

## 免疫染色における positive および negative control の意義

慶應義塾大学医学部病理学教室

鈴木一生

### 【はじめに】

免疫組織化学染色（以下、免疫染色と記す）は病理診断において、いまや必須の技法であることは周知のことであり、免疫染色が必要となる症例は、全症例の 5% と言われている。現代の医学において免疫染色業務に携わる臨床検査技師は病理診断や治療方針決定に大きな影響を与える免疫染色について熟知し、正しい染色結果なのかを判断できなければならない。そこで、染色結果評価のために重要になってくるのがコントロールである。本稿では positive および negative control の意義とともに、その結果の解釈や注意点について解説する。

### 1 negative control

negative control を用いる理由は、偽陽性の証明である。偽陽性とは共染や目的のもの以外が染まってしまうことであるが、その原因として一次抗体の希釈間違い、抗体のかけ違い、内因性ペルオキシダーゼの不活化不良、抗体反応中のスライド乾燥など染色工程での人為的ミスおよび一次抗体の非特異的反応などが挙げられる。不可解な染まりを呈した時に、人為的ミスの場合は抗体や DAB 反応液を新調し再染色を行えば解決することが多い。一方、特に問題となるのが、非特異的な染色結果が得られた場合である。非特異的反応の有無を確認するための negative control としては以下の方法がある。

- ① 一次抗体の代わりに同種動物免疫グロブリン濃度の他抗体を用いる。
- ② 一次抗体の代わりに同じ免疫グロブリン濃度の同種動物正常血清を用いる。
- ③ 一次抗体の代わりに PBS を用いる。

抗体が目的物以外に染まった時、①で同部位が染まらなければ、それは非特異的反応ではなく、その抗体共通の抗原決定基が他の部位でも存在していることを示し、正当な染色性と判断できる (Fig.1)。一方、②で陽性となり③で陰性となれば一次抗体が由来する動物種免疫グロブリンの非特異的反応とわかる。

なお、negative control をすべての免疫染色に使用するのは日常業務的に現実的ではなく、初めて染色する抗体や反応性が不安定な抗体に対して有効である。すなわち、普段使いなれた、染色性を十分に理解している抗体に関しては不要である。

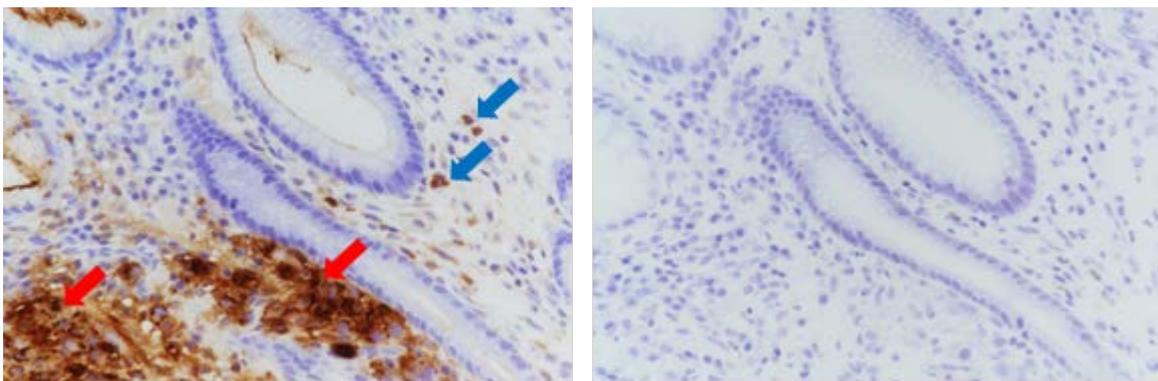


Fig.1 胃印環細胞癌に対する染色結果。左 CEA、右 AFP

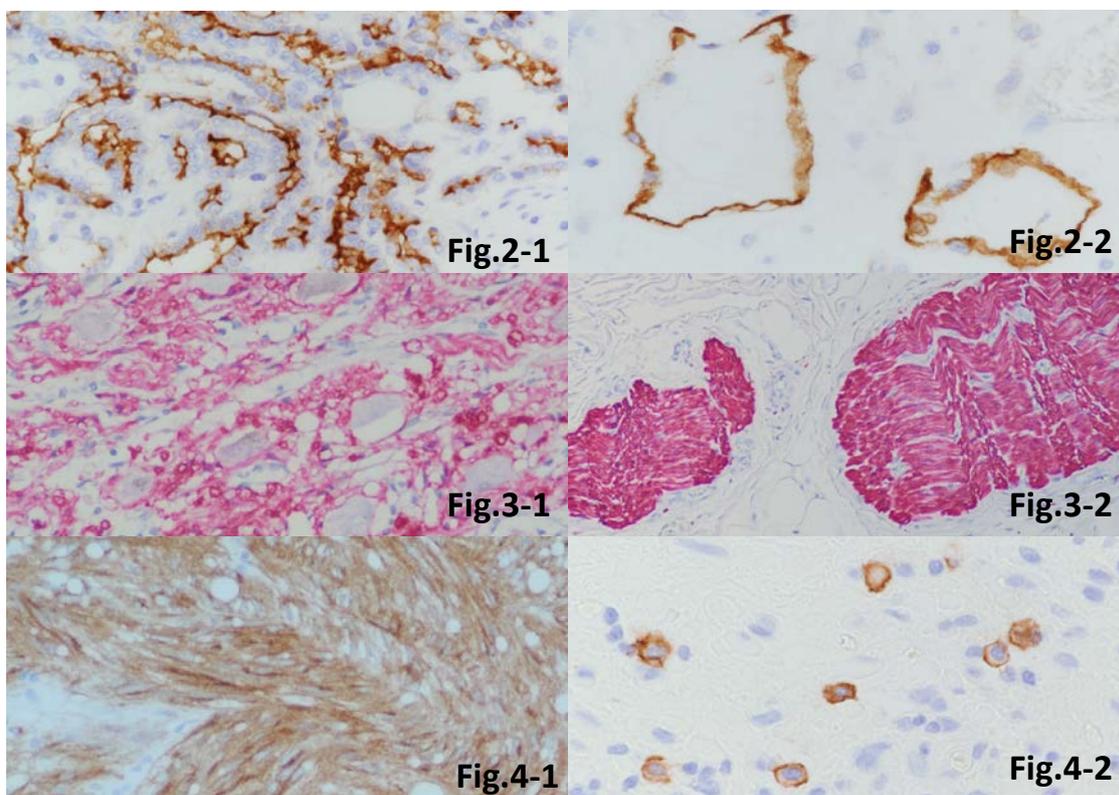
CEA では腫瘍細胞 ↑ の他に好中球 ↑ に陽性所見が見られるが、AFP では好中球陰性である。

## 2 positive control

positive control を用いる理由は偽陰性の証明である。偽陰性は様々な原因で起こりうることを知っておく必要がある。パラフィン切片を用いる場合、固定液の種類や固定時間により染色性が減弱あるいは消失することがある（→総論 8 項 固定および包埋による抗原性の失活・流出 参照）。また、抗原賦活化の処理不良（賦活化液の種類、賦活時間、温度）、一次抗体や二次抗体の劣化、発色液の調製不良、手技中のミスなどが挙げられる。これらの原因によって偽陰性化された結果を評価する方法として positive control は有用である。

### 1) positive control の選択

抗体データシートや文献等で陽性となる物質や組織、正しい発現・局在パターン、基本的なプロトコールを確認すること。Web 上にも抗体ごとに詳しく説明されたホームページが存在するので大いに参考にすると良い。positive control の種類としては、既知の陽性（病変）症例を用いる方法や、臓器・病変・発現レベルの異なる多症例の組織を基盤の目状に並べて包埋したブロックを使用するマイクロアレイ法、剖検例などを利用し、諸正常組織の小片を羊膜で巻いて作製した multi-tissue control block などがある。また、リンパ球マーカーや細胞骨格蛋白など同一切片上に陽性部位が存在するものはインナーコントロールとして利用できる。すなわち、病変部と正常部で陽性を示すことが既知の場合は指標とすることができる (Fig.2~4)。それぞれの方法についての長所短所を示す(表 1)。



**Fig.2** D2-40 における中皮腫 (Fig.2-1) とリンパ管 (Fig.2-2) の染色性。

**Fig.3** S100 における悪性黒色腫 (Fig.3-1) と神経細胞 (Fig.3-2) の染色性。

写真はアルカリホスファターゼ標識、ファースト赤発色。

**Fig.4** c-kit における GIST (Fig.4-1) と肥満細胞 (Fig.4-2) の染色性。

表 1 positive control の長所・短所

方法	長所	短所
陽性(病変)組織	同じ陽性組織を使い続けることで、前回と比較でき染色性が安定する。	陽性組織の選定には、十分な配慮が必要である。
マイクロアレイ法	多くの症例を1枚のスライド上で比較でき、評価できる。	組織をくりぬくため、大事な症例を損失してしまう。組織を集めるのに時間がかかる。
正常組織 multi-tissue control block	多組織から構成され、汎用性が高い。	組織を集めるのに時間がかかる。
インナーコントロール	同一切片上の陽性部分を指標とするため、コントロールを用意する手間が省ける。	同一切片上に陽性部が必ずあるとは限らない。病変部などと同じ感度で染まるとは限らない。

## 2) positive control の使用と評価における注意点

すべての染色抗体について positive control を使用するのが理想的だが、費用や運用上の点から困難であることが多い。免疫染色の結果判定には、定性的あるいは定量的な評価がなされる。定性的な評価を行うものに関しては、先に述べたインナーコントロールで対応できる場合が多い。一方、ER、PgR、HER2 蛋白など定量的な評価を行い、そのスコアが臨床的な治療に重要な影響を及ぼすものは、ただ単純に強く染まればよいというのではなく、positive control と当該スライドを比較することによって組織の状態や染色工程の不具合を確認することが重要となる。以下に定量評価における positive control の注意点を述べる。

- ・強陽性のもの (HER2 における 3+ 症例等) は避ける。抗原が過剰に発現して強く染まり過ぎる組織や固定条件が良い組織を positive control として用いた場合、剖検症例や過固定された組織に対して反映されるとは考えにくい。1+~3+ という概念からいえば 2+ ぐらいの組織を選定したい。HER2 の positive control は典型的な 1+~3+ 症例を同一切片上にのせておく評価しやすい (Fig.5)。
- ・薄切後、あまりにも時間が経過したコントロール切片の使用は避ける。p53、MIB-1、ER、PgR、HER2 など、特に核内に抗原を有するものは薄切後の時間経過とともに抗原性が減弱する。我々の施設では、防止策として薄切した日時をスライドに記載し、切片表面をパラフィンでカバーをするなどの対策を行っている (Fig.6)。

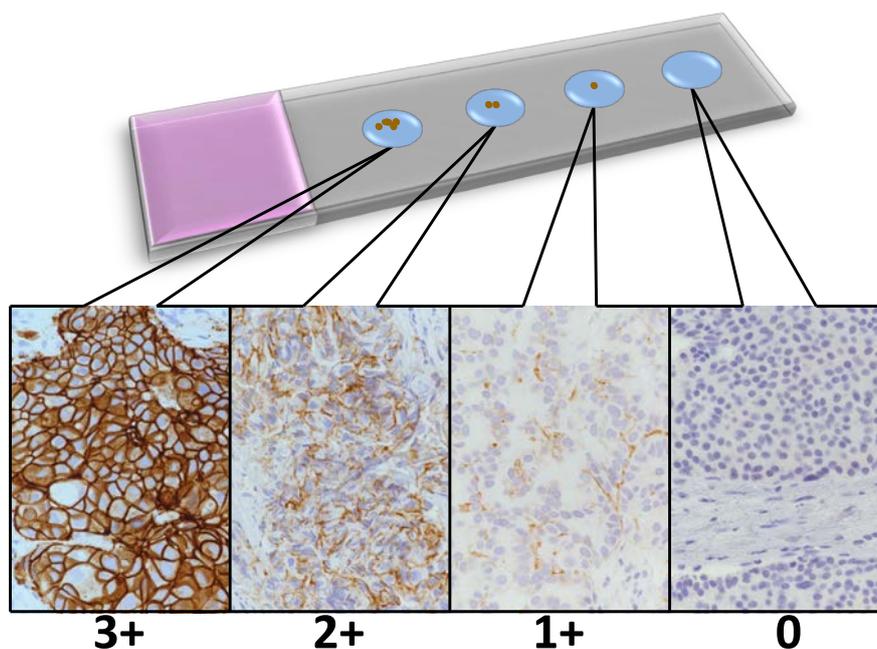


Fig.5 1スライドに3+~0の切片をのせたHER2 positive control



Fig.6-1 コントロール切片の表面をパラフィンコートする機器。

Fig.6-2 パラフィンコートされたコントロールスライド。

### 【おわりに】

免疫染色は病理診断の際に、重要な決め手のひとつとなる情報を提供するが、これまで述べてきたように、先週まで染まっていたものが急に染まらなくなることも少なくなく、染色結果が不安定になることが多々ある。検査室や研究室に自動免疫染色装置が普及し、染色性は標準化されつつあるが、すべての抗体に対応できるとは言い難く、用手法で行わなければならないものも多く存在する。また、次々と新しい抗体が作製されており、それに伴い染色条件の決定や、コントロールとなる組織を選定する機会が多くなることが予想される。各施設の状況により一概には言えないが、病理医と技師が染色条件や結果において定期的にディスカッションができるような環境が望ましく、これを通じて技師の染色技術の向上や染色結果に対する正しい解釈につながるのである。お互いに連携を取り合える環境でありたいと考える。

本稿により **positive** および **negative control** の意義を理解し、免疫染色の技術向上の役に立てれば幸いである。

### 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) 鴨志田伸吾：免疫染色 至適条件決定法. 学際企画
- 3) 古屋周一郎：コントロールの効果的な使い方と評価. *Medical Technology* 37: 1279-1284, 2009
- 4) 塩竈和也、堤寛：抗原性賦活化が核染色に及ぼす影響. 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（偏）：組織細胞化学 2008. 学際企画, 149-163, 2008
- 6) 伊藤智雄：免疫染色の精度管理. *診断病理* 2012,29(3) 179-187