

## 生体色素標本の免疫組織学的染色法

順天堂大学医学部附属練馬病院 臨床検査科

青木 裕志, 浅見 志帆, 鈴木 さやか, 根本 明子

### 【はじめに】

組織標本上には種々の色素が見られる。これらの色素は生体内での病的な沈着や標本作製時のアーティファクトとして生じ、生体色素（表1）と呼ばれている。

生体色素はその由来や性状により十数種類に分類され、その存在は病変を診断する上での手掛かりとなるが、一方で、過剰の色素沈着は免疫染色結果の評価を困難にする場合がある。

本稿では、日常遭遇しうる生体色素のうちヘモジデリン、メラニン、ホルマリン色素を取り上げ、生体色素と陽性部位の識別を容易にする免疫染色手技について解説する。

表1 生体色素の分類と性状

	色素名	形態	性状(消化・溶解性)
血色素由来 (Hematogenous pigment)	ヘモグロビン (Hemoglobin)	赤～黄褐色, 顆粒状	
	ヘモジデリン (Hemosiderin)	黄褐色, 顆粒状	酸(10%塩酸, 10%シュウ酸)
	ヘマトイジン (Hematoidin)	黄褐色, 顆粒状	クロロホルム, アルカリ
	胆汁色素 (Bile pigment)	黄橙色～緑褐色, 顆粒状	クロロホルム, アルカリ
	ポルフィリン (Porphyrin)	赤褐色, 顆粒状	
非血色素由来 (Non-hematogenous pigment)	カロテノイド (Carotenoid)	黄～赤色	酸化(1%クロム酸, 1%重クロム酸カリウム)
	メラニン (Melanin)	黄褐色～黒褐色, 顆粒状	酸化(0.25%過マンガン酸カリウム)
	クロマフィン (Chromaffin)	暗褐色, 顆粒状	
	リポフスチン (Lipofuscin)	黄～褐色, 顆粒状	
	セロイド色素 (Ceroid pigment)	黄～褐色, 蠟質様	
アーティファクト・その他 (Artifact pigment)	マラリア色素 (Malarial pigment)	黒褐色, 顆粒状	アルカリ
	ホルマリン色素 (Formalin pigment)	褐色, 顆粒状	アルコール性アルカリ

### 【免疫染色の実際】

免疫組織学的染色法（以下、免疫染色）では標識酵素にペルオキシダーゼ（以下、POD）、発色基質にジアミノベンジジン（以下、DAB）を用いる方法が一般的であるが、発色の色調が褐色であるため、同系色の生体色素が存在する標本では、免疫染色の結果判定に苦慮する症例が少なくない。

以下に、生体色素との鑑別を容易にする染色手技について簡単に述べる。

## 1. 発色系

免疫染色の標識酵素および発色基質を表 2 に示す。標識酵素と発色基質の組合せを変え、生体色素と異なる色調で発色させることにより、生体色素と陽性部位との識別を容易にすることが可能である (図 1)。詳しい染色方法については成書を参考されたい。

発色基質の種類により封入剤の選択が必要な場合や染色標本の安定性が劣るものもあり、発色系の選択に際しては、これらの点についても考慮する必要がある。

表 2 標識酵素と発色基質

標識酵素	発色基質	色調	封入剤	溶解性
ペルオキシダーゼ (Peroxidase: POD)	ジアミノベンジジン (3, 3-Diaminobenzidine: DAB)	褐色	疎水性	
	アミノエチルカルバゾール (3-Amino-9-ethylcarbazole: AEC)	赤色	水溶性	アルコール, キシレン
アルカリフォスファターゼ (Alkaline phosphatase: ALP)	BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl phosphate/Nitro blue tetrazolium chloride)	青紫色	水溶性	アルコール
	ファーストレッド (Fast red)	赤色	水溶性	アルコール, キシレン
	ニューフクシン (New fuchsin)	赤色	疎水性	

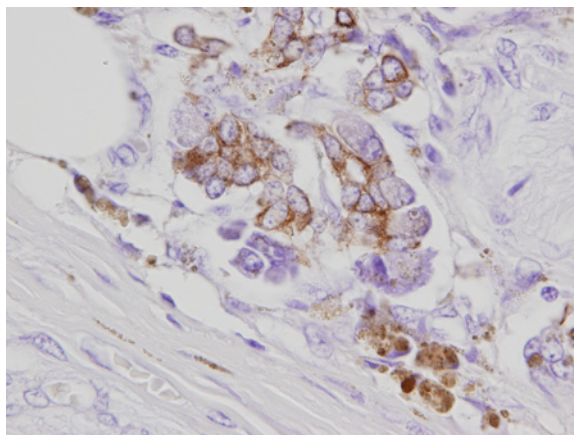
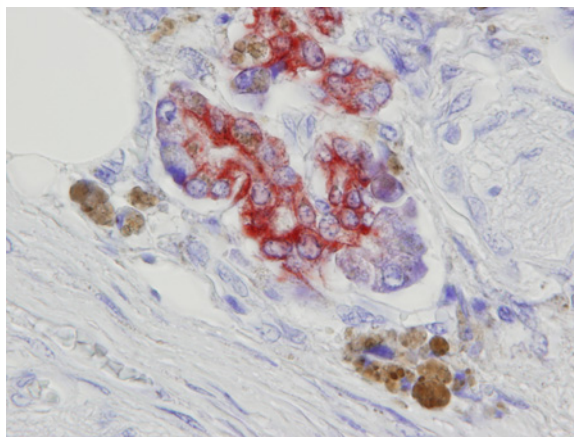


図 1 膵臓ヘモジデローシス例における  
Cytokeratin (CAM5.2) 染色像

a) 発色基質に DAB を用いた場合、ヘモジデリン顆粒と陽性部位の鑑別が困難である。



b) AEC では陽性部位が赤色に染色され、ヘモジデリン顆粒と明瞭に区別される。

## 2. 生体色素の脱色・除去

一部の生体色素は、酸・アルカリに対する溶解や酸化・還元による脱色などの性質を有している。この性質を利用し、生体色素を脱色・除去することにより陽性部位の観察を容易にする（図2）。基本的な染色手順を表3に、脱色・除去後の免疫染色結果を表4に示す。使用する溶液の濃度や処理時間、さらには一次抗体の種類によっても免疫染色の反応性が変化するため、各施設で適した条件設定を行う必要がある。

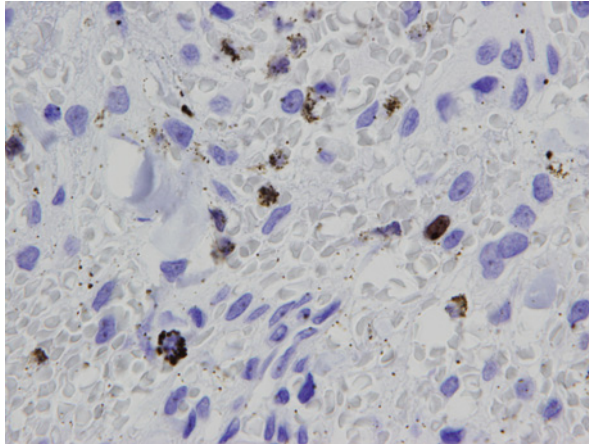
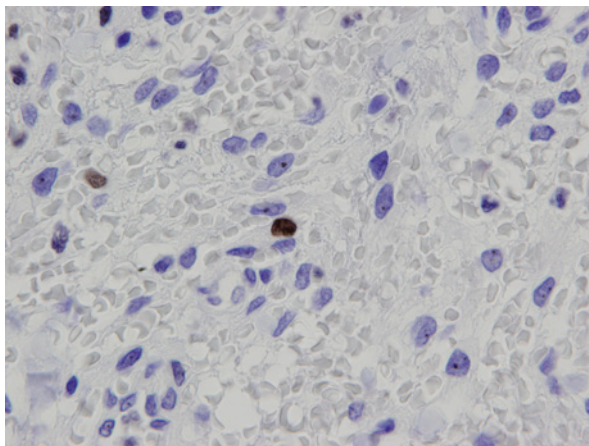


図2 脳髄膜腫例における  
Ki-67 抗原 (MIB-1) 染色像

a) ホルマリン色素が沈着し、陽性細胞の判定が困難である。



b) ホルマリン色素除去後、免疫染色標本では陽性細胞の判定が容易である。

表3 生体色素脱色・除去染色手順

- 1) 脱パラフィン
- 2) 生体色素脱色・除去処理<sup>※1</sup>
  - ①ヘモジデリン：10%シュウ酸水溶液（30～120分）
  - ②メラニン：0.25%過マンガン酸カリウム水溶液（15～30分）<sup>※2</sup>，  
2%シュウ酸水溶液（30秒）
  - ③ホルマリン色素：10%アンモニア 70%エタノール溶液（30～60分）
- 3) 抗原賦活化
- 4) 一次抗体
- 5) 二次抗体
- 6) 発色
- 7) 後染色
- 8) 脱水，透徹，封入<sup>※3</sup>

※1 生体色素量に応じ、時間を調整するが、完全に消失しない症例もある。

※2 処理時間に比例し、組織障害が強くなるため必要以上に長くしない。

※3 発色基質により封入方法を変える。

表 4 免疫染色結果

抗体名	Clone	10%シュウ酸 処理	0.25%過マンガン酸 カリウム処理	10%アンモニア 70%エタノール処理
Cytokeratin wide spectrum	Rabbit Poly	+	-	+
Cytokeratin	CAM5.2	+	-	+
Epithelial membrane antigen(EMA)	E29	+	-	+
Carcinoembryonic antigen(CEA)	II-7	+	+	+
Vimentin	V9	+	-	+
Desmin	D33	+	-	+
α-SMA	1A4	+	+	+
S-100	Rabbit Poly	+	±	+
CD3	F7.2.38	+	-	+
CD20	L26	+	-	+
CD34	My10	+	-	+
CD45	2B11+PD7/26	+	-	+
CD45RO	UCHL1	+	-	+
CD79α	JCB117	+	-	+
CD68	KP1	+	-	+
Synaptophysin	Snp88	+	-	+
Chromogranin A	DAK-A3	+	+	+
D2-40	D2-40	+	-	+
Ki-67	MIB-1	+	-	+
p53	DO-7	+	-	+

未処理標本と染色結果を比較し殆ど変わらない (+), 減弱 (±), 陰性化または異常反応 (-)



### 3. 後染色

後染色により生体色素を他の色調に変化させることで、免疫染色陽性部位との識別を容易にする。ヘモジデリンはベルリン青染色を行い青緑色に、メラニンもギムザ染色を行い黒緑色にそれぞれ呈色させることにより、発色基質に DAB を用いることが可能となる (図 3)。

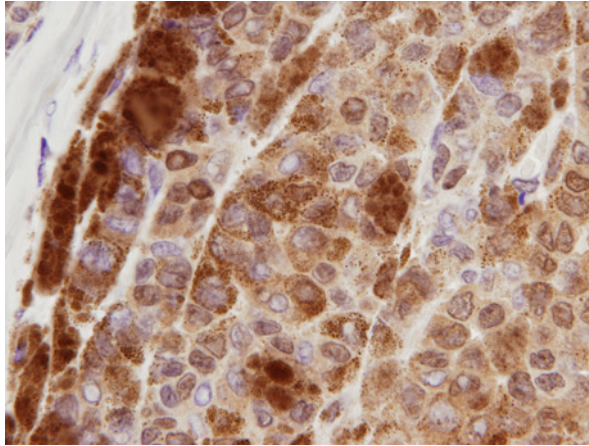
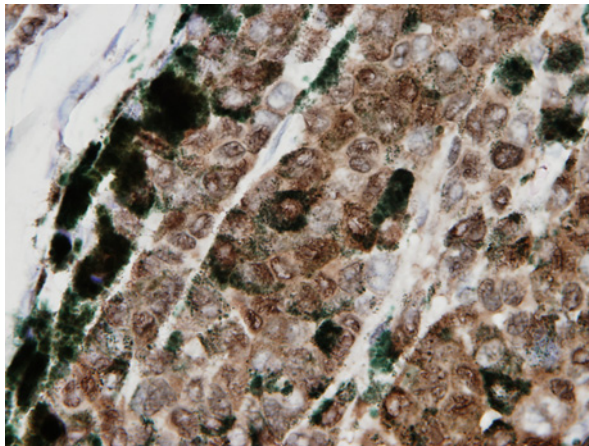


図 3 皮膚悪性黒色腫例における  
S-100 蛋白染色像

a) メラニン顆粒と陽性部位が不明瞭である。



b) ギムザ染色で後染色を行うとメラニンは黒緑色に染色され、陽性部位が明瞭に区別される。

#### 【おわりに】

近年、免疫染色は病理診断のみならず治療方針に直結する情報を診療の場へ提供するようになった。したがって、免疫染色の結果判定が重要であるということはいふまでもない。組織標本上には様々な生体色素が観察され、時として免疫染色の結果判定に支障をきたす場合があるが、生体色素の種類により適した染色法を選択し、診断に適した標本作製に努める事が重要である。