

モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の特性と 免疫組織化学への応用

藤田保健衛生大学医学部第一病理学講座

鴨志田 伸吾, 堤 寛

1. モノクローナル抗体とポリクローナル抗体

モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の特性を表1に対比した。モノクローナル抗体は対象抗原の一つの抗原決定基に特異的に反応する。しかし、モノクローナル抗体ならすべて特異性に優れ、ポリクローナル抗体より使いやすいと信じるのは早計である。異なる抗原分子上に同一のあるいは近似の抗原決定基が存在する場合、モノクローナル抗体は分子そのものを区別することができず、交差反応を示す。モノクローナル抗体は、培養上清ないし腹水として提供される。培養上清は純度に優れており、非特異反応が少ない利点を有しているが、腹水型に比べて抗体濃度が低い。腹水には高濃度の特異抗体が含まれるが、マウス血清に由来するその他の免疫グロブリン成分が混在している。

一方、ポリクローナル抗体の場合、抗原分子上に存在する多数の抗原決定基に対する抗体が混在しているとともに、単一の抗原決定基に対しても親和性が異なる複数の抗体が認められる。一つの分子上に他分子と構造が類似する抗原決定基も含まれる場合は、ポリクローナル抗体の特異性が問題となる。ヒトの抗原分子（とくに系統発生的にみて古い物質）に対するポリクローナル抗体は、マウスやウサギなどの他動物に対しても応用可能であることが少なくない。

表1 モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の比較

	モノクローナル抗体	ポリクローナル抗体
由来	免疫されたマウス、ラット、ウサギないしニワトリの正常抗体産生細胞と骨髄腫細胞とのハイブリドーマ	異種動物（ウサギ、ヤギ、ヒツジないしモルモット）に抗原を免疫して得られた抗血清
クラス、サブクラス	均一	異なる抗体が混在
特異性	抗原分子上に存在する一つの抗原決定基にのみ反応する	抗原分子上に存在する複数の抗原決定基に反応する
交差反応	通常ない。ただし、共通部分を認識する抗体間で交差する	共通部分のある分子とは部分的に交差する
親和性	均一であるが、弱いものが少なくない	異なる抗体が混在
再現性	永久に同一の抗体が得られる	免疫動物ごとに多少の差（ロット差）が生ずる
抗体濃度	ハイブリドーマの培養上清は低い。腹水は高い	比較的高い
安定性	凍結融解操作や室温放置により、失活しやすい。化学的修飾（フラグメント化、酵素標識）に対して不安定なことがある	モノクローナル抗体より安定

2. 免疫組織化学への応用上の留意点—総論—

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を組織・細胞内における抗原の発現解析・局在観察に応用する場合にも、知っておくべき留意点が少なくない。モノクローナル抗体は、夾雑物がほとんどないため、背景染色のないきれいな染色像を得やすい。しかし、前述のごとく、一つのモノクローナル抗体に認識されただけでは、抗原分子の同一性を証明したことにほなり得ない。モノクローナル抗体の中には、まれに、陰性となるべき細胞のゴルジ野に反応するものがある（**図1**）。モノクローナル抗体の特異性確認のために、イムノプロット法が必要とされる場合が多い。ポリクローナル抗体の特異性を確認するには、原則として免疫吸収試験が必要である。同一抗原に対するポリクローナル抗体や複数種のモノクローナル抗体を用いて同一の染色像が得られることを検証するのも、特異性検定の有力かつ重要な手段である。陽性コントロールと陰性コントロールを検体と同時に実施することも忘れてはならない。

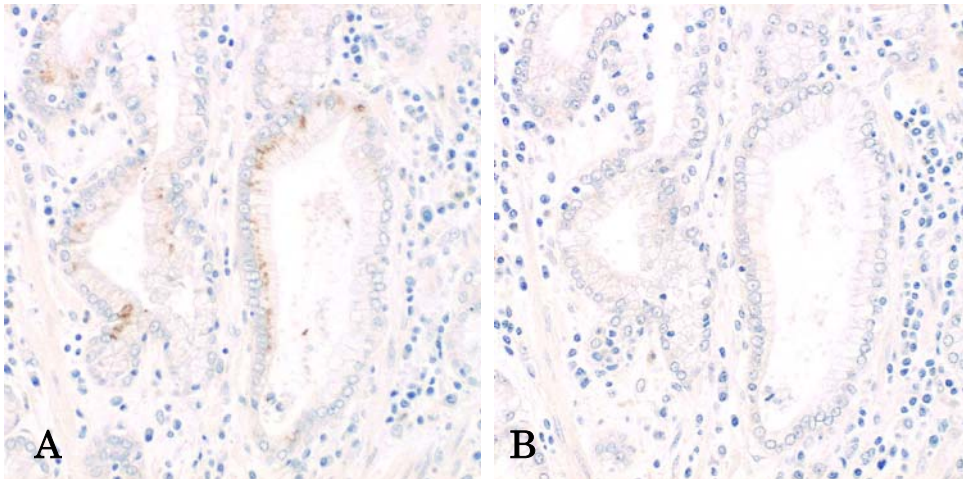


図1 モノクローナル抗体による非特異反応の一例

非腫瘍性胃粘膜上皮細胞に対する抗 AFP 抗体の反応性（ホルマリン固定パラフィン切片、抗原性賦活化処理なし、シンプルステイン法）。腹水型モノクローナル抗体 ZSA06 (A) は胃粘膜表層粘液細胞のゴルジ野に非特異反応を示しているが、ポリクローナル抗体 (B) では陰性である。

一方、当該抗原決定基に固定操作による変質やマスキングが生じた場合やモノクローナル抗体の親和性が低い場合、ポリクローナル抗体では陽性を示すが、モノクローナル抗体では陰性ないし弱陽性となることがある。

染色実施に先立って、使用する抗体ごとに最適な抗原性賦活化法を自施設で決定しなければならない。抗原のマスキングは分子レベルではなく、抗原決定基レベルで起こる現象であり、加熱溶液、蛋白分解酵素の種類により効果の特異的部位や程度が異なるからである（表2）。抗体の希釈は、ポリクローナル抗体や腹水型のモノクローナル抗体の場合は、100～1,000 倍を目安として、倍々希釈を行い適切な希釈倍率を決める。まず、10 倍、100 倍、1,000、10,000 倍希釈で見当をつけるとよい。

二次抗体には一次抗体の種に対する抗免疫グロブリンを用いることはいうまでもない。病理診断のためのルーチンの免疫染色にはウサギ、マウス由来の抗体を使用することがほとんどであるため、ウサギ一次抗体、マウス一次抗体両用の製品が使いやすい。

表2 Cytokeratin 免疫組織化学染色における抗原性賦活化法の効果

(藤田保健衛生大学医学部第一病理学講座による)

抗体	Trypsin	Proteinase K	圧力鍋処理/ クエン酸緩衝液 (pH 6.0)
ポリクローナル抗体	↓ ↓, ↑	→ →, ↑↑	↑↑ ↑↑
モノクローナル抗体 クローン MNF116	↑ ↑↑	↑↑ ↑, ↑↑	↑↑ ↑
モノクローナル抗体 クローン AE1・AE3	↑ ↑, ↑↑	↑ ↑, ↑↑	↑↑ ↑↑

赤矢印は正常胃粘膜上皮および胃腺癌（2例）、青矢印は正常食道粘膜上皮および食道扁平上皮癌（2例）を対象としたデータである。無処理切片と比較して、↓：逆効果、→：変化なし、↑：明らかな効果あり、↑↑：最も優れた効果あり、を示す。抗体、上皮・腫瘍の種類、症例ごとに最適な抗原性賦活化法が異なる。ルーチン業務への導入前に予備実験として、自施設で、複数の症例を対象に抗原性賦活化法を綿密に比較検討する必要がある。

3. 免疫組織化学への応用上の留意点—各論—

抗 cytokeratin (CK) モノクローナル抗体は、複数の CK サブタイプに反応する場合が多い。たとえば、MNF116 (クローン名) は CK 10、17、18 および 19 を認識し、広範囲の正常・腫瘍性上皮細胞に反応性を示す。クローン 34βE12 は高分子 CK (CK 1、5、10 および 14) と反応する抗体で、前立腺基底細胞の同定 (前立腺良・悪性病変の鑑別) に有用である。また、上皮系マーカーとしての CK の有用性をより高めるために、特異性の異なる複数のモノクローナル抗体のカクテルが利用されている。代表的なカクテル抗体である AE1・AE3 (クローン名) は、CK 1・8、10、14・16 および 19 と反応する。一方、CK 7 と 20 に代表されるように、単一の CK サブタイプに特異的なモノクローナル抗体には、原発巣推定に威力を発揮するものがある。CK5 は中皮マーカーとして応用されている。また、腫瘍化を含む種々の病変に伴って CK の発現パターンが変化することもよく知られている。

Carcinoembryonic antigen (CEA) と共通の抗原決定基を有する CEA 関連抗原 [nonspecific cross-reacting antigen (NCA) が代表的] の存在が知られている。抗 CEA モノクローナル抗体は、NCA との共通部分に対するものが多く、好中球とも反応する。特異性が厳密な (NCA との反応性を有しない) 抗 CEA モノクローナル抗体は、NCA に対する反応部分の吸収操作を加えたポリクローナル抗体に比べて陽性細胞が少ない傾向がある。クローン ZC23 は NCA をも認識するが、COL-1 は NCA には反応しない。図2には大腸癌における抗 CEA 抗体の免疫反応性を示す。

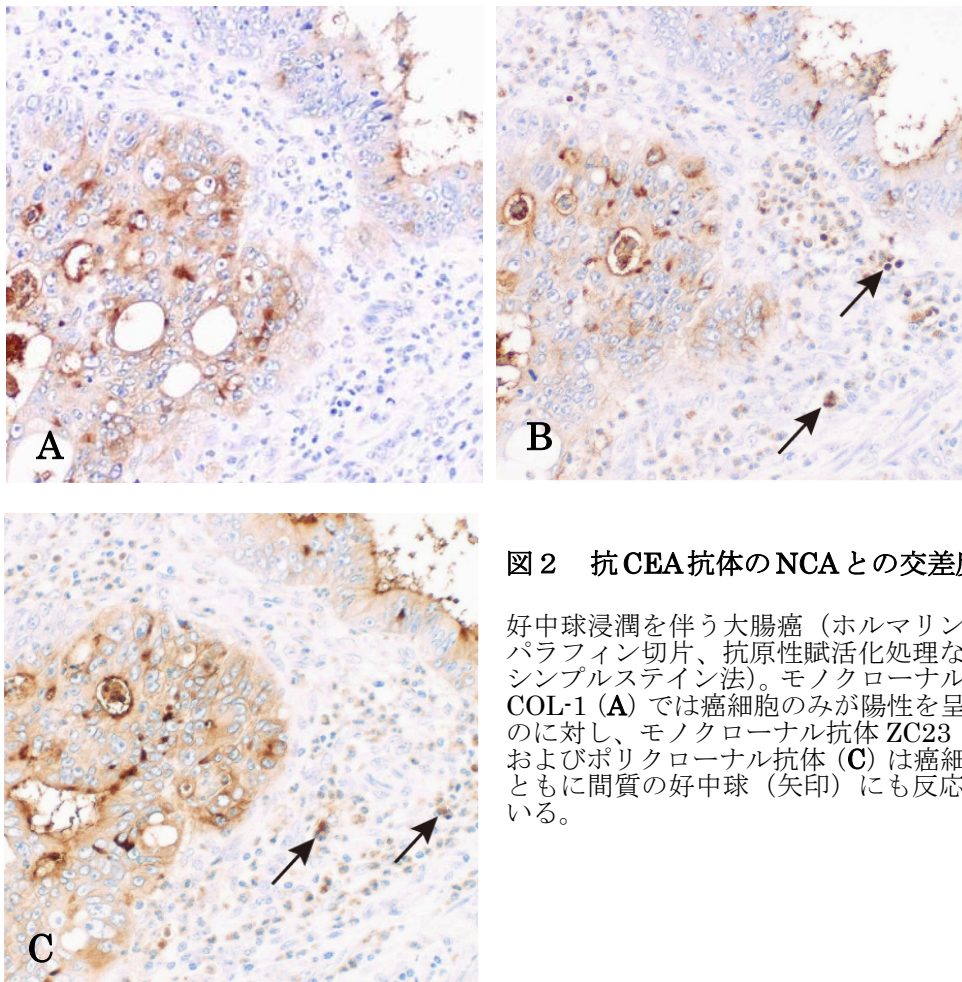


図2 抗CEA抗体のNCAとの交差反応性

好中球浸潤を伴う大腸癌 (ホルマリン固定パラフィン切片、抗原性賦活化処理なし、シンプルステイン法)。モノクローナル抗体 COL-1 (A) では癌細胞のみが陽性を呈するのに対し、モノクローナル抗体 ZC23 (B) およびポリクローナル抗体 (C) は癌細胞とともに間質の好中球 (矢印) にも反応している。

HER2/*neu* 遺伝子産物に対するモノクローナル抗体 SV2-61γを用いた免疫組織化学染色は、従来のポリクローナル抗体に比して fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法との相関性に優れていると報告されている (図3)。ポリクローナル抗体を使用する際の抗原性賦活化法としてはクエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中での加熱処理がすすめられているが、SV2-61γの場合はプロテアーゼが適している。

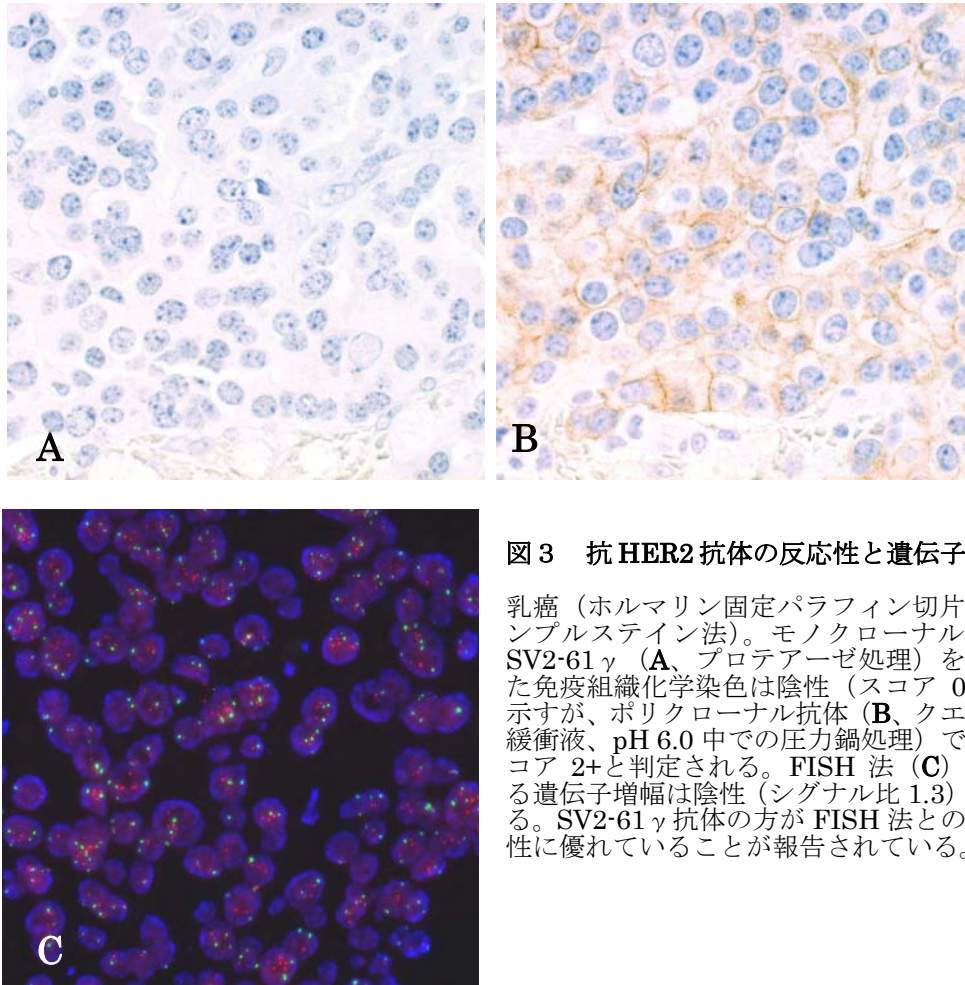


図3 抗HER2抗体の反応性と遺伝子増幅

乳癌（ホルマリン固定パラフィン切片、シンブルステイン法）。モノクローナル抗体SV2-61 γ （A、プロテアーゼ処理）を用いた免疫組織化学染色は陰性（スコア 0）を示すが、ポリクローナル抗体（B、クエン酸緩衝液、pH 6.0 中での圧力鍋処理）ではスコア 2+と判定される。FISH 法（C）による遺伝子増幅は陰性（シグナル比 1.3）である。SV2-61 γ 抗体の方が FISH 法との相関性に優れていることが報告されている。

最近ではウサギモノクローナル抗体が普及しつつある。ウサギモノクローナル抗体の利点として、高い特異性と親和性を有していること、小さい分子やペプチドを含む広範囲の抗原を認識可能であることやマウス抗原に対する反応性も良好であることがあげられる。Cyclin D1 に対するウサギモノクローナル抗体 SP4 は、従来のマウスモノクローナル抗体よりも優れた染色性を提供してくれる。

ご協力いただいた方々：財団大和会東大和病院 病理・臨床検査センター 桑尾定仁センター長、病理細胞診断科 木村文一科長、河村淳平技師