

病理検査部門

精度管理事業部員：橋本 克訓

(名古屋大学大学院医学系研究科 TEL:052-719-3107)

実務担当者：長田 裕之 (名古屋第二赤十字病院)

柚木 浩良 (公立陶生病院)

I. はじめに

平成26年度精度管理調査は、Ki-67抗原の検出を目的とした免疫染色のサーベイを実施した。免疫染色は病理診断に欠かすことができない染色手法である。また、近年は診断のみならず、患者の治療薬の適否の決定に用いる機会が増え、その重要性はますます高まり、実施件数も増加している。

このような現状をふまえ、免疫染色のサーベイを実施した。

検出対象は多くの病理検査室で実施されていると思われるKi-67抗原を選定した。

II. 参加施設

平成26年度愛知県臨床検査精度管理調査に参加申し込みのあった127施設中、病理検査部門への参加は39施設であった。

III. 材料

各種腫瘍組織（悪性リンパ腫3症例、ホジキン病1症例、乳癌1症例、大腸癌2症例の計7症例）のホルマリン固定・パラフィンブロックからそれぞれ組織小片を切り取り、再度、1つのパラフィンブロックに再包埋したtissue arrayブロックを作製後、3μmの厚さに薄切片、スライドガラスに載せた未染色標本を材料とした。スライドガラスは剥離防止コートスライドガラスを用いた。薄切後の抗原性低下が染色結果に影響を与えないために、薄切は試料配布の直前（2日前）に行った。

IV. 評価方法

1. 評価項目と採点基準

下記1)～4)の評価項目に対して3段階評価を基本とした採点基準を設定して評価した。評価項目と採点基準は以下のとおりである。

1) Ki-67の陽性所見（陽性所見は核に現れる）

- 良 : 5点 核が染まっている
- 可 : 3点 核の染まりが薄いが出検できる
- 不可 : 0点 核が染まっていない

染色むらがある場合は1点減点する

2) 共染の有無

- 良 : 2点 共染なし、または若干の共染がある

可 : 1点 共染あり

不可 : 0点 強い共染あり

3) 後染色の染色性

- 良 : 2点 陽性所見を妨げない染色性
- 可 : 1点 陽性所見を妨げている、または、染色性が悪いものの診断に支障はない
- 不可 : 0点 陽性所見を妨げている、または、染色性が悪く診断に支障がある

4) 全体的な標本の仕上がり（以下の3項目の合計）

●封入

- ・良 : 2点 適正に封入されている
- ・可 : 1点 封入不良で小さな気泡の混入があるが診断に支障はない
- ・不可 : 0点 封入不良で診断に支障がある

●標本切片の剥がれ

- ・良 : 2点 剥がれはない
- ・可 : 1点 小さな剥がれがあるが診断に支障はない
- ・不可 : 0点 大きな剥がれがあり診断に支障がある

●染色ごみの有無

- ・良 : 2点 ごみはない
- ・可 : 1点 小さなごみがあるが診断に支障はない
- ・不可 : 0点 大きなごみがあり診断に支障がある

2. 評価点数

評価点数は、20名の病理細胞検査研究班班員が4項目について鏡検し、採点した平均点数（小数点以下第3位四捨五入）の合計とし、核の陽性染色性を優先した下記の評価法によりAからDの評価を行った。

1) A評価（染色上目的を十分に達している）

総得点が13点以上

2) B評価（染色上目的を達しているが、更なる向上が望まれる）

総得点が11点以上、13点未満、かつ陽性所見点数が2点以上

3) C評価（染色上目的を達しておらず、改善の必要がある）

総得点が9点以上11点未満、もしくは陽性所見点数が2点未満。

4) D評価（染色の目的を達しておらず、診断に支障をきたす可能性がある）

総得点が10点未満。

参加施設の中で、評価点数の最も高かった施設を「高評価施設」とし、自施設における染色法の改善などに役立てていただくため、参考データとして同施設の標本画像を施設別結果報告書に添付して配布した。

V. 結果

参加施設39施設のうちA評価は25施設（64.1%）、B評価は11施設（28.2%）、C評価は3施設（7.7%）、D評価は0施設（0%）であった。

1施設の標本が封入不良のため、標本全体に空気が入り込み、鏡検・評価が不能な状態であった。本調査では、免疫染色の陽性所見の評価が目的であるため、この施設の標本は再封入し、鏡検・評価できる状態に修復後、他の参加施設の標本とともに評価を行った。その際に、評価項目4（標本全体の仕上がり）の「封入」の項目を0点として採点した。

VI. 染色工程調査の集計結果

染色サーベイとともに実施したKi-67免疫染色の染色工程調査の集計結果を総合評価の結果と比較した。

1. 染色の方法に関して

用手法で実施したのは12施設（30.8%）、機械法は27施設（69.2%）であった。

平成21年度に実施した前回の免疫染色サーベイ（38施設参加）では、用手法（シーケンザを用いた用手法を含む）は13施設（34.2%）、機械法は25施設（65.8%）であり、今回の調査では機械法が微増した。なお、今回はシーケンザを使用した施設は0であった。

染色方法、使用機器、総合評価の結果を表1に示す。

表1：染色方法、使用機器と総合評価

染色法	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
染色機メーカー・機種名				
ロシュ・ベンチマーク XT	8	1	1	10
ロシュ・ベンチマーク GX	2	1	0	3
ロシュ・ベンチマーク HX	0	1	0	1
ロシュ・ベンチマーク LT	1	0	0	1
ライカ・ボンド MAX	5	1	0	6
ライカ・ボンド III	2	1	0	3
ダコ・Autostainer Link 48	0	1	0	1
ダコ・Autostainer Plus	1	0	0	1
ダコ・Autostainer DJ-K346611	0	1	0	1
用手法	6	4	2	12
計	25	11	3	39

機械法で実施した27施設の使用機器はロシュ（ベンチマーク・シリーズ）が15施設（55.6%）、ライカ（ボンド・シリーズ）が9施設（33.3%）、ダコ（オートステイナー・シリーズ）が3施設（11.1%）であった。使用機器のメーカーと染色評価の結果を表2に再掲した。

表2：使用した機器メーカーと染色評価の結果

メーカー	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
ロシュ	11 (77.3)	3 (20.0)	1 (6.7)	15 (100)
ライカ	7 (77.8)	2 (22.2)	0 (0.0)	9 (100)
ダコ	1 (33.3)	2 (76.3)	0 (0.0)	3 (100)
用手法	6 (50.0)	4 (33.3)	2 (1.7)	12 (100)
計	25	11	3	39

()内は割合(%)

機械法のA評価施設の割合は27施設中19施設（70.4%）であった。機械法のメーカー別では、ロシュが15施設中11施設（77.3%）、ライカが9施設中7施設（77.8%）、ダコが3施設中1施設（33.3%）であり、ロシュ、ライカはA評価施設が70%以上であったが、ダコは両社よりも低率であった。

用手法のA評価施設は12施設中6施設（50%）であったが、B評価が4施設（33.3%）、C評価が2施設（16.7%）と評価にばらつきがみられた。なお、C評価となった施設の内訳は用手法が2施設、機械法（ロシュ）が1施設であった。

2. 染色原理について

染色原理はポリマー法を用いた施設は24施設（61.5%）、LSAB（Labeled Streptavidin Biotin）法などのストレプトアビジン-ビオチン系の方法を用いた施設は15施設（38.5%）であった。

LSAB法を用いた全ての施設がロシュの機器を使用しており、その他のメーカー（ライカ、ダコ）および用手法で実施した施設は全てポリマー法であった（表3）。

表3：染色原理と染色評価の結果

染色原理	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
ポリマー法	14 (58.3)	8 (33.3)	2 (8.3)	24 (100)
LSAB 法	11 (77.3)	3 (20.0)	1 (6.7)	15 (100)
計	25	11	3	39

()内は割合(%)

A評価施設の割合はポリマー法が24施設中14施設(58.3%)であるのに対し、LSAB法では15施設中11施設(77.3%)であり、LSAB法の方がA評価施設の割合が高かった。

3. 染色するまでの所要日数および未染色切片の保管方法

染色するまでの未染色切片の所要日数は、39施設中35施設(89.7%)が7日以内に染色を実施しており、7日後以上に染色したのは4施設(10.3%)であった。

保管温度に関しては室温で保管した施設が最も多く25施設(64.1%)であった。4℃で保管した施設は10施設(25.6%)、その他、43℃で保管した施設と室温で保管後、60℃のふ卵器に30分保管後に染色した施設がそれぞれ1施設(2.6%)ずつあった。

染色までの所要日数および、未染色切片の保管温度と、評価との間に関連性、傾向は認められなかった。切片を配布後、回収までの期間が短い本調査では、保管期間、保管温度の差は出ないと思われた。

4. 染色工程について

1) 内因性ペルオキシダーゼ活性除去処理について

内因性ペルオキシダーゼ活性の除去処理を実施した施設は37施設(94.9%)、実施しなかった施設は2施設(5.1%)であった(表4)。

表4：内因性ペルオキシダーゼ活性除去処理について

試薬	方法(施設数)		計
	機械法	用手法	
自動染色機メーカーの試薬	23	0	23
0.3%過酸化水素加メタノール	0	6	6
3.0%過酸化水素水	3	5	8
しない	1	1	2
計	27	12	39

機械法で染色を行った27施設のうち、染色機メーカーの試薬を使用した施設は23施設(85.2%)、3%過酸化水素水が3施設(11.1%)、0.3%過酸化水素加メタノールは0施設、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去処理を実施しない施設は1施設(3.7%)であった。

用手法で実施した12施設では0.3%過酸化水素加メタノールが6施設(50%)と3%過酸化水素水が5施設(41.7%)、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去処理を実施しないのは1施設(8.3%)であった。

内因性ペルオキシダーゼ活性の除去処理の有無や使用試薬と総合評価の関連性、傾向は認められなかった。

2) タンパクブロッキング処理

タンパクブロッキング処理を実施した施設は3施設

(7.7%)、しない施設は36施設(92.3%)であった(表5)。

表5：タンパクブロッキング処理について

	方法(施設数)		計
	機械法	用手法	
実施した	1	2	3
実施しない	26	10	36
計	27	12	39

タンパクブロッキング処理の有無と総合評価の関連性、傾向は認められなかった。

3) 内因性ビオチン活性の除去処理

ロシュの機械法で実施した15施設は全てLSAB法であったが、このうち、内因性ビオチン活性の除去処理を実施した施設は4施設(26.7%)、実施しない施設は11施設(73.3%)であった(表6)。なお、ポリマー法を用いた場合は内因性ビオチン活性の除去処理は必要ない。

表6：内因性ビオチン除去処理について

	施設数 (ロシュ機械法のみ)	共染の評価点 (2点満点)
実施した	4	1.85
実施しない	11	1.58
計	15	

共染の有無の評価点(2点満点、全参加施設の平均点は1.70)を比較すると、この処理を実施した4施設の平均点が1.85であるのに対し、処理をしなかった11施設の平均点は1.58であった(表6)。

処理をした方が共染の有無の評価点が高く、共染が少ない結果となった。

4) 抗原の賦活処理について

(1) 抗原賦活の方法

全ての施設が加熱処理の賦活処理を実施していた。加熱方法と染色方法（機器メーカー別）を表7にまとめた。

表7：加熱方法と染色方法

加熱方法	染色方法(施設数)				計
	ロシュ	ライカ	ダコ	用手法	
自動染色機	15 (100)	9 (100)	2 (66.7)	0 (0)	26
温浴装置	0 (0)	0 (0)	1 (33.3)	6 (50)	7
オートクレーブ	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (25)	3
圧力釜	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (16.7)	2
マイクロウェーブ	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (8.3)	1
計	15 (100)	9 (100)	3 (100)	12 (100)	39

※()内は割合(%)

機械法で実施した27施設中26施設(96.3%)は賦活の加熱を自動染色機で行い、1施設(3.7%)のみが恒温温浴装置(電気ポットなど)で行っていた。

用手法では恒温温浴装置(電気ポットなど)が6施設(50.0%)、オートクレーブが3施設(25.0%)、圧力釜が2施設(16.7%)、マイクロウェーブが1施設(8.3%)であった。

平成21年度の調査ではマイクロウェーブで加熱した施設は38施設中7施設であったが、今回は1施設のみであった。加熱方法と総合評価を表8にまとめた。

表8：加熱方法と総合評価

加熱方法	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
自動染色機	19 (73.1)	6 (23.1)	1 (3.8)	26 (100)
温浴装置	4 (57.1)	3 (42.9)	0 (0)	7 (100)
オートクレーブ	2 (66.7)	0 (0)	1 (33.3)	3 (100)
圧力釜	0 (0)	2 (100)	0 (0)	2 (100)
マイクロ ウェーブ	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
計	25	11	3	39

A評価の施設に関して、加熱を自動染色機で行った施設のうち、A評価は71.3%、同様に温浴装置で行った施設は57.1%、オートクレーブでは66.7%であった。また、C評価の3施設の加熱方法は自動染色機、オートクレーブ、マイクロウェーブで、それぞれ1施設ずつであった。

(2) 賦活液について

賦活液に使用した試薬と染色方法別に表9にまとめた。

表9：抗原賦活液と染色方法

使用試薬	染色方法(施設数)				計
	ロシュ	ライカ	ダコ	用手法	
ロシュ・CC1	15	0	0	0	15
ライカ・BOND Epitope Retrieval Solution 1(クエン酸系 pH 6)	0	2	0	0	2
ライカ・BOND Epitope Retrieval Solution 2(EDTA系 pH 9)	0	7	0	0	7
ダコ Target Retrieval Solution, pH 6 など	0	0	2	2	4
ダコ Target Retrieval Solution, pH 9	0	0	0	1	1
ニチレイ HEAT PROCESSOR Solution pH 9	0	0	0	4	4
ニチレイ・ヒストファイン抗原賦活化液 pH 9.0	0	0	0	1	1
自家製クエン酸緩衝液 (pH 6)	0	0	1	2	3
三菱化学メディエンス・抗原賦活化液 (中性)	0	0	0	1	1
自家製トリス塩酸緩衝液 (pH 10)	0	0	0	1	1
計	15	9	3	12	39

さらに、賦活液をLow pH (pH 6～中性を含む) と High pH (pH 9～10) の2つに分け、評価成績と比較した(表10)。

A評価施設の割合は、Low pH使用施設が62.5%、High pH使用施設が66.7%で、ほぼ同じ割合であった。C評価施設の3施設は全てLow pHを使用していた。

(3) 加熱の方法、温度、時間について

加熱の方法と温度について表11にまとめた。また、加熱時間と温度について表12にまとめた。

表10：賦活化試薬と総合評価

賦活化試薬	総合評価(施設数)			合計
	A	B	C	
Low pH	15 (62.5)	6 (25)	3 (12.5)	24 (100)
High pH	10 (66.7)	5 (33.3)	0 (0)	15 (100)
計	25	11	3	39

※()内は割合(%)

表11：加熱方法と温度

加熱方法	温度(°C)(施設数)								計
	90°C	95°C	97°C	98°C	99°C	100°C	121°C	150°C	
染色機	1	2	2	0	1	20	0	0	26
温浴	0	3	1	3	0	0	0	0	7
オートクレーブ	0	0	0	0	0	0	3	0	3
圧力釜	0	1	0	0	0	0	0	1	2
マイクロウェーブ	0	1	0	0	0	0	0	0	1
計	1	7	3	3	1	20	3	1	39

表12：加熱時間と温度

時間(分)	温度(°C)(施設数)								計
	90°C	95°C	97°C	98°C	99°C	100°C	121°C	150°C	
1分	0	0	0	0	0	0	1	0	1
7分	0	0	0	0	0	0	1	0	1
10分	0	0	0	0	0	0	1	0	1
15分	0	2	0	0	0	0	0	1	3
20分	0	0	2	0	0	8	0	0	10
30分	0	0	1	0	0	2	0	0	3
40分	0	2	0	0	0	0	0	0	2
45分	0	0	0	2	0	0	0	0	2
60分	1	3	0	1	1	10	0	0	16
計	1	7	3	3	1	20	3	1	39

加熱温度は90°Cから150°Cと様々であり、最も高温の150°Cで加熱した施設の加熱方法は圧力釜であった。

加熱の方法と温度の組み合わせで最も多かったのは、自動染色機で100°Cの加熱を行った施設の20施設(51.3%)であった。

加熱時間は1分から60分と時間の幅が広く、加熱温度と時間の組み合わせは100°C、60分(10施設)、100°C、20分(8施設)、95°C、60分(3施設)の順に多かった。加熱時間が短時間(10分以下)の3施設の加熱方法は全てオートクレーブであった。

加熱温度と時間の組み合わせと総合評価の関係を表13にまとめた。

表13：加熱温度・時間の組み合わせと総合評価

加熱温度、時間	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
90°C、60分	0	1	0	1
95°C、15分	0	1	1	2
95°C、40分	1	1	0	2
95°C、60分	3	0	0	3
97°C、20分	1	1	0	2
97°C、30分	0	1	0	1
98°C、45分	2	0	0	2
98°C、60分	0	1	0	1
99°C、60分	1	0	0	1
100°C、20分	6	2	0	8
100°C、30分	1	0	1	2
100°C、60分	8	2	0	10
121°C、1分	0	0	1	1
121°C、7分	1	0	0	1
121°C、10分	1	0	0	1
150°C、15分	0	1	0	1
計	25	11	3	39

A評価の25施設において、加熱温度と時間の組み合わせで多かったのは、100℃、60分（8施設）、次いで100℃、20分（6施設）、95℃、60分（3施設）の順であった。

A評価であった25施設の加熱温度は95℃～121℃であり、加熱方法は自動染色機が19施設、温浴が4施設、オートクレーブが2施設であった（表8、表13）。

圧力釜を使用した2施設はともにB評価で、マイクロウェーブを使用した1施設はC評価であり、両方法ともA評価施設は無かった（表8）。

加熱温度が最も低い90℃の1施設と、最も高い150℃の1施設はともにB評価であった（表13）。

抗原の賦活処理には加熱処理と酵素処理があるが、Ki-67の免疫染色では主に加熱処理が用いられる。本調査では全ての施設で加熱処理を用いていたが、加熱方法、温度時間は施設ごとで様々であった。

（4）賦活液の種類と加熱温度と時間の組み合わせ

賦活液のpH（LowとHigh）別に加熱温度・加熱時間と総合評価を比較した（表14、15）。

表14：Low pH賦活液使用施設の加熱温度・時間と評価

賦活液 Low pH	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
温度、時間				
90℃、60分	0	1	0	1
95℃、15分	0	0	1	1
95℃、60分	2	0	0	2
97℃、20分	1	1	0	2
99℃、60分	1	0	0	1
100℃、20分	0	1	0	1
100℃、30分	1	0	1	2
100℃、60分	8	2	0	10
121℃、1分	0	0	1	1
121℃、7分	1	0	0	1
121℃、10分	1	0	0	1
150℃、15分	0	1	0	1
計	15	6	3	24

表15：High pH賦活液使用施設の加熱温度・時間と評価

賦活液 High pH	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
温度、時間				
95℃、15分	0	1	0	1
95℃、40分	1	1	0	2
95℃、60分	1	0	0	1
97℃、30分	0	1	0	1
98℃、45分	2	0	0	2
98℃、60分	0	1	0	1
100℃、20分	6	1	0	7
計	10	5	0	15

Low pH使用の24施設では100℃、60分の組み合わせが10施設（41.2%）で最も多く、そのうち9施設はロシュの機械法であった。

一方、High pH使用の15施設では、100℃、20分の組み合わせが7施設（46.7%）で最も多く、その全てがライカの機械法であった。これは自動染色機のメーカーの推奨プロトコールに従った結果と思われる。

5) 使用抗体について

（1）抗体のクローン、メーカー

使用した抗Ki-67抗体のクローン名と染色法を表16にまとめた。

表16：抗体のクローン名と染色方法

使用抗体	染色方法(メーカー)(施設数)				計
	ロシュ	ライカ	ダコ	用手法	
クローン名					
MIB-1	11	7	<u>2</u>	9	29
30-9	<u>4</u>	1	0	0	5
SP6	0	0	1	3	4
MM1	0	<u>1</u>	0	0	1
計	15	9	3	12	39

※下線数字は染色機と抗体が同一メーカーの施設数

使用したクローンはMIB-1：29施設（74.4%）、30-9：5施設（12.8%）、SP6：4施設（10.3%）、MM1：1施設（2.6%）の順であった。各染色方法ともMIB-1を使用した施設が最も多かった。

MIB-1はダコ、30-9はロシュ、SP6はニチレイおよびサーモ、MM1はライカがそれぞれ販売しているが、染色機を使用した27施設において、染色機メーカーと抗体メーカーが同一の割合は、ロシュ：4/15（26.7%）、ライカ：1/9（11.1%）、ダコ：2/3（66.7%）、計：7/27（25.9%）であった（表16）。本調査の結果が

ら、染色機メーカーと同じ抗体を使用している割合は低いことが明らかとなった。この理由はMIB-1（ダコ）がKi-67抗原に対する抗体の代表的クローンとして以前から使用されてきた経緯があり、染色機を導入後も以前から使用していた抗体をそのまま使用し続けている施設が多いことによると考えられる。染色機メーカーと同じ抗体を使用した施設のうち、A評価施設の割合は、ロシュ：4/4（100%）、ライカ：1/1（100%）、ダコ：1/2（50.0%）で合計6/7（85.7%）であるのに対して、染色機メーカーと異なるメーカーの抗体を用いた施設のA評価施設の割合はロシュ：7/11（63.6%）、ライカ：6/8（75.0%）、ダコ：1/1（100%）で合計14/20（70.0%）であり、染色機と同一メーカーを使用した方がA評価の割合が高かった。

クローン別の総合評価を表17にまとめた。

表17：使用抗体と総合評価

使用抗体	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
クローン名				
MIB-1	17 (58.6)	9 (31.0)	3 (10.3)	29 (100)
30-9	5 (100)	0 (0)	0 (0)	5 (100)
SP6	2 (50.0)	2 (50.0)	0 (0)	4 (100)
MM1	1 (100)	0 (0)	0 (0)	1 (100)
計	25	11	3	39

()内は割合(%)

各クローンにおけるA評価施設の割合は、MIB-1：17/29（58.6%）、30-9：5/5（100%）、SP6：2/4（50%）、MM1：1/1施設（100%）であった。

C評価の3施設は全てMIB-1を使用した施設であった。

MIB-1は抗Ki-67抗体の代表的なクローンであり、使用施設が多い。機械法に移行した施設でも染色機メーカーの販売する抗体を使用せず、MIB-1を用いている施設が多い。

MIB-1以外のクローンの3つを使用した10施設のうち、A評価施設は8施設（80.0%）となり、MIB-1の58.6%を大きく上回った。

(2) 抗体の希釈倍率について

使用した抗体クローン別の希釈倍率を表18にまとめた。さらに各クローン別に希釈倍率と総合評価の結果を表19～表22にまとめた。

表18：抗体の希釈倍率

希釈倍率	抗体のクローン名(施設数)				計
	MIB-1	30-9	SP6	MM1	
50倍	4	0	0	0	4
100倍	8	0	0	0	8
200倍	7	0	1	1	9
250倍	1	0	0	0	1
300倍	1	0	0	0	1
400倍	1	0	0	0	1
800倍	1	0	0	0	1
希釈済み	5	5	3	0	13
希釈済を2倍	1	0	0	0	1
計	29	5	4	1	39

表19：クローンごとの希釈倍率と総合評価（MIB-1）

MIB-1 希釈倍率	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
50倍	3	0	1	4
100倍	4	3	1	8
200倍	3	4	0	7
250倍	1	0	0	1
300倍	1	0	0	1
400倍	1	0	0	1
800倍	1	0	0	1
希釈済み	3	2	0	5
希釈済みを2倍	0	0	1	1
計	17	9	3	29

表20：クローンごとの希釈倍率と総合評価（30-9）

30-9 希釈倍率	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
希釈済み	5	0	0	5
計	5	0	0	5

表21：クローンごとの希釈倍率と総合評価（SP6）

SP6 希釈倍率	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
希釈済み	2	1	0	3
200倍	0	1	0	1
計	2	2	0	4

表22：クローンごとの希釈倍率と総合評価（MM1）

MM1 希釈倍率	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
200倍	1	0	0	1
計	1	0	0	1

MIB-1を使用した施設の希釈倍率は50倍から800倍、希釈済みさらさらに2倍にするなど、様々であり、100倍（8施設）、200倍（7施設）、希釈済み（5施設）の順に多かった（表18）。

MIB-1使用施設において、A評価施設は17施設（58.6%）であったが、それらの施設での希釈倍率は50倍から800倍、希釈済み抗体を使用など、様々であった。MIB-1使用施設でA評価施設の希釈倍率で多かったのは100倍（4施設）、50倍（3施設）、200倍（3施設）、希釈済み（3施設）であった。なお、希釈済み抗体をさらに2倍して使用した施設はC評価であった（表19）。

30-9を使用した5施設の全てが希釈済み抗体を用いており、全施設がA評価であった（表20）。なお、30-9使用施設は全て機械法で、ロシユが4施設、ライカが1施設であった。

SP6を使用した4施設のうち、3施設がニチレイの希釈済み抗体、1施設がサーモの抗体を200倍に希釈して実施していた。ニチレイを使用した施設は全てが手法であり、サーモを使用した施設はダコの機械法であった（表16、17）。SP6使用施設のA評価施設は2施設（50%）であり、2施設とも希釈済み抗体を使用した施設であった（表21）。

MM1を使用した施設は1施設のみで、200倍に希釈して実施し、A評価であった（表22）。

（3）抗体の反応時間

一次抗体の反応時間を、クローンごとに表23にまとめた。

表23：一次抗体の反応時間（クローン別）

反応時間	抗体のクローン名(施設数)				計
	MIB-1	30-9	SP6	MM1	
15-16分	8 (27.6)	3 (60.0)	0	1 (100)	12
20分	1 (3.4)	0	0	0	1
30-32分	14 (48.3)	2 (40.0)	2 (50.0)	0	18
45分	2 (6.9)	0	0	0	2
60分	3 (10.3)	0	2 (50.0)	0	5
一晚	1 (3.4)	0	0	0	1
計	29 (100)	5 (100)	4 (100)	1 (100)	39

※()は割合(%)

一次抗体の反応時間は30-32分：18施設（46.2%）、15-16分：12施設（30.8%）、60分：5施設（12.8%）の順に多く、クローン別では、MIB-1：30-32分が14施設（48.3%）、30-9：15-16分（60.0%）、SP6：15-16分と60分がそれぞれ2施設（50.0%）ずつ、MM1の1施設は15分であった。

各クローン別の一次抗体の希釈倍率・反応時間と総合評価を表24～表27にまとめた。

表24：MIB-1使用施設の希釈倍率・反応時間と総合評価

MIB-1 希釈倍率・反応時間	総合評価 (施設数)			
	A	B	C	計
50倍・32分	3	0	0	3
50倍・一晚	0	0	1	1
100倍・15-16分	1	2	0	3
100倍・30-32分	2	1	1	4
100倍・60分	1	0	0	1
200倍・15分	2	1	0	3
200倍・32分	1	3	0	4
250倍・32分	1	0	0	1
300倍・15分	1	0	0	1
400倍・20分	1	0	0	1
800倍・15分	1	0	0	1
希釈済み・30分	1	0	0	1
希釈済み・45分	2	0	0	2
希釈済み・60分	0	2	0	2
希釈済みを2倍・30分	0	0	1	1
計	17	9	3	29

表25：30-9使用施設の希釈倍率・反応時間と総合評価

30-9 希釈倍率・反応時間	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
希釈済み・15-16分	3	0	0	3
希釈済み・30-32分	2	0	0	2
計	5	0	0	5

表26：SP6使用施設の希釈倍率・反応時間と総合評価

SP6	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
希釈倍率・反応時間				
希釈済み・30分	1	0	0	1
希釈済み・60分	1	1	0	2
200倍・30分	0	1	0	1
計	2	2	0	4

表27：MM1使用施設の希釈倍率・反応時間と総合評価

MM1	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
希釈倍率・反応時間				
200倍・15分	1	0	0	1
計	1	0	0	1

クローンごとでA評価が多かった希釈倍率・反応時間の組み合わせとその施設数は、MIB-1では50倍・32分が3施設(表24)、30-9では希釈済み・16分が3施設(表25)、SP6)では希釈済み・60分と、希釈済み・30分がそれぞれ1施設(表26)、MM1では200倍・15分が1施設(表27)であった。

(4) 抗体の反応温度

一次抗体の反応温度を方法別に表28にまとめた。

表28：一次抗体の反応温度

一次抗体 反応温度	染色方法(メーカー)(施設数)				計
	ロシュ	ライカ	ダコ	用手法	
室温	1	9	3	11	24
37℃	12	0	0	0	12
42℃	2	0	0	0	2
4℃	0	0	0	1	1
計	15	9	3	12	39

一次抗体の反応温度は室温が24施設(61.5%)、37℃が12施設(30.8%)、42℃が2施設(5.1%)、4℃が1施設(2.6%)であった。

一次抗体の反応温度で、37℃および42℃に加温した施設の全てはロシュの機械法であり、ロシュの染色機を使用して室温で反応させた施設は1施設であった。また、ライカ、ダコの機械法で実施した全ての施設は室温であった。

用手法では12施設中、11施設が室温で、1施設のみ、4℃であった。この施設は4℃で一晩の条件で反応を行っていた。

一次抗体の反応温度と総合評価を表29にまとめた。

表29：一次抗体の反応温度と総合評価

反応温度	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
室温	14 (58.3)	9 (37.5)	1 (4.2)	24 (100)
37℃	10 (83.3)	1 (8.3)	1 (8.3)	12 (100)
42℃	1 (50)	1 (50)	0 (0)	2 (100)
4℃	0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
計	25	11	3	39

※()は割合(%)

A評価施設は室温では24施設中14施設(58.3%)、37℃では12施設中10施設(83.3%)、42℃では2施設中1施設(50.0%)であった。なお、4℃で実施した施設は1施設でC評価であった。

6) 検出系(二次抗体など)の反応

(1) 検出系試薬

検出系試薬(二次抗体など)と染色法を表30にまとめた。

表30：検出系試薬と染色法

検出試薬(メーカー名)	染色方法(メーカー)(施設数)				計
	ロシュ	ライカ	ダコ	用手法	
i-View(ロシュ)	<u>15</u>	0	0	0	15
Bond系(ライカ)	0	<u>9</u>	0	0	9
EnVision系(ダコ)	0	0	<u>2</u>	3	5
シンプルステイン(ニチレイ)	0	0	1	9	10
計	15	9	3	12	39

※下線は染色機メーカーと検出試薬メーカーが同一のものを示す

機械法では、ロシュの機械法で実施した15施設はLSAB法のi-View(ロシュ)を使用した。ライカの機械法で実施した9施設はポリマー法のBond系試薬(ライカ)を使用した。ダコの機械法で実施した3施設のうち、ポリマー法のEnVision系(ダコ施設)を使用したのは2施設で、1施設はポリマー法のシンプルステイン(ニチレイ)を使用していた。

機械法で実施した27施設では、染色機と同一メーカーの検出試薬を用いた施設は26施設であった。ロシュ、ライカの機械法では全ての施設で同一メーカーの検出系試薬を用いていたが、ダコの機械法では3施設中、1施設がニチレイの検出試薬を使用していた。

用手法で実施した12施設のうち、9施設がシンプルステイン(ニチレイ)を使用し、3施設がEnVision系(ダコ)の試薬を使用していた。

本調査から、機械法では必ずしも同一メーカーの検出系試薬を使用しない施設があることが判明した。一方、用手法では12施設の全てがポリマー法であるシンプルステイン、EnVisionを使用していた。染色工程がLSAB法より少ないポリマー法が採用されたと思われる。

(2) 二次抗体の反応温度

二次抗体の反応温度をLSAB法とポリマー法の2群に分けて表31にまとめた。

表31：二次抗体の反応時間

反応時間(分)	検出原理(施設数)		計
	LSAB法	ポリマー法	
8-10分	15	10	25
20分	0	5	5
30分	0	7	7
45分	0	1	1
60分	0	1	1
計	15	24	39

検出系にLSAB法を用いた15施設は全てロシュのi-Viewを用いた機械法で実施しており、ビオチン化二次抗体の反応時間は全ての施設で8-10分であった。一方、ポリマー法で実施した24施設では8-60分と反応時間は様々であった。

ポリマー法を用いた24施設をさらに検出系試薬別に分けると(表32)、ライカの検出系試薬を使用した9施設は全てライカの機械法で実施しており、全施設8-10分の反応時間であった。ダコの検出系試薬は2種類用いられていた。EnVision FLEXを使用した3施設のうち、2施設はダコの機械法で実施し、反応時間はともに20分であった。1施設は用手法で実施し、反応時間は30分であった。EnVision+を用いた施設は2施設であったが、いずれも用手法で、反応時間は10分と30分であった。ポリマー法で最も多く、10施設で使用されているニチレイのシンプルステインは、30分の反応が5施設で最も多いが、20分(3施設)、45分(1施設)、60分(1施設)と反応時間が様々であった。また、シンプルステインを用いた施設のうち、1施設はダコの機械法で実施し反応時間は30分であった。

表32：検出系試薬（ポリマー法）

	メーカー名（施設数）				計
	ライカ	ダコ		ニチレイ	
反応時間	Refine Detection/Intense Detection	FLEX	+	シンプルステイン	
8-10分	9	0	1	0	10
20分	0	2	0	3	5
30分	0	1	1	5	7
45分	0	0	0	1	1
60分	0	0	0	1	1
計	9	3	2	10	24

(3) 二次抗体の反応温度

二次抗体の反応温度を表33にまとめた。

表33：二次抗体の反応温度

反応温度	検出原理（施設数）		計
	LSAB法	ポリマー法	
37℃	14	0	14
42℃	1	0	1
室温	0	24	24
計	15	24	39

検出系にLSAB法のロシュの試薬、機械を用いた15施設の反応温度は、37℃（14施設）、42℃（1施設）であった。ポリマー法では24施設全てが室温で反応させていた。

(4) 酵素標識ストレプトアビジンの反応

ロシュのi-Viewを用いた機械法で実施した15施設のストレプトアビジン-ビオチンの反応温度は全て37℃であった。

7) 発色基質について

(1) 発色基質の試薬

発色基質のDAB(3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochlorid)について表34にまとめた。

表34：発色基質について

試薬	染色方法（施設数）		計
	機械法	用手法	
自動染色機 メーカーの試薬	26	0	26
市販の基質キット	1	11	12
自家調製	0	1	1
計	27	12	39

機械法で実施した27施設中、26施設が機器メーカーの試薬を使用し、ダコの自動機を用いた1施設のみがメーカー以外の市販基質キットを使用していた。

用手法で実施した12施設のうち11施設が市販の基質キットを使用し、1施設のみがDAB試薬を自家調製して使用していた。

(2) 発色時間について

発色の時間は、10秒から8分まで様々で用手法の方が機械法に比べ多様であった。また、顕微鏡下で観察し、適度な時間染色するという回答があった（表35）。

表35：発色時間について

発色時間	染色方法（施設数）				計
	ロシュ	ライカ	ダコ	用手法	
10秒	0	0	0	1	1
1-2分	0	0	0	4	4
5分	1	1	0	2	4
8-10分	14	8	3	4	29
時間調整	0	0	0	1	1
計	15	9	3	12	39

温度に関してはロシュの機械法で実施した15施設は全て37℃で行ったが、他の機械法、用手法では室温であった。

8) 後染色について

(1) 後染色の試薬について。

後染色について表36にまとめた。

表36：後染色のヘマトキシリンについて

ヘマトキシリン	染色方法(施設数)				計
	ロシュ	ライカ	ダコ	用手法	
自動免疫染色機の試薬	13	8	1	0	22
キット試薬	0	1	0	0	1
ルーチン用を流用	2	0	2	12	16
計	15	9	3	12	39

機械法で実施した27施設のうち22施設は自動機メーカーの試薬を使用していた。

用手法で実施した12施設は全て、HE染色など、ルーチンで使用しているヘマトキシリンを使用していた。

(2) 後染色の時間、温度について

後染色の時間は30秒から32分と様々であるが、用手法の方が機械法に比べ短時間の傾向があった(表37)。また、後染色の温度は、ロシュの機械法の5施設のみが37℃であった以外は室温であった。

表37：後染色の時間

発色時間	染色方法(施設数)				計
	ロシュ	ライカ	ダコ	用手法	
3秒程度	0	0	0	1	1
30秒	0	0	0	3	3
1-3分	2	1	3	5	11
5分	1	5	0	3	9
8分	6	1	0	0	7
10-12分	4	2	0	0	6
20分	1	0	0	0	1
32分	1	0	0	0	1
計	15	9	3	12	39

5. 免疫染色の実施状況について

1) 年間の免疫染色実施枚数

本精度管理調査に参加された39施設の年間の免疫染色実施枚数と今回のサーベイの総合評価の結果を表38にまとめた。

表38：年間枚数と総合評価

年間枚数 (枚数)	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
100未満	2	1	1	4
100-500未満	2	4	0	6
500-1,000未満	2	1	1	4
1,000-2,000未満	2	2	0	4
2,000-3,000未満	5	0	0	5
3,000-5,000未満	4	0	0	4
5,000-8,000未満	5	1	1	7
8,000以上	3	2	0	5
計	25	11	3	39

年間実施枚数は100枚未満から、23,295枚であった。年間実施枚数が1,000未満(14施設)と、それ以上(25施設)の2群に区分し総合評価を比較すると、1,000枚未満の施設ではA評価施設が42.9%、1,000枚以上の施設では76.0%であった。実施枚数が少ない施設ではA評価施設の割合が件数の多い施設に比べて33.1ポイント下回った(表39)。B評価施設の割合は1,000枚未満の施設が42.9%、1,000枚以上の施設が20.0%であり、1,000枚未満の施設で割合が高かった。C評価の3施設のうち、1,000枚未満の施設は2施設であった。

表39：年間実施枚数1,000枚未満とそれ以上の比較

区分	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
年間実施枚数				
1,000未満	6 (42.9)	6 (42.9)	2 (14.3)	14 (100)
1,000以上	19 (76.0)	5 (20.0)	1 (4.0)	25 (100)
計	25	11	3	39

※()は割合(%)

2) 免疫染色後の結果の確認について

免疫染色後の染色結果の確認について調査した結果を染色方法別に表40にまとめた。

表40：免疫染色の結果の確認について

染色結果の確認	染色方法(施設数)		計
	機械法	用手法	
必ず確認する	19(70.4)	12(100)	31
時々確認する	7(25.9)	0(0)	7
確認しない	0(0)	0(0)	0
確認後、病理医と共に再度確認する	1(3.7)	0(0)	1
計	27(100)	12(100)	39

※()は割合(%)

免疫染色後に必ず染色結果を技師が確認してから病理医に提出する施設は31施設(79.5%)、時々確認する施設は7施設(17.9%)、確認後、病理医とともに再度確認すると自由回答した施設が1施設(2.6%)、確認せず提出すると回答した施設は0であった(表40)。必ず確認する施設の割合は、病理医と再度確認する施設を含めると32施設(82.1%)であった。

染色方法別で比較すると、用手法で実施した12施設は全て(100%)、必ず確認すると回答があった。一方、機械法で実施した27施設中、必ず確認する施設は病理医と再度確認すると回答した施設を加えると20施設で74.1%であった。時々確認する7施設は全て機械法での実施施設であった。

3) 染色結果の満足度について

染色結果の満足度をアンケート調査し、総合評価別に表41にまとめた。

表41：今回の染色結果の満足度について

染色結果の満足度	総合評価(施設数)			計
	A	B	C	
大変満足	2	0	0	2
満足	15	10	1	26
どちらともいえない	7	0	2	9
やや不満	1	1	0	2
不満	0	0	0	0
計	25	11	3	39

全体で大変満足、満足と回答した施設は28施設(71.8%)で、どちらともいえないが9施設(23.1%)、やや不満は2施設(5.1%)であった。

総合評価別では、大変満足、満足と回答した施設は、

A評価：17施設(68.0%)、B評価：9施設(90.9%)、C評価：1施設(33.3%)であった。A評価の7施設、C評価の2施設がどちらともいえないと回答があった。

4) 免疫染色での工夫、特徴および免疫染色で困っていることについて

免疫染色での工夫、特徴および免疫染色で困っていることについて、各施設から頂いた回答(自由記載)を表42、43に全て掲載した。

5) 今後の病理検査部門の精度管理調査についての意見について

今後の病理検査部門の精度管理の要望については、回答が1施設のみであったため、原文のまま以下に記載する。

「大多数の施設が参加可能な項目のサーベイを行うという必要性は理解できるが、今回のような診断結果に直に結びつく染色類のサーベイは非常に重要であると考えられる。公的(あるいはそれに近い)外部精度管理事業が少ない中、これらの染色技術を担保するデータが大病院でも乏しい現状を鑑みて、さらにレアなものでも行うことを考える必要があると思う。」

6) サーベイに用いた未染標本の切片的厚さおよび染色工程調査の設問量について

サーベイ用に各施設に配布した未染標本の切片的厚さと、染色工程アンケートの設問量に関して調査した結果を表44、45にまとめた。

切片的厚さが適切であったと回答したのは37施設(94.9%)、薄いと回答したのは2施設(5.1%)施設であり、厚いと回答した施設は無かった(表44)。切片的厚さに関してはほとんど(94.9%)の施設から適切との回答があり、配布した切片的厚さの違いが染色結果に支障をきたすことはないと思われた。

染色工程調査の設問量に関しては、設問量が適切であったと回答したのは24施設(61.5%)、多いと回答したのは14施設(35.9%)、未回答が1施設(2.6%)、少ないと回答した施設は無かった。

免疫染色は工程が多く、使用する抗体や検出試薬、染色方法(機械法、用手法)などが多様であるため、染色工程調査の設問数や選択肢が多くなった。このため、60%以上の施設から設問が多いとの回答があったものと思われる。染色工程調査は染色で重要な工程に限定することが必要と思われた。

表42：免疫染色における工夫、特徴について

染色方法	評価	自由記載(原文を要約)
R・XT	A	内因性ペルオキシダーゼブロックの反応時間を検体により調整している。
R・HX	B	撥水(5%スキムミルク前処理バッファー溶液に10分浸水)処理を行っている。 染色機の推奨プロトコールでは核の染まりが弱いので病理医の希望により長めに設定している
L・MAX	A	陽性コントロールを作製し、染色時に用いている。
用手法	C	用手法で実施しているため、気温や湿度で染色性が異なる。そのために技師間で抗体の特徴を共有し、染色している。
L・MAX	A	自動染色機では核の染色が不十分であるため、ヘマトキシリン染色を用手法で1分追加している。
用手法	A	染色態度に影響のない限りにおいて、できるだけ低コストで染色している。 一次抗体、検出系、発色系以外の試薬を自家調製し、一次抗体は未希釈抗体を購入している。

※R・XT:ロシュ・ベンチマーク XT / R・HX:ロシュ・ベンチマーク HX / L・MAX:ライカ ボンド MAX

表43：免疫染色で困っていることについて

染色方法	評価	自由記載(原文を要約)
R・XT	A	免疫染色は試薬代が高い割りに保険点数が低く、実施すると赤字になる。
R・HX	B	当施設でCD20の免疫染色が陰性であった切片が他施設では陽性となり、結果に乖離があった。 染色機メーカーと異なるメーカーの抗体を使用している。抗体の希釈はどちらのメーカーのものを使用すべきか。現状は染色機メーカーの希釈液を使用している。
L・III	A	所有する抗体数が多く、管理方法に困っている。 抗体の希釈倍率の決定。
用手法	B	陽性となるコントロールを入手することが難しい。
用手法	C	陽性となるコントロールを入手することが難しい。 用手法で実施しているため技師間で染色性に差がある。
R・XT	A	細胞診標本の免疫染色。
用手法	A	用手法なので手間がかかる。

※R・XT:ロシュ・ベンチマーク XT / R・HX:ロシュ・ベンチマーク HX / L・III:ライカ ボンド III

表44：未染標本の切片の厚さに関して

評価	回答施設数(%)
適切	37(94.9)
厚い	0(0)
薄い	2(5.1)
計	39(100)

表45：染色工程調査の設問量

評価	回答施設数(%)
適切	24(61.5)
多い	14(35.9)
少ない	0(0)
未回答	1(2.6)
計	39(100)

VII. 今後の病理検査部門の精度管理（染色サーベイ）を行うにあたり実施したアンケートの集計結果について

次年度以降の精度管理調査の参考とするため、免疫染色で使用件数の多い抗体名と実施件数の多い特殊染色名を調査した。どちらも件数の多い順に5つ回答する形式の設問によって調査した。特殊染色に関してはPAM（periodic acid-methenamine silver）染色の実施の有無を別途調査項目に加えた。

1. 使用件数の多い抗体の調査結果

使用件数が多い順に1番から5番まで、回答のあった抗体名とその回答施設数を表46にまとめた。使用件数が最も多い（1番件数が多い）と回答があった抗体はKi-67：18施設（46.1%）であり以下、HER2（HER2/neu）：6施設（15.4%）、ER/PgR（estrogen receptor/progesterone receptor）：3施設（7.7%）の順であった。

抗体名ごとに、使用件数が多い順、1番から5番と回答した施設数の合計は、Ki-67が最多の33であり、以下、CD3/20/79a：28、ER/PgR：26、HER2：22、Cytokeratin（wide）：14の順となった（表46）。

表46：使用件数の多い抗体（件数の多い5つの抗体名）

件数の多い順	抗体名(施設数)									
	Ki-67	CD3 CD20 CD79a	ER/PgR	HER2	CK (wide)	p53	CD34	D2-40	<i>H.pylori</i>	CK5/ CK6
1	18	1	3	6	2	2	1	2	2	1
2	6	5	6	8	5	6	0	0	0	1
3	6	6	7	5	2	1	2	1	0	0
4	3	10	7	3	2	1	0	0	0	0
5	0	6	3	0	3	1	1	0	0	0
計	33	28	26	22	14	11	4	3	2	2

※CD3/CD20/CD79aとER/PgRはそれぞれ単体で回答された数を合計した

表47：実施件数の多い特殊染色名

件数の多い順	染色名(施設数)												
	PAS	ギムザ	EVG	ダイロン	グロコット	チール ネルゼン	VB-HE	AZAN	マッソン	ALB PAS	ALB	鍍銀	PAM
1	20	5	1	0	1	0	1	2	0	7	0	0	0
2	6	6	3	1	2	3	8	3	2	0	2	1	1
3	1	2	3	7	3	5	2	0	3	1	2	1	2
4	4	3	6	4	4	3	0	5	3	0	1	4	1
5	1	2	5	4	5	4	2	2	2	1	3	2	1
計	32	18	18	16	15	15	13	12	10	9	8	8	5

※PAS:periodic acid-Schiff/EVG:elastica van Gieson/VB-HE:Victoria blue-hematoxylin eosin

ALB-PAS:alcian blue-periodic acid-Schiff/ALB:alcian blue/PAM:periodic acid methenamine silver

今回の精度管理調査のテーマを免疫染色と決定する際に、参加施設が多く見込めると予測して、抗Ki-67抗体を用いた免疫染色を実施したが、アンケート調査からもKi-67抗体の使用件数が多いことが判明した。Ki-67以外にはCD3/CD20/CD79aのようなリンパ球マーカーやER/PgR、HER2といった抗体の使用頻度が高いことが本調査によって把握できたため、今後の精度管理調査の参考とした。

2. 実施件数の多い特殊染色の調査結果

実施件数が多い順に1番から5番まで、回答のあった特殊染色名とその回答施設数を表47にまとめた。実施件数が最も多い（1番件数が多い）と回答があった染色法はPAS（periodic acid-Schiff）：20施設（51.3%）、以下、ALB（alcian blue）-PAS：7施設、ギムザ：5施設であった。

特殊染色名ごとに、実施件数が多い順、1番から5番と回答した施設数の合計はPASが最多の32であり、以下、ギムザ：18、EVG：18、ダイロン：16、グロコット：15、チール・ネルゼン：15の順であった（表47）。

特殊染色のうちPAM染色の実施施設は22施設（56.4%）であった（表48）。PAM染色は腎生検の病

理診断に欠かせない特殊染色であるが、腎生検を扱う施設はある程度限定されるため、実施施設が56.4%に留まったと推察される。

表48：PAM染色の実施状況

PAM 染色	回答施設数(%)
実施している	22(56.4)
実施していない	17(43.6)
計	39

免疫染色の普及とともに、以前に比べ特殊染色の実施件数や実施項目が減少しているが、切片上の様々な物質の同定に特殊染色が必要な場合もあり、その重要性は不変である。今回の調査で概ね特殊染色の実施頻度が把握できたので、今後の精度管理調査の参考としたい。

Ⅷ. まとめ

1. 調査参加施設数について

今回の病理検査部門の精度管理調査はKi-67抗原の検出を目的とした免疫染色サーベイを実施し、参加施設は39施設であった。当初は50施設から申し込みがあり、それぞれの施設に未染標本を送付したものの、染色標本を返送しなかった施設が11施設あった。その理由として、「免疫染色を実施していない」、「Ki-67の免疫染色を実施していない（抗体を保有していない）」と回答した施設があった。

平成21年度にも免疫染色の染色サーベイを実施したが、この時のテーマは「抗CD3抗体を用いた免疫染色法」であり、参加施設は38施設であった。5年前と比べ参加施設が1施設増加した。病理検査部門の精度管理調査では、なるべく多くの施設の参加が見込まれるテーマの選定を心掛けている。今回の調査では免疫染色における使用抗体の件数および特殊染色の実施件数を調査も併せて行った。この結果を次年度以降のテーマの選定の参考にする予定である。

2. 総合評価について

今回の調査では参加39施設中、A評価：25（64.1%）、B評価：11（28.2%）、C評価：3（7.7%）でD評価は0であった。

自動免疫染色機の普及が進んでいるが、自動免疫染色機（機械法）で染色した施設は27（69.2%）であった。H21年度の調査では65.8%であり、前回調査より機械法での実施施設の割合が微増した。

A評価施設の割合は、機械法が70.4%、用手法が50.0%であり、機械法が30.4ポイント高い結果であった。C評価施設数は機械法で1施設（機械法で実施の3.7%）、用手法で2施設（用手法で実施施設の16.7%）であった。このような結果から機械法の有用性がうかがえた。

本調査参加施設の年間の免疫染色の実施枚数は100枚

未満から、23,295枚と施設によって差が大きかった。実施枚数が年間1,000枚未満の14施設のうちA評価の割合は42.9%であったが、1,000枚以上の25施設のうちA評価施設は76.0%であり、実施枚数の多い施設の方がA評価施設の割合が高い結果となった。この理由は、実施枚数の多い施設では機械法での実施施設がほとんどであることや、多くの実施経験による技術的なノウハウの蓄積が高いことが影響していると思われる。

3. 染色工程調査について

免疫染色は施設ごとで使用する試薬、機器、方法が異なる。染色工程調査の結果、自動染色機は3メーカー（ロシュ、ライカ、ダコ）の機器が使用されていた。また、一次抗体は4種類のクローン（MIB-1、30-9、SP6、MM1）が使用されていた。自動染色機メーカーは抗体も販売しており、自社の一次抗体の使用を推奨しているものの、自社の一次抗体を使用している施設は7施設（機械法で実施の25.9%）と少なかった。自動染色機メーカーの抗体を使用した7施設のうちA評価施設は6施設（85.7%）であるのに対して、異なるメーカーの抗体を用いた20施設のうちA評価施設は14施設（70.0%）であり、染色機と同一メーカーを使用した方がA評価の割合が15ポイント以上高かった。なお、機械法でC評価となった1施設は異なるメーカーの抗体を用いていた。これらの結果から、自動染色機で実施する場合は染色機メーカーの推奨する抗体を用いた方が良いと推察される。自動染色機メーカーの推奨する染色プログラム（染色工程）はあくまでも自社の抗体、試薬を使用する前提になっているため、他社の抗体を使用した場合は、染色に不具合が生じた時の検証が難しくなる懸念もある。

免疫染色において、一次抗体の選定は最も重要なポイントであり一次抗体を変更するのは容易とは言えない。用手法の時代から使用し続けている、機種変更をした、あるいは病理医の意向など、様々な理由があると思われるが、他施設と比較して染色性が悪い、本調査などの染色サーベイで結果が思わしくないなど、不具合が指摘された場合は抗体の変更も一考した方が良いと思われる。Ki-67のような汎用される抗体は各染色機メーカーが販売しているが、特殊な抗体の場合は必ずしも染色機メーカーが販売していないこともある。この場合は抗体の希釈倍率、反応時間、賦活法などの条件設定を慎重に行うことが必要である。

一次抗体の選定の次に重要なポイントは抗体の希釈倍率や抗原の賦活方法の設定である。希釈倍率や賦活方法は通常はメーカーの推奨希釈倍率や推奨賦活法を参考に各施設で検討を重ねて決定している。本調査の結果、一番多くの施設（29施設）で使用されている抗体（MIB-1）のみで希釈倍率を比較すると50倍から800倍、また、希釈済み抗体をさらに2倍など、様々な希釈倍率で使用されていた。賦活法も加熱方法、温度、時間など様々な方法が用いられていた。C評価であった3施設の

うち、用手法で実施している2施設に関しては抗体希釈倍率と賦活方法が原因と思われたため、11月に開催した結果検討会で助言を行った。

2次抗体以降の検出試薬などは、メーカーの推奨法で実施している施設がほとんどであり、多様性や総合評価の差は認められなかった。

4. 免疫染色での工夫、特徴および免疫染色で困っていることについて

参加施設から寄せられた意見を表42、表43に掲載した。各施設で様々な工夫をしてより良い染色結果を追求しているようである。自動染色機の設定では核の染色（後染色）が弱いため、時間を延長する、あるいは用手法で追加染色している施設や、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング処理を細かに調整している施設もあり、自動染色機を使用している施設でも、技師の手による微調整をしている施設があった。

困っていることに関しては、以下のような意見（回答）が寄せられた。

免疫染色にかかる試薬代が高く、実施すると赤字になることを指摘した施設や、試薬を自家調製するなどして、免疫染色のコストを低くする工夫をしていると回答した施設があった。用手法であれば、緩衝液、賦活液などを自家調製して使用することが可能であるが、自動染色機で実施する場合はメーカーの提供する試薬を使用せざるを得ない。免疫染色のコストと保険点数に関しては以前から問題になっているが、今後の診療報酬の改正で改善に向かうことを期待したい。

自動染色機を使用している施設から抗体希釈液について、染色機と異なるメーカーの抗体を用いる場合はどちらのメーカーの抗体希釈液を使用するべきかの質問があった。これに関しては自動染色機メーカーに相談するなどし、自施設で両社のメーカーの希釈液を用いて実際に染色を行い、その結果を検証して決定すべきである。

陽性コントロールの切片的入手、選定に関する悩みも寄せられた。陽性コントロール切片とともに染色を行うことで染色の是非の検証が可能となるため、可能な限り、陽性コントロールをおいて染色をするのが理想である。自施設で得られた検体の残余組織から陽性コントロールブロックを作製して用いている施設も多いと思われるが、症例数の少ない施設ではこのようなブロックの入手は難しい。日ごろから陽性コントロールとして使用できそうな組織検体が提出された場合に残余検体の一部を別に包埋してブロックを作製することを心掛ける必要がある。

自施設で免疫染色（CD20の免疫染色）が陰性であった切片を他施設で染色すると陽性となり、染色結果に乖離が生じた事例を回答した施設があった。免疫染色で陰性の結果となった場合は、陽性コントロールが陰性の結果である場合は真に陰性と判断できる。CD20はBリンパ球のマーカーであるので、陽性コントロールが無くても、切片内に存在するBリンパ球の染色所見を確認

（internal controlの確認）することで染色の妥当性が確認できたはずである。今回の調査では、免疫染色後に技師が染色結果を確認してから病理医に提出するかの設問を設けた。「必ず確認する」と回答した施設は82.1%、「時々確認する」が17.9%で「確認しない」と回答した施設は無かった。この結果を機械法と用手法の施設に分けると、「必ず確認する」と回答した割合が、機械法が70.4%、用手法は100%であり、機械法の方が低かった。この理由としては機械法で染色した施設は自動染色機の染色結果を信頼する傾向が強く、染色後に「必ず確認する」割合を低くさせているのかもしれない。免疫染色の質を保証するためには全件必ず染色後の鏡検、確認をすると同時に陽性コントロール、internal controlの染色結果の確認をしてから病理医に提出することが必要である。

用手法で実施している施設からは技師間による染色結果の差が生じることや、手間がかかるといった回答が寄せられた。技師間によって染色結果に差が生じないように、手順書を遵守するのは言うまでもない。これに関しても、染色後の確認を行い、染色性が悪い場合は、その原因を検証し、是正することが必要である。免疫染色は手間、時間のかかる染色法である。実施枚数が多くなった場合は自動染色機導入の検討が必要かもしれない。今回の調査では年間2,000枚以上を染色している施設は全て自動染色機で染色を行っていた。

「細胞診検体の免疫染色」と回答した施設があった。体腔液検体や組織検体が得られない場合に提出される細胞診検体の鑑別診断のために免疫染色が必要な場合がある。また、液状化検体細胞診（LBC）検体などへの免疫染色の応用も今後は増加すると予想される。組織切片と細胞診検体では固定法などの標本作製法が異なるので、組織切片の免疫染色の条件が細胞診標本に当てはまらない事例もある。検体によって条件を検討する必要がある。

このほか、抗体の管理方法、希釈倍率に関する質問も寄せられたが、これらに関しては抗体のメーカーの仕様書や参考文献、あるいは文末に記載した参考図書を参照されたい。

他施設との結果に乖離が生じた事例を前述したが、自施設の染色標本と他施設の染色標本を比べる機会は少ない。本調査におけるA評価施設とC評価施設の染色像を図1～図4に示す。本精度管理調査のような外部精度管理に積極的に参加して自施設の染色の質の向上に努めていただきたい。

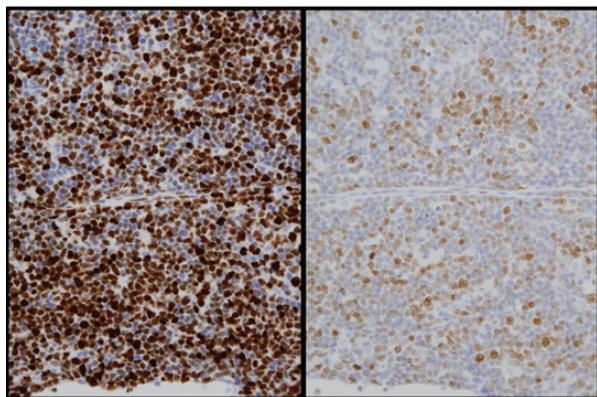


図1：Ki-67免疫染色像
(悪性リンパ腫、対物200倍。左：A評価、右：C評価)

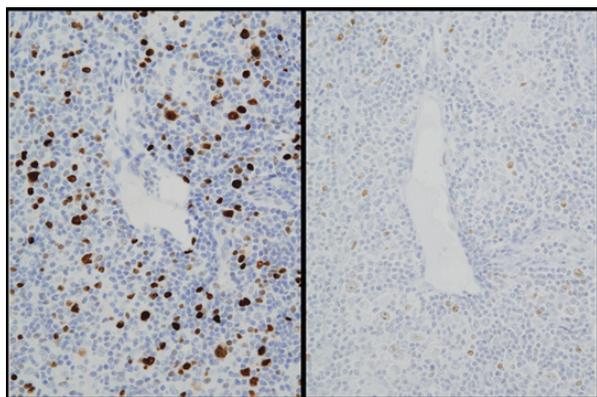


図2：Ki-67免疫染色像
(ホジキン病、対物200倍。左：A評価、右：C評価)

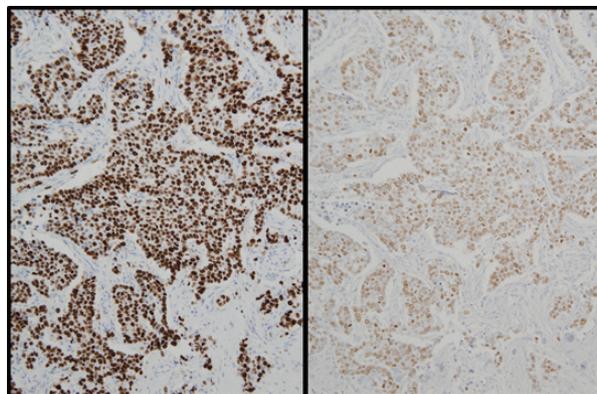


図3：Ki-67免疫染色像
(乳がん、対物100倍。左：A評価、右：C評価)

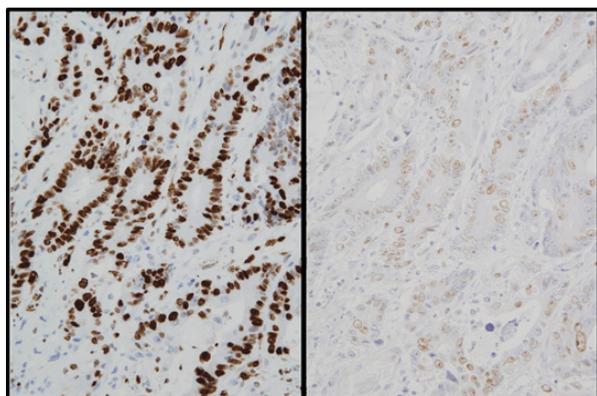


図4：Ki-67免疫染色像
(大腸がん、左：A評価、右：C評価、対物200倍)

Ⅹ. 総括

本年度は病理検査部門の精度管理調査として、抗Ki-67抗原の検出を目的とした免疫染色サーベイを実施した

免疫染色は抗体のクローン、抗原の賦活化法、検出試薬などの染色試薬、工程が多様であるため、染色結果の差異がどの工程によるものであるのか同定するのが難しい。今回の染色サーベイのC評価施設の工程を検証すると、用手法で実施した2施設に関しては、抗原の賦活法、抗体の希釈倍率が影響を及ぼしていると推測されたが、機械法で実施した1施設においては原因が不明であった。

自動染色機の導入が進んでおり、A評価施設の割合も機械法が用手法に比べて高く、機械法は有用であることが本調査を通じて明らかとなったものの、C評価施設が1施設あった。免疫染色に不具合が生じた際、機械法の場合はメーカーへの相談を推奨する。

病理検査部門にも自動化の波が押し寄せているが、標準化の観点からみると、喜ばしい傾向なのかもしれない。ただ、自動染色機も完全ではないため、染色に不具合が生じたときは染色原理、工程をよく理解した上で原因究明の必要がある。

質の保証された染色標本を作製することは我々の責務である。本調査が免疫染色の技術向上の一助となれば幸いである。

最後に、今回の精度管理調査にご協力いただいた施設各位、ならびにサーベイ標本を免疫染色していただき、ご助言を下さった染色機メーカーのダコ・ジャパン株式会社、ライカマイクロシステムズ株式会社、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社（50音順）の担当者様に深謝いたします。

【参考文献】

- 1) 平成21年度愛知県臨床検査精度管理調査総括集
- 2) 改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法 (学際企画)
- 3) 診断に役立つ免疫組織化学 (文光堂)
- 4) 免疫組織化学 診断と治療選択の指針 (文光堂)