

Journal of Histochemistry & Cytochemistry[§] 掲載論文

「ホルマリン固定パラフィン包埋組織試料を用いた 免疫2重蛍光染色法の最適化」

梶村順子、伊藤玲子、Nancy R. Manley、Laura P. Hale

“Optimization of Dual Color Immunofluorescence Protocols for Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Archival Tissues”

J Histochem Cytochem 2016 (February) 64: 112-24

(doi: 10.1369/0022155415610792)

今回の研究で明らかになったこと

60年前の組織試料（胸腺のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本）を用い、鮮明で高品質の免疫蛍光染色画像を得る方法を開発した。この方法を用いることで、1) 最新のイメージ画像解析が可能になり、更に、2) 従来の方法より少ない試料の分量で病理解析できる。放影研で保存されている貴重な被爆者試料の研究利用に有益である。

解 説

ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本の免疫蛍光染色は、主として組織の品質劣化と自家蛍光由来のノイズシグナルのために、一般的にはほぼ不可能だと考えられている。放影研で保存されている被爆者のパラフィン包埋組織標本も、作成後60年が経過しているものは、これまで解析は困難であると考えられていた。このたび放影研分子生物科学部の梶村順子研究員らは、自家蛍光^{*}由来のノイズシグナルを少なくするとともに、調べようとする細胞の蛍光シグナルを拡大する最適な組織処理法および染色法の組み合わせを開発した。更に、最新のデジタル画像処理を用いて、より鮮明な高品質の2重免疫蛍光染色画像を得る技術を開発した。

^{*}自家蛍光：細胞や組織が本来持っている蛍光で、染色によって調べようとする細胞の蛍光を測定する際のノイズになる。

1. 調査の目的

放影研で保存されている被爆者のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を有効利用できる、2重免疫染色法を開発する。

2. 調査の方法

1954-70年に作成された原爆被爆者（広島）の胸腺ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本（10例）を用いて、胸腺上皮と胸腺細胞をそれぞれCK14抗体^{*}とCD1a抗体^{*}で識別する2重免疫蛍光染色を行った。染色および画像解析の改良法として、1) 免疫染色の特異性を高めるための独立した複数のステップ、2) 組織上に認められる蛍光シグナルを損なうことなく自家蛍光由来のノイズシグナルを減弱するための種々の化学的処理、3) 蛍光顕微鏡のデジタル画像処理機能を用い、より鮮明で高品質な蛍光染色画像の作成を試みた。

^{*}CK14 抗体：胸腺上皮細胞の細胞質に発現するI型ケラチン（CK14）に反応する抗体。

^{*}CD1a 抗体：皮質胸腺細胞に発現する細胞膜結合性の糖タンパク質（CD1a）に反応する抗体。

3. 調査の結果

1) 組織処理と染色に独立した複数のステップを取り入れること、2) NH₃/EtOH処理^{*}と、Sudan black B染色による自家蛍光除去^{*}を行うこと、3) デジタル画像処理を用いて陽性シグナルとノイズシグナル比の拡張を行うことにより、古いパラフィン包埋胸腺組織標本（胸腺上皮と

胸腺細胞)においても、ノイズシグナルを低く抑えたハイコントラストな高品質の2重免疫蛍光染色画像を得ることができた。

※NH₃/EtOH処理：アンモニア/エタノール混合液中で処理する方法。ホルマリン固定による組織中の架橋（ホルマリンによる蛋白質同士を結合させ安定化させる作用）を除去し、抗原決定基であるアミノ酸を露出し、抗体との反応性を増加させる。

※Sudan black B染色による自家蛍光除去：ホルマリン固定組織切片では血球やエラスチンファイバー由来と考えられる自家蛍光（ノイズシグナル）が観察される。0.3% Sudan black B染色により、蛍光標識の蛍光シグナルに影響を与えることなく、自家蛍光を減弱することができる。

今回の調査の意義

今回開発された改良法により、60年前のパラフィン包埋組織標本（胸腺上皮と胸腺細胞）でも、免疫2重蛍光染色法を用いた高品質な蛍光画像が得られた。この方法は、胸腺以外の組織の蛍光染色にも応用可能と思われる。

放射線影響研究所は、広島・長崎の原爆被爆者および被爆二世を60年以上にわたり調査してきた。その研究成果は、国連原子放射線影響科学委員会（UNSCEAR）の放射線リスク評価や国際放射線防護委員会（ICRP）の放射線防護基準に関する勧告の主要な科学的根拠とされている。被爆者および被爆二世の調査協力に深甚なる謝意を表明する。

§ *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 誌は、1953年に創刊し、細胞生物学分野の査読付き学術誌で、細胞・組織・器官の構造と機能はもとより、発達・分化・疾病の機序に関する研究を対象とする。また顕微鏡や画像技術の進歩についても取り上げる。（2014年のインパクト・ファクター：1.959）