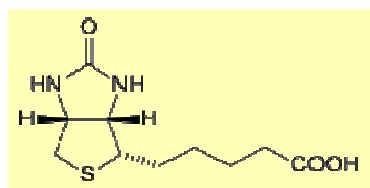


内因性ビオチンについて

順天堂大学大学院医学研究科研究基盤センター
細胞病理イメージング研究部門
末吉 徳芳

はじめに

ビオチンはビタミンB群複合体のひとつとして1927年にM.A.Boasによりネズミの抗卵白障害要素として発見されたとされているが、一説には1935年オランダのケーグル(F.Kögl)により卵黄中から発見されたとの記載もありさだかではない。酵母の増殖に必要な因子ビオス(bios)の1成分として研究されたためこの名が付いたようである。生卵白の大量投与によって皮膚に生じる炎症を防止する因子として発見された事からビタミンH(Hは皮膚を表すドイツ語Hautより)別名ビタミンB7とも呼ばれ(図1)腸内細菌により合成されて生体内に存在し、欠乏すると脱毛や皮膚炎をおこす。体内のアミノ酸や脂肪酸の分解・代謝を助ける。生化学的な役割は炭酸化反応(CO₂)で、トランスアミナーゼ系、脱水素酵素系に共役する代謝経路での補酵素として働いている。また、細菌類では重要な成長因子である。このような生体内に存在するビオチンを内因性ビオチンという。生体内でのビオチン含有量はヒトでは肝臓、腎臓、筋肉、乳腺、消化管で多く存在し、ブタでは腎臓>肝臓>筋肉の順とされる。



ビオチンの化学構造

特 性	
組成式	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S
分子量	244.31
外観	無色針状結晶
融点	232 ~ 233
水への溶解度(25)	22mg/100ml
その他	熱、光、酸に安定
	アルカリに不安定

図1 ビオチンの化学構造および特性

ビオチンの免疫染色への応用

抗原抗体反応の百万倍以上、結合力の強いビオチンとアビジンの反応性を利用して、1979年にGuesdon等が酵素と抗体を結合する方法(LAB法)を提唱した。1981年にはHsu等が更に改良しABC法を報告し、更にアビジンをストレプトアビジンに替えたLSAB法を考案した。すなわち一次抗体反応後、二次抗体にビオチンを結合させた抗体を用い、次いで標識抗体にはアビジン-HRP(ペルオキシダーゼ)複合体を反応させる事により、ビオチン-アビジン-HRPの複合体が出来上がる。そこでHRPをDAB(H₂O₂加ジアミノベンチジン)で発色させ抗原の局在を可視化する方法である。病理分野では特殊染色同様かなり汎用されている手技である。

内因性ビオチンと免疫染色

内因性ビオチンは上記の臓器において新鮮凍結切片では保存された状態で存在する(図2)。また、アルコール系固定液では失活しないが(図3~5)、アルデヒド系固定液では浸漬時間に応じて順次失活(図6~13)する。ただし、ヘマトキシリンによる核染が無い状態だと24時間処理の組織でもわずかに反応が確認される(図14)。酵素抗体法でアビジン-ビオチンの反応系を使用する場合はアルデヒド系固定液以外で固定された材料は上記の内因性ビオチンの存在に注意しなければなら

ない。即ち、上記標識抗体（アビジン-HRP）を反応する前に内因性ビオチン処理を施行しないと、内因性ビオチンの存在する場所にも標識抗体（アビジン-HRP）が反応して、結果非特異的反応となってしまうため偽陽性反応を惹起する（図 15）。簡単な内因性ビオチン処理の方法は無標識のアビジンとビオチンを結合させる事で防げる。アビジン 1 分子はビオチン 4 分子と結合する事が知られている。そこで内因性のビオチンにアビジンを結合させると内因性のビオチンとアビジンが結合する（図 16）。アビジンの残った未反応 3 分子部分に更に無標識のビオチンを結合させて、すべての未反応部分を塞ぐ（図 17）。

ところが、アルデヒド系固定液での固定材料でも水酸化ナトリウム加クエン酸緩衝液（pH7.0）、EDTA 溶液（pH8.0）尿素水溶液やトリス塩酸緩衝液を抗原賦活化溶液として加熱処理に使用した場合、肝細胞や腎尿細管上皮に内因性ビオチンの活性が復活する事がある（図 18）。

このような場合は、アビジンとビオチンの結合力を利用しない方法であるポリマー試薬（シンプルステイン MAX-PO；ニチレイバイオサイエンス社）などを用いて施行すると良い（図 19）。

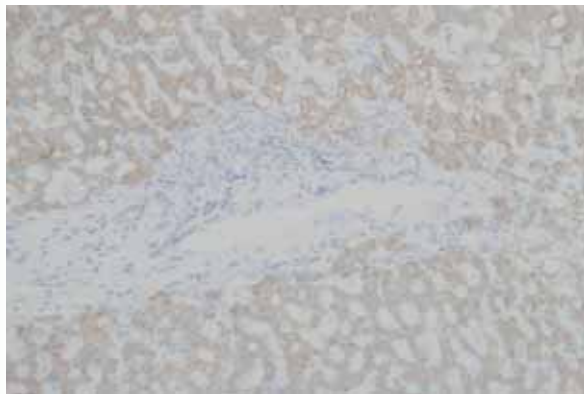


図 2 未固定（ヒト肝臓）
アビジン・HRP を反応させ、DAB 発色した例（X40）

アルコール系固定液（図 3～5）アビジン・HRP を反応させ、DAB 発色した例（X20）

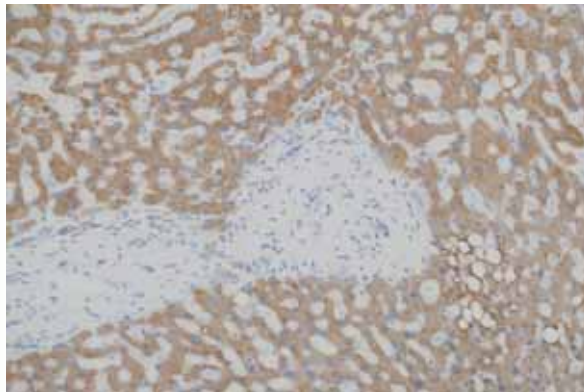


図 3 エタノール 10 分固定（ヒト肝臓）

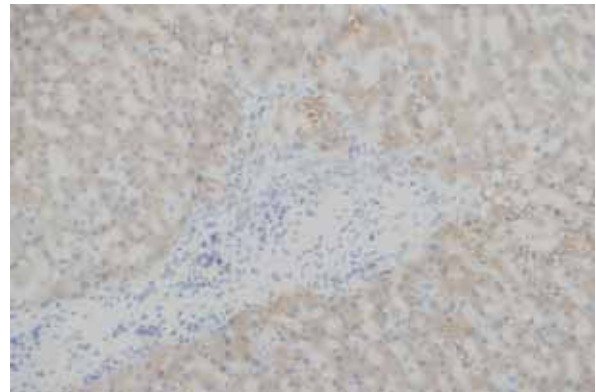


図 4 メタノール 10 分固定（ヒト肝臓）

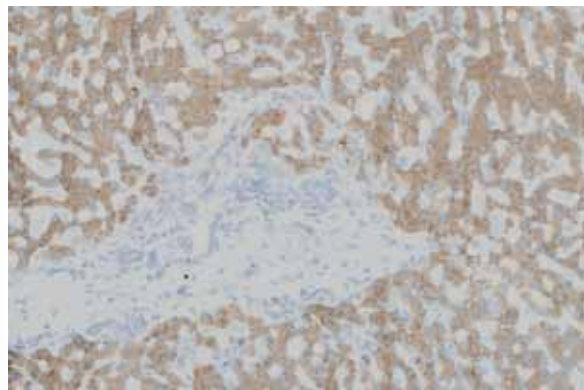


図 5 アセトン 10 分固定（ヒト肝臓）

アルデヒド系固定液 (図 6 ~ 13) アビジン・HRP を反応させ、DAB 発色した例 (X20)

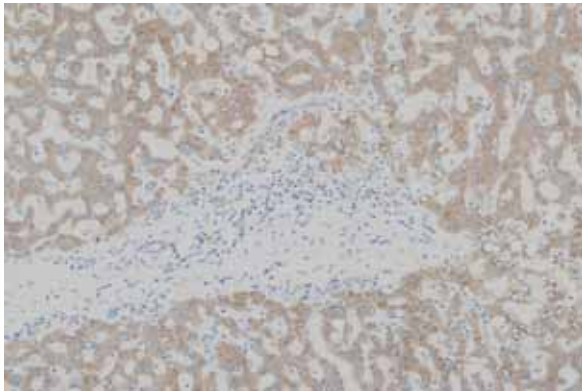


図 6 20%ホルマリン 5 分固定 (ヒト肝臓)

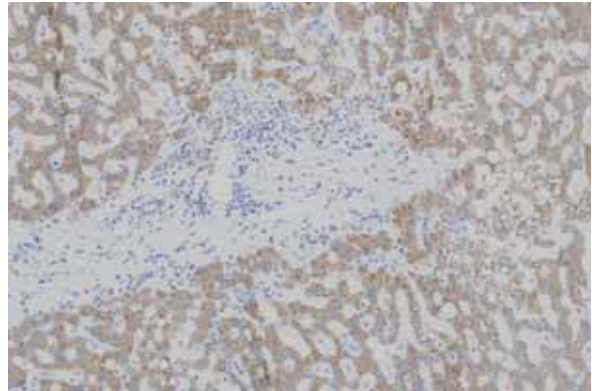


図 7 20%ホルマリン 10 分固定 (ヒト肝臓)

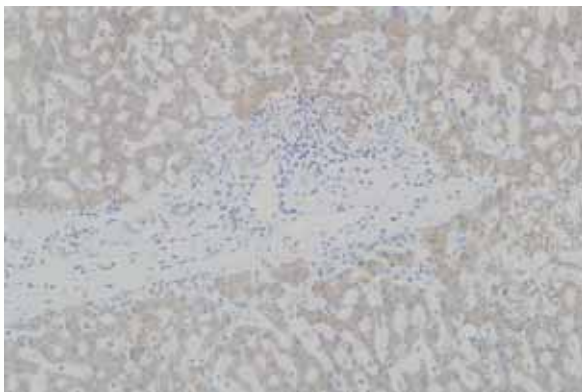


図 8 20%ホルマリン 30 分固定 (ヒト肝臓)

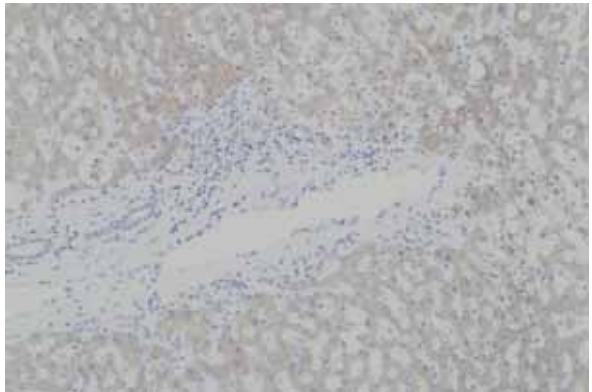


図 9 20%ホルマリン 1 時間固定 (ヒト肝臓)

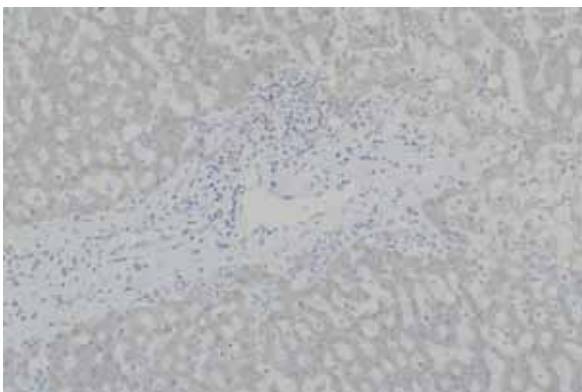


図 10 20%ホルマリン 2 時間固定 (ヒト肝臓)

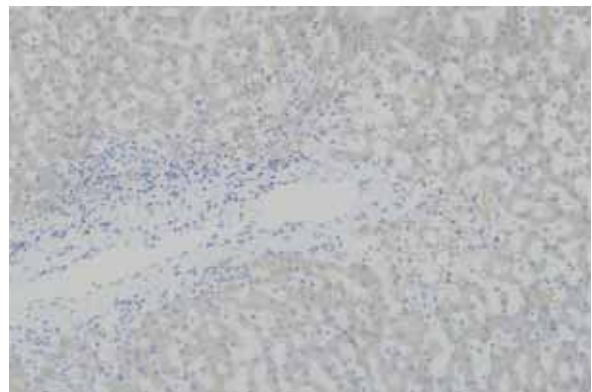


図 11 20%ホルマリン 3 時間固定 (ヒト肝臓)

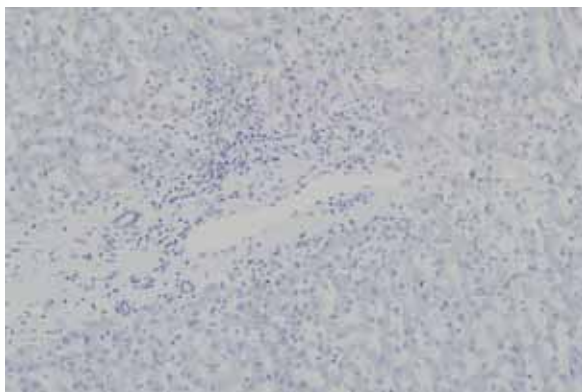


図 12 20%ホルマリン 5 時間固定 (ヒト肝臓)

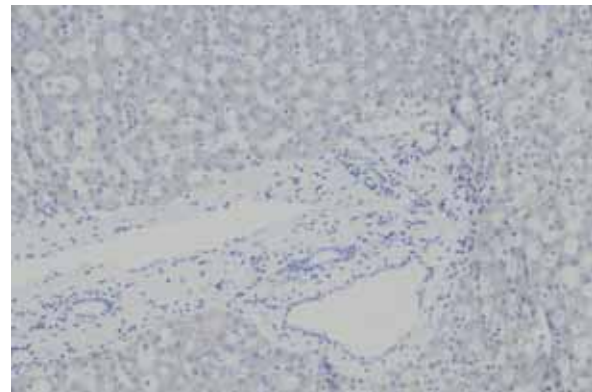


図 13 20%ホルマリン 24 時間固定 (ヒト肝臓)



図 14 20%ホルマリン 24 時間固定 (ヒト肝臓)
アビジン・HRP を反応させ、DAB 発色した例
後染色無し (X20)

Avidin-Biotin 系 (SAB 法) で起こる内因性ビオチンによる非特異反応の模式図 (図 15 ~ 17)

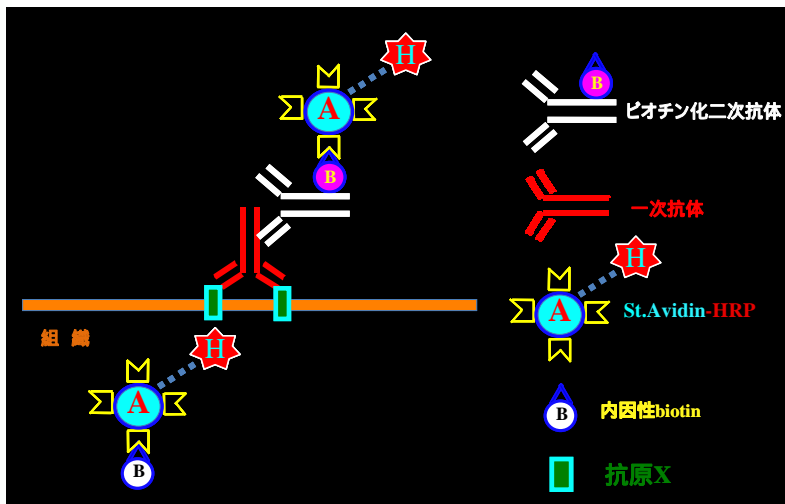


図 15
Avidin-Biotin 系の染色法を使用する際に内因性ビオチンをブロックしない場合、非特異的の反応が起こり偽陽性を惹起する。

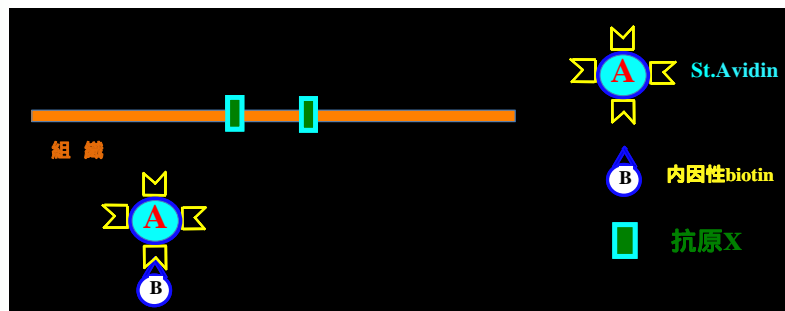


図 16
アビジン 1 分子を内因性ビオチンと反応させる。4 つのビオチンと反応する部分のうち、1 つが内因性ビオチンと結合する。

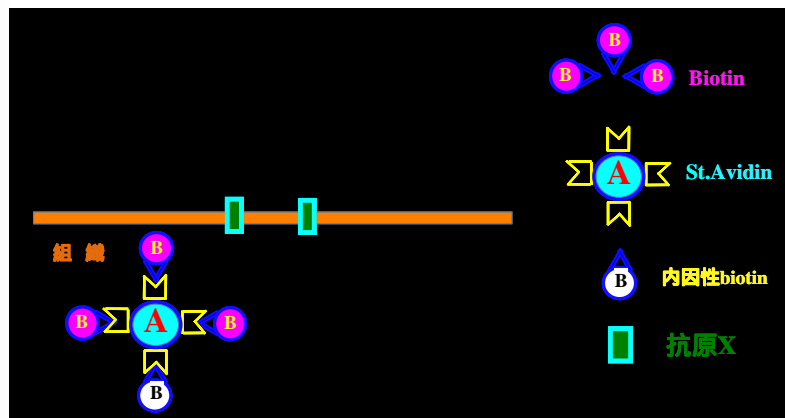


図 17
次いで、ビオチンを反応させ、アビジンの残っている 3 つの未反応部分にビオチン 3 分子を結合させる。これにより、全ての反応が安定化する。

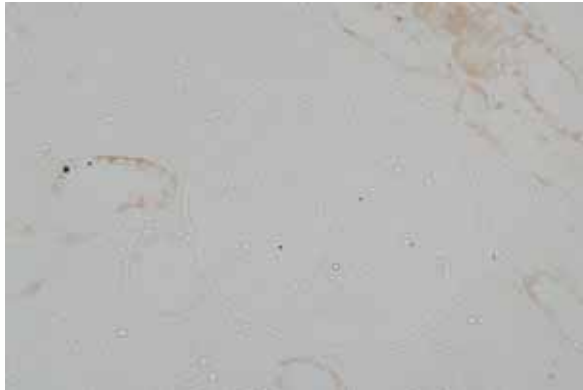


図 18 内因性ビオチンの活性 (0.1M EDTA pH8.0)

水酸化ナトリウム加クエン酸緩衝液 (pH7.0)、EDTA 溶液 (pH8.0)、尿素水溶液やトリス塩酸緩衝液を抗原活化溶液として加熱処理に使用した場合、肝細胞や腎尿管上皮に内因性ビオチンの活性が復活する。

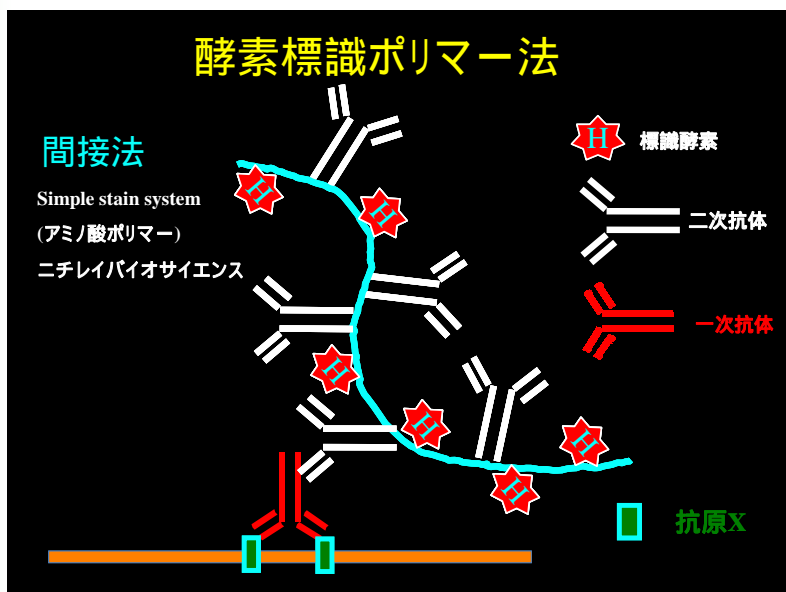


図 19 シンプルステインの反応模式図

おわりに

繰り返しになるが、内因性ビオチンの活性は肝臓、腎臓、筋肉、乳腺等の未固定新鮮凍結切片はもちろんの事、アルコール系固定液でも残っている。アルデヒド系固定液での短時間における処理では内因性ビオチンの反応は弱陽性を示す場合が多く観られる (図 6~13)。経験者の場合は細胞とその反応性から内因性ビオチンと判断できる (陽性部位、形態学的に判断可能である) と思われるが、正確性を求める場合は ABC 法や LSAB 法などの検出法を用いず、ポリマー試薬 (シンプルステイン MAX-PO; ニチレイバイオサイエンス社) など (図 19) アビジンビオチン系以外の検出方法を用いる。しかし、1 次抗体によっては ABC 法や LSAB 法でないと検出できない事もある。その場合は、市販されているビオチンのブロッキング試薬 (内因性アビジン・ビオチンブロッキングキット; ニチレイバイオサイエンス社) などを用いると好結果を得る事がある。