

平成29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

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

【目的】

・標本作製

各施設での薄切・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確認と基本的な臓器の病理組織像を理解する．

標本作製

【精度管理調査概要】

【参加施設】

HE染色:46施設

膠原線維染色(AzanまたはMasson trichrome染色):42施設

【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.

【方法】

方法Ⅰ:各施設で日常業務における切片厚での薄切・HE染色, 膠原線維染色(AzanまたはMasson trichrome染色)を実施し, 染色態度の評価を行った.

方法Ⅱ:切片厚 $7\mu\text{m}$ 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切片厚を測定した.

【精度管理調査概要】

〈評価方法〉

HE染色(6項目), 膠原線維染色(5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.

(HE: 11-12点, 膠原線維染色: 9-10点)

B: 染色上, 目的を達成している.

(HE: 9-10点, 膠原線維染色: 7-8点)

C: 染色上, 目的を達成していない.

(HE: 7-8点, 膠原線維染色: 5-6点)

D: 目的から逸脱し, 早急な改善が必要.

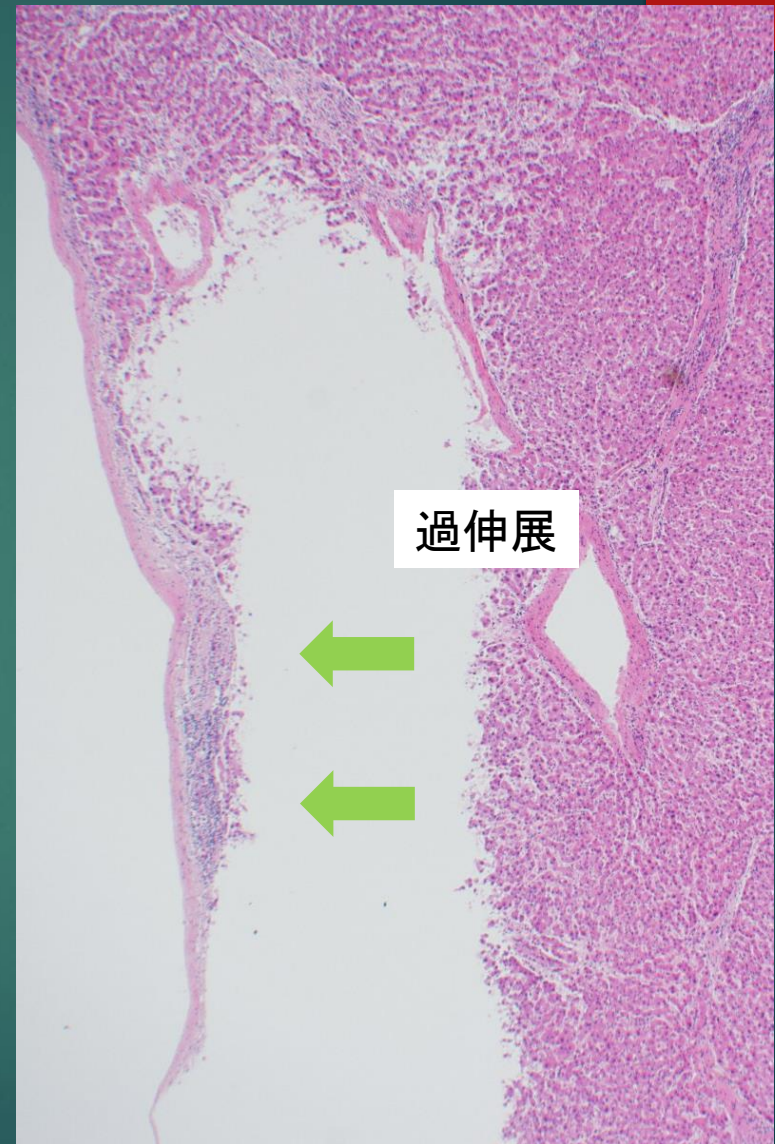
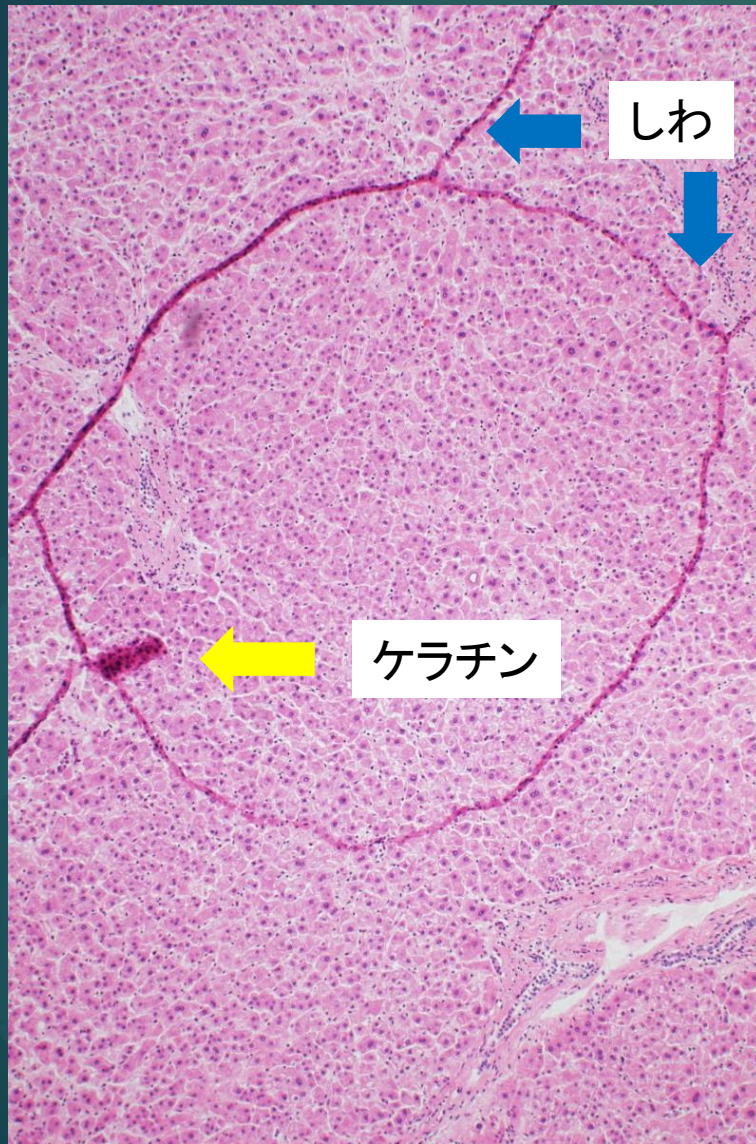
(HE: 6点以下, 膠原線維染色: 4点以下)

※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.

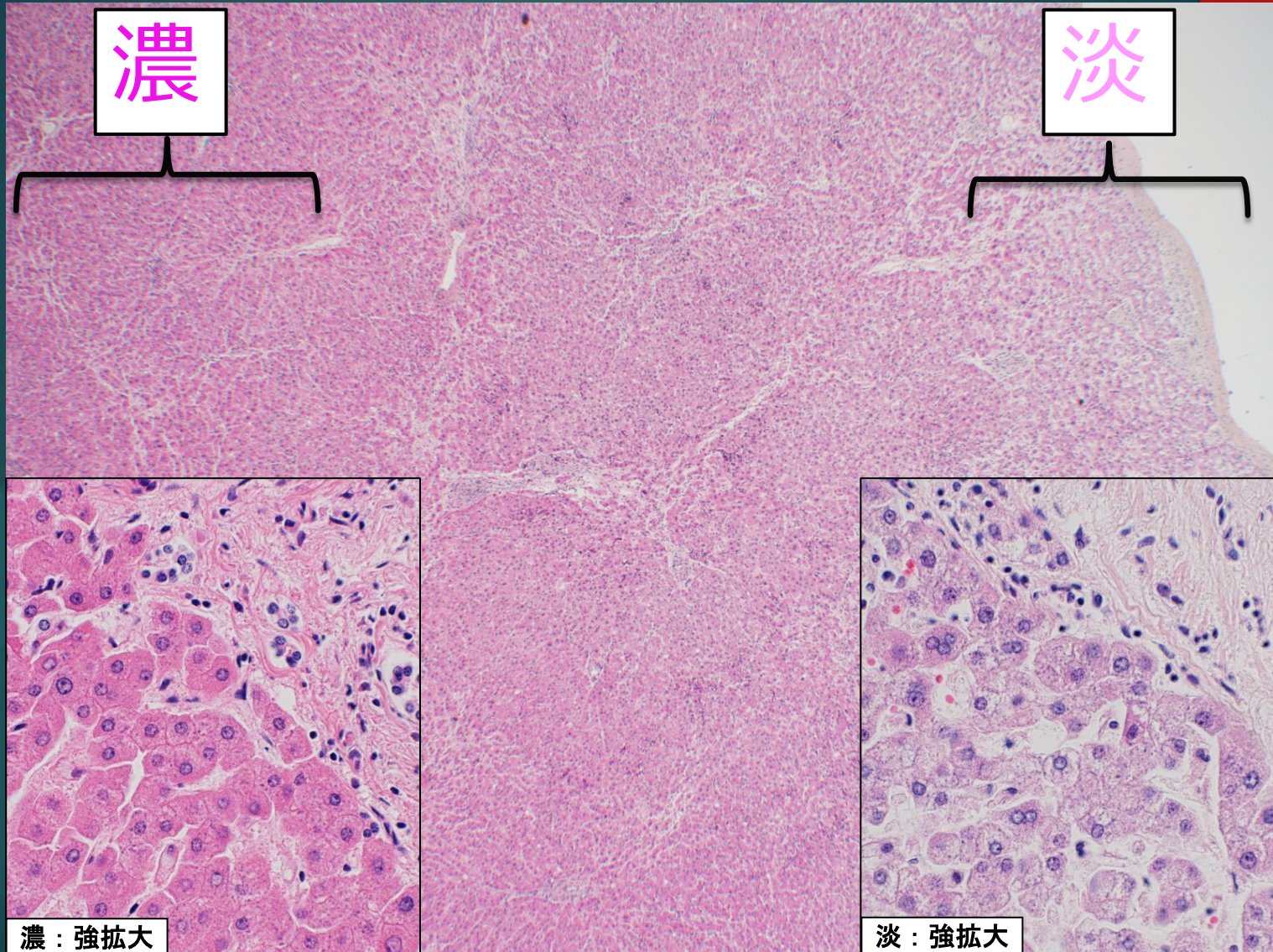
【HE染色標本評価表】

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】 標本上のゴミ・しわ・過伸展



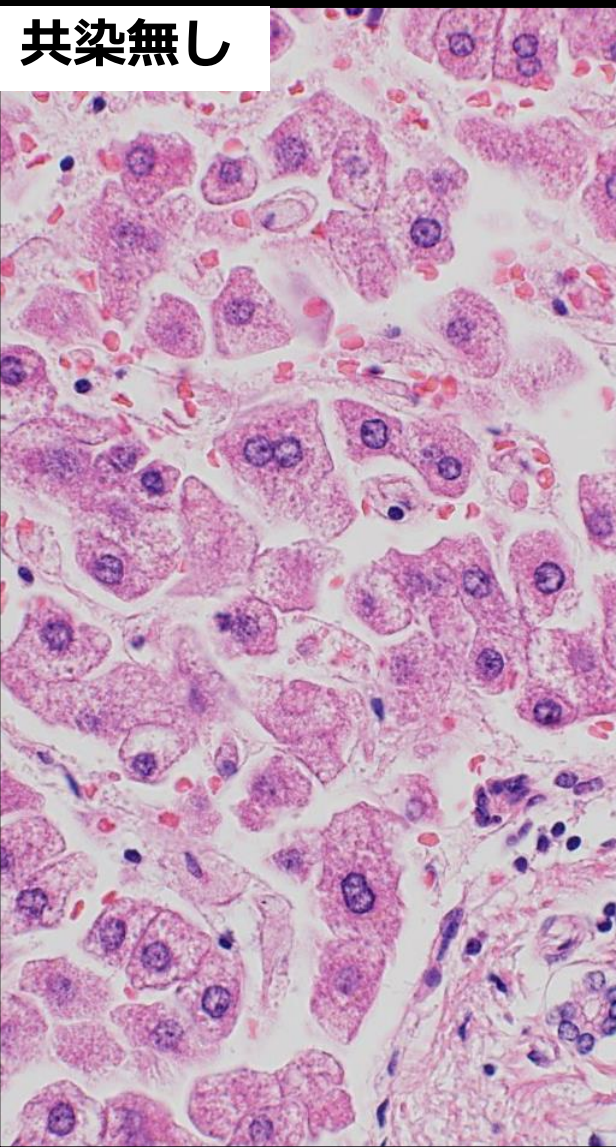
【HE染色標本評価】 染色むら



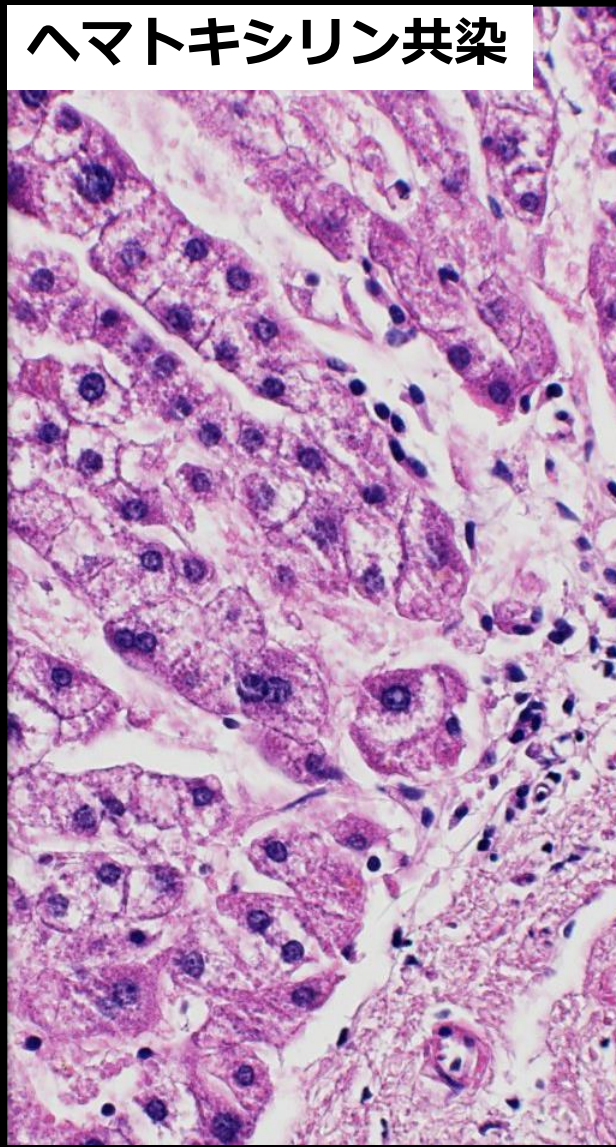
標本辺縁部と中心部に染色むらを認める.

【HE染色標本評価】 共染の有無

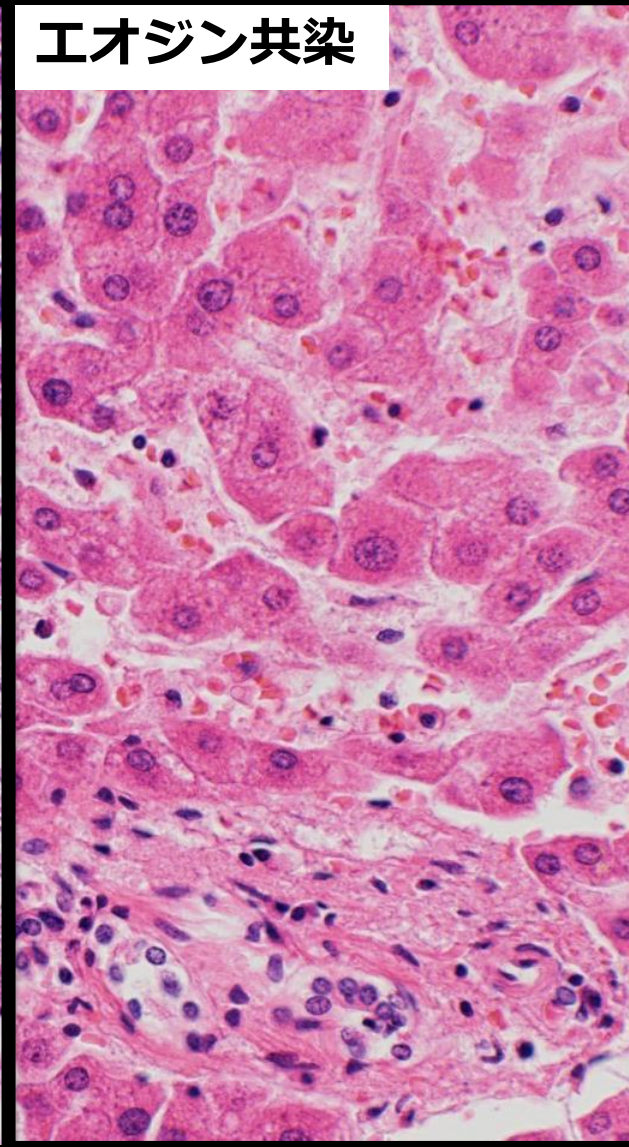
共染無し



ヘマトキシリン共染

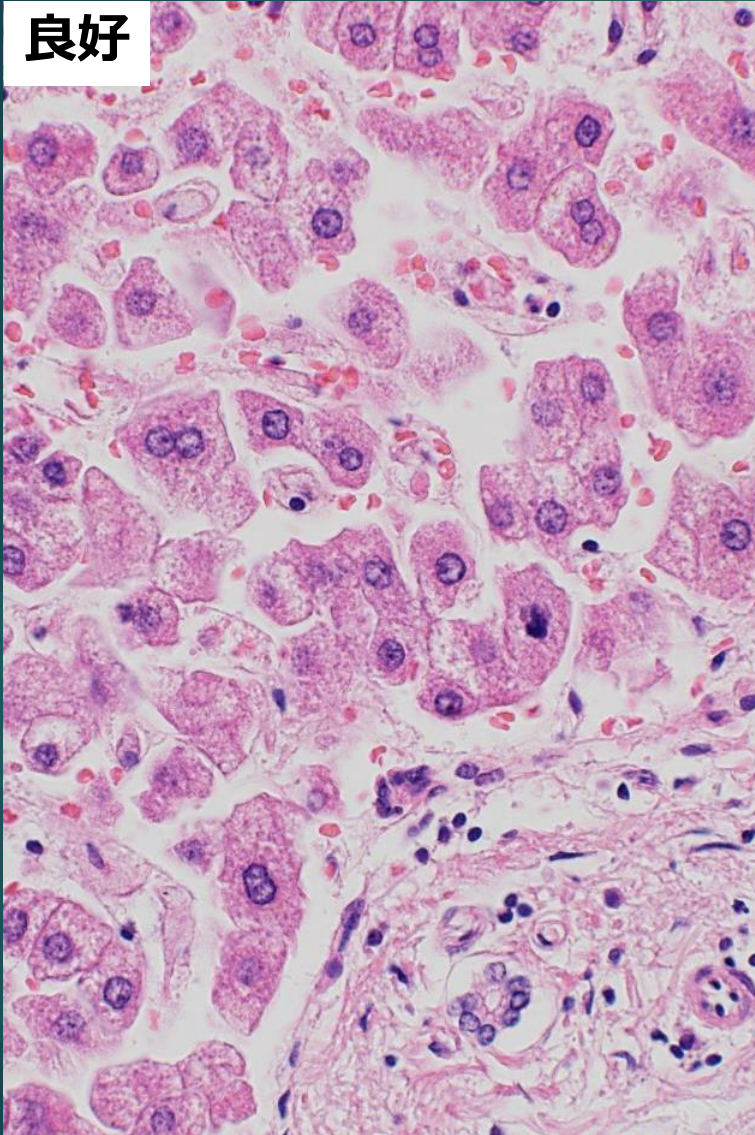


エオジン共染

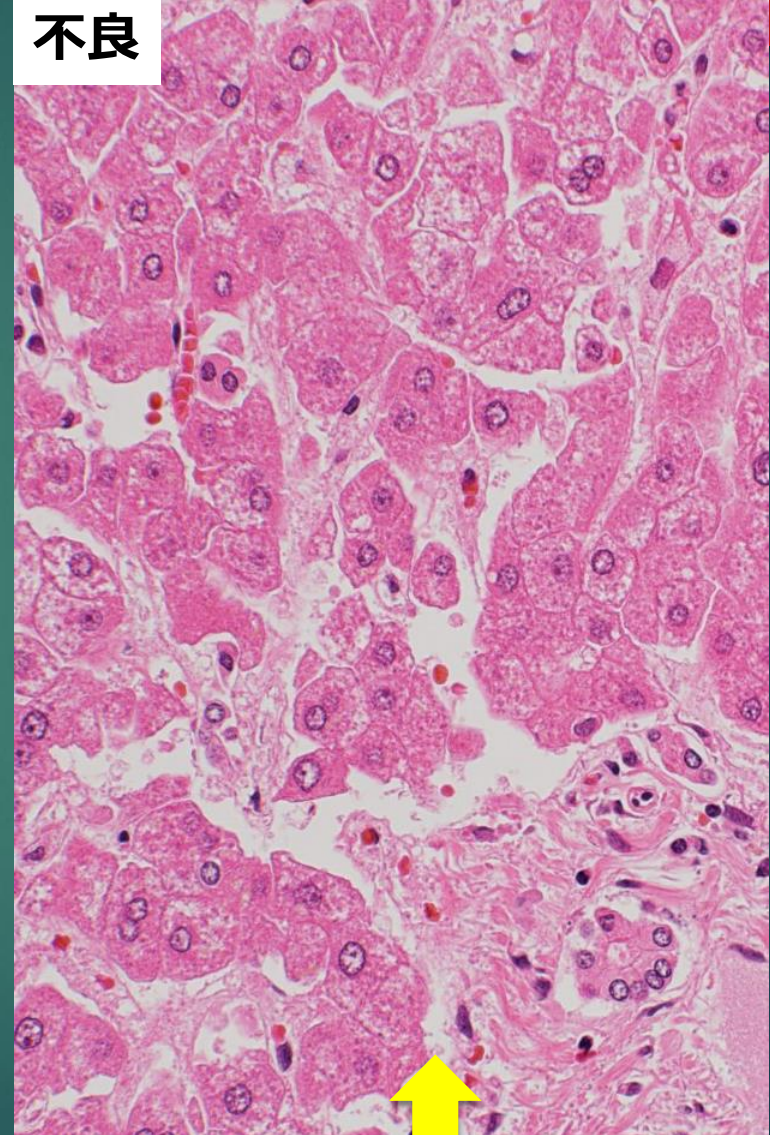


【HE染色評価】ヘマトキシリンの染色性

良好



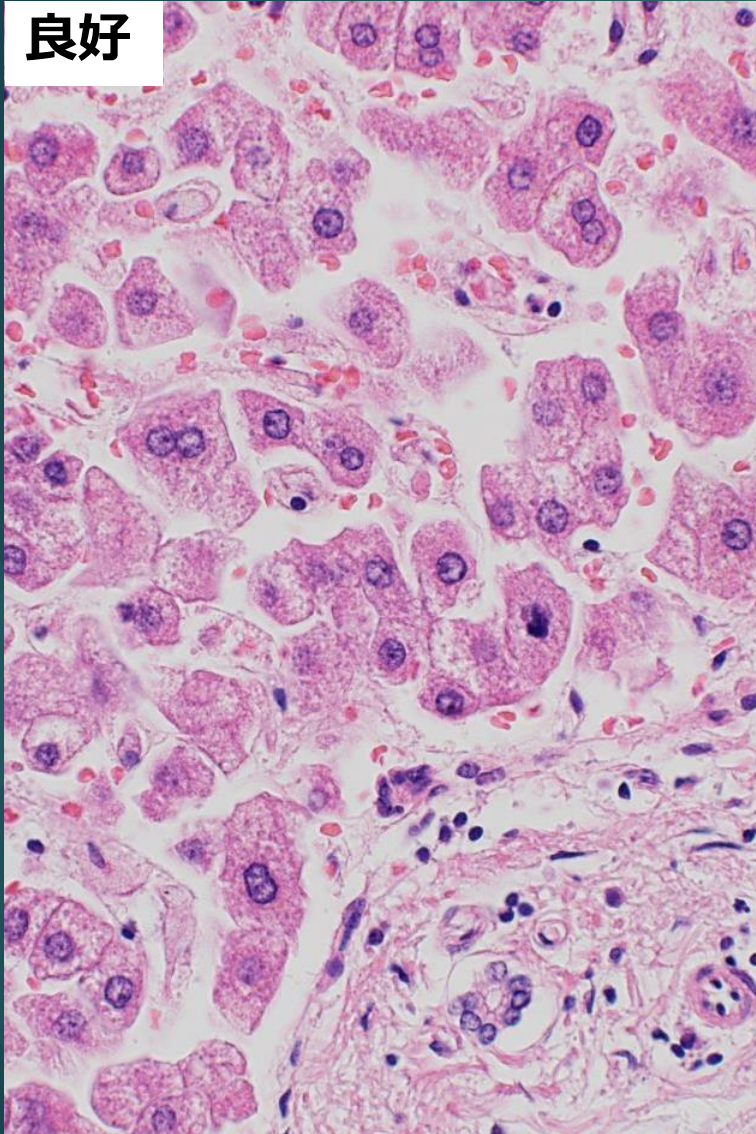
不良



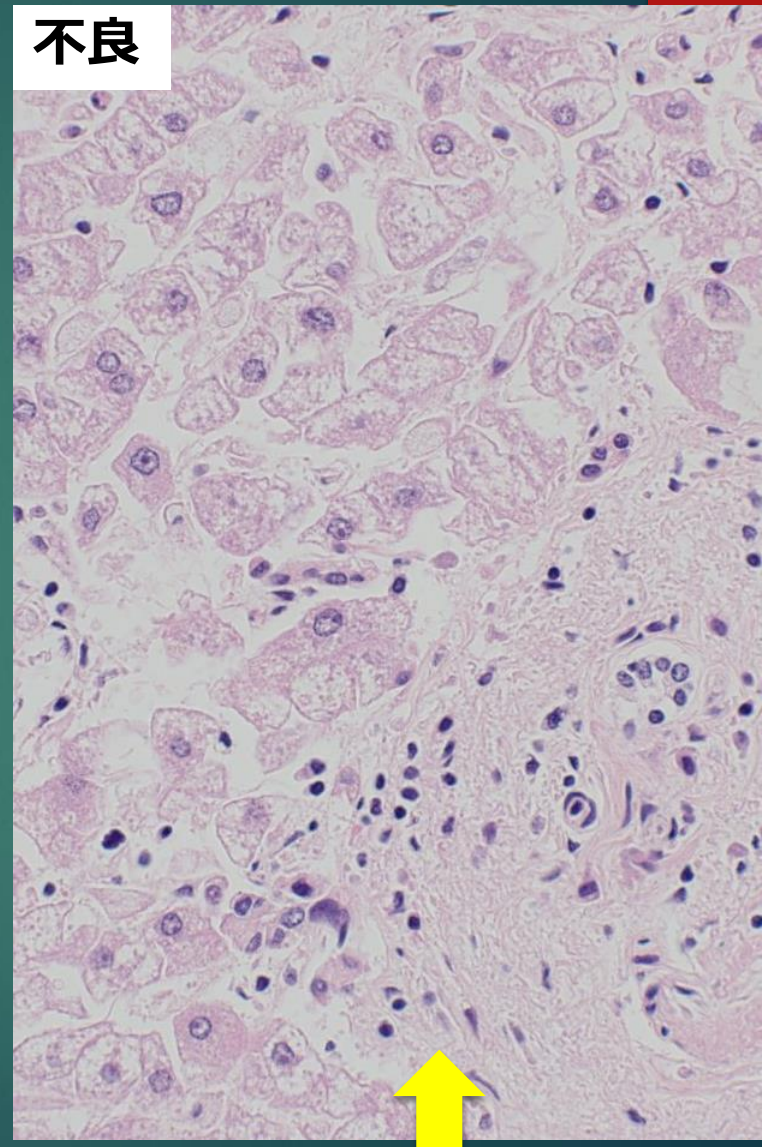
核の染色性が弱く、クロマチンの状態が観察しづらい。

【HE染色評価】 エオジンの染色性

良好



不良



細胞質の染色性が弱い. 肝細胞とグリソン鞘に染色性の違いが見られない.

【HE染色標本各項目への評価】

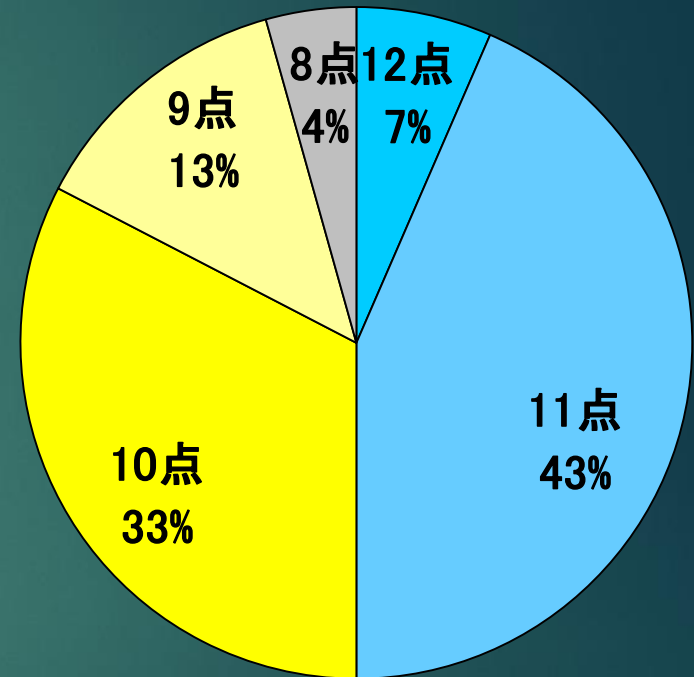
HE染色	減点となった施設数(割合)
スライドガラスの汚れ・剥離・傷等	21/46施設(45.7%)
染色むら	2/46施設(4.3%)
共染の有無	19/46施設(41.3%)
ヘマトキシンの染色性	3/46施設(6.5%)
エオジンの染色性	19/46施設(41.3%)
核と細胞質のコントラスト	13/46施設(28.3%)

【HE染色標本評価まとめ】

総合評価 施設数【46施設】

A 評価	23 (50.0%)
B 評価	21 (45.7%)
C 評価	2 (4.3%)
D 評価	0 (0.0%)

総合得点

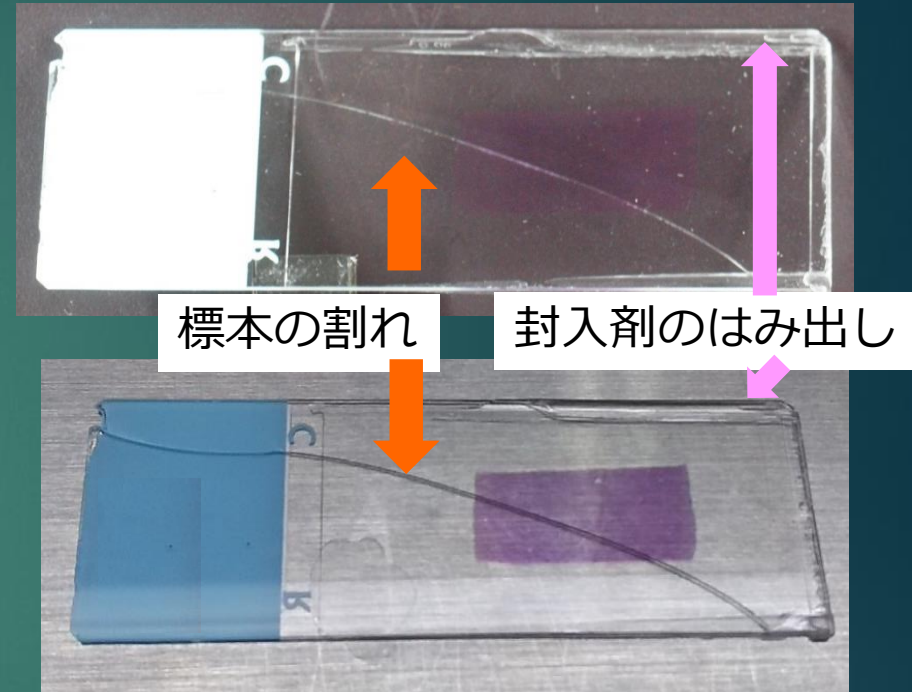


今年度のHE染色標本評価では、C評価となった2施設を除き、多くの施設において染色上の目的を達成しており良好といえる結果であった。

【膠原線維染色標本評価表】

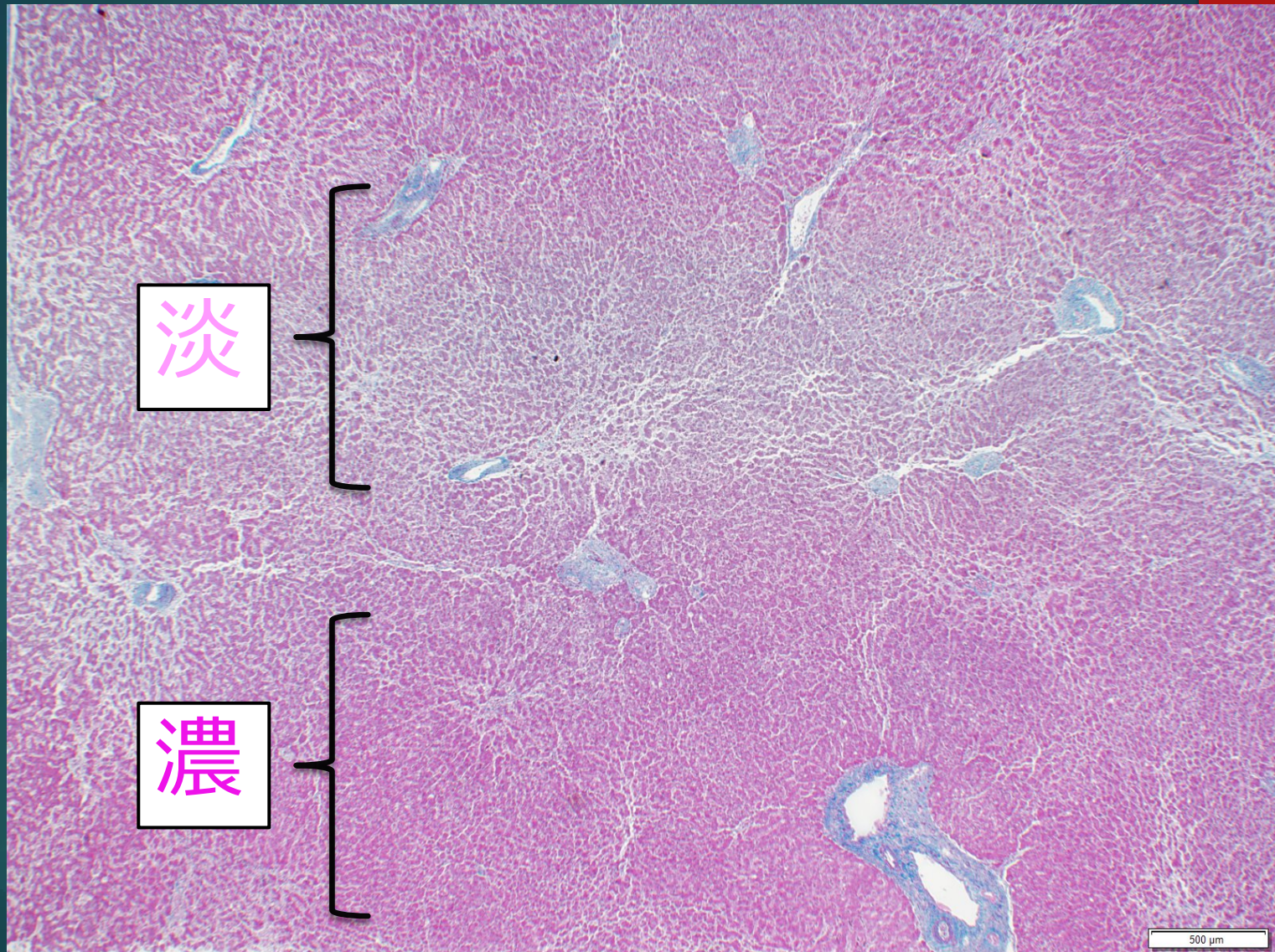
膠原線維染色	配点
スライドガラスの汚れ・剥離・傷等	2
染色むら	2
共染の有無(アニリン青かぶり)	2
膠原線維の染色性	2
コントラスト	2
合 計	10

【膠原線維染色標本評価】 ゴミ・封入剤のはみ出し



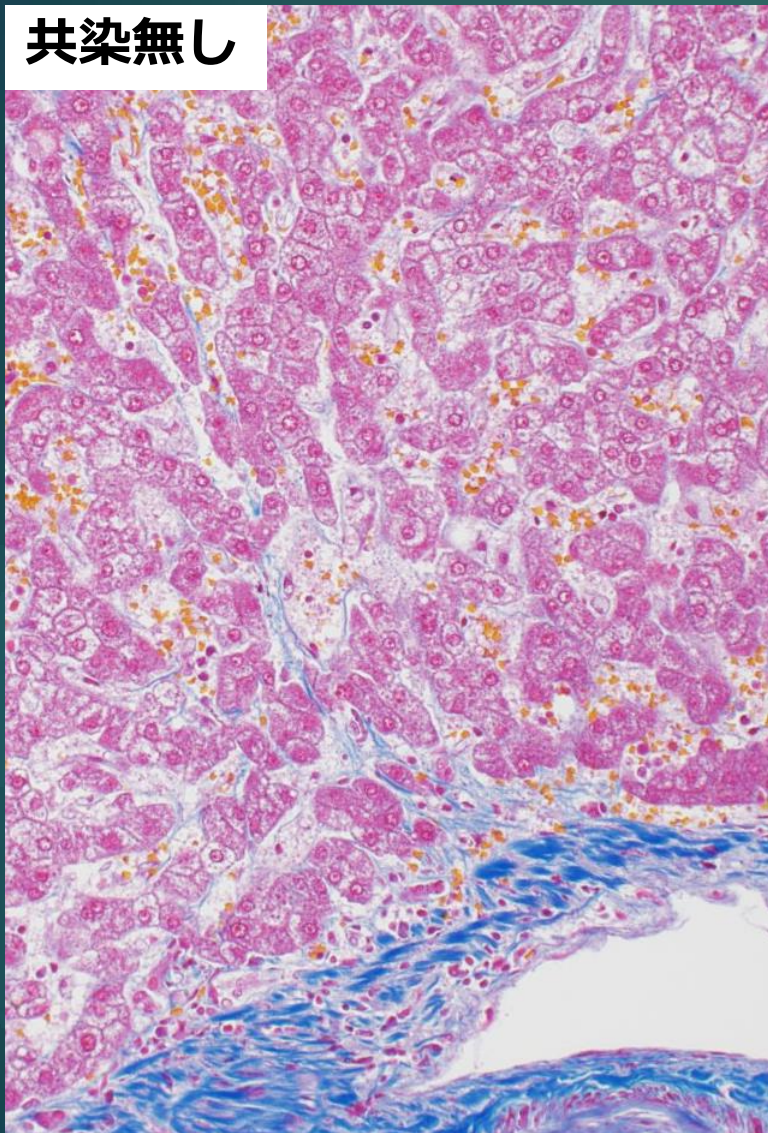
封入剤のはみ出し・標本の割れ
→封入剤乾燥前に標本ケースに入れた事により、標本ケースと標本がくっつき取り出す際に標本が割れてしまった。

【膠原線維染色標本評価】 染色むら

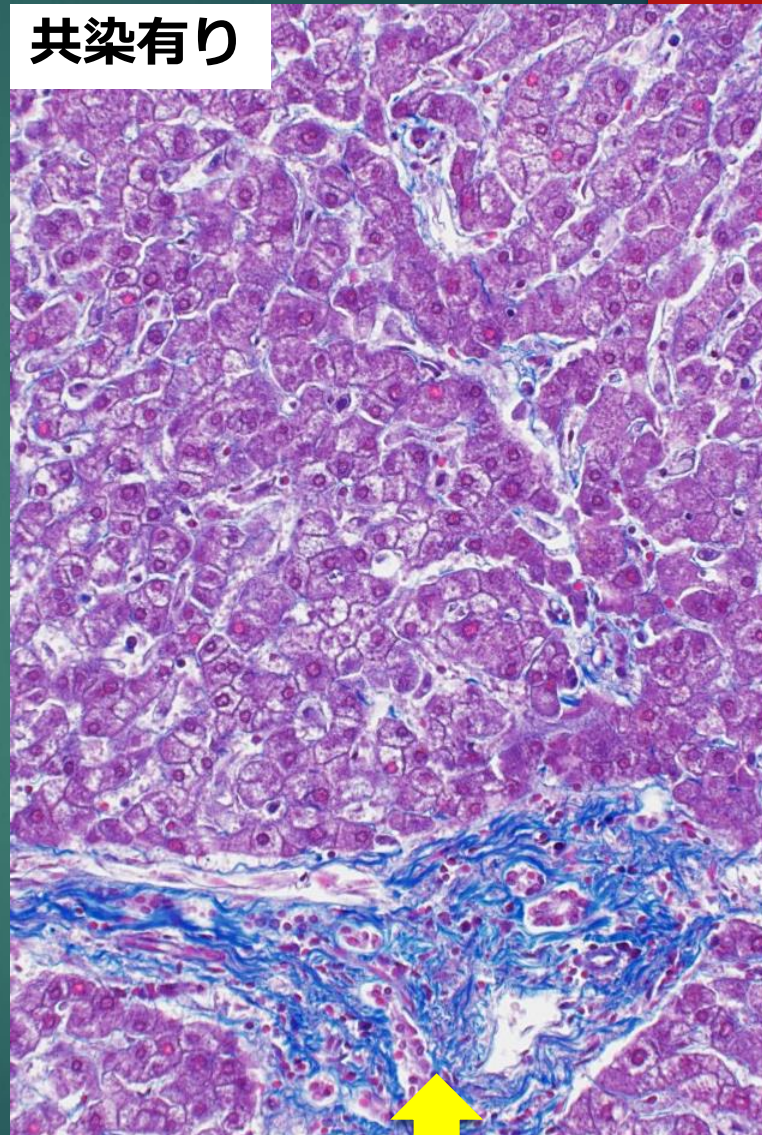


【膠原線維染色標本評価】 共染の有無

共染無し



共染有り

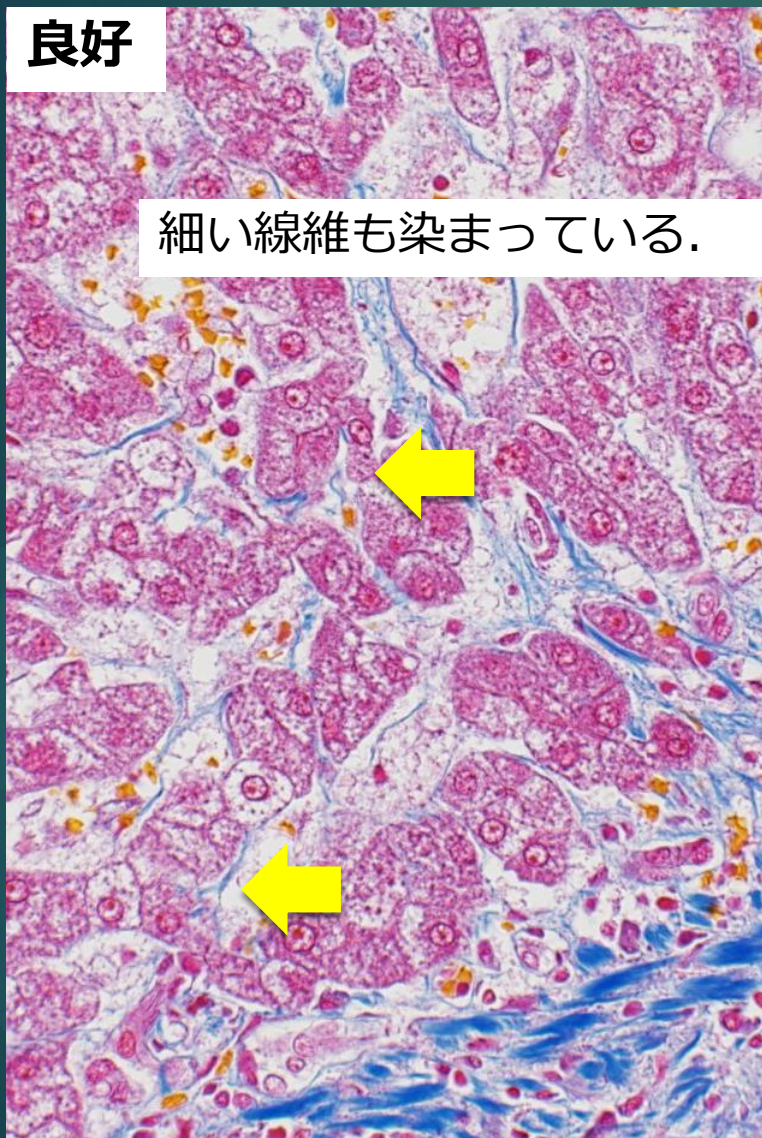


細胞質にアリニン青がかぶり紫色っぽく見える.

【膠原線維染色標本評価】 膠原線維の染色性

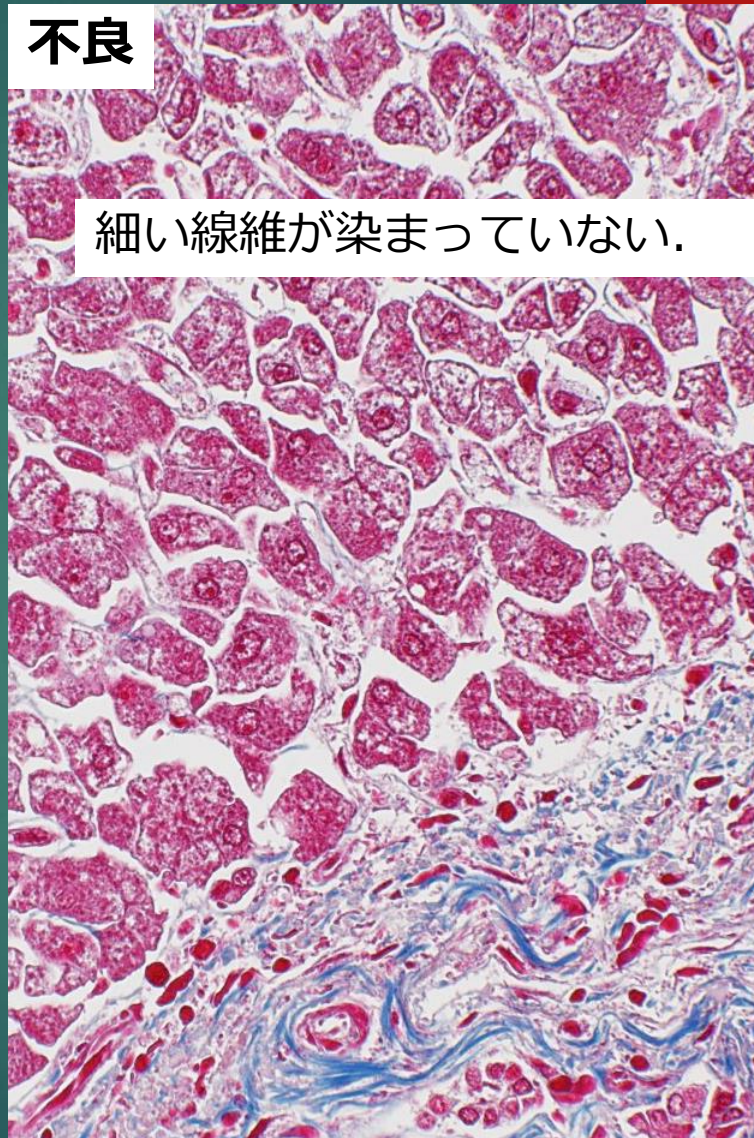
良好

細い線維も染まっている。



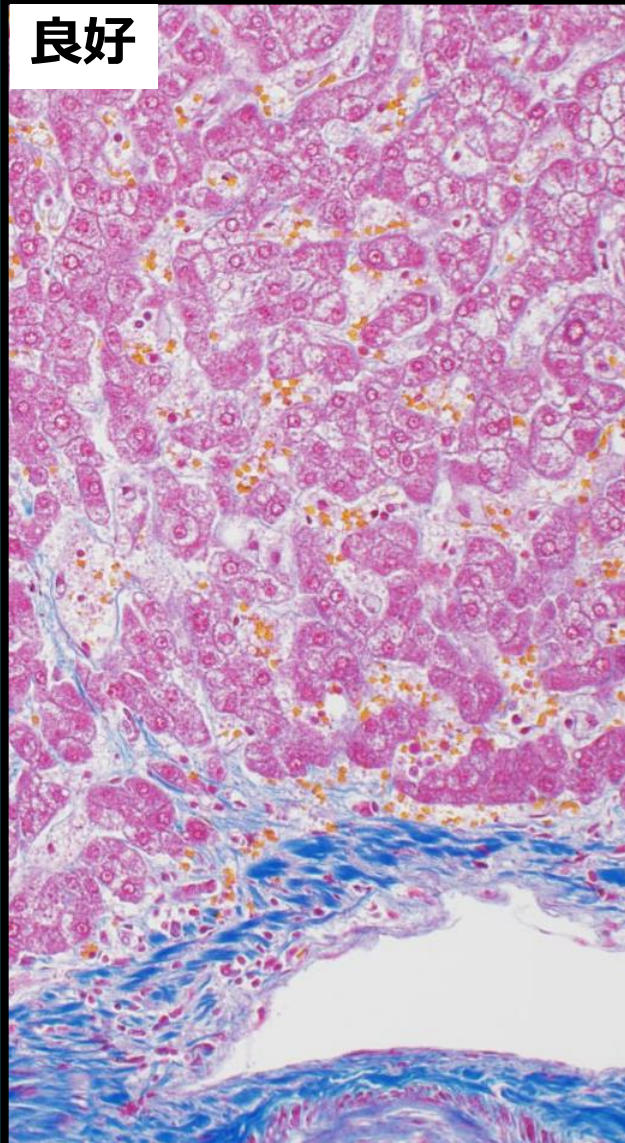
不良

細い線維が染まっていない。

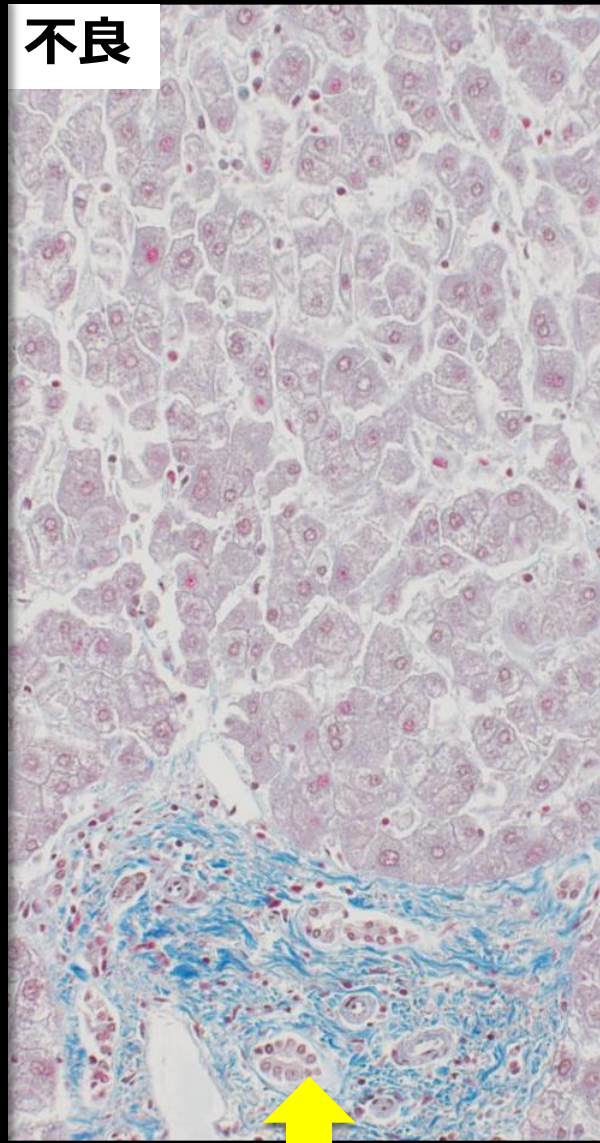


【膠原線維染色標本評価】 コントラスト

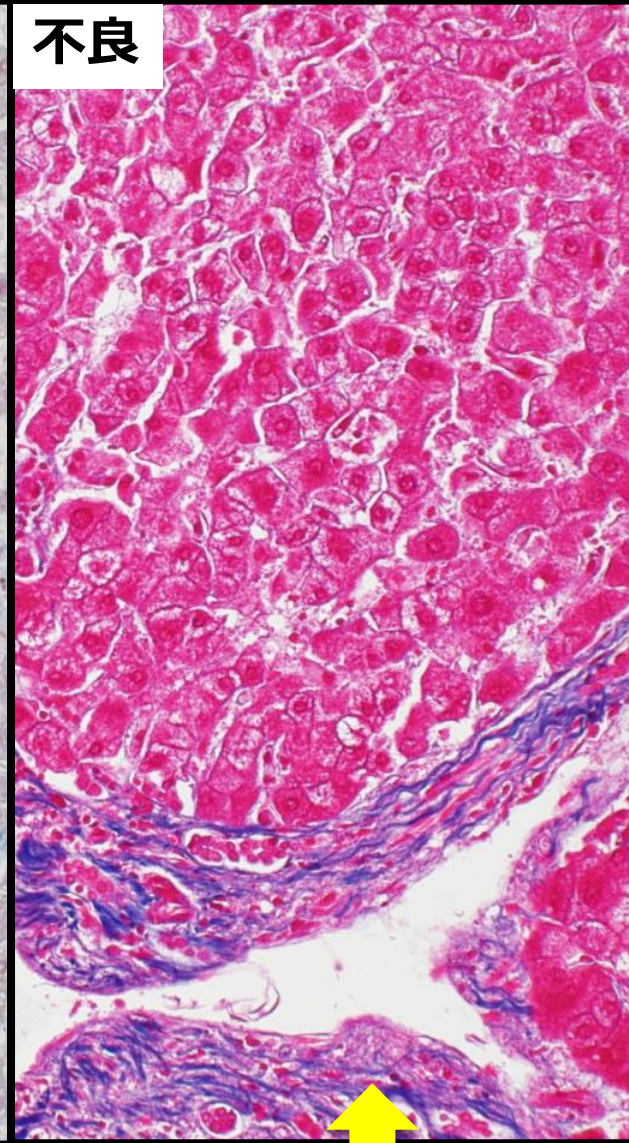
良好



不良



不良



細胞質の染色性低下と過染が見られ、コントラストが低下している。

【膠原線維染色標本各項目への評価】

膠原線維染色

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

22/42施設(47.8%)

染色むら

1/42施設(2.2%)

共染の有無

4/42施設(8.7%)

膠原線維の染色性

26/42施設(56.5%)

コントラスト

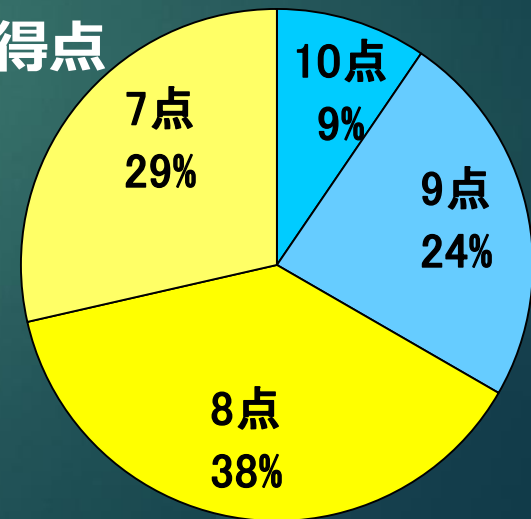
25/42施設(54.3%)

【膠原線維染色標本評価まとめ】

総合 評価	総施設数 【42施設】	Azan染色 【17施設】	Masson-T染色 【25施設】
A 評価	14 (33.3%)	6 (35.3%)	8 (32.0%)
B 評価	28 (66.7%)	11 (64.7%)	17 (68.0%)
C 評価	0 (0.0%)	0	0
D 評価	0 (0.0%)	0	0

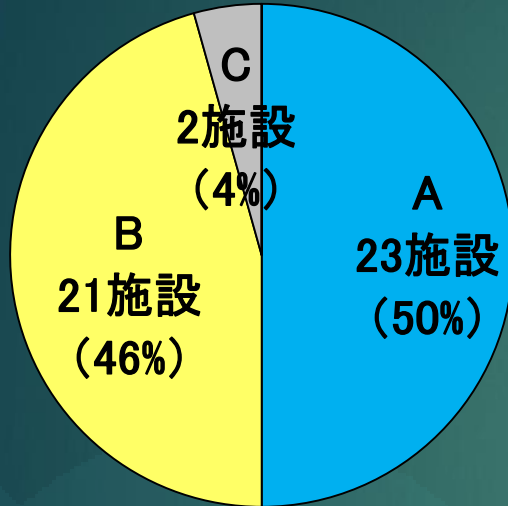
今年度の膠原線維染色
標本評価では、全ての施設で染色上の目的を達成しており良好といえる結果であった。

総合得点

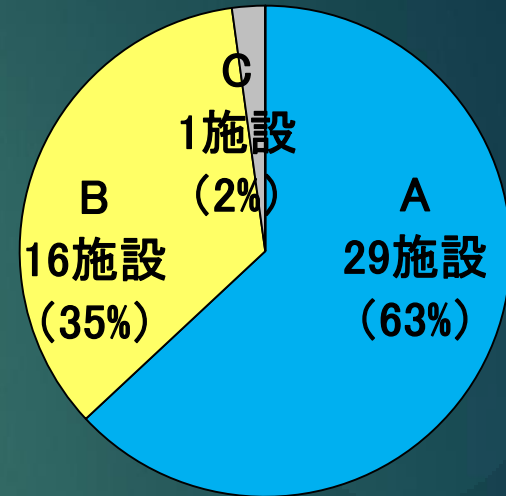


【染色標本評価】

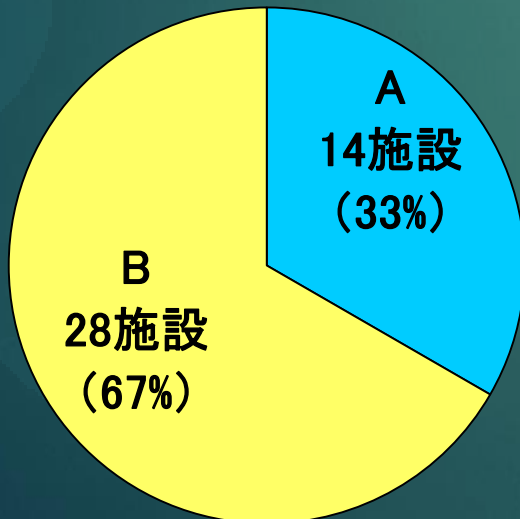
HE染色:ゴミの混入あり



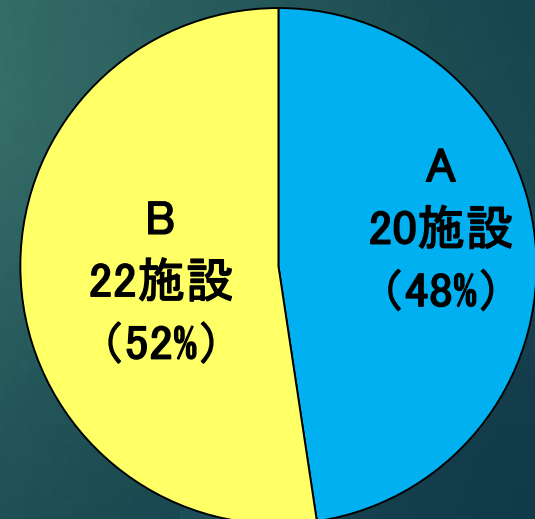
HE染色:ゴミの混入なし



膠原線維染色:ゴミの混入あり

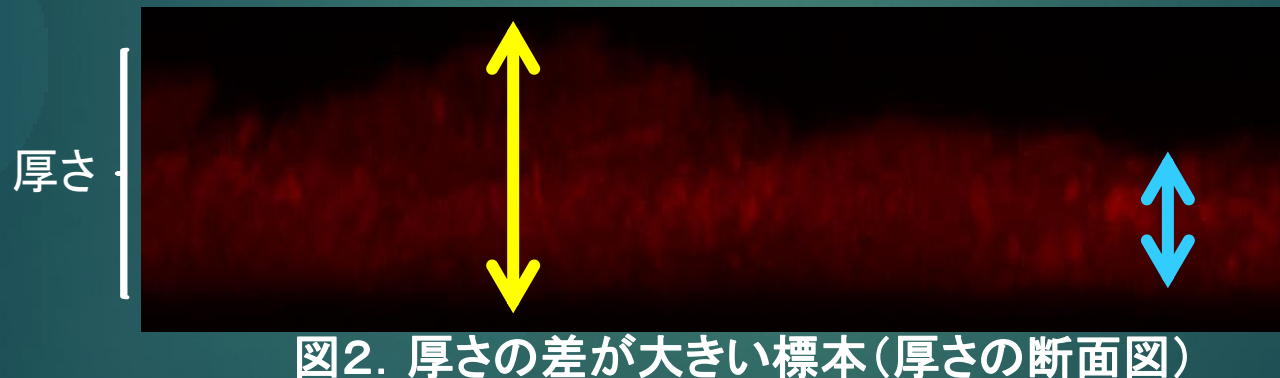
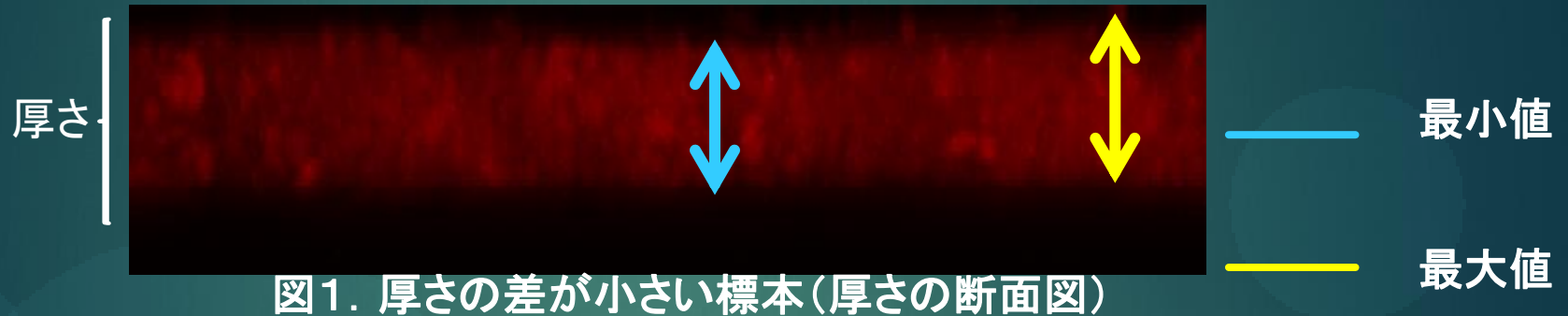


膠原線維染色:ゴミの混入なし



【切片厚測定】

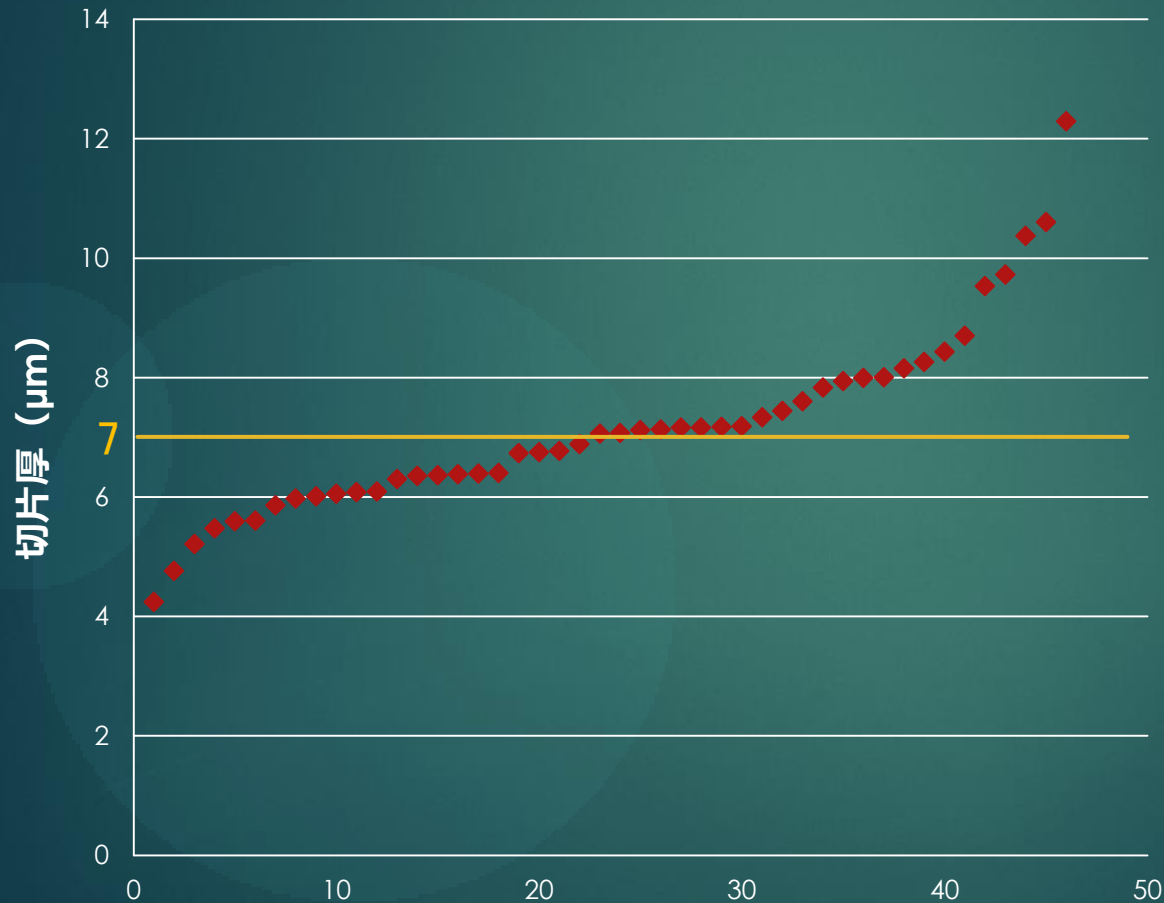
共焦点レーザー顕微鏡を用いて、切片中的一部分における切片の厚さの最小値と最大値を測定した。



今回は最小値が設定した $7\mu\text{m}$ に近い値になると想定されたため、最小値の測定結果について述べる。

【切片厚測定】

7 μm を設定値として薄切した切片厚



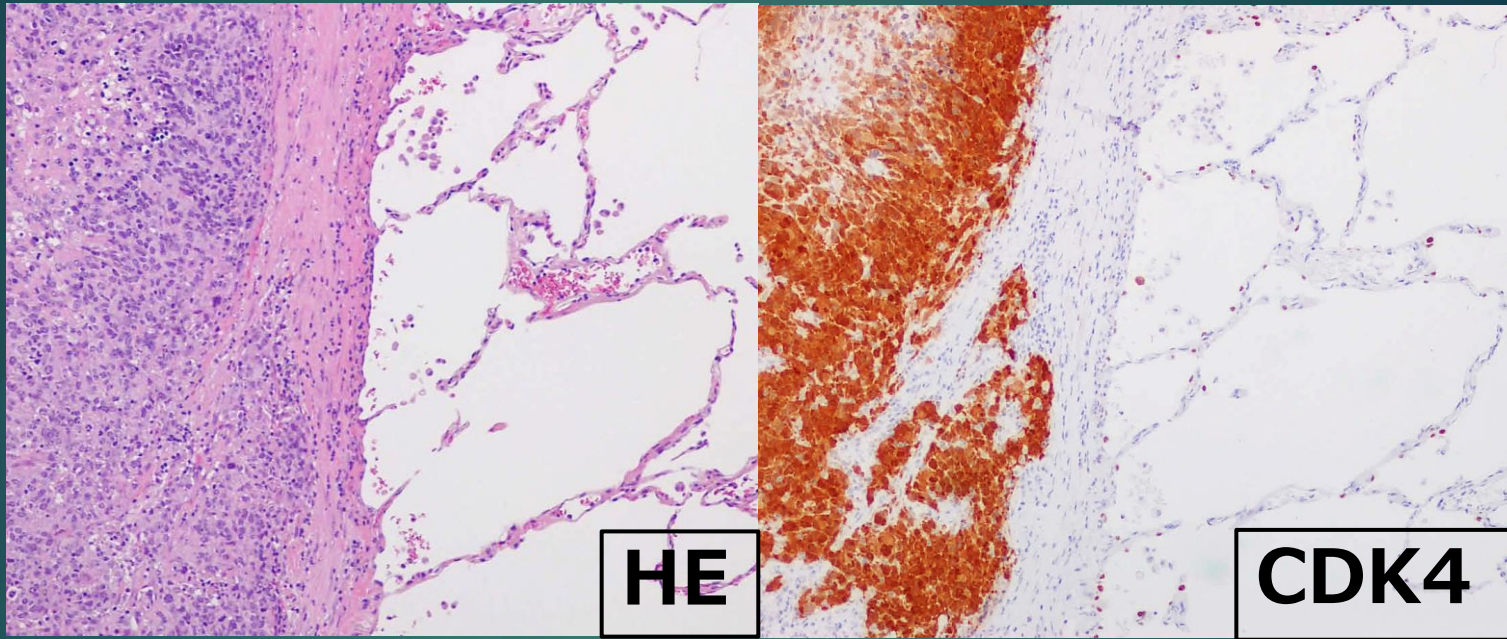
最小値	4.24 μm
最大値	12.29 μm
平均値	7.16 μm
中央値	7.07 μm
標準偏差	1.53

フォトサーベイ

問題5

お詫び

写真は、肺腫瘍を指摘され摘出した手術材料のHEおよび免疫組織化学(CDK4)標本の写真である。同時にCTにおいて後腹膜腫瘍も疑われている。摘出された肺腫瘍およびその標本に関して、最も適切と考えられるものはどれですか。

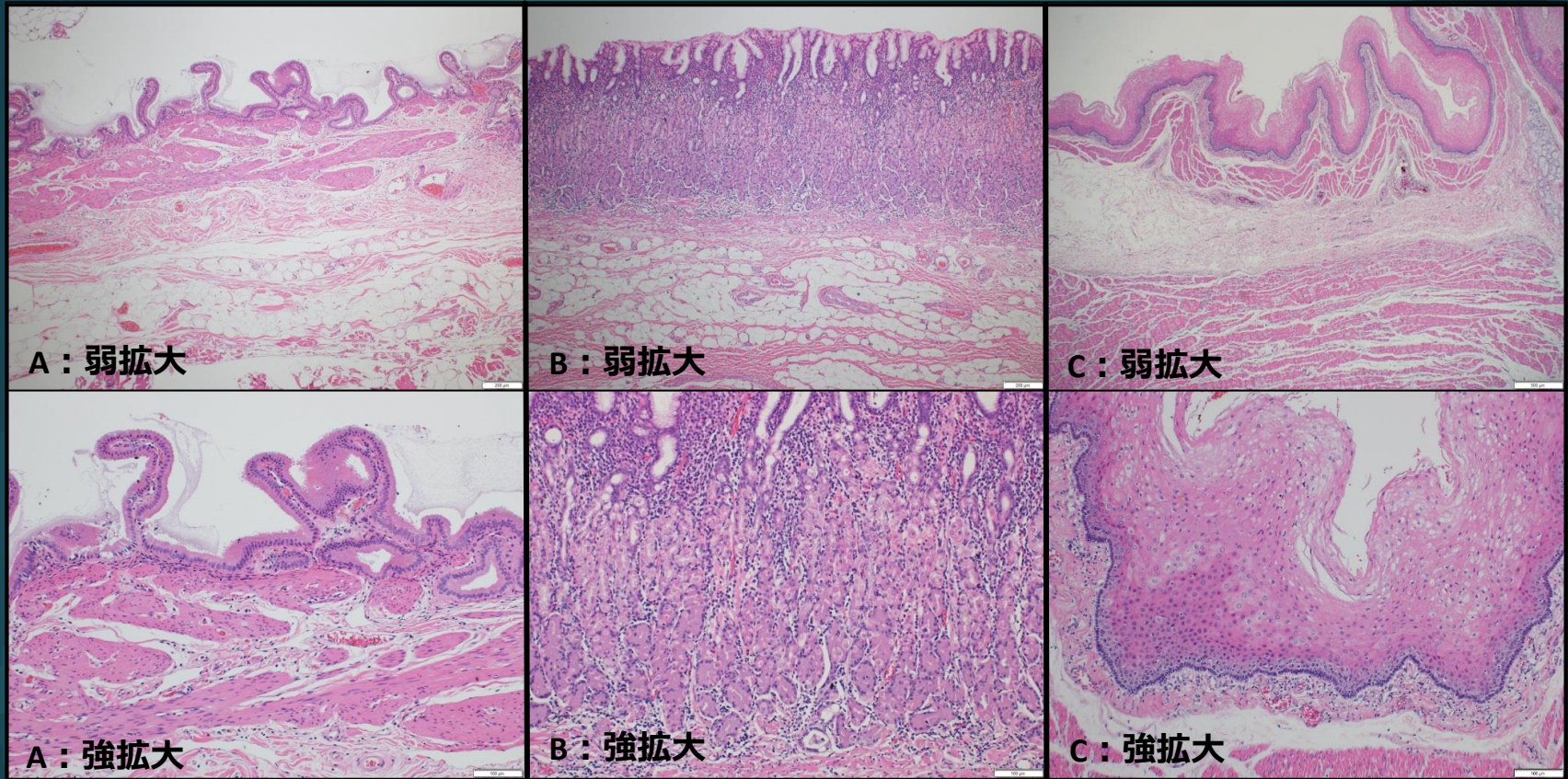


- ①免疫組織化学は正しく染色されており、横紋筋肉腫を最も疑う。
- ②免疫組織化学は正しく染色されており、脂肪腫を最も疑う。
- ③免疫組織化学は正しく染色されており、軟骨肉腫を最も疑う。
- ④免疫組織化学は正しく染色されており、脂肪肉腫を最も疑う。
- ⑤免疫組織化学は染色不良が疑われ、再度の染色が必要である。

➡ 評価対象外

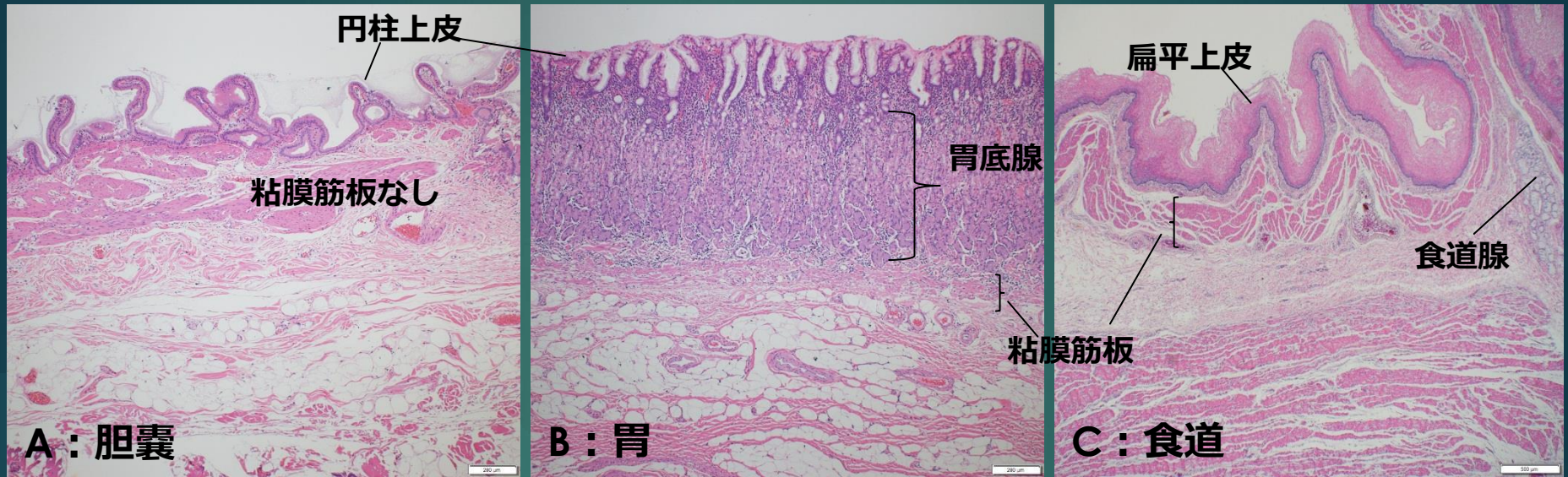
問題1

HE染色の組織像です. A～Cにおいて, 臓器の正しい組み合わせはどれですか.



- ①A-胆嚢,B-小腸,C-食道
- ②A-胆嚢,B-胃,C-食道
- ③A-胆嚢B-小腸,C-舌
- ④A-小腸,B-胃,C-食道
- ⑤A-小腸,B-胃,C-舌

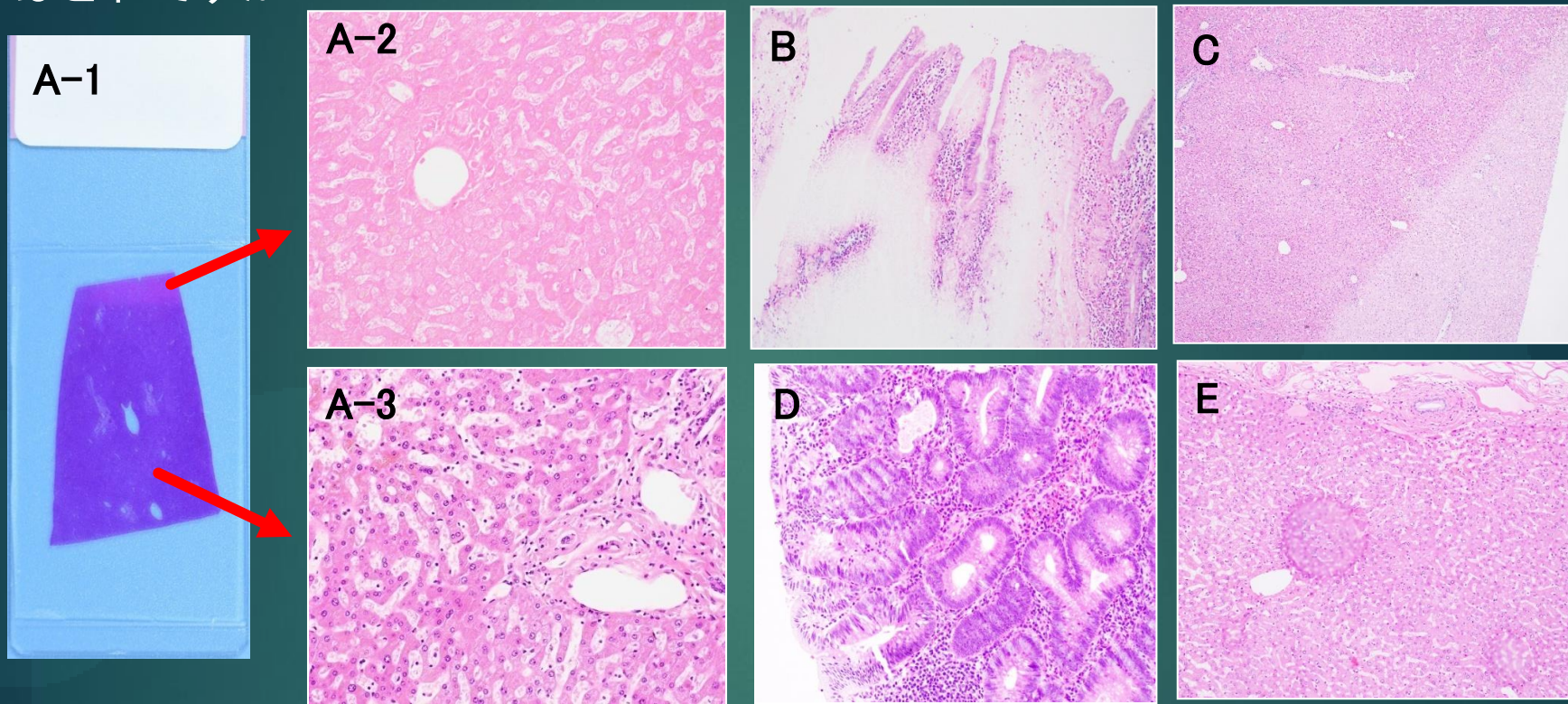
解答：②A-胆嚢,B-胃,C-食道



- ・Aは胆嚢である。粘膜上皮, 粘膜固有層, 筋層, 漿膜から構成される。粘膜上皮は単層円柱上皮で, 粘膜筋板はない。
- ・Bは胃である。粘膜上皮, 粘膜固有層, 粘膜筋板, 粘膜下組織, 固有筋層, 漿膜から構成される。粘膜上皮は単層円柱上皮で, 胃底腺を認める。
- ・Cは食道である。粘膜上皮, 粘膜固有層, 粘膜筋板, 粘膜下組織, 固有筋層, 外膜から構成される。粘膜上皮は重層扁平上皮で, 食道腺を認める。
- ・小腸では粘膜が突出した絨毛構造をとり, 粘膜筋板を有する。
- ・舌では食道と異なり粘膜筋板を認めない。

問題2

次のHE染色A～E画像より、アーチファクトの原因として考えられる組み合わせはどれですか。



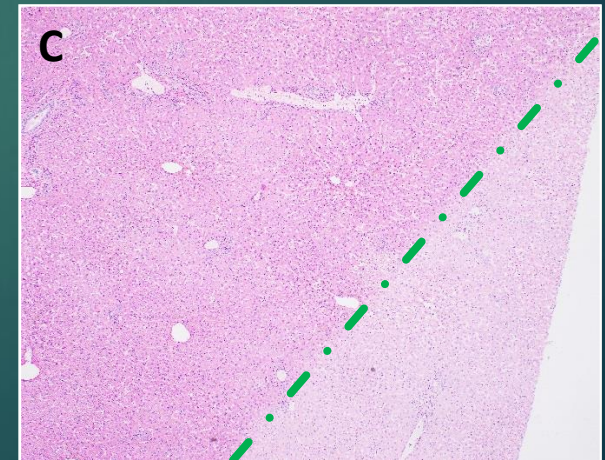
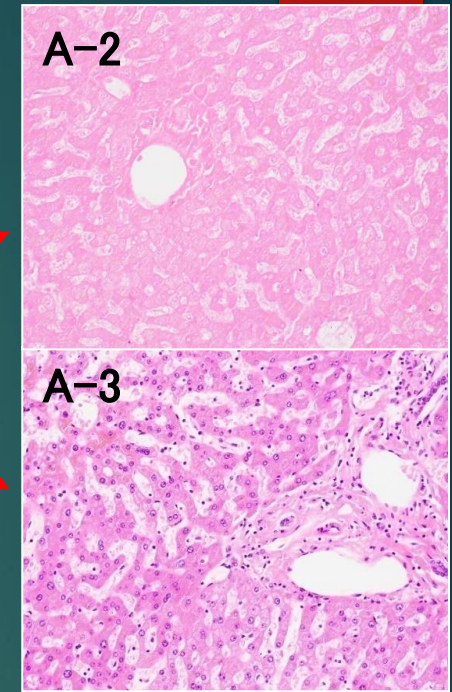
- ①A薄切ムラ-B脱パラ不良-Cヘマトキシリン液量不足-Dチャタリング-E気泡
- ②Aヘマトキシリン液量不足-B脱パラ不良-C薄切ムラ-Dチャタリング-E気泡
- ③Aチャタリング-B薄切ムラ-C脱パラ不良-D気泡-Eヘマトキシリン液量不足
- ④Aヘマトキシリン液量不足-B薄切ムラ-C脱パラ不良-Dチャタリング-E気泡
- ⑤A薄切ムラ-Bチャタリング-Cヘマトキシリン液量不足-D気泡-E脱パラ不良

解答②：Aヘマトキシリン液量不足-B脱パラ不良-C薄切ムラ-Dチャタリング-E気泡

A画像においては、A-1:HE標本マクロ画像にてフロスト付近に色むらを認める。拡大ミクロ画像にて、A-2は核と細胞質が共にエオジンにて桃色に染色されている。A-3は核はヘマトキシリンに染色され青紫を呈し、細胞質はエオジンにて桃色に染色されている。これよりヘマトキシリンの液量不足が考えられる。

B画像においては、矢印で示した部分は、大きく白ぬけした染色となっており、組織片は存在するが、染色されていないことが分かる。色素がどれも染まっていないことから、脱パラ不良による染色ムラが考えられる。

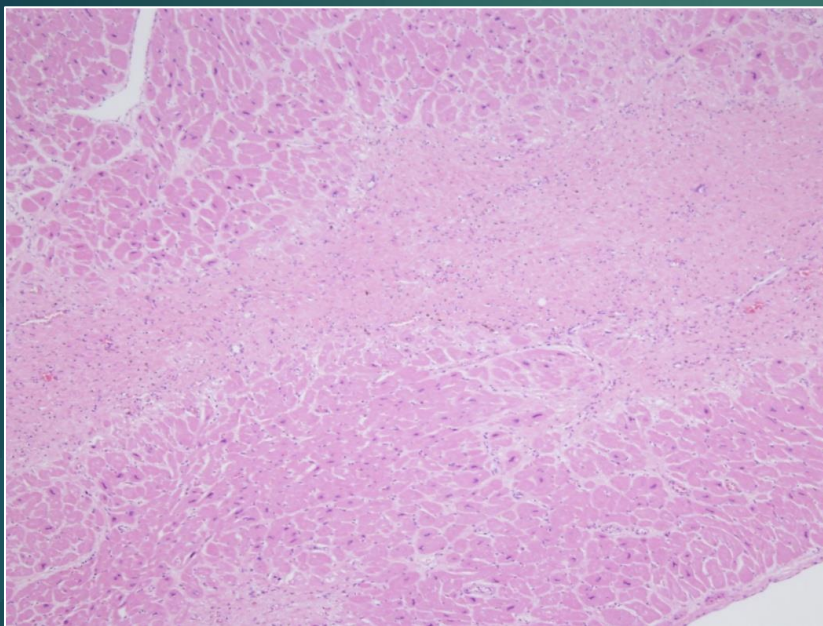
C画像においては、右の画像に示す点線を境に切片の厚さが異なるのが分かる。また、両領域とも核・細胞質の染色が実施されているため液量不足による染色ムラは除外できる。



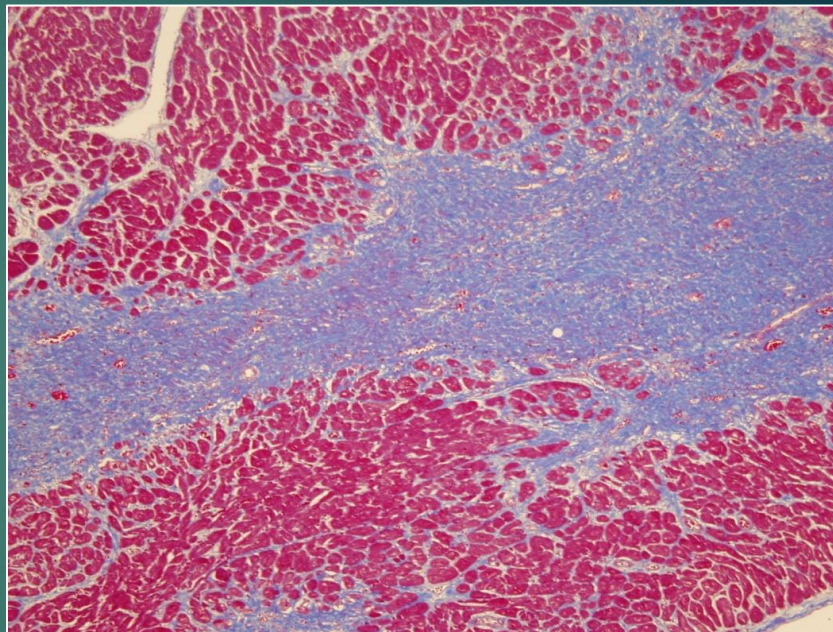
問題3

写真Aは心臓の組織像で、急性心筋梗塞のHE像(写真A)とその特殊染色像(写真B)を示しています。この特殊染色名とその染色態度の組み合わせが正しいのはどれか。

写真A

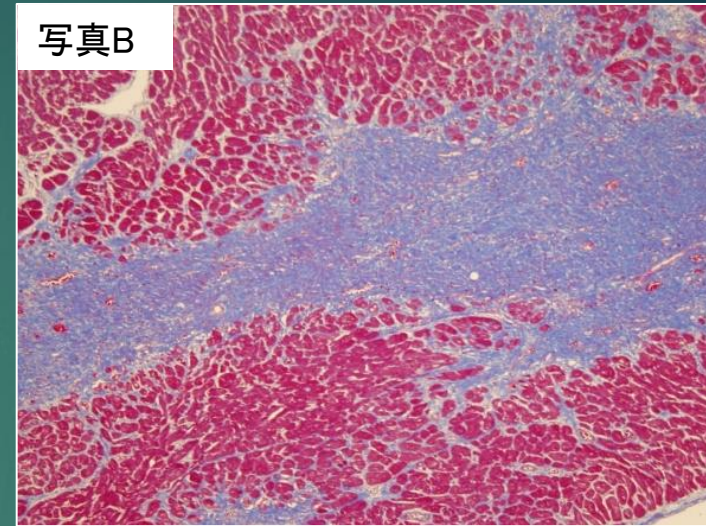
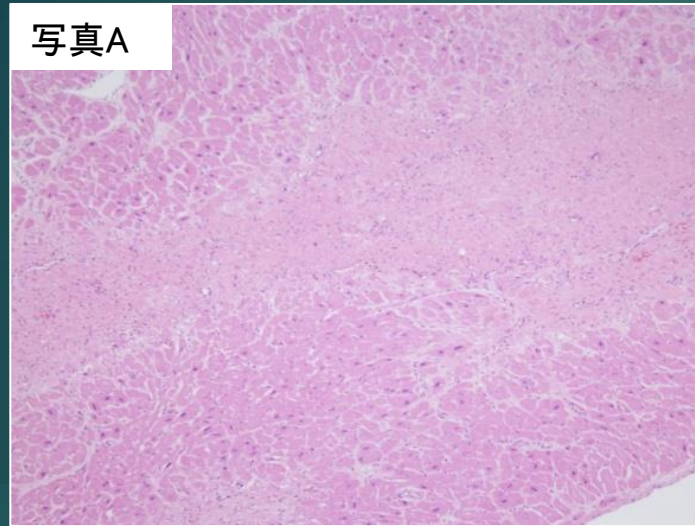


写真B



- ① AZAN染色 — 膠原線維: 赤色、細胞質: 青色
- ② AZAN染色 — 膠原線維: 青色、細胞質: 赤色
- ③ AZAN染色 — 膠原線維: 赤色、細胞質: 橙黄色
- ④ EVG染色 — 膠原線維: 黄色、細胞質: 赤色
- ⑤ EVG染色 — 膠原線維: 赤色、細胞質: 黄色

解答: ② AZAN染色 — 膠原線維: 青色, 細胞質: 赤色



写真Bの特殊染色は膠原線維染色であるAZAN染色で, アニリン青で膠原線維や細網線維を青色, アゾカルミンGで細胞質や核を赤色に染める. 同じ膠原線維染色であるMasson trichrome染色でも核が黒紫色に染まる以外はほぼ同様の色調を示す.

EVG染色は弾性線維染色で, レゾルシンフクシン液で弾性線維を黒紫色, ワンギーソン液で膠原線維を赤色, 細胞質を黄色に染める.

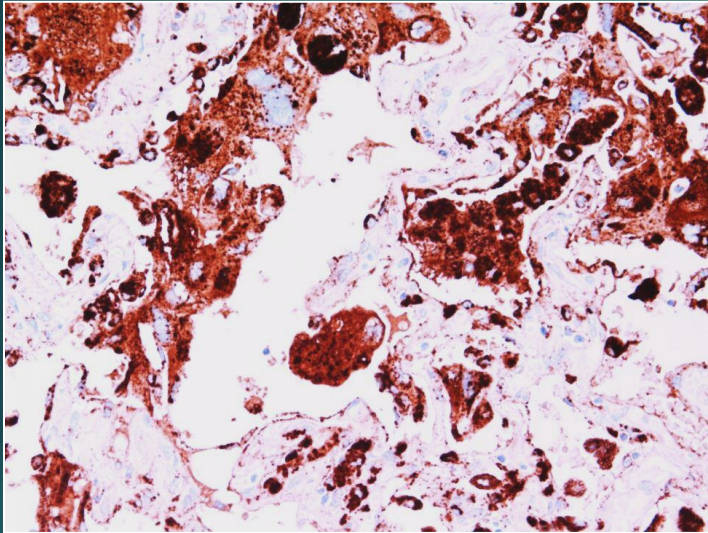
	膠原線維染色		弾性線維染色
	AZAN	Masson trichrome	EVG
膠原線維	青	青	赤色
弾性線維	青～赤	青～赤	黒紫
細網線維	青	青	黄色
核	赤	黒紫～赤紫	黒褐
細胞質	赤	淡赤～紫赤	黄色
赤血球	オレンジ～赤	橙黄～橙赤	黄色

問題4

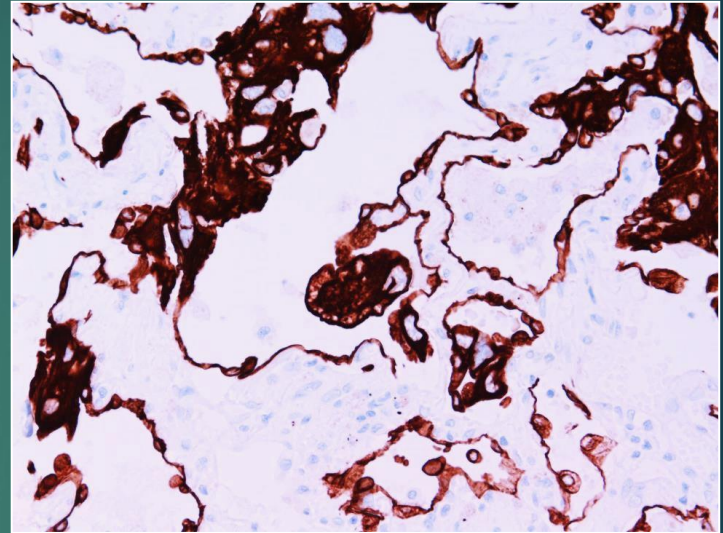
IHC法による染色像です. 肺の腺癌におけるTTF-1抗体の陽性像として適切なものはどれか.

材料: 肺の手術例 FFPE組織 倍率40倍 染色 (Napsin A ・ CEA ・ TTF-1 ・ CAM5.2)

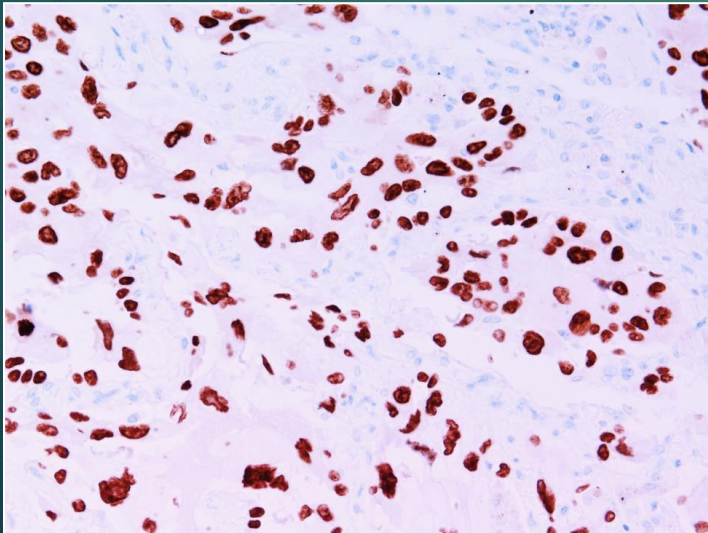
①



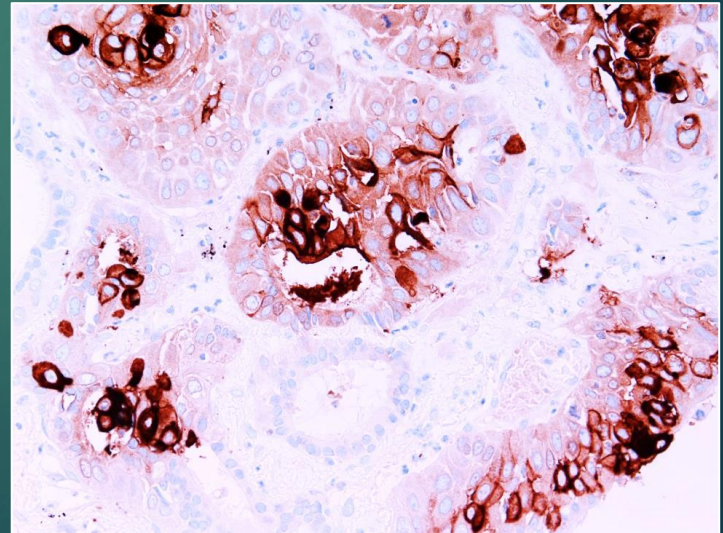
②



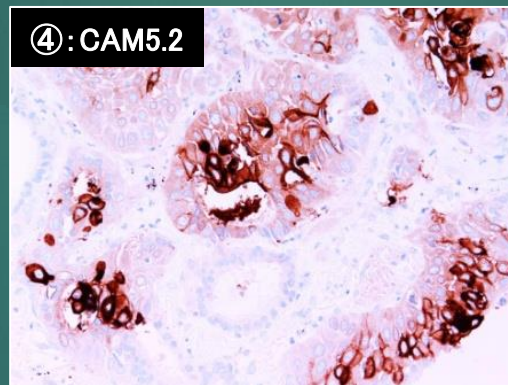
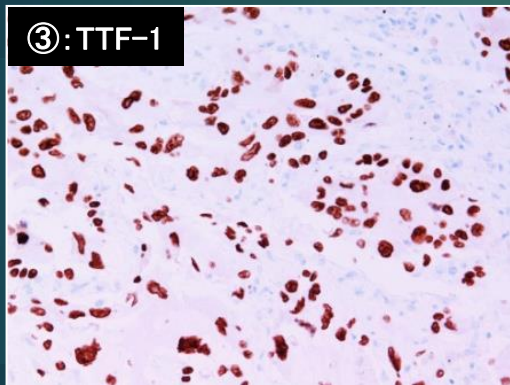
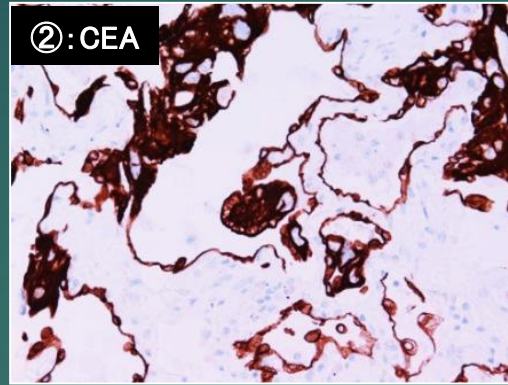
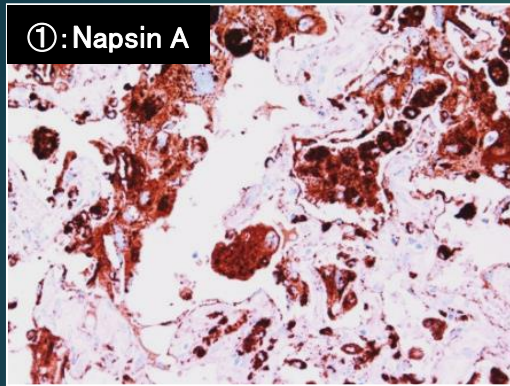
③



④



解答 : ③



TTF-1は上皮細胞の核に出現する核転写因子で、核に陽性像を示す。

その他のNapsin Aは細胞質が顆粒状に、CEAは細胞膜、CAM5.2は細胞質に陽性像を示す。

目的とした抗原の局在以外に陽性像が見られる場合、正しく染色が行われていない事が考えられるので、鏡検の際は抗原の局在部位(細胞膜・細胞質・核)を把握しておくことが重要である。

(各種抗体の抗原局在の例)

・細胞膜

細胞特異蛋白: CD
レセプター: HER2 ,
EGFR
分泌蛋白: CEA

・細胞質

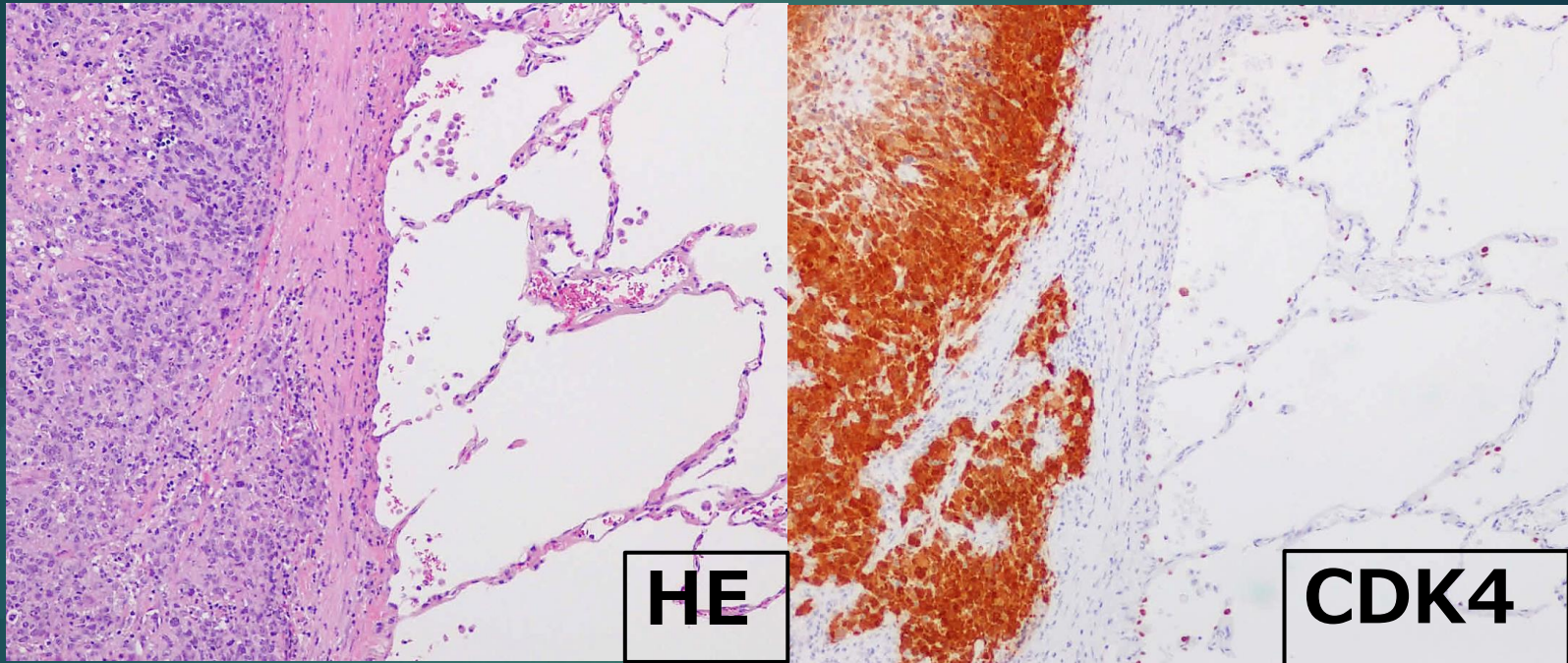
分泌蛋白: AFP , hCG , ホルモン (LH , TSH)
ウイルス: CMV
中間系フィラメント: CK (上皮) 、 GFAP (グリア細胞)

・核

増殖能マーカー: MIB-1
レセプター: ER , PgR
転写因子: TTF-1
がん抑制遺伝子: p53

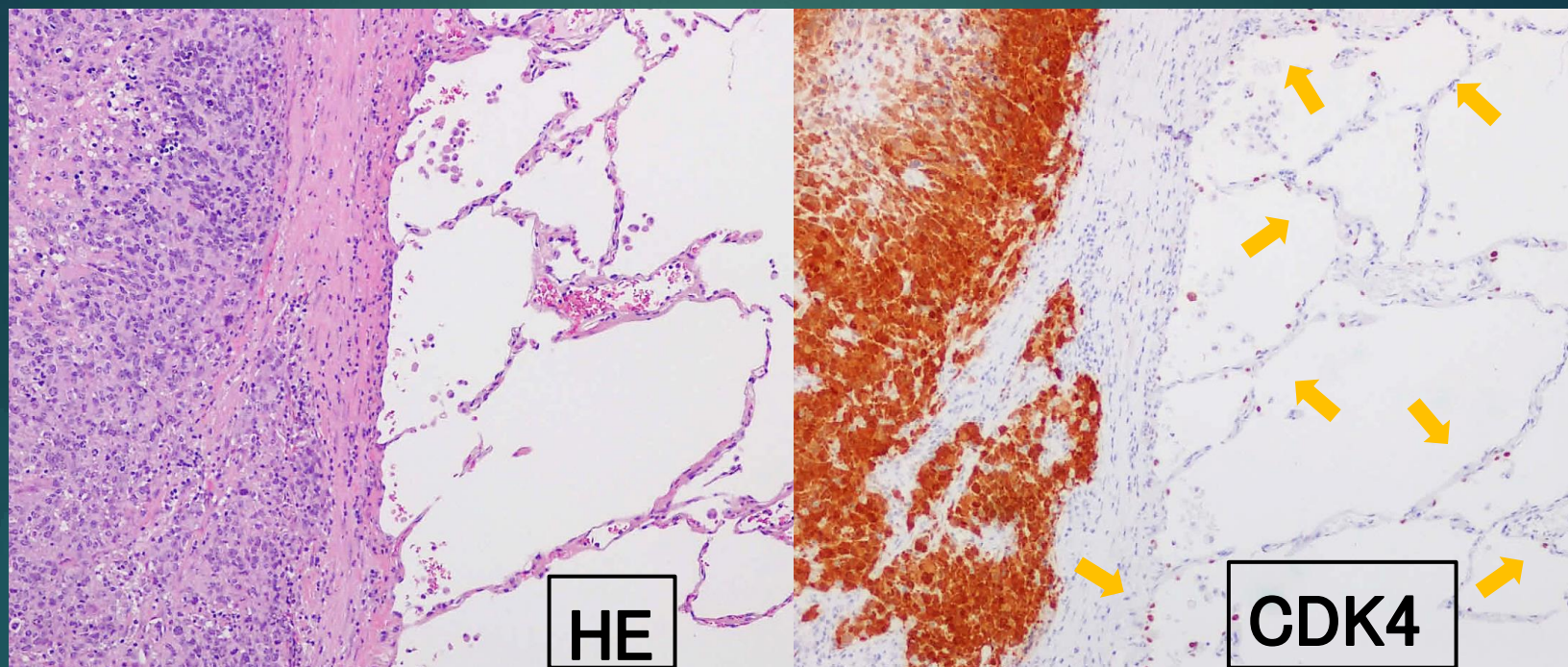
問題5

写真は、肺腫瘍を指摘され摘出した手術材料のHEおよび免疫組織化学(CDK4)標本の写真である。同時にCTにおいて後腹膜腫瘍も疑われている。摘出された肺腫瘍およびその標本に関して、最も適切と考えられるものはどれですか。



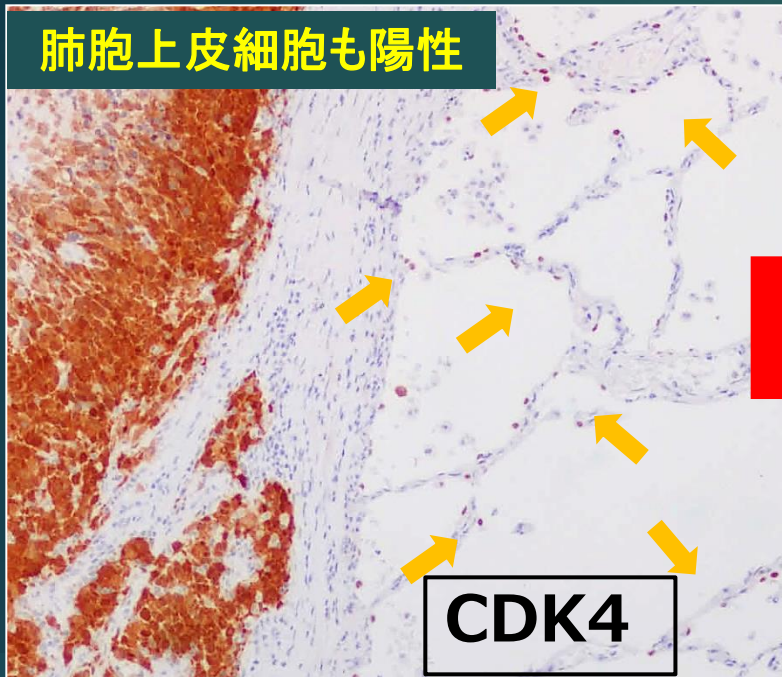
- ①免疫組織化学は正しく染色されており、横紋筋肉腫を最も疑う。
- ②免疫組織化学は正しく染色されており、脂肪腫を最も疑う。
- ③免疫組織化学は正しく染色されており、軟骨肉腫を最も疑う。
- ④免疫組織化学は正しく染色されており、脂肪肉腫を最も疑う。
- ⑤免疫組織化学は染色不良が疑われ、再度の染色が必要である。

解答:⑤免疫組織化学は染色不良が疑われ, 再度の染色が必要である.

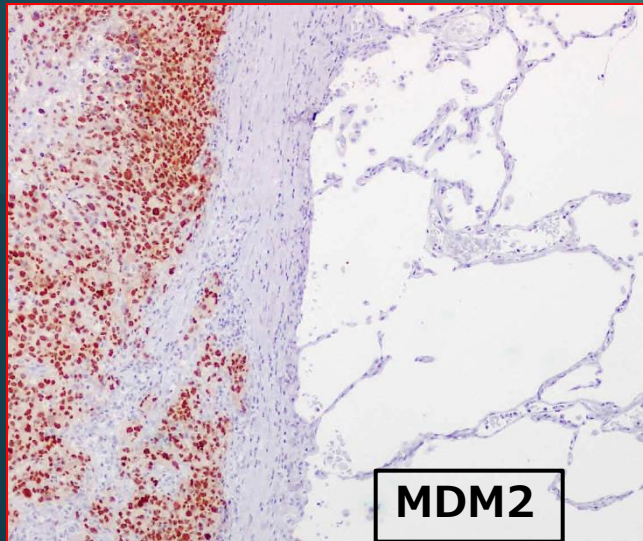
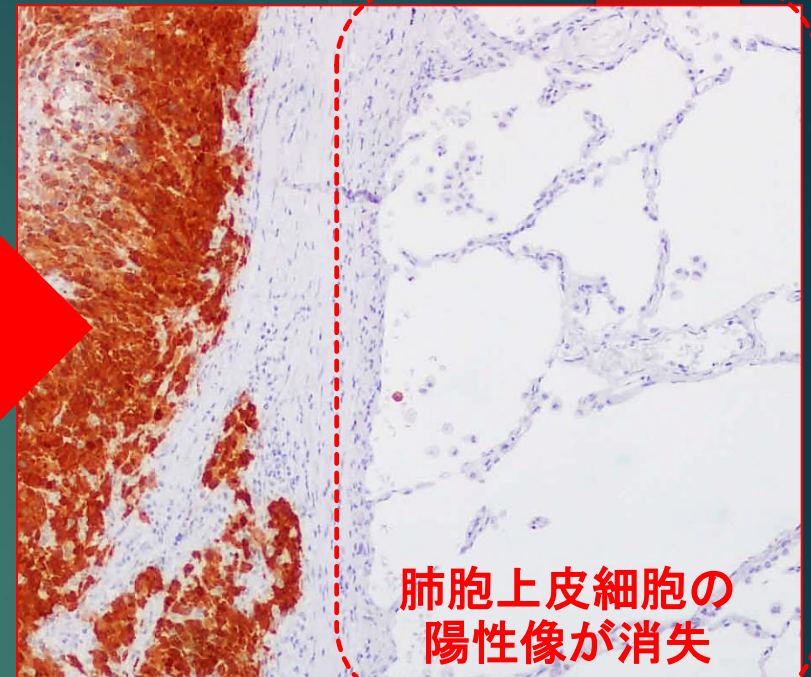


CDK4抗体を用いた免疫組織化学は高分化および脱分化型脂肪肉腫で90%以上の高い陽性率を示し, マーカーとして使用されている. 本症例においてはCTで後腹膜腫瘍も疑われていることと併せて脂肪肉腫の肺転移を最も疑う. しかし腫瘍背景の正常肺胞上皮細胞にも陽性像が見られ, CDK4蛋白は通常これらの細胞に陽性を示さないことから, 写真の免疫組織化学は染色不良を考えなければならない.

肺胞上皮細胞も陽性



再染色



一次抗体を新調し再度染色を実施したところ、肺胞上皮細胞の陽性像は消失し正しい染色像となった。他の一次抗体が混入していた事等が推測される。

また、CDK4の他にMDM2抗体も脂肪肉腫のマーカーとして有用であることが報告されており、主に良性脂肪腫瘍やその他腫瘍との鑑別に用いられている。

※粘液型脂肪肉腫は上記2つのマーカーで陽性は示さない。

また、実際の鑑別・診断はその他の抗体も併せて行う。

【フォトサーベイ評価まとめ】

	正解施設数(正解率)
問題1	43/46施設(93.5%)
問題2	46/46施設(100%)
問題3	46/46施設(100%)
問題4	46/46施設(100%)
問題5 (評価対象外)	12/46施設(26.1%)

評価対象外となった問題5を除き, 90%以上の正解率となり良好な結果であった.

アンケート

【HE染色アンケート結果】

＜①染色方法＞

	件数
自動染色装置	26
用手法	19
未回答	1

＜②ヘマトキシリン液＞

	件数
自家製	12
市販品	33
未回答	1

＜③ヘマトキシリン染色前の蒸留水使用の有無＞

	件数
有り	27
無し	18
未回答	1

＜④分別液の種類(使っている施設のみ)＞

	件数
0.5%アルコール	2
1%塩酸アルコール	6
0.5%塩酸水	4
1%塩酸水	2
その他	4

＜⑤エオジン液＞

	件数
自家製	16
市販品	29
未回答	1

＜⑥酸性添加剤(酢酸など)の有無＞

	件数
有り	25
無し	19
未回答	2

【 膠原線維染色アンケート結果 】

＜①切片の厚さ＞

	件数
2 μ m	9
3 μ m	22
4 μ m	7
その他	3
未回答	5

＜②実施頻度＞

	件数
精度管理のみ	2
年に1回	1
6ヶ月に1回	5
2～3ヶ月に1回	5
月に1～2回程度	11
週に1回程度	8
週に2～3回程度	6
毎日	2
その他	1
未回答	5

＜③膠原線維の染色液＞

	件数
自家製	21
市販品	20
未回答	5

＜④核の染色液(Masson-T染色のみ)＞

	件数
自家製	9
市販品	14
未回答	1

＜⑤細胞質の染色液＞

	件数
自家製	19
市販品	17
未回答	10

＜⑥媒染剤の使用＞

	件数
自家製	19
市販品	17
不使用	3
未回答	7

<染色操作のポイントや工夫>

1. HE染色

- ・エオジンのpH管理をしている。ヘマトキシリンは2週間で交換している。
- ・染色液を交換した際は、コントロール切片にて染色性を確認している。
- ・温水にて3分間色だし。

2. 膠原線維染色

- ・アゾカルミンGの染色具合によって、アニリンアルコールでの分別・酢酸アルコールでの分別停止の工程を調整している。
- ・媒染後、オレンジG液で染色してからアゾカルミンG、アニリン青・オレンジG液と染色を進めている(赤血球が鮮やかなオレンジに染まり、コントラストがはっきりするため)。
- ・アニリン青の分別は素早く行う。

<今後精度管理で行ってほしい特殊染色>

- Elastica van Gieson染色
- Giemsa染色

<今後、学会や研修会等で取り上げてほしいテーマや内容>

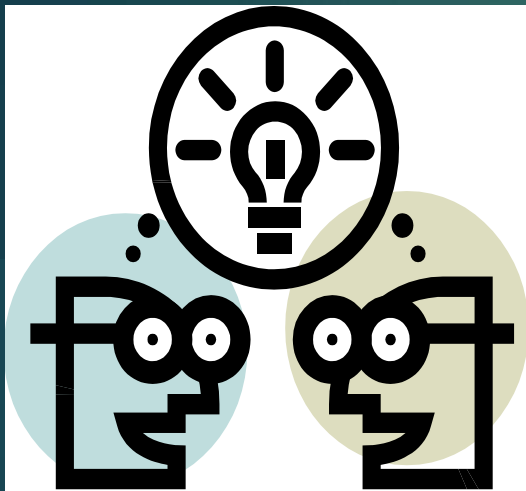
- 中性緩衝ホルマリンを用いた推奨される固定条件について
- 新人技師を対象に、切り出し補助の時に関係する摘出臓器や小物検体の処理方法，癌取り扱い規約について
- 次世代シーケンサー(NGS)

【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概ね良好な結果であった。現在、病理組織標本の作製方法は多岐に渡っており、施設間の染色態度は様々である。標本作製の標準化について検討されている中、まずは今後も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。

加えて、免疫組織化学染色が診断に欠かせない存在になっているが、染色した標本が不適切な場合もあり、標本が適切であるかの確認が必要である。

【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。