



研究用試薬

ヒストファイブ

第一抗体

抗 INSM1モノクローナル抗体 (A-8)

(動物種：マウス)

包装：50 テスト (6mL)

Code：418401

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**：INSM1(Insulinoma-associated protein 1)と特異的に反応する。INSM1は染色体20p11.2上のINSM1遺伝子にコードされる510アミノ酸からなる約53kDaの転写因子であり⁽¹⁾⁽²⁾、膵内分泌細胞の分化や神経の発生に重要な役割を果たす⁽³⁾⁽⁴⁾。正常では、INSM1を発現する細胞は限定されており、消化管や呼吸器などの神経内分泌細胞、膵島細胞などの核に反応がみられる⁽⁵⁾⁽⁶⁾。腫瘍では、神経内分泌腫瘍(消化管：95%、膵：94.4%、肺：95%、子宮頸部：94%、乳腺：82.5%)では高率に反応がみられるが、非神経内分泌腫瘍では低率であることから⁽⁶⁾⁻⁽¹⁰⁾、神経内分泌分化の有用なマーカーである⁽⁷⁾⁽⁸⁾。INSM1は従来の神経内分泌マーカー(Chromogranin A、Synaptophysin、CD56)に比べ特異度及び感度が高いことが報告されており⁽¹¹⁾、これらのマーカーとの併用が神経内分泌腫瘍の判別に有用である⁽⁶⁾。

注1：INSM1の細胞内発現パターンは核であるので⁽⁶⁾⁻⁽⁸⁾、核の染色を強拡大にて観察すること。

注2：INSM1が発現している細胞は、核の他に細胞質にも弱～中程度の染色がみられることがある。

■**クローン名**：A-8■**抗体のクラス/サブクラス**：IgG1κ■**免疫原**：ヒトINSM1の81-125番目のアミノ酸配列からなるタンパク質■**製法**：アフィニティー精製して得ている。

1. 内容

第一抗体・・・抗INSM1モノクローナル抗体(A-8) (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INSM1の染色。

研究用としてのみ使用すること。

3. 使用方法

パラフィン包埋切片の免疫組織化学及び免疫細胞化学染色に使用できる第一抗体である。

パラフィン包埋切片の場合、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)を用いた温浴処理が必要である(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(100μL)滴下し、常温(15-25℃)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**：組織の固定条件等により前処理(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℃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。
- アジ化ナトリウムは有毒化学薬品である。本品の含有量は危険なものとして分類されないが、蓄積されたアジ化ナトリウムは爆発性の金属アジ化物として形成され、水道管に含まれる銅、鉛と反応する可能性がある。そのようなリスクを避けるために大量の水とともに洗い流すこと。
- ヒト由来の検体は、取扱い者に感染をひき起こす危険性がある。従って、適切な取扱い及び廃棄法を用いるとともに、この免疫組織(細胞)化学染色法を施行するに際し、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) Lan MS, et al. Genomic organization, 5'-upstream sequence, and chromosomal localization of an insulinoma-associated intronless gene, IA-1. J Biol Chem. 1994 May 13;269(19):14170-4.
- (2) Goto Y, et al. A novel human insulinoma-associated cDNA, IA-1, encodes a protein with "zinc-finger" DNA-binding motifs. J Biol Chem. 1992 Jul 25;267(21):15252-7.
- (3) Chen C, et al. Insulinoma-Associated-1: From Neuroendocrine Tumor Marker to Cancer Therapeutics. Mol Cancer Res. 2019 Aug;17(8):1597-1604.
- (4) Gierl MS, et al. The zinc-finger factor Insm1 (IA-1) is essential for the development of pancreatic beta cells and intestinal endocrine cells. Genes Dev. 2006 Sep 1;20(17):2465-78.
- (5) Yoshida A, et al. INSM1 expression and its diagnostic significance in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. Mod Pathol. 2018 May;31(5):744-752.
- (6) Rosenbaum JN, et al. INSM1: A Novel Immunohistochemical and Molecular Marker for Neuroendocrine and Neuroepithelial Neoplasms. Am J Clin Pathol. 2015 Oct;144(4):579-91.
- (7) McHugh KE, et al. INSM1 Is a Highly Specific Marker of Neuroendocrine Differentiation in Primary Neoplasms of the Gastrointestinal Tract, Appendix, and Pancreas. Am J Clin Pathol. 2020 May 5;153(6):811-820.
- (8) Mukhopadhyay S, et al. Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) is a sensitive and highly specific marker of neuroendocrine differentiation in primary lung neoplasms: an immunohistochemical study of 345 cases, including 292 whole-tissue sections. Mod Pathol. 2019 Jan;32(1):100-109.
- (9) Kuji S, et al. Immunosenitivity and specificity of insulinoma-associated protein 1 (INSM1) for neuroendocrine neoplasms of the uterine cervix. J Gynecol Oncol. 2023 Jan;34(1):e1.
- (10) Metovic J, et al. INSM1 Expression in Breast Neoplasms with Neuroendocrine Features. Endocr Pathol. 2021 Dec;32(4):452-460.
- (11) Rooper LM, et al. INSM1 Demonstrates Superior Performance to the Individual and Combined Use of Synaptophysin, Chromogranin and CD56 for Diagnosing Neuroendocrine Tumors of the Thoracic Cavity. Am J Surg Pathol. 2017 Nov;41(11):1561-1569.

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): 温浴処理

- ① 温浴槽をあらかじめ 95-99℃に温めておく。以下の操作を行うにあたり、手袋等を用いて高温による火傷に注意する。
- ② 調製した抗原賦活化液(下記参照)を耐熱性の染色バットに入れ、ゆるく蓋をする。これを恒温槽に入れ、95-99℃に温める。
- ③ 抗原賦活化液の温度が 95-99℃に達したら、スライドを抗原賦活化液に浸漬させ、ゆるく蓋をする。
- ④ 抗原賦活化液の温度が再び 95-99℃まで上昇したことを温度計で確認してから、40分間、95-99℃でインキュベートする。
- ⑤ 染色バットを温浴槽から取り出し、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。
- ⑥ 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] <ヒストファイン 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。
- ・ヒストファインSABキットを使用する場合は上記1.~4.まで行い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: ヒストファイン 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を用いる場合

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(上記記載)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)。