

学内実習における抗核抗体検査への酵素抗体法を利用した HEp-2 細胞染色の導入

小野川 傑*

【要 旨】 間接蛍光抗体法による抗核抗体検査は、自己免疫疾患における重要なスクリーニング検査である。しかし、この検査を教育施設で行うためには1台の蛍光顕微鏡を多くの学生で利用するため染色像の観察が十分できない、また標本の蛍光退色など多くの問題があることから、学内実習の項目としては敬遠されがちである。そこで今回、二次抗体を蛍光標識抗体から酵素標識抗体に変更することで、これらの問題が解消するか検討した。その結果、酵素標識抗体を使用した場合、得られる陽性染色像は蛍光標識抗体を使用した場合とほとんど変わらないこと、光学顕微鏡が利用可能で染色の退色を心配せずに観察できることが確認できた。さらに検査キットを使わない測定系であることを活かし、抗体希釈倍数を変更して反応させた結果の違いを比較するなどの工夫を課題とすることで、検査キットを使った学内実習では得難い「考える力」を養うことにつながることを示唆された。

【キーワード】 抗核抗体検査、酵素免疫染色、陽性染色像、「考える力」

I. 目 的

間接蛍光抗体法による抗核抗体検査(FANA)は、自己免疫疾患の重要なスクリーニング検査である。ヒト喉頭がん由来 HEp-2 細胞を用いたこの検査法は、単に抗核抗体陽性という検査結果にとどまらず、陽性染色像を観察することで細胞成分に対する抗体を特定する抗体同定検査へ進むための振り分けを手助けすることができる。しかし、FANAは検査の自動化に対応しておらず、検査担当者の目視による判定であるため、陽性染色像の判読には一定の技術が求められる¹⁾。また、臨床検査技師国家試験においてFANAは度々写真問題として出題されていることから、卒前教育としても国家試験受験対策上重視してきた検査項目である。

一方、教育機関において学内実習項目として

FANAに取り組む場合は、学生実習用としてはおそらく1施設に1台程度しかない蛍光顕微鏡を多くの学生で利用することになる。このため学生が顕微鏡をのぞく時間は十分に確保できず、さらに染色像を型別分類するのに必要な染色結果の特徴を理解するには程遠く、結局学内実習にFANAを導入していない教育機関も見受けられる。結果的に学生は染色像を講義スライドでしか目にする機会がないまま、国家試験問題の写真問題に取り組まなければならないことから、これを難しいと感じている学生も多いと思われる。

臨床検査における免疫血清分野の検査項目は、生化学分野同様、検査の自動化およびキット化が進み、学内実習や臨地実習においても何を実習させるかについて議論されているところである²⁾。第9回の当学会学術大会において、免疫検査のキット化に伴い学内実習が難しくなっていることへ

*杏林大学保健学部臨床検査技術学科 onogawa@ks.kyorin-u.ac.jp

の解決策として、検査原理を考えさせる方向にシフトすることを提案させていただいた³⁾。今回、教育機関の抱えるこの問題を解決するためのひとつの手段として、間接蛍光抗体法で行う FANA を、通常学生ひとり 1 台使用できる環境にある光学顕微鏡で観察可能な酵素免疫染色に変更することを試みた。これは単に染色像をじっくり観察できるようにするだけでなく、反応の最適化などの反応条件を考えさせる発展的教育用ツールとしても使えることから紹介したい。

II. 方 法

1. 使用核材および被検材料

使用核材は、通常臨床検査で使用される市販の HEP-2 細胞基質スライド(フルオロ HEPANA テスト、MBL、長野)を使用した。被検材料は、市販の抗核抗体用精度管理血清(HEPASERA-1、MBL、長野)および市販の自己抗体陽性血清(抗 dsDNA 抗体陽性、Binding site、英国)を用いた。精度管理血清は、Homogenous、Speckled、Discrete-Speckled(Centromere)、Nucleolar の各染色像を示す 4 バイアルで構成されている。今回購入した精度管理血清の抗体価は、Homogenous 320 倍、Speckled 320 倍、Discrete-Speckled 320 倍、Nucleolar 320 倍であった。陰性対照には、FANA 陰性血清および血清希釈液であるリン酸緩衝食塩液(PBS)を用いた。

2. 酵素標識抗体の使用濃度の決定

今回、間接蛍光抗体法から酵素免疫染色に切り替えるにあたり、標識抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG (Fc γ 特異) 抗体(Mouse IgG1、Southern Biotechnology、米国)を使用し、高感度測定が可能な酵素基質液(ImmPACT™ NovaRed™、Vector、米国)で発色させることにした。そこで一般的にカットオフ値として採用している⁴⁾ 40 倍希釈を参考に希釈した精度管理血清に対して、酵素標識抗体を PBS で 500 倍、2,000 倍および 8,000 倍希釈したものを反応させ、どの希釈倍数の酵素標識抗体の使用が適切かについて検討した。反応条件については後述のとおりである。

3. 精度管理血清を用いた核材との一次反応

精度管理血清は、PBS を用いて 40 倍、80 倍、160 倍および 320 倍希釈を行い、細胞基質スライドの細胞固定ウェルあたり 30 μ L 滴加した。その後、湿潤箱内で 37°C 30 分間反応させた。

4. 精度管理血清を用いた二次反応

反応が終了した細胞基質スライドを湿潤箱から取り出し、PBS の入った洗浄ビンを使って管理血清を洗い流した。その後、PBS の入ったビーカーを用いて細胞基質スライドを洗浄かごに入れてスターラーで 15 分間洗浄した。洗浄が終わった細胞基質スライドにペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体を細胞基質スライドの細胞固定ウェルあたり 30 μ L 滴加した。その後、湿潤箱内で 37°C 60 分間反応させた。

5. 観察標本の作製

反応が終了した細胞基質スライドを湿潤箱から取り出し、PBS の入った洗浄ビンを使って二次抗体を洗い流した。その後、PBS の入ったビーカーを用いて細胞基質スライドをスターラーで 15 分間洗浄した。洗浄が終わった細胞基質スライドに酵素基質液を 30 μ L 滴加し、6 分間を目安に室温で反応させた。顕微鏡下で染色状況を確認後、酵素基質液を水洗し、封入した。標本は、光学顕微鏡(BX-51、OLYMPUS、東京)にて 200 倍および 400 倍で観察し、赤褐色に染色された細胞を陽性細胞として判定、さらに染色像について蛍光抗体法で実施した場合に観察される特徴と比較しながら記録した。

6. 自己抗体陽性血清を用いた反応

酵素免疫染色を用いた方法は、臨床検体を用いても観察に支障がないことを確認するため、市販の自己抗体(抗 dsDNA 抗体)陽性血清を用いて精度管理血清と同様に実験した。自己抗体陽性血清は、リン酸緩衝食塩液(PBS)を用いて 40 倍、80 倍、160 倍および 320 倍希釈を行い、細胞基質スライドの細胞固定ウェルあたり 30 μ L 滴加した。以降、精度管理血清と同様に反応させ、標本を作製した。

III. 結 果

1. 酵素標識抗体の使用濃度の決定

間接蛍光抗体法から酵素免疫染色への切り替えにあたり、二次抗体として使用するペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 抗体の使用濃度を決定した。PBS で 500 倍、2,000 倍および 8,000 倍希釈した酵素標識抗体を二次抗体として反応させた。その結果、カットオフ値として採用されることの多い 40 倍希釈した精度管理血清との反応においてもっとも観察しやすかったのが、2,000 倍希釈であった。よって、以降の実験では 2,000 倍希釈した酵素標識抗体を用いることにした。

2. 精度管理血清を用いた染色像の観察

Homogeneous、Speckled、Discrete-Speckled、Nucleolar の各染色型について、酵素標識抗体を用いても間接蛍光抗体法と同じ染色像が得られるのかについて検討した。今回は酵素基質液に Vector 社の ImmPACT™ NovaRed™ を使用した。これは赤褐色に染色されることから DAB などの褐色陽性像よりも見やすいのが特徴である。

Homogeneous については、希釈倍数 40 倍から

320 倍にかけていずれも核辺縁部がより強く染色される像が得られた(図 1 : 1 段目)。とくに 160 倍以降については非常に分かりやすい像が得られた。

Speckled についても、希釈倍数 40 倍から 320 倍にかけて陽性像が観察でき、Speckled の特徴である核内が顆粒状に染色される像が間接蛍光抗体法よりもきれいに得られた(図 1 : 2 段目)。

Discrete-Speckled については、間接蛍光抗体法同様、やや見にくい染色像ではあるが、それでも希釈倍数 40 倍から 320 倍にかけて、核内の散在する顆粒状染色像が観察できた(図 1 : 3 段目)。

Nucleolar については、希釈倍数 40 倍から 320 倍にかけてはっきりと核小体が染色されており(図 1 : 4 段目)、他の染色型と迷うような染色結果ではなかった。

以上の結果から、抗核抗体の染色型観察には酵素免疫染色の利用も可能であることがわかった。

3. 市販自己抗体陽性血清を用いた染色像の観察

今回、抗 dsDNA 抗体陽性の市販血清を用いて、酵素免疫染色にて抗体の検出を試みた(図 1 : 5 段目)。被検血清は精度管理血清同様、希釈倍数

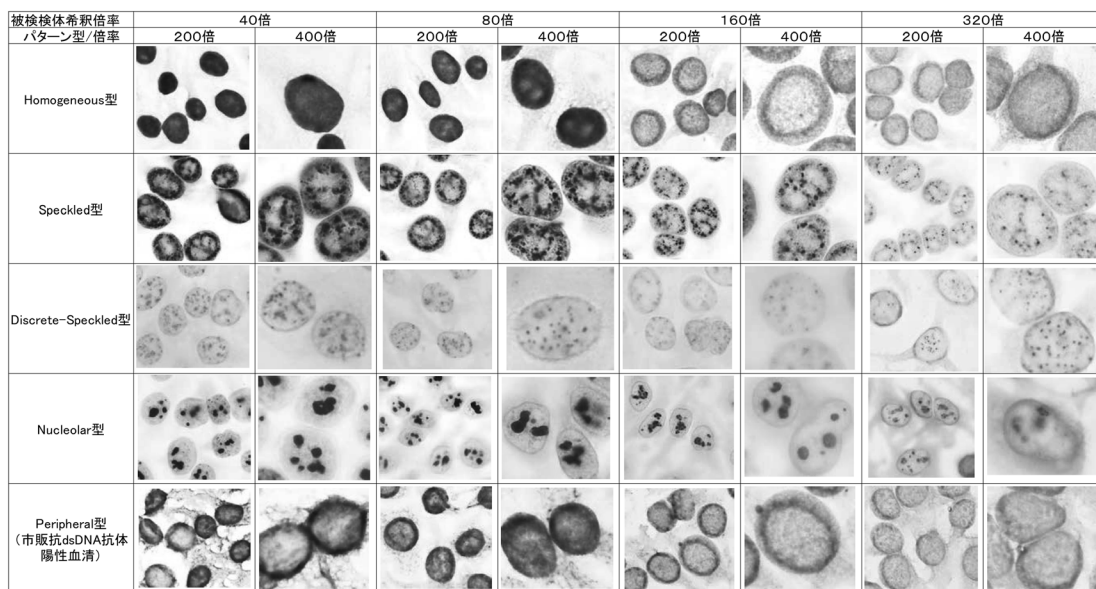


図 1 酵素免疫染色による HEp-2 細胞を用いた抗核抗体陽性像

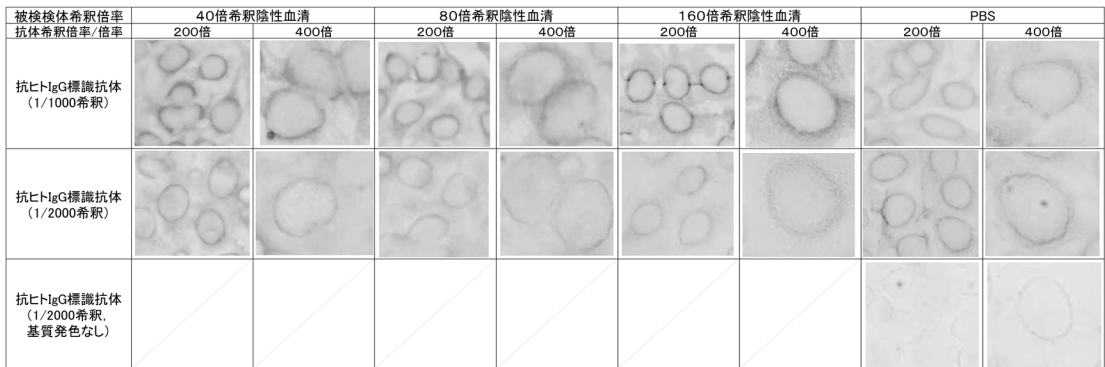


図2 酵素免疫染色によるHEp-2細胞を用いた抗核抗体陰性像

40倍から320倍にかけて陽性像を観察することができた。陽性像は40倍希釈ですでに核辺縁が強く染色されており、典型的なPeripheral像を得ることができた。

これにより、FANAにて観察できる5つの基本的染色型は、すべて酵素免疫染色にて観察できることがわかった。

4. 陰性対照における染色像の観察

FANA陰性血清を使用して陰性像を確認したところ、Peripheralに似た核周囲を縁取るような薄い染色像が観察された(図2:2段目)。血清の代わりにPBSを用いた反応の結果においても、同様の染色像が観察された。この像は基質を入れずに反応を終了することで消失した。そこで酵素標識抗ヒトIgG抗体の非特異的反応を疑い、酵素標識抗体を2,000倍希釈から1,000倍希釈に変更したところ、像が2,000倍希釈より濃く得られた(図2:1段目)。よって、これは酵素標識抗体が原因となっていることが示唆された。しかしながら、陰性対照の40倍希釈においてみられる染色結果は、陽性血清と比較するとかなり薄く、陽性判定に支障となるほどではなかった。

IV. 考 察

今回、FANAを学内実習に導入するに当たり支障となる教育機関のもつ問題を解決するため、間接蛍光抗体法で行うFANAをどこの施設でも数多く所有する光学顕微鏡で観察可能な酵素免疫染

色に変更することを試みた。FANAを酵素免疫染色に変更することで、学内実習における蛍光顕微鏡の使用に関する問題は事実上解消されることを示した。さらに蛍光色素に見られるような標本の退色もなく、染色像をしっかりと観察することも可能になるため、教育上有益な効果が得られることが期待された。

蛍光抗体法から酵素免疫染色に切り替えた場合、陽性細胞がこれまでFANAでみられてきた蛍光染色像と同じように観察できるのかが重要になる。そこで、まず標識抗体を酵素標識に変更して精度管理血清と反応させた。その結果、予想以上にきれいな染色像が得られ、背景も非常にクリアであることから、学生が観察しやすい標本が出来上がることがわかった。さらに、各染色型の特徴はFANAよりも酵素免疫染色の方がむしろわかりやすくなることもわかった。学生教育上苦勞するのがSpeckledであり、FANAでは核内が顆粒状に染色されている様子が非常にわかりにくい。酵素免疫染色におけるSpeckledは顆粒がやや大きく染色されてしまうが、それでも顆粒状に染色される様子ははっきりと観察することが可能であった。さらにDiscrete-Speckledとの比較もわかりやすく、こちらは陽性顆粒がSpeckledよりも核内に散在している様子が観察できた。この2つの染色型は分裂期細胞を見つけることができれば鑑別も簡単だが、学生からは区別が難しい染色型であるよく聞く。酵素免疫染色に切り替えることでこ

ういった教育上の効果も期待できるのではないかと考える。

さらに酵素免疫染色への切り替えは、単に染色型の鑑別がしやすくなるばかりでなく、二次抗体には何に対する抗体を選択すべきか、どのくらいの希釈が適しているのかなど反応系を学生に考えさせて組ませることも可能である。今回、陰性対照で薄い染色像が観察されたわけだが、例えばこの現象は何が原因で生じているのかを検討させる課題を与えることで、問題解決に取り組む姿勢を身につける機会となることが期待できる。また、間接抗体法においては非特異的反応が起こりうることも、反応系の組み立てを経験することで確実な知識になるであろう。検査キットの学内実習への利用は、検査結果が出ないなどの失敗が少なく簡便であるが、測定値ができれば単に「陽性」か「陰性」ばかりに目が向き、検査原理を意識せずに終わってしまうのが欠点であろう。試行錯誤しながら適切な反応条件をみつけ、その条件のもとに検体を観察してみることは、実際の検査において異常反応に遭遇した場合の対応にもつながる「力」が養われるのではなかろうか。標識抗体の濃度を変更してみる、反応時間を変更してみる、そうして得られた結果の違いを説明できるようになることが、現在の臨床検査技師養成の卒前教育に不足している「考える力を養う」ことにつながることを切に願っている。

今回の FANA の酵素免疫染色への変更は、あくまでも教育効果を期待してのものである。現在、抗核抗体検査スクリーニングで細胞の染色像観察に採用されているのは間接蛍光抗体法であることから、FANA が基準方法であることは間違いない。教育機関においては、FANA で得られる染色像を見せつつ、酵素免疫染色で得られた染色像から各染色型の特徴をとらえること、さらには工夫する力や考える力を養う手段として今回の変法を紹介させていただいた。今後、本方法を実際の学内実習に導入した場合に得られる学生の理解度の変化

について、さらには本方法の日常検査への応用について検討を進めていく予定である。これらに関心のある教育機関から連絡をいただければ幸いである。

V. 結 語

抗核抗体検査で使用する二次抗体を蛍光標識抗体から酵素標識抗体に変更することで、学内実習において障害となっていた FANA を取り巻く問題を解消できる可能性がある。さらに反応系の組み立てなどを経験させることは「考える力」を養う機会となり、検査試薬がキット化された環境で不足しがちな発展的学習効果を期待できると考えられる。

謝辞：本実験を進めるにあたり協力いただいた杏林大学保健学部臨床検査技術学科卒業研究生の松田真歩、大谷友貴、田場川裕哉の諸氏に、また顕微鏡写真の撮影に協力いただいた杏林大学保健学部の山本 寛准教授に感謝申し上げる。

文 献

- 1) 陣内記代, 大竹皓子. 抗核抗体－間接蛍光抗体法. 検査と技術 2005; 33: 709-14.
- 2) 奥村伸生. 免疫血清検査の自動化の時代に学内で何の実習を行うことが望ましいか－信州大学の現状報告－(抄). 第 9 回日本臨床検査学教育学会学術大会抄録集. 東京: 日本臨床検査学教育協議会事務局. 2014: 80.
- 3) 小野川 傑, 田口晴彦. 臨床検査学教育において「学生の考える力」をどうやって引き出すか?－免疫検査学実習の場合－(抄). 第 9 回日本臨床検査学教育学会学術大会抄録集. 東京: 日本臨床検査学教育協議会事務局. 2014: 80.
- 4) 野崎正行, 小野綾子, 高橋俊司, 中村厚志, 神田真聡, 嶋村沙苗, その他. 抗核抗体間接蛍光抗体法検査のカットオフ値の検討(抄). 日本臨床免疫学会誌 2013; 36: 407.