

病理検査

病理検査部門の精度管理は、県内検査施設の染色技術の標準化及び向上を目的として実施している。2025年度(以下、今年度)は、HE染色には35施設、アザン染色には28施設が参加して行われた。精度管理調査用標本は今年度も信州大学医学部倫理委員会で使用許可を得たヒトの臓器を使用した。

HE染色における精度管理

【はじめに】

HE染色は、病理組織検査の最も基本となる染色であり、その染色標本から多くの病理組織学的な情報を得ることができる。しかし、組織の固定状態や染色環境の変化により、なかなか安定した結果が得られないのも事実である。日常業務で必要不可欠な染色であるため、今年度も精度管理の対象とした。

【材料・方法】

1. 材料及び実施要項

10%中性緩衝ホルマリンで48時間固定した胃癌の手術材料を型どおりにパラフィン包埋し、約3 μmに薄切した未染色標本を2枚ずつ参加施設に配布した。

各施設にて染色後、いずれか良く染まった標本に丸印をつけてもらい、アンケート(染色方法、試薬の調合方法や自己評価などの調査目的)と共に2枚とも回収した。

2. 判定方法

病理検査研究班役員11名(内、認定病理検査技師3名)および信州大学医学部保健学科太田浩良先生(信州大学医学部保健学科教授・病理医)に依頼し、判定基準に従い評価した。太田先生には実際に診断する立場で評価、検閲していただいた。

1) 判定ポイント

標本を弱拡大で鏡検して、核・細胞質が明瞭に染色され、組織構築に応じて細胞質・間質などが区別されているかどうか、腫瘍細胞が見やすいかを評価した。強拡大では、共染の有無、細胞質の染色性の差異、炎症細胞や粘膜のリンパ小節の瀘胞構造が観察しやすいか、などを判定した。また封入状態として、気泡の混入、カバーガラスのずれ、封入剤のはみ出し等を評価した。

2) 判定基準 (評価点数)

1. ヘマトキシリンの染色態度	
1) 核の色調及び濃淡	6点
2) ヘマトキシリン共染の有無	6点
2. エオジンの染色態度	
1) 細胞質の色調	6点
2) 間質の色調	6点
3) エオジンのかぶりの有無	6点
3. 標本全体の染色態度	
バランス (赤・青)	15点
4. 封入状態	5点
減点方式で評価点を算出 合計 50点満点	

3) 評価区分

評価 A : 50~46点
色調のバランスが良く、全体像および組織内の構造が明瞭に染色され診断に適した標本
評価 B : 45~41点
色調のバランスがやや悪く、染色の一部に不明瞭さがあるものの、検査をする上で差し支えない標本
評価 C : 40~31点
色調のバランスが悪く、染色に不明瞭さがあり、詳細な検査をする上で問題を呈する標本
評価 D : 30点以下
目的とする組織構築等が不明瞭(鑑別困難)であり、診断に用いるには支障をきたす標本

【結果】

1. 成績

今年度の判定結果は、以下のとおりである。

(表 1) 評価区分と施設数

評価	A		B	C	D	計
点数	50	49~46	45~41	40~31	30~0	
施設数	8	24	3	0	0	35
(%)	(22.9)	(68.6)	(8.6)	(0)	(0)	

(表 2) 減点項目の割合

項目	減点施設数	(%)
1. ヘマトキシリンの染色態度		
1) 核の色調及び濃淡	7	20.0
2) ヘマトキシリン共染の有無	14	40.0
2. エオジンの染色態度		
1) 細胞質の色調	1	2.9
2) 間質の色調	8	22.9
3) エオジンのかぶりの有無	12	34.3
3. 標本全体の染色態度		
バランス(赤・青)	14	40.0
4. 封入状態	0	0

評価 A であった施設は 32 施設(91.4%)であり評価 B となった施設は 3 施設(8.6%)であった。評価 A の施設において、50 点満点の施設が 8 施設(22.9%)、49~48 点の施設が 14 施設(40.0%)、47~46 点の施設が 10 施設(28.6%)であった(表 1)。

平均点は 48.1 点であり、昨年度の 47.5 点、一昨年の 48.0 点と比べて若干増加したがほぼ同様の結果であった。

減点項目の内容としてはヘマトキシリンにより減点された施設は 20 施設(57.1%)であり、核の色調では 7 施設、共染では 14 施設が減点された(両方で減点された施設を含む)。エオジンで減点された施設は 17 施設(48.6%)であり、細胞質の色調が 1 施設、間質の色調が 8 施設、エオジンのかぶりが 12 施設となった(重複して減点された施設を含む)。標本全体のバランスでの減点は 14 施設(40.0%)であった。封入での減点は見られなかった(表 2)。今回、一部の標本の同一部分で染色のムラが見られた。該当する施設が複数見られたことから、標本作成時の問題の可

能性があるため、今回は減点対象としなかった。

2. アンケート調査結果

今回の HE 染色では 3 施設(8.6%)がルーチン業務と精度管理でプロトコールを別にして染色を行っていた。理由としてはルーチン業務のプロトコールではエオジンが濃く、コントラストが不良になってしまうあるいは、切片の厚さや状態に合わせて染色性を向上させるために手染めにて染色を行ったとの回答であった。

各施設の染色液の使用内容を見るとヘマトキシリン、エオジン共に自家調製を行っている施設は 22 施設(前年度 23 施設)(62.9%)、ヘマトキシリンのみ自家調製という施設は 3 施設(前年度 3 施設)(8.6%)、エオジンのみ自家調製の施設は 1 施設(前年度 1 施設)(2.9%)であった。共に市販品という施設は 9 施設(前年度 9 施設)(25.7%)であった。

ヘマトキシリンを自家調製している 25 施設のうち 17 施設は進行性のマイヤーのヘマトキシリンを使用しており、ヘマトキシリンの量(g/1000mL)は、多い順に 3 g(1 施設)、2.5 g(2 施設)、2 g(2 施設)、1.5 g(6 施設)、1 g(6 施設)であった。退行性のカラッチのヘマトキシリンは 8 施設(22.9%)で使用されており、そのうち 7 施設が 2 倍カラッチを使用していた。市販品を使用している施設はヘマトキシリン 3G(サクラファインテックジャパン)が 5 施設、カラッチヘマトキシリン(武藤化学)が 2 施設、マイヤーヘマトキシリン(サクラファインテックジャパン)が 2 施設、New ヘマトキシリン TypeM(武藤化学)が 1 施設であった。

分別を行っている施設は 14 施設あり退行性ヘマトキシリンを使用している 8 施設に加えて、進行性のヘマトキシリンを使用している 6 施設で行われており、その内訳はヘマトキシリン 3G が 3 施設、マイヤーヘマトキシリンが 1 施設、自家調製が 2 施設(ヘマトキシリン量 2.5g)であった。

分別液は塩酸水アルコールが 6 施設(塩酸水アルコール濃度 0.2%:1 施設、0.25%:1 施設、0.5%:3 施設、1%:1 施設)、塩酸水が 5 施設(塩酸水濃度 0.1%:1 施設、0.2%:1 施設、0.25%:2 施設、不明:1 施設)であり、酢酸(酢酸水)が 3 施設(酢酸水濃度 1%:1 施設、

1. 5%:1 施設、2%:1 施設)であった。

色出しを行っている施設は 34 施設(97. 1%)とほとんどの施設で行われており、方法として流水(水道水)が 22 施設、温水が 8 施設、アンモニアアルコールが 1 施設、0. 1%炭酸リチウムが 1 施設、PBS が 1 施設、TBS が 1 施設であった。その時間はアンモニアアルコールや炭酸リチウムといったアルカリ液を使用している施設では 5 秒と短く、緩衝液を使用している施設では PBS で 10 秒、TBS では 10 分と施設ごとにバラツキがあり、温水で 5 分～15 分(5 分:1 施設、10 分:5 施設、13 分:1 施設、15 分:1 施設)、水道水で 5 分～20 分(5 分:5 施設、7 分:1 施設、10 分:10 施設、12 分:1 施設、15 分:4 施設、20 分:1 施設)と長時間になるケースが多かった。

エオジンを自家調整している施設は 23 施設(65. 7%)であり、使用しているエオジンのメーカーは富士フィルム和光純薬が 15 施設、メルクが 5 施設、関東化学 2 施設、シグマ 2 施設、ナカライテスク 1 施設であった。市販品を使用している施設は 12 施設(34. 3%)であり、サクラファインテックジャパンのエオジンを使用している施設が 7 施設、武藤化学のピュアエオジンを使用している施設が 3 施設、武藤化学の New エオシン液 TypeM を使用している施設が 1 施設、1%エオシン Y(メーカー不明)を使用している施設が 1 施設であった。エオジン後の水洗の有無は水洗ありが 32 施設(91. 4%)であり大半の施設が水洗を行っていた。

続いて1日の平均染色枚数、各組織における薄切時の切片の厚さ、染色液の交換頻度についてである。1日の平均染色枚数は1～30枚が最も多く14施設、次点で31～60枚が12施設、61～90枚と121～150枚が共に4施設という結果となった。

切片の厚さに関しては多様な回答結果となったため、切片厚に幅を持たせて集計を行った(表3)。多くの施設が2. 1～3. 0 μmの厚さで薄切しているが、組織によって切片の厚さを変える施設は14施設(40%)あり、肝臓や生検を胃や肺よりも薄い1. 1～2. 0 μmで薄切する施設はやや多く、リンパ節においては、1. 1～2. 0 μmで薄切している施設はさらに増加していた。切片の厚さを変えて薄切する14施設のうち9施設

(25. 7%)がリンパ節を最も薄く切っており(肝臓や生検と同様の厚さの場合は含まない)、それぞれの施設での工夫が垣間見える結果となった。

(表3) 各組織と薄切時の切片の厚さ

厚さ (μm)	施設数				
	胃	肺	肝臓	リンパ節	生検
1. 0 以下	0	0	0	1	0
1. 1～2. 0	4	3	6	10	7
2. 1～3. 0	26	23	23	23	24
3. 1～4. 0	4	4	3	1	4
薄切なし	1	5	3	0	0

各施設の染色液の交換の指標には、日数を用いている施設が32施設と最多であり、そのうちの23施設は日数のみを指標としていた。染色枚数を指標としている施設は11施設であり、そのうちの3施設(ラック数で交換する1施設を含む)は染色枚数のみを指標としていた。また、染色態度を交換の指標としている施設は5施設であった(表4)。交換する日数としては、1週間以内が8施設、1～2週間以内が12施設、2～3週間以内が3施設、3週間～1ヶ月以内が6施設、1～2か月以内が1施設、2～3ヶ月以内が2施設となった。このうち4施設はヘマトキシリンとエオジンを別々の日数で交換していた。染色液の交換の指標としては、技師間で個人差の出ない日数や染色枚数を単体または組み合わせて指標とする施設が大多数であり、さらに染色態度を加味して染色液の交換を行う施設が見られた。また、染色液の交換頻度においては、各施設の1日の平均染色枚数との間に相関は見られず、各施設それぞれの基準で交換頻度を定めて行っていた。

(表4) 各施設の染色液交換の指標

	施設数
日数のみ	23
日数および染色枚数	4
日数および染色態度	1
日数、染色枚数および染色態度	4
染色枚数またはラック数のみ	3

最後に、今回のアンケートでは日頃の内部精度管理の実施状況や方法に関するアンケートも行った。内部精度管理についての回答があった28施設のう

ちルーチンで染色した標本を用いて染色性を確認している施設が 16 施設、コントロール切片を用いて染色性を確認している施設が 12 施設あった。加えて、コントロール切片として使用している臓器を答えていた 9 施設のうち、多く挙げられていたのは胃で消化管をコントロール切片としている施設が 6 施設、複数の臓器をコントロール切片としている施設が 3 施設あった。また、染色性の確認をした結果を記録として残していると答えた施設は全部で 7 施設であり、確認項目として挙げられたものは、染色性(共染の有無、染色ムラ、コントラスト)や切片の厚さ、アーチファクトの有無、封入など今回の精度管理にて評価した項目と類似した項目を各施設で確認していた。

【考察】

1. 概要

今年度の判定と昨年度を比較すると、評価 A の 50 点満点の施設は 8 施設、49~46 点の施設は 24 施設と昨年度と変わらず、評価 B の 45~41 点の施設は 4 施設から 3 施設と減少したが参加施設数が 36 施設から 35 施設と変わっているため、昨年度とほぼ同様の結果と言える。平均点で比較すると昨年度は 47.5 点だったのに対し今年度は 48.1 点と若干の増加が見られた。減点項目では、今年度は昨年度と比べるとヘマトキシリンの共染での減点は減ったが、核の色調での減点が若干増え、次いでエオジンの細胞質の色調での減点は減ったが、エオジンかぶりのある施設は昨年度とほぼ同様数みられたことから、相対的にヘマトキシリンとエオジンのバランスでの減点もあり、昨年度とあまり変わらない評価区分となったと考える。以下は各減点項目に関してアンケート内容や該当施設のプロトコールを踏まえて考察した。

2. ヘマトキシリン

核の色調で減点された施設は、核の濃い施設が 4 施設、薄い施設が 3 施設であった。核の濃い施設ではカラッチのヘマトキシリン(自家調製)を 1 施設、カラッチ・ヘマトキシリン 2 倍法(武藤化学)を 1 施設、ヘマトキシリン 3G (サクラ)を 1 施設、New ヘマトキシリン TypeM (武藤化学)を 1 施設が使用しており、

退行性と進行性の両方で核の染色が濃いという結果であり、使用している試薬や通常業務で使用する切片厚も施設ごと異なっているため原因を断定するのは困難であった。核の薄い施設ではマイヤーのヘマトキシリン(自家調製)を 3 施設共に使用しており、今回のアンケートでは自家調製で最も使用されているヘマトキシリンであった。施設ごと染色条件が異なる中、他施設での核の染色性が良好であることを考えると、共通する条件であるヘマトキシリンの使用量が 1g と少ない方である 2 施設は 1.5g に増やしたり、通常業務より薄い切片厚であった 1 施設は、普段よりもヘマトキシリンの染色時間を長くしたりすることで染色性が良くなる可能性がある。

共染を起こしている施設は 14 施設見られ、これらの施設間では一定の傾向は見られなかった。しかし、退行性染色の 8 施設のうち 5 施設で共染がみられ、退行性を使用する施設は分別操作の改善や分別後の確認で良好な染色結果が得られると考える。また、進行性のヘマトキシリン 3G(サクラ)を使用している 5 施設の中で 4 施設に共染がみられた。共染の見られない 1 施設では分別操作をしていたことから、分別操作をしていない施設は分別を試みると共染が抑えられる可能性があるのではないかと考える。

3. エオジン

エオジンはアルコール・エオジンや水溶性エオジンなど染色液の種類や濃度、染色時間、水洗の有無など様々な要因で染色性が変化するため一概に原因を断定することはできないが、エオジンかぶりのみられた 12 施設と良好な染色結果(50 点満点)であった 8 施設を比べると、使用しているエオジンはかぶりありの施設は 12 施設中 4 施設が、50 点満点の 8 施設中 1 施設が市販品を使用していた。自家調製している施設の方が、自分の施設にあった染色液に調整ができるため、より染色性の良い標本が作れると考える。また、エオジンを自家調製している施設の染色時間を比較するとエオジンかぶりありの施設の平均染色時間は 285 秒に対して 50 点満点の施設では 205 秒と 80 秒程短い傾向が見られた。

間質の色調にて減点された 8 施設はいずれも間質

の色調が薄いという指摘であり、8施設中7施設が市販品のエオジンを使用していた。試薬の種類はエオジン(サクラ)が4施設、ピュアエオジン(武藤化学)が2施設、New エオシン液 TypeMが1施設である。市販品は再現性の高いことが利点の1つであるため、他施設の染色方法を参考にすると、染色性が改善されるかもしれない。エオジン(サクラ)を使用している染色良好な施設の染色時間はエオジンを1分30秒染色後2~3秒水洗(1施設)または、エオジンを5分染色後10秒水洗(2施設)であった。ピュアエオジン(武藤化学)を使用している染色良好な施設の染色時間はエオジンを5分染色後3秒または15秒水洗であった。間質の色調が薄い要因として、エオジンの染色時間が短いまたは水洗時間が長いことが考えられるので、染色時間に対し水洗時間が長めであった施設はエオジン染色後の水洗時間を短く、あまり水洗時間に変化のない施設はエオジン水洗後のアルコールでの分別・脱水操作にて水を含む1、2層目のエタノールの時間を必要以上に長くしないことで改善できるかもしれない。別の市販品を使っている施設でも参考にしつつ試してほしい。

細胞質の色調にて減点された施設は1施設で間質の色調でも減点がみられた。エオジンは塩酸を用いた自家調製したものを使っており、水洗は行っていない。他施設で同様の条件でエオジン染色を行っている施設は1施設あるがそちらはエオジンかぶりがみられていた。両施設の違いとしては染色時間が3分か5分、エオジン液に酢酸を入れるか入れないかなどがあったが原因を特定することは困難であった。また、赤血球や好酸球の染まりがやや弱かったため、染色液の劣化の可能性も考えられた。

4. アンケート結果

今回、アンケート結果より染色液の種類や染色方法などの観点から比較を行った。

1) 自家調製と市販品との比較

エオジン染色では自家調製と市販品で違いが見られたため、ヘマトキシリン、エオジン共に自家調製を行っている22施設(前年度23施設)と共に市販品と

いう9施設(前年度9施設)の平均点を比較してみた。

結果は共に自家調製している施設は48.5点、対して共に市販品を使用しているは47.0点であり、両方自家調製している施設の方がやや高得点となった。また、ヘマトキシリンとエオジンをそれぞれ自家調製と市販品で分け、各々で減点された施設数の割合を算出した。ヘマトキシリンに関して、自家調製は44%(減点11施設/全25施設)であり、市販品では90%(減点9施設/全10施設)であった。エオジンにおいては、自家調製が39.1%(減点9施設/全23施設)であり、市販品は66.7%(減点8施設/全12施設)となった。ヘマトキシリン、エオジン共に市販品を使用している施設の方が減点は多いという結果となった。しかし、減点となった項目やその程度も異なるため使用した染色液が原因とは考えにくい。自家調製と市販品にはそれぞれの利点や欠点があり、各々の施設にとって最適な染色液と条件を選び、その検討を定期的に行うのが良いのかもしれない。

2) 自動染色と用手法との比較

アンケートにて自動染色機を使用した28施設と用手法を行った7施設にて平均点と標準偏差の比較を行った。結果、自動染色機は平均点47.9点(中央値48点)、標準偏差1.7、に対して、手染めは平均点48.9点(中央値49点)、標準偏差1.2となった。自動染色機を用いた施設の方が平均値は低く、用手法と比べて結果のバラツキがみられた。用手法は染色過程の途中で染色性を確認しながら微調整ができるため、熟練の技術があれば安定して染色性の良好な標本作製ができ、高得点につながったと考える。

3) 染色枚数による比較

1日の染色枚数が1~30枚の14施設とそれ以上の枚数の染色を行っている20施設とで、平均点の比較を行った。結果、1~30枚の施設は平均点が47.6点(前年度46.9点)であり、それ以上の施設では平均点が48.3点(前年度48.0点)であった。しかし、今年度と前年度の1日の染色枚数を比較すると、1~30枚が14施設(前年度19施設)、31~60枚が12施設

(前年度 8 施設)、61～90 枚が 4 施設(前年度 5 施設)、121～150 枚が 4 施設(前年度 1 施設)と全体的に染色枚数が増加傾向にあることがわかる。1 日の染色枚数が多い施設の方が平均点は若干高いが、差はあまりないことや染色枚数が年々変わっていることから、染色枚数と点数に相関はあまりないと考え。

4) 染色液の交換頻度による比較

染色液の交換頻度と各施設の 1 日の平均染色枚数との間に相関は見られず、各施設がそれぞれの基準で交換頻度を定めて行われていた。そこで、日数を染色液の交換の指標とする 32 施設の中で、日数のみを指標とする 23 施設とそれ以外の指標も使う 9 施設とで平均点の比較を行った。日数のみの施設の平均点は 48.3 点、複数の指標を使う施設での平均点は 47.8 点であった。試薬交換日までの染色枚数は、日数のみが指標の施設は他の指標も使用している施設よりバラつきがあるが、ほぼ全ての施設で標本提出前に、染色した標本の染色性の確認を行っていることから、指標の種類と点数に相関は見られなかったのだと考える。

【結語】

今回のように自施設とは異なる環境下や条件で作製された切片にて、良好な染色結果を得なければいけない場合、普段の自施設のやり方ではうまくいかない場合がある。また普段の業務でも、検体の状態や臓器ごとに異なる対応が求められる場合もある。個人の技量や知識に左右されず、一定のクオリティが保たれた標本作製するために、病理業務の標準化が重要であるが、加えて臨機応変な対応も求められる。しかし、アンケートにもあったように 1 日の染色枚数の増加や内部精度管理の記録の実施など、以前より日常業務が多忙となっている施設が多数ある。今回のような外部精度管理の第三者による客観的な判定は、病理業務の標準化に役立つだけでなく、他施設の傾向や方法を知ること、自施設でのより効率的な方法や柔軟な対応、ミスの予防、良好な標本作製に繋げることができる。今回の精度管理が、自施設の検討や改善の一助となることを願う。

【謝辞】

本年度の精度管理事業に際してご協力いただいた、信州大学医学部保健学科太田浩良先生(信州大学医学部保健学科教授・病理医)に感謝の意を表します。

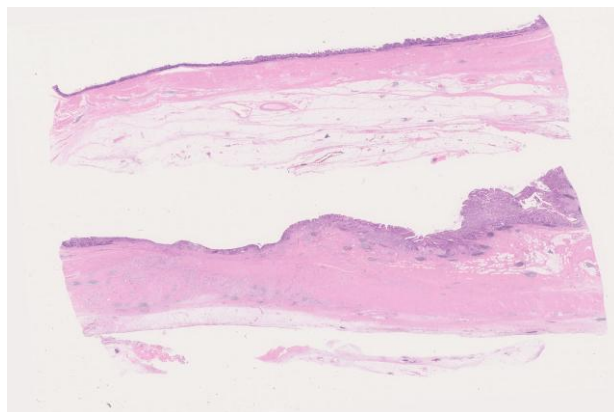


写真 1. 評価 A (50 点)ルーペ像

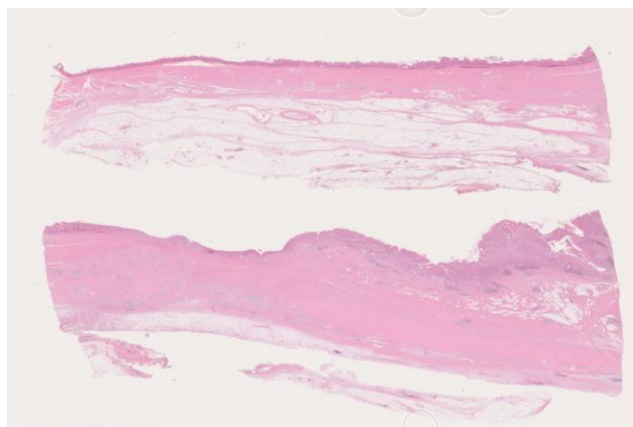


写真 2. 評価 B (45 点)ルーペ像

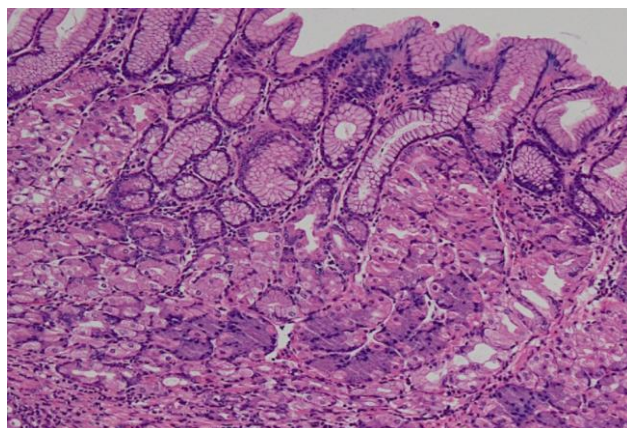


写真 3. 胃底腺の染め分けが良好。評価 A(50 点)

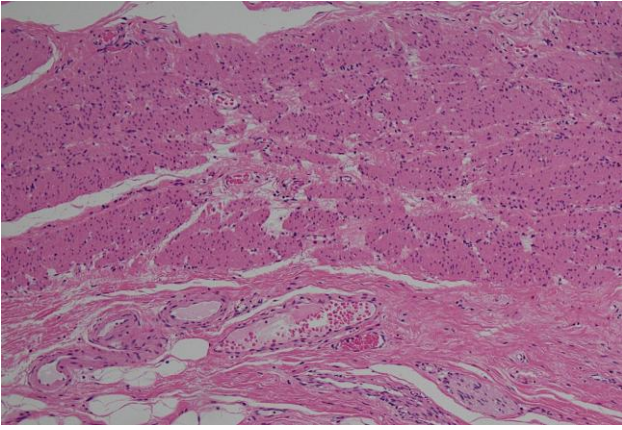


写真 4. 間質の染め分けが良好。評価 A(50 点)

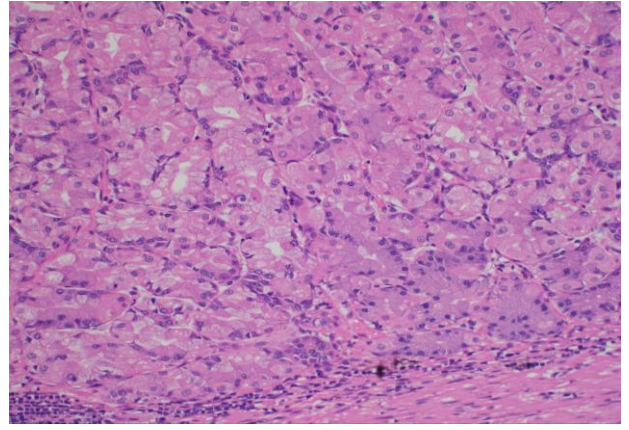


写真 7. 好酸球の判別が困難。評価 A(47 点)

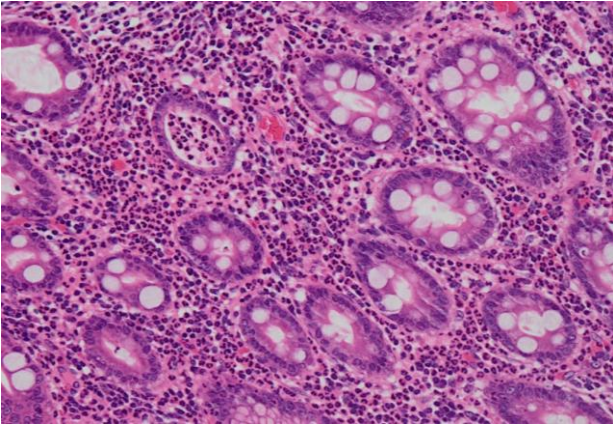


写真 5. 好酸球が判別できる。評価 A(50 点)

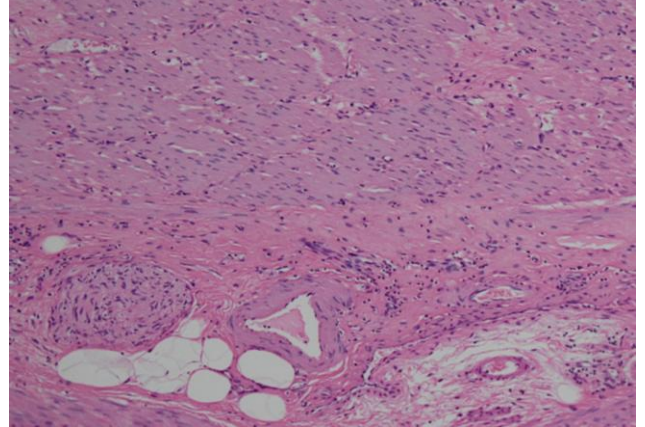


写真 8. 間質の染め分けが不良。評価 A(47 点)

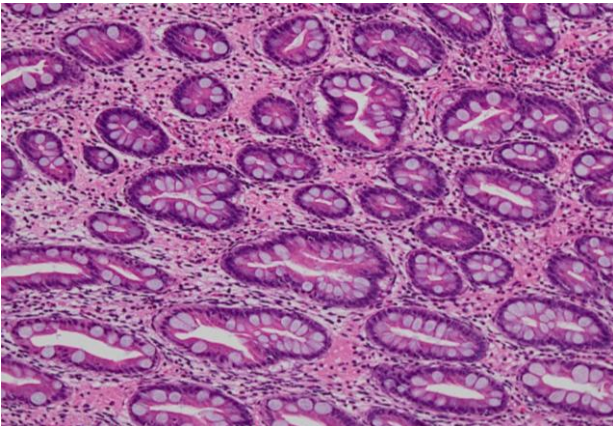


写真 6. 粘液への共染が見られる。評価 A(48 点)

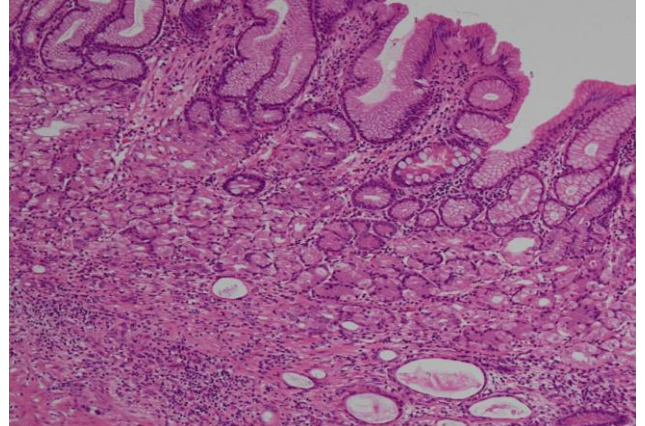


写真 9. エオジンのかぶりが強く、胃底腺の染め分けが不良。評価 A(47 点)

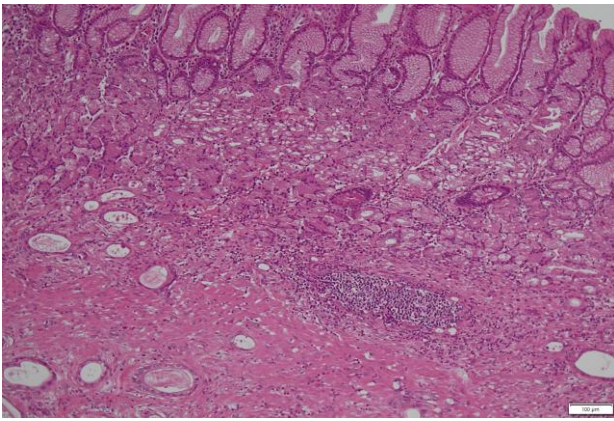


写真 10. ヘマトキシリンが弱く、エオシンが強いため色調のバランスが不良。評価 B (43 点)

アザン染色における精度管理

【はじめに】

アザン染色はアゾカルミン (Azocarmin) とアニリン青 (Aniline blue) を染色に使うことからアザン (Azan) 染色とよばれている。詳細な染色原理は明らかになっていないが、重クロム酸カリウムやトリクロロ酢酸、リンタングステン酸による媒染作用とアニリン青、アゾカルミン G、オレンジ G の分子量の異なる色素分子が組織・細胞への取り込まれる際の違いを利用した染色である。染色態度はアニリン青で膠原線維や細網線維を青く染め、赤血球をオレンジ色、それ以外を赤く染めるコントラストの強い美しい染色法のひとつである。線維化病変をはじめ筋線維、基底膜、線維素、腫瘍性病変などの観察に用いられる。そこで長野県下の各施設の染色方法およびその染色性の調査目的で、アザン染色の精度管理を実施した。

【材料・方法】

1. 材料及び実施要項

10%中性緩衝ホルマリンで 48 時間固定したヒトの肝臓組織をパラフィン包埋し、約 3 μm に薄切した未染色標本を 2 枚ずつ参加施設に配布した。

各施設にて染色後、いずれか良く染まった標本に丸印をつけてもらい、アンケート(染色方法、試薬の調合方法や自己評価などの調査目的)と共に 2 枚とも回収した。

2. 判定方法

病理検査研究班役員 11 名(内、認定病理検査技師 3 名)および信州大学医学部保健学科太田浩良先生(信州大学医学部保健学科教授・病理医)に依頼し、判定基準に従い評価した。太田先生には実際に診断する立場で評価、検閲していただいた。

1) 判定基準 (評価点数)

- | |
|------------------------------------------|
| 1. アニリン青の染色態度 (13 点満点)
膠原線維・細網線維の染色態度 |
| 2. アゾカルミン G の染色態度 (13 点満点)
細胞質の染色態度 |
| 3. オレンジ G の染色態度 (6 点満点)
赤血球の染色態度 |
| 4. 標本全体の染色態度 (13 点満点)
染色のバランス・コントラスト |
| 5. 封入状態 (5 点満点)
気泡の混入、カバーガラスの位置 |

減点方式で評価点を算出 合計 50 点満点

2) 評価区分

評価点数をもとに 4 段階で評価した。

評価 A : 50~46 点

診断上支障のない標本、良好な染色を示す標本

評価 B : 45~41 点

改善の余地はあるが診断上支障の無い標本

評価 C : 40~31 点

診断上支障が出る可能性がある標本

評価 D : 30 点以下

診断不能な標本

【結果】

1.成績

今年度の判定結果は、以下のとおりである。

(表 1) 評価区分と施設数

評価	A		B	C	D	計
点数	50	49~46	45~41	40~31	30~0	
施設数	5	20	2	1	0	28
(%)	(17.7)	(71.4)	(7.1)	(3.6)	(0)	

評価 A のうち 50 点満点は 5 施設でそれらの標本は膠原線維や細網線維、赤血球の染色性が明瞭で、赤と青のバランスがとれた良好な染色であった。(写真 1~3) また評価 A のうち 49~46 点の施設では膠原線維や細網線維の染色性や赤血球の染色性、アゾカルミン G の色調や濃淡において各程度に応じて減点した(写真 4~7)。

評価 B の施設は 2 施設で膠原線維や細網線維の染色性、赤血球の色調、染色のムラなどにより標本全体の染色態度にも影響を及ぼし減点となった(写真 8, 9)。

評価 C の施設は 1 施設ありアゾカルミン G やアニリン青の染色性により標本全体の染色態度にも強く影響を及ぼし大きく減点となった(写真 10)。

評価 D の施設は認めなかった。

評価項目と減点施設数は以下のとおりである。

(表 2) 減点項目の割合

項目	減点施設数	%
1.アニリン青の染色態度	11 施設	39.2
2.アゾカルミン G の染色態度	3 施設	10.7
3.オレンジ G の染色態度	15 施設	53.6
4.標本全体の染色態度	5 施設	17.9
5.封入状態	0 施設	0

アニリン青の染色態度で減点された 11 施設の内訳は、色被りが 3 施設、細網線維の染まりが薄いのが 8 施設(内 2 施設は膠原線維の染まりも薄くさらに減点)であった。

アゾカルミン G の染色態度で減点された 3 施設の内訳は色被りが 1 施設、薄いのが 2 施設であった。

オレンジ G の染色態度で減点された 15 施設は、いずれもプロトコール上ではオレンジ G を使用して

いるものの、赤血球が細胞質と同様に赤色(アゾカルミン G)に染まっていた。

標本全体の染色態度で減点された 5 施設は、いずれもアニリン青とアゾカルミン G のバランスが悪く、その内訳はアニリン青が濃い施設が 3 施設、薄い施設が 2 施設であった。

封入状態で減点された施設はなかった。

2.アンケート調査結果

1) アザン染色の色素の染色順

染色順	施設数 (%)
オレンジ G→アゾカルミン G →アニリン青	12(42.9)
アゾカルミン G→ オレンジ G・アニリン青混合液	12(42.9)
オレンジ G→アゾカルミン G →オレンジ G・アニリン青混合液	4(14.3)

参加した 28 施設中、オレンジ G を先に染色している施設は 16 施設(57.1%)と半数以上であった。

2) 媒染処理

媒染剤	施設数 (%)
重クロム酸・ 5%トリクロロ酢酸等量混合液	16(57.1)
10%重クロム酸・ 10%トリクロロ酢酸等量混合液	6(21.4)
ブアン液	1(3.6)
5%リンモリブデン酸	1(3.6)
媒染無し	4(14.3)

媒染時間	施設数 (%)
5 分	2(8.7)
10~20 分	18(78.3)
30 分以上	3(13.0)

参加した 28 施設中、媒染を行っている施設は 24 施設(85.7%)と大半の施設が媒染処理を行っていた。この 24 施設のうち大半の施設(22 施設 : 91.7%)が

重クロム酸とトリクロロ酢酸の等量混合液による媒染を行っており、ブアン液やリンモリブデン酸にて媒染を行っている施設も各1施設見られた。また媒染時間は10分と20分が各7施設で最も多く、約8割の施設が10～20分であった。最短時間は5分、最長は60分であった。

3) アゾカルミン G について

染色時間	施設数 (%)
10～20分	2(7.2)
25～35分	9(32.1)
45～60分	16(57.1)
120分	1(3.6)

温度	施設数 (%)
室温	17(60.7)
加温	8(28.6)
加温+室温	3(10.7)

分別操作	施設数 (%)
有り	7(25.0)
無し	21(75.0)

アゾカルミン G の染色時間は60分が13施設で最も多く最短時間は10分、最長は120分(加温60分+室温60分)であった。また加温の温度については最低温度が37℃、最高が60℃であった。

アゾカルミン G の分別操作に用いられている溶液はアニリンアルコールが6施設、1%酢酸水が1施設であった。

4) リンタングステン酸について

時間	施設数 (%)
15～30分	6(21.4)
45～60分	14(50.0)
90～180分	4(14.3)
一晩以上	4(14.3)

リンタングステン酸による分別・媒染時間は60分が13施設で最も多く最短時間は15分、最長は24時間であった。

リンタングステン酸でなくリンモリブデン酸を使用している施設が2施設あったが、今回はリンタングステン酸と分けずに一緒の集計とした。

5) アニリン青・オレンジ G について

染色液	施設数 (%)
アニリン青・オレンジ G 混合液	12(42.9)
アニリン青・オレンジ G 別に染色	12(42.9)
オレンジ G 単染色+ アニリン青・オレンジ G 混合液	4(14.3)

アニリン青・オレンジ G 混合液の染色時間

染色時間	施設数 (%)
10～15分	3(25.0)
30分	3(25.0)
45～60分	6(50.0)

アニリン青、オレンジ G 別染色

	染色時間	施設数 (%)
オレンジ G	1～5分	4(33.3)
	8～10分	4(33.3)
	15～20分	4(33.3)
アニリン青	3～10分	6(50.0)
	20～25分	4(33.4)
	40分	1(8.3)
	メチル青3分	1(8.3)

アニリン青・オレンジ G の混合液で染色している施設とオレンジ G とアニリン青を別に染めている施設は各12施設で同数であった。また4施設はオレンジ G を染めた後にアニリン青・オレンジ G の混合液で染色をしていた。

アニリン青・オレンジ G 混合液での染色時間は45分が5施設で最も多く最短時間は10分、最長は60分であった。

アニリン青・オレンジ G 別染色ではオレンジ G は最短1分、最長20分であり、アニリン青は最短3分、最

長 40 分であった。

またオレンジ G とアニリン青・オレンジ G 混合液を使用している施設ではオレンジ G の染色時間は最短 5 分最長 20 分、アニリン青・オレンジ G 混合液が最短 3 分最長 60 分であった。

アニリン青の分別を行っている施設は 18 施設あり、内訳はアルコールによる分別が 3 施設、水洗が 9 施設、酢酸水が 2 施設、色素の拭き取りが 4 施設であった。水洗の時間は最短が一瞬、最長は 30 秒であった。

6) 各染色液について(数字は施設数)

	市販品	自家調整	使用なし 無回答
媒染剤	9	14	5
アゾカルミン G	15	12	1
リントングステン酸	7	20	1
アニリン青・ オレンジ G	12	16	0

媒染剤を使用している 23 施設中、市販品を使用している施設は 9 施設 (39.1%) であり、自家調整を行っている施設は 14 施設であった (60.9%)。市販品はいずれの施設も武藤化学株式会社のものを使用しており、希釈せず原液を使用していた。自家調整の 14 施設の内訳は、重クロム酸カリウム(富士フィルム和光純薬) (二クロム酸カリウムも含む) とトリクロロ酢酸(富士フィルム和光純薬:11 施設、ナカライテスク株式会社:1 施設) を当量混合している施設が 12 施設と最多であった。ブアン液(ピクリン酸、ホルマリンの詳細は不明) を使用している施設も 1 施設見られた。

アゾカルミン G に関して、市販品を使用している 15 施設 (53.6%) はいずれも武藤化学株式会社のもをそのまま使用していた。自家調整をしている 12 施設 (42.9%) はメルクが 4 施設、Chroma が 3 施設、富士フィルム和光純薬が 2 施設、SCHMID GMBH & CO.、メーカー不明、回答なしが各 1 施設であった。試薬の濃度は、0.1% が 7 施設、0.2% が 3 施設であっ

た。濃度不明が 2 施設であった。

リントングステン酸はに関して、市販品を使用している 7 施設 (33.3%) はいずれも武藤化学株式会社のもをそのまま使用していた。自家調整を行っている 20 施設 (71.4%) のうち、富士フィルム和光純薬のリントングステン酸(12 タングスト(VI)りん酸 n 水和物を含む) 17 施設と最多であった。残りの 3 施設は、リンモリブデン酸(富士フィルム和光純薬) を使用している 2 施設とリントングステン酸とリンモリブデン酸を当量混合している 1 施設であった。

アニリン青・オレンジ G に関して、市販品を使用している 12 施設 (42.9%) はいずれも武藤化学株式会社のものを使用していた。12 施設のうち混合液を使用している施設は 10 施設 (83.3%) であり、別々に染色している施設は 2 施設 (16.7%) であった。市販品を 2 倍や 3 倍に希釈している施設は 7 施設(混合液 6 施設、別々の染色液でアニリン青のみ希釈 1 施設) であった。自家調整をしている 16 施設のうち、混合液を使用している施設は 6 施設 (37.5%) である、別々に染色液している施設は 10 施設 (62.5%) であった。使用しているメーカーはアニリン青、オレンジ G とともに富士フィルム和光純薬を使用している施設が多数であり、オレンジ G はメルク、アニリン青は関東化学も見られた。濃度に関して、アニリン青は 0.5%~0.8% の施設が多数であった。使用時に希釈して使用する施設は 3 施設見られたが、これらの施設の濃度は 0.1%~0.2% であり、1 施設は 0.1% 以下であった。オレンジ G は 0.2%~2% まで様々であった。

【考察】

1) 媒染剤

アニリン青やアゾカルミン G の染色性に影響を与える要因として媒染剤が挙げられる。重クロム酸、トリクロロ酢酸、ブアン液による媒染は、アゾカルミン G (赤色) を増強させ、長時間の反応はアニリン青 (青色) を減弱させるとされている。アニリン青が薄い 8 施設とアゾカルミン G が薄い 2 施設に関して、反応時間を調査したが、良好な染色性を示す施設との差はなかった。リントングステン酸はアニリン青の媒染作用があるとされているが、アニリン青が薄い 8 施設にお

いて良好な染色性を示す施設との差はなかった。

以上より、アザン染色においては媒染剤の種類や時間よりも各種染色液の染色時間が染色性により関与すると考えられる

2) オレンジ G

染色プロトコールを確認すると、減点されていない施設では全ての施設が先にオレンジ G を染めていた。またアニリン青・オレンジ G 混合液のみで染色している12施設では、すべてオレンジ G の染色態度で減点されていた。このことから、オレンジ G を別で染めていても減点された施設も3施設あるものの、先にオレンジ G を染めることで赤血球の染色性の改善になるのではないかと考える。アザン染色に使う色素の分子量 (g/mol) がアニリン青:737.73、アゾカルミン G : 579.58、オレンジ G:452.38 であることから分子量が小さいオレンジ G を先に染めることで構造がより密な赤血球に取り込まれ、その後のアゾカルミン G やアニリン青が入り込まないと考えられる。

3) アゾカルミン G

アゾカルミン G で減点された3施設の染色液の内訳は自家調整が2施設、市販品が1施設であった。これらの試薬濃度や染色時間に関して、染色性が良好な施設と差がなかった。また、アニリンアルコールや酢酸水によるアゾカルミン G の分別操作を行っている施設と行っていない施設に差はなかった。このことから、減点された3施設に関しては、アゾカルミン G の試薬濃度や染色時間、分別操作以外の要因が大きいと考えられる。色被りにより減点された1施設では、リンタングステン酸による分別時間が15分と他の施設と比較して短いため、分別時間の延長や分別操作にアニリンアルコールを併用することで改善の可能性がある。薄い2施設のうち1施設はアニリン青が極めて濃く、アゾカルミン G が薄い標本であったため、後述するアニリン青の分別により改善される可能性がある。もう1施設はアゾカルミン G に染色ムラがあった標本であるため、染色液とスライドを十分に馴染ませることで改善する可能性がある。

4) アニリン青

アニリン青が被り減点された3施設の内訳は、若干の被りが見られた2施設と強く被りが見られた1施設である。いずれも自家調整で0.5%のアニリン青溶液を使用しており、2施設は25分、1施設は40分間染色をしていた。この濃度と染色時間にて良好な染色性を示す施設も見られることから、試薬の劣化や染色手技など濃度や染色時間以外の要因が大きいと考えられる。また3施設中2施設は染色後に分別操作を行っていないため、分別操作により染色性が改善される可能性がある。

染色性が薄い8施設の染色液の種類は自家調整が7施設、市販品が1施設であった。自家調整している7施設のうち、5施設は染色時間が10分以下であった。また4施設はアニリン青の濃度が0.5%未満であった。10分以下の染色時間において良好な染色性であった施設はアニリン青の濃度が0.8%であり、0.5%未満の施設で良好な染色性が見られないことから、染色時間の延長や濃度の増加により、改善されると思われる。市販品で染まりが薄いとされた1施設は、市販品を使用している12施設中、唯一染色時間が10分未満であったため、染色時間の延長による改善が見込まれる。

【まとめ】

今年度の精度管理調査としてアザン染色を実施した。28施設中25施設が評価Aであり、大部分の施設が良好な染色結果が得られていることが確認された。一方で、染色順や各色素の染色条件、分別操作の有無などに施設間差がみられた。特にオレンジ G の染色態度で減点される施設が多く、先にオレンジ G の単染を行っている施設の方が良好な染色結果が得られる傾向がみられた。アニリン青については自家調整を行っている施設での減点が多く、染色時間や試薬の濃度の見直しが必要である。アゾカルミン G に関しては、試薬の濃度や染色時間ではなく分別操作や染色手技の見直しより改善が見込まれた。今回の精度管理では媒染剤による差は見られなかったが、ルーチン業務にて良好な染色性が得られない場合は一考される。

今回の精度管理を通して、アザン染色において染色手順や試薬の濃度、染色時間の影響が大きいことを改めて確認された。各施設においては、これらに加えて、媒染剤の種類や時間、分別操作の有無、切片厚などの条件も加味して検討していただきたい。

今回の精度管理が各施設の染色を見直すきっかけとなり、より良好な標本作製の一助となれば幸いである。

【謝辞】

精度管理調査をおこなうにあたり、実際に診断する立場で評価・検閲していただいた信州大学医学部保健学科 太田浩良先生に深謝いたします。

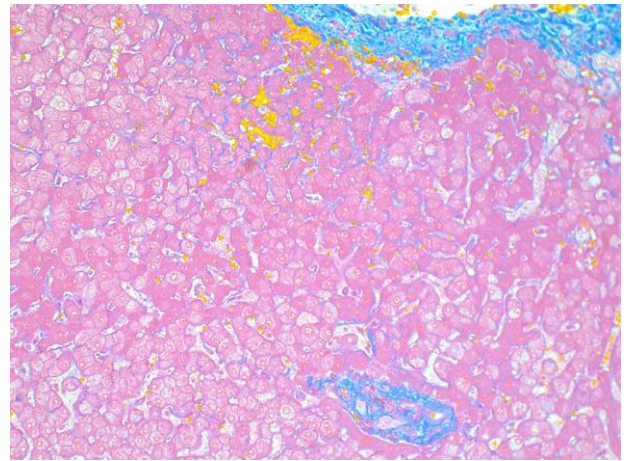


写真 3. 細網線維がしっかり染色されている。評価 A (50 点)

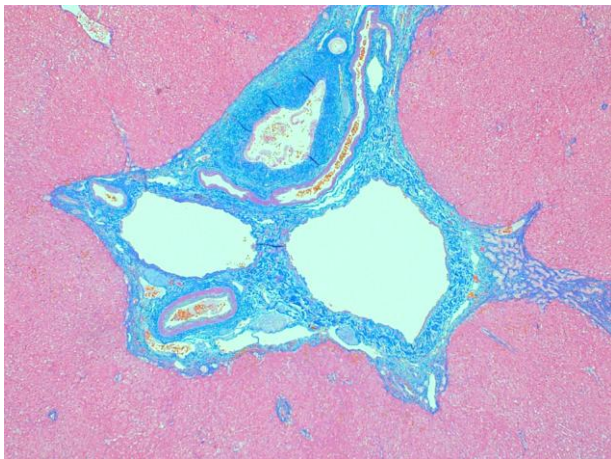


写真 1. 膠原線維が青、細胞質が赤に染色され、赤と青のバランスが良好な標本。評価 A (50 点)

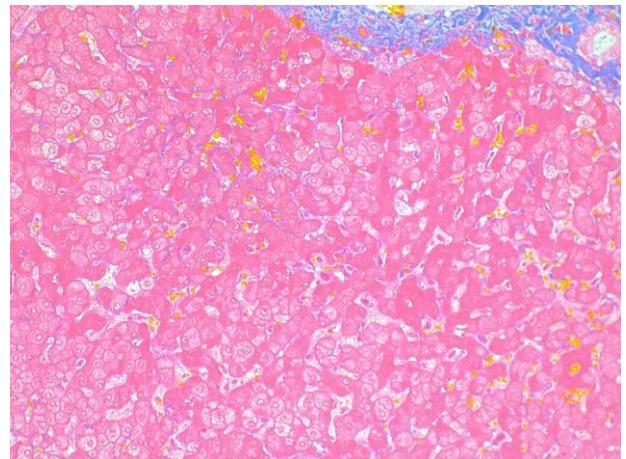


写真 4. 細網線維の染まりがやや薄い。評価 A (49 点)

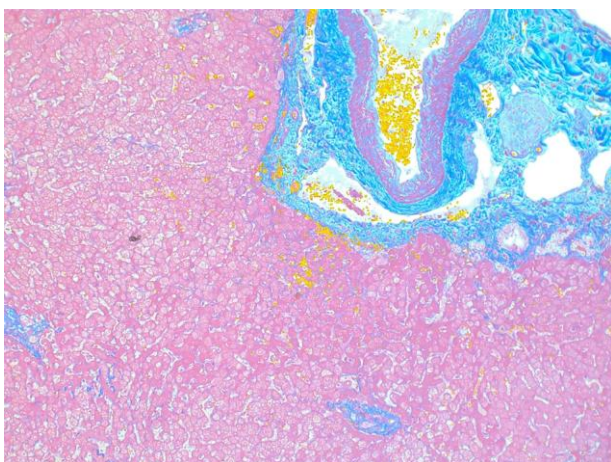


写真 2. 赤血球がオレンジ G で染色されている。評価 A (50 点)

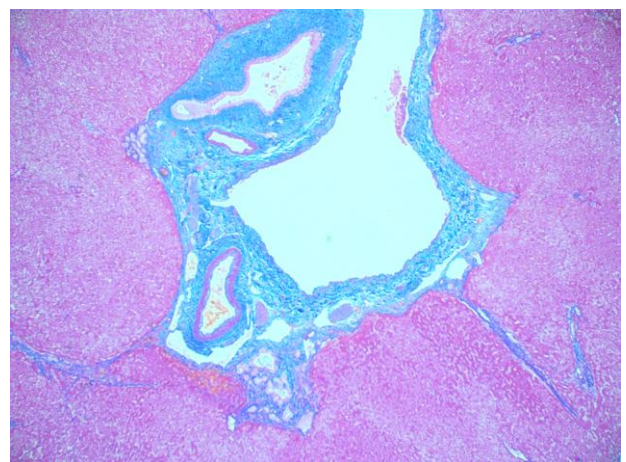


写真 5. アニリン青が細胞質に被り紫がかっている。評価 A (48 点)

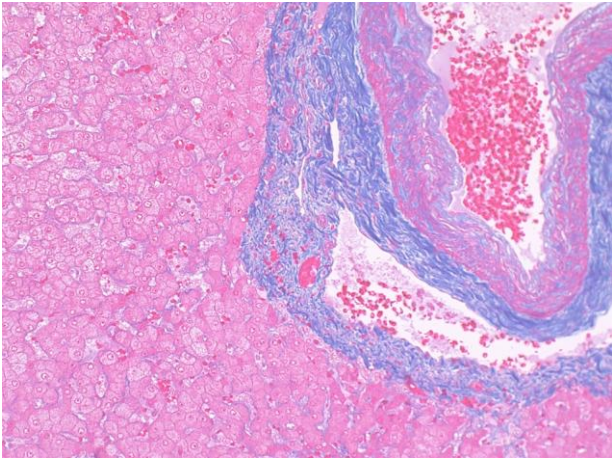


写真 6. 膠原線維や細網線維、細胞質の染色性は良好だが赤血球が赤い。評価 A (47 点)

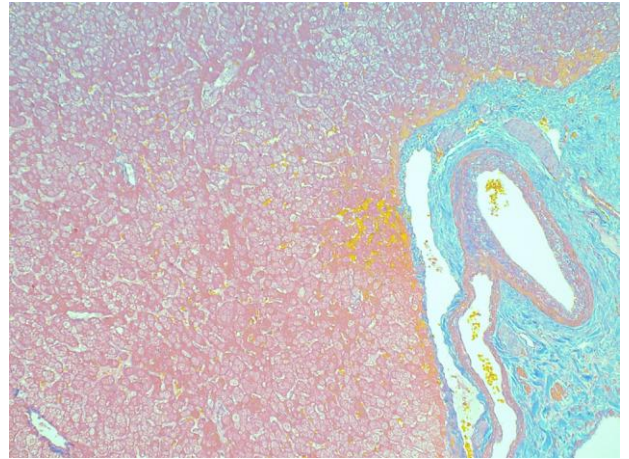


写真 9. 膠原線維と細胞質の両方の染まりが薄く染色ムラもある。評価 B (42 点)

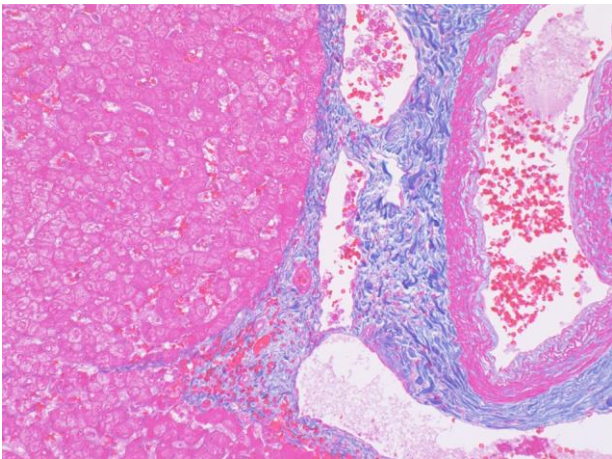


写真 7. 赤血球が赤く染まり、細網線維の染まりもやや薄い。評価 A (46 点)

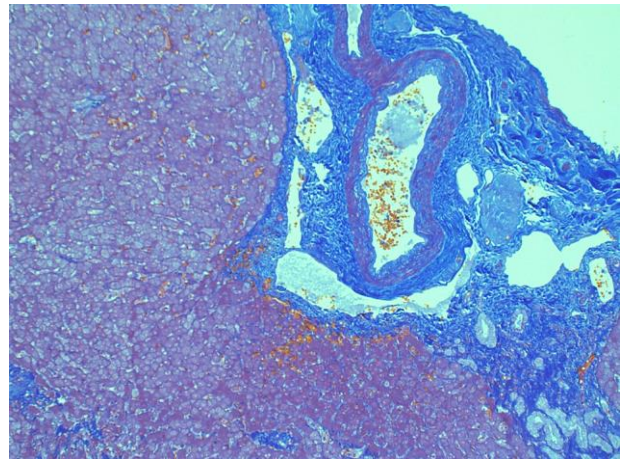


写真 10. アゾカルミン G の染まりが弱く、アニリン青が全体にかぶっていてバランスが不良。評価 C (40 点)

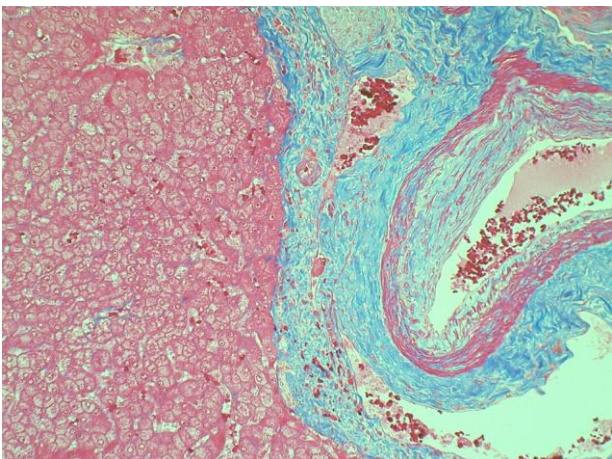


写真 8. 膠原線維の染まりが薄く赤と青のバランスが不良。評価 B (44 点)

HE 染色担当:

社会医療法人財団 慈泉会 相澤病院

臨床検査センター検査科

古畑 葉奈

加藤 昌希

アザン染色担当:

JA 長野厚生連 浅間南麓こもろ医療センター

臨床検査科

田畑 仁史

病理検査精度管理責任者

長野赤十字病院 病理部

御子柴 柊介