

研 究 報 告 書
2019 年度：B 課題

2021 年 3 月 31 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 京都大学医学部附属病院病理部

住 所 京都市左京区聖護院川原町 54

研究者氏名 平田 勝啓

(印)

(研究課題)

新規免疫染色法を利用した病理診断の迅速化と精度向上に関する研究

2020 年 3 月 12 日付助成金交付のあった標記 B 課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究者】 平田勝啓

【研究課題】 一般研究 B

【研究期間】 2020年4月1日～2021年3月31日

【研究題目】 新規免疫染色法を利用した病理診断の迅速化と精度向上に関する研究

【研究目的】

申請者が開発中の新規免疫染色法を、術中診断を含む病理診断の迅速化と精度向上に役立て
ることができるかを検討することが本研究の目的である。

従来の免疫染色法は一次抗体と二次抗体それぞれの反応を別個に行う 2 ステップ法であり、
前処理を含めて結果を得るために数時間かかる。迅速に結果を得るために凍結切片に対して
一次抗体を高濃度で使用する方法が一般的に利用されているが、時間的・人的制約の大き
い術中病理診断には使いにくく、コストも増大するという問題点があった。本新規免疫染色
法は、酵素標識した 1 個 IgG フラグメントを利用して市販の一次抗体に対し簡便・短時間に
酵素標識を行うことを可能とし、検出感度を犠牲にすることなく 1 ステップで免疫染色を実
施することができる。今年度は酵素標識法および染色プロトコールの条件検討を実施した。
なおこの研究は、研究目的利用の同意を得た患者サンプルを使用し、所属施設の倫理委員会
の承認を受けて実施した。

【方法】

1. Horseradish peroxidase 標識 IgG Fab fragments の調製

1.1 Horseradish peroxidase のマレイミド化

Horseradish peroxidase (HRP, 東洋紡) に、sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclo
hexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC, spacer arm 8.3 Å, Thermo Fischer または東京化成),

およびスペーサー部分がポリエチレングリコール(PEG)鎖で構成される Maleimide-PEG2-N HS Ester (SM(PEG)2, spacer arm 17.6 Å, Thermo Fischer), Maleimide-PEG12-NHS Ester (SM(PEG)12, spacer arm 53.4 Å, Thermo Fischer) をそれぞれ反応させ、スペーサーを有するマレイミド基を導入した(HRP-maleimide)。なお sulfo-SMCC は SMCC 分子に硫酸基を導入して水溶性を高めた物質であり、標識後は SMCC と同等であるので以下 SMCC と表記する。

1.2 IgG Fab' fragment への HRP 標識

Goat anti-mouse IgG, F(ab')2 (Jackson Immunoresearch) を 2-mercaptopropylamine で還元し、IgG Fab' fragments を生成した。ついで Fab' fragments に HRP-maleimide を反応させ、IgG Fab' fragment のヒンジ部分に HRP を標識した(Fab'-HRP)。還元条件下 SDS-PAGE により適切に標識されていることを確認した。

2. Fab'-HRP による免疫染色の検討

2.1 Fab'-HRP 標識一次抗体の調製

市販の CD20, CD45 抗体原液と Fab'-HRP を混合し、室温で 10 分間反応させ Fab'-HRP 標識一次抗体 (Ab-Fab'-HRP)を得た。Ab-Fab'-HRP を 1% ウシ血清アルブミン加 PBS で希釈したものを抗体使用液とした。

2.2 染色

ヒトリンパ節の生鮮サンプルから凍結切片を作製し、表 1 に示すプロトコールで染色を実施した。CD45 については癌の転移巣が存在するリンパ節を使用した。

表1：染色プロトコール

固定	1-2 分	10% NBF
洗净	15 秒	TBST
内因性ペルオキシダーゼ不活化	1 分	BLOXALL(Vector)
洗净	15 秒	TBST
Ab-Fab'-HRP	10 分	
洗净	15 秒	TBST
DAB 使用液	3 分	
流水		
ヘマトキシリソ	15 秒	
流水		
色出し	15 秒	TBST
流水		
封入		

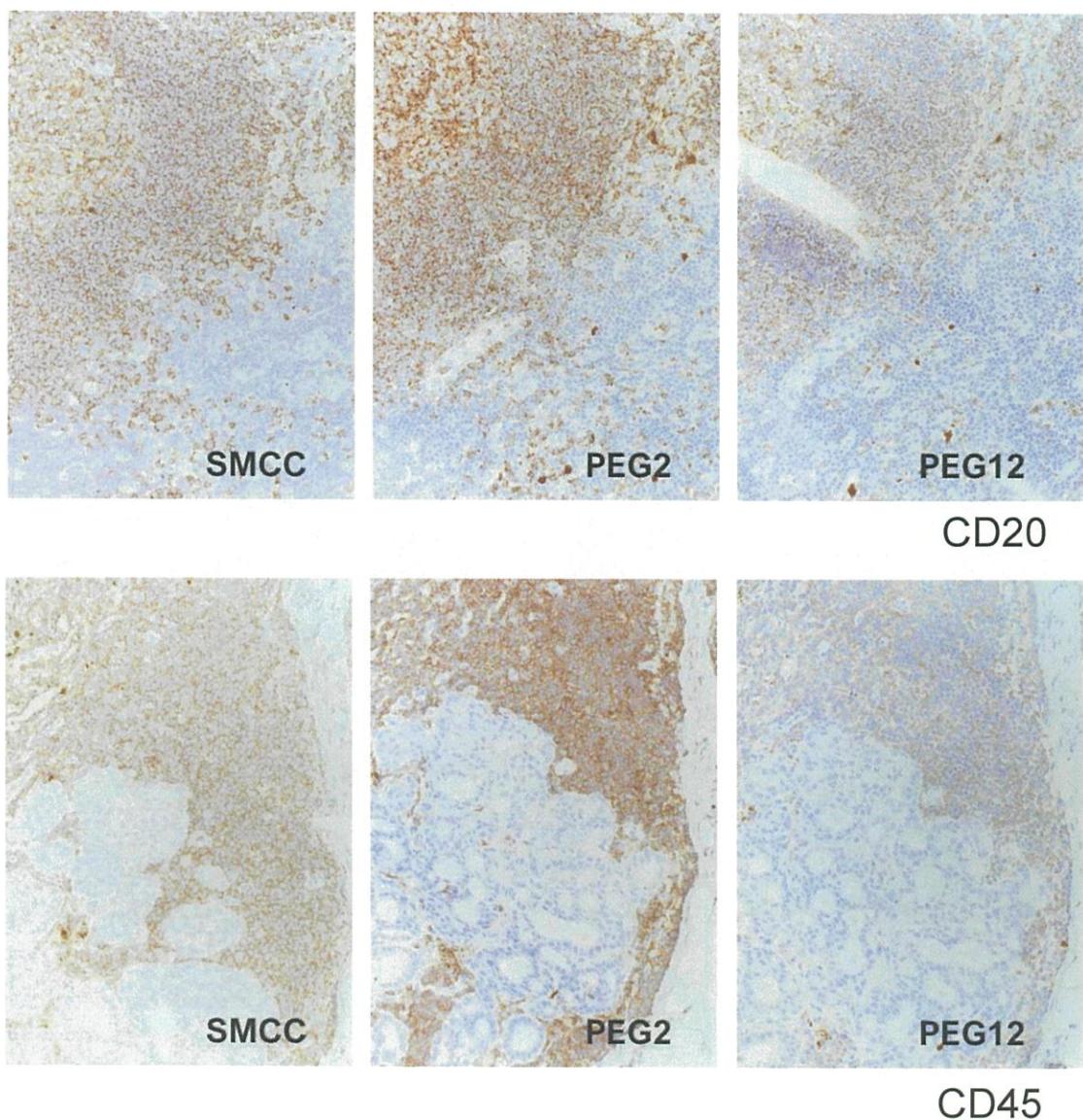
NBF: neutral-buffered formalin, TBST: Tris-buffered saline with Tween 20,

DAB: 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride

【結果】

CD20, CD45 いずれについても、Fab-HRP 標識一次抗体により明瞭な染色像が得られた。

CD20 は濾胞領域のリンパ球が染色され、B 細胞の分布と一致していた。CD45 はリンパ球が特異的に染色され、転移巣は陰性となった。リンカーの種類（すなわちスペーサーアームの長さ）による差異は、PEG2 が最も染色強度が強く、次いで SMCC, PEG12 は染色性が最も弱かった(写真)。



【考察】

本新規免疫染色法によって、新鮮凍結切片の CD20, CD45 免疫染色を、短時間・高感度に実施できることを確認した。また癌の転移陽性のリンパ節に対する CD45 染色の結果、上皮組織への共染を認めなかったことから実用的な特異性があることが示された。

Fab' フラグメントに対する酵素標識は、使用したリンカー試薬のスペーサーの長さによって感度が異なることが推定された。既報の免疫染色法や酵素免疫測定法の検討では、スペーサーの長さが長いほど酵素分子と抗体分子の距離を取れるので、立体障害が軽減されるため抗原抗体反応が促進され検出感度が向上すると考えられている。しかし今回は長いスペーサー長を持つ SM(PEG)12 で標識した場合に最も検出感度が低かった。調製した Fab'-HRP を SDS-PAGE で確認すると、SM(PEG)12 で標識した Fab'-HRP はゲル始点にバンドが観察され、高分子複合体が形成されていることが示唆された（データ非開示）。したがって、長いスペーサーを有するリンカー試薬を使用した場合には、複数の Fab' および HRP 分子からなる巨大な複合体が形成されたため、Ab-Fab'-HRP の形成が阻害されたか、Ab-Fab'-HRP がターゲット抗原分子に接触しにくくなった可能性が考えられる。SMCC は最もスペーサー長が短くコンパクトな Ab-Fab'-HRP を形成すると推測されたが、SMCC の約 2 倍長のスペーサーを有する SM(PEG)2 のほうが若干染色強度が高かった。SMCC のスペーサーは疎水性である一方、PEG（ポリエチレングリコール）は親水性でかつ柔軟性が高いので、SMCC よりも抗原分子に接触しやすかったことが考えられる。SMCC は分子内に芳香環を有し他のリンカー試薬と比較して安定なので市販の酵素標識キットに広く用いられているが、免疫染色には PEG リンカーのほうが適している可能性が示唆された。SM(PEG)2 と同じ長さの疎水性スペーサーをもつ LC-SMCC, KMUS による標識と比較する必要があるかもしれない。今回の検討では個々のリンカー試薬の標識効率、フリーの Fab' や HRP の関与については詳細な検討を行っていないが、この免疫染色法については、スペーサーの長さと親水性が感度に大きな影響を与えることが示唆された。今後も標識法の最適化を進め、他の一次抗体やサンプルへの適用も検討し、この免疫染色法を日常診断業務への適用可能な水準まで改良した

いと考えている。

【謝辞】

公益財団法人 がん研究振興財団 および関係各位からのご支援に厚く御礼申し上げます。

今回の研究により、抗体への酵素標識に使用するリンカー試薬の物性が検出感度に強く関与しているという知見を得ることができました。これは本新規免疫染色法の開発において非常に重要な知見であると考えており、実用化に向けて引き続き研究を進めて参ります。