

免疫組織化学の基礎と応用

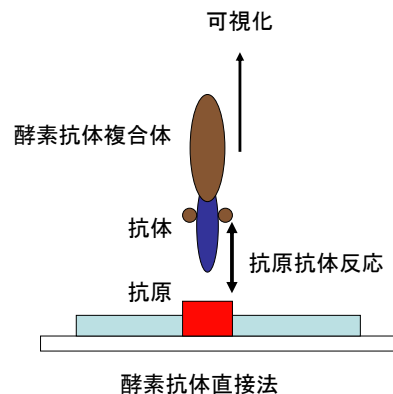
蓮井 和久 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・講師

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。

III. 各酵素抗体法

a) 酵素抗体直接法

基本となる酵素抗体法である。一次抗体が酵素で標識されており、この酵素標識一次抗体が細胞や組織の抗原と反応し、酵素の呈色反応を行い、その発色と顕微鏡で観察する。前述したように、一次抗体を標識する必要があり、頻繁に用いる一次抗体の場合以外には、余り用いられていない。しかし、複数の酵素をポリマー等に標識して一次抗体を標識する技術が開発されており、外科病理診断に用いられる一次抗体では、有用性が高い。



b) 酵素抗体間接法

i. 酵素抗体間接法 (古典的)

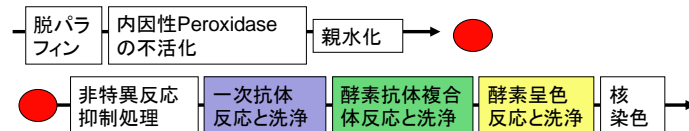
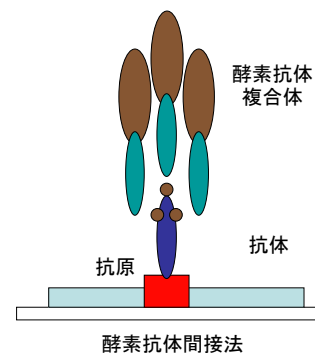
同じ動物種の一次抗体の検出に用いる二次抗体を酵素標識する方法である。一般に、二次抗体はポリクローナル抗体であることから、一次抗体の有する複数のエピトープ (epitope=抗原) を二次抗体との抗原抗体反応が生じることから、**直接法よりも、抗原検出感度が高くなる。**

プロトコールと産物

- 1) 工程表 2) グラフィックな工程表

酵素間接法の染色工程

- 1) 脱パラフィン
- 2) 内因性Peroxidaseの不活化
- 3) 親水化
- 4) 非特異反応抑制処理
- 5) 一次抗体反応と洗浄
- 6) 酵素抗体複合体反応と洗浄
- 7) 酵素呈色反応と洗浄
- 8) 核染色



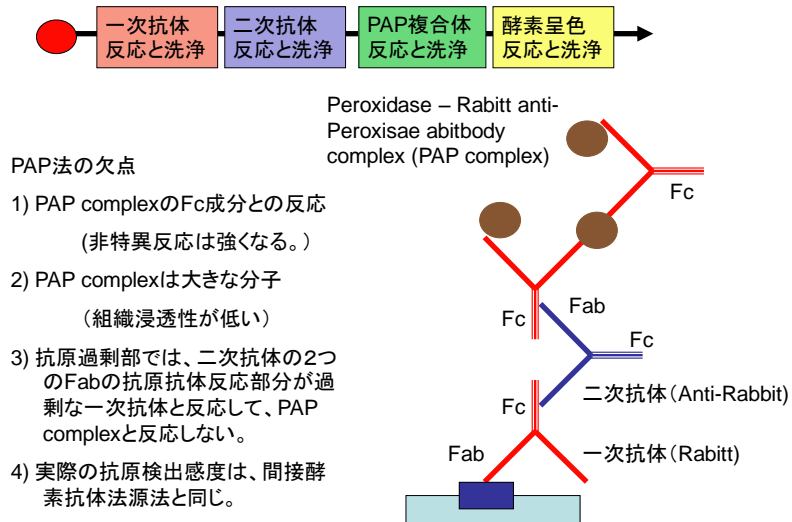
免疫組織化学の各方法を理解するのに、上の図に示す様に、プロトコール (工程表)、グラフィックな工程表と産物のモデル図がある。プロトコールとグラフィックな工程表は等価な表現であるが、産物のモデル図では、工程表 4)の非特

異反応抑制処理等の表現が出来ない欠点がある。

ii. PAP 法 (Peroxidase - anti-peroxidase method)

HRP(peroxidase) と抗 HRP 抗体で複合体 (PAP complex) を作り、同種の一次抗体と抗 HRP 抗体をその動物種の抗体への抗体でブリッジを形成する増感法である。

しかし、右図に示すような欠点があり、特に、4)の問題から、余り用いられなかった。

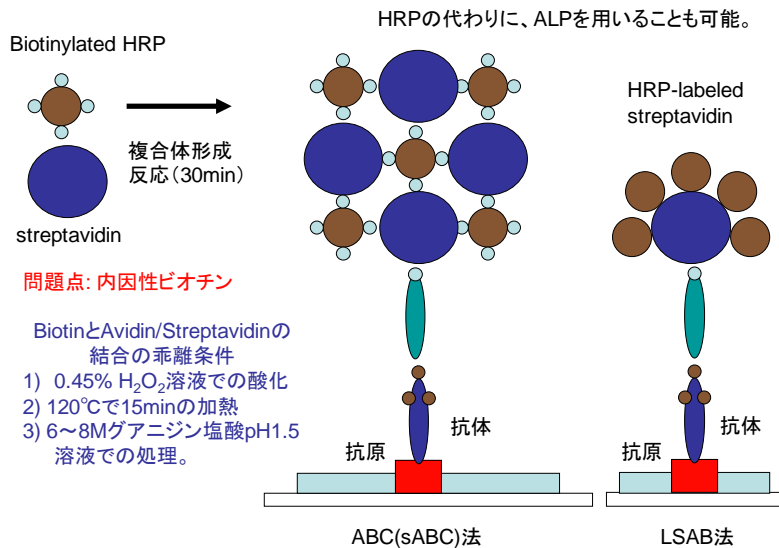


iii. ABC 法/sABC 法/LSAB 法 (Avidin-biotin complex method)

1980年代から1990年代に用いられた代表的な高感度の酵素抗体間接法である。

二次抗体をビオチンで標識し (ビオチン化二次抗体)、ビオチン化した HRP 等の酵素とアビチンないしストレプトアビチンの複合体 (ABC

complex) を作るか、HRP 等の酵素で標識したストレプトアビチン (HRP 標識ストレプトアビチン) をビオチン化二次抗体と反応させる方法である。非常に感度が良い方法である。しかし、内因性ビオチンないしビオチン様蛋白とのクロス反応が背景染色を増強し、時に、特異反応と区別が出来ないことがあることから、ビオチンフリー法の開発が行われた。ビオチンに代えて生体内に存在し



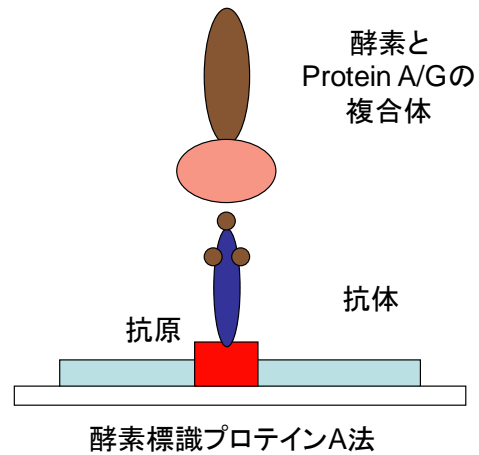
ない FITC 等を二次抗体に標識し、酵素標識した抗 FITC（三次）抗体を反応させる方法等が開発された。

iv. 酵素標識プロテイン A 法 (Enzyme-labeled protein A method)

黄色ブドウ球菌の細胞膜構成蛋白である protein A、ないし、G 群ブドウ球菌の Protein G の抗体の 2 つの Fc 成分と結合する性格を利用した方法である。

感度は酵素抗体間接法と同等であり、また、PAP 法の二次抗体の代わりに用いることも出来る。また、HRP の代わりに、Gold や Silver 粒子を標識することも可能。Gold 標識の場合には、銀増感の処理も行いえる。

しかし、抗体の Fc 成分は、時に、非特異反応の原因ともなることから、また、 $F(ab)^2$ や $F(ab)$ の抗体の検出には使えないことなど等から、余り普及しなかった。Gold 標識の場合には、免疫電顕等では使われたことがあるようである。

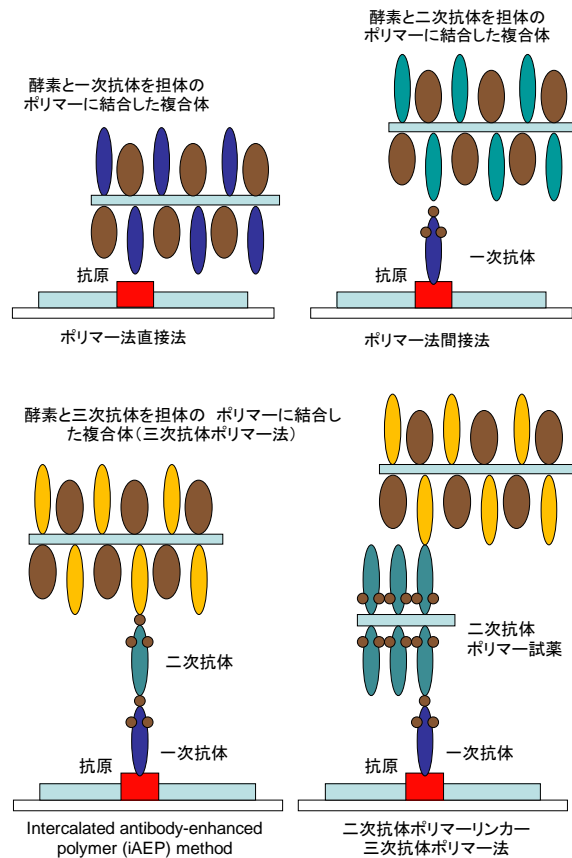


v. 高分子ポリマー法

ビオチンフリー法の一つとして開発されたポリマー法では、酵素と抗体をポリマーの担体に標識したポリマー試薬により、抗体酵素比を上げることで、増感している。

ポリマー担体に標識される抗体と酵素の数により、増感の程度が決定されるが、余り長いポリマーよりも短いポリマーへの標識の方が感度が高いことが知られている。

ポリマー法には、右図に示すように、ポリマー法直接法（一次抗体標識ポリマー法：primary antibody-labeled polymer (pALP) method）とポリマー法間接法（二次抗体標識ポリマー法：secondary



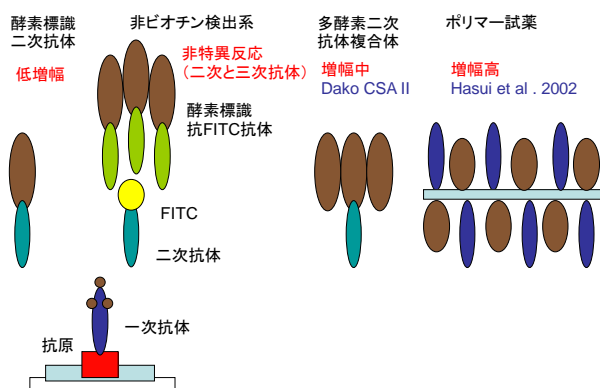
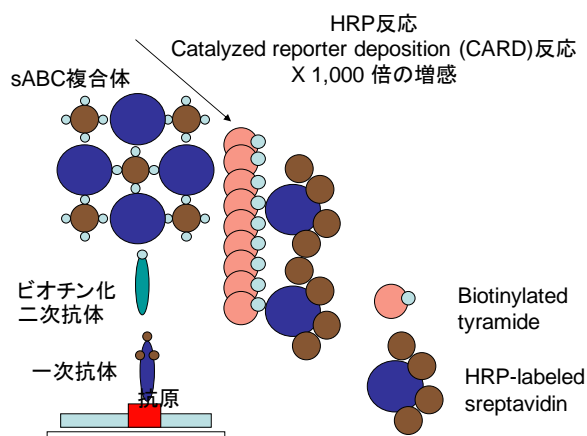
antibody-labeled polymer (sALP) method) の他に、三次抗体と酵素を標識したポリマー試薬 (thirdary antibody-labeled polymer method) を用いる三次抗体ポリマー法が開発されており、それには、二次抗体を用いるものと二次抗体ポリマー試薬を持ちいる方法がある。前者は intercalated antibody-enhanced polymer (iAEP)法、後者は云わば二次抗体ポリマーリンカー三次抗体ポリマー法 (secondary antibody-labeled polymer-linker thirday antibody-labeled polymer (sALP-liket tALP) method)である。

これ等のポリマー法の実際の抗原検出感度は、pALP 法が酵素抗体間接法と同感度、sALP 法 (Dako EnVision 等) が改良型 ABC 法や sABC 法と同感度、iAEP 法が sALP 法の x10 倍未満、sALP-liket tALP 法 (Dako EnVision Flex+や Leica Bond polymer 法) が sALP 法の x100 倍未満と考えられている。しかし、一次抗体反応の抗体濃度や時間等の基準化を行って検討すべきであると考えられる。

vi. CSA 法 (Catalyzed signal amplification method)

フェノール類の異化反応にて沈着する catalyzed reporter deposition (CARD)反応を利用し方法で、そのオリジナルは、右図に示す様に、sABC 法とビオチン化タイラマイドの CARD 反応で沈着したビオチン化タイラマイドを HRP 標識ストレプトアビチンで標識して、HRP の呈色反応を行うもの (Dako CSA 法や ImmunoMax 法等) である。

しかし、二度の HRP 反応、二度のビオチン-ストレプトアビチン反応により、内因性ペロオキシダーゼと内因性ビオチンによる非特異反応が問題となり、Dako は sABC 法を多数の HRP 分子標識二次抗体法に代え、タイラマイドの標識を FITC にして、Dako CSA II 法を供給している。我々は、sABC 法を二次抗体標識ポリマー法に代えた



newCSA 法を開発して、国内特許を得ている。

この CSA 法の抗原検出感度は、CARD 反応により、改良型 ABC 法、sABC 法、二次抗体標識ポリマー法の抗原検出感度を 1 とした場合に、x1000 倍未満である。

酵素抗体間接法の種々の方法は、抗原検出感度を上げて来た。

その一方で、免疫組織化学の標的である抗原の量に関する理解は、最近まで、議論されることが余り無かった。

Single copy の遺伝子の DNA-ISH では、

検出系に CSA 法を用いても、4 回前後の in-situ PCR にて、標的 DNA を増幅する必要はある。即ち、少なくとも、10 前後の epitopes がないと標的抗原を検出できない。

しかしながら、改良型 ABC 法、sABC 法、二次抗体標識ポリマー法の抗原検出感度を 1 とした場合に、三次抗体ポリマー法で x10~x100、そして、CSA 法で x1000 倍と、検出される抗原量は、一単位程の低発現のものとなって来ている。

