

# 平成29年度 静岡県臨床検査精度管理調査 病理検査部門

平成29年10月22日  
静岡県男女共同参画センター「あざれあ」

# 参加施設 27施設

地域医療振興協会伊東市民病院	静岡県立総合病院	浜松市赤十字病院
国際医療福祉大学熱海病院	静岡県立こども病院	浜松労災病院
順天堂大学医学部付属静岡病院	静岡済生会総合病院	聖隷三方原病院
沼津市立病院	焼津市立総合病院	磐田市立総合病院
富士市立中央病院	市立島田市民病院	藤枝市立総合病院
富士宮市立病院	浜松医療センター	静岡県立静岡がんセンター
静岡市立清水病院	聖隷浜松病院	沖縄徳洲会静岡徳洲会病院
静岡市立静岡病院	浜松医科大学医学部付属病院	中東遠総合医療センター
静岡赤十字病院	JA静岡県厚生連遠州病院	株式会社 パソネット

## メーカーサーベイ協力企業

ダコ・ジャパン株式会社	株式会社ニチレイバイオサイエンス
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



# 調査内容

## ➤ 免疫組織化学染色

- ✓ 「病理組織検査サーベイ調査書」
- ✓ 「染色結果の判定」

## ➤ アンケート調査

- ✓ 「プレアナリシスにおける作業工程(固定・薄切)の実態調査」
- ✓ 「病理精度管理調査不参加施設における病理検体取扱いの実態調査」



# 対象抗体

抗体名	主な用途	保有率 (全27施設)
HER2	乳癌や胃癌における抗HER2治療薬の適応判断	81%
Estrogen Receptor(ER)	乳癌における予後や内分泌療法の効果予測	93%
Desmin	筋原性腫瘍の鑑別	100%

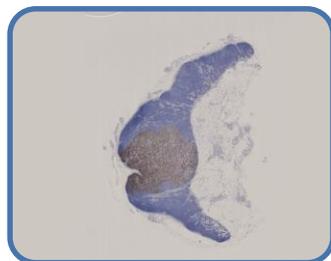


# 調査配布試料



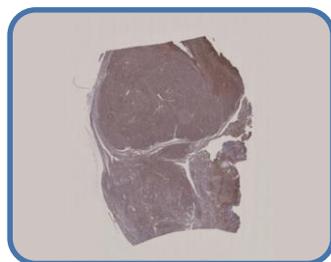
## No.51 HER2抗体用

- 10%緩衝ホルマリン、48時間固定
- ヒト腫瘍細胞異種移植組織(4-1ST由来)



## No.52 ER抗体用

- 20%緩衝ホルマリン、24～48時間固定
- 乳癌リンパ節転移組織



## No.53 Desmin抗体用

- 20%緩衝ホルマリン、24～48時間固定
- 子宮平滑筋肉腫組織



# 調査標本作製

## 全自動連続薄切装置

「ティッシュ・テック スマートセクション」

サクラファインテックジャパン株式会社

切片厚:4.0 $\mu$ m設定

5月上旬薄切

5月10日発送



サクラファインテックジャパンHPより

本精度管理調査において初めて使用

切片厚のバラツキによる評価結果の影響を最小限に



# 評価判定方法

## ① 染色性評価

7名の病理医に5段階評価として評価していただいた。※HER2は染色強度スコアも  
(1:診断不適性標本、2:評価困難、3:要努力、  
4:普通、5:良好)

## ② マイナス評価

「血球の非特異反応の有無」「背景の非特異反応の有無」「染色班の有無」を各々、(非特異反応なし:2、診断に影響しない程度に有:1、強い非特異反応:0)と評価し合計6ポイントを3段階評価(A:5~6、B:3~4、C:2以下)とした。

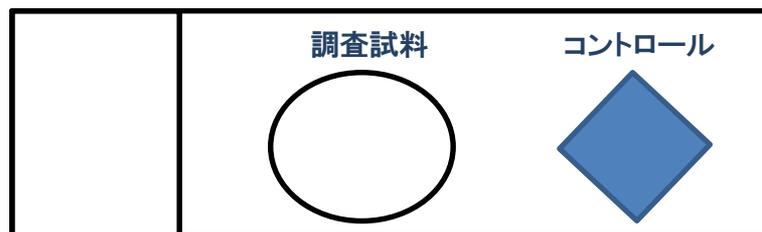


# コントロール切片貼付

## <実施のねらい>

染色性の自己評価を行う際に、通常通りの染色性が得られているかの確認材料とする。

※HER2はコントロールスライド



内部精度管理として染色性を保証



# コントロール切片実施率

## ➤ HER2

**86%実施**(19/22施設)

乳腺、メーカーコントロールスライドなど

## ➤ ER

**96%実施**(21/25施設)

乳腺、子宮など

## ➤ Desmin

**93%実施**(25/27施設)

子宮、心臓、胃、虫垂、皮膚など



# 結果判定自己評価について

## <実施のねらい>

### 日常業務における染色性の評価

---

#### 染色結果の判定方法

##### 1. 核染色とのコントラスト

(通常より良好：1、通常と同様：2、通常より悪い：3)

##### 2. DAB発色

(通常より良好：1、通常と同様：2、通常より悪い：3)

##### 3. 今回の染色結果の自己評価

(通常より良好：1、通常と同様：2、通常より悪い：3)

---



# 自己評価と調査評価の乖離

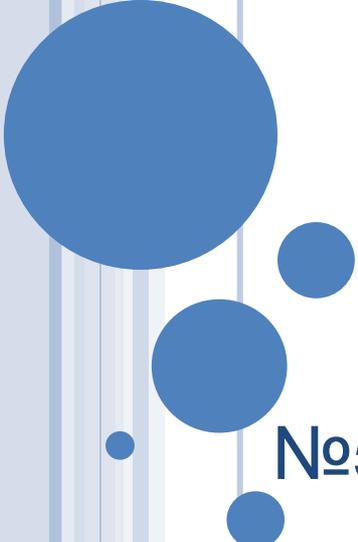
3抗体の調査にて低評価(3.4以下)となった10  
施設中8施設が染色結果の自己評価にて「通常  
と同様」と判定

診断は可能だとしても、

- コントロール切片による染色性の確認
- 病理医とのすり合わせ

この2点は必要





# HER2染色

№51 ヒト腫瘍細胞異種移植組織(4-1ST由来)

# ヒト腫瘍細胞異種移植組織(4-1ST)とは

C-erbB-2癌遺伝子について約20倍の過剰発現がDNAレベルで確認されており、C-erbB-2タンパクを発現する。HER2-IHCにおいて、キット(4社6製品)すべてで陽性(3+)となり、外部精度管理試料としての有用性が確認されている。

医学検査Vol.65 No3 2016

原著

## HER2 検査における外部精度評価試料としての 4-1ST xenograft model mice の有用性に関する 検討

磯崎 勝<sup>1)</sup> 小山田裕行<sup>2)</sup> 島田 直樹<sup>3)</sup> 芹澤 昭彦<sup>4)</sup>  
大西 保行<sup>5)</sup> 川井 健司<sup>6)</sup>

1) 小田原市立病院病理診断・臨床検査科 (〒250-8558 神奈川県小田原市久野 46)

2) 東海大学医学部附属大磯病院中央臨床検査科

3) 聖マリアンナ医科大学横浜市西部病院病理診断科

4) 東海大学医学部附属病院病理検査技術科

5) インビテック株式会社

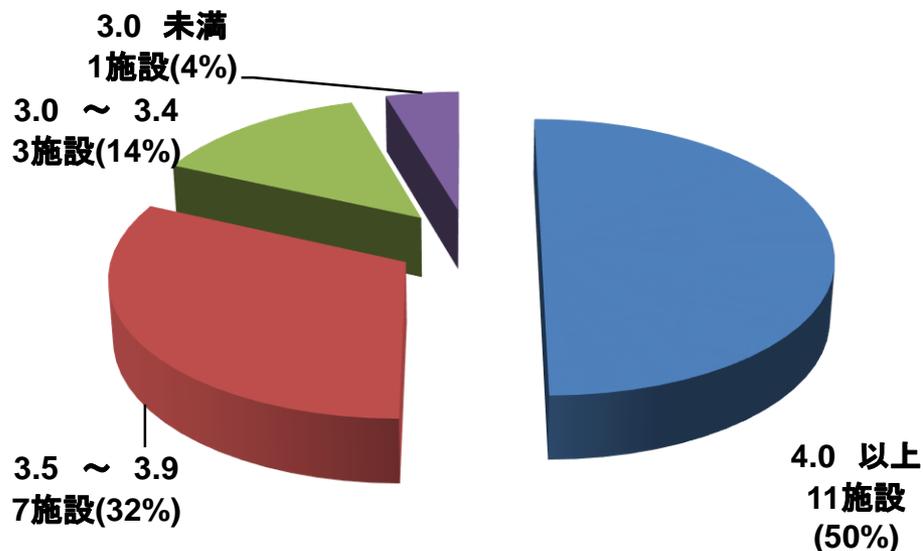


# HER2染色 評価判定結果

## マイナス評価

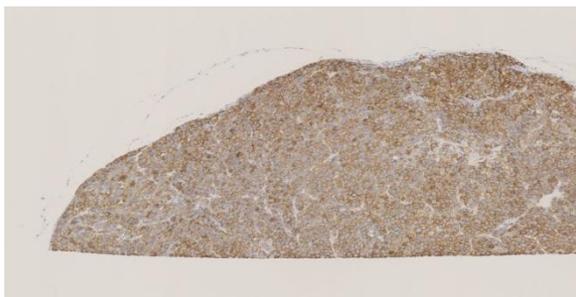
評価	施設数	(%)
A評価	17	77
B評価	5	23
C評価	0	0

## 病理医評価

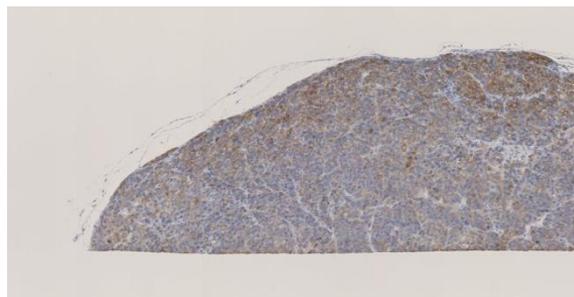


# HER2メーカーキット別染色一覧

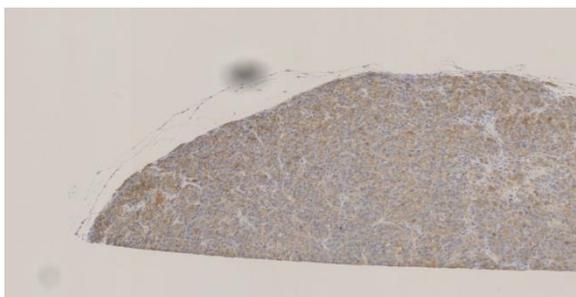
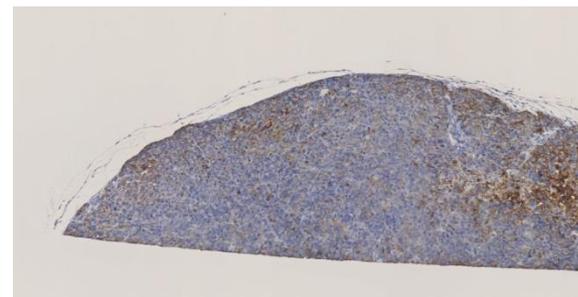
① DAKO  
HercepTest II / Poly



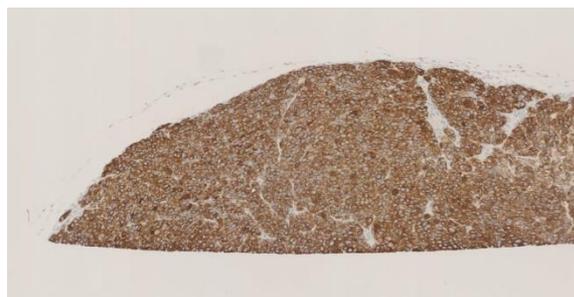
② ニチレイ  
ヒストファイン  
HER2キット/Poly



③ ニチレイ  
ヒストファインHER2キット  
Mono/SV2-61y



④ Leica  
Bondポリマーシステム  
HER2テストMouse/CB11



⑤ Roche  
ベンタナultraViewパスウェー  
HER2 Rabbit/4B5



⑥ Roche  
ベンタナI-Viewパスウェー  
HER2 Rabbit/4B5

# 低評価考察①

- 全22施設はメーカーキットを使用し、定められた方法で染色が実施され、メーカー条件からの逸脱はないと考えられる。そのため、メーカーキットの染色性を基準に比較した。
- 「ニチレイ/ヒストファイブHER2キット(Mono)/SV2-61γ」と「Leica/BondポリマーシステムHER2テスト/CB11」を使用した6施設において低評価となる傾向があり、高評価キットとの比較を行った。
- 低評価施設では反応強度スコアを3+よりも2+と判定した病理医が多くなる傾向があった。



# メーカー染色条件と平均評価

メーカー	DAKO	ニチレイ	ニチレイ	Leica	Roche ultraView	Roche I-View	
一次抗体	Poly	SV2-61γ	Poly	CB11	4B5	4B5	
賦活化	試薬pH	Low	—	Low	Low	High	High
	処理	熱	酵素	熱	熱	熱	熱
	時間	40分	5分	40分	25分	60分	60分
検出系	polymer	polymer	polymer	polymer	polymer	LSAB	
評価平均	4.3	3.0	4.0	3.5	4.2	4.7	



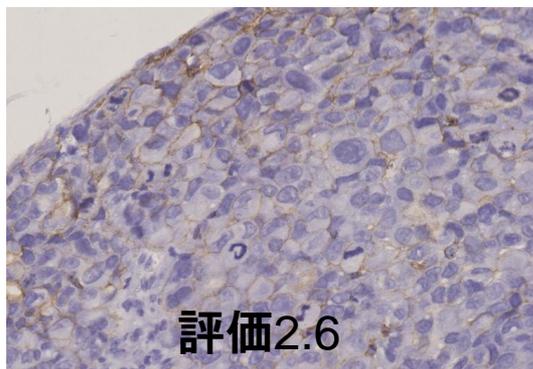
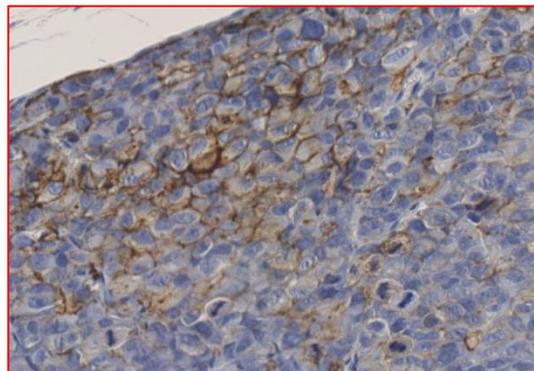
## 低評価考察②

- 賦活化が弱い(酵素処理やLow pHで短時間)キットで評価が低くなる傾向がみられた。
- 各キットにおいてHER2陽性が確認されている組織を用いたが、何らかの要因が組織に加わり、比較的弱い賦活化では染色性が低下した可能性が示唆される。
- 「ニチレイ/ヒストファイブHER2キット(Mono)/SV2-61γ」と「Leica/BondポリマーシステムHER2テスト/CB11」において、サーベイ参加施設との染色性を比較した。

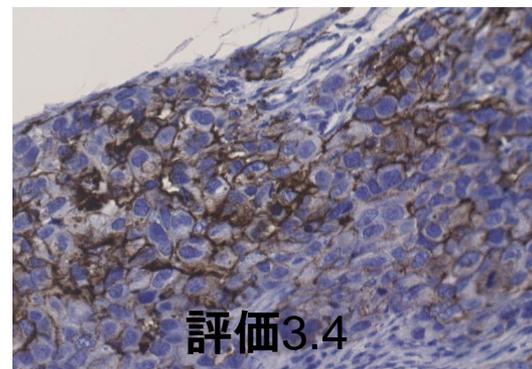


# ニチレイ/ヒストファインHER2キット(Mono)/SV2-61y メーカーと2施設の比較

ニチレイ Mono/SV2-61y



メーカーよりやや染色不良

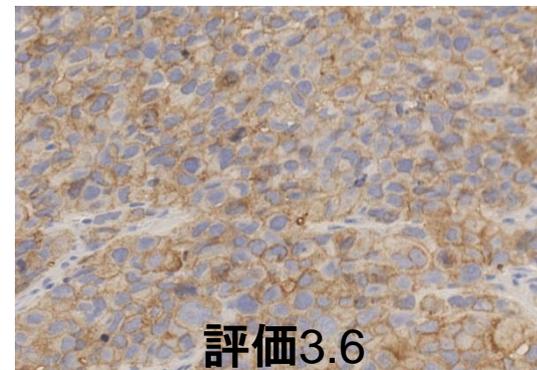
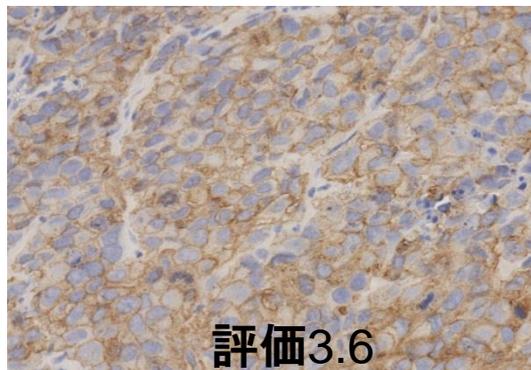
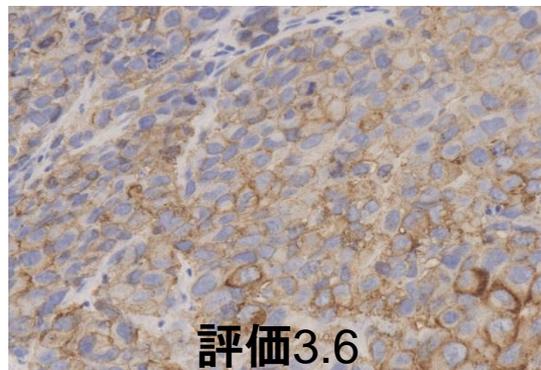
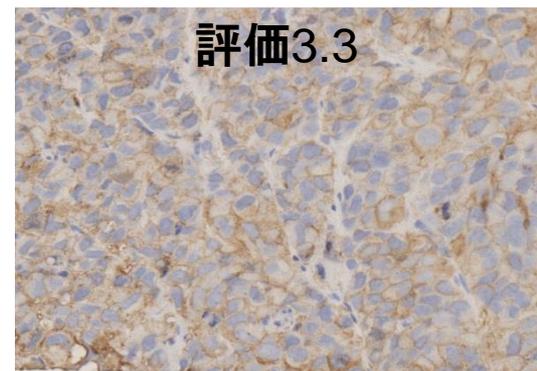
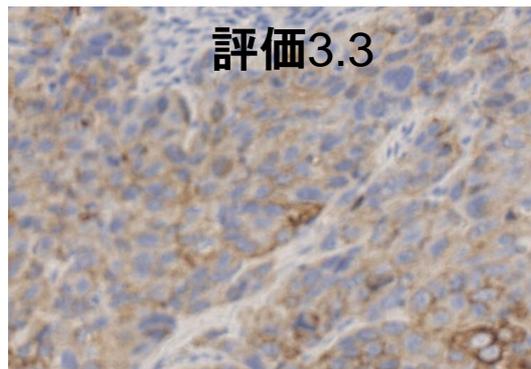
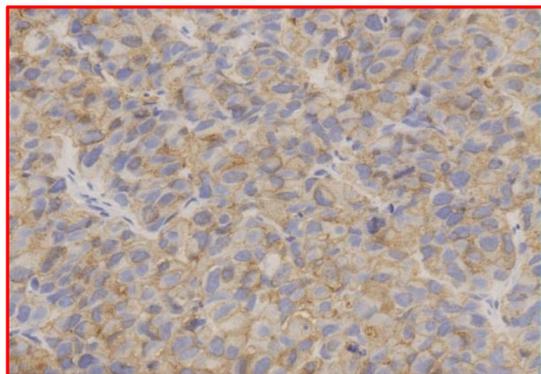


メーカーと同様の染色性



# Leica/BondポリマーシステムHER2テスト/CB11 メーカーと5施設の比較

Leica CB11



5施設ともメーカーと同様の染色性

# HER2染色まとめ①

- 「ニチレイ/ヒストファインHER2キット(Mono)/SV2-61γ」と「Leica/BondポリマーシステムHER2テスト/ CB11」において、メーカー染色標本と同等の染色性を示した施設は染色に問題ないと考えられる。
- 「ニチレイ/ヒストファインHER2キット(Mono)/SV2-61γ」を使用し、メーカー染色標本に比べて発色が低い1施設は低評価であった。
- この1施設の自己評価は「通常と同様」であり、陽性コントロールもたてていた。染色方法が用手法であるため、染色手順の確認をしていただきたい。



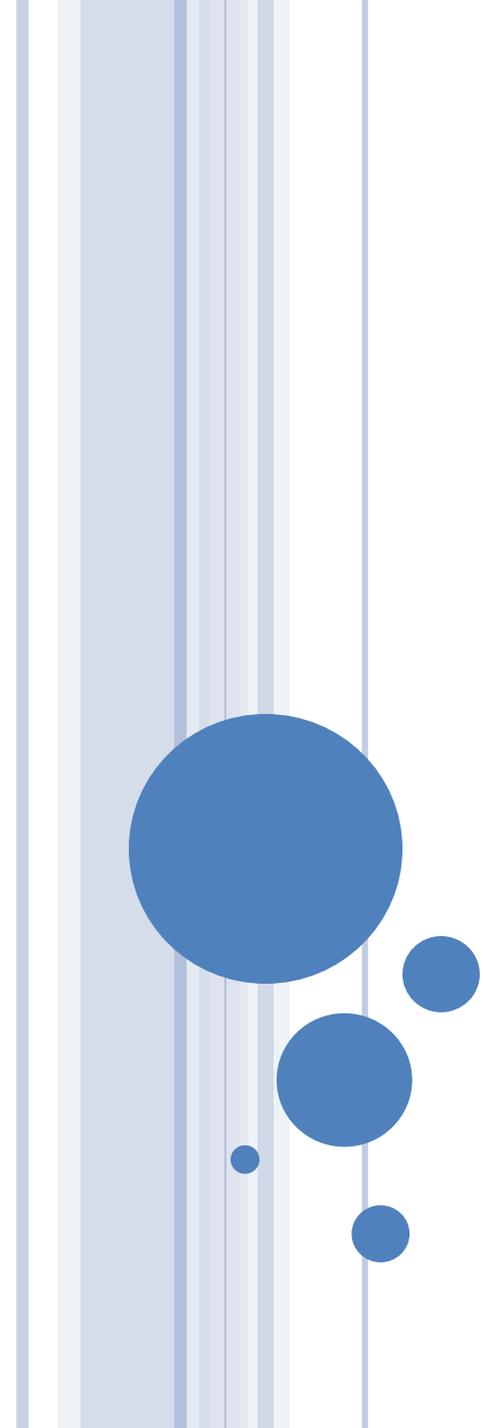
# HER2染色まとめ②

- ▶ 同一条件の組織を用いても、メーカーキットの違いにより染色性に大きな差が表れる結果となった。組織の状態により、染色性が低下する可能性が示唆された。
- ▶ 日常業務では以下の点に留意し、染色を行う。
  - 各施設ではプレアナリシスをそろえる事により、各組織の状態を均一にする
  - キット手順に沿った適切な染色を行なう
  - メーカーキットのコントロールをたて、染色性を確認する



精度が保証される





# ER染色

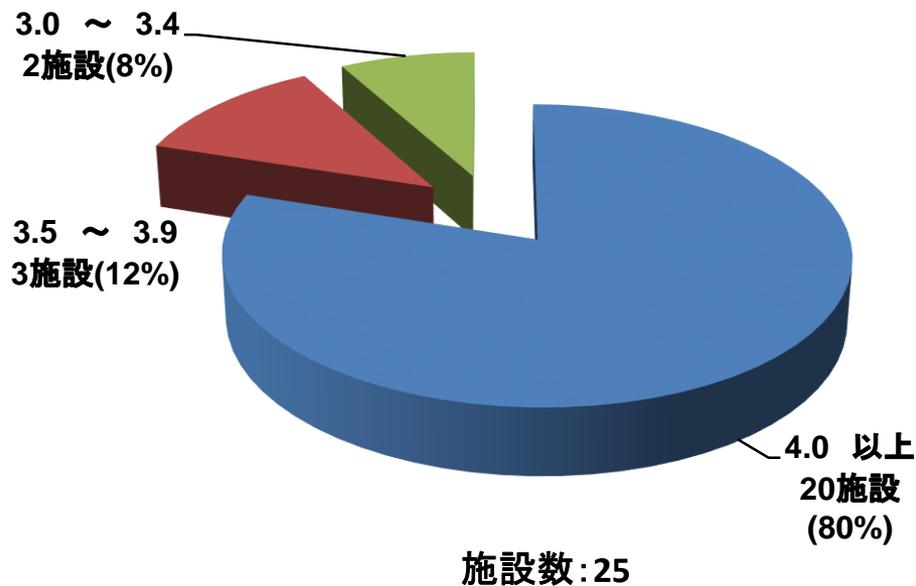
№52 乳癌リンパ節転移組織

# ER染色 評価判定結果

## マイナス評価

評価	施設数	(%)
A評価	24	96
B評価	1	4
C評価	0	0

## 病理医評価

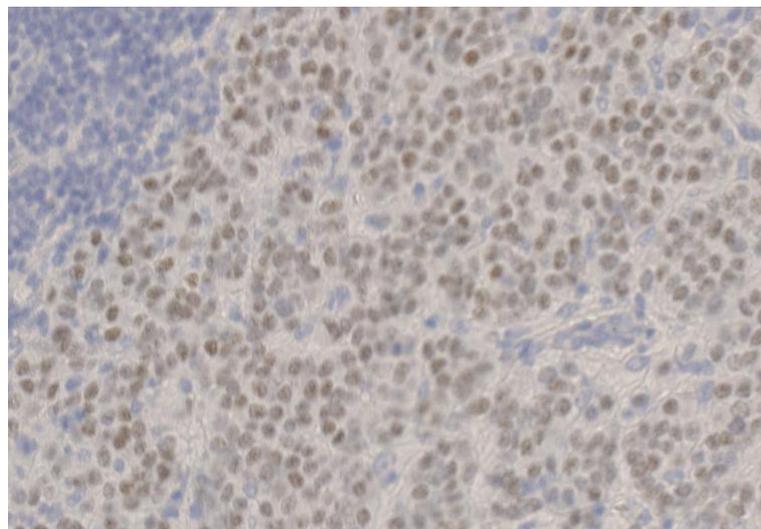
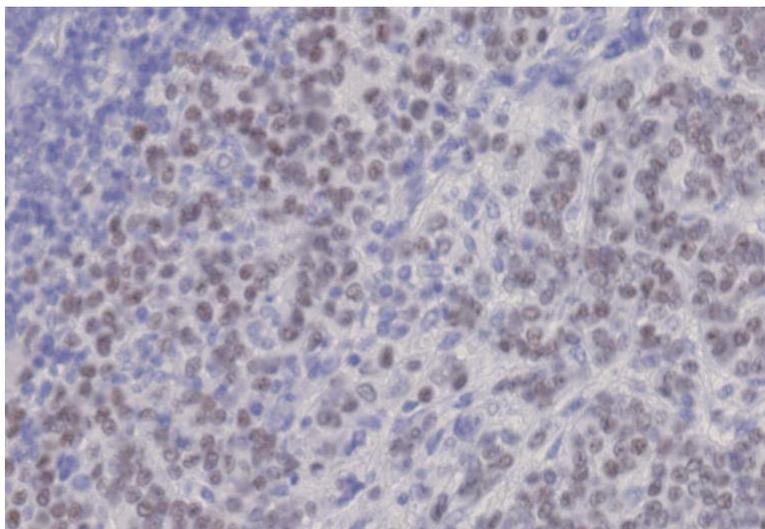
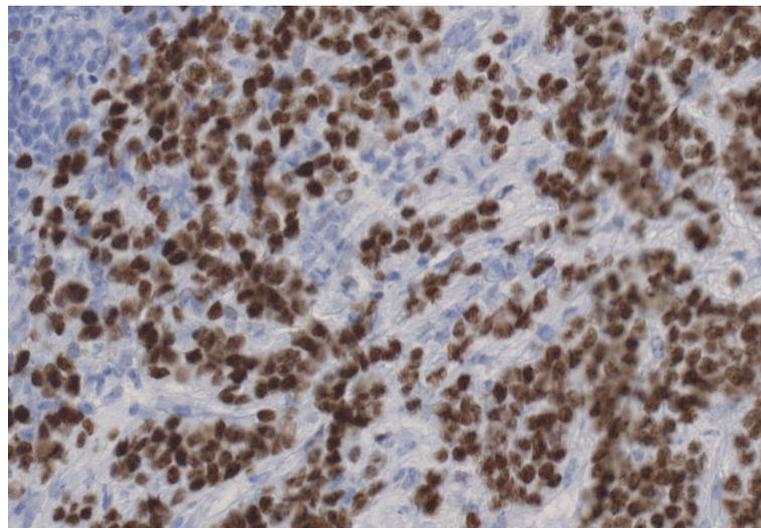


ER

評価4.6

評価3.0

評価3.7



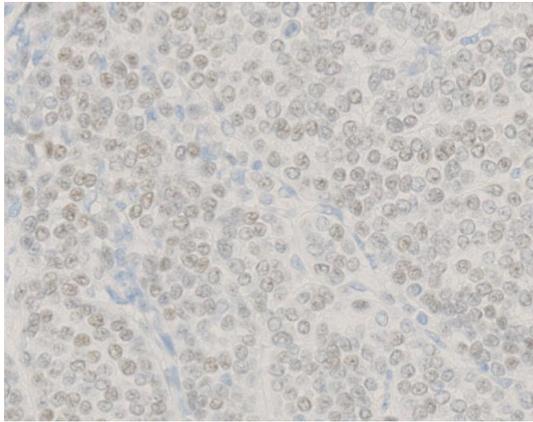
# 低評価考察

- 評価3.6以下は3施設
- これら3施設すべて、Rocheの装置/SP1/賦活化/検出系あった。3施設ともほぼ同様の染色プロトコールであり、同様の染色条件で高評価を得ている施設と比較した。
- 「Leica 6F11」と「ニチレイ D33」を使用していた施設において、抗体濃度により染色性を比較した。

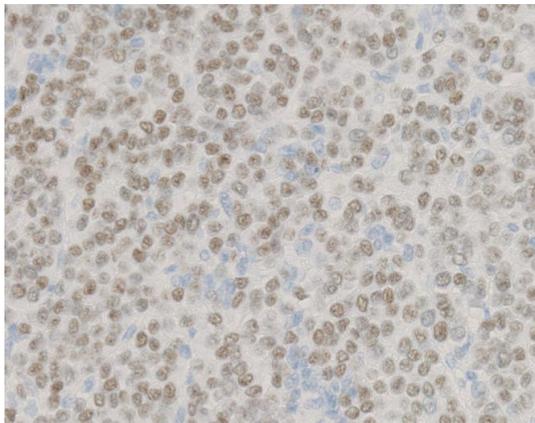
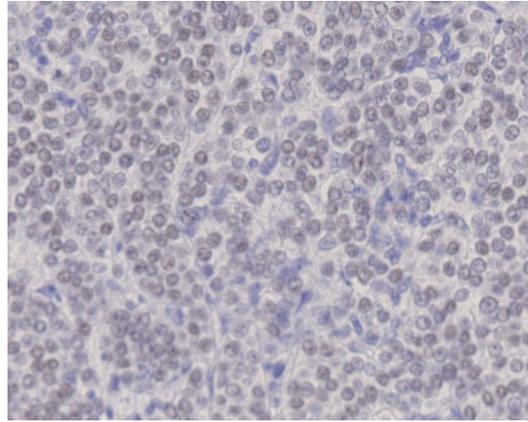


# Roche 染色装置/SP1/賦活化

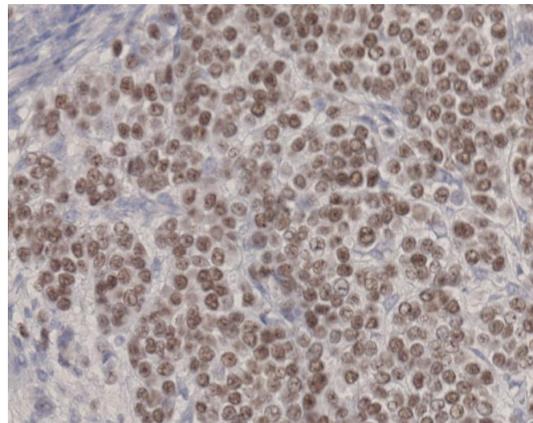
施設A 評価3.0



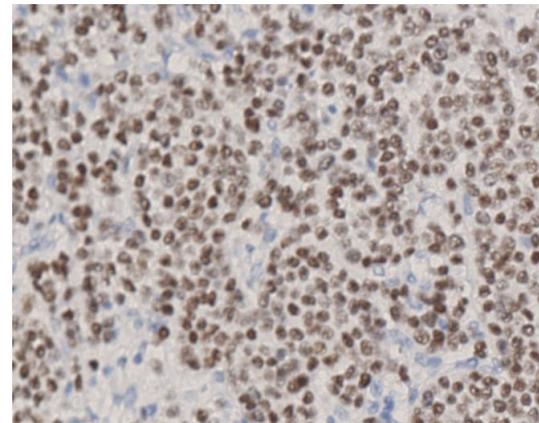
施設B 評価3.0



施設C 評価3.6



施設D 評価4.3



施設E 評価4.4



# Roche 染色条件比較

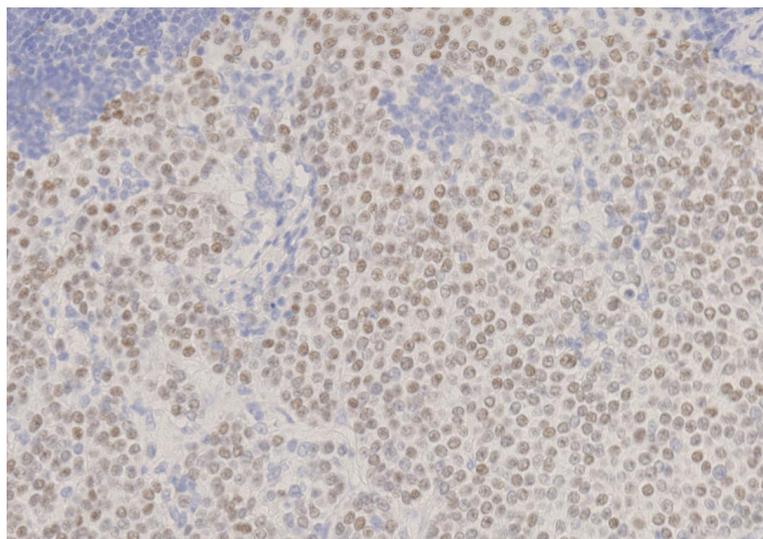
		施設A	施設B	施設C	施設D	施設E
評価		3.0	3.0	3.6	4.3	4.4
ベンタナベンチマーク		XT	XT	GX	GX	XT
賦活化		CC1(pH8.5) 60分				
一次抗体	clone	SP1				
	希釈	希釈済み				
	反応時間	16分	32分	16分	20分	16分
検出系		LSAB				



# Lieca 6F11 希釈倍率比較

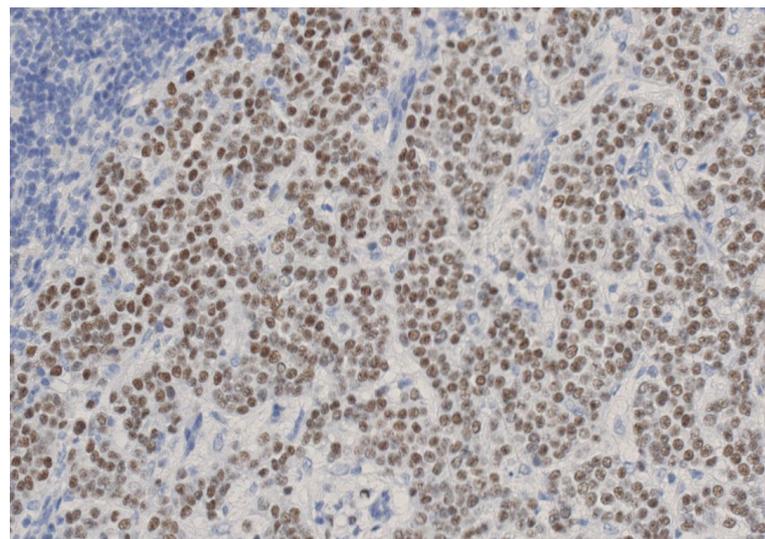
メーカー推奨: 50倍希釈

300倍希釈



評価3.9

50倍希釈



評価4.4

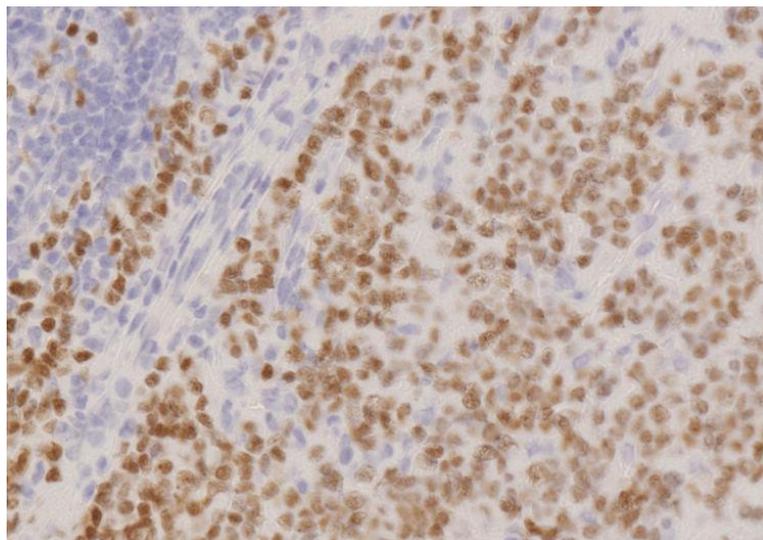
※賦活化など、その他プロトコールはほぼ同条件



# ニチレイ SP1 希釈倍率比較

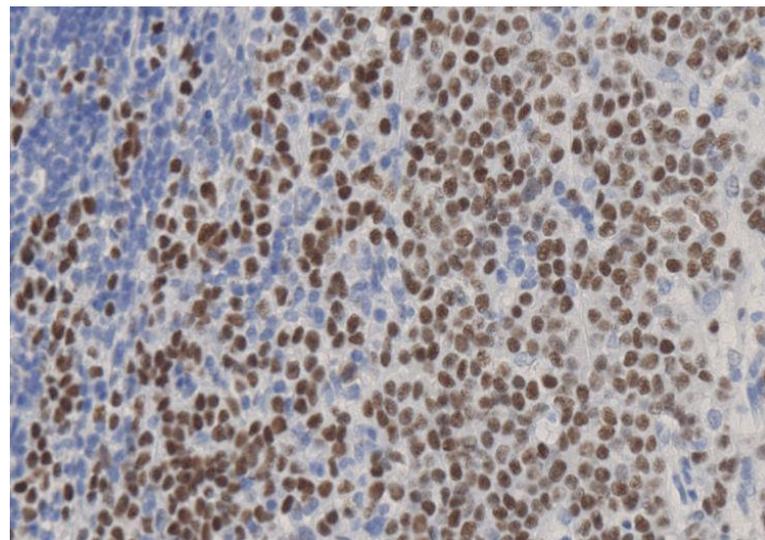
メーカー推奨: 20~30倍希釈

400倍希釈



評価4.0

50倍希釈



評価4.6

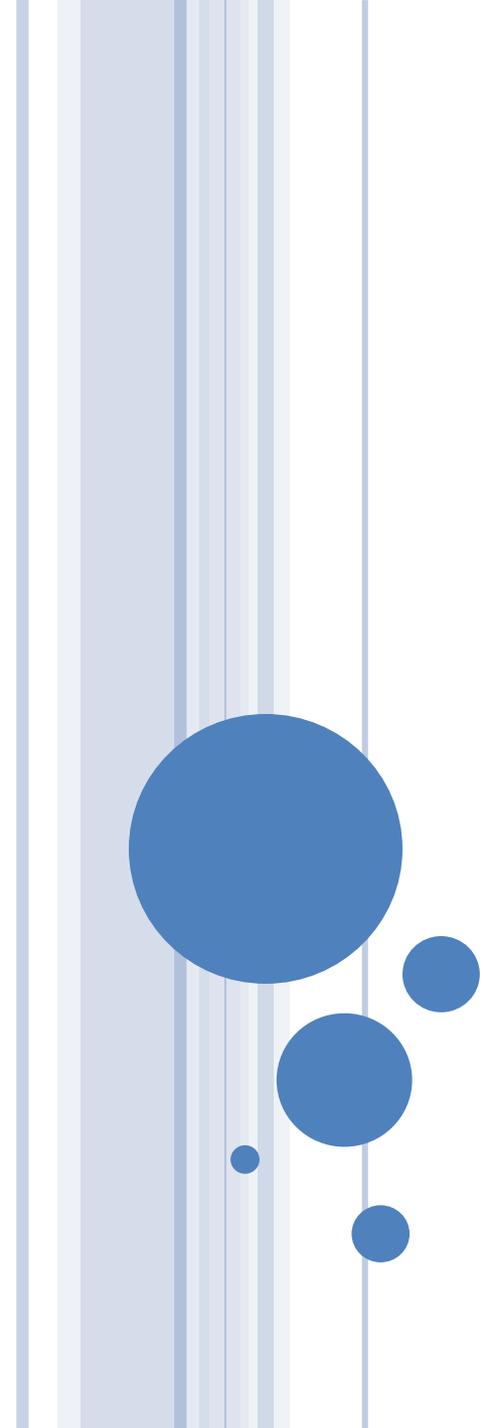
※賦活化など、その他プロトコールはほぼ同条件



# ER染色まとめ

- ▶ 低評価3施設とほぼ同様の染色条件でも高評価を得ている施設がある。原因は明らかではないが、試薬や抗体の劣化の可能性が示唆される。
- ▶ 自己評価では、1施設で「通常より悪い」、残り2施設で「通常と同様」と判定されていた。全3施設で陽性コントロールをたてており、日常染色でも同様に染色性の確認をしていただきたい。
- ▶ メーカー推奨よりも低い濃度で染色した施設よりも推奨濃度に近いほうが比較的高評価となる傾向がみられた。必ずしも濃く染まればよいわけではないが、メーカー推奨濃度に近づけることにより染色性の向上が見込まれる。





# Desmin染色

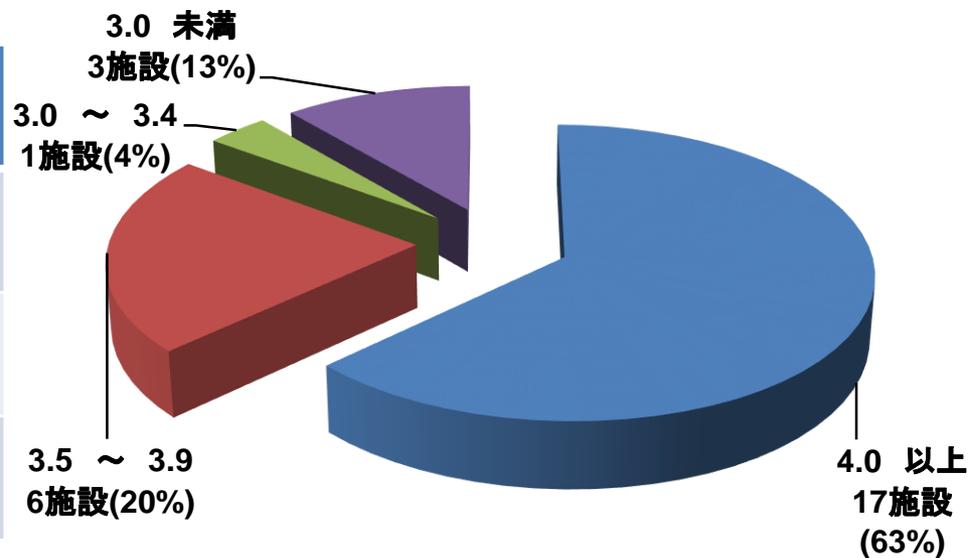
№53 子宮平滑肌肉腫組織

# Desmin染色 評価判定結果

## マイナス評価

評価	施設数	(%)
A評価	26	96
B評価	1	4
C評価	0	0

## 病理医評価



施設数:27

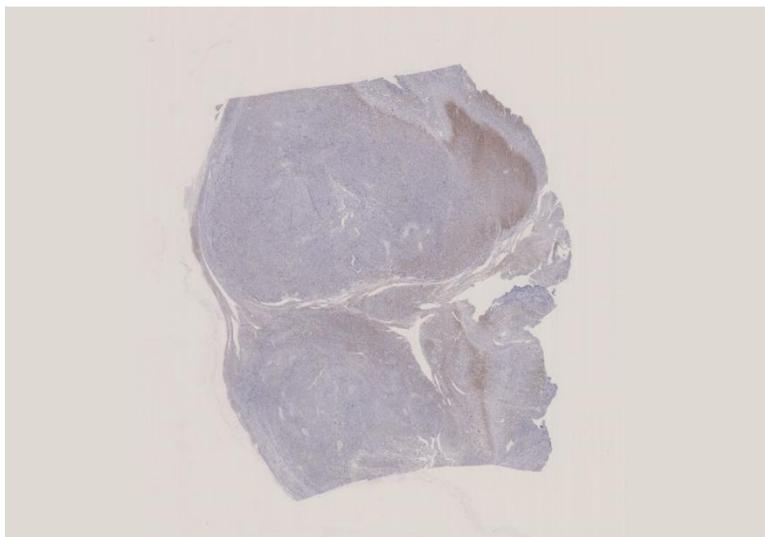
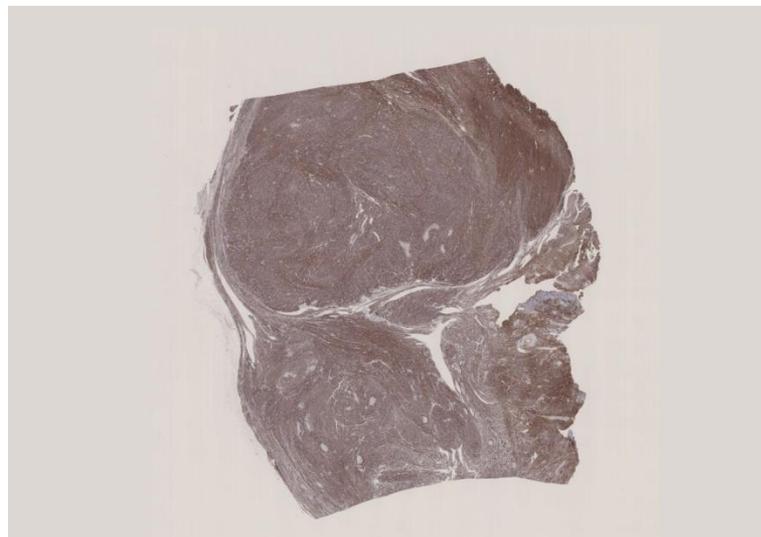


Desmin

評価4.7

評価2.9

評価3.9



# 低評価考察

- 評価3.5未満は4施設
- 「診断不適正標本」と評価された1施設では発色がほとんど確認できない。この施設と同様に「DAKO D33」を使用しており、ほぼ同様のプロトコールである施設と比較した。
- 残りの低評価3施設は共通して「ニチレイ D33」を使用していた。この抗体を使用し、高評価を得ている施設と比較した。

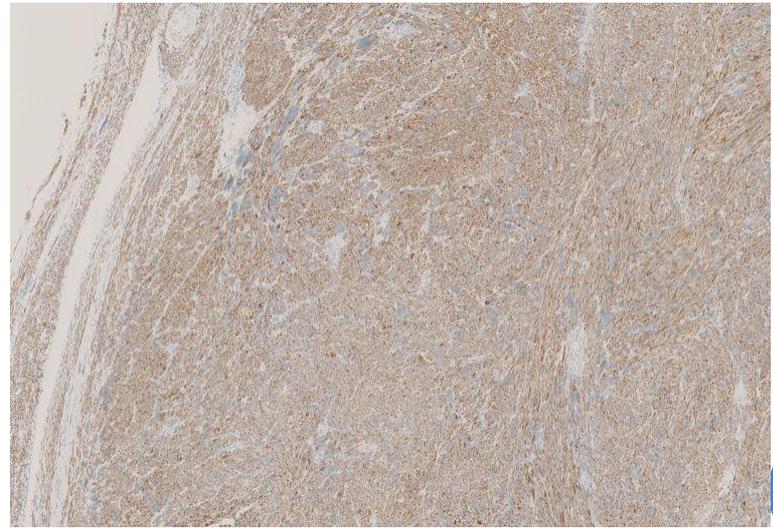
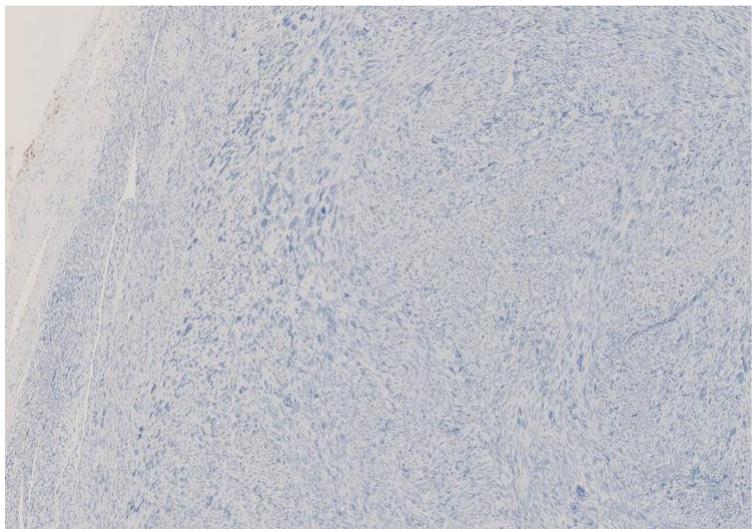
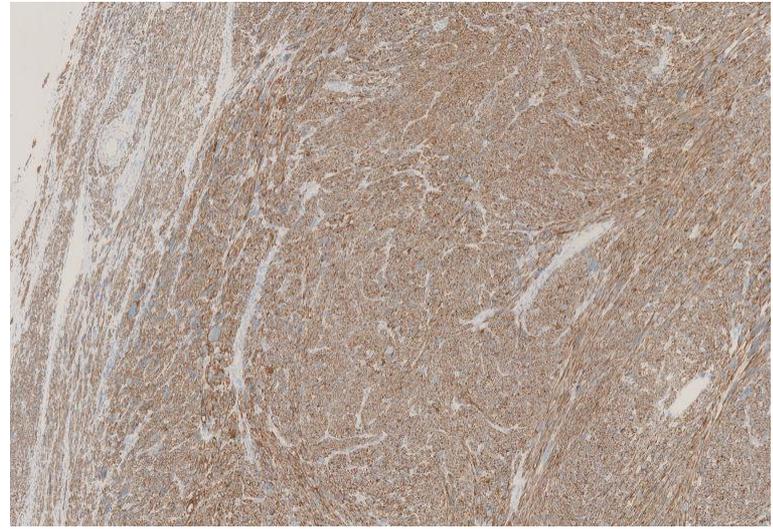


**DAKO  
D33**

**施設A  
評価4.6**

**施設C  
評価1.3**

**施設B  
評価4.1**



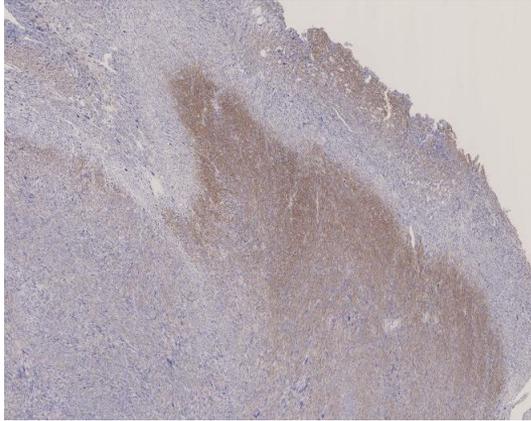
# DAKO D33 染色条件比較

		施設A	施設B	施設C
ベンチマーク		GX	XT	XT
希釈倍率		100倍	100倍	希釈済み
賦活化	処理	酵素	熱	熱
	pH	—	High	High
	時間	4分	60分	60分
検出系		LSAB		
評価		1.3	4.1	4.6

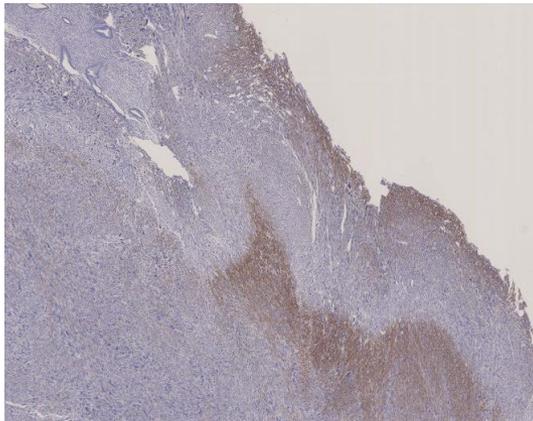


# ニチレイ D33(希釈済み)

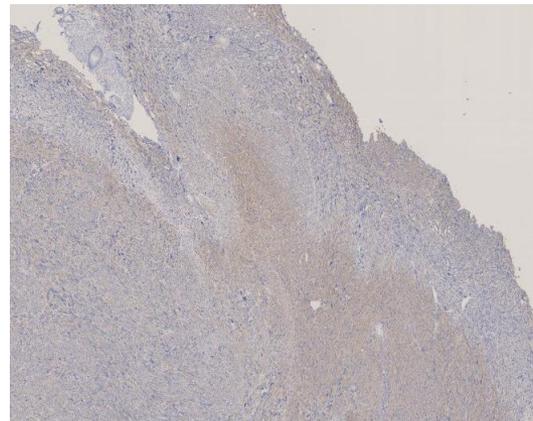
施設A 評価2.9



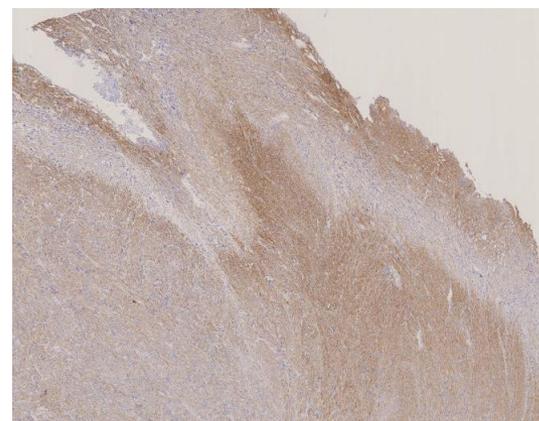
施設B 評価4.6



施設C 評価2.9



施設D 評価3.4



施設E 評価4.3



# ニチレイ D33 染色条件比較

		施設A	施設B	施設C	施設D	施設E
装置		Roche	Roche	用手法	Leica	Leica
賦活化	処理	熱	熱	—	熱	熱
	pH	High	High	—	High	Low
	時間	8分	60分	—	30分	10分
検出系		LSAB	LSAB	polymer	polymer	polymer
評価		2.9	4.6	2.9	3.4	4.3

※すべて希釈済み抗体を使用

# Desmin染色まとめ

- 「診断不適正標本」と評価された1施設ではほとんど発色は認められなかった。メーカー推奨の賦活化条件へ変更(酵素処理→熱処理/pH High)により染色性の改善が見込まれる。
- 残りの低評価3施設はいずれも発色は認められるが、染色ムラが目立っていた。「ニチレイ D33」を使用しているが、染色装置などにより高評価での賦活化条件が異なっていた。同様の染色条件の施設における賦活化方法を参考にしていきたい。
- 4施設とも「通常と同様」と自己評価していた。また、3施設で陽性コントロールをたてていたが、「診断不適正標本」と評価された1施設ではみられなかった。陽性コントロールでの染色性確認が必要であった。

# 精度管理調査まとめ

- HER2とERは染色結果が治療に直結し、Desminも診断には欠かせない抗体であり、まず第一にメーカー推奨条件での染色が求められる。
- 次に、日常業務において染色性にバラツキがでないよう、各組織の状態を一定にするプレアナリシスの管理が大変重要となる。染色性に疑問を感じたときは、陽性コントロールでの染色性の担保とプレアナリシスの確認が必要である。



**ご清聴ありがとうございました**

