

原 著

プリオン不活化のための蟻酸処理が免疫組織化学の染色性に及ぼす影響

¹東京女子医科大学病理診断科²東京女子医科大学医学部病理学（第一）

ヤマモト	トモコ	カトウヨウイチロウ	ヒロイ	アツコ	マスダ	アキヒロ
山本	智子 ^{1,2}	加藤陽一郎 ²	廣井	敦子 ^{1,2}	増田	昭博 ^{1,2}
サワダ	タツオ	シバタ	ノリユキ	ニシカワ	トシオ	
澤田	達男 ^{1,2}	柴田	亮行 ^{1,2}	西川	俊郎 ¹	

(受理 平成26年1月24日)

Use of Formic Acid for Prion Inactivation Influences Staining Intensity in Immunohistochemical Techniques

Tomoko YAMAMOTO^{1,2}, Yoichiro KATO², Atsuko HIROI^{1,2}, Akihiro MASUDA^{1,2},
Tatsuo SAWADA^{1,2}, Noriyuki SHIBATA^{1,2} and Toshio NISHIKAWA¹

¹Department of Surgical Pathology, Tokyo Women's Medical University²Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine

Neuropathological examinations are indispensable for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), an infectious prion disease. Immunohistochemistry performed using various primary antibodies is required for diagnosing CJD, especially when it needs to be differentiated from or associated with other diseases. During formalin fixation, prions are believed to be inactivated by tissue immersion in formic acid after sectioning. However, formic acid has been known to influence immunohistochemical results. Here, we show that formic acid treatment tends to decrease staining intensity and that the extent of this variation depends on the primary antibodies used. For example, staining intensity decreased prominently in tissues treated with anti-Ki-67 antibody. Higher temperature, smaller specimens, and longer immersion times also influenced the outcome of immunostaining. Staining intensity was found to be relatively preserved in the cerebrum, compared to other organs. In conclusion, we show that the results of immunohistochemistry performed after formic acid treatment should be evaluated carefully.

Key Words: prion, prion inactivation, formic acid, immunohistochemistry

緒 言

プリオン病は、プリオンが病因と考えられる感染性疾患である。大部分は孤発性 Creutzfeldt-Jakob 病 (sporadic CJD: sCJD) に分類されるが、その他にも、Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病などの家族性のもの、硬膜移植後や脳下垂体ホルモン製剤投与後に発生するもの、variant CJD (vCJD) といわれる牛海綿状脳症に伴うもの、ニューギニアの kuru などがある。

プリオン病の確定診断には、中枢神経系の病理学的所見が重要であるが、プリオンは、通常の滅菌、消毒では失活しないことが知られている^{1)~3)}。病理学分野では、剖検や手術、生検などにより得られた

検体の扱いも問題となる。ホルマリン固定検体においては、切り出した組織を蟻酸に浸漬することで、プリオンが不活性化するとされている¹⁾²⁾。一方、確定診断のつかない症例や、合併疾患の存在する症例など、プリオン蛋白に対する免疫組織化学染色以外に、種々の免疫染色が必要となることも想定されるが、蟻酸処理がこれらの染色性に影響を及ぼす可能性があるため、この点に関して検討を行った。非 CJD 成人剖検例 2 例の、ホルマリン固定後の大脳、扁桃、心筋、肺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、小腸を 98% 蟻酸に浸漬した後、免疫組織学的染色を施行し、非浸漬標本との比較を行った。また、切片の大きさや蟻酸浸漬時間、温度による違いも検討した。

Table 1 Primary antibodies used in this study

Antibody	Clone	Dilution	Source
GFAP	Code No. Z 0334, rabbit, polyclonal	1 : 1000	DAKO, Glostrup, Denmark
S-100 protein	Code No. Z 0311, rabbit, polyclonal	1 : 800	DAKO
Synaptophysin	Code No. A 010, rabbit, polyclonal	1 : 200	DAKO
Neurofilament	Clone 2F11, mouse, monoclonal	1 : 100	DAKO
Keratin	Clone AE1/AE3, mouse, monoclonal	1 : 50*	DAKO
EMA	Code No. M 613, mouse, monoclonal	1 : 100	DAKO
CD20	Clone L26, mouse, monoclonal	1 : 500	DAKO
CD45RO	Clone UCHL-1, mouse, monoclonal	1 : 500	DAKO
CD34	Clone QBEnd/10, mouse, monoclonal	1 : 50*	Novocastra, Newcastle, UK
CD68	Clone KP-1, mouse, monoclonal	1 : 500**	DAKO
Actin	Clone 1A4, mouse monoclonal	1 : 500	DAKO
Ki-67	Clone MIB-1, mouse, monoclonal	1 : 100 †	DAKO

GFAP: glial fibrillary acidic protein, EMA: epithelial membrane antigen, Actin: α -smooth muscle actin.

*Antigen retrieval by trypsin, RT, 30 min.

**Microwave retrieval with citrate buffer (pH 6.0), 20 min.

†Microwave retrieval with Tris-EDTA (pH 9.0), 40 min.

材料および方法

死体解剖保存法に基づき剖検を行った非 CJD 成人剖検例 2 例(死後時間約 2 時間および 12 時間)の, ホルマリン固定後の大脳, 扁桃, 心筋, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 膵臓, 小腸について検討を行った. それぞれの臓器を約 5×5×5mm に切り出した後, 98% 蟻酸に 2 時間浸漬した. 蟻酸処理をしないものを対照とした. 型通りにパラフィン包埋切片を作製し, 各種一次抗体を用いた免疫組織学的染色を行った (Table 1). 死後時間 12 時間例の大脳, 膵臓, 脾臓においては, 組織片の大きさ (10×10×5mm, 5×5×5mm), 蟻酸浸漬時間 (1 時間, 2 時間), 温度 (4°C, 30°C) による違いも検討した.

免疫染色は, 切片を 3% 過酸化水素/PBS で室温 10 分, 正常ヤギ血清で室温 30 分ブロッキングを行った後, 一次抗体と 4°C で一晩反応させた. 洗浄後, ビオチン化抗ウサギ IgG ないしビオチン化抗マウス IgG と室温 30 分インキュベーションし, アビジン・ビオチン複合体と室温 30 分反応させ, chromogen diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) により発色を行った. 必要に応じ, 抗原の賦活化を行った.

染色性の増減は, 対照群との比較により判定し, 対照群において陰性ないし染色状態不良のものは, 判定不能とした.

結 果

全体としては, 2 例いずれにおいても類似した染色態を示し, 蟻酸処理により免疫染色性が低下する傾向がみられたが, 使用する一次抗体の種類によ

り, 程度は異なっていた (Table 2, 3, Fig. 1). S-100 蛋白, synaptophysin, neurofilament, epithelial membrane antigen, CD20, CD45RO, CD34, CD68, α -smooth muscle actin, Ki-67 などは, 2 時間の 98% 蟻酸浸漬により染色性の低下傾向を示した (Table 2, 3, Fig. 1A-F). S-100 蛋白や synaptophysin, α -smooth muscle actin は, 諸臓器においては染色性の低下を示したが, GFAP も含め, 脳での染色性は比較的保たれていた (Table 2, 3, Fig. 1G-L). Keratin は, 扁桃, 肝臓, 腎臓, 膵臓では低下傾向を示したが, 肺胞上皮や腸上皮においては, むしろ染色性が増強した (Table 2, 3). 死後 12 時間例の方が, 2 時間例よりも, やや染色性が保たれる傾向が認められた (Table 2, 3).

切片の温度や大きさ, 蟻酸浸漬時間によっても染色態度は異なり, 膵臓や脾臓では高温 (Fig. 2A-F), 小切片 (Fig. 2G-L), 長時間での浸漬の方が影響を受けやすかったが, 脳では顕著な差異はみられず, 染色性は保たれていた (Table 4). また, 4°C では, 小切片で 2 時間浸漬しても, ほとんどの一次抗体で比較的染色性は保たれていたが (Table 4), Ki-67 は, 小組織片のみならず大組織片においても染色性の低下を示した (Table 4, Fig. 2F).

考 察

プリオン病の中には, 硬膜移植後や脳下垂体ホルモン製剤投与後に発生する例が存在するが, 1999~2008 年の日本の 753 例の sCJD 中には, 明らかに発症前の手術や輸血などが原因となったと考えられる例はないとされている⁴⁾. また, European Creutzfeldt-

Table 2 Differences in staining intensity after formic acid treatment for 2 h at room temperature, in specimens obtained approximately 2 h after death

Antibody	Brain	Tonsil	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Pancreas	Intestine
GFAP	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S-100	+	↓	↓	ND	↓	↓	↓	↓	↓
Syn	↓	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NF	↓	↓	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↓
Keratin	ND	↓	ND	↑	↓	ND	↓	↓	↑
EMA	ND	↓	ND	+	↓	ND	+	↓	+
CD20	ND	↓	ND	+	ND	↓	+	ND	↓
CD45RO	ND	↓	ND	ND	↓	↓	↓	ND	↓
CD34	↓	↓	+	↓	↓	↓	↓	↓	↓
CD68	↓	↓	↓	+	↓	↓	↓	↓	↓
Actin	+	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Ki-67	ND	↓	ND	ND	↓	ND	↓	↓	↓

GFAP: glial fibrillary acidic protein, Syn: synaptophysin, NF: neurofilament, EMA: epithelial membrane antigen. ND: not determined, + : No difference compared to controls, ↓ : decrease, ↑ : increase.

Table 3 Differences in staining intensity after formic acid treatment for 2 h at room temperature, in specimens obtained approximately 12 h after death

Antibody	Brain	Tonsil	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Pancreas	Intestine
GFAP	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S-100	+	↓	ND	ND	↓	↓	↓	↓	↓
Syn	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	↓
NF	↓	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Keratin	ND	↓	ND	↑	+	ND	+	↓	ND
EMA	ND	+	ND	+	+	ND	+	+	+
CD20	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
CD45RO	ND	↓	ND	↓	↓	↓	↓	ND	↓
CD34	↓	↓	+	↓	↓	↓	↓	↓	↓
CD68	↓	↓	+	+	↓	↓	ND	↓	↓
Actin	+	↓	+	+	↓	↓	↓	↓	+
Ki-67	ND	↓	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

GFAP: glial fibrillary acidic protein, Syn: synaptophysin, NF: neurofilament, EMA: epithelial membrane antigen. ND: not determined, + : No difference compared to controls, ↓ : decrease, ↑ : increase.

Jakob Disease Surveillance network における 1965 年から 2010 年にかけての検討では、医療従事者において明らかに sCJD が増加しているという結論には至っていないようである³⁾。しかしながら、プリオン病は潜伏期間の長いものが多く、不明な部分も多く残されており、特に感染性の高い臓器を扱う領域の仕事に従事している場合、可能なかぎり感染の機会を減らすことは重要と考えられる。

病理の分野では、剖検や手術、生検などで得られた検体の取り扱いが問題となる。プリオンは、100°C の煮沸やガス滅菌、紫外線照射などの通常の滅菌では不活化されず、ホルマリン固定後の検体においても感染性が残る¹⁾²⁾。焼却が最も完全な滅菌法で、蟻酸、sodium dodecyl sulfate (SDS) などを用いた処理が推奨されている。組織標本作製時には、切り出し

た組織をカセットに入れた後、カセットごと 98% 蟻酸溶液に、室温 2 時間浸漬し、失活させる¹⁾。一方で、蟻酸処理は組織の変性をきたすため、高濃度の溶液中の長時間の浸漬は、診断に影響を及ぼす可能性がある。

プリオン病例のなかには、診断の難しい例や他疾患を合併している例もあり、CJD 患者における諸臓器の手術も行われている。sCJD の 4.5% が、発症後に何らかの手術を受けており、0.8% は脳神経外科的、1.8% は眼科的手術であったとの報告もある⁴⁾。また、プリオンは中枢神経系に高濃度に含まれるが、他の臓器にも分布している²⁾³⁾。sCJD においては、中枢神経系に比較的限局しているといわれているが、vCJD においては、中枢神経系のほか、扁桃、脾臓、リンパ節、末梢神経、網膜などにも異常プリオンが

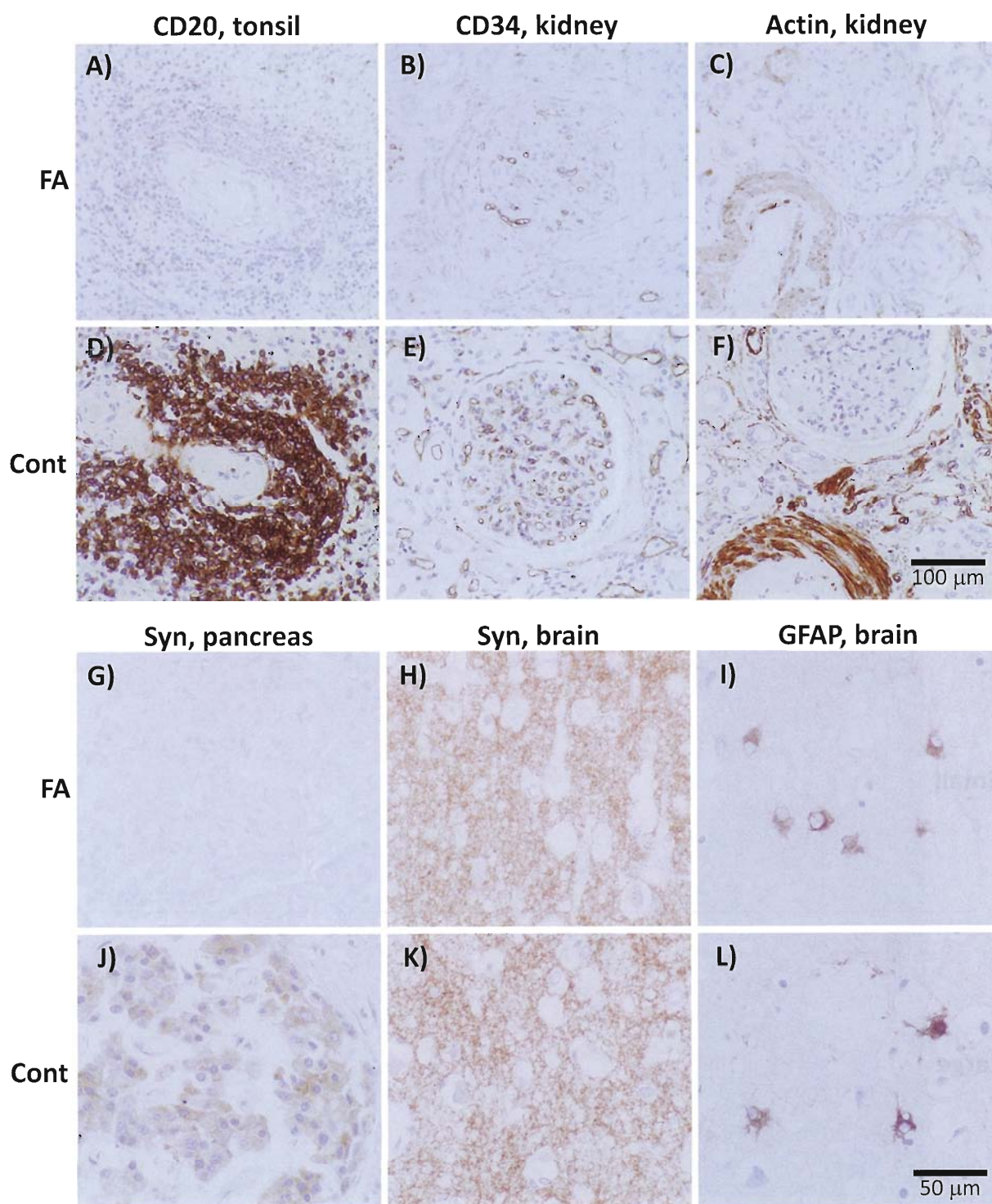


Fig. 1 Immunohistochemistry with and without formic acid treatment

Immunohistochemistry was performed on various tissues obtained approximately 2 hours (A-F) and 12 hours after death (G-L), with and without formic acid treatment for 2 hours at room temperature (RT). Staining intensity decreases in CD20 (A), CD34 (B), and α -smooth muscle actin (C) after formic acid treatment. Staining intensity for synaptophysin decreases in the pancreas (G) but is preserved in the brain (H). Immunoreactivity of GFAP is preserved (I). FA: formic acid, Cont: control, Syn: synaptophysin.

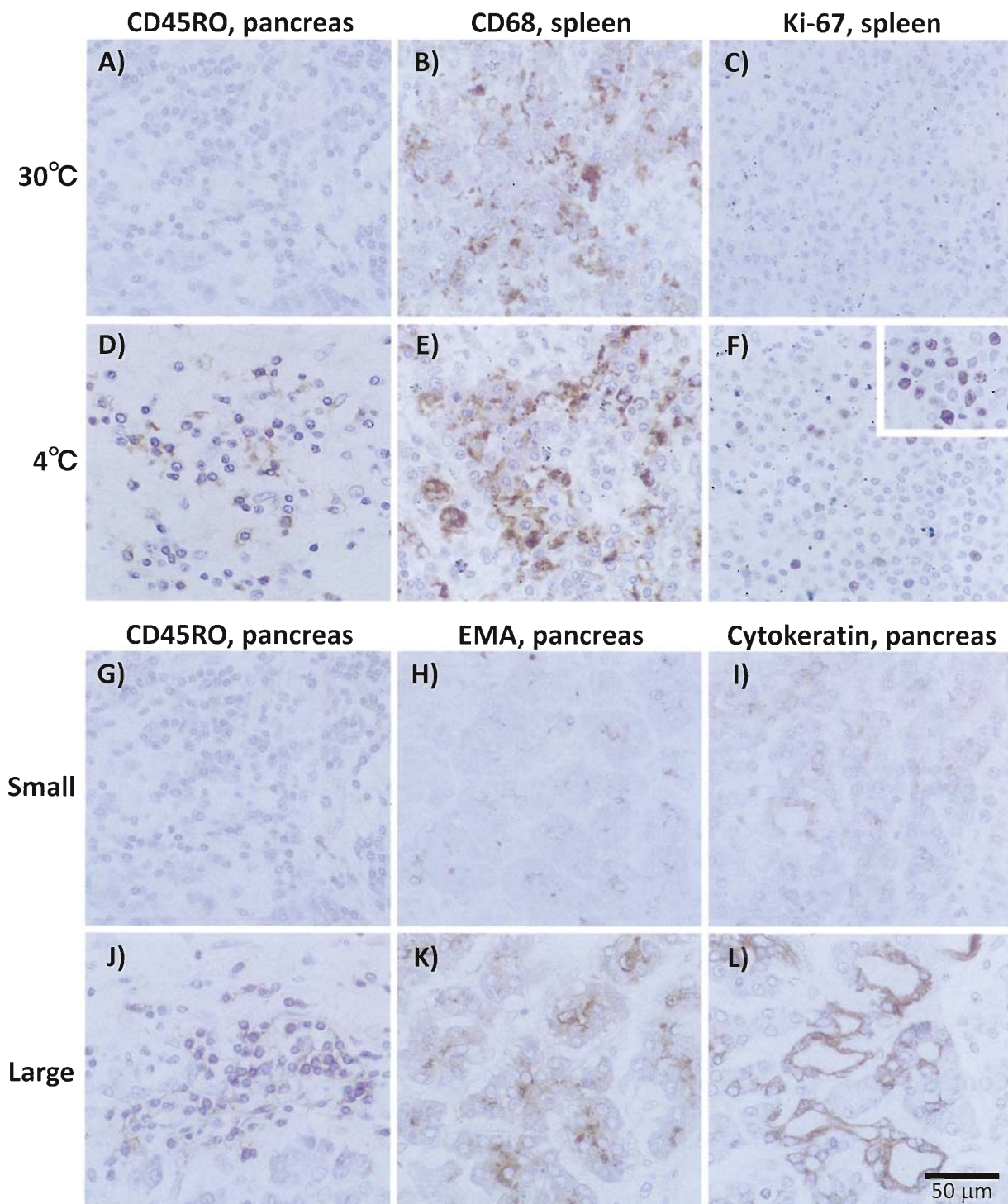


Fig. 2 Effect of formic acid treatment under various conditions. Tissues obtained 12 hours after death were used

Effect of temperature on staining intensity in immunohistochemistry (A-F). Staining intensity for CD45RO, CD68, and Ki-67 decreases further in tissues treated at 30°C (A-C), compared to the intensity of those treated at 4°C. Positive immunoreaction for Ki-67 decreases even at 4°C (F). Effect of specimen size on staining intensity in immunohistochemistry (G-L). Staining intensity for CD45RO, epithelial membrane antigen (EMA), and cytokeratin decreases more in smaller tissue specimens (G-I). Inset: Ki-67 immunostaining without formic acid treatment.

Table 4 Effects of temperature, time, and the size of tissues on staining intensity in immunohistochemistry

Antibody	30°C, 2 h						30°C, 1 h						4°C, 2 h					
	Brain		Pancreas		Spleen		Brain		Pancreas		Spleen		Brain		Pancreas		Spleen	
	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S	L	S
GFAP	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND
S-100	+	+	↓	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND
Syn	+	+	+	↓	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND
NF	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND
Keratin	ND	ND	+	↓	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND
EMA	ND	ND	+	↓	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND
CD20	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+
CD45RO	ND	ND	+	↓	+	+	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	+	+	+	+
CD34	+	+	+	↓	+	↓	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD68	+	+	+	↓	+	↓	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Actin	+	+	↓	↓	↓	↓	+	+	+	↓	+	+	+	+	+	+	+	+
Ki-67	ND	ND	↓	↓	↓	↓	ND	ND	↓	↓	↓	↓	ND	ND	+	+	↓	↓

GFAP: glial fibrillary acidic protein, Syn: synaptophysin, NF: neurofilament, EMA: epithelial membrane antigen.

L: large specimen, S: small specimen, ND: not determined, +: No difference compared to controls, ↓: decrease, ↑: increase.

分布している³⁶⁾。CJDとしての臨床症状を呈する以前から異常プリオン蛋白が存在していることも知られている³⁶⁾。中枢神経系以外の組織では、中枢神経系組織に比べ異常プリオンの濃度が低く、感染性は低いとされているが²⁶⁾、プリオン病患者やプリオン病の疑われる患者の検体を診断する機会がでてくることも想定され、診断のために免疫染色が必要となってくる可能性もある。蟻酸処理に伴う免疫染色性の変化が診断に影響を及ぼす可能性も否定できず、染色性の変化の有無を事前に知っておくことは有用と考えられる。

今回の検討では、一次抗体の種類や浸漬時の条件による差異はあるが、蟻酸浸漬より免疫染色性が低下する傾向がみられた。本検討とは条件が異なるが、蟻酸処理による乳癌のHER-2 scoreの低下も報告されており⁷⁾、定量的な観点からの評価が必要な場合は、注意が必要と考えられる。特にKi-67に関しては染色性の低下が容易におこり、4°Cにおいて大組織片を浸漬した場合であっても染色性の低下を示した。腫瘍組織において、Ki-67の免疫染色を用いた増殖能の評価を行う際には、注意が必要と考えられる。また、浸漬時間や温度、切片の大きさなどは、プリオンの不活化という点でも考慮する必要があるが、免疫染色の染色性の評価の際にも注意する必要があると思われる。

大脳において、体内諸臓器に比べ、より染色性が保たれる傾向があることも興味深い結果である。CJDの診断に際しては、特に非定形例の場合、他の疾患との鑑別が問題となる。Alzheimer病などの神

経変性疾患や自己免疫疾患、傍腫瘍症候群、感染症などと誤診断される場合や⁸⁾、CJDと脳腫瘍との鑑別が困難であった例⁹⁾、CJDに髄膜黒色腫と慢性リンパ球性白血病を合併した例¹⁰⁾などが報告されている。逆にCJD様の症状を呈した癌性髄膜炎例¹¹⁾やgliomatosis cerebri例¹²⁾も報告されている。これらの症例では、剖検や生検により最終診断が行われており、免疫染色も施行されている。今回の結果は、脳においては、少なくともS-100蛋白, synaptophysin, α -smooth muscle actinに関しては、蟻酸処理後も染色性の低下に乏しく、診断にあまり大きな影響を与えない可能性を示している。

一方、S-100蛋白, synaptophysin, α -smooth muscle actinは、非中枢神経系諸臓器においては、染色性の低下を示した。同じ蛋白であっても、組織により存在様式やisoformなどに違いがあるのかもしれない。また、keratinに関しては、肺胞上皮や腸上皮では染色性が増強した。薄切した組織切片を蟻酸処理することにより、amyloid Aなどの免疫染色性が増強することが知られており¹³⁾、ある種の蛋白においては、蟻酸処理により抗原性が賦活化されると考えられる。しかしながら、keratinに関しては、肺や腸以外の臓器では染色性は低下しており、この点に関する理由は不明である。また、今回検討した2例では、死後時間12時間例の方が2時間例に比べ、染色性の保たれる傾向がみられた。死亡以前の組織の状態や、ホルマリン固定までの死後時間、ホルマリン浸漬時間など、種々の要因が関与していると思われる。

結 論

プリオン不活化のための蟻酸処理が、免疫組織染色において染色性に及ぼす影響を検討した。全体としては、染色性が低下する傾向がみられ、蟻酸処理した組織において免疫染色を行う場合は、染色性の評価に注意する必要があると思われる。

謝 辞

本検討にあたって免疫染色を行っていただいた東京女子医科大学医学部病理学（第一）教室、刈田瑞穂氏に深謝いたします。

本論文の要旨は、第98回日本病理学会総会（2009年5月1日～5月3日、京都）において、発表した。

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 佐々木健介, 岩城 徹: プリオン病の病理解剖と標本作製の留意点. *病理と臨床* 25: 1124-1130, 2007
- 2) 厚生労働省選発性ウイルス感染調査研究班: 「クロイツフェルト・ヤコブ病診療マニュアル (改訂版)」, 厚生労働省, 東京 (2002)
- 3) Pauli G: Tissue safety in view of CJD and variant CJD. *Cell Tissue Bank* 6: 191-200, 2005
- 4) Hamaguchi T, Noguchi-Shinohara M, Nozaki I et al: The risk of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease through medical and surgical procedures. *Neuropathology* 29: 625-631, 2009
- 5) Alcalde-Cabero E, Almazán-Isla J, Brandel JP et al: Health professions and risk of sporadic

Creutzfeldt-Jakob disease, 1965 to 2010. *Euro Surveill* 17: pii: 20144, 2012

- 6) Ramasamy I, Law M, Collins S et al: Organ distribution of prion proteins in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Infect Dis* 3: 214-222, 2003
- 7) Fritzsche FR, Kristiansen G, Boesl A et al: Tissue pretreatment with formic acid might lower HercepTest scores in breast cancer. *Diagn Mol Pathol* 15: 237-242, 2006
- 8) Paterson RW, Torres-Chae CC, Kuo AL et al: Differential diagnosis of Jakob-Creutzfeldt disease. *Arch Neurol* 69: 1578-1582, 2012
- 9) Holmes SJ, Ironside JW, Shalet SM: Neurosurgery in a patient with Creutzfeldt-Jakob disease after pituitary derived growth hormone therapy in childhood. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60: 333-335, 1996
- 10) King A, Ryan P, Puranik A et al: Leptomeningeal melanoma and Creutzfeldt-Jakob disease in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25: 345-348, 1999
- 11) Francolini M, Sicurella L, Rizzuto N: Leptomeningeal carcinomatosis mimicking Creutzfeldt-Jakob disease: clinical features, laboratory tests, MRI images, EEG findings in an autopsy proven case. *Neurol Sci* 34: 441-444, 2013
- 12) Slee M, Pretorius P, Ansorge O et al: Parkinsonism and dementia due to gliomatosis cerebri mimicking sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77: 283-284, 2006
- 13) Kitamoto T, Ogomori K, Tateishi J et al: Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab Invest* 57: 230-236, 1987