

総説 「輸血前検査, 不規則抗体検査に触れてみる」

成田赤十字病院 検査部

千葉県臨床検査技師会 輸血研究班

今 村 梓

はじめに

安全な輸血を行うために、輸血前検査として血液型検査、不規則抗体検査は必要不可欠な検査です。不規則抗体検査にて検出される不規則抗体には臨床的に意義のあるものとなないものがあります。臨床的に意義のある抗体は溶血性輸血副作用の原因となるため、輸血をする際にはその抗体に対する抗原陰性の血液を選択する必要があります。そのため輸血前に不規則抗体検査を実施することは、輸血副作用のリスクの軽減に繋がります。しかし、不規則抗体を検出することは容易いことではありません。そこで今回は、不規則抗体検査の中で抗体同定をする際の消去法を中心に確認していきたいと思います。

1. まず、不規則抗体検査を行うにあたり赤血球抗原の特異性、抗体の性状を理解する。

(1) 赤血球抗原の特異性

- ・酵素試薬処理によって破壊されてしまう抗原にはどんなものがあるか
- ・各血液型抗原の発現頻度はどれくらいか

(2) 抗体の性状

- ・どの方法に反応態度が現れているのか
- ・量的効果を示しているか

2. 不規則抗体検査の結果から抗体を絞り込むために必要になってくるのが消去法。

不規則抗体検査が陽性となり、パネル赤血球での反応パターンがすべて一致する抗原があった場合、その抗原に対する抗体が「可能性の高い抗体」といえます。しかし、検出される不規則抗体は1種類とは限りません。反応パターンが一致した抗体があったとしても、その反応パターンの陰に別の抗体が隠

れている可能性があります。また、反応パターンがどの抗原とも一致しないこともあります。このような現象の裏には量的効果によって反応しなかったパネル血球がある場合や、複数抗体(2種類以上の抗体)の存在も考えられます。これらを確認する方法として「消去法」があります。その「消去法」を用いて複数抗体と量的効果を考慮した不規則抗体同定方法を解説します。

(1) 消去法の解説

消去法の考え方は、まず反応が陰性となった血球に着目する。反応が陰性ということは、血清(血漿)中の抗体はその血球中の抗原と反応していない(抗原に対する抗体ではない)ということになり消去することができる。

表記手順は陰性反応を示した抗原表の陽性(+)表記上に「×」または「/」を記入する。

①量的効果のあるホモ接合体の抗原や、量的効果がない抗原には「×」を記入。

②量的効果のあるヘテロ接合体の抗原には「/」を記入。

③「×」が記入された血球が1つ以上ある場合は、対応抗原に対する抗体を否定して、抗原表上段に記載されている抗原名に「×」を記入する。

④「×」が1つも無く、「/」のみ記入された抗原に対する抗体については、判定を保留とし、抗原名には何も記載せずに残す。

(2) 量的効果とは？

ここで、消去法の解説でも出てきた「量的効果」について詳しく説明します。

赤血球の抗原には、対立遺伝子がホモ接合体(例：EE)のものと、ヘテロ接合体(例：Ee)のものがある。この二通りの赤血球の抗原量を比べてみた時に、ホモ接合体の方がヘテロ接合体よりも約2倍の抗原が発現しているといえる。(図1)

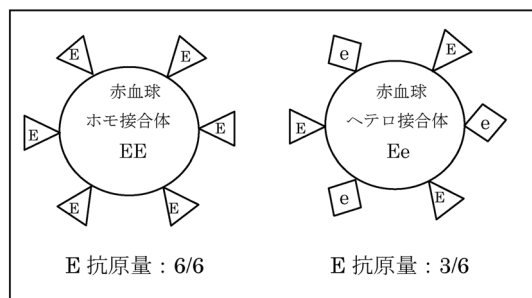


図 1

3. 実際にアンチグラムを用いて消去法を実施してみる。

例 1

	Rh-hr					KELL		DUFFY		KIDD		LEWIS		MNS				P			Sal	IAT	Enz
	D	C	c	E	e	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Lea	Leb	S	s	M	N	PI					
1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	+		1	0	3+	2+
2	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	+	Di(a+)	2	0	2+	1+
3	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0		3	0	0	0

	Rh-hr					KELL		DUFFY		KIDD		LEWIS		MNS				P			Sal	IAT	Enz
	D	C	c	E	e	K	k	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Lea	Leb	S	s	M	N	PI					
1	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+		1	0	2+	1+
2	+	0	0	0	+	+	+	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	0		2	0	0	0
3	+	0	+	0	0	0	+	+	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+		3	0	0	0
4	+	0	0	0	+	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+	0	+	+		4	0	0	0
5	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+		5	0	3+	2+
6	0	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	+	+		6	0	2+	1+
7	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	0		7	0	3+	2+
8	0	0	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	0	+	+	+	+		8	0	0	0
9	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+		9	0	3+	2+
10	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+		10	0	0	0
11	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	0	0	+	+	0	+	Di(a+)	11	0	2+	1+
自己																				自己	0	0	0

間接抗グロブリン法(IAT)と酵素法(Enz)で反応が見られ、反応に強弱がある。反応パターンを見ると一致する特異性がJkbに見られる為、可能性の高い抗体は抗Jkbと推測される。

陰性を示しているスクリーニング血球3、パネル血球2・3・4・8・10に着目して消去法を実施

そのため、ホモ接合体の赤血球にはヘテロ接合体の赤血球に比べて約2倍の抗体が結合するので、凝集反応はホモ接合体の赤血球の方がヘテロ接合体の赤血球よりも強くなるといえる。

このように、抗原発現量の違いにより抗原抗体反応の強さが異なる現象を量的効果という。量的効果を示す血液型には、Rh, Duffy, Kidd, MNSなどがある。KellやDiegoにも量的効果がみられるといわれているが、その量的効果が僅かであることと、K+k-, Di(a+b-)の赤血球が稀であり入手困難であるということから、ヘテロ接合体の赤血球に関しては反応が陰性であっても否定してよいことになっている。

する。陽性を示しているパネル血球を見ると、1・6・11で反応強度が弱く、量的効果がみられる。また、消去法にてDi(a+)を含む血球が消去できないことから抗Diaが否定できない抗体といえる。

例 2

	Rh-hr					DUFFY		KIDD		LEWIS		P	MNS						Sal	IAT	Enz
	D	C	c	E	e	Fys	Fyb	Jka	Jkb	Lea	Leb	Pl	M	N	S	s					
1	+	+	0	0	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+	+		1	3+	1+	0
2	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+		2	2+	w+	0
3	0	0	+	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	Diego(b+)	3	0	0	0

	Rh-hr					DUFFY		KIDD		LEWIS		P	MNS							Sal	IAT	
	D	C	c	E	e	Fya	Fyb	Jka	Jkb	Lea	Leb	Pl	M	N	S	s						
1	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	0	+	0	0	+			1	3+	1+		
2	+	+	0	0	+	+	0	0	0	+	+	+	0	+	+			2	3+	1+		
3	+	0	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	+		3	0	0		
4	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	+	+	+	+	0		4	2+	w+		
5	+	+	0	0	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+	0	+		5	0	0		
6	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	+	+	+		6	0	0		
7	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+		7	3+	1+		
8	0	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+		8	2+	w+		
9	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+		9	0	0		
10	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0		10	0	0		
11	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	+		11	3+	w+		
自己																		自己	0	0		

生理食塩液法 (Sal), 間接抗グロブリン法で反応が見られる. 反応パターンから可能性の高い抗体は抗Mと推測できる.

陰性を示しているスクリーニング血球 3, パネル血球 3・5・6・9・10に着目して消去法を実施する. また, MNS血液型抗原は酵素により抗原性が破壊されてしまうため酵素法で反応が出ていないことと, 陽性パネル血球 4・8で量的効果が見られることから抗Mと推測することができる.

スクリーニング血球 3にはDiegoヘテロ接合体の赤血球が含まれているが, 量的効果の説明でも述べたとおり否定する.

また, その他にもすべての血球に反応が見られる場合には, 高頻度抗原に対する抗体や, 寒冷同種抗

体の存在, また自己血球にも反応がある場合には, 自己抗体なども考えられるため, すべての不規則抗体検出に際しては, 反応性と患者情報を得た上で追加検査が必要となる.

おわりに

今回の例は過去のペーパーサーベイで提示したもので, 日々の検査ではこのような結果だけではなく, 複数抗体や患者由来の要因により複雑な結果となることが多々あると思います. その中で不規則抗体の性状や, 赤血球抗原の特異性など基本的な所を理解して検査に望むことで, 今まで悩んでいたところがすっきりすることもあるかと思います. ペーパーサーベイなど積極的に参加していただき, 日々の仕事に役立てていただければと思います.

入職時職員健診としてのクオンティフェロン(QFT)検査の活用

荻原 真二 秋倉 史 岩間 暁子 加地 大樹

足達由佳里 柿沼 響香 高橋 弘志

国保君津中央病院 医療技術局 臨床検査科 微生物検査室

【要 旨】

クオンティフェロン検査(QFT検査)はツベルクリン反応と異なりBCG接種やほとんどの非定型抗酸菌症の影響を受けることなく、高感度・高特異度を兼ね備えた結核感染を補助診断できる検査である。今回、我々は入職時健診にてQFT検査を導入して5年が経過し、さらにその期間に接触者健診をQFT検査で実施し有用性があったため報告する。2008年度～2012年度までの入職時健診にてQFT検査を行い、実施者588名中陽性17名、判定保留23名、判定不可6名、陰性542名であった。陽性17名のうち、4名が肺結核症、9名が潜在性結核症と診断された。接触者健診では実施者58名中陽性4名、判定保留6名、判定不可1名、陰性47名であった。QFT検査は特異度が高く潜在性結核の検出にも優れ職員の感染対策に貢献できたことを示した。またQFT検査はその後の接触者健診があった場合でも、interferon- γ 値の変動によって結核感染の有無を判定でき有用性が高い検査であると考えられる。

【keyword】

QFT, 入職者健診, 結核感染, IGRAs, 接触者健診

【はじめに】

従来、ツベルクリン反応(以下、ツ反)が潜在性結核症の補助診断に用いられる方法として主流であった。しかし、日本ではBCG接種率が非常に高く偽陽性が多いためツ反による結核症の診断が困難とされてきた¹⁾。クオンティフェロン検査(以下、QFT検査)はツ反と異なりBCG接種やほとんどの非定型抗酸菌症の影響を受けることなく、高感度・高特異度を兼ね備えた結核感染を補助診断できる検

査法である。

当院は、3次救急を担当している地域の基幹病院で結核病棟を有している。そのため以前から入職時健診にツ反を導入していたが、判定に時間がかかること、判定が主観的であること、反応に偽陽性があることから2008年度からQFT検査を実施している。そこで、我々は5年間実施した入職時健診とその期間に実施された接触者健診でのQFT検査の有用性について報告する。

【方 法】

検査試薬は2008年度～2009年度にQuantiFERON[®]-TB Gold(以下、QFT-2G)(日本BCG株式会社)、2010年度～2012年度はQuantiFERON[®]-TB Gold In-Tube(以下、QFT-3G)(日本BCG株式会社)を使用した。カットオフ値は表1に示す。測定値A(TB抗原)が ≥ 0.35 IU/mL以上かつ測定値M(陽性コントロール)が ≥ 0.5 IU/mL以上を陽性、測定値A(TB抗原)が $\geq 0.1 \sim 0.35$ IU/mLかつ測定値M(陽性コントロール)が ≥ 0.5 IU/mL以上を判定保留、測定値A(TB抗原)が ≥ 0.1 IU/mL以下かつ測定値M(陽性コントロール)が ≥ 0.5 IU/mL以上を陰性、測定値A(TB抗原)が ≥ 0.35 IU/mL未満で測定値M(陽性コントロール)が ≥ 0.5 IU/mL未満を判定不可とした。

【対 象】

入職時健診では2008年度～2012年度までの新入職員641名を対象者とした。実施者は588名、実施率は91.9%であった。そのうち医師218名中176名(80.7%)、看護師267名中260名(97.4%)、コメディカル94名中93名(98.9%)、事務職62名中59名(95.2%)であった。接触者健診では実施者が2010年7月

は10名， 2011年3月は35名， 2012年1月は10名， 2012年2月は3名であった。

【結 果】

2008年度～2012年度までのQFT検査結果を図1に示す。実施者588名中陽性17名(2.9%)，判定保留23名(3.9%)，判定不可6名(1.0%)，陰性542名(92.2%)であった。また，今回のQFT検査の特異度は99.3%であった。

測定値A(TB抗原)	測定値M(陽性control)	判定
0.35 IU/mL以上	0.5 IU/mL以上	陽性
0.1～0.35 IU/mL	0.5 IU/mL以上	判定保留
0.1 IU/mL以下	0.5 IU/mL以上	陰性
0.35 IU/mL未満	0.5 IU/mL未満	判定不可

表1 QFT検査のカットオフ値

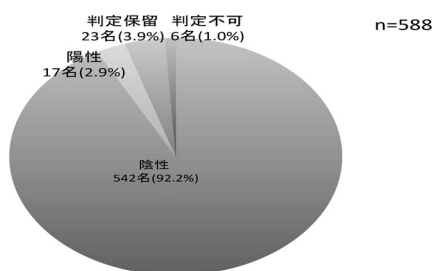


図1 QFT検査結果割合

職種別の結果割合を図2に示す。医師は176名中陽性4名(2.3%)，判定保留3名(1.7%)，判定不可1名(0.6%)，陰性168名(95.4%)，看護師は260名中各々10名(3.9%)，13名(5.0%)，4名(1.5%)，233名(89.6%)，コメディカルは93名中各々1名(1.1%)，5名(5.4%)，0名(0.0%)，87名(93.5%)，事務職は59名中各々2名(3.4%)，22名(3.4%)，1名(1.7%)，54名(91.5%)であった。

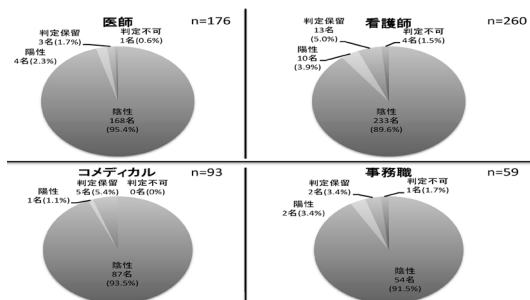


図2 QFT検査の職種別結果

陽性者の職種別結果割合を図3に示す。陽性者17名中医師4名(23.5%)，看護師10名(58.8%)，コメディカル1名(5.9%)，事務職2名(11.8%)であった。

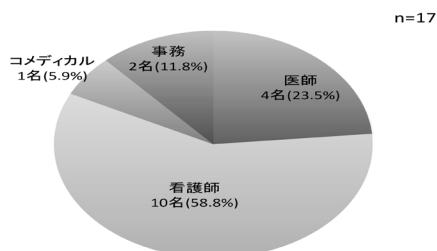


図3 QFT検査陽性者の職種別結果

年齢別の結果割合を図4に示す。25歳以下は176名中陽性2名(1.1%)，判定保留11名(6.3%)，判定不可1名(0.6%)，陰性162名(92.0%)であった。26歳～30歳は175名中各々3名(1.7%)，6名(3.4%)，0名(0.0%)，166名(94.9%)であった。31歳～35歳は114名中各々7名(6.1%)，5名(4.4%)，4名(3.5%)，98名(86.0%)であった。36歳～40歳は101名中各々5名(5.0%)，1名(1.0%)，1名(1.0%)，94名(93.0%)であった。41歳以上は22名中すべて陰性であった。

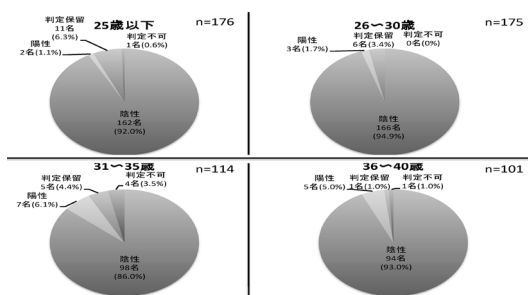


図4 QFT検査の年齢別結果

陽性者の年齢別結果割合を図5に示す。陽性者17名中25歳以下2名(11.8%)，26歳～30歳3名(17.6%)，31歳～35歳7名(41.2%)，36歳～40歳5名(29.4%)であった。

陽性者の診断結果は，画像診断(胸部レントゲン，CTスキャン)や問診などを行い17名中4名(内訳:医師1名，看護師1名，コメディカル1名，事務職1名，年齢別では31歳～35歳2名，36歳～40歳2

名)が肺結核症，9名(内訳：医師1名，看護師8名，年齢別では25歳以下1名，31歳～35歳5名，36歳～40歳3名)が潜在性結核症，4名が結核症陰性であった。

治療は，肺結核者がINH(Isoniazid)，RFP(Rifampicin)，EB(Ethambutol)，PZA(Pyrazinamide)の4剤を6カ月間投与，潜在性結核者がINHを6カ月間予防投与し経過観察している。

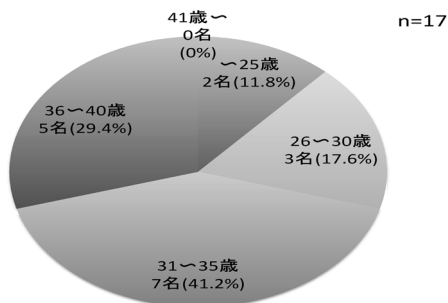


図5 QFT検査陽性者の年齢別結果

さらに，当院では2008年度～2012年度の5年間に接触者健診を4回行った。QFT検査のタイミングは接触後2カ月後に実施した。接触者健診でのQFT検査の結果を図6に示す。実施者58名中陽性4名(6.9%)，判定保留6名(10.3%)，判定不可1名(1.7%)，陰性47名(81.0%)であった。

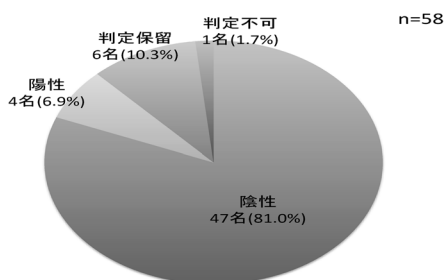


図6 接触者検査のQFT検査結果

接触者健診実施別の結果を図7に示す。2010年7月は，10名中陽性1名(10.0%)，判定保留1名(10.0%)，判定不可0名(0.0%)，陰性8名(80.0%)であった。2011年3月は，35名中各々3名(8.6%)，3名(8.6%)，0名(0%)，29名(82.8%)であった。2012年1月は，10名中各々0名(0%)，2名(20.0%)，0名(0%)，8名(80.0%)であった。2012年2月は，3名中各々0名(0.0%)，0名(0.0%)，1名(33.3%)，2名(66.7%)であった。

2010年7月，10名(10.0%)，判定不可0名(0.0%)，陰性8名(80.0%)であった。2011年3月は，35名中各々3名(8.6%)，3名(8.6%)，0名(0%)，29名(82.8%)であった。2012年1月は，10名中各々0名(0%)，2名(20.0%)，0名(0%)，8名(80.0%)であった。2012年2月は，3名中各々0名(0.0%)，0名(0.0%)，1名(33.3%)，2名(66.7%)であった。

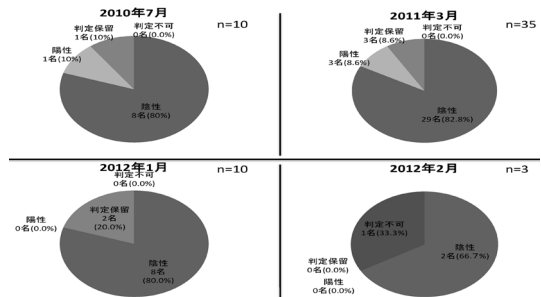


図7 接触者検査の実施別割合

【考 察】

QFT検査の原理は，結核菌感染によって分子したメモリーT細胞とマクロファージを含む全血液をBCGに含まれない結核菌抗原で刺激し，メモリーT細胞から産生されたinterferon- γ 量を測定する。2006年にQFT検査は結核感染の補助診断として保険適応となり，当時の検査試薬はQFT-2Gであったが2010年7月に販売中止となった。その後は後継試薬としてQFT-3Gが販売され現在に至る。QFT-2GとQFT-3Gの相違点は標的とする結核菌抗原が異なる。QFT-2GはESAT-6(early secreted antigenic target 6)およびCFP-10(culture filtrate protein 10)であるが，QFT-3Gは上記の結核菌抗原にTB-7.7(a protein of tuberculosis antigen)が加わった。これにより特異度は両者で同等の高い値を示したが，新たな結核菌抗原を追加したことにより感度はQFT-2Gと比較するとQFT-3Gがより高くなった²⁾。

日本は，欧米先進国に比べ結核罹患率は高く未だに中蔓延国である。罹患率を高率にしている要因として，血液透析などのimmunocompromised hostや日本人口の高齢化が挙げられる^{3), 4)}。また，粟粒結核症は結核菌が血行性に全身に播種し，多臓器に結核病変が形成される重症結核症である。粟粒結核症は結核症の1～2%を占め，診断の遅れは生命予後に関わるため早期発見が重要である⁵⁾。当院では，透析センターが有しているため入職時にQFT検査を行うことにより感染を拡げないように対

応できている。

当院では2008年度～2012年度までの入職時職員健診でQFT検査を行い、実施者588名中17名の陽性者を検出した。陽性17名のうち、4名が肺結核症、9名が潜在性結核症と診断された。医療従事者は病院実習や過去に医療機関での勤務などにより入職前に結核感染のリスクが少なからずある。だが、陽性者の中に事務職がいることから健常人でも感染のリスクは存在しているといえる。そして結核菌は空気感染するため、今回の健診は結核症の早期発見によりアウトブレイクを阻止できたと考えられる。残り4名は結核症陰性で特異度が99.3%と示した。QFT検査は98%という高い特異度を持った検査法であるとMoriらによって報告されており⁶⁾、今回の結果もMoriらの報告と同等の結果が得られた。職種割合の結核症陽性者は看護師が多かったがこれは病院内で看護師の絶対数、割合共に一番高いためこのような結果となったと考えられる。年齢別の結核陽性者が31～35歳に最も多かったことに関しては、結核の罹患率は年齢とともに上昇していく⁴⁾が、今回は35～40歳が30～35歳より低い陽性率となった。これは新入職員を対象としているため、35歳以上の実施者が少なかったことからこのような結果が出たと推測される。

治療は、肺結核者がINH、RFP、EB、PZAの4剤を6カ月間投与、潜在性結核者がINHを6カ月間予防投与した。また判定保留23名は、陽性同様に画像診断等を考慮し経過観察として半年ごとに陰性化になるまでQFT検査を実施しているが予防投与は実施されなかった。QFT検査は、活動性結核症と潜在性結核症あるいは過去と現在の感染を区別する事ができない。そのため、実際には個々の過去の接触歴や職歴を詳細に調べ、総合的に判断するしか方法がないのが実情である。原田氏は、感染リスクの高いとされる医療従事者における結核感染を判断するために、あらかじめQFT検査を実施しベースラインをとっておくことが非常に有意義であると報告している⁷⁾。入職時健診で行ったQFT検査の値はベースラインと考え、その後接触者健診があった場合でもベースラインからの変動を確認することにより結核感染の有無を判定でき有用性が高い

と考えられる。実際に当院では、4回にわたる接触者健診があり、その際は入職時QFT検査データを活用することができた。

また、*M. marinum*, *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. flavescens*の非定型抗酸菌はESAT-6遺伝子を保有している⁸⁾。上記の非定型抗酸菌症の既往歴がある場合、QFT検査では偽陽性を示す。一方、感度は89%⁵⁾と高い値だが偽陰性があることも念頭に置いとかなければいけない。日本結核病学会のクオンティフェロン[®]TBゴールド指針にはimmunocompromised hostの場合も感度の低下や判定不可になると記載されている⁹⁾。これらのことからQFT検査のみでの診断は非常に危険であり、画像検査や問診などを行い総合的に判断することが重要である。

【結 語】

QFT検査は、つ反と比べBCGワクチンの影響を受けず、特異度も高く潜在性結核の検出にも優れていた。今後もQFT検査を施行することにより、職員の感染対策に貢献でき、接触者健診にも有用であると考えられた。

【参考文献】

- 1) 原田 登之 他: Quantiferon TB 第二世代の基礎的特性 結核 80:774～777, 2005
- 2) Nobuyuki Harada et al: Comparison of the sensitivity and specificity of two whole blood interferon-gamma assays for *M. tuberculosis* infection. J Infect. 56:348～353, 2008
- 3) 佐々木 結花 他: 血液透析患者における結核発病の現状 結核 77:51～59, 2002
- 4) 山岸文雄 : 高齢者結核 結核 79:481～486, 2004
- 5) 平塚 雄聡 他: 当院における粟粒結核の臨床的検討 感染症学雑誌 78:929～934, 2004
- 6) Toru Mori et al: Specific detection of tuberculosis infection an interferon-gamma-based assay using new antigens. Am J Respir-Crit Care Med. 170:59～64, 2004
- 7) 原田 登之: QFTからみた結核感染免疫の動態 結核 86:743～749, 2011

- 8) Morten Harboe et al: Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. Infect Immun. 64:16~22, 1996
- 9) 長尾 啓一 他: クオンティフェロン®TBゴールドの使用指針 結核 86:839~844, 2011

免疫組織化学染色における電界非接触攪拌装置の使用経験



千葉大学医学部附属病院 病理部

小木 義貴 小野寺清隆 鈴木 学 曾川 紀子
米川 球恵 山田 千裕 岩井 優 大木 昌二

[要 旨]

病理組織学的診断において免疫組織化学染色は診断が困難な症例に対する補助的方法であり、診断の確実性を高めるために有用な方法である。特に近年は分子標的薬が活用されるようになり、また診断に有用な抗体が数多く証明されていることなどから、免疫組織化学染色の需要が増加していくことが考えられる。今回、我々は電界非接触攪拌法という新しい原理を用いた免疫組織化学染色装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)を使用することで、抗体の感作時間の短縮や使用する抗体の節約が可能となるかを検討し、一定の効果が確認されたので報告する。

[キーワード]

抗体の節約、感作時間の短縮、攪拌技術

[背 景]

病理組織学的診断では通常HE染色標本によって行われる。しかし、HE染色標本のみでの診断が困難な場合も少なくなく、特殊染色や免疫組織化学染色を併用して診断を行うことが多くなっている。特に免疫組織化学染色では乳癌、胃癌におけるHER2や肺癌におけるALK、EGFRなどのように染色結果が治療法の適応判定に用いられる抗体もあり、病理組織学的診断には欠かせない存在となっている。また、診断に有用な抗体が日々証明されており、今後もその需要は増加していくことが予想される。

今回我々は電界非接触攪拌技術という新しい技術を用いた免疫組織化学染色装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)を使用する機会を得た。電界非接触攪拌技術は、以前より報告のあるマイクロウェーブによる免疫組織化学染色の迅速化¹⁾と同様の目的によ

り開発されており、実際には電圧を印加することで、スターラーなどの攪拌子を接触せずに液中の粒子を効果的に攪拌する技術である。スライドガラスに塗貼された切片の周囲に円形の撥水リングを塗貼、または撥水ペンで目的部位を円形に囲み、その内部に抗体を滴下、上下の電極により挟み低周波電圧を印加する。これにより液滴は電極には接触せずに上下方向の運動または外内周方向に活発に動き、液内部の抗体は均一に、また効率的に攪拌される。²⁾(図1)免疫組織化学染色は抗原抗体反応を原理としており、一次抗体および二次抗体の抗原への感作にこの攪拌技術を用いることで抗原と抗体の接触機会は増加し、反応が促進されることが予想される。

[目 的]

今回我々は電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)を使用することによる抗原抗体反応の促進効果について抗体感作時間の短縮や抗体の低濃度化に着目し検討を行ったので報告する。

[対象・方法]

ホルマリン固定された扁桃を3～4μmに薄切したパラフィン切片を使用した。抗体はCD3(Dako、polyclonal、100倍希釈)、κ-mono(ニチレイ、clone LIC1、Ready to Use)、λ-mono(ニチレイ、clone HP6054、Ready to Use)、CD20(Dako、clone L26、250倍希釈)、Ki-67(Dako、clone MIB-1、50倍希釈)の5種類を使用し、以下の検討を実施した。

1. 使用する抗体濃度の検証

前述した5種の抗体に対して、日常業務で使用している濃度を1倍希釈とし、CD3では1倍、5倍、10

倍、20倍に希釈、その他4種類の抗体では1倍、2倍、6倍、8倍、10倍に希釈し、室温静置による染色と電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)を抗体感作に使用した染色の両方を実施した。前処理としてPT Link(Dako社)を使用しHigh pHの抗原賦活液(pH9)中で97℃、20分間、熱賦活により行った。染色はポリマー法(Dako社 Envision Flex kit)を原理として用手法により実施した。

染色手順は以下の通りである。

- i) 賦活処理 20分間
- ii) ブロッキング操作 3分間
- iii) 一次抗体感作 5分間
- iv) 二次抗体感作 5分間
- v) DAB 3分間
- vi) マイヤーのヘマトキシリン
(武藤化学)による核染色 1分間
- vii) 脱水・透徹・封入

また洗浄操作はii)～iv)のそれぞれの間で3分3回トリス緩衝液(tween20を含む)により行った。電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)は一次抗体および二次抗体の感作にのみ使用し、その他の染色操作は通常法と同様に行った。

2. 抗体感作時間の検証

前処理や染色原理、染色手順は1. 抗体濃度の検証で行ったものと同様に実施した。ただし抗体濃度はそれぞれ日常使用している希釈倍率のものを、反応時間に関しては当院で行われている用手法を基準として以下の4種類に時間を設定し、室温静置と電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)での染色を実施した。

- i) 一次抗体30分、二次抗体20分
- ii) 一次抗体20分、二次抗体10分
- iii) 一次抗体10分、二次抗体10分
- iv) 一次抗体5分、二次抗体 5分

また、DAB発色も当院用手法に従い10分間で行った。

[結 果]

1. 使用する抗体濃度の検証

前述の通り日常業務で使用している抗体の希釈倍率を1倍希釈としてこれを室温静置によって染色した結果と比較して、抗体の感作に電界非接触攪

拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)を用いた染色では、CD3においては希釈倍率5倍、κ-monoでは希釈倍率8倍(図2)、Ki-67、CD20では希釈倍率2倍の抗体で染色した結果で同程度の染色強度が得られた。しかし、λ-monoにおいては室温静置における染色と装置を使用した染色に明らかな差は見られなかった。(図3)

2. 抗体感作時間の検証

日常業務で行われている室温静置における一次抗体30分、二次抗体20分での染色を従来法とし、この結果と比較して電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)を抗体の感作に使用した染色では、Ki-67においては一次抗体、二次抗体共に10分で実施した染色で同等の染色強度が得られた。(図4) CD3、κ-mono、λ-monoにおいては一次抗体20分、二次抗体10分での染色で従来法と同等の染色強度が得られた。しかし、CD20では従来法と比較して、室温静置で一次抗体30分、二次抗体20分での染色結果、抗体感作に電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)を使用し一次抗体30分、二次抗体20分での染色ならびに一次抗体20分、二次抗体10分での染色結果に明らかな差は見られなかった。(図5)

[考 察]

1. 使用する抗体濃度の検証の結果から、λ-monoでは電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)の効果は得られなかったが、その他4種類の抗体については電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)を使用することで通常の抗体濃度から2～8倍の希釈を行うことが出来ることが確認された。

2. 抗体感作時間の検証の結果からはCD20では電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)の明らかな効果は見られなかったが、その他の4種類の抗体では電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)の使用で一次抗体、二次抗体合わせて20分～30分の時間短縮が見込まれることが確認された。

以上より、電界非接触攪拌装置(TypeA、TypeBプロトタイプ)によって抗原抗体反応が促進され染色強度が増すことで、室温静置での染色と比較してより低濃度の抗体での染色、または染色時間の短縮が可能となることが確認された。

[結 論]

使用する抗体の種類によって攪拌の効果に違いはあるものの、免疫組織化学染色において抗体の節約、時間短縮に一定の効果があるのではないかと考えられる。

今後抗体の種類を増加させるなどさらなる検討を行うことで電界非接触攪拌装置は免疫組織化学染色の低コスト化や迅速化へつながることが予想される。また今回使用したのは試作段階の装置であり、今後の装置の改良によって、より効果的な結果が得られるようになることが期待される。

図 1 電界攪拌法の免疫組織化学染色への利用

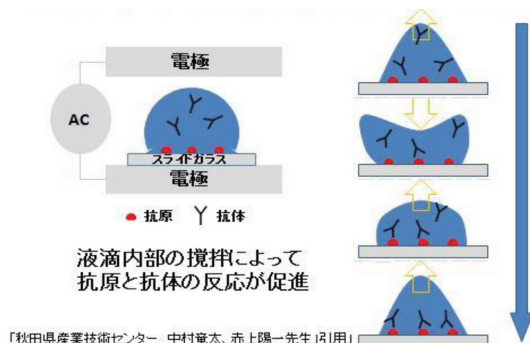


図 2 検討結果 1 : κ-mono

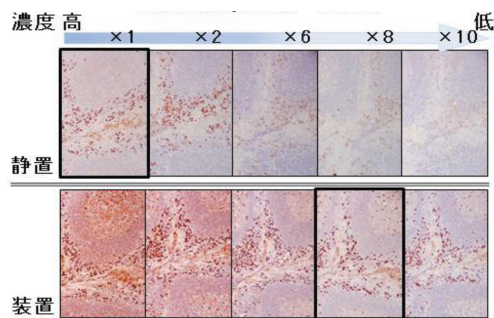
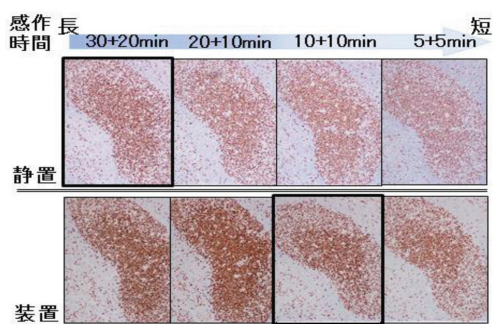


図 4 検討結果 2 : K i -67



[参考文献]

- 1) T Kumada et al.: Improved 1-h rapid immunostaining method using intermittent microwave irradiation: practicability based on 5 years application in Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital, Modern Pathology 17:1141-1149, 2004
- 2) 南條博、他：迅速免疫染色, 病理と臨床2014年臨時増刊号32:54-58, 2014

図 3 検討結果 1 : λ-mono

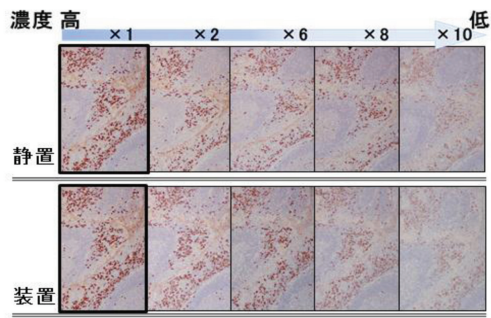
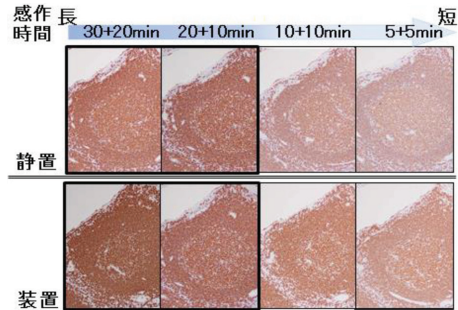


図 5 検討結果 2 : C D 20



地方独立行政法人 東金九十九里地域医療センター 東千葉メディカルセンター

平成26年4月1日に開院したばかりの東千葉メディカルセンターへ、施設訪問してきました。千葉駅、東京駅から高速バスも乗り入れており、千葉県のほぼ中央部、緑に囲まれた東金市丘山台に病院はあります。

出来たばかり、まだ新しい匂いのする病院は、玄関入ってすぐのセンタープラザは2階まで吹き抜けになっており開放的で、白を基調とした建物は明るく清潔感にあふれています。

青いしずくが7つ、赤いしずくが1つ、黄色い円を中心にこれらのしずくが円を作った病院のロゴマーク。黄色い円は人々の明るい未来を、青いしずくは地域医療に関係する各機関を、赤いしずくは東千葉メディカルセンターを表しています。「東千葉メディカルセンターは地域医療連携のもとにみなさんの明るい未来へ貢献する」という思いがこめられているそうです。

【病院の概要】

東千葉メディカルセンターは、山武長生夷隅保険医療圏の地域医療再生と改善を目指し、救急医療を中心とした医療体制の整備し、地域中核病院の役割を担うべく、平成26年4月に開院しました。この開院にあたり、既存の公立病院を引き継ぐのではなく、医療機関の運営を目的に、新しく地方独立行政法人



が設立され、全く新しい病院を建設し運営するというのは全国で初めての試みであり注目を集めています。

また、東千葉メディカルセンターは、千葉大学医学部および千葉大学医学部附属病院と提携を結んでおり、センターに勤務する医師は全て千葉大学医学部総合医科学講座の特任教授・准教授等の教官です。そしてセンター内に、千葉大学医学部附属病院東金九十九里地域臨床教育センターが、併設されております。



病院は、地下1階、地上6階。検査室がある1階は、センタープラザを中心に救命救急センター・手術室・放射線・内視鏡・ICU(10床)・HCU(10床)など、緊急時の診療に際し縦方向の患者移動が不要となるような造りになっています。駐車場脇にヘリポートも併設されており、救命救急センターは24時間、365日体制で三次救急医療を提供しています。2階は外来診察室と講堂があり、技師会の研修会でも利用できそうな広さがあり、空いていれば技師会でも使用可能であるとのこと。災害時での受け入れも可能であるように、スペースは広く取っており、講堂の壁には医療用ガスのアウトレットが張り巡らされているとのこと。3階から6階は一般病棟になっており、全一般病床数は294床、現在は3・4階のみの126床が稼働しています。段階的に

病床数を増やし、平成28年度には全稼働を予定しているそうです。診療科は現在16科、最終的には23科とする計画だそうです。



【検査室訪問】

はじめに、真々田賢司技師長に病院・検査室の概要についてのお話を伺いました。検査室・病院内の案内は、長谷健二副技師長にしてみました。

開院初年度の臨床検査技師は11名で、休・祝日の日・当直は1名体制で業務を行っているそうです。

正面玄関を入ってすぐの右側に検査室の受付があります。受付を通り、正面に採血・採尿室、左側には待合廊下が奥まで広がり、その両側には各種生理検査室が並んでいます。



採血・採尿室に入ると、右側に採尿スペース、正面に4台の採血台、後方にはカーテンで仕切られリクライニング式の自己血採血用のベッドがあります。テクノメディカの採血システムが採用されており、外来採血容器はICタグが内蔵されたバーコー

ドで運用されています。そのため、トレイ単位での採血管の一括照合、検体到着確認が可能との事でした。採血業務は看護師1名と臨床検査技師で行っており、6歳以下の小児は小児科処置室で採血を行なうそうです。



コの字型に囲むように、採血・採尿室のすぐ裏には検体検査室があります。採尿スペースの裏にはシスメックスのUX-2000が置かれ、尿の定性・沈渣を行なう一般検査のスペースになっています。次に、免疫検査、生化学検査、血液検査、輸血検査の順に、自動分析機、分注機、顕微鏡などが配置されています。生化学自動分析機は日本電子JCA-BM9130が2台、感染症・薬物検査はロシュのcobas6000、腫瘍マーカーはcobas e411など、テクノラボの検査システムで進捗状況を確認しながら検査が進められていました。検査結果は一時間以内に報告できるように努めているとの事です。当直・日直等の時間外の検査項目は、日勤帯の項目と同様の項目を実施しており、昼夜問わずいつでも同様のサービスを臨床に提供する事を目指しているとの事でした。



自動血球分析装置はシスメックスのXN-3000が導入されており、血小板を蛍光色素で染色し、前方散乱光と蛍光強度の違いにより、血小板とそれ以外の血球を明確に区別できるのが特徴だそうです。凝固測定装置は、CS5100が2台設置されていました。機器故障時、メンテナンス時に対応できるよう、主要な測定機器は2台ずつ設置されています。

輸血は、夜間帯でのクロスマッチ検査は、コンピュータクロスマッチで対応を行なっているとの事でした。



血液ガス分析装置はラジオメーターのABL800FLEXが設置されており、ICU、手術室に設置されている機器も、リモート操作・管理されていました。ICUには血液ガスなどの結果を管理する独自のシステムが存在し、ラベルの運用方法により電子カルテとそのシステムへの結果の反映のされ方が異なるとの事でした。

生理機能検査は4名の技師で、心電図、腹部エコー、心エコー、肺機能、脳波、筋電図などの検査が行われています。心エコーはフィリップスのEPIQ 7Cが導入されていました。訪問当日は、心臓カテーテル検査が入っていましたが、突然の検査依頼などは技師同士声を掛け合い対応しているそうです。



細菌検査室では血液培養の定性検査、病理検査室では医師による切り出しのみがおこなわれています。来年再来年と技師を増員し、今後充実を図っていくとのお話でした。まだ機器・設備が整っていない、これらの部屋たちは今後の活躍の時を静かに待っているようでした。

検査・診察終了時に各ブロック受付に立ち寄る事で、会計の計算が始まり、会計では待つことなく精算ができるなど、患者様への細かな配慮が感じられました。

検査室の他、救命救急、手術室、放射線部なども見学させていただきました。救命救急センターは、検査室の隣に位置しています。救急が忙しい時などは、技師が採血や検体の分注などを手伝うこともあるそうです。手伝うことで、患者様の状況を確認した上で検査が行えるなど、救急のスタッフとの繋がりの良さを話の中から感じ取ることができました。



手術真最中のその部屋の中には、真々田技師長も呼ばれて入っているとの事でした。技師長自ら色々な現場に赴き、横の繋がりを持つことを心掛けていると伺いました。その姿を見ている他の若いスタッフも、検査室の外へ出て行くことに抵抗がないそうです。検体の取り直し等も、直接病棟に赴き、看護師と会話しながら円滑に進めているようです。未到着検体リストを受け渡しする事、翌日の採血容器を届けたりする事が、病棟との距離を近くしているように感じました。次に向かった放射線部でも快く受け入れていただけたのも、日常業務の中で良好なコミュニケーションが取れている結果ではないかと思いました。



今回の訪問の中で強く感じたのは、真々田技師長の下、検査室スタッフが皆同じ方向を向き、日々の業務に携わっているということでした。

【おわりに】

検査室スタッフをはじめ、病院スタッフ全員が生まれたばかりの新しい病院を、地域の皆様のために、自らの手で大きく育てようとする思いを感じました。

お忙しい業務の時間を割いていただいた真々田技師長、当直明けであるにも関わらず丁寧に説明をしていただいた長谷副技師長、検査室の皆様、ご協力ありがとうございました。心より感謝申し上げます。

微生物検査研究班のこれまで、そしてこれから

微生物検査研究班

村 田 正 太

微生物検査研究班紹介の前にちょっと・・・。

微生物検査の礎である細菌学は、肺結核やチフス、赤痢などの強毒菌による感染症を明らかにすることによって発展してきました。青カビ(Penicillium notatum)から発見されたペニシリン(抗生物質)の改良や新たな開発を経て、抗菌薬は魔法の弾丸として擲擧され、感染症を制圧したかのように思われました。しかし、抗菌薬に対する耐性機構を獲得した耐性菌が現れ、新規抗菌薬と耐性菌のイタチごっこが始まりました。このような時代を経て、現在では新規抗菌薬が開発されず、既存の抗菌薬を適正使用することで耐性菌を作り出さないことが求められています。また、新興感染症や再興感染症も問題となっています。

このように感染症を取り巻く状況は変化しており、微生物検査研究班はその時代に応じた研修会を行ってきました。その歴史は中台班長、久保班長、郡班長、渡邊班長、丸山班長、高橋班長と半世紀に渡っています。例えば、渡邊班長の時には1996年堺市でアウトブレイクした腸管出血性大腸菌血清型O157による感染症を受け、千葉県内での腸管出血性大腸菌に対する検査体制を整えることを目的とした研修会や千葉県臨床検査技師会精度管理の出題株とし周知活動に努めました。現在の研究班は耐性菌の検出や感染症の迅速診断、抗菌薬治療効果判定という観点から古くて新しいグラム染色検査もさらに重要だと考えています。これらは日常検査での実践的な内容であることから実習の必要性を考え、前郡班長が教鞭を執られていることが縁で東京医学技術専門学校をお借りして実習を行っています。これまでも高橋班長の時に千葉科学大学で寄生虫の実習を行いました。実習では基礎的なことから、時代に応じた検査まで毎年実施したいと

考えています。また、稀ではあるけれど重要な感染症については、研修会で取り上げたり、精度管理の出題株としています。精度管理という観点からは外れますが、一度、稀な菌株を経験しておけば日常業務において迅速に同定されると考えています。日本臨床検査技師会の精度管理は基本的な出題内容となっているので、本当の意味での精度管理はそちらにゆだねています。さらに近年、耐性菌の増加から微生物検査室に求められている耐性菌サーベイランスにも力を注いでいます。この情報は感染対策を実践する際に医師、看護師、事務の各業種の方々に現状を理解して頂くための可視化された資料として利用されています。また、厚生労働省に示される感染防止対策加算を取得するためにも必要で、この集計作業は微生物検査室の無い病院においても必要です。耐性菌の分離率の増減やアウトブレイクの発見は継続的なサーベイランスが必要であるため、感染対策の仕事が増加しています。また、感染防止対策地域連携においては、各施設における耐性菌の分離状況を同じ尺度で比較することでより現状を把握できると考え、研究班では各施設で使用可能な集計表を作成しました。今後はこの集計表を評価し問題点を改善しながら各施設に普及していきたいと考えています。

研究班の最大の特長は郡班長の時代から一泊研修会を継続していることです。この一泊する目的は、各施設の方々との交流であることから夜遅くまでお酒を交わしながらいろいろな話をしています。これが日常業務で大変に役立っています。参加者はわからないこと、困っていることをみんなに相談し、色々な意見から解決方法を探し出しています。是非、多くの方々に参加していただき悩みを打ち明けてほしいと願っています。丸山班長の時には微

生物検査に対する問題点について、研究班として研究活動を実施し、日本臨床微生物学会のワークショップに報告しました。研究班である以上、少しずつ研究活動を実施して行きたいと考えています。また、皆さんからの要望にも応えられるよう日々研鑽し

ていきたいと研究班員皆が考えています。今後も時代に応じた研修会を開催していきたいと考えておりますので微生物検査研究班活動へのご協力をどうぞよろしくお願いいたします。

