

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18227

研究課題名（和文）免疫組織化学の新技法「微粒子標識抗体染色」の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new technique for immunocytochemistry: microparticle-labeled antibody staining

研究代表者

坂部 名奈子（Sakabe, Nanako）

名古屋大学・医学系研究科（保健）・助教

研究者番号：90907809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、発色操作のいらない簡便で汎用性の高い「微粒子標識抗体染色」を確立することである。2次抗体に微粒子を標識した抗体を作製し、培養細胞株を用いて免疫染色（ツーステップ法）を行った結果、目的の抗原を発色操作なしで検出することができた。今回の検討において複数の膜抗原の検出を確認しており、異なる色の微粒子を用いることで同一標本上で抗原を染め分ける多重染色にも繋がると考えている。また、ツーステップ法による迅速免疫染色への応用を検討した結果、10分間の抗体反応で陽性と判定できる染色結果が得られ、「微粒子標識抗体染色」が術中細胞診断にも応用できる染色法であることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療分野における診断・治療薬適応判定や研究分野で広く使用される免疫染色は、操作が煩雑で時間を要し、非特異反応や発色操作による過染色・未染色などの問題も存在する。本研究において、様々な色の微粒子を用いて微粒子標識抗体を作製し、培養細胞株を用いた検討により目的の抗原を発色操作なしで検出することができた。これにより、染色作業が簡便・迅速化され過染色・未染色による誤判定も回避でき、術中細胞診断への応用にも繋がると考えている。さらに、微粒子の色を使い分けることで同一標本上で複数の抗原を観察する多重染色へも応用でき、汎用性の高い染色法の提供に繋がると考えている。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to establish a simple and general-purpose, microparticle-labeled antibody staining, that does not require a staining step. We produced a secondary antibody labeled with microparticles and performed immunostaining (two-step method) using cultured cell lines, resulting in the detection of the target antigen without the staining step. In this study, we detected several membrane antigens using the microparticle-labeled antibody. We suggest that the use of microparticles of different colors may lead to multiplex staining to detect different antigens on the same specimen. In addition, we evaluated the application of the two-step method to rapid immunostaining and obtained positive staining results in only 10 minutes of antibody reactions. We consider that microparticle-labeled antibody staining might be applicable to intraoperative diagnosis.

研究分野：医療技術評価学

キーワード：微粒子標識抗体染色 免疫組織化学 膜抗原 非特異反応 ワンステップ法 ツーステップ法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

分子生物学的性状を確認できる免疫組織化学は、医療分野における診断・治療薬適応判定や、科学技術関連の研究で広く用いられ、医療や科学の発展に欠かすことのできない技法となっている。免疫組織化学には酵素を用いる酵素抗体法や蛍光色素を用いる蛍光抗体法が主流となっているが、各々の技法に問題点も存在する。

酵素抗体法では標識した酵素を発色基質によって呈色し、光学顕微鏡下で抗原存在部位を可視化している。染色過程では過酸化水素水(内因性酵素活性除去)、正常血清(ブロッキング)、1次抗体、2次抗体、発色基質など多くの試薬を使用するため、非特異反応の要因も多く、時間を要する技法である。また、基質による発色操作が引き起こす過染色や未染色の問題も加わり、抗原性の確認に苦慮することも少なくない。一方、蛍光抗体法には発色操作はなく抗原性の確認が容易であるが、暗室処理や蛍光顕微鏡が必要となり、永久保存することはできないため汎用性に欠けている。

医療現場においては、形態像の観察から良悪性の判定を行う細胞診において、判定に苦慮する際に着色の有無で抗原性を確認できる酵素抗体法が用いられている。細胞診は、侵襲性の少ない検査であり体腔液・腹腔洗浄液を用いて手術中に行われることもあるが、15~30分程度で結果報告を行う術中検査では時間的猶予がなく形態像のみで判断しているのが現状である。

### 2. 研究の目的

発色操作不要で煩雑な作業を回避した新技法を提供するために、微粒子を用いて汎用性の高い試薬を作製し、「微粒子標識抗体染色」を確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞標本

免疫組織化学で膜抗原の発現が確認された市販の細胞株を用いて細胞標本を作製し免疫染色に使用した。

#### (2)微粒子標識抗体の作製

微粒子を1次抗体または2次抗体に標識し、ワンステップ法またはツーステップ法の試薬を作製した。異なる素材の微粒子や、様々な色の微粒子を用いて標識抗体を作製し検討した。また、標識時の最適なpHを検討するために様々なバッファーを用いて検討した。

#### (3)免疫染色

ワンステップ法では、1次抗体に標識した微粒子標識抗体を使用し室温で1~3時間または4で一晩反応させた。ツーステップ法では、1次抗体反応後に2次抗体に標識した微粒子標識抗体を室温で30-60分間反応させた。迅速免疫染色の検討では、1次抗体5分、微粒子を標識した2次抗体5分の計10分の抗体反応で目的の抗原を検出できるか検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)ワンステップ法による免疫染色

1次抗体を用いて微粒子標識抗体を作製し免疫染色を実施した。その結果、細胞膜上に微粒子標識抗体が結合するのが観察されたが、免疫染色の結果が陽性と判定できるほどの強い反応性は認められなかった(図1A)。感度向上のために、1次抗体の種類や微粒子(素材、粒子径、色など)、標識の条件、反応条件を検討したが、反応性に大きな改善が認められなかった。

#### (2)ツーステップ法による免疫染色

感度を上げるために直接法から間接法へと切り替え、2次抗体を用いて微粒子標識抗体を作製した。これにより、反応性が増強し陽性と判定できる感度となったが、非特異反応も認められたためこの反応を除去する検討を実施した。微粒子標識時のバッファー、抗体濃度、保存液、免疫染色時に使用するブロッキング剤などを検討したが染色結果に大きな変化が認められなかった。次に、免疫染色に用いる細胞標本の作製方法を見直した結果、非特異反応が除去され良好な結果が得られた(図1B)。また、様々な種類の膜抗原の検出を目指し、異なる1次抗体を用いてツーステップ法による検出を試みたが、問題なく陽性と判定できる染色結果が得られた。さらに、染色結果の視認性向上のために使用する微粒子の色の検討を実施した。その結果、使用した微粒子すべての色で陽性と判定できる染色結果が得られ、赤色と青色の視認性が特に良好であった(図2A-D)。微粒子の色を使い分けることで、2種類以上の抗原を同一標本上で同時に検出することが可能となり、悪性は赤色、良性は青色のように一目で判定できる汎用性の高い染色法に繋がると考えている。

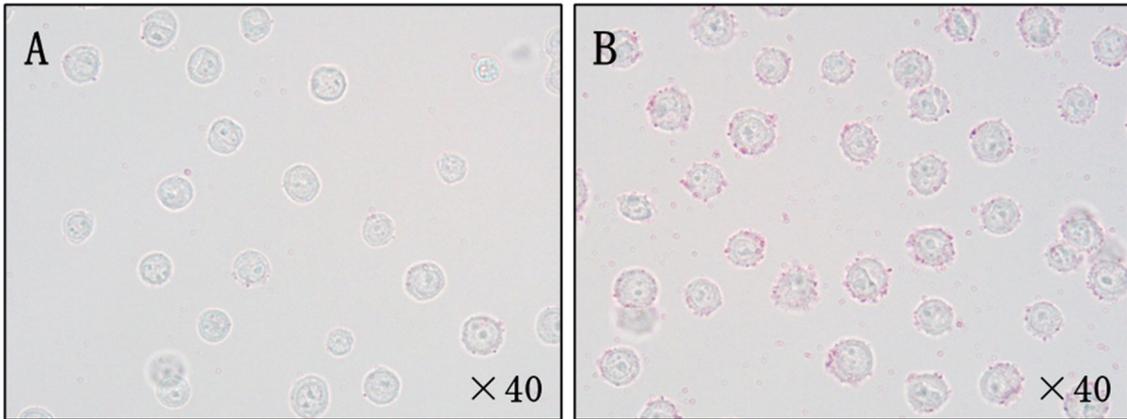


図1.ワンステップ法、ツーステップ法による免疫染色

(A)ワンステップ法：1次抗体に赤色の微粒子を標識した微粒子標識抗体を用いて免疫染色を実施した。細胞の周囲に点々と赤色の微粒子標識抗体が結合しているのが確認できた。

(B)ツーステップ法：2次抗体に赤色の微粒子を標識した微粒子標識抗体を用いて免疫染色を実施した。細胞の周囲を囲むように赤色の微粒子標識抗体が結合しているのが確認できた。

(A、Bともに核染色なし)

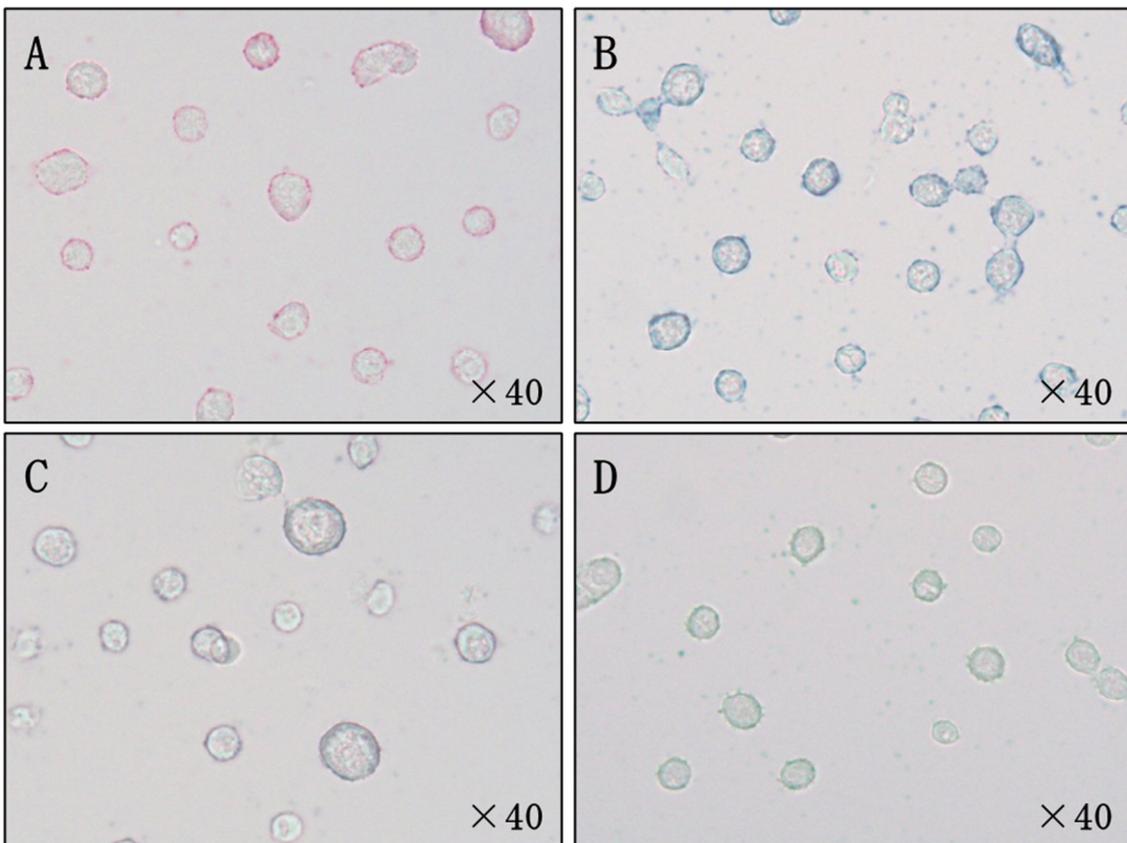


図2.微粒子の色による視認性の検討

2次抗体に微粒子を標識した微粒子標識抗体を用いてツーステップ法で免疫染色を実施した。

(A)赤色、(B)青色、(C)黒色、(D)緑色の微粒子を用いて視認性への影響を検討した。

4色とも細胞周囲を囲むように微粒子標識抗体が結合しているのが確認でき、赤色と青色の視認性が特に良好であった。

(A-D全て核染色なし)

### (3)ツーステップ法による迅速免疫染色への応用

従来の免疫染色より簡便かつ迅速な手法の確立を目指しているが、ワンステップ法では十分な感度を得られずツーステップ法での利用にとどまっているため、ツーステップ法による迅速免疫染色への応用を検討した。1次抗体5分、微粒子標識2次抗体5分の計10分間の抗体反応で陽性と判定できる染色結果が得られた(図3A)。これにより、術中細胞診断への応用にも繋がると考えている。また、非特異反応の有無の確認のために、直接、微粒子標識2次抗体を反応させた場合(1次抗体との反応なし)(図3C)と、1次抗体と反応後に微粒子(2次抗体なし)と反応させた場合(図3D)の反応性を確認した。その結果、微粒子による非特異的な結合は確認されなかった。

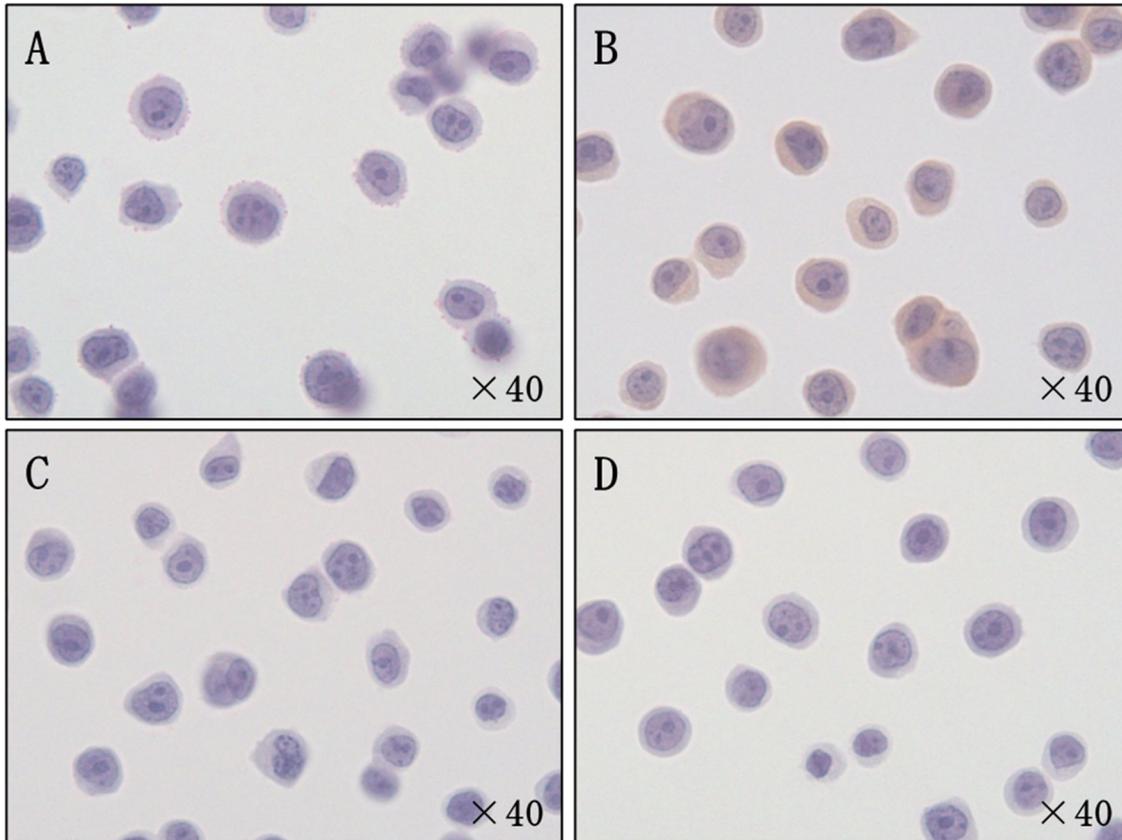


図3. ツーステップ法による迅速免疫染色への応用

2次抗体に赤色の微粒子を標識した微粒子標識抗体を用いて迅速免疫染色を実施した。

1次抗体5分、2次抗体5分の計10分間の反応時間とした。

(A)1次抗体と反応後、2次抗体に微粒子標識抗体を使用

(B)Aと同じ1次抗体と反応後、2次抗体の反応にポリマー法を使用しDABにより発色させた【従来法】

(C)直接、微粒子標識2次抗体と反応(1次抗体との反応なし)

(D)Aと同じ1次抗体と反応後、微粒子と反応(2次抗体なし)

Aでは細胞周囲に赤色の微粒子標識抗体が結合しており、陽性と判定できる染色結果が得られた。

また、非特異反応の有無を確認するためにCとDの条件で免疫染色を行ったが、微粒子標識抗体による非特異的な結合は確認されなかった。

(A-D全て核染色あり)

以上の結果より、微粒子を用いた微粒子標識抗体の作製により、目的の抗原を発色操作なく検出することが可能となった。これにより、染色作業が簡便・迅速化され、発色作業で問題となる過染色・未染色による誤判定も回避できる。また、迅速免疫染色への応用の検討により、計10分の抗体反応で陽性と判定できることが確認され、微粒子標識抗体染色の医療現場への発展に繋がると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------