

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。

XI. 多重免疫染色

多重免疫染色とは、2つ以上の抗原を同一切片で染色する免疫染色である。その方法には、1) 同時に2つ以上の抗原への一次抗体を反応させる方法、2) それぞれの抗原を順次検出していく方法、1)と2)の2つの方法を組み合わせて、多くの抗原を同一切片で検出する方法がある。その目的は、多数の分子（抗原）間の存在ないし発現の関係を解析することである。

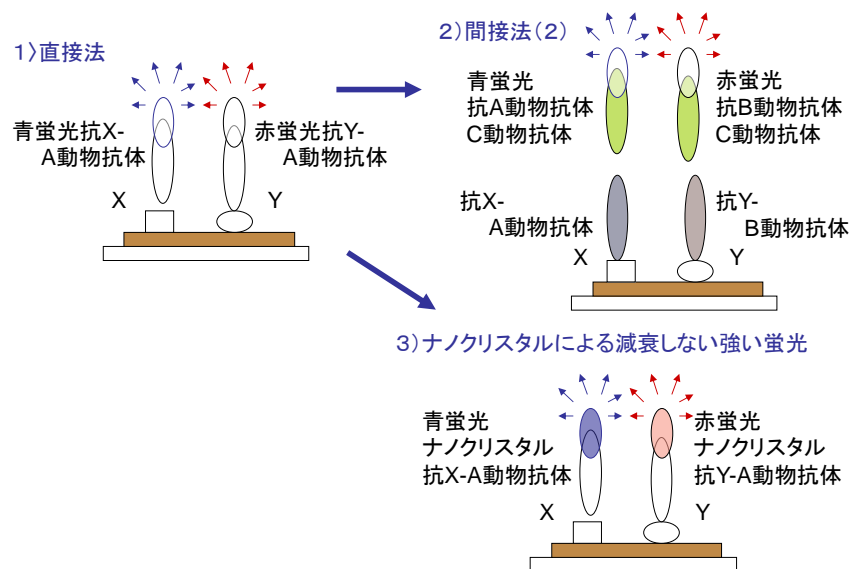
1. 複数の一次抗体の同時反応法（蛍光法、一般に、パラフィン切片には不適）

直接法：2つの一次抗体を異なる蛍光物質で標識して、蛍光顕微鏡で観察する。

蛍光の弱さ
や減衰から、
減衰しない
ナノクリスタルを用いることも可能。

間接法：2つの異なる動物種ないし同じ動物種の異なるイソタイプの

一次抗体を反応させて、一次抗体の動物種と異なる動物種の2つの一次抗体へのそれぞれの抗体を異なる蛍光物質で標識して、2つの一次抗体を標識し、蛍光顕微鏡で観察する。



参考書：実験医学別冊 注目のバイオ実験シリーズ 初めてでもできる共焦点顕微鏡活用プロトコール（高田邦昭編）羊土社

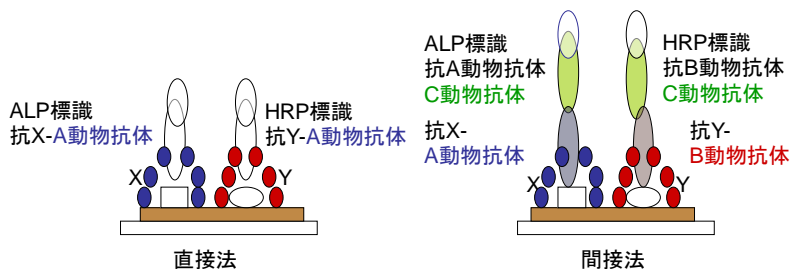
2. 複数の一次抗体の同時反応法 (パラフィン切片で可能)

a) 酵素抗体法の直接法と間接法

異なる酵素, 例えば、HRP と ALP で一次抗体を標識する直接法と、動物種の異なる2つの一次抗体を、異なる動物の HRP

と ALP で標識した二次抗体で標識する間接法がある。

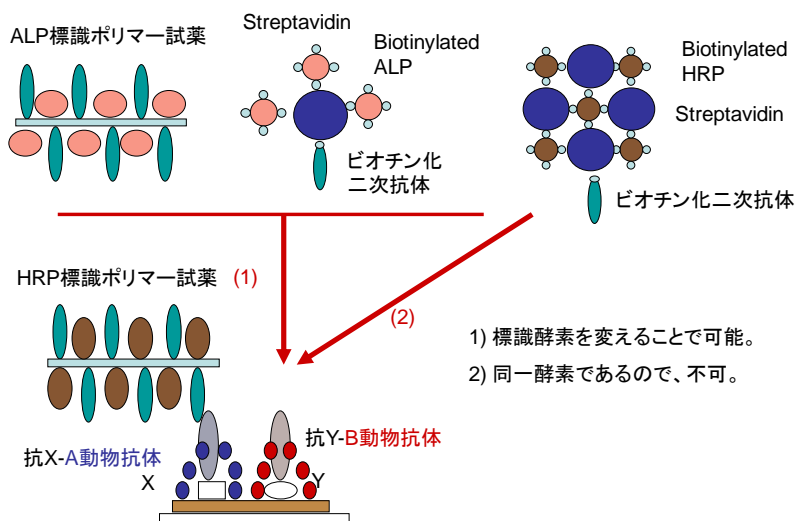
この方法は、酵素抗体法の直接法と間接法であることから、通常使用されている ABC 法やポリマー法と比較して、抗原検出感度が低い。



b) 古典的間接法以外の間接法

古典的な間接法以外の間接法 (ABC 法とポリマー法) でも可能である。異なる動物種の一次抗体に対する二次抗体の異なる酵素が標識されたものであれば、右図のように可能である。

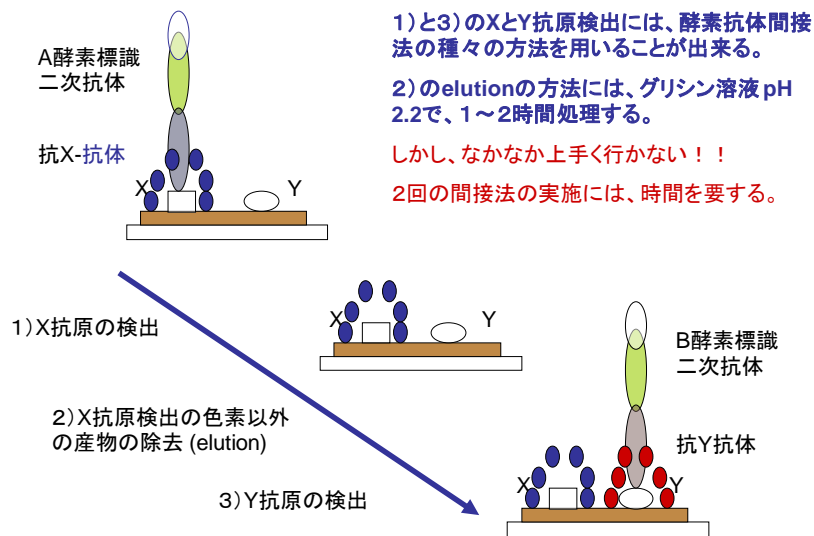
最近は、この二次抗体試薬が商業的に供給されているが、異なる動物種の一次抗体が得られるかが問題である。



- 1) 標識酵素を変えることで可能。
- 2) 同一酵素であるので、不可。

3, 抗原を順次検出して行く方法 (Elution 法 : 古典的方法 : 中根法)

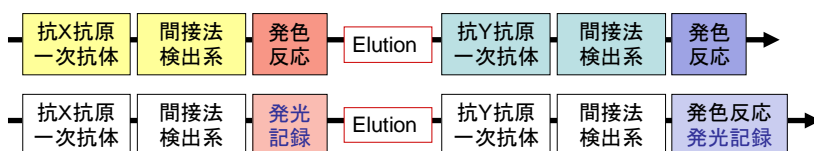
Elution とは、最初の抗原検出に用いた呈色色素以外を除くことである。この現象は、抗原抗体反応の結合が強アルカリや強酸性の溶液での処理で、抗原抗体反応での結合が乖離することを利用する。



この Elution 法では、上図に示す様に、同種の一次抗体と改良 ABC 法・sABC 法、ポリマー法等の検出法を用いることが出来る。しかし、CARD 反応による超高感度法では、ビオチン化タイラマイドの沈着は非特異な HRP の異化反応の近辺に生じる沈着であることから、抗原抗体反応を乖離させて elution を行うグリシン緩衝液 pH 2.2 での処理では除去できないので、最後の抗原の検出にしか利用出来ない。

a) Elution 法の利点

可視光領域の免疫組織化学では、Elution 法で X 抗原と Y 抗原の検出では、一



次抗体も検出系も、同種のもので使える。酵素も発色反応で色は変えることが可能であるので、同じものが使える。

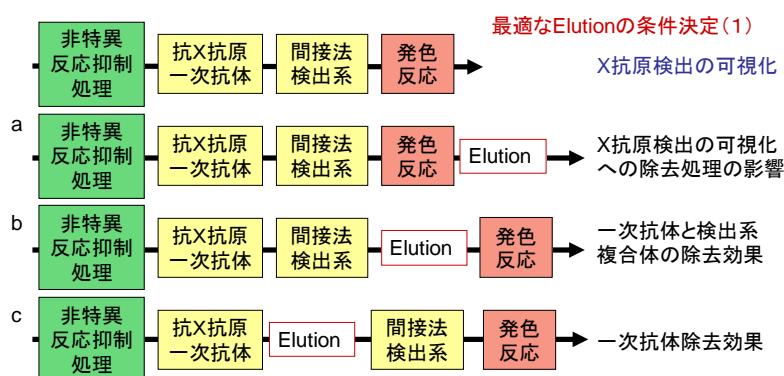
また、蛍光領域でも、切片の同一部位の記録が出来るオートステージ蛍光・透過顕微鏡による X 抗原検出の蛍光発光の発色記録を行い、Elution 後に、Y 抗原の検出を行い、同一部位の記録を行い、画像処理 (マージ) にて、画像データとして多重染色を行うことが可能である。

b) Elution の方法

1) グリシン処理：抗原抗体反応は、pH 3 以下ないし pH 9 以上で、乖離する。
(0.1M グリシン塩酸緩衝液 pH 2.2: グリシン 7.5g を 500ml のイオン交換水で溶解する。
塩酸溶液で、pH を 2.2 に合わせる。)

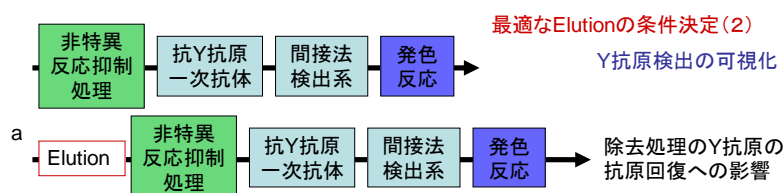
- i) グリシン緩衝液 pH 2.2 での 1～2 時間の処理 (古典的方法、中根)
- ii) グリシン緩衝液 pH 2.2 での 15 分間の処理
- iii) **グリシン緩衝液 pH 2.2 での 6 分間以下の処理** 6 分を超えると抗原回復に影響 (remasking) を与える。

この条件は、右図の様に、elution 処理と染色工程の関係から、決定された。a の実験は、発色色素の変化が検討され、b,c の処理では、elution 後も、陽性染色が観察される場合



には、一次抗体反応に、抗原抗体反応以外の強い結合の影響が示唆され、非特異反応抑制処理の検討を行った。

次に右図の実験にて、elution の抗原回復への影響が検討された。



最終的、上図と右

図の a の系で、1 分間のグリシン処理を繰り返して、**6 分間以下、好ましく 3 分間のグリシン処理が最適な elution であることが判明した。**(Hasui K, Takatsuka T, Sakamoto R, Matsushita S, Tsuyama S, Izumo S, Murata F. Double autoimmunostaining with glycine treatment. JHC. 51(9): 1169-1176, 2003, 特許 2003-183193(平 15.6.28) 免疫組織化学的染色方法による抗原の検出方法)

2) 熱処理による方法 (シラン処理スライドガラスの利用で、繰り返しの熱処理も可能となった。しかし、自動化がかなり難しい。)

- i) 温浴 (90°C 以上) 30 分以上の処理
- ii) マイクロウェーブ処理 (組織中の免疫グロブリンのエピトープの破壊を伴うので、elution の方法であると共に、同種抗体で同種組織を染める前処理としても用いられている。)
- iii) 圧力鍋ないしオートクレーブ法

4. 多重染色に用いられる呈色色素

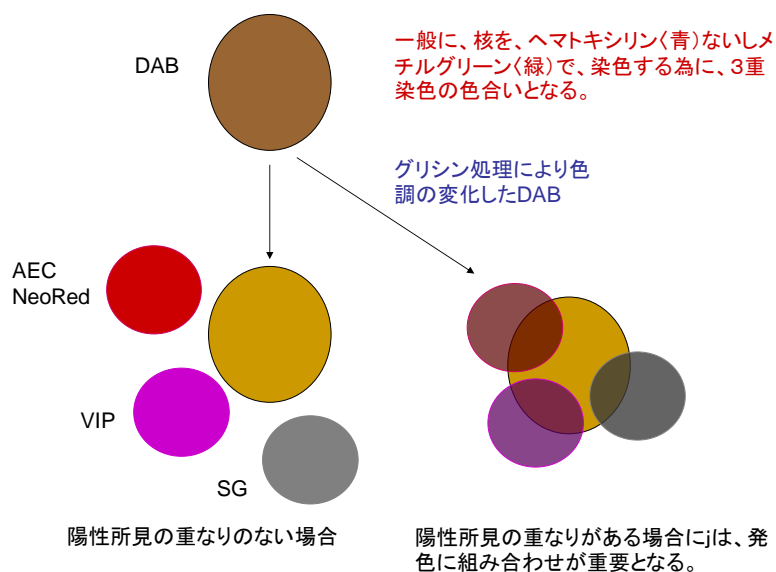
右の表に示す様に、HRP のカップリング色素には、多彩な色があるが。その多くは、水溶性樹脂による封入では色調の変化はないが、通常のプラスチック封入では茶色っぽく変化する。

酵素	基質等	発色の色と封入法	
HRP (Horse raddish peroxidase)	DAB(3,3'-diaminobenzidine)	原法 Brown ●	Permanent
		DAB-nickel Blueish purple (Dark Brown) ●	Permanent
	AEC(3-amino-9-ethylcarbazole)	Red ●	Permanent (Ultramount/Vectamount)
	Vector-neoRed	Red ●	Permanent (Vectamount)
	Vector-VIP	Purple ●	Permanent (Vectamount)
	Vector-SG	Grayish blue (Black) ●	Permanent /Vectamount
ALP(Alkaline phosphatase)	New Fucsin	Red ●	Permanent
	First-Red	Red ●	Permanent
	First-Red-Violet	Red-violet ●	Permanent
	Fast-Blue	Blue ●	Permanent

特に、AEC は、DAKO Ultramount で 切片に滴下後に、70℃で過熱（カバーグラスなし）と、AEC の鮮明赤色を示すが、プラスチック封入では茶色に変色する。Vectamount では、カバーグラスを被せることが可能である。

また、グリシン処理にて、DAB は僅かながら変色するが、他の色素との組み合わせでは、重なりが無い場合も問題ないが、重なると法判別が困難になる。

また、Vector SG は青との表現が用いられ、RGB分解では確かに青の成分があるが、黒を表現した方が良いようだ。



実際の染色例は、**Hasui K, Takatsuka T, Sakamoto R, Matsushita S, Tsuyama S, Izumo S, Murata F. Double autoimmunostaining with glycine treatment. JHC. 51(9): 1169-1176, 2003,** ないし、特許 2003-183193(平 15.6.28) 免疫組織化学的染色方法による抗原の検出方法を参照して下さい！