

蛍光抗体法と酵素抗体法の比較

東京医科大学病院 病理診断部

渡部 顕章

はじめに

免疫組織化学 (immunohistochemistry) は、抗原抗体反応という特異性の高い反応を利用して、組織・細胞内の抗原物質の局在 (存在場所) を明らかにする方法である。抗体の結合部位を検出するために蛍光色素を利用した蛍光抗体法 (immunofluorescence method)、酵素を利用した酵素抗体法 (immunoenzyme method)、金属を利用した金属標識抗体法 (immunocolloid method) に分類される。本稿では、日常われわれが病理検査で、主に行っている蛍光抗体法および酵素抗体法の利点と欠点について述べる。

1. 蛍光抗体法と酵素抗体法の概要

1) 蛍光抗体法とは

蛍光抗体法は、1955年 Coons らによって発表され、それ以来多くの改良が加えられた結果、現在は高度に洗練された信頼性の高い技法となった。蛍光抗体法による染色標本は解像度と S/N 比 (signal to noise ratio) が高く、適切なフィルターを用いることにより多重染色した場合でも識別性が極めて高い特性を有する。また、発光体が微小なものであってもコントラストが十分にあれば、明瞭に検出できる利点がある。そのほかにも、共焦点レーザー顕微鏡への応用や医学、生物学的な研究領域において幅広く活用されている。

2) 酵素抗体法とは

酵素抗体法は、酵素によって抗体を標識し、抗体の結合部位を酵素反応によって発色させることにより抗原物質の局在を明らかにする技法である。酵素抗体法は、光顕および電顕でも観察ができる点が特徴であり、1966年に Nakane と Pierce によって開発された。直接法や間接法のように抗体に直接酵素を結合させて標識する方法が狭義の酵素抗体法 (酵素標識抗体法) であるが、その後、PAP 法 (peroxidase-antiperoxidase method)、ABC 法 (avidin-biotinylated peroxidase complex method)、LSAB 法 (labeled streptavidin biotinylated antibody method)、

CSA 法 (catalyzed signal amplification method)、ポリマー法 (universal immunoenzyme polymer method) などの高感度法が開発され、現在では特異抗体と酵素を用いる方法を総称して酵素抗体法とよんでいる。現在では、その取扱いの簡便さから、幅広い分野で利用されている。

そこで、蛍光抗体法と酵素抗体法の相違点を比較検討した。

2. 蛍光抗体法と酵素抗体法の比較

蛍光抗体法と酵素抗体法の相違点を表 1 にまとめた。主な事項について解説する。

表 1 蛍光抗体法と酵素抗体法の比較

	蛍光抗体法	酵素抗体法
標識物質	FITC(緑色) RITC(赤色) CY, Alexa 系色素など他にも多くの蛍光色素が利用される	ペルオキシダーゼ(HRP) アルカリホスファターゼ(ALP)
検出感度	良好	より良好(増感が可能)
反応機序と操作性	主に抗原抗体反応をもちいた直接法比較の簡便である	・抗原抗体反応と酵素化学反応をもちいた間接法 ・内因性酵素活性のブロッキングと発色操作が必要
非特異反応	ほとんどない	あり (内因性の酵素活性など)
コントラスト	良好 (自家蛍光の問題はごくまれである)	ときに不良(生体内色素との鑑別を要する場合あり)
多重染色	可能	可能 (細胞内局在が同一の場合は困難)
観察方法	蛍光顕微鏡 (暗視野での観察のため背景がわかりにくい)	光学顕微鏡 (陽性細胞の同定が容易で背景がわかりやすい)
永久標本	基本的には作製不可能(1~2週間) (現在では長期保存可能な色素と封入剤の開発により可能になってきている) *画像として保存可能	可能
電顕応用	不可能(抗 FITC 抗体を用いれば可能だが、一般的には行われない)	可能
共焦点顕微鏡への応用	可能	不可能
自動染色機	なし(基本的に手作業)	あり (機械化が可能で大量に染色する事が出来る)

1) 固定の影響と検出感度

蛍光抗体法は、未固定の培養細胞に、直接蛍光標識して、細胞の性質やタンパク質の局在を直接観察することが可能である。また一般の病理検査室において未固定臓器を直接切り出し、新鮮凍結切片として使用することが多い。この方法は、未知の抗原を検出する際、微量の抗原を的確に検出する最適な方法であり、腎生検や皮膚生検で用いられている(図1)。とくに腎生検では、糸球体基底膜の膜部分に線状や顆粒状に陽性像として染色され、メサンギウム領域においては、びまん性や顆粒状に陽性となる。これらの細かい所見は、ホルマリン固定後の蛍光抗体法や酵素抗体法標本では、うまく染まらないことがある。したがって、ホルマリン固定パラフィン切片に比べて形態保持は不十分であるが、新鮮凍結切片の方が抗原性の保持にはたいへん優れている。しかし、多量の新鮮凍結組織を長時間保存することは困難であり、retrospective study は不向きである。

それに対して、酵素抗体法も当初は凍結切片を用いていたが、最近ではホルマリン固定パラフィン切片を用いることが多い。その理由としてはホルマリン固定された切片は形態保持に優れ、HE 標本と対比して形態観察が可能である。それに加え検体の取扱いが容易であり、長期保存が可能である。また、蓄積されたパラフィンブロックを使って retrospective study が可能なことも重要な利点である。しかし、固定から一連の切片作製過程で、組織内の抗原性にさまざまな影響を少なからず受け、検出感度の低下がおり、凍結切片に比べ細かい陽性所見が観察しづらい、あるいは染まらない欠点を持っている。ホルマリンによる架橋形成が検出すべき抗原(タンパク質)をマスキングし偽陰性となることがあり、このため抗体反応の前段階として抗原賦活化処理を加える必要がある。この操作は、組織内のタンパク質がどのような影響を受けているか未知なため、それぞれの抗体ごとに抗原賦活化処理法を選択し、最適な条件を検討して染色を実施する

必要がある。これにより固定後の検体においても非常に多くの抗原を検出することが可能になっている。抗原保持という点において優れた PLP (periodate-lysine-paraformaldehyde)、ブアン固定などもあるが、日常的にはあまり行われていないのが実情である。

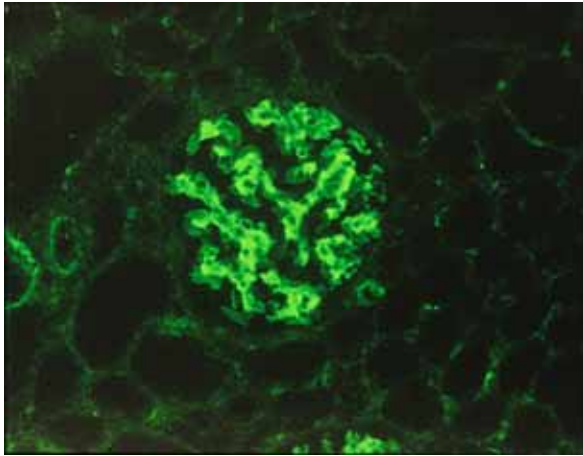


図1 腎系球体、蛍光抗体法 (FITC 標識) IgG 染色

陽性部位が暗視野の背景の中に浮かび上がって観察される。

2) 検出方法による利点と欠点

現在病理検査において、日常的に多く用いられている蛍光抗体直接法と酵素抗体法で主に用いられている広義の間接法を中心に述べる。

1 直接法

一般的な病理検査室において蛍光抗体法は、直接法が多く用いられるが、利点として、抗原抗体反応が一回のみのため操作方法が極めて簡便である、標識抗体の分子量が小さいため浸透性が良いことがあげられる。しかし、特異抗体それぞれに直接標識しなければならない点に加え、市販品も限られているため、汎用性に欠けるのが欠点である。現在蛍光色素の改良により、蛍光強度が強く、退色が少なく安定した蛍光色素を用いた二次抗体が作成され、蛍光抗体法は間接法での実施も多くなってきている。

一方酵素抗体法も従来は直接法で行われていたが、様々な理由から次に述べる間接法へと変化していった。

2 間接法

間接法の利点は、第一に、組織の抗原に結合した多種類の特異的一次抗体を検出するために標識二次抗体を統一して使うことができ、現在では力価や特異性の優れた二次抗体が多数販売されていることから、汎用性が高い。第二に、反応が2ステップのため、より増強された染色所見が得られる。

間接法の欠点としては、抗原抗体反応を繰り返すため、直接法よりも時間と手間がかかることや、二次抗体が組織と非特異的結合を起こすことによる非特異的染色を引き起こす可能性があることが考えられる。

3 増感法

間接法をさらに感度の高い反応として発展させたものが、ABC法 (avidin-biotinylated peroxidase complex method)、LSAB法 (labeled streptavidin biotinylated antibody method)、CSA法 (catalyzed signal amplification method)、ポリマー法 (universal immunoenzyme polymer method) などの高感度法であり、酵素抗体法は、固定による抗原性の低下をこれらの増感法により補うことで、蛍光抗体法と同様の検出感度を取得している。以前は、直接法より感度の高い間接法が日常的に使用されていたが、今日ではポリマーを使って間接法をさらに高感度に改良したポリマー法がわが国では最も普及している。

しかしながら、抗原局在部位に、抗体・標識物質からなる大きな分子団が、形成されることによって発色強度が増す反面、抗原局在部位への浸透性が低下し、偽陰性に陥る可能性がある。しかしながら、ポリマーの低分子化により浸透性を高めた製品が市販され、上記の弱点がほぼ解消されている。

3) 発色コントラストについて

蛍光抗体法では、暗視野の黒い背景の中の蛍光発色という光と影（すなわち、光のコントラスト）で表現されているため、陽性像をはっきりと捕らえることが可能である。例えば、星が昼間に見えないのに、暗い夜空では、はっきり見えるのと同じである。また、陰性の場合、蛍光発色どころか背景組織も観察されない。夏の夜空に蛍を観察するがごとく、いるのかいないのかが分からない、暗闇のなかで、月明かりをたよりに蛍を探しているように例えられよう（図1）。

酵素抗体法は、3,3'-diaminobenzidine (DAB)、3-amino-9-ethyl carbazole (AEC) などの基質を用いて発色させるために明視野で観察することが可能で、後染色（核染色）を加えることにより背景も同時に観察できることが利点である。（色のコントラスト）パラフィン切片を用いた免疫染色は基本的には定性的であるが、近年では、HER2 遺伝子産物のように、発色強度と陽性細胞の割合から発現蛋白量を半定量化する方法が取り入れられているが、これは、固定や薄切・染色が一定条件下で実施されてはじめて評価可能となる。また、Ki-67 標識率も 1/4 刻み程度の半定量的評価は可能であるが、24%以上は悪性、24%未満は陰性というような細かい数字による評価は、なるべく避けるべきである。

基本的には、免疫組織化学におけるもっとも重要な役割としては、組織・細胞の構築と機能分子の局在を同時に観察できる点にある。すなわち、免疫組織化学は組織・細胞の機能の“場”を明らかにし、形態と機能の関連を解明する手段として用いられることを常に念頭に置き判定することが重要である。

4) 多重染色について

蛍光染色の最大の利点として、多重染色によって複数抗原の同時観察が容易に行えることがあげられる（図2~4）。一般に、蛍光色素とは一定の波長の光線（刺激光ないし励起光という）を当てることによって蛍光を発する物質であり、励起光によって発光する蛍光の波長は励起光のそれよりもつねに大きいという Stokes の法則が成立する。蛍光色素は固有の蛍光波長をもっており、特定波長の励起光によってもっとも強い蛍光を発する。これらの特徴により、同一組織切片上の異なる抗原を標的として、容易に多重染色をすることが可能である。また、同一組織切片上で、同一細胞内にある細胞骨格や膜蛋白を証明するとき、局在が異なる抗原の場合は異なる蛍光色素により表現されるが、局在が同じ場合は励起される蛍光どうしが混ざり合うことにより、別の色彩に表現される。蛋白が複雑に絡みあうような部位においては、蛍光色素がその構造に忠実に再現され、細部の詳細な観察が可能である。また、共焦点レーザー顕微鏡や画像をコンピューター上で立体的に構築することが可能な蛍光顕微鏡やコンピューターシステムが市販されている。このような機器を用いれば、多重染色と同様のことが容易におこなえ、なおかつ電子画像として永久的に保存でき蛍光抗体法における欠点が解消される（図5）。

一方、酵素抗体法による多重染色は、同一切片上の分布が異なる抗原や同一細胞内でも局在を異にする抗原の証明には適しているが、同一細胞内で局在が同じ蛋白を同時に検出する場合は、発色色素どうしが相互に影響しあうためコントラストが不十分で、染め分けができてにくい欠点がある。

酵素抗体法による多重染色も可能であるが、実際には染色するタンパク質の局在、抗体の性質や特性、場合によっては検出方法を慎重に選択する必要があり、至適条件設定が大変困難であることがあげられる。またコントラストがつきにくいことなどがあげられ染色結果に満足できる標本とするのが難しいことがある。現実的には、連続切片やミラー切片を用いて染色することにより多重染色と同様な効果が期待でき、酵素抗体法の欠点をカバーすることも可能である。

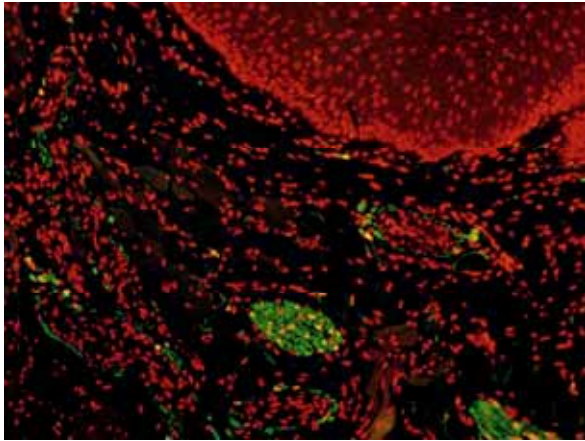


図2 舌、蛍光抗体法、S-100 タンパク染色
(S-100 ; FITC , 緑 核 ; PI (Propidium Iodide), 赤)

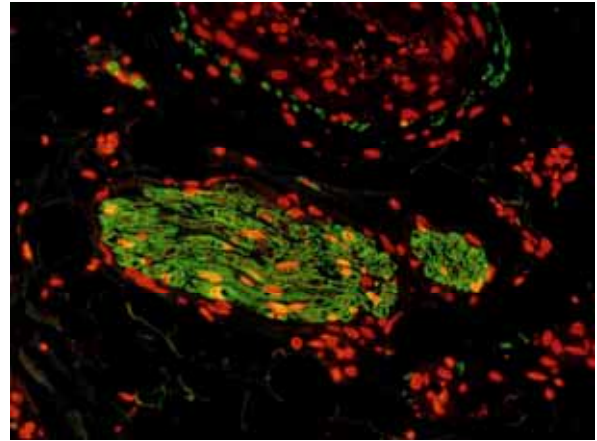
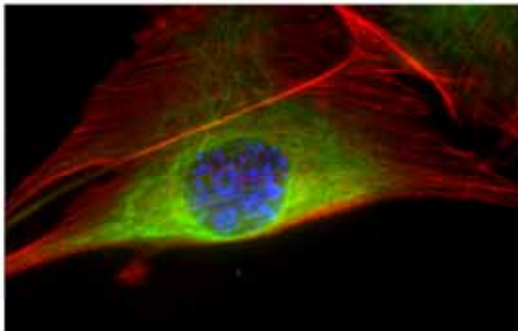
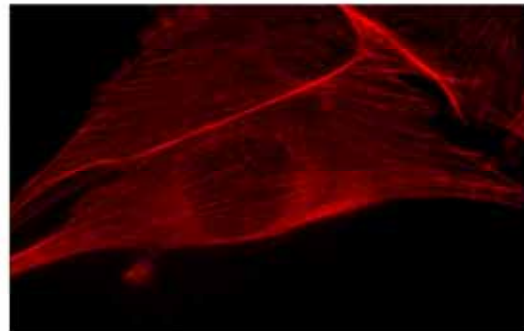


図3 舌、蛍光抗体法、S-100 タンパク染色
図2の強拡大

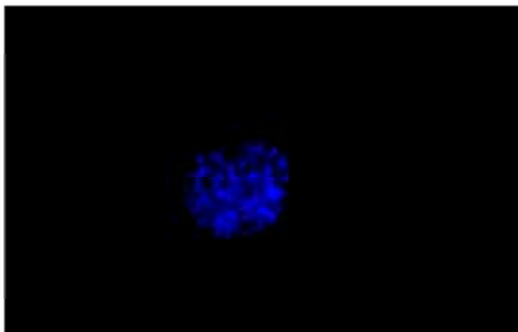
S-100 タンパクは細胞質及び核に局在する。S-100 陽性を示す核は両者を混合した色、すなわち黄色に発色する。蛍光抗体法は多重染色に優れるといわれるゆえんである。



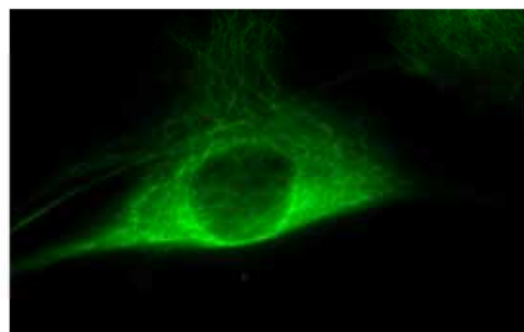
Multi Color Image
(核、チューブリン、アクチンの蛍光多重染色図)



Cy3
(チューブリン ; Cy3 , 赤)



DAPI
(核 ; DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) , 青)



FITC
(アクチン ; FITC , 緑)

図4 Multi Color Image、DAPI、Cy3、FITC の蛍光体多重染色

画像の取り込みは単色で行い、後で画像を重ね合わせると良質な組織像が得られる。

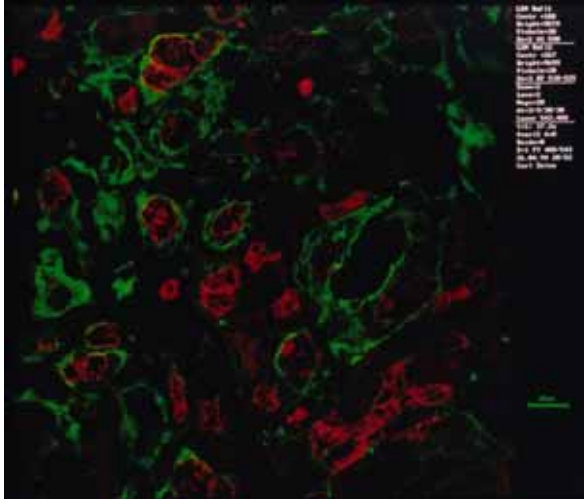


図5 絨毛癌、肺転移、HCG 染色

(S-100; FITC, 緑 核; PI, 赤) 共焦点レーザー顕微鏡による組織像

蛍光抗体法は、レーザー顕微鏡での観察、検索が可能である。

腫瘍細胞の細胞質内に HCG の局在が観察される。

5) 試料作製と観察方法について

蛍光抗体法では、当然暗室と蛍光顕微鏡が必須であり、また、切片の作製上多くの場合クリオスタットを用いた凍結切片を使用する。そのため凍結するディープフリーザーなどの特殊な冷却機器もなくてはならない。液体窒素、アルコール系の冷却溶媒なども必要で、その爆発、引火などの危険性、有害性（神経毒）、調達コストなどが問題となる。蛍光抗体法の最大の欠点は永久標本になりえない点である。しかし、最近では長期保存可能な蛍光色素が開発され、それに加えて蛍光減衰の少ない封入剤を用いることで、この欠点は改善傾向にある。また、電子画像として永久保存可能になっていることと、暗室のいらぬ蛍光顕微鏡が開発され、蛍光抗体法の実験環境が改善されている。

それに対して、酵素抗体法は既存の光学顕微鏡があれば観察可能であり、日常われわれが使用している機器で対応可能である。また、酵素抗体法では容易に永久標本が作製でき、何度でも観察可能である。

6) 蛍光抗体法と酵素抗体法の応用

一般的な病理検査において蛍光抗体法は、自己抗体の検出、皮膚の免疫性疾患の診断、腎生検の質的診断などごく限られた検査証明法として確立している。しかし研究や実験分野においては、未固定の培養細胞、生きた組織や細胞内での小器官、各種の分子、細胞内伝達シグナルなどを一定条件下においての蛍光抗体やプローブを用いた技法で、生化学的特異性を得やすく、その蛍光強度は一般的に物質の量（抗原量）に比例する。その性質に、高感度 CCD カメラ、共焦点レーザー顕微鏡、フローサイトメトリーなどの光学的技術や画像処理技術を応用することにより、時間空間的に可視化し、定量的解析を行うことが可能になってきている。

また、細胞が本来もっている抗原の局在部位が微小器官レベルまで、正確に把握できる利点があり応用の範囲が広がっている。

一方、酵素抗体法は、とり扱いの簡便さと組織全体の観察をする事にとっても優れた手法である。それに加え安定した染色試薬が開発され、染色の自動化がおこなわれている。自動化することで病理診断だけでなく広く実験的な分野においても、再現性が高く、人為的なエラーが少ないため、信憑性のあるデータ作りに欠かせないものとして広く普及している。

7) 判定上の注意点

いかに優れた染色方法でも、その使用上の利点、欠点や限界を知っておくことが重要である。

- 1 一般的に免疫組織化学染色において、たとえ陰性だとしても、抗原が存在しないと結論できない。なぜなら、検出感度が不十分である可能性が考えられる。その場合は、より高感度の検出系で、確かめる必要がある。また蛍光抗体法においては標識した蛍光の減弱などが考えられるが、コントロールスライドによる確認や蛍光の減弱が少なくより蛍光強度の高い Cy, Alexa などの蛍光色素に変えてみるのも重要である。また酵素抗体法において（通常ホルマリン固定パラフィン切片の場合）固定や組織の処理過程に抗原の流出、失活が起こり、偽陰性を呈する可能性があるからである。厳密には各抗原に対する最適な処理方法を行い、コントロールスライドと比較する必要がある。

- 2 蛍光抗体法においては反応強度が実際の抗原量に反映するため、その蛍光量を正しく測定すれば評価は可能である。
一方酵素抗体法において同一切片内の異なる部位や一定条件のもとで作製された異なる切片間で染色性の強弱を相互に比較するのは可能であるが、異なる条件や検体間で比較評価するのはあまり適切ではない。
- 3 パラフィン切片作製過程において人工産物が生成されることや、スライドガラスに付着したゴミに蛍光色素が沈着することがあり、これらのアーティファクトが偽陽性の原因となることも知っておくべきである。
- 4 異なった抗原でも共通の抗原決定基を有する場合があります。細胞の鑑別・同定にあたっては注意を要する。たとえば、細胞骨格蛋白には共通抗原性を有するものが多く、また、keratin や actin には複数の isoprotein が存在する。したがって、検出用抗体の選択には慎重におこなうべきである。
- 5 組織切片上において組織内に内因性物質によって偽陽性反応を起こすことがある。例えば、蛍光抗体法における自家蛍光の問題や酵素抗体法における内因性酵素活性、内因性ビオチンなどによる偽陽性化に注意しなければならない
- 6 現在多数の抗体が各社より販売され、容易に入手可能になってきたが、蛍光抗体法、酵素抗体法のどちらも抗体の良し悪しが結果に影響する。したがって購入する際は、抗体力価、ロット差、交差反応、不純抗体の混入などに注意する必要がある。

おわりに

蛍光抗体法と酵素抗体法について利点と欠点を述べた。

病理学などの形態観察を中心とする分野において、酵素抗体法は組織レベルの全体の観察に、蛍光抗体法は細胞レベルの微小な観察に有用であることがわかる。

両者の特徴を把握し、適材適所に使い分けることが、肝要である。

謝辞

本稿を執筆するにあたり、御指導賜った東京都済生会中央病院 病理診断科 向井 清 部長、神戸大学大学院 保健学研究科 病態解析学領域 鴨志田 伸吾 教授に深謝いたします。

参考文献

1. 日本病理学会編：病理技術マニュアル4 病理組織化学とその技術．医歯薬出版社，1986
2. 渡辺 陽之輔, 坂口 弘, 細田 泰弘編：病理組織標本の作り方 第6版, 医学書院, 1986
3. 浅野伍郎：診断・研究のための病理技術詳解3．免疫組織化学法．藤田企画出版，1992
4. 名倉 宏, 長村義之, 堤 寛編：改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法, 学際企画, 2002
5. 高田 邦明：組織細胞化学, pp17-24 学際企画, 2003
6. 鴨志田伸吾：免疫染色 至適条件決定法, 学際企画, 2009