



研究用試薬

ヒストファイブ

第一抗体

抗グリピカン3モノクローナル抗体

(動物種：マウス)

包装：50テスト(6mL)

Code：418021

製造販売元

株式会社ニチレイバイオサイエンス

〒104-8402

東京都中央区築地6-19-20

TEL. 03(3248)2208 FAX. 03(3248)2243

■ **特異性及び抗原分布**：ヒトグリピカン 3(Glypican-3：GPC3)と特異的に反応する。グリコシルフォスファチジルイノシトール(GPI)アンカーにより細胞膜に結合している約60kDaの糖タンパク質である。細胞の細胞質(発現量により弱～強染色となる)及び細胞膜に反応が見られる。正常では、胎児期の肝細胞にみられるが成人肝細胞では発現はみられない。腫瘍では、肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma：HCC)、肝芽腫、メラノーマ、精巣胚細胞性癌、ウィルムス腫瘍等に発現がみられる。特に、肝硬変や形成異常小結節や癌化した肝細胞腺腫(hepatic adenoma：HA)のような限局病変肝よりもHCC組織に高い発現がみられる。肝臓癌の腫瘍マーカーとして有用である。

■ クローン名：1G12

■ 抗体のクラス/サブクラス：IgG1

■ 免疫原：コアタンパクの70アミノ酸

■ 製法：マウスの腹水から得ている。

1. 内容

第一抗体・・・抗グリピカン3モノクローナル抗体(動物種：マウス)。

液状。

ウシ血清アルブミン(BSA)と、0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)中にて、即時使用可能な抗体濃度に希釈済み。

1バイアル中に6mLを含む。

**2. 使用目的

組織・細胞中のグリピカン3抗原の染色。

ホルマリン固定パラフィン包埋切片の免疫染色に使用できる。

研究用としてのみ使用すること。

**3. 使用方法

組織切片の場合、前処理(抗原賦活化)としてヒストファイブ 抗原賦活化液pH9(Code:415201又はCode:415211)を用いたオートクレーブ処理が必要である(裏面の■操作手順参照)。

スライド上の組織切片が完全に覆われるように第一抗体を2滴(100 μ L)滴下し、常温(15-25 $^{\circ}$ C)で30分～1時間インキュベートする。

この反応時間は、ヒストファイブ シンプルステインMAX-PO(M)を使用する場合の目安であり、他のキットを使用する場合は、研究者自身が至適反応時間を調べる必要がある。

■参考：組織の固定状況等によりヒストファイブ 抗原賦活化液 pH9(Code：415201 又は Code：415211)の代わりに10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)を用いたオートクレーブ処理をすることで良好な染色結果が得られる場合がある(裏面の■参考参照)。

■組織の固定状況等が染色結果に影響を及ぼすため学会等が推奨する固定液や固定時間を遵守し、検体の取扱いには十分注意すること。染色条件を変更することで良好な染色結果が得られる場合があるが、組織へのダメージや偽陽性化、偽陰性化が起こるおそれがあるため、研究者自身の責任において至適条件をよく検討すること。

**4. 貯法及び使用上の注意

- 2-8 $^{\circ}$ C保存。
- 使用期限はラベルに記載されているので使用前に確認すること。
- 使用前に室温に戻すこと。
- 使用後は速やかに冷蔵保存すること。
- 異なるロットの試薬や他製品の試薬を混ぜたりしないこと。

**5. 取扱い上(危険防止)の注意

- 使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
- 本品に関する化学物質の安全情報は安全データシート(SDS)を参照すること。
- 本品を吸い込んだり、眼、口、皮膚、衣類などへの接触を避けること。
- 本品の廃棄の際には、各施設や地域及び国のルールに従い、適切に廃棄すること。
- 本品は、動物由来成分を含むので、取扱いに注意が必要である。
- 本品にはアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムは水道管に含まれる銅、鉛との反応によって爆発の危険性があるので、多量の水とともに洗い流すこと。
- ヒト由来の検体は、感染の恐れがあるので適切な取扱い及び廃棄法を用いるとともに、免疫染色を実施するにあたって、関連技術及び操作法に充分習熟しておかなければならない。

6. 参考文献

- (1) Filmus J, et al. Glypicans: proteoglycans with a surprise. J Clin Invest. 2001 Aug;108(4):497-501.
- (2) Yamauchi N, et al. The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Mod Pathol. 2005 Dec;18(12):1591-8.
- (3) Wang XY, et al. Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. Hum Pathol. 2006 Nov;37(11):1435-41.
- (4) Libbrecht L, et al. Glypican-3 expression distinguishes small hepatocellular carcinomas from cirrhosis, dysplastic nodules, and focal nodular hyperplasia-like nodules. Am J Surg Pathol. 2006 Nov;30(11):1405-11.
- (5) Kandil D, et al. Glypican-3 immunocytochemistry in liver fine-needle aspirates : a novel stain to assist in the differentiation of benign and malignant liver lesions. Cancer. 2007 Oct 25;111(5):316-22.
- (6) Di Tommaso L, et al. Diagnostic value of HSP70, glypican 3, and glutamine synthetase in hepatocellular nodules in cirrhosis. Hepatology. 2007 Mar;45(3):725-34.
- (7) Coston WM, et al. Distinction of hepatocellular carcinoma from benign hepatic mimickers using Glypican-3 and CD34 immunohistochemistry. Am J Surg Pathol. 2008 Mar;32(3):433-44.
- (8) Zynger DL, et al. Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. Hum Pathol. 2008 Feb;39(2):224-30.
- (9) Anatelli F, et al. Value of glypican 3 immunostaining in the diagnosis of hepatocellular carcinoma on needle biopsy. Am J Clin Pathol. 2008 Aug;130(2):219-23.
- (10) Shafizadeh N, et al. Utility and limitations of glypican-3 expression for the diagnosis of hepatocellular carcinoma at both ends of the differentiation spectrum. Mod Pathol. 2008 Aug;21(8):1011-8.
- (11) Ligato S, et al. ypican-3 in differentiating hepatocellular carcinoma from other primary and metastatic lesions in FNA of the liver: an immunocytochemical study. Mod Pathol. 2008 May;21(5):626-31.

**免疫染色における操作手順及び前処理(抗原賦活化)

■ 操作手順

[切片の準備]

1. 50℃で十分に湯伸ばした切片(3-4μm厚)をシランなどのコーティングスライド上に貼り付け、37℃の恒温器内で16時間以上乾燥させる。

[脱パラフィン]

2. 脱パラフィン → 親水化 → PBS

[抗原賦活化処理]

3. 前処理(抗原賦活化): オートクレーブ処理

- ① 調製した抗原賦活化液(下記記載)を耐熱性の染色バットに入れ、スライドを浸漬させる。
- ② 染色バットに蓋をする。蓋が取れないように輪ゴムでとめる。
- ③ 120℃、20分間オートクレーブ処理する。
- ④ 圧力が十分下がった後、染色バットをオートクレーブから取り出し、蓋をはずす。スライドを浸したまま常温(15-25℃)で20分間放置しゆっくり熱を冷ます。
※オートクレーブ処理後は、染色バット及び抗原賦活化液等が高温になっている。これらを取り扱う際は、手袋等を使用して火傷に注意する。
- ⑤ スライドを抗原賦活化液から取り出し、PBSで洗浄する(洗浄用容器を2度かえ3分間の洗浄操作を3回繰り返すか、又は洗浄びんを使用する)。

[染色手順] <ヒストファイน์ シンプルステインMAX-PO(M)使用の場合>

- | | | | |
|----------------------------|-------------|-----------|-------|
| 4. 内因性ペルオキシダーゼの除去 | 10~15分間/常温 | → | PBS洗浄 |
| 5. 第一抗体の添加・反応 | 30分~1時間/常温 | → | PBS洗浄 |
| 6. シンプルステインMAX-PO(M)の添加・反応 | 30分間/常温 | → | PBS洗浄 |
| 7. 基質溶液の添加・反応 | DAB発色 | → | 水洗 |
| 8. 対比染色 | 核染(ヘマトキシリン) | → 封入 → 乾燥 | → 検鏡 |

■ 注意

- ・「PBS洗浄」は5分間ずつ容器を2度かえるか、又は洗浄びんを使用する。
- ・4.のプロセスは3.の前に行ってもよい。
- ・ヒストファイน์SABキットを使用する場合は上記1.~4.までを行いSABキットの操作方法に従って染色を行う。

・抗原賦活化液

「抗原賦活化液pH9」の調製方法

- | |
|---|
| ・ Code : 415201 抗原賦活化液pH9 (調製済)は、そのまま用いる。 |
| ・ Code : 415211 抗原賦活化液pH9 (10倍濃縮)は、精製水で10倍希釈する。 |

■ 参考 : 10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)、オートクレーブ処理を用いる場合

- ・ 10mM クエン酸緩衝液(pH6.0)の調製方法

A液 9mL+B液 41mL+精製水 450mL(用時調製)

- | |
|---|
| A液 : 0.1M クエン酸水溶液 : 常温で保存可能
クエン酸一水和物 (C ₆ H ₈ O ₇ · H ₂ O) 2.1g/精製水 100mL |
| B液 : 0.1M クエン酸ナトリウム水溶液 : 常温で保存可能
クエン酸三ナトリウム二水和物 (C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ · 2H ₂ O) 14.7g/精製水 500mL |
| ここから必要な時に調製する。 |