

病 理 部 門

精度管理事業委員

迫 欣二

厚生連加茂病院

TEL 0565-31-1511

実務委員

鈴木利明

名古屋大学医学部附属病院

佐藤允則

愛知医科大学附属病院

病理検査の精度管理調査

愛臨技病理検査研究班では県下病理検査施設の染色技術のレベルアップと情報交換を目的に毎年特殊染色のコントロールサーベイを行ってきた。本年度からは新たに病院協会、医師会と合同の精度管理事業となり、第一回目のテーマとして最も一般的で広く行われている PAS 染色を取り上げた。本染色は他の特殊染色と違って経験的な要素、いわゆる職人芸的な部分が少なく、染色液の精度管理がポイントと考えられた。

また①過ヨウ素酸の酸化時間の違いによる染色性の差、②シッフ試薬のメーカー差、③液温の違いによる染色性の差、④シッフ試薬の更新時期、⑤亜硫酸水を用いない PAS 染色、の計 5 項目について精度管理委員による検討を行ったのであわせて報告する。

方法：参加施設を公募し、応募のあった 55 施設に未染標本 2 枚（腎剖検材料、2 μ 切片）と染色手技に関する設問用紙、また自施設にて包埋、薄切、染色までの一連の操作を行うためのホルマリン固定組織（腎手術材料、20%緩衝ホルマリン固定）を送付した。返送された標本は 16 名の病理検査研究班員と精度管理委員が全ての標本を直接鏡検し、糸球体基底膜や真菌のシッフの染まり具合、核染のバランス、薄切の厚さ等について、それぞれ 5 を最高の評価とした 5 段階評価し、自施設の標本と評価の高かった施設の標本とその手技を並べて印刷した報告書を作成し、送付した。尚、手技に問題のあると思われる施設についてはアドバイスのコメントを添えた。染色手技に関してはアンケートの内容を集計し以下にまとめた。

結果 1：酸化液について

酸化液にはすべての施設で過ヨウ素酸を用いて

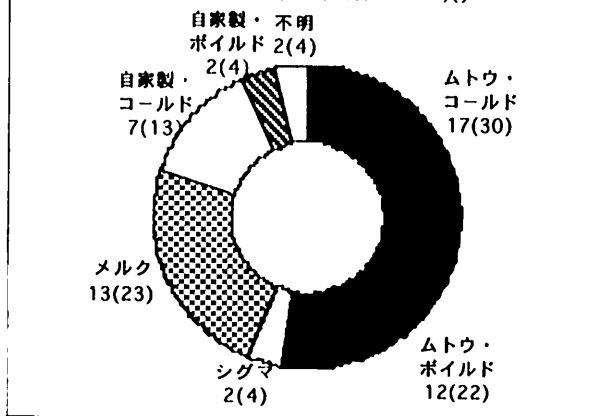
表 1. 過ヨウ素酸の濃度と反応時間 n=54, (): %

	5分以下	5~10分	15分	20分
0.5%	11 (20)	19 (35)	3 (5)	0 (0)
1%	6 (11)	13 (24)	1 (2)	1 (2)

いた。その濃度と反応時間を以下の表 1 にまとめた。検討課題①として取り上げた過ヨウ素酸の濃度と反応時間の問題は 0.1% 液を用いても 5 分以上の反応で十分な染色性が確認された。また 2% 液で 20 分反応させても過酸化による影響は認められなかった。冷蔵保存された過ヨウ素酸液を取り出した直後に使用した場合、若干染色性の低下が見られたが、反応時間を長くする（20 分程度）ことでその影響は回避できた。過ヨウ素酸液の保存性について、室温保存で 1 ヶ月程度は十分にその酸化力を保つことが証明できた。

結果 2：酸化液後の蒸留水水洗について酸化後の蒸留水水洗時間は 1~15 分と幅が見られたが、この時間の違いによる染色への影響は考えられなかった。

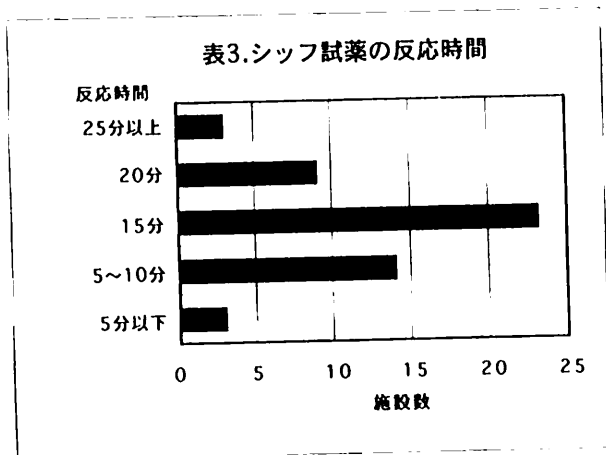
表 2. シッフ試薬の種類 n=55, (): %



結果 3：シッフ試薬について

シッフ試薬についてその種類を表 2 にまとめた。

シッフ試薬の反応時間を表3に示す。



コールドシッフを用いた施設の中には反応時間が1分と極端に短い施設もみられたが、それでもまずまずの染め上がりであった。

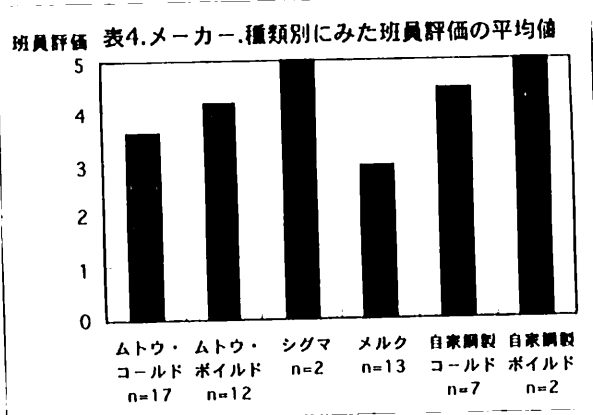
検討課題②のメーカー、種類の違いによる色の差については、ムトウ社のコールド、ポイルド、シグマ社、および自家調製のコールド、ポイルド処方ものはよく染色されていたが、メルク社のものは若干弱い傾向がみられた。全体的に見てポイルド処方に比してコールド処方は紫が強くコントラストのはっきりとした仕上がりとなる傾向がみられた(写真1)。

メルク社の製品はコールド処方らしいが(詳しい処方は明らかでないが)薄く薄切された腎糸球体基底膜の染色には若干物足りない仕上がりのもが多かった。しかしながらこの製品でも真菌や消化管粘液等は十分に染色されることから日頃腎組織を取り扱うことのない施設では全く問題なく使用できると考えられた。

シグマ社の製品に関してはどちらの処方であるか不明であった(回答がなかった)。

また良質の塩基性フクシンの品不足や、染色液作製時に周囲に飛散する塩基性フクシン粉末の発癌性の問題から自家調製は少なくなったと想像されたが、9施設では今もなお、この処方を守り続け、なおかつどれも高い評価を受けていた

(表4)。



コールドとポイルド処方の評価を比較してみるとコールド処方では評価の高いものと低いものとの差が大きく、平均値で見るとポイルド処方の方が勝っていた。言い換えればコールド処方の染色性は強いが、その分不安定な要素も含んでおり使用にあたって若干の注意が必要と考えられた。その不安定な部分に関して試薬の更新時期や、反応温度、反応時間を比較してみたが原因を究明するには至れなかった。

当方で行ったシッフ試薬のメーカー差と反応時間についての検討では表5のとおりであった。

	5分	10分	15分	20分	30分
ムトウ・コールド	良	優	優	良	良
ムトウ・ポイルド	可	良	良	優	良
シグマ	可	可	良	良	良
メルク	不可	不可	可	可	可
自家調製コールド	良	良	優	優	良

コールド処方ものは5分でもよく染色されるが、どのメーカーでも15~20分が最も適当と考えられた。

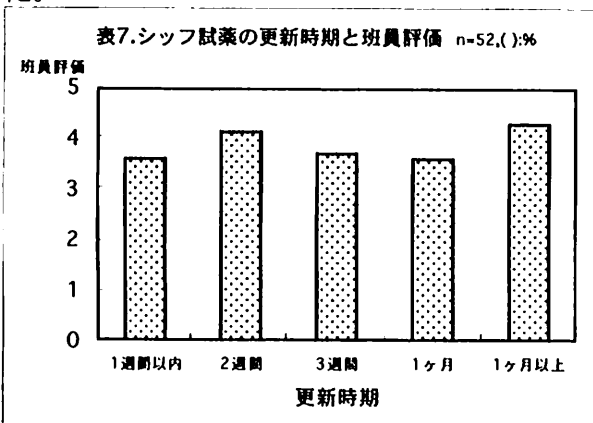
検討課題③のシッフ試薬の低温での反応を確認するために、冷蔵庫から取り出した直後から15分、30分反応させたものと室温15分反応させた

ものを比較した（表6）。

冷蔵庫から取り出した直後に30分反応させたものでも室温15分に比べると染色結果はやや弱い。

	15分	30分	室温15分
ムトウ・コールド	良	良	優
ムトウ・ボイルド	可	良	良
シグマ	不可	不可	良
メルク	不可	不可	可
自家調製コールド	良	良	優

このことから試薬はできるだけ室温近い液温にまで戻してから使用すべきで、ちなみに冷蔵庫から取り出した直後の液温は5℃、15分で11℃、30分で16℃と、液温が室温に戻るまでには60～90分程かかった。すなわち脱バラ開始前に冷蔵庫から取り出しておく必要があると考えられた。

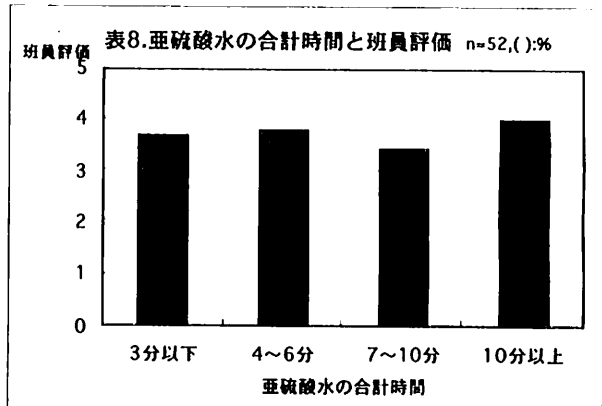


検討課題④のシッフ試薬の更新時期については毎回更新している施設から1ヶ月以上使用している施設までみられた。当方で行った検討においても2～3週間でやや染色性は落ちる傾向が見られたものの、4週間経ってもまだ使用に耐えうると考えられた。染色枚数や使用頻度によってはより短期間で染色性が落ちることも考えられるが日に数枚程度の染色枚数で、染色バットの

蓋をパラフィルム等でしっかりと密閉しておけば2～3週は十分に染色できると考えられた。

結果4：亜硫酸水について

シッフ試薬後の亜硫酸水の反応時間と班員の評価の関係を表8にまとめた。



この表からみると亜硫酸水の時間の長短は染色結果とは相関しないものと考えられた。今回のサーベイでは亜硫酸水を全く用いない施設が3施設にみられたが、その仕上がりは亜硫酸水を通した標本に比べ若干赤みが強く、コントラストもしっかりとしており班員の評価も高かった（写真2）（検討課題⑤）。

亜硫酸水後の流水水洗時間については3～5分がほとんどで、試みに1分程度まで短縮させて次の核染色に移ったが、後の色だしの段階で5分水洗したものと何ら変わらない状態まで発色していた。

結果5：核染色について

核染色については臓器が長時間ホルマリンに浸けられた解剖例であったこともあってなかなか染まりにくく、共染気味の施設からほとんど染まっていない施設まで様々であった。核の染まりは鏡検して確認することを習慣づけるべきである。

まとめ

評価の高かった標本、および評価の低かった標本とその染色手技を写真3、4に示す。評価の低

かった標本（写真4）を見てみると、真菌はまずまず染色されているが、糸球体基底膜はほとんど染色されていない。酸化は十分に行われており、染色液自体はどれも新調されたばかりで原因がはっきりしない。上段のメルク社のシッフ試薬を用いた標本は10分、5分と反応時間がやや短いのではないかと考えられるが、下段のムトウ・コールドシッフでは十分な染色時間のはずである。酸化液、染色液の劣化、若しくはシッフの液温が低すぎたのが原因と考えられる。包埋、薄切、染色の一連の操作を通したサーベイでは包埋はどの施設も確実になされているものの、薄切の段階でかなりのばらつきがみられ、そのためその染色像も様々なものであった。この結果は剖検例の評価の参考資料とした。

考察

病理標本の善し悪しはそれを診断する病理医の好みによって大きく左右されることがある。従って今回評価の高い標本が全ての病理医が満足する標本であるとは限らない。これは病理標本のサーベイを行う上で忘れてはならないことである。

PAS染色は最も一般的な特殊染色だが、この染色から得られる情報量は多い。とくに腎生検を取り扱う施設においてはこのPAS染色で得られる情報がかなり重要で、極力薄く薄切された切片を、できるだけ濃く染色した標本の方が診断しやすいとされている。

PAS染色において染まりが悪かった場合に考えなければならないことは、シッフ試薬の液温と、シッフ試薬の劣化、それに酸化液の劣化等が上げられる。

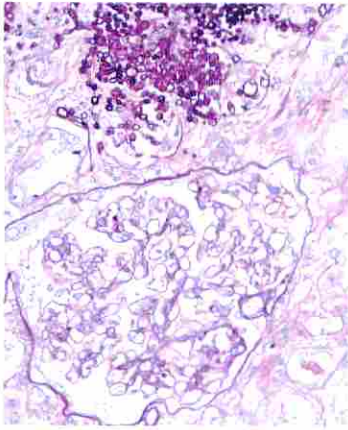
今回のサーベイにおいて予想外に結果のばらつきがみられた。たかがPAS染色、されどPAS染色といったところである。

最後に今回のサーベイにご参加下さいました施設の方々に厚くお礼申し上げます。今後もこの精度管理事業に積極的にご参加いただきますようお願い申し上げます。また一部の施設にはメルク社のシッフ試薬をポイルドに近い処方であると誤った報告書を送付してしまったことを、この場をおかりして深くお詫び申し上げます。

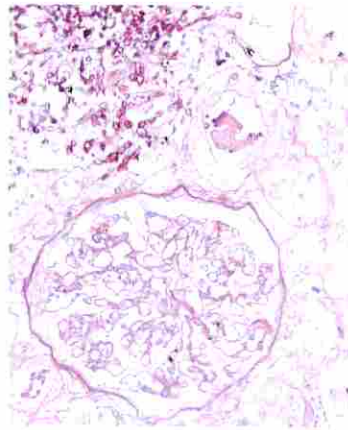
今回の内容は次年度の例会で詳しく報告する予定ですのでその時には是非ご参加いただき、活発な御討議をお願いいたします。

病理検査

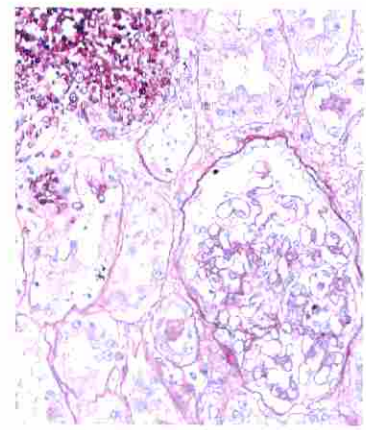
写真1. シッフ試薬の種類、メーカーによる色の差



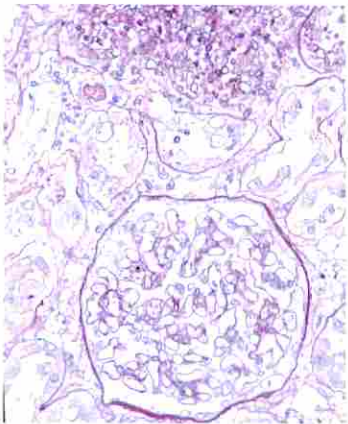
ムトウ・コールド



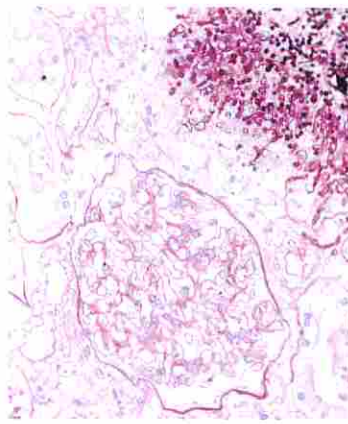
ムトウ・ボイルド



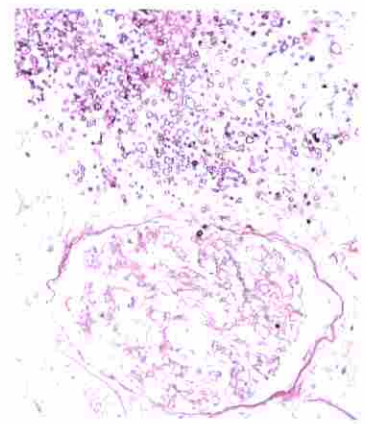
シグマ



自家製・コールド

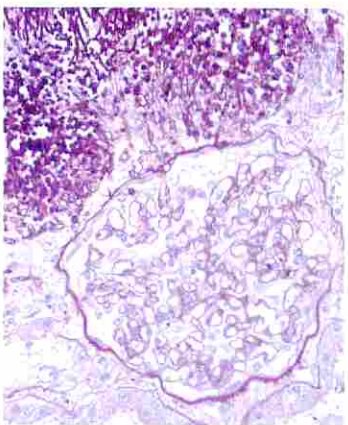


自家製・ボイルド

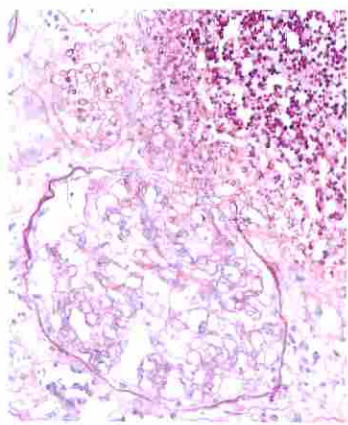


メルク

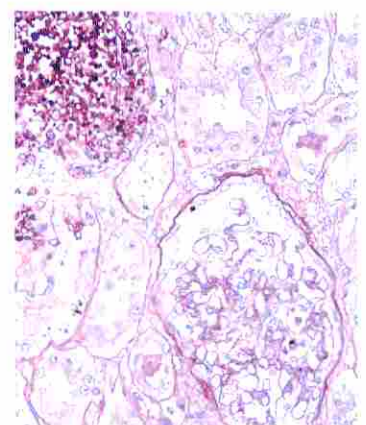
写真2. 亜硫酸水を用いない PAS 染色



ムトウ・コールドシッフ
亜硫酸水処理あり

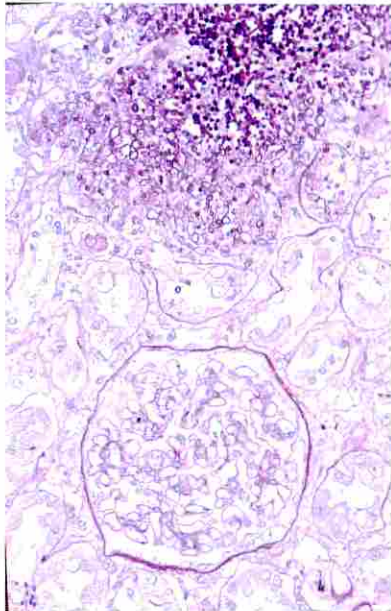


ムトウ・コールドシッフ
亜硫酸水処理なし

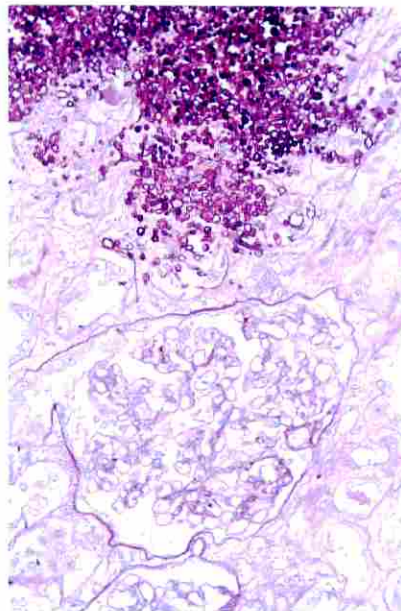


シグマ・シッフ
亜硫酸水処理なし

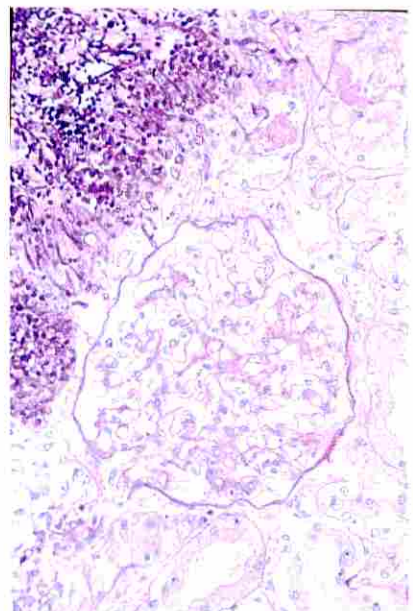
写真3.評価の高かった標本



0.5%過ヨウ素酸 10分
自家製コールド 7.5分
(更新7日目)

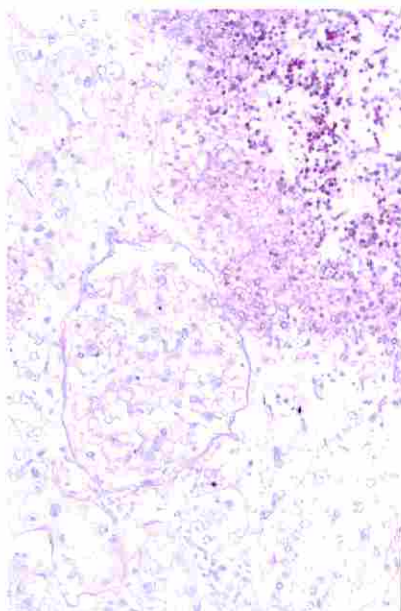


0.5%過ヨウ素酸 10分
ムトウ・コールド 20分
(更新5日目)

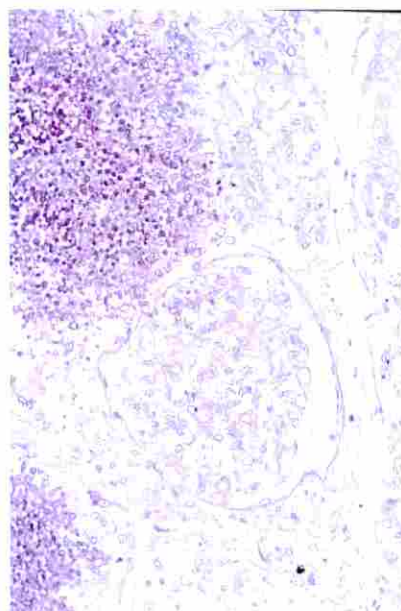


1%過ヨウ素酸 7分
自家製コールド 10分
(更新7日目)

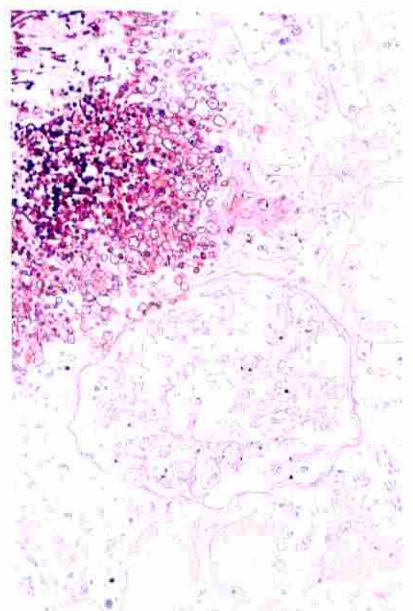
写真4.評価の低かった標本



1%過ヨウ素酸 10分
メルク・シッフ 10分
(更新1日目)



1%過ヨウ素酸 3分
メルク・シッフ 5分
(更新1日目)



1%過ヨウ素酸 10分
ムトウ・コールド 20分
(更新3日目)

平成10年度精度管理事業委員会

委員長 (担当副会長)	稲垣 勇夫	
情報システム (編集担当)	平井 信弘	愛知医科大学メディカルクリニック
微生物部門	白石 了三	半田市医師会健康管理センター
血液部門	伊藤 淳治	名古屋市立緑市民病院
臨床化学部門	中根 生弥	厚生連加茂病院
病理部門	迫 欣二	厚生連加茂病院
輸血部門	松本 圭司	総合病院南生協病院
血清部門	余郷 とし子	名古屋第一赤十字病院
生理部門	林 重孝	岡崎市民病院
一般部門	森光 陽一	名古屋公衆医学研究所
細胞部門	今井 律子	東海市民病院
遺伝子部門	長屋 清三	名古屋市立大学医学部
學術部長	稲垣 清剛	
会長	森 芳夫	

ご協力団体・会社名簿 (順不同、敬称略)

愛知県赤十字血液センター

シスメックス株式会社

株式会社エスアールエル

国際試薬株式会社

栄研器材株式会社

小野薬品工業株式会社

日水製薬株式会社

和光純薬工業株式会社

株式会社ニプロ

株式会社アズウエル

平成 11 年 2 月発行 (非売品)

発行人	森 芳 夫
編集人	稲垣 勇夫 平井信弘
発行所	名古屋市中村区名駅 5-16-17 花車ビル南館 愛知県臨床衛生検査技師会
印刷所	西春日井郡西春町大字沖村権現 12 株式会社 新生堂