

病 理 検 査 部 門

精度管理事業部員	中村 広基	西尾市民病院 TEL 0563-56-3171
実務担当者	黒木 雅子 水嶋 祥栄	(厚生連豊田厚生病院) (名古屋第二赤十字病院)

I. はじめに

人体病理診断では、ヘマトキシリン・エオジン染色が基本として行われている。それに加えて、免疫染色標本を診断の補助に使用するようになって久しい。これまでに、ホルマリン固定標本で検出可能な多種類の抗体の作製、酵素標識ポリマー法などの優れた検出システムの開発、抗原賦活法の開発改善など免疫染色を取り巻く環境は大きく変化した。また、免疫染色の一連の操作を自動化した機器も発売され普及しつつある。

しかし、固定から始まる一連の過程で施設間あるいは個人間でさまざまな方法がとられている。また、同一の抗原を検出する抗体についても多くのクローンが存在し、しかも抗体ごとに推奨される賦活方法が異なっている。したがって、必ずしも全体的な手順が指定されていないため、各施設でこの多彩な条件の中から手探りで最適な染色条件を設定することになり、実際に染め上がった標本の染色状態も多様であるのが現状である。それに加え、昨年度の本調査からも明らかなように、自動化した機器の特性や抗体との相性なども染色性がばらつく要因となっている。

このような免疫染色の現状把握と染色の標準化を目的に、昨年度愛知県臨床検査精度管理調査は、「抗CD3 抗体を用いた免疫染色法」を実施し評価や情報収集を行った。この結果により、各施設で染色性の維持や改善などを行っていただいた。本年度は引き続き「抗CD3 抗体を用いた免疫染色法」を実施、改善や維持の状況を調査することとした。

また、併せて標本作製や染色など病理検査全般におけるフォトサーベイを実施し、病理検査の基本となる知識についての調査を行った。

II. 参加施設

平成22年度愛知県臨床検査精度管理調査に参加した107施設中、病理検査部門への参加は50施設であった。内訳はフォトサーベイは50施設全てが参加、そのうち免疫染色は40施設で、昨年度より2施設多くなった。

III. 調査方法

フォトサーベイは、検体処理～染色までの病理検査の業務内容から10の設問を設定し、それぞれ5択で回答してもらうこととした。

免疫染色に関しては今回の調査も昨年度同様、抗CD3 抗体(DAKO 社、抗ヒト CD3 T細胞・ウサギポリクローナル抗体)と未染標本(T細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、肝組織のTMA(Tissue micro array)ブロックを2μm 厚で再薄切、MAS コーティングスライドガラスに貼付)を用意、配布して各施設の方法で免疫染色を実施した。

また同時に、各施設が保有する抗CD3 抗体の染色状態の把握を主な目的として、抗CD3 抗体を保有している施設にはそれを用いた染色も任意で実施。加えて抗体の保存に関する調査を目的として、昨年度参加施設に配布し最適と思われる方法にて保存していただいた抗体を用いての染色も任意で実施した(ともに評価対象外)。

さらに昨年度同様の内容で、各施設の染色状況を把握しやすいように、アンケート形式で染色方法を記述していただいた。

IV. フォトサーベイ

1. 評価方法、評価基準

フォトサーベイは10設問用意したが、配布後に設問P5が不適切な問題(3ページの解説参照)であることが判明したため、評価対象外とした。各設問、正解をA判定、不正解をC判定とした。満点を9点、各設問の合計からA評価(8点以上)、B評価(6、7点)、C評価(5点以下)とし、フォトサーベイの総合判定とした。

2. 結果

各設問の回答および正解率を表1. に示す。

フォトサーベイの総合評価では、参加 50 施設中A評価が49施設(98%)で、内訳は9点36施設、8点13施設であった。B評価は7点が1施設(2%)、C評価となった施設はなかった。以下、設問ごとの解説を記す。

表1. フォトサーベイ回答状況

	設 問				
回答	P1	P2	P3	P4	P5
a	0	0	0	1	0
b	0	1	0	9	3
c	0	48	50	1	46
d	50	0	0	1	0
e	0	1	0	38	1
正解率%	100	96	100	76	92

	設 問				
回答	P6	P7	P8	P9	10
a	0	50	0	0	49
b	50	0	0	0	1
c	0	0	50	0	0
d	0	0	0	50	0
e	0	0	0	0	0
正解率%	100	100	100	100	98

数字は施設数

設問 P1

正解はd「コンタミネーションを認める。水槽、スライドガラス、染色液、封入剤、カバーガラス等を清潔に保つ」で、正解した施設が 50 施設、正解率は 100%であった。設問の写真は皮膚の HE 標本で、切片上に扁平上皮細胞の混入が見られる。薄切操作中、水槽中に指などを入れてしまうと扁平上皮細胞が水槽表面に浮遊し、それが標本中に混入する恐れがある。水槽の水は常にきれいに保ち、切片を拾う際にもスライドガラスの表面を素手で触らぬように注意する必要がある。また、染色・封入の過程においても同様の注意を払う必要がある。手引書設問中に提示した写真と参考資料として伸展不良および組織のはがれの写真を巻頭のカラーページに示す(写真1, 2)。また、以降の設問についても、巻頭のカラーページに写真を示すので随時参考にとされたい。

設問 P2

正解はc「塩化カルシウム水溶液で脱灰する」である。正解した施設が 48 施設、b「10%ギ酸水溶液で脱灰する」ならびにe「脱灰液を頻繁に替えて、脱灰時間を必要最小限にとどめる」と回答した施設が各 1 施設で、正解率は 96%であった。設問の写真は骨髓の HE 染色で、過脱灰により核の染色性が減弱・消失している(写真3左)。

プランク・リュクロ液は迅速・簡便な脱灰液として知られているが、塩酸(無機酸)を使用しているため、長時間の脱灰により核(ヘマトキシリン)の染色性が低下してしまう。そのため 選択肢のa「脱灰時間を必要最小限とすべく脱灰状態をこまめに観察する。」やe「カルシウムの再沈着を防ぐために頻繁に脱灰液を交換する。」などは有

効な手段として知られている。また、b「ギ酸」などの有機酸やd「EDTA」などのキレートの使用では、脱灰に多少の時間を要するものの組織の染色性や抗原性への影響が少ない。

上記以外の対応策として、核染色の時間を長くしてエオジンの染色時間を短くする方法や染色前に過ヨウ素酸で酸化する方法などで染色性の改善が見られると言われているが、過脱灰標本への完全な対応策では無いと思われる。

参考資料として、ギ酸脱灰とEDTAによる脱灰の像を添付する(写真3中・右)。

設問 P3

正解はc「電気メスによる挫滅」で、正解した施設が 50 施設、正解率は 100%であった。

設問の写真は膀胱 TUR の HE 標本で、赤矢印で示した部分にアーチファクトを認める。組織は電気メスによる検体採取時の熱(高周波電流)により蛋白が熱凝固している。組織構造は破壊され網目状となり、エオジン好性に染色されている。検体採取時に起こるアーチファクトの一つで不可逆的な反応である(写真4)。

a「はがれ」は薄切後の乾燥不足などが原因となる現象で、しっかりと乾燥させる、表皮などの剥れやすい組織ではコーティングガラスを用いるなどの対処方法で回避できる場合がある。

b「染色ムラ」は染色後の標本にグラデーション状、スポット状などの色ムラが起こることで、染色液の濃度が均一になっていない場合や、薬液量が不足し、浸漬している一端から薬液が毛細管現象であがり、最上部は染色液に浸漬しないのでグラデーション状に染まる場合などを指す。染色前に試薬が十分あるか確認し、標本を浸漬する前に十分攪拌するといった対応策で改善する。

d「脱水不良」では、切片上に残った水滴により封入物が観察される。この封入物により屈折率の違いが生じ、ぼやけた組織像となる。また、e「固定不良」では、固定の悪い組織の中心部分で組織が変性し、辺縁部分(固定良好部分)との染色性の違いが生じる。

設問 P4

正解はe「過ヨウ素酸で酸化してからヘマトキシリンを染め直した」で、正解した施設は 38 施設、a「新しいヘマトキシリン液があったので、新しい液に交換し再薄切標本を染め直した」ならびにc「この標本を1%塩酸アルコールに浸漬し分別を行った」、d「この標本を1%塩酸水に浸漬し分別を行った」と回答した施設が各 1 施設、b「新しいヘマトキシリン液がなかったので、使用中のヘマトキシリン液に pH を確認しながら酢酸を加え、再薄切標本を染め直した」と回答した施設は9施設で、正解率は 76%であった。

設問の写真は胃の HE 染色で、ヘマトキシリンの共染

により、核のみならず細胞質、粘膜下組織も青色調を帯びている(写真5)。進行性染色液では一般的に共染することは無いと言われているが、染色液の管理が不十分で、至適pHが崩れている染色液では共染や染色の減弱が起こる。したがって、a「すでに交換時期なので新しい液に交換する」ことが最も薦められる。他に一時的な方法として、b「使用と共にヘマトキシリン液のpHが高くなり、核との選択的染色性が低くなっているため、酢酸を添加してpHを低くする。」ことで、対応することもできる。また、退行性染色液では分別の必要があるため必ず行うが、c「塩酸水」もしくはd「塩酸アルコール」などの酸(H⁺)で分別し、細胞質に結合していたレーキと水素イオン(H⁺)を交換、細胞質部分などの色を落とす方法もとられる。しかし、長く浸漬すると核に結合していたレーキも水素イオンと交換してしまい、色が落ちるので注意が必要である。新しい液に交換する方法以外はいずれの方法も色合いの調整が難しい。ヘマトキシリンの交換時期と判断した染色液での検討写真を(写真6)に示す。

e「過ヨウ素酸で酸化する」のは、長時間、酸性溶液や脱灰液で処理した際、陽イオンにチャージされた組織の染色性を回復する方法でヘマトキシリンの染色性が弱い場合の対処法であり、過染の対策として不適当である。PAS染色で過ヨウ素酸での酸化後の核染色の時間を短く設定する例が判りやすいと思う。

設問 P5

写真は母斑のHE染色で、茶褐色の顆粒(メラニン)を有する細胞(メラノサイトもしくはマクロファージ)が多数見られる(写真7)。

a「フォンタナ・マッソン染色」ではアンモニア銀により、メラニン保有細胞は黒～茶褐色に染まる。b「シュモール反応」では、フェリシアン化カリ塩化第二鉄染色液によりメラニンが青～暗青色に染まる。c「グリメリウス染色」では、硝酸銀によりメラニン保有細胞は黒～茶褐色に染まる。d「漂白法」では過マンガン酸カリウムの酸化作用によりメラニンが消失する。e「免疫染色HMB45」は悪性黒色腫の細胞質内抗原と特異的に反応し、メラニン形成細胞および、メラニン形成細胞へと分化傾向を示す腫瘍とも反応する。また、顆粒を持たないメラニン形成細胞とも特異的に反応する。しかし真皮内母斑、メラニンを保有する組織球などとは反応しない。その他、メラニン顆粒を同定するにはギムザ染色などが用いられる。

設問では顆粒(メラニン)を同定する方法として不適当な染色法を聞いているが、顆粒(メラニン)自体を同定する方法はb「シュモール反応」とd「漂白法」のみである。その他の染色法は、顆粒(メラニン)を保有する細胞を染色する方法となる。したがって、不適切問題と判断し、評価対象外とした。

設問 P6

正解はb「DFS染色—アミロイド陽性」で、正解した施設は50施設、正解率は100%であった。

設問の写真は腎臓のDFS染色で、沈着したアミロイドが、橙赤色に染色されている(写真8)。図の右側は左側と同じ部位の偏光顕微鏡像で、アミロイドは緑色複屈折を呈している。

a「PAS反応」は多糖類、粘液等を検出するための染色法で、陽性物質は赤紫色を呈する。c「コンゴレッド染色」でもアミロイドは橙赤色に染まり、偏光顕微鏡下でアミロイドが緑色複屈折を呈する。d「アザン染色」では膠原線維がアニリン青により濃い青色に染色される。e「ムチカルミン染色」では上皮性粘液が赤色に染色される。

設問 P7

正解はa「グロコット染色—真菌」で、正解した施設は50施設、正解率は100%であった。

設問では、グロコット染色の画像を提示した。真菌の細胞壁が明瞭に黒色ないし黒褐色調に染め出されている。他の染色の主な使用目的は、b「PAS染色」では菌体の細胞壁が赤紫色に、c「ムチカルミン染色」ではクリプトコッカスの菌体や莢膜が赤桃色に、d「メチレン青染色」では、真菌や細菌は濃青色に、e「ワルチン・スターリ法」はH.pyloriの好銀性を利用して、H.pyloriを黒褐色～黒色に染めることである。

これらの染色についても、真菌も染めることが出来るものもあり、参考としてグロコット染色の画像と共に巻末カラーページに提示しておく(写真9)。

設問 P8

正解はc「ギムザ染色」で、正解した施設は50施設で、正解率は100%であった。

設問で提示した写真は、胃生検のHE染色とギムザ染色で、H.pyloriが染まっている。a「グロコット染色」は真菌を染めだすのに有用な染色で、真菌に含まれる多糖類を酸化させて反応させ、黒褐色に染める染色である。b「PAM染色」は腎糸球体基底膜の染色方法で、真菌や細菌の細胞壁の多糖体も黒褐色に染め出すことも可能である。d「チール・ネルゼン染色」は抗酸菌を選択的に染め出すための染色法で、抗酸菌は赤く、その他の細菌、細胞は青く染まる。e「コッサ反応」はカルシウム塩を証明する染色で、カルシウム塩が黒褐色に、その他のものは赤～ピンクに染まる。巻頭のカラーページに他の染色でのH.pyloriの染まりを示す(写真10)。

設問 P9

正解はd「脱脂不足」で、正解した施設は50施設、正解率は100%であった。

設問で提示した写真は乳腺の手術材料のパラフィンブロックで、脱脂不足により組織内に脂肪が残り、脱水、透徹の過程でアルコールや中間剤との置換が十分に行われず、パラフィンが組織中に浸透できていない状態である。その後の薄切作業で切片が散ってしまった標本である(写真 11)。

乳腺組織など脂肪を多く含む材料は、包埋前に十分脱脂を行う必要がある。脱脂液には、エタノール・クロホルム等量混合液やエタノール・キシレン等量混合液などがある。

設問 P10

正解はa「T 細胞の細胞膜」で、aと回答した施設は 49 施設、b「T 細胞の核」と回答した施設が1施設、正解率は 98%であった。

設問で提示した写真はリンパ節を抗 CD3 抗体で免疫組織化学染色したものであり、T細胞の細胞膜(と細胞質)が染まっている(写真 12 左)。

CD3 は、T細胞レセプタ(TCR)を含む大きな複合体の一部で、成熟T細胞の代表的な表面マーカーである。免疫組織化学染色では、対象となる抗体の組織中、細胞中の局在を十分把握した上で行うことが重要である。

細胞膜に染色される抗体としては、HER2/neu、CD3 などの細胞表面マーカー、細胞質に染色される抗体として、サイトケラチンや S100、NSE など、核に染色される抗体として、ER や PgR、p53 などが挙げられる。それぞれ局在の異なる抗原に対する抗体の染色態度を巻末に示す(写真 12 中、右)。

V. 免疫染色

1. 免疫染色の材料

未染標本は、昨年度使用したT細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、肝組織の TMA(Tissue micro array)ブロックを2mm 厚で再薄切し、MASコーティングスライドガラスに貼り付けて、精度管理調査用、任意自施設抗体用、任意保存抗体用、予備の計4枚を各施設に配布した。

また、抗 CD3 抗体は、DAKO 社抗ヒト CD3 T細胞・ウサギポリクローナル抗体濃縮液を DAKO REAL Antibody Diluent にて 100 倍に希釈して、各施設に 1.0ml 程度ずつ冷蔵で配布した。

2. 評価方法、評価基準

免疫染色は、標本を回収後、病理検査研究班班員 16 名にて鏡検を行い評価基準に合わせて評価を行なった。

評価は昨年度同様、染色標本を実際に判断する場合に重要な5つのポイントを点数化して行った。同時に、弱拡大にて抗原の発色を確認できることを主目的とし、核染色とのバランスとあわせて総合的にA・B・Cと判定した。評価ポイントは次の5項目で、16 点を満点とした。(表2)

項目1. 抗原の染色性(最高5点)

項目2. 共染の有無(最高3点)

項目3. 組織の剥れ(最高3点)

項目4. 核染色の濃さ(最高1点)

項目5. 核染色とのコントラスト(最高4点)

抗原の染色性および核染色とのコントラストの2項目を重要ポイントに設定し最大点数に反映した。逆に核染色の濃さについては核が認識できるかどうかのみを評価し点数配分を低く設定した。

また総合評価は“項目1)抗原の染色性”、“項目5)核染色とのコントラスト”を重視して、次のように設定した。

- A. 弱拡大で陽性細胞の確認ができ、判別可能と思われる標本である
- B. 若干、染色性に問題はあるものの陽性細胞が判別可能と思われる標本である
- C. 染色性に問題があり改善を要すると思われる標本である

表2. 免疫染色評価ポイントの採点基準

項目1)	抗原の染色性(細胞膜が陽性であり、弱拡大で間違いなく視認できるか)
5点	細胞膜が陽性であり、弱拡大で確実に視認できる
4点	発色は若干弱いが見落としをする可能性は低い
2点	発色が弱く見落としが危惧される
0点	ほとんど染まっていない
項目2)	共染の有無(バックグラウンドや細胞質、陰性細胞への共染が起こっていないか)
3点	ほとんどみられない
2点	多少認めるが細胞膜に染色性のある陽性細胞との区別が可能である
0点	バックグラウンドや、疑陽性、細胞質への染色により、真の陽性細胞が不明確である
項目3)	組織の剥れ(組織への過剰なダメージがなく標本として適切か)
3点	剥れや捲れがほとんどない
2点	剥れや捲れはあるが、十分判別できる
0点	ほとんど剥れている
項目4)	核染色の濃さ(核染が適切で、陽性細胞と陰性細胞が区別できるか)
1点	陽性細胞と陰性細胞とが区別できる
0点	陽性細胞と陰性細胞とが区別し難い、もしくはできない
項目5)	コントラスト(抗原の染色と核染色のコントラストは適切か)
4点	程よい核染の濃さで抗原の染色性を対比する標本である
3点	抗原の染色性とのバランスは若干悪いが弱拡大で十分判別可能である
2点	抗原の染色性とのバランスは悪いが強拡大にすると判別が可能である
1点	抗原の染色性とのバランスが悪く見落としを誘発する危険がある
0点	抗原が染まっていない、あるいは核染が抗原の染色性をマスクし評価不能である

3. 判定結果

参加 38 施設の判定結果は、A評価が 33 施設(82%)、B評価が6施設(15%)、C評価が1施設(3%)であった。

最も評価の高かった用手法と機械法について巻頭のカラーページに示す(写真 13)。

また、各施設の染色性を比較検討、色情報の集約を行うため、それぞれの施設の標本から同一条件で顕微鏡写真を撮影した。次に、色の表現系である RGB 値(赤_Red、緑_Green、青_Blue)や HSB 値(色相_Hue、彩度_Saturation、明度_Brightness)を画像から簡便に取得できる自作のアプリケーションを作製し、顕微鏡写真から抗 CD3 抗体陽性部分(DAB 発色の部分)、抗 CD3 抗体陰性細胞の核、陰性対象として用意した肝細胞の細胞質をそれぞれ 100 箇所サンプリングし、平均集計をした。A、B、C評価施設の RGB 値を平均したものを巻頭カラーページに示す(別表1)。円の中心部が陰性細胞の核、外側が DAB 陽性部分である。評価が下がるごとに DAB の色調が淡くなっている。

昨年度同様、染色態度は様々であり、抗原の発色がほとんど認められない標本(評価C)が、本年度もみられた(写真 14)。また、核の染色性だけで判断すると若干弱いと思われる標本であったが、同時に共染も起こしているためにコントラストが悪く、低い評価(評価B)となった施設も見られた(写真 15)。

昨年度は、配布した抗体で気泡が原因と考えられる染色ムラが機械法の施設を中心に認められたが、本年度は認められなかった。認められたのは、自施設の抗体を用いた染色で1施設のみであった。また、昨年度よりも全体的に DAB の発色が強くなったが、陰性コントロールとして用意した肝細胞やリンパ濾胞内に共染を認める施設があった(写真 16)。

本年度は新しい試みとして、昨年度との染色性を比較し観察した(図1)。前回の染色性を維持している施設は 19 施設(50%)あり、改善を認めた施設が9施設(24%)であった。改善を認めた施設のうち、多くは DAB の発色が改善されていた。染色性を維持している施設は、ほとんどが免疫染色の総合評価でA評価の施設だったが、昨年度、本年度ともに B 判定であった施設が1施設あった。また、昨年度A評価であったが、本年度B評価となった施設が1施設あった。この施設は標本の判別上では問題の無い染色であったが、若干 DAB の発色が弱めであり、鏡検者の個人差が集計に反映してしまい、このような結果となったと考えられた。

巻頭のカラーページに昨年度との色調の違いを示す(別表3)。青数字が用手法の施設で、緑背景が維持していると評価された 19 施設である。色調だけ見ると、維持していると評価された施設も若干のばらつきがみられることで「染色性＝色調」だけでないことが判る。

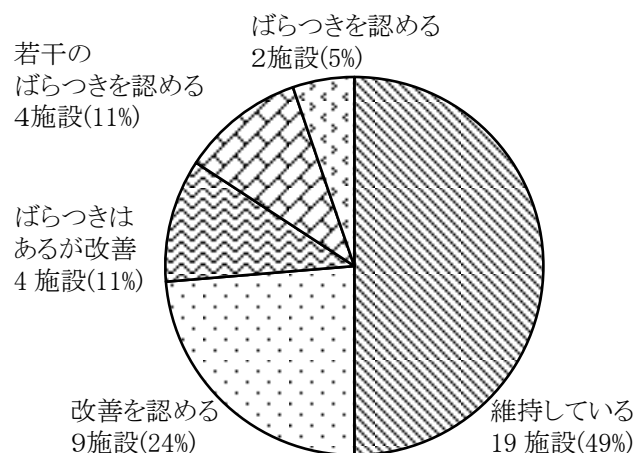


図1. 昨年度との比較

4. 免疫染色方法のアンケート結果

アンケート結果の集計報告にあたって、鏡検によるA、B、Cと共に、評価者 16 名の各評価ポイントの総合計や各評価ポイントの合計から算出した平均値を使用することとした。また、色調を比較する場合は、前述で算出した RGB 値、HSB 値から作成したグラフや表を用いることとした。

i. 染色方法

染色方法は、参加 40 施設のうち機械法が 25 施設(63%)、用手法が 13 施設(32%)、シーケンザを用いた用手法が2施設(5%)であった(図2)。参加施設は昨年度よりも2施設増え、2施設ともに用手法であった。また、機械法で参加された施設数は昨年度と同様 25 施設で、昨年度B評価であった2施設がA評価となり、機械法全ての施設がA評価となった。昨年度シーケンザを用いて用手法を行っていた施設のうちC評価となった1施設が、用手法に変更されてA評価となった。この施設は、昨年度の精度管理結果検討会に参加され、問題となる染色ステップを洗い出し、ルーチンの改善がなされたために本年度調査の改善に繋がったと思われる。また、昨年度同様、用手法の施設では評価にばらつきを認めた。

機械法と用手法での色調の違いを示す(別表2)。機械法は用手法やシーケンザを用いた用手法と比較して、発色が強い傾向を認めた。しかし、陰性細胞の核の染色の強さについては、用手法2種の方が若干強く発色する傾向を認めた。これも昨年度同様の結果となった。

各染色方法の DAB の発色、DAB と核染色とのバランスの数値(鏡検者が採点した点数を平均したもの)を基に、昨年度との比較を図に示す(図3、4)。この表では、見やすいように点数の低い数施設を除いて表示した。昨年度に比べ DAB の発色についての評価が高くなっていることがわかる。特に、用手法の施設全般について評価が上がっている。しかし、「核染色とのバランス」について

は、昨年度とあまり変わらない印象を受けた。

機械法を実施している 25 施設の機器メーカーの内訳は、ロシュ社が 17 施設(68%)、DAKO 社が5施設(20%)、三菱化学メディエンス社が2施設(8%)、協和メディックス社が1施設(4%)で昨年度と変更がなかった。昨年度の総合判定との比較を示す(表3)。総合評価について、昨年度との比較は前述の通りである。ロシュ社、DAKO 社に昨年度との差異が生じたのは、全体数が他のメーカーに比べ多いことがばらつきの影響と考えられる。

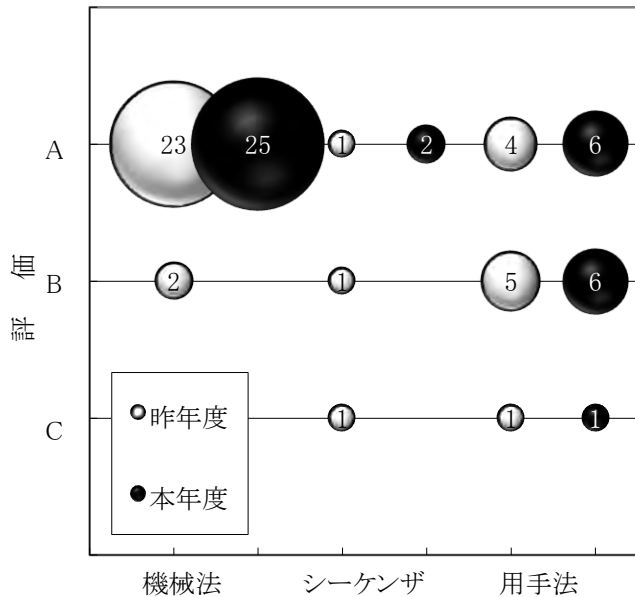


図 2. 染色方法と総合評価

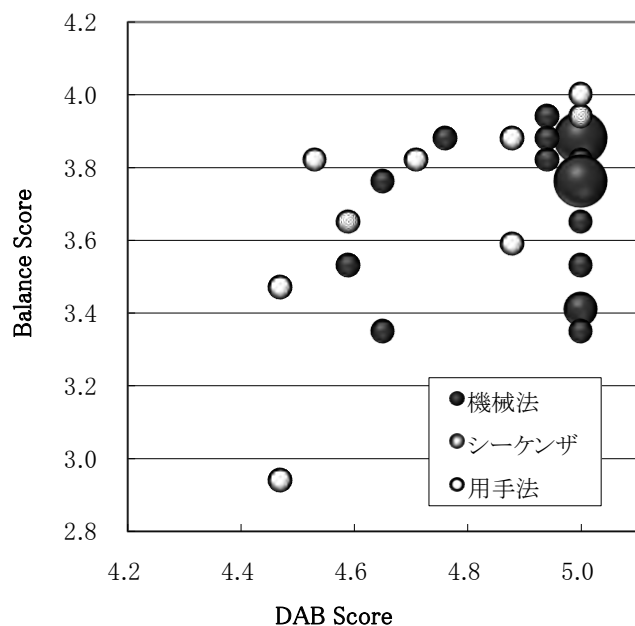


図 3. 昨年度の各染色方法と点数

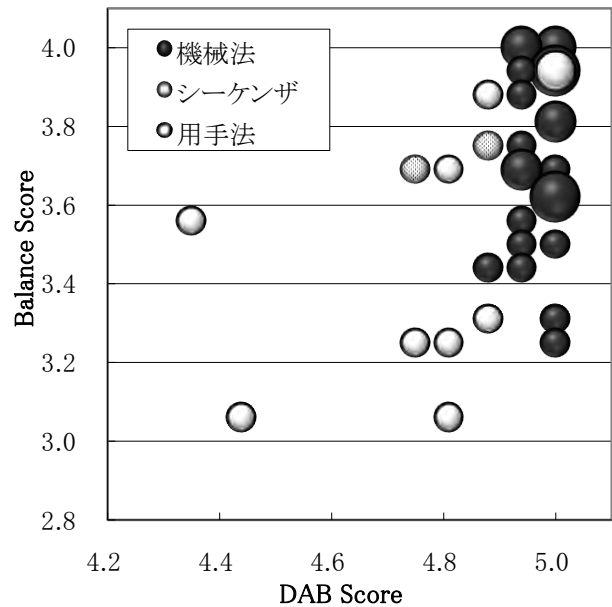


図 4. 本年度の各染色方法と点数

表3. 染色方法と総合評価(施設数)

染色方法とメーカー		総合評価		計
昨年度	本年度	昨年度	本年度	
ロシュ ベンタナXTシステム等)	同	A	A	16
		B	A	1
DAKO (Autostainer plus 等)	同	A	A	4
		B	A	1
三菱化学メディエンス、 ライカ(Bond-X など)	同	A	A	2
協和メディックス (i6000,Optimax Plus 等)	同	A	A	1
シーケンザ	同	A	A	1
		B	A	1
	用手法	C	A	1
用手法	同	A	A	2
			B	2
		B	A	3
			B	2
		C	B	1
新規参加	用手法		B	1
			C	1
計				40

ii. 検出法

検出法は参加 40 施設のうち LSAB 法が 19 施設(48%)、ポリマー法が 19 施設(48%)、ABC 法が2施設(5%)であった(表4)。

検出試薬は、機器メーカーと同様にロシュ社の iVIEW DAB Universal Kit が多く、続いてDAKO 社の EnVision、ニチレイ社のシンプルステインの順であった(表5)。

表4. 染色方法と総合評価(施設数)

検出法	総合評価	計		計
		昨年度	本年度	
LSAB 法	LSAB 法	A	A B	16 1
		B	A	1
	ポリマー法	A	A	1
ポリマー法	ポリマー法	A	A	8
		B	A B	5 2
			A	1
		C	B	1
ABC 法	ABC 法	A	A B	1 1
新規参加	LSAB 法	新	C	1
	ポリマー法	新	B	1
計				40

LSAB 法を利用している 19 施設のうち、機械法は 17 施設でその全てがロシュ社の染色機を採用していた。

表5. 検出試薬と総合評価(施設数)

方法	検出試薬		評価		計
	昨年度	本年度	昨年度	本年度	
Mc	ロシュ iVIEW DAB Universal Kit		A	A	16
			B	A	1
	DAKO EnVision		A	A	4
			B	A	1
	BOND or Leica		A	A	1
			A	A	1
	協和ステイン Link	ニチレイ シンプルス	A	A	1
C	DAKO EnVision		A	A	1
	ニチレイ シンプルステイン		B	A	1
Mn	DAKO EnVision		B	A	1
			B	B	2
	ニチレイ シンプルステイン		C	A	1
			A	B	1
			A	A	1
			B	A	2
			C	B	1
	VECTASTAIN ANTI-RABBIT IgG Biotinylated Antibody		A	A	1
				B	1
	新規参加	DAKO EnVision	新	B	1
		DAKO LSAB+	新	C	1

※Mc:機械法、C:シーケンザ、Mn:用手法

iii. 賦活

賦活について調査したところ、参加 40 施設の全てが加熱処理を行っており、蛋白分解酵素など他の方法を採用している施設はなかった。加熱処理の賦活手段として、自動免疫染色装置の賦活機能が 18 施設と最も多く、電気ポットなどの恒温機器が9施設、マイクロウェーブが8施設であった(表6)。

ほとんどの施設が昨年と同様であるが、マイクロウェーブを利用している施設のうち、1 施設が温浴機器に変更、更に賦活液をクエン酸系からトリス塩酸系に変更し総合評価が C からAになった。また、表の一番下の行は新規参加の2施設であるが、双方ともマイクロウェーブ、クエン酸系賦活液の利用であった。

オートクレーブを使用している施設で、賦活液をクエン酸系からトリス EDTA 系に変更し、賦活の強度を上げたが評価が低くなった施設が1施設あった。顕微鏡で確認すると細胞や組織のダメージが強かったことから、賦活液の効果が強すぎて組織への障害が起り、染色に影響を及ぼしたのではないかと考えられた。また、表からも判る通り他の方法に比べマイクロウェーブを使用している施設は、同条件にもかかわらず昨年度と今年度の評価にばらつきを認めた。賦活温度については昨年度同様、マイクロウェーブ、温浴法、圧力釜(鍋)を利用した施設は、ほとんどが95℃以上、オートクレーブは121℃という設定であった。

賦活方法別に見た賦活液ごとの色調を巻頭のカラーページに示す(別表4)。それぞれの方法の数字は施設数である。高い賦活が期待される賦活方法や賦活液では、茶褐色系の濃度が強い傾向が認められる。また、オートクレーブとマイクロウェーブを利用する施設で色調がばらつく結果となった。これは昨年度も同様の結果であり、この2種の賦活方法は安定した賦活を行うことが難しいのではないかと感じられた。

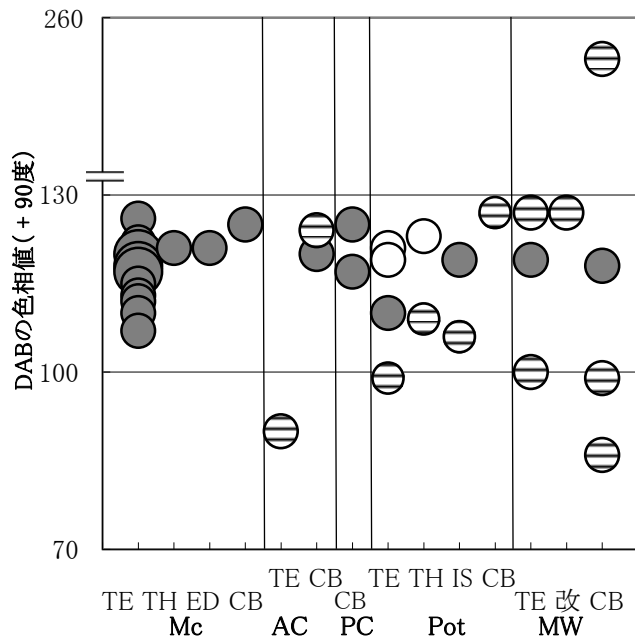
賦活方法別の DAB の色相値(図 5)、賦活液別の核の色相値(図6)をバブルグラフで示す。x軸に各賦活法、y軸に色相値、バブルのサイズが施設数である。バブルの色は、黒地白点が機械法、横縞が用手法、白地黒点がシーケンザを用いた用手法である。色相値の意味する色合いは、巻頭カラーページに参考資料として載せた色相環を参照いただきたい。DABの発色であるが、機械法に比べ用手法ではばらつきが大きいことがわかる。また昨年度比較的ばらつきの少なかった温浴法で、色のばらつきを認める結果となった。核の色相値に関しては、どの賦活方法もばらつく結果となったが、機械法、用手法で比較すると、若干であるが用手法でばらつきを認めた。

表6. 加熱方法と総合評価(施設数)

加熱器具		賦活液群		時間(分)		評価		計
昨年度	本年度	昨年度	本年度	昨年度	本年度	昨年度	本年度	
Mc	同	TE 系	同	90	90	A	A	2
				60	60	A	A	13
		TH 系	同	20	20	A	A	1
		EDTA	同	20	20	A	A	1
		CB 系	同	32	32	A	A	1
AC	同	CB 系	TE 系	20	15	A	B	1
			同	15	10	B	A	1
		10		15	B	A	1	
PC	同	CB 系	同	30	20	A	A	1
				5	5	A	A	1
Pot	同	TE 系	同	40	40	A	A	1
				未	30	A	A	1
		TH 系	同	60	60	A	A	1
		IS	同	45	45	A	A	1
						B	B	1
		CB 系	TE 系	45	45	B	A	1
				40	40	B	A	1
				同	180	180	B	B
MW	Pot	CB 系	TH 系	40	60	C	A	1
	同	TE 系	同	40	40	B	A	1
				10	10	A	A	1
		改 CB	同	15	15	C	B	1
		CB 系	TE 系	20	15	B	A	1
			同	15	15	A	A	1
				10	10	A	B	1
MW		CB 系			20	-	B	1
					5	-	C	1
計								40

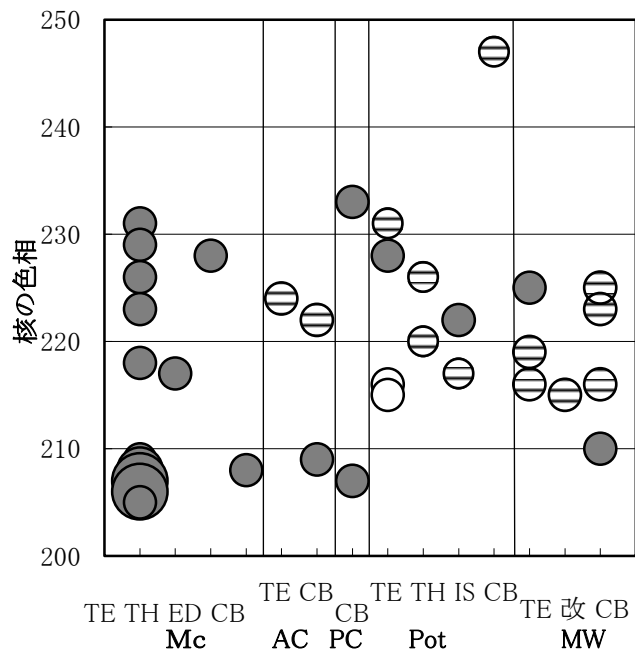
※ Mc:機器の賦活機能
AC:オートクレーブ
PC:圧力釜(鍋)
Pot:温浴機器
MW:マイクロウェーブ
TE 系:トリス EDTA 系
TH 系:トリス塩酸系
IS:イムノセイバー
CB 系:クエン酸系
改 CB:改良クエン酸系

次に、賦活法と総合点数のグラフを示す(図7)。y軸が合計点数で、x軸とバブルの色等は(図5)のグラフと同じである。このグラフからも、機械法が用手法に比べ高評価であり、用手法のばらつきが大きいことがわかる。



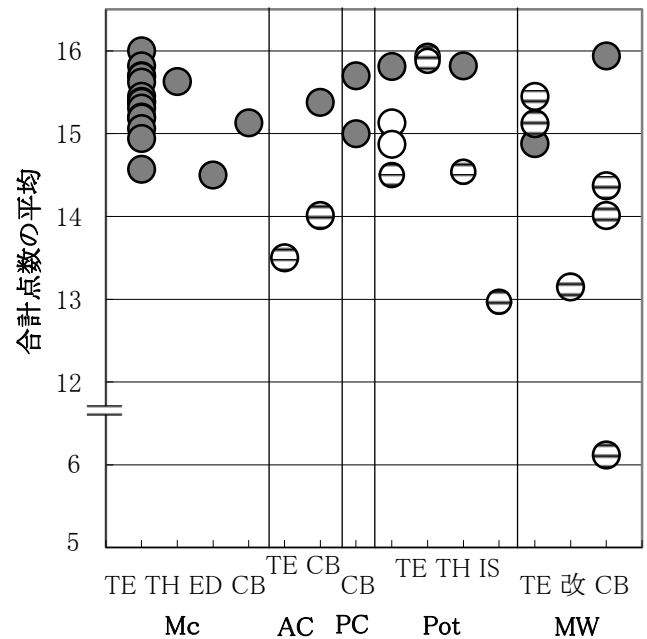
※灰色：機械法、横縞模様：用手法、
白色：シーケンザ

図5. 賦活法別 DAB の色相値



※灰色：機械法、横縞模様：用手法、
白色：シーケンザ

図6. 賦活法別 核の色相値



※灰色：機械法、横縞模様：用手法、
白色：シーケンザ

図7. 賦活法別 総合点数

iv. 内因性ペルオキシダーゼ除去操作

内因性のペルオキシダーゼ除去操作については、昨年度と同様、賦活操作後一次反応前に行う施設が29施設(73%)と最も多く、除去操作のタイミング、使用試薬、時間はさまざまであった(表7)。

除去操作の反応温度については、室温、37℃、42℃という結果であった。加温している施設の全てが染色装置を用いて染色を行っており、用手法(シーケンザを含む)の施設は全て室温での反応であった。しかし、機械法を用いる全ての施設が加温しているのではなく、機械法全体の約60%であった。除去操作を行わない施設は1施設となったが、やはり昨年度同様肝細胞や赤血球などに偽陽性像を認めたが、本年度も誤判定に繋がるほどではなかった。

次に、内因性ペルオキシダーゼ除去操作の方法別の肝細胞の色相値のグラフを示す(図8)。x軸が除去操作のタイミング、y軸が色相値、バブルサイズが除去操作の時間である。これを見ると値が2極化している。色相値100～190周辺がヘマトキシリンの色相にあたり、250～340周辺がDABの色相にあたることから、ヘマトキシリンの共染を起こしている施設とDABの共染を起こしている施設があることがわかる。除去操作をしない施設は色相値が247であった。これは、100箇所サンプリングした値が、ヘマトキシリンの色相に近い場所とDABの色相に近い場所の2種類の色調があり、その平均の値が中間の値となって表現されたと考えられる。

除去操作の試薬別では、アンケート内容、グラフなどを見比べても、試薬別の特徴を見出せず、同試薬間でばらつきも認められた。

表7. 内因性ペルオキシダーゼ除去操作(施設数)

昨年度	本年度	A	B	C	計
賦活操作前	賦活操作前	2			2
	一次抗体反応前	1			1
一次抗体反応前	賦活操作前	1			1
	一次抗体反応前	24	4		28
一次抗体反応後	一次抗体反応後	3			3
発色する前	一次抗体反応後	1			1
行わない	一次抗体反応前		1		1
	行わない	1			1
新規参加	一次抗体反応前		1	1	2
計		33	6	1	40

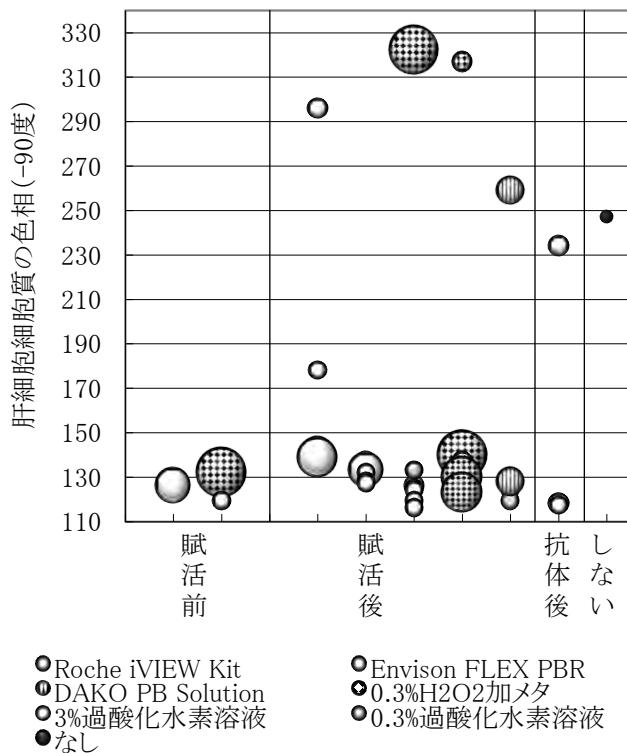


図8. 内因性ペルオキシダーゼ除去操作別肝細胞の色相

v. 抗体の希釈

今年度も 100 倍希釈した抗 CD3 抗体を配布したが、染色を行う諸条件により適正な抗体濃度が異なるため、各施設で希釈する可能性を含めて調査を行った。

100 倍希釈した抗 CD3 抗体を更に希釈した施設は6施設(15%)で、2施設を除いて機械法の施設であった。

抗原の染色性と最終希釈濃度を比較したが、評価について顕著な傾向を認めなかった。顕微鏡的には、用手法 500 倍希釈の施設が若干弱めの発色でB評価であったが、用手法 100 倍希釈の施設の中にも同様の染色態度であった施設も見られた。参考資料としてDABの色相値を元にしたグラフを示す(図9)。

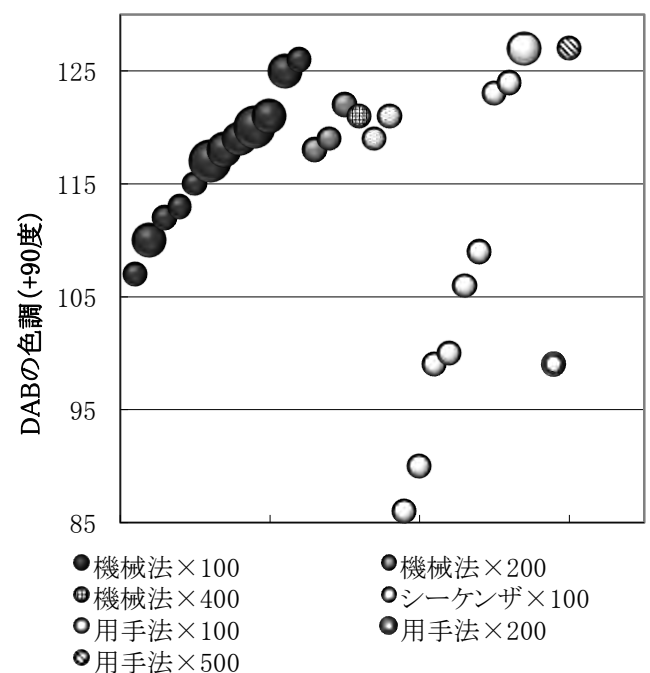


図9. 抗体の最終希釈濃度

vi. その他

染色結果の自己評価(表8)、1ヵ月の染色枚数(図 10)、抗体原液の保存場所(表9)、希釈済み抗体の保存場所(表 10)、抗体希釈に使用する希釈用試薬(表 11)について表にまとめたので参考にさせていただきたい。

総合点数についてのグラフから、どのグループもある程度のばらつきを認めるが、1ヵ月の染色枚数 400-600 枚の施設がもっとも評価点数の差が少ないと思われた。

表8. 染色結果の自己評価(施設数)

自己評価	A	B	C	計
満足	14			14
やや満足	5	3	1	9
普通	12	2		14
不満	1	1		2
やや不満	1			1
計	33	6	1	40

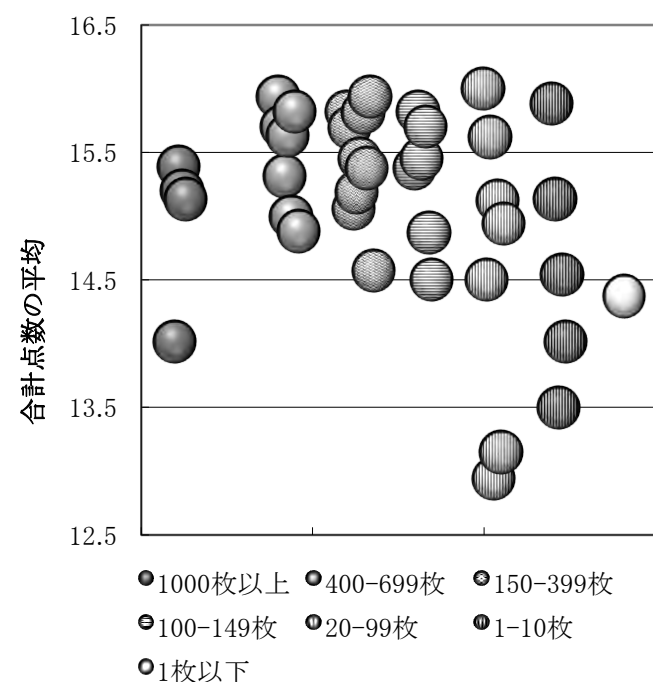


図 10. 一日の染色枚数と合計点数

表9. 抗体原液の保存(施設数)

保管方法	計
市販冷蔵庫	21
実験専用冷蔵庫	18
用時調整	1
計	40

表 10. 抗体原液の保存(施設数)

保存方法	計
原液として保有していない	2
試薬瓶ごと	
市販冷蔵庫	11
実験用冷蔵庫	12
実験専用冷蔵庫と -80℃実験用冷凍庫	1
分注して	
実験用冷凍庫(約-30℃)	1
実験用冷凍庫(約-40℃)	1
実験用冷凍庫(約-80℃)	6
抗体の保存指示による	2
計	36

表 11. 抗体希釈に使用する希釈用試薬(施設数)

抗体希釈液	計
市販	
DAKO Antibody Diluent	15
DAKO Antibody Diluent Background Reducing	1
ロシュ VENTANA Antibody Diluent	3
IBL Ab-Dilution Buffer	1
ライカ 抗体希釈液	1
10% nomal Gaot serum [MILLIPORE 社]	1
自家製 0.1%BSA, 0.1%NaN3 含有 PBS	5
自家製 1%BSA, 0.1%NaN3 含有 TBS 溶液	1
自家製 BSA, チメロザール含有 PBS	1
不明 M/100 リン酸緩衝性食水 pH7.4	1
未記入及び希釈済使用液として購入	10
計	40

コントロールについての集計を示す(表 12)。40 施設中 10 施設でコントロールは立てていないとの回答であった。30 施設はいずれかのタイミングでコントロールを立てており、その対象抗体は Her2/neu、ER、PgR が最も多く、その他には、EBER などのウィルス系や、EGFR などだった。

表 12. コントロールについて(施設数)

コントロールについて	計
抗体ごとに毎回立てる	1
抗体ごとに定期的に立てる	1
抗体ごとに不定期に立てる	6
抗体によっては、毎回立てる	10
抗体によっては、定期的に立てる	5
抗体によっては、不定期で立てる	3
コントロールは立てていない	10
病理医から指示のあった場合に立てる	1
内因性コントロールにて一部管理。	1
染まりがおかしいと感じたときコントロールを立てる	1
内因性コントロールが取れない時、必要に応じて立てる	1
計	40

抗体の使用期限についての集計を示す(表 13)。40 施設中 26 施設が管理していない、あるいは染まる限り使用するという回答であった。管理していると回答した施設の多くが Her2/neu、ER、PgR について使用期限の設定をしているとの回答であった。

表 13. 抗体の使用期限(施設数)

抗体の使用期限	A	B	C	計
管理していない		1		1
染まる限りは使用している	20	4	1	25
一部の抗体について設定	5			5
全ての抗体について設定	8	1		9
計	33	6	1	40

vii. 自施設保有抗体、保存抗体を用いた染色

同時に実施した、自施設の保有する抗体を用いた染色調査への参加は 34 施設(85%)であった。保有抗体と配布抗体の総合評価の集計を示す(表 14)。

自施設保有および配布の抗体ともに A 判定は 28 施設(82%)、B 判定は 3 施設(9%)で、31 施設(91%)で両抗体の評価が一致した。

また、昨年度使用し各施設で保存してもらった抗体を用いた染色調査では、32 施設(80%)の参加があった。保存および配布抗体ともに A 判定は 29 施設(88%)、B 判定は 3 施設(9%)で、32 施設(97%)で両抗体の評価が一致した(表 15)。DAB の発色の評価点数および核染色とのバランスの評価点数を合計した値(以下合計点)で比較したグラフを示す(図 11)。多少のばらつきが認められるものの、保存抗体と配布抗体の合計点はほぼ一致した。したがって、この調査からは参加した各施設とも抗体の保存管理についての問題は認められず、また、抗体の希釈後 1 年間保存した場合でも染色性に問題は認められないという結果であった。ただし、希釈済み抗体の使用限界については、使用頻度(保冷から室温に戻している時間)、他の抗体や違うロットで異なる可能性は考えられる。

次に、使用した自施設保有抗体の調整(購入)日と総合評価を示す(表 16)。6ヶ月以内に調整(購入)した施設が 27 施設(82%)であった。

昨年度との比較では、昨年度は 6ヶ月以内に調整した施設に高評価が多く認められたが、今年度は全体的にばらつく傾向となった(図 12)。

表 14. 保有抗体の評価と配布抗体の評価(施設数)

		配布抗体			計
		A	B	C	
保有抗体	A	28	1	0	29
	B	1	3	0	4
	C	1	0	0	1
計		30	4	0	34

表 15. 保存抗体の評価と配布抗体の評価(施設数)

		配布総		計
		A	B	
保存総	A	28	1	29
	B	0	3	3
計		28	4	32

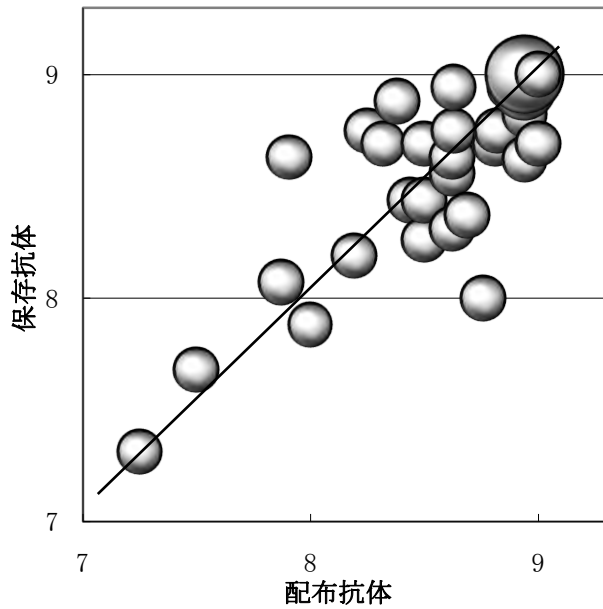


図 11. 保存抗体と配布抗体の DAB と
バランスの評価の合計

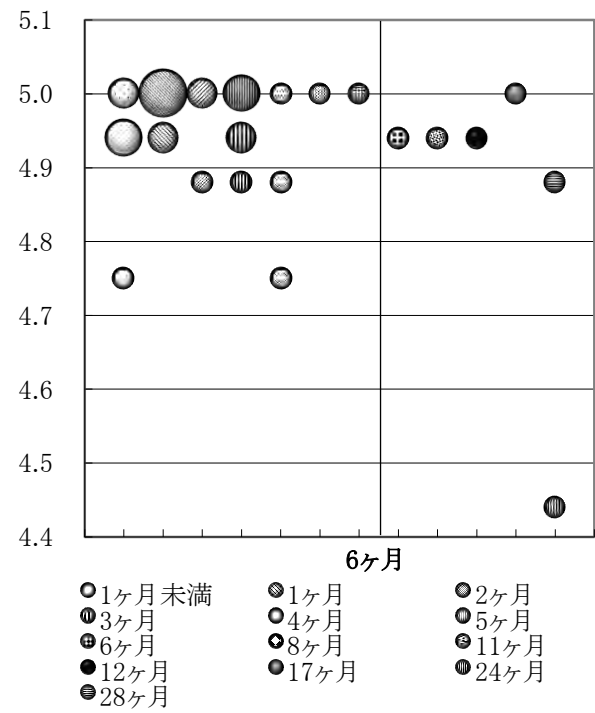


図 12. 保有抗体の調整(購入)日と DAB 発色の点数

表 16. 保有抗体の調整(購入)日と総合評価(施設数)

調整日	A	B	計
1ヶ月未満	5	1	6
1ヶ月	7		7
2ヶ月	3		3
3ヶ月	6		6
4ヶ月	3		3
5ヶ月	1		1
6ヶ月	1		1
8ヶ月	1		1
11ヶ月	1		1
12ヶ月	1		1
17ヶ月	1		1
24ヶ月		1	1
28ヶ月	1		1
計	31	2	33

VI. 総括

今年度は病理組織検査全般におけるフォトサーベイと、昨年度に引き続いて「抗 CD3 抗体を用いた免疫染色法」を実施した。

フォトサーベイでは10設問のうち6問が正解率100%、1問が評価対象外であり、3問で数施設の誤回答があった。今回、「もっとも不適当なものを選択」という問い方の設問を3問作成した。これらの設問では、正解率が100%ではなかった。不正解であった施設の一部は、選択肢の中でもっとも適当と思われるものを選択していることから、問題の読み違いによる誤回答と考えられる。

設問4も同様の問い方であり、正解率76%と低めであった。この設問の不正解であった施設にも問題の読み違いと思われる回答もあったが、アンケート中に「ルーチン中でめったに遭遇しない事例のため不適切な問題である」との御意見をいただいた。HE染色は病理検査の基本となる染色であるが、施設間差などが大きく精度管理や標準化の難しい染色である。特に、ヘマトキシリン液やエオジン液を新調する時期の設定で、苦労している施設は少なくないと考えたため、この設問を用意した。

免疫染色では、施設によって染色方法も染色性も異なり、同一機器を使用しているにもかかわらず、染色性にばらつきが存在している現状は昨年度同様であった。

DABの発色に関しては、昨年度に比べ多くの施設で発色が強くなり、弱拵での鏡検で判別し易くなった。しかし、核とのバランスが崩れてしまった施設も多く、また、賦活を強くしすぎて組織へのダメージが大きくなりすぎた結果、評価が下がった施設も認められた。

染色方法に関しては、昨年度同様、機器を使用して染色を行っている施設が、用手法(シーケンザを使用している施設を含む)よりDABの発色が強い傾向が認められ、高評価群が多く、用手法の施設と比較すると染色のばらつきが少なかった。精度管理を主眼におく場合、自動染色機を用いる方法は有効である可能性を示唆する結果であり、昨年度の調査と同様になったが、機械法でもばらつきは認められるため、各機器メーカーや抗体メーカーの協力のもと、染色方法やプロトコルの集約が今後の課題と思われる。

検出法についてLSAB法、ポリマー法の違いでは一定の傾向を見出すことができなかった。

賦活法の改善などで、DABの発色が強く、昨年度よりも高評価であった施設もあったが、核染色とのバランスが崩れた施設や賦活が強すぎ、組織や細胞の破壊が起こり染色全体に悪影響が出た施設もあった。やはり、強い熱賦活を行った場合、核の染色が弱くなることや核構造が不鮮明になるなどの影響がみられるため、こ

れらに配慮した核染色の時間や賦活時間などの調整をする必要があると思われる。

また賦活法の全体的な集計では、賦活能力が高いとされているトリスEDTA緩衝液やトリス塩酸緩衝液を用いて、温浴法、圧力釜法、自動免疫染色装置の賦活機能などで賦活を行う施設に高評価の傾向がみられた。

内因性ペルオキシダーゼ除去操作では、本抗体に対しては操作タイミング別、試薬別の差異は認められなかったが、十分行われなければ共染を起こす原因となることが確認された。

冒頭でも述べたが、免疫染色の方法や手技はさまざままで、染色状態に影響を及ぼす要因は多い。例数が少なく十分な解析ができなかった要因も存在したが、傾向は捉えることができたと思われる。昨年度、今年度を通じて、抗原の賦活化の工程は染色性および標本の評価に直結しもっとも重要な要因のひとつであると考えられた。

これまでに、他県やその他小規模での免疫染色の精度管理調査が実施されている。しかし、いずれの調査においても施設間差が問題となっていて、標本作製過程に多くの要素が存在し、原因を追及することはかなり困難である。また、どのようなポイントを設定し評価するべきなのかについても、一定の基準がないためそれぞれの精度管理グループで模索中であるのが実情である。解決の方法としては、①精度管理に必要な多量配布、長期間配布の可能な試料(標準物質)の準備、②それを染色したものを評価する方法や論理の確立が絶対不可欠と思われる。また、各施設が今回行ったような外部精度管理調査への積極的な参加がさらに重要となってくると思われる。

病理医が診断に迷うことがないように、質の高い染色標本を安定して提供することが我々病理検査技師の責務である。今回参加された施設には、本調査結果等を参考に自施設の現状を把握し、それぞれの抗体に対する賦活の検討などを十分に行っていただいたうえで、病理医が安心して診断できる標本を提出できるように期待したい。

最後に、今回精度管理調査に参加していただいた施設各位に深謝いたします。

病理検査部門 フォトサーベイおよび色調表

フォトサーベイ

設問 P1

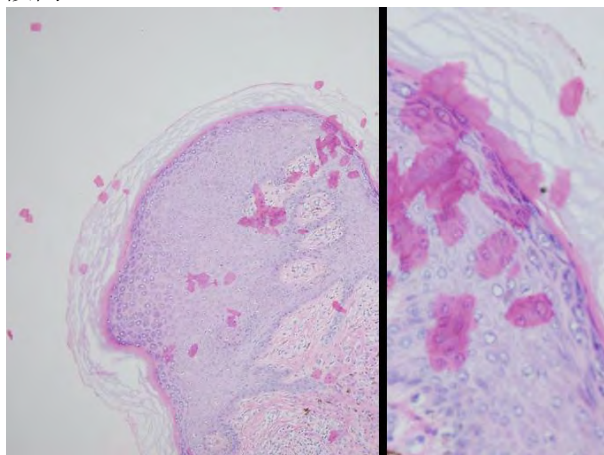


写真1. 作業者の手指等からのコンタミネーション

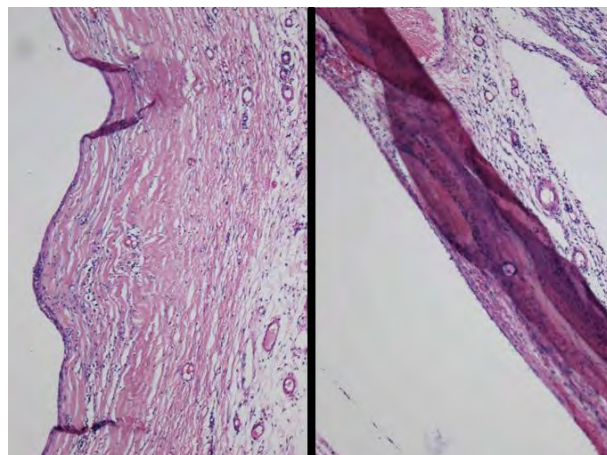


写真2. 左) 伸展不良、右) 組織の剥れ

設問 P2

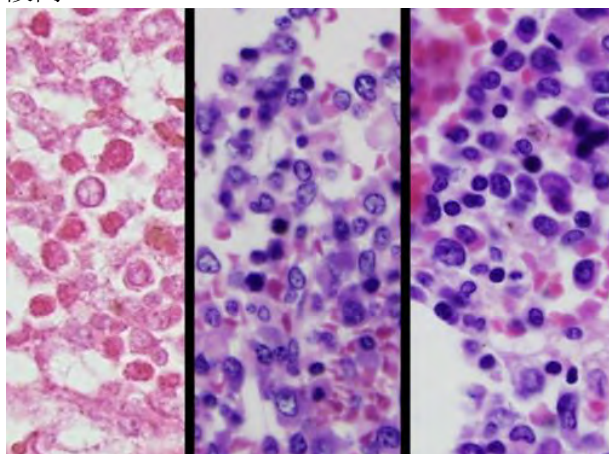


写真3. 左) プランクリュクロによる過脱灰の HE 像
中) ギ酸による脱灰の HE 像
右) EDTA による脱灰の HE 像

設問 P3

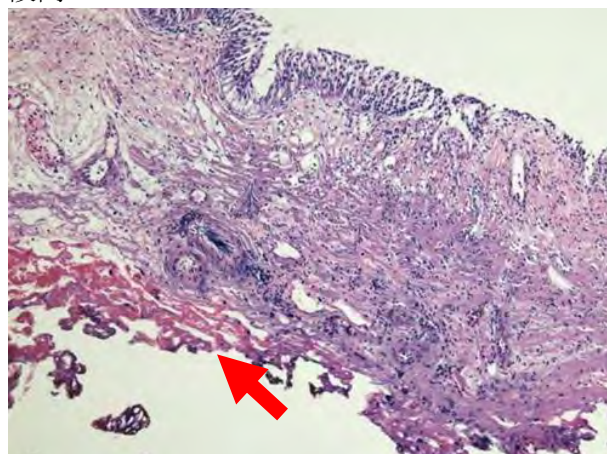


写真4. 電気メスによる組織の熱凝固

設問 P4

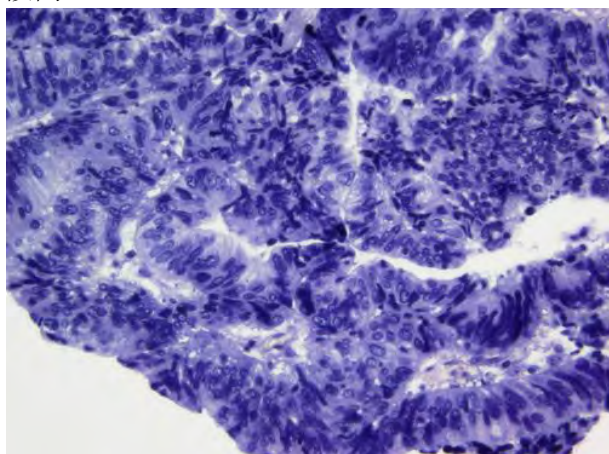


写真5. 設問に用いた写真。ひどく共染を起こしている

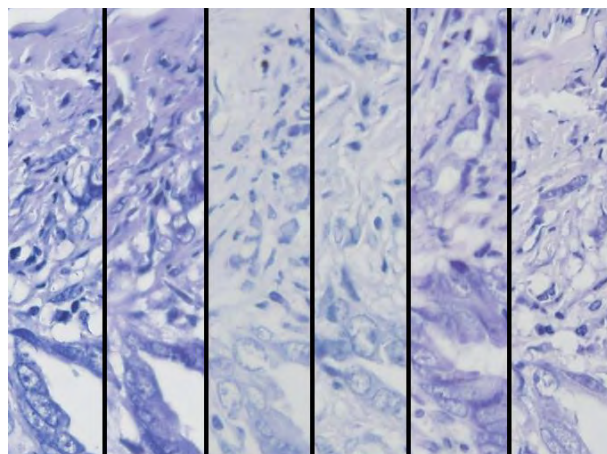


写真6. 左から未対処、過ヨウ素酸で酸化、試薬交換、酢酸で pH 調整、1%塩酸アルコール分別、1%塩酸分別

病理検査部門 フォトサーベイおよび色調表

設問 P5

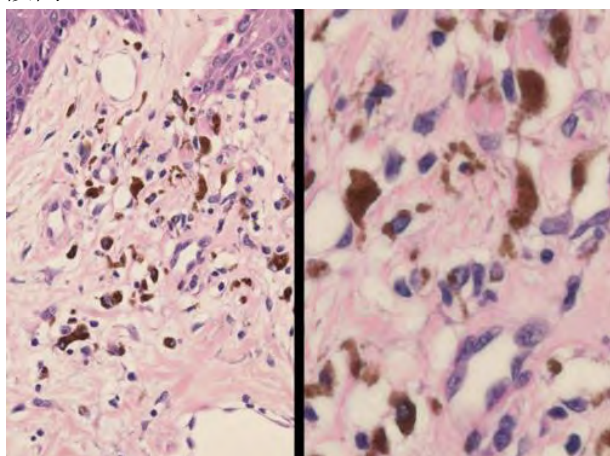


写真7. HE 染色で、メラニン顆粒を有する細胞(メラノサイトもしくはマクロファージ)が多数見られる

設問 P6

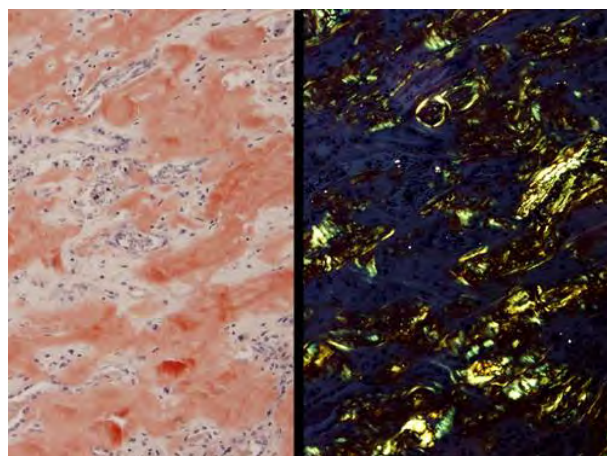


写真8. DFS染色。光顕像(左)と、偏光像(右)

設問 P7

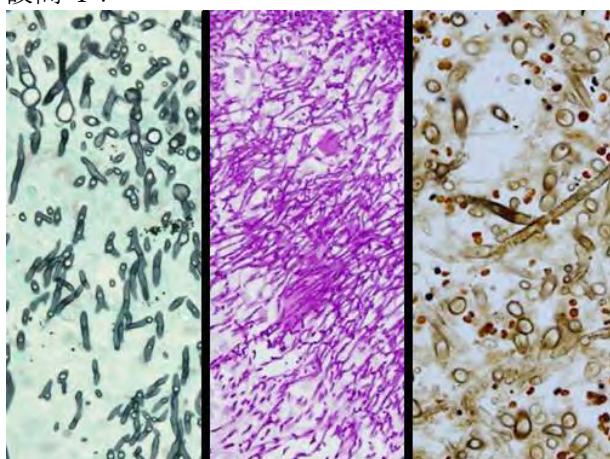


写真9. 左)グロコット染色
中)PAS 染色
右)ワルチンスターリー染色

設問 P8

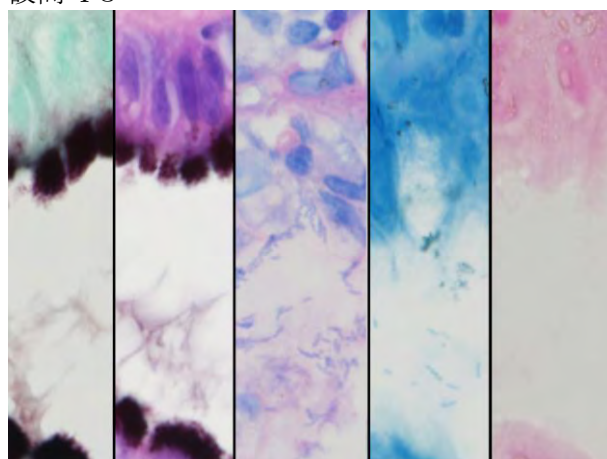


写真 10. 左から順に、グロコット、PAM、ギムザ、チールネルゼン、コッサ染色

設問 P9



写真 11. 脱脂不足の組織。温浴伸展時に組織が散ってしまっている

設問 P10

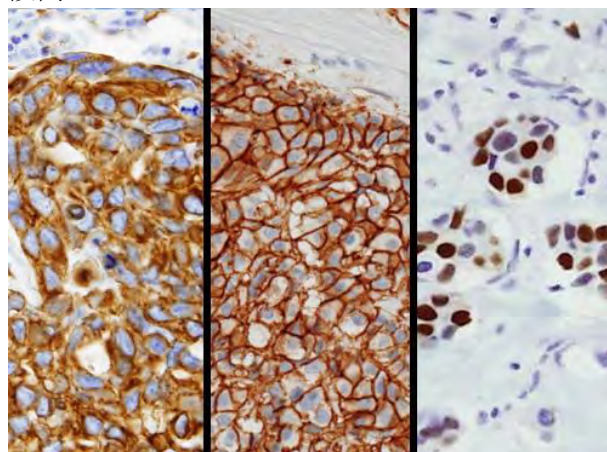


写真 12. 左)Cytokeratin AE1/AE3(細胞質)
中)Her2/neu(細胞膜)、右)PgR(核)

病理検査部門 フォトサーベイおよび色調表

免疫染色

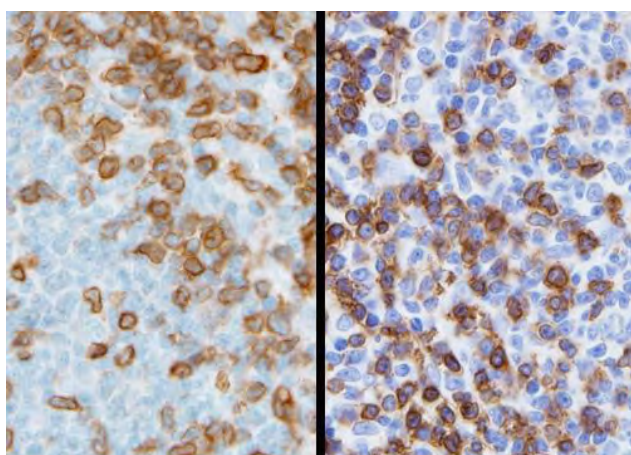


写真 13. 評価の高かった標本
左)機械法
右)用手法

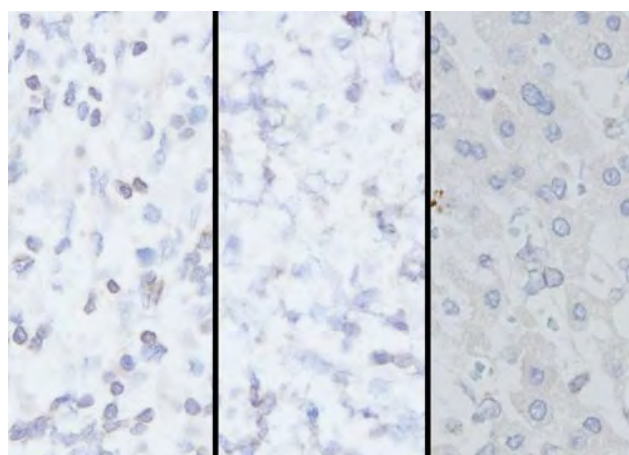


写真 14.
抗原の染色性が弱い標本(用手法)
左からT細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、肝組織

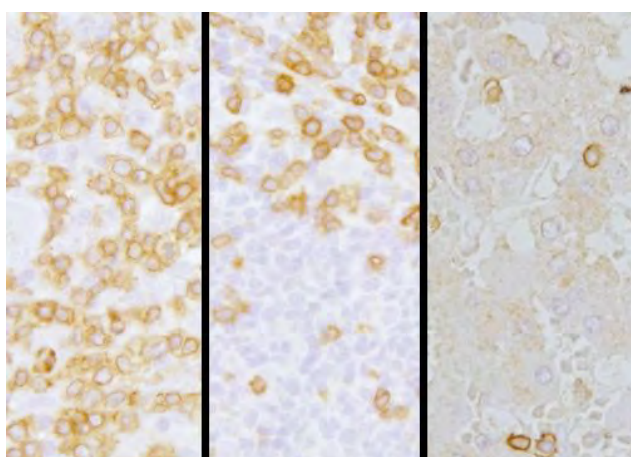


写真 15. 核の染色が若干弱い標本(用手法)
左)T細胞性リンパ腫
中)濾胞性リンパ腫
右)肝組織

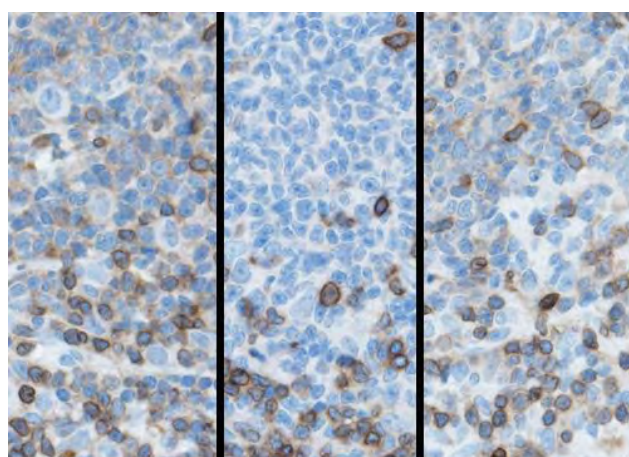


写真 16. 胚中心部に共染をみる標本(用手法)
左)配布抗体
中)自施設抗体
右)保存抗体

色調表

別表1. 総合判定各群の色調

総合評価	施設数	色調
A	33	
B	6	
C	1	

別表2. 染色方法別色調

染色方法	施設数	色調
機械法	25	
シーケンザ	2	
用手法	13	

病理検査部門 フォトサーベイおよび色調表

別表3. 昨年度との比較

昨年→本年	昨年→本年	昨年→本年	昨年→本年	昨年→本年
01	03	04	05	06
08	09	10	12	13
15	16	17	18	20
21	22	23	24	25
26	27	28	29	30
31	33	34	36	37
38	40	41	42	43
45	46	48	49	50

数字:部門番号 (青字:用手法、黒字:機械法)
:恒常性の保たれていると評価された施設

別表4. 賦活法別色調

加熱器具	賦活液群	機械法	用手法	シーケンザ
装置賦活機能	トリスEDTA系	15	0	0
	トリス塩酸系	1	0	0
	EDTA系	1	0	0
	クエン酸系	1	0	0
オートクレーブ	トリスEDTA系	1	0	0
	クエン酸系	1	1	
圧力釜(鍋)	クエン酸系	2	0	0
恒温機器	トリスEDTA系	1	1	2
	トリス塩酸系	0	2	0
	イムノセイバー	1	1	0
	クエン酸系	0	1	0
マイクロウェーブ	トリスEDTA系	1	2	0
	改良クエン酸系	0	1	0
	クエン酸系	1	3	0

参考資料 HLB 色調環

