

R-IHC 標準プロトコール1 (凍結標本)

推奨1次抗体リスト*

項目	内容	時間
1 薄切	凍結切片・薄切	
2 固定	アセトン固定 (4℃)	2分
3 洗浄	PBS	10秒 × 3
4 ブロッキング	内因性ペルオキシダーゼ*1	1分
5 洗浄	PBS	10秒 × 3
6 電界攪拌	1次抗体反応 (150μL)	5分
7 洗浄	PBS	10秒 × 3
8 電界攪拌	2次抗体*2反応 (150μL)	5分
9 洗浄	PBS	10秒 × 3
10 発色	DAB	~3分
11 水洗	流水水洗	10秒
12 核染色	ヘマトキシリン	30秒
13 色出し	微温湯	2秒
14 水洗	流水水洗	10秒
15 脱水→透徹→封入		1分

項目	1次抗体名	クローン名	メーカー名	製品 code	備考
上皮	CK	AE1/AE3	Dako	IS053	上皮性マーカー
			Genemed	60-0022-7	
腺上皮	CK7	OV-TL 12/30	Dako	IR619	多くの腺上皮
			Roche	760-2224	
			Genemed	60-0019-7	
腺上皮	CK20	Ks20.8	Dako	IR777	大腸腺癌など
			Roche	760-2635	
			Genemed	60-0018-7	
上皮	EMA	E29	Dako	IR629	髄膜腫 上衣腫など
		GM008	Genemed	60-0030-7	
肺胞上皮	TTF-1	8G7G3/1	Dako	IR056	肺腺癌、 甲状腺癌
			Roche	760-4398	
			Genemed	60-0065-7	
リンパ球 胆管	CD10	56C6	Dako	IR648	胆管断端評価の補助 リンパ腫
			Roche	760-2705	
			Leica	RTU-CD10	
細胞増殖	Ki-67	MIB-1	Dako	IR626	悪性度
		GM010	Genemed	60-0078-7	
グリア	GFAP	ポリクローナル	Dako	IR524	グリオーマ
		EP672Y	Roche	760-2516	
		ポリクローナル	Genemed	60-0032-7	
リンパ球	CD20	L26	Dako	IS604	リンパ腫診断
			Roche	760-2531	
			ニチレイ	422441	
			Genemed	60-0010-7	
リンパ球	CD3	2GV6	Roche	790-4341	リンパ腫診断
		F7.2.38	Dako	M7254	
		ポリクローナル	Genemed	60-0011-7	

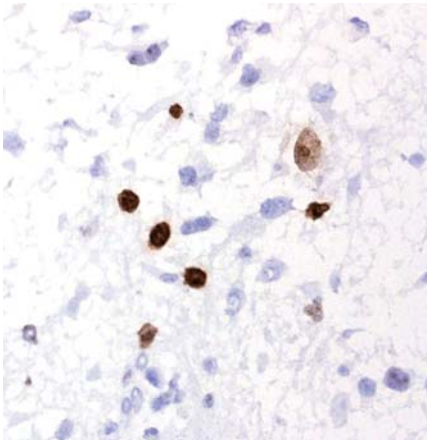
※迅速免疫染色研究会で検討された抗体です

コメント:

- ① 原液抗体を使用する際、各メーカーデータシートの希釈倍率に幅がある場合、まずは希釈倍率の低い方から試すのがおすすめです。
- ② はっ水ペンを使用する場合は、各洗浄の最終槽に界面活性剤を入れずに洗浄するとペンの効果が回復し試薬が載せやすくなります。
- ③ *1: 内因性ペルオキシダーゼのブロッキングは過酸化水素を使用
- ④ *2: 2次抗体は EnVision™ + (K4061, Dako社) / Power Stain™ 1.0 (52-0017, Genemed社) 使用
- ⑤ 使用抗体の染色性、および装置の動作確認を事前に必ず行うようにしてください。

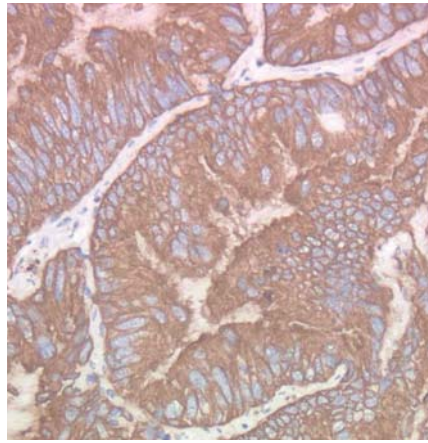
■ はっ水リングφ20・滴下量150μLにおける推奨攪拌条件

滴下量	一次抗体					二次抗体				
	時間 (min)	電圧 (kV)	周波数 (Hz)	隙間 (mm)	電界強度 (kV/mm)	時間 (min)	電圧 (kV)	周波数 (Hz)	隙間 (mm)	電界強度 (kV/mm)
150μL	5	4	5	4.1	0.98	5	4	4	4.1	0.98



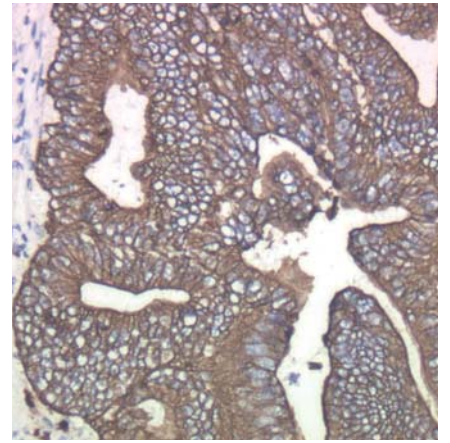
Ki-67 | 脳

神経膠腫の悪性度の決定などに有用です。



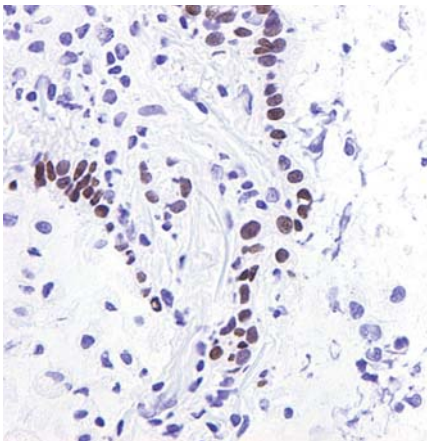
CK7 | 肺腺癌

原発巣推測に役立ちます。



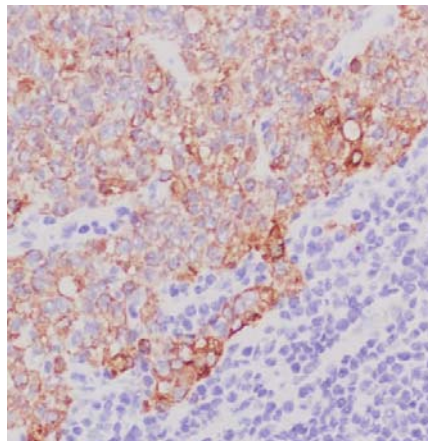
CK20 | 大腸癌

原発巣推測に役立ちます。



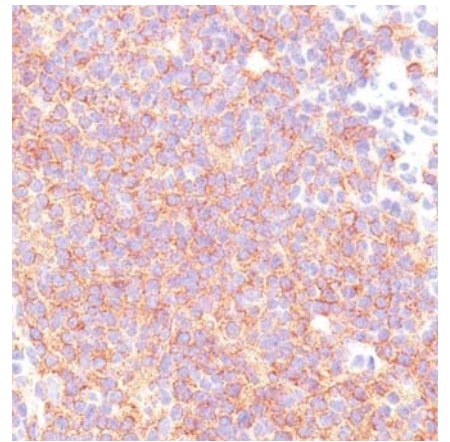
TTF-1 | 肺

肺の腺癌、扁平上皮癌の鑑別などに有用です。



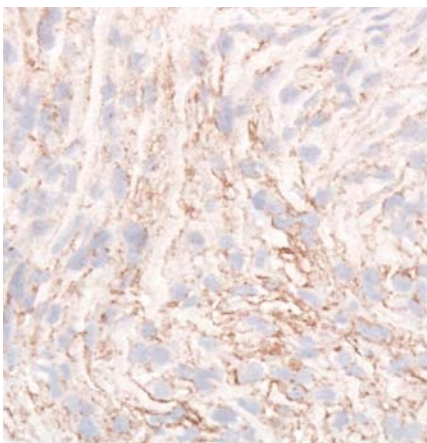
CK(AE1/AE3) | リンパ節

代表的な汎サイトケラチンです。



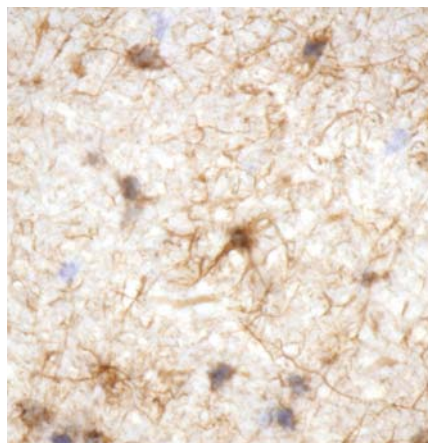
CD20 | リンパ節

B細胞マーカー。術中のリンパ腫の診断に重要です。



EMA | 髄膜腫

髄膜腫や上衣腫の診断に有用性が高いです。



GFAP | 脳

神経膠腫の診断に有用です。

迅速免疫染色研究会：

平成 24 年 7 月に患者さんのために迅速免疫染色を普及するため発足した下記施設の病理医および臨床検査技師を設立メンバーとする研究会。

- 北海道大学大学院医学研究科
- 弘前大学医学部附属病院
- 岩手医科大学附属病院
- 秋田大学医学部附属病院
- 千葉大学医学部附属病院
- 桑名市総合医療センター
- 神戸大学医学部附属病院
- 仙台厚生病院

(順不同)

術中迅速診断に免疫染色を応用できれば、より客観性の高い正確な診断が可能となります。R-IHC は様々な抗体に応用可能ですが、今回は迅速免疫染色研究会で確認した有用性の高い10種の抗体が選定されています。推奨プロトコールを守って染色しましょう。染色が適切に行われたかの判断は重要ですので、可能な限りコントロールを含めるようにしてください。また、形態と合わせた総合判断が重要なことは言うまでもありません。

※監修：神戸大学大学院 医学研究科 病理学講座 病理診断学分野 教授 伊藤 智雄

