

V. 免疫染色法概論

(戸田 好信)

免疫染色法

はじめに

病理組織学において、基本染色である HE (Hematoxylin Eosin) 染色以外に、特定の細胞、組織、物質などを染めるための特殊染色法が多く開発されてきた。しかしながら多くの特殊染色法では、目的物質のみを特異的に染め出すことは出来にくいので、特異性には欠けているといえよう。一方、免疫組織化学法は、抗原抗体反応を組織切片上で施行し、その免疫反応結果を可視化したものであり、免疫染色と呼ばれ、従来の特殊染色法の欠点を補った染色法である。そのため病理学的検討や研究に大いに貢献するようになった。また、ここ数年来、遺伝子工学の発展により、非常に多くの抗体が作成されるようになり、レセプター、ホルモン、癌遺伝子の検出、血液細胞、腫瘍細胞の由来、性質、細胞周期をみることにより、予後の判定、転移と悪性度の判定、ウイルス、細菌等感染源の検出など広範囲な検索が可能となり、今日では病理組織学、分子病理学の分野には不可欠な方法となっている。免疫組織化学法は、きわめて特異性の高い鋭敏な方法であるため、原法の原理、抗原・抗体の性質・特徴を熟知しないで安易に行うと、重大なミス招く原因にもなる。ここでは免疫染色法を解説する。

目的

免疫染色法の最終到達目標は、個々の細胞・組織の同定、細胞内外の各種物質を検出することにより、病因、病態、病変、さらには予後の検討への大きな情報源を得ることである。しかも、免疫染色結果は特異性が高いため有用なデータとなるので、免疫染色の実施にあたっては、免疫組織化学に関する十分な知識と注意力が必要とされる。すなわち染色結果が本来陽性とされるべき物質が検出されているのか、あるいは非特異的反応により染色されているのかが重要な判断因子であり、解析を誤ると免疫染色本来の目的が果たせないことになる。そのためには、特異性の高い抗体の選択、論理的な最良の免疫染色システムの構築と共に有効な対照試験を設定することが重要である。

原理

免疫染色法は、細胞、組織中の蛋白である抗原と、その蛋白に対する抗体とが特異的に結合する抗原抗体反応を基盤としている。一番単純な方法として直接法があげられる。この方法は免疫染色法の基本原理を理解するのに適した方法である。目的物質である組織中の抗原と、その抗原に対する抗体に顕微鏡で視認することが出来るよう、何らかの物質を標識し、抗原抗体

反応を行う方法である。直接法の応用法として間接法があげられる。この方法では、抗原に対する抗体（一次抗体）には標識せずに、一次抗体を抗原とみなし、一次抗体中に含まれる Immunoglobulin に対する抗体（二次抗体）を作製し、それに標識を行う方法である。たとえば一次抗体をウサギで作製したならば、二次抗体はヤギなどで作られた抗ウサギ IgG 抗体が用いられる。直接法、間接法は標識法とも呼ばれる。これに対して非標識法と呼ばれる方法がある。この方法は、後述するように一次抗体、二次抗体には直接標識をしないで免疫染色を行う方法である。代表的な方法として PAP 法、ABC 法がある。標識マーカーとして蛍光標識、酵素標識、金属化合物などがあるが、光顕標本では蛍光色素、ペルオキシダーゼなどの酵素がよく用いられている。蛍光色素の場合は、蛍光顕微鏡下で紫外線により励起された発色光を観察し、酵素の場合は酵素組織化学反応を行い呈色させ観察する。

抗体について

免疫染色に用いる抗体はポリクローナル抗体とモノクローナル抗体がある。

①ポリクローナル抗体の特性

ポリクローナル抗体は、抗原を動物に免疫したさいに、抗原中の抗原決定基の数に応じた複数の抗体が作られる。それらの抗血清を精製したものがポリクローナル抗体である。うまく免疫が行えた抗体ならば高い抗体価が得られ、強い反応を示す抗体であるといえる。しかし単一の抗原決定基に対する抗体ではないので、目的物質以外にも反応することもあり、また免疫動物の血清成分と組織との非特異的な反応があるので、結果の解釈には注意が必要である。

②モノクローナル抗体の特性

モノクローナル抗体は文字どおり単一の抗原決定基に対する抗体であるので、非特異的に染色されることは少ない。しかし、抗体が認識しているエпитープによっては、目的物質以外にも抗原決定基と同じアミノ酸組成の物質があれば反応する。すなわち、目的物質のみの特徴を捉えたエпитープに対する抗体が、良いモノクローナル抗体である。また、抗体が認識しているエпитープによっては、パラフィン包埋切片では検出しにくい場合や、抗体価が低く、弱い反応しかえられないことがある。通常は抗ヒトに対する抗体の場合、他の動物では使えないことが多い。まとめると、ポリクローナル抗体は、認識する抗原決定基が複数ある、非特異的反応が起こりやすい、染色性は多様である。モノクローナル抗体は、特異性が高い、非特異的反応が少ない、抗体の希釈倍率が低い、パラフィン切片では反応が得られない場合もある。

抗原賦活法

免疫染色法で検出するには、1) 目的物質が固定により不動化すること、2) 抗原に対する抗体が得られていること、が最低限必要である。

免疫染色で目的とする物質の不動化、組織の基本構築を保持するために固定を行う。しかしながらホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用いて免疫染色を行う場合、ホルマリン固定作用によるメチレン架橋の影響で抗原がマスキングされ、良好な結果が得られない場合がある。この対処法としてトリプシン、ペプシン、プロテアーゼなどの蛋白分解酵素処理を行うことにより、抗原が賦活化され染色されるようになる。しかし抗体が認識しているエピトープによっては、酵素処理によっても抗原性が賦活化されず、良好な染色結果が得られないことがある。そのような場合、マイクロウェーブや、オートクレーブを用いて熱処理を加えると抗原性の賦活化がみられ、免疫染色での検出が可能となることもある。

以下、簡単に処理法を述べる。

なお抗原賦活化は通常、一次抗体を作用させる前の段階で行う。

(A) トリプシン処理法

1. 脱パラフィン切片をPBSに浸す。
2. 0.1%-0.01%トリプシン, 0.1%塩化カルシウム/0.05M トリス塩酸緩衝液(pH7.6)で 37℃30分インキュベートする。
3. 切片を水洗。

(B) マイクロウェーブ処理法

1. 脱パラフィン切片をPBSに浸す。
2. 沸騰した0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)あるいは1mM EDTA液(pH8.0)にスライドグラスをいれ、5-20分マイクロウェーブを照射する。
3. 直ちにスライドグラスを水洗。

(C) オートクレーブ処理法

1. 脱パラフィン切片をPBSに浸す。
2. 耐熱性染色バットに0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)あるいは1mM EDTA液(pH8.0)スライドグラスをいれ、121℃5分間処理を行う。
3. 温度が下がればスライドグラスを水洗。

腫瘍マーカー

抗体の中でもよく使用されるものとして、腫瘍マーカーと呼ばれるグループがある。腫瘍マーカーとは、癌細胞のみが作り出すものと、癌細胞や正常細胞も作り出すが、癌細胞では大量に作り出されるものがある。いずれにせよ、組織中での腫瘍マーカーの発現を調べることにより、腫瘍細胞の有無、部位、種類さらには悪性度、原発巣の確認などに有用である。腫瘍マ

ーカーの種類として、胎児性蛋白、胎盤蛋白、免疫グロブリン、細胞膜抗原、癌遺伝子、ウイルス抗原、など多くの種類がある。今回の実習では、腫瘍マーカーを用いて免疫染色法を行う。

Alpha Fetoprotein (AFP) : 胎児性蛋白であるAFPは胎生期に存在する血清蛋白であり、胎生期は高濃度であるが、出生後は次第に減少し、成人では10 ng/ml前後である。ところが成人でも種々の病的状態において、血中AFPが高くなることが明らかとなり腫瘍マーカーとして用いられるようになっている。血中AFP濃度が高くなる疾患として、肝芽腫、肝細胞癌、ヨークザック腫瘍などがある。

Involucrin : Involucrinは扁平上皮への分化のよいマーカーであり、扁平上皮癌では高頻度に陽性となるが腫瘍細胞のみに陽性となるわけではない。

Carcino embryonic antigen (CEA) : 癌胎児性抗原であるCEAは、ヒト大腸癌組織で免疫した抗血清と反応した所から名付けられた腫瘍マーカーであり、広い範囲の癌をカバーでき、再発の早期発見に役立つなどの有用性がある。IgG supergene familyに属する糖脂質結合型膜糖蛋白質であり、局在組織として、消化器癌、肺癌、乳癌など多くの癌組織、胎児組織では、気管支粘膜、舌、胃、大腸などの消化管、成人正常組織では、少量ながら正常大腸粘膜や血清中に存在する。

S100 protein: S100は脳のグリア細胞、中枢、末梢のSchwann細胞やメラノサイトに存在する蛋白である。表皮のランゲルハンス細胞、リンパ節の樹枝状細胞、軟骨細胞、脂肪細胞、唾液腺などの筋上皮細胞にも陽性である。神経鞘腫や悪性黒色腫に陽性であり鑑別診断に用いられる。

悪性リンパ腫とはリンパ組織に発生する腫瘍でB細胞由来のものとT細胞由来のものに分けられる。UCHL-1抗体(CD45RO)はT-cell由来のリンパ球細胞膜に反応し、L26抗体(CD20/cy)はB-cell由来のリンパ球細胞膜に反応する。共にモノクローナル抗体であり、リンパ腫の同定に有用な抗体である。

CMV: Cytomegalovirus抗体は感染初期細胞の核内のサイトメガロウイルス抗原の検索に有用な抗体である。

Chromogranin A : 神経内分泌顆粒に存在する蛋白であり、カルチノイドや小細胞癌などで陽性である。しかし、非小細胞癌でも陽性となることがある。

CD56 (NCAM: neural cell adhesion molecule) : 神経細胞接着分子であり、細胞表面糖タンパク群である。ニューロン、シュワン細胞、NK細胞などに発現しており小細胞癌に特異性の高いマーカーである。

Keratin : Keratinは上皮マーカーであり、正常上皮細胞、上皮性腫瘍細胞に陽性である。

酵素抗体法

原理

すでに説明したように、免疫染色の基本原理として直接法があげられるが、よく用いられているのは間接法、PAP法、ABC法である。間接法は二次抗体にペルオキシダーゼなどの酵素を標識をして免疫反応を行う方法である。PAP法は、一次抗体、二次抗体、共に非標識で反応させ、その後、ペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ複合体を反応させる方法である。この方法では間接法に比べ、約2〜3倍検出感度が増す。標識マーカーとして用いられている物質として、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどの酵素、フェリチン等、金属化合物、蛍光物質などがあるが、現在では、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼなどの酵素が好んで用いられている。酵素抗体法では、標識マーカーにより検出感度が異なるが、グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼの順に感度が高くなり、ペルオキシダーゼよりもアルカリフォスファターゼを標識マーカーとして使用する場合の方が約7倍検出感度が高まる。いずれの酵素を用いた場合も、標識酵素と酵素基質溶液とを反応させることにより、顕微鏡下での観察が可能となる。

検出感度増幅法

直接法の検出感度を1とすると、間接法では約10倍の検出感度があるが、合成ペプチドを用いて作成した抗体や、遺伝子に対する抗体、レセプター、リンパ球系マーカー、細胞周期関連抗体など、間接法、PAP法では検出しにくい抗体が多くある。そこで検出感度増幅法としてABC法、APAAP (alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase) 法、TSA (tyramide signal amplification) 法が開発されている。ABC法では、卵白中に含まれるアビジンと低分子ビタミンH (ビオチン) との強い親和性と特異性を利用した方法であり、アビジンとビオチンの結合は不可逆的である。二次抗体にビオチン標識抗体を用いて反応させ、その後アビジン-ビオチン標識酵素複合体、もしくはストレプトアビジン酵素標識抗体を反応させ、最後に酵素基質溶液と反応させる。ABC法での検出感度は、間接法の約20倍と高感度な方法であり、一次抗体を高倍希釈することにより非特異的反応も押さえることが可能な方法である。APAAP法は、PAP法での標識酵素をペルオキシダーゼの代わりに、アルカリフォスファターゼを用いた方法である。1992年 Adamsによって、免疫組織化学法に応用されたTSA法は、biotinyl-tyramideを用い、チラミドが過酸化水素とHRP (horseradish peroxidase) の触媒によりラジカル化され、HRPのごくそばの組織に結合する性質を利用した方法である。その後、筆者らによりTSA-ABC法が

応用され、シグナル増幅度はABC法の、10倍〜100倍の感度増幅が得られるのみならず、パラフィン包埋組織切片では検出困難であった抗原についても検出が可能になるようになった。

まとめ

病理組織検査における免疫染色の役割は益々重要なものとなり、病因の検索、病態の予後、悪性度の判定などに威力を発揮している。

参考文献

1. Hsu S-M, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem. 1981;29:577-580.
2. Adams JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. J. Histochem. Cytochem. 1992;40:1457-1463.
3. Yoshinobu Toda, Katsuhiko Kono, Hitoshi Abiru, Kumiko Kokuryo, Mareyuki Endo, Hiroshi Yaegashi, Manabu Fukumoto. Application of Tyramide signal amplification (TSA) system to immunohistochemistry: A potent method to localize antigens which are not detectable by ordinary method. Pathology Int. 1999;49:479-483.
4. Nakane PK, Pierce GC. Enzyme-labeled antibodies: preparation and application for localization of antigens. J. Histochem. Cytochem. 1966;14:929-931.
5. Sternberger LA, Hardy PH Jr, Cuculis JJ, et al. 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. 1970;18:315-333.
6. 高橋 清之: 免疫染色法-総論. 検査と技術. 1986;14:518-523.
7. 病理組織染色ハンドブック. 1999. IV-2.

免疫染色法実習 (戸田 好信)

目的

実際に自分たちの手で免疫染色を行い、染色原理お

よびその理論の理解を深める。

6. 一次抗体の反応

4℃, ON

準備するもの

- ・ インキュベーションチャンバー
- ・ カット濾紙・エッペンドルフピペット
- ・ ピンセット
- ・ スライド洗浄用バット
- ・ 氷を入れるバット
- ・ ブロッキング血清
- ・ Smooth Muscle Actin , Keratin 抗体
- ・ ビオチン標識 Anti-Rabbit IgG 抗体
- ・ HRP 標識ストレプトアビジン
- ・ 10mM phosphate buffer (pH7.2) (PBS)
- ・ 蒸留水
- ・ PAP ペン
- ・ 過酸化水素水 (hydrogen peroxide) / メタノール
- 0.3%過酸化水素水 / メタノール: メタノール (100ml)
- +30%過酸化水素水 (1ml)
- ・ DAB (ジアミノベンチジン塩酸塩)
- ・ 50 mM Tris-HCl Buffer (pH7.6) (TBS)

<prepared before use>

DAB 発色: 3-5mg DAB/10mlTBS + 0.1ml of 0.3% hydrogen peroxide

- ・ 薄切切片 (自分で薄切, コントロール-提供)

染色手順

1 日目

1. 脱パラフィン
 - (1) キシレン・I 5分
 - (2) キシレン・II 5分
 - (3) キシレン・III 5分
 - (4) 100%エタノール 2分
 - (5) 100%エタノール 2分
 - (6) 90%エタノール 2分
 - (7) 70%エタノール 2分
 - (8) 水洗 2分
- (9) PAP ペンで組織の輪郭をなぞる。PBS
2. 抗原賦活化 (今回の抗体では必要ない)
 - 0.1%トリプシン処理 37℃, 30分
 - 水洗 3分または
 - オートクレーブ処理 5分
 - 水洗 3分
3. 内因性ペルオキシダーゼ処理 20分
 - 0.3%過酸化水素水 / メタノール: メタノール (100ml) + 30%過酸化水素水 (1ml)
4. 洗浄
 - (1) 蒸留水 2分, 2回交換
 - (2) PBS 洗浄 3分, 3回交換
5. ブロッキング血清 20分

2 日目

7. PBS 洗浄 3分, 6回交換

ABC 法

8. ビオチン標識抗 rabbit IgG 抗体 30分
9. PBS 洗浄 3分, 6回交換
10. HRP 標識ストレプトアビジン 30分
11. PBS 洗浄 3分, 6回交換
12. DAB 発色 顕微鏡で確認しながら
13. PBS 洗浄 浸すだけでよい
14. 水洗 1分
15. ヘマトキシリン
16. 水洗 / 脱水 / 封入 / 鏡検

シンプルステイン法

8. 酵素標識第2抗体 30分
9. PBS 洗浄 3分, 6回交換
10. DAB 発色 顕微鏡で確認しながら
11. PBS 洗浄 浸すだけでよい
12. 水洗 1分
13. ヘマトキシリン
14. 水洗 / 脱水 / 封入 / 鏡検

染色に際しての注意点

- ・ パラフィンが残っているとバックグランド染色が強くなるので, 脱パラフィンは十分に行う。
- ・ 染色中は切片を乾燥させない。
- ・ 使用する抗体は, そのつど確認しながら行う。
- ・ 包埋のパラフィン温度は上げすぎないように。
- ・ 洗浄用 PBS は 4℃に冷やしておく。