

原 著

病理組織診断における入れ墨用色素による 病理組織マーキングの有用性

長岡中央総合病院、病理部；臨床検査技師¹⁾、病理医²⁾

は せ が わ ひ で ひ ろ ¹⁾、 い か ら し と し ひ こ ²⁾
長谷川秀浩¹⁾、五十嵐俊彦²⁾

目的：病理検査に提出される組織に入れ墨用色素を用いてマーキングを行った際の標本作製の各工程における有用性ならびに作製された標本について評価を行った。

方法：色素でマーキングされた病理検査材料がHE染色標本へと至る各工程における着色耐久性ならびにマーキングされた微小検体と粘膜切除材料における検体取り扱いの簡便性と顕微鏡下で確認されるマーキングされた断端や剥離面の有用性と評価

成績：マーキングされた色素は病理組織標本作製の各工程においてその着色は保持され断端や剥離面を認識する判断材料となり適確な断面での標本作製が可能であった。また、顕微鏡下においても着色された色素は確認された。

結論：病理診断上、切除された組織の断端や剥離面における腫瘍の残存などを厳密に評価するうえでそれらの部位をマーキングし作製された標本は顕微鏡下においても確認でき病理切片上でオリエンテーションが可能であることから本色素を用いた標本作製は極めて有用と判断された。

キーワード：入れ墨用色素、Davidson marking system、病理組織標本、病理組織マーキング、切片上で
のオリエンテーション

緒 言

近年、外科的手術もQOLの向上に重点をおいた手術が行われ腫瘍組織のみが最小限に摘出される場合や早期の消化器系の腫瘍に対しては腫瘍が発生した粘膜面のみを剥離してくる内視鏡的粘膜切除術（Endoscopic mucosal resection：EMR）や内視鏡的粘膜剥離術（Endoscopic submucosal dissection：ESD）により提出される検体が病理検査室においては増加傾向にある。その結果、病理組織切片上において断端や粘膜剥離面における腫瘍残存の有無について厳密な評価が求められ病理組織標本の作製には今まで以上の繊細な技術が要求されている。しかし、再構築可能な分割切除されたEMR組織ならびに標本作製の都合から切り出し時に適当な大きさに分割する必要がある大きく剥離されたESD組織について病理医は断端と分割面を明確に区別し認識する必要がある。しかし従来、断端や剥離面示すために用いられてきた墨汁や朱墨のみでは剥離面、断端および分割面の同時標識は困難である。

したがって、包埋時ならびに顕微鏡下でも確認可能である多彩な色素でのマーキングの必要が望まれる。しかし、他の色素では各種有機溶剤に浸漬しパラフィン浸透を行う過程で脱色され包埋時において切り出し時にマーキングした適切な面の確認が困難である。または標本作製が危ぶまれるような微小検体も提出されるが、このような場合は紛失を防止する目的から確認しやすいように墨汁やヘマトキシリンなどの染色液で着色した後、サンプルパックに入れたり生検材料を入れるカセットの色を変えるなどの工夫を行いパラフィン浸透の工程に持ち込むなど極めて煩雑かつ繊細な工夫がなされてきた。

今回、我々は従来から直面してきたこれらの問題を解決すべく当初、入れ墨用色素として開発され、その後、水や有機溶剤に対する色素の耐久性や多彩なラインナップから病理組織に対するマーキング用として用いられ始めているDavidson marking system：DMS色素（Bradley products USA）の使用経験からその有用性について検討を行った。

材料および方法

検討に用いたDMS色素は赤、青、緑、黄、黒の五色である（図.1）。通常の標本作製を想定して、それぞれの色素を生検材料、内視鏡的剥離粘膜および消化器系組織に塗布し成書¹⁾に従いパラフィン包埋組織を作成した。次いでパラフィン包埋された組織を3μmの厚さに薄切しHE染色を施した標本について各製作工程における色素の着色耐久性と適確な標本作製のための必要性および顕微鏡下で確認されるマーキング色素有用性について検討を行った。

結 果

着色耐久性

病理標本作製の各工程における着色耐久性の検討を行った結果、着色後、水中にて2時間経過した時点で赤色の色素が若干水中に溶出していた。同様に着色した組織片をメタノール中にて同時間保存した組織からは色素の溶出は認められなかった。その後、メタノールによる脱水、キシロールでの置換を経てパラフィン浸透を行った結果、着色した各色素の保存性は良好と判断された（図.2）。作成されたパラフィン包埋組織を3μmにて薄切し、スライドガラスに取り伸展、乾

燥後の未染色標本においてもマーキングした各色素は肉眼で確認することが可能であった(図.3)。薄切した標本をキシロールによる脱パラ、親水後HE染色を施し顕微鏡下で観察を行った結果、着色した全ての色素を確認することが可能だった(図.4)。

生検材料への応用

微細な生検材料をDMS色素にて着色することにより検体の確認が極めて容易であった(図.5)。さらに複数の生検材料が提出された場合、それぞれを異なる色素で着色することにより一括した標本作成が可能となった(図.6)。

EMR、ESDへの応用

粘膜のみを剥離し提出された組織の剥離面を着色することにより剥離面が正確に把握できることから包埋ミスが防止でき適確な面での標本作製が可能であった(図.7)。さらに広範囲に切除されたESDなど分割し標本作製する必要のある場合、分割面と切除断端を異なる色素でマーキングすることにより標本作成の工程ならびに顕微鏡下において分割面と切除断端を正確に把握することが可能であった(図.8)。

手術例への応用

消化管の口側断端と肛門側断端をそれぞれ異なる色素で着色する事により各断端が正確に確認できるとともに複数の組織を一括し標本作成することが可能であった(図.9)。さらに乳腺や肝臓など部分切除され提出された組織に対して断端や剥離面をマーキングすることにより顕微鏡下でそれらを正確に確認することが可能であった(図.10)。

考 察

近年、増加傾向にある消化器系の早期癌に施される粘膜切除術により病理検査に提出される標本は病理検査室において短冊状に細かく細分化され、その一つ又について断端と剥離面の腫瘍残存の有無が検索されるが、細分化された組織片では粘膜面と剥離面が正確に特定できない症例もある。そのような場合においては包埋ミスから必ずしも病理医が必要とされる面での標本作製が行われていなかったことも否定できない。腫瘍の残存を病理学的に正確に判断するには診断の為に必要とされる面での標本作製が極めて重要であり適切な面で包埋操作が行われているか否かが診断の精度を左右する鍵となる。したがって病理診断の質的向上の為に標本作製を行う技師の包埋作業のミスの防止に対する対応こそが根本的に取り組まなければならない課題であると考え。今回、検討したDMS色素を用いてEMRやESDなどの剥離面や切除断端をマーキングすることにより細分化された組織片でも位置関係が把握でき病変の広がりや断端や剥離面における腫瘍残存についての厳密な評価を行う事が可能であり、その活用効果は極めて高いものと判断された。また1mm以下の微小検体の取り扱いが紛失の恐れから特に慎重を期さねばならない作業であるがDMS色素で着色することにより検体のナンバリングやパラフィン包埋処理など紛失の危険のある各作業工程での検体確認が容易となりその活用価値は極めて高いと判断された。さらに微小検体では標本として作製すべく薄切面が正確に出ているか否かの確認が極めて困難である。阿部等²⁾は適切な薄切面の確認や微小検体の確認のために

スライドガラス上の未染色の薄切標本に対しトルイジン青染色液での仮染色が有用であると報告している。従来、未染標本の組織像を知るための方法として顕微鏡のコンデンサーを下げたりコンデンサーの絞りを動かしたりして確認を行ってきたが、この方法ではある程度の組織構造は把握できるものの詳細については観察不可能であった。従来の方法と比較するとトルイジン青による仮染色標本では標本を作製する技師が作製すべき面が正確に出ているか否かについて確認するという方法としては有用である。しかし微小検体が正確に組織標本として薄切されたか否かについては最初の工程で検体をDMS色素で着色することによりスライドガラス上に拾われただけの状態で組織の存在を肉眼的に確認する事が可能で改めて仮染色を行うまでもなくパラフィンに埋没された微小検体が薄切面に出ていないなどの薄切ミスが回避できる。また通常通りに作製された標本では診断を行う病理医に対して断端や分割面などの切り出し時の情報が伝わらない事から顕微鏡下でオリエンテーションが付くような情報伝達の手段の必要性が望まれた。つまり切り出し作業を行う病理医や技師と包埋や薄切作業をはじめとする一連の標本作製に携わる技師と出来上がった標本について診断を下す病理医との間に統一した情報認識を行えるシステムを構築する必要があった。今回、検討したDMS色素は包埋時においてマーキング用の色素として着色した色素の耐久性ならびに顕微鏡下における認識度ともに必要条件を満たすものであり豊富なラインナップを揃えるDMS色素は切り出された一組織に対し口側断端、肛門側断端、剥離面などという複数の情報を一括して病理組織標本上に表示することが可能であり顕微鏡下においてそれらの情報が色素の色として確認でき標本作製に携わる技師と診断を行う病理医との間で共通認識ができる。さらに包埋ミスや微小検体の紛失防止などヒューマンエラーの防止に繋がるだけでなく複数検体の一括処理についても活用できコストの低減化にも貢献できる。適正な病理標本の作製は病理診断の質的向上に直結することから本色素の活用は極めて有用であるものと判断された。

文 献

1. 病理技術研究会, 病理標本の作り方, 東京: 文光堂; 1992; 19-30.
2. 阿部仁、橋本悠子、中島清聖、鈴木美那子、草刈悟, トルイジン青染色液を用いた面出し確認のための簡便な方法, 病理技術研究会誌, 2008; 71(2): 60-63.

Original Article

Usefulness of tissue marking by tattoo dyes for both the histological tissue processing and the tissue orientation during microscopic diagnosis.

Nagaoka Central General Hospital, Department of pathology; Medical technologist¹⁾, pathologist²⁾
Hidehiro Haegawa¹⁾, Toshihiko Ikarashi²⁾

Objective: We examined the useful application of tattoo

dyes for histological tissue processing.

Study design : Several formalin-fixed surgical specimens were stained with the dyes. We checked changes of the stains of dyes during and after routine tissue processing. Davidson marking system, Bradley products, USA, was used as tattoo dyes.

Results : Dye marking was kept throughout tissue processing and microscopic examination for orientation. The dyes were most effective when applied to smallest and difficult to find tissue. Cut ends of many step-sectioned specimens from wide endo-

scopic mucosal resection tissue were easily oriented with this staining procedure. Pathologist was able to confirm the dyes by microscope.

Conclusion : Tissue staining with tattoo dyes was very useful for medical technologists to handle various specimens. These stains were, furthermore, effective for histological diagnosis with microscopic examination.

Key Words : dyes for tattoo, Davidson making system, tissue marking, tissue processing



図.1 Davidson marking system

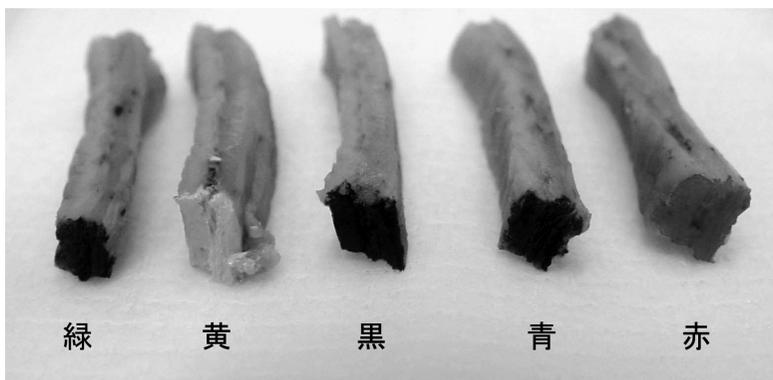


図.2 パラフィン浸透後の DMS 色素

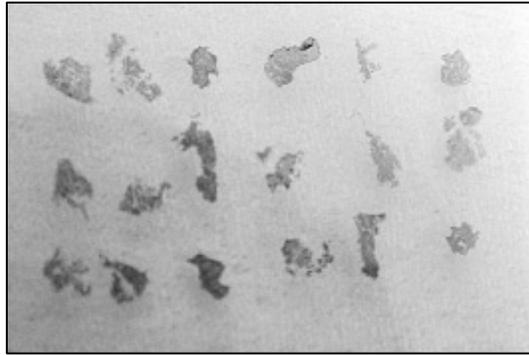
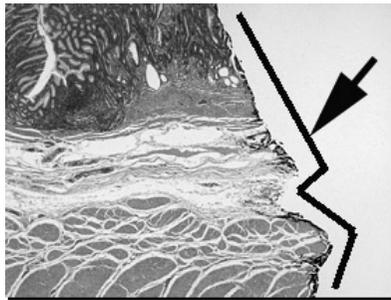
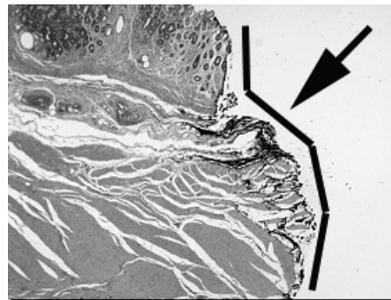


図.3 3 μ m に薄切された未染色標本 (生検材料)

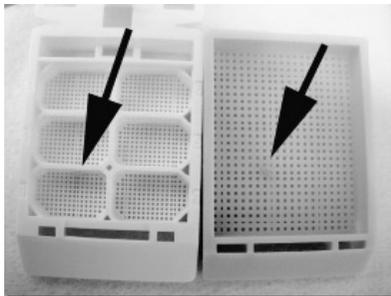


緑

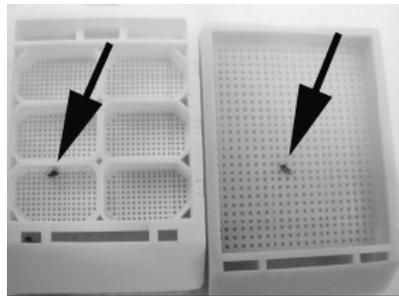


黄

図.4 顕微鏡下での確認状況 (H E 染色)

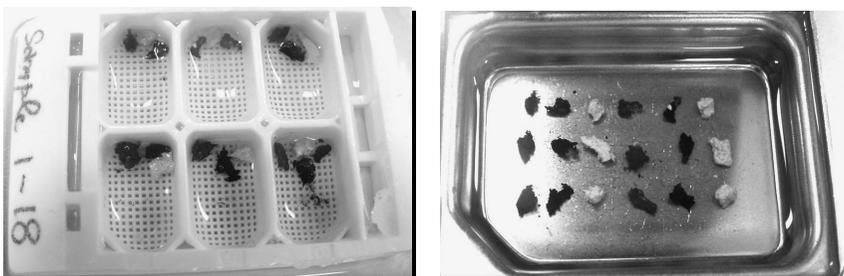


DMS色素による着色なし



DMS色素による着色あり

図.5 微小生検材料への活用例



検体処理作業時

パラフィン包埋作業時

図.6 複数の生検材料における活用例



粘膜剥離面をDMS色素にて黒く着色することにより正確に粘膜割面の標本作製が可能とされる

図.7 粘膜切除標本における活用例

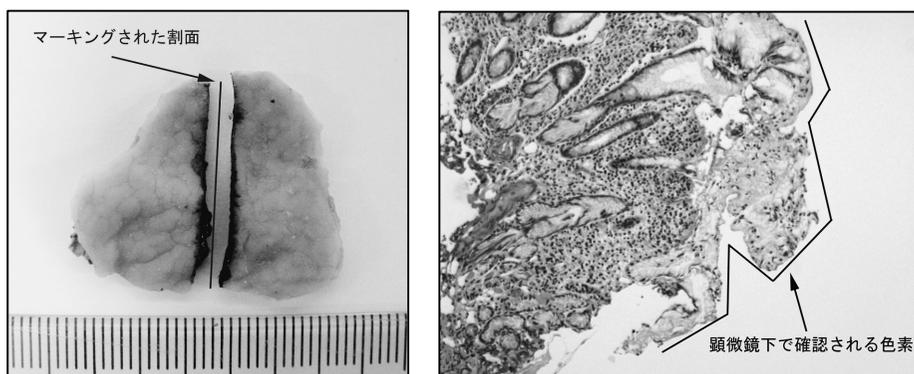


図.8 分割された粘膜剥離組織と分割面の組織像

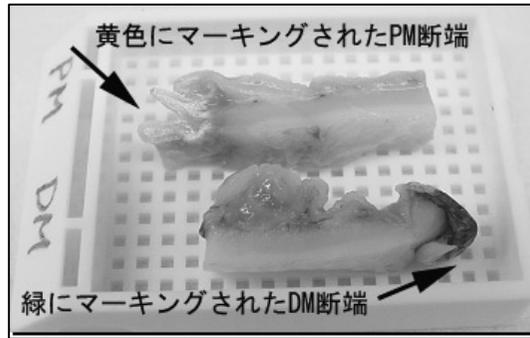


図.9 一括に検体処理が可能となった口側断端と肛門側断端

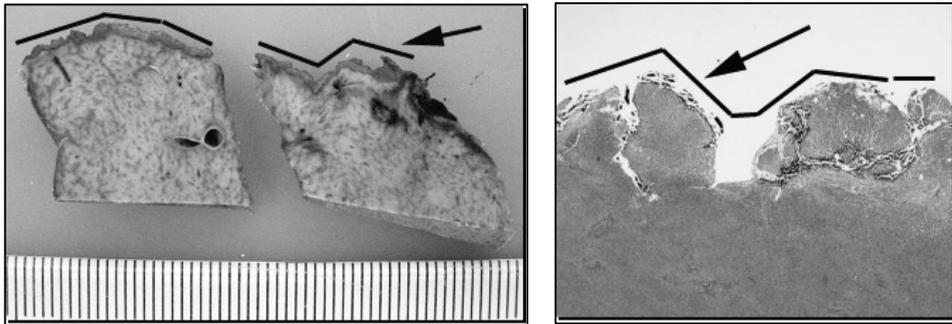


図.10 DMS色素でマーキングされた肝臓の切除断端とその組織像 (H E 染色)

2009/02/02 受付 (2008-36)