

# 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

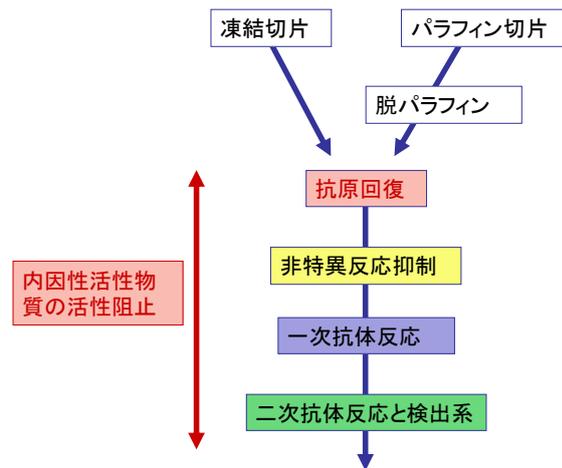
この講義は、2007年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

## VII. 抗原回復方法と酵素抗体法の非特異反応

### 1. 内因性活性物質の活性阻止

酵素抗体法での内因性活性物質の活性抑制は、右図に示すように、総ての処理過程に関係し、染色結果に大きな影響を持つ。

まず問題となるのは内因性の酵素である。酵素抗体法では西洋ワサ



内因性活性物質	活性阻止法	方法と特徴
内因性ペルオキシダーゼ	過ヨウ素酸 ○メチル緑の染色性が向上する。 ○凍結切片でも、①と②の実施可能。 ×糖鎖抗原、細胞表面抗原、レクチン組織化学には不適。	(Isobe法)：切片を①5mM (114mg/dl)の過ヨウ素酸水溶液に室温10分間浸し、②3mM(11.4mg/dl)水素化ホウ素ナトリウム(NaBH4)水溶液に室温30分間浸し、PBSで洗浄する。  (PAS染色用溶液を用いる方法)：0.5ないし1%の過ヨウ素酸水溶液で①に代えて行う。②は省略可能。
	過酸化水素水 ○通常用いられる方法である。	0.3%過酸化水素水・メタノールに15～30分間浸す。3%濃度のメタノール溶液では、阻害効果の低下がある。0.3%ないし3%濃度PBS溶液による室温10分間浸すことが行われる。
	アジ化ナトリウム ○凍結切片に用いることが可能である。	DAB-H2O2反応液に10mM (65mg/dl)のアジ化ナトリウム(Sodium azide, NaN3)を加える。アジ化ナトリウムはペルオキシダーゼの阻害剤であり、動物性ペルオキシダーゼの活性をより阻害することから、検出系のHRPは阻害されずに、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害する。
	加熱処理	ある程度の阻害効果がある。
内因性アルカリフォスファターゼ	レバミゾール	発色液中に、3mMレバミゾール(levamisole = 1-tetramisole)を添加する。しかし、小腸絨毛上皮のALPは阻害されない。標識に用いられるALPはウシ小腸由来のものであるため。
	20%酢酸処理	20%酢酸水溶液ないしエタノール溶液で、4℃ 15秒で前処理。抗原性の破壊の可能性は強い（一次抗体反応後に実施）。
	加熱処理	65℃ 10分間の加熱処理。抗原性の破壊の可能性あり。
内因性ビオチン	アビジンによるマスキング	①0.1～0.01%アビジン溶液を反応させ、PBSで洗浄後に、②0.01～0.001%ビオチン溶液を反応させる。キット化されて試薬が供給されている。

ペルオキシダーゼ (HRP) の呈色反応が良く用いられることから、内因性ペ

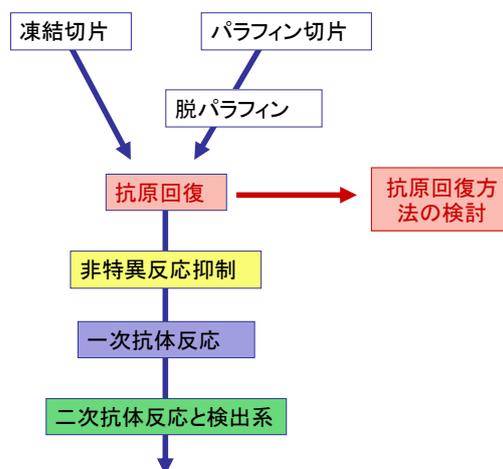
ルオキシダーゼの不活化処理は重要である。表に示す様に、脱パラフィン直後に、3%過酸化水素水・メタノール溶液に浸したり、抗原回復後に、**0.3 ないし 3% 過酸化水素水・PBS 溶液で 10 分間処理**することが行われている。呈色反応にアルカリフォスファターゼ(AIP)を用いる場合には、内因性 AIP が問題となる。

また、ABC 法や sABC 法、LSAB 法では、ビオチン化二次抗体の検出にビオチン-アビチン/ストレプトアビチン結合を利用することから、内因性ビオチンが大きな問題となる。

それぞれの対象法は、表に示した。

## 2. 抗原性の賦活化

アルデヒド系固定で、しばしば、抗原性が隠される (masking) ことが生じる。染色前にエッチング処理を行うことで、隠された抗原を検出することが出来る。一般に、このエッチング処理を抗原回復 (Antigen retrieval) と呼ばれるが、エピトープの回復 (Epitopes retrieval) である。



以下の表に示すものがある。

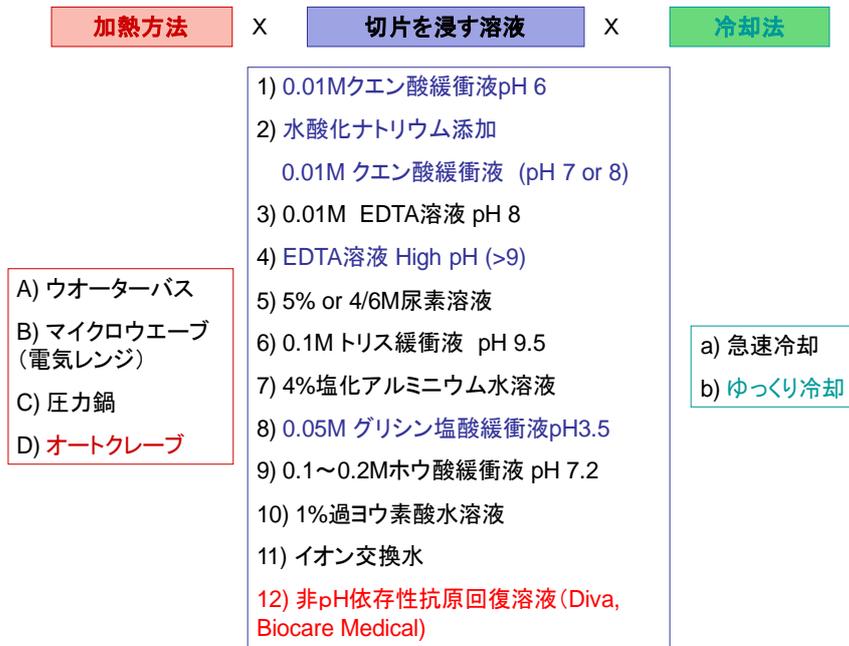
1) 蛋白分解酵素処理 (ペプチド間や内の架橋形成による立体障害の回復)	トリプシン処理	1%トリプシン溶液 (trypsin 10mg, Cacl2 10mg、0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH7.6, 10ml) で 37°C 30 分間~2 時間処理
	プロナーゼ処理	0.05%プロナーゼ溶液 (Pronase 5mg, 0.05M Tris-HCl 緩衝液 pH7.6 ないし 0.01M PBS, 10 ml) で室温 10~30 分間処理
	ペプシン処理 (トリプシン処理+でも実施)	0.4%ペプシン溶液 (Ppsin 40mg 0.01N 塩酸溶液 10ml) で 37°C 20~30 分間処理
	アクチナーゼ処理	0.04 (0/01 ~ 0.08)% アクチナーゼ溶液 (actinase 4mg、CaCL2 10mg、0.05M Tris 緩衝生食水 10ml) で室温 30 分間
	フィシン処理 (イチジク由来の酵素)	0.6%フィシン溶液 (Ficin 2.5mg、0.01M PBS pH 7.4) で 37°C 30 分間処理
	プロテナーゼ K 処理	0.04% プロテナーゼ K 溶液で、5~10 分間処理
2) DNase 処理	DNA 結合抗原の検出 (ER/PgR/BrdU)	DNase 溶液 (DNase I (Sigma, #D-5025) 5.0 mg, 0.05M Tris-HCL 緩衝液 0.9 ml, 0.1M 硫酸マグネシウム液 0.1 ml) で室温 10 分間~2 時間処理

3) アルカリ処理	封入体分子の構造変化や脂質のケン化 (saponification)	1% KOH 70%メタノール溶液に室温 60 分間浸し、トリプシン処理を行う。
		NaOH 飽和メタノール (50~100gNaOH を 50ml のメタノールに混ぜて作製) とメタノールで 4 倍希釈し、室温 30 分間の処理後に、100%メタノールと 70%メタノールで 15 分間ずつ洗浄。
4) 塩酸処理	二本鎖 DNA の酸変性とヒストン蛋白に抽出により、DNA に組み込まれて標識 (BrdU) の検出に用いられる。	2~4N 塩酸で、常温 20 分間処理、洗浄後に PBS へ。蛋白分解処理 (トリプシン、p 路ナーゼ、アクチナーゼ処理) が行われる。
		5N 塩酸で、37°C30 分間処理、洗浄後に、PBS に戻す方法でも、良好な結果が得られる。
5) 蟻酸処理	アミロイドやプリオン蛋白の抗原性増強と感染性除去に用いられる。	98~100 蟻酸溶液に、室温で 15 秒から 5 分間浸し、流水による洗浄 (10 分間) の後に、PBS に戻す。
6) 高濃度変性剤処理	Structural unfolding 効果で、エピトープが露出する。	6M 尿素 0.1M グリシン塩酸緩衝液(pH 3.2)に 4°Cで 1 時間浸潤する。洗浄後、PBS へ。
		6~8M グアニジンないし尿素 0.1MTris 塩酸緩衝液(pH10.2)で、常温一晩浸潤する。洗浄後、PBS へ。

最近では、加熱処理による抗原回復方法が良く行われている。その場合、以下の図に示す加熱の方法、切片を浸す溶液、霊薬方法を考慮する必要がある。一

般には、オートクレーブ処理で、クエン酸処理か、pH 非依存溶液で、ゆっくり冷却が行われる。標的となる抗原により、詳細は異なる。

また、最近では制御されたウォーターバス (電気ポット) により、90°Cや 75°Cでの 2 時間程度の処理も行われている。



**\*凍結切片ないし細胞標本における抗原性の賦活化**

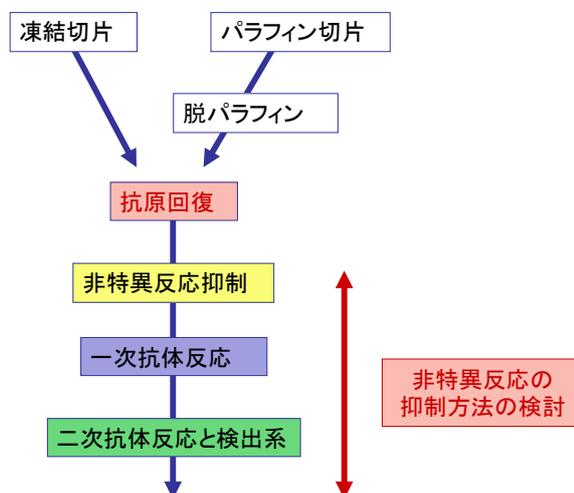
- 熱処理：核内蛋白の検出には有効
- メタノール処理：有機溶剤による処理（脂質の抽出）が必要な抗原がある。
- -20℃ 70～100%メタノール固定：細胞増殖抗原等では有効。
- 酸性尿素処理：免疫グリブリンJ鎖の検出

**\*\*電顕用樹脂包埋切片の ETCHING による抗原性の賦活化**

- Semithin 切片（1 μm 厚さ切片）：飽和メタ過ヨウ素酸処理
- 2% ないし飽和水酸化ナトリウム加無水メタノールないしエタノール処理
- 凍結乾燥法ないし凍結置換法の利用
- 電顕で post-embedding 法では、10%過酸化水素水（3倍希釈）10分間反応

**3. 非特異反応の抑制方法の検討**

右図に示す、所謂、検出系の非特異反応には、反応後の洗浄不足、不適切な抗体希釈液の選択、反応中の乾燥、反応自体の非特異反応によるものがある。



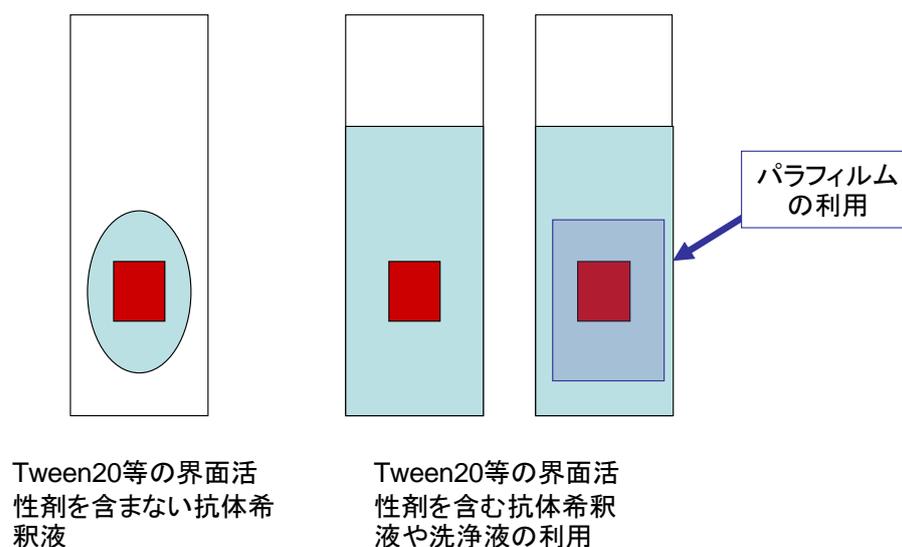
洗浄緩衝液（下表）：一般には PBS が用いられている。しかし、高感度や背景の染色のクリアーにするには、TB, TBS, TBST が用いられる。

洗浄用緩衝液	作製法	洗浄力
0.01M リン酸緩衝食塩水 (Phosphate-buffered saline: PBS) pH 7.2～7.5	リン酸水素二ナトリウム・12水和物 28.7g、リン酸二水素ナトリウム・2水和物 3.3g、塩化ナトリウム 85.0g をイオン交換水に溶解してLとして、x10濃縮保存液とする。pHを調整しておく。使用時に、イオン交換水でx10倍に希釈して用いる。	1
0.05M トリス塩酸緩衝液 pH 7.6：T B	1M トリス塩酸緩衝液 (121.1g のトリスマベース (トリスヒドロキシメチルアミノメタン:シグマ社) を 800ml のイオン交換水でオートクレーブで加熱溶解し、冷却後に濃塩酸で pH を 7.6 に合わせ、イオン交換水で 1L にする。) をイオン交換水で 20 倍に希釈する。	> 1
0.05M トリス塩酸緩衝 0.18M 食塩水 pH 7.6：T B S	上記の 1M トリス緩衝液 500ml と 5M 塩化ナトリウム(292.2g の塩化ナトリウムを 800ml のイオン交換水にオートクレーブで加熱溶解し、冷却後にイオン交換水で 1L にする。)の 360ml を、イオン交換水で 10L に希釈する。	>> 1
0.05M トリス塩酸緩衝 0.18M 食塩水 pH 7.6 0.1% tween 20：T B S T	上記の 0.05M トリス塩酸緩衝 0.18M 食塩水 pH 7.6 (T B S) に、0.1%の割合で、ポリオキシエチエンソルビタンモノラウレート (Tween 20) を溶解する。	>>> 1

**抗体希釈液**：抗体希釈液には、一般に、免疫染色の洗浄液が用いられる。BSAを添加することで、抗原抗体反応を促進する効果があるようだ。また、商業的に、抗体希釈液として供給されているものもある。

抗体希釈液		
免疫染色の洗浄液	0.01M リン酸緩衝食塩水(Phosphate-buffered saline: PBS) pH 7.2~7.5	一般的
	0.05M トリス塩緩衝液 pH 7.6 : T B	
	0.05M トリス塩酸緩衝 0.18M 食塩水 pH 7.6 : T B S	
	0.05M トリス塩酸緩衝0.18M 食塩水 pH 7.6 0.1% tween 20 : T B S T	一般的・超高感度
1%ないし2% BSA 加 PBS	0.1g ないし 0.3g の bovine serum albumin (BSA, sugma)を PBS に入れて、自然溶解し、攪拌する。	抗 BSA 抗体の問題
1%ないし2% BSA 加 PBS 0.1% tween 20	上記の 1%ないし 2% BSA 加 PBS に 0.1% tween 20 を添加する。	抗 BSA 抗体の問題
0.25% カゼイン溶液	25mg のカゼイン (Sigma 社) を 10ml の PBS に溶解する。	15 分以上の抗原抗体反応では阻害効果がある。

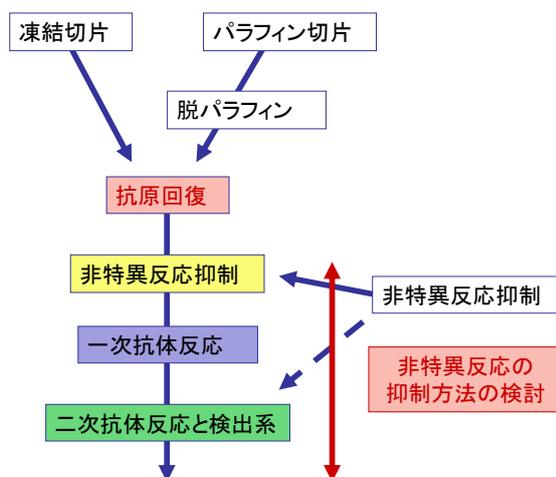
抗体等の反応中の試薬の乾燥防止の方法：TBST のように海面活性剤が添加されている試薬では、スライドグラスに滴下された試薬が、下図のように、スライドグラス全面に薄く広がり、反応中に乾燥することがある。それを防ぐ為に、パラフィルムを掛けると良い。



非特異反応抑制剤（背景染色の除去に用いる溶液）：一般に、5%動物血清が用いられるが、二次抗体の交叉反応より、無血清系の溶液が近年は用いられている。

その非特異反応抑制力は、5%動物血清、3%ウシ血清アルブミン(BSA)溶液、5%スキムミルク、0.25%カゼイン溶液の順に強くなる。

現在、一般に、商業的に供給されている0.25%カゼイン溶液が用いられている。しかし、15分以上の処理にて、特異的な抗原抗体反応を阻害する可能性が高いので、10分以内での使用が勧められる。



溶液	作製法	特徴
5%動物血清	二次抗体と同じ動物種の正常〈非免疫〉血清 0.5ml を、9.5ml の PBS に溶解する。 マウスモノクローナル抗体の一次抗体の非特異反応抑制にはウマ血清が用いられる。	長期保存に向かない。 自然抗体の問題。 二次抗体の非特異反応抑制
3%ウシ血清アルブミン(BSA)溶液	BSA (Sigma 社) 0.3g を、10ml の PBS に自然溶解させて、攪拌する。	抗 BSA(キャリアー)抗体の問題
5%スキムミルク	スキムミルク (non-fat) 0.5g を温めた PBS 10ml に溶解する。	
0.25%カゼイン溶液	25mg のカゼインを PBS に溶解する。	最大 15 分程度まで。それ以上では抗原抗体反応の阻害が生じる。