

免疫組織化学染色に有用な脱メラニン法

岩手医科大学附属病院 病理診断科

山田 範幸、菅井 有

【はじめに】

メラノサイト関連病変の診断および研究では、日常的に免疫染色が用いられている。しかしながら、メラニン顆粒沈着の程度は、病変により様々であるため免疫染色の評価を困難にする機会にも遭遇する。

免疫染色に適した方法として 3%過酸化水素水（1%第 2 リン酸ナトリウム液）を利用した方法¹⁾が記載されているがメラニン顆粒は様々（図 1）で、すべてのメラノサイト関連病変には対応できていないのが現状である。

本稿では、自施設で行っている 20%過酸化水素水を用いた脱メラニン法と免疫染色技術を紹介する。

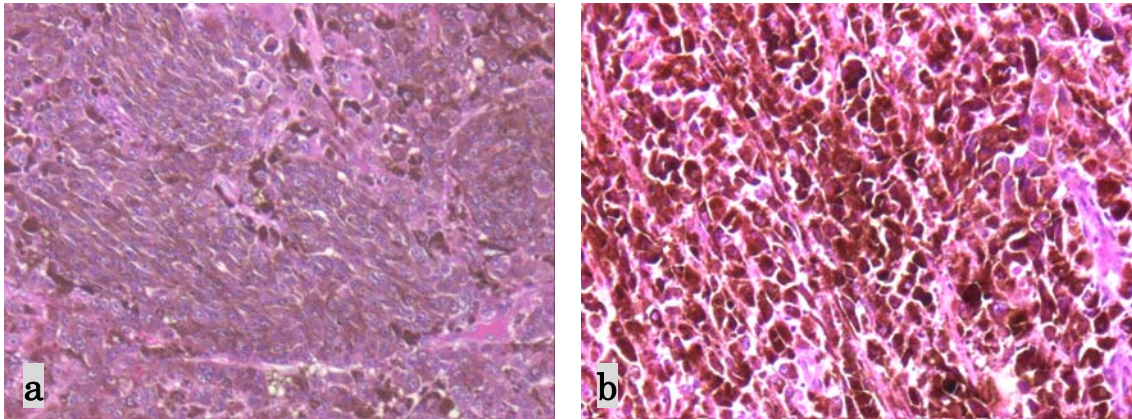


図 1 皮膚悪性黒色腫のメラニン顆粒沈着（H&E 染色）

- a: メラニン顆粒の沈着は軽度の症例 核所見は比較的観察しやすい。
 b: メラニン顆粒の沈着が著しい症例 高度のメラニン沈着により、核所見が観察しにくい。

【脱メラニン法】

脱メラニンは、脱パラフィン、親水化の後、20%過酸化水素水中で 15~18 時間浸漬して行う。その後流水水洗し、免疫染色を施す。脱メラニンの効果を図 2 に示す。メラニン顆粒は、ほとんどみられない。実際の免疫染色時で賦活化が必要な抗体を使用する場合は、脱メラニン前に賦活化を行う。一連の手順を表 1 に示す。また、無色素性悪性黒色腫症例で脱メラニン有・無での比較をした免疫染色を図 3 に示す。脱メラニン有・無での染色性に差異は認められない。

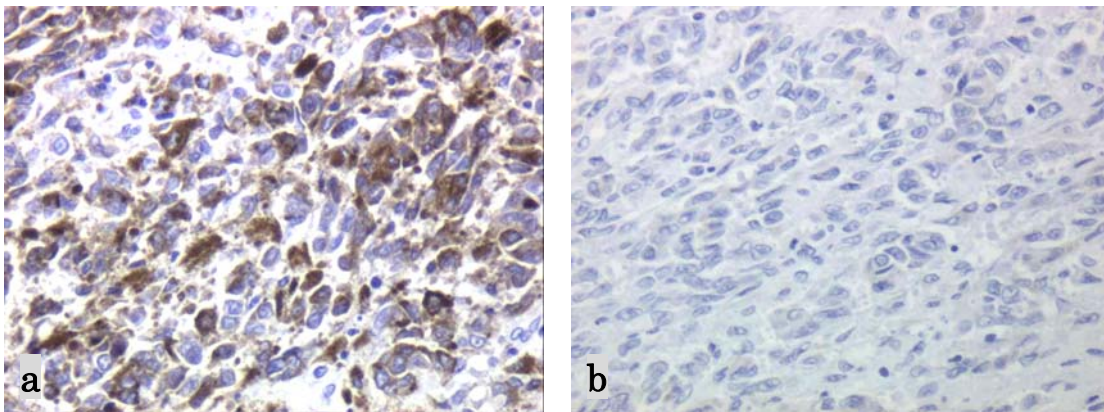


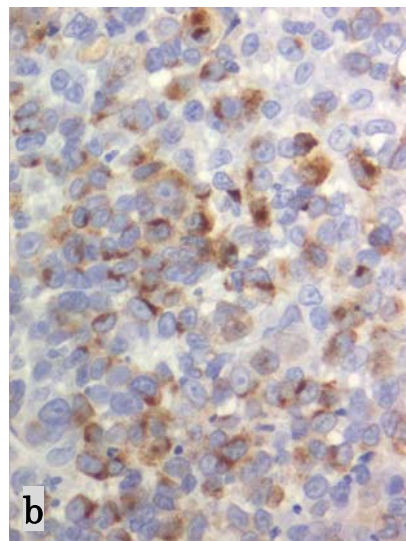
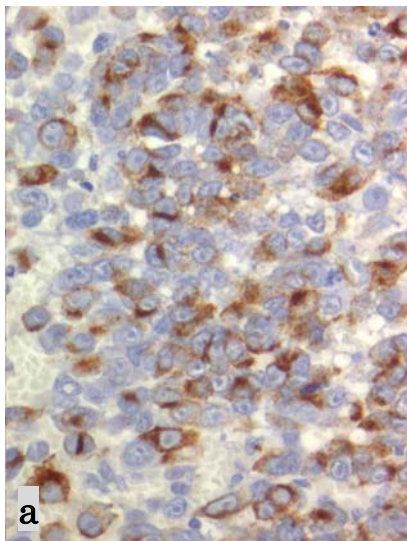
図 2 子宮腔部悪性黒色腫における脱メラニンの効果（ヘマトキシリン染色）

- a: 脱メラニン前の悪性黒色腫（対物×20） 腫瘍細胞にメラニン顆粒が沈着している。
 b: 脱メラニン後の悪性黒色腫（対物×10） 腫瘍細胞にメラニン顆粒がほとんどみられない状態になる。

表 1 脱メラニン法と免疫染色技術

1. 脱パラフィン・親水化
2. マイクロウェーブによる賦活化 (賦活化の必要のない抗体については省略)
3. 20%過酸化水素水に 15~18 時間浸漬
4. 流水水洗
5. 一次抗体
6. buffer で洗浄
7. 二次抗体 (ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI))
8. buffer で洗浄
9. DAB で発色
10. 後染色
11. 脱水・透徹・封入

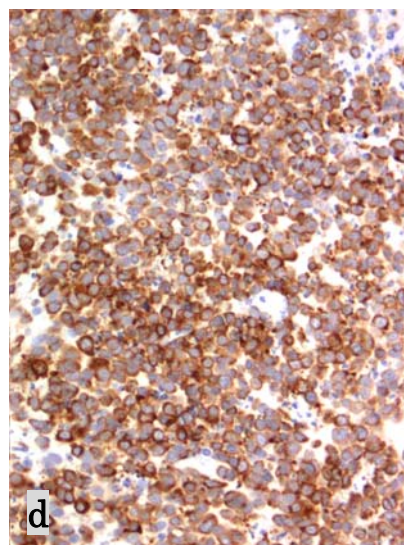
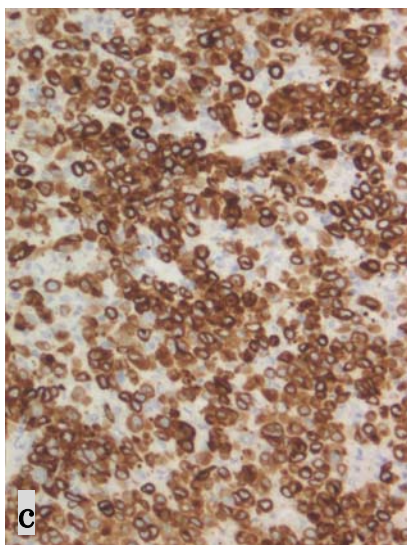
図 3 鼻腔内無色素性悪性黒色腫における脱メラニン法の有無による各種抗体の染色像



a: 脱メラニン無し (対物×20)
b: 脱メラニン有り (対物×20)

抗悪性黒色腫モノクローナル抗体では、腫瘍細胞の細胞質に陽性を示す。脱メラニンの有無による染色性の差異は認められない。

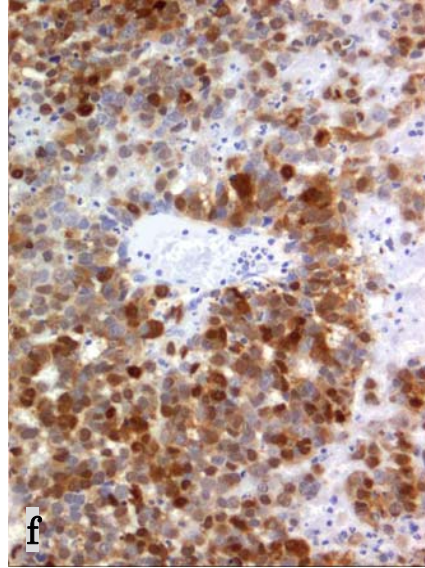
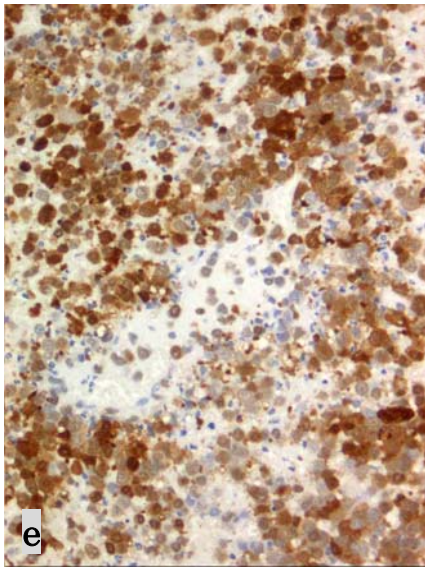
A 抗悪性黒色腫モノクローナル抗体 (clone: HMB45, ニチレイバイオサイエンス)



c: 脱メラニン無し (対物×10)
d: 脱メラニン有り (対物×10)

抗 MART-1/MelanA モノクローナル抗体では、腫瘍細胞の細胞質に陽性を示す。脱メラニンの有無による染色性の差異は認められない。

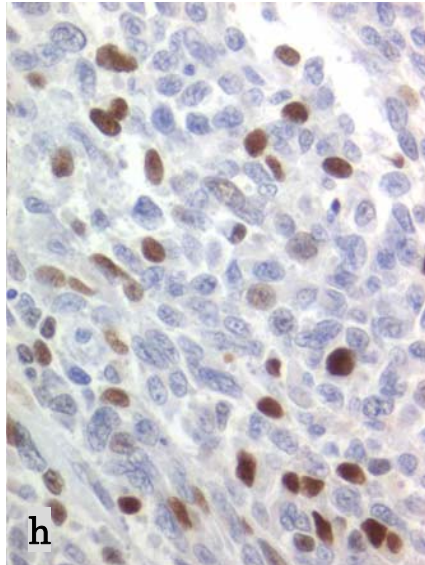
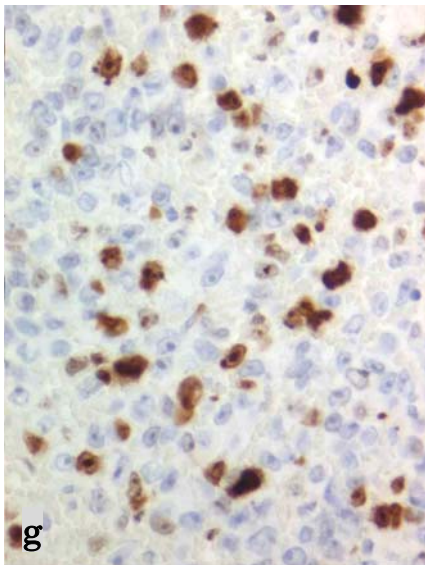
B: 抗 MART-1/MelanA モノクローナル抗体 (clone: M27C10, ニチレイバイオサイエンス)



e: 脱メラニン無し (対物×20)
f: 脱メラニン有り (対物×20)

抗 S100 タンパクポリクローナル抗体では、腫瘍細胞の細胞質に陽性を示す。脱メラニンの有無による染色性の差異は認められない。

C: 抗 S100 タンパクポリクローナル (ニチレイバイオサイエンス)



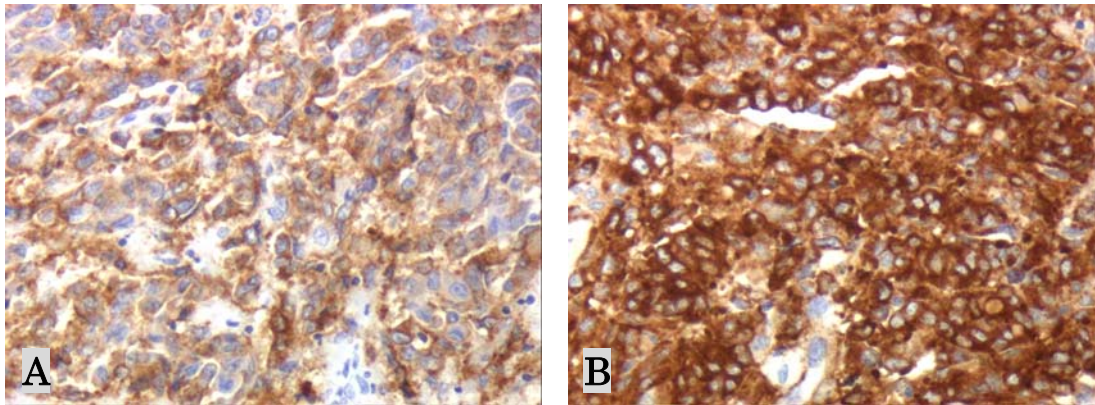
g: 脱メラニン無し (対物×10)
h: 脱メラニン有り (対物×10)

抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体では、腫瘍細胞の核に陽性を示す。脱メラニンの有無による染色性の差異は認められない。

D: 抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体 (clone: SP6, ニチレイバイオサイエンス)

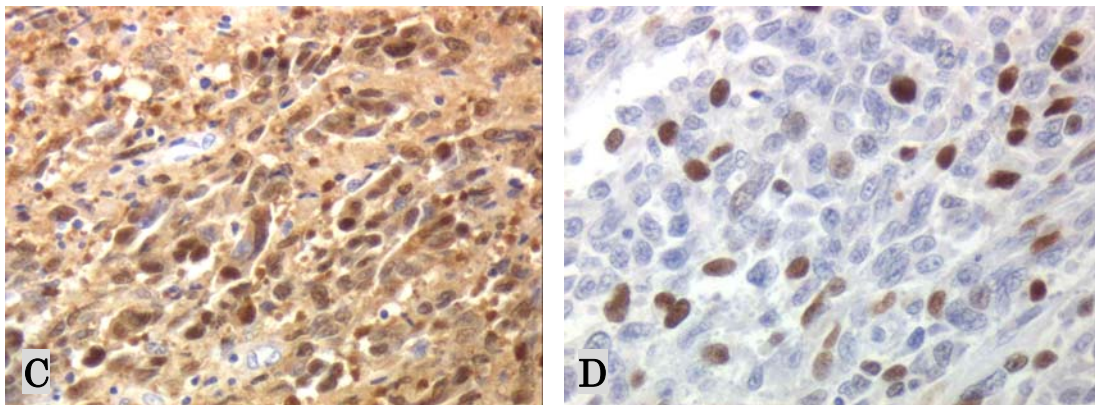
メラニン顆粒を有する悪性黒色腫症例で脱メラニンを行った免疫染色を図 4 に示す。

図4 子宮腔部悪性黒色腫における脱メラニンを行った各種抗体の染色像 (図2と同様の症例)



- A: 抗悪性黒色腫モノクローナル抗体 (clone: HMB45, ニチレイバイオサイエンス)
脱メラニン有り (対物×20)
- B: 抗 MART-1/MelanA モノクローナル抗体 (clone: M27C10, ニチレイバイオサイエンス)
脱メラニン有り (対物×20)

抗悪性黒色腫モノクローナル抗体および抗 MART/MelanA モノクローナル抗体共に腫瘍細胞の細胞質に陽性を示す。脱メラニン後でも明瞭な染色態度である。



- C: 抗 S100 タンパクポリクローナル (ニチレイバイオサイエンス)
脱メラニン有り (対物×20)
- D: 抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体 (clone: SP6, ニチレイバイオサイエンス)
脱メラニン有り (対物×20)

S100 タンパクポリクローナル抗体では、腫瘍細胞の核と細胞質に陽性を示す。
また、Ki-67 ウサギモノクローナル抗体では腫瘍細胞の核に陽性を示す。

【おわりに】

メラノサイト関連病変の病理診断および研究を目的とした免疫染色において、染色の評価を行う際に有用な脱メラニン法を紹介した。免疫染色の施行に当たっては、症例、病変に応じた対処法が必要であり、臨機応変な技術により、正確な判定の出来る標本作製が可能になるものと考えられる。

【参考文献】

- 1) 渡辺慶一, 中根一穂編: 改訂三版 酵素抗体法, 学際企画, 1992