

細胞検査部門

精度管理事業部員 成田 淳 厚生連安城更生病院 TEL 0566-75-2111 (内線 2462)
 実務担当者 内田 一豊 (豊橋市民病院)
 小野田 聡美 (厚生連豊田厚生病院)

I. はじめに

細胞検査部門では、愛知県臨床検査標準化協議会より平成 20 年 7 月に発行した「Papanicolaou 染色のガイドライン (以下、ガイドライン)」に基づき、Papanicolaou 染色 (以下、Pap 染色) について、県内施設における染色性の統一化を目的とした精度管理調査を実施した。なお、今年度は Pap 染色の原理や注意点などの再確認と、染色改善に役立つ個別の染色アドバイスをを行った。また、次年度は良好な染色性の維持や改善状況を調査する予定であり、2 年計画で取り組むこととした。

アルコールにてコーティングし再固定をした (未染色標本 2 枚を配布)。

3. 染色

各施設で通常行われている染色工程にて、Pap 染色の実施を依頼した。

4. 提出物

各施設で Pap 染色を施した 1 枚と染色工程表の提出を求めた。

5. 評価

今回の評価基準は、愛臨技細胞検査研究班の班員施設で実施した事前調査を基に定め、その基準に従って各施設の染色結果を評価した。

1) 評価基準

染色標本は、数値として表記できる客観的な指標がないため、項目ごとに重要度に応じた配点した評価基準 (表 1) を設け、60 点満点の合計ポイントとして評価ができるように工夫した。評価の誤差を極力軽減するため、愛臨技細胞検査研究班班員全員が同時に標本を供覧し、意見交換後に評価した。

II. 方法

1. 検体

ガイドラインで推奨している喀痰材料をプールして使用した。

2. 標本作製

95%エタノールで湿固定後、試料発送直前に 5%ポリエチレングリコール加イソプロピール

表 1. 評価基準

項目	配点および評価基準					
	1 点	2 点	3 点	5 点	7 点	10 点
塗抹検体はがれ	見られる	適切	—	—	—	—
気泡	見られる	適切	—	—	—	—
封入剤の量	少・多	適切	—	—	—	—
脱水透徹(水滴)	見られる	適切	—	—	—	—
染色むら	見られる	適切	—	—	—	—
バックグラウンド過染	過染	適切	—	—	—	—
ヘマトキシリン	薄い・濃い	—	やや(薄い・濃い)	—	適切	—
オレンジ G	薄い・濃い	—	やや(薄い・濃い)	—	適切	—
ライトグリーン	薄い・濃い	—	やや(薄い・濃い)	—	適切	—
エオジン	薄い・濃い	—	やや(薄い・濃い)	—	適切	—
核の分別	不足・過剰	—	やや(不足・過剰)	適切	—	—
色だしの色	不足・過剰	—	やや(不足・過剰)	適切	—	—
オレンジ G 分別	不足・過剰	—	—	やや(不足・過剰)	—	適切
合計ポイント	60 点満点					

2) 判定基準

60点満点の評価点数を集計した。その結果、平均値 53.1、標準偏差 5.4、SD 範囲 48、2SD 範囲は 42 であった。

判定基準は、52 点以上を A 判定、44～51 点を B 判定、43～40 点を C 判定、39 点以下を D 判定とした。

III. 結果

A 判定：28 施設、B 判定：20 施設、C 判定：2 施設、D 判定：該当なし（参加 50 施設）。

IV. 解説・考察

1. 核染色

核染色の最短時間は 7 秒で、最長時間は 6 分、平均 2 分 9 秒であった。1 分以下のほとんどの施設がやや薄い染色結果を示したが、最短 7 秒の施設のみ核染色に問題点は見出されなかった。核染色がやや薄いと評価された施設は 8 施設（16%）で、やや濃いのは 1 施設（2%）であった。核染色時間は 1 分～4 分であった（図 1）。

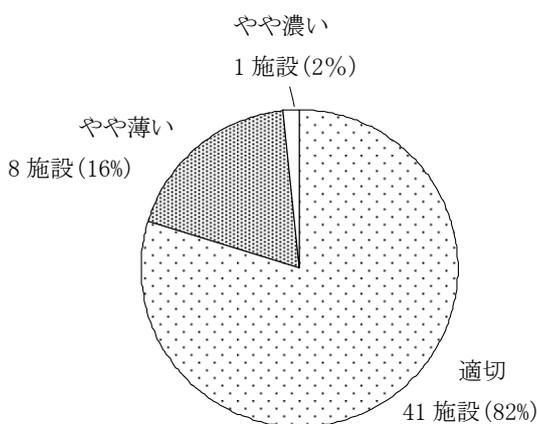


図 1.ヘマトキシリンの染色性

適切な染色性を示さなかった施設について、1 分以下の場合を除くと核染色時間との因果関係は見出されず、問題点は核分別操作ではないかと推測された。Pap 染色の核染色は退行性染色である。濃く染めて塩酸アルコールで余分なヘマトキシリンを落とすという操作を理解する必要があり、1 分以下の染色時間は好ましくないとと思われる。

2. 核分別並びにバックグラウンドへの過染

核分別の最短時間は 5 回の出し入れ（手染め）で最長時間は 10 分、平均 43 秒であった。45 施設（90%）が適切と評価され（図 2a）、バックグラウンド項目で過染と評価されたのは 7 施設（14%）であった（OG-6・EA-50 染色を含む）（図 2b）。これらの配点において、ヘマトキシリンと差別化ができておらず、次年度は今年度と配点の整合性を取りつつ改善すべき項目である。その中で、バックグラウンドがヘマトキシリンに過染していると評価された施設は 5 施設（14%）で、そのうち核染色時間が長い施設は 1 施設のみであった。残りの施設は塩酸アルコールの塩酸濃度が薄い、もしくは分別時間が 5 秒～20 秒と短い傾向にあった（ガイドライン推奨 30 秒）。

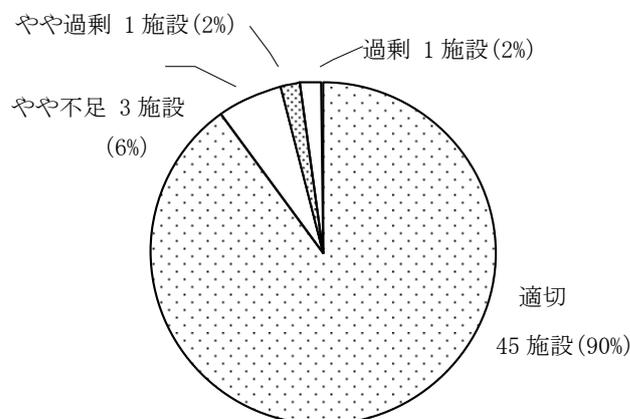


図 2 a.核分別の評価

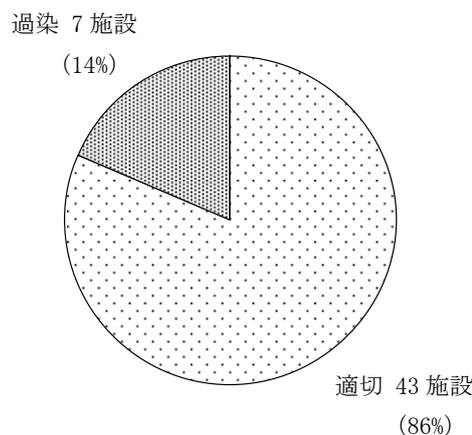


図 2 b.バックグラウンドの過染

担当者は、とかく核の分別に目が捉われがちとなり、分別時間を短めに行う傾向があるように思われる。核染色が適切と評価された施設に

も、粘液成分にヘマトキシリンが部分的に被っているケースが多くみられた。粘液成分等にヘマトキシリンが被っているようであれば、核分別に配慮する必要がある。

ヘマトキシリンを希釈して使用している施設は10施設で、そのうち3施設(33%)は核染色が適切でもバックグラウンドにヘマトキシリンの過染がみられ、制御の困難さがうかがわれた。これにより希釈して使用する場合にもバックグラウンドに配慮する必要があると思われる。

3. OG-6 染色

OG-6 染色の最短時間は1分で、最長時間は8分、平均2分28秒であった。OG-6 染色は見かけ上、染色時間にあまり左右されないが、最短時間および最長時間の施設も各々工夫して良好な結果を得ていた。46施設(92%)が適切と評価され、4施設(9%)はやや薄いと評価された(図3)。やや薄いと評価された施設は、オレンジGの過剰分別と推測された。

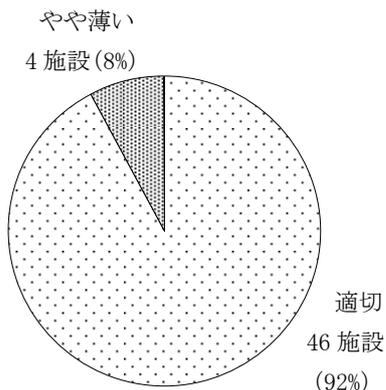


図3. オレンジGの染色性

OG-6 染色とオレンジG 分別(5. オレンジG 分別で後述)には相関関係がある。施設によってはリンタングステン酸や酢酸を使用するなどの工夫がみられるので、一概に染色時間のみでは適切か否かを判断できない。ただ、それらを使用せずにアルコールのみで実施した場合は、オレンジG 分別時間に左右されることを十分認識されたい。

また、OG-6 染色を長時間施しかつオレンジG 分別が不良な場合、背景や粘液にもオレンジG 色が被る傾向にあることも理解されたい。

4. リンタングステン酸、酢酸の使用

リンタングステン酸は23施設(46%)が使用

し、酢酸を使用している施設は26施設(52%)あり(図4a、4b)、そのうち18施設(36%)は併用使用であった。良好な染色結果を示している施設がある一方、細胞質にオレンジGが極度に染まった施設も多数あった。

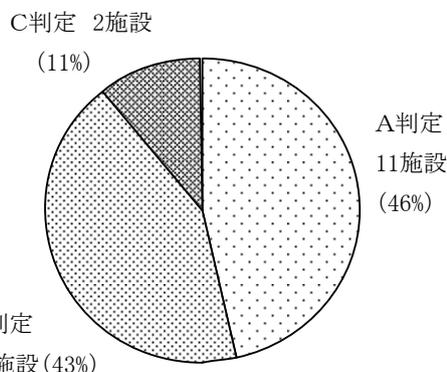


図4 a. リンタングステン酸使用施設 (23施設)

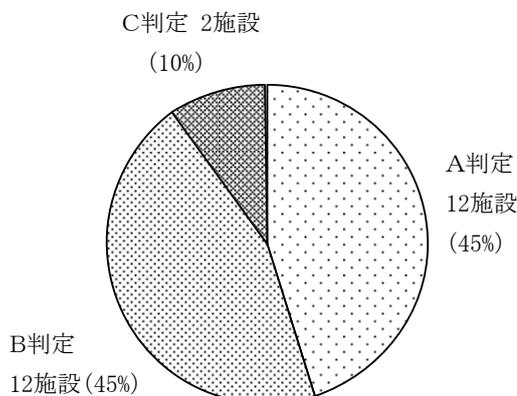


図4 b. 酢酸使用施設 (26施設)

リンタングステン酸や酢酸は、オレンジG 分別(5. オレンジG 分別で後述)と密接な関係にある。たとえば、リンタングステン酸の効果はオレンジGの分別抑制にあり、OG-6直後に使用するとオレンジG色素が細胞質に残り、エオジン色素が細胞質と結合しにくくなる。染色傾向は、オレンジG色とエオジン色の混合色になる場合やライトグリーンも黄緑色に染まるなどがみられることがある。したがって、その制御が使用の要となるため注意が必要である。

また、リンタングステン酸や酢酸は安易に使

用すると逆効果になる場合もあるため、これらの試薬は慎重に用いる必要がある。しかし、明確な目的を持ってすれば効果は期待できる。

一方、リンタングステン酸や酢酸の使用を一旦中止すれば、改善の可能性が期待できる旨のアドバイスを多数の施設（リンタングステン酸単独使用 7 施設 酢酸単独使用 2 施設 併用 9 施設の合計 18 施設において）にさせて頂いたことを報告しておく。

5. オレンジ G 分別

オレンジ G 分別（以下 OG 分別）は、Pap 染色にとって最も重要な部分である。OG 分別の総合時間（OG-6～EA-50 間のアルコール系列の合計時間）は最短時間 35 秒、最長時間 9 分で、平均 2 分 31 秒であった。この OG 分別とエオジン染色は密接な関係にあるため、単純に時間の長短ではかることは不可能である。半数以上 26 施設（52%）で問題点がみられ、適切な施設は 24 施設（48%）であった。分別不足はやや薄いも含めると 17 施設（34%）に達しており、今回全工程で適切ではなかった施設に対して問題点の指摘を行ったが、その多くがオレンジ G 分別の不足傾向によるものであった（図 5）。

また、最短時間の施設はやや OG 分別不足と評価され、最長時間の施設は適切であった。

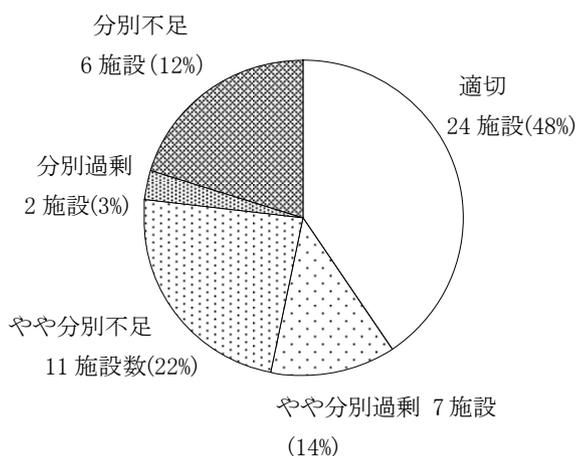


図 5. オレンジ G 分別

Pap 染色の細胞質染色は、オレンジ G、エオジン Y、ライトグリーンイエローの 3 種類の色素によって、《黄色・黄色がかった橙色・赤色がかった橙色・薄い赤色・濃い赤色・緑色》（ガイドラインの表記）の 6 色に染め分けることが可能で、理想はその 6 色すべてを出すことである。

OG 分別は、染色液メーカーの特性やアルコールの分別能力、リンタングステン酸、酢酸およびアンモニア濃度等や使用の有無、さらに時間によって大きく左右され色調が変化する。しかし、これらの特性を理解すれば制御は可能となる。

そして今回、新たな問題点が見つかった。それは、細胞質染色でピンク色～赤色を出すことに主眼を置いたため、オレンジ G の分別を過剰にしてエオジン色を濃くしすぎたことで、核染色にエオジン色の被りが生じて、核が赤紫色になることである。そこで、黄色～橙色～ピンク色～赤色～緑色がバランスよく配色された標本が最良の染色ではないかと仮説した『オレンジ G 分別』という新たな概念に基づき、OG-6～EA-50 間の操作で、オレンジ G に染色された細胞質の分別具合を評価するというものである。具体的には、その OG 分別が不足していればオレンジ G 色が過剰に細胞質に残って黄色調の標本となり、また OG 分別が過剰であればエオジン色が入り込み赤っぽい標本になるという現象を数値化したものである。この OG 分別が適切と判断されるということは、オレンジ G 色とエオジン色がバランスよく配色された標本であると理解されたい。また、これによる評価で適切な標本には、核染色にエオジン色の被りはほとんど見られなかった。以上により、実際にこの項目を追加して再評価したところ、感覚的な見目で A・B・C 評価したものとほぼ一致した。黄色がかった染色または赤みがかった染色と感じられるものは減点に値すると評価した。

6. EA-50 染色

EA-50 染色の最短時間は 2 分で、最長時間は 10 分、平均 2 分 37 秒であった。EA-50 染色では、その中に含まれる色素であるエオジンの濃淡が OG 分別と密接に関連しているため、一概に染色時間だけでは結果を推測できない。エオジン染色は 23 施設（46%）が適切で、薄い施設はやや薄い施設を併せると約半数（44%）の施設に問題点が見出された（図 6a）。改めて OG 分別と高度な相関関係が確認される結果となった（OG 分別の適切は 24 施設 48%）。

への拘りの現れであろう。すなわち、脱水系列に長い時間をかけた方が永久標本作製目的の条件には良いと考えられているからである。極端に短い時間では、脱色等の経時劣化が発生する恐れがあり永久標本として問題が生じる。

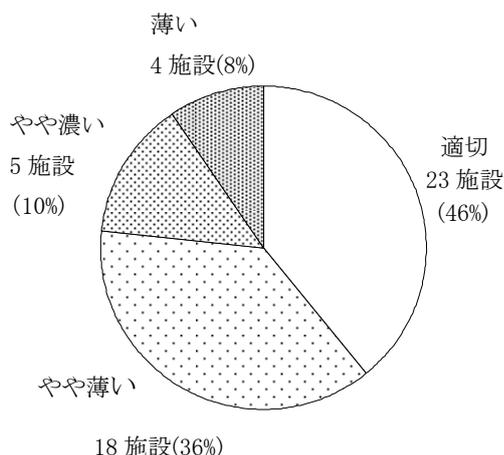


図 6a.エオジンの染色性

また、EA-50 染色液に含まれるもう一つの色素であるライトグリーンは、1 施設がやや濃いのみで(図 6b)、染色性はおだやかと思われた。しかし、EA-50 を長時間染色すると問題点が発生する恐れがあり、5 分以上染色している施設にその傾向がみられた。これは、バックグラウンドや粘液成分等にライトグリーンが被る傾向にあることと、核にエオジン色が被ることで起こるもので、今後の検討結果に期待したい。

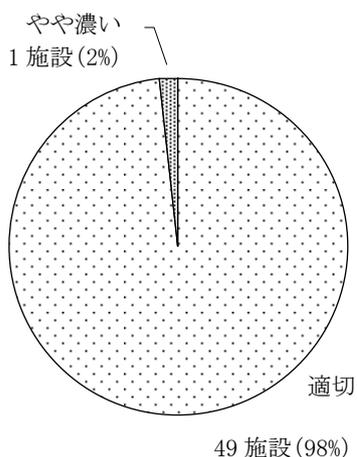


図 6b.ライトグリーンの染色性

7. 脱水系列

脱水系列の総合時間は最短 1 分 40 秒、最長時間は 14 分で、平均 3 分 54 秒であった。ガイドラインは合計 3 分を推奨しているが、平均時間がそれより 1 分程度長いのは各施設の永久標本

8. 透徹系列

透徹系列の総合時間は最短 30 秒、最長時間は 18 分で、平均 6 分 5 秒であった。ガイドラインでは合計 3 分を推奨しているが、平均時間が 3 分以上長いのは、脱水系列同様に永久標本への拘りの現れであろう。また、透徹系列が 1 槽しか設けていない施設があった。このことにより、透徹剤にアルコールが混入し、封入後に気化して結露が生じ、その水分で標本が脱色する可能性が考えられる。同様の現象は、透徹時間が 3 分より短い施設や透徹槽が少ない施設にも起こり得ることが予測されるので、改善を検討されたい。

9. 染色液メーカーによる差

県内で主に使用されている 2 社の判定結果をグラフに示した(図 7a、7b)。メーカーごとに染色性に特徴がみられるが、それを理解し制御することで良好な結果を出すことは可能であると考える。

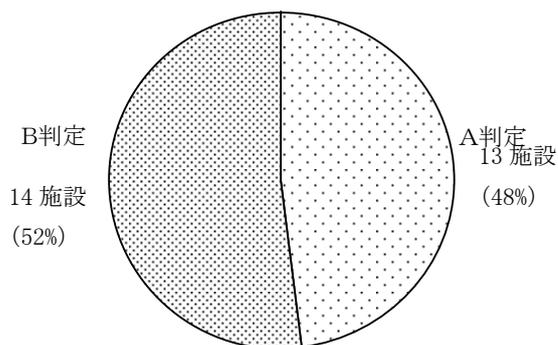


図 7a.MU社(判定結果) 27 施設

において良悪に支障をきたすほどの染色ではないと判断したため、D判定はなかった。

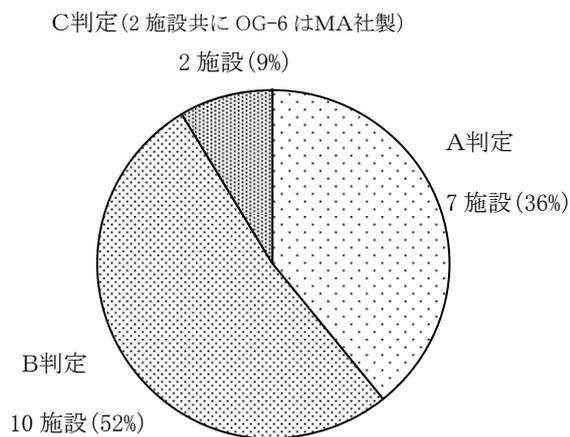


図 7b.ME社(判定結果) 19 施設

10. 粘液やバックグラウンドへの染色液（色素）の被り

意外にも粘液やバックグラウンドへ各種の染色液（色素）が被るという事実は見過ごされてきたと思われる。粘液やバックグラウンドが呈色していたら、それは過剰な色素（ヘマトキシリン・オレンジG・エオジン・ライトグリーン）などが原因である可能性があり、今一度染色方法等を検討する必要がある。それによって、問題点の洗い出しができ、改善の糸口となる可能性も出てくる。

11. 施設別染色アドバイス

今回、各施設には染色工程を記入して頂いた。その染色工程表と実際の染色標本を照らし合わせ、現時点で我々が最善と考える各施設別の方策を染色アドバイスとして報告書に同封した。改善を試み、次年度の精度管理結果に結びつけるよう期待するが、ご意見等があれば担当者に連絡頂きたい。

12. 判定

前述の通り、今年度参加施設の評価点数（60点満点）を集計すると、平均値 53.1、標準偏差 5.4、SD 範囲 48、2SD 範囲は 42 であった。

愛臨技精度管理調査にあたり、細胞検査部門で定めた下記の評価基準と実際の標本を照らし合わせて詳細に検討した結果、52 点以上を A 判定、44～51 点を B 判定、43 点以下を C 判定とした。今回、39 点以下の施設があったが、診断に

愛知県臨床衛生検査技師会精度管理調査における細胞検査部門で定めた評価基準

A判定：欠点が見出せない

B判定：やや欠点はあるものの細胞判定に支障がない

C判定：欠点が見られるが良悪の判定には支障をきたさない

D判定：良悪の判定に支障をきたす

(施設数)

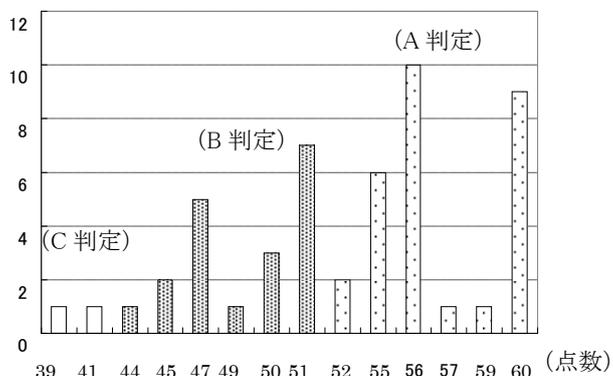


図 8.評価点数と施設数

評価点数と施設数は、図 8 に示すように A 判定 56 点が最も多く 10 施設であった。次いで、60 点が 9 施設、B 判定で最も多かったのが 51 点で 7 施設であった。参加施設 50 施設中、48 施設（96%）が A ないし B 判定を示し、比較的高成績であった。

V. 総括

今回、判定作業直前に追加した評価項目『オレンジ G 分別』が、標準化における判定基準の要になるのか実際には何も根拠は無い。現時点で我々が適切と考える Pap 染色は、オレンジ G 色とエオジン色の配色バランスがとれ、核染色は適切で、背景や粘液成分にヘマトキシリンや色素の被りが見られないなどという簡潔なものであった。

この評価基準で、全項目に欠点が見られなかった施設は 9 施設であった。これらの施設の許

可を得て、すべての染色態度と OG-6～EA-50 間の染色工程も併せて公開した。染色液メーカーが異なっても、使用するアルコールや濃度、時間配分等を調整すれば適切に染色することが可能になることを提示した（施設別報告書に高評価の施設として添付：別図カラーページ）。

また、今回の精度管理調査の結果、ライトグリーンはほとんどの施設が良好であったが、OG-6 とエオジン染色およびその分別に課題が認められた。すなわち、Pap 染色の良否はこれらの操作を適切に行うことに集約されよう。

このように、様々な考察と改善提案ができたことは、各施設から提出して頂いた染色工程表の存在なくしては有り得なかった。公開していただいた施設に感謝すると共に、今年度非公開であった施設は、精度向上のため、次年度は公開に対してご理解とご協力を願いたい。

最後に、平成 20 年 7 月に発行したガイドラインは、Pap 染色の解明に対し完全終結したものではなく始まりである。今後更に多くの情報を蓄積し、検討および考察をしていくことが重要と考える。引き続き次年度も、同一方法・同一評価基準を用いて Pap 染色の精度管理を実施する予定である。以上の集約した情報を基に、より良い解決方法や対処方法を見出していきたい。

謝 辞

今回の精度管理調査の実施にあたり、ご指導いただいた愛知県立看護大学の越川卓教授に深謝いたします。

<MEMO>