

## 病理学的アミロイドーシスの同定と妥当性評価

長岡中央総合病院・病理部；臨床検査技師<sup>1)</sup>、病理専門医<sup>2)</sup>  
竹日健太<sup>1)</sup>、五十嵐俊彦<sup>2)</sup>、多田直人<sup>1)</sup>、柳田杏奈<sup>1)</sup>

目的：アミロイド陽性症例における特殊染色、免疫染色に関する精度管理を確立する。

方法：アミロイドーシス 5 症例に関して、Congo-Red、DFS、AL $\kappa$ 、AL $\lambda$ 、AA、ATTR、A $\beta$ 2MG 染色を実施し、コンサルト依頼した外部施設との染色性、判定を比較検討した。

成績：当院で実施した染色と、外部施設でのアミロイド特殊染色、免疫染色には差異はなかった。

結論：我々が実施してきた病理学的アミロイドーシス同定のための染色の実施は外部施設評価において妥当性確認できた。Congo-Red、DFS および免疫染色を組み合わせることにより、正確なタイプ分が可能となる。

キーワード：アミロイドーシス、Congo-Red、Direct fast scarlet(DFS)、Anti-kappa light chain (AL $\kappa$ )、Anti-lambda light chain (AL $\lambda$ )、Anti-amyloid-A (AA)、Anti-transthyretin (ATTR)、Anti- $\beta$ 2-microglobulin (A $\beta$ 2MG)、ギ酸処理、外部精度管理、妥当性確認、ISO15189

### 緒言

アミロイドとは、体を構成しているタンパク質の形や性質が変わり、水や血液に溶けにくい線維状の塊となった物質である。アミロイドが体に沈着することにより引き起こされる病気をアミロイドーシスと言い、アミロイドはアミロイドのもとになるタンパク質により分類することが基本となる（表 1）。今回、直近のアミロイドーシスと診断された 5 症例において、ISO15189 外部精度管理を含め、外部施設へコンサルト依頼を実施し当院での染色との比較における評価確認を行った。

### 方法

アミロイドーシスと診断された 5 症例における当院で実施した染色および診断結果と外部施設に委託した染色における診断評価を比較検討した。当院で実施した染色として Congo-Red(消化 Congo-Red)、DFS、AL $\kappa$  (ギ酸処理)、AL $\lambda$  (ギ酸処理)、AA、ATTR、A $\beta$ 2MG を対象とした(表 2、表 3)。外部施設のコンサルトとして、厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班と PCL ジャパ

ンに該当染色の依頼をした。コンサルト依頼先においては当院と同一の染色が実施できない染色があった。切片の厚さは3~5 $\mu$ mを検討し、結果5 $\mu$ mでの染色性が特殊染色、免疫染色いずれも最も良好であったため切片の厚さを5 $\mu$ mに設定した。使用するスライドガラスは切片剥離防止のため、コーティングスライドガラスを使用した。

## 結果

症例 1. 78 歳、男性(表 4)

臨床診断：心不全、心アミロイドーシス疑い。

材料：心臓、生検材料

染色： いずれの施設においても Congo-Red、DFS が (+) であり免疫染色においては ATTR 実施可能施設において当院と同様に (+) を呈した。また、いずれの施設の AL  $\kappa$ 、AL  $\lambda$  に偽陽性所見を確認した。

症例 2. 83 歳、男性(表 5)

臨床診断：右心不全で死亡。

材料：心臓、剖検材料

染色： いずれの施設においても Congo-Red、DFS が (+) であり免疫染色においては ATTR 実施可能施設において当院と同様に (+) を呈した。

症例 3. 72 歳、男性(表 6)

臨床診断：うっ血性心不全。

材料：心臓、生検材料

染色： 当院のみ DFS が (+) という結果であった。過薄切によるアミロイド沈着部の消失が示唆された。免疫染色に陽性所見は確認されないが、AL  $\kappa$ 、AL  $\lambda$  に偽陽性所見を確認した施設があった。

症例 4. 85 歳、男性(表 7)

臨床診断：うっ血性心不全、糖尿病、骨髄腫。

材料：心臓、生検材料

染色： いずれの施設においても Congo-Red、DFS が (±) ~ (+) であり免疫染色においては AL  $\lambda$  に (±) ~ (+) の所見を確認した。また当院でのギ酸処理において染色性の増強が確認された。

症例 5. 72 歳、男性(表 8)

臨床診断：右手根管症候群、血清陰性型関節リウマチ。

材料：手根管屈筋支帯、手術材料

染色： いずれの施設においても Congo-Red、DFS が (±) ~ (+) であり免疫染色においては ATTR 実施可能施設において当院と同様に (+) を呈した。また AL  $\kappa$ 、AL  $\lambda$  に偽陽

性所見を確認した施設があり、当院のギ酸処理においては染色性の増強が確認された。

## 考察

アミロイドーシスは積極的な治療が行われる中で、早期発見や治療法選択のためのタイプ分けが重要とされている。特殊染色や免疫染色において染色法の選択や染色結果の判定は重要である。

Congo-Red や DFS は染色性が不良な場合、周囲の膠原繊維や弾性繊維が共染することがあり注意が必要である。また症例によっては染色性の弱い場合があるため、偏光顕微鏡下での緑色複屈折の確認することも必要とされている。切片の厚さにおいては、少し厚めに設定しアミロイドの量を増やすことにより、よりきれいな標本の作製が可能である。

各種免疫染色の結果解釈は、1種類の抗体で均一に陽性を呈する場合、他の抗体が陰性または偽陽性の時はそのアミロイドタイプの決定が可能となる。AL アミロイドは部分的な陽性所見があっても  $\kappa$ 、 $\lambda$  どちらか一方が他の一つより明らかな優位な染色態度を呈する場合、AL アミロイドと考えられる。ATTR はタイプ決定が困難な場合があるため、ギ酸などの抗原賦活操作が必要な場合がある。当院での実施においては、ギ酸処理は実施していないが、比較的良好な染色結果が得られた。

その他のギ酸処理においては A $\beta$  2MG や AL $\lambda$  は処理後染色性が増強する場合があり、AA においては逆に染色性が低下する場合があるので注意が必要である。

## 結語

我々が実施してきた病理学的アミロイドーシス同定のための各種特殊染色、免疫染色の実施は外部施設評価において妥当性確認できた。

## 文献

山田正仁、他．厚生労働科学研究費補助難治性疾患克服研究事業 アミロイドーシス診療ガイドライン 2010 3 - 26 頁、32 - 35 頁

## 英文抄録

Our pathologic identification and validation of amyloid deposit

Department of Pathology, Nagaoka Central General Hospital; Laboratory Technician1), Pathologist2)

Kenta Takehi1), Toshihiko Ikarashi2), Naoto Tada1), Anna Tada1)

Objective: We decided to establish an accuracy of special staining and

immunostaining in amyloid deposit.

Methods: Confirmed 5 cases of amyloidosis were selected, The histochemical confirmation of amyloid by Congo-Red and, DFS staining, AL $\kappa$ , AL $\lambda$ , AA, ATTR, and A $\beta$ 2MG staining were added immunohistochemically. Their staining results were compared with those of an outside institution.

Results: There was no difference between the staining performed between our hospital and the outside facilities.

Conclusions: Our established histologic staining procedures for identification of amyloid were validated in this study.

Keywords: amyloidosis, Congo-Red, Direct fast scarlet (DFS), Anti-kappa light chain (AL $\kappa$ ), Anti-lambda light chain (AL $\lambda$ ), Anti-amyloid-A (AA), Anti-transthyretin (ATTR), Anti- $\beta$ 2-microglobulin (A $\beta$ 2MG), formic acid treatment, external accuracy control, validation, ISO 15189

表 1. 主なアミロイドーシスの分類

| 主なアミロイドーシス            | アミロイド蛋白      | 前駆体蛋白          |
|-----------------------|--------------|----------------|
| AL アミロイドーシス $\kappa$  | AL $\kappa$  | L 鎖 $\kappa$   |
| AL アミロイドーシス $\lambda$ | AL $\lambda$ | L 鎖 $\lambda$  |
| AA アミロイドーシス           | AA           | 血性アミロイド A(SAA) |
| 遺伝性 ATTR アミロイドーシス※1   | ATTR         | 変異型トランスサイレチン   |
| 野生型 ATTR アミロイドーシス※1   | ATTR         | 野生型トランスサイレチン   |

※1: 遺伝性 ATTR か野生型 ATTR かの鑑別には遺伝子検査が必要。

表 2. 特殊染色

| 染色名       | 方法                            | 備考  |
|-----------|-------------------------------|---|
| Congo-Red | Congo-Red<br>Puchtler-sweat 法 | 切片の厚さ: 5 $\mu$ m<br>コーティングガラス使用<br>分別操作なし |
| DFS       | DFS<br>硫酸 Na+2-プロパノール         | 切片の厚さ: 5 $\mu$ m<br>コーティングガラス使用           |

|  |  |   |
|--|--|---|
|  |  | DFS 調整は完全溶解した溶液を使用するため、時間をかけて攪拌する<br>加温なし |
|--|--|---|

表 3.免疫染色で使用する主要な一次抗体

| 一次抗体                         | クローン名           | 試薬メーカー                |
|------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Anti- $\kappa$               | L1C1 マウス Mono   | 株式会社ニチレイバイオサイエンス      |
| Anti- $\lambda$              | HP6054 マウス Mono | 株式会社ニチレイバイオサイエンス      |
| Anti-AA                      | mc1 マウス Mono    | アジレントテクノロジー株式会社(DAKO) |
| Anti-TTR                     | ウサギ Poly        | NOVUS                 |
| Anti- $\beta$ 2microglobulin | ウサギ Poly        | GeneTex               |

表 4.症例 1

| 染色                   | 長岡中央総合病院 | 調査研究班※2 | PCL ジャパン |
|----------------------|----------|---------|----------|
| Congo-Red            | +        | +       | #        |
| 消化 Congo-Red         | +        |         | ±        |
| DFS                  | +        | +       | +        |
| Anti- $\kappa$       | ±        | ±       | ±        |
| Anti- $\kappa$ ギ酸処理  | ±        |         |          |
| Anti- $\lambda$      | ±        | -       | ±        |
| Anti- $\lambda$ ギ酸処理 | +        |         |          |
| Anti-AA              | -        | -       |          |
| Anti-TTR             | +        | +       |          |
| Anti- $\beta$ 2MG    | -        | -       |          |

※2：厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班

表 5.症例 2

| 染色                   | 長岡中央総合病院 | 調査研究班※2 | PCL ジャパン |
|----------------------|----------|---------|----------|
| Congo-Red            | +        | +       | #        |
| 消化 Congo-Red         |          |         | #        |
| DFS                  | +        | +       | #        |
| Anti- $\kappa$       | -        | -       | ±        |
| Anti- $\kappa$ ギ酸処理  |          |         |          |
| Anti- $\lambda$      | -        | -       | ±        |
| Anti- $\lambda$ ギ酸処理 |          |         |          |
| Anti-AA              | -        | -       | -        |

|           |   |   |  |
|-----------|---|---|--|
| Anti-TTR  | + | + |  |
| Anti-β2MG | - | - |  |

※2：厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班

表 6. 症例 3

| 染色           | 長岡中央総合病院 | 調査研究班※2 | PCL ジャパン |
|--------------|----------|---------|----------|
| Congo-Red    | -        | -       | -        |
| 消化 Congo-Red |          |         | -        |
| DFS          | +        | -       | -        |
| Anti-κ       | -        | -       | ±        |
| Anti-κ ギ酸処理  |          |         |          |
| Anti-λ       | -        | -       | ±        |
| Anti-λ ギ酸処理  |          |         |          |
| Anti-AA      | -        | -       | -        |
| Anti-TTR     | -        | +       |          |
| Anti-β2MG    | -        | -       |          |

※2：厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班

表 7. 症例 4

| 染色           | 長岡中央総合病院 | 調査研究班※2 | PCL ジャパン |
|--------------|----------|---------|----------|
| Congo-Red    | ±        | ±       | +        |
| 消化 Congo-Red |          |         | -        |
| DFS          | +        | +       | +        |
| Anti-κ       | ±        | -       | ±        |
| Anti-κ ギ酸処理  | +        |         |          |
| Anti-λ       | +        | ±       | ±        |
| Anti-λ ギ酸処理  | #        |         |          |
| Anti-AA      | -        | -       | -        |
| Anti-TTR     | -        | -       |          |
| Anti-β2MG    | -        | -       |          |

※2：厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班

表 8. 症例 5

| 染色           | 長岡中央総合病院 | 調査研究班※2 | PCL ジャパン |
|--------------|----------|---------|----------|
| Congo-Red    | ±        | ±       | +        |
| 消化 Congo-Red |          |         | ±        |
| DFS          | +        | +       | +        |

|                      |   |   |   |
|----------------------|---|---|---|
| Anti- $\kappa$       | ± | — | ± |
| Anti- $\kappa$ ギ酸処理  | + |   |   |
| Anti- $\lambda$      | ± | ± | ± |
| Anti- $\lambda$ ギ酸処理 | + |   |   |
| Anti-AA              | — | — | — |
| Anti-TTR             | + | + |   |
| Anti- $\beta$ 2MG    | — | — |   |

※2 : 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 アミロイドーシスに関する調査研究班