

固定前組織片洗浄法と免疫組織化学染色法

抗免疫グロブリンモノクローナル抗体を用いた腎組織・骨髄穿刺液の染色法

◆使用方法

■操作手順

- 1) 固定前組織切片洗浄法。組織片を固定前にPBS※1で洗浄し、可溶性タンパク質を除去する。
 - ・腎組織の場合
 - (生検) 組織片を冷蔵庫内で4℃に冷やしたPBSに浸漬し、2時間静置する。
 - (培検) 組織片を冷蔵庫内で4℃に冷やしたPBSに浸漬し、2～24時間静置する。
 - ・骨髄穿刺液の場合
 - (生検) 組織片を冷蔵庫内で4℃に冷やしたPBSに浸漬し、2時間静置する。
 - (培検) 組織片を冷蔵庫内で4℃に冷やしたPBSに浸漬し、2～24時間静置する。
 - 1) 穿刺吸引された骨髄液に抗凝固剤※2を加え穏やかによく混和する。
 - 2) 骨髄液1に対してPBS9を加え混合する。
 - 3) 2000rpm、3分間遠心分離後、冷蔵庫で4℃2時間静置する。遠心後、骨髄組織片は最イ表層及びバフィーコート層に存在する。
- 2) 組織片を中性緩衝ホルマリン液※3に浸漬し、室温で約20時間固定する。
骨髄組織片の場合は、最表層及びバフィーコート層に存在する骨髄組織片をキャピラリーなどを用いて回収し、チューブの中で穏やかに混和する。
- 3) パラフィン包埋する。
- 4) 切片を作成する。
剥離防止のため、シランコートスライドガラスを使用する。
- 5) 脱パラフィン後、蒸留水で5分間洗浄する。
- 6) 3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼ活性阻止操作を行う。室温、5分間。
- 7) TBS※4で洗浄する。(常温、5分間、3回)
- 8) 0.01%プロテアーゼ※5でタンパク分解処理する。室温、15分間(骨髄組織)あるいは30分間(腎組織)。
- 9) TBSで洗浄する。(常温、5分間、3回)
- 10) ウサギ正常血清(ニチレイコード:426052)によるブロッキング操作を行う。常温、10分間。
- 11) TBSで希釈した一次抗体を反応させる。4℃、一晚。
 - ・抗免疫グロブリンGモノクローナル抗体(A57H)(ニチレイコード:413271) 50倍希釈。
 - ・抗免疫グロブリンAモノクローナル抗体(CB1-10.4/B8)(ニチレイコード:413281) 100倍希釈。
 - ・抗免疫グロブリンMモノクローナル抗体(R1/69)(ニチレイコード:413291) 100倍希釈。
- 12) TBSで洗浄する。(常温、5分間、3回)
- 13) ビオチン標識抗マウスIgG+IgA+IgM抗体(動物種 ウサギ)(ニチレイコード:426032)を反応させる。
常温、30分間。
- 14) TBSで洗浄する。(常温、5分間、3回)
- 15) ペルキシオキターゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイコード:426062)を反応させる。常温、30分間。
- 16) TBSで洗浄する。(常温、5分間、3回)
- 17) ヒストファインシンプルステインDAB溶液(ニチレイコード:415172)で発色させる。
- 18) 精製水で洗浄する。
- 19) ヘマトキシリン溶液で対比染色する。
- 20) 脱水、透徹、封入、検鏡。

※1:10mM PBS(pH7.4)

※2:アングロット/ET(株式会社アズウェル)

※3:マイルドホルム10N(和光純薬 コード:133-10311)

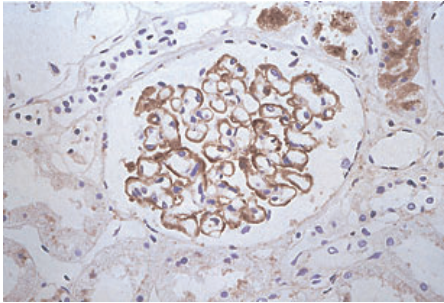
※4:50mM TBS(pH7.6)

※5:プロテアーゼ(Type XXIV:Bacterial. SIGMA コード:P8038)が0.01%となるように、50mMトリス緩衝液(pH7.6)に溶かす。

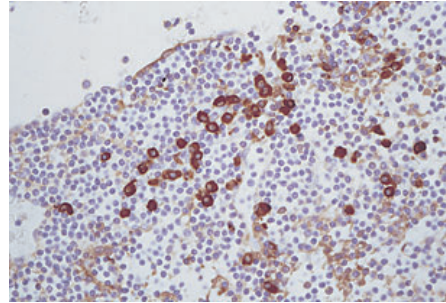


◆染色例

■抗免疫グロブリンGモノクローナ抗体 (A57H)

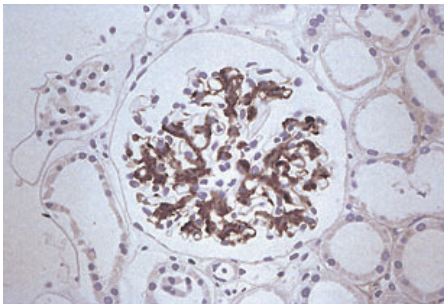


膜性腎症 (剖検):糸球体係蹄壁に沿って陽性反応を示す。プロテアーゼ処理 (+)。

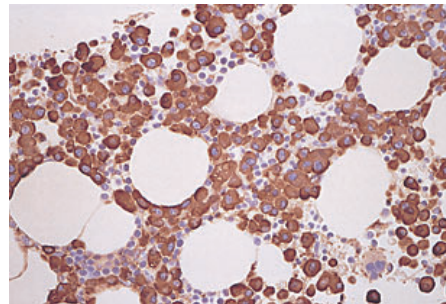


骨髄腫:骨髄中にみられる腫瘍細胞の細胞質に陽性反応を示す。プロテアーゼ処理 (+)。

■抗免疫グロブリンAモノクローナル抗体 (CB1-10.4/B8)

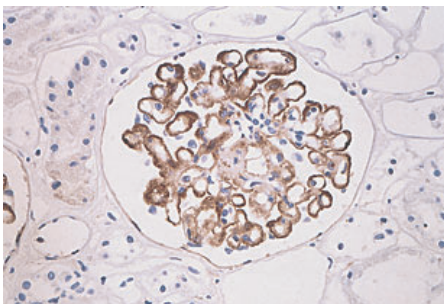


IgA腎症 (剖検):主として腎糸球体メサンギウム領域に陽性反応を示す。プロテアーゼ処理 (+)

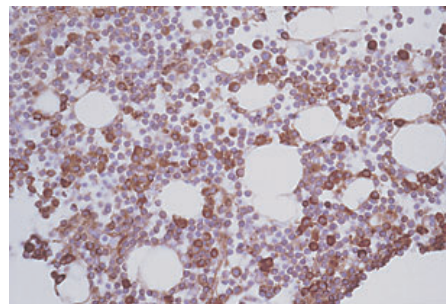


骨髄腫:骨髄中に多数みられる腫瘍細胞の細胞質に陽性反応を示す。プロテアーゼ処理 (+)。

■抗免疫グロブリンMモノクローナ抗体 (R1/69)



膜性腎症 (剖検):糸球体係蹄壁に沿って陽性反応を示す。プロテアーゼ処理 (+)。



原発性マグログロブリン血症:骨髄中に多類みられる異形細胞に陽性反応を示す。プロテアーゼ処理 (+)。

◆参考文献

- (1)濱川真治他:腎生検における酵素抗体法の有用性。病理技術第56巻、9-12、1997
- (2)濱川真治他:当院における骨髄穿刺液の検体処理法の新しい試み。病理技術58巻、4-5、1998
- (3)濱川真治他:酵素抗体法による免疫グロブリンの染色に有効な検体処理法。MedicalTechnology 28、19-20、2000