

# 簡便なセルブロック作製法の紹介と蛍光抗体二重染色の検討

中川 雄伸、清田 恵美、林田 唯

熊本大学大学院医学薬学研究部・細胞病理学分野

## 1. 背景

セルブロック (CB) とは、細胞を固形化した後、パラフィンで包埋した半永久的に保存可能な細胞標本である。CB として保存することにより、免疫染色、核酸抽出など多方面で検索を行うことができるため、より精度の高い診断や研究結果が得られる。CB の作製法には様々な方法があるが、安価・安全・使用時の温度管理不要・試薬作製や操作が簡便・細胞の回収率も良好とされているアルギン酸ナトリウム (AN) を用いた CB の作製法を紹介する。蛍光抗体二重染色についても検討したので併せて報告する。

## 2. 材料と方法

### 1) 検体

インフォームドコンセントを得た卵巣癌患者の腹水を用いた。血性腹水については、溶血処理と未溶血の2種類を準備した。

### 2) AN を用いた CB の作製

1. 遠心チューブに入った検体を遠心分離、1500rpm, 5min。

(溶血処理は、上清を除去後に ACK (ammonium chloride-potassium) 溶血緩衝液で溶血し、遠心分離、1500rpm, 5min。)

2. 上清を除去し、沈渣成分に 10%中性緩衝ホルマリンを 3ml 加え混和する。

3. 室温で3時間放置後、遠心分離、1500rpm, 5min。

4. 上清を除去し、1% AN を 0.5-1ml を加え、混和後、遠心分離、1500rpm, 5min。

5. 上清を除去し、1M 塩化カルシウム 100  $\mu$ l を加えると瞬時にゲル化する。

6. ピンセットでゲルを取り出し (Photo.1)、通常の方法でパラフィン標本を作製する。



### 3) 蛍光抗体二重染色

ニチレイ抗原賦活化液, pH9 を用いて、抗原賦活処理用プレッシャーチャンバー (Dako, Pascal) で 125°C, 30 秒間の抗原賦活化を行った。一次抗体として、CD204 (当研究室作製, Clone: SRA-E5, 抗ヒトマクロファージスカベンジャーレセプター A マウスモノクローナル抗体)、Cytokeratin (Dako, 抗ヒトサイトケラチンワイドウサギポリクローナル抗体)を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor 488 (抗マウス, 緑色)、Alexa Fluor 546 (抗ウサギ, 赤色)を使用した。封入剤には、VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (青色)を用い、蛍光顕微鏡で観察・写真撮影を行った。

### 4) HE 染色

蛍光顕微鏡で写真撮影後、カバーグラスを取り除いて HE 染色を行い、蛍光写真と同一細胞を写真撮影した。

## 3. 結果

CD204 と Cytokeratin の蛍光抗体二重染色では腹腔マクロファージの細胞質が緑色に、癌細胞と中皮細胞の細胞質が赤色に、有核細胞の核が青色に観察された (Photo.2)。鮮明な蛍光像を示し、ゲル自体の自家蛍光や非特異的反応は認められなかった。溶血処理後の検体には自家蛍光を示す細胞はほとんどみられなかったが (Photo.2)、未溶血の検体には自家蛍光を示す赤血球が認められた (Photo.3, arrow)。

蛍光抗体二重染色後の HE 染色 (Photo.4, Photo.5) も染色態度は良好であった。ゲル自体は淡いピンク色または淡い紫色の無構造物質として観察され鏡検への影響は認められなかった。

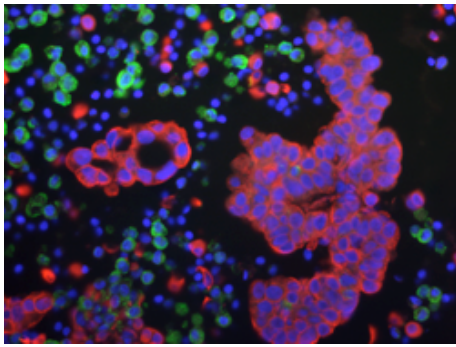


Photo.2

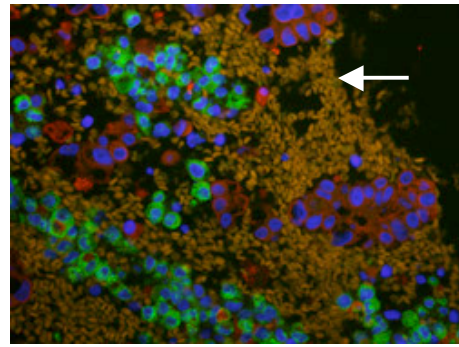


Photo.3

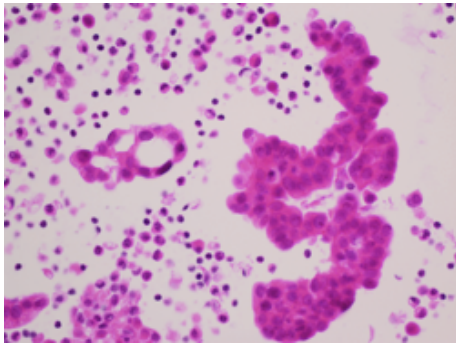


Photo.4

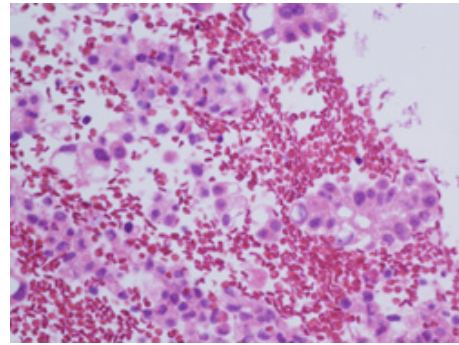


Photo.5

#### 4. 考察

AN はワカメなど海藻類のヌルヌルしたぬめり成分の天然多糖類で、食品添加物、医薬品など多方面で活用されている。カルシウムイオンの存在下でナトリウムイオンとカルシウムイオンの交換が起こり、アルギン酸はカルシウムイオンを抱き込むような egg box junction 構造を形成しゲル化することから、細胞の回収率が高いと考えられている。

一般的に、通常のパラフィン組織切片は自家蛍光が強いため蛍光抗体染色には不適とされているが、CB のパラフィン切片は細胞レベルであり、組織ほど余分な成分が含まれていないため自家蛍光が少ないと考えられる。しかし、血性検体の場合は赤血球の自家蛍光が鏡検の妨げになることがあるため、細胞変性の少ない溶血緩衝液や溶血固定液を用いての溶血処理後、通常の CB 作製を行う必要があると考えられた。

#### 5. まとめ

- 1) 安価・安全・使用時の温度管理不要・試薬作製や操作が簡便・細胞の回収率も良好とされている AN を用いた CB の簡便な作製法を紹介した。蛍光抗体二重染色の染色態度は良好で、ゲル自体の自家蛍光や非特異的の反応は認められないため、AN を用いた CB は蛍光抗体染色の材料としても適すると考えられた。また、血性検体の場合は赤血球が自家蛍光を示すため、細胞変性の少ない溶血緩衝液や溶血固定液を用いて溶血処理を行う必要があると考えられた。
- 2) 蛍光抗体二重染色標本の蛍光顕微鏡写真撮影後にカバーグラスを取り除いて HE 染色が行えるため、同一細胞の対比観察が可能である。したがって、AN を用いた CB の蛍光抗体染色は腹水などの液状検体の診断の補助として有用であると考えられた。今後、培養細胞を用いた細胞形態学的研究などの診断目的以外の分野での活用が期待される。

#### 6. 参考文献

- 1) Basch PF. An alginate matrix double-embedding method for paraffin sectioning of minute specimens. *Stain Technol* 61: 253-258, 1986.
- 2) 佐野順司、吉本尚子、溝口良順、齊藤みち子. アルギン酸ナトリウムを用いたセルブロック法の有用性についての検討. *日臨細胞会誌* 44: 291-297, 2005.
- 3) 牛島友則. 細胞診断および免疫染色に有用な cell block 標本の作製法. *検査と技術* 33: 19-26, 2005.