第 36 回組織細胞化学会講習会
「組織細胞化学 2011」日本組織細胞化学会編 pp. 209-218, 2011

免疫染色のトラブルシューティング

藤田保健衛生大学医学部第一病理学　　堤　寛　Yutaka Tsutsumi, M.D.
e-mail: tsutsumi@fujita-hu.ac.jp

Key words：免疫組織化学（immunohistochemistry）、トラブルシューティング（trouble shooting）、固定（fixation）、高感度技法（highly sensitive techniques）、抗原性失活（antigenic loss）、抗原性賦活化（antigen retrieval）、加熱処理（heating treatment）、背景染色（background staining）、免疫染色の特異性（specificity of immunostaining）、抗体の特異性（specificity of antibodies）、内因性活性物質（endogenous activity）、偽陽性（false positivity）、擬陽性（equivocal positivity）、病理診断（histopathologic diagnosis）

はじめに

免疫染色では、「染めました、染まりました」の時代は終わり、適切な結果判定のためのトラブルシューティングが要求される。検体処理および染色技法における「落とし穴」の記述が、免疫染色の適切な臨床応用につながれば幸いである。[1-4]

Ⅰ．検体処理

1．固定

最近では、ホルマリン固定標本に適した抗体が数多く市販されているが、それでも、固定によって失活・消失する抗原物質は少なくない。新鮮凍結切片が利用可能な場合でも、エタノールやアセトンによる固定が最適とは限らない。

1）新鮮凍結切片（アルコール・アセトン固定）

新鮮凍結切片は通常、エタノールで湿固定される。この固定条件は、通常の細胞標本の固定条件と同じであり、細胞表面マーカーや細胞骨格蛋白といった不溶性抗原の局在観察にもっとも適している。リンパ球表面マーカーの検索には、薄切標本を風乾したのちにアセトン固定してもよい。一方、細胞質・核内の可溶性蛋白、ペプチドホルモンや血小板第４因子・リゾチームといった顆粒内に含まれる分泌蛋白は、こうした有機溶剤による脱水・脱脂固定の過程で溶出し、偽陰性化する。可溶性蛋白の局在観察にはアルデヒド系固定液がすぐれている。膜蛋白についても、有機溶剤固定による膜溶解によりにじんだような局在性がしばしば観察される。

2）有機溶剤で固定された標本のパラフィン切片

脱水性固定液（アルコールないしアセトン）で固定された組織をパラフィン包埋すると、架橋

性固定液であるアルデヒド系固定液に比べて、抗原性の保持が良好な傾向がある。とくに、冷アセトンを用いる AMeX 法では、新鮮凍結切片と同等の抗原性や核酸構造（DNA, RNA）の保持が期待できる。[5] しかし、脱水固定による組織の収縮は避けられず、HE 染色の形態像保持は十分とはいえない。組織が硬くなるため、切片の薄切が難しいことも少なくない。また、可溶性抗原の流出や局在変化が生じる場合もある。目的によっては、凍結乾燥法や凍結置換法によるパラフィン包埋作製が行われることもある。

3）ホルマリン固定パラフィン切片

病理組織標本の大部分がこの条件で検討される。ギ酸が混入するために酸性を示す 10%～20% ホルマリンの代わりに中性緩衝ホルマリンを用いる場合があるが、HE 染色の染色性は通常の非緩衝ホルマリンがより優れている。この条件では多くの抗原性が失活する。リンパ球表面マーカーやサイトケラチン抗体でホルマリン固定パラフィン包埋切片に応用可能なのは一部のみだった。しかし、最近ではこの条件でも安定した染色結果の得られる抗体が数多く市販されるようになり、パラフィン切片用の抗体を選ぶ時代となっている。

以下に述べるような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。限界さえよく認識すれば、パラフィン包埋されたことが免疫染色をあきらめる理由はない。

4）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内へのしみ込み（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こみ、免疫染色陽性を示す（核は陰性)。代表的で有名な現象が Hodgkin 細胞あるいは Reed-Sternberg 巨細胞における細胞質内免疫グロブリンの局在である（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、さまざまな細胞（肝細胞、非ホジキンリンパ腫など）の細胞質が免疫グロブリン陽性を呈す。この場合は、IgG のみならず、IgA、IgM、κ鎖、λ鎖やアルブミンも陽性となり、しかも細胞質がびまん性に染色される。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）染色されるのが特徴である（図１)。細胞が固定される以前に周囲の血漿蛋白が細胞内にしみ込んだあとに固定されたとみなされる。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。IgG やα1 アンチトリプシン免疫染色の対照にはアルブミンが適している。

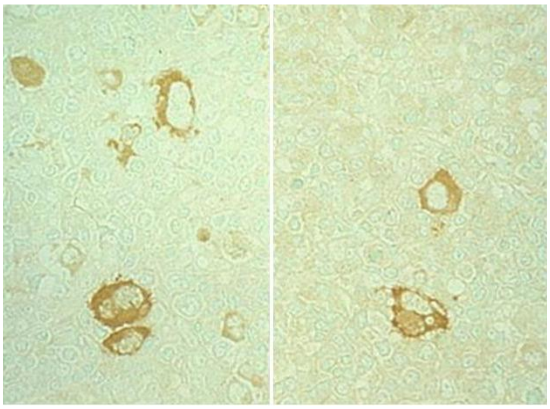

図１． パラフィン切片における血清蛋白の非特異的染み込み：Hodgkin 細胞ならびに Reed-Sternberg 巨細胞における免疫グロブリン反応性（左：kappa 鎖、右：lambda 鎖、間接法メチル緑核染色)．ポリクローナルな L 鎖反応性が巨細胞の細胞質に一致して観察される。人工産物であり、IgG、IgM やアルブミンも陽性を呈する。

②固定ムラによる偽陰性化：

固定ムラの影響が免疫染色の結果に大きく影響することはしばしば経験される。固定不良の部位での偽陰性化のみならず逆に過固定部位における偽陰性化も認められる。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の他、逆に陰性化する場合があり、一定の規則性に乏しい。図２に悪性リンパ腫における LCA と vimentin の paradoxical な固定の影響を提示する。

一本鎖 DNA 抗体は、切断部に生じる一定の長さの一本鎖 DNA を認識し、アポトーシスのマーカーとなるが、ホルマリン固定の影響で DNA の断片化が生じると正常細胞の核にも偽陽性反応を生じてしまう（図３）。[6]

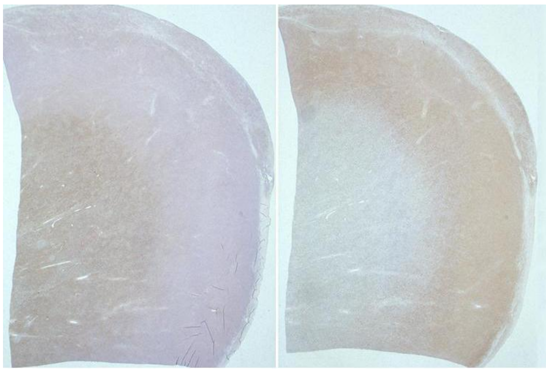

図２．ホルマリン浸漬固定による人工産物（左：LCA、右：vimentin、間接法）．悪性リンパ腫剖検例で、vimentin 免疫反応性（加熱処理後）は固定のよい組織の外側に陽性で、固定不良の内部には陰性である。これに対して、LCA は paradoxical な局在性を呈している。固定液に長く接触した外側は過固定による偽陰性を呈する。

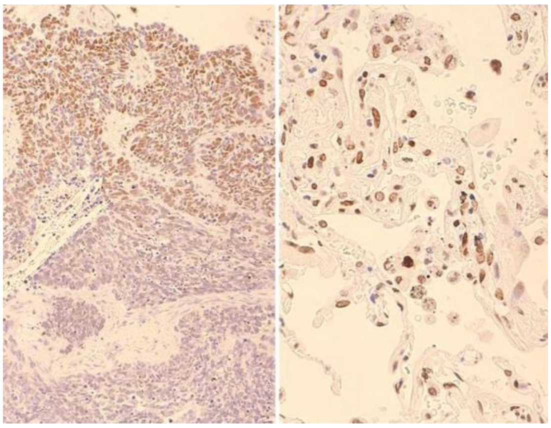

図３．一本鎖 DNA 免疫反応性の核内偽陽性反応（左：肺小細胞癌、右：周囲非腫瘍性肺組織）．一本鎖 DNA 抗体は、アポトーシスに伴う DNA 切断部に生成される一本鎖 DNA stretch に反応して、アポトーシスのよいマーカーとなる。しかし、ホルマリン固定の過程で人工的な DNA 切断が生じると（左では外側の過固定部）特異性は消失する。右の肺組織では、肺胞上皮や血管内皮の核の多くが非特異的に陽性を呈している。

２．脱灰・壊死組織

ギ酸やクロロ酢酸による脱灰操作は HE 染色の染色性を低下させる。同様の現象は、長期間ホルマリンに浸漬された標本にも観察される。これら標本では抗原性低下が予測されるため、免疫染色が敬遠される傾向にある。実際には、たとえヘマトキシリンの染色性が極端に悪い場合でも、抗原性はかなりよく保たれていることがある。第８因子関連抗原では脱灰標本の方が染色性のよい場合すらある。また、凝固壊死に陥った腫瘍組織だからといってマーカー陰性になるとは限らない。リンパ球表面マーカーや中間径フィラメントは、壊死部でもきれいに染色されることはまれでない。これらは、*in vivo* ないし *ex vivo* で抗原性賦活化（蛋白分解酵素処理や酸処理）が行われているためとみなすことができる。ホルモン類、secretory component などの各種分泌蛋白

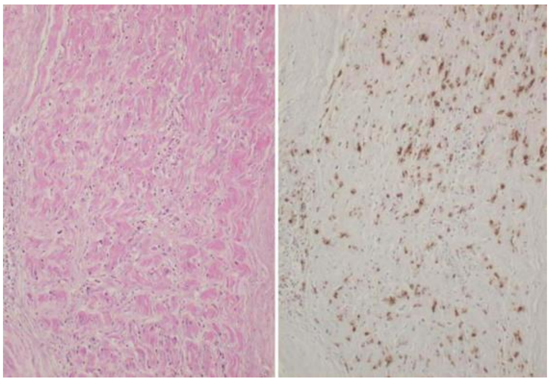

図４．30 年間ホルマリン固定されたらい性末梢神経炎組織における BCG 免疫反応性（左：HE 染色、右：BCG）．BCG 抗原は抗酸菌に共通に発現しており、結核菌やらい菌のマーカーとしてすぐれている。BCG 抗原は長期ホルマリン固定に耐性であり、多数のらい菌を貪食する泡沫状マクロファージの細胞質が陽性を呈する。

も抗原性が脱灰条件によく耐える。

　年余にわたってホルマリン液に浸漬されていた組織でも、美しい免疫染色が得られることは決して少なくない。図４に 30 年以上ホルマリン固定されたパラフィン包埋組織切片（らい性神経炎）における抗酸菌（BCG）抗原の局在を示す。amyloid A 蛋白や血液型物質も証明可能だった。まず、染色に挑戦してみることが大切である。

Ⅱ．染色技法

1．内因性物質

1）内因性ペルオキシダーゼ活性

　パラフィン切片でも残る内因性（偽）ペルオキシダーゼ活性は好酸球、好中球と赤血球が代表的である。しつこいペルオキシダーゼ活性を除去するには、メタノール・過酸化水素の代わりに、0.5%過ヨウ素酸処理を行い、DAB 液に 10 mM アジ化ナトリウムを添加するとよい。ただし、糖鎖が抗原決定基になっている場合、過ヨウ素酸処理は禁忌である。唾液腺、乳腺、腎尿細管などの上皮細胞やマクロファージ・血小板のペルオキシダーゼ活性はパラフィン切片では問題にならない。リンパ球表面マーカー（糖鎖が抗原決定基になっていることが多い）をアルコール固定新鮮凍結切片で観察する場合は、過酸化水素を利用する内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止操作によっても抗原性が失活することがあるため、ブロッキングは行わないか、一次抗体の反応後に行うとよい（図５）。

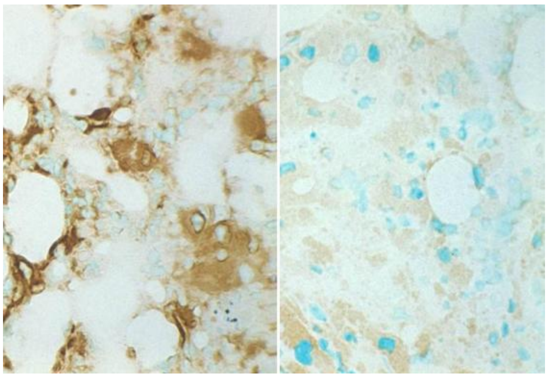

図５．新鮮凍結切片における骨髄巨核球マーカーGPⅡbⅢa 免疫反応性の内因性ペルオキシダーゼ活性阻止による減弱（左：内因性ペルオキシダーゼ活性阻止なし、右：あり、メチル緑核染色）．本態性血小板血症の骨髄新鮮凍結切片における GPⅡbⅢa（β３インテグリン）はメタノール・過酸化水素液への浸漬（常温 20 分）によって抗原性が著しく減弱する。

２）内因性ビオチン活性

新鮮凍結切片では内因性ビオチン活性が残存する。脱炭酸反応の補酵素であるビオチン（ビタミン H）はおもにミトコンドリアに分布し、腎尿細管、肝細胞、筋肉細胞などに多く含有される。新鮮凍結切片や細胞標本に対して LSAB 法や ABC 法を応用する場合は、残存する内因性ビオチン活性に留意したい。アビジン試薬を用いた内因性ビオチンのブロッキング操作が必要となる（アビジンとビオチンの結合はきわめて強固で、いったん結合すればまず解離しない）。通常、内因性ビオチン活性はホルマリン固定で失活する。しかし、子宮内膜細胞、子宮内膜癌や胎児型肺腺癌の一部に観察される opaque nuclei（核内が白く抜けてみえる）では、ホルマリン固定パラフィン切片においても内因性ビオチン活性が核内に残存するので注意を要する。

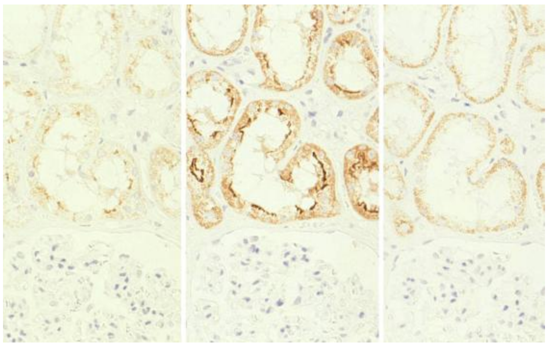

図６．加熱処理による腎近位尿細管における内因性ビオチン活性の賦活化（左：10 mM クエン酸緩衝液（CB）、pH 6、中：CB、pH 7、右：一次抗体なし（CB、pH 6）、villin に対する LSAB 法）. ミトコンドリアに豊富なビオチン活性の賦活化効果は CB（pH 6）より CB（pH 7）に高い。Villin 免疫反応性は刷子縁に観察される（CB、pH 7 に強い）。

さらに、パラフィン切片に加熱処理による抗原性賦活化（下記参照）を行う場合、内因性ビオチン活性が復活することがある。とくに、10 mM クエン酸緩衝液（pH 7）ないし 1 mM EDTA 溶液（pH 8）で加熱する場合はしばしばこの現象が観察される（図６）。[7] したがって、染色にビオチンが関与しない高感度法であるポリマー法（Envision Flex、Simple Stain Max、Novolink など）が最近の免疫染色の主流になっている。

一方、卵白由来のアビジン分子が塩基性に富むことを利用した組織肥満細胞（ヘパリンを含有し、酸性度が高い）の証明法が工夫されている。レンサ球菌由来で中性のストレプトアビジンにはこのような性質はないため、現在、卵白アビジンが染色に用いられることはほとんどない。

３）内因性 protein A 活性

特殊な例だが、黄色ブドウ球菌やレンサ球菌に対する免疫染色を行う際に、パラフィン切片に加熱処理（下記）を加えると、もともとこれら細菌類が保有し、IgG、Fc 部分との結合性を示す protein A や protein G の生理活性が復活してしまう。逆に、このことを利用した菌種の同定が可能である一方、この厄介な反応を避けるためには、加熱処理の代わりに蛋白分解酵素処理が適している。どうしても加熱処理が必要な場合は、正常血清になどによるブロッキングが求められる。[8]

４）内因性色素

内因性色素が diaminobenzidine (DAB)反応の色調に類似し、陽性反応と紛らわしいことがある。メラニン色素は異染性を示すため、核染色にギムザ染色あるいはメチル緑染色を選ぶと DAB 発色の褐色と明瞭に識別される。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ブ

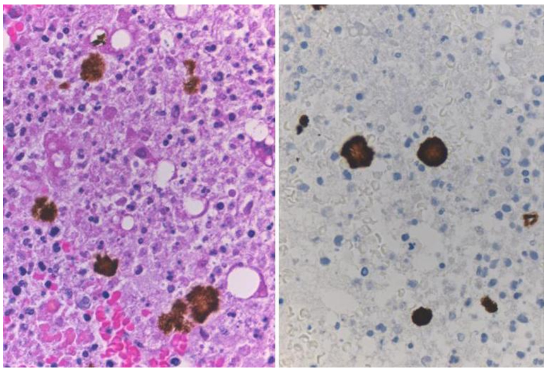

図７．内因性色素（胆汁色素）に対する注意点：アメーバ性肝膿瘍疑い患者から採取された穿刺吸引液の cell block 標本（左：HE 染色、右：抗赤痢アメーバモノクローナル抗体 EHK153 による Simple Stain 法）．凝集したビリルビン色素がアメーバ虫体による陽性所見ときわめて紛らわしい（偽陽性反応であり、HE 染色と見比べる必要がある）。

ルー染色との重染色が有用である。ホルマリン色素がめだつ場合は、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よい。ビリルビン色素が紛らわしい所見を呈する場合もある（図７）。

２．染色技術

１）染色中の切片の乾燥とあわ

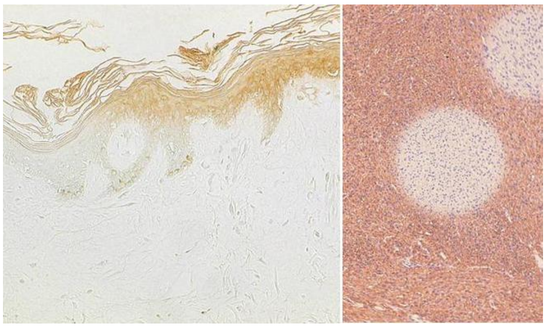

図８．乾燥による抗体の非特異的偽陽性反応と気泡による偽陰性反応（左：皮膚における surfactant apoprotein 染色、右：平滑筋肉腫における α-SMA 染色）．染色中に抗体液が乾燥すると、抗体分子が非特異的に切片上に沈着する（左）。反応液中の気泡が抗原抗体反応を局所的に妨げることもある（右）。

緩衝液のふき取り不十分のために抗体が過度に希釈される、DAB 発色液に過酸化水素を入れ忘れるなど、単純な染色技術的問題については成書を参照されたい。[1] 染色中に切片を乾燥させると、乾燥部位に抗体蛋白が乾燥固定されるため、組織構築を無視した陽性所見がおもに切片の周辺部に観察される。一方、大きな気泡により抗体液がはじかれた部位には、円形の反応陰性部位がもたらされる（図８）。脱パラフィン不良部位にも不定形の非染色領域が観察される。

２）切りおき陽性対照切片における抗原性減弱

免疫染色の陽性対照として、パラフィン切片を切りおいておくことは病理診断の実務上重要である。大多数の抗原に問題ないが、一部の抗原、とくに核内抗原は薄切後時間が経つにつれて抗原性が失活してゆき、加熱処理で賦活化を受けにくくなる。その代表例が MIB-1（Ki-67)、p53

蛋白およびステロイドホルモン受容体である。これら抗原（とくに ER、PgR）に対しては、陽性対照切片もそのつどパラフィンブロックから薄切するようにしたい。それが難しい場合は、薄切切片を-20℃以下に冷凍保存するとよい。[9]

3）パラフィン切片の伸展温度の影響

過酸化物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-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を局在観察する際には、パラフィン切片薄切後に hot plate 上で伸展・乾燥する温度が問題となる。すなわち、伸展温度を 70℃以上にすると抗原性が極端に低下する（図９）。この場合、伸展温度は 50℃までが望ましい。[10] こうした落とし穴は例外的だが、正しい免疫染色には重要なポイントとなる。

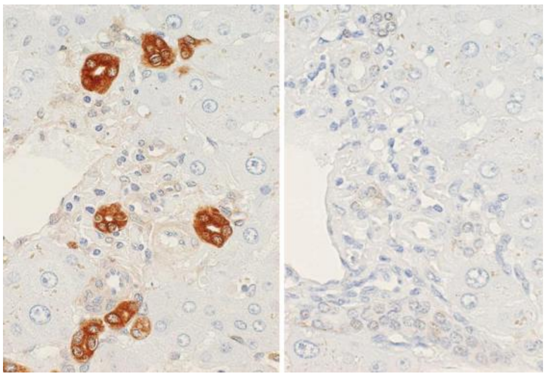

図９．Hot plate 上でのパラフィン切片伸展温度が抗原性に及ぼす影響：正常の肝内胆管上皮における glutathione-S-tranferase π（GSTπ）の局在観察（左：伸展温度 50℃、10 秒、右：伸展温度 70℃、３秒）．正常胆管上皮における GSTπ免疫反応性は、伸展温度を 70 度まで上げると完全に消失する。

4）高感度技法

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（Envision、Simple Stain や Novolink）は、確かに従来の間接法、ABC 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（catalyzed signal amplification）法と次項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思われていた抗原（細胞接着分子、リンパ球表面マーカーなど）が染色可能となる。[11] 確かに、この場合の CSA 法の有用性は高いが、逆に通常法で染色可能である抗体が入手可能であるなら、そちらを用いた方が結果はずっと安定している。事実、パラフィン切片用抗体のバラエティーは年々増加している。高感度法は背景染色も増感することを忘れてはならない。一方、CSAⅡ法（ビオチン化タイラマイドの代わりに、ビオチン化 FITC 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。[12]

最近、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し、セツキシマブによる治療効果を予見するための染色キット pharmDx™ が DAKO 社から市販されている。しかし、腺癌細胞がごく一部でも陽性になればセツキシマブ治療の適応となるという判定基準に対して、数多くの疑問や不信感が投げかけられている。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 CSAⅡを用いると、陽性率・陽性細胞数ともに激増することが判明した（図 10）。この結果は、他のモノクローナル抗体を用いる EGFR 免疫染色とほぼ一致した。[13] 保険収載された染色キットの大きな問題点と言えよう。

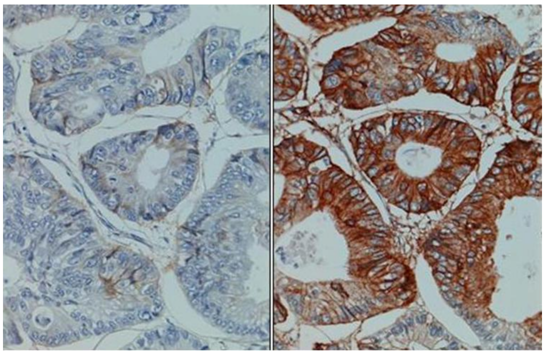

図 10. 高感度法による免疫反応性の著しい増強：大腸腺癌における EGFR 免疫反応性（左：PharmDx キットによる染色、右：二次抗体を CSA II に置換した場合）. EGFR が発現する大腸癌はセツキシマブによる分子標的治療の対象となる。この市販キットの染色感度は明らかに低く、偽陰性反応がまれでない（陽性細胞数・陽性率がともに低い）。

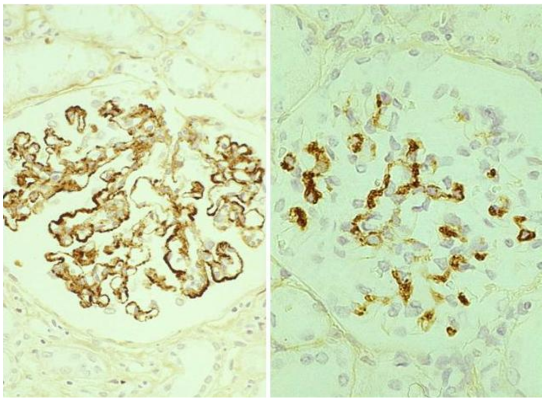

図 11. 蛋白分解酵素処理による抗原性賦活化：ホルマリン固定パラフィン包埋された膜性腎症における IgM（左）および IgA 腎症における IgA の局在（右）. プロテアーゼ前処理（30 分）により、新鮮凍結切片と同等の免疫グロブリン沈着（それぞれ糸球体係蹄壁における IgM とメサンギウム領域に一致した IgA）が生検組織（パラフィン切片）に可視化される。

５）抗原性賦活化

抗原性賦活化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操作をさす。方法論的には次の３種に分類される。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が必須事項である。

①蛋白分解酵素（トリプシン、プロナーゼ、ペプシンなど）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のに必須の方法である（図 11）。その他、type 4 collagen、ラミニンやケラチン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・失活する場合もある（ペプチドホルモン、B リンパ球における細胞表面 IgD など）。

加熱処理では、脱パラフィン切片を 10 mM クエン酸緩衝液（pH 6）、1 mM EDTA (pH 8)あるいは 0.1 M ホウ酸（pH 7）に浸漬して 60℃ないし 121℃で加熱する。加熱方法は、孵卵器（60℃一晩）、水槽（90℃）、マイクロウェーブ（100℃）、オートクレーブ（121℃）、圧力鍋（120℃前後）、蒸し器などさまざまである。核内抗原（MIB-1, p53 蛋白、エストロゲン受容体）のほか、膜蛋白（細胞表面マーカー、EMA、bcl-2）、細胞骨格蛋白（ケラチン）、分泌蛋白（PTH）の抗原性が賦活化される。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少なくない。[14] なお、細胞標本でもエストロゲン受容体（ER）などの核内蛋白に対しては加熱処理が抗原性賦活化に働く点は注目に値する。この場合、核染色にはヘマトキシリンが向いている。二本鎖 DNA 親和性の高いメチル緑は加熱切片（DNA が一本鎖化している）の核を染色しづらい。加熱処理によって、抗原性が減弱・失活する場合もある。

MIB-1 (Ki-67)は、加熱後の切片の取扱い方によってその局在性が大きく変化してしまうので注意を要する（図 12）。加熱後の切片を急速に冷やすと、ゆっくりと常温に戻した場合に比べて染

色性が悪いことがある。標識二次抗体に高分子ポリマー（Envision）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場合がある。[15] そのため、最近では分子量が小さめのポリマー試薬（DAKO 社では、Envision Plus、EnVision Flex など）が主流となってきている。

③その他の賦活化法として、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 N 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。

6）抗体の失活

「抗体は生きている」、「抗体いのち」が免疫染色の鉄則である。生きた形での抗体の保存・管理は免疫染色の第一歩であるし、もっとも重要視すべきポイントである。蛋白質は低濃度溶液では失活しやすいので、1%ウシアルブミン加 PBS で抗体を希釈するとよい。原則として、抗体はある一定濃度以上で保存すべきである。一般に冷蔵よりは冷凍保存が望ましいが、凍結保存、とくに繰り返す凍結融解に弱いモノクローナル抗体（とくに IgM 型）があることには注意すべきである。うまく管理すれば、抗体は半永久的に使用できるものである。

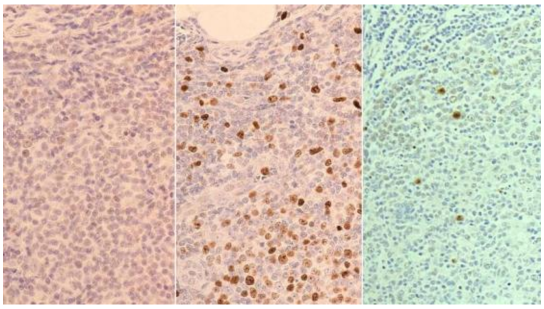

図 12. MIB-1 染色の落とし穴（左：加熱処理後に切片を急冷、中：加熱処理後に常温放置、右:EnVision 法を用いた場合の核分裂像染色、左・中は悪性リンパ腫、右は正常扁桃）．加熱処理後に切片を急冷すると MIB-1 が偽陰性を呈することがある。また、EnVision を二次抗体に使用すると、核分裂像のみが染色される場合がある。

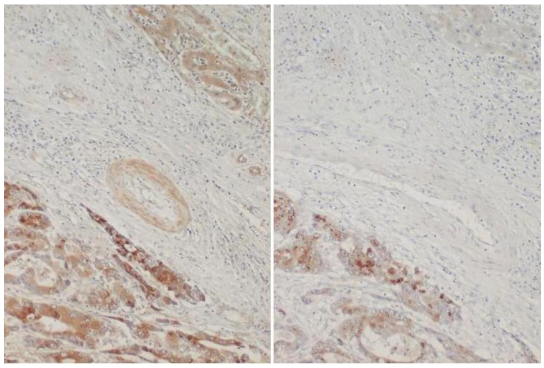

図 13. 適切な抗体濃度決定の重要性（肝細胞癌に対する AFP 染色、左：家兎血清 400 倍希釈、右：家兎血清 3,200 倍希釈、Simple Stain 法）．抗体濃度が高い（希釈率が低い）と、血管壁（中央）や胆管上皮（上部）が非特異的に染色されてしまう。適正希釈では、肝癌細胞の細胞質のみが顆粒状の陽性所見を呈する。

7）背景染色 signal/noise ratio

signal/noise ratio とは、特異染色と背景染色の比であり、この差が際だった染色が望ましい。特異染色の染色強度（感度）を上げ、背景染色をなくす技術が理想的である。抗原性賦活化法とモノクローナル抗体の開発が免疫染色のアートとしての側面に大いに貢献している。背景染色が高い（signal/noise ratio が低い）染色になる場合は、以下の３つの可能性が考えられる。抗体（一次抗体あるいは二次抗体以降）が濃い、抗体力価が低い（とくに抗血清の場合）、PBS による洗浄が足りない。抗体の適正希釈をあらかじめ決めておくことは免疫染色の前提条件である（図 13）。

抗血清の代わりにモノクローナル抗体を使うと美しい染色所見が得られる場合が多いが、必ずしもモノクローナル抗体が最良とは限らない。至適希釈濃度からさらに数倍程度希釈して一晩反応させる、PBS による洗浄を一晩行う、PBS に高濃度（1 N）の食塩を添加する、Tween 20 などの界面活性剤を添加する、抗体溶液に skim milk やアルブミンを添加するといった技術的工夫を試してみたい。

３．染色結果の判定

1）偽陽性と擬陽性

染色結果が弱陽性にみえる場合、これを偽陽性とみなすか擬陽性とみなすか、が判断の分かれ道となる。胎盤型アルカリホスファターゼを弱陽性と判断したために胚細胞性腫瘍と誤認された肺小細胞癌例は痛恨の症例として印象に残る。場合によっては、上述した抗原性賦活化法や免疫染色の増感法の併用が必要となる。

ホルマリン固定・パラフィン包埋の過程で抗原性が不活化されて偽陰性の結果となる可能性は常に念頭に入れておくべきである。ホルマリン固定に比較的弱い抗原としては、ケラチン、ニューロフィラメント、第８因子関連抗原が代表的である。ニューロフィラメントに対する市販モノクローナル抗体を用いて神経芽細胞腫や褐色細胞腫のパラフィン切片に陽性所見を得ることはなかなか難しい。パラフィン切片用のリンパ球表面マーカーが陰性ないしムラ染まりとなるリンパ節や扁桃の標本は決してまれではない。ルーチンの固定条件下で、どの程度の再現性をもった免疫染色が可能であるのか、用いる抗体それぞれの特徴をあらかじめよく知っておくべきである。MIB-1 の免疫染色に際して留意すべきは、上に述べた加熱処理方法（とくに切片の冷やし方）に基づく偽陰性化である。

2）染色の特異性判定

① 正しい細胞内抗原局在：

免疫染色の特異性検定に関しては、細胞内局在性の詳細な観察が有用である。AFP、HCG などの分泌蛋白は小胞状に、ペプチドホルモンは細顆粒状に、S-100 蛋白や NSE などの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）。膜蛋白は細胞膜に沿った陽性所見となる。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、偽陽性を見抜きやすい。プロゲステロン受容体（PgR）や MIB-1 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、容易に非特異反応と判断される（図 14）。[15] 逆に、細胞膜に対する MIB-1 の非特異的陽性反応を甲状腺硝子化索状腺腫（甲状腺乳頭癌と紛らわしい核内封入体を示す）の病理診断マーカーに利用することも報告されている。[16]

② 抗体の特異性：

ルーチンの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くべきである。メーカーから提供される情報は有用だが、決して盲信してはならない。家兎抗血清には、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、たとえば抗ミオグロビン抗体で表皮細胞や血管内皮細胞が染色される事態が生じる。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思わぬ交差反応を認めることがある。

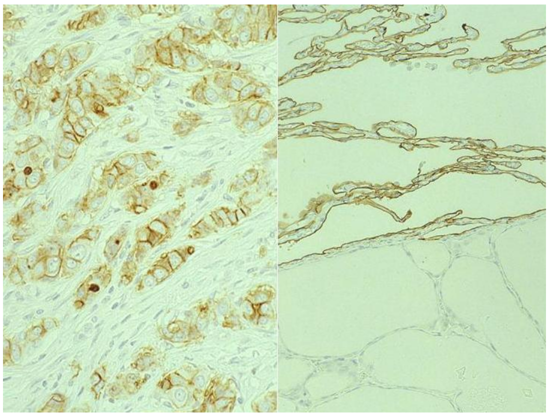

図 14. 核内抗原の細胞膜への非特異的陽性反応（左：浸潤性乳癌における PgR 免疫反応性、右：肺胞上皮における MIB-1 免疫反応性）．左図の乳癌細胞の核は PgR 陰性だが、細胞膜がびまん性陽性を呈している。正常肺胞上皮の細胞膜は MIB-1 陽性となる。右図下半分にみられる甲状腺濾胞癌転移巣には陽性所見はほとんどみられない。

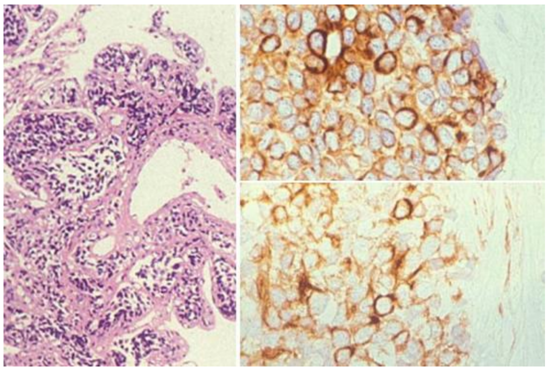

図 15. vimentin 陽性を呈した末梢肺の多発性小細胞性腫瘍（左：HE 染色、右上：cytokeratin、右下：vimentin）．若年男性、非喫煙者にみられた悪性小細胞性腫瘍であり、cytokeratin、EMA、CD56、synaptophysin 陽性から肺小細胞癌が疑われたが、vimentin 陽性像がヒントとなり、後腹膜原発の desmoplastic small round cell tumor と最終診断された。

③ 抗体分子の特定細胞による非特異的吸着：

組織肥胖細胞、内分泌細胞（G 細胞）、プルキニエ細胞、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。

３）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。しかし、喜び勇んで免疫組織化学的な解釈を与える前に、上述した染色やマーカーの特異性を再吟味する過程が求められる。つまり、ケラチン陽性の悪性リンパ腫や悪性黒色腫の可能性が否定できるかと考えるかどうか、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否かが誤った診断を避けるキーポイントとなる。図 15 には、若年者の小細胞性肺腫瘍で、神経内分泌マーカーに加えて、vimentin が陽性を呈した症例を示す。通常、肺小細胞癌は vimentin 陰性である。この所見から、後腹膜由来の desmoplastic small round cell tumor（神経内分泌分化を含む多様な分化を示す軟部腫瘍で、悪性小円形細胞腫瘍の一種）の転移が判明した。こうした各論的知識に基づいた経験を踏まえて初めて、免疫染色の真の醍醐味を味わうことができる。[4)]

臨床診断と病理診断が大きく乖離したときもまた要注意である。この場合、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まず否定したい。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いうまでもない。必要に応じて、血液型物質に対する免疫染色を加えるとよい。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ているので、パラフィン切片上での血液型鑑定が可能である。この方法で検体の取り違いが証明され、無用な手術を避け得た貴重な体験がある。２例の前立腺生検組織が外来手術室で混在して

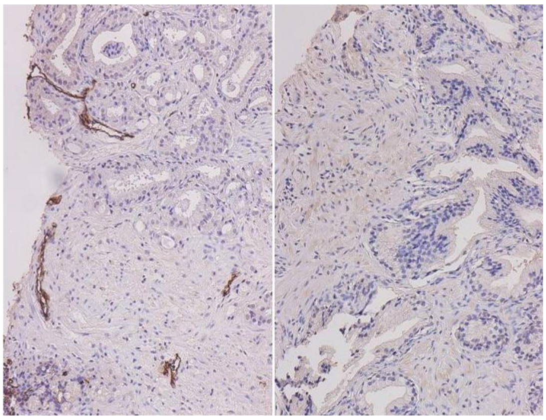

図 16. 血液型物質による前立腺癌組織の個人識別：Ａ型血液型物質に対する免疫染色（左：担癌例、血液型Ａ型、右：非癌例、Ｏ型）．提出時に誤って２例の前立腺針生検組織が混在してしまった、担癌症例の血管内皮細胞にＡ型物質が発現しているが、非癌症例ではＡ型物質陰性だった。癌は血液型Ａ型の個体に存在することが決定された。

しまい、浸潤癌が一部の切片にのみ観察された事例において、血液型判定が患者の特定に有効だった経験もある（図 16）。

おわりに

免疫染色は美しく特異性の高い染色が当然である時代である。技師諸氏は技術のプロとしてマーカー選択の妥当性や結果の判定にまで踏み込んだ検討をしてほしいし、病理医をはじめとする医師は「染色技術は技術のプロにお任せ」状態からの脱却をめざしてほしい。病理診断における免疫染色の応用に関しては、染色対象とするマーカーをいかに選ぶか、いかに染めるか、そして結果をいかに判断するかの３者がそろって初めて有効な免疫染色となることを肝に銘じてほしい。つまり、技師と医師の連係プレイが必須条件である。

文献

1) 堤寛．パラフィン切片による光顕的酵素抗体法染色；市販抗体および抗原に関する一般的注意点；病理診断への応用．*改訂三版酵素抗体法*（渡辺慶一、中根一穂編）、学際企画、東京、pp.99-149, 277-331, 338-425, 1992.

2) 堤寛、鴨志田伸吾. 病理医に必要なワンポイント病理技術(10)：免疫染色のコツ. 病理と臨床 **23**: 83-88, 2005.

3) 堤寛、鴨志田伸吾. 病理医に必要なワンポイント病理技術(11)：抗原性賦活化法. 病理と臨床 **23**: 189-198, 2005.

4) 堤寛．病理医に必要なワンポイント病理技術(12)：免疫染色結果の判定．病理と臨床 **23**:

309-316, 2005.

5) Sato Y, Mukai K, Watanabe S, et al. The AMeX method. A simplified technique of tissue processing and paraffin embedding with improved preservation of antigens for immunostaining. Am. J. Pathol. **125**: 431-435, 1986.

6) 堤寛、塩竃和也、鴨志田伸吾．病理医に必要なワンポイント病理技術(13)：アポトーシスの組織化学．病理と臨床 **23**: 403-416, 2005.

7) Kamoshida S, Matsuoka H, Matsuyama A, *et al.* Reproducible and reliable immunohistochemical demonstration of thymidylate synthase in formalin-fixed, paraffin-embedded sections: Application of antigen retrieval in EDTA solution. Acta Histochem. Cytochem. **36**: 115-118, 2003.

8) Shimomura R, Tsutsumi Y. Histochemical identification of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Contribution to preventing nosocomial infection. Seminars Diagn. Pathol. **24**：217-226, 2007.

9) Wester K, Wahlung E, Sundstroem C, *et al*. Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effect of time, temperature, fixation, and retrieval protochol with emphasis on p53 protein and MIB1 antigen. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. **8**: 61-70, 2000.

10) Kamoshida S, Sakamoto N, Matsuoka H, et al. Heat-assisted stretching of paraffin section on hot plate weakens immunoreactivity of orotate phosphoribosyltransferase. Acta Histochem. **38**: 69-74, 2005.

11) 谷洋一．DNA ターゲット増幅法（PCR 法）とシグナル増幅法（CSA 法）の *in situ* hybridization (ISH) 法への応用．*組織細胞化学 1997*（日本組織細胞化学会編）、学際企画、東京、pp. 174-178, 1997.

12) 塩竃和也、宮瀬薫、鴨志田伸吾、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: 1213-1217, 2010.

13) 塩竃和也、水谷泰嘉、稲田健一、他．大腸癌における高感度 EGFR 免疫染色の確立：EGFR pharmDx kit と比較した免疫組織化学的研究．日本病理学会会誌 **100**: 480, 2011（抄録）.

14) Shi S-R, Gu J, Kalra KL, *et al.* Antigen retrieval technique. A novel approach to immunohistochemistry on routinely processed tissue sections. Cell Vision **2**: 2-17, 1995.

15) 川井健司、堤寛．MIB-1 染色の落とし穴．病理技術 **59**: 20-21, 1999.

16) Hirokawa M, Carney JA. Cell membrane and cytoplasmic staining for MIB-1 in hyalinizing trabecular adenoma of the thyroid gland. Am. J. Surg. Pathol. **24**: 575-578, 2000.