

シリーズ—腫瘍マーカーの免疫染色

第4回 免疫染色の技術的な留意点と落とし穴

つつみ病理診断科クリニック 院長
堤 寛 Yutaka Tsutsumi, M.D.

腫瘍マーカーの免疫染色は今や腫瘍の病理診断に必須事項となっている。本稿では、腫瘍マーカーの免疫染色に際して知っておくべき技術的な留意点と落とし穴について、以下の9項目にフォーカスして記述する。

① 免疫染色の方法論、② ホルマリン固定による影響、③ ホルマリン固定による人工産物、④ 内因性色素、⑤ 諸操作による抗原性の減弱、⑥ 抗原性賦活化法に対する留意点、⑦ 免疫染色の特異性判定と免疫染色結果の判断、⑧ 予想外の結果が得られたとき、⑨ 病理標本による血液型判定。

免疫染色の方法論

1) 免疫染色法と抗体の選択

現在では多様な染色キット、一次・二次抗体や発色剤が市販され、染色技術に関する知識や自動免疫染色装置の普及と相まって、染色技術そのものが問題となる時代は過ぎ去った。染色の増感法に関しては、peroxidase 標識ポリマーを利用するポリマー法 [EnVision FLEX, Flex (ともに Dako 社), Simple Stain Max (ニチレイバイオサイエンス社), Novolink (ライカマイクロシステムズ社)], FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識タイラミドを利用する CSA (catalyzed signal amplification) 法 (Dako 社) が普及している。一時期主流だったビオチン標識を基盤とする ABC (avidin biotinylated peroxidase complex) 法や LSAB (labeled streptavidin biotinylated peroxidase) 法は、現在はほぼ使われない。その理由として、加熱処理による抗原性賦活化により内因性ビオチン

活性が賦活されてしまうこと、染色ステップが多いこと、より高い感度が求められることがあげられる^{1~3)}。

多数のペルオキシダーゼ分子を結合した高分子ポリマーを二次抗体とする免疫染色は、従来の間接法や LSAB 法をしのぐ染色感度をもたらした。さらに、超高感度抗原検出法である CSA 法と次項以降に述べる抗原性賦活化法を組み合わせることで、従来ホルマリン固定パラフィン切片では失活して証明不能とされていた抗原 (細胞接着分子、リンパ球表面マーカーなど) が染色可能となった⁴⁾。高感度法は背景染色をも増感することに加え、抗原の局在性が拡散される点 (例: 膜蛋白が細胞質全体に陽性となる) を決して忘れてはならない。超高感度法用に高度に希釈した一次抗体は、その保存・管理が難しい (失活しやすい) 点も指摘したい。慣れた方法で再現性のよい染色結果を得ることを最優先とすべきである。

染色対象の大部分は通常ホルマリン固定パ

ラフィン切片である。そのため、抗体はこの条件で再現性よく染色可能なものを選んで使用すべきである。限定的な固定条件のもとでしか使用できない抗体は、ルーチン業務や後ろ向き研究には応用しづらい。発色はDAB (diaminobenzidine) による褐色が、核染色はマイヤーのヘマトキシリンによる紫色が原則である（ギルのヘマトキシリンは大腸粘膜の粘液や軟骨器質が共染するため勧められない）。

2) 高感度技法の落とし穴

CSA II法(ビオチン化タイラマイドの代わりに、FITC化タイラマイドを利用)において、抗体濃度が高い場合に偽陰性化が生じる場合があることも知っておきたい⁵⁾。大腸癌における epidermal growth factor receptor (EGFR) の発現を免疫組織化学的に判定するための染色キット PharmDx™ が、Dako (Agilent) 社から市販されている。しかし、腺癌細胞のみならず正常大腸粘膜上皮も染色されにくく、使いにくいのが実情である。このキットで二次抗体として用いられている EnVision の代わりに、同じ Dako 社製の CSA II を用いると、陽性率・陽性細胞数ともに激増する。この結果は、他のモノクローナル抗体を用いる EGFR 免疫染色に一致した⁶⁾。保険収載された染色キットの大きな問題点といえよう。

自動免疫染色装置は、一般に高感度な抗原検出レベルに設定されている。たとえば、ベンタナベンチマーク ULTRA (ロシュ・ダイアグノスティックス社) で乳癌や胃癌の HER2 染色を行うと、正常乳管や胃粘膜粘液被覆上皮が染まりすぎる傾向があり、慣れていないと過剰発現の偽陽性判断となる可能性がある。

ホルマリン固定による影響

病理標本は通常、ホルマリン固定パラフィン

包埋された組織から作製される。10~20%ホルマリンはギ酸への酸化が生じて酸性を呈するため、中性ホルマリンや中性緩衝ホルマリンを用いる場合もあるが、HE染色の染色性は非緩衝ホルマリンがより優れている。経験的には、わざわざ中性化したホルマリンを利用しなくても、通常非緩衝ホルマリン固定標本で十分に検出可能なマーカーが多い。ホルマリン濃度に関しては、10~20%の間で抗原性保持能はほぼ同等である。核酸(DNA, RNA)についても、PCRにおける増幅対象DNAの塩基配列を100bp程度に短く設定すれば、比較的安定して核酸を証明することが可能である⁷⁾。

ホルマリン固定パラフィン包埋によって失活・減弱する抗原性は確かにある。しかし、この条件でも安定した染色結果を得られる抗体が数多く市販されるようになり、通常のパラフィン切片に使える抗体を選ぶ時代となっている。抗原性賦活化操作や高感度法は、ホルマリン固定パラフィン切片に適した免疫染色を可能とする。限界さえ認識すれば、パラフィン包埋されたからという理由で免疫染色を諦める必要はない。

きわめて長期にわたるホルマリン固定後でも免疫染色や *in situ* hybridization 法が可能な場合がある。筆者らは、かのトーマス・ホジキン医師自身が19世紀初頭に病理解剖し、170年間の固定(80年間エタノール、その後90年間ホルマリン)した後に切り出された肝臓、脾臓およびリンパ節の Hodgkin リンパ腫の標本を用いて、EBER および CD15 (Leu M1) を証明できた (図1)⁸⁾。

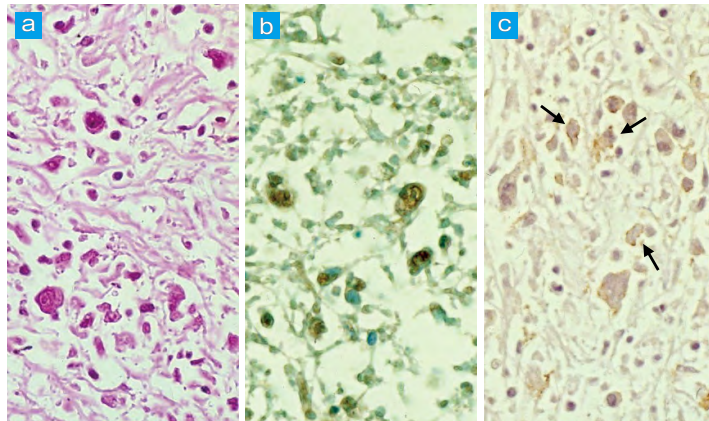


図 1 トーマス・ホジキン自身が 1820 年代に病理解剖した Hodgkin リンパ腫の EBER および CD15 (Leu M1) の陽性所見
 a: HE 染色, b: EBER, c: CD15 (Leu M1).
 死後変化が強いが, Reed-Sternberg 巨細胞が確認される. 巨細胞の核に EBER, 細胞膜に CD15 (Leu M1) の陽性所見が確認できる (c 矢印). 80 年間エタノールで, その後 90 年間ホルマリンで固定され続けた標本である.

ホルマリン固定による人工産物

1) 血漿蛋白の特定細胞の細胞質へのしみ込み (diffusion artifact)

組織間液に多量に存在する血漿蛋白は, ホルマリン固定の間に一部の細胞の細胞質に非特異的にしみ込み, 免疫染色で陽性を示す (核は陰性). 代表例として, Hodgkin 細胞・Reed-Sternberg 巨細胞における細胞質内免疫グロブリンの局在があげられる (細胞質がポリクローナルに陽性). ホルマリン固定の条件がよくない場合には, 肝細胞, 表皮, 甲状腺濾胞上皮細胞, 肝細胞癌, 非 Hodgkin リンパ腫など, さまざまな細胞の細胞質が免疫グロブリン陽性を呈す. こうした場合, IgG のみならず, IgA, IgM, κ 鎖, λ 鎖やアルブミンも陽性となる. 核は陰性で, 一部の細胞の細胞質のみがみごとに (いかにも意味ありげに) びまん性に染色される点が特徴である (図 2). 細胞が固定される前に周囲の血漿蛋白が細胞内にしみ込み, その後に固定されたためと考えられる. 免疫反応そ

のものは特異的だが, 陽性所見に意味は乏しい. したがって, IgG や α_1 アンチトリプシンの免疫染色には, アルブミンが対照として適している⁹⁾.

2) 固定ムラによる偽陰性化・偽陽性化

固定ムラは, 免疫染色の結果にしばしば影響する. 固定不良部位での偽陰性化のみならず, 過固定部位における偽陰性化もみられる⁹⁾. 一般に, 固定不良部位では vimentin が陰性化するため, vimentin の免疫染色が組織の固定条件のよしあしの目安となる. 図 3 に内因性対照としての vimentin 免疫染色の有用性を示す¹⁰⁾. 同一抗原, たとえば leukocyte common antigen (LCA: CD45) でも, リンパ節の周辺部のみが陽性となる場合や, 逆に周辺部のみが陰性化する場合もある. こうした場合, 陰性部には目をつむり, 陽性部の所見を重視する判定をせざるをえない.

内因性色素

内因性色素が DAB 反応の褐色の色調に類似

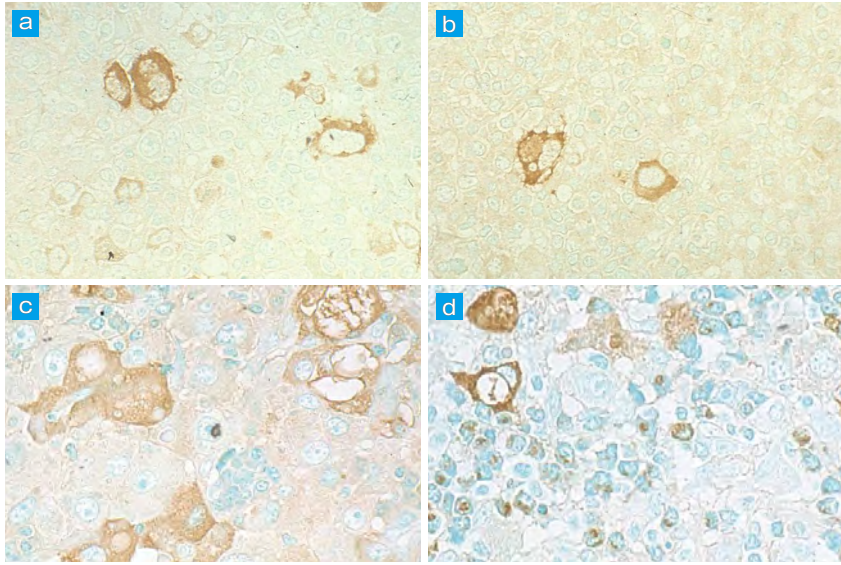


図 2 ホルマリン固定のアーチファクト①
 血漿蛋白の大型細胞の細胞質への非特異的なしみ込みの観察。
 a : Hodgkin リンパ腫 κ 鎖, b : Hodgkin リンパ腫 λ 鎖, c : 肝細胞癌リンパ節転移巣アルブミン, d : 肝細胞癌リンパ節転移巣 IgG.
 Reed-Sternberg 巨細胞の細胞質は κ 鎖と λ 鎖がともに陽性に染色される。リンパ節転移の巨細胞化した肝細胞癌の腫瘍細胞は、細胞質にアルブミンと IgG (γ 鎖) が陽性を呈している。固定による人工産物であり、肝細胞癌がアルブミンを産生しているとはいえない。IgG の陽性像は形質細胞の細胞質 (ゴルジ野) にも観察される。

し、陽性反応と紛らわしいことがある^{1~3)}。メラニン色素は異染色性を示すため、後染色にメチルグリーン染色あるいは Giemsa 染色を選ぶと、DAB 発色の褐色と明瞭に識別できる (図 4)。メラニン産生性病変の免疫染色では、HMB45-Giemsa および melan A-Giemsa 染色をルーチン化したい。

血鉄素 (ヘモジデリン) を有する細胞の免疫染色には、ベルリン青染色との重染色が有用である。ホルマリン色素が目立つ場合 (特に出血部) は、あらかじめ脱パラフィン切片にアルカリ処理を行ってホルマリン色素を溶解させておくといよい。ビリルビン色素が DAB 発色と紛らわしい所見を呈することもある。ペルオキシダーゼの代わりにアルカリホスファターゼを標識酵素として、マーカーを赤ないし青に発色さ

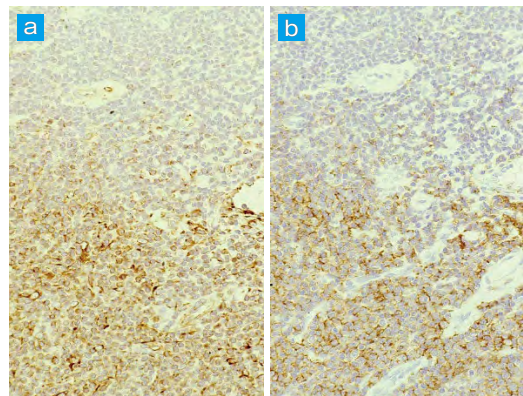


図 3 ホルマリン固定のアーチファクト② (vimentin control)
 a : CD20, b : vimentin.
 リンパ節生検された B 細胞リンパ腫である。vimentin の抗原性が保たれる領域 (写真の下半分) に限って、CD20 の陽性所見が観察される。上半分の領域は、過固定によってともに偽陰性化を呈している。

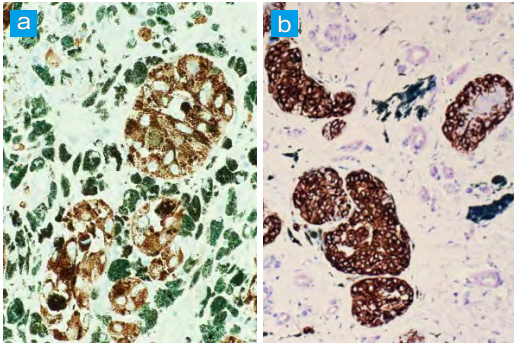


図 4 メラニン産生の目立つ悪性黒色腫に対する免疫染色
 a: HMB45-メチルグリーン核染色, b: melan A-Giemsa 染色。
 ヘマトキシリンによる核染色では、DAB 発色による褐色とメラニンの黒褐色が区別しづらい。後染色にメチルグリーンあるいはGiemsa 染色を選ぶことで、メラニン色素は異染色性を示す。メラニン色素は a では緑色調に、b では濃青色に染色され、腫瘍細胞が示す HMB45/melan A の褐色の陽性所見を容易に識別できる。

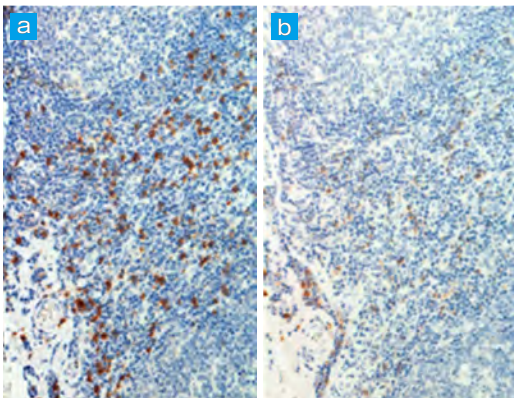


図 6 ホットプレート上でのパラフィン切片伸展温度が抗原性に及ぼす影響（扁桃における CD8）
 a: 40°C 20 秒伸展, b: 70°C 3 秒伸展。
 高温で切片を伸展すると、特定の抗原（ここでは CD8）の抗原性が減弱するため、40°C での伸展が望ましい。

せると問題の多くは解消される。

◆ 諸操作による抗原性の減弱

1) 切り置き切片における抗原性の減弱

免疫染色の陽性対照として、パラフィン切片

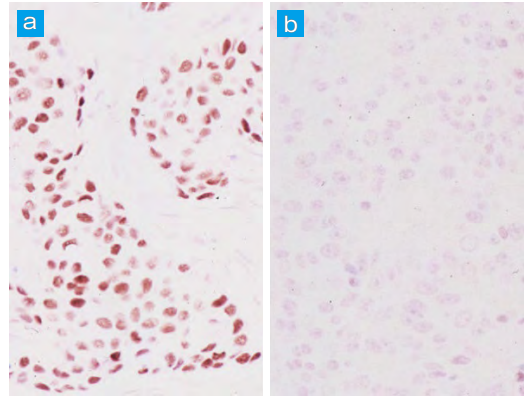


図 5 切片の切り置きによる抗原性の失活（ER 陽性乳癌）
 a: 薄切直後に染色, b: 切片を常温で 1 年間保存後に染色。
 未染色切片を長期間常温保存することで、ER の抗原性は失われる。加熱処理を行っても、抗原性は賦活化されない。

を切り置いておくことは、病理診断の実務上重要である。多くの場合は問題ないが、一部の抗原、特に核内抗原は薄切後時間が経つにつれて抗原性が次第に失活し、加熱処理でも賦活化を受けにくくなる。その代表例が Ki-67 (MIB-1), p53 蛋白およびステロイドホルモン受容体 (ER, PgR, AR) である (図 5)。これらの抗原に対しては、必要時に陽性対照切片をパラフィンブロックから薄切するようにしたい^{1~3)}。薄切切片を -20°C 以下で冷凍保存すると、長期保存が可能となる¹⁰⁾。

2) パラフィン切片の伸展温度および薄切後の乾燥条件の影響

過酸化還元酵素のアイソザイムである glutathione-S-transferase (GST)-π および抗癌剤 5-fluorouracil (5-FU) のリン酸化（活性化）酵素である orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) といった細胞質内酵素や CD8 を局在観察する際には、パラフィン切片薄切後にホットプレート上で伸展・乾燥する温度が問題となる (図 6)¹¹⁾。すなわち、伸展温度を 70°C 以上にすると抗原性が極端に低下する。この場

合、伸展温度は40℃が望ましい。薄切後の切片乾燥の条件についても、40℃孵卵器に3日間保存すると、乳癌や胃癌のHER2染色性は明らかに低下する(図7)¹²⁾。金曜日に薄切した標本を翌週の月曜日に染色することはなるべく避けたい。

3) 表面脱灰による抗原性失活

病理組織の脱灰操作は抗原性の減弱・失活につながる場合がある。血球表面マーカーでは、CD3やCD79aが影響を受けやすい。EDTA脱灰は影響が最小だが、脱灰に時間を要する。10%ギ酸による脱灰操作が実務的である。できれば、ブランク・リュクロ液、K-CX液やトリクロロ酢酸による脱灰は避けたい¹³⁾。

予期せぬ石灰化がある際には、酸性脱灰液によるパラフィンブロックの表面脱灰が利用される。この操作はKi-67、ER/PgR、HER2、CD3、TTF-1など多くの抗原性を減弱させる。表面脱灰操作によるKi-67の偽陰性化例を図8に示す。脱灰液のなかで、抗原性減弱への影響がもっとも少ないのは10%ギ酸である。通常の脱灰操作と同じく、ブランク・リュクロ液、K-

CX液やトリクロロ酢酸の使用は控えたい¹⁴⁾。

抗原性賦活化法に対する留意点

抗原性賦活化(antigen retrieval)とは、ホルマリンによる蛋白架橋反応の過程でマスクされた(抗体分子が反応できなくなった)抗原決定基を何らかの方法で表面に露出させる前処理

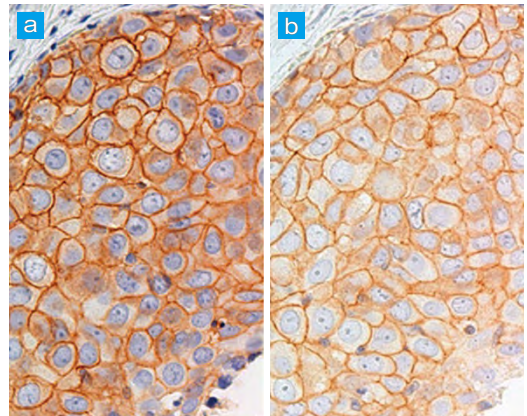


図7 長時間の乾燥によるパラフィン切片の抗原性の減弱(HER2を過剰発現する乳癌)
a: 40℃ 1時間乾燥, b: 40℃ 3日間乾燥。
40℃孵卵器中での乾燥時間が長いと、HER2の抗原性が明らかに減弱する。週末に薄切して翌週に染色することは避けたい。

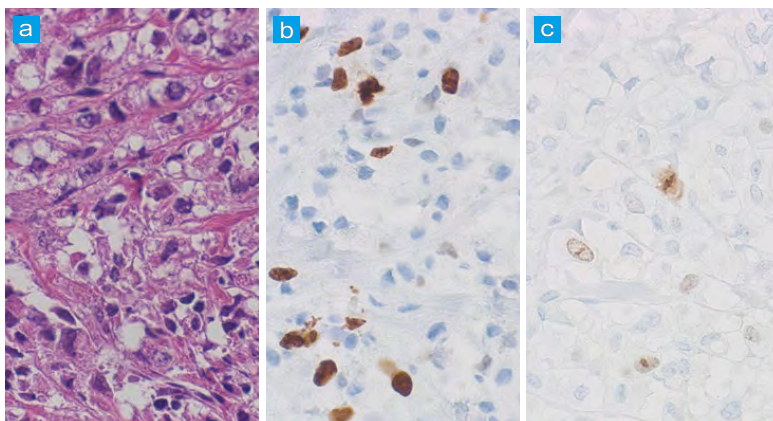


図8 表面脱灰操作によるKi-67抗原性の著しい減弱(石灰化を伴う乳癌)
a: HE染色, b: 未脱灰標本, c: トリクロロ酢酸による表面脱灰後。
パラフィンブロックに予期せぬ石灰化があり、トリクロロ酢酸による表面脱灰が行われた。未脱灰標本に比べて、Ki-67の抗原性は著しく減弱している。10%ギ酸による短時間の表面脱灰操作に切り替えたい。

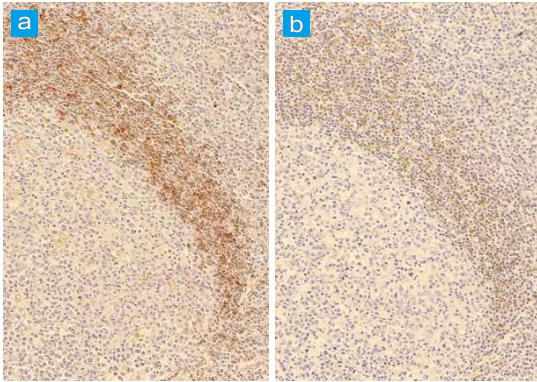


図 9 プロテイナーゼ K 処理による IgD 抗原性の減弱 (扁桃リンパ濾胞の暗殺リンパ球)
 a: 未処理, b: プロテイナーゼ K 処理, 常温 30 分.
 蛋白分解酵素処理によって, 一部の抗原 (IgD や一部のペプチドホルモン) の抗原性は減弱してしまう. 表面 IgD は暗殺小リンパ球のマーカーである.

操作を指し, 以下の 3 つの方法がある. 前処理による切片の剥離を防止する目的で, シラン処理スライドへの切片添付は必須である¹⁴⁾.

1) 蛋白分解酵素処理

プロテイナーゼ K, トリプシン, プロナーゼ, ペプシン, フィシンといった蛋白分解酵素による前処理は, 腎糸球体に沈着した免疫グロブリンや補体を再現性よく検出する. type 4 collagen, laminin や cytokeratin 蛋白の一部の証明にも用いられる. 蛋白分解酵素処理によって抗原性が減弱・失活する場合がある (substance P などのペプチドホルモン, B リンパ球における細胞表面 IgD など) (図 9)^{1~3)}.

2) 加熱処理

脱パラフィン切片を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0 あるいは pH 7.0) ないし 1 mM EDTA (pH 8.0) に浸漬して, 60~121°C で加熱する. 加熱方法は, 孵卵器 (60°C 一晚), 水槽 (95°C), マイクロウェーブ (100°C), オートクレーブ (121°C), 圧力鍋 (120°C 前後), 蒸し器など, さまざまである. 核内抗原 (Ki-67, p53 蛋白,

ER/PgR) の他, 膜蛋白 (細胞表面マーカー, EMA, bcl-2), 細胞骨格蛋白 (cytokeratin, vimentin), 分泌蛋白 (副甲状腺ホルモン) といったさまざまな蛋白の抗原性が賦活化される. 従来, パラフィン切片で安定して証明されると思われてきたペプチドホルモンでも, 加熱処理による抗原性賦活化が認められる. この操作により, ホルマリン固定パラフィン包埋標本で新鮮凍結切片と同等の免疫染色結果が得られることが多い.

加熱処理に用いる溶液を適切に選択することも重要である. 細胞標本でも, ER や p53 などの核内蛋白に対して加熱処理が抗原性賦活化に働く点は注目に値する. クエン酸緩衝液や EDTA が有効であることから, カルシウムイオンのキレート作用が抗原性賦活化機序として重要であることが推測される¹⁵⁾. モノクローナル抗体の反応を室温 30 分とした場合に強く染色される p53, Ki-67 や ER が, 室温または 4°C で一晚反応させると免疫反応性が減弱・偽陰性化することがある^{1~3)}. これは, 加熱処理によって一本鎖化した DNA が, 水溶液中で徐々に二本鎖に還元してしまう現象の影響と推測される.

加熱処理を加える場合, 核染色にはヘマトキシリンが適している. 二本鎖 DNA 親和性の高いメチルグリーンは, DNA が一本鎖化した加熱処理切片の核を染色しづらい. EDTA 溶液を用いて加熱処理をすると, ヘマトキシリンの核染色性が明らかに低下するため, 核染色の時間を延長したい (図 10)¹⁶⁾. クエン酸緩衝液 (pH 7.0) の加熱処理では, 切片が剥離しやすい. また, 加熱処理によって抗原性が減弱・失活する抗原物質もある.

Ki-67 (MIB-1) は, 加熱後の切片の取り扱い方によってその局在性が大きく変化してしまうため, 注意を要する. 加熱後の切片を急速に

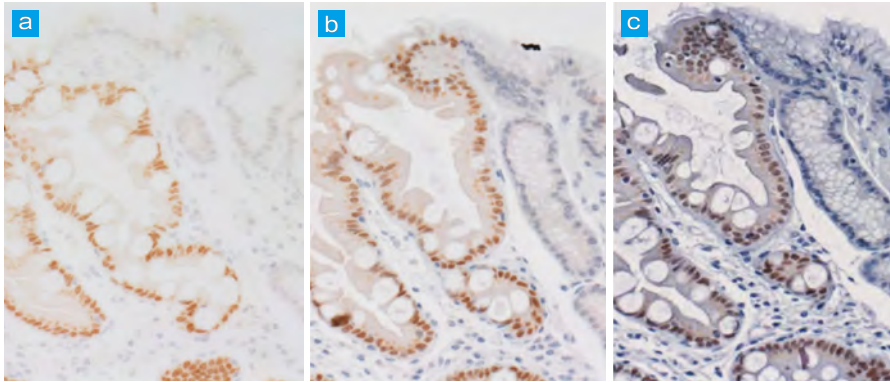


図 10 EDTA 溶液 (pH 8.0) 加熱処理後のヘマトキシリン染色不良
胃粘膜腸上皮化生における CDX-2 の核内局在。マイヤーのヘマトキシリン液への浸漬時間は、
a: 10 秒 (通常の染色時間), b: 1 分, c: 3 分。
1 mM EDTA 溶液による加熱処理によって、核のヘマトキシリン好性が減弱する。1 分程度の核
染色が必要となる。

冷やすと、ゆっくりと常温に戻した場合に比べて染色性が悪い (図 11)^{1~3)}。標識二次抗体に高分子ポリマー (EnVision) (Dako 社) を用いると、核分裂細胞の細胞質のみが染色される奇異な偽陰性化が経験される¹⁷⁾。そのため、分子量が小さめのポリマー試薬 (EnVision Plus, EnVision Flex など) の使用が求められる。

3) その他の賦活化法

脳内に沈着する β -amyloid 蛋白に対する 100%ギ酸処理, DNA に人工的に取り込ませた BrdU に対する 2~4 規定塩酸処理, 細胞質内アクチン封入体に対するアルカリ (1% KOH) 処理などが知られている¹⁸⁾。

免疫染色の特異性判定と 免疫染色結果の判断

免疫染色結果の判定に際しても、さまざまな落とし穴が待ち構えている⁹⁾。

1) 偽陽性と擬陽性

染色結果が弱陽性を示す場合、これを偽陽性 (false positive) とみなすか擬陽性 (equivocal positive) とみなすかが、病理診断の分かれ道

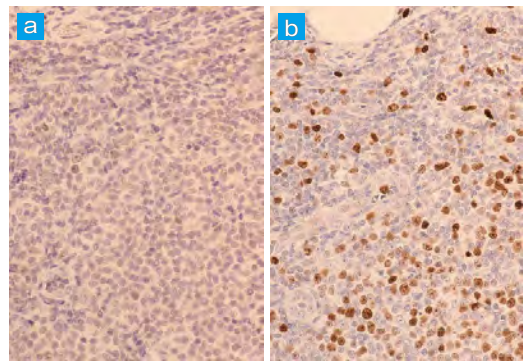


図 11 加熱後の急冷による Ki-67 抗原性の失活
a: 急冷, b: 常温放置。
反応性リンパ節を 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で圧力鍋加熱した後、a では切片を急冷し、b では常温放置してゆっくり冷却した。切片を急冷すると、加熱によって一本鎖化した DNA が二本鎖に戻ってしまうため、核内抗原が証明されにくくなると考えられる。

となる。筆者は、胎盤型アルカリホスファターゼ抗血清を用いた免疫染色で弱陽性と判断したために、肺小細胞癌を胚細胞性腫瘍 (精上皮腫) と誤診した痛恨の経験がある。一般に、腫瘍化した細胞の分泌蛋白に対する染色性は、正常細胞に比べて弱いことが多い (例: インスリン, クロモグラニン A, 第八因子関連抗原, 免疫グ

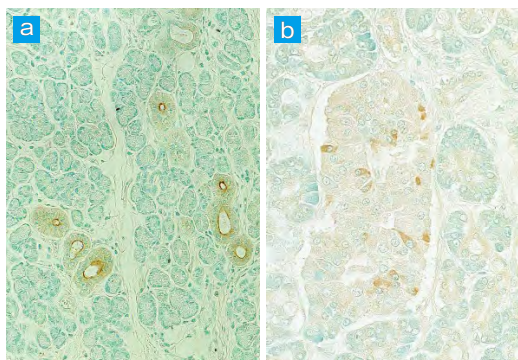


図 12 抗血清が示す予期せぬ交差反応性
 a : PSA 抗血清による正常唾液腺導管上皮の陽性像, b : ミオグロビン抗血清による正常膵島の陽性像.
 PSA は kallikrein-3 とも称される. PSA 抗血清は、唾液腺導管上皮が産生する kallikrein-1 と交差反応性を示す (a). 使用したミオグロビン抗血清には、ウサギが生理的に保有する抗中間径フィラメント抗体が含まれる. 膵島の一部の細胞の cytokeratin 分子が可視化されていると考えられる (b). いずれも、非特異的な交差反応である.

ロブリンなど).

2) 抗体の特異性

免疫染色に使用する抗体の特異性は、あらかじめ十分検討しておきたい。メーカーから提供される情報は有用だが、妄信してはならない(図 12)。PSA 抗血清は正常唾液腺導管上皮や唾液腺腫瘍に反応する。これは kallikrein 分子に対する交差反応であり (PSA は kallikrein-3 とも称される), 抗 PSA モノクローナル抗体には反応しない¹⁹⁾。家ウサギ抗血清には、しばしば中間径フィラメントに対する自然抗体が存在し、たとえば、ミオグロビン抗血清によって表皮細胞や膵島細胞が染色される²⁰⁾。モノクローナル抗体でも、マウス腹水中の血清成分による予期せぬ交差反応を認めることがある²¹⁾。上述のように、TTF-1 は甲状腺癌と肺腺癌・小細胞癌の核内マーカーだが、子宮内膜癌や肺外発生の小細胞癌にも陽性となる^{22,23)}。

小分子 (ハプテン) に対する抗体はハプテンを結合したキャリア蛋白を用いて作製されるた

め、抗血清にはキャリア蛋白に対する抗体が混在している。たとえば、牛サイログロブリンがキャリア蛋白に用いられた場合、ヒト甲状腺の濾胞上皮やコロイドが陽性に染色される²⁴⁾。免疫時に使用されるアジュバントには結核菌成分が含まれているため、抗血清の多くに結核菌 (抗酸菌) に反応する抗体が含有される。

マーカーの意義の理解も重要である。上述のように、PCNA と Ki-67 の標識率が大きく異なることはまれではない。PCNA は核内代謝が遅く、増殖サイクルの後まで抗原が核内に残存することが乖離のおもな要因である²⁵⁾。両者の乖離は、核分裂像に乏しい割に核の異型化 (bizarre nucleation) の目立つ上皮性腫瘍において特に顕著である (PCNA 陽性, Ki-67 陰性)。

3) 特定細胞による抗体分子の非特異的吸着

組織肥満細胞、内分泌細胞 (ガストリン細胞)、小脳プルキンエ細胞、胃底腺の壁細胞や B 型肝炎ウイルス感染肝細胞といった特定の細胞や間質の膠原線維が抗体分子を非特異的に吸着しやすい点にも留意したい^{1~3)}。

4) 細胞内抗原局在性に基づく免疫染色の特異性判定

免疫染色の特異性の判断に、細胞内局在性の観察が有用である^{3,9)}。AFP、HCG などの分泌蛋白は粗面小胞体・ゴルジ装置に局在するため、細胞質において小胞状に陽性となる。ペプチドホルモンは内分泌顆粒に一致して細顆粒状に染色される。S-100 蛋白、ミオグロビン、neuron-specific enolase (NSE) といった細胞質内可溶性蛋白はびまん性に細胞質内陽性を呈する (S-100 蛋白はしばしば核も陽性を呈する)。S100 蛋白、熱ショック蛋白、 β -catenin や claudin-18 は、細胞質と核内を移動する点の特徴である。膜蛋白は細胞膜に沿った陽性所

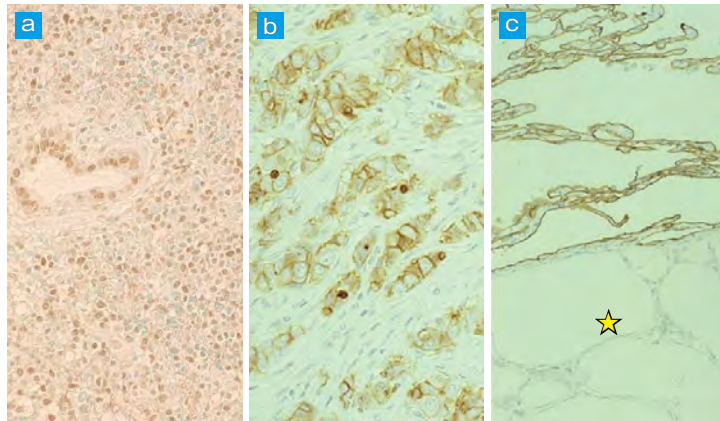


図 13 非特異的な免疫染色所見

a: 鼻腔リンパ腫に対する UCHL1 (CD45RO) 染色, b: 乳癌に対する PgR 染色, c: 正常肺胞上皮における Ki-67 染色.

a では T 細胞表面マーカーが核を染色している. b の PgR 染色では, 核の陽性像は一部のみで, 細胞膜の陽性反応が目立つ. c では, Ki-67 が非腫瘍性肺胞上皮の細胞膜に沿って観察される (星印: 肺内の異所性甲状腺組織は陰性). いずれも非特異反応である.

見となるが, ゴルジ野も陽性となりうる. こうした細胞内局在性は, 組織形態保持のよいパラフィン切片では凍結切片に比して明瞭であり, 「偽陽性」をみきわめやすい. リンパ球表面マーカーや cytokeratin が核内に陽性になる場合, Ki-67 や PgR といった核内抗原が細胞膜に沿った陽性像を示す場合は非特異反応であることが明瞭である (図 13).

細胞質内の可溶性蛋白は, 固定条件によって核内に移動する人工産物が発生する. 加熱処理が必要な抗原の場合, 細胞膜に局在すべき物質が, 細胞質内にびまん性に局在するようにみえることがある. 非特異反応を考えるべきだが, 加熱処理後に 1%過ヨウ素酸処理を行うと, 細胞質の陽性反応が抑制されることがある.

5) 陽性対照と陰性対照

免疫染色に際して, 一次抗体の代わりに正常動物血清ないしリン酸緩衝液を利用する陰性対照は必須である. 同時に多数の抗体を用いる場合, 互いが indifferent antibody (無関係な抗

体) として働くため, 正常動物血清による陰性対照は不要となる. 適切な陽性対照もまた重要であり, 抗体の失活を否定する技術的な確認作業に位置づけられる. vimentin, 血管内皮マーカー, 上皮マーカーなど, 切片に必ず陽性部位が期待できる場合, 陽性対照切片を準備する必要はない.

針生検された乳癌切片には ER, PgR, HER2, Ki-67 の免疫染色が必須である²⁶⁾. 筆者が ER 陰性と判断された乳癌のセカンドオピニオン患者からの検査依頼を受けた際, 癌周囲の正常組織 (非腫瘍性乳管) でも ER が陰性だったが, 未染色標本を取り寄せて免疫染色し直すと, 非腫瘍性乳管とともに, 乳癌細胞にも ER が陽性となった. 治療方針を左右する重大な「偽陰性」反応であり, 内因性対照の重要性が再認識された.

◆ 予想外の結果が得られたとき

HE 染色での予測と異なった免疫染色の結果

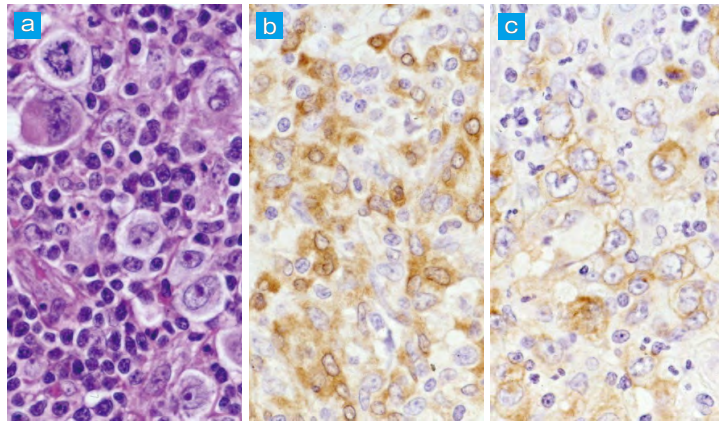


図 14 cytokeratin 陽性の Ki-1 リンパ腫（頸部リンパ節生検）

a : HE 染色, b : cytokeratin 抗血清, c : CD30.

大型異型細胞がリンパ節に高度に増殖し, cytokeratin 抗血清にびまん性に染色された。上皮性悪性腫瘍の転移を第一に考えたが, 追加検討の結果, CD30 および CD45 の陽性所見が得られ, Ki-1 リンパ腫（未分化大細胞リンパ腫）の確定診断となった。

が得られたときは, 免疫染色の意義が最大限に発揮される瞬間である。喜び勇んで免疫組織化学的な解釈を与える前に, 染色やマーカーの特異性を再吟味する過程が必要である。図 14 には cytokeratin 陽性の悪性リンパ腫, Ki-1 リンパ腫を示す。神経膠腫や悪性黒色腫でも cytokeratin が陽性を呈する症例がある。形質細胞や骨髄腫細胞に EMA が発現することを知っているかどうか, 誤った診断を避ける鍵となる⁹⁾。

◆ 病理標本による血液型判定

臨床診断と病理診断が大きく乖離したときは特に要注意である。この場合, まず他の標本からのコンタミネーションあるいは標本相互の取り違えの可能性を否定したい。提出容器やパラフィンブロックのチェックが第一段階であることは言うまでもない。ここでは, 血液型物質に対する免疫染色の有効性を強調したい。ABO 型や Lewis 型の糖鎖は血管内皮細胞や上皮細胞に発現されるため, パラフィン切片上での血液

型鑑定が可能である。この方法で生検検体の取り違えが証明され, 無用な手術を回避できる。

2 人の患者からの針生検組織が固定瓶の中で混在してしまった場合や検体の取り違えが疑われるときは, ABO 血液型に対する免疫染色の有用性が高い。対象患者の ABO 血液型が異なることが前提である。

前立腺針生検標本 2 名分が混入し, かつ 1 カ所でのみ癌があった場合, どちらの患者に癌があるのかを明確にしたい。非癌患者と癌患者の胃生検が取り違えられたおそれが高い場合, 癌が非癌患者の病変でないことを明確にしたい。このような状況では, 癌のある組織の血液型を明確にすることで問題の解決が可能となる²⁷⁾。ちなみに, ホルマリン固定パラフィン包埋に安定な血液型物質は, 抗原性賦活化処理を行う必要がない。生検標本の血液型判定によって検体の取り違えが証明され, 不必要な胃切除を回避できた事例を図 15 に示す。

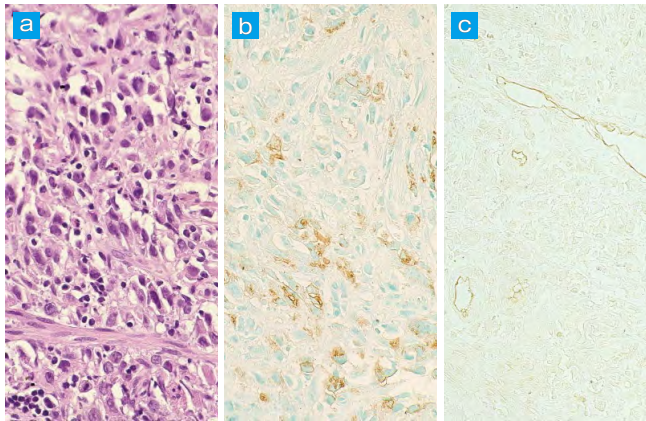


図 15 血液型判定で検体取り違いを見抜く極意

胃生検標本の血液型鑑定 (a: HE 染色, b: H 型物質, c: B 型物質)。血液型 O 型の 50 代男性。他院での胃生検で胃癌と診断され、手術目的で大学病院に来院。胃内視鏡を繰り返すが、良性潰瘍のみで悪性所見はみられなかった。そこで、初回の生検標本を取り寄せて、ABO 血液型に対する免疫染色を行った。浸潤性に増殖する低分化型腺癌細胞に H 型物質が陽性で、血管内皮細胞に B 型物質が証明された。A 型物質は陰性だった。この結果から本症例の癌腫は B 型被検者由来の検体 (検体の取り違い) と証明され、予定されていた胃切除手術は中止となった。H 型物質は O 型血液型を反映するとともに、A 型物質、B 型物質の前駆体でもある。血液型抗原は非常に安定で、長期ホルマリン固定に耐える。70 年間ホルマリン固定された標本でも利用可能だった。

おわりに

免疫組織化学的な腫瘍マーカーを適切に利用・応用するポイントは、① いかにかに染めるか、② いかにかにマーカーを選ぶか、③ いかにかに染色所見を判定するかの 3 点である。免疫染色は決して万能ではない。免疫染色などしなければよかつた、という痛い経験を通して、症例から一つひとつ学んでいく姿勢が問われる場面も少なくない。マーカーの特異性を信じすぎて痛い目にあった経験の積み重ねを大切にしたい。本シリーズが、少しでも実務者の役に立てば幸いである。

謝辞

塩竈和也先生 (藤田医科大学医療科学部臨床・教育連携ユニット形態・病理診断学分野 准教授)、鴨志田伸吾先生 (神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域 教授) に、長きにわたって技術的側面で多大なる知恵と協

力をいただきました。深謝します。

文献

- 堤寛: 免疫染色の工夫と落とし穴. 組織細胞化学 2015 (日本組織細胞化学会 編). pp.61-76, 学際企画, 2015.
- 堤寛: 免疫組織化学総論—検体処理・染色に当たっての注意点. 胃と腸, **52** (8): 973-987, 2017.
- Tsutsumi, Y.: Pitfalls and caveats in applying chromogenic immunostaining to histopathological diagnosis. *Cells*, **10** (6): 1501, 2021.
- 堤寛, 他: 免疫染色のコツ. 病理と臨床, **23** (1): 83-88, 2005.
- 塩竈和也, 他: CSA II 法を用いた免疫染色において、抗体濃度が高い場合に生じる偽陰性化の検討. 病理と臨床, **28** (11): 1213-1217, 2010.
- Shiogama, K., et al.: High-sensitivity epidermal growth factor receptor immunostaining for colorectal carcinomas, compared with EGFR PharmDx™: a study of diagnostic accuracy. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **6** (1): 24-30, 2013.
- Tamakuma, K., et al.: Histopathological diagnosis of Japanese spotted fever using formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens: usefulness of immunohistochemistry and real-time PCR analysis. *Clin. Microbiol. Infect.*, **18** (3): 260-267, 2012.

- 8) Tsutsumi, Y. : Demonstration of Epstein-Barr virus genome in archival paraffin sections of Hodgkin's lymphoma autopsied by Dr. Thomas Hodgkin nearly 170 years ago. *Acta Histochem. Cytochem.*, **36** (6) : 511-514, 2003.
- 9) 堤寛 : 免疫染色結果の判定. *病理と臨床*, **23** (3) : 309-316, 2005.
- 10) Wester, K., et al. : Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, **8** (1) : 61-70, 2000.
- 11) Kamoshida, S., et al. : Heat-assisted stretching of paraffin sections on hot plate weakens immunoreactivity of orotate phosphoribosyltransferase. *Acta Histochem. Cytochem.*, **38** (1) : 69-74, 2005.
- 12) 山口大, 他 : 病理標本の伸展および乾燥条件が染色性に与える影響. *検査と技術*, **41** (8) : 698-702, 2013.
- 13) Schrijver, W. A., et al. : Influence of decalcification procedures on immunohistochemistry and molecular pathology in breast cancer. *Mod. Pathol.*, **29** (12) : 1460-1470, 2016.
- 14) 尾花ゆかり : 表面脱灰の免疫組織化学への影響. *病理技術*, **7** (1) : 26-29, 2014.
- 15) Kim, Y-S., et al. : The use of alkaline EDTA solution improves heat-induced epitope retrieval for immunohistochemical localization of MIB-1 antigen. *Acta Histochem. Cytochem.*, **32** (3) : 287-294, 1999.
- 16) 塩竈和也, 他 : 抗原性賦活化が核染色に及ぼす影響. 免疫染色玉手箱 (ニチレイ), 2015.
- 17) 川井健司, 他 : MIB-1 染色の落とし穴. *病理技術*, **59** : 20-21, 1999.
- 18) 堤寛, 他 : 抗原性賦活化法. *病理と臨床*, **23** (2) : 189-198, 2005.
- 19) Tazawa, K., et al. : Localization of prostate-specific antigen-like immunoreactivity in human salivary gland and salivary gland tumors. *Pathol. Int.*, **49** (6) : 500-505, 1999.
- 20) 小林道也, 他 : 家兎由来多クローン性抗体に含まれる抗中間径フィラメント抗体の吸収法 その簡易法. *病理と臨床*, **6** (3) : 363-366, 1988.
- 21) Bacchi, C. E., et al. : Specificity of antibody HMB-45. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **116** (9) : 899-900, 1992.
- 22) Tachibana, M., et al. : Lung metastasis of endometrioid carcinoma aberrantly expressing thyroid transcription factor-1. *Hum. Pathol. Case Rep.*, **22** : 200448, 2020.
- 23) Agoff, S. N., et al. : Thyroid transcription factor-1 is expressed in extrapulmonary small cell carcinomas but not in other extrapulmonary neuroendocrine tumors. *Mod. Pathol.*, **13** (3) : 238-242, 2000.
- 24) 堤寛 : 抗体の性状と標識抗体. 渡辺・中根 酵素抗体法改訂四版 (名倉宏, 他 編). pp.33-73, 学際企画, 2002.
- 25) 堤寛, 他 : 増殖細胞のマーカー : 免疫組織化学の見地から. *病理と臨床 臨時増刊号*, **6** (10) : 1229-1236, 1988.
- 26) Zaha, D. C., et al. : Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World J. Clin. Oncol.*, **5** (3) : 382-392, 2014.
- 27) 堤寛 : 検査データをどう読むか. *Medicina*, **26** (4) : 692-693, 1989.

* * *