

Comparison of evaluations of hormone receptors in breast carcinoma by image-analysis using three automated immunohistochemical stainings

KOJI ARIHIRO, MIYO ODA, KATSUNARI OGAWA, KENSHI TOMINAGA, YOSHIE KANEKO, TOMOMI SHIMIZU, SHIHO OHNISHI, MEGUMI ODA, YUKI KURITA, YUKO TAIRA, MASAYOSHI FUJII and MAIKO TANAKA

Department of Anatomical Pathology, Hiroshima University Hospital, Hiroshima 734-8551, Japan

Received June 22, 2010; Accepted August 6, 2010

DOI: 10.3892/etm.2010.142

Abstract. The aim of this study was to compare the results of immunohistochemistry (IHC) assays evaluated by human examiners with the results evaluated by computerized image analysis, and to compare the computerized image analysis results among three automated IHC assays, namely the BioGenex, Dako and Ventana assays. All slides were semiquantitatively evaluated according to the Allred score and J-score by human examiners. The images were analyzed using MacSCOPE version 2.6 for Macintosh according to the H-score and the percentage of positive-stained nuclei per area of carcinoma cells (PP) irrespective of the intensity of the stained nuclei. The H-score for the estrogen receptor (ER) was significantly correlated with the Allred score ($P < 0.0001$) and the PP for the ER was significantly correlated with the J-score ($P < 0.0001$), suggesting that the image analysis used in the present study is a useful method for the evaluation of ER status. Several discrepancies were identified between the Allred score and H-score and between the PP and J-score due to the positive-stained cytoplasm area of carcinoma cells and/or the positive-stained nuclei area of non-carcinoma cells, including benign epithelial cells, lymphocytes and stromal cells. Accordingly, advances in the algorithm of the digitized analyzing system is necessary.

Introduction

Although a refined assessment of hormone receptors in breast carcinoma is necessary to select therapeutic agents, endocrine responsiveness has recently been defined as the presence of any detectable estrogen receptor (ER) according to the recommendations and thresholds for the post-operative

adjuvant systemic therapy of early breast cancer proposed by the St. Gallen International Expert Consensus meeting in 2009 (1). In other words, the previous three categories of endocrine responsiveness using 1 and 10% cut-off values have been simplified, so that endocrine therapy is considered when any ER-positive cells are noted in the tumor. For the evaluation of hormone receptor (HR) status, it is recommended that the percentage of HR-positive cells be indicated on pathology reports rather than merely using scores. In particular, positivity for HRs of 50% or more of tumor cells is viewed as indicating highly endocrine-responsive tumors, suggesting that the HR must be reliably and accurately measured.

As to the immunohistochemistry (IHC) methods for the detection and quantification of the ER and progesterone receptor (PgR), the authors compared evaluations for HRs in breast carcinoma using two manual and three automated IHC assays, and showed intermethod variability indicated by multi-rater κ -values for the ER and PgR (ER, $\kappa = 0.34$; PgR, $\kappa = 0.45$) (2). In addition, to assess low levels of HR expression, the HR was evaluated by real-time monitoring polymerase chain reaction (RT-PCR) using complementary DNA produced by reverse transcription of the messenger RNA of each breast carcinoma. Although we showed an excellent correlation between RT-PCR results and those of the IHC method, there were some discrepancies between the results of RT-PCR and IHC due to the overestimation of HR-positive lymphocytes and mesenchymal cells in tumor stroma, among other factors (3).

To provide a standardized semi-quantitative measurement of the HR for IHC specimens, computerized image analysis has been employed since the late 1980s (4). These attempts were performed using various systems or software, including Cell Analysis System's CAS 100 (4), BIOCUM500 (5), CAS 200 (6), Image cytometry (7), Adobe Photoshop (8,9), computer-supported analysis (10), SpectraCube™ (11), Chroma Vision Automated Cellular Imaging System (ACIS) (12-14), WinROOF (15), QCA (16) and VISUAL C++ (17). In particular, automated image analysis technology, including AQUA (18), Ariol (14,19) and MatLab7 using digital image capturing (20), has recently been developed. Although it is emphasized that computerized image analysis has improved quantification, reproducibility and interobserver variability for the HR evaluation of breast carcinoma (4-20), the process

Correspondence to: Dr Koji Arihiro, Department of Anatomical Pathology, Hiroshima University Hospital, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734-8551, Japan
E-mail: arihiro@hiroshima-u.ac.jp

Key words: estrogen receptor, immunohistochemistry, automated staining, image analysis

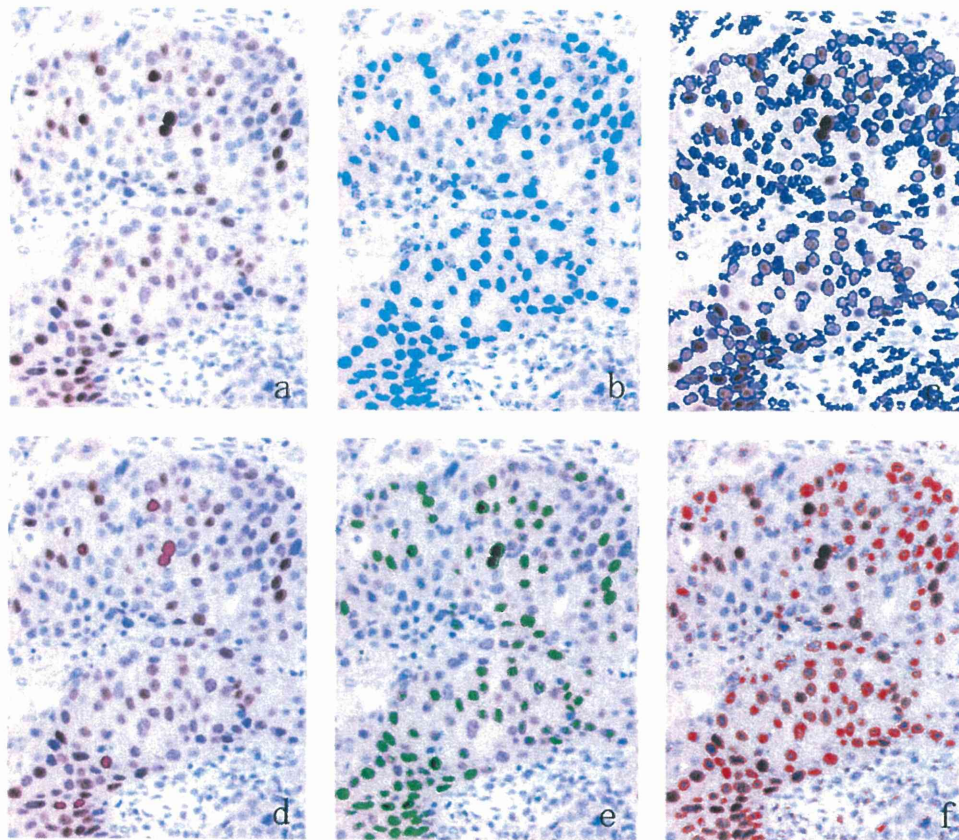


Figure 1. Immunohistochemistry of ER and the images analyzed by MACScope. (a) Nuclei of carcinoma cells show various intensities of the ER. (b) All positive-stained nuclei of carcinoma cells are shown in light blue; $3,994.4 \mu\text{m}^2$. (c) All negative-stained nuclei of carcinoma cells are shown in blue; $5,409.3 \mu\text{m}^2$. (d) Strongly stained nuclei of carcinoma cells are shown in pink; $92.6 \mu\text{m}^2$. (e) Intermediately stained nuclei of carcinoma cells are shown in green; $1,728.9 \mu\text{m}^2$. (f) Weakly stained nuclei of carcinoma cells are shown in red; $2,173 \mu\text{m}^2$.

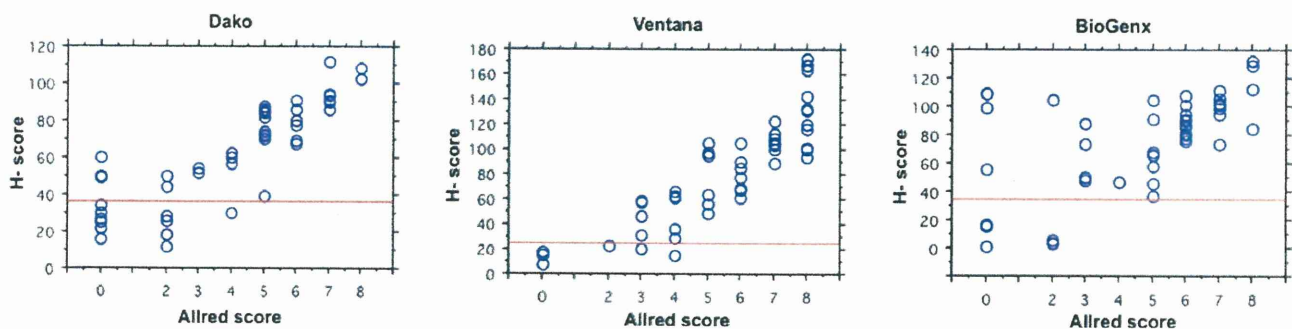


Figure 2. Scattergram of H-score with Allred score for the ER. The H-score was significantly correlated to the Allred total score of IHC using the Dako, Ventana and BioGenx assays (Spearman's rank correlation test, $P < 0.0001$). The cut-off values in the Dako, Ventana and BioGenx assays were 36, 24 and 34 (red line), respectively.

determined by the Dako, Ventana and BioGenx assays were regarded as 36, 24 and 34 according to the Allred score, respectively. The concordance rates at these cut-off values were the highest of each IHC assay, and 88, 98 and 90% among the IHC results generated by the Dako, Ventana and BioGenx assays, respectively.

Relationship between J-score and PP for ER. A comparison of the distribution of J-scores scored by the human examiners and that of the percentage of positive cells calculated

by image-analyzing software for ER by the three staining methods is shown in Fig. 3. The Spearman's rank correlation coefficient between the two methods ranged from 0.495 to 0.914. The cut-off values of the PP for ER determined by the Dako, Ventana and BioGenx assays were regarded as 37, 36 and 38 according to the J-score, respectively. The concordance rates at these cut-off values were the highest of each IHC assay, and 90, 92 and 84% among the IHC results generated by the Dako, Ventana and BioGenx assays, respectively.

Additionally, in the present study, ER expression in the cytoplasm or plasma membrane of carcinoma cells was noted in 3.5, 2 and 25% of examined cases using the Dako, Ventana and BioGenex assays, respectively (Fig. 4). In a previous study, the extranuclear expression of HR in breast carcinoma cells was reported in 9.5% of examined cases (28). Accordingly, the software used in the present study may have overestimated the positivity of ER in carcinoma cells, as it could not discriminate between ER expression in the nuclei and that in the cytoplasm or plasma membrane of carcinoma cells. Accordingly, it is necessary to use software with improved function that derives ER expression only from the nuclei of carcinoma cells.

Regarding the time required to perform computerized image analysis, in general, the process of image analysis is more time consuming and labor intensive than visual scoring from a glass slide. Although in a previous report the processing time for 100 images from 20 cases by WinROOF was reportedly approximately 60 min, excluding the time required to capture the images (15), there have been few reports discussing the time necessary to capture and process the images by software. In the present study, the capture and processing time for 10 images per case was approximately 4 min. In comparison to the study using WinROOF, the process of image analysis in the present study was less time consuming and labour intensive due to the improved function of the computer and software.

With regard to the number of images captured for digitized analysis, there have been various numbers of images used ranging from the single best field (16,17), three fields (8), four fields (14), five fields (5,15,29), eight fields (9) and ten fields (6,10). In the present study, ten fields were selected and captured for image analysis, similar to previous studies which used the maximal numbers of images (6,10). Although twenty fields was regarded as sufficient for digitized image analysis on the basis of a preliminary study on the relationship between the number of images digitally analyzed and H-score or the percentage of stained nuclei area (Fig. 5), the optimal number of images for digital analysis should be considered, taking into account the time required for the procedure. Recently, a fully automatic digitized analyzing system for the total fields of specimens was developed using digital images captured by the Aperio ScanScope XT Slide Scanner and algorithm by MatLab 7 (20). This system reportedly identifies only tumor nuclei and automatically excludes non-tumor structures, including stromal components and lymphocytes. In particular, it is entirely unsupervised and does not require any *a priori* data. Irrespective of the adjustment of various thresholds and cut-off values to detect various cells exhibiting particular sizes and shapes, to date, it has been difficult for a digitized analyzing system to discriminate between benign and malignant cells with complete accuracy. Accordingly, advances in the algorithm of digitized analyzing systems are necessary.

As for image analysis of the RGB system, in general, a composite color signal is built up from combinations of basic color values produced by the mosaic arrangement of three color filters (red, green and blue) on the surface of the imager. In this way, each color image is recorded as a superimposition of 3 images with a photometric resolution of 255 linear values: a red, a blue and a green one, reflecting the slide trans-

mission into these three types of wavelengths (5). However, even when an RGB imaging system functions perfectly, there are intrinsic limitations to its ability to distinguish between similar chromogens and to isolate the optical signal from each chromogen. Thus, each color signal is quantitatively and separately measured (30). In the present study, DAB was used as a chromogen substrate, and the choice of chromogen and counterstain is known to affect both the visual and quantitative results. Accordingly, the appropriate chromogen substrate and counterstain dye suitable for image analysis must be selected.

References

1. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B and Senn HJ: Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol* 20: 1319-1329, 2009.
2. Arihiro K, Umemura S, Kurosumi M, *et al*: Comparison of evaluations for hormone receptors in breast carcinoma using two manual and three automated immunohistochemical assays. *Am J Clin Pathol* 127: 356-365, 2007.
3. Oda M, Arihiro K, Kataoka T, Osaki A, Asahara T and Ohdan H: Comparison of immunohistochemical assays and reverse transcription real-time polymerase chain reaction for analyzing status of hormone receptors in human breast carcinoma. *Pathol Int* 60: 305-315, 2010.
4. Bacus S, Flowers JL, Press MF, Bacus JW and McCarty KS Jr: The evaluation of estrogen receptor in primary breast carcinoma by computer-assisted image analysis. *Am J Clin Pathol* 90: 233-239, 1988.
5. Rostagno P, Birtwisle I, Ettore F, *et al*: Immunohistochemical determination of nuclear antigens by colour image analysis: application for labelling index, estrogen and progesterone receptor status in breast cancer. *Anal Cell Pathol* 7: 275-287, 1994.
6. Layfield LJ, Saria EA, Conlon DH and Kerns BJ: Estrogen and progesterone receptor status determined by the Ventana ES 320 automated immunohistochemical stainer and the CAS 200 image analyzer in 236 early-stage breast carcinomas: prognostic significance. *J Surg Oncol* 61: 177-184, 1996.
7. Cohen C: Image cytometric analysis in pathology. *Hum Pathol* 27: 482-493, 1996.
8. Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, Santeusanio G and Gown AM: Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 45: 1559-1565, 1997.
9. Bejar J, Sabo E, Misselevich I, Eldar S and Boss JH: Comparative study of computer-assisted image analysis and light-microscopically determined estrogen receptor status of breast carcinomas. *Arch Pathol Lab Med* 122: 346-352, 1998.
10. Mofidi R, Walsh R, Ridgway PF, *et al*: Objective measurement of breast cancer oestrogen receptor status through digital image analysis. *Eur J Surg Oncol* 29: 20-24, 2003.
11. Rothmann C, Barshack I, Gil A, Goldberg I, Kopolovic J and Malik Z: Potential use of spectral image analysis for the quantitative evaluation of estrogen receptors in breast cancer. *Histol Histopathol* 15: 1051-1057, 2000.
12. Vesoulis Z, Rajappannair L, Define L, Beach J, Schnell B and Myers S: Quantitative image analysis of estrogen receptors in breast fine needle aspiration biopsies. *Anal Quant Cytol Histol* 26: 323-330, 2004.
13. Fisher ER, Anderson S, Dean S, *et al*: Solving the dilemma of the immunohistochemical and other methods used for scoring estrogen receptor and progesterone receptor in patients with invasive breast carcinoma. *Cancer* 103: 164-173, 2005.
14. Gokhale S, Rosen D, Sneige N, *et al*: Assessment of two automated imaging systems in evaluating estrogen receptor status in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 15: 451-455, 2007.
15. Hatanaka Y, Hashizume K, Nitta K, Kato T, Itoh I and Tani Y: Cytometrical image analysis for immunohistochemical hormone receptor status in breast carcinomas. *Pathol Int* 53: 693-699, 2003.
16. Diaz LK, Sahin A and Sneige N: Interobserver agreement for estrogen receptor immunohistochemical analysis in breast cancer: a comparison of manual and computer-assisted scoring methods. *Ann Diagn Pathol* 8: 23-27, 2004.

分子病理診断の標準化と精度管理

畑中 豊* 久保田佳奈子*
松野吉宏*

はじめに

タンパクや核酸分子の状態把握のために行われる免疫組織化学 immunohistochemistry (IHC) 法や *in situ* ハイブリダイゼーション *in situ* hybridization (ISH) 法は、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE 検体) を対象とした検索において日常病理診断上欠くことのできない検査手法となっている。1990年頃より普及が進んだ IHC 法は、2000年以降の自動化の流れにより、多くの施設でルーチン検査^{注1}として本格的に導入され、現在では腫瘍鑑別や悪性度評価、病原体の同定等の補助診断法として一般化している。また分子標的治療の登場を契機に、IHC 検査や ISH 検査は治療対象患者の選別に用いられるようになった。こうした標的分子の有無や異常を検出する検査薬を治療薬と組み合わせて行う併用的診断はコンパニオン診断と呼ばれ、がん個別化医療の中心的役割を担っている¹⁾。さらに近年、遺伝子変異検査などの体細胞遺伝子検査^{注2}においても、FFPE 検体が利用されるようになり、対象材料 (パラフィンブロック) の選択、腫瘍細胞をエンリッチする場合の核酸抽出エリアの特定等に病理医が携わるようになった。最近では体細胞遺伝子検査を病理診断部門で実施、もしくは窓口となり外注するケースが増えつつある。こうした FFPE 検体を用いた検査が分子病理診断の柱をなす一方で、これら検査の標準化や精度管理は十分とはいえず、一部の検査項目を除き本格的な取り組みが必要となってきた。

本稿では分子病理診断で行われている検査のうち FFPE 検体を用いる検査にフォーカスし、それら検査における標準化や精度管理の問題点について述べるとともに改善に向けた取り組みについて紹介する。

*北海道大学病院病理部/北海道大学大学院医学研究科分子病理診断学

I. 分子病理診断に用いられる検査の現状

一般に検査は、プレアナリシス段階 pre-analytic phase, アナリシス段階 analytic phase, ポストアナリシス段階 post-analytic phase の三段階に大別され、検査の標準化を含め精度管理を実践する上で重要な分類となっている²⁻³⁾。これを踏まえ FFPE 検体を用いた分子病理診断として現在実施されている検査とそれらの各段階における作業を表1にまとめた。特にアナリシス段階において、組織切片上で反応を進める IHC 検査や ISH 検査は概ね手法が画一化されているのに対し、核酸抽出サンプルを用いて行う体細胞遺伝子検査では多くの手法が用いられており、状況が大きく異なる。これら検査の保険適用状況を表2に示す。分子病理診断において、コンパニオン診断を目的とした項目は、IHC 検査では estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), HER2, EGFR, ISH 検査では HER2のみとごく一部ではあるものの、これら検査は全て臨床妥当性が確認され標準化された体外診断用医薬品 *in vitro* diagnostics (IVD) が使用されており、また診療報酬点数表では個別の項目と保険点数が設定されている。一方、体細胞遺伝子検査の多くは IVD 未承認の研究用試薬で実施されており、点数表上は個

注1: 平成20年の診療報酬改定において病理診断が第3部 検査から第13部へ新設移行されたことに伴い、診療報酬点数表上は IHC 法や ISH 法を用いた検索は「染色」や「標本作製」の用語が適用されるようになったが、国際的にこれら検索には通常「test」や「testing」といった用語が用いられているため本稿では「検査」という用語を使用した。

注2: 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS)・専門家委員会では、これまで一般に用いられてきた「遺伝子検査」の総称を「遺伝子関連検査」とし、さらにこれを「病原体遺伝子検査」「ヒト体細胞遺伝子検査」「ヒト遺伝学的検査 (生殖細胞系列遺伝子検査)」へと分類・定義したため、これらの用語を使用した。

表1 分子病理診断で用いられる検査とその段階別の作業

検査段階	〈組織タンパク関連検査〉 IHC 検査	〈組織遺伝子関連検査〉 ISH 検査	〈遺伝子関連検査〉 体細胞遺伝子検査
プレアナリシス段階 [作製作業]	検体採取 → 切り出し → ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック作製		
	切片作製	切片作製	(切片作製 →) 核酸抽出
アナリシス段階 [解析作業]	IHC 法 ・前処理 (抗原賦活処理) ・検出 (染色)	FISH 法, BRISH 法 ・前処理 ・検出 (染色)	Direct sequence 法 Scorpion-ARMS 法 PNA-LNA PCR clamp 法 PCR-invader 法 Cycleave 法 Luminex 法 PCR-SSCP 法 など
ポストアナリシス段階 [判定・診断作業]	定性的判定 半定量的判定 定量的 (計数的) 判定	定量的 (計数的) 判定	各基準に準じた判定

[] は分子病理診断の場合の主な作業。

表2 主な分子病理診断関連の検査項目と保険適用

カテゴリー	〈組織タンパク関連検査〉 IHC 検査	〈組織遺伝子関連検査〉 ISH 検査	〈遺伝子関連検査〉 体細胞遺伝子検査
コンパニオン診断項目	第13部 N002 1' 720点 ER (乳癌) 第13部 N002 2 690点 PgR (乳癌) 第13部 N002 3 690点 HER2 (乳癌・胃癌) 第13部 N002 4 690点 EGFR (大腸癌)	第13部 N005 2,500点 HER2 (乳癌・胃癌)	第3部 D004-2 1 2,000点 悪性腫瘍遺伝子検査 ・肺癌 (EGFR) ・大腸癌 (KRAS) ・GIST (KIT, PDGFRA)
補助診断項目	第13部 N002 5 400点 その他 ※4種類以上の抗体を用いた場合は1,600点を加算	第3部 D004-2 1 2,000点 悪性腫瘍遺伝子検査 ・骨軟部腫瘍 ※脳腫瘍や悪性リンパ腫なども対象となる場合がある	第3部 D006-6 2,400点 免疫関連遺伝子再構成 ・悪性リンパ腫 (IgH, TCR) 第3部 D004-2 1 2,000点 悪性腫瘍遺伝子検査 ・肺癌 (KRAS)

別項目化されていない。補助診断項目においてはいずれの検査においても IVD 承認品が皆無に近い状況にあり、その多くはやはり研究用試薬で実施されている。特に IHC 検査は、研究用試薬として市販されている特異抗体を入手すれば、検査として取り入れることが容易なことから、多くの施設で100項目以上の検査が日常行われており、そのため検査と研究の境界がわかりづらくなっている。

II. IHC 検査の標準化と精度管理

1. IHC 検査の現状把握

本検査における標準化と精度管理については、前述のとおりコンパニオン診断項目と補助診断項目では状

況が大きく異なる。ER, PgR, HER2などのコンパニオン診断項目は、体外診断用医薬品の使用や標準化プロトコルの遵守などが進んだことで標準化は浸透し、現在取り組みの中心は検査の精度管理を含め、診断精度向上へと移行している(次項参照)。これに対し補助診断項目はその大部分が研究用試薬を用いて行われている上、抗原賦活処理や染色といったアナリシス段階の作業が各施設の状況に合わせカスタマイズされたために多様化してしまっており、研究手法のような検査形態をとっている。それゆえ補助診断項目部分の標準化は大きな遅れをとっているが、各項目の検査実施件数やその施設間差などの実態が把握できていない状況にあり、取り組みへの足がかりが見出しにくくなっている。

表3 IHC 検査実施件数の上位40項目

順位	IHC 検査項目	平均年間 実施件数	検査 占有率(%)
1	Ki-67	357	6.5
2	p53	243	10.9
3	cytokeratin (pan)	227	15.0
4	D2-40	223	19.0
5	CD20	213	22.9
6	CD3	209	26.7
7	estrogen receptor	195	30.2
8	progesterone receptor	187	33.6
9	HER2	173	36.7
10	CD34	149	39.4
11	CD79a	140	42.0
12	CD10	134	44.4
13	α -SMA	134	46.8
14	S100	132	49.2
15	CD68 (KPI, PGM1)	106	51.2
16	cytokeratin 7	104	53.0
17	BCL2	97	54.8
18	CD56 (NCAM)	95	56.5
19	p63	90	58.1
20	CD5	87	59.7
21	cytokeratin 20	82	61.2
22	synaptophysin	77	62.6
23	vimentin	75	64.0
24	chromogranin A	75	65.3
25	TTF-1	74	66.6
26	desmin	70	67.9
27	CK-HMW (34 β E12)	63	69.1
28	CD31	54	70.0
29	EMA (E29)	49	70.9
30	CD117/KIT	48	71.8
31	cyclin D1	47	72.7
32	CK-LMW (CAM5.2)	46	73.5
33	PIN cocktail	42	74.3
34	CD30/Ki-1	41	75.0
35	myeloperoxidase	37	75.7
36	CD4	37	76.3
37	CEA	37	77.0
38	cytokeratin 5/6	36	77.7
39	kappa chain	36	78.3
40	lambda chain	36	79.0

こうした背景から、我々は厚生労働省がん研究助成金「がん診療を標準化するための病理診断基準の確立」に関する研究班(長谷川班)で平成19年度にパイロット調査を行い、さらにこれを踏まえ平成22年度に本調査を後継班であるがん研究開発費研究班(津田班)において実施した。この調査は国内24施設(このうちがん拠点病院は21施設)を対象にIHC検査項目別の実施件数に関する実態調査を行った。全対象施設から集計したIHC検査実施項目の総数は284項目(施設別の年間実施項目数では最少の施設は65項目、最多の施設は186項目)であった。284項目のうち上位

40項目とその累積検査占有率を表3に示した。上位項目にはコンパニオン診断項目(ER, PgR, HER2)が含まれるほか、補助診断項目では悪性度評価・良悪性鑑別(Ki-67, p53など)、脈管同定(podoplanin/D2-40, CD34など)、悪性リンパ腫、神経内分泌腫瘍、消化管間質腫瘍や軟部腫瘍の鑑別、原発臓器推定等に関わるマーカーやパネルが含まれ、パネルについては平成22年の診療報酬改定で1,600点加算の対象となっている(「N002 免疫染色(免疫抗体法)病理組織標本作製」に関する通知)。24施設の平均年間IHC検査実施件数は約5,500件で、上位30項目で全体の約70%、上位40項目で全体の約80%、上位60項目で全体の約90%を占めており、少なくとも上位40~60項目がルーチン検査上の必須項目とみなせるように思われた⁴⁾。

2. IHC 検査標準化への取り組み

IHC検査は長らく保険点数が低い状況が続き、さらにこの10年の自動化の浸透はさらに検査コストを上げることになり、検査現場ではコスト抑制のための技術的対応を余儀なくされていた。特に特異抗体試薬については、精度管理上予め最適化された ready-to-use (RTU) タイプの抗体試薬の使用が望ましいにもかかわらずコスト面から敬遠され、低コスト化が可能な精製抗体がこれまで好んで使用されてきた。つまり各施設での染色条件検討や希釈作業の実施、使用期限を越えた凍結保管など、試薬コスト抑制への努力が行われていた反面、これを人的コストでまかなうといった構造が続いていた。しかし平成22年の診療報酬改定でIHC検査の補助診断項目は400点への引き上げ、そして対象疾患が限定されているとはいえ4項目以上の場合は1,600点の加算とプラス改定が行われ、十分とはいえないものの、ようやく標準化の議論が可能な状況となった。今後はこれを契機に、コンパニオン診断用試薬と同様に、RTUタイプの抗体試薬の使用などが望まれる。またこうした試薬は、通常専用の抗原賦活処理試薬と検出試薬、そして完全自動化された免疫染色機との一体的使用が前提となっており、アナリシス段階の標準化では、これを念頭に置くことが肝要である。

一方規制面においても大きな問題が横たわっている。保険診療上実施される検査では体外診断用医薬品の使用が原則となっているが、RTU抗体を含め抗体試薬の多くは前述のとおり未承認のままとなっている。病理診断領域における先発品IVDの開発は、企業の研究者、対象疾患を専門とする病理医や臨床医、その他の医学研究者などにより進められ、治験・臨床

試験などにおける臨床有用性の確認(特コンパニオン診断薬の場合), 臨床性能試験ならびに安定性試験の実施を経て薬事申請を行い, 最終的に承認取得となる⁵⁾. このとき承認品の添付文書には上記試験にて臨床妥当性が確認された検査手法が記載されることになり, 遵守すべき標準化法となる. また後発品としてIVDが開発される場合も, 先発品との相関性確認を行った後は概ね同様の流れとなる. しかしIVD承認された試薬がない項目ではこうしたプロセスを経ないため方法は標準化されないままとなり, 未承認試薬間の性能差についても把握されないまま検査が実施されているのが実情である.

前述の上位項目のうち, 補助診断項目でIVDとして承認が得られている項目は, CD20, CD3, pan-cytokeratin (CK), vimentin, S100, desmin, kappa/lambda chainなど10項目にも満たない状況であり, 検査件数が多いKi-67やpodoplanin/D2-40をはじめ大部分の補助診断項目は今も研究用試薬として用いられている. 現在市販されているRTU抗体試薬の多くは欧米で既に承認が得られたものが輸入されているため, 染色性は一定レベル担保され実用上問題はないように思われるが, 高額な規制関連コストや市場環境などの問題を抱える現状では, 今後も本邦での承認申請は進まない状況が続くことが予想され憂慮すべき状況にある.

3. IHC検査精度管理への取り組み

一般に検査, 特にアナリシス段階の精度保証 quality assuranceは施設内で検査手法の管理を行う内部精度管理 internal quality controlと検査データの施設間差の調査・管理を行う外部精度評価 external quality assessmentに大別され⁶⁾, 両面での取り組みが不可欠となる. 本邦のIHC検査においては, 後者は十分に体制が整備されていないことから, 精度管理は現状内部精度管理に頼らざるをえない状況となっている. アナリシス段階の内部精度管理には標準物質に相当する陽性コントロール組織の利用が重要となる. 前述の津田班の調査研究の際に並行して行ったアンケート調査では, 86%の施設がIHC検査時に陽性コントロール組織を使用しているものの, 全てのIHC検査に対し行っている施設は14%にとどまっている. また陽性コントロール組織を使用する形態は, 検体組織と同一スライド上に配置するかたちを採用している施設は50%, 検体組織と陽性コントロール組織を各々染色するかたちを採用している施設は38%, 両方を採用している施設は12%であった⁴⁾.

当院では2000年頃より全てのIHC検査において, 検体組織と同一スライド上に陽性コントロール組織を配置する内部精度管理を開始し, 2010年より組織マイクロアレイ(TMA)の利用を開始した. また津田班における研究の一環として, IHC検査実施件数上位項目に対応できる陽性コントロールTMAのデザインについて検討を行っており, 搭載するコア数や組織の組み合わせについて全身主要臓器からなる組織マイクロアレイを作製し, データの集積を現在進めている(図1).

III. 組織ISH検査の標準化と精度管理

コンパニオン診断項目として実施されているHER2を除外すると, その他の項目は未だ研究的要素を残したまま検査が実施されており, 標準化や精度管理は議論しにくい状況となっている. ISH検査のほとんど全ては現在FISH法で実施されている. 自動化が中心となっているIHC検査とは異なり, アナリシス段階の多くの処理ステップは用手法で行われており, そのため, アナリシス・エラーを招来しやすい状況にはある. 検査の成否はFISHシグナルの有無を検体組織中の内部コントロール細胞で確認することにより可能となることから, 陽性コントロール組織は必ずしも必要とはならないが, 検体組織でプレアナリシス・エラー(不適切な固定など)が起こっている場合には原因が特定できないことから, 当院ではIHC検査同様, 陽性コントロール組織を検体組織と同一スライド上に配置しFISH染色を行っている.

一方, ポストアナリシス段階においては, FISHシグナルのカウント作業は検査精度に大きな影響を与える要因の一つとなっている. ISH検査は遺伝子増幅の判定を行うほか, 悪性リンパ腫や軟部腫瘍でみられる相互転座や脳腫瘍1p/19qのように染色体欠失を検出・判定する場合にも用いられる. 判定方法にあたっては解析する腫瘍細胞数, 陽性のカットオフ(異常細胞の割合), 相互転座判定については分離シグナル間の距離など基準設定が重要となるが, 特に相互転座や染色体欠失の判定においては, 検査基準に関するコンセンサスはほとんど得られていない. またFISHの判定は暗視野で限られたエリアのみを対象に行い, さらに解析対象となる細胞核は観察者の主観で判定することから, 観察者間誤差を生じやすい. 特に胃癌のHER2遺伝子増幅など組織にheterogeneityがみられる場合, 暗視野の判定ではばらつきを生じやすくな

IV. 体細胞遺伝子検査の標準化と精度管理

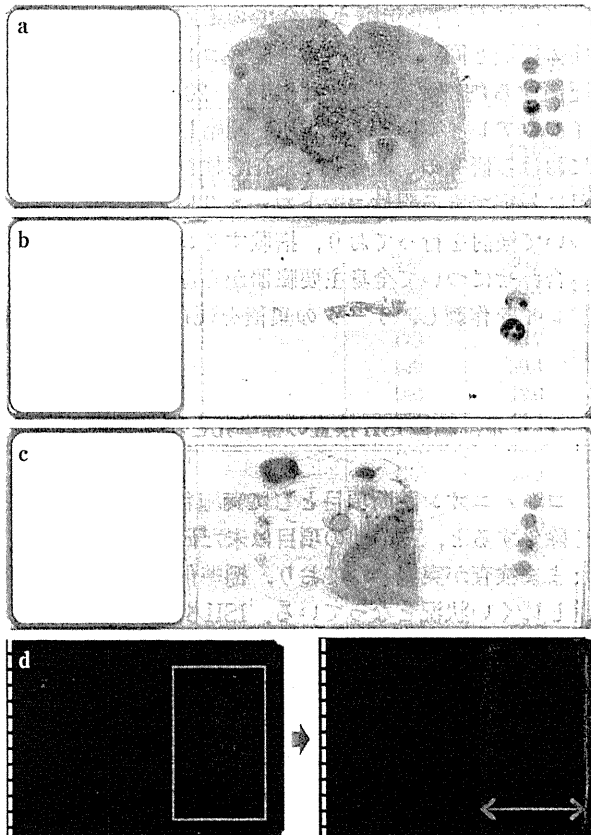


図1 内部精度管理用組織マイクロアレイ (TMA)

a, b: 現在試験的に作製・使用している補助診断項目用 TMA. 上位項目用は扁桃, 虫垂, 肝臓, 膵臓を含めたΦ2mmの8コア TMAで検討を進めている (a). また使用頻度の高い悪性リンパ腫マーカー用には扁桃と虫垂からなるΦ3mmの2コア TMAを使用している (b). これらの TMAは1週間分に相当する枚数をまとめて薄切し, スライドグラスに TMAを事前に載せた状態で保管するようにし負担軽減を図っている.

c, d: コンパニオン診断用は HER2, ER, PgR, EGFRの4項目をカバーした4コア TMA (乳癌3コアと大腸癌1コア) を作製し使用している (c). これらの項目ではより厳密な管理が求められるため, 薄切後の切片にパラフィンコーティング (dの両矢印, 写真ではカケンジェネックス社のパラメートを使用) を行い, 酸化による劣化を防止し, また長期保存可能な状態にしている.

る. 最近では IHC 法と同様にアナリシス段階の完全自動化とポストアナリシス段階での明視野観察が可能となった明視野 ISH (bright-field *in situ* hybridization: BRISH) が HER2 など一部の項目で実用化され, 本邦でも先ごろ承認された. ISH 検査の標準化や精度管理上の利点の多い技術であることから今後の普及が見込まれる.

近年大腸癌 KRAS 変異検査や肺癌 EGFR 変異検査など体細胞遺伝子検査において FFPE 検体を用いた検査が急増している. 国内の体細胞遺伝子検査のアナリシス段階は, その大部分が大手検査センターにおいて集約的に実施されている状況にある. 肺癌 EGFR 変異検査など検査項目によっては各検査センターで採用されている検査手法が異なるため, 検査センターごとに検査の標準化が行われ, またこれに則った精度管理も日常厳密に行われている. それゆえこの段階の検査精度は現在のところ一定水準を維持しているといえる. 一方で核酸を対象とする検査はとりわけプレアナリシス段階の影響を受けやすいことから, FFPE 検体の作製プロセスは検査の成否を決定する極めて重要な段階といえる. 体細胞遺伝子検査では, 抗体や核酸プローブとの反応性回復を目的とした賦活処理を行うことができないため, 深刻な核酸断片化はそのままアナリシス段階の PCR 反応へ影響を与え致命的となる. それゆえホルマリン固定などにより受ける影響は賦活処理が可能な IHC 検査や ISH 検査に比べ大きいといえ, 今後の FFPE 検体作製にあたっては遺伝子関連検査での使用も十分念頭に置き作業を行う必要がある.

こうした状況のなか, 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS) ・遺伝子関連検査標準化専門委員会では, 検体の品質管理による検査精度確保を目的とし「遺伝子関連検査の検体品質管理マニュアル」を策定し 2009 年に公表した⁷⁾. 本マニュアルは 2009 年 2 月の厚生労働省の先進医療専門家委員会で先進医療申請において遵守すべき要件として採択されている. また現在, 同委員会では産学からなるワーキンググループを設け, 血液検体, 喀痰検体, 組織検体を柱とした遺伝子関連検査のプレアナリシスに関する情報収集と検証作業を行っており, 本活動の一環として我々は組織検体に関する検討を進めている. この検証作業での課題の一つに, 検体の品質に関する指標の設定が挙げられる. 特に FFPE 検体の作製時に行われるホルマリン固定は核酸断片化への影響が大きく, 検体の品質を事前評価できることが検査上望ましい.

現段階での核酸の品質管理方法として, DNA を評価する場合は, DNA 抽出サンプルをアガロース電気泳動で確認する方法や, 既知 DNA 領域の PCR 増幅の成否をみる方法, リアルタイム PCR 法を用いた増

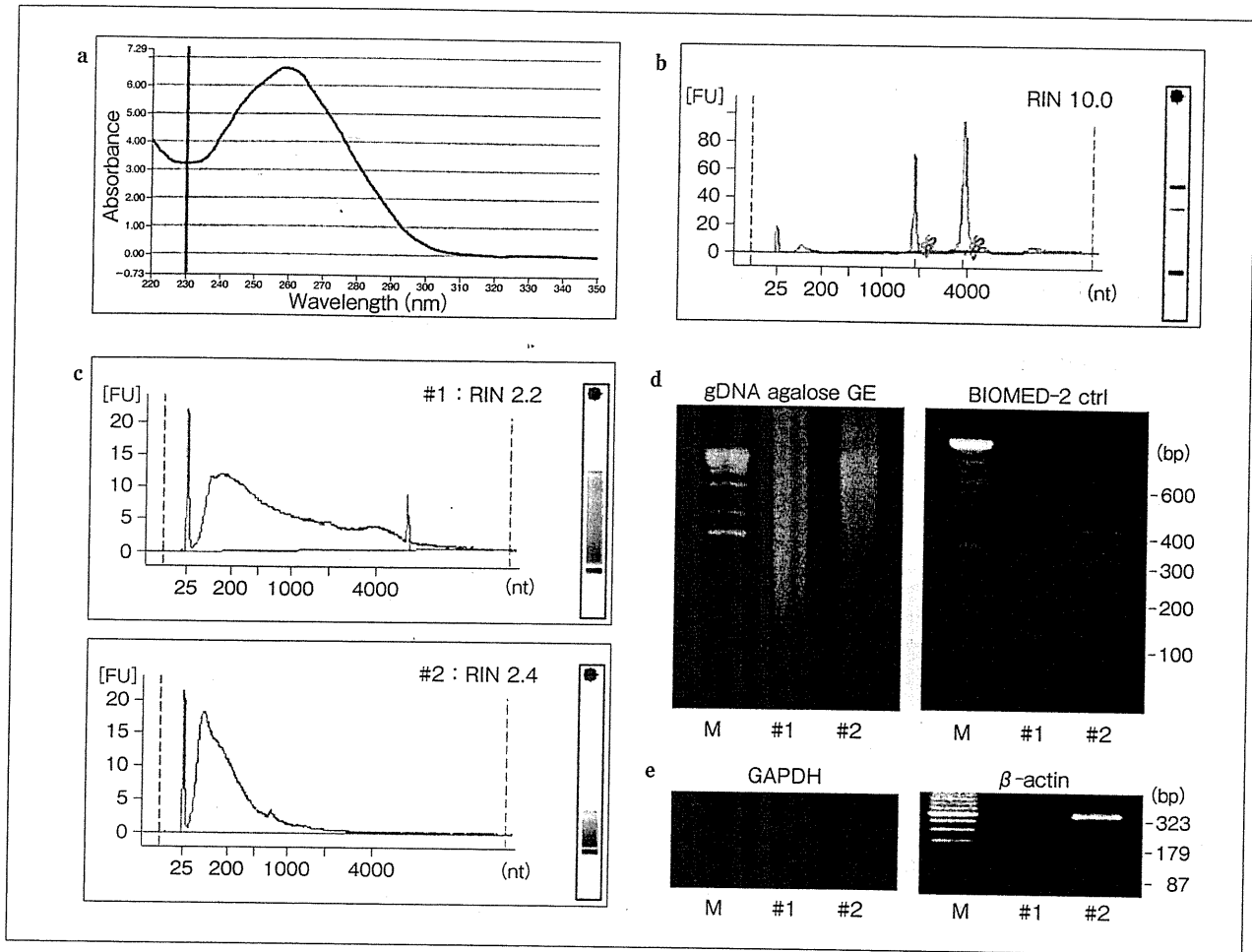


図2 核酸の品質評価 a: 吸光度 A260/A280 比による核酸品質確認. カラム法を用いた FFPE 検体からの DNA 抽出液では比はおよそ 1.9~2.1 となる (JCCLS・遺伝子関連検査標準化専門委員会調査). 抽出に問題があった場合は A230 の値が高値を示すため A260/A230 比が低くなる場合があるため, この比の確認も必要である. b: マイクロチップ型電気泳動装置を用いた RIN 値による RNA 品質確認. 培養細胞などから良好に RNA 抽出ができた場合などは高い RIN 値を示す. c: RIN 値を用いた FFPE 検体等の品質確認. 通常の FFPE 検体ではしばしば RIN 値は低値を示す (上段, #1). 核酸安定性が高いとされるアルコール系固定液 (ここではキアゲン社の PAXgene を使用) で固定したパラフィン検体でも RIN 値は同程度となり (下段, #2), こうした検体の品質評価に RIN 値は適していないようである. d: DNA の品質確認. 従来から用いられている抽出ゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動と BIOMED-2 コントロール・プライマー・セットを用いたマルチプレックス PCR の結果. サンプル #1 に比べ #2 のほうが DNA 断片化の程度が低く, 特に PCR の結果では 400bp のサイズの増幅で差が顕著である. e: ハウスキーピング遺伝子 RT-PCR による RNA の品質確認. GAPDH (108bp) と β -actin (87, 179, 323bp) のうち, 長いサイズ (β -actin 323bp) において #1 と #2 間の差が確認可能である.

幅速度の状態により評価する方法が挙げられる. 一方 RNA を評価する場合は, 精製した RNA の純度を吸光度 A260/A280 比により確認する方法, rRNA, GAPDH, β -actin などのハウスキーピング遺伝子の発現状態を RT-PCR 法により確認する方法, 28S/18S rRNA の比を確認する方法が知られている⁶⁾. 近年マイクロアレイ研究の普及に伴い, 解析サンプルの核酸断片化をみる指標として, RNA integrity number (RIN) 値の使用が研究領域で一般化しつつある⁸⁾ (図

2). RIN 値はマイクロチップ型電気泳動装置 (Agilent2100 バイオアナライザ) を用いて得られる 18S や 28S rRNA やその分解物のエレクトロフェログラムをデジタル解析し RNA の分解度をアルゴリズムにより算出した数値であり, RIN 値は品質の低い 1~高い 10 の 10 段階で表される. RIN 値はしばしば FFPE 検体の品質の確認に用いられるが, 臨床材料で用いる場合には固定条件などが良く, 保存状態が比較的良い場合であってもしばしば低値を示すことから, 新鮮材料の

わずかな品質劣化を検出する場合とは異なり、相対的に品質が低い FFPE 検体の場合はそのまま適用することは難しく、従来から用いられている方法のほうが品質の差を見極めやすい(図2)。欧州では FFPE 検体からの核酸抽出の多施設間比較に関する検討が、欧州委員会が支援する研究プロジェクトで行われている。この検討では DNA の品質の確認に欧州共同研究プロジェクト BIOMED-2 において検討された BIOMED-2 control gene primer set が使用されており⁹⁾、現在我々も検証に取り入れている。

おわりに

分子病理診断およびこれに用いられる検査は今後も拡大し重要性を増していくことは必至である。特に検査の件数はコンパニオン診断薬や診断に有用な新規試薬の開発・上市の急拡大とともに近年急速な伸びをみせている一方、それら検査の標準化や精度管理は大きな遅れをとっている。適切な分子病理診断はより正確な患者の層別化や治療の個別化を可能にし、これにより医療の質や効率化の向上、ひいては医療費削減などの医療経済面にも大きなインパクトを与える。こうした状況を踏まえ、分子病理診断で必要となる検査標準化・精度管理に関する体制づくりが急がれる。

文 献

- 1) 畑中 豊, 松野吉宏: 治療薬開発およびコンパニオン診断薬との同時開発の現状と今後—体外診断用医薬品の開発と承認申請. 技術情報協会, 2010
- 2) Nakhleh, R.E.: What is quality in surgical pathology? J Clin Pathol 2006, 59: 669-672
- 3) 真鍋俊明, 三上芳喜: 病理の精度管理. 病理学と社会, 病理と臨床 2009, 27(臨増): 42-50
- 4) 畑中 豊, 松野吉宏: 未発表データ
- 5) 日本臨床検査薬協会(編): 体外診断用医薬品取扱い指針, 第5版, じほう, 東京, 2007
- 6) 大澤 進, 深津俊明, 永峰康孝 他: 臨床検査学講座 検査管理総論, 第4版. 医歯薬出版, 東京, 2010
- 7) 日本臨床検査標準協議会, 遺伝子関連検査標準化専門委員会(編): 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル(暫定文書). 日本臨床検査標準協議会, 東京, 2009
- 8) Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S. et al.: The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. BMC Mol Biol 2006, 7: 3
- 9) van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Brüggemann, M. et al.: Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. Leukemia 2003, 17: 2257-2317



図1 バーチャルスライドシステム
アピリオ社 ScanScope (CS).

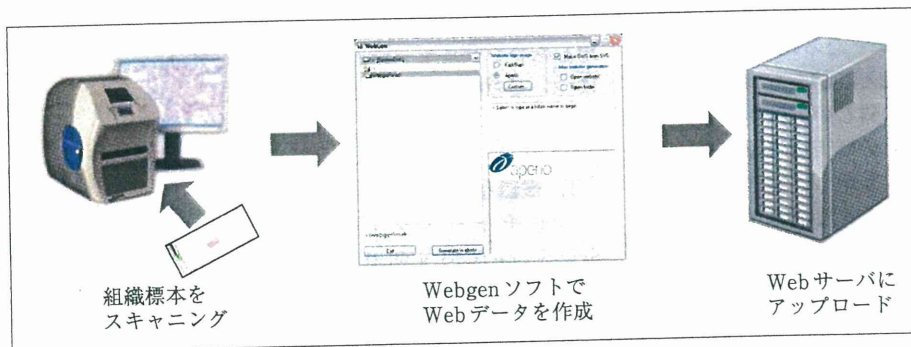


図2 VSデータ処理の流れ

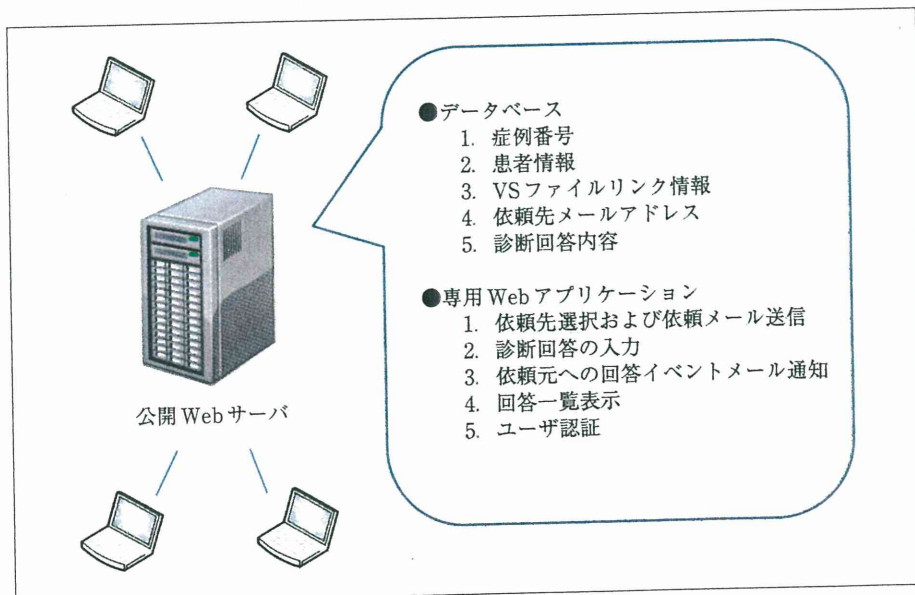


図3 システム仕様の概要

る WebScope を利用した (どちらもアピリオ社製)。その理由として、① ImageScope は Windows のみ対応しており、Macintosh では利用できない、② ImageScope で開く

VS データ自体を直接 Web 上で扱えない、③ ImageScope と同様に、WebScope であっても拡大、縮小、画像移動が可能で診断機能として十分機能することが挙げられる。今

回のシステムを利用する以前は、VSデータと閲覧ソフトの用意を行っていたが、WebScopeであれば依頼先のPC環境を選ばず、また設定準備の必要がないため、この方法を採用した。

4. コンサルテーションシステムの流れ

依頼者は、組織標本をスキャニングしてサーバへ保存し、コンサルテーションシステムの画面上で患者情報を入力し、該当するVSを指定する。必要に応じてVSは5枚、静止画像は3枚まで提示できるので、皮膚や腫瘍などのマクロ像や手術所見などを判断材料として利用することが可能である。また、登録してある病理医のなかから一度に最大10名の病理医へ依頼送信が可能である。

診断依頼のメールを受信した病理医は、ID・パスワードでシステムへアクセスする。患者情報を確認し、VSを観察して診断結果や根拠など必要なデータを入力し、送信する(図4~6)。

依頼者はメールで診断結果を受信し、システムの管理画面より回答を確認する。複数の病理医へ依頼を行い、回答が自分の考えと異なる場合であっても、最終的に自分の責任で診断を下す。

II. 結果

具体的な症例を提示する。1例目は42歳女性の子宮頸部の組織で癌を疑う症例である。一部に高度の異型を認めたため、院内(岩手医大)を含めて北は北海道、南は沖縄までの全国6施設の病理医にコンサルテーションを依頼し

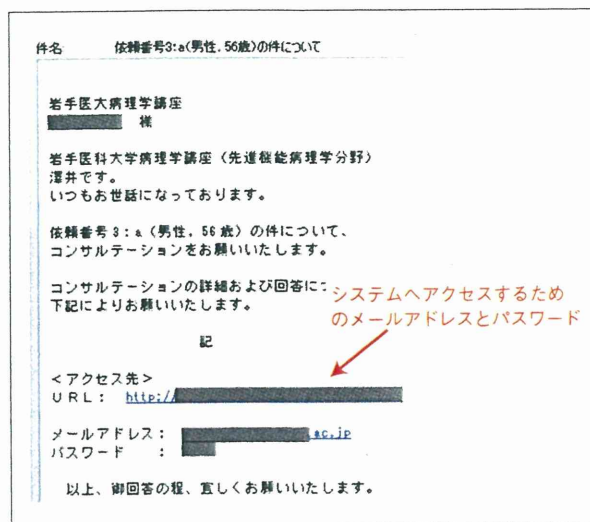
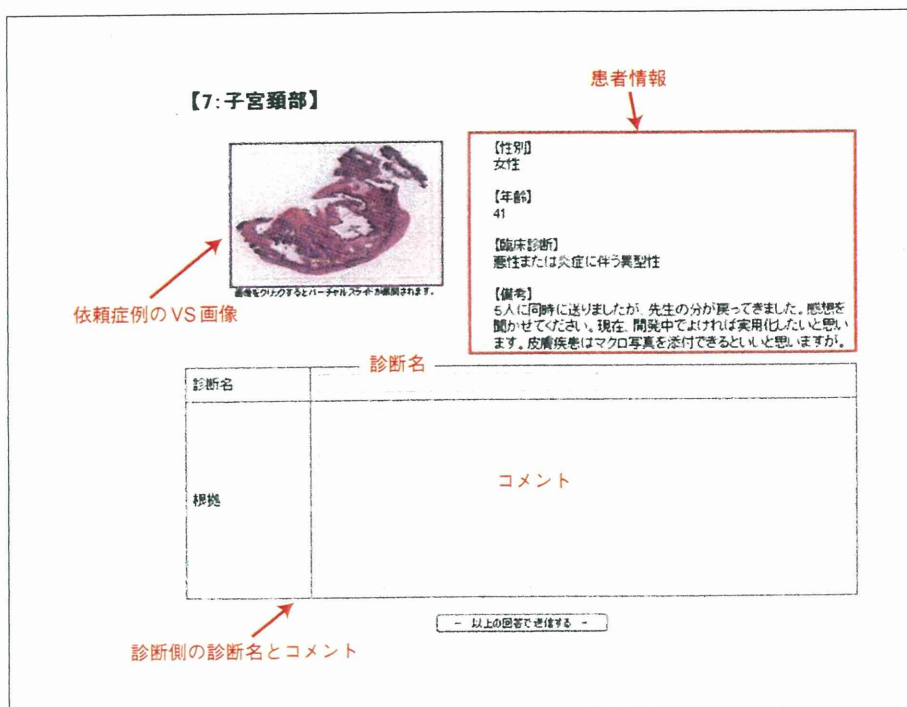


図4 診断依頼メール システムから診断メールを受信する。

た。早い例では10分、遅い例でも10時間、平均6時間で回答があり、“CIN2”と診断したのは2名、あとの4名の診断は“CIN1”であった。最終的な責任は依頼側にあるため検討した結果、“CIN2”にして“十分な追跡が必要である”と診断し、臨床側に回答した。もちろん、初めに6人の病理医に対しては、複数の病理医にコンサルテーションを行うことを付け添えている。

図5 依頼内容画面 システムへアクセスすると、患者情報が提示される。



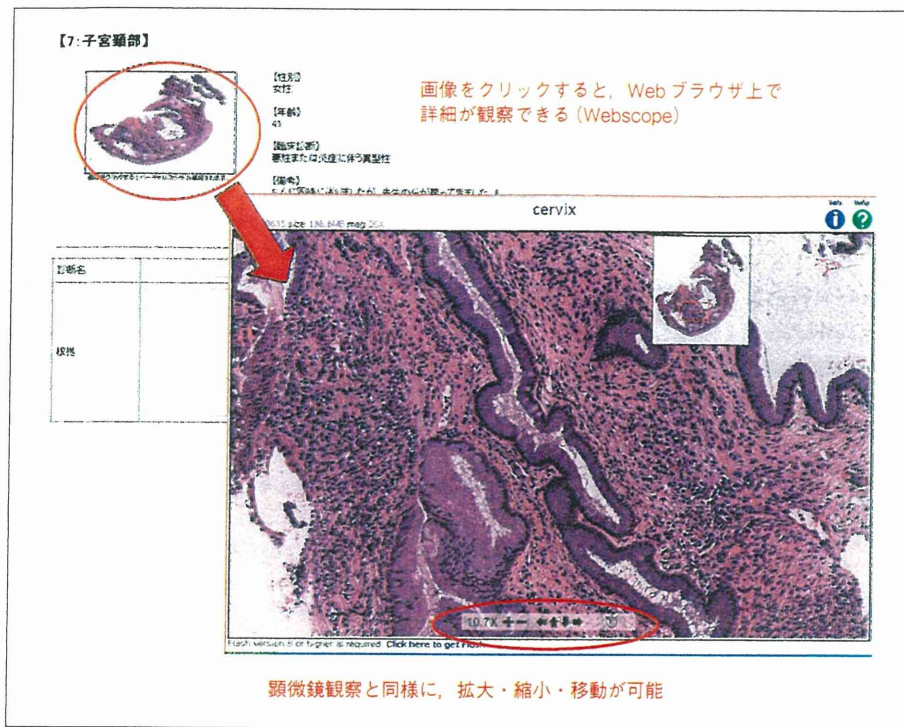


図6 VS画面 画面(サムネイル画像)をクリックすると、Webブラウザ上でVSが開く。

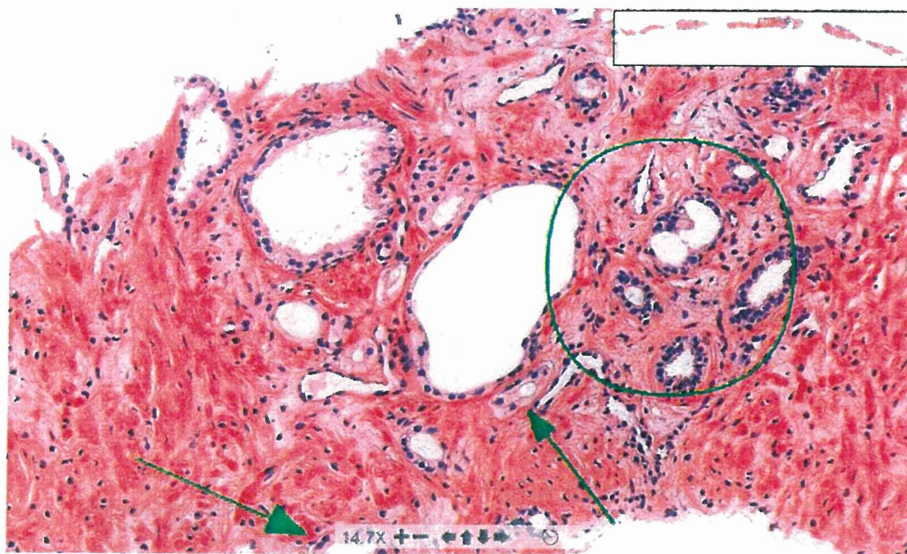


図7 アノテーションを提示 丸, あるいは矢印で表示が可能。

2例目は前立腺組織の症例である。細胞および核に異型は認めなかったが、小型腺管の上皮に二層構造を欠いていたため、本邦の前立腺の専門病理医へコンサルテーションを依頼した。当初、20倍で取り込んだVSで診断を依頼したが、核の性状が不鮮明であるということで、40倍で取り込んだ画像を再度送信した。その後、問題となる腺管のアノテーションや34βE12の免疫染色を依頼されたので、それに従って画像を取り込み送信した(図7, 8)。その結

果、依頼した専門病理医から“軽度異型の上皮”という診断を受け、我々も自分たちの責任のもとに“異形成”と診断した。この前立腺組織のコンサルテーションにおいては、数回のやり取りの中でも早いものでは15分で回答があり、3日間程で全てが終了した。

このような方法でこれまで子宮頸部、前立腺、肺など良悪性のコンサルテーションを23症例行っている(表1)。

図8 免疫染色を提示 問題の箇所を矢印で表示した。

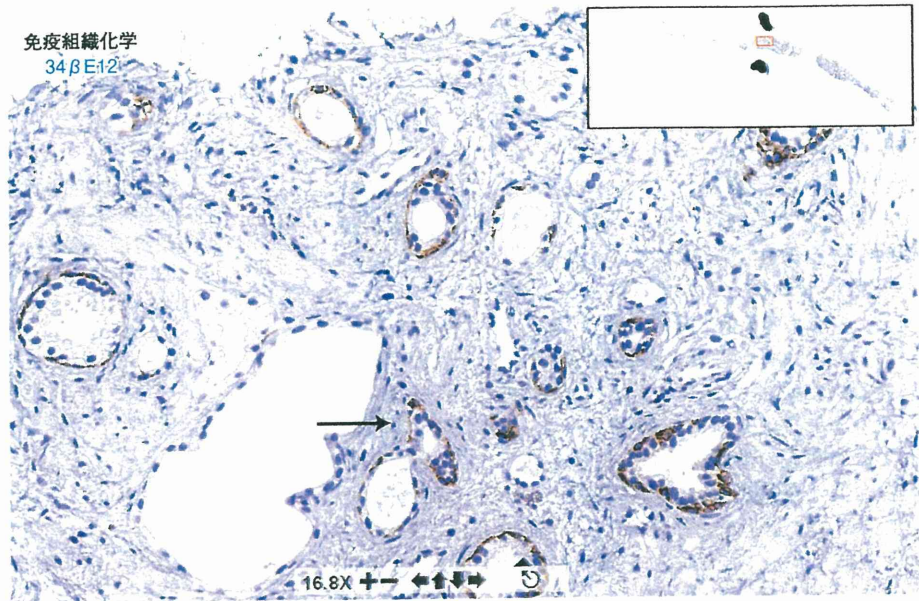
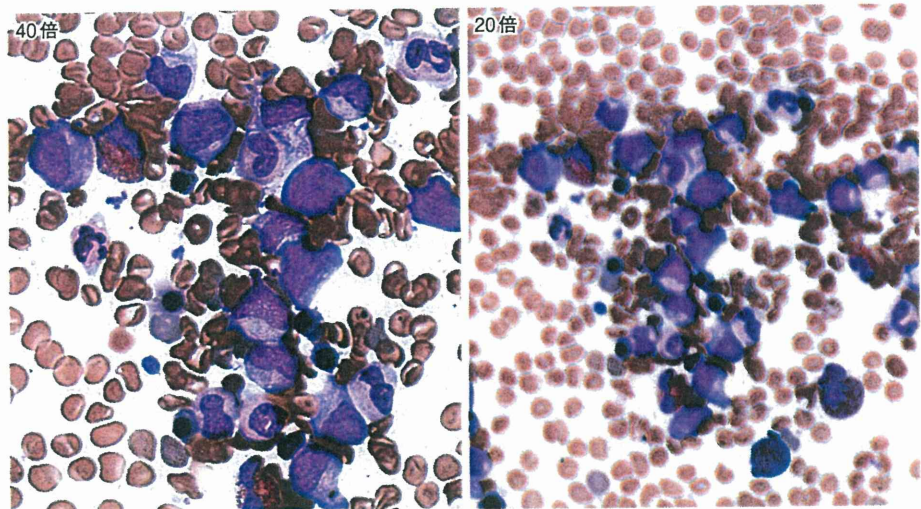


図9 血液像でみる20倍と40倍の比較



Ⅲ. 考 察

今回のコンサルテーションの特徴は、プレパラートを直接送付する従来の方式を電子化した点にある。これによって、コンサルテーションに要する診断の時間、作業、送付に関する費用を大幅に短縮させただけでなく、一度に多数の病理医に対してコンサルテーションを依頼することが可能となった。また、一度のやり取りだけにとどまらず、数回のやり取りを行った前立腺症例の事例をみても、従来の直接送付と比較して時間的、経済的な効率が高いたといえる。

複数にコンサルテーションを行う場合、回答意見の差異が目されるが、今まで行ってきたコンサルテーションの

表1 これまでの実施症例

臓器	症例数	依頼医師数
子宮頸部・体部	6	15
前立腺	3	3
肺	3	7
大腸	2	1
皮膚	2	2
乳腺	1	1
十二指腸	1	2
脊椎	1	2
リンパ節	1	1
胃	1	1
副甲状腺	1	1
肝臓	1	1
合計	23	37

2009年5月～2011年3月までの症例実績。

中で大きな意見の乖離はなかった。しかし、対物レンズ20倍よりも40倍でスキャンを行った方が核の性状が鮮明になるため、確信をもって診断回答される場合が多い。40倍のスキャンに関しては、データの処理時間、サイズともに大きくなるため、コンサルテーションを円滑に行う点を考慮して通常は20倍でスキャンしている。細胞像が問題になる場合であれば、40倍スキャンは詳しい診断回答、根拠を得る有効な手段といえる(図9)。

VSシステム機を導入する場合の初期費用に関して、スキャンのための装置とそれを操作しデータ管理を行うサーバが必要となる。これらは高額機器なため、VSの普及には低価格化が必要不可欠である。2008年、厚労省はがん対策のなかでバーチャルスライドシステムの導入の推進として機器購入の半額を援助する制度を設けており、VSの普及台数は約250台と増え、医科大学の約60%に導入された⁹⁾。これにより2008年以降VSの普及は拡大したが、コンサルテーションを目的としている機関は少なく、教育、カンファランス、学会発表といった使われ方が主流である¹⁰⁾。しかし、標本を複数人で観察できる利点は大きく、教育、研究、臨床の分野で活用できるようになれば、費用対効果が得るものと思われる。また、将来VSによる病理診断が、保険診療として認められれば、使用のニーズが高まり、VSによるコンサルテーションも増えてくるものと思われる。

一般的に、インターネットを利用したコンサルテーションは、静止画像を使用して現在も世界的に行われている^{11,12)}。しかし、静止画像と比較して拡大、縮小、画像移動が可能なVSのほうが、標本観察において有用であることはいうまでもない。さらに、このシステムは、稀有、あるいは教育的に貴重な症例を多くの病理医が供覧でき、教育的な面だけでなく診断精度の向上にもつながるといえる。利用が拡大すれば、国際的なデータベースとしての活用も期待できる。

現在、国際的にみても病理医が少ないため^{13,14)}、幾つかのコンサルテーションがインターネットを介して行われているが¹⁵⁾、今回のシステムでは依頼側にバーチャルスライド機器が必要であるものの、回答側では通常のPCがあれば利用可能である。回線に関しては、光ファイバーでネットワークが接続していれば十分に操作可能であり、通信衛星などが利用できると、全世界的にVS画像を共有したコンサルテーション、カンファランスが可能となる¹⁶⁾。

IV. 結 論

VSを利用したコンサルテーションシステムは、従来の方式と比較して発送の手間、経費が削減でき、回答時間も短縮できる。光ファイバーを利用したインターネットの環境下では、国内外問わず誰にでも送信・回答が可能であるため、病理医不足の現状を補う有効な手段といえる。この

システムを今後広く活用することで、医療に対して大きく貢献できるものと思われる。

文 献

- 1) 濃沼信夫：病理医をめぐる課題と医療制度改革の展望。病理と臨床 2005, 23 : 1025-1030
- 2) 病理学会報告(Personal communication)
- 3) 長谷部孝裕(Personal communication)
- 4) Halliday, B.E., Bhattacharyya, A.K., Graham, A.R. et al. : Diagnostic accuracy of an international static-imaging telepathology consultation service. Human Pathol 1997, 28 : 17-21
- 5) 澤井高志：バーチャルスライド特集にあたって。Med Technology 2008, 36 : 792-795
- 6) 鈴木健介, 石澤 伸, 江頭玲子 他：肺の病理診断バーチャルスライドと病理診断臨床・教育・研究への応用。日本胸部臨床 2008, 67 : S214-S221
- 7) Jara-Lazaro, A.R., Thamboo, T.P., Teh, M. et al. : Digital pathology : exploring its applications in diagnostic surgical pathology practice. Pathology 2010, 42 : 512-518
- 8) Tsuchihashi, Y., Takamatsu, T., Hashimoto, Y. et al. : Use of virtual slide system for quick frozen intra-operative telepathology diagnosis in Kyoto, Japan. Diagn Pathol 2008, 3 : S6
- 9) 澤井高志：バーチャルスライドへの応用。医学のあゆみ 2010, 234 : 288-291
- 10) 澤井高志, 東福寺幾夫, 古谷敬三 他：地域医療に貢献する医師養成のためのバーチャルスライドを利用した学習ツールの開発に関する研究。平成22年度総括・分担研究報告書, 2011, 69-72
- 11) Weinstein, R.S., Bhattacharyya, A., Yu, Y.P. et al. : Pathology consultation service via the Arizona-International Telemedicine Network. Arch Anat Cytol Pathol 1995, 43 : 219-226
- 12) Brauchli, K., Oberli, H., Hurwitz, N. et al. : Diagnostic telepathology : long-term experience of a single institution. Virchows Arch 2004, 444 : 403-409
- 13) 木田正敏：今後の日本における大学の病理学講座(分野)の在り方II。米国の現状。病理と臨床 2009, 27 : 1010-1014
- 14) Sawai, T., Uzuki, M., Kamataki, A. et al. : The state of telepathology in Japan. J. Pathol Inform 2010, 1 : 13-18
- 15) Weinstein, R.S., Graham, A.R., Richter, L.C. et al. : Overview of telepathology, virtual microscopy, and whole slide imaging. Human Pathol 2009, 40 : 1057-1069
- 16) 澤井高志, 長村義之, 吉見直己 他：超高速インターネット衛星“きずな”(WINDS)を用いた遠隔病理診断(テレパソロジー)の実証実験(第2報)―岩手-東京-沖縄の3地点を結んでのバーチャルスライドによる遠隔カンファランス。医学のあゆみ 2010, 235 : 204-212

バーチャルスライドシステムを用いた病理診断支援

飯嶋達生^{*1}
松野吉宏^{*2}

はじめに

適正な医療を行うためには病理診断が必要である。近年の癌診療においても分子標的薬の進歩により病理組織標本での標的蛋白発現の有無やその発現程度の判定等、病理診断の重要性は高まっている。この増加する需要に対して本邦の病理医の数は絶対的に少なく、また地域による病理医の偏在も目立っている。例えば東京都と比較して茨城県では人口10万人あたりの病理医専門医の数が1/3以下である。また都道府県単位でも大学附属病院などに病理医が集中し、500床規模の病院でも常勤の病理医が1人しかいない医療施設が大半である¹⁾。1件の病理診断に求められる内容も医療の進歩に伴い高度となっており、「ひとり病理医」では頭の方から足の先まで全ての病理診断を的確かつ迅速に行うことが困難になってきている。病理診断件数の増加と診断内容の高度化に、特に「ひとり病理医」は孤独感を強め疲弊してきている。病理診断業務の負荷軽減を行うために様々な病理診断支援方法が考えられているが、本稿ではバーチャルスライド virtual slide (VS) を活用した病理診断支援を行う具体的な方法について述べる。

VSは病理組織画像を高精細でデジタル記録保存し、サーバーを介して遠隔地でも病理組織画像を観察でき遠隔病理診断に有用な装置である²⁾。VSは瞬時に日本国内どころか世界中の病理医とも組織画像に対して意見交換ができるが、地域内で孤立する病理医の病理診断支援には、まず地域内(県単位程度)でのVSの有効な利用法がある。

そこで本稿では地域内で孤立する病理医を支援するためにはVSをどのようにうまく利用するか、地域内

の利用方法に主眼をおいて、以下の項目の順に「術中迅速診断支援」「病理診断コンサルテーション」「免疫染色等の病理補助診断の集約化」「精度管理支援」に対する事例を紹介し、また「今後の展望」について述べる。

I. 術中迅速診断へのVSの利用

手術の精度を保証するものとして術中迅速診断は欠かすことのできないものであるが、病理医のいない医療施設では迅速診断を行うことができずにいる。迅速診断が必要な場合、従来は大学病院などの他の医療施設に依頼し、病理医を迅速診断のために派遣してもらい、迅速診断が行われているが、病理医の移動に時間をとられることが障害となっている。この点でVSのもつ病理組織画像を瞬時に遠隔地に送ることができるという利点を生かして、VSを用いた遠隔迅速診断が行われるようになってきている。これにより病理医が病理医不在の医療施設まで迅速診断をするために移動する時間が節約でき、病理医の負担を軽減し、従来は省略されていた迅速診断が行われるようになる。また病理医が常勤でいる医療施設でも、自身の臓器専門性などと異なる病変の迅速診断では、特に「ひとり病理医」は診断に不安を感じることもあり、この場合にはVSを用いることで他医療施設の病理医に即時に迅速症例のコンサルテーションを行うことができ、病理医の精神面の負荷を軽減することにも役立てることができ、岩手県では10年以上前から岩手医科大学を中心に県内の病理医不在医療施設の迅速診断をカバーするために遠隔迅速診断が行われてきたが、2004年からはVSによる遠隔迅速診断が導入され、活用されてきている^{3,4)}。また九州では佐賀大学、山陰では鳥取大学、関西では兵庫県立がんセンターなどが中心となって日本各地でバーチャルスライドを用いた遠隔迅速診断が行われるようになってきており、病理医不在の医療施設における迅速診断をカバーし、手術の質を保

*1 茨城県立中央病院・茨城県地域がんセンター病理診断科

*2 北海道大学病院病理部

証する努力がなされている。関東では東京など首都圏の交通網が発達している地域では、病理医も比較的多く、直接病理医が、病理医不在の医療施設に出向き、迅速診断を行うことが可能であるため遠隔迅速診断の要求が少ない。しかし茨城県では病理医不在医療施設まで片道1時間以上の移動時間をかけて迅速診断を行うこともあり、また茨城県では病理医の数が少ないので、直接出かけるこの方法では対応できる迅速診断の数にも限りがあるため、本来、術中迅速を行うべき手術でも、迅速診断が行われないうまとなつて手術が多くある。このため茨城県内でもVSによる遠隔迅速診断が行える体制づくりが必要と思われる。しかし茨城県を含め多くの地域でなかなかVSによる迅速診断が導入されない理由としては、①VSの機器が比較的高価であり、医療施設の側に経済的に導入がためられること、②病理医としてはVSが活用されることで、VSでの迅速診断が増加し、迅速診断に拘束されることになるのではないかという懸念があると思われる。

VSの価格問題については迅速診断に必要な機能だけ特化したVSが商品化できれば価格を抑えることが期待できると思われる。VSによる迅速診断の仕事の増加に対する病理医の懸念への対策としては、VSでの迅速診断を担当する病理医を地域内で輪番制として、1人の病理医に負担が集中しない体制をつくることなどが考えられる。

II. 病理診断コンサルテーションへのVSの応用

現在、医療の飛躍的な進歩から病理医に求められる病理診断の質は高度になり、病理医1人の自己学習、研鑽では全ての疾患領域には対応しきれなくなつてきている。複数の病理医が種々の疾患に対応できる医療施設は限られており、一般には常勤病理医のいる医療施設でも病理医の専門性によって、施設間での病理診断の質が不均等になる可能性があり、ひいては診療の質全体にも影響することが考えられる。このため病理診断の質を向上、均質化していくためには、外部への病理診断コンサルテーションは重要である。代表的なものとして日本病理学会コンサルテーションがあり、また公的機関のコンサルテーションとしては国立がん研究センターがん対策情報センター、国立循環器病研究センター、国立成育医療研究センターがある。また自治体単位や民間団体でのコンサルテーションなど様々な機関、団体で行われている。病理診断コンサル

テーションは一般には依頼情報とともにHE標本や未染標本が依頼病理医から学会等に郵送され、さらに学会等で病理診断コンサルタントに振り分けられて郵送され、コンサルタントの手元に届くことになる。その後、検鏡、診断が行われ、意見等が依頼病理医に返送されることになっている。病理診断に迅速性が要求されている中、病理標本の郵送にかかる日時を短縮するために、VSの瞬時に組織画像を送る特性がコンサルテーションに利用されるようになってきている。また最初のコンサルタントで結論がでず、さらに別のコンサルタントに診断意見を聞く必要がある場合に、従来の方法では、標本を学会等を経由してコンサルタント間で郵送することになり時間を消費することになるが、VSであれば一瞬で次のコンサルタントに組織画像を送ることができ、時間の消費を抑えて複数の診断意見を聞くことができる。さらに郵送中の標本の破損がVSの利用では生じないことも利点といえる。VSの利点を生かすことで病理診断コンサルテーションの時間短縮が可能となることから国立がん研究センターがん対策情報センターの病理診断コンサルテーション・サービスではVS画像とHE染色等の郵送が併用されている。VSを利用した場合には従来のHE染色標本の郵送に比較して、病理診断意見書の作成日数が有意に短くなつていることが国立がん研究センターの長谷部らから報告されており、病理診断コンサルテーションにおいてVSは有用であることが示されている。

しかし日常の病理診断において病理診断に幾分不安が生じるが病理学会等のコンサルテーションに送るほどではないという症例が時々ある。できれば他の病理医の意見を聞き、安心・納得できる身近なコンサルテーションシステムが要望される。従来、近隣の知り合いの病理医のもとに持ち込んで意見を聞くことになるが、そこでも結論が出にくい症例がある。このような場合や複数の病理医の意見を聞きたい場合に、県単位程度の広さの地域内で、問題症例に対する専門性の高い複数の病理医に意見を聞ける敷居の低いコンサルテーションシステムが必要となる。このシステムにもVSを導入することで遠隔地の複数の病理医が同一組織画像をみて標本に対する意見を比較的迅速に出すことができ、日常の病理診断の質を向上させることが可能となる。三重県では三重大学を中心にテレパソロジーネットワークの構築が行われており地域内でのコンサルテーションが行われてきている⁵⁾。

問題点としてはVS機器が比較的高価なことから、全ての医療施設にVSを設置するのではなく、地域内

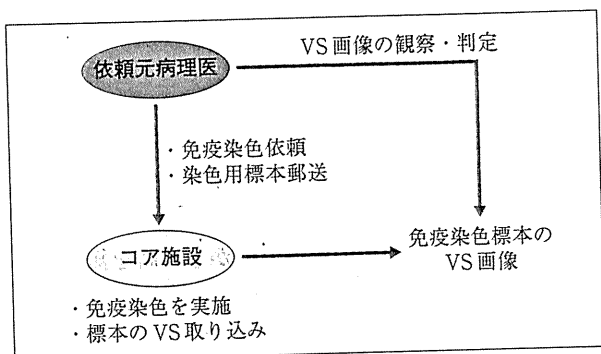


図1 VSを利用した免疫標本作製集約化での標本作製・VS画像の流れ図 各医療施設の病理医がコア施設に免疫標本作製を依頼し、コア施設では完成した標本をVSに取り込み、依頼した病理医が免疫染色のVS画像を観察して病理診断の補助とする。

(県レベル)で数カ所、コアとなる医療施設にVSを設置し、近隣の医療施設は問題症例の病理標本をコアに送り、ここでVS画像化して地域内の病理医に配信し意見を聞くシステムが考えられる。このコンサルテーションシステムの運営には地域内の病理医の緊密な連携と、大学附属病院の病理部などの病理医の比較的豊富な医療施設がリーダーシップをとっていく必要がある。

Ⅲ. 免疫染色等の業務の集約化

免疫染色や *in situ* hybridization (ISH) 等の病理補助診断法は、病理診断に必要不可欠となっている。しかし常勤病理医のいる医療施設であっても、免疫染色標本等を作製する人員の不足や、標本作製のための装置・機器、あるいは特殊な検査試薬がないなどから自施設で標本作製が行えない医療施設が少なくない。このような医療施設では検査センター等の外部機関に標本作製等を依頼することになるが、作製依頼を行ってから、依頼した病理医の手元に標本が届くまでには比較的時間がかかり、また費用がかさむ、依頼内容への対応に小回りがきかないなどの点からも、依頼すること自体を躊躇し、免疫染色等を十分行わないまま最終病理診断を報告する場合があります。その結果、免疫染色の行える医療施設と行うことのできない医療施設の間で病理診断の質に差が生じている可能性がある。解決策の一つとして先の地域内コンサルテーションに類似したシステムが考えられる。地域内の医療施設の免疫染色等の病理補助診断標本の作製を、コアの医療機関に集めて行い、作製された免疫染色等の標本画像をVSに取り込み、この画像を依頼した病理医が観察し

て病理診断の補助とする。VSを利用することで、作製された標本の郵送にかかる時間が短縮され、その分、病理診断が迅速に行われることになる。コア施設と依頼した病理医での標本、VS画像のやりとりは図1のようになり、従来の検査センター等外部機関への標本作製と異なる点はVSを利用している点である。地域内での免疫染色等の標本作製をコア施設で行うことで、従来、免疫染色等が行えなかった医療施設の病理医にも免疫染色等の標本による病理補助診断が加えられることで、より質の高い病理診断が行え、病理診断の医療施設間の差を減らすことになると考えられる。特にVSを導入することで免疫染色標本の画像を迅速に病理医が観察できることで、病理診断書作成の日数が短くできることは意義が大きいと考えられる。また時間の短縮のみでなく、既にVS画像となっている点で、この症例を遠隔地の他の病理医にコンサルテーションするとき、即座にコンサルタントにVS画像を閲覧してもらい意見を聞くことができる点も利点と考えられる。

さらに免疫標本等の作製業務を地域内のコア施設で行うことで、免疫染色等の標本作製に関わる人員や機器、器具、試薬の集約化を進めることが可能になり医療資源を効率的に活用することができると思われる。特に年に1~2回しか使用しない抗体などは、1つの医療施設では経済的理由から購入がためられるが、多数の施設から免疫染色標本作製を受けるコア施設では、使用頻度が高くなり、利用することが可能となる。

また免疫染色標本等の作製をコア施設に集約化することで均一な高品質の標本作製を行うことができ標本作製の精度管理向上にも役立ち、ひいては病理診断の質の向上にもつながるものと思われる。

実例として茨城県内の医療施設で試験的にVSを利用した免疫染色の集約化を行っている。具体的には筑波大学のつくばヒト組織診断センター (THDC) を免疫染色のコア施設とし、茨城県立中央病院・茨城県地域がんセンターを含む、病理専門医のいる県内4つの医療施設の免疫染色標本の一部作製を行っている。THDCは標本作製を行う技術職員が比較的豊富で機器も拡充されている点およびVS機器を有している点で、免疫染色のコア施設として設定された。基本的には図1で示すように依頼元病理医が未染標本をコア施設のTHDCに郵送し、THDCが免疫染色標本の作製を行い、作製された免疫染色をVSに取り込んでもらい、依頼元病理医はその免疫染色画像をパソコンのモニター上で観察し、病理診断の補助としている。現在

はVSに取り込んだ後、実際に作製された免疫染色標本は依頼元病理医の手元に郵送され、病理医は実物の免疫染色標本を今度は直接検鏡し、VS画像での判断の確認を行っている。これまでのところVSを利用することで、実際の免疫染色標本が郵送され、病理医の手元に届くまでの日数に比べて、2~4日早く、免疫染色の標本画像を観察することができ、病理診断の日数が短縮できることが確認できている。また通常の免疫染色標本においてはVS画像の観察による判断とに違いはみられない。現在まだ試験的に行っている段階で、幾つかの問題点が挙がっている。THDCで作製された免疫染色標本のVSへの取り込み等はTHDCの技師が行っているが、症例が増加した段階でVSへの取り込みや、機器、画像の管理を誰がどのように行うかの運営方法が確定していない点や、VSに取り込まれた免疫染色画像の焦点がずれている場合などの不具合に対して調整の依頼方法が確立されていない点がある。またTHDCから免疫染色標本のVS画像が観察可能となったことをメールを用いて連絡しているが、この方法では依頼した病理医がそのメールを確認するまでの時間が無駄になってしまい、VSによる迅速さという利点が発揮できないことになる。現在はVS画像が観察可能となったことを依頼病理医に迅速に連絡する簡略な方法を模索している段階である。

IV. 病理診断および標本作製に対する精度管理へのVSの利用

正しい病理診断は医療において必要不可欠であるが、そのためには病理標本が正しく作製されていることと、病理医が標本を正しく診断することが必要となる。このためには技師による標本作製と病理医による診断の双方に対する精度管理が重要である。ここではVSを利用した精度管理の実例を紹介する。

1. 病理標本作製に対する精度管理

正しい病理診断を行うためには、正しい病理標本が作製されていることが前提となる。

このために病理標本作製の精度管理は重要であり、県単位等の地域内での外部精度管理が行われてきた。従来、標本作製の精度管理は、地域内の医療施設で作製された病理標本を病理医・技師等が検鏡し、その染色性等が判定・評価され、その結果が地域内の参加医療施設に報告されてきた。

北海道では、北海道臨床検査技師会と北海道がんセンター、北海道大学附属病院等による研究で、組織染

色標本作製に対する外部精度管理において、標本に対する評価報告書とともに染色標本のVS画像を参加施設から閲覧できるようにしたところ、評価報告書の理解がしやすくなったとの結果が、北海道がんセンターの東らから報告されている⁶⁾。

我々も茨城県でVSを利用した病理標本作製の外部精度管理を行っている。茨城県では茨城県臨床検査技師会が年に1回標本作製の精度管理を行っているが、精度管理に迅速性が求められることから3人の病理医・技師で判定・評価が行われてきた。判定者を増やすことでより判定・評価の精度を上げることが期待されるが、判定者が増えることで、判定者への標本郵送にかかる時間の増加や、郵送中の標本の破損の危険性等があり、判定者を増やすことができずにいた。この点でVSは実物の標本を判定者に郵送する必要がなく、VS画像を複数の判定者が随時観察でき、迅速に多数の判定結果を得ることができる利点がある。我々は茨城県臨床検査技師会と共同でVSを利用した標本作製の精度管理を行っている。評価者を従来の3人から10人に増やし、精度管理用に県内18の医療施設で作製された標本(HE染色標本および鍍銀染色標本)のVS画像を基に標本の染色性等を評価してもらうことにしている。評価者を増やすことで評価の精度を上げ、かつVSを利用することで迅速性を維持することができる。また北海道における検討でも明らかになっているように、従来は参加医療施設に評価結果が文章で通知されるだけであったが、VSを利用することで参加医療施設は評価結果とともに作製した標本をVS画像として再度観察することができ、評価結果で指摘された標本作製の問題点をよりの確に把握することができ、精度管理において重要なフィードバックともなる。

2. 病理診断の精度管理

同じ病理標本を検鏡しても病理医間で病理診断名ないし所見の異なることがあるが、ほとんどは診療に影響しない許容範囲内のものと思われる。しかし分子標的薬治療において標的分子に対する免疫染色の評価を正確に行うことが病理医に求められている。このため病理による免疫染色標本の評価に対する精度管理は重要である。精度管理は迅速さが求められるものであり、その点でVSは有用なものと考えられる。ここでは我々がVSを利用した乳癌HER2免疫染色標本の評価の精度管理の実例を紹介する。

主に茨城県内の病院に勤務する15人の病理医に乳癌手術症例に対するHER2免疫染色標本の判定を行っ