

R-IHC 標準プロトコール2 (細胞診標本)

項目	内容	時間
1 細胞診標本作製	捺印法・引きガラス法* *引きガラス法の場合は、ダコペンで上から囲う、または転写法を行います。	
2 固定	4℃冷アセトンまたは 95%エタノール*固定 *95%エタノールの場合、背景染色がやや強い傾向があります。	2分～
3 洗浄	PBS	10秒×3
4 熱処理	Target Retrieval Solution, pH9 (Dako)* *熱処理による抗原賦活が必要な一次抗体の場合は、この工程を行います。	マイクロウェーブ(600W) 3分* または温浴 97℃ 5分 *常温でスタートして3分間処理します。
5 洗浄	PBS	10秒×3
6 内因性ペルオキシダーゼ 活性の除去	1～3% H_2O_2 メタノール* *血液成分が多く捺印されている場合は3% H_2O_2 メタノールを推奨します。 *3% H_2O_2 水も使用可能ですが、細胞診標本の場合は剥離の可能性があります。	1分
7 洗浄	PBS	10秒×3
8 電界攪拌	1次抗体反応	5分
9 洗浄	PBS	10秒×3
10 電界攪拌	2次抗体反応	5分
11 洗浄	PBS	10秒×3
12 発色	DAB	～3分
13 洗浄	流水水洗	10秒
14 核染色	ヘマトキシリン	30秒
15 色出し	流水水洗	10秒
16 脱水・透徹・封入		1分

推奨1次抗体リスト*

項目	1次抗体名	クローン名	メーカー名	製品 code	備考
肺胞上皮	TTF-1	8 G7G3/1	Dako	M3575	肺腺癌、甲状腺癌など
	NapsinA	ポリクローナル	Genemed	60-0065-7	
腺上皮	CK7	OV-TL12/30	ニチレイ	413481	多くの腺上皮
			Genemed	60-0019-7	
	CK20	Ks20.8	ニチレイ	413491	大腸腺癌など
			Genemed	60-0018-7	
上皮	CK	AE1/AE3	Dako	IS053	上皮性マーカー
			Genemed	60-0022-7	
	EpCAM (Epithelial Antigen)	Ber-EP4	Dako	IS637	上皮性マーカー
甲状腺	Thyroglobin	ポリクローナル	Dako	IS509	甲状腺癌など
		2H11/6E1	Genemed	60-0064-7	
神経内分泌細胞	ChromoglaninA	LK2H10	Roche	760-2519	神経内分泌腫瘍など
細胞増殖	Ki-67	MIB-1	Dako	IR626	増殖能
		GM010	Genemed	60-0078-7	
Bリンパ球	CD20	L26	Dako	IS604	B細胞性リンパ腫
			Genemed	60-0010-7	
グリア	GFAP	ポリクローナル	Dako	IR524	グリアの確認
			Genemed	60-0032-7	

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 2次抗体はEnVision™ FLEX, EnVision™+Dual Link(Dako社)使用
- ④ 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。

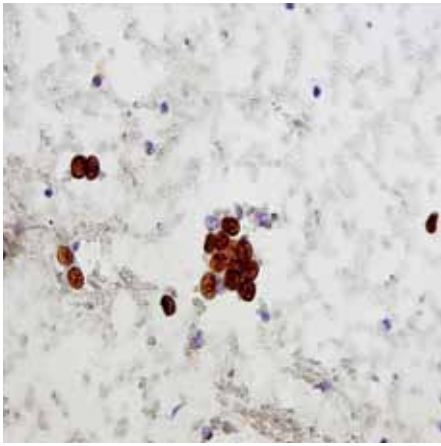
※迅速免疫染色研究会細胞診ワーキンググループで検討された抗体です

■ 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

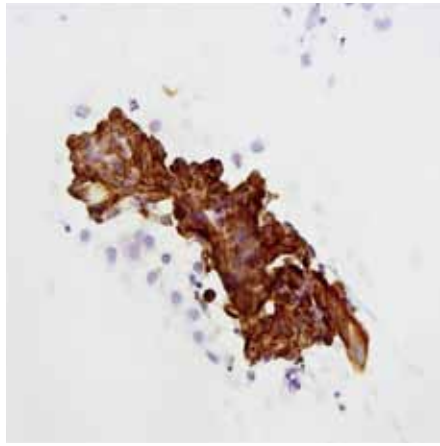
発行：迅速免疫染色研究会

<http://www.rihc.jp>



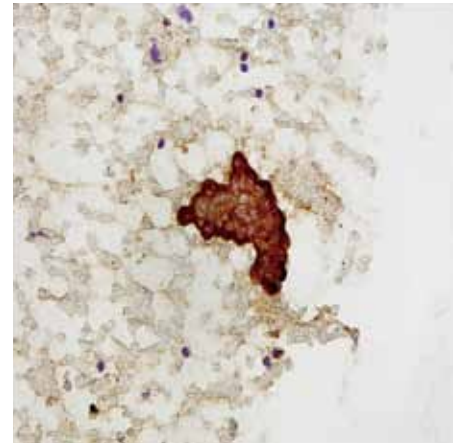
TTF-1 | 肺 腺癌

肺の腺癌、扁平上皮癌の鑑別などに有用です。



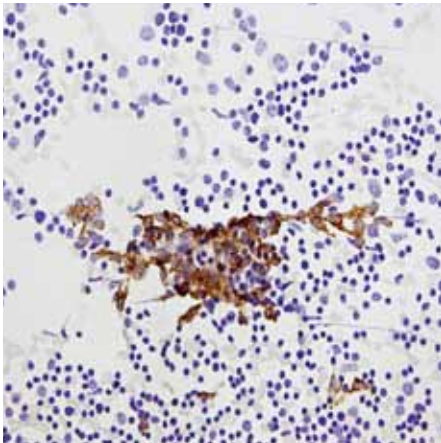
CK20 | 肺 大腸癌転移

原発巣推測に役立ちます。



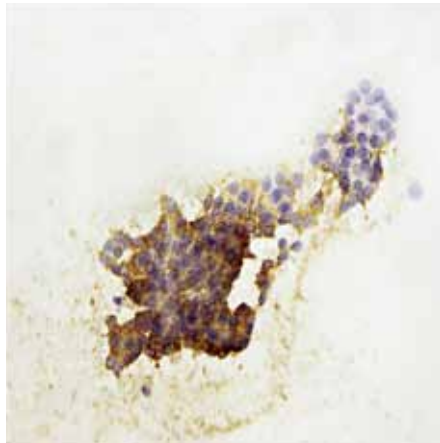
CK7 | 肺 腺癌

原発巣推測に役立ちます。



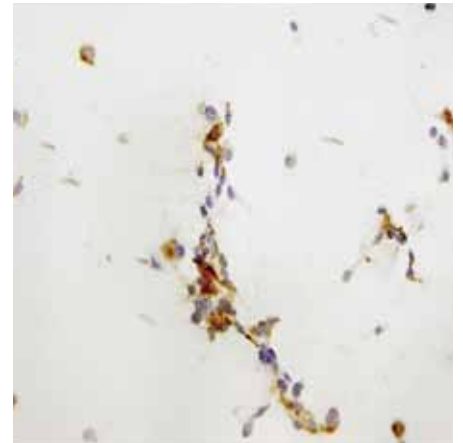
CK(AE1/AE3) | 胸腺 胸腺腫

代表的な汎サイトケラチンです。



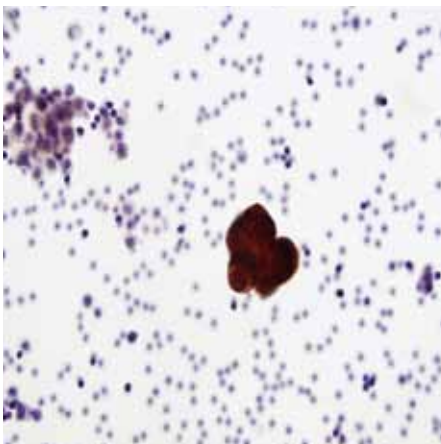
Thyroglobulin | 肺 甲状腺癌転移

原発巣推測に役立ちます。



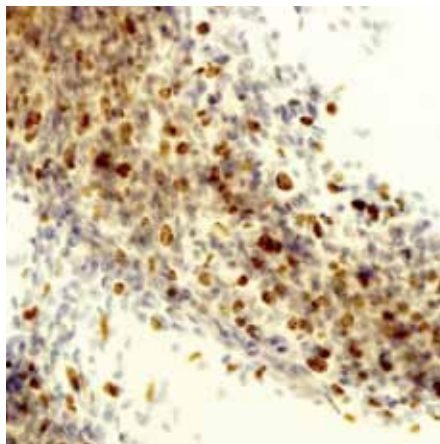
ChromograninA | 肺 大細胞神経内分泌癌

神経内分泌腫瘍の鑑別に有用です。



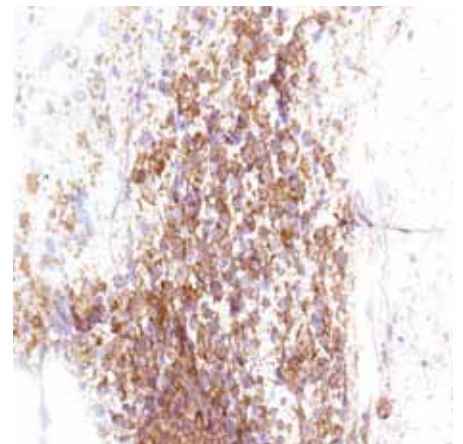
Anti Human Epithelial Antigen | 胸水 腺癌

上皮性細胞の鑑別に有用です。



Ki-67 | 脳

神経膠腫の悪性度の決定などに有用です。



CD20 | 脳

B細胞マーカー。術中のリンパ腫の診断に重要です。

細胞診標本を用いてもR-IHCは良好な染色性が得られます。細胞診標本のプロトコールは組織標本とほぼ同様ですが、核内抗原には賦活が必要であること、また細胞が剥離しやすい検体があることなどが異なります。それらの点に注意するだけで背景染色が少ない、きれいな免疫染色標本になります。上皮性腫瘍の由来臓器推定やリンパ腫の細胞系統の鑑別など、利用価値は多彩です。ぜひご活用ください。



監修：仙台厚生病院 臨床検査センター病理診断・臨床検査科 センター長 遠藤 希之

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)