

背景の共染が起こる原因と対処法

静岡県立静岡がんセンター病理診断科 林 勇
 東京慈恵会医科大学病理学講座 林 勇介

【はじめに】

免疫染色は現在の病理診断において必要不可欠な補助染色法であり、日常業務の中でも大きな比重を占めていると思われる。しかしながら、時には、反応が弱かったり、全く反応しなかったり、または反応にムラが出来たり過度に反応してしまったという経験があるのではないかと思う。今回これら失敗例のうち、共染（非特異的反応）について、その原因と対処法を紹介する。

なお、今回の共染標本は読者の皆さんにみていただくため、過度に不適切な条件で行った事を付記しておきたい。

【共染の主な原因と対処法】

以下に共染の主な原因と対処法について述べるが、最初に共染例を提示し、次いでそれに対処したものを示す。

1. 1次抗体の濃度が高い場合（抗 S100 タンパク抗体使用）

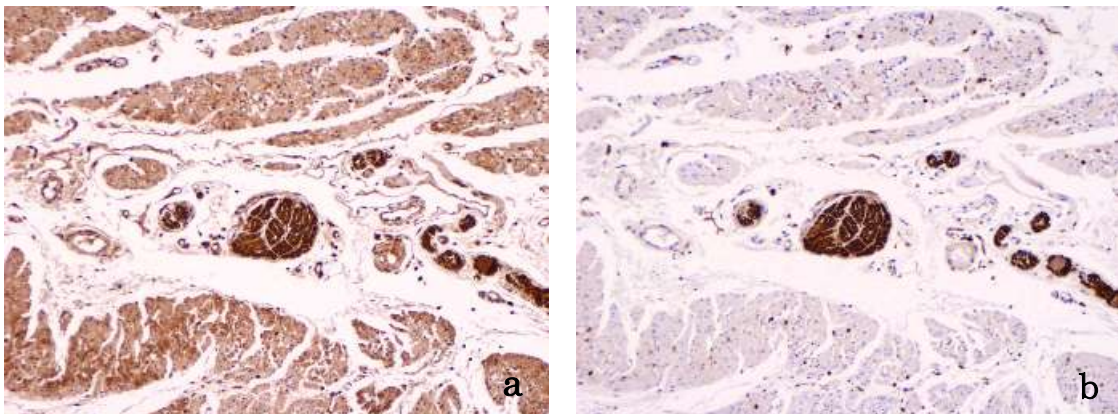


図1 抗 S100 タンパク抗体、酵素標識ポリマー法、胃切除例 対物 10 倍

- a: 1次抗体の濃度を適正倍率の10倍、高濃度で反応を行った場合。陽性である固有筋層内のアウエルバッハ神経叢は強く染色されているが、本来陰性である他の平滑筋や血管壁にも強い反応が認められる。
- b: 1次抗体の濃度を適正倍率で抗原抗体反応する事により、神経線維は陽性、周囲の平滑筋等の共染は消失している。

共染の特徴

組織全体に 3,3'-diaminobenzidine（以下、DAB）反応を呈し、標本全体が茶褐色調となる。

対処法

日常の業務の中で一番多くみられる共染の原因と思われる。新規で購入した原液抗体は必ず至適濃度を検討する事はもちろん、使い慣れた抗体を希釈する場合も希釈濃度を誤らない事が重要である。また、種々の希釈済み抗体が各メーカーから市販されているが、それらの抗体に関しても検出法の違いにより希釈濃度を変えると好結果を得られる場合がある。

2. 過剰な反応温度、時間（抗 Desmin 抗体使用）

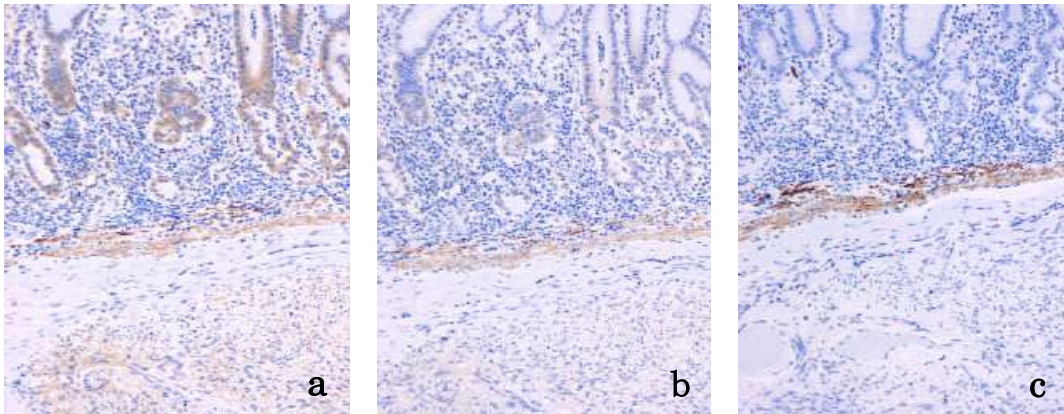


図 2 抗 Desmin 抗体、酵素標識ポリマー法、胃切除例 対物 10 倍

- a: 50℃、1 時間の反応では抗 Desmin 抗体陽性である粘膜筋板の反応性は弱く、一方、陰性であるべき腺上皮や粘膜下組織に陽性を認める。
- b: 37℃で一晩反応した場合、抗 Desmin 抗体で反応する粘膜筋板は弱陽性を示すのみである。一方、腺上皮の一部にも弱陽性を認める。
- c: 室温、1 時間（至適温度、至適時間）の反応では腺上皮や粘膜下組織に共染はなく、粘膜筋板に明瞭な陽性像を認める。

共染の特徴

背景に非特異的な反応を認める場合があり、目的とする 1 次抗体陽性物質とのコントラストが低くなる傾向にある。

対処法

抗原抗体反応の基本は室温であり、加温は極力避けた方がよい。また、1 次抗体を一晩反応させる場合は、切片の乾燥を防ぐ事からも室温もしくは 4℃で行う事を推奨する。

備考：免疫染色の 2 重染色時、1 次抗体の発色後加熱処理をして、抗原と抗体を乖離し第 2 抗体を反応させるが、上記のごとく 50℃、1 時間の反応でも若干ではあるが抗原抗体反応の熱乖離が起きている可能性が示唆される。

3. 1 次抗体反応中の乾燥（抗 S100 タンパク抗体使用）

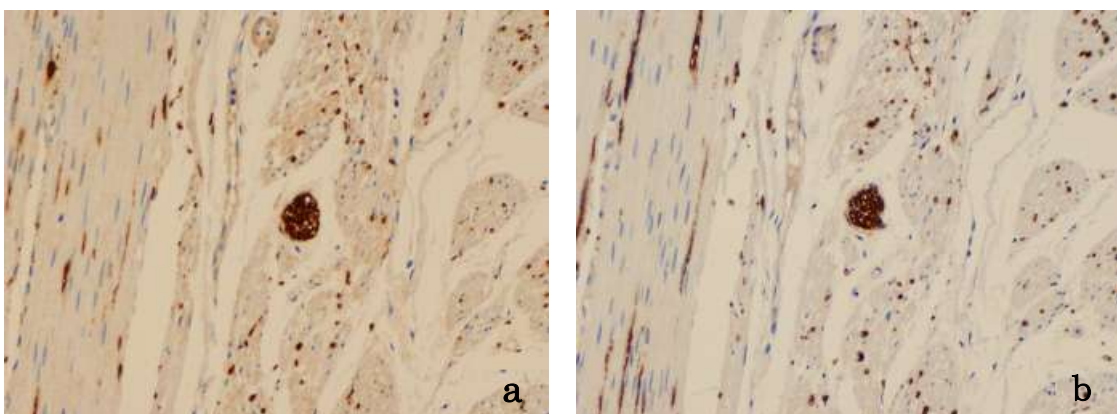


図 3 抗 S100 タンパク抗体、酵素標識ポリマー法、胃切除例 対物 20 倍

- a: 1 次抗体の反応中に乾燥した場合。抗 S100 タンパク抗体で反応する神経線維の外、平滑筋やスライドガラスにまでも反応が認められる。
- b: 乾燥に注意して染色した場合。神経線維に陽性反応を認めるが、平滑筋等にはほとんど反応を認めない。

共染の特徴

組織全体が乾燥してしまった場合は組織全体に（時にはスライドグラスにも）、辺縁のみが乾燥した場合にはその乾燥した部分に、1次抗体が沈着するため共染が起こる。また、組織の乾燥がない場合でも、湿潤箱が傾いていた場合は染色ムラの原因となる。

対処法

湿潤箱の密閉不足や傾きがある場合、抗体が組織に非特異的な沈着を起こしてしまい、洗浄しても余分な抗体が残ってしまうという事が考えられる。机や湿潤箱の傾きを確認するとともに蓋の密閉の確認を怠らない事が大切である。

4. 各種反応間の洗浄不足（抗 Desmin 抗体使用）

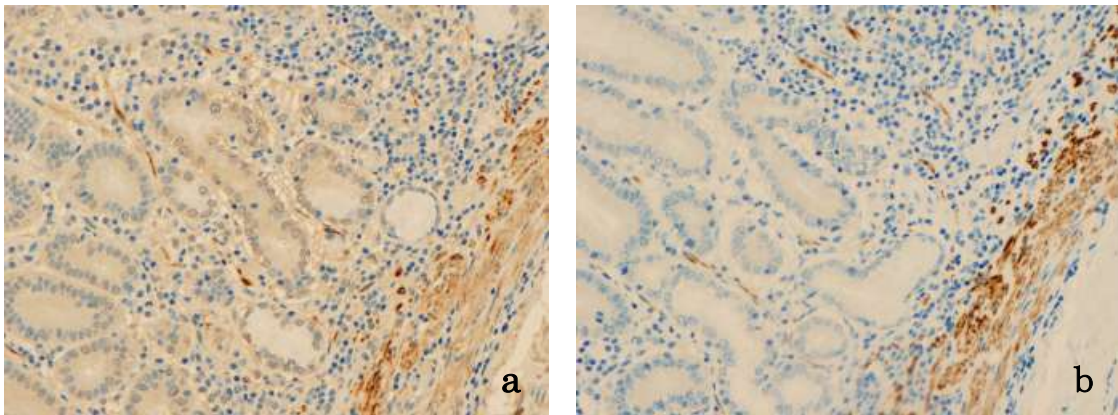


図4 抗 Desmin 抗体、酵素標識ポリマー法、胃切除例 対物 20 倍

- a: 1次抗体の洗浄不足により抗 Desmin 抗体が核、細胞質、間質に残存するため、粘膜筋板以外にも組織全体に DAB 反応を認める。
- b: 十分に洗浄する事により、粘膜筋板の平滑筋成分のみ、抗 Desmin 抗体に陽性を示している。背景には共染を認めない。

共染の特徴

核や細胞質、間質を問わず組織全体に反応を認める。

対処法

各反応間で、Phosphate Buffer Saline（以下 PBS）或いは Tris Buffer Saline（TBS）を用いて十分な洗浄（例えば 5 分×3 回）を行う。更には 0.01～0.2%非イオン性界面活性剤（Tween 20 等）や 5%スキムミルクの添加、pH や塩濃度を上げる事により洗浄力が向上する場合もある。

5. 加熱処理による内因性ビオチンの非特異的反応（抗 Vimentin 抗体使用）

肝細胞や腎の尿細管など、ヒト臓器には内因性のビオチンが存在する。内因性ビオチンはオートクレーブ処理やマイクロウェーブ処理などの加熱による賦活化処理により活性化される。

1 次抗体反応後 avidin-biotin-peroxidase complex 法（ABC 法）や labeled streptavidin biotin 法（LSAB 法）などの、2 次抗体にビオチンを用いる検出法により内因性ビオチンが反応する。

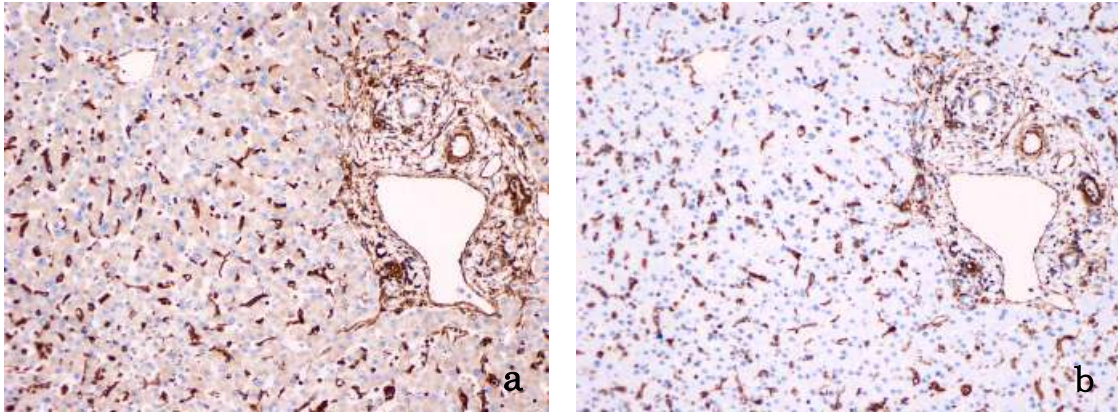


図 5 抗 Vimentin 抗体、a: LSAB 法、b: 酵素標識ポリマー法、肝切除例 対物 20 倍
マイクロウェーブ 95℃、クエン酸緩衝液、10 分

- a: 内因性ビオチンの不活化処理をしない切片においては、LSAB 法では抗 Vimentin 抗体陽性の類洞壁やグリソン鞘以外に、肝細胞内に存在する内因性ビオチンの影響による弱陽性を認める。
- b: 酵素標識ポリマー法では肝細胞内の内因性ビオチンによる反応は認めない。

共染の特徴

内因性ビオチンが存在する細胞が弱陽性を呈する。

対処法

内因性ビオチンの反応は弱陽性を示す場合が多い。経験者の場合は細胞とその反応性から内因性ビオチンと判断できると思うが、正確性を求める場合は ABC 法や LSAB 法などの検出法を用いなくて、ポリマー試薬（シンプルステイン MAX-PO；ニチレイバイオサイエンス社）など、ビオチン化抗体を使わない検出方法を用いる。しかし、1 次抗体によっては ABC 法や LSAB 法でないと検出できない事もある。その場合は、市販されているビオチンのブロッキング試薬（内因性アビジン・ビオチンブロッキングキット；ニチレイバイオサイエンス社）などを用いると好結果を得る事が出来る。

6. 過剰な DAB 反応時間 (抗 S100 タンパク抗体使用)

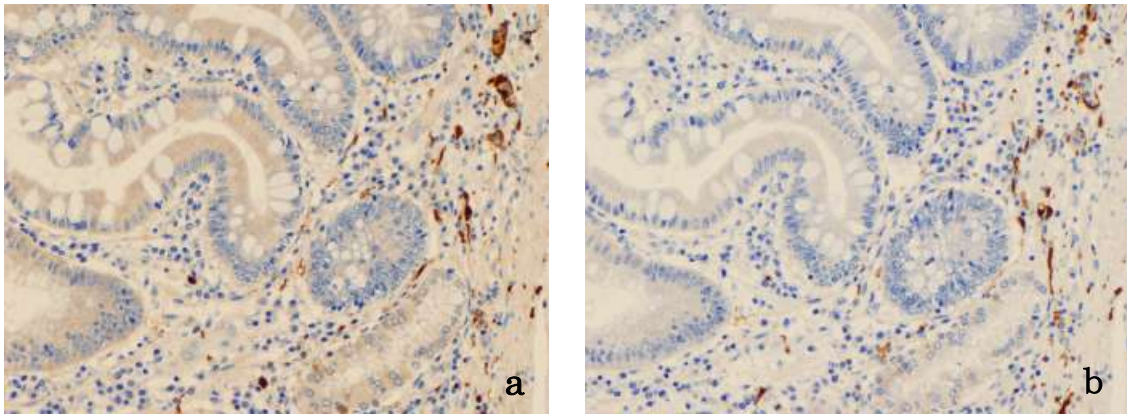


図 6 抗 S100 タンパク抗体、酵素標識ポリマー法、胃切除例 対物 20 倍

- a: DAB 反応時間 1 時間では抗 S100 タンパク抗体陽性の神経線維の外、腺上皮の細胞質や間質の結合組織にも DAB の反応が認められる。
- b: DAB 反応時間 10 分では腺上皮や間質に DAB 反応を認めない。

共染の特徴

背景の共染とともに陽性部位も強く反応する。

対処法

抗体ごとに DAB 反応の時間を決めている施設もあると思うが、1 次抗体別に反応時間を決めるのではなく、DAB 反応の時間を一定にし、それに合わせて 1 次抗体の希釈倍率を決定する事が望ましい。

7. 高濃度の DAB (抗 S100 タンパク抗体使用)

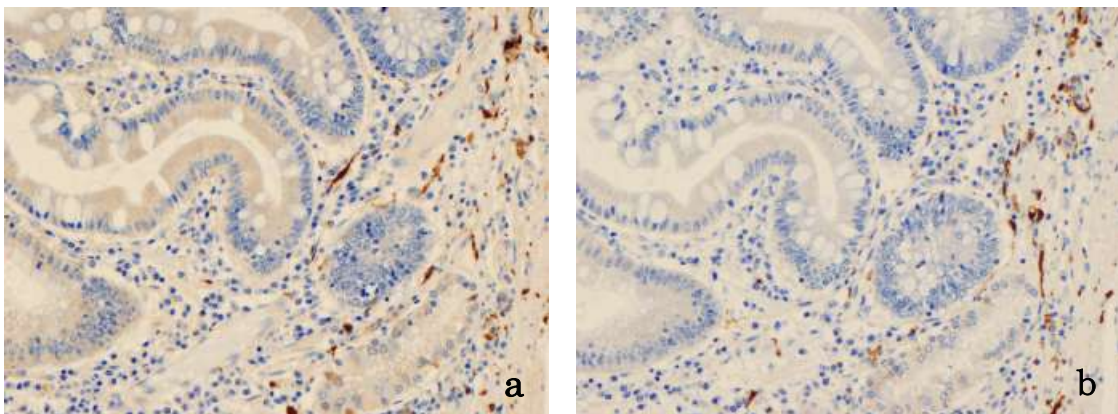


図 7 抗 S100 タンパク抗体、酵素標識ポリマー法、胃切除例 対物 20 倍

- a: DAB 添加量を 60mg/dL と通常の 3 倍で反応液を作製したところ、抗 S100 タンパク抗体で陽性を示す神経線維は強い反応を示すが、背景、特に腺上皮の細胞質にも DAB の反応を認める。
- b: DAB 添加量を 20mg/dL と通常量にする事により、腺上皮や間質に DAB 反応を認めず神経線維が明瞭に観察される。

共染の特徴

背景の共染とともに陽性部位も強く反応する。

対処法

DAB の量を正しく水溶液に入れる。しかし、少量の反応液を作製する場合、DAB 量が微量のため毎回誤差が出る可能性がある。当施設では、DAB 反応液の不安定さを防ぐため、DAB 濃縮液を作製し用事調整している。

DAB 濃縮液の作り方

- ・ 2-Methoxyethanol (Ethylene glycol monomethyl ether) 100mL
- ・ 蒸留水 400mL
- ・ DAB 4 塩酸塩 10g

を褐色瓶に入れ-20℃で保管する。

使用時 pH7.6 トリス塩酸緩衝液で 100 倍に希釈し、反応直前に過酸化水素水 60 μ L/100mL を添加して使用する。

8. 内因性ペルオキシダーゼ活性阻止が不十分もしくは未処理 (抗 CD45RO 抗体使用)

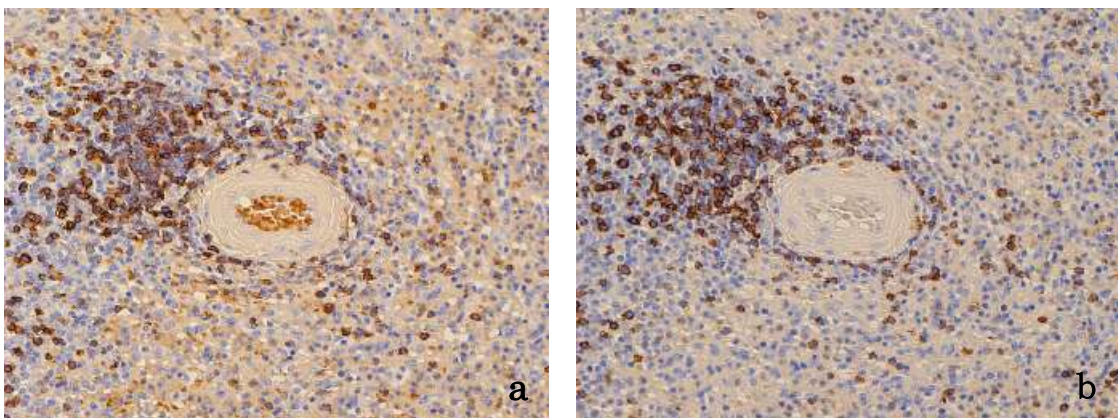


図 8 抗 CD45RO 抗体、酵素標識ポリマー法、脾切除例 対物 20 倍

- a: 過酸化水素水での処理を怠った場合、組織内に存在する赤血球に DAB 反応を認める。
- b: 過酸化水素水処理により赤血球には反応を認めず、抗 CD45RO 抗体陽性細胞が明瞭に観察される。

共染の特徴

組織内の赤血球に Pseudoperoxidase 等の DAB 反応を認める。

対処法

DAB 反応液など過酸化水素水を基質にして発色を行う場合は、組織内の内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止する必要がある。通常は 1 次抗体の反応前に行うが、抗体の種類によっては 1 次抗体反応後に処理を行うと好結果を得られる場合がある。

9. 抗原と1次抗体が同種の動物である場合における反応

(抗 α -smooth muscle actin (ASMA) 抗体使用)

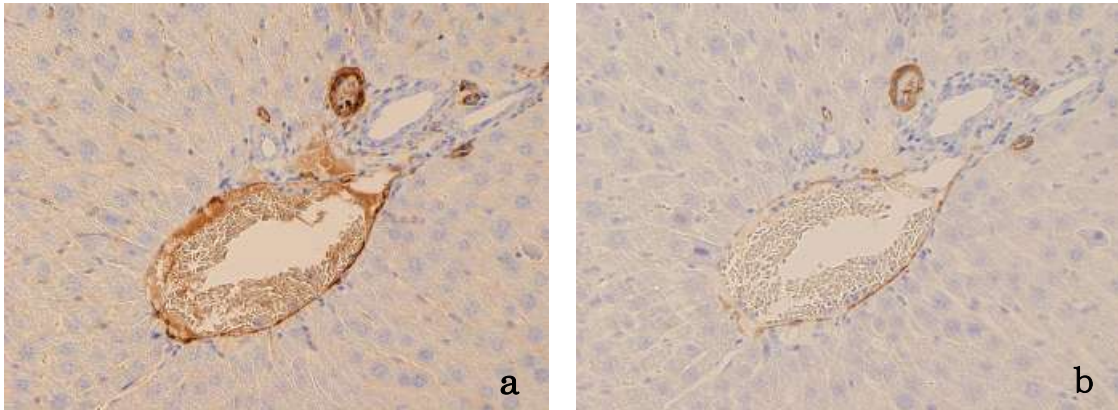


図9 抗 α -smooth muscle actin (ASMA) 抗体、マウス肝 対物 20倍

- a: 酵素標識ポリマー法。マウス肝のグリソン鞘内の血管壁に抗 ASMA 抗体に反応する平滑筋を認めるが、血管内及び類洞内の血清成分が反応している。
- b: マウスステインキット (ニチレイバイオサイエンス社) を用いた抗 ASMA 抗体の反応性は、血管壁に明瞭に陽性反応を認める。

共染の特徴

血清成分やリンパ球の一部に反応を認める。

対処法

同種動物での免疫染色の場合、内因性免疫グロブリンの反応を阻止する必要がある。同種の正常血清で吸収試験を行うと好結果を得る事が出来る。また、マウス組織でマウス1次抗体を染色する場合は、ニチレイバイオサイエンス社よりマウスステインキットが市販されており、容易に染色する事が出来る。

【おわりに】

今回、免疫染色において代表的な共染の原因と対処法を記載した。諸先輩方から不十分と指摘されそうであるが、初心者の方々を対象にまとめさせていただいた。本稿“共染”のなかで一番重要なのは、ただ単に背景に色がついているのではなく、1次抗体の陽性物質が確実に反応しているかを確認する事である。1次抗体の目的物質が陽性であるにも関わらず、背景に特徴的な反応が認められる事を共染と呼ぶ。そのような場合に、この稿を参考にいただければ幸いです。

参考文献

渡辺・中根 酵素抗体法 改訂四版 2002年 学際企画
新 染色法のすべて 1999年 医歯薬出版