鏡があげられる。

- 多光子顕微鏡：multi-photon microscopy
- 第二高調波顕微鏡：second harmonic generation (SHG) microscopy
- コヒーレントアンチストークスラマン散乱法顕微鏡：coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy
- 近接場顕微鏡：near field microscopy

これらの新しい顕微鏡を用いると、機能分子をまったく

染色なしに観察、計測、制御などが可能となる。今後期待される顕微鏡である。

### 3.3 電子顕微鏡観察

細胞内の微細構造を観察するためには、電子顕微鏡が用いられる。標本の作製方法も一般光学顕微鏡とは異なる。詳細は割愛する。

## 4. 免疫組織細胞化学 (immunohistochemistry and immunocytochemistry)

抗原抗体反応を基盤とした組織細胞化学である。求める物質に対する抗体をあらかじめ作製し、その抗体を組織細胞に反応させた後標識物質により可視化する。標識物質により、酵素抗体法(酵素)、蛍光抗体法(蛍光色素)などに大別される。

### (1) 可視化標識

酵素抗体法—標識酵素：西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を酵素組織化学の系で発色する。他の酵素：アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼなど。

蛍光抗体法—標識物質として蛍光色素を用い蛍光顕微鏡で観察する。代表的蛍光色素：FITC, RITC, ローダミン, テキサスレッドなど。

免疫電子顕微鏡組織化学—標識物質として金属(金, 銀, フェリチンなど)を用いる。オートラジオグラフィ—放射性同位元素(アイソトープ)を用いる。

### (2) 直接法と間接法

直接法—求める物質に対する抗体(一次抗体)そのものに標識する。

間接法—反応系を2~3段階にし、二次抗体以降の反応液に可視化の標識をする。PAP( Peroxidase-antiperoxidase)法, ABC(avidin-biotin-peroxidase complex)法など。

## 5. 酵素組織化学 (enzyme-histochemistry)<sup>4)</sup>

酵素活性検出法の原理は、基質(substrate)が酵素によって分解された結果生じた一次反応産物(primary reaction product)を捕捉剤(capturing agent)と反応させ、光顕ないし電顕的に可視できる沈殿物を形成する最終反応産物(final reaction product)に変えることにより、酵素活性部位を証明しようとするものである。

## 6. *in situ* ハイブリダイゼーション法<sup>5)</sup>

ハイブリダイゼーションとは、一本鎖の核酸がこれと相補的塩基配列をもつ一本鎖の核酸と特異的に水素結合することにより、二本鎖を形成することをいう。したがって、ハイブリダイゼーションは、DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-RNA間に存在する。*in situ*ハイブリダイゼーションとは、一本鎖の核酸が細胞、組織内に存在し、これと相補的な塩基配列をもつ一本鎖の核酸とハイブリダイゼーションすることをいう。あらかじめ使用する一本鎖の核酸(DNAやRNA,特にmRNAの場合が多い)に、後に認識可能な物質(放射性同位元素や抗原物質(ハプテン))が標識されている。これを標識プローブ(cDNAや合成オリゴヌクレオチド)と呼ぶ。たとえば、あるタンパクの局在が組織化学的手法により証明されても、その場で産生されたものか、あるいは他の場所で産生されその場に運ばれてきたものかは不明である。タンパクの場合、細胞質内でリボゾームによりmRNAの塩基配列を翻訳して合成されるので、その場で特異的mRNAが検出されれば、その場においてそのタンパクが産生(合成)されたことの証明となる。蛍光標識したプローブを用いる方法を *fluorescent-in situ hybridization* (FISH) と呼ぶ。

## 7. 新しい技法

### 7.1 緑色蛍光タンパク<sup>6),\*3</sup>

緑色蛍光タンパク(GFP: green fluorescent protein)は、自己完結的な蛍光活性をもつ238アミノ酸からなる分子量27kDaのタンパク質で、1992年に発光オワンクラゲ(*Aequorea victoria*)のGFP遺伝子がクローニングされた。さらに、野生型GFPに比べて約35倍の蛍光強度をもつenhanced green fluorescent protein(EGFP)など変異体GFP(ECFP, EYFP, ERFPe etc.)も紹介され、その種類も豊富になってきた。そして近年、GFPの発色団形成過程において、46番目のフェニルアラニンをロイシンに置換する、アミノ酸置換が導入された結果、さらに強い蛍光強度をもつ改変GFP(Venus)が報告された。今日、ますます多くの研究分野で活用されているのは、周知のとおりである。

#### 7.1.1 緑色蛍光タンパクの特徴

- ① 発光のための基質、コファクター、発色団を必要としない。酸素存在下で、400~460nmの波長の励起光で蛍光を発光する。

<sup>\*3</sup>細胞内シグナル伝達に関与する機能分子の細胞内のシグナル伝達系などを包括的かつ系統だてて理解するには、細胞内の事象を生きた細胞個々において観察する必要がある。そのためには、目的とする遺伝子や細胞内の部位で、それぞれに蛍光標識を行い、観察することが求められる。

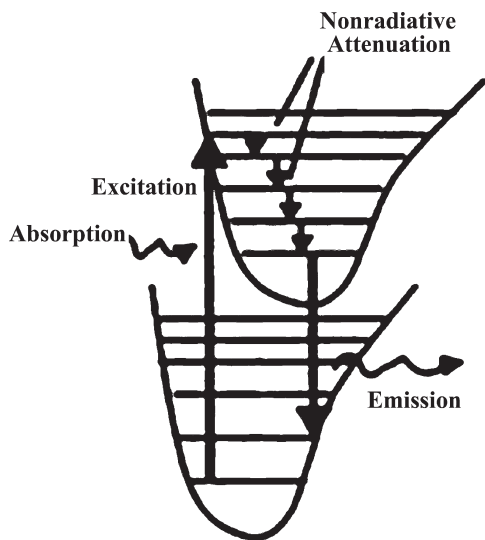


図4 蛍光原理.

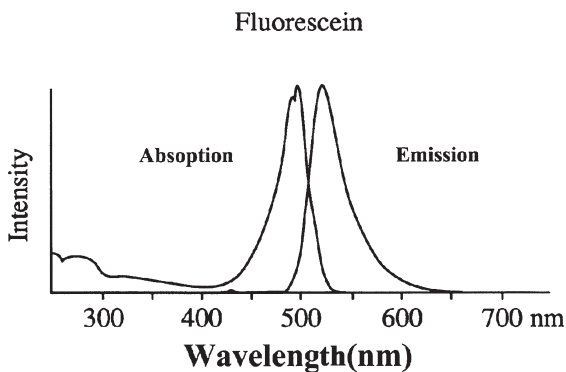


図5 通常蛍光色素 (FITC) スペクトル.

② GFP を発現した細胞を生きたまま継続して観察できる。GFP 融合タンパクの細胞内局在性などをリアルタイムで解析できる。さらに、GFP 融合タンパクの細胞内局在性などをリアルタイムで解析可能で、このとき異なる蛍光色での二重、三重の標識も可能である。さらに、蛍光共鳴エネルギー転移 FRET (fluorescence resonant energy transfer), 蛍光波長がある程度近接している 2 種類の蛍光分子 2~10 nm 以内に接近している状況下で、励起された蛍光分子 (donor) の光エネルギーがもう一つの蛍光分子 (acceptor) に移動する現象を観察する方法、フォトブリーチング後の蛍光回復 FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), 特定エリアにおける蛍光退色後のリカバリーを測定する方法、ブリーチしていない領域の蛍光強度測定 FLIP (fluorescence loss in photobleaching), 繰り返し退色させた特定領域における蛍光の消失を観察する方法などの解析への応用も可能である。

THE ELECTRON OF THE SEMICONDUCTOR IN A MICRO CRYSTAL STRUCTURE

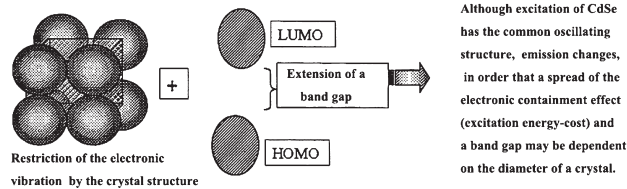


図6 微小結晶 (ナノクリスタル) 構造における半導体の電子.

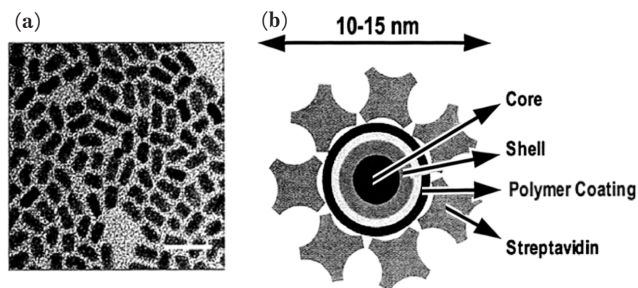


図7 Qdot の模式図. (a) 透過電顕像, (b) Qdot の構造.

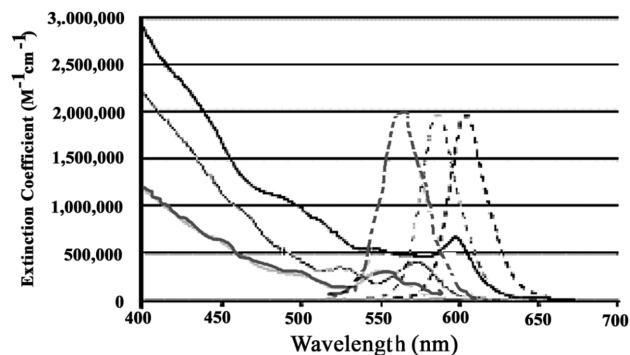


図8 Qdot の吸収特性と蛍光特性.

7.1.2 緑色蛍光タンパクの短所

- ① GFP の蛍光性の獲得には、ある程度の成熟時間を必要とし、成熟した GFP はおよそ 1 日の寿命である。観察しようとするものの選択が必要となる。
- ② 蛍光強度は 24~30°C で高く、37°C では若干落ちる。
- ③ 還元剤が共存すると消光する (蛍光が失われる)。

7.2 量子ドットプローブ (quantum dot (Qdot) technology)<sup>7-11)</sup>

近年、従来の蛍光色素とはまったく異なる、新しい蛍光プローブが紹介された。それは、直径数 nm の半導体素材からなる新しいナノクリスタル quantum dot (Qdot : 量子ドット) 蛍光プローブである。Qdot はナノクリスタル粒子径のサイズ (バンドギャップ) に依存して発光蛍光波長が異なり、1 つの励起波長 (レーザー光) で複数の蛍光が得られる。この蛍光は、従来の蛍光色素とは異なり、卓越した

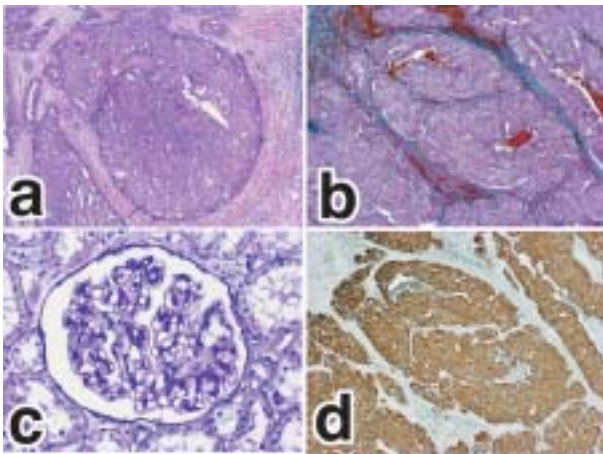


図3 各種染色法. (a) HE 染色, (b) アザン染色, (c) PAS 染色, (d) 酵素抗体法染色.

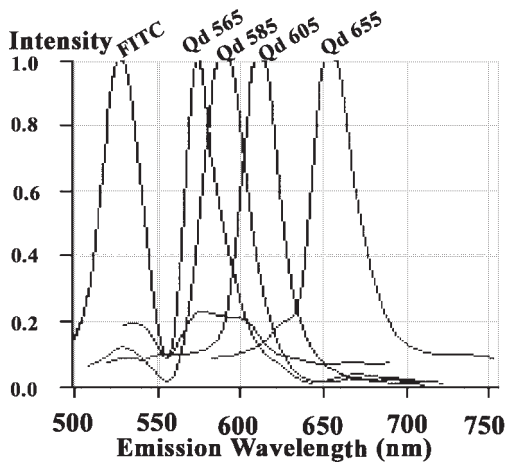


図9 各種 Qdot 蛍光スペクトル.

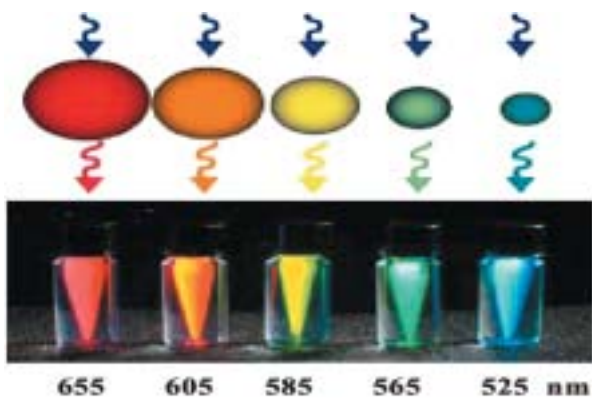


図10 Qdot の蛍光色.

光安定性 (長時間の検出が可能), 退色が遅い (生きた細胞での (経時変化) 観察に便利), きわめて明るい蛍光 (感度の向上, 定量的な検出), 検出波長の分布がシャープ (複数の蛍光標識を同時に解析可能), ストークスシフトが長い

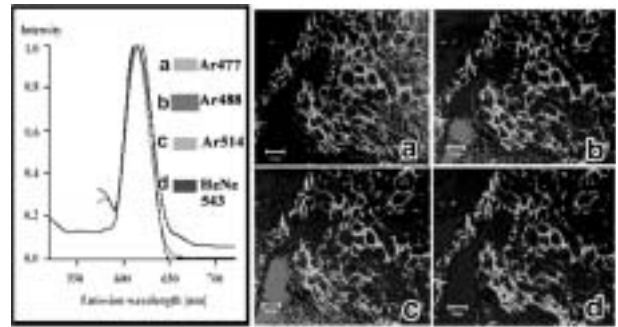


図11 ヒト乳がん組織における HER2 の Qdot 観察例. (a) Ar 477, (b) Ar 488, (c) Ar 514, (d) HeNe 543 で励起, いずれも同一の蛍光を発する.

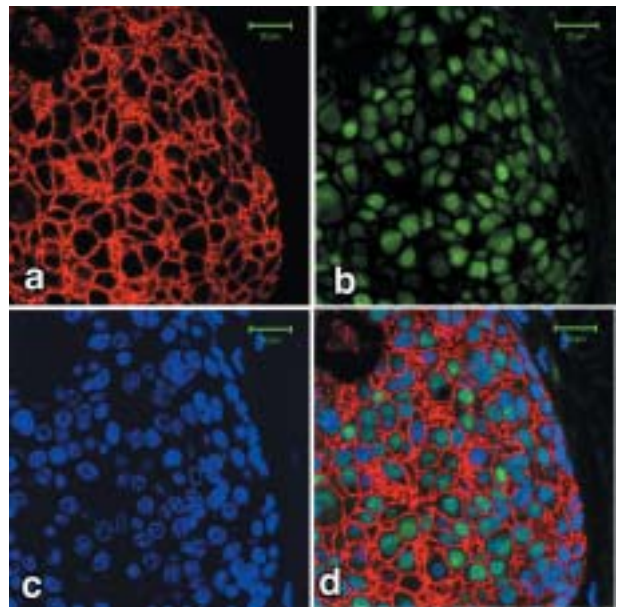


図12 Qdot の応用例. (a) HER2 (Qd605), (b) ER (Qd565), (c) Nu (MG), (d) 合成画像.

(自家蛍光の影響を受けにくい) などの数々の利点がある。さらに、生細胞にも Qdot はラベル可能であるため、さらに解析の範囲は拡大されると期待される。

#### 7.2.1 発光原理

##### (1) 従来の蛍光色素の発光原理

励起された分子は、エネルギーを失うにつれて振動順位を下げ、次いで高い電子状態の基底状態から放射遷移が起こる (蛍光は振動エネルギーをロスした後に蛍光放射が起こるので、入射光より低い振動数のところで起こる) (図4)。

吸収スペクトルは高い側のエネルギー状態に特有の振動構造を、蛍光スペクトルは低い側の状態に特有の構造を示す。また、蛍光は低振動数側にずれて吸収の鏡像に似たものとなる (図5)。

## (2) Qdot の発光原理

Qdot は、セレン(selenium, Se)、カドミウム(cadmium, Cd)の異核2原子分子(CdSe)による半導体である(図6)。

Qdot においては、電子は三次元的な微小空間に封じ込められ(量子効果)、運動が束縛されている。半導体を光で励起すると電子と正孔(ホール)対ができ、より小さい粒子は、電子とホールがより近く存在し、近ければ近いほどバンドギャップは広がり、励起に必要なエネルギーは高く、したがって放射されるエネルギーも大きくなる(青色に近くなる)。すなわち、Qdot の粒子径が小さいほど青色、大きいほど赤色の蛍光を発する(図10)。

Qdot ストレプトアビジン標識は、ナノメートルサイズの半導体素材(CdSe)の結晶(core)からなり、光学特性を改良するため外殻にさらに半導体(ZnS)がコーティングされている。これらの粒子は最大蛍光波長が605 nm または655 nm で、その最大波長を中心に対称的でシャープな蛍光スペクトルを有している。このコア-シェル部分(図7)の光学特性を保持し、生体分子への結合性をもたせるため、ポリマーで外殻をコーティングしている。このポリマー層に直接ストレプトアビジンが結合した構造になっている(図7)。Qdot ストレプトアビジン標識は、巨大分子または蛋白質(〜10-12 nm)ほどのサイズである。

## (3) Qdot の蛍光特性

従来の蛍光色素は、励起と蛍光スペクトルの関係はほぼ相似形に近く、比較的小さなストークス・シフトしか存在しない(図4)。したがって、最適な励起波長は蛍光ピークのすぐ近くに存在し、きわめて近接している場合が多いが、Qdot の場合これとはまったく異なる(図8)。

図8のようにQdot は、従来の蛍光色素のような最大吸収ピークはもたない。励起エネルギーが高い(波長が短い)ほど蛍光発光効率率はよい。この特徴により、1つの励起光で複数のQdot を励起することが可能となる。

実際には、525〜660 nm くらいの蛍光を使用するので、励起光源はアルゴン 488 nm 1つで可能である(図9, 10)。

Qdot ストレプトアビジン標識605を各種レーザー光源で励起すると、励起光源(波長)が異なっても、得られる蛍光はすべて同一の特性を示す。これは、Qdot の性格を如実に表している。この特性を活用すると、他の蛍光色素との組み合わせ観察を行う際、蛍光色素の励起光源を用いることにより、Qdot の蛍光も得られることになる(図11)。

## (4) 応用例

次に、蛍光抗体法間接法の標識二次抗体にQdot 標識抗体を用いた染色例を示す。

図12はヒト乳がん組織の免疫組織化学染色で、Qdot で

標識した2種類の異なる抗体を反応させたものである。従来の蛍光色素と遜色なく染色されている。

Qdot は図7(a)で示すように、電子密度を有するので、電子顕微鏡観察が可能である。この性質を活用することにより、免疫電顕観察に応用することも可能である。Qdot を用いる手法が、従来の蛍光抗体法の検出精度を一段と向上させると考えられ、さらに電顕観察をも可能とすることは、免疫電顕の新しい解析方法のひとつとして発展することが期待される。

組織形態学、免疫組織細胞化学(蛍光抗体法、酵素抗体法など)は、物質(抗原)の局在を *in situ* で検出することを目的としているので、常に真正な反応(陽性像)とバックグラウンド(背景および偽陽性部位)との分離識別が重要な問題である。用いられる染色方法・染色剤などを十分に理解し、正しい染色像(真の反応)のもと、「画像で何を表現するのか、またしなくてはいけないのか」を明確にすることが肝要である。

本稿が少しでも参考になれば幸いである。誌面の関係で簡略に記したが、詳細は成書を参考にされたい。

## 文 献

- 1) 伊東丈夫：改訂版光学顕微鏡写真撮影法(学際企画, 1998)。
- 2) 名倉 宏, 長村義之, 堤 寛編：改訂四版渡辺・中根酵素抗体法(学際企画, 2002)。
- 3) 水口國雄(代表企画), 赤尾信吉ほか：「Medical Technology」別冊：新染色法のすべて(医歯薬出版, 1999)。
- 4) 斉藤多久馬：“酵素組織化学の原理”，組織細胞化学 1995 (1995) 48-58。
- 5) 中根一穂：“*In situ* ハイブリダイゼーションの原理”，組織細胞化学 1995 (1995) 118-121。
- 6) 永井建治, 宮脇敦史：“GFPを使ったバイオセンサーの作成法”，組織細胞化学 2004 (2004) 69-81。
- 7) Qdot™ Streptavidin Conjugates User Manual; Cat. # 1000-1, Cat. # 1001-1, Cat. # 1002-1, Cat. # 1003-1, Cat. # 1004-1, Cat. # 1005-1 (Quantum Dot Corporation, CA, USA)。
- 8) L. Wenhun, X. Haiyan, X. Zhixiong, L. Zhexue, O. Xiangdong and S. Ping: “Exploring the mechanism of competence development in *Escherichia coli* using quantum dots as fluorescent probes,” J. Biochem. Biophys. Meth., **58** (2004) 59-66。
- 9) 伊東丈夫：“共焦点レーザー顕微鏡によるナノクリスタル3次元スペクトル解析”，組織細胞化学 2004 (2004) 289-296。
- 10) L. Zhu, S. Ang and W.-T. Liu: “Quantum dots as a novel immunofluorescent detection system for *Cryptosporidium parvum* and *Giardia lamblia*,” Appl. Environ. Microbiol., **70** (2004) 597-598。
- 11) J. M. Ness, R. S. Akhtar, C. B. Latham and K. A. Roth: Combined tyramide signal amplification and quantum dots for sensitive and photostable immunofluorescence detection,” J. Histochem. Cytochem., **51** (2003) 981-987。

(2004年11月16日受理)