



# 固定液の違いによる免疫染色への影響

愛媛大学病院 病理診断科

今井美奈,片山英司,明賀さつき,池内五十鈴,水野洋輔,北澤理子

# 細胞診検体での免疫染色

セルブロック

LBC標本

細胞転写法

ホルマリン固定

アルコール固定

市販されている抗体のプロトコールは通常、ホルマリン固定された検体が対象であり、アルコール固定については記載がないか、推奨されていないものが多い



固定液の違いによる免疫染色への影響は？



# 固定の目的

- ▶ 可能な限り速やかに、組織の自己融解過程を停止させる
- ▶ 組織や細胞の主要成分である蛋白質を安定化、不溶化することで、細胞内成分の流出を防ぎ、形態を保持する
- ▶ 標本作製過程における薬品や熱などの影響による組織の変質や変形をできるだけ少なくする

# 固定液の種類

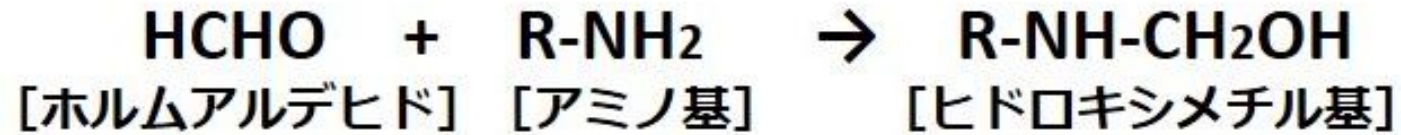
## ➤ 蛋白変性型(架橋型)

蛋白とペプチド鎖の架橋形成による固定  
ホルマリンなどのアルデヒド系

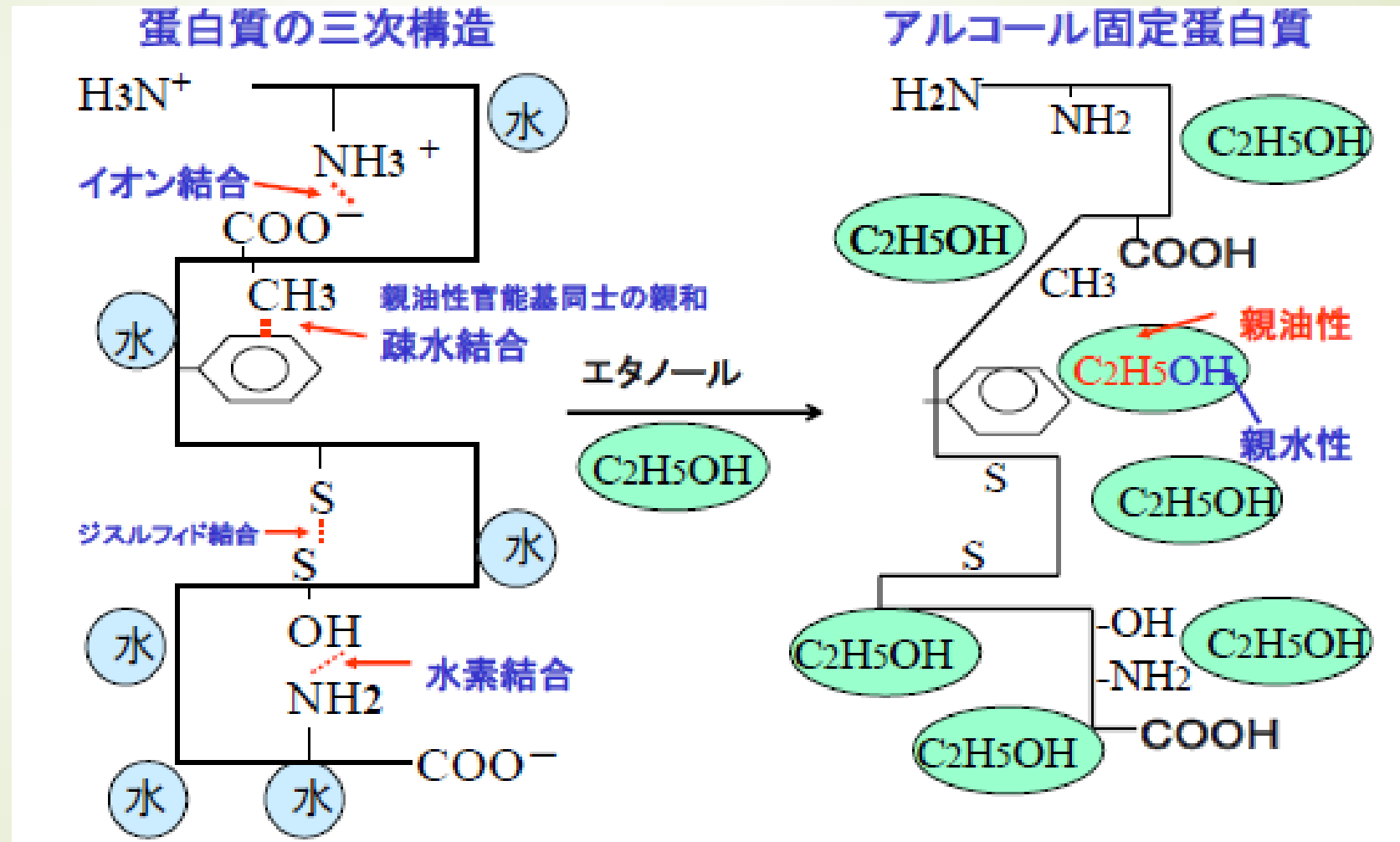
## ➤ 蛋白凝固型(脱水型)

蛋白質の凝固・沈殿による固定  
アルコール,アセトンなどの有機溶剤系

# ホルマリン固定の原理



# エタノールによる蛋白質固定のメカニズム



# アルコール固定によって抗原性が失活するポイント

固定

ホルマリンに比較して抗原の不活化能力が弱いためにおこる経時的な抗原性の失活

包埋・薄切

脱パラ

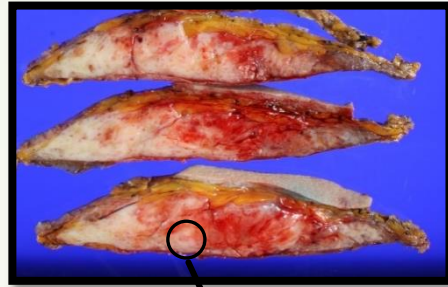
免疫染色

抗原賦活(熱処理)時：  
抗原の固定不足による抗原性の失活

脱水・透徹・  
封入

# 方法

- ①切り出し時に採取した乳癌組織を約1mm角に切る



免疫染色用として先に切り出し、残りを約1mm角に切る

- ②Thinprep固定液とBDサイトリッチレッド(アルコール)にて1日,3日,7日,14日間固定する
- ③ホルマリンにて1晩固定する
- ④標本作製後、免疫染色



# 使用したアルコール固定液




写真：BDのホームページより

ホルムアルデヒドを0.4%含有



ホルムアルデヒドを含まない



## 使用した抗体

- ▶ 抗ヒトER  $\alpha$ ウサギモノクローナル抗体 Dako
- ▶ 抗ヒトPgRウサギポリクローナル抗体 Dako
- ▶ 抗ヒトHER2/neuウサギポリクローナル抗体 Dako
- ▶ 抗ヒトki-67抗原マウスモノクローナル抗体 Dako

## 結果まとめ

- ▶ ER,PgR,Ki-67では、アルコール固定による染色性の低下はみられなかった
- ▶ HER2では、特にThinprep固定液でアルコール固定の時間が長くなるほど染色性の低下がみられた
- ▶ Thinprep固定液とサイトリッチレッドを比較すると、ER,PgR,Ki-67では両者の染色性に違いはみられなかったが、HER2ではThinprep固定液の方で染色性の低下がみられた

# 考察

- アルコールによる固定の段階で抗原性は失活する
- HER2において、サイトリッチレッドに比べてThinprep固定液では明らかな染色性の低下がみられたことから、抗原性の保持にはホルマリンが重要であることが示唆された
- 使用する抗体によるが、アルコール固定により染色性が低下した抗体もみられたことから、アルコール固定された検体を用いて免疫染色を実施する際は各施設で事前に検討を行う必要があると思われた