

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。

IX. 光顕的酵素抗体法の超高感度法

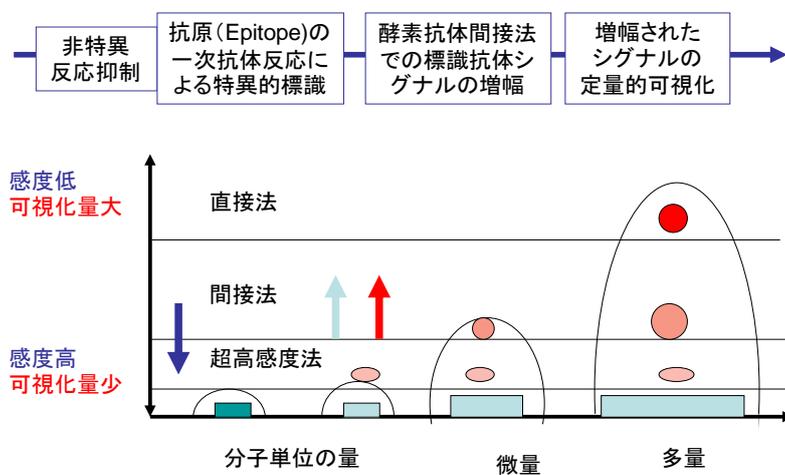
超高感度法の目的は、より微量な抗原を検出することであるが、しばしば、よりコントラストの高い染色像を得たいとか、現実的な問題として、貴重な一次抗体量を節約したい等といったものである。

超高感度法も、酵素抗体間接法に属し、右図上

の非特異反応抑制、一次抗体での抗原の標識、反応した一次抗体シグナルの増幅、その増幅されたシグナルの酵素反応による可視化である。抗原検出感度の上昇は、抗原検出閾値の低下を意味し、分子単位の量の抗原の検出では、非特異反応の抑制が非常に重要になる。

従って、1) 超高感度検出系の基準化は、増幅シグナルの定量的可視化が必要であり、一般に、抗原抗体反応と酵素反応であるので、反応の試薬条件、反応温度と反応時間を一定にする必要がある。2) 検出系の非特異反応の抑制が必要である。

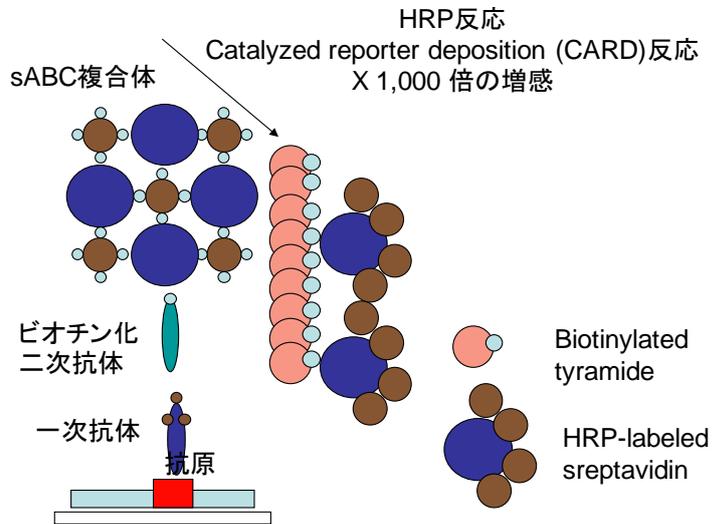
その一方で、抗原の masking 等や抗原の存在様式により、抗原検出感度は左右されることから、3) 抗原回復方法の検討が必要である。



1) 超高感度検出系の基準化は、増幅シグナルの定量的可視化が必要であり、一般に、抗原抗体反応と酵素反応であるので、反応の試薬条件、反応温度と反応時間を一定にする必要がある。2) 検出系の非特異反応の抑制が必要である。3) 抗原回復方法の検討が必要である。

1. CSA 法 (Catalyzed signal amplification method)/ImmunoMax 法)

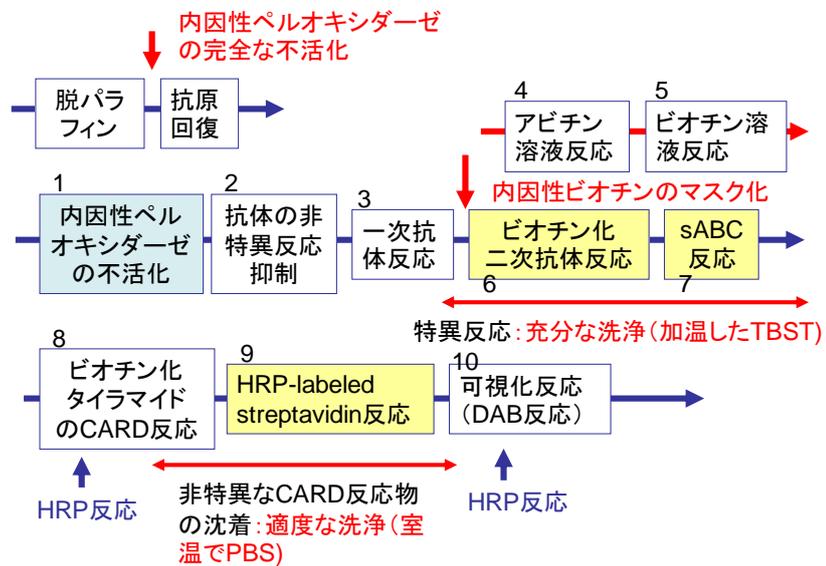
オリジナルな方法は、sABC 法 + catalyzed reporter deposition (CARD) 反応 (Labeled streptavidin 法を含む) による sABC 法の x1000 倍の超高感度免疫染色である。異化を受ける tyramide の標識物に FITC やその他の物質もあり、異化沈着物の検出方法もそれぞれに対応している。



このオリジナル法は、CARD 反応と最終的な

増幅されたシグナルの可視化で2度の HRP 反応を利用することから、内因性ペルオキシダーゼを非常に強く検出し、sABC 法と沈着したビオチン化タイラマイドの検出で2度のビオチン-streptavidin 結合反応を利用することから、内因性ビオチンを非常に強く検出し、シグナル増幅の過程、即ち、超高感度であることによる

非特異反応の強い検出が、ヒト病理組織標本への導入の初期段階から問題となった。



我々は、右図のように、内因性ペルオキシダーゼの2度の不活化、一次抗体反応後の内因性ビオチ

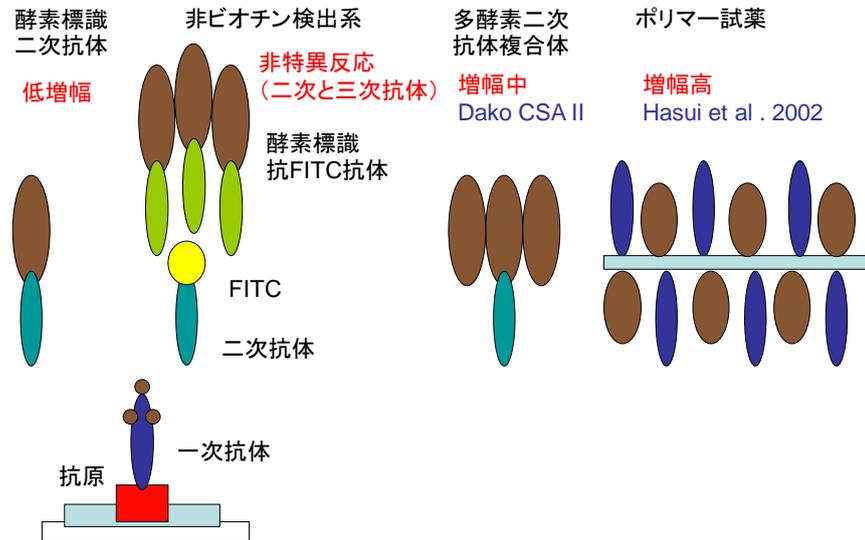
ン (ビオチン様蛋白) のアビチン溶液での標識とビオチン溶液での飽和化でマスク化を行い、加温 TBST による十分な洗浄を行い、modified ImmunoMax 法 (Hasui K, Sato E, Tanaka Y, Yashiki S, Izumo S. Quantitative highly-sensitive immunohistochemistry (Modified ImmunoMax) of HTLV-1 p40tax and p27rex proteins in HTLV-1-associated non-neoplastic lymphadenopathy (HANNLA) with estimation of HTLV-1 dose

by polymerase chain reaction. DENDRITIC CELLS 7:19-27, 1997) を確立した。

しかし、工程が多く、内因性ビオチンのマスク化が安定しないことが判明して来た。そこで、2度のビオチン-ストレプトアビチン結合反応を1度に減じることで、sABC法を別の酵素抗体法間接法に置換する開発を行った。

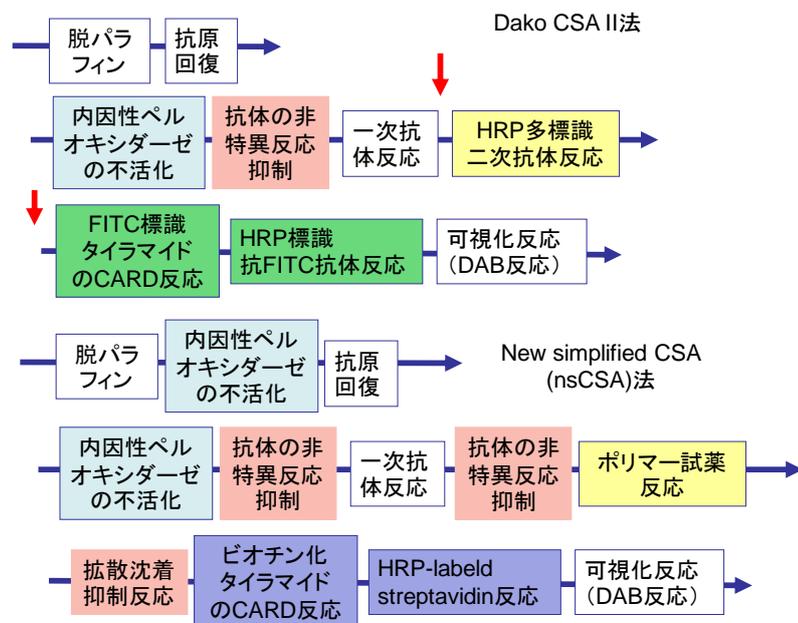
酵素抗体法

間接法には、右図に示すような感度が低い酵素標識二次抗体法、2段階のステップを要するFITC標識二次抗体-HRP標識抗FITC抗体法（通称、非ビオチン検



出系)、複数の HRP を標識した多 HRP 標識二次抗体法、ポリマー法があり、Dako は多 HRP 標識二次抗体法で (Dako CSA II 法)、我々はポリマー法で sABC 法を置き換えた (New simplified CSA: nsCSA 法)。

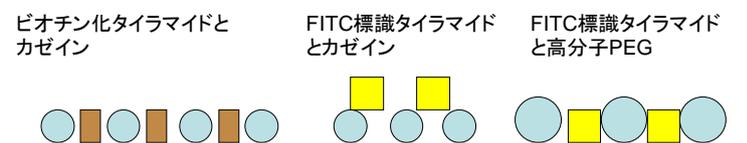
nsCSA 法は、一次抗体反応とポリマー試薬反応の前処理として抗体の非特異反応抑制を行い、CARD 反応での異化ビオチン化タイラマイドの拡散珍訳抑制反応を行っているが、Dako CSA II 法はこの前処理を行っておらずに、実際の染色の実施では、nsCSA 法の非特異



反応抑制処理を行う必要があった。また、CARD 反応での異化ビオチン化タイ

ラマイドの拡散珍訳抑制反応の試薬でも、ビオチン化タイラマイドを用いる場合は、抗体の非特異反抑制処理試薬で対応できたが、Dako CSA II 法の用いら FITC 標識タイラマイドの異化反応は抗体の非特異反抑制処理試薬で完全に阻害された。

この現象は、ビオチンと FITC の分子量の差によるもので、抗体の非特異反抑制処理試薬は分子量の小さな



なカゼインでビオチン化タイラマイドの異化沈着を阻害しないが、FITC 標識タイラマイドの異化沈着反応をカゼインは阻害し、20000 前後の分子量の生化学的に安定なポリエチレングリコールが、FITC 標識タイラマイドの拡散沈着を抑制し異化沈着を促進した。

2. 超高感度免疫染色における試薬反応の条件等

- 1) 内因性ペルオキシダーゼの不活化試薬：過酸化水素水の劣化のチェック(30% 過酸化水素水は pH 4.7 であり、劣化するに従い pH が上昇する。内因性ペルオキシダーゼの不活化が不十分と判断した時には、pH をチェックし、pH5 ないし 6 であれば、新しいものに交換する必要がある。)
- 2) 抗体の非特異反応抑制には、カゼイン溶液が推奨。BSA 等の動物性蛋白を避ける（二次抗体試薬への抗 BSA 抗体の混入）。
- 3) 一次抗体希釈液は、TBST（1 ないし 2% BSA-PBS 溶液も可。しかし、二次抗体試薬への抗 BSA 抗体の混入の問題あり）。
- 4) 抗体反応時間は 15 分間。(抗一本鎖 DNA 抗体の免疫染色にて、proteinase K 処理後の抗体反応時間を、15 分、30 分、45 分で比較したところ、15 分での反応が期待する染色を示し、30 分と 45 分では染色強度は増加したが期待しない細胞を標識した。個々の抗体により最適な抗体濃度と反応時間を決める必要がある。)
- 5) 洗浄緩衝液は TBST。可能であれば加温（35-45℃）の TBST
- 6) 二次抗体を含む試薬の非特異反応抑制が必要。カゼイン溶液が推奨。
- 7) CARD 反応前の反応後の洗浄は十分に。CARD 反応後は通常（フェノール類の沈着は、従来、組織中の分子との結合で説明されて来たが、繰り返しの TBST の洗浄では、洗い流されることが判明）。
- 8) CARD 反応にも、非特異反応（拡散沈着）がある。

参考文献

1. Hasui K, Takatsuka T, Sakamoto R, Su L, Matsushita S, Tsuyama S, Izumo S, Murata F. Improvement of supersensitive immunohistochemistry with an autostainer: a simplified catalyzed signal amplification system. *Histochem J.* 34:215-22. 2002
2. Hasui K, Murata F. A new simplified catalyzed signal amplification system for minimizing non-specific staining in tissues with supersensitive immunohistochemistry. *Arch. Histol. Cytol.* 68(1):1-17, 2005
3. Hasui K, Wang J, Tanaka Y, Izumo S, Eizuru Y, Matsuyama T. Development of ultra-supersensitive immunohistochemistry and its application to the etiological study of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Histochem. Cytochem.* 45 (2): 83-106, 2012

特許

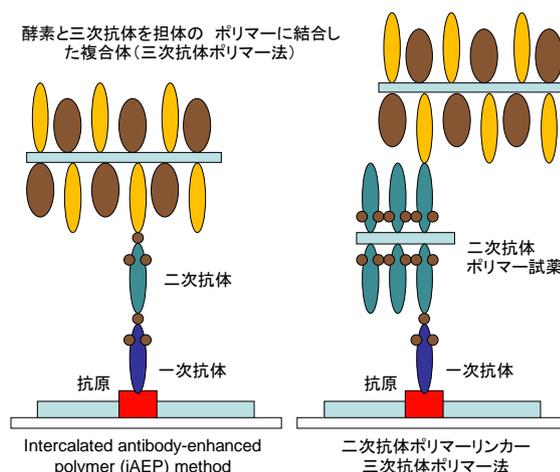
- 特許 2003-366044 (平 15.10.27) 免疫組織化学的染色による抗原の検出方法
特許 2004-234558 (平 16.8.11) 免疫組織化学的染色による抗原の検出方法

3. 三次抗体ポリマー試薬法

ビオチンフリー法の一つとして開発されたポリマー法はポリマー法間接法（二次抗体標識ポリマー法：secondary antibody-labeled polymer (sALP) method）であり、最近。三次抗体ポリマー法（thirdary antibody-labeled polymer method）が商業的に供給されて来た。

三次抗体ポリマー法で、二次抗体を用いるものは **ntercalated antibody-enhanced polymer (iAEP)法**であり、二次抗体ポリマー試薬を用いるもの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 thirdary antibody-labeled polymer (sALP-likier tALP) method)である。

実際に、市販の二次抗体を用いて、iAEP法の検討を行うと、抗原回復処理に依存するようであるが、二次抗体反応と三次抗体ポリマー試薬反応の前に抗体の非特異反応の抑制が必要であり、また、二次抗体の交叉性や混入成分等の問題があるようである。商業的に供給されている sALP-likier tALP 法でも、この検討が必要であるようだ。



5. 超高感度法の抗原検出感度について

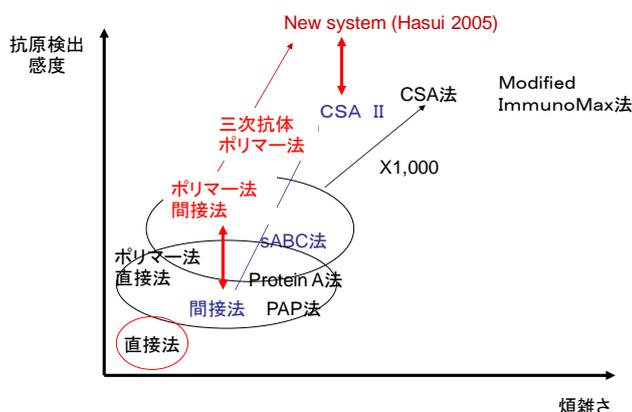
超高感度法の nsCSA 法は、Dako CSA II 法よりも、二次抗体ポリマー法と多酵素標識二次抗体法との差だけ、より高感度である。

また、三次抗体ポリマー法の感度は、二次抗体ポリマー法 (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-likier 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。

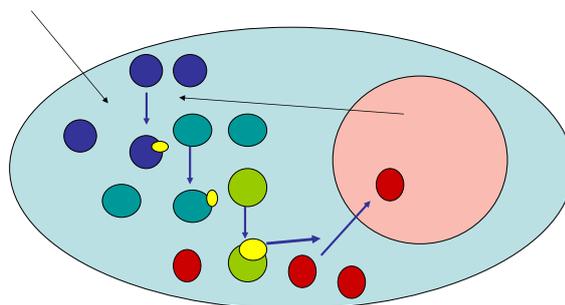
しかし、超高感度法の抗原検出感度は、抗原回復法、一次抗体反応の抗体濃度や時間等の基準化を行って検討すべきであり、凡そ、通常感度検出法で検出できない抗原を iAEP 法で検出出来たら、その抗原検出感度は一桁上がり、その抗原量は一桁少ないと判断し、同様に、sALP-likier tALP 法で検出出来たら、2桁抗原検出感度は上がり、抗原量は2桁少ない、そして、CSA 法で検出出来たら、3桁抗原検出感度は上がり、抗原量は3桁少ないとの理解であろうと思われる。

現実には、癌増殖遺伝子や癌抑制遺伝子の産生産物は、癌組織細胞では、通常ないし三次抗体ポリマー法で検出されているが、これらの遺伝子の生理的発言は CSA 法でしか検出されていないことから、CSA 法の x1000 倍 (3桁) の抗原検出感度は意味のあるものであるようだ。



6.. 超高感度免疫染色の標的

CSA 法の超高感度免疫染色では、分子レベルでの検出が可能となりつつあり、シグナルを受けて変化したリン酸化分子や、核等の機能部位に移動したシグナル分子であるようだ。



従って、超高感度免疫染色は、免疫染色による機能解析の領域を切り開く。当然、リン酸化分子やシグナル分子の特異的抗体の供給に依存しているのは当然である。

