

## 〔 研究 〕

## 免疫染色における前処理の検討 ～ Ki-67 (MIB-1)、P-53 の染色性について ～

静岡赤十字病院 検査部

後藤 務 八木 弥八  
大塚 証一 山口 孝一

**Key words :** 核増殖抗原, Ki-67, p-53, 免疫組織化学的染色,  
マイクロウェーブ処理

### 【 要 旨 】

腫瘍組織の指標とされる核増殖抗原の Ki-67 及び P-53 抗体を胃癌例、卵巣癌例を用いて、各種の固定法、包埋法並びに酸、酵素、マイクロウェーブの前処理等の条件を基に免疫染色を行い、陽性細胞の出現度合いについて比較検討を行った。その結果、凍結切片・アセトン固定法は染色性が良好で、パラフィン包埋法による酸及び蛋白分解酵素処理では染色性は不良であった。マイクロウェーブ処理法では細胞の出現度合いは他者に比べ極めて良好で、その中でも、4%パラホルムアルデヒド固定による染色性とコントラストは最良であった。以上、固定液、包埋法、前処理等は免疫染色を行う上で、染色性を左右する重要な要因である。

### 【 は じ め に 】

近年、免疫抗体法は日常よく使用され、病理診断の確定や患者の予後の推定に不可欠な手段の一つとして用いられている。免疫抗体法の抗体には、細胞骨格、ホルモン、腫瘍マーカー等の組織発生由来を示唆するものと、細

胞表面マーカーや核蛋白抗原等を証明するものがあり、その中には、パラフィン切片の使用に於いてマイクロウェーブ (MW) やオートクレーブ等による熱処理が必要とされる抗体もある。

しかし、これらの熱処理は、その操作の煩雑性、切片の剥離や染色むら等種々の問題もしばしば経験し、必要に応じた固定法や包埋法の選定、標本作製上の技術の良否によってもその診断が大きく左右される。

そこで今回我々は、熱処理が必要とされている Ki-67 (MIB-1)、P-53 モノクローナル抗体を用い、熱処理以外に酸及び蛋白分解酵素処理の有効性や、最良の染色性が得られる固定液の選択を目的とし、それらの染色性について MW 熱処理との比較検討を行った。さらに、各種処理法が薄切切片上に与える影響を見る為、走査電顕を用い切片表面の微細構造の観察を行い、若干の知見を合わせて報告をする。

### 【 材料並びに方法 】

#### 1) 対象材料

病理診断にて確定された悪性腫瘍例、卵巣

癌及び胃癌の手術材料を使用した。

2) 一次抗体

- ①抗ヒトマウス Ki-67 モノクローナル抗体 (IMMUNOTECH社) を50倍に希釈した。
- ②抗ヒトマウス P-53 モノクローナル抗体 (DAKO社) を100倍に希釈した。

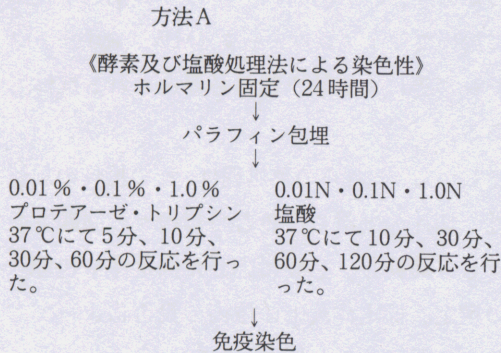
【 検 索 方 法 】

検索方法は次の4つに大別し検索を行った。

1) 光 顕 的 検 索

検索A : 各濃度の蛋白分解酵素及び塩酸処理による染色性の比較 (図1)

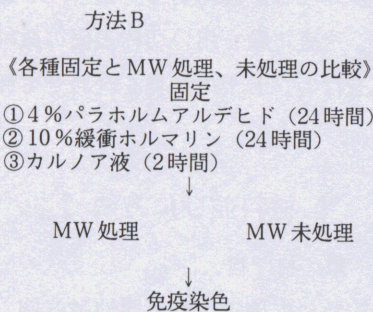
図1



検索B : 各種固定液とMW処理、未処理についての染色性の比較 (図2)

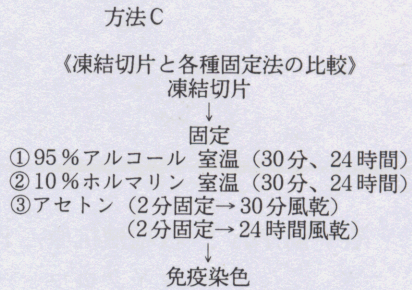
尚、加熱処理法として0.01Mクエン酸緩衝液 (PH6.0) 中で家庭用電子レンジ500W、5分、3回行った。

図2



検索C : 凍結切片と各種固定液についての染色性の比較 (図3)

図3



以上、A~Cの免疫染色はABC法を用い手技は以下の如く行った。

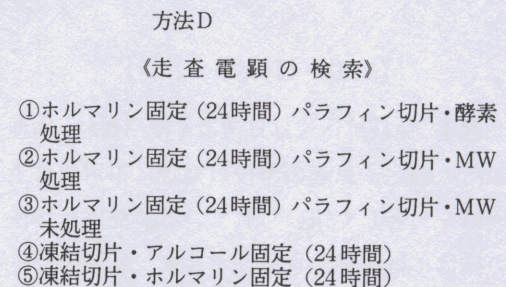
0.3%過酸化水素加メタノール液にて室温、30分→5%スキムミルクにて室温、30分→一次抗体反応を4℃にてOVER NIGHT→二次抗体を37℃、1時間反応→ペルオキシダーゼ・ABC (avidin biotin complex) にて37℃、1時間反応→DABにて発色させた。

判定は陽性の出現率を400倍で細胞100個を計測し、50%以上を3+、30%以上を2+、それ以下を1+と陰性とに表した。

2) 走査電顕的検索

検索D : 図4の①~③については、ホルマリン固定後のパラフィン切片を使用し、蛋白分解酵素やMW処理を施したものと、未処理のものについて各処理が細胞表面に与える影響

図4



を観察した。④、⑤については凍結切片を使用し、アルコール固定とホルマリン固定が細胞表面に与える影響について観察を行った。

電顕の試料作製は次の通りに行った。

上記の各固定後の試料を70%、80%、95%、100%とそれぞれエタノールで脱水を行い、酢酸イソアミルで置換させ臨界点乾燥後、イオンスパッタリング装置で2分間のコーティングを行った。

観察には、日本電子JSM5200型の走査電顕を使用した。

### 【 結 果 】

検索A：(表1)の如くプロテアーゼ並びにトリプシンによる蛋白分解酵素処理と酸は、濃度や処理時間に関係なく染色反応は認められなかった。

検索B：各種固定液とMW処理、未処理の出現率では①MW処理を行う事により、MIB-1、P-53は陽性を呈した。その中でもホルマリン系固定液は、アルコール系固定液に比べて強く陽性を呈した。②ホルマリン系固定液の中でも、10%緩衝ホルマリン液と4%

表1 (検索A)

《プロテアーゼ及びトリプシン濃度と反応時間》

濃 度	抗体名	5分	10分	30分	60分
0.01%	MIB-1	-	-	-	-
	P-53	-	-	-	-
0.1%	MIB-1	-	-	-	-
	P-53	-	-	-	-
1.0%	MIB-1	-	-	-	-
	P-53	-	-	-	-

《HCl濃度と反応時間》

濃 度	抗体名	10分	30分	60分	120分
0.01N	MIB-1	-	-	-	-
	P-53	-	-	-	-
0.1N	MIB-1	-	-	-	-
	P-53	-	-	-	-
1.0N	MIB-1	-	-	-	-
	P-53	-	-	-	-

パラホルムアルデヒド液の比較では、4%パラホルムアルデヒド液の方が染色性の低下や過染色が少なく、背景が抑えられコントラストがきれいであった(写真1、2)。③MW未処理法のP-53抗体を用いた材料の一部に陽性を呈するものもあった(表2、写真3)。

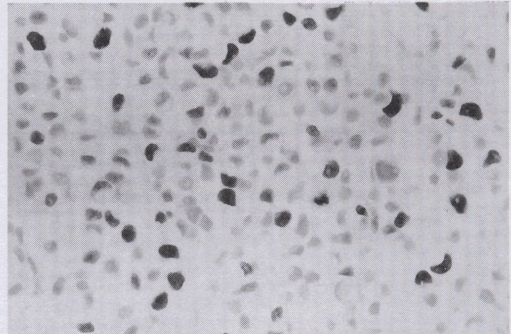


写真1 4%パラホルムアルデヒド固定、24時間  
パラフィン包埋法 MW処理有り  
MIB-1抗体 ×400

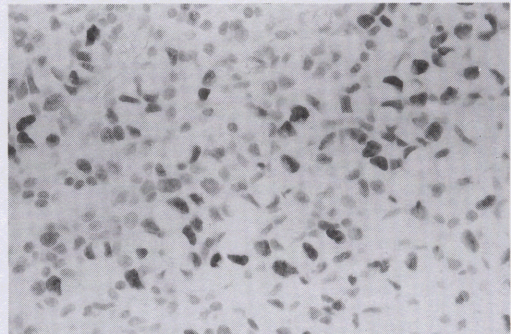


写真2 10%緩衝ホルマリン固定、24時間  
パラフィン包埋法 MW処理有り  
MIB-1抗体 ×400

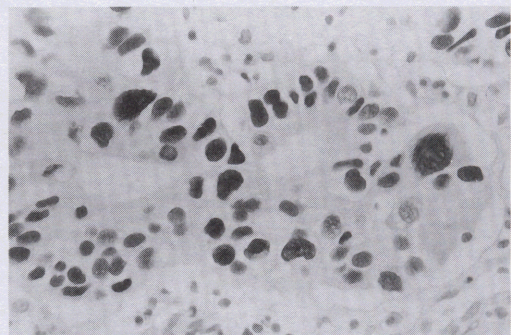


写真3 4%パラホルムアルデヒド固定、24時間  
パラフィン包埋法 MW処理なし  
P-53抗体 ×400

表2 (検索B)

各種固定液の染色性 (パラフィン切片)

固定液	症 例 1				症 例 2			
	MW 処理あり		MW 処理なし		MW 処理あり		MW 処理なし	
	P-53	MIB-1	P-53	MIB-1	P-53	MIB-1	P-53	MIB-1
4% PFA	+++	+++	-	-	++	++	+	-
10% BFA	+++	+++	-	-	++	++	+	-
カルノア液	+	+	-	-	+	+	+	-

検索C：①凍結切片に於ける各種固定液の比較を行った所、3種の固定液中ではアセトン固定液が最も染色性が高く、24時間の風乾を施しても染色性に耐えうる事が出来た (写真4)。

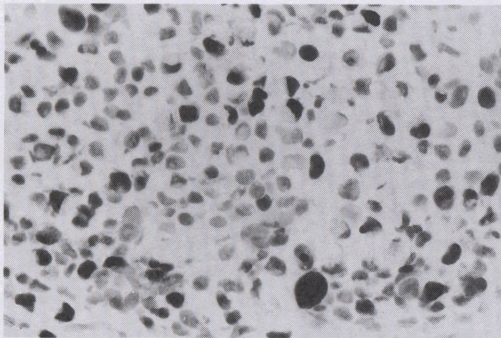


写真4 凍結切片法  
アセトン固定、2分、風乾24時間  
MIB-1抗体 ×400

分後と24時間後の各固定後の染色性を比較すると、アルコール固定では24時間、ホルマリン固定では30分固定後の染色性が良好であった (表3)。

検索D：走査電顕による観察は①パラフィン包埋・トリプシン処理法では、核表面は比較的スムーズであった。②MW処理、未処理の比較では、MW処理を施したものは核表面に無数の微細な穴があいており粗になっていた。一方、未処理のものは、核表面が比較的スムーズであった (写真5、6、7)。

③凍結切片におけるアルコール固定液とホルマリン固定液による核表面への影響は、アルコール固定液では脱水による作用か核表面に微細な穴が確認できた。又ホルマリン固定液では切片上の細

表3 (検索C)

各種固定液の染色性 (凍結切片)

固定液	固定時間	症 例 1		症 例 2	
		P-53	MIB-1	P-53	MIB-1
アセトン	2分 風乾30分	+++	+++	+++	++
	2分 風乾24時間	+++	+++	+++	+++
アルコール	30分	+	+	+	+
	24時間	++	++	++	++
10% FA	30分	++	++	++	++
	24時間	+	+	+	-

胞同士が無数に手が伸び合い結合し、ブリッキングをしている様な構造を呈していた(写真8)。

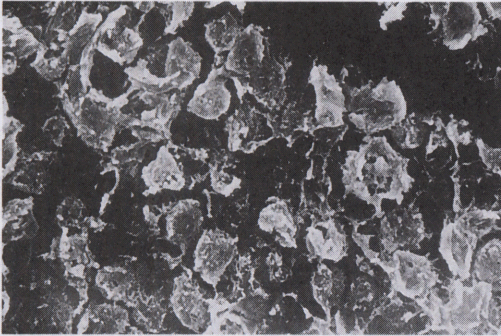


写真5 10%ホルマリン固定、24時間  
パラフィン包埋法 MW処理有り  
×1500

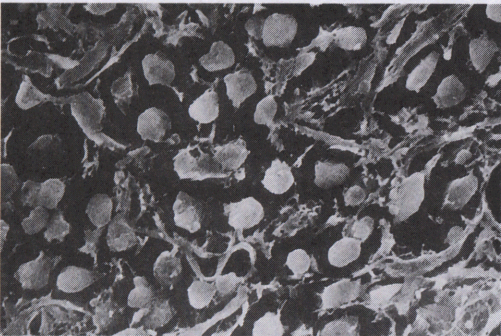


写真6 10%ホルマリン固定、24時間  
パラフィン包埋法 MW処理なし  
×1500

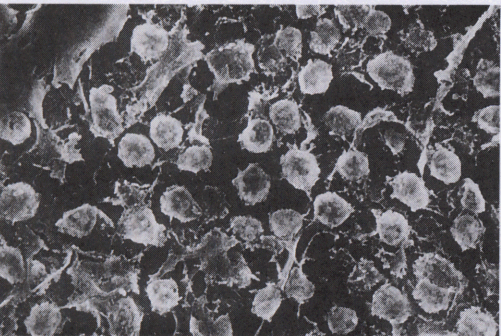


写真7 10%ホルマリン固定、24時間  
パラフィン包埋法  
トリプシン処理、37℃、1時間  
×1500

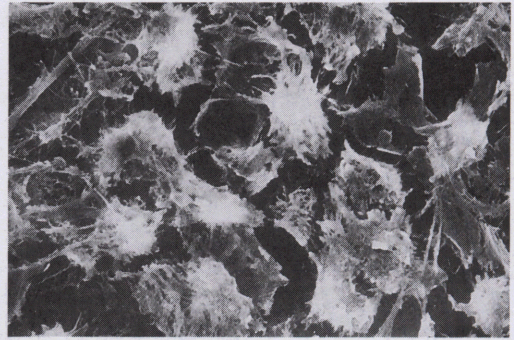


写真8 凍結切片法  
10%ホルマリン固定、24時間  
×1500

### 【 考 察 】

今日、免疫染色に於いては固定法、包埋法、前処理法が極めて重要であり種々の検討、報告がされている。中でも前処理法に於けるマイクロウェーブ処理については1970年にMayers<sup>1)</sup>が組織の固定に使用し、さらには1991年にShan-Rong-Shi<sup>2)</sup>が切片への照射を試みている。

今回、我々は各種固定液、凍結切片やパラフィン包埋法により作製した切片を用い、蛋白分解酵素や酸による処理法及び、MW処理、未処理が染色性に与える影響と、走査電顕による細胞表面の微細構造を観察した。

検索に使用したKi-67、P-53抗体は通常MW処理が必要とされている。その理由として、今回の検索の中で推測できる事は、凍結切片・ホルマリン固定法で30分後に比べ24時間後の染色性は明らかな低下を示していた事。即ち、アルデヒド系の固定液によって組織内に産生された蛋白分子内の重合と周囲に存在する他の蛋白分子との架橋構造によって立体障害を起こしている事が考えられる<sup>3)</sup>。もう一つは、パラフィン切片法として試料作製を行う過程で、固定以外に加熱、アルコール、キシレン、パラフィンなど有機溶媒による化学作

- 期細胞の免疫組織化学的同定法—パラフィン切片における抗原賦活法の検討—. 病理と臨床 vol.11 : 373 - 377, 1993
- 6) 安積和之、他 : 大腸腫瘍におけるP-53発現の免疫染色評価に関する基礎的研究—マイクロウェーブ処理の有用性について—. 日本大腸肛門病会誌 48 : 33 - 38, 1995
- 7) 川井健司、他 : 加熱処理による抗原性賦活化. 細胞 26(4) : 152 - 157, 1994
- 8) 居鶴一彦、他 : MICROWAVE照射による免疫組織細胞化学の検討. 山形済生会館誌 (第15巻第1号) : 145 - 150, 平成2年8月発行
- 9) 岩井みなど、他 : マイクロウェーブ処理と酵素処理を組み合わせた二重処理による抗原賦活法の検討. 病理と臨床 vol.13 : 1753 - 1757, 1995
- 10) 五十嵐久喜、他 : マイクロウェーブを利用した病理組織標本の作り方. 検査と技術 vol.21 : 1011 - 1016, 1993