

免疫染色の発色技術

防衛医科大学校臨床検査医学講座

富永 晋

【はじめに】

免疫染色は抗原抗体反応を利用した染色法であり、組織・細胞中に存在する抗原性を持った物質の局在を明らかにする手法です。その局在を可視化する目的で抗体には蛍光色素、フェリチン、酵素等の物質が標識されています。病理組織検査では西洋わさびペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase : HRP) あるいは牛小腸由来のアルカリホスファターゼ (ALP) を標識酵素とした酵素抗体法が最も多く用いられ、各メーカーより種々の酵素発色キットが販売されています。

【標識酵素】

HRPは西洋わさびの葉に含まれる酵素で分子量は 40～45kDa、至適pHは 6.0～7.0 です²⁾。アジ化ナトリウム (NaN₃) はペルオキシダーゼ (PO) の阻害薬として用いられますが、植物性POは動物性POに比べてNaN₃に対して抵抗性があり、発色液に 10mMのNaN₃を添加することにより切片中の内因性PO活性を抑える事が出来ます。

牛の小腸由来アルカリホスファターゼの分子量は 120～200kDa、至適pHは 8～10 です。その活性はアルコール、加熱およびレバミゾールによる阻害を受けにくいですが、切片中の内因性アルカリホスファターゼの大部分は包埋過程で失活するため問題となりませんが、凍結切片中では活性が残っているため反応液中に 1～5mMのレバミゾールを添加して内因性ALP活性を抑える必要があります。また、腸管組織はパラフィン包埋標本中でも活性が残るため過酸化水素・過ヨウ素酸・水素化ホウ素カリウム処理³⁾ や酢酸・過ヨウ素酸・水素化ホウ素カリウム処理⁴⁾ のような前処理を必要とします。

【酵素の発色法】

酵素自体を可視化する事は出来ないため、反応液に発色基質や色素を加える事により不溶性の沈殿物として酵素 (抗原蛋白) の局在を明らかにしています。また、反応産物は発色法の違いにより有機溶剤に耐性な物質と溶けだす物質があります。

今回は非水溶性封入の使用が可能な発色方法の説明と注意点を説明します。

HRP の反応液

ジアミノベンジジン (3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride:DAB) 液

(発色 : 茶色, 図 1)

DAB^{*1} 20mg

0.05M トリス塩酸緩衝液 (pH7.5) ^{*2} 100ml

30%過酸化水素 10 μ l

DAB ならびに過酸化水素の至適な配合割合にはかなり幅があります。しかし、DAB の分量を増やすとより強い反応産物が得られますが過度の添加は供染が見られます (図 2)。また、過酸化水素を過度に添加すると陰性化する事があります (図 3)。ニチレイバイオサイエンスからは DAB 基質キットが販売されています。

^{*1} 開封時に DAB (DOJINDO社) 1gを蒸留水 50mlで溶解し 1mlづつ分注し-20℃保存する。

^{*2} トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン 6gを蒸留水 1,000mlに溶解し、塩酸を加えながら pHメーターで確認し pH7.5 に調整します。

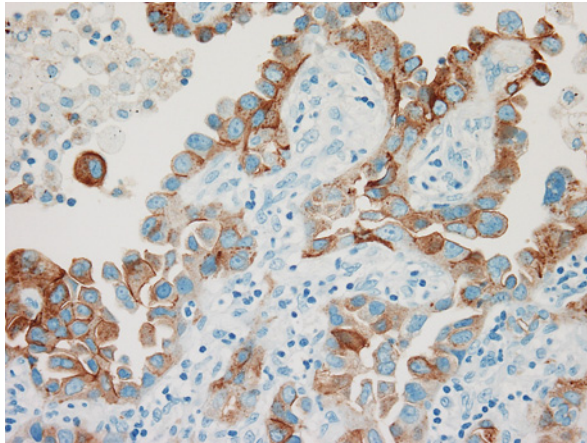


図1 肺腺癌, DAB 発色 (20mg/dl)

腫瘍細胞を縁取る様に細胞膜に陽性像が見られる。また、細胞質内の陽性部位は粗面小胞体ならびにゴルジ装置と言われている。(CEA; clone PARLAM4)

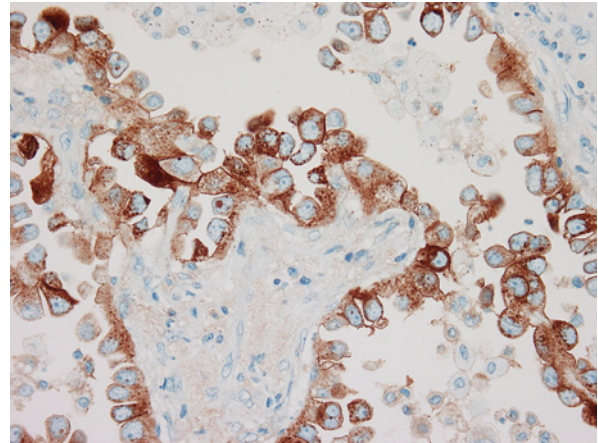


図2 肺腺癌, DAB 発色 (60mg/dl)

図1よりも陽性部位が強く発色しているが、間質への非特異的な反応が見られる。(CEA; clone PARLAM4)

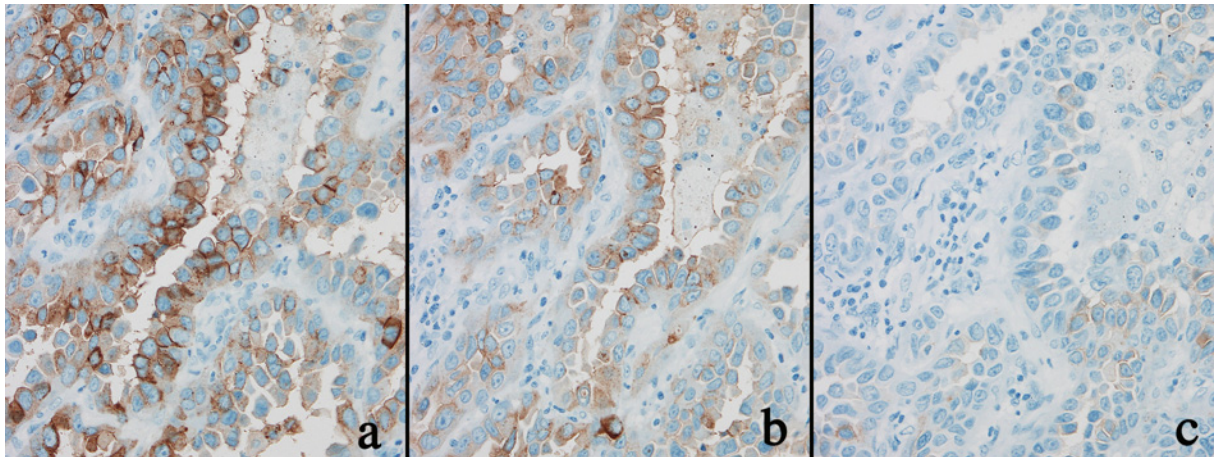


図3 肺腺癌, DAB 発色 (20mg/dl)

発色液中に30%過酸化水素を通常の $10\mu\text{l/dl}$ 添加では腫瘍細胞に陽性像が認められる(a), $160\mu\text{l/dl}$ 添加では発色が弱くなり(b), $320\mu\text{l/dl}$ 添加ではほとんど陽性像が認められない(c)。(CEA; clone PARLAM4)

Co-DAB液 (発色：灰色, 図4)

DAB*¹ $25\mu\text{l}$
 トリス塩酸緩衝液*² 1.0ml
 1%塩化コバルト水溶液 $50\mu\text{l}$
 3%過酸化水素 $5\mu\text{l}$

混合後、切片上に乗せて使用液とする。長時間発色を行うと背景が黒ずむため発色は5分程度で終了し水洗を行います。

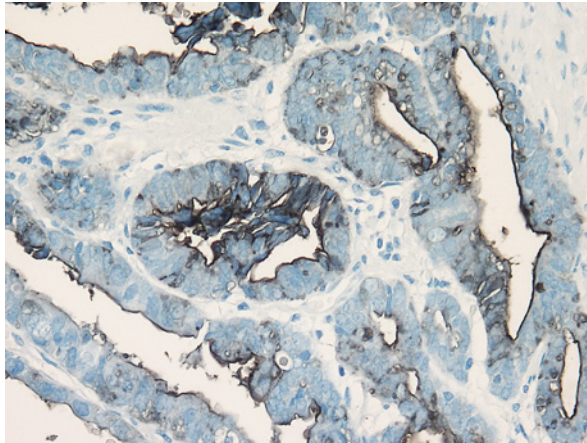


図4 胃癌, Co-DAB 発色

発色液中へ DAB と共に塩化コバルトを加える事で色調が灰色に変わる。(CEA; clone PARLAM4)

HistoGreen (発色：緑色, 図5)

添付されている HistoGreen-buffer 1ml に HistoGreen-Chromogen 1 滴と過酸化水素 1 滴を混合し切片の上に載せて発色を行います。発色後は手早く水洗をし、ケルンエヒテロートあるいはカラッチのヘマトキシリンで核染色を行い、脱水、透徹、封入を行います。反応産物は水洗中に溶け出してしまうため操作は手早く行います(図5b)。また、酸性水溶液中では反応産物が紺色に変わるので注意が必要です。

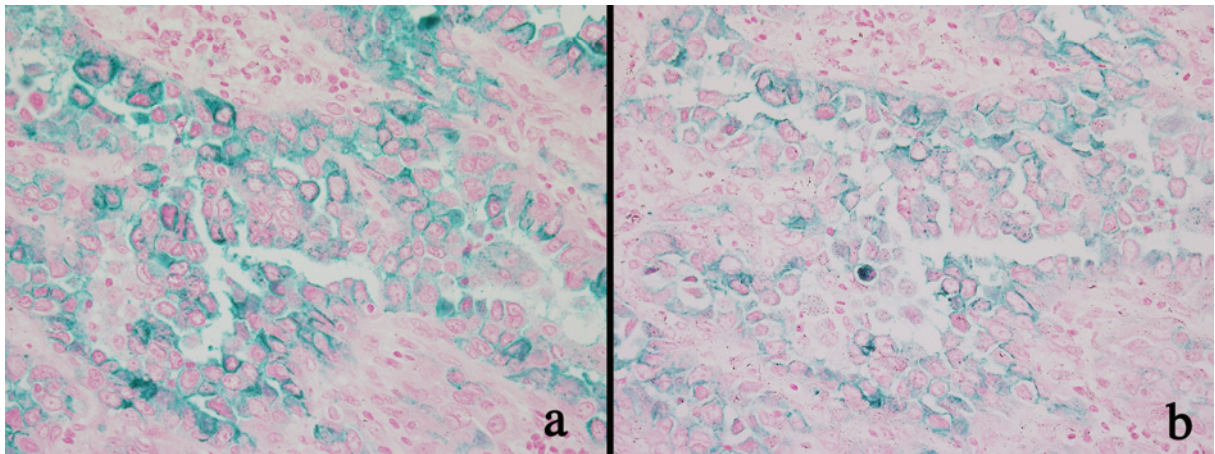


図5 肺腺癌, HistoGreen 発色

陽性部位は緑色に発色し明瞭に見いだされる (a), 発色終了後に通常通り流水水洗を5分行うと反応産物が溶け出してしまう陽性所見が弱くなってしまふ (b)。(CEA; clone PARLAM4)

ALP の反応液

ニューフクシン液 (発色 : 赤色, 図 6)

1%ニューフクシン (あるいは塩基性フクシン) /2N 塩酸液 100 μ l

1%亜硝酸ナトリウム水溶液 100 μ l

混合後, ナフトール AS-BI 2.5mg 加 0.2M トリス塩酸緩衝液 (pH8.3) 10ml を加え使用液とします. 色素はニューフクシンにこだわらずパラローズアニリン等手持ちの塩基性フクシンでまずは試し染めする事をお勧めします. ニチレイバイオサイエンスからは手軽なニューフクシン基質キットが販売されており調整は非常に簡単です.

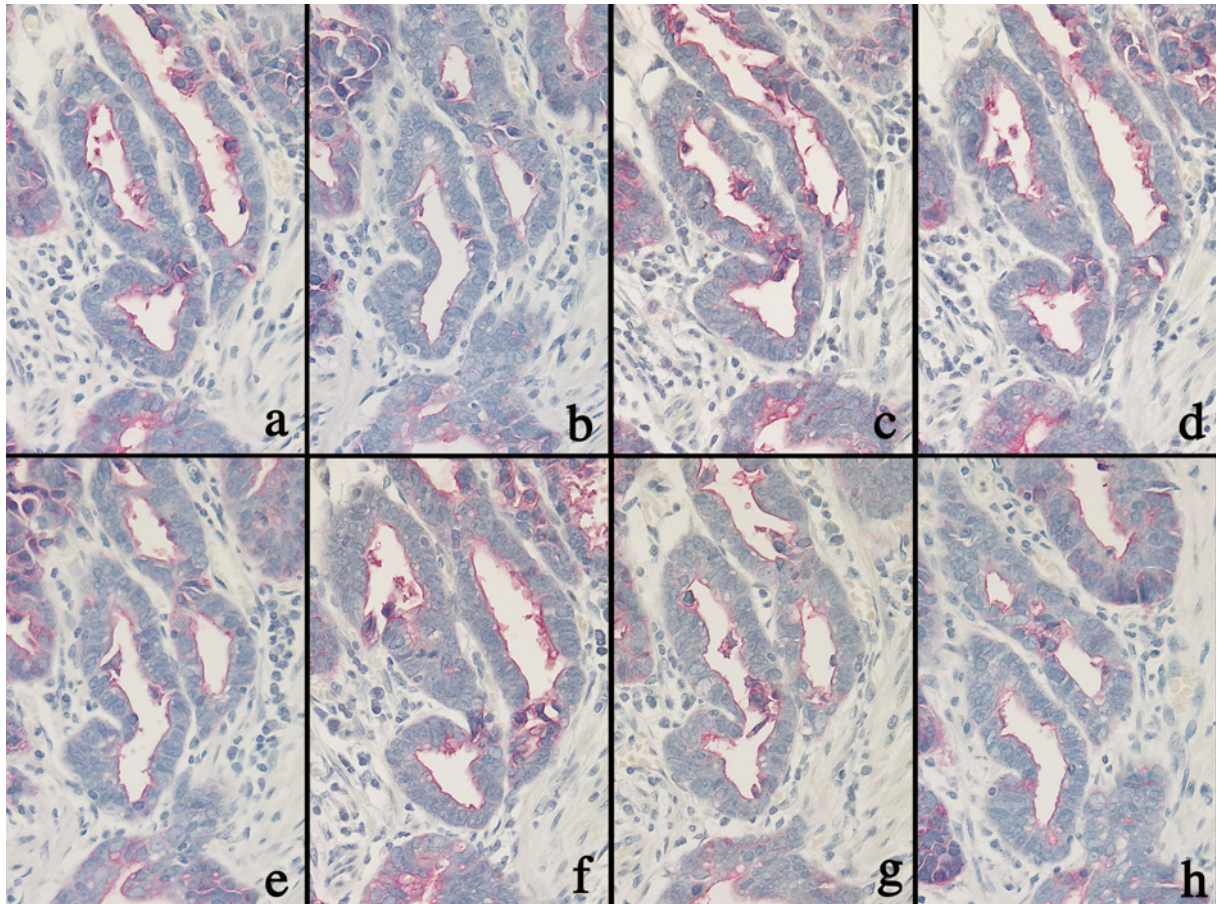


図 6 胃癌, ニューフクシン液発色 (色素による違い)

ニューフクシン液の処方と同様に色素を変えているがどれも支障はない, ニューフクシン-Merck 社 (a), ニューフクシン-Sigma 社 (b), パラローズアニリン-Merck 社 (c), パラローズアニリン-Sigma 社 (d), 塩基性フクシン-Merck 社 (e), 塩基性フクシン-Sigma 社 (f), 塩基性フクシン-Wako 社 (g), ダイヤモンドフクシン-Chroma 社 (h). (CEA; clone PARLAM4)

ファーストレッドII 基質キット；商品名（ニチレイバイオサイエンス社，発色：赤色，図7）
 添付されている基質緩衝液 2.5ml にファーストレッド溶液 1 滴を混合し切片の上に乗せて
 発色を行います。反応液の感度は非常に高く，鮮やかな赤色を呈します。ファーストレッド
 TR salt 塩を用いたアゾ・カップリング法はアルコール中で反応産物が色落ちしますが（図
 8），ファーストレッド II 基質キットでは気にせず脱水操作を行えます。

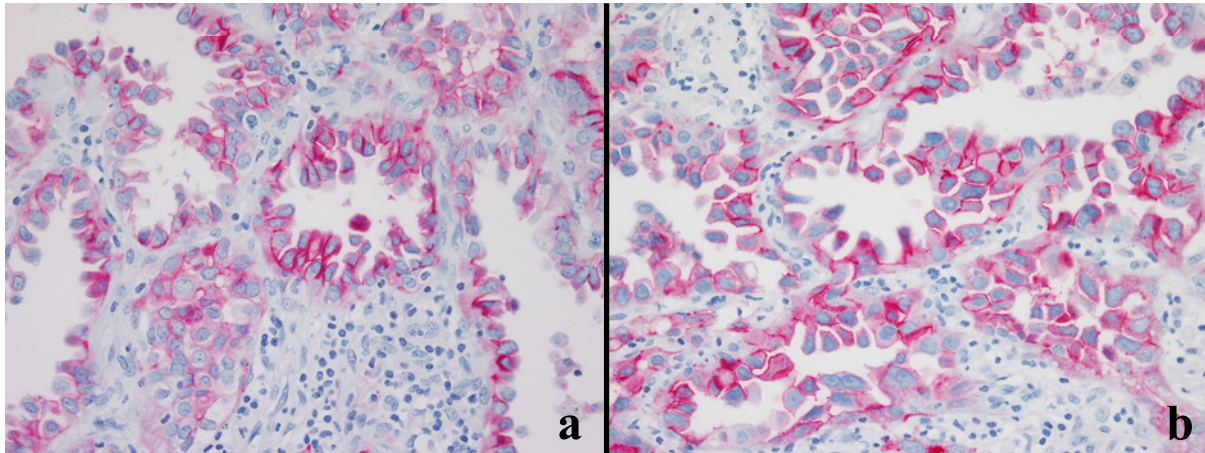


図7 肺腺癌，ファーストレッドII 発色

陽性部位は鮮やかな赤色に発色しており（a），脱水時にエタノール中に30分間浸けておいても支障がない（b）。（CEA; clone PARLAM4）

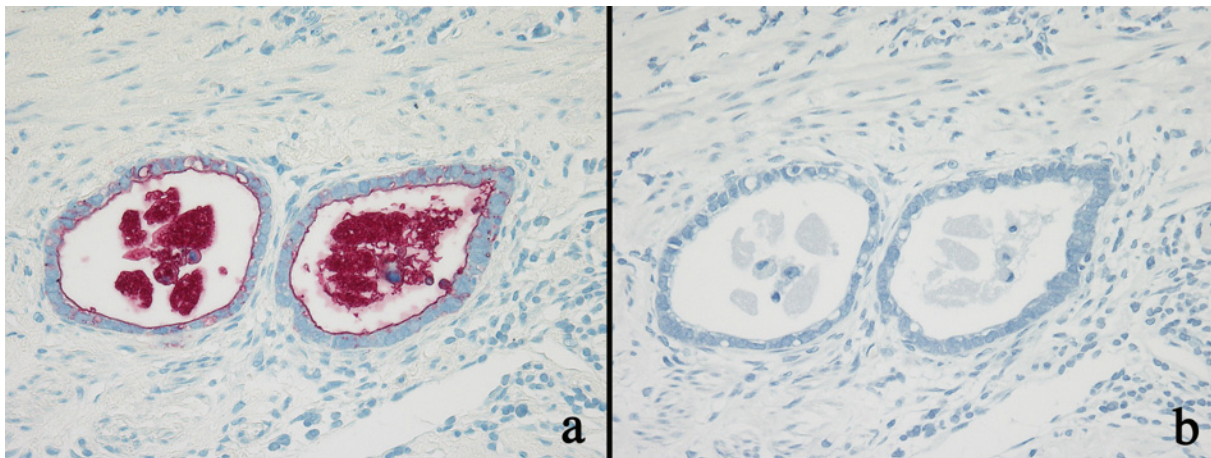


図8 胃癌，ファーストレッド TR salt を用いたアゾ・カップリング法発色

陽性部位は赤色に強く発色しているが（a），通常の脱水・透徹を経て封入した組織では完全に反応産物が溶出して陽性所見は認められなくなってしまう（b）。（CEA; clone PARLAM4）

【おわりに】

免疫染色では組織の固定状態，内因性酵素の阻止あるいは抗原賦活化等いくつかの操作を経て発色にたどり着きます。発色操作に問題があった場合はそれまでの行程が無駄になりますし，仮に偽陰性化あるいは非特異的な反応が他の要因により起こった場合でも発色条件を一定に保つ事で気づく事が出来ます。安定した発色操作は免疫染色の信頼性へも繋がりますので，染色毎に変わる事なく一定に保つ事が必要です。

【参考文献】

- 1) 名倉 宏，長村義之，堤 寛，編：渡辺・中根 酵素抗体法，学際企画，東京，2002.
- 2) 浅野伍郎，監修：診断研究のための病理技術詳解 3.免疫組織化学法，藤田企画出版，青森，1992.
- 3) Elias, J. M. : Immunohistopathology, A Practical Approach to Diagnosis. ASCP Press, 1990.
- 4) Bulman AS. : Heyderman EJ. : Clin. Pathol., 34, 1349-1351, 1981.