

第6回迅速免疫染色研究会

会期 2014年7月26日（土）13:00～18:30

会場 北海道大学医学部 臨床大講堂

第6回迅速免疫染色研究会会長

迅速免疫染色研究会代表世話人

北海道大学大学院医学研究科 腫瘍病理学分野教授

田中 伸哉

事務局

北海道大学大学院医学研究科 腫瘍病理学分野

谷野美智枝

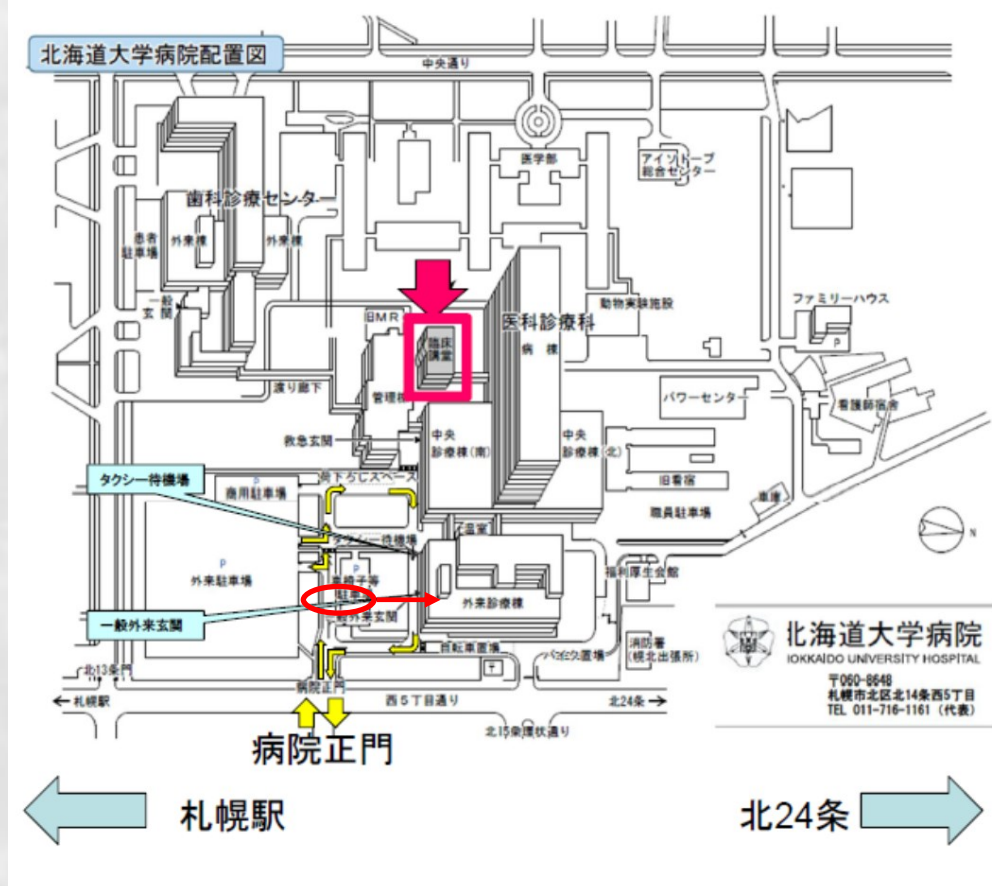
〒060-8638札幌市北区北15条西7丁目

Tel 011-706-5053/Fax 011-706-5902

e-mail: tanino@med.hokudai.ac.jp

会場地図

北海道大学医学部 臨床大講堂 臨床講義棟 2F



○病院正門から入り、救急・時間外玄関左手に見えます「臨床講堂」入口よりお入り下さい。

ごあいさつ

北海道もすがすがしい夏を迎えておりますが、ご関係の皆様方はいかがお過ごしでしょうか。

今回、札幌において第6回の迅速免疫染色研究会を開催する機会を戴き有り難うございます。これまでクローズの形式で行われてきたこの会が、5月のラピートの発売を受けて今回からどなたでも参加できるオープンな研究会へと移行しました。その最初の記念すべき会となり大変光栄に存じます。

今回は特別講演として三重大大学の白石泰三教授に、教育講演として神戸大学の伊藤智雄教授、千葉大学の太田聡准教授にそれぞれ講演をいただく予定です。また一般演題も8題いただくことができまして、ご講演される先生方、座長の先生方には北海道までお越しいただき感謝しております。

80年代後半に病理学に導入された免疫染色は急速に発展し、現在では医療にとって欠く事のできない技術となっております。その中で迅速免疫染色の技術の発展も益々期待されています。

この研究会の特徴は医師ばかりではなく、各大学・研究施設・病院の臨床検査技師、若手研究者など実務的に標本作製、機器改良、診断に関わるメンバーが集まっていることです。また各メンバーもこの機器の臨床病理への応用に熱心に取り組んでいます。それほど免疫染色は病理診断にとって重要で、ひいては患者さんの診断治療に深くかかわっているからに他なりません。

本研究会を通じて学術的な技術の向上、新規発展をはかることはもとより、懇親の場でも北海道の美味しいものを食べながら参加者が大いに交流をはかり人的交流面の中からさらなる発展の芽が生まれれば望外です。

どうぞ宜しくお願い致します。

第6回迅速免疫染色研究会会長

迅速免疫染色研究会代表世話人

北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学分野教授

田中 伸哉

プログラム 7月26日（土）

13:00-13:05 開会の挨拶：北海道大学医学研究科腫瘍病理学分野 田中伸哉

13:05-13:35 オープニングシンポジウム

座長 南條 博（秋田大学医学部附属病院 病理部）

演者：南谷佳弘（秋田大学大学院医学系研究科呼吸器・乳腺内分泌外科学講座）

演題：「新技術R-IHC法による迅速免疫染色：R-IHC開発の経緯と臨床応用」

13:35-14:25 特別講演

座長 後藤明輝（秋田大学 器官病態学講座）

演者：白石泰三（三重大学医学研究科腫瘍病理学）

演題：「前立腺病理と免疫染色」

15分休憩

14:40-15:40 一般演題（1）

座長 伊藤 智（秋田大学医学部附属病院 病理部）

1 非接触攪拌装置 ラピートの可能性

柳田絵美衣（神戸大学医学部附属病院 病理部）

2 迅速免疫染色装置を用いた特殊染色の検討について

今川奈央子（神戸大学医学部附属病院 病理部）

3 電界非接触攪拌技術を用いたパラフィン切片の免疫組織化学的検討

－抗体反応温度と使用抗体量における染色性について－

武山純也（三重大学 トランスレーショナル医科学講座）

4 術中捺印細胞診検体におけるR-IHCの有効性

諸橋 彰（仙台厚生病院臨床検査センター病理診断・臨床検査科）

15:40-16:40 一般演題（2）

座長 遠藤希之（仙台厚生病院 病理診断科）

5 市中病院の病理診断が迅速免疫染色装置から受ける恩恵

遠藤希之（仙台厚生病院 病理診断科）

6 脳腫瘍以外の術中迅速免疫染色の経験

南條博（秋田大学医学部附属病院 病理部）

7 呼吸器外科領域での使用経験と将来の臨床応用に関して

今野隼人（秋田大学大学院医学系研究科呼吸器・乳腺内分泌外科学講座）

8 脳腫瘍迅速診断におけるR-IHCの有用性

谷野美智枝（北海道大学 腫瘍病理学分野）

10分休憩

16:50-18:30 教育講演

座長 西村訓弘（三重大学トランスレーショナル医科学講座）

（1）演者：伊藤智雄（神戸大学医学部附属病院 病理診断科）

演題：「免疫染色 update」

（2）演者：太田 聡（千葉大学医学部附属病院病理部）

演題：「呼吸器疾患の免疫染色」

19:00-21:00 懇親会（サッポロビール園）

オープニングシンポジウム

座長 南條 博（秋田大学医学部附属病院 病理部）

演者 南谷佳弘（秋田大学大学院医学系研究科呼吸器・乳腺内分泌外科学講座）

演題「新技術R-IHC法による迅速免疫染色：R-IHC開発の経緯と臨床応用」

我々は肺癌・乳癌の手術を行う際の微小転移診断、特に術中診断に関して研究を進めていた。しかし市中病院でも手術中にリンパ節微小転移診断を可能にする方法は見つからなかった。一方、秋田県産業技術センターの赤上らは電界攪拌法を用いて抗原抗体反応を迅速化する方法を開発していたが、その臨床応用の方向性を見出せずにいた。たまたま同席した研究会で互いの考えを知り、共同研究を行った。ここで生まれたのが、新技術R-IHC法による迅速免疫染色である。この方法により肺癌の組織を、抗サイトケラチン抗体を用いて免疫染色を行ったところ20分以内に染色することができたため、技術開発を進めることとした。そして経済産業省や秋田県の支援を受けて、秋田県産業技術センター、秋田大学、株式会社アクトラス、秋田エプソン株式会社等で産官学の共同研究を開始した。また試作機が完成した時点から北海道大学腫瘍病理の田中伸哉教授の協力により装置開発が飛躍的に進んだ。特に脳腫瘍の分野で有用であることがわかった。その後7大学1病院（北海道大学、弘前大学、秋田大学、岩手医科大学、千葉大学、三重大学、神戸大学、仙台厚生病院）で研究会を形成して、装置開発がさらに飛躍的に進んだ。これらの共同研究を通して装置自体が臨床応用可能なレベルまで開発が進み、2014年5月12日にサクラファインテック・ジャパン株式会社からHistotech-R-IHC ラピートとして発売された。ラピートを用いて肺癌の手術時に郭清したリンパ節205個をサイトケラチンの免疫染色を行い、従来の免疫組織染色法で染色した結果と比較検討した。その結果、ラピートによる免疫組織染色は従来の方法と全く同様の結果が得られた。また微小転移も見逃しなく診断可能であった。本法は術中迅速免疫染色が可能なことから、術中に判断が求められる手術に応用可能である。今後のさらなる発展を期待している。

特別講演

座長 後藤明輝（秋田大学 器官病態学講座）

演者 白石泰三（三重大学医学研究科 腫瘍病理学講座）

演題 「前立腺病理と免疫染色」

前立腺は病変の種類が少なく、二大疾患は癌と肥大症である。肥大症を生検標本で診断することは困難で、針生検の目的は癌の存否診断とGleason分類にある。組織型も腺癌が大半である。腺癌の多くは通常型で、少数の導管腺癌がみられる。免疫染色に使用する抗体の種類も少なく、多数の抗体を使いこなすよりは、各抗体の特性・限界を把握し、慎重に判定を行うことが重要である。前立腺は低異型度の癌が多く、前立腺生検の観察時にもっとも注意すべきは癌の見落としを防ぐことである。

基底細胞のマーカー；高分子サイトケラチン（抗体クローン名34βE12）、サイトケラチン5/6あるいはp63が代表的である。サイトケラチンは細胞質が、p63は基底細胞の核が染色されるので二種（あるいは三種）の抗体のカクテルを使用することも可能である。異型腺管で基底細胞の完全消失が証明されれば癌と診断されるが、少しでも残存していればPINとなるので判定には注意が必要である。周囲の正常腺管を陽性対象として観察し、染色が的確に施行されているかまず確認すべきである。HE標本で異型を示さない腺管で基底細胞が完全欠如している場合はただちに癌とするのではなく、「異型腺管」に留めておくべきである。低頻度ではあるが、p63陽性の前立腺癌の報告もある。この場合はp40のほうがより特異性が高いとされている。

前立腺癌のマーカー；AMACR（ α -methyl-CoA racemase, P504S）は、前立腺癌でのみ発現している遺伝子産物として同定された。当初は前立腺癌特有とされていたが、今ではHGPIN、あるいは前立腺以外に肝細胞癌、腎細胞癌、尿路上皮癌でも陽性になることが知られている。有用性は低いようにもみられるが、癌の陽性マーカーであり、基底細胞マーカーと組み合わせればそれなりの有用性はある。p63とAMACRと高分子サイトケラチンを組み合わせたカクテル（PIN4）抗体が市販されており、基底細胞をp63と34βE12で茶色に染色し（DAB）、同時に癌細胞をP504S（AMACR）で赤色（Fast Red）に染色する。癌の部分が赤色にハイライトされ判りやすい像を呈する。

前立腺組織のマーカー；従来からのマーカーにはPSA（prostate specific antigen）、PSAP（prostatic acid phosphatase）がある。PSAのほうが安定した結果を示すが、高悪性度の前立腺癌の陽性率は90%程度である。比較的新しい抗体にPSMA（Prostate-Specific Membrane Antigen）があり、前立腺癌での感度はより高いが、尿路上皮癌の10%強が陽性となる。P501S（Prostein）はドット状に染まるためかあまり使用されていない。AR（Androgen receptor）も前立腺のマーカーになりうる。

tao@doc.meid.mie-u.ac.jp

教育講演(1)

座長 西村訓弘（三重大学トランスレーショナル医科学講座）

演者 伊藤智雄（神戸大学医学部附属病院 病理診断科）

演題 「免疫染色 update」

現在の病理学にとって、免疫染色は重要な補助的手段として欠かすことのできないものである。形態が最重視されることは依然として言うまでもないものの、免疫染色を併用した診断は形態のみの診断をはるかに凌駕する確度をもたらしてくれる。近年では治療の決定にも深くかわるようになり、重要性はさらに増加しているといっても過言ではない。ここでは近年登場した新たな抗体について紹介する。

胆管癌の術中免疫染色での断端評価は病理医にとって悩ましい問題である。免疫染色はこれまでp53が用いられることがあったが、陽性率が低い点が問題である。近年、CD10がこの目的に有用であると報告された。正常の胆管上皮は冊子縁の部分にCD10が陽性となる一方、癌では陰性となる。本学会の主たるテーマの一つである迅速免疫染色に適した知見と考える。

いわゆるsmall round cell tumorsの診断も難題の一つである。代表的な腫瘍であるEwing/PNETの診断も必ずしも容易とはいえない。免疫染色としてはMIC2が有名で、膜にびまん性強陽性となる場合は診断的価値が高いが、特異度は必ずしも高いとは言えない。近年NKX2.3が新たなマーカーとして着目されている。Olfactory neuroblastomaやsmall cell carcinomaなどを除けば特異的は比較的高いとされる。

悪性黒色腫の診断はこれまで、古典的なS100蛋白に加え、HMB45, Melan-Aなどがもちいられてきたが、感度、特異度が優れた抗体が一つでも多く欲しいところである。近年見い出された抗体として、最も有用なもののひとつにSox-10が挙げられる。感度、特異度とも優れており、重要な長所として核に陽性となることが挙げられる。メラニンの色調が問題となる免疫染色において、核で評価できるメリットは計り知れないものがある。

血液の領域ではhairy cell leukemiaの診断に有用な抗体が登場した。この疾患は病理医にとってなじみがやや薄いことに加え、必ずしも有用なマーカーが存在せず、病理的な確定が難しい場合が多かった。近年、BRAF V600E mutationが本疾患の100%にみられることが分かり、血液疾患の中では他の型にみられないものである。BRAF V600E mutation-specific antibodyを用いた免疫染色は感度100%、特異度も極めて高いものとして紹介された。

近年、transcription factorsを中心として、診断に有用な抗体が次々と登場し、診断病理の世界では喜ばしい状況となってきた。本講演では可能な限り新抗体を紹介したい。

教育講演(2)

演者 太田 聡（千葉大学医学部附属病院病理部）

演題 「呼吸器疾患の免疫染色」

呼吸器分野のみならず、近年の分子標的薬を含めた治療の進歩にともない、生検、細胞診、手術検体などの採取検体をより積極的に詳細な分析に活用する時代が到来しつつあることはいうまでもない。次世代シーケンサーにて核酸の解析がより低コストで実施できる時代が訪れつつあるが、古典的な病理組織標本を用いた検討は、その特徴を活かし多くの要求が生まれてくるであろう。また肺腺癌の原因遺伝子として上皮様増殖因子受容体の変異が見出されてから10年が経過した。分子標的薬の開発とその臨床応用がもっとも進んでいる分野の一つである呼吸器領域は、肺癌治療において上皮様増殖因子受容体やALK阻害剤が治療に利用されている。病理組織診断や細胞診断は、検体の扱いを含め、多角的な役割を要求されている。病理診断科では免疫組織化学、FISHそしてキメラタンパクの有無などの方法に加え、採取時の扱いなどが課題としてあがるのではないかな。

肺癌では、診断し治療する過程において初発時に進行しており手術不可能な症例が多くを占める。病理診断する立場から考えると、現代の治療に則した、治療選択のために生検もしくは細胞診を診断名として診断記載する必要がある。古典的に小細胞癌、非小細胞癌を鑑別すれば最低限の役割を果たしていた。現在では治療選択のために、小細胞癌、非小細胞癌の鑑別に加え、非小細胞癌であれば、扁平上皮癌、腺癌の鑑別が求められている。ただし、生検・細胞診では検体量が少量であることが多く、その形態学的鑑別は苦慮する。微少検体でも、追加での検討が可能な病理組織検体において、免疫組織化学的検討が必須となり、2014年度の診療報酬改訂において、肺癌診断は4抗体以上では2000点の免疫組織化学的検討の加算が認められている。また2015年に予定されている肺癌のWHO分類の改定においても病理診断の際に、形態学的に組織型の鑑別困難な症例の場合、できる限り免疫組織化学的検討を施行し、治療選択に貢献することが推奨される予定である。

今回は、免疫組織化学として使用する抗体の正常、発生過程におけるおもな分子の分布、肺癌診断における免疫組織化学的検討の方向性、WHO2015改訂などについて考えたい。

一般演題(1)

座長 伊藤 智（秋田大学病院 医学部附属病院 病理部）

<演題1>

非接触攪拌装置 ラピートの可能性

○柳田絵美衣

神戸大学医学部附属病院 病理部

【背景】迅速免疫染色研究会にて、術中迅速病理診断のための免疫染色を目的とし、ラピート（サクラファインテックジャパン）の開発・検討をおこなっている。ラピートは非接触攪拌技術により、スライドガラス上の液滴に直接電流が流れることは無く、液滴を上下させ攪拌させる仕組みである。攪拌させることにより抗原抗体反応を促進させ、免疫染色に要する時間の短縮を可能としている。この装置使用し、凍結切片を用いて染色した場合、で全工程は約15分となる。一次抗体反応時間5分、二次抗体反応時間5分で良好な染色が得られる。

【目的】凍結切片での免疫染色を目的とし開発された装置だが、パラフィン切片検体、細胞検体など、その他の可能性を求め検討をおこなった。

【方法】①検体はホルマリン固定パラフィン切片、一次抗体48種類を用い、一次抗体反応時間10分、二次抗体反応時間10分とし、装置を使用し染色した染色性と、通常の用手法で染色した染色性を比較し、染色強度、染色部位などの染色態度に遜色ない場合、装置使用法の染色結果を「染色良好」と判定②検体はホルマリン固定パラフィン切片、数種類の抗体を組み合わせた免疫多重染色を、装置を使用し染色した染色性と、通常の用手法で染色した染色性を比較し、染色強度、染色部位などの染色態度に遜色ない場合、装置使用法の染色結果を「染色良好」と判定③検体は細胞検体、数種類の固定液の検討をおこない染色性が良好であった固定で染色をおこなった。装置を使用し染色した染色性と、通常の用手法で染色した染色性を比較し、染色強度などを比較した。

【結果】ホルマリン固定パラフィン切片や細胞検体にも、非接触攪拌技術による染色時間短縮効果が得られた。

使用する一次抗体の力価や性質、対象とする抗原によっては、反応時間の調節が多少必要であるが、術中迅速中の染色だけでなく、パラフィン切片や細胞診検体を用いた日常業務での免疫染色においてもラピートは有用であるといえる。今回は、様々な検討をおこない、良好な結果が得られたので報告する。

神戸大学医学部附属病院病理部 先端組織染色センター（KATS）078-382-6474

<演題2>

迅速免疫染色装置を用いた特殊染色の検討について

○今川 奈央子¹⁾、柳田 絵美衣¹⁾、山田 寛¹⁾、塚本 龍子¹⁾、伊藤 智雄²⁾

国立大学法人 神戸大学医学部附属病院病理部¹⁾、国立大学法人 神戸大学医学部附属病院病理診断科²⁾

【背景】病理組織標本作製において、自動染色装置の開発によりさまざまな染色が自動化されている。これにより、臨床検査技師の業務の負担を軽減され、人為的なミスを削減するだけではなく、技量の個人差による染色のばらつきが軽減し、一定の染色性を保った標本を病理医へ提供することが可能となった。病理診断における要のHE染色だけではなく、当施設では、マッソントリクローム染色、PAS反応、EVG染色、PAM染色などに自動染色装置を使用している。その一方で、依頼頻度の低い染色や自動染色装置での染色が困難な染色方法は用手法で実施している。反応に時間を有する染色もあるため、染色時間の合間に別の業務を行うこととなる。いくつかの業務を平行して行うことにより、業務に焦りや油断が生じ人為的なミスにつながる可能性がある。用手法で行う特殊染色の時間を短縮することで、平行して行う業務を削減し、人為的なミスを防止できると考えた。我々は迅速免疫染色を目的として開発された迅速免疫染色装置を使用し、特殊染色における染色時間が短縮可能かを検討したので、結果を報告する。

【方法】迅速免疫染色装置の染色原理上、スライドガラス上での液体の表面張力が必要となす、染色溶液がアルコール溶媒の染色液は使用できないと考える。この為、アルシアン青染色、トリイジン青染色など、染色溶液がアルコール溶媒でない特殊染色を複数実施した。材料は、胃、腎臓などの臓器を使用した。方法は、最新染色法のすべて(医歯薬出版株式会社)に記載されているプロトコルを基準とし、迅速免疫染色装置で染色した標本が、基準プロトコルでの染色性と同程度の反応を示すまでの時間を測定し比較した。

【結果】迅速免疫染色装置を使用した結果、検討を実施した特殊染色において用手法より染色時間は短縮した。

【考察】迅速免疫染色装置の染色原理は、電界を操作することで粒子を運動させ、溶液が攪拌されるというものである。粒子が運動することで、静置状態で起こるブラウン運動よりも切片と染色色素の接触面積が増える。これにより染色時間が短縮されたと考えられる。

神戸大学医学部附属病院病理部 KATS078-382-6474

<演題3>

電界非接触攪拌技術を用いたパラフィン切片の免疫組織化学的検討
-抗体反応温度と使用抗体量における染色性について-

○武山純也

三重大学トランスレーショナル医科学

【はじめに】電界非接触攪拌技術は、電極で挟み低周波電界を印加することで発生する吸引力によって、非接触で液滴内部を迅速に均一化できる技術である。この技術を免疫組織化学染色（以下、免疫染色）に応用させることで、抗原抗体反応時間を短縮させる可能性が報告されている。過去に本法を用いた凍結切片における有用性は報告されているが、パラフィン切片での有用性や反応条件の検討結果は報告されていない。今回我々は、電界非接触攪拌技術を用いたパラフィン切片における抗体反応温度と抗体量について、反応条件の違いによる染色結果の比較検討を実施したので報告する。

【対象および方法】三重大学医学部附属病院で手術摘出された肺門部リンパ節のパラフィン切片を、電界非接触攪拌装置(秋田エプソン社)を用い、抗CD20cy抗体、抗CD3抗体(DAKO社)について、以下の各条件における免疫染色を実施し、染色性を比較検討した。①一次・二次抗体の反応温度を4℃および37℃に設定し比較。②原液、2倍、4倍、8倍、16倍希釈された一次抗体を用いた場合の比較。③免疫染色の現行法（ベンチマークXT：以下ベンタナ）と本法との比較。

【結果】抗体反応温度の比較では、抗CD20cy抗体において4℃に比べ37℃で染色性が強く良好であった。希釈倍率では8倍希釈まで良好な染色性が確認された。ベンタナとの染色性の比較について、抗CD20cy抗体は良好であったが、抗CD3抗体は染色性が弱い傾向が認められた。

【まとめ】本装置での一次抗体反応時間は5分と非常に短いため、4℃では反応が不十分であり、37℃で反応させることで良好な染色結果を得ることが出来た。一次抗体の希釈倍率は8倍希釈まで良好な染色性を得ることができた。したがって、免疫染色の抗体反応過程に電界非接触攪拌技術を用いることで、迅速かつ低濃度の抗体量で免疫染色を実施できる可能性がある。ただし、良好な染色性を得るための反応時間や抗体量は使用抗体により異なるため、個別の反応条件を検討する必要がある。

<演題4>

術中捺印細胞診検体におけるR-IHCの有効性

○諸橋 彰¹⁾, 遠藤 希之¹⁾, 赤平 純一¹⁾, 成田 菊夫¹⁾, 南谷 佳弘²⁾,
赤上 陽一³⁾

仙台厚生病院臨床検査センター病理診断・臨床検査科¹⁾, 秋田大学大学院医学系
研究科呼吸器・乳腺内分泌外科²⁾, 秋田県産業技術センター³⁾

【目的】術中迅速診断時の捺印細胞診は組織診断の補助的な診断とはいえ、標本作製が簡便で時に重要な情報を提供してくれる。また細胞診検体に対する免疫染色も同じく操作が簡便なことに加え、重要な情報を提供してくれる優れた方法である。しかしながら免疫染色を行うにはこれまでの技術では2～3時間を必要とし、特に威力を発揮しそうな術中迅速診断時の捺印細胞診に利用することは諦めざるを得なかった。そこで今回、電解非接触攪拌技術を用いたR-IHCによる細胞診検体に対する免疫染色を施行し、その術中迅速診断時における有用性について検討したので報告する。

【方法】術中迅速診断時に捺印細胞診標本作製し、R-IHCを用いて電界下で一次抗体及び二次抗体を振動させ、抗体と抗原の接触頻度を高めることで反応を促進し、免疫染色全体の時間の短縮を試みた。当院呼吸器外科にて手術を施行した肺原発腺癌、扁平上皮癌、転移性癌(大腸癌、甲状腺がん)などに対してTTF-1, NapsinA, CK7, CK20, P63, Thylogrobrinなどの一次抗体を用いて染色し、その染色性を評価した。

【結果】R-IHCを用いることで、一次抗体及び二次抗体の反応時間、通常1時間から30分程度要する時間を、5分程度に短縮することができた。その結果、全体の染色時間は約30分に短縮された。

染色性に関しては診断に耐えうる染色性を示し、将来的に術中迅速捺印細胞診断への応用が可能ではないかと思われた。

【考察】染色時間は約30分と大幅な短縮に成功した。また染色性に関しても十分に評価可能なレベルであった。今回の検討で使用していない抗体に対する条件設定や、他臓器の術中迅速細胞診検体での染色性なども今後、検討していきたい。細胞診検体における迅速免疫染色法により、常勤病理医が不在などの理由で細胞検査士が補助的に迅速細胞診断を行っている施設においても、精度の高い細胞診断が可能になると考えられた。

一般演題(2)

座長 遠藤希之（仙台厚生病院 病理診断科）

<演題5>

市中病院の病理診断が迅速免疫染色装置から受ける恩恵

○遠藤希之1)、赤平純一1)、諸橋 彰1)、今田智子1)、南谷佳弘2)、赤上 陽一3)

仙台厚生病院 病理診断科1)、秋田大学医学部呼吸器外科学2)、秋田県産業技術センター3)

当院では2013年より貸与された「ラピート」のプロトタイプを用い、主に術中迅速診断時に診断に迷う例や、大事をとり確認を要する症例に対して免疫染色を行ってきた。通常の凍結切片を用いた染色のみならず、捺印細胞診検体でも免疫染色を行った。本演題では、凍結切片を用いた症例のうち代表的な染色例を供覧、迅速免疫染色の有用性について報告する。なお細胞診検体については他演題で報告予定である。

当院の手術例は特に消化器系、呼吸器系が大部分を占めている。参考ながら入院患者数は全国DPC参加病院1774院中、消化器系が4位、呼吸器系が5位と症例数は非常に恵まれている。

免疫染色を施行した主な疾患対象は以下のごとくであった。

呼吸器系：転移性肺腫瘍疑い例、原発性肺腫瘍（特に間葉系腫瘍）。

消化器系：胆管癌（胆管断端）、腹膜播種病変、後腹膜・腸間膜腫瘍、悪性リンパ腫疑い例。

使用した抗体は以下のごとく多種にわたった：CK7, CK19, CK20, TTF-1,

Napsin A, synaptophysin, p40, p63, CDX-2, CD10, EMA, vimentin, thyroglobulin, s-100, c-kit, alpha-smooth muscle actin, CD34, p53, estrogen receptor, mammoglobin, CD3, CD20, CD79alpha, bcl-2. これらはルーチンに行っている免疫染色に使用している抗体と同様である。

染色の所要時間は薄切、固定後から計測し、平均34.4分であった。

諸疾患における有用性を以下に総括する

転移性肺腫瘍疑い例：大腸癌転移、甲状腺癌転移（乳頭癌、濾胞癌）、乳癌転移、腎細胞癌（淡明細胞癌）転移、hemangiopericytoma転移、metastatic leiomyomaなどほぼ全ての転移性腫瘍の診断は迅速時に十分確認可能であった。

原発性肺腫瘍：カルチノイド腫瘍、solitary fibrous tumor / hemangiopericytoma など特に癌腫以外の腫瘍の診断に有効であった。

胆管癌断端：当初p53を用いていたが染色性が不良だったため、CD10に変更し検討した。若干不安定さは残るものの炎症による反応性異型との鑑別に有効と考えられた。

後腹膜・腸間膜腫瘍：GIST、脂肪肉腫、平滑筋肉腫などの鑑別に有効であった。

<演題6>

脳腫瘍以外の術中迅速免疫染色の経験

○南條 博¹⁾、吉岡年明¹⁾、廣嶋優子¹⁾、伊藤智¹⁾、成田かすみ¹⁾、川村学¹⁾、
後藤明輝¹⁾、大森泰文¹⁾、南谷佳弘²⁾、赤上陽一³⁾

秋田大学医学部附属病院病理部¹⁾、秋田大学大学院医学系研究科腫瘍制御医学系
呼吸器・乳腺内分泌外科学講座²⁾、秋田県産業技術センター³⁾

南谷と赤上らが開発した電界非接触攪拌迅速免疫染色技術を用いた、脳腫瘍以外の術中迅速病理診断の当院における現況を紹介し、本技術の今後の活用法を会員のみなさんと考えたい。

35例の術中迅速病理診断に迅速免疫染色を併用し、悪性リンパ腫、軟部腫瘍、肺腫瘍、中皮腫、後腹膜腫瘍、センチネルリンパ節などの質的診断に有用との感触を得ている。迅速免疫染色結果と最終結果との乖離はほとんどみられない。しかし、小細胞癌の診断に有用なマーカーとなるCD56抗体については、染色結果の十分な信頼性を担保できていない。

また、腹腔洗浄液などの術中迅速細胞診断の液状検体においても、必要と判断した場合は迅速免疫染色を活用し、早期中皮腫の診断などで良好な結果を得ている。

病理細胞診断の現場を預かる一人として、病理技師や細胞検査士の負担を念頭におきながら、がん治療の個別化、精密な外科手術に対応すべく、必要と判断した時は迅速免疫染色を活用し、タイムリーで精度の高い病理細胞診断情報を臨床医と患者様に還元できるようにしたいと考えている。同時に、迅速免疫染色装置の自動化の開発も期待したい。

<演題7>

呼吸器外科領域での使用経験と将来の臨床応用に関して

○今野隼人1)、工藤智司1)、齋藤芳太郎1)、寺田かおり1)、南條博2)、南谷佳弘1)

秋田大学大学院医学系研究科 呼吸器・乳腺内分泌外科学講座1)

秋田大学医学部附属病院病理部2)

これまで当科の研究にて、非接触電界攪拌技術を応用し免疫染色の時間短縮に成功した。この技術を用いて行った当科での呼吸器外科領域における研究について報告する。

1. TTF-1迅速免疫組織染色を用いた術中肺腫瘍の鑑別法に関する研究。

【背景】未確定診断の肺腫瘍では術中迅速診断にて良悪性の鑑別のみならず、原発性肺癌か転移性肺腫瘍かの鑑別は、術式決定に際し極めて重要である。しかし時としてその鑑別は容易ではない。

【目的】肺腫瘍における迅速免疫組織染色によるTTF-1発現につき検討する。

【結果】原発性肺腺癌のTTF-1迅速法による陽性率は89%であった。腺癌症例におけるTTF-1迅速法による原発性肺腺癌の陽性的中率(PPV)は100%であった。

2. 迅速免疫組織染色を用いた非小細胞肺癌微小リンパ節転移同定に関する研究。

【背景】非小細胞肺癌においてリンパ節転移陽性例は予後不良である。早期肺癌でも術後転移、再発を認めることがあり、その一因として微小リンパ節転移の存在が考えられている。

【目的】非小細胞肺癌切除例のリンパ節転移同定を迅速免疫組織染色を用いて術中診断可能か検討する。

【結果】迅速免疫組織染色を用いた非小細胞肺癌微小リンパ節転移同定は通常免疫染色と比較して、感度、特異度、精度いずれも100%であった。

R-IHCの呼吸器外科領域での将来の臨床応用としては、①各種抗体を組み合わせることで肺腫瘍の迅速診断において組織型を含めた詳細な判断が術中にできることや②術中リンパ節転移診断を行うことで、術式や郭清範囲など治療選択の判断として一躍担うことが期待される。近年、呼吸器外科手術では盛んに行われるようになった肺癌縮小手術(区域切除術)においては、微小リンパ節転移を術中診断することでより根治度の高い術式を選択することができると考えられる。標準的な肺葉切除術においても、選択的リンパ節郭清に応用できると考えられる。また当科での研究として行っている磁性体を用いたセンチネルリンパ節同定との併用によるリンパ節転移診断にも活用していきたい。

<演題8>

脳腫瘍迅速診断におけるR-IHCの有用性

○谷野美智枝1)、竹浪智子1)、木村太一1)、石田雄介1)、西原広史2)、田中伸哉1)2)

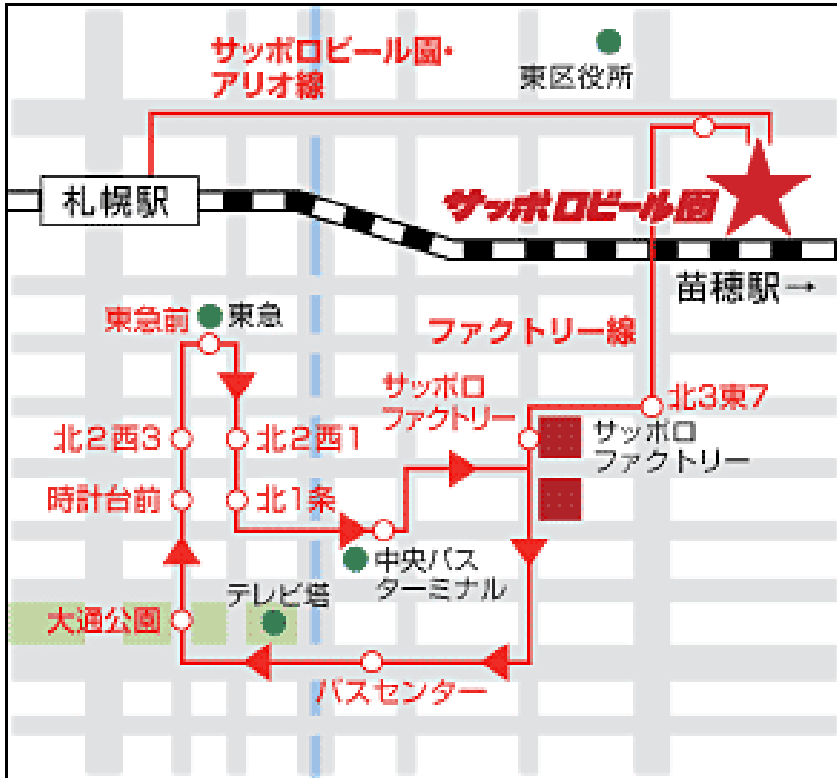
1)北海道大学大学院医学研究科 病理学講座 腫瘍病理学分野 2)同 探索病理学

脳腫瘍の術中迅速診断においては、臨床所見に加えH&E染色及び細胞診を用い細胞密度、細胞形態、核異型、核分裂像、壊死、血管増生などを評価するが、診断やその悪性度に迷う症例が存在する。近年では悪性神経膠腫の治療薬としてギリアデル・ウエファールが新規に臨床適応されたが、術中診断でGrade IIIかGrade IVの診断がついたときのみ使用され、さらなる術中診断の正確性が求められる。一方、Rapid immunohistochemistry (以下R-IHC法)とは、電界攪拌により抗原抗体反応を迅速化し、免疫染色の安定性と強度を増すことを目的にした方法であり、この方法を搭載した装置がHisto-Tek R-IHCが販売され、その装置を用いた術中診断における利用が期待されている。我々は脳腫瘍凍結検体を対象にR-IHC法による免疫染色を施行しその有用性を検討した。Ki-67, CD20, CD3抗体を用いて免疫染色を行ったがいずれも通常希釈の抗体濃度で30分以内の免疫染色が可能であった。Ki-67 (MIB-1) indexはWHO grade IIでは2.4%, Grade IIIでは11.6%, Grade IVでは19.1%と悪性度に伴いindexの上昇を認めた。またこれらの数値は永久標本でのMIB-1 indexと強い相関を認めた。中枢神経原発悪性リンパ腫検体においては、CD20の陽性所見及び高いMIB-1 indexが確認され、永久標本での所見と一致していた。以上より脳腫瘍の術中迅速診断においてR-IHC法による免疫染色が非常に有用であることが示された。これまでに市原、八田らをはじめとして様々な方法による迅速免疫染色が開発されてきたが臨床現場ではあまり普及していない。電界攪拌技術を搭載した本方法は通常希釈倍率での免疫染色が約22分で可能であり脳腫瘍ばかりではなく今後さらなる応用が期待される。

MEMO

懇親会会場地図

一次会：サッポロビール園(19:00～21:00)



住所：北海道札幌市東区北七条東9-2-10 サッポロビール園 開拓使館

電話番号：0120-150-550

交通手段：

サッポロビール園・アリオ線

路線バス
運賃：片道210円

札幌駅北口2番乗場(系統番号188)

札幌駅北口⇄サッポロビール園

土曜・日曜・祝日—20分間隔

月曜～金曜—30分間隔

ノンストップ・約7分

ファクトリー線 路線バス

運賃：片道210円

札幌駅南口「札幌駅前」乗場(環88)

サッポロビール園⇒北8東7⇒北3東7⇒サッ

ポロファクトリー⇒バスセンター⇒大通公園

⇒時計台前⇒北2西3⇒東急前⇒北2西1⇒

北1条⇒北1東1⇒サッポロファクトリー⇒北3

東7⇒北8東7⇒サッポロビール園

20分間隔

タクシー

札幌駅北口より約8分

二次会：うおや一丁札幌駅店(21:00～23:00)

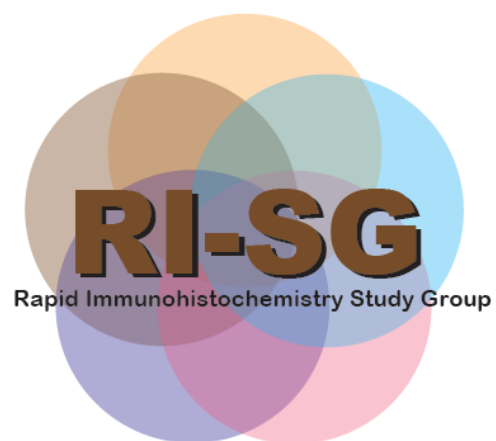


住所：札幌市北区北6条西1丁目

JR高架下

電話番号：011-232-0022

交通手段：JR札幌駅3分



迅速免疫染色研究会

事務局担当

〒010-8543 秋田県秋田市本道1-1-1

秋田大学大学院医学系研究科

呼吸器・乳腺内分泌外科学教室

今野隼人 (konno-h@gipc.akita-u.ac.jp)

<http://www.rihc.jp>