

愛知県臨床検査標準化ガイドライン

# 「Papanicolaou 染色のガイドライン」

第 1 版  
平成 2 0 年 7 月

**愛知県臨床検査標準化協議会**

AiCCLS : Aichi Committee for Clinical Laboratory Standardization

## 標準化に向けて

愛知県臨床検査標準化協議会

会 長 大野 和美

急速な勢いで高齢化および少子化が進み、予測よりも早く人口減少が始まった。人口構成の変化により日本の国民皆保険制度の維持は崩壊の危機を迎えている。ゆえに社会保障制度全般の根本的な見直しが迫られている。

一方で、科学技術の発展により医療を取り巻く技術もめまぐるしく進歩している。国民はこの医療技術の進歩を享受できて、しかも経済的である医療サービスを受けたいと考えている。これらの医療サービスを提供するのは医師をはじめとする医療スタッフであるが、ここに経済性と効率を持込むと、真の医療サービスは低下する。

となると、医療における経済効率は、技術の向上で受け止めることの出来る様々な検査に求めることが可能であると思われるが、その中で臨床検査は、経済的効率化と医学的効率化を並行して進めることの容易なものの一つであろう。但し、そこには、「いつ」、「どこで」、「だれが」、「なにを」、「どの方法で」検査しても、患者さんへのサービスが低下しないことが重要である。

臨床検査に精度管理がとくに大事なことは「検査の質」の維持を図るからだが、生活習慣病対策として今後ますます重要視される保健事業の中では、健診受診者が受け取る検査値および検査結果については、標準化されていることが「サービスの質」としてもう一つの重要な事項である。

子宮がんや肺がんの集団検診で行われている細胞診検査は受診者への侵襲性が低い検査で、また癌診断にとっても重要な検査法のひとつである。この細胞診検査に用いられている染色法がPapanicolaou 染色であり、染色動態によって判定が違ってはならない。標準化がすすみ精度が向上することを祈念して「Papanicolaou 染色のガイドライン」の完成を祝したい。

2008年7月

## 発刊にあたって

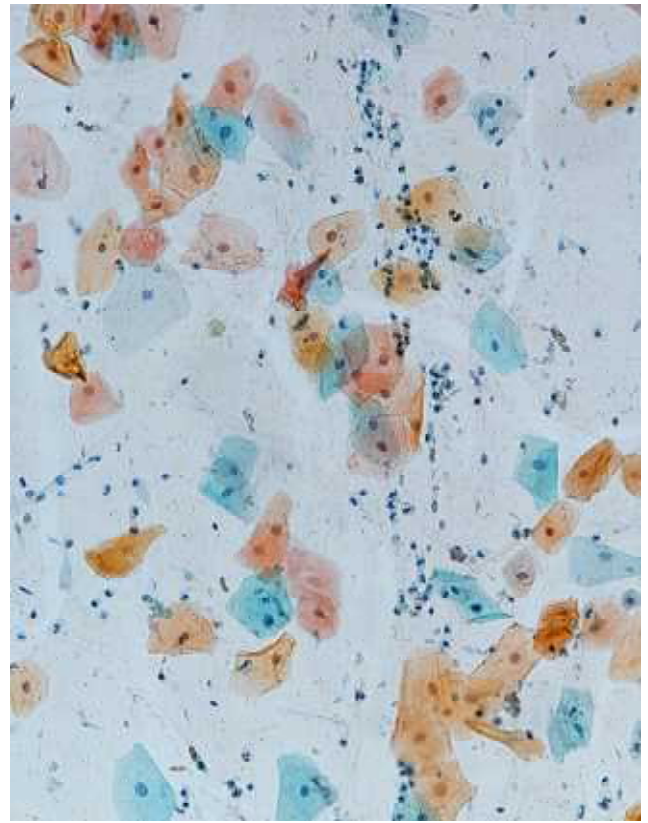
愛知県立看護大学 病理学

越川 卓

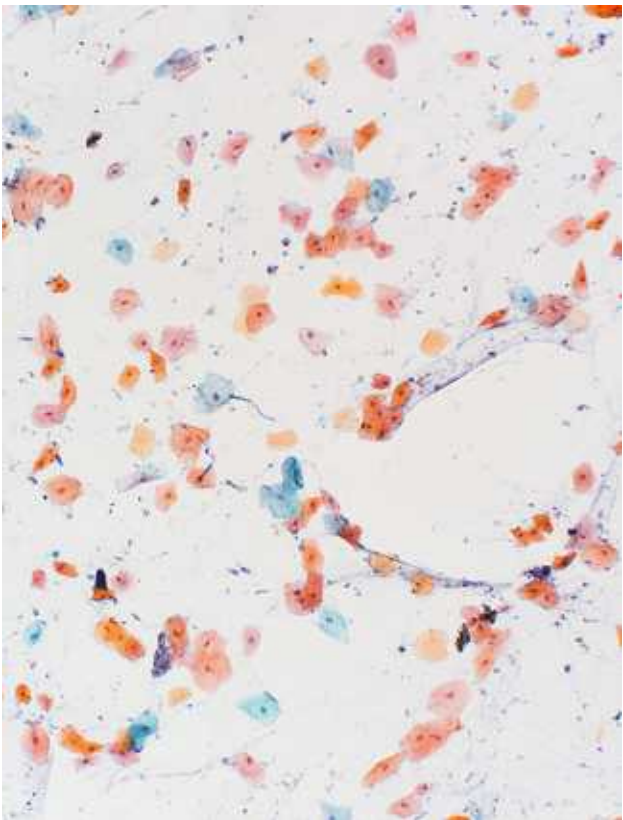
パパニコロウ染色はメイ・ギムザ染色と共に細胞診検査に欠くことのできない代表的かつ重要な染色法であります。その染色結果は施設によってマチマチであり、セカンドオピニオンなどで他施設の標本を見る機会があると、これが同じパパニコロウ標本だろうかと驚くことも少なくありません。細胞診において良性か悪性かという重要な判断をするにあたって、その判断材料であるパパニコロウ標本の染まり具合が違っていたのでは診断結果に相違が生じることも不思議なことではありません。従って、細胞診検査の精度管理にあたっては、まずパパニコロウ染色の染色結果について施設間の格差を是正し標準化を行うことが非常に重要であります。この課題は大変基本的で重要なものなのでありますが、一方で非常に解決が難しいものであるため、今日まで積極的な取り組みが行われず放置されてきたというのが実情であります。標準化の基準となるべき“良いパパニコロウ標本”がどのようなものであるのかということについて十分なコンセンサスが得られていないことが、パパニコロウ染色の標準化を困難にしている大きな理由であります。では“良いパパニコロウ標本”とはどのようなものなのでしょうか？ 元来パパニコロウ染色は扁平上皮細胞の観察あるいは扁平上皮癌の診断に適した染色法として開発されたものですから、概念的には扁平上皮細胞の分化の指標となるライトグリーン、エオジン、オレンジGによる細胞質の染色性がバランス良く適正に表現されているものが良い標本ということになります。このように言葉で表現すると簡単なのですが、実際の標本では良いと思う標本にかなりの個人差があり、標準化の妨げとなっている訳であります。そこで今回のガイドライン作成にあたっては、作成委員の皆さんの多大な尽力を得て、まずは“良いパパニコロウ標本”の基準作りから始め、その上で染色工程において染色結果に影響を与える様々な要素を細かく分析し、パパニコロウ染色に関わる詳細なノウハウを総括することによって、パパニコロウ染色の標準化という難しい課題に対する一定の指針を作成することが出来ました。そういう意味でこのガイドラインは非常に価値のあるものであると考えております。監修者といたしましては、出来るだけ多くの施設においてこのガイドラインが日常の細胞診業務における指針として活用されることを心から願っております。



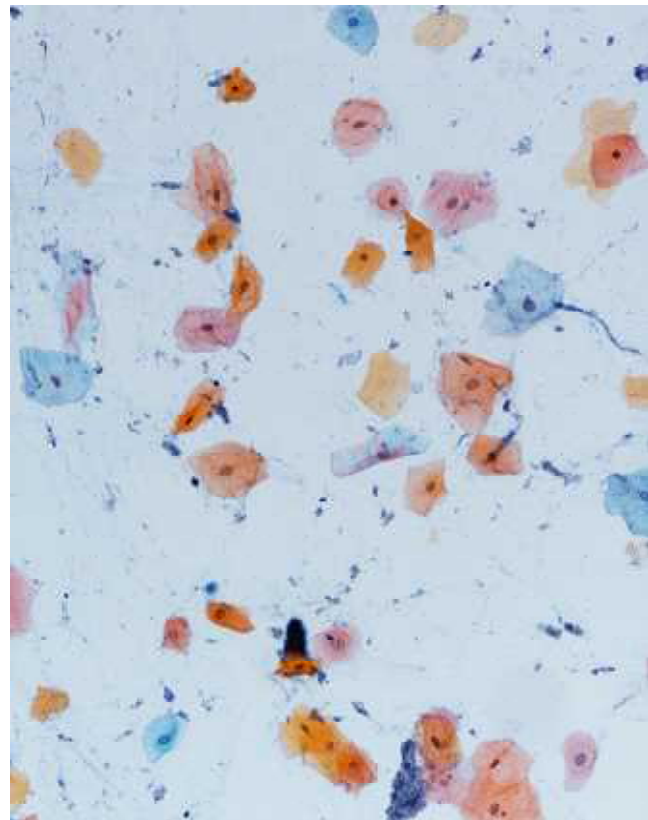
画像 1 -a : 染色結果に関するアンケートにおいて最も支持された染色結果 (X10)



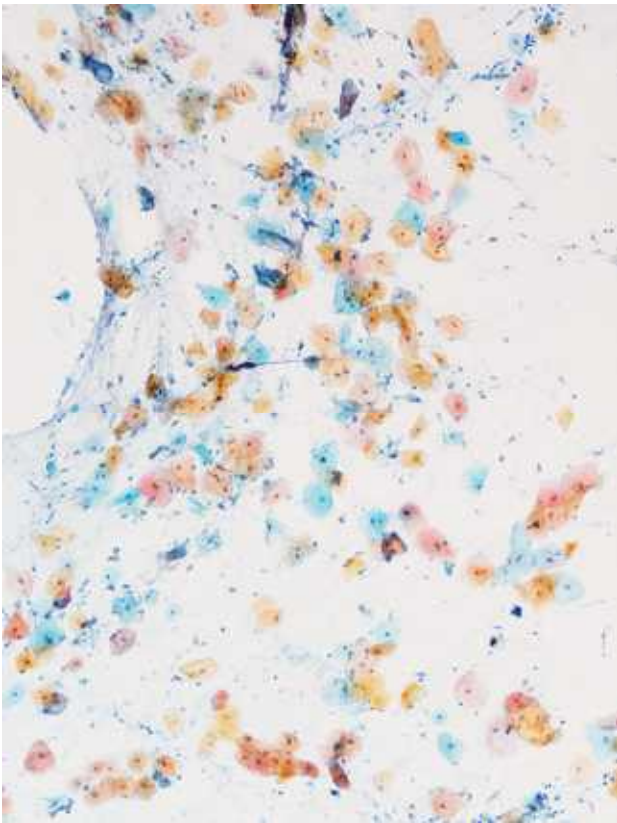
画像 1 -b : 染色結果に関するアンケートにおいて最も支持された染色結果 (X20)



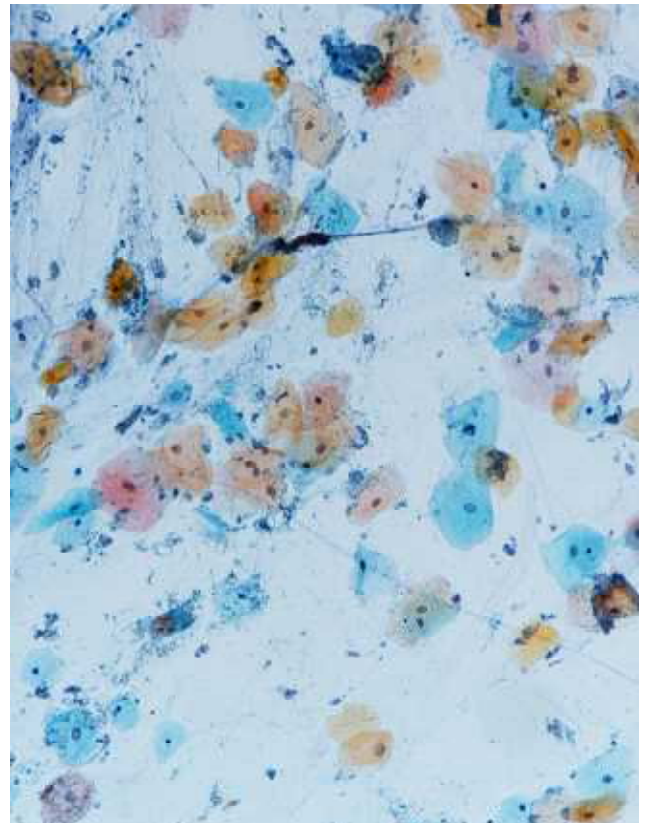
画像 2 -1 -a : 本ガイドライン推奨染色工程 1  
で染色した染色結果 (X10)  
(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)



画像 2 -1 -b : 本ガイドライン推奨染色工程 1  
で染色した染色結果 (X20)  
(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)



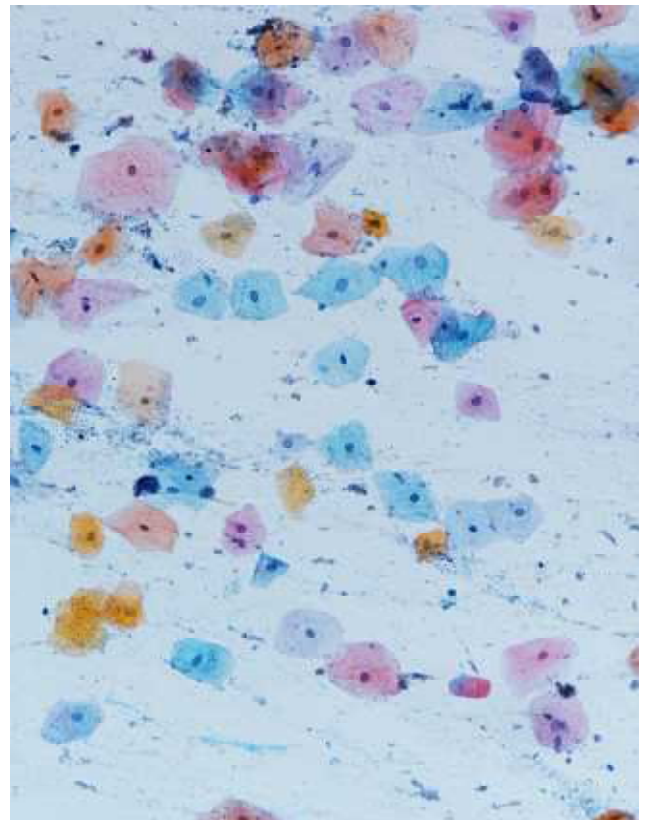
画像 2 -2-a : 本ガイドライン推奨染色工程 2  
で染色した染色結果 (X10)  
(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)



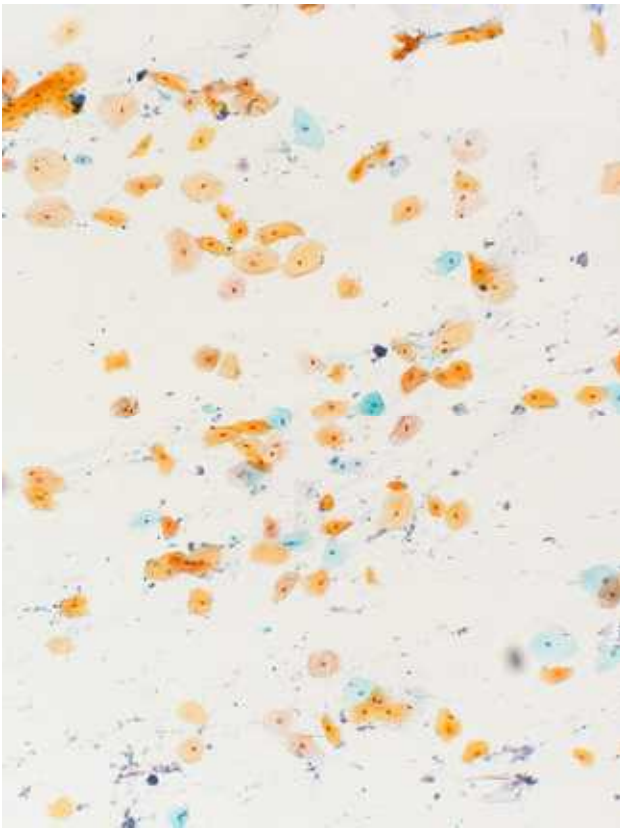
画像 2 -2-b : 本ガイドライン推奨染色工程 2  
で染色した染色結果 (X20)  
(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)



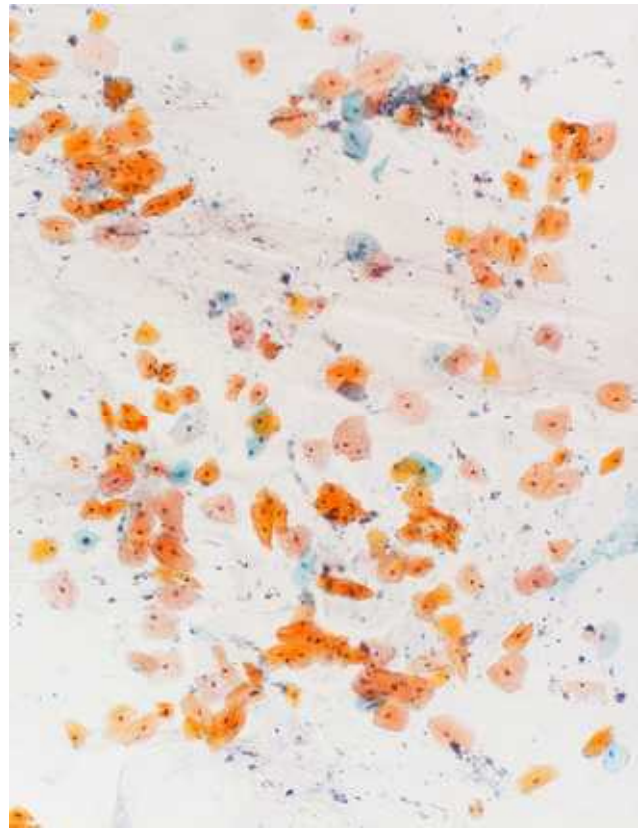
画像 3 -a : 参考染色工程にて染色した染色結果  
(X10)(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)



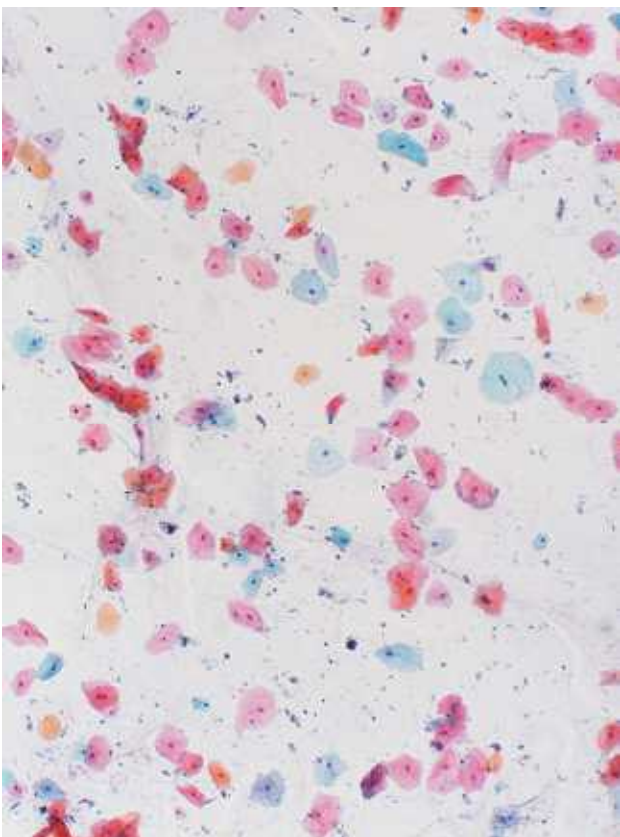
画像 3 -b : 参考染色工程にて染色した染色結果  
(X20)(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)



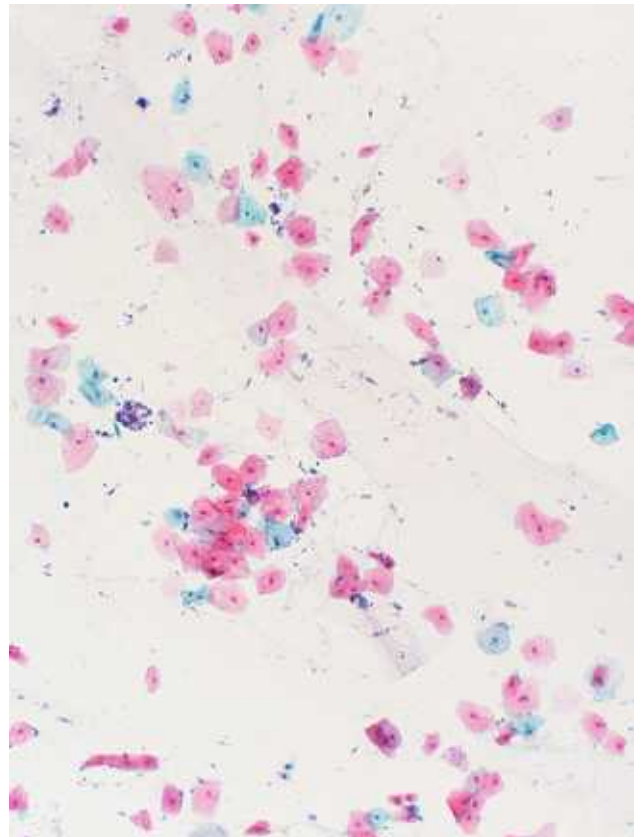
画像 4 : 内部精度管理法コントロール 1  
(X10)(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)



画像 5 : 内部精度管理法コントロール 2  
(X10)(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)

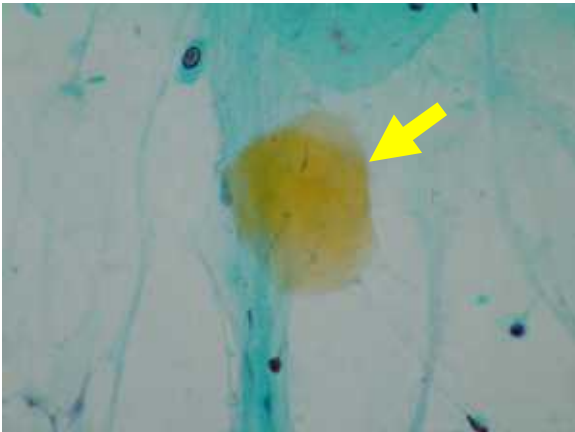


画像 6 : 内部精度管理法コントロール 3  
(X10)(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)

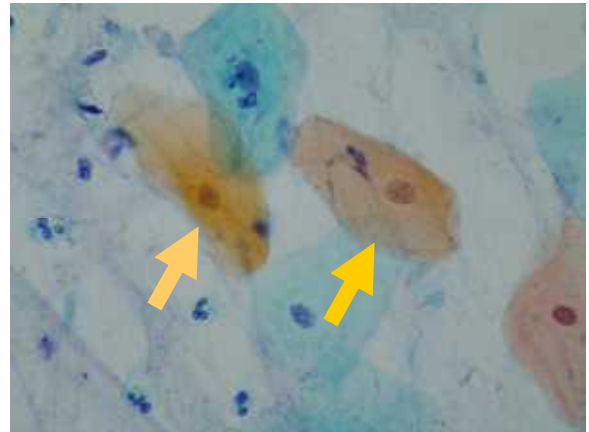


画像 7 : 内部精度管理法コントロール 4  
(X10)(画像 2 ~ 画像 7 は同一検体)

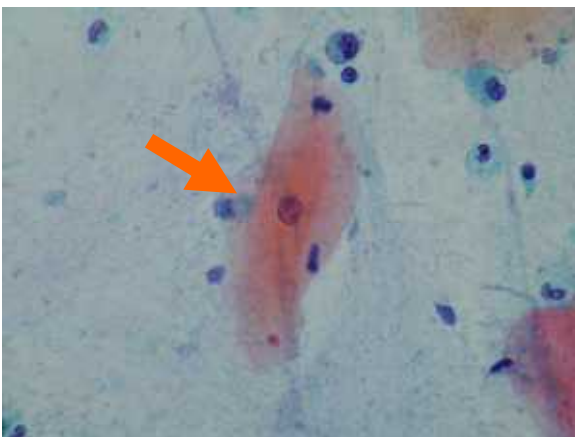
扁平上皮細胞の染色結果による分類（6種類）



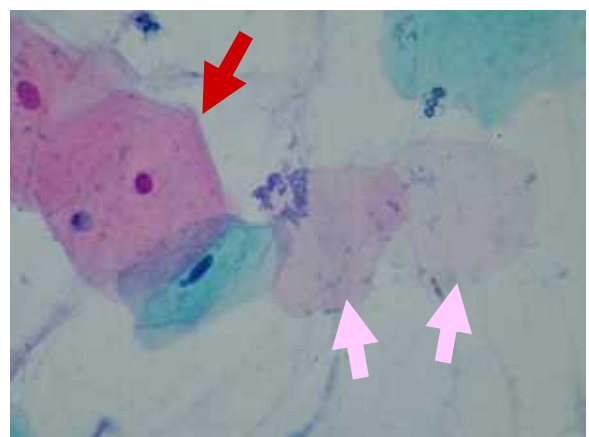
画像 8



画像 9



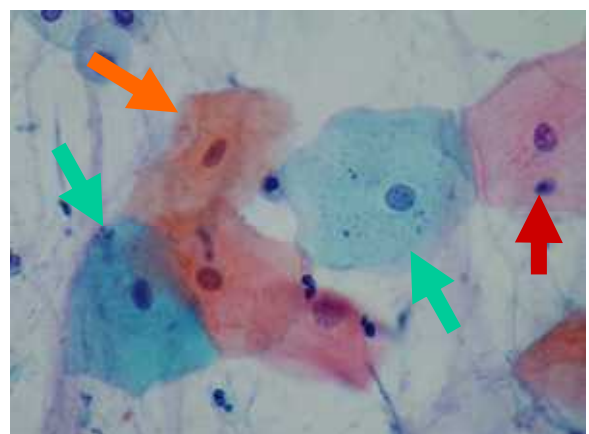
画像 10






画像 11






画像 12



画像 13

-  : 黄色を呈する細胞
-  : 黄色がかった橙色を呈する細胞(黄橙色)
-  : 赤色がかった橙色を呈する細胞(赤橙色)

-  : 濃い赤色を呈する細胞
-  : 薄い赤色を呈する細胞
-  : 緑色を呈する細胞

## 目次

はじめに	1
. 指針	
1 . Papanicolaou 染色標準化のフローチャート	2
A ) 自施設の現状把握	3
B ) 自己評価	3
C ) 染色環境、染色工程の見直しおよび変更	3
D ) 内部精度管理の実施および染色環境および染色工程の維持・管理	3
E ) 外部精度管理調査への参加（客観的評価）	3
F ) 自施設染色結果の向上	3
2 . AiCCLS 推奨 Papanicolaou 染色染色工程	4
A ) 本ガイドラインで推奨する染色工程	5
B ) 参考染色結果が期待できる染色工程	5
. 染色結果をコントロールするために	
1 . Papanicolaou 染色標準染色結果	
A ) 暫定的な標準染色結果の設定	7
B ) 今後の課題	7
C ) 参考染色結果	8
2 . Papanicolaou 染色液に使用される染色液や試薬の性質について	
A ) ヘマトキシリン染色液	8
B ) ヘマトキシリンの分別	9
C ) 色だし	9
D ) 細胞質染色（OG-6 染色液、EA-50 染色液）	11
E ) Papanicolaou 染色におけるリンタングステン酸の役割	15
F ) Papanicolaou 染色におけるアルコールの種類や濃度の影響	16
3 . Papanicolaou 染色の主要染色工程におけるアドバイス	
A ) 染色工程全般	16
B ) 核染色・分別	17
C ) 色だし	18
D ) 細胞質染色	19
エオジン優位な染色結果をオレンジ G 優位に変えるために	19
オレンジ G 優位な染色結果をエオジン優位に変えるために	21
E ) 各種アルコールの染色結果への影響	24
F ) 透徹・封入	25
G ) 染色工程試薬や染色液の劣化	26



. 内部精度管理法

1 . 概要	27
2 . コントロール標本を作製する検体について	27
3 . コントロール標本用未染色標本の作製および保存について	27
4 . 試薬および染色工程について	27
5 . コントロール標本の作製	27
6 . 日差再現性を評価する標本の作製	29
7 . 扁平上皮細胞の染色態度の分類方法	30
8 . 評価方法	30

付録

参考文献	32
編集後記	33

はじめに

わが国の細胞検査において Papanicolaou 染色は基本の染色法として欠くことのできない存在である。しかし染色工程が長く、煩雑なため染色結果に施設間格差が生じやすい染色であることも事実である。実際、学会や講習会などにおいて他施設の標本からそう感じている人も多いのではないかと推測する。

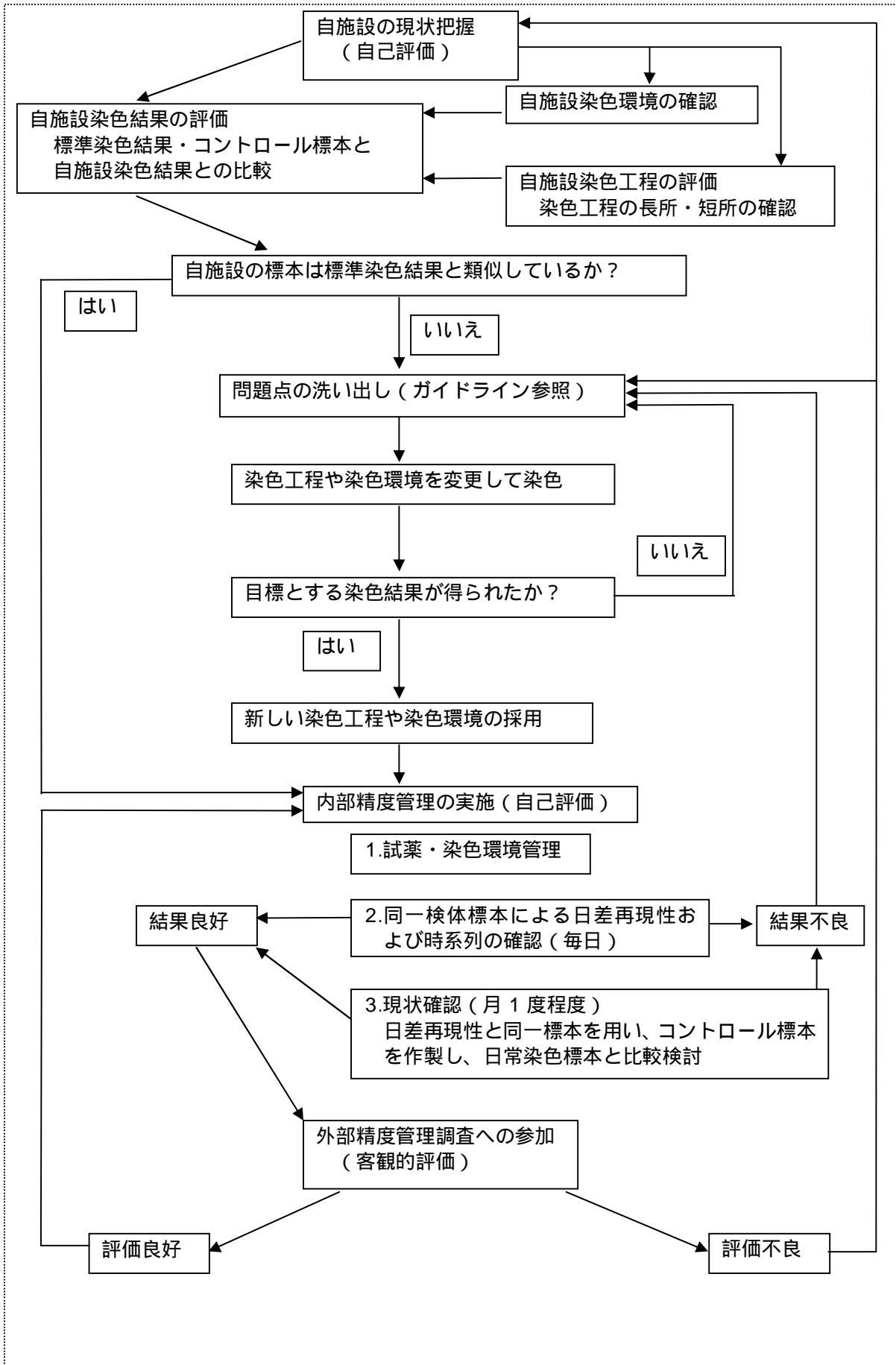
近年各種検査データを複数の医療機関で共有しようとする動きの中で、細胞検査標本も例外ではなくセカンドオピニオンや他施設への患者紹介に伴う標本の貸し借りなどが増加しており、Papanicolaou 染色の染色結果の施設間格差の是正は必要不可欠と考える。

そこで愛知県臨床検査標準化協議会（AicCLS）の細胞検査部門では、愛知県臨床衛生検査技師会細胞検査研究班（以下、愛臨技細胞班）や日本細胞診断学推進協会細胞検査士会愛知県支部（以下、細胞検査士会愛知県支部）に協力を要請した。これに対して、愛臨技細胞班は Papanicolaou 染色の染色工程に関する検討（この検討結果の一部は第 4 回・第 5 回中部医学検査学会で報告済み）を、細胞検査士会愛知県支部は染色結果に関するアンケート（アンケート結果は第 26 回日本臨床細胞学会東海連合会総会で報告済み）をそれぞれ実施した。前者の検討結果から同一の染色工程で染色を行っても染色結果が同じになるとは限らないため、本ガイドラインでは標準染色工程は参考程度として強要はしないこととした。また、検査技師は技術者であることから独創性がなければ技術力の進歩はないと考えるので、染色工程については各施設の独自性を尊重することとし、染色結果をコントロールする技術力の習得をガイドラインの目標とすることにした。従って、ポイントとなる染色工程ごとに染色結果に影響する重要事項の確認や問題点およびそれを改善するための方法、アドバイスを記載することを軸として本ガイドラインを編集した。それだけでは目標とすべき到達点が曖昧なので、細胞検査士会愛知県支部が実施した染色結果に関するアンケートにおいて、最も多く支持された染色結果を暫定的に標準染色結果とした。これはすべての施設が納得できるものとは言えないため、今後も引き続き検討していく必要がある。しかし、今後標準染色結果がどのように変更されようとも、本ガイドラインが目標とした染色結果をコントロールする技術力を習得できれば、それぞれの施設において対応は充分可能と考える。

また、日々の染色結果における僅かな変動が、長い期間では大きな変動になることを避けるため、従来の試薬や染色工程を維持・管理する内部精度管理以外に染色結果に対する評価を加えた内部精度管理法についても提案した。

日常業務の中でわずらわしさが増えることと推察されるが、日々の努力が細胞検査の基礎を固め、更なる発展を推進してくれるものと信じる。そしてすべての施設が Papanicolaou 染色の染色結果を自由にコントロールする技術力を習得し、施設間格差が是正されることを切に希望する。そのためにこのガイドラインが役立てば幸いである。

図1 . Papanicolaou 染色標準化のフローチャート



## . 指針

### 1 . Papanicolaou 染色標準化のフローチャート（図 1 参照）

はじめに述べたように、Papanicolaou 染色の標準化が不可欠な時代となってきたことをよく理解し、標準化に向け努力していただきたい。それには自施設の現状把握はもちろんのこと、標準染色結果に近づけたり、施設内変動を少なくしたりするための技術力さらには良好な状態を維持する管理能力が必要である。以下に、標準化への流れと注意事項を示す。

#### A) 自施設の現状把握

染色結果：標準染色結果と後述する内部精度管理法によるコントロール標本および自施設標本の染色結果とを比較し、自施設の現状を把握する。

染色工程：推奨染色工程と比較し、自施設の現状を把握する。

染色環境：試薬管理や機器のメンテナンスだけでなく、試薬の特性や pH・室温・水質・水温など染色に影響を及ぼしそうな事項を確認する。

#### B) 自己評価

現状把握を基に本ガイドラインを参考にして染色工程や染色環境の差による染色結果への影響を認識し、自施設の長所および短所を把握する。

#### C) 染色環境、染色工程の見直しおよび変更

自己評価で得られた自施設の長所を生かしながら短所は是正する。

また、自施設標本が標準染色結果に類似していない場合は、自己評価を基に標準染色結果に類似した標本作製できるよう染色環境や染色工程を変更する。

#### D) 内部精度管理の実施および染色環境および染色工程の維持・管理

試薬管理や機器のメンテナンスだけでなく、本ガイドラインを参考に染色結果についても内部精度管理を実施する。また、染色環境や染色工程の維持・管理を徹底する。それぞれにマニュアル等を作成し個人差をなくす努力をする。

#### E) 外部精度管理調査への参加（客観的評価）

外部精度管理調査を利用し、自施設の運用について客観的な評価を得る。

#### F) 自施設染色結果の向上

外部精度管理調査の結果を基に問題点があれば改善する。また、新たな知識習得に励み自施設の染色結果向上に努力する。

表 1 : AiCCLS 推奨および参考 Papanicolaou 染色染色工程

工程	染色工程	説明	推奨工程 1	推奨工程 2	自施設	参考工程
1	80% A L	親水	1 分	1 分		1 分
2	70% A L		1 分	1 分		1 分
3	流水水洗		1 分	1 分		1 分
4	蒸留水		1 分	1 分		1 分
5	ヘマトキシリン	核染色	2 分	2 分		2 分
6	流水水洗		1 分	1 分		1 分
7	0.5%塩酸 70% A L 溶液	分別	30 秒	30 秒		30 秒
8	流水水洗		1 分	1 分		1 分
9	温水	色だし	5 分	5 分		
10	流水水洗		1 分	1 分		
11	70% A L	脱水	1 分	1 分		1 分
12	80% A L		1 分	1 分		1 分
13	95% A L		1 分	1 分		1 分
14	OG-6	細胞質染色	2 分	2 分		2 分
15	95% A L	分別	1 分	30 秒以下 *2		30 秒以下*2 or 1 分
16	1%リントングステン酸 95% A L 溶液	定着		1 分		1 分
17	95% A L	分別	1 分	1 分		1 分
18	0.025%アンモニア*1 95% A L 溶液	分別・色だし				1 分
19	95% A L	分別	1 分	1 分		1 分
20	EA-50	細胞質染色	3 分	3 分		3 分
21	95% A L	分別	30 秒	30 秒		30 秒
22	95% A L		30 秒	30 秒		30 秒
23	95% A L		30 秒	30 秒		30 秒
24	100% A L	脱水	1 分	1 分		1 分
25	100% A L		1 分	1 分		1 分
26	100% A L		1 分	1 分		1 分
27	透徹剤	透徹	1 分	1 分		1 分
28	透徹剤		1 分	1 分		1 分
29	透徹剤		1 分	1 分		1 分
30	封入	封入				

\* 1 25%アンモニア水を使用し調製。

\* 2 使用する OG-6 染色液によって最適な時間配分を検討する必要あり。

A L : アルコール                      はその工程を省くことを意味する。

## 2 . AiCCLS 推奨 Papanicolaou 染色染色工程

表 1 に AiCCLS 推奨の染色工程および参考染色工程を提示する。推奨染色工程は暫定的な標準染色結果（画像 1・2）（詳細は -1-A 参照）に類似の染色結果を、また参考染色工程は参考染色結果（画像 3）（詳細は -1-C 参照）に類似の染色結果を得ることが期待できる。しかしこれらの染色工程を用いても、各施設における染色試薬、染色環境などの違いにより必ずしも期待通りの染色結果を得ることができるとは限らない。その場合は本ガイドラインを参考に染色工程の工夫および改良が必要である。

### A ) 本ガイドラインで推奨する染色工程

細胞検査士会愛知県支部が実施した染色結果に関するアンケートで最も支持された染色結果の染色工程を基本に、愛臨技細胞班の実施した「Papanicolaou 染色の染色工程に関する検討」の結果などを踏まえて再構成したものである。画像 1・2 の染色結果と類似の染色結果が期待できる。オレンジ G の分別にアンモニアアルコール溶液を使用しない場合、OG-6 染色液のオレンジ G 含有量により染色結果の印象が左右されるため、2 種類の染色工程を用意した。

#### 推奨染色工程 1

- ・ オレンジ G 含有量が多い OG-6 染色液を使用する場合

推奨染色工程は暫定的な標準染色結果（画像 1 のような比較的オレンジ G 優位の染色結果）を目指しているため、オレンジ G を分別し過ぎないようにしなければならない。推奨染色工程 1 ではオレンジ G を 95% アルコール 3 槽で分別するため、オレンジ G の細胞質内への浸透度と結合強度が強めとなるオレンジ G 含有量が多い OG-6 染色液を使用している場合に最適な染色法である。

#### 推奨染色工程 2

- ・ オレンジ G 含有量の少ない OG-6 染色液を使用する場合

オレンジ G 含有量の少ない OG-6 染色液を使用した場合、推奨染色工程 1 ではオレンジ G が分別され過ぎてしまう程、オレンジ G の細胞質内への浸透度と結合強度が弱い。推奨染色工程 2 では OG-6 染色液直後の 95% アルコールでの分別は 30 秒以下にして、その後 1% リンタングステン酸 95% アルコール溶液にてオレンジ G と細胞質蛋白質との結合強度を増大させ、分別されにくい状態にすることが暫定的な標準染色結果（画像 1 のような比較的オレンジ G 優位の染色結果）を得るために必要である。

### B ) 参考染色結果が期待できる染色工程

本ガイドラインで暫定的に定めた標準染色結果の課題であるオレンジ G の分別を目的に考案した染色工程を紹介する。これは退色などの標本保存性（現時点で自験例では 22 ヶ月間は通常染色法との差を認めない）や細胞などの染色結果について検討の余地があることをご理解のうえ、実施していただき評価していただければ幸いである。

## 参考染色工程

- ・ オレンジGを最適に分別するためにリタングステン酸とアンモニアを併用する方法

酸性条件下でオレンジGは細胞質蛋白質と強く結合するが、細胞質構築密度の差により結合の強度ないし分別されやすさに違いがあり、オレンジGの分別過程でアルカリ性条件下にすると結合強度の低いもの、もしくは構築密度が疎の細胞質からオレンジGの分別が起こることを利用して一定レベルのオレンジGの分別を促す方法である。OG-6染色液にて染色後に、まず1%リタングステン酸95%アルコール溶液(pH2程度)に浸漬し、次に0.025%アンモニア95%アルコール溶液(25%アンモニア水にて使用時調製:pH10程度)に浸漬することで、リタングステン酸(強酸性条件下)でオレンジGの染まるべき場所には強固な結合を形成させ、次のアンモニア(アルカリ性条件下)でオレンジGの染まるべきでない場所から余分なオレンジGの分別を促すとともにリタングステン酸自体も細胞から分別することを期待したものである。あえてオレンジGの分別抑制とオレンジGの分別促進の相反する作用を染色工程に導入することによりオレンジGとエオジンが共存する環境を作ることができた。また、オレンジG分別に利用する0.025%アンモニア95%アルコール溶液にて核の色だしもできるため核染色後の色だしはあえて実施しなくても問題なく、染色工程の工程数は推奨染色工程と同じである。

・染色結果をコントロールするために

## 1 . Papanicolaou 染色標準染色結果

### A) 暫定的な標準染色結果の設定

施設間格差ができてしまっている現状を考えると、誰もが認める標準染色結果の設定は非常に困難である。しかし、目標とすべき染色結果がないと到達点が曖昧になってしまう可能性がある。そこで細胞検査士会愛知県支部が実施した染色結果に関するアンケートを基に最も支持された染色結果を暫定的に AICCLS 推奨の標準染色結果とすることにした。画像 1 としてアンケートで実際に使用した画像を提示する。この画像を後述する内部精度管理法で評価すると表層～中層細胞はオレンジ G、オレンジ G とエオジンの混合色、エオジン、ライトグリーンに染まっているが、オレンジ G とエオジンの混合色（黄橙色：画像 1 0 > 赤橙色：画像 1 1）が主体を占める。このためエオジン単独の色調をとるものはわずかであり、オレンジ G の分別の必要性が示唆される。

注意) オレンジ G 優位な染色結果とエオジン優位な染色結果という表現について

暫定的な標準染色結果は後述する内部精度管理法で評価すると、表層～中層細胞はオレンジ G、オレンジ G とエオジンの混合色、エオジン、ライトグリーンに染まっているが、オレンジ G とエオジンの混合色（特に黄橙色）が主体を占める。このためエオジン単独の色調をとるものはわずかである。このような色調を本ガイドラインではオレンジ G の優位な染色結果と表現する。（例は画像 1 ないし 2 である。画像 4・5 はさらにオレンジ G が過剰に染色された極端な状態である。）逆に主体を占める色素がオレンジ G に代わってエオジンの場合はエオジン優位な染色結果と表現する。（例は画像 6・7 である。特に画像 7 は OG-6 染色液を使用しないで EA-50 染色液のみで染色したためエオジンとライトグリーンのための色調となる。）

オレンジ G 優位な染色結果を暫定的な標準染色結果とした関係上、それを基本として染色工程変更によりエオジン優位とまでは言えないが、オレンジ G とエオジンの混合色の中で赤橙色の割合が増えるなどの結果を得られる場合は、染色工程変更前の染色結果からみてエオジンが強調される、またはエオジン優位度が増すなどと表現をする。

画像 1～7 を観察すると、同一検体標本における Papanicolaou 染色ではライトグリーンに染まる細胞は染色液や染色工程を変更しても、数的にあまり変動しない。よって、ライトグリーンに染まっていない細胞におけるオレンジ G とエオジンの占有率の変動により染色結果の印象が変化することになる。

### B) 今後の課題（理想的な標準染色結果を求めて）

標準染色結果の考え方としては、解剖学的な扁平上皮細胞の分類と染色結果を相関させる方法と細胞内構築密度に最適な色素が入るように染色を施す方法があると思われる。理想としては両者の染色結果が一致することであるが、実際にはかなり異なると考えられる。前者は扁平上皮細胞の角化した細胞をオレンジ G で、表層～中層細胞をエオジン、ライトグリーンで染めることになる。このような染色結果にすることは可能と思われるが、扁平上皮細胞が成熟していく段階



の細胞内構造密度は多種多様である可能性が高いため、やや作られた染色結果という感は否めない。後者は前者と違い表層～中層細胞がオレンジ G、オレンジ G とエオジンの混合色、エオジンなどで染まり多彩な染色結果となり実際の扁平上皮細胞の成熟を反映した色調が得られると思われる。しかし、すべての扁平上皮細胞の細胞内構築密度を客観的に把握できないため（但し、後述の内部精度管理法におけるコントロール標本の評価方法でおおまかに可能と考えられる）、実際に最適な色素が入っているかどうかの判定が困難である。また、現行の多くの施設が実施している染色工程では暫定的な標準染色結果のように、オレンジ G の影響を受けすぎてエオジン単独の色調が乏しくなる傾向があることから、細胞に最適な色素を選択させるためにはオレンジ G の分別も必要となるであろう。どちらの考え方も解決すべき点があり、またどちらの考え方を推奨するかという根本的な問題もある。この件に関心を持ってもらうため、あえて今後の課題として記載した。

### C) 参考染色結果

暫定的に定めた標準染色結果の課題であるオレンジ G を最適に分別するために考案した方法で染色した染色結果を画像 3 として提示する。画像 1 の染色結果と比べて、課題であったエオジン単独の色がしっかり表現できただけでなく、個々の色にメリハリを持たせながら多彩な色調を表現することができた。また、同一の染色工程（使用する染色液により若干の時間配分の変更が必要）で染色すればどのメーカーの染色液を用いても、比較的類似性の高い染色結果が得られた。この染色方法の導入によりオレンジ G を最適に分別できるだけでなく、染色結果の統一化も期待できる。さらに扁平上皮細胞の細胞質内構築密度を反映した色調が表現されている可能性についても期待が持てる。このように評価に値する項目が多いが、染色工程変更による標本保存性や細胞などの染色結果の変化に対する診断への影響について検討の余地があるため参考提示とした。理想的な標準染色結果の問題と合わせて今後の検討課題としたい。

## 2 . Papanicolaou 染色に使用される染色液や試薬の性質や組成について

ここでは Papanicolaou 染色に使用される染色液や試薬の性質を文献や検討結果を基に述べる。さらに詳しい原理等は成書を参照されたい。

### A) ヘマトキシリン染色液

ヘマトキシリン自身は無色ないし白色であるが、酸化剤（ヨウ素酸ナトリウムなど）で酸化すると橙色を呈するヘマティン（酸化体）となる。さらに媒染剤（アルミニウム塩などの金属塩）を用いて生成したヘマティン媒染剤結合物が正(+)に荷電しており、負(-)の性質を持つ部分（細胞核のリン酸基など）とイオン結合することによってその部分を染色する<sup>1)</sup>。

ハリスの処方では有害な酸化水銀を酸化剤とする為、ヨウ素酸ナトリウムなどを酸化剤とする処方のヘマトキシリン染色液が望ましい。

市販のヘマトキシリン染色液はメーカーや種類によってヘマトキシリンの含有量が異なる。

## B) ヘマトキシリンの分別

Papanicolaou 染色ではヘマトキシリン染色液の処方が退行性染色用でも進行性染色用であっても、標本全体を過剰染色ぎみに染めて分別する染色工程が一般的である<sup>1)</sup>。

分別の原理は、核および細胞質を染めているヘマティン媒染剤結合物を酸に浸漬することにより、その酸（水素イオン）とヘマティン媒染剤結合物が置換することに基づいている。

- ・ ヘマティン媒染剤結合物と3種類の官能基の親和部分はカルボキシル基（主に細胞質）＜リン酸基（主に核）＜硫酸基（主に酸性粘液）の順に結合性が強いと推測する。つまり同一分別条件の場合、すべての官能基でヘマティン媒染剤結合物は水素イオンと置換され色が落ちるが、結合強度の違いによりその置換率に差が生まれると考えられる<sup>1)</sup>。これを基に細胞質の色を落とし、核の色を残す最適な条件を模索することになる。

各種分別剤の分別力は溶媒のヘマティン媒染剤結合物の溶解力、分別剤中の水素イオン濃度、分別時間（浸漬時間）および分別温度などで決まる。その関係を表2にまとめた。

- ・ 溶媒のヘマティン媒染剤結合物の溶解力は水＞アルコールである。また塩酸は水中では水素イオンと塩素イオンにほぼ100%イオン化するが、アルコール中では水中ほどイオン化しない<sup>1)</sup>ため、塩酸が同一濃度ならば水素イオン濃度（分別力）は塩酸水＞塩酸アルコール溶液となる。さらに言えば、塩酸水＞塩酸70%アルコール溶液＞塩酸100%アルコール溶液となる。

表2：ヘマトキシリン分別における各種条件設定による分別力の変化

条件	分別力		
	強	>	弱
溶媒の水分含有量	高い	>	低い
溶媒の例	水	>	70%AL <sup>*1</sup> > 100%AL <sup>*1</sup>
分別時間（浸漬時間）	長い	>	短い
塩酸濃度	高い	>	低い
分別温度	高い	>	低い

\*1 AL：アルコール

## C) 色だし

ヘマトキシリンはpHにより色調が変化する。ヘマティン媒染剤結合物が結合した細胞核は、酸性条件下では赤紫色を呈し、分別液由来の水素イオンの存在によりヘマティン媒染剤結合物とリン酸基の結合が不安定（退色の原因）になりやすい。そこで水洗や弱アルカリ性水溶液で中和するとヘマトキシリンに染まった核は青色を呈し、ヘマティン媒染剤結合物とリン酸基の結合強度は強くなり安定化する。このように核をヘマトキシリン本来の青色にし、ヘマティン

媒染剤結合物と細胞核DNAとリン酸基の結合を安定化させることを色だしという<sup>1)</sup>。色だしには様々な方法が存在するので主なものを表3にまとめた。

表3 - 1 : 各種色だし方法の条件や特徴

条件・特徴	色だしの方法		
	水道水	温水	P B (燐酸緩衝液)* <sup>1</sup>
p H	p H 6.0 ~ 7.5 地域により違う <sup>2)</sup> 季節により変動あり	p H 6.0 ~ 7.5 地域により違う <sup>2)</sup> 季節により変動あり	p H 6.8 や p H 7.2 など
温度	6 ~ 25 程度 季節により変動あり	~ 55 程度	室温
手軽さ	手軽	設備が必要な場合あり	試薬調製が必要
細胞剥離	軽度	軽度	中等度
細胞の膨化	なし	なし	あり
塩素の影響 (脱色)	可能性あり	可能性少ない	なし

\* 1 P B : Phosphate Buffer solution ( 燐酸緩衝液 )

表3 - 2 : 各種色だし方法の条件や特徴

条件・特徴	色だし方法 ( アルカリ系試薬 )	
	1%アンモニア* <sup>2</sup> 70% A L * <sup>3</sup> 溶液	1%炭酸水素ナトリウム水溶液
p H	p H 11 ~ 9 濃度により変動あり 調製後、時間経過で p H 低下	p H 8 ~ 9.7 調製後、時間経過で p H 上昇
温度	室温	室温
手軽さ	試薬調製が必要	試薬調製が必要
細胞剥離	中等度	中等度
細胞の膨化	あり	あり
塩素の影響 (脱色)	なし	なし

\* 2 25%アンモニア水を使用し調製

\* 3 A L : アルコール

アルカリ系色だし試薬を染色工程に使用した場合、アルカリ性が強くなるほど、ならびに色だし時間（浸漬時間）が長くなるほど、細胞剥離や細胞膨化が起こりやすい。

アルカリ系色だし試薬は試薬調製直後から時間経過とともに pH が変動する。

- ・ アンモニアの場合：25%アンモニア水を1%濃度で含む70%アルコール溶液では、調製直後 pH11 程度、2 日後 pH10 程度、15 日後 pH9 程度となる。
- ・ 炭酸水素ナトリウムの場合：アンモニアと違い、1%炭酸水素ナトリウム水溶液では調製後から時間経過とともに pH が上昇するが、15 日後でも pH10 を超えることがない。
- ・ pH 変動には様々な要因が関与していると推測されるので、条件（温度など）によっては経過時間が同じであっても pH に差が生じる可能性がある。

#### D) 細胞質染色（OG-6 染色液、EA-50 染色液）

細胞質を染色する色素（オレンジ G、エオジン、ライトグリーン）の基本的な性質<sup>1) 3)</sup>

- ・ オレンジ G は分子量 452.4 のスルホン酸基を持つ酸性色素であり、Papanicolaou 染色液中の酸性色素で最も分子量が小さい。pH の低い強酸性領域で最も染色力が強く、細胞質をより濃いオレンジ色に染める。しかし中性領域では染色力が弱くなる。
- ・ エオジンは分子量 691.9 のカルボキシル基を持つ酸性色素であり、Papanicolaou 染色液中の酸性色素で中間の分子量である。弱酸性から中性領域で染色力が強く、細胞質を濃い赤色に染めるが、強酸性では細胞質へほとんど結合できなくなり、その結果発色が弱くなり、無色に近くなる。
- ・ ライトグリーンは分子量 792.9 で酸性官能基（スルホン酸基）と塩基性官能基（アミノ基）をもつ両性色素であるが、スルホン酸基を多く持つため酸性色素に分類される。性状も酸性色素の挙動を示す。ライトグリーンの持つスルホン酸基はオレンジ G のものと同じ挙動を示すが、ライトグリーンの分子量は Papanicolaou 染色液中の酸性色素中最も大きいいため、オレンジ G と比べると拡散能力という点で劣る。ライトグリーンは強酸性で最も発色し、pH の上昇とともに細胞質への結合力が低下する。そのため中性領域、特に弱アルカリ領域では染色力がかなり低下し、無色に近くなる。
- ・ pH の変動における細胞質蛋白質との結合強度という点で、スルホン酸基という共通の官能基を持つオレンジ G とライトグリーンは pH の変動に対してほぼ同じ挙動を示し、カルボキシル基を持つエオジンとは異なる挙動を示す。細胞質がどの色素により染まりやすいかという点で、染色工程における染色順や色素の拡散力および分子量ないし分子サイズの違いにより、オレンジ G とエオジンは競合して最終的な標本の染色結果を左右する。一方、ライトグリーンは表面上、他の色素と共染して色調が若干変化する程度でライトグリーンに染まる細胞の割合が増減するような競合は少ない。

細胞質を染色する色素（オレンジ G、エオジン、ライトグリーン）の細胞質への浸透ないし染色の強さは pH が同一の場合、主に染色液の色素含有量（色素濃度）に左右される。

- ・ 表 6 の如く市販の染色液は OG-6 染色液、EA-50 染色液どちらも新品の pH についての

メーカー間格差は少ない。また使用方法が同じならば使い古しても pH のメーカー間格差は少ないままである。しかし、色素含有量は各メーカーが基準としている処方に違いがあるため、メーカー間格差が大きい（2倍以上のこともある）場合がある。

- ・ 同一の染色工程で E A-50 染色液は同じものを使用し、OG-6 染色液のみメーカーを変えてそれぞれ染色すると、オレンジ G の含有量が多い OG-6 染色液で染色した標本がオレンジ G 優位の染色結果になる。このことは細胞への色素の浸透量が染色液中の色素の含有量（色素濃度）に依存していることを示唆する。

表 4：各種染色液の色素（オレンジ G、エオジン、ライトグリーン）含有量と色素の働きとの関係

色素の働き	各染色液それぞれの色素含有量	
	多い	少ない
拡散力	高い	低い
細胞への浸透力	高い	低い
分別に対する抵抗力	高い	低い

細胞質を染色する色素（オレンジ G、エオジン、ライトグリーン）の細胞質蛋白質との結合強度は染色液の pH 及び各染色液の後のアルコール溶液の pH に左右される。

- ・ オレンジ G における pH の影響と染色結果  
 オレンジ G は酸性度が増すことで細胞質蛋白質との結合強度が増大し、細胞質をより強く染める。その結合強度は pH 2 付近を最高として酸性度により変動する<sup>1)</sup>。また、OG-6 染色液にて染色直後に 1% リンタングステン酸 95% アルコール溶液に浸漬する場合と浸漬しない場合では、リンタングステン酸溶液に浸漬したほうが明らかに染色結果のオレンジ G 優位度は高くなる。これは OG-6 染色液のオレンジ G 含有量にあまり左右されない。オレンジ G はリンタングステン酸を含む酸性アルコール溶液には溶出しにくく、また後述のごとく、酸性条件下ではエオジンの染色が抑制され、細胞質に入り込んだオレンジ G がエオジンと置換される率は低くなる。
- ・ オレンジ G はアルカリ性条件下にすると、イオン化して細胞質蛋白質に結合していたオレンジ G が溶出し、分別されやすくなる。中性付近では、オレンジ G はそれほど分別されないが、分別用の 95% アルコール溶液が pH 9 以上の条件下になると、オレンジ G は強制的に分別されることになる。この変化は pH の上昇に伴って強くなり、OG-6 染色液のオレンジ G 含有量には左右されないが、OG-6 染色液の pH に影響を受ける。つまり OG-6 染色液が新品（pH 4.0 ~ 4.7 程度）と使い古し（pH 5.4 ~ 5.6 程度）ではオレンジ G 分別に差が生じる。実際には分別用の 95% アルコール溶液のアルカリ性条件が pH 9.5 未満でオレンジ G 分別に差が生じやすく、pH 9.5 以上ではその差が少なくなる。このこと

とアルカリ性が強くなるほど細胞剥離や細胞膨化が起こりやすくなることを考慮し、オレンジ G 分別の条件は pH10 付近としたい。表 9 の如く pH10 付近のアンモニアアルコール溶液は 0.025% ~ 0.1% アンモニア 95% アルコール溶液である。またアンモニアアルコール溶液は調製後、経時的に pH が低下していくので、特に薄い濃度 (0.1% 以下) の場合は使用時調製を厳守する。

- OG-6 染色液にて染色後、EA-50 染色液に浸漬する前の染色工程で、酸性条件下に続いてアルカリ性条件下にすると多彩な色調の染色結果になる。OG-6 染色液にて染色後にリンタングステン酸アルコール溶液 (酸性条件) に浸漬、その後アンモニアアルコール溶液 (アルカリ性条件) に浸漬すると、オレンジ G とエオジンの染め分けが可能であった。これはどのメーカーの OG-6 染色液と EA-50 染色液の組み合わせ (使用する染色液により若干の時間配分の変更が必要) でも比較的類似の染色結果が得られた。このことは酸性条件下でオレンジ G は細胞質蛋白質と強く結合するが、細胞質構築密度の差により結合強度が異なり、アルカリ性条件下になった時に結合強度の低いものからオレンジ G の分別が起こると考えると矛盾しない。またアルカリ性条件にする前にリンタングステン酸アルコール溶液で酸性条件にしてオレンジ G の結合強度を制御しているため、アンモニアアルコール溶液単独使用時に比べ、OG-6 染色液の pH の影響を受けにくい。酸性条件とアルカリ性条件を最適にすれば細胞質構築密度と関連した染色結果が得られる可能性がある。これを応用したのが参考染色工程である。

表 5 : 各 pH における各種色素と細胞質蛋白質との結合強度

色素	pH									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
オレンジ G	強	>	>	>	弱	>	>	>	非常に弱	
ライトグリーン										
エオジン	非常に弱	<	<	<	強	>		弱		

- エオジンにおける pH の影響と染色結果  
エオジンはオレンジ G やライトグリーンと違い、強酸性領域では染色力はほとんどなく、pH 2 ないし 3 付近から細胞質蛋白質と結合できるようになり、その染色強度は中性付近で最高となる<sup>1)</sup>。その意味で EA-50 染色液の pH 5.2 ~ 6.1 はエオジンにとって細胞質蛋白質と結合するには最適な pH と言える。(表 5) しかし、エオジンがより多くの細胞質を染めるかどうかは、実際には先に染色されるオレンジ G の細胞質蛋白質の占有具合とその結合強度により左右されることになる。つまり EA-50 染色液において細胞質をエオジン

にて染める段階でオレンジ G の占有率が高く、結合強度が高ければ、エオジンにとって最適な pH であってもエオジンの入り込む余地はなく、オレンジ G 優位な染色結果は変わらない。オレンジ G の占有率が低く、結合強度も低ければ、エオジンは空いている部分に浸透し、またオレンジ G と置換しエオジン優位な染色結果となる。ライトグリーンに染色される細胞の割合は染色工程を変化させても比較的安定しているため、オレンジ G とエオジンの占有率が Papanicolaou 染色の染色結果の印象を左右することになる。

- ・ ライトグリーンにおける pH の影響と染色結果

ライトグリーンは pH に対してオレンジ G とほぼ同様の挙動を示す<sup>1)</sup>が、他の色素と共染して色調が若干変化する程度でライトグリーンに染まる細胞の割合が増減するような競合は少ない。他の色素と共染による色調の変化は、オレンジ G 優位な染色結果の場合はライトグリーンに染まる細胞内にオレンジ G が残存するため黄緑色を呈することが多く、エオジン優位な染色結果の場合はオレンジ G の影響がなくなり、細胞質内にエオジンとライトグリーンの共存ないしライトグリーンが単独で存在し濃い緑色～青緑色を呈することが多い。EA-50 染色液後のアルコールは中性付近のことが多く、pH の変動によるライトグリーンへの直接的な影響は少ない。しかしアルカリ性条件下ではオレンジ G 同様分別されやすくなるため、EA-50 染色液後にアルカリ性溶液に浸漬するとオレンジ G、ライトグリーンはほとんど脱色され、エオジンの色調のみが残る。

- ・ EA-50 染色液後の数槽のアルコール系列の pH はその色調により、ある程度推測できる。EA-50 染色液直後の数槽のアルコール系列は、色素の分別や前槽からの試薬の持ち越しのため EA-50 染色液の構成色素により色がついている。この色調が pH によって変化する。つまり、簡単な pH 指示薬として働く。色調の変化は強酸性から弱酸性付近では青緑色、弱酸性から中性付近にかけてエオジンの蛍光色様の橙色と緑色の混合色、アルカリ性が強くなるにつれ、エオジンの蛍光色様の橙色単色になる。通常市販のアルコールの pH は中性付近のため、エオジンの蛍光色様の橙色と緑色の混合色を呈することが多い。再生したアルコール溶液は再生方法によっては pH が安定していないことがあるため注意が必要である。

#### 使い古しによる染色液の pH 変動と染色への影響

- ・ EA-50 染色液はメーカーにより pH 5.2 ~ 6.1 程度と若干差があるものの、使い古しても pH 5.2 ~ 6 程度の範囲に納まり変動が少ない。それはエオジンにとって細胞質蛋白質と結合する最適の pH であるため、エオジンが優位に染色されるように思われるが、実際にはオレンジ G の浸透具合により左右される。またこの pH はエオジンとは逆に、ライトグリーンと細胞質蛋白質との結合には不利であるが、ライトグリーンは一旦細胞質に浸透すると、拡散しにくいいため分別されにくく<sup>3)</sup>、オレンジ G と比べると、染色後のアルコールにおける条件が多少変化しても影響を受けにくいと思われる。
- ・ OG-6 染色液は使用条件によるが、表 6 のように pH 1 程度の変動がある。オレンジ G は低い pH で染色力が強いので、pH 4.0 ~ 4.7 程度の新品の方が細胞質蛋白質をより濃く染

める。しかしpHが約1上昇したpH5.4～5.6程度の使い古しでは、オレンジGの染色力が少し弱くなり、その結果染まりが少し薄くなる。その使い古しの染色液による薄い染まりは、その後の染色工程における試薬のpHや浸漬時間の変動に対して、思わぬ染色結果の変化をもたらす可能性がある。特にオレンジGの挙動は染色結果の印象に大きな影響を与えるため注意する。

表6：各染色液の新品のpHおよび使用によるpHの変動

	新品	使い古し
OG-6 染色液	4.0～4.7 程度	5.4～5.6 程度
EA-50 染色液	5.2～6.1 程度	5.2～6 程度

注意1) 各メーカーともpHの変動はおおよそこの表の範囲に納まった。

注意2) この場合の使い古しは使用前に毎日濾過、減少した量(全体量の1割程度)を継ぎ足しながら30日程度使用したものを測定した。この検討は推奨染色工程1で行い、EA-50染色液の前にはリンタングステン酸アルコール溶液やアンモニアアルコール溶液などのpHに影響する試薬は使用していない。

#### E) Papanicolaou 染色におけるリンタングステン酸の役割

##### 酸性側へのpH調整

- ・ リンタングステン酸 95%アルコール溶液のpHは、リンタングステン酸濃度が1%でpH2程度、0.1%でpH2.7程度、0.01%でpH3.6程度、0.001%でpH4.5程度となる。1%リンタングステン酸 95%アルコール溶液は調製後1か月経過してもpH2程度であり、変動はほとんどなく安定していた。しかし染色に使用すると、試薬の持ち越しなどにより酸性度が弱まる可能性がある。これは染色する標本量に最も左右されるので、各施設で保持したいpHが維持できるように試薬の交換時期を検討する必要がある。
- ・ pH調整には酢酸も使用できるが、酢酸は1%酢酸 95%アルコール溶液でpH4程度と、リンタングステン酸に比べ、若干強酸性にする能力に乏しい。オレンジGの浸透の少ない標本におけるオレンジG分別抑制の効果は期待ができる。

##### 選択的染色作用

- ・ リンタングステン酸は陰イオン錯体であるため、酸性色素と類似の化学的挙動を示す。よってオレンジG、エオジン、ライトグリーンと一緒に拡散して競合しながら細胞質蛋白質と結合し、各色素の重複を防ぐ作用(選択的染色作用)を示すと考えられる<sup>1)3)</sup>。しかし、強酸性の1%リンタングステン酸 95%アルコール溶液(約pH2)で浸漬後、EA-50染色液にて染色すると、その酸によりオレンジGは分別されにくくなり、エオジンの染色力は低下するため、エオジンに対してオレンジGがかなり優位になり、選択的染色作用が



うまく機能しないこともある。pH調整で取り上げた酢酸は分子量的に色素の競合を防ぐ選択的染色作用については期待薄である。

強酸性条件下でライトグリーンに対する媒染作用

- ・ 強酸性条件下ではライトグリーンの塩基性官能基もリンタングステン酸を介して細胞質蛋白質と結合する場合がある<sup>1)</sup>。

染色工程にリンタングステン酸を使用した場合と使用しない場合の染色結果の違い

- ・ リンタングステン酸を使用しない場合（市販染色液に入っている程度）は、染色時に細胞質内に残存するリンタングステン酸が少ないため、細胞質蛋白質と色素との結合割合が多くなり、色素の色調が濃く反映され、透明感も控えめの染色結果となる。
- ・ リンタングステン酸を使用した場合は、染色時に細胞質内に残存する無色透明のリンタングステン酸が多くなるため細胞質蛋白質と色素の結合割合が少なくなり色素の色調が希釈され、透明感の強調された染色結果となることが多い。

#### F) Papanicolaou 染色におけるアルコールの種類と濃度の影響

アルコールを含む溶剤の種類により水溶性色素に対する色素溶解力（分別力）が異なる。

- ・ 各種溶剤の水溶性色素に対する色素溶解力は水 > メチルアルコール > エチルアルコール > イソプロピルアルコールである。この他にエチルアルコールを主体としイソプロピルアルコールを約 11%程度含有する混合アルコール（以下、病理・細胞診用アルコールとする）は両者の中間的な色素溶解力を示す。このためエチルアルコールからイソプロピルアルコールや病理・細胞診用アルコールに変更した場合、色素を分別する能力が低下する可能性がある。

アルコール中の水分濃度による色素溶解力（分別力）は水分濃度が高いほど強くなる。たとえばエチルアルコールなら 70% > 95% > 100%となる。

### 3. Papanicolaou 染色の主要染色工程におけるアドバイス

ここでは前述した Papanicolaou 染色に使用される染色液や試薬の性質を基に、主要な染色工程における染色結果をコントロールするための注意事項やアドバイスを記載した。

#### A) 染色工程全般

染色工程における様々な反応は穏やかな条件にすることで染色結果が安定する。

- ・ 同じ反応を行うなら、濃い濃度で反応時間を短くではなく、薄い濃度で反応時間を長くすることが望ましい。特に自動染色装置ではこのような設定がよい。

染色環境（特に染色場所の室温や湿度、水道水の pH）を一定に保つことで染色結果が安定する。

- ・ 自施設の染色環境（特に季節の変化による染色環境の変化）を把握する。染色環境を一定に保てない場合は、染色環境の変化に応じて試薬や染色時間などの設定や条件を調整する。

染色液の前の槽では染色液とほぼ同じ組成の溶媒で馴染ませることで染色結果が安定する。

- ・ 試薬の持ち込みによる染色液の劣化防止や非特異的な反応の防止に役立つ。

コンタミネーションを防止する。

- ・ 検体処理や固定の段階で細胞剥離しにくい標本作製を心掛ける。
- ・ 剥離しやすい検体やがんが疑われる検体は染色順を後回しにする。
- ・ 同一の染色籠に異種の検体を入れない。
- ・ 染色工程における染色液や試薬は使用前ないし使用後に濾過もしくは濾過に準ずる操作を実施する。

染色工程において使用している試薬や染色液の組成や仕様を確認する。続いて、自施設の染色工程を本ガイドライン推奨条件や条件変更に伴う効果と照らし合わせて検討する。

染色を用手法で行い、かつ染色実施者が複数いる場合は染色工程における細かな操作を申し合わせておくと染色結果が安定する。

- ・ 染色工程の浸漬時間だけ厳守しても、試薬と馴染ませるための染色籠の出し入れの回数や染色籠移動時の試薬の液切り操作などの染色実施者の細かな操作の違いにより、後述の内部精度管理の検討においてデータが10%程度変動する場合があった。

## B) 核染色・分別

### アドバイス

- ・ 核の染色結果の濃淡をコントロールするためには関連する条件を管理する必要があるが、特に核染色では条件を穏やかにすることで染色結果が安定する。これは用手法より自動染色装置による染色で有効である。
- ・ 水道水に不純物として含まれる金属イオンとヘマトキシリンとの反応を防止するためにヘマトキシリン染色液に浸漬する直前の槽で蒸留水に馴染ませることが望ましい。

表7：核染色および分別に関する推奨条件ならびに条件変更による効果

核染色・分別の条件	核染色を薄く染色するためには	本ガイドライン推奨条件	核染色を濃く染色するためには	自施設の条件
染色時間（浸漬時間）	短い	2分	長い	
ヘマトキシリン濃度	薄い	2.5～3.0 g/l	濃い	
染色温度	低い	室温（25 前後で一定が望ましい）	高い	
塩酸濃度	濃い	0.5%	薄い	
塩酸を希釈する溶媒の種類	水	70% AL <sup>*1</sup>	100% AL <sup>*1</sup>	
分別時間（浸漬時間）	長い	30秒	短い	

\*1 AL：アルコール

- 市販のヘマトキシリン染色液はメーカーや種類によってヘマトキシリンの含有量に2倍近い差がある場合がある。Papanicolaou 染色用ヘマトキシリン染色液の処方の多くは重積した細胞の核を明瞭に染めるために、組織用の処方に比べてヘマトキシリン含有量が多い。観察のしやすさから考えて、薄め均一の塗抹標本の作製を心掛ければヘマトキシリン濃度は 2.5 ~ 3.0 g / l で十分な染色結果を期待できる。実際の検討においても 2.5 ~ 3.0 g / l で特に問題ないレベルの染色結果を得ることができた。しかし、それ以下の濃度になると核の染まり具合が薄く感じられる場合がある。

### C) 色だし

#### アドバイス

- 色だしをコントロールするためには色だしに使用する試薬等の pH、温度、色だし時間(浸漬時間)の把握や管理が重要であるが、試薬等の pH による細胞への影響も考慮する必要がある。
- 水道水の pH は地域や季節により違いがある<sup>2)</sup>。また水温も季節により変動がある。このため自施設の状況を把握しておく必要がある。
- 水道水は塩素を含有しているため、長時間の浸漬により色落ちする可能性がある。
- 各種色だし方法は個々に特徴があるため、特徴を表3に、推奨設定を表8にまとめた。その中で比較的手軽で工程時間も短く、細胞剥離や細胞膨化が少ないことから温水による色だしを本ガイドラインの推奨としたい。しかし、設備等の関係で温水が利用できない場合はその他の方法の長所・短所をよく理解したうえで、短所に対する対策を施して実施することが望ましい。

表8 - 1 : 各種色だし方法による本ガイドライン推奨設定

条件	色だしの方法		
	水道水	温水(推奨)	P B ( 磷酸緩衝液 ) * 1
色だし時間(浸漬時間)	5 ~ 10 分	50 度 5 分程度	p H 6.8 で 5 分 p H 7.2 で 3 分
色だし温度	15 以上	45 ~ 55 程度	室温
p H	p H 6.8 以上	p H 6.8 以上	一定

\* 1 P B : Phosphate Buffer solution ( 磷酸緩衝液 )

表 8 - 2 : 各種色だし方法による本ガイドライン推奨設定

条件	色だしの方法 (アルカリ系試薬)		自施設の設定
	1%アンモニア* <sup>2</sup> 70%AL* <sup>3</sup> 溶液	1%炭酸水素ナトリウム 水溶液	
色だし時間 (浸漬時間)	1分 時間厳守	1分 時間厳守	
色だし温度	室温	室温	
pH	pH9~10程度	pH8~9	

\* 2 25%アンモニア水を使用し調製

\* 3 AL: アルコール

- ・ アルカリ系試薬を使用する際、色だしにはpH9程度、1分で十分である。アンモニアの場合70%アルコール(pH7程度)100ml対して25%アンモニア水25μl(パスツールピペットで約1滴)でpH10程度になる。使用時調製ならこれでよい。しかし、長期間にわたり同一の試薬を使用したい場合(つまりアルカリ性を維持させたい場合)は1%という濃度が必要と思われる。1%濃度を使用する際は細胞剥離や細胞膨化を考えると調製直後(pH11程度)の使用は避け、調製後2日程度経過したもの(pH10程度以下)が望ましい。
- ・ 炭酸水素ナトリウムの場合、1%炭酸水素ナトリウム水溶液のpHは変動してもpH10程度で納まるため、アンモニアに比べ細胞への影響は軽度と思われる。されど時間は厳守するべきである。

#### D) 細胞質染色

細胞質の染色は3種類の色素(オレンジG、エオジン、ライトグリーン)の染色液中の含有量、浸漬する溶液のpH、溶媒の種類や水分濃度、浸漬時間などが複雑に絡み合っている。特にオレンジGの細胞質への浸透度合いと細胞質蛋白質との結合強度により染色結果の印象が左右されるといっても過言でない。

エオジン優位な染色結果をオレンジG優位に変えるために(オレンジGの分別抑制)高い効果が期待できるもの

- ・ オレンジG含有量の多いOG-6染色液の使用
- ・ OG-6染色液で染色後にリンタングステン酸アルコール溶液を使用  
注意する設定(リンタングステン酸濃度、浸漬するタイミング、浸漬時間)

中等度～軽度の効果が期待できるもの

- ・ OG-6 染色液で染色後に酢酸アルコール溶液を使用
- ・ OG-6 染色液への浸漬時間の延長
- ・ オレンジG 分別用アルコールの設定変更（種類、水分濃度、浸漬時間）

アドバイス

- ・ 使用している OG-6 染色液のオレンジG 含有量をメーカーに確認する。確認できている市販の OG-6 染色液におけるオレンジG 含有量は 1.9 g / l と 5.0 g / l で 2.5 倍程度差がある。推奨染色工程 1 で染色してみると、使用する OG-6 染色液のオレンジG 含有量が 5.0 g / l の場合はオレンジG 優位の染色結果となり、オレンジG 含有量が 1.9 g / l の場合は 5.0 g / l の場合と比べてエオジン優位度が増した染色結果（赤橙色の比率が増える）となる。このことからオレンジG 含有量を確認できない OG-6 染色液は推奨染色工程 1 で染色すると、染色結果によってオレンジG 含有量のおよその量が把握できる。
- ・ 推奨染色工程 1 において染色結果のエオジン優位度が高くなる場合で、染色工程を変更することなくオレンジG 優位の染色結果にしたいなら、オレンジG の含有量が 5.0 g / l 程度の OG-6 染色液に変えてみるとよい。この際の EA-50 染色液はどのメーカーでも大差はない。推奨染色工程 1 とオレンジG の含有量が 5.0 g / l 程度の OG-6 染色液の組み合わせで暫定的な標準染色結果に類似の染色結果が得られることが多い。
- ・ 染色工程でリタングステン酸アルコール溶液を使用する目的はオレンジG の分別抑制であるため、その目的だけならば使用するタイミングは OG-6 染色液直後が最も効果があり、95%アルコールに浸漬後では効果が低下する。逆に言えばオレンジG が分別されてしまってからリタングステン酸アルコール溶液に浸漬しても意味がない。つまりどの程度オレンジG を分別抑制するかによって染色結果の印象が変化するため、リタングステン酸濃度や浸漬時間に合わせたリタングステン酸アルコール溶液を使用する最適なタイミングを検討する必要がある。オレンジG 含有量が 1.9 g / l 程度の OG-6 染色液を用いて、暫定的な標準染色結果に近づけるためには推奨染色工程 2 に近い条件がよい。
- ・ 酢酸アルコール溶液を使用する効果は pH が酸性であることから、オレンジG の分別抑制を期待するものと推測する。酢酸アルコール溶液の単独使用でも若干のオレンジG の分別抑制効果は期待できる。浸漬するタイミングは OG-6 染色液直後ないし、推奨染色工程 2 のリタングステン酸アルコール溶液の代わりとしての使用が効果的と思われる。リタングステン酸アルコール溶液との併用では、リタングステン酸と酢酸を混合する使用法や OG-6 染色液後の浸漬順序が、まずリタングステン酸アルコール溶液、次いで酢酸アルコール溶液とする使用法は、両方が 1%濃度であるなら 1%リタングステン酸 95%アルコール溶液のみでオレンジG が分別されにくく、オレンジG 優位な染色結果となる最適な pH となっているため、併用使用にメリットは見出せない。となると OG-6 染色液後の浸漬順序が、まず酢酸アルコール溶液、次いでリタングステン酸アルコール溶液とする使用法で、酢酸アルコール溶液の代わりに 95%アルコールを使用するよりはオレンジ

G の分別を抑制でき、OG-6 染色液直後にリンタンゲステン酸アルコール溶液に浸漬するよりは染色結果のオレンジ G 優位度が穏やかになる効果を期待することになる。

- ・ OG-6 染色液の浸漬時間の延長は色素が拡散する時間を増やすことになるため、理論的には色素が高濃度のものに浸漬するのと同様の効果を得る可能性がある。実際に染色結果のオレンジ G 優位度を増すためには、オレンジ G 含有量が 5.0 g / l の OG-6 染色液で 3 ~ 5 分程度の浸漬時間 ( 1 ~ 3 分程度の延長 ) により可能であるのに対して、オレンジ G 含有量が 1.9 g / l の OG-6 染色液では大幅な浸漬時間の延長が必要であり、現実的でない。
- ・ オレンジ G 分別用アルコールの設定変更としては、色素溶解性の高いエチルアルコールから色素溶解性の低いイソプロピルアルコールや病理・細胞診用アルコール ( エチルアルコールを主体として他のアルコールを混合したアルコール ) に変更することや、アルコールの水分濃度を下げることで、および分別用アルコールへの浸漬時間を短縮することで、オレンジ G の分別抑制効果を期待できると思われるが、見かけ上十分な効果を得られないこともある。オレンジ G 分別用アルコールの設定変更だけでは十分な効果が見込めない場合でも、他の方法と併用することにより効果を発揮する可能性がある。

オレンジ G 優位な染色結果をエオジン優位に変えるために ( オレンジ G の分別促進 )

高い効果が期待できるもの

- ・ オレンジ G 含有量の少ない OG-6 染色液の使用
- ・ OG-6 染色液で染色後にアンモニアアルコール溶液を使用  
注意する設定 ( アンモニア濃度、浸漬するタイミング、浸漬時間 )

注意) オレンジ G 分別にアンモニアを用いることは一般的に確立された方法ではないが、本ガイドラインの検討中に見出し、有用と思われるので記載した。標本の保存性については自験例で 22 ヶ月は問題ないことを確認している。

中等度 ~ 軽度の効果が期待できるもの

- ・ オレンジ G 分別用アルコールの設定変更 ( 種類、水分濃度、浸漬時間 )
- ・ OG-6 染色液への浸漬時間の短縮

アドバイス

- ・ 使用している OG-6 染色液のオレンジ G 含有量をメーカーに確認する。確認できている市販の OG-6 染色液におけるオレンジ G 含有量は 1.9 g / l と 5.0 g / l で 2.5 倍程度差がある。推奨染色工程 1 で染色してみると、使用する OG-6 染色液のオレンジ G 含有量が 5.0 g / l の場合はオレンジ G 優位の染色結果となり、オレンジ G 含有量が 1.9 g / l の場合は 5.0 g / l の場合と比べてエオジン優位度が増した染色結果 ( 赤橙色の比率が増える ) となる。このことからオレンジ G 含有量を確認できない OG-6 染色液は推奨染色工程 1 で染色すると、染色結果によってオレンジ G 含有量のおよその量が把握できる。
- ・ 推奨染色工程 1 において染色結果がオレンジ G 優位となる場合で、染色工程を変更することなくエオジン優位度が増した染色結果にしたいなら、オレンジ G の含有量が 1.9 g / l 程

度の OG-6 染色液に変えてみるとよい。この際の EA-50 染色液はどのメーカーでも大差はない。推奨染色工程 1 とオレンジ G の含有量が 1.9 g / l 程度の OG-6 染色液の組み合わせでエオジン優位度が増した染色結果が得られることが多い。

- OG-6 染色液後の染色工程でアンモニアアルコール溶液を使用する目的はオレンジ G の分別促進であるため、その目的だけならアンモニアアルコール溶液を使用するタイミングは EA-50 染色液前ならいつでも良いが、標本移動による試薬や染色液の pH 変動を極力抑えるため、酸性である OG-6 染色液から中性付近の 95% アルコールで酸性を弱めてから、アルカリ性のアンモニアアルコール溶液に浸漬し、その後中性付近の 95% アルコールでアルカリ性を弱めてから弱酸性の EA-50 染色液に浸漬することが最良の選択と考える。

表 9 : アンモニア 95% アルコール溶液の各種アンモニア濃度における pH の経時的変化

アンモニア濃度	pH 変化			
	調製直後	30 分後	1 時間後	5 時間後
0.010%	10	9.5	9.4	9.4
0.025%	10.1	10	10	9.5
0.100%	10.5	10.2	10.1	9.9
1.000%	11.5	11	11	10

注意 1 ) 25% アンモニア水を使用して調製

注意 2 ) アルコールは市販の病理・細胞診用アルコールの 100% のものをイオン交換水で 95% に希釈したものを使用した。pH 7.1 ~ 7.5 程度

- オレンジ G の分別効果と細胞剥離や細胞膨化の防止を両立できるアンモニアアルコール溶液の pH は 10 付近と考える。アンモニアアルコール溶液の pH の経時的変化を考慮し、使用時調製を厳守するなら、出来るだけアンモニア濃度の低い 0.025% アンモニア 95% アルコール溶液を推奨する。0.025% アンモニア 95% アルコール溶液は 95% アルコール ( pH 7 程度 ) 100ml 対して 25% アンモニア水 25  $\mu$ l ( パスツールピペットで約 1 滴 ) で簡易的に作製でき、pH も 10 付近である。この方法では、使用するアルコールの pH によって、加えるアンモニア量を変更する必要がある。
- OG-6 染色液の浸漬時間の短縮は色素が拡散する時間を減らすことになるため、理論的には色素が低濃度のものに浸漬するのと同様の効果を得る可能性がある。しかし、オレンジ G は OG-6 染色液に浸漬して 10 秒くらいから、見かけ上十分に細胞質を染色できるため OG-6 染色液への浸漬時間の短縮はエオジン優位な染色結果にする効果はあまり期待でき

ない。

- ・ オレンジ G 分別用アルコールの条件設定において、色素が溶解しやすくなるようにアルコールの水分濃度を上げたり、あるいは分別用アルコールへの浸漬時間を延長したりすることでオレンジ G の分別促進効果を期待できる。しかし条件により効果は様々である。例えば、アルコールの水分濃度を上げることによるオレンジ G の分別促進ではオレンジ G の細胞質への浸透度と細胞質蛋白質との結合強度の違いにより効果が異なる。アルコール中の水分濃度を 5% から 30% に変更することにより明らかに分別効果が増したのは、オレンジ G の含有量が 1.9 g / l の OG-6 染色液を使用した場合であり、オレンジ G の含有量が 5.0 g / l のものでは効果が少なかった。さらに水分濃度を 30% 以上にしても、この傾向に極端な変化はなかった。アルコールの水分濃度を上げることでオレンジ G の分別促進を行うなら、アルコールの水分濃度は 30% 程度 (70% アルコール) が最適な選択と考える。染色工程に取り入れるタイミングは分別効果だけなら OG-6 染色液後であればいつでもよいが、その後の脱水のことを考えると OG-6 染色液直後がよい。

EA-50 染色液 (エオジン、ライトグリーン) が染色結果に与える影響

アドバイス

- ・ 市販の EA-50 染色液は、メーカーによって参考にしている処方異なるため、OG-6 染色液よりも色素含有量に格差が存在する可能性がある。その格差はエオジンでは小さく、ライトグリーンでは最大 5 倍程度と推測される。しかし、実際に確認できている市販の EA-50 染色液においてエオジン含有量は 2.3 g / l と 2.6 g / l、またライトグリーン含有量は 0.5 g / l と 0.6 g / l であり、処方に大差を認めなかった。
- ・ エオジンの細胞質内への浸透は先に染色されるオレンジ G の浸透度や細胞質蛋白質との結合強度に強く影響される。このため EA-50 染色液におけるエオジン含有量の多少は染色結果に反映されにくい。また参考とされている処方からエオジン含有量のメーカー間格差は小さいと予測されるので、エオジン優位度を増す染色結果にするためには、前述のオレンジ G の分別促進の項を参照して最適な条件を模索することが肝要であろう。
- ・ EA-50 染色液におけるライトグリーン含有量には 5 倍程度のメーカー間格差が存在する可能性がある。しかし、EA-50 染色液への浸漬時間を極端に延長しない限り、見かけ上ライトグリーンに染色される細胞の割合が変動するような影響は少ない。一部の EA-50 染色液では浸漬時間を極端に長くすると、エオジンに染まっている細胞がライトグリーンとの混合色になったり、背景がライトグリーンで共染したりする傾向をみる。
- ・ ライトグリーンは同一検体標本において染色される細胞の割合の変動は少ないものの、色調は変化する。オレンジ G 優位な標本ではライトグリーンに染まる細胞は、細胞質内にオレンジ G とライトグリーンが共存し黄緑色を呈することが多い。さらに染色工程にリンタングステン酸を使用すると同じ細胞質内に無色透明のリンタングステン酸の割合が増え、オレンジ G やライトグリーンの割合が減るため、黄緑色が薄くなり、透明感も増すことになる。エオジン優位な標本ではライトグリーンに染まる細胞は細胞質内にエオジンとライ



トグリーンが共存もしくはライトグリーンが単独で存在し、濃い緑色～青緑色を呈することが多い。

#### E) 各種アルコールの染色結果への影響

##### アドバイス

- エチルアルコールを主体として、他のアルコール（メチルアルコールやイソプロピルアルコール）を混合させたものを病理・細胞診用アルコールと表現した。今回、表 10 における各種アルコールの性質ではイソプロピルアルコールを約 11%程度含むエチルアルコールの場合を示してあるが、この種のアルコールにはメーカーにより様々な処方が存在する。よって、病理・細胞診用アルコールを使用するときには、組成をメーカーに確認して染色に与える影響を把握しておく必要がある。

表 10：各種アルコールの性質

性質	強	>	弱
色素溶解力			
分別能力	エチルアルコール	>	病理・細胞診用アルコール > イソプロピルアルコール
水との親和性			
脂肪との親和性	イソプロピルアルコール	>	病理・細胞診用アルコール > エチルアルコール
各種透徹剤との相性	アルコールの種類に関係なく、特に問題なし		

- 染色系列で使用するアルコールをイソプロピルアルコールとした場合、95%エチルアルコール並みの分別力を望むなら、EA-50 染色液直後のイソプロピルアルコール濃度を 80%程度とする必要がある。また病理・細胞診用アルコールにおいても、EA-50 染色液直後のアルコール濃度は厳密に 95%程度が望ましい。EA-50 染色液直後のアルコールを捨て、その後のアルコールを順に前にずらしていく方法では、その操作を繰り返すうちに EA-50 染色液直後のアルコールのアルコール濃度が 100%に近づいていくためライトグリーンの分別不良（スライドグラス背景への共染）をみる可能性がある。
- イソプロピルアルコール、病理・細胞診用アルコール、エチルアルコールなどの各種アルコールとキシレン、リモネン系透徹剤、アルカン系透徹剤などの各種透徹剤との相性は問題ないレベルである。但し、エチルアルコールとアルカン系透徹剤の相性ないし合溶性は、エチルアルコールとキシレンの相性ないし合溶性に比べ少し劣るので、アルカン系透徹剤で透徹する場合は、キシレン透徹時よりも浸漬回数を多めにしたり、浸漬時間を長めにし

たりすることが望ましい。

- EA-50 染色液後のアルコール系列は、標本から分別された余分なエオジンやライトグリーンで色が付く。これが pH 指示薬様に働き、アルコール溶液の pH がおおまかにわかる。その色調の変化は強酸性から弱酸性付近では青緑色、弱酸性から中性付近にかけてエオジンの蛍光色様の橙色と緑色の混合色、アルカリ性が強くなるにつれ、エオジンの蛍光色様の橙色単色になる。OG-6 染色液後のアルコール系列でも同様のことが言えるが、オレンジ G は pH の変動による色調変化がわかりづらい。アルコール系列の pH は標本の色調に影響する可能性があるため一定であることが望ましい。市販の新品のアルコールを使用すれば pH は中性付近で比較的安定していると思われるが、再生アルコール溶液を使用する場合は、再生方法によっては再生前の使用条件により、pH が一定とは限らないため注意する。アルコール溶液を再生した際に pH を測定しておくといよい。

## F) 透徹・封入

### アドバイス

- アルカン系透徹剤はキシレン系封入剤とは相性が悪く白濁するため、アルカン系専用の封入剤を選択する必要がある。また、透徹剤ないし封入剤を変更するさいは、念のためその相性をメーカーに確認することが望ましい。

表 11：各種透徹剤と封入剤の相性

組み合わせ		透徹剤		
		キシレン	レモネン系	アルカン系
封入剤	キシレン系	適合	適合	不適合
	アルカン系	適合	適合	適合

- 透徹剤は濾過することにより透徹槽に生じた小さな水滴やコンタミネーションの原因となる剥離した細胞成分を除去できる<sup>4)</sup>。特に封入前の最終槽は染色籠ごとに濾過することが望ましい。濾過では除去不可能な透徹剤中に溶解している水分の乾燥除去には、モレキュラシーブ等の乾燥剤の使用が有用である。
- 標本中への水滴混入の原因としては、染色工程における脱水不良と封入時のスライドガラスと封入剤の温度差による結露が挙げられる。染色工程における脱水不良対策しているにも関わらず、細かな粒状に標本内に水滴混入をみる場合は結露が原因の可能性もある。封入時の結露は封入を実施する部屋の室温や湿度、スライドガラスの温度、さらには封入剤の温度などに関連して起こる。理論上、結露が発生する条件は飽和水蒸気圧曲線により推

測できる<sup>5)</sup>。

- ・ 結露防止の注意事項としては多湿な場所での封入は避けること、封入する部分（スライドガラス）に直接、冷風が当たらないようにすること、封入剤を気泡抜きのために加温している場合は、封入時に室温に戻すこと、気化する際に熱が奪われスライドガラスが冷えるため透徹剤は揮発性の低いものが望ましいこと（揮発性：アルコール>キシレン>リモネン系>アルカン系）などが挙げられる。
- ・ 透徹剤を使用しないで脱水アルコールから直接封入する方法があるが、多くの場合結露が生じ標本に水滴が混入する。各種アルコールの中で水滴混入の少ないのはイソプロピルアルコールで、標本辺縁部のみのことが多い。イソプロピルアルコールより揮発性の高いエチルアルコールや病理・細胞診用アルコールにおける脱水アルコールからの直接封入は現実的ではない。

#### G) 染色工程試薬および染色液の劣化

染色液および試薬の劣化原因は染色液や試薬の次の槽への持ち越しによる希釈ならびに組成の変化、さらに染色液については色素の消費などが挙げられる。ここでは試薬等の持ち越しについて述べる。

#### アドバイス

- ・ 表 12 に用手法ならびに自動染色装置における試薬の持ち越し量を記載した。籠の種類やスライドガラスの数量、液切り操作の仕方により変動はあると思われるが、おおまかな量は把握できるため籠移動回数やスライドガラスの枚数による試薬の劣化管理の参考にしていただきたい。

表 12：染色操作法（用手法と自動染色装置）における試薬持ち越し量

染色操作法 条件	用手法		自動染色装置	
	籠のみ	籠	籠のみ	籠
	スライドガラスなし	スライドガラス15枚	スライドガラスなし	スライドガラス50枚
試薬持ち越し量	約 0.5ml	約 1.0ml	約 1.0ml	約 2.0ml

- ・ 染色液は新品の状態では維持することは不可能である。このため染色液の劣化防止は許容範囲内で色素濃度、pH などの平衡状態を維持することが染色結果の安定につながる。よって、染色液の濾過や継ぎ足し等は面倒でも毎日実施するほうが染色液の状態は安定する。

## 内部精度管理法

多くの施設では、Papanicolaou 染色の内部精度管理は試薬管理や染色時間の管理のみで実施されていると思われる。これらは重要な管理項目であることに間違いはなく、実際にはそれで施設ごとの染色結果の再現性はだまかに保たれている。しかし染色結果の管理を経験的な主観に頼っているため、日々の僅かな変動が長い期間では大きな変動になってくる可能性を秘めている。これが Papanicolaou 染色の染色結果に現在のような大きな施設間格差を作った原因であろう。そこで染色結果についてもできるだけ主観を除き、客観的に比較できるコントロール標本作製し評価することにより、目標とする染色結果の維持に努めてもらいたい。施設ごとに染色工程が違っているので、全く同じことをしても満足な結果が得られない可能性があるため各施設で工夫や改良が必要である。

### 1. 概要

この内部精度管理法は、同一検体で作製した未染色標本を使って実施する。検体により検体量が異なるため未染色標本の作製枚数にも差がでる。その枚数により 1 クールが決まる。1 クールは初日と最終日にコントロール標本を 2 枚ずつ、日差再現性標本を毎日 1 枚ずつで構成する。例えば未染色標本 30 枚の場合は、コントロール標本 4 枚、日差再現性標本 26 枚ということになり 26 日間（染色実施日）の内部精度管理が実施可能ということになる。

### 2. コントロール標本作製する検体について

Papanicolaou 染色の染色結果の変動は、扁平上皮の染色性が最もわかりやすい。また染色結果の比較をするため、同一検体で未染色標本を多数作製することになる。さらに検体の入手しやすさという点も考慮すると扁平上皮を多く含んだ喀痰が検体として最適と考える。

### 3. コントロール標本用未染色標本の作製および保存について

ここで紹介する内部精度管理法は、自施設標本とコントロール標本との比較および日差再現性標本で実施される。未染色標本は必要量を一度に作製し、95%エタノールで固定して保存する。未染色標本作製時には、標本によって扁平上皮細胞の種類に偏りがないように、検体をよく混和することが望ましい。

### 4. 試薬および染色工程について

コントロール標本作製の染色工程を設定する。自施設の染色工程を一部変更もしくは染色試薬変更などで対応する。コントロール標本作製するわずらわしさを軽減するために染色工程の変更はできるだけ少なく、多岐に亘らぬことが望ましい。

### 5. コントロール標本の作製

作り置きして保存してある内部精度管理用未染色標本でコントロール標本（極端にオレンジ G 優位な染色結果標本と極端にエオジン優位な染色結果標本）を作製する。コントロール標本はオ

レンジ G 優位なものとはエオジン優位なものを作製できれば染色工程は各施設独自のものでかまわないが、例として表 13 に推奨する方法を記載する。特に極端にオレンジ G 優位な染色結果とするためには、OG-6 染色液のオレンジ G 含有量の多少により染色工程に若干の工夫が必要である。

#### A) 極端にオレンジ G 優位な染色結果標本の作製方法

- ・ コントロール 1 : リンタングステン酸を使用してオレンジ G 分別を抑制する方法

強酸性の 1% リンタングステン酸 95% アルコール溶液で処理すると、エオジンの染色が抑制されるため、オレンジ G とエオジンが競合する細胞のオレンジ G の分別が極端に抑制され、その結果オレンジ G 優位の染色結果となる。そしてエオジンの赤色の色調に乏しく、黄色および緑色の色調が主体の染色結果となる。細胞質内構築密度がやや疎で、オレンジ G が無色透明のリンタングステン酸と置換した細胞は無色で、そのリンタングステン酸が少量エオジンと置換した細胞は非常に薄い赤色を呈する。

この反応は OG-6 染色液のオレンジ G 含有量の多少と染色工程におけるリンタングステン酸溶液に浸漬するタイミングによって、極端にオレンジ G 優位な染色結果とならない場合があるため注意する。OG-6 染色液のオレンジ G 含有量の少ない場合 (1.9 g/l) では、リンタングステン酸溶液に浸漬するタイミングは OG-6 染色液直後でないとい十分な効果は得られない。

- ・ コントロール 2 : オレンジ G を過剰染色し分別時間も制限してオレンジ G 分別を抑制する方法

OG-6 染色液への浸漬時間を延長し、分別時間を短縮することによりオレンジ G の分別を最小限に抑えることで、エオジンがオレンジ G と置換して細胞質内へ浸入し細胞質蛋白質と結合することを制限されることになり、エオジンの赤色の色調に乏しく、黄色から橙色および緑色が主体の染色結果となる。この方法はオレンジ G が分別される機会を最小限にしかないので、オレンジ G 含有量の少ない OG-6 染色液 (1.9 g/l) を使用した染色では、OG-6 染色液浸漬時点でのオレンジ G の細胞質への染まりはあまり濃くないため、極端にオレンジ G 優位な染色結果にはなりにくい。この方法の有用性はオレンジ G 含有量の多い OG-6 染色液 (5.0 g/l) を使用した場合に限られる。

染色結果の色調はエオジンがオレンジ G と置換する猶予があり、コントロール 1 と比べるとエオジンとオレンジ G の混合色も多くみられる。

#### B) 極端にエオジン優位な染色結果標本の作製方法

- ・ コントロール 3 : アンモニアを利用してオレンジ G を過剰に分別する方法

0.025% アンモニア 95% アルコール溶液の pH の影響によりオレンジ G のイオン化を促進し、一部を除いてほとんどの細胞質蛋白質との結合を解除させることで分別する。これによりオレンジ G とエオジンが競合する細胞の内部は色素のない状態となり、エオジンは容易に細胞内に浸透し細胞蛋白質と結合できる。これによりオレンジ G の黄色の色調に乏しく、赤色と緑色が主体の染色結果となる。一部、角化した細胞など細胞内構築密度が非常に高いものはオレンジ G との結合が強く、アルカリ性条件下でも分別されにくい

黄色～橙色を呈することがある。

・ コントロール4：OG-6 染色液を使用しない方法

OG-6 染色液を染色工程から除くことで、オレンジGの色調がなくなり赤色と緑色のみの染色結果となる。この方法では角化した細胞など細胞内構築密度が非常に高いものはエオジンの分子が細胞内に浸透できず、無色ないし非常に薄い赤色を呈することがある。エオジン本来の赤色の確認および間接的にオレンジGとエオジンの混合による橙色の確認が可能となる。

表 13：コントロール標本作製法（推奨染色工程からの変更部分を抜粋）

推奨染色工程 1	通常染色時間	極端にオレンジG優位な染色標本作製法		極端にエオジン優位な染色標本作製法	
		コントロール 1	コントロール 2	コントロール 3	コントロール 4
95%AL	1分	1分	1分	1分	6分
OG-6	2分	2分	5分30秒	2分	
95%AL	1分	1%リントングステン酸95%AL溶液(1分)	10秒	1分	
95%AL	1分	1分	10秒	0.025%アンモニア*195%AL溶液(1分)	
95%AL	1分	1分	10秒	1分	
EA-50	3分	3分	2分	3分	3分

はその工程を省くことを意味する。

\* 1 25%アンモニア水を使用し調製（使用時調製厳守）

AL：アルコール

注意1）コントロール2の染色工程で極端にオレンジG優位な染色結果にする条件は、オレンジG含有量の多いOG-6染色液（5.0g/l）を使用した場合に限られる。

注意2）表13の染色工程はすべて、通常染色時間と同じ9分になるように設定してある。そのため工程数の少ないコントロール4では、OG-6染色液直前の95%アルコールの浸漬時間が6分と長くなっているが、これは染色結果にはほとんど影響がなく時間調整である。よって通常染色時間と同じ1分でもなんら問題はない。

6．日差再現性を評価する標本の作製

作り置きして保存してある日差再現性用未染色標本を毎日1枚ずつ自施設のPapanicolaou染色工程にて日常検体と一緒に染色する。

## 7. 扁平上皮細胞の染色結果の分類方法

Papanicolaou 染色の表層～中層扁平上皮細胞の染色結果を黄色、黄色がかった橙色(黄橙色)、赤色がかった橙色(赤橙色)、薄い赤色、濃い赤色、緑色の6種類に分類する。この分類とコントロール標本を実際に分類することにより、表層～中層扁平上皮細胞の細胞内構築密度の把握が一部可能と思われる。

分類する6種類の色調の確認(画像8～13参照)

- ・ 黄色：コントロール1・2・3にて確認  
脱核した表層扁平上皮細胞で確認する。特にコントロール3で認められれば赤色主体の中で確認しやすい。
- ・ 薄い赤色：コントロール1・4にて確認  
コントロール1の色のりの悪い表層～中層扁平上皮細胞もしくはコントロール4の赤色のりの悪い脱核した扁平上皮細胞で確認する。
- ・ 濃い赤色：コントロール4にて確認  
コントロール4はOG-6染色液を染色工程から除いてあるので純粋にエオジンの赤色を確認できる。
- ・ 緑色：どのコントロール標本でも確認可能  
同じ緑色でもオレンジG優位な染色結果標本では黄緑色、エオジン優位な染色結果標本では青緑色の場合がある。
- ・ 橙色：コントロール1・2・3にて確認  
黄色、濃い赤色と比較しながら黄色がかっている橙色と赤色がかっている橙色を確認する。この橙色(黄橙色と赤橙色)が最も主観の入りやすい色調であるので、基本となる色調を画像として確認できるような工夫が必要である。特に内部精度管理実施者が2人以上の施設では注意を要する。

(分類上の注意)

分類対象の扁平上皮細胞は散在性のもので、単染色性のものとする。集団形成しているものや1個の細胞で多染色性を示すものは分類対象から除くことが望ましい。

## 8. 評価方法

コントロール標本の評価

- ・ 作製したコントロール標本中の表層～中層扁平上皮細胞500個を前述の6種類の色調に百分率で分類する。オレンジG優位になっているはずの標本では、赤色や赤橙色より黄色や黄橙色が主体の染色結果となっているか、エオジン優位になっているはずの標本では黄色や黄橙色より赤色が主体染色結果となっているかを確認する。もし、期待した染色結果を得られない場合は単一な成熟過程の扁平上皮細胞しか存在しないようなコントロール標本として不適切な検体でないかの確認、染色過程における操作の確認および染色工程の設定の確認などを実施して問題点を修正の上、再度コントロール標本を作製する。

表 14：各種コントロール標本における細胞内構築密度と色調の関係

染色方法	細胞内構築密度		
	密	中等度	疎
コントロール1	黄色	黄橙色 > 薄い赤色	緑色
コントロール2	黄色	黄橙色 > 赤橙色	緑色
コントロール3	黄色	赤橙色 < 濃い赤色	緑色
コントロール4	無色 & 薄い赤色	濃い赤色	緑色
推奨法	黄色	黄橙色 & 赤橙色	緑色

#### 自施設染色工程の染色結果の評価

- ・ 日常検体と一緒に染色した日差再現性標本を利用して自施設染色工程の染色結果の評価をする。コントロール標本と同様に表層～中層扁平上皮細胞 500 個を前述の 6 種類の色調に百分率にて分類する。この百分率とコントロール標本の百分率を比較して自施設標本の染色結果の現状を把握し、暫定的な染色結果との類似性の確認や問題点の検索を実施する。その上で目標とする染色結果に向けた染色環境や染色工程の見直し、問題点の是正などを行う。

#### 染色結果の日差再現性に対する評価

- ・ 日常検体と一緒に染色した日差再現性標本を利用して染色結果の再現性をみる。その標本中の表層～中層扁平上皮細胞 500 個を前述の 6 種類の色調に百分率にて分類し、その百分率を基に日々の再現性を評価する。
- ・ この場合の評価は、生化学などのデータのような標準偏差でなく、子宮腔上皮ホルモン細胞診で使用される成熟度指数 (maturation index : MI) のような大きな変動を確認できれば十分である。それぞれのデータの変動の許容範囲は 10% 程度が望ましい。10% 以上の変動がみられる場合は鏡検上でも染色結果の色調に違いを実感できることがある。この際は染色環境や染色工程などを見直して問題点を見つけ改善する。



## 参考文献

- 1) 渡辺明朗：染色理論の基礎知識 パパニコロウ染色．細胞診の基本 上巻 総論．12-22．田嶋基男編．武藤化学株式会社．東京．1998
- 2) 水道水質データベース：<http://www.jwwa.or.jp/mizu/index.html>
- 3) 原田弥生, 川岸克博, 牛島友則：15 細胞診の日常染色法 パパニコロウ染色．病理組織・細胞診のための日常染色法ガイドンス．918-924．松谷章司, 斉藤信昭「検査と技術」編集委員会編．医学書院．東京．2001
- 4) 山岸紀美江： - 1 Papanicolaou 染色．細胞診の基礎と応用．82-88．田嶋基男, 社本幹博, 山岸紀美江編．名古屋大学出版．名古屋．1990
- 5) 結露はなぜ起こる：<http://www.ads-network.co.jp/tokusyuu/t-05/t-0501.htm>
- 6) 阿倉薫, 畠中光恵, 井上環, 寺本友昭：染色の最終過程にキシレンを使用しない標本封入についての検討．医学検査．2005；9：54：1217-1221
- 7) Baker J.R.：The Differential Action of Dyes．Principles of Biological Microtechnique．228-242．METHUEN&Co.. London．1958
- 8) Boon M.E., Drijver J.S.：1 Cell Biology．Routine Cytological Staining Techniques, Theoretical Background and Practice．3-15．MACMILLAN．London．1986
- 9) Boon M.E., Drijver J.S.：2 Comparing Cells in Histology and Cytology．Routine Cytological Staining Techniques, Theoretical Background and Practice .22-25．MACMILLAN．London．1986
- 10) Boon M.E., Drijver J.S.：6 Cytoplasmic Dyes and Stains．Routine Cytological Staining Techniques, Theoretical Background and Practice．68-79．MACMILLAN．London．1986
- 11) 佐藤七郎：7 細胞核．UP BIOLOGY 細胞 第3版．88-101．東京大学出版会．東京．1985

## 編集後記

平成 15 年の AiCCLS 設立準備時に、Papanicolaou 染色のガイドライン作成を含む中期計画を起案してから早 5 年が経過した。中期計画では標準化すべき事項として細胞所見、検体処理法、染色法、作業環境などを取り上げたものの、いざ始めるとなると一筋縄ではいかなかった。細胞所見では 4 年前より年 1 回の研修会を毎回 100 名前後の参加を得て、関連団体と共催という形（共催は今年で 3 回目）で実施しているものの、単独開催には至っていない。検体処理法は関連団体のマニュアルを準拠することになり、作業環境は他部門がまとめてくれることとなった。染色法だけが唯一主体となって進めた事業になる。しかし Papanicolaou 染色にはすでに施設間格差があり、診断に直結する染色法であることもあって、染色結果や染色工程はこうあるべきという参考文献は見当たらず、当初はどのような趣旨でガイドラインを作成するか五里霧中であった。それでも何かきっかけをと思い、染色工程をいくつかの項目に分けて、項目ごとの染色結果に与える影響因子や問題点について検討してもらったり、どのような染色結果が好まれているかアンケートを取ったり、原理や試薬について文献で調べたり、試薬メーカーの方に尋ねたりした。それらの過程において新たな知見を得たことで光明が差し、疑問に思っていたことが解決に向かい、様々な想定で確認作業をして蓄積した結果をまとめることで、このガイドラインが完成し発刊するに至った。これは、ひとえに Papanicolaou 染色原理等についてご指導くださった元メルク株式会社の渡辺明朗氏をはじめ、検討やアンケートに協力してくださった細胞検査士会愛知県支部の方々や日本臨床細胞学会東海連合会の方々の Papanicolaou 染色をよりよいものにしていこうとする気持ちの賜物と思う。その気持ちや協力を深く敬意を表し、感謝したい。本書は指針とする部分はあるものの、まだまだ検討の余地があると思われるため、Papanicolaou 染色の標準化に対する問題提議として考えていただき、誰もが納得するガイドラインの礎になれば幸いである。その上で Papanicolaou 染色の施設間格差が是正され、最終的に患者サービスの向上につながることを期待する。

角屋 雅路

ガイドライン作成委員会（細胞検査）

監修	越川 卓	（愛知県立看護大学）
作成委員長	角屋 雅路	（知多市民病院）
委員	南谷 健吾	（名古屋記念病院）
委員	大嶽 宏幸	（西尾市民病院）
委員	丹羽 京太郎	（岡崎市民病院）
委員	佐藤 初代	（豊川市民病院）
委員	成田 淳	（厚生連安城更生病院）
委員	梅田 総一郎	（総合病院南生協病院）

問い合わせ先

愛知県臨床検査標準化協議会事務局

〒450 - 0002

名古屋市中村区名駅五丁目 16 番 17 号

花車ビル南館 1 階

（社）愛知県臨床衛生検査技師会事務所

Tel 052 - 581 - 1013

Fax 052 - 586 - 5680

愛知県臨床検査標準化ガイドライン  
Papanicolaou 染色のガイドライン  
第 1 版

発行 平成 20 年 7 月  
発行所 愛知県臨床検査標準化協議会  
発行者 大野 和美  
編集者 松本 祐之・所 嘉朗・角屋 雅路