

病 理 部 門

精度管理事業委員

滝野 寿

名古屋市立大学 医学部

TEL 052-853-8161

実務委員

富貴田	誠一	小牧市民病院
加藤	浩	春日井市民病院

病理検査の精度管理調査

はじめに

線維性結合組織の膠原線維、筋線維、弾性線維の識別に用いられるエラスチカ・ワンギーソン (Elastica Van Gieson Stain: 以下、EVG 染色と略) は、心、血管系病変の検索の他にも、障害組織の修復過程の線維化等の程度や、腫瘍の脈管浸潤の有無をより明瞭に知ることができる有効な手段である。それゆえに EVG 染色はヘマトキシリン・エオシン (Hematoxylin-Eosin Stain: HE 染色) に次いで汎用されている。今年度は病理検査の精度管理として EVG 染色を取り上げ、各施設に未染色標本を送付し、自施設法にて EVG 染色を施してもらい、同時に各施設における EVG 染色の実情をアンケートにて把握した。

愛知県臨床衛生検査技師会病理検査研究班では精度管理事業として、平成 6 年度のヘマトキシリン・エオジン染色を取り上げて以来、毎年精度管理活動を手掛けてきたが、EVG 染色も平成 8 年度にミニサーベイイとして取り上げていた¹⁾、5 年前の精度管理結果をふまえて今回の精度管理解析も行なった。

材料と方法

(1) 参加施設

平成 13 年度愛知県臨床検査精度管理調査に申込みのあった 110 施設のうち、病理検査の精度管理に 54 施設の参加申込みがあった。参加各施設に未染色標本を 2 枚送付し、自施設法にて染色を行なってもらい、1 枚を返送してもらった。

(2) 材料

病理解剖症例の肺組織。22 才男性、急性心不全の患者。死後 12 時間で病理解剖。20% 緩衝ホルマリン液にて固定。型どおりパラフィン包埋、3 μ m で薄切した未染標本。

(3) 評価方法

精度管理委員および病理検査研究班班員 18 名により、各施設名を伏せた状態にて鏡検を行ない、EVG 染色判定基準*に従って点数化し、18 名の合計を平均して、各施設の評価点数とした。

判定方法 [EVG 染色判定基準]* (改訂滋賀県法)^{8)・11)}

- 1) 酸性フクシンの染色性
- 2) ピクリン酸の染色性
- 3) レゾルシン・フクシンの染色性
- 4) 鉄ヘマトキシリンによる核の染色性

以上の EVG 染色に用いられる 4 染色液の染色態度について、おのおの判定基準を設けた。

-補足-

a) 酸性フクシン: 脱水・透徹不良や諸々の条件下で退色しやすく、EVG 染色では特に重要なため他の 3 項目よりも高得点配分とした。

A (6 点): 明瞭に染色されているもの

B (4 点): 若干不明瞭なもの

C (2 点): 不明瞭なもの

b) 2)～4)については

A (3 点): 明瞭に染色されているもの

B (2 点): 若干不明瞭なもの

C (1 点): 不明瞭なもの

c) 1)～4)の染色性のバランス

満点を 5 点として-1～-3 点の減点方式による。

以上、1)～5)について評価判定表を作成

表 1: 評価判定表

	A	B	C	
1) 酸性フクシンの染色性	6	4	2	
2) ピクリン酸の染色性	3	2	1	
3) レゾルシン・フクシンの染色性	3	2	1	
4) 鉄ヘマトキシリンによる核の染色性	3	2	1	
5) 染色性のバランス	5	4	3	2

*加算法で採点し、1 部位 20 点満点とし、最終的に評価点数を合計し、100 点満点として、総合判定を行った。

各染色液による染色結果の判定は、代表的な肺組織標本の以下の(a)～(e)の部位についておのの行なった。

(a)肺胸膜、(b)血管系(肺動脈、肺静脈)、(c)肺胞、(d)細気管支、(e)赤血球

評価は、事前に精度管理委員が参加標本の中から推奨する染色態度を示す施設の標本を各評価委員に提示し、評価判定識能の統一化を図った。評価委員全員の評点を合計し、平均値を各施設の最終評価とし、A～E の総合判定を行なった。

総合判定

- A:「染色上、目的を十分に達している」----- 100 ～ 80 点
- B:「染色上、目的を達している」----- 79 ～ 70 点
- C:「染色上、目的を達しているが、今一步である」----- 69 ～ 60 点
- D:「染色上、目的を達していない」----- 59 点以下
- E:「標本未提出のため判定不能」

なお、D 判定におよんだ施設については、その原因について検討し、アドバイスを加えて、標本を再送付して染色を再度行なってもらった。

EVG 染色の染色手順は変法もあるが、代表的な方法を以下に示す。主な染色液は弾性線維を黒紫色に染めるレゾルシン・フクシン液、核を黒色に染める鉄ヘマトキシリン液、そして膠原線維を赤色、筋線維を黄色に染め分けるワンギーソン液である。

弾性線維に含まれるポリペプチド鎖、粘液多糖類と結合したタンパクがレゾルシン・フクシンと化学結合して黒紫色を呈し、筋線維や細胞質、赤血球を小色素分子のピクリン酸で黄色に染め、その後大色素分子の酸性フクシンで膠原線維や細網線維を染め出す方法である。

EVG 染色法

1. 脱パラ、純アルコール、水洗、蒸留水を通す
2. 1%塩酸 70%アルコール
3. レゾルシン・フクシン液(40～50 分又は 30 分～1 時間)
4. 純アルコールで分別。(ごく軽く水洗後、純アルコール 2 槽で分別)
5. 水洗(5 分)
6. 鉄ヘマトキシリン液(5 分)
7. 軽く水洗
8. 1%塩酸 70%アルコールで分別
9. 色出し、水洗(10 分)
10. ワンギーソン液(2～5 分)
11. 軽く水洗、純アルコール 2 槽で分別
12. 脱水、透徹、封入

結 果

参加申込みのあった 54 施設のうち、回収できたのは 46 施設(回収率 85%)であった。未提出の施設の主な未提出理由は「現状で EVG 染色を行っていないため試薬がない」であった。なお標本運搬等による標本の破損等はなかった。

1. 染色標本の評価結果

総合判定にて A 判定は 25 施設(46.3%)、B 判定は 15 施設(27.8%)、C 判定は 5 施設(9.2%)、D 判定は 1 施設(1.9%)、および E 判定は 8 施設(14.8%)であった。A 判定の施設の標本のうち特に評価の高かった標本(図 2-4)と、評価の低かった標本(図 5)を示す。また、評価の低かった施設に染め直しを行なってもらった標本を示す(図 6)。

図 1 は今回、精度管理に供した肺組織の HE 組織像である。肺胞上皮、肺動脈、細気管支等が散見される。HE 染色は基本的には青紫色の核と、淡紅色に染まる細胞質といった2種類の色素による染め分けである。図 2 は今回の精度管理においてもっとも評価の高かった施設のEVG染色像である。肺動脈の内

外弾性板はレゾルシン・フクシン液にて黒紫色に、筋線維はピクリン酸の黄色の色調をとり、周囲の膠原線維は酸性フクシンの赤紫色に染まり、3 色の染め分けが良好である。図 3 は肺動脈に平行して走行する肺静脈で、内腔の赤血球はピクリン酸の色調をとって透明感のある黄色に染色されている。図 4 は肺胞の拡大像で、肺胞上皮やそれを取り巻くように毛細血管網が存在し、膠原線維、筋線維が細かい部位にまで存在しているのが認められる。

図 5 は評価の低かった施設のEVG染色像で、かろうじて弾性線維の染め分けはできているが、筋線維および膠原線維が同系色に染色されて、染め分けができおらず、EVG染色としての目的を達していなかった。同施設には、後日標本を送り、新調した染色液にて染色を行ってもらったところ、「A」判定の評価であった(図 6)。

全体的にみても EVG 染色の満たすべき条件、すなわち弾性線維、膠原線維、筋線維の染め分けに満足しうる標本(A 判定、B 判定)が約 9 割を占めた。しかし、EVG 染色は、弾性線維、膠原線維、筋線維の各成分の染色液による「染め分け」が評価の重要なポイントとなるために、「染め分け」が不十分な、いわゆる染色液同士の「かぶり」または「共染」がある場合には評価が低い傾向にあった。

評価として A を受けた施設も、C および D 評価を受けた施設の染色手順自体に違いは無かった。もちろん個々の染色液に標本を浸漬する時間は異なるが、それは染色液の新鮮度によっても異なる。また同じ種類の試薬でも市販品の既成染色液と、自施設にて自家調整した染色液とでもその染色態度と保存度は異なる。今回の評価の中でも最も評価の高かった施設の染色手技を以下に示す。

[評価の高かった施設法]

1. 脱パラフィン、水洗
2. 70%エタノール
3. レゾルシン・フクシン液(武藤化学) 120 分
4. 1%塩酸 70%エタノールにて分別 6 分以上
5. 水洗 1～5 分
6. 鉄ヘマトキシリン(武藤化学)で核染
7. 水洗 10 分
8. ワン・ギーソン液(武藤化学)

1%酸性フクシン:飽和ピクリン酸= 1 : 5

9. 脱水・透徹・封入

特に、レゾルシン・フクシン液の調整後 2 年以上経過している施設が 9 施設あり、中でも既製品の染色液を使用している施設が 7 施設あった(表 2、施設 A～G)。市販の調整済の染色液の場合、その有効期限は半年から 1 年以内である。使用期限を過ぎたレゾルシン・フクシン液の場合には過染する傾向が強いので、かなりの分別液による調整が必要である。さらに使用期限切れ期間が超過すると、分別液を用いてもなかなか過染した部分は落ちきらない。表 2 において、A 判定を受けた施設は何れも 60 分と 15 分と染色時間が短めであるのに対し、C および D 判定の施設は 2 時間以上も染色している為に容易に

分別されずに、あとのワンギーソン液に影響を生じていた。

レゾルシン・フクシン液の自家製あるいは半自家製の染色液は既製品の染色液とは異なり、調整直後よりも時間が経過した方が良好な染色性を示している。

表 2:レゾルシン・フクシン液の調整後 2 年以上経過している施設

	染色時間(分)	分別液	分別時間	判定
A	60	純エタノール	数秒	A
B	360	純エタノール	3 分以上	C
C	120	純エタノール	数秒	B
D	30	純エタノール	数秒	B
E	120	0.5%塩酸エタノール	1〜3 分	D
F	15	1%塩酸 70%エタノール	1〜3 分	A
G	420	純エタノール	数秒	C

2.技師の経験年数は染色結果に影響するのか

EVG 染色はメジャーな染色法ではあるが、年間を通じて頻繁にオーダーが出る染色ではないので、染色液の購入はそのタイミングが難しい。全施設の 1 ヶ月あたりの平均染色枚数は 6.5 枚である。染色機会の多い年間 21 件以上の 10 施設中 9 施設が既成のレゾルシン・フクシン染色液を使用しており、A 判定が 7 施設、B 判定が 3 施設と染色結果も安定していた。染色機会が多ければ染色液の染色態度の把握が容易と言えるので、一概に染色液の購入時期と総合判定の結果とは相関しなかった。

染色結果は技師個人個人の力量に左右されるので、今回の精度管理用の EVG 染色を実際に手掛けた技師の病理検査の経験年数を聞いたところ、平均経験年数 9.3 年であった。A 判定を受けた施設の平均経験年数は 10.4 年、B 判定は 7.9 年、C 判定では 6.6 年であった。A 判定を受けた施設の平均得点は 87.2 点、B 判定の施設で 75.4 点、C 判定の施設で 65.8 点であった。

表 3:技師の経験年数と評価

Age	A	B	C	D	Total	Average
1〜5	9	8	2		19	79.2
6〜10	5	3	1	1	10	78.3
11〜15	7	3			10	83.6
16〜20	2		1		2	78.3
21以上	3	1			4	88.7
	25	15	4	1		

経験年数年代別の得点分布を表 3 に示す。21 年以上の病理検査経験を持つ者は別にしても、経験年数 11 年から 15 年の世代がより熟練しているのが判るが、経験の浅い技師が必ずしも低い点というわけではなかった。また、今回染色した標本の染色結果に対する満足度を表 4 に示した。

表 4: 染色結果の満足度

	A判定	B判定	C判定	D判定	Total	平均点
満足	9	4	1		14	81.8
どちらとも言えない	9	4	3		16	81
やや不満	2	7	1		10	77.4
不満	3			1	4	80
未記入		2			2	75
Total	23	17	5	1	46	

3. 前回のミニサーベイ結果との比較 ¹⁰⁾

前回平成 8 年度のミニサーベイに参加して、今回も引き続き参加した施設が 24 施設、新たに参加した施設が 16 施設、未記入または参加不明が 6 施設で、合計 46 施設であった。5 年前のミニサーベイでは、レゾルシン・フクシン液の前に媒染を行なっている施設が 3 施設あったが、今回の調査では 1 施設もなかった。前回、媒染を行なった施設が今回のサーベイに参加したかは不明である。

レゾルシン・フクシン液は、前回の調査ではレゾルシンと塩基性フクシンの色素から調合する自家調製施設が 6 施設、調製済みのレゾルシン・フクシン色素粉末を使用した半自家製施設が 9 施設と、自施設での調製が 15 施設(44.1%)あったが、今回の調査では 32 施設(69.6%)が市販の染色液(武藤化学製; 前田変法)を用いていた。残りの 14 施設も自家製が 1 施設のみで、残りは半自家製であった。ここ 5 年間で検査室内で手間を省く努力がなされた結果と思われる。

酸性フクシンの代わりに、チアジン赤またはシリウス赤を用いることもあるが、前回の調査の時にはシリウス赤を使用している施設が数施設あったが、今回の調査ではどちらの色素も使用している施設は無かった。

4. レゾルシン・フクシン液について

前田変法 ⁹⁾はレゾルシンにヒドロキノンを加え、塩化第二鉄の代わりに硝酸第二鉄を用いており、共染や染色ムラが少ないのが特徴である。46 施設の平均レゾルシン・フクシン染色液の染色時間は平均で 185.7 分であるが、最短で 15 分、最長で 960 分とかなりのばらがある。市販の染色液では平均 186.9 分、自家製の施設では 182.9 分と大差なかった。つまり、レゾルシン・フクシンの染色態度はレゾルシン・フクシン染色液の後の工程である分別操作に寄与するところが大きいと思われる。実際に分別操作を行なっている施設は 46 施設中、43 施設(93.5%)であった。レゾルシン・フクシン液の後の分別液には塩酸加エタノールまたはメタノールが利用されるが、エタノール濃度が高く、酸性が強いほどレゾルシン・フクシンを溶解し易く、弾性繊維のみを選択的に染色すると言われている。分別操作を行なうと回答した 43 施設のうち、純エタノールを使用する施設が 28 施設、次いで 1%塩酸 70%エタノール液を使用する施設は 11 施設、あとは 70%エタノールが 2 施設、95%エタノールと 0.5%塩酸エタノールがおのおの 1 施設であった。1%塩酸 70%エタノール液の方がすばやく分別が進むために、分別時間は数秒がもっとも多く、純エタノール使用では 1〜3 分、それ以上もあった。

日臨技が推奨する日臨技標準法(1993)²⁾では、レゾルシン色素と塩基性フクシンを蒸留濾過した自家製処方を推奨しているが、この日臨技標準法を知っていた施設は 10 施設(21.7%)、実際に行なったことのある施設は 3 施設(6.5%)にすぎなかった。うち 2 施設は通常は市販の染色液を利用し、残る 1 施設もクロマ社のレゾルシン・フクシン粉末を用いた半自家製処方で行なっていた。また今後、日臨技標準法を実際に導入してみようと考えている施設は 21 施設(45.6%)、思っていない施設は 6 施設(13%)と導入を考えている施設が多い結果となった。導入を考えている施設で今回の EVG 染色標本の出来ばえについての満足度を聞いた回答では、「やや不満」、「満足」および「どちらとも言えない」がほぼ同数で、あまり反映していなかった。

5.核染色について

核染色は鉄ヘマトキシリンを用いている施設が 39 施設(84.8%)、カラッチのヘマトキシリンが 4 施設(8.7%)で、マイヤー、ハリスおよびギルのヘマトキシリンを使用している施設がそれぞれ 1 施設であった。鉄ヘマトキシリンのうち自家調製している施設は 22 施設(56.4%)、残りの 17 施設は市販の染色液で、殆どが武藤化学社製であった。ハリスおよびギルのヘマトキシリンの使用施設は市販の染色液を使用しており、カラッチ、マイヤー使用施設は自家調製であった。

核染色の分別操作を行なう施設は 18 施設(39.1%)、しない施設は 27 施設(58.7%)であり、未記入が 1 施設あった。分別すると回答した施設の分別液の組成は、1%塩酸 70%エタノールが一番多く 10 施設、続いて 0.25%塩酸水および 0.5%塩酸水が各 2 施設、純エタノール、0.5%塩酸 70%エタノール、0.2%塩酸エタノール、0.5%塩酸エタノールが各 1 施設であった。分別時間はすべて数秒であった。一般に鉄ヘマトキシリンは分別されにくいと言われており、カラッチのようにアルミニウムを媒染剤として用いたような場合は、酸性のワンギーソン液中にて浸透すると、ヘマトキシリンが分別されて脱色してしまう恐れがあると言える。

6.コントロール標本について¹⁾

通常、病理組織染色を施す場合、目的とする物質が染色によって染め出されているか、または染色液の充実度を知るために、コントロールを置く必要がある。EVG 染色の場合にはコントロール組織として、肺以外にも腎臓や大動脈等が用いられる。今回のように染色時間がまちまちな染色法の場合には、特にコントロール標本が重宝する。

今回のサーベイの調査の結果、EVG 染色においてもコントロール標本を一緒に染色している施設は 8 施設(17.4%)あり、コントロール用標本として、肺および腎が 3 施設、心臓と消化管が各 1 施設であった。8 施設の評価は A 判定が 5 施設、B 判定が 3 施設で、平均得点は 83.5 点と全体の平均点より高得点であった。コントロール標本は、目的とする組織内物質が陰性であった時に力を発揮する。該当組織内物質が他種の物質なのか、染色法のミスなのか、または染色液の不良なのかを確認するのに必要である。EVG 染色は大動脈の組織を陽性対照として使用することが多いが、正常組織や、わざわざ対照標本を置かなくとも当該の組織切片中に陽性に染まる物質があるので、それをインターナルコントロールとして利用するのも得策である。

7. ワン・ギーソン液について

EVG 染色におけるレゾルシン・フクシン液、鉄ヘマトキシリン液およびワンギーソン液は何れも使用期限があり、溶媒としてエタノールを用いている関係上、保存した場合に蒸発することにより試薬濃度が変化し、必ずしも適正な染色時間や態度を示さないことが多い。特にワンギーソン液はピクリン酸と酸性フクシン液の色素分子の比率が問題となる。大量の切片を染色した場合には、切片内の結合組織量によっては、染色液中のピクリン酸と酸性フクシンの量の比が変化して、赤と黄色のどちらか一方が優勢に染色され、所謂染色ムラを生じる原因になる。その場合には、染まらなくなった方の液を足せば元に戻るが、この加える量は目算であるので、そのさじ加減が難しい。

ワンギーソン染色液は成書によれば、保存液として飽和ピクリン酸水溶液と、1%酸性フクシン液を準備しておき、作成時に濾過した飽和ピクリン酸水溶液 100ml あたり 1%酸性フクシン液を 5～10ml 加えた、すなわち 100:5～100:10 の比で使用される。日臨技標準法²⁾では飽和ピクリン酸水溶液 100ml あたり 2%の酸性フクシン液を 6ml 加えている。つまり 100:12 の比率である。

今回の調査では、自家調製している施設が 32 施設 (69.6%) であった。市販の既成染色液は武藤化学製で 14 施設 (30.4%) あったが、使用時に 100:15 の比率で混合するように指定されている。自家調製の場合には各施設ごとにその混合比率はまちまちである。なお平均すると飽和ピクリン酸 100ml に対して 1%酸性フクシン液が 12.1ml であった。自家調製の 32 施設のうち、酸性フクシン、ピクリン酸および色バランスの評価の高かった (酸性フクシン 6 点中 5 点以上、ピクリン酸 3 点満点中 2.5 点以上、色バランス 5 点満点中 4 点以上) 8 施設の酸性フクシンとピクリン酸の混合比は、平均で飽和ピクリン酸 100ml に対して 1%酸性フクシン液が 14.2ml で、やや酸性フクシンの濃度が高めである。

ワンギーソン液後の水洗を行なっている施設は 46 施設中 10 施設 (21.7%) にすぎず、多くは水洗せずにいきなり分別・脱水操作を行なっていた。分別・脱水操作にはいったん低濃度エタノール (70%) に漬けてからという施設が 15 施設あったが、分別・脱水操作中にもワンギーソン液はどんどん落ちてしまうので、多くの施設ではこの操作にあまり時間を費やしていない。またエタノールの代わりにイソプロピルアルコールを用いたり、無水アルコールを用いている施設もあった。分別・脱水操作に移る前に、切片上の余分な染色液を濾紙にて吸い取り、なるべく分別・脱水時間を短縮する努力をしている施設もあったが、ここで時間をとられ過ぎて、ワンギーソン成分が落ちてしまうと、酸性フクシンの鮮やかな赤色がくすんだり、透明感のあるピクリン酸の黄色がくすんだり、他の鉄ヘマトキシリンやレゾルシン・フクシン液に影響を受けた、いわゆる「かぶり」を生じる結果となるので注意を要する。

EVG 染色における目頃感じている問題点をあげてもらう設問では、以下のような問題点があげられていた。

- (1) レゾルシン・フクシンの染色時間
- (2) ワンギーソン液後の分別・脱水処理
- (3) 酸性フクシンとピクリン酸のバランス
- (4) 染色機会が少ない

- (5) ピクリン酸の色のりが悪い
- (6) ピクリン酸の排液処理問題

考察

病理組織染色技術は機械に置き換えることが困難で、経験に拠るところが多く、単純に精度管理を数値で表すことが困難である。今回、平成 8 年に愛知県病理検査研究班が行なったミニサーベイ¹¹⁾、滋賀県および日臨技で行なわれた過去の EVG 染色の精度管理における評価判定を参考にして^{8)~11)}、できるだけ客観性を持たせた EVG 染色の判定基準を作成し、それに基づいて評価を行なった。今回行なった EVG 染色は他の目的で行なう染色とは異なり、変法が比較的少ないので精度管理はしやすい染色法である。

特に平成 8 年に行なったミニサーベイの時に比べると、染色液を自家調製から既に調製済みの市販染色液に変更している施設が 70%と増えていた(前回は 56%)。しかも自家調製している施設の中でも、調製済みのレゾルシン・フクシン粉末で染色液を作成した、所謂「半自家製」がほとんどで、塩基性フキシンの粉末を乳鉢ですりつぶすような作成法を行なっている施設は、1 施設のみであった。市販の染色液は前田変法を用い⁵⁾、レゾルシン・フクシンが強調して良好に染色される。しかし、この染色液は有効期限が半年と短い。EVG 染色は年間を通じてそんなにオーダーの出る染色法ではない。染色する度に新しい試薬を購入するのは不経済である。事実、市販の染色液を販売しているメーカーは 1 社だけなので、通常考えればもう少し染色態度にバラツキが少ないはずにもかかわらずこれだけ染色結果や評価および染色時間に差が生じるのは、レゾルシン・フクシン液の新鮮度に問題があると思われる。レゾルシン・フクシン液は有効期限を過ぎると、途端に共染傾向が強くなる。1 年位までの染色液であれば、染色後に 1%塩酸 70%エタノール等の分別液を用いれば、ある程度のところまでは共染した部分を落とすことは可能である。しかし、有効期限を 2 年を過ぎたような試薬を用いると、レゾルシン・フクシン液の染色時間を短くしても、過染した部分は落ちない。そうなるとワンギーソン液はレゾルシン・フキシンの紫黒色が勝ってしまうことになる。何れにせよレゾルシン・フクシン液が終了したら必ず顕微鏡下で弾性線維の染色態度を確認し、周辺組織へのレゾルシン・フクシン液の共染程度を確認し、もし共染があるならば分別操作をしっかりとしなければならぬ。

鉄ヘマトキシリンも同じメーカーから既製の染色液が販売されているが、使用直前に保存液を等量混合するだけである。しかし、一旦、混合してしまった染色液は日持ちせず、せいぜい 1 週間位である。それ以上経過したものを使用すると共染の原因となる。鉄ヘマトキシリンの代わりにマイヤー等、他のヘマトキシリン液を用いている施設もあるが、特に大差はなかった。しかし、物によっては酸性のワンギーソン液で脱色するものもあるので注意を要する。

ワンギーソン液は何と言っても酸性フクシンとピクリン酸の微妙な関係が難しい。先にも述べたが、その組成比率によっても微妙な染色態度が異なってしまう。また、先の行程のレゾルシン・フクシン液およびヘマトキシリン液の影響も受けて、この 4 色のバランスを絶妙に染め分けるのが EVG 染色の醍醐味である。またワンギーソン液後の脱色、分別操作も染色結果に多大な影響があるので、よりスピーディに、しかもム

ラの起こらないように分別操作を行なわねばならない。

これらの解決にはコントロール標本の使用が望まれ、染色液の劣化の程度や、ワンギーソン液の酸性フクシンとピクリン酸の比率の程度を知るためには大変重宝する。特にレゾルシン・フクシン液後の顕微鏡下での弾性線維の染色態度や、共染のチェック、ワンギーソン液後の分別程度は、同時に染めるコントロール標本によって確認しながら行なうのが望ましい。以下に愛臨技の推奨する染色法を記す。染色液は市販品でも自家製でも構わないが、できるだけ調製後あまり時間が経過していないものを使用する。

EVG 染色法(愛臨技推奨法)

1. 脱パラ、純アルコール、水洗、蒸留水を通す
2. 70%アルコール 1 分
3. レゾルシン・フクシン液 120 分
4. 純アルコールで分別。(ごく軽く水洗後、純アルコール 2 槽で分別)
5. 軽く水洗後、顕微鏡下で弾性線維の染色態度を確認。周辺の本来レゾルシン・フクシンで染まらない部分に、共染しているなら、さらに 1%塩酸 70%エタノールにて分別 数秒
6. 水洗(5 分)
7. 鉄ヘマトキシリン液(5 分)
8. 色出し、水洗(10 分)
9. ワンギーソン液(2～5 分)
10. 軽く水洗、純アルコール 2 槽で素早く分別
11. 脱水、透徹、封入

最後に、今回精度管理事業に参加していただいた施設に感謝いたします。

参考文献

- 1) 石川喜美男，他：臨床検査の標準化；病理組織検査の標準化の考え方と現状，医学検査 40(11)：1759-1771，1991
- 2) 則松良明，他：岡山県における病理組織染色精度管理の現状；エラスチカ・ワンギーソン(EVG)染色について 第 1 報，医学検査 43(8)：1362-1367，1994
- 3) 則松良明，他：岡山県における病理組織染色精度管理の現状；エラスチカ・ワンギーソン(EVG)染色について 第 2 報，医学検査 43(8)：1368-1373，1994
- 4) 渡辺明朗，広井禎之：色素の化学；第 4 回 弾性線維染色，*Medical Technology* 28(13)：1497-1499，2000
- 5) 前田 明：ワイゲルト弾性線維染色法の変法，病理技術 31：24，1985
- 6) 山下和也，他：弾性線維の染色法，検査と技術 26(7)：114-118，1998
- 7) 佐野 豊：組織学研究法．南山堂，p270-，1977
- 8) 滋賀県臨床衛生検査技師会：平成 7 年度 滋賀県臨床検査精度管理報告書，

231-245 , 1995

9) 滋賀県臨床衛生検査技師会:平成 8 年度 滋賀県臨床検査精度管理報告書 ,

235-253 , 1996

10) 滋賀県臨床衛生検査技師会:平成 9 年度 滋賀県臨床検査精度管理報告書 ,

195-218 , 1997

11) 平沢 浩:愛臨技精度管理 エラスチカ・ワンギーソン(EVG)染色,らぼ 48(1):63-66 , 1996

遺伝子・染色体 部 門

精度管理事業委員

北原 公明

藤田保健衛生大学病院

TEL 0562-93-2304

遺伝子・染色体検査のアンケート調査

【はじめに】

近年、polymerase chain reaction(PCR)を中心とした遺伝子検査は、検査のキット化や保険収載などにより、一般の検査室へ次第に普及し始め、今後も発展する分野と予想される。一方、染色体検査は、古くから臨床診断に利用されていたが、解析に多くの時間や労力がかかり、検査に熟練を必要とすることからまだ広範な施設で普及をみていないのが現状である。そんな中、平成12年より（社）日本臨床衛生検査技師会（日臨技）は、精度管理事業へ新たに遺伝子検査を加え実施した。それに伴い、（社）愛知県臨床衛生検査技師会（愛臨技）も、県が主催する精度管理事業へ新たに遺伝子・染色体検査を加える準備をすすめている。今回は、それにあたり、遺伝子・染色体検査の現状や実態を把握するためにアンケートを実施し、その集計結果を得たので若干の考察を加えて報告する。

【目的と方法】

今回のアンケートの目的は、以下のとおりである。

- 1 遺伝子あるいは染色体検査を実施している施設の実態と施設名を把握すること。
- 2 実際に行われている検査項目を把握する。
- 3 サーベイへの参加状況と、今後愛臨技のサーベイを実施した場合の参加有無。

調査方法として、平成13年7月に愛臨技精度管理事業への参加募集を各施設へ行い、参加するとの回答を得た110施設を対象にアンケートを実施した。

【結果】

1 アンケートの回収結果

1) 遺伝子検査の回収結果

遺伝子検査についてのアンケート回答数は87施設で、回収率は79.1%であった。その内訳は総合病院が39施設（44.8%）と最も多く、一般病院24施設（27.6%）、検査所10施設（11.5%）、大学病院4施設（4.6%）、診療所4（4.6%）と続いた（表1）。

表1 施設分類別遺伝子検査実施状況

施設分類	回答数	a 一部	実施%	b 外部	c 未実施	b+c	未実施%
総合病院	39	8	20.5%	26	5	31	79.5%
一般病院	24	0	0.0%	19	5	24	100.0%
検査所	10	3	30.0%	5	2	7	70.0%
大学病院	4	4	100.0%	0	0	0	0.0%
診療所	4	0	0.0%	2	2	4	100.0%
精神病院	2	0	0.0%	1	1	2	100.0%
その他	2	1	50.0%	0	1	1	50.0%
健診センター	1	0	0.0%	0	1	1	100.0%
療養所	1	1	100.0%	0	0	0	0.0%
合計	87	17	19.5%	53	17	70	80.5%
		a 一部であるが実施		b すべて外部委託		c 全く実施していない	

2) 染色体検査の回収結果

染色体検査についてのアンケート回答数は85施設で、回収率は77.3%であった。その内訳は総合病院が37施設(43.5%)と最も多く、一般病院24施設(28.2%)、検査所10施設(11.8%)、大学病院4施設(4.7%)、診療所4(4.7%)と続いた(表2)。

表2 施設分類別染色体検査実施状況

施設分類	回答数	a 一部	実施%	b 外部	c 未実施	b+c	未実施%
総合病院	37	2	5.4%	31	4	35	94.6%
一般病院	24	1	4.2%	17	6	23	95.8%
検査所	10	0	0.0%	6	4	10	100.0%
大学病院	4	0	0.0%	4	0	4	100.0%
診療所	4	0	0.0%	3	1	4	100.0%
精神病院	2	0	0.0%	0	2	2	100.0%
その他	2	0	0.0%	2	0	2	100.0%
健診センター	1	0	0.0%	0	1	1	100.0%
療養所	1	0	0.0%	0	1	1	100.0%
合計	85	3	3.5%	63	19	82	96.5%
未記入	2						

a 一部であるが実施 b すべて外部委託 c 全く実施していない

2 実施状況

1) 遺伝子検査の実施状況

遺伝子検査の実施状況を図1に、施設別内訳を表1に示した。遺伝子検査を一部でも実施している施設は全体で17施設(19.5%)であった。また、各施設群において、実施率を比較した結果、回答数の多かった上位5施設群のうち、大学病院が4施設ではあるが100%と実施率が最も高かった。次いで検査所の30%(3施設)、総合病院20.5%(8施設)と続いた。また、施設内では実施していないが外部委託検査として受け付けているのは、53施設で全体の61%であった。これらのことから全体の約8割の施設が遺伝子検査を診断の一部として利用していることがわかった。他方、全く実施していないと回答した施設は17施設(19.5%)であった。

遺伝子検査を外部委託している施設と、全く実施していない施設、合計70施設へ今後の検査予定を質問したところ、採算、予算、人員増、件数増などの条件が整えば実施したいとする回答が合計16施設(22.9%)あった(表3)。

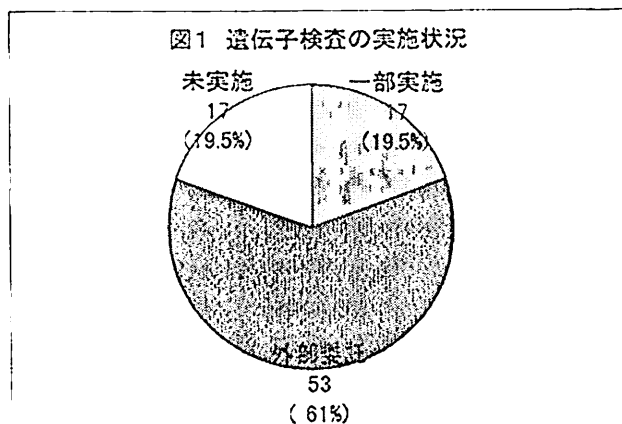


表3 外部委託および未実施施設の遺伝子検査予定

	施設数	比率
今のところ行う予定はない	53	75.7%
採算がとれれば行なう	6	8.6%
予算がついたら行う	4	5.7%
検査人員が増えたら行う	4	5.7%
依頼件数が増えたら行なう	2	2.9%
保険適応項目が増えたら行なう	0	0.0%
未記入	1	
合計	70	

2) 染色体検査の実施状況

染色体検査の実施状況を図2に、その施設別内訳を表2に示した。染色体検査を一部でも実施している施設は全体で3施設(3.5%)で、施設別にみると、総合病院2施設(5.4%)と一般病院1施設(4.2%)であった。また、施設内では実施していないが外部委託検査として受け付けているのは、63施設で全体の74.1%であった。よって、全体の約8割の施設が染色体検査を診断の一部として利用しているにもかかわらず、自施設にて実施している施設が少ないのは、解析に多くの時間と労力がかかり、検査に熟練を要するためと考えられた。

染色体検査を外部委託している施設と、全く実施していない施設、合計82施設へ今後の検査予定を質問したところ、74施設(90.2%)が今のところ行う予定はないと回答し、今後も自施設にて染色体検査を行う施設は、ほとんど増加しないと思われる(表4)。

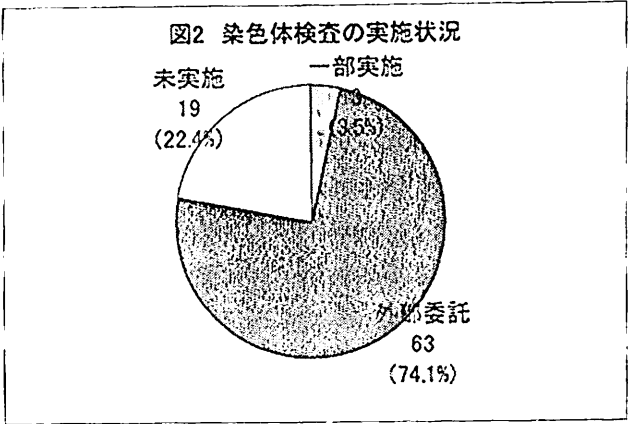


表4 外部委託および未実施施設の染色体検査予定

	施設数	比率
今のところ行う予定はない	74	90.2%
採算がとれれば行なう	2	2.4%
予算がついたら行う	2	2.4%
検査人員が増えたら行う	3	3.7%
依頼件数が増えたら行なう	1	1.2%
保険適応項目が増えたら行なう	0	0.0%
合計	82	

3 検査項目の傾向

遺伝子検査はその内容により、感染症、造血器細胞腫瘍、遺伝病・先天異常、癌関連、DNA 多型解析などに分類することが

できる。先に遺伝子検査を自施設で実施していると答えた17施設をこの分類に当てはめて解析したところ表5に示したように、保険適応の感染症検査を実施している施設が圧倒的に多く、16施設(94.1%)であった。その内訳は表6に示すとおり、結核菌、アピウム/イントラセラー、クラミジア、トラコマチス、淋菌、HCV などの順であった。次に、保険適応の造血器細胞腫瘍検査を実施している2施設の内訳は、BCR-ABL キメラ mRNA 検出、API/

表5 遺伝子検査実施17施設の検査内訳

検査項目	保険	施設数	実施率
感染症遺伝子検査	適応	16	94.1%
造血器細胞腫瘍検査	適応	2	11.8%
感染症遺伝子検査	非適応	1	5.9%
遺伝病・先天異常検査	非適応	0	0.0%
造血器細胞腫瘍検査	非適応	0	0.0%
癌関連検査	非適応	1	5.9%
DNA 多型解析検査	非適応	1	5.9%

表6 感染症遺伝子検査(保険適応)実施16施設の内訳

検査項目	施設数	実施率
結核菌 DNA(PCR 法)	14	87.5%
アピウム/イントラセラー DNA(PCR 法)	13	81.3%
クラミジアトラコマチス DNA(PCR 法)	9	56.3%
淋菌 DNA(PCR 法)	8	50.0%
HCV RNA 核酸同定(PCR 法)	7	43.8%
HCV RNA 核酸定量(PCR 法)	6	37.5%
抗酸菌群核酸同定(DDH)	3	18.8%
結核菌 rRNA(TMA 法)	2	12.5%
HIV-1 RNA 定量(PCR 法)	2	12.5%
HCV RNA 核酸定量(分岐 DNA プローブ)	1	6.3%

MALTI であった。また、保険非適応の遺伝検査を実施していると回答した3施設の検査内容は、サイトメガロウイルス DNA、HPV(パピローマウイルス)、P53 変異、ACE で、これらはいずれも施設の特長性や専門性がうかがわれる結果であった。一方、染色体検査を自施設にて実施している3施設の検査内訳は表7となった。また、FISH法検査の実施有無を質問したところ、自施設で実施しているが5施設(5.9%)、外部委託26施設(30.6%)となり、いずれかでFISH法を臨床診断に利用している施設が31施設(36.5%)あった(表8)。

表7 染色体検査実施3施設の内訳

血液疾患	1
先天異常	1
固形癌	0
出生前診断	1

表8 FISH法検査実施の有無

	施設数	比率
実施していない	49	57.6%
外部委託している	26	30.6%
実施している	5	5.9%
未記入	5	5.9%
合計	85	

4 サーベイへの参加

日臨技は平成12年から遺伝子検査のサーベイをスタートさせた。そこで、遺伝子検査を自施設にて実施していると回答した17施設について、日臨技サーベイへの参加状況を質問した結果、表9に示すように6施設(35.3%)が参加していた。これは、検査項目がHCVであったため、表6でHCV RNA 核酸定量(PCR法)を実施していると回答した施設数と一致した。次に、日臨技以外の遺伝子サーベイへの参加状況への質問に対しては、参加したと答えた施設が13施設(76.5%)で日臨技サーベイ参加を上回った(表10)。これについて、検査項目の質問はなかったが、表6から抗酸菌の実施施設数とほぼ一致するため、検査項目は抗酸菌であることが考えられた。そこで、遺伝子検査を自施設にて実施していると回答した17施設について、愛臨技がサーベイを実施した場合の参加の有無を質問したところ、項目によっては参加する10施設(58.8%)、参加する7施設(41.2%)で、17施設全てがいずれかで参加すると回答した。さらに参加すると回答した17施設へ、参加可能な検査項目を質問したところ、表12に示すように結核菌15

表9 日臨技遺伝子サーベイ参加状況

	施設数	比率
参加していない	11	64.7%
平成12年のみ参加	0	0.0%
平成13年のみ参加	0	0.0%
平成12年、13年両方参加	6	35.3%
合計	17	

表10 日臨技以外の遺伝子サーベイ参加状況

	施設数	比率
参加していない	4	23.5%
参加した	13	76.5%
合計	17	

表11 愛臨技遺伝子サーベイへの参加予定

	施設数	比率
参加しない	0	0.0%
項目によっては参加する	10	58.8%
参加する	7	41.2%
合計	17	

表12 サーベイへの項目別参加可能施設数

検査項目	施設数	比率
結核菌	15	88.2%
マイコバクテリウムアビウム/イントラセルラー	13	76.5%
クラミジアトラコマチス	9	52.9%
淋菌	8	47.1%
HCV 定性	7	41.2%
HCV 定量	6	35.3%
HIV-1 定量	2	11.8%
HBV 定性	0	0.0%
HBV 定量	0	0.0%
HIV-1 定性	0	0.0%

施設（88.2％）、マイコバクテリウムアビウム/イントラセラー１３施設（76.5％）、クラミジアトラコマチス９施設（52.9％）、淋菌８施設（47.1％）、HCV 定性７施設（41.2％）、HCV 定量６施設（3

表 13 染色体検査サーベイ参加状況
(染色体あるいは FISH 実施 7 施設対象)

	施設数	比率
参加していない	6	85.7%
参加した	1	14.3%
合計	7	

表 14 愛臨技染色体サーベイ参加有無
(染色体あるいは FISH 実施 7 施設対象)

	施設数	比率
参加しない	1	14.3%
項目によっては参加する	6	85.7%
参加する	0	0.0%
合計	7	

表 15 サーベイ参加可能項目

bcr-abl、PML-RARα	1
先天異常	1
G-BANDING FISH	1
FISH 法	1
未記入	2

愛臨技サーベイが実施された場合、6 施設が項目によっては参加すると回答した（表 14）。その場合の参加可能項目を表 15 に示した。

【結語】

今回、初めて愛知県内の施設を対象に、遺伝子・染色体検査についてアンケート調査を実施した。設問の仕方が悪かったせいか、対象は遺伝子・染色体検査についてのアンケートにもかかわらず、遺伝子・染色体検査以外のこととして回答されていた施設があった。また回答を、FD もしくは解答書以外の実施手引へ直接回答された施設もあったため、施設名がわからず問い合わせができないところもあった。

アンケート結果から、愛知県内にて遺伝子検査を実施している施設はまだそれほど多くないが、採算、予算、人員、件数などにもなう制約が解消されれば、実施施設がまだ増えることが示唆された。実施項目については、予想したとおり感染症の遺伝子検査 PCR がほとんどであった。わが国では、人の遺伝子を検査対象とする場合の倫理面や社会の理解がまだ十分得られていないため、保険収載が得られやすい感染症の遺伝子検査が今後も普及しやすいものと考えられる。一方染色体検査は、自施設での実施はかなり少なく、外部委託で対処している施設が多くみられ、あらためて染色体検査を自施設にて実施することの難しさがわかった。

今後、愛臨技の精度管理調査へ遺伝子・染色体検査を追加すると仮定した場合、検査対象は、感染症遺伝子検査の中から選択される可能性が高い。そのなかでも、日臨技あるいはメーカー主催サーベイ以外の項目となると、対象は限られ、その参加施設数は、精度管理調査の信頼性に十分となる数になるのか、現在のところ疑問が残される。しかし、遺伝子・染色体検査は、手技などによる結果への影響が大きいことも事実であるため、今後検討していきたいと考える。

病理検査フォトサーベイ

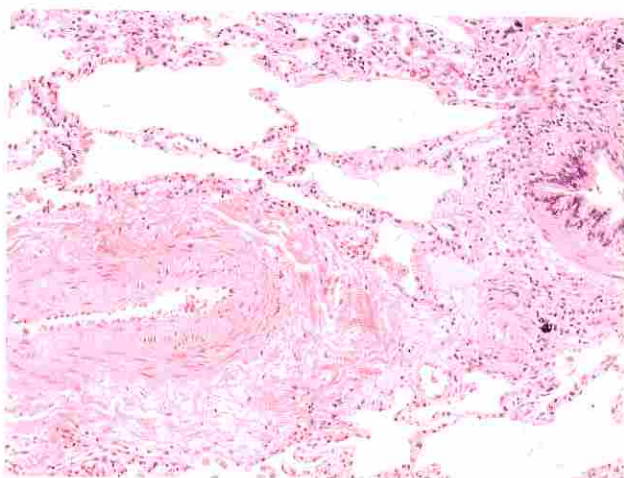


図 1：HE肺組織像

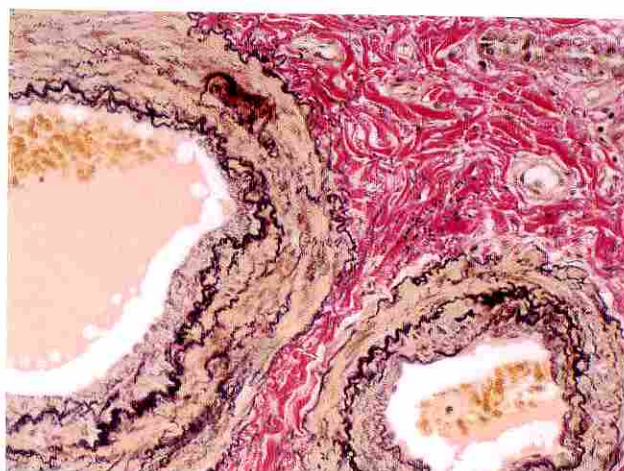


図 2：評価の高かったEVG染色像。
弾性線維、膠原線維、筋線維の
染め分けができています。

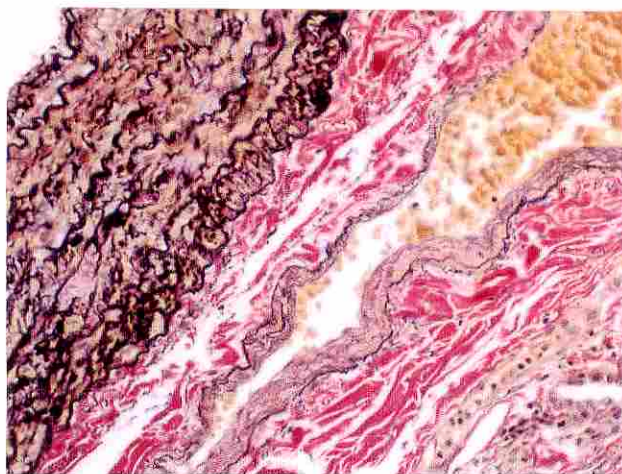


図 3：評価の高かったEVG染色拡大像。
細かい弾性線維まで染色
されている。

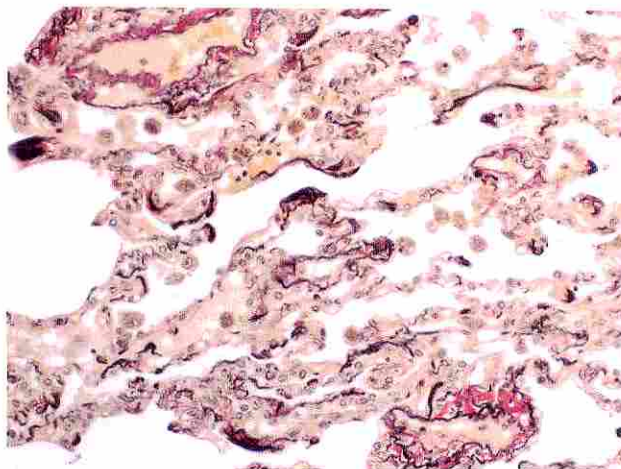


図 4：評価の高かったEVG染色肺
胞上皮拡大像

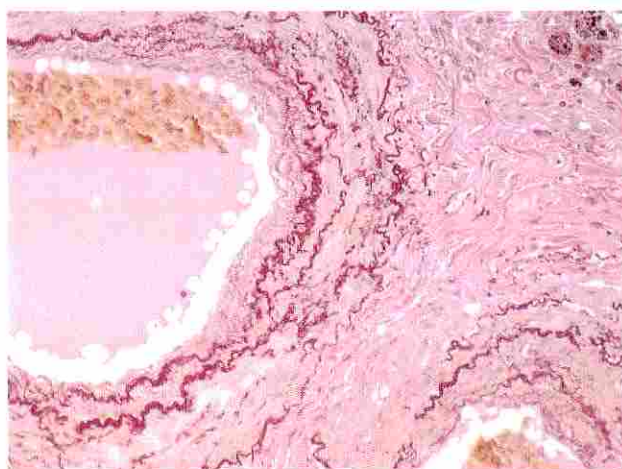


図 5：評価の低かったEVG染色像。
本来の染め分けがされてい
ない。（評価D）

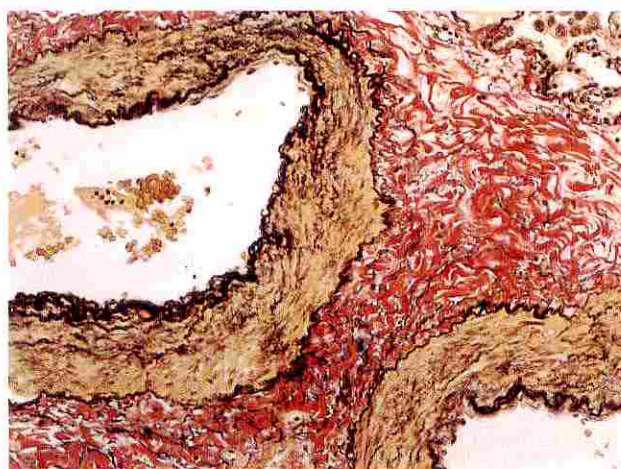


図 6：評価の低かった施設の再染
色標本。（再評価A）

平成13年度精度管理事業委員会

委員長（副会長）	永島 昇	東海産業医療団中央病院
事務局長（情報）	平井 信弘	愛知医大メディカルクリニック
IT担当（情報）	岡田 光義	株式会社デソラー健康管理部
微生物	内藤 淳	厚生連更生病院
免疫血清	進士 都	社会保険中京病院
血液	牧 俊哉	名古屋第一赤十字病院
臨床化学	藤田 孝	藤田保健衛生大学病院
病理	滝野 寿	名古屋市立大学医学部
細胞	角屋 雅路	知多市民病院
生理	中井 規隆	中部労災病院
一般検査	遠藤 けい子	国立名古屋病院
輸血	丹羽 玲子	愛知医科大学附属病院
遺伝子	北原 公明	藤田保健衛生大学病院
学術部長	松本 祐之	名古屋大学医学部附属病院
会長	荻津 直通	藤田保健衛生大学短期大学

平成13年度精度管理実務委員

微生物	多和田行男	国立名古屋病院
	榎山 弘	半田市医師会健康管理センター
免疫血清	伊東公一	名鉄病院
血 液	椎野 由裕	藤田保健衛生大学病院
	今井 正人	愛知医科大学附属病院
臨床化学	加藤 隆正	豊田地域医療センター
	柘植 和子	春日井市健康管理センター
病 理	加藤 浩	春日井市民病院
	富貴田 誠一	小牧市民病院
細 胞	郡司 昌治	名古屋第一赤十字病院
	佐藤 茂	名古屋市立大学病院
生 理	堀出 剛	名古屋掖済会病院
	伊藤 理恵子	名古屋大学医学部附属病院
	(心電図) 高須賀 広久	藤田保健衛生大学病院
	(心臓超音波) 余語 保則	小牧市民病院
	(脳波) 吉子 健一	名古屋大学医学部附属病院
一般検査	包原 久志	碧南市民病院
	滝 賢一	愛知医科大学附属病院
	野村 昌代	藤田保健衛生大学病院
輸 血	左右田春美	医療法人豊田会刈谷総合病院
	谷川美佳子	愛知県赤十字血液センター

ご協力団体・会社名 (順不同、敬称略)

愛知県赤十字血液センター	日水製薬株式会社
デンカ生研株式会社	三光純薬株式会社
国際試薬株式会社	栄研器材株式会社
ベックマン・コールター株式会社	ニッポーボーメディカル株式会社
和光純薬株式会社	協和メデックス株式会社
株式会社カイノス	栄研化学株式会社
関東化学株式会社	株式会社シノテスト
株式会社セロテック	株式会社ニプロ
第一化学薬品株式会社	株式会社アークレイ
富士メディカル株式会社	株式会社東ソー
株式会社ダイアヤトロン	極東製薬工業株式会社
ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社	
オーソ・クリニカルダイアグノスティックス株式会社	
株式会社スズケン	
株式会社アズウエル	

平成14年2月発行

発行者	荻 津 直 通
編集者	永島 昇・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1階 (社)愛知県臨床衛生検査技師会
印刷所	名古屋市千種区千種3丁目33-11 山菊印刷株式会社