

病理 TOPICs : 免疫染色について

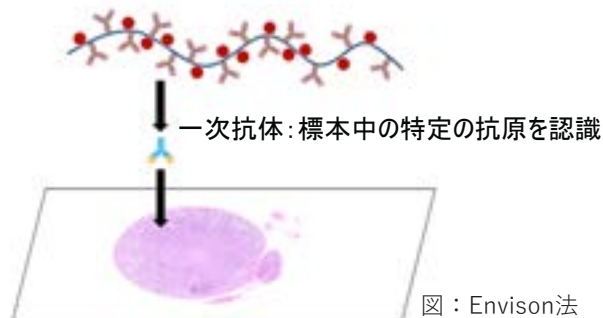
今号では、病理検査でよく実施される「免疫染色」について、その原理と病理分野での応用事例についてご紹介します。

病理医は、検体から適切な部位を切り出して標本ブロックを作製し、そのブロックを薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施すことで病変を観察・評価しています。HE染色は病理形態学的評価に必要な染色法であり、全体の病変の構成の把握や、個々の細胞形態を詳細に評価するのに非常に優れています。しかし一方で、HE染色では標本中に含まれる情報量が非常に多いため、微細な病変や感染体を見落としてしまう可能性があります。また、組織のどこ領域にタンパク質が発現しているのかなど、分子生物学的な評価はHE標本ではできません。

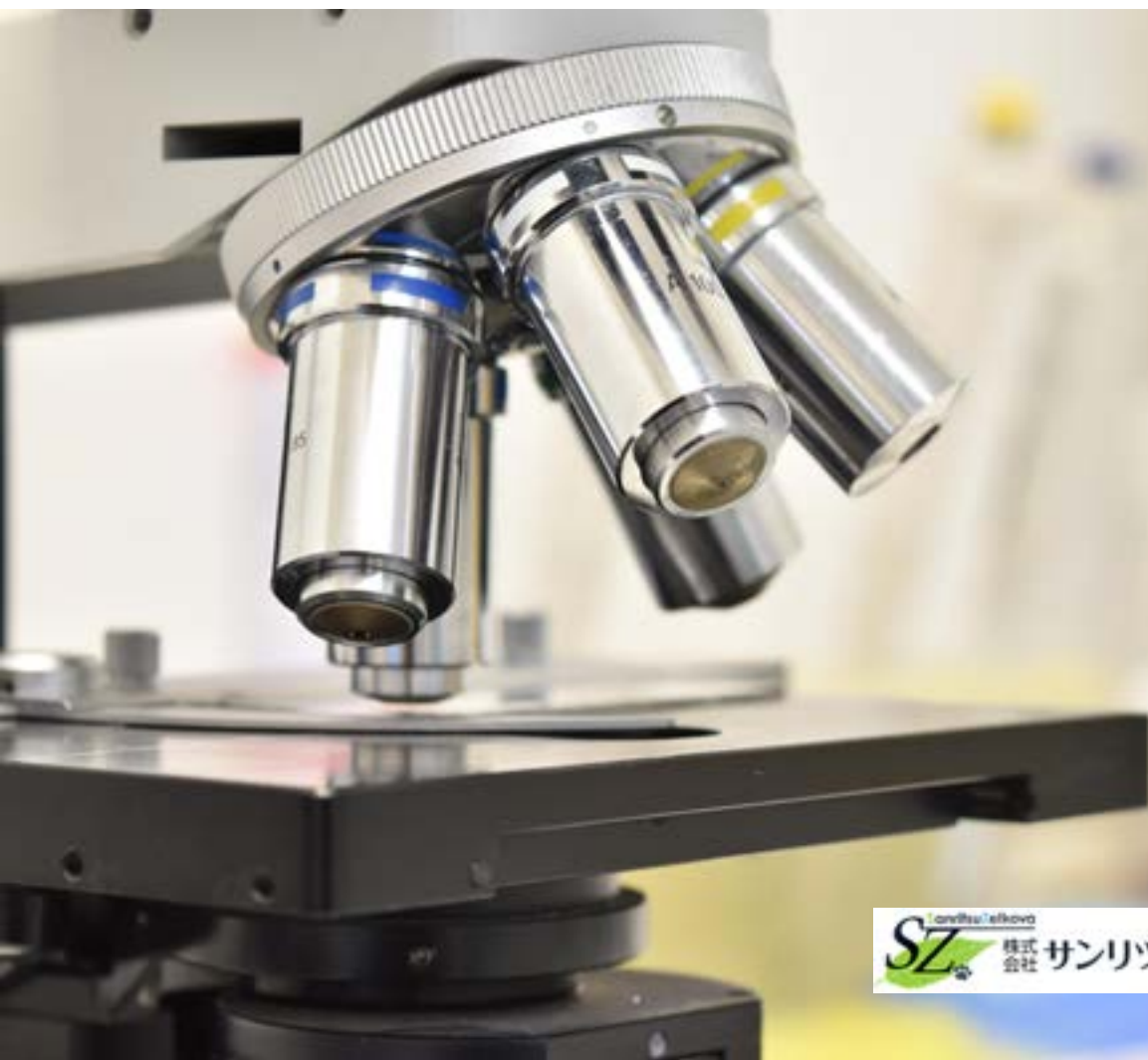
免疫染色は、正式には「免疫組織化学」とよばれ、HE染色などでは通常不可視なタンパク質の一部である「抗原」を可視化する技術です。抗原抗体反応という、生体の異物排除機能の一つである免疫反応を利用しており、細胞内や細胞表面に存在する特定のタンパク質（抗原）に対して、それに反応する物質（抗体）を結合させ、抗体に標識した色素を発色させることで、抗原が標本上のどの部位に存在するかを可視化する技術です。

免疫染色は、原発不明癌の原発巣推定や腫瘍の組織亜型分類など様々な用途で利用され、病理診断には必須の技術となっています。

二次抗体:一次抗体を認識
⇒二次抗体に標識された酵素を化学的に可視化



免疫染色の手法はいくつかありますが、弊社では Envision法と呼ばれる、抗原抗体反応を増幅して検出する高感度な染色法を利用しています (上図)。HE染色と比べると手間のかかる染色で、通常半日から1日程度時間がかかります。また、使用する抗体によりその希釈倍率や抗原賦活化の仕方など、染色条件が異なるため、熟練した技術が必要になります。



病理分野における免疫染色の利用例

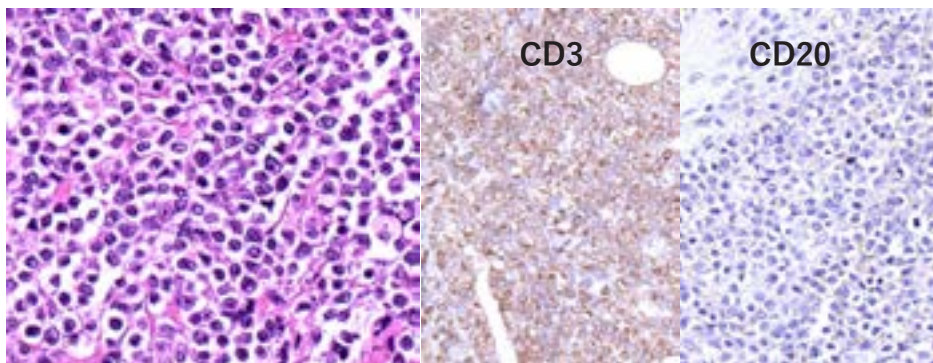
◆ 腫瘍の由来特定

最も多い利用法が、起源が分からない腫瘍の由来を特定するための免疫染色です。

細胞の種類によって細胞を構成するタンパク質の種類が異なり、例えば上皮細胞は「サイトケラチン」と呼ばれる、細胞骨格を形成する中間フィラメントを持つことが知られています。このようなタンパク質の特徴は、腫瘍化した際にも残っている場合が多いため、その特徴を免疫染色の「マーカー」として利用することで、腫瘍の由来を判定することができます。

現在、小動物臨床領域では様々なマーカーが利用されています。最も有名なマーカーは上皮性腫瘍に特異的に発現する「サイトケラチン」と、間葉系腫瘍に特異的に発現する「ビメンチン」です。両者を組み合わせて使うことで、腫瘍が上皮性腫瘍なのか、間葉系腫瘍なのかを判定することができます。最近ではリンパ腫の由来を特定するため「CD3（：T細胞マーカー）」や、「CD20（：B細胞マーカー）」が利用されることも多いです（右下図）。また、悪性黒色腫の多くは「PNL2」と呼ばれるタンパク質を発現することが知られており、無色素性メラノーマの診断に役立ちます。

マーカー検索は腫瘍の由来を特定するために非常に有効な手段ですが、腫瘍があまりに未分化な状態の場合は、マーカーの発現も弱くなり、免疫染色でも由来が特定できない場合があるので注意が必要です。また、ホルマリンの固定条件や固定時間などによって染色結果が左右されやすく、固定不良・あるいは過固定の組織では正しい結果が得られない場合があります。

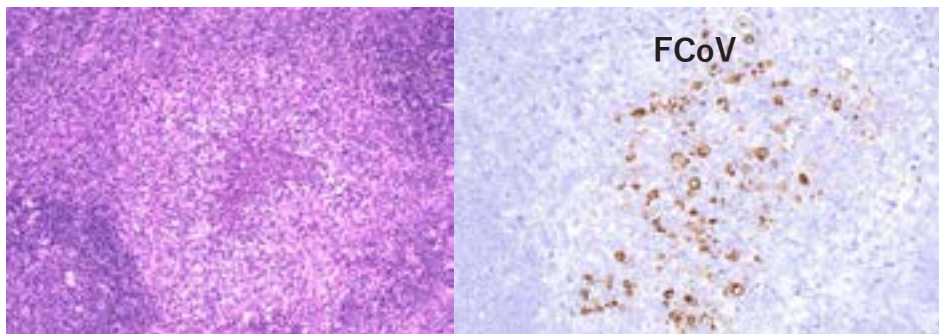


図：犬の皮膚型リンパ腫。腫瘍細胞はCD3に陽性を示し、T細胞性リンパ腫と診断された。

◆ 病原体特定

病変中の病原体の有無を判定する際にも免疫染色が有効な場合があります。細菌や真菌などは、標本を注意深く観察すればHE染色や特殊染色（ギムザ染色・グラム染色・PAS染色など）でも病原体を検出することができますが、検出された病原体がどんな種類の感染体なのか、厳密な分類をすることは困難です。また、多くのウイルス性疾患では、封入体など特殊な病変が出現しない限り、病原体を光学顕微鏡で認識することはできません。

免疫染色を利用することで、病原体に特異的な抗原を検出することが可能になります。右図は猫の回盲部に発生した化膿性肉芽腫性炎症の病変ですが、猫コロナウイルスのヌクレオカプシドに対する抗体を用いて免疫染色を実施すると、病巣内に陽性像が認められ、本病変が猫伝染性腹膜炎（FIP）と確定診断することができます。



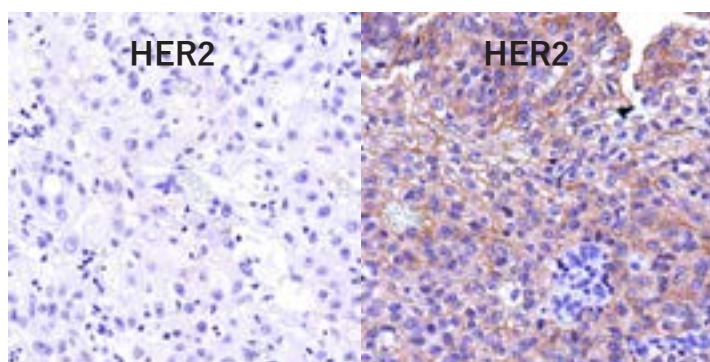
図：猫の化膿性肉芽腫性腸炎。病巣内に猫コロナウイルスの抗原が検出された。

◆ 腫瘍の予後予測因子、分子標的薬の選択

近年は腫瘍の治療のために分子標的薬を選択される先生も増えてきているのではないのでしょうか。イマチニブやトセラニブといったチロシンキナーゼ阻害剤は、犬・猫の肥満細胞腫、犬の消化管間質腫瘍（GIST）に発現する「KIT」や「PDGFR（血小板由来成長因子レセプター）」を標的にした分子標的薬です。特に犬/猫の肥満細胞腫では、KITをコードするc-kit遺伝子の変異が報告されています。変異によってKITを起点とする細胞伝達シグナルが恒常的に活性化し、腫瘍細胞の増殖が促進します。残念ながら、免疫染色では変異型KITと正常なKITを区別することはできず、変異の有無を評価するには遺伝子検査が必要となります。

しかし、c-kitが腫瘍細胞の細胞質に発現している症例は、膜に発現している症例と比べて生存期間が短く、局所再発率が高いことが報告されており、免疫染色によるc-kitの発現パターンから症例の予後をある程度予測することができます。

また、犬の膀胱移行上皮癌では、約6割の症例で「HER2」と呼ばれるチロシンキナーゼが過剰に発現していることが報告されています。HER2に対する分子標的薬ラパチニブを用いた犬の膀胱癌の臨床試験の結果も近年報告されており、近い将来、HER2の発現の有無によって治療薬を選択する時代が来るかもしれません。



図：犬の膀胱移行上皮癌のHER2の発現。
症例によってHER2分子の発現強度が異なる。