

# 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。

## VI. 切片の作製法

### 1. 切片の種類

標本切片には、以下の表に示すものがあるが、一般に、凍結切片はクリオスタット切片を、無凍結切片はパラフィン切片を指す。

凍結超薄切片は、電子顕微鏡用のマイクロトームに凍結装置を組み合わせた特殊なマイクロトームで作製され、主に、免疫電顕用である。現在、高压凍結装置で凍結して、凍結置換で固定して、通常電子顕微鏡用の水溶性樹脂包埋標本が作られ、免疫電顕での最適な切片となっている。

マイクロスライサー切片は、前処置（抗体を反応させるとか、酵素組織化学反応を行う等）をして、固定等へと進む場合の切片である。ビブラトームと云う作製装置を要する。

切片			特徴	
凍結切片	クリオスタット切片		光顕、電顕	
	凍結超薄切片		電顕	
無凍結切片	無包埋切片	マイクロスライサー切片	主に、電顕 (前包埋処理)	
		包埋切片	パラフィン切片	光顕
	包埋切片	樹脂切片	水溶性樹脂切片	電顕 (主に、 免疫電顕)
		樹脂切片	脂溶性樹脂切片	電顕

### 2. 凍結切片の免疫組織学における利点

○脂溶性の抗原物質や脂質内の可溶性の抗原物質が溶出せずに保存される。

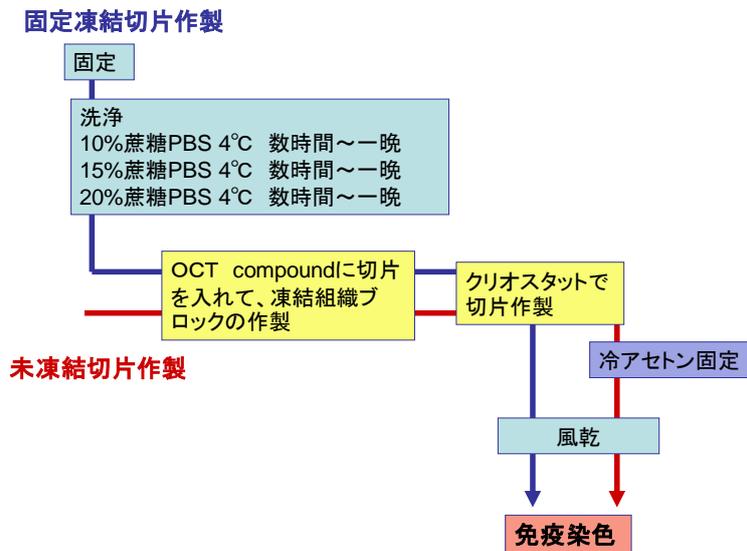
固定と包埋操作にて、有機溶剤を用いると脂質は溶出する。

○どのような抗原物質でも、抗原性の損失が少ない。

○凍結切片作製後に、スライドガラスに貼付し、常温に戻す時に、氷解が生じて、パラフィン切片よりは軽度に、樹脂切片よりは強度に、膜系が抗体分子等の浸透が出来るほどに破壊される。

ただし、免疫染色が陰性である場合には、検出感度以下の量の抗原の存在は否定できないので、陰性とするよりは、検出感度以下と表現すべきかな？

### 3. 凍結切片の作製手順



#### 凍結切片の作成法

1) 提出された新鮮標本をOCTコンパウンドをいれた金属の皿に入れて、金属の土台をつける。



2) 金属の皿をピンセットで持ち、チープフリーザーの中の冷アセトンに、皿の底から入れて固める。



3) 凍結切片作成装置にそのブロックをセットして、指で表面を少し暖めて、切ってゆく。



4) アンチロールの切片附着部を指腹で暖めて、皺のない切片を作成し、スライドガラスに張る。



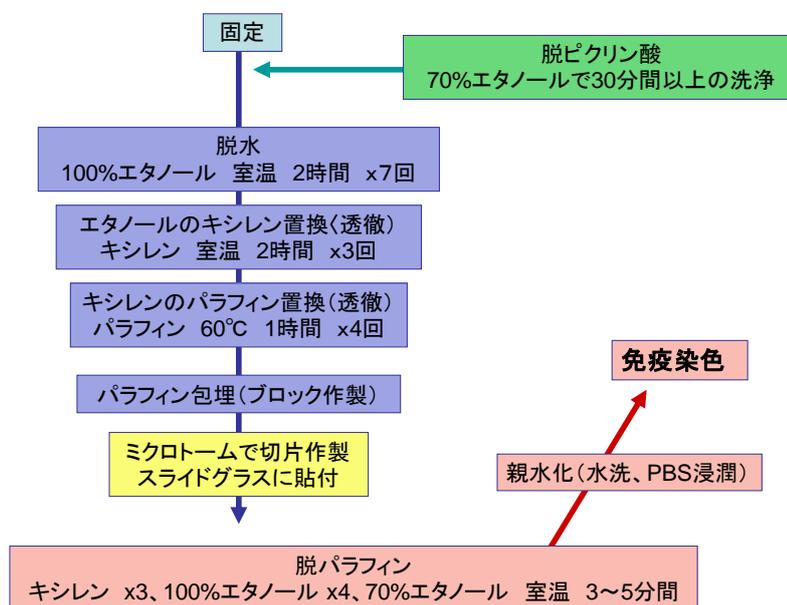
5) 作成した切片は冷アセトンで固定して、次ぎの染色に移る。



#### 4. パラフィン切片の利点と欠点

パラフィン切片の利点は、優れた形態保持（目的の組織・細胞の形態情報と免疫染色の情報を同時に得られる。）、取り扱いの簡便さ、長期保存の容易さ、後見的研究（Retrospective study）が可能（ヒト病理標本は、膨大な数の病変等の病理標本が病理関連施設に保存されている。従って、特定の研究課題を得た場合には、この病理標本のパラフィン切片が使えることは、非常に大きな意味があるようだ！）である。固定の強いことは、形態の保持性に関係するが、欠点として、熱の加わる煩雑な切片作製過程による抗原の修飾等を招く、浸透性の向上はアルコール等の利用により、脂質の流出 につながる。

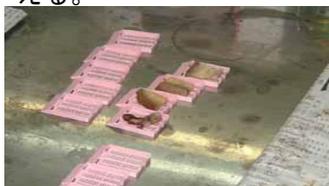
#### 5. パラフィン切片作製手順



1) 固定された手術標本からの顕微鏡検査の為に切り出し。



2) 切り出す標本は顕微鏡標本の大きさに揃える。



3) パラフィンブロックの作成



4) 出来上がったパラフィンブロックをマイクロームで切る。



5) 必要な枚数の切片をまとめて切る、



6) スライドガラスに皺が出ないように張り、乾燥する。



## 6. スライドガラスの切片剥離防止加工法

現在は、シランスライドが、商業的に供給されている。

方法	製法	特徴
卵白アルブミンスライド	卵1個の卵白とアンモニア水1mlを500mlの蒸留水に溶解し、ペーパータオルで濾過した溶液に、スライドガラスを30秒浸して、60℃オープンで一晩乾燥する。	多量のアビチンを含むために、ABC法等に使えない。
ゼラチンスライド	アセトンとエタノールに浸潤して脱脂し、5gのゼラチンを60℃で500mlの蒸留水で溶解し、室温に戻った時に、0.5gのクロムヨウバンを加えた溶液に、スライドガラスを5～10分間浸し、風乾し、つづいて、1%PFA液に10分間浸し、60℃で一晩乾燥する。	HE染色で背景が赤く染まる。六価クロムの危険性・公害性から、その使用に問題がある。
ポリ-L-リジンスライド	0.01%ポリ-L-リジン水溶液に、浸すか、スライドの端からスメアーの要領で引く。	直ぐに、使えるが、保存は1週間まで。
ネオブレインスライド	ドラフトの中で0.1%ネオブレイントルエン溶液（応研商事）に浸し、37℃2時間乾燥させる。	長持ちしないので、使用直前に作製。
シランスライド	3-アミノプロピルトリエキシシランの2mlをアセトン98mlに溶き、スライドガラスを浸し、アセトンにて洗浄して、37℃で一晩乾燥させる。	接着力が強い。 現在、最も、普及している方法である。

熱による抗原回復中（特に、pH8 以上のアルカリ域）や免疫染色の過程で切片の剥離しない切片のスライドガラスへの貼付法は、時に、重要となる。

余分な水分をスライドガラスと切片の間に残さない。



乾燥は、53℃程度で、一晩。  
最初は、立てかけて、水分を除き、後は、スライド乾燥伸展器の上で一晩。

