

固定および包埋による抗原性の失活・流出

藤田保健衛生大学医学部第一病理学講座

塩竈和也, 堤 寛

はじめに

固定および包埋は、免疫組織化学に欠かせないステップである。しかし、この必須操作によって抗原性が失われるケースがあり、染色結果に大きな影響を及ぼしかねない。本稿では、固定および包埋によって抗原性が失活・流出する代表的抗原に焦点を絞って解説する。

固定による抗原性の失活・流失

<第Ⅷ因子関連抗原>

血管内皮に存在する第Ⅷ因子関連抗原 (von Willebrand 因子) は、ホルマリン固定では失活しやすいが、カルボジイミド固定、すなわち 1% 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide in 0.01 M PBS による固定では、抗原性保持が良好である (図 1)。¹⁾

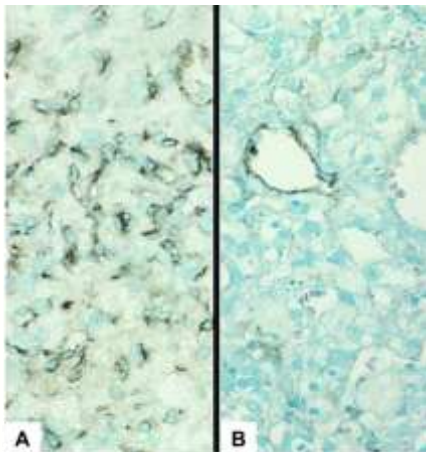


図 1. 第Ⅷ因子関連抗原の免疫染色
(小脳原発の血管芽細胞腫)

A: カルボジイミド固定パラフィン切片

B: ホルマリン固定パラフィン切片

カルボジイミド固定の場合、間質の紡錘形細胞の陽性率が明らかに増加する。ただし、組織の収縮が目立ち、HE 染色の美しさはホルマリン固定に劣る。

<脱水性固定による分泌蛋白の流出>

アルコール固定では、somatostatin, calcitonin や HCG を除いて、insulin, glucagon, pancreatic polypeptide といった多くのペプチドホルモンの抗原性が流出する。同様に、顆粒内に存在する物質 (血小板第Ⅳ因子やリゾチームなど) もアルコール固定は不適である (図 2)。

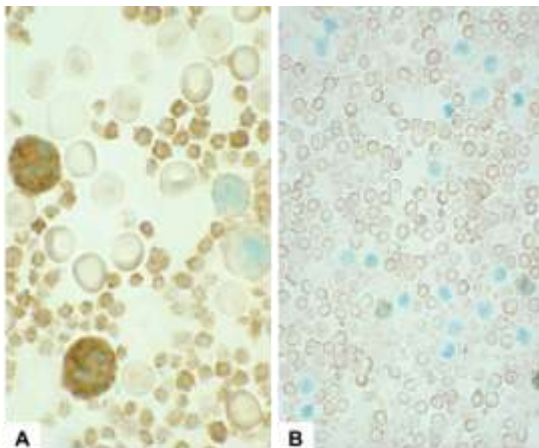


図 2. 血小板第Ⅳ因子の免疫染色
(末梢血の血小板分画)

A: パラホルムアルデヒド固定

B: アセトン固定

アルデヒド固定では、顆粒内分泌蛋白の局在が明瞭に示されている。好中球には内因性ペルオキシダーゼ活性を認める。アセトン固定では、陽性となるべき血小板に陽性所見が明らかでない。赤血球に弱いペルオキシダーゼ反応性を認める。

<Keratin, vimentin>

Keratin 蛋白や vimentin の抗原性は、ホルマリン固定パラフィン切片では失活する場合が多いが、アルコール固定では比較的安定している。^{2),3)} ただし、ホルマリン固定材料においても、抗原性賦活化処理で抗原性が回復する場合が多く、最近では、ホルマリン固定パラフィン切片に適したモノクローナル抗体が使われるようになってきた。図の悪性リンパ腫症例に示すごとく、極度に固定不良の場合は、加熱による抗原性賦活化処理後においても vimentin は陰性となり、同部位では、B 細胞抗原 (L26=CD20) も染色されない (図 3)。

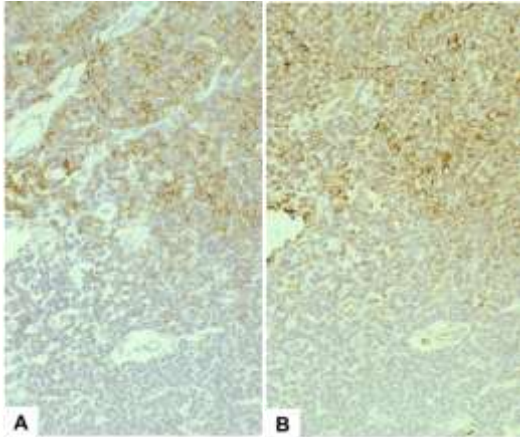


図 3. B 細胞性悪性リンパ腫リンパ節材料
(ホルマリン固定パラフィン切片)

A: vimentin

B: B 細胞表面抗原 (L26=CD20)

固定不良な同一部位において両抗原がともに偽陰性化となっている。Vimentin 免疫染色は、免疫染色における偽陰性を判断する指標となる (vimentin control)。

<LCA>

LCA (leukocyte common antigen = CD45) は、切片の最外層部のリンパ球のみが陽性に染色されたり、逆に、内部のみが美しく染色されて、最外層部が偽陰性になる場合がある。⁴⁾ 不思議なことに、ホルマリンによる固定状態が必ずしも十分とはいえない消化管リンパ腫切除材料の多くは美しく染色されるのに対して、固定良好な扁桃の生検材料では、LCA の染色性が悪いことが多い。図に示すごとく、LCA 陽性部と vimentin 陽性部が逆転する場合がある。LCA はむしろ固定不良の部位で染色性がよく、過固定となっている標本の周辺部で染色性が悪い (図 4)。

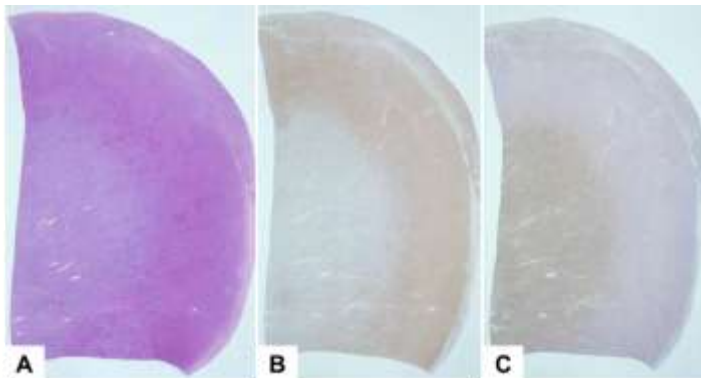


図 4. B 細胞性悪性リンパ腫の
手術切除材料
(ホルマリン固定パラフィン切片)

A: HE

B: vimentin

C: LCA (CD45)

Vimentin と LCA の局在性が逆転している。加熱処理による vimentin の抗原賦活化の効果にも限界がある点と、HE 染色の染色性が悪い腫瘍組織中央の固定不良部で LCA の染色性がよく保たれている点が注目されている。

<長期ホルマリン固定による抗原への影響>

60年間にわたってホルマリン固定された剖検標本（国立療養所呂久光明園より提供）の免疫染色でも、多くの抗原で陽性シグナルが確認された（表1, 図5）。とくに、ペプチドホルモンは全例陽性であり、超過固定標本においても安定した染色結果を示した。しかし、多くの上皮性抗原、CD抗原および核内抗原では、陽性シグナルは検出されなかった。本染色には、いずれもニチレイバイオサイエンス社製 Simple Stain MAX-PO (MULTI)を用いた。

表1. 長期ホルマリン固定材料による免疫染色

抗体名	結果	抗体名	結果	抗体名	結果
Blood group A	○	CD79a	×	Gastrin	○
Blood group B	○	Cytokeratin (CAM5.2)	○	Glucagon	△
Blood group H	○	Desmin	△	Insulin	○
CEA	○	GFAP	○	Somatostatin	○
E-cadherin	×	α-SMA	×	Amyloid A	○
EGFR	×	Vimentin	○	BCG	○
EMA	×	Androgen Receptor	×	Chromogranin A	×
CD3	×	CDX2	×	Cleaved caspase 3	×
CD15	○	Cyclin D1	×	D2-40	×
CD20	×	Ki-67	×	Myoglobin	○
CD34	×	PCNA	×	Synaptophysin	×
CD45 (LCA)	×	p53	×	S100	○
CD56 (NCAM)	×	p63	×	von Willebrand 因子	○

<判定基準> ○：陽性，△：弱陽性，×：陰性

血液型糖鎖抗原，上皮性抗原，CD抗原，細胞骨格抗原，核内抗原，ペプチドホルモン，その他に色分けした。

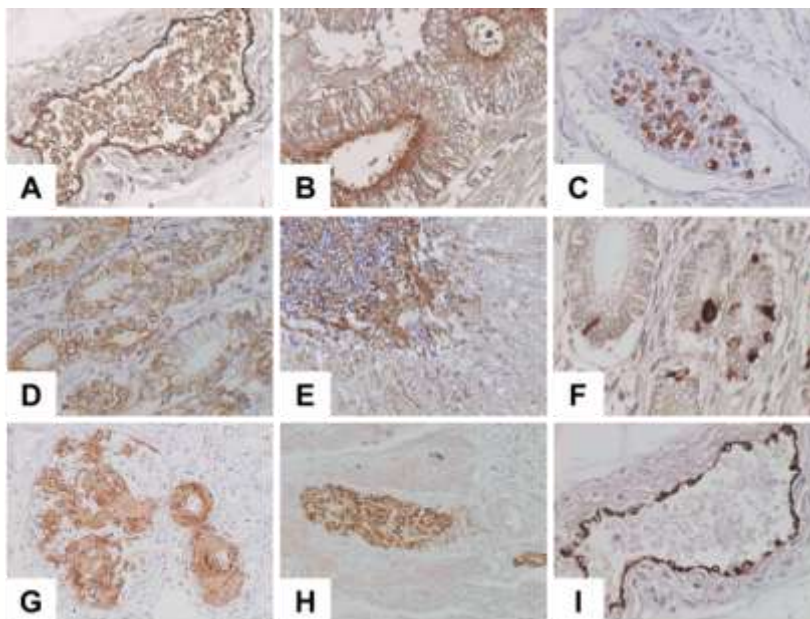


図5. 長期ホルマリン固定による染色性への影響

- A: blood group A (血管)
- B: CEA (大腸癌)
- C: CD15 (顆粒球)
- D: cytokeratin (CAM5.2) (小腸)
- E: GFAP (脳)
- F: gastrin (十二指腸)
- G: amyloid A (腎アミロイド沈着)
- H: S100 (大腸神経叢)
- I: vWF (血管)

Simple Stain MAX-PO (MULTI)を用いた免疫染色の一例。超過固定標本においても約半数の症例で陽性像が確認された。通常、賦活化処理を行わない抗原 (blood group, CEA, GFAP, BCG, myoglobin, S100) では、本症例でも未処理の状態でも検出可能だった。

パラフィン包埋による抗原性の失活・流失

<Secretory component (SC), HER2>

胆道系・膵管系上皮細胞の SC は、腸管上皮と異なり、パラフィン切片では、凍結切片に対してしばしば反応性が弱い。正常および腫瘍性乳腺上皮細胞は、凍結切片では常に弱陽性を呈するが（図 6）、パラフィン切片では一部の症例のみが弱陽性を呈する。⁵⁾

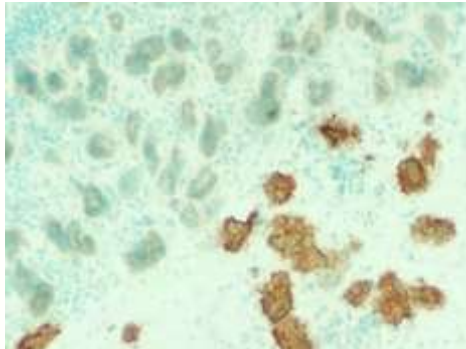


図 6. 新鮮凍結切片における HER2 免疫染色（乳癌）

右下半分の乳癌細胞に HER2 蛋白が強陽性を示す。しかし、左上半分の非腫瘍性乳腺組織にも弱いながら、HER2 蛋白が発現している。正常細胞における HER2 蛋白のこの局在性は、パラフィン包埋により消失することが多い。

<神経ペプチド>

ペプチドホルモンないし神経ペプチドは、内分泌細胞に含有されている場合は、ホルマリン固定パラフィン切片できわめて安定的に同定可能である。しかし、同一のペプチドが末梢の自律神経系や中枢神経系に含有される場合は、その含有量の少なさと固定の間に放出されてしまうことから、通常のパラフィン切片では、その証明がむずかしいことが多い。

<CEA>

成人の正常大腸粘膜や正常幽門粘膜の CEA は、パラフィン切片では、たとえ高感度法を用いた場合でも、しばしば弱陽性を呈するにすぎない。しかし、パラホルムアルデヒドないし PLP 固定された凍結切片で同一材料を観察すると、上記粘膜の表層上皮細胞に、間接法でも明らかな CEA 陽性所見が観察される（図 7）。^{6), 7)}

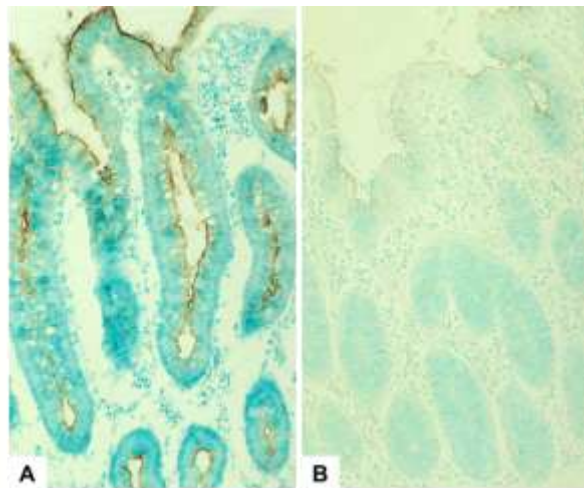


図 7. パラフィン包埋による CEA の抗原性減弱。モノクローナル抗体 (CM-010) を用いた免疫染色（正常幽門腺粘膜）

A: 4% PFA 固定凍結切片

B: 同一症例のホルマリン固定パラフィン切片

CEA モノクローナル抗体 CM-010 は、凍結切片では被覆上皮を強陽性に染色するが、同一材料をホルマリン固定パラフィン包埋すると、その反応性は著しく減弱化する。

<Keratin>

ホルマリン固定パラフィン切片でも安定した結果の得られる抗 keratin モノクローナル抗体 (KL1) においても、凍結切片とパラフィン切片で、明らかな抗原性保存の違いが観察できる。⁸⁾ ヒト正常胸腺の凍結切片では、Hassal 小体に加え、網状に分布する胸腺上皮細胞にも陽性像が得られるのに対して、パラフィン切片では Hassal 小体のみが陽性を示す。

<細胞表面マーカー>

細胞表面抗原や自己抗体に対応する抗原（核抗原）は、パラフィン包埋により抗原性が失われることが多い。しかし、CSA（catalyzed signal amplification）法などの超高感度法を利用すると、従来凍結切片専用であった抗体を通常のパラフィン切片に応用することが可能になる。⁹ ICAM-1 の症例を図 8 に示す。

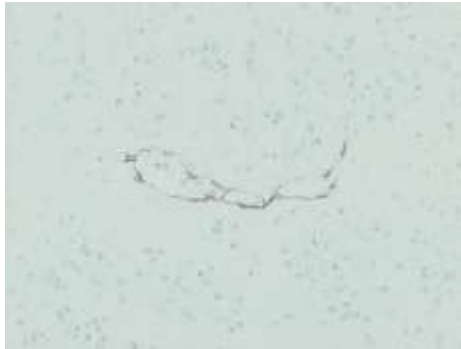


図 8. 超感度法による ICAM-1 免疫染色
(ホルマリン固定パラフィン切片)

超高感度な CSA 法を使用すると、凍結切片用の高 ICAM-1 モノクローナル抗体（clone: 6.5B5）によって、血管内皮細胞表面に発現する接着因子の局在が通常のパラフィン切片内に示されている。この場合、従来の検出法では陰性である。

その他の要因による抗原性の失活・流出

<パラフィン切片の切り置き>

ER, p53, Ki-67 (MIB-1)などの核内抗原は、切片の切り置きによって抗原性の減弱が認められる。^{10), 11)} 切片を凍結保存することで、ある程度は抗原性保持期間を延長することが可能である。

<パラフィン切片の伸展・乾燥>

切片の伸展条件¹²⁾ や乾燥条件¹³⁾ により抗原性の減弱が生じる。抗原蛋白の種類によって、高温伸展条件で劇的に染色性が低下する場合や、全く発現強度が変化しない場合がある（図 9）。多くの抗原蛋白において、高温および長時間の伸展・乾燥により、染色性が低下する傾向がある（表 2, 3）。

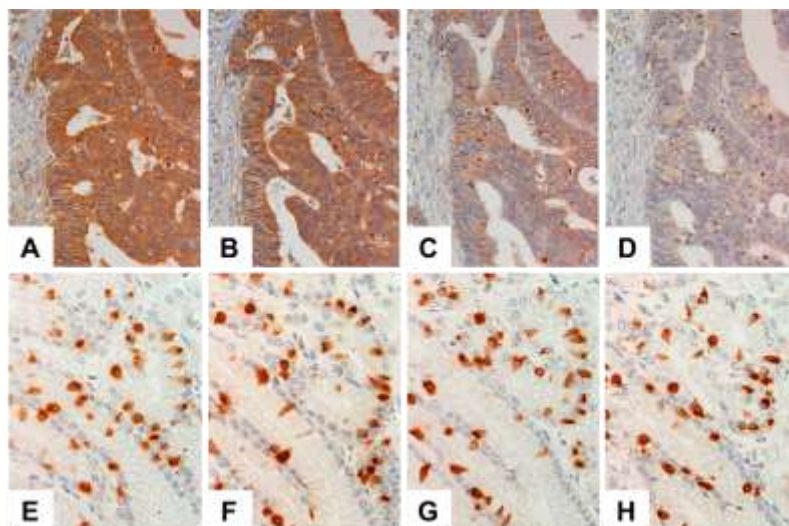


図 9. 高温伸展による
抗原性の失活

A-D: OPRT（胃癌）
E-G: gastrin（幽門腺）
A, E: 40°C 伸展
B, F: 50°C 伸展
C, G: 60°C 伸展
D, H: 70°C 伸展

OPRT（orotate phosphoribosyltransferase）免疫染色では、伸展温度を高温にすることにより細胞質の陽性シグナルが減弱する。Gastrin 免疫染色では、伸展温度にかかわらず明瞭な染色性を保持している。

表 2. 切片の伸展条件の比較

	HER2	gastrin	EGFR	Ki-67	高分子 keratin	CD8	CD20	Pepsino gen II
40°C	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
50°C	◎	◎	○	○	◎	○	◎	◎
60°C	○	◎	○	○	○	○	○	◎
70°C	○	◎	○	○	○	△	○	○

<判定基準> ◎: 強発現, ○: 中程度発現, △: 弱発現

表 3. 切片の乾燥条件の比較

		HER2	gastrin	EGFR	Ki-67	高分子 keratin	CD8	CD20	Pepsino gen II
一 時 間	40°C	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	60°C	◎	◎	◎	◎	◎	○	◎	○
	80°C	○	◎	◎	◎	○	○	◎	○
一 日 間	40°C	○	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
	60°C	○	◎	○	◎	○	○	◎	○
	80°C	△	◎	○	○	△	○	◎	△
三 日 間	40°C	△	◎	◎	◎	○	○	○	○
	60°C	△	◎	○	○	△	○	○	△
	80°C	△	◎	○	○	△	△	○	△

<判定基準> ◎: 強発現, ○: 中程度発現, △: 弱発現

おわりに

形態保持のための固定のつよさと生物活性あるいは抗原性の保持とは反比例の関係にある。パラフィン包埋過程における抗原性の失活・流出の原因として、脱水・脱脂・加温工程があげられる。切片の切り置き、切片の伸展条件および乾燥条件も抗原性失活の大きな要因として指摘される点も留意すべきである。

現在では、抗原性賦活化処理の向上や安定した市販抗体の出現によって、一昔前と比べて検出が容易になった。しかし、いつ遭遇するかもしれない検出困難な場面に備えて、十分に理解して、問題解決に努めるべきである。

文献

1. van Pelt-Verkuil E, Emeis JJ: The use of a carbodiimide-containing fixative for the immunohistochemical demonstration of coagulation factor VIII in rat vascular tissue. *Histochemistry* 71: 187-194, 1981.
2. Altmannsberger M, Osborn M, Schauer A, et al: Antibodies to different intermediate filament proteins. Cell type-specific markers on paraffin-embedded human tissues. *Lab Invest* 45: 437-443, 1981.
3. Shi S-R, Key ME, Kalra KL: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748, 1991.
4. 堤 寛, 尾形隆夫, 川井健司: ホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いたリンパ球表面抗原の解析. 悪性リンパ腫への応用. *臨床免疫* 19 (Suppl 11): 163-175, 1987.
5. Tsutsumi Y, Naber SP, DeLellis RA, et al: neu oncogene protein and epidermal growth factor receptor are independently expressed in benign and malignant breast tissue. *Hum Pathol* 21: 750-758, 1990.

6. Tsutsumi Y, Nagura H, Watanabe K: Immunohistochemical observations of carcinoembryonic antigen (CEA) and CEA-related substances in normal and neoplastic pancreas. Pitfalls and caveats in CEA immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 81: 535-543, 1984.
7. Tsutsumi Y, Onoda N, Misawa M, et al: Immunohistochemical demonstration of nonspecific cross-reacting antigen in normal and neoplastic human tissues using a monoclonal antibody. Comparison with carcinoembryonic antigen localization. *Acta Pathol Jpn* 40: 85-97, 1990.
8. 堤 寛:細胞骨格. 病理学への応用: ケラチン, ビメンチン, desmin. *病理と臨床* 5: 445-461, 1987.
9. Hashizume K, Hatanaka Y, Kamihara Y, et al: Automated immunohistochemical staining of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using a catalyzed signal amplification method. *Appl Immunohistochem Molecul Morphol* 9: 54-60, 2001.
10. Wester K, Wahlund E, Sundstrom C, 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: 61-70, 2000.
11. van den Broek L, van de Vijver MJ: Assessment of problems in diagnostic and research immunohistochemistry associated with epitope instability in stored paraffin sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 8: 316-321, 2000.
12. Kamoshida S, Sakamoto N, Matsuoka H, et al: Heat-assisted stretching of paraffin sections on hot plate weakens immunoreactivity of orotate phosphoribosyltransferase. *Acta Histochem Cytochem* 38: 69-74, 2005.
13. 神原由季: HercepTest™に関する最近の知見. *病理技術* 72: 22-25, 2009.