

「千葉県内病理標本の標準化を目指して」 ～千葉県認定病理検査技師推進協議会 プレアナリシスに関するアンケート調査～

東邦大学医療センター佐倉病院 病院病理部
北村 真

1. 千葉県認定病理検査技師推進協議会について
認定病理検査技師制度は平成26年に発足し、令和元年までに6回の認定試験が行われ、全国で1107名の認定病理検査技師が登録されている。

認定病理検査技師は標準化された病理標本作製技術や専門的知識、病理検査室の管理運営に必要なマネジメント能力等を有することが認められた者で、病理医と協力し国民の医療に貢献することを求められている。また、地域の中核となり積極的な情報の発信・共有を推進する役割を担っている。

千葉県認定病理検査技師推進協議会は千葉県臨床検査技師会（以下 千臨技）所属の認定病理検査技師が県内の病理組織標本作製技術の標準化と質の向上を図ることや、認定病理検査技師制度の意義と認定技師が担う責務について啓蒙すること等を目的として、平成29年に立ち上げた。現在34名の会員が所属し、千臨技の病理検査研究班、細胞診検査研究班と連携し、共同で県内研修会の企画・運営を行っている。

2. プレアナリシスに関するアンケートの実施

近年、コンパニオン診断を主体とした分子病理診断や体細胞遺伝子検査が広く行われるようになり、また次世代シーケンサー（以下 NGS）を用いたがん遺伝子パネル検査も保険収載されたこと

から、病理検体の品質保証や精度管理体制の整備が急務となっている。

千葉県認定病理検査技師推進協議会では病理検体の品質（核酸や抗原性）の保持という観点でホルマリン固定パラフィン包埋標本（以下 FFPE）作製におけるプレアナリシス段階の各施設の現況を調査し、県内の標準化を推進するきっかけとすべくアンケートを実施した。

アンケートは千葉県認定病理検査技師推進協議会会員と千臨技病理検査研究班班員、千臨技細胞診検査研究班班員それぞれが所属する施設の他、有志の方が所属する施設を対象に実施し、合計31施設(表1)からの回答を得た。

表 1. アンケート実施施設内訳

指定	施設数	病床数	施設数
がん診療連携拠点病院	1	200～299床	3
都道府県がん診療連携拠点病院	1	300～399床	5
地域がん診療連携拠点病院 (高度型)	3	400～499床	9
地域がん診療連携拠点病院	11	500～599床	1
千葉県がん診療連携協力病院	10	600～699床	6
		700～799床	4
指定なし	5	800床以上	3

アンケートではプレアナリシス段階の各工程とアナリシス段階の薄切について(図1)、「81」の質問に回答をいただいたが、本稿では病理学会が発行

した『ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程』において推奨事項が記載されている標本作製の各工程に沿い、病理検体の品質（核酸や抗原性）の保持に重要と思われる質問に絞って調査結果を報告する。

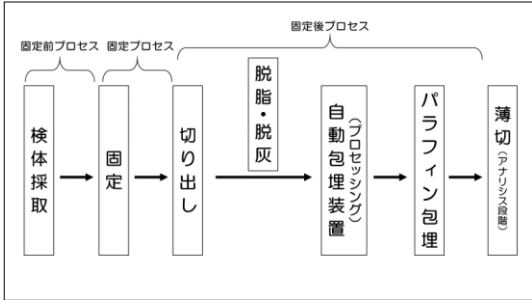


図 1. FFPE 標本作製におけるプレアナリシス段階

3. 固定前プロセス〔検体採取～固定まで〕

固定前プロセスにおいては、血流の停止から組織摘出までの時間（温虚血時間）と組織を摘出してから固定液に浸漬・固定を行うまでの時間（冷虚血時間）がFFPE標本を用いた分子診断結果に影響を及ぼす因子として重要であり、摘出後の組織検体の保管温度や固定液に浸漬するまでの時間がゲノム診療用病理組織検体取扱い規程において推奨され、これに準ずる対応が求められている(図2)。

- 摘出後の手術検体は、速やかに冷蔵〔4℃下〕で保管する
- 手術検体においては、摘出後30分以上室温で保持することは極力回避する
- 摘出後の手術検体は、1時間以内、遅くとも3時間以内に固定する
- 生検や内視鏡的に切除された消化管組織など、小型の組織については、速やかに固定液に浸漬し固定を行う

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程より

図 2. 固定前プロセスにおいて推奨される組織検体の取扱い

今回のアンケートでは、「生検材料は採取後速やかに固定されているか」、「手術により切除された

組織を固定するまでの間、冷蔵〔4℃下〕保管をしているか」、「手術により切除された組織を固定するまでの時間」、「手術材料の摘出から固定までの時間や温度管理は誰が行っているか」について質問をした。

生検材料については多くの施設で速やかに固定が行われていたが、速やかに固定されないことがあるという回答が一部の施設でみられた(表2)。

表 2. 生検材料は採取後速やかに固定されているか

回答	回答数
されている	25 施設
されないことが時々ある	5 施設
わからない	1 施設

手術材料の摘出から固定までの管理については臨床医が行っている施設が多く(表3)、3時間以内に固定を行っている施設が23施設（74.2%）であったが(表4)、摘出後4℃下で保管している施設は12施設（38.7%）と少なかった(表5)。摘出後の手術検体を4℃下で保管し、1時間以内に固定を行っている施設は1施設のみであった。

表 3. 手術材料の摘出から固定までの時間や温度管理は誰が行っているか（検体の所在）

管理者	回答数
臨床医	23 施設
病理医	1 施設
病理技師	5 施設
未回答	2 施設

表 4. 手術により切除された組織を固定するまでの時間（平均）

固定するまでの時間	回答数
1時間以内	9 施設
2～3時間	11 施設
基本的には3時間以内 (症例や状況による)	3 施設
3時間以上	3 施設
把握していない	4 施設
未回答	1 施設

表 5. 手術により切除された組織を固定するまでの間、冷蔵〔4℃下〕で保管しているか

回答	回答数
している	12 施設
していない	19 施設

病理検査室に提出されるまでの組織検体は臨床医が管理している場合が多く、取扱い規程の推奨通りの運用の実現は容易ではないが、固定処理の適否が病理診断における免疫組織化学染色結果や分子標的薬などのコンパニオン診断結果に影響を及ぼし、その後の治療法選択にもかかわることを念頭に置き、臨床医と病理医、病理技師が認識を共有して良質なFFPE標本を作製できるよう、運用改善に向けた努力が必要と考える。

4. 固定プロセス

ホルマリンは核酸やタンパク質に物理的および化学的修飾を引き起こし、検体品質に極めて大きな影響を与える。図3は固定プロセスにおける組織検体取扱いの推奨で、ホルマリン固定液の濃度とpH、ホルマリン固定の時間や温度などについて規定している。

- 酸性や非緩衝ではなく、中性緩衝ホルマリン溶液を固定に用いる
- ホルマリン濃度は10%を用いる
- 組織検体（手術、内視鏡的切除、生検）では、コンパニオン診断等の推奨を考慮し、6～48時間の固定を行う
- 微細な組織検体では、固定時間の短縮化（6～24時間）に努める
- 固定不足や過固定による品質劣化は回避しなければならない
- ホルマリン固定時の処理温度は、室温でよい

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程より

図 3. 固定プロセスにおいて推奨される組織検体の取扱い

アンケートでは「ホルマリン固定液の種類と濃度」、「固定時間」、「ホルマリンの再利用」、「手術材料の固定促進の為の検体処理」、「コンパニオン診断用検体の週末や連休における対応」について質問をした。

アンケート結果では、27施設（87.1%）が通常の組織診検査で中性緩衝ホルマリンを使用しており、推奨の10%濃度での使用が多かったが、15%や20%に濃度を上げて使用する施設もみられた。また、非緩衝ホルマリンを使用している施設が4施設あった(表6)。

表 6. 組織診検査で使用しているホルマリン固定液の種類と濃度

固定液の種類	回答数
10%中性緩衝ホルマリン	18 施設
15%中性緩衝ホルマリン	2 施設
生検：15%中性緩衝ホルマリン 手術：20%中性緩衝ホルマリン	1 施設
20%中性緩衝ホルマリン	6 施設
10%非緩衝ホルマリン	3 施設
20%非緩衝ホルマリン	1 施設

生検材料の固定時間では、25施設（80.6%）が6～24時間で、2施設が24～48時間、3施設が3～6時間、3時間未満の施設が1施設あった(表7)。手術材料ではほとんどの施設（96.8%）が6～48時間で、48時間以上という回答が1施設あった(表8)。

表 7. 生検材料の固定時間

固定時間	回答数
3時間以下	1 施設
3～6時間	3 施設
6～24時間	25 施設
24～48時間	2 施設

表 8. 手術材料の固定時間

固定時間	回答数
6～24時間	15 施設
24～48時間	14 施設
6～48時間	1 施設
48時間以上	1 施設

ホルマリンの再利用については、生検材料の固定で使用したものを再利用する施設は少なかったが(表9)、手術材料については再利用している施設が多かった(表10)

表 9. 生検材料や小型の手術材料で使用したホルマリンの再利用について

回答	回答数
再利用はしない (1度使用したものは廃棄)	23 施設
再利用する (複数回)	2 施設
再利用する (回数は決めずに汚れるまで)	1 施設
再利用する (大型の手術材料用として)	5 施設

表 10. 手術材料の固定容器とホルマリンの再利用について【複数回答可】

	患者毎に個別の容器で固定 タッパー / チャック付き保存袋 バケツ 等	複数の患者の検体を 同時に固定 ホルマリン槽 / バケツ 等
ホルマリンの 再利用はしない	14 施設	3 施設
ホルマリンを 再利用する	11 施設	9 施設

手術材料の固定促進の為の検体処理に関する質問は、癌取り扱い規約に記載されている検体処理法を中心に選択肢を作成したが、思っていたよりも実施している施設が少なかった(表11)。

表 11. 手術材料の固定を促進させる為の検体処理として行っていること【複数回答可】

臓器	処理法	回答数 (%)
肺	気管支からホルマリンを注入する	20 施設 (64.5%)
消化管	切り開いてゴム板等に張り付ける	31 施設 (100%)
肝臓・脾臓	割を入れる	27 施設 (87.1%)
	切り開く	22 施設 (71.0%)
胆管・主胆管	細管・主胆管にホルマリンを注入する	4 施設 (12.9%)
膵臓実質	注射器を用いてホルマリンを注入する	7 施設 (22.6%)
	割を入れる	7 施設 (22.6%)
乳腺	注射器を用いてホルマリンを注入する	18 施設 (58.1%)
子宮・膀胱	前壁で開く	27 施設 (87.1%)
腎臓	長軸方向に外側から腎門部に縦割する	25 施設 (80.6%)
前立腺	注射器を用いてホルマリンを注入する	3 施設 (9.7%)
リンパ節	割を入れる	8 施設 (25.8%)

コンパニオン診断用検体の週末や連休における対応については、コンパニオン診断用に切り出し前に組織を一部採取して自動包埋処理を行う、土曜日に切り出しを行っている、土曜日に切り出しを行い自動包埋装置内で再固定と脱脂を行う、連休は自動包埋装置の薬液タンク第1槽をホルマリン、第2槽を水、3槽目からをアルコールとしてホルマリン固定時間が48時間を超えないようにプログラムを組み替えるなどの回答があった。

ホルマリン固定によるDNAの断片化などの品質の劣化は非緩衝ホルマリンに比べて中性緩衝ホ

ルマリンの方が抑えられ、ホルマリン濃度が低い方がDNAの品質が保たれる。また、ホルマリン固定によるDNAの品質の劣化は経時的に進み、72時間以降から顕著となる。

固定不足や過固定ではHER2などの免疫染色で染色性が低下する例がみられることがあり、また、核酸の品質低下が進むなど、コンパニオン診断への影響が問題となる。

ホルマリン固定処理においては、検体の品質保持に関わる因子が多く、一概に固定条件を設定することは難しいが、上記のような組織への影響とその許容範囲を認識し、より良質なFFPE標本作製するために、各施設が可能な限り推奨条件に準じた固定処理を行うことが望まれる。

5. 固定後プロセスー脱灰

脱灰法については自施設で使用している脱灰液の種類とその脱灰液を使用している理由について質問をした。

EDTAを使用している施設は15施設で全体の約半数であった。EDTAを単独で使用している施設は2施設と少なく、他の酸性脱灰液と併用されていた。K-CX[®]〔株式会社ファルマ〕を使用している施設が21施設で最も多く、単独で使用している施設が13施設あった(表12)。

表 12. 自施設で使用している脱灰液
【複数回答可】

脱灰液	回答数
ギ酸	4 施設
ブランク・リクロ	6 施設
EDTA	15 施設
K-CX [®] 〔株式会社ファルマ〕	21 施設
カルキトックス TM 〔富士フイルム和光純薬(株)〕	1 施設

酸性脱灰液は脱灰力に優れているということが重要視され、それとともにHE染色への影響が少な

いものが多くの施設で使用されていた。EDTAを使用している理由はHE染色への影響が少ないことに加え、免疫染色や核酸品質への影響も少ないことが理由として挙げられていた(表13)。

表 13. 各脱灰液を使用している理由

ギ酸	H-E染色への影響（核の染色性の低下・エオジン過染）が少ない
	脱灰力
EDTA	組織のダメージが少なく、H-E染色および免疫染色への影響が少ない
	核酸品質に対する影響が少ない
K-CX	組織のダメージが少なく、H-E染色への影響が少ない
	脱灰力に優れ、短時間で脱灰ができる
	調整の必要がない
ブランク・リクロ	脱灰力
	薄切時の表面脱灰に使用
カルキトックス	脱灰力と染色性の保持

硬組織の標本作製において、脱灰力に優れた脱灰液を使用することが最も重要であるが、脱灰の必要な組織を用いて免疫染色やコンパニオン診断を行う可能性のある場合は、酸性脱灰液は使用せず、EDTAによる脱灰をすることが推奨される。

6. 薄切について〔①切片厚およびベーキング温度と時間〕

HER2やALK、PD-L1等のコンパニオン診断におけるIHC法やFISH法の為の切片の厚さについて、また、これらのベーキング温度と時間について確認した。薄切切片厚については、多くの施設が各コンパニオン診断のガイドラインや診断薬メーカーの推奨法に従って薄切をしていたが、一部の施設ではIHC法とFISH法の全てにおいて2 μ mまたは3 μ mと推奨よりも薄い切片厚で薄切を行っていた。IHC法においてもFISH法においても切片厚が判定・解析の重要な影響因子となるので推奨法に沿った薄切を心掛けていただきたい。

ベーキング温度と時間については、施設間で条件がバラバラで全体的に推奨法に沿っている印象がなく、一定の見解が得られなかった。過度なベーキングで染色性の低下を示すことがあると言われるが、ベーキングの詳細な条件と染色性の

関係については認定病理検査技師推進協議会として今後の検討課題としたい。

7. 薄切について〔②未染標本の保管〕

コンパニオン診断等の体細胞遺伝子検査を行う場合、原則、薄切後時間の経過した未染色FFPE標本を使用することは避け、新たに再薄切することがゲノム診療用病理組織検体取扱い規程では推奨されているが、極端に長期間でなければ室温に保管しても核酸の品質には概して影響はないともされている。

今回のアンケートでは、薄切切片を長時間保管してコンパニオン診断に用いている施設はなく、外注先での実施も含め、薄切後1週間以内に核酸の抽出が行われていた。

8. 薄切について〔③体細胞遺伝子検査用の切片の薄切〕

コンパニオン診断等の体細胞遺伝子検査用の切片を薄切する際に行っていることを選択肢から選んで回答をしてもらったところ、表14の様な回答を得た。検体毎にミクロトームの清掃や替刃の交換をするコンタミネーション防止対策とグローブの着用による核酸分解防止対策を行っている施設が多かった。1施設では超純水の使用による核酸分解防止を行っていた。問題と思われたのは、ダブルチェックによる材料の確認をしている施設が少

表 14. コンパニオン診断等の体細胞遺伝子検査用の切片を薄切する際に行っていること【複数回答可】

実施事項	回答数
検体毎にミクロトームの清掃	21 施設
検体毎に替刃を交換	19 施設
グローブの着用	19 施設
超純水に切片を浮かべる	1 施設
ダブルチェックによる材料の確認	13 施設

なかったことである。コンパニオン診断では、薄切の段階で検体の取り違いが起こるとその患者に適切ではない治療法が選択されることになる。病理検査における安全管理と同様、全ての検体に対するダブルチェックが必要と考える。

9. 薄切について〔④パラフィンプロックの保管〕

薄切後のパラフィンプロックのカバーリングについて確認したところ、表15のような回答を得た。パラフィンプロックの核酸品質は経年劣化していくことが明らかとなっており、NGSを用いたがん遺伝子パネル検査では作製後3年以内のパラフィンプロックを使用することが望ましいとされている。カバーリングをする場合としない場合の品質の劣化の差については明らかではないが、少しでも変性による品質劣化を防ぐためにも、病理診断後の長期保管を行う場合はカバーリングをしておく方が好ましいと思われる。

表 15. パラフィンプロックのカバーリングはいつ行っていますか

回答	回答数
薄切当日	15 施設
病理診断結果報告後 (1～2週間後)	12 施設
2～3か月後	1 施設
カバーリングはしていない	3 施設

10. 細胞診セルブロック法

通常の細胞診検査においては全ての施設がセルブロック法を実施しており、セルブロック作製法では細胞固定法のアルギン酸ナトリウム法とサンプルチューブやピペットチップを用いた遠心分離細胞収集法を行っている施設が多かった(表16)。セルブロックを作製する際の固定液については、数件、入力ミスと思われる回答数のズレがみられたが、ほとんどの施設が組織診検査で使用してい

表 16. 自施設で行っているセルブロック作製法【複数回答可】

方法	回答数
コロジオンバック法	1 施設
クライオバイアル法	2 施設
ピベットチップ法	9 施設
サンプルチューブ法	15 施設
アルギン酸ナトリウム法	10 施設
アレイジエル (ユークンサイエンス)	2 施設
血液凝固因子法	1 施設
寒天法	1 施設
ゼラチン法	1 施設
葉包紙使用	1 施設

たものと同じであった。組織診では20%中性緩衝ホルマリンであったのに対し、セルブロック法では10%の中性緩衝ホルマリンを選択した施設が1施設あり、これが入力ミスなのか意図してホルマリン濃度を下げているのかは不明であった。

セルブロックを作製する際のホルマリン固定時間について規定がない施設が21施設と多く、規定がある施設は10施設のみであった。規定のある施設での固定時間は、24時間以内が7施設、48時間以内が3施設であった。

セルブロックの固定時間も6～24時間が推奨されており、組織診材料と同様、過不足のない固定時間の設定が求められる。

肺癌のドライバー遺伝子解析におけるIVD法では検査対象としてFFPE組織検体が原則ではあるが、胸水などの細胞診材料が利用可能な場合は最大限活用するべきとされている。組織採取が困難な症例や組織検体で腫瘍細胞量が不足している症例のコンパニオン診断では、セルブロックがそれを補える可能性があることから、品質の良いセルブロックを作製することが求められる。

11. 最後に

平成29年10月に厚生労働省より示された「がん対策推進基本計画（第3期）」において、がんゲノム医療の体制整備の推進が目標に掲げられたことにより、がんゲノム医療の臨床導入に向けて病理

標本作製における標準化と精度管理体制の整備に関するディスカッションが各地の学会や研修会で盛んに行われるようになった。

時期を同じくして立ち上がった千葉県認定病理検査技師推進協議会では、県内施設の病理標本の標準化を1つの活動目標に掲げ、最初の活動としてプレアナリシスに関するアンケートを実施した。昨年にはこのアンケート結果を基に千葉県認定病理検査技師推進協議会で「免疫染色に影響を与える諸条件の検討」を行い、令和元年12月14日に開催された第1回千葉県・茨木県 病理・細胞診検査研究班合同研修会にて検討結果を報告した。

今後、がんゲノム医療の進歩とともに病理検体の取り扱いの重要性が更に高まることが予想されることから、千葉県認定病理検査技師推進協議会は引き続き千葉県内病理標本の標準化を目指して活動し、研修会などを通して県内の病理関係者皆様とディスカッションができればと考えております。

12. 参考文献

- 1) 一般社団法人 日本病理学会（編集）：ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程、株式会社 羊土社、2019

抗菌薬適正使用支援チーム(AST)における臨床検査技師の役割

千葉市立海浜病院 臨床検査科
静野 健一

はじめに

2018 年、診療報酬に抗菌薬適正使用支援加算（入院初日 100 点）が新設され、多くの施設で抗菌薬適正使用支援チーム(Antimicrobial Stewardship Team ; AST)による活動が行われている。AST における臨床検査技師の役割について、当院における活動を紹介しつつ確認する。

1. AST 設立の背景・臨床検査技師に求められること

1) 設立の背景

薬剤耐性菌、特に多剤耐性菌の増加は世界的な問題であり、2015 年、WHO は GLOBAL ACTION PLAN を発表し、加盟各国に行動計画の策定を求めた。日本は 2016 年に薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプランを発表し、その対策の一つとして 2018 年より AST 活動の診療報酬加算を新設し、各施設で取り組むことを推奨している (図 1)。一般的にこれまでの感染対策活動は感染制御チー

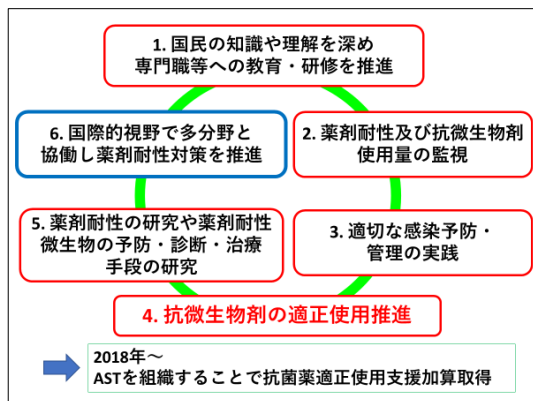


図 1. AMR action plan in Japan

ム(ICT)が中心となり行われてきたが、ICT 活動が感染症の発生を防止することを主な目的とすることに対し、AST 活動は発生した感染症への介入が主体となる。感染症診療・治療を行うにあたり微生物検査室で得られる情報は必要不可欠であり、臨床検査技師の果たす役割は非常に大きい。

2) 臨床検査技師に求められること

2019 年 2 月、日本臨床微生物学会より「ICT・AST で求められる臨床微生物検査室の役割」についての提言が発表され、AST 活動では 5 つの項目が挙げられている (図 2)。

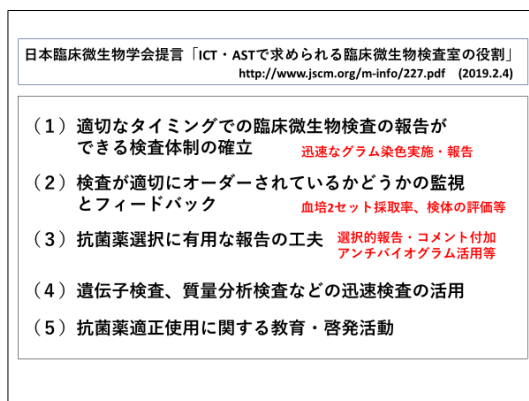


図 2. AST 活動における臨床微生物検査室の役割

(i) 適切なタイミングでの臨床微生物検査の報告ができる検査体制の確立

塗抹検査においては、血液培養陽性、細菌性髄膜炎疑い、肺結核症疑い等のような緊急性の高い結果報告を常に行える体制作りが望ましい。また、培養検査や薬剤感受性検査は最終結果報告までに時間を要するが、検査途中であっても臨床に役立つ

つ情報は多く存在するため、中間報告を適切に役立てることが求められる。薬剤感受性結果が出ているが、菌名が決定しないために結果値を検査室で留めておくようなことがあってはならない（特に使用中の薬剤が耐性と判明している場合）。近年、電子カルテの普及に伴い微生物検査の結果送信が簡便になる一方、受け手の医師側で結果の出るタイミングがわからず、治療につながる重要な情報が遅れて伝わることも危惧される。一般的な検査結果報告のタイミングは予め周知し、通常と異なる場合には、中間報告時に次の報告予定時期を伝える工夫を行うことも重要である。

（ii）検査が適切にオーダーされているかどうかの監視とフィードバック

微生物検査は、検体が適切に採取・提出されているかの影響を大きく受けるが、検査をオーダーする医師がこれらを把握することは困難な場合が多く、検査室で把握し、報告することが求められる。受け付け時に、検体量が十分か、採取後速やかに提出されているか等を評価し、不適である場合には検査を受け付けないか、やむを得ず実施する場合には結果報告の際にその内容を添えることで、誤った結果解釈を防止することができる。検体の採取・提出方法については、新入職員の研修として毎年繰り返し教育することが望ましい。

（iii）抗菌薬選択に有用な報告の工夫

薬剤感受性検査を実施する場合、複数菌種を共通の抗菌薬セットで測定を行う場合があるが、測定結果は検査室で選択して報告することが望ましい。例えばグラム陽性菌用の薬剤感受性検査であれば、ブドウ球菌用の薬剤の一部は腸球菌にとって自然耐性となり、検査上 MIC 値が低値であっても、生体内では無効の場合がある（例：ST 合剤）。結果を受け取る全ての医師がこれらを把握することは困難であり、AST メンバーの医師と協議し、検査室において菌種により報告薬剤を選択する工夫が求められる。また、多くの検査室では米国の臨床検査標準協会（Clinical and Laboratory Standards Institute；CLSI）の判定基準を用いている

が、治療時の投与薬剤量が異なる場合が多く、コメント報告で注意喚起を行うことが必要である（例：緑膿菌における Piperacillin（PIPC）や、Levofloxacin（LVFX））。

（iv）遺伝子検査、質量分析検査などの迅速検査の活用

近年、遺伝子検査の自動化が急速に進み、様々な自動機器が開発・販売されている。世界的に問題となっているカルバペネム耐性腸内細菌目細菌（Carbapenem-resistant enterobacteriaceae；CRE）のカルバペネマーゼ検査においても様々な機器が販売されており、積極的な導入が望まれる。自動機器の他にも、イムノクロマト法やディスク法でカルバペネマーゼを検出するキットが販売されており、これらの情報を把握し、自施設に合った備えを行うことが求められる（図3）。

検査法	商品名	原理	判定可能	判定時間
仏/クロト法	5-plex NG-Test CARBAS (写真)	発育コロニーを溶解させ、イムノクロマト法で5種の酵素の有無を判定	NDM, OXA-48, KPC, VIM, IMP	15分
ディスク法	カルバペネマーゼ鑑別ディスクPlus	5種類の薬剤ディスクを使用、阻止円直径とその差から酵素型を判定	MBL, OXA-48, KPC, AmpC+Porin loss	18-24時間
選択培地	mSuper CARBA	CPEスクリーニング用	CPE	18-24時間
	chromID CARBA	色素産生選択分離培地		
PCR法	ESBL/MBLスクリーニング培地	ESBL産生菌、MOP/MAR-2産生菌のスクリーニング培地	CPDX → ESBL CAZ → MBL	3時間
	シグナル・アンプ・ベーマーゼ遺伝子型検出キット2	DNA抽出後、1検体につき2種類のリアルタイムPCRを行う	IMP-1, IMP-6, VIM, KPC, NDM, OXA-48, カルバペネマーゼ型GES	



藤原麻有, 他. IASR vol.40(2).2019より一部改変引用

図3. カルバペネマーゼ検出キットおよびCPEスクリーニング培地

（v）抗菌薬適正使用に関する教育・啓発活動

AST 加算取得要件の1つに、年に2回研修会を行うことが義務付けられている。薬剤師が主体となることが多いと思われるが、検査技師としても、前述の内容などに関して院内研修会で教育・広報する活動が求められる。

2. AST 業務と千葉市立海浜病院の取り組み

前述の内容と一部重複するが、AST 加算取得要件で定められているAST業務（図4）に沿い、当院の取り組みについて紹介する。

①モニタリングする患者の抽出	・広域抗菌薬使用 ・菌血症 ・免疫不全状態
②抽出患者の継続的評価 (⇒主治医にフィードバック)	・検査実施と治療への活用 ・抗菌薬の使用状況
③適切な検査体制の整備	・検体採取、培養検査の適切性 ・アンチバイオグラム作成
④プロセス・アウトカムの定期的評価	・抗菌薬使用状況 ・血液培養複数セット提出率 ・耐性菌発生率
⑤研修の開催	・抗菌薬適正使用目的で年2回 ・院内マニュアルの作成
⑥使用抗菌薬の定期的見直し	・種類、用量 ・必要性の低い薬剤の中止

厚生労働省「中央社会保険医療協議会（第389回）」（平成30年2月7日）
https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12404000-Hokenkyoku-Iryousha/0000193708.pdf

図 4. 加算取得要件で定められている AST 業務

1) モニタリングする患者の抽出と継続的評価

当院では AST 委員会を週に一度開催し、①特定抗菌薬使用患者（薬剤部抽出）、②菌血症患者（微生物検査室抽出）、③抗がん剤投与等免疫能低下患者（薬剤部抽出）について、抗菌薬の使用状況や微生物検査の実施状況の確認を行っている。微生物の検査状況については、抗菌薬使用前に起炎菌検索のための検査が行われているか、血液培養分離菌の起炎性評価が正しく行われているか等について確認している。

なお、培養で分離された細菌の起炎性評価は、血液培養以外も常に行う必要がある。採取時に汚染されやすい尿培養であれば、炎症反応（尿中白血球エステラーゼ反応）を認めない場合、発育した細菌が尿路感染症を起こしている可能性は低く、

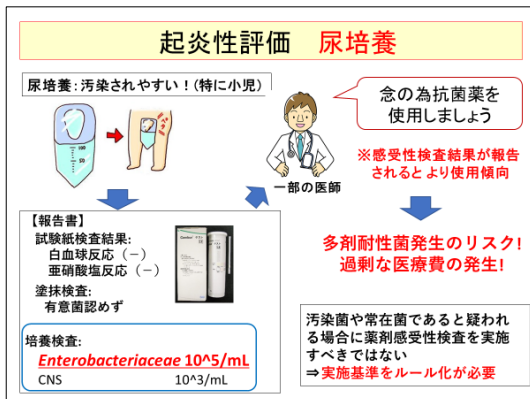


図 5. 起炎性評価 尿培養

検査オーダー時に依頼があったことを理由に汚染菌に対して薬剤感受性検査を実施した場合、不必要な抗菌薬が投与される恐れがある（図 5）。また、小児の場合、上気道に *Haemophilus influenzae* や *Streptococcus pneumoniae* が常在しているため¹⁾、これらが呼吸器材料から分離された際は、起炎菌であるかどうかの評価が必要となる（図 6）。

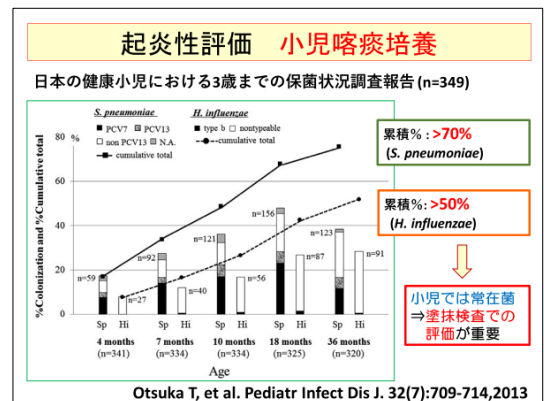


図 6. 起炎性評価 小児喀痰培養

2) 適切な検査体制の整備

検体採取、培養検査の適切性を管理することや、アンチバイオグラムを作成し活用することが必要とされる。培養検査は感度に優れた検査であるため、検体採取状況の影響を大きく受ける。当院では、採取時に汚染されやすい喀痰の検査時、滅菌生理食塩水を用いた洗浄操作を行っている。肉眼的評価である Miller & Jones 分類は用いず、顕微鏡鏡見下で Geckler 分類による評価を行い、検体の適切性を確認している。前述の小児における常在菌については、Geckler 分類 5 群相当の良質な検体において、塗抹上有意に菌を認めない場合、喀痰培養検査で *H. influenzae* や *S. pneumoniae* が常在菌と同程度発育している場合は、薬剤感受性検査は実施していない。反対に、塗抹検査でこれらの菌体が確認される場合には、培養検査で常在菌と同程度の発育であっても、薬剤感受性検査を実施し、報告している。

採取された検体は速やかに検査室に提出し、培

養検査を開始することが望ましく、尿のような採取時汚染を受けやすい検体は、採取後室温で2時間以上放置されていた場合などは培養検査を実施すべきではない。また、腹水や胸水など、検査に十分量を必要とするような材料が滅菌綿棒で提出された場合には、検体量不足による偽陰性となる危険があることを提出医に報告するべきである。

アンチバイオグラムの作成方法として、2019年3月、AMRアクションプランの一環として設立された感染症教育コンソーシアムと、国公立大学附属病院感染対策協議会が協力し作成したガイドラインが公表された²⁾。施設で分離される全ての細菌について作成する必要はなく、主要な菌の主要薬剤について作成することが推奨される。また、施設によっては特定の診療科に限ったアンチバイオグラムが有用となる場合もあるため、各施設での工夫も求められる。当院では血液培養、尿培養で腸内細菌目細菌が起炎菌として分離された場合のアンチバイオグラムを作成し、グラム染色で腸内細菌目細菌が疑われた場合に参照できるようにしている(図7)。アンチバイオグラムの活用例として、施設の一定期間における感性率の差をみることで抗菌薬適正使用の評価とする方法もある³⁾。

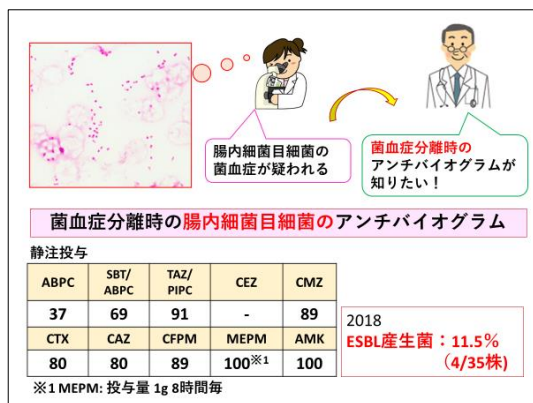


図7. アンチバイオグラムの活用

3) プロセス・アウトカムの定期的評価

(i) 血液培養評価

血液培養が適切に実施されているかの指標として、複数セット採取率、陽性率・汚染率、採血量

が挙げられる(図8)。複数セット採取は検出感度や発育した菌の起炎性判定に重要であるため、高い実施率を維持するようASTで取り組むことが必要である。陽性率は5-15%の範囲内が望ましいとされ、5%未満であれば検査の過剰実施、15%を超える場合は、疑わしい症例でしか実施せず見逃されている症例があることが危惧される。汚染率は2-3%以下になることが望ましい。採血量は、少ない場合には感度の低下につながり、多すぎる場合には白血球による偽陽性反応や、血液の希釈不十分による偽陰性反応を生じるため、遵守することが望ましい。検査室で重量を測定して管理し、十分量を培養することで感度が上昇したとの報告も挙げられている⁴⁾。

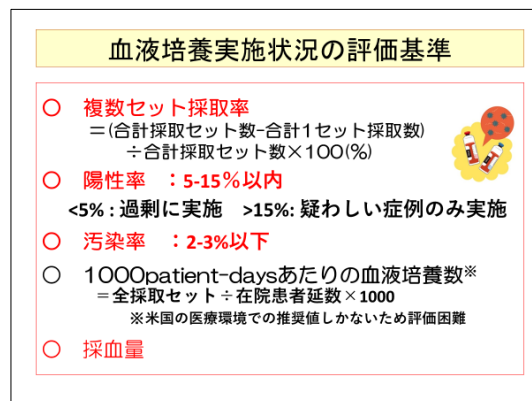


図8. 血液培養実施状況の評価基準

(ii) 耐性菌発生率

耐性菌発生率を把握することにより、他施設と比較して自施設の評価や、アウトブレイクの早期発見を行うことができる。一方、他施設と比較する際には、使用している計算式に注意が必要である。図9の①～③はいずれもMRSA新規発生率を求める式であるが、分母や分子が異なっており、それぞれで得られる数値を比較することはできない。なお、分子に新規患者数(院内発生症例+持込み症例)を使用する式の場合は、その施設における耐性菌の発生リスクの指標として用いることができ、分子に院内検出症例のみを用いる場合は、

その施設における感染対策の評価指標として用いることができる。自施設の推移を評価する場合、分母は施設にあったものを使用すると見やすい値となる。当院では他施設と比較できるよう、図 9 の①式で発生率を把握しているが、数値が小さく評価しづらいため、①式の方母に入院患者数を使用する計算式を用いて自施設での推移を評価している。

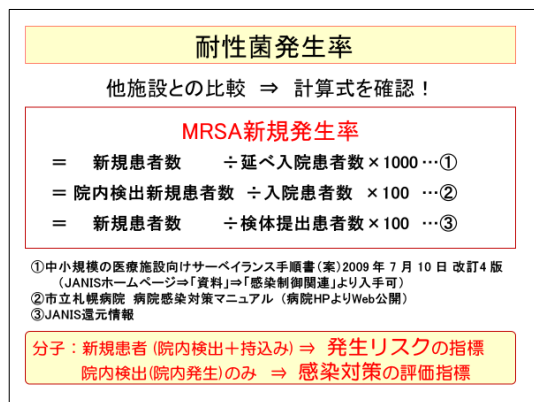


図 9. 耐性菌発生率

おわりに

AST における臨床検査技師の役割を確認した。微生物検査の果たす役割は大きく、検査結果が臨床で正しく活用されるよう、報告方法の工夫など自施設の検査体制の適正化に取り組むことが求められる。また、各種サーベイランスを行い、AST に情報提供する役割も求められ、これに関しても自施設に沿った工夫が必要である。近年、自動機器や新しい試薬・培地が次々と開発されているため、情報を常に更新し、より良い貢献ができるよう検査方法の見直しを定期的に行う姿勢も求められている。

参考文献

- 1) Otsuka T, et al.: Individual Risk Factors Associated With Nasopharyngeal Colonization With *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*: A Japanese Birth Cohort Study. *Pediatr Infect Dis J.* 32(7):709-714,2013

- 2) アンチバイオグラム作成ガイドライン.2019年3月
http://amr.ncgm.go.jp/pdf/201904_antibiogram_guideline.pdf
- 3) CLSI M39-A5 Workgroup Meeting 資料
https://clsi.org/media/2304/2018_june_ast_m39_update.pdf
- 4) 大城健哉,他：血液培養検査 ～抗菌薬適正使用に有用な情報提供～ 臨床病理 66：1196-1205,2018

寒冷凝集素保有例における Rh コントロール陽性時の対応

東邦大学医療センター佐倉病院 輸血部

蓮沼 秀和 町田 保 石田 智子
岩下 洋一 清水 直美

【要旨】

背景：寒冷凝集素保有例では血液型検査において偽陽性反応を起こす可能性がある。今回我々は寒冷凝集素により Rh コントロールの反応が陽性となった症例について、その対応法を検討したので報告する。

方法：室温と 37℃に加温した生理食塩液による寒冷凝集素の洗浄効果について目視による凝集判定とフローサイトメーターを用いた寒冷凝集素(IgM)の結合量を測定し検討を行った。

結果：室温生食では洗浄効果が得られなかったが、37℃加温生食で6回洗浄を行うことで偽陽性反応は陰性化した。

結論：寒冷凝集素を除去する操作方法是多く報告されているが、一般的に簡便な方法である加温生食を用いた洗浄法は多くの施設でも可能な対処方法であり、本報告は臨床検査現場において、有用であると考えられた。

【はじめに】

寒冷凝集素は赤血球膜上に存在する(Ii)抗原に対する自己抗体(抗I)であり、健常人にもわずかに産生されている。通常は室温で赤血球に反応しないが、寒冷凝集素症(冷式自己免疫性溶血性貧血)やマイコプラズマ肺炎などの一部の疾患では高値となり室温でも赤血球凝集を起こすようになる。そのため赤血球型検査ガイドライン(改訂第2版)¹⁾ではRhD血液型検査の際にはRhコントロール試薬の反応性を確認する事が求められている。

今回我々は当院で経験した寒冷凝集素保有例について、最も簡便な方法である生理食塩液(生食)による患者赤血球の洗浄効果について検討を行ったので報告する。

【材料】

検討に用いた検体は血液型・不規則抗体検査など診療目的で採血された患者の残検体を用いた。なお残検体の使用ならびに今回行った検討と報告については当院倫理委員会の承認を得て行ってい

る(承認番号 S18089)。

【症例】

70代男性。輸血・移植歴なし。肺がんの通院中に貧血を認め赤血球液(RBC)2単位の輸血依頼がされた。患者血液型検査のほか、各種血液検査の結果を図1、2に示す。

血液型検査では全ての結果において凝集を認め、ABO・RhD血液型の判定は保留となった。Rhコ

・ 血液型検査(試験管法)							
抗A	抗B	オモテ結果	A赤血球	B赤血球	ウラ結果	抗D	Rhコントロール
4+	4+	AB型	4+	4+	O型	4+	4+
・ 直接抗グロブリン試験							
多特異	抗IgG	抗C3d	対照	ABO判定 RhD判定 判定保留 判定保留			
4+	4+	4+	4+				

東邦大学

図1. 輸血関連検査

WBC	3270/ μ L	CRP	1.46mg/dL
RBC	142×10^4 / μ L	総蛋白	7.5g/dL
Hb	5.0g/dL	アミ	3.1g/dL
Ht	15.4 %	AST(GOT)	16 U/L
MCV	114 fL	ALT(GPT)	9 U/L
MCH	44.7 pg	LDH	185 U/L
MCHC	41.3 %	ALP	317 U/L
Plt	2.9×10^4 / μ L	総ビリルビン	0.5 mg/dL
血液像			
赤血球大小不同(+)			
赤血球凝集(+)			
総ビリルビン			
尿素窒素			
アルブミン			
Na			
K			
Cl			
HDL-C			
LDL-C			
血糖			

図 2. 血算・生化学検査

ントロール試薬が強陽性を示したことから、自己赤血球の凝集反応を疑い追加検査として直接抗グロブリン試験を行った。各種抗グロブリン試薬の他、生食を用いた対照にも4+の凝集を認めたことからIgM型の自己抗体、寒冷凝集素の可能性が考えられた。血算の値からRBC・Htが低値、MCV・MCH・MCHCが高値となり鏡検の結果からも赤血球凝集像が認められた。MCV、MCH、MCHCの高値は寒冷凝集素の特異的反応のひとつもあり、これらの結果から本症例における偽陽性反応は高力価の寒冷凝集素による自己凝集反応と推察した。

【方法】

寒冷凝集素保有例に対する血液型検査については図3に示す4つの対応法が考えられた。それぞれ

① 37℃下での採血・検体の加温
利点: 多くの場合、寒冷凝集の影響を予防できる。
欠点: 初回採血時には気づかれない。採血室で個別な対応が必要。
② 加温生理食塩液による洗浄
利点: 簡易的、比較的短時間。特別な試薬を必要としない。
欠点: 完全に寒冷凝集を除去できない場合がある。
③ 寒冷凝集素の自己吸着法
利点: 簡易的、特別な試薬を必要としない。
欠点: 時間を要する。1回では寒冷凝集を除去できない場合がある。
④ 患者赤血球のDTT処理
利点: 1回の処理でほぼIgM由来の寒冷凝集素を除去できる。
欠点: DTT試薬が必要。1時間程度の時間を要する。

図 3. 寒冷凝集素保有例の対応法

れに利点・欠点が考えられるが、今回は生食を用いた患者赤血球の洗浄について下記の方法による洗浄効果について検討を行った。

①凝集判定による洗浄効果の検討

生食の温度(室温・37℃)と洗浄回数(1回・3回・6回・9回)を変えた患者赤血球について、抗D試薬とRhコントロール試薬の反応性を試験管法による凝集判定結果から検討した。

②フローサイトメトリー (FCM)を用いた寒冷凝集素の測定

①と同条件で洗浄した患者赤血球についてAnti-IgM(μ chain)(Human)pAb-FITC(株式会社医学生物学研究所)で室温15分間反応後、フローサイトメーター(FACS Verse: 日本BD社)を用いて寒冷凝集素(IgM)の赤血球膜結合量を蛍光強度から測定した。

未洗浄かつ未染色の患者赤血球の蛍光強度を1とした場合の陽性比率(S/N比)を算出し、患者赤血球の洗浄効果について解析を行った。なおカットオフ値については丸橋らの文献²⁾を参考にS/N比1.7以上を特異性ありとして判断した。

【結果】

①凝集判定による洗浄効果の検討

結果を図4に示す。室温の生食では9回洗浄してもRhコントロールは強陽性のままであった。しかしながら、37℃加温生食で洗浄した場合には6回の洗浄でRhコントロールが陰性化することを確認した。

室温生食				
洗浄回数	1回	3回	6回	9回
抗D	4+	4+	4+	4+
Rh control	4+	4+	4+	3+

37℃ 温生食				
洗浄回数	1回	3回	6回	9回
抗D	4+	4+	4+	4+
Rh control	4+	4+	0	0

結果: 本症例では温生食で6回洗浄でRh controlが陰性化した。
室温生食では洗浄効果は見られなかった。

図 4. 凝集判定による洗浄効果の検討

②FCM を用いた寒冷凝集素の測定

結果を図 5、6 に示す。未洗浄のものが S/N 比 4.70 となったのに対して、室温生食・加温生食共に 3 回程度の洗浄では寒冷凝集の除去率に変化は

認められなかった。しかしながら、6 回洗浄を行った場合に室温では洗浄効果が認められなかったのに対して、加温生食を用いた場合には顕著に低下傾向を示していた(S/N 比 1.38)。

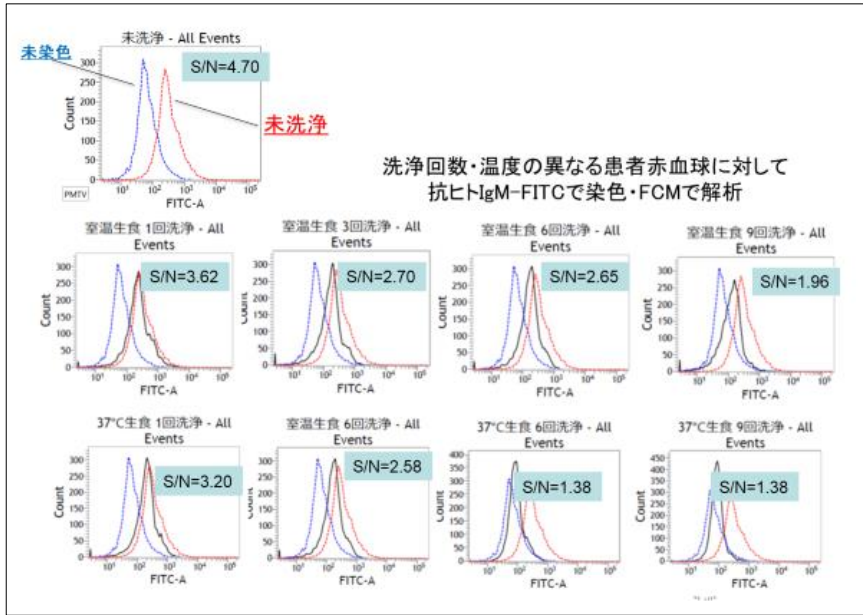


図 5. FCM を用いた寒冷凝集素の測定 (結果②-1)

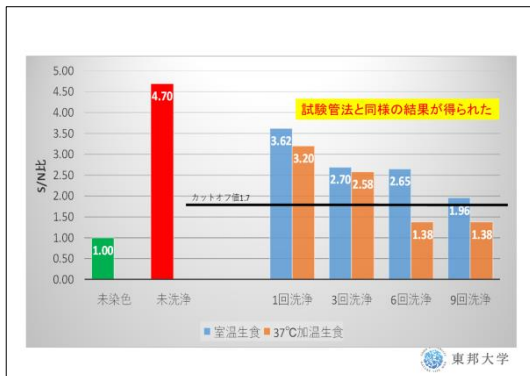


図 6. FCM を用いた寒冷凝集素の測定 (結果②-2)

③精査結果

37°C加温生食を 6 回洗浄した患者赤血球との反応性から患者の血液型は O 型 RhD 陽性と判定した(図 7)。

37°C加温生理食塩液による洗浄(6回)を行い、血液型判定を行った

オモテ検査・Rhコントロールの偽陽性が陰性化され、
血液型は下記の通り判定した

抗A	抗B	オモテ結果	A ₁ 赤血球	B赤血球	ウラ結果	抗D	Rhコントロール
0	0	O型	4+	4+	O型	4+	0

ABO判定	RhD判定
O型	RhD陽性

図 7. 精査後の血液型検査

【考察】

本症例の寒冷凝集素価の測定を行ったところ4096倍以上と非常に高力価であった。これに対して加温生食による洗浄は6回程度でも十分な洗浄効果が得られた。加温生食による洗浄効果の懸念材料の一つとして、試験管の径や洗浄液量・時間など手技の違いや患者の病態（更に高力価の寒冷凝集素価を有する場合）によっては洗浄回数を増やしても完全に陰性化する事が難しい場合がある。そのような場合にはジチオスレイトール(DTT)処理による患者赤血球の調製を選択すべきと考える。DTTはIgM型抗体のジスルフィド(S-S)結合を還元的に切断することで寒冷凝集による影響を完全に抑制する事が可能である。既に細川らの報告³⁾でもその有用性は示されており、本症例においても図8(参考資料①)の通りDTTキット(株オーソ・クリニカルダイアグノスティックス社)によるDTT処理を施行したところ、我々が精査で行った結果と一致した血液型の結果が得られた。ただしDTT処理における最大の問題点はDTT試薬を日常的に検査室に常備している施設が少ない事である。現在DTT試薬は多発性骨髄腫の患者に対するヒト型抗CD38モノクローナル抗体薬(ダラツムマブ)を使用している施設の検査室では普及が高まりつつあるが、それらは全国の一部の施設にすぎず、DTT試薬を選択できない場合には加温生食による洗浄を行う必要がある。仮に6～9回程度洗浄を行っても洗浄効果が得られない場合には患者検体の加温や自己赤血球による吸収等の別に挙げた操作法についても重ねて検討していく必要があると考えられた。

➤ 方法

- ① 患者赤血球沈査1容をpH7.4PBSで4回洗浄
- ② 上清をよく切った赤血球沈査1容に対し4容のpH8.0 0.2mol/L DTT溶液を加える。
- ③ よく混和した後、37℃で30分インキュベーションする。
その間、3～4回よく混和をする。
- ④ pH7.4 PBSで4回洗浄する。
- ⑤ 赤血球沈査よりpH7.4 PBSを用いて3～5%浮遊液を調整し、
ABO・RhD血液型検査に用いる。

➤ 注意点

一部の血液型(Kell等)も同時に変性・破壊される。

オーソ社 ジチオスレイトール(DTT)キット 添付文書より一部抜粋



図8. 赤血球の DTT 処理

【結語】

高力価の寒冷凝集による偽陽性反応に対して加温生食による洗浄を行った。今回は6回の洗浄で十分な効果を得られたが、それ以上の洗浄を行っても自己凝集反応が消失しない場合には検体の採血後の加温やDTT処理などの操作を併用する事で効率的に寒冷凝集素を除去できるものとする。

【参考文献】

- 1) 日本輸血・細胞治療学会：赤血球型検査（赤血球系検査）ガイドライン（改訂2版），2016.
- 2) 丸橋隆行，他：フローサイトメトリーによる不規則抗体スクリーニングの可能性，日本輸血細胞治療学会誌 vol.65.No5 782-792,2019
- 3) 細川美香，他：強い自己凝集反応を認めた低力価寒冷凝集素症に対する DTT 処理の有用性，日本輸血細胞治療学会誌 vol.63.No5 716-722,2017

脱灰による組織標本への影響についての検討

千葉大学医学部附属病院 病理部 検査部*

相田 真莉菜	鈴木 学	曾川 紀子
中 千裕	岩井 優	四宮 義貴
高橋 大樹	石毛 崇之*	小野寺 清隆

<要旨>

病理組織標本作製過程の脱灰ではEDTA処方の脱灰液を使用する事が推奨されている。今回、当院で使用するEDTA脱灰液よりも高濃度のEDTA脱灰液を使用する機会を得たため、組織への影響について酸性脱灰液も含めて比較検討を行った。脱灰液は10%ギ酸ホルマリン、K-CX、中性脱灰液C、EDT-Xを使用し脱灰完了時間を確認した。また種々の染色を行うことで染色性への影響を、Q-valueを算出することで核酸の品質を比較した。中性脱灰液においては酸性脱灰液と比較して脱灰完了に多くの時間を要した。また染色性や核酸品質において、酸性脱灰液は影響が見られたが中性脱灰液では全ての染色で明らかな影響は認めず、Q-valueも非脱灰検体と同等の結果が得られ、高濃度のEDTAではより高値傾向を示した。2種の中性脱灰液の間には脱灰に要する時間や染色性に有意な差は認めなかったが、核酸の品質において高濃度のEDTA脱灰液で脱灰することで、より良質な核酸を得られる可能性がみられた。

キーワード：酸性脱灰液、中性脱灰液、EDTA、核酸品質、FFPE

1. 背景

病理組織標本作製の過程において、骨などの硬組織や組織中の石灰化部分は通常の処理のみでは薄切時に切片を得ることが困難となる¹⁾。そこで、骨や石灰化部分の主たる成分であるカルシウムを除去する「脱灰」という操作が必要となる。脱灰に使用する溶液は大きく分類すると塩酸などの酸を用いる酸性脱灰液とEDTAなどのキレート剤を用いる中性脱灰液に分類される。

酸性脱灰液は短時間での脱灰が可能であるが、組織への影響が大きく、中性脱灰液では逆に、脱灰に時間を要するが組織への影響が少ないとされている¹⁾。

近年、がんゲノム医療の本格的な開始に伴い病理組織検体を用いた遺伝子検査が急速に増加しており、酸性脱灰液の使用による病理組織標本の染

色性の低下だけでなく、核酸への影響に関しても問題となっている。その観点から急速脱灰を回避し、EDTAによる緩徐脱灰を行うことがゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程等で推奨されている²⁾。しかしながら、前述のとおりEDTAは脱灰力において酸性脱灰液にやや劣るため、TAT延長などデメリットも多く存在する。

そこで今回、当院で使用しているEDTA脱灰液よりも高濃度のEDTA脱灰液を使用する機会を得たため、EDTA濃度と脱灰効果や組織への影響に一定の相関関係にあるという仮定に基づき脱灰時間や組織への影響について酸性脱灰液も含めて比較検討を行った。

2. 材料・方法

本検討に使用した脱灰液は酸性脱灰液として

10%ギ酸ホルマリン(自家調製:20%ギ酸水溶液と20%中性緩衝ホルマリンの等量混合)とK-CX(主成分:塩酸;株式会社ファルマ)の2種類使用し、中性脱灰液は以前から当院で使用している中性脱灰液C(主成分:12%EDTA;ユーアイ化成株式会社)と、より高濃度のEDTAを含むEDT-X(主成分:18.5%EDTA;株式会社ファルマ)を使用した。この4種類を使用して主成分による染色性への影響と、中性脱灰液の2種については、濃度の差による変化について比較検討を行った。

2.1 各脱灰液における脱灰完了日数の確認

検体：当院にて実施された病理解剖時に採取した骨髄5例を使用した。

方法：10%中性緩衝ホルマリンで48時間以内の固定後、キシレンとアルコールの等量混合液で脱脂を行い、組織を $1.5 \times 2.5 \times 0.5$ cm大に切り出して包埋カセットに入れ、各脱灰液200mlに浸漬し脱灰完了時間を確認した。確認方法は、針を刺して抵抗がなくなった時点で完了とした。自動包埋装置Tissue-Tek VIP 6(Sakura Finetek Japan)にてホルマリン固定パラフィン包埋(formalin fixed paraffin embedded:FFPE)ブロックを作製した。各ブロックからヘマトキシリン・エオジン(Hematoxylin-Eosin:HE)染色とGiemsa染色、免疫組織化学(Immunohistochemistry:IHC)を実施し、染色性についても比較を行った。HE染色は自動染色装置Tissue-Tek Prisma(Sakura Finetek Japan)を使用し、Giemsa染色は、用手法で染色を行った。IHCは、全自動免疫染色装置Leica BOND-III(Leica Microsystems)を使用し、Myeloperoxidase:MPO(clone:poly, 希釈倍率1:600;Agilent Technologies)に対する染色を実施した。

2.2 一定期間各脱灰液に浸漬させた検体における染色性の比較

検体：当院にて実施された病理解剖時に採取した大腸5例を使用した。

方法：10%中性緩衝ホルマリンで48時間以内の固定後、キシレンとアルコールの等量混合液で脱脂を行い、組織を $1.0 \times 0.5 \times 0.3$ cm大に切り出して包埋カセットに入れ、各脱灰液150mlに1日～7日まで浸漬させ、自動包埋装置Tissue-Tek VIP 6(Sakura Finetek Japan)にてFFPEブロックを作製した。また、対照として脱灰液に浸漬しない非脱灰検体のFFPEブロックも同時に作製を行った。各ブロックからHE染色とAlcian Blue染色、IHCを実施した。HE染色は先述の自動染色装置を使用し、Alcian Blue染色は用手法で染色を行った。IHCは自動免疫染色装置Autostainer Link48(Agilent technologies)を使用し、Ki-67(clone:MIB-1,Ready to Use;Agilent Technologies)、E-cadherin(clone:NCH-38,Ready to Use;Agilent technologies)、CK AE1/AE3(clone:AE1/AE3,希釈倍率1:100;Novocastra)の局在が異なる3種類の染色を行った。

2.3 核酸品質評価

検体：検討2.2で作製したFFPEブロックの内、非脱灰検体と検討2.1で得られた脱灰完了までの平均日数(ギ酸ホルマリン:3日間、K-CX:2日間、中性脱灰液C・EDT-X:5日間)脱灰液に浸漬したブロックを選択し使用した。

方法：1ブロックあたり約 $5 \mu\text{m}$ 、5枚切片を薄切し、Maxwell RSC DNA FFPE Kit-PKK,Custom(Promega)を使用し添付文書に準じて核酸自動精製システム(Maxwell RSC;Promega)によりDNAを抽出した。その後抽出したDNAを蛍光法(使用機器:Quantus Fluormeter;Promega)とリアルタイムPCR法(使用機器:LightCycler480;Roche Diagnostics)にて測定し、Q-valueを算出した。Q-valueとは国立がんセンター中央病院が開発したDNAの品質指標で、リアルタイムPCR法を用いて得た測定値(Ct値)を蛍光法による測定値(dsDNA濃度)で割った値である。Q-valueが0.2以上におけるがんパネル検査の成功

率は約85%である³⁾。この事から本検討では0.2をカットオフ値とし、比較を行った。

2.4 統計解析

Studentのt検定を用いてQ-valueに対する統計解析を行った。本検討では、有意水準5%未満を統計学的に有意と判定した。

3. 結果

3.1 各脱灰液における脱灰完了日数の確認

ギ酸ホルマリンでは 2.6 ± 0.80 日、K-CXでは 2.4 ± 0.80 日で、中性脱灰液CとEDT-Xでは共に 4.6 ± 1.20 日であった。酸性脱灰液2種と比較して中性脱灰液2種ではおおよそ2倍程度の時間を要した(Fig.1)。

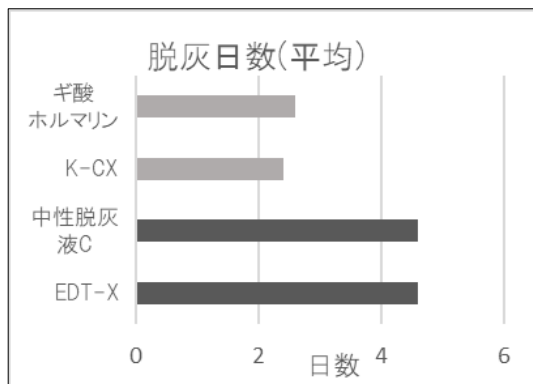


Fig. 1 脱灰液4種の脱灰完了までの平均日数

HE染色・Giemsa染色において、酸性脱灰液の2種では、全体的に赤みが増し、核の染色性の低下を認めた。特にK-CXでは、より明らかな染色性の低下を認めた。一方で、中性脱灰液の2種では共に染色性に明らかな影響は認めなかった。IHC(MPO)では、全ての脱灰液で明らかな影響は認めなかった(Fig.2)。

3.2 一定期間各脱灰液に浸漬させた検体における染色性の比較

HE染色は検討3.1と同様の結果となった(Fig.3)。Alcian Blue染色は、K-CXは2日以降、ギ

酸ホルマリンは3日以降で粘液部分の染色性の低下が認められた。中性脱灰液CとEDT-Xでは7日間脱灰液に浸漬した場合でも、明らかな影響は認めなかった(Fig.4)。

IHCはE-cadherin(Membranes)、CK AE1/AE3(Cytoplasm)、Ki-67(Nuclear)に対する染色を行った。E-cadherin、CK AE1/AE3は酸性脱灰液を含む全ての脱灰液で7日間浸漬した場合でも、明らかな影響は認められなかった。Ki-67はK-CXは1日以降で、ギ酸ホルマリンは3日以降で染色性の低下を認めた。一方で中性脱灰液CとEDT-Xでは、明らかな影響は認めなかった(Fig.3~7)。

3.3 核酸品質評価

非脱灰検体でのQ-valueは、 0.39 ± 0.11 であった。まず、酸性脱灰液のK-CXは測定不能であり、ギ酸ホルマリンでは、 0.05 ± 0.03 であり両者ともに測定値が低くカットオフ値である0.2を下回った。それに対し、中性脱灰液の中性脱灰液Cは 0.44 ± 0.18 、EDT-Xでは、 0.56 ± 0.11 であり、非脱灰検体同様に0.2以上の数値が得られた。EDTA処方の脱灰液で処理した検体では非脱灰検体と比較し、やや高いQ-valueが得られたが、統計学的には有意差は得られなかった。また、中性脱灰液CとEDT-XではEDT-Xの方がやや高値となる傾向が見られたが、こちらも統計学的な有意差は見られなかった(Fig.8、Table.1)。

4. 考察

酸性脱灰液では脱灰完了時間は短く、中性脱灰液ではより多くの時間を要することが再確認された。また、HEや特殊染色、一部の抗原に対するIHCにおいて酸性脱灰液では明らかな染色性の低下を示すのに対し、中性脱灰液においてはHE染色、特殊染色及びIHCの染色性が一定以上保持されていることが観察された。

特殊染色ではGiemsa染色とAlcian-Blue染色を実施した。これらの染色原理はHE染色と同様にpHが重要であることが知られ⁵⁾、酸性脱灰液に浸

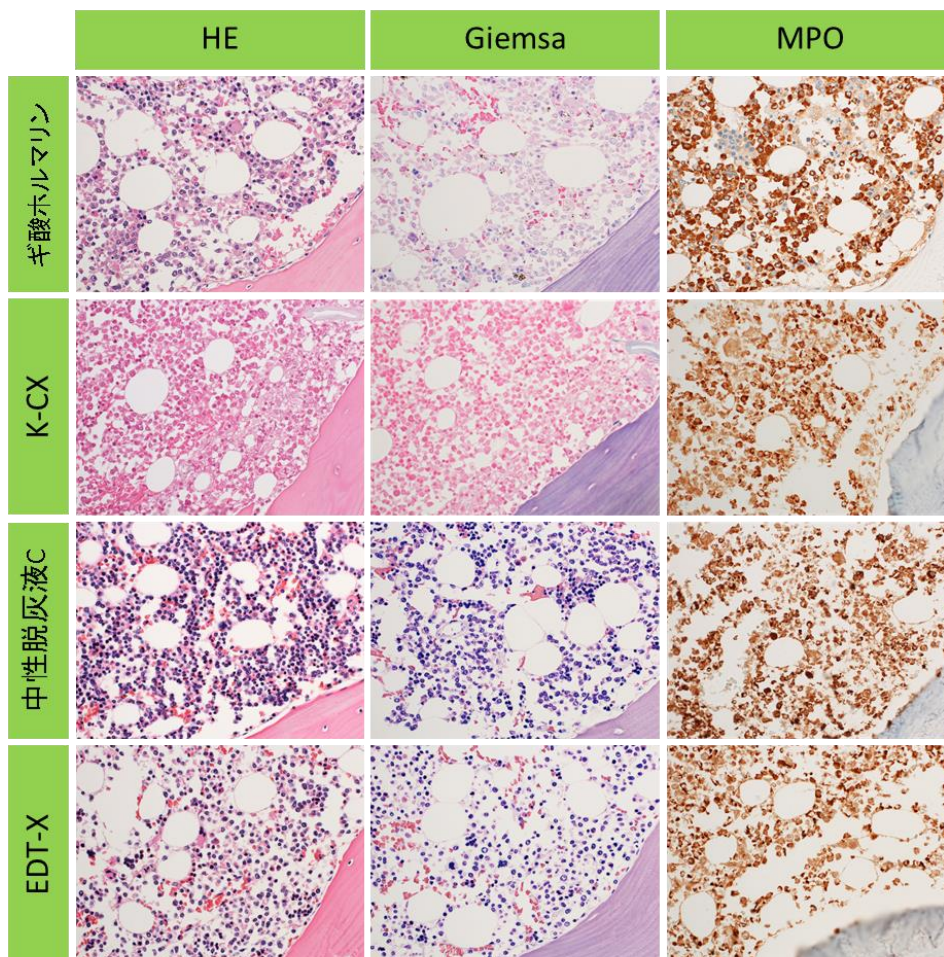


Fig. 2 脱灰完了時における HE 染色と MPO の染色結果(脱灰日数)
 中性脱灰液 C(5 日間) EDT-X (5 日間) K-CX(2 日間) ギ酸ホルマリン(3 日間)

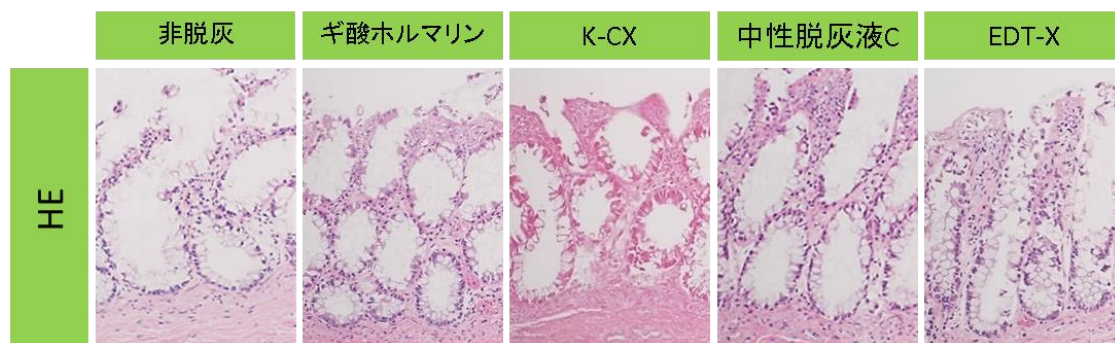


Fig. 3 各脱灰液に 7 日間浸漬した検体の HE 染色

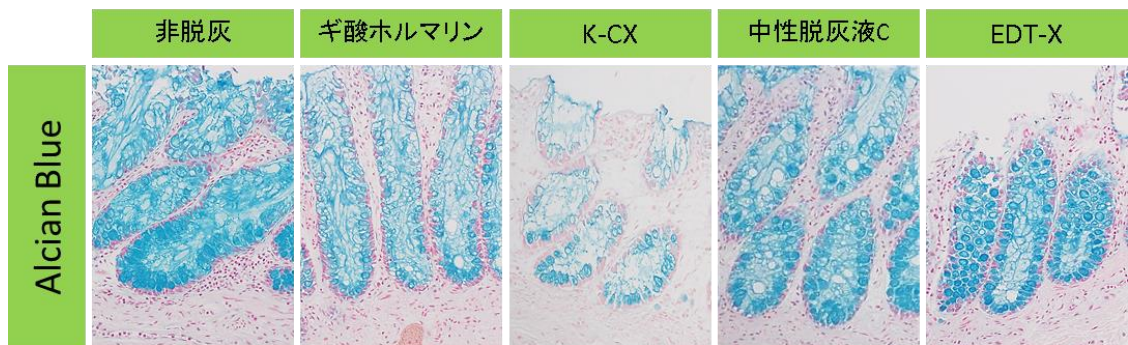


Fig. 4 Alcian Blue 染色 (脱灰日数)

中性脱灰液 2 種では、明らかな影響は認めない。

ギ酸ホルマリンや K-CX では粘液部分の染色性が低下し、泡沫状に染色されている。

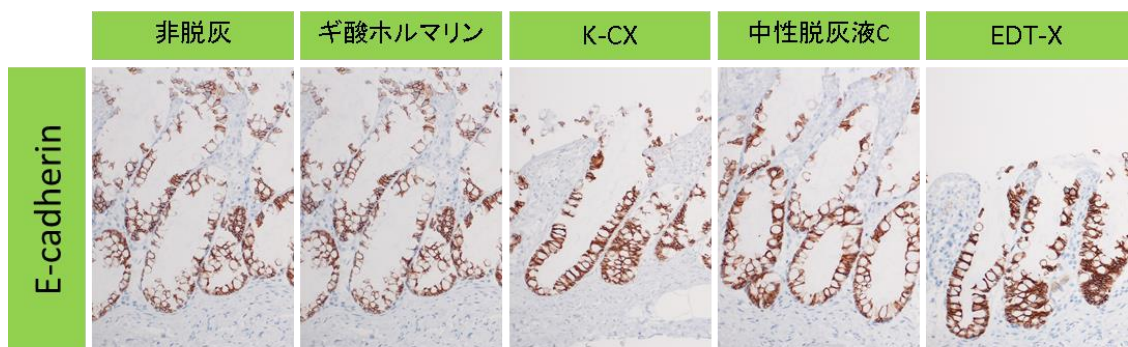


Fig. 5 IHC E-cadherin (脱灰日数 : 全て 7 日間)

全ての脱灰液で明らかな影響は認めない。

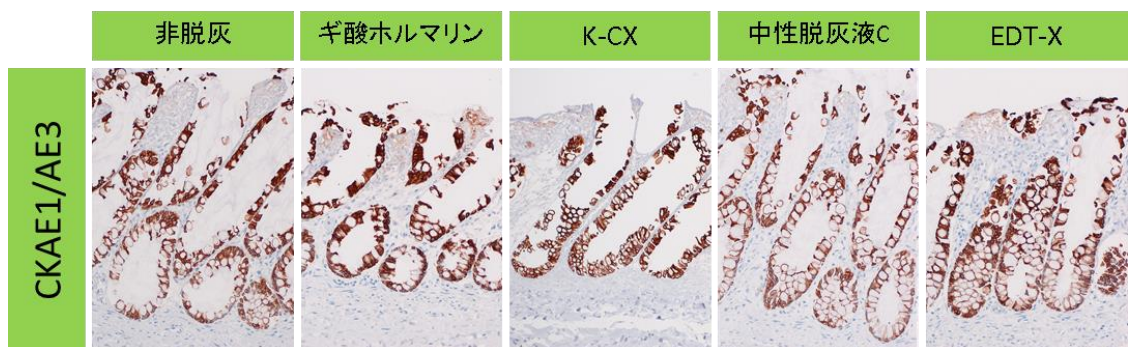


Fig. 6 IHC CK AE1/AE3 (脱灰日数 : 全て 7 日間)

全ての脱灰液で明らかな影響は認めない。

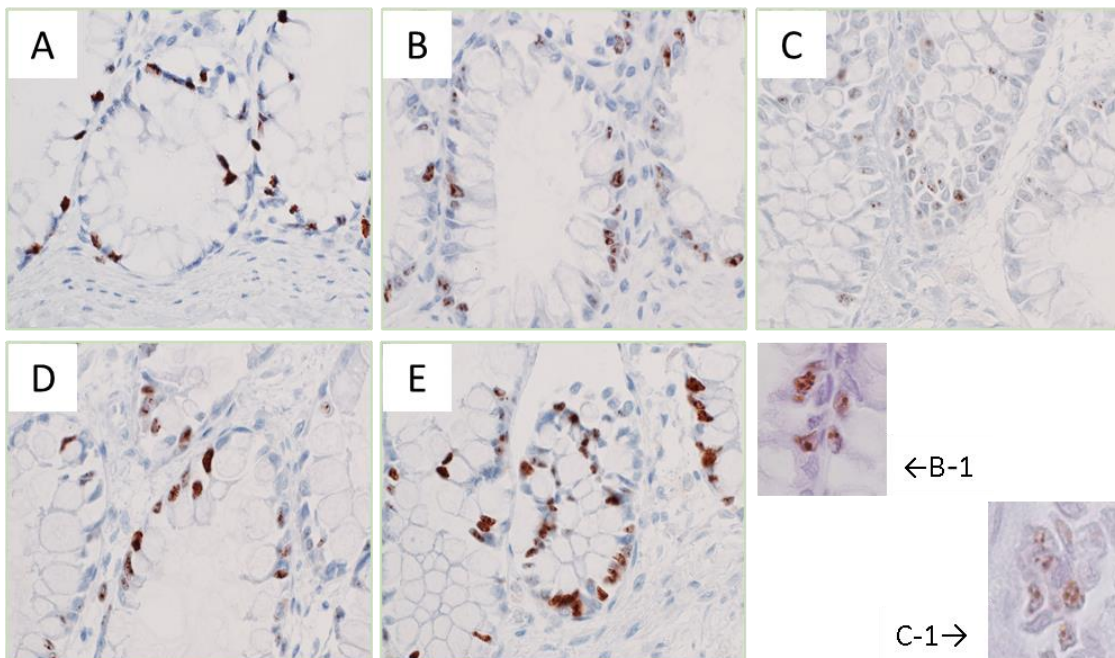


Fig. 7 A:非脱灰. B:ギ酸ホルマリン×40(脱灰日数:3日間). B-1:×100. C:K-CX×40(脱灰日数:1日間). C-1:×100. D:中性脱灰液C(脱灰日数:7日間). E:EDT-X(脱灰日数:7日間).

BとCにおいて陽性細胞数が減少し、陽性部位の染色性も点状に染色されており、染色強度の減弱がみられる。

Table. 1 非脱灰検体・中性脱灰液2種で脱灰された検体におけるQ-valueの有差検定

非脱灰液と中性脱灰液2種、また中性脱灰液2種の間に有意差はみられなかった。

p-value	非脱灰	EDT-X
中性脱灰液C	0.588	0.284
EDT-X	0.150	—

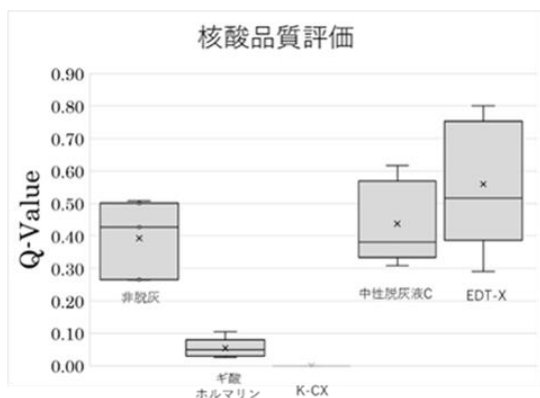


Fig. 8 非脱灰検体および各脱灰液で脱灰された検体のQ-value

酸性脱灰液の2種ではQ-valueのカットオフ値である0.2を大幅に下回っているのに対し、中性脱灰液2種では非脱灰検体と同様にカットオフ値を上回っている。

漬されることで組織切片の pH が低下し、それにより染色性が変化したことが考えられる。これに対し中性脱灰液である EDTA 処方の脱灰液 2 種では組織の pH に影響を与えないため染色性の低下がみられなかったと推察される。また、IHC において、異なる局在を示す 3 種類の抗原のうち、酸性脱灰液で脱灰した検体において核内抗原である Ki-67 にのみ明らかな染色性の低下が見られた。この結果は細胞質や細胞膜と比較して核内に存在する抗原の方が酸性脱灰液の影響を受けやすいということを推測させるものであった。核に局在を有する抗原中でも、Ki-67 で抗原性の低下が顕著であり、抗原の局在にだけ依存するものではないという報告もみられた⁴⁾ ため、より多くの抗体を用いて検討を行い、脱灰液の影響と抗原の種類もしくは局在に一定の傾向があるかを確認することが必要であると思われる。

本検討の主たる目的である中性脱灰液 2 種間の差に焦点を当てると、高濃度の EDTA 脱灰液 (EDT-X) は染色性においては従来当院で使用している EDTA 脱灰液 (中性脱灰液 C) との間に明らかな差は認められなかった。また、予想されていた脱灰時間に関しても明らかな短縮がみられなかった。これらの結果から、当初の我々の推測に反して脱灰に要する時間が EDTA 濃度に依存しないということも考えられるが、今回使用した中性脱灰液 2 種では、EDTA 濃度が約 1.5 倍 (差: 6.5%) と濃度差が小さかったために、結果として差が現れなかったことも要因として考えられる。また、本検討では、脱灰効果の指標として針を刺すという主観的な方法のみで検討を行ったが、脱灰液中に溶出された分解産物の量を測定し効果を判定している文献もみられた⁶⁾。そのため、より高感度で客観的な方法により判定を行うことでわずかな差を見つけることができた可能性も考えられる。今後の課題として濃度を段階的に幅広く設定し、判定方法についても客観的に脱灰効果を判定できる方法での検討が必要になるとと思われる。

核酸の品質に関しては酸性脱灰液では両者ともに測定値が低かった。中性脱灰液の 2 種では、良好な結果が得られた。特に EDT-X においては、前述のとおり統計的な有意差は見られなかったものの、非脱灰検体と比較して Q-value が高値になる傾向を示した。これは EDTA における核酸の保持効果が関係していると考えられる。DNA 分解酵素は、2 価の金属イオンを必要とする酵素であることが知られ、EDTA はこれらのイオンのキレート効果を有しているため、DNA 分解酵素の阻害剤として利用されている⁷⁾。

本検討では、先に作製が完了した非脱灰検体の FFPE ブロックは、脱灰液に浸漬した他の FFPE ブロックが揃った後に全てのブロックを同時に DNA の抽出を行ったため、待機期間中に組織内に残存している DNA 分解酵素によって DNA の分解が進んだことも考えられる。対して EDTA 処方の脱灰液に浸漬した FFPE ブロックは、浸漬している間 DNA 分解酵素が EDTA によって阻害された可能性が考えられる。実際にホルマリン固定組織から DNA を抽出する際に EDTA を使用し、抽出結果が良好に得られたという報告もみられる⁸⁾ ため FFPE 作製時に EDTA に浸漬することでより良い DNA の抽出に繋がることも考えられる。本検討では、EDTA 濃度が高い脱灰液のほうが良い結果が得られたため、EDTA 濃度も関与しているのではないかと考える。詳細な検討を実施できなかったため、今後の課題としたい。

5. 結論

本検討において、使用した EDTA 脱灰液 2 種間の濃度差が小さかったこともあり、脱灰時間や染色性に明らかな差はみられなかった。しかし、より高濃度の EDTA 脱灰液で脱灰された検体では低濃度の EDTA 脱灰液で脱灰された検体、更には非脱灰検体よりも良質な核酸を検体から抽出できる可能性が示唆された。

6. 参考文献

- 1) 日本臨床衛生検査技師会(編):病理検査技術
教本：53-54、丸善出版、2017 年 5 月 25 日
- 2) 日本病理学会：ゲノム研究用・診療用病理
組織検体取扱い規程：95、日本病理学会、
2019 年 3 月 5 日
- 3) 日本病理学会：ゲノム診療用病理組織検体
取扱い規程：11 、日本病理学会、2018 年
3 月 1 日
- 4) 尾花ゆかり 他：表面脱灰が免疫染色に与え
る影響、ニチレイ 免疫組織化学 玉手箱
22、
[https://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/
technical.html](https://www.nichirei.co.jp/bio/tamatebako/technical.html)、2013 年 5 月、最終閲覧
日：2020 年 9 月 13 日
- 5) 日本臨床衛生検査技師会(編):病理検査技術
教本：224-225、丸善出版、2017 年 5 月 25
日
- 6) Ahmet Serper et al:The Demineralizing
Effects of EDTA at Different Concentrations
and pH : J Endod. 28(7):501-2,2002 Jul
- 7) Y Tokuda et al:Fundamental study on the
mechanism of DNA degradation in tissues
fixed in formaldehyde. J Clin Pathol.
43(9):748-751,1990 Sep
- 8) Yagi N et al:The Role of DNase and EDTA
on DNA Degradation in Formaldehyde
Fixed Tissues. Biotech Histochem,
71(3):123-9,1996 May

急性骨髄性白血病患者の肺拡散能力評価における 血中ヘモグロビン濃度の影響

千葉大学医学部附属病院 検査部¹ 呼吸器内科²

今泉 優理¹ 小林 崇平¹ 鎌田 知子¹ 山本 修一¹
仙波 利寿¹ 川崎 健治¹ 川田 奈緒子² 松下 一之¹

【要旨】

肺拡散能力(DLco)は、血液中のヘモグロビン濃度(Hb)の低下に伴ってその値も低下するため、Hb補正が推奨されているが、補正の必要な低Hb患者のDLco測定は稀であり、Hb補正はほとんど行われていない。今回、急性骨髄性白血病(AML)の骨髄移植前評価として行ったDLco測定をきっかけに、Hb補正の効果及び今後の結果報告について検討した。

患者は57歳男性。初回検査時のVC、FEV₁/FVC、FRCは基準範囲内であったが、%DLco値は60.0%と低拡散能であった。この時のHb値は5.9 g/dLであり、Hb補正を行うと、%DLco値は96.4%と基準範囲内になった。計3度の検査を実施し、補正值はいずれも基準範囲内であった。

Hb補正はHb値が6~7g/dL以下の重度低Hb患者に有用であり、補正DLco値の報告には、呼吸機能検査ガイドラインで推奨されているCotesの式を用いることが望ましい。

【keywords】

肺拡散能力(DLco)、ヘモグロビン濃度(Hb)、急性骨髄性白血病(AML)、骨髄移植、貧血

【はじめに】

呼吸機能検査は換気障害の有無やその程度による呼吸器疾患の評価、治療の選択や効果の判定、手術のリスク評価などに用いられ、肺全体の機能を客観的かつ定量的に評価することができる。

その一項目として、肺拡散能力(diffusing capacity of lung for carbon monoxide : DLco)がある。肺胞気と肺毛細血管のガス交換の指標であるDLcoは、吸気が肺胞から赤血球のヘモグロビンに結合するまでの過程を測定していることから、血液中のヘモグロビン濃度(Hb)に影響されることが知られている¹⁾。DLcoが低下する主な疾患は、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や間質性肺炎、肺血管塞栓症、肺高血圧症などが挙げられるが、肺疾患にかかわらずDLcoが低下してしまう要因に貧血が挙げられる。したがって、貧血患者にはHb補正

を行うことが推奨されている¹⁾。しかし、DLcoを測定する対象は呼吸器疾患をもつ患者が多く、血液疾患患者のDLco測定は稀であったことから、Hb補正はほとんど行われてこなかった。近年、血液疾患患者の骨髄移植前評価²⁾や移植片対宿主病(GVHD)の肺機能評価としてDLco測定が行われるようになり、Hb補正の必要性が高まってきている³⁾。

我々は今回、低Hbの急性骨髄性白血病(AML)患者の症例を経験し、DLco値のHb補正の効果及び、今後の結果報告について検討した。

【症例及び方法】

1. 症例

症例患者は57歳男性。近医で骨髄異形成症候群の診断を受け、骨髄移植を希望して当院を受診し

た。AMLへの転化やGVHDの発症により、初回骨髄移植の1年後と2年後にも移植を行い、計3度の骨髄移植を受けた。それぞれの移植前に精密呼吸機能検査を実施した。

2. 方法

精密呼吸機能検査では、肺活量(VC)、一秒率(FEV₁/FVC)、機能的残気量(FRC)、肺拡散能力(DLco)の4項目を測定した。基準範囲は性、年齢、身長、体表面積から求めた予測値に対する割合(%予測値)にて判断した。 % VCは80%以上、FEV₁/FVCは70%以上、%FRCは80%以上、%DLcoは80%以上を基準範囲とした¹⁾。

精密呼吸機能検査にはCHESTAC-8900(チェスト社)を使用し、DLcoは一回呼吸法^{1,4)}にて検査を行った。DLcoの測定式¹⁾は以下に示した。

DLco測定式

$$DLco = \frac{V_A \times 60}{(P_B - 47) \times BHT} \times \ln \frac{F_{Aco}(0)}{F_{Aco}}$$

V_A: 肺胞気量、P_B: 大気圧、BHT: 息こらえ時間、ln: 自然対数、F_{Aco}(0): 吸入直後の肺胞気CO濃度、F_{Aco}: 呼出肺胞気CO濃度

Table 1. 3回の精密呼吸機能検査結果

		初回	1年後	2年後
VC (L)		3.79 (94.5%)	3.70 (93.7%)	3.74 (94.7%)
FEV ₁ (L)		2.85 (91.1%)	3.01 (92.6%)	2.85 (88.0%)
FEV ₁ /FVC (%)		79.6	78.6	75.4
FRC (L)		3.20 (98.2%)	3.20 (98.5%)	3.27 (100.0%)
DLco (mL/min/mmHg)	実測値	13.08 (60.0%)	16.92 (85.4%)	17.17 (88.6%)
	補正值	21.02 (96.4%)	22.06 (111.3%)	20.42 (105.4%)
Hb (g/dL)		5.9	8.4	10.0

Hb測定にはXN-9100(シスメックス社)を使用し、SLS-Hb法にて測定を行った。ただし、Hb値はDLco測定日±3日以内のものをを用いた。基準範囲は当院でも採用している日本臨床検査標準協議会(JCCLS)の共用基準範囲を用い、男性は13.7~16.8g/dL、女性は11.6~14.8g/dLとした。本論文では、輸血を行う一つの目安⁵⁾とされているHb値6~7g/dL以下の患者を重度低Hb患者と定義した。

Hb補正式には日本呼吸器学会肺生理専門委員会の呼吸機能検査ガイドライン⁶⁾で推奨されているCotesの式⁷⁾を用いた。

Cotesの式

男性: $補正DLco = 実測DLco \times \frac{10.22 + Hb}{1.7 \times Hb}$
女性・小児: $補正DLco = 実測DLco \times \frac{9.38 + Hb}{1.7 \times Hb}$

【結果】

計3度の精密呼吸機能検査の詳細はTable1に示した。以下、カッコ内は%DLco値とした。初回検査時の実測DLco値は13.08 mL/min/mmHg(60.0%)であり拡散障害があるかのような低値であった。VC、FEV₁/FVC、FRCはいずれも基準範囲内であった。同時期に実施した胸部X線写真をFigure1に示した。胸部X線、全身CTにおいても異

Table 2. 当院骨髄移植前評価目的の DLco 測定患者一覧(2019 年)

病名	性別	Hb (g/dL)	%DLco (%) 実測値 → 補正值 (差)	病名	性別	Hb (g/dL)	%DLco (%) 実測値 → 補正值 (差)
ALL	男	6.4	78.4 → 119.8 (+41.4)	急性白血病*	男	11.3	72.6 → 81.3 (+8.7)
AML	男	7.4	65.8 → 92.1 (+26.3)	POEMS症候群	女	11.0	96.6 → 105.2 (+8.6)
EBV-HLH	女	8.0	61.9 → 79.1 (+17.2)	多発性骨髄腫	男	12.2	88.9 → 96.1 (+7.2)
ALL	男	9.3	73.1 → 90.2 (+17.1)	多発性骨髄腫	女	11.6	107.6 → 114.5 (+7.0)
AML	男	10.0	88.6 → 105.4 (+16.8)	濾胞性リンパ腫	男	13.3	87.5 → 91.0 (+3.5)
ALL	男	11.5	100.8 → 112.0 (+12.0)	POEMS症候群	男	13.6	50.6 → 52.1 (+1.5)

ALL：急性リンパ性白血病、EBV-HLH：EBウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症
 * 急性白血病(CD7陽性幹細胞白血病疑い)、その他の系統を特定できない急性白血病



Figure1. 胸部X線写真(初回時)

常は認めず、呼吸器症状もなく、呼吸器疾患は認められなかった。この時のHb値は5.9g/dLと重度低Hb状態であり、Hb補正を行うと、補正DLco値は21.02mL/min/mmHg(96.4%)と基準範囲内であった。1年後の移植前検査では実測DLco値は16.92mL/min/mmHg(85.4%)と基準範囲内であったが、Hb値8.4g/dLで補正を行うと、補正DLco値は22.06mL/min/mmHg(111.3%)と実測値より高値を示した。2年後の移植前検査では実測DLco値は17.17mL/min/mmHg(88.6%)、Hb値は

10.0g/dLであり、補正DLco値は20.42mL/min/mmHg(105.4%)であった。

2019年における当院骨髄移植前評価目的のDLco測定患者一覧をTable2に示した。当院では2019年に938件のDLco測定を行い、そのうち骨髄移植前評価目的のものは12件であった。その中で、Hb補正によって%DLco値が10%以上改善した例は6件であり、そのうち5件は白血病患者であった。また、%DLco値がHb補正によって20%以上改善した例は2件あり、いずれもHb値が6~7g/dL前後の重度低Hb患者であった。また、%実測DLco値とHb値の相関をFigure2に示した。元々の拡散能力の差によるばらつきを補うために%補正DLco値が100%以上の群、80~100%の群、80%以下の群に

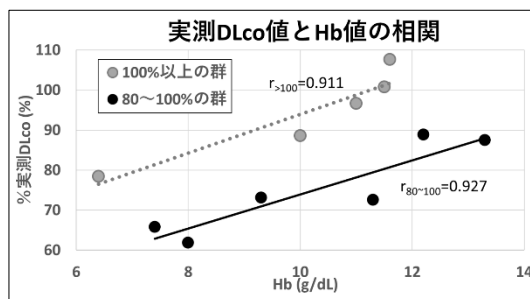


Figure2. 補正 DLco 値別の実測 DLco 値と Hb 値の相関関係

分けた。ただし、今回80%以下の群は1例であったためグラフからは除外した。100%以上の群、80~100%の群の相関係数はそれぞれ $r_{>100}=0.911$ 、 $r_{80-100}=0.927$ であり相関を認めた。

【考察】

DLcoは肺泡と肺毛細血管の間で行われているガス交換の指標である。したがってDLcoが低下する要因としては、大きく2つに分けられる。肺や肺胞自体に原因がある場合と肺に接する血管や血液に原因がある場合である。後者に関連して、Hbは血管内の大半の酸素を運搬する役割をもつため、Hbが低下すると肺に疾患がなくてもDLcoが低下する。このことはFigure2でも示したように、Hb値が低下するとDLco値も相関して低下し、DLcoを正しく評価するためにHb補正は重要である。

AMLは分化・成熟能が障害された造血幹細胞の増殖による血液疾患であり、汎血球減少をきたすことが知られている。つまり多くの白血病患者はHb値が低く、DLco測定時にはHb補正の必要性が高い。本症例の実測DLco値、補正DLco値、Hb値の変化をFigure3に示した。実測DLco値の変化のみ見ると、拡散障害が改善しているかのように見受けられるが、実際には補正DLco値のように3度ともほぼ一定の値を示しており、呼吸機能に変化はなかった。また、Hb値が基準範囲に近づくにしたがって、実測値と補正値の差は小さくなっており、軽度低Hb患者でのHb補正の必要性は低いと

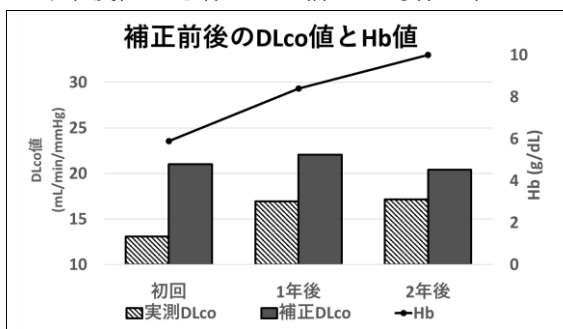


Figure3. 補正前後のDLco値とHb値の比較と経時的変化

考えられた。これはTable2のデータでも同様の結果が得られた。Hb値6~7g/dL以下の重度低Hb患者では補正によって大きくDLcoが改善しているのに対し、基準範囲に近い患者では実測値と補正値の差は小さく、Hb補正は重度低Hb患者に有用であることが示唆された。

Cotesの式は、病態生理学的にDLcoの規定因子を示したRoughtonとForesterモデル⁸⁾に一致しており、後続の研究⁹⁾でも様々な患者での有効性が述べられていることから、米国胸部疾患学会(ATS)や欧州呼吸器学会(ERS)⁴⁾で推奨されている。今回の検討ではHb補正にCotesの式を用いたが、Hb補正式はほかにもいくつか存在する。Cotesの式とよく比較される式の一つにDinakaraの式¹⁰⁾がある。

Dinakaraの式

$$\text{補正DLco} = \frac{\text{実測DLco}}{0.06965 \times \text{Hb}}$$

移植のリスク評価として用いられるHCT-CI²⁾によるスコアリングの際、DLcoのHb補正にCotesの式を用いるとDinakaraの式を用いた時に比較して、DLco値が過小評価され、移植リスクが高いと判断されてしまうという報告がある^{11,12)}。今回も移植前評価であることから、Dinakaraの式を用いる方が適切である可能性を考え、Cotesの式と比較した。それぞれの式から求めたHb値の変化による補正比(補正値/実測値)をFigure4に示した。Cotesの式

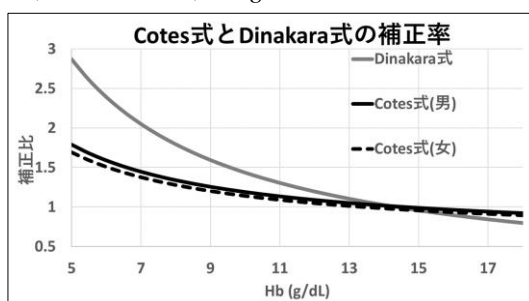


Figure4. Cotes式とDinakara式のHb値による補正率の違い

はDinakaraの式よりも補正比が低いため、補正DLco値が過小評価されるという報告に矛盾はなかった。一方でDinakaraの式は性別によるHb値の差は考慮されておらず、Hbの低下に伴って補正比は大幅に上昇していた。

本症例を用い、Cotesの式とDinakaraの式による補正DLco値の比較をFigure5に示した。Cotesの式はDinakaraの式に比べていずれも補正DLco値は低値であった。しかし、Cotesの式は3度ともほぼ一定の値であるのに対し、Dinakaraの式はHb値が低いときは補正值が高く、基準範囲に近づくにつれて補正值は低くなっていき、拡散能力が低くなっているかのような結果となった。

これらのことから、確かにDinakaraの式の方が補正值は高いことが示されたが、Hb値への依存が大きく、過度に補正している可能性が示唆された。他の論文でもDinakaraの式はその他の補正式に比べて補正比が逸脱しており、低Hbにおいて補正DLco値は過大評価であると述べられている¹³⁾。今回の結果からもDLcoを経時的に評価していくときにはCotesの式の方が優れていると考えられたが、補正式の選択は様々な研究で多くの見解が述べられており、ある1つの式が適切で正しいと言い切れないのが現状である。それぞれの補正式の特性を理解してうえで、どの補正式を使用するか吟味すべきである。

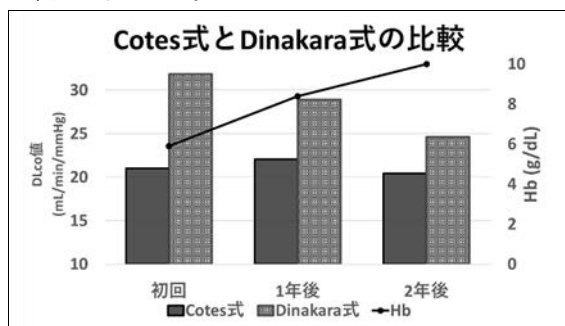


Figure5. Hb 値の違いによる Cotes 式と Dinakara 式の補正值の比較

【結語】

低Hb患者のDLco値はHb値の影響を受け、そのままの結果報告では誤った解釈を招く可能性がある。したがって、DLco測定時には既往歴の確認、白血病患者等の血液内科受診患者はHb値を確認し、必要に応じてHb補正した値を報告する必要がある。Hb補正式はそれぞれの特性を理解したうえで選択することが求められるが、結果報告の際には、呼吸機能検査ガイドラインで推奨されているCotesの式を用いてHb補正をすることが望ましい。

【文献】

- 1) 鈴木敦、他：JAMT技術教本シリーズ 呼吸機能検査技術教本 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会：58~80、株式会社 じほう、2016
- 2) Mohamed L. Sorrow et al. : Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT、BLOOD、106 (8) : 2912~2919、2005
- 3) 菅美樹、他：肺拡散能力検査(DLco)のヘモグロビン濃度補正の臨床的意義、医学検査、Vol.54, No.9 : 1241~1245、2005
- 4) Brian L Graham et al. : 2017 ERS/ATS standards for single-breath carbon monoxide uptake in the lung、Eur Respir J、49: 1600016、2017
- 5) 日本赤十字社 輸血情報 0511-92
- 6) 西村正治、他：呼吸機能検査ガイドライン—スパイロメトリー、フローボリューム曲線、肺拡散能力— 日本呼吸器学会肺生理専門委員会 社団法人 日本呼吸器学会：26~41、株式会社メディカルレビュー社、2004
- 7) J E Cotes et al. : Iron-deficiency Anaemia: Its Effect on Transfer Factor for the Lung (Diffusion Capacity) and Ventilation and Cardiac Frequency During Sub-Maximal Exercise、Clinical Science、42: 325~335、1972

- 8) Roughton FJ and Forster RE et al. : Relative importance of diffusion and chemical reaction rates in determining rate of exchange of gases in the human lung, with special reference to diffusing capacity of pulmonary membrane and volume of blood in the lung capillaries、 J. Appl Physiol、 11 : 290~302、 1957
- 9) Clark E H et al. : Effect of blood transfusion on the carbon monoxide transfer factor in the lung in man. Clin、 Sci. Mol. Med、 54:627~631、 1978
- 10) Dinakara P et al. : The effect of anemia on pulmonary diffusing capacity with derivation of a correction equation 、 American Review of Respiratory Disease、 102 : 965~969、 1970
- 11) Coffey DG et al. : Adjusting DLCO for Hb and its effects on the Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index、 Bone Marrow Transplant、 48 : 1253~1256、 2013
- 12) 横山 泰久、他：一酸化炭素肺拡散能の血色素量補正法の違いがもたらすHCT—CI評価の不安定性 日本造血細胞移植学会雑誌 第4巻 第4号 : 108~113、 2015
- 13) Marrades R et al. : Adjustment of DLCO for hemoglobin concentration、 Am J Respir Crit Care Med、 155 : 236~241、 1997