

2. 病態解析と免疫組織化学

堤 寛

藤田保健衛生大学医学部第一病理学

キーワード

酵素抗体法, アポトーシス, テイラーメイド医療, 病原体, 酵素抗原法

免疫染色は方法論的にすでに確立されており, 染色技術そのものの難しさはなくなった。免疫染色には, 美しく特異性の高い染色が求められる。さらに, 多数のペルオキシダーゼ分子を結合した高分子ポリマーを二次抗体とするポリマー法 (Envision 法, シンプルステイン) や CSA (catalyzed signal amplification) 法と, 加熱処理による抗原性賦活化を組み合わせることで, 超高感度の免疫染色が可能となっている¹⁾。

こうした特異性と感度に優れた免疫染色を諸種の病態解析に応用されている。本稿では, 病態解析に際して注意すべき技術的“落とし穴”と病態解析への代表例を提示する。

1. 留意すべき技術的落とし穴^{2, 3)}

アビジン親和性を示すビオチン(ビタミンH)はミトコンドリアに含まれる。内因性ビオチン活性は, 通常, ホルマリン固定で失活するが, ホルマリン固定パラフィン切片上の内因性ビオチン活性は EDTA による加熱処理で復活する。切片に EDTA (pH 8.0) による加熱処理を行う場合は, ABC 法や LSAB 法を避け, ポリマー法を採用すべきである。

パラフィン切片を切りおくと抗原性が減弱する場合がある。とくに, 核内抗原は薄切後時間が経つと抗原性が失活し, 加熱処理で賦活化されにくくなる。代表例として, Ki-67 (MIB-1), p53 タンパクおよびステロイドホルモン受容体 (ER, PgR) があげられる。薄切切片を -20℃以下に冷凍保存するとよい。

hot plate 上でのパラフィン切片の伸展温度を 70℃以上にすると抗原性が極端に低下することがある。過酸化還元酵素のアイソザイム glutathione-S-transferase (GST)-pi および抗癌剤 5-FU のリン酸化酵素 orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) といった細胞質内酵素が代表例となる。この場合, 伸展温度は 50℃までが望ましい。

抗原性賦活化の目的で行う加熱処理に際して, 加熱後の切片を急冷すると Ki-67 を含めた一部の核内抗原が陰性化・減弱化する場合がある。加熱処理により一本鎖にほぐれた二本鎖 DNA が, 急速冷却によって元の二本鎖に戻ってしまうためである。二次抗体に用いる標識ポリマーの分子量が小さいと, この偽陰性反応が生じにくい。

2. 免疫染色の病態解析への応用

1) 細胞増殖とアポトーシス

細胞増殖と細胞死の可視化は, 腫瘍をはじめとする諸種の疾患の細胞動態を知る上で極

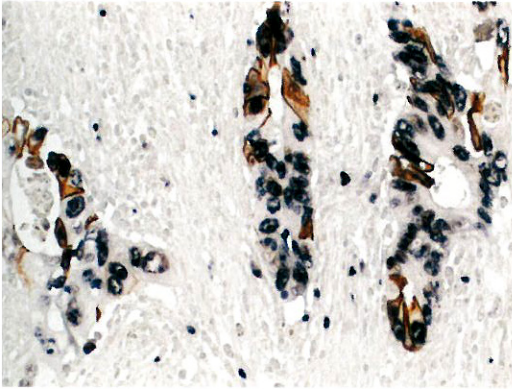


図1 5-FU系抗癌剤投与後の大腸癌にみられた増殖細胞のアポトーシス (Ki-67 =青色と cleaved cytokeratin 18 =茶色の二重免疫染色)

Ki-67 陽性の増殖細胞の一部が、cleaved CK18 陽性を呈しており、アポトーシスに陥っている。

めて重要な情報である。ホルマリン固定パラフィン切片に利用できる細胞増殖マーカーとして最も有用なのは Ki-67 (MIB-1) である。加熱処理後に安定した核内陽性像が得られる。アポトーシスのマーカーとしては TUNEL 法が基本だが、固定の影響を受けやすく、手技も複雑で再現性に難点がある (偽陽性や偽陰性が問題となる)。アポトーシスの起点となる細胞質内酵素 caspase 3 は、アポトーシスが生じると切断・活性化されて cleaved caspase 3 となる。この cleaved caspase 3 に対する特異抗体を用いる免疫染色で、安定的にアポトーシスを証明できる (加熱処理が必須)。cleaved caspase 3 は、続いて caspase 6, poly (ADP-ribose) polymerase, cytokeratin 18 (CK18), vimentin, actin など、70 種類以上の核内・細胞質内タンパク質を限定分解するため、これら切断タンパクに対する抗体もまた、アポトーシスの証明に利用できる⁴⁾。

アポトーシスに伴って生じるこうした一連のタンパク質限定分解カスケードの証明は、パラフィン切片におけるアポトーシス細胞の観察に、技術的な安定と高い再現性をもたらした。次に、応用例を示す。

癌組織に対して、Ki-67 と cleaved caspase 3 ないし cleaved CK18 の二重染色を行うと、Ki-67 が陽性となる増殖性癌細胞の一部に、これらアポトーシス関連活性化タンパクの細胞質内陽性像が観察される場合がある。図1に、5-FU 投与によって縮小効果のみられた大腸癌における Ki-67 と cleaved CK18 の二重染色所見を示す。こうした奇異な所見は、抗癌剤による殺細胞効果が増殖細胞に強いことを反映していると思われる。

2) テーラーメイド医療への貢献

乳癌の病理診断にホルモン受容体 (ER, PgR) と HER2 の免疫染色は必須となって久しい。これら免疫染色の結果が患者への治療方針を決定するからである。最近では、Ki-67 陽性率の評価も求められる。ER, PgR, HER2 がいずれも陰性のトリプルネガティブ症例は Ki-67 陽性率が高く、治療抵抗性を示す⁵⁾。

図2に乳腺アポクリン癌における免疫染色を示す。アポクリン癌では ER, PgR が常に陰性で、HER2 は強陽性の場合と陰性の場合がある。HER2 陰性アポクリン癌はトリプルネガティブと判定されるが、実は AR (androgen receptor) が陽性で、かつ EGFR (HER1) も陽性となる。近い将来、AR や EGFR を標的とした治療法が確立される可能性がある。

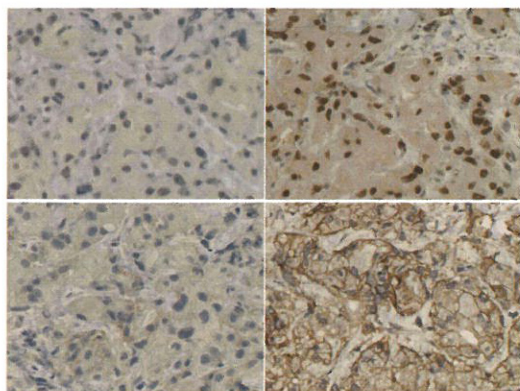


図2 乳腺におけるアポクリン癌のマーカー発現（左上：ER，右上：AR，左下：HER2，右下：EGFR）

アポクリン癌はER，PgR，HER2陰性のトリプルネガティブとなることが少なくないが，ARとEGFRが常に発現している点が特徴である。

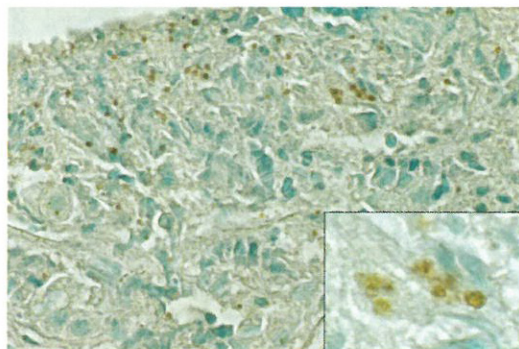


図3 患者血清による内臓リーシュマニア症の病理診断（肝生検，ホルマリン固定パラフィン切片，500倍希釈患者血清を用いた酵素抗体法間接法）

肝に形成された小肉芽腫を構成するKupffer細胞（類上皮細胞）の細胞質内に，原虫様構造物が陽性を示す（inset：拡大）。

大腸癌におけるEGFR，胃腸管間質腫瘍（GIST）におけるc-kit（CD117），B細胞性リンパ腫におけるCD20の免疫染色についても，病理診断にすでにルーチン化されている。今後，様々な腫瘍において，分子標的治療薬の治療戦略を決め手としての免疫染色のニーズが，ますます高まっていくと予測される。

3) 病原体の証明

免疫染色や*in situ* hybridization法といった組織化学的手法を導入すると，HE染色や従来の特殊染色ではわからなかった感染症が確定診断できる。病変内における病原体の証明は，患者の治療に直結するのみならず，感染症の蔓延防止の役立つ社会性を有している。

特異性の明確な市販抗体を利用した免疫染色は有用だが，稀な輸入感染症や新興・再興感染症をもたらす多様な病原体に対する抗体パネルを揃えることは，事実上難しい。

患者血清中の抗病原体特異抗体を，パラフィン切片中に眠る病原体の同定に利用した実例を示す。一般に，膿瘍や肉芽腫形成といった生体反応が病理組織学的に確認できる場合は，患者血中に高タイトーの特異抗体が存在する。患者血清は500～1,000倍希釈が可能である。組織内の内在性IgGによる背景染色を避けるため，酵素抗体法間接法が選ばれる⁶⁾。

図3では，肝に形成された小肉芽腫病変内に類円形の原虫が可視化されている。希釈患者血清による染色所見により，内臓リーシュマニア症（カラ・アザール）が強く示唆された。赤痢アメーバ，アカントアメーバ，クリプトスポリジウム，イソスポーラといった原虫類，回虫，顎口虫，広東住血線虫，ビルハルトツ住血吸虫といった蠕虫類の感染症でも特異性の高い免疫染色が期待できる。水痘・帯状疱疹ウイルス感染症，ネコひっかき病，ブドウ球菌感染症などでも，回復期患者血清によって，パラフィン切片内の病原体が観察できる。バイオハザード防止の観点から，B型・C型肝炎ウイルスやHIVキャリアの血清は使用しない。

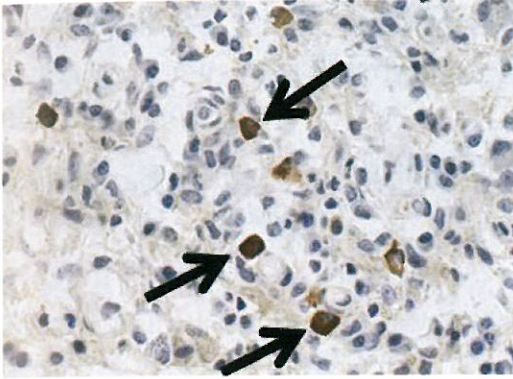


図4 関節リウマチの病変関節を用いた酵素抗原法（パラホルムアルデヒド固定凍結切片）

病変滑膜で産生されるIgGに反応するビオチン化自己抗原を利用して、この抗原を認識する特異抗体産生細胞の局在が可視化されている（矢印）。

4) 酵素抗原法の開発と応用

「酵素抗原法」は、酵素やビオチンなどで標識した抗原を組織切片に反応させて、切片上の特異抗体産生細胞を可視化する組織化学的技法である。標識抗体を用いる免疫染色の裏返しの方法である。実験的に horseradish peroxidase (HRP), ovalbumin, keyhole limpet hemocyanin を免疫したラットのリンパ節を対象として、HRP あるいはビオチン化抗原を利用した「酵素抗原法」を行った結果、これら抗原に対する特異抗体産生形質細胞の可視化に成功した。抗原投与部位の所属リンパ節では、全体の40%近くの形質細胞が特異抗体を産生していた点は特筆される⁷⁾。

図4には、関節リウマチの滑膜病変に「酵素抗原法」を応用した結果を示す。滑膜から抽出したIgGに反応する抗原分子を自己抗原ライブラリーからスクリーニングして、ビオチン標識した。この標識抗原が、リウマチ病変に浸潤する形質細胞の一部に反応している。「酵素抗原法」を用いると、疾患の病態解析・診断および治療に有用な抗体を産生する形質細胞を病変内に特定することができる。今後、諸種の自己免疫疾患、感染症や腫瘍において、応用が期待される新しい方法論である。

参考文献

- 1) 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, 東京, 2002.
- 2) 堤 寛, 鴨志田 伸吾:免疫染色のコツ, 病理と臨床 23: 83-88, 2005.
- 3) 堤 寛, 鴨志田 伸吾:抗原性賦活化法, 病理と臨床 23: 189-198, 2005.
- 4) 堤 寛, 塩竈 和也, 鴨志田 伸吾:アポトーシスの組織化学. 病理と臨床 23: 403-416, 2005.
- 5) Carey A, Carey LA: Understanding and treating triple-negative breast cancer. Oncology 22: 1233-1239, 2008.
- 6) Tsutsumi Y: Diagnosis of infectious diseases using patients' sera. Seminar Diagnost Pathol 24: 243-252, 2007.
- 7) Mizutani Y, Tsuge S, Shiogama K, Shimomura R, Kamoshida S, Inada K, Tsutsumi Y: Histochemical Detection of antigen-specific antibody-producing cells in tissue sections of rats immunized with horseradish peroxidase, ovalbumin or keyhole limpet hemocyanin. J Histochem Cytochem, 57: 101-111, 2009.