内因性酵素除去におけるピットフォール

聖マリアンナ医科大学病院　病院病理部
草苅　宏有

はじめに

免疫染色法が開発されてから今日まで，技術面において目覚ましい発展を遂げてきたことは言うまでもない．病理診断科では，多少の施設間差はあるが，色々な抗体を保有し，免疫染色の業務を行っている．免疫染色を行う上で，その理論を理解して染色することが大切である．

免疫染色では，発色したから陽性，発色しなかったから陰性と単純に判断してよいのか．発色するということは，その場所で発色までのプロセスが行われたと考えられるが，目的とする抗原が存在したと言い切って良いのか？

本稿では，免疫染色の結果判定，及び偽陰性化の危険性のある内因性酵素の除去法とピットフォールについて解説する．

1. 内因性酵素について

細胞内に存在する内因性酵素の中で，免疫染色法に影響を及ぼすものを以下に示す．

（ア）ペルオキシダーゼ

ペルオキシダーゼは，過酸化水素を水素受容体として種々の酸化を触媒する酵素で反応は以下の通りである．

$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2H_2O + A$

＊生物種や臓器によりAH_2が異なり，性格も変わってくる．

免疫染色で問題となる好中球，好酸球，マクロファージ等に含まれる内因性ペルオキシダーゼは，抗体標識用に用いられる西洋ワサビペルオキシダーゼ horseradish peroxidase（HRP）と同様に活性が強く，また赤血球に含まれるヘモグロビンのヘムによる偽ペルオキシダーゼ活性も同様に強い作用を示す．さらに，骨格筋に含まれるミオグロビンのヘムによる反応も問題となる．甲状腺濾胞上皮，唾液腺腺房細胞，腎尿細管上皮，授乳期乳腺上皮などに含まれる上皮性（ラクト）ペルオキシダーゼ活性は，ホルマリン固定により完全に消失するため，AMeX 切片を除いてまず問題とならない．

内因性ペルオキシダーゼは，パラフィン切片よりは凍結切片あるいは細胞診標本で活性が強い傾向にある．従って，免疫染色工程で内因性ペルオキシダーゼを不活化する処理を行わないと非特異的反応が生じる．

（イ）アルカリフォスファターゼ

生体内において，アルカリフォスファターゼは，肝臓，小腸，骨芽細胞，血管内皮細胞，好中球や一部のリンパ球（marginal zone B-cell）などに存在する．内因性アルカリフォスファターゼ活性は，通常のホルマリン固定パラフィン切片ではホルマリン固定時に失活するため問題とならない．新鮮凍結切片や AMeX 切片，及び細胞診標本などで見られることがある．

2. 内因性酵素の除去

内因性ペルオキシダーゼに対しては，ホルマリン固定パラフィン切片の場合，3%過酸化水素水による方法を推奨する．新鮮凍結切片や AMeX 切片，及び細胞診標本の場合は，DAB 溶液にアジ化ナトリウムを添加する方法，または 0.3%過酸化水素加メタノールを一次抗体反応後に使用する方法との併用を推奨する．

内因性アルカリフォスファターゼに対しては，ホルマリン固定パラフィン切片の場合問題とならないが，新鮮凍結切片や AMeX 切片，及び細胞診標本の場合，発色基質液に 5mM（または 1mM でもよい）レバミゾールの添加を推奨する．一般的には前述した方法でよいが，すべての条件に対し万能ではないため，場合によって後述する変法等を行う必要がある．

（ア）内因性ペルオキシダーゼ活性の除去

免疫染色法において，内因性ペルオキシダーゼ活性の除去は省略することのできない工程であり，染色結果を左右する重要な技術ポイントとなる．なお，内因性ペルオキシダーゼ活性の除去法には多くの方法がある．変法も含め，以下にその方法を紹介する．

①Isobe 法

切片を 5mM（114mg/dl）の過ヨウ素酸水溶液に室温 10 分浸漬し，水洗ののち，3mM 水素化ホウ素ナトリウム$NaBH_4$水溶液（11.4mg/dl）に室温 30 分浸漬する．

②0.5%～1%過ヨウ素酸水溶液

0.5%ないし 1%の過ヨウ素酸水溶液に室温で 10 分浸漬したのち流水水洗．1%メタ過ヨウ素酸ナトリウム水溶液を用いてもよい．酸化後に行う水素化ホウ素ナトリウムによる還元操作は省略可能である．

③3%過酸化水素水

30%過酸化水素水原液 10ml とイオン交換水 90ml を混合. 免疫染色用のキット品として多く用いられている．

④0.3%過酸化水素加メタノール

脱パラフィン後 100%アルコールから水洗せずに 0.3%過酸化水素加メタノールに 10～30 分浸漬したのち流水水洗．過剰な基質との接触による酵素活性の消失がその原理である．メタノールにはヘム蛋白からヘムを遊離させる効果がある．やや反応時間が延びるが，水溶液よりメタノール溶液の方が阻害効果がよい．0.3%過酸化水素加 40%メタノール溶液で一晩反応でもよい．

⑤アジ化ナトリウムによる方法

DAB-H_2O_2反応液中に 10mM（65mg/dl）のアジ化ナトリウムを添加する．アジ化ナトリウムは本来ペルオキシダーゼ阻害剤であるが，低濃度の条件では，動物性（内因性）ペルオキシダーゼの方が植物性ペルオキシダーゼ（HRP）に比して，アジ化ナトリウムに対する感受性が高い点を利用している．通常，過酸化水素を用いる方法との組み合わせで行われる．

⑥0.3%過酸化水素・0.1%アジ化ナトリウム

100mg のアジ化ナトリウムを 100ml のイオン交換水に溶解し，それに 30%過酸化水素水原液を 1ml 加える．室温で 10 分浸漬する．

⑦加熱処理による方法

抗原賦活化の目的でパラフィン切片を対象に行われるマイクロウェーブやオートクレーブ処理にも，ある程度の内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害効果が認められる．ただし，赤血球の偽ペルオキシダーゼ活性の除去は難しい．

⑧フェニルヒドラジン法

0.1%フェニルヒドラジン PBS 溶液に室温で 30 分～2 時間浸漬する．好酸球以外の内因性ペルオキシダーゼはほとんど消失する．抗体活性やある抗原性はよく保持するとされている．

⑨ニトロプルシド法

メタノール中に，1%ニトロプルシドナトリウムおよび 0.2%酢酸を加えた液中に切片を室温で 1 時間浸漬する．内因性ペルオキシダーゼの阻止は非常に良好だが，やや抗原性が低下することは否めない．

⑩グルコースオキシダーゼを用いた方法

180mg β-D（＋）グルコース，5mg グルコースオキシダーゼ，6.5mg アジ化ナトリウム／50ml PBS で 37℃，1 時間反応．グルコースオキシダーゼの酵素反応により，非常にゆっくり，かつ持続的に低濃度の過酸化水素を生成し確実にペルオキシダーゼ活性を失活させる．

（イ）内因性アルカリフォスファターゼ活性の除去

ホルマリン固定パラフィン切片においては固定時に失活するため問題とはならない．

新鮮凍結切片や AMeX 切片，及び細胞診標本などで内因性アルカリフォスファターゼ活性が残存することがある．5mM レバミゾールを加えることで大部分の内因性アルカリフォスファターゼ活性は除去できるが（レバミゾール濃度は 1mM（24mg/dl）でも実用上問題はない），小腸上皮微絨毛の内因性アルカリフォスファターゼ活性は除去されない（市販の標識抗体に使用されているアルカリフォスファターゼはウシ小腸由来アルカリフォスファターゼであり，レバミゾールによる活性除去が少ない）．また，体腔液中の腺癌細胞にレバミゾール耐性のアルカリフォスファターゼ活性が証明される場合があるとの報告がある．

小腸上皮微絨毛の内因性アルカリフォスファターゼ活性除去には，20%酢酸水溶液（または 20%酢酸 100%エタノール溶液）による切片の前処理（4℃，15 秒），あるいは PBS 溶液による加温処理（65℃）が有効だが時間調整が難しく，更に抗原性の変質効果が高い．染色対象が小腸あるいは体腔液中の腺癌細胞の場合は，内因性アルカリフォスファターゼ活性の影響を考慮し，ペルオキシダーゼによる免疫染色法を行うことを推奨する．

3. 内因性酵素除去におけるピットフォール

（ア）糖鎖抗原

CEA，CA19-9，CA125，CA15-3 などの腫瘍マーカーおよび血球表面マーカーに対するモノクローナル抗体は，糖鎖抗原を認識するものである．これら抗体を用いる場合に，内因性ペルオキシダーゼ除去に過ヨウ素酸あるいはメタ過ヨウ素酸塩で処理を行うと，抗原が著しく失活するため使用は避けた方がよい（Fig.1）．レクチン組織化学においても，過ヨウ素酸の使用は禁忌である．また，過酸化水素加メタノール処理でも，長時間にわたると糖鎖破壊の影響が明らかとなる（パラフィン切片）．同様に，新鮮凍結切片（アセトン固定）においても，過酸化水素加メタノールで処理を行うと，多くの血球表面抗原が失活してしまう．

CD4 抗原に関しては，免疫染色の型の如く，熱処理によって抗原賦活化処理を行ったのち，一次抗体反応前に 3%過酸化水素で処理を行うと抗原性の失活が認められるため，とくに注意を要する．（Fig.2）．

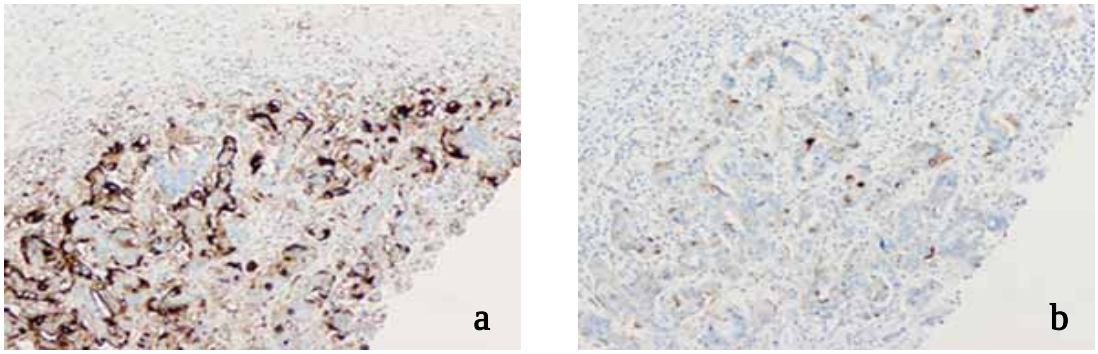

Fig.1 抗 CA19-9 抗体に対する 0.5%過ヨウ素酸処理の影響

内因性酵素除去の目的で，a：3%過酸化水素，b：0.5%過ヨウ素酸をそれぞれ 10 分間行った．0.5%過ヨウ素酸では陽性部位の減弱あるいは消失が認められる．

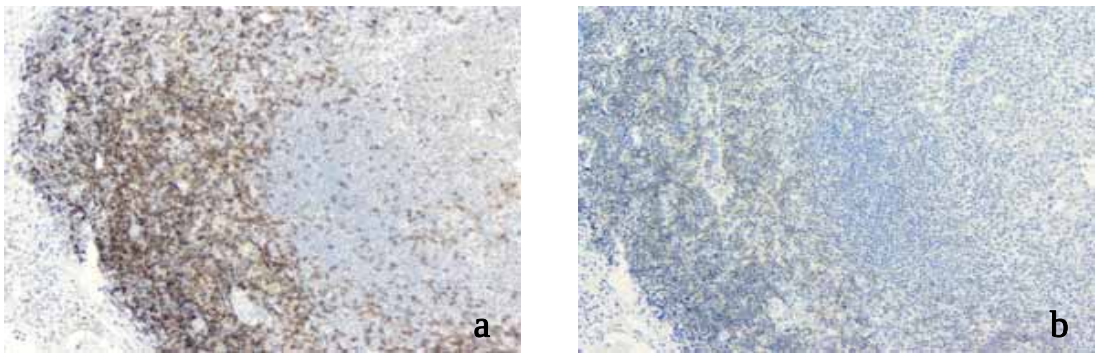

Fig.2 抗CD4 モノクローナル抗体に対する 3%過酸化水素処理の影響

内因性酵素除去の目的で，3%過酸化水素を a：一次抗体反応後，b：一次抗体反応前にそれぞれ 10 分間行った．一次抗体反応前では陽性部位の減弱傾向が認められる．

（イ）抗原賦活化処理

抗原賦活化処理の目的でパラフィン切片を対象に行われるマイクロウェーブやオートクレーブ処理にある程度の内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害効果が認められる．しかしながら，赤血球偽ペルオキシダーゼについては処理不十分か一部復活することもある．この点については，pH7.0 に調整されたクエン酸緩衝液で，オートクレーブによる 121℃，20 分間処理で阻害効果が得られると報告がある。

また肝細胞や腎の近位尿細管に内因性ビオチン活性が見られることがある．

（ウ）細胞診標本

免疫染色法の細胞診標本での応用が盛んに行われているが，組織検体同様に前述したピットフォールに加え，細胞診標本特有の性質により注意する点がある．ホルマリン固定に比べアルコール固定は細胞鮮度が比較的保たれた状態のため，内因性ペルオキシダーゼ活性が非常に強い．このため，市販のキットで型の如く染色手技を遂行すると過酸化水素と過剰に反応し，激しく発泡する．その結果，塗抹面が機械的に剥がれ落ちてしまう現象がしばしば観察される．

対策としては，0.3%過酸化水素加メタノールを使用し時間をかけて反応させるか，あるいは一度パパニコロー染色をした後，後日脱色操作を行い，免疫染色法を施行するとこの現象は軽減される．また使用する抗体マーカーに注意すれば，過ヨウ素酸による内因性ペルオキシダーゼ除去操作を行う方法でもよい．

検体処理後, 迅速で免疫染色法を施行したい場合は, ある程度アルコール固定を行った後, ヘマトキシリン分別用塩酸アルコール（1%塩酸 70%アルコール）になじませる程度（2～3回）通すことで発泡現象は軽減される（Fig.3）.

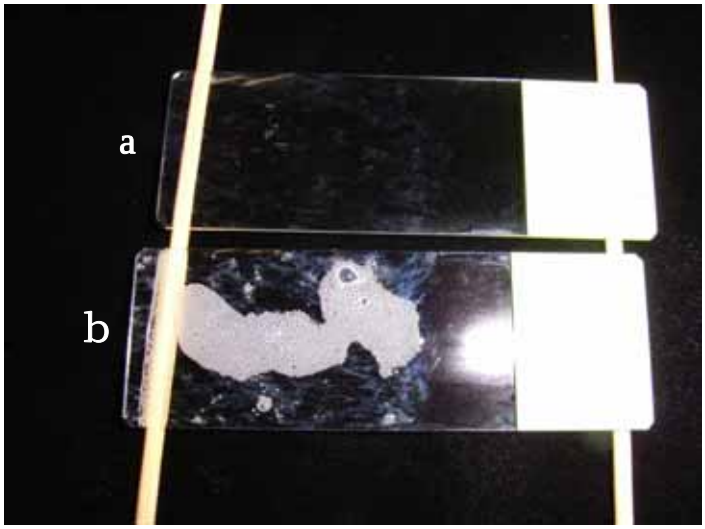

Fig.3 喀痰塗抹標本における 3%過酸化水素処理の影響

95%アルコール 30 分間固定後，a：塩酸アルコールに通したものは発泡現象が抑えられている．b：通さなかったものは発泡現象がみられ，一部塗抹面が剥がれている．

おわりに

内因性酵素除去，とくに内因性ペルオキシダーゼ除去による操作によっては抗原性の失活を招く恐れがあることを理解する必要がある．一般に市販されている染色キットを使用しても同様の危険性があり，このことが施設間差の原因の一つと考えられる．

目的とする抗原性の弱いものは，特にこの点に留意し，場合によっては内因性酵素除去を行わないか，あるいは一次抗体または二次抗体反応後に行うなど染色プロセスの変更を試みることが必要である．しかしながら内因性酵素除去を行わない場合に関しては，内因性ペルオキシダーゼ処理不十分のため染色結果の解釈には十分な注意が必要である．