

R-IHC 標準プロトコール3 (ホルマリン固定20φパラフィン標本)

推奨1次抗体リスト*

	1次抗体名	クローン名	メーカー名	製品 code	前処理条件
A	ACTH	O2A3	Dako	M3501	—
	AE1/AE3	AE1/AE3	Dako	IR053	HIER
	α-SMA	1A4	Dako	IR611	—
B	Bcl-2	124	Dako	N1587	HIER
	Ber-EP4	Ber-EP4	Dako	IR637	Enzyme
C	CAM5.2	CAM5.2	BD	649205	Enzyme
	CD3	F7.2.38	Dako	M7254	HIER
	CD4	1F6	Leica	RTU-CD4-1F6	HIER
	CD5	4C7	Leica	RTU-CD5-4C7	HIER
	CD10	56C6	Leica	RTU-CD10-270	HIER
	CD20	L26	Dako	IR604	HIER
	CD23	1B12	Leica	NCL-CD23-1B12	HIER
	CD43	MT1	Leica	NCL-MT1	—
	CD45RO	UCHL1	Dako	N1520	—
	CD68	PG-M1	Dako	M0876	Enzyme
	CD79a	JCB117	Dako	IR621	HIER
	CDX-2	DAK-CDX2	Dako	IR080	HIER
	CEA	II-7	Dako	IR622	HIER
	ChromograninA	DAK-A3	Dako	M0869	HIER
	CK5/6	D5/16/B4	Dako	M7237	HIER
	CK14	LL002	Leica	NCL-LL002	HIER
CK19	b170	Leica	NCL-CK19	HIER	
CK20	Ks20.8	Dako	IR777	HIER	
CyclinD1	SP4	ニチレイ	413521	HIER	
D	D2-40	D2-40	Dako	M3619	HIER
	Desmin	D33	Dako	IR606	HIER
E	E-Cadherin	4A2C7	Life Technologies	33-4000	HIER
	EMA	E29	Dako	IR629	HIER
F	ER	SP1	Roche	107925	HIER
	FactorVIII	F8/86	Dako	M0616	HIER
G	GFAP	EP672Y	Roche	760-2516	HIER
	Glucagon	ポリクローナル	Dako	A0565	—
H	hCG	C6405	ニチレイ	422321	HIER
	HepPar1	OCH1E5	Dako	M7158	HIER
	HER2	4B5	Roche	107918	HIER
I	hGH	ポリクローナル	Dako	A0570	—
	HHF35	HHF35	Dako	IS700	—
	HMB45	HMB45	ENZODIAGNOSIS	C34930	—
	Insulin	2D11-H5	Leica	NCL-INSULIN	—
K	Ki-67	MIB-1	Dako	IR626	HIER
L	LH	C93	Dako	M3502	—
	MPO	ポリクローナル	Dako	A0398	—
M	MUC1	Ma695	Leica	NCL-MUC-1	HIER
	MUC2	Ccp58	Leica	NCL-MUC-2	HIER
	MUC5AC	CLH2	Leica	NCL-MUC-5	HIER
	MUC6	CLH5	Leica	NCL-MUC-6	HIER
O	Olig2	ポリクローナル	IBL	18953	HIER
	p40	ポリクローナル	CALBIOCHEM	PC373	HIER
	p53	DO-7	Dako	IR616	HIER
	p63	4A4	ニチレイ	413751	HIER
	PgR	1E2	Roche	102333	HIER
P	PLAP	8A9	Dako	M7191	HIER
	PRL	ポリクローナル	Dako	A0569	—
	PSA	ER-PR8	Dako	N1550	—
	S-100	ポリクローナル	Dako	Z0311	—
S	Somatostatin	ポリクローナル	Dako	A0566	—
	SP-A	PE10	Dako	M4501	—
	Synaptophysin	MRQ-40	Roche	760-4595	HIER
T	Thrombomodulin	1009	Dako	M0617	Enzyme
V	Vimentin	V9	Dako	N1521	HIER

*迅速免疫染色研究会パラフィン切片ワーキンググループで検討された抗体です

【抗原賦活化処理】

HIER；熱処理，Enzyme；酵素処理

項目	内容	時間
1 脱パラフィン		
2 水洗		
3 ブロッキング	内因性ペルオキシダーゼ活性の除去*1	1分
4 抗原賦活化処理	Target retrieval 熱処理*2/タンパク分解酵素処理による抗原賦活化が必要な1次抗体の場合は、この工程を行う	それぞれの1次抗体に準じた処理を行う
5 洗浄	PBST	10秒×3
6 サークルを描く	はっ水ペンで20φのサークルを描く	～1分
7 電界攪拌	1次抗体反応(150μL)	10分
8 洗浄	PBST	10秒×3
9 電界攪拌	2次抗体反応*3(150μL)	10分
10 洗浄	PBST	10秒×3
11 発色	DAB	～3分
12 洗浄	流水水洗	10秒
13 核染色	ヘマトキシリン	30秒
14 色出し		
15 水洗	流水水洗	
16 脱水→透徹→封入		

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はっ水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。熱処理の前に行うことで、H₂O₂のブロッキングによる抗原への影響を回避することができます。Ref.1,2
- ④ *2：熱処理による抗原賦活化処理を行った場合は、賦活化液に入れたまま液温が50～60℃になるまで冷却してから次のステップに進みます。(20～30分放置して自然冷却するか、賦活化液に入れたまま大きめの容器に入れて流水で冷却することも可能です)
- ⑤ *3：2次抗体はEnVision™+ (K4061, Dako社), シンプルステインMAX-PO (MULTI) (424151, ニチレイ) 使用
- ⑥ 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。

Ref)1：鴨志田伸吾「免疫染色至適条件決定法」(学際企画)

2：鴨志田伸吾「基礎からの免疫染色術-いかに確実に染め出すか-

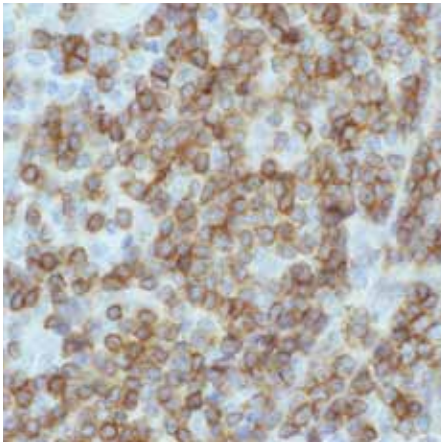
日本組織細胞化学会編「組織細胞化学」2012, p11-25 (2012)

■ 20φ・滴下量 150μL における推奨攪拌条件

	時間 (min)	電圧 (kV)	周波数 (Hz)	隙間 (mm)	電界強度 (kV/mm)
1次抗体	5	4	5	4.1	0.98
2次抗体	5	4	4	4.1	0.98

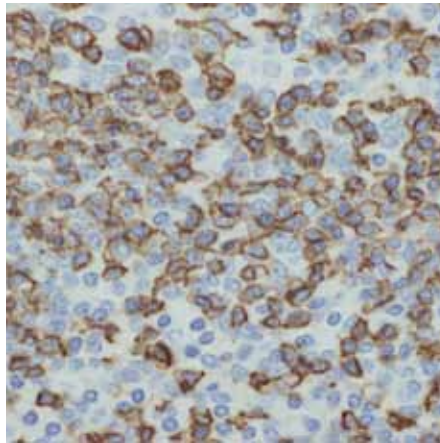
発行：迅速免疫染色研究会

<http://www.rihc.jp>



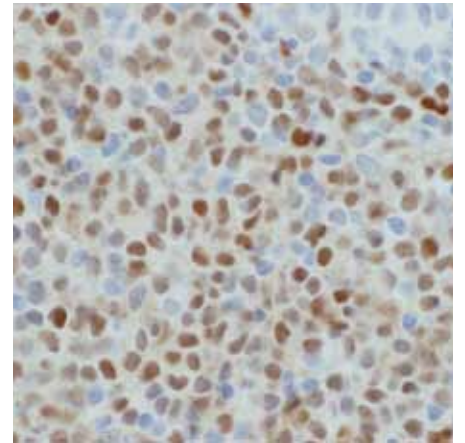
CD3 | 扁桃

代表的なTリンパ球マーカーです。



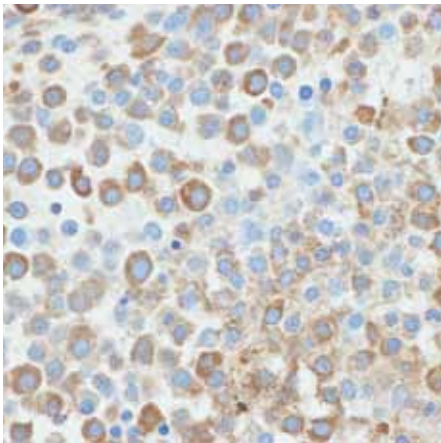
CD20 | 扁桃

代表的なBリンパ球マーカーです。



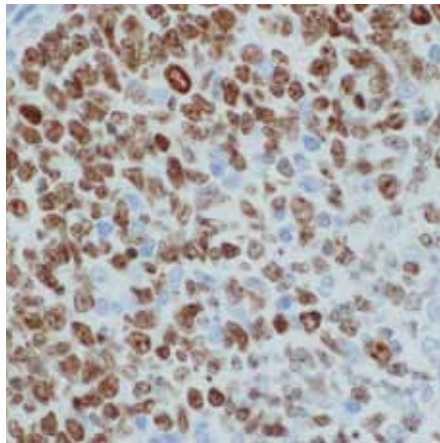
Cyclin D1 | マントル細胞リンパ腫

マントル細胞リンパ腫の診断に役立ちます。



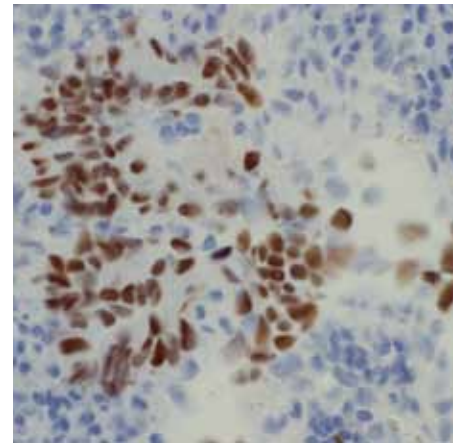
MPO | 骨髄

最も頻用される顆粒球系マーカーです。



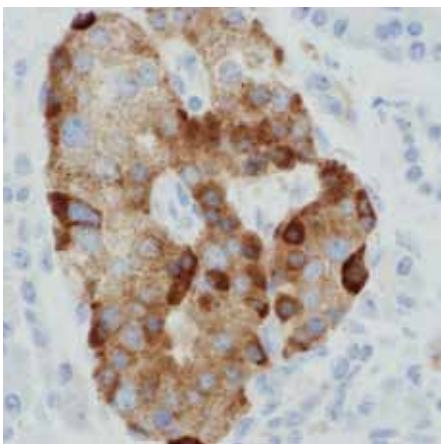
Ki-67 | 扁桃

増殖能の評価に最も用いられます。



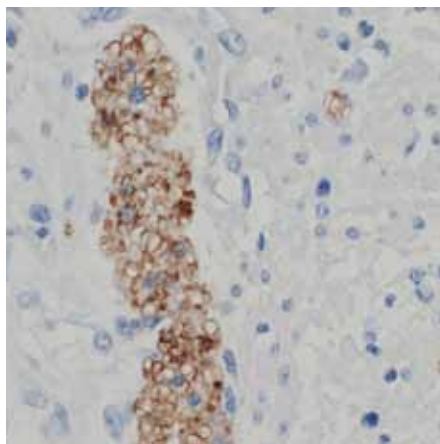
p53 | 大腸癌

良悪性診断の補助として使用されます。



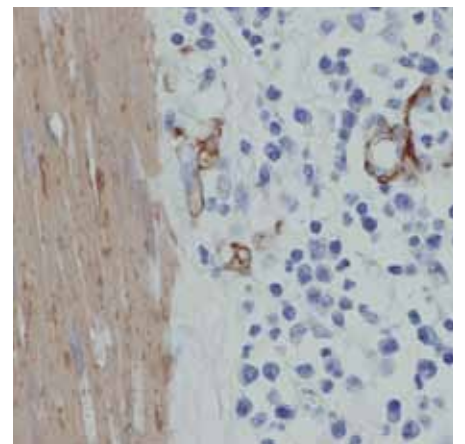
Chromogranin A | 膵臓

代表的な神経内分泌系マーカーです。



S100 | 大腸

神経系腫瘍や悪性黒色腫などの診断に役立ちます。



α-SMA | 大腸

代表的な平滑筋マーカーです。

免疫染色の重要性は日々高まっています。様々なマーカーの出現により、診断補助手段として多くの応用範囲がすでに確立されました。一方で、免疫染色を行うことによる診断の遅れは、いまだに問題として残っています。「ラピート」はパラフィン切片にも応用可能な迅速免疫染色装置です。例えば、1週間に1度の病理医出張といった体制のもとで応用すれば、1日の間に数回の免疫染色も可能で、報告所要時間の大幅な短縮につながることでしょう。今回は、この装置での推奨抗体をリストアップしました。適切な外部コントロールを置き、標準プロトコールでの染色を推奨いたします。
※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



- 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)