

## 同じ宿主動物由来の一次抗体を用いた多重免疫染色とその条件検討

著者	佐々木 健, 宮田 学, 林 秀次, 簗島 伸生, 佐藤 康二
雑誌名	技術報告
巻	25
ページ	39-42
発行年	2020-03-01
出版者	静岡大学技術部
URL	<a href="http://doi.org/10.14945/00027083">http://doi.org/10.14945/00027083</a>

# 同じ宿主動物由来の一次抗体を用いた多重免疫染色とその条件検討

佐々木 健<sup>1,2</sup>, 宮田 学<sup>2</sup>, 高林 秀次<sup>3</sup>, 蓑島 伸生<sup>2,4</sup>, 佐藤 康二<sup>1</sup>

浜松医科大学 器官組織解剖学講座<sup>1</sup> 技術部<sup>2</sup> 医用動物資源支援部<sup>3</sup> 光ゲノム医学<sup>4</sup>

## 1. はじめに

生体内での分子の分布は、解剖学や組織学に限らず生命科学全般における極めて重要なテーマとして古くから研究されてきた。このような研究では、対象分子に対する抗体（一次抗体）を利用した免疫染色法が広く利用されており、さらに複数の異なる一次抗体を組み合わせることにより、「異なる分子を同一組織上で同時に検出（可視化）する免疫多重染色法」も非常に重要な技術とされている。しかしながら、この多重染色（二次抗体を用いた間接法の場合）では、基本的に一次抗体の免疫動物種（宿主）を異種にする必要があり、利用可能な一次抗体が同じ宿主（動物種）由来であったため、多重染色に苦慮して染色自体を断念する場合も少なくはない。

一方、熱湯処理による抗体の剥離/失活現象を利用し、一回目の染色の可視化後に熱湯処理を行い、続いて同じ宿主由来の一次抗体を用いて二回目の染色を行う多重染色法が報告された（1-4）。しかしながら、これらの報告では加熱温度（熱湯温度）や加熱液の詳細な検討はなされていない。また、加熱処理による標本組織の損傷も懸念されるため、加熱処理・時間がより低温・短時間であれば、より良い染色手技になるはずである。さらに加熱処理液の選択によっても、染色手技の改良が望める可能性も考えられる。

## 2. 目的

上述の背景から、本研究では同一動物種由来の抗体を用いた多重染色を行う際の加熱による抗体の剥離手技に関して、加熱処理の温度と時間、加熱処理液に関する検討を行った。

## 3. 材料と方法

本検討の概要は、組織切片に一次抗体・二次抗体を反応、TSA反応を利用した Opal Manual IHC Kit (PerkinElmer) により可視化した後に加熱による抗体剥離を行い、同じ二次抗体を再び反応させて同様に可視化し、最初の抗体が剥離できているか（残存していないか）を検討した。なお、この検討手順の概略を図1に示した。

染色を行う対象組織として、マウス、ラット、ヒトの各動物から採取された血管、皮膚、脾臓、肝臓、脳を用い、それらの組織を4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（pH7.6）により固定した後、定法によりパラフィン包埋して薄切（3.5 $\mu$ m厚）を行った。また、免疫染色には表1に示す一次抗体を用い、二次抗体はHRP標識 anti Rabbit IgG (Nichirei) または anti Mouse IgG (Nichirei) を使用した。

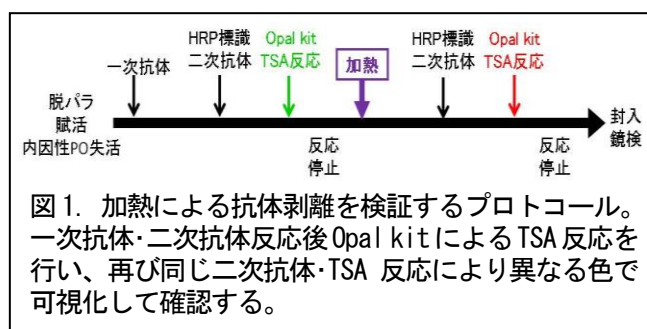


図1. 加熱による抗体剥離を検証するプロトコル。一次抗体・二次抗体反応後 Opal kit による TSA 反応を行い、再び同じ二次抗体・TSA 反応により異なる色で可視化して確認する。

表1. 本検討に用いた一次抗体

抗体	動物種	会社	希釈
$\alpha$ -actin	Rabbit	Spring Bioscience	×200
Ki-67	Rabbit	Thermo Scientific	×100
GFAP	Rabbit	Diagnostic BioSystems	×200
vWF	Rabbit	Thermo Scientific	×200
PCNA	Rabbit	Abcam	×100
PCNA	Mouse	Thermo Scientific	×100
Mast cell tryptase	Mouse	Dako	×400

一方、反応させた抗体を剥離させるための加熱時間と温度については表2に示し条件を検討した。加熱に利用した器具については、オートクレーブは Labo Autoclave (Sanyo)、加熱加圧装置は Pascal (Dako)、湯煎は Superstat Mini (ATTO) を用いた。さらに、加熱処理液についても2種類の緩衝液、10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) と 1mM Tris-EDTA 緩衝液 (pH9.0) について検討を行った。

#### 4. 結果

クエン酸緩衝液 (10mM) を用いたオートクレーブ (105°C、1分) または加熱加圧装置 (95°C、20分) による加熱処理では、初めに反応させたほぼ全ての一次・二次抗体の剥離・失活が認められた(結果は示さず)。同じくクエン酸緩衝液を用いた 90°C湯煎による 20分間または 10分間の加熱では、加熱後の陽性反応は殆ど消失していたため(図2B, D)、加熱処理により大半の抗体が剥離したと考えられた。

同様に 80°C湯煎による加熱の検討を行った結果、20分間の加熱では一次・二次抗体の剥離・失活が認められたが(図3B、表3)、10分間の加熱では部分的に陽性反応が残存していたため(図3D、表3)、一部の抗体は剥離・失活していないと考えられた。

一方、70°Cでの湯煎では加熱時間が20分であっても多くの抗体で剥離が認められず、抗体の残存による陽性シグナルが観察された(図4)。

表2. 今回検討した加熱条件

加熱温度	加熱時間	加熱装置
105°C	1分	オートクレーブ
95°C	20分	加熱加圧装置
90°C	20分	湯煎
90°C	10分	湯煎
80°C	20分	湯煎
80°C	10分	湯煎
70°C	20分	湯煎
70°C	10分	湯煎

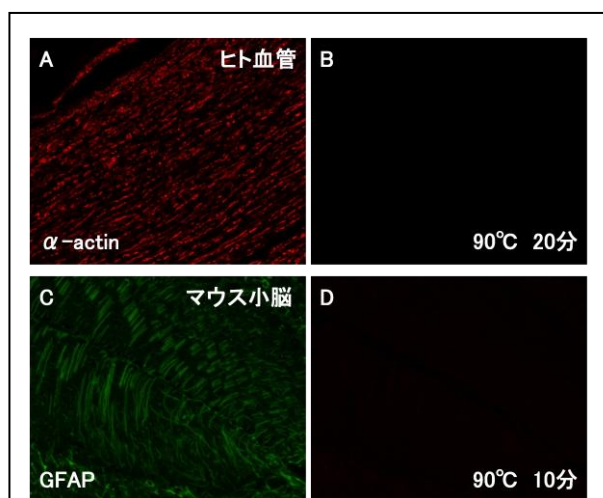


図2. 湯煎による 90°C加熱での抗体剥離。加熱時間 20分(A, B)および 10分(C, D)ともに最初の染色(A, C)から抗体が剥離され、2回目の二次抗体反応では陽性シグナルが見られなかった(B, D)。

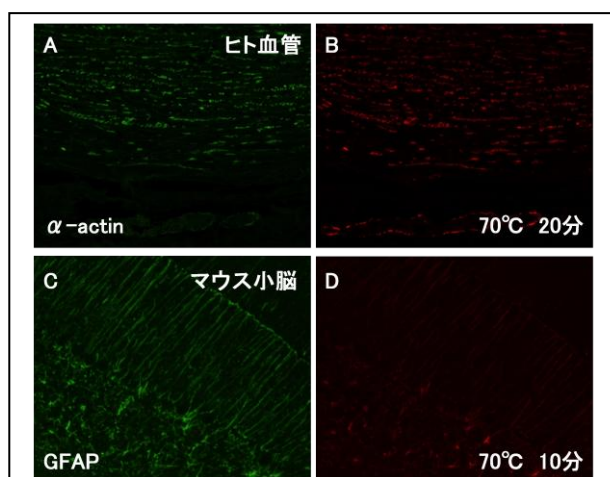


図4. 湯煎による 70°C加熱での抗体剥離。加熱 20分(A, B) および 10分(C, D)ともに最初の染色(A, C)からの抗体の剥離が不十分であり、陽性シグナルが認められた(B, D)。

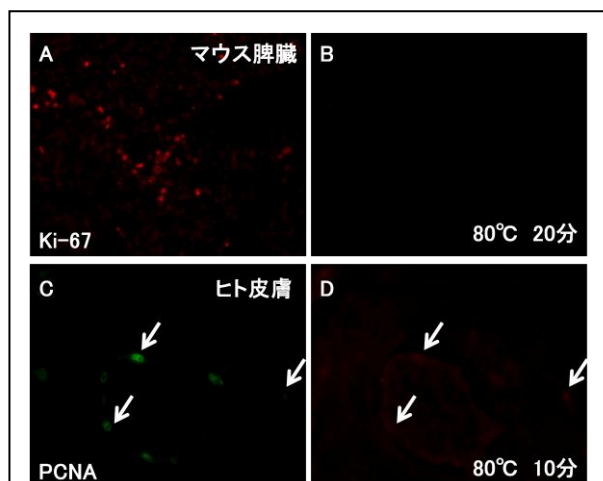


図3. 湯煎による 80°C加熱での抗体剥離。加熱 20分(A, B)では、抗体が剥離により陽性シグナルが見られなかった(B)。一方、加熱 10分(C, D)では、一部で完全な抗体剥離が起きず、いくつかの陽性シグナルが認められた(D, 矢印)。

これらのクエン酸緩衝液を用いた加熱温度・時間に関する一連の結果は表3に示した。なお、一連の加熱処理の対照実験として、加熱による抗体剥離処理を行わずそのまま2回目の二次抗体反応を行った場合では、1回目の反応陽性シグナルと同じ箇所と同じレベルの2回目の反応陽性シグナルが確認された(図5)。

次に、抗体の剥離効果が加熱液によって異なる可能性も考えられたため、クエン酸緩衝液と Tris-EDTA 緩衝液の二種類の加熱液について検討を試みた。その結果、 $\alpha$ -actin や vWF に対する抗体では、80°C以上の高温域では一次抗体の剥離が認められ、70°C10分の処理では抗体の残存が確認された(表4)。

表3. 加熱温度・時間による抗体剥離の検討

温度	時間	抗体	組織	結果
105°Cオートクレーブ	1分	全て	全て	-----
95°C 加熱加圧装置	20分	全て	全て	-----
90°C 湯煎	20分	$\alpha$ -actin	ヒト血管	-----
90°C 湯煎	10分	Ki-67	マウス脾臓	-----
		GFAP	マウス小脳	----+
80°C 湯煎	20分	Ki-67	マウス脾臓	-----
		vWF	ヒト血管	-----
			ヒト皮膚	-----
	10分	PCNA	ヒト皮膚	----+
		Mast cell tryptase	ヒト血管	++++
		$\alpha$ -actin	ヒト皮膚	--++
		Ki-67	マウス脾臓	-----
GFAP		マウス小脳	----+	
70°C 湯煎	20分	$\alpha$ -actin	ヒト血管	--++
		Mast cell tryptase	ヒト血管	++++
		GFAP	マウス小脳	--++
	10分	Mast cell tryptase	ヒト血管	++++
		GFAP	マウス小脳	--++
		PCNA	ラット肝臓	++++
			ラット脾臓	++++

++++: ほぼ剥離なし(強陽性)、+++ : 多くは剥離せず(陽性)、--++: 半分程度剥離(中陽性)、--++: 一部剥離せず(弱陽性)、-----: ほぼ全て剥離(陰性)

## 5. 考察

近年、分子生物学的手法や遺伝子改変技術などのような生命科学における様々な解析手法が考案、開発、駆使されつつある。その一方で、組織学的な解析手法もいまだに多くの研究者・技術者が利用する方法であり、特に抗体を使った免疫染色は強力なツールであることは間違いのない事実である。本研究で用いた「同

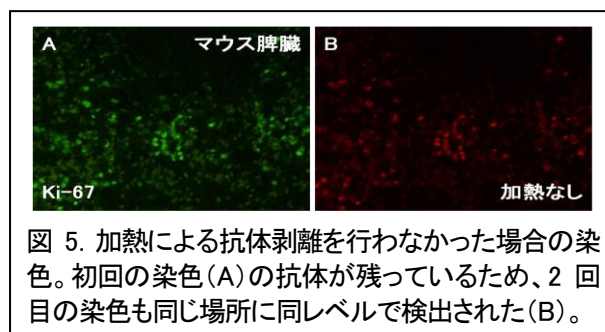


図5. 加熱による抗体剥離を行わなかった場合の染色。初回の染色(A)の抗体が残っているため、2回目の染色も同じ場所に同レベルで検出された(B)。

表4. 加熱処理液による抗体剥離の検討

加熱液	温度時間	抗体	組織	結果
クエン酸緩衝液(pH6)	105°C 1分	$\alpha$ -actin	ヒト血管	-----
		WF	ヒト血管	-----
	80°C 10分	WF	ヒト皮膚	-----
		GFAP	マウス脳	--+++
	70°C 10分	PCNA	ラット肝臓	++++
			ラット脾臓	++++
Tris-EDTA 緩衝液(pH8)	105°C 1分	$\alpha$ -actin	ヒト血管	-----
		WF	ヒト血管	-----
	80°C 10分	WF	ヒト皮膚	-----
		WF	ヒト血管	--+++
	70°C 10分	GFAP	ヒト皮膚	--+++
			マウス脳	--+++
		PCNA	ラット肝臓	++++
			ラット脾臓	++++

++++: ほぼ剥離なし(強陽性)、+++ : 多くは剥離せず(陽性)、--++: 半分程度剥離(中陽性)、--++: 一部剥離せず(弱陽性)、-----: ほぼ全て剥離(陰性)

「宿主動物由来の一次抗体を用いた多重染色法」は、今まで非常に困難であった同一動物種由来抗体ゆへの交差反応を克服し、多重免疫染色のさらなる有用性、汎用性を高め、さらには研究コストの面でも非常に有効な手法になると思われる。

過去の報告からも、熱湯処理による抗体の剥離現象を応用した多重染色法が知られていたが、これらの報告では比較的高温の加熱処理が行われており(1-4)、実際にどの程度の温度域で抗体が剥離するのかは知られていなかった。今回の我々の検討から、免疫染色において反応した一次抗体や二次抗体は80℃の前後で剥離が起こり、90℃以上になるとかなり安定した剥離現象が認められることが示唆された。その一方で、一部の抗体(Mast cell tryptase)については、80℃の加熱処理においてもかなり強い陽性シグナルが認められ、多くの抗体が残存していると思われた。また、GFAPやa-actinについても、80℃の加熱によってもわずかに未剥離の抗体が認められたため、剥離が起こる温度は抗体によって違いがあるのかもしれない。

抗原賦活化の手法では、目的の抗原によっての賦活液の使い分けが有効であることが一般的に知られており、実際に賦活液によって抗体の反応性に差が出ることも周知の事実である(5)。このことから、今回我々は加熱液(賦活液、クエン酸緩衝液とTris-EDTA緩衝液)による抗体剥離の差も検討した。しかしながら、両液の間に抗体剥離の大きな差は認められなかった。一方、ウェスタンブロットの抗体の剥離に利用されている低pHのグリシン緩衝液も免疫染色時の抗体剥離に対して有用性が示唆されている(6,7)。今後はグリシン緩衝液のような加熱液についても詳細に調べる必要があるように思われる。

本手技に用いる加熱処理が、観察する組織に損傷を与えることは大いに予想される。このため、より組織形態に影響を与えない加熱温度や時間、加熱液のpH等が望まれるはずである。本研究の結果では、80℃付近で多くの抗体の剥離が認められることから、加熱温度は80~90℃が適温であると思われる。また、pHについても中性付近の6~9辺りが適していると思われる。その一方で、例えば80℃の加熱を複数回繰り返ることによる組織損傷の程度や、パラフィン切片と凍結切片における組織損傷の違いについても、今後詳細に調べる必要があるように思われる。

本研究の結果が、同一動物種由来の一次抗体を用いたより簡便でより安定した多重免疫染色のプロトコール作成への一助になれば幸いである。

## 謝辞

本研究の遂行に対して格別の取り計らいをして下さいました、浜松医科大学器官組織解剖学講座のスタッフの皆様、ならびに同大学技術部、震災伸生技術部長、宮田学副技術部長、及び技術部の皆様方に深く感謝いたします。なお、本研究は以下の文部科学省科学研究費補助金の助成により行なわれました。

平成 26-29 年度(基盤研究 C、研究課題番号：26462104)

平成 29-31 年度(基盤研究 C、研究課題番号：17K10752)

## 参考文献

- 1) 青木ら, 病理と臨床 14: 1533-6 (1996).
- 2) Tóth, Mezey, J Histochem Cytochem. 55: 545-54 (2007).
- 3) Ikeda et al, Acta Histochem. 113: 117-24 (2011).
- 4) 梅ら, 生物学・生理学技研報 24: 104-5 (2013).
- 5) Yamashita, Prog Histochem Cytochem. 41: 141- 200 (2007).
- 6) Nakane, J Histochem Cytochem. 16: 557-60 (1968).
- 7) Tramu et al, J Histochem Cytochem. 26: 322-4 (1978).