

パラフィン包埋 (FFPE) 標本の蛍光核染色の難しさ

牧(黒田) 由紀子^{#1} 住友 日香^{#1} 瀬尾 めぐみ^{#1} 大島 玲子^{#1} 三ツ井 貴夫^{#1}

^{#1} 独立行政法人 国立病院機構 とくしま医療センター西病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地 1354 番地

受付 2025. 3. 6 受理 2025. 3. 7 出版受託 2025. 3. 10

要旨

剖検病理組織は、通常、長期室温保存できるパラフィン包埋 (FFPE) されている。同標本は免疫染色の際、何らかの抗原賦活化処置が必要となる。我々は、FFPE 剖検脳組織を免疫蛍光染色する中で、核を蛍光色素で染色すること、特にドーパミン神経細胞核の染色の困難さに直面している。本学会では、現在取り組んでいる蛍光核染色の方法について報告する。方法は PD 患者中脳 FFPE 剖検薄切標本を、脱パラフィンの後24種類の抗原賦活化処置を実施した。なお、免疫染色としてチロシン水酸化酵素およびヒストン (H2B) を染色した。ほとんどすべての処置において小細胞の核は良好に染色されたが、大細胞の核の染色性は認められなかった。ただし、ソニケーションを行った時は、大細胞核にもわずかだが染色性が認められた。現在まで計74回試みたが、まだ満足いく核染色には至っていない。今後はソニケーションの条件を変更し、その効果をさらに検討していく予定である。

キーワード：パラフィン包埋 (FFPE)、抗原賦活化

背景と目的

剖検病理組織は、通常、長期室温保存できるパラフィン包埋 (FFPE) されている。同標本は免疫染色の際、何らかの抗原賦活化処置が必要となる。我々は、FFPE 剖検脳組織を免疫蛍光染色する中で、核を蛍光色素で染色すること、特にドーパミン神経細胞核の染色の困難さに直面している。本学会では、現在取り組んでいる蛍光核染色の方法について報告する。

対象と方法

PD 患者中脳 FFPE 剖検薄切標本を、脱パラフィンの後 24 種類の抗原賦活化処置を実施した。具体的には市販の抗原賦活化液や、種々の Buffer、pH、界面活性剤を使用し、圧力鍋などを用いて加温した。さらに新たにソニケーション処理を試みた。核染色液は DAPI 2 種類、Hoechst (33258, 33342)、Nuclear Blue (AAT Bioquest, Inc.) の 5 種類を試した。なお、免疫染色と

してチロシン水酸化酵素およびヒストン (H2B) を染色した。(図 1)

図 1 FFPE染色のステップ

1. 脱パラフィン
2. 賦活化処理

Buffer	10 mMウエン酸ナトリウム緩衝液, Tris溶液, EDTA緩衝液, Urea, グリシン
pH	6.0 or 7.4 or 8.0 or 9.0
市販賦活化液	L.A.B solution CCA(シトラコノ酸)
加熱処理	圧力鍋, マイクロウェーブ(電子レンジ), AC法
界面活性剤	Triton X-100, Tween20, NP-40
タンパク分解酵素	トリプシン, Protease K, ペプシン
3. ブロッキング
4. 1次抗体反応
5. ビオチン標識2次抗体反応
6. 核染色

DAPI 2種類 (DOJINDO, Nakarai)	賦活化条件はどれにするか？ どれを組み合わせるか？ 反応時間、温度など色々な検討を行った。また核染色液も計5種類の検討を行った。
Hoechst 33258/33342	
Nuclear Blue (AAT Bioquest, Inc.)	
7. 自家蛍光抑制液
8. 封入後、観察

結果

条件①

図 2 に示すように、Buffer は、6M Urea, 0.1M Glycine を使用、PH は 7.4、核染色は DAPI を用いて免疫蛍光染色を行った

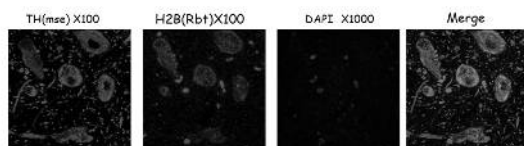
Correspondence to: 牧(黒田) 由紀子, 独立行政法人 国立病院機構 とくしま医療センター西病院 臨床研究部 776-8585 徳島県吉野川市鴨島町敷地 1354 番地 Phone: +81-88-324-2161 Fax : +81-88-324-8661 e-mail: maki.yukiko.yd@mail.hosp.go.jp

1)。その結果、細胞質マーカーの TH の染色性は良好で、大細胞も綺麗に染色されていたが、核のマーカーである H2B は染色できなかった。また、DNA プローブである DAPI の染色も全く確認されなかった。そこで、賦活化条件をもっと検討することになった。

図 2

条件①

Buffer	6M Urea, 0.1M Glycine
PH	PH7.4
核染色	DAPI



結果

細胞質(TH)	○ 大細胞○
核(H2B)	×
DNAプローブ(DAPI)	×

➡ 賦活化条件をもっと検討してみよう！

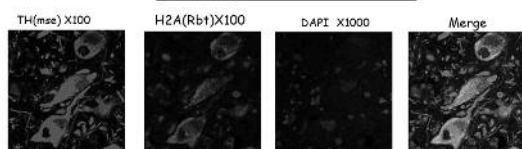
条件②

Buffer は、10mM クエン酸ナトリウムを使用、PH は 6.0、抗原賦活化として圧力鍋を使用し 3 分加圧、核染色は DAPI を用いて免疫蛍光染色を行った。その結果、細胞質マーカーの TH の染色性は良好で、大細胞も綺麗に染色されていたが、核のマーカーである H2A は核を染色できなかった。DNA プローブである DAPI の染色も全く確認されなかった。そこで、賦活化条件をもっと強くしてみることにした。(図 3)

図 3

条件②

Buffer	10mM クエン酸ナトリウム
PH	PH6.0
加熱処理	圧力鍋 3min 加圧
核染色	DAPI



結果

細胞質(TH)	○ 大細胞○
核(H2A)	×
DNAプローブ(DAPI)	×

➡ 賦活化条件が弱いので、核内まで染色できないのでは？

条件③

Buffer は、10mM クエン酸ナトリウム、1mM EDTA を使用、PH は 6.0、抗原賦活化として圧力鍋を使用し 10 分加圧、核染色は DAPI を用いて免疫蛍光染色を行った。その結果、細胞質マーカーの TH の染色性は良好

で、大細胞も綺麗に染色されていた。核のマーカーである H2B は核膜が染色されたが、核内までは染色できなかった。DNA プローブである DAPI の染色は変わらず確認されなかった。このことより、さらに賦活化条件をもっと強くしてみることにした。(図 4)

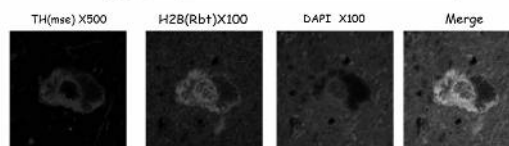
条件④

Buffer は、10mM クエン酸ナトリウム、1mM EDTA を使用、PH は 6.0、抗原賦活化として圧力鍋を使用し 20 分加圧後、賦活化溶液 L.A.B solution を 60℃ 30min 反応させた。核染色は DAPI を用いて免疫蛍光染色を行った。その結果、細胞質マーカーの TH の染色性は良好で、大細胞も綺麗に染色されていた。核のマーカーである H2B は核膜や、細胞質が染色されたが、核内までは染色することができなかった。一方、DNA プローブである DAPI の染色は小細胞では核が染色されたが、大細胞は染色することができなかった。賦活化条件をきつくしたことで、DAPI は小細胞を染色することができたため、さらに超音波洗浄機の賦活化反応をプラスしてみることにした。(図 4)

図 4

条件③

Buffer	10mM クエン酸ナトリウム, 1mM EDTA
PH	PH6.0
加熱処理	圧力鍋 10min 加圧
核染色	DAPI



結果

細胞質(TH)	○ 大細胞○
核(H2B)	△ (核膜○)
DNAプローブ(DAPI)	×

➡ 賦活化条件がまだ弱かったか？

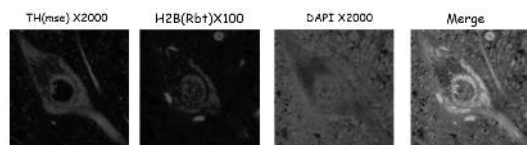
条件⑤

Buffer は、Tris-HCL、1mM EDTA を使用、PH は 9.0、抗原賦活化として圧力鍋を使用し 20 分加圧後、超音波 RT 1hr 反応させた。核染色は DAPI を用いて免疫蛍光染色を行った。その結果、細胞質マーカーの TH の染色性は良好で、大細胞も綺麗に染色されていた。核のマーカーである H2B は核膜の染色性は良好で、一部核内も染色されている細胞が観察された。DNA プローブである DAPI の染色は小細胞では核が染色され、大細胞は一部の細胞は染色できた。納得のいく染色性まであと少しと感じた。(図 5)

図 5

条件⑤

Buffer	Tris-HCL, 1mM EDTA
PH	9.0
加熱処理+sonication	圧力鍋 30min 加圧+超音波 RT 1hr
核染色	DAPI



結果

細胞質(TH)	○ 大細胞○
核(H2B)	△ (核膜 ○、一部核内あり)
DNAプローブ(DAPI)	△ (小細胞○ 大細胞△ 核内核も)

58回目で、
いよいよ
finishが近
いぞ !!!

まとめ

- ① PD 患者中脳 FFPE 剖検標本を、脱パラフィン後 24 種類の抗原賦活化処理を実施した。
- ② 核染色液は計 5 種類を検討した。
- ③ Sonication を用いたオリジナル染色方法も試みた。
- ④ 現在まで 74 回試みたが、まだ満足いく核染色には至っていない。
- ⑤ 今後は別の条件も考慮し、100 回になるまでには必ず染め上げたい。

引用文献

- 1) Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, et al Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. Hum Mol Genet, 2006;15: 883-895.