

脱メラニン法を行った皮膚組織の免疫染色

櫻井 秀子 筑波大学医学系技術室

概要：免疫染色は抗原抗体反応を利用し、酵素反応で抗原の局在を明らかにする染色方法である。皮膚組織中に過剰に沈着したメラニンは免疫染色で一般的に使用される DAB(3,3'-diaminobenzidine)発色の色調と類似した黒褐色を呈し評価を困難にしている。

それを識別するためにメラニンが沈着している皮膚組織にギムザ染色を行い免疫染色の結果との識別を良好なものにした。また過剰に沈着しているメラニンを弱く脱色してより識別しやすくしたので報告する。

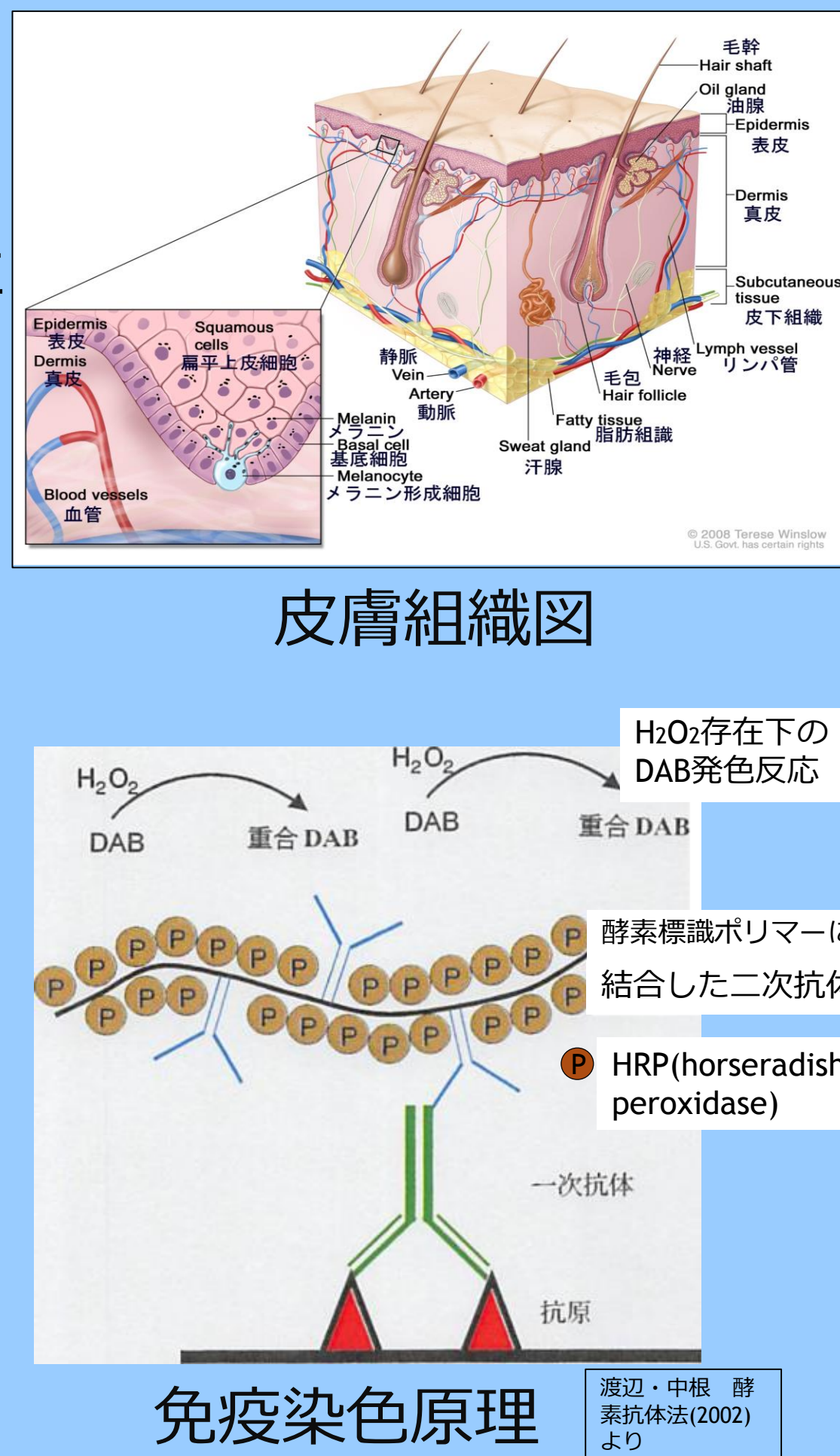
はじめに

免疫染色は免疫組織化学染色とも呼ばれ医学・生物学分野において重要な役割を持った検査法である。医学分野においては 1955 年頃より行われ、近年はより高感度な手技が開発されている。病気の病理診断の補助手段として日常的にも行われている。また、研究分野においても抗原の局在、機能解析のためほとんどの組織で行われ果たす役割は大きい。

多種類の抗体を使用して免疫染色を業務としている中で生体内色素であるメラニンが過剰に産生している皮膚腫瘍の免疫染色の依頼を受けた。

メラニンはチロシンの酸化生成物で、種々の酸化剤で容易に酸化漂白を受け消失することが知られている。今回、過マンガン酸カリウム・シュウ酸法を行った。

免疫染色の発色は一般的に DAB と HRP (horseradish peroxidase)の酵素反応を用いるため茶褐色を呈するが、メラニン色素の色調である黒茶褐色と重なり評価が困難になる欠点がある。今回、ギムザ液でメラニンを緑色に染め DAB の発色と染め分けをして目的抗原の局在を見やすくするよう検討した。組織検体のメラニン沈着度合いが強い今回の場合、脱色を行った方がより見やすい標本になると思われたので必要性を検討しながら行ったので報告する。なお、基本的な事であるが使用後の廃液に関しても適切に処理を行った



皮膚組織図

免疫染色原理

源辺・中根 酵素抗体法(2002)より

結果

- メラニン色素は DAB の発色色調である茶褐色と類似しており判定が困難な色調を呈していた(図1)。
- ギムザ染色を行うことによりメラニンは染め分けられ判読が出来るようになった。

メラニンは濃緑色であった(図2)。

- 脱色を行うことによりメラニン色素は薄れてさらに見やすくなった(図3、図4)。

今回の検体の脱メラニンは 2 回が最適であると思われた。

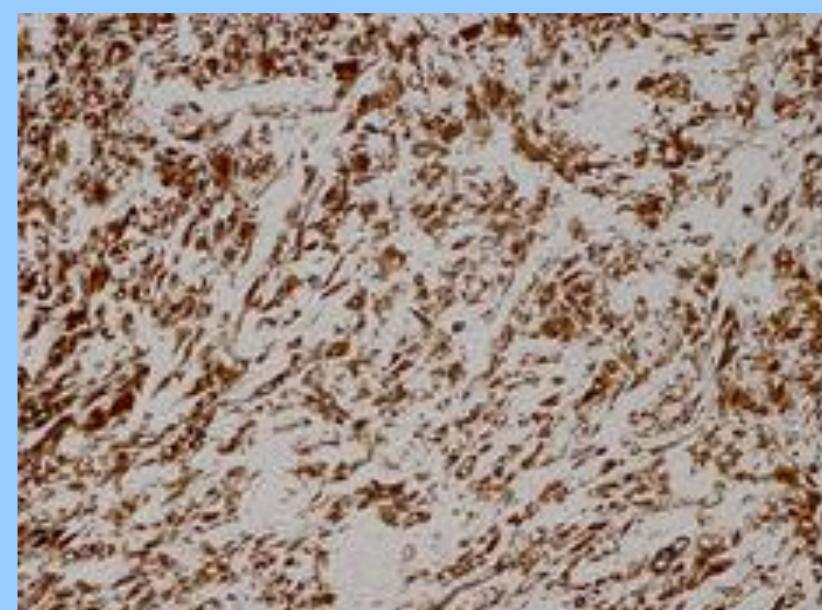


図1. メラニン色素 (無染色) ×200



図2. メラニン色素(ギムザ染色) + 免疫染色(DAB) ×200

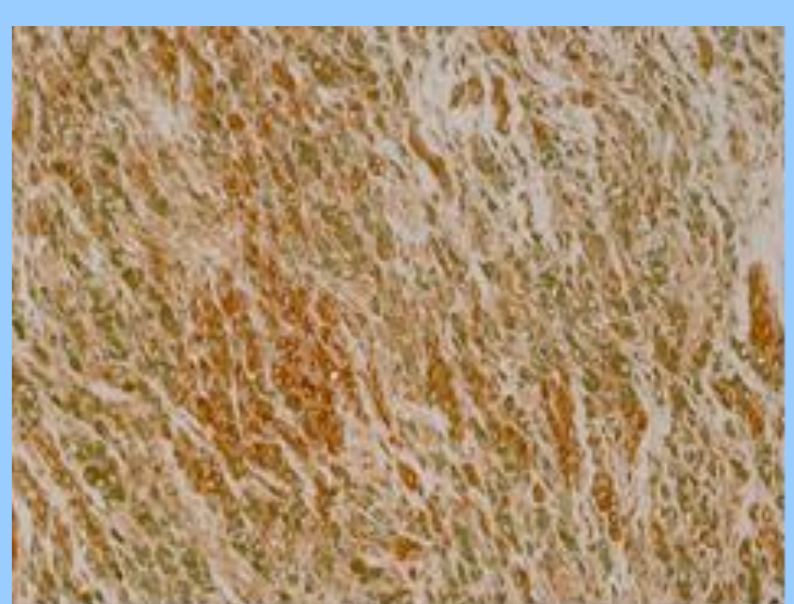


図3. 脱色1回 + ギムザ染色 + 免疫染色(DAB) ×200

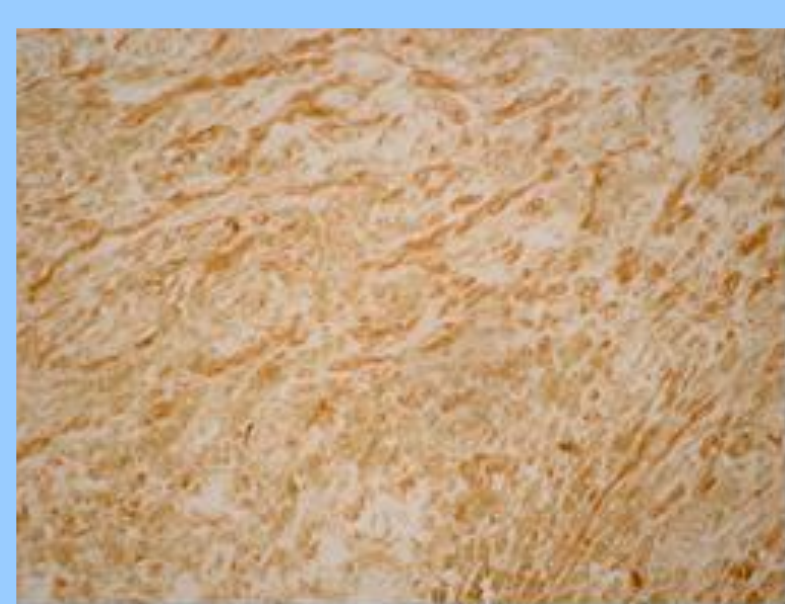


図4. 脱色2回 + ギムザ染色 + 免疫染色(DAB) ×200

対象・方法

対象：ヒト皮膚組織は、メラニンの産生が過剰に沈着している腫瘍組織。パラフィンブロック、薄切は、つくば組織診断センターで作製したものを使用した。

メラニンの脱色

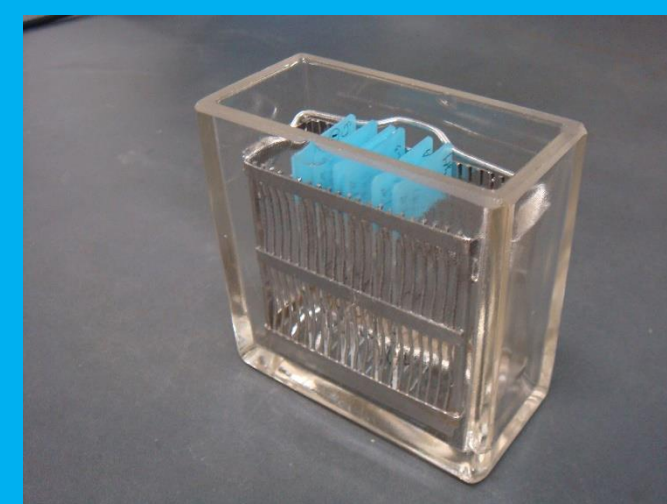
1. 脱パラフィン操作 キシレン、エタノール系列(キシレン除去)
2. 洗浄:流水(エタノール除去) 3 分-5 分
3. 酸化： 0.25 %過マンガン酸カリウム水溶液 3分後、流水 3 分-5 分
4. 還元： 2 %シュウ酸水溶液 2 分、後流水 3 分-5 分
5. 2-4の洗浄、酸化、還元を1サイクルとしてメラニンの色調を見ながら脱色操作を行う。メラニンの色調は少し残すようにする。

ギムザ染色

ドーゼ内で2 %ギムザ液(武藤化学株式会社)リン酸緩衝液(1/150M,pH6.4)を15 分反応させた後、流水洗浄・脱水・封入

免疫染色

1. 脱メラニンを行った後、内因性ペルオキシターゼ活性を阻止するため 5%過酸化水素メタノール液で 5 分間反応させ、PBSで洗浄
2. 抗原賦活のために 0.1M トリス塩酸緩衝液(pH10)オートクレーブ で 121℃、5分加熱
3. 非特異反応を抑えるため 2 % NGSで室温 60 分
4. 一次抗体 anti-PKA[R I α] BD Biosciences 400倍希釈(2 % NGS)を用い、4 °C で 一晚反応
5. 二次抗体は、anti-Mouse IgG HRP(DAKO)を用い 室温 30 分 反応 PBS で洗浄後 DAB(DAKO)による発色を行った。2-5分後反応を停止



染色瓶に入ったスライドガラス



脱パラフィン用キシレン、アルコール系列



湿潤箱に並べられたスライドガラス：抗体を載せているところ

まとめ

- メラニンを過剰に産生する皮膚腫瘍組織の免疫染色依頼を受け、メラニンの脱色法とギムザ染色を行うことにより、目的である皮膚組織の免疫染色の染色像を見やすいものにする事が出来た。

免疫染色は目的の抗原に合わせて、陽性コントロール、陰性コントロールを対象として行うことにより正しい評価になるが、今回の抗体は、全ての細胞に発現が見られる抗体のため特定のコントロールは用いなかった。今後、他の抗体での対応についてはそれぞれに検討が必要になってくる。今回のメラニン過剰沈着の皮膚組織の経験を生かしてこれからの免疫染色について対応していきたい。

環境や職場の安全衛生に対し廃液の処理は重要な点である。使用した試薬類の廃液について、今回使用した試薬類廃液の分類は、DAB は発がん性のある物質で注意して扱うとともに含水有機廃液とし、シュウ酸溶液、ギムザ液も同様の含水有機廃液とした。過マンガン酸カリウムの洗浄液と廃液は一般重金属に分類した。また過酸化水素水/メタノールは一般有機廃液とし各々ノートに記載して適切に処理を行った。