

パラフィン切片を用いた免疫組織染色の結果の解釈

東京医科大学病理診断学

向井 清

免疫組織化学、特に酵素抗体法は病理診断や形態学的研究に広く用いられている。免疫組織化学は生体内の物質（抗原）の存在と分布を生物試薬（抗体、酵素）を用いて高感度に、かつ特異性高く検出する方法である（表1）。その特徴として1）手技的に易しい、2）応用範囲が広い（生化学的情報→形態情報）、3）生物学的、病理学的に重要な情報を提供する、4）生物学的試薬を用いるので通常の方法とは異なった注意がいる、などがあげられる。免疫組織化学染色は新鮮凍結切片から細胞診検体、固定組織のパラフィン切片まで検体の種類をあまり選ばないという長所もある。

酵素抗体法による免疫染色は通常病理診断に用いられるホルマリン固定パラフィン包埋組織が使えるために、その応用範囲は非常に広い。しかし、ホルマリン固定組織であるために起こりうるアーチファクトなどに十分な注意を払わないと染色に失敗したり、あるいは染色結果の解釈を誤ることがある（表2）。

結果の解釈には二面性がある。まず一般的な DAB で発色したときに茶色に染色されている部分が本当に陽性であるのか。ホルマリン固定組織を用いた場合には多くのアーチファクトにより、偽陽性や偽陰性が生じうる。従って染色自体が陽性であるのかどうかをきちんと検定する必要がある。次に陽性である場合あるいは陰性である場合、それが生物学的にどういう意義があるのかを明らかにする必要がある。

表1 酵素抗体法で染色可能な抗原

・細胞の産生/分泌物	・増殖細胞抗原
・細胞特異抗原（分化マーカー）	・癌遺伝子産物
・ホルモン/ホルモンレセプター	・病原微生物
・細胞間基質	・免疫複合体など

表2 パラフィン切片を用いる際の留意事項

・固定/包埋による抗原の変化	・検出法の感度
・抗体の浸透と反応性	・結果の解釈

A. 染色の感度、特異性など

まず、ホルマリン固定組織について回る諸問題について解説する。

I. 固定の影響とそれに対する対策

組織の固定は自己融解を止め、組織や細胞の形態を保持するとともに、抗原が細胞内や組織内で移動することを防ぐために行われる（表3）。通常組織学的検索に用いられるホルマリン固定は形態の保持には優れているが、抗原性の保持という点からは理想的な固定液とはいえない。そこでホルマリン以外にもアルコールなどが固定液として用いられているが、形態保持に優れ、すべての抗原の抗原性を保存できるような固定法はまだない。ホルマリン固定組織では染色が不可能あるいは困難な抗原があり、常に偽陰性という可能性が回る。固定の影響について十分な理解がないと結果の解釈を正しくできないことも起こりうる。

固定の影響を克服するにはいくつかの方法が考えられる。まず、ホルマリン固定の影響を受けないエピトープを認識する抗体を用いるということが考えられる。現在は実に多くのモノクローナル抗体が入手可能となり、一つの抗原を認識する抗体でも、認識するエピトープは異なっているものが多く作製されている。その中で固定の影響を受けにくいエピトープを認識する抗体を選択することにより、偽陰性を減らすことが可能となる。

2番目の対応としてホルマリン固定により抗体との反応性が減弱した抗原の反応性を賦活化するという方法がある（表4）。この方法のはしりは1970年代に導入された消化酵素を用いた切片の消化による方法（Protease-induced epitope retrieval, PIER）である。トリプシン、ペプシンなどによる切片の消化が免疫染色の前に行われた。この方法は有効な場合もあるが、酵素の力価



がロットにより異なり切片自体が消化されてガラスからはがれたり、あるいは染色結果が安定しないなどの問題があった。

1990年代に導入されたマイクロウェーブ照射による高熱を用いた抗原賦活化法は、簡便な方法で組織切片における抗原の反応性を非常に高める有効方法であった(図1)。マイクロウェーブ照射による抗原賦活化の作用機序についてはいろいろと推測されているが、高温によって高分子量の分子(抗原)が加水分解されてエピトープが抗体と結合可能になるといわれている。従って熱源としてはマイクロウェーブに限らず、煮沸やオートクレーブによる加熱も用いられている(表5)。高熱を用いているので最近では Heat-induced epitope retrieval (HIER) という呼び方が行われている。HIER の効率はそれまでの PIER に比べると格段に高く、HIER 導入以前の結果と以後の結果を比較することは無意味に近いとさえいわれている。HIER に用いる熱源と加熱温度/加熱時間、加熱時に切片を入れる緩衝液とその pH などには複数の選択肢があるが、はじめに目的の抗原が存在する組織の切片でいろいろと条件を変えて予備実験を行い、最適な方法を選ぶ必要がある。

パラフィン切片を用いた免疫組織化学染色一般にいえることであるが、試薬メーカーのマニュアルあるいは文献に記載してある条件が、自分のラボの切片にとって最適であるという保証はないので、このような条件設定が必要となる。また、抗原によっては高温にさらすことでかえって染色性が減弱するものもある(図2)。もう一つ大事な点として加熱後に切片を自然冷却するが、これに十分時間をかけず高温のままの切片を室温の緩衝液に移すと、抗原賦活化の効果が消失してしまうことがある。

3番目の可能性としては、免疫染色の感度をあげて通常の方法では可視化できない抗原を検出する方法である(表6)。一番簡単なのは発色時に DAB に銅などの重金属を加える方法であるが、それほど感度の上昇は期待できない。ABC法・LSAB法でビオチン化2次抗体とABCあるいは酵素標識アビジンを繰り返して切片と反応させることによって感度をあげるという方法も試みられたが、反応回数が増えるごとに背景の非特異染色も増強する傾向がある。さらに酵素標識デキストランポリマーを用いる EPOS (enhanced polymer one-step staining) 法や、ビオチン化タイラマイドとABC法を組み合わせた CSA (catalyzed signal amplification) 法が利用できるようになって、染色の感度は飛躍的に向上した。従来の方法では検出感度以下で陰性と考えられていた組織や細胞にも陽性像が得られるようになり、これまでのデータとの比較が難しくなる場合もある。ABC法などの従来の方法を用いると、ホルマリン固定組織では腫瘍組織は陽性で、正常/非腫瘍組織は陰性となる抗原がいくつかあり、それを用いて腫瘍と非腫瘍の鑑別を行うことが可能であった。しかし、高感度法を用いると非腫瘍組織内の微量の抗原も検出するため、このような応用はできなくなってしまう場合もある。また、高感度法を用いる場合は1次抗体を非常に高倍率に希釈するので、その保存や管理が難しくなり、また高感度ゆえに背景染色も増強するといった問題も含んでいる。

表3 固定についての一般事項

<ul style="list-style-type: none"> 固定の目的と作用機序 組織の自己融解を止め形態を保持する 抗原物質の変性崩壊を防ぎ拡散移動を阻止する 低毒性、安定性、経済性 架橋 — ホルマリン 蛋白凝固 — 有機溶剤
<ul style="list-style-type: none"> 固定液の例 10% ホルマリン (4% ホルムアルデヒド) : 非緩衝, 中性緩衝, 亜鉛加 有機溶剤 : アルコール, アセトン (Filament 蛋白) 抗原保存に優れた固定液 : Bouin's, Zamboni's, PLP, AMeX
<ul style="list-style-type: none"> すべての抗原の保存に優れた万能固定法はない

表4 抗原賦活化

<ul style="list-style-type: none"> 消化酵素 (PIER) <ul style="list-style-type: none"> トリプシン ペプシン プロナーゼ 	<ul style="list-style-type: none"> High heat (HIER) <ul style="list-style-type: none"> マイクロウェーブ照射 オートクレーブ 圧力鍋
---	--

PIER と HIER を組み合わせる必要がある抗原もある (順番も大事)
 賦活化しないでもよく染まる抗原には逆効果もありうる

表5 高熱を用いた抗原賦活化 (HIER)

・熱源：マイクロウェーブ照射、圧力鍋、オートクレーブなど
・マイクロウェーブの機種：家庭用で十分だがセンサーがある方が便利
・加熱時間：抗原の状態により設定する
・温度：高い方 (120 度) がよいとされているが、高温で失活する場合は低温でも試してみる
・賦活液：クエン酸緩衝液 pH6.0, EDTA 溶液など
・pH：標準的 pH (クエン酸緩衝液 pH6) からはずれた方がよい結果の出る抗原もある
・注意事項：ガラスのバットは高温で割れるので使わない。よく冷やしてから次のステップへ
・False positive, antigen diffusion の可能性
・免疫染色以外の応用：in situ hybridization, TUNEL, FISH, DNA/RNA 抽出

表6 感度増強法

<ul style="list-style-type: none"> Color enhancement <ul style="list-style-type: none"> Cobalt Dark blue Copper Bluish Gray Nickel Purple Silver Black 	<ul style="list-style-type: none"> Multiple layers (biotinylated-anti-avidin, ABC) EPOS CSA
--	--

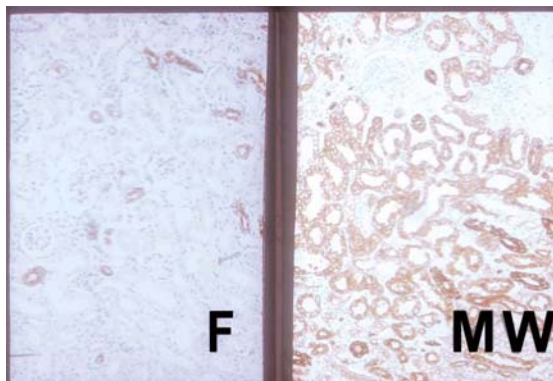


図1：マイクロウェーブ加熱による抗原不活化
 左 (F) はホルマリン固定組織を前処置なしに cytokeratin 7/8 を染めた切片。右 (MW) は脱パラ後マイクロウェーブにより加熱した切片。陽性細胞数が未処理切片よりも大幅に増加している。

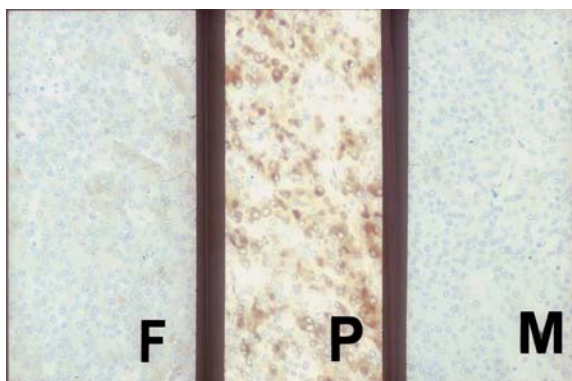


図2：膵臓におけるトリプシンの染色
 左 (F) はホルマリン固定組織を前処置なしに抗トリプシン抗体を用いて染色した切片。中 (P) は染色前にペプシン処理した切片。右 (M) は染色前にマイクロウェーブにて加熱した切片。未処理切片では膵の腺房細胞がごく薄く染色されている。ペプシン処理により陽性細胞の染色強度が増強している。マイクロウェーブ処理では染色性が消失している。

II. ホルモン固定を用いた免疫染色による定量化は慎重に

パラフィン切片を用いた免疫染色の結果は基本的には定性的であり、定量的ではない。固定の条件、抗原賦活化の効率、発色時間などが切片ごとに異なるので、切片ごとの結果を比較することは厳密な意味では難しい。陽性細胞が全体の 1/3 以下というような半定量的評価は可能であるが、陽性率を%で表して比較することは不適當な場合が多い。また、固定条件が一定しない場合は、染色強度の比較で抗原量の推定をすることも難しい。1次抗体の希釈倍率を倍々希釈で何段階か設定して、どの希釈倍率まで陽性像が得られるかで比較することは可能であるが、1種類の希釈倍率で染色して染色強度を標本間で比較することは避けるべきである。最近組織マイクロアレイが導入されるようになって、研究的目的では多くの標本を同時に染色し、評価できるようになったため切片ごとの染色条件による差は無視できるようになった。

III. 染色の特異性の検定

免疫染色が陽性と思われる場合は、その染色が目的の抗原を検出していることを検定するために、染色が非特異的でないことを証明するいくつかのコントロールを用いる必要がある (図3)

(表7)。また、内因性の酵素活性などは、その阻害を行ってから免疫染色を行えば判定は容易になる。ルーチン染色では1次抗体を正常血清あるいは正常免疫グロブリンに置き換えた陰性コントロールを用いて非特異反応の有無を確認している。特異抗体を用いた染色と正常血清/免疫グロブリンを用いた染色が同様の染色態度を示す場合には「陽性」は非特異染色によるものであり、その抗原が問題の組織に存在するとはいえない (図4)。このような場合に陰性コントロールを用いないと特異的染色であると誤った判定をしてしまう。厳密に染色の特異性を検定するためには多種類のコントロールを用いる必要がある (表7)。

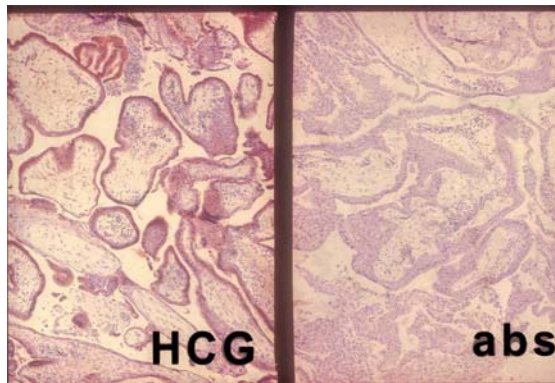


図3：胎盤における HCG の染色

右 (abs) は抗原 (HCG) で吸収した抗 HCG 抗体で染色した切片。染色性が消失し、この抗体が HCG と反応しており、左の陽性像が特異的であることを示している。

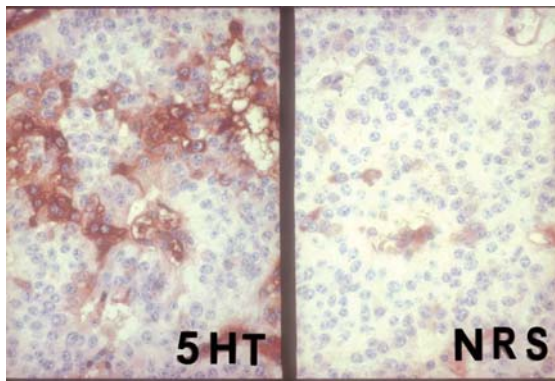


図4：カルチノイド腫瘍におけるセロトニン (5HT) の染色

左は特異抗体を用いた切片。右は正常血清を1次抗体として用いた切片。左のみを見るとこの染色が陽性であると判断するが、右の陰性コントロールにおいても左ほどではないが陽性像が得られており、この染色の特異性が保証できない。陽性となることが期待されているような免疫染色の場合には、特に注意が必要である。

表7 コントロールの種類

使用試薬・組織	以後のステップ	被検定対象
1. 抗体希釈液	二次抗体/ABC	二次抗体以降
2. 正常血清	二次抗体/ABC	一次抗体以降
3. 無関係抗体	二次抗体/ABC	一次抗体以降
4. 免疫前血清	二次抗体/ABC	一次抗体以降
5. 吸収抗体	二次抗体/ABC	抗体特異性
6. ブロッキング抗体	通常染色	抗体特異性
7. 酵素基質	基質のみ	内因性酵素
8. 陰性組織	通常染色	生物学的
9. 陽性組織	通常染色	生物学的

B. 免疫染色に用いられる抗原と抗体について

まず正しい解釈をするために必要な抗原とそれを検出するために用いられる抗体について解説する。これらに対しては実に多くの誤った認識や表現が見られる。自ら用いる方法を正しく記載することは、科学者として最低限のことではないであろうか。

I. 抗原の特異性

多くの抗原が組織特異マーカー、あるいは細胞の増殖能や予後を反映するマーカーとして用いられている（表8）。これらの抗原を組織特異抗原あるいは分化抗原として用いる場合は、その特性を十分に理解しておく必要がある。そうでないと結果の解釈を誤ることが起こる。

腫瘍の起源を知るためによく用いられるケラチンは上皮細胞の、ビメンチンは間葉系細胞の特異マーカーとして当初報告されたが、その後の検討で間葉系細胞由来の肉腫の一部にもケラチンの発現が見られ、また上皮性の癌でも分化が低くなるとビメンチンが発現することがあることが明らかとなって、当初信じられていたほどの特異性はないことが示されてきた（表9）。一方、横紋筋のマーカーであるミオグロビンは横紋筋以外の細胞での発現はなく、非常に特異性の高いマーカーである。例外として横紋筋が壊死に陥るような状況では死んで崩壊した筋肉細胞をマクロファージが貪食し、そのようなマクロファージが陽性となることはあるが、それは発現ではない。このような例外を除けば、ミオグロビンが腫瘍細胞に陽性の場合、細胞起源を決める有力な情報を提供する。一般に特異性の高いマーカーは分化のよい腫瘍での発現頻度は高いが、低分化となるとごく一部にしか陽性とならない傾向がある。

これまでの経験からいうと「ある組織や細胞に 100%特異的」といわれるようなマーカーを診断に応用する際は、慎重に特異性を検定する必要がある。当初は期待が大きい、数年すると初めにいわれたほど特異性は高くならないことが明らかになることがほとんどである。

マーカーの特異性について使用者側の問題を一つ指摘する。CD34 は血液幹細胞を認識する抗体と当初は考えられていたが、血管内皮細胞やある種の間葉系細胞とも反応することが示されている。さらに Solitary fibrous tumor や gastrointestinal stromal tumor (GIST) などの間葉系腫瘍でも陽性となることが判明した。初心者が陥りやすい誤解として、ある腫瘍が CD34 陽性であると血管内皮細胞のマーカーであるということしか考えなくて、その腫瘍が血管内皮への分化を示していると考えてしまうことである。そのような考察をした原稿が雑誌に投稿されたこともある。単一の種類の細胞だけに発現しているマーカーであればその特異性は高いが、CD34 のように多種類の細胞に発現するマーカーは、それが何々細胞特異的マーカーとラベルに書かれて売られていても、その特異性については慎重に見極める必要がある。また、未分化な腫瘍で分化の方向が明らかでない腫瘍の検討をする場合は、複数のマーカー（陽性と陰性、いずれも大事である）を用いて慎重に検討すべきで、一つのマーカーにだけ頼ることは危険である。

表 8 抗原の特性

・組織・細胞に存在し、それらの種類/分化の方向/機能状態などを示す
・マーカーとしての特異性の認識
・固定・包埋による抗原性の低下
・抗原賦活化 (Epitope/antigen retrieval) による抗体との反応性の回復

表 9 抗原の特異性の問題例

<ul style="list-style-type: none"> ・中間径フィラメント Keratin (上皮細胞) 筋肉、肉腫の一部、 Vimentin (非上皮細胞) 低分化癌 Desmin (筋肉細胞) 中皮腫
<ul style="list-style-type: none"> ・Keratin サブタイプにより分布が異なる 高分子：扁平上皮 低分子：腺上皮 平滑筋肉腫など肉腫の一部も陽性となる
<ul style="list-style-type: none"> ・EMA (上皮膜抗原) 形質細胞, 髄膜腫
<ul style="list-style-type: none"> ・ある組織/細胞に 100%特異的といわれるマーカーは疑わしい

II. 抗体の特異性

つぎに抗体の特異性の問題に触れる。抗体の特異性の検定は多くの正常および病的組織を含む多臓器ブロックを用いて、検出されている抗原の組織分布を見てその抗原が存在することが知られている組織や細胞に陽性となっているか、その抗原が存在しないとされている組織に陽性像が見られないかなどで検討するのが病理医にとっては一番やさしい(図5)(表10)。RIAやWestern blotなどの免疫学的方法では検定に用いた抗原との反応性は証明できるが、検討していない抗原との反応性は不明である。

市販されている抗体を用いる場合は必ずデータシートを参照するが、データシートでは交叉反応についての記載は不十分なことが多く、多臓器ブロックを使って陽性細胞の種類や分布から非特異反応や交叉反応の有無を検討することが必要となる。繰り返しになるが、抗体の容器にはあってあるラベルに「抗 x x 抗体」と書いてあるからといって、その抗原とのみ反応すると信じてはいけない。

一方、同じ抗原に対する抗体でもその認識するエピトープは異なり、そのエピトープが固定の影響をどのくらい受けるかなどによって、同じ抗原を染色しているはずなのに、陽性細胞の数や分布が異なることが起こりうる。また、抗 p53 抗体のように、変異のある遺伝子産物に対する抗体や、変異の起こらない部位のエピトープを認識する抗体など多種類の抗体がある場合は、その反応性を十分に知らないと誤った解釈を行う恐れがある。同じように蛋白のN端あるいはC端に対する抗体など1種類の蛋白に対して複数の抗体が存在する場合は、その特異性/染色性を十分に検証しておく必要がある。

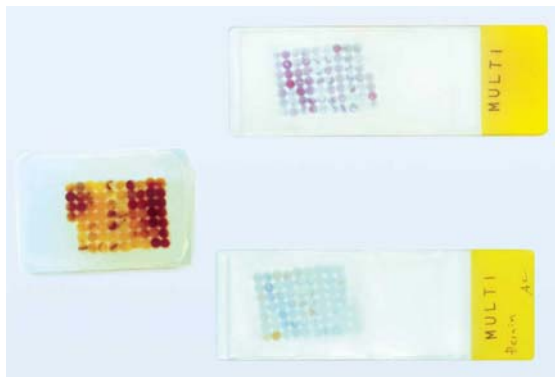


図 5 : 組織マイクロアレイ

既存のパラフィンブロックから針生検のように円筒形の組織を採取し、新たなブロックに埋め直したブロックを作成する。鍼の直径により数百までの異なった組織を一つのブロックに包埋できる。このブロックを使って染色を行うと、染色条件を均一にできる。また陽性細胞の種類から、染色の特異性の検定がたやすくできる。右上は HE 染色標本、右下は免疫染色標本。

表 10 抗体について

<ul style="list-style-type: none"> ・ 特異性の検定 陽性細胞の組織内分布 免疫学的手法（オキタロニー、RIA、Western blot など）
<ul style="list-style-type: none"> ・ 反応性の確認 同じ抗原に対する抗体でも反応するエピトープが違うことがある
<ul style="list-style-type: none"> ・ 希釈・保存条件の設定
<ul style="list-style-type: none"> ・ 非特異結合の有無の検定

Ⅲ. 抗原と抗体の混同

免疫染色を用いた検討を報告した論文で抗原と抗体の混同がしばしば行われている。免疫学の基本である抗原と抗体の区別を十分に理解していないと思われる記載がしばしば見られる。これは一流の雑誌を含め病理の分野では非常に多く見られる誤りである。慣用的に用いられているこれらの表現で内容は理解できるが、病理の世界だからといって科学的に誤った表現が許されるとは思われない。例えば広く用いられている汎ケラチン抗体の1種でAE1/3というクローン名で市販されているものがある。これは酸性と塩基性のケラチンのサブタイプを認識するモノクローナル抗体のカクテルである。よく見られる誤りは「腫瘍細胞がAE1/AE3を発現している」、あるいは「腫瘍細胞はAE1/AE3陽性である」といった表現である。AE1/AE3はあくまで抗体であり、ヒトの組織や細胞がそれを発現することはありません。陽性なのはAE1/3で認識されるケラチンである。言い換えるとAE1/3を用いた免疫染色が陽性なのであり、AE1/3は決して人の細胞では発現されることはないということが理解されていない（表 11）。

また、「以下の抗体を用いて免疫染色を行った」と言いながら、示されているのはすべて抗原であることもよく見受けられる。そのような場合には、抗原の後にかっこを付けて抗体の情報を記載していることがほとんどである。これは抗原の入手先を示していることになり、明らかにおかしい。自分が用いた方法をきちんと記載できないような著者の論文は信用すべきではないと考える。

表 11 抗原と抗体の混同

<ul style="list-style-type: none"> ・ 組織や細胞で陽性となるのは抗原であり、抗体ではない
<ul style="list-style-type: none"> ・ 抗体のクローン名で陽性/陰性をいうのは誤り 例：腫瘍細胞がAE1/3陽性ということはありません、AE1/3で認識されるkeratinが陽性である
<ul style="list-style-type: none"> ・ リンパ球のCD番号は本来抗体のグループに付けられた名称であるが抗原としても用いられ、混乱している

C. 陽性結果の解釈

I. 陽性・陰性の判定(表 12)

免疫染色の結果は常に一定の基準で行う必要がある(図6)。陽性となることを期待していると、どうしても判定が甘くなる傾向があるので注意する。外国では診断を行う病理医とは別の病理医が免疫染色の判定を行って、症例の知識無しに染色結果だけを判定することも行われている。

表 12 結果の解釈

<ul style="list-style-type: none"> ・ 陽性 vs. 陰性 基準を明らかにする
<ul style="list-style-type: none"> ・ 陽性：産生、能動輸送、結合、拡散、貪食、非特異 (組織/細胞内分布をよく見る)
<ul style="list-style-type: none"> ・ 陰性：存在しない、活発な分泌、感度以下、固定によるマスク

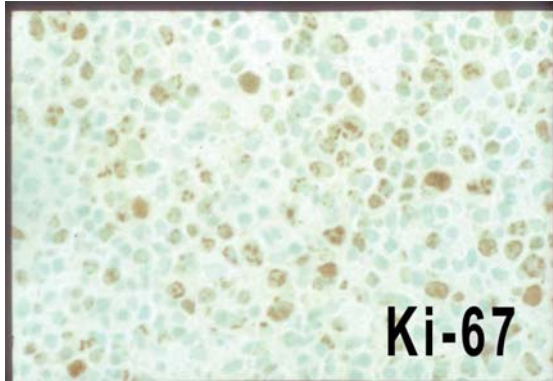


図6：リンパ腫における Ki-67 の染色

どの染色強度までを陽性とするかによって、陽性率が大きく変わりうる。常に一定の基準で判定を行う必要がある。

II. 陽性・陰性の意義(表 12)

免疫染色の陽性像が得られた場合には、目的の抗原が陽性細胞で産生されている可能性が高いが、それ以外にも 1) 抗原が受容体に結合している、2) 産生部位から拡散している、3) 壊死細胞から流出した抗原がマクロファージに貪食されている、などの可能性がある。1) の例としては、腸管の粘膜固有層に存在する形質細胞が産生した IgA が腸管上皮細胞内の **secretory component** に結合して能動輸送が行われ、上皮細胞が IgA 陽性となる (図 7)。エストロゲンなどのステロイドホルモンが乳癌細胞の受容体に結合している場合は、量的問題で免疫染色では検出できないと思われる。

2) 抗原の拡散は固定不良組織で見られるアーチファクトであるが、抗原量が多い場合によく見られる (図 8)。この場合は特定の細胞が陽性に染まっているというよりは、ある領域がぼや々と染まることが多い。また、生体内で変性し、細胞膜の透過性が増し、血清蛋白が変性細胞内に浸透して陽性となることもある。ホジキンリンパ腫の **Reed-Sternberg** 細胞は、免疫グロブリン軽鎖の **kappa, lambda** の両者が同一細胞で陽性となるが、細胞膜の透過性の亢進によると考えられている (図 9)。

3) の例としては、乳癌患者の領域リンパ節をケラチンで染めると陽性となることがある。その場合は陽性細胞をよく観察することが重要である。微小転移の可能性と、それが壊死に陥りマクロファージに貪食されている場合と、原発部で壊死に陥った細胞から流出したケラチンがリンパ流に乗ってリンパ節に到達し、マクロファージに貪食されていた可能性が考えられる。ケラチン染色による微小転移の判定は慎重に行わないと、病期判定を誤る可能性がある。

免疫染色を陽性と判定した場合は、陽性細胞の種類やその分布を確認する必要がある。特に多種類の細胞が混在するような病変の場合は重要である。腫瘍の辺縁部では非腫瘍性の細胞が巻き込まれている可能性がある。腫瘍細胞が陽性であるか、それとも巻き込まれた非腫瘍性細胞が陽性となっているかの判定は難しい場合があるが、非腫瘍性細胞は数が少なく何らかの規則性を持って配列していることが多い (図 10)。

一方、陰性の場合はその抗原が産生されていないと考えたくなるが、他の可能性も考えるべきである。特にホルマリン固定パラフィン包埋組織の切片を用いている場合は、固定の影響で偽陰性となっている可能性を常に念頭に置く必要がある。例を挙げると、免疫グロブリンの軽鎖の染色は免疫染色がホルマリン固定組織で行われるようになったごく初期から染色されてきた抗原であるが、きれいな陽性像を得ることはなかなか難しい。重鎖も同様に生化学的にはマクログロブリン血症があっても組織の免疫染色では陰性であったり、ごく一部のリンパ球のみ陽性となることはよく経験する。最近では **in situ hybridization** の方が感度が高いので、こちらを用いるようになりつつある。

分泌蛋白の一部は産生される先から分泌されるために、細胞質内に貯留せず、そのために陰性となることがある。このように免疫染色が陽性の場合にはそこに抗原があるといえるが、陰性の場合にはそこに存在しないということは言い切れない。

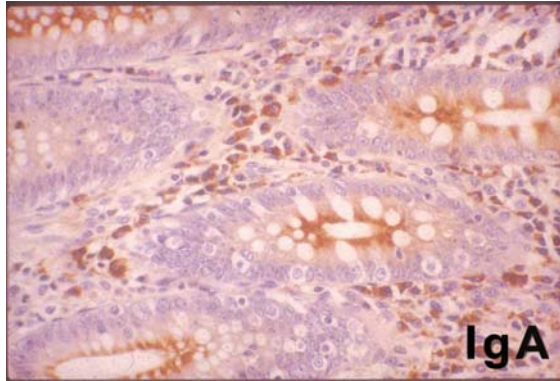


図7：虫垂粘膜におけるIgAの染色

粘膜固有層の形質細胞が産生したIgAは腺管上皮に吸収されSecretory componentに結合して安定化し、腸管内に分泌される。腺管の内腔側の染色はsecretory componentに結合したIgAである。

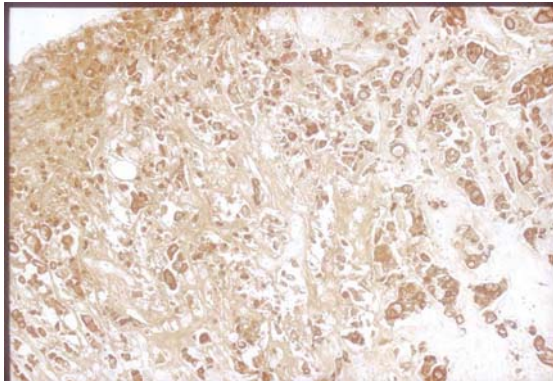


図8：固定不良組織における非特異染色

右下は比較的固定が良好で非特異染色が少ない。左側は固定が不良で間質に非特異反応が強く出ている。

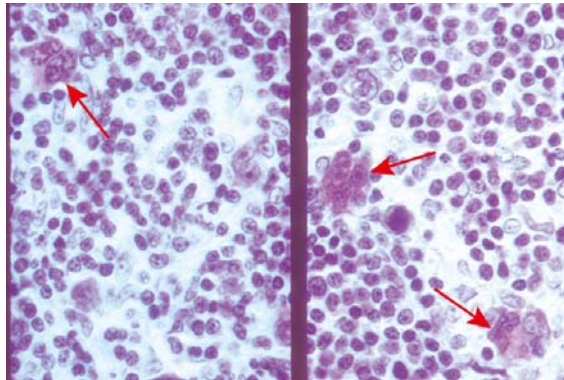


図9：ホジキン病におけるkappa（左）とlambda（右）の染色

腫瘍性のB細胞であれば軽鎖は1種類のみ陽性となるはずだが、大型多核細胞は免疫グロブリン軽鎖の両者が陽性となっている。これは生体内で膜の透過性が増し血清タンパクが細胞内にしみ込んだためと思われる。

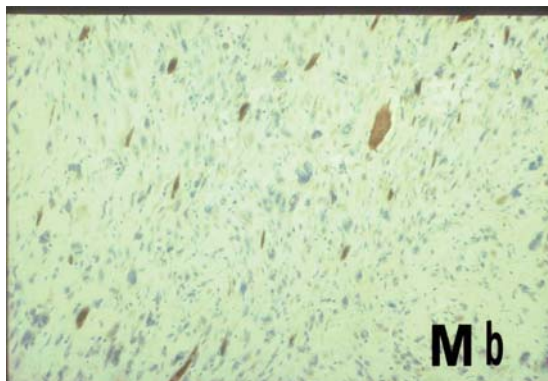


図10：悪性線維性組織球腫におけるミオグロビンの染色

陽性細胞が散見されるが、ほぼ同じ方向を向いており、横紋筋内に浸潤した腫瘍に巻き込まれた横紋筋束と考える。

Ⅲ. 陽性像の検定

免疫染色が陽性と思われる場合は、その染色が目的の抗原を検出していることを検定するために、染色が非特異的でないことを証明するいくつかのコントロールを用いる必要がある。また、内因性の酵素活性などはその阻害を行ってから免疫染色を行えば判定は容易になる（図11）（表13）。また、コラーゲンなど抗体が非特異的に結合しやすい組織や細胞についての知識も必要であ

る (表 14)。ルーチン染色では1次抗体を正常血清あるいは正常免疫グロブリンに置き換えた陰性コントロールを用いて非特異反応の有無を確認している。

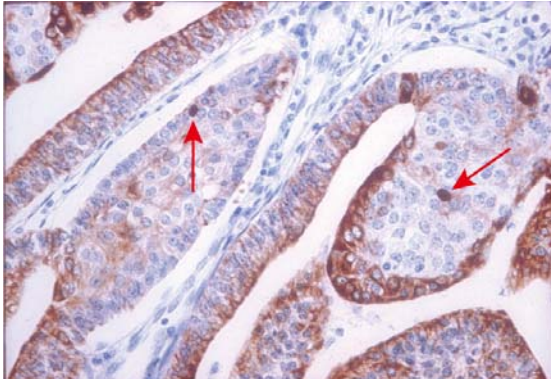


図 11 : 肺芽腫におけるケラチン染色

腫瘍細胞の核が陽性となっているが、これは核のビオチン含有量が多いために ABC 試薬が結合して生じた陽性像である。アビジン・ビオチンシステム以外の染色法を用いるとこの陽性像は見られなくなる。

表 13 内因性酵素活性の阻害

内因性 peroxidase 活性 (赤血球・顆粒球など) 3% H ₂ O ₂ in Methanol, NaN ₃ in DAB
内因性 alkaline phosphatase 活性 固定標本では問題にならない。凍結切片では levamisole を基質に加える
内因性 biotin Avidin, biotin で飽和させる

表 14 非特異反応の出やすいもの

コラーゲン	(電荷)
Mast cell granules	(電荷?)
Plasma cells	(交差反応)
Smooth muscle	(自己抗体による)
Fc receptor の存在	
細胞膜破壊による抗原・抗体浸透	

IV. 病理診断への応用

病理診断に応用する際には、まず染色の目的を明らかにする必要がある (表 15)。病理診断の現場で考えると免疫染色の目的は、1) 未分化腫瘍が上皮性か非上皮性かの鑑別をする、2) 通常の染色では鑑別診断の難しい腫瘍の確定診断を行う、3) HE で診断可能であるがその診断の確認をする、4) 増殖能などの予後因子の染色を行う、5) 組織沈着物、病原微生物などの検出を行う、などの場合が想定される。いずれの場合も HE 染色での診断や鑑別診断がきちんとできて、初めて免疫染色の適応と有効性が明らかとなる。むやみに数多くの免疫染色を行っても、その目的が不明確であれば、無駄な努力となり、誤った解釈を行う可能性がある (表 15)。

免疫染色に限らず組織標本における染色の良し悪しを判断するためには、病理医は自分で染色を行わない場合でも染色の技術的問題についての一般的知識を持っておく必要がある。そうでないと予想通りの結果が得られなかった場合にそれが技術的な問題によるのか、組織自体に目的の抗原が存在しないのかの判断が正しく行えない。また、パラフィン切片を用いる場合はその限界についても知っておく必要がある。

病理診断に免疫染色を用いる場合は、結果をきちんと記載した報告書を作成すべきである (表 16)。染色に用いた抗体の特異性によって染色結果が異なることがあるので、どの抗体を用いた染色かは非常に重要で、その情報を報告書に必ず含めるべきである。また免疫染色のための台帳を作るとともに、試薬や手技を変更したとき、あるいは染色に失敗した際の原因とその対策などもきちんと記録しておく必要がある。

表 15 解釈の問題

・免疫染色の目的/適応を明らかにする
・技術的問題を理解する
・正しいコントロールを用いる
・腫瘍の場合、非腫瘍性細胞の巻き込みを陽性と誤認しない
・腫瘍の場合は腫瘍細胞と反応性細胞を見きわめる
・陽性像のみ意味がある。陰性の場合でもその抗原が存在しないとはいえない
・パラフィン切片での免疫染色は基本的に定性的であり、定量的ではない
・予想外の結果が出たときの対応：診断の場合は HE 染色による形態優先
・解釈は判定者の知識と経験に依存するので経験を積む

表 16 免疫染色の記録/報告に含めるべき内容

・免疫染色の適応
・用いた試薬と方法
・陽性コントロールの染色状態
・陰性コントロールの染色状態
・目的組織での染色結果と抗原の分布

D. その他の問題点

I. 予想外の結果への対応

予想外の染色結果、例えばある種の腫瘍でこれまで陰性といわれてきた抗原が陽性となった場合の対処も慎重に行う（表 17）。その抗原が本当にその組織に存在するのかどうかは、複数の抗体を使って染色を行ったり、Western blotting などの方法で確認する必要がある。また、HE 染色での診断が正しかったかを再考する必要もでてくる。どうしても HE 染色による形態診断と免疫染色の結果が矛盾する場合は、形態診断を優先するようにしている。

病理診断に新しいマーカーを導入する場合は、正常組織での分布や、多数例の検討でそのマーカーの特異性と感度を検討してから、ルーチンに用いるようにすることを薦める。

表 17 予想外の染色結果の原因

・一次抗体の取り違い
・抗体の交差反応
・抗体のコンタミネーション
・非特異反応（コントロールで確認）
・抗原の移動（固定、抗原賦活処理）
・真の陽性像（十分な証明が必要）

II. 免疫染色の標準化

免疫染色がどのラボでも同じように行われ、同じ結果が得られているという保証はどこにもない（図 12）。同じ抗原の染色でもあるラボは染色キットを用い、別のラボでは自前で試薬を選択し、希釈倍率などの染色条件も決めている。免疫染色の結果には組織の固定から、染色条件、染色者の巧拙など多くの因子が影響を与える。同じラボでさえ、日によって染色結果にばらつきがあることはよく経験することである。しかし、すべての条件を一定にすることは不可能である。従ってルーチンの免疫染色では必要最低限のコントロールスライドを使って、染色がうまくいっていることを確認する必要がある（表 18）。また、組織における抗原の保持状態を確認するためにビメンチンの様な、どの組織にでも存在する抗原の染色を行うことも薦められている。

免疫染色キットを使用すると染色条件の設定などに気を使わなくてよいが、そのラボの組織標本の条件に必ずしも合っているとは限らないので、染色強度が不十分であったり、背景の非特異染色が濃くなったりすることが起こりうる。また、染色を施行する側の問題として、人により染色のうまい下手があり、染色結果に影響を及ぼすこともよく経験する。

今後はエストロゲンレセプター、c-erbB2 (HER2)、Ki-67 などの予後マーカーの免疫染色がこれまで以上に広く行われるようになると思われる。これらの染色の結果は患者の治療法の選択に直接関わるものであり、その結果の信頼性が非常に重要となる。

これらの信頼性/安全性の検定（検査試薬として認めるかどうか）は厚生労働省が行うが、日々の染色においても結果が一定するような努力を常に続けることが求められる。米国では乳癌患者にハーセプチンを投与するかどうかを c-erbB2 (HER2) の免疫染色の結果により決定することが長年行われている。乳癌患者が多く、簡単な免疫染色で多額の検査料が得られるということから、当初はそれまで免疫染色を行っていなかったような検査室まで、c-erbB2 (HER2) の染色を行うようになった。そこでの精度管理は不十分で、細胞質のみ染まっただけでも陽性と判定したりして c-erbB2 (HER2) 染色の導入がかえって臨床医の免疫染色全般に対する信頼感を低下させたと聞いている。現在ではセンター的な施設に未染標本を集めてそこで自動染色機による染色を行い、免疫染色に精通している病理医が判定するか、あるいは画像解析による客観的な判定を行うことにより、精度を保つようになっている。

免疫染色は非常に有用で強力な方法であるが、その特性を十分に理解して用いないと誤った結論を導く可能性がある。臨床の学会の発表を見るとちょっとでも茶色になっていると陽性と判定している例が多いことに驚かされる。基本は抗体や抗原についての十分な知識と、慎重な解釈という点につけると考える。

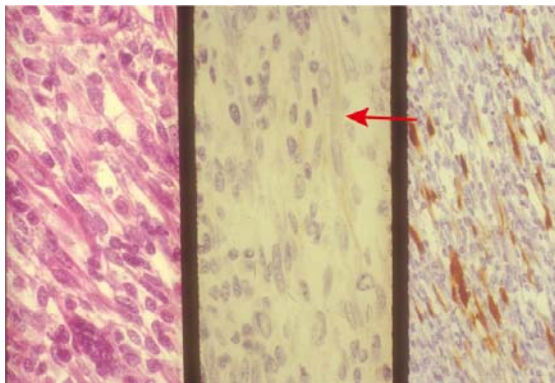


図 12：平滑筋肉腫におけるデスミンの染色
 左 (HE 染色)、中はA病院における染色、右は B 病院における染色。中のパネルではごくわずかに陽性像が見られるのみである。

表 18 免疫染色の標準化

<ul style="list-style-type: none"> ルーチン染色時のコントロールの使用 陽性コントロール 目的の抗原を含む組織切片を通常染色。染色の良し悪しの検定 陰性コントロール (特異的) 目的の抗原が存在しない組織切片を通常染色。交叉反応の検定 陰性コントロール (非特異的) 検討組織の切片を非免疫血清、正常血清、抗体希釈液で染色。 抗体の非特異的吸着の有無を検定
<ul style="list-style-type: none"> ビメンチン染色による抗原保持状態の確認
<ul style="list-style-type: none"> 染色キットの使用：組織の状態に合わないこともある
<ul style="list-style-type: none"> 自動免疫染色機：40-200 枚同時に同一条件で染色できる 特別の試薬が必要/試薬使用量が多い

文献

Taylor CR, Cote RJ eds., Immunomicroscopy. A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist, 3rd ed., Saunders Elsevier, 2006.

Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR: Antigen retrieval immunohistochemistry: Past, present, and future. J Histochem Cytochem 45:327-343, 1997.

Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR: Antigen retrieval techniques: Current perspectives. J Histochem Cytochem 49:931-937, 2001.

名倉 宏, 長村義之, 堤 寛 (編): 渡辺・中根の酵素抗体法. 学際企画, 東京, 2002.

Banks PM: Incorporation of immunostaining data in anatomic pathology reports. Am J Surg Pathol 16:808, 1992.