

免疫組織化学の基礎と応用

著者	蓮井 和久
URL	http://hdl.handle.net/10232/15020

免疫組織化学の基礎と応用

蓮井 和久 鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科・講師

この講義は、2007 年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

X. 自動免疫染色

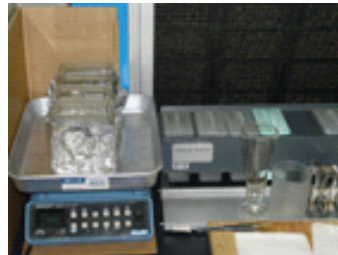
1. 自動免疫組織化学の序章

免疫組織化学の自動化は、既に、標本の切り出し標本の脱水、アルコールからキシレンへの置換、キシレンからパラフィンへのパラフィン透徹の自動化に始まり、各段の免疫染色が可能となっている。

切片を貼付したスライドガラスの 60℃での Baking は、切片のシラン処理されたスライドガラスへの接着を高める。脱パラフィンでの加熱は良好な脱パラフ



60℃での Baking



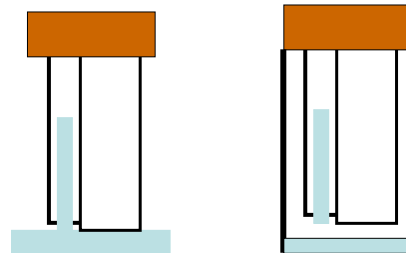
加熱した脱パラ染色瓶列 専用オートクレーブ



インを可能としている。最近は、この脱パラフィンと熱による抗原回復を同時に行う装置も開発されている。

キャピラリーギャップ法

湿箱 (Moist chamber)



キャピラリーギャップ(毛細管現象)による反応液 (100~150 μ lの溶液が、スライド間に吸い上げられる。)

湿箱(プラスチック染色びんに、底に水を張り、ホルダーごと、スライドグラスを入れる)

ドライヤー方式にて、この湿箱の温度を調整する装置がある(Fisher MicroProbe)。

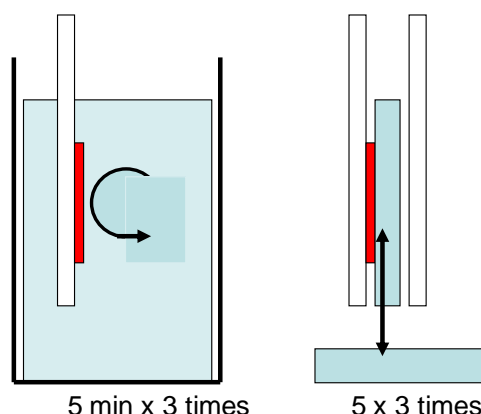
2. 免疫組織化学の染色過程の自動化の始まり

免疫組織化学の染色過程の自動化の始まりは、キャピラリーギャップ(毛細管現象)方式である。

この方法は、脱パラフィンと抗原回復処理後に、切片貼付面に向かい合わせた2枚のスライドガラスの10組ホルダーにセットし、右図の左の様に、20枚の切片に毛細管現象で反応液や洗浄液を同時に吸い上げて、右図の右の

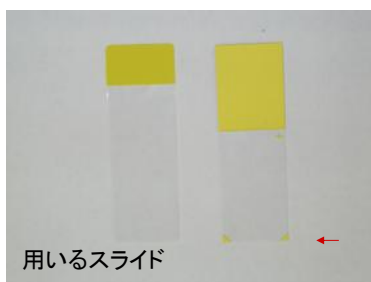
様に、染色瓶ないしドライヤーシステムの温度管理が可能な湿箱で同じ時間反応させ、同時に、廃液できる。

このキャピラリーギャップ方式の反応後の洗浄は、右図に示す様に、染色瓶中での洗浄は洗浄液の対流で行われるが、狭い2枚のスライドグラス間では洗浄液の対流は生じないので、繰り返しの洗浄液の吸い込みと排出（吸収紙に吸い取る）を繰り返すことになる。



しかしながら、反応液や洗浄液の前もっての温度制御が可能で、同時に反応液を吸い込み、同じ反応時間で実施できる点は、自動染色の特徴を有するものと考えられる

右に、用いるスライドグラスを示すが、記録出来る面（黄色部分）が大きく、下に左右に2か所の出っ張りがある。通常の2枚のスライドグラスの黄色部分に適切な厚さの紙を挟んでも、ホルダーにセットすることは可能である。



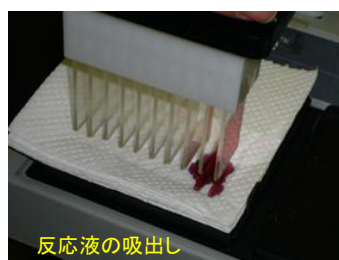
用いるスライド



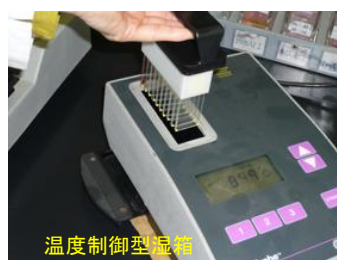
スライドをホルダーにセット



20枚のグラスがセットされたホルダーでの専用の試薬供給パッドでの吸い込み、吸収紙での反応液の吸い出し、専用湿箱ないし染色瓶での湿箱を右に示す。



反応液の吸出し



温度制御型湿箱



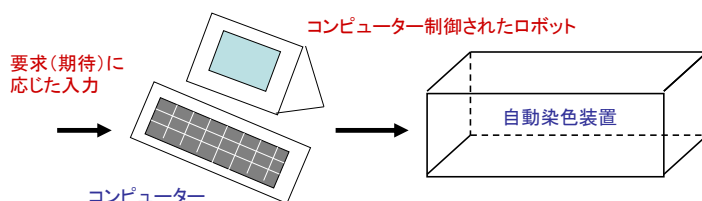
染色びんでの湿箱



ドライヤー型
温度制御ユニット

3. 自動免疫染色装置での免疫染色

自動免疫染色への要求
ないし期待は、1) 染色し
たい抗原の染色をお任せ
で染色して欲しい。2) 免
疫染色の基準化（異なる
場所、異なる時で、再現



性のある染色の実施) を行いたい。3) 新しい抗原も同様の方法で染色したい。4) 繰り返し染色作業をさせたいと云ったものである。これらには、限定された抗原の検出に対応した Ready made programs の供給と On demand なそれぞれの染色プロトコールが組めると云う対立した要求がある。

近年、外科病理学分野では、治療適応の為の免疫染色が要求されており、限定された抗原の検出に対応した Ready made programs の供給を旨として、試薬等も供給品を用いて、病理標本だけが異なると云う **Ready made 型自動染色装置** もある。その一方で、種々の染色条件で一度に染色を行う実験に用いることも可能な On demand なそれぞれの染色プロトコールが組める **On demand 型自動染色装置** もある。

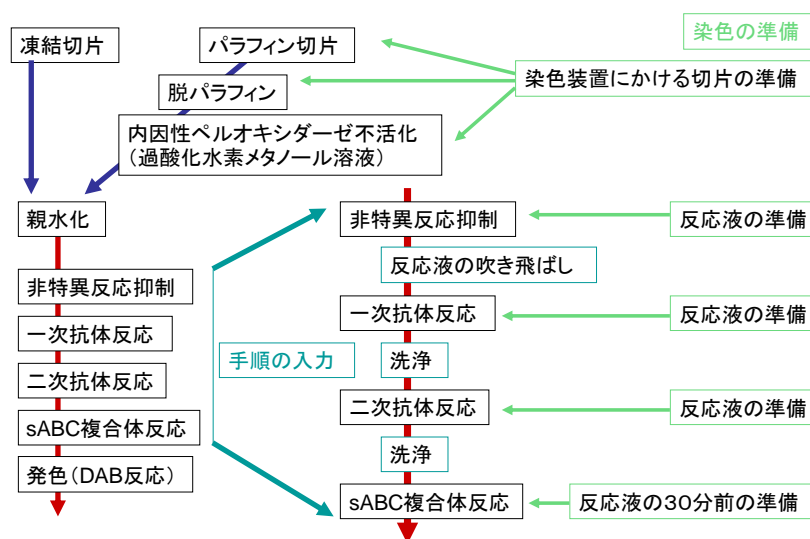
Ready made 型自動染色装置での染色は、当然、基準化されて、病理診断や治療法の選択等に貴重な免疫染色を提供している。しかし、病理診断を行うコストが実際の病理診断料に入りきれない現状があると共に、種々の研究での免疫染色には不向きである。

以下は、On demand 型自動染色装置での染色について述べる。

4. 自動染色装置に何をやらせるのか？

sABC 法での自動染色の手順を説明する。

まず、コンピューターの On demand のプログラムで、右図の左の sABC 法の工程を手順として入力する。手順には、核反応の前処理、反応、反応後の洗浄と



云った具合で入力する。その後、各反応の試薬等を選択して、染色工程の入力が終わる。次に、反応液と洗浄液等を準備する。一般には、用手法での試薬と同様である。そして、染色装置の所定の場所の反応液や洗浄液をセットする。洗浄液の温度管理の為に、我々は、腺溶液ボトルをウォーターバスで45°Cに加熱している。

染色する切片スライドガラスを、脱パラフィン、抗原回復処理等を行い、染色装置にセットする。

そして、染色プログラムを開始して、自動染色が始まる。この装置では、染色を始める前に、試薬等の必要量がセットされているのかをチェックし、染色の開始ないし終了時間を設定することが出来る。この機能は、長時間の反応等が可能となり、夕方にセットして、朝に出来あがっているようにも設定可能で、便利である。

染色が終わると、切片スライドガラスを染色装置から取り出して、永久標本作製の処理を行う。

従って、自動染色装置にやらせるのは、実際の染色操作であり、試薬等は、それぞれの用途で、調整出来る。このような On demand 型自動染色装置は、染色手順は記録されており、最適な免疫染色手順が決まれば、同じことが繰り返し可能である。また、各工程での反応液や反応時間を設定出来るので、複数の試薬での染色の相違等を検討する研究等にも用いることが出来る。



全景



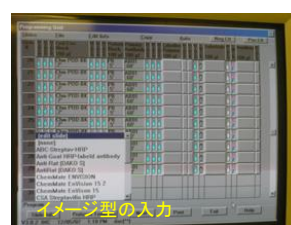
ロボットアームとスライドトレイ



試薬置き場とプローブ洗浄装置



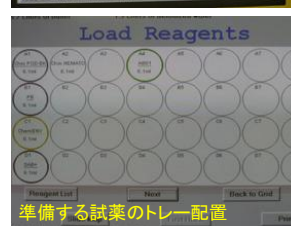
洗浄緩衝液の温度制御系



イメージ型の入力



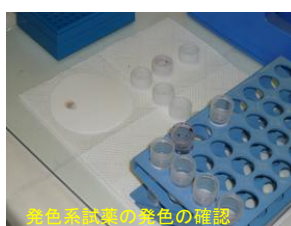
切片への反応液分布の設定



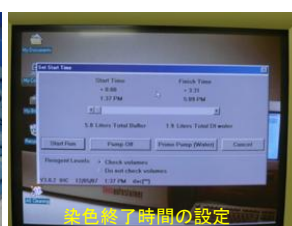
準備する試薬のトレイ配置



試薬のトレイへの準備



染色済試薬の発色の確認



染色終了時間の設定



試薬の位置と量の確認



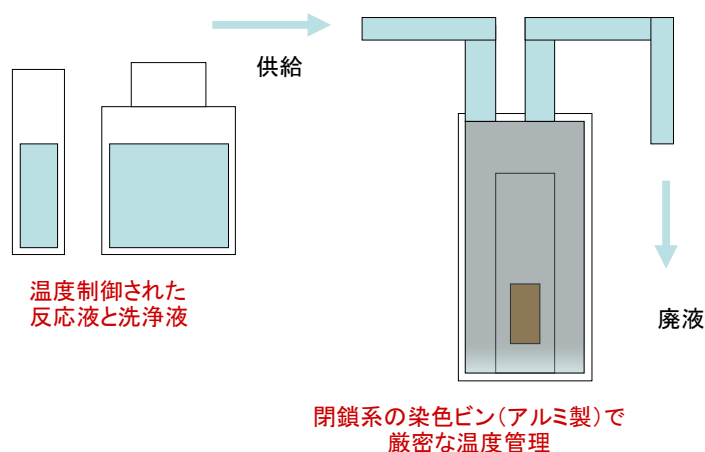
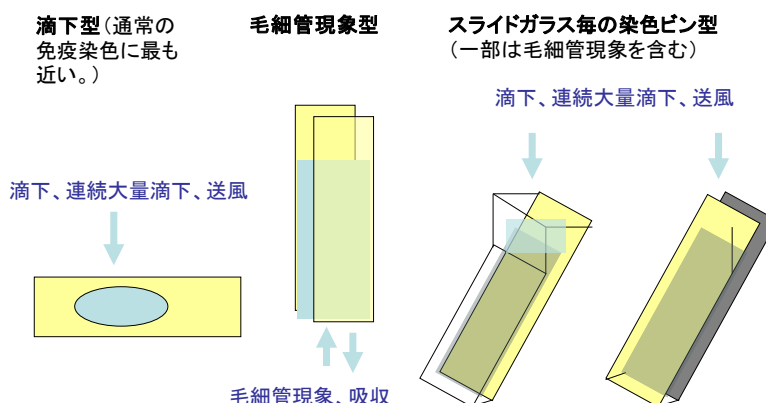
染色の実際の様子

5. 自動免疫染色装置における反応液や洗浄液の供給方式

自動染色装置には、切片貼付スライドガラスのセットの仕方により、右図の様に、滴下型、毛細管現象型、スライド毎の染色瓶型がある。滴下型と毛細管現象型では、反応の温度管理は、反応

液や洗浄液の温度管理を行うことで可能である。スライド毎の染色瓶型には、下面のプレートの温度調節により、繊細な反応温度管理が可能なものもある。

右の図の様に、完全閉鎖染色瓶型の自動染色装置もあるようだ。この場合は、染色瓶がアルミ等で出来ていると、温度管理は容易であると共に、反応液や洗浄液の厳密な管理も可能となることから、次世代の自動染色装置であるようだ。



従って、自動染色装置は、Ready made 型であれ、On demand 型であれ、基準化した免疫染色を行う装置であり、今後、感度の高い免疫染色が要求されて来ていることから、染色工程と試薬の開発改良が自動染色装置での染色の質を向上させて行くものと思われる。