

病 理 検 査 部 門

精度管理事業部員	田中 浩一	藤田保健衛生大学病院	TEL 0562-93-2316
実務担当者	柴田 伸一 黒木 雅子	岡崎市医師会公衆衛生センター 厚生連豊田厚生病院	

I. はじめに

脱灰は骨、歯、石灰化した病巣を含む組織標本の作製に際して必要不可欠な操作であり、日常の病理検査業務では頻繁に行う操作の1つである。しかし、その操作方法は単純ではなく、脱灰を必要とする組織の種類、硬さ、大きさなどを考慮した脱灰方法を選択しなければ病理診断に影響を及ぼしかねない。

平成19年度の愛臨技精度管理調査でわれわれ病理検査班は、ホルマリン固定した骨髄材料を「脱灰」・「パラフィン包埋」・「薄切」・「HE染色」と各施設が日常業務で実施する脱灰標本作製法に順じて作製したHE染色標本を評価対象とした。

尚、脱灰標本の作製とは別に各施設に対して脱灰操作に関するアンケート調査を実施したので調査結果と合わせて報告する。

II. 参加施設

平成19年度愛知県臨床衛生検査技師会精度管理調査に参加した147施設中、病理検査の精度管理調査に申し込みがあったのは62施設であった。その全施設からHE標本と脱灰操作に関する調査報告が提出された。

III. 調査目標

今回の精度管理調査で使用した骨髄（剖検材料）に対して、「脱灰操作」、「薄切」、「HE染色」が適切に施行されているかを調査目標とした。

IV. 材料

剖検材料の骨髄を使用した。

10%ホルマリンで骨髄を1週間固定後、硬組織カッティング・マシンを使用して大きさ、厚さ、重量が均一になるよう細切し調査検体とした。尚、骨髄の使用に際しては御遺族の目的外使用に対する同意を得た検体を用いた。

V. 評価方法

病理班の班員により判定を行った。

評価に際しては各施設のHE標本を直接鏡検して評価する方法とデジタル撮影によるHE染色画像での評価の選択によって行った。

VI. 評価ポイント

評価ポイントは以下の5項目、各項目を5点満点で評価した。

- 1) 脱灰状態・・・・・・・・
(1点、2点、3点、4点、5点)
- 2) ヘマトキシリンの染色性・・・・・・・・
(1点、2点、3点、4点、5点)
- 3) エオジンの染色性・・・・・・・・
(1点、2点、3点、4点、5点)
- 4) 染色バランス（コントラスト）・・・・・・・・
(1点、2点、3点、4点、5点)
- 5) 切片の厚さ・・・・・・・・
(1点、2点、3点、4点、5点)

精度管理委員と病理検査研究班員により評価ポイント5項目、各5点満点、計25点を満点とし各施設の総合評価（A、B、C判定）を行った。

《総合判定分類》

- A判定：「脱灰操作、HE染色ともに良好で、病理診断に支障を与えない」
・・・・・・・・25点～20点
- B判定：「脱灰操作あるいはHE染色に若干の問題はあるが病理診断に支障を与えない」
・・・・・・・・20点未満
- C判定：「脱灰操作あるいはHE染色に問題があり、病理診断に支障を与えかねない」
・・・・・・・・B判定の中から班員の評価と病理医の意見を考慮して判定。

結果

- A判定・・・48施設
- B判定・・・10施設
- C判定・・・4施設

今回の精度管理調査で最も評価の高かった施設の脱灰・染色方法を以下に示す。

《脱灰方法》

- ・脱灰液；EDTA（市販品）
- ・脱灰液選択理由；免疫染色の染色性が良い
- ・脱灰前処理の有無；有
- ・前処理方法；脱脂
- ・前処理溶液；70%アルコール
- ・前処理時間；2時間
- ・脱灰時間；15時間
- ・脱灰温度；室温
- ・脱灰液の新旧；新
- ・脱灰液の液量；50ml
- ・中和処理の有無；無
- ・ヘマトキシリンの種類；マイヤー
- ・ヘマトキシリン染色時間；60秒
- ・エオジンの種類；エオジンY
- ・エオジン染色時間；90秒

Ⅶ. 脱灰および染色手順に関する回答集計

脱灰方法およびHE染色法は各施設間で異なっている。脱灰・染色手順を回答のあった全62施設；以下（全施設）を対象に調査し、A判定の中でも評価の高い10施設；以下「甲群」とB判定・C判定であった14施設；以下「乙群」との比較を交えて報告する。尚、報告に際しては脱灰・染色手順に直接関係のない設問内容は省略した。

1. 【使用している脱灰液の種類について】

脱灰操作に使用する脱灰液で最も多かったのがプランク・リュクロ液（迅速脱灰液）の21施（34%）、次いでKC-X（市販品）の各18施設（29%）、蟻酸の17施設（27%）であった（表. 1）。プランク・リュクロ液は簡便で、脱灰速度も速く優れた脱灰法で脱灰後の染色性に対する影響も少ないと言われているが、甲群での使用率は2施設（10%）、乙群では5施設（24%）と乙群での使用頻度が高い事が注目される。また、KC-Xも7施設（41%）と使用頻度が高い。甲群に着目すると蟻酸の5施設（29%）とEDTA（市販品）の2施設（100%）も注目すべき点である。

蟻酸、プランク・リュクロ液に関しては自家調整している施設がほとんどであるが、蟻酸は蒸留水で10%に希釈した10%蟻酸、プランク・リュクロ液に関しては成書にある処方で作製されたものであ

った。

表. 1 脱灰液の種類

	全施設 (n=62)	(%)	甲群 (n=10)	乙群 (n=14)
塩酸	1	2	0(0)	1(100)
蟻酸	17	27	5(29)	1(6)
プランクリュクロ液	21	34	2(10)	5(24)
三塩化酢酸	1	2	0(0)	0(0)
KC-X(市販品)	18	29	1(6)	7(41)
その他;EDTA(市販品)	2	3	2(100)	0(0)
その他	2	3	0(0)	0(0)
合計	62	100	10	14

()は各脱灰液の全施設使用数に対する割合

2. 【脱灰液の選択理由】

各種脱灰液の選択理由で最も多かったのが「脱灰までの時間が短い」を理由とする回答であった（表. 2）。今回の骨髄材料は硬組織の中でも比較的、脱灰は容易であったと思われるが、日常の病理検査業務では骨頭や顎骨などの緻密骨や歯など脱灰完了までに長時間を有する検体も少なくない。脱灰操作に要する時間が病理診断報告の遅れに繋がるため、どのようにして短時間で脱灰操作を完了させるかが今後の課題である。

表. 2 脱灰液の選択理由

	全施設 (n=62)	(%)	甲群 (n=10)	乙群 (n=14)
脱灰完了までの時間が短い	19	31	2	4
安価で脱灰液の作製が簡単である	7	11	1	0
中和処理を行わなくてもよく操作が単純	4	6	2	1
脱灰による組織への障害(膨化、収縮など)が少ない	13	21	3	2
市販品のため試薬作製の手間が無い	13	21	1	6
その他	6	10	1	1
合計	62	100	10	14

3. 【脱灰前処理の有無とその内訳】

脱灰前処理の有無については前処理（無）が41施設（66%）、前処理（有）が21施設（34%）であった。その内訳は21施設のうち18施設（85%）が脱脂であった（表. 3）。

甲群、乙群を比較しても前処理の有無では半々であった。今回の骨髄材料では前処理の有無、特に脱脂の有無に関して標本の評価に差は無かった。しかし、骨頭などの明らかに黄色調を呈し脂肪の存在を確認できるような検体に対して脱脂は必要不可欠である。

表. 3 脱灰全処理の有無と内訳

	全施設 (n=62)	(%)	甲群 (n=10)	乙群 (n=14)
前処理 (無)	41	66	5	7
前処理 (有)	21	34	5	7
合計	62	100	10	14
前処理(有)の内訳				
脱脂	18	85	5	5
再固定	2	10	0	2
その他	1	5	0	0
合計	21	100	5	7

4. 【脱灰時間と甲群、乙群に対する内訳】

脱灰時間は1時間以内から96時間までと大きな差が見られたが22時間から24時間が13施設(約21%)を占め最も多かった(表. 4)。脱灰操作における事前検討を各脱灰液に対して実施しているが、すべての脱灰液で24時間以内に脱灰は完了できた。また、EDTAをベースとする脱灰液は24時間、他の脱灰液においては8時間で脱灰完了できた。

甲群、乙群を比較すると脱灰液と脱灰時間の間に明らかな相関は見られなかった。

表. 4 脱灰時間 (甲群、乙群の内訳)

脱灰時間	全施設 (n=62)	塩酸	蟻酸	ブランク リュクロ	KC-X	その他; EDTA (市販品)	その他
1時間以内	3			2	1		
1時間～3時間	6		[1]	1 [2]	2		
4時間～6時間	6		1	2	3		
7時間～9時間	2		1 ①				
10時間～12時間	5			2 [1]	① [1]		
13時間～15時間	8		2	2 [1]	1 [1]	①	
16時間～18時間	2				1 [1]		
19時間～21時間	4	[1]	1	1 ①			
22時間～24時間	13		3 ③	4	1 [2]		
36時間	3		2 ①				
40時間	3			[1]	1		1
42時間	1				[1]		
48時間	4		1	①	[1]		1
72時間	1		1				
96時間	1					①	
合計	62	1	18	21	18	2	2

各脱灰液の実数は甲乙以外、○は甲群、[]は乙群

5. 【脱灰温度について】

脱灰温度は62施設中56施設(90%)が室温であった(表. 5)。脱灰温度は染色性の低下を防止するために4℃が推奨される事が多いが、室温での脱灰操作でも標本の完成度に差がない事が分かった。事前の脱灰検討で加温して脱灰操作を検討したが、

脱灰速度は速いが組織へのダメージが極めて強く病理診断に影響を及ぼすものであったので、加温での脱灰操作は禁忌と考える。また、スターラーを使用して脱灰液を攪拌する方法も一つのアイデアである。

表. 5 脱灰温度

	全施設(n=62)	甲群(n=10)	乙群(n=14)
室温	56	8	12
4℃	6	2	2
合計	62	10	14

6. 【脱灰後の中和処理の有無と内訳】

中和処理は結合組織の膨化や染色性への影響を防止するために通常は酸性脱灰液であるプランク・リュクロ液等に用いる。また、KC-Xにおいてもその取り扱い説明には中和処理を推奨している。しかし、今回の調査では中和処理の有無による標本への影響に相関は見られなかった(表. 6a、6b)。

表. 6a 中和処理の有無

	全施設(n=62)	甲群(n=10)	乙群(n=14)
中和処理 有	27	2	6
中和処理 無	35	8	8
合計	62	10	14

表. 6b 中和処理の内訳

	全施設(n=62)	甲群(n=10)		乙群(n=14)	
		中和(有)	中和(無)	中和(有)	中和(無)
塩酸	1		1		1
蟻酸	17	4	13	5	1
ブランクリュクロ	21	16	5	1	1
三塩化酢酸	1		1		
KC-X	18	7	11	1	3
その他;EDTA (市販品)	2		2		2
その他	2		2		
合計	62	27	35	2	8

7. 【脱灰完了の判断について】

脱灰終了の判定に関しては実際にメス刃や針等を使用して脱灰の程度を確認していた。「その他」では、「指」で組織の硬さを確認するという回答もあり、「硬さを確認」する作業で脱灰完了を確認している施設は58施設(94%)であった(表. 7)。「材料や大きさにより脱灰時間が決まっている」施設は全体で4施設、うち3施設が乙群に含まれている点は注目すべきである。

表. 7 脱灰完了の判断方法

	全施設 (n=62)	甲群 (n=10)	乙群 (n=14)
メス刃や針等を使用して脱灰程度を確認した。	49	10	11
材料や大きさによって脱灰時間は決めてある。	4		3
その他	9		
合計	62	10	14

8. 【脱灰ブロック薄切に対する満足度】

脱灰時間でも述べたが、事前の検討では今回の骨髓材料はいずれの脱灰液を用いてもおよそ24時間で脱灰は完了すると考えられる。骨頭や顎骨などの緻密骨とは異なり単に「脱灰」だけに注目すれば比較的、脱灰操作は容易であったと思われる。従って、標本上にメス傷を有する標本は全く無く、各施設の自己評価も53施設（84%）が「ほぼ満足」以上であった（表.8）。また、骨梁に「しわ」を有する施設を数施設認めしたが、病理診断に支障を及ぼす程ではなかった。

表. 8 薄切に対する満足度

	全施設 (n=62)	甲群 (n=10)	乙群 (n=14)
満足できる切片が薄切できた	23	4	6
ほぼ満足できる切片が薄切できた	30	4	7
やや不満足である	8	2	1
空白	1		
合計	62	10	14

9. 【ヘマトキシリンと染色時間】

使用しているヘマトキシリンは「マイヤーのヘマトキシリン」が圧倒的多数で43施設（69%）であった（表.9a）。マイヤーのヘマトキシリンについて染色時間を見ると1分00秒から30分00秒まで染色時間に極めて大きな差を認めた。最も多いのは10分00秒～20分00秒の間で18施設、マイヤーのヘマトキシリン使用施設全体の42%であった（表.9b）。

また、ヘマトキシリン染色時間を甲・乙群で比較すると乙群でヘマトキシリンの染色時間が長い事が判明した（表.9c）。

尚、脱灰標本に対してヘマトキシリンの染色時間を延長している施設は61施設中11施設（18%）、短縮している施設は5施設（8%）であった。これを甲群で見ると延長は2施設（20%）、短縮も2施設（20%）であった。乙群では延長が3施設（21%）、短縮は0施設であった。

ヘマトキシリンの染色時間は62施設中の45施設（73%）で非脱灰検体と同様であった。

表. 9a ヘマトキシリンの種類

	全施設 (n=62)	甲群 (n=10)	乙群 (n=14)
マイヤー	43	6	10
カラッチ	9	2	3
ギルマイヤー	3	1	0
その他	7	1	1
合計	62	10	14

表. 9b マイヤーのヘマトキシリン染色時間

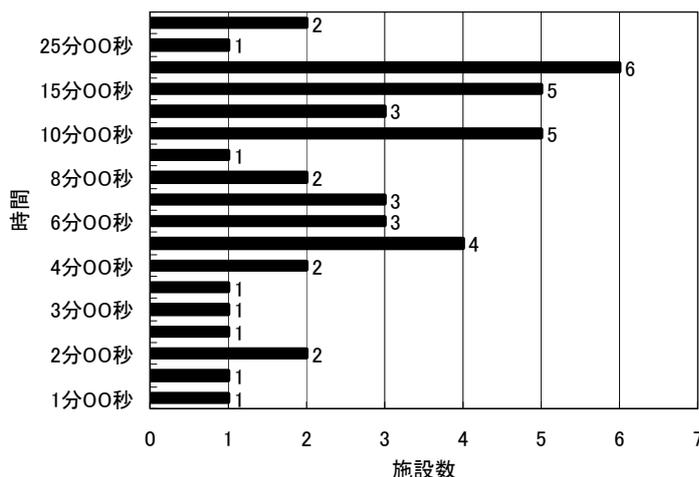


表. 9c ヘマトキシリン染色時間の比較（甲群・乙群）

甲群(n=6)	施設数	乙群(n=10)	施設数
1分00秒	1	2分00秒	1
3分00秒	1	5分00秒	1
3分30秒	1	6分00秒	1
5分00秒	1	7分00秒	1
6分00秒	1	8分00秒	1
15分00秒	1	10分00秒	2
		15分00秒	1
		20分00秒	1
		30分00秒	1
平均5分30秒		平均10分20秒	

10. 【エオジンと染色時間】

各種エオジンの使用割合はエオジンアルコールと水溶性エオジンがほぼ半々であった（表.10a）。しかし、甲群と乙群を比較すると甲群でエオジンアルコール、乙群で水溶性エオジンの使用頻度が高い事から水溶性エオジンとエオジンアルコールでは脱灰材料に対して染色態度が異なる事が推測される。

また、各施設のエオジン染色時間は10秒から25分まで大きな差を認めたが、染色時間と標本の完成度の間に明らかな相関は認めなかった（表10b）。

表10a エオジンの種類

	全施設 (n=62)	甲群 (n=10)	乙群 (n=14)
エオジンアルコール	24	7	4
水溶性エオジン	26	2	8
その他・不明	12	1	2

表10b 甲群、乙群：エオジンの染色時間の比較

甲群(n=9)、乙群(n=12)		
染色時間	エオジン アルコール	水溶性エオジン
10秒		[1]
40秒	1	
1分00秒		[1]
1分30秒	1	1
2分00秒	1[2]	
2分30秒		[1]
3分00秒	1[2]	
4分30秒		[1]
5分00秒	2	
6分00秒	[1]	
7分00秒		[1]
8分00秒	1	
15分00秒	[1]	[1]
25分00秒		1

[]は乙群

VIII. 総括

平成19年度の精度管理調査は過去に例のない「脱灰」をテーマに実施した。例年と比較して標本作製には「脱灰操作」、「薄切」、「HE染色」の3つの要素が兼ね合わさるため標本の完成度には幅があり多種多様であった。また、病理組織染色の評価は数値で置き換える事が出来ないため主観的な要素が大きく影響し、その評価は標本作製者の技量や染色の好みに影響され易い。しかし、今回の精度管理調査では「脱灰における事前検討」を行い班員に対して評価の標準化を行ったので評価における判定差は最小限であったと考える。

全参加施設のHE標本を班員で評価、点数化してA、B、C判定を行った。前述したが「C判定」の判定に際してはB判定標本の中から、病理検査研究班の評価と病理医の意見を参考にC判定を選別した。評価のポイントは5つ、①脱灰状態、②切片の厚

さ、③ヘマトキシリンの染色性、④エオジンの染色性、⑤全体の染色バランス（コントラスト）である。

①脱灰状態

今回、「メス傷など脱灰不良に伴うアーチファクトの有無」に焦点を絞って言えば、全施設目的を達成していた。骨梁の剥れ、皺、折れ曲がりなどのアーチファクトを認める施設も数施設認めたが、病理診断に影響を及ぼす程ではなかった。全施設の標本を検鏡して感じたのは、エオジンが過染している施設の割合が多い事である。過脱灰するとヘマトキシリンの染色性が落ち、エオジンは過染傾向になるため染色時間を延長あるいは短縮するなどの対応を要する。今回の精度管理調査のテーマが「脱灰」と言う事もあり必要以上に脱灰された可能性が示唆される結果であった。

脱灰終了の判断は「メス刃や針等を使用して確認する」事が多く93%を占めるが、同じ骨髄材料と脱灰液を使用しているにもかかわらず大きな格差があるのは、同じ判断方法を用いても判断基準が各施設によって異なっているからであろう。

②切片の厚さ

切片の厚さに関しては「切片が厚い」施設が6施設と全体の10%、「切片が薄い」施設は2施設で全体の3%、「適切な切片」は54施設（91%）であった。切片の厚さは病理標本作製において極めて重要な要素であり、均一な厚さの切片を薄切するには熟練を要する。今回の骨髄材料も適切な切片の厚さが要求されるものであり、厚い切片では細胞同士が重積し合い個々の細胞鑑別が困難となるので注意が必要である。

③ヘマトキシリンの染色性

骨髄には骨髄巨核球、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球系細胞、赤芽球系細胞など様々な細胞が含まれている。これらのクロマチン構造は個々で異なっており、適切な染め分けが出来るように染色、分別を行う必要がある。その中でも赤芽球系細胞は円形で小型、濃縮したクロマチン構造を呈し、集団化して見られるためヘマトキシリンの染色、分別の目安になると考える。今回、ヘマトキシリンの過染色標本は6施設で全体の10%を占めた。これらは、前述したよう核染色が過染色しているために赤芽球系細胞と他の細胞との鑑別が困難であった。また、ヘマトキシリンの染色性が悪い場合はカラッチのヘマトキシリンやヘマトキシリン3Gなどを使用して対応するのが良い。

④エオジンの染色

脱灰後の切片は多少とも染色性に変化をきたすが、エオジンでは細胞質、結合組織が濃染する傾向がある。今回、エオジンが過染していた施設は10施設16%であった。エオジンの染色性は骨髄標本の病

理診断において細胞質内に顆粒を有する好酸球などの鑑別に重要である。エオジンが過染してしまうと細胞質全体が均一に染色され、細胞鑑別が極めて困難となるので注意が必要である。過染する場合は通常使用する濃度の液を希釈して用いるか、染色時間を短くするなどの対応が必要である。

⑤全体の染色バランス（コントラスト）

脱灰材料ではヘマトキシリンとエオジンの両者に対して染色性に変化をきたすため、バランス良く染色するのは非常に難しい。コントラストが良好であったのは62施設中、21施設（34%）であった。脱灰材料におけるヘマトキシリンとエオジンの染色時間を調査すると62施設中、45施設（73%）で非脱灰材料と同じであることから、脱灰材料における染色時間の設定に問題解決のヒントがあると考えられる。

今回の精度管理調査を通じて判明したのは、脱灰条件（脱灰材料、脱灰液、脱灰終了の確認手段）が同一であっても脱灰時間に大きな差を認めることである。脱灰終了の確認手段が同一でも、その判断は主観的な要素が大きいため施設間で大きな差が生じていると考えられる。従って、この脱灰時間の違いが、その後のHE染色に大きく影響するためにヘマトキシリンとエオジンの染色時間も施設間で大きく異なると考えられる。脱灰操作は臓器の種類、硬さ、大きさなどにより異なるため一元的に処理することは出来ないため、脱灰標本の作製に際してはヘマトキシリンとエオジンの染色状態を確認しながら非脱灰標本の染色とは別に染色する必要があると考える。

最後に、今回の精度管理調査が今後の「脱灰標本作製」の技術向上に繋がれば幸いである。参加協力施設に深く感謝します。