

# 免疫組織化学を考える： 抗原の賦活化・樹脂包埋試料の免疫電顕

## Immunoelectron Microscopy with the Post-Embedding Method Based on Heat-Induced Antigen Retrieval: Techniques and Mechanisms

山下 修二

Shuji Yamashita

慶應義塾大学医学部病理学教室

**要旨** 近年ではホルムアルデヒド固定によって形成された架橋を加熱によって切断し、エピトープ（抗原決定基）を露出させる抗原賦活化法が免疫組織化学に多用され、抗原の立体構造を保存することが重要であるとの従来の考えを一変させている。本稿では免疫組織化学における固定、加熱によるエピトープの露出のメカニズム、アクリル樹脂包埋およびグルタルアルデヒド・四酸化オスミウム固定・エポソ包埋試料の抗原賦活化を利用した免疫電顕への応用について述べる。さらに免疫組織化学において、各抗体とエピトープの最適な反応条件の選択の重要性について紹介する。

**キーワード**：抗原賦活化、免疫電顕、LR-White 樹脂包埋、エポソ樹脂包埋、抗体の希釈溶液

### 1. はじめに

免疫組織化学は標識した抗体を用いて、組織・細胞内の抗原を顕微鏡下で可視化する手法である。したがって特異的な抗体の使用、形態の保存、抗原性の保存は必須条件である。1980年代半ばまでは、精製した抗原（主としてタンパク質）を動物に投与して得られた抗血清（ポリクローン抗体）が、免疫組織化学に用いられていた。また抗体の特異性の証明にはオクタロニーの二重拡散法や免疫電気泳動など、寒天やアアグロース中での沈降反応が主として用いられていた。沈降反応は未変性のタンパク質の表面に存在する複数の抗原決定基（エピトープ）と、抗体との反応である。したがって免疫組織化学においても酵素組織化学と同様に、タンパク質の変性を避ける温和な固定や組織処理法が望ましいと考えられていた。しかし最近では抗体の作製にはモノクローン抗体や合成ペプチド抗原を用いることが主流になっている。これらの抗体は1つのエピトープに対して抗体が結合するため、沈降反応で抗体の特異性を証明することが困難であり、特異性の証明にはELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) やウエスタンブロット法が主として用いられている。これらの手法では、多くの場合タンパク分子の立体構造の保存を必要とせず、エピトープを露出させて抗体と接触できるようにすることが重視される。したがって免疫組織化学においても、このような抗体の性質を理解し、至適な反応条件を選択するこ

とが重要である。本稿では免疫組織化学における固定と加熱によるエピトープの露出のメカニズム、アクリル樹脂包埋およびエポソ包埋試料の抗原賦活化を利用した免疫電顕への応用について述べる。また光顕・電顕レベルの免疫組織化学における、エピトープと抗体の最適な反応条件の選択の重要性について紹介する。

### 2. 化学固定と加熱による影響

#### 2.1 ホルムアルデヒド

ホルムアルデヒドはリジン、システイン、ヒスチジン、アルギニンなどのアミノ酸の側鎖やアミノ末端と反応して、メチロール基 (-CH<sub>2</sub>OH) を付加する。リジンに付加したメチロール基の一部はシッフ塩基 (イミン) を形成する。シッフ塩基が更にチロシン、トリプトファン、メアルギニン、アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、アミノ末端と結合して、メチレン橋 (-CH<sub>2</sub>-) を形成して架橋する。ホルムアルデヒド処理したBSA (bovine serum albumin), ovalbumin, RNase A (ribonuclease A) などをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析すると、タンパク質分子間に架橋が形成されオリゴマー/ポリマーが得られることが証明される (図1; lane 1, 2)。ホルムアルデヒド処理ではタンパク質の2次構造は保存されるが、脱水によってβ構造が損なわれ、疎水の部分も露出するため分子内および分子間の架橋反応がさらに進行すると報告されている<sup>1)</sup>。しかしホルムアルデヒドによる架橋の多くは可逆的かつ不安定であり、加熱によって開裂する (図1; lane 3)。

〒160-8582 東京都新宿区信濃町35

E-mail: shuji@z5.keio.jp

2014年4月4日受付

## 2.2 グルタルアルデヒド

グルタルアルデヒドは種々のアミノ酸と反応し、速やかにタンパク質を架橋する(図1; lane 4), その架橋反応のメカニズムに関しては十分には解明されていない。グルタルアルデヒドの水溶液はカルボニル基に基づく紫外吸収の極大を280 nmに示すが、共役した二重結合を有する重合物が生じると235 nmに吸収が生ずる。研究者の多くは、グルタルアルデヒド(図2A-a)は他の二価の架橋剤とは異なり、非常に強固な架橋を生じるため、タンパク質はグルタルアルデヒドモノマーの両端のアルデヒド基のシッフ塩基形成によって架橋(図2A-b)されるのでは無く、アルドール縮合によって形成されたオリゴマー/ポリマーが重要な役割をはたしていると考えている。Kawaharaらは蒸留したグルタルアルデヒドは235 nmの吸収を示さないにもかかわらず、微量のアミンを加えると、235 nmの吸収が急増することから、タンパク質のアミノ基やアミノ酸との結合と同時に種々の長さのグルタルアルデヒドポリマー(図2A-d)が形成され、タンパク質との強固な架橋が生じるメカニズムを提唱している<sup>2)</sup>。グルタルアルデヒド固定ではタンパク質の $\alpha$ 構造の30%以上が失われていると報告されている。脱水はホルムアルデヒドと同様に、架橋反応を促進すると思われる。グルタルアルデヒドによる架橋は酸や加熱処理に対して極めて安定であるが(図1; lane 5), その理由は架橋によって形成された $C=C-C=N-R$ が共鳴構造により安定化されるためであると考えられている<sup>2)</sup>。

## 2.3 四酸化オスミウム

四酸化オスミウムは脂質の不飽和(二重)結合に付加し、さらに二重結合を架橋して脂質を固定する反応が良く知られ、電顕による形態観察には必須の固定剤である。タンパク質に対する架橋反応も報告されているが、BSAやRNase Aを四酸化オスミウムと反応させても、オリゴマーはほとんど形成されず、タンパク質の架橋作用はグルタルアルデヒドやホルムアルデヒドに比べ極めて低い(図1; lane 6)。またトリプトファン残基でのポリペプチド鎖の切断、メチオニンやシステインを酸化してメチオニンスルホンやシステイン酸を形成することが知られている<sup>3)</sup>。我々の実験においても、トリプトファンを含まないRNase Aではポリペプチド鎖の切断は認められないが(図1; lane 6, 7), トリプトファンを含むBSAやovalbuminは四酸化オスミウム処理により分解されることが確認された(図1; lane 6)。

## 3. 加熱による抗原賦活化と免疫電顕法

ホルムアルデヒド固定・パラフィン包埋切片の加熱による賦活化は、すでに確立した手法として多様されている<sup>4-7)</sup>。加熱による抗原の賦活化は主として次のメカニズムに基づいていると推測される。①加熱によってタンパク分子内、分子間の架橋(メチレン橋)が切断されて、ポリペプチド鎖が伸展し、エピトープが露出し、抗体との接触が容易になる。②架橋の切断により組織内のタンパク質や核酸などが部分的に抽出

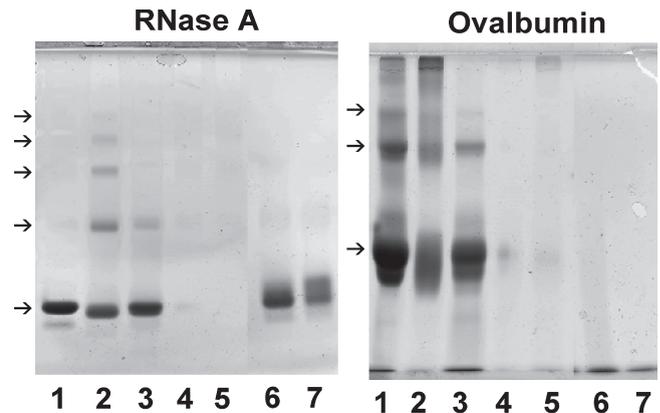


図1 タンパク質の化学固定と加熱の影響

RNase Aとovalbuminを4%ホルムアルデヒド/0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で1時間(lane 2, 3), 2%グルタルアルデヒド/0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で15分間(lane 4, 5), 1%四酸化オスミウム/0.1 Mリン酸緩衝液(pH 7.4)で15分間(lane 6, 7)処理した後、アセトンで沈殿させた。試料の一部は2% SDS/20 mM トリシュー塩酸緩衝液(TB)(pH 9.0)中で10分間オートクレーブ(120°C)をして(lane 3, 5, 7), SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した。RNase Aは14%ゲル, ovalbuminは10%ゲルを用いて分析した。lane 1は未処理のタンパク質, lane 2, 4, 6はオートクレーブ処理をしていない試料を示す。矢印はゲルの先端側からRNase Aの単量体(13.7 kD), 2量体(27.4 kD), 3量体(41.1 kD), 4量体(54.8 kD), 5量体(68.5 kD)とovalbuminの単量体(42.5 kD), 2量体(85 kD), 3量体(127.5 kD)を示す。

されるため、抗体の組織内への浸透が容易になる<sup>5-7)</sup>。しかしこれに対して、立体構造を認識する抗体では、組織の加熱により反応は減弱する。エピトープの露出のために加熱処理のみでは不十分で、免疫組織化学においても2-メルカプトエタノールなどでジスルフィドを還元・切断した後、加熱して完全に立体構造を破壊することが必要な場合もある<sup>8)</sup>。加熱による賦活化はパラフィン切片のみならず、ホルムアルデヒド固定した凍結切片や培養細胞の免疫組織化学にも応用が可能である。

従来の免疫電顕においては、形態と抗原性の保存や抗体の浸透のために、抗原ごとに至適な固定法や組織の処理法を選択することが重視されていた。包埋後染色法では脱水・樹脂包埋を行うためホルムアルデヒド固定のみでは微細構造の保存が不十分である。したがって微細構造の保存のために低濃度のグルタルアルデヒド(0.01%~0.5%)を加えることが多いが、免疫組織化学反応を著しく低下させる。加熱による抗原の賦活化を利用して、同一の固定法と組織処理法で種々の抗原を検出することが可能であることが判明したので紹介する。

### 3.1 標準化固定法<sup>9)</sup>

ホルムアルデヒドのみを固定剤として用いて、以下の方法で微細構造の保存を行った。抗原性も低下するが、加熱によって賦活化される。(a)ホルムアルデヒドに塩化カルシウム、塩化マグネシウムを加える。(b)固定をpH 7.4, 続いてpH 8.5で行う。(c)ホルムアルデヒドを除いた固定液の浸透圧を300~330 mOsmにする。(d)固定温度は室温とする。

固定は以下の手法で行う。①組織を4%ホルムアルデヒド

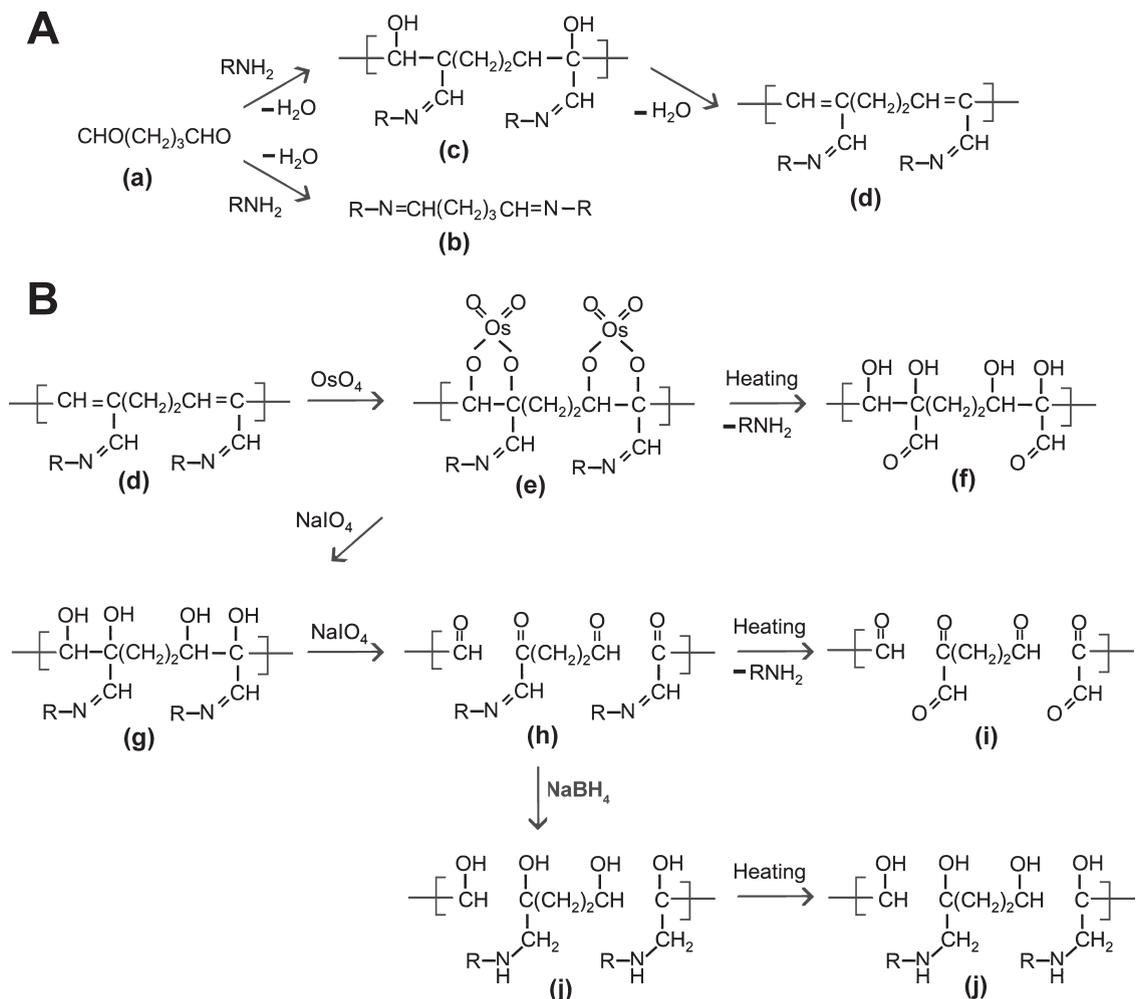


図2 タンパク質のグルタルアルデヒド固定、二重固定と熱処理の影響  
 A グルタルアルデヒド固定  
 B 二重固定試料における抗原賦活化のメカニズム

+2.5 mM 塩化カルシウム+1.25 mM 塩化マグネシウム+2.9%グルコース/0.1 M HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.4) 中、室温 2 時間固定する。②続いて 4%ホルムアルデヒド+2.5 mM 塩化カルシウム+1.25 mM 塩化マグネシウム+2%グルコース/0.1 M HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 8.5) で室温、一晚固定する。

### 3.2 LR-White 包埋と包埋後染色法<sup>9)</sup>

包埋前染色法と包埋後染色法に应用が可能であるが、本稿では包埋後染色法を紹介する<sup>7,9)</sup>。標準化固定法で固定した組織を DMF (ジメチルホルムアミド) で脱水後、LR-White に包埋する。超薄切片を加熱し、抗原の賦活化を行うことによって、これまで反応陰性であった多くの抗原の検出が可能であった。さらにタンニン酸処理を電子染色に应用することによって、非常にコントラストの良い電顕像が得られ、詳細な抗原の局在を検索することが可能である (図 3)。

包埋、免疫染色、電子染色を以下の手法で行う。①水冷した DMF で脱水し、LR-White に 4°C、一晚浸漬する。② LR-White を満たしたゼラチンカプセルに組織を移し、55°C、24

時間熱重合する。③ネオプレン W (日新 EM) 処理したニッケルメッシュ (200 メッシュ) に超薄切片 (干渉色: 金~銀色程度) を載せる。④シリコン管を半割して中央に縦にスリットを入れ、シリコン管にメッシュを立てる。エッペンドルフチューブに入れた 20 mM トリス-塩酸緩衝液 (TB) (pH 9.0) 中で、95°C、1-2 時間加熱する。賦活化、免疫組織化学反応、洗浄および電子染色はシリコン管を用いて行う。⑤ 1% BSA/TBS (150 mM 塩化ナトリウム/10 mM TB, pH 7.4) で 30 分間ブロッキング後、ブロッキング溶液で希釈した一次抗体を 4°C、一晚作用させる。⑥洗浄ピンを用いて TBS のジェット水流で洗浄後、1% BSA+0.1% gelatin/TBS で希釈した金コロイド標識抗体 (15 nm) を作用させる (室温 60 分間)。⑦ TBS で洗浄し、さらに蒸留水で洗浄する。⑧ 1% グルタルアルデヒド+0.05% タンニン酸/0.1 リン酸緩衝液 (pH 5.5) で固定後 (室温 5 分間)、蒸留水で洗浄する。⑨ 1% 四酸化オスミウム/0.1 リン酸緩衝液 (pH 7.4) で固定後 (室温 5 分間)、蒸留水で洗浄する。⑩酢酸ウラン (2 分間)、クエン酸鉛 (30 秒間) で電子染色する。

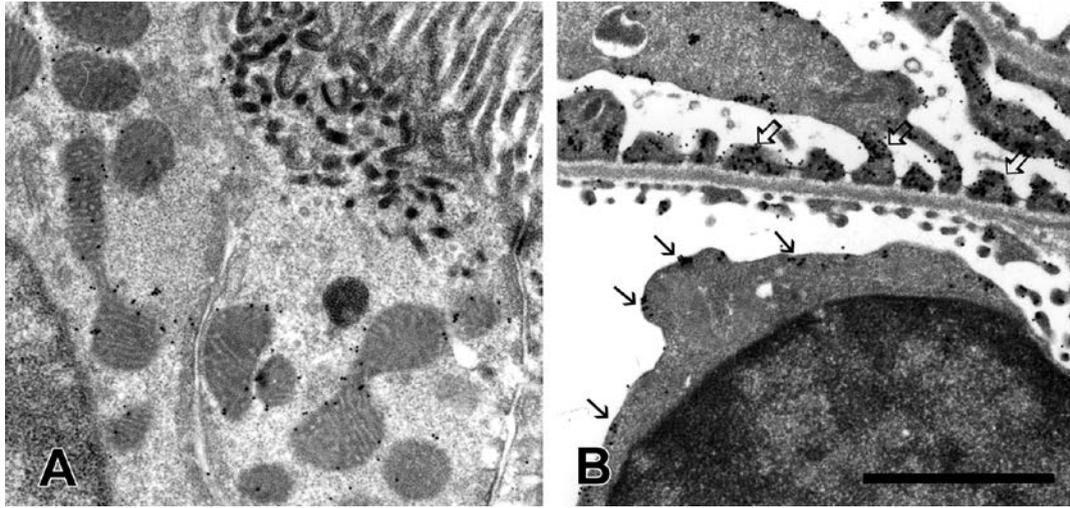


図3 標準化固定法の包埋後染色法への応用

マウス腎臓を標準化固定法を用いて灌流固定後、LR-Whiteに包埋した。超薄切片を20 mM TB (pH 9.0) 中で95°C、1時間加熱後、Tom 20 と  $\beta$ -actin を金コロイド標識抗体を用いて検出した。Tom 20 は近位尿管上皮のミトコンドリア外膜に局在する (A)。 $\beta$ -actin の免疫組織化学反応は糸球体のタコ足細胞の小足 (白抜き矢印) と、毛細血管内に存在するリンパ球の細胞膜の内側に沿って斑点状に (矢印) 認められる (B)。スケールバー: 1  $\mu$ m

#### 4. グルタルアルデヒド・四酸化オスミウム固定 (以下二重固定) と抗原賦活化<sup>10)</sup>

電子顕微鏡での形態観察には二重固定した組織をエポキシ樹脂包埋した試料を用いることが標準である。これまでもエポキシ包埋した一部の抗原に対して、包埋後染色法を用いた免疫電顕が試みられているが、以下の理由により、これら抗原の検出は稀な例であると考えられてきた。①グルタルアルデヒド固定により抗原性が著しく低下する。②四酸化オスミウム後固定により、タンパク質は切断や酸化作用を受け、さらに抗原性が低下する。③エポキシ樹脂はタンパク質の種々の官能基と共重合し、かつ疎水的な三次元の密な架橋を形成するため、エピトープと抗体との結合が困難である。しかし二重固定・エポキシ樹脂包埋した試料の抗原賦活化を試みた結果、予想以上に多くの抗原が賦活化できることが判明し、加熱による賦活化のメカニズムについて考察したので紹介する。

##### 4.1 凍結切片を用いた検討

エポキシ包埋の影響を除外して、二重固定した試料における賦活化の可能性とそのメカニズムを検討するために、凍結切片を25 mM 塩化カルシウムを含む4%ホルムアルデヒド、2%グルタルアルデヒド、または2%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムで二重固定した後、加熱処理をして免疫組織化学反応を行った。固定は各固定液に室温で30分間浸漬し、20 mM TB (pH 9.0) 中で30分間 (95°C) 加熱または10分間オートクレーブ (120°C) した。加熱による抗原賦活化が可能で19種類の抗体のうち、半数以上の抗体 (10/19) はホルムアルデヒド固定切片を加熱した時のみ、反応は増強した。 $\gamma$ -GTP (glutamyl transpeptidase) と  $\beta$ -actin 抗体はグルタルアルデヒド固定した組織を95°C、30分間加熱した時にホルムアルデヒド固定した組織より強い反応を示した。しかし抗

PCNA (proliferating cell nuclear antigen), Tom (translocase of mitochondrial outer membrane) 20, claudin-5, occudin, clathrin,  $\alpha$ -amylase, GFAP (glial fibrillary acidic protein) の7種類の抗体は、グルタルアルデヒド固定した切片をオートクレーブ処理しても免疫組織化学反応はほぼ陰性であるにもかかわらず、二重固定をした切片をオートクレーブ処理すると強い反応が得られ、抗原の賦活化が可能であった (図4)。

##### 4.2 エポキシ準超薄切片の免疫組織化学

上記7種類の抗体のうち、抗PCNA以外の抗体は二重固定・エポキシ包埋試料で、免疫組織化学反応は陽性であり (図4)、ナトリウムエトオキシドによる脱樹脂は抗原性の保存に大きな影響を与えないことも判明した。免疫組織化学反応は以下の手法で行った。①1-1.5  $\mu$ m の切片をスライドガラスに張り付け、60°C一晩乾燥する。②ナトリウムエトオキシド/エタノールに室温で1-2時間浸漬して、脱樹脂する。ナトリウムエトオキシドは水酸化ナトリウムをエタノールに飽和させ、室温遮光下に2-8週間保存後、使用した。③エタノールと蒸留水で洗浄後、20 mM TB (pH 9.0) 中で10分間オートクレーブし、免疫組織化学反応を行った。

##### 4.3 二重固定切片の抗原賦活化のメカニズム

凍結切片をグルタルアルデヒド固定、またはグルタルアルデヒドと四酸化オスミウムによる二重固定を行った。固定した切片の一部は1%過ヨウ素酸ナトリウム水溶液で5分間処理した。さらにその一部は1%水素化ホウ素ナトリウム水溶液で5分間処理した。これらの切片を20 mM TB (pH 9.0) 中で10分間オートクレーブ処理し、ヘマトキシリン・エオジン染色をして形態を観察した。グルタルアルデヒド固定した切片では、過ヨウ素酸ナトリウム処理や水素化ホウ素ナトリウム処理後オートクレーブを行っても、未処理の切片と同様に形態の保存は良好であった (図5A, 5B, 5C)。二重固

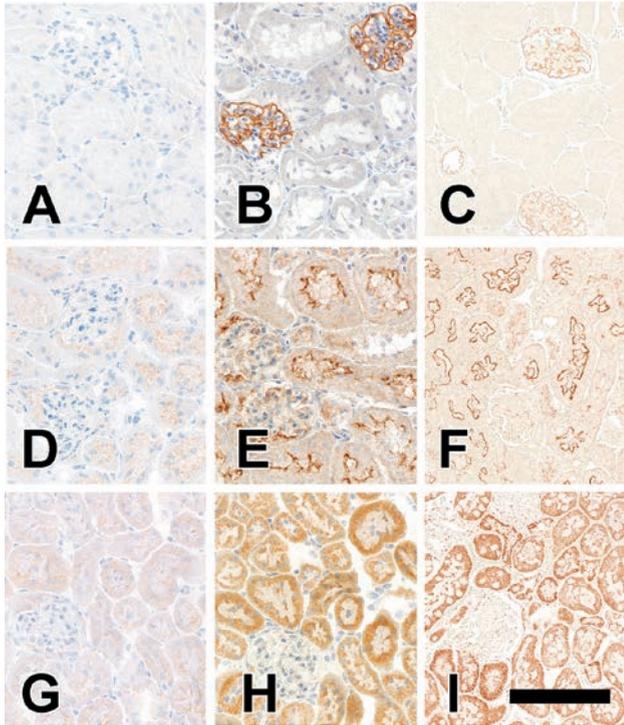


図4 二重固定切片の抗原賦活化

マウス腎臓の凍結切片を2%グルタルアルデヒド/0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で30分間(A, D, G), 2%グルタルアルデヒド0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)と1%四酸化オスミウム0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)で各30分間固定をした(B, E, H). マウス腎臓の二重固定・エポキシ包埋試料の準超薄切片をナトリウムエトオキシサイド/エタノール溶液中で1時間脱樹脂を行った(C, F, I). すべての切片を20 mM TB (pH9.0) 中で10分間オートクレーブ(120°C)をした後, claudin-5 (A, B, C), clathrin (D, E, F), Tom 20 (G, H, I) の免疫組織化学反応を行った. 一次抗体は4°C一晩作用させ, 二次抗体のHRP Envisionは室温, 1時間反応した. claudin-5は糸球体の毛細血管に沿って, clathrinの局在は近位尿細管の刷子縁の直下に, Tom 20は近位尿細管と遠位尿細管の細胞質に局在する. スケールバー: 100 μm

定をした切片では, グルタルアルデヒド固定した試料に比べ, オートクレーブによる組織の破壊が顕著であり(図5D), 過ヨウ素酸ナトリウム処理は組織の破壊をさらに促進した(図5E). 水素化ホウ素ナトリウム処理をした組織はこれらの中間の形態を示した(図5F).

以上の結果から二重固定した組織における抗原賦活化は以下のメカニズムに基づくと考えられる. 四酸化オスミウムはC=C-C=N-Rのエチレン二重結合に付加する(図2B-e). 加熱により付加したオスミウムが加水分解され, 共鳴構造も破壊されるためタンパク質とのシッフ塩基による架橋が切断される(図2B-f). 過ヨウ素酸ナトリウム処理は付加したオスミウムを酸化し, さらにジアルコールをアルデヒドに酸化して炭素鎖を切断する(図2B-h). さらに加熱によりシッフ塩基による架橋も切断される(図2B-i). 水素化ホウ素ナトリウム処理は, アルデヒドをアルコールに還元するとともに, シッフ塩基による結合を還元して安定化し(図2B-j), 加熱処理に対し抵抗性を示すため, 形態の破壊が低減される.

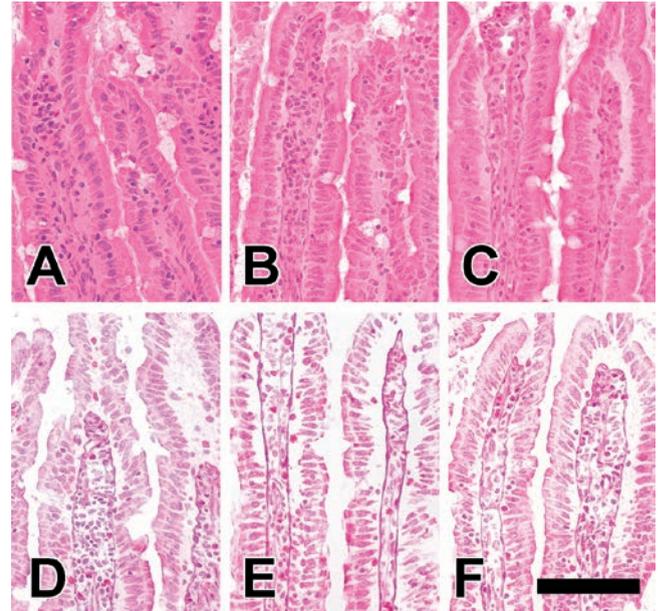


図5 グルタルアルデヒド固定および二重固定切片の加熱による影響  
マウス小腸の凍結切片を2%グルタルアルデヒドで固定(A, B, C)または2%グルタルアルデヒドと1%四酸化オスミウムで二重固定した(D, E, F). 固定した切片の一部を1%過ヨウ素酸ナトリウム水溶液中で5分間処理(B, E), または過ヨウ素酸ナトリウム処理に続いて1%水素化ホウ素ナトリウム水溶液中で処理した(C, F). すべての切片を20 mM TB (pH9.0) 中で10分間オートクレーブ(120°C)をして, ヘマトキシリン・エオジン染色を行った. スケールバー: 100 μm

#### 4.4 エポキシ包埋切片の免疫電顕法

超薄切片の加熱, 免疫組織化学反応, 電子染色はLR-White包埋切片と同様に, メッシュをシリコン管に立てて行った. 加熱処理には0.5 M TB (pH 9.0) を用い, 1-3時間(95°C)行ったが, 20 mM TB (pH 9.0) より強い反応を与え, 形態の保存にも優れていた. α-amylaseは膵臓外分泌細胞の分泌顆粒, ゴルジ層板, 粗面小胞体に検出されたが, 非加熱切片では反応は陰性であった(図6A, 6B). clathrinの局在は曲尿細管上皮の被覆小胞・小管に証明され(図5C), Tom 20は曲尿細管上皮のミトコンドリア外膜に検出された. ナトリウムエトオキシサイドによるエッチングの反応強度に与える効果は顕著ではなく, 再現性に乏しかった. ナトリウムエトオキシサイドによる脱樹脂は深層の抗原を露出させるとともに, 加熱による抗原の抽出を促進し, 超薄切片上における反応強度が相殺されるものと推測される.

#### 5. 抗原抗体反応と緩衝液:

##### 一次抗体, 標識抗体の希釈溶液の影響

エピトープと抗体のパラトープ(エピトープとの結合部位)は鍵と鍵穴にたとえられる. しかし両者は, 互いに立体構造を変化させながら, 最終的に特異的で強固な結合を行うため, それぞれのポリペプチド鎖の柔軟性が保たれていることが重要であると考えられている. 強固な結合にはエピトープとパラトープの電気的な引力, 水素結合, 疎水結合, ファンデル

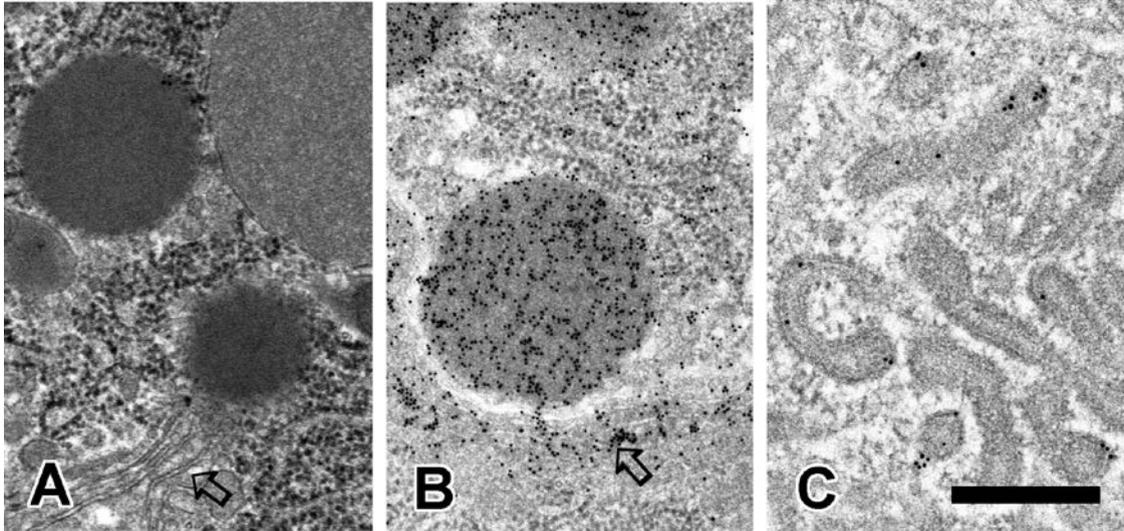


図6 二重固定・エボン包埋切片の抗原賦活化と免疫電顕法

マウス組織を2%グルタルアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で室温3時間, 1%四酸化オスミウム/0.15 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で0°C, 90分間固定してエボンに包埋した.  $\alpha$ -amylase の局在をマウス膵臓外分泌細胞で (A, B), clathrin をマウス近位尿細管で検出した (C). 非加熱のエボン切片 (A) と 0.5 M TB (pH 9.0) 中で95°C, 1時間加熱した切片 (B, C) を用いて, 金コロイド標識抗体法によって免疫組織化学反応を行った. 白抜き矢印はゴルジ装置を示す. スケールバー: 1  $\mu$ m

ワルス力などが関与しているが, 抗体と抗原の接近・接触・相互作用には両分子の荷電が最も重要な役割を果たしていると思われる. したがって反応溶液のイオン強度, pH, 界面活性剤の有無などは, 免疫組織化学反応の特異性, 強度に影響を与えると考えられるが, 研究はほとんど行われていない. 従来 PBS (150 mM 塩化ナトリウム/10 mM リン酸緩衝液, pH 7.4) や TBS が一次抗体の希釈に用いられているが, TBS を推奨する研究者も多い. また最近では, 免疫組織化学やウエスタンブロットのために多くの一次抗体や二次抗体の希釈液が販売されている. その成分は不明であるが, 反応の特異性を高め, 有用な場合も多い. 以下, 免疫組織化学反応は適切な抗体の希釈溶液の選択によって感度と特異性の高い反応が得られることを示す.

### 5.1 緩衝液の影響

各種のモノクローン抗体を1% BSA を含む PBS, TBS, HBS (150 mM 塩化ナトリウム/10 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) で希釈し, 抗体希釈溶液の免疫組織化学反応に与える影響を検索した. ホルムアルデヒド固定, パラフィン包埋試料を用い, 切片を20 mM TB (pH 9.0) 中で10分間オートクレーブして抗原賦活化を行った. 一次抗体とは4°C, 一晚反応させ, 二次抗体の Envision HRR (Dakocytomation) とは室温で1時間反応させた. 免疫組織化学反応の結果を表1に示す. ER $\alpha$  (estrogen receptor  $\alpha$ : D12) 抗体以外のすべての抗体の希釈液として TBS が PBS より優れていることが明らかになった. 詳細な理由は不明であるが, 大きなリン酸イオンがエピトープやパラトープの正に電荷した部分に結合すると, ポリペプチド鎖の柔軟性が失われ, 強固な結合の形成が阻害されるためではないかと思われる.

### 5.2 イオン強度の影響

抗体を50 mM, 150 mM, 300 mMの塩化ナトリウムを添加した1% BSA/10 mM TB (pH 7.4) で希釈した. ホルムアルデヒド固定, パラフィン包埋試料を用い, オートクレーブによる賦活化後, 免疫組織化学反応を行った (表1). モノクローン抗体の多くはイオン強度が低い緩衝液中で強い染色性を示した. しかし PCNA や ER $\alpha$  などの抗体はイオン強度の影響を受けないか, イオン強度が高い方が反応は強かった. 核内のタンパク質 (ER $\alpha$ , androgen receptor, glucocorticoid receptor, p300) のポリクローン抗体も50 mM 塩化ナトリウムより150 mM または300 mM 塩化ナトリウムの方が, 強い免疫染色を与えた. 電荷は抗体分子と抗原分子, エピトープとパラトープの接近・接触に影響を与えるが, 抗原の局在部位の電荷も抗体との接触に影響すると思われる. 核や軟骨の基質などは強く負に荷電しているために, 負に荷電した抗体分子は斥力を受ける. その斥力を低下させるためには, 核内タンパク質と抗体との結合にはイオン強度の高い緩衝液を必要とするのではないかと推測される. また高密度に同じタンパク質が局在する場合は, そのタンパク質の等電点が強い酸性や塩基性であると, 抗体との荷電による相互作用に影響を与えるものと考えられる. 抗体を希釈する最適な緩衝液を選択することによって, ウエスタンブロットのみならず, 免疫組織化学においても特異性と感度の高い反応を得ることが期待できる.

### 5.3 包埋後染色法と抗体の希釈液

光顕レベルの免疫組織化学において二次抗体に HRP 標識抗体などを用いる場合は, 酵素反応時間の延長や, 基質にイミダゾール, ニッケルイオンや銅イオンなどを添加することによって, 反応の感度を増すことができる. しかし金コロイ

表 1 モノクローン抗体の希釈溶液の免疫組織化学反応への影響

抗体	クローンとサブクラス	希釈倍率	免疫組織化学反応を行った組織・細胞	緩衝液の種類			mM NaCl/10 mM TB (pH 7.4)		
				PBS	TBS	HBS	50	150	300
PCNA	PC10; IgG2a	500,000	腸腺 (小腸)	1	2	2	1	2	2-3
ER $\alpha$	D12; IgG2a	20,000	子宮腺	3	2	2	2	2	2
S-100	M2A10; IgG1	3,000	筋層間神経叢 (小腸)	1	2	1-2	3	2	1
Mortalin	MA3-028; IgG3	25,000	間細胞 (精巣)	3	3	3	3	3	3
HSP 70	sc-27; IgG2a	30,000	導管 (耳下腺)	1	2	2	3	2	1-2
$\alpha$ -Synuclein	42; IgG1	50,000	大脳	2	2	2	2	2	2
GFAP	6F2; IgG1	30,000	大脳	2	2	1	0-1	2	2
Desmin	D33; IgG1	30,000	平滑筋 (精巣上体管)	1	2	1	1	2	2
$\beta$ -Actin	AC-74; IgG2a	100,000	リンパ球	2	2	2	1	2	1-2
Clathrin	X22; IgG1	50,000	近位尿管	1	2	2-3	3	2	1
E-Cadherin	36B5; Ig1	2,000	子宮上皮	1	2	2	3	2	1
$\beta$ -Catenin	sc-763; IgG1	50,000	子宮上皮	1	2	1	3	2	1
$\gamma$ -GTP	5B9; IgG1	500	近位尿管	1	2	2	3	2	1
CASGM	170-5; IgG1	2,000	膵臓	2	2	2	3	2	1

ホルムアルデヒド固定・パラフィン包埋切片を 20 mM Tris-HCl 緩衝液 (TB) (pH 9.0) 中で 10 分間オートクレーブ (120°C) した後、免疫組織化学反応を行った。一次抗体は 4°C 一晩作用させ、二次抗体の HRP Envision は室温、1 時間反応した。PCNA (proliferating cell nuclear antigen), ER (estrogen receptor)  $\alpha$ , HSP (heat shock protein), GFAP (glial fibrillary acidic protein),  $\gamma$ -GTP (glutamyl transpeptidase), CASGM (common antigen of secretory granule membrane). PBS (150 mM 塩化ナトリウム/10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4)), TBS (150 mM 塩化ナトリウム/10 mM TB (pH 7.4)), HBS (150 mM 塩化ナトリウム/10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4)). 反応強度: 1 (弱), 2 (中程度), 3 (強).

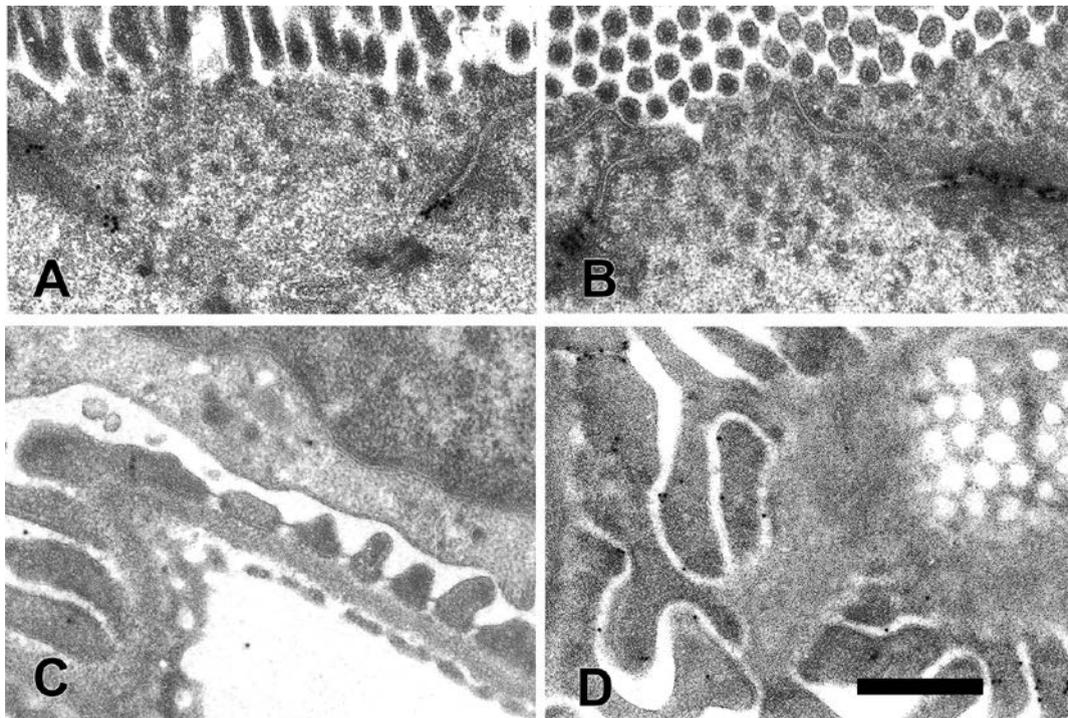


図 7 包埋後染色法における抗体希釈溶液の影響

標準化固定・LR-White 包埋切片を 20 mM TB (pH 9.0) 中、95°C、1 時間加熱処理した後、免疫組織化学反応を行った。E-cadherin をマウス小腸吸収上皮で (A, B), claudin-5 を糸球体のタコ足細胞で (C, D) 検出した。一次抗体を 1% BSA を添加した Can Get Signal A (Toyobo) で希釈し、金コロイド標識抗体の希釈には 25 mM 塩化ナトリウム、0.1% BSA、0.1% fish gelatin/Can Get Signal B を用いた (B, D)。比較のため一次抗体と金コロイド標識抗体を 1% BSA を添加した PBS で希釈し反応を行った (A, C)。スケールバー: 500 nm

ド標識抗体や金コロイド標識 protein A を用いる包埋後染色法では、このような手法で反応を増感することができない。非特異染色を抑え、より反応性を増すためには、光顕レベル以上に一次抗体、二次抗体の希釈液の選択が重要であると考えられる。標準化固定して LR-White 包埋した試料を用いて包埋後染色法を行い、抗体の希釈溶液の影響を検索した。一次抗体と金コロイド標識抗体の希釈液として 1% BSA を添加した PBS, TBS, Can Get Signal A と B (Toyobo) を用いた。抗 E-cadherin 抗体の希釈には TBS または Can Get Signal A が (図 7A, 7B), 抗 caludin-5 抗体の希釈には Can Get Signal A が (図 7C, 7D), 抗  $\beta$ -catenin 抗体の希釈には TBS または Can Get Signal B が、抗 Tom 20 抗体の希釈には Can Get Signal B が強い反応を与えることが判明した。金コロイド標識抗体の希釈には、標識抗体の凝集と非特異染色を抑えるために 25 mM 塩化ナトリウム, 0.1% BSA, 0.1% fish gelatin を添加した Can Get Signal B が最も強い反応を与えた。

## 6. おわりに

近年ではホルムアルデヒド固定によって形成された架橋を加熱によって切断し、エピトープを露出させる賦活法が免疫組織化学に多用され、従来の抗原の立体構造を保存することが重要であるとの考えを一変させている。また加熱による抗原賦活化は免疫電顕にも応用され、賦活化を前提とした固

定法を利用することにより、包埋前染色法や LR-White 包埋切片を用いた包埋後染色法においても、同一の手法で多くの抗原の局在を証明することが可能になっている。本稿ではさらに、二重固定・エポソ包埋した試料でも、予想以上に多くの抗原が加熱によって賦活化が可能であることを証明し、その賦活化のメカニズムについて紹介した。これらはエピトープの露出と抗体の接触という視点から理解することが可能である。ま抗原の賦活化と同時に各抗体とエピトープとの最適な反応条件を選択することも重要であることを示した。

## 文 献

- 1) Fowler, C.B. *et al.*: *Lab. Invest.*, **88**, 785–791 (2008)
- 2) Kawahara, J. *et al.*: in Swift, G. *et al.* (Ed.), *Polymer Modification*, Plenum Press, New York, 119–131 (1997)
- 3) Deetz, J.S. and Behrman, E.J.: *Int. J. Peptide Protein Res.*, **17**, 495–500 (1981)
- 4) Shi, S.R. *et al.*: *J. Histochem. Cytochem.*, **39**, 741–748 (1991)
- 5) Yamashita, S. and Okada, Y.: *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 13–21 (2005)
- 6) Emoto, K. *et al.*: *J. Histochem. Cytochem.*, **53**, 1311–1321 (2005)
- 7) Yamashita, S.: *Prog. Histochem. Cytochem.*, **41**, 141–200 (2007)
- 8) Yamashita, S. *et al.*: *Biol. Reprod.*, **88**: 1–13, 116 (2013)
- 9) Yamashita, S. *et al.*: *J. Electron Microsc.*, 267–279 (2009)
- 10) Yamashita, S. and Okada, Y.: *J. Histochem. Cytochem.* **62**, 584–597 (2014)