

## 抗原性賦活化が核染色に及ぼす影響

藤田保健衛生大学医学部第一病理学

塩竈 和也、堤 寛

### はじめに

抗原性賦活化とは、アルデヒド固定に伴う架橋反応によって埋もれてしまった抗原を呼び覚ますテクニックである。ホルマリン固定パラフィン切片を対象とする場合、この操作を一次抗体反応前に加えることで抗原部位のマスキングが取り除かれ、抗体分子との結合がスムーズになり、良好な染色結果を得ることができる。Blum らによるホルマリン固定の発明から 120 年以上経つが、ルーチン業務における免疫染色の多くは、今でもホルマリン固定パラフィン切片を使用している。ホルマリン固定材料で免疫染色が当たり前になっただけでなく、この抗原性賦活化の発展が大きな役割を担っており、今日の免疫染色に欠かせないステップとして定着している。以下に、代表的な賦活法を示す。

#### ・タンパク分解酵素処理

タンパク分解酵素処理は、架橋に基づく立体障害を取り除く目的で用いられる。特定のアミノ酸残基のペプチド結合を切断することによって抗体が入り込むスペースを生み出す<sup>1), 2)</sup>。酵素処理は、0.002% proteinase K (PK, 37°C 10 分)、0.05% pronase (37°C 30 分)、0.05% pepsin (37°C 30 分)、0.1% trypsin (37°C 30 分) などが用いられる。PK は幅広い基質特異性をもつ強い酵素として知られており、核酸抽出など分子生物学分野で頻繁に利用されている。

#### ・加熱処理

Dr. Shi らによって考案された加熱による抗原性賦活法<sup>3)</sup>は、再現性の高い高感度なシグナル検出ができるいまや定番のテクニックである。タンパクの立体障害や DNA 二本鎖構造による抗体アクセスの困難性が加熱により解除・分解されて<sup>1)</sup>、さらに加熱後の冷却によって緩んだタンパクの高次構造が再構築されることで効果を発揮すると考えられている<sup>4)</sup>。同時に、カルシウムイオンないし金属陽性イオンとタンパクが共有結合した複合体は、EDTA やクエン酸を主成分とする加熱溶液のキレート作用によって除去されると想定される<sup>1)</sup>。

本講座で取り扱っている各種抗体の抗原性賦活化条件を表 1 に示す。多くの抗体で加熱処理を採用しており、EDTA 溶液 (1mM EDTA 溶液, pH 8.0) による加熱処理が最も多く (45%)、次いで CB6 溶液 (10 mM クエン酸緩衝液, pH 6.0) による加熱処理 (25%)、さらに PK 処理 (20%) の順に続く。EDTA 溶液による加熱処理は、高感度な検出が期待できるものの、切片のささくれ立ちや形態変化 (核の金平糖化) が生じる欠点も合わせもつ<sup>5), 6)</sup>。やみくもに EDTA 溶液に頼るのではなく、条件検討を怠らずに最適条件を導き出すことが求められる。筆者らは、フランス製料理用圧力鍋 (T-FAL, 6 リットル) と電磁調理器を推奨している (図 1)。火を使わず安全で、簡単な操作性や一度に大量の切片を処理できる利便性を兼ね備えている<sup>6)</sup>。圧力鍋は、性能的にもオートクレーブに近く、圧が抜けるまでの時間がかからず、大変使い勝手がよい<sup>5), 7), 8)</sup>。本講座では連日使用しているが、2~3 年は耐久性があり、2 万円程度で購入できる。

このように、免疫染色に欠かせない抗原性賦活法であるが、賦活法の種類によって発色後の核染色に影響を及ぼすことが知られている<sup>2), 6)</sup>。今回、代表的な核の染色液であるヘマトキシリンおよびメチルグリーンに絞って、各種抗原性賦活法における核染色への影響について報告する。

表 1 免疫染色における抗原性賦活法一覧 (藤田保健衛生大学医学部第一病理学)

0.002% proteinase K (PK), 37°C 10 分
adipophilin, amyloid A, amyloid P, C1q, C3c, C4c, CD21, CD35, CD61, CD68, collagen IV, cox2, cytokeratins (AE1/AE3, MNF116, CK7, CK8, CK19, CK20, WSS), elastin, factor VIII, fibronectin, HBME-1, HGM, immunoglobulins (IgA, IgD, IgG, IgM), kappa light chains, lambda light chain, laminin, mast cell tryptase, PAR (ADP-ribose), pepsinogen II, prostatic acid phosphatase, <i>C. difficile</i> , <i>E. coli</i> , <i>H. pylori</i> , <i>S. aureus</i> , Streptococcus group A, HBe-Ag, HBs-Ag
0.05% pronase, 37°C 30 分
<i>Candida</i> sp., <i>E. cloacae</i>
0.1% trypsin, 37°C 30 分
IgE
100% 蟻酸, 室温 1 分
$\beta$ -amyloid, prealbumin
圧力鍋, CB6 溶液 (10 mM クエン酸緩衝液, pH 6.0), 120°C 10 分
$\alpha$ -defensin 1, $\alpha$ -defensin NP5, ALK, Brm, caveolin-1, CD3, CD5, CD10, CD30 (Ki-1), CD33, CD44, CD45 (LCA), CD45RO, CD56 (NCAM), CD79a, CD99 (MIC2), CD138, CD163, c-erbB-2 (HER2), CK-HMW, CK14, DOG-1, EMA, fibrinogen gamma chain, FOXP3, GCDFP-15, glicentin, glucagon, hepatocyte, HLA-DR, lactoferrin, MyoD1, nestin, NSE, p40, p53, somatostatin, synaptophysin, TIA-1, thyroglobulin, vimentin, <i>B. cereus</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>C. trachomatis</i> , <i>E.coli</i> (LPS), <i>P. jiroveci</i> , Rhizomucor, <i>T. gondii</i> , <i>R. arhizus</i> , PBP2', HPV, SFTSV
圧力鍋, CB7 溶液 (10 mM クエン酸緩衝液, pH 7.0), 120°C 10 分
APC, BRG1, $\beta$ -catenin, CD4, CD25, CD34, CD204 (MSR-A), chromogranin A, LH-RH, napsin A, PCNA, PDX-1 (H-140), RB, HTLV-1, JC virus
圧力鍋, EDTA 溶液 (1 mM EDTA 溶液, pH 8.0), 120°C 10 分
M-actin, $\alpha$ -SMA, AR, bcl-6, CA15-3, CA19-9, caldesmon, calponin, calretinin, CD1a, CD8, CD13, CD15, CD20, CD31, CD38, CD57, c-Met, CD103, c-kit, CD235a, CD236R, CD200, cdx-1, cdx-2, cleaved caspase 3, cleaved CK18, cyclin D1, CK5/6, CK8/18, CK13, CK17, CK18, desmin, D2-40, E-cadherin, EGFR, ER, FDC, fascin, G-CSF, GLP-1, gramzyme B, HCG ( $\alpha$ ), hemoglobin F, inhibin $\alpha$ , Ki-67 (MIB-1), MCM2, melan-A, melanoma, melanosome, MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6, MUM1, myoglobin, P504S, p27, p63, PTH, perilipin, pepsinogen I, peptide YY, perforin, plectin, PgR, proteasome, proton pump, PSA, RUNX3, secretory component (H-300), sox2, TTF-1, thrombomodulin, uroplakin III, villin, VIP, Willm's tomor 1 protein, Aspergillus sp., <i>B. henselae</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>T. pallidam</i> , CMV, EBV-EBNA & LMP, Influenza virus type A & B, HBc-Ag, HCV, Mumps virus, Parvo virus B19, Measles virus, MCPyV



図 1 加熱処理に用いる圧力鍋 (T-FAL) と電磁調理器

## ヘマトキシリン核染色への影響

2倍マイヤー・ヘマトキシリン液（武藤化学）を用いて検討した。染色条件は、①ヘマトキシリン液 10秒 → ②流水水洗 3分 → ③PBS (pH 7.2)による色出し 1分 → ④流水水洗 3分 → ⑤脱水・透徹・封入として統一した。できるだけ均一な連続切片を得るために、パラフィンブロックを冷やさず、自動加湿器を併用する廣井らの方法<sup>9)</sup>で、一定のスピードを維持して連続切片を作製した（設定目盛 2 μm）。再現性を確認するために、同一条件で各 2枚ずつ染色を行った。賦活化溶液の pH 9 溶液（抗原賦活化溶液 pH 9）は、ニチレイバイオサイエンス社より提供された。

各種抗原賦活化法におけるヘマトキシリン核染色像を図 2 に示す。A：賦活化なし、B：PK 処理、C：CB6 溶液および D：CB7 溶液（10 mM クエン酸緩衝液, pH7.0）による加熱処理では、ヘマトキシリンの染色性が良好で十分なコントラストが得られた。E：EDTA 溶液では、極端な染色性の低下が生じて全体が不明瞭な染色像となった。F：EDTA ベースである pH9 溶液では、上記の処理と比較して若干染色性が低下したが、陽性シグナルとのコントラストは最も優れていた。

なお、EDTA 溶液による加熱処理の場合、図 3 に示すように、ヘマトキシリンの染色時間を延長することで染色性の低下を補うことができる。EDTA 溶液による加熱処理では、5 倍以上の核染色時間が推奨されているが<sup>6)</sup>、今回使用したヘマトキシリン液の場合も、5 倍程度に相当する 1 分以内が至適域だった。染色時間を延長しすぎるとヘマトキシリンと陽性シグナルの色が重なって判定に影響が出た。とくに核内抗原の場合は、薄めに核染色を行うことを心がけるとよい<sup>10)</sup>。

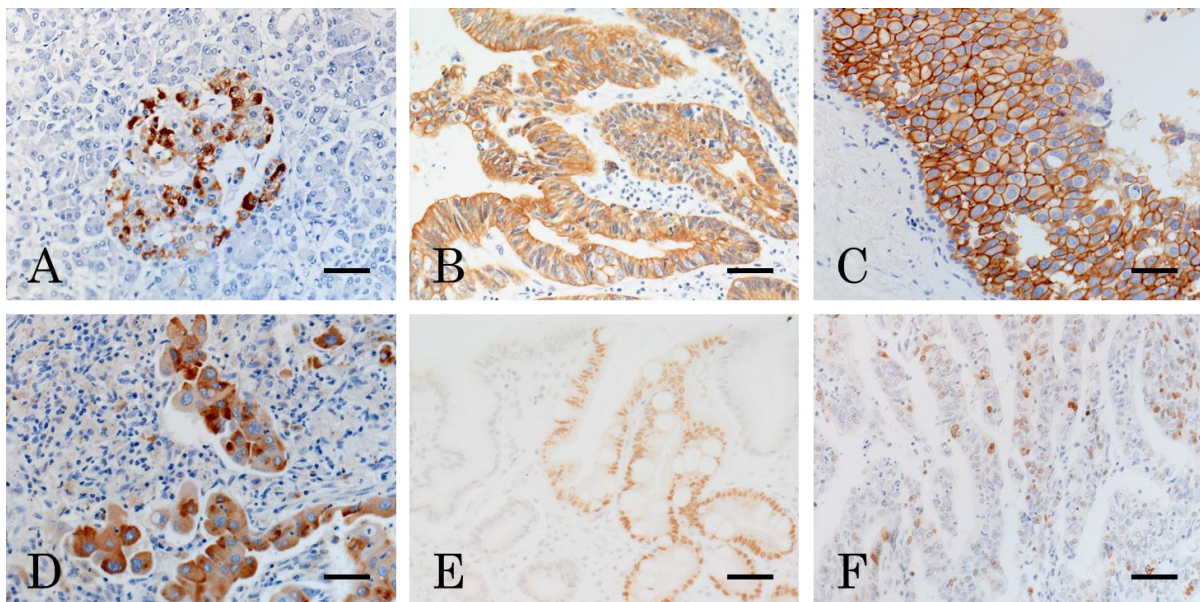


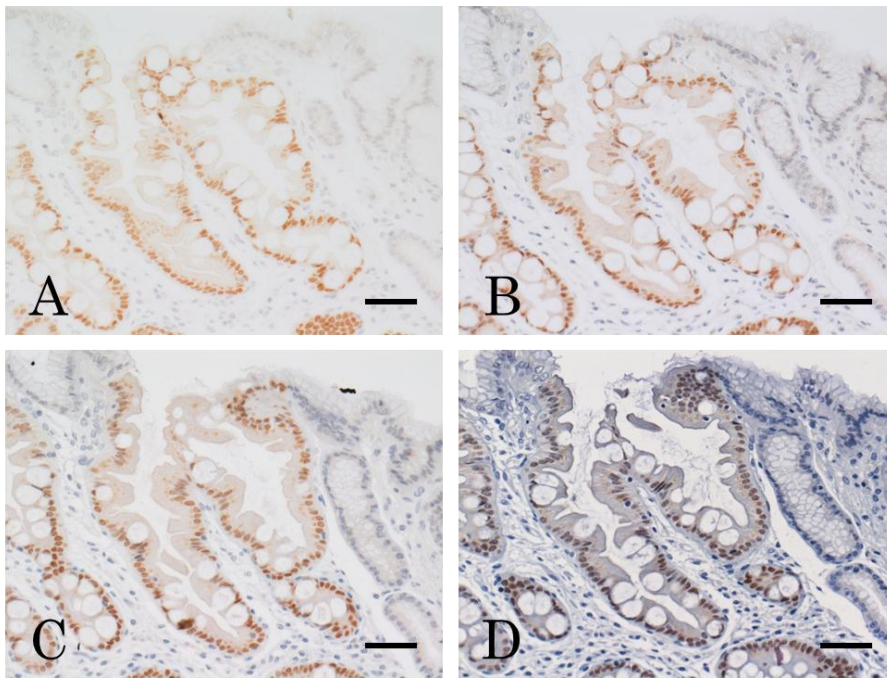
図 2 各種抗原賦活化法におけるヘマトキシリン核染色の比較

A: Insulin（賦活化処理なし、膵臓）、B: Cytokeratin\_MNF116（Proteinase K 処理、胃癌）、C: HER2（CB6 溶液による加熱処理、乳癌）、D: Napsin A（CB7 溶液による加熱処理、肺癌）、E: CDX2（EDTA 溶液による加熱処理、胃の腸上皮化生）、F: Ki-67\*（pH9.0 溶液\*\*による加熱処理、大腸癌）、Bars = 50 μm

\*抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体（ニチレイバイオサイエンス社, clone: SP6）

\*\*抗原賦活化液 pH 9（ニチレイバイオサイエンス社）





**図3** ヘマトキシリン核染色の経時的変化

EDTA 溶液による加熱処理を用いた CDX2 免疫染色 (胃の腸上皮化生)  
 A: ヘマトキシリン 10 秒浸漬、B: ヘマトキシリン 30 秒浸漬、C: ヘマトキシリン 1 分浸漬、D: ヘマトキシリン 3 分浸漬、Bars = 50  $\mu$ m

#### メチルグリーン核染色への影響

1%メチルグリーン液 pH 4.0 (自家製) を用いて検討した。染色条件は、①1%メチルグリーン液 5 分 → ②水洗 5 秒 → ③無水エタノールによる脱水 3 槽 (すばやく) → ④透徹・封入として統一した。切片作製は上記の方法に準じる。

メチルグリーンは二本鎖 DNA と特異的に結合する性質がある。加熱処理によって二本鎖 DNA が一本鎖 DNA に解離するため、メチルグリーンの極端な染色性低下につながる<sup>1), 2), 11)</sup>。図 4 に示すように、加熱処理のうち EDTA 溶液および pH 9 溶液で染色性の低下が目立った。ヘマトキシリンの場合でも同様の傾向があり、高 pH 溶液の場合は“核染色を長めにする”配慮が必要である。メチルグリーンの染色性が悪い場合は、染色時間を延長するより濃度を上げて対応するほうが効果的である (図 5)。

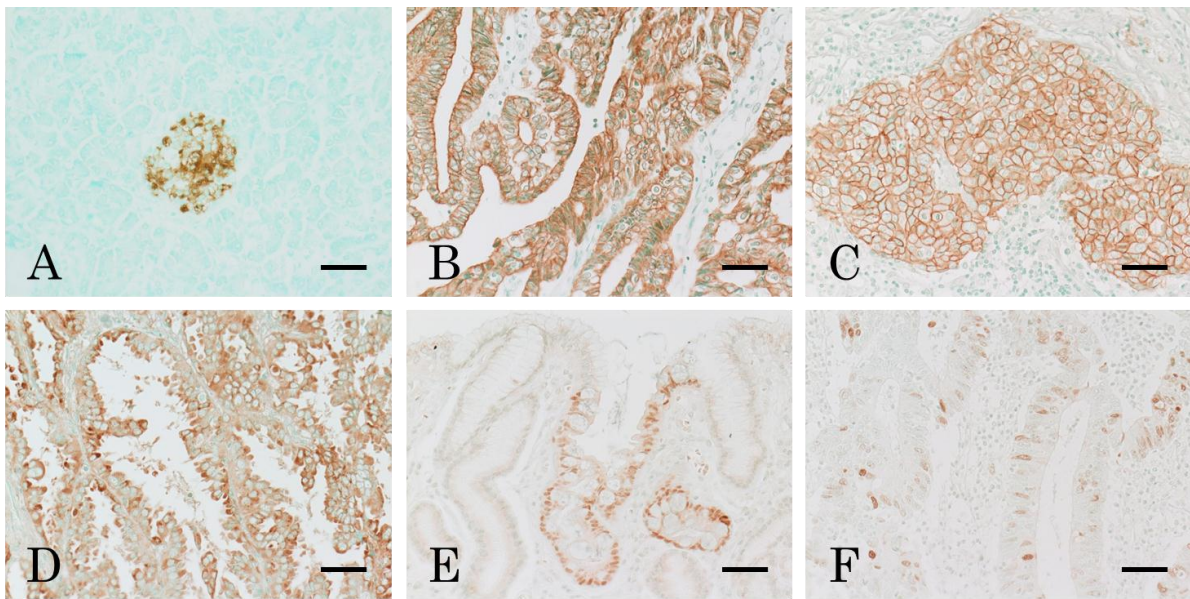


図4 各種抗原賦活化法におけるメチルグリーン核染色の比較

A: Insulin (賦活化処理なし、膵臓)、B: Cytokeratin\_MNF116 (Proteinase K 処理、胃癌)、C: HER2 (CB6 溶液による加熱処理、乳癌)、D: Napsin A (CB7 溶液による加熱処理、肺癌)、E: CDX2 (EDTA 溶液による加熱処理、胃の腸上皮化生)、F: Ki-67\* (pH 9 溶液\*\*による加熱処理、大腸癌)、Bars = 50  $\mu$ m

\*抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体 (ニチレイバイオサイエンス社, clone: SP6)

\*\*抗原賦活化液 pH 9 (ニチレイバイオサイエンス社)

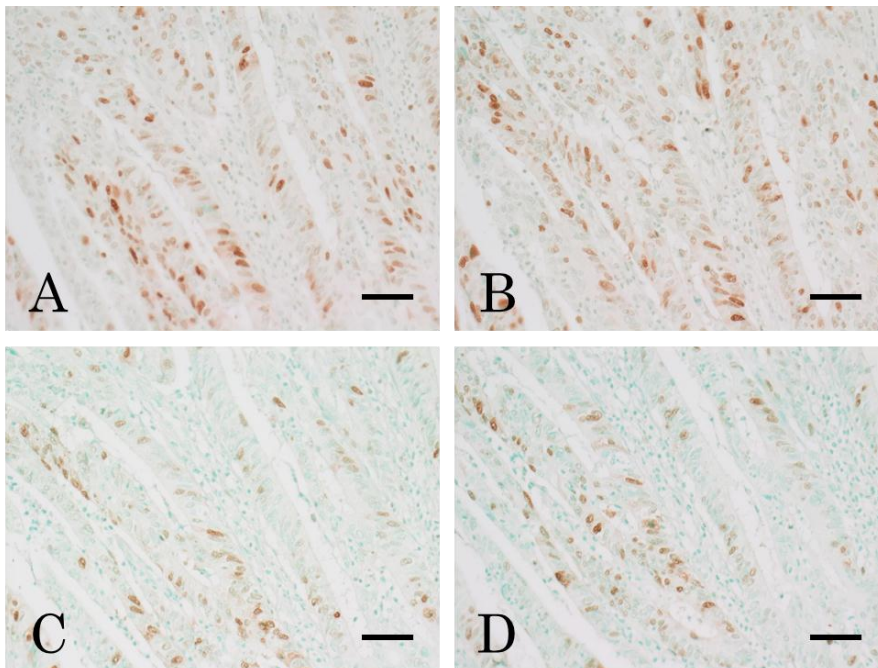


図5 メチルグリーン核染色の経時的変化

pH 9 溶液\*による加熱処理を用いた Ki-67\*\*免疫染色 (大腸癌)  
A: 1%メチルグリーン溶液 10分浸漬、B: 1%メチルグリーン溶液 20分浸漬、C: 3%メチルグリーン溶液 10分浸漬、D: 3%メチルグリーン溶液 20分浸漬、Bars = 50  $\mu$ m

\*抗原賦活化液 pH 9 (ニチレイバイオサイエンス社)

\*\*抗Ki-67 ウサギモノクローナル抗体(ニチレイバイオサイエンス社, clone: SP6)



## 内因性ペルオキシダーゼ阻止による核染色への影響

内因性ペルオキシダーゼ阻止を 1%過ヨウ素酸処理 (10 分) で行うと<sup>12)</sup>、図 6 に示すように、 $H_2O_2$  加メタノールによる場合と比べて、若干ヘマトキシリンの染色性がよくなる傾向があることも知っておきたい。

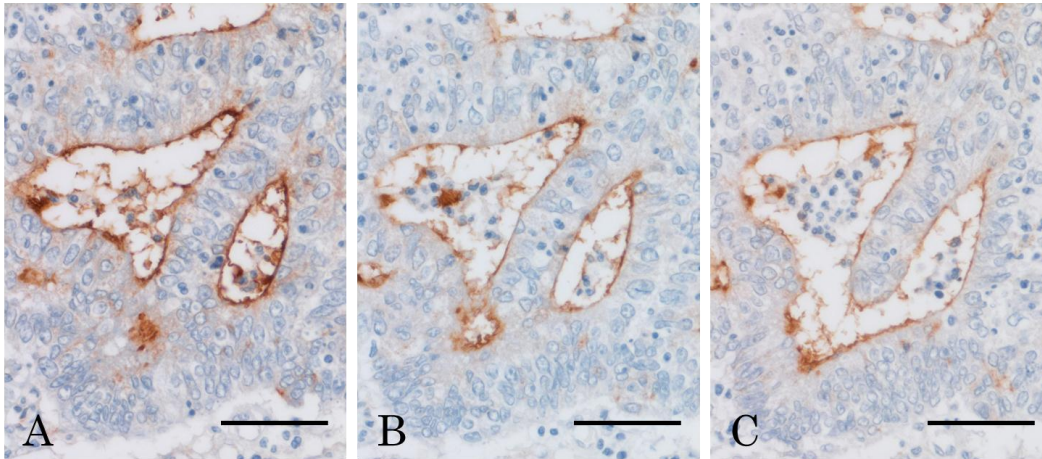


図 6 各種内因性ペルオキシダーゼ活性の除去における核染色の比較

CB6 溶液による加熱処理を用いた EMA 免疫染色 (大腸癌)

A: 1%過ヨウ素酸水溶液 10 分、B: 0.3%過酸化水素加メタノール 30 分、C: 3%過酸化水素水 30 分、Bars = 50  $\mu$ m

## おわりに

一般に、高 pH 溶液を用いた加熱処理において、核染色の減弱を経験するが、その原因は明確にされていない。今回の検討から、EDTA 溶液あるいは高い pH に原因があると推測される。この件に関しては、今後の検討課題である。

自動免疫染色装置の普及、抗体や検出試薬および技術の向上により、明瞭な陽性シグナルを誰でも検出できる時代に突入している。しかし、いつの時代でも、細かな変化に気づき、よりよい標本作製ができる病理技術者が求められている。今回紹介した内容に限らず、先人たちが築きあげた技術を継承することが、さらなる技術向上の道へとつながる。本稿が、免疫染色に携わる皆さまの役に立つことができれば幸いである。

## 参考文献

- 1) 名倉 宏、長村義之、堤 寛：渡辺・中根 酵素抗体法. 学際企画
- 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第 11 回. 抗原性賦活法. 病理と臨床 23: 189-198, 2005
- 3) Shi SR, Cote RJ, Young LL, et al: Antigen retrieval immunohistochemistry: Practice and development, J Histotechnol. 20: 145-154, 1997
- 4) 藤田浩司：免疫組織化学染色における抗原賦活の原理について考える. ニチレイバイオサイエンス社 免疫染色玉手箱
- 5) 桑尾定仁：分子病理診断時代の免疫組織化学—あなたは固定をとりますか？それとも賦活化をとりますか？— 日本組織細胞化学会 (編)：組織細胞化学 2008. 学際企画, 149-163, 2008
- 6) 鴨志田伸吾：免疫染色 至適条件決定法. 学際企画
- 7) 鈴木 舞、鴨志田伸吾：免疫染色の精度管理. 検査と技術. 36 (3): 263-266, 2008
- 8) 丸山活司、森谷 純、清水幹雄、他：より良好な免疫染色の追求 圧力鍋を用いた抗原賦活化と精度管理. 医学検査. 51: 1503-1508, 2002
- 9) 廣井貞之：ホルマリン固定・パラフィン切片作製の技術. 連続切片. Medical Technology 39: 795-800, 2011
- 10) 中島 研：免疫染色における後染色. ニチレイバイオサイエンス社 免疫染色玉手箱



11) 堤 寛：免疫染色の落とし穴と工夫. 組織細胞化学 2014: 39-51, 2014

12) Isobe Y, Chen ST, Nakane PK, et al: Studies on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium. I. Improvements in the peroxidase-labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. Acta Histochem Cytochem. 10: 161-171, 1977