



免疫組織化学の際に問題になる非特異反応

社会医療法人財団 大和会 東大和病院 病理細胞診断科 ^{※1}

神戸大学 大学院 保健学研究科 病態解析学領域 ^{※2}

島方崇明^{※1}・鴨志田伸吾^{※2}・桑尾定仁^{※1}

はじめに

免疫組織化学は抗原抗体反応を利用して、抗原の存在および局在を可視化することを目的とする。最も代表的な免疫組織化学の酵素抗体法では抗原に酵素標識抗体を反応させる。病理診断の分野では、主にホルマリン固定パラフィン包埋組織を対象とした酵素抗体法のことを免疫染色とよぶ。個別化医療の発展に伴って、コンパニオン診断にも広く活用され、分子標的薬の適応判定に欠かすことができない。そのため、染色結果の解釈が特に重要で、非特異反応を伴っていないかを考察することは必須である。

そもそも非特異反応とは、検出対象物質以外の因子によって引き起こされる異常反応で、真の結果とかけ離れた結果を導き出す現象である。これには偽陽性のみならず、偽陰性も含まれる。本稿では、ペルオキシダーゼ標識ポリマー試薬を用いた免疫組織化学の際に問題になる非特異反応を偽陽性反応と偽陰性反応に分け、それぞれの原因と対策について解説する。

偽陽性反応

1. 内因性ペルオキシダーゼ活性

赤血球，好中球，好酸球，組織球や一部の上皮細胞には内因性ペルオキシダーゼ（POX）活性が認められる。特に好酸球や赤血球のPOX活性は、パラフィン包埋後でも残存することが知られている。現在の免疫組織化学はポリマーを利用した高感度法（ポリマー法）が主流であり、その標識物質として西洋ワサビPOXがよく使用されている。そのため、内因性POX活性の除去が不十分であると、上記の細胞が偽陽性反応を示す。

対策

代表的な内因性ペルオキシダーゼ不活化法としては、3%過酸化水素水（室温，5-10分），0.3%過酸化水素加メタノール（室温，30分）および1%過ヨウ素酸水溶液（室温，10分）がある。しかし，3%過酸化水素水は一部のマーカーに偽陰性反応をもたらす（後述）。また，1%過ヨウ素酸水溶液は糖鎖抗原には不適である。したがって，0.3%過酸化水素加メタノールが推奨されるが，自家調製する場合にはメタノール（劇物）の使用に十分な注意が必要である。



2. イオン結合・疎水結合

抗体（＋荷電）とミトコンドリアの豊富な組織成分（－荷電）との間に生じるイオン結合や疎水結合が原因で背景染色が生じることがある。

対策

一次抗体反応の前に、0.25%カゼイン溶液、5%ウシ血清アルブミンや5%スキムミルクを反応させる。これらブロッキング液の反応後は洗浄せずに（ブロッキング液を吸い取るだけで）、一次抗体を滴下する。抗体希釈液へ界面活性剤（Tween 20など）を添加する方法もある。

3. 一次抗体の濃度

一次抗体の濃度が高すぎた場合、背景を含めてびまん性に偽陽性所見が認められることが多い（図1）。とくにポリクローナル抗体を用いた場合に起こりやすい。

対策

事前に一次抗体の希釈倍率を検討し、最適な倍率を設定する。精製度の高い一次抗体を選ぶ。最も重要なポイントであり、調製方法については成書を参考にされたい。

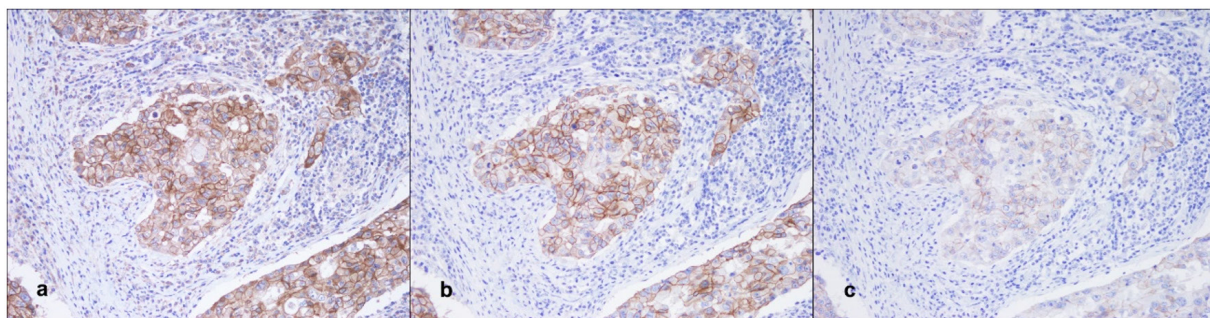


図1 不適正な希釈倍率による偽陽性反応および偽陰性反応（乳癌；HER2）

抗HER2ウサギポリクローナル抗体を使用

a.10倍希釈（高濃度） b.50倍希釈（適正） c.100倍希釈（低濃度）

4. 抗原賦活化処理

ホルマリン固定パラフィン包埋組織では、メチレン架橋の形成およびカルシウムイオンや金属イオンの共有結合による抗原決定基のマスクングが起こっている。そのマスクングされた抗原決定基を露出させる処理を抗原賦活化とよび、加熱処理や蛋白分解酵素処理がその代表的な手技である。加熱処理では、加熱溶液のpHや成分が賦活化の効果に大きく影響する。賦活化液としてはクエン酸緩衝液(pH 6.0)、クエン酸緩衝液(pH 7.0)、EDTA溶液(pH 8.0)、EDTA加トリス塩基溶液(pH 9.0)が広く利用されている。一方、蛋白分解酵素（プロテアーゼ）とは加水分解によりペプチド結合を切断する酵素の総称であり、ペプチド鎖の末端側を切断するペプチダーゼと内部を切断するプロテイナーゼに分けられる。抗原賦活化処理で用いられるのは後者であり、プロテアーゼ・タイプXXIV、プロテイナーゼKが基質特異性の低さゆえに汎用されている。

加熱処理の場合、賦活化溶液のpHが高くなると処理強度が強くなる反面、偽陽性反応が生じやすくなる。また、高pH溶液による加熱処理は核形態にも影響を及ぼすことが知られている。

対策

陽性および陰性コントロール切片を用いて、最適な抗原賦活化方法を選択するための条件検討を事前に行う。



5. 染色中の乾燥

湿潤箱が密閉されていない、傾いている等によって、切片上の抗体液が乾燥すると、抗原の有無にかかわらず、組織全体の偽陽性反応につながる。乾燥により、組織全体に抗体が吸着されてしまうことが原因と考えられる。

対策

湿潤箱の底面全体に水が張られているか、湿潤箱に設置したガラス棒や湿潤箱そのものが傾いていないかを水平器を用いて確認する。

6. 洗浄

緩衝液による洗浄は、過剰に付着した抗体や試薬を除去する目的で行われる。洗浄回数や洗浄時間が不十分な場合、残存した余分な抗体や試薬が反応して偽陽性所見を示すことがある(図2)。

対策

適切な洗浄回数と洗浄時間(一般的には2-5分を3回)を守る。洗浄能力を向上させる目的で界面活性剤(Triton X-100やTween 20)を0.1%程度の割合で洗浄液に添加するのもよい。

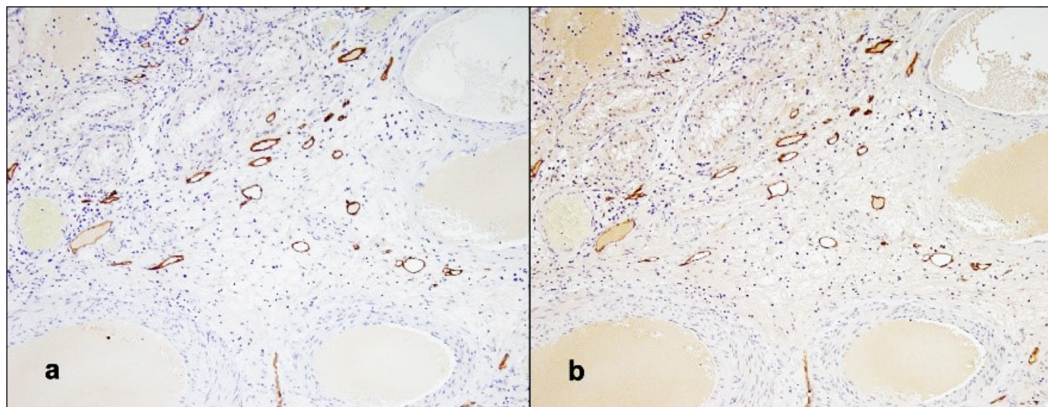


図2 洗浄不足による偽陽性反応(精嚢結合組織;D2-40)

抗D2-40マウスモノクローナル抗体(ニチレイバイオサイエンス)を使用
a. 洗浄適正(2分, 3回) b. 洗浄不足(30秒, 1回)

7. Protein A

黄色ブドウ球菌の細胞壁にはProtein Aが多く存在する。Protein Aには、免疫グロブリンFc領域に特異的に結合する特徴がある(ただし、サブクラスや動物種により結合性は異なる)。さらに、抗原賦活化の加熱処理を行うことでProtein A活性が復活をする特徴も併せもつ。黄色ブドウ球菌に感染した組織では、一次抗体のFc部分がProtein Aに結合することにより、偽陽性反応を示すことがある(図3)。

対策

10%正常動物血清により、ブロッキングをしっかりと行うことにより軽減される。

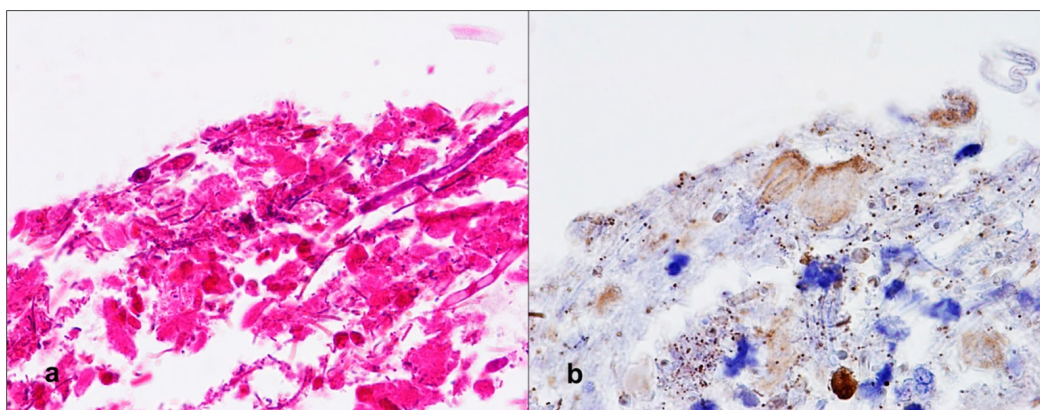


図3 Protein Aによる偽陽性反応(食道癌潰瘍底)
a. グラム染色(ハッカー変法)
b. 抗HER2ウサギポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学

偽陰性反応

1. 固定時間

ホルマリン固定パラフィン包埋検体を対象とした免疫組織化学では、10%中性緩衝ホルマリンによる固定が一般的である。ホルマリンは蛋白のアミノ基と反応し、メチレン架橋を形成することにより蛋白が安定化する。固定不良、過固定いずれの場合も抗原性の失活や減弱化を引き起こす(図4)。

対策

検体および一次抗体に適した固定時間を遵守する。たとえば、HER2蛋白の場合は6~72時間、PD-L1蛋白であれば6~48時間と定められている。この時間を遵守するため、臨床各科からの提出時間、固定開始時間および固定終了時間を記録することが重要である。なお、推奨固定時間の設けられていない検出対象についても6~48時間を守るべきである。また、大きな組織であれば割入れや注入固定を行って、固定液がなるべく早く浸透するよう工夫することも大切である。

検体摘出から固定までの時間が染色性に大きく影響することも念頭におくべきである。とくに手術材料においては、未固定状態での温阻血時間と冷阻血時間を確認する必要がある。通常、温阻血時間は限りなく短いことが望ましく、冷阻血時間については4℃、1時間以内(最低でも3時間以内)が望ましいとされている。

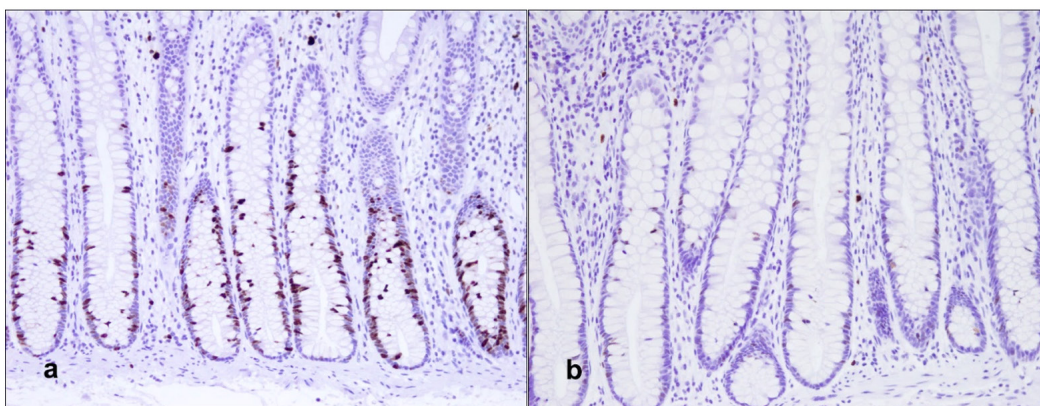


図4 過固定による偽陰性反応(大腸;Ki-67)
抗Ki-67マウスモノクローナル抗体(clone:MIB-1)を使用
a. 10%中性緩衝ホルマリンにて2日間固定
b. 10%中性緩衝ホルマリンにて35日間固定



2. 脱灰

脱灰液にはEDTA液，有機酸（ギ酸，トリクロロ酢酸），無機酸（塩酸，硝酸）もしくは有機酸と無機酸の混合液（プランク・リュクロ液）がある．とくに酸を使用した脱灰には注意が必要である．すなわち，酸を使用した脱灰には抗原性の減弱化を伴うことがあり，薄切時の表面脱灰も例外ではない．リンパ球表面マーカーやアンドロゲン受容体など酸による脱灰の影響を受けるマーカーは少なくない（図5）．

対策

切り出し時に脱灰が必要と思われる部分を取り除いたブロックを作製することが第一選択である．やむをえず脱灰部分も含めなければならない場合は酸脱灰液ではなく，EDTA脱灰液を使用することが肝要である（ただし，脱灰完了までに時間がかかる）．薄切時に石灰化部分が存在することに気づいた場合は，EDTA脱灰液で時間をかけて表面脱灰をする，あるいは組織全面を表面脱灰するのではなく，必要な部分に限局させて酸脱灰液を滴下するのも有効な方法である（ピンポイント表面脱灰）（図6）．

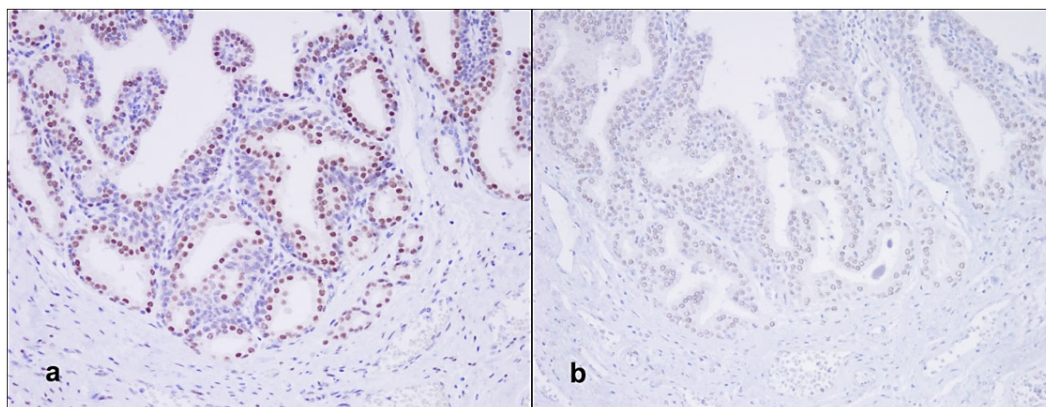


図5 表面脱灰による偽陰性反応（前立腺部尿道；アンドロゲン受容体）
抗アンドロゲン受容体マウスモノクローナル抗体(clone:F39.4.1)を使用
a. 表面脱灰なし
b. プランク・リュクロ液による表面脱灰あり(7時間)

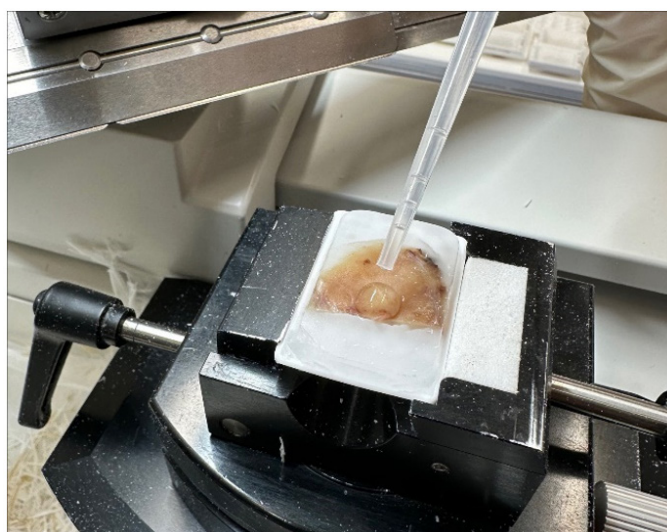


図6 ピンポイント表面脱灰
面出しを行い（本薄切前の状態で），スポイトを用いて適量の酸脱灰液を必要な部分にだけ滴下する．数分後に脱灰液を完全に拭き取り，本薄切を行う．酸脱灰液の影響を受ける範囲が最小限に抑えられる．



3. 未染色切片の取扱い

高温（60℃以上）での伸展および伸展後の高温乾燥によって偽陰性化を示すことがある。さらに、未染色切片を常温で長期間放置することにより、膜蛋白抗原や核内抗原における抗原性が減弱ないし偽陰性化する（図7 a, b）。

対策

伸展温度を45-50℃に設定し、伸展後の乾燥は37℃で一晩（または60℃で1時間）とする。また、薄切から染色までの期間をなるべく短くする（できれば1週間以内、染色直前が理想）。しかし、研究や検討等で大量に染色を行う場合は、未染色切片の長期保存を余儀なくされる。その際は、密閉した状態で冷凍庫（-20℃）に保管することにより、数カ月程度は抗原性の減弱を防ぐことができる（図7 c）。*

※病理診断を目的に染色を施行する場合には、病理検体取扱いマニュアルやゲノム診療用病理組織検体取扱い規程などに準じた未染色標本保管条件を厳守すること。

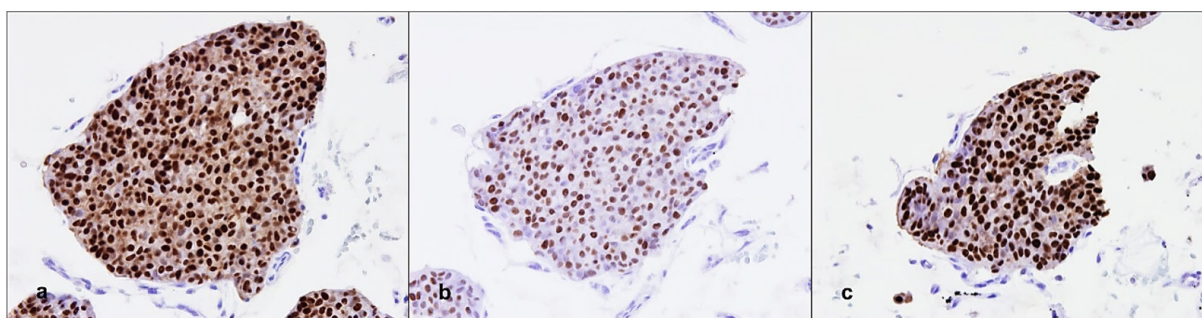


図7 未染色標本の室温長期保管による陽性反応の減弱化(乳癌;エストロゲン受容体)
抗エストロゲン受容体ウサギモノクローナル抗体(clone:SP1)を使用
a. 室温にて1日保管
b. 室温にて1カ月保管
c. 冷凍庫(-20℃)にて1カ月保管

4. 過酸化水素

先述したように内因性POXのブロッキング液には過酸化水素が含まれており、その濃度が高い場合、一部のマーカーの抗原決定基が酸化により破壊されて偽陰性となる。

対策

過酸化水素の濃度が低いブロッキング液で処理（0.3%過酸化水素含有メタノール，30分）する。なお、加熱による抗原賦活化処理を行う場合は、内因性POXのブロッキング工程を省略することも可能である（熱によるPOXの不活性化）。また、ブロッキング工程を一次抗体反応後に行うことも一手である。



5. 抗原賦活化処理

- 1) 抗原賦活化処理はマスキングされた抗原決定基を露出させることを目的とするが、不適切な加熱溶液を用いることによって偽陰性化する場合がある（図8）。
- 2) 圧力鍋を用いて加熱処理を行った後、急激に減圧することや切片を急冷することにより核内抗原の染色性低下や偽陰性化が引き起こされる（図9）。すなわち、圧力および温度の急激な変化は、抗原賦活化処理によってアンマスキングされた抗原を再度マスキングしてしまう可能性がある。
- 3) 蛋白分解酵素処理における反応時間が短い、反応温度が低いと陽性反応の減弱化や偽陰性化をまねく（図10）。

対策

- 1) 事前に、適切な加熱溶液を選択するための条件検討を行う。製品データシートに記載された内容を鵜呑みにせず、自施設で比較検討を行った結果に基づいて加熱溶液を選ぶ。なお、条件検討の際には、陽性コントロールと陰性コントロールを用いて染色性を評価する。
- 2) 加圧終了後は室温に放置してゆっくりと減圧させる。また、加熱後の切片は、加熱溶液の温度が低下するまで（20～30分間）室温で自然冷却させる。
- 3) 蛋白分解酵素処理においては、冷蔵保存された酵素液を室温に戻してから使用することに加え、反応時間を厳守することが重要である。

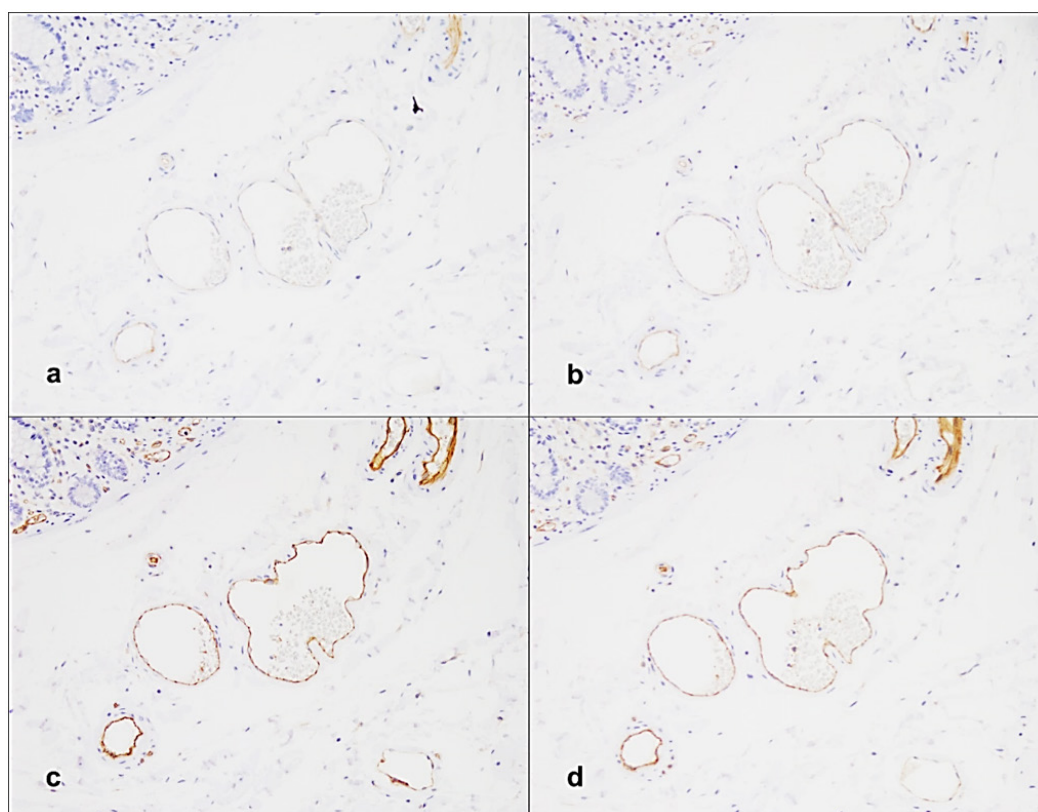


図8 不適正な賦活化液による偽陰性反応（大腸粘膜下組織；CD31）
 抗CD31マウスモノクローナル抗体（clone:JC70A）を使用
 a. クエン酸緩衝液（pH 6.0） b. クエン酸緩衝液（pH 7.0）
 c. EDTA溶液（pH 8.0） d. EDTA加トリス塩基溶液（pH 9.0）

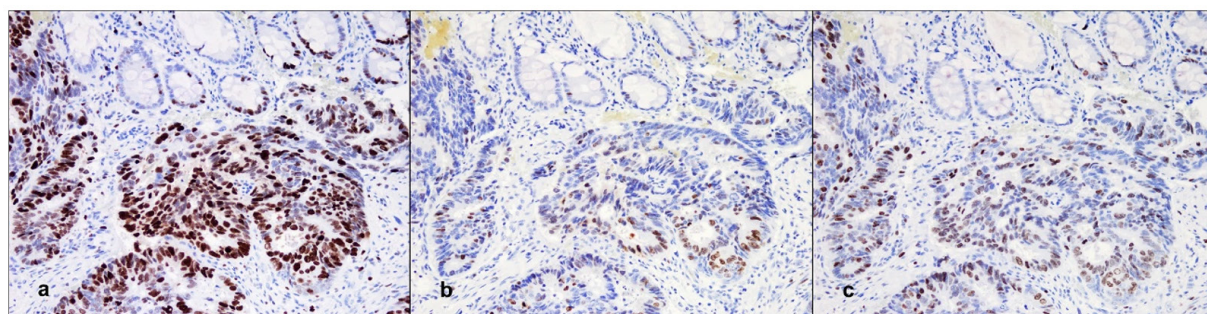


図9 加熱(圧力鍋)処理後の急激な減圧および急冷による陽性反応の減弱化(大腸癌;Ki-67)
抗Ki-67マウスモノクローナル抗体(clone:MIB-1)を使用
a. 自然減圧・冷却 b. 急激な減圧 c. 急冷

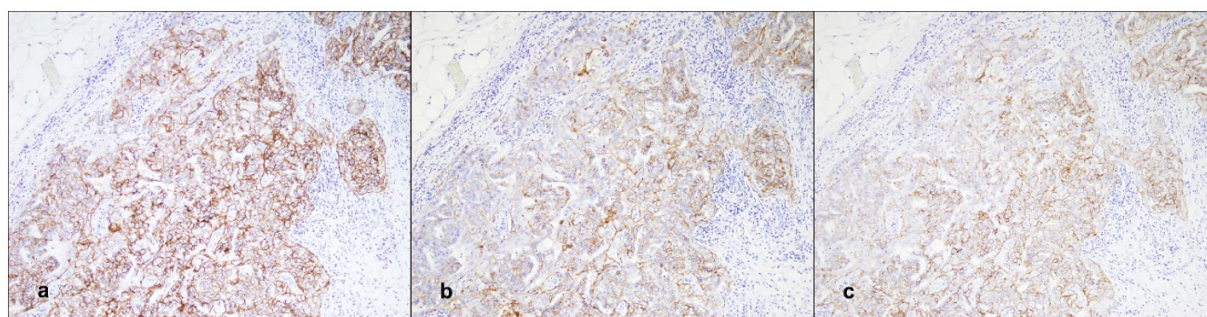


図10 不適正な蛋白分解酵素の反応時間・温度による陽性反応の減弱化(乳癌;HER2)
抗HER2マウスモノクローナル抗体(clone:SV2-61 γ)を使用
a. 適正な反応時間・温度(反応時間4分;冷蔵庫から酵素液を取り出し,室温で30分間静置してから使用)
b. 反応時間が短い(反応時間1分)
c. 反応温度が低い(冷蔵庫から酵素液を取り出した直後に使用)

6. 一次抗体の濃度

免疫組織化学において一次抗体を適切な濃度に設定することは、正しい染色結果を得るために重要である。低濃度の抗体を用いると、抗原決定基にまで十分な抗体が浸透しない、あるいは抗原決定基の数に対して結合する抗体の数が少ないことが原因で偽陰性化する。

対策

製品データシートを参考に、事前に希釈倍率を検討する。たとえば、データシートに推奨希釈倍率が200倍と記載されていた場合、これを参考に50倍、100倍、200倍、400倍、800倍と倍々希釈で希釈抗体を作製し、陽性および陰性コントロール標本における染色性を比較する。



まとめ

免疫組織化学の際に問題になる非特異反応と題し，偽陽性反応と偽陰性反応について述べた．自動免疫染色装置の普及に伴い，病理検査室における免疫組織化学の重要性はますます高まっている．しかし，用手法の経験がないためにトラブルに直面しても原因や対策を考察できない臨床検査技師や研究者が少なくない．自動化が進んだからこそ，原点に立ち戻るべきであろう．自動免疫染色装置の構造や機能だけでなく，トラブルシューティングに関する正確かつ十分な知識を身につけた人材が求められている．原点に立ち戻る際に本稿がその一助となれば幸いである．

参考文献

- 1) 鴨志田伸吾ほか：酵素抗体法－基礎から実践まで－．組織細胞化学2017（日本組織細胞化学会編）.pp.67-80，学際企画，2017.
- 2) 芹澤昭彦：酵素抗体法．JAMT技術教本シリーズ 病理検査技術教本（一般社団法人日本臨床衛生検査技師会監修）.pp.253-260，丸善出版株式会社，2017.
- 3) 鴨志田伸吾ほか：酵素抗体法実践入門．組織細胞化学2018（日本組織細胞化学会編）.pp.47-60，学際企画，2018.
- 4) 柳田絵美衣ほか：現場で“パッと”使える免疫染色クイックガイド．検査と技術.vol.46 no.9. 増刊号，2018.
- 5) 梅森宮加,梅沢敬：加熱処理による抗原賦活化.ニチレイバイオサイエンス社 免疫染色玉手箱，2018
- 6) 一般社団法人 日本病理学会（編）：ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規定.羊土社，2019.
- 7) 島方崇明ほか：実践！免疫組織化学の精度管理．Medical Technology.vol.52 no.2. pp.155-162，医歯薬出版，2024.