

## 病理学的検査

### 【はじめに】

今年度の病理の精度管理は胃（胃底線領域）を用い、HE 染色に加え特殊染色は PAS 染色、免疫組織化学染色は平滑筋アクチン染色の確認を行なった。選択の理由としては、PAS 染色は日常の病理検査において上位の頻度で染色されること。平滑筋アクチン染色も、非上皮性腫瘍の鑑別において頻度が高いと考えられた。

### 【材料および実施方法】

標本は、胃癌で摘出された手術材料（組織検体を使用することの同意を得られた検体）を 20% 緩衝ホルマリン液で固定を行い、一週間以内に正常胃底腺領域を切り出し、型の通りパラフィンブロックを作製後、3  $\mu$ 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配布・回収した。（HE 染色は必須、PAS 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。

PAS 染色：表層粘液細胞と副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 9 施設中 9 施設（100%）、一般病院等も 37 施設中 37 施設（100%）、46 全施設回収することができた。

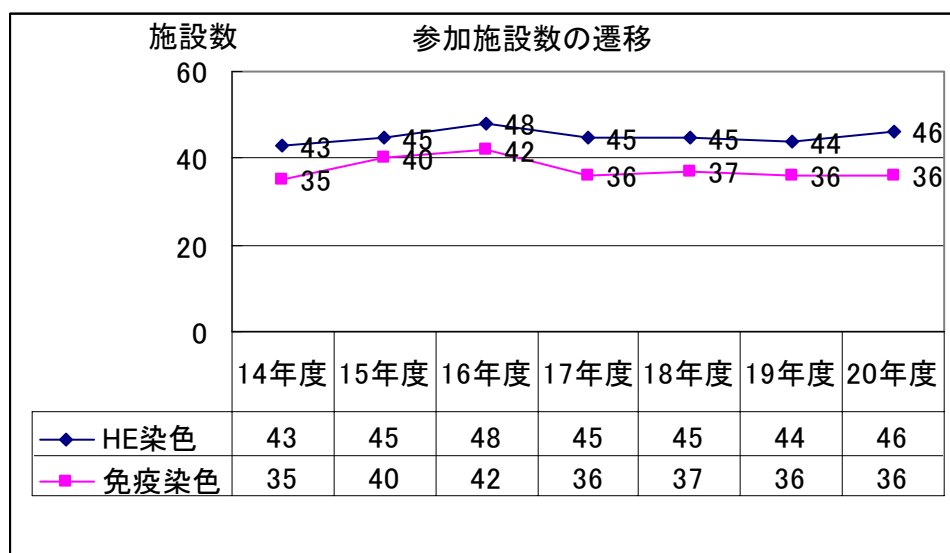
PAS 染色の回収率は、登録衛生検査所が 9 施設中 9 施設（100%）、一般病院等は、37 施設中 36 施設（97.3%）、合計では、46 施設中 45 施設（97.8%）であった。

免疫染色の回収率は、登録衛生検査所が 9 施設中 4 施設（44.4%）、一般病院等は 37 施設中 32 施設（86.5%）、全体では 46 施設中 36 施設（78.3%）と HE 染色と特殊染色(PAS 染色)は前年を上回り、免疫染色は昨年度と同じであった。

	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	9/11 (81.8%)	9/9 (100%)	35/35 (100%)	37/37 (100%)	44/46 (95.7%)	46/46 (100%)
PAS 染色 昨年度は Grimelius 染色	6/11 (54.5%)	9/9 (100%)	32/35 (91.4%)	36/37 (97.3%)	38/46 (82.6%)	45/46 (97.8%)
免疫染色	4/11 (36.4%)	4/9 (44.4%)	32/35 (91.4%)	32/37 (86.5%)	36/46 (78.3%)	36/46 (78.3%)

### 参加施設数の年次推移

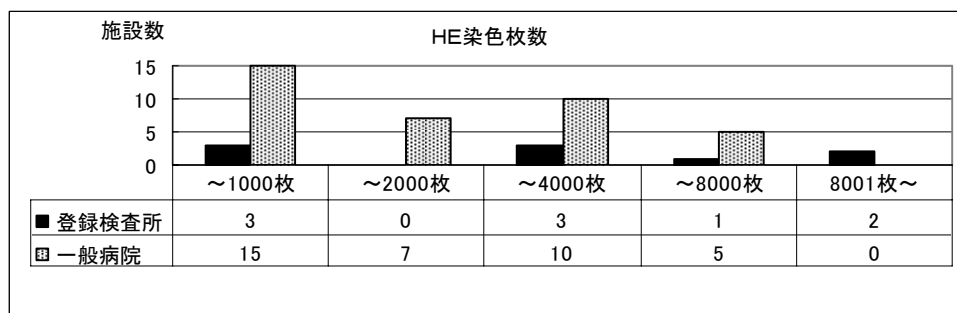
過去2年間と比べ、参加施設数に大きな増減はなく横ばい状態である。



## 2. HE 染色

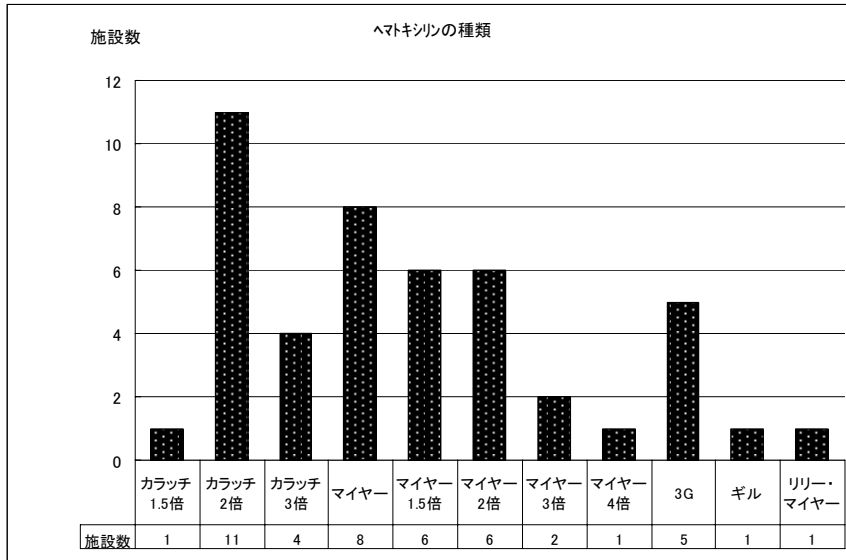
### ①染色枚数

一ヶ月における染色枚数は100-18000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約5600枚に対して、一般病院等の月平均は約2000枚と約2.8倍の差があった。



## ②ヘマトキシリン染色

ヘマトキシリン染色液は、マイヤー染色液（リリー・マイヤーを含む）が24施設（52%）と半数以上の施設で使用され、カラッチヘマトキシリン染色液は16施設（34%）の施設で使用されていた。ヘマトキシリンの濃度は、マイヤー染色液が1～2倍の濃度で使用している施設が多く、カラッチヘマトキシリン染色液は2倍の濃度で使用している施設が多かった。また、サクラ社独自のヘマトキシリン3Gを使用している施設が5施設（15%）あった。なお、市販されているヘマトキシリン染色液の使用している施設は21（46%）であった。



ヘマトキシリン液のまとめ													
種類	倍率	数	染色時間(分)					総計	製法	計	メーカー	数	
			～5	～10	～15	15～	平均						
カラッチ	1.5	1				1	20	16	自家	9	メルク	5	
	2	11	1	6	3	1	10.5				クロマ	1	
	3	4	1	2	1		9.5				不明	3	
									市販	7	武藤化学	7	
マイヤー	1	8	3	5			7	23	自家	15	メルク	10	
	1.5	6	6				4.3				和光純薬	2	
	2	6	3	2	1		7.8				関東化学	1	
	3	2	2				1.5				不明	2	
	4	1	1				3						
									市販	8	武藤化学	7	
3G	3	5	2	2	1		9	市販	5	5	サクラ	5	
リリー・マイヤー	5	1	1				5	1	自家	1	1	メルク	1
ギル		1	1				5	1	市販	1	1	武藤化学	1

分別操作はカラッチ、リリー・マイヤー、ギル使用の全ての施設が行なっていた。分別液の塩酸濃度は0.5%および1%の使用が多かった。マイヤーにおいても4施設が分別を行なっていた。色出しは流水および温水で行なっている施設が多かった37施設（80%）。

分別のまとめ				色出しまとめ	
分別	塩酸濃度 (%)	数	計	方法	数
あり	0.2	2	22	流水	20
	0.2-0.3	2		温水	17
	0.3	1		アンモニア水	4
	0.5	5		アンモニア・アルコール	2
	0.8	1		炭酸リチウム	3
	1	9			
	5	1			
	2%酢酸	1			
なし			24		

### 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（58.7%）で、昨年度と同じであった。染色時間は1-3分と短時間で行なっていた（平均1.8分）。エオジンはアルコール性のものが半数以上であった。2施設がエオジンにフロキシンを添加して使用していた。

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	15	27	<1分	8
	クロマ	5		1分	13
	和光	4		<2分	3
	小宗化学	1		2分	9
	不明	2		<3分	4
市販品	武藤化学	13	19	3分	5
	サクラ	4		3分<	4
	メルク	2			
エオジンの種類			色素の添加		
アルコール性	31		なし	44	
水溶性	15		フロキシシン	2	

#### ④自動染色機

自動染色機の保有施設は 21 (46%) で、その使用機種では DRS シリーズ (サクラ社製) が多かった。

メーカー	型番	数	計	比率
サクラ	DRS2000	7	21	46%
	DRS601	4		
	DRSprisma	4		
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			25	54%

### ⑤総合判定

検査技師6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、昨年と同様に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35施設（76.1%）、B評価は11施設（23.9%）、C評価の施設はなかった。

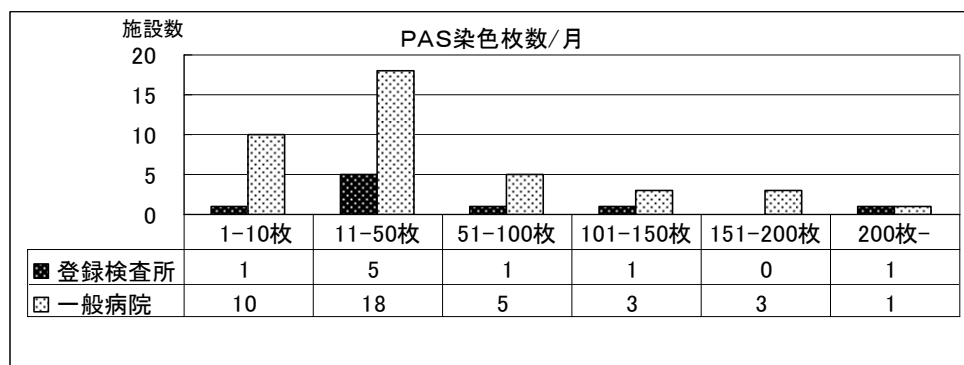
### ⑥考察等

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、本年度はA、B評価のみの結果となり、昨年よりさらに優秀と思われる。また、A評価は一昨年度が29施設（64.4%）、昨年度は32施設（69.6%）と年々増えていて良い傾向である。

## 3. PAS染色

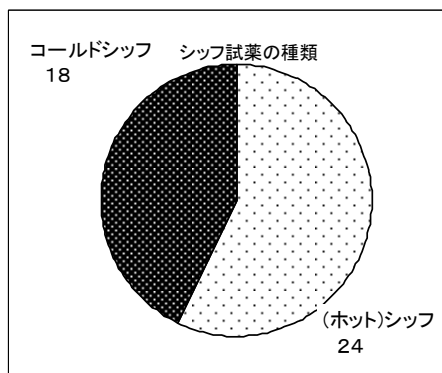
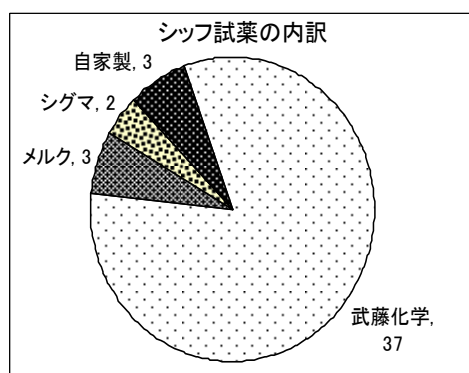
### ①染色枚数

月平均染色枚数は登録衛生検査所の平均は約70枚で、一般病院等の平均枚数は55枚であった。（全体平均58枚）。染色を行っていない施設は1施設であった。

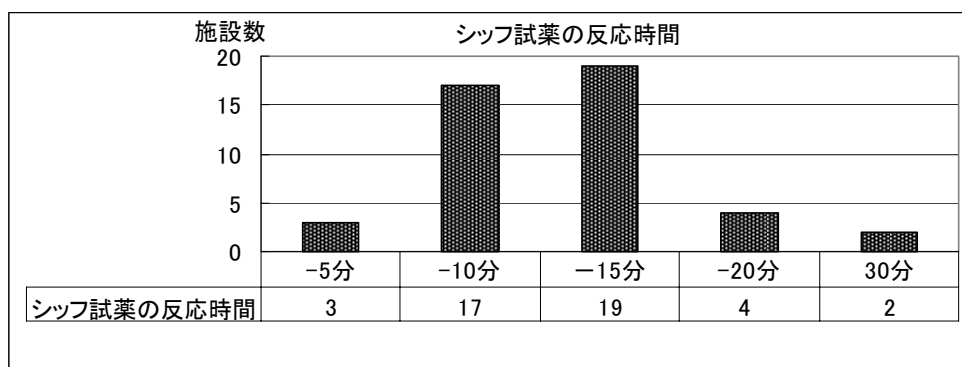


### ②シッフ試薬と亜硫酸水

シッフ試薬はほとんどの施設が市販のものを購入し、その内訳は武藤化学社製が37施設、メルク社製が3施設、シグマ社製が2施設であった。自家製はわずかに3施設であった。シッフ試薬の種類は（ホット）シッフが24施設で、コールドシッフが18施設であった。

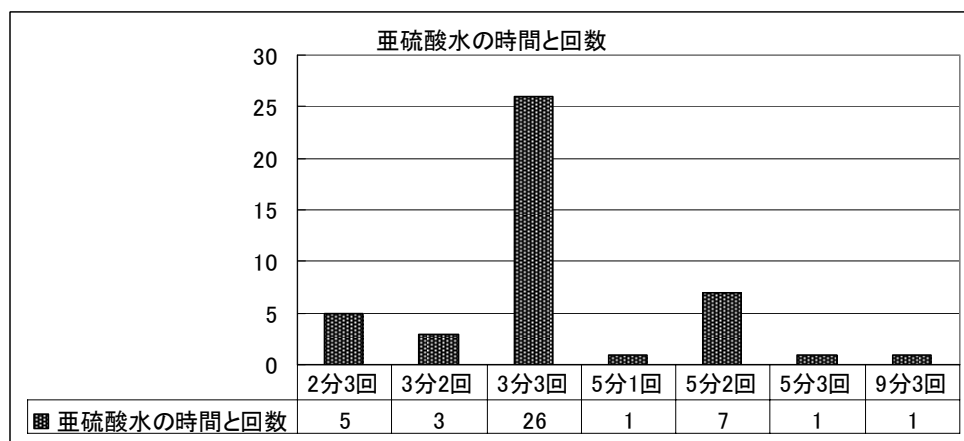


シッフ試薬の反応時間は3分から30分と大きく差があったが、10分から15分の施設がほとんどであった。

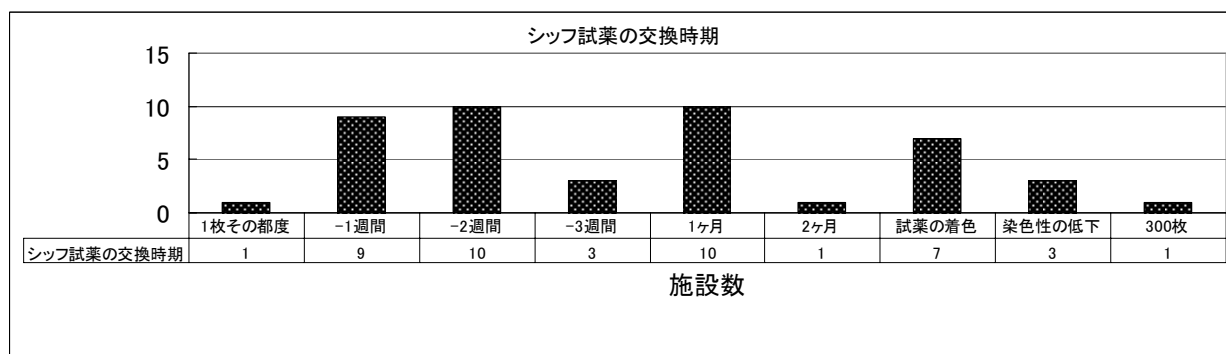


亜硫酸水はほとんどが自家調整で、4施設が市販のものを使用し、1施設は亜硫酸水を使用しなかった。

自動染色機を使用していたのは1施設（サクラ Multiple Special Stainer MHS-30）であった。



シッフ試薬の交換時期は1週間から1ヶ月が多く、それ以外はその都度や染色性が低下した場合、シッフ試薬が着色したとき、300枚と染色枚数を決めて交換すること等があった。



### ③判定

判定結果は、A 評価は 43 施設（96%）で、B 評価は 2 施設（4%）で C 評価の施設はなかった。

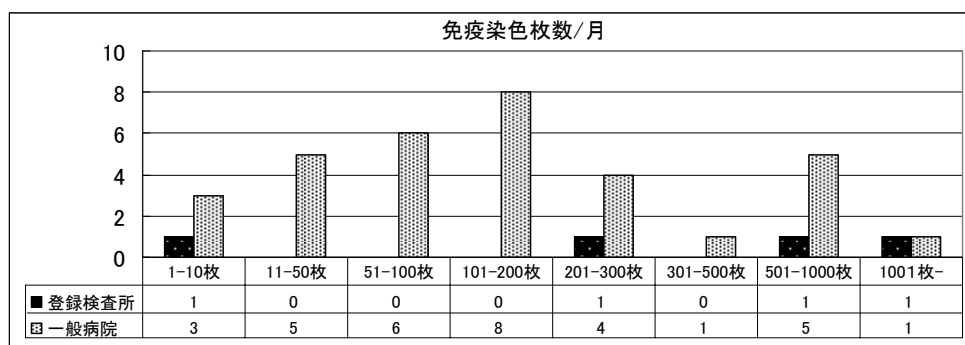
### ④考察等

PAS 染色は、日常病理検査において頻度の高い染色法のため、染色技術が安定し、ほとんどの施設で A 評価となった。B 評価は、バックグラウンドの染色性が高いことと、反応が弱いことであり、それらの問題点を改善することで評価は上がるものと考えられた。PAS 染色は腺癌細胞の検索をはじめ、診断を確定するために大切な染色であるため、陰性陽性の判断に迷うことのない染色を行うことを望みたい。

## 4. 免疫染色：平滑筋アクチン染色

### ①染色枚数

全体の月平均染色枚数は約 510 枚（昨年度は約 530 枚）。施設間の差も 50 枚以下の施設が 9 施設と 500 枚以上が 8 施設と、施設間の差も昨年同様に大きかった。登録衛生検査所の平均は約 1800 枚で、一般病院等の平均は約 300 枚と登録衛生検査所の方が約 6 倍多く、昨年と同じ結果であった。



### ②使用抗体（一次抗体：平滑筋アクチン）

一次抗体は DAKO のモノクローナル抗体を使用した施設は 29 施設（79%）と一番多く、賦活法を行なっている施設は 12 施設（32%）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 9 施設（24%）であった。

一次抗体と賦活法			
メーカー	クローン	加熱処理なし	加熱処理あり
DAKO	1A4	15 (40%)	
	1A4		12 (32%)
	M851	2 (5%)	
ニチレイ	1A4	4 (11%)	
Bio Genex	1A4	1 (3%)	
BioMakor	1A4	1 (3%)	
IMMUNOTECH	1A4	1 (3%)	
SIGMA	1A4	1 (3%)	
計		25 (68%)	12 (32%)

### 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 8 施設であった。pH6 CB(クエン酸緩衝液)を用いたオートクレーブ処理と pH6 CB 電気ポットが多かった。

pH6 CB オートクレーブ	3	pH7 CB マイクロウェーブ	1
pH6 CB 電気ポット	2	pH6 CB 圧力釜	1
pH6 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（シンプルステイン MAX、Envision 等）が 28 施設（76%）と大半を占めていた。

自動染色機の使用は、昨年同様 14 施設であった。その中で DAKO 社と VENTANA 社製のものが多かった。

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	16(43%)	用手法	23(62%)
ポリマー法:Envision	9(25%)	DAKO 社製	6(16%)
(L)SAB・ABC 法	8(21%)	VENTANA 社製	5(14%)
ポリマー法:ultra View	3(8%)	ニチレイ社製	2(5%)
間接法	1(3%)	BioGenex 社製	1(3%)

#### ⑤判定および結果

判定結果は、A 評価は 35 施設 (94.6%)、B 評価は 2 施設 (5.4%) 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 施設と昨年に続き大変良い成績であった。平滑筋アクチン染色においては、昨年のクロモグラニンA染色と同様に染色を行いやすく、安定した結果を得ることができた。B 評価の判定については、非特異的なバックグラウンドの染色性を解決することで、次回以降の精度改善において、全ての施設が A 評価となることを望みたい。

毎年、精度改善は他の施設の標本を評価することで、評価方法についての問題点が指摘されている。今回は、“誰が見ても良い標本といえる”ことを掲げ、評価を行った。また、昨年の技師会で指摘を受けたことから、とくに評価が大きく分かれたものは、ディスカッションを行い、調整をかけた。昨年より評価が上がった施設、又は変わらなかった施設、そして、昨年からの評価が下がった施設は特に、良い標本を作製することを目標に、続けて参加をされることを是非とも希望したい。

以上

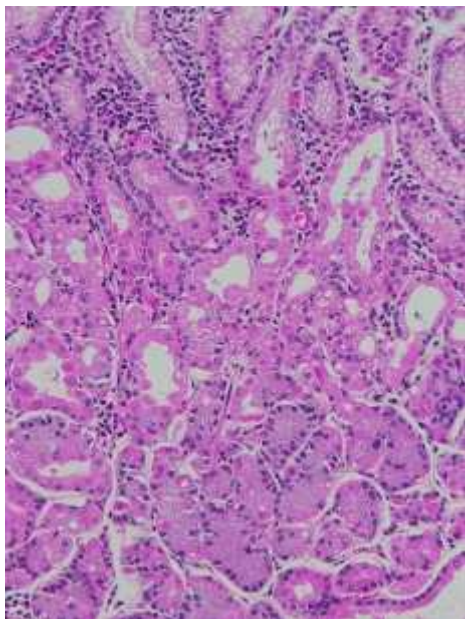


図1

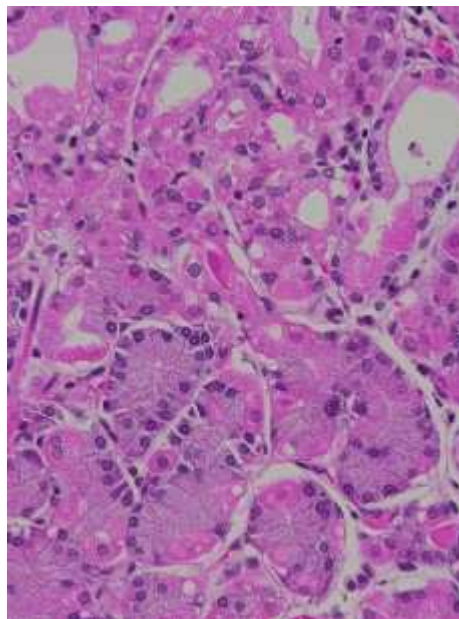


図2

ヘマトキシリン・エオジンともにきれいに染まり、主細胞と壁細胞が明瞭に判別できる。

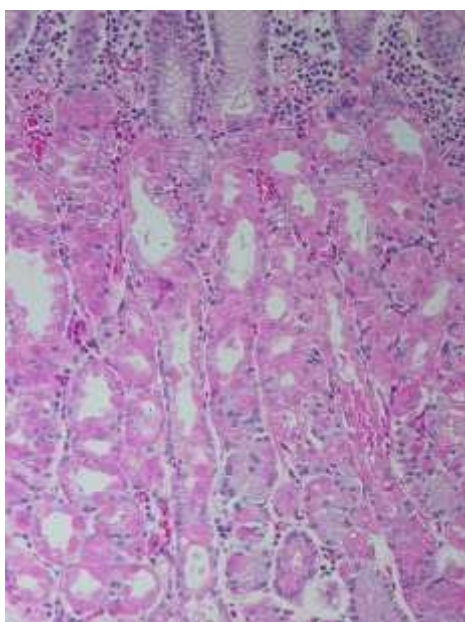


図3

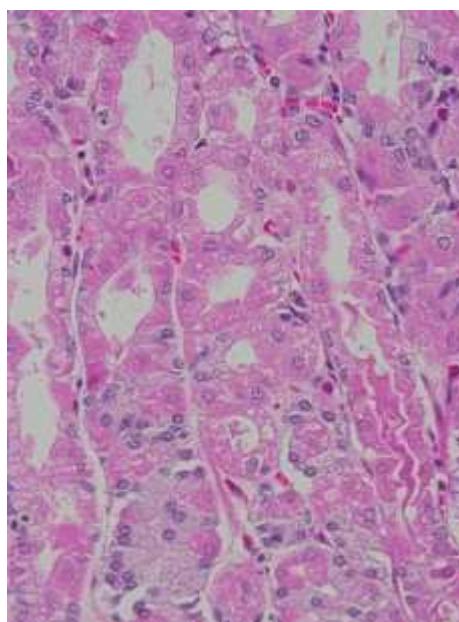


図4

図1、2よりも控えめな染色性であるが、主細胞と壁細胞が判別できる。

HE染色 B評価標本 (左弱拡大 対物×10 右強拡大 対物×20)

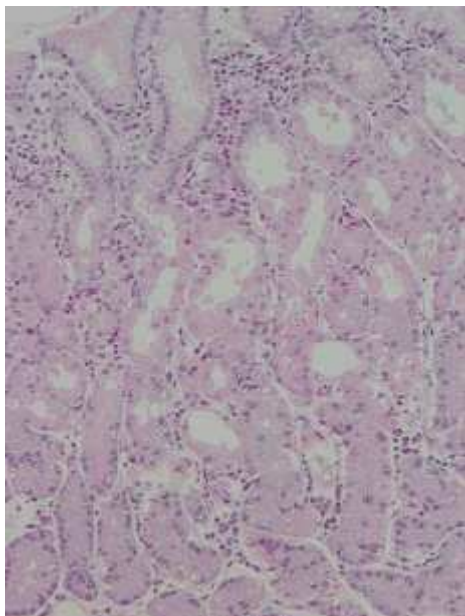


図5

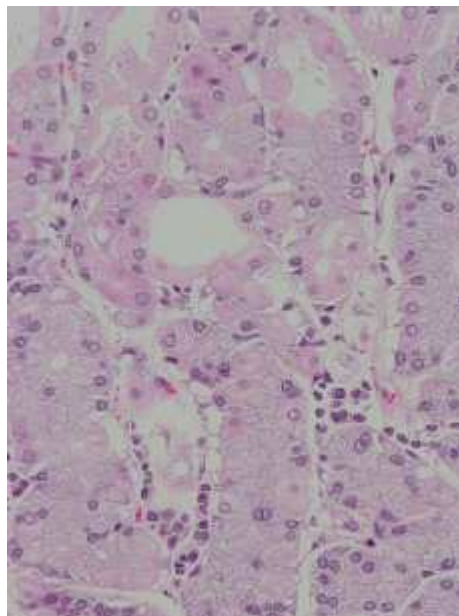


図6

ヘマトキシリン・エオジンともに染色性が弱めである。強拡大で、壁細胞の判別ができる。

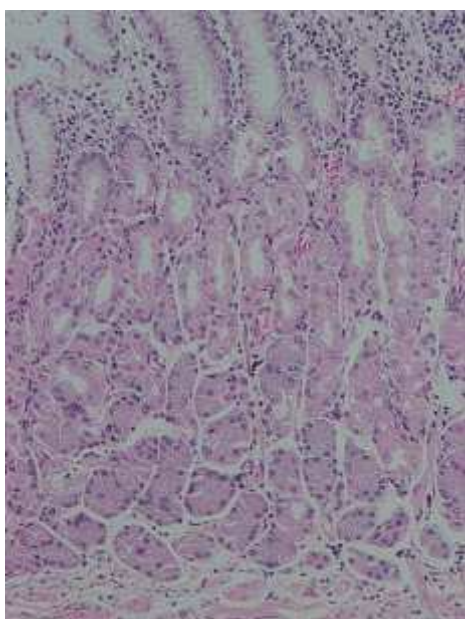


図7

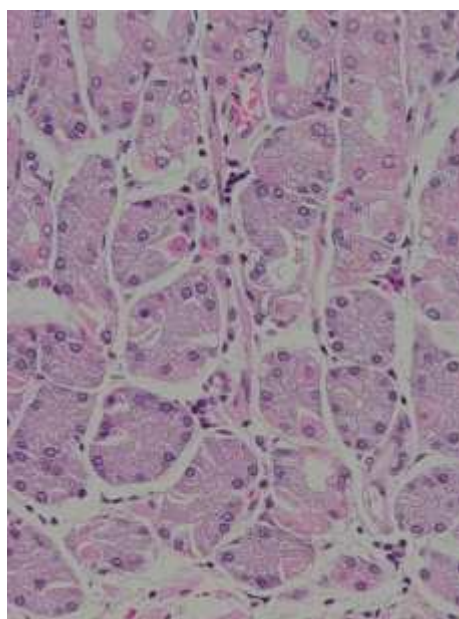


図8

エオジンの染色性が弱めである。

PAS染色 A評価標本 (左弱拡大 対物×10 右強拡大 対物×20)

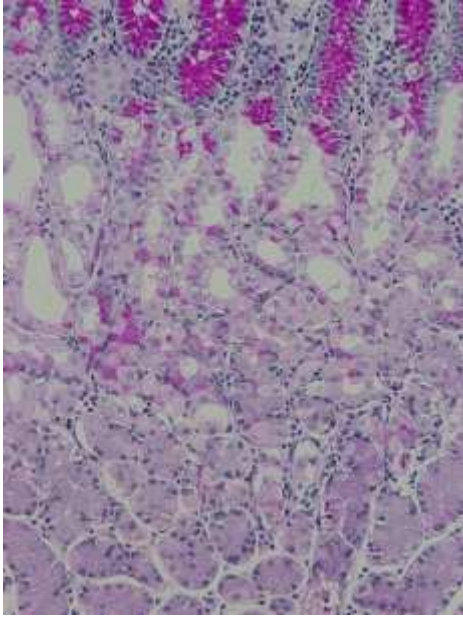


図9  
表層粘液細胞と副細胞が明瞭に染められている。

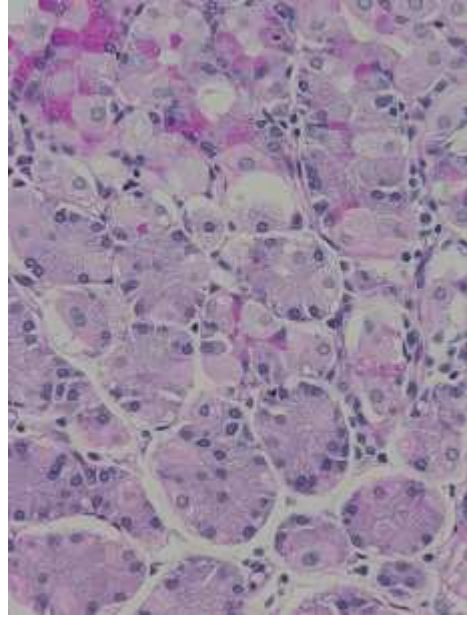


図10

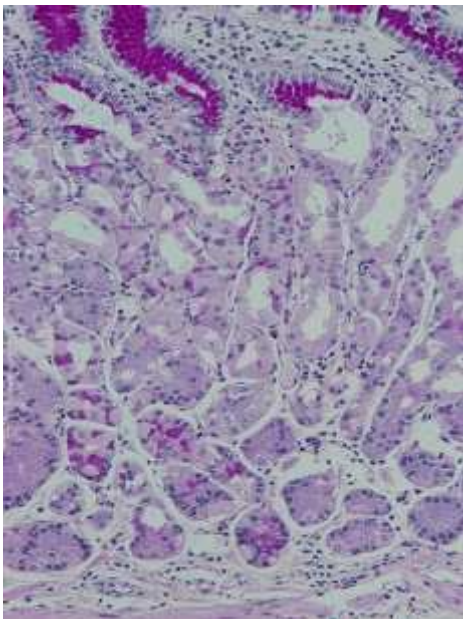


図11  
図9、10と同様によく染められている。

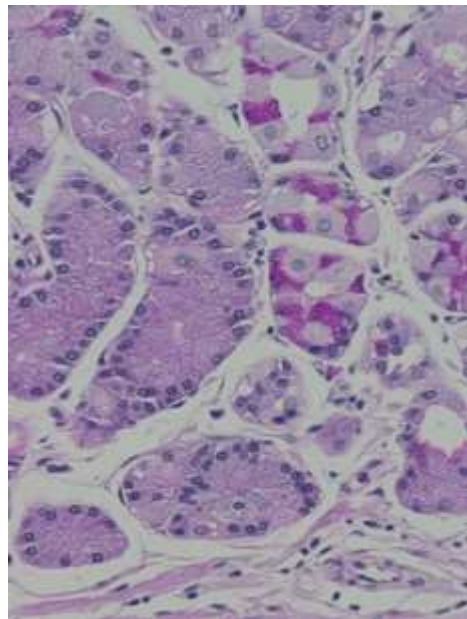


図12

PAS染色 B評価標本 (左弱拡大 対物×10 右強拡大 対物×20)

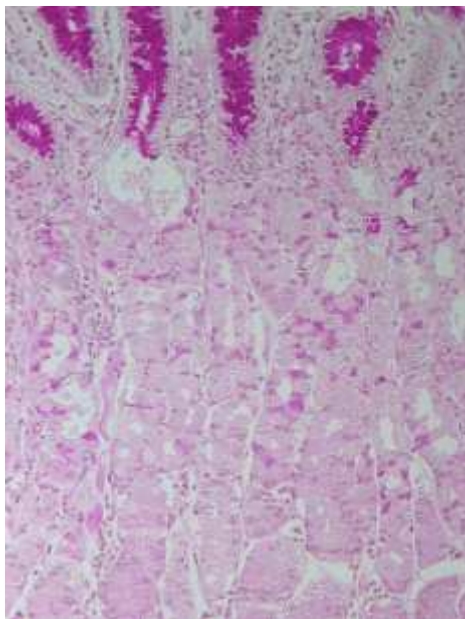


図13

バックグラウンドの染色性がやや高く、主細胞、壁細胞、間質成分も赤色を呈している。

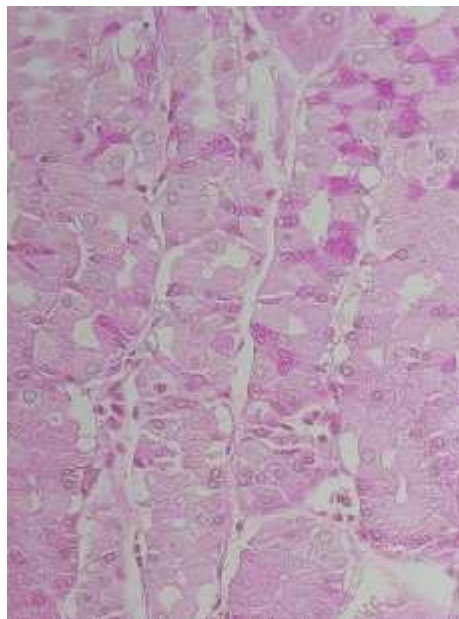


図14

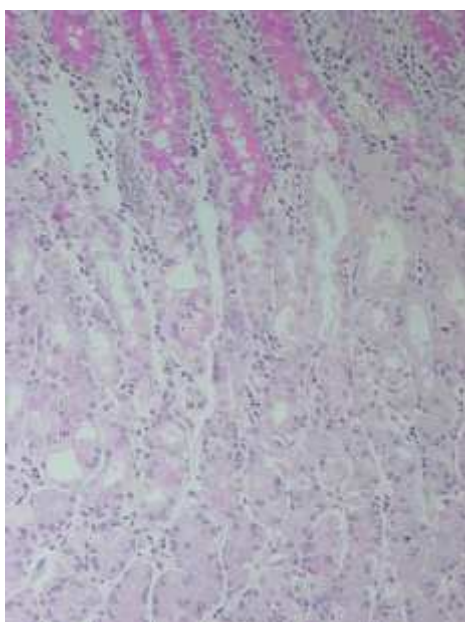


図15

表層粘液細胞は染まっているが、副細胞の染色性が弱めである。

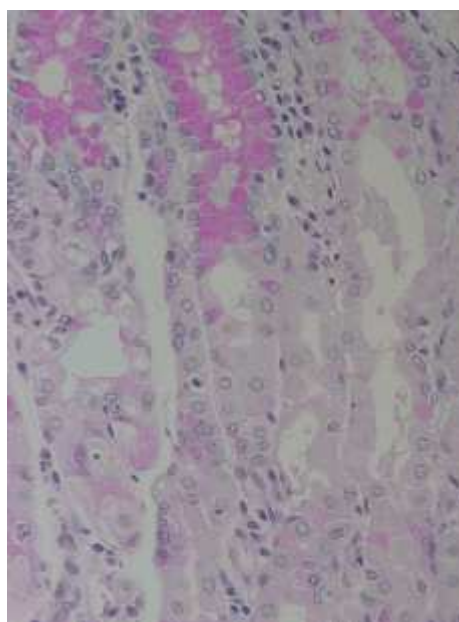


図16

平滑筋アクチン染色 A評価標本 (左弱拡大 対物×4 右強拡大 対物×20)

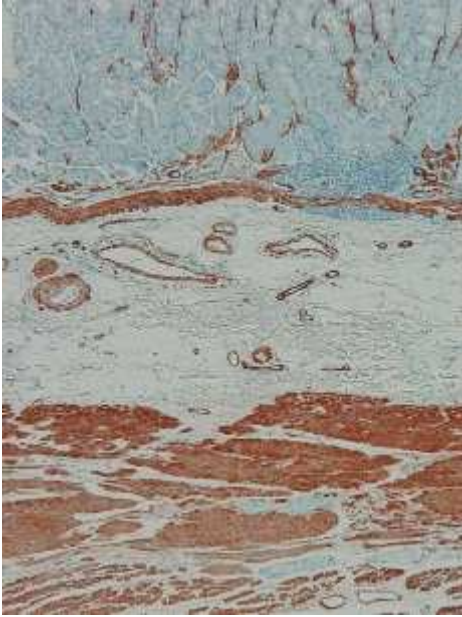


図17

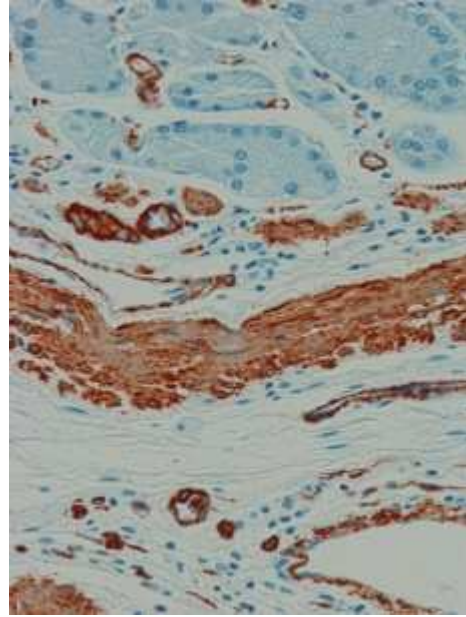


図18

固有筋層、粘膜筋板、毛細血管が明瞭に染められている。

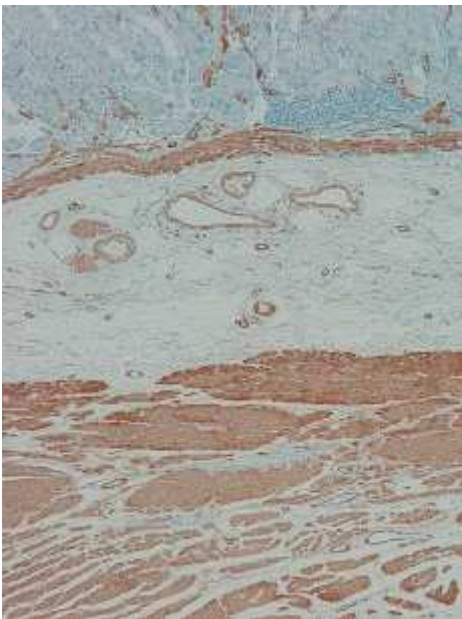


図19

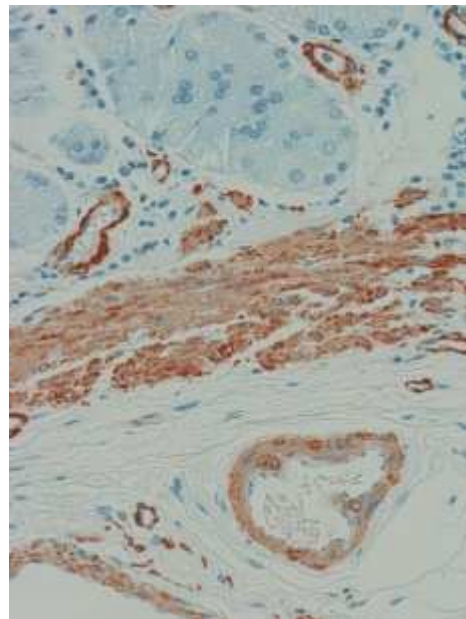


図20

図17、18よりも控えめな染色性であるが陽性部位は明瞭である。

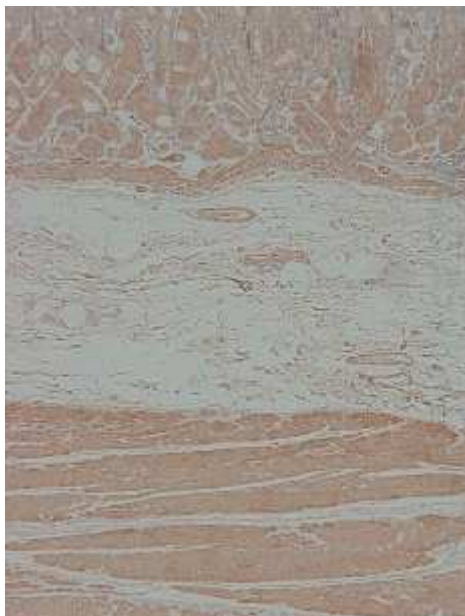


図2 1

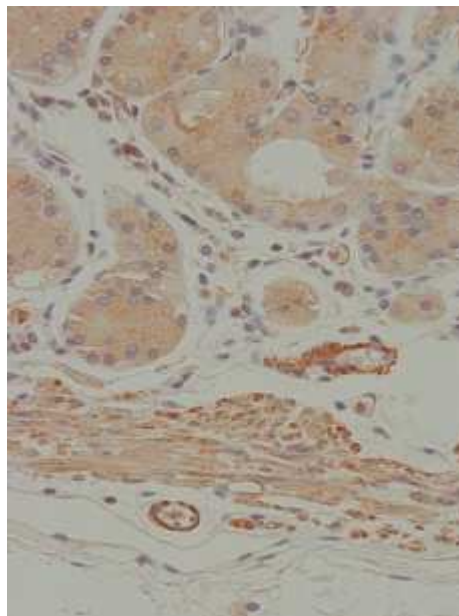


図2 2

固有筋層、粘膜筋板、毛細血管とともに、陰性であるべき主細胞や間質細胞がバックグラウンドとして明らかに陽性を呈している。

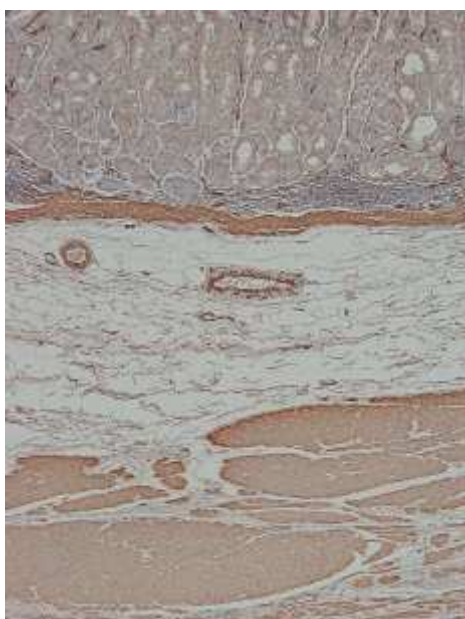


図2 3

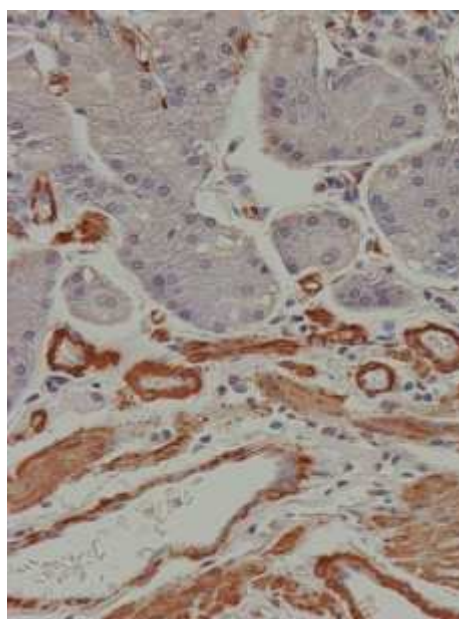


図2 4

図2 1、2 2よりも弱い、主細胞、壁細胞等に弱く陽性を呈している。