原 著

マイクロ波利用による迅速免疫細胞化学法
の試みについて国立がんセンター病院臨床検査部¹⁾, 同 研究所病理部²⁾山岸紀美江²⁾ 広橋 説雄²⁾ 當銘 良也¹⁾ 日吾 雅宜¹⁾渡部 庸一¹⁾ 上井 良夫¹⁾ 下里 幸雄¹⁾

迅速細胞診に酵素抗体法免疫細胞化学を導入するため, microwave (2450 MHz) 照射による上記染色法の迅速化について検討した。

塗抹標本は肺癌術中採取胸水, 胸腔洗浄液, 胃癌術中腹水, 腹腔洗浄液, その他から作製した。

方法は, 95% ethanol 固定, avidin-biotin peroxidase complex 法(ABC法), diamino-benzidine 発色, hematoxylin 核染色を施行した。一部は alcianblue 重染色を行った。一次抗体は carcino-embryonic antigen (CEA) に反応する mouse monoclonal 抗体を用いた。

microwave は BIO-RAD H 2500 を用い, 出力を 50% (300 W) に減力し, 間欠照射法とし, 最高温度 37°C に調整して, 内因性 peroxidase 活性阻止, 一次抗体反応, 二次抗体反応, ABC 反応, DAB 発色過程に照射を行った。

通常の免疫細胞化学法で用いられている試薬濃度で, microwave 照射下に反応を行い, 20~30 分間で ABC 法による免疫細胞化学標本が得られた。

microwave 照射は免疫細胞化学反応時間を著しく短縮する効果があり, 迅速細胞診に利用可能であると思われた。

Key words : Intraoperative lavage—Rapid immunostaining—Microwave irradiation—Carcinoembryonic antigen—Intraoperative cytology

I. はじめに

1970 年, Mayers⁸⁾ がマイクロ波照射による光顕用

組織, 腎, 肝, 肺, 筋肉の固定を試みて以来, 固定から染色までの標本作製過程, 電顕用固定, 免疫組織化学などにマイクロ波照射が利用され^{1,5-9,12)}, 著しい反応時間短縮効果をあげている。しかし, 照射による人工産物発生, 固定むら, 染色むらなどの欠点もあり, まだ, 日常的には普及していない。

最近, 迅速細胞診の頻度が増加してきているが, 迅速診断においても通常の細胞診と同等の精度が求められる。限られた時間でできるだけ正確に診断を下すため, パパニコロウ染色, 迅速ギムザ染色, アルシアン青染色を行っている。しかし, ときに, 小型の散在性に出現する腺癌細胞や, 著しい異型を示す中皮細胞様の細胞の判定に困難を感じることもある。細胞の由来や良性, 悪性の生物学的性格を知る手掛かりを得て,

A rapid immunostaining in a microwave oven

Kimie YAMAGISHI²⁾, C.F.I.A.C., Setsuo HIROHASHI²⁾, M.D., Yoshiya TOME¹⁾, C.T.I.A.C., Masanobu HIGO¹⁾, C.T.I.A.C., Youiti WATANABE¹⁾, C.T.I.A.C., Yoshio UEI¹⁾, M.D., F.I.A.C., Yukio SHIMOSATO¹⁾, M.D.

¹⁾Clinical Lab., National Cancer Center Hospital

²⁾Pathology Div., National Cancer Center Research Institute

論文別刷請求先 ☎ 104 東京都中央区築地 5 の 1 の 1 国立がんセンター研究所病理部 山岸紀美江

平成 2 年 12 月 20 日受付

平成 3 年 4 月 12 日受理

診断精度を向上させようとする試みの中に、免疫細胞化学の導入がある^{2-4,11,13}。今回、染色過程はやや複雑であるが、感度の高い、免疫細胞化学法の、avidin-biotin peroxidase complex 法の迅速化の手段としてマイクロ波照射利用を検討したので報告する。

II. 材料と方法

材料は手術中の開胸時胸水、胸腔洗浄液、開腹時腹水、腹腔洗浄液などの沈渣の95%エタノール固定塗抹標本を用いた。

染色方法は、直接法、間接法よりはるかに感度の高い、avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法により行い、diamino-benzidine (DAB) 発色、Gill-hematoxylin 核染色を行った。一部の標本にalcian blue 重染色を行った。試薬は通常の染色法に用いる濃度で調整した。

抗体は国立がんセンター研究所病理部で作製された、carcino-embryonic antigen に反応するマウスモノクローナル抗体 (抗 CEA), NCC-CO-411 (2.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ + NaN_3 50 μl), NCC-CO-432 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)¹⁰ を 500 倍希釈して用いた。二次抗体は 200 倍希釈液を用いた。

carcino-embryonic antigen (CEA) は体腔液中にみられる癌細胞と鑑別を要する中皮細胞や大食細胞にはほとんど陰性であり、陽性の場合は癌細胞の可能性が高く、細胞鑑別に有用であるため用いた。

alcian-blue は腺癌細胞の粘液や細胞辺縁の微絨毛の判定に有用であるため用いた。

染色方法は以下のとおりである。

1) 95% ethanol solution で塗抹標本を 1~2 分間固定し、5~10 秒間水洗する。

2) 0.3% H_2O_2 methanol solution に標本を浸液して、3 分間マイクロ波を間欠照射し内因性ペルオキシダーゼ活性阻止する。

3) phosphate buffer solution, 1/100 M pH 7.2 に約 0.8% の割合で NaCl を加えた液 (PBS-NaCl) で 3 回各 3 秒間洗浄する。

4) 10% normal swine serum (NSS) で塗抹面を軽くおおい、一次抗体 (抗 CEA) を滴下、各種時間マイクロ波を間欠照射する。

5) PBS-NaCl で 3 回各 3 秒間洗浄する。

6) NSS で塗抹面をおおい、二次抗体 (biotinylated anti-mouse IgG) を滴下、各種時間マイクロ波を間欠照射する。

7) PBS-NaCl で 3 回各 3 秒間洗浄する。

8) NSS で塗抹面をおおい、avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 滴下、各種時間マイクロ波を間欠照射する。

9) PBS-NaCl で 3 回各 3 秒間洗浄する。

10) diaminobenzidine solution (DAB) に標本を浸液して、1 分間マイクロ波を間欠照射する。

11) 95% ethanol と 100% ethanol で脱水、xylene で透徹し封入する。

ヘマトキシリン染色 1 分 30 秒間染色、アルシアン青染色 5 分間染色、は通常の方法で上記過程 2 の前で、一部の標本は、10 の後に行った。

マイクロ波照射は、BIO-RAD H 2500 を用い、出力を 50% に調節し、300 W に減力して、1.5 秒照射、2.5 秒照射停止を繰り返す間欠照射法とした。

最高温度は 37°C に設定した。温度センサーの位置は染色条件とほぼ同一の状態、すなわち染色過程 4、6、8 では、スライドグラス上に盛った約 2 ml の水道水の中につけ、染色過程 2、10 では染色容器の中の反応液に直接浸漬した。

照射時間は染色過程 4、6、8 では 10 秒、30 秒、1 分、3 分、5 分について検討した。内因性ペルオキシダーゼ阻止には 3 分間、DAB 反応には 1 分間マイクロ波を照射した。

III. 結 果

microwave 照射を利用して酵素抗体法免疫細胞化学染色の迅速化を、肺癌術中胸水、胸腔洗浄液、胃癌術中腹水、腹腔洗浄液などの細胞塗抹標本を用いて、95% エタノール固定、ABC 法、一次抗体に抗 CEA、diaminobenzidine 発色、核に hematoxylin 染色を施行し、以下の結果を得た。

1) microwave 照射時間について

照射時間 10 秒、30 秒、1 分では標本上の細胞に染色むらがみられたが、照射時間 3 分、5 分では非特異的反応は認められず、検討した液状検体細胞塗抹標本では標本による反応性の差異は認められず、同時に染色した 15~21 枚の標本に microwave 内染色場所による染色むらを認めず、染色良好であった。

2) microwave 照射による温度上昇時間について

約 20 度から約 37 度に達する時間は、スライドグラスに盛った約 2 ml の反応液では約 5 秒間を、ガラス製染色容器内の約 100 ml の反応液では 40~50 秒間

であった。

3) 対比染色について

ヘマトキシリン染色, アルシアン青染色は, 染色方法2の前, すなわち, 免疫細胞化学染色の前に行った場合に, 染色方法10の後, すなわち, 免疫染色終了後に行った場合より, ヘマトキシリンやアルシアン青の色調に淡染傾向がみられた。

IV. 考 察

酵素抗体法による免疫細胞化学染色時間を短縮するには, 操作, 手間の少ない方法を選ぶか, 使用する試薬の濃度を高くするか, 染色中の温度を高くするか, いずれかが考えられる。

1. 操作, 手間の少ない方法について

最も簡易な方法は, 標識一次抗体を抗原と反応させて, 発色させる直接法である。この反応は非特異的反応は少ないが感度が低い。

次いで簡易な方法は, 一次抗体を抗原と反応させ, これに標識二次抗体を反応させてから発色させる間接法がある。堀ら³⁾は5倍の抗体濃度を用い, 染色手技, 反応液調整, 器具の準備などを2人で分担して, 間接法により約5分に短縮して迅速化に成功している。ただし, 術中迅速診断に応用するには万全の準備と手技の分担の必要性を強調している。

酵素抗体法の迅速化の試みは, 直接法⁴⁾, 間接法^{3,4)}などでは行われているが, これらの方法は peroxidase-anti-peroxidase 法 (PAP 法), avidin-biotin peroxidase complex 法 (ABC 法) に比べ反応回数は少ないものの, 感度が低いという欠点を有している。今回は, 3~4 回操作手順の少ない方法より, 感度の最も高い ABC 法の短縮化を試みた。

2. 反応液濃度を高くして時間を短縮する方法について

反応液濃度を高くする方法^{2~4,11,13)}などでは, 一次抗体, 二次抗体とも2~10倍濃い濃度を用いている。たとえば, ある市販のキットでは, 原液の希釈倍率を, 室温20分で反応させる場合は100倍に, 4℃16時間で反応させる場合は400~1,000倍に, 室温4分の迅速法では50倍にするよう指示している。

しかし, 一般に抗体濃度を高くして反応させると, 背景にも非特異的に発色が起こりやすく, 反応の陽性, 陰性の判別が困難になる場合がある。また, 免疫細胞化学で使用する試薬は, 一般の細胞診で使用する試薬

と比較すると, 現在のところかなり高価なものが多いので経済的負担が大きい。

3. 反応温度を高くして時間を短縮する方法について

短時間に, 正確に, 少量の液温を一定に保持するには, 従来用いられている湯煎にしたり, 直接火にかけて加熱する方法, すなわち物質の外側から暖める方法より, マイクロ波照射による加熱, すなわち周波数2,450 MHzのマイクロ波を照射して物質に含まれている水の分子運動を盛んにして摩擦熱を発熱させる方法¹⁾が優れている。

マイクロ波照射は, 家庭用電子レンジを利用してもできる¹²⁾が, 最高温度設定や一定温度に保つような照射方法の設定などの制御機構がないため, 照射して50~60℃以上に温度が上昇すると細胞の膜構造に影響して人工産物が出現したり⁹⁾, 加熱して目的物を煮てしまうことがある。今回は出力ワット数600 Wを50%減力して, 1.5秒照射, 2.5秒照射中断を繰り返す間欠法により照射し, 最高温度37℃+3℃の良好な反応環境がえられた。

免疫細胞化学ではスライドガラス上の数滴の反応液で染色するため, 照射時間が長いと標本が乾燥して, DAB反応の非特異的反応による誤染色が起こりやすい。これを防ぐには湿潤箱の中で反応を行う方法もあるが, 今回の迅速法では, 連続照射法でなく, 間欠照射法を採用し急激な温度上昇を抑え, さらに, 塗抹面を10%NSSで湿らせたうえで反応液を滴下したことにより標本の乾燥を防止できた。

照射時間については, できるだけ時間を短縮するため, 試しに出力600 Wで, 10~30秒間連続照射してみた。しかし, この時間では同時に多数の標本を染色する場合, 標本ごとの反応時間にばらつきが出やすい。ばらつきを少なくするには, 照射出力を減ずること, 間欠照射により, 反応時間を延長する必要がある。今回の通常の反応液濃度における検討では, 10秒, 30秒, 1分の照射では, 標本上の一部に反応むらがみられた。しかし, 3分, 5分照射しても, 温度センサーを染色条件とほぼ同様にして, 37℃に最高温度を設定したので, 過熱による人工産物や抗原性の低下は認められなかった。

なお, 染色容器を用いて照射すると, 液上部と底部では5~10℃の温度差ができる。温度センサーは染色しようとする細胞と同じ位置に置くことが重要である。正確に温度条件を一定にするには液を振動したり,

攪拌する必要がある。

以上により、標本の乾燥を防止した適切な照射方法と時間、温度、照射出力をコントロールできる制御装置を備えたマイクロ波照射装置を用いることにより、酵素抗体法迅速免疫細胞化学染色は可能であり、したがって迅速細胞診に十分利用できるものと思われた。

V. 結 語

ABC法免疫細胞化学染色は、マイクロ波照射を利用すると、通常の試薬濃度を用いて20~30分間で染色可能である。

したがって迅速細胞診に利用可能である。

本研究の一部は、厚生省対がん10ヵ年総合戦略事業プロジェクト研究助成金によるものである。

Summary

The innovative application of microwave irradiation in the immunohistochemical reactions of a wide range of antigens is described.

We investigated the possibility of a rapid immunocytochemical staining using 2450 MHz microwave irradiation during surgery.

Pleural or peritoneal lavage cytology carried out during operation in patients with lung or stomach cancer. Immediate cytological examination of the lavage fluid was performed with Giemsa stain, Papanicolaou stain and alcian blue stain.

There are always some problems regarding the accuracy of cytological examination. To confirm true positive results, it would be better to use immunocytological stains such as CEA.

The present study introduces a rapid avidin-biotin peroxidase complex method that requires 20~30 min.

Two monoclonal antibodies reactive with carcinoembryonic antigen (CEA) were obtained by hybridizing mouse myeloma cells.

Microwave irradiation is used to accelerate the process of the blocking endogenous peroxidase, the incubation of the primary antibody and the second antibody, and the diaminobenzidine reaction at 300 watts, at 37°C.

Cytomorphological preservation and antigenicity were also good and background staining was minimal.

It might be useful to routinely apply this technique for immunocytostaining during surgery.

文 献

- 1) Boon, M.E. and Kok, L.P. : Microwave cookbook of pathology, pp. 15~190, Coulomb Press Leyden, Leiden, 1988.
- 2) Gerdes, J. : An immunohistological method for estimating cell growth fractions in rapid histopathological diagnosis during surgery, *Int. J. Cancer*, 35 : 169~171, 1985.
- 3) 堀 貞明, 堤 寛 : 酵素抗体法染色手技の迅速化とその術中迅速診断への応用, *病理と臨床*, 5 : 1025~1027, 1987.
- 4) 市原 透, 名倉 宏, 中尾昭公・他 : 迅速酵素抗体法の肺癌術中診断への応用, *医学のあゆみ*, 138 : 371~372, 1986.
- 5) 逸見明博, 山口比呂美, 瀬山好美・他 : 免疫組織学的手段によるマイクロウェーブ固定法の有用性に関する研究, *臨床病理*, 38 : 193~200, 1990.
- 6) Kok, L.P., Visser, P.E., Boon, M.E. : Histoprocessing with the microwave oven : an update, *Histochem. J.*, 20 : 323~328, 1988.
- 7) Leong, A.Y., Millios, J. : Rapid immunoperoxidase staining of lymphocyte antigens using microwave irradiation, *J. Pathol.*, 148 : 183~187, 1986.
- 8) Mayers, C.P. : Histological fixation by microwave heating, *J. Clin. Pathol.*, 23 : 273~275, 1970.
- 9) 水平敏知 : マイクロウェーブ照射による生物試料の固定法, *医学のあゆみ*, 149 : 907~911, 1989.
- 10) Sakurai, Y., Hirohashi, S., Ohishi, T., et al. : Conformational epitopes specific to carcinoembryonic antigen defined by monoclonal antibodies raised against colon cancer xenografts, *J. Surg. Oncol.*, 42 : 39~46, 1989.
- 11) Tabibzadeh, S.S., Shah, K. : Application of a quick immunoenzymatic labeling as an adjunct to frozen-section diagnosis, *Am. J. Clin. Pathol.*, 91 : 63~66, 1989.
- 12) Yamashina, S., Katsumata, O., Sekine, R. : Evaluation of microwave irradiation in immunohistochemical reactions, *Acta Histochem. Cytochem.*, 23 : 553~562, 1990.
- 13) Yokota, T., Takahashi, T., Yamaguchi, T., et al. : A rapid immunohistologic method for determining the limit of cancer invasion at the surgical margin of scirrhous carcinoma of the stomach during surgery, *Am. J. Clin. Pathol.*, 91 : 187~190, 1989.