

免疫蛍光染色の基本と応用

三重大大学自然科学系技術部 医科学研究技術グループ

一志真子

masako-i@med.mie-u.ac.jp

1. はじめに

免疫組織染色（IHC）/免疫細胞染色（ICC）は、抗体の特異性を利用してターゲットタンパクの細胞内局在を顕微鏡下で観察することができる検出法である。これまで多くの改良がなされ様々な手法が存在するが、今回はその中でも、レーザー光で励起され発光する蛍光色素標識抗体を利用した免疫蛍光染色の基本と応用(蛍光抗体法多重染色)について説明する。

2. 各種免疫染色法

免疫染色は、抗原抗体反応を用いて細胞内におけるタンパクの発現や局在を検出するものであり、可視化する方法が異なる次の3つに大別される。

a. 蛍光抗体法

細胞内の特定のタンパクを抗体によって蛍光標識し、その試料に励起光を当て、標識分子が発する蛍光による像を顕微鏡観察することで、ターゲットタンパクの細胞内での局在・移動を調べる方法である。この方法の最大の特徴は、マルチカラー検出が可能であることで、異なる励起・蛍光波長をもつ複数の蛍光色素を用いて、組織や細胞内外で発現する複数の抗原を同時に検出することができ、抗原間の位置関係（同一細胞・異なる細胞での発現の確認など）を解析できる。

b. 酵素抗体法

酵素抗体法では HRP(西洋わさびペルオキシダーゼ)や AP(アルカリホスファターゼ)を用い、基質を標識酵素と反応させ発色性の反応産物を沈降させることで可視化する。染色した組織は安定に保管することができ、光学顕微鏡により簡単に観察できる。

c. 金属標識抗体法

代表的なものに金コロイド法がある。組織を固定後に樹脂包埋まで進めたのち超薄切片を作製し、その切片の表面に対して抗体を反応させる。蛍光標識や酵素標識のようにシグナルが減退することがない。

3. 免疫蛍光抗体法の原理

ある種の分子は、特定の波長の光（励起光）を照射すると分子が光エネルギーを吸収し、そこに含まれる電子が基底状態から励起状態へと遷移する。しかし励起状態は不安定なので、発光によってエネルギーを放出し基底状態へ戻る。このとき放出される光を蛍光といい、この蛍光を効率よく発するのに適した化学構造をもつ物質が蛍光色素である。免疫蛍光抗体法では、抗体に標識された蛍光色素に励起光を当てて観察をする。

4. 免疫蛍光染色の特徴とメリット・デメリット

免疫蛍光染色は、細胞内での局在の詳細や変化（定量）を調べたりすることに適しているという点から、培養細胞のサンプルに頻繁に用いられる手法であるが、組織でも同じように染色することができる。

蛍光染色のメリット

- ・ 明視野では観察できない透明な細胞やタンパクを容易に可視化できる
- ・ バックグラウンドが暗黒に近いため、検出感度が他の観察方法に比べて非常に高く、高倍率での観察に向く

- ・ 特定のタンパク質を選択的に可視化できる
- ・ 立体的なデータを取得できる
- ・ 複数の蛍光色素を用いることで、複数のタンパクの局在ならびに共局在を観察することができる（マルチプレックス解析）
- ・ 基本的に増幅処理を行わないので、目的とするタンパクの組織内での共局在を定量評価することが可能（免疫蛍光細胞定量解析）

蛍光染色のデメリット

- ・ 組織の全体像を見るのには不向き
- ・ 組織の自家蛍光が、目的とするタンパクの検出の妨げになることがある
- ・ 保存に適さない（ただし4℃から-20℃で保存すれば1,2ヶ月ほどは観察可能）
- ・ 褪色しやすい（励起光が強いほど、また照射時間が長いほど退色しやすいので注意）

4. 基本プロトコール

直接法は、一次抗体に蛍光色素を直接標識した抗体を使用する方法である。蛍光標識抗体による染色と蛍光発光の検出が1回の反応で完了するため、染色に要する時間を削減でき、非特異反応も少ない。

間接法では、まず目的とするタンパク質に特異的な非標識一次抗体をサンプルと反応させ、次に一次抗体の宿主動物種を認識する蛍光色素標識済み二次抗体を反応させてターゲットを検出する。この方法では、複数の蛍光色素を有する二次抗体が一次抗体に結合する可能性があるため、抗原部位で蛍光を発する分子数が増えて、シグナルが増幅するというメリットがある。ここでは、蛍光標識二次抗体を用いた間接法の基本手順を示す。（図1）

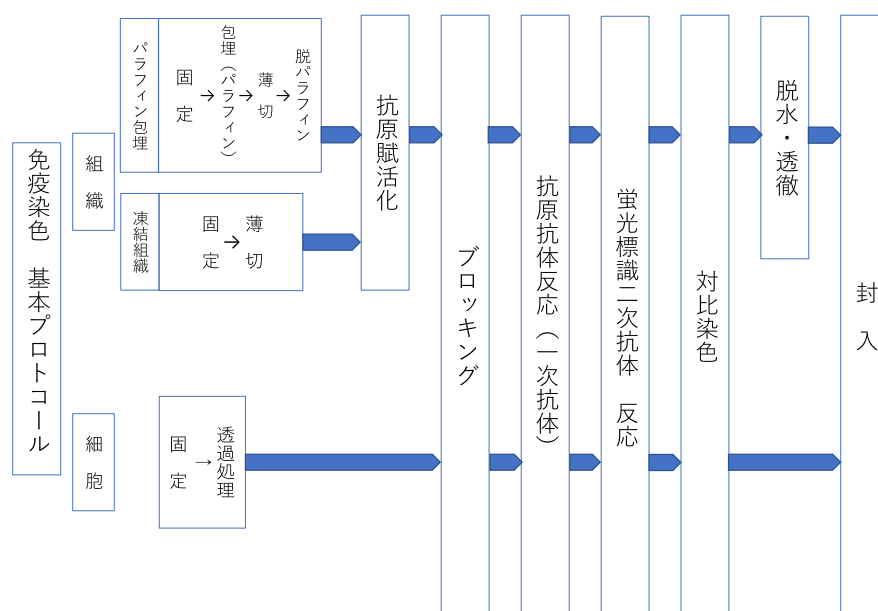


図1 免疫蛍光染色プロトコール（間接法）

5. 応用（多重染色）とコツ

蛍光顕微鏡の性能と操作性が向上し、さらにたくさんの蛍光色素が登場したことにより、複数の蛍光色素を駆使して自由自在に多重染色や解析することが可能となっている。免疫蛍光染色の多重染色

は、単染色（一次抗体は1種類）の応用編になることから、基本の単染色を理解しておけば決して難しいものではない。

💡 ポイントとコツ 💡

<ブロッキング>

1%BSA(ウシ血清アルブミン)や二次抗体のホスト動物と同種動物の正常血清を用いると良い。
市販のブロッキング剤もある。

<洗浄>

通常 PBS 5分3回洗浄のところを、PBS containing 0.05% Tween20 5分2回 + PBS 5分1回洗浄にする。

<賦活化>

賦活化の種類によっては、バックが上がることがあるので注意。

<一次抗体>

まずは、異なる動物種由来の一次抗体での組み合わせを検討する。この場合、抗体混合液を使用することにより染色手順の簡素化および時間短縮が可能となるが、必ず単染色で抗体条件（希釈倍率、賦活化の方法、反応時間など）を検討して最適条件を決めたのち、それぞれの抗体条件について擦り合わせ、最適条件に近づける必要がある。しかし異なる動物種を選択できなかった場合は、1つの抗体は直接蛍光標識がされている抗体を使用して検出する方法や、単染色を繰り返し染色する方法などを組み合わせることで、多重染色が可能となる。

<蛍光標識二次抗体>

使用する機器のレーザー・フィルター・検出器の種類によって、使用できる蛍光色素は異なるため、波長のあった蛍光標識を選ぶ必要がある。

多重染色を行うため複数の蛍光色素を選択する場合には、蛍光波長がなるべく重ならない色素にし、さらに蛍光強度がなるべく同じような色素を選ぶことも重要である。また蛍光の強度は、標識する蛍光色素の蛍光強度、目的とするターゲットタンパクの発現量などによって変わってくる。シグナルが弱い時は、同じ励起光でも代表的な蛍光色素がいくつかあるので試してみるとよい。

6. まとめ

免疫蛍光染色を含む免疫組織染色（IHC）/免疫細胞染色（ICC）では、やはり抗体の選択および条件設定が重要となってくる。また目的の抗原タンパクを正しく染め上げるためには、抗体の良し悪しだけでなく、標本の固定方法から関係してくることも忘れてはならない。このように、押さえるポイントがいくつかあるものの、多分野において広く用いることのできる検出法であることから、今後さらに良い技術提供ができるよう技術の習得に努めていきたい。

謝辞

本業務において、多大なるご支援ご協力をいただいている三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学講座の渡邊昌俊教授をはじめ研究室の方々に、厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 井関祥子 太田正人(編集), 実験医学別冊「免疫染色・イメージングのコツ」, 羊土社,
- 2) 伊藤智雄, 免疫染色究極マニュアル, 金芳堂
- 3) 水口國男(編集), 最新 染色法のすべて, 医歯薬出版, 2011
- 4) 松崎利行, 培養細胞の蛍光多重染色, 日薬理誌, 2019, Vol. 154, 195-170