

令和元年2月1日

令和元年度 千臨技病理検査研究班 精度管理調査報告

千葉県臨床検査技師会 病理検査研究班

山崎	利城	豊永	安洋				
大本	真琴	四宮	義貴	草野	広行	諏訪	朋子
永澤	友美	佐藤	嘉洋	中村	博	鈴木	学

目的

- ・ HE染色および鍍銀染色を実施し、染色態度を評価することで染色技術の再確認をする。
- ・ フォトサーベイによる適切な標本作製に関する技術確認と基本的な臓器の病理組織像を理解する。

方法

- ・ 各施設で通常実施しているHE染色標本作製(1枚)
- ・ 鍍銀染色標本作製(1枚)
- ・ インターネットを利用したフォトサーベイ 5問
- ・ アンケート実施

参加施設

標本作製

- ・ HE染色 45施設
- ・ 鍍銀染色 37施設

フォトサーベイ&アンケート

- ・ 46施設 回答

標本作製

標本作製

材料

- ・ 10%中性緩衝ホルマリン固定された肝臓のパラフィン包埋ブロック.

評価方法

総合評価A: 染色上, 目的を十分に達成している.
(HE染色:11-12点, 鍍銀染色:15-16点)

総合評価B: 染色上, 目的を達成している.
(HE染色:9-10点, 鍍銀染色:13-14点)

総合評価C: 染色上, 目的を達成していない.
(HE染色:7-8点, 鍍銀染色:11-12点)

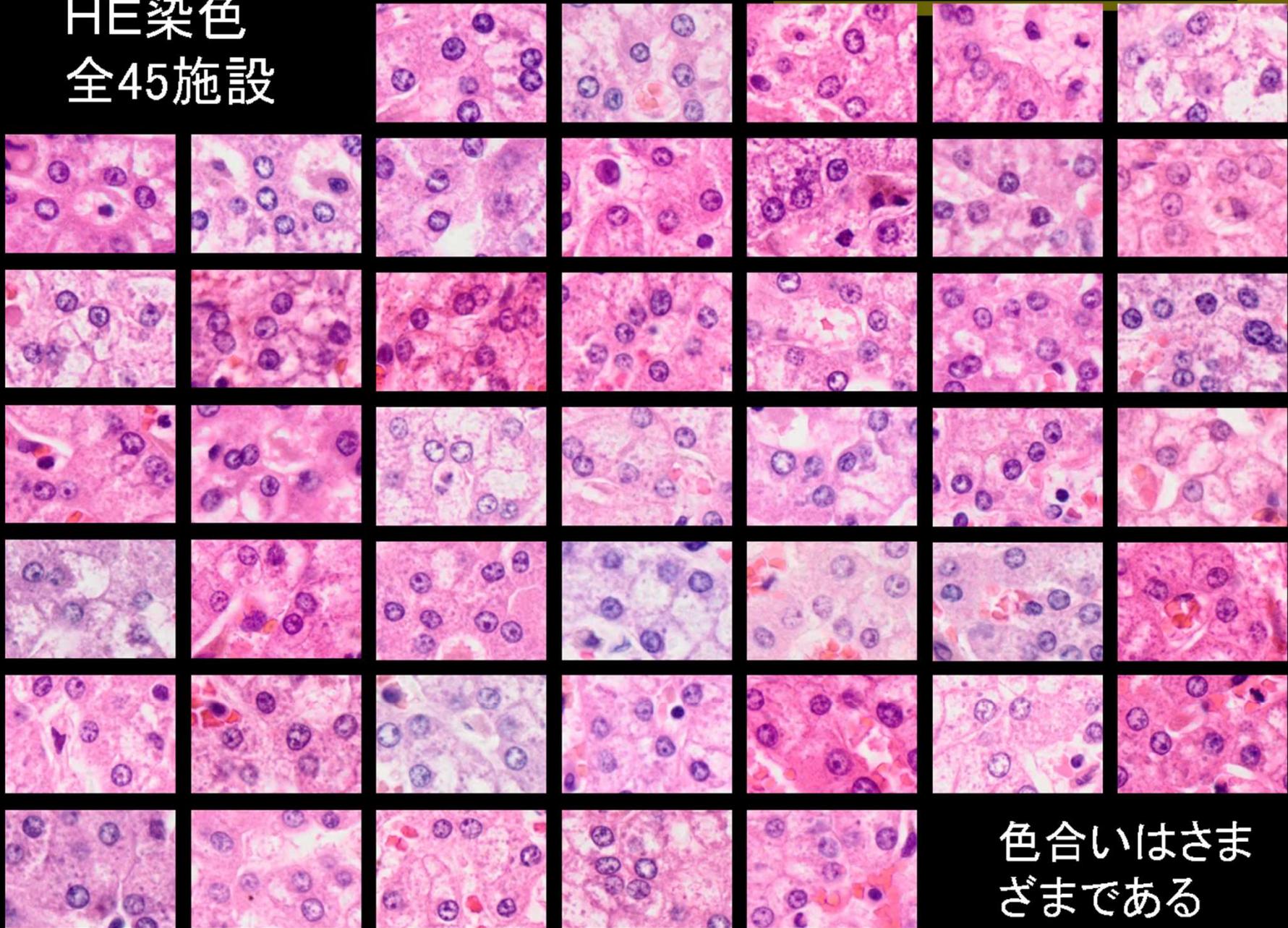
総合評価D: 目的から逸脱し, 早急な改善が必要.
(HE染色:6点以下, 鍍銀染色:10点以下)

※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 全45施設



色合いはさまざま
である

【HE染色標本評価】

スライドガラスの汚れ・剥離・傷等 7施設(前年14施設)

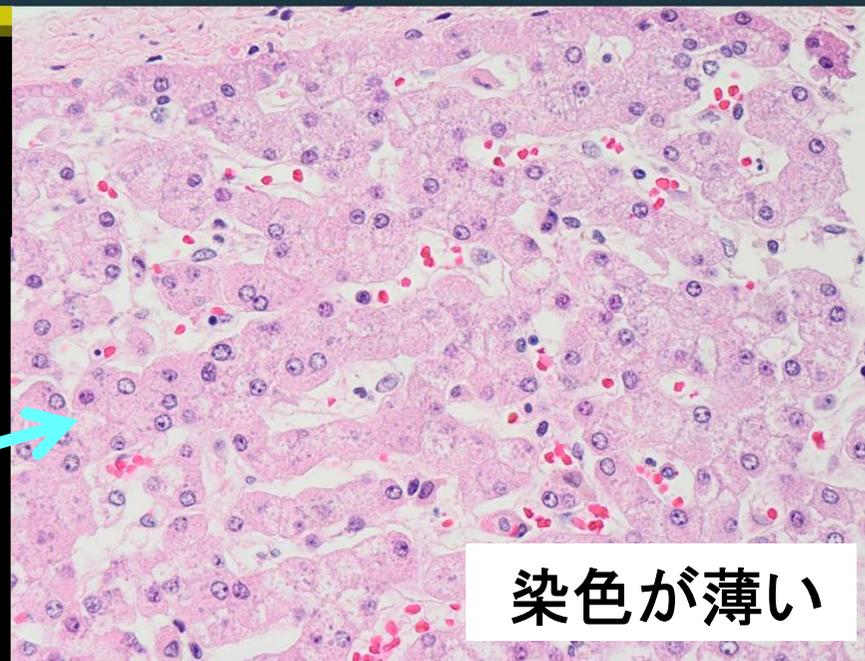
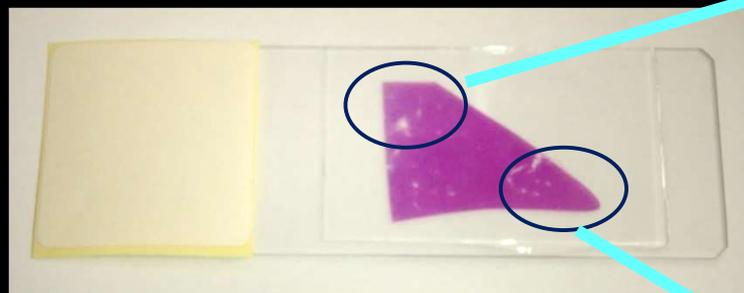


減点対象：切片ゴミの混入、封入剤の漏れ

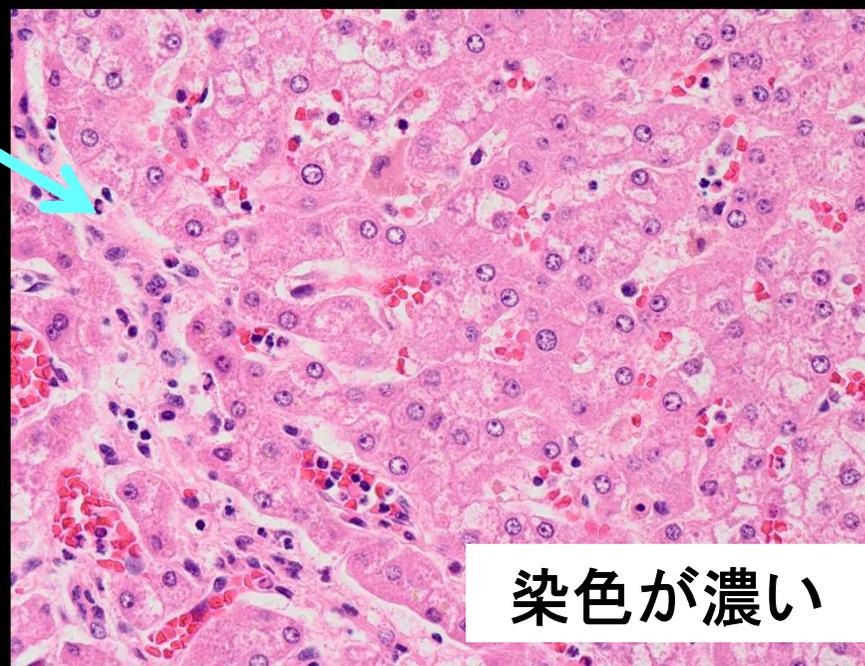
標本上に数か所のゴミの混入や封入剤の漏れ出が認められたもの

【HE染色標本評価】

染色むら 3施設
(前年1施設)



染色が薄い



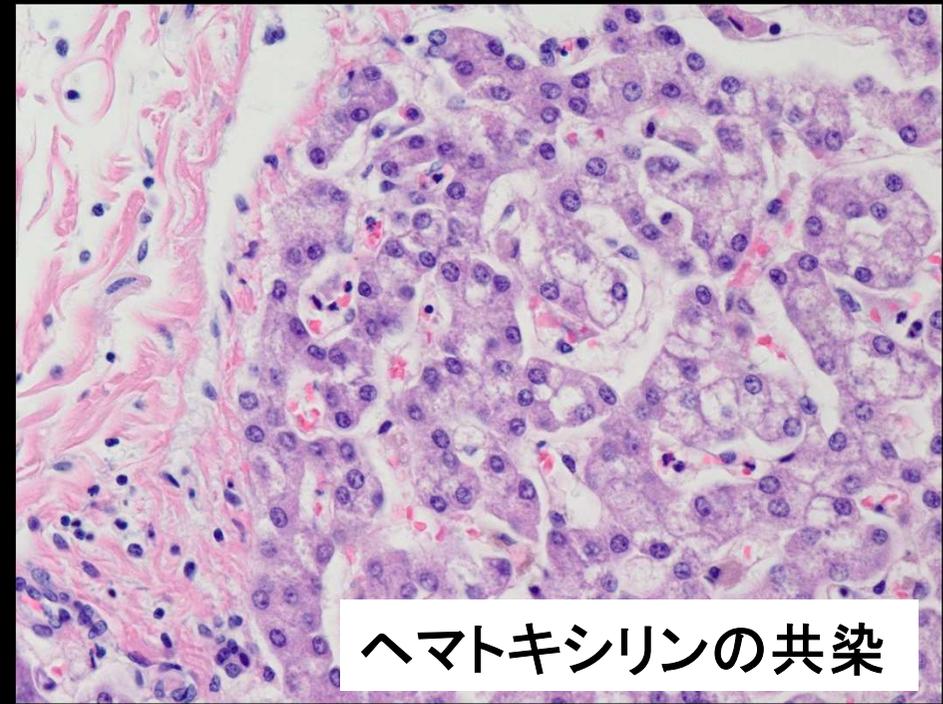
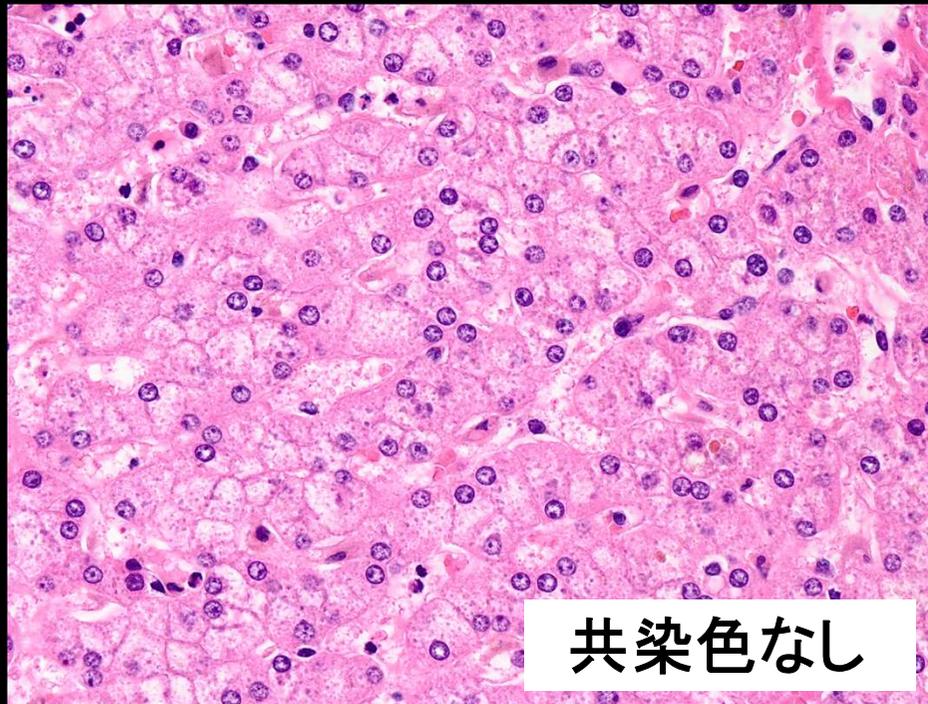
染色が濃い

減点対象

切片の不均一な厚さによる
染色むら

【HE染色標本評価】

共染の有無 13施設（前年6施設）

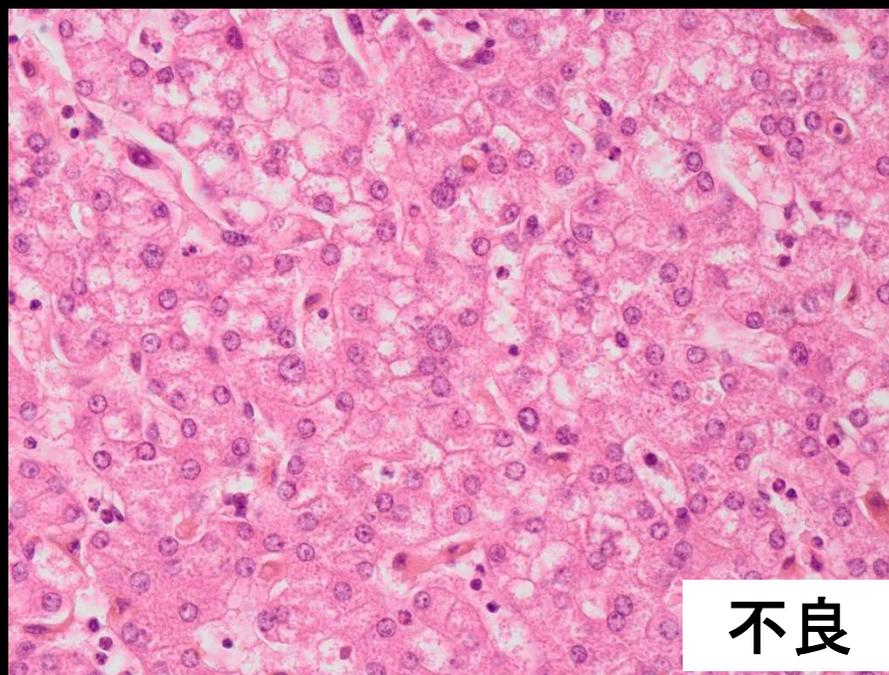


減点対象

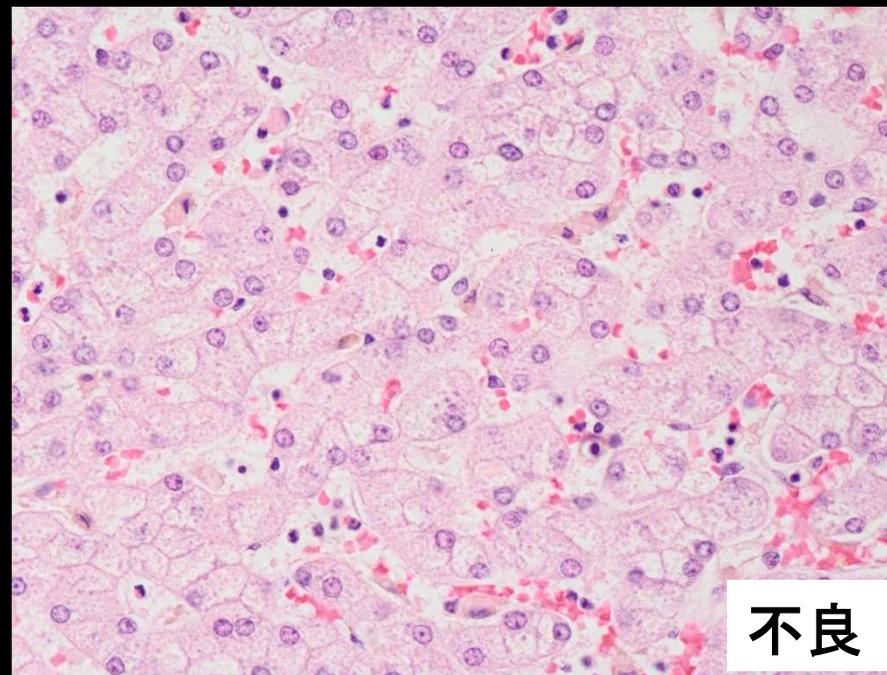
分別不良でのヘマトキシリン共染 くすみ
エオジンの共染

【HE染色標本評価】

ヘマトキシリンの染色性
2施設(前年10施設)



エオジンの染色性
18施設(前年17施設)

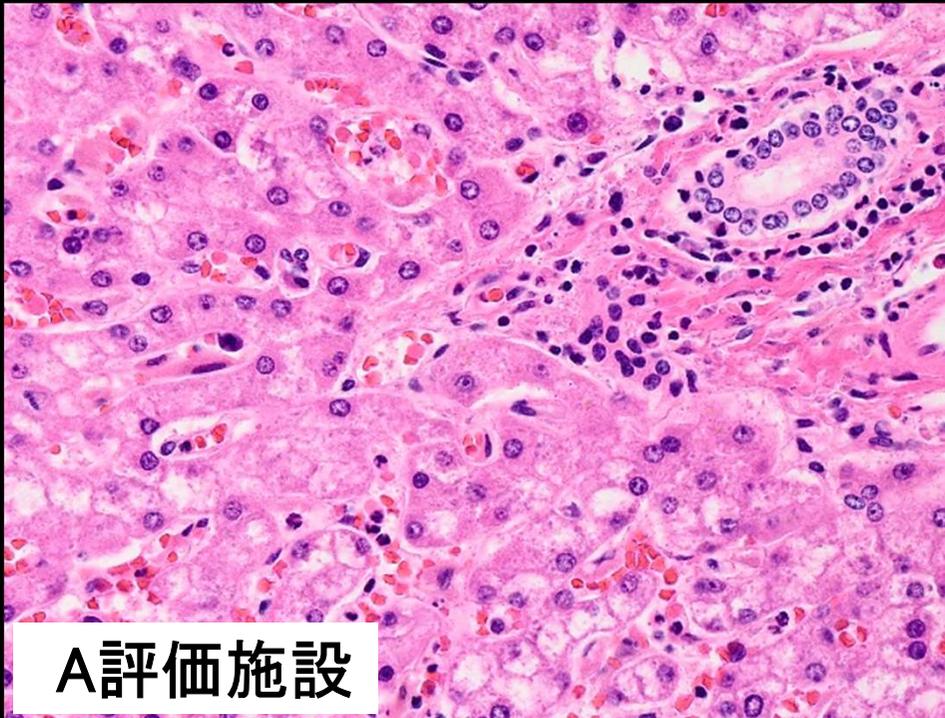


減点対象

ヘマトキシリンやエオジンの染色不良
染色性が弱く観察しにくい

【HE染色標本評価】

コントラスト 21施設（前年15施設）



A評価施設

減点対象

ヘマトキリンとエオジンの
バランスが悪い

A評価： 切片の厚さも考慮し、全体のバランスが良い。
クロマチンや核縁がシャープ、細胞質内に十分エオジンの
色素が入り込み、細胞質の形態も低倍率で把握できるもの。

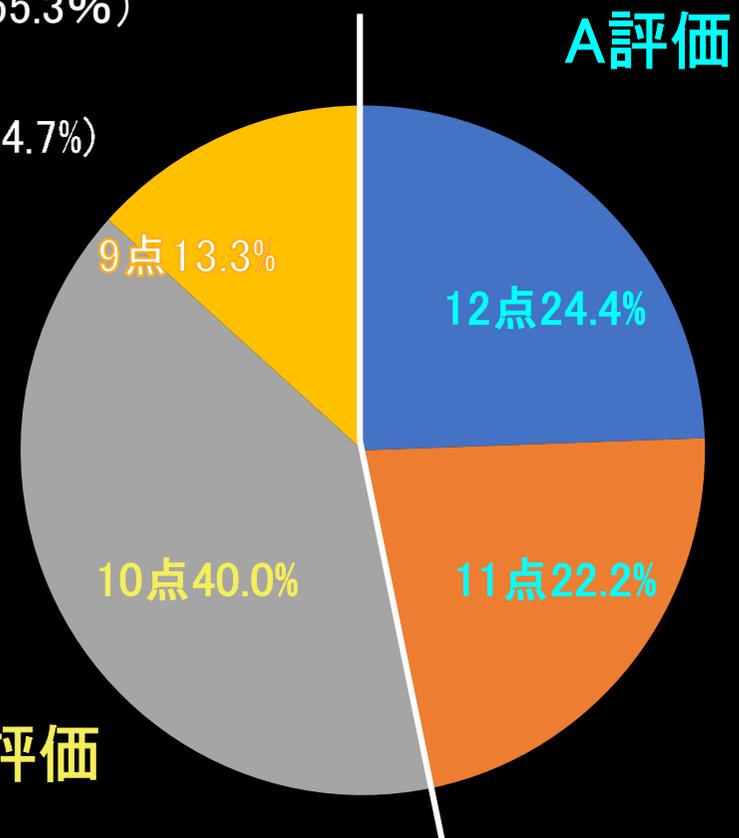
HE染色標本の評価

HE染色	減点となった施設数 (割合)	前年度 割合
スライドガラスの汚れ・剥離・傷等	7/45(15.6%)	14/47(29.8%)
染色むら	3/45(6.7)	1/47(2.1)
共染の有無	13/45(28.9%)	6/47(12.7%)
ヘマトキシリンの染色性	2/45(4.4%)	10/47(21.3%)
エオジンの染色性	18/45(40.0%)	17/47(36.2%)
核と細胞質のコントラスト	21/45(46.7%)	15/47(31.9%)

スライドガラスの汚れ・剥離・傷等やヘマトキシリンの染色性による減点が大幅に減少した。

【HE染色標本評価まとめ】

総合評価	施設数 (45施設)	昨年 (47施設)
A 評価	21 (46.7%) ←	26 (55.3%)
B 評価	24 (53.3%) ←	21 (44.7%)
C 評価	0 (0.0%)	
D 評価	0 (0.0%)	



多くの施設において良好な結果
Bの割合が増加した

【HE染色アンケート結果】

<①染色方法>

	件数
自動染色装置	29
用手法	16
未回答	0

<②ヘマトキシリン液>

	件数
自家製	12
市販品	33
未回答	0

<③ヘマトキシリン染色前の蒸留水使用の有無>

	件数
有り	26
無し	19
未回答	0

<④分別液の種類(使っている施設のみ)>

	件数
0.5%塩酸アルコール	3
1%塩酸アルコール	7
0.5%塩酸水	3
1%塩酸水	1
その他	5

<⑤エオジン液>

	件数
自家製	14
市販品	31
未回答	0

<⑥酸性添加剤(酢酸など)の有無>

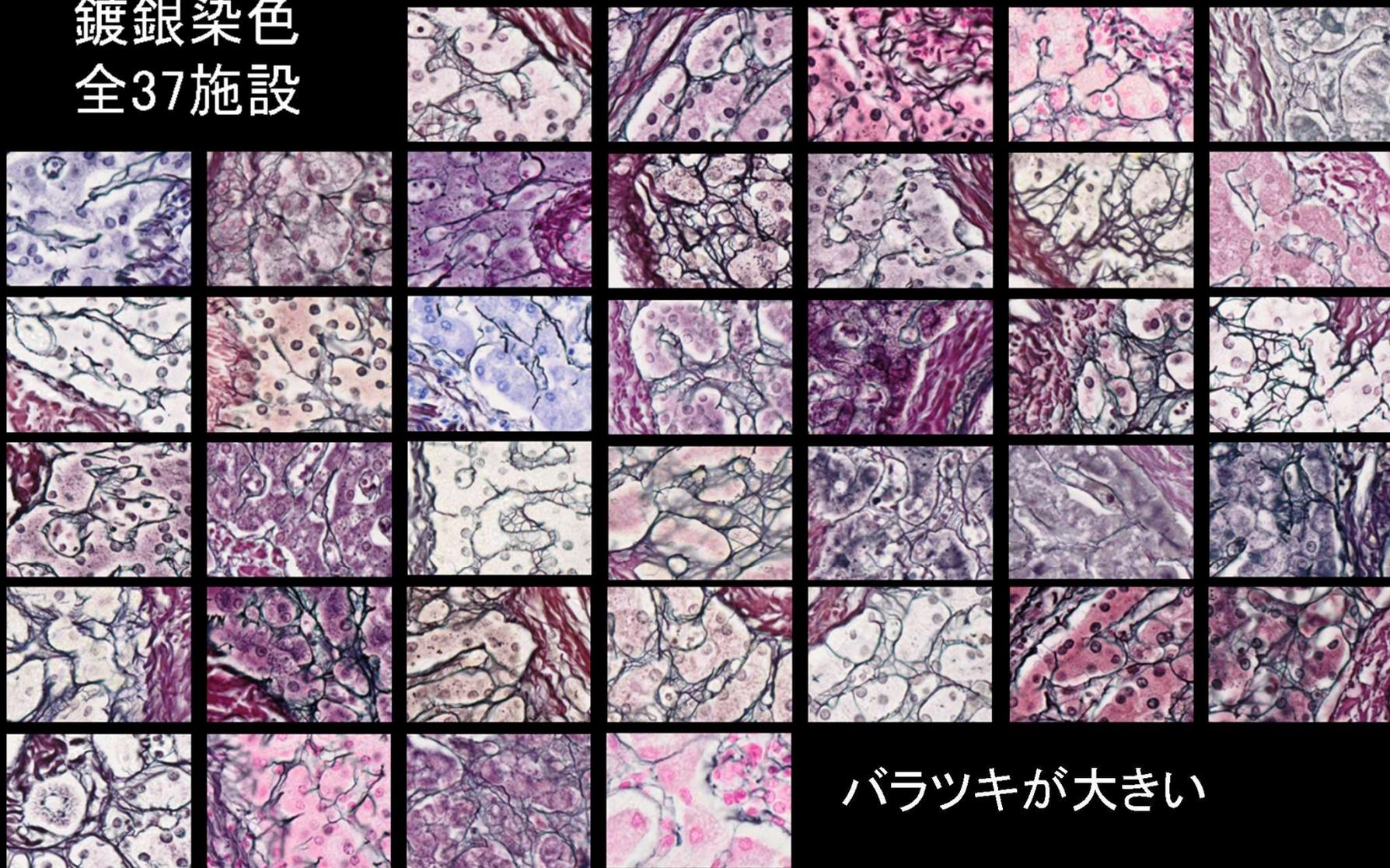
	件数
有り	15
無し	20
未回答	10

昨年度より、染色方法の変更は4施設、ヘマトキシリン液の自家製から市販品への変更は2施設、市販品試薬変更は10施設、染色時間の変更は11施設であった。エオジンの自家製から市販品への変更は1施設、市販品試薬変更は3施設、染色時間の変更は11施設であった。

【鍍銀染色標本評価表】

鍍銀染色	配点
切片の厚さ	2
スライドガラスの汚れ・剥離・傷等	2
染色むら	2
共染・過染の有無	2
細網線維の染色性	2
膠原線維の染色性	2
核の染色性	2
コントラスト	2
合 計	16

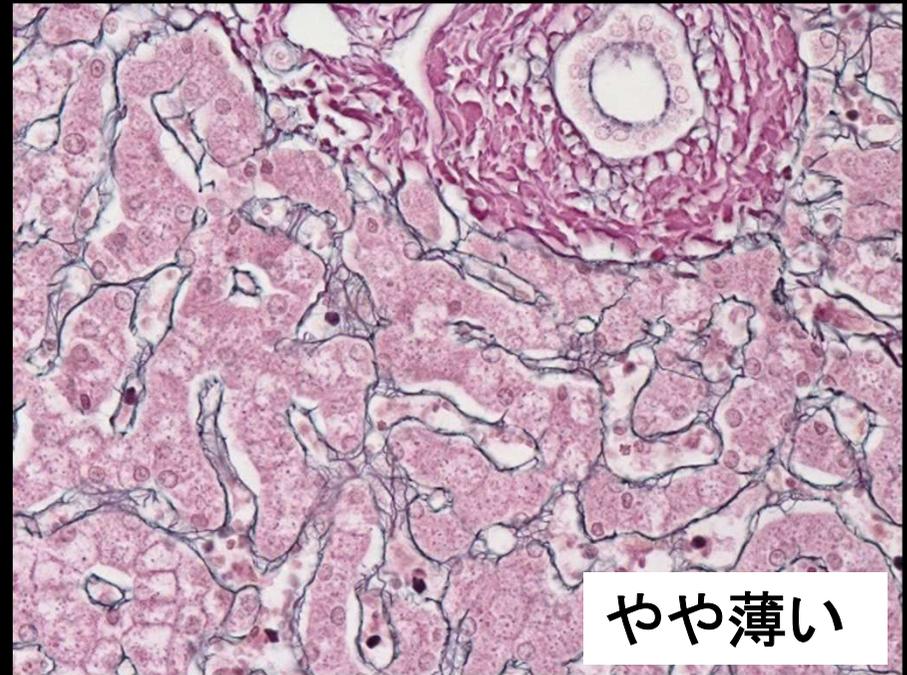
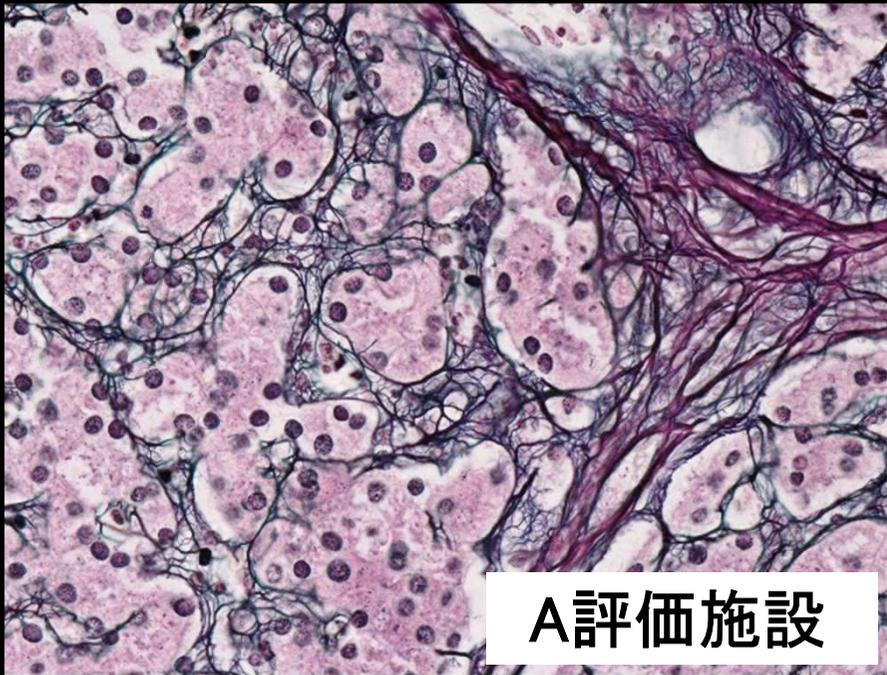
鍍銀染色
全37施設



バラツキが大きい

【鍍銀染色標本】

切片の厚さ 7施設



減点対象：薄い切片

A評価に比べ切片が薄いと判断したもの

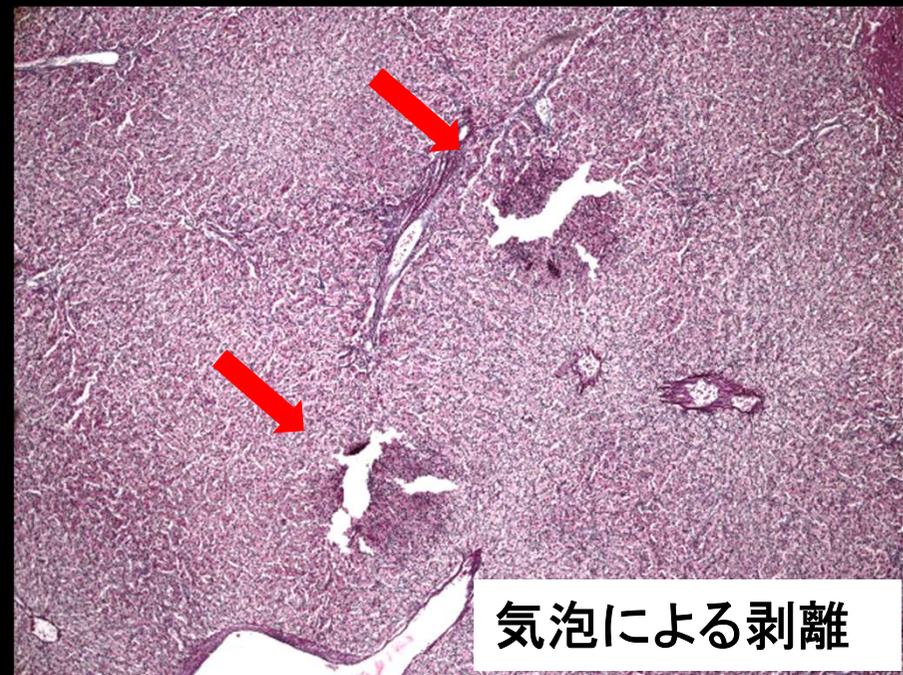
【鍍銀染色標本】

スライドガラスの汚れ・剥離・傷等

4施設



標本上の傷



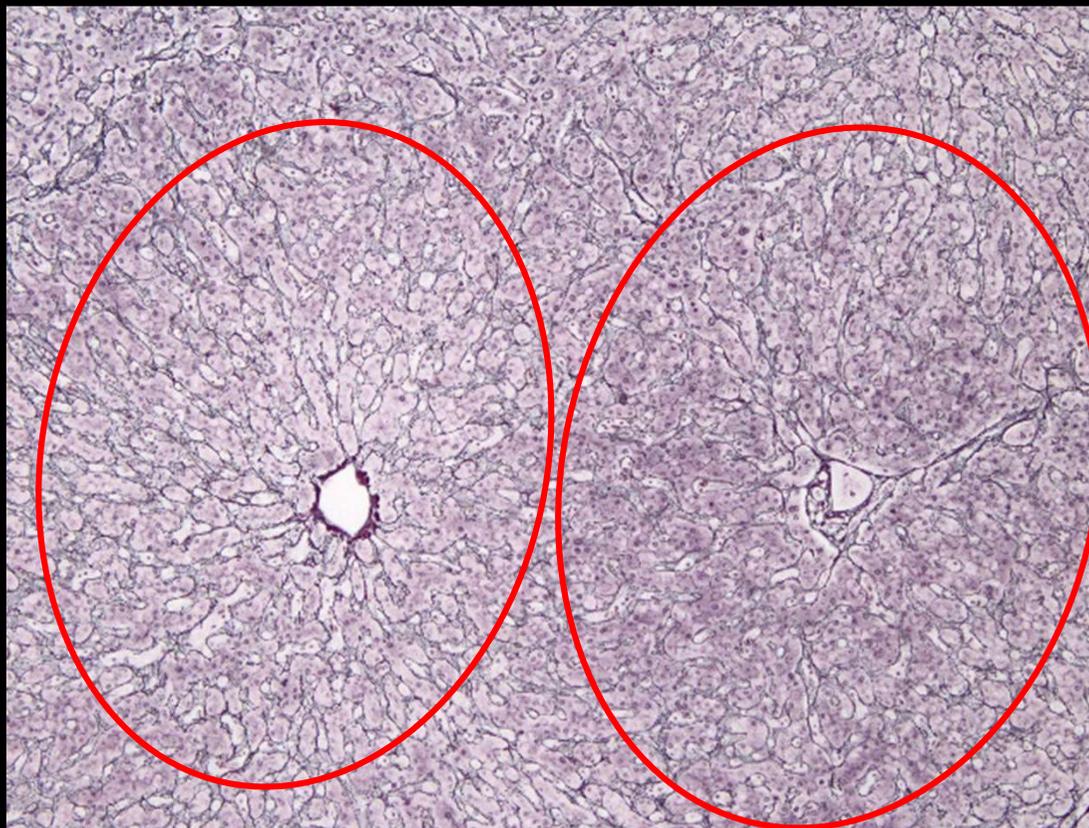
気泡による剥離

減点対象：標本上に傷や剥離（気泡）

ブロックを冷やして薄切を行うと、硬度が増してもろくなり
亀裂が生じる

【鍍銀染色標本】

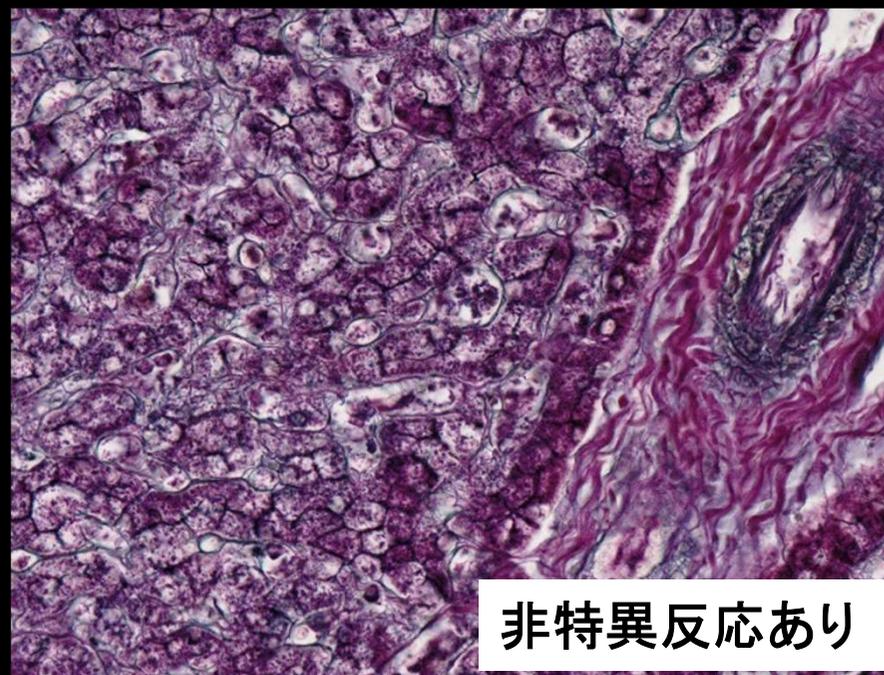
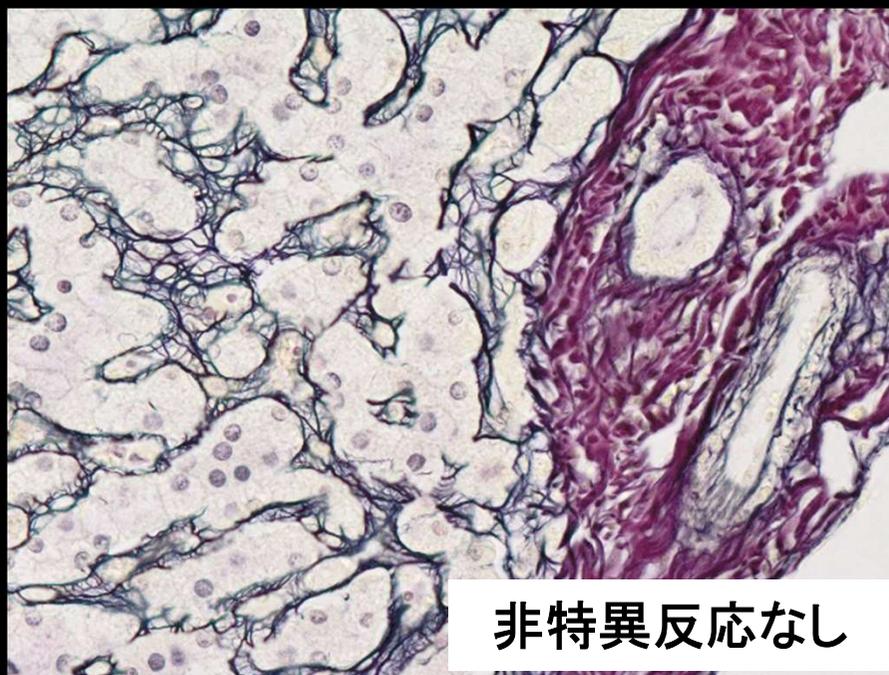
染色むら 23施設



減点対象：染色操作による染色むら
細胞質への非特異反応による染色むらがみられるもの

【鍍銀染色標本】

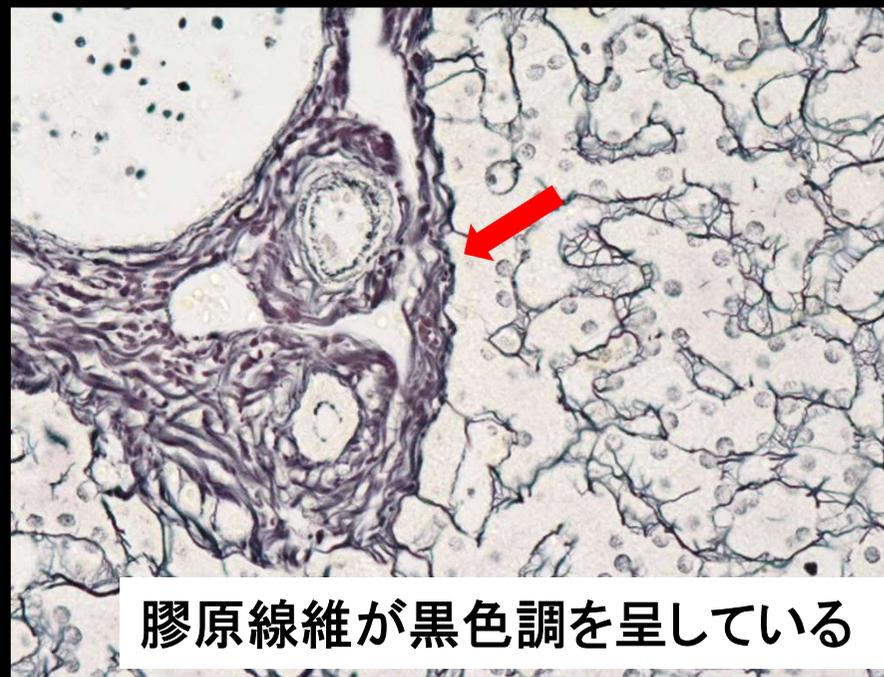
共染・過染の有無 10施設



減点対象：細胞質の非特異反応
銀液作製不良によるもの

【鍍銀染色標本】

膠原線維の染色性 4施設

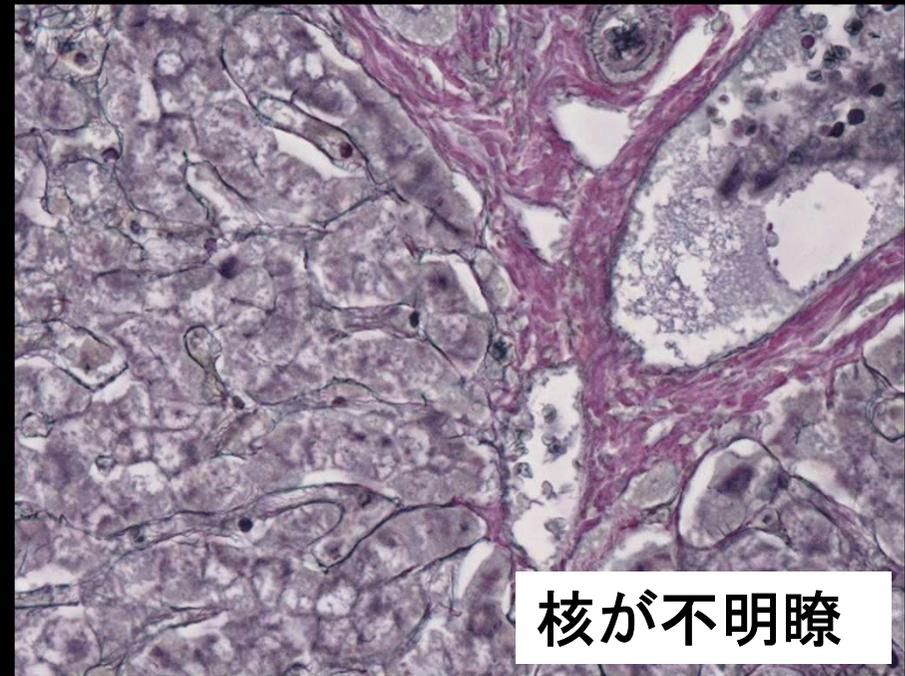
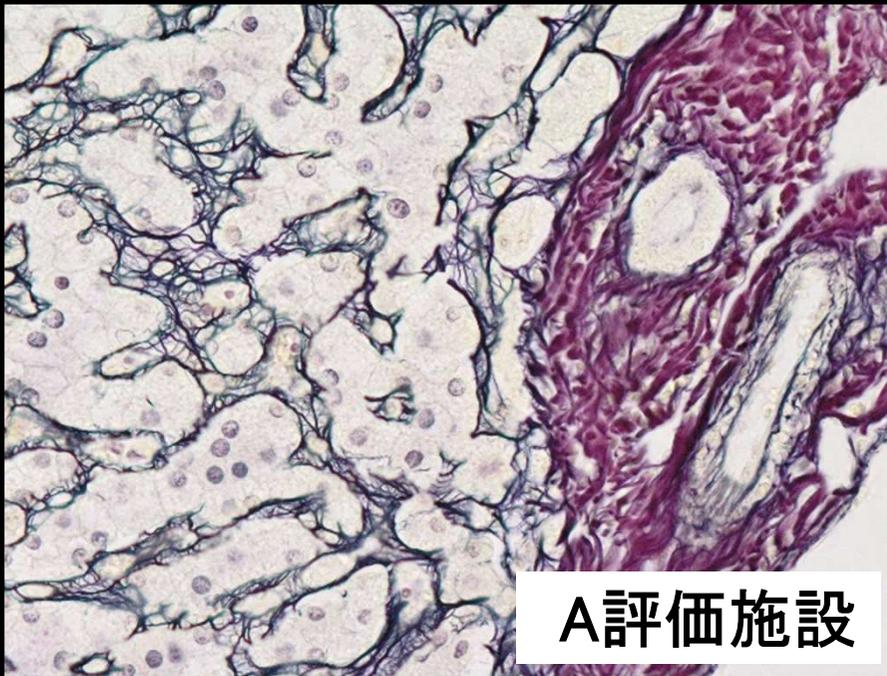


減点対象： 膠原線維の染色不良

銀液作製不良によるもので、膠原線維が黒色に染まっている

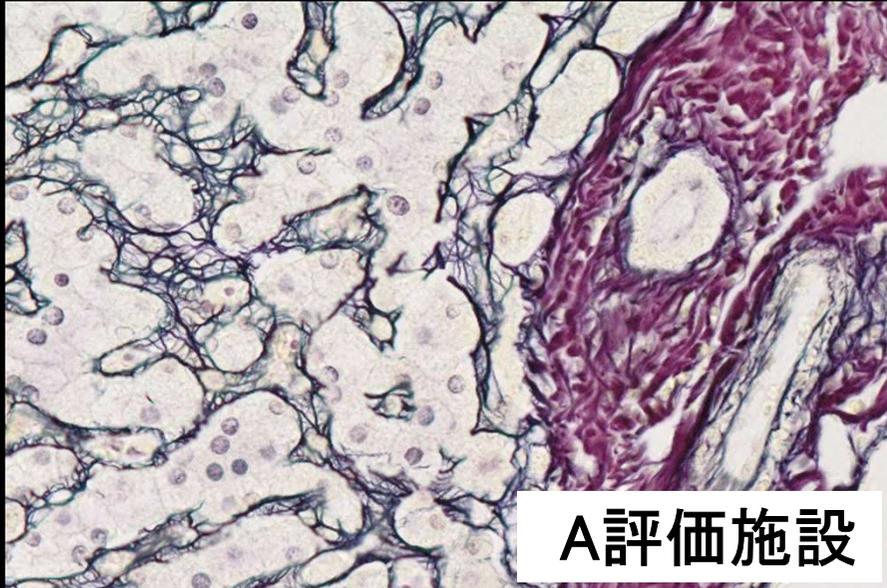
【鍍銀染色標本】

核の染色性 1施設

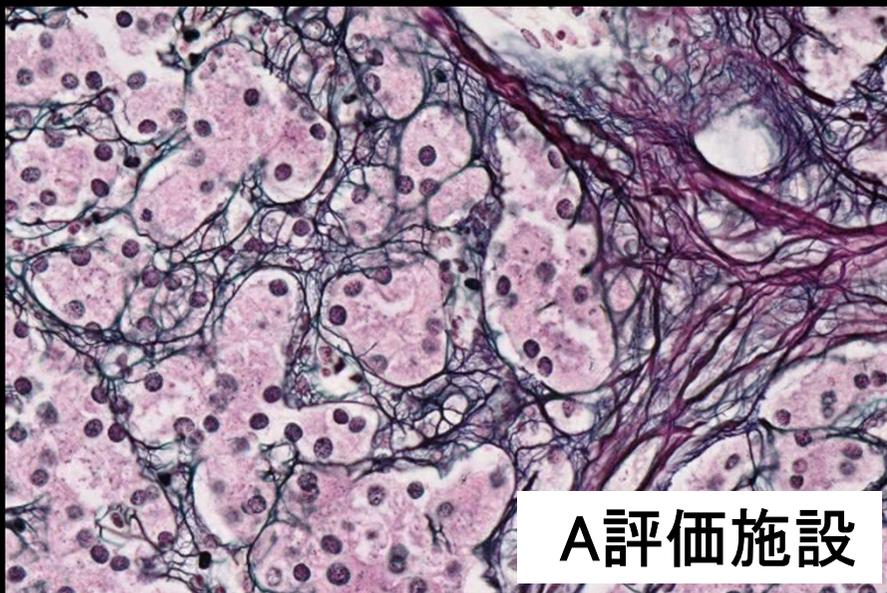


減点対象： 核の染色不良

【鍍銀染色標本】

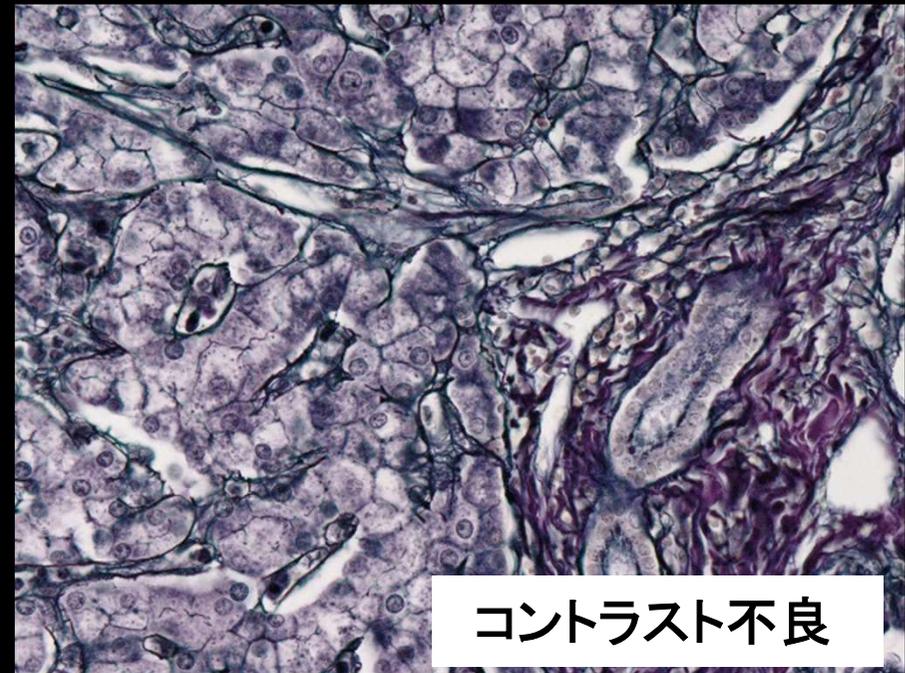


A評価施設



A評価施設

コントラスト 15施設



コントラスト不良

減点対象：黒色と茶色の
バランスが悪い

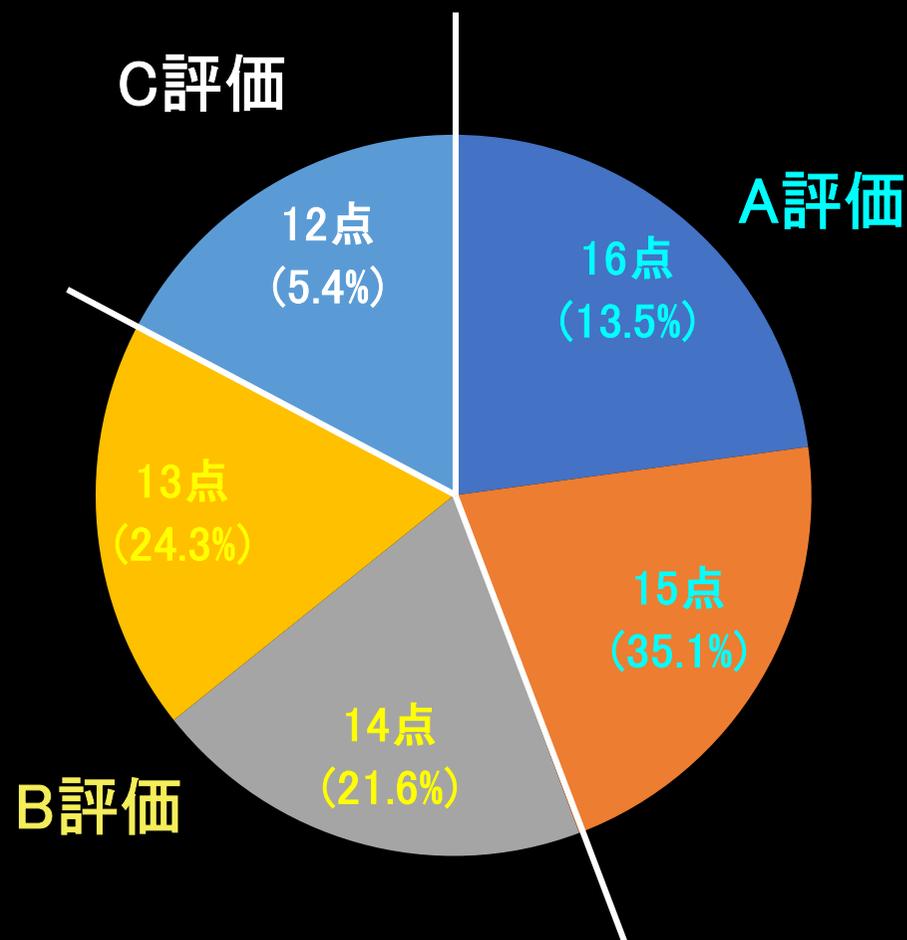
鍍銀染色標本の評価

膠原線維染色	減点となった施設数 37施設(割合)
切片の厚さ	7(18.9%)
スライドガラスの汚れ 剥離・傷等	4(10.8%)
染色むら	23(62.2%)
共染・過染の有無	10(27.0%)
細網線維の染色性	0(0/0%)
膠原線維の染色性	4(10.8%)
核の染色性	1(2.7%)
コントラスト	15(40.5%)

鍍銀染色標本の評価

評価	鍍銀染色 (37施設)
A 評価	18(48.7%)
B 評価	17(45.9%)
C 評価	2 (5.4%)
D 評価	0 (0.0%)

C評価を2施設認めた。



【鍍銀染色アンケート結果】

<①切片の厚さ>

	件数
3.3 μm	1
4.0 μm	2
5.0 μm	6
6.0 μm	14
6.3 μm	1
7.0 μm	3
8.0 μm	8
9.0 μm	1
未回答	1

<②実施頻度>

	件数
毎日	2
週に1回程度	7
週に2~3回程度	5
月に1~2回程度	8
2~3ヶ月に1回程度	5
6ヶ月に1回	7
年に1回	1
精度管理のみ	2

<③酸化剤>

	件数
自家製	33
市販品	4

<④還元液-前処理>

	件数
自家製	32
市販品	4
未使用	1

【鍍銀染色アンケート結果】

<⑤増感液>

	件数
自家製	32
市販品	5

<⑦分別>

種類	件数
90%アルコール	2
95%アルコール	23
100%アルコール	8
未回答	4

<⑩塩化金後-シュウ酸>

	件数
自家製	20
市販品	3
未使用	14

<⑥アンモニア銀>

	件数
自家製	29
市販品	8

<⑧還元液>

	件数
自家製	33
市販品	4

<⑪定着液>

	件数
自家製	26
市販品	10
未使用	1

<⑨調色液>

	件数
自家製	32
市販品	4
未使用	1

<⑫後染色の有無>

種類	件数
ケルンエヒテロート	20
マイヤーヘマトキシリン	3
ヘマトキシリン	14

< 鍍銀染色操作のポイントや工夫 >

鍍銀染色

- ・過マンガン酸カリウム水溶液、アンモニア銀水溶液、還元液を調整する際の器具は厳重に蒸留水で洗浄しています。
- ・アンモニア銀水溶液染色終了後、アルコールを通し還元液に入れる際、染色ムラにならないよう静かに入れています。
- ・分別後の還元処理でスライドガラスを動かさないように染める。

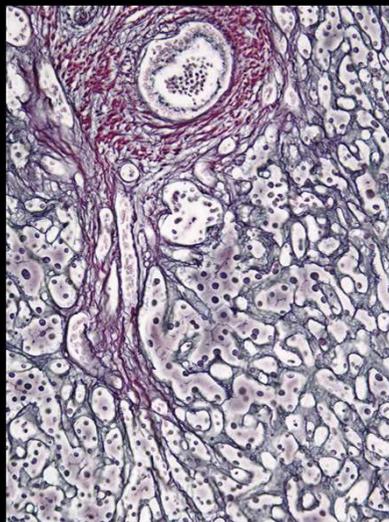
【細胞質の共染】

- ・過マンガン酸カリウムの処理不足、酸化後のシュウ酸、鉄ミョウバン、アルコール、塩化金、塩化金後のシュウ酸の過剰で認められる。
- ・アンモニア銀作製時の、アンモニアの減量、水酸化カリウムの増量でも認められる。

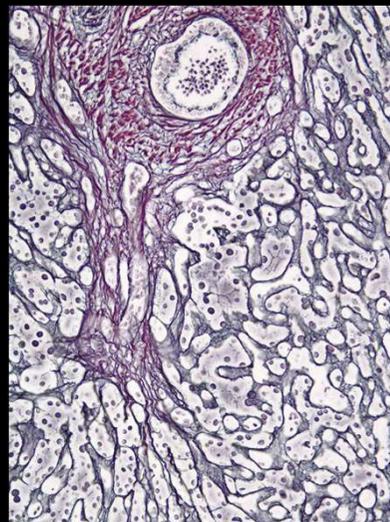
小林博久ほか. 鍍銀染色(標準化への取り組み). 医学検査 45:78-84, 1996 より

酸化時間による差(アンモニアック銀液【武藤化学】使用)

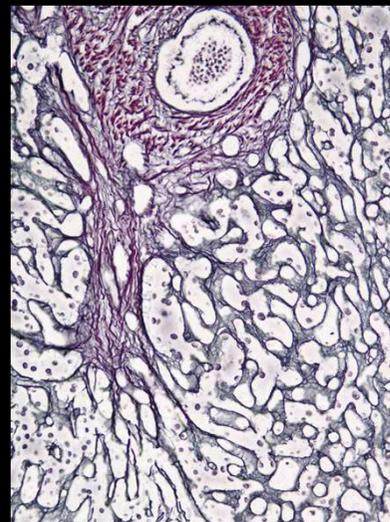
3分



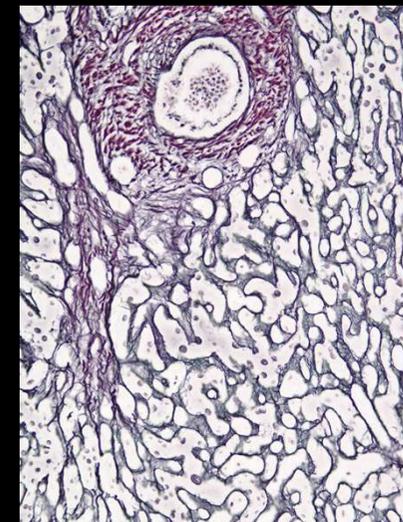
5分



10分



20分



【銀液組成について】

〈アンモニア銀作製時のポイント〉

アンモニア量

終点量より±1、2滴が良好

4滴以上の減量-細胞質の共染増強、線維の染色性低下

4滴以上の増量-共染はなくなるが、膠原線維の黒色調が増す

水酸化カリウム(4%水溶液)量

3～8滴が良好

減量-膠原線維の黒色調が増し、染め分けは不良

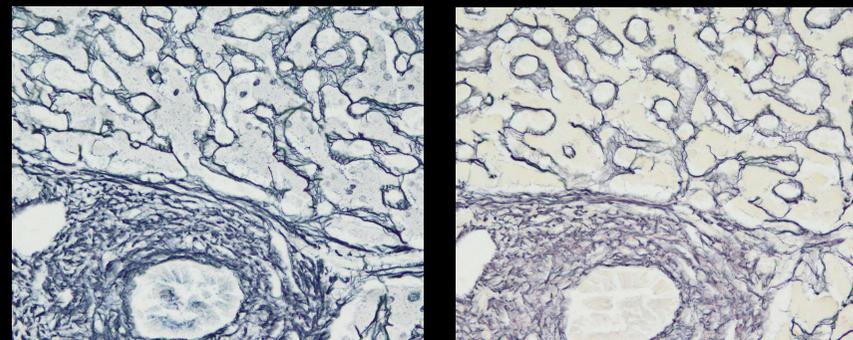
増量-細胞質の共染が増強

【銀液組成について】

〈一般的なアンモニア銀調整方法〉

10%硝酸銀液10mlに4%水酸化カリウム水溶液5滴加えると、ただちに黒褐色の酸化銀の沈殿が生じる。ここにアンモニアを滴下しごく微量残る状態で終了とする。蒸留水で全量を100mlとする。

病理業務経験年数12か月の新人に2回、鍍銀染色を染めてもらった



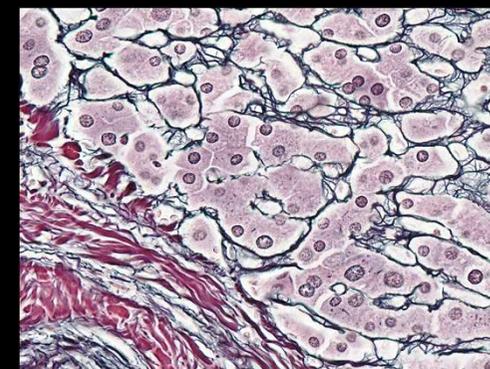
不良標本、再現性も悪い

工夫

〈簡便なアンモニア銀調整方法〉

1%硝酸銀液50mlに5%水酸化カリウム水溶液とアンモニア水を等量混合した液を滴下していき、顆粒が消失した時点で終了とする。アルブモーゼシルバーを少量加える。

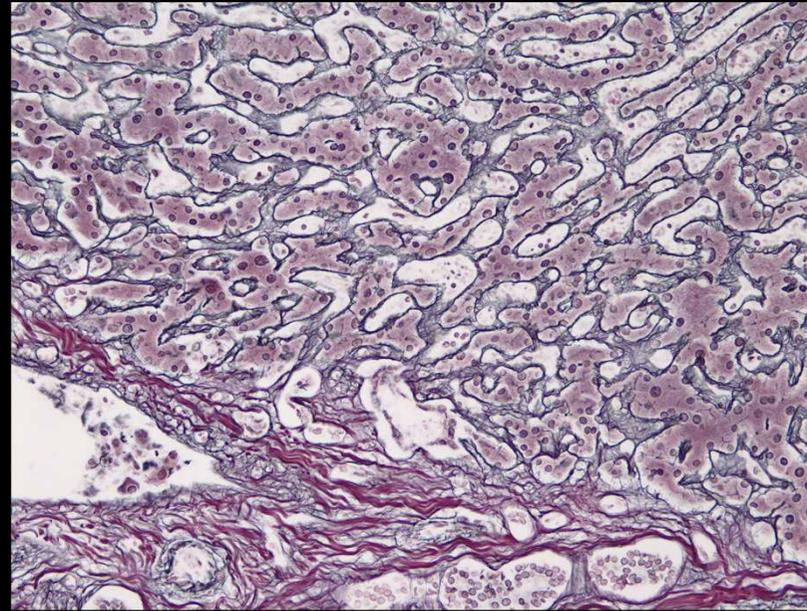
東邦大佐倉法



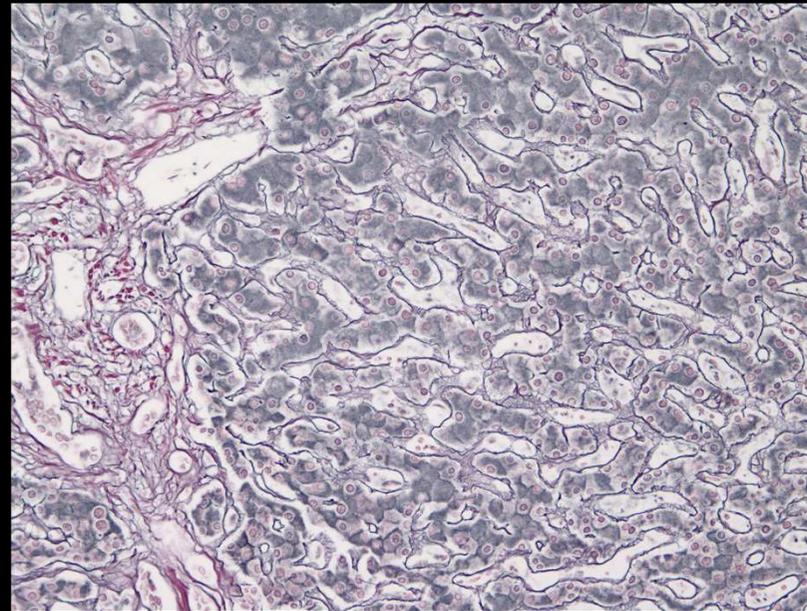
経験値の差が出にくい

【染色ムラ】

還元液中で静置する



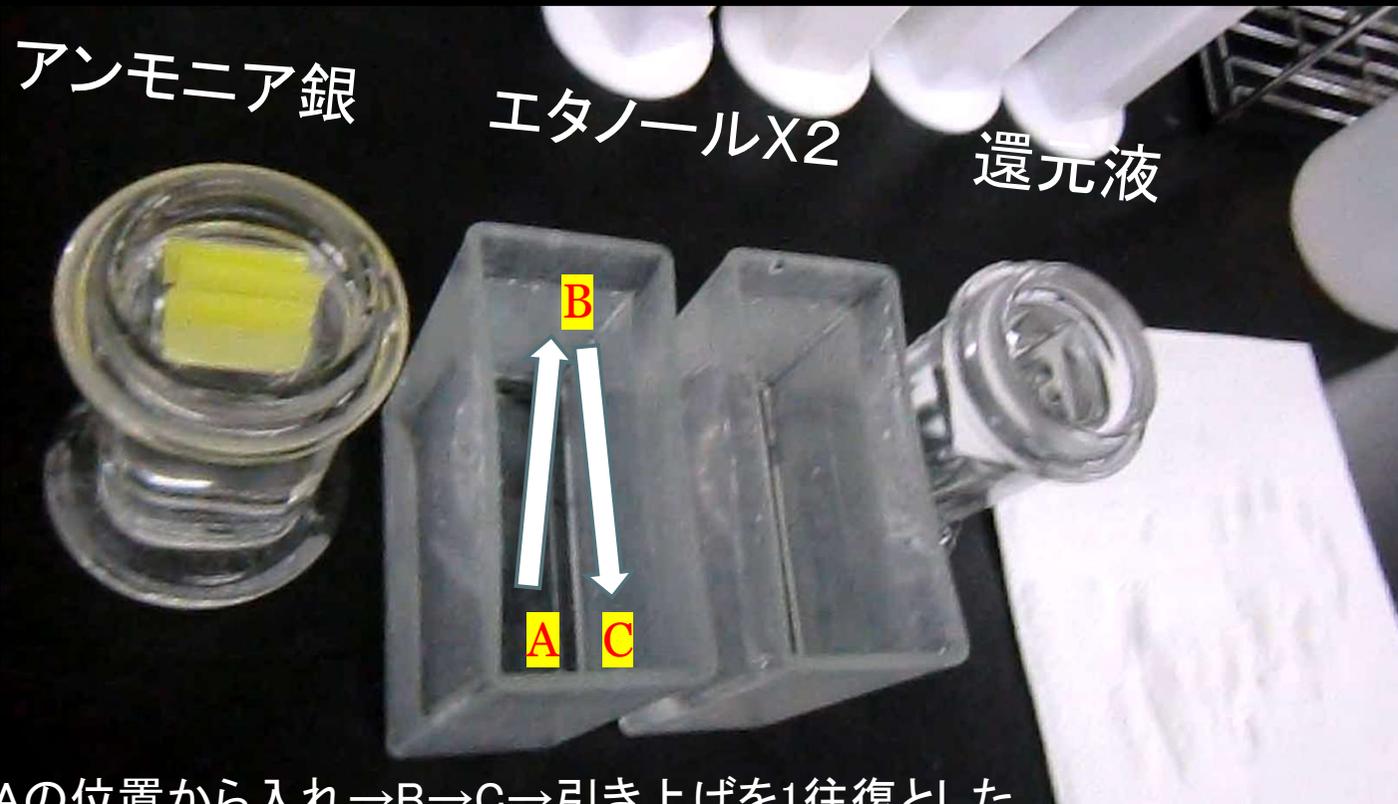
還元液中で絶えず揺らす
細胞質に銀顆粒の付着が
目立つ



【染色ムラ】

アルコール洗浄方法による差

- ① 1往復 ② 2往復 ③ 1往復X2槽 ④ 2往復X2槽

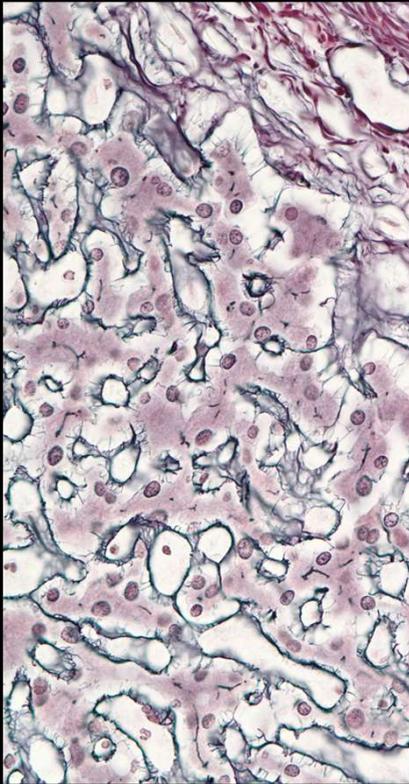


切片をAの位置から入れ→B→C→引き上げを1往復とした

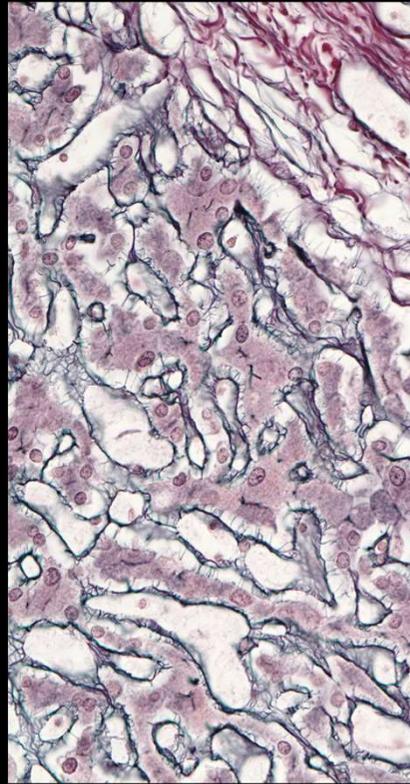
【染色ムラ】

アルコール洗浄方法による差

① 1往復



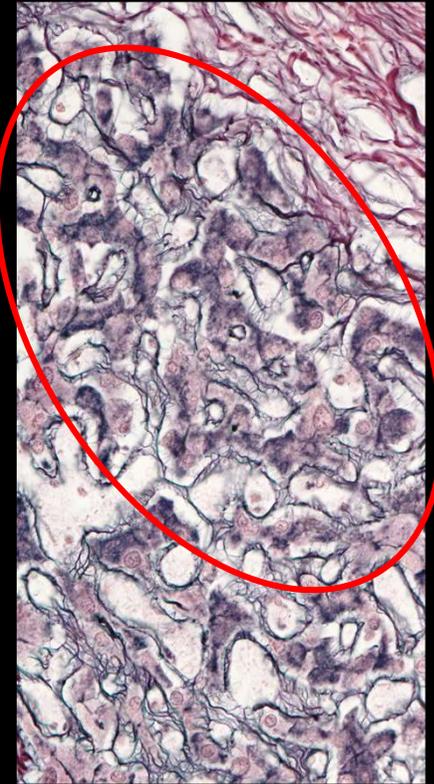
② 2往復



③ 1往復×2槽



④ 2往復×2槽



③ 1往復×2槽から非特異反応が出現した

【染色ムラ】

還元液の操作 静置が最良だが、どこまで許容されるか検討した

- ① 1往復 ② 2往復 ③ 吹きかけ ④ 絶えず動かす

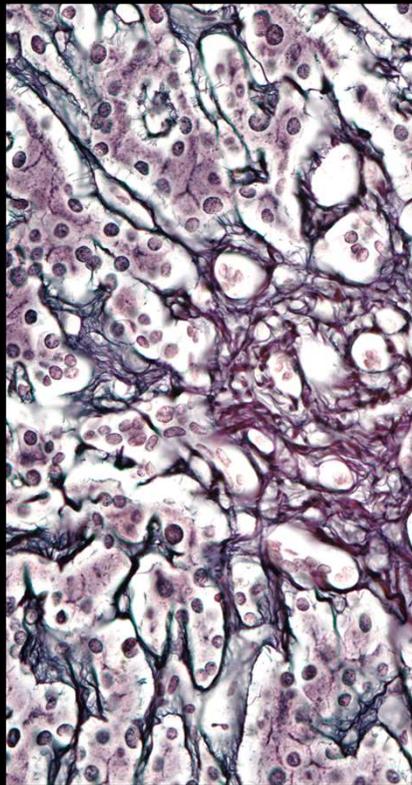


切片をAの位置から入れ→B→C→静置を1往復とした

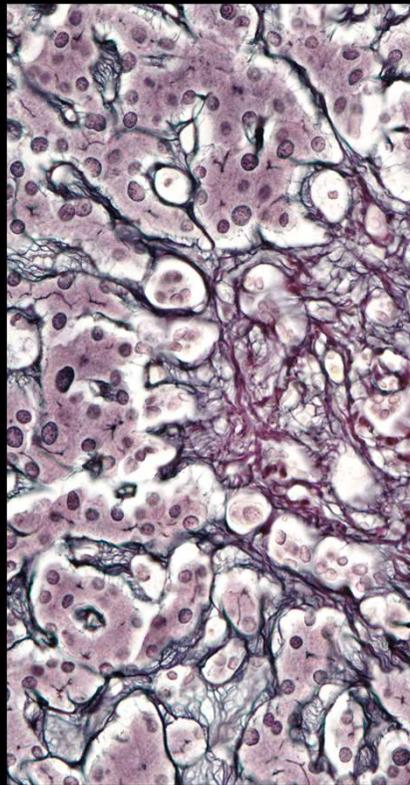
【染色ムラ】

還元液の操作

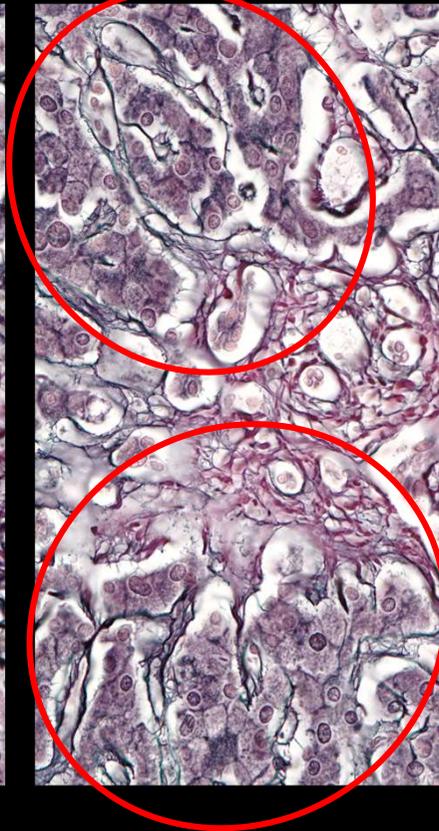
① 1往復



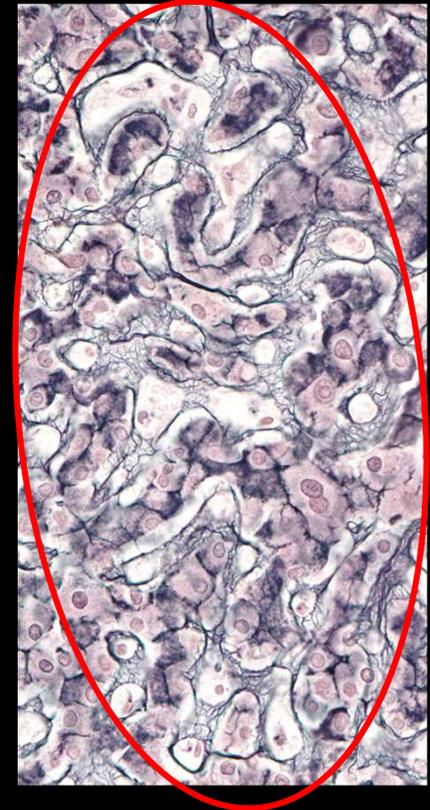
② 2往復



③ 吹きかけ



④ 絶えず動かす



③ 吹きかけから非特異反応が出現した

フォトサーベイ

フォトサーベイ(5問)

評価方法

A評価	B評価	C評価	D評価
5問正解	4問正解	3問正解	2問以下

総合評価A: 目的を満たし, 極めて優れている.

総合評価B: 目的を満たしているが, 改善の余地あり.

総合評価C: 目的を満たしておらず, 改善が必要.

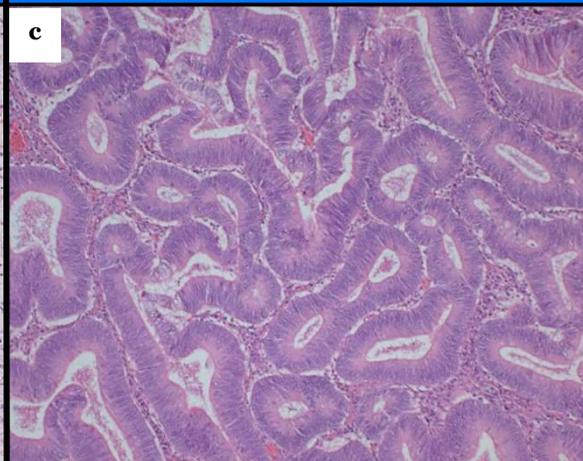
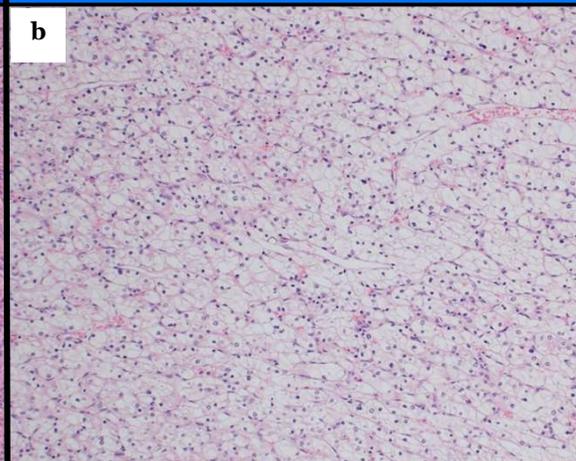
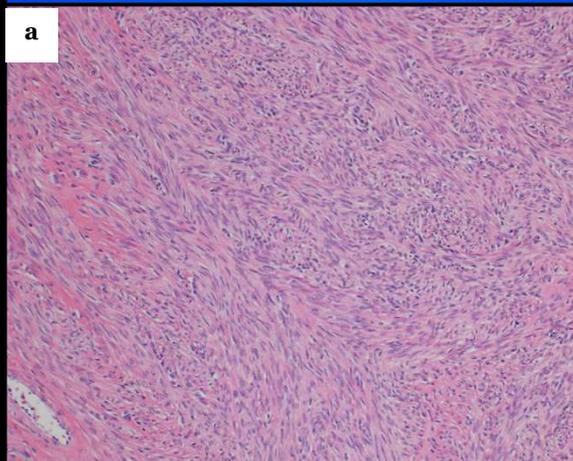
総合評価D: 目的から極めて大きく逸脱し, 早急な改善が必要.

※解答が大きく分かれた設問, 極端に正解率が低い設問については設問の適・不適の再評価を行う.

※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.

【設問 1】 A～Cは腫瘍の肉眼像、a～cはHE染色の組織像です。

A～Cの肉眼像から推測される、最も適切な組織像の組み合わせはどれか。



① A - a, B - b, C - c

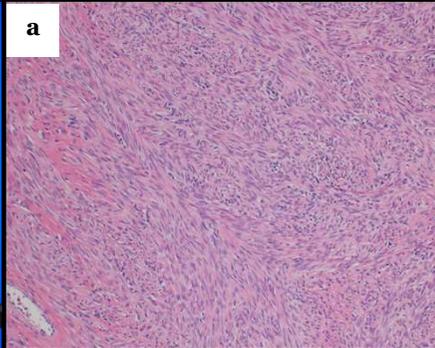
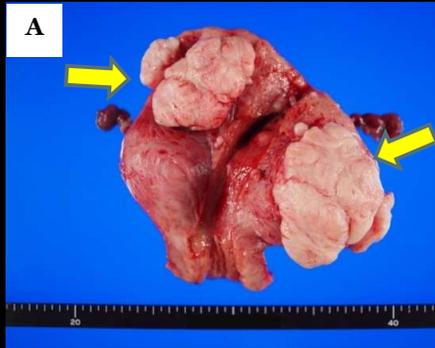
② A - b, B - a, C - c

③ A - c, B - a, C - b

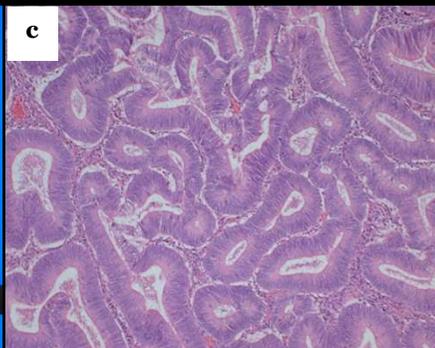
④ A - a, B - c, C - b

⑤ A - b, B - c, C - a

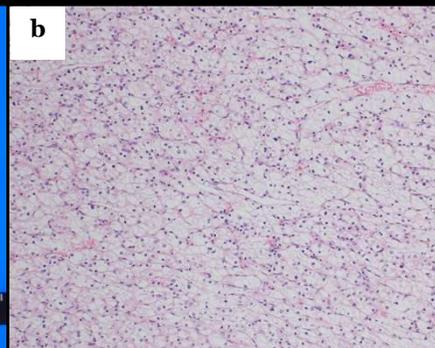
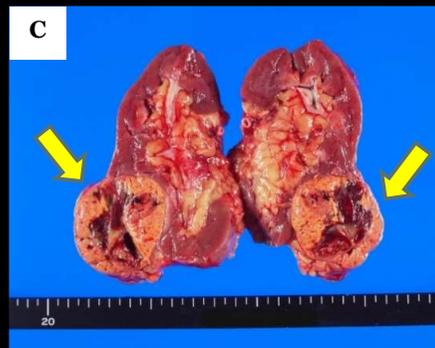
【設問1】 解答：④A-a, B-c, C-b



A-aは、子宮筋腫の肉眼像および組織像である。Aは肉眼的に周囲との境界が明瞭で、断面では渦巻き状あるいは唐草模様を呈する球状の白色結節性病変が多発して見られる。
aは棍棒状核と豊富な細胞質を有する細胞境界不明瞭な紡錘形細胞が束をなして増殖し、細胞束が複雑あるいは不規則に錯綜している

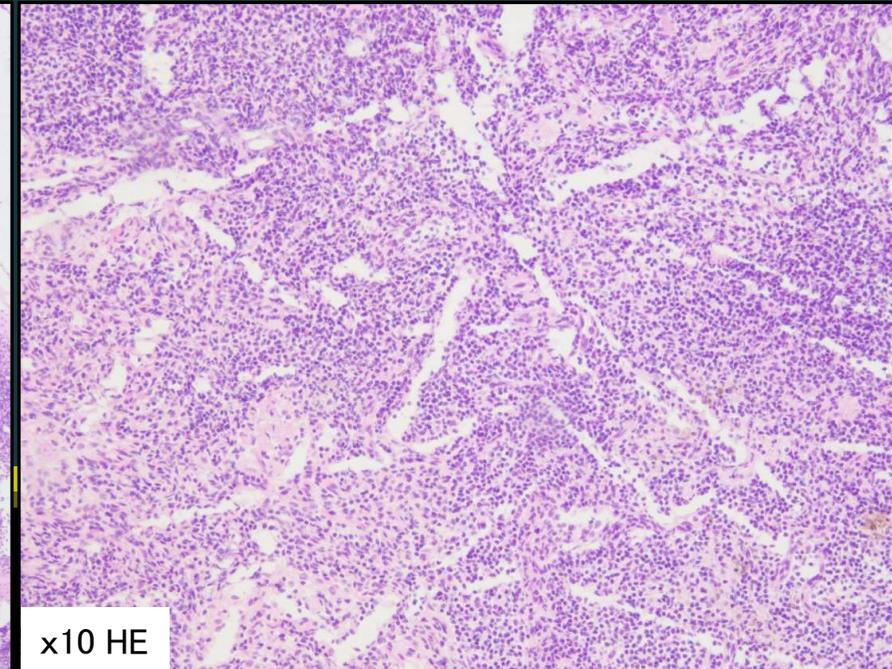
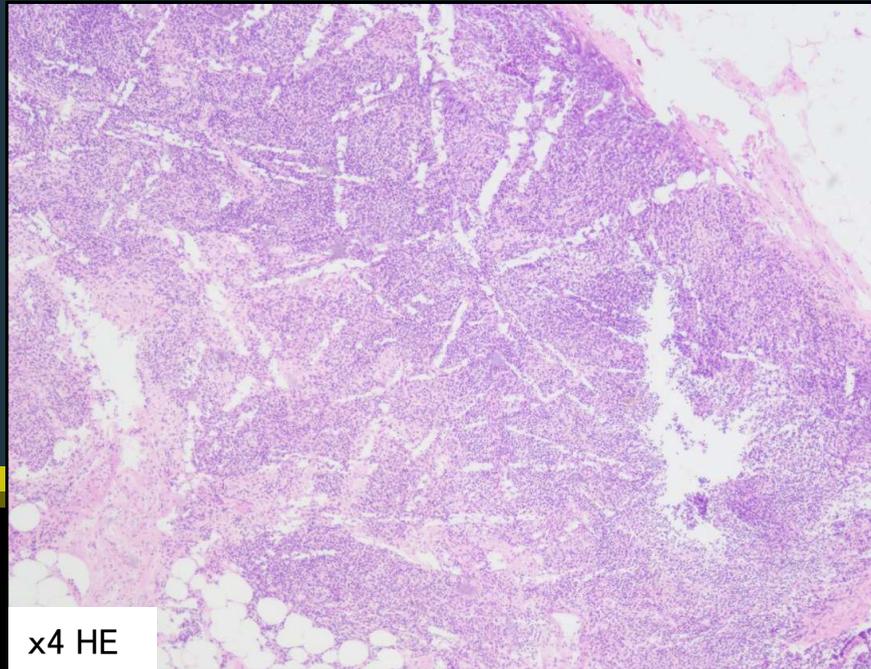


B-cは、大腸腺癌の肉眼像および組織像である。Bは肉眼的に潰瘍形成を伴う隆起性病変を認める。
cは高円柱上皮の不整な腺管状増殖を呈し、腺管の大小不同や不規則な分岐・迂曲を認める。



C-bは、淡明細胞型腎細胞癌の肉眼像および組織像である。Cは肉眼的に腎臓の中～下極に、断面が特徴的な黄色調を呈する周囲実質と境界明瞭な腫瘍を認める。
bは細胞境界明瞭で淡明な胞体を有する大型の立方状・円柱状あるいは多角形な腫瘍細胞が、線維性間質の乏しい血管性間質に囲まれて大小の充実性包巣を形成して増殖している。

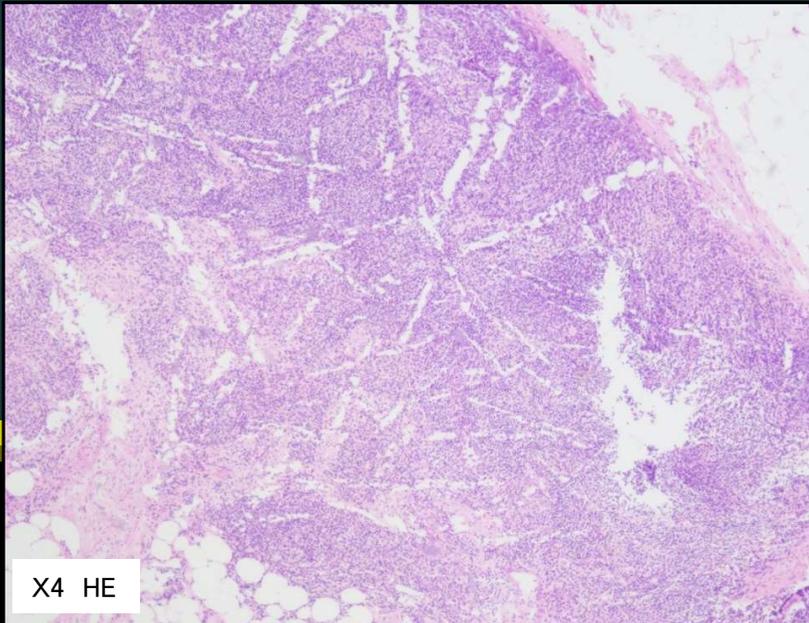
【設問2】 術中迅速診断(リンパ節)で作製した凍結切片についての記述で適切な選択肢はどれか。



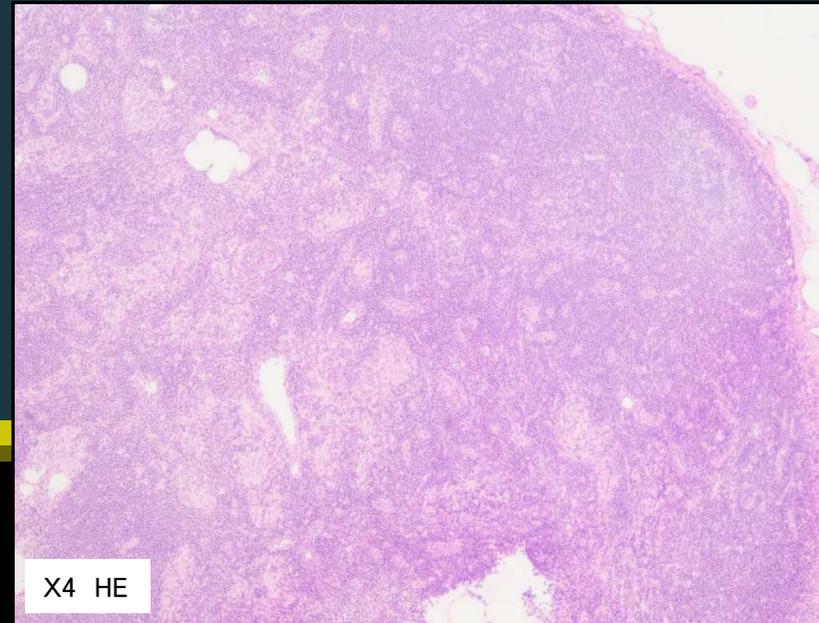
- ① 良好に標本作成が行われている。
- ② 標本が温度が低すぎるため簾状になっている。
- ③ 氷晶形成によるアーチファクトが見られる。
- ④ 標本の温度が高すぎるため皺が見られる。
- ⑤ 染色不良が見られる。

【設問2】 解答：③氷晶形成によるアーチファクトが見られる

氷晶形成を生じた凍結切片



適正に凍結された凍結切片



氷晶形成は組織を凍結する際のアーチファクトで、 0°C ～ -10°C 付近が最大氷晶形成帯となっている。



氷晶形成を回避するには 0°C から -10°C の温度域を急速に通過させることが必要である。

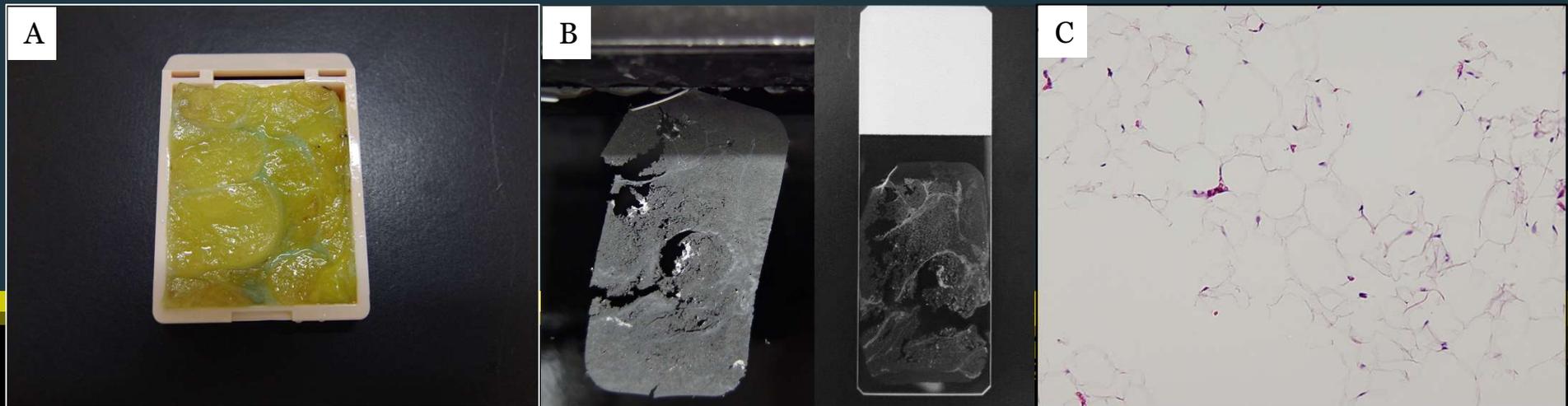
【設問3】 写真A～Cは、乳腺組織の切り出しからHE染色を作成する過程の写真です。

(A) 包埋カセットに詰めた状態

(B) 薄切切片

(C) HE染色像

これらA～Cに関する選択肢で正しい記述はどれか。



- ① 切り出された組織は包埋カセットに適切に詰められている。
- ② 包埋カセットと組織の間に隙間がほとんどなく、切り出しは不適切である。
- ③ 脱脂液による処理は十分になされていると考えられる。
- ④ 再脱脂などの処理は必要ない。
- ⑤ 標本は適切に作成されている。

【設問3】 解答: ②包埋カセットと組織の間に隙間がほとんどなく、
切り出しは不適切である。



包埋カセットと組織の間にほとんど隙間がないと、
脱脂における脂肪の溶出が不十分となり、薄切切片は脆くバラバラになりやすい。

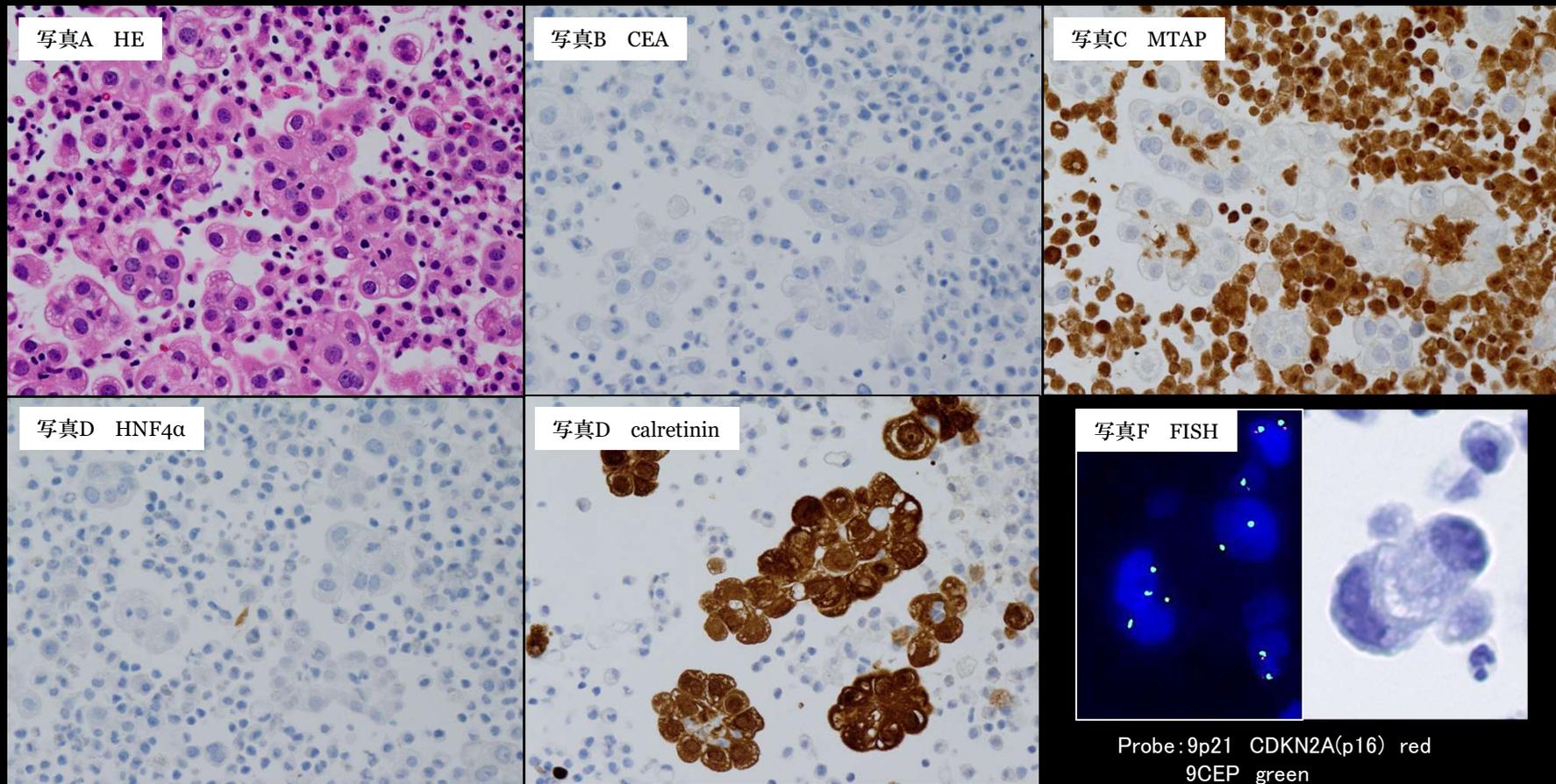


切り出しは脱脂の良否を決める重要な工程。
組織は包埋カセットや蓋との間に隙間ができる
程度に切り出すのが適切である。

【設問4】腹水セルブロック標本のHE染色(写真A)と免疫染色(写真B, C, D)、FISH(写真F)を下図に示します。もっとも疑われる細胞はどれか。

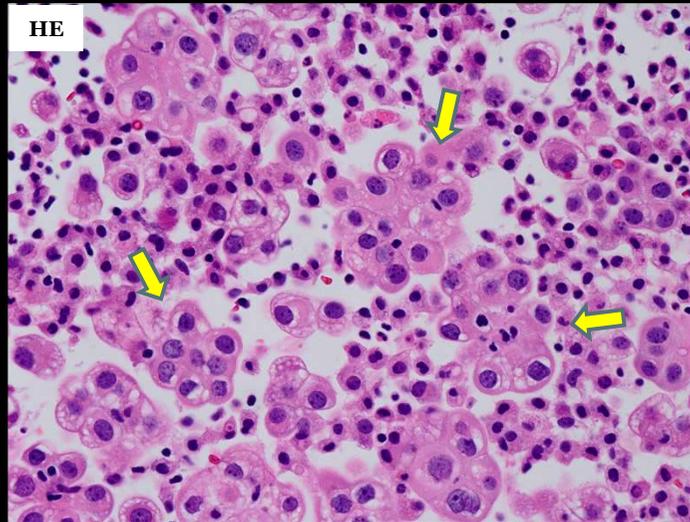
＜症例＞臍部周囲に違和感があり前医受診し、高度炎症・CTにて腹部に炎症所見あり、腹膜炎疑いで当院紹介された。腹水ヒアルロン酸値 334000ng/ml

(HE, Hematoxylin-Eosin ; CEA, carcinoembryonic antigen ; MTAP, methylthioadenosine phosphorylase ; FISH, fluorescence in situ hybridization)

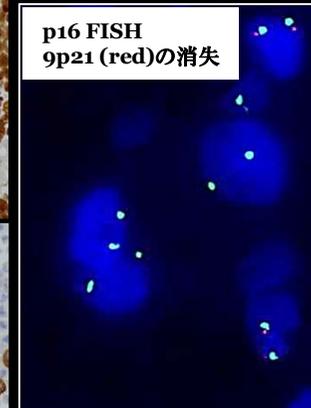
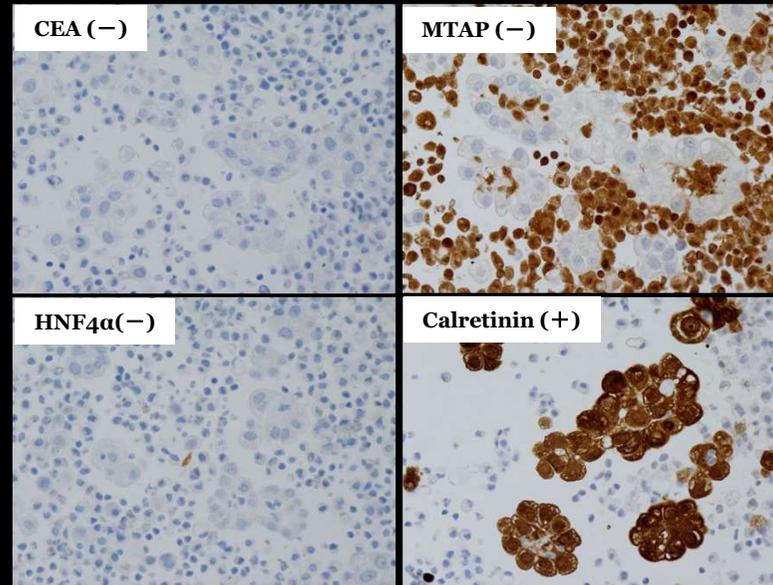


- ①反応性中皮細胞 ②悪性中皮腫細胞 ③胃腺癌細胞 ④肝細胞癌細胞 ⑤扁平上皮癌細胞

【設問4】 解答: ②悪性中皮腫細胞



HE標本では、炎症性背景に乳頭状様集塊の異型細胞を多数認めます。反応性中皮細胞や腺癌細胞、臨床情報(ヒアルロン酸高値)を考慮して悪性中皮腫細胞が鑑別に挙げられます。



免疫染色では、CEA陰性、HNF4 α 陰性、calretinin陽性と判断でき中皮細胞由来であることがわかります。MTAP染色は蛋白発現が消失しており間接的にp16のホモ接合性欠失と判断できます。さらにp16 FISHにて、赤シグナル(9p21)の消失が確認できるので、反応性中皮細胞ではなく悪性中皮腫細胞と判断できます。

*中皮腫診断において単独で確定診断しうるマーカーは存在しないため、免疫組織化学的検討では2種の中皮マーカーと、2種の癌腫マーカー以上を検討することが薦められており、本症例においても実施したうえで悪性中皮腫細胞と判断しています。

【MTAP methylthioadenosine phosphorylase】

2018年度版肺癌診療ガイドラインによれば、体腔液細胞診で中皮腫と診断するためには、セルブロック法などによりp16のホモ接合性欠失の検討やBAP1 lossの検討を追加することが推奨されていますが、p16FISHは多くの施設で施行できないという問題点があります。

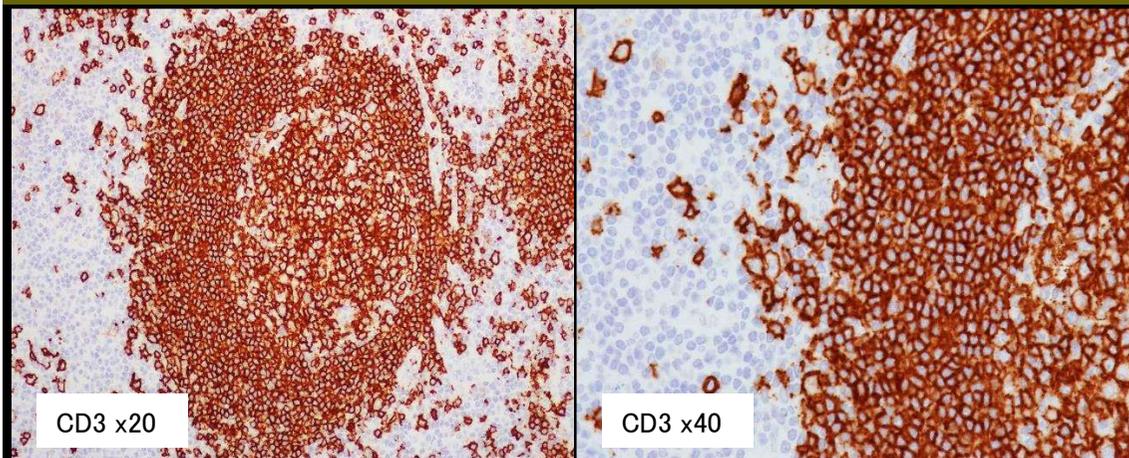
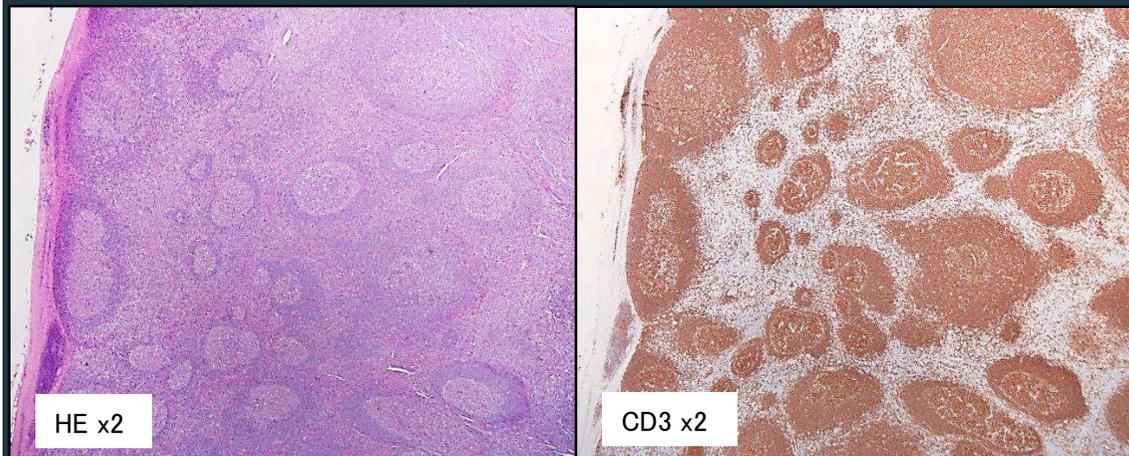
MTAP染色はp16FISHの代替マーカーとして注目されており、文献によるとMTAP蛋白欠失の全例でp16FISHホモ接合性欠失を確認できたと報告されています。悪性中皮腫におけるMTAP免疫染色の評価は、核染色の状態に関係なく細胞質の染色性の状態を評価し、欠失していることを確認することが重要です。

【HNF4 α hepatocyte nuclear factor 4 α 】

HNF4 α は肝細胞の分化に重要な転写因子で、また消化管、膵 β 細胞の遺伝子抑制に関与されているといわれており、正常組織の肝細胞および消化管細胞・膵 β 細胞由来の悪性細胞で発現しています。

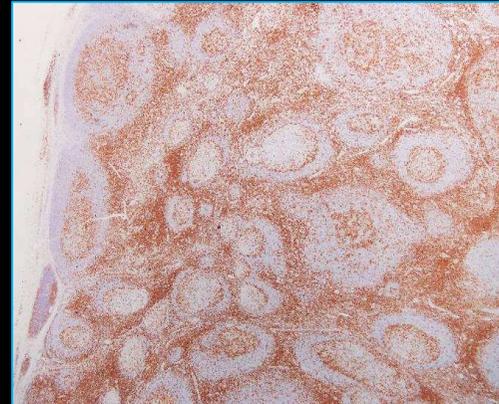
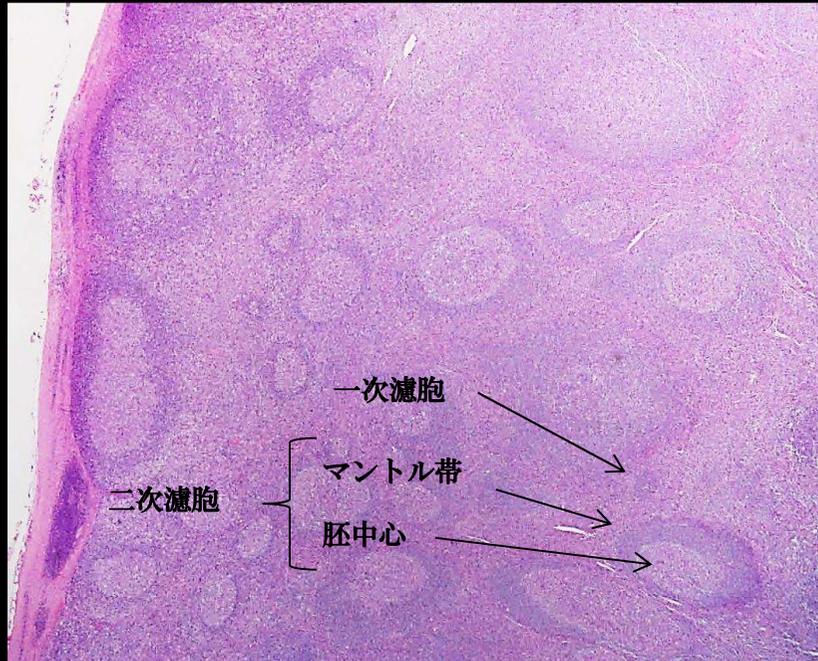
自施設の検討では、中皮細胞は良性・悪性すべて陰性を示しました(0/16)。体腔液細胞診で遭遇する頻度の高い消化器系の腺癌はすべて陽性を示し(18/18)、婦人科系の腺癌は66%(6/9)、呼吸器系の腺癌は文献よるとすべて陰性と報告されていますが、われわれの検討では陽性を示す症例を認めています。HNF4 α は中皮細胞の陰性マーカーとしても有用な抗体とも言えます。

【設問5】下の写真は、廓清されたリンパ節に対しHE染色および免疫組織染色(一次抗体:CD3)を実施した標本である。以下の設問の内、最も適切と思われるものはどれか。

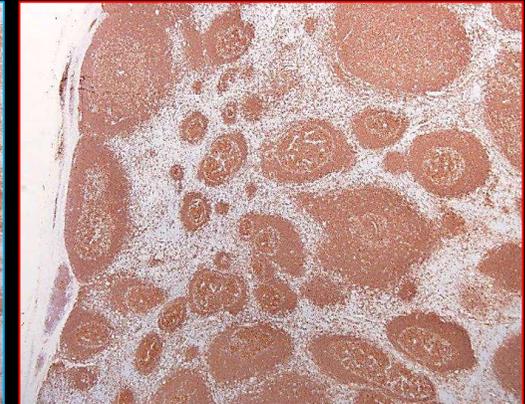


- ① CD3抗原に対する染色は適切に実施されている。
- ② CD3抗原の細胞内における局在は核であり、染色は不適切である。
- ③ CD3陽性細胞はリンパ節には出現し得ないため、染色は不適切である。
- ④ CD3陽性を示す領域と陰性を示す領域を認めるため、染色ムラが考えられる。
- ⑤ CD3陽性となる細胞のリンパ節内における局在が異なっており、染色は不適切である。

【設問5】 解答：⑤ CD3陽性となる細胞のリンパ節内における局在が異なっており，染色は不適切である。



CD3：T細胞の汎用マーカー
濾胞間領域に多数の陽性細胞

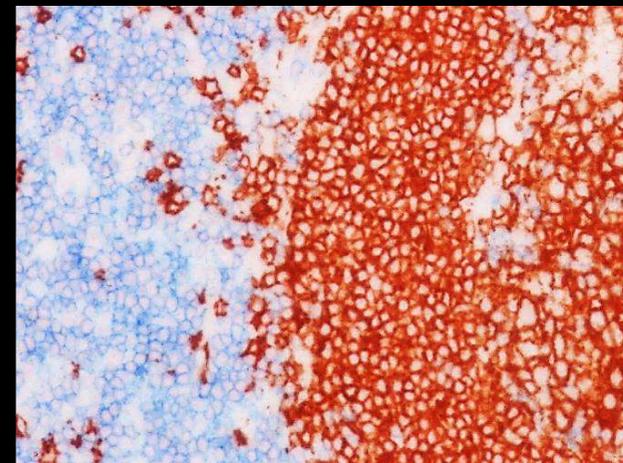


CD20：B細胞の汎用マーカー
濾胞領域に多数の陽性細胞

【リンパ節内の領域と細胞の種類】

濾胞領域 一次濾胞と二次濾胞が形成され，主要な細胞は**B細胞**である。二次濾胞の胚中心には少数のT細胞や樹状細胞，マクロファージが混在している。

濾胞間領域・傍皮質 T細胞が豊富な領域で少数のB細胞性免疫芽球などが混在している。



二重免疫組織染色（茶：CD20 青：CD3）
細胞内の局在は両抗原共に**細胞膜**であることがわかる。

フォトサーベイ正解率

	正解施設数(正解率)
設問1	46/46(100%)
設問2	42/46 (91.3%)
設問3	45/46 (97.8%)
設問4	46/46 (100%)
設問5	44/46 (95.7%)

全ての設問で90%以上の正解率となり良好な結果でした。

フォトサーベイ総合評価

総合評価	施設数(48施設)
A評価	39(84.8%)
B評価	7(15.2%)
C評価	0(0.0%)
D評価	0(0.0%)

全ての施設で良好な結果でした。

今後精度管理で行ってほしい染色

- ・EVG染色、Ziehl-Neelsen染色、DFS染色、Masson染色、Gram染色
- ・免疫染色

今後、学会や研修会等でとあげてほしいテーマや内容

- ・遺伝学的検査における検査技師の役割と、意義について
- ・初心者向けの免疫染色について(基礎)

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、良好な結果が継続している。

現在、病理検査技術は標準化が検討されている中、病理研究班は千葉県内の現状を調査し、標準化を目指したサポート体制を整備していきたいと考えている。

今後も病理検査研究班では、参加施設のニーズに答えられる精度管理事業、研修会の開催に努力して行きたいと考えている。

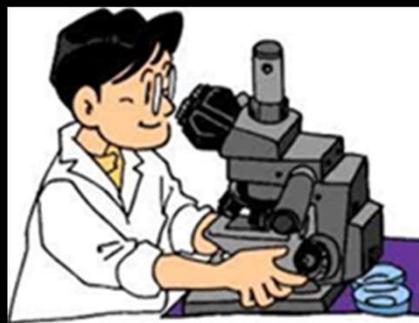
謝辞

今年度の精度管理に参加していただいた施設の
皆様に感謝いたします。

千臨技病理検査研究班 精度管理委員

- | | | |
|----|----|------------------|
| 鈴木 | 学 | (千葉大学医学部付属病院) |
| 豊永 | 安洋 | (帝京大学ちば総合医療センター) |
| 永澤 | 友美 | (株式会社 江東微生物研究所) |
| 草野 | 広行 | (国際医療福祉大学医学部) |
| 四宮 | 義貴 | (千葉大学医学部付属病院) |
| 大本 | 真琴 | (千葉市立青葉病院) |
| 佐藤 | 嘉洋 | (東千葉メディカルセンター) |
| 諏訪 | 朋子 | (船橋市立医療センター) |
| 中村 | 博 | (順天堂大学医学部付属浦安病院) |
| 山崎 | 利城 | (東邦大学医療センター佐倉病院) |

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下さい。



ご清聴ありがとうございました