

病 理 検 査 部 門

精度管理事業部員 小熊 孔明 名古屋記念病院 TEL 052-804-1111
 実務担当者 柴田 伸一 (岡崎市医師会公衆衛生センター)
 加藤 克幸 (名古屋大学附属病院)

はじめに

PAS反応は、糖質を検出する一般的染色で、グリコーゲン、粘液物質、真菌類、アメーバの検出、腎糸球体病変の観察などに幅広く用いられ、多くの施設で最も利用されている。原理としては真菌内の多糖類を過ヨウ素酸で酸化し、生じたアルデヒド基にシッフ(Schiff)試薬を反応させ赤紫色に呈色する方法で、真菌体以外の組織中のグリコーゲンや多糖類も染め出すことが出来る。

今回はこの染色法が日常業務の中で正しく処理されているかを調査するとともに、優れた染色を示した施設の方法を紹介すると共に、様々な情報を提供することを目的として調査を行った。

参加施設

平成18年度愛知県臨床衛生検査技師会精度管理調査に参加した126施設中、病理検査の精度管理調査申し込み施設は60施設あった。その全施設から回答が提出された。

材料

剖検材料、真菌感染した腎臓組織。
 10%ホルマリン固定後、2.5µmの厚さで薄切した未染標本

評価方法

提出されたPAS標本は全て同一条件下で顕微鏡撮影を行い、写真にて判定を行った。
 判定ポイントは判定時に表記し以下のポイントに関して評価して貰った。

1. 評価ポイント

- 1) 真菌の染色性……………(良・可・不可)
- 2) 糸球体基底膜の染色性……………(良・可・不可)
- 3) 上記陽性対象部位と
非対象部位とのコントラスト…(良・可・不可)
- 4) 核の染色性……………(薄・適・濃)
- 5) 核染色による共染の有無……………(無・有)

2. 点数配分

- 1) 真菌の染色性、糸球体基底膜の染色性
非対象部位とのコントラスト
良:2点、可:1点、不可:0点
- 2) 核の染色性
薄:-1点、適:0点、濃:1点
- 3) 核染色による共染
無:1点、有:0点

精度管理委員及び病理検査研究班員20名の評価を点数化し、それを100点満点で換算して総合評価A、B、Cに分類した。

総合判定分類

- A判定:「染色上目的を十分に達しており、美しい」
……………75~100点
 B判定:「染色上目的を達しているが、更なる向上が望まれる」
……………50~74点
 C判定:「染色上、目的を達しておらず、診断に支障が考えられる」
……………49点以下

結果

総合判定にて A判定・・・46施設
 B判定・・・14施設
 C判定・・・該当なし

今回、「染色上、目的を達しておらず、診断に支障が考えられる」に相当するC判定の施設は無かった。PAS陽性物質(真菌、糸球体、基底膜)、核共に良く染色され、染色上の目的を十分果たしていた。しかし、PAS染色の評価はそれだけでなく、「結合織への共染」、「核の染色性」、「核染色による共染」なども重要な評価ポイントになるため、それにより評価が低くなった施設も見られた。A判定の施設では、真菌や糸球体基底膜など綺麗に染色されていた。また、その多くの施設は非対象部位とのコントラストや核の染色性も良好であった。

B判定になった14施設では、評価ポイント項目の単項目のみ評価が低くなった施設や、複数の項目で評価が低かった施設など理由は様々である。

評価の低かった施設の代表的な写真を示す。

1. 真菌又は基底膜の染色性が薄い……(写真1)
2. 結合織への共染あり……(写真2)
3. 核染色による尿細管上皮への共染あり……(写真3)
4. 核染色が薄い……(写真4)

今回の評価の中で、最も評価の高かった施設の染色手順を以下に示す。

1. 脱パラ、脱キシレン、水洗
2. 0.5%過ヨウ素酸 5分
3. 水洗 2分
4. シッフ試薬 コールドシッフ 15分
5. 亜硫酸水 1層 9分
6. 水洗 3分
7. 核染色(マイヤーのヘマトキシリン)
8. 色だしー温湯 5分
9. 脱水、透徹、封入

設問の解答より

【設問1】PAS染色の方法

- 用手法……53施設
- 自動染色装置……7施設
(ライカ製:4施設、サクラ製:3施設)

【設問2】染色手順

1. 過ヨウ素酸濃度と反応時間について表にまとめた。前回のサーベイ(平成10年度)同様、0.5%又は1.0%で5~10分反応させている施設が多かった。反応時間が5分未満の2施設については、糸球体基底膜の染まりが薄くB判定になっている。

今回(平成18年度:n=60)

	0.5%	1.0%	5.0%
5分未満	1	1	0
5-10分	32	19	1
15分	5	1	0
20分	0	0	0

前回(平成10年度:n=54)

	0.5%	1.0%	5.0%
5分未満	1	1	0
5-10分	30	18	0
15分	3	1	0
20分	0	1	0

酸化剤の種類

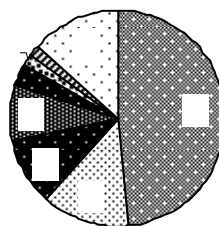
多くの施設(49施設)が過ヨウ素酸(二水和物)を使用している。

	濃度	A判定	B判定
過ヨウ素酸(二水和物)	0.5%	25	8
	1.0%	12	3
	5.0%	1	0
オルト過ヨウ素酸(二水和物)	0.5%	4	0
	1.0%	2	0
過ヨウ素酸ナトリウム(メタ過ヨウ素酸ナトリウム)	1.0%	2	2
不明	0.5%	0	1

2. シッフ試薬の種類及び反応時間について、前回のサーベイ(平成10年度)と比較した。シッフ試薬の種類については、前回と比べ、ムトウのコールドシッフを使用している施設が増え、約半数の施設(48%)が使用している。反応時間については、前回(平成10年度)同様、15分反応させている施設が一番多かった。

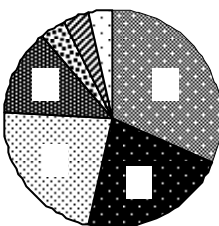
シッフ試薬の種類

今回(平成18年度:n=60)



	施設数	%
ムトウコールド	29	48%
ムトウボイルド	8	13%
メルクコールド	6	10%
自家製コールド	5	8%
メルクボイルド	2	3%
シグマコールド	1	2%
自家製ボイルド	1	2%
不明	8	13%

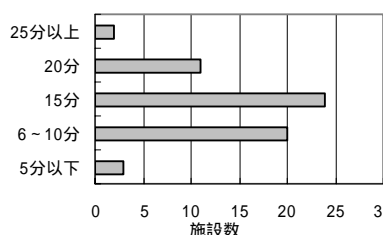
前回(平成10年度:n=52)



	施設数	%
ムトウコールド	17	31%
メルク	12	22%
ムトウボイルド	12	22%
自家製コールド	7	13%
シグマ	2	4%
自家製ボイルド	2	4%
不明	2	4%

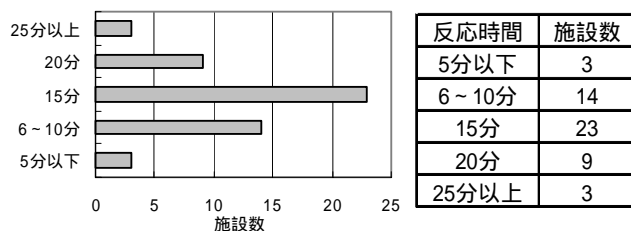
シッフの反応時間

今回(平成18年度:n=60)



反応時間	施設数
5分以下	3
6~10分	20
15分	24
20分	11
25分以上	2

前回(平成10年度:n=52)



【設問3】 1ヶ月のPAS染色枚数

PAS染色は、多くの施設で一般的に行われている染色である。施設により年間染色枚数に差があるが、今回の評価結果からは、年間染色枚数が評価に影響しているとは考えられなかった。

染色枚数	A判定	B判定
10枚以下	21	4
11~100枚	9	5
101~200枚	6	3
201-500枚	7	2
500枚以上	3	0

【設問4、5、6】

ルーチン業務として事前(H・E判読前)にPAS染色を実施しているか

1. 実施している・・・32施設

材料(施設数:複数回答)	目的
胃、大腸(23施設)	低分化腺癌(印鑑細胞癌)の鑑別
腎臓(10施設)	
肺(9施設)	赤痢アメーバ、真菌の検出
皮膚(8施設)	系球体病変の観察 等々
肝臓(3施設)	
乳腺、マルク(各1施設)	

2. 実施していない・・・27施設

1)ルーチンで実施しない理由

病理医の方針、オーダーが無い、経費節減、人手不足など

2)病理医からオーダーがある症例

真菌やアメーバの確認、腺癌の鑑別など

3. 不明・・・1施設

事前(H・E判読前)にPAS染色を実施している施設 32施設の評価は、A判定 26施設、B判定 6施設で、事前(H・E判読前)に実施していない施設 27施設の評価、A判定 20施設、B判定 7施設と大差はなかったため、ルーチン業務でPAS染色を実施しているかどうかは、今回の評価結果に影響しているとは考えられなかった。PAS染色が、病理医からオーダーがあったときのみ実施できれば、業務の効率化、経費削減ができると思われるが、病

理医の方針、考え方に大きく左右されると思われる。

【設問7】 コントロール標本の有無

1. 用いる・・・5施設(大腸、小腸、結腸、腎臓、肺気管支など)
2. 用いない・・・55施設

【設問8】 今回の染色結果の満足度

満足度	A判定	B判定
大変満足している	5	1
満足している	29	8
どちらともいえない	7	2
やや不満	2	3
不満	2	0
不明	1	0

「大変満足している」がB評価だった1施設は、「診断に支障無く、真菌、基底膜は綺麗に染まっていたが、結合織への共染があり、核染色の染まりが薄い印象」と判定された。

また、「やや不満」「不満」だが、A評価だった2施設は、「綺麗に染まっており、診断に支障無いと思われます。核染色による尿細管上皮への共染がやや見られるようです」と判定された。このことは、染色者により染色度を評価する基準が違うことを意味していると思われる。「満足している」がB評価だった8施設は、ほとんどが「診断には支障が無いが、基底膜の染まりが薄い」と判定された。

【設問9】 染色した技師の病理経験年数

経験年数	A判定	B判定
5年以下	23	7
6~10年	12	0
11~15年	4	2
16~20年	4	2
21年以上	3	2
不明	0	1

染色結果は、技師個々の力量に左右されるため、今回のPAS染色を行なった技師の病理経験年数を聞いたところ、平均経験年数は9.0年であった。A判定施設 46施設の平均経験年数は8.3年、B判定施設 13施設(1施設不明)の平均経験年数は11.7年であり、判定と経験年数は関連しなかった。

【設問10】 過ヨウ素酸の反応温度

1. 室温・・・57施設
2. 冷蔵(冷蔵庫から出してすぐ使用)・・・3施設

【設問11】 過ヨウ素酸の酸化時間は、検体の種類、厚さにより変えているか

- 1. 変えている……3 施設
- 2. 変えていない……57 施設

【設問12】 過ヨウ素酸の交換目安

- 1. ない……8 施設
- 2. ある……52 施設

交換目安	施設数
毎回	12
2～3日	2
1週間	15
2週間	5
1ヶ月	10
2～3ヶ月	2
染まりが悪い時	3
シッフ交換と同時	3

【設問13】 シッフ試薬の反応温度

- 1. 室温……44 施設
- 2. 冷蔵(冷蔵庫からだしてすぐ使用)……16 施設

【設問14】 シッフ試薬は、検体種類、厚さにより時間を変えているか

- 1. 変えている……11 施設
 - 1) 解剖検体は染まりが薄いので、倍時間をかける。
 - 2) 通常は15分、薄い切片(腎生検)は25分。
 - 3) 4-5 μは10分、2-3 μは30分。
 - 4) 糸球体基底膜の染まり具合。好中球の細胞質。
 - 5) ピンクの色調を目視して決めます。
- 2. 変えていない……49 施設

【設問15】 シッフ試薬の交換目安

染色枚数、染色頻度により交換目安は異なる。多くの施設では期間を決めて交換するか、シッフ試薬が赤く(ピンク)なってきたら交換しているようである。また、亜硫酸臭が薄くなったり、ホルマリン原液に滴下し青紫色を呈した場合に交換する施設もあった。

- 1. 1～2週間で交換又はシッフ試薬が赤く(ピンク)なってきたら交換……18 施設
- 2. 1ヶ月で交換又はシッフ試薬が赤く(ピンク)なってきたら交換……10 施設
- 3. 特に期間はないが、シッフ試薬が赤く(ピンク)なってきたら交換……18 施設
- 4. 毎回(のせガラス法)交換又は数回、数枚で交換……7 施設
- 5. 染まり具合を確認して交換、その他……7 施設

【設問16】 シッフ試薬についてボイルドシッフとコールドシッフの染色性の違いについて

- 1. 知らない……35 施設
- 2. 知っている……23 施設
- 3. 未回答……2 施設

シッフ試薬にはコールドシッフとボイルドシッフといわれるものがある。コールドシッフはボイルドシッフを改良したもので、腎臓糸球体基底膜を明瞭に染めることが出来る。腎生検の染色には有効と考えられる。尚、真菌、粘液などの染まりには違いは無いようである。

【設問17】 亜硫酸水は必要と思うか

- 1. 必要である……40 施設
 - 1) 非特異反応、共染を防ぐため
- 2. 必要でない……4 施設
 - 1) 共染は気にならない、綺麗に染まるから
 - 2) 必要であると思うが、亜硫酸ガスが充満するため行っていない
 - 3) 検討して差がみられなかったため、
- 3. どちらともいえない……16 施設

「必要でない」の意見の中で、検討した結果差が無かったとの事であるが、我々も調査を行った。それによればシッフ試薬に入れてあったプレパラートを直接水洗した所、水流中でシッフの発色が起こり、それにより目的以外の結合組織に共染が起きることが判った。染色は常日頃から、より良い結果を求めて条件の見直しや、工夫により様々な方法に改良されて行くのが現状であるが、基本的なセオリーを遵守するのは重要と思われる。

【設問18】 今回のサーベイで利用した染色液は

- 1. 酸化剤……新品:42 施設
 - (A判定:34 施設、B判定:8 施設)
 - 使い古し:18 施設
 - (A判定:12 施設、B判定:6 施設)
- 2. シッフ試薬……新品:48 施設
 - (A判定:39 施設、B判定:9 施設)
 - 使い古し:11 施設
 - (A判定:6 施設、B判定:5 施設)
 - 不明:1施設
- 3. 亜硫酸……新品:40 施設
 - (A判定:31 施設、B判定:9 施設)
 - 使い古し:15 施設
 - (A判定:12 施設、B判定:3 施設)
 - 利用していない:3 施設
 - (A判定:2 施設、B判定:1 施設)
 - 不明:2 施設

4. 核染……新品:14 施設
 (A判定:11 施設、B判定:3 施設)
 使い古し:45 施設
 (A判定:34 施設、B判定:11 施設)
 不明:1 施設

【設問19】 貴施設におけるPAS染色で、何か問題点があれば記入してください(反応がうまく起こらないことがあるなど…)

1. 試薬の交換の目安がわからず、反応がうまく起こらないことがある。
2. 腎生検等の標本が薄いものについてはシッフ試薬の劣化の影響を受けやすい。
3. 金属バットを使用するとシッフ試薬が混濁する。
4. バックグラウンドに共染があるときがある。
5. シッフ試薬の調整が難しい。
6. ゲフリール時にPAS反応がうまく起こらない
7. 陽性部分の赤味が弱いことがある。
8. 非特異反応が起きる事がある
9. 酸化剤を調整してからの交換時期

等々

【設問20】 PAS染色について、御意見及びコツがありましたら記入して下さい。

1. シッフ試薬にカビが繁殖することがあるので、それらを除くため染色前に濾過をしている。
2. シッフ試薬の日数がたつほど、徐々に染色時間を長くする。
3. シッフの前に蒸留水につける(5分) 0.5%ピロ亜硫酸ナトリウム 5分×2槽
4. 脱パラ後の流水水洗は、糖質が拡散・溶出するおそれがあるため長い時間はしない。核染はPAS反応により核酸が酸化されて塩基性色素に親和性が増しているため長い時間はしない。

等々

考察

病理組織染色は、数値を扱う分野と異なり、作製者の技量や病理医の好みなど、主観的要素が大きく影響するため標準化や精度管理が困難な部門である。今回行ったPAS染色は、特殊染色の中で最も多くの施設で行われているため、60 施設もの参加があった。これは平成16 年度に真菌の染色を目的に行ったグロコット染色の時(参加施設 51 施設)よりも多い参加である。

全参加施設の標本の染色性を病理班全員で評価、点数化し、全体としては、「染色上、目的を達しておらず、診断に支障が考えられる」に相当するC判定の施設は無かった。しかし、各施設間による染色性にばらつきが存在した。特に 糸球体基底膜の染色性、PAS反応の共染、核染色およびその共染の3 つに原因があると

思われる。目的の真菌については、各施設共比較的良好的な結果を得ていた。

については、材料によって染色時間を変更しているかどうかが挙げられる。今回使用した材料は、剖検材料であり、生検組織より染色性が悪くなるのが一般的である。したがって、今回の染色で、剖検材料であることを念頭において、染色したかどうか1つのポイントとなる。設問14の結果からも材料によって染色時間を変更している施設が11 施設、残りの49 施設は変更していないとの回答があった。これにより、真菌の染色性は保たれても、糸球体基底膜の染色性低下、核の染色性低下と言う結果が生じたものと思われる。また、核染色性の低下を考慮し、通常より長めに染めた結果、ヘマトキシリンの共染を引き起こした施設もあった。ただ、同一条件の切片で染色の綺麗な施設があることから、高得点施設の染色手順を紹介し、各施設染色法の参考にしてもらう事で、施設間格差を減らし、標準化の一端を担うことができると考える。

については、シッフ反応後の、亜流酸水による洗浄処理を行っているかどうかを挙げられる。業務でのPAS染色は、陽性部位がしっかり染まっていれば診断に支障は無く、特に気にならない程度の共染であれば見逃される事が多い。ただ、今回の様にPAS本来の染色性を見た場合、亜流酸水を通して余分なシッフ試薬を洗浄したかどうか、関係してくると考えられる。診断に支障が無いことから、亜流酸水を使用すべきかどうかは、賛否両論と思われる。しかし、共染の無い美しい染色をめざるのであれば、セオリーに乗っ取って、亜硫酸は使用すべきと考える。

また、特殊染色の染色性に重要な位置を占めるのが、試薬の劣化であり、その交換時期等の試薬管理は非常に重要である。今回のPAS染色について言えば、厳密な交換時期を設定している施設は少ないようである。ただ、アンケートの集計結果に見られるように、多くの施設が導入している、「シッフ試薬に色付きがある」と言う段階では交換すべきと考える。また酸化剤である過ヨウ素酸の劣化は、シッフ試薬の染色性低下を惹き起こすことから、染色枚数にもよるが短期間で新調することが望まれる。

本来ならばPAS染色の評価を行うには、劣化した試薬では染まりにくい赤痢アメーバなどの症例を提示して染色の評価をしたほうが、評価は分かれやすい。しかしながら多くの施設に同じものを配るだけの試料を入手することが症例上困難であったことで、断念せざるを得なかった。今回、仮に赤痢アメーバでサーベイを行ったとしたのなら、明らかにC評価になると思われる施設が存在した。今回、あくまでも診断は可能であると判断した為、B 評価とした。しかし、その施設には、原因が明らかであった場合、施設別報告書に改善が望む旨のコメントを具体的に記載した。

班員全員の点を合計し点数化することで評価の低い施設と評価の高い施設の調査結果に開きができるが、平成 16 年度に行われたグロコット染色が、30 点～100 点と開きが大きかったのに対し、今回のPAS染色では55点～100点と開きが少なかった。これは、PAS染色がグロコット染色と比べ各施設における染色頻度が高く日常的に行われる染色であること、テクニク的な要素の低い染色であること、及び平成 10 年度にPAS染色の精度管理を1度行っており、その成果があったことが考えられた。ただ、具体的にボイルドシッフとコールドシッフの染色性について知らない施設が多く、今後例会やネット上で違いを広めて行く必要がある。それを理解したうえで何を使用するかは、各施設の責任で選択して頂ければ良いと考える。

また、亜硫酸水を省くなど、染色は常日頃から、より良い結果を求めて条件の見直しや、工夫により様々な方法があるのが現状であり、それを伺い知ることができた。しかしながら基本的なセオリーを遵守するのは重要であることを踏まえて、我々は日々の努力をすべきであると思われる。

病理染色は試薬劣化等の影響も加わるため、問題の原因解析が困難な場合もあり、施設間の染色方法、手順の完全な統一化を図るのは困難と思われる。むしろ施設毎に自施設の染色標本を的確に評価し、問題となる部分を具体化して、これに対処していくことが施設間の染色態度の統一化に導くものと思われる。精度管理事業がこの一端を担うことができれば幸いである。

最後に、今回この精度管理事業により、明確になった事項が多々あった。このことを踏まえ、今後の例会等で情報の提供を行っていきたいと考える。参加協力施設及び関係者に感謝する。