

技術報告

マイクロウエーブを用いた免疫染色法

天羽 則子, 若槻 真吾, 佐野 壽昭

徳島大学医学部第一病理学教室 (主任: 佐野壽昭教授)

(平成9年8月8日受付)

Immunohistochemistry using microwave method

Noriko Amo, Shingo Wakatsuki, and Toshiaki Sano

First Department of Pathology, School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima

(Director: Prof. Toshiaki Sano)

Key words: immunohistochemistry, microwave, technical note

免疫組織化学 (免疫染色) におけるマイクロウエーブ処理は、従来より抗原の賦活の目的でよく行われているが、我々は、マイクロウエーブ照射下に抗原抗体反応が行える装置 (東屋医科器械社製, MI-77型) を導入し、ルーチンの免疫染色に利用したところ、染色時間の大幅な短縮と染色像の鮮明化に有用であったので、紹介したい。

方法および結果

1. マイクロウエーブ照射下免疫染色の手順

教室では現在、酵素抗体法の LSAB 法 (DAKO 社のキット使用) を用いており、染色手順の基本は LSAB 法に準拠している。以下にその概略を示す。

- 1) 脱パラフィン: 切片を載せたプレパラートをあらかじめ60℃, 15分加温し、パラフィンが溶けやすくしておき、型の如く、キシレン, アルコールで脱パラする。(計45分)
- 2) 内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害: 0.3%過酸化水素-メタノール溶液に30分。
- 3) 洗浄: 流水5分→PBSに1分ずつ3回。
- 4) 正常ウシ血清による前処理: LSAB キットの血清。照射条件, 反応時間は表1の如くに。
- 5) 一次抗体による反応: ウシ血清を振り切り, 洗浄することなく, 一次抗体による反応を行う。照射条件, 反応時間は表1に。
- 6) 洗浄: PBSにて20秒×3回。従来法では洗浄を

5分×3回であった。

- 7) 二次抗体による反応: LSAB キットの抗体を用いる。照射条件, 反応時間は表1の通り。
- 8) 洗浄: 6) と同じ。
- 9) SAB (ストレプトアビジン・ビオチン) による反応: LSAB キットの SAB を用いる。照射条件, 反応時間は表1に。
- 10) 洗浄: 6) と同じ。
- 11) DAB による発色: 45 mgDAB / 150 mlTris-HCl buffer に100倍希釈過酸化水素水2, 3滴を反応直前に加える。発色までの時間は1分から数分(検鏡しながら)。
- 12) 洗浄: 流水1分。従来法では5分であった。
- 13) 核染色, 封入。

表1 反応過程ごとの所要時間

	5秒照射/ 3秒休止 5℃上昇	3秒照射/ 3秒休止 2~3℃上昇	従来の方法
正常ウシ血清	6分	10分	30分
一次抗体反応	12分	20分	4℃1晩
二次抗体反応 (ビオチン化抗 マウスIgヤギ血 清又はビオチン 化抗ウサギIgヤ ギ血清)	7分	10分	30分
SAB 反応	7分	8分	30分

図1 回転ステージのシェーマ

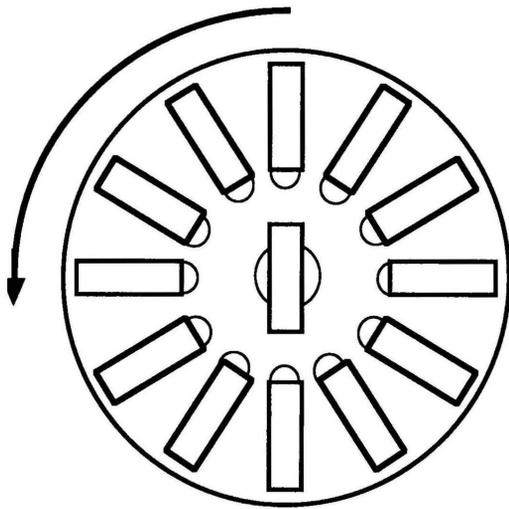


表2 照射設定規格

照射ワット	150~400ワット, 50ワットずつ可変式
照射方法	秒単位, 連続照射, 間欠照射
資料ステージ	回転 (0~60回転/毎分, 可変式)
上限温度設定	可
試料温度測定	レーザー式

2. 照射条件

図1のように, 抗体溶液を載せたプレパラートは装置の中で回転ステージに水平に置かれ, マイクロウエーブ照射を受けながら抗原抗体反応が進む。ステージの中央には温度測定用のPBSを滴下したプレパラートを置く。

照射の方法には表2に示したように連続照射と間欠照射があるが, 本法には後者が適している¹⁾。4回の反応過程(4, 5, 7, 9)に行う照射はいずれも同じ間欠照射法である。具体的には, 5秒照射/3秒休止と3秒照射/3秒休止のいずれかをを用いるが, 温度上昇は後述するように5秒照射/3秒休止の方がやや高くなる。免疫反応促進効果は加温作用によるものではなくむしろマイクロウエーブの持つ振動作用によるものと考えられており²⁾, 我々の経験では温度上昇の低い3秒照射/3秒休止の方が染色結果はより良好のようである。

4回それぞれの反応過程における照射必要時間は表1のように, 最も長くても一次抗体の反応の20分である。表1には従来の方法での反応時間も併記した。

照射設定条件として, 表2の規格のうち, 出力コントロールは250ワットとし, 温度上昇を1分で1℃上昇を目安とする。5秒照射/3秒休止では5~6分で5℃上

昇, 3秒照射/3秒休止では10分で2~3℃上昇し, どちらもその後は変わらない。なお, 照射上限温度は37℃に設定しておく。

3. 従来の免疫染色との所要時間比較

表1のように4回の反応過程で時間短縮され, さらに洗浄時間も短縮可能である。脱パラ開始から封入までの全行程に要する時間は2時間13分(5秒/3秒間欠) - 2時間30分(3秒/3秒間欠)である。ちなみに従来法では, 一次抗体反応以外の過程に約4時間を要し, これに一次抗体反応時間(2時間~一晚)を加えると, 少なくとも6時間を必要としていた。

なお, 洗浄時間が短縮可能な理由としては, 1) 染色液温の上昇により洗い出しが容易となる, 2) 染色時間の大幅な短縮のため組織との非特異的結合が生じにくくなる, の2点が考えられる。

4. 染色像の比較

本法による免疫染色の染め上がり標本はバックグラウンドが非常に少なく, DAB液に多少長く浸し過ぎてもバックグラウンドはほとんどない。この染色像は4℃, 一晚での一次抗体反応の染色像に匹敵し, 室温2時間の一次抗体反応の場合より明らかに鮮明であった。

5. 留意点

照射時の抗体の乾燥を防ぐため回転ステージのくぼみに蒸留水を入れておき, 装置内に十分な湿度を保つ。

6. その他の組織処理におけるマイクロウエーブの活用

免疫染色以外に, 組織の固定, 抗原性の賦活, 反応時間(HE, PAS, Azan-Mallory, PAMなどの一般染色にも)の迅速化, 術中迅速診断時への免疫染色応用などにマイクロウエーブの活用が期待できる。

このうち, 本装置による抗原性の賦活化の設定条件は, 1) 設定温度: 95℃, 2) 照射出力: 400ワット, 3) 照射方式: 連続照射, 4) 温度上昇: 設定温度に達したら350ワットに切り換える, 5) 照射時間: 設定温度到達後8分~10分, である。なお, 蒸発による溶液の減少によるトラブルを防止するために, 我々は増田社の染色バットと染色トレイを使用している。照射終了後は30分ほど自然に冷ました後, 免疫染色に進む。

7. 学内での利用

第一病理に導入後、臨床検査医学、医学部総研にも同じ装置が入っている。照射時間などは器械固有の特性が多少あるようなので、それぞれの担当者と相談の上、至適条件を設定すべきである。

文 献

1. 森 吉臣：マイクロウェーブを用いた迅速免疫染色
臨床検査, 39:136, 1995
2. 森 吉臣：マイクロウェーブの能率的利用 電子顕
微鏡基礎技術と応用, 1996, pp.30-36