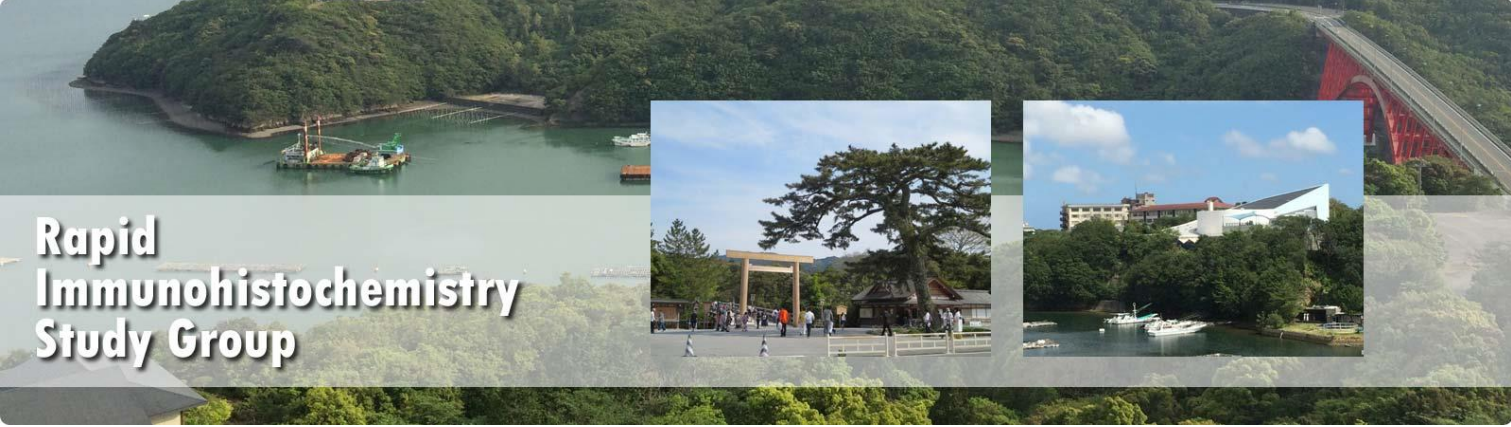




Rapid
Immunohistochemistry
Study Group

第七回迅速免疫染色 研究会

Rapid

Immunohistochemistry

Study Group

「迅速免疫染色と精度保証」

プログラム・抄録集

日時：2015 年 10 月 3 日（土） 13:00～18:00

会場：三重大学医学部臨床第 2 講義室

学術集会長：白石泰三(三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学教授)

事務局：金山和樹(三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学)

〒514-8507 三重県津市江戸橋 2-174

TEL 059-232-2864/FAX 059-232-2864

E-mail: stussykzk@clin.medic.mie-u.ac.jp

主催：第七回迅速免疫染色研究会

共催：三重病理医会

LET'S WORK
ONCOLOGY FROM BOEHRINGER INGELHEIM

Boehringer
Ingelheim



抗悪性腫瘍剤 / チロシンキナーゼ阻害剤 [薬価基準収載]



シオトリブ®錠 20mg
30mg
40mg
50mg

アファチニブマレイン酸塩製剤

真実、処方箋照会等 (注意・医師等の処方箋により使用すること)

Giotrif® Tablets 20mg・30mg・40mg・50mg

製造販売

日本ベリンガー・インゲルハイム株式会社

〒141-8017 東京都品川区大崎2丁目1番1号

資料請求先: DIセンター

「効能・効果」「用法・用量」「警告・禁忌を含む使用上の注意」「効能・効果に関連する使用上の注意」「用法・用量に関連する使用上の注意」につきましては製品添付文書をご参照ください。



2015年4月作成

第七回迅速免疫染色研究会

- テーマ「迅速免疫染色と精度保証」
- 日時 2015 年 10 月 3 日 (土) 13:00～18:00
- 場所 三重大学医学部臨床第 2 講義室
三重大学大学院医学系研究科・医学部 〒514-8507 三重県津市江戸橋 2-174
会場 HP: <http://www.medic.mie-u.ac.jp>
- 参加費 1000 円
世話人会長: 白石泰三(三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学教授)
第七回研究会事務局担当: 金山和樹(三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学)
TEL: 059-232-2864/FAX 059-232-2864
E-mail: stussykzk@clin.medic.mie-u.ac.jp
研究会事務局担当: 今野隼人
(秋田大学大学院医学系研究科呼吸器外科)

*本研究会参加により細胞検査士資格認定更新ポイント(JSC 5 単位、IAC 5 単位)が付与されます。

プログラム概要

受付: 10 月 3 日(土) 12:00- (三重大学医学部臨床第 2 講義室 入口受付デスク)

スライド受付: 同上

幹事会: 10 月 3 日(土) 13:00-13:15 (三重大学医学部臨床第 1 講義室)

オープニングシンポジウム 13:20-13:35

「R-IHC 開発の経緯と臨床応用」

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)

特別講演 13:35-14:20

「免疫染色の定性性と精度」

増田しのぶ(日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野)

教育講演(1) 16:50-17:25

「骨髄病理と免疫染色」

伊藤雅文(名古屋第一赤十字病院病理部)

教育講演(2) 17:25-18:00

「免疫染色の工夫と落とし穴」

堤 寛(藤田保健衛生大学医学部病理学)

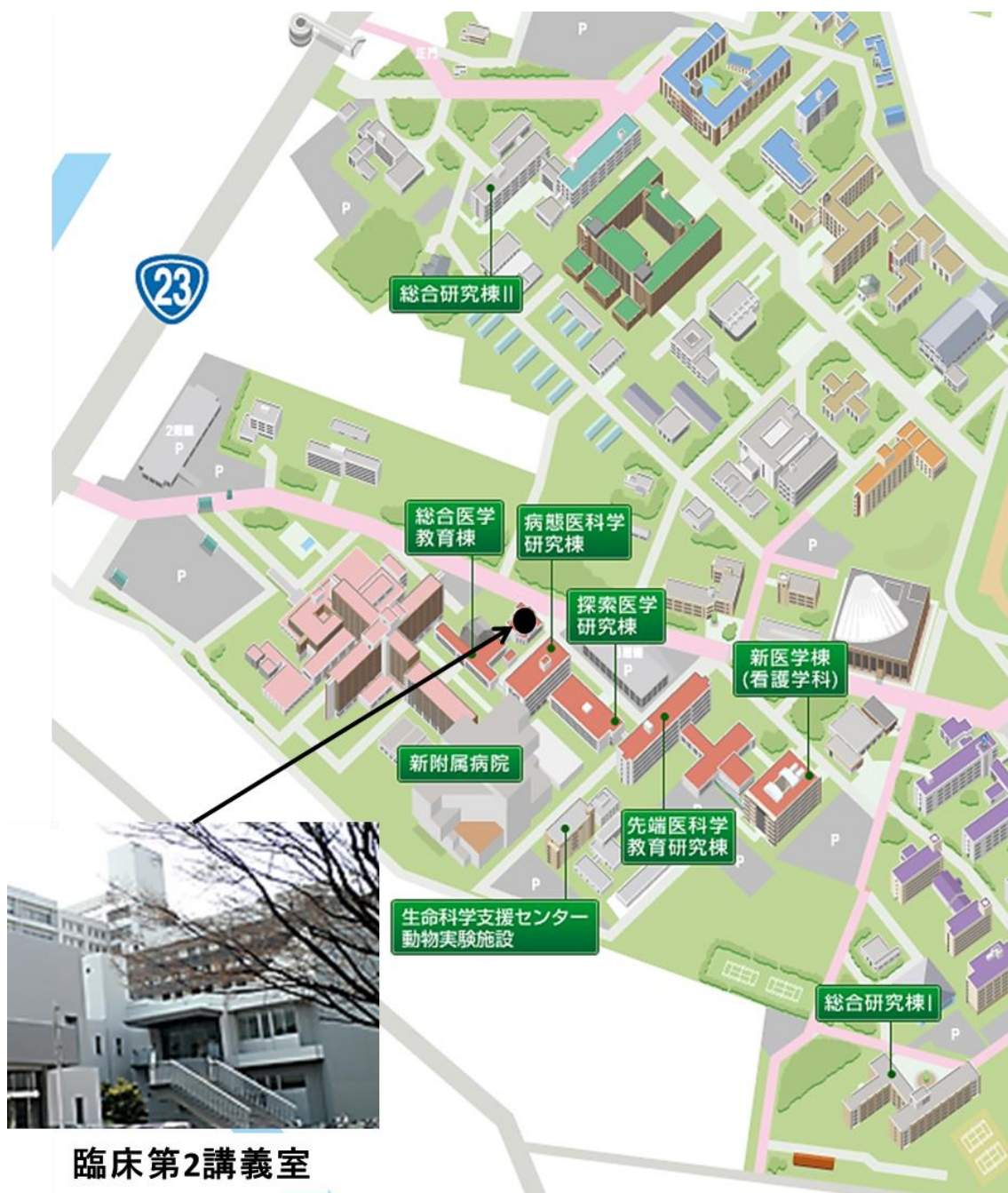
一般演題 10 題 14:35-16:35

懇親会: 19:00- 鰻の新玉亭 <http://www.shintamatei.co.jp/>

三重県津市丸之内養正町 5-1(津市役所前), TEL: 059-224-0008

会場案内

三重大学医学部臨床第2講義室



○病院正門から入り、約 300m 先右手に階段が見えますので、そちらから臨床第 2 講義室へお入り下さい。

ごあいさつ

初秋の候、皆様にはますますご活躍のことと拝察いたしております。

今回、三重において第七回迅速免疫染色研究会を開催する機会をいただき、ありがとうございます。本研究会はクローズの形式からオープンな研究会に移行してからの 2 回目の開催となります。今回は「迅速免疫染色と精度保証」をテーマにして進めさせていただいております。

昨年の 5 月に専用機器ラピートが発売となり、迅速免疫染色は実用段階に入りました。迅速免疫染色は術中迅速診断の補助手段だけではなく、コンパニオン診断の分野でも重要と思われます。このように診療に直結していきますと「Quality assurance, 精度保証」の必要性も高まってきます。昨年に日本病理学会が中心になって NPO 法人日本病理精度保証機構が設立されました。免疫染色の分野でも精度保証の動きが加速されると予測されますが、本研究会でもこれを念頭に進めていきたいと思っております。

今回、特別講演には日本大学の増田しのぶ先生に「免疫染色の定性性と精度」について、教育講演では名古屋第一赤十字病院の伊藤雅文先生に「骨髄病理と免疫染色」、藤田保健衛生大学医学部病理学の堤寛先生に「免疫染色の工夫と落とし穴」についてそれぞれご講演いただく予定でございます。また、一般演題も 10 題いただくことができまして、ご講演される先生方、座長の先生方には三重県までお越しいただき感謝申し上げます。

なお、本研究会の特徴は病理医に加え、臨床医、臨床検査技師、および機器の開発担当者と異なる分野の会員が一同に参加し意見交換を行え、いわゆる学際的雰囲気が高い研究会となっております。このよき特徴を活かした運営を進める所存であります。

三重県は全国屈指のパワースポットである伊勢神宮をはじめ、観光名所に事欠きません。一人でも多くの皆様が研究会に参加されるよう期しております。

どうぞ宜しくお願い申し上げます。

第七回迅速免疫染色研究会会長

三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学教授

白石泰三

プログラム

13:15-13:20 開会の挨拶: 白石泰三(三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学)

13:20-13:35 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)

演題: 「R-IHC 開発の経緯と臨床応用」

演者: 南谷佳弘(秋田大学大学院医学系研究科胸部外科学講座)

13:35-14:20 特別講演

座長: 白石泰三(三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学)

演題: 「免疫染色の定性性と精度」

演者: 増田しのぶ(日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野)

Coffee Break 15 分

14:35-15:35 一般演題 (1)

座長: 伊藤智雄(神戸大学医学部附属病院病理診断科)

1.卵巣腫瘍における明細胞腺癌と漿液性腺癌の鑑別を目指した迅速免疫二重染色

柳田絵美衣(神戸大学医学附属病院病理部)

2.迅速免疫染色装置 R-IHC を用いた皮膚、腎生検の蛍光免疫染色

池田 聡(土浦協同病院病理診断部)

3.迅速免疫染色装置 R-IHC を用いた肺癌捺印細胞診標本の組織型迅速診断

池田 聡(土浦協同病院病理診断部)

4.呼吸器外科手術における迅速免疫組織染色装置(R-IHC)による術中診断

今野隼人(秋田大学呼吸器外科)

5.電界攪拌染色装置を用いた脳腫瘍手術時の迅速免疫組織染色の有用性と体制構築

平山裕子(医療法人社団英明会 大西脳神経外科病院)

15:35-16:35 一般演題 (2)

座長: 田中伸哉(北海道大学医学系研究科腫瘍病理学分野)

6.迅速免疫組織化学染色(R-IHC)を用いた膠腫における IDH1 染色の術中応用

廣嶋優子(秋田大学医学部附属病院病理部・病理診断科)

7.前立腺癌診断における TRIM29 染色の有用性の検討

吉田一彦(北海道大学医学系研究科腫瘍病理学分野)

8.脳腫瘍術中迅速診断における電界攪拌迅速免疫染色装置(ラピート)による迅速免疫染色の有用性

森谷 純(北海道大学医学系研究科腫瘍病理学分野)

9.術中捺印細胞診を用いた固定法および内因性ペルオキシダーゼ(POD)除去の条件検討

荒屋敷 聖(仙台厚生病院臨床検査センター病理診断科)

10.電界攪拌染色装置ヒストテック R-IHC を使用した腸神経節の同定に関する検討

佐々木奈都紀(岩手医科大学附属病院病理診断科)

Coffee Break 15 分

16:50-18:00 教育講演

座長: 遠藤希之(仙台厚生病院病理診断科)

(1) 演題: 「骨髄病理と免疫染色」

演者: 伊藤雅文(名古屋第一赤十字病院病理部)

(2) 演題: 「免疫染色の工夫と落とし穴」

演者: 堤 寛(藤田保健衛生大学医学部病理学)

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）

演題 「R-IHC 開発の経緯と臨床応用」

演者 南谷佳弘（秋田大学大学院医学系研究科胸部外科学講座）

癌のリンパ節転移は予後を規定する重要な因子である。そのため治療的な観点から固形癌の多くではその外科療法として臓器切除とリンパ節郭清が行われている。通常、リンパ節転移診断は病理学的にヘマトキシリン・エオジン（HE）染色で診断されている。しかし最大径 2 mm 以下の微小転移は見逃されることがある。そのため微小転移診断には本来リンパ節内の細胞には存在しないが、癌細胞を含めた上皮系細胞に存在する蛋白を免疫組織染色で検出する方法が一般的に用いられている。特にサイトケラチンが頻用されている。しかし免疫組織染色には通常 2 時間以上を要するために、手術中に癌のリンパ節微小転移を診断することは難しかった。そのため現在でも術中のリンパ節転移診断は HE 染色が用いられている。また微小転移の検出に RT-PCR 法を使ってサイトケラチンなどの mRNA を検出する方法も研究として行われてきた。しかし RT-PCR 法も結果が出るまで数時間を要するため、術中診断には適していない。この問題を解決するためにサイトケラチン 19 の mRNA をターゲットとした OSNA 法が開発され、乳癌で保険収載されるに至った。しかし形態学的な情報得ることができず、偽陽性を否定できない。この問題を解決するため、我々は秋田県産業技術センターで開発した微量液滴を攪拌する方法（電界非接触攪拌法）を用いた免疫組織染色の迅速化を考案して実験を行った。その結果従来 2 時間以上を要していた免疫組織染色を 20 分以内に終える方法を開発して特許出願した。そして経済産業省の支援を得て本技術を用いた迅速免疫染色装置の開発を株式会社アクトラス、秋田エプソン株式会社に依頼した。試作機を 7 台作成して多施設共同研究を行いその有用性を明らかにした。肺癌のリンパ節微小転移診断の有用性を検討した。従来の免疫組織染色の結果と本技術を用いた迅速免疫組織染色の結果は同じであった。本装置は 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発売された。また本装置による免疫組織染色迅速化はリンパ節微小転移診断のみではなく、さまざまな用途に応用可能である。特に脳腫瘍の一つである神経膠腫の悪性度診断に抗 Ki67 抗体を用いた免疫組織染色が有用であることが明らかになった。今後様々な抗体で迅速免疫組織染色装置を試すことにより用途が広まって、その有用性が増すことを期待している。

特別講演

座長 白石泰三（三重大学大学院医学系研究科腫瘍病理学）

演題 「免疫染色の定性性と精度」

- － 免疫染色が“特殊染色”ではなく、免疫組織化学に基づく“定量的アッセイ法”であるためには？－

演者 増田しのぶ（日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野）

免疫染色の有用性が認められ市民権を得て実臨床で使用されるようになったのは、**estrogen receptor** のアッセイ系が **EIA** 法から免疫染色に変更された **2005** 年頃であろう。約 **10** 年間の間に、多くの可能性と課題が明らかになってきた。現在、定性的方法論として定着した免疫染色であるが、今後“特殊染色”の一環として扱われていくのか、あるいは“定量的アッセイ法”として技術的改良が行われていくのか、に興味をもたれる。

本講演では、免疫組織化学の原理、現在の免疫染色の感度向上をもたらした経験と理論、定量的免疫組織化学 (**quantitative IHC (QIHC)**) を目指す様々な試みを紹介し、定量的免疫組織化学に必要な要素について考察したい。

また、日本病理精度保証機構による現在の免疫染色の定性的判定についての外部精度評価の現状を紹介する。定量的免疫組織化学的方法論が確立されると、外部精度評価のあり方もまた、変遷していくものと期待される。

教育講演

座長 遠藤希之（仙台厚生病院病理診断科）

(1) 演題 「骨髓病理と免疫染色」

演者 伊藤雅文（名古屋第一赤十字病院病理部）

細胞病理学と組織病理学は病理診断の分野の両輪である。ほとんど分野で、細胞病理学は診断の推定に留まり、確定診断に組織病理学が必要である。血液病理分野では、造血器疾患では細胞診断がその基準となり、組織病理診断は他の分野に比べその診断的意義は低い位置にある。その原因は、造血器疾患は細胞採取が容易であること、細胞形質、遺伝子検索が早くからその疾患特異性を明らかにされてきたからである。組織病理での免疫染色が進歩し、凍結細胞や蛍光抗体法で解析されてきた多くの単クローン抗体が、通常のパラフィン標本で使用が可能となったこと、細胞免疫染色に比べ細胞質抗原、核内抗原の同定に組織免疫染色は優れること、さらに組織構築、構造と形質発現を対比して評価できる点で、細胞免疫染色とは異なる次元（ディメンジョン）を提示する。

白血病を中心とする造血器疾患は、MDSの疾患概念が整理されるにつれ、低頻度の腫瘍細胞、造血障害の構造的変化など、従来細胞病理学での解析に限界があった分野での組織病理学的解析に重点が置かれるようになった。自ずと、その解析は細胞病理学とは異なる視点が重要になる。すなわち、構造、構築と関連した形質発現をどうとらえるかである。

本講演では、骨髓病理診断を従来の細胞病理診断とは異なるディメンジョンから切り込み、免疫染色による形質を評価することの意義について、実践的病理診断の観点から解説する。

(2) 演題 「免疫染色の工夫と落とし穴」

演者 堤 寛（藤田保健衛生大学医学部病理学）

免疫染色は方法論的には確立されており、染色技術そのものの難しさはほぼ解消された。「染めました、染まりました」の時代は過ぎ去り、現在では適切なアーチファクト対策、トラブルシューティングが要求されている。本講演では、免疫染色の技術的な工夫とともに、検体処理・染色技法・染色結果の判定にまつわるさまざまな「落とし穴」を紹介する。

①1枚の標本を免疫染色する、②二重染色の工夫、③ホルマリン固定の影響、④パラフィン切片利用の可能性と限界、⑤内因性物質の除去（ペルオキシダーゼ、ビオチン、protein A、色素性物質）、⑥切片の保存や乾燥の影響、⑦切りおき切片における抗原性減弱、⑧パラフィン切片の伸展温度の影響、⑨高感度技法の落とし穴、⑩抗原性賦活化法の落とし穴、⑪抗体の失活、⑫背景染色を下げる、⑬偽陽性と擬陽性、⑭免疫染色の特異性判定のコツ、⑮予想外の結果が得られたとき。

MEMO

一般演題 (1)

座長 伊藤智雄 (神戸大学医学部附属病院病理診断科)

【演題 1】

卵巣腫瘍における明細胞腺癌と漿液性腺癌の鑑別を目指した迅速免疫二重染色

○柳田絵美衣¹⁾、今川奈央子¹⁾、遠藤亮和¹⁾、伊藤智雄²⁾

1)神戸大学医学部附属病院病理部

2)神戸大学医学部附属病院病理診断科

【はじめに】卵巣悪性腫瘍のうち、本邦では約 90%を上皮性腫瘍が占めている。また、卵巣癌は進行した状態で発見されることが多い。漿液性腺癌ではⅢ期以上での発見がほとんどである。近年では、明細胞腺癌や粘液性腺癌が漿液性腺癌や類内膜腺癌を比較して生存率や化学療法奏効率が低いことが報告されている。従って、組織亜型別の治療戦略の必要性が提唱され、国際コンセンサスも形成されてきており、明細胞腺癌に対する分子標的薬剤を用いた臨床試験も加速している。両者の治療方針や予後などが異なるため、組織型の診断が必要である。術中迅速診断中に両者の鑑別が可能であれば、術後治療などの一助となると期待できる。

【目的】迅速細胞診への応用を目指し、両者を迅速に染め分ける方法の開発

【方法】卵巣の漿液性腺癌で陽性を示す抗 WT-1 抗体、明細胞腺癌で陽性を示す抗 HNF-18 抗体を使用し免疫二重染色をおこない、さらにラピートを用いて迅速プロトコルを確立する。

- ① 初期検討として組織検体の漿液性腺癌、明細胞腺癌の各 20 症例で、各一次抗体の感度・特異度を検討。
- ② ①を基本とし細胞検体用プロトコルに改良した。

【結果】細胞診上でも核の WT1、細胞質の HNF-18 の各陽性像は明確に区別して判定が可能であった。

【考察】通常の免疫染色法より迅速であり、組織診断を行うことが難しい進行例においても、細胞診からも治療選択に必要な組織型の決定をより正確に行える方法と考え、報告する。

(本内容は第 56 回日本臨床細胞学会総会において発表したものを改良したものである)

【演題 2】

迅速免疫染色装置 R-IHC を用いた皮膚、腎生検の蛍光免疫染色

○池田 聡

土浦協同病院病理診断部

【はじめに】皮膚や腎の生検において蛍光免疫染色によるグロブリン、補体の証明は、その組織診断には欠かせない重要な検査である。当院においても蛍光染色用の皮膚や腎の未固定の組織を用いて凍結薄切切片が作成され日常病理診断が行われている。今回、サクラファインテック(株)の迅速免疫染色装置 R-IHC を試用する機会を得たので、皮膚や腎の生検を用いた蛍光染色がこの装置により迅速化できるか、また染色の出来について従来法との比較を検討したので報告する。

【対象】当院にて検査が行われた 5 例の皮膚生検(類天疱瘡 3 例、尋常性天疱瘡 1 例、非特異性皮膚炎 1 例)および 5 例の腎生検(IgA 腎症 2 例、膜性腎症 1 例、急性腎不全 1 例、アルポート症候群疑い 1 例)を用いた。

【方法】当院における蛍光染色方法は以下のとおりである。

1. 薄切標本を 10 分風乾後、PBST で洗浄
2. 暗室箱中で蛍光抗体 35 分
3. 水洗後蛍光用封入剤で封入

R-IHC での染色は、上記 1,3 は同様に行い、2 については一次抗体推奨モード(電圧 4kv、周波数 5Hz、隙間 4.1mm、電界強度 0.98kv/mm)で 5 分染色を行った。蛍光抗体の希釈倍率は統一して使用した。

【結果】検討の結果、日常検査で行われている従来法の染色結果と R-IHC での染色結果は全く同等の染色結果となった。皮膚生検では基底膜等での陽性像は明瞭であり、腎生検でもたとえば膜性腎症における IgG サブクラスやアルポート症候群疑い例でのコラーゲンIVの検出は全く同等に観察できた。

【考察および結語】R-IHC での染色は従来法と比較して全く同等の染色結果が得られることがわかった。つまり、染色の出来が同等で染色時間が 35 分から 5 分に短縮され、薄切、染色、写真撮影を含めた検査全行程が約 30 分で終了できるようになった。

R-IHC での染色は現在まで主に DAB などの色素で発色させる可視光的検出が検討されている。この場合、切片の固定を含め工程数が多いため標本の出来がばらつき、その評価が困難なこともある。今回、直接法である蛍光染色で全く同等の染色結果になったことは、R-IHC で使われている非接触型電界攪拌が抗原抗体反応を理想的に行わせ、反応時間の短縮ができることを明快に証明するものと考えられた。

【演題 3】

迅速免疫染色装置 R-IHC を用いた肺癌捺印細胞診標本の組織型迅速診断

○池田 聡

土浦協同病院病理診断部

【はじめに】細胞診標本に対する免疫染色は細胞の由来の検証や良悪性鑑別などに有効な手段であり、その意義は高まりつつある。術中診断においても、組織診と並行して細胞診標本を迅速に作成し診断の補助に使うことも多く、この場合も免疫染色を併用することにより診断精度の向上が期待できる。最近、非小細胞肺癌の治療に際しては、ベバシズマブやペメトレキセド等の薬剤が扁平上皮癌患者への使用が禁止されていることもあり、病理診断には扁平上皮癌と非扁平上皮癌を必ず鑑別することが求められている。今回、サクラファインテック(株)の迅速免疫染色装置 R-IHC を試用する機会を得たので、細胞診標本に対する免疫染色がこの装置により迅速的に行えるかを基礎検討し、さらに肺癌の捺印細胞標本を用いて非小細胞肺癌の組織型鑑別が可能か検討したので報告する。

【対象】当院にて手術が行われた 30 例の非小細胞肺癌(腺癌 19 例、扁平上皮癌 9 例、大細胞癌 2 例)の捺印細胞標本を用いた。標本は作成後ただちに 95%エタノールにて湿固定され保存されたものを用いた。

【方法】基礎検討については肺の扁平上皮癌と腺癌の鑑別に有用とされる抗体について R-IHC を用いて染色できるか検討した。腺癌のマーカーとしては TTF-1(クローン SPT24 ライカマイクロシステムズ社)、Napsin A(ポリクローナル ニチレイバイオサイエンス社)を、扁平上皮癌のマーカーとして p40(ポリクローナル ニチレイバイオサイエンス社)、CK5(クローン XM26 ライカマイクロシステムズ社)をそれぞれ選択した。一次抗体は推奨モード(電圧 4kv、周波数 5Hz、隙間 4.1mm、電界強度 0.98kv/mm)で 5 分染色を行い、その後シンプルステイン(ニチレイバイオサイエンス社)を二次抗体に用いて 5 分染色を行った。抗体の希釈倍率は日常検査に用いる濃度で検討した。

【結果】TTF-1 は日常検査では通常 150 倍で使用しているが、R-IHC では 30 倍希釈で染色することで良好な反応が得られた。一方、CK5 は日常検査濃度でも十分な反応が得られた。Napsin A と p40 に関しては抗体がすでに希釈済みであり、製品をそのまま用いたがその反応は弱かった。最終的に 30 例の検討には TTF-1(30 倍希釈)と CK5(100 倍希釈)の 2 つを用い鑑別の検討を行った。そして、30 例の非小細胞肺癌の捺印細胞標本を用いた検討の結果、19 例すべての腺癌で TTF-1 陽性 CK5 陰性であり、9 例の扁平上皮癌ではすべて TTF-1 陰性、CK5 陽性であった。大細胞癌は 2 例とも TTF-1 陰性、CK5 陰性であった。

【結語】R-IHC は細胞診標本を用いてもその染色は良好で、検討においても肺の扁平上皮癌と腺癌の鑑別が可能であった。R-IHC は迅速組織診のために開発されたデバイスであるが、細胞標本にも応用できその応用範囲は今後拡大していくものと思われる。

【演題 4】

呼吸器外科手術における迅速免疫組織染色装置(R-IHC)による術中診断

○今野隼人¹⁾、齋藤元¹⁾、齋藤芳太郎¹⁾、栗原伸泰¹⁾、亀山孔明¹⁾、南條博²⁾、南谷佳弘¹⁾

1)秋田大学呼吸器外科

2)秋田大学医学部附属病院病理部

呼吸器外科手術において術中迅速診断による病理部への検索依頼事項としては、①未確定診断肺腫瘍の診断(良悪性、組織型の鑑別)、②リンパ節転移診断、③播種の有無、④切除断端の確認などが挙げられる。昨年の研究会では臨床応用の展望について述べた。今年度の当科手術における R-IHC 臨床使用実績を述べたい。

1) TTF-1 による迅速免疫染色にて一期的に根治手術が施行できた症例を報告する。大腸癌手術既往のある肺腫瘍症例に対して、胸腔鏡下手術を施行した。肺部分切除を行い術中迅速診断へ提出した。HE 染色による迅速診断では大腸癌肺転移が第一に考えられたが、TTF-1 による迅速免疫染色にて陽性となり原発性肺癌と診断された。術式は肺葉切除を行った。部分切除で終了し、最終病理で原発性肺癌の診断であれば二期的手術を要する。R-IHC の併用により二期的開胸手術を回避できた症例であった。

2) CK(AE1/AE3)による術中迅速リンパ節転移診断の検討につき報告する。肺癌手術において積極的縮小手術後の再発は回避されるべきである。特にリンパ節転移のある症例では予後は不良であり、術中のリンパ節転移の評価は重要である。区域切除術が標準術式になり得るための工夫として、術中迅速診断を多用してリンパ節転移が陽性の場合には肺葉切除に切り替える方針で手術を行うことが報告されている。しかしながら微小転移も含めるとその正確な診断は困難である。微小リンパ節の検出には免疫染色(IHC)や RT-PCR が必要となる。現在当科では肺癌手術症例において、免疫組織染色も含めた術中迅速リンパ節転移診断を行い術式決定の参考としている。検討したなかで微小転移症例は認めなかったが、その特異度は 100%であった。凍結標本を用いた迅速診断で微小リンパ節転移を術中に検出することは、縮小手術の適応をより確実なものにし、外科における個別化医療の発展につながると期待される。

【演題 5】

電界攪拌染色装置を用いた脳腫瘍手術時の迅速免疫組織染色の有用性と体制構築

○平山 裕子¹⁾、衣笠 千典¹⁾、中田 隆司¹⁾、埴本 勝司¹⁾、大西 英之¹⁾、
広瀬 隆則²⁾

1)医療法人社団 英明会 大西脳神経外科病院

2)兵庫県立がんセンター

【目的】迅速免疫組織染色の手技および有用性の検討と、脳腫瘍手術の術中迅速組織検査時における活用。

【対象・方法】これまで当院で治療された神経膠腫、悪性リンパ腫の凍結保存組織、および、迅速免疫染色装置(R-IHC)導入後の術中迅速組織検査時の神経膠腫、髄膜腫、転移性腫瘍を対象に免疫染色を行った。各抗体の染色条件、染色性を検討すると共に通常の免疫組織染色を施行したホルマリン固定標本の結果と比較検討した。

【結果】迅速免疫組織染色は R-IHC 標準プロトコール(凍結標本)を基本に施行した。切片はやや厚めのほうが組織構築や細胞形態の観察が容易であった。染色において抗体は希釈済抗体でも問題はなく、原液抗体はやや低めの希釈倍率が良好な染色性を示した。核染色は HE で使用しているヘマトキシリンを希釈し、時間も短縮することで核内抗原の染色状況が判別しやすくなった。ホルマリン固定の免疫染色標本と比べると細胞形態に多少の乱れや荒さを認めるが、染色性に大きな差は認められなかった。MIB-1 Index は凍結保存組織の約半数がホルマリン固定組織に比し低値であったが、術中迅速組織検査時の染色においては差を認めなかった。

【考察】迅速免疫染色は、ホルマリン固定標本と比較しても染色性に大差はなく、充分実用に耐えると評価できた。凍結保存検体における MIB-1 Index の差は採取部位の差や保存状態不良による抗原性の低下が考えられる。術中迅速検査時に染色した症例をみるとその値に大差はなく、WHO の Grade 判定に有用であると考えられる。迅速標本作製に要する時間は 20 分程で、当院ではこれらの組織画像を直ちに院内ネットワークで手術室に配信している。監視カメラを応用したもので、カラー画質はよくないが細胞形態の識別は充分可能であり、術中に術者が組織を確認できる事は有用である。

【結語】○迅速免疫組織染色を行う事で客観的な診断が可能となった。

○より診断し易い標本作製のためには染色条件の見直しが必要である。

○手術室への画像配信により情報の共有化が可能となった

一般演題 (2)

座長 田中伸哉 (北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理学)

【演題 6】

迅速免疫組織化学染色(R-IHC)を用いた膠腫における IDH1 染色の術中応用

○廣嶋 優子¹⁾、伊藤 智¹⁾、成田 かすみ¹⁾、川村 学¹⁾、三澤 桃子¹⁾、鈴木 世志子¹⁾、山本 洋平¹⁾、後藤 明輝²⁾、大森 泰文¹⁾、笹嶋 寿郎³⁾、南谷 佳弘⁴⁾、赤上 陽一⁵⁾、津田 真寿美⁶⁾、谷野 美智枝⁶⁾、田中 伸哉⁶⁾、南條 博¹⁾

1)秋田大学医学部附属病院病理部・病理診断科

2)秋田大学大学院医学系研究科器官病態学講座

3)同脳神経外科学講座

4)同胸部外科学講座

5)秋田県産業技術センター

6)北海道大学大学院医学系研究科病理学講座腫瘍病理学分野

【目的】IDH1 に特異的な突然変異は、乏突起膠腫、星細胞腫など数種類の膠腫で確認されている。IDH1 変異陽性腫瘍とグリオーシスとの鑑別に IDH1 染色が有用とされており、切除範囲の決定にその応用が期待される。今回、その臨床応用に向け、術中 IDH1 迅速免疫染色の妥当性を検討する。

【方法】術中迅速診断時に提出された膠腫組織(18 例)において、電界非接触攪拌技術を用いた迅速免疫組織化学染色法(R-IHC)で IDH1 染色を行い、永久標本での通常法の免疫染色および遺伝子解析の結果と比較した。また、同時に GFAP, Olig2, Ki-67 の R-IHC 結果の妥当性も検討した。

【結果】IDH1 遺伝子解析によって変異が確認された grade II・III の膠腫 6 症例中 5 例は、迅速標本、永久標本ともに IDH1 染色陽性を示した。しかしながら、壊死を伴う膠芽腫症例では、迅速標本において IDH1 偽陽性像が見られ、永久標本および遺伝子解析の結果との乖離を認めた。GFAP, Olig2, Ki-67 の R-IHC 結果は永久標本とほぼ一致した。

【考察】IDH1 迅速免疫染色は術中診断に応用可能と考えられるが、切除範囲の決定に使用する際には、壊死の有無を考慮するなど若干の注意を必要とする。

【結語】膠腫の術中診断における IDH1 迅速免疫染色の妥当性を検討した。

【演題 7】

前立腺癌診断における TRIM29 染色の有用性の検討

○吉田一彦^{1,2)}、谷野美智枝¹⁾、堀井理絵³⁾、木村太一¹⁾、津田真寿美¹⁾、西原広史¹⁾、近藤恒徳²⁾、田邊一成²⁾、秋山太³⁾、畠山鎮次⁴⁾、田中伸哉¹⁾

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)東京女子医科大学病院腎臓病総合医療センター泌尿器科

3)がん研究会がん研究所病理部

4)北海道大学大学院医学研究科生化学講座医化学分野

【はじめに】前立腺癌の病理診断において、基底細胞の有無は形態に加えて 34E12 染色や p63 染色をはじめとする免疫組織化学染色が用いられるが、偽陰性の問題が存在する。これまで我々は正常前立腺組織の基底細胞に Tripartite motif-containing protein 29(TRIM29)が発現しており、前立腺癌の病理診断に応用可能であることを報告してきた。

【目的】TRIM29 の基底細胞の認識の程度を従来の免疫染色と比較検討し、HE 染色による病理組織形態のみでは良悪の診断に苦慮する境界病変について、既存の免疫染色と比較して TRIM29 の有用性を検討した。

【材料と方法】PIN(prostatic intraepithelial neoplasia)の合併を認める前立腺癌の手術検体 15 例および前立腺の針生検検体で HE 染色のみでは確定診断に至らなかった 50 例を対象とした。手術検体についてはTRIM29 染色、K903 染色、p63 染色を、生検検体ではTRIM29 染色、34E12 染色を施行した。

【結果】PIN の基底細胞の認識率は、TRIM29 は 87%、K903 は 93%、p63 は 73%であり、TRIM29 は高い認識率を示した。生検 50 例は 34E12 染色により以下の 3 群に分類された：①「悪性(すべて陰性)」17 例、②「良性(すべて陽性)」6 例、③「良性疑い(一部に陰性腺管を含む)」27 例。各群について、TRIM29 染色を施行したところ、「悪性」群で全例 TRIM29 染色は陰性となり最終診断に変更はなかった。「良性」群では 1 例(17%)で TRIM29 は陰性となった。「良性疑い」群では 8 例(30%)で TRIM29 陽性となり「良性」と確定できた。

【結論】TRIM29染色は前立腺の病理診断において、良性腺管やPINを判別する際に、34E12とTRIM29染色を併用することで偽陰性を減らし、診断の精度を高める可能性が期待できることが判明した。

【演題 8】

脳腫瘍術中迅速診断における電界攪拌迅速免疫染色装置(ラピート)による迅速免疫染色の有用性

○森谷 純¹⁾、谷野 美智枝¹⁾、竹浪 智子¹⁾、漆戸 万紗那¹⁾、木村 太一²⁾
、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腫瘍病理学分野

2)北海道大学大学院医学研究科探索病理学講座

【はじめに】神経膠腫(グリオーマ)は中枢神経原発腫瘍のうち 2 番目に頻度の高い腫瘍である。近年、グリオーマのサブタイプは、形態に加え IDH1(isocitrate dehydrogenase 1)、p53、ATRX(alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)などの遺伝子変異や 1p/19q 共欠失に基づく分子生物学的マーカーによって分類されてきており、治療選択や予後に関連する。我々はこれまで、グリオーマの術中診断におけるラピートを用いた Ki-67/MIB-1 や CD20 の迅速免疫組織細胞化学染色を行い、グリオース vs 低悪性度グリオーマ、低悪性度 vs 高悪性度グリオーマ、高悪性度グリオーマ vs 中枢神経リンパ腫との鑑別診断に有用であることを報告した(Tanino M, Sasajima T, et al. Brain Tumor Pathol. 2015)。

【目的】術中凍結切片と細胞診圧挫検体を用いて、グリオーマの鑑別診断に有用な GFAP、Olig2、IDH1^{R132H}、p53、ATRX の迅速免疫組織細胞化学染色を行い永久標本と比較検討する。

【方法】凍結切片の染色プロトコールは標準法で行い、細胞診圧挫標本には 90℃ 5 分の熱による賦活化を加えた。抗体は GFAP(Dako, Rabbit Polyclonal FLEX RTU), Olig2 (IBL, Rabbit Polyclonal), IDH1^{R132H} (dianova, Clone H09), p53 (Dako, Clone DO-7, FLEX RTU), ATRX (SIGMA, Rabbit Polyclonal HPA001906)を用いた。

【結果】GFAP、Olig2、IDH1^{R132H}、p53 においては良好な染色結果が得られており、現在進行中である ATRX については当日報告する。

【考察】脳腫瘍、特に神経膠腫における術中迅速病理診断は凍結切片の H&E 染色標本のみでは判別に難渋する場合も経験されることから、迅速免疫染色の併用が有用であり診断補助ツールに成り得ると考えられた。

【結語】ラピートを使用することにより 30 分以内で安定した免疫染色が可能となり、術中迅速診断により多くの情報を付与し、より正確な術中迅速診断に寄与することができると考えられる。

【演題 9】

術中捺印細胞診を用いた固定法および内因性ペルオキシターゼ(POD)除去の条件検討

○荒屋敷 聖¹⁾、諸橋 彰¹⁾、成田 菊夫¹⁾、今田 智子¹⁾、赤平 純一¹⁾、遠藤 希之¹⁾
1)仙台厚生病院臨床検査センター病理診断科

【目的】我々は以前に術中捺印細胞診検体における R-IHC の有用性を検討し、時間の短縮および評価可能な染色レベルであった事を報告した。一方近年では分子標的薬の開発が進み、腫瘍治療の選択肢も広がっている。そのため細胞診断においても組織型の確定も含めた質の高い診断が求められる傾向にある。そこで細胞診における迅速免疫染色法の標準化に向けて、今回固定法と内因性ペルオキシターゼ(POD)除去についての条件検討を行った。

【方法】固定液として、冷アセトン、95%エタノールを、内因性ペルオキシターゼ(POD)除去に、3%過酸化水素メタノール、3%過酸化水素水を使用し検討した。一次抗体は染色性が安定している CK7(ニチレイ)、CK20(ニチレイ)、TTF-1(DAKO 濃縮抗体×100)の3種を選択した。特に TTF-1 に関しては日常業務で使用している濃度のものを用いた。

【結果】固定液：固定液は冷アセトン、95%エタノールの双方が使用可能であった。しかしながら 95%エタノールにおいて背景染色が強く染色された。

POD 除去：3%過酸化水素メタノール、3%過酸化水素水に大差は認められず、いずれも診断に適切な染色レベルであった。ただし 3%過酸化水素水では反応中に発泡した。

【考察】固定液は双方とも異型細胞の染色性には大差はなく、診断に支障はなかった。ただし 95%エタノールは背景染色が強いため、染色強度の弱い症例などは冷アセトンの使用が適していると思われた。POD 除去も双方可能であった。しかしながら 3%過酸化水素水では発泡により細胞剥離が危惧され、使用は控えた方が良いものと考えられた。

【結語】今回、ラピート導入を容易にする可能性として、検査室に常備されている試薬を含めた条件検討を行った。一次抗体や症例により、多少条件設定の微調整が求められるものもあったが、染色性に関しては診断に問題のないレベルであった。ラピート導入により迅速かつ精度の高い診断が可能となり、細胞検査士のみでも組織型の推定診断がより容易になると思われた。

【演題 10】

電界攪拌染色装置ヒストテック R-IHC を使用した腸神経節の同定に関する検討

○佐々木 奈都紀¹⁾, 山田 範幸¹⁾, 石田 和之^{1,2)}, 菅井 有^{1,2)}

1)岩手医科大学附属病院病理診断科

2)岩手医科大学医学部病理診断学講座

【目的】ヒルシュスプルング病の手術時には術中迅速診断で切除断端の腸神経節の確認が必須であるが、Hematoxylin-Eosin 染色標本による形態学的な判定とともに迅速免疫染色を用いることによりその精度の向上が期待される。今回我々は、R-IHC を用いたカルレチニン、CD56、S-100 およびシナプトフィジンの腸神経節に対する染色性について検討したので報告する。

【方法】正常の大腸 6 例を用いて凍結標本を作製し、R-IHC 標準プロトコールに準じてカルレチニン、CD56、S-100 およびシナプトフィジン抗体を用いて染色した。腸神経節の染色評価は、ホルマリン固定パラフィン切片を用いた通常免疫組織化学による染色性をコントロールとし、コントロールと同等の陽性像を 2+、コントロールよりも弱い陽性像を 1+、陰性を 0 と評価した。

【結果】正常の大腸 6 例すべての症例でカルレチニン、CD56、S-100、シナプトフィジンは神経節に 2+の陽性像を示し、パラフィン切片を用いた通常免疫組織化学と染色性に相違はみられなかった。また、神経節の同定はいずれの抗体も同程度に行うことが可能であった。

【結語】R-IHC を用いたカルレチニン、CD56、S-100、シナプトフィジン染色は、術中迅速診断時の腸神経節の同定に有用であった。

MEMO

MEMO

まだないくすりを 創るしごと。

世界には、まだ治せない病気があります。

世界には、まだ治せない病気とたたかう人たちがいます。

明日を変える一歩を創る。

アステラスの、しごとです。

77

www.astellas.com/jp/

明日は変えられる。

 **astellas**
Leading Light for Life
アステラス製薬



at the Front Line CHUGAI ONCOLOGY

がんと闘う最前線で、希望に向かう最前線。
それが、中外オンコロジーの願い。
高度な研究開発力、豊富な製品ライン、グローバルな調剤提供力、
専門性豊かな診療とスタッフで、がん治療をサポートしていきます。

中外製薬の乳がん治療薬ラインナップ

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
アバスチン 承認済 乳がん
HER2/neu陽性乳がん用

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
ゼロダ 承認済 乳がん
HER2/neu陽性乳がん用

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
カドサイラ 承認済 乳がん 100%
HER2/neu陽性乳がん用

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
トセグチン 承認済 乳がん
HER2/neu陽性乳がん用

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
パーシエタ 承認済 420mg/14日
HER2/neu陽性乳がん用

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
フェマ-ラ 承認済 25mg
HER2/neu陽性乳がん用

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
イトロシ 承認済 乳がん
HER2/neu陽性乳がん用

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
カイトリ 承認済 乳がん
HER2/neu陽性乳がん用

抗がん剤 抗HER2/neuモノクローナル抗体
抗HER2/neu抗体、抗HER3抗体
承認済 乳がん 100%
HER2/neu陽性乳がん用

※特許・商標・用法・用量・禁忌・副作用・薬物動態を
含む使用上の注意等は製品添付文書でご確認ください。

中外製薬株式会社
〒100-8584 東京都千代田区千代田1-1-1
ホームページ: <http://www.chugai-pharm.co.jp>

2014年4月現在

広告掲載企業一覧

日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

アステラス製薬株式会社

中外製薬株式会社

赤福

賛助団体

三重県臨床細胞学会

企業展示

サクラファインテックジャパン株式会社



伊勢
名物 **赤福**

本店 〒516-0025 伊勢市宇治中之切町26番地
電話 0596-22-2154(代) ファクシムル 0120-081381
<http://www.akafuku.co.jp/>



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外科学

今野隼人 (konno-h@gipc.akita-u.ac.jp)