

原 著

自動免疫装置DAKO Autostainerの有用性について

病理センター

小杉久良、戸田文男、長谷川秀浩、片桐丘充
大橋珠紀、花垣照夫、五十嵐俊彦

目的：免疫組織化学染色は病理診断において重要な手法であり、その需要度は増加傾向にある。しかし、その手法は手作業で行っているため、施設間、個人、再現性に差が生じているのが現状であり、精度の維持が要求されている。

方法：我々は、自動免疫装置であるDAKO Autostainerを導入し、その有用性について検討した。

成績・結論：その結果、染色結果の標準化と作業の効率化に極めて貢献できる機器だと考えられた。

キーワード：自動免疫装置DAKO Autostainer

緒 言

病理診断は基本的にHE染色標本によって行われているが、得られる情報には限りがあり、補助手段として各種特殊染色や免疫組織化学染色、In situ hybridization等が併用されている。そのため病理検査室のスタッフには多様な技術が要求されるが、いまだ手作業によることが多く、自動化については他の検査部門に比較して著しく遅れており、作業の効率化が急務である。また、複雑な染色手技は担当者に熟練した技術と時間的労力が要求されるため、その染色結果には施設間や担当技師間においても差があり、誰でも安定した染色結果を得られるような精度が求められている。中でも、免疫組織化学染色は良・悪性の鑑別や腫瘍の性格を検討するうえで必要不可欠な方法であり、多くの抗体の開発に伴い今後益々その需要が増加するものと考えられる。当施設では染色結果の標準化と作業の効率化を目的に自動免疫染色装置 (DAKO Autostainer) を導入し、その有用性について検討した。

材 料 と 方 法

システムの概要

本装置は図1に示すように本体を制御するコンピュータと染色装置から構成されており、オペレーションシステムはWindows 98仕様である。自動化可能範囲は抗原性の賦活化からDAB発色までの行程である。一回の染色操作における最大処理能力はスライドガラス48枚であり、最大48種類の一次抗体が使用可能である。染色原理は水平に並べられたスライドガラスに試薬を滴下してゆくドロップディスペンサー方式で、スライドガラス上の組織の位置に合わせて滴下場所を選択できるシステムとなっており、100 μ lから

800 μ lの試薬量を検体の大きさに合わせて使用できる。染色プロトコルの登録数についての制限はなく、抗体別に染色ステップが異なるような場合でも、それぞれのプログラムを作成して登録しておくことにより、スライドガラスごとに用手法のマニュアルが忠実に再現できる。また、各プロトコルは最大35ステップまで設定でき、二重免疫組織化学染色など多様な染色手技への対応も可能である。染色中は画面に染色の進行状況、開始時間および終了時間が表示され、同時に染め上がり予定時間の設定ができることから夜間運用や休日運用などの使用も可能である。廃液は一般廃液とハザード廃液に分け排出できるので、DABなど発癌性物質を含む廃液は適切な処理が可能である。

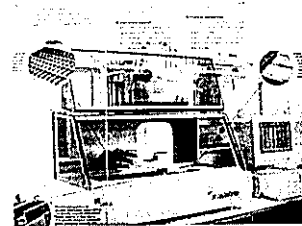


図1 DAKO Autostainer装置

材 料

当施設で使用している一次抗体83種類(表1)と陽性コントロール標本を用いて行った。

標本は10%ホルマリン固定後のパラフィン包埋組織を3 μ mに薄切し、MASコート付のスライドガラスを用いた。

方 法

キシレンエタノール系で脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ阻止は3%過酸化水素水で5分間、一次抗体は1時間反応させ、LSABキット/HRP (DAKO) を用いて、二次抗体15分間、酵素試薬15分間、発色は武藤化学のDAB試薬で行った。洗浄液には0.05MTBS緩衝液 (pH7.2) を使い、カッターのヘマトキシリンで核染色を行い、その染色性について用手法と比較した。なお脱パラフィン後に抗原性の賦活化が必要なのは次の処理を行った。

A 賦活化

- 1) マイクロウェーブ加熱処理 (MW)
10mMクエン酸緩衝液 (pH6.0) で、照射は最大出力で5分間予備加熱後20分間行った。
- 2) オートクレーブ加熱処理 (AC)
マイクロウェーブ処理と同様の10mMクエン酸緩衝液 (pH6.0) で121℃ 20分間行った。CD4、CyclinD1については10mMクエン酸緩衝液 (pH7.0) で121℃ 20分間行った。
- 3) 蛋白分解酵素処理 (ProK)
0.05% プロテナーゼK (トリス-塩酸緩衝液 pH7.6) で10分間行った。血清蛋白IgG、IgA、IgM、Kappa、Lambdaについては3分間行った。

染色プロトコールの編集

Standard:LSAB法をもとに作成したプログラム。(図2)
Step:上記の方法で内因性ペルオキシダーゼ阻止や蛋白分解酵素処理を手作業で行った場合のプログラム。(時間短縮に活用)
CD4:CD4は内因性ペルオキシダーゼ阻止を一次抗体反応後に(0.3%過酸化水素メタノール溶液10分間)行うため、専用のプログラムを作成。

以上、3つのプロトコールを使い分け効率よく運用させた。またDABによる発色までを機器上でを行い、核染色からの行程は手作業で行った。

操作手順について

基本的な操作画面を図3に示す。Programming Grid画面上のメニューバーからスライド枚数を入力し、登録済みの染色プロトコール (Standard, Step, CD4)をAutoのprogramを利用することで、一次抗体を除いたすべての染色手順を画面上に入力できる。あとは一次抗体を選択するかたちで、蛋白分解酵素処理 (ProK)が必要なものは一次抗体を選択すると入力される仕組みになっている。また複数の同一抗体はSelect機能を用いることでスムーズな入力が可能である。すべての染色手順を入力後、スライドガラスを試

図2 染色プロトコール (Standard)

1. Rinse Buffer
2. End.Enz.Block (3%過酸化水素水 5分間)
3. Rinse Buffer
Pretreatment (プロテナーゼK処理)
Rinse Buffer
4. Primary Antibody (一次抗体 1時間)
5. Rinse Buffer
6. Rinse Buffer
7. Rinse Buffer
8. Secondary Reagent (二次抗体 15分間)
9. Rinse Buffer
10. Rinse Buffer
11. Tertiary Reagent (酵素試薬 15分間)
12. Rinse Buffer
13. Rinse Buffer
14. Swtch (一般廃液からハザード廃液への切り替え)
15. Substrate (DAB発色)

薬をセットし、画面上でドロップゾーンや分注量の変更を行い、Start Runするだけである。

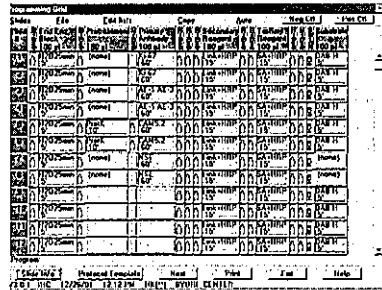


図3 Programming Grid画面

結果

用手法と同様の良好な染色態度であった。これはDAKO Autostainerが用手法を忠実に再現していると判断できる。自動化にあたりDABによる発色時間は、それぞれの抗体により異なるため設定が必要であった。用手法をもとに測定した結果、数秒間から約8分間とかなりの幅がみられた。これを出来る限り同一時間にするために、DABの濃度や、抗体を適切な濃度に調整し、設定時間を5分間に固定した。そのためにポリクロナール抗体などで非特異反応の存在が心配されたが認められず、良好な染色態度であった。しかし、短時間で発色する血清蛋白、Myoglobin、Thyroglobulin、神経内分泌系の一部に関しては、機器の構造上1分未満の設定では誤作動を生ずるため、発色をしない方法 (none) とした。特に血清蛋白であるIgG、IgA、IgM、Kappa、Lambdaは血清成分を多く含む組織の場合、陽性コントロールが指標とならないため、発色は顕微鏡下で行うことにした。DABによる発色時間を5分間と発色をしない (none) の2項目にしたことで入力時の混乱を防止でき、スムーズな運用が可能となった。

考察

DAKO Autostainerの導入にあたり、その有用性について検討した。今回、陽性コントロールを対照に染色性を比較したが、日常の組織検体は固定不良などの影響により検出しにくい抗原物質もあり、発色における最終確認は顕微鏡下で行う必要性が考えられた。また、一行程で最大48枚染色を行った場合、約4時間を要するため1日2回転が限界であり、依頼件数が多い場合は処理能力が問題となった。夜間運用を行うことで対応は可能であるが、今後、現法のLSAB法 (3ステップ) から、ENVISION法 (2ステップ) を検討することで時間の短縮が可能となり、処理能力は増すものと思われた。コスト面に関しては、DAKOペンを用いて組織を簡単に囲み、抗体や試薬の滴下量を必要最低量の100μlに設定したことで、用手法と比べてわずかな負担に抑えられた。一方、当機器は洗浄液を多量に必要とし、特に夜間運用の場合には乾燥防止機能が働き更に必要となるため、その分1枚あたりのコスト

が増額された。コストを重視した場合は、特に夜間運用は問題となった。しかし、自動化における最大のメリットは作業の効率化にあり、手法では担当者が係り付けになるのに対して、1度作動すれば数時間単位で手が空き、他の仕事に目が向けられる点で評価できるため、それによるコストの増額は、やも得ない範囲内と判断した。また、自動化されたことにより、技師の負担も軽減され、自動化できないDABの発色などにおいても、技師同士が情報交換を行う余裕もできることから、技術面も改善されていくと思われた。これにより、誰が行っても同じ結果、同じ評価が得られるようになり、精度の維持は可能となった。以上のことから染色結果の標準化と作業の効率化は可能であり、DAKO Autostainerは有用であると判断できる。

結 語

病理診断に広く用いられている免疫組織化学染色は、新たな抗体の開発により増加すると思われる。染色結果に信頼性を高めるために、精度管理を行うことが重要である。

文 献

1. 佐藤友章, 阿部一之助, 伊藤真紀子, 他. 自動免疫装置ダコテックメイトHorizon使用経験. 東北医学検査学会抄録集 2001.
2. 池田康夫, 覚道建一, 加藤良平, 坂本穆彦. 免疫組織・細胞化学検査. 臨床検査 1995; 39 (増刊号).

英 文 抄 録

Original Article

Usefulness of automatic immunity device DAKO Autostainer

Pathology Center

Hisayoshi Kosugi, Fumio Toda, Hidehiro Hasegawa, Okamitu Katagiri, Tamaki Oohasi, Teruo Hanagaki, and Toshihiko Ikarashi

Objective: The immunohistochemical dyeing was an important method in pathological diagnosis and its necessity tended to increase. Because the method was done with hand-work, several differences were found among institutions, individuals, and reappearance. The maintenance of the accuracy is demanded.

Study Design: We introduced DAKO Autostainer that was an automatic immunity device and examined about its usefulness.

Results and Conclusion: It was conceivable that this device contributed for the economization of dyeing and the standardization of staining results.

Key Words: automatic immunity device, DAKO Autostainer.

表1 一次抗体表

抗体名	賦活化	製造元	希釈倍率	抗体名	賦活化	製造元	希釈倍率
リンパ系				筋系			
CD45	MW	DAKO	×200	Desmin	MW	DAKO	×50
芽球				α -SMA	MW	DAKO	×200
TDT	AC	NOVO	×100	Myoglobin		SEIKAGAKU	×2000
Bcell系				神経内分泌系			
CD79 α	MW	DAKO	×50	NFP	ProK	DAKO	×100
CD20	MW	DAKO	×100	S-100 (poly)	ProK	DAKO	×100
bcl-2	MW	DAKO	×80	GFAP		DAKO	×200
CD5	MW	NOVO	×50	ChromograninA		DAKO	×2000
CD10	MW	NOVO	×100	C-kit	MW	DAKO	×50
CD23	ProK	NOVO	×50	HMB-45	MW	DAKO	
CyclinD1	AC	IBL	5 μ g/ml	Go- α	MW	MBL	×200
CD74	MW	ニチレイ	×2	NSE		Immunotech	×2
CD45RA	MW	DAKO	×50	S-100 (mono)	MW	DAKO	×100
Tcell系				Calcitonin			
CD3	MW	DAKO	×100			ニチレイ	
CD45RO	MW	DAKO	×100	Gastrin		Zymed	×300
CD43	MW	DAKO	×100	Glucagon	ProK	DAKO	×2
CD8	MW	DAKO	×50	Somatastatin		DAKO	×1200
CD4	AC	NOVO	×40	Insulin		DAKO	×400
ホジキン細胞系				Serotonin			
CD15	MW	DAKO	×50			DAKO	
CD30	MW	DAKO	×40	Pancreatic Polypeptide		IBL	×1000
NK/T				α -Amylase			
CD56 $_{L}$	MW	DAKO	×100			MBL	×200
骨髄赤血球系				Myelin basic protein			
GlycopholinA		DAKO				DAKO	
骨髄系				増殖因子・癌抑制遺伝子			
Myeloperoxidase		DAKO	×100	P-53	AC	IBL	0.4 μ g/ml
顆粒球系				Ki-67	AC	DAKO	×50
Neutrophil Elastase		DAKO	×100	腫瘍マーカー			
巨核球血小板系				AFP		Zymed	×200
CD61	ProK	DAKO	×50	CEA	ProK	DAKO	×100
組織球系				CA19-9			
CD68		DAKO	×600	CA15-3	ProK	DAKO	×100
α 1-Antitrypsin	ProK	ニチレイ	×4	PSA		DAKO	×800
Lysozyme	ProK	DAKO	×4	Human Milk Fat Globule	MW	NOVO	×100
内皮系				Thyroglobulin			
CD34		ニチレイ	×100			DAKO	×4000
FactorⅢ	ProK	DAKO	×600	SP-A		DAKO	×100
CD31	ProK	DAKO	×40	RCC	ProK	NOVO	×50
上皮系				PTH			
AE-1/AE-3	MW	DAKO	×100		MW	NOVO	×200
EMA	MW	DAKO	×100	C-erbB2	MW	DAKO	×150
CAM5.2	ProK	Becton Dickinson		HSA	MW	NOVO	×50
Ber-Ep4	ProK	DAKO	×100	ホルモン系			
Cytokeratin-17	MW	Immunotech		h-CG		DAKO	×400
34 β E12	MW	DAKO	×50	Estrogen receptor	AC	Immunotech	×50
CollagenⅣ	ProK	DAKO	×50	Progesteron receptor	AC	Immunotech	×50
Laminin	ProK	DAKO	×500	HPL		DAKO	×800
間葉系				血清蛋白			
Vimentin	MW	DAKO	×200	IgG	ProK	DAKO	×10000
				IgA	ProK	DAKO	×5000
				IgM	ProK	DAKO	×5000
				Kappa	ProK	Bio Genex	
				Lambda	ProK	Bio Genex	
				その他			
				Hericobacter Pylori		DAKO	×400