

# 平成23年度 千臨技病理研究班 精度管理調査報告

(社) 千葉県臨床検査技師会 病理検査研究班

○鈴木 学 中村 和昭 東 和彦 青柳 正則  
永田 雅裕 三橋 涼子 田島 秀昭 小野寺 清隆

# 目的

本精度管理は、HE染色ならびに特殊染色を実施し、染色態度を評価することで、基本的な染色技術の再確認をする。  
また、HE染色標本の適否を判定し、染色性の評価を行う。



# 精度管理調査概要 I

【参加施設】 43施設

【材料】

標本A・B共に、20%中性緩衝ホルマリンにて固定された消化管組織（食道・胃・大腸）のマルチブロックを作成、厚さ4 $\mu$ mで薄切した切片を用いた。

【方法】

標本A：未染色標本4枚配布

HE染色、PAS反応、アルシアン青染色を実施

標本B：HE染色済み標本を配布、標本を観察した上で標本の適否を判定、不適正とした場合は、その理由として最も適切と思われるものを選択肢の中から回答する。

# 精度管理調査概要Ⅱ

## 【評価方法】

### 標本A

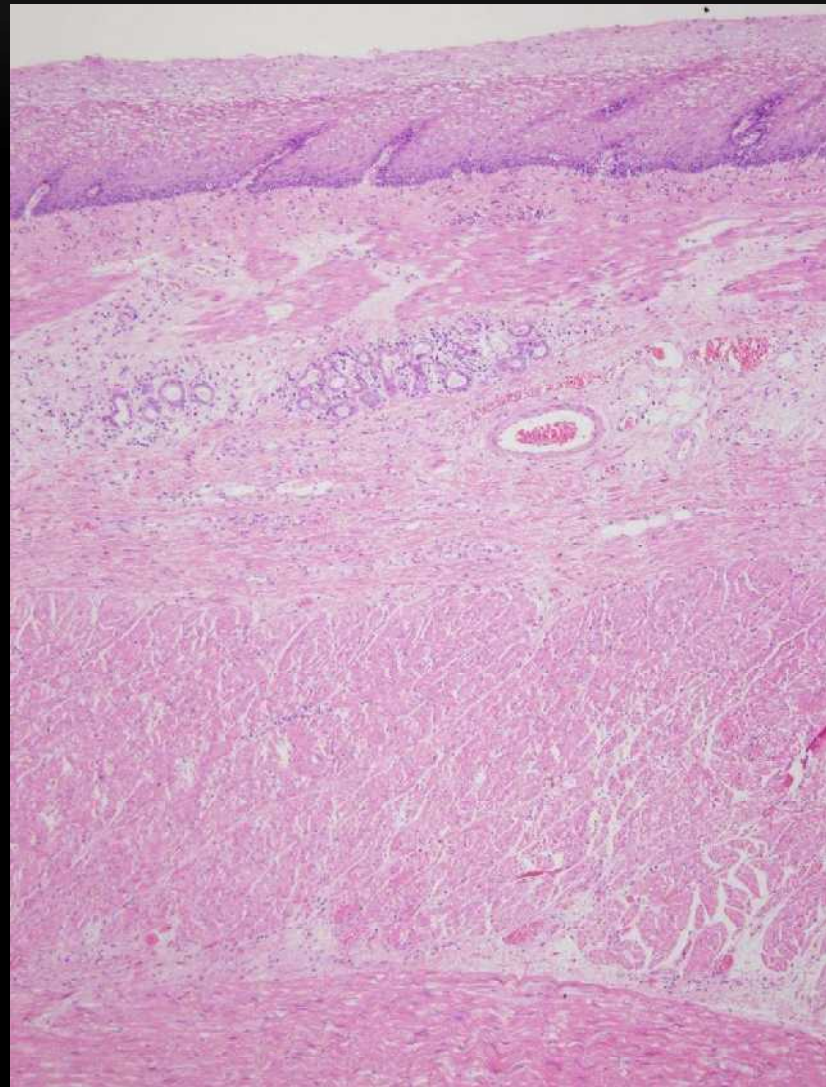
- ・ HE染色, PAS反応, アルシアン青染色 (7項目)
- ・ 各項目 良 (2点), 可 (1点), 不可 (0点)
- ・ 総合評価 (7項目の合計)
  - A : 染色上、目的を十分に達成している (12-14点)
  - B : 染色上、目的を達成している (7-11点)
  - C : 染色上、目的を達成していない (6点以下)

### 標本B

○・△・×の3段階により評価

# 精度管理標本A・B

## 食道



粘膜層  
重層扁平上皮細胞

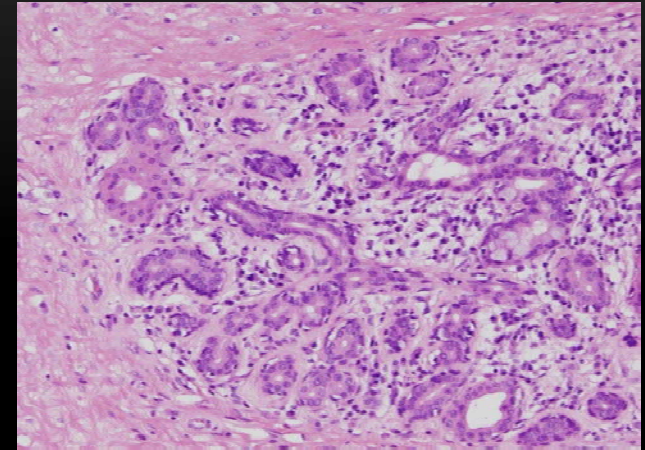
粘膜固有層

粘膜筋板

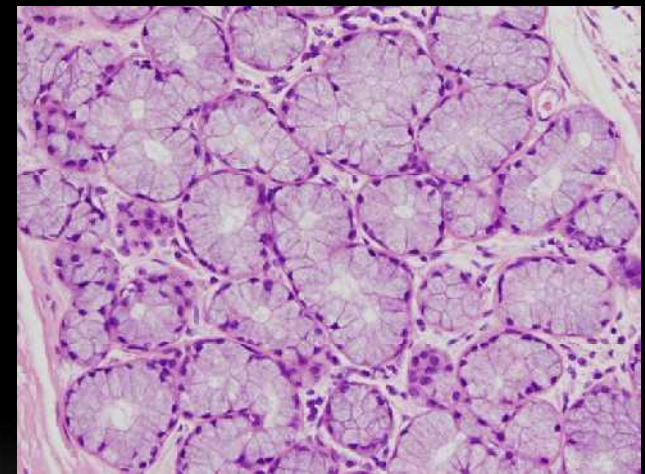
粘膜下層

筋層

## 食道固有腺



## 食道噴門腺



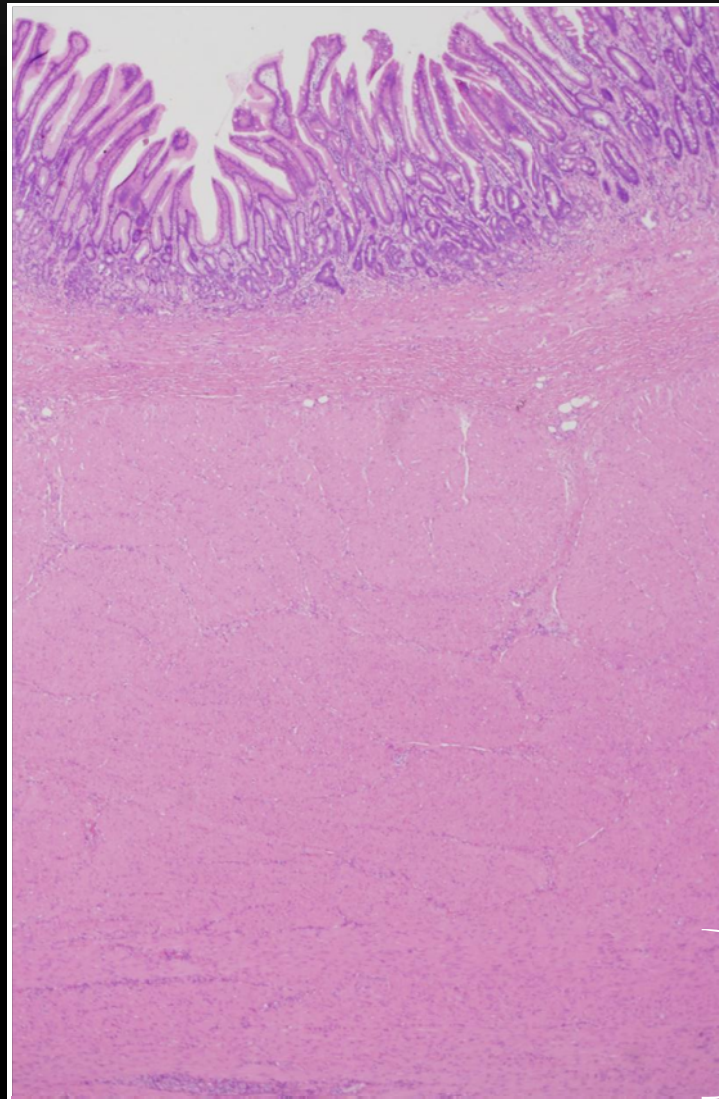
食道粘膜は、重層扁平上皮細胞からなり、有棘細胞の細胞質にはグリコーゲンを含む。食道には食道固有腺や食道噴門腺が存在する。



# 精度管理標本A・B

## 胃

## 胃固有腺（幽門腺）



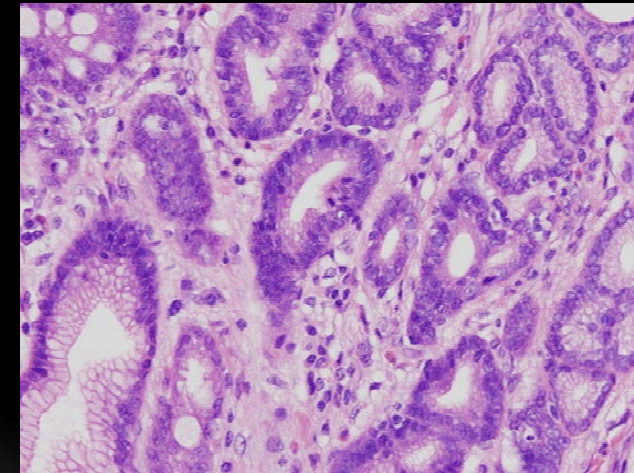
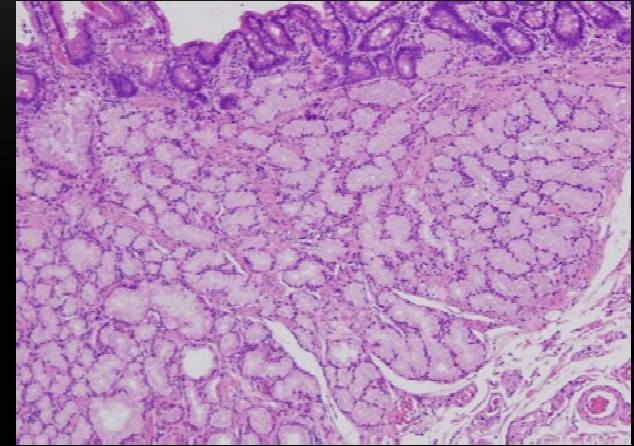
粘膜層  
粘膜上皮：単層円柱上皮  
粘膜固有層

粘膜筋板

粘膜下層

筋層

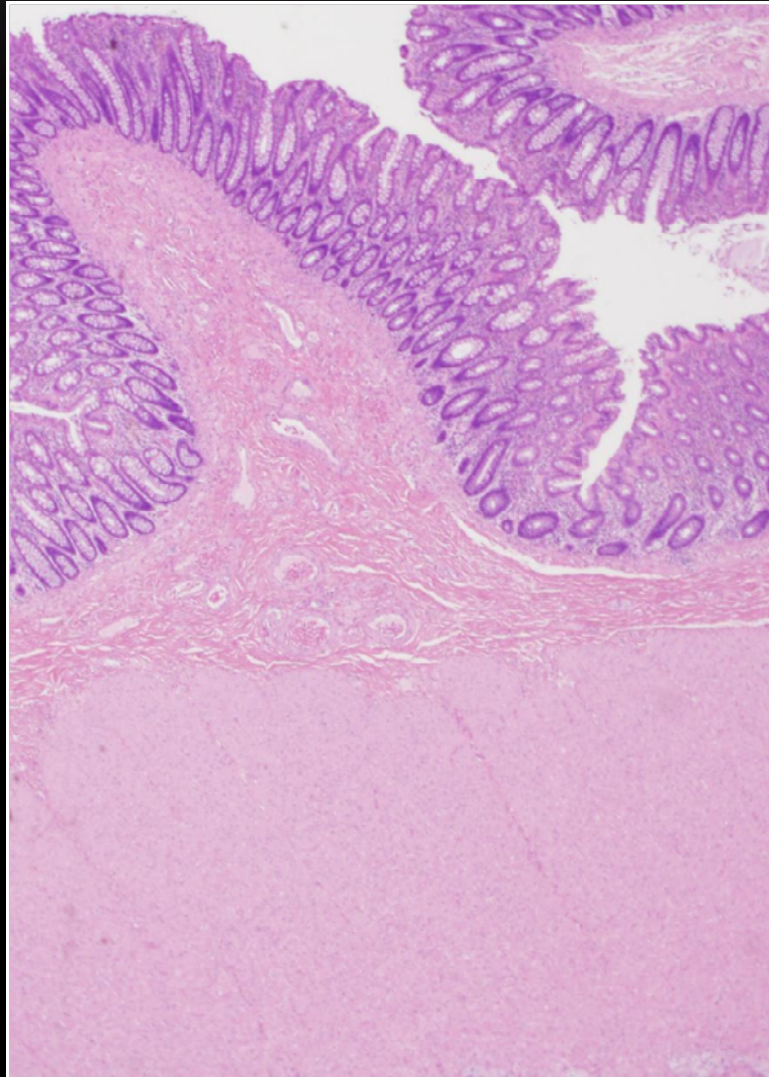
漿膜下層



胃粘膜は、単層円柱上皮細胞からなり、粘膜固有層には幽門腺などの胃固有腺のもみられる。

# 精度管理標本A・B

## 大腸

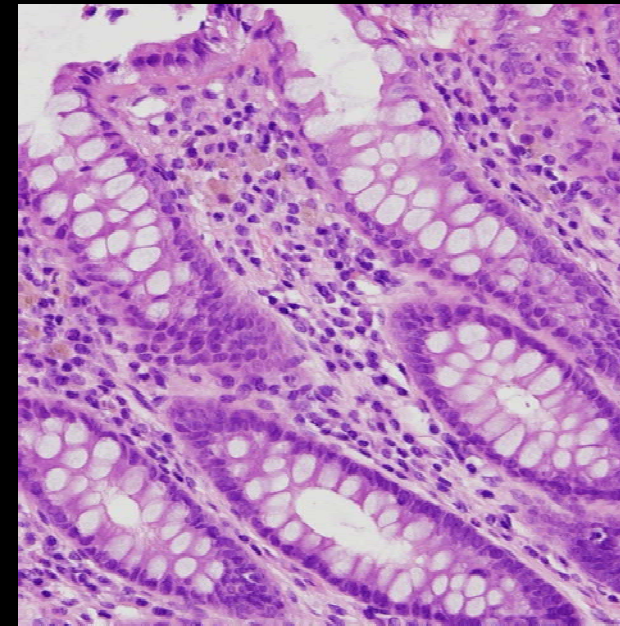


粘膜層  
粘膜上皮  
単層円柱上皮  
粘膜固有層

粘膜筋板  
粘膜下層

固有筋層

腸陰窩の上皮細胞



大腸粘膜は、単層円柱上皮細胞からなる。腸陰窩の上皮細胞は杯細胞が多く、多量の粘液を分泌する。

# 精度管理標本A 評価項目 (HE染色)

HE染色	配点
スライドガラスの汚れ	2
染色むら	2
共染の有無	2
切片の剥離（傷等）	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	14

# 精度管理標本A 評価基準 (HE染色)

---

総合評価

---

点数

A評価

12-14

B評価

7-11

C評価

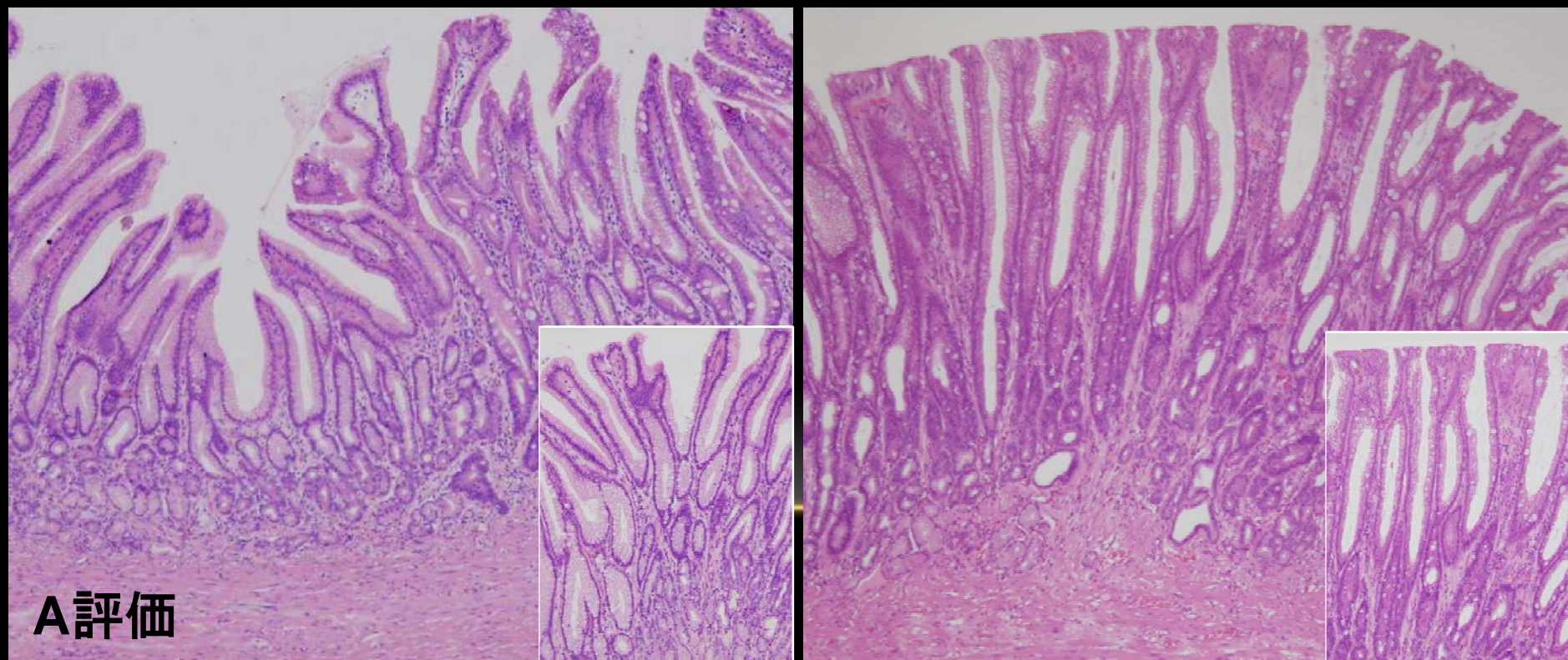
0-6

---



# 精度管理標本A 評価 (HE染色)

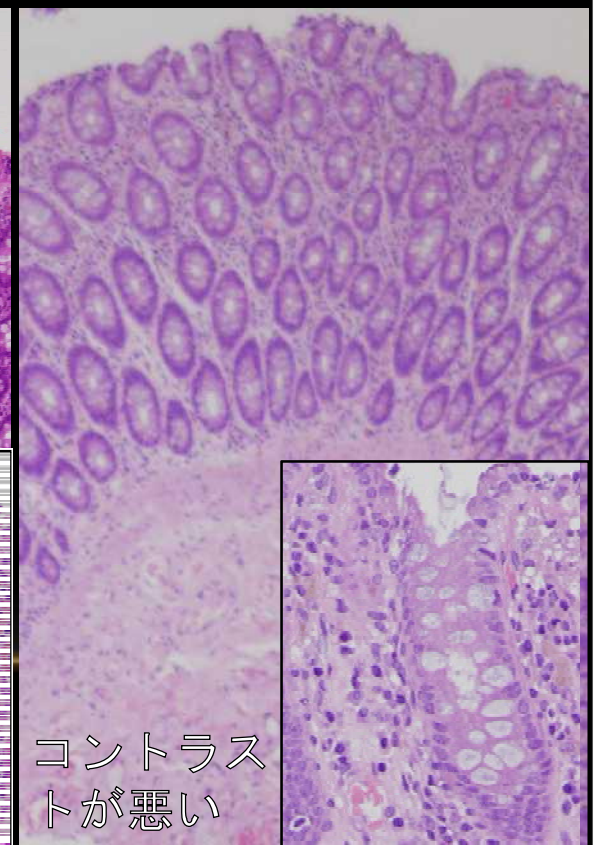
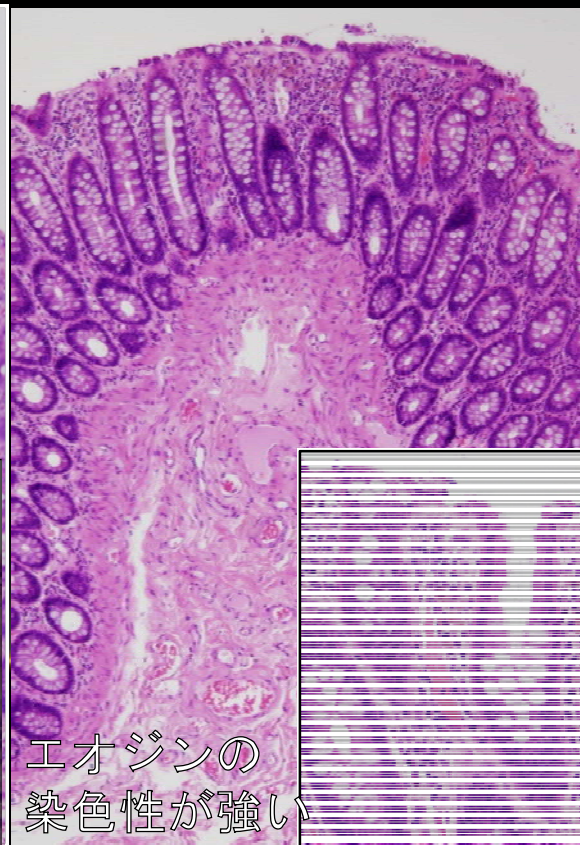
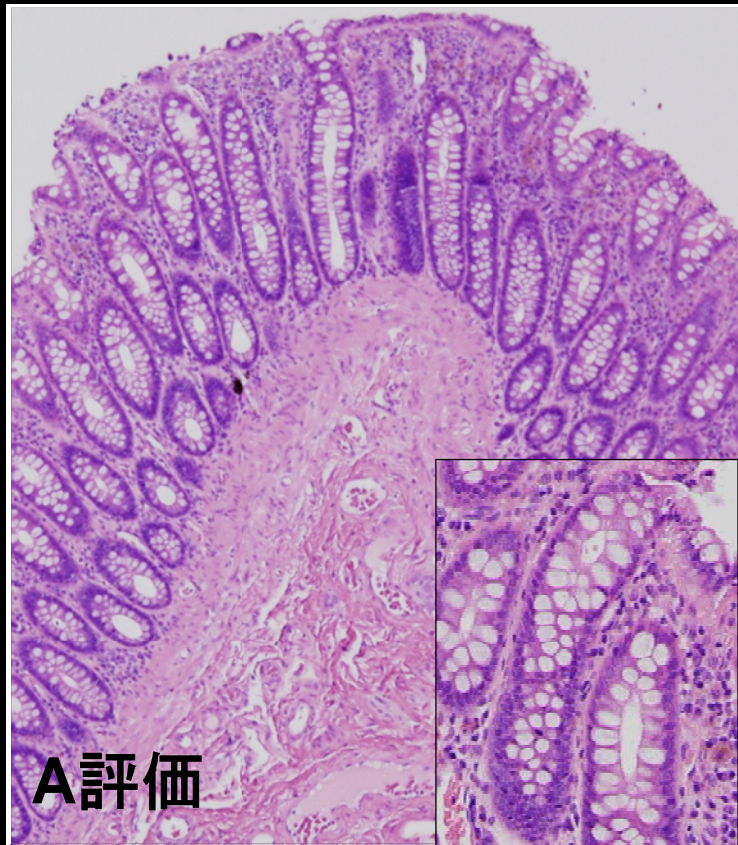
- スライドガラスの汚れ (3/43施設)  
封入剤のはみ出しなどによるスライドガラスへの  
汚れを認めた。
- 共染の有無 (7/43施設)  
エオジンによる共染を認めた。





# 精度管理標本A 評価 (HE染色)

- ヘマトキシリンの染色性 (11/43施設)
  - エオジンの染色性 (12/43施設)
  - 核と細胞質のコントラスト (13/43施設)
- ヘマトキシリンとエオジンのバランスが悪く、  
標本を観察しづらい。



# 精度管理標本A 評価結果 (HE染色)

---

総合評価

---

施設数 (%)

---

A評価

39(90.7)

B評価

4(9.3)

C評価

0(0.0)

---

# 精度管理標本A 評価項目 (PAS反応)

PAS反応	配点
スライドガラスの汚れ	2
染色むら	2
共染の有無	2
切片の剥離	2
粘液・陽性物質の染色性	2
核染色の染色性	2
粘液・陽性物質と核のコントラスト	2
合計	14

# 精度管理標本A 評価基準 (PAS反応)

---

**総合評価**

---

**点数**

**A評価**

**12-14**

**B評価**

**7-11**

**C評価**

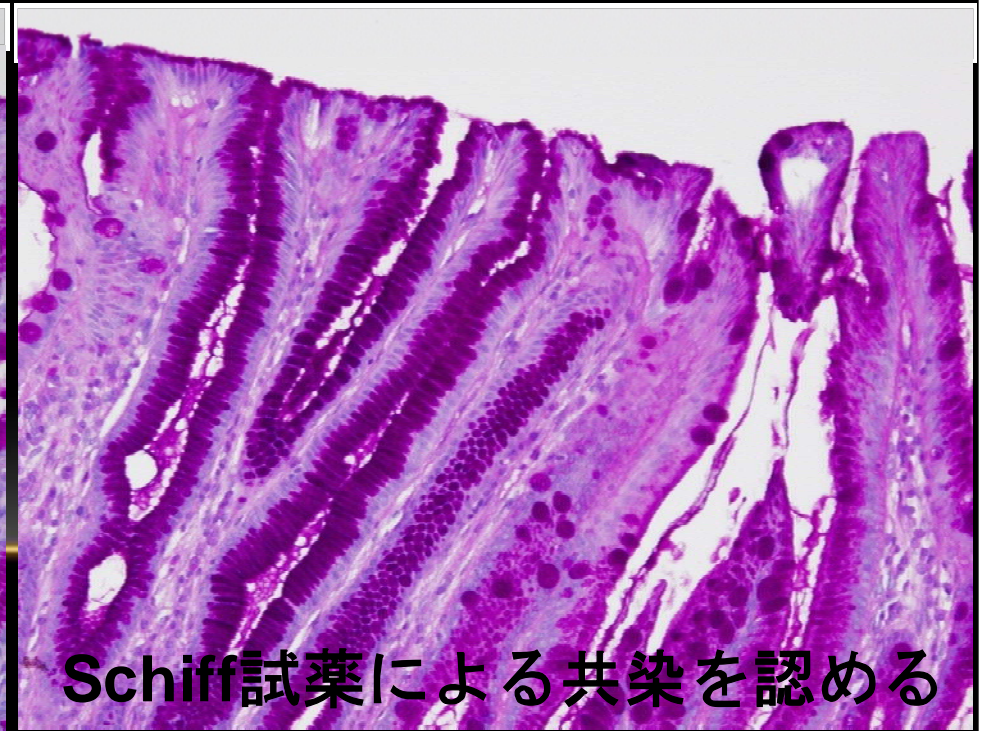
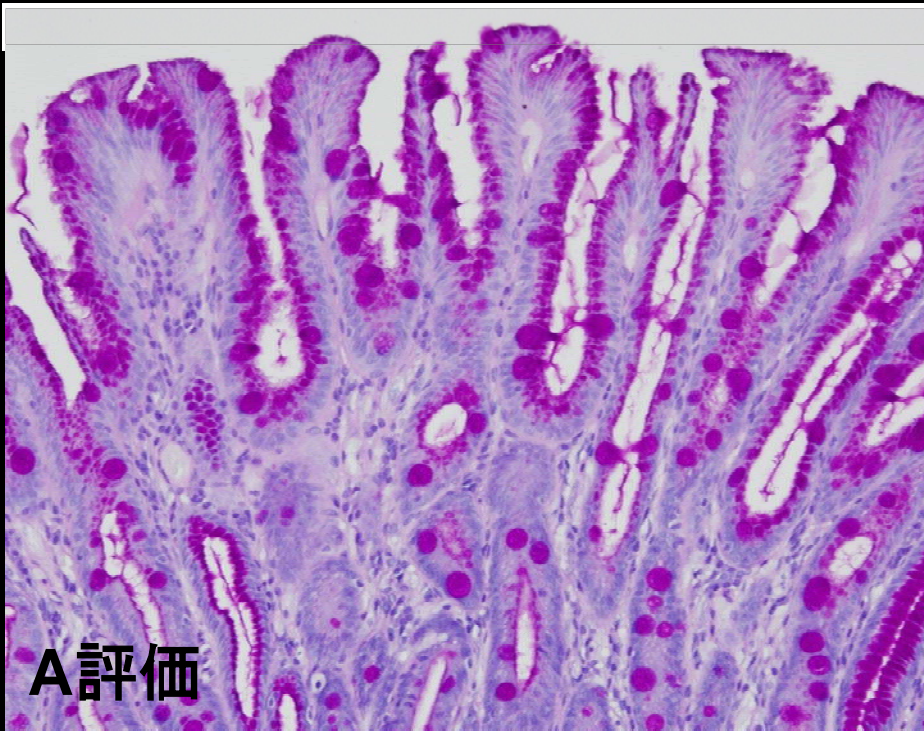
**0-6**

---



# 精度管理標本A 評価 (PAS反応)

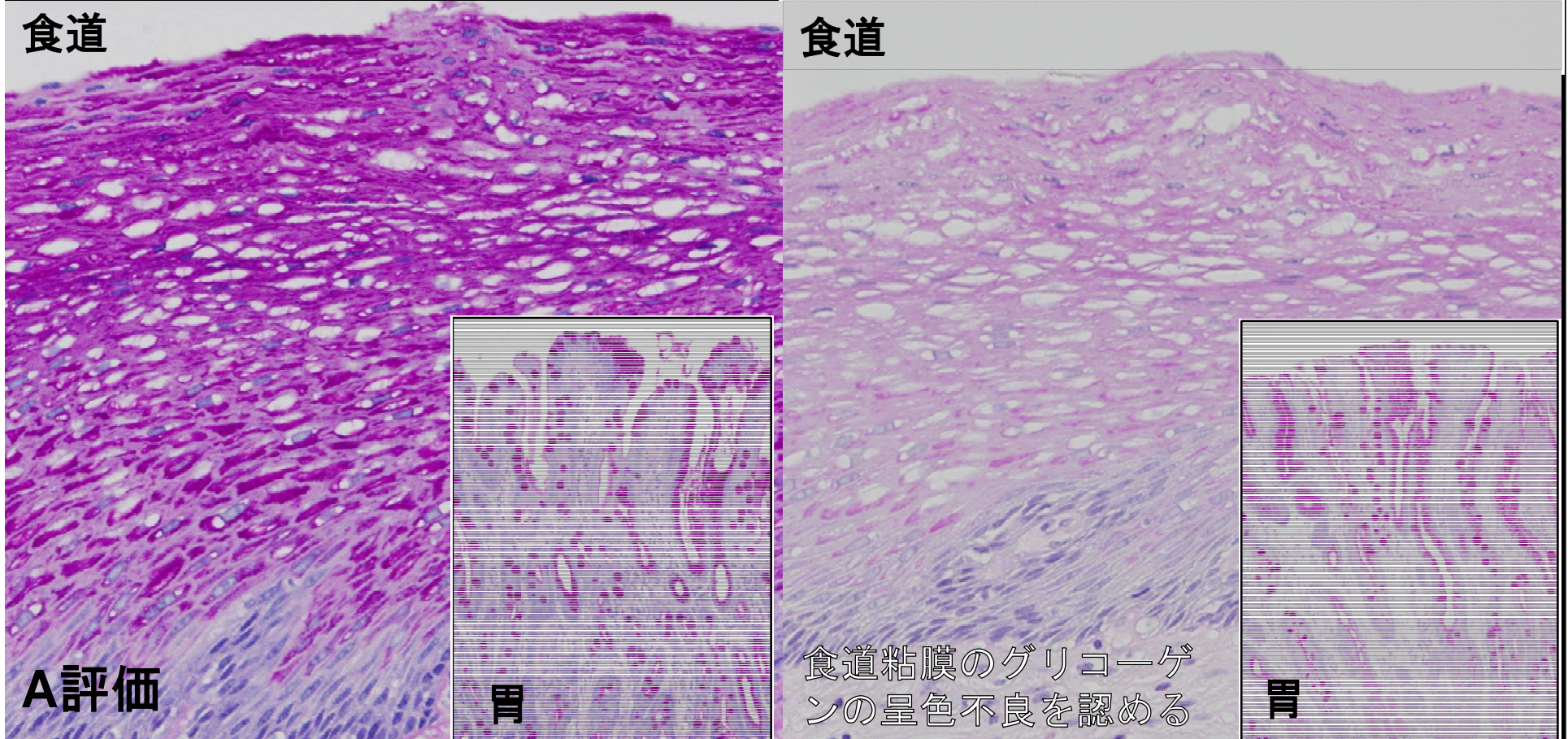
- スライドガラスの汚れ (1/43施設)  
封入剤によるスライドガラスの汚れが認められた。
- 共染の有無 (6/43施設)  
Schiff試薬やヘマトキシリンによる共染が認められた。





# 精度管理標本A 評価 (PAS反応)

- 粘液・陽性物質の染色性 (1/43施設)  
胃・大腸粘液の染色性は良いが、食道粘膜 (扁平上皮細胞) のグリコーゲンの染色が薄い。

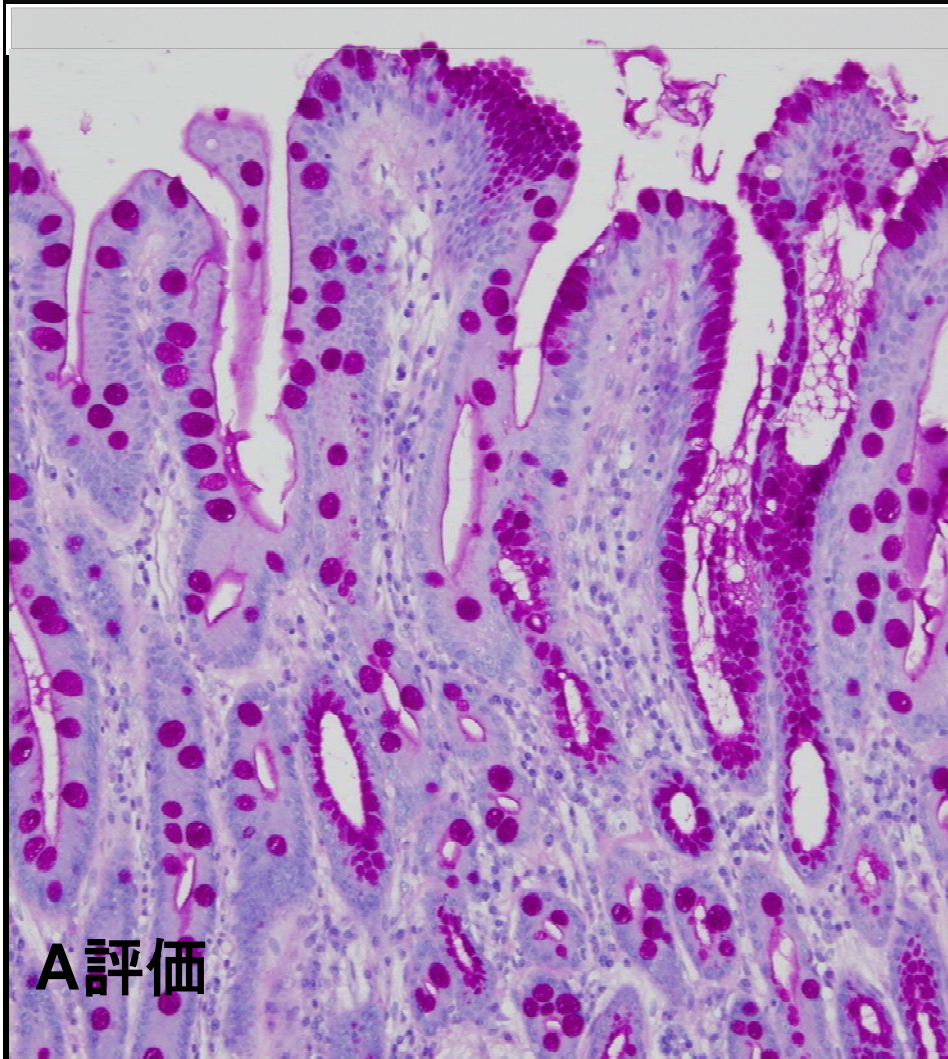




# 精度管理標本A 評価 (PAS反応)

➤核の染色性 (2/43施設)

核の染色が薄く、粘液との関係が観察しづらい。



A評価



核の染色が薄く、粘液との関係が不明瞭である

# 精度管理標本A 評価結果

## (PAS反応)

---

**総合評価**

**施設数 (%)**

---

**A評価**

**43 (100.0)**

**B評価**

**0 (0.0)**

**C評価**

**0 (0.0)**

---



# 精度管理標本A 評価項目 (Alb染色)

Alb染色	配点
スライドガラスの汚れ	2
染色むら	2
共染の有無	2
切片の剥離	2
粘液・陽性物質の染色性	2
核染色の染色性	2
粘液・陽性物質と核のコントラスト	2
合計	14

# 精度管理標本A 評価基準 (Alb染色)

---

**総合評価**

---

**点数**

**A評価**

**12-14**

**B評価**

**7-11**

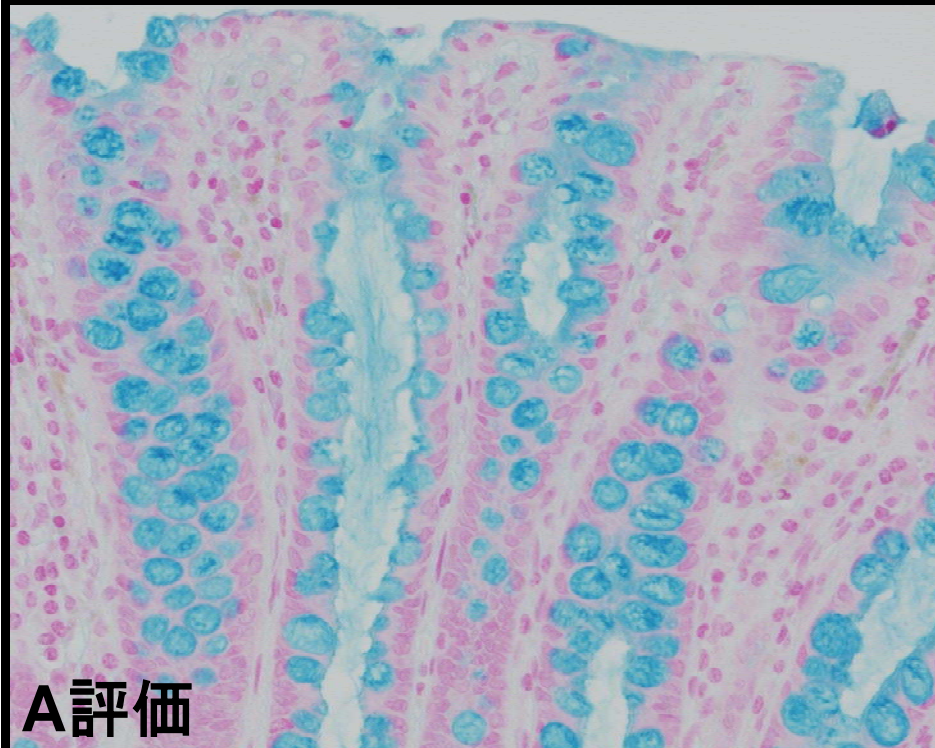
**C評価**

**0-6**

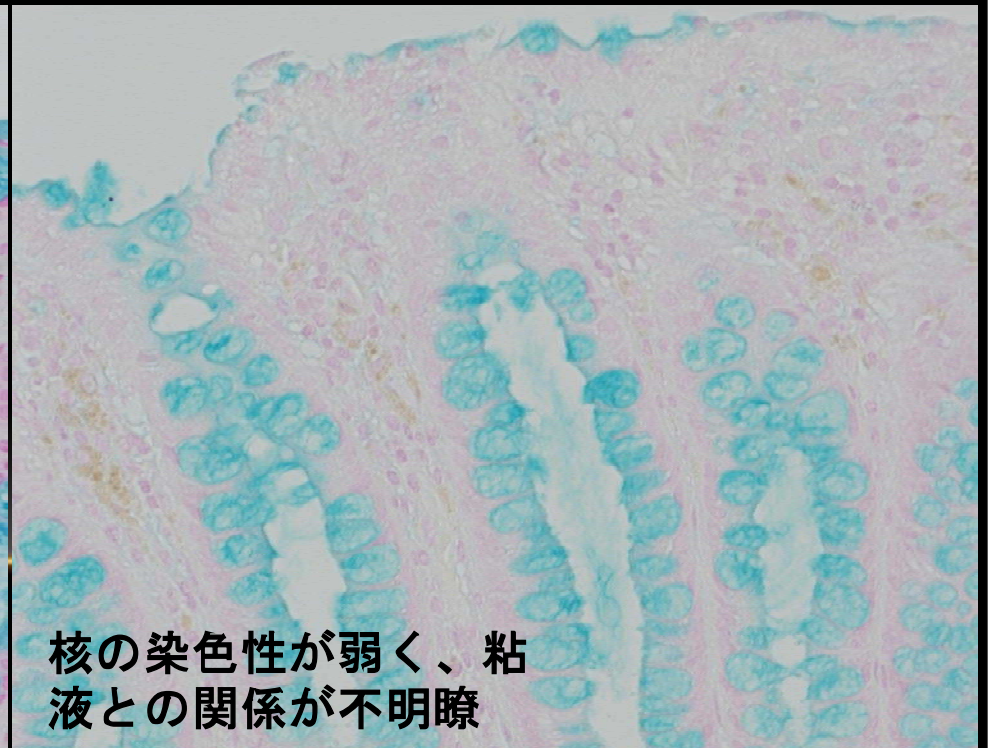
---

# 精度管理標本A 評価 (Alb染色)

- スライドガラスの汚れ (1/37施設)  
封入剤によるスライドガラスの汚れが認められた。
- 核の染色性 (1/37施設)
- 核と粘液のコントラスト (1/37施設)  
核の染色性が弱く、粘液との関係が観察しづらい



A評価

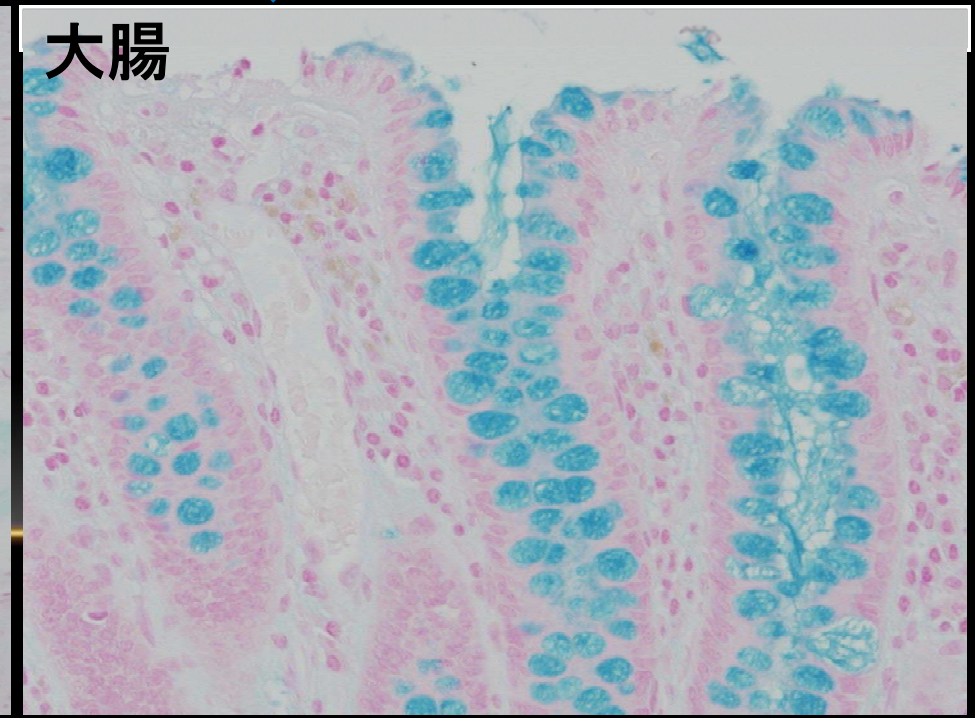
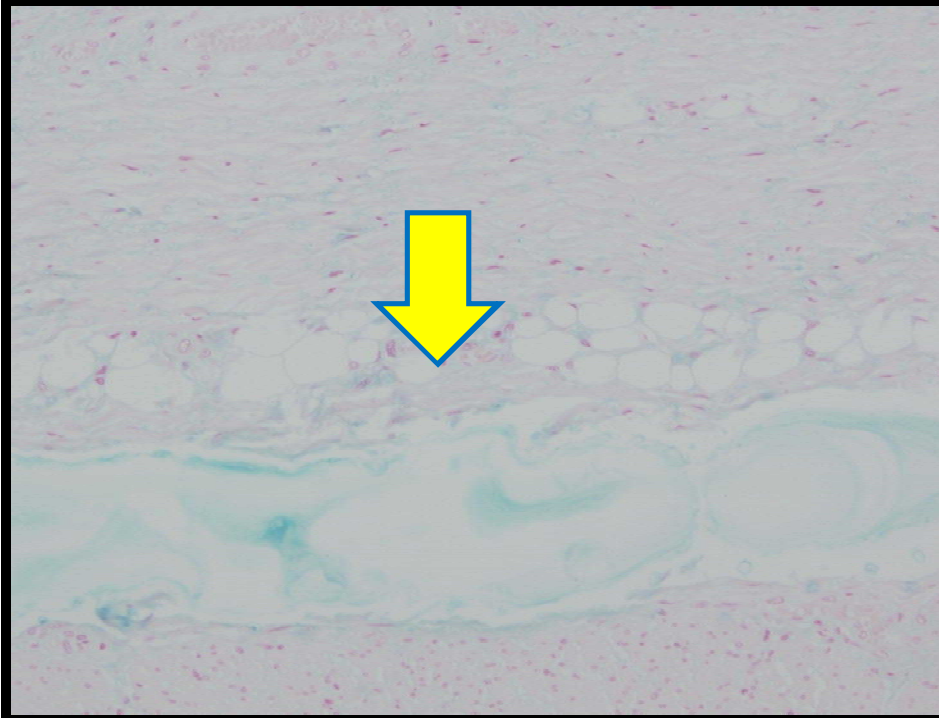


核の染色性が弱く、粘液との関係が不明瞭

# 精度管理標本A 評価 ( Alb染色 )

## ➤ 共染の有無 (10/37施設)

胃・大腸粘液の染色性は良好であるが、  
組織の間隙などにアルシアン青の色素の  
共染が認められた。( ↓ )



# 精度管理標本A 評価結果 (Alb染色)

---

総合評価

---

施設数 (%)

---

A評価

36 (100.0)

B評価

0 (0.0)

C評価

0 (0.0)

---

## 精度管理標本B

### ➤ HE染色標本の作製

食道・胃・大腸のマルチブロックを薄切した切片を脱パラフィン後、マイヤーのヘマトキシリンで核染、色だしせずに、染色性の低下したエオジンにて後染色して脱水、透徹、封入した。

## 精度管理標本B

### ➤ 標本BにおけるHE染色の適否

01:適正

02:不適正

### ➤ 不適正とした理由

01:ヘマトキシリンは良好だが、エオジンは染色不良（色調が薄い）

02:ヘマトキシリン、エオジン共に染色不良（色調が薄い、色出し不足や染色液劣化）

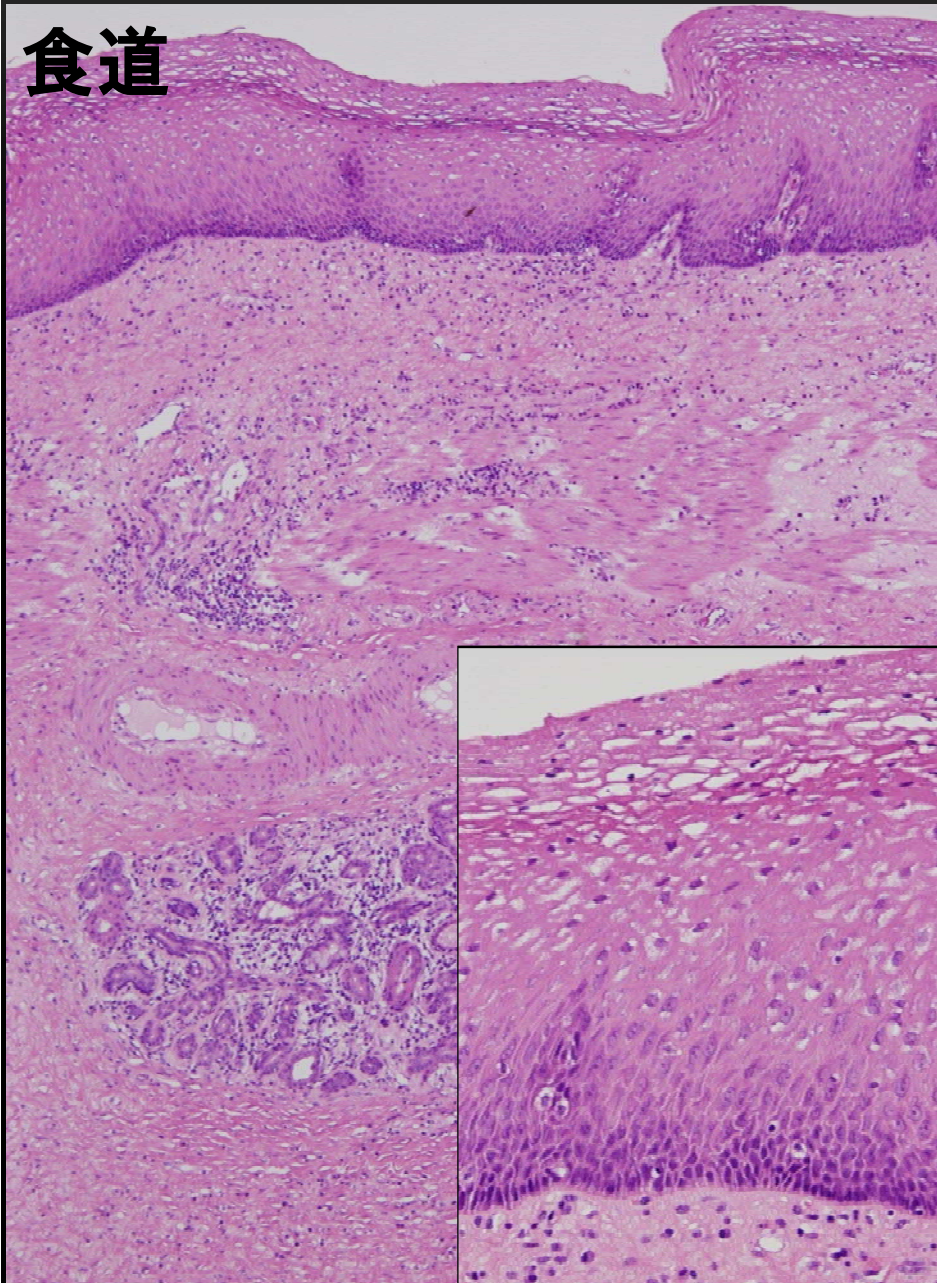
03:ヘマトキシリンは良好だが、エオジンは過染・共染傾向

04:ヘマトキシリン、エオジン共に過染・共染傾向

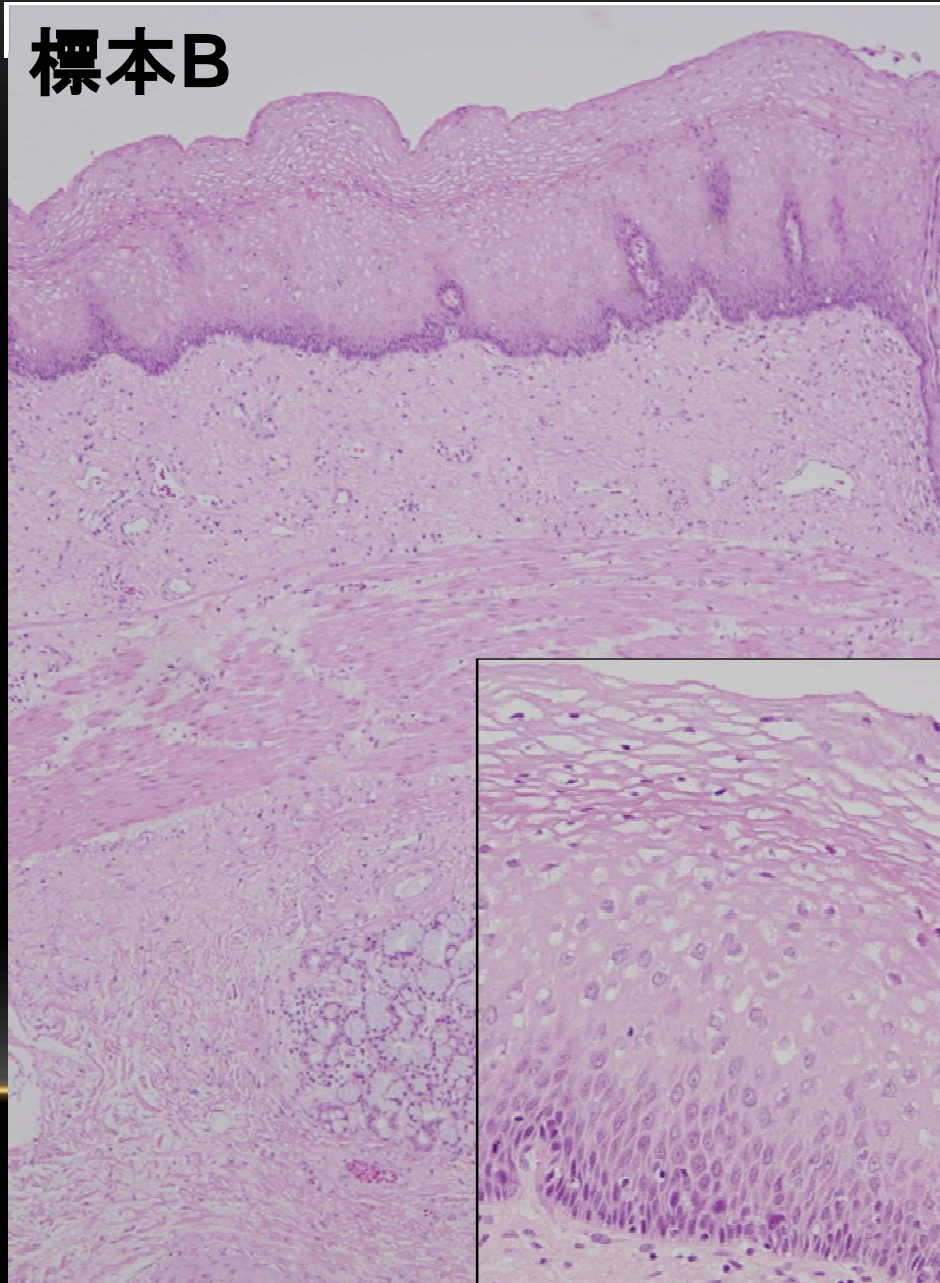


# 精度管理標本B

食道



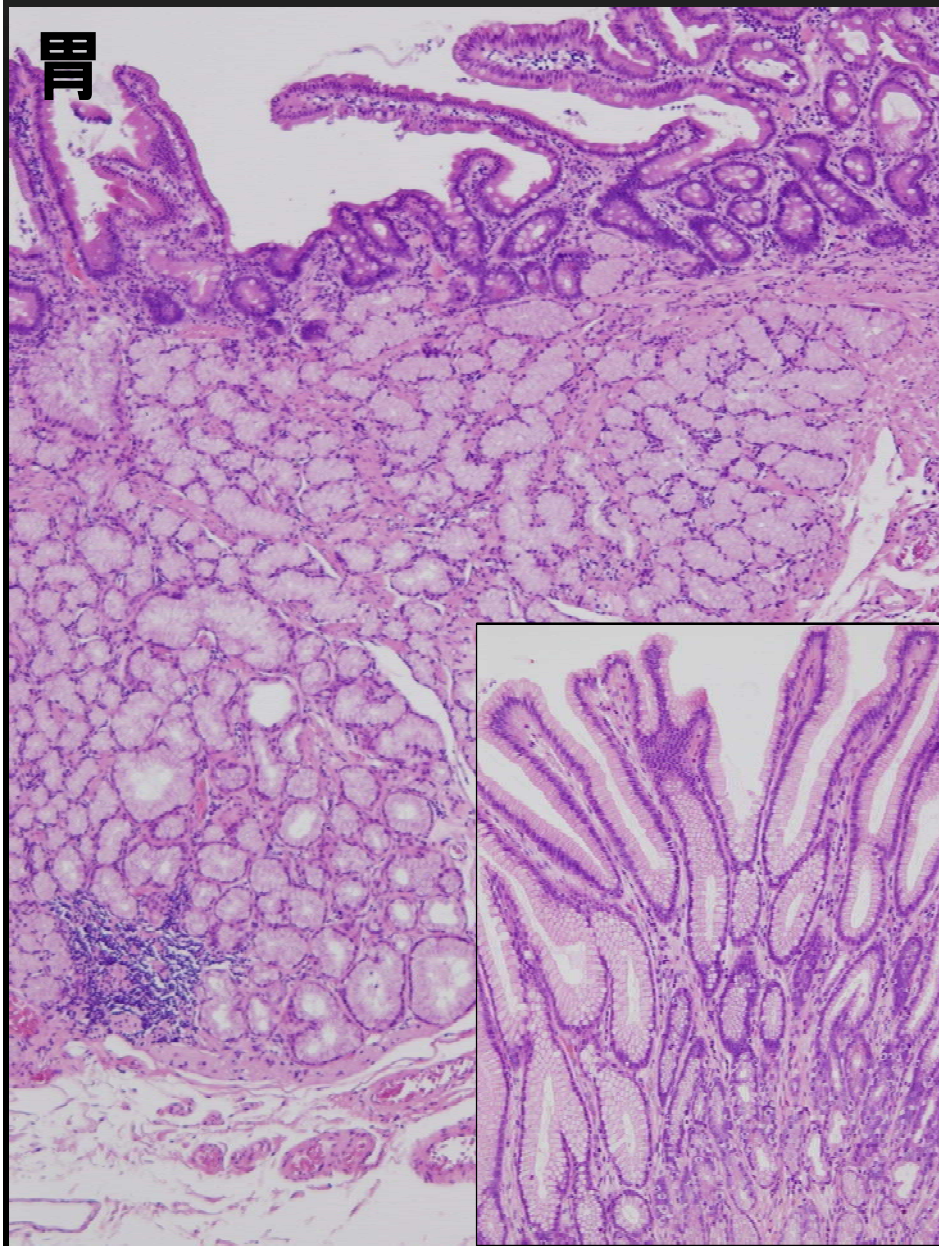
標本B



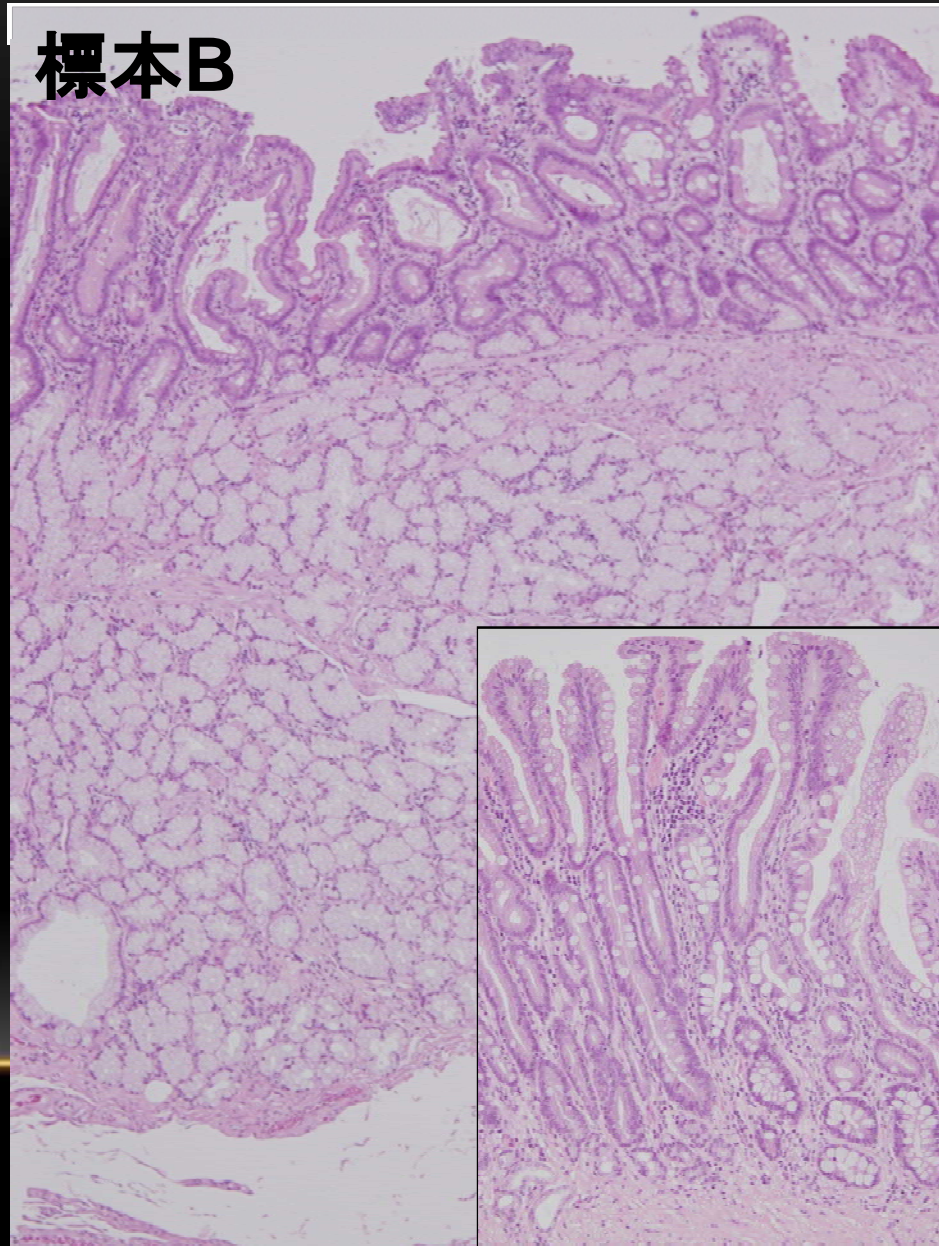


# 精度管理標本B

胃



標本B

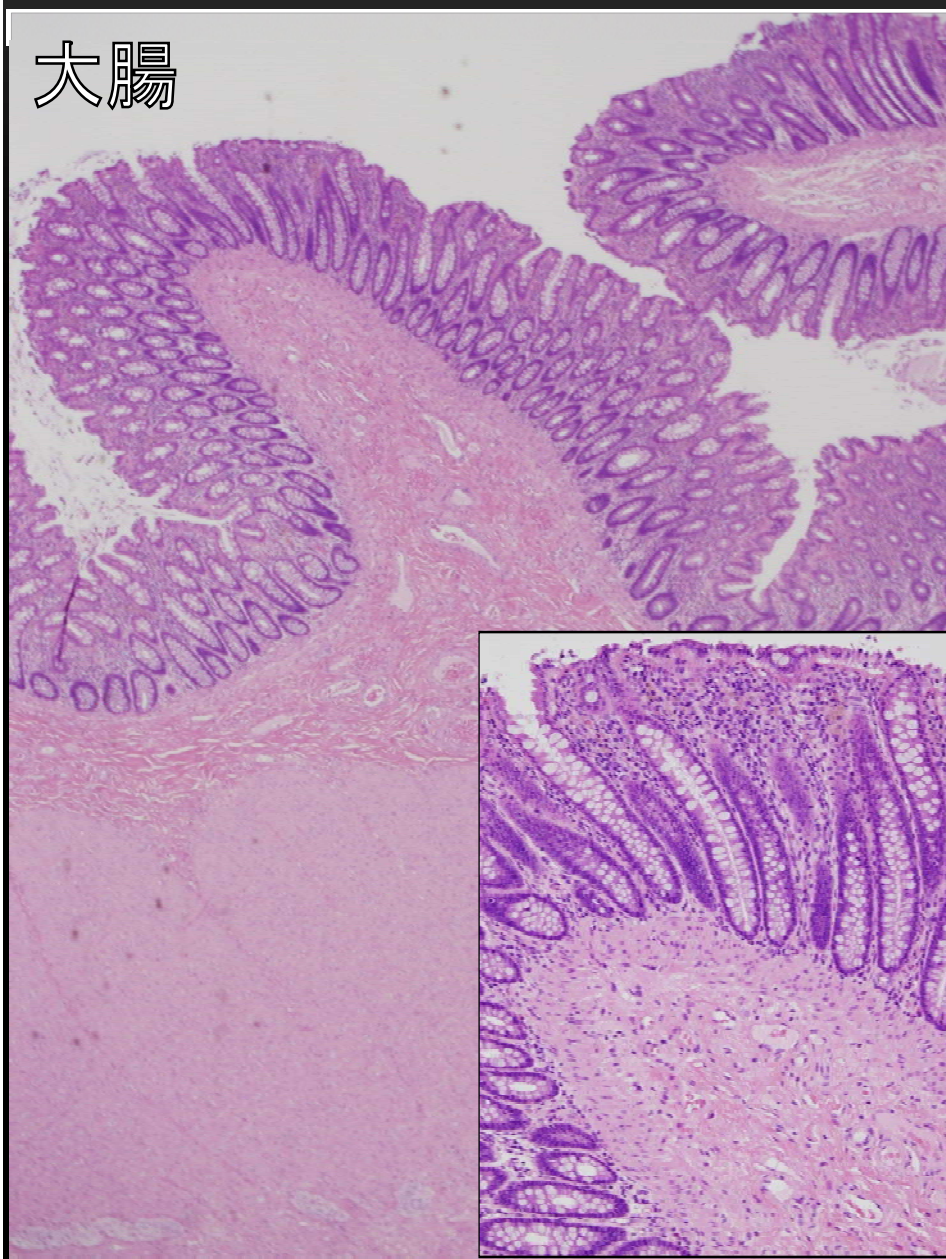




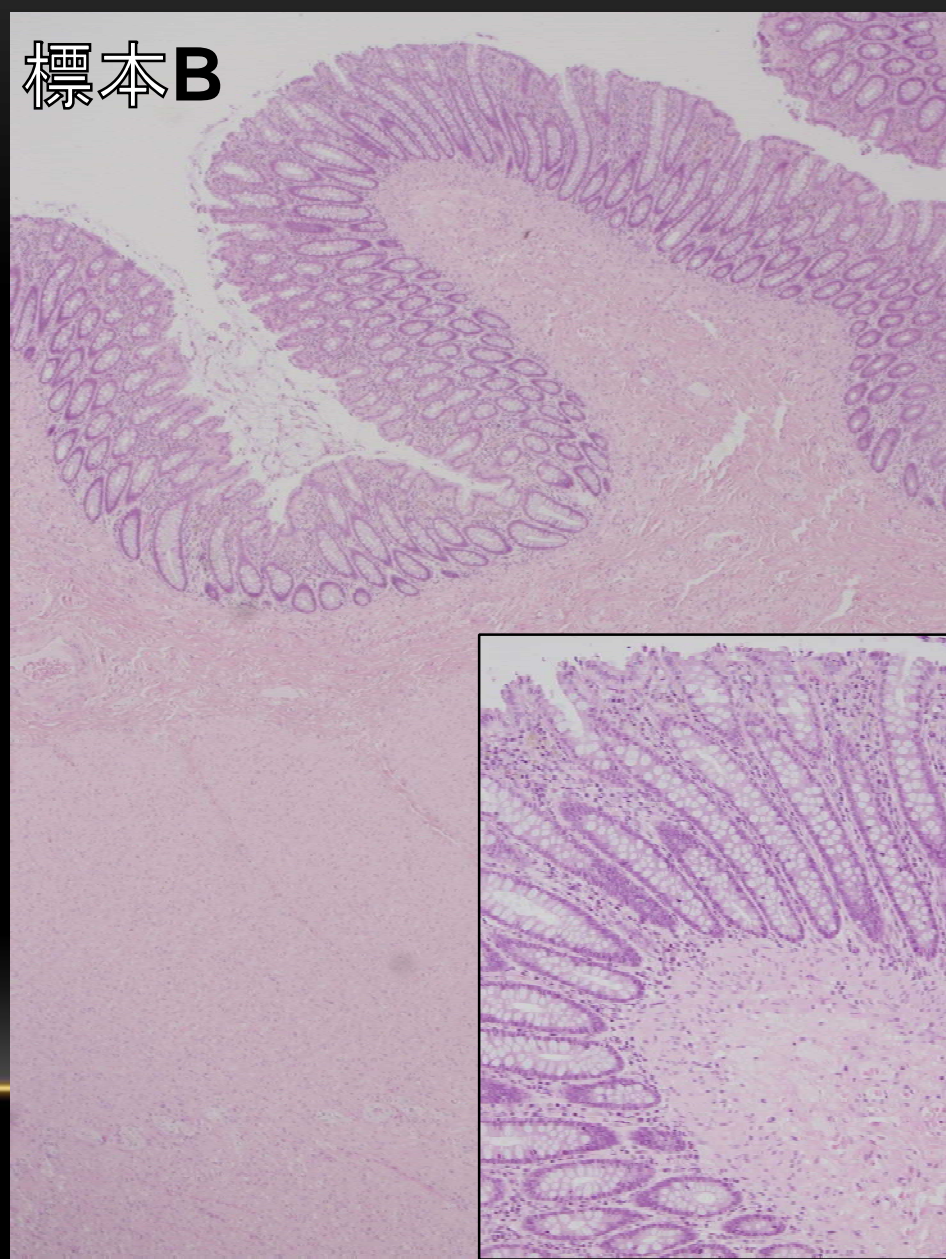
# 精度管理標本B

# (標本の評価)

大腸



標本B



## 精度管理標本B

### ➤ 正解

- ・ 標本の適否：不適正
- ・ 不適正とした理由  
ヘマトキシリン、エオジン  
共に染色不良  
(色調が薄い、色出し不足  
や染色液劣化)

# 精度管理標本B 評価結果

評価	標本の適否・理由	施設数 (43施設中)
○	標本を不適正と回答 理由：ヘマトキシリン、 エオジン共に染色不良	37
△	標本を不適正と解答 理由：不正解 又は解答選択なし	3
×	標本を適正と解答	3

# 総括

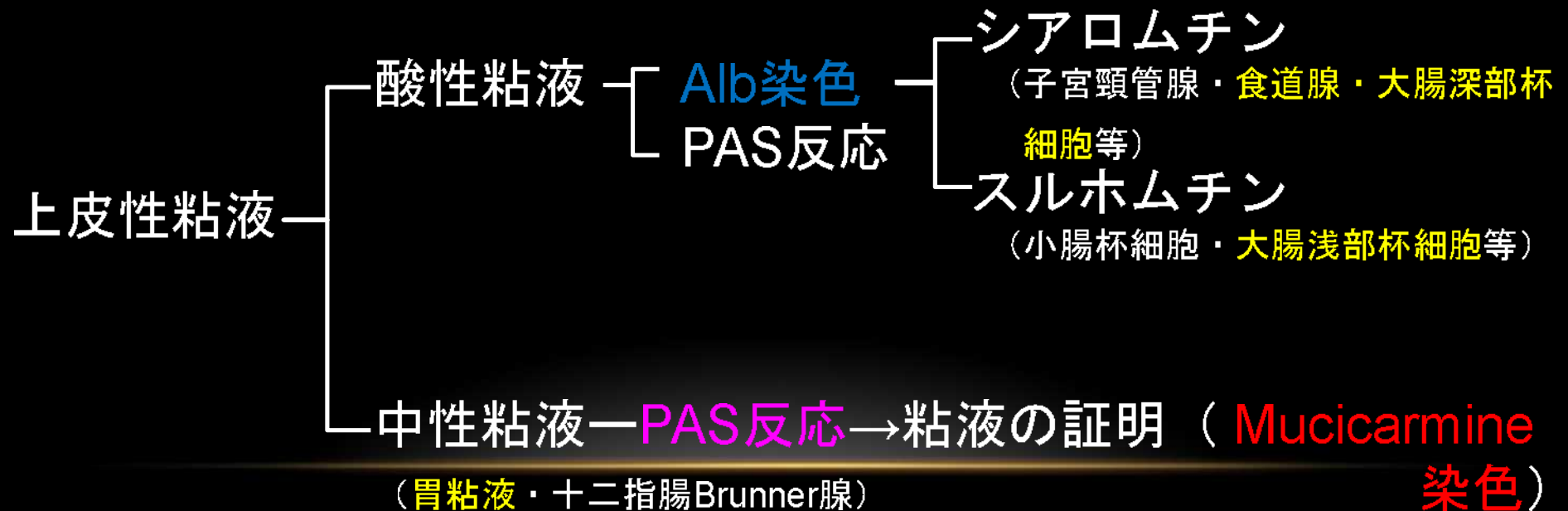
今年度の千臨技精度管理は、参加施設のご努力により良好な結果でありました。病理組織標本については、統一した評価方法や標準法の設定が困難であると考えますが、今後も継続して良い標本を作製することを心がけていただきたい。

また、研究班においても参加施設のニーズに答えられる精度管理を目指していきたい。

# 粘液染色について

粘液（mucin）とは、核となる**蛋白質（コアタンパク）**に**糖鎖**が修飾してできた**糖蛋白質**（分子量は数百万）の総称である。

また、粘液は酸性度の違いから**中性粘液**と**酸性粘液**（シアロムチン・スルホムチン）に分けられる。



※コアタンパクー免疫染色：MUCシリーズ

# PAS反応

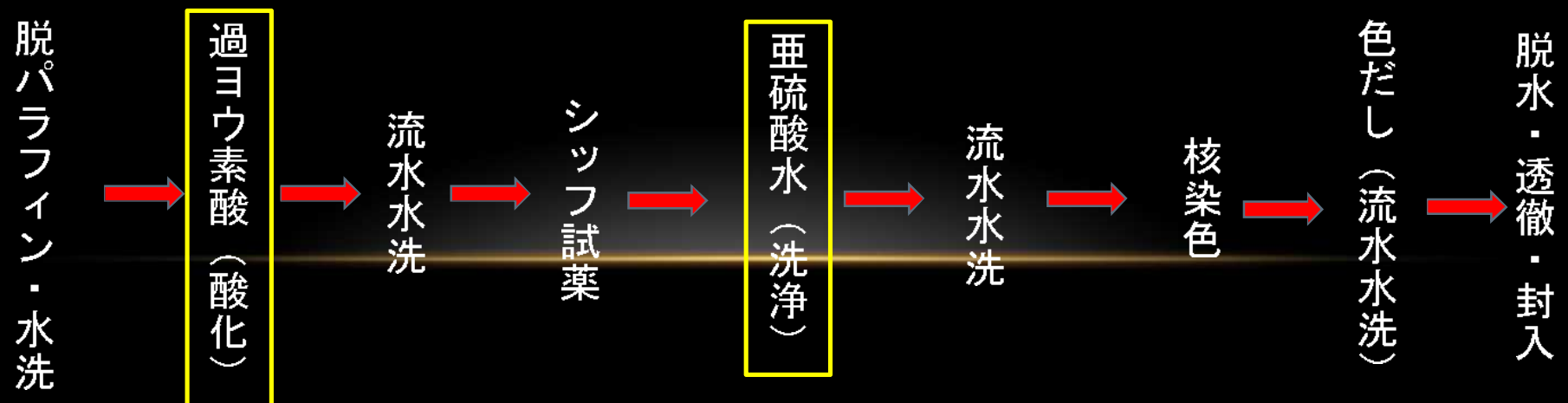
## 原理

PAS反応は、過ヨウ素酸による酸化反応とSchiff試薬による呈色反応の2つの過程で構成されている。

酸化：過ヨウ素酸により、粘液を構成する糖鎖部分にあるグリコール基（ $-\text{CHOH}-\text{CHOH}-$ ）やアミノアルコール基（ $-\text{CHOH}-\text{CHNH}-$ ）などの2個の炭素結合を開裂させて2個アルデヒドを生じさせる。（Malaprade反応）

呈色：酸化により生じた2個のアルデヒドにSchiff試薬が結合、試薬中や洗浄操作に用いている亜硫酸が水洗により離脱（酸化）することで赤紫色（パラローズアニリン）の色調を呈する。

## 手技





# 酸化について

- 酸化は、Schiff試薬との反応を左右する重要な過程であり、酸化不足は呈色反応を低下させる要因となる。
- 酸化剤である過ヨウ素酸には、メタ過ヨウ素酸 ( $\text{HIO}_4$ ) と オルト過ヨウ素酸 ( $\text{H}_5\text{IO}_6$ ) があるがどちらも使用可能である。
- 酸化時間は、5分から30分で染色性に大きな変化はみられない。

0.5% オルト過ヨウ素酸による酸化時間における染色性の変化

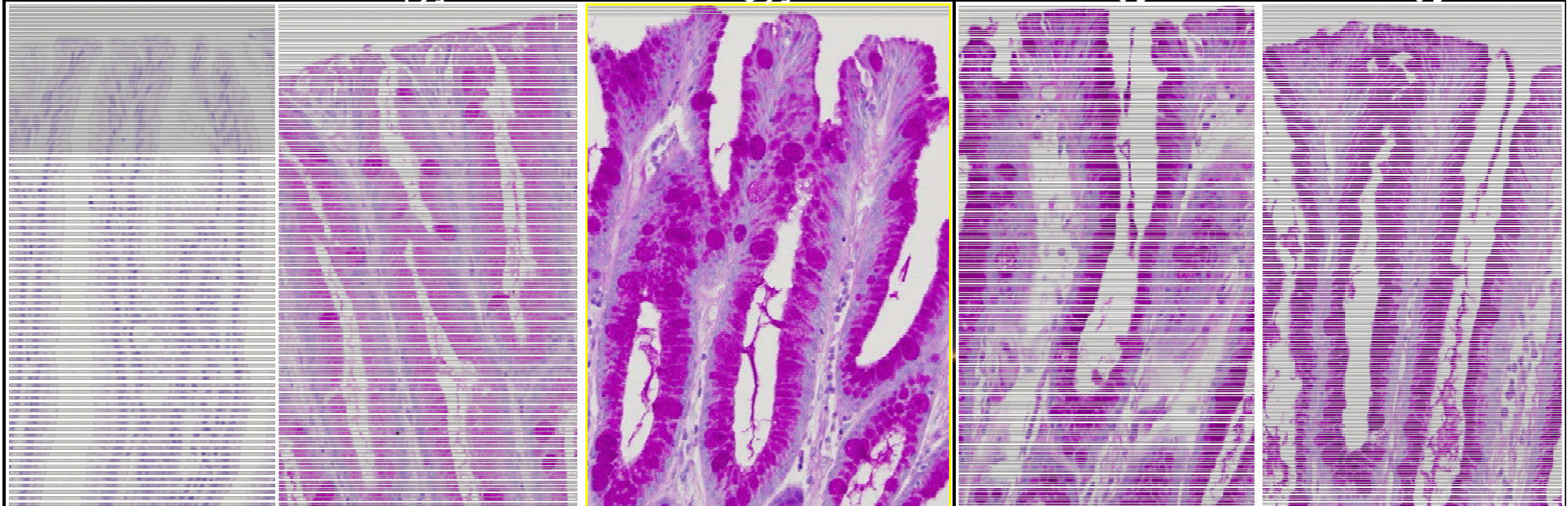
酸化無し

1分

5分

10分

30分



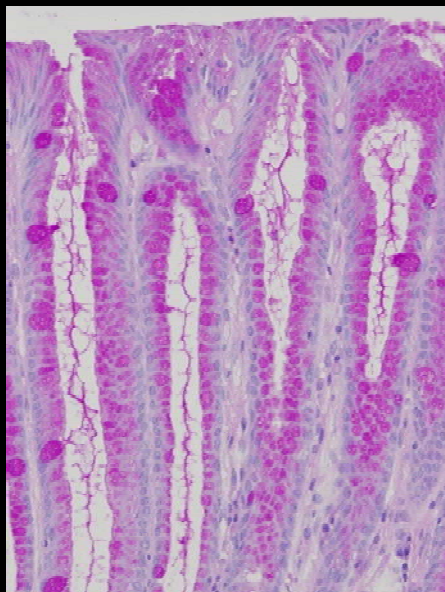


# 亜硫酸水による洗浄について

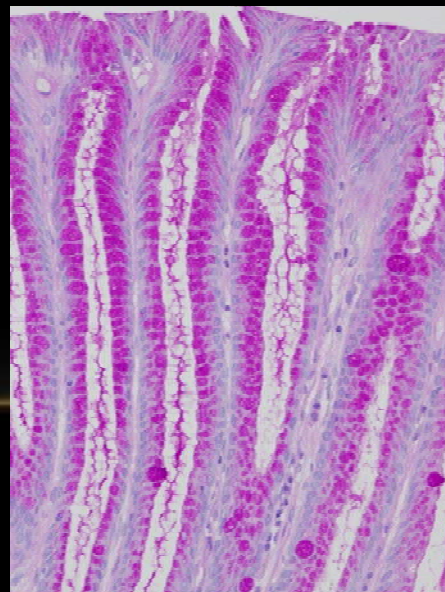
- 亜硫酸水による洗浄には、分別効果や共染防止の作用があるとされている。文献的にはこの操作を省略することが可能との記載があるが、使用しない場合は流水水洗の時間の調整が必要である。
- 本精度管理のアンケートでは、亜硫酸水を使用する施設が39施設、使用しないが4施設であった。
- 十分な呈色には流水水洗は5分程度は必要と考えられる。

亜硫酸水未使用での水洗時間における染色性の変化

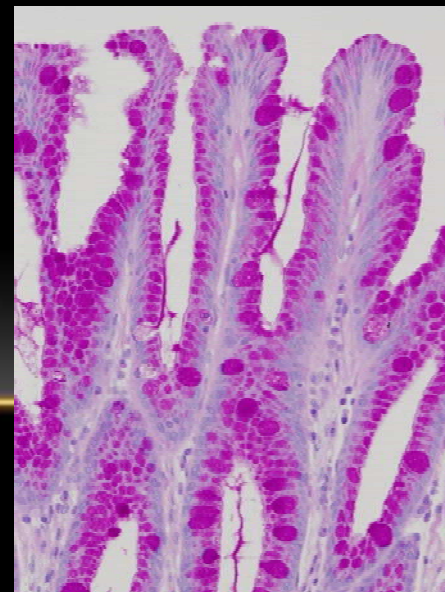
1分



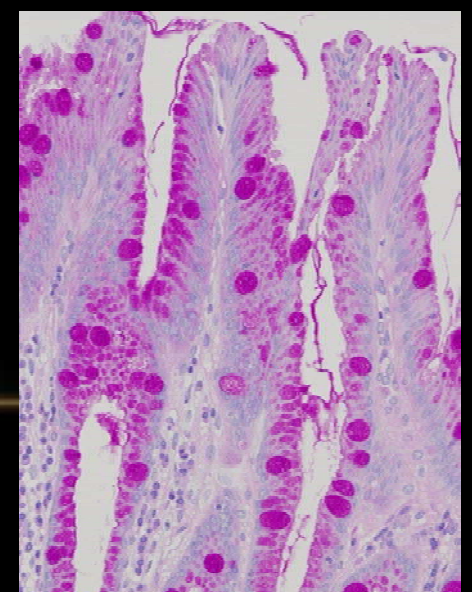
3分



5分



10分



# Mucicarmine染色

## 目的

主としてPAS陽性物質中より上皮性粘液を区別するために使用され、粘液産生細胞の検索に使用される。

## 原理

染色液中のカルミン（色素）は、染色液中のアルミニウムと結合、色ラックを形成し塩基性色素として負に帯電した粘液とイオン結合する。

## 染色態度

上皮性粘液：赤（↑）  
細胞核（ヘマトキシリン）：青紫



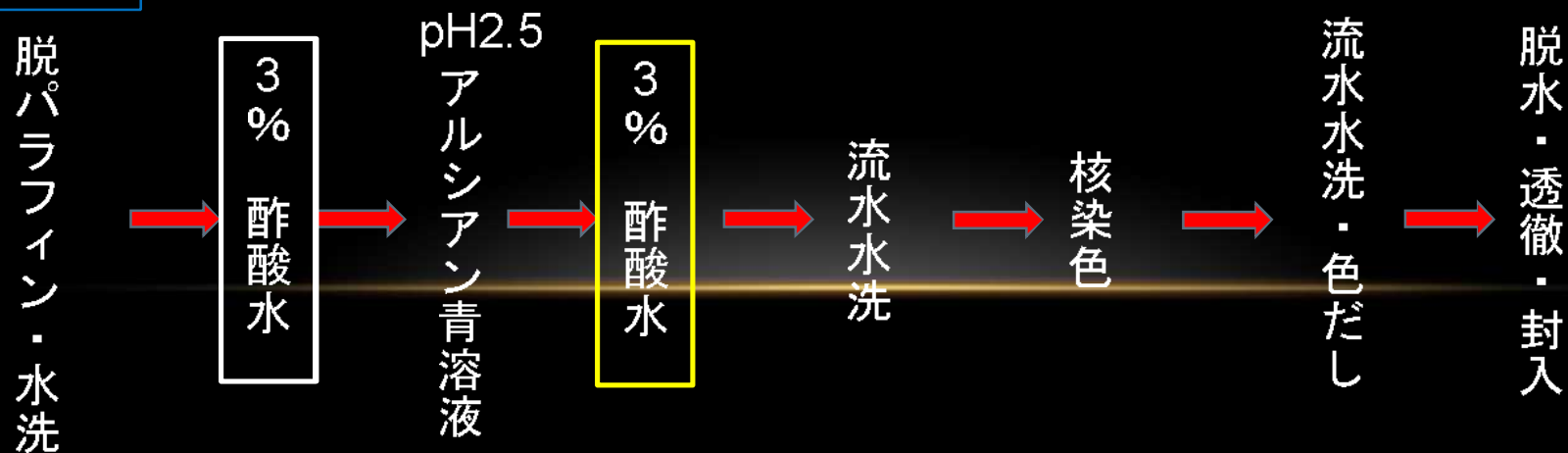
# Alb染色

## 原理

アルシアン青色素は銅イオンを分子の中心に持つ塩基性色素で、酸性条件下ではイソチオウロニウム基が正（+）に帯電するため、組織中の陰性荷電を有する硫酸基（ $\text{SO}_4^-$ ）やカルボキシル基（ $\text{COO}^-$ ）イオン結合する。また、硫酸基とカルボキシル基の等電点の差を利用することで、両者を鑑別することができる。

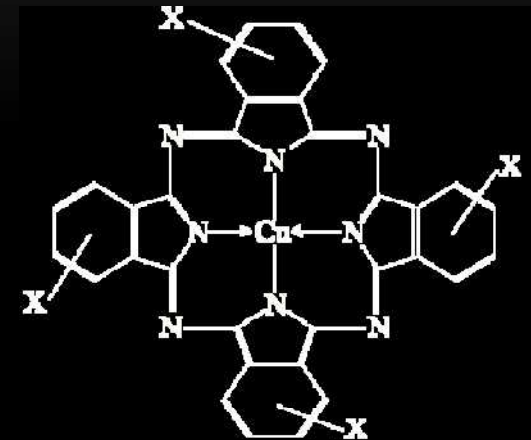
【溶媒：pH2.5（3%酢酸） pH1.0（0.1N塩酸）】

## 手技



Alcian blue 8GXの化学構造

分子量：1298.86



X = イソチオウロニウム基

X =  $\text{CH}_2\text{SC}(\text{N}^+\text{R}_2)(\text{NR}_2)$  R =  $\text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5$  他

# 3%酢酸水による洗浄について

アルシアン青染色では染色前後の洗浄操作が、染色の良否に影響を与える。

## 染色前

- アルシアン青溶液のpHの変化を低減させる。（劣化の防止）
- 組織のpHを低下させて、非特異的染色を防止させる。

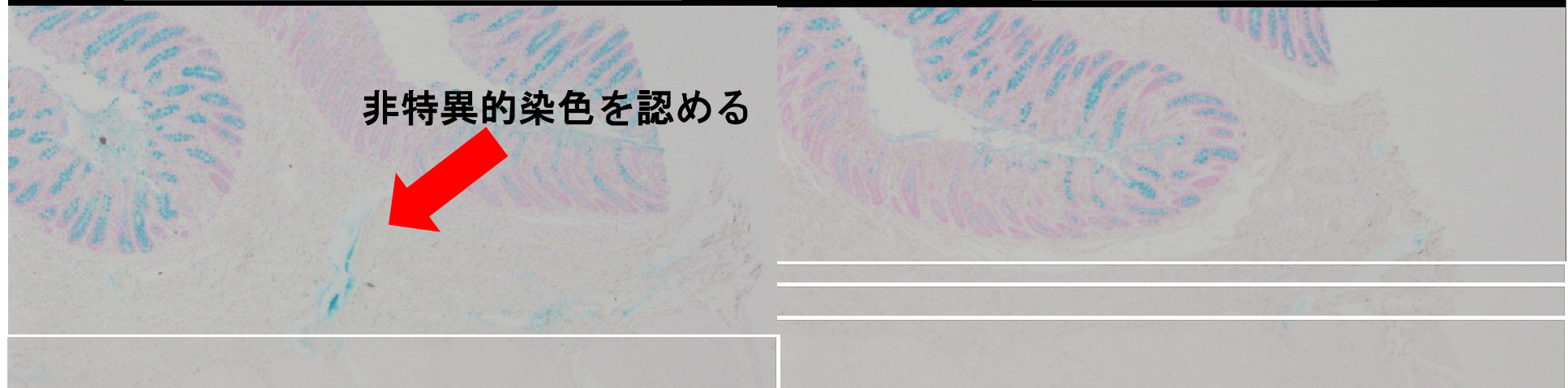
## 染色後

- 目的物質以外に反応した余分な色素を落とす。（分別）

染色後の洗浄操作なし

洗浄操作あり

非特異的染色を認める





# 粘液の免疫染色 MUCシリーズ

- 粘液の免疫染色における目的物質は、基本的に粘液の核となるコア蛋白（MUCと略称:主要なアミノ酸はセリン・スレオニン）であり、このコア蛋白の種類により分類され、現在までに約20種類程度が報告されている。
- MUCは、その存在部位により**分泌型ムチン**（上皮細胞より分泌される）と**膜結合型ムチン**（細胞膜に結合、細胞膜を貫通する形で存在）として分けられている。

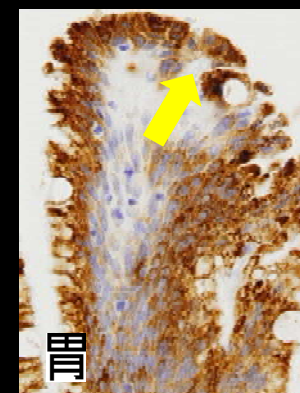
コアタンパク	分類	主な局在部位
MUC1	膜結合型	膵腺房中心細胞・乳腺
MUC2	分泌型	小腸・大腸・気道
MUC3	膜結合型	小腸・大腸・胆嚢
MUC4	膜結合型	大腸・気道
MUC5AC	分泌型	胃腺窩上皮細胞
MUC5B	分泌型	食道腺細胞
MUC6	分泌型	胃幽門腺・噴門腺・十二指腸Brunner腺・食道噴門腺
MUC7	分泌型	唾液腺

# 精度管理標本でのMUCの局在

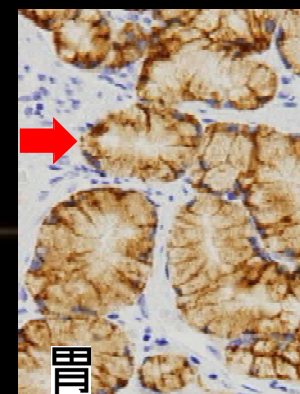
MUC2：腸型（杯細胞型）の形質マーカーとして使用されている。正常組織では大腸、特に杯細胞に陽性を示す。また胃の腸上皮化生粘膜や一部の胃分化型腺癌（腸型形質を持つ）などでも陽性を示す。

大腸

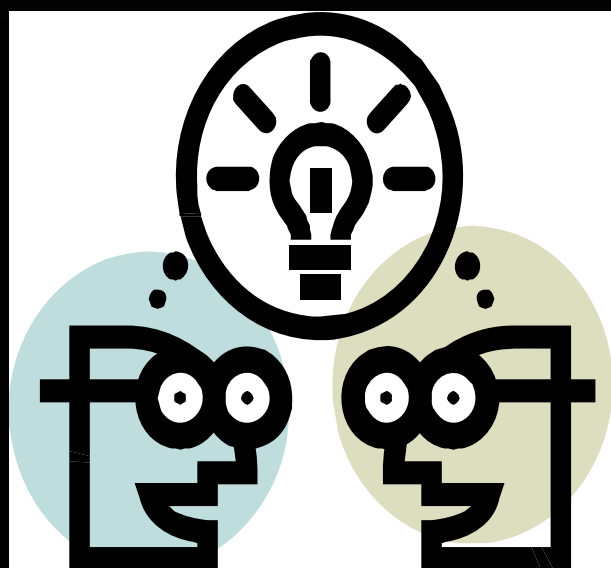
MUC5AC：「胃表層型ムチン」とも呼ばれる分泌型ムチンで、修飾している糖鎖にはLewis抗原なども含まれる。正常組織では胃の表層部腺窩細胞に（**黄色矢印**）陽性を示すほか、胃腺上皮型形質のみられる大腸過形成ポリープや鋸歯状腺腫などで陽性を示す。



MUC6：「幽門腺型ムチン」とも呼ばれる分泌型ムチンで、正常組織では、胃幽門腺・噴門腺・食道噴門腺などに（**赤矢印**）陽性を示す。



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。