

熱湯処理を用いた酵素抗体法多重染色

昭和大学藤が丘病院 病理診断科

池田勝秀 鈴木孝夫

はじめに、熱湯処理を用いた酵素抗体法三重染色の染色例を提示する（写真 1）。

各抗体の陽性部位が色鮮やかに染色されている。多重染色法は同一切片上で複数の抗原を検出することが可能であり、抗原分布の相互関係を観察する際に優れた手法となる。我々は、酵素抗体多重染色法の技術を確認すべく種々の検討を行い、熱湯処理を用いた手法が有用であるという結論を得た。本稿においては、多重染色の種類と変遷、現在行われている多重染色法の問題点を解説し、私共の確立した酵素抗体多重染色を紹介する。

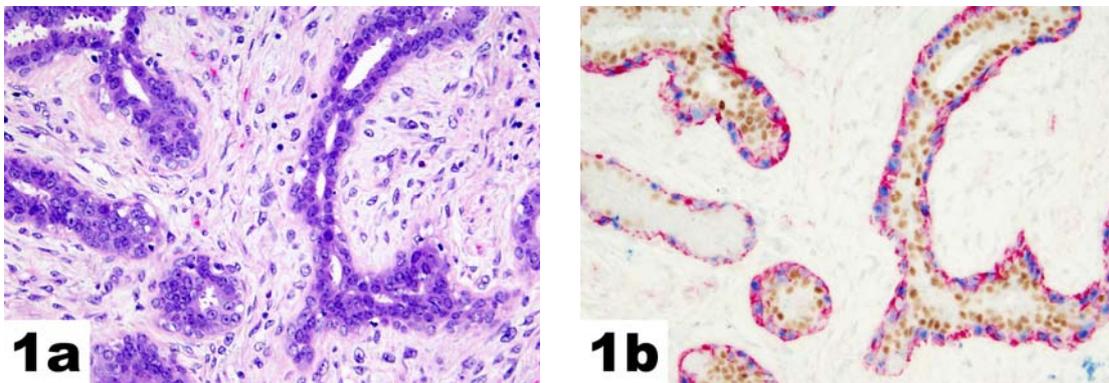


写真 1 乳腺 線維腺腫。

- a : ヘマトキシリン・エオジン染色（以下、HE 染色）。
- b : 酵素抗体法三重染色。青色（PermaBlue 発色）で p63 を検出，赤色（Fast Red II 発色）で Smooth muscle actin を検出，茶色は 3,3-diaminobenzidine（以下，DAB）を用い，Progesterone receptor の検出を行っている。

1. 多重染色法の種類と変遷

酵素抗体法の検出法は、直接法→間接法→PAP 法→アビジン・ビオチン法と、より高感度な方法へと展開され、現在では、ポリマーを用いた高感度でありながら簡便な間接法（ポリマー法）が一般化してきている。これに伴い、酵素抗体法多重染色も高感度化へと推移している。

酵素抗体法多重染色（以下、多重染色）は、異種動物の一次抗体を用いる方法、複数の検出法を用いる方法、異なるアイソタイプ的一次抗体を用いる方法、複数の標識酵素を用いる方法など、これまで多くの多重染色法が報告されている。しかし、従来からの方法では、検出抗原に制限が加わるなど、汎用性に欠けていた。これは、一次抗体のほとんどがマウスおよびウサギにより免疫された抗体であり、標識酵素はペルオキシダーゼ (POD) およびアルカリホスファターゼ (ALP) の二種類であることに起因する。したがって、同種動物種由来の一次抗体および同一の標識酵素でも検出可能な多重染色法が、以前より望まれていた。

近年では、各抗原検出のステップ間に熱湯処理を行い、一次抗体、二次抗体および標識酵素活性を失活させ、交差反応・再反応を阻止することにより同種動物種由来の一次抗体を用いた多重染色が可能となった¹⁻⁴。この方法は汎用性が高く、広く用いられている。

2. 多重染色における交差反応・再反応

ここで、同種動物種由来の一次抗体および同一の標識酵素を用いた場合の、交差反応・再反応を解説する。

なお、抗サイトケラチンマウスモノクローナル抗体（Pan Cytokeratin, clone: AE1/AE3, 以下、AE1/AE3）は細胞質、抗増殖細胞核抗原マウスモノクローナル抗体（Proliferating Cell Nuclear Antigen, clone: PC10, 以下、PCNA）は核内に反応を呈する。両抗体ともにマウスモノクローナル抗体であり、使用した標識酵素は両者とも ALP である。（写真 2）

写真 2a と 2b の違いは熱湯処理の有無である。2a は各検出間に熱湯処理（40 分間）を行い、2b は熱湯処理を行っていない染色である。熱湯処理を行っていない 2b では、赤色に呈色した細胞質に青色がかぶったため、紫色になっている。この原因として考えられる反応を、下図に示す。

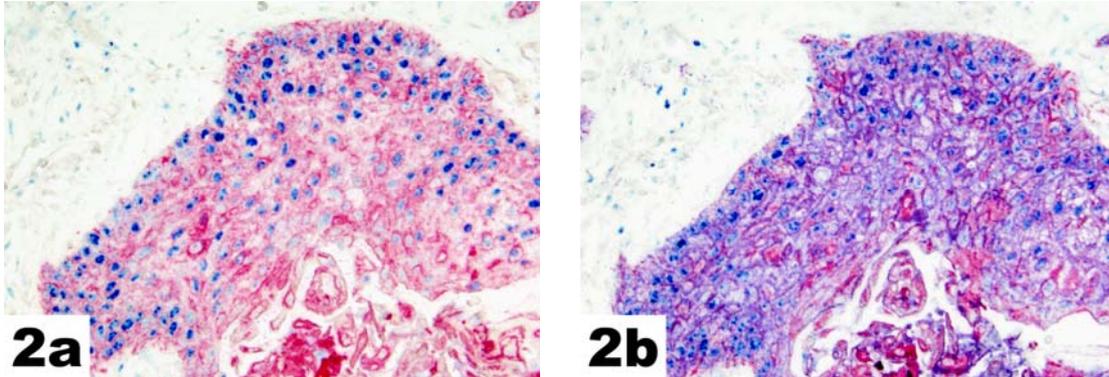
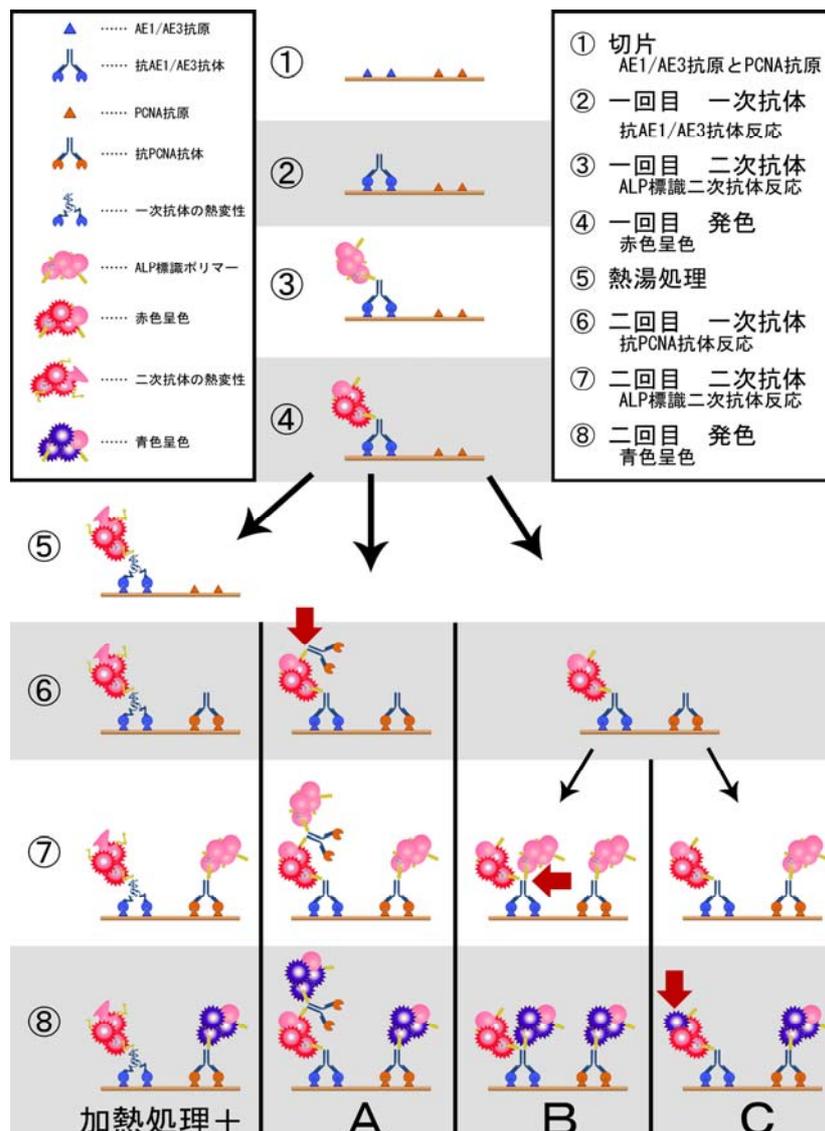


写真 2 子宮頸部 扁平上皮癌を用いた酵素抗体法二重染色。

- a: AE1/AE3 を赤色で検出し、熱湯処理を 40 分間施行後、PCNA を青色で検出。それぞれの色が鮮やかに染色されている。
- b: AE1/AE3 を赤色で検出し、熱湯処理を施行せず、PCNA を青色で検出。AE1/AE3 抗原部位の細胞質（赤色）に青色（PCNA 検出色）がかぶったため、紫色に染色されている。



- a) 一回目で用いた二次抗体と、二回目に用いた一次抗体の交差反応 (⑥A ↓)
- b) 一回目で用いた一次抗体と、二回目に用いた二次抗体の交差反応 (⑦B ←)
- c) 残存する標識酵素の再反応 (⑧C ↓)

染色がかぶった原因として、上記の三種類があり、いずれの反応も生じていると考えられる。

写真 3a, 3b は POD と ALP を使い分けて検出した染色である。異なる標識酵素を用いても、a), b) の要因により染色のかぶりが発生する。

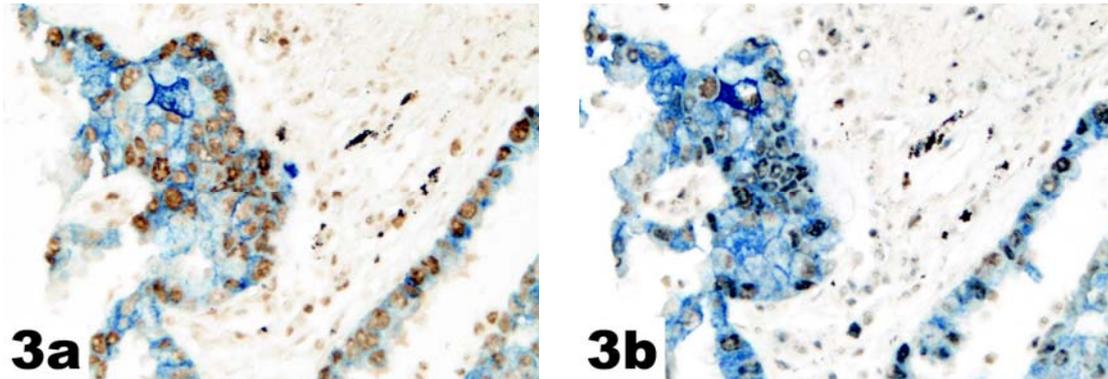


写真 3 肺 腺癌を用いた酵素抗体法二重染色。

- a : PCNA を POD 標識二次抗体を用いて、茶色で検出し、熱湯処理を 20 分間施行後、AE1/AE3 を ALP 標識二次抗体を用いて、青色で検出。それぞれの色が抗原部位に呈色している。
- b : PCNA を POD 標識二次抗体を用いて、茶色で検出し、熱湯処理を施行せず、AE1/AE3 を ALP 標識二次抗体を用いて、青色で検出。PCNA 抗原部位の核（茶色）に青色（AE1/AE3 検出色）がかぶったため、黒色に染色されている。

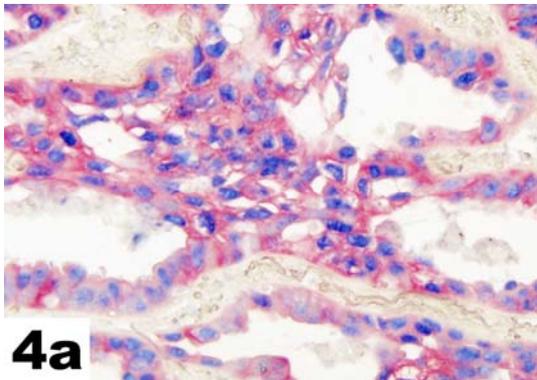
3. 同種動物種由来の一次抗体を用いた多重染色法

一次抗体の交差反応を回避する方法として、0.1M グリシン緩衝液 (pH2.2) を用いた「残存する一次抗体を解離する方法」が古くから知られている⁵。この方法は、1~2 時間の攪拌洗浄による解離を行うが、後に、この方法では完全に解離することはできないと報告されている⁶。そして、より簡便で確実な方法として、熱湯処理を用いる手法が考案された¹。これは各検出間に 98℃・5 分間×2 (計 10 分間) の加熱処理を施すことにより、前段階の「一次抗体」「二次抗体」および「標識酵素」を不活性化し、交差反応・再反応を防いでいるのが特徴である。加えて、二次抗体にポリマー試薬を用いることで、高感度・簡便・汎用性に優れ、再現性のある多重染色が行えるとされている²⁻⁴。しかしながら、標識酵素は 5 秒、ポリマーを用いた二次抗体は 10 分の熱湯処理で失活化するものの、一次抗体は熱湯処理では完全に失活しないと、近年われわれは報告した⁷。以下にその内容を抜粋し記載する。

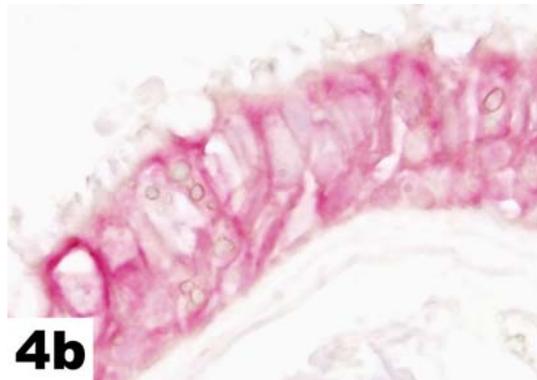
4. 一次抗体の失活時間

写真 4, 5 は抗 Thyroid Transcription Factor マウスモノクローナル抗体 (clone: SPT24, 以下, TTF-1) と AE1/AE3 を用いた二重染色である. 写真 4 では TTF-1 を先に検出し, 写真 5 では AE1/AE3 を先に検出している (a, b ともに同一切片上の組織). なお, 両抗体ともにマウスモノクローナル抗体であり, 各検出ステップ間には 10 分間の熱湯処理を加え, 二次抗体には ALP 標識のポリマー試薬のみを用いている. 写真 4 では鮮やかに二重染色が施行され, 交差反応・再反応も生じていないが, 写真 5a では細胞質の赤色調が強くなり, また, 本来抗原性を示さない線毛円柱上皮に TTF-1 検出色 (青色) がみられることにより (写真 5b), 交差反応・再反応が生じていると考えられる. 写真 4, 5 ともに同一条件 (一次抗体, 二次抗体, 標識酵素, 発色色素, 熱湯処理時間) で検出しているため, 交差反応の原因はこれらの試薬に依存するものではない. 両者の違いは一次抗体の検出順のみである. したがって, 熱湯処理による一次抗体失活の有無が交差反応の原因と推測される.

この推測をもとに, 様々な一次抗体の熱失活時間を調べた. 結果は, 「抗体により失活時間が異なる」というものであった. 論文⁷の一部を抜粋し, 表 1 として末尾に掲載にする. われわれは, これらの違いが, 抗体の動物種・アイソタイプ, 検出に用いた臓器, 賦活条件等に起因していないことから, 「切片上に存在する抗原量に依存する」のではないかと考えている.



4a

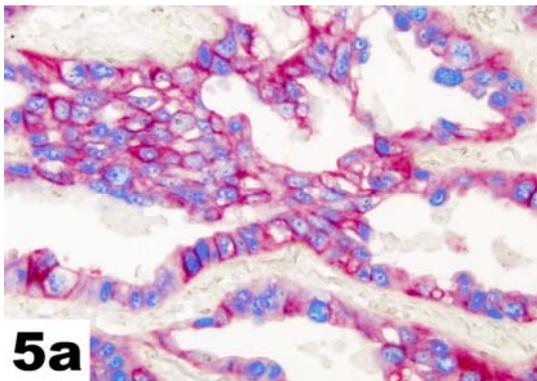


4b

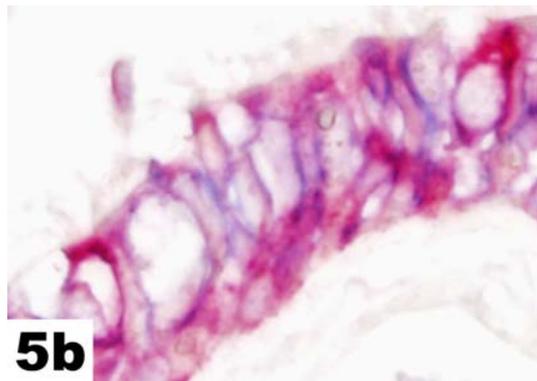
写真 4 肺 腺癌を用いた酵素抗体法二重染色.

a, b ともに同一切片上の組織. TTF-1 を青色で検出し, 熱湯処理を 10 分間施行後, AE1/AE3 を赤色で検出.

- a: 腺癌部位. それぞれの色が抗原部位に呈色している.
- b: 気管支線毛円柱上皮. 赤色のみの染色結果である.



5a



5b

写真 5 肺 腺癌を用いた酵素抗体法二重染色.

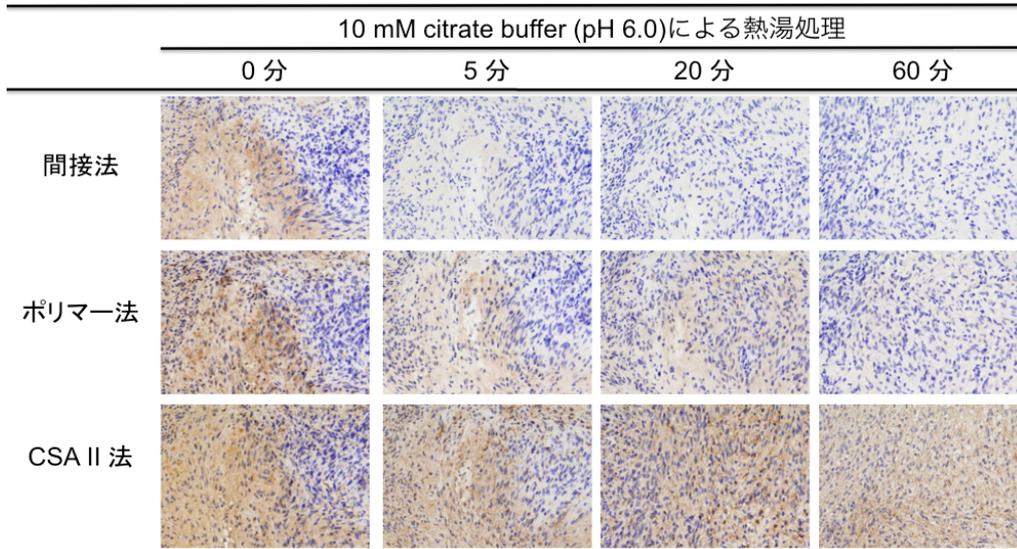
a, b ともに同一切片上の組織. AE1/AE3 を赤色で検出し, 熱湯処理を 10 分間施行後, TTF-1 を青色で検出.

- a: 腺癌部位. AE1/AE3 抗原部位の細胞質 (赤色) に青色 (TTF-1 検出色) がかぶったため, 赤色調が強くなっている.
- b: 気管支線毛円柱上皮. 本来, 抗原性を有さない部位に青色 (TTF-1 検出色) が呈色している.

5. 一次抗体の抗原性失活と検出法の感度

様々な熱湯処理時間と、検出方法に間接法、ポリマー法、ビオチンフリータイラマイド シグナル増幅システム (Biotin-Free Catalyzed Signal Amplification System, 以下, CSA II 法) を用いた比較検討結果を下図に示す (検出感度: 間接法 < ポリマー法 < CSA II 法)。

方法は、抗原賦活化→一次抗体反応 抗神経特異エノラーゼマウスモノクローナル抗体 (neuron specific enolase: NSE, clone: BBS/NC/VI-H14) →熱湯処理→各検出法→発色。



間接法では 5 分間の熱湯処理で検出されなくなっているものの、ポリマー法、CSA II 法では 20 分間でも検出されており、CSA II 法は 60 分間でも検出されている。この結果から、一次抗体の抗原性は完全には失活していないと考える。また、一次抗体の抗原性は熱湯処理時間に比例して失活していくが、検出法の感度が高い場合、残存する少量の抗原を検出しまうためと結論づけられる。

6. 熱湯処理を用いた酵素抗体法多重染色

我々の検討した 78 種類の一次抗体のうち、52.6%の一次抗体は 10 分間の熱湯処理で失活したが、23.1%は 60 分間の熱湯処理でも失活しなかった。一次抗体は完全に失活しないという現実があるものの、熱湯処理を用いた多重染色が完全否定されたわけでもない。切片上の抗原量に対する一次抗体の失活時間、そして、一次抗体検出法の感度を熟知することにより、熱処理時間を使い分けることで有用な方法となり得るのではないかと考えた。

以下に多重染色の染色例を提示する。(写真 6~9)

細胞の大きさが小さいリンパ球や (写真 6)、同一細胞内の複数抗原 (写真 7) にいたっても多重染色が可能である。また、多重染色を用いることによって、脈管侵襲の確認や (写真 8)、癌腫成分と肉腫成分の増殖能の違い⁸ (写真 9) 等の検討が可能となる。参考までに、今回染色した反応性リンパ節の三重染色手順を表 2 として末尾に掲載する。なお、一次抗体失活のための熱湯処理の条件は、用いた切片で CD4 および CD8 が失活する 10 分間に設定した。

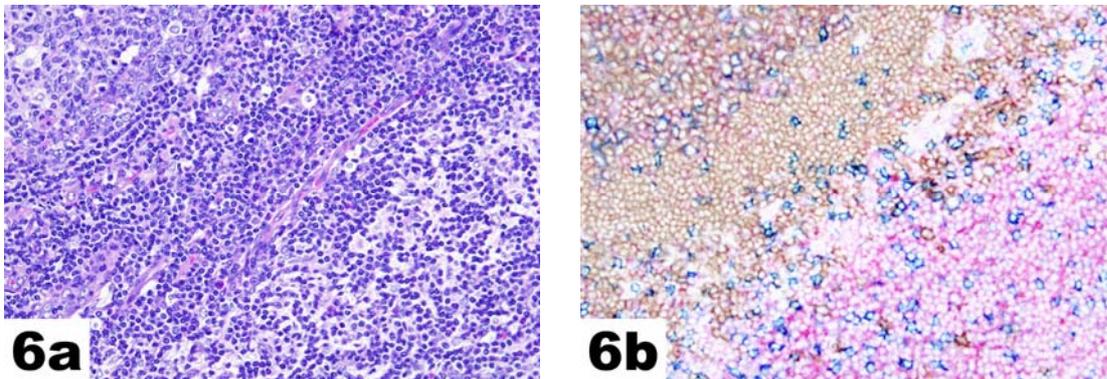


写真 6 反応性リンパ節.

a: HE 染色.

b: 酵素抗体法三重染色. CD8 (clone: 1A5) を青色で検出, CD4 (clone: 1F6) を赤色で検出, CD20cy (clone: L26) を茶色で検出.

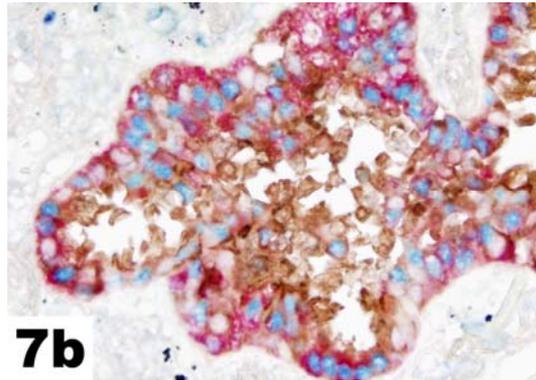
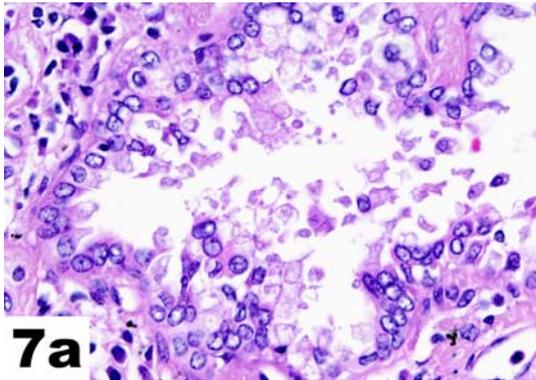


写真7 肺 腺癌.

a : HE 染色.

b : 酵素抗体法三重染色. TTF-1 を青色で検出, AE1/AE3 を赤色で検出, Epithelial membrane antigen (clone: E29) を茶色で検出.

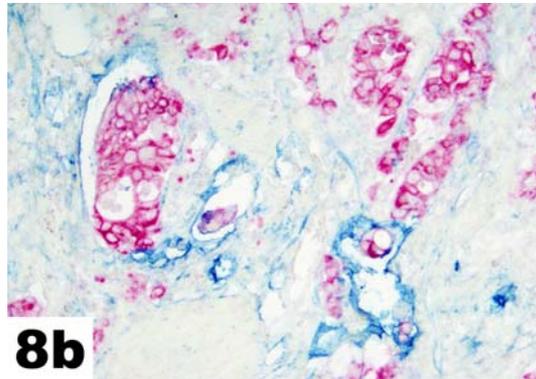
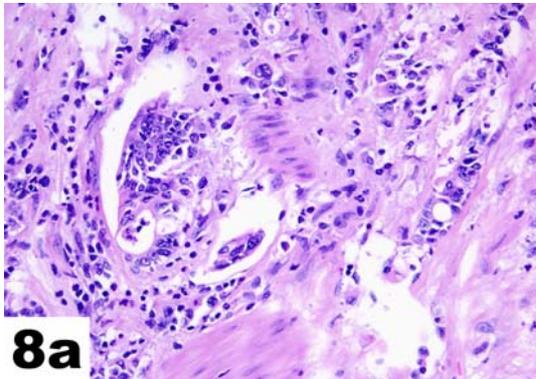


写真8 胃 腺癌.

a : HE 染色.

b : 酵素抗体法二重染色. D2-40 (clone: D2-40) を青色で検出後, AE1/AE3 を赤色で検出.

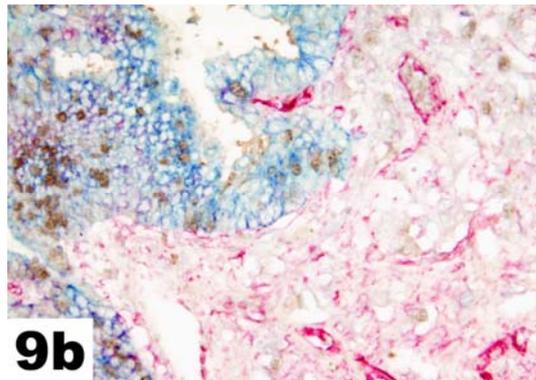
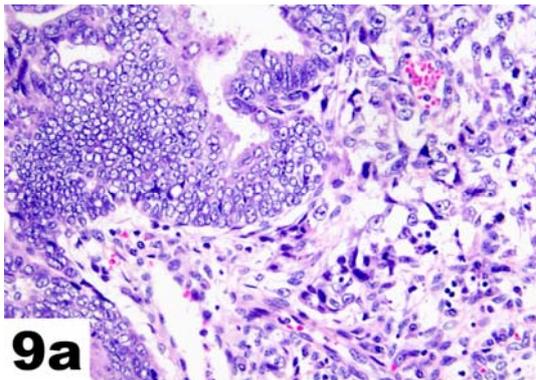


写真9 子宮体部 癌肉腫.

a : HE 染色.

b : 酵素抗体法三重染色. AE1/AE3 を青色で検出, Vimentin (clone: V9) を赤色で検出, Ki-67 (clone: MIB-1) を茶色で検出.

7. 染色時のアドバイス

実際に熱湯処理による多重染色を行う際は、用いる一次抗体の抗原性が熱湯処理で失活するかどうかをあらかじめ確認する。多重染色を行うブロックの連続切片を作製し、用いる一次抗体に対して、本稿5のごとく「抗原賦活化→一次抗体反応→熱湯処理（0分，10分，…）→二次抗体反応→発色」を行い、存在する抗原量および熱湯処理により検出不能になるかを確認する。熱湯処理時間は任意に複数設定しても良いが、約半数の抗体が10分間で失活し、また、過度の熱湯処理は過染の原因になるため、10分に設定することを推奨する。熱湯処理後も検出してしまいう抗体は、検出順の最後に用いるとよい。

多重染色では、通常の免疫染色を複数回行う。このため、三重染色以上では1日では終わらないのが欠点でもある。我々の施設では、二回目検出の一次抗体反応までを当日中に、以降は翌日に行い、2日間をかけて行っている。

この他、多重染色を行う上でのポイントを以下に記載する。

- A) 赤・青・茶色のコントラストから、抗原量の少ない検出に青色を用いるのが望ましい。
- B) 長時間の熱湯処理は過染を生じやすい。このため、短時間の熱湯処理で失活する一次抗体から検出し、失活までに処理時間を要するものはあとに検出すると良い。
- C) ALP発色はDAB発色に比べ、呈色までに時間を要するため、一回目・二回目の検出に使用するのが望ましい。加えて、反応を繰り返すことによって、切片上が抗体により複雑化してくると考えられるため、抗原量の少ない検出は最初に行うとよい。われわれは、青（抗原量少）→赤→茶（抗原量多）の順番が妥当と考えている。
- D) 過酸化水素水や熱処理により不活性化してしまう抗原が存在するため、それらの検出は一回目に行う。
- E) 抗原賦活化には検出抗原によって様々な手法があり、賦活力の強い条件で処理してしまうと、過染が生じたり、検出できなくなる抗原も存在する。従って、賦活力の弱い条件の抗原から検出するのが望ましい。強い賦活法の条件に合わせて、各抗体の希釈倍率や発色時間の調整を行うのも一つの手法である。後者で行うと、抗原賦活化は最初の一回で済む。

8. まとめ

熱湯処理を用いた多重染色は、数多く存在する多重染色法の中でも、簡便で汎用性に優れた方法であり、ポリマー法を併用することで高感度な検出法となる。一次抗体の特性（陽性となる細胞の種類および局在性、熱・過酸化水素水処理などによる抗原の保持性、抗原賦活条件、過染のしやすさ、発色に要する時間）を熟知することで、再現性ある多重染色が可能になると考えられる。

参考文献

1. Lan HY, Mu W, et al. A novel, simple, reliable, and sensitive method for multiple immunoenzyme staining: use of microwave oven heating to block antibody crossreactivity and retrieve antigens. *J Histochem Cytochem* 1995;43:97-102.
2. 池田勝秀, 鈴木孝夫, 他. 高感度間接法を用いた酵素抗体法三重染色. *医学検査* 2003;52:944-949.
3. 鈴木孝夫, 池田勝秀. 熱湯処理を用いた免疫組織化学多重染色法. *Medical Technology* 2004;32:1298-1301.
4. 池田勝秀, 鈴木孝夫, 他. 技術講座 病理 酵素抗体法三重染色. *検査と技術* 2005;33:803-808.
5. Nakane PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigen using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem* 1968;16:557-560.
6. Tramu G, Pillez A, et al. An efficient method of antibody elution for the successive or simultaneous localization of two antigens by immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1978;26:322-324.
7. Ikeda K, Suzuki T, Tate G, et al. Multiple immunoenzyme labeling using heat treatment combined with the polymer method: an analysis of the appropriate inactivation conditions of primary antibodies. *Acta Histochem* 2009; in press.
8. Ikeda K, Tate G, Suzuki T, et al. Effusion cytodagnosis of carcinosarcoma derived from the female genital tract: immunohistochemical features of MMP-7 and Ki-67 and Immunofluorescence double staining analyses of eight cases. *Gynecol Oncol* 2005;97:323-329.

表 1

一次抗体 ; クローン	用いた組織切片	10 mM citrate buffer (pH 6.0)を用いた熱湯処理					
		0min	5min	10min	20min	30min	60min
Actin (Muscle); HHF35	Nasal cavity, Rhabdomyosarcoma	+	+	-	-	-	-
Actin (Smooth Muscle); 1A4	Breast, Fibroadenoma	+	+	-	-	-	-
Alpha-1-Fetoprotein; P	Liver, Hepatoblastoma	+	-	-	-	-	-
beta-catenin; 14/Beta-Catenin	Liver, Hepatoblastoma	+	+	+	-	-	-
CA 125; M11	Ovary, Adenocarcinoma	+	-	-	-	-	-
Calretinin; DAK-Calret 1	Mesothelium	+	+	-	-	-	-
CAM5.2; CAM5.2	Lung, Adenocarcinoma	+	+	+	+	+	+
Carcinoembryonic Antigen (CEA); P	Lung, Adenocarcinoma	+	-	-	-	-	-
CD4; 1F6	LN, Malignant lymphoma	+	-	-	-	-	-
CD8; 1A5	LN, Malignant lymphoma	+	-	-	-	-	-
CD20cy; L26	LN, Malignant lymphoma	+	+	+	+	+	+
CD23; 1B12	LN, Malignant lymphoma	+	-	-	-	-	-
CD30, Ki-1; Ber-H2	LN, Hodgkin' lymphoma	+	-	-	-	-	-
CD45 (LCA); 2B11+PD7/26	LN, Malignant lymphoma	+	+	+	+	+	+
CD56 (NCAM); 1B6	Carcinoid tumor	+	+	+	+	-	-
CD68; PG-M1	Dermato fibrosarcoma	+	+	+	+	+	-
CD79a; JCB117	LN, Malignant lymphoma	+	-	-	-	-	-
Chorionic Gonadotropin (hCG); P	Testis, choriocarcinoma	+	+	+	+	+	+
Cytokeratin 7; OV-TL 12/30	Colon, Adenocarcinoma	+	+	+	+	+	+
Cytokeratin 20; Ks20.8	Colon, Adenocarcinoma	+	+	+	+	+	-
D2-40; D2-40	Mesothelium	+	+	-	-	-	-
Desmin; D33	Nasal cavity, Rhabdomyosarcoma	+	+	+	+	+	+
Epithelial Membrane Antigen; E29	Lung, Adenocarcinoma	+	+	+	+	+	+
Estrogen Receptor alpha; 1D5	Breast, Ductal carcinoma	+	+	+	-	-	-
Factor VIII; F8/86	Hemangioma	+	-	-	-	-	-
Glial Fibrillary Acidic Protein; 6F2	Schwannoma	+	+	-	-	-	-
Ki-67; MIB-1	Lung, Squamous cell carcinoma	+	+	+	+	+	-
Melan-A; A103	Malignant melanoma	+	+	+	+	+	+
Melanosome; HMB-45	Malignant melanoma	+	+	+	+	+	+
Neuron-Specific Enolase (NSE); BBS/NC/VI-H14	Schwannoma	+	+	+	+	+	-
p53; DO-7	Colon, Adenocarcinoma	+	+	+	-	-	-
p63; 7JUL	Prostate	+	-	-	-	-	-
P504S; 13H4	Prostate, Adenocarcinoma	+	-	-	-	-	-
Placental Alkaline Phosphatase; P	Testis, Seminoma	+	-	-	-	-	-
Progesterone Receptor; PgR 636	Breast, Ductal carcinoma	+	+	+	+	+	+
Proliferating Cell Nuclear Antigen; PC10	Lung, Squamous cell carcinoma	+	+	+	-	-	-
S100; P	Schwannoma	+	+	+	+	+	+
Somatostatin; P	Pancreas	+	+	+	+	+	+
Thyroid Transcription Factor (TTF-1); SPT24	Lung, Adenocarcinoma	+	-	-	-	-	-
T cell restricted intracellular antigen-1; TIA-1	LN, Malignant lymphoma	+	-	-	-	-	-
Vimentin; V9	Ovary, Carcinosarcoma	+	+	+	-	-	-

P: polyclonal antibody, +: active, -: inactive.

表 2

1 回目	1	脱パラフィン, 脱キシレン, 水洗
	2	抗原賦活化 1mM-EDTA Tris Buffer (pH9.0), 95°C, 40 分, 1 時間自然冷却
	3	PBS, 5 分×3
	4	一次抗体 CD8 マウスモノクローナル抗体, 37°C, 1 時間
	5	PBS, 5 分×3
	6	二次抗体 ヒストファイン シンプルステイン AP (MULTI)*, 常温, 30 分
	7	PBS, 5 分×3
	8	ALP 発色 PermaBlue/AP
	9	水洗
熱湯処理, 15mM リン酸緩衝液 (pH6.0), 98°C, 10 分		
2 回目	10	水洗
	11	PBS, 5 分×3
	12	一次抗体 CD4 マウスモノクローナル抗体, 4°C, 一晚
	13	PBS, 5 分×3
	14	二次抗体 ヒストファイン シンプルステイン AP (MULTI)*, 常温, 30 分
	15	PBS, 5 分×3
	16	ALP 発色 FastRed II
	17	水洗
熱湯処理, 15mM リン酸緩衝液 (pH6.0), 98°C, 10 分		
3 回目	18	水洗
	19	3%過酸化水素水, 10 分
	20	水洗
	21	PBS, 5 分×3
	22	一次抗体 CD20cy マウスモノクローナル抗体, 37°C, 1 時間
	23	PBS, 5 分×3
	24	二次抗体 ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI)*, 常温, 30 分
	25	PBS, 5 分×3
	26	POD 発色 DAB
	27	水洗, 蒸留水
	28	水溶性封入

*ニチレイバイオサイエンス社