

2. 組織細胞科学シリーズ (若手研究者へのヒント)

病理標本における免疫組織化学の基礎 (5)

清水 章 若松 恭子 益田 幸成 福田 悠

日本医科大学大学院医学研究科解析人体病理学

2. Histochemistry Series

Immunohistochemistry in Pathology (5)

Akira Shimizu, Kyoko Wakamatsu, Yukinari Masuda and Yuh Fukuda

Department of Analytic Human Pathology, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

Abstract

Immunohistochemistry is a technique to examine the expression and distribution of biomolecules in situ using antibodies labeled with enzymes, such as horseradish peroxidase. Generally, both immunohistochemistry and immunofluorescence are termed as immunostaining, because localized biomolecules in situ are detected with antigen-antibody immunoreactions producing color signals. Immunostaining techniques are divided into 3 types: direct, indirect, and amplification methods (peroxidase-antiperoxidase, avidin-biotin complex, and polymer). Because each method has advantages and disadvantages, the method should be selected according to the biological purpose. In this technical note, we describe mechanisms and procedures for immunostaining, including immunohistochemistry and immunofluorescence. (日本医科大学医学会雑誌 2010; 6: 140-146)

Key words: immunohistochemistry, immunofluorescence, immunostaining, double staining

はじめに

免疫組織化学 (immunohistochemistry) は、今や日常の病理学研究の現場にとって欠くことができない技術である。病理分野の免疫組織化学は、主に標識抗体を用い、抗原抗体反応により病理組織内の特異抗原 (主にタンパク分子) を高感度に同定する、いわゆる免疫染色のことを指す。免疫染色の原理はほぼ確立されているが、その手技や技術は現在でもさまざまな工夫が施されている。光学顕微鏡 (光顕) による病理形態観察は HE 染色標本をはじめ、種々の特殊染色標本

での観察が基本である^{1,2}。光顕ばかりではなく電顕による観察や、その特殊染色も行われている^{3,4}。しかし、細胞の起源、細胞の質的な性格やその変化、産生タンパク質の同定など、本来の特殊染色では同定が困難な特異なタンパク分子の動態は免疫染色による観察が必須である。病理研究の分野ばかりではなく、日常の病理診断においても免疫組織化学の助けがなくては診断が困難な場合や分子標的薬の治療適応の決定に免疫組織化学が必須な場合など、多くの場面で免疫染色は活躍している。免疫染色に用いる抗体は、生命活動に活躍するタンパク分子に対して幅広く網羅されており、またパラフィン切片に用いるための抗原賦活法の確立

免疫組織化学と免疫染色

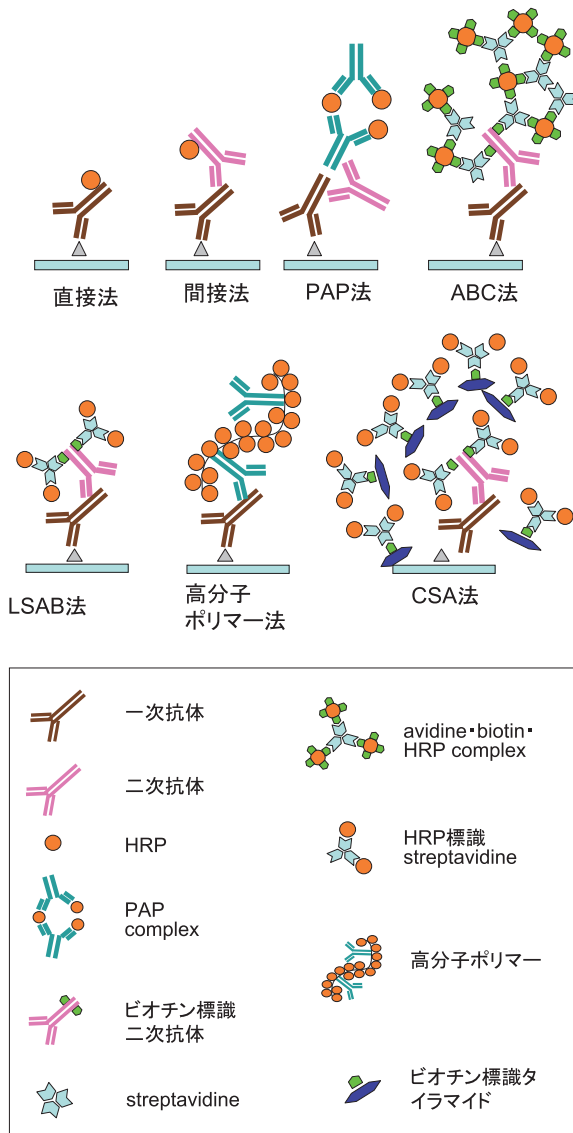


図1 免疫染色の原理

免疫染色の、直接法、間接法、PAP (peroxidase-antiperoxidase) 法、ABC (avidin-biotin complex) 法、LSAB (labeled streptavidin-biotin) 法、高分子ポリマー法、CSA (catalyzed signal amplification) 法の原理

や、高分子ポリマー法など高感度染色法の開発も加わり、免疫染色は比較的簡便に行うことが可能な日常の研究に欠かすことができない研究手法になっている。今回の組織細胞科学シリーズ(若手研究者へのヒント)は、免疫染色の基礎とその応用について、日常行っている免疫染色の原理と手技の実際について、その応用も含め概説する。このシリーズの第1回目の固定に続く免疫組織化学の実際編である。

免疫組織化学は、抗原抗体反応により組織・細胞内の抗原(主にタンパク分子)を検出する方法である。1940~1950年代のCoonsらによる蛍光色素を標識した抗体を用いた蛍光抗体法の確立に始まり、1966年の中根一穂とPierceによる酵素抗体法の開発により広く応用されるに至っている。有機化学反応を用いて組織標本中の酵素を検出する方法として組織化学(histochemistry)という名称が用いられていたため、抗体に標識した酵素を組織切片中で検出することで抗原抗体法により同定された抗原の局在を検出する酵素抗体法のことを免疫組織化学と呼ぶようになった。抗原抗体反応を可視化する方法として、オートラジオグラフィ法、金コロイド法、蛍光抗体法、酵素抗体法があるが、いずれも抗原と反応する特異抗体に何を標識して、抗原抗体反応を可視化するかにより名称が異なる。放射性同位元素により可視化する方法がオートラジオグラフィであり、このシリーズの第3回目に提示された免疫電顕で用いられていた方法が金コロイド法である。シリーズの第1回目と第2回目に説明のあった蛍光色素を標識した蛍光抗体法と、今回説明する酵素抗体法は、組織標本中の抗原の局在が色として認識されるため免疫染色と呼ぶことが多い。

免疫染色法は技術の進歩により感度や特異性の向上が確立され、手技の簡略化や多種類の特異抗体の開発により、実に多くの抗原を病理標本上で同定することが可能になった。実際の組織の免疫染色には、凍結組織とホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いる場合があり、また免疫染色法も蛍光抗体法と酵素抗体法がある。はじめに、それぞれの利点と欠点を理解して、目的に応じてどちらが適しているのかを決める必要がある。

凍結組織とホルマリン固定パラフィン包埋組織

凍結標本はこのシリーズの第1回目にその詳細が記されている。凍結前に固定をする場合もあるが、一般的に組織を薄切面を下にしてそのままOCT compound内に埋め、ドライアイスで冷やしたアセトンもしくは液体窒素内で急速凍結する。この際にドライアイス・アセトンで冷やしたヘキサン内にOCT compoundに埋めた組織を入れる場合もある。凍結組織は抗原の保持には優れているが、扱いが大変である。組織を素早く凍結する必要がある、凍結するため

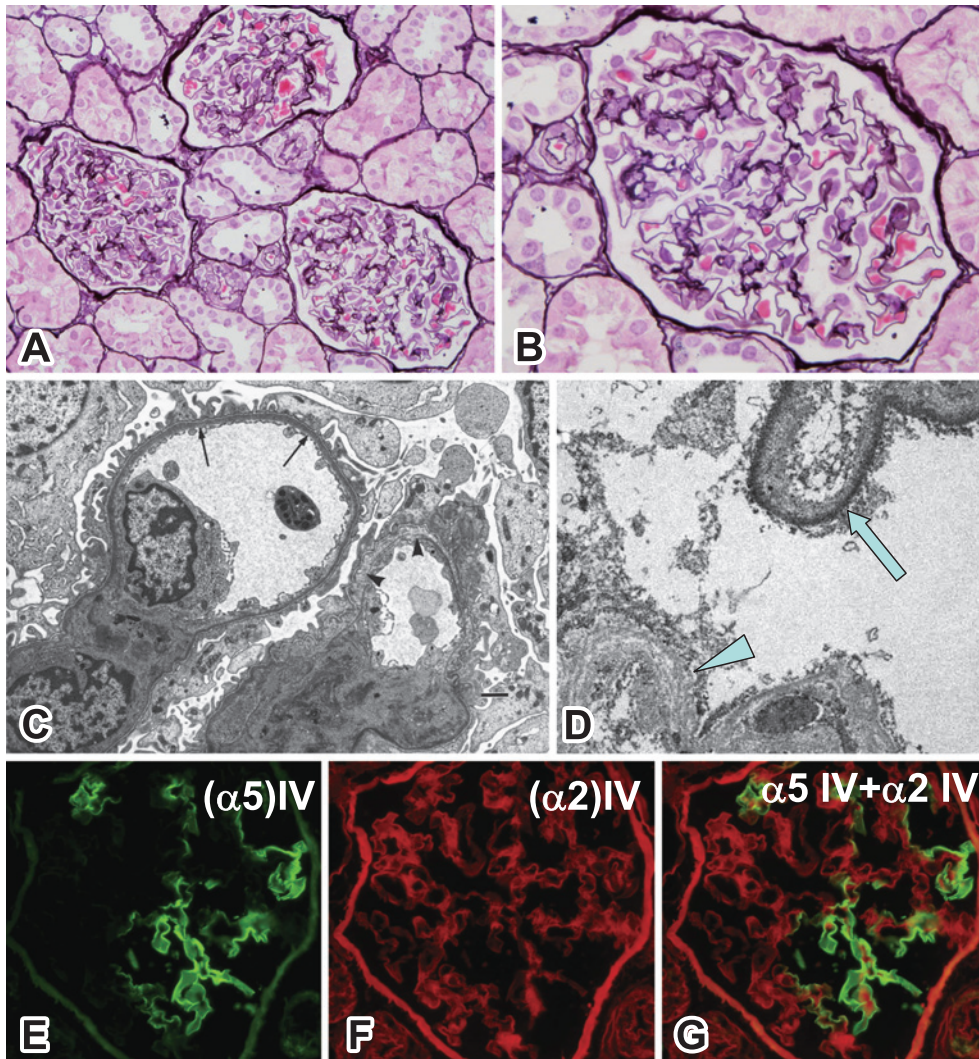


図2 電顕所見から明らかになった Alport 症候群 (解析人体病理学客員教授石崎正通博士より供与)⁸.

光顕 PAM 染色 (A, B) では、糸球体病変は明らかではなかった。電顕 (C) により Alport 症候群の存在が疑われた。矢印は正常係蹄基底膜、矢頭は異常基底膜を示す。DAB を用いた凍結材料からの免疫電顕 (D) では、形態的に健常部の糸球体基底膜 (矢印) には $\alpha 5$ 鎖が染まっているのに対し、lamina densa の lamination を認める基底膜部位 (矢頭) では、 $\alpha 5$ 鎖が欠損していることが確認された。IV 型コラーゲンの alpha 鎖の免疫染色で $\alpha 5$ 鎖が緑色と $\alpha 2$ 鎖が赤色の単染色 (E, F) と二重染色 (重ね合わせ像 G) により、 $\alpha 5$ 鎖のモザイク状の欠損と同部位の $\alpha 2$ 鎖の増強が認められ、女性の Alport 症候群に矛盾しないと診断された。

の準備、凍結した組織の保存や整理、管理も大変である。一方、ホルマリン固定パラフィン包埋組織は、室温でホルマリンに入れ固定を開始するため、準備が容易で、パラフィン包埋ブロックを作製してしまえば、室温での長期間の保存が可能になるため、整理や扱いが簡単である。しかし、固定による抗原の失活が大きな問題となる。実験材料の場合は、凍結組織とホルマリン固定パラフィン包埋組織の両方を作製し、組織検索に備えるのが一般的である。

蛍光抗体法と酵素抗体法

蛍光色素を用いて抗原抗体反応を可視化する方法を蛍光抗体法といい、酵素を用いて可視化する方法を酵素抗体法という。蛍光抗体法と酵素抗体法は、ともに、凍結組織とホルマリン固定パラフィン包埋組織の両方から行うことが可能である。凍結検体はクリオスタットで約 $4\mu\text{m}$ で薄切し、その切片を 10 分間のアセトン固定を行い、蛍光抗体法や酵素抗体法に用いること

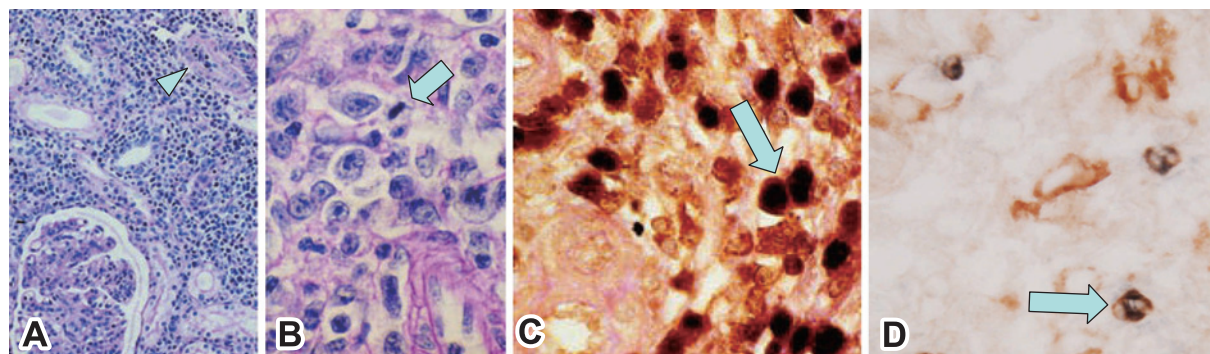


図3 移植腎の拒絶反応

光顕PAS染色(A, B)では、腎間質を主体にびまん性の炎症細胞浸潤を認める。(A)の矢頭は小動脈内に炎症細胞浸潤を認める動脈内膜炎を示している。糸球体にも糸球体炎を伴っている。(B)の拡大像では、浸潤細胞は大型の核を有し、核小体が明瞭な活性化している炎症細胞であることがわかる。矢印は核分裂像で、浸潤した炎症細胞は局所で細胞分裂していることが確認できる。(C)は核分裂関連タンパクである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (黒色)と T cell receptor (CD3) (茶色)のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた酵素抗体二重染色である。拒絶反応にみられる浸潤細胞は主に CD3 陽性の T 細胞であり、拒絶している局所で PCNA を発現しており(矢印)、細胞分裂サイクルに入っていることが確認できる。(D)は CD3 (茶色)と、細胞傷害顆粒として知られる TIA-1 (青色)のホルマリン固定パラフィン包埋切片酵素抗体二重染色である。拒絶反応時に浸潤している CD3 陽性 T 細胞は細胞傷害顆粒を持つ細胞傷害性 T 細胞(矢印)であることが確認できる。

が多い。ホルマリン固定は組織への浸透性と抗原性の保持を考慮し、中性緩衝 20% ホルマリンを用いて固定を行い、パラフィンに包埋して組織ブロックを作製する¹。マイクロトームで 2~3 μm で薄切し免疫染色を行う。蛍光抗体法では、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による観察が必要であり、暗視野で見ることから組織の同定が難しく、染色した標本の保存も効かない欠点がある。しかし、抗原性の保持が良好で、多重染色での抗原の同定が容易である利点がある。一方、酵素抗体法は通常の光学顕微鏡での観察が可能で、観察範囲が大きく、染色標本の長期保存が可能である。しかし、多重染色後の細かい抗原の同定に適さず、抗原の賦活化や増感法による非特異的な染色が出るなどの欠点もある。それぞれの利点と欠点を理解して、研究の目的に応じて使い分ける。

免疫染色の実際

蛍光抗体法と酵素抗体法は、内因性 peroxidase や biotin の不活化や抗原の賦活化などの詳細は異なるものの、免疫染色の原理や基本的な手技は同じである⁵⁶。直接法、間接法、増感法に分けてその原理と手順について概説する(図1)。

1) 直接法：目的とする抗体に蛍光物質もしくは酵素を直接標識した一次抗体を用いて1回の反応で検出する方法である。操作の簡易性と迅速性を有し、シグナルの増幅反応がないため非特異的反応が少ない利点

がある。しかし、感度が低く少量の抗原に対しての抗原の検討には不向きである。それぞれの抗原に対応する標識抗体が必要となる欠点もある。最近、酵素抗体法では直接法に対する増感法として Dako 社製の EPOS (enhanced polymer one-step staining) 試薬が開発されている。デキストランポリマーを骨格とし、一次抗体と horseradish peroxidase (HRP) を多数標識しており、一つの抗体に対して数十個の HRP が反応し感度の増幅が可能になる。

2) 間接法：目的の抗原に対する一次抗体には蛍光物質や酵素が標識されておらず、一次抗体に対する標識された二次抗体を用いて染色する方法である。間接法は抗原抗体反応を2回繰り返すことから操作には時間がかかるものの、反応性は増強される利点がある。非特異的な染色も増強される可能性もある。シリーズ第1回目に凍結検体を用いた間接法の実際が説明されている。蛍光抗体法では直接法と間接法による観察がほとんどであるが、酵素抗体法では、以下のような抗原抗体反応の可視化のさらなる増感法が開発されている。

3-1) PAP (peroxidase-antiperoxidase) 法：HRP を直接抗体に標識することなく、すべての反応を抗原抗体反応のみで行う。原理は、一次抗体反応後、過剰量の非標識二次抗体を反応させる。過剰量の二次抗体の片方の Fab 側が free の状態となる。そこへあらかじめ作製した HRP 抗 HRP 抗体複合物 (PAP; 抗体 2 分子 + HRP 3 分子の複合物) を反応させ、この HRP を検出する。原理的には間接法の3倍の感度になる

表 パラフィン切片の酵素抗体法 (ABC 法)

1. 脱パラフィン→水洗	
2. 0.3% H ₂ O ₂ メタノール溶液 30 分 (内因性ペロキシダーゼ活性の阻止)	
3. 水洗→PBS	
4. 前処置→PBS	
(前処置はホルマリンなどの固定液による抗原性の失活を取り戻し, 非特異的反応も消化する. しかし, 時間や濃度の条件が厳しく必要以上の処理は組織の構造が不明瞭となるので注意する)	
5. 10% 正常血清 (ビオチン化二次抗体と同じ正常免疫動物血清を用いる) 10 分	
(background staining の除去: 抗体が非特異的に組織に結合するのを防ぐ. その後洗浄せず, 次の一次抗体を反応させる)	
6. 特異抗体 室温 or 37°C 45 分から 90 分. または 4°C overnight	
7. PBS 洗浄 10 分 3 回	
8. ビオチン化二次抗体	
この間に次に使用する ABC を調整し, よく攪拌後に 30 分以上室温で静置する.	
9. PBS 洗浄 10 分 3 回	
10. ストレプトアビジン・ビオチン・ペロキシダーゼ複合体 (ABC) 室温 30 分から 1 時間	
ストレプトアビジン (A) 2 μL	} 混合し作成する
ビオチン・ペロキシダーゼ (B) 2 μL	
PBS 1 mL	
11. PBS 洗浄 10 分 3 回	
12. DAB-H ₂ O ₂ 溶液	
顕微鏡で 1 枚ずつ見ながら行う. 固定状態や抗体によっても時間は異なる.	
ジアミノベンチジン (DAB) 20 mg (8 mg)	} 混合し作成する
0.05M Tris Buffer 100 mL (40 mL)	
30% H ₂ O ₂ (反応直前に加える) 17 μL (7 μL)	
13. 水洗 (DAB を完全に除去)	
14. マイヤーのヘマトキシリン核染色	
マイヤーのヘマトキシリンの他, ライトグリーン, メチルグリーンでもよい. マイヤーのヘマトキシリンの場合は PBS で色出し 2~3 分	
水洗後脱水, 透徹, 封入	

が, 実際には感度が上がりやすく, 非特異的な反応が高いことから, 最近ではあまり用いられていない.

3-2) ABC 法 と LSAB 法: Avidin-biotin complex (ABC) 法は avidin (現在では streptavidin が使用されることが多い) と biotin の間に形成される非常に強固で特異的な結合を利用した免疫染色法である. 複数の反応基を持つ avidin と複数カ所で biotin 化された HRP をあらかじめ適当な割合で混合し, 多数の HRP を含み, 一方で avidin の未反応基を残す格子状の ABC が形成される. 二次抗体に標識された biotin とこの ABC を反応させる方法である. この方法は, 抗原抗体反応と avidin-biotin 反応を組み合わせたものであり, 非常に感度の良い方法として知られている. Biotin 化二次抗体を反応させた後, ABC の代わりに HRP 標識 streptavidin (labeled streptavidin: LSA) との反応を行うものが LSAB 法である. LSAB 法は浸透性に優れ染色感度も良く, 非特異的反応が少ないことから広く用いられている方法である. これらの方法は二次抗体に標識されている biotin の特異的な結合を利用するため, 組織中に内在している内因性

biotin のブロックが必要である. ABC 法は汎用されることが多く, 酵素抗体法の基本となるためその手順を表に示す.

3-3) 高分子ポリマー試薬を用いた免疫染色法: 直接法の EPOS と同様に, 高分子ポリマーに HRP と今度は, 一次抗体ではなく二次抗体を多数結合させた試薬であり, 間接法を応用した高感度な免疫染色法である. 染色法は, 基本的には従来の間接法と同様であり, 一次抗体反応後に二次抗体としてこれらの高分子ポリマー試薬を反応させる. 染色感度は従来の LSAB 法より高い. また, avidin-biotin 反応を利用しないため内因性 biotin を block する必要がない. DAKO 社からの EnVision (デキストランポリマーを使用) やニチレイ社からのシンプルステイン (アミノ酸ポリマーを使用) が開発され, 組織浸透性を考慮し, 高分子ポリマーの分子量を小さくした Envision+ (DAKO 社), ImmPRESS Regent (Vector 社) やシンプルステイン MAX (ニチレイ社) も市販されている.

3-4) タイラミドを用いた免疫染色法: Biotin 標識タイラミドを ABC 法と組み合わせる超高感度な CSA

(catalyzed signal amplification) 法が開発されている。ABC法と同様に一次抗体, biotin 標識二次抗体との反応後にABCとの反応を行い複合体を形成させる。次にbiotin 標識タイラミドを過酸化水素存在下で反応させることでperoxidase との触媒作用によって多数のタイラミドを抗原の周囲に付着させる。これらの多数のタイラミドに標識されているbiotin に再びHRP 標識streptavidin を反応させることで増幅する。免疫染色のキットとしてDAKO社からはCSAキットが, NEN Life Science社からはTSAキットが市販されている。この方法は間接法に比して500~1,000倍, ABC法とは100倍の検出感度の増幅が期待され, 微量な抗原に対して威力を発揮し, ほかの方法では検出困難な微量な抗原の検出に優れている。しかし, 非特異的な反応も強くなるため, 内因性peroxidase 活性や内因性biotin 活性の十分な不活化処理が必要となる。

現在ではラットで作製されたモノクローナル抗体も市販されるようになったが, 一般的にはモノクローナル抗体はマウスで作製されている。動物実験でマウスを用いている場合は, 血清中のマウスIgGが二次抗体で用いる抗マウスIgGと反応し, 非特異的反応が強くなる。マウス血清との交差反応を阻止するためのキットも発売されている。以上の直接法, 間接法, 増感法ともにすべての免疫染色法には特徴があり, 全ての抗体に通用する万能な免疫染色法というものはない。個々の抗体の最適な方法や条件を前もって設定し, 使用に備えることが重要である。

多重染色法

複数の抗原の局在を同一切片上で染色する多重染色法は多種類のタンパク分子の関連を同一切片上で確認することが可能で, 情報量が格段に増える。多重染色は, 異なる抗原の局在を異なる抗体で同定し, 異なる色彩に染色する必要がある(図2, 3)。

蛍光抗体法と酵素抗体法による多重染色にはそれぞれ特徴がある。蛍光抗体法の直接法が最も特異性に優れた方法である。しかし, 蛍光色素が標識されている抗体には限りがあり, また, 直接法で満足いく蛍光強度が得られない場合も多いことから, 実際には間接法により蛍光強度を増幅した二重染色が行われることが多い。フローサイトメトリー用に調整された標識抗体は蛍光顕微鏡で十分な蛍光強度が得られないことも多い。酵素抗体法では蛍光抗体法を用いた多重染色とは異なり, 標本の全体像の観察が光学顕微鏡で行うこと

が可能で, 長期間の保存もできる。しかし, 詳細な抗原の同定には適していない。多重染色においても蛍光抗体法と酵素抗体法の特徴を良く理解して, 使い分けをする必要がある。

多重染色で重要なことは, 異なる抗原を交差反応なく異なる色調に明瞭に染め分けることである。特に, 間接法や増感法で行う場合は, 異なる一次抗体を認識する際に交差反応が起こらないように注意をする。一次抗体は標識された二次抗体の関係からIgGのサブクラスの異なるモノクローナル抗体, モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組み合わせ, 動物種の異なるポリクローナル抗体とポリクローナル抗体の組み合わせで行うことが望ましい。しかし, 特異抗体が同じ動物種で作られているものしか手に入らない場合もある。この場合は第一の抗原染色後に0.1Mグリシン塩酸緩衝液(pH2.2)や0.1N塩酸で1~2時間洗浄し, 反応した抗体を遊離, 溶出する⁶。しかし, 反応産物を完全に遊離することは困難なことにも注意が必要がある。ホルマリン固定を用いた酵素抗体法の場合に最初の抗原染色の後に加熱処理を施すことで抗体分子の抗原性と酵素の不活化が同時に行える方法も報告されている⁷。

多重染色では, 抗原ごとに異なる色調に染色する必要がある。蛍光抗体法の場合には緑色に発色するFITCと赤色に発色するRhodamine, PE, Texas-red, Cy3を標識した抗体を用いることが多く, 必要に応じて青色に細胞核を染色するDAPIまたはHoechstを用いて三重染色を行う。研究分野で多重染色を行う場合は, 蛍光抗体法で染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で観察する方法がよく用いられる。酵素抗体法の場合の可視化には, 同一酵素を組み合わせる方法と複数の酵素を組み合わせる方法がある。同一酵素を用いても発色剤を変えることにより二重染色が可能であるが, 交差反応を避ける意味で, 異なる酵素を用いる方が無難である。標識酵素としては一般的にHRPとalkaline phosphatase (AP) が用いられることが多い。多くの発色剤が各社から簡便なキットとして発売されている。一般にHRPの発色剤として3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)の茶色とAPの発色剤として青色の5'-bromo-4-chloro-3-indoxyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT)や赤色を呈するNew fuchsinやFast redの組み合わせがよく用いられる。最近では, 二重染色用の二次抗体のポリマーカクテル(HRP標識抗マウス免疫グロブリンポリマー+AP標識抗ウサギ免疫グロブリンポリマー)も市販され, 操作の煩雑さも解消されてきている。

連続切片を応用した切片の鏡面切片法(ミラー切片法)

前処置が異なる場合や同じ動物種で作製された異なる一次抗体が交差反応を起こしてしまう場合など一枚の切片での2重染色ができない場合には、連続切片による染色で同一部位での染色性を確認する。同一細胞の観察など薄切の厚さの数 μm の差で場所が変わってしまう場合は、切片を鏡面(初めの薄切切片は裏面にしてガラススライドに乗せ、次の薄切切片は表面をガラススライドに乗せることで鏡面になる)でガラススライドに乗せることで、理論的には同一薄切面を染色することが可能になる。鏡面切片法の場合は画像の取得にコツがいるが、バーチャルスライドで得られたデジタル画像を反転することで容易に同一部位の観察が可能となる。

おわりに

特異性および高感度な免疫組織化学染色は、形態研究の分野において欠くことができない手法になっている。今回はそれぞれの抗体については触れていないが、同一の抗原に対する抗体であっても、ポリクローナルやモノクローナルの抗体があり、また製造会社やモノクローナルのクローンも異なり、それぞれの抗体によって染色態度も異なることも多い。ホルマリン固定によって使用できなくなる抗体も数多く存在し、前処置や染色法も個々の抗体で異なる。文献に報告されているからといって、同一の結果が得られないこともしばしば経験する。すべての抗体、抗原に対して万能

な染色法は現在のところ存在しない。常に安定した再現性のある成績を得るためには、確実に染色可能な抗体の選択、固定法や最適な染色条件を、前もって個々の抗体について設定しておく準備が重要である。今回は酵素抗体法の原理と手技を中心に概説した。若手研究者における今後の研究の発展に役立つことを期待する。実際の研究での詳細やコツは文章では伝え難い。大切なことは、直接、研究室に尋ねてきて頂くのが一番である。

文献

1. 新井孝司, 片岡光枝, 桑原尚美, 益田幸成, 清水 章: 腎生検の光顕観察: 光学顕微鏡標本の作製. *Nephrology Frontier* 2009; 8: 375-380.
2. 新井孝司, 片岡光枝, 桑原尚美, 益田幸成, 清水 章: 腎生検の光顕観察: 光学顕微鏡標本の各種染色. *Nephrology Frontier* 2010; 9: 75-84.
3. 益田幸成, 石川吾利美, 清水 章: Essential Pathology: 電子顕微鏡による腎生検組織の観察: 特殊電子染色の有用性とその用法. *Nephrology Frontier* 2009; 8: 176-185.
4. 益田幸成, 石川吾利美, 清水 章: Essential Pathology: 電子顕微鏡による腎生検組織の観察: 正常構造. *Nephrology Frontier* 2009; 8: 302-309.
5. Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT: Diagnostic immunopathology (Colvin RB, Bhan AK, McCluskey RT eds), 2nd edition, 1995; Reven Press, New York.
6. 渡辺慶一, 中根一穂: 酵素抗体法. 第4版, 2002; 学際企画 東京.
7. 青木 潤, 難波紘二, 山本津由子: 熱湯処理による多重免疫染色法. *病理と臨床* 1996; 14: 1533-1536.
8. Ishizaki M: An absence of the collagen type IV $\alpha 5$ chain in Alport syndrome. *J Nippon Med Sch* 2002; 69: 40-41.

(受付: 2010年4月28日)

(受理: 2010年5月21日)