

免疫染色での陽性所見と物質の産生について

防衛医科大学校臨床検査医学講座

廣井 禎之

はじめに

肝癌の肝病理組織標本に α -フェトプロテインの免疫染色を行ない、癌細胞の細胞質に陽性を認めました。この場合、肝癌細胞が α -フェトプロテインを産生していたと解釈して良いのでしょうか？ 答えはノーです。常識的にはイエスですが、厳密には（理論的には）イエスということとはできません。免疫染色の陽性所見より、肝癌細胞の細胞質中に α -フェトプロテインが存在したと理解すべきで、産生していたと解釈してはいけません。産生の証明には α -フェトプロテインを産生する mRNA を確認することが必要です。

では何故、免疫染色の陽性を産生ととってはならず、mRNA シグナルの証明が産生を示唆しているのでしょうか。それにはまず、産生に関するメカニズムから説明しましょう。

細胞における産生のメカニズム

生体細胞において、すべての情報の源は遺伝子です。遺伝子は機能的タンパク質や RNA 分子などをコードする DNA (RNA ウイルスの場合は RNA) と定義され、生体の細胞中で、物質の生成、代謝など、生きていくうえでの必要な生命現象の指示を絶え間なくだしています。

一方、遺伝子の指示（情報）を発現させるのは RNA で、RNA の主な機能は遺伝情報の運び手であることとタンパク質合成の道具であることです。タンパク質を作るために遺伝子から転写された RNA は特に mRNA と呼ばれ、遺伝子の指示（情報）をタンパク質合成の場であるリボゾームに運ぶ役割をもちます。

ここで、遺伝子 (DNA) から物質 (蛋白) 産生までのメカニズムを少し詳しく整理しましょう。

1) 遺伝子

人体においては DNA のことです。前述の通り、生体細胞におけるすべての生命活動の源です。DNA は 相補結合した 2 重螺旋構造 (10 塩基対で 1 回転) をとっており、このねじれは右上がり、すなわち右巻きです。おのおのの鎖は水素結合で結合し、2 本の鎖の塩基間で A (アデニン) と T (チミン)、G (グアニン) と C (シトシン) が対をつくって (相補的) います。DNA を構成するこの鎖はおのおのセンス鎖、アンチセンス鎖と呼ばれ、RNA 合成の鋳型 (生命活動の情報を持つ鎖) となるのはアンチセンス鎖です。

2) プレ mRNA の合成

DNA の転写開始のシグナル (プロモーター配列) から、DNA の一方の鎖 (アンチセンス鎖) のみを鋳型として RNA ポリメラーゼにより RNA が合成されます (mRNA の前駆体、プレ mRNA)。すなわちプレ mRNA の塩基配列は、センス鎖と同じということになります。

3) mRNA のスプライシング

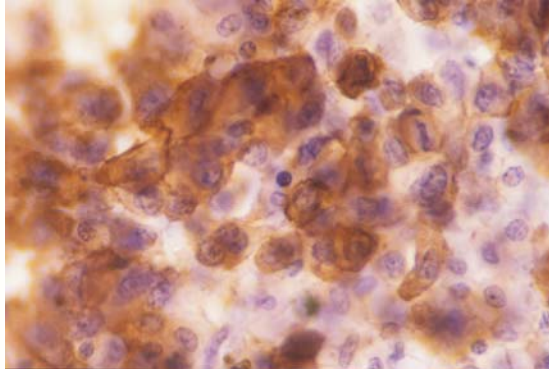
プレ mRNA の塩基配列は DNA と同じですが、DNA の塩基配列にはエキソンとイントロンがあります。スプライシングによりイントロン部分が切り捨てられ、エキソン部は残ってつながられます。これにより mRNA が合成されます (mRNA の塩基配列はエキソンのみです)。mRNA のスプライシングはプレ mRNA を材料として核内で起こり、合成された mRNA は細胞質 (リボゾーム) に転送されます。

4) リボゾームでの蛋白合成

リボゾーム内で mRNA の情報 (コドン) を tRNA (transfer RNA) が読み、対応するアミノ酸と結合してリボゾームへ運びます。そして、各アミノ酸がペプチド結合し、蛋白が合成されます。すなわち、遺伝子は細胞におけるすべての情報の源であり、mRNA の検出は遺伝子の発現 (細胞の機能; 産生) を示唆します。そして、免疫染色では産生された蛋白レベルを検出します。

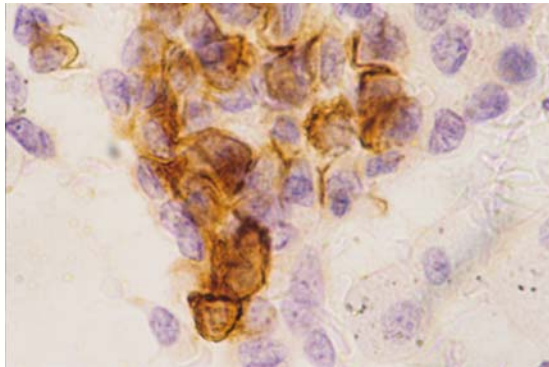
免疫染色の陽性所見

免疫染色での陽性所見は必ずしも産生（細胞の機能）とイコールではないことがわかりいただけたことと思います。免疫染色での陽性は、存在の証明になりますが、産生されたものか、運ばれてきたものか、もしくは標本作成過程により現れたものなのか、断定することはできません。したがって、免疫染色での陽性所見は、局在の証明と認識することが適切と考えます。



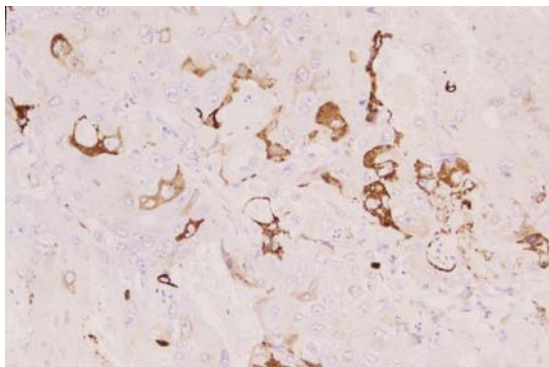
ニチレイバイオサイエンス社製 抗 CD15 抗体 (MCS-1) による免疫染色、肺腺癌腫瘍擦印細胞診標本

腫瘍細胞の細胞膜に CD15 陽性を認める



糖鎖抗原 AH6 の免疫染色、肺腺癌腫瘍擦印細胞診標本

腫瘍細胞の細胞質と細胞膜に AH6 陽性を認める



hCG (human chorionic gonadotropin) の免疫染色、絨毛癌組織標本

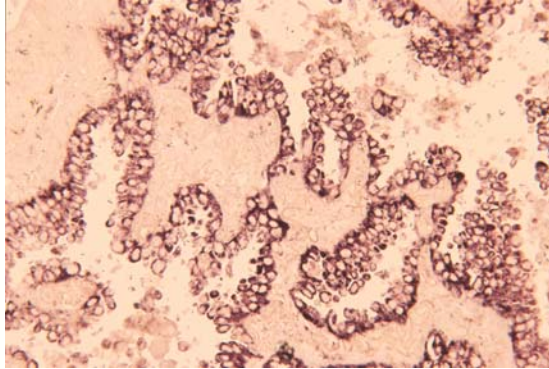
絨毛癌（胚細胞が胎盤に分化する傾向を持った腫瘍）の細胞質に hCG 陽性を認める

ついでですが、免疫染色は陽性所見のみに限って積極的に解釈可能であり、陰性の場合には目的とする物質が存在しなかったと言い切ることができません。理由は自家融解、固定による抗原性の失活、固定液中への流出、テクニックエラー、等のために染まらなかった可能性を否定できないからです。また、一般論として染色強度も判定の基準にしないほうが無難です。理由は、切片の厚さ、染色（検出）メカニズム、固定条件、組織の状態の相違のためです（例外として HER2 があげられますが、これは固定条件、切片の厚さ、染色工程の一定化が定められています）。免疫染色判定の基本はやはり陽性か否かだと思います。

病理組織標本による mRNA の検出

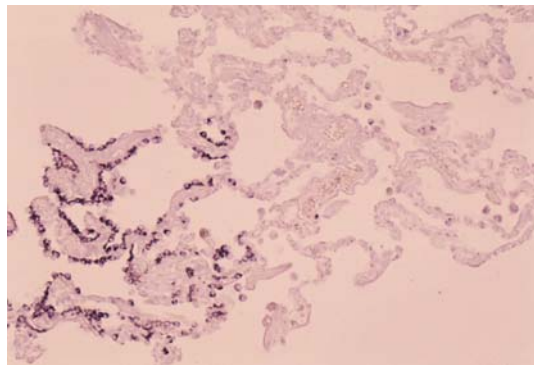
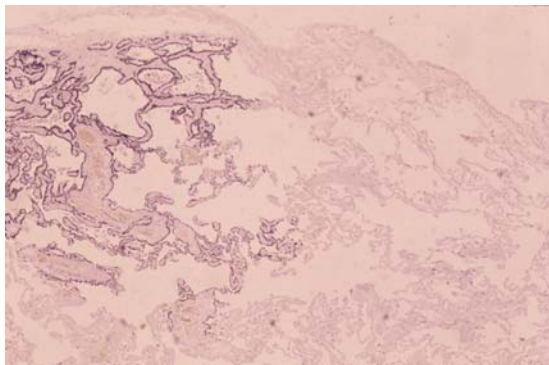
病理組織標本上における mRNA の検出には ISH (*in situ hybridization*) 法が広く用いられています。本法は組織、細胞標本上で目的とする mRNA 局在の検索が可能である点が特徴です。ISH 法による mRNA 局在の証明は産生シグナルの直接証明でもありますが、やはり陰性の場合には RNA の保

存不良なども考えなければなりません (mRNA の保存状態は、ポリ A プローブなどにより確認可能です)。また、シグナルが出ていてもその後の代謝過程における合成障害 (完成された物質が合成されない。したがって生体における作用も無い。この場合は基本的に免疫染色も陰性となる) も考慮しなくてはなりません。



PDGF (platelet-derived growth factor) の ISH 法、肺腺癌組織標本

腫瘍細胞の細胞質に PDGF mRNA のシグナル (PDGF mRNA の発現) を認める



hTERC (human telomerase mRNA component) の ISH 法 (左; 弱拡大、右; 強拡大)

AAH (atypical adenomatous hyperplasia) 細胞に hTERC mRNA のシグナル (hTERC mRNA の発現) を認める。既存の肺胞細胞は陰性である。細胞分裂毎に短縮するテロメア DNA を AAH 細胞が自ら補っていることを示唆する

終わりに

免疫染色での陽性は物質の産生を直接示している所見ではありません。目的とする物質の存在 (局在) を意味します。物質の産生を証明するためには mRNA の検出が必須です。では、物質の産生を検討するためには mRNA だけ検索すればよいかというとそうでもありません。

いくつかの蛋白は複数の遺伝子の発現により合成されることが確認されていますし、mRNA の発現が認められても、合成過程における障害のため、蛋白合成のできないケースも考慮する必要があります。生体内において機能する蛋白の証明にはやはり免疫染色が有用です。免疫染色での陽性所見の意義を理解し、免疫染色と ISH 法を併用しながら生命現象の解明を行ってゆくことが大切と考えます。