

座長：中島 孝輔 (JA 愛知厚生連 豊田厚生病院)

52. HE600 緊急停止時の用手法 HE 染色運用に向けた染色条件の検討

岡野 夏希 国立大学法人 名古屋大学医学部附属病院 病理部

53. 血液塗抹標本用試薬を用いた病理組織標本におけるベルリン青染色の検討

田口 遥都 国立大学法人 名古屋大学医学部附属病院 病理部

54. 異なる自動免疫装置間における二重染色法の検討

武井 章 日本赤十字社愛知医療センター名古屋第一病院

55. 自動特殊染色装置におけるグロコット染色でコンタミネーションが起きた原因と対策

田中 佑佳 国立大学法人 名古屋大学医学部附属病院 病理部

56. 当院の肺癌コンパニオン診断の運用と遺伝子解析が困難な症例の検討

鈴木 慎哉 社会医療法人 杏嶺会 一宮西病院

## HE600 緊急停止時の用手法 HE 染色運用に向けた染色条件の検討

同一試薬の使用と ImageJ Fiji による定量評価

◎岡野 夏希<sup>1)</sup>、池田 悠馬<sup>1)</sup>、船戸 連嗣<sup>1)</sup>、原 稔晶<sup>1)</sup>、小林 晴美<sup>1)</sup>、佐藤 浩司<sup>1)</sup>、加留部 謙之輔<sup>1)</sup>  
国立大学法人 名古屋大学医学部附属病院 病理部<sup>1)</sup>

【背景】当院では HE 染色に（以下 HE600）を使用している。病理診断において安定した染色性の標本作製は重要であり、HE600 の緊急停止時、至急検体の染色は用手法での継続が必要となる。HE600 の運用条件や染色性は施設ごとに異なるため、当院の HE 染色に近似する用手法の HE 染色条件を設定し、客観的評価に基づき最適条件を検討した。

【対象と方法】胃、肝臓、膵臓の手術材料の残組織を用い、3 $\mu$ m 厚の切片を作製した。用手法では HE600 と同一の試薬を用い、染色条件は VENTANA HE 600 Hematoxylin を 2 分で固定し VENTANA HE 600 Eosin（以下 Eo）は 2, 5, 10 分、VENTANA HE 600 Differentiating Solution（以下 Dif）[分別] および VENTANA HE 600 Bluing reagent（以下 Blu）[色出し] はそれぞれ 30, 60 秒で組み合わせた条件で染色した。染色評価は目視に加え、画像解析ツール ImageJ Fiji を用いた。同一倍率・同一条件で TIFF 形式にて取得した画像を Color Deconvolution (H&E) によりヘマトキシリン成分（以下 H 成分）とエオシン成分（以下 E 成分）に分離設定した。各領域内の輝度の平均値の評価に加え、H/E 比を算出しコン

トラスト評価とした。当院の HE600 自動染色の値の分布（平均 $\pm$ 1.96SD）を許容範囲として各条件の定量値と比較し、近似する条件を選定した。本検討は名古屋大学医学部倫理委員会の承認(2010-1038-12)を得て実施した。

【結果】用手法では Eo 染色時間、Dif および Blu の時間の組み合わせにより、臓器ごとに染色性が変化した。Dif 30 秒・Blu 60 秒・Eo 10 分の条件の H/E 比(胃:1.22, 肝臓:0.80, 膵臓:1.23)は、いずれの臓器においても許容範囲内(胃:0.64~1.96, 肝臓:0.61~1.33, 膵臓:1.00~1.81)に収まり、定量評価と目視評価を総合した結果、当院 HE600 自動染色により近い染色性を示した。

【まとめ】今回 ImageJ Fiji を用いた定量評価を併用することで、HE600 自動染色に近似する用手法 HE 染色の染色条件を客観的に選定できた。本条件は、HE600 の緊急停止時において至急検体の染色法として適応可能であると考えられた。

連絡先：052-744-2582

## 血液塗抹標本用試薬を用いた病理組織標本におけるベルリン青染色の検討

◎田口 遥都<sup>1)</sup>、池田 悠馬<sup>1)</sup>、金田 晴輝<sup>1)</sup>、船戸 連嗣<sup>1)</sup>、原 稔晶<sup>1)</sup>、小林 晴美<sup>1)</sup>、佐藤 浩司<sup>1)</sup>、加留部 謙之輔<sup>1)</sup>  
 国立大学法人 名古屋大学医学部附属病院 病理部<sup>1)</sup>

【はじめに】ベルリン青染色は組織内の三価鉄 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) を証明する特殊染色である。当院では 2%フェロシアン化カリウム溶液と 2%塩酸溶液を染色直前に混和する自家調製試薬を使用しているが、施行頻度が少なく、試薬管理や調製操作に伴う品質変動およびヒューマンエラーが懸念される。血液塗抹標本用特染キット Fe 染色キット(武藤化学株式会社:以下 Fe 染色キット)は調製済みの 2 種の反応液を染色直前に混合することで使用可能な試薬である。今回、試薬変更を目的として Fe 染色キットを用い、現行試薬との染色性を比較検討した。

【対象と方法】10%中性緩衝ホルマリンで 48 時間固定した豚肝臓および牛脾臓からパラフィンブロックを作製し、3  $\mu\text{m}$  切片を用いた。染色方法はベルリン青反応 1 時間後に水洗し、ケルンエヒトロートで 5 分核染した。現行試薬と Fe 染色キットで染色性を比較した。また、Fe 染色キットでは水洗回数 (5 槽・10 槽) および反応温度 (室温・37°C) の影響を検討した。

【結果】豚肝臓および牛脾臓のいずれにおいても、両試薬

でベルリン青陽性の顆粒状沈着を認めた。Fe 染色キットでは、豚肝臓において顆粒がより明瞭に観察され、牛脾臓では微細な顆粒状沈着が観察された。Fe 染色キットの染色条件検討では、水洗回数による差は明確でなかった。一方、37°C 反応では室温と比較して顆粒がより鮮明に染色された。

【考察】 Fe 染色キットは現行試薬と同様に背景組織への目立った非特異反応を認めず、診断に支障がない染色性であった。また Fe 染色キットにおいて顆粒の視認性が向上した要因を追求したところ、何らかの染色液の組成を疑った。そこで両試薬の pH を測定したところ、Fe 染色キットが現行試薬よりも低い pH を示していた。これは Fe 染色キットの pH が低いことにより組織内の  $\text{Fe}^{3+}$  が反応しやすくなった可能性が考えられた。また反応温度を上げることで顆粒の視認性が向上した。

【結語】 今回の検討により、Fe 染色キットは良好な染色性を示し、簡易な試薬調製が可能な点から、ヒューマンエラー低減に寄与することが示唆された。

(連絡先: 052-744-2582)

## 異なる自動免疫染色装置間における二重染色法の検討

◎武井 章<sup>1)</sup>、広瀬 美砂<sup>1)</sup>、美濃島 慎<sup>1)</sup>、大屋 輝明<sup>1)</sup>  
 日本赤十字社愛知医療センター名古屋第一病院<sup>1)</sup>

【はじめに】

二重染色法は同一切片上で複数の標的を可視化でき、病理診断において有用である。特に EBER in situ hybridization (EBER-ISH) と免疫組織化学染色 (IHC) の二重染色法は、Epstein-Barr ウイルス (EBV) 関連疾患の診断に必要なウイルス感染細胞の系統同定に有用である。当院では EBER-ISH を BenchMark ULTRA PLUS (ロシュ・ダイアグノスティクス社:以下 ULTRA PLUS) で、IHC は BOND-III (ライカ・バイオシステムズ社) で行なっているため、両装置を併用した二重染色プロトコールを検討した。

【方法】

過去に EBV 感染が認められた症例を対象に染色を行なった。第一染色として ULTRA PLUS で EBER-ISH を施行後、反応オイル (Liquid Coverslip) を中性洗剤で完全に除去し、第二染色として BOND-III で IHC を実施した。抗原賦活化条件および発色系の組み合わせを検討し、複数の病理医および病理検査技師が染色態度を評価した。

【結果】

EBER-ISH と IHC は明瞭に識別可能で、高い視認性を得られた。単染色と比較しても同等の染色態度が確認され、診断に支障をきたす所見は認められなかった。

【結語】

ULTRA PLUS と BOND-III を併用した二重染色プロトコールは、両装置の特性を活かしながら良好な染色品質を実現できることが示された。今後は工程の簡略化と標準化を進め、より効率的な運用体制の確立が課題である。

連絡先 052-481-5111

## 自動特殊染色装置におけるグロコット染色でコンタミネーションが起きた原因と対策

◎田中 佑佳<sup>1)</sup>、船戸 連嗣<sup>1)</sup>、金田 晴輝<sup>1)</sup>、池田 悠馬<sup>1)</sup>、原 稔晶<sup>1)</sup>、小林 晴美<sup>1)</sup>、佐藤 浩司<sup>1)</sup>、加留部 謙之輔<sup>1)</sup>  
 国立大学法人 名古屋大学医学部附属病院 病理部<sup>1)</sup>

【背景】グロコット染色は多種の真菌を染める特殊染色である。当院ではグロコット染色を VENTANA®BenchMark Special Stains(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、以下 SS)で染色しているが、プレパラート内の組織以外の部位に菌体が観察され、組織とのフォーカスもずれていたことから外部からの真菌のコンタミネーションが疑われた。今回我々は、装置の試薬及び採水環境におけるコンタミネーション原因経路の追求を行ったので報告する。

【方法】コンタミネーションの原因として考えられたのは SS で使用する①Deparaffinization Solution(以下 Depar)②Wash II ③Liquid Coverslip と試薬作製に関わる純水製造装置の蒸留水(以下 DW)である。当院では普段より純水製造装置に採水ホースを取り付けて給水するため、④DW ホース無⑤DW ホース有を用意した。コントロールとして⑥製品化された蒸留水を使用した。それぞれの溶液 50ml を遠心処理し 5ml へ濃縮したものを Cyto-Tek®(SAKURA)で 2500rpm、10 秒間で標本上に塗抹した。標本は M-FIX®spray fixative(Sigma-Aldrich)で 10 分以上固定後グロコット染色を

行い、標本上の真菌の個数を計測し評価を行った。また今回の検討は SS のメンテナンス後、コンタミネーションがないことを確認し行った。

【結果】②19 個 ⑤28 個の菌体が確認され、他の条件では認められなかった。

【考察】Depar と Wash II は共に界面活性剤を含む濃縮液を DW で希釈するが、希釈時に採水ホースを通して調製用 20 L タンクに汲みこむ。この作業時に真菌が混入したと推察された。界面活性剤の濃度は Depar が 10%、Wash II が 0.25% であるため①では真菌が認められなかったと考えられた。純水製造装置に取り付けた採水ホースは乾燥しにくい環境下で不衛生だったと考えられた。今回の結果より Wash II では採水ホースの使用を止め、作製手順を一部変更した。Wash II は 2 段階の希釈を行うため従来は 2 段階希釈した状態で保管し、随時 SS に補充して使用していたが、1 段階希釈したものを使用直前に必要量のみ 2 段階目の希釈をするように変更した。

(連絡先：052-744-2582)

## 当院の肺癌コンパニオン診断の運用と遺伝子解析が困難な症例の検討

◎鈴木 慎哉<sup>1)</sup>、衣川 康弘<sup>1)</sup>、玉田 舞優<sup>1)</sup>、広瀬 智也<sup>1)</sup>  
 社会医療法人 杏嶺会 一宮西病院<sup>1)</sup>

【背景】非小細胞肺癌 (NSCLC) では複数のドライバー遺伝子異常が同定され、分子標的治療薬が開発されている。進行・再発の NSCLC では初回治療前にドライバー遺伝子異常の有無および PD-L1 の発現の有無が確認される。

従来のコンパニオン診断はシングルプレックス遺伝子検査が行われてきたが、現在はマルチプレックス遺伝子検査が強く推奨されている。標的とする遺伝子数の増加に伴い、検査に必要な核酸量と質の向上が求められている。

【目的】NSCLC におけるコンパニオン診断としてオンコマイン DX Target Test マルチ CD x システム(オンコマイン DxTT)、Amoy Dx 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル(Amoy Dx)が行われている。オンコマイン DxTT で遺伝子解析の実施が困難な場合、核酸の必要量が少ない Amoy Dx を行う。微小な生検検体における偽陰性の可能性が問題となっており、当院での結果を報告する。

【方法】2023~2025 年で実施したホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPE)生検検体 148 検体における解析成功率および判定不能数を算出した。また、判定不能検体中の腫

瘍割合を求めた。

【結果】生検検体によるオンコマイン DxTT による解析の成功数は 114 件で、解析成功率は 77%だった。各年で比較すると 2023 年の成功率は低かったが、2024.2025 年の成功率は 80%以上となった。また、Amoy Dx での結果は核酸の推奨値に満たない、参考値による報告が多かった。特に ALK、ROS-1 などの RNA 遺伝子の結果が参考値となってしまった。両方の判定不能件数は 2 件だった。

【考察】全体的にオンコマイン DxTT の解析成功率の上昇がみられた。Amoy Dx での参考値標本を観察したが、僅少な検体、血液など腫瘍以外を含むものが多かった。マクロダイゼクションを行い、腫瘍割合を高めた検体で実施することで解析率が改善されると思われる。

0586-48-0070(内線 7252)