

シンポジウム

## 病理領域における新しい解析方法の導入 免疫組織化学—内分泌病理の立場から—

東京女子医科大学 附属第二病院病院病理科

アイ バ モト ヒコ  
相 羽 元 彦

(受付 平成8年1月9日)

### Immunohistochemistry in Endocrine Pathology

Motohiko AIBA

Department of Surgical Pathology, Tokyo Women's Medical College Daini Hospital

Immunohistochemical methods have played an important role in the pathological research and surgical pathology. This article first overviews the recent progresses of the immunoperoxidase methods, briefly describing on monoclonal antibodies and antibodies against synthetic peptides, three immunostaining methods recently proposed by DAKO (i.e., enhanced polymer one step staining method (EPOS), Envision system as a highly-sensitive indirect method, and catalytic signal amplification (CSA) method), targets of immunostaining, semi-quantitative evaluation of amount of antigen or intensity of staining, and several pitfalls in the immunohistochemistry. Two examples of immunohistochemical studies are then introduced in the endocrine pathology. One is aldosterone synthase and  $11\beta$  hydroxylase cytochrome P-450 of the adrenal cortex, a hot issue on zona glomerulosa and uppermost zona fasciculata and their transitional zone. The other is immunohistochemical studies of thyroglobulin (TG), focusing on TG derived from papillary carcinoma of the thyroid, TG of autonomously functioning thyroid nodules (AFTN) and non-functioning tumors with the surrounding thyroid follicles, and TG as a carrier protein of haptens and synthetic peptides. Finally, intrinsic biotin, an interferer of immunostaining systems containing avidin and biotin, is described as an example of pitfalls of immunohistochemistry and in situ hybridization.

#### はじめに

免疫組織化学は、抗原と抗体の特異的な結合を利用し、組織・細胞中の抗原または抗体の局在と量を半定量的に（通常染色性の強さとして）知る方法論である。逆に未知の血清中の組織細胞構成成分に対する（自己）抗体の有無の評価と半定量も既知の抗原組織を用いて免疫組織化学的に行われてきた。この中で今回は特異抗体による抗原の免疫染色、特に酵素抗体法に限定して記述する。まず最近の免疫組織化学の動向を、抗体作製技術・染色技術・免疫染色の対象・抗原物質の半定

量・pitfall という観点から概観し、次いで具体例を副腎皮質のステロイド生合成に参与する酵素と甲状腺のサイログロブリンの免疫組織化学について述べ、最後に内因性 biotin が持つ問題点に触れる。本稿に相補的な項は成書を参照されたい<sup>1)</sup>。

#### 免疫組織化学の発達

##### 1. 抗体作製技術

単クローン抗体の作製技術の開発は、それほどの抽出抗原の純度を必要としなくなったこと、蛋白・ペプチドの特定部位の認識が可能となったこと、抗体産生細胞の不活化により抗体が安定的

に供給されるようになったことをもたらした。さらに蛋白・ペプチドが未知の場合であっても、分子遺伝学的方法により得られた塩基配列からアミノ酸配列を推定しその特定部位のペプチドを化学合成することにより、それを抗原として抗ペプチド抗体を作製することが可能となった。これにより注目される遺伝子の蛋白レベルでの発現の様子、同蛋白の機能や動態などを含め、分子生物学的・細胞生物学的な解析力が著しく増し、免疫組織化学領域にも大きな武器となっている。

## 2. 染色技術

### 1) 標識法

光学顕微鏡や蛍光顕微鏡、電子顕微鏡などに適した様々な標識法（非標識法を含めて）が開発されている。蛍光色素（Coonsら、1955年）、酵素（Nakaneら、1965年）、ferritinやprotein A-goldをはじめとする重金属、放射線同位元素などがあり、酵素抗体法一つに限っても、直接法や、間接法、peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法、avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法、labeled streptavidin biotin (LSAB) 法、その他多岐にわたる。peroxidase に代わって、あるいは二重染色に alkaline phosphatase や glucose oxidase を標識する場合も多い。最近 DAKO 社より 3 種類の免疫染色システムが発売された。

① enhanced polymer one step staining method (EPOS) では、dextran polymer に染色すべき抗原に対する抗体と peroxidase を多数結合し、直接法と同様の染色ステップで、しかも高い染色性を得ることができる。

②高感度間接法としての envision system では、dextran polymer にマウス免疫グロブリン (Ig) に対する抗体とウサギ Ig に対する抗体と peroxidase の 3 者を多数結合したものをを用い、染色感度を高めるものである。この方法はもう一つ、avidin-biotin が染色システムに含まれていないために、内因性 biotin による偽陽性を考えなくてよいという長所を有している（後述）。

③ catalysed signal amplification (CSA) 法は 8 つの段階から成り、その第 5 段階 (avidin-biotin-peroxidase 複合体を作用させる段階) まで

は ABC 法と同じプロセスである。次の段階で、biotin 標識タイラミドを作用させると、peroxidase の局在部に同酵素によりタイラミドがラジカル生成物となり、近傍の蛋白に結合する。そして第 7 段階で、biotin を検出するために peroxidase 標識 streptavidin を作用させ、最後に  $H_2O_2$  を基質とし、3,3'-diaminobenzidine を発色剤として peroxidase 反応を行うものである。これにより抗原抗体反応当りの発色の効果を著しく高めている。insulin-like growth factor II の予備的な染色実験では抗体の希釈について桁違いの染色感度を示した。従来ホルマリン固定パラフィン包埋材料では染色困難であった分子も染色可能となる場合もあろう。

### 2) 組織細胞の固定法

ホルマリン固定パラフィン包埋による組織の処理は病理検体の通常の処理方法である。この方法は免疫染色にしばしば有効であり、excellent である場合や、新鮮凍結切片よりもこちらの処理を指定する抗体もある。mRNA や DNA の長期保存が不適であることが指摘されており免疫組織化学と組み合わせた研究には問題が残る。一方新鮮凍結切片でないと免疫染色性が無効の抗体も多い。その場合組織形態の解像が犠牲になる。また組織凍結ブロックの保存も  $-70^{\circ}C$  の deep freezer を要する、組織の乾燥を避ける必要があるなど、経済性を含めて取り扱いが不便である。両方法の中間的な組織処理の方法として、AMeX 法などが工夫されている。その他、PLP 固定など、染色の対象となる抗原によった固定法の選択が望まれる。

3) ホルマリン固定パラフィン包埋材料の抗原賦活法

trypsin などの蛋白分解酵素処理により、ホルマリン固定により形成された架橋を切り、抗原性を賦活することが行われてきた。最近 0.01M クエン酸バッファー中で、組織切片を microwave 処理（または圧力釜などで加熱処理）することにより、著しく免疫染色性が賦活されることが示され、microwave 処理を前提とした免疫染色用の抗体の市販も多い。

このような染色技術の発達により染色結果の意

味も多様化し、染色法の記述なしでは染色結果の意味も半減する。また外科病理学領域では、免疫組織化学の標準化も叫ばれている。

### 3. 免疫染色の対象

ホルモン・増殖因子やその受容体、細胞内シグナル伝達物質、癌遺伝子産物や癌抑制遺伝子産物、種々の産生物質、臓器・組織・細胞・細胞内小器官の marker 物質（酵素を含む）、細胞増殖の marker、接着分子、細胞外 matrix や線維分子など、あるいはウイルスや細菌などの微生物の構成成分をはじめとする外来性の物質の分子またはその一部の構造が染色可能となり、形態学と分子遺伝学的知見を結合する分子病理学の大きな部分を占める。同時に日常の病理業務においても、任意の組織・細胞形態の解析に役立ち、病理診断でも検体から多くの情報を臨床科に提示できる。例えば悪性腫瘍の上皮性/非上皮性あるいはその母組織の解明、腫瘍の機能状態、ホルモン依存性、悪性度、細胞増殖の程度、腫瘍再発時に血中上昇が予想される marker の呈示などである。

### 4. 抗原物質の半定量

免疫染色された組織切片上の抗原物質について、必ずしも染色性の強さと抗原量が比例するものではない。非標識法（PAP 法や ABC 法）は間接法に比べて染色の強さが抗原量を反映していないことが指摘されている。同一組織切片上での比較においても、単純比較ができないことは多い。例えば後述の thyroglobulin (TG) の免疫染色性について、甲状腺濾胞中のコロイドのエオジン染色性と TG の染色性は略々逆比例する。しかしエオジン好性コロイドは trypsin 処理することにより、TG 染色性は増加し、TG 量は多いが単に抗原性が修飾されていたにすぎないことが示される。このような例は形質細胞の Russell 小体の Ig 染色性や、infantile digital fibromatosis における細胞内封入体の actin 染色性をはじめ多い。

一方、免疫染色の結果を半定量する試みも多く行われている。乳癌の estrogen receptor (ER) の陽性の判定を染色性の強さにかかわらず陽性細胞の数によって行おうとする考えと、陽性細胞の数と染色性の強さを観察し score 化することに

よって評価する考えがある。甲状腺濾胞のコロイドの T4・T3 の免疫染色性は eosin 染色性と逆関しない場合も多い。しかし、TG の染色性との比を見ることによりその意義が明らかとなる（後述）。日常的には、染色性の強さやある基準物との染色性の相対比で評価・記述することが多い。

### 5. pitfall

免疫染色標本の読みには多くの pitfall が潜んでいる。非特異的な染色、非免疫化学的な染色、交差反応性、酵素の免疫染色性と酵素活性の解離、内因性 peroxidase 活性による発色、avidin-biotin を含んだ免疫染色システムを用いた場合の内因性 biotin の関与、合成ペプチドを抗原として作製された抗体はその精製がない場合 carrier 蛋白に対する抗体も有していること、その他多数に及ぶ。

#### 事例 1: 副腎皮質の aldosterone synthase cytochrome P-450<sub>aldo</sub> (P-450<sub>aldo</sub>) と 11 $\beta$ hydroxylase cytochrome P-450<sub>11 $\beta$</sub> (P-450<sub>11 $\beta$</sub> ) の免疫組織化学

##### 1. ヒト副腎皮質における steroidogenesis

aldosterone を代表とする鉱質コルチコイド、cortisol を代表とする糖質コルチコイド、dehydroepiandrosterone を代表とする副腎性アンドロジェンの 3 種類の副腎皮質ホルモンは図 1 のような経路によって cholesterol から生合成される。そのうちコルチゾル生成の最終段階は P-450<sub>11 $\beta$</sub>  の触媒作用により行われるが、アルドステロンの最終段階に関与する酵素は動物により異なり、牛では P-450<sub>11 $\beta$</sub>  がこちらにも関与する。ヒトでは Mornet らが 1989 年 2 種類の P-450<sub>11 $\beta$</sub>  関連遺伝子、CYP11B1 と、CYP11B2 を発表し<sup>2)</sup>、前者が P-450<sub>11 $\beta$</sub>  であろうとされた。Ogishima らは 1991 年に両遺伝子産物の第 80~90 番目のアミノ酸残基の違いに着目し、後者の同部合成ペプチドを抗原として家兎抗体を作製した。この抗体は、アルドステロン産生腺腫 (APA) と特発性アルドステロン症 (IHA) の副腎皮質の糸粒体分画より精製した P-450<sub>11 $\beta$</sub>  関連物質のうち、アルドステロン合成活性のある一つをのみ認識した<sup>3)</sup> (anti-P-450<sub>aldo</sub>)。anti-P-450<sub>11 $\beta$</sub>  も同様に第 279~292 番目のペプチドを合成して作製されたものである。

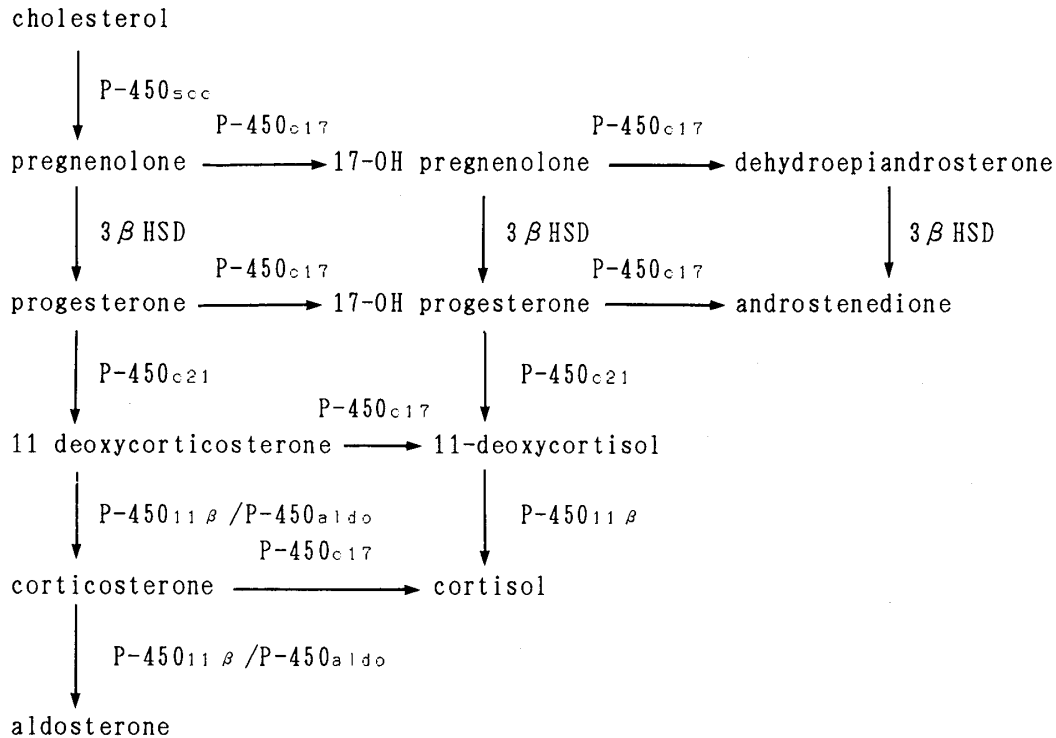


図1 副腎皮質におけるステロイド合成の経路  
3βHSD: 3β hydroxysteroid dehydrogenase

## 2. 免疫染色の方法

anti-P-450<sub>aldo</sub>とanti-P-450<sub>11β</sub>の両抗体は慶応大医化学の三谷芙美子先生より供与された。この抗体は新鮮凍結切片を用いたとき良好に免疫染色性が発揮される。一方、副腎皮質は多量の biotin を含んでいるので、avidin-biotin を含んでいる染色システムでは、染色操作は煩雑になる(後述)。ここでは、前述の Envision System (DAKO) を用いて免疫染色を行った<sup>4)</sup>。発色は3,3'-diaminobenzidine を用い、hematoxylin で核染した。対象組織は、アルドステロン産生腺腫、コルチゾル産生腺腫、ACTH 非依存性両側副腎皮質大結節性過形成(AIMAH)、原発性副腎皮質小結節性異形成、ACTH 依存性副腎皮質過形成である。また副腎皮質ステロイド合成の比較的速い段階で関与する3β hydroxysteroid dehydrogenase (3βHSD)についても同様に免疫染色を行った(家兎多クローン抗体、Oncogene Science 社)。

## 3. 免疫染色性

P-450<sub>aldo</sub>は副腎皮質球状層細胞の一部に強い免疫染色性があり、連続切片で同細胞はP-450<sub>11β</sub>の

染色性は陰性または弱い染色性が示された(図2, 3)<sup>4)</sup>。まれに索状層最上部の細胞にP-450<sub>aldo</sub>の中等度の染色性が示された。索状層・網状層細胞とコルチゾル産生皮質腺腫はP-450<sub>11β</sub>の免疫染色性を示したが、P-450<sub>aldo</sub>の染色性はなかった。APAはP-450<sub>aldo</sub>とP-450<sub>11β</sub>の両者の中等度の免疫染色性を示した(図2)。AIMAHの結節部はP-450<sub>aldo</sub>は陰性、P-450<sub>11β</sub>が陽性であった。1例において被膜下にP-450<sub>aldo</sub>陽性細胞小塊が観察され、これはP-450<sub>11β</sub>染色性は乏しかった。

## 4. 免疫染色の意義

OgishimaらはAPAとIHAの組織よりaldosterone synthaseを分離精製し、これがCYP11B2遺伝子産物に対する抗体により認識されることを示したが、正常副腎皮質やAPAに付着する正常部副腎皮質などからは同酵素の分離はされなかった<sup>3)</sup>。しかし、今回免疫組織化学的方法により特異抗体に反応性を示す細胞が球状層に存在することが示された<sup>4)</sup>。ヒトの場合副腎皮質球状層の発達は概して悪く、また症例により多様性を示すこと、APAに付着する副腎皮質の場合renin-

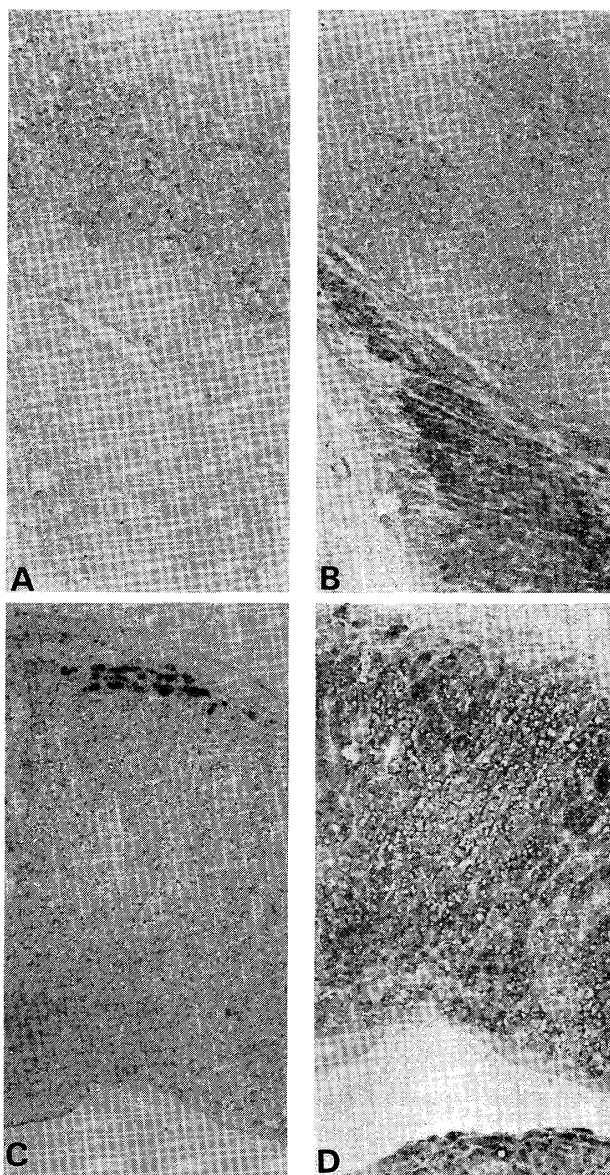


図2 アルドステロン産生腺腫 (APA) と非腫瘍部の移行部 (A・B), 同非腫瘍部 (C・D) の P-450<sub>a1do</sub> (A・C) と P-450<sub>11β</sub> (B・D) の免疫染色性

非腫瘍部の索状層と網状層は P-450<sub>a1do</sub> は陰性であるが, P-450<sub>11β</sub> は強く染まっている。球状層も多くは P-450<sub>a1do</sub> は陰性であるが (A), 一部 (C) に強く染色される細胞集塊を被膜直下に認める。APA は P-450<sub>a1do</sub> と P-450<sub>11β</sub> の両者の染色性を示している。

angiotensin 系が抑制されていること, 球状層が被膜に付着し同層の糸粒体の集率が悪いことなどで生化学的に検出できなかったものと思われる。APA 例球状層における P-450<sub>a1do</sub> 陽性細胞の分布は, 3βHSD の酵素組織化学で示されたものと同様である<sup>5)</sup>。P-450<sub>a1do</sub> と P-450<sub>11β</sub> の免疫組織化学は, アルドステロン産生系とコルチゾル産生系の

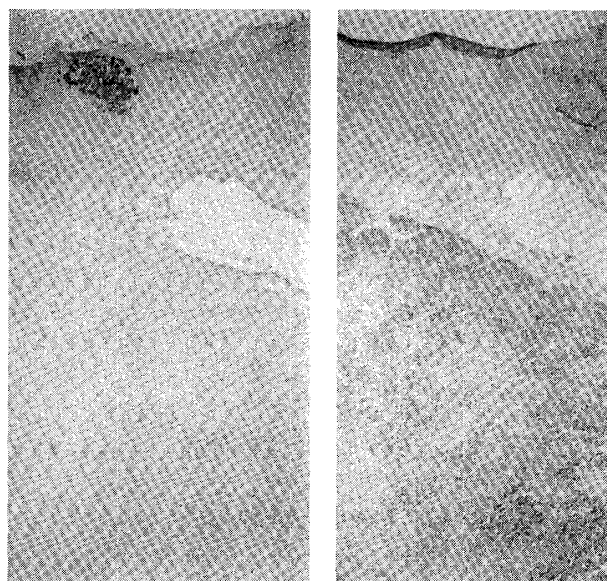


図3 AIMAH の P-450<sub>a1do</sub> (左) と P-450<sub>11β</sub> (右) 結節部全体と非結節部の大部分は P-450<sub>a1do</sub> は陰性であるが, 一部に被膜直下の球状層細胞に強い染色性が認められる。P-450<sub>11β</sub> は結節部と非結節部に染色性を認める。

細胞を区別する上で意義が高い。その中で, APA が両者の免疫染色性を示し, 所謂 hybrid 細胞の性格を示したのは興味深い。

また現在球状層と索状層最上部の境界部の機能や hybrid corticosteroid (18-OH cortisol) の意義について注目されており, その解析に威力を発揮するものと考えられる。AIMAH は索状層最上部型の細胞を含む結節性過形成によるクッシング症候群であるが<sup>6)</sup>, その結節部に P-450<sub>a1do</sub> 染色性はなく, P-450<sub>11β</sub> 染色性のみを示したのは興味深い。笹野らは P-450<sub>11β</sub> の免疫染色を行っている<sup>7)</sup>が, 93% の homology を示すとされる P-450<sub>a1do</sub> と P-450<sub>11β</sub> の両者を認識する単クローン抗体を用いており, 今回の両抗体が示す意義は有していない。

#### 事例2: サイログロブリン (TG) の免疫組織化学

TG は分子量66万のヨウ素化蛋白で, 2 個の subunit から成り, サイロキシン (T4) や triiodothyronin (T3) の生合成とコロイド内保存の場であるとともに, monoiodotyrosine, diiodotyrosine の形でヨウ素の貯蔵の機能を有する。また, TG は甲状腺のみで産生されるので, 甲

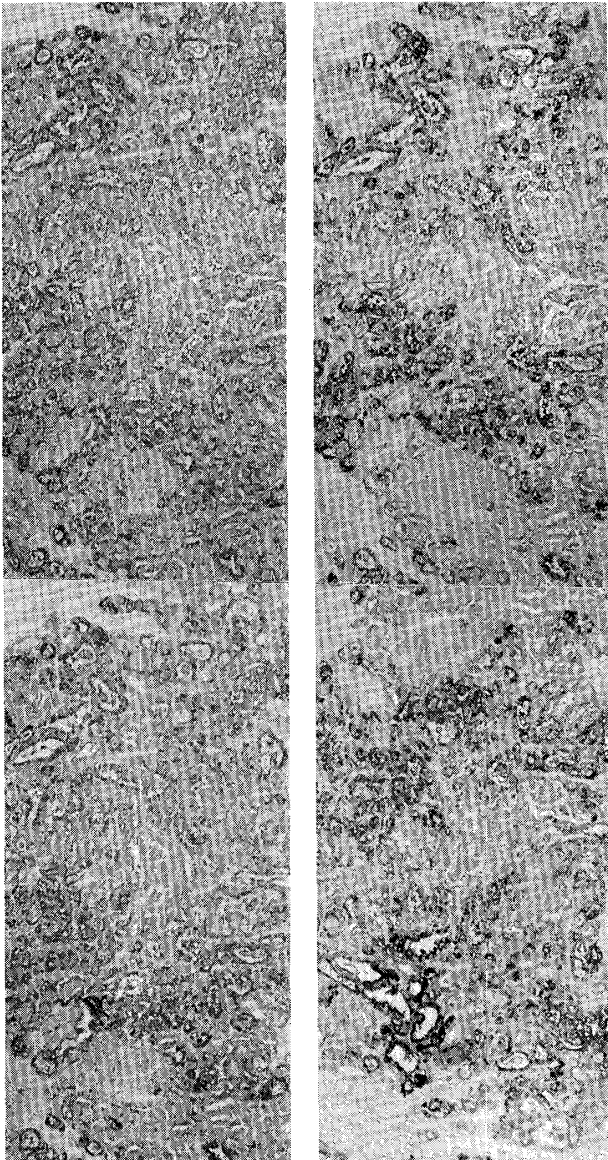


図4 甲状腺乳頭癌由来のサイログロブリン (TG) に対する3つのマウス単クローン抗体 (PCTG1~3) と甲状腺 TG に対する家兎多クローン抗体 (pTG) の甲状腺乳頭癌乳癌に対する免疫染色性  
pTG (左上) と PCTG2 (左下) は染色 pattern が類似している。PCTG1 (右上), 3 (右下) は染色性の強弱が前2者に比し強い。

甲状腺のマーカーとしても重要な蛋白である。ここでは、次の3点について記述する。

### 1. 甲状腺癌が癌に特異的な TG を産生するか

上記の命題に基づいて本学内分泌外科の金地先生は甲状腺乳頭癌由来の TG に対する3つのマウス単クローン抗体 (5D6B6B12, 4A10H4E12, 5D10F3C12; それぞれ PCTG1, 2, 3と略記) を作

製された<sup>8)</sup>。その抗体の免疫組織化学的特徴の解析を行った<sup>9)</sup>。

1) この抗体と Miles-Scientific 社の家兎多クローン抗体 (pTG) を用いて ABC 法で、種々の病変を有する甲状腺組織 (乳頭癌・汭胞癌・腺腫・腺腫様甲状腺腫・Basedow 病甲状腺・髓様癌) を免疫染色した。いずれの PCTG も pTG と同様の強い免疫染色性が得られた (図4)。特に PCTG-2は pTG と最も近い染色 pattern を示したのに対し、PCTG1, 3は組織中の強い染色性を示す所ではより強く、弱い染色性を示すところではより弱い染色性を示した。特に乳頭癌が選択的に染色性が高いことはなく、非腫瘍組織のコロイドもよく染色された (図5)。

2) 図5のように、blocking protein として正常家兎血清の代わりに、pTG を preincubation すると、PCTG1-3による免疫染色性は著しく減少消失した。その中で、PCTG2の染色性の抑制はやや低かった。

3) dysmorphogenetic goiter (DG) は遺伝子異常により甲状腺ホルモンの生合成が障害され、そのために下垂体からの甲状腺刺激ホルモン (TSH) の慢性の刺激を受けて甲状腺が腫大するものである。その異常は heterogenous である。DG またはその疑いの4例の甲状腺組織を1)と同様に免疫染色した。①2例で多クローン抗体である pTG を用いると強い免疫染色性が得られたが、PCTG1の免疫染色性は antiT4と共に全くなかった。1例では、一部の結節と印環細胞の形態を示す汭胞上皮に上記2例と同様の所見が得られた (図6)。1例では、pTG と PCTG1の免疫染色性は同様であった。②PCTG2は全例において pTG と同様の免疫染色性を示した。③PCTG3ははじめの3例において、非常に弱い染色性を示した。

以上より、①1)が示すように PCTG1-3は乳頭癌に特異的なものではなく、2)が示すように pTG の認識する TG の epitopes の一部を認識するものと考えられる。②PCTG1-3は3)の結果から TG の異なった epitope を認識するものと考えられる。



染色段階	対 照 試 験	
第 1 段	3%過酸化水素水による内因性peroxidaseの抑制	
第 2 段	正常家兎血清 (x5)	家兎抗 TG 多クローン抗体 (x5)
第 3 段	マウス抗 TG 単クローン抗体	
第 4 段	西洋ワサビペルオキシダーゼ結合抗マウス Ig 家兎抗体	
第 5 段	3,3'-diaminobenzidineによる発色	
第 6 段	ヘマトキシリンによる後染色	

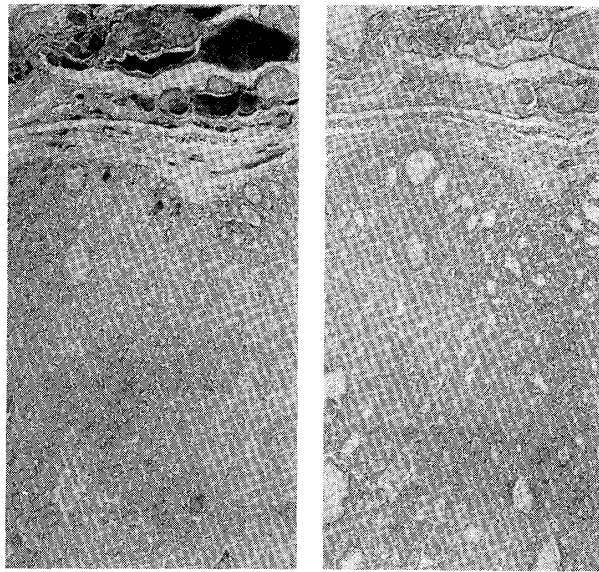


図5 家兎抗 TG 多クローン抗体によるマウス抗 TG 単クローン抗体の免疫染色性の抑制試験

抗 TG 多クローン抗体が認識する epitope の一つを抗 TG 単クローン抗体が認識する場合は対照 (左) に比し TG 染色が抑制される (右)。写真下3/4は甲状腺腫瘍、上1/4は非腫瘍部甲状腺である。

## 2) 甲状腺腫瘍・結節の機能状態と免疫組織化学

甲状腺腫瘍や過形成性結節は通常非機能性であるが、まれに過機能性腺腫・結節性病変が経験され、Plummer 病、あるいは autonomously functioning thyroid nodules (AFTN) と呼ばれる。Europe の過機能性甲状腺腺腫では、TSH 受容体や Gs 蛋白  $\alpha$  subunit をコードする遺伝子の点突然変異がしばしば見いだされるが、日本においてはそのような変化はまれとされる。これらの機能状態の違いは免疫組織化学的にも反映される<sup>10)</sup>。正常甲状腺細胞のコロイドは eosin 染色性が低いと TG の免疫染色性が高く、前者が高いと後者が

低いという関係を示し、T4・T3の免疫染色性も TG と同様であるが、非機能性の甲状腺腫瘍・結節では、TG の染色性が高くても T4・T3の免疫染色性が低いという両者の染色性の解離がみられる。ところが、Plummer 病の腫瘍・結節では、この染色性の解離がないのが特徴的である(図7)。さらに、Plummer 病の場合、視床下部—下垂体—甲状腺系の抑制から、非腫瘍部・非結節部甲状腺細胞の萎縮を示し、コロイドも HE 染色では標的状となって、コロイド中央部の TG の免疫染色性が低くなり辺縁部のみの染色性を示すことが多い。さらに、その辺縁部では T4・T3の免疫染色性が低

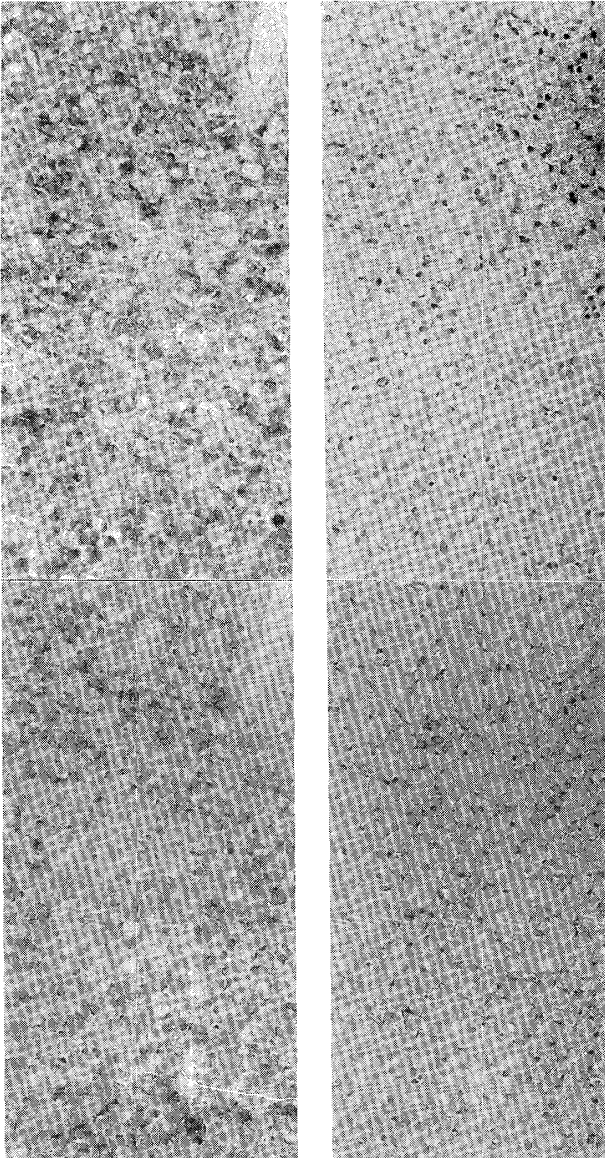


図6 印環細胞様変性を示した dysrhormonogenetic goiter の免疫染色性

pTG (左上), PCTG1 (右上), PCTG2 (左下), antiT4 (右下) を用いた染色で, ここでも pTG と PCTG2 は類似した染色 pattern を示す. PCTG1 と antiT4 は陰性であり, この抗体が示す epitope と TG 内の T4 形成はないことを示唆している.

く, TG の染色性との解離を示す (図7). 非機能性の甲状腺腫周囲の正常部甲状腺濾胞ではそのような変化は示さず, 正常甲状腺と同様の免疫組織化学的態度をとる. 即ち, 機能性と非機能性の甲状腺腫瘍・結節では腫瘍部と非腫瘍部の TG と T4・T3 のとる染色 pattern が逆転している. 非機能性病変の濾胞や萎縮甲状腺濾胞では, ヨウ素化

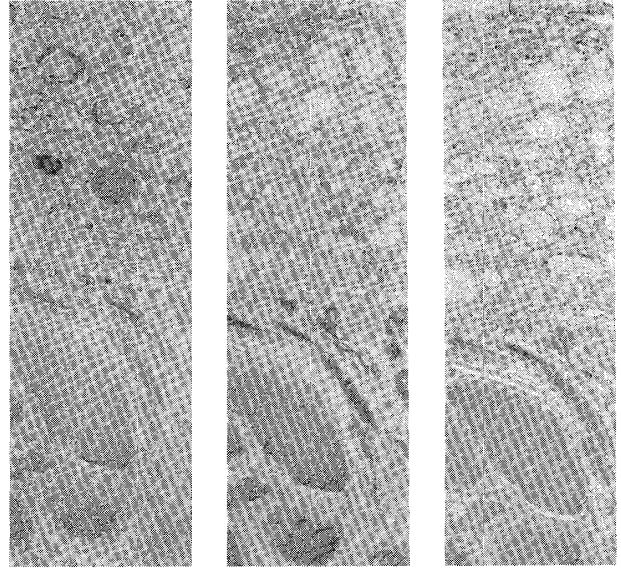


図7 過機能性腺腫様甲状腺腫の TG (左), T4 (中), T3 (右) の免疫染色性  
結節部 (下) は3者とも良好に染色されるが, 非結節部 (上) は TG は一部の濾胞のコロイドやコロイド辺縁部が染色されるのみで, かつ T4・T3 の染色性は悪く, TG との間に染色性の解離を示している.

やヨードチロシンの coupling が行われていない TG が存在すると考えられる.

### 3. 抗原の carrier としてのサイログロブリン

ハプテンや合成ペプチドに対する抗体作製過程で, TG は抗原の carrier として動物を免疫するときに使われることがある. 多クローン抗体使用の場合注意すべきことは, その抗原を固定したアフィニティーカラムなどを用いて精製していない場合があり, 抗 TG 抗体もその抗体中に含まれることがある. insulin-like growth factor I や endothelin の免疫染色などで経験したことであるが, その TG に対する抗体の力価は高い. carrier 蛋白はその他, アルブミン, ミオグロビン, ヘモシアニン (keyhole limpet hemocyanin) などが使われる.

### pitfall としての生体内 biotin

biotin は vitamin H とも呼ばれ, 生体内の上皮細胞を主体に多くの組織に, 細胞内でも種々の部位に局在するが, 多くの carboxylase の補酵素であることから, 糸粒体に富む副腎皮質や内分泌臓器の特に oxyphilic cell, oncocyte とその腫瘍としての oncocytoma に多く存在する<sup>11)</sup> (図8).



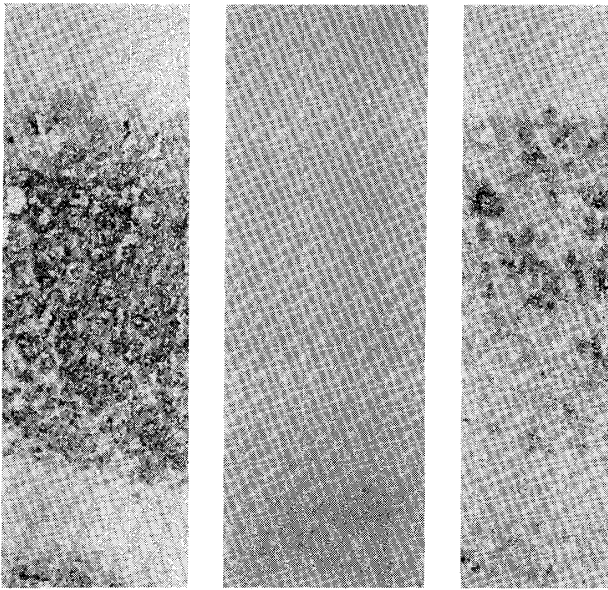


図8 副腎皮質の biotin の局在

新鮮凍結切片を streptavidin-peroxidase と incubate すると内因性 biotin の存在により染色される(左)。切片をあらかじめ10%ホルマリン10分固定するとこの反応は抑制される(中)。ホルマリン固定後、抗 biotin 抗体を用いて間接法で染めると免疫染色性を示す(右)。

avidin-biotin を含んだシステムで免疫染色または in situ hybridization を行う場合、ホルマリン固定材料では biotin の avidin 結合性は失われるので、通常はこの点を無視してよい(図8)。しかし、新鮮凍結切片を染める場合(切片をアセトンやエタノールで固定しても同様)、肝・腎・内分泌臓器をはじめとする上皮組織では ABC 法や LSAB 法では内因性 biotin を次のように処理する必要がある<sup>12)</sup>。biotin の avidin 結合性は分子当たり1価であり、avidin の biotin 結合性は4価で、両者の結合性は非常に強固であるので、まず内因性 biotin に対し、avidin を反応させる。次に biotin を作用させ、avidin の biotin 結合性を飽和させる。このことより、次に2次抗体、biotin 結合物や、avidin-peroxidase, ABC 複合体を作用させても反応は起こらない。しかし最近森らは、新鮮凍結切片をアルコール・アセトン等量混合液で固定した後の in-situ hybridization の過程で、内因性 biotin を block 後に70%ホルムアミド80°C10分の処理の過程で、avidin-biotin 複合体の解離が起こり非特異的シグナルが強くなることを示して

いる<sup>13)</sup>。また、ホルマリン固定材料でも核内に biotin 活性を示した microfilamentous な封入体を有する甲状腺乳頭癌の亜型<sup>14)</sup>や、同様の核内封入体を有する肺腫瘍や妊娠子宮内膜が報告されている。avidin-biotin を含んだシステムを使用する場合の内因性 biotin への注意は常に必要であり、陰性コントロールを置くことによりその評価を行うべきである。またこのような煩雑を避けて、間接法や PAP 法、前述の高感度間接法 (Envision System) を採用するのも方法である。

#### 文 献

- 1) 渡辺慶一, 中根一穂 編: 酵素抗体法 第3版. 学際企画, 東京 (1992)
- 2) Mornet E, Dupont J, Vitek A et al: Characterization of two genes encoding human steroid 11 $\beta$ -hydroxylase (P-450<sub>11 $\beta$</sub> ). J Biol Chem 264: 20961-20967, 1989
- 3) Ogishima T, Shibata H, Shimada H et al: Aldosterone synthase cytochrome P-450 in the adrenals of patients with primary aldosteronism. J Biol Chem 266: 10731-10734, 1991
- 4) 相羽元彦, 河上牧夫, 山下共行ほか: Aldosterone synthase cytochrome P-450と11 $\beta$ -hydroxylaseの免疫組織化学的検討. 日病理会誌 85: 208, 1996
- 5) Aiba M, Suzuki H, Kageyama K et al: Spirinolactone bodies in aldosteronomas and in the attached adrenals. Am J Pathol 103: 404-410, 1981
- 6) Aiba M, Hirayama A, Iri H et al: Adrenocorticotrophic hormone-independent bilateral adrenocortical macronodular hyperplasia (AIMAH) as a distinct subtype of Cushing's syndrome. Am J Clin Pathol 96: 334-340, 1991
- 7) Sasano H, Okamoto M, Sasano N: Immunohistochemical study of cytochrome P-450<sub>11 $\beta$</sub>  hydroxylase in human adrenal cortex with mineralo- and glucocorticoid excess. Virchows Archive [A] 413: 313-318, 1988
- 8) 金地嘉春, 藤本吉秀, 佐藤幹二ほか: 甲状腺癌より抽出したサイログロブリンを抗原としたモノクローナル抗体の作製. 第21回甲状腺外科検討会抄録集: 84, 1988
- 9) 相羽元彦, 平山 章, 金地嘉春ほか: 甲状腺乳頭癌由来 thyroglobulin に対する mouse monoclonal 抗体の免疫組織化学的検討. 第22回甲状腺外科検討会抄録集: 25, 1989
- 10) 相羽元彦: 機能性腫瘍の形態. (特集 腺腫様甲状

- 腺腫/形態と機能). 内分泌外科 7: 301-305, 1990
- 11) 相羽元彦, 押部信之, 飯塚英治ほか: 下垂体 null cell adenoma 分類における抗糸粒体抗体と抗ビオチン抗体を用いた免疫染色の有用性について. ホルモンと臨 44(増刊): 34-38, 1996
- 12) **Wood GS, Warunke R:** Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection system. J Histochem Cytochem 29: 1196-1204, 1981
- 13) 森 正樹, 法木左近, 前川秀樹ほか: ホルムアミドによるアビジン・ビオチン複合体の解離—アルコール固定およびアセトン固定における in situ hybridization の問題点. 病理と臨 13: 1607-1609, 1995
- 14) **Yamashita T, Aiba M:** Peculiar nuclear clearing composed of microfilaments in papillary carcinoma of the thyroid (Letter). Cancer 72: 300, 1993
-