モノクローナル抗体を用いた組織内抗原分布の解析 ——その問題点と展望——

Immunohistochemical Analysis with Monoclonal Antibodies

石 田 康 生^{*1} 服 部 進^{*2} 阿 部 雅 明^{*}
YASUO ISHIDA, M.D. SUSUMU HATORI M.T. & MASAOKI ABE M.T.

最近、抗原特異的抗体を利用して組織内抗原の検出が行われるようになった。これは抗体の持つごく限られた抗原にしか反応特異性を示さないという特徴を利用している。しかし、従来用いられた抗血清中には必ず目的とするものと、無関係な反応性（非特異反応）を持つ抗体が含まれており判定に多大な影響を与えてきた。モノクローナル抗体の登場は、この非特異的反応の排除に完全な回答を与えた。少なくとも理論的にはモノクローナル抗体を使用する場合、そのモノクローナル抗体の持つ特異性以外の反応は起こらないからである。しかし、モノクローナル抗体も、反応特異性があまりに限られているため、かえって組織内抗原検出に不向きな面もある。現在、これらの欠点に対して種々の増強手段が用いられている。これら補助手段の確立によって、モノクローナル抗体の応用範囲は拡大し、今後、多方面での利用が期待される。

索引用語：免疫組織化学分析，モノクローナル抗体，ビオチン-アビジン法。

Key words: Immunohistochemical analysis, Monoclonal antibodies,
Biotin-avidin system

近年、疾患の診断、検査項目の多くに免疫学的手法が用いられるようになってきた。たとえばラジオイムノアッセイによる微量物質の定量や蛍光抗体法による物質の組織内での同定がそれである。これらは抗原-抗体反応の特色の内、もっぱら抗体の持つ抗原特異性を利用したものである。Aという抗原に対するA'という抗体は、Bという抗原に対しAと共通する一部の抗原決定基を持たぬ限り、反応しない。この抗原特異性の差異は、わずか2、3個のアミノ酸配列の違いによっても決定される。これは抗原-抗体反応は他の反応系

に比べ、けた違いに特異性が高いことを意味する。このことが免疫学的手法の持つ第一の特徴である。しかし、特異的な結合は決して抗原-抗体反応系に限ったものではなく、他の反応系にも存在する。抗原-抗体反応の、もう1つのきわめて重要かつ有用な特徴は、反応特異性がきわめて広範囲に及ぶということである。これは生体が全ての抗原系に対して反応し得るだけの抗体産生能力を持っているということである。たとえば、ある抗原Aに対し特異的に反応する抗体A'を産生した場合には動物にその抗原Aで免疫すれば、特異抗体A'を得ることができ、同様にBに対しB'、Cに対しC'といった具合に限りなく別々の特異性を持つ抗体ができるわけである。

* 順天堂大学医学部第二病理 *¹ 助手 *² 研究技師
Department of Pathology (II), School of
Medicine, Juntendo University

**第225回順天堂医学会学術集会 (May 19, 1983)
(Aug. 9, 1983 受付)

モノクローナル抗体と通常抗血清

今ヒトインスリンに対する抗ヒトインスリン抗体を作製しようと、家兎にヒトインスリンを注射免疫したとする。そうすると家兎血清中にはヒトインスリンに対する抗ヒトインスリン抗体が形成される。従って、この抗血清を用いてヒトインスリンを特異的に同定できる。しかし、この抗ヒトインスリン抗体は決して1つの特異性から成り立っていない。家兎がヒトインスリンを抗原として認識する場合、認識する抗原決定基は一カ所ではなく複数である。ところで、抗体を産生する一つの細胞（形質細胞）は、ただ一種類の特異性を有する抗体しか産生しない。言い換えれば1クローンの抗体産生細胞より産生される抗体の抗原特異性は、ただ一種類ということである（即ちモノクローナル抗体）。それに対して、通常の抗血清中に含まれる複数の抗原特異性は、これらモノクローナル抗体の集合として存在する（多クローン抗体）。しかし実際にインスリン分子を同定するために、必ずしもインスリン分子上にある多くの異なる抗原決定基を常にとらえる必要はなく、その内のごく限られたものでも充分である。また、通抗常の血清中には決してインスリンに対する特異性しか存在しないわけではない。数多くのインスリン分子以外の抗原に反応する別の抗体が含まれている。しかも場合によっては、目的とする抗原よりも、全く別の抗原に対する抗体の方がより多く産生されていることさえある。従って、仮りにある特定の抗原を同定しようとする場合には、明確な特異性を持つごくわずかのクローンより形成される抗体を用いるのが理想的であり、とりわけ、ただ1つの特異性しか持たぬクローンより産生される抗体——モノクローナル抗体——が、上述の目的のためには最適なのは言うまでもない。この意味で Milstein らの考案したハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の産生は、免疫学的手法にとっても革命的な出来事なのである。現在、ハイブリドーマ法により容易にモノクローナル抗体を産生できるようになった。モノクローナ

ル抗体の利用により、別の特異性を有する抗体の混入とそれによる抗原特異性の低下といった通常の抗血清では避けられない欠点をを一挙に解決できるわけである。

組織内抗原分布検索における通常抗血清の持つ欠点

前述のように、通常の抗血清中には目的とする抗原以外の特異性を有する抗体がきわめて多く含まれている。試みに、抗ヒト免疫グロブリン特異的と称される一般に市販された抗血清でヒトのリンパ節を蛍光抗体法で染めてみると、大半のロットが全ての組織（細胞、結合組織 etc...）に対し多かれ少なかれ反応していることに気づくはずである。きわめてまれに特異性の高い抗血清を得ることもあるが、多くは吸収操作をしなければ使用に耐えない。余分な抗原特異性を持つ抗体をその抗原と反応させ、吸収してしまうわけである。たとえば、抗ヒト免疫グロブリン血清からそれ以外の特異性を除くために、多くの場合、この抗血清をヒト肝ホモジネートと混和し（ヒト肝には免疫グロブリンはほとんど含まれていないため）、ヒト免疫グロブリン以外の抗原と反応する抗体が取り除いてしまう。このような吸収を行っても通常抗血清を組織内抗原の検索に用いる場合には、どうしても非特異的反応をさけ難い。この欠点は、免疫的手法の最大の利点である高い反応特異性をそこなうものであり、免疫組織化学の進歩に長い間障害となっていた。

単クローン抗体による組織内抗原分布の検索における欠点

このような通常抗血清の最大の欠点は、モノクローナル抗体の出現で一挙に解決されてきた。しかし、モノクローナル抗体にもまた欠点は存在する。たとえば、FITCで標識したモノクローナル抗体を用いて組織を染色してみると、多くの場合、なかなか陽性部分を識別できないか、できても反応が弱い。これは、皮肉なことにモノクローナル抗体の最大の利点である、きわめて厳密な反

図1 図中Yで示されるものは免疫グロブリンである。

- a) 直接法：免疫グロブリン（モノクローナル抗体）に直接FITCをラベルし、それを検出する。
b) 間接法：一次抗体（モノクローナル抗体）に対する抗体（二次抗体）にFITCをラベルし、それを検出する。
c) Biotin-avidin system; biotin をラベルした二次抗体を一次抗体（モノクローナル抗体）に反応させた後、biotinに高い親和性を持つavidinをbiotinに反応させる。avidinにはFITCないしperoxidaseがラベルされており、それを検出する。

応特異性に基づいているのである。同定しようとする抗原分子が同一であっても、通常の抗血清は数多くの抗原決定基に反応するが、モノクローナル抗体の反応し得る部位ははるかに少ない。その結果、モノクローナルによる反応性はどうしても弱くなる。この欠点をおぎなうために、現在では2次抗体、あるいは3次抗体などを用いてモノクローナル抗体による反応を増強している。図1

に示されるようにモノクローナル抗体に対する抗体（抗マウス免疫グロブリン）に蛍光色素を標識するか、biotin化し、モノクローナル抗体に対する標識物質（FITC）をより多くし、検出し易くするわけである。われわれは現在モノクローナル抗体を用いる場合、biotin化抗マウス免疫グロブリン抗体を2次抗体として用い、さらに標識物質を結合させたavidinをbiotinに反応させ、最

最終的に avidin に結合した 標識物質を検出して いる (biotin-avidin system). 分子量の小さな biotin 分子は抗体のようなタンパクに多数結合させることができ、このような状態で biotin に対しきわめて強い親和性を持つ avidin-FITC を作用させると、1つの抗体分子に大量の avidin-FITC を結合させることができる。この方法で、直接法ではなかなか検出できない抗原結合性のモノクローナル抗体を容易に検出できる。

ところで二次抗体を用いる場合、当然二次抗体の抗原特異性が問題となる。しかし、この場合、一次反応の抗血清中に含まれる抗体の非特異的反応とは異なり、二次抗体を十分に厳選して、一次抗体非存在下で非特異的反応の認められない条件に設定さえすれば、あとはいかなるモノクローナル抗体を一次抗体として使用しても、ほぼ条件は同一である。従って、一次抗体でモノクローナル抗体を用いる場合、間接法で最も重要なのは二次（あるいは三次以上の）抗体に非特異的反応が存在するか否かに尽きるわけである。

次に単クローン抗体による組織抗原検出の具体例を図2～7に示す。いずれも単クローン抗体を一次抗体とし、biotin-avidin system で抗原を検出したものである。詳細については各脚注を参照されたい。

お わ り に

前述のように、免疫系最大の特色とされるのは反応抗原特異性の多様性である。従って、モノクローナル抗体も理論的にはきわめて多様に富む特異性を持つものの産生が可能である。モノクローナル抗体の持つ一般的な欠点をおぎなえる手段が確立していれば (biotin-avidin system など)、いくつもの異なったモノクローナル抗体を用いて組織内よりその抗体に対応する、抗原の分布を厳密に検出し得る。

現在は、市販され比較的容易に入手できるモノクローナル抗体の種類は限られている。しかし、ここ1～2年モノクローナル抗体の数と種類は飛躍的に増加している。ごく近い将来にも必要最低限のモノクローナル抗体のパネルは各分野で完成すると思われる。その時、これら同一規画の多種のモノクローナル抗体を利用して組織内抗原検出が、標準的に行われるようになり、これらの持つ診断的価値は最大限利用されるようになると考えられる。

図2 リンパ節 paracortical area に存在する Leu 2 a 陽性 T 細胞を biotin-avidin 法で検出したもの。白色に明るくリング状に見えるものが陽性細胞。

図5 悪性リンパ腫を抗 Leu 3 a 抗体で染め出したもの。

図3 同様にして Leu 4 陽性 T 細胞を検出したもの。左半分、暗く丸くぬけた部分が、リンパ濾胞を含む B 細胞領域であり、これに対し右半分は、大半の細胞が Leu 4 陽性 T 細胞で、T 細胞領域を示す。

図6 図5と同じ症例を抗 Leu 4 抗体で染め出したもの。従ってこの症例は Leu 3⁺4⁺の T 細胞性悪性リンパ腫であると証明された。

図4 図3とは逆にリンパ濾胞を中心とし存在する B 細胞領域に免疫グロブリン μ 鎖陽性細胞を証明したもの。T 細胞領域に存在する細胞はほぼ μ 鎖陰性。

図7 図5と同一の症例を peroxidase 法で Leu 4 抗原を検出したもの。△で示される細胞は、核のみ染色されており Leu 4 抗原は陰性である。◼で示されるものは核周囲にリング状に染まる Leu 4 抗原を示す。