

## 酵素抗体多重染色法

神戸大学医学部附属病院病理部 先端組織染色センター  
柳田絵美衣

### はじめに

免疫組織化学や免疫細胞化学（以下「免疫染色」）は病理診断において重要な役割を果たしている。免疫染色は多くの技術的改良がなされ、現在では多種多様な手法や応用法が存在する。その中でも多重免疫染色法は同一切片・同一細胞上で複数の抗原局在を同時に検出することにより、それらの相互関係の観察・証明が可能となる応用法のひとつである。代表的な多重免疫染色法には蛍光抗体多重染色法と酵素抗体多重染色法がある。前者は研究の場で幅広く用いられ、染色工程は少なく手技的にシンプルである。しかし、診断病理の現場ではあまり用いられてはいない。その理由として暗視野顕微鏡での観察が必須であり組織構築の確認が困難であることが考えられる。それに対して酵素抗体多重染色法は、明視野顕微鏡での観察が可能であるため、組織構築の観察・確認が容易である。しかし、蛍光抗体法とは異なり電子的なマージが困難であり、対象とする複数の抗原の局在が同一部位または近接している場合には、共発現の評価が困難となる。さらに、手技が煩雑で所要時間も長いことから、酵素抗体多重染色法も診断現場では敬遠されてきた。しかしながら、近年ではカクテル抗体を用いた染色方法の登場や自動化が進み、シンプルな手技でかつ短時間の染色が可能となったため、酵素抗体多重染色法も診断の現場に応用しやすくなってきている。酵素抗体法では二次抗体の標識に用いる酵素は主にペルオキシダーゼ（peroxidase : PO）とアルカリフォスファターゼ（alkaline phosphatase : AP）である。使用する酵素により発色剤が異なる。茶色、赤色、青色、黄色や黒色など多様な色調の発色剤が登場しており、原理的には何重もの染色が可能である。

本稿では、病理学検査で主流である間接法による多重染色技術について解説する。

### 1. 基本法

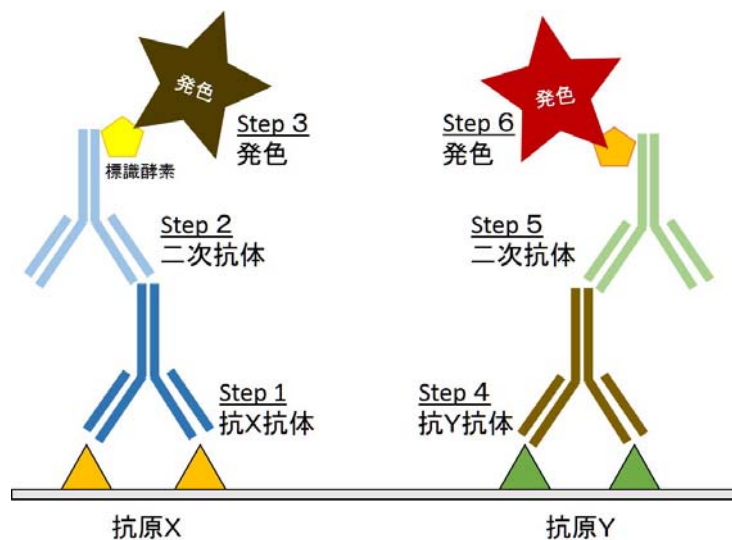
従来からある基本的な方法は、抗原抗体反応を単一の標本に複数回重ねて行う方法である。

例えば、抗原 X と抗原 Y を証明する場合、まず 1 染色目に抗 X 抗体を用いて通常通りの免疫染色をおこなう。次に、抗 Y 抗体を用いて、免疫染色を同一標本上に重ねる。1 染色目の後に、抗原抗体複合物の除去や残存する抗体の解離を目的とした洗浄操作、残存する抗体や酵素の失活を目的とした加熱操作が必要となる場合が多い（表 1、模式図 1）。しかし、これらの操作や、1 染色目での抗原賦活化処理が、2 染色目の対象抗原の抗原決定基を破壊し、染色不良となる場合がある。また、単染色と比べ、ほぼ倍の工程を要することとなり、ルーチン業務には適した方法ではない。そのため、2 種類の抗原に対して、マウスとウサギといった異なる動物種の抗体を用意できる場合は後述するカクテル法が望ましい。

基本法の染色例として 2 例紹介する。

表 1 : 酵素抗体多重染色法 基本法

1. 脱パラフィン、流水水洗
2. 抗原賦活化処理 (必要に応じて施行)
3. 流水水洗
4. 内因性ペルオキシダーゼ活性阻止 室温 10~30 分
5. 洗浄 TBS
6. 一次抗体反応 抗 X 抗体 室温 30~60 分
7. 洗浄 TBS
8. 二次抗体反応 酵素標識抗 IgG 抗体 室温 30 分
9. 洗浄 TBS
10. 発色 (標識酵素に対応した発色剤を使用)
11. 流水水洗
12. 抗体失活・洗浄かつ抗原賦活化処理
13. 流水水洗
14. 一次抗体 抗 Y 抗体 室温 30~60 分
15. 洗浄 TBS
16. 二次抗体 酵素標識抗 IgG 抗体 室温 30 分
17. 洗浄 TBS
18. 発色 (標識酵素に対応した発色剤を使用)
19. 流水水洗
20. カウンター染色 (使用した発色剤の色調により染色を選択)
21. 流水水洗
22. 色出し
23. 流水水洗
24. 封入



模式図 1 : 基本法 原理

- ① 劇症肝炎の治癒過程における細胆管からの肝細胞再生像を挙げる。HE 染色像ではロゼット様の形態が観察され (図 1a)、Cytokeratin7 と Hepatocyte の各単染色では図 1b、図 1c のような像となる。これらの像からは、何が起きているのかを把握し組織を読み取ることは困難である。そこで抗 Cytokeratin7 マウスモノクローナル抗体 (OV-TL12/30) と抗 Hepatocyte マウスモノクローナル抗体 (OCH1E5) の二重染色をおこなう。染色プロトコールは表 1 に準じる。1 染色目の二次抗体は PO を標識した抗マウス IgG 抗体 (ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (M)) を用い、Cytokeratin7 を PO 系発色剤である DAB で茶色に発色した。2 染色目では AP を標識した抗マウス IgG 抗体 (ヒストファイン シンプルステイン AP (M)) を用い、Hepatocyte を AP 系発色剤の PermaBlue (Blue) で青色に発色させた。1 染色目と 2 染色目の間には加熱処理を行った。染色結果は図 1d に示す。増殖した細胆管は Cytokeratin7 で茶色に、再生肝細胞は Hepatocyte で青色に陽性となっている。両者は極めて明瞭に区別が可能であり、増殖した細胆管から肝細胞が再生する両者の関係も容易に観察が可能となる。HE 染色像、単免疫染色のみでは把握困難な症例も二重免疫染色をおこなうことで明確になる。

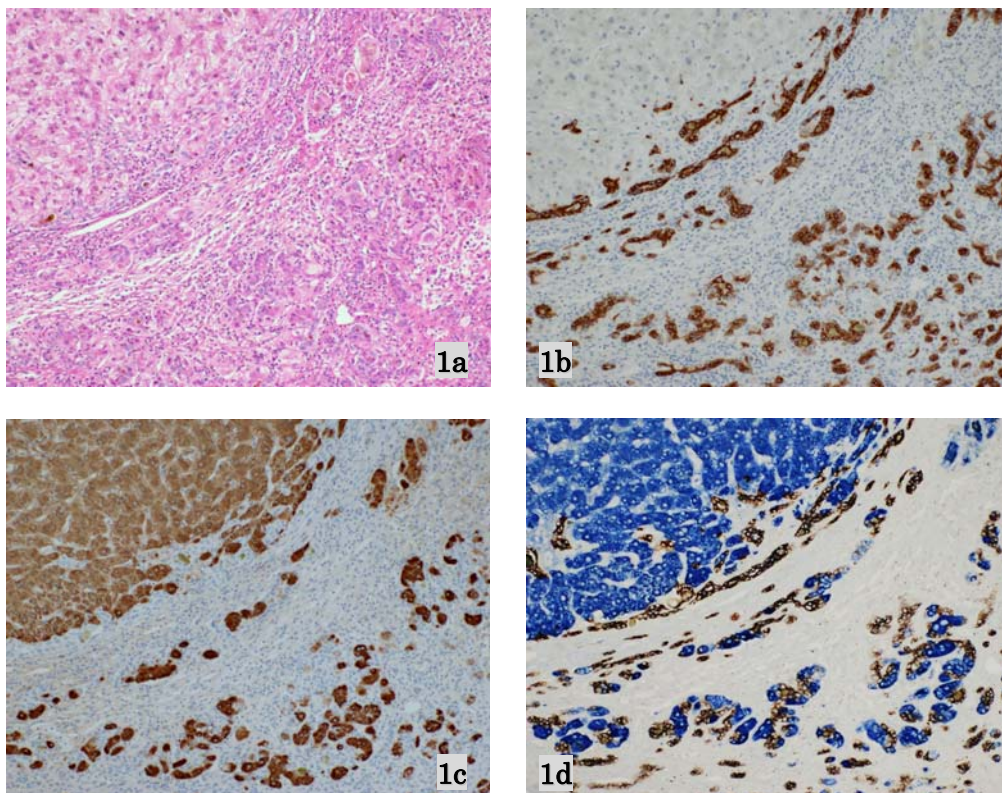


図 1：劇症肝炎からの治癒過程症例。

- a：HE 染色.ロゼット様の像を示す.
- b：Cytokeratin7 (DAB) 単免疫染色.
- c：Hepatocyte (DAB) 単免疫染色.
- d：Cytokeratin7 (DAB) と Hepatocyte (Blue) の二重免疫染色. 増殖した細胆管から肝細胞が再生する両者の関係も容易に観察が可能.治癒過程の像が確認できる.

- ② 三重免疫染色の場合も同じように免疫染色を3回繰り返すこととなる。リンパ節における癌転移を抗 CD45 (Leucocyte Common Antigen) マウスモノクローナル抗体 (2B11+PD7/26)、抗 Podoplanin マウスモノクローナル抗体 (D2-40)、抗 Cytokeratin マウスモノクローナル抗体 (AE1/AE3) を用いて三重免疫染色をおこなった例を示す。1 染色目で CD45 を PermaBlue (Blue) で青色に、2 染色目で Podoplanin を DAB で茶色に、3 染色目で Cytokeratin を PermaRed (Red) で赤色に染色した。抗 Podoplanin 抗体と抗 Cytokeratin 抗体の2種類の一次抗体は抗原賦活化処理が加熱処理であるため、CD45 の染色後に残存する抗体や酵素の失活を目的と Podoplanin の抗原賦活化処理の目的で加熱処理をおこなう。同様に Cytokeratin 染色前も加熱処理をおこなう。このように、免疫染色を3回繰り返すことになるので非常に煩雑となり費やす時間も長くなるが、明瞭に染め分けることが可能である (図 2)。CD45 で青色に染められたリンパ装置内に Podoplanin で茶色に染められたリンパ管がみられ、そのリンパ管内に Cytokeratin で赤色に染められた腫瘍細胞が確認出来る。

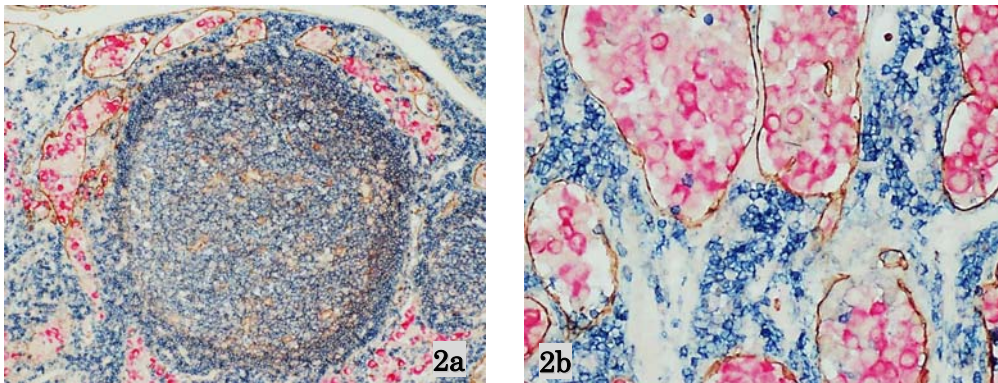


図 2 : CD45 (Blue) と Podoplanin (DAB) と Cytokeratin (Red) の三重免疫染色。

- a : 弱拡大。  
 b : 強拡大。CD45 で青色に染められたリンパ装置内に Podoplanin で茶色に染められたリンパ管がみられ、そのリンパ管内に Cytokeratin で赤色に染められた腫瘍細胞が確認出来る。

## 2. 異なる免疫動物の一次抗体と異なる標識酵素を用いる方法(カクテル法)

基本法の手技の煩雑性・時間の長さ・染色性の減弱などの問題点を軽減する方法もいくつか存在し、2種類の標識酵素を利用する方法、免疫動物の異なる一次抗体を用いる方法、異なる検出系を用いる方法などがある。特に、本項で紹介する、異なる免疫動物の一次抗体と異なる酵素標識二次抗体を用いる方法では、2種類の抗体の反応系統をそれぞれ独立的に反応させる仕組みである。そのためカクテル化した試薬を用い、同時進行させることが可能である。これにより、手技、時間は単免疫染色とほぼ同じで二重染色が可能となり、診断病理の現場に持ち込みやすい実践的な方法である。

原理は、証明したい抗原 X と抗原 Y に対し、抗 X 抗体と抗 Y 抗体の免疫動物をマウスとウサギの組み合わせで行う。この2種類の一次抗体をあらかじめ混和しカクテル化しておき、抗原 X と抗原 Y に同時に反応させる。次に、二次抗体として PO または AP を標識した抗マウス IgG と抗ウサギ IgG をあらかじめ混和しカクテル化しておき、同時にそれぞれの一次抗体に反応させる。反応後は、PO 系発色剤と AP 系発色剤を用いて発色させる。(表 2、模式図 2)。

まずは、正常扁桃 (図 3a) における抗 CD3 ウサギモノクローナル抗体 (SP7) と抗 CD20cy マウスモノクローナル抗体 (L26) の二重染色を示す。2種類の一次抗体を混和してカクテル化し、各抗原に同時に反応させる。二次抗体として AP を標識した抗ウサギ IgG 抗体 (ヒストファイン シンプルステイン AP (R)) と PO を標識した抗マウス IgG 抗体 (ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (M)) を混和し、反応させる。その後、PO 系発色剤である DAB と AP 系発色剤の Red で発色させる (図 3b)。また、両者を逆の標識酵素で染色した場合は図 3c となる。2種類の抗原抗体反応を同時におこなうことで、染色工程、所要時間は単免疫染色をほぼ同じとなる。

三重免疫染色の場合はカクテル法を利用し 2 回の染色で三重染色をおこなう。膵臓のランゲルハンス島での、抗 Insulin マウスモノクローナル抗体 (2D11-H5)、抗 Glucagon ウサギポリクローナル抗体、抗 Somatostatin ウサギポリクローナル抗体を用いて三重染色をおこなった例を示す。まず異なる動物種の組み合わせとなる抗 Insulin マウスモノクローナル抗体と抗 Somatostatin ウサギポリクローナル抗体を等量混合してカクテル化しておき、切片上に載せ 2

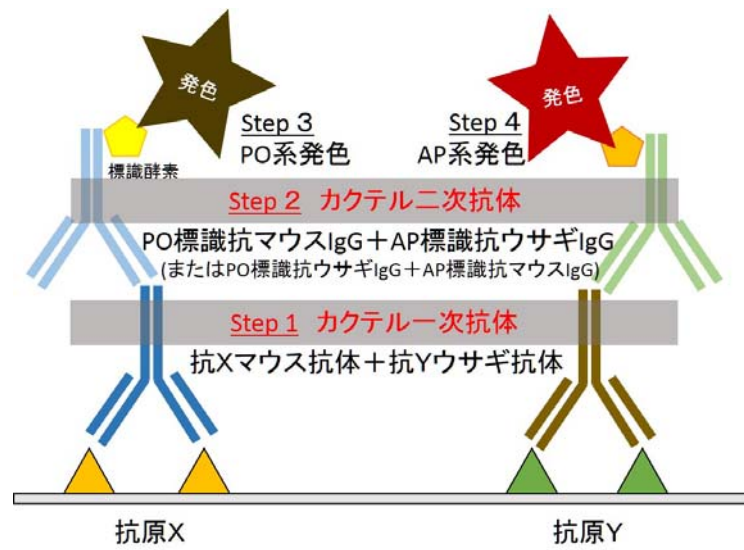
種類の抗原に対する反応を同時に起こす。次に、二次抗体には異なる酵素で標識した PO を標識した抗マウス IgG 抗体と AP を標識した抗ウサギ IgG 抗体（ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (R) とヒストファイン シンプルステイン AP (M)）をカクテル化し反応させる。その後、各酵素に対応した発色剤（DAB と Red）で発色させる。その後、通常通り抗 Glucagon ウサギポリクローナル抗体を用いて単免疫染色をおこない Blue で発色する。3 種類の一次抗体は全て抗原賦活化処理が不要であるため、残存する抗体や酵素の失活を目的とした加熱処理をおこなえない。この場合は、1 染色目の後に失活を目的とした専用の試薬を反応させ、次の Glucagon の染色をおこなうと良い。基本法であれば免疫染色を 3 回繰り返すことになるが、カクテル法を用いることで 2 回の染色で三重染色が可能となる（図 4）。

下垂体における抗 Adrenocorticotropin (ACTH) 抗体 (O2A3)、抗 Growth Hormone (hGH) ウサギポリクローナル抗体、抗 Prolactin ウサギポリクローナル抗体を用いて三重染色も同様におこなう。まず異なる動物種の組み合わせとなる抗 ACTH 抗体と抗 hGH 抗体を等量混合してカクテル化しておき、染色する。次に Prolactin の単染色をおこなうだけである。（図 5）。

近年では、あらかじめカクテル化されている一次抗体や二次抗体が販売されている。各自で混合する場合は、組み合わせる抗体の混合比や一次抗体の希釈倍率が染色結果に影響を及ぼすので、染色前には的確な陽性・陰性コントロールを用いての条件設定が必須である。

表 2：異なる免疫動物と異なる標識酵素を使用した二重染色（カクテル法）

1. 脱パラフィン、流水水洗
2. 抗原賦活化処理（必要に応じて施行）
3. 流水水洗
4. 内因性ペルオキシダーゼ活性阻止 室温 10～30 分
5. 洗浄 TBS
6. 一次抗体 室温 30～60 分 抗 X マウス抗体+抗 Y ラビット抗体（または抗 X ラビット抗体+ 抗 Y マウス抗体）
7. 洗浄 TBS
8. 二次抗体 室温 30 分 HRP 標識抗マウス IgG+ALP 標識抗ラビット IgG（または ALP 標識抗ラビット IgG+HRP 標識抗マウス IgG）
9. 洗浄 TBS
10. 発色 HRP 系発色剤
11. 発色 ALP 系発色剤
12. 流水水洗
13. カウンター染色（使用する発色剤の色調により染色を選択）
14. 流水水洗
15. 色出し
16. 流水水洗
17. 封入



模式図 2 : カクテル法 原理

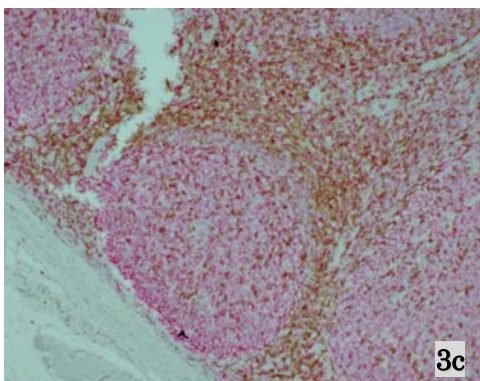
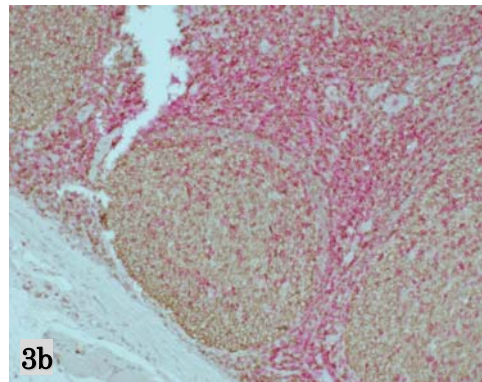
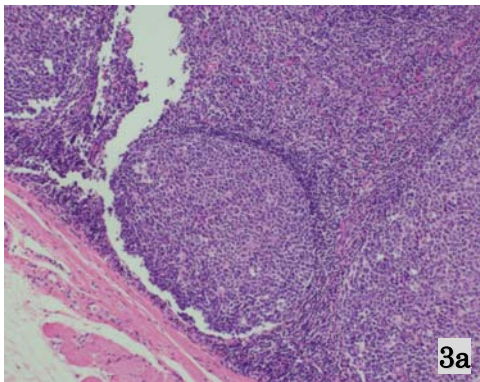


図 3 : 正常扁桃.

- a : HE 染色.
- b : CD3 (DAB) と CD20cy (Red) の二重免疫染色.
- c : CD3 (Red) と CD20cy (DAB) の二重免疫染色.

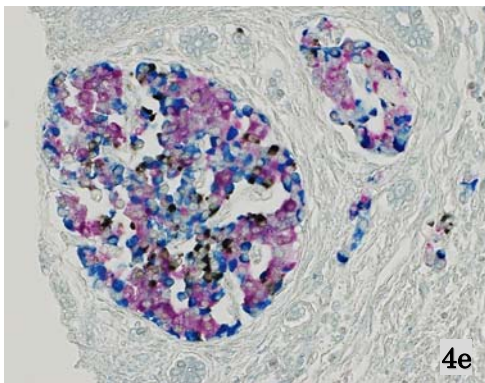
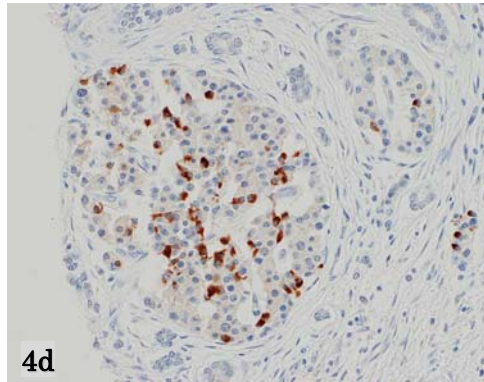
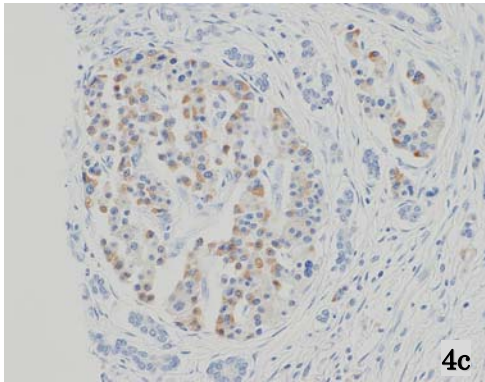
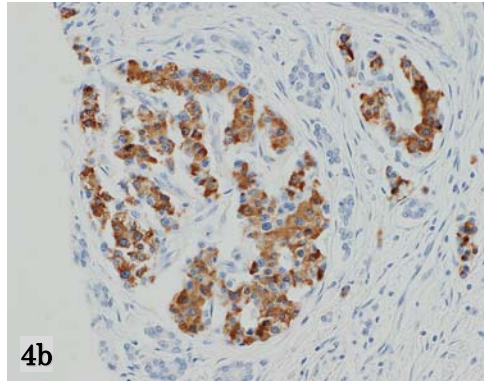
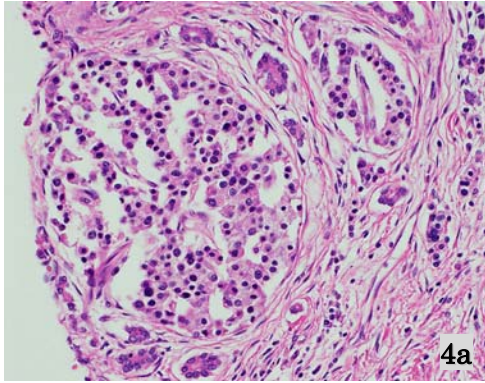


図 4：膵臓のランゲルハンス島.

- a : HE 染色.
- b : Insulin (DAB) 単免疫染色.
- c : Glucagon (DAB) 単免疫染色.
- d : Somatostatin (DAB) 単免疫染色.
- e : Insulin (Red) と Somatostatin (DAB) と Glucagon (Blue) の三重免疫染色.

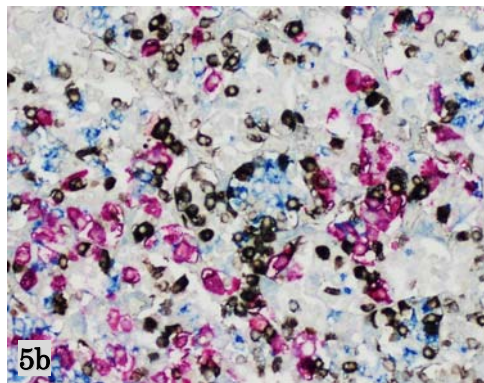
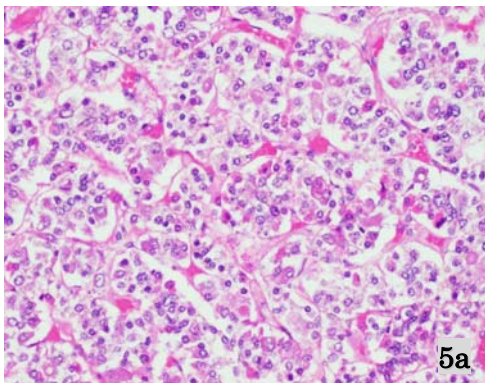


図 5：下垂体.

- a : HE 染色.
- b : ACTH (Red) と hGH (DAB) と Prolactin (Blue) の三重免疫染色.

### 3. 診断への応用が期待される一次抗体の組み合わせ

#### 1) PIN4

前立腺では、多重免疫染色による鑑別が有用で、市販のカクテル抗 PIN4 (CK5/14+p63+P504S) を用いて、前立腺癌や prostatic intraepithelial neoplasia (前立腺上皮内腫瘍) を容易に鑑別することが可能である。CK5/14 と p63 がマウス抗体であり、P504S がウサギ抗体となっている。一次抗体を反応させた後、PO を標識した抗マウス IgG (ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (M)) と AP を標識した抗ウサギ IgG (ヒストファイン シンプルステイン AP (R)) を混和しカクテル化して、同時に反応させる。その後、DAB と AP 系 Red の発色剤で発色する。染色態度は、正常前立腺組織に存在する基底細胞を高分子量サイトケラチン 2 種と p63 を茶色に染色し、さらに同時に P504S ( $\alpha$ -methylacyl-CoA Racemase : AMACR) を赤色に染め上げる。正常であれば前者が陽性、後者が陰性、PIN であれば両者が陽性、癌であれば前者が陰性、後者が陽性となる。実際には形態と併せた判断が必要ではあるが、有用性が高い。カクテル多重免疫染色では最も利用されている方法のひとつである (図 6)。

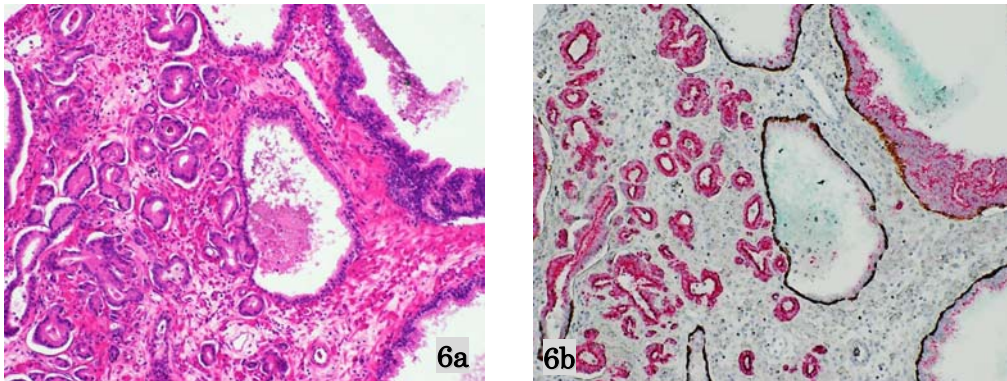


図 6 : 前立腺.

a : HE 染色.

b : PIN4 (CK5/14+p63+P504S) 染色.正常部は基底層が p63 と CK5/14 で DAB により茶色に染色.癌部は P504S のみが Red で赤色に染色.前癌病変 (PIN) では両染色性が混在し一目で判定可能となる.

#### 2) YANA-4

近年、分子標的治療薬の開発などにより、特に肺がん領域では“non-small cell carcinoma”の診断では許されず、腺癌なのか扁平上皮癌なのかの正確な鑑別が求められる。YANA-4 は我々が考案した多重免疫染色システムで、4 種類の一次抗体を用いて短時間で容易に肺腺癌と扁平上皮癌を染め分ける方法である。使用する一次抗体は肺腺癌のマーカーとして Napsin A と TTF1、扁平上皮癌のマーカーとして Cytokeratin14 と p63 を用いる。マウスモノクローナル抗体である Napsin A 抗体 (IP64) と抗 p63 遺伝子産物抗体 (4A4) と、ウサギモノクローナル抗体である抗 TTF1 抗体 (EP1584Y) と Cytokeratin14 (EP1612Y) を使用する。この 4 種類の一次抗体をカクテル化し、各抗原に同時に反応させる。二次抗体には異なる酵素で標識した AP を標識した抗マウス IgG 抗体 (ヒストファイン シンプルステイン AP(M)) と PO を標識した抗ウサギ IgG 抗体 (ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (R)) をカクテル化し、対応する免疫動物 IgG に反応させる。その後、各酵素に対応した発色剤 (DAB と Blue) で発色させる。Napsin A と p63 は同じ動物種であるので同じ色 (青色) になるが、Napsin A は胞体、p63 は核に染まるので、発現部位で両者を区別することが出来る。TTF1, Cytokeratin14 も同じ色 (茶色) に染まるが、TTF1 は核、Cytokeratin14 は胞体に染まるので、同様に発現部位で両者を区別できる。これにより、肺腺癌は核が茶、胞体が青、扁平上皮癌はその逆のパターンとなる (図 7、図 8)。4 種類の一次抗体のカクテルを 2 色のみで染色するが、発現部位で別個に判定が可能であり、また、カクテル法であるので、単染色とほぼ同様の時間で染色することができるこの方法は細胞診検体でも染色が可能であり、検体量が少ない場合は特に有用な方法である。



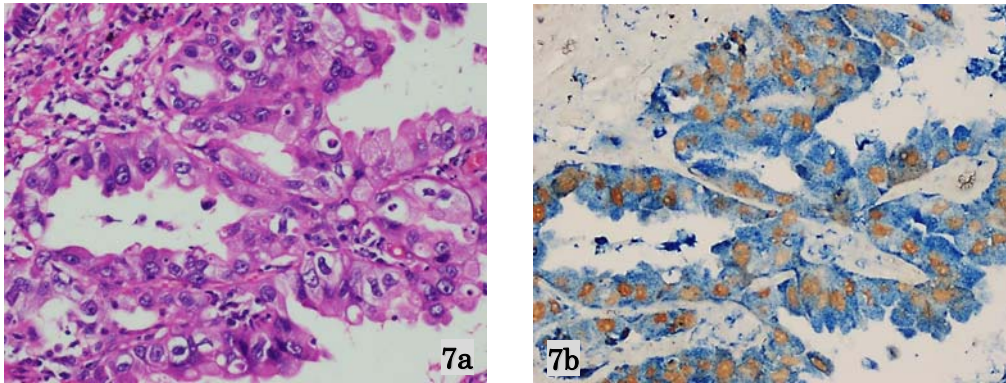


図 7：肺.原発性肺腺癌症例.

- a : HE 染色.
- b : YANA-4 染色.TTF1 (DAB) で核が茶色.NapsinA (Blue) で胞体が青色.

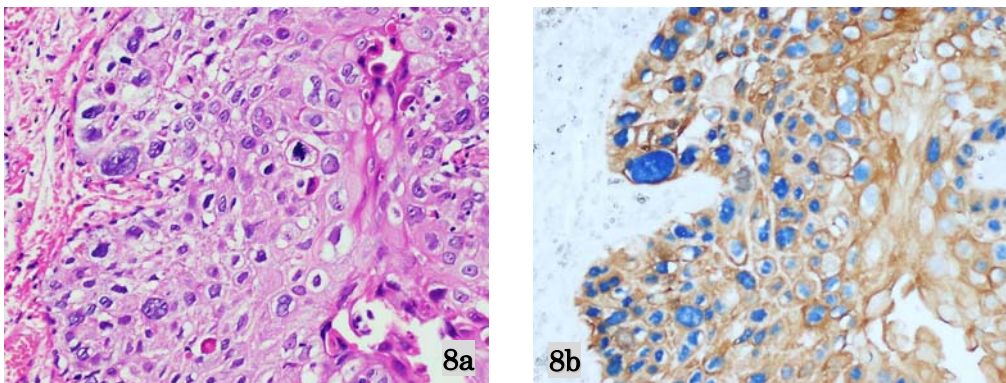


図 8：肺.扁平上皮癌症例.

- a : HE 染色.
- b : YANA-4 染色.p63 (Blue) で核が青色.Cytokeratin14 (DAB) で胞体が茶色.  
原発性肺腺癌の染色パターンとは逆となる.

#### 4. 細胞診検体での多重染色

パラフィン包埋ブロックなどは薄切することで何枚もの連続切片を作製することが可能であり、多重免疫染色の必要性は高くはない。しかし、細胞診検体で同一の細胞が得られない場合や細胞数が少量の場合などに多重免疫染色は特にその優位性が期待できる。卵巣の組織検体と細胞診検体での二重免疫染色を例に挙げる。一次抗体は卵巣の明細胞腺癌で核に陽性となる抗 HNF18 ウサギポリクローナル抗体と漿液性腺癌で核に陽性となる抗 WT1 抗体 (WT49) をカクテル化して用いる。染色プロトコールは表 2 参照。抗 HNF18 抗体は Blue で発色し、抗 WT1 抗体は DAB で発色する。組織検体での染色像 (図 9、10)、細胞診検体での染色像 (図 11、12) とともに、明細胞腺癌では核が HNF18 陽性となり青色、漿液性腺癌では核が WT1 陽性となり茶色となる。卵巣の明細胞腺癌と漿液性腺癌では治療方針が異なるため両者の鑑別が重要となる。しかし、異型度が高くなるにつれ両者の鑑別が困難となる。この二重染色を用いれば細胞診検体においても両者の鑑別が可能となり、迅速に対応が出来る。細胞診では、組織検体とは異なる固定法や処理法が用いられるため、多重免疫染色の方法論が十分確立されていないのが現状であるが、条件設定を正しくおこなえば細胞診検体でも染色は可能である。

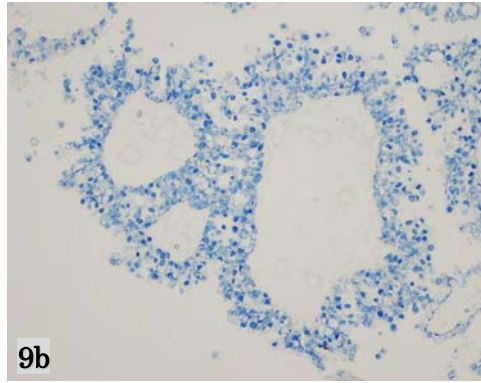
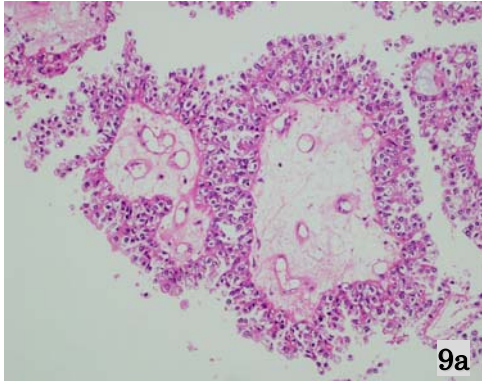


図 9 : 卵巣.明細胞腺癌症例.

- a : HE 染色.
- b : WT1 (DAB) と HNF18 (Blue) の二重免疫染色.明細胞腺癌では WT1 陰性かつ HNF18 が核に陽性となるため HNF18 (Blue) の染色像のみとなる.

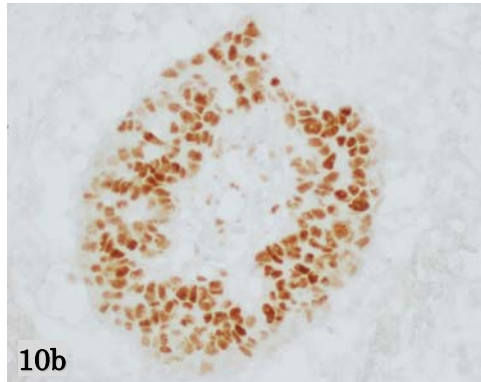
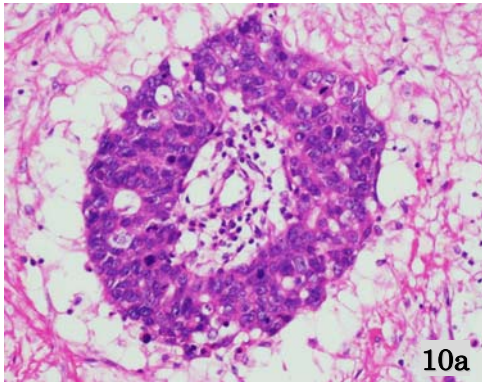


図 10 : 卵巣.漿液性腺癌症例.

- a : HE 染色.
- b : WT1 (DAB) と HNF18 (Blue) の二重免疫染色.漿液性腺癌では WT1 が核に陽性かつ HNF18 陰性となるため WT1 (DAB) の染色像のみとなる.

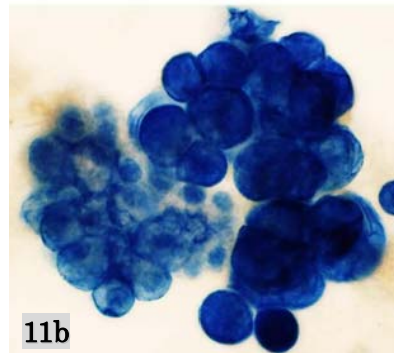
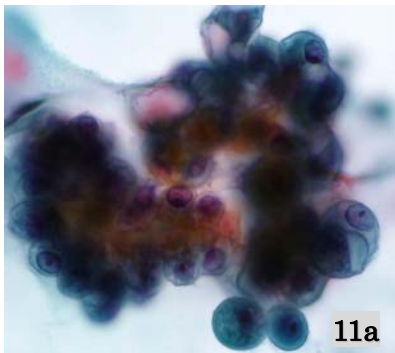
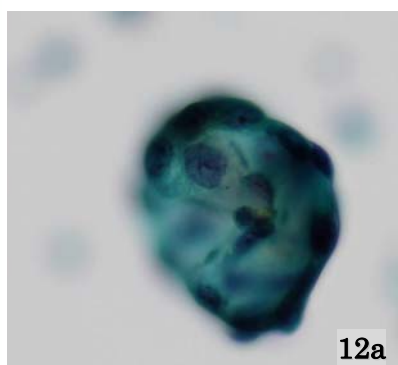
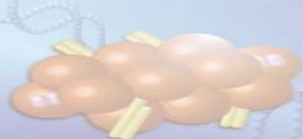
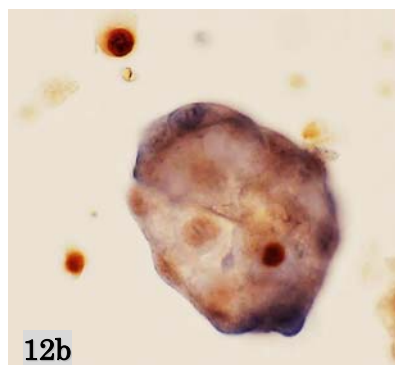


図 11 : 細胞診検体.体腔液.明細胞腺癌症例.

- a : パパニコロウ染色.
- b : WT1 (DAB) と HNF18 (Blue) の二重免疫染色.漿液性腺癌では WT1 陰性かつ HNF18 陽性となるため HNF18 (Blue) の染色像のみとなる.



12a



12b

図 12 : 細胞診検体.体腔液.漿液性腺癌症例.

a : パパニコロウ染色.

b : WT1 (DAB) と HNF18 (Blue) の二重免疫染色.漿液性腺癌では WT1 が陽性かつ HNF18 陰性となるため WT1 (DAB) の染色像のみとなる.

## 5. 動物検体での多重染色

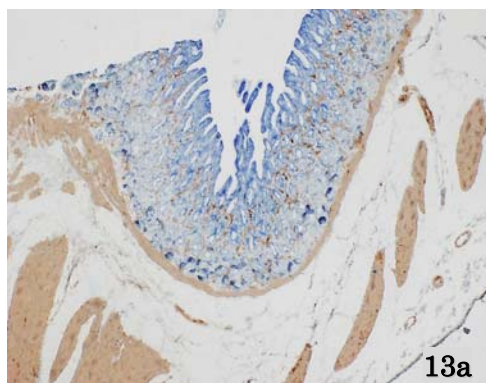
動物組織用二次抗体を使用すれば動物検体においても多重免疫染色は可能となる。ニチレイ バイオサイエンスからマウス組織用二次抗体として抗マウス抗体用のヒストファインマウス ステインキット、抗ウサギ抗体用としてヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO (R)があり、両者とも標識酵素は PO であるため、発色剤は PO 系発色剤である DAB、Blue、Red を使用する。これらを用いてマウス大腸組織での染色を例に挙げる。

使用する一次抗体を抗 Cytokeratin 抗体 (AE1/AE3) と抗 Actin (Smooth Muscle) 抗体 (1A4) とする。まず、抗原賦活化処理が不要な抗 Actin 抗体から、キットのプロトコルに従い染色する (マウス組織に対して抗マウス抗体を使用する場合は、内因性のマウス Ig のブロッキングが必要となる)。DAB で発色後、残存する抗体や酵素の失活と次に検出する抗原の賦活化を目的とした加熱操作をおこなう。その後、抗 Cytokeratin 抗体を PO 系の Blue の発色剤を用いて通常通りのプロトコルで染色する (図 13)。

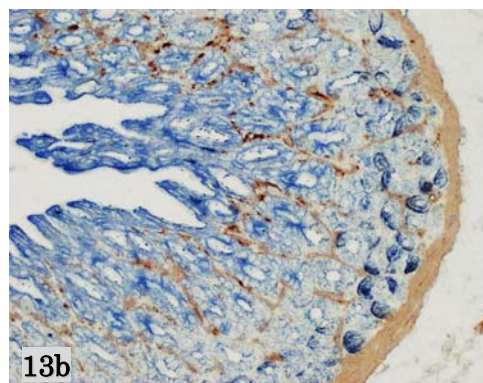
使用する一次抗体が抗ウサギ抗体の場合はブロッキング等の操作を省略することが出来る。染色は基本法のプロトコルに従いおこなう。ここでは、ウサギポリクローナル抗体を 2 種類反応させる。使用する二次抗体はヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO (R) と AP を標識した抗ウサギ IgG に対応した二次抗体を使用した。

マウスの脳組織における抗 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) ウサギポリクローナル抗体と抗 S100 ウサギポリクローナル抗体、抗 GFAP 抗体と抗 Synaptophysin 抗体の二重染色をそれぞれ示す (図 14)。

細部まで明瞭な染め分けが可能であり、動物検体においても多重染色はほぼ同様のプロトコルで染色が可能である。



13a



13b

図 13 : 動物検体 (マウス).大腸.Cytokeratin (Blue) と Actin (DAB) の二重免疫染色.両発色剤とも PO 系発色剤使用.

a : 弱拡大.

b : 強拡大.

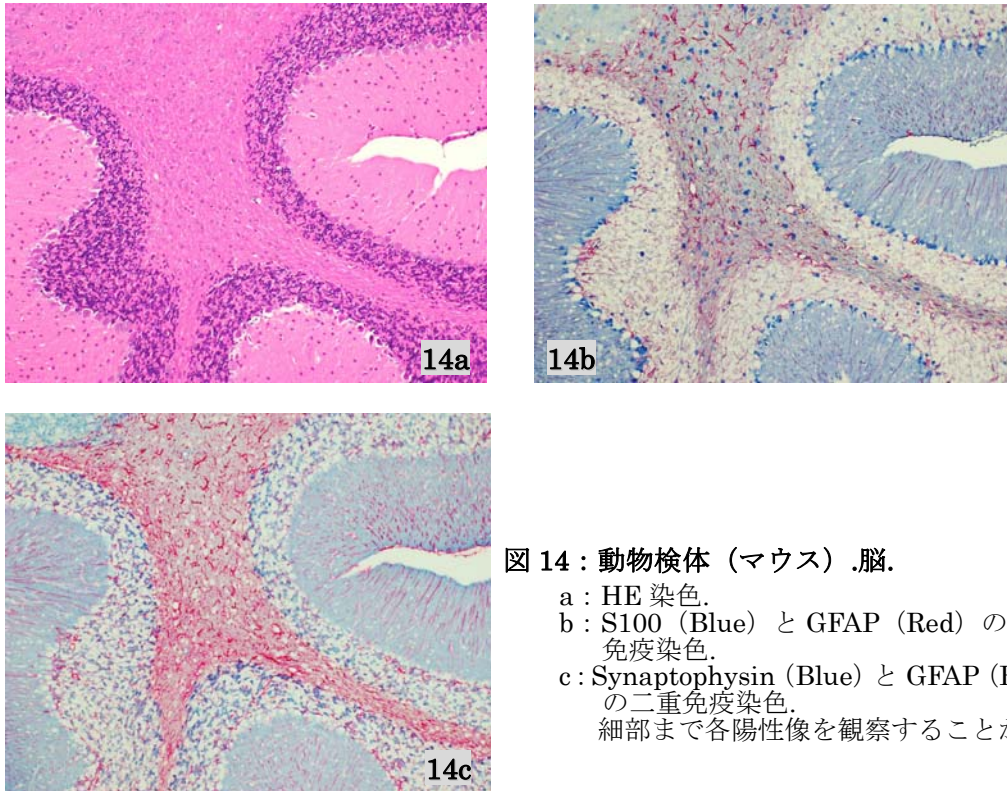


図 14 : 動物検体 (マウス) .脳.

- a : HE 染色.
  - b : S100 (Blue) と GFAP (Red) の二重免疫染色.
  - c : Synaptophysin (Blue) と GFAP (Red) の二重免疫染色.
- 細部まで各陽性像を観察することが可能.

#### おわりに

多重免疫染色は同一標本・同一細胞上で複数の抗原局在を証明する画期的方法ではあるが、煩雑な手技、所要時間の長さなど日常業務に取り入れるには非常にハードルが高い。手技のシンプル化や時間短縮が可能なカクテル法は、それらの問題を解決することは出来るが、専用試薬や一次抗体の組み合わせなどの条件を揃える必要がある。また、組み合わせる一次抗体の性質や染色条件なども考慮した上でプロトコルを確立しなくてはならないし、常に染色精度の管理は必須である。そのため、闇雲におこなうのではなく、単免疫染色ではなく多重免疫染色だからこそ有用性が高いと思われる場面で、この技術を活用してもらいたい。プロトコルの確立には手間や時間を要することはあるが、確固たるプロトコルさえ確立してしまえば、用手法でも再現性の高い染色が可能となる。また自動染色装置にプログラムすることも可能であるため、日常業務に取り入れることも容易となる。

多重免疫染色は染色するにあたり多くの情報・知識・技術を要するが、使い方によっては複数枚の単免疫染色でも得られないような情報をもたらし、研究の幅を広げることや、病理診断に大きく役立つこととなる。

#### 参考文献

- 1) 名倉宏、長村義之、堤寛：「改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法」
- 2) 柳田絵美衣、伊藤智雄：「病理技術 キットによる免疫多重染色プロトコル」病理と臨床. Vol.28, Number1, p91-95. 2010
- 3) 柳田絵美衣、伊藤智雄：「新しい免疫組織化学」検査と技術. Vol.38, Number10, p770-772. 2010
- 4) 柳田絵美衣、伊藤智雄：「酵素抗体重染色法」最新染色法のすべて Medical Technology 別冊. p209-212. 2010
- 5) Emmy Yanagita, Naoko Imagawa, Chiho Ohbayashi, Tomoo Itoh : 「Rapid Multiplex Immunohistochemistry Using the 4-antibody Cocktail YANA-4 in Differentiating Primary Adenocarcinoma From Squamous Cell Carcinoma of the Lung.」 Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology. Vol.19, Issue6, p509-513.2011
- 6) 柳田絵美衣：「多重染色」病理と臨床 2014 年臨時増刊号 免疫組織化学 診断と治療選択の指針 vol.32, p39-44. 2014

- 7) 柳田絵美衣、伊藤智雄：「免疫多重染色とその診断への応用」診断病理. Vol.31, Number4, p291-300. 2014
- 8) 柳田絵美衣：「免疫組織化学の技術 酵素抗体法の多重染色」病理技術. Vol.77, Number2, p55-58. 2014
- 9) 柳田絵美衣：「免疫組織化学の現状」医学検査. Vol.64, Number2, p133-142. 2015
- 10) Emmy Yanagita, Shingo Kamoshida, Naoko Imagawa, Tomoo Ito : 「Immunohistochemistry-based Cell Cycle Detection (iCCD): A Novel System to Visualize Cell Kinetics on Formalin-fixed Paraffin-embedded Tissues.」 American Journal of Surgical Pathology. Vol.36, Number5, p769-773. 2012