

病理検査部門

精度管理事業部員：住吉 尚之

(厚生連 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24年度精度管理調査は、アルシアン青染色を実施した。このアルシアン青染色は、生体内の酸性粘液多糖類を検出する組織化学的手法を用いた代表的な特殊染色の一つであり、多くの施設で実施されている染色法である。なお同調査は、平成15年度にも実施している。

II. 参加施設

平成24年度愛知県臨床検査精度管理調査に参加した121施設中、病理検査部門への参加は53施設であった。

III. 材料

胃と大腸の手術材料を10%ホルマリン液で固定し、TMAブロックを作製後、4 μmの厚さに薄切した未染色標本を材料とした。

IV. 評価方法

1. 評価項目と採点基準

下記1)～6)の評価項目に対して3段階<4)と5)は2段階>の採点基準よりスコア化を行い評価した。

1) 印環細胞癌の染色性

- 良 : 3点 染まっている
可 : 2点 染まりが悪い
不可 : 0点 診断に支障がある

2) 胃の腸上皮化生の染色性

- 良 : 3点 染まっている
可 : 2点 染まりが悪い
不可 : 0点 診断に支障がある

3) 大腸の吸収上皮、杯細胞の染色性

- 良 : 3点 染まっている
可 : 2点 染まりが悪い
不可 : 0点 診断に支障がある

4) 胃および大腸の結合織の染色性

- 良 : 1点 染まっている
不可 : 0点 染まっていない

5) アルシアン青の共染および色素粒子析出の有無

- 良 : 1点 共染や汚れがない
不可 : 0点 共染または汚れがある

6) 核染色によるアルシアン青染色への影響度の有無

- 良 : 3点 影響なし
可 : 2点 若干影響
不可 : 0点 過度に影響

2. 評価点数

評価点数は、19名の病理細胞検査研究班班員が6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：12点以上

染色上目的を十分に達している。

2) B評価：10点以上12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：8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：8点未満

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。

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た。

V. 結果

A評価は52施設(98%)となり、A評価に該当した施設の割合は前回*1調査の84%より14ポイントと増加した。今回評価が改善し、B評価からA評価となった施設は6施設であった。また、A評価からB評価となった施設は1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15年度愛臨技精度管理調査を指し、病理検査部門参加数は45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

- ・手法：46施設
- ・機械法：7施設

設問2 使用している前処理液

- ・酢酸水 : 51施設
- ・使用していない: 2施設

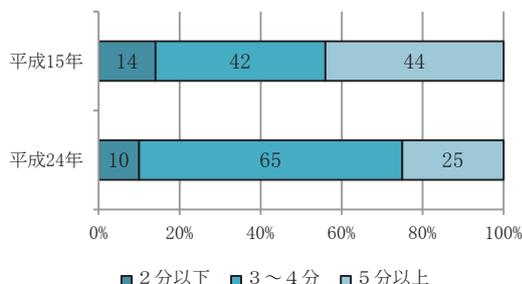
前処理液を使用しない施設にB評価の施設が含まれていたが、他の1施設はA評価であり、染色性に明らかな差は見られなかった。

設問3 前処理液の濃度 (%)

前処理液を使用している51施設すべてが、酢酸水濃度3%にて実施していた。

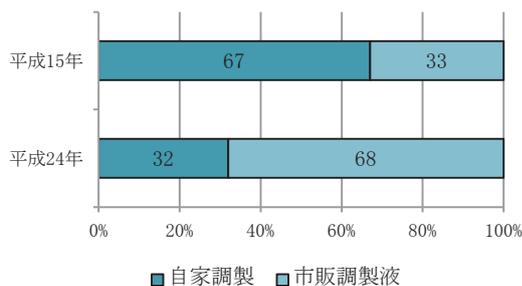
設問4 前処理液の時間 (分)

前処理液の時間を3~4分と回答した施設数は、51施設中33施設(65%)となり、前回の42%から23ポイント増加した。それに伴い、前処理液の時間を2分以下と回答した施設が4ポイント、5分以上と回答した施設が19ポイント減少した。



設問5 アルシアン青染色液の自家調製

自家調製(パウダーを購入)している施設は、17施設(32%)であり、前回の67%から35ポイント減少した。



設問6 アルシアン青染色液の市販調製品について

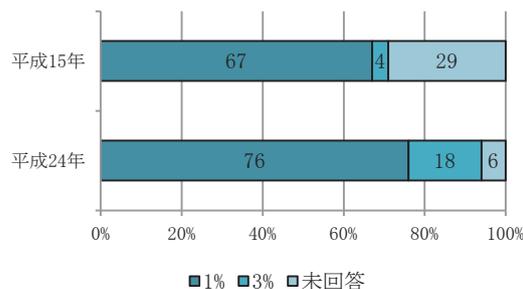
- ・武藤化学100ml : 10施設
- ・武藤化学500ml : 23施設
- ・メルク : 1施設
- ・その他 : 2施設

「その他」と回答した施設の内訳は、武藤化学(細胞診用)であった。また、和光純薬、ナカライテスクを回答した施設はなかった。

設問7 自家調製におけるアルシアン青の試薬名と濃度

- ・Alcian Blue 8GX 1% : 6施設
- ・Alcian Blue 8GX 3% : 1施設
- ・Alcian Blue 8GS 1% : 7施設
- ・Alcian Blue 8GS 3% : 2施設
- ・未回答 : 1施設

自家調製を実施している施設の中で、染色液濃度1%と回答した施設の割合は今回81%であり、前回の94%に比べて13ポイント減少した。



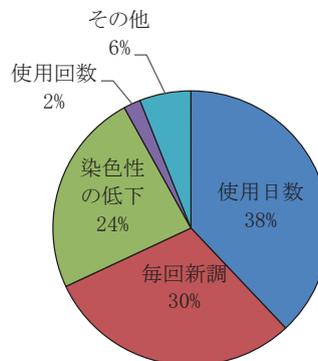
設問8 アルシアン青染色液の染色時間

アルシアン青染色液の染色時間は、最短10分、最長300分と大きな差が見られた。

染色時間	施設数
30分未満	9
30~50分	33
60~90分	8
120分以上	3

設問9 アルシアン青染色液の交換時期(目安)

アルシアン青染色液の交換時期を使用日数と回答した施設が38%、毎回新調と回答した施設は30%であった。交換時期を「その他」と回答した施設の内訳は、「液量が少なくなったとき」、「液を継ぎ足すので交換しない」、「交換時期は決めていない」であった。



設問10 使用している洗浄液

- ・酢酸水 : 45施設
- ・使用していない: 8施設

洗浄液を使用していない施設にB評価の施設が含まれていたが、他の7施設はA評価であり、染色性に明らかな差は見られなかった。

設問11 洗浄液の濃度 (%)

洗浄液を使用している45施設すべてが、酢酸水濃度3%にて実施していた。

設問12 洗浄液の薬液槽数

- ・1槽のみ: 26施設
- ・2槽使用: 7施設
- ・3槽使用: 12施設

薬液槽数による染色性に明らかな差は見られなかった。

設問13 洗浄液各槽の洗浄時間 (分)

1槽のみ

洗浄時間	施設数
1分未満	7
1分以上～2分未満	9
2分以上～3分未満	1
3分以上～5分未満	8
5分以上	1

2槽使用

洗浄時間	施設数
1分未満	1
1分以上～2分未満	2
2分以上～3分未満	0
3分以上～5分未満	3
5分以上	1

1槽数秒、2槽3分含む

3槽使用

洗浄時間	施設数
1分未満	1
1分以上～2分未満	6
2分以上～3分未満	1
3分以上～5分未満	3
5分以上	1

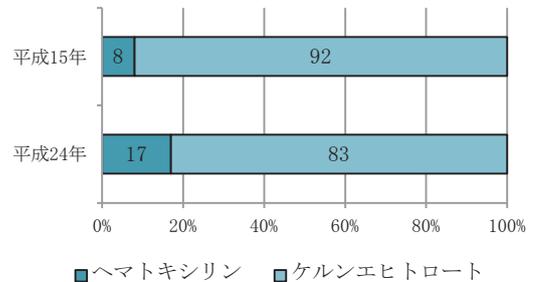
設問14 洗浄液後 (もしくはアルシアン青染色後) の水洗時間 (分)

水洗時間	施設数
1分	10
2分	3
3分	11
4分	1
5分	28

設問15 核染色の染色液名

- ・ケルンエヒトロート (NFR、NR) : 44施設
- ・ヘマトキシリン : 9施設

核染色液名をケルンエヒトロートと回答した施設数は、44施設 (83%) となり、前回の92%から9ポイント減少した。



設問16 核染色の染色時間

ケルンエヒトロートの染色時間は、最短10秒、最長20分と大きな差が見られた。

染色時間	施設数
4分以下	23
5～9分	17
10分以上	4

ヘマトキシリンの染色時間は、最短40秒、最長10分であった。

染色時間	施設数
4分以下	8
5～9分	0
10分以上	1

設問17 組織切片のアルシアン青染色枚数（1年間）

染色枚数	施設数
10枚以下	30
11～100枚	17
101～500枚	2
501枚以上	4

設問18 今回使用した前処理液について

- ・新調した : 42施設
- ・新調していない（前回の液を使用） : 9施設

設問19 前処理液の保管

- ・冷蔵 : 2施設
- ・室温 : 28施設
- ・毎回破棄（保管しない） : 21施設

設問20 今回使用したアルシアン青染色液について

- ・新調した : 31施設
- ・新調していない（前回の液を使用） : 22施設

設問21 アルシアン青染色液の保管

- ・冷蔵 : 20施設
- ・室温 : 26施設
- ・毎回破棄（保管しない） : 7施設

設問22 今回使用した洗浄液について

- ・新調した : 36施設
- ・新調していない（前回の液を使用） : 9施設

設問23 洗浄液の保管

- ・冷蔵 : 2施設
- ・室温 : 23施設
- ・毎回破棄（保管しない） : 20施設

設問24 今回の未染色標本の切片の厚さ

- ・適度 : 50施設
- ・厚い : 1施設
- ・薄い : 2施設

設問25 今回の染色結果の満足度

	A評価	B評価
大変満足	0	0
満足	36	0
どちらともいえない	15	0
やや不満	1	0
不満	0	1

設問26 アルシアン青染色について工夫していること

以下に回答を列記する。

- ・乗せガラス法にて染色を実施している。
- ・PAS-アルシアン青重染色を実施する機会が多く、組織切片のアルシアン青染色の頻度は少ない。
- ・アルシアン青染色実施の頻度が少ないため、細胞診用の染色液を代用している。試薬濃度が薄いため、染色時間を長くしているが、現在検討中。
- ・アルシアン青染色は、主に心臓弁を染めるために活用しており、粘液を染めることはめったにない。
- ・前処理液を毎回新調して使用し、その液を用いて洗浄を行い、その後破棄している。
- ・アルシアン青染色液のpHを定期的に測定している。
- ・加温したアルシアン青染色液を使用しているが、過染気味となる傾向があるので、酸性粘液の強い組織はなるべく加温せずに用いている。
- ・洗浄液の洗浄時間に関して、1槽も3槽もほとんど色の変化がないため、1槽3分で実施している。
- ・洗浄液後の水洗は、しっかり行う。
- ・ケルンエヒトロートが、強く染まる傾向にあるので、核染色の時間を短くしている。
- ・核染色は、ヘマトキシリンを使用している。
- ・すべての生検にPAS-アルシアン青重染色を実施しており、核染色は、ヘマトキシリンを使用している。

設問27 アルシアン青染色について困っていること

以下に回答を列記する。

- ・組織切片のアルシアン青染色の頻度が少ないため、試薬を保管して使用することができない。
- ・組織切片の実施頻度が少ないため、細胞診用のアルシアン青染色液を使用したいが、その場合の注意点を教えてほしい。
- ・自施設のコントロール標本では、共染は認めなかったが、サーベイ標本において若干の共染を認めた。共染の理由を教えてほしい。
- ・ケルンエヒトロートが染まり過ぎる。
- ・ケルンエヒトロートの劣化が早い。
- ・ケルンエヒトロートの色調が不安定であり、染色結果にむらができることがある。
- ・間違えてアルシアン青染色液に浸漬してしまった場合、脱色できない。

VII. まとめ

本年度は、病理部門の精度管理調査としてアルシアン青染色を実施した。平成15年に実施して以来2回目の調査となったが、施設によって染色性が異なっている現状を改めて実感した。(社)愛知県臨床衛生検査技師会では、県下における施設間差是正を目的に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。

病理部門では、精度管理調査後、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。

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、本書に検討結果を掲載し、精度管理事業部の報告会ならびに病理細胞検査研究班研究会にて発表を行ってきた。これら研究班活動の検討結果をもとに、本年、愛知県臨床検査標準化協議会（AiCCLS）からアルシアン青染色の推奨方法が発行される予定である。

1. 評価

今回、A評価に該当した施設が前回よりも14ポイント増加した。これは、平成15年度にアルシアン青染色の詳細な検討を行った中で、前処理液および洗浄液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。

B評価となった施設は、アルシアン青の染色性が悪く、色素粒子の析出が見られた。また、前処理の操作を行っていなかった2施設のうちの1施設であり、1年間にわたり試薬の交換が行われていなかった。したがって3%酢酸水により前処理を行うことと、色素粒子が析出する前に試薬交換を定期的に行うことで、染色性の改善に繋がるものと考えられる。

2. 試薬管理

アルシアン青染色に限らず、特殊染色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。

3. 前処理液

前処理液の目的は、溶媒である酢酸水に浸漬することにより、アルシアン青染色液への水分の持ち込みを防止、染色液の劣化を防止することにある。したがって染色液を毎回新調する場合においても、3%酢酸水にて前処理を行い、アルシアン青染色液に浸漬することを推奨する。

4. アルシアン青染色液

アルシアン青染色の染色時間は、20~30分程度で十分な染色性が得られるので、染色性が得られない場合は、他の原因をご検討いただきたい。必要以上に染色時間を延長すると背景に共染を生じる恐れがある。

また、今回の調査にて、68%の施設が市販調製品を購入していることが明らかとなった。これは、平成15年にAlcian Blue 8GX（パウダー）が、発癌性の問題により一時的に発売中止となったことを受け、当面の期間は供給可能な市販調製品を購入する施設が増加したためと考えられる。

5. 洗浄液

洗浄液の薬液槽数による染色性に明らかな差は見られなかった。しかし、洗浄が不十分であると、水洗時切片上に残ったアルシアン青染色液が共染の原因となるため、余分な染色液を十分洗い流すことに留意して操作を進めていただきたい。

6. 核染色液

核をヘマトキシリンで染色している施設は9施設（17%）であった。ヘマトキシリンの青紫色とアルシアン青との対比は、同系色となるため、酸性粘液多糖類を検出する目的から考えると、ケルンエヒトロートによる核染色を推奨する。ケルンエヒトロートは、一般的に利用頻度が少なく、調製方法に手間がかかり、安定した長期保存が困難である。もし調整後に再結晶化が起きた場合は、加温して溶解させれば再度染色が可能である。しかし、施設の事情により業務の簡略を図るためには、ヘマトキシリンの使用も容認せざるを得ないとする。

7. 最後に

アルシアン青染色は、染色操作も簡便で安定した染色結果が得られやすいが、切片の厚さなど染色性へ影響を及ぼすことに配慮が必要である。設問27の回答から、自施設コントロール標本と比較し、サーベイ未染色標本にて共染を認めたという報告については、切片の厚さが原因であったのか、固定液の種類等の他に原因があるのかは、今後引き続き検討を行いたい。

アルシアン青染色の染色結果に疑問を抱いている施設各位には、参考資料として、高評価施設の染色手技を下記に掲載したので、まずは貴施設の染色手技と比較検討をしていただきたい。

（社）日本臨床衛生検査技師会では、1972年より実施してきた染色サーベイが平成22年度をもって終了した。質の高い染色標本を病理医へ提供することが我々の責務である。県下の全施設における染色標本の質の向上とレベルの維持のために、病理検査部門では、今後も特殊染色の精度管理を継続的に行い、施設間差是正と標準化の一端を担っていきたいと考えている。今回精度管理調査に参加いただいた施設は、今後も継続して参加いただき、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》

平成24年度精度管理調査における高評価施設（アルシアン青自家調製施設）の染色工程を示す。

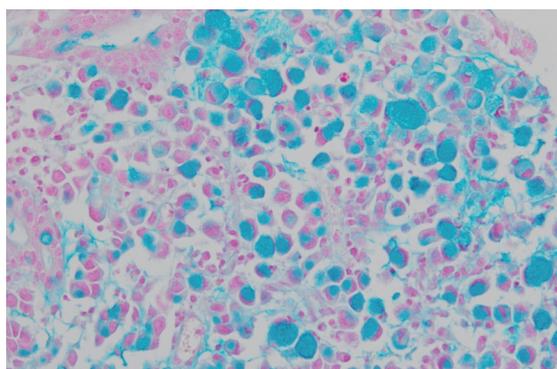
1. 脱パラフィン、水洗
2. 3%酢酸水 : 3～4分
3. pH2.5 1%アルシアン青 : 60分
4. 3%酢酸水2槽 : 各3分
5. 水洗 : 1分
6. ケルンエヒトロート : 2分
7. 水洗、脱水、透徹、封入

《参考文献》

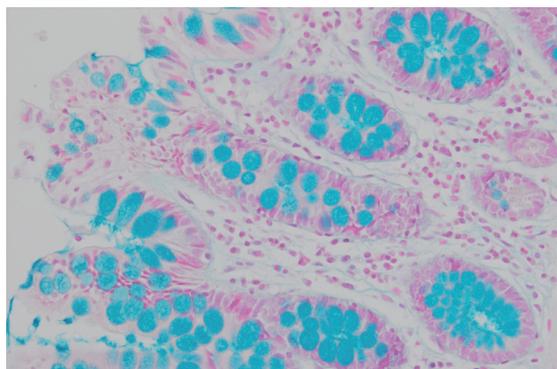
1. 平成15年度愛知県臨床検査精度管理調査総括集
2. メルク株式会社：Trouble shooting シリーズNo.5
3. (社)愛知県臨床衛生検査技師会：平成19年度基礎講座「特殊染色」テキスト

《参考写真》

高評価施設アルシアン青染色標本

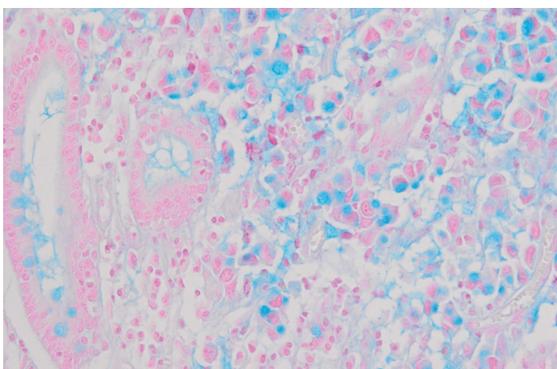


胃印環細胞癌 対物20倍

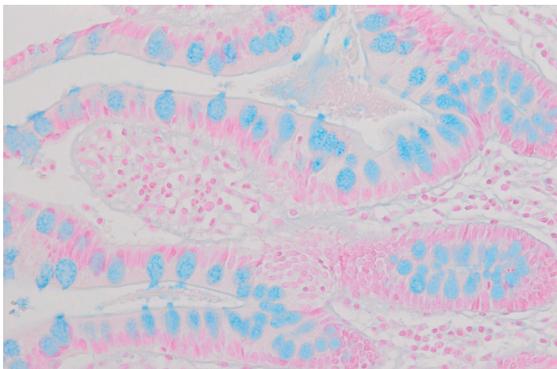


大腸杯細胞 対物20倍

染色性が低いアルシアン青染色標本

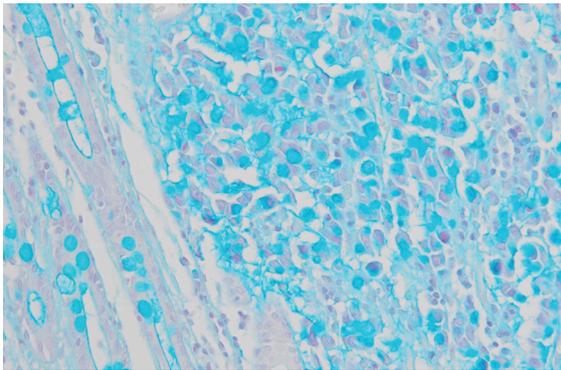


胃印環細胞癌 対物20倍

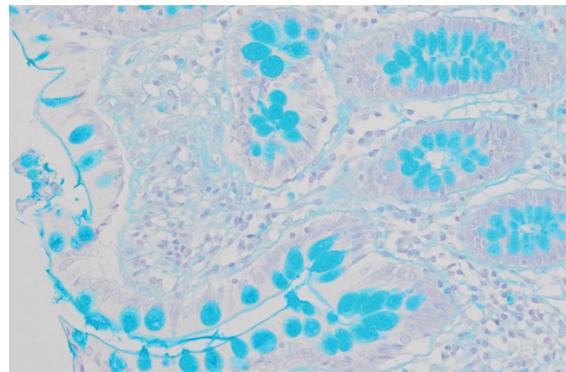


大腸杯細胞 対物20倍

共染が見られたアルシアン青染色標本

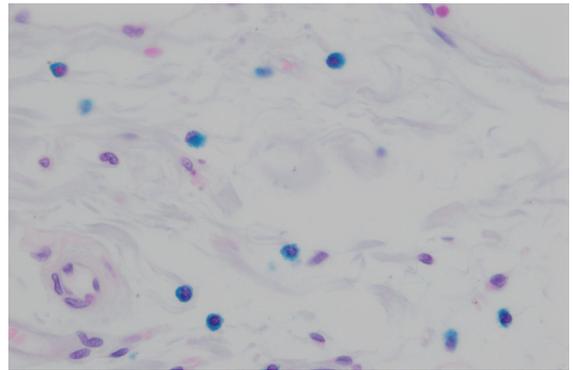


胃印環細胞癌 対物20倍



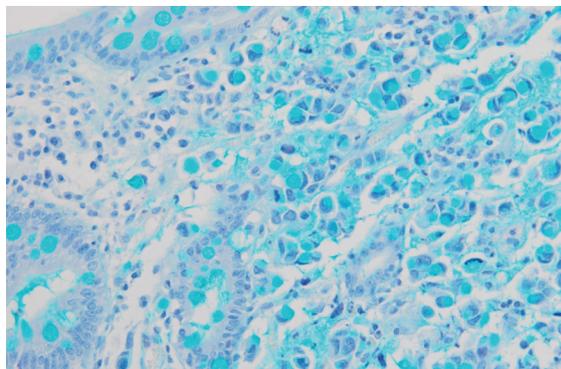
大腸杯細胞 対物20倍

大腸粘膜下の肥満細胞

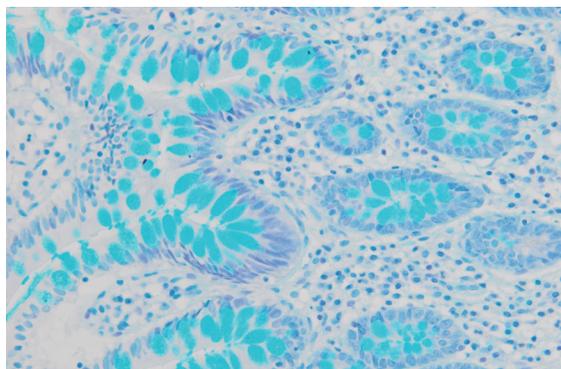


肥満細胞 対物40倍

核染色にヘマトキシリンを用いたアルシアン青染色標本



胃印環細胞癌 対物20倍



大腸杯細胞 対物20倍