



薄切・貼付・伸展技術に起因する免疫組織化学のアーチファクト

長野赤十字病院 病理部

佐藤秀太、武田千佳

はじめに

免疫組織化学のアーチファクトの原因として、固定条件や染色の手技に関する文献がよく知られているが、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程にて10%中性緩衝ホルマリンの使用が推奨されたり、自動免疫染色装置の普及により、固定や染色の標準化が進み、これらに起因するアーチファクトは減少した。しかし、依然として薄切・貼付・伸展操作は用手法が主流であり、これらの操作に起因するアーチファクトは把握しておく必要がある。

本稿では薄切・貼付・伸展に由来する免疫組織化学のアーチファクトについて、解説する。

薄切

1. 切片厚

薄切のアーチファクトで最も頻度が高いのは切片厚による染色性の変化である。乳癌症例のHER2スコア0～3+までの症例について、切片厚を2 μ m～8 μ mまで変化させた場合の染色性を提示する(図1)。

切片が厚くなるにつれ、染色性が強くなり、切片が薄くなるにつれ、染色性が弱くなることは容易に想像できるだろう。乳癌・胃癌HER2病理診断ガイドラインでは「切片の厚さはIHC法4 μ mが最適である」と記載されている¹⁾。HER2-IHCでは染色強度によって、FISH検査の必要性や適応となる治療薬が異なるため、安定して4 μ mで薄切する技術は患者の命に関わるといっても過言ではない。

また、切片が厚くなると非特異反応が起きやすい(図1 A-4, B-4)。これは切片厚に比例して、非特異反応の原因となる組織中に含まれる種々の成分(タンパク質、糖、ミネラルなど)が多くなるためと推察される。

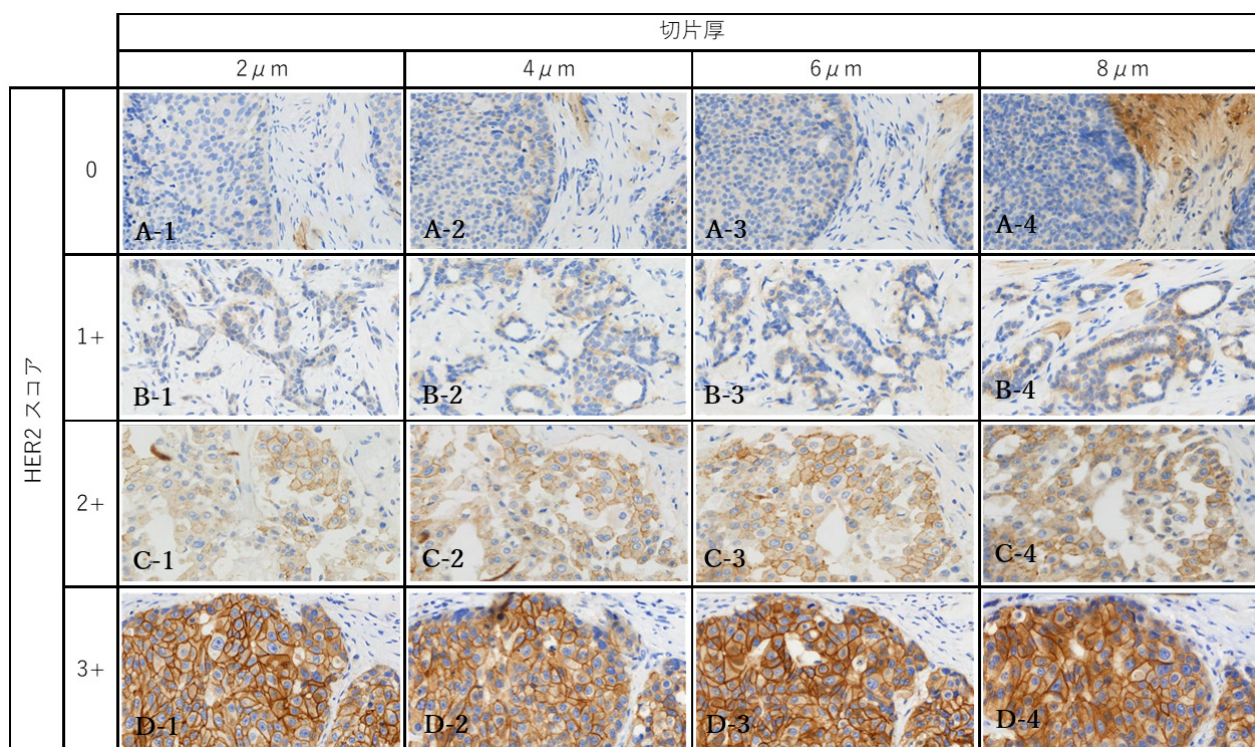


図 1 切片厚による染色性の変化 (抗HER2抗体, 乳癌症例)

切片が厚くなるにつれ、染色性が強くなる。HER2 2+の症例が最も影響を受けやすい(C1~C4)。また、切片が厚くなるにつれ、間質部分に非特異反応が出るようになる(A-4, B-4)。

2. 切片のしわ、剥がれ

パラフィンの浸透不良、薄切メスが鋭利でない、切片が厚い、スライドと切片間の気泡混入、伸展不十分など様々な要因で、切片にしわのアーチファクトが起こると、しわの部分で試薬の濃度勾配が起きたり²⁾、洗浄が不十分となり、染色ムラや非特異反応が起こることがある(図2)。コーティングスライドはノンコーティングスライドに比べ、接着力が強く、伸展不十分となりやすいため、注意が必要である。

同様にパラフィンの浸透不良やスライドと切片間の気泡混入、薄切後切片の乾燥不十分などの要因で、軽度の剥がれ(組織が浮いた状態)が生じた場合も非特異反応が起こる(図3)。

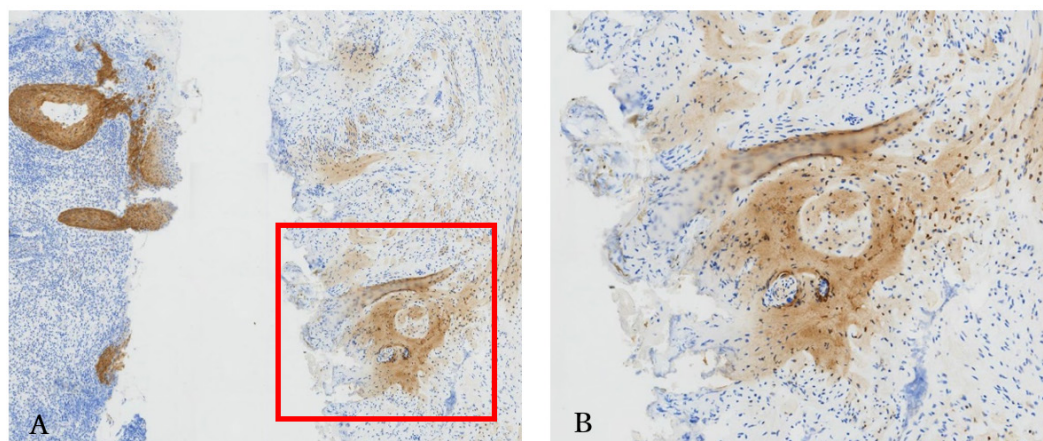


図 2 切片のしわ (抗p16^{ink4a} 抗体、子宮頸部円錐切除症例)

A(弱拡大), B(強拡大):切片のしわの部分とその周囲に非特異反応がみられる。

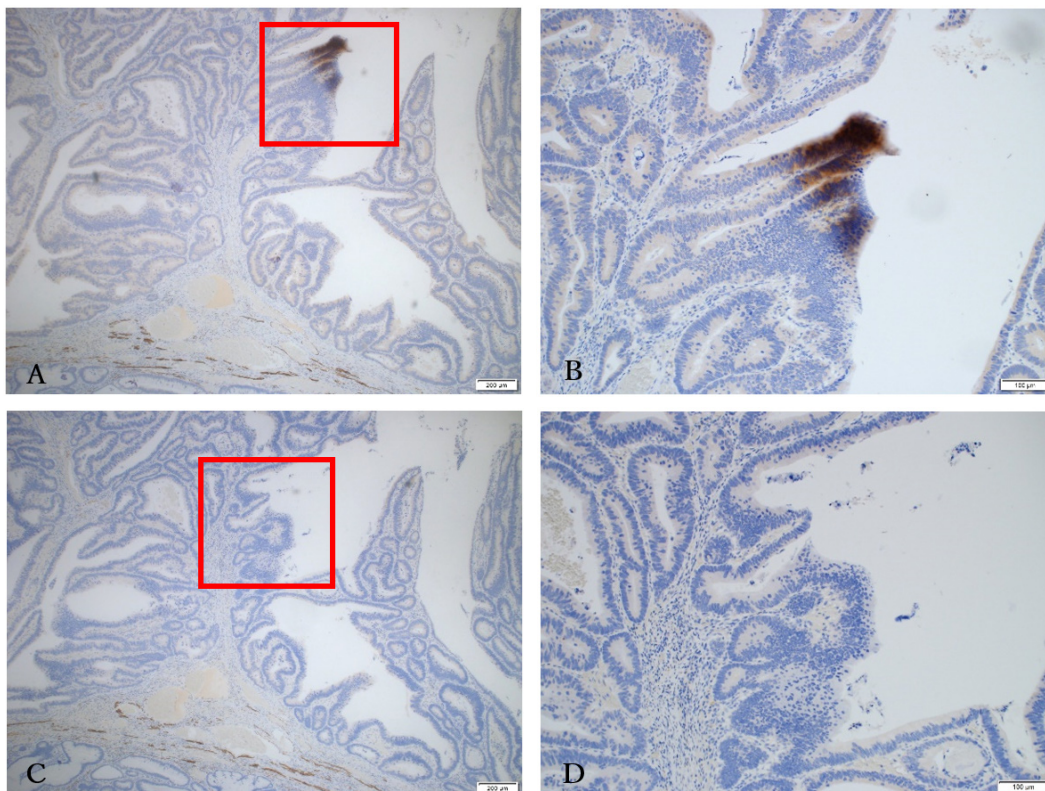


図3 切片の剥がれ(抗desmin抗体, 消化管ポリープ)

A(弱拡大), B(強拡大): 非特異反応を起こしている部分を強拡大すると焦点が合わず、組織が剥がれかかっていることがわかる。

C(弱拡大), D(強拡大): 同じブロックを再薄切、再染色したもの。組織の剥がれがなく、非特異反応はなくなった。

3. 表面脱灰

切り出し時に酸性脱灰液に浸漬すると、免疫組織化学の染色性が減弱することはよく知られているが、薄切時の表面脱灰でも同様である(図4-B, C)。

EDTAに代表される中性脱灰液を使用したり(図4-D)、酸性脱灰液に浸漬する時間を極力短くする、小さく切ったガーゼ等を使い脱灰面積をなるべく小さくするなどの工夫が必要である(図5)。

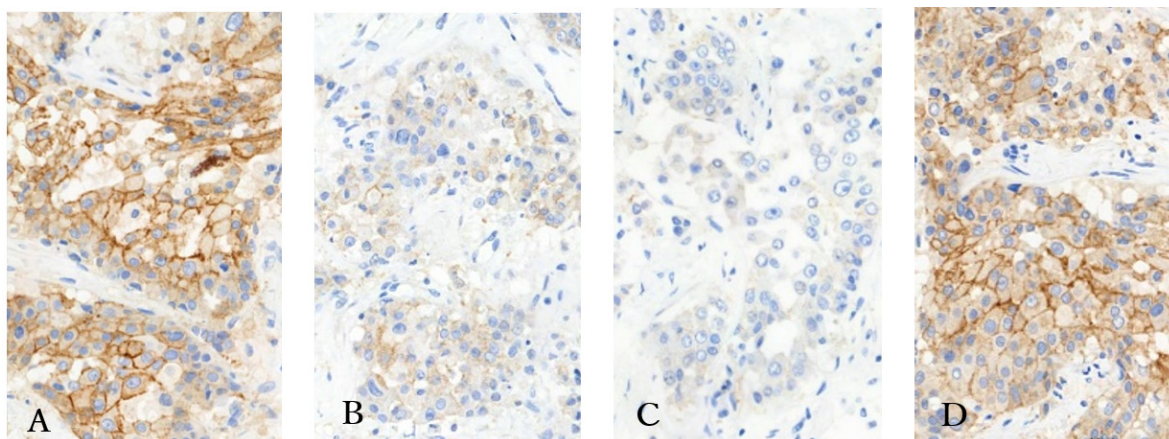


図4 表面脱灰による影響(抗HER2抗体, 乳癌症例)

A: 未脱灰

B: 5%トリクロロ酢酸水溶液 30分

C: 5%トリクロロ酢酸水溶液 60分

D: 10%EDTA-2Na液 60分

Aに比べ、Bは染色性が低下しており、Cはさらに減弱する。Dは染色性が保たれている。

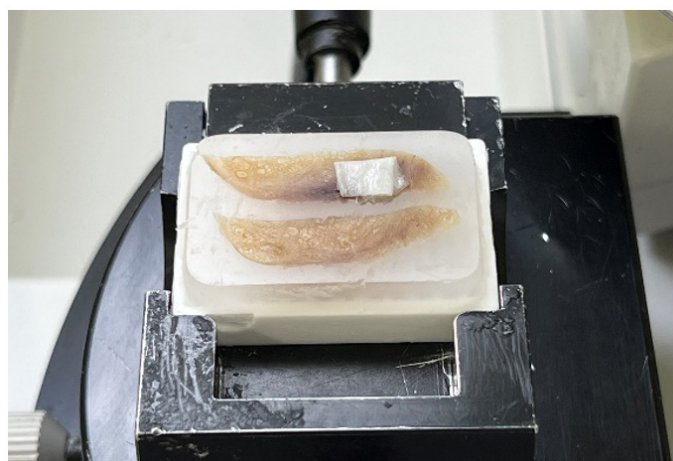


図 5 脱灰面積を小さくする工夫

ブロック全面を脱灰液に浸すのではなく、小さく切ったガーゼ等を脱灰液で湿らせて、石灰化部分のみにあてる。

貼り付け

1. 気泡の混入

貼付時にスライドと切片の間に気泡が混入すると、気泡に沿った円状のしわが生じ、染色ムラや非特異反応が起こることがある。また、スライドとの接着が不十分となり剥がれることもあるため、貼付時に気泡が混入しないように気をつける。

伸展

1. 伸展時の水抜き不良による切片の剥がれ

免疫組織化学では一般的にコーティングスライドを使用する。その際、伸展の前に水切り、伸展後に水抜きと呼ばれる作業が重要である。

水切りは切片を拾った後にガーゼ等の上でスライドを垂直に立て、余分な水を落とす。その後、伸展板の上で30～60秒ほど伸展させる。

水抜きは伸展後に切片とスライド間の余分な水を取り除く作業である。スライドを伸展板などに軽くコツンと叩きつける衝撃で水を落としたり、空中でスライドを振って遠心力で落としたり、組織が埋没されていないパラフィン部分を傷つけて水を排出するなどの方法がある。いずれにしる目視で水が抜けたことを確認する(図6-A)。伸展時間が必要以上に長いと切片周辺がスライドに接着し、水抜きが不十分になりやすい。低濃度酢酸水による膨張や湯伸ばしを利用し、伸展時間を短くすることも対策の一つである。

水抜きが不十分な状態では切片の乾燥に必要な時間を要する(図6-D, E, F)。また、切片が剥がれやすくなったり、乾燥中に気泡が発生することもある。

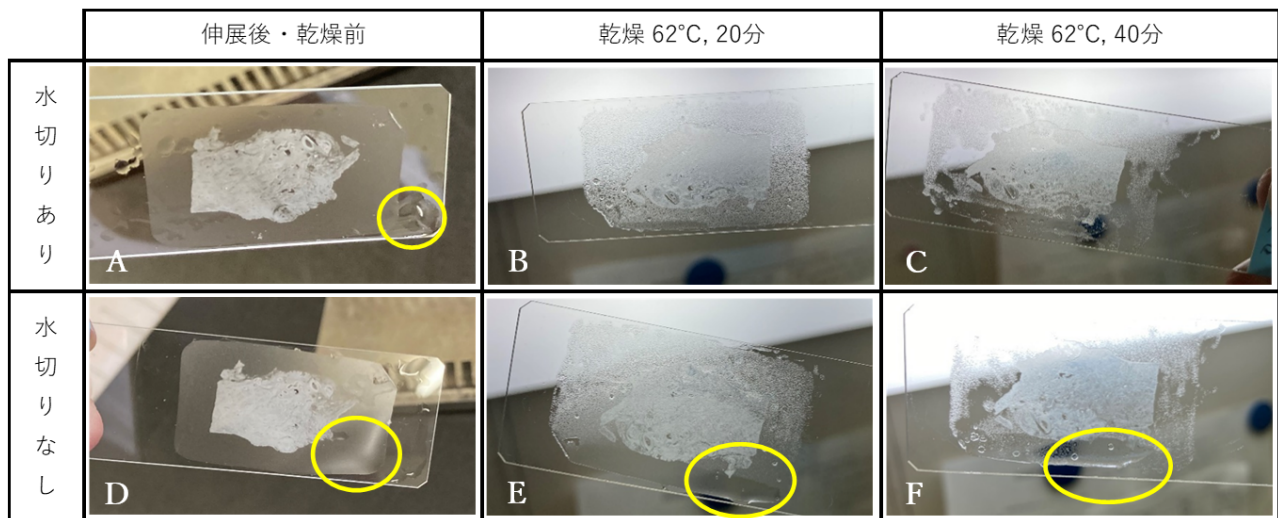


図 6 伸展時の水抜き不良による切片の剥がれ(黄色部分に水滴がみられる)

A, B, C: 適切に水切り・水抜きを行い、水が抜けたことを確認する(A)。

62°C, 20分の乾燥で水滴は無くなっている(B)。

D, E, F: 水切り、水抜きをしなかった切片(D)。

62°C, 40分の乾燥でも水が残っている(F)。

2. 薄切・伸展後の乾燥

薄切・伸展後の切片は37°Cで一晩乾燥させてから、染色するとよい。薄切当日に染色を行う場合は55~62°C程度で1時間ほど高温乾燥させる。この高温乾燥の時間が必要以上に長かったり、温度が高い(80°C以上)と染色性が低下する(図7)。また、室温~37°Cであっても長期間の保管により、徐々に染色性は低下していく³⁾。未染標本を長期保存する場合は、冷凍保管、スライド表面をパラフィンでコーティング、脱パラフィン後に封入して保管などの方法がある。

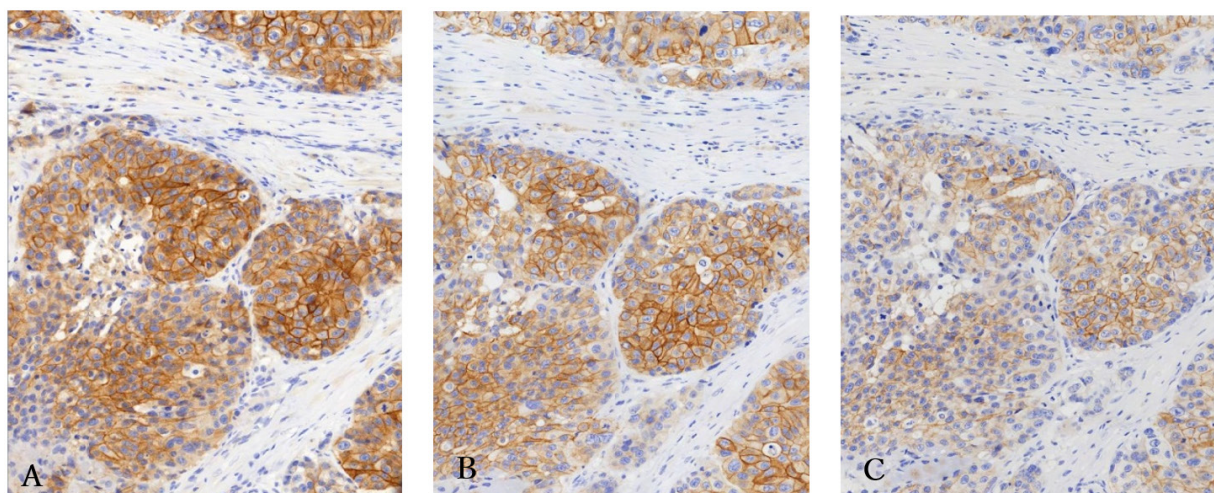


図 7 長時間の高温乾燥 (62°C) による染色性の低下(抗HER2抗体, 乳癌症例)

A: 高温乾燥 1時間 B: 高温乾燥 8時間 C: 高温乾燥 18時間(overnight)



おわりに

今回紹介したアーチファクトの度合いは抗体種によって異なる。また、実際にルーチンの現場で遭遇するアーチファクトは複数の要因が絡んでいることが多く、その対応策を考えるには、可能性を一つずつ検証していく必要がある。

参考文献

- 1) 一般社団法人 日本病理学会 編：乳癌・胃癌HER2病理診断ガイドライン第2版, 金原出版,2021; 16-26.
- 2) 山田寛：免疫染色クイックガイド-検体処理に問題がある- 検査と技術, 医学書院,2018; 46(9): 952-959
- 3) 名倉宏,長村義之,堤寛 編：改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法, 学際企画,2002; 180-181.