

Dipeptidyl (amino) peptidase IV (DAPIV, DPPIV, CD26) 活性染色法

塗抹(凍結切片)・冷風乾燥 → 固定 → 反応 → 核染 → 封入

1) 塗抹標本、捺印標本、凍結切片などを冷風で乾燥させる。

- * DPPIVは、比較的安定な酵素である。未固定標本は室温に3日間位放置可能。
- * 長期保存する場合は、未固定標本をシャーレなどに入れビニールテープで密封してフリーザー中に保存すれば数ヶ月は可能。フリーザーから出した標本は、完全に室温に戻してから封を開ける。すぐに開けると露で細胞が崩壊する。

2) 30~60秒固定する。

- * 固定液は、ホルマリン: PBS: 冷アセトン $1:35:15$ に混合したもの。
- * 固定液は、アセトンとホルマリンをベースにしたものであれば混合比は多少異なっても良い。例えば、血液細胞のエステラーゼ染色キットのホルマリン・アセトン・緩衝液なども可。
- * DPPIVはアルコールで失活するので、アルコールを含む固定液は不可。
- * 固定液は、使用時に新調する。
- * アセトンは常時、フリーザー内で冷やしておく(-20~30度)。
- * ポイントは、冷たい固定液中で、短時間(60秒以内)固定すること。

3) 室温で約30分間、反応させる。

- * 固定後、流水で20~30秒水洗し反応液を載せる。
- * 反応液の必要量は、一枚の標本あたり約1ml前後。
- * 反応は、37°Cでも良いが術中迅速への応用等を考え室温反応としている。
- * 活性の強い標本は、反応液を載せて数分以内に肉眼でみえる位に赤く発色するので、その時点で判定しても良い。最終的には30分間反応させる。

4) 核をヘマトキシリンで染める。

- * 20~30秒間、流水で洗った後、カラッチのヘマトキシリンで5分間核染する。
- * ヘマトキシリンは、アルコールを含まないものを用いる。

5) 封入する。

- * 水洗、乾燥後、グリセリン・ゼラチンなど水性の封入剤で封入する。
- * 反応生成物は、アルコールやキシレンで退色するので注意。
- * 標本にキズがつくことを恐れなければ封入は省いても良い。

6) 判定・評価

- * 陽性細胞は、細胞質が赤く染色される。染色所見の詳細は、別紙を参照。

試薬の準備

必要な試薬類

- A) 基質(Glycyl-prolyl-4-methoxy- β -naphthylamide ,Sigma, G9137)
- B) N-N dimethyl formamide (半井)
- C)アゾ色素(Fast blue BN : o-Dianisidine, Tetrazotized, Sigma, D9805)
- D) pH7.2, 0.1Mリン酸緩衝液

試薬の準備

*1回に使う基質とアゾ色素は、それぞれ約6mg ,約12mg。これをその都度、秤量するのは面倒なので何回分かまとめて準備しておく。

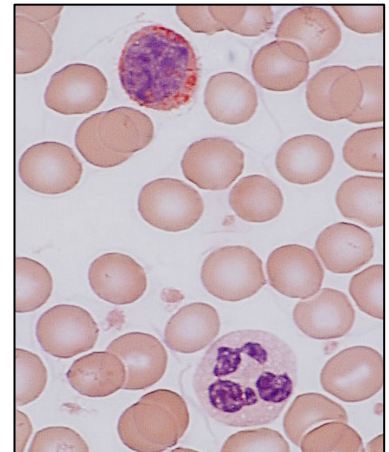
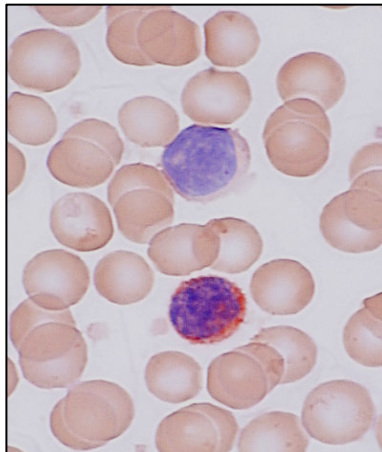
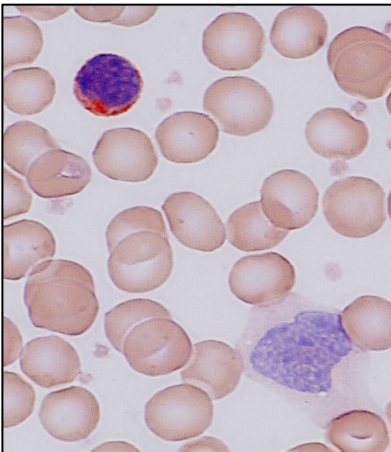
- A) 基質(Glycyl-prolyl-4-methoxy- β -naphthylamide)の250mg入り一瓶を8.3mlのN-N dimethyl formamide(原液) で溶かし、その0.2mlずつをstock-tube に分注し、フリーザーにストックする(約40回分、約400枚分)。
- B) アゾ色素(Fast blue BN)も 500mg を10mlの75% N-N dimethyl formamide (水で75%に希釈したもの)で溶かし、0.25mlずつstock-tubeに分注しフリーザーにストックする (約40回分)。

反応液の作り方

1. Aの基質(0.2ml)に2mlの緩衝液を加え転倒混和する。
 2. Bのアゾ色素(0.25ml)に2mlの緩衝液を加え転倒混和した後、15~20ml入るキャップ付き試験管に移し、これに緩衝液6mlを加え混和する。
 3. 2の試験管に1の基質を加え、激しく15~20秒間混和したもの(約10ml)を反応液とする。
- * 反応液は使用の都度新調する。

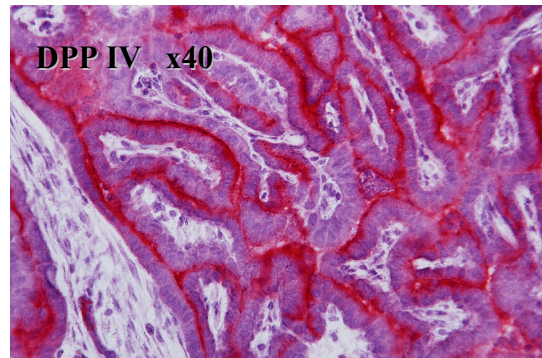
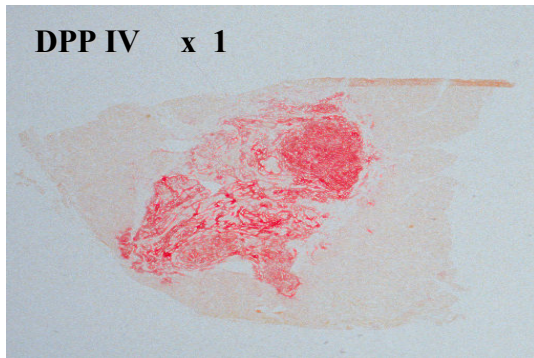
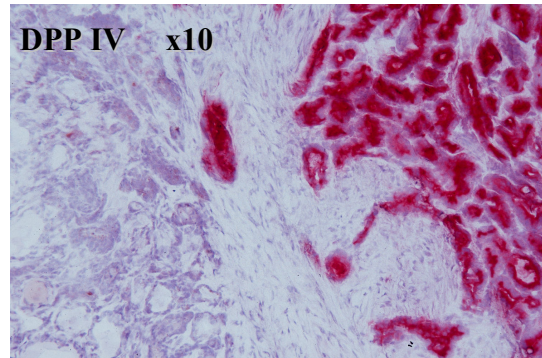
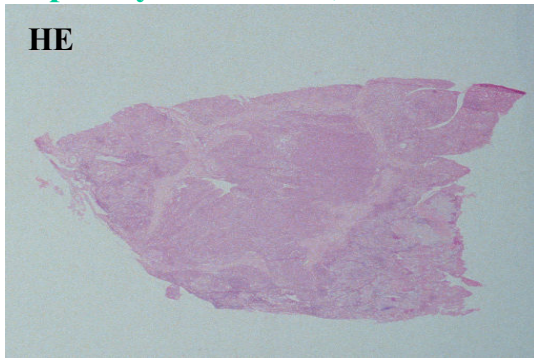
染色性のチェック

染色手技が適当であったか否かの判定は、例えば下図のようにリンパ球が陽性であることを確認する。リンパ球の20-30%がDPPIV陽性。単球や好中球は陰性~弱陽性。



染色例 1

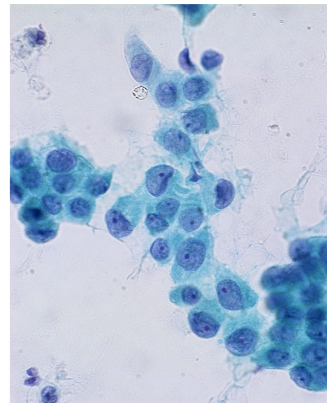
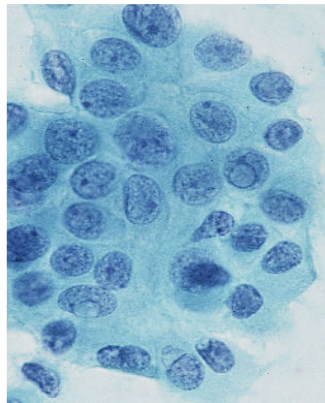
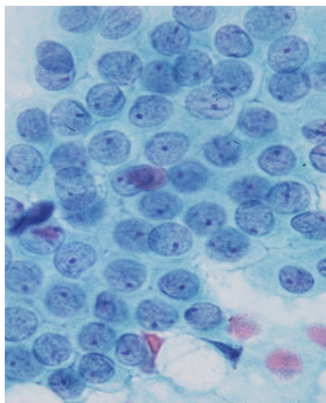
Papillary carcinoma, Frozen



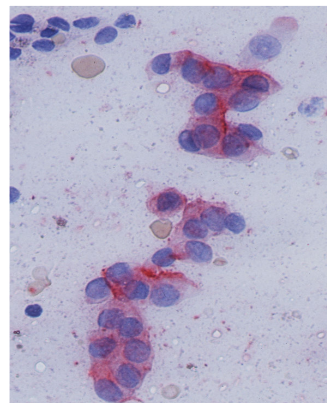
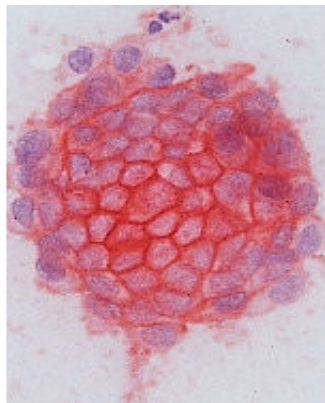
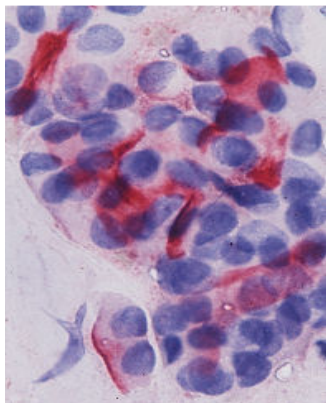
乳頭癌の多くの症例は、反応液を載せてすぐに(2-3分以内に)肉眼で見える位に赤く発色する。

Papillary carcinoma, Cytology

Pap.



DPP IV



Case 1

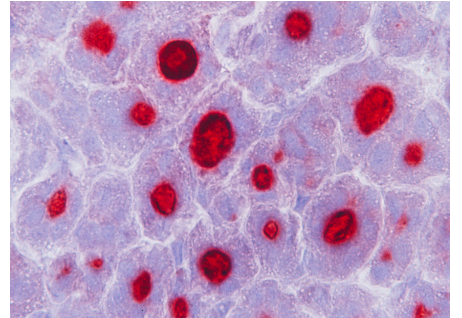
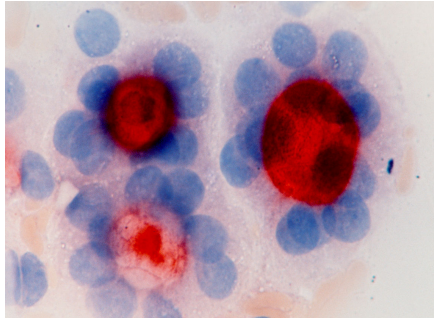
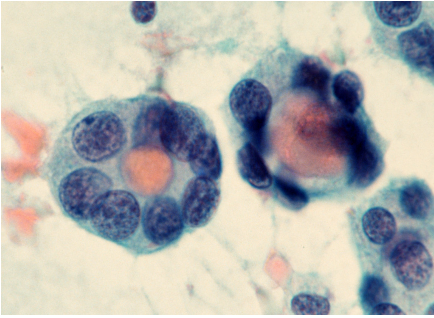
Case 2

Case 3

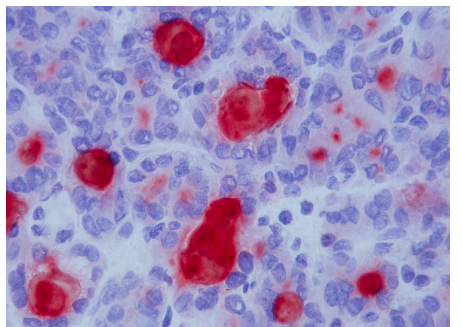
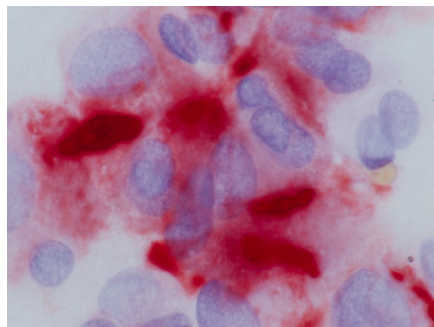
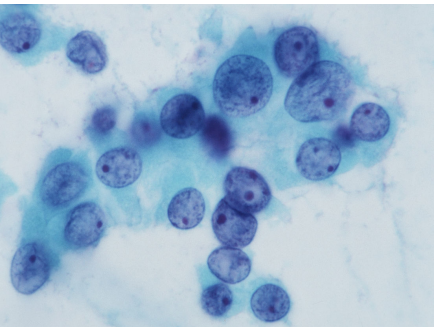
Pap.

DPP IV, cytology

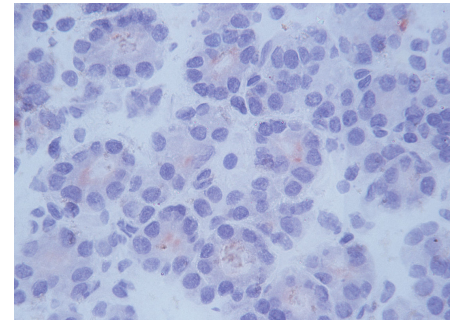
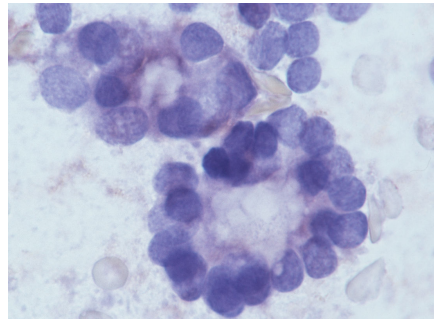
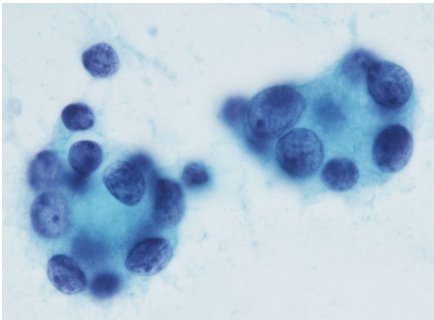
DPP IV, frozen



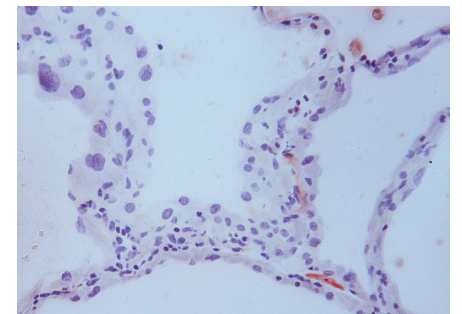
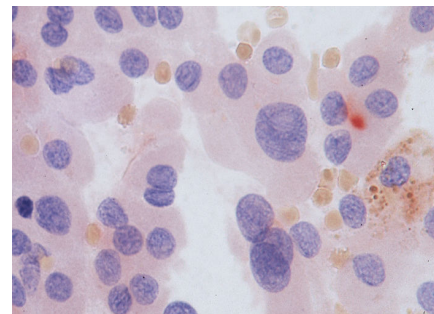
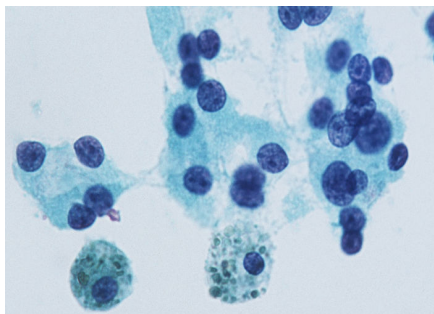
Follicular carcinoma, Case 1



Follicular carcinoma, Case 2



Follicular adenoma



Adenomatous goiter