

## 発色の増感法

慶應義塾大学医学部病理学教室

阿部 仁

### はじめに

免疫組織化学染色の発色に際して 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 四塩酸塩発色による反応の色調が淡いことがある。このような場合には発色の感度を増加させる目的にて、次のような方法が一般的に行われる。1. 一次抗体の濃度を濃くする。2. 一次抗体の反応時間を長くする。3. 加熱処理やタンパク分解酵素処理など抗原賦活化法を行う。4. 間接法から ABC 法、LSAB 法への変更。さらには高分子ポリマー法や catalyzed signal amplification (CSA) 法での検出。<sup>1)</sup> 5. DAB 量や過酸化水素添加量を増やす。<sup>2)</sup> 6. 発色時あるいは発色後に増感法を用いる。<sup>3,4)</sup> 7. 蛍光染色に変更する。

本稿ではこれらの増感法のうち、特にペルオキシダーゼ発色時と発色後に発色反応の感度を増加させる方法を解説する。

### 増感法

#### 1. DAB 発色時の増感法

##### (1) イミダゾール溶液の使用

発色の増感法としては、手軽で最も使用されている方法の一つである。

DAB 20mg を 100mL の 0.05M トリス塩酸緩衝液、pH7.6 に溶解し、30%過酸化水素 5 $\mu$ L を加える。この DAB 溶液に 1M イミダゾール (imidazole) ストック溶液を 1mL 加えて発色する。

われわれの施設では、最初から DAB 溶液にイミダゾールを加えないで DAB 溶液のみで発色し、DAB 反応がプラトーに達したらイミダゾールを添加して、さらに反応を続けると茶色から褐色～黒褐色へと反応産物に変化する (図 1A)。

##### 1M イミダゾールストック水溶液

3.4g イミダゾール (Sigma 社) を 50mL イオン交換水に溶解して 4°C 保存。使用時に DAB 反応液に 1/100 量を加える。

##### イミダゾールと硫酸銅溶液処理

発色時に DAB 溶液にイミダゾールを加えて発色させ、水洗後 0.5%～1%硫酸銅水溶液に切片を 5～10 分間処理すると黒褐色の反応産物が得られる。DAB 単独使用時と比較すると明らかに発色色調は異なった色になるが、強い反応色を得ることが出来る (2. DAB 発色後の増感法、重金属イオンを用いる方法参照) (図 1A)。

##### (2) DAB 発色液への塩化コバルト、塩化ニッケル、硫酸銅の添加

DAB 50mg を 100mL の 0.05M トリス塩酸緩衝液、pH7.6 に溶解する。これに、1%コバルト (CoCl<sub>2</sub>) 水溶液、1%ニッケル (NiCl<sub>2</sub>) 水溶液、1%硫酸銅 (CuSO<sub>4</sub>) 水溶液を 2mL 添加するとそれぞれ暗青色、紫青色、灰青色となる (図 1B)。硫酸銅の添加では、背景の共染が目立ち (★)、顆粒状物質が出現してくる。

##### (3) 硫酸ニッケル・DAB 法

DAB 20mg と硫酸ニッケル (NiSO<sub>4</sub> · (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O) 40mg を 0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.6) 100mL に溶解する。発色色調は紫青色となる (図 1B)。

##### (4) 硫酸ニッケル・塩化コバルト・DAB 法

DAB 50mg を 100mL の 0.1M リン酸緩衝液、pH7.3 に溶解する。これに、1%塩化コバルト (CoCl<sub>2</sub>) 水溶液 2.5mL と 1%硫酸ニッケル (NiSO<sub>4</sub> · (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> · 6H<sub>2</sub>O) 水溶液 2mL を添加して、発色すると黒紫色となる (図 1B)。

硫酸ニッケル・塩化コバルト・DAB 法は、硫酸ニッケル・DAB 法とともに反応産物が強調され、綺麗な染色結果となる。

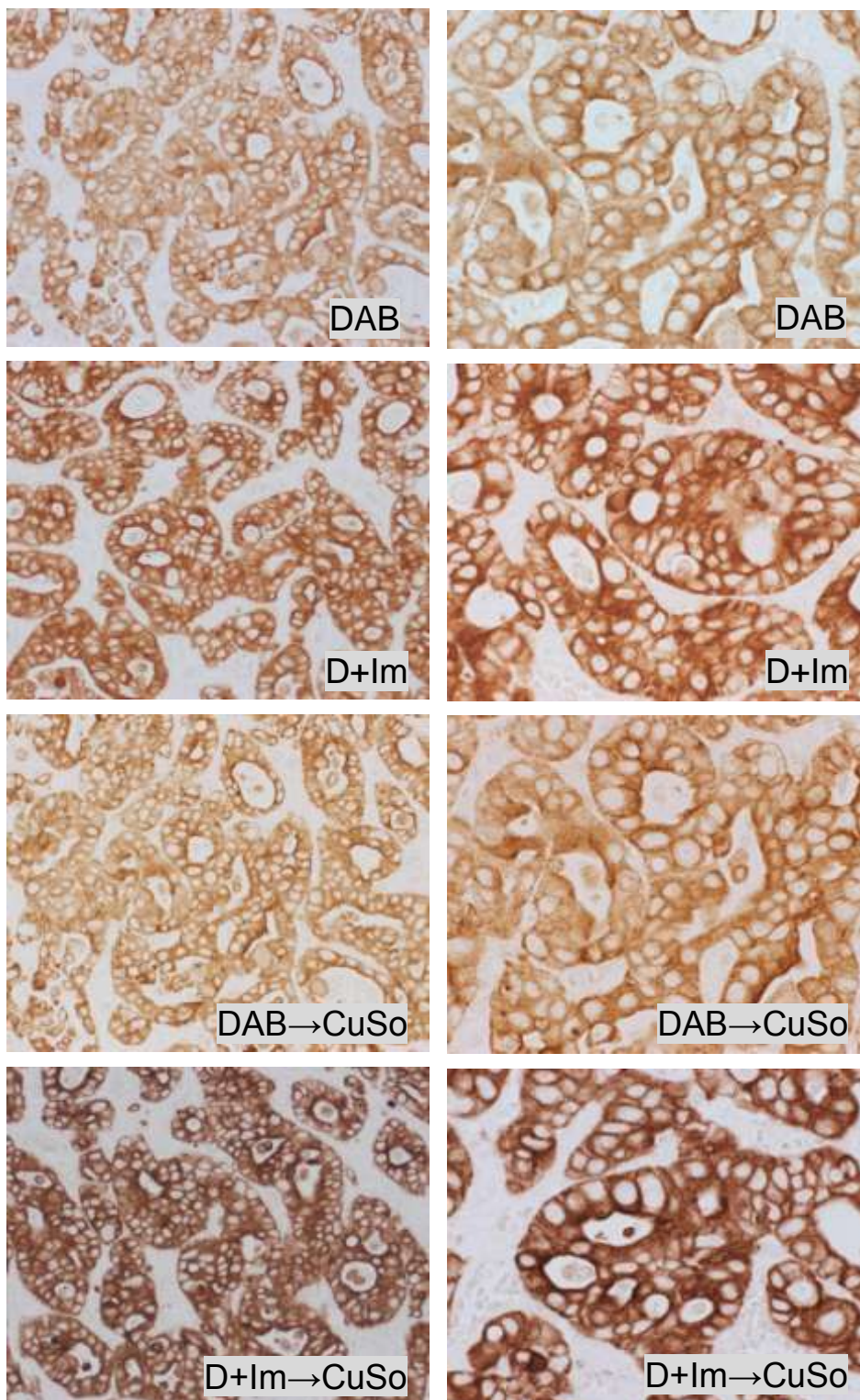


図 1A : DAB 発色時の増感法

DAB : DAB のみ、無処理。

D+Im : DAB 溶液中にイミダゾール添加して発色。

DAB→CuSo : DAB 発色後に硫酸銅溶液にて処理(重金属イオンを用いる方法参照)。

D+Im→CuSo : DAB 溶液中にイミダゾール添加し、発色後に硫酸銅溶液にて処理。

図 1A、1B は、同一ブロックでのパラフィン切片。

切片厚 : 4 $\mu$ m。

一次抗体 : 抗サイトケラチン抗体 (clone: AE1/AE3)、室温、3 時間反応。

二次抗体 : 室温、1 時間反応。

核染色なし。



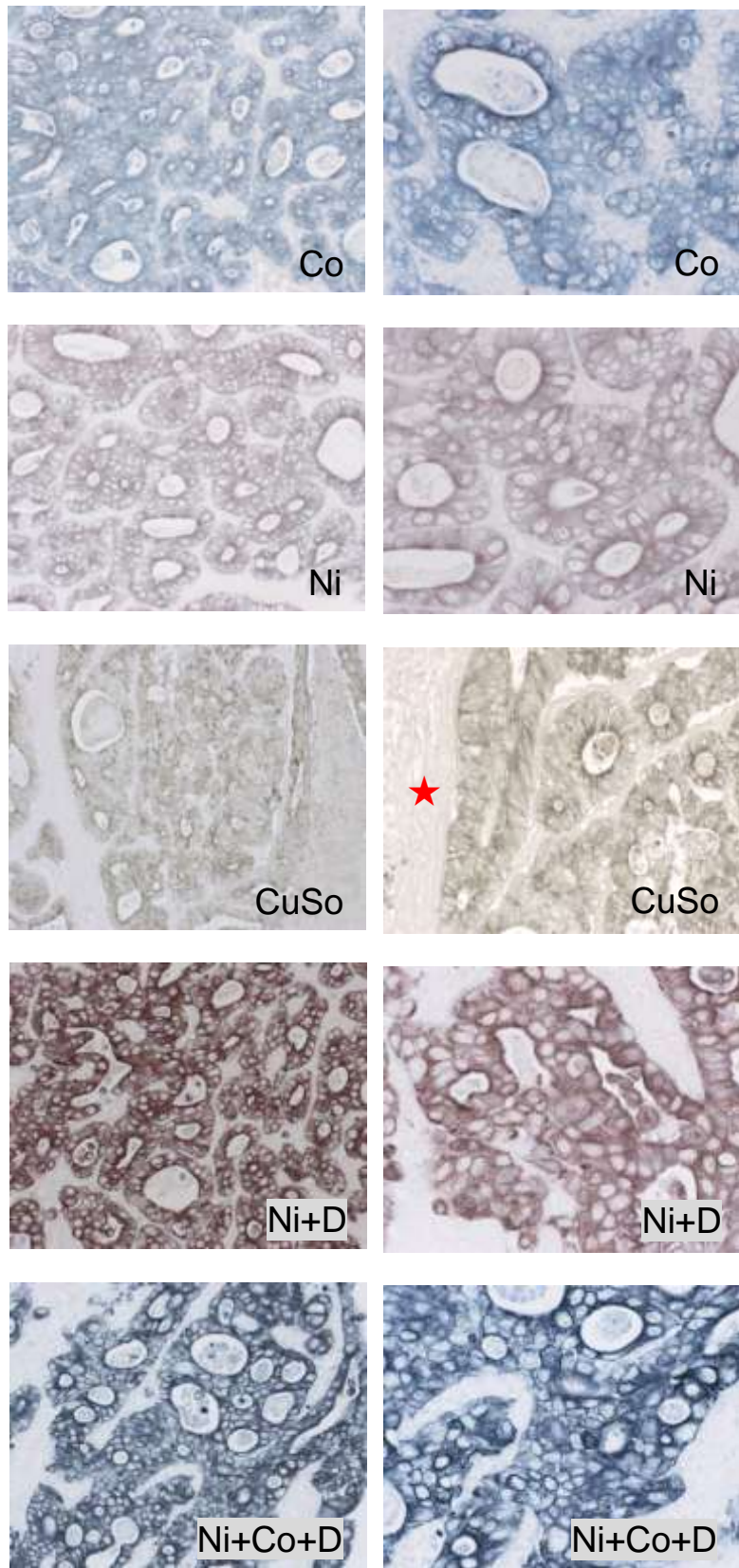


図 1B : DAB 発色時の増感法

Co : DAB 溶液中に塩化コバルト添加。  
 Ni : DAB 溶液中に塩化ニッケル添加。  
 CuSo : DAB 溶液中に硫酸銅添加。(★) 共染が目立ち、顆粒状の沈着物が出現。  
 Ni+D : 硫酸ニッケル・DAB 法。  
 Ni+Co+D : 硫酸ニッケル・塩化コバルト・DAB 法。

### (5) DAB の溶解にクエン酸-酢酸アンモニウム緩衝液の使用

DAB 溶解液に 0.05M トリス塩酸緩衝液、pH7.6 の代わりに、0.05M クエン酸-酢酸アンモニウム緩衝液 (citric acid - ammonium acetate buffer)、pH5.0 を用いる。茶色の反応がさらに強調される (図 2)。<sup>5)</sup>

### (6) DAB 以外の感度の高い発色剤の使用

ペルオキシダーゼ標識抗体を使用した際に、DAB 溶液よりも発色感度の高い tetramethyl benzidine (TMB) 試薬、Histo-Green 試薬 (図 2)、Hanker-Yates 試薬 (Data not shown) などの基質溶液を使用する。<sup>5)</sup>

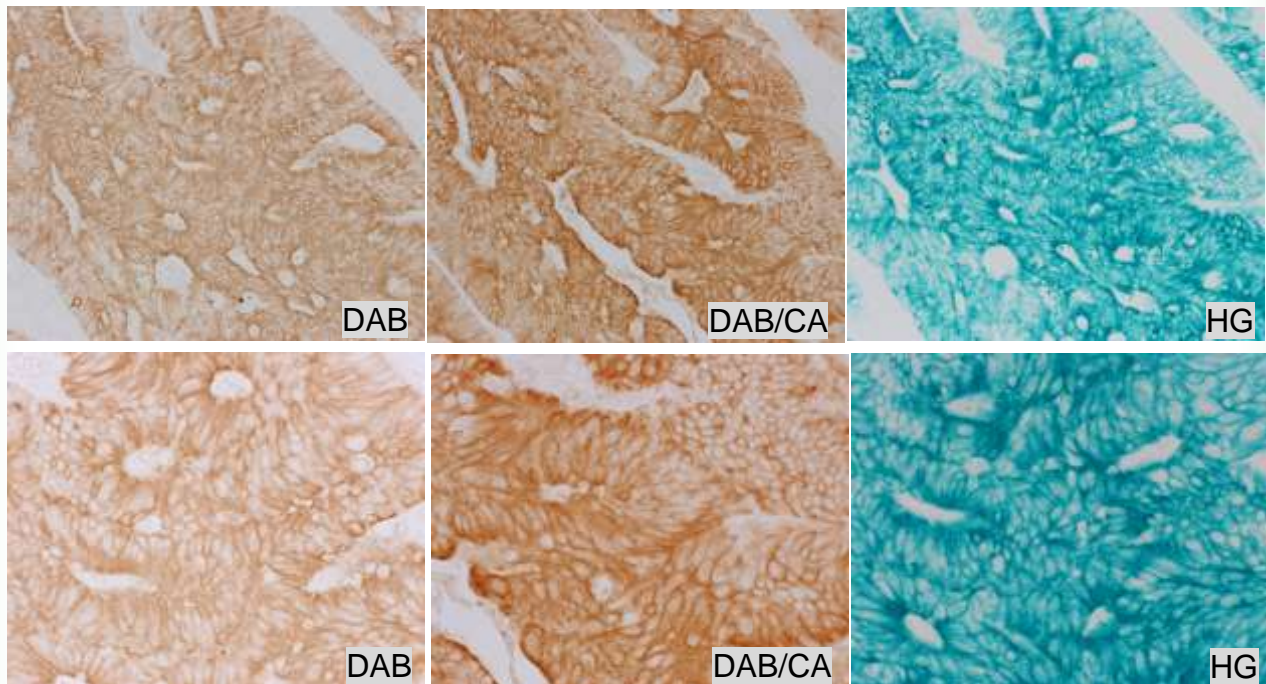


図 2 : DAB 発色時の増感法

DAB : DAB のみ、無処理。

DAB/ CA : DAB 溶解に 0.05M クエン酸-酢酸アンモニウム緩衝液、pH5.0 使用。

HG : Histo-Green 試薬にて発色。

図 2 は、同一ブロックでのパラフィン切片。

切片厚：4 $\mu$ m。

一次抗体：抗サイトケラチン抗体 (clone: AE1/AE3)、室温、3 時間反応。

二次抗体：室温、1 時間反応。

核染色なし。

## 2. DAB 発色後の増感法

### (1) 重金属イオンを用いる方法

DAB 発色後に流水水洗後、蒸留水を通してから重金属イオン溶液で処理する。

- ① 硫酸銅水溶液との反応：0.5%~1%硫酸銅水溶液に切片を 5~10 分間反応させると DAB 単独処理に比較して、やや黒色調が増す (図 1A)。イミダゾールを加えて発色させ、水洗後に硫酸銅水溶液で処理すると強い反応色となる (図 1A)。
- ② オスミウム酸との反応：DAB 発色後に切片を 1%オスミウム酸 (OsO<sub>4</sub>) 溶液で反応させると黒色となる (図 3A)。
- ③ オスミウム酸と 0.4%フェロシアン化カリウム・0.8%塩酸溶液との反応：DAB 発色後、オスミウム酸処理に続いて、0.4%フェロシアン化カリウム・0.8%塩酸溶液に 5~10 分間反応させると反応産物は黒色化する (図 3A)。
- ④ この他に、DAB 発色後に切片を 1%酢酸ウラン水溶液、1%塩化金水溶液、1%リンタングステン酸溶液などで反応させる (図 3B)。酢酸ウラン水溶液やリンタングステン酸溶液処理は、DAB 単独処理と比較してやや褐色調は増すがあまり差はみられない。塩化金水溶液では暗褐色調となり綺麗だが、切片を保管している際に反応産物が滲んで顆粒状となり退色してくる。



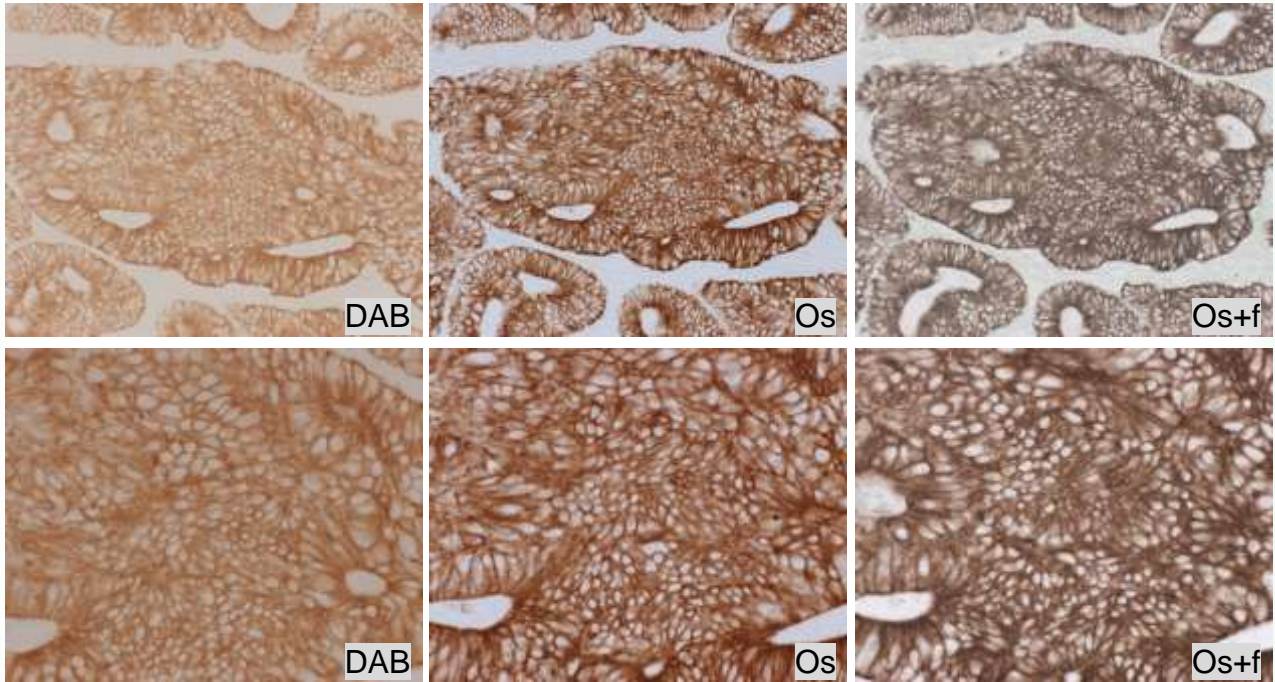


図 3A : DAB 発色後の増感法 金属イオンを用いる方法-1

DAB : DAB のみ、無処理。  
 Os : オスミウム酸との反応。  
 Os+f : オスミウム酸と 0.4%フェロシアン化カリウム+0.8%塩酸溶液との反応。

図 3A、3B は、同一ブロックでのパラフィン切片。  
 切片厚 : 4 $\mu$ m。  
 一次抗体 : 抗サイトケラチン抗体 (clone: AE1/AE3)、室温、3 時間反応。  
 二次抗体 : 室温、1 時間反応。  
 核染色なし。

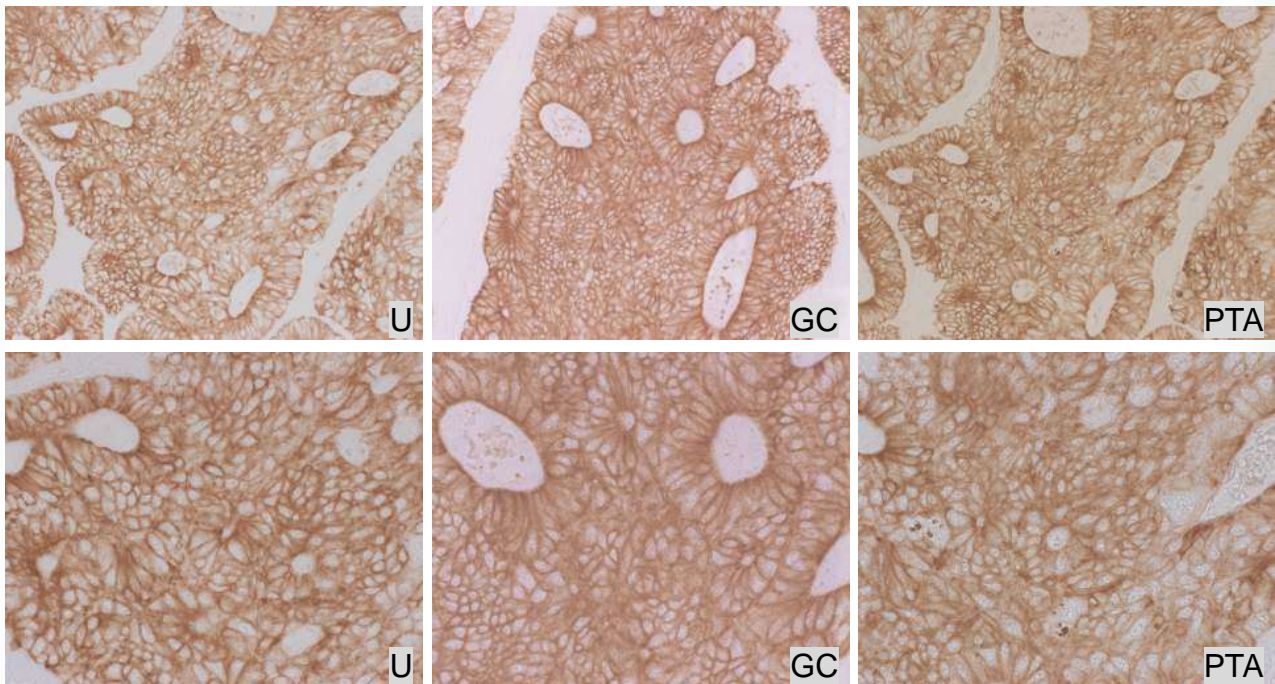


図 3B : DAB 発色後の増感法 金属イオンを用いる方法-2

U : 酢酸ウラン水溶液との反応。  
 GC : 塩化金水溶液との反応。  
 PTA : リンタングステン酸水溶液との反応。



## (2) 銀液を使用した増感法

### メセナミン銀を使用する方法

DAB 発色後の切片を、糸球体基底膜染色の PASM 染色液で反応させると茶色の反応産物が黒褐色となる (図 4)。

メセナミン銀を使用する他に、銀増感法用のキット品が市販されているのでこれらを使用することもできる。

### 反応液

3%テトラメチレンヘキサミン溶液 25mL に蒸留水 20mL を加え、5%硝酸銀 2.5mL を加えて良く混和する。次に、5%ホウ砂 2.5mL を加えて混和し使用液とする。60°C の恒温槽で 10~15 分反応後、鏡検しながら染色状態を確認し反応を止める。

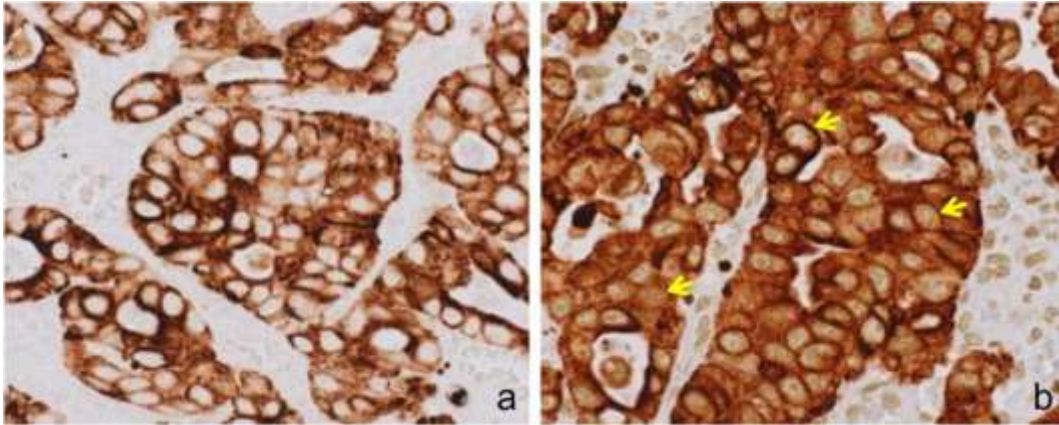


図 4：銀液を使用した増感法 (メセナミン銀)

切片厚：4 $\mu$ m。

一次抗体：抗サイトケラチン抗体 (clone: AE1/AE3)、室温、3 時間反応。

二次抗体：室温、1 時間反応。

a：ヘマトキシリン核染色なし。

b：ヘマトキシリン核染色後に銀反応すると核が染色 (↑) されて見難くなることがある。

## 3. その他の増感法

暗視野照明法 (dark field illumination) を用いた観察、光学顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡観察での画像処理、蛍光色素を用いた蛍光抗体法でも発色所見を強調することが可能である (図 5)。<sup>6)</sup>

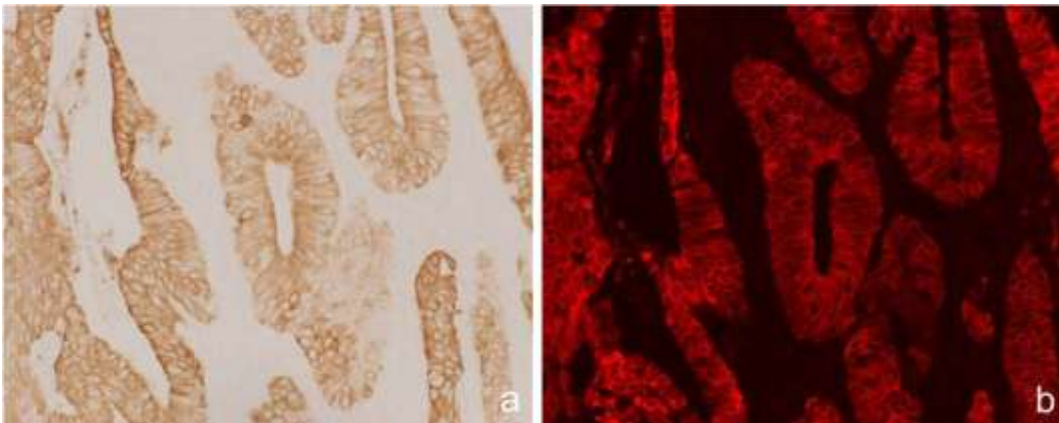


図 5：蛍光色素を使用した増感法

切片厚：4 $\mu$ m。

一次抗体：抗サイトケラチン抗体 (clone: AE1/AE3)、室温、3 時間反応。

二次抗体：室温、1 時間反応。

a：DAB 発色、ヘマトキシリン核染色なし。

b：Q ドット標識二次抗体。

### 染色上の注意点とポイント

1. 日常染色を行う上で最も簡単な増感法はイミダゾールを使用する方法である。イミダゾール発色後にさらに硫酸銅水溶液に浸透させる 2 段階増感法もあり、濃黒色の反応が得られる (図 1A)。
2. 増感法として用いられるニッケル・DAB 法やニッケル・コバルト・DAB 法、TMB 試薬や Histo-Green 試薬などは酵素抗体法二重染色の発色基質としても利用される (図 1B、図 2)。<sup>7,8)</sup>
3. オスミウム酸は強い刺激臭がありドラフト内にて取り扱う。
4. 酢酸ウランによる増感法はあまり効果が得られず (図 3B)、放射性物質で取り扱いには注意が必要である。
5. DAB 以外の基質溶液はアルコール脱水、キシレン透徹によって退色するものもあるので注意する。(Data not shown)
6. 銀増感法を行う場合には、銀液で反応させてからヘマトキシリンによる核染色をする。ヘマトキシリン核染色後に銀反応を行うと、核のヘマトキシリンと銀が反応して核が染色される (図 4)。
7. 銀増感法は黒色の反応産物となるが操作が煩雑で時間がかかる。(Data not shown)
8. 剥離防止剤の塗布されたスライドガラスは硝酸銀に共染するので注意すること。(Data not shown)

### おわりに

発色の増感法では様々な方法が報告あるいは開発されている。しかしながら、増感の工程が複雑である割には DAB 単独の発色感度とそれほど変化のない方法もある。これらの増感法から発色の色調などを参考として目的に応じた増感を行うとよい。

### 参考文献

- 1) 阿部仁：3 ステップ、アビジン-ビオチンシステム (SAB 法) とポリマー法。ニチレバイオサイエンス免疫染色玉手箱，技術 <http://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/index.html>。
- 2) 富永晋：免疫染色の発色技術。ニチレバイオサイエンス免疫染色玉手箱，技術 <http://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/index.html>。
- 3) 川井健司，芹澤昭彦，堤寛，長村義之：免疫組織化学と in situ hybridization のすべて。3) 増感法。病理と臨床 18【臨時増刊号】：38-43，2000。
- 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：207-214，2002。
- 5) Mesulam MM, Rosene DL: Sensitivity in horseradish peroxidase neurohistochemistry: A comparative and quantitative analysis of nine methods. J Histochem Cytochem 27: 763-773, 1979.
- 6) 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：307-319，2002。
- 7) 阿部仁：酵素抗体法による免疫組織化学染色と特殊染色の二重染色。ニチレバイオサイエンス免疫染色玉手箱，技術 <http://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/index.html>。
- 8) 佐藤雄一，土屋紅緒，亀谷徹：免疫組織化学と in situ hybridization のすべて。4) 二重染色法。病理と臨床 18【臨時増刊号】：44-50，2000。