

術中迅速診断における迅速免疫染色について

- 細胞診材料への応用 -

日本医科大学多摩永山病院病理部
片山博徳、前田昭太郎

はじめに

免疫化学染色の1つである酵素抗体法は光学顕微鏡下で標的抗原の局在を観察でき、病理診断においても特異性に優れた特殊染色として広く用いられている。

術中迅速診断は、手術中に腫瘍の良悪性の判定、悪性であればその組織型やその広がりなどの診断などを行うことにより、正確でより効果的な手術をする目的で行われている。細胞診は迅速組織切片に見られるような凍結による artifact がなく、細胞個々の観察に最適である。また、手技も簡単で、短時間で染色もでき、術中迅速診断の手段の一つとして重要な位置を占めている。

しかし、術中迅速診断は制約された条件下で行われ、時にその診断に苦慮することもある。そこで特異性に優れた特殊染色として広く用いられている免疫化学染色（酵素抗体法）を必要に応じて術中迅速診断に併用することによって、限られた時間の中でさらに精度の高い診断が期待できる。

今回、迅速細胞診断に免疫染色を併用するために、その技術的な事項を中心に現在までの経験に基づき述べる。

検体処理方法

検体の種類、性状により捺印法、擦過法、圧挫法を選択し、体腔液はサイトスピンを用いて処理を行っている。

この際に次のステップである固定が短時間で十分行われるように、材料の塗抹が厚くならないよう心掛けることも大切である。また、塗抹する面積もスライドガラス全面ではなく 25～32mm のカバーガラスで封入できる程度の範囲内に塗抹することにより、判定時間を短縮でき効果的である。この際には、細胞接着剤を塗布したスライドガラスに細胞を塗抹することが必要で、我々はシランコートのスライドガラスを用いている。また、陰性コントロール用のプレパラートを同時に作製することも忘れないようにする。固定液はパパニコロウ染色用の 95% のエタノールを用いて、固定時間は 1 分程度としている。

使用する抗体の濃度と反応時間

今まで使用した抗体は普段パラフィン切片に用いている物で、その濃度はパラフィン切片に用いるものより高濃度で使用している（表-1）。使用する抗体は反応時間を短くして、最良の結果が得られるように事前に検討した。

表-1 迅速免疫染色に使用している抗体

Antibody	Clone	Titer	
		rapid	regular
GFAP	6F-2	1:20	1:100
S-100	Cow-s100	1:20	1:200
Keratin	MNF116	1:20	1:100
CEA	COL-1	Predilute	Predilute
Vimentin	V9	1:10	1:50
LCA	2B11	1:20	1:100
CD3	T3	1:10	1:50
CD20	L26	1:20	1:50
Chromogranin A	DAK-A3	1:40	1:200
CK7	OV-TL 12/30	1:20	1:100
CK20	Ks20.8	1:10	1:50
NapsinA	TMU-Ad02	1:20	1:100
Villin	CWWB1	1:20	1:100

写真-1 は 1 次抗体（抗 Keratin）の反応時間による発色濃度を比較検討したものである。反応時間 3 分以上で十分な発色濃度が得られたが、1 分の反応時間では判定可能であるがやや発色濃度が弱く感じられた。検出法は 3 ステップアビジン-ビオチンシステムを使用し、これら 2 次抗体、標識試薬の反応時間も 1 次抗体と同様に事前に最適な反応時間を検討し、各々 2 分間で判定に十分な発色濃度を得ている。

写真-1 一次抗体の反応時間による発色濃度の比較

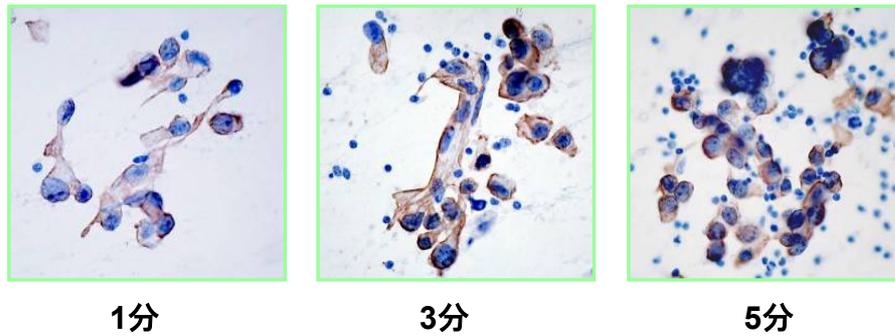


写真-2 は 2 ステップで免疫染色が可能なシンプルステイン（SS）とエンビジョン（EV）を用いて、反応時間は各々 1 分、3 分、5 分として発色濃度を比較検討したものである。1 次抗体は抗 Keratin 抗体を使用し反応時間は 3 分とした。1 分では発色濃度が薄く 3 分、5 分で判定に十分な発色濃度が得られた。反応時間が 5 分では背景にも弱く発色を認めた。

写真-2 検出系の反応時間による発色濃度の比較

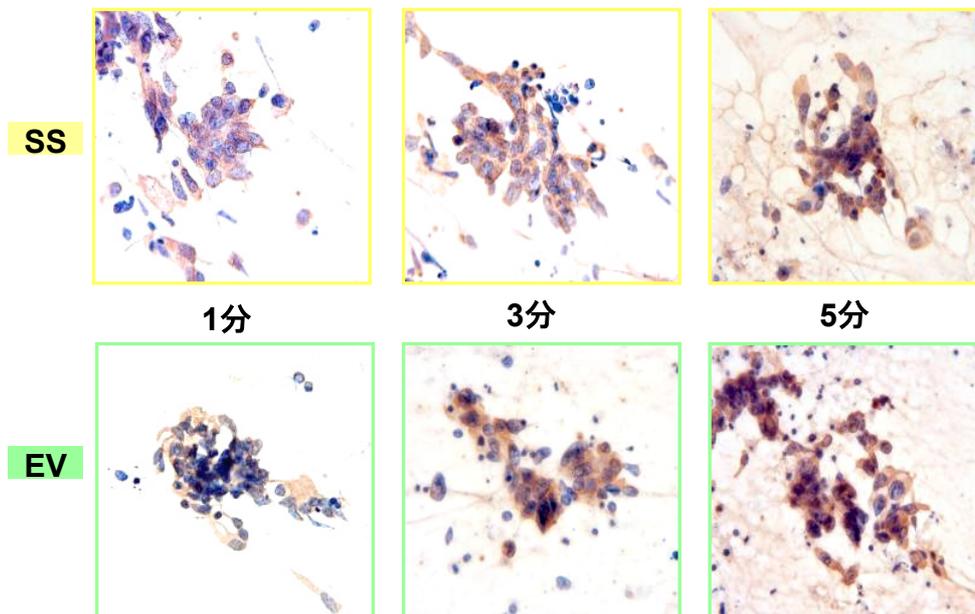
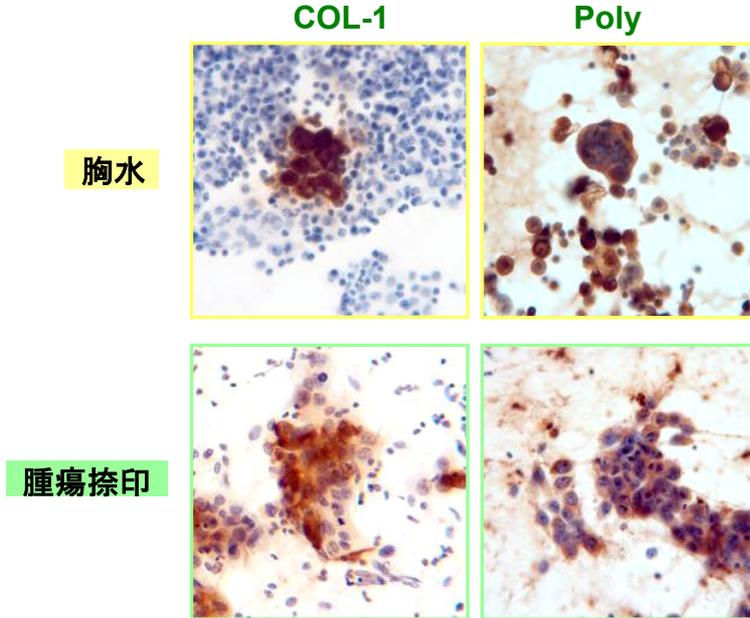


写真-3 は術中のリンパ節捺印材料（腺癌の転移）と胸水中の腺癌に対して 2 種類の抗 CEA 抗体を使用して迅速細胞免疫染色を行った。
non-specific cross-reacting antigen (NCA) に反応しないモノクローナル抗体 (COL-1) では、腫瘍細胞のみに明瞭な陽性所見を認めている。NCA 未吸収なポリクローナル抗体 (Poly) では、腫瘍細胞に陽性所見を呈しているが周囲の NCA を有する好中球にも発色を認めている。

写真-3 抗 CEA 抗体の NCA との交差反応



迅速免疫染色法

迅速免疫染色を行うにあたり用いた器具は、湿潤箱、洗浄ビン、マイクロピペットなど普段の免疫染色に使用しているもので特別な器具は使用していない。(写真-4)

固定、水洗し TTBS (Tween-20 加 Tris buffer saline) 洗浄後、1 次抗体を 3 分反応させる。非特異的反応などの確認のために用意した陰性コントロールは、1 次抗体の反応中は TTBS 中に入れておき、その後は検体と同様に反応をすすめる。3 ステップアビジン-ビオチンシステムでは 2 次抗体と酵素標識試薬は各々 2 分、2 ステップ法では標識抗体を 3 分反応させる。

抗体、標識試薬などは TTBS を用いて、洗浄ビンで 5~10 秒ほど洗浄するのみで十分である。発色基質は DAB (3,3'-diaminobenzidine) で 1~2 分反応させている。この発色基質について現在は、市販の DAB キットを使用している。以前は DAB を 25mg/100ml の濃度にした基質液を自家調整し使用していたが、現在は増感目的で DAB にイミダゾールを添加した試薬を使用している。

対比染色はマイヤーのヘマトキシリンを用いて、微温湯で洗浄後、判定までの時間を短縮させるために直ちにカバーガラスをのせて鏡検している。この際にグリセリンを使用すると封入がし易いようである。判定終了後に脱水、透徹、封入を行う。また、陽性コントロールは必要に応じて固定の良好なパラフィン切片を使用している。尚、内因性のペルオキシダーゼ活性の阻止、蛋白ブロックは結果の判定に支障がないために現在、この操作は省いている。このように 10 分程で判定が可能である。

免疫染色の判定に際しては、日頃からそれぞれの抗体の特異性、細胞における局在部位やそのパターンを熟知しておくことは精度管理のうえでも重要である。

他に免疫染色の迅速化には EPOS (Enhanced Polymer one-step Staining) 法などの one step 法やマイクロウェーブ照射などを用いる方法があり、試薬、抗体の管理や器具・機材の準備など、それぞれの施設で行いやすい方法を選択する事が良い結果を得るうえで最良である。また、今まで、迅速細胞診材料への迅速免疫染色について述べてきたが、この方法は凍結切片にも使用できる。この時の固定液は迅速ヘマトキシリン・エオジン染色用の酢酸、アルコール、ホルマリン (9 : 1 : 1) を使用している (時間は 15 秒~30 秒位)。

写真-4 湿潤箱と洗浄ビン



Humid chamber



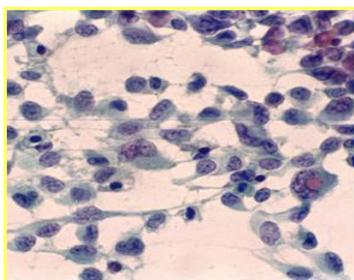
Wash bottle

症例提示

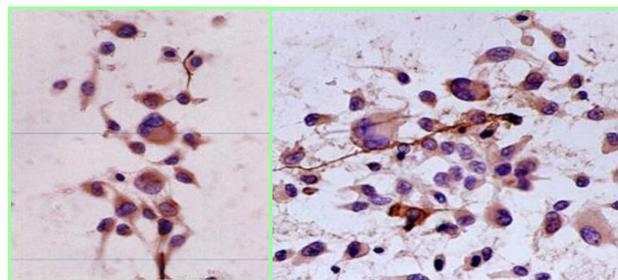
当院での迅速診断は原則的に予約制としており、その内容によるがほぼ全例に対し臨床と病理で症例検討を行うことにしている。この症例検討で術中に迅速免疫染色の必要性についても話し合われるために、抗体の準備などあらかじめ確認でき、当日、慌てることなく対応ができる。また、急な迅速免疫染色に対応するために抗体、試薬などの管理を普段から行っておくことも大切である。

写真-5 は脳腫瘍で Gemistocytic type の glioblastoma と最終診断された症例で、術前の臨床・病理症例検討を行いグリオーマ、転移性癌、悪性リンパ腫の鑑別を主目的とした術中迅速診断が行われた。術中の細胞、組織所見よりグリオーマを鑑別するために、術中迅速免疫染色を行った。異型グリア細胞に対して GFAP が陽性で keratin、LCA は陰性であり、術中迅速診断は肥胖細胞型の悪性グリオーマとして臨床へ報告した。

写真-5 膠芽腫（肥胖細胞型）



Pap染色



迅速免疫染色:GFAP

まとめ

以上、現在までの経験に基づいた迅速免疫染色の方法と実例を示してきた。

今後、患者への侵襲を最小限におさえるために縮小手術の傾向が進み、効率的な治療法が進歩するに従い、術中迅速診断にはより高い精度が望まれることになると思われる。

このような状況において、術中迅速細胞診は短時間で標本作製が可能であり、微小検体、液状検体、広い病変の検索などに有効な手段として、常日頃よりその診断能力を高める努力が必要である。そのうえで迅速診断時に組織発生に基づく診断に難渋し、しかもその診断が術式や治療方針を決定するうえで不可欠であるとき、鑑別診断に迅速免疫染色を併用することは有用である。