

# 病理学的検査

## 【はじめに】

今年度の病理の精度管理は、膵臓および神経内分泌腫瘍を用い、HE 染色に加え、特殊染色は Grimelius 染色、免疫組織化学染色は Chromogranin A の染色性の確認を行なった。選択の理由としては、両染色とも神経内分泌系腫瘍の診断には欠く事ができない染色である。特に Grimelius 染色は、染色条件が一定でなく染色結果が不安定であり、昨年度のアンケート調査でも調査の要望があったため行なった。

## 【材料および実施方法】

標本は正常の膵臓および直腸 Carcinoid の手術材料 10% ホルマリン、24 時間固定を用いた。型の通りパラフィンブロックを作製後、 $3 \mu\text{m}$  前後で薄切した未染色標本を 6 枚ずつ、参加申し込み施設 46 施設に染色方法のアンケートと共に標本を回収した。(HE 染色は必須、Grimelius 染色および免疫染色は可能な施設)

## 【評価のポイント】

HE 染色：核、細胞質の染色性、色のバランス、共染、色むらなどを総合評価する。

Grimelius 染色：膵臓のラ氏島および内分泌腫瘍細胞の染色性および共染、色むらなど。

免疫染色：DAB の発色の強度、染色の分布（局在）、非特異的な共染の程度など。

## 【結果】

### 1. 標本の回収率および参加施設数の年次推移

本年度の HE 染色の回収率は、登録衛生検査所が 11 施設中 9 施設 (81.8%)、一般病院等は 35 施設中 35 施設 (100%)、合計では 46 施設中 44 施設 (95.7%) であった。

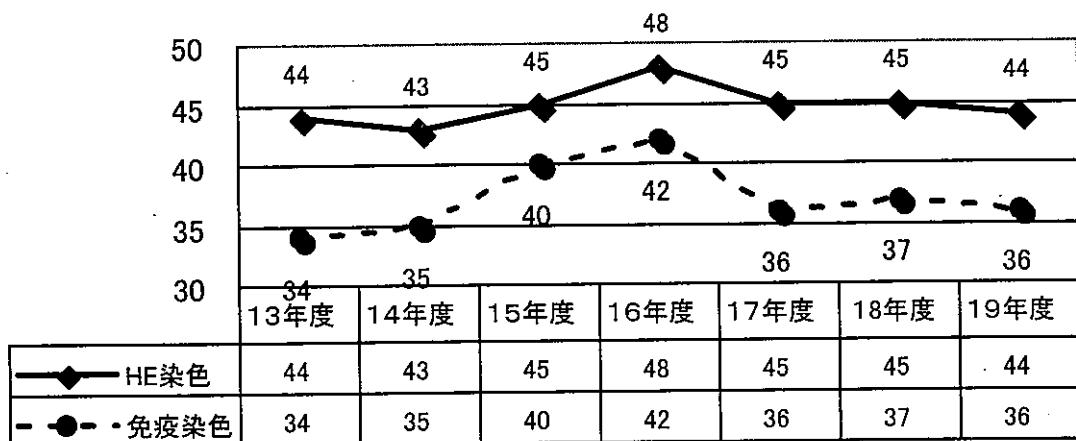
Grimelius 染色の回収率は、登録衛生検査所が 11 施設中 6 施設 (54.5%)、一般病院等は 35 施設中 32 施設 (91.4%)、合計では、46 施設中 38 施設 (82.6%) であった。

免疫染色の回収率は、登録衛生検査所が 11 施設中 4 施設 (36.4%)、一般病院等は 35 施設中 32 施設 (91.4%)、合計では、46 施設中 36 施設 (78.3%) とすべての染色で昨年度を下回った。

	登録衛生検査所		一般病院等		全体	
	昨年度	本年度	昨年度	本年度	昨年度	本年度
HE 染色	9/9 (100%)	9/11 (81.8%)	36/36 (100%)	35/35 (100%)	45/45 (100%)	44/46 (95.7%)
Grimelius 染色	9/9 (100%)	6/11 (54.5%)	36/36 (100%)	32/35 (91.4%)	45/45 (100%)	38/46 (82.6%)
昨年度は PAS 染色	5/9 (55.6%)	4/11 (36.4%)	32/36 (88.9%)	32/35 (91.4%)	37/45 (82.2%)	36/46 (78.3%)
免疫染色						

## 参加施設数の年次推移

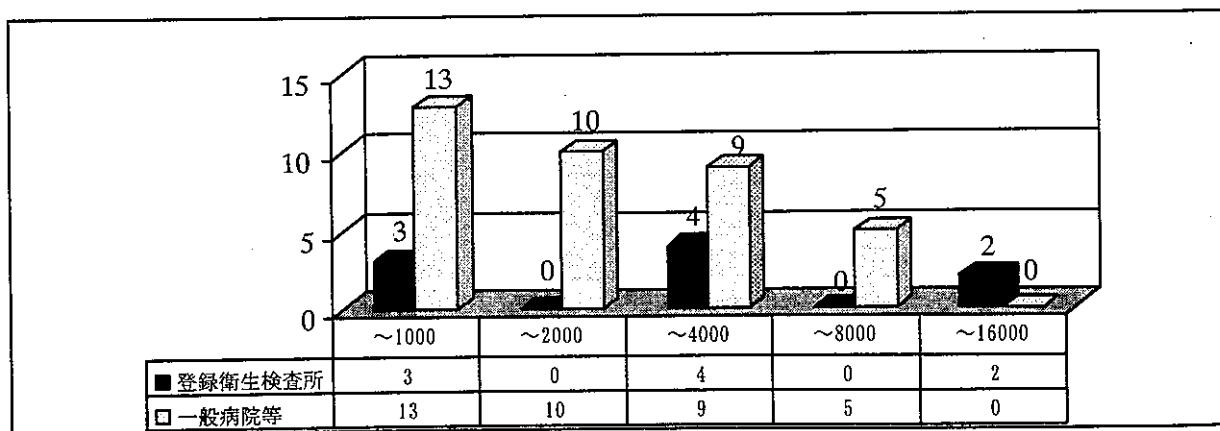
過去 2 年間と比べ、参加施設数に大きな増減はなく横ばい状態である。



## 2. HE 染色

### ①染色枚数

一ヶ月における染色枚数は 100? 15000 枚と施設間の差が大きかった。特に登録衛生検査所と一般病院等での差が大きく登録衛生検査所では月平均 5122 枚に対して、一般病院等の月平均は 2126 枚と約 2.4 倍の開きがあった。





### ③エオジン染色

エオジン染色液においては、自家調整で作製している施設が 27 施設 (58.7%) 昨年度より若干減少していた。染色時間は 1? 3 分と短時間で行なっている施設が多かった (平均 2.2 分)

エオジン染色液まとめ					
製法	メーカー	数	計	染色時間	数
自家製	メルク	16	27 (58.7%)	<1分	7
	クロマ	5		1分	10
	和光	5		<2分	3
	小宗化学	1		2分	10
				<3分	3
市販品	武藤化学	12	19 (41.3%)	3分	4
	サクラ	6		3分<	9
	メルク	1			

エオジンの種類		色素の添加	
アルコール性	27(58.7%)	なし	41(89.1%)
水溶性	19(41.3%)	フロキシン	4(8.7%)
		エリスロシン	1(2.2%)

### ④自動染色機

自動染色機の保有は 23 施設 (50%) の施設が保有していた。その使用は 16 施設 (36%) で機種では DRS シリーズ (サクラ) が多かった。

メーカー	型番	数	計	比率
サクラ	DRS2000	7	23	50%
	DRS601	5		
	DRSprisma	5		
白井松	TSC-120W	4		
LEICA	ST5020	1		
シャンドン	バリステインジェミニ	1		
未保有		23		50%

### ⑤総合判定

検査技師（T）4名、病理医（D）2名により、それぞれ5段階（1?5）で評価を行い、合計を計算し20以上をA評価、10以上をB評価、9以下をC評価とした。その結果、A評価は32施設（69.6%）、B評価は13施設（28.3%）、C評価は1施設（2.1%）であった。

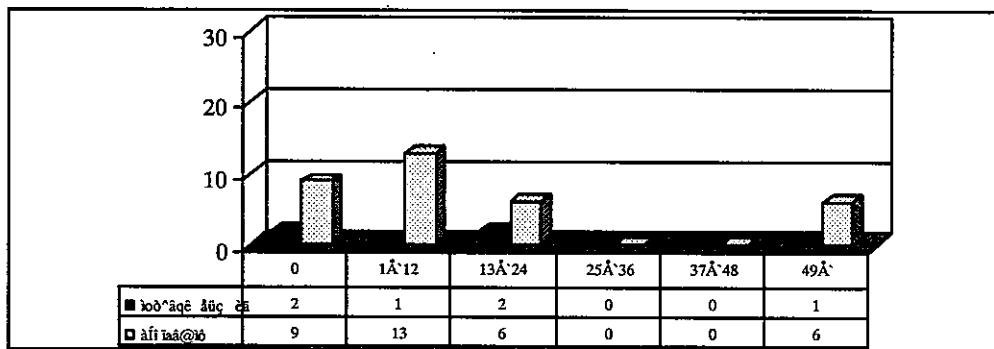
#### ⑥考察等

病理診断において最も重要な染色であるHE染色において、昨年度と同様にA、B評価で占めた結果は大変、優秀と思われる。また、A評価は一昨年が22施設（51%）、昨年度が29施設（64.4%）、本年度は32施設（69.6%）と年々増えていて良い傾向である。しかし、本年度もC評価が1施設認められた。C評価は染色に改善が求められる状態であり、この結果を参考に染色の見直しや改善を行なわされる事を切望する。

### 3. Grimelius染色

#### ①染色枚数

年平均染色枚数は登録衛生検査所の平均は20枚で、一般病院等の平均枚数は18枚とほぼ同等であった（全体平均18.1枚）。全く染色を行なっていない施設は11施設（27.5%）であった。



#### ②銀液

銀液の濃度は、pHの違いはあるものの0.03%の施設がほとんどであった38施設（95%）。反応温度・時間に関しては、37°Cの長時間が24施設（60%）と56°C以上の短時間が14施設（35%）の2方法に別れた。

濃度	施設数	反応温度・時間				
		37°C一晩	24 (60%)	60°C2時間	1 (2.5%)	不明
0.03% (pH5.6)	19 (47.5%)					
0.03%	16 (40%)					
0.03% (武藤)	3 (7.5%)					
1% (pH5.6)	1 (2.5%)					
0.003%	1 (2.5%)					
		60°C1.5時間	2 (5%)			

### ③還元液

還元液の温度および時間に関しては、ばらけた結果となり特に多かった条件は 37°C 1 分で行なっている方法であった。

反応温度・時間			
室温 1分	1 (2.5%)	45°C 1分	3 (7.5%)
37°C 1分	12 (30%)	45°C 5分	3 (7.5%)
37°C 2分	1 (2.5%)	50°C 1分	5 (12.5%)
40°C 1分	2 (5%)	58°C 1分	1 (2.5%)
40°C 5分	1 (2.5%)	60°C 1分	5 (12.5%)
42°C 2分	1 (2.5%)	不明	4 (10%)
43°C 1分	1 (2.5%)		

### ④今回の染色で銀液に入れた回数

今回の染色で銀液に入れた回数では、3回が最も多かった（平均 2.9 回）

回数	数 (%)	回数	数 (%)
1	3 (7.5%)	4	4 (10%)
2	9 (11.5%)	5	1 (2.5%)
3	22 (55%)	8	1 (2.5%)

### ⑤反応が弱い際の銀液および還元液の新調

銀液と還元液の新調では、15 施設 (37.5%) が共に新調しており、還元液のみ行なっている施設が 12 施設 (30%) で行なっていた。

銀液および還元液の新調	施設
共に行なう	15 (37.5%)
還元液のみ行なう	12 (30%)
行なわない	11 (27.5%)
不明	2 (5%)

### ⑥定着液

定着液の使用は、濃度の差はあるが、チオ硫酸 Na を使用している施設が 23 施設 (57.5%) で、濃度は 2 % が最も多かった。

組成	施設	組成	施設
0.25%チオ硫酸Na	1 (2.5%)	5%チオ硫酸Na	4 (10%)
0.5%チオ硫酸Na	1 (2.5%)	2%ハイポ(武藤)	3 (7.5%)
2%チオ硫酸Na	15 (37.5%)	5%次亜硫酸Na	1 (2.5%)
2.5%チオ硫酸Na	1 (2.5%)	写真用定着液	8 (20%)
3%チオ硫酸Na	1 (2.5%)	なし	5 (12.5%)

#### ⑦固定液による前処理および使用している水の種類

染色前に前処理を行なっている施設は 14 施設 (35%) あった。また、染色に使用している水の種類は、蒸留水を使用している施設が 17 施設 (42.5%) と多かった。

前処理		水の種類	
ブアン固定液	12 (30%)	蒸留水	17 (42.5%)
ピクリン酸	2 (5%)	イオン交換水	12 (30%)
なし	26 (65%)	ミリQ水	8 (20%)
		純水	2 (5%)
		逆浸透水	1 (2.5%)

#### ⑧判定

判定結果は、A評価は 10 施設 (25%) で、B評価は 21 施設 (52.5%)、C評価は 9 施設 (22.5%) であった。

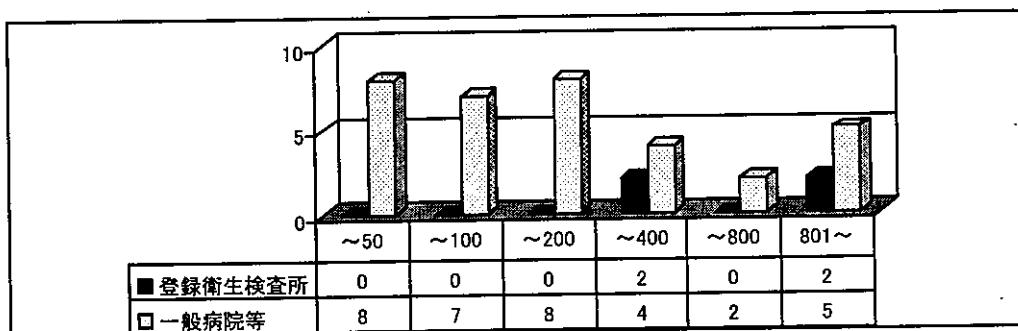
#### ⑨考察等

Grimelius 染色は、手技が煩雑であり、特殊染色の中でも技術やコツを必要とする染色のひとつであるため、今回のように、A評価が少なく、C評価の施設も多数出てしまった。また、染色を難しくしている原因のひとつとして、「染色の依頼は減ってきていますか?」とのアンケートの調査結果では半数の 20 施設で減っているとの回答があった。その理由として最も多かったのが、「ChromograninA や CD56 などの免疫染色で代用でき、良好な染色結果が得られるため」との回答であった。このように、染色を行なう頻度も少なくなってきた事も染色結果を不安定にさせる原因のひとつと考えられる。

#### 4. 免疫染色 : ChromograninA 染色

##### ①染色枚数

全体の月染色枚数は 530 枚で昨年度（462 枚）同様、年々増加傾向にある。50 枚以下の施設が 8 施設と 800 枚以上の施設が 7 施設と施設間の差は大きい。登録衛生検査所の平均は 2056 枚で、一般病院等の平均は 351 枚と登録衛生検査所の方が約 6 倍多かった。（全体平均 530 枚）



##### ②使用抗体（一次抗体 : ChromograninA）

一次抗体は DAKO のポリクローナル抗体を使用した施設は 14 施設（36.8%）と一番多かった。賦活法を行なっている施設は 12 施設（31.6%）と約 1/3 であった。また、一次抗体は、希釈済み抗体を使用する施設が 15 施設（39.4%）であった。

一次抗体と賦活法				
メーカー	クローラン	加熱処理なし	加熱処理あり	計
DAKO	pory	8 (21.1%)	6 (15.8%)	14 (36.8%)
	DAK-A3	3 (7.9%)	4 (10.5%)	7 (18.4%)
ニチレイ	pory	5 (13.2%)	0	5 (13.2%)
Immunoteck	LK2H10	3 (7.9%)	0	3 (7.9%)
VENTANA	LK2H10	2 (5.3%)	0	2 (5.3%)
Thermo	LK2H10	2 (5.3%)	0	2 (5.3%)
BioGenex	LK2H10	1 (2.6%)	0	1 (2.6%)
MBL	LK2H10	1 (2.6%)	0	1 (2.6%)
Lipshaw	LK2H10	1 (2.6%)	0	1 (2.6%)
NOVOCastra	LK2H10	0	1 (2.6%)	1 (2.6%)
	5H7	0	1 (2.6%)	1 (2.6%)
計		26 (68.4%)	12 (31.6%)	38

### ③賦活機器および蛋白消化液

抗原賦活化を行なっている施設は 12 施設であったが、なかでも、pH6.0 のクエン酸緩衝液を用いた加熱処理が多かった。

pH6 CB マイクロウェーブ	4	pH6 CB オートクレーブ	1
pH6 CB ウオーターバス	3	マイクロウェーブ+電気ポット	1
pH6 CB 電気ポット	2	pH9 CB マイクロウェーブ	1

### ④検出試薬および自動染色機の使用

検出試薬はポリマー法 (Envision, シンプルステイン MAX) が 27 施設 (71%) を占めていた。

自動染色機の使用は 14 施設で昨年より 1 施設増えている。その中でも DAKO 社の Autostainer を使用している施設が多かった。

検出試薬一覧		用手法および自動染色機一覧	
方法（品名）	数（%）	方法（機種名）	数（%）
ポリマー法：シンプル MAX	15 (39.5%)	用手法	24 (64.9%)
ポリマー法：Envision	12 (31.6%)	Autostainer(DAKO)	9 (23.7%)
(L)SAB 法	8 (21.1%)	VENTANA	3 (7.9%)
間接法	3 (7.9%)	ST5050(LEICA)	1 (2.6%)
		Optimax(協和メディックス)	1 (2.6%)

### ⑤判定

判定結果は、A 評価は 35 施設 (92.1%), B 評価は 3 施設 (7.9%) であった。

### ⑥考察等

本年度の免疫染色においては、A 評価は 35 施設 (92.1%) と前々回、前回に比べ大変良い成績であった。Chromogranin A においては、膵臓のラ氏島では染色されやすく、安定して良好な染色結果を得る事ができる。しかし、腫瘍によっては染色されにくいことが経験される。今回、用いた腫瘍も比較的染色されにくい症例であったが、ほとんどの施設が良好な染色結果であった。また、C 評価の施設がなかった事もとても優秀であった。本年度同様、今後も精度管理上、安定した染色結果を常に心掛けて、患者に良い医療を提供できるよう神奈川県の病理技術のレベルアップに務めていきたいと思う。

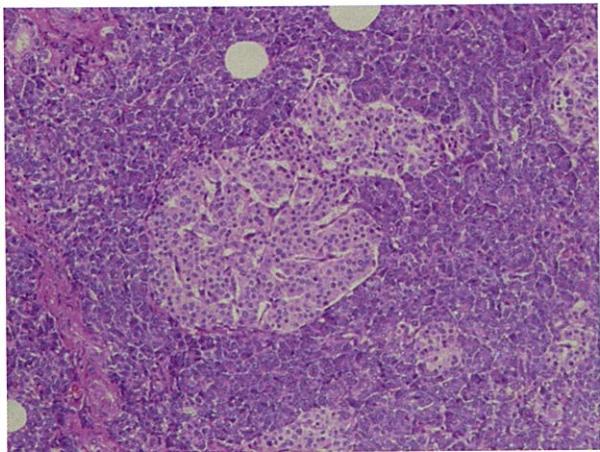


写真 1 : HE 染色 (評価 A)

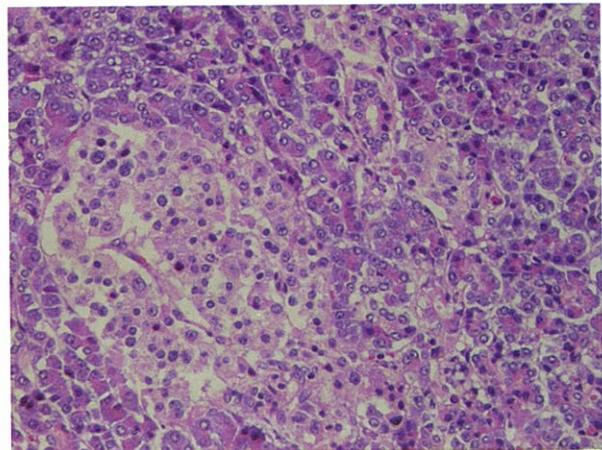


写真 2 : HE 染色 (評価 A)

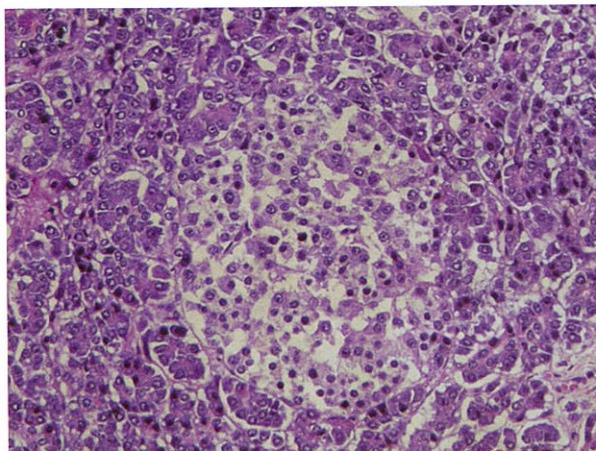


写真 3 : HE 染色 (評価 B)  
ヘマトキシリン共染

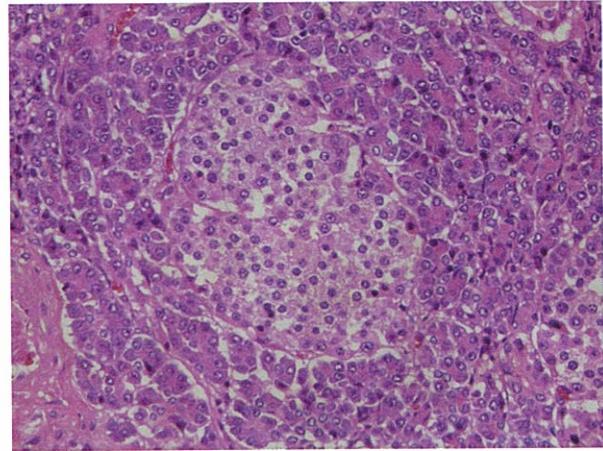


写真 4 : HE 染色 (評価 B)  
エオジン共染

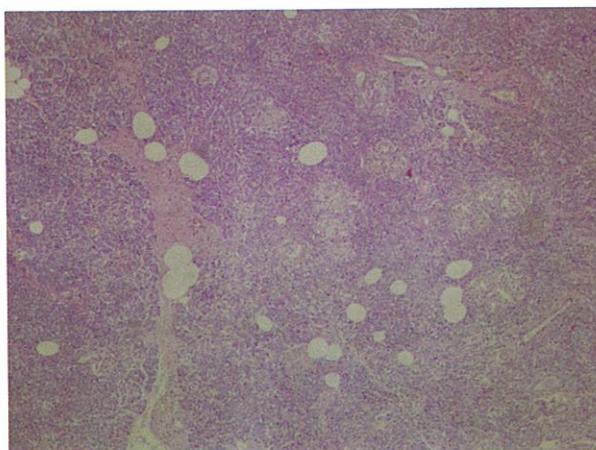


写真 5 : HE 染色 (評価 C)  
染色ムラ

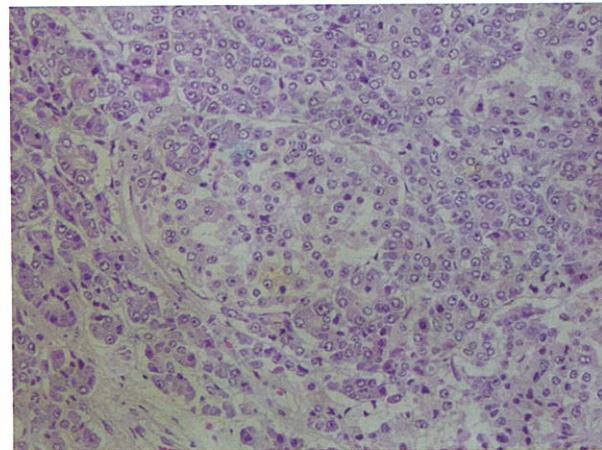


写真 6 : HE 染色 (評価 C)  
エオジン染色弱

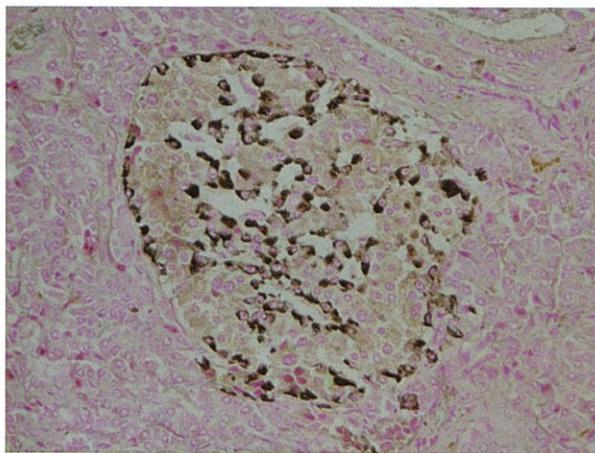


写真 7 : Grimelius 染色 (評価 A)

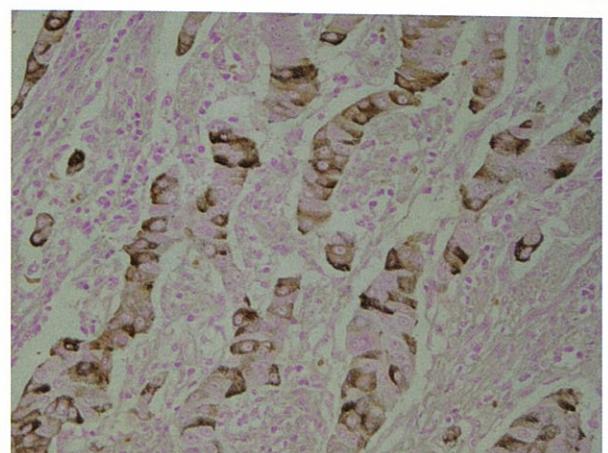


写真 8 : Grimelius 染色 (評価 A)

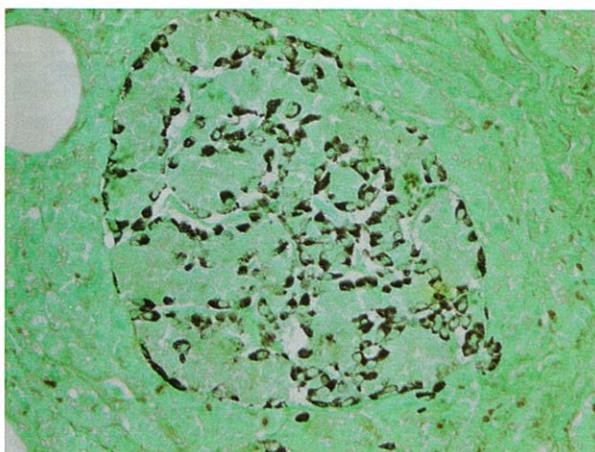


写真 9 : Grimelius 染色 (評価 A)

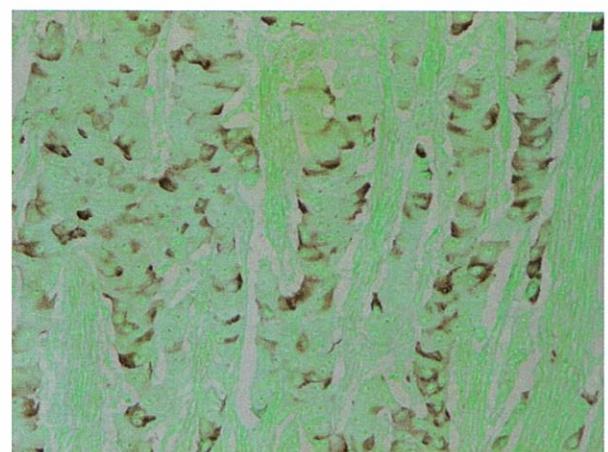


写真 10 : Grimelius 染色 (評価 A)

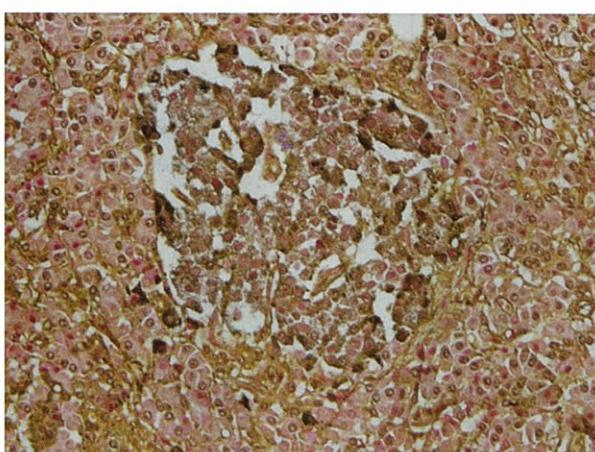


写真 11 : Grimelius 染色 (評価 B)  
共染強

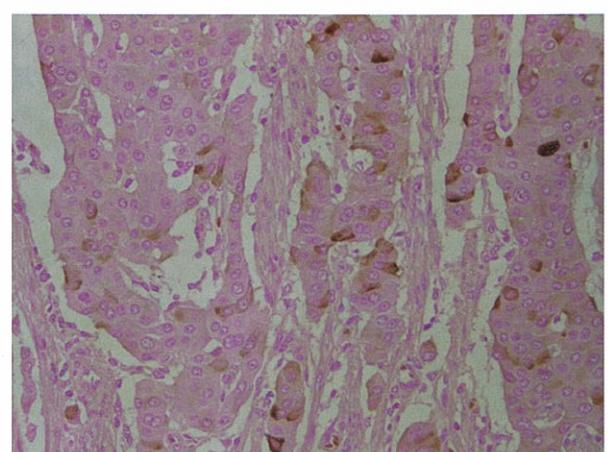


写真 12 : Grimelius 染色 (評価 B)  
染色弱

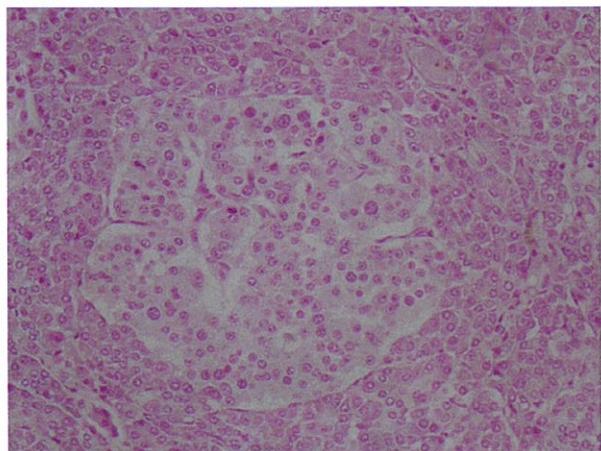


写真 13 : Grimelius 染色 (評価 C)  
染色 (-)

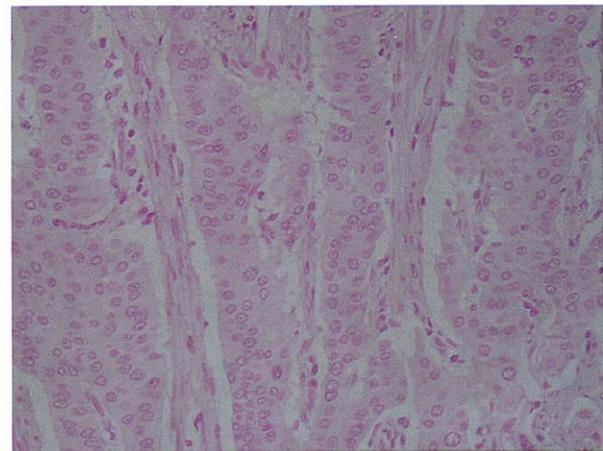


写真 14 : Grimelius 染色 (評価 C)  
染色 (-)

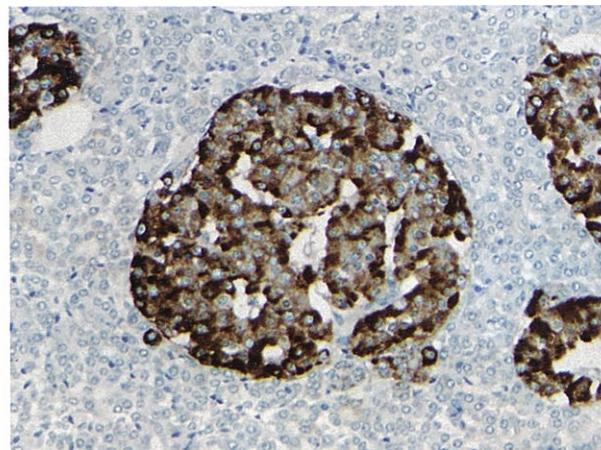


写真 15 : ChromograninA 染色 (評価 A)

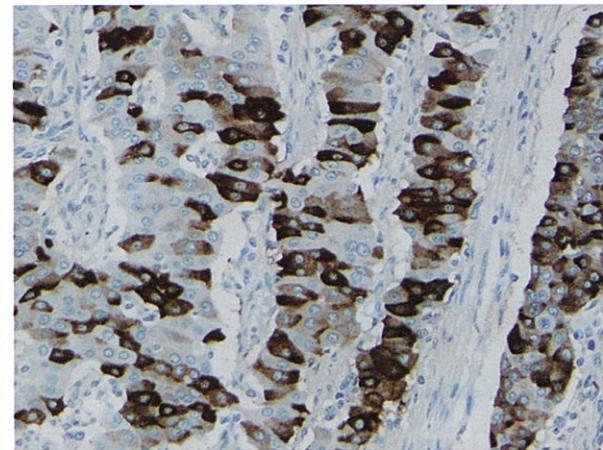


写真 16 : ChromograninA 染色 (評価 A)

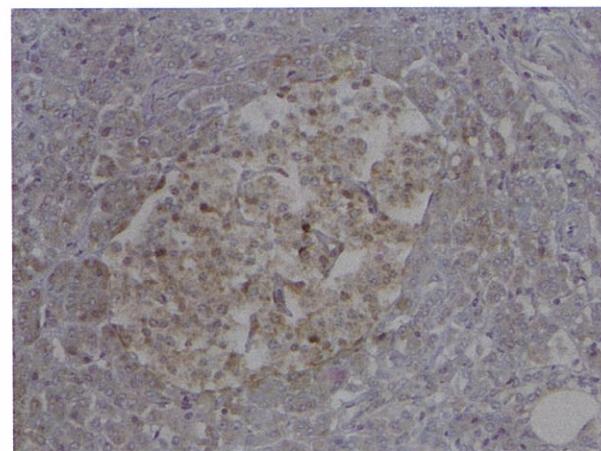


写真 17 : ChromograninA 染色 (評価 B)  
染色弱

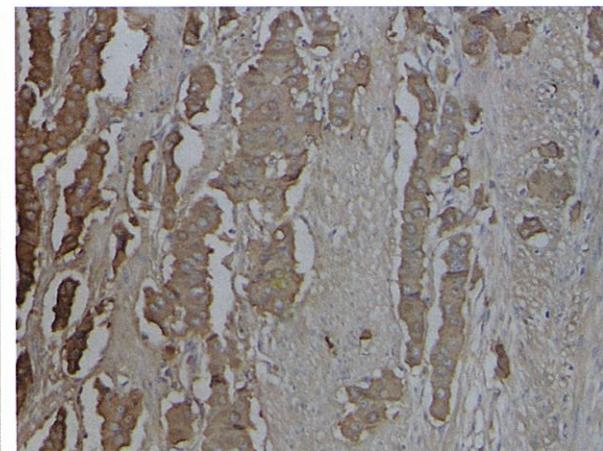


写真 18 : ChromograninA 染色 (評価 B)  
共染強









