

2. 組織細胞化学シリーズ (若手研究者へのヒント)

最近の免疫組織化学賦活法 (6)

並松 茂樹 杉崎 祐一 土屋 眞一

日本医科大学付属病院病理部

2. Histochemistry Series

A New Antigen Retrieval Method (6)

Shigeki Namimatsu, Yuichi Sugisaki and Shinichi Tsuchiya

Division of Diagnostic Pathology, Nippon Medical School Hospital

Abstract

Current antigen retrieval techniques include the use of citrate buffer, Tris-HCl containing 5% urea, and EDTA solutions combined with heating in a microwave oven or autoclave. These methods must be adjusted for a given tissue or antigen. To improve the efficiency of antigen retrieval for immunohistochemical staining, we developed a new method using citraconic anhydride. We describe this new antigen retrieval method using 0.05% citraconic anhydride solution of pH 7.4 and heat. This antigen retrieval method produced satisfactory staining results for a wide variety of antigens.

(日本医科大学医学会雑誌 2010; 6: 178-184)

Key words: antigen retrieval, citraconic anhydride, immunohistochemistry

はじめに

今回は、免疫組織化学賦活法 (一般的には抗原賦活化ともいう) (unmasking, antigen retrieval, epitope retrieval) の技術について解説します。

免疫組織化学を行うのに必要な前処理としての賦活化

十分に固定した (本シリーズ第一回目の光学免疫組織化学の基礎: 固定と凍結切片を用いた蛍光免疫組織化学 (1))¹ 組織をパラフィン包埋 (パラフィンブロック標本の作製: 永久保存を可能にする標本) し、ミクrotームで3 μmの厚さに薄切、免疫染色を行った場

合 (本シリーズ第五回目の病理標本における免疫組織化学の基礎 (5))² ほとんどの一次抗体は抗原と反応することなく染色は失敗に終わります。その理由は、固定にあります。一般に普及している固定液はアルデヒド基を含んでおり、このアルデヒド基は、タンパク質やアミノ基と求核反応 (アミノ酸残基との反応)、化学反応 (末端アミノ基との反応)、メチレン架橋 (アミノ酸残基末端と結合しヒドロメチル基によりアミノ酸残基と連結) 反応を起こすことで組織細胞の形態を保持しています。とくに、メチレン架橋には非常に安定した強固な固定作用があるため、蛋白質である抗原を失活させ、抗原抗体反応が起こりにくくさせてしまいます (マスキングと言う)。

抗原を失活させずに免疫染色をするには、未固定の

Correspondence to Shigeki Namimatsu, Division of Diagnostic Pathology, Nippon Medical School Hospital, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8603, Japan

E-mail: namimatsu@nms.ac.jp

Journal Website (<http://www.nms.ac.jp/jmanms/>)

組織を用いればよいのですが、未固定の組織は取り扱いが煩雑で、組織を低温のフリーザーに凍結した状態で保管する必要があります。しかも、凍結状態でも徐々に抗原性の低下が生じます。同じ組織を繰り返し利用する場合には、その度に人工的修飾（アーティファクト）が加わっていき、情報量・質の低下を避けられません。本シリーズの第五回目（5）²に記載されているように、実験材料であれば、凍結組織とホルマリン固定パラフィン包埋組織を用意することで、形態情報と免疫反応情報がある程度までは補完することはできます。しかし永久標本であるパラフィン切片に含まれるマスクされた検索対象物質の抗原性を何らかの方法で元に戻すこと（抗原の賦活化）ができれば、得られる情報の質はより高まるであろうと考えられます。

特に人体の組織を扱う病理の領域では、病変・病態の解析に大きな力を発揮します。病理検体のほとんどは、光顕レベルであればホルマリン、電子顕微鏡レベルであればグルタルアルデヒドで固定された形で永久保存されているため、何十年前の組織であっても新たに開発された抗体を用いて検索することが可能です。

抗原賦活化の種類と方法

先に述べましたように、アルデヒド基における抗原性を失活させる主な作用はメチレン架橋です。このメチレン架橋を壊してしまえば、抗原性の活性が戻るであろうと考えられます。

まず考えられたのは、蛋白分解酵素を用いてアルデヒド基と反応している特定のアミノ酸残基のペプチド結合を加水分解により切断・メチレン架橋を破壊して抗原の活性を元に戻すことでした。

この蛋白分解酵素による賦活化には、抗原決定基を構成しているアミノ酸の部分に作用した場合、逆に抗原性が失活してしまうという欠点もあります。染色する抗原に対して、蛋白分解酵素の種類や、濃度、反応温度や反応時間の設定が重要となります。

次に考えられたのは、お湯の中で切片を煮ること（加熱による加水分解）でした。これはアルデヒド基により形成されたメチレン架橋が、加熱することで構造の解離を起こし、抗原の活性を戻そうとする考えです。

この加熱による抗原賦活化が、現在の主流です³⁴。

加熱の方法は、温浴（恒温槽、電気ポット）、マイクロウェーブ（電子レンジ）、オートクレーブ、プレッシャークッカー（圧力釜）などがあります。

加熱に使う溶液は、蒸留水、クエン酸緩衝液（pH6.0, pH7.0）、トリス塩酸緩衝液（pH9.0~11.0）、トリス

EDTA 緩衝液、EDTA、尿素水溶液（pH9.0）のほか、各メーカーが工夫した抗原賦活化液があります。これらの加熱方法と溶液の組み合わせは、扱う抗原により条件が多様で、使い分けが必要です。また核内抗原か、膜抗原かによっても条件が異なります（Table 1）。これらが現在まで行われてきている抗原賦活化の技術です。

著者らが所属している付属病院病理部では、100種類を超える一次抗体を用いて、年間12,000枚を超える免疫染色を実施しています。免疫染色の対象となる抗原の数は、1日平均で50種類を超えます。作業の煩雑さ、時間の制約もあり、既存の賦活化法を組み合わせることで多くの抗原に対応することは、日常作業としては非現実的です。そこで、簡単でしかも安定した染色性が得られる方法がないかと、著者らが検討・考案した方法について紹介します。

最近の免疫組織化学賦活化

基本は熱処理と抗原賦活化溶液を用いる前述の方法と同じで、電気ポットを用い、抗原賦活化溶液として、citraconic anhydride, CCA（無水シトラコン酸（無水メチルマレイン酸））を用いる方法です⁵。

抗原賦活化の手順

I. 光学顕微鏡レベル

1. パラフィンブロックの作製と切片の準備

組織をモノアルデヒド基を含む固定液（10%、20%ホルマリン溶液固定液）で固定、脱水、透徹しパラフィンに包埋。パラフィンブロックを3μmに薄切し、剝離防止剤付きスライドガラスに貼付し、伸展板にて十分乾燥させる。70℃ 孵卵器内にて30分間パラフィンを溶解させる（剝離防止の強化）。

キシレンで脱パラフィンした後、アルコールでキシレンを除去し水洗を行う。

切片は蒸留水またはイオン交換水の中に保持しておく。

2. 賦活化の方法

準備するもの

98℃に保温できる3Lの電気ポット、0.05%、pH7.4の無水シトラコン酸水溶液。無水シトラコン酸水溶液（抗原賦活化剤）は作製に手間がかかるため、著者らは、無水シトラコン酸水溶液を200倍に濃縮した製品（製品名イムノセイバー：日新EM社）を購入し、使用時に蒸留水またはイオン交換水で200倍に希釈して用います（緩衝液で希釈すると抗原賦活化の効果が低下しやすい）。

Table 1 一次抗体と賦活剤の比較

一次抗体	種類	クローン名	会社名	クエン酸緩衝液	Tris-HCl+5% Urea	EDTA	TRS	Enzyme	CCA
CD1a	mono	O10	Immunotech						●
CD2	mono	AB75	Novocastra			●			●
CD3	poly	Rabbit	DAKO	●			●		●
CD4	mono	1F6	Novocastra	● pH7		●			●
CD5	mono	4C7	Novocastra	●		●			●
CD7	mono	CD7-272	Novocastra	●					●
CD8	mono	C8/144B	DAKO				●		●
CD10	mono	56C6	Novocastra	●					●
CD15	mono	Leu-M1	Becton Dickinson						●
CD20	mono	L26	DAKO	●			●		●
CD21	mono	2G9	Novocastra	●					●
CD23	mono	1B12	Novocastra	● P					●
CD25	mono	4C9	Novocastra	● P					●
CD30	mono	Ber-H2	DAKO	●		●	●		●
CD34	mono	NU-4A1	ニチレイ						●
CD35	mono	RLB25	Novocastra			●			●
CD38	mono	SPC32	Novocastra	●					●
CD43	mono	MT-1	Bio-Science				●		●
CD45	mono	2B11+PD7/26	DAKO	●					●
CD45RA	mono	MB-1	生化学工業						●
CD45RO	mono	UCHL-1	DAKO	●			●		●
CD56	mono	1B6	Novocastra	● P					●
CD57	mono	Leu-7	Becton Dickinson						●
CD68	mono	KP-1	DAKO	●					●
CD68	mono	PGM-1	DAKO	●					●
CD74	mono	LN2	ニチレイ						●
CD79a	mono	JCB1117	DAKO	● A			●		●
CD99	mono	12E7	DAKO						●
CD117	poly	Rabbit	DAKO						●
Keratin, wide	mono	Z622	DAKO					●	●
CAM5.2	mono		Becton Dickinson					●	●
CK7	mono	OV-TL 12/30	DAKO	● M			●		●
CK20	mono	Ks20.8	DAKO	●			●		●
HMW	mono	34βE12	DAKO				●		●
CA125	mono	M11	DAKO	●					●
CyclinD1	mono	P2D11F11	Novocastra			●		●	●
c-erb B2	poly		ニチレイ	● AM					●
GCDFP-15	mono	23A3	Novocastra	● P					●
ER	mono	1D5	DAKO				● High pH		●
PgR	mono	PgR636	DAKO	●			●		●
Ki-67	mono	MIB-1	DAKO	●		●	●		●
P53	poly	Rabbit	Novocastra	●					●
P63	mono	4A4	DAKO		●	●			●
P80	mono	5A4	Novocastra	● P					●
PCNA	mono	PC10	DAKO	●					●
IgA	poly	Rabbit	DAKO					●	●
IgG	poly	Rabbit	MBL					●	●
IgM	poly	Rabbit	DAKO					●	●
κ chain	poly	Rabbit	DAKO					●	●
λ chain	poly	Rabbit	DAKO					●	●
Melan-A	mono	A103	DAKO	●			●		●
MiTF	mono	Ab-3 (5+D5)	NeoMarkers						●
Hepatocyte	mono	OCH1E5	DAKO	●					●
SP-A	mono	PE-10	DAKO						●
TTF-1	mono	8G7G311	DAKO	●					●
TdT	mono	SEN28	Novocastra	●					●
Factor VIII	mono	F8/86	DAKO	●			●		●
bcl-2	mono	123	DAKO	● A		● A			●
Granzyme β	mono	11F1	Novocastra	● P					●
TIA-1	mono	2G9	Immunotech						●
LMP-1	mono	CS1-4	DAKO	●		●	●		●
Calretinine	poly	Rabbit	Zymed	●		●			●
D2-40	mono	D2-40	Signet	●					●

TRS : Target Retrieval Solution (DAKO 社製抗原賦活剤) A : オートクレーブ M : マイクロウェーブ P : プレッシャクッカー (圧力釜)

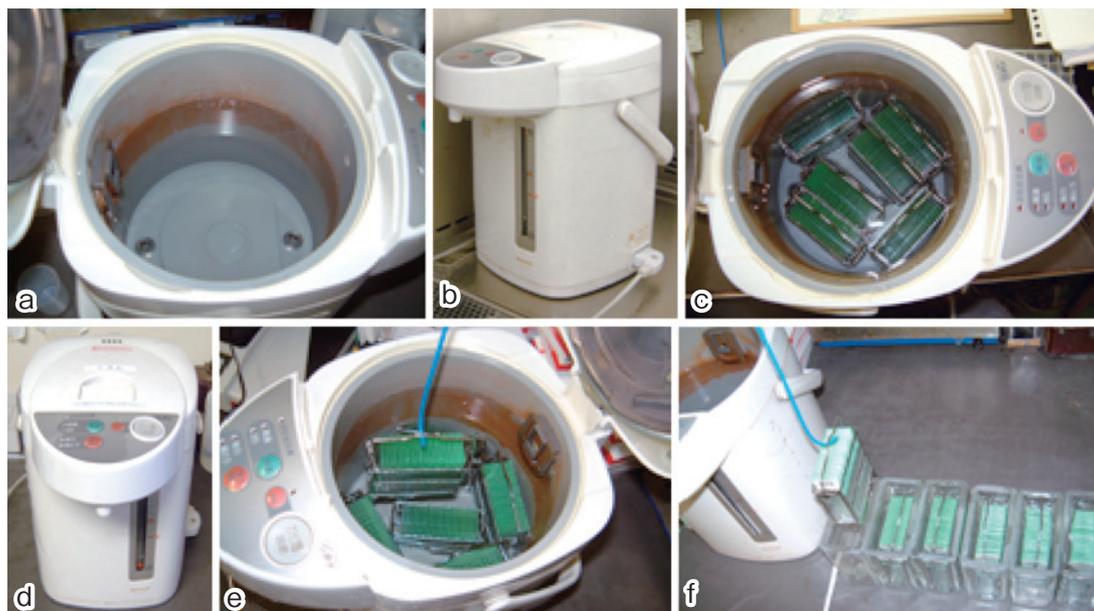


Fig. 1 Fill a kitchen electric pot with IS. Heat to boiling. Transfer the slides in staining racks into the pot. Set the pot at keep warm temperature mode for 45 min. Transfer the slides to buffer solution.

3. 賦活化の手順 (Fig. 1)

(1) 電気ポットに、3Lのラインまで0.05%、pH7.4の無水シトラコン酸水溶液を満し、電源を入れる。

(2) 水溶液を沸騰させた後、98℃の保温状態(3Lで約30分かかる)にしたポットに、切片をセットした金属カゴを切片を馴染ませながら沈め(半回転を繰り返しながら)45分間静置。

(3) 45分後に金属カゴを取り出し直ちに水洗し(ほかの熱処理法と違って、20分かけて液温を下げる必要はない)、水洗後直ちにバッファーに浸す。

(4) 通常の免疫染色操作。

以上記載したように、抗原賦活化の手技は非常に簡単で、特に高等な技術は必要ありません。

この抗原賦活化は万能ではありませんが、多くの抗原に有効です。(Table 1のCCAの欄参照)

II. 電子顕微鏡レベル

次にジアルデヒド基を含む固定液、2.5%グルタルアルデヒド固定液により処理した組織の対応について述べます。

グルタルアルデヒドは、アルデヒド基を2つ持つ2官能性化合物であるために、固定組織中に遊離したままのアルデヒド基が残り、抗体のアミノ基と非特異的に反応してしまいます。そのため、免疫組織化学用の固定液としては通常使用されることはあまりありませんが(免疫電顕についての詳細は、本シリーズ第一回目の免疫電子顕微鏡法の基礎(3))⁶、電子顕微鏡の標準的固定法であるグルタルアルデヒドにより固定

した組織でも、無水シトラコン酸による賦活化により、研究対象とすることが可能になります。

1. 包埋前染色 (Pre-embedding method)

著者が第34回臨床電子顕微鏡学会で発表した方法を紹介します。(この一部は、当時留学生であった戴威先生が論文⁷にまとめています。)

(1) 組織を切り出し、細切(1mm×2mm×1mm)

(2) 2.5%グルタルアルデヒドで固定(4℃3日まで可:3日以上はデータなし)

(3) リン酸緩衝液で洗浄

(4) 10%→20%→30%と段階的に濃度を上げた蔗糖加リン酸緩衝液(4℃)に一晩浸漬

(5) 組織をOCTコンパウンドに包埋しアセトンドライアイスで凍結

(6) クライオスタットで6μmの凍結切片を作りシランコートガラスに貼付

(7) 室温で30分間切片を乾燥

(8) リン酸緩衝液で洗浄

(9) 0.1%セミカルバジド水溶液で1回洗浄

(10) 0.1%セミカルバジド水溶液に1時間静置(余分なアルデヒド基をブロックし非特異反応を阻止)

(11) リン酸緩衝液で洗浄

(12) 0.05%pH7.4無水シトラコン酸水溶液(イムノセイバーを使用時に200倍希釈)で1回洗浄後、新しい0.05%pH7.4無水シトラコン酸水溶液で賦活化(70℃の恒温槽で16時間反応)

(13) リン酸緩衝液で洗浄

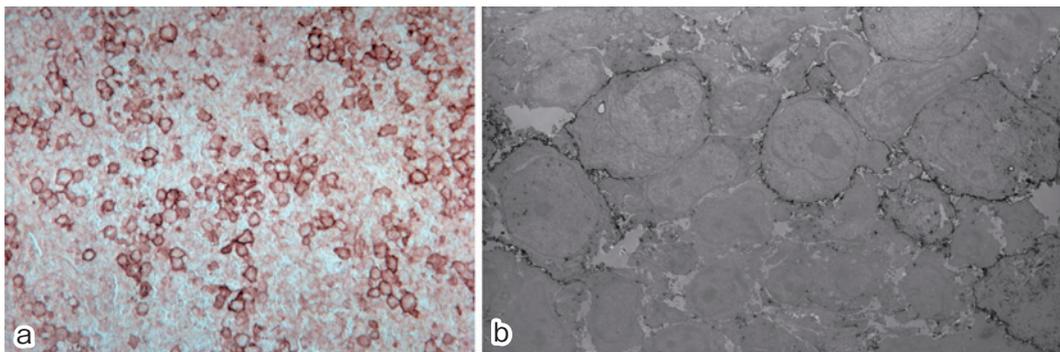


Fig. 2

(14) 免疫染色（本シリーズ第五回目の病理標本における免疫組織化学の基礎 (5)）²

(15) 2.5% グルタルアルデヒドで再固定

(16) リン酸緩衝液で洗浄

(17) 2% オスミウムで後固定

(18) 脱水

(19) エポキシ樹脂に包埋

(20) 薄切し電顕観察

Fig. 2 は病理部において、リンパ節生検で採取されたリンパ節標本を包埋前染色 (Pre-embedding method) の技法を用いて、抗 CD30 抗体を用いて染色を行ったリンパ腫の標本です。

Fig. 2a は、染色後エポキシ樹脂に包埋し重合した後、光学顕微鏡にスライドガラスをセットしブロックを倒立させ観察した像です。細胞の周りに褐色に陽性反応が見られます。

Fig. 2b は、包埋したブロックを、超薄切片法を用いてシルバーゴールドの厚さに薄切した切片を、グリッドメッシュに貼付し、無染色で電子顕微鏡観察した像です。CD30 陽性と思われる細胞の周りに黒く染色反応が見られます。

2. 包埋後染色 (Post-embedding method)

エポキシ樹脂包埋後、薄切した後の染色法について、獨協医科大学越谷病院医学総合研究所 (発表当時) の黄海文昌先生が考案した方法を紹介します。

(1) 通常電子顕微鏡標本を作製

(2) 超薄切片を作製しグリッドメッシュに載せる

(3) 抗原性の賦活化

ドーゼにイムノセーバー原液 (50 mL) を入れ、95°C に達するまで MW 装置にて加温 (MW 照射条件: 出力: 250W)。

95°C に達したドーゼの中に直ちに超薄切片を載せたグリッドメッシュを浸し、250W で間歇照射 15 分 (5 秒照射 2 秒停止、液温 95°C)

照射後 30 分間放置し、電顕免疫染色を施行

(4) 免疫電顕染色: Immuno-Gold 法

一次抗体: Glucagon Rabbit polyclonal antibody

二次抗体: Immuno Gold EM Goat anti-Rabbit IgG-15

1) グリッドメッシュを 1% BSA/TBS の水滴中に浸漬 (5 分)

2) グリッドメッシュを一次抗体、水滴中に浸漬して反応 (一昼夜)

3) グリッドメッシュに TBS を滴下して抗体を洗浄 (1 分×6 回)

4) グリッドメッシュを二次抗体、水滴中に浸漬して反応 (30 分)

5) 3) 同様の操作で洗浄

6) 2% グルタルアルデヒドで固定 (5 分)

7) 蒸留水で洗浄、余分な水分を吸い取り乾燥

8) 電子染色: 2% 酢酸ウラン液 (3 分)、クエン酸鉛液 (1 分) 後検鏡

Fig. 3 は、包埋後染色 (Post-embedding method) 技法を用いて抗グルカゴン抗体で染色した電子顕微鏡写真です。(写真提供: 黄海文昌先生) Immuno-Gold の顆粒が陽性に見られます。

抗原賦活化の原理について

抗原賦活化剤に用いた無水シトラコン酸は、Dixon⁸ の報告にあるように、化学的修飾作用シトラコニル化作用をもつ試薬です。加温によりメチレン架橋に対する加水分解が進み、同時にシトラコニル化すなわち二重結合 (シス型) を持つ無水シトラコン酸が加水分解によってメチレン架橋が外れたリジンのアミノ基に作用、脱アシル化が行われます。無水シトラコン酸が抗原性を回復したアミノ基を保護することで熱に対して安定となり、抗原性を回復したアミノ基に対する過剰の加水分解が阻止されと考えられます。脱アシル化後は、元のアミノ基と構造や機能の点で全く変わらない状態になり、多くの抗原が限りなく元の状態すなわち賦活化されると考えられます (**Fig. 4**)。以上の過程は、universal な反応であり、多くの抗原において再

4. Pasha T, Montone KT, Tomazewski JE: Nuclear antigen retrieval utilizing steam heat. *Lab Invest* 1995; 72: 167A.
5. Namimatsu S, Ghazizadeh M, Sugisaki Y: Reversing the Effects of Formalin Fixation with Citraconic Anhydride and Heat: A Universal Antigen Retrieval Method. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2005; 53: 3-11.
6. Ozawa H, Matsuzaki T : 2. *Histocytochemistry Series The Fundamentals of Immunoelectron Microscopy* (3). *日医大医学会誌* 2009; 5: 215-220.
7. Dai W, Sato S, Ishizaki M, et al.: A new antigen retrieval method using citraconic anhydride for immunoelectron microscopy: localization of surfactant pro-protein C (proSP-C) in the type II alveolar epithelial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2004; 36: 219-224.
8. Dixon HBS, Perham RN: Reversible blocking of amino groups with citraconic anhydride. *Biochemical J* 1968; 109: 312-314.
9. Greg T, Hermanson: *Bioconjugate techniques* (2ND). *Academic Pr* 2008; 4: 109.
10. Alelú-Paz R, Iturrieta-Zuazo I, Byne W, et al.: A New Antigen Retrieval Technique for Human Brain Tissue. *PLoS ONE* 2008; 3: e3378.
11. Sakamoto A, Murata K, Suzuki H, Yatabe M, Kikuchi M: Immunohistochemical Observation of Co-expression of E- and N-cadherins in Rat Organogenesis. *Acta Histochem Cytochem* 2008; 41: 143-147.
12. Shi SR, Liu C, Taylor CR: Standardization of Immunohistochemistry for Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Sections Based on the Antigen-retrieval Technique: From Experiments to Hypothesis. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 2007; 55: 105-109.
13. Shi S-R, Liu C, Young L, Taylor C: Development of an optimal antigen retrieval protocol for immunohistochemistry of retinoblastoma protein (pRB) in formalin fixed, paraffin sections based on comparison of different methods. *Biotechnic & Histochemistry* 2007; 82: 301-309.
14. Phanomsri E, Waraasawapati S, Khunmee S: Multiple immunofluorescence labeling of the same section of invasive ductal breast cancer: A preliminary study. *Journal of Medical Technology and Physical Therapy* 2009; 21.
15. Leong A S-Y, Haffajee Z: Citraconic anhydride: a new antigen retrieval solution. *Pathology* January 2010; 42: 77-81.

(受付 : 2010 年 8 月 20 日)

(受理 : 2010 年 9 月 9 日)