

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19063

研究課題名(和文) 酵素抗原法の技術開発：パラフィン切片における特異抗体産生細胞の証明をめざして

研究課題名(英文) Detection of specific antibody-producing cells with the enzyme-labeled antigen method in paraffin sections

研究代表者

水谷 泰嘉 (Mizutani, Yasuyoshi)

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：10546229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来適用困難だったホルマリン固定パラフィン包埋(FEPE)切片へ酵素抗原法を応用することをめざした。研究の結果、FEPE切片へ酵素抗原法を応用するには至らなかったが、FEPE切片における酵素抗原法の適用を困難とする要因を明らかにした。さらに、パラフィン包埋切片でも酵素抗原法が適用できる組織固定法を明らかにするとともに、包埋に使用するパラフィンの種類が酵素抗原法の成否に影響することも明らかにした。FEPE切片に酵素抗原法を応用するための有用な情報を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was the application of the enzyme-labeled antigen method in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections. This purpose has not been achieved during this period. However, we elucidated factors inactivating antibodies during paraffin sectioning for the enzyme-labeled antigen method. Fixation methods maintaining antibody activities in paraffin sections were found. We demonstrated properties of paraffin wax used for embedding tissues involve antibody activities in tissue sections. These findings would help us to realize the application of the enzyme-labeled antigen method in FFPE sections.

研究分野：人体病理学

キーワード：酵素抗原法 抗体 抗原 病変局所 形質細胞 パラフィン切片

1. 研究開始当初の背景

酵素抗原法は、酵素やビオチンで標識した抗原をプローブとして、組織切片上の特異抗体産生細胞を可視化する免疫組織化学的手法である。本技法を利用することで、「病変局所における特異抗体産生細胞の局在観察」という視点で病態を観察することが可能となり、病態について新たな知見を得られる可能性がある。本技法は新鮮凍結切片や 4%パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde、PFA) 固定後凍結切片に適用できるが、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded、FFPE) 切片への応用は困難である。したがって新規に解析する場合には新たに新鮮な検体を採取する必要がある。

病理診断に利用される病理切片は、基本的に FFPE 切片である。FFPE 切片は病理標本として各医療機関で蓄積・保管されている。これら FFPE 切片に対して酵素抗原法を応用できれば、多数の症例をまとめて解析することが可能となる。さらに、発症の稀な疾患も比較的容易に入手および解析が可能となることが期待される。したがって、FFPE 切片における酵素抗原法の実現は、病変部で産生される抗体を標的とした研究の発展に貢献できるものと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、FFPE 切片において酵素抗原法を適用可能にすることにある。そのために、(1) FFPE 作製工程における抗体を失活させる要因の検索、(2) 凍結切片およびパラフィン包埋切片における抗体活性を維持する固定法の検索、(3) FFPE 切片を対象にした酵素抗原法における染色感度増感法・抗体活性賦活化法の検索を行うことを目的とした。また凍結組織ブロックは保存管理に超低温フリーザーなどの設備が必要になるため、(4) 室温保存でも抗体活性を維持することが可能な固定包埋法の検索も本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) FFPE 作製工程における抗体を失活させる要因の検索：ラットの足底部に horseradish peroxidase (HRP) とアジュバントのエマルジョンを 3 回皮下免疫した。鼠径部、腋窩部、膝下部のリンパ節および脾臓を回収した。各リンパ組織を半割して、片方の組織を 4%PFA 固定後凍結切片とした。半割した組織片の残りについて、FFPE 切片作成工程の各段階、すなわち、ホルマリン固定、エタノール脱水、キシレン透徹の各段階で凍結切片とした。さらに、パラフィン包埋における加温処理を再現するために、ホルマリン固定後、水中で 4 時間加温して凍結切片としたものも用意した。これら凍結切片に対して HRP をプローブとした酵素抗原法を実施した。各組織切片について、全形質細胞における抗

HRP 抗体産生細胞の割合を算出した。4%PFA 固定後凍結切片における抗 HRP 抗体産生細胞の割合で、対応する各処理組織における抗 HRP 抗体産生細胞の割合を除いて陽性細胞残存率を算出したこれを抗体活性の指標とした (陽性細胞残存率 (抗体活性) = 4%PFA 固定後切片の陽性率 / 対応する各処理切片の陽性率)。また、ホルマリン固定時間による抗体活性への影響も同様の方法で検証した。

(2) 抗体活性を保持する固定法の検索：(1) と同様に HRP を免疫したラットの各リンパ組織を採取して、ホルマリン以外の固定法について、凍結切片およびパラフィン包埋切片における酵素抗原法の染色性を、HRP をプローブとした酵素抗原法によって検証した。さらに HRP 以外抗原でも同様の傾向が認められるか検証する目的で、ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin、BSA)、卵白アルブミン (ovalbumin、OA)、スカシガイヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin、KLH) とアジュバントを混合したエマルジョンでラットを免疫して、各リンパ組織を採取したのち、各ビオチン化抗原をプローブとした酵素抗原法により、各固定法における染色性を比較した。

(3) FFPE 切片を対象にした酵素抗原法における染色感度増感法の検証：通常、コムギ無細胞系でプローブを合成する場合、合成段階でビオチンを付加して、HRP 標識ストレプトアビジンによる間接法で抗原抗体反応を検出できるようにしている。今回、各種増感法を検証するために、ビオチン標識に加えて、特異ペプチドタグを標識した BSA をコムギ無細胞系で合成した。ペプチドタグの位置と数による染色性への影響を検証するため、特異ペプチドタグは C 末端または N 末端に 1 分子付加するものと、N 末端と C 末端に 1 分子ずつ (計 2 分子) 付加するものの 3 種類を作製した。BSA を免疫したラットのリンパ節の 4% PFA 固定後凍結切片および FFPE 切片において、これらペプチドタグ標識 BSA をプローブとして、このペプチドタグを認識するモノクローナル抗体とアミノ酸ポリマー法または Catalyzed signal amplification (CSA) II 法を組み合わせ、酵素抗原法における増感法の適用性について検証を試みた。

4. 研究成果

(1) FFPE 作製工程における抗体を失活させる要因の検索：ホルマリン固定によって、4% PFA 固定後凍結切片でみられた抗体活性は 50% 減弱した。さらにエタノール処理を加えると 20% 程度抗体活性が低下した。キシレン処理によりこの低下は回復傾向を示したが、パラフィン包埋を行うことで、ほぼ完全に失活した。一方ホルマリン固定後に 60 で加温処理した場合は、抗体活性の回復傾向が認められた (図 1、2)。ホルマリン固定とパラフ

イン包埋が、抗体活性失活の主因であることが示された。

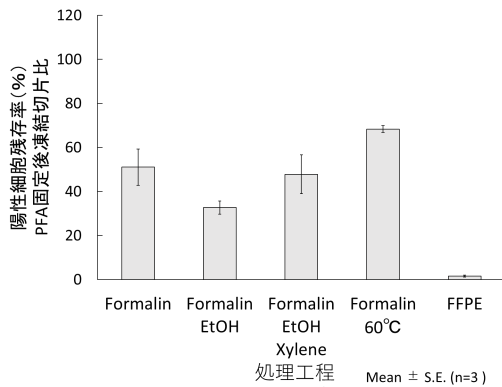


図1. FFPE 切片作製工程がおよぼす抗体活性への影響

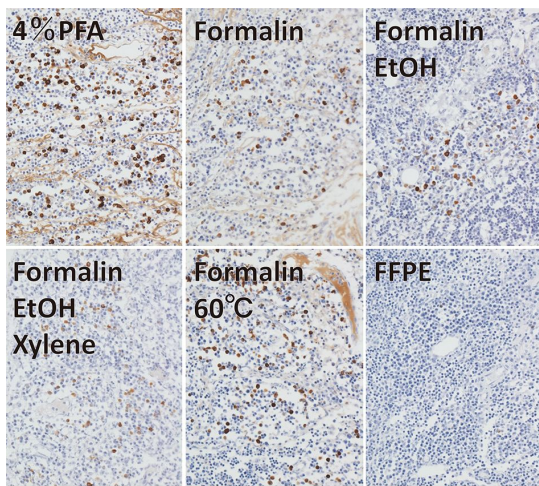


図2. FFPE 切片作製工程処理後の凍結切片(図中 FFPE はパラフィン切片) における抗 HRP 抗体産生細胞の染色像。4%PFA 凍結切片と比較して、FFPE 切片では染色性が著しく損なわれている。

(2) 固定時間の影響：4、24、48 時間および1 週間のホルマリン固定した凍結組織切片について、酵素抗原法を実施して、固定時間の影響を検証した。4 時間固定では4%PFA と同等の染色性が保たれたが、24 時間および48 時間固定では70 - 50%程度に減少した。1 週間の固定では、20%程度まで減少した。長時間のホルマリン固定は抗体活性に悪影響をおよぼすことを確認した(図3)。

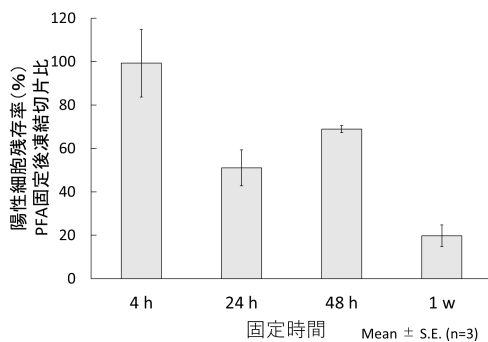


図3. ホルマリン固定時間が抗体活性におよぼす影響

(3) 固定法の種類による抗体活性への影響：

HRP 免疫ラットのリンパ節について、Acetone・Methyl-benzoate・Xylene (AMeX)、carnoy、acetone、ethanol、carbodiimide、periodate lysine paraformaldehyde (PLP)、PLP-AMeX、Zamboni、中性緩衝ホルマリンの各固定法で固定後、凍結切片およびパラフィン包埋切片を作製して、各種固定法の抗体活性への影響を検証した。HRP をプローブとした酵素抗原法の結果、凍結切片では、carnoy 以外の固定法において良好な染色性が確認された。パラフィン切片では、AMeX、エタノールおよびアセトンで良好な染色性が確認された。他の固定法ではパラフィン包埋によって染色性が低下した。蛋白架橋形成を固定機序とする固定法について、低融点パラフィン包埋切片も検証したところ、PLP および中性緩衝ホルマリンでパラフィン切片よりも良好な染色性が認められた。したがって、凝固系固定液では、パラフィン切片でも抗体活性が比較的維持できることが示された。各固定処理における酵素抗原法染色性の影響について図4に示した。

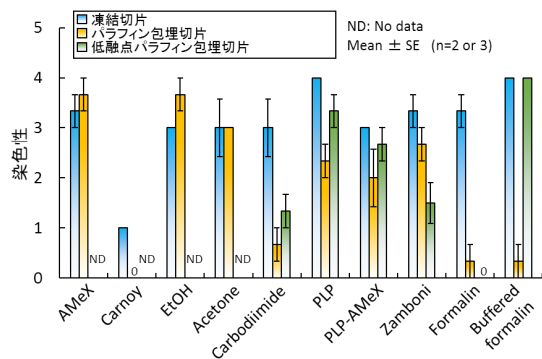


図4. 固定法および包埋法が抗体活性におよぼす影響

HRP による酵素抗原法において、中性緩衝ホルマリン固定後低融点パラフィン包埋切片で良好な染色性が確認できたことから、BSA、KLH、OA の混合抗原を免疫したラットのリンパ節において、同様の傾向が見られるか検証した。残念ながら、HRP で観察されたような染色性は得られなかった。その他の固定法における抗原間での染色性の違いは現在検証中である。

(4) 加熱による抗体活性への影響：HRP 免疫ラットの脾臓を60、70、80、90で1分、3分および5分間加熱した後、凍結切片とパラフィン包埋切片を作製した。60 および70では1~5分の処理でも凍結切片で良好な酵素抗原法染色性が得られた。1分よりも3分および5分の方が良好な染色性が得られた。一方、80 および90では顕著な染色性の低下がみられた。パラフィン切片では凍結切片よりも染色性が低下した。70、5分以下の加熱処理では、生材料の抗体活性は維持されることが示された。

さらに、HRP 免疫ラットのリンパ節を用いてホルマリン固定後の組織の加熱による染色性の変化を検証した。ホルマリン固定した組織を加熱処理後、凍結切片とするもの、ホルマリン固定した組織を加熱処理後、パラフィン包埋切片とするもの、一度パラフィン包埋した FFPE 組織を脱パラフィンして加熱処理後、凍結切片とするものを検証した。加熱処理は各組織を PBS 中で 70、80 および 90 で 4 時間実施した。70 で加熱した場合に、ホルマリン固定後 70 処理した場合は、凍結切片において未処理と同等の染色性が認められ、70 の加熱は抗体活性に影響しなかった。脱パラフィンした凍結組織や加熱後にパラフィン包埋した場合、70 での加熱はわずかに染色性を改善した。効果は微弱であったが、ホルマリン固定による抗体活性の低下において、加熱処理の有効性が示された(図5)。前述の中性緩衝ホルマリン固定低融点パラフィン包埋切片で抗体活性が保存されていたのは、単純にパラフィンの融点が低いことによるものではなく、低融点パラフィン包埋の性質や組成に依存する可能性が示唆された。

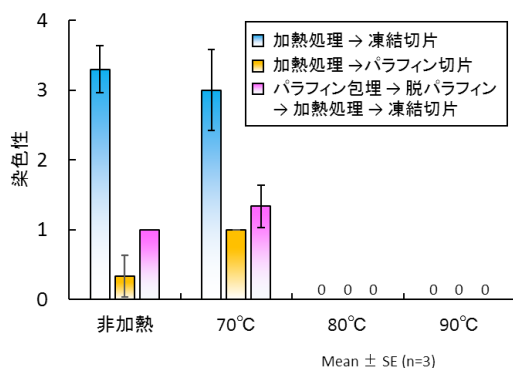


図5.ホルマリン固定時間が抗体活性におよぼす影響

(5) FFPE 切片を対象にした酵素抗原法における染色感度増感法の検証：増感法検証のため、コムギ無細胞系による BSA の合成を試みた。コムギ無細胞系用のプラスミドベクターへ BSA をコードする cDNA をサブクローニングする際に、ペプチドタグ配列を組み込んで、N 末端または C 末端のどちらかまたは両方に特異ペプチドタグが標識された BSA を合成した。ウェスタンブロッティングにより、目的蛋白プローブの合成を確認した。このプローブを用いて BSA 免疫ラットのリンパ節を対象に酵素抗原法を実施した。現在のところ、HRP 標識ストレプトアビジンを二次抗体とした検出系でほとんど染色性が得られていない。抗ペプチドタグ抗体を二次抗体として、その後アミノ酸ポリマー法を利用すると、各プローブで陽性細胞を確認することができたが、ペプチドタグの数や位置による差異は確認できていない。想定していたよりも HRP 標識ストレプトアビジンを二次抗体として用いた場合の染色性が悪く、CSAII 法での比較検証には至っていない。

(6) 総括と展望：本研究により次の点が明らかとなった。ホルマリン固定とパラフィン包埋が FFPE 切片作製工程における抗体失活の要因である。AmEx 法のようなタンパク凝固を機序とする固定法では、パラフィン切片でも抗体活性が維持できる可能性がある。

タンパク架橋を機序とする固定法でも、包埋するパラフィンの性質によって、抗体活性を維持できる可能性がある。パラフィン包埋時の加熱処理は、抗体失活の主因ではない。

ホルマリン固定組織を加熱処理することで、固定によって低下した抗体活性がやや回復する。

FFPE 切片へ酵素抗原法を適用するという当初の目的は達成できていない。本研究で得られた知見をもとに、既存の病理標本である FFPE ブロックを対象に酵素抗原法を適用可能にする手法を引き続き探していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Mizutani Y, Shiogama K, Onouchi T, Sakurai K, Inada K, Tsutsumi Y. Enzyme-labeled antigen method: Development and application of the novel approach for identifying plasma cells locally producing disease-specific antibodies in inflammatory lesions. *Acta Histochem Cytochem.* 49(1):7-19, 2016. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤寛. 酵素抗原法の技術開発：パラフィン包埋切片において固定法が抗体活性におよぼす影響. 第106回日本病理学会、京王プラザホテル(東京都)、2017年4月29日

水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤寛. *Helicobacter pylori* 感染スナネズミにおける抗 *Helicobacter pylori* 抗体産生細胞の局在証明. 第48回藤田学園医学会、藤田保健衛生大学(豊明市)、2016年10月6日

水谷泰嘉、春宮覚、川久保雅友、中山淳、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤寛. 酵素抗原法によるピロリ菌感染スナネズミにおける抗ピロリ菌抗体産生細胞の局在証明. 第57回日本組織細胞化学会総会・学術集会、杏林大学井の頭キャンパス(三鷹市)、2016年9月3日

堤寛、水谷泰嘉. 酵素抗原法の開発と応用. 第57回日本組織細胞化学会総会・学術集会、第57回日本組織細胞化学会総会・学術集会、杏林大学井の頭キャンパス(三鷹市)、2016年9月3日

水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤 寛：酵素抗原法の技術開発：ホルマリン固定パラフィン包埋切片作製工程が抗体活性におよぼす影響、第 105 回日本病理学会、仙台国際センター（仙台市）、2016 年 5 月 14 日

水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤 寛：酵素抗原法の技術開発 ホルマリン固定パラフィン包埋切片作製過程における組織内の抗体失活要因の検証、第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、関西医科大学枚方キャンパス（枚方市）、2015 年 10 月 4 日

水谷泰嘉：病変部で産生される抗体の標的抗原検索法と酵素抗原法の技術開発、第 56 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、関西医科大学枚方キャンパス（枚方市）、2015 年 10 月 3 日

水谷泰嘉、塩竈和也、尾之内高慶、櫻井浩平、稲田健一、堤 寛：ホルマリン固定パラフィン包埋切片作製過程における抗体活性失活要因の検証～酵素抗原法の応用をめざして～、第 47 回藤田学園医学会、藤田保健衛生大学（豊明市）、2015 年 10 月 2 日

水谷 泰嘉、塩竈 和也、尾之内 高慶、稲田 健一、堤 寛、酵素抗原法を用いたピロリ菌感染胃粘膜における抗ピロリ菌抗体産生細胞の検索、第 104 回日本病理学会、名古屋国際会議場（名古屋市）、2015 年 5 月 1 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://info.fujita-hu.ac.jp/pathology/1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷 泰嘉 (MIZUTANI, Yasuyoshi)
藤田保健衛生大学・医学部・助教
研究者番号：10546229

(4) 研究協力者

堤 寛 (TSUTSUMI, Yutaka)