

病気の原因となる細胞やタンパクの局在を検索するための 免疫二重染色法について

磯山茂美

筑波大学人間総合等教育研究支援室（医学系）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

免疫染色法は分子レベルで病理組織の検索を可能にする点で、きわめて重要な技術である。今回私が検討した免疫二重染色法は、組織切片上で複数の分子の局在を同定できるので、特に有用性が高い。目標とする分子（抗原）の存在を可視化するためには、検出に用いる抗体を、酵素または蛍光物質で標識する必要がある。前者は酵素抗体法、後者が蛍光抗体法である。本研究では、免疫二重染色について、酵素抗体法と蛍光抗体法の長所と短所を検討した。

酵素抗体法では至適条件の設定に時間を要するが、組織全体の把握に優れていた。一方、蛍光抗体法は染色条件の設定が容易であり、また共焦点レーザー顕微鏡を用いることにより、細胞内の微小器官レベルで抗原の局在を精密に決定することが可能であった。

1. はじめに

病気の原因を知るために、ある特定の細胞やタンパク質が体内のどこに存在するか検索することは重要である。小児科研究室では病的タンパクの存在部位を病理組織学的に検討することで、先天性疾患の診断に役立っている。

免疫染色法とは、免疫（抗原-抗体）反応を利用して、特定の物質（抗原）の存在部位を明らかにする方法である。実際には組織切片に抗体をかけて抗原と結合した抗体の存在部位を染め出し、顕微鏡で観察する。この方法により、分子レベルで組織切片の観察が可能になる。

抗体を目で見えるようにするために、種々の物質で標識された抗体を使用する。ペルオキシターゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素で標識された抗体を用いて、光学顕微鏡により明視野で観察する方法を酵素抗体法と呼ぶ。蛍光物質で標識された抗体を用いて蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡などで観察する方法は蛍光抗体法である。重金属で標識すれば、電子顕微鏡による観察も可能である。

さらに同一切片上で複数の物質を同定する場合に多重免疫染色法が用いられる。この場合には異なる標識物質や、酵素反応の基質を変えることによって、2種類以上の抗体を識別し、複数の目的物質の存在部位を染め分けることが可能になる。技術的な制約から二重染色法が多用されている。

2. 目的

光学顕微鏡レベルで免疫二重染色を行う方法として、通常の光学顕微鏡で観察する酵素抗体法と、蛍

光顕微鏡で観察する蛍光抗体法がある。本研究では、この両者を行い、その長所、短所を検討したので報告する。

3. 方法

酵素抗体法（二重染色）

パラフィン切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシターゼのブロッキングを行い、一次抗体を反応させた。洗浄後、ペルオキシターゼで標識された二次抗体を反応させた後、ニッケル-ジアミノベンジジン（DAB）で発色させた（1回目の染色、青色に発色）。さらに別の抗原を検出するために、異なる特異性を有する一次抗体、二次抗体と反応させ、DABで発色させた（2回目の染色、茶色に発色）。封入後、顕微鏡で観察した。

蛍光抗体法（二重染色）

パラフィン切片または凍結切片を用い、二種類の異なる動物種由来の抗体を混合した一次抗体と反応させた。洗浄後、Cy3、Alexa488等で蛍光標識された二次抗体を混合して反応させた。洗浄後封入し、蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

免疫染色法における条件設定には、まず陽性、陰性コントロールを用意して、内因性ペルオキシターゼのブロッキング法や抗原賦活化法の選択、一次抗体の希釈倍率、二次抗体の特異性の検討を行った。さらに種々の切片を用いて、酵素抗体法と蛍光抗体法の違いを検討した。

3. 結果と考察

染色法についての検討

酵素抗体法では、

1. 内因性ペルオキシターゼをブロッキングするために過酸化水素の濃度や反応時間を変えて検討する必要があった。
2. パラフィン切片では、しばしば抗原性が低下しており、このため抗原の賦活化が必要な場合が多かった。抗原賦活化法には、マイクロウェーブ処理とプロテアーゼ K 処理を用いた。一次抗体の種類ごとにどちらが適切か検討し、さらにその至適条件を決めるために、マイクロウェーブの温度や時間、プロテアーゼ K の温度、反応時間を細かく検討する必要があった。しかもこの条件設定は、標本ごとに変える必要があった。
3. 一次抗体の濃度は、陽性コントロールと陰性コントロールを見比べながら、細かく検討し

た。

一方、蛍光抗体法では1は不用で、2ではマイクロウェーブ処理のみが可能で、検討項目が少なく、3の一次抗体の希釈濃度も、細かく検討する必要がなかった。

顕微鏡観察での検討

酵素抗体法では、通常の明視野下での観察が可能であり、組織の構築の全体像が容易に把握できた。さらに対比染色を行えば、説得力の高い像が得られた。また、標本は長期間保存が可能であった。

蛍光抗体法では、見慣れていないと、組織の全体像の把握が困難であった。しかし、抗原の局在を精密に決定することが可能であった。特に、コンピューターを用いて異なるフィルターで撮影した写真を重ね合わせるにより、二種類の抗原が同じ場所に存在するのか、異なる場所に存在するのか明瞭に示すことができた。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いれば、細胞内の微小器官のレベルで、抗原の局在を決定することが可能であった。

以上から、酵素抗体法は組織レベルでの観察に、蛍光抗体法は細胞レベルでの観察に有用な免疫二重染色法であることが判明した。

参考文献

- [1] 組織細胞化学、日本組織細胞化学会編
- [2] R. Sumazaki, N. Shiojiri, S. Isoyama et al., Conversion of biliary system to pancreatic tissue in Hes1-deficient mice. Nature Genetics 36 (2004) 83-87.