

平成28年度 千臨技病理研究班 精度管理調査報告

(一社) 千葉県臨床検査技師会 病理検査研究班

○四宮 義貴 豊永 安洋 坪内 優子 草野 広行
櫻井 真琴 永田 雅裕 永澤 友美 諏訪 朋子
佐藤 嘉洋 鈴木 学

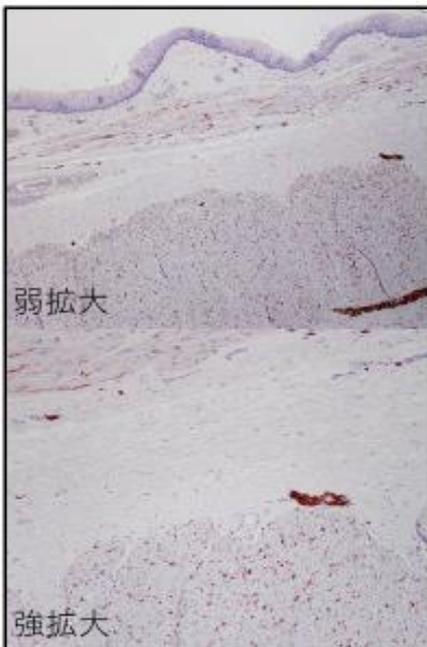
お詫びと訂正

問題5. 免疫組織化学染色において、病理医よりバックグラウンドの上昇を指摘されました。標本Aは良好な染色、Bは今回指摘された染色不良標本です。考えられる**対象法**として適さないものを次から選んでください。

標本A、B共に食道、一次抗体はS-100を使用。

- ①：使用する一次抗体の濃度を下げる。
- ②：洗浄操作を十分に行う。
- ③：染色操作中に切片を乾燥させないようにする。
- ④：洗浄操作には界面活性剤（Tween20等）を含まないものを使用する。
- ⑤：一次抗体をポリクローナルからモノクローナルに変更する。

標本A



標本B



対象法×
対処法○

目的

- ・ 標本作製

各施設での薄切・HE染色を実施し、薄切や染色態度の評価を行うことで、基本的な標本作製技術の再確認を行う。

- ・ フォトサーベイ

適切な標本作製に関する技術や知識の再確認を行う。また、基本的な臓器の肉眼像や病理組織像に対する理解を確認する。

HE染色標本評價

精度管理調査概要

【参加施設】 45施設

【材料】

20%中性緩衝ホルマリンにて固定された胃（胃体部）のパラフィン包埋ブロックを作成，各施設に配布した。

【方法】

方法Ⅰ：各施設の日業業務における切片厚での薄切・HE染色を実施。
染色態度の評価を行った。

方法Ⅱ：切片厚4 μ mを目標として薄切を実施。

未染色標本として回収後，共焦点レーザー顕微鏡を使用し，
実際の切片厚を測定。

精度管理調査概要

〈評価方法〉

HE染色（6項目）

- ・各項目 良（2点），可（1点），不可（0点）

- ・総合

- A：染色上，目的を十分に達成している。（11-12点）

- B：染色上，目的を達成している（9-10点）

- C：染色上，目的を達成していない。（7-8点）

- D：目的から逸脱し，早急な改善が必要（6点以下）

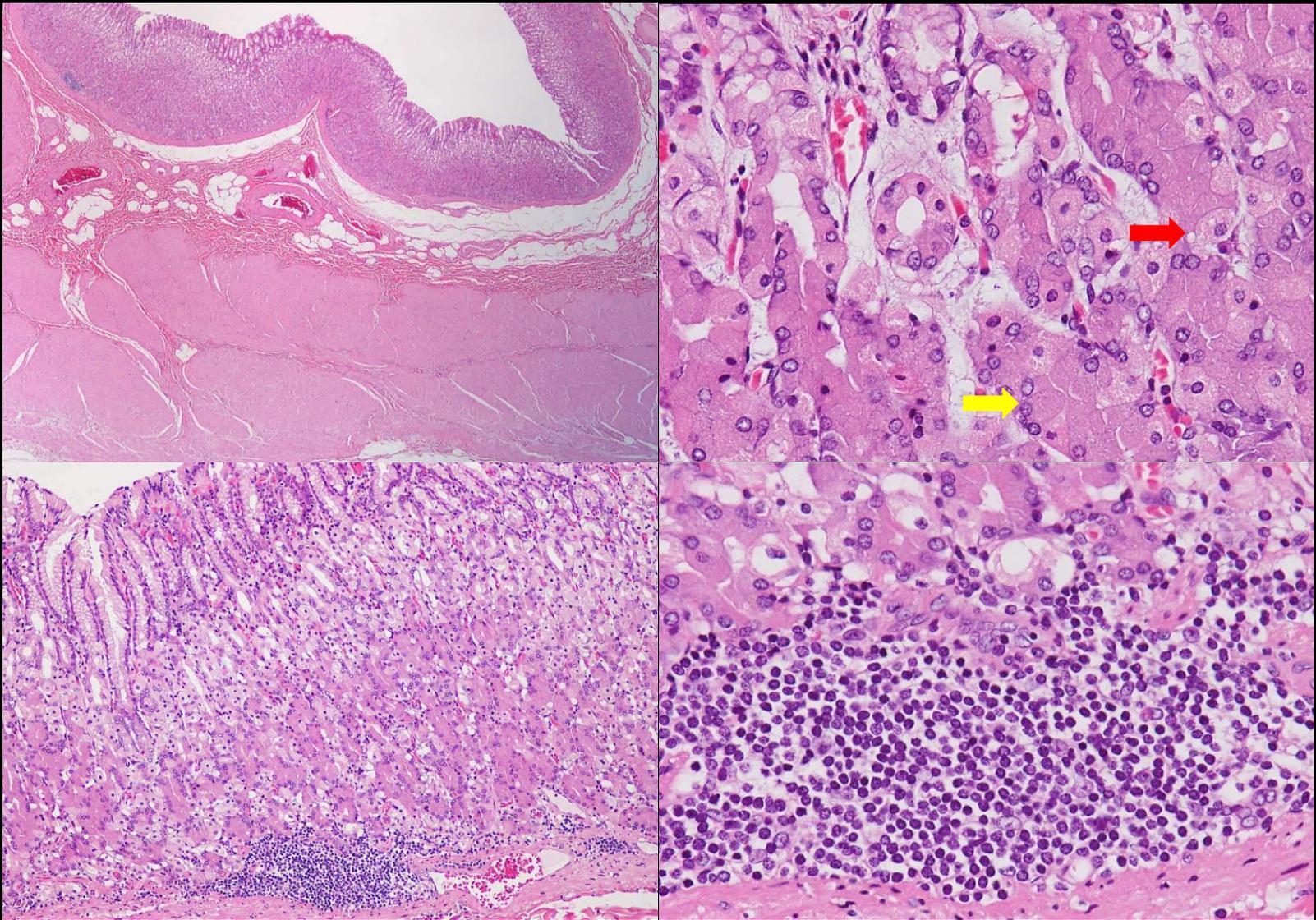
※但し1項目でも不可がある場合は，他の項目の点数に係わらずD評価とすることとした。

【HE染色標本評価表】

HE染色	配点
スライドガラスの汚れ・剥離・傷等	2
染色むら	2
共染の有無	2
ヘマトキシンの染色性	2
エオジンの染色性	2
核と細胞質のコントラスト	2
合 計	12

【HE染色標本評価】

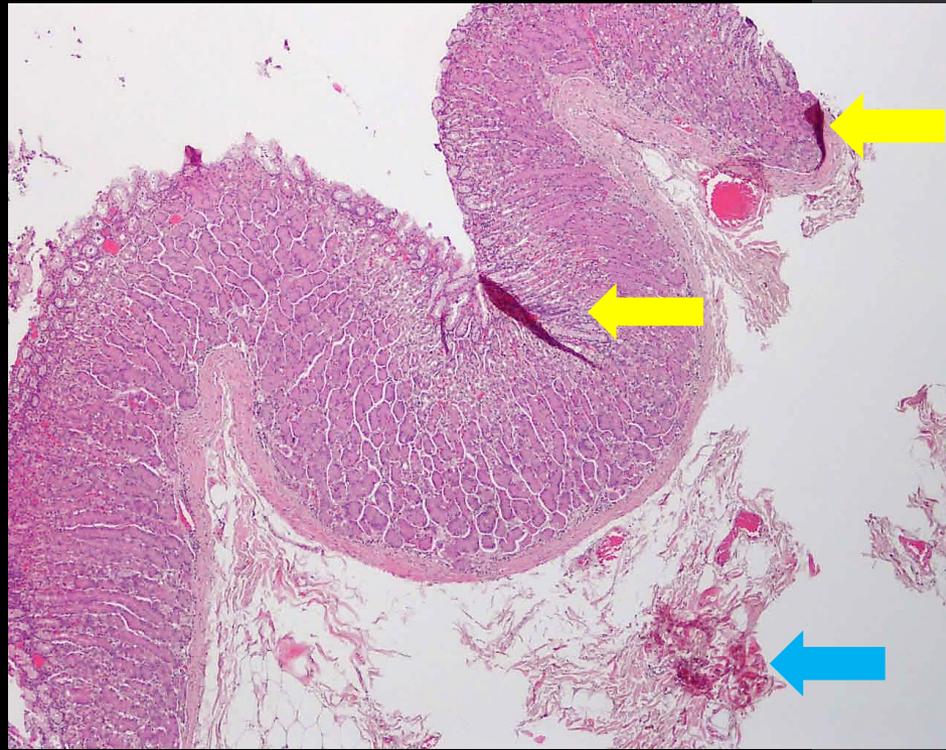
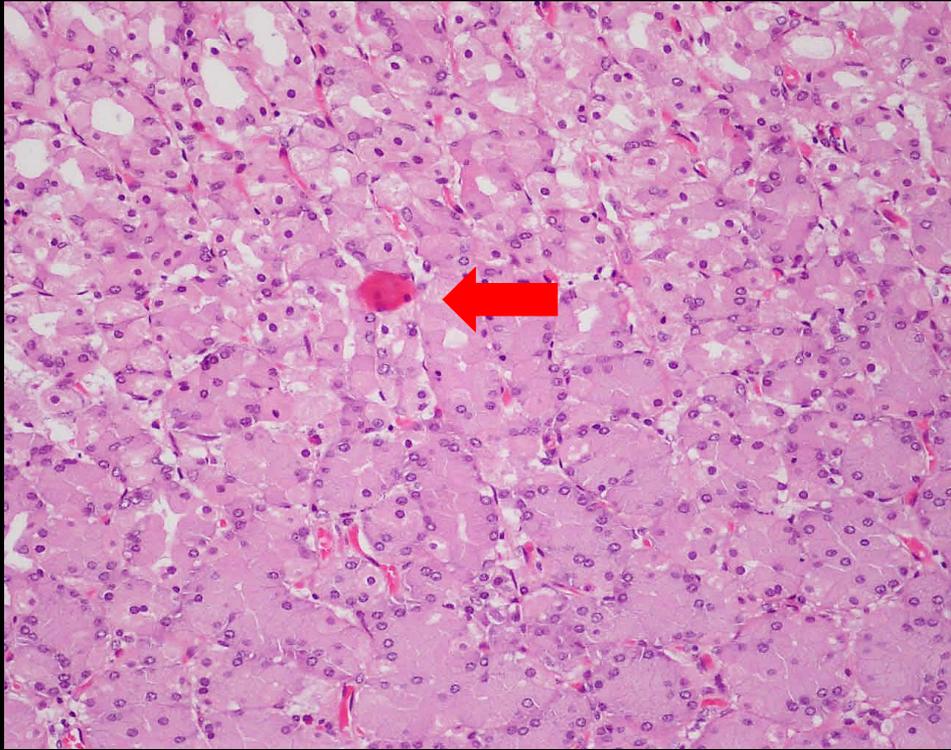
A評価(12点満点)標本



- 胃底腺（主細胞，副細胞，壁細胞）の染め分けが明瞭である。
- リンパ球の核内が明瞭に確認できる。

【HE染色標本評価】

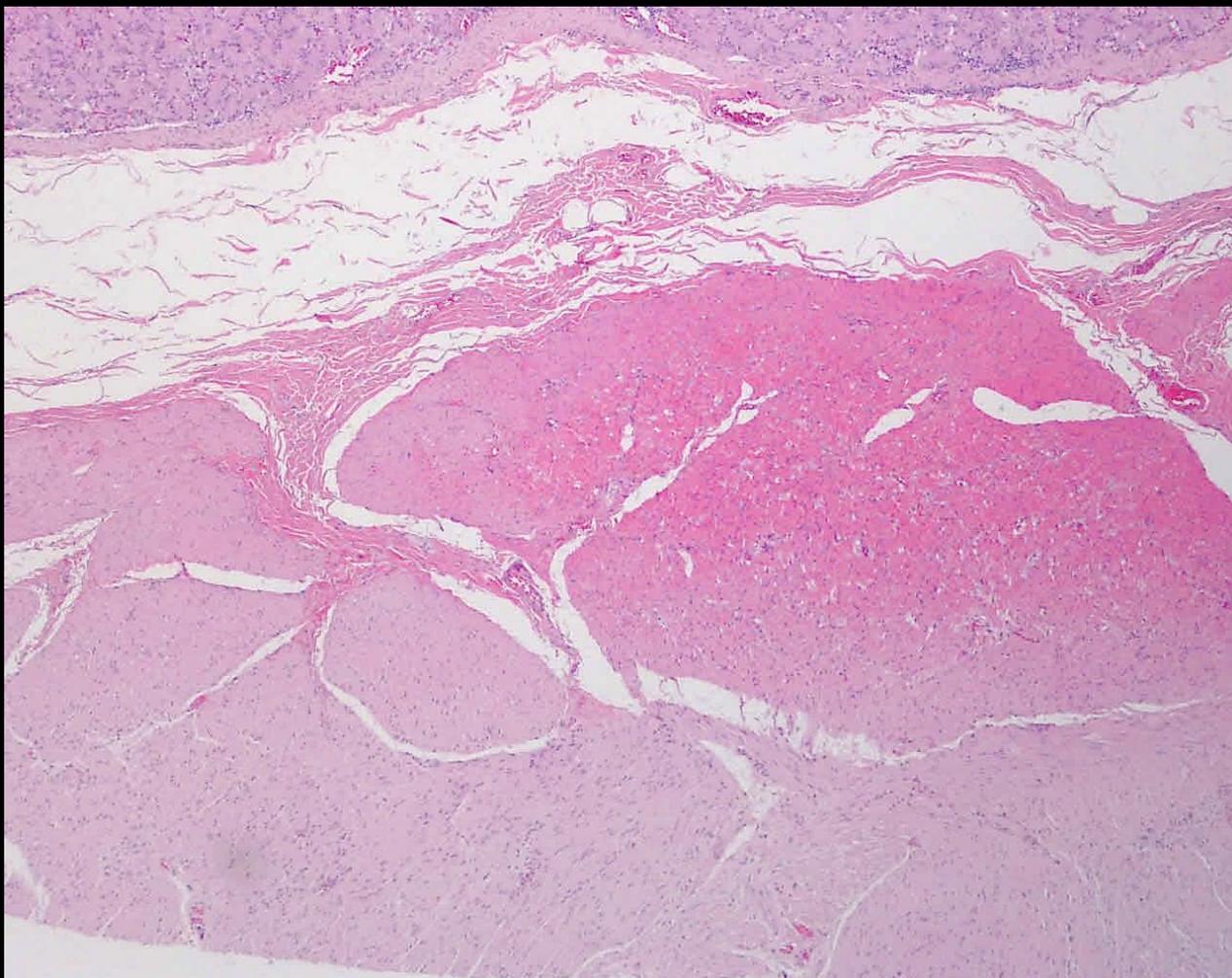
標本上のゴミ・しわ・剥離



- ・切片上にケラチンがのっている（左図  ）
- ・切片にしわがみられる（右図  ）
- ・切片の剥離がみられる（右図  ）

【HE染色標本評価】

染色むら



濃

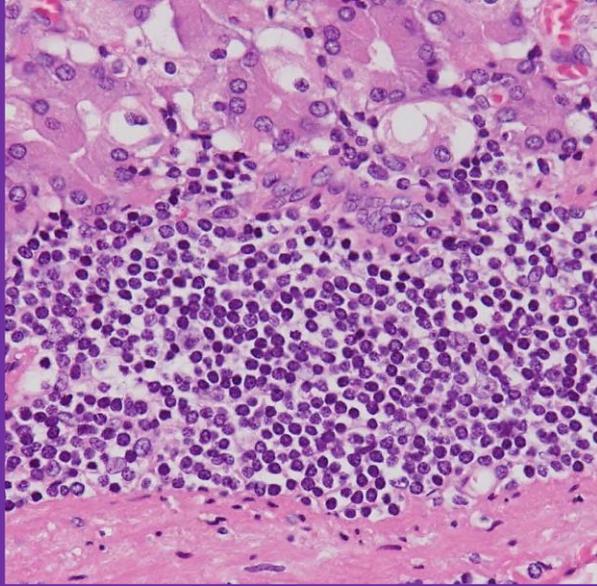
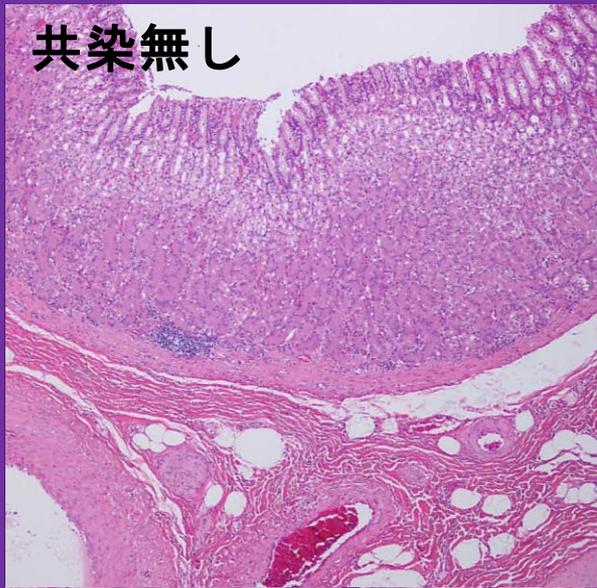
淡

- ・筋層に不自然な染色性の差異（むら）がみられる。

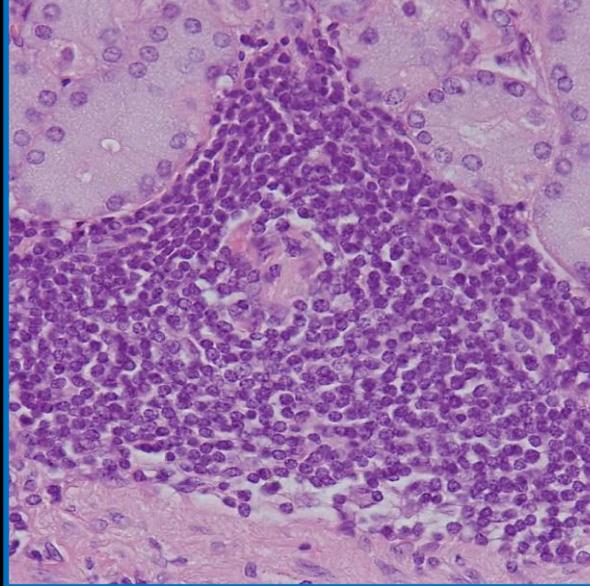
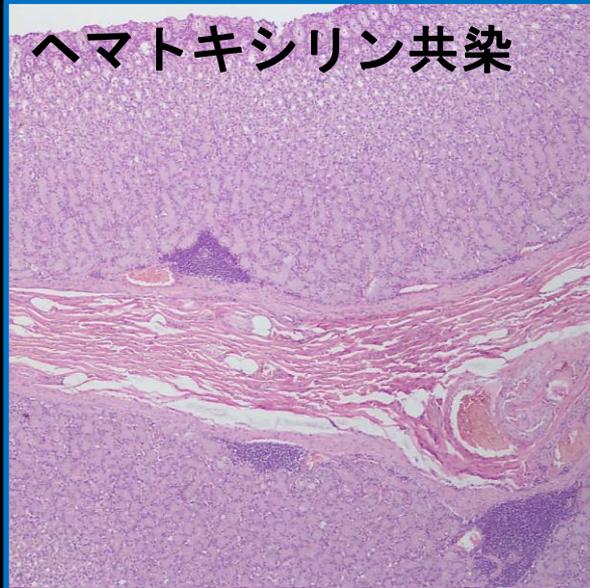
【HE染色標本評価】

共染の有無

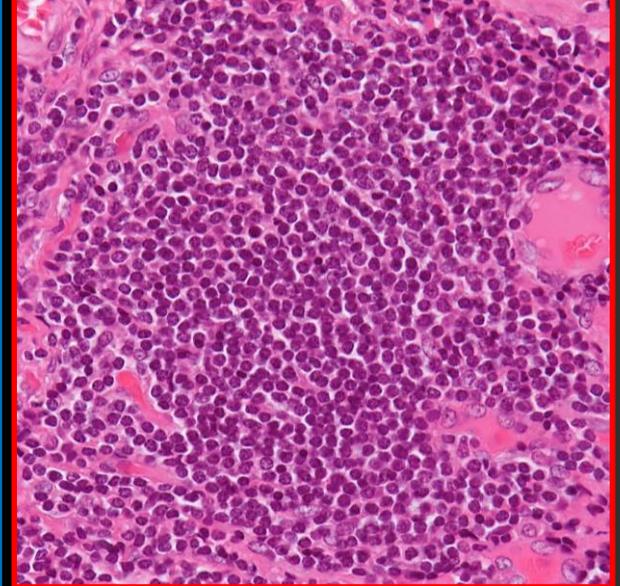
共染無し



ヘマトキシリン共染



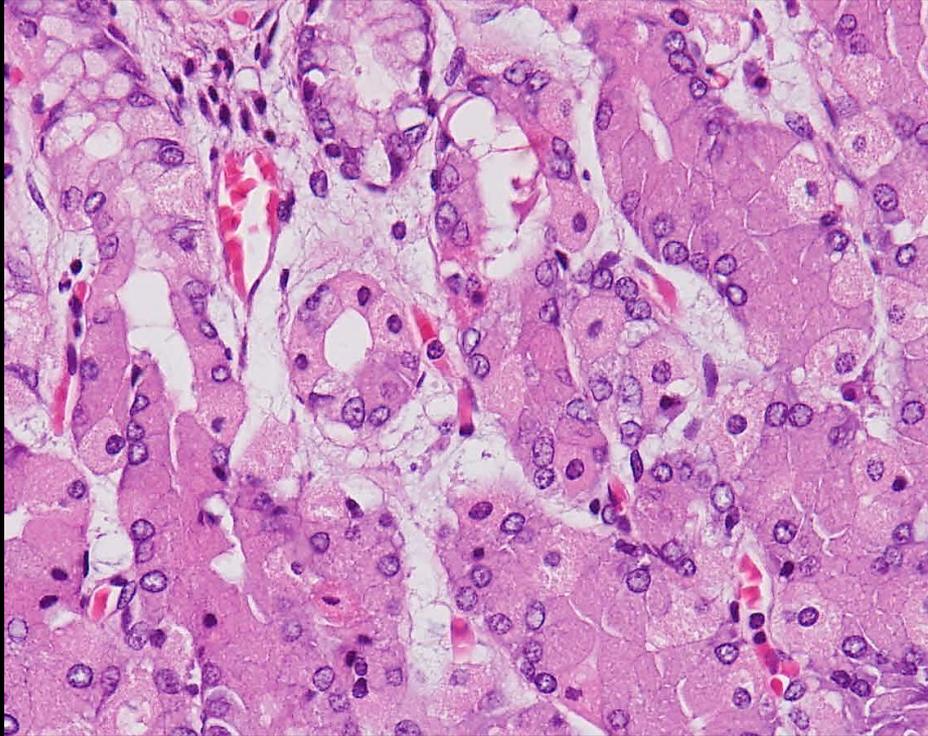
エオジン共染



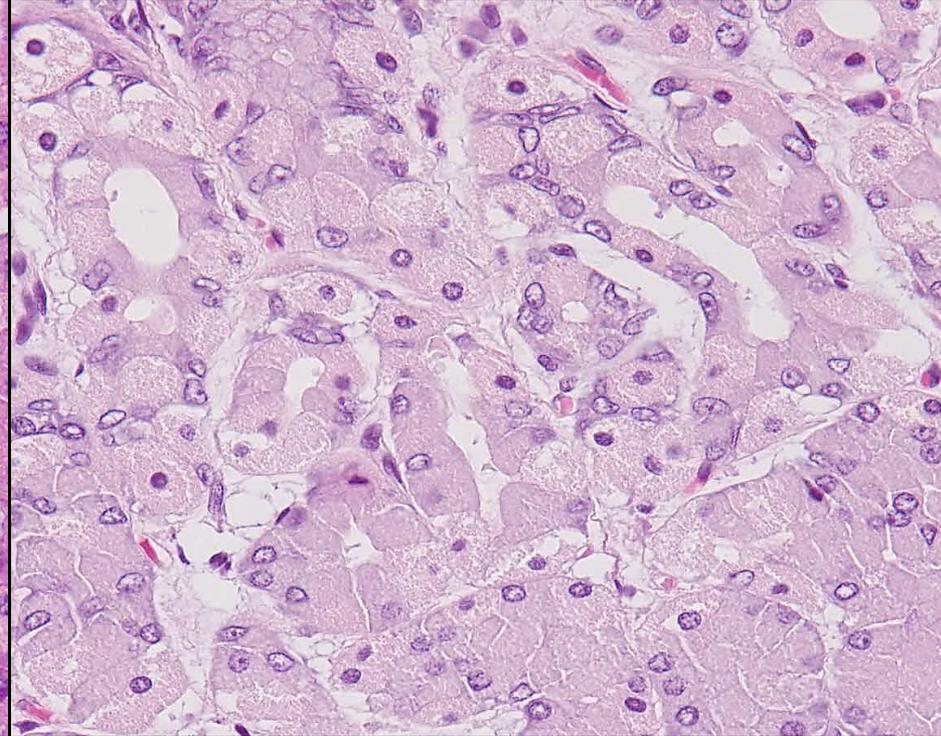
【HE染色評価】

エオジンの染色性

エオジン染色性良好



エオジン染色性低下



- 細胞質の染色性が弱く，細胞質の状態（染色性や質感）などが観察しづらい。
- 胃底腺（主細胞，副細胞，壁細胞）の染め分けが不明瞭である。

HE染色標本各項目への評価

HE染色	減点となった施設数(割合)
スライドガラスの汚れ・剥離・傷等	19/45施設(42.2%)
染色むら	4/45施設(8.9%)
共染の有無	12/45施設(26.7%)
ヘマトキシンの染色性	10/45施設(22.2%)
エオジンの染色性	21/45施設(46.7%)
核と細胞質のコントラスト	7/45施設(15.6%)

【HE染色標本評価まとめ】

総合評価 施設数【45施設】

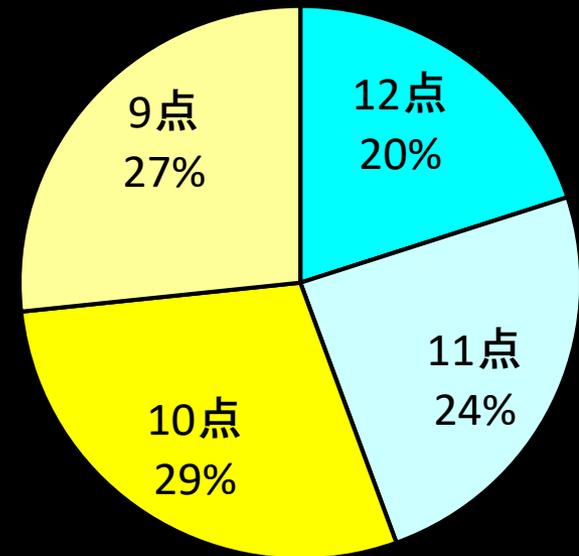
A 評価 20 (44.4%)

B 評価 25 (55.6%)

C 評価 0 (0.0%)

D 評価 0 (0.0%)

総合得点

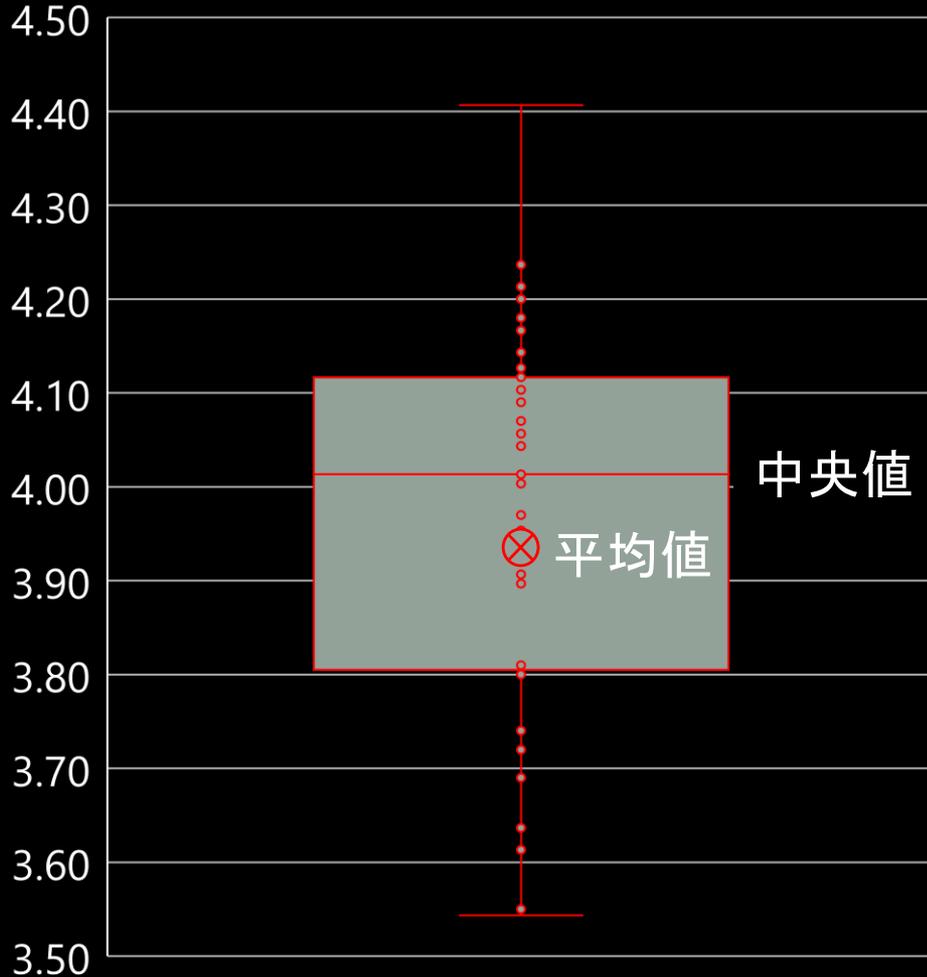


今年度のHE染色標本評価では、
全ての施設で概ね良好な結果が得られた。

【切片厚測定】

4 μm を設定値として薄切した実際の切片厚

※測定は同一切片内の3点を測定後、その平均を標本の切片厚として算出



最小値 2.06 μm

最大値 4.41 μm

平均値 3.97 μm

中央値 4.01 μm

標準偏差 0.20

※標準偏差の算出は44施設
で実施

目標値 $\pm 0.4\mu\text{m}$ の範囲内に約95%の施設が含まれることから
全体的に良好な結果であったといえる。

【切片厚測定】

同一切片内における薄切厚の誤差

切片厚例

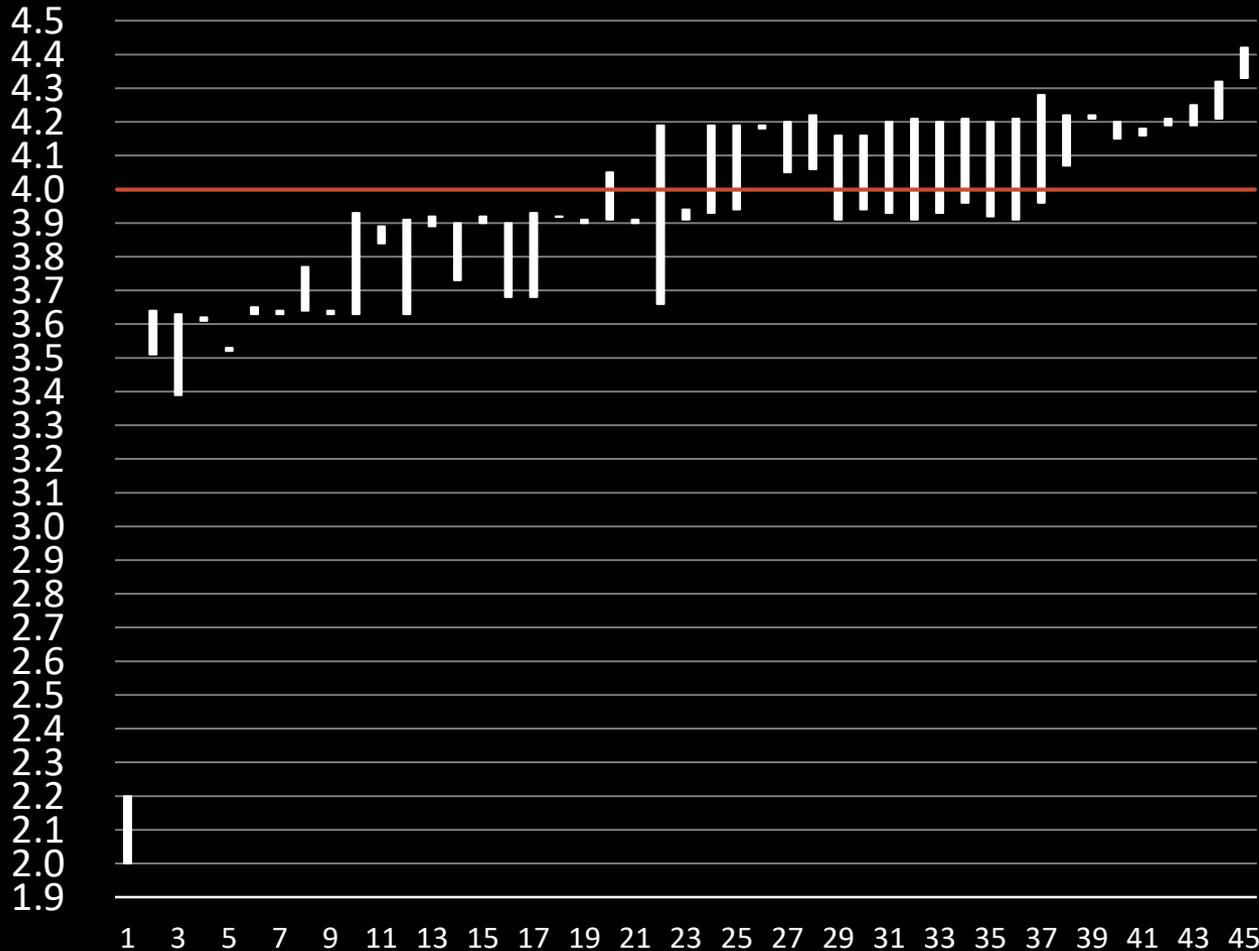
厚さ1 (μm)	厚さ2 (μm)	厚さ3 (μm)	平均厚さ (μm)
4.10	4.00	3.90	4.00
4.00	4.00	4.00	4.00
3.20	4.10	4.70	4.00
3.00	3.50	5.50	4.00

算出された平均厚さが4μmであっても、標本によって、測定された3点のばらつきの程度に差があることが分かる。

- ▶ 同一切片内における薄切厚のばらつきに
関しても同様に検証を行った。

【切片厚測定】

同一切片内における薄切厚の誤差



最小値	0.02μm
最大値	0.53μm
平均値	0.22μm
中央値	0.25μm
標準偏差	0.13

切片厚平均が目標4.0μmに近似している標本においても、
切片内の誤差範囲は様々である。

【HE染色標本評価まとめ】

HE染色標本評価

全ての施設でA評価またはB評価という結果になり、概ね良好な結果であった。

前年度A評価であったが今年度B評価となってしまった施設を多く認めた。その内およそ半数で染色液や染色時間の変更を認めた。このことが染色性に影響を与えている要因の一つであると推測される。

薄切厚の測定

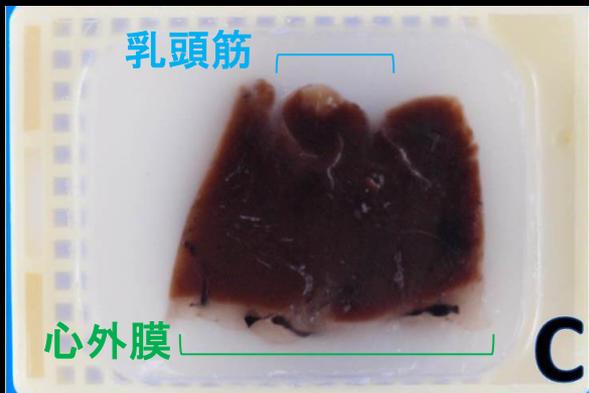
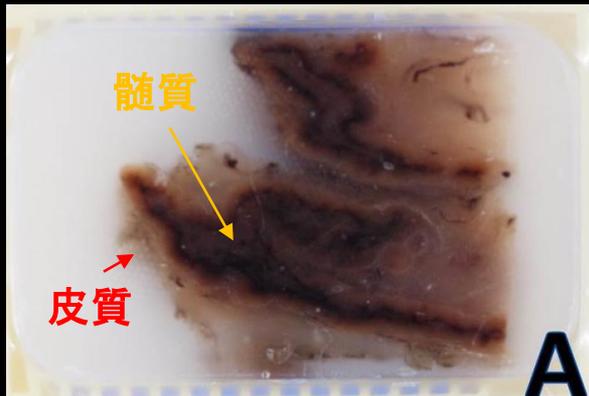
設定値 $4\mu\text{m}$ に対して実際の薄切厚が $\pm 0.4\mu\text{m}$ であった施設は95%と、薄切厚のコントロールが良好な施設がほとんどであった。

また、標本によって切片内の厚さに誤差がみられることが明らかになったことから、均一な切片厚を心がけることで、むらの無いよりきれいな標本作製が望めると考えられる。

フォトサーベイ

問題 1

病理標本ブロック写真A~Dにおいて、臓器の正しい組み合わせはどれですか。



解答：⑤A-副腎， B-肝臓， C-心臓， D-肺

ブロックAは左右の副腎で、脂肪組織内に外側を帯状に取り囲むように黄色調の皮質が、中央には褐色調の髄質が層構造を形成している。

ブロックBは肝臓で、茶褐色で均一、一部に小さく抜けて見えているのは血管である。

ブロックCは心臓の左室後壁水平断で、内腔に乳頭筋、外側に心外膜の脂肪組織を認める。

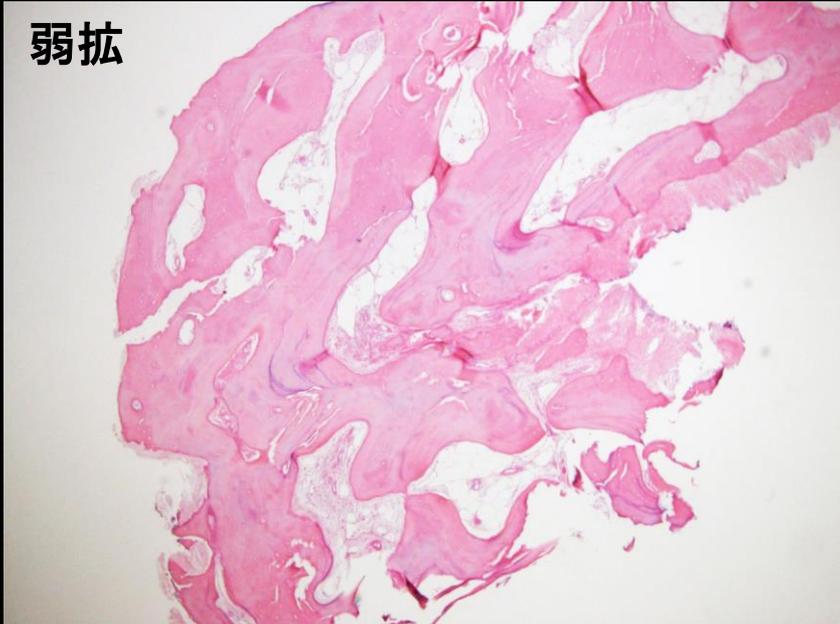
ブロックDは肺で、主気管支を認める。

問題 2

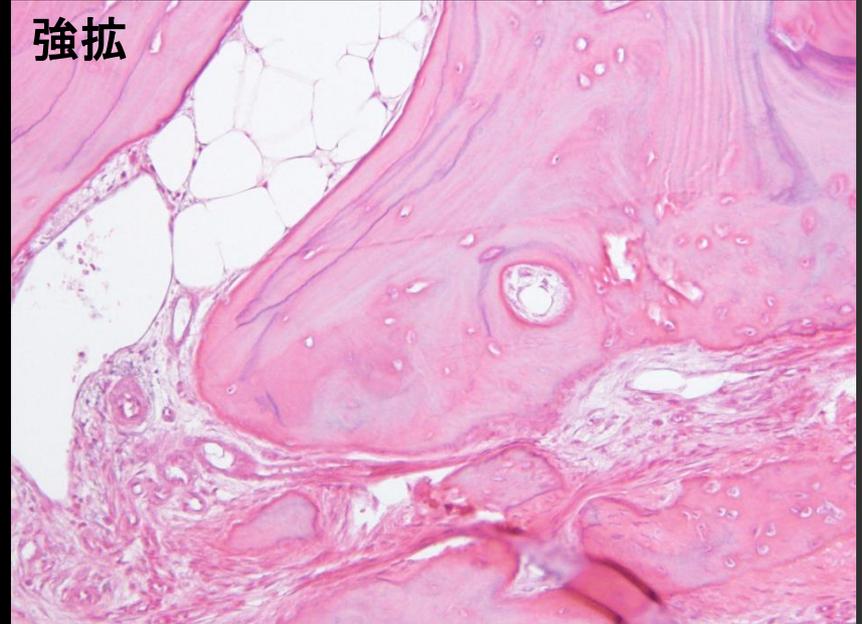
口腔癌，下顎骨組織のHE染色を下記に示します。

標本に見られるアーチファクトの原因として考えられるものはどれですか。

弱拡



強拡



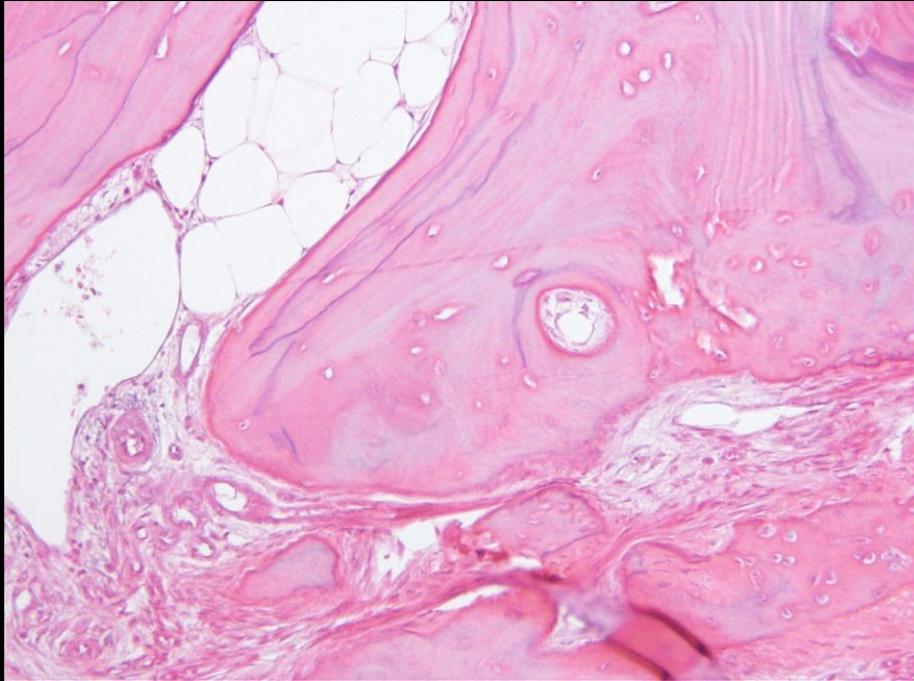
解答：③過脱灰

設問のHE像は，K-CXを用い約1週間程度の脱灰操作後に作製したHE標本の像である。酸性脱灰液による過度の脱灰は，組織の変性や染色性の低下をきたす。

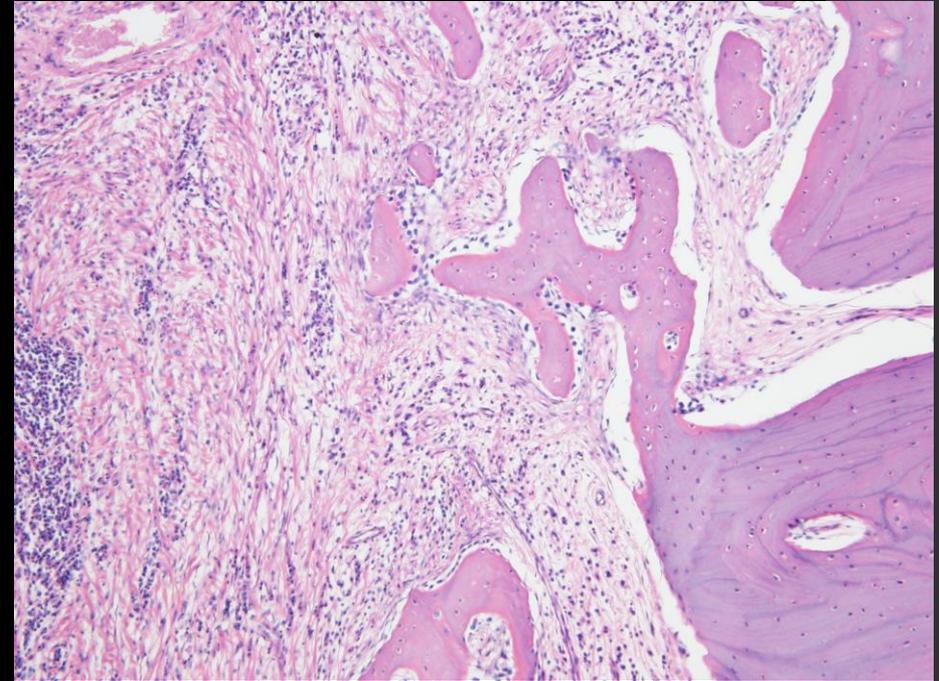
一般的に酸性脱灰液を用いた脱灰法では，核の染色性が低下（好酸性を示す）する。

問題 2

過脱灰となった標本



適切に脱灰された脱灰標本



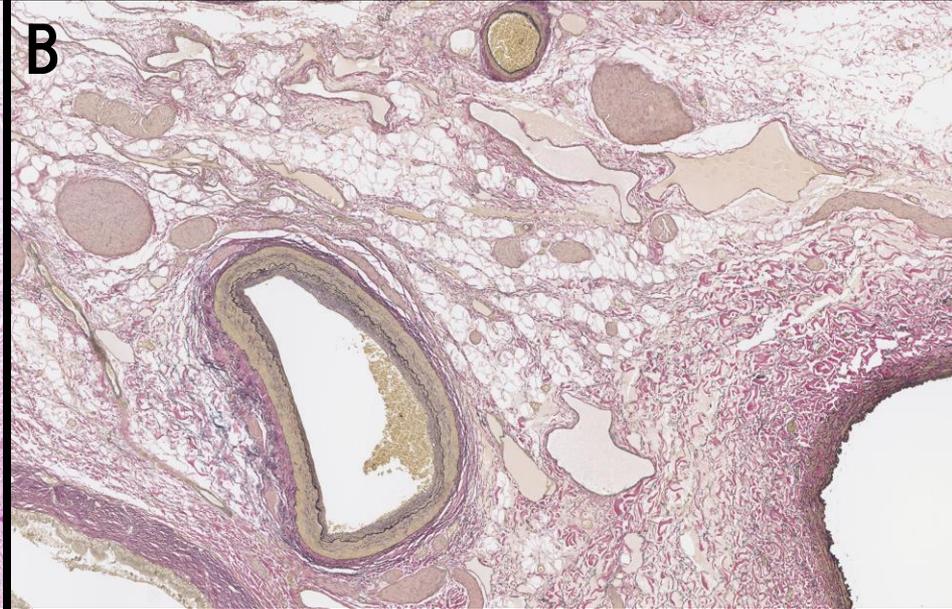
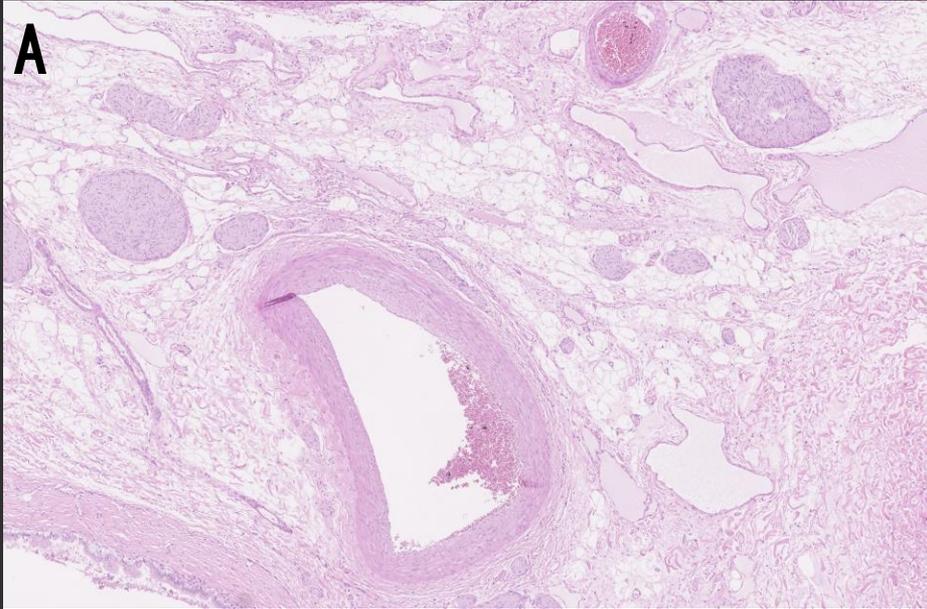
左の写真は今回問題となった過脱灰された検体のHE標本で、右が蟻酸ホルマリンで2週間適切に脱灰処理が行われた検体のHE標本である。

適正に処理された標本と比べると、やはり過脱灰標本では核の染色性が著しく低下していることが分かる。

脱灰法には酸やキレート剤を用いる方法や電気脱灰法、イオン交換樹脂を用いる方法などがあり、各脱灰液やその方法により脱灰の速度、染色性、更には遺伝子検索への影響が異なるため、目的に応じた脱灰法の選択が必要となる。

問題3

写真A, BはHE染色標本とその特殊染色標本です.
この特殊染色の染色手順として正しいのはどれですか.



解答：①レゾルシンフクシン→鉄ヘマトキシリン→ワンギーソン

この設問の特殊染色はエラスチカ・ワンギーソン（EVG）染色であり、その染色工程は、

レゾルシンフクシン（弾性繊維を黒色に染色）→鉄ヘマトキシリン（核染）
→ワンギーソン（膠原繊維を赤色，筋肉や赤血球を黄色に染色）の順で行われる。

問題 4

特殊染色の写真を示します。(写真 1, 2, 3)

使用している硝酸銀濃度の組み合わせが正しいのはどれですか。

写真 1

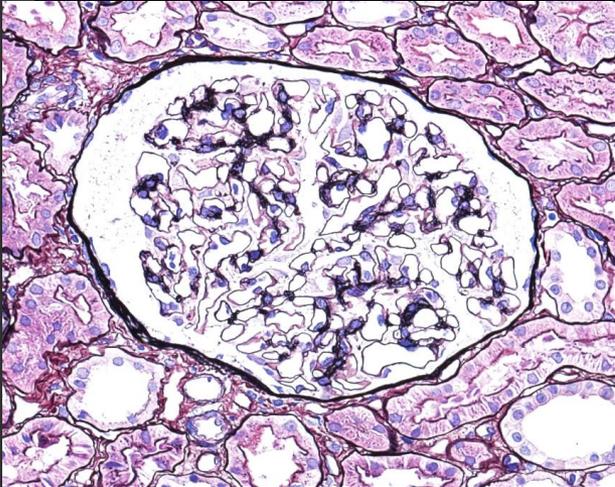


写真 2

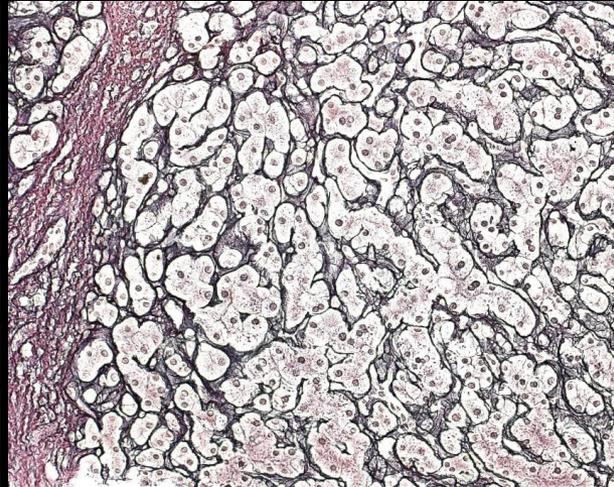
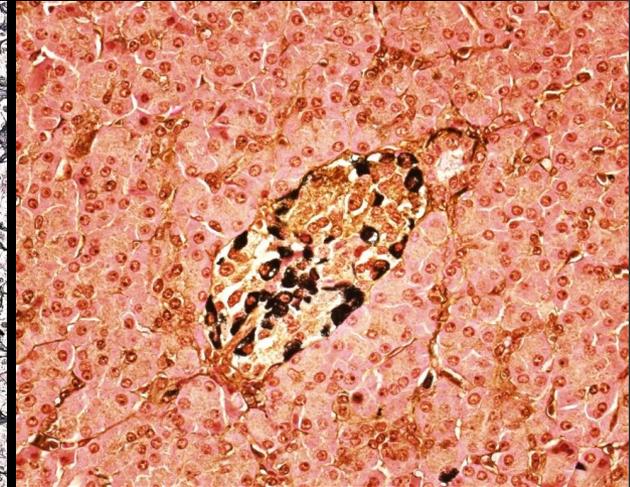


写真 3



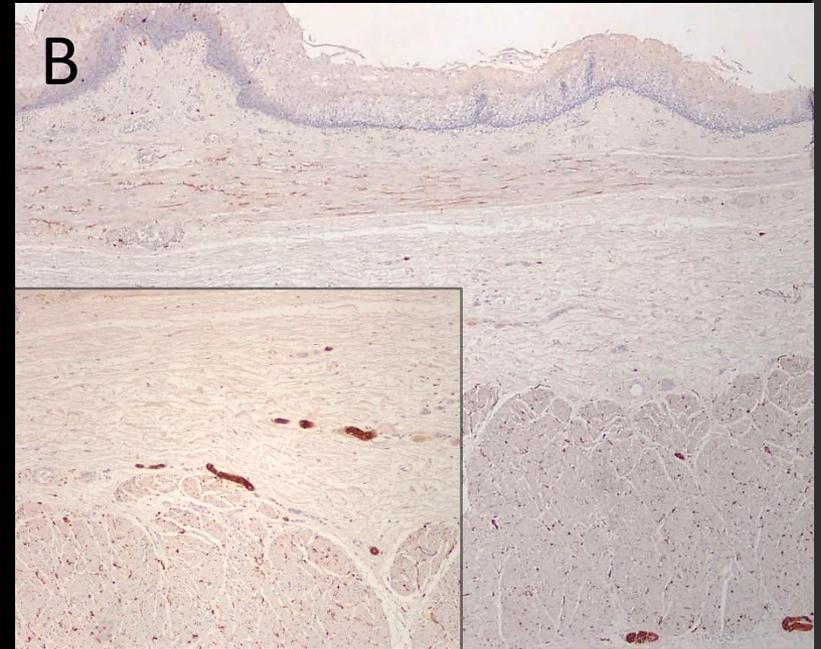
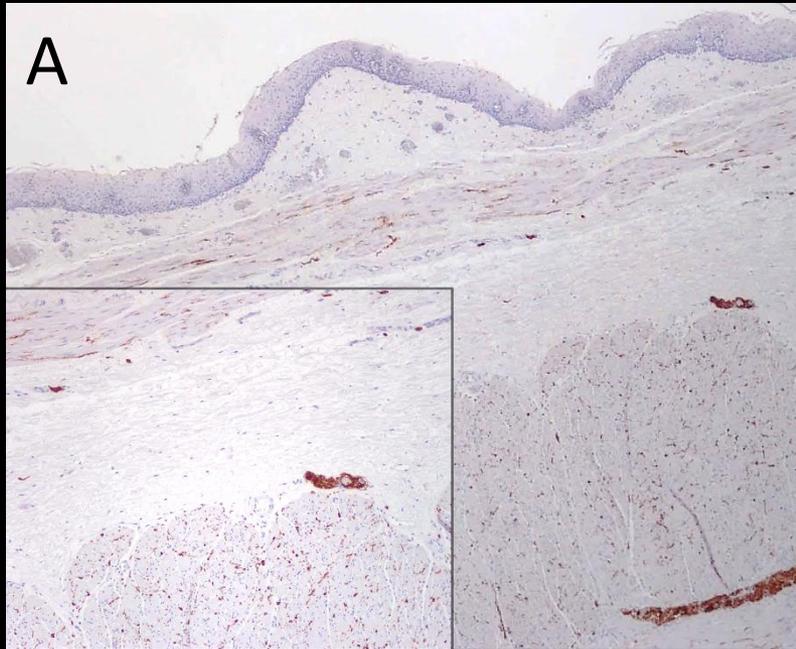
解答 : ③ 1 : 5% 2 : 10% 3 : 0.03%

写真は上からPAM染色, 渡銀染色, グリメリウス染色である。どれも硝酸銀を使用する染色法である。

PAM染色にはジョーンズ原法, 矢島変法, TSC-PAM染色があるが, いずれも使用している硝酸銀濃度は5%である。

また, 渡銀染色, グリメリウス染色で使用する硝酸銀濃度はそれぞれ10%, 0.03%である。

問題5. 免疫組織化学染色において、病理医よりバックグラウンドの上昇を指摘されました。標本Aは良好な染色、Bは今回指摘された染色不良標本です。考えられる対処法として適さないものを次から選んでください。



解答：④洗淨操作には界面活性剤（Tween20等）を含まないものを使用する。

洗淨操作で、界面活性剤を低濃度混ぜたバッファーを使用するのは、切片上の組織内荷電物質による非特異結合を防止することにより洗淨効果を上昇させることを主な目的としている。そのため、これを含まないものを洗淨操作で用いることはかえって洗淨効果を低下させ、バックグラウンドを上昇させてしまうことにつながると考えられる。したがってこの選択肢は誤りである。

その他の選択肢は全てバックグラウンドの上昇を改善するために考えられる方法として適切である。

フォトサーベイ評価まとめ

	正解施設数（正解率）
問題1	39/45施設（86.7%）
問題2	45/45施設（100.0%）
問題3	45/45施設（100.0%）
問題4	42/45施設（93.3%）
問題5	40/45施設（88.9%）

問2, 3で100%, その他の設問に関しても80%以上の正解率であり, 概ね良好な結果であった.

固定用ホルマリン濃度に関して

近年のゲノム解析の発達や
さらなる研究開発のために. . .

病理組織検体固定液, 固定時間等の見直し,統一化が重要

ゲノム研究用病理組織検体取扱規定

(日本病理学会)

2016年に公開され, その中に検体の固定液がゲノム解析に与える影響に関する実証がなされている。

【ゲノム研究用病理組織検体取扱規定】

固定液の濃度と種類

- ・ 遺伝子検索を念頭においた場合、非緩衝ではなく、**中性緩衝ホルマリンを固定に使用することが望ましい。**

DNAを用いた解析のためには、

10%緩衝ホルマリンでの固定が望ましい。

固定後組織から抽出したDNAの品質(DIN値)10% > 15% > 20%緩衝ホルマリン
非緩衝ホルマリンでは全濃度で緩衝ホルマリンよりも低値

※RNAを用いた解析に関しては、10%ホルマリンよりも20%ホルマリンでの固定の方が品質のよいRNAが得られるという結果が示されている。
固定後組織から抽出したRNA品質(RIN値)20% > 15% > 10%

DNAに比してより十分な固定を行った方がRNaseを完全に失活するため？

千葉県内における固定液種類と濃度の現状

アンケート結果

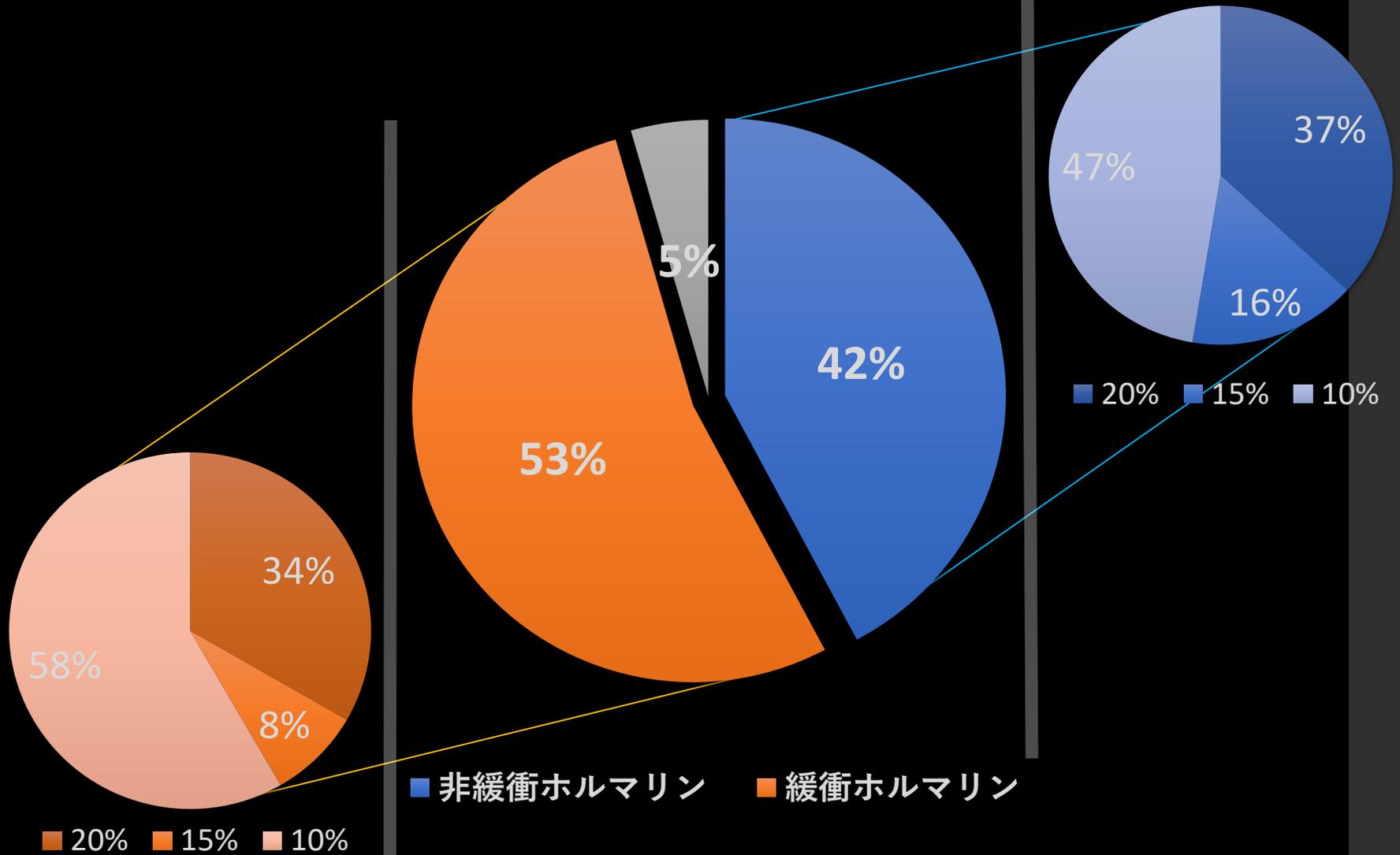
ホルマリン種類	施設数(割合)
20%ホルマリン	7 /45施設(15.6%)
15%ホルマリン	3 /45施設(6.7%)
10%ホルマリン	9 /45施設(20.0%)
20%緩衝ホルマリン	8 /45施設(17.8%)
15%緩衝ホルマリン	2 /45施設(4.4%)
10%緩衝ホルマリン	14 /45施設(31.1%)
その他	2 /45施設(4.4%)

その他

- ・ 50%ホルマリン(迅速固定液ユフィックス:サクラファインテックジャパン)
 - ・ 腎生検などの小さな検体では10%緩衝ホルマリン
- 解剖材料や手術材料の大きな検体に関しては非緩衝20%ホルマリン、その他は20%緩衝ホルマリンというように使い分けをしている。

千葉県内における固定液種類と濃度の現状

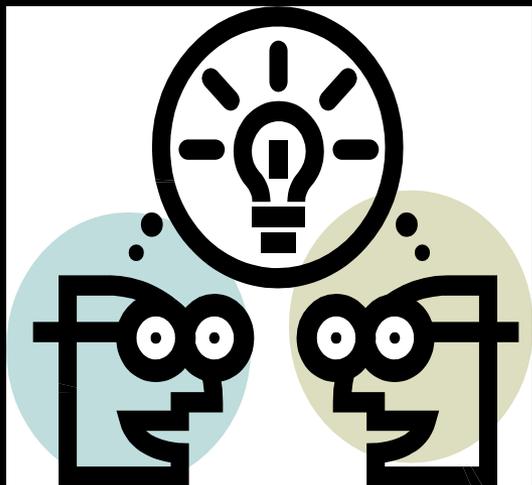
アンケート結果



【総括】

今年度の千臨技精度管理は、前年度同様に参加施設のご努力により良好な結果でありました。病理組織標本については、認定病理検査技師制度が立ち上がり数年が経過しておりますが、引き続き標本作製の標準化について検討されています。今後、それらの方向性も踏まえ、安定した染色結果が得られる様、各施設において継続して良い標本作製することを心がけていただきたい。

【さいごに・・・】



研修会や精度管理等， 活動内容
についてのご意見・ご要望が
ございましたら， お気軽に
研究班委員までご連絡ください。

ご清聴ありがとうございました。