

# 病理検査部門

精度管理事業部員：住吉 尚之

(江南厚生病院：TEL.0587-51-3333)

実務担当者：橋本 克訓 (名古屋大学医学部保健学科)

樋口 美砂 (名古屋第一赤十字病院)

## I. はじめに

病理検査部門は、平成10年より精度管理調査ならびに標準化事業として特殊染色の精度管理調査を実施してきた。平成23年度精度管理調査は、過よう素酸シッフ periodic acid Schiff (PAS) 反応を実施した。同調査は、平成10年度、18年度にも実施している。

PAS反応は、多糖類を検出する組織化学的手法として広く発展し、現在はグリコーゲン、粘液物質、真菌類、原虫類の検出、腎糸球体病変の観察など幅広く用いられており、多くの施設で最も利用されている代表的な特殊染色の一つである。

## II. 参加施設

平成23年度愛知県臨床検査精度管理調査に参加した119施設中、病理検査部門への参加は56施設であった。

## III. 材料

10%ホルマリン固定後の剖検材料(真菌感染した腎臓組織)を2.5 $\mu$ mの厚さに薄切した未染色標本

## IV. 評価方法

### 1. 評価項目と採点基準

下記1)～5)の評価項目に対して、良、可、不可の採点基準よりスコア化を行い評価した。

- 1) 真菌の染色性
- 2) 腎糸球体基底膜の染色性
- 3) 陽性対象の部位と非対象の部位とのコントラスト
- 4) 核の染色性
- 5) 核染色による共染

良：3点 可：2点 不可：0点

### 2. 評価点数

評価点数は、19名の病理細胞検査研究班員が5項目についてスコア化した平均点数(小数点以下第3位四捨五入)の合計とし、評価点数に応じてAからDの評価を行った。

- 1) A評価：13点以上

染色上目的を十分に達しており、美しい。

- 2) B評価：10点以上13点未満

染色上目的を達しているが、更なる向上が望まれる。

- 3) C評価：5点以上10点未満

染色上目的を達しておらず、改善の必要がある。

- 4) D評価：5点未満

染色上目的を達しておらず、診断に支障が考えられる。

参加施設の中で、評価点数の最も高かった施設を「高評価施設」とし、自施設における染色法の改善などに役立てていただくため、参考データとして同施設の標本画像を結果報告書に添付している。

## V. 結果

A評価は50施設、全体の89%となり、A評価に該当した施設の割合は前回\*1調査の77%より12ポイント増加した。前回のA評価を維持継続したのは43施設、今回改善し、A評価となった施設は7施設であった。B評価は6施設、全体の11%であった。前回A評価であった施設のうち、B評価となった施設は4施設、今回もB評価であった施設は2施設であった。C評価およびD評価は該当なしであった。

\*1 前回とは平成18年度愛臨技精度管理調査を指し、病理検査部門参加数は60施設であった。

## VI. アンケートの集計結果

### 設問1 染色の方法

用手法 46施設  
機械法 10施設

### 設問2 酸化剤に用いる試薬

オルト過よう素酸 44施設  
メタ過よう素酸 10施設  
市販既製品 2施設

市販既製品は、1%過よう素酸液であった。

メタ過よう素酸ナトリウムを酸化剤として用いる場合は、酸化力が弱いいため、酸化剤濃度と酸化時間は注意をする必要がある。なお、愛知県臨床検査標準化協議会

(AiCCLS) 推奨方法では、1.0%オルト過よう素酸を使用し酸化時間 10 分を推奨している。

設問 3 酸化剤の濃度 (%)

B 評価の 5 施設が、酸化剤濃度 0.5%にて実施している(表 1)。

表 1：酸化剤濃度と評価

酸化剤	濃度 (%)	A 評価	B 評価
オルト過よう素酸	0.5	23	2
	1.0	19	0
メタ過よう素酸	0.5	3	3
	1.0	3	1
市販既製品	0.5	0	0
	1.0	2	0

酸化剤濃度 1.0%と回答した施設の割合は、前回 35%であったが、今回 45%となり 10 ポイント増加した。また、今回、酸化剤濃度 5.0%と回答した施設はなかった(図 1)。

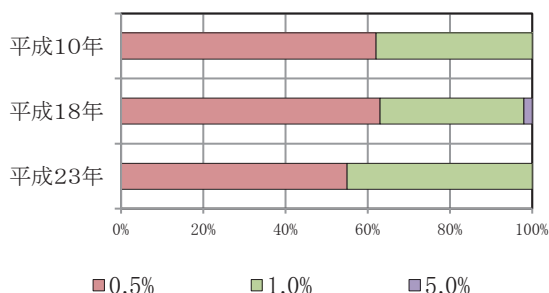


図 1：酸化剤濃度の動向

設問 4 酸化時間 (分)

酸化時間 5～10 分と回答した施設数は、53 施設であった。このうち 5 分と回答した施設数が 14 施設あり、B 評価の 3 施設が含まれていた。

酸化時間 5～10 分と回答した施設の割合は、前回 87%であったが、今回 95%となり 8 ポイント増加した。また、今回、酸化時間を 5 分未満と回答した施設はなかった。(図 2)

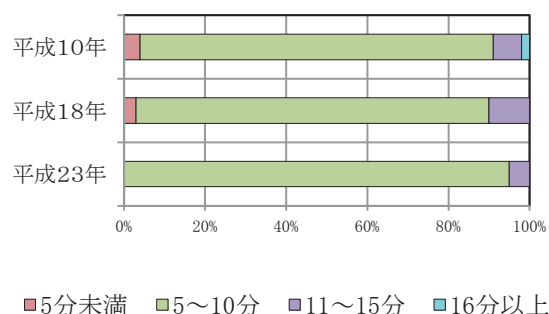


図 2：酸化時間の動向

設問 5 条件による酸化時間の変更

酸化時間を変更しない 49施設

酸化時間を変更する 7施設

酸化時間を変更する理由は、「検体の種類(腎生検とそれ以外、組織診と細胞診など)」「酸化剤の酸化能力に応じて変更する」であった。

設問 6 酸化剤の交換時期(目安)

酸化剤の交換時期を使用日数と回答した施設が 59%となり、使用日数の内訳は最短 2 日、最長 6 ヶ月であった。交換時期を「その他」と回答した施設の内訳は、「染色枚数」と「染色結果」および「コンタミネーション発生時」であった。(図 3)

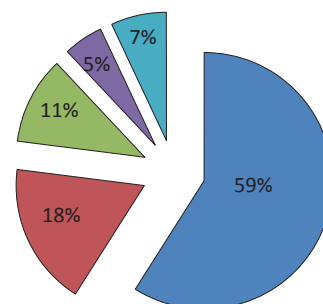


図 3：酸化剤の交換時期目安 (複数回答)

ただし、亜硫酸臭を嗅いで目安とする方法は、亜硫酸ガスの毒性により呼吸器障害などを引き起こす恐れがあるため、注意が必要である。

設問 7 酸化工程後の水洗時間 (分)

表 2：酸化のあとの水洗時間

水洗時間	施設数
数回洗う	1
30 秒	12
1～2分	7
3～4分	11
5分	24
10 分	1

設問 8 シッフ試薬の自家調製

市販既製品を購入 50施設

自家調製 6施設

設問 9 シッフ試薬の種類

コールドシッフ 27施設

ボイルドシッフ 29施設

ボイルドシッフと回答した施設数はコールドシッフを

上回り、その割合は、前回の18%から今回52%になり、34ポイントの大きな増加となった。コールドシッフは、ポイルドシッフと比べて塩基性フクシンが2倍含まれ染色性に優れているが、ポイルドシッフを使用している施設が増加した原因については、今後調査をしていきたい。(図4)

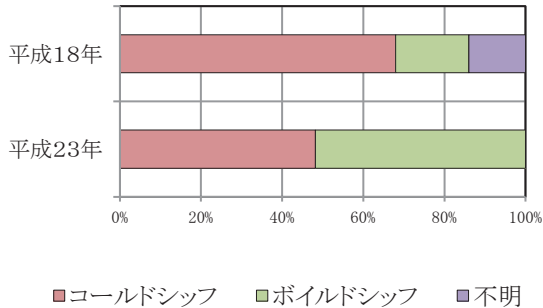


図4：シッフ試薬の動向

設問10 シッフ試薬の反応時間(分)

表3：シッフ試薬の反応時間

反応時間	施設数
5分以下	3
6～10分	15
11～15分	26
16分以上	12

設問11 シッフ試薬の反応時間の変更

反応時間を変更しない 40施設  
 反応時間を変更する 16施設

反応時間を変更する理由は、「検体の種類(腎生検とそれ以外、組織診と細胞診など)」「使用日数および回数」「染色結果」「シッフ試薬の色調に応じて変更する」であった。

設問12 シッフ試薬の交換時期(目安)

シッフ試薬の交換時期を色調と回答した施設が41%、使用日数と回答した施設は24%であった。交換時期を「その他」と回答した施設の内訳は、「染色枚数」と「染色結果」であった。(図5)

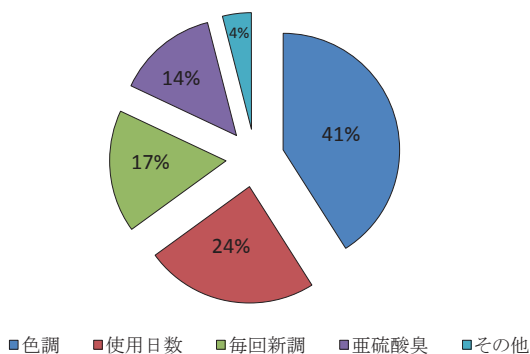


図5：シッフ試薬の交換時期目安(複数回答)

酸化剤と同様、シッフ試薬の亜硫酸臭を嗅ぐ際は、亜硫酸ガスの毒性により呼吸器障害などを引き起こす恐れがあるため、注意が必要である。

設問13 シッフ試薬の反応温度

室温 42施設  
 冷温(冷蔵庫から取り出した直後) 14施設

設問14 亜硫酸水による洗浄の実施状況

実施している 52施設  
 実施していない 4施設

設問15 亜硫酸水洗浄後(シッフ試薬後)の水洗時間(分)

表4：亜硫酸水洗浄後(もしくはシッフ試薬後)の水洗時間

水洗時間	施設数
1～2分	4
3～4分	12
5分	29
6～10分	7
15分	4

設問16 核染色の染色液名

マイヤーのヘマトキシリン 41施設  
 カラッチのヘマトキシリン 4施設  
 オムニのヘマトキシリン 3施設  
 その他 8施設

染色液名を「その他」と回答した施設の内訳は、「リリーマイヤー変法」「ギルのヘマトキシリン」「市販既製品」であった。

設問17 核染色の染色時間(分)

2分未満 18施設  
 2分以上5分未満 22施設  
 5分以上16分未満 16施設

設問18 核染色の色出し方法

水洗 23施設  
 温湯 31施設  
 その他 2施設

色出し方法を「その他」と回答した施設の内訳は、「トリス緩衝液」「炭酸水素ナトリウム水溶液」であった。

温湯温度の内訳は、  
 30～39℃ 4施設  
 40～49℃ 16施設  
 50～60℃ 8施設  
 未回答 3施設

設問 19 1ヶ月間の病理組織切片のPAS反応枚数

前回の調査では、作製枚数とB評価との関連は認められなかったが、今回の調査では10枚以下と回答した22施設中にB評価施設が4施設含まれていた。

表5：1ヶ月間のPAS反応作製枚数と評価

作製枚数	A評価	B評価
10枚以下	18	4
11～100枚	12	1
101～200枚	9	0
201～500枚	8	1
501枚以上	3	0

設問 20 今回使用した酸化剤

表6：今回使用した酸化剤

	A評価	B評価
新品	30	3
中古品(使用中)	20	3

設問 21 今回使用したシッフ試薬

表7：今回使用したシッフ試薬

	A評価	B評価
新品	28	3
中古品(使用中)	22	3

設問 22 今回使用した亜硫酸水

表8：今回使用した亜硫酸水

	A評価	B評価
新品	24	2
中古品(使用中)	24	3
使用していない	2	1

設問 23 今回核染色に使用した染色液

表9：今回核染色に使用した染色液

	A評価	B評価
新品	5	1
中古品(使用中)	45	5

設問 24 今回の未染色標本の切片の厚さ

適度 53施設  
薄い 3施設

設問 25 今回の染色結果の満足度

表10：今回の染色結果の満足度

	A評価	B評価
大変満足	1	0
満足	41	3
どちらともいえない	6	1
やや不満	1	2
不満	1	0

設問 26 愛知県臨床検査標準化協議会(AICCLS)におけるPAS反応の推奨方法についてPAS反応推奨方法を知らない施設が12施設あり、そのうちB評価1施設が含まれていた。さらに、推奨方法に変更していない施設33施設にはB評価5施設が含まれていた。一方、推奨方法に変更した、以前から実施している11施設はすべてA評価であった。(表11)

表11：愛知県臨床検査標準化協議会PAS反応推奨方法

	A評価	B評価
推奨方法を知らない	11	1
推奨方法に変更していない	28	5
推奨方法に変更した	11	0
以前から推奨方法を実施		

設問 27 PAS反応について工夫していること

以下に回答を列記する。

- ・のせガラス法で実施している。
- ・金属製の染色カゴは使用しない。
- ・セロイジン被膜によりグリコーゲンの溶出防止。
- ・陽性コントロールを2種類以上同時に染色する。
- ・脱パラ時の水洗を手早く行う(グリコーゲン溶出防止)。
- ・過よう素酸は毎回新調し15分以上は反応させない。
- ・シッフ試薬に浸漬するとき、十分に水分を除く。
- ・大型冷蔵庫内で冷温染色の実施(シッフ試薬の交換頻度を極限まで落としている)
- ・剖検材料は反応時間を延長する。
- ・亜硫酸水の実施と十分な水洗。
- ・亜硫酸水の第1槽には前回の第2槽を練り上げて使用する。
- ・試薬交換は早めに行う。

設問 28 PAS反応について困っていること

以下に回答を列記する。

- ・シッフ試薬の交換時期がわからない。
- ・コールドシッフの劣化防止方法。
- ・強酸染色液のため染色装置(シッフ液周辺)が錆びる。



- ・良く染まり過ぎる。

## Ⅶ. まとめ

(社)愛知県臨床衛生検査技師会では、県下における臨床検査施設の施設間差是正を目的に精度管理調査から各施設の改善までを精度管理事業の範疇として活動している。

特に、精度管理調査後、考えられる施設の問題点を抽出し、結果報告書にアドバイスを載せるなど個別対応のサポートに力を入れている。

さらに、改善が必要な施設などに対しては結果検討会への参加を呼び掛けてきた。結果検討会とは、精度管理委員と各施設担当者が対話形式で改善方法を共に考える直接的なサポート活動である。

また、病理細胞検査研究班では、これまでに特殊染色の染色液や使用試薬の検討を独自に行い、本総括集に検討結果を掲載し、精度管理事業部会の報告会ならびに病理細胞検査研究班例会にて発表してきた。これら研究班活動の検討結果をもとに、愛知県臨床検査標準化協議会(AiCCLS)から平成22年9月にPAS反応の推奨方法が発行されている。

今回、A評価に該当した施設が12ポイント増加した。これは、平成10年度、18年度にPAS反応の詳細な検討を行った中で、特に酸化剤濃度と酸化時間についての検討報告が、各施設における改善結果としてA評価に表れたものと考えられる。そして、AiCCLSからPAS反応の推奨方法が提案されたことも改善結果に繋がった一因であると考えられる。

B評価となった施設は、酸化剤濃度あるいは酸化時間が不十分であったと考えられる。十分に酸化処理を行うことで、染色性の改善に繋がるものと考えられる。

PAS反応は、試薬管理が重要とされているが、今回の調査においても保存方法と交換時期は、施設によって違いが見られ、統一化を図るには時間と労力を要することが予測される。平成18年度に当研究班で酸化剤の検討を行った結果、オルト過よう素酸は濃度低下による染色性の影響が少なかったことに比し、メタ過よう素酸(メタ過よう素酸ナトリウム)は濃度低下による染色性の減弱が顕著であった。過よう素酸濃度の低下が及ぼす酸化能低下の度合いは、脱パラフィン後の水の持ち込みによる影響度が両者で異なるものと思われる。よって、過よう素酸水の交換時期はどちらの試薬を使用するかによって依存する。また、当時の検討では、オルト過よう素酸水調整後の経時的な染色性を検討したが、調整後4週間後も良好な染色性が保たれていることを確認した。

設問28の回答から、シッフ試薬の交換時期(シッフ試薬の効力)の確認方法は、シッフ試薬をホルマリン原液に滴下すると瞬時に赤紫色を呈することで確認が可能である。また、シッフ試薬の劣化は、水の持ち込みによる影響が無視できないため、標本の水分をよく除去し、試薬に浸漬する必要がある。

PAS反応の染色結果に疑問をいっている施設各位に

は、参考資料として、下記に愛知県臨床検査標準化協議会推奨方法(2)PAS反応の染色手技を掲載したので、先ずは貴施設の染色手技と比較検討をしていただきたい。

今後も特殊染色の精度管理を継続的にを行い、施設間差是正と標準化の一端を担っていく。

最後に、今回精度管理調査に参加いただいたご施設は、今後も継続してご参加いただき、自施設における精度の維持向上にお役立ていただくとともに当精度管理調査にご理解とご協力をお願いいたします。

## 《参考資料》

愛知県臨床検査標準化協議会推奨方法の染色工程を示す。

1. 脱パラ、脱キシレン、水洗
2. 1.0%過よう素酸 10分
3. 水洗 5分
4. コールドシッフ 15分
5. 亜硫酸水 3層 各3分
6. 水洗 5分
7. 核染色(マイヤーのヘマトキシリン)
8. 色出し(温湯) 5分
9. 脱水、透徹、封入

## 《参考写真》

高評価施設PAS反応標本(図6、7)

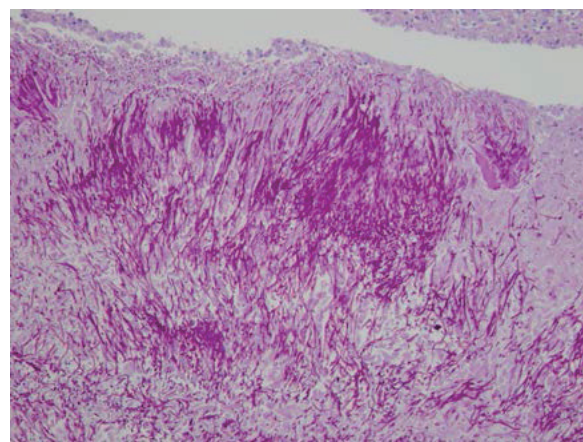


図6：真菌 対物10倍

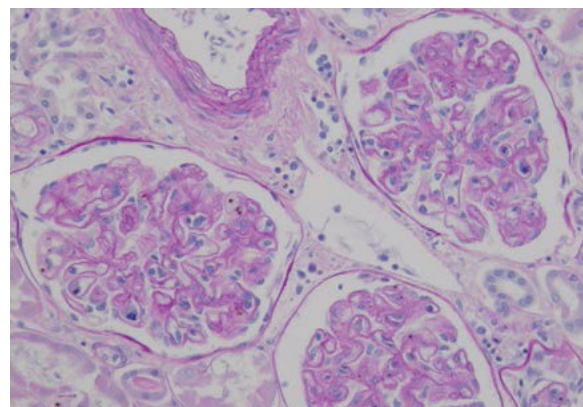


図7：腎糸球体 対物20倍

染色性が低いPAS反応標本（図8、9）

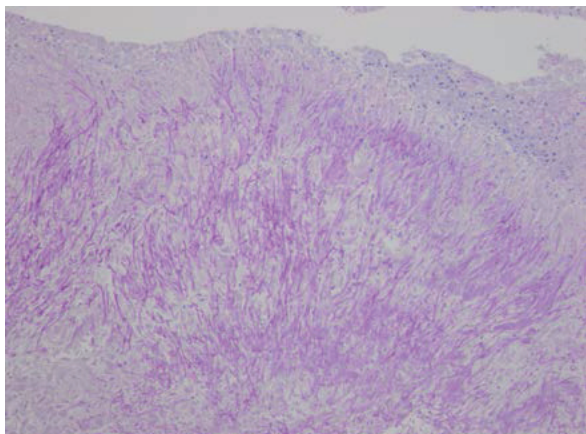


図8：真菌 対物10倍

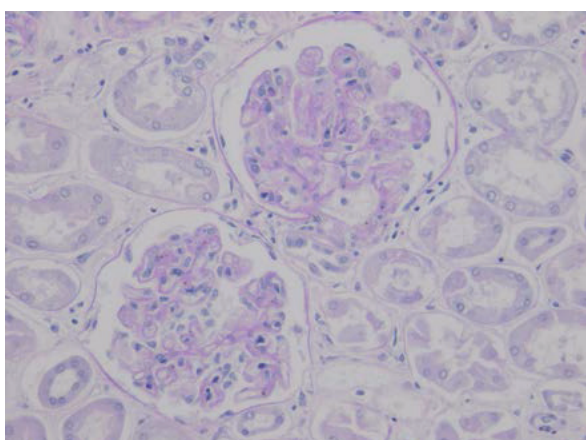


図9：腎糸球体 対物20倍

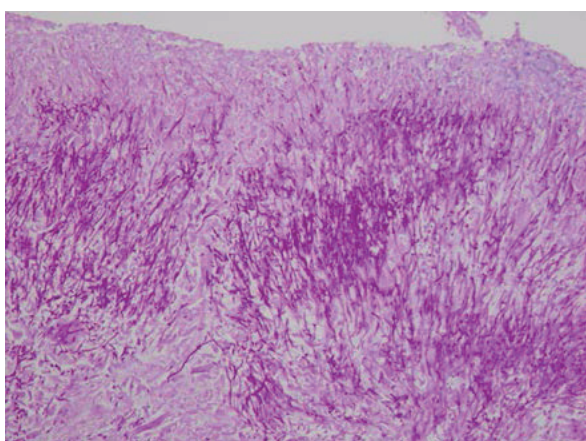


図10：真菌 対物10倍

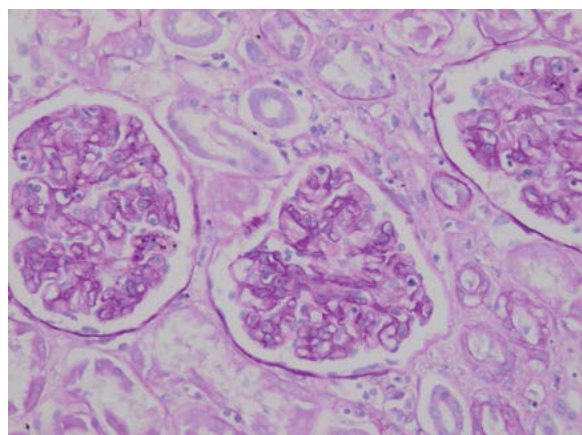


図11：腎糸球体 対物20倍

《参考文献》

平成10年度愛知県臨床検査精度管理調査総括集  
平成18年度愛知県臨床検査精度管理調査総括集  
愛知県臨床検査標準化協議会推奨方法（2）PAS反応