

## 加熱処理による抗原賦活化

東京慈恵会医科大学葛飾医療センター 病院病理部 梅森 宮加  
東京慈恵会医科大学葛飾医療センター 病院病理部 梅澤 敬

### 【はじめに】

免疫組織化学染色における抗原賦活化は、欠かすことのできないステップである。賦活化には様々な方法が存在するが、全ての抗原・抗体に対する万能な抗原賦活法は存在しない。抗原賦活化を必要としないもの、あるいはその賦活化が逆効果となるタンパクもあるため、最適な条件決定にはデータシートや証明したいタンパクについて熟知することが最も重要である。今回は数ある賦活法のひとつである、加熱処理について解説する。

### 【加熱賦活原理】

パラフィン切片を用いた免疫染色の場合、組織はホルマリン固定され、多くの施設では 10-15% 中性緩衝ホルマリンを用いている。ホルマリン固定は組織や細胞の形態保持、抗原性の保存には、極めて優れた方法である。しかし、ホルムアルデヒド分子により生じたタンパク間の架橋のために、抗原タンパクの立体構造の変化による抗原性の失活や抗体の浸透性の低下が起こり、免疫染色に大きな影響を与える場合がある。こうした架橋構造を取り除き、抗原性を回復あるいは抗体の浸透性を高める目的で、熱による抗原賦活化が有効な場合がある。具体的に、ホルマリン固定により形成されたタンパクの立体構造やメチレン架橋が加熱により切断され、ポリペプチド鎖が伸展し、エピトープが露出、抗体との接触が容易になる。また、架橋の切断により組織内のタンパクや核酸などが部分的に抽出されるため、抗体の組織内への浸透が容易になる。

### 【加熱賦活方法】

種類	反応時間	特徴
マイクロウェーブ	5分 (100℃)	加熱ムラや吹きこぼれの可能性がある 長時間の処理には不向き
オートクレーブ	5-20分 (121℃)	細胞の空胞化など形態保持に難点あり 電源 ON から切片を取り出すまでに時間がかかる
温浴槽	40分 (95-99℃)	剥離しやすい脂肪組織、硬組織に適する
圧力鍋	5-10分 (120℃前後)	短時間で大量の切片を処理できる 安価であり用意しやすい 界面活性剤の使用は禁忌

## 【加熱賦活の注意点】

加熱賦活は、適切な賦活条件で行った場合に抗原性や抗体の浸透性を高めることができる。しかし加熱賦活の条件によっては、組織障害や細胞変化、染色性に影響を及ぼすことがある。以下に注意点をまとめた。

### 1) 切片の損傷・細胞形態の変化

切片の剥離やささくれ立ち、核の金平糖化が生じる。特に EDTA 溶液を用いた場合に起こりやすい。

### 2) 急冷による偽陰性化(写真 1, 2)

加熱処理後に切片を急冷すると MIB-1 などの一部の核内抗原が陰性化・減弱化することがある。加熱により一本鎖にほぐれた二本鎖 DNA による立体障害構造が、急速冷却により元に戻ってしまうためと言われている。偽陰性化を防ぐためには、室温に 20-30 分間放置して自然冷却することが重要である。

10%中性緩衝ホルマリンで 1 晩固定された、正常扁桃の連続切片を用い MIB-1 の染色を実施した。30 分の自然冷却では、胚中心が強陽性で、扁平上皮基底層がびまん性に陽性となり、良好な染色結果が得られた。それに対して煮沸法による賦活処理後、水道水で急冷した切片では、胚中心や扁平上皮の基底層の陰性化が顕著である。MIB-1 では急速冷却は禁忌であり、同一切片上には必ず扁桃など陽性となる外部コントロール切片を載せることも必須である。

### 3) 抗原性の減弱・失活

加熱処理により抗原性が弱まり、さらに失活する抗体がある。代表例として骨髄系前駆細胞マーカー、好中球エステラーゼ、vWF、NSE や Calretinin が挙げられる。

### 4) 内因性ビオチン活性の復活

ABC 法や LSAB 法を用いた際にみられる細胞質内顆粒状の非特異的反応で、特に EDTA 溶液で強い。アビジン溶液、ビオチン溶液によるブロッキングが必要であるが、現在では、アビジンやビオチンを介さない高分子ポリマー法が主流となっているので問題にならない。

### 5) 内因性 proteinA 活性

黄色ブドウ球菌やレンサ球菌に対する免疫染色の際に、加熱処理により細菌類が保有する proteinA や proteinG の生理活性が復活し、一次抗体の Fc 部分と反応、そこにポリマー試薬の二次抗体が多数の一次抗体と結合するため、偽陽性となることがある。これを避けるためには、正常血清によるブロッキングまたはタンパク分解酵素処理による賦活化が適している。

### 【加熱処理に用いられる賦活化剤】

ホルマリン固定過程では、カルシウムイオンないし金属陽イオンとタンパクが共有結合した複合体が形成される。EDTA やクエン酸を主成分とする賦活化剤は、この複合体からカルシウムイオンないし金属陽イオンの除去に関与していると言われている。

加熱処理による抗原性賦活化は、賦活化剤の pH が重要となる。蒸留水でも十分効果のあるマーカーもあれば、特定の pH を有する緩衝液でなければ強い陽性反応が得られないマーカーもある。

### 【賦活化剤の種類】

主な賦活化剤

- ・ 10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0, pH7.0)
- ・ 1mM EDTA 溶液 (pH8.0)
- ・ Tris-EDTA 溶液 (pH9.0)

賦活化剤の強さは、蒸留水<クエン酸緩衝液<EDTA 溶液である。EDTA 溶液による加熱処理は、高感度な検出が期待できるものの、切片のささくれ立ちや核の金平糖化など組織のダメージが強く、可能な限りクエン酸緩衝液による賦活が推奨される。また、核の染色性が低下するため、染色時間には注意が必要である。賦活化剤に NP40 や Tween 20 といった界面活性剤を 0.1%の割合で加えると、より賦活化の効果が增大する。

### 【まとめ】

加熱処理の至適条件は、組織の固定時間、固定液の種類や濃度、抗体の反応性および検出方法により様々である。そのため、免疫組織化学染色は施設間で差がある切片を用いているのが現状であると思われ、日常のルーチンワークでは各検査室で最適条件を設定し、特に熱処理による抗原賦活化で生じるエラーを理解することが重要である。抗体のデータシートを参考に各施設で十分な条件検討が必要である。

現在の免疫組織化学染色は、用手法に代わり自動染色装置が主流となっており、免疫組織化学の原理を理解されないまま実施されていることが多いように思われる。特に熱処理によるメカニズムを熟知した上で、自動染色における染色原理やピットホールを理解して日常の染色を実施したい。

免疫組織化学染色の結果に及ぼす影響は様々な要因が存在し、熱処理以外に組織が固定液に入るまでの時間差、固定条件、パラフィン浸透条件など未知の要因が含まれており、今後、染色結果に及ぼす影響を様々な方向から分析することが必要である。

### 【参考文献】

1. 鴨志田伸吾：基礎からの免疫染色術—いかに確実に染め出すか—。組織細胞化学 2012 (日本組織細胞化学会編) 学際企画. 11-25, 2012
2. 堤 寛：免疫染色の工夫と落とし穴。組織細胞化学 2015 (日本組織細胞化学会編) 学際企画. 61-76, 2015

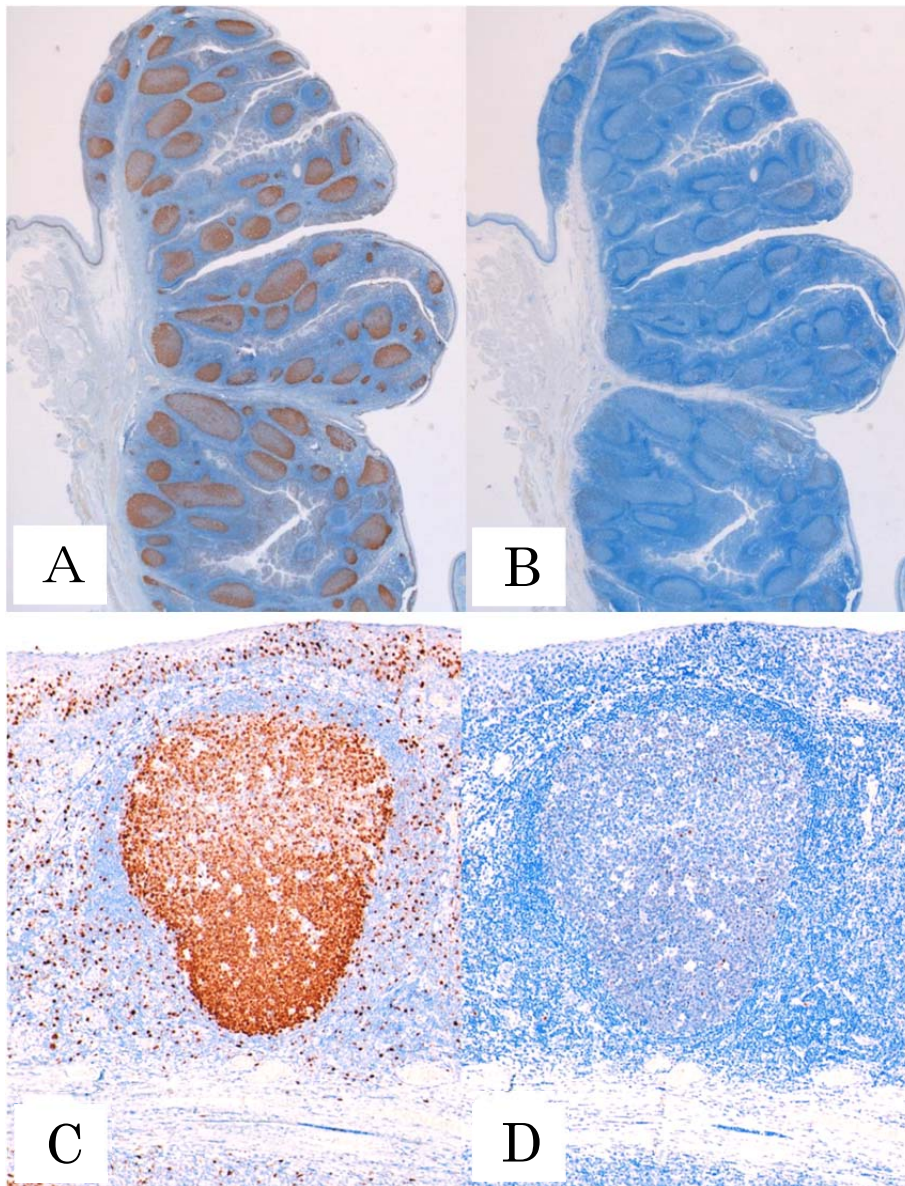


写真1 MIB-1 扁桃

A: 圧力釜による賦活処理（自然冷却）（ルーペ）.

B: 煮沸による賦活処理（急冷）（ルーペ）.

C: A の拡大. 胚中心が明瞭強陽性（MIB-1  $\times 10$ ）.

D: B の拡大. 陰性化が顕著である（MIB-1  $\times 10$ ）.

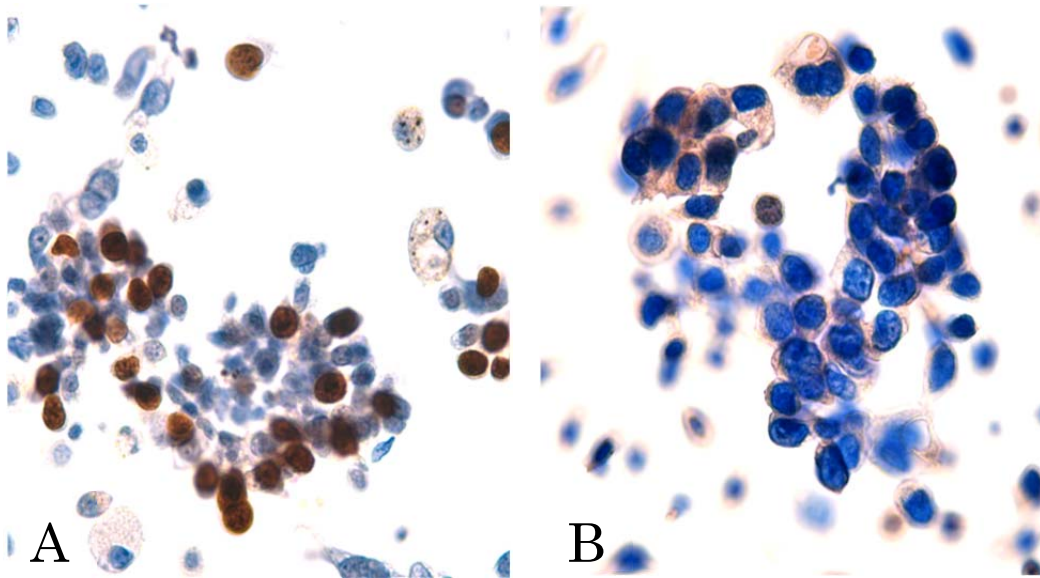


写真2 MIB-1 肺腺癌 シュアパス標本（気管支擦過）

A：圧力釜による賦活処理．腺癌の核内に陽性（自然冷却）（×60）．

B：煮沸による賦活処理．標本全体の腫瘍細胞でMIB-1が陰性化（急冷）（×60）．