

病理検査

片桐 恭雄

岐阜大学医学部附属病院



病理検査

片桐 恭雄

[岐阜大学医学部附属病院]

【はじめに】

病理検査における精度管理は日常業務のレベル向上や知識習得を目的として行っている。

平成 27 年度は病理標本作製の中で比較的高頻度で経験する脱灰標本のパラフィンブロック作製と薄切を実施した。

【方法】

(材料)

骨髓組織 (10%中性緩衝ホルマリン固定)

(実施手順)

1. 申し込み施設に骨髓組織 (ホルマリンを P B S に入れ換えて輸送), スライドガラス 2 枚, 標本作製手順記入用紙を送付。
2. 脱灰操作, パラフィンブロック作製, 薄切を各施設で行い, パラフィンブロックと HE 染色標本 1 枚と未染色標本 1 枚及び作製手順用紙を返送。
3. 病理細胞検査部門員 6 名にて評価を行った。評価に当たっては, 事前に計画していた評価判定ポイントを確認, コントロール標本を利用し期待される適切な標本を明確にし, 評価を行った。

(評価項目)

- 1 スライドガラスの汚れ
良 (2 点), 可 (1 点), 不可 (0 点)
- 2 切片の状態 (面出し, 剥がれ, 亀裂, 皺など)
優 (4 点), 良 (3 点), 可 (2 点), 不可 (1 点, 0 点)
- 3 切片のメス傷
良 (2 点), 可 (1 点), 不可 (0 点)
- 4 切片の厚さ
良 (2 点), 可 (1 点), 不可 (0 点)
- 5 HE 染色態度 (バランス, 核染色)
優 (4 点), 良 (3 点), 可 (2 点), 不可 (1 点, 0 点)

結果

参加施設数 : 18 施設

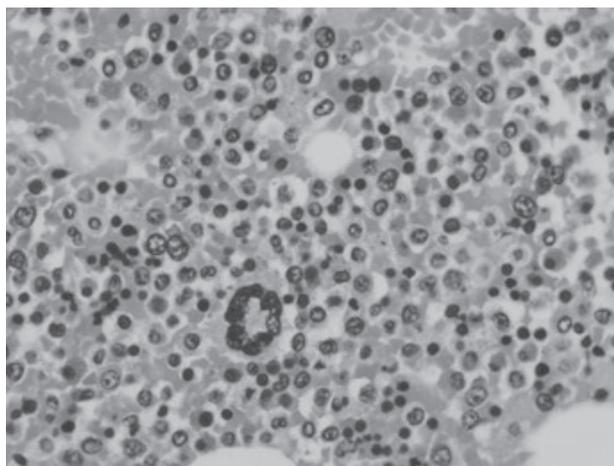
判定	A	B	C	D
評価	○		△	×
施設数	15	3	0	0

(評価点減点の内訳)

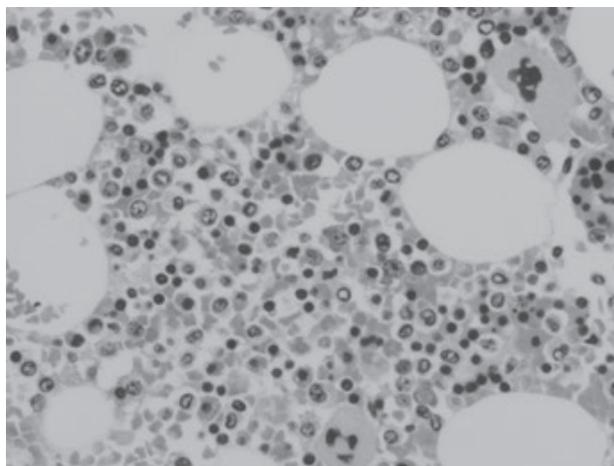
今回のサーベイで評価点の減点対象となった標本の不具合内容を以下に示す。

- ・ ガラスの汚れ; 染色液によるガラスの汚れ
- ・ 組織上の亀裂, 厚さムラ
- ・ 切片の剥がれ
- ・ 切片が厚い
- ・ HE 染色態度 (染色が濃すぎる, バランスが悪い, など)

今回のサーベイで評価の高かった施設の染色標本 (写真) と作業手順を以下に示す。



最高評価施設. 切片の厚さも適当で, 染色態度, 特にエオジンの染色バランスに評価◎



一番切片厚が薄かった施設. 観察がしやすいが反面染色バランスがやや崩れており減点した。

最高評価施設の脱灰条件

脱灰法

0.5mol/l EDTA (pH 7.5) (Wako)

室温 24 時間浸漬

脱灰状況の確認

時間および触った感触で脱灰状況を確認

HE 染色

ヘマトキシリン 10 分

エオジン 2 分

(日常の HE 染色と同じ条件)

[調査票及びアンケート結果より]

(調査票集計)

脱灰作業について

今回初めて	少しの経験あり	日常施行
0 施設	3 施設	15 施設

ほとんどの施設で実施されていた。

今回の脱灰操作のタイミング

脱灰包埋装置処理前	12 施設
ブロック化後薄切時(表面脱灰)	3 施設
上記の両方を併用	3 施設

ブロック化前に脱灰を行い脱灰状況を確認してからブロック化する施設が多い。

今回使用した脱灰液は市販品ですか？自施設調整ですか？

脱灰液	施設数	
自施設調整	6 施設	
市販品	13 施設	Wako 6 施設 ファルマ 4 施設 常光 3 施設

コスト高ではあるが、より精度の安定した市販品を扱う施設が多い

今回使用した脱灰液の名称とその組成について

脱灰液名	メーカー	組成	施設数
脱灰液 B	Wako	0.5mol/l EDTA	5 施設
K-CX	ファルマ	塩酸キレート剤	4 施設
デカルックス	常光	プランクリュクロと同様	3 施設
プランクリュクロ	自施設調整	塩化アルミニウム+塩酸+蟻酸	2 施設
0.05mol/l EDTA	自施設調整	EDTA2Na + トリス緩衝液 pH7.6	
EDTA	自施設調整	EDTA4Na 16.7g + リン酸 1.5ml / DW100ml	
10%EDTA2Na + アンモニア	自施設調整	pH7.4	
10%EDTA4Na + 塩酸	自施設調整	pH7.4-7.5	
カルキトックス	Wako	プランクリュクロ + EDTA	

中性脱灰 9 施設、酸性脱灰 9 施設と二分された。

今回の脱灰処理温度

室温	13 施設	
温度調整	5 施設	
	40℃	10%EDTA
	37℃	EDTA+KCX
	5℃	デカルックス
	4℃	KCX カルキトックス

脱灰力の強い酸性脱灰液を使用した施設でも室温で脱灰終了のタイミングをコントロールしており、経験の豊富さがうかがえる。

今回の脱灰状況の確認方法(複数回答有)

確認方法	施設数
直接接触した感触で確認	14 施設
時間で確認	12 施設
マイクロトームの切削時	11 施設
目視で確認	3 施設
切り出し用の刃を利用し確認	1 施設

全ての施設で経験による時間設定と感触による職人技が重点を占めている。

今回の脱灰に要した時間

30分～73時間 平均 32.9時間
 薬液浸漬脱灰 2.5時間～73時間 平均 34.6時間
 表面脱灰 30分～1.5時間 平均 0.88時間

脱灰後の中和処理について(中和処理を行なった施設のみ)

5%硫酸ナトリウム 0.5時間 室温
 中和液・組成未回答 8時間 室温

今回のHE染色時間について

日常のHE染色と同じ時間 16施設
 脱灰標本用に調整した時間 2施設

ヘマトキシリン染色 40秒～20分 平均 6.9分
 エオジン染色 30秒～10分 平均 4.0分

自己評価

脱灰状況について

良好	10 施設
並	6 施設
やや不満	2 施設

染色態度について

良好	5 施設
並	10 施設
やや不満	2 施設
未回答	1 施設

総合

日常以上の出来栄え	1 施設
日常通り	13 施設
やや不満だが許容範囲内	4 施設

ほとんど日常通りの作業が行えたようであり、試料の選択に問題はなかった。

(アンケート集計)

日常、他に使用している脱灰液は何がありますか？

デカルックス
 5%トリクロロ酢酸
 オステオモル(メルク)(表面脱灰用)
 オステオソフト(メルク)
 プランクリュクロ
 1N塩酸(表面脱灰用)
 EDTA脱灰液
 カルキトックス
 モールス

脱灰操作を必要とする材料で、脱脂操作も必要な場合、どちらを先に行なっていますか？

脱脂→脱灰	11 施設
脱灰→脱脂	4 施設
材料によって順番が入れ替わる	2 施設

その他の意見

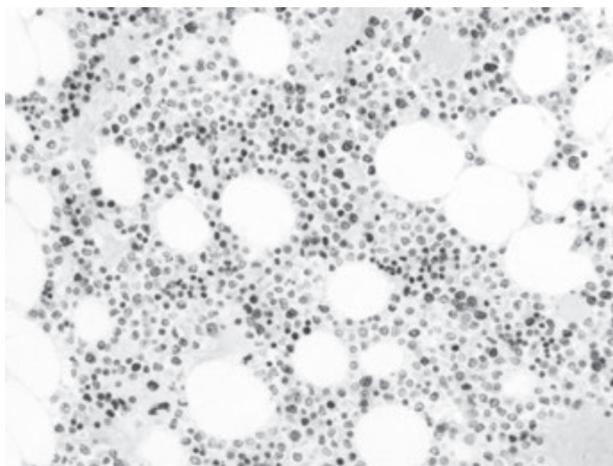
両方必要であったことがない
 骨髓などは脱灰→脱脂
 カルキトックス使用時は脱脂なし(同時に脱脂できる)

骨髓生検は日常どのような作製をしていますか？

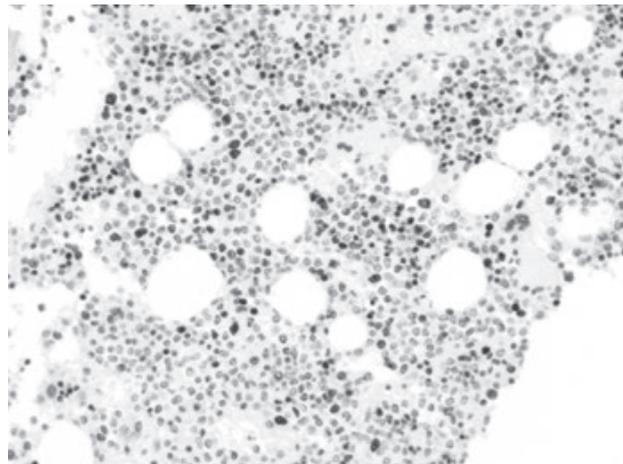
基本的には脱灰操作を行う	12 施設
免疫染色等の検索への影響を考慮し	5 施設
基本的に脱灰操作は行わない	

回収した未染色標本で免疫染色 Ki-67 を実施した(評価対象外)

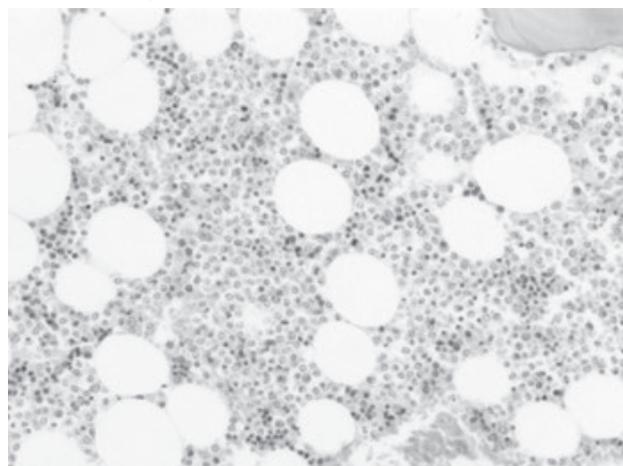
中性脱灰(浸漬)



酸性脱灰（表面脱灰のみ）



酸性脱灰（浸漬）



酸性脱灰による免疫染色への影響は著しく、浸漬法においては全ての施設で消失していた。

日常使用している剥離防止コーティングスライドにどのような種類を準備していますか？使用目的（特殊染色，免疫染色，遺伝子検索，凍結切片，細胞診など）とメーカー、及び商品名を記入してください。

使用目的	商品名	メーカー
免特凍細遺脳	MAS	松浪硝子
免特細遺	MASGP	松浪硝子
特凍細遺	フロンティア	松浪硝子
免特凍	プラチナプロ	松浪硝子
免特	シラン	DAKO
免特	スターフロスト B	武藤化学
特凍	ニューシランⅢ	武藤化学

今後の精度管理調査用スライドガラスの選考にあたり、参考とする。

今回のサーベイ実施にあたり、凍結標本作製を検討しています。しかし、生材料は管理が困難なため、ホルマリン固定材料で凍結標本作製を考えています。ホルマリン固定後の凍結標本作製は経験がありますか？

現在も必要時には実施している	4 施設
過去に経験したことがある	5 施設
全く経験がない	9 施設

上記サーベイ実施についてどう思いますか？

実施する意義はあると考える	10 施設
精度管理の枠を逸脱しているため、実施には賛成できない	5 施設
未回答	3 施設

その他

- ・他施設がどのように作製されているか興味があります。しかしながら精度管理という意味での標準化の必要性がどれほどあるのかと考えます。勉強会などでとりあげていただきたい。
- ・凍結の良悪を判定するには意味がないのではと考える。

今回のサーベイで困ったことや日常の要脱灰組織材料標本作製で困っていること、今後のサーベイで取り組んで欲しい内容について

今回のサーベイで困ったこと

材料受け取り時、試料が割れていた。瓶容器ではなく試料本体。

(回答)今回は材料が硬く脆いために起きた現象とされます。今後検証します。

今後の取り組み

特殊染色の鍍銀，ギムザ，アザン
HER2 蛋白，ALK (IHS (ISH? IHC?))，硬い組織(筋腫等)

(回答)アザン染色及び免疫染色は行える施設が少なく実施できません。筋腫組織は簡単に行えそうです。

日常の脱灰で困っていること

肺(腫瘍)と肋骨が接続したまま提出された場合接している部分のつながりの病変を観察するには腫瘍とも全体を脱灰するしかないでしょうか。免染や EGFR 変異，ALK に影響が出ると思われるため。

(回答)影響は出ると思われます。そのため、脱灰操作前の切り出し時に腫瘍部分を一部だけ切り出し標本作製し、そのブロックから様々な検索を行うと良好な条件が作れます。

【結果と考察】

今回使用された脱灰液は酸性溶液9施設、中性溶液9施設と二分した。酸性溶液を使用していた施設ではHE染色の時間調整をする工夫がみられ、ほとんどの施設が良好であった。

B評価の3施設は全てファルマのKCXを使用しており、脱灰コントロールが難しいのではないかと問われた。

表面脱灰のみを選択した施設では、浸漬脱灰と違い短時間で脱灰を終了させていたが、脱灰が完全には終了しておらず、切片の剥がれ(めくれ)が目立った。

組織に亀裂がみられた(比較的目立つ)施設において、酸性、中性脱灰ともに有意差はなく、他の要因(薄切環境など)が影響したと思われる。

今回の材料では24時間以内で十分な脱灰効果が得られた。長時間実施の施設では時間の短縮を図ることが可能と考えられる。

今回の精度管理調査から脱灰標本作製の結果を左右する要因としては、適切な脱灰液の選択、脱灰時間、脱灰温度であった。酸性溶液の加温使用はコントロールが難しく、室温や低温で行うことで良好な結果が得られていた。中性溶液は加温や室温でのコントロールがしやすく(長時間でも良好)、失敗が目立たなかった。

評価外ではあるが、免疫染色において中性脱灰、表面脱灰では影響が少なく、酸性溶液浸漬法にて大きな影響がみられた(Ki-67の消失)。脱灰液の選択時に注意する必要がある。

【まとめ】

参加18施設中、A判定15施設と良好な成績であった(評価○としては参加全18施設)。

ほぼ全ての施設で酸性溶液、中性溶液の脱灰液が準備されており、各施設で材料ごとに選択使用できている。脱灰液選択の標準化は取り組みやすいのかもしれない。

今回の骨髄標本作製では、切片がやや厚めの施設が多くみられた。脱灰されていても骨成分が邪魔をして薄い標本が得られにくいわけではあるが、極薄な標本作製した施設もあり、目的別(材料別)の薄切厚を自在にコントロールできるよう各施設でこれまで以上に取り組んでいただきたいと思います。

HE染色にて、少し染色時間の長過ぎる施設があった。HE染色時間の施設間差を無くすような取り組みを今後検討する必要があるのかもしれない。

【文献】

- 1) 病理組織標本の作り方 第6版 医学書院 1986
- 2) 標本道場(病理関連技術情報)
<http://www.sakura-finetek.com/doujyou/doujyou.html>