

病理検査部門

精度管理事業部員：橋本 克訓

(名古屋大学大学院医学系研究科 TEL:052-719-3107)

I. はじめに

チール・ネルゼン(Ziehl-Neelsen)染色は抗酸菌の検出を目的とする染色法で、その染色結果は病理診断に直結するため、より高い精度が要求される。また、平成26年度の精度管理調査時に実施頻度の高い特殊染色のアンケート調査¹⁾を行なった結果、チール・ネルゼン染色が比較的頻度の高い染色であったため、今年度の染色サーベイのテーマとした。

なお、チール・ネルゼン染色サーベイは平成12年度に本精度管理調査で行われており、15年ぶりの実施となった。

II. 対象項目

未染色のパラフィン切片標本を参加施設に配布し、各施設でチール・ネルゼン染色を実施した標本を回収し、染色結果を評価した。

III. 試料について

病理解剖例からチール・ネルゼン染色強陽性の肝臓と脾臓のホルマリン固定・パラフィンブロックを選び、それぞれ組織小片を切り取り、再度、1つのパラフィンブロックに再包埋したブロックを作製した。ブロックは3 μ mの厚さに薄切し、スライドガラスに載せた未染色パラフィン切片標本を試料とした。スライドガラスは剥離防止コートスライドガラスを用いた。

薄切後の染色性の低下が染色結果に影響を及ぼさぬよう、薄切は試料配布の3日前に行った。

IV. 参加施設数について

52施設が染色サーベイに応募し全施設から染色標本を回収した。このうち1施設は石炭酸ビクトリア青染色(チール・ネルゼン染色と同様の抗酸菌の染色方法)^{2,3)}を実施した標本であったため評価対象外とし、今回は51施設を評価対象とした。

V. 評価基準

1. 評価項目と採点基準

下記1～4の評価項目に対して3段階評価を基本とした採点基準を設定し評価した。評価項目と採点基準は以下のとおりである。

1) 抗酸菌の染色性

- 良 : 13点 良好に染色されている
- 可 : 6点 染色が薄いが見出できる
- 不可 : 0点 染色不良で見出が困難

2) 共染の有無

- 良 : 2点 共染なし
- 可 : 1点 共染を多少認めるが鏡検に支障がない
- 不可 : 0点 強い共染があり鏡検に支障がある

3) 後染色の染色性

- 良 : 2点 陽性所見を妨げない染色性
- 可 : 1点 陽性所見を妨げている、または、染色性が悪いものの診断に支障はない
- 不可 : 0点 陽性所見を妨げている、または、染色性が悪く診断に支障がある

4) 全体的な標本の仕上がり(以下の2項目の合計とした)

・染色ごみの有無

- 良 : 2点 染色ごみはない
- 可 : 1点 多少認めるが診断に支障がない
- 不可 : 0点 大きな染色ごみがあり診断に支障がある

・切片の剥がれ

- 可 : 1点 剥がれはない
- 不可 : 0点 大きな剥がれがあり鏡検に支障がある

2. 染色結果評価

染色結果の評価は、23名の病理細胞検査研究班班員がすべての染色標本を、施設名を伏せた状態で鏡検して、上記の4項目について採点した。各項目の平均点(小数点以下第3位四捨五入)の合計(20点満点)を総合評価点とし、抗酸菌の染色性を優先した下記の評価法によりAからDの評価を行った。

1) A評価(染色上目的を十分に達している)

総合評価点が15点以上、抗酸菌の染色性が9点以上

2) B評価(染色上目的を達しているが、更なる向上が望まれる)

総合評価点が10点以上、15点未満、抗酸菌の染色性が9点未満

3) C評価(染色上目的を達しておらず、改善の必要がある)

総合評価点が7点以上10点未満

4) D評価(染色上目的を達しておらず、診断に支障をきたす可能性がある)

総合評価点が7点未満。

VI. 調査結果

評価対象施設の51施設のうち、A評価は46施設(90.2%)、B評価は4施設(7.8%)、C評価は1施設(2.0%)、D評価は0施設(0%)であった(図1)。なお、

各評価項目の平均点、総合評価の平均点(括弧内は満点)は、抗酸菌の染色性：11.90点(13.00点)、共染の有無：1.85点(2.00点)、後染色の染色性：1.62点(2.00点)、全体的な標本の仕上がり：2.96点(3.00点)、総合評価：18.34点(20.00点)であった。また、総合評価の最高点は19.87点(A評価)、最低点は9.87点(C評価)であった。

参加施設の中で、評価点数の高い施設を「高評価施設」とし、自施設の染色像と高評価施設の染色像を比較してもらうため、施設別結果報告書に両施設の顕微鏡画像を並べて掲載し配布した。B、C評価施設に配布した切片に近接する切片を染色し、A評価となった施設の染色像と、B、C評価の染色像の比較を図2～6に示す。

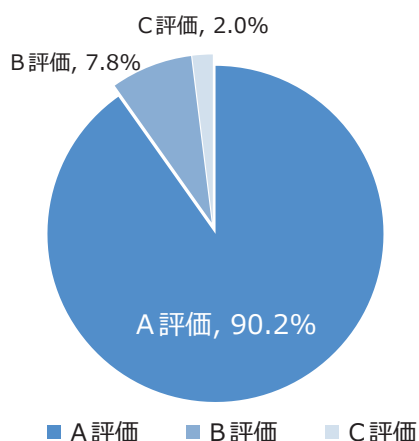


図1：総合評価

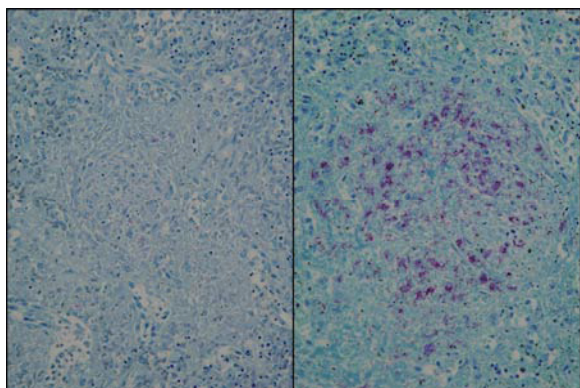


図2：B評価施設の染色像とA評価施設の染色像の比較1
左；B評価施設1、右；A評価施設(ともに脾臓、対物40倍)

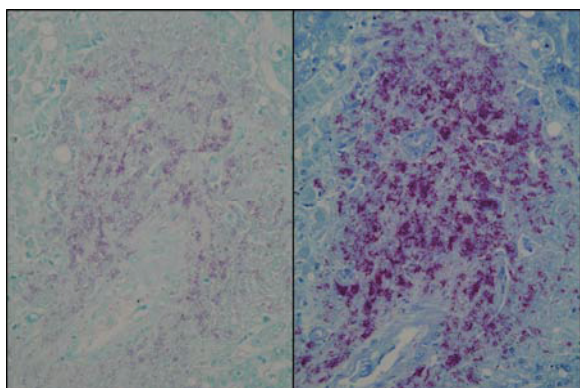


図3：B評価施設の染色像とA評価施設の染色像の比較2
左；B評価施設2、右；A評価施設(ともに肝臓、対物40倍)

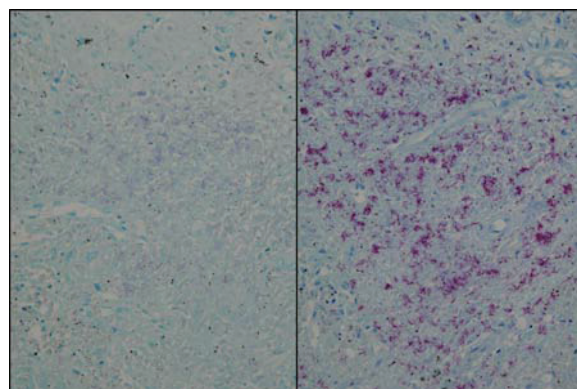


図4：B評価施設の染色像とA評価施設の染色像の比較3
左；B評価施設3、右；A評価施設(ともに脾臓、対物40倍)

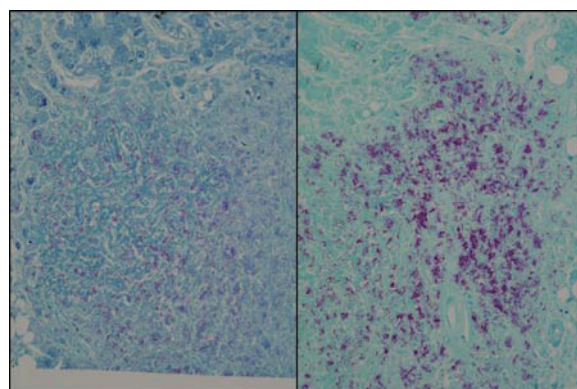


図5：B評価施設の染色像とA評価施設の染色像の比較4
左；B評価施設4、右；A評価施設(ともに肝臓、対物40倍)

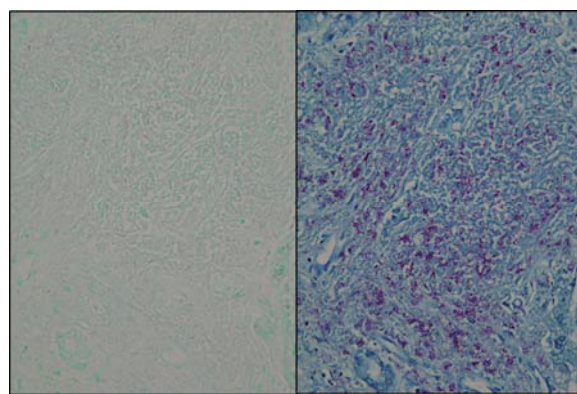


図6：C評価施設の染色像とA評価施設の染色像の比較
左；C評価施設、右；A評価施設(ともに肝臓、対物40倍)

染色サーベイとともにチール・ネルゼン染色実施状況調査を実施した。調査結果を集計し、総合評価の結果と比較した。

1. 染色の実施方法に関して

51施設すべてが用手法で実施した(図7)。このうち、細菌検査部門の試薬を使用した施設が1施設(2.0%)、また、細菌検査部門で染色を実施した施設が2施設(4.0%)あった(表1)。

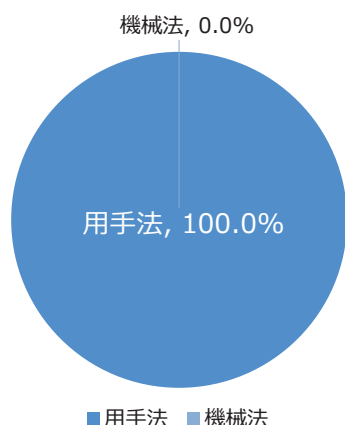


図7：染色方法

表1：染色方法と総合評価

染色法	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
病理検査部門で実施	43	4	1	48
細菌検査部門の試薬を使用して病理部門で実施した	1	0	0	1
細菌検査部門で実施した	2	0	0	2
計	46	4	1	51

2. 陽性コントロールの使用について

チール・ネルゼン染色を実施する時に陽性コントロール切片を使用する施設は32施設(62.7%)、使用しない施設は19施設(37.3%)であった(図8)。陽性コントロール切片を使用する施設のうち、陽性コントロール切片と検索切片を同時に染色する施設は29施設、検索切片と同じスライドガラス上に陽性コントロール切片を載せて染色する施設は3施設であった。C評価施設は陽性コントロールを使用していなかった(表2)。

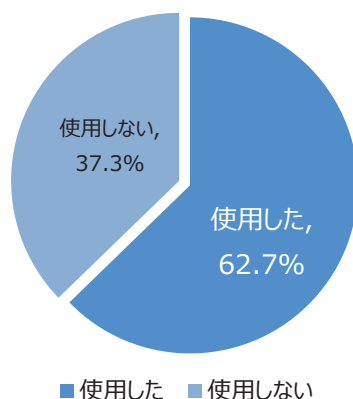


図8：陽性コントロールの使用状況

表2：陽性コントロール切片の使用について

陽性コントロールの有無		総合評価(施設数)			
		A	B	C	計
有	コントロール切片と同時に染色する	26	3	0	29 (56.9)
	同じスライドガラスに載せる	3	0	0	3 (5.9)
無	使用しない	17	1	1	19 (37.3)
計		46	4	1	51 (100)

()内は割合 (%)

3. チール・ネルゼン染色で使用するスライドガラスについて

チール・ネルゼン染色を実施する際に用いるスライドガラスは剥離防止コートスライドガラスを使用する施設は25施設(49.0%)、コートなしを使用する施設は26施設(51.0%)であった(図9、表3)。

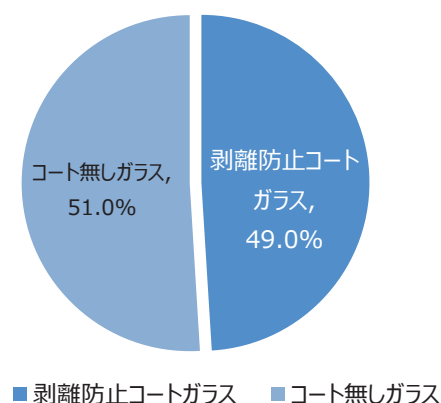


図9：染色に用いるスライドガラスについて

表3：染色に用いるスライドガラスと評価

スライドガラスの種類	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
剥離防止コート	23	2	0	25 (49.0)
コート無し	23	2	1	26 (51.0)
計	46	11	3	51 (100)

()内は割合 (%)

4. 脱パラフィンの方法について

脱パラフィンをHE染色などの他染色法と同様の方法で実施(時間短縮する配慮をする1施設を含む)する施設は40施設(78.4%)、チール・ネルゼン染色で推奨されるオイルキシレン(Fite法)で実施する施設(キシレンを

キシレン代替品に置き換える1施設を含む)は11施設(21.6%)、であった(図10)。抗酸菌の染色性の評価点(13点満点)を脱パラフィンの方法別に2群(Fite法群と非Fite法群)に分けると、前者は12.42点、後者は11.76点で、Fite法群の方が評価点の平均点が若干高値であったが、明らかな差は認められなかった。脱パラフィン法と総合評価、抗酸菌の染色性の評価点の一覧を表4に示す。

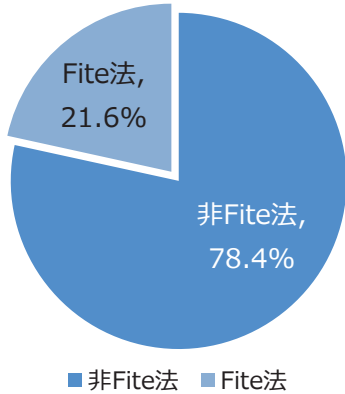


図10：脱パラフィンの方法について

表4：脱パラフィンの方法について

脱パラフィンの方法	総合評価(施設数)				評価*2 抗酸菌の染色性 (点)
	A	B	C	計	
Fite 法	10	1	0	11 (21.6)	12.42
非 Fite 法*1	36	3	1	40 (78.4)	11.76
計	46	4	1	51 (100)	11.90 (平均)

()内は割合(%)

*1: 非 Fite 法は HE 染色など他染色と同じ脱パラフィン法

*2: 評価点(抗酸菌の染色性)の満点は13点

5. 前処理(酸化処理)について

前処理を実施した施設は1施設(2.0%)のみ(図11)で、その方法は10%過ヨウ素酸水、室温、1時間であった。前処理の有無と評価、抗酸菌の染色性の評価点について表5に示した。前処理の有無で評価点に明らかな差は認められなかった。

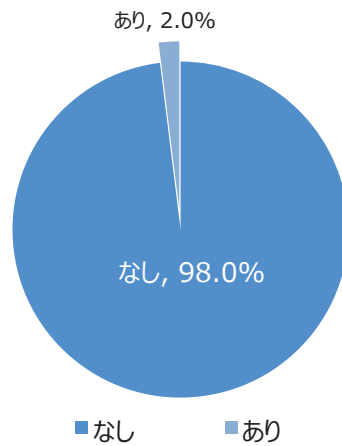


図11：前処理について

表5：前処理の有無と評価、染色性の評価点について

前処理	総合評価(施設数)				評価*1 抗酸菌の染色性 (点)
	A	B	C	計	
なし	45	4	1	50 (98.0)	11.91
あり	1	0	0	1 (2.0)	11.48
計	46	4	1	51 (100)	11.90 (平均)

()内は割合(%)

*1: 評価点(抗酸菌の染色性)の満点は13点

6. 染色試薬(石炭酸フクシン)について

調製済み市販染色液を使用する施設は44施設(86.3%)、自家調製する施設は7施設(13.7%)であった(図12)。両者の総合評価、染色性の評価点を表6に示した。自家調製群の方が染色性の評価点が高値であったが、両者に明らかな差は認められなかった。

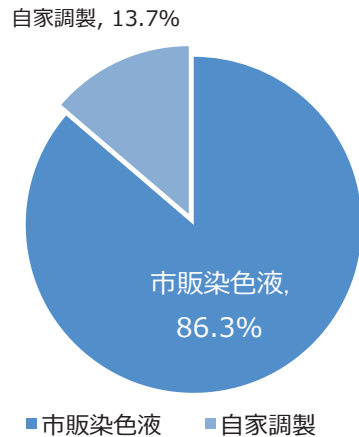


図12：石炭酸フクシンについて

表6：石炭酸フクシンと総合評価について

石炭酸 フクシン	総合評価(施設数)				評価*1 抗酸菌の染色性
	A	B	C	計	
市販染色液	40	3	1	44 (86.3)	11.85
自家調製	6	1	0	7 (13.7)	12.22
計	46	4	1	51 (100)	11.90 (平均)

()内は割合(%)

*1;評価点(抗酸菌の染色性)の満点は13点

染色試薬、市販染色液のメーカーと総合評価の一覧を表7に示す。武藤化学(株)の調整済み染色液を使用した施設が28施設(54.9%)で最多であった。

表7：染色液、色素のメーカーと総合評価について

試薬メーカー	石炭酸 フクシン	総合評価(施設数)			
		A	B	C	計
武藤化学	染色液*1	26	2	0	28
シグマ	染色液	10	0	0	10
	色素*2	2	0	0	2
関東化学	染色液	2	0	0	2
	色素	3	0	0	3
メルク	染色液	0	0	1	1
	色素	1	0	0	1
和光純薬	染色液	1	1	0	2
クローマ	色素	0	1	0	1
片山化学	染色液	1	0	0	1
計		46	4	1	51

*1:染色液;市販染色液

*2:色素;自家調製する際に用いる塩基性フクシン色素

染色方法は、染色液に切片を浸漬する(浸漬法)施設：16施設(31.4%)、切片の上に染色液を積載する(積載法)施設：35施設(68.6%)であった(図13)。染色方法と総合評価の一覧を表8に示す。また、染色液を繰り返し使用する施設は11施設(21.6%)、毎回新調する施設は39施設(76.5%)であった(未回答1施設)(図14)。染色液の使用法の詳細と総合評価は表9にまとめた。

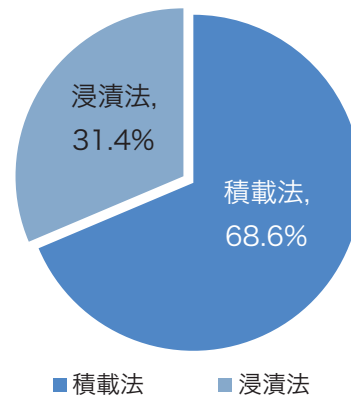


図13：染色方法について

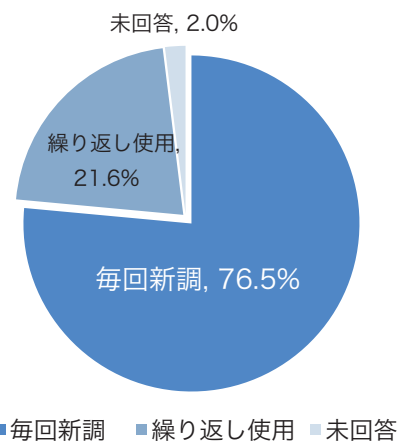


図14：染色液の使用法について

表8：染色方法と総合評価について

染色方法	総合評価(施設数)				評価*1 抗酸菌の染色性 (点)
	A	B	C	計	
浸漬法	15	1	0	16 (31.4)	12.03
積載法	31	3	1	35 (68.6)	11.84
計	46	4	1	51 (100)	11.90 (平均)

()内は割合(%)

*1;評価点(抗酸菌の染色性)の満点は13点

表9：染色液の使用法と総合評価について(その2)

方法	使用法	総合評価(施設数)			
		A	B	C	計
浸漬法	濾過する	7	0	0	7 (13.7)
	濾過しない	3	1	0	4 (7.8)
	新調	4	0	0	4 (7.8)
積載法	新調	31	3	1	35 (68.6)
未回答		1	0	0	1 (2.0)
計		46	4	1	51 (100)

()内は割合(%)

石炭酸フクシンの染色方法と染色時間について表10にまとめた。染色時間の平均は34.7分で、方法別では浸漬法：46.9分、積載法：29.1分であった。

表10：染色方法と染色時間について

染色方法	染色時間の平均(分)
浸漬法	46.9
積載法	29.1
計(全平均)	34.7

染色液の加熱は、加熱しない施設38施設(74.5%)、加熱する施設13施設(25.5%)であった(図15)。加熱方法は火炎が7施設、恒温器が5施設、ホットプレートが1施設であった(表11)。このうち、恒温器で加熱する5施設はすべて浸漬法で染色する施設であり、火炎とホットプレートで加熱する施設はすべてが積載法で染色する施設であった。

加熱をしない施設群と加熱する施設群で評価点数(抗酸菌の染色性)を比較すると、加熱しない：12.04点、加熱する：11.51点であった(表11)。加熱しない方が若干、点数が高いものの、明らかな差は認められなかった。C評価施設(1施設)は加熱をしない群であった。

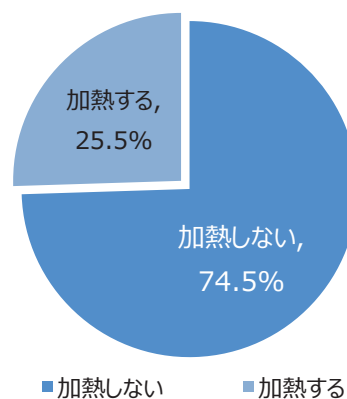


図15：染色液の加熱について

表11：染色液の加熱の有無・方法と総合評価・染色性の評価について

加熱の有無 加熱方法		総合評価(施設数)				評価*1 抗酸菌の染色性
		A	B	C	計	(点)
なし	-	35	2	1	38	12.04
あり	火炎	6	1	0	7	11.51
	恒温庫	4	1	0	5	
	ホット プレート	1	0	0	1	
計		46	4	1	51	11.90 (平均)

*1 評価点(抗酸菌の染色性)の満点は13点

恒温器やホットプレートで加熱した6施設の加熱温度は56℃が1施設、60℃が4施設、65℃が1施設であった。なお、火炎で加熱した全7施設は加熱温度不明と回答した。加熱方法別の加熱温度と総合評価、評価点(抗酸菌の染色性)を表12にまとめた。56℃で加熱した施設の評価点が他より低かった。

表12：加熱方法・温度と総合評価・染色性の評価について

方法×温度℃		総合評価(施設数)				評価*1 抗酸菌の染色性
		A	B	C	計	(点)
火炎	不明	6	1	0	7	11.83
恒温器	56℃	0	1	0	1	8.48
	60℃	3	0	0	4	11.99
	65℃	1	0	0	1	10.57
ホットプレート	60℃	1	0	0	1	11.78
計		11	2	0	13	11.51 (平均)

*1;評価点(抗酸菌の染色性)の満点は13点

染色時間は最短2分から最長120分と多様であった。15分以下の施設はすべて火災により加熱する施設であった。加熱なしで30分間染色する施設が最多の32施設であった。

加熱の有無・染色時間と総合評価について表13にまとめた。

表13：加熱の有無・染色時間と総合評価について

加熱の有無と染色時間		総合評価(施設数)			
		A	B	C	計
なし	20 分	2	0	0	2
	30 分	29	2	1	32
	40 分	1	0	0	1
	60 分	3	0	0	3
あり	2 分	1	0	0	1
	5 分	0	1	0	1
	6 分	1	0	0	1
	15 分	1	0	0	1
	20 分	2	0	0	2
	30 分	2	0	0	2
	60 分	3	0	0	3
	120 分	1	1	0	2
計		46	4	1	51

7. 分別液(試薬)について

分別液の組成は1%塩酸70%アルコールを使用する施設が31施設(60.8%)と最多で以下、3%塩酸70%アルコール；8施設(15.7%)、0.5%塩酸70%アルコール；6施設(11.8%)であった(表14)。このような塩酸アルコール系試薬で分別する施設が47施設(92.2%)あり、他の4施設は硫酸水、硫酸アルコールを使用する施設であった。

表14：分別液と総合評価について

分別液	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
0.5%塩酸 70%アルコール	6	0	0	6 (11.8)
1%塩酸 70%アルコール	27	4	0	31 (60.8)
3%塩酸 70%アルコール	7	0	1	8 (15.7)
0.15%塩酸 80%アルコール	1	0	0	1 (2.0)
3%塩酸 95%アルコール	1	0	0	1 (2.0)
1%硫酸水	2	0	0	2 (3.9)
15%硫酸水	1	0	0	1 (2.0)
1%硫酸 70%アルコール	1	0	0	1 (2.0)
計	46	4	1	51 (100)

()内は割合(%)

分別方法は、切片を分別液に浸漬して実施する施設；30施設(58.8%)、切片の上に分別液を積載して実施する施設；21施設(41.2%)であった(図16)。

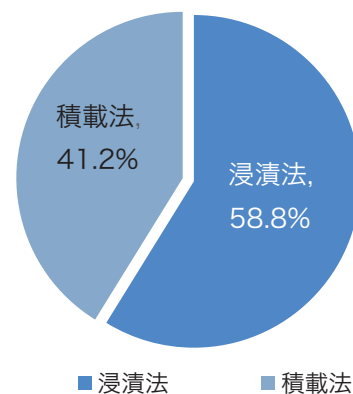


図16：分別方法

分別方法により、総合評価、抗酸菌の染色性に明らかな差は認められなかった(表15)。

表15：分別方法と総合評価について

分別方法	総合評価(施設数)				評価*1 抗酸菌の染色性 (点)
	A	B	C	計	
浸漬法	28	2	0	30 (58.8)	12.16
積載法	18	2	1	21 (41.2)	11.53
計	46	4	1	51 (100)	11.90 (平均)

()内は割合(%)

*1;評価点(抗酸菌の染色性)の満点は13点

分別時間は2秒から300秒と多様であった。10秒が最多で13施設(25.5%)、以下、30秒；10施設(19.6%)、5秒；7施設(13.7%)であった(表16)。

表16：分別時間と総合評価について

分別時間	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
2 秒	0	1	0	1 (2.0)
3 秒	3	0	0	3 (5.9)
5 秒	7	0	0	7 (13.7)
10 秒	12	1	0	13 (25.5)
15 秒	5	0	0	5 (9.8)
20 秒	2	0	0	2 (3.9)
30 秒	10	0	0	10 (19.6)
40 秒	1	0	0	1 (2.0)
60 秒	2	1	0	3 (5.9)
120 秒	0	1	0	1 (2.0)
300 秒	2	0	1	3 (5.9)
未回答	2	0	0	2 (3.9)
計	46	4	1	51 (100)

()内は割合(%)

分別時間の平均は37.4秒であり、方法別では、浸漬法；19.5秒、積載法；63.3秒で、浸漬法の方が短時間であった(表17)。

表17：分別方法と分別時間

分別の方法	分別時間の平均(秒)
浸漬法	19.5
積載法	63.3
全平均	37.4

分別のポイントは、切片の肉眼的な色調を確認しながら適宜実施している施設が最多で45施設(88.2%)、あらかじめ決められた分別時間に従い実施している施設が3施設(5.9%)であった。その他、コントロールスライドの分別状況を顕微鏡下で確認しながら、同程度の時間で検体スライドの分別を行う施設が1施設(2.0%)、あらかじめ決められた分別時間に従いかつ、切片の肉眼的な色調を確認しながら実施している施設が1施設(2.0%)、

顕微鏡で確認しながら実施する施設が1施設(2.0%)であった(表18)。

表18：分別のポイントについて

分別のポイント	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
決められた分別時間に 従い実施	3	0	0	3 (5.9)
切片の肉眼的な色調を 確認しながら適宜実施	41	3	1	45 (88.2)
コントロールスライドの分 別状況を顕微鏡下で確 認しながら、同程度の時 間で検体スライドの分別 を行う。	0	1	0	1 (2.0)
決められた分別時間に 従いかつ、切片の肉眼的 な色調を確認しながら適 宜実施	1	0	0	1 (2.0)
顕微鏡で確認する	1	0	0	1 (2.0)
計	46	4	1	51 (100)

()内は割合(%)

8. 後染色について

後染色液についてはレフレルのメチレン青で実施する施設が43施設(84.3%) (5倍希釈レフレルのメチレン青を使用する1施設を含む)で、ヘマトキシリン；4施設(7.8%)、ライト緑；3施設(5.9%)、マラカイト緑；1施設(3.9%)であった(図17)。それぞれの後染色液(マラカイト緑を除く)の染色像を図18に示す。なお、図6左はマラカイト緑の染色像である。

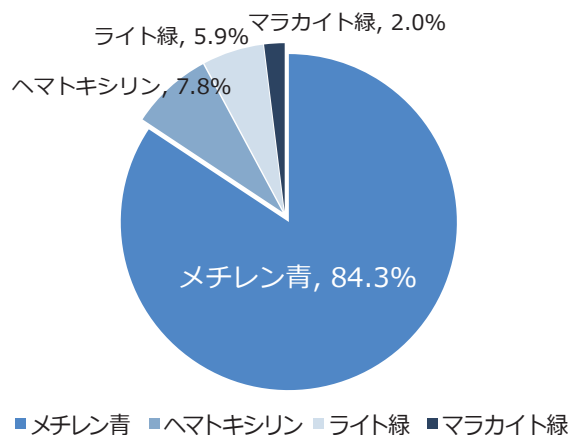


図17：後染色液の種類について

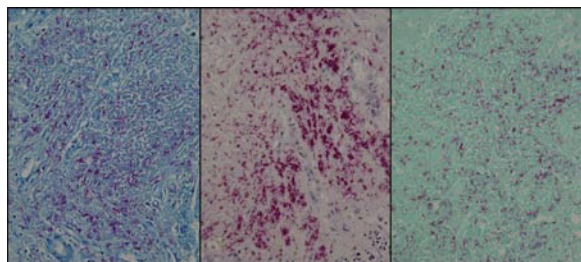


図18：後染色液の種類による染色像の差異(肝臓、対物40倍)
左；メチレン青、中；ヘマトキシリン、右；ライト緑

後染色と総合評価・染色性(後染色)との関係を表19に示す。後染色の染色性の評価点(平均点；1.62点)はライト緑；1.71点、レフレルのメチレン青(5倍希釈を含む)；1.65点、マラカイト緑；1.61点、ヘマトキシリン；1.43点の順であった。

表19：後染色の種類と総合評価・染色性

染色液	総合評価(施設数)				後染色の 染色性 (評価点)
	A	B	C	計	
レフレルの メチレン青*1	39	4	0	43 (84.3)	1.65
ヘマトキシリン	4	0	0	4 (7.8)	1.43
ライト緑	3	0	0	3 (5.9)	1.71
マラカイト緑	0	0	1	1 (2.0)	1.61
計	46	4	1	54 (100)	1.62 (平均)

()内は割合(%)

*1:レフレルのメチレン青・5倍希釈を含む

後染色の実施法は、切片を後染色液に浸漬する施設が20施設(39.2%)、後染色液を切片に積載する施設が31施設(60.8%)であった(図19)。後染色の染色性の評価点(2点満点、平均1.62点)は浸漬法；1.62点、積載法；1.62点と同等であった(表20)。

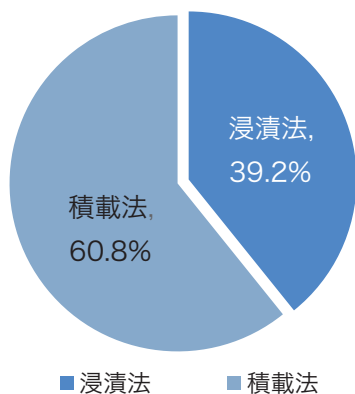


図19：後染色の実施法について

表20：後染色の実施法と総合評価・染色性

実施方法	総合評価(施設数)				後染色の 染色性 (評価点)
	A	B	C	計	
浸漬法	18	2	0	20 (39.2)	1.62
積載法	28	2	1	31 (60.8)	1.62
計	46	4	1	51 (100)	1.62 (平均)

()内は割合(%)

染色時間は最短2秒から、最長600秒と多様であった。染色液と染色時間の組み合わせで最も多い組み合わせは、メチレン青・10秒；11施設(21.6%)、以下、メチレン青・60秒；7施設(13.7%)、メチレン青・2秒、同・5秒、同・30秒；いずれも5施設(9.8%)であった(表21)。

表21：後染色の染色時間と総合評価

後染色液	染色 時間	総合評価(施設数)			
		A	B	C	計
レフレルのメチレン青	2 秒	5	0	0	5 (9.8)
	3 秒	4	0	0	4 (7.8)
	5 秒	5	0	0	5 (9.8)
	10 秒	10	1	0	11 (21.6)
	20 秒	2	0	0	2 (3.9)
	30 秒	3	2	0	5 (9.8)
	60 秒	6	1	0	7 (13.7)
レフレルのメチレン青 (5倍希釈液)	120 秒	2	0	0	2 (3.9)
	300 秒	1	0	0	1 (1.96)
	10 秒	1	0	0	1 (2.0)
ヘマトキシリン	60 秒	2	0	0	2 (3.9)
	300 秒	1	0	0	1 (2.0)
	600 秒	1	0	0	1 (2.0)
ライト緑	3 秒	1	0	0	1 (2.0)
	30 秒	1	0	0	1 (2.0)
	120 秒	1	0	0	1 (2.0)
マラカイト緑	20 秒	0	0	1	1 (2.0)
計		46	4	1	51 (100)

()内は割合(%)

9. 封入前の切片の脱水方法、試薬について

染色後、封入前の切片の脱水方法は、エタノールを使用する施設が23施設(47.1%)、乾燥する施設が22施設(43.1%)、2-プロパノールを使用する施設が3施設(5.9%)、その他、ドライゾール；1施設(2.0%)、アセトン；1施設(2.0%)、70%アルコールに15秒浸漬後、乾燥する；1施設(2.0%)であった(表22)。

後染色と封入前脱水方法の関係は、メチレン青で実施する施設は乾燥の他アルコール、アセトンなどで脱水する施設もあり多様であった(表23)。

表22：封入前の脱水方法と総合評価

脱水方法	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
乾燥	19	2	1	22 (43.1)
70%アルコール 15 秒浸漬後・乾燥	1	0	0	1 (2.0)
エタノール	22	1	0	23 (47.1)
2-プロパノール	2	1	0	3 (5.9)
アセトン	1	0	0	1 (2.0)
ドライゾール	1	0	0	1 (2.0)
計	46	4	1	51 (100)

表23：後染色と封入前脱水方法について

脱水方法	後染色(施設数)				
	メチレン青系*1	ヘマトキシリン	ライト緑	マラカイト緑	計
乾燥	18	1	2	1	22
70%アルコール 15 秒浸漬後、乾燥	1	0	0	0	1
エタノール	20	2	1	0	23
2-プロパノール	2	1	0	0	3
アセトン	1	0	0	0	1
ドライゾール	1	0	0	0	1
計	43	4	3	1	51

*1;レフレルのメチレン青とレフレルのメチレン青・5倍希釈液

10. チール・ネルゼン染色の実施状況について

2014年度のチール・ネルゼン染色の実施枚数を調査した結果を表24に示した。年間実施枚数は0～180枚と多様であった。0枚／年の施設が6施設(11.8%)あり、このなかにはB評価の1施設とC評価の1施設が含まれた。

チール・ネルゼン染色の結果判定(スクリーニング)は、スクリーニングしない施設(コントロールのみ確認する1施設を含める)が11施設(21.6%)、スクリーニングを行った後、病理医に提出する施設が36施設(70.6%)、染色の依頼がない施設が4施設(7.8%)であった(表25)。

表24：年間染色件数と総合評価について

年間染色枚数	総合評価(施設数)				総合評価*1 (点)
	A	B	C	計	
0	4	1	1	6 (11.8)	16.21
1-29	21	1	0	22 (43.1)	18.31
30-59	11	1	0	12 (23.5)	18.86
60-89	6	1	0	7 (13.7)	18.66
90-180	4	0	0	4 (7.8)	19.60
計	46	4	1	51 (100)	18.34 (平均)

()内は割合(%)

*1: 総合評価の満点は20

表25：染色後のスクリーニングについて

染色後のスクリーニングなど	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
スクリーニングする	33	3	0	36 (70.6)
コントロールを確認後、病理医に標本とともに提出する	1	0	0	1 (2.0)
スクリーニングしない	10	0	0	10 (19.6)
染色依頼がない	2	1	1	4 (7.8)
計	46	4	1	51 (100)

()内は割合(%)

チール・ネルゼン染色の工夫、特徴についての質問内容に対する回答(自由記載)が5施設から寄せられた。表26に抜粋し掲載した。

表26：自施設で行っているチール・ネルゼン染色の工夫特徴について

総合評価	自由記載(原文を要約)
A	分別時に背景の組織に石炭酸フクシンが残らないよう注意している
A	脱パラフィン時のキシレンを可能な限り短時間で、染色性を保持させる後染色は薄く染色する
A	脱パラフィンに代替キシレン(ヒストクリア)を使用している
A	火炎加熱後にしっかり冷ます
A	Fite-松本法で実施している

チール・ネルゼン染色で困っていることについての質問内容に対する回答(自由記載)が5施設から寄せられた。表27に抜粋し掲載した。

表27：チール・ネルゼン染色で困っていることについて

総合評価	自由記載(原文を要約)
A	陽性コントロールの確保が難しい
A	陽性コントロールをたてて染色をしたいが、染色件数が少ないため陽性コントロールとなる検体がない。陽性コントロールの標本は販売されているのか
A	少量検体のコントロールはあるが、一見して染まっていることがわかる対照がない
B	陽性検体が少ない
A	陽性コントロールを得ることが難しい

11. 今回の染色サーベイについて

今回の染色サーベイにおける染色の満足度、配布した未染色切片の厚さ、染色実施状況調査の設問量を調査し、総合評価別に表28～30にまとめた。

今回の染色について大変満足と回答した施設は8施設(15.7%)、満足が32施設(62.7%)、どちらともいえないが9施設(17.6%)、やや不満は2施設(3.9%)であり、不満と回答した施設は無かった(表28)。

表28：染色の満足度

染色結果の満足度	総合評価(施設数)			
	A	B	C	計
大変満足	8	0	0	8 (15.7)
満足	28	4	0	32 (62.7)
どちらともいえない	8	0	1	9 (17.6)
やや不満	2	0	0	2 (3.9)
不満	0	0	0	0 (0)
計	46	4	1	51 (100)

サーベイに用いた未染標本の切片の厚さが適切であったと回答したのは49施設(96.1%)、厚いと回答したのは2施設(3.9%)施設であり、薄いと回答した施設は無かった(表29)。

表29：未染標本の切片の厚さに関して

評価	回答施設数(%)
適切	49(96.1)
厚い	2(3.9)
薄い	0(0)
計	51(100)

()内は割合(%)

染色の実施状況に関する設問では、設問量が適切であったと回答したのは50施設(98.0%)、多いと回答したのは1施設(2.0%)、少ないと回答した施設は無かった(表30)。

表30：染色実施状況調査の設問数について

評価	回答施設数(%)	
適切	50	(98.0)
多い	1	(2.0)
少ない	0	(0)
計	51	(100)

()内は割合(%)

12. 今後の病理検査部門のサーベイについての意見等について

上記の質問内容に対しての回答(自由記載)が5施設から寄せられた。表31に抜粋し掲載した。

表31：今後の病理検査部門の精度管理調査についての要望などの意見について

総合評価	自由記載(原文を要約)
A	今回のチール・ネルゼン染色のように、多くの施設で日常的に実施されているような項目を精度管理調査の対象とすることは、とても有意義である。
A	未染色標本の材料を記載してほしい。
A	各特殊染色の良い標本を愛臨技のホームページにバーチャルスライド等で公開してほしい。(サーベイの標本でも可)
A	HE染色の染色評価をしてほしい。
A	HE染色の染色サーベイを実施してほしい。

VII. 解説および考察

1. 総合評価結果

評価対象施設の51施設のうち、A評価は46施設(90.2%)、B評価は4施設(7.8%)、C評価は1施設(2.0%)、D評価は0施設(0%)であった(図1)。A評価施設がほとんどであり、D施設はみられなかったのが概ね、良好な結果となった。

2. 染色方法について

染色の実施方法に関して、対象の全施設(51施設)が用手法で実施していた(図7)。チール・ネルゼン染色は脱パラフィン、脱水・透徹系試薬を除くと、抗酸菌を染色するための石炭酸フクシンと、その分別液(塩酸アルコールなど)と、後染色液(レフレルのメチレン青など)の3つの試薬で比較的簡単に染色できるため、用手法で染色を行っているのではないかと推測する。また、石炭酸フキシンの分別を切片の肉眼的な色調を確認しながら適宜実施している施設が88.2%(表18)と多いことや、染

色件数が年間90枚未満の施設が92.2%(表24)と、比較的染色件数が少ないことも自動染色機を利用しない理由と考えられる。

チール・ネルゼン染色は微生物検査部門でも実施される染色法であるため、染色試薬を微生物検査室から借りて実施する施設(1施設)や、微生物検査室で染色している施設(2施設)が存在することがわかった(表1)。

染色時に陽性コントロールを使用している施設は62.7%であった(図8、表2)。染色の精度管理のために、陽性コントロールを用いるのが望ましいが、陽性コントロールの入手に苦労している施設があることが染色実施状況調査の結果(表27)から明らかとなった。病原菌の存在を証明する染色に関しては、染色結果が病理診断に直結するため、陽性コントロールを置くことを強く推奨する。

染色に用いるスライドガラスは剥離防止コートスライドガラス、コート無しスライドがそれぞれ49.0%、51.0%とほぼ半々であり(図9、表3)、総合評価への影響はみられなかった。

今回の染色サーベイで配布した未染色パラフィン切片は染色中の切片に剥がれが生じると評価不能になる恐れがあったため、念のために剥離防止コートスライドガラスを用いた。そのため、鏡検に支障が出るほど大きく切片の剥がれた施設はなかった。石炭酸フクシン中で切片は膨化し、その後の塩酸アルコールなどによる分別や水洗で剥がれやすく、特に乾酪壊死巣を含む組織切片は剥がれやすいため剥離防止の工夫を推奨する成書⁴⁾もある。乾酪壊死巣が広範な組織などには剥離防止コートガラスが必要かもしれない。

3. 染色工程について

1) 染色前の各工程について

脱パラフィンで切片をキシレンやアルコールを通すと、抗酸菌の細胞壁の脂質成分が脱脂されてしまうため、抗酸菌の本来の性質が失われてしまい染色性が低下する懸念がある⁴⁻⁸⁾。そこで脱パラフィンにオイル・キシレンを用いることで抗酸菌の細胞壁を保護して染色性の低下を抑えるFite法が考案された⁴⁻⁸⁾。Fite法で脱パラフィンをした施設は11施設(21.6%)であった(図10)。その総合評価の内訳は、A評価；10施設、B評価；1施設でC評価；0であった(表4)。Fite法で脱パラフィンした施設群(Fite法群)とHE染色と同様の脱パラフィンした施設群(非Fite法群)で抗酸菌の染色性の評価点(13点満点)を比較するとFite法群が12.42点であるのに対し、非Fite法群は11.76点であり、Fite法の方が高値であったが、明らかな差は認められなかった(表4)。今回の染色サーベイで配布した切片は抗酸菌が強陽性となる検体であったため、両者の差が明瞭にならなかったものと推定する。抗酸菌でも抗酸性の弱い菌や放線菌のノカルジアのような染まりにくい菌体を検出する場合にFite法は有用である⁴⁻⁸⁾。

前処理を実施した施設は1施設(2.0%)のみであった(図11)。前処理として、広井らが考案した過ヨウ素酸化法⁶⁾が知られており、この施設は過ヨウ素酸前処理を実施し、A評価であったが、抗酸菌の染色性の評価点(13点満点、平均11.90点)は11.48点であり、前処理なし施設群の平均値の11.91点より低値であった(表5)。酸化による前処理はらい菌やノカルジアのような嫌色素性の菌種の染色に有用とされている^{6,8)}。また、結核菌は病期や治療によって、その細胞壁の性状が変化することで、嫌色素性となることがある。この場合は通常のチール・ネルゼン染色では難染色性となるため、酸化による前処理を行うことで良好な染色性を得られるとされている⁶⁾。今回、前処理の実施が染色性の向上に寄与しなかった理由は不明である。

2) 染色液(石炭酸フクシン)について

石炭酸フクシンは、調製済み市販染色液を使用する施設:86.3%、自家調製する施設:13.7%であった(図12)。平成12年の同染色サーベイでは、市販染色液:65.3%、自家調製:34.7%であり⁹⁾、今回のサーベイでは市販染色液を使用する割合が21.0ポイント増加した。

市販染色液を使用した施設群と自家調製した施設群の抗酸菌の染色性の評価点はそれぞれ、11.85点、12.22点であり(表6)、自家調製群の方が高かったが、明らかな差は認められなかった。

チール・ネルゼン染色に限らず、他の特殊染色においても市販染色液を使用する施設の割合が自家調製する施設を上回っており、特殊染色で市販染色液を用いる割合は愛知県内の調査では、PAS反応:89.3%¹⁰⁾、アルシアン青染色:67.9%¹¹⁾の報告があり、チール・ネルゼン染色も同様に市販染色液の導入が進んでいる状況である。なお、市販染色液は武藤化学(株)の試薬を使用した施設が28施設(54.9%)あり(表7)、県内施設の半数以上の施設が同社の試薬を採用していることがわかった。

染色液の使用方法は浸漬法が31.4%、積載法が68.6%であった(図13)が、染色性の評価点はそれぞれ12.03点、11.84点と明らかな差は認められなかった(表8)。また、染色液を毎回新調する施設は39施設(76.5%)であった(図14、表9)。積載法の方が染色試薬を節約でき、他の切片からの抗酸菌のコンタミネーションを防ぐことができる。また、積載法で実施した35施設はすべて、染色ごとに試薬を新調していた(表9)。積載法では染色ごとに新しい試薬を使用するため、試薬の劣化がない点も利点であると思われる。年間の染色枚数が少ない施設では積載法の方が染色結果の安定性、経済的にも良いと思われる。

浸漬法で染色した15施設のうち、染色液を繰り返し使用する施設が11施設あったが、そのうち4施設は染色液の濾過をしないと回答した(表9)。抗酸菌陽性の結果が出た場合は、次の染色時にコンタミネーション防止のため、染色液の濾過が推奨される。なお、浸漬法でも染色ごとに染色液を新調する施設が4施設あった。

染色時間の平均は34.7分であったが、方法別では、浸漬法群:46.9分、積載法群:29.1分となり(表10)、浸漬法の方が長時間であった。積載法では染色液の蒸発による切片の乾燥が懸念される。また、火災加熱する施設もあったので、浸漬法よりも染色時間が短時間なのではないかと推測する。

石炭酸フクシンを加熱して使用する施設は13施設(25.5%)であった(図15)。加熱の有無で染色性の差は認められなかった(表11)。また加熱方法と温度に関しては様々であり、温度や加熱方法によって染色性が向上するような傾向は認められなかった(表12)。この結果から石炭酸フクシンの加熱は必須ではないと考えるが、染色されにくい、らい菌などの染色には加熱が有効と記載された文献⁷⁾もある。

染色時間は2分から120分と施設によって多様であったが、染色時に加熱する施設群は染色時間が短い傾向がみられた(表13)。加熱は染色時間の短縮に寄与すると考える。

3) 分別について

抗酸菌の細胞質に浸透した色素は安定で、酸やアルコールによる脱色がされにくくなり、これが抗酸菌の名の由来である⁶⁾。分別では塩酸アルコール系分別液を用いる施設が47施設(92.2%)であり、そのうち、1%塩酸70%アルコールが31施設(60.8%)で最多であった(表14)。

分別の方法は分別液に切片を浸漬させる:30施設(58.8%)に対して、切片に積載する:21施設(41.2%)であり、浸漬法で実施する施設が多かった(図16)。抗酸菌の染色性の評価点は浸漬法:12.16点、積載法:11.53点で差はみられなかった。分別時間は2秒から300秒まで、様々であった(表16)。分別の方法と分別時間の関係は浸漬法の平均は19.5秒であるのに対し、積載法の平均は63.3秒で、浸漬法の方が短時間であった(表17)。浸漬法の方がより多くの分別液を均等に切片になじませることができるので分別時間が短いのではないかと推測する。

染色では積載法が多かった(68.6%)が、分別では浸漬法を採用する施設が多かった。これは、分別のポイント、切片の色調を見て見極める施設が94.1%(表18)と大半を占めており、浸漬法の方が分別の見極めがしやすいと思われる。

4) 後染色について

後染色はメチレン青で実施する施設が43施設(84.3%)で最も多かった(図17)。成書にはメチレン青で後染色をすると記載されていることが多いが、ヘマトキシリンでもよいと記載した文献もある^{4,5)}。ライト緑、マラカイト緑で背景を緑色に染色する施設が合わせて4施設あった。後染色に関しては抗酸菌を石炭酸フクシンで赤く染める本法の場合は背景を赤色の補色にあたる青緑系の色で染色し対比させるのが一般的である。身近なヘマトキシリン、ライト緑の使用も抗酸菌の検出には問題ないと

思われる。後染色の染色性の評価点(平均1.62点)はライト緑を使用した施設の平均が最も高く1.71点、レフレルのメチレン青；1.65点であり、マラカイト緑；1.61点とヘマトキシリン；1.43点は平均点を下回った(表19)。ヘマトキシリンを使用した施設の評価点が低いのは、ヘマトキシリンの紫色の色相が赤色の補色の青緑の色相より赤色側に近いため、コントラストが低く感じられるためと思われる。

後染色液の使用法は浸漬法：20施設(39.2%)、積載法31施設(60.8%)であった(図19)。後染色性の評価点は浸漬法；1.62、積載法；1.62となり同等であった(表20)。後染色の染色時間はメチレン青やライト緑では30秒以下であることが多いが、ヘマトキシリンで染色する施設は60秒から600秒であり、染色時間が延長する傾向がみられた(表21)。

5) 封入前の脱水法について

染色後の脱水方法は、エタノールで脱水する施設(47.1%)が最も多かった(表22)。レフレルのメチレン青で後染色した43施設においては、乾燥(70%エタノール後乾燥を含む)；19施設、エタノール；20施設とエタノールで脱水する施設が多かった(表23)。通常の染色では封入前の脱水はエタノールで行うが、アルコールに溶解する染色色素を用いた場合、エタノールでの脱水が行えないため乾燥の方法をとる染色法がある。

脱水方法をアルコール系、乾燥、その他で分類すると、アルコール系；27施設(52.9%)、乾燥；23施設(45.1%)、その他；1施設(2.0%)となる。

6) チール・ネルゼン染色の実施状況について

年間の染色枚数は0～180枚と施設によって大きな差があった(表24)。0枚(／年間)の施設のなかには、B評価施設1施設、C評価施設1施設が含まれた。90枚(／年間)以上の4施設はすべてA評価であった。年間染色枚数群別の施設数と総合評価(20点満点)は、0枚(／年間)施設群(6施設)；16.21、1～29枚(／年間)施設群(22施設)；18.31、30～59枚(／年間)施設群(12施設)；18.86、60～89枚(／年間)施設群(7施設)；18.66、90～180枚(／年間)施設群(4施設)；19.60であり、染色枚数が多い施設は総合評価点が高い傾向がみられた。

結果判定に関しては、病理医に提出する前にスクリーニングする施設が36施設(70.6%)あり(表25)、染色結果の判定に積極的に関わる施設が多いことが分かった。染色のみならず、染色結果も技師で確認し、責任を持つとする姿勢が見受けられる結果であった。また、染色依頼がない施設が4施設(7.8%)あり、C評価施設も含まれた。染色依頼がないのにも関わらず、このサーベイのために染色試薬を調達し参加していただいた施設もあった。

チール・ネルゼン染色の工夫、特徴についての回答が5施設から寄せられた(表26)。脱パラフィン法を工夫している施設が3施設、分別のポイントについてが1施設、

染色時の注意事項が2施設からそれぞれ寄せられた(複数回答あり)。チール・ネルゼン染色のポイントは脱パラフィン、染色液の使用法、分別の程度、後染色とのバランスが重要であることを示唆する回答であった。

チール・ネルゼン染色で困っていることについての回答は、陽性コントロール標本の入手についての悩みが多かった(表27)。陽性コントロールの使用率が62.7%(図8)に留まっている理由は、陽性コントロールの入手が困難なことが要因となっていることが窺える。自施設の症例で抗酸菌陽性のコントロール標本を確保している施設がほとんどであると思われる。施設間で陽性コントロール標本を共有するシステムの構築が必要かもしれないが、倫理的問題があるため、今後の大きな課題である。

染色結果の満足度については、大変満足あるいは満足と回答した施設は78.4%(表28)であったが、B評価の全4施設が「満足」、C評価となった1施設は「どちらともいえない」という評価であった。B、C評価施設の担当者はA評価施設の染色像と自施設の染色を施設別報告書で確認し、染色態度に差異があることを認識していただきたい。他施設の染色像を比較する機会は少ない。積極的に本サーベイのような外部精度管理調査に参加して、自施設の染色結果の向上に日々、努めていただきたい。

サーベイ全体に関するアンケートでは、サーベイで配布した切片について、「適切」と回答した施設が96.1%であったが、2施設(3.9%)が「切片が厚い」と回答した。適正な切片の作製、配布ができるよう、心掛けたい。また、染色状況調査の設問量については適正と回答した施設が98.0%で、1施設(2.0%)のみが「多い」と回答した。染色工程、染色状況に関しては、なるべく設問を絞るよう、配慮するつもりである。

今後の病理検査部門のサーベイについての意見等について、いくつかの意見が寄せられた(表31)。今後のサーベイのテーマの選定や実施方法の参考にさせていただく予定である。

最後に今回の染色サーベイで評価対象外とした施設が実施した石炭酸ビクトリア青染色の染色像を図20に示す。

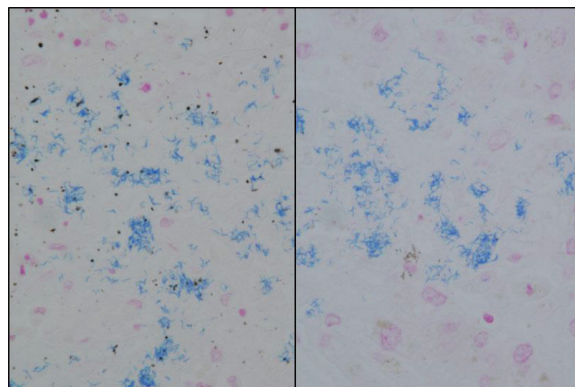


図20：ビクトリア青染色による抗酸菌染色
(左：脾臓、右：肝臓 ともに対物100倍)

菌体がビクトリア青で青く染色されている。後染色にケルンエヒトロートを用いて細胞の核が赤に染色されている

染色は文献3を参考に筆者の所属施設で行った。石炭酸ビクトリア青で菌体を青色、ケルン・エヒトロート(赤色)で後染色する方法である。一般的なチール・ネルゼン染色の染色像とは真逆である。文献3によると、この方法はチール・ネルゼン染色でしばしば問題となる抗酸菌以外の組織への過染がみられず、染色性は良好と総評しているが、今回、石炭酸ビクトリア青染色を実施した施設の染色結果は菌体の染色が弱くB評価と同等の染色結果と思われた。石炭酸ビクトリア青染色を行った施設に問い合わせたところ、従来のチール・ネルゼン染色の染色性が悪く、染色の改善を図るためにこの方法を採用し、以後、抗酸菌染色として実施しているとの説明があった。標本評価の際に病理細胞検査研究班・班員と協議した結果、この施設の染色標本はチール・ネルゼン染色ではないので、評価から除外することに決定した。

今回の染色サーベイでチール・ネルゼン染色以外の抗酸菌染色法を実施している施設があることが明らかとなった。また、チール・ネルゼン染色の後染色に4種類(メチレン青、ヘマトキシリン、ライト緑、マラカイト緑)の染色液が使用されており、染色像は多様であった。このような状況のなか、後染色の方法を含め、チール・ネルゼン染色の標準化は難しいと考えるが、本染色の目的は抗酸菌の検出であるため、検出に適した染色方法や抗酸菌の検索の妨げにならない後染色の方法を各施設が選択すればよいと思われた。

VIII. まとめ

平成27年度の病理検査部門の染色サーベイはチール・ネルゼン染色をテーマとした。参加施設は52施設あり、うち1施設は石炭酸ビクトリア青染色の標本を提出したため、この施設を除外した51施設を評価対象とした。

評価結果はA評価；46施設(90.1%)、B評価；4施設(7.8%)、C評価；1施設(2.0%)、D評価；0施設であり、概ね良好な結果であった。

未染色標本配布と同時にチール・ネルゼン染色の染色状況調査を実施し各施設の染色工程、状況を調査した。各施設で染色工程は様々であった。後染色には4種類の染色液が使用されており、染色像は多様であった。

平成26年3月に病理診断の精度管理の向上を目的とした日本病理精度保証機構が設立され、病理検査の精度管理の重要性が高まっている。本精度管理調査が病理検査の精度管理、標本作製技術の向上の一翼を担うよう、今後も活動を継続していきたい。

IX. 実務担当者

- 長田 裕之(名古屋第二赤十字病院)
- 柚木 浩良(公立陶生病院)

X. 参考文献

- 1) 愛知県臨床検査技師会(編), 平成26年度愛知県臨床検査精度管理調査報告集, p217-235, 2015
- 2) 若松菊男, 石炭酸ビクトリア青液を用いた新しい抗酸菌染色法, 衛生検査 38(3): p348, 1989
- 3) 石堂純, 石炭酸ビクトリア青液を用いた抗酸菌染色法の検討(第1報), 袋井市民病院研究誌 1(1): p91, 1990
- 4) 渡辺陽之輔ら(編), 病理組織標本の作り方(第6版), 医学書院, p259-261, 1986
- 5) 病理技術研究会(編), 基礎病理技術学, 笹氣印刷, p113-124, 2013
- 6) 月刊Medical Technology(編), 最新染色法のすべて, 医歯薬出版, p93-97, 2011
- 7) 日本病理学会(編), 病理技術マニュアル3 病理組織標本作製技術 下巻 染色法, p150-158, 1981
- 8) 病理技術研究会(編), 病理標本の作り方, 文光堂, p200-205, 1999
- 9) 愛知県臨床衛生検査技師会(編), 平成12年度愛知県臨床検査精度管理調査報告集, p103-117, 2001
- 10) 愛知県臨床衛生検査技師会(編), 平成23年度愛知県臨床検査精度管理調査報告集, p205-210, 2012
- 11) 愛知県臨床衛生検査技師会(編), 平成24年度愛知県臨床検査精度管理調査報告集, p201-207, 2013