

免疫組織化学の基礎と応用

蓮井 和久 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・講師

この講義は、2007 年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

I. 序論

1) 医学・生物学における免疫組織化学の確立と意義

免疫組織化学は、1950 年代の Coons et al. の蛍光抗体法、Singers フェリチン抗体法の確立に始まり、1966 年の Nakane & Pierce の酵素抗体法の確立で、汎用性の高い研究技術の一つとなった。

免疫組織化学 (Immunohistochemistry) は組織レベルないし光顕レベルでのものを指し、免疫細胞化学 (Immunocytochemistry) は細胞レベルないし電顕レベルのものを指す。

1970 年代には、固定パラフィン包埋組織標本の自動処理法による基準化が行われ、所謂パラフィン切片の免

疫組織化学が可能となった。1990 年代には、抗原回復方法（酵素処理、熱処理）が開発され、更に、超高感度免疫染色方法が確立され、そして、自動免疫染色装置の開発により免疫染色の基準化の方向が模索され出した。2000 以降は、内因性ビオチンの問題からビオチンフリーの検出法として、FITC 標識抗体と酵素標識抗 FITC 抗体法とポリマー試薬法が開発されてきた。

免疫組織化学の検索対象は、組織・細胞の構築と機能分子の局在の同時観察であり、免疫組織化学は、組織・細胞の機能の場を明らかにして、形態と機能の関連を解明する手段として用いられる。現在、ヒトゲノムが解読されると共に、

医学・生物学における免疫組織化学の確立

1955 Coons et al. 蛍光抗体法の確立

1959 Singers フェリチン抗体法の確立

1966 Nakane & Pierce 酵素抗体法の確立

免疫組織化学 Immunohistochemistry

免疫細胞化学 Immunocytochemistry

1970 Sternberger et al. PAP 法を開発

1981 Hsu et al. ABC 法の確立

1990 年代以降

抗原回復方法（酵素処理、熱処理）

超高感度免疫染色方法

自動免疫染色装置の開発：免疫染色の基準化

2000 以降

内因性ビオチンの問題からビオチンフリーの検出法

FITC etc. 標識抗体と酵素標識抗 FITC etc. 抗体法

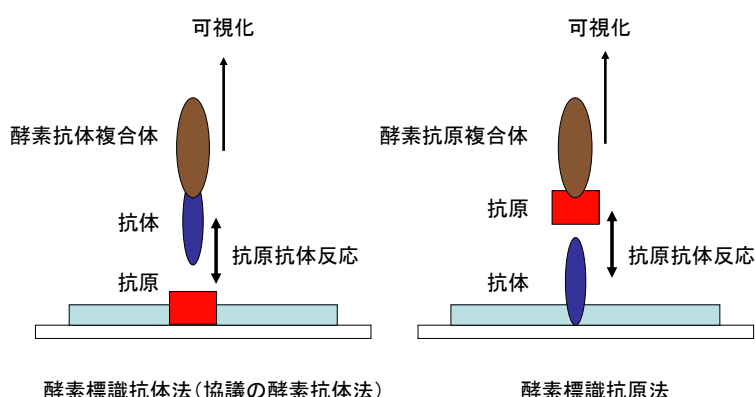
ポリマー試薬法

ヒト細胞の有する蛋白に対して網羅的に抗体が作製される気運があると共に、特定の蛋白については、その機能状態を反映したリン酸化蛋白を特異的に標識する抗体が作製され、また、突然変異の生じた蛋白を標識する抗体が作製されている。また、分子生物学の飛躍的な進歩に伴い多くのシグナル伝達経路の解明と関連分子を標識する抗体が作製されて来ている。従って、免疫組織化学の研究における位置づけも、大変、重要なものとなって来ている。

2) 免疫組織化学としての酵素抗体法

酵素抗体法には、酵素標識抗体法（協議の酵素抗体法）と酵素標識抗原法がある。酵素標識抗体

法が、一般に用いられているが、右図の左に示す様に、組織や細胞の抗原を、酵素標識された特異抗体にて検出するものである。酵素標識抗原法は、右図の右に示す様に、組織



や細胞の抗体を、酵素標識した抗原で検出する方法で、最近では、受容体を標識リガンドで検出方法等は、この方法の発展型であると考えられる。

3) 免疫組織化学の種類

免疫組織化学は、蛍光（標識）抗体法、酵素（標識）抗体法、金属標識抗体法がある。

蛍光抗体法は、現在、蛍光を細胞・組織標本で検出する落射蛍光顕微鏡法、汎焦点蛍光顕微鏡法、レーザー顕微鏡法等と、個体レベルで蛍光を掲出する所謂イメージングと呼称されるものがある。この講義は、後者の酵素（標識）抗体法について進める。蛍光抗体法については、他の成書を参照して下さい。

酵素（標識）抗体法には、i) 酵素標識抗体法（直接法と間接法/酵素抗体間接法） ii) AP法 (Peroxidase - anti-peroxidase method) iii) ABC法/sABC法/LSAB法 (Avidin-biotin complex method) iv) 酵素標識プロテインA法 (Enzyme-labeled protein A method) v) 高分子ポリマー法 vi) CSA法 (Catalyzed signal amplification method)がある。詳細は以降に説明する。

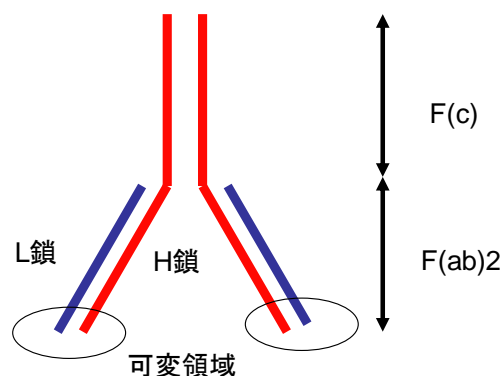
金属標識抗体法は、免疫電顕等で用いられるが、近年、カドミウムを金属籠に入れて、励起光の波長による多彩な蛍光を発生し、簡単な落射蛍光顕微鏡で、

強く減衰のない蛍光を発するナノクリスタルが注目されている。これは、固定パラフィン包埋標本切片にも用いることが可能であるようだ。

II. 酵素抗体法の原理

1) 標識酵素の条件

抗原抗体反応の可視化に用いられるものに、蛍光色素と酵素がある。抗体の F(ab)₂ は、可変領域を含み、抗原抗体反応に用いられる。抗体の F(c) に、蛍光色素や酵素が標識される。



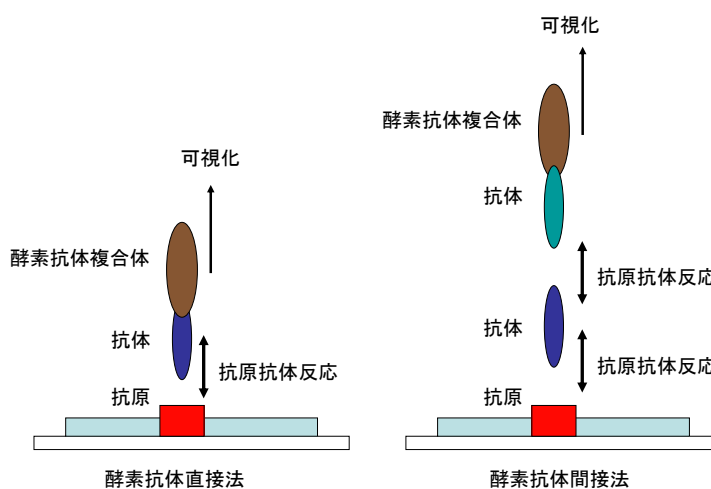
代表的な標識酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (Nakane et al)

である。過酸化水素 (H₂O₂、基質) ジアミノベンチジン (DAB、カップリング色素) 反応で、茶色 (光学顕微鏡) に発色し、そのコバルト処理で青色に発色し、オスmium酸処理は免疫電顕で用いられる。DAB 以外のカップリング色素では、赤、青、黒といった発色を示すものがある。HRP 以外の酵素では、ALP があり、赤色等への発色するカップリング色素がある。

2) 酵素抗体法の直接法と間接法 (原理)

酵素抗体法には、直接法と間接法がある。

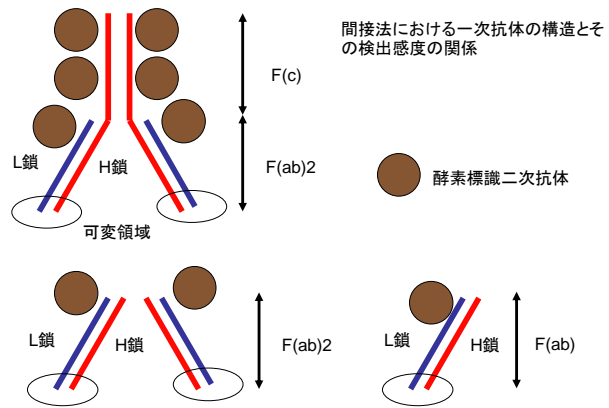
直接法では、右図の左に示すように、抗原と最初に反応する抗体 (一次抗体、primary antibody) を酵素で標識する方法である。間接法は、一次抗体と同種の抗体を標識する二次抗体 (secondary antibody) を酵素標識する方法である。



3) 酵素抗体直接法と間接法の利点と欠点

直接法の利点は、抗原抗体反応が1回で済むと云う単純な系である一方で、その欠点は、1) 標識抗体の分子量が大きくなり、組織への浸透性が低下する

(例: 電顕免疫染色の場合でも、組織浸透性が低いことから同様の問題があるが、凍結切片では、組織への浸透性が低いので、IgG 抗体単体では 3 時間、酵素標識 IgG では 6 時間以上、overnight が必要。電顕免疫組織化学では、細胞小器官への抗体等の浸透が必要であり、F(ab)2 や F(ab) が用いられることがある)。 2) それぞれの特異抗体を酵素や蛍光色素で標識する必要がある。 3) 間接法より感度が低いと云ったことがある。



間接法の利点は、1) パラフィン切片での抗体等の組織浸透性が高い（反応時間は 15~30 分で充分である）。2) 一次抗体の動物種（ラビット、マウス、ラット）と決めておくと、酵素等で標識する二次抗体を共通させることが出来る。3) 2 度の抗原抗体反応による増幅される（感度が高い）ことがあるが、その欠点は、1) 抗原抗体反応が 2 回。2) 反応時間が長くなる。3) 2 回の抗原抗体反応による背景染色の増強（非特異反応）が生じる可能性が高いといったことがある。