

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25年度精度管理調査は、グロコット染色を実施した。このグロコット染色は、組織内の真菌を検出する組織化学的手法を用いた代表的な特殊染色で他の染色法では検出が難しい放線菌やノカルジア、ムコールにも適しており、病理診断を行う上で重要な染色の一つである。なお、グロコット染色の精度管理調査は、平成16年度にも実施している。

II. 参加施設

平成25年度愛知県臨床検査精度管理調査に参加した122施設中、病理検査部門への参加は48施設であった。

III. 材料

腎臓の剖検材料（カンジダ感染）を10%ホルマリン液で固定し、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。未染色標本作製には、倉敷紡績（株）組織切片自動作製装置AS-400を使用した。

IV. 評価方法

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、5の評価項目に対して2段階の採点基準よりスコア化を行い評価した。

1) カンジダの染色性

- 良：8点 染まっている
- 可：4点 染まりが薄い（又は濃い）が検出できる
- 不可：0点 染まっていない

2) 共染の有無

- 良：3点 共染なし、または若干の共染がある
- 可：2点 共染あり
- 不可：0点 強い共染

3) 銀粒子付着の有無

- 良：3点 付着なし
- 可：2点 若干の付着あり
- 不可：0点 強い付着のため診断に支障がある

4) 後染色の染色性

- 良：3点 染まっている
- 可：2点 染まりが薄い（又は濃い）

不可：0点 不良、診断に支障がある

5) 標本切片の剥がれ

- 良：2点 剥がれなし
- 不可：0点 剥がれあり

2. 評価点数

評価点数は、21名の病理細胞検査研究班班員が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、グロコット染色の目的であるカンジダ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）

カンジダの染色性が6点以上かつ、総得点が16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）

カンジダの染色性が4点以上かつ、総得点12点以上16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）

カンジダの染色性が2点以上かつ、総得点10点以上12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）

カンジダの染色性が2点未満かつ、総得点10点未満。

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34施設（71%）であり、A評価に該当した施設の割合は前回^{*1}調査の87%より16ポイント減少した。B評価は13施設（27%）、D評価は1施設（2%）であった。

^{*1}前回とは平成16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

- ・ 的手法 43施設
- ・ 機械法 5施設

設問 2：陽性コントロールの使用

- ・ 陽性コントロールを使用した 36施設
- ・ 陽性コントロールを使用していない 12施設

陽性コントロールを使用した施設のうち、業務においてもコントロール切片のスライドグラスと同時に染色すると回答した施設は32施設、業務では1枚のスライドグラスに検索切片とコントロール切片を載せていると回答した施設は、4施設であった。

陽性コントロールを使用していない施設のうち、A評価の施設が8施設、B評価の施設が4施設であった。陽性コントロールを使用している施設との染色性の差は見られなかった。

設問 3：使用した酸化剤

- ・ 5%クロム酸 47施設
- ・ 6%クロム酸 1施設

設問 4：酸化時間（分）

酸化時間を60分と回答した施設は、48施設中36施設（75%）となり、前回の64%から11ポイント増加した。

酸化時間が5分以下であった2施設のうち、1施設は共染が見られたことでB評価となった。

表 1：クロム酸による酸化時間

| 酸化時間 | 施設数 |
|------|-----|
| ～5分 | 2 |
| 16分 | 3 |
| 45分 | 4 |
| 50分 | 1 |
| 60分 | 36 |
| 75分 | 1 |
| 未回答 | 1 |

設問 5：メセナミン銀液の事前加温

- ・ 事前加温を行った 33施設
- ・ 事前加温を行っていない 15施設

加温方法は、孵卵器（溶融器）と回答した施設が22施設、温浴槽（恒温槽）と回答した施設が8施設、孵卵器で加温したあと温浴槽で加温する施設が1施設、未回答2施設であった。

孵卵器の加温温度は、孵卵器を使用している施設の77%が60℃であった。（最高温度70℃、最低温度42℃）孵卵器の平均加温時間は、27分（最長60分、最短10分）であった。

温浴槽の加温温度は、温浴槽を使用している施設の83%が50℃～60℃であった。（最高温度60℃、最低温度37℃）

温浴槽の平均加温時間は16分（最長30分、最短10分）であった。

設問 6：メセナミン銀液の染色について

加温方法は、孵卵器（溶融器）と回答した施設が31施設、温浴槽（恒温槽）と回答した施設が12施設、直接スライドグラスを温める（ホットプレート法）と回答した施設が5施設であった。

孵卵器の加温温度は、孵卵器を使用している施設の74%が60℃であった。（最高温度70℃、最低温度42℃）孵卵器の平均加温時間は、53分（最長90分、最短25分）、事前加温時間と合計した平均時間は、75分（最長130分、最短45分）であった。

温浴槽の加温温度は、温浴槽を使用している施設の83%が55℃～60℃であった。（最高温度65℃、最低温度40℃）温浴槽の平均加温時間は、22分（最長50分、最短10分）、事前加温時間と合計した平均時間は、38分（最長85分、最短20分）であった。

表 2：加温方法と評価

| | A評価 | B評価 | D評価 |
|----------|-----|-----|-----|
| 孵卵器 | 22 | 8 | 1 |
| 温浴槽 | 5 | 5 | 0 |
| ホットプレート法 | 5 | 0 | 0 |
| その他 | 2 | 0 | 0 |

その他では、事前加温を孵卵器60分、温浴槽10分、メセナミン銀染色を温浴槽60分が1施設、事前加温を孵卵器10分、温浴槽35分が1施設であった。

設問 7：メセナミン銀液の反応停止の目安

- ・ 染色態度を鏡検して停止する 43施設
- ・ 反応時間を決めていない（鏡検チェックしない） 5施設

設問 8：非特異的反応の防止方法

- ・ アルブミン水溶液 7施設
- ・ ゼラチン水溶液 8施設
- ・ その他 2施設
- ・ 特に防止は行っていない 31施設

設問9：後染色液

48施設すべてがライトグリーン液を使用していた。このうち6施設がライトグリーンの染色性が薄いと評価された。

設問10：病理組織切片のグロコット染色について、1年間の枚数（数／年）

年間の染色枚数が20枚以下の施設中、B評価となったのは7施設（26%）であった。

表3：組織切片の年間染色枚数

| 年間染色枚数 | 施設数 |
|----------|-----|
| 1～10枚 | 20 |
| 11～20枚 | 7 |
| 21～30枚 | 6 |
| 31～40枚 | 2 |
| 41～50枚 | 5 |
| 51～100枚 | 5 |
| 101～190枚 | 3 |

設問11：今回使用した酸化剤

- ・新調した 22施設
- ・新調していない 26施設

設問12：今回使用したメセナミン銀液

- ・新調した 43施設
- ・新調していない 5施設

設問13：今回使用したライトグリーン液

- ・新調した 23施設
- ・新調していない 25施設

新調していない25施設の中に、後染色（ライトグリーン）の染色性が弱いことでB評価となった4施設が含まれていた。この4施設は、室温にて保管していたライトグリーン液を使用しており保管期間については不明である。

設問14：ライトグリーン液の保管

- ・保管しない（毎回新調） 8施設
- ・室温保管 36施設
- ・冷蔵保管 3施設
- ・冷凍保管 1施設

設問15：今回のサーベイにおける未染標本の切片の厚さ

- ・適度 44施設
- ・厚い 2施設
- ・薄い 2施設

設問16：今回の染色結果の満足度

表4：染色結果の満足度と評価

| | A評価 | B評価 | D評価 |
|-----------|-----|-----|-----|
| 大変満足 | 0 | 0 | 0 |
| 満足 | 24 | 9 | 0 |
| どちらともいえない | 3 | 1 | 0 |
| やや不満 | 7 | 3 | 0 |
| 不満 | 0 | 0 | 1 |

設問17：愛知県臨床検査標準化協議会（AicCLS）のグロコット染色推奨方法

- ・推奨方法を知っている 38施設
- ・推奨方法を知らない 10施設

設問18：グロコット染色推奨方法の実施の有無

- ・推奨方法を参考にして実施した 26施設
- ・推奨方法を参考にしていない 12施設

設問19：グロコット染色について工夫していること

以下に回答を列記する。

- ・メセナミン銀液の反応温度、時間を検討し、最適と思われる条件を設定した（機械法）。
- ・メセナミン銀液の共染や銀粒子付着を防ぐため、始め10分間隔で鏡検し、黄色みを帯びてきた頃から5分間隔で鏡検しながら染色を確認した（孵卵器65℃加温）。
- ・ライトグリーンは色が落ちやすいため、アルコールにて脱水せず、風乾し透徹している（孵卵器60℃加温）。
- ・銀液に不純物を混入させないようにした。
- ・60℃に設定した伸展板に直置きして上乗せ法で行うことにより、スムーズに加温される。また、必要量が少なく経済的（伸展板60℃、酸化時間4分、メセナミン銀液15分程度）。
- ・メセナミン銀で加温している際は、10分おきに気泡を取り除き、染色ムラが出ないようにしている（孵卵器60℃加温）。

設問20：グロコット染色について困っていること

以下に回答を列記する。

- ・定着の工程でチオ硫酸ナトリウムではなく、写真定着液を使用しているが、染色に違いはあるか。
- ・今回のサーベイの標本では菌以外のバックグラウンドに共染が見られたが、当施設で使用しているコントロールスライドでは共染は見られなかった（機械法）。
- ・銀染時に、数分の違いで背景と目的部位が共染してしまう事が多々あり、銀染終了のタイミングに困る

ている（事前加温なし、孵卵器65℃加温）。

- ・検体数が少ないため、試薬が残ったまま古くなってしまふ。また、その廃液の処分方法を知りたい（染色実施枚数5枚/年）。
- ・メセナミン銀液の反応の止め時がわからない（陽性コントロールは使用していない。事前加温なし、孵卵器60℃加温、染色時間90分程度）。
- ・アスペルギルスなどの、よくある感染症のコントロールは保有し活用しているが、他の真菌のコントロールが用意できていない。
- ・各染色液はどのくらいの保存が可能か知りたい。

設問21：今後の染色サーベイについてのご意見、ご要望

以下に回答を列記する。

- ・HE染色のサーベイ実施を希望
- ・マッソントリクローム染色のサーベイ実施を希望
- ・いろいろな染色を標準化するのであれば、染色結果の写真を載せるだけではなく、今回のグロコット染色の様に、時に鏡検を必要とする染色の場合には、その途中過程の写真も載せていただきたい。
- ・染色サーベイのシリーズ化が必要だと思う。また、参加施設数が多い染色のサーベイも必要かと思うが、診断の重要性から考えたサーベイテーマの設定が必要。IHC (immunohistochemistry) は偽陰性によって診断過誤に直結、おもな対象がガンであるので、治療方針の誤った選択につながる。

設問22：今回の染色工程調査の設問量

- ・適切 46施設
- ・多い 2施設
- ・少ない 0施設

Ⅶ. まとめ

本年度は、病理部門の精度管理調査としてグロコット染色を実施した。平成16年度に実施して以来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。

1. 評価

D評価となった施設の対応として、結果検討会で染色試薬の組成・染色手技をさらに詳しく聴取し、染色結果に対する検討を行った。その結果D評価施設のメセナミン銀液は市販品を購入しており、使用時に沈殿物を認めていたとのことから、後日メーカーに確認したところ試薬の劣化が最大の原因ではないかと考えられた。

また今回、A評価に該当した施設が前回調査よりも16ポイント減少した。グロコット染色の実施件数において、年間の染色枚数が20枚以下の施設が全体の48%、そのうちの26%がB評価であった。

グロコット染色に代表される銀染色は、試薬管理とともに技術が染色結果に大きな影響を与えることを再認識させられた。技師の染色技術の向上のためには、今後研

究班主催による学習会や基礎講座を開催する必要性が求められるものと思われる。

2. 酸化剤（クロム酸液）

酸化剤の目的は真菌の細胞壁に含まれる糖関連成分を酸化させ、アルデヒド基を形成させるために用いている。使用するとそのアルデヒド基にメセナミン銀液中の銀粒子が付着することで黒化する。クロム酸の酸化力は強く、結合織などに含まれる糖関連成分はアルデヒド基からさらにカルボキシル基まで酸化されるので、銀粒子は付着せず選択的に真菌が染色される。酸化が不十分であると、結合織や赤血球に共染を起こす。過酸化の場合は、真菌のアルデヒド基もカルボキシル基へ変化してしまい染色性が薄くなる。酸化剤の適度な濃度と酸化時間が酸化のポイントであり、AiCCLSの推奨方法ではクロム酸濃度5%・酸化時間60分としている。

試薬調製の手間、コスト、廃液方法等を考慮すると難しい問題であるが、適正な染色を行うためにはクロム酸液、メセナミン銀液、ライトグリーン液は、毎回新調することが望ましいと考えられた。

3. メセナミン銀液

本法の染色原理は、真菌の菌体表面上の多糖類を酸化して生成するアルデヒド基に、メセナミン銀が作用して銀粒子となって可視化する染色法である。この銀粒子の大きさが小さいときは赤褐色に見え、大きく発達するにつれ黒く発色するようになる。生体内（結合織や赤血球など）にも濃度は低いものの糖関連成分が存在し、共染の原因となる。糖関連成分の濃度は組織部位により異なる。また、個体差も見られる。また、ホルマリンの固定時間が長いと染色性の低下を起こす。今回、自施設のコントロール標本は共染が見られなかったが、サーベイ標本に共染が見られたという報告をいただいた。しかし、細胞間差、固定条件など様々な要因が考えられるため、原因を特定することは極めて難しいと思われた。

今回の調査では、メセナミン銀液の加温方法が、孵卵器（溶融器）、温浴槽（恒温槽）、直接スライドガラスを温めるホットプレート法に分かれた。

染色時間は、ホットプレート法、温浴槽、孵卵器の順に短時間であった。これは、ホットプレート法と温浴槽は、熱伝導が良く、メセナミン銀液の温度の上昇が早いためである。温浴槽を用いた施設の半数はB評価となった。温浴槽では加温が速やかに行われるが、加温が早いと銀液中での化学反応もより速やかに進行することで、反応停止のタイミングが難しくなり、共染のリスクが高くなったためと考えられる。一方、ホットプレート法は、さらに染色時間が短いにも関わらず、5施設すべてがA評価であった。今回の調査結果から類推すると、スライドガラスをホットプレートで加温した方が、温浴中に浸漬し加温するよりもスライドガラスに載せた少ない銀液が均一に加温されるので、染色時間が短縮し良好な

染色結果をもたらしたと思われる。共染が少ない理由は不明であるが、銀液の温度差が関与しているかもしれない。また、ホットプレート法は試薬の使用量が少ないので、低コストと廃液量の減量という利点もある。これらの結果を受けて、今回ホットプレート法の優位性が示されたものの、実施施設数が少なく得られた情報だけでは適正な評価ができないため、温浴槽との詳細な比較調査が必要であると考えます。

グロコット染色は、目的とする真菌によってメセナミン銀液の染色時間を調整する必要がある。

カンジダを検出する場合、グロコット染色の染色時間は、事前の加温時間を含め孵卵器では、60℃、50分程度、温浴槽では、60℃、30分程度で十分な染色性が得られる。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。また、チオ硫酸ナトリウムによる定着の工程で、かなり脱色されるので、それを加味して染色を停止しなければならない。しかし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。

4. チオ硫酸ナトリウム

写真酸性硬膜定着液を使用してもチオ硫酸ナトリウムと比較して染色性に差は見られない。むしろ、チオ硫酸ナトリウムは、弱アルカリ液であるため切片剥離のリスクが高いので、写真酸性硬膜定着液は有用である。

5. 後染色（ライトグリーン液）

ライトグリーンは、水に非常に溶解しやすいことと、光により分解褪色しやすいという大きな2つの特徴を持つ。ライトグリーン液のあとの水洗は、色素が溶出するリスクが大きい。また、アルコールの脱水系列においても、アルコール中に水分が含まれていると色素溶出の可能性が高まる。アルコール脱水が不十分な場合、封入後にも残留した水分により退色をきたす恐れがある。したがって、ライトグリーン染色後に水洗する場合はすばやく行ない、新調したアルコールにて十分脱水し、封入後は遮光して標本を保管することを推奨する。

6. 最後に

グロコット染色は、技師の技量・技術が染色性に反映される染色法である。試薬は新調することが望ましいが、試薬を繰り返し使用する場合は、水分の持ち込みなど試薬の品質管理に注意していただきたい。用手法による染色の場合、染色反応の停止は、鏡検を行ない、染め上がりを判断することを推奨する。

グロコット染色の染色結果に疑問を抱いている施設には、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、自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、染色サーベイが平成

22年度をもって終了したが、愛臨技病理細胞研究班では、今後も特殊染色の染色サーベイを継続的に行い、施設間差是正と標準化の一翼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いただきたい。

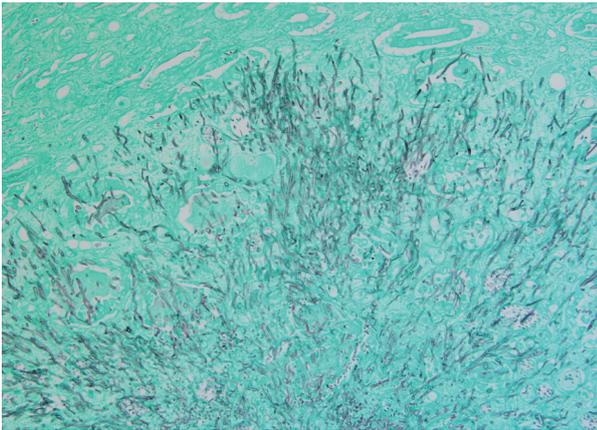
<参考資料>

平成25年度精度管理調査における高評価施設の染色工程を示す。

1. 脱パラフィン、水洗
2. 酸化剤（5%クロム酸） 60分
3. 水洗 数秒間
4. 1%重亜硫酸ナトリウム 1分
5. 水洗 5分、蒸留水 1分×3回
6. 事前加温 孵卵器 61℃ 20分
7. メセナミン銀液 孵卵器 61℃ 30分
8. 蒸留水 1分×3回
9. 0.1%塩化金 5分
10. 蒸留水 1分×3回
11. 写真用酸性硬膜定着液 1分
12. 水洗 5分
13. 後染色 5分
14. 水洗、脱水、透徹、封入

<参考写真>

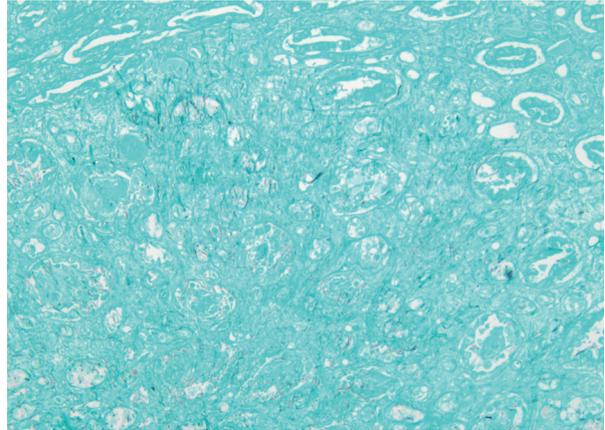
高評価施設のグロコット染色標本



対物10倍

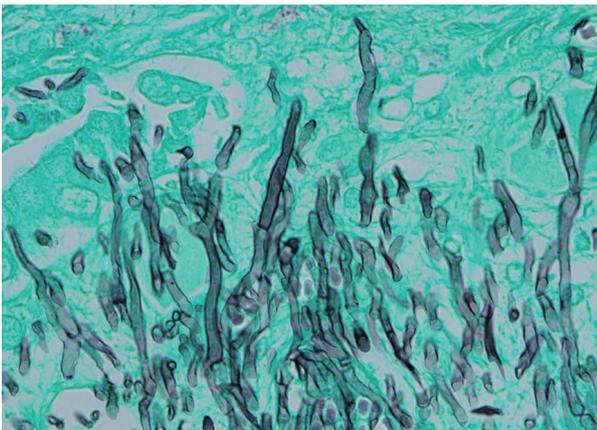
菌糸の存在がはっきりと確認できる。ライトグリーン
の染色性とのバランスも良い。

カンジダの染色性が薄い標本



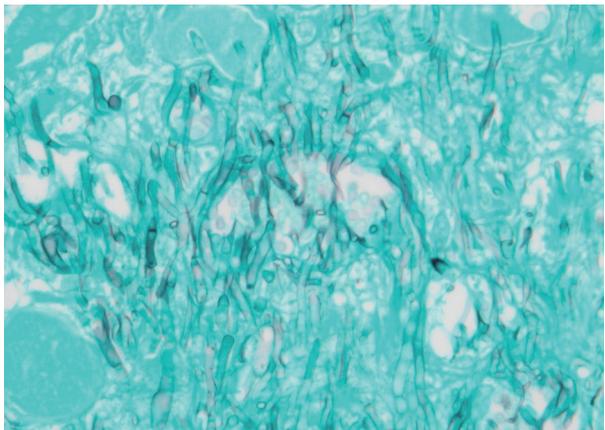
対物10倍

菌糸の存在をはっきりと確認できない。ライトグリーン
の色調のみが強調されている。



対物40倍

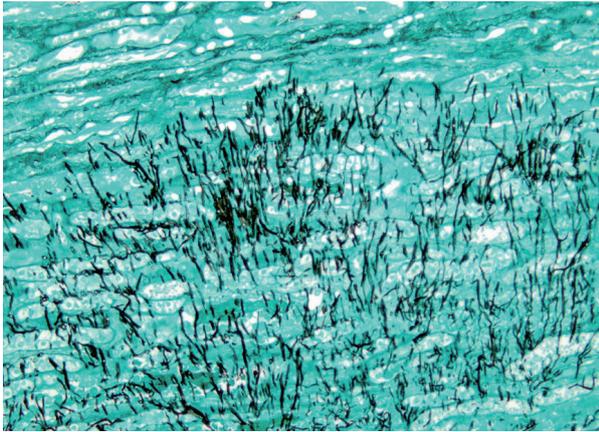
菌糸一本一本が明瞭である。菌体表面が膜様に染まり、
横断像はストローのように透き通って見える。重なり
合った菌糸も立体像を把握することができる。



対物40倍

菌糸の染色性が薄く不明瞭である。
写真の施設は、メセナミン銀液を新調せずに染色を実施
した。試薬の劣化が推察される。

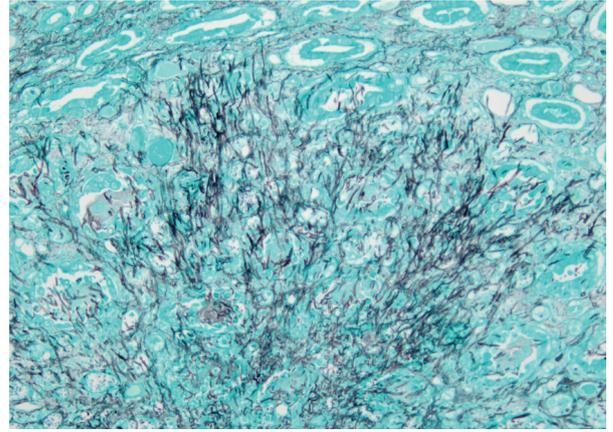
カンジダの染色性が濃い標本



対物10倍

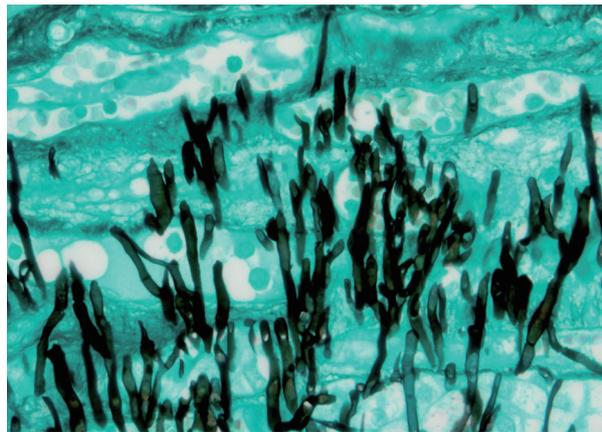
菌糸の染色性が極めて濃く、棍棒状の菌糸は、一部集塊状になっている。

共染が見られた標本（結合織）



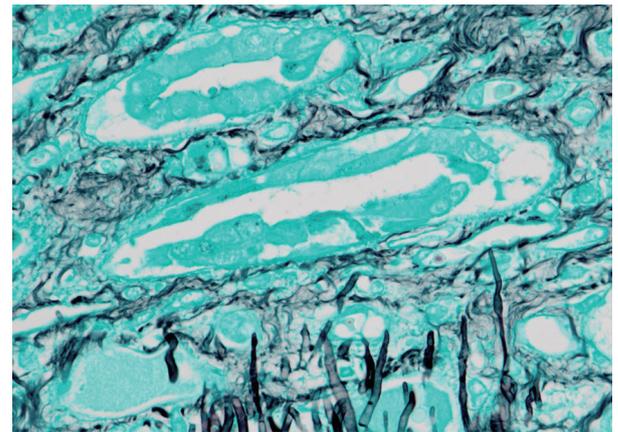
対物10倍

結合織に共染が見られ、菌糸の存在をはっきりと確認できない。



対物40倍

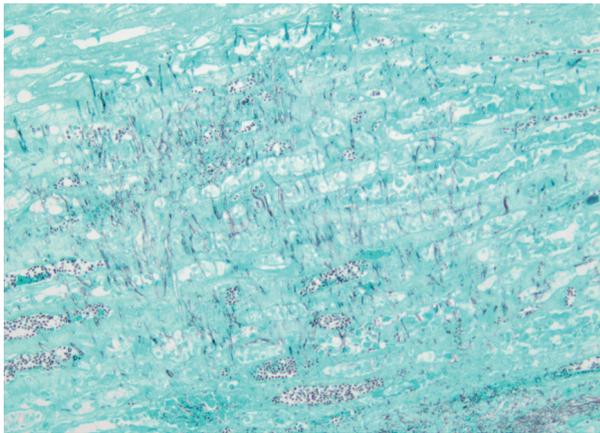
菌糸は透明感がなく、ストロー状の構造は見られない。集塊となっているところは分枝状態がわかりにくい。写真の施設は、温浴槽を用いて加温していた。孵卵器と比較して染色反応が早く進むので、反応停止のタイミングが遅れると過染を起こす。



対物40倍

結合織に強い共染が見られる。写真の施設は、染色時間が90分と長かった。

共染が見られた標本（赤血球）



対物10倍

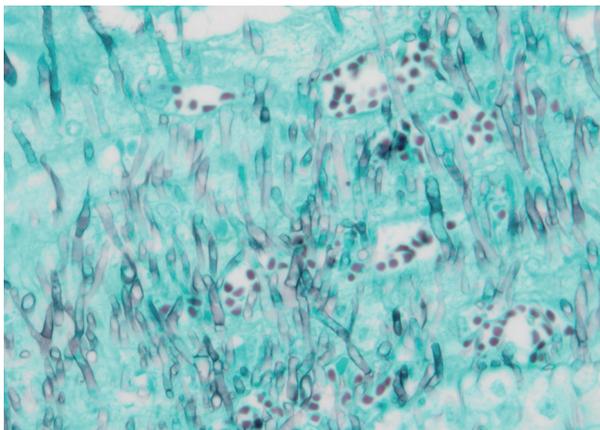
赤血球が菌糸よりも濃く染まり、集簇状に見られる。

ライトグリーンが濃い標本



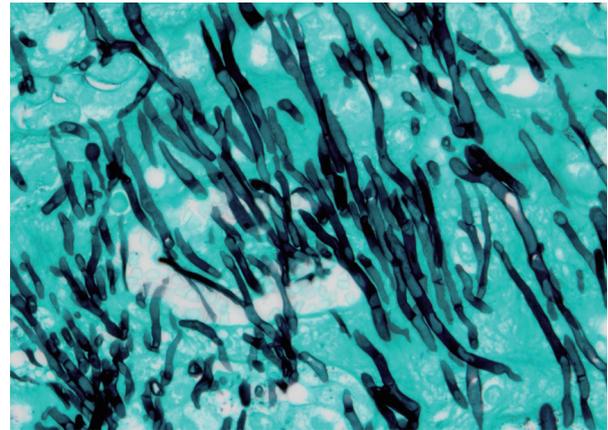
対物10倍

ライトグリーンの染色性が極めて濃く、菌糸の存在を確認することが難しい。



対物40倍

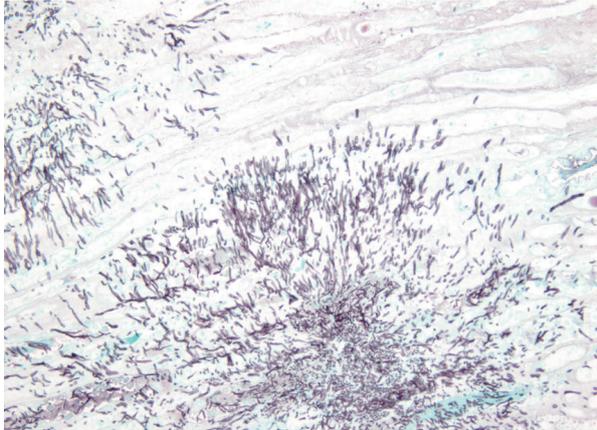
血管内に赤血球が、赤褐色に共染している。
写真の施設は、温浴槽により加温していた。事前加温30分、染色時間30分、合計60分と加温時間が長いため、銀粒子が析出したと推察される。



対物40倍

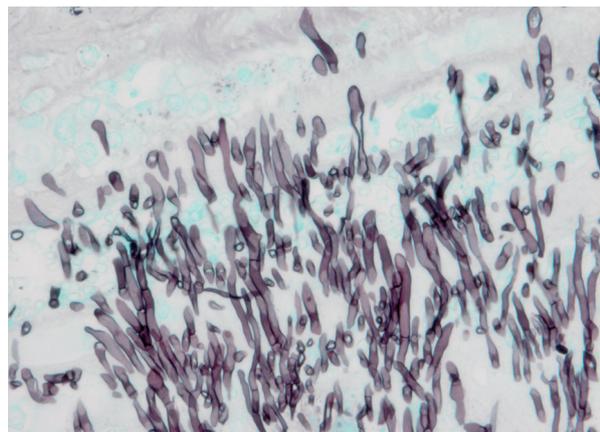
ライトグリーンが濃いため、菌糸の染色性に影響を及ぼし、ストロー様の透明感が見られない。

ライトグリーンが薄い標本



対物10倍

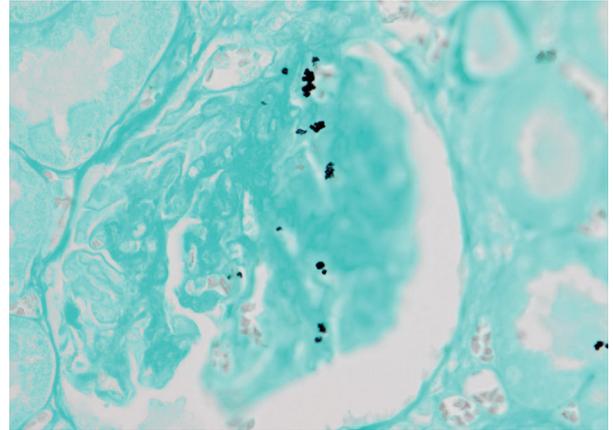
ライトグリーンの染色性が極めて薄く、染色ムラも見られる。



対物40倍

ライトグリーンの染色性が極めて薄く、背景の組織構造が確認できない。

銀粒子の析出



対物40倍

黒色に大きく発達した銀粒子が析出している。

<参考文献>

1. 平成16年度 愛知県臨床検査精度管理調査総括集
2. 愛知県臨床検査標準化協議会 (AiCCLS) 推奨方法 (1) グロコット染色
3. 中島研：知っておきたい特殊染色-染色のコツと鏡検のポイント 2.グロコット染色. Medical Technology, 41 (4) : 429~438, 2013