

～表面脱灰が免疫染色に与える影響～

日本大学医学部病態病理学系病理学分野
尾花ゆかり、根本則道

<はじめに>

パラフィンブロックの薄切中に、切片にメス傷ができたり裂けてしまったりして良好な切片が得られず、石灰化物の存在に気づくことがある。そのような時は、脱灰液を含ませたガーゼやペーパーをパラフィンブロックの薄切面に直接当てて浸す表面脱灰*を行って石灰化物を除去し、薄切する。緊急処置であるため、迅速な脱灰ができる酸性脱灰液が主に用いられる。

一般的に脱灰というと、骨髄生検などに対して行われるパラフィン包埋の前処理のことを指す。その場合、酸性脱灰液を用いると染色性が低下することが知られている。表面脱灰（ブロック脱灰ともいう）というパラフィン包埋後のブロックに対する処置が免疫染色にどのような影響を与えるかについてはあまり知られていない。

ここでは、表面脱灰後の薄切切片の、免疫染色性について述べる。

*表面脱灰とは

薄切中に石灰化物に気づいた場合に緊急で行われる脱灰処置のこと。
病巣内微小石灰化物や結石などが対象となる。

◎脱灰と染色性

酸性脱灰液を用いた脱灰は、染色性を低下させることが知られている。H&E 染色ではヘマトキシリンの染色性が低下し、免疫染色でも長時間脱灰のような過度の操作により免疫染色性が減弱することが知られている。酸性脱灰液の基本となるギ酸や塩酸などの酸類は、短時間で脱灰を可能にするだけでなく、低コストであることから日常的に汎用されるが、その後に行う H&E 染色や免疫染色への影響を考慮して、多少時間はかかるが染色性への影響が少ない EDTA をベースとした中性脱灰液を選択することもある。なお、表面脱灰の場合は、緊急処置であるので迅速脱灰が可能な酸性脱灰液を用いる。

<表面脱灰と免疫染色>

1) 表面脱灰に用いられる代表的な脱灰液

① プランクーリクロ

組成はギ酸 50ml、濃塩酸 85ml、塩化アルミニウム ($\text{AlCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 70g、蒸留水 1,000ml。

- ・ギ酸、塩酸の単独使用は有毒ガスを発生するので推奨できない。
- ・無水の塩化アルミニウムを直接水に溶かすと発熱が激しく爆発するため、間違わないように注意する。

② K-CX (株式会社ファルマ)

2) 表面脱灰の手技

ガーゼあるいはペーパーに脱灰液を十分に含ませ、荒削りしたパラフィンブロックの薄切面に直接当てて脱灰する方法で、パラフィンブロックのサイズにペーパーを折って脱灰液を含ませ薄切面に置く方法や、シャーレなどの容器にペーパーを敷いて脱灰液を注ぎ、薄切面を下にして脱灰液に浸ける方法などがある。(酸は腐食性があるため金属容器は避ける。)

3) 表面脱灰が免疫染色に与える影響

本テーマを目的に行った我々の実験およびその結果を紹介する。

<材料と方法>

材料は、Ki-67、PgR、E-cadherin の免疫染色に陽性の乳癌手術検体と、HER2 タンパク陽性染色像がスコア 3 であると判定された乳癌手術検体、TTF-1 および CK7 の免疫染色に陽性の肺腺癌手術検体のホルマリン固定パラフィンブロックを用いた。

方法は、まず通常通りに薄切をして切片を得る（以下、未処理切片）。次に脱灰箇所があると想定して迅速脱灰液であるプランクローリクロ液を十分に含ませたキッチンペーパーをパラフィンブロックの薄切面に直接置いて脱灰し、軽く水洗、その後 2 枚ほどの切片を切り捨てて薄切した切片を脱灰処理切片とした。

なお、脱灰の処置時間は 15 分、30 分、1 時間、3 時間とし、それぞれ未処理切片と脱灰処理切片を作製した。HER2 に対しては、さらに脱灰処理時間を延長して 4℃一晩の脱灰処理切片も作製し検討した。

その後、ヒストステイナー（ニチレイバイオサイエンス）を用いて Ki-67、PgR、HER2、E-cadherin、TTF-1、CK7 の免疫染色を行い、脱灰処理後の染色標本を未処理切片の染色性をコントロールとして、免疫染色性を比較検討した。

検討に使用した抗体

- ・抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体 (SP1) ニチレイバイオサイエンス
- ・抗 PgR マウスモノクローナル抗体 (PgR636)
- ・抗 HER2 ヒストファイブ HER2 キット (POLY) ニチレイバイオサイエンス
- ・抗 E-cadherin マウスモノクローナル抗体 (NCH-38)
- ・抗 TTF-1 マウスモノクローナル抗体 (SPT24) ニチレイバイオサイエンス
- ・抗 CK7 マウスモノクローナル抗体 (OV-TL12/30)

<結果>

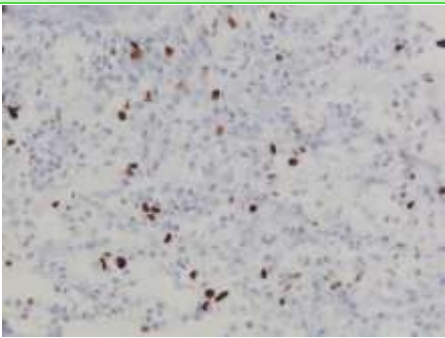
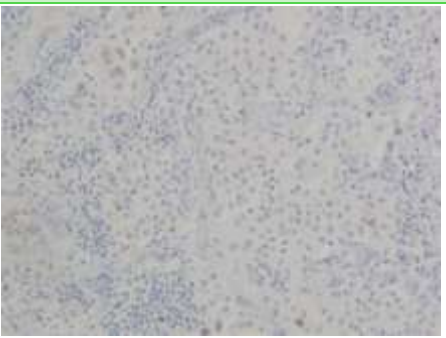
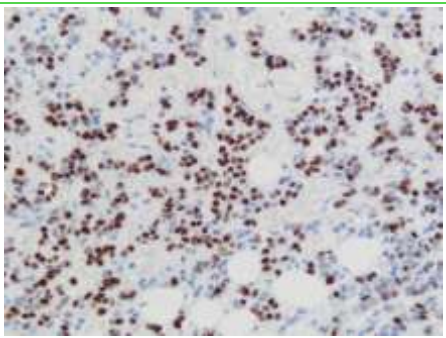
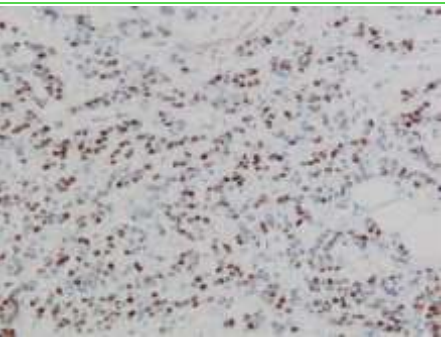
各々の免疫染色において、未処理切片と脱灰処理切片における染色性は、15 分、30 分、1 時間の脱灰処理では明らかな差異は認めなかった。

しかし、3 時間の脱灰処理切片における免疫染色では、明らかな DAB 発色の減弱やヘマトキシリンの染色性の低下が確認された。

とくに Ki-67 は DAB 発色が著しく減弱し、偽陰性化を示した (図 1)。

PgR、E-cadherin、TTF-1、CK7 でも、DAB 発色強度の減弱がみられた (図 2、3、4)。とりわけ CK7 では一部に不染部分が見られ、不均一な染色性を示した (図 5)。

HER2 では、4℃一晩での表面脱灰処理で染色性は著しく減弱し、判定スコアは 1+を示した (図 6)。

| | 未処理 | 表面脱灰 3 時間 |
|---|---|--|
| 図 1 MIB-1 ×400 乳癌手術検体における MIB-1 の免疫染色 |  |  |
| 図 2 PgR ×400 乳癌手術検体における PgR の免疫染色 |  |  |

| | 未処理 | 表面脱灰 3 時間 |
|--|-----|-----------|
| 図 3 E-cadherin ×400 乳癌手術検体における E-cadherin の免疫染色 | | |
| 図 4 TTF-1 ×400 肺腺癌手術検体における TTF-1 の免疫染色 | | |
| 図 5 CK7 ×200 肺腺癌手術検体における CK7 の免疫染色 | | |
| | 未処理 | 表面脱灰 4℃一晩 |
| 図 6 HER2 ×400 乳癌手術検体における HER2 の免疫染色 | | |

<まとめ>

パラフィンブロックにおける表面脱灰操作が、免疫染色にどのような影響をもたらすかについて検討した結果、今回用いた 6 種の抗体に関しては 1 時間までの表面脱灰操作であれば、未処理切片に劣らぬ陽性染色を確認することができた。しかし、表面脱灰時間が 3 時間に及ぶと、6 種すべての抗体を用いた免疫染色において DAB 発色は減弱し、とくに Ki-67 では陽性率が著しく低下した。脱灰時間を一晩 4℃まで延長した HER2 では染色強度が著しく減弱し、判定スコアは 3+から 1+に評価する結果となった。

酸を用いた脱灰は、H&E 染色において核染色であるヘマトキシリンの染色性を低下させることから、核内抗原である PgR や TTF-1、Ki-67 の染色結果をみると、PgR と TTF-1 は脱灰により染色性が低下するものの、陽性率に影響を与える程度ではないのに対し、Ki-67 は偽陰性化するほどの著明な染色性の低下を示した。この結果、表面脱灰の影響は、抗原の局在 (Cellular

localization) だけに依存するものではないと考えられる。

従って、表面脱灰は1時間までとすることが免疫染色の精度管理の上で非常に重要であると考ええる。

今回検討に用いた乳癌組織や肺癌組織は、日常薄切中に石灰化物に遭遇することが多い検体である。免疫染色結果は、組織型推定のほか、診断・治療に直接関与する項目が多く、表面脱灰の影響を正しく理解しておくことが必要である。表面脱灰の影響が染色性にもっとも表れた Ki-67 は、腫瘍の悪性度や予後とよく相関する細胞増殖マーカーとして有用であり、その標識率 (Label Index) は予後推定に大きく関与するため、表面脱灰時間を厳守する必要がある。

また、脱灰時間だけでなく、手技においても工夫することは可能であり、薄切困難をきたした石灰化物の場所が特定できれば、ブロック全面を迅速脱灰液に浸す方法ではなく、スポイトや注射針などを用いて石灰化物のみに迅速脱灰液をピンポイントで滴下する方法も有効である。

<おわりに>

表面脱灰が免疫染色に与える影響について述べた。表面脱灰は最長1時間までとし、脱灰が必要な部分のみに表面脱灰を施すことで、免疫染色に与える影響を最小限にすることができると考える。

また、免疫染色の精度管理を行う上で、正しい表面脱灰操作はきわめて重要である。