

# 酵素抗体法による免疫組織化学染色と特殊染色の二重染色

慶應義塾大学医学部病理学教室

阿部 仁

## はじめに

免疫組織化学は組織および細胞に存在する抗原の局在を証明する方法で、標識物質により大別すると、①蛍光抗体法、②酵素抗体法、③重金属抗体法がある。特に、酵素抗体法による免疫組織化学染色（以下、免疫染色）は、病理診断など形態学的観察においてさまざまな物質の局在証明に重要な役割を演じている。病理診断時にヘマトキシリン・エオジン染色（以下、H&E 染色）で特定不可能な細胞内外の物質、組織内病原体、内分泌細胞などの検出・同定・鑑別にアザン染色や鍍銀染色、グラム染色やワルチン・スターリー染色、グリメリウス染色などの特殊染色が使用されてきた。これらの特殊染色に代わり免疫染色が主流となっはいるが、現在も特殊染色は免疫染色とともに併用して使用されている。また、時に免疫染色では証明することが困難な物質の局在証明に免疫染色との二重染色が行われる。<sup>1,2,3,4,5)</sup>

本稿では、免疫染色と特殊染色との二重染色について解説する。

## 免疫染色と特殊染色との二重染色法

ここで特殊染色とは、H&E 染色と免疫染色を除いた一般組織化学染色を含めて扱う。

### 1. 免疫染色後に特殊染色

一般的には、免疫染色の発色を先に行ってから特殊染色を行う。

骨髓標本などでは DAB 発色の茶色と黄褐色顆粒状のヘモジデリン顆粒との鑑別が必要となることがある。この場合、免疫染色を行ってからベルリンブルー染色による鉄染色を行うと細胞内のヘモジデリン顆粒が青色に発色されて容易に鑑別可能となる（図 1）。免疫染色後に、アルシアン青染色やアルシアン青・PAS 重染色を行うことで、腫瘍細胞と粘液との関係がわかりやすくなる（図 2,3,4）<sup>2)</sup>。

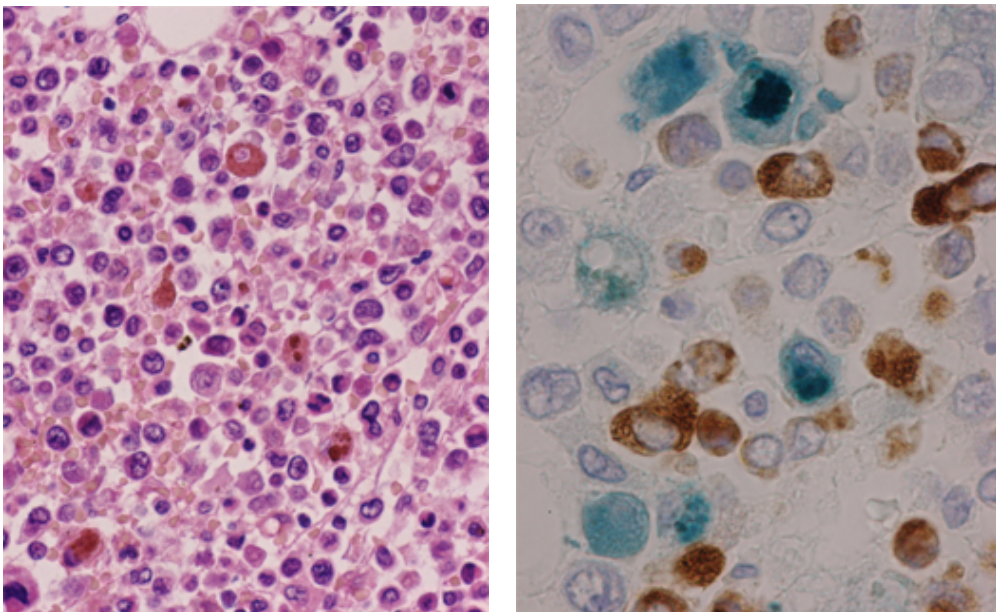
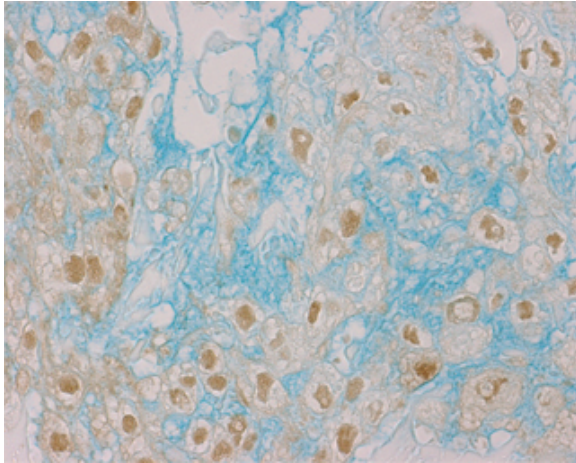


図 1：抗 MPO ウサギポリクローナル抗体と鉄染色（骨髓）

左：H&E 染色

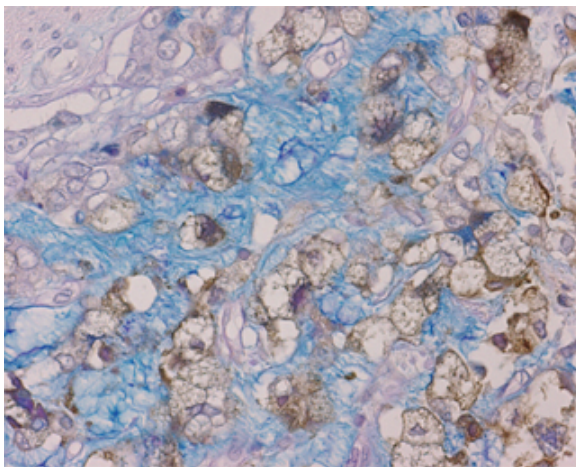
右：抗 MPO 抗体で免疫染色後（DAB 発色）に鉄染色、ヘマトキシリンで核染色。

DAB 発色の茶色と黄褐色顆粒状のヘモジデリン顆粒との鑑別が必要な場合にベルリンブルー染色による二重染色を行うと、ヘモジデリン顆粒が青色に発色されて容易に鑑別可能となる。



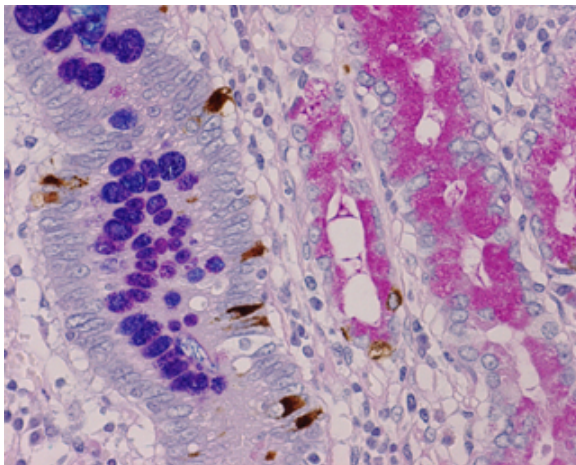
**図 2 : 抗 S-100 蛋白ウサギポリクローナル抗体と  
アルシアン青染色 (軟骨腫)**

抗 S-100 蛋白抗体で免疫染色後 (DAB 発色) にアルシアン青染色、核染なし。  
軟骨細胞と酸性粘液との関係がわかりやすい。



**図 3 : 抗 CEA ウサギポリクローナル抗体と  
アルシアン青・PAS 重染色 (胃癌)**

抗 CEA 抗体で免疫染色後 (DAB 発色) にアルシアン青・PAS 重染色、ヘマトキシリンで核染色。  
腫瘍細胞の CEA 発現と粘液産生がわかりやすい。



**図 4 : 抗クロモグラニンウサギポリクローナル抗体と  
アルシアン青・PAS 重染色 (胃粘膜上皮)**

抗クロモグラニン抗体で免疫染色後 (DAB 発色) にアルシアン青・PAS 重染色、ヘマトキシリンで核染色。  
酸性および中性粘液多糖類を有する腺細胞とこれらの腺細胞に介在する内分泌細胞の局在がわかりやすい。

## 2. 特殊染色後に免疫染色

腎糸球体を PAS 染色後に、抗レニン抗体で染色することで、糸球体と傍糸球体細胞内のレニンとの関係が明瞭となり詳細に観察することができる。また、発色剤に DAB の代わりに DAB-cobalt を使用することで赤紫色の PAS 染色との対比がよく、褐色顆粒状のホルマリン色素との鑑別も容易となる (図 5) <sup>3)</sup>。

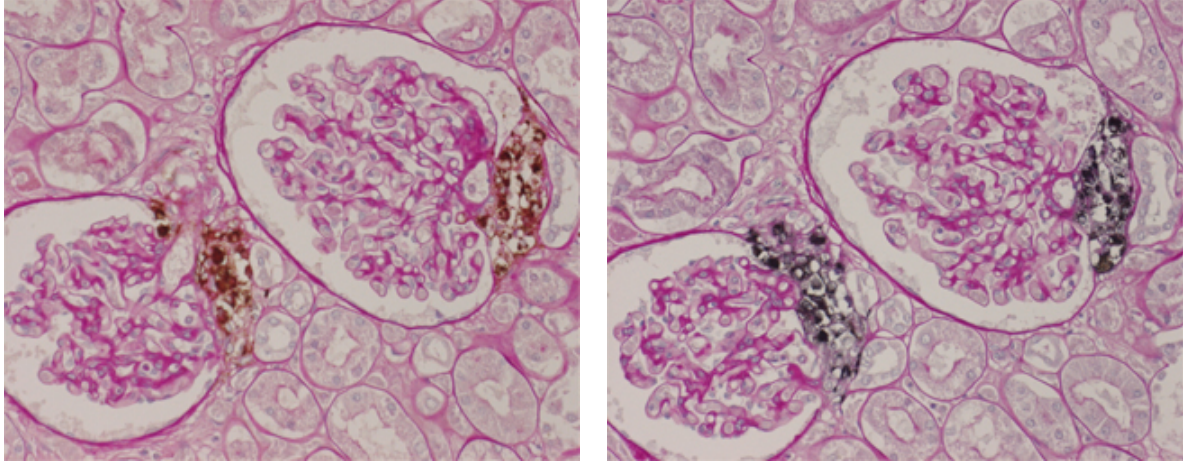


図 5 : PAS 染色と抗レニンウサギポリクローナル抗体 (腎臓)

左 : PAS 染色後に抗レニン抗体で免疫染色 (DAB 発色)、ヘマトキシリンで核染色。 右 : PAS 染色後に抗レニン抗体で免疫染色 (DAB-cobalt 発色)、ヘマトキシリンで核染色。

糸球体と傍糸球体細胞内のレニンとの関係が明瞭となり詳細に観察することができ、また、DAB-cobalt を使用することで赤紫色の PAS 染色との対比がよい。

## 3. 抗原の賦活化処理を行った免疫染色後に特殊染色

蛋白架橋反応によって組織内でマスクされた抗原決定基を表面に露出させる方法として抗原の賦活化法がある。蛋白分解酵素処理、加熱処理、蟻酸処理や塩酸処理などが行われている。これらの処理により多くの抗原が検出可能となる。一部の特殊染色では抗原賦活化を行った後でも、免疫染色後に特殊染色との二重染色が可能な場合がある (図 6,7,8)。

中皮腫は酸性粘液多糖類 (ヒアルロン酸) を産生するが、抗カルレチニン抗体とアルシアン青染色の二重染色を行うことで、腫瘍細胞と酸性粘液多糖類との局在がわかりやすくなる。また、発色基質にアルカリフォスファターゼ基質 (ファーストレッド II 基質キット : ニチレイバイオサイエンス) を用いて赤色に発色すると、DAB 発色の茶色と比較してアルシアン青染色の青色とのコントラストも鮮明になる (図 6)。

神経組織切片で抗 Neurofilament Protein (NFP) 抗体による免疫染色とルクソール・ファスト青 (LFB) を重染することで軸索と髄鞘を同一切片上で観察することができ (図 7)、また、組織球細胞質内の結核菌も重染色により観察可能となる (図 8)。

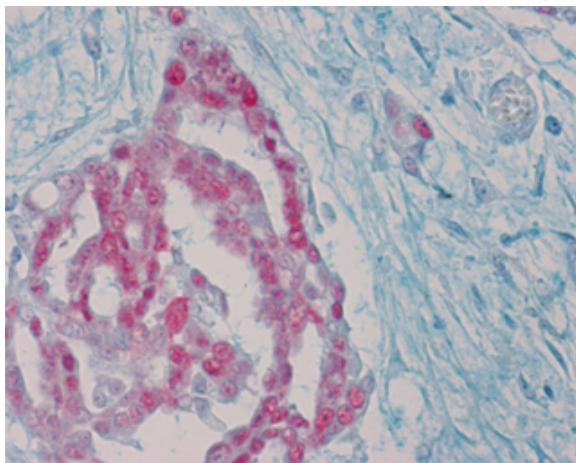


図 6 : 抗カルレチニンウサギモノクローナル抗体 (Clone : SP13) とアルシアン青染色 (中皮腫)

抗カルレチニン抗体で免疫染色後にアルシアン青染色、核染なし。アルカリフォスファターゼ基質 (ファーストレッド II 基質キット : ニチレイバイオサイエンス) で発色後、脱水・透徹・封入。  
腫瘍細胞と酸性粘液多糖類 (ヒアルロン酸) との関係がわかりやすくなる。

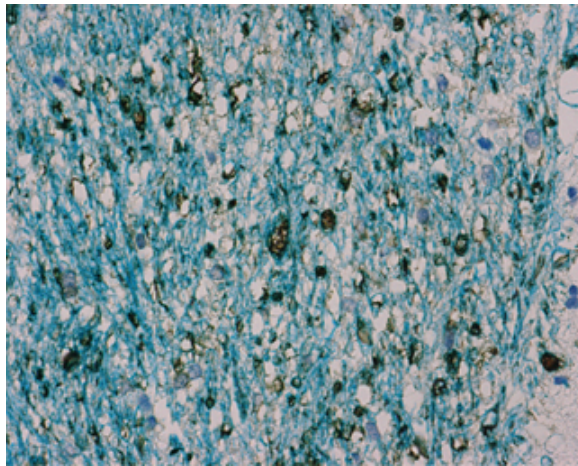


図7：抗 NFP マウスモノクローナル抗体 (Clone: 2 F11) と LFB 染色 (神経組織)

抗 NFP 抗体で免疫染色後 (DAB 発色) に LFB 染色、ヘマトキシリンで核染色。軸索と髄鞘を同一切片上で観察することができる。

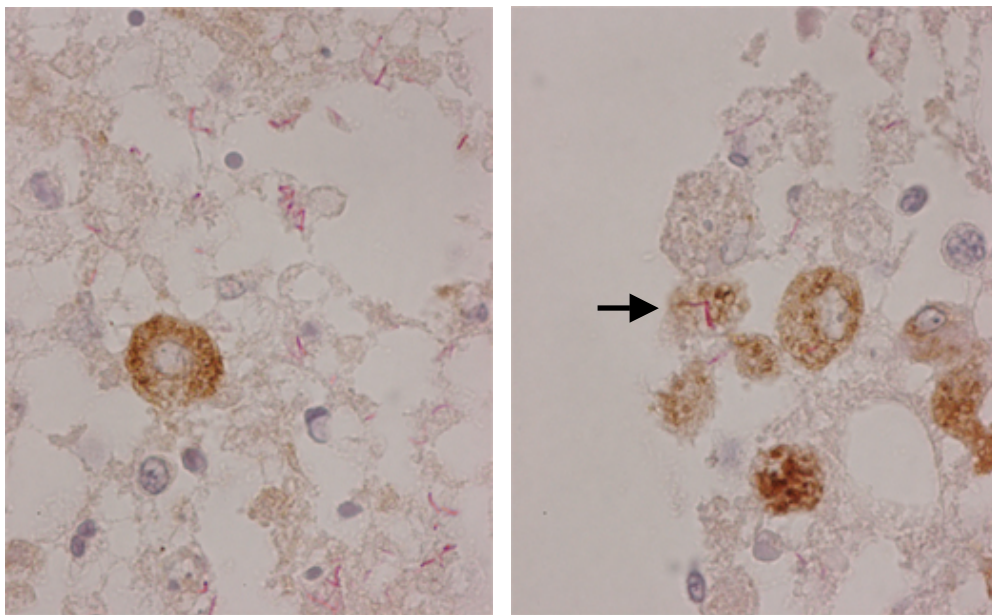


図8：抗 CD68 マウスモノクローナル抗体 (Clone: KP1) と チールネルゼン染色 (肺結核)

抗 CD68 抗体で免疫染色後 (DAB 発色) にチールネルゼン染色、ヘマトキシリンで核染色。組織球細胞質内の結核菌も重染色により観察可能である。

#### 染色上の注意点とポイント

1. 免疫染色に アミノエチルカルバゾール (AEC)、4-クロロ-1-ナフトールなどアルコールやキシレンによる脱水・透徹により退色する発色基質を使用するのは避け、DAB や脱水可能なアルカリフォスファターゼ発色基質 (ファーストレッド II 基質キット：ニチレイバイオサイエンス) を使用する (図6)。
2. 特殊染色の色調により免疫染色の発色剤を変えるとよい (図 5,6)。
3. 免疫染色の発色に際して、組織切片上に抗原が多量に存在して陽性部位が強く染色される時には、特殊染色とのバランスを考慮してやや弱めに反応させる。
4. 染色結果が青色調の鉄染色などの特殊染色では、ケルンエヒトロート液で赤色に核を染色するが、茶褐色の DAB と反応色がかぶってしまうので、核染色を行うときはヘマトキシリン液で薄めに染色するか、核染色をおこなわない。アルシアン青染色液を用いた二重染色ではアルシアン青が核染色の代用となる (図 1,2,3,4)。

5. 0.01M クエン酸緩衝液 pH6.0 による 121°C 10 分のオートクレーブ処理後でも特殊染色による二重染色は可能である。しかし、加熱処理を行うことで特殊染色の染色性が減弱あるいは染色されなくなることがある。例えば、加熱処理を行ってから免疫染色をおこない、その後、鉄染色やクロロアセテートエステラーゼ染色などの染色をおこなった場合、加熱処理未処理と比較して極端な染色性の低下がみられる。このようなことは特に一般組織化学染色で起こりやすい。同様に、EDTA 溶液を用いた加熱処理や強力な蛋白分解酵素処理は、組織切片へのダメージが強く特殊染色が出来ないことがある。
6. 一般的には、PAS 染色との二重染色の場合に、過ヨウ素酸酸化を行ったのちに酵素抗体法の発色をすませ、その後、Schiff 試薬と反応させる。<sup>4)</sup> しかし、この順番だと Schiff 試薬と反応し難くなることがある。このような場合には、第 1 抗体の種類にもよるが、過ヨウ素酸酸化を行ったのちに Schiff 試薬と反応させて PAS 染色を終え、その後、免疫染色を行ってもよい (図 5)。

### おわりに

免疫染色と特殊染色の二重染色は、DAB 発色の色調と紛らわしいことがあるヘモジデリン、リポフスチンなど生体内色素と同一組織標本で鑑別可能であり、さらに免疫染色と種々の特殊染色と同時に行うことにより、両者の相互関係を明らかにすることができるのでより多くの有用な情報を提供してくれる。

### 参考文献

- 1) 西野武夫、川井健司、堤寛：酵素抗体法の病理診断への応用 (その 3)。特殊染色としての酵素抗体法の意義。病理と臨床 2：980-986,1984
- 2) Michell DP, Gusterson BA: Simultaneous demonstration of keratin and mucin. J Histochem Cytochem 30: 707-709, 1982.
- 3) 猪野義典、佐藤雄一、広橋説雄、他：ABC 法と PAP 法を併用した酵素抗体法の二重染色とその発色法の検討。病理と臨床 1：1475-1479, 1983.
- 4) Tubbs RR, Gephardt GN, Valenzuela R, et al.: An approach to immunomicroscopy of renal disease with immunoperoxidase and periodic acid-Schiff counterstain (IMPAS stain). Am J Clin Pathol 73: 240-244, 1980.
- 5) ニチレバイオサイエンス免疫染色玉手箱、技術、生体内色素標本の免疫組織学的染色、青木裕志。