

免疫組織化学の基礎と応用

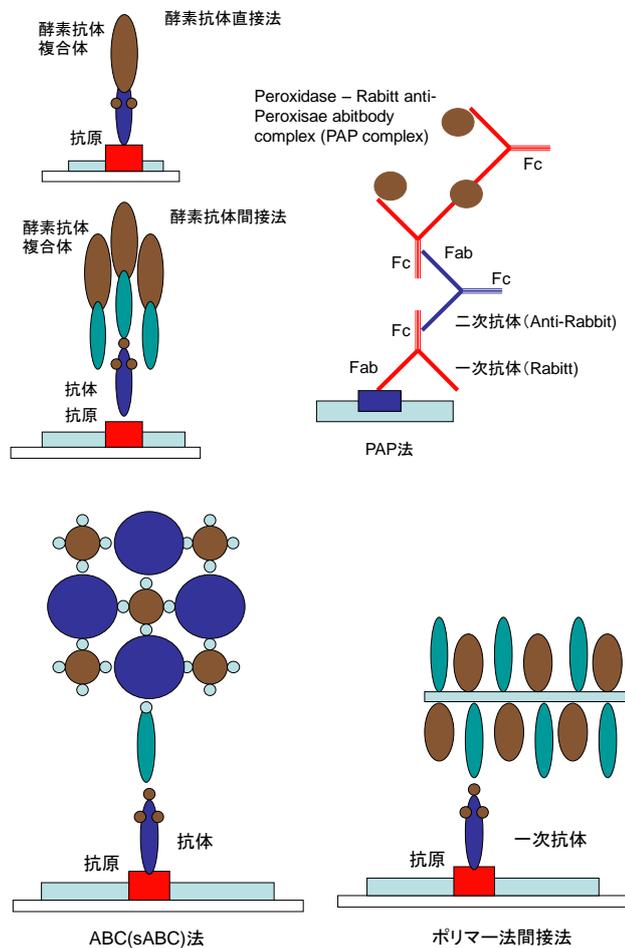
蓮井 和久 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・講師

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。

VIII. 光顕的酵素抗体法の PAP 法、ABC 法、ポリマー法

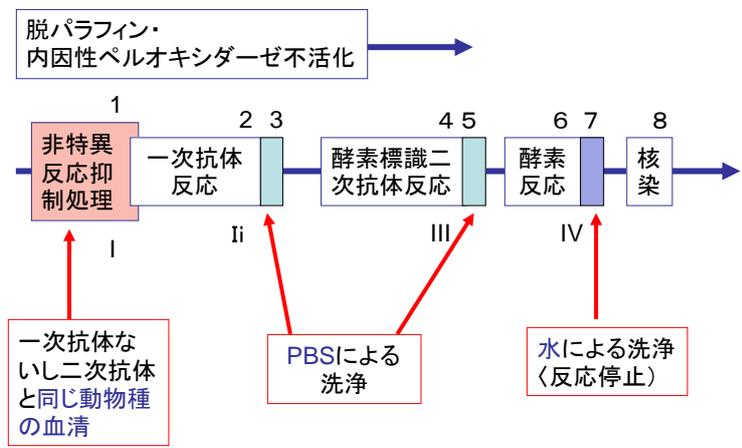
1. 光顕的酵素抗体法の PAP 法、ABC 法、ポリマー法：現在、極普通に用いられている基本となる染色法である。これらは、酵素抗体法の間接法の増感法となることから、高感度免疫染色とも呼ばれる一方で、極普通に用いられていることから、通常感度の免疫染色とも呼称されている。

それぞれの方法は、既に、(2)で説明している。右図にその産物の違いを示した。現在、一般に用いられているのは、改良型 ABC 法ないし sABC 法とポリマー法間接法である。



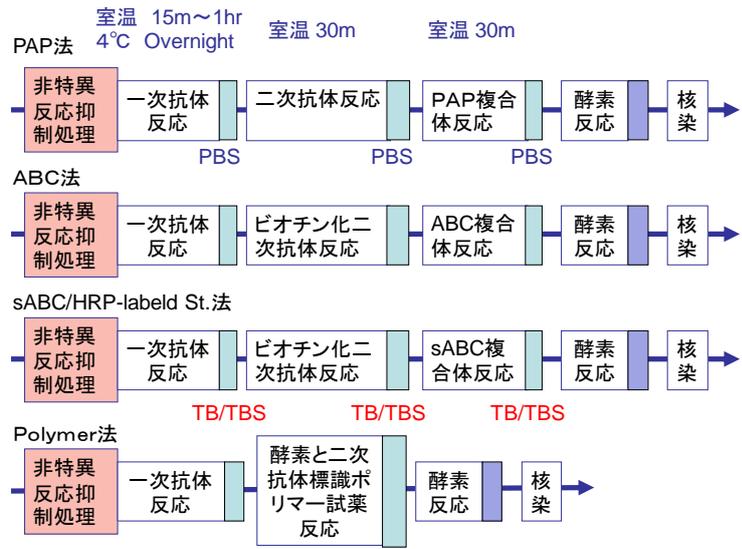
2. 光顕的酵素抗体法の PAP 法、ABC 法、ポリマー法の処理過程

右図に、酵素抗体法間接法の染色工程をグラフィックに示す。この染色過程は、脱パラ、内因性ペルオキシダーゼ不活化、非特異反応抑制、一次抗体反応とその後の洗浄、酵素標識二次抗体反応と洗浄、酵素反応による呈色、核染色からなる。



一般に、二次抗体と同じ動物種の血清 PBS 溶液で非特異反応抑制が行われ、酵素反応の停止は水による洗浄が行われる。

PAP 法、ABC 法、ポリマー法の処理過程を同様にグラフィックに示したのが、右図である。PAP 法と ABC 法では、非特異反応の抑制には、二次抗体と同じ動物種の血清 PBS 溶液で非特異反応抑制が行われるが、3%BSA-PBS 溶液等も用いられ、反応の洗浄は PBS であった。



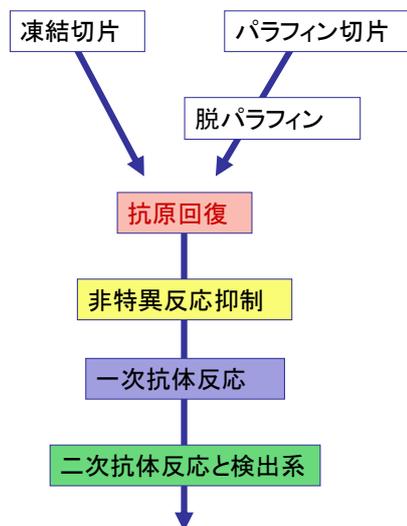
しかし、sABC 法やポリマー法では、非特異反応抑制には、カゼイン溶液等が用いられており、反応洗浄液も、TB ないし TBS が用いられている。一般に、自動染色装置等での実施では、TBST が用いられている。

3. 光顕的酵素抗体法の PAP 法、ABC 法、ポリマー法の実施形態

右図に示す染色過程で、酵素処理による抗原回復をする場合には、抗原回復の段階から、熱処理等での抗原回復の場合は、非特異反応抑制から、実際の染色処理と云うことになる。

内因性ペルオキシダーゼ不活化は、脱パラ直後に 0.3% 過酸化水素水メタノール溶液に 2-0 分前後浸すか、非特異反応抑制処理の中で、0.3%ないし 3%過酸化水素水 PBS 溶液で 10 分間の処理となる。

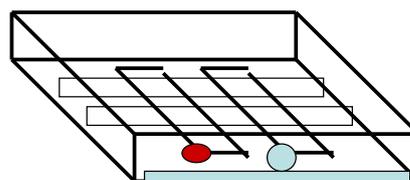
自動染色装置での工程は、以降に述べるとして、以下に、用手法とキャピラリーギャップ法での染色方法を説明する。



用手法

1) **湿箱**を準備して、底に、キムワイプ等の紙を引き、水で十分な湿度が得られるようにして、割り箸等を置いて、スライドガラスの置く場所を確保する。湿箱は市販のものもあるが、100 枚入りのプラスチック製標本箱も流用出来る。

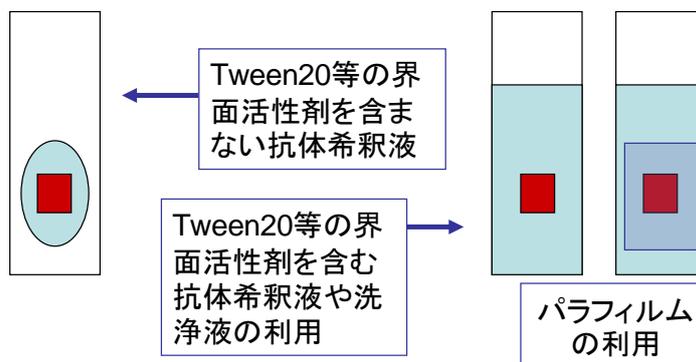
湿箱 (Moist chamber)



長時間の反応でも、反応液が乾燥しないように、湿箱(中に、ティッシュないしペーパータオルを敷き、水を浸る程度に入れる。)の中で反応を行う。また、室温は低い時には、このまま、ホットプレート(37℃程度まで)か培養庫に入れることも可能である。

2) 試薬、洗浄液、湿箱等は、年間の室温以上の温度 (25℃ないし 30℃) に保温して、染色を始める。

3) 右図にあるように、抗体希釈液や洗浄液に界面活性剤は入っている場合

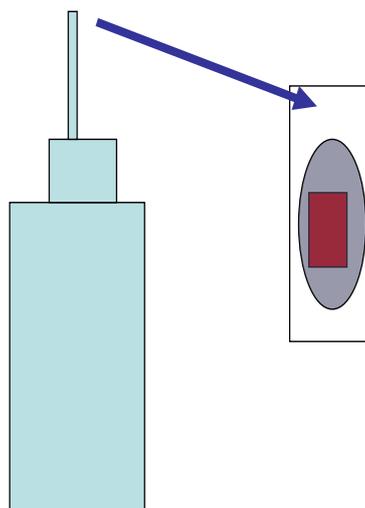


には、反応させている間は、パラフィルムを覆っておく。

4) 反応後の洗浄は、反応直後の洗浄は、洗浄液ボトルから、**Running water 法**（標本の無い部分に洗浄液をかけて、そこから流れる洗浄液で洗う）で洗う。

スライドグラスを斜めにして、標本面を下にした状態で、表の上部に洗浄液をかけると、洗浄液は背面（標本面）を一様に流れることを利用することもある。

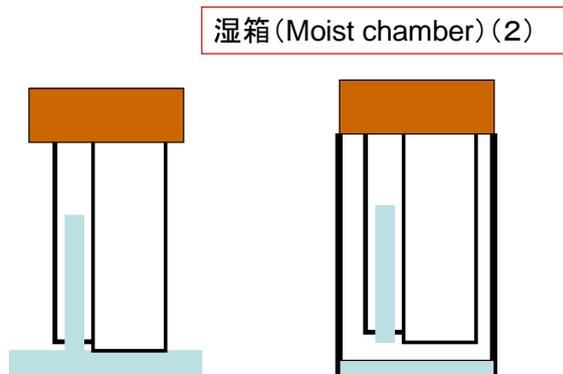
その後は、染色瓶中の洗浄液に 5 分間浸し、洗浄液を交換して、合計で、3 回洗う。



キャピラリーギャップ法

右図のように、切片貼付面を向き合わせて、2 枚スライドを紙一枚程度の感覚せホルダーにセットすると、その間に、毛細管現象で、反応液や洗浄液を吸い上げることが出来る。フィシャー社は 20 枚で 10 組のスライドがセット出来るホルダーを供給している。

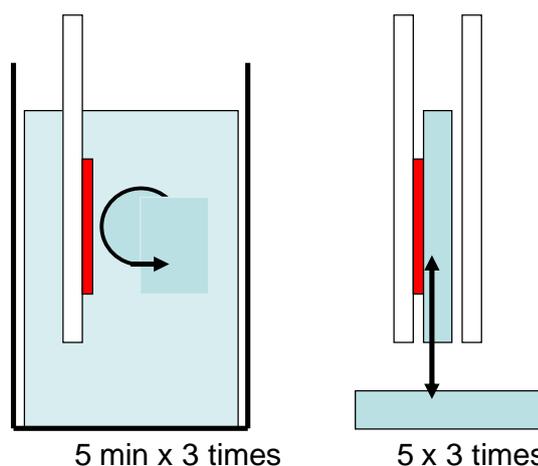
このホルダーを染色瓶にセットすると、右図の右の図のように、湿箱が出来る。専用のドライヤー方式で温度管理の出来る染色センターも、フィシャー社より供給されている (Fisher MicroProbe)。



用手法とキャピラリーギャップ法での洗浄の違い

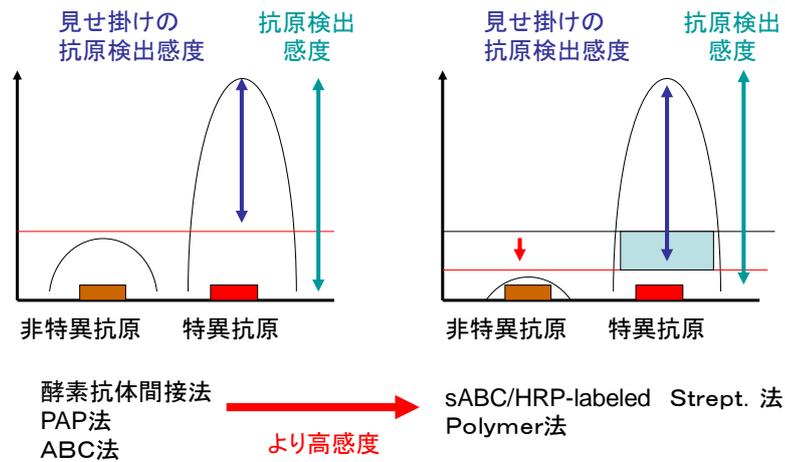
右に示す様に、染色瓶中のスライドグラスの表面では、洗浄液の対流が生じ、スライドグラスを洗浄液に一定時間浸すことで洗浄出来るが、キャピラリーギャップ法の吸い上げられた洗浄液では対流が生じるに、繰り返しの洗浄液の交換を行う

必要がある。反応液や洗浄液は、吸収紙にスライド下端を当てることで、吸収紙に吸収される。



4. 抗原検出感度

抗原検出感度の上昇は、緩衝洗浄液(ABC法までのPBSとsABA法やポリマー法でのTB/TBS/TBST)の洗浄力の相違をもたらす**非特異抗原との反応の低下の結果、見せ掛けの抗原検出感度の上昇**が生じたものである。



抗原検出感度の上昇は、

緩衝洗浄液の洗浄力の相違をもたらす**非特異抗原との反応の低下の結果、見せ掛けの抗原検出感度の上昇あるいは低下が生じたものである。ただし、顕微鏡下に最終段階の酵素(DAB)反応を調節した場合である。**

ただし、顕微鏡下に最終段階の酵素(DAB)反応を反応時間等で調節した場合には、**signal noise ratio** は高くなるが、抗原量は反映しているのかは解らなくなる。可能な限り、所謂、DAB 反応は、5 分間とか 10 分間と決めて、対応する方が良いでしょう。