

細胞膜および細胞核蛋白抗原に対する市販一次抗体を用いた免疫組織化学の至適条件の検討

関 貴行

文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

要旨

近年の免疫組織化学（Immunohistochemistry, IHC）は安定した条件が確立されてきたが、市販抗体を用いる場合、その抗体メーカーの推奨条件に準じて作成した標本は必ずしも満足のいく染色感度を示さない場合がある。今回は抗原賦活処理の強度、抗原抗体複合体の検出系（標識ポリマー系二次抗体、avidin-biotin peroxidase complex（ABC）法）、および抗体希釈濃度を様々な条件に振り分け、完成した各標本の染色性を評価することで至適条件の決定を試みた。組織切片には固有胃粘膜（胃底腺領域）を用意し、上皮性細胞膜抗原の E-cadherin および細胞核内抗原の Ki-67 に対する一次抗体（共に DAKO 社）を用いた。E-cadherin に対する IHC では、強い熱処理による抗原賦活、高 pH 系賦活用緩衝液の使用、および ABC 法による検出でより高感度の染色標本を得られた。さらに高感度標本においても明らかなバックグラウンド染色性は確認されなかった。Ki-67 に対する IHC においても同様の条件で感度の増強が可能であったが、ABC 法を用いた場合では強いバックグラウンド染色性が出現する場合があった。最終的に両抗原に対する IHC において、800 倍希釈抗体液を用いて良好な染色標本を得ることができた（メーカー推奨条件では 50-100 倍抗体希釈液使用）。抗体メーカーの推奨条件を基本に至適条件を検討することは実際の症例切片における IHC を行う前に必須の作業であると考えられる。各一次抗体の特徴を把握および考慮し、経済的かつ最もコントラストの良い標本を得られるように工夫すべきである。

キーワード

免疫組織化学, 抗原賦活処理, バックグラウンド染色性, avidin-biotin peroxidase complex 法, 標識ポリマー系二次抗体

1. 緒言

病理学的検査および病理診断において最も重要な事は、一般染色としてのヘマトキシリン-エオジン（hematoxylin-eosin, HE）染色標本の作製とその標本観察による形態学的変化の把握である。そして必要および目的に応じて特殊染色が補助的に行なわれる。特殊染色は特定の物質や細胞を染め出す手段として有用であり、目的に応じて実に多様な特殊染色が開発されてきた。

しかしながら現在ではかつてほど特殊染色を頻繁に用いることが少なくなり、一部の特殊染色は行なわれない状態である。特殊染色によって行なわれてきた特定の物質や細胞の同定の多くを、免疫組織化学（immunohistochemistry, IHC）が取って代わったからである。IHC は抗原抗体反応を利用した方法で、同定した

い物質とそれに反応する抗体を反応させ抗原抗体複合体を形成し、その部分に酵素や蛍光物質を標識して、酵素基質反応による発色または蛍光励起させることにより、物質の局在やその物質を有する細胞を可視化する手段である。

古くは直説法¹⁾と呼ばれる、物質（抗原）と反応する一次抗体に標識物質を付加した方法が行なわれてきたが、各抗原に対する抗体に逐一標識を施さなければいけないという大変な手間が必要であった。その標識の煩雑さを補う手段として開発されたのが間接法¹⁾である。間接法は一次抗体に対する抗体（二次抗体）に標識物質を付加することで標識の手間を軽減することを可能とした。さらに染色感度の増強を目的として間接法は改良され、peroxidase anti-peroxidase complex（PAP）法^{2, 3)}が開発された。peroxidase（POD）を複数分子（実際は3分子）標識する事を可能にし、問題であった感度不足を改善

する結果に至った。その後さらなる増感の目的で avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法^{2, 3)} が開発された。近年では標識ポリマー系二次抗体²⁾ とされるものが開発、市販され、病理検査部門においても一般的に使用されるようになってきた。これはアミノ酸ポリマーに標識酵素と Fab' にした二次抗体を結合させた標識ポリマーで、高感度および低いバックグラウンド染色性を実現した検出系である。代表的な製品として、シンプルステイン MAX-PO(ニチレイバイオサイエンス) や EnVision (DAKO 社) などがある。

上記のような検出系の進歩もさることながら、病理検査部門のみならず様々な研究において IHC が用いられるようになった大きな要因として、市販抗体の安定性が格段に良くなったことが挙げられる。過去にはホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた検討では IHC によって同定できない抗原が存在した。しかしながら現在市販されている抗体を用いた場合、適切な抗原賦活処理(熱や蛋白分解酵素によって、ホルマリン固定による蛋白質の架橋反応による抗原性の失活を改善する処理)を行えば十分な検出が可能である。

抗体販売メーカーのカatalogおよびホームページでは各メーカーの技術担当者により検討された、染色推奨条件というものに記載されている。新しい一次抗体を購入した場合、基本的にこの推奨条件に準じて検出を行なうが、抗体によっては十分な検出感度が得られない場合や非特異的反応および交差反応によるバックグラウンド染色性の出現により正しい評価が困難な場合もある。また、市販抗体は 1ml で平均数万円と非常に高価なものであるが、推奨条件において working solution とするための希釈倍率が低い場合もありコストパフォーマンスの悪い場合がある。

今回はメーカー推奨条件を基本として、抗原賦活処理の強度、抗原抗体複合体の検出系の違い、および抗体希釈濃度を様々な条件に振り分け標本作製し、十分な検出感度を呈し、かつコストパフォーマンスに優れた反応条件(以下、至適条件とする)を決定すべく検討を行なった。今回の検討では IHC のうち、特に酵素 (POD) 標識抗体法について検討した。

2. 材料と方法

2.1 組織切片

都立大久保病院において外科的に切除された胃組織検体のうち、本来の固有胃粘膜の状態がよく保たれている胃粘膜検体のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用意した。3 μ m 連続薄切切片を作製し HE 染色および IHC に用いた。薄切した組織切片は剥離防止の目的でシランコーティングガラス(武藤化学薬品)に貼り付けた。今回の検討に用いた組織検体の使用に関しては、大久保病院における倫理審査委員会の許可を得た(倫理番号 20-3-3)。また今回使用したブロックには切除の原因となった病変は含まれていなかった。

2.2 一次抗体

今回の検討には、上皮性細胞膜抗原の E-cadherin⁴⁾ および増殖細胞核内抗原の Ki-67⁵⁾ に対するモノクローナル抗体(マウス由来、共に DAKO 社)を用いた。各抗体のクローンおよび DAKO 社が推奨する IHC の条件を表 1 に示した。

2.3 免疫組織化学

組織切片を脱パラフィン、水洗後、抗原賦活用緩衝液に浸して熱による抗原賦活処理を行った。その後、過酸化水素加メタノールに 20 分間反応させて、内因性ペルオキシダーゼ活性を取り除いた。リン酸緩衝生理食塩水(phosphate-buffered saline, PBS, pH7.4)になじませた後、非特異的な反応のブロッキングを目的に、2.5% 正常馬血清(VECTOR)を組織片に滴下し湿潤箱に 15 分間放置した。続いて、一次抗体を湿潤箱内で 4℃ の条件下に置いて一晩反応させた。PBS で洗浄後、POD 標識ポリマー系二次抗体を用いる系では、シンプルステイン MAX-PO(ニチレイ)を滴下し、湿潤箱で 30 分間反応させ、その後、発色基質であるシンプルステイン DAB 溶液(ニチレイ)で 20 分間反応させ褐色から黒褐色に発色した。ABC 法を用いる系では、ABC kit(VECTOR)を用いて発色までの過程を行った。発色後の切片を PBS で洗浄して発色を止

表 1 検討に用いた一次抗体の clone およびメーカー推奨染色条件

抗体名	clone	メーカー推奨条件		
		抗体希釈倍率	抗原賦活処理	抗原賦活用緩衝液
抗 E-cadherin 抗体	NCH-38	50-100 倍	強い熱処理	低 pH 系緩衝液 (高 pH 系緩衝液使用で染色性改善)
抗 Ki-67 抗体	MIB-1	50-100 倍	強い熱処理	低 pH 系緩衝液

め流水水洗した。さらに、マイヤーのヘマトキシリンで3分間核染色を行い、10分間の色出し水洗の後、脱水、透徹、封入した。

2.4 抗原賦活条件の検討

- A. 賦活用緩衝液の pH：DAKO 社の示す処理法に準じ、低 pH 系抗原賦活液および高 pH 系抗原賦活液による抗原賦活処理を行った。低 pH 系賦活液として試薬より調製したクエン酸緩衝液 pH 6.0 (citrate buffer pH 6.0, CB 6.0) を、高 pH 系賦活液としてヒストファイン抗原賦活化液 pH 9 (HF 9.0, ニチレイバイオサイエンス) を用いた。また、CB 6.0 に水酸化ナトリウム水溶液を滴下し pH 6.5 に調整した CB を作製し (CB 6.5) 同様に賦活処理に用いた。
- B. 熱処理の強度：DAKO 社の示す処理法に準じ、通常の熱処理としてマイクロウェーブ (microwave, MW) を用いた熱処理を、強い熱処理としてオートクレーブ (Autoclave, AC) を用いた熱処理を行った。MW による処理は、まず組織切片を緩衝液に浸した状態で沸騰するまで加熱した。その後 1 分間のインターバルをおきながら 1 分間ずつ、計 5 分間沸騰状態で加熱した。AC による処理は、121℃ 20 分間行った。MW 処理および AC 処理の後、ドーズを水道水中に沈め 20 分間冷却した後に以降の行程を行った。

2.5 抗体希釈倍率の検討

各一次抗体を 50, 200, および 800 倍に希釈して用いた。

2.6 染色性の評価

染色性の評価基準を具体的に表 2 に示す。

- A. 染色感度：各抗体を用いた IHC において陽性となるべき細胞および組織における染色感度を 4 段階に区分して評価した。抗体添付のデータシートに準じ、

E-cadherin は上皮細胞の細胞膜における発現を評価した。Ki-67 は固有胃粘膜においてはその腺頸部の一部の細胞の細胞核に発現が観察されることが報告されている。低感度の染色標本において陽性となるべき細胞がどの程度の比率で染色されているか判断不能であったため、全ての標本を観察した上で一部相対的に評価した。

- B. バックグラウンド染色性：非特異的および交差反応による、目的以外のバックグラウンド染色性の程度を 3 段階に区分して評価した。

2.7 その他の組織所見

上記以外に、熱処理による組織変化やヘマトキシリンの染色性の低下などが観察した。

2.8 至適条件の決定

上記の検討結果を総合的に判断し、各抗体を用いた IHC における至適条件を決定した。

3. 結果

今回の検討に用いた組織切片の HE 染色標本を図 1 に示す。

3.1 E-cadherin に対する IHC

染色結果の一部を図 2 に、標本観察による評価結果を表 3 に示す。

- A. 各抗原賦活処理による染色感度およびバックグラウンド染色性の違い：MW 処理に比較して AC 処理を行った場合で顕著な染色感度の増強が確認された。特に MW 処理にて染色した標本において、腺底部では十分な染色感度が確認できたのに対し (図 2c)、腺頸部および腺窩上皮の

表 2 染色性の評価

A. 染色感度の評価	
0：	陽性となるべき細胞および組織における染色性が確認されない。
1：	陽性となるべき細胞および組織において部分的な染色性が確認される。
2：	陽性となるべき細胞および組織のすべてが染色されているが、染色感度の不十分な領域が存在する。
3：	陽性となるべき細胞および組織のすべてが十分な感度をもって染色されている。
B. バックグラウンド染色性の評価	
0：	バックグラウンド染色性が確認されない。
1：	バックグラウンド染色性が確認されるが、評価目的の細胞および組織の観察を妨げない。
2：	評価目的の細胞および組織の観察を妨げるようなバックグラウンド染色性が確認される。

表3 E-cadherin に対する IHC の評価結果

検出系	賦活処理	賦活緩衝液	一次抗体希釈倍率		
			50 倍希釈	200 倍希釈	800 倍希釈
ポリマー系 二次抗体	MW	CB6.0	1/0	1/0	0/0
		CB6.5	2/0	1/0	1/0
		HF9.0	3/0	3/0	2/0
	AC	CB6.0	3/0	2/0	1/0
		CB6.5	3/0	3/0	2/0
		HF9.0	3/0	3/0	3/0
ABC 法	MW	CB6.0	2/0	2/0	1/0
		CB6.5	3/0	3/0	2/0
		HF9.0	3/0	3/0	3/0
	AC	CB6.0	3/0	3/0	3/0
		CB6.5	3/0	3/0	3/0
		HF9.0	3/0	3/0	3/0

セル内の表示: 染色感度の高さ / バックグラウンド染色性の強さ

MW: マイクロウェーブによる熱処理, AC: オートクレーブによる強い熱処理

CB6.0: クエン酸バッファー pH6.0, CB6.5: クエン酸バッファー pH6.5, HF9.0: ヒストファイン抗原賦活化液 pH9.0

一部で感度不十分な領域が確認される場合があったが (図 2d), AC 処理により改善された。さらに抗原賦活緩衝液の pH が高いほど染色感度の増強が確認された。またどちらの熱処理を行った場合でもバックグラウンド染色性は出現しなかった。

- B. 各抗原抗体複合体検出系による染色感度およびバックグラウンド染色性の違い:

標識ポリマー系二次抗体を用いた系に比較して, ABC

法による検出において顕著な染色感度の増強が確認された。またどちらの検出系を用いた場合でもバックグラウンド染色性はほとんど出現しなかった。

3.2 Ki-67 に対する IHC

染色結果の一部を図 3 に, 標本観察による評価結果を表 4 に示す。

- A. 各抗原賦活処理による染色感度およびバックグラウン

表4 Ki-67 に対する IHC の評価結果

検出系	賦活処理	賦活緩衝液	一次抗体希釈倍率		
			50 倍希釈	200 倍希釈	800 倍希釈
ポリマー系 二次抗体	MW	CB6.0	2/0	2/0	0/0
		CB6.5	2/1	2/0	1/0
		HF9.0	3/1	3/1	2/0
	AC	CB6.0	2/1	2/0	2/0
		CB6.5	3/1	3/1	3/0
		HF9.0	3/1	3/1	3/0
ABC 法	MW	CB6.0	2/1	2/1	2/0
		CB6.5	3/2	3/1	2/0
		HF9.0	3/2	3/2	3/1
	AC	CB6.0	3/1	3/1	2/1
		CB6.5	3/2	3/2	3/1
		HF9.0	3/2	3/2	3/2

セル内の表示: 染色感度の高さ / バックグラウンド染色性の強さ

MW: マイクロウェーブによる熱処理, AC: オートクレーブによる強い熱処理

CB6.0: クエン酸バッファー pH6.0, CB6.5: クエン酸バッファー pH6.5, HF9.0: ヒストファイン抗原賦活化液 pH9.0

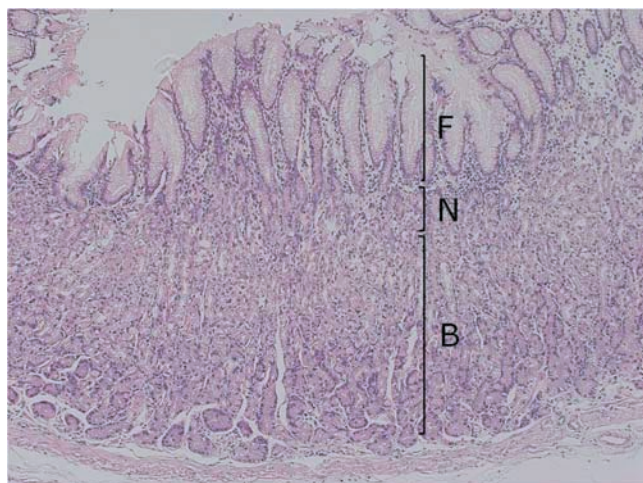


図1 今回の検討に用いた固有胃粘膜（胃底腺領域）

F: 腺窩上皮（foveolar epithelium）, N: 腺頸部（neck region）,
B: 腺体部 / 腺底部（glandular body/glandular base）

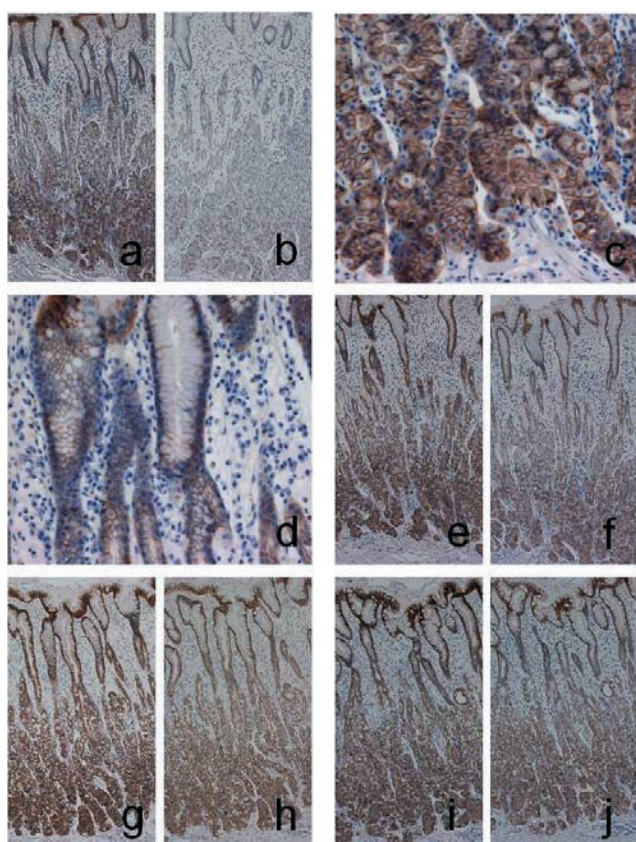


図2 条件別の E-cadherin に対する IHC の染色態度

(a, b) CB6.0 を用いた MW 処理の後、標識ポリマー系二次抗体で検出した場合。(a) 抗体希釈倍率 50 倍。(b) 抗体希釈倍率 800 倍。(c, d) 図 a の強拡大像。(c) 腺底部。(d) 腺頸部および腺窩上皮。(e, f) HF9.0 を用いた MW 処理の後、標識ポリマー系二次抗体で検出した場合。(e) 抗体希釈倍率 50 倍。(f) 抗体希釈倍率 800 倍。(g, h) HF9.0 を用いた AC 処理の後、標識ポリマー系二次抗体で検出した場合。(g) 抗体希釈倍率 50 倍。(h) 抗体希釈倍率 800 倍。(i, j) HF9.0 を用いた MW 処理の後、ABC 法で検出した場合。(i) 抗体希釈倍率 50 倍。(j) 抗体希釈倍率 800 倍。

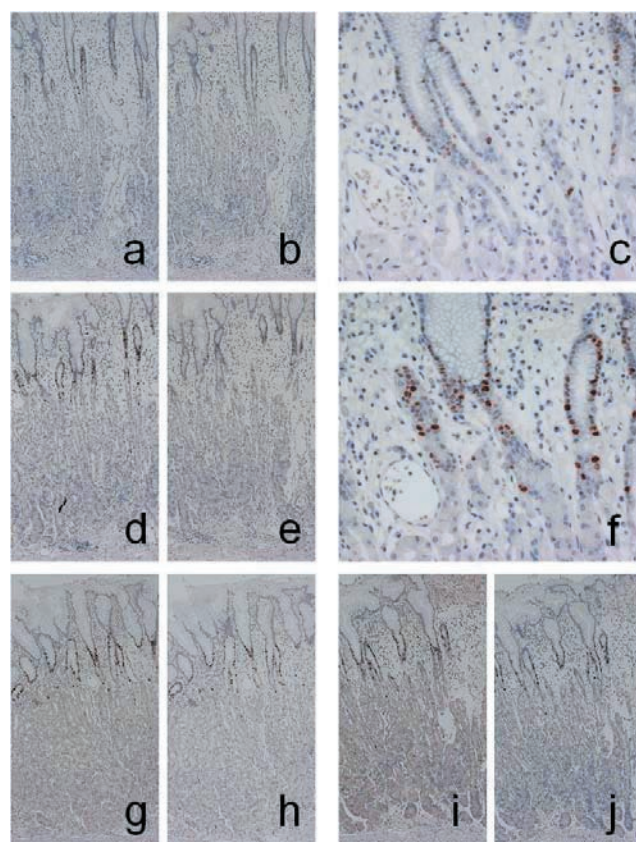


図3 条件別の Ki-67 に対する IHC の染色態度

(a, b, c) CB6.0 を用いた MW 処理の後、標識ポリマー系二次抗体で検出した場合。(a) 抗体希釈倍率 50 倍。(b) 抗体希釈倍率 800 倍。(c) 図 a の強拡大像。(d, e, f) HF9.0 を用いた MW 処理の後、標識ポリマー系二次抗体で検出した場合。(d) 抗体希釈倍率 50 倍。(e) 抗体希釈倍率 800 倍。(f) 図 d の強拡大像。(g, h) HF9.0 を用いた AC 処理の後、標識ポリマー系二次抗体で検出した場合。(g) 抗体希釈倍率 50 倍。(h) 抗体希釈倍率 800 倍。(i, j) HF9.0 を用いた MW 処理の後、ABC 法で検出した場合。(i) 抗体希釈倍率 50 倍。(j) 抗体希釈倍率 800 倍。

ド染色性の違い：

MW 処理に比較して AC 処理を行った場合で顕著な染色感度の増強が確認された。さらに抗原賦活緩衝液の pH が高いほど染色感度の増強が確認された。特に CB.6.0 を用いて賦活した場合では染色感度が低くヘマトキシリンの青藍色の色調が透けて観察されるものが存在したが (図 3c), HF9.0 を用いる事により染色性の観察される細胞数が増加し, 染色感度も増強した (図 3f)。しかしながら感度の増強と傾向を同じくしてバックグラウンド染色性の増強も確認された。特に粘膜下層に存在する血管壁においてバックグラウンド染色性が確認された。(図 4)

B. 各抗原抗体複合体検出系による染色感度およびバックグラウンド染色性の違い：

標識ポリマー系二次抗体を用いた系に比較して, ABC 法による検出において顕著な染色感度の増強が確認された。しかしながら ABC 法を用いた場合では血管壁におけるバックグラウンド染色性がほぼすべての条件において出現し, 抗原賦活緩衝液の pH を高くした場合では腺体部におけるバックグラウンド染色性が顕著に出現し, 目的とする陽性細胞と重なりをもって観察された (図 4)。

3.3 その他の組織所見 (共通)

HF 9.0 を用いた抗原賦活処理を行った標本において, 粘膜下層組織が若干の粗雑さを呈していたが, 明らかな組織構造の障害や観察を妨げるような組織切片の浮き上がりは確認されなかった。また, ヘマトキシリンの染色性は MW 処理よりも AC 処理の場合で, さらに抗原賦活緩衝液の pH が高くなるほどその染色性の低下が観察された。しかしながら, 後染色として不十分な染色性と判断される標本は確認されなかった。

3.4 至適条件の決定

抗 E-cadherin 抗体を用いた IHC の至適条件は, CB 6.5 を用いた AC による抗原賦活処理を行った上で 800 倍希釈の一次抗体を反応させ, ABC 法により検出することと決定した。抗 Ki-67 抗体を用いた IHC の至適条件も同様に, CB 6.5 を用いた AC による抗原賦活処理を行った上で 800 倍希釈の一次抗体を反応させ, ABC 法により検出することと決定した。今回決定した至適条件で行った場合の染色態度を図 5 に示す。

4. 考察

今回の検討によりメーカーの推奨条件はあくまで最低限の必要条件であり, 独自の検討によりさらなる改善が可能であることが示唆された。現在の市販抗体は非常に安定しており多数のメーカーが膨大な数の抗原に対する抗体を販売している状態であるが, それらは決して安価でなく効率的な実験計画の遂行のためにも標本作製におけるコストパフォーマンスの向上は必須であるといえる。

今回の検討では, 特に抗原賦活処理および抗原抗体複合体の検出系の工夫による染色感度の増強を目的とした。代表的な抗原賦活処理として, 蛋白分解酵素 (プロテアーゼ, トリプシン, ペプシン等) 処理や加熱 (MW, AC, 温浴) 処理がある⁶⁾。現在では熱処理によって多くの抗原賦活が可能であることが確認されており^{7, 8, 9, 10)}, 酵素処理よりも熱処理の方が日常的に選択されている。一般的に MW や温浴による処理を「通常の熱処理」とし, AC のように加圧でより高温の処理をした場合を「強い熱処理」と表現するが, 熱を強くかけた方が抗原賦活の効果も高いとされており¹¹⁾, 今回の検討結果もそれを支持するものであった。増感の目的から考えれば AC 処理が選択されるべきだが, MW と比較して処理時間がかかる (加熱開始から減圧して取り出せるまで, 約 2 時間) ため, 作業効率を優先する場合には MW を選択することも考慮しなければならない。MW 処理は家庭用の電子レンジで行うと加温ムラが起き染色の再現性が悪くなることが懸念されるため, できる限り温度調節機能のついた MW を用いるべきと考える。

抗原賦活処理の効果をもつ得るためには抗原賦活用緩衝液の選択も重要になってくる。CB 6.0 が最も一般的に使用されているが, 実際にその種類は多数に及ぶ⁶⁾。今回の検討では緩衝液の pH を高くするにつれて, 染色感度も増強される傾向が得られた。特に注目したいのは CB 6.0 に水酸化ナトリウム水溶液を加えて調整することで作製した CB 6.5 を用いた場合で, CB 6.0 からわずかに pH を高くしただけであるが明らかな抗原賦活効果の増強が確認されたことである。篠宮ら¹²⁾ もほぼ同様の検討結果を報告しており, 市販の高 pH 系緩衝液を購入し組織障害を懸念しながら使用するより, 経済的かつ安定であると考えられる。

標識ポリマー系二次抗体と ABC 法を比較した場合, ABC 法の方がより強い染色感度を得ることができたが, Ki-67 に対する IHC の場合では同時に明らかなバックグラウンド染色性が出現した。検出系の選択は抗体との相性を考慮し, より良いコントラストを得られるように工

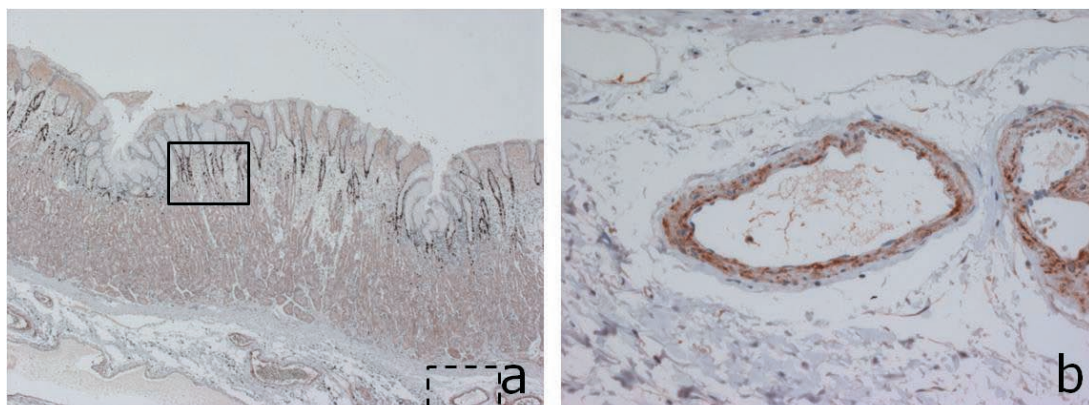


図4 Ki-67 に対する IHC において確認された強いバックグラウンド染色性

HF9.0 を用いた AC 処理の後, ABC 法で検出した場合. (a) 弱拡大像. (b) 図 a の点線部分 (血管). (c) 図 a の実線部分 (腺頸部).

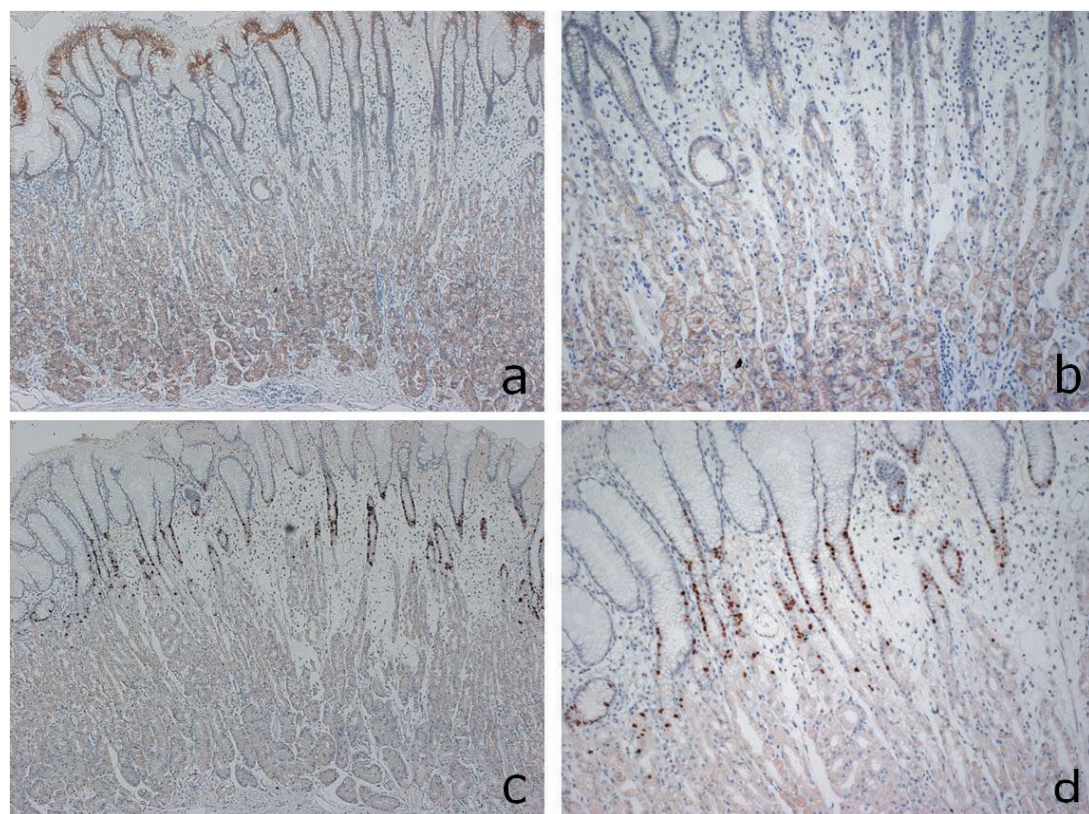
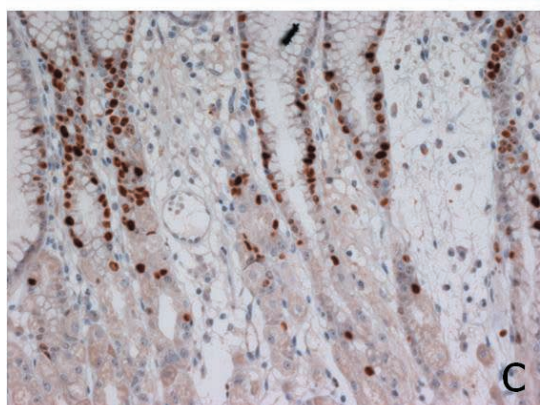


図5 今回の検討で決定した至適条件による染色態度

(a, b) E-cadherin に対する IHC. CB6.5 を用いた AC 処理の後, 800 倍希釈の一次抗体を反応させ, ABC 法で検出した場合. (a) 観察倍率 50 倍. (b) 観察倍率 200 倍. (c, d) Ki-67 に対する IHC. CB6.5 を用いた AC 処理の後, 800 倍希釈の一次抗体を反応させ, ABC 法で検出した場合. (c) 観察倍率 50 倍. (d) 観察倍率 200 倍.

夫すべきと考える。一次抗体に酵素や蛍光物質が標識された直説法から始まり、PAP法、ABC法とより感度を高めた検出法が確立されてきたが、近年ではさらに超高感度検出法として catalyzed signal amplification (CSA) 法¹³⁾ が用いられるようになった。CSA法はABC法の増感法であり、ビオチン化タイラミドが抗原抗体複合体付近に沈着することにより感度の増強を可能にしたものである。また VECTOR 社からは新たな POD 発色試薬として ImmPACT DAB (商品名) が販売された。これは基本の発色基質である DAB と共にナイロン繊維等を混合し発色時の増感を可能にしたものである。今回のような検討方法において CSA 法や ImmPACT DAB 試薬を用いた場合、よりコントラストの良い標本をさらに高い抗体希釈倍率で得られる可能性も考えられる。

抗体メーカーの推奨条件を基本に至適条件を検討することは実際の症例切片における IHC を行う前に必須の作業であると考えられる。各一次抗体の特徴を把握および考慮し、経済的かつ最もコントラストの良い標本を得られるように工夫すべきである。

5. 謝辞

本検討を行うにあたり使用した胃組織検体は、大久保病院病理部門の迫間隆昭先生のご好意によりいただいたものである。この場において深く御礼申し上げる。

引用文献

- 1) 名倉宏, 長村義之, 堤寛. 酵素抗体法の原理. “渡辺・中根 酵素抗体法” 東京: 学際企画, 2002 年. p.26-29.
- 2) 名倉宏, 長村義之, 堤寛. 高感度染色法. “渡辺・中根 酵素抗体法” 東京: 学際企画, 2002 年. p.136-162.
- 3) Elias JM, Margiotta MM, Gaborc D: Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods. *Am J Clin Pathol* 1989; 92: 62-67.
- 4) Shiozaki H, Tahara H, Oka H, Miyata M, Kobayashi K,

Tamura S, Iihara K, Doki Y, Hirano S, Takeichi M, Mori T. Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 1991; 139: 17-23.

- 5) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. *J Immunol* 1984; 133: 1710-1715.
- 6) 名倉宏, 長村義之, 堤寛. 酵素抗体法染色に際して行う前処理. “渡辺・中根 酵素抗体法” 東京: 学際企画, 2002 年. p.163-189.
- 7) Miller RT, Swanson PE, Wick MR. Fixation and epitope retrieval in diagnostic immunohistochemistry: A concise review with practical considerations. *AIMM* 2000; 8: 228-235.
- 8) Cattoretti G, Suurmeijer AJH. Antigen unmasking on formalin-fixed paraffin-embedded tissues using microwaves: a review. *Adv Anat Pathol* 1995; 2: 2-9.
- 9) Taylor CR, Shi S-R, Cote RJ: Antigen retrieval for immunohistochemistry. Status and need for greater standardization. *Appl Immunohistochem* 1996; 4: 144-166.
- 10) Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future. *J Histochem Cytochem* 1997; 45: 327-343.
- 11) Taylor CR, Shi S-R, Chen C, Young L, Yang C, Cote RJ. Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave and pressure cooker, autoclave, and steamer. *Biotech Histochem* 1996; 71: 263-270.
- 12) 篠宮克彦, 細田周二, 根本充弘, 野呂昌弘, 秋草文四郎, 濱川真治. 免疫組織化学における前処理 (抗原賦活化処理) の検討 リンパ球関連抗原を中心に. *医学検査. (Jpn J Med Tech)* 2001; 50: 166-173.
- 13) Adam JC. Biotin amplification of biotin and horseradish peroxidase signals in histochemical stains. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 1457-1463.

Examination of the Optimal Conditions for Immunohistochemistry with Antibodies against Cellular Membrane and Nuclear Proteins on the Market

Takayuki Seki

Department of Clinical Laboratory Medicine, Faculty of Health Science Technology,
Bunkyo Gakuin University

Abstract

Recommended conditions by manufactures for usage of primary antibodies are sometimes insufficient in the staining sensitivity in immunohistochemistry (IHC). I performed IHC with commercial antibodies against cellular membrane (E-cadherin) and nucleus (Ki-67) with various procedures modified from the recommended conditions to determine the optimal conditions. Tissue sections were heated by microwave (standard procedure) or autoclave (strong procedure) in lower pH buffer (pH 6.0 or pH 6.5) or higher pH buffer (pH 9.0) for antigen retrieval. Antigen-antibody complexes were detected by labeled polymer or avidin-biotin peroxidase complex (ABC) method. Heating by autoclave, and heating in higher pH buffer were more sufficient for antigen retrieval. While there was strong background staining on tissue section in a condition using ABC method, ABC method could show better staining sensitivity than labeled polymer. Finally, I could performed IHC with good staining sensitivity, even using $\times 800$ antibody diluent (recommended condition by the manufacture: $\times 50-100$). Examination of the optimal conditions of IHC is necessary not only for good staining sensitivity as well as economical way.

Key words —— immunohistochemistry, antigen retrieval, background staining, avidin-biotin peroxidase complex method, labeled polymer

Bunkyo Journal of Health Science Technology vol.2: 1-9