

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

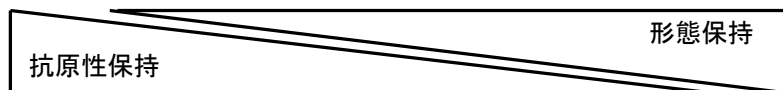
この講義は、2007年から大学院専門基礎過程の選択科目として開講しているものである。教科書には、改訂四版 渡辺・中根の酵素抗体法（名倉宏、長村義之、堤寛 編集）学際企画を用いています。それに、最近のポリマー法の開発等と私の研究への応用等を基礎にしています。

V. 組織・細胞の固定

1. 組織の固定に際しての注意点

- 目的とする抗原性の保持
- 目的とする抗原性の本来の部位への保持
- 形態の保持

抗原性保持と形態保持の関係は、ペプチド・蛋白の抗原



では、右図の関係が成り立つ場合がある。（抗原回復処理を行わない場合）糖鎖抗原では、固定に抗原性保持は影響を受けない場合が多い。“抗原性の保持が良い”とは、“染まるはずのものが、染まるべき場所にきれいに染まる。”ことであり、きれいに染まるとは、signal to noise ratio が高いことである。

2. 固定の方法

- 1) 未固定凍結切片、2) 固定後凍結切片、3) 固定後パラフィン包埋切片

固定法	利点	欠点
未固定凍結切片	抗原性の保持に優れる。	形態の保持がやや悪い。 保存に、作製した切片の保存にも、デープフリーザーが必要。
固定後凍結切片	抗原性の保持が良い。 形態の保持が良い。	一部の抗原で、抗原性の低下がある。 保存に、作製した切片の保存にも、デープフリーザーが必要。
固定後 パラフィン包埋 切片	抗原賦活法により抗原性回復がある抗原が多い。 形態の保持が良い。 保存されている人体標本（病理標本）が活用できる。 常温で保存が可能。 薄切標本（未染標本）の保存が可能。	抗原により、抗原性が失活する。

3. 固定法の選択

組織や細胞を固定する溶液は、アルデヒド系と有機溶媒系がある。

固定液	固定の機序	利点	欠点
アルデヒド系	蛋白・ペプチド鎖の架橋形成(cross-linkage)による固定	低分子の不溶化の固定力と形態保持に優れている。蛋白質のアミノ末端と塩基性蛋白の側鎖に存在するアミノ基が架橋するので、アミノ基のない核酸、脂質、糖鎖には影響なし。	蛋白やペプチドの抗原性保持で劣る。
有機溶剤系	蛋白質の凝固・沈殿による固定	高分子の抗原保持に優れている。	脱水性凝固剤であるアルコールやアセトンでは、組織片の収縮があり、抗原物質の不動態化の能力は架橋剤と比べて劣る。

代表的な固定液：一般的に、ヒト組織（病理標本の固定に用いられる固定液

固定液	機序（作製方法）	利点	欠点とその他
非緩衝ホルマリン（10～20%） ○マスクドホルム ○Baker液	ホルマリン原液（36%ホルムアルデヒド溶液）を水道水で10倍希釈した溶液	タフな固定液。 通常は10%で使用。赤血球の溶血を防ぐには20%で用いる。 通常の病理標本の固定に用いられる。	自然酸化による蟻酸を含む。 ○マスクドホルム：ホルマリン臭を除いたホルマリン溶液 ○固定力を抑えてたBaker液（10%冷ホルマリン+1%塩化カルシウム）
緩衝ホルマリン（10%） ○中性ホルマリン	0.1Mリン酸緩衝液などでpHを中性にしたホルマリン液 ○中性ホルマリン：炭酸カルシウムを沈殿するまで添加し、中性化したホルマリン液	常温で用いられる。 DNAの断片化が少ない。	固定むらが生じる場合がある。非緩衝ホルマリンより固定力が劣る。

組織化学に特化した固定液

固定液	作製法	利点と欠点
緩衝4%パラホルムアルレヒド (paraformaldehyde: PFA)	PFA 4を90mlの0.1M PBS (pH7.4)にドラフト内で60℃加温攪拌し、濾過冷却後に、上記緩衝液で100mlとする。	固定後凍結切片作製に用いられる。 パラフィン包埋可能。 蛋白、ペプチド、糖鎖の固定が良い。 ISH用の固定に向く。4℃保存で一週間使用可能であるが、早期の使用が勧められる。 固定むらが生じる。 浸透性が悪い(切片を2mm厚さ以下として浸潤固定)。
PLP (periodate-lysine- paraformaldehyde) 液	使用直前に、保存液AとBを3:1の割合で混合し、(メタ)過ヨウ素酸ナトリウムを0.01M (21.4 mg/10ml)の割合で加える。これで、2%PFA濃度となる。4%で用いる場合には、保存液Bを16%PFA溶液とする。 保存液A: 0.1Mリジン/0.05Mリン酸緩衝液 pH 7.4); 1.825gのL-リジン・一塩酸塩を50mlのイオン交換水で溶解し、0.1Mリン酸水素二ナトリウムでpHを7.4に調整し、0.1MPBで100mlとする。 保存液B (8%PFA): 8gのPFAを、100mlのイオン交換水に、ドラフト内で、60℃に加温攪拌して溶解し、1N水酸化ナトリウムの3~5滴を加えて白濁をとり、濾過して、4℃で保存する。	中世緩衝の固定液であり、組織化学分野では一般的なもの。糖鎖も固定し、糖蛋白の検索に向くが、糖鎖抗原の検出には不向きである。

組織化学に特化した固定液 (2)

固定液	作製法	特徴
ザンボニ (Zamboni) 液	A液とB液を全量混合して、0.1MPB (pH 7.4)で1Lとする。室温で1年間保存可能。 A液: 濾過した飽和ピクリン酸溶液150ml.	ピクリン酸とPFAを含む中性緩衝固定液。ペプチド鎖抗原の保持に向く。
○ブアン (Bouin) 液: 飽和ピクリン酸液:ホルマリン原液:氷酢酸=15:5:1で混和する。	B液 (20%PFA): 20gのPFAを、100mlのイオン交換水に、ドラフト内で、60℃に加温攪拌して溶解し、1N水酸化ナトリウムの3~5滴(2.52%水酸化ナトリウム液を滴下)を加えて白濁をとり、濾過して、4℃で保存する。	
グルタルアルデヒド (glutaraldehyde/GA)	電顕用: 2.5% GAで4℃、2時間固定が通常行われる。 免疫電顕用: 4%PFAと0.5%GAの混和液が用いられる。In-situ hybridizationにも向く。	分子内に2個のアルデヒド基を有する最も強力な固定液。 主に、電顕用に用いられる。
緩衝ホルマリン・アセトン液	無水リン酸水素二ナトリウム15mgとリン酸二水素カリウム120mgを30mlのイオン交換水に溶解し、アセトン45mlとホルマリン原液25mlを混合する。	凍結ないし低温固定用。

組織化学に特化した固定液（3）：特殊な固定液

固定液	作製法	特徴
エタノール	原液	アルデヒドを含まない凝固系固定液。組織の硬化が強い。アルデヒドを含まないので、蛍光抗体法にも使える。
メタノール	原液	
カルノア (Carnoy) 液 (エタノール：クロロホルム：氷酢酸=6:3:1で混合)		
メタカン (Methacarn) 液 (メタノール：クロロホルム：氷酢酸=6:3:1で混合)		
カルボジイミド固定液 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) 0.1MPBS (pH 7.4)溶液		アミノ基の分子内と分子間架橋による固定。アルデヒド系固定液で抗原失活しやすい抗原に用いる。血管内皮の第Ⅷ因子やセクレチンなどの消化管ホルモンの固定に向く。
パラペンゾキノン液 (PBS緩衝飽和1% p-benzoquinone溶液)		
アクロレイン液	4～10%のカコジル酸緩衝液溶液として用いる。	組織浸透性が良く、アミノ基以外にSH基、水酸基、イミダゾール基、インドール基、飽和脂肪酸と反応する。主に、電顕用。
昇汞(しょうこう：塩化第二水銀) 加ホルマリン系固定液 ○Helly液 (ホルマリン+昇汞+重クロム酸カリ+酢酸) ○B5液 (ホルマリン+昇汞+酢酸ナトリウムpH5.8～6.0) ○Susa液 (ホルマリン+昇汞+トリクロロ酢酸+酢酸)	水銀の廃液処理が必要で、日本では使われていない。	組織の収縮が強い。脱昇汞操作が必要。リンパ節の固定に向く。

4. 抗原の性質から見た固定液の選択

抗原	推奨される固定液	問題点
蛋白質	PLP、PFA	PLPは糖蛋白質の固定に優れているが、糖鎖抗原の固定には適さない。糖鎖抗原の固定にはPFAを用いる。
比較的短いペプチド	ザンボニ液	
糖脂質	有機溶剤 (クロロホルム・メタノール) で除いた形で、未固定凍結切片の結果と凍結検討する。	有機溶剤は固定と包埋処理に用いない。
核酸やmRNA	蛋白凝固系固定液	迅速に周囲の蛋白、分解酵素の固定を行う。

5. 固定法の選択

一般には、浸潤固定が行われる。新鮮標本を固定液中に入れて固定するのであるが、表面から最大で5mm程度しか固定されないため、標本に割を入れる等が行われる。

凍結置換固定は、抗原の保持からは非常に優れているが、標本は、3~5mm径の小さな標本となることが多い。

固定法	特徴
浸潤固定 (immersion fixation)	通常の方法
還流固定 (perfusion fixation)	血管から緩衝液を流して脱血して、固定液を流す。固定液浸透が早いですが、人体標本には応用が難しい。
注入固定 (infusion fixation)	主に肺の固定に用いられ、気管支から固定液を圧力をかけて注入する。気管内への浸出性変化が失われる。
脱気固定 (devacuation fixation)	肺の固定法。陰圧下に浸潤固定を行う。肺胞は膨らんだ状態で固定される。
凍結置換固定 (freeze substitution)	凍結固定して、エタノールやアセトンで脱水固定を行い、常温に戻して、パラフィン包埋する。高圧凍結置換法は、細胞小器官や溶媒中の器質の分布を反映している。電顕用に用いられる。
凍結乾燥固定 (freeze drying)	可溶性抗原の不動化目的に使用される。感想後にガス固定される。

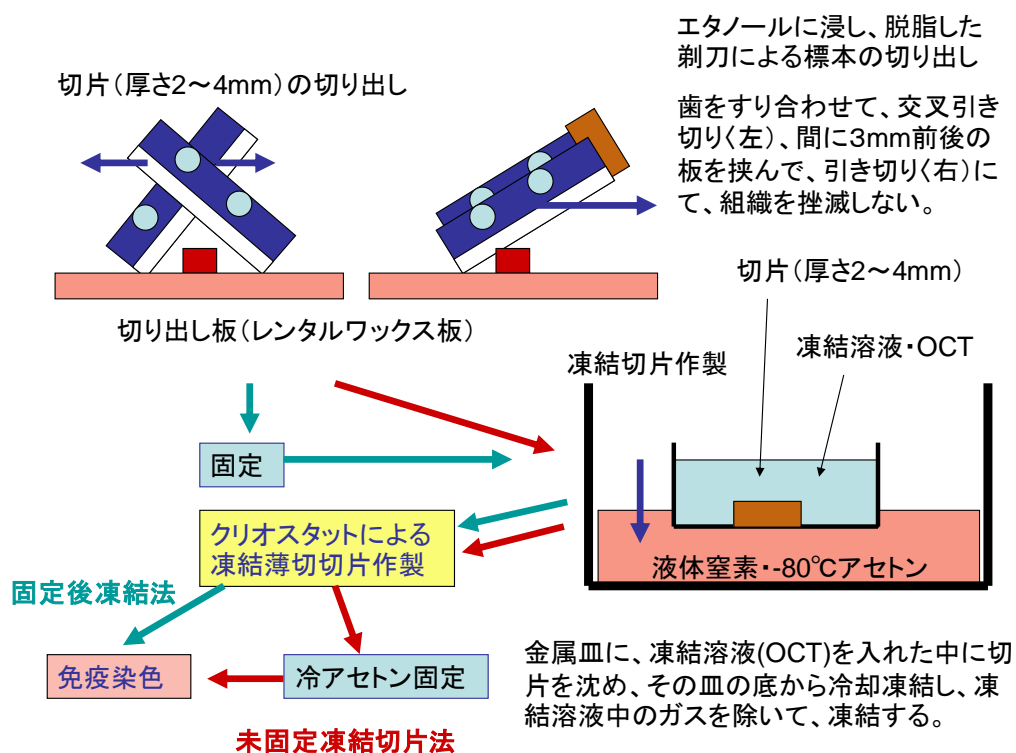
6. 迅速固定法：組織化学の分野ではPLP固定が用いられることがある。

迅速固定法	問題点	対応
PLP固定	2%PLP固定では、4時間で固定されるが、固定むらが生じる。	4%PLPで一晩固定で対応が可能。
マイクロウェーブ固定	固定液中に3mm以下の厚さでスライスした標本を家庭用電子レンジで液温が37℃になるまで(数秒から数十秒)照射するが、まだ、固定が不十分である。	その後に、3,4時間の浸潤固定を行う。
超音波固定 (特別な装置)	固定が不十分。	その後に、30分程の浸潤固定を行う。

7. 固定の実際

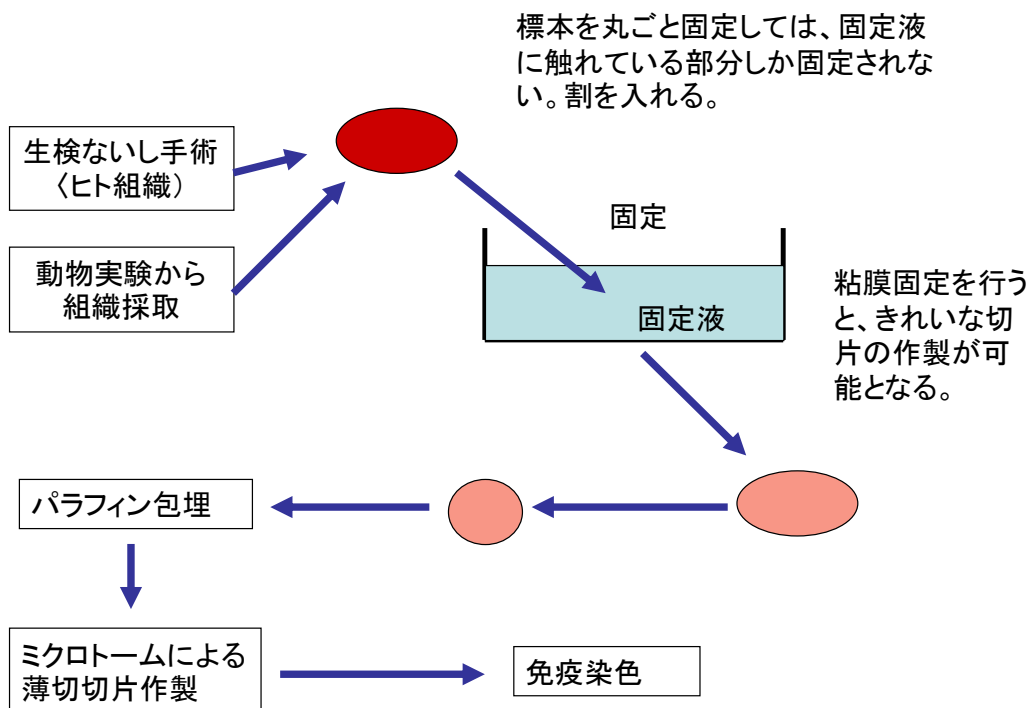
凍結標本

- 1) 切り出し：新鮮組織（生検、切除新鮮標本）を、切り出し板の上で、2つの片刃のカミソリ刃で、適当な大きさ（1x1 cm 以内）と厚さ（2～4 mm）の組織片を作製する。
- 2) 凍結標本ブロックの作製：切り出した標本を、固定が必要であれば固定し、OCT コンパウンド（パラフィンに相当するもの）を入れた切片皿に観察したい標本面を下にして入れる。液体窒素ないし-80の冷アセトンに、切片皿の底から、ゆっくりと半分程度入れる。この時に、OCT コンパウンドや組織中の空気が泡状に、表面から出て来る。それが収まってから、切片皿全体を液体窒素ないし冷アセトンに沈めて、凍結標本ブロックを作製する。
- 3) 薄切と切片作製：凍結標本ブロックをクリオスタットにて、薄切し、標本切片を作製する（切り出された薄切切片はアンチロール等で伸ばして、スライドガラスに貼付する。固定されていない標本では、-アセトン液中に浸して固定し、ドライヤー等の冷風で風乾する。



パラフィン包埋標本

- 1) 切り出し：通常は、固定された標本（生検、切除標本）を、切り出し板の上で、片刃のカミソリ刃等で、適当な大きさ（2x4 cm 以内）と厚さ（4 mm 前後）の組織片を作製する。
- 2) パラフィン包埋標本ブロックの作製：切り出した標本を、切り出しカセットに入れて、脱水、透徹、パラフィン浸透処理を自動処理装置で行い、パラフィン包埋標本ブロックを作製する。パラフィン浸透の段階では、熱が加わることから、手回しで処理すると、標本での抗原喪失等の事故が発生し易いので、可能な限り自動処理装置で行う。
- 3) 薄切と切片作製：マイクロームにて、薄切し、標本切片を作製する（切り出された薄切切片は 53°C の温水に浮かべて、皺を無くして、スライドガラスに貼付する）。

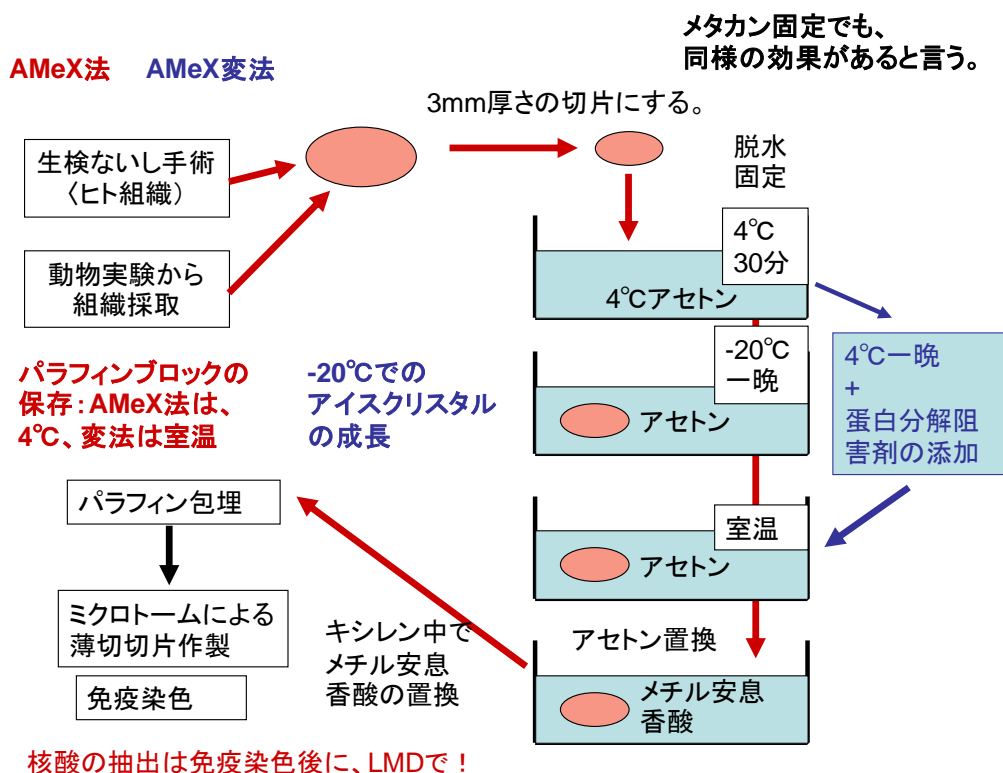


8. パラフィン標本から核酸の抽出を目的とする固定法

AMeX 法 (Aceton-Methybenzoate-Xylen 法) : 4°Cアセトン(30分)—20°Cアセトン(一晩)—室温アセトン—メチル安息香酸で置換し、キシレンで透徹し、パラフィン包埋する。脱パラフィンは、キシレンとアセトンを用いる。(エタノールによる悪影響を除いた方法である。) パラフィンブロックは4°C保存。

○**変法1 (冷アセトン法)** : 4°Cアセトン (蛋白分解酵素阻害剤を付加) で一晩固定して、メチル安息香酸で置換し、キシレンで透徹し、パラフィン包埋する。パラフィンブロックは室温保存。

○**変法2 (メタカン固定法)** : メタカン (Methacarn) 液 (メタノール:クロロホルム:氷酢酸=6:3:1 で混合) で一晩固定し、メチル安息香酸で置換し、キシレンで透徹し、パラフィン包埋する。パラフィンブロックは室温保存。



9. 培養細胞の固定

	固定法	方法
付着培養細胞の固定	シャーレおよびカバーグラスを用いる方法	カバーグラスをコートして、シャーレの中に入れて状態で培養し、そのカバーグラスごと固定する。
	スライドグラス (Lab-Tek chamber) を用いる方法	コートされたスライドグラス上で培養して、そのまま固定する。
浮遊培養細胞の固定	サイトスピンを用いる方法	細胞浮遊液をサイトスピンの装置でスライドグラスに貼り付ける方法。
	遠沈後のペレット (セルブロック) を用いる方法	フラッシュして作製したペレット・セルブロックのフィブリンノーゲン溶液を浸し、トロンビン溶液を加えて凝固させて、それを凍結切片用に用いる。