

# 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。

## IV. 抗体の性状と取り扱い

### 1. 抗体の性状と標識抗体

1) 抗体：組織中には、多くの抗原が存在することから、組織化学に用いる抗体はより厳密な特異性が要求される。

	分子量	沈降係数 (S)	H鎖	L鎖	分子構成
Ig G	150kDa	6.6	$\gamma$	$\kappa, \lambda$	$\kappa_2\gamma_2$ or $\lambda_2\gamma_2$
Ig A	170kDa	7.0	$\alpha$	$\kappa, \lambda$	$\kappa_2\alpha_2$ or $\lambda_2\alpha_2$
Ig M	900kDa	18.0	$\mu$	$\kappa, \lambda$	$(\kappa_2\mu_2)_5$ or $(\lambda_2\mu_2)_5$
Ig D	170kDa	7.0	$\delta$	$\kappa, \lambda$	$\kappa_2\delta_2$ or $\lambda_2\delta_2$
Ig E	180kDa	7.8	$\epsilon$	$\kappa, \lambda$	$\kappa_2\epsilon_2$ or $\lambda_2\epsilon_2$

IgAの分泌型は2量体を形成し、分泌型IgAとIgMにはJ鎖がある。

#### a) 抗体の化学構造

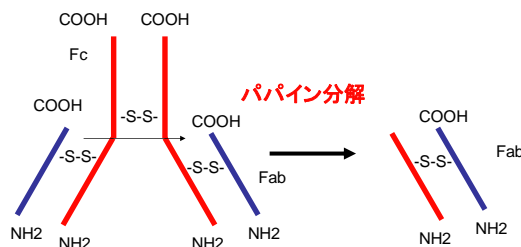
IgG は、IgG1～IgG4 のサブクラスがあり、IgG1 (65%), IgG3(7%)と IgG4(3%) は、146kDa であるが、IgG2(25%)は 170kDa と Fc のヒンジ部分が長い。また、IgA にも、IgA1 と IgA2 のサブクラスがある。

最初に抗原に接すると、Ig M の反応（上昇）が生じ（ウイルスの初感染時の抗体は IgM である）、次に抗原に接すると Ig G の反応（上昇）が起こる。それ以降は、抗原に遭遇すると Ig G の上昇が起こる。

IgA は粘膜免疫で見られる。Ig D は B 細胞の分化過程で見られる。Ig E は寄生虫感染やアレルギー 1 型（アナフィラキシー）に関与する。その場合、肥満細胞の表面に Ig E が存在する。

#### b) Ig G 及び Ig G 分画の分離・精製

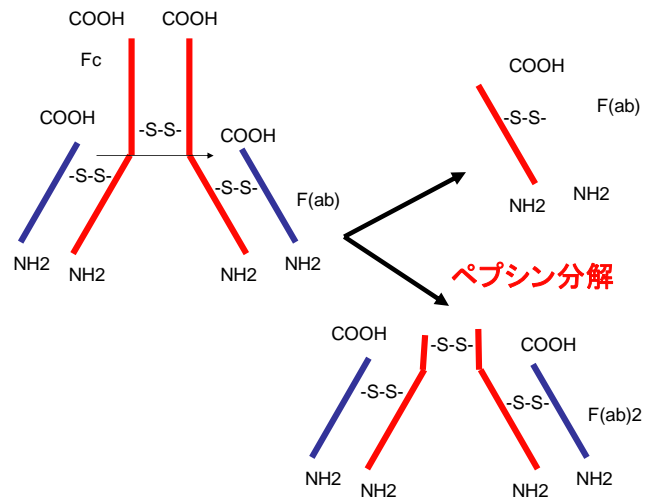
Ig G は、EDTA とシステインの存在下で、パパインにより、Fc と Fab 部分に分解される。従って、Sepharose-G100 カラムで濾過すると、Fc と Fab との混合分画が得られ、Protein A-Sepharose カラムで Fc 成分



を除くことが可能となる。

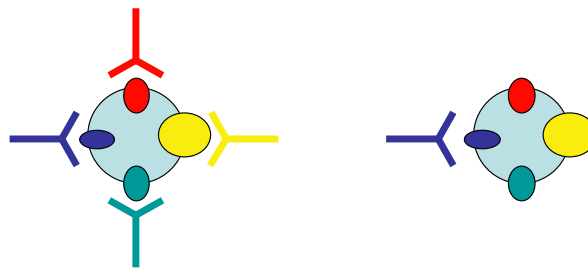
Ig G は、ペプシン分解で、Fc 成分が消化されて、F(ab)<sup>2</sup> ないし F(ab)が生じる。

2-メルカプトエタノール存在下で、S-S 結合を乖離し、Sepharose G100 カラムで精製して、50kDa の分画に、F(ab) が得られる。



### c) モノクローナル抗体とポリクローナル抗体

1975 年に、イギリスの Milstein が、抗体産生細胞と骨髄腫細胞のハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマが産生する抗体が、モノクローナル抗体である。



**ポリクローナル抗体**は、抗原の有する複数の epitopes (赤、青、水色、黄色の epitopes) とそれぞれ反応する抗体の集合体 (赤、青、水色、黄色の抗体) である。

**モノクローナル抗体** (青の抗体) は、ハイブリドーマが産生し、抗原の一つの epitope (青の epitope) としか抗原抗体反応を示さない、可変領域が均一な抗体である。

### 2) 酵素抗体法に用いられる酵素

Horserraddish

peroxidase (HRP)

はかなり安定した酵素であり、pH5-10 で 50℃ 以下で安定である。一般には、HRP と Alkaline phosphatase

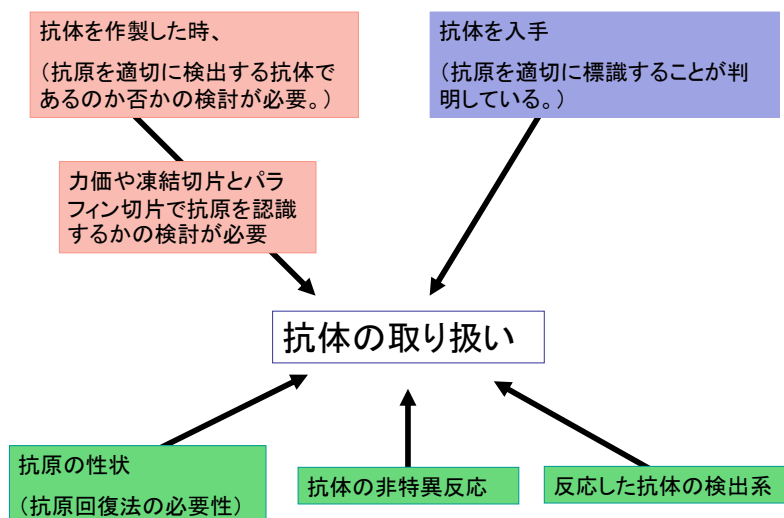
(ALP) が用いられることが多い。

	安定性	分子量	染色性	内在性	市販
<b>Horserradishu peroxidase (E.C.1,11,1,7)</b>	<b>Excellent</b>	<b>40-45kDa</b>	<b>++++</b>	<b>+</b>	<b>○</b>
<b>Alkaline phosphatase (E.C.3,1,3,1)</b>	<b>Fair</b>	<b>80-120kDa</b>	<b>+++</b>	<b>+++</b>	<b>○</b>
<b>Acid phosphatase (E.C.3,1,3,2)</b>	<b>Fair</b>	<b>100kDa</b>	<b>++</b>	<b>+++</b>	<b>-</b>
<b>β-D-galactosidase (E.C.3,2,1,23)</b>	<b>good</b>	<b>750kDa</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>○</b>
<b>Glucose oxidase (E.C.1,1,3,4)</b>	<b>Excellent</b>	<b>160-190kDa</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>○</b>

## 2. 抗体の取り扱い方と使用上の注意点

### 1) 抗体側の問題

**a) 抗体力価:** 同一抗原の複数の epitopes の中で、非常に多いものを標識する抗体は、力価が高いと表現される。従って、ポリクローナル抗体の方がモノクローナル抗体よりも、一般に力価は高い。しかし、特異性（その抗原のみの epitopes を標識しているか否か）の問題がある。



**b) ロット差:** 供給されている抗体でも、ロット差がある。

**c) 不純抗体の混入**（主に、抗血清やポリクローナル抗体の場合）：抗 L 鎖抗体（抗 IgD や抗 IgE 抗体中）、抗 Ig A( $\alpha$  鎖) 抗体（抗 SC 抗血清中）、抗 NCA: Non-specific cross-reacting antigen) 抗体（抗 CEA 抗体中）、抗血液型物質抗体（抗前立腺酸性フォスファターゼ(PAP)抗体中）、抗中間径フィラメント抗体（家兔血清中）、共雑物（抗ホルモン抗体）等

**d) Region specificity:** 抗原がペプチドのどの領域を認識し、また、ペプチド間での共用領域との関係。

**e) ハプテン抗体の注意点:** 小さな分子（ハプテン）の抗体を得るには、キャリアー蛋白（ウシ血清アルブミン：BSA、やブタやウシのサイログロブリン）を用いることから、抗キャリアー蛋白抗体の混入が当然ある。

**f) RIA 用抗体の注意点:** 免疫組織化学に用いる場合よりも、RIA に用いる抗体は  $\times 100$  希釈され、抗原との競合的な反応で用いられる。従って、RIA で良い抗体が、免疫組織化学に用いることが出来るとは限らない。

**g) 動物抗原に対する抗体:** 実験動物の抗原への抗体は、必ずしも、商業的に供給されていない。

## h) 抗体の検定

○陽性コントロール、陰性コントロールにて、抗体と対照動物血清で染色する。

○x100 ないし

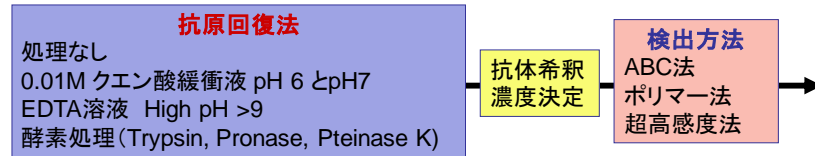
x500 希釈抗体溶

液で、倍々、三

倍毎、x10, x100,

x1000 倍系列で

チェックする。



パラフィン切片で間接法で検出する時の  
至滴抗体濃度決定に影響する因子

○凍結切片、パラフィン切片での検討（固定の影響）

i) 凍結切片後、アセトン固定、

ii) 4%緩衝パラホルムアルデヒド固定後凍結切片

iii) 100%エタノール固定（ないし Amex)パラフィン切片

iv) 10%ホルマリン固定パラフィン切片

○抗原による吸収試験

○in-situ hybridization による mRNA の確認

○抗原回復方法による検討（パラフィン切片）

○抗体の有無による検討

○検出方法の検討（酵素抗体法間接法での通常と高感度法）

## i) 抗原抗体反応に用いる抗体の適正濃度の決定（抗体の希釈法）

○一定の条件が判明してる場合

i) 免疫電気泳動(オクタロニー法の最大希釈濃度の x4 希釈濃度から検定する。

ii) Immunoblotting に用いられる抗体濃度の x100 濃縮の濃度から検定する。

○一定の条件が判明していない場合。

i) 原液から始めて、x1, x10, x100, x1000, x10000...で、凡その希釈倍率を決めて、その適度な倍率の周辺で、x2 ないし x3 の系列で、詳細を決める。

## j) 全血清か IgG 分画か？

○全血清：補体の非動化（56°C 30min の加温）が必要。

○硫酸分画で IgG 分画にする時に、プロテアーゼ阻害分子も除かれるので、IgG 分画のプロテアーゼ消化による IgG 消失を検討に入れて置く必要がある。

DEAE-Sepharose column では、この可能性が低い。

○Affinity chromatography では、elution にグリシン(pH2.2)を用いる場合、affinity が低く、avidity が低い IgG 成分のみが抽出される場合がある。

これは、抗原の epitopes の検出感度の上昇に伴い、avidity の高い成分 (IgG)

の抗原抗体反応による epitope 認識の特異性 specificity は低くなることが予測される。したがって、必ずしも、高い avidity を示す IgG が epitopes への高い specificity を示すものではないことが予測される。

### k) 抗体分子の浸透性

○パラフィン切片では問題にならない。しかし、巨大分子（ポリマー試薬等）の浸透性には注意しておく必要がある。

○凍結切片でミトコンドリア内の蛋白の同定には、膜構造があるので、Fab 一次抗体に直接 HRP を標識した直接法が必要になる。

## 2. 抗原側の問題

### 1) 固定による抗原性の失活

### 2) パラフィン包埋による抗原の失活と流出

### 3) 血漿蛋白の固定・包埋による diffusion artifact

血漿中の IgG 等の組織や細胞への拡散浸潤による影響

### 4) 脱灰操作、及び過固定の影響

○蟻酸、

○トリクロロ酢酸に酸脱灰：NaOH-メタノール処理（常温 30min）

○EDTA による低温脱灰

……抗原回復法の検討が必要！

### 5) パラフィン切片における抗原性の賦活化

パラフィン切片の抗原回復法 (antigen retrieval: AR) の熱処理では、クエン酸緩衝液 pH8 や EDTA 溶液での切片の剥離が問題となる場合があり、pH 非依存性の Diva Dicloaker (Biocare Medical) が

抗原回復法	溶液等	処理方法
酵素処理	トリプシン	恒温 (37°C) ないし室温で、10～30min処理
	ペプシン	
	プロナーゼ	
	プロテナーゼ K	
熱処理	0.01Mクエン酸緩衝液pH6	マイクロウェーブ、圧力鍋、オートクレーブ等による加熱処理
	0,01Mクエン酸緩衝液pH7/8	
	1mM EDTA溶液(pH 8)	
	PBS	
	イオン交換水	

用いることがある。これは、クエン酸系の緩衝液 pH6 にキレート剤を入れたものであり、切片の剥離はなく、高い pH での AR を要した抗原では、一度、試してみる必要があると思われる。

## 6) 共通抗原性を示す関連物質の存在と抗原分布の正しい知識

○ペプチドのサブユニットを共有しているものは、そのサブユニットに存在する抗原への抗体による抗原認識で、検出される。

○細胞や組織でも、上記の共有サブユニットの存在は、免疫染色の陽性所見の解釈上の問題である。

## 7) 糖鎖抗原の特性

○がん化に伴い蛋白の糖鎖の異常が生じている。

○糖鎖を有する蛋白は、膜蛋白や分泌蛋白である。分泌蛋白は、アルブミンやペプチドホルモンを除き、全て、糖蛋白である。

○核内蛋白、細胞質内蛋白（細胞骨格蛋白）やミトコンドリア内蛋白は、原則として、糖鎖を持たない。

○血液型糖鎖(H, A, B and Lewis)、癌関連糖鎖抗原(CA19-9:シアル化Lewis<sup>a</sup>など)、

○粘液抗原(MUC1/EMA~MUC7)

## 8) 糖鎖抗原に対する抗体の落とし穴

○内因性ペルオキシダーゼの不活化に、糖鎖構造を破壊する過ヨウ素酸処理を用いることが出来ない。長時間での H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-メタノール処理も避ける必要がある。

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-PBS 溶液が利用出来る)

○混入血液型物質抗体等の考慮が必要である。

## 9) レクチンと糖鎖

UEA-1 や PNA

## 10) マーカーの特異性

マーカーの特異性は絶対的なものではない。

特に、癌細胞に特異なマーカーは存在しないと考えるべきである。

## 11) 特定の細胞による抗体の非特異的吸着

HBs 陽性細胞、胃粘膜壁細胞 (Parietal cells)、肥満細胞 (Mast cells)、消化管内分泌系細胞等で問題になる。

## 12) Isozyme (isoprotein)の同定

isozyme のある酵素や蛋白等の同定には、それぞれの isozyme に対応した抗体を準備する必要がある。

## 13) 生理活性と免疫反応性

ホルモンや酵素は、生理活性を失っても、免疫反応性を有するので、機能を示唆するに留めるべきである。例外：naphthol ASD-chloroacetate esterase と heat-resistant acid phosphatase

## 14) 抗原の種特異性

## 15) 材料の長期保存と抗原性

可能であれば、直前の薄切。パラフィンブロックは冷暗所保存が望ましい。

### 3.モノクローナル抗体の特性

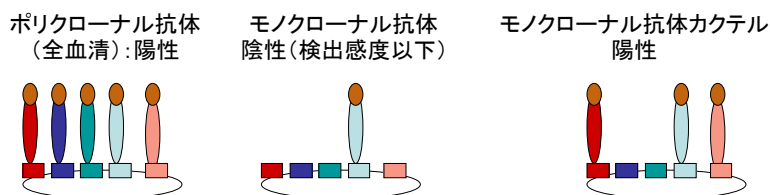
#### モノクローナル抗体の特徴のまとめ

- a) 作製する時に、抗原の精製は必ずしも必要ない。
- b) 分子の均一性
- c) 明確な特異性（予知は不能）
- d) 一定の抗原親和性（予知は不能）
- e) 永続的な供給が可能。
- f) 混入する抗体を避けることができる。
- g) 一つの抗原決定基(Epitope)と反応する。
- h) 抗原結合力(affinity)に幅がある。(抗原量の問題が関係している可能性がある。)

#### 1) モノクローナル抗体は単一の epitope とのみ反応する。

○抗血清で陽性、モノクローナル抗体で陰性: Epitope の masking (固定や包埋処理過程で、抗原がマ

スクされる) の可能性があるが、現在は、一般に、epitope の量が充分でないと判断され、モノクロ



ーナル抗体のカクテルや、超高感度の検出法が導入される。

○類似分子種の特異的識別が可能。

異なる部分の epitope を標識することで、識別が可能となる。

○交叉反応

ペプチドの共通サブユニットというマクロ的な違いは当然で、異なる分子でも類似 epitope が存在する可能性がある。実際に検索して調べる必要がある。

#### 2) 細胞表面抗原とモノクローナル抗体

細胞膜抗原の多くが、モノクローナル抗体で検出できた。

#### 3) モノクローナル抗体における培養上清と腹水の使い分け

○抗体濃度が培養上清では低いので、ハイブリドーマを同種動物に移植した腹水を用いるべきである。X10 培養上清、x100~x1000 腹水、精製 IgG では 1  $\mu$ g/ml で用いる。しかし、培養上清は、背景染色が低い。腹水では自然抗体の混入の可能性はある。



#### 4) モノクローナル抗体の化学的修飾と保存

○モノクローナル抗体は、Fab や F(ab)<sub>2</sub> に切ったり、HRP で修飾しにくい。一方、ビオチン標識や FITC 標識は容易である。

#### 5) モノクローナル抗体に対する抗マウス免疫グロブリン二次抗体の選択

○通常の (多様な) マウス免疫グロブリンを標識しても、マウスモノクローナル抗体を十分に標識しない二次抗体がある。

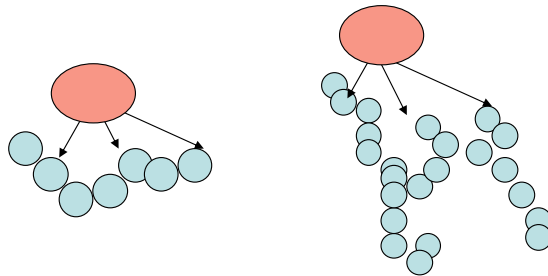
○通常、現在は、十分な抗マウス二次抗体が商業的に供給されている。

#### 6) モノクローナル抗体を用いた免疫染色の特異性の検討

○モノクローナル抗体は一つの epitope を認識するので、夾雑物の中で (免疫染色や immunoblot)、特異な epitope の検出に向いている。

#### 7) 抗原決定基 (Antigen determinant: Epitope)

抗原決定基は、通常、3~7個のアミノ酸で構成されるが、これらのアミノ酸は連続した分布を示すとは限らない。3次元 (立体的な) 分子の構造の一部が抗原決定基となる。更に、3つのアロステリック部位で抗体は抗原と結合するので、更に、抗原決定基の予測を困難にしている。



一方、蛋白の三次元、時間軸を加

えた四次元での構造を理解する必要がある。現在、次第に、蛋白の三次元構造が web のデータベース等で公開されるようになると共に、しばしば、この三次元構造とアレルギー等の関係が議論されている。

#### 8) 抗体の affinity と avidity

○**Affinity** : 抗原と特異抗体の三次元的な適合性(fitness)を親和性(Affinity)と呼ぶ。

モノクローナル抗体の中には、affinity の低い抗体も多い。PBS等の洗浄にて、結合が外れるものがある。

○**Avidity** : 抗体の avidity とは、抗血清 (ポリクローナル抗体) における特異抗体成分の構成で、種々の処理で、一度に全ての特異抗体の結合が外れる時は、Avidity が低いと表現し、一度に結合が外れない場合を avidity が高いと表現する。