

## 実験動物における免疫組織化学染色

### ～マウス組織を中心に～

川井健司<sup>1)</sup>，中村雅登<sup>1, 2)</sup>，玉置憲一<sup>1)</sup>

1. 財団法人 実験動物中央研究所，
2. 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学

#### はじめに

動物を使った実験というのは、医学の研究者および新薬の開発を目指す研究者にとって欠かせないものであり、その実験の素材となるのが「実験動物」である。実験動物として使用される動物は多種類の動物が使用されており、代表的な実験動物としてマウス、ラット、イヌ、ネコ、サル等が使われている。中でもマウスやラットは、個体が小さく繁殖効率が良好であり、遺伝子背景が解析されている点から実験動物として適材といえる。近年では、さまざまな研究分野における遺伝子操作動物または遺伝子改変動物としてトランスジェニックマウス、ノックインマウス、ノックアウトマウスなどが作製されている。これらによる遺伝子レベルでの発現・機能解析も著しい進捗が見られるが、最終的に、組織・細胞レベルでの発現蛋白を証明する免疫組織化学染色は今日でも重要な手法であることに異論はない。

今回は「実験動物」、とくにマウス組織を対象とした動物専用試薬による免疫組織化学染色についての染色結果を供覧し、若干の使用経験を含め述べたい。

#### 実験動物としてのマウス

通常、実験動物として使用されるマウスは、白毛のアルビノ系 (BALB/c など)、黒毛のブラック系 (C57BL など) が一般的に使われている。マウスの系統、種類および実験用途の詳細に関してはブリーダーのホームページ (<http://www.clea-japan.com/index.html>) を参照されたい。

近年では、通常のマウスでは *in vivo* で正着不可能であったヒト血液系腫瘍細胞やヒト正常細胞の移植実験が、異種細胞に対する拒絶能が低い免疫不全マウスを使用することにより移植可能となった。表 1 に当研究所における免疫不全マウス (遺伝子改変マウス) の歴史を簡単にまとめた。なかでも伊藤<sup>1)</sup> らが作出した超免疫不全マウス (NOGマウス®) の実用性は非常に高い。免疫不全マウスの中で、B細胞を持たない免疫不全マウスでは免疫グロブリンが作製されないため、一次抗体にマウスモノクローナル抗体を使用する免疫組織化学染色では通常のマウスと異なり、標識抗体 (抗マウス抗体) と形質細胞の反応性は認められず、ウサギポリクローナル抗体と同様に染色操作が可能である (図 1)。

表 1. 免疫不全マウスの歴史

The history in development of immunodeficient mice

Immunodeficient mice discovered or developed		CIEA	
1962	<b>nude mice</b> (defect of thymus)	1973	Introduction to CIEA and development of nude mice on the strains with various genetic background
		1979~1988	Introduction of other immunodeficient mice; i.e. beige, Dh, XID mice
1983	<b>SCID mice</b> (defect of T, B cells)	1985	Introduction to CIEA
		1985~	Development of various combined immunodeficient mice by introducing transgenes or immunodeficient genes to SCID mice
1995	<b>NOD/LtSz-<i>scid</i> mice</b> (NOD/SCID mice) (reduced macrophage, complement and NK functions in addition to the absence of T and B cells)	1995	Development of NOD/Shi- <i>scid</i>
2001	<b>NOD/SCID/<math>\beta 2m^{null}</math> mice</b> (NOD/SCID mice with completely defect of NK activity)		
		2002	<b>NOG (NOD/SCID/<math>\gamma c^{null}</math>) mice</b> (NOD/SCID mice with the absence of NK cells and reduced function of other unknown cells)

CIEA: (財) 実験動物中央研究所

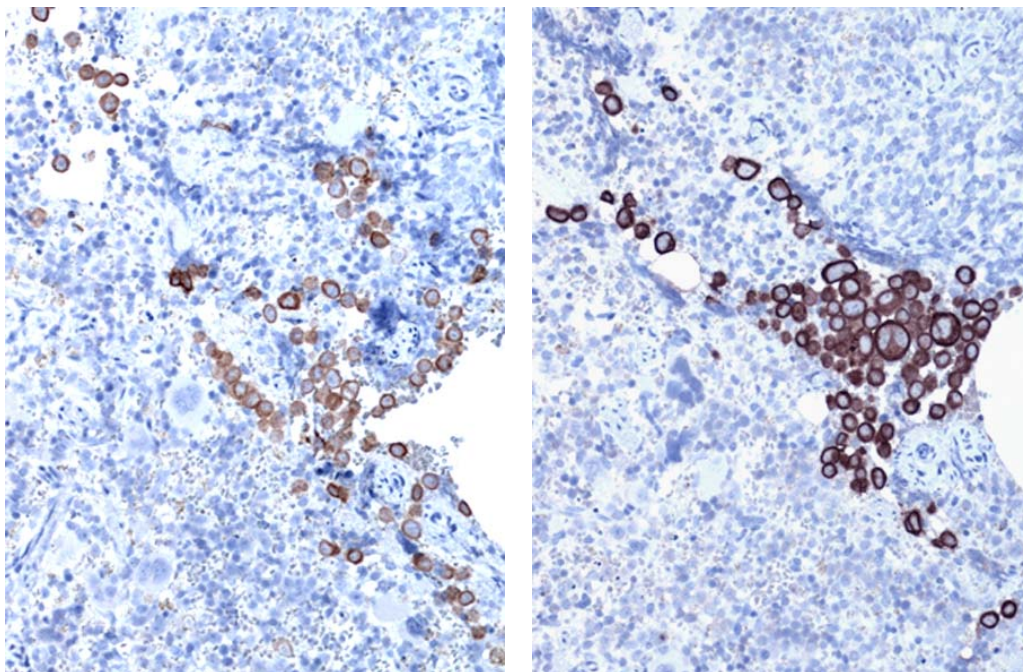


図 1. 超免疫不全マウス (NOGマウス®) 脾臓における抗マウス抗体の反応性  
(左: ウサギ抗サイトケラチンポリクローナル抗体, 右: マウス抗サイトケラチンモノクローナル (AE1, AE3) 抗体)

NOGマウス®脾門部に大腸癌培養細胞 (HCT 116) を移植した脾臓組織. 写真左のサイトケラチンポリクローナル抗体 (動物種: ウサギ) では, 腫瘍細胞のみに陽性像が認められる. 標識二次抗体はヒストファイン シンプルステインマウスMAX-PO (R)を使用. 写真右のサイトケラチンモノクローナル抗体 (動物種: マウス) による染色においても, 形質細胞が存在しないため, 標識二次抗体にヒストファイン シンプルステインMAX-PO(M) (ヒト染色用) を使用しても内因性免疫グロブリンとの反応はまったく認められない.

## マウス組織での免疫組織化学染色

当研究所では、マウス組織に対する免疫組織化学染色の重要なポイントとして、マウス組織（細胞）特異的抗原、ヒト細胞（組織）特異的抗原および両者に共通の抗原検出を行っている。これらの特異抗原を検出するために、多種の動物種（一次抗体）を使用している。これらの一次抗体の検出系として、マウス組織専用試薬（標識二次抗体）としてアミノ酸ポリマーにペルオキシダーゼと Fab' を標識しているニチレイバイオサイエンス社製のマウス組織用ヒストファイン シンプルステインマウスシリーズを使用している。この検出系は、マウス組織に対しての非特異反応が少なく、検出感度が高く、染色操作ステップが少ない点で優れている。染色時間・方法などの条件に関してはカタログ等を参照されたい。以下に、各種免疫動物（一次抗体）におけるシンプルステインマウスを使用した染色結果を示す。

図2は、大腸癌培養細胞（HCT 116）をマウス脾門部から移植し、肝臓内への微小転移実験を行った肝臓組織である。肝臓内に転移した腫瘍細胞とクッパー細胞の局在を示している。写真左は H&E 染色、写真右は一次抗体に anti-murine monocyte/macrophage (clone; F4/80)（動物種：ラット）、標識二次抗体にヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO (Rat) を用いた染色結果である。標識二次抗体による肝細胞への非特異的反応は全く見られず、癌細胞（矢印）周囲および類洞内のクッパー細胞のみに陽性像が認められる。

一次抗体に anti-cytochrome P450 2E1 (CYP 2E1)（動物種：ウサギ）での染色結果を図3に示す。チトクローム P450 2E1 は肝臓の薬物代謝酵素でありエタノールおよびアセトアルデヒドの代謝経路の副側路としても知られている。CYP 2E1 陽性細胞は中心静脈を中心とした zoning（分布）が見られる。標識二次抗体は、ヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO (R) を使用した。

ヒト肝細胞癌培養細胞（Hep G2）を腎臓被膜下に移植し、移植後 6 週間後に摘出した腎臓組織を図4に示す。写真左は H&E 染色、写真右は一次抗体に anti-Human albumin（動物種：ヤギ）を用いた免疫組織化学染色。本抗体はマウスアルブミンと非交差であることをウエスタンブロットで確認している。免疫組織化学的にもマウスアルブミンとは反応せず、ヒト肝細胞癌に特異的に陽性反応が認められ、腫瘍細胞におけるヒトアルブミン産生能が確認できた。標識二次抗体は、ヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO (G) を使用した。

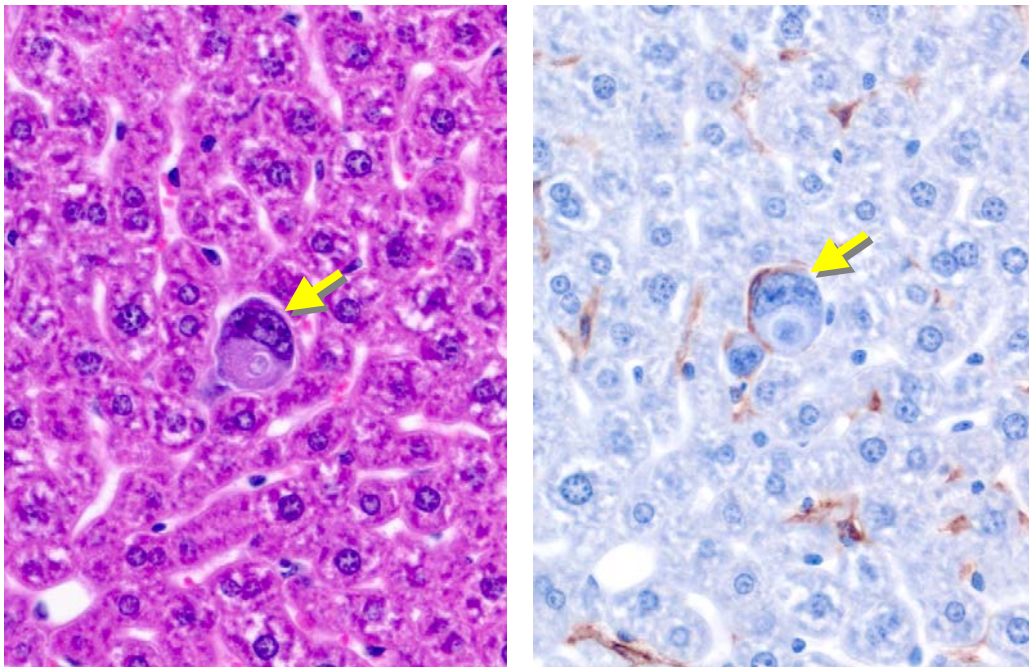


図2. ヒト大腸癌培養細胞（HCT116）の微小肝転移における大腸癌細胞とクッパー細胞の動態的観察

（左：H&E 染色，右：ラット抗 murine monocyte/macrophage 抗体染色）

ヒト大腸癌の培養細胞を脾門部から移植。肝臓組織内に微小転移した大腸癌細胞を取り囲むクッパー細胞と類洞内に分布するクッパー細胞の局在が明らかである。標識二次抗体はヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO (Rat) を使用し、肝細胞への非特異反応は全く認められない。

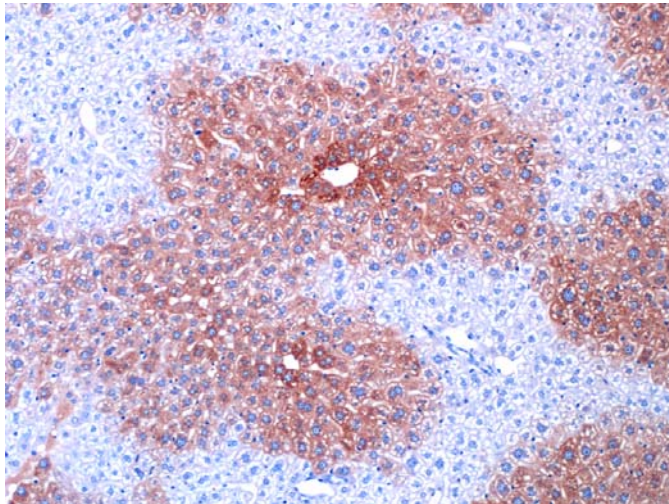


図3. マウス正常肝組織におけるチトクローム P450 2E1 (CYP 2E1) 抗原局在の観察 (ウサギ抗 cytochrome P450 2E1 抗体染色)

肝臓内における CYP 2E1 は様々な代謝経路に関与する酵素である。中心静脈周辺部の肝細胞に高発現し zonation を示しているのが一目瞭然である。標識二次抗体はヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO (R) を使用。

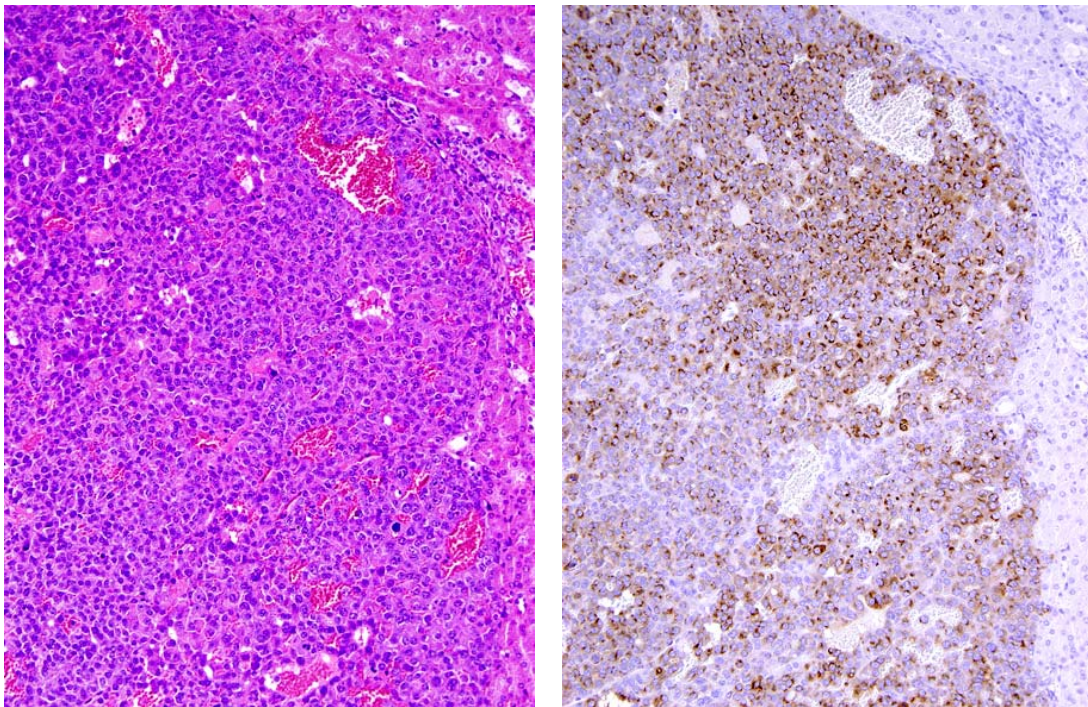


図4. ヒト肝細胞癌培養細胞の腎被膜下移植におけるヒトアルブミンの証明 (左: H&E 染色, 右: ヤギ抗ヒトアルブミン抗体染色)

マウス腎臓被膜下に、ヒト肝細胞癌培養細胞 (Hep G2) を移植し、移植後 6 週間後に採材した腎臓組織。この抗体は、マウスアルブミンとは交差しないため、マウス腎臓組織は陰性を示す。移植したヒト肝細胞癌のヒトアルブミン産生能が確認できる。標識二次抗体はヒストファイン シンプルステインマウス MAX-PO (G) を使用。

#### マウスモノクローナル抗体を用いた免疫染色

一次抗体の特異性向上や抗原の決定基 (エピトープ) の解析により、一次抗体にマウスモノクローナル抗体しか選択肢がない場合が少なくない。マウス組織切片でマウスモノクローナル抗体を使用して免疫組織化学染色を施行する場合、内因性免疫グロブリンへの反応は避けて通れないのが現状であり、とくに形質細胞の内因性免疫グロブリンは強陽性反応を示す。前述したように、NOGマウス®などの免疫不全マウスでは、このような内因性の反応は認められないが、通常のマウスでは内因性免疫グロブリンの陽性が染色結果に支障をきたす事がある。そのため、通常マウス組織に対して内因性免疫グロブリンを阻止し、マウスモノクローナル抗体のみに反応可能な染色キットが市販されている。

図5は、ヒト組織用ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(M) (写真左)とマウス組織用ヒストファイン マウスステインキット (写真右)の染色結果を示す。対象はICRマウスの脾臓組織で、anti-smooth muscle actin (1A4) (動物種：マウス)を染色した。ヒト組織用標識二次抗体では、血管平滑筋細胞だけでなくマウス形質細胞に対しても陽性反応が認められる。一方、マウス組織用のマウスステインキットでは、内因性免疫グロブリンは完全に阻止され、平滑筋細胞のみに陽性反応が認められる美しい染色像が得られる。マウスモノクローナル抗体を使用し、染色結果で内因性免疫グロブリンの反応を阻止するには適したキットである。

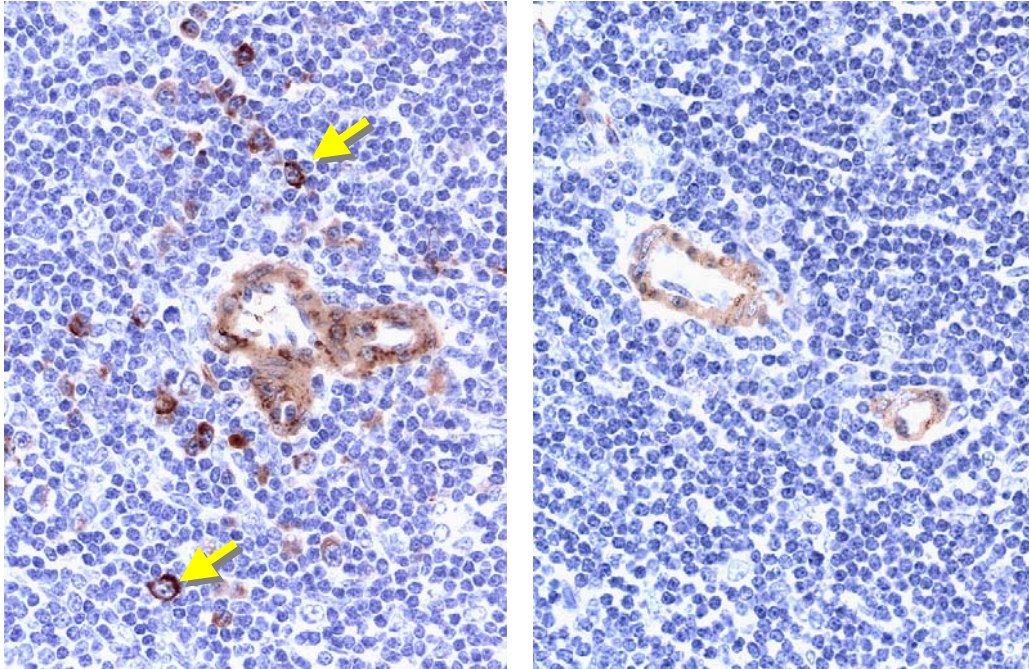


図5. ヒストファイン マウスステインキットによる内因性免疫グロブリンの阻止 (左：ヒト組織用ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(M) , 右：マウス組織用ヒストファイン マウスステインキット)

ICRマウス脾臓におけるマウス抗アクチン(平滑筋)モノクローナル抗体染色。ヒト組織用標識二次抗体では、血管平滑筋と形質細胞(矢印)に強陽性を示す(写真左)。一方、マウスステインキットにおいては、内因性免疫グロブリンとの反応は認められず、平滑筋細胞のみに陽性所見が認められる(写真右)。

### ウサギ(ラビット)モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、主としてマウスやラットで作製されていたが、最近ではウサギ(ラビット)モノクローナル抗体が開発・市販されている(モノクローナル抗体の特性に関しては総論を参照されたい)。ウサギ抗体はマウス抗体よりも10倍高い親和性を示すことや、ウサギの免疫応答は、マウスでは認識されない小さいエピトープに対しても認識する事から、マウスモノクローナル抗体で検出不可能なマーカーに対しても有用とされている。図6に、ヒト正常小腸におけるウサギモノクローナル抗体(SP20; ニチレイバイオサイエンス, 写真a, b)とマウスモノクローナル抗体(V9; invitrogen, 写真c, d)とのビメンチンの染色結果を示す。いずれも希釈済み抗体を使用したため抗体希釈濃度の違いによる染色強度の差を認めたが、ビメンチンに対する特異性・染色性には差が認められなかった。ビメンチン抗体はヒト組織に特異的であり、マウス組織に対しては陰性を示す。

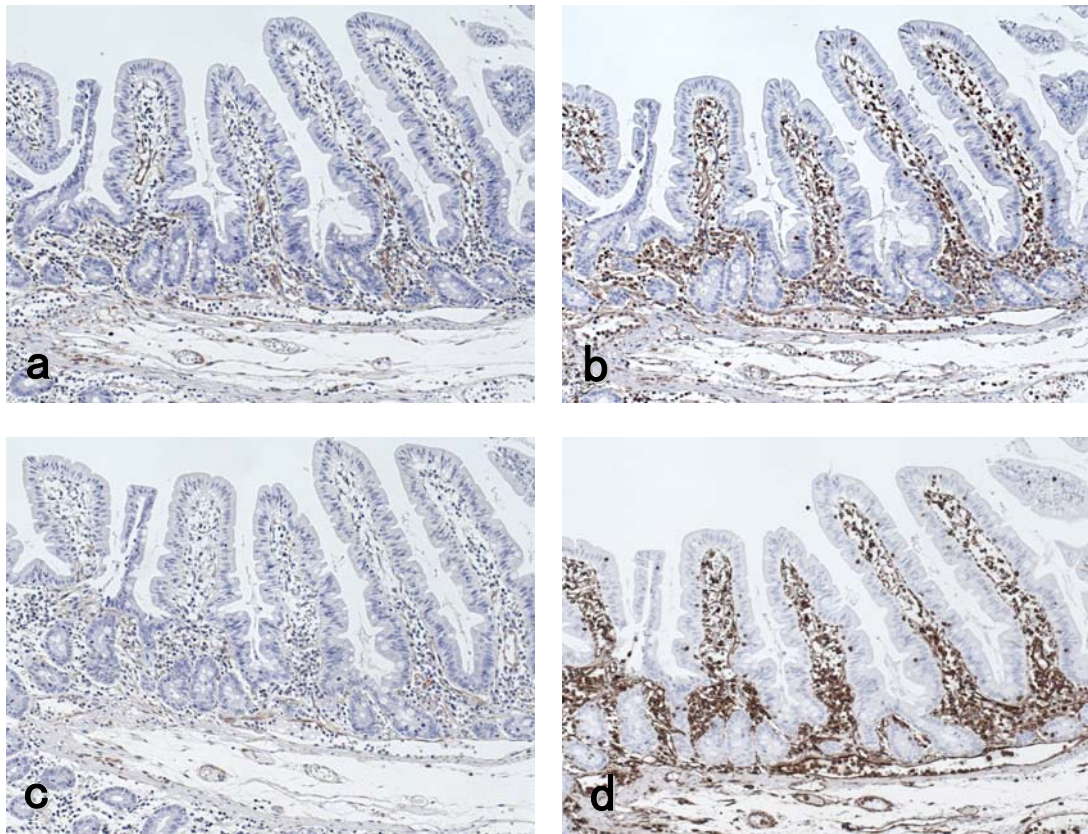


図6. ウサギモノクローナル抗体とマウスモノクローナル抗体によるビメンチン染色  
 a: ウサギ抗ビメンチン抗体 (clone; SP20, 賦活化処理なし)  
 b: ウサギ抗ビメンチン抗体 (clone; SP20, pH6 クエン酸緩衝液で賦活化)  
 c: マウス抗ビメンチン抗体 (clone; V9, 賦活化処理なし)  
 d: マウス抗ビメンチン抗体 (clone; V9, pH6 クエン酸緩衝液で賦活化)

ヒト正常小腸におけるビメンチン染色. 抗原性の賦活化を行わない場合, ウサギ抗ビメンチン抗体 (a) はマウス抗ビメンチン抗体 (c) に比べエピトープのマスキングの影響は少なく, 反応は強かった. クエン酸による賦活化を行った場合は, ウサギ抗ビメンチン抗体 (b) およびマウス抗ビメンチン抗体 (d) の染色性, 特異性の差異は認められなかった.

### 最後に

マウス組織における免疫組織化学染色は, 様々な遺伝子レベルでの解析が進む現在においても, 発現される蛋白レベルの解析・証明には重要な解析手法の一つといえる. ウサギモノクローナル抗体は, マウス組織を対象とする我々にとって内因性免疫グロブリンを考慮する事なくモノクローナル抗体を使用できる点で有用であり, 多種類のウサギモノクローナル抗体開発・供給に期待する.

### 参考文献

1) M. Ito, H. Hiramatsu, K. Kobayashi, K. Suzue, M. Kawahata, K. Hioki, Y. Ueyama, Y. Koyanagi, K. Sugamura, K. Tsuji, T. Heike, and T. Nakahata . NOD/SCID/ $\gamma$  c<sup>null</sup> mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. Blood. Vol: 100. pp3175-3182. 2002