

**「パパニコロウ染色の施設間差」
～千葉県における精度管理事業に基づいて～**

**千葉県こども病院 検査部病理科
有田茂実**

第58回日本医学検査学会(パシフィコ横浜) 2009年7月31日

【目的】

(社)千葉県臨床検査技師会には11検査部門の研究班があり、うち9研究班が毎年それぞれ精度管理事業を行っている。細胞診検査研究班は8年前より「標本作製・細胞判定」と「インターネットを利用したフォトサーベイ」を組み合わせた形式で行っているが、各参加施設で作製された標本の染色性には施設間差がみられている。今回は、平成20年度精度管理事業で実施したパパニコロウ染色(以下Pap.染色)に関する調査内容を紹介するとともに、これらを元にアンケート回答内容とPap.染色標本の染色性とを比較し、施設間差について新たに検討したので報告する。

【細胞診検査研究班による精度管理事業の変遷】

	標本作製・細胞判定部門		フォトサーベイ部門	参加施設数
平成13年度	Pap.染色	蓄痰検体を配布し、標本作製・染色について評価	インターネット形式	44(45)
平成14年度	Pap.染色	自施設の体腔液検体を提出してもらい、標本作製・染色・報告書について評価	インターネット形式	40(41)
平成15年度	Pap.染色	自施設の体腔液検体を提出してもらい、標本作製・染色・報告書について評価	インターネット形式	48(48)
平成16年度	MG 染色	体腔液未染塗抹標本を配布し、染色・細胞判定について評価	インターネット形式	44(45)
平成17年度	MG 染色	体腔液未染塗抹標本を配布し、染色・細胞判定について評価	インターネット形式	47(47)
平成18年度	MG 染色	体腔液未染塗抹標本を配布し、染色・細胞判定について評価	インターネット形式	42(43)
平成19年度	PAS反応	体腔液未染塗抹標本を配布し、染色・細胞判定について評価	インターネット形式	46(47)
平成20年度	Pap.染色	喀痰未染塗抹標本を配布し、染色・細胞判定について評価	インターネット形式	41(42)
平成21年度	Pap.染色	平成20年度と同内容で実施	インターネット形式	

()内はフォトサーベイ参加施設数

【精度管理使用症例】

組織学的に扁平上皮癌と確認された原発性肺癌例

50歳代 男性

主訴 健診にて右胸水を指摘, 胸痛あり

既往歴 胃潰瘍 タバコ30~40本/day × 30年

検査結果 胸部CT: 右胸水貯留, 肺に腫瘍を認める

縦隔リンパ節, 頸部リンパ節腫脹

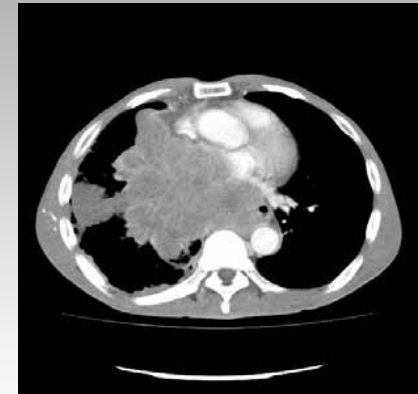
心エコー: 左房内に可動性の腫瘍を認める

腫瘍マーカー: CEA 7.9, SCC抗原 9.1, NSE 53.2, シフラ21-1 168

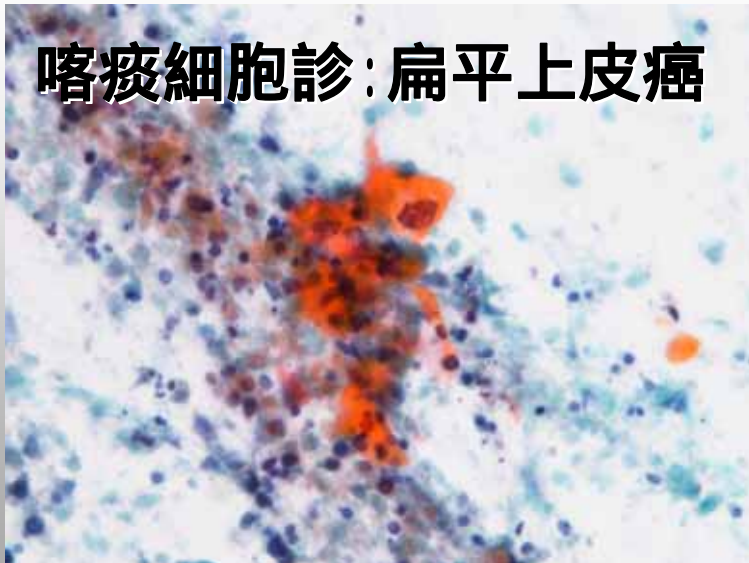
胸部XP



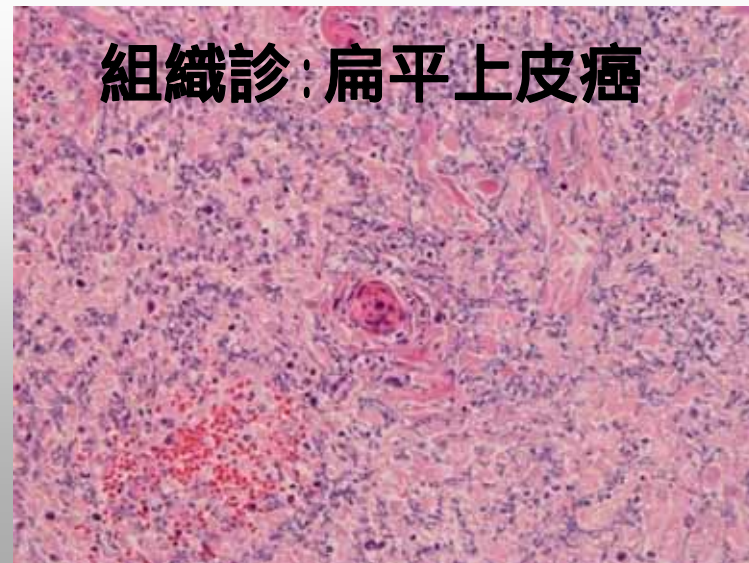
胸部CT



喀痰細胞診: 扁平上皮癌



組織診: 扁平上皮癌



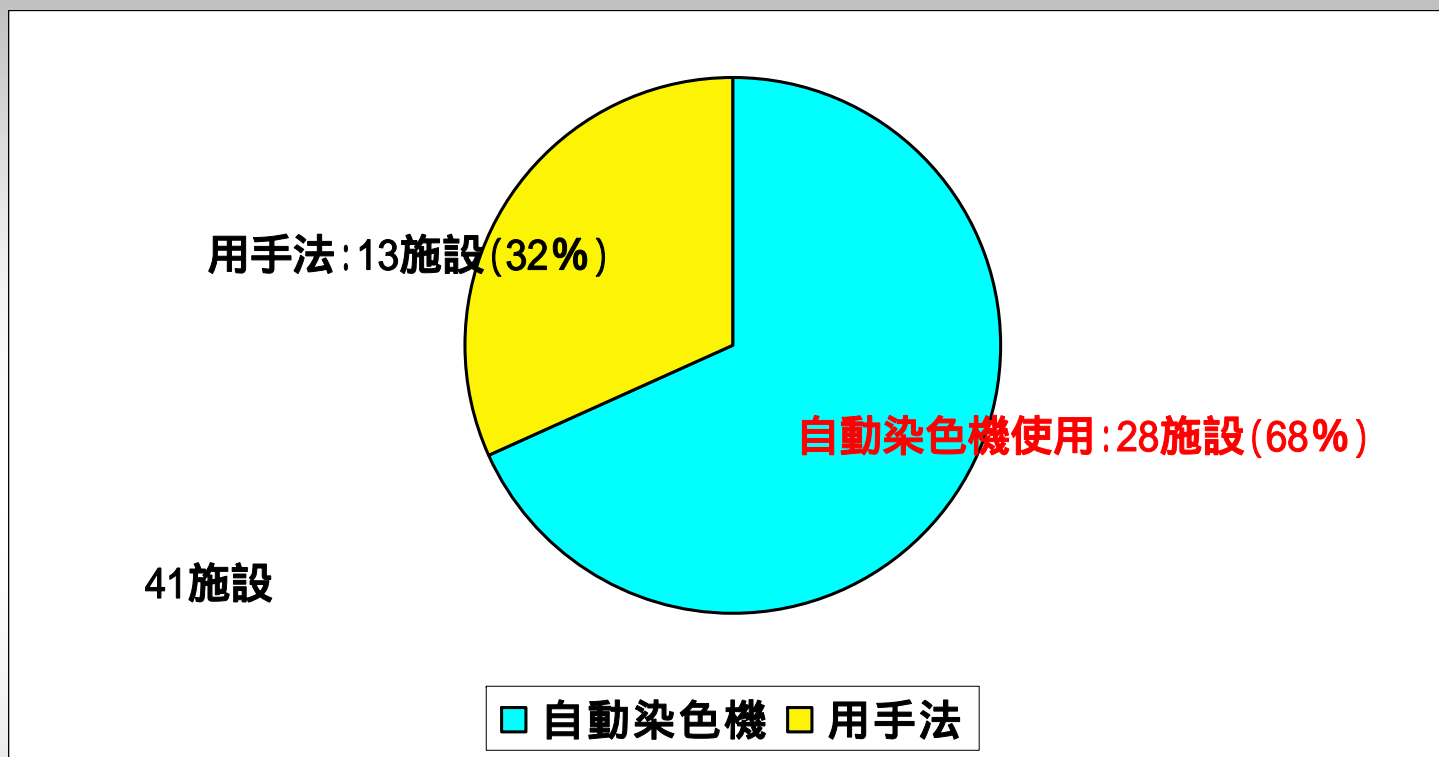
【精度管理の対象と方法】

喀痰塗抹標本をアルコール固定後，迅速コーティング剤を塗布し，参加41施設に配布し，Pap.染色後鏡検，細胞判定を行ってもらった．1ヶ月後，細胞判定の記載のある報告書（施設任意），アンケート回答用紙，Pap.染色標本を回収し，それらについて解析した．

【細胞判定結果】

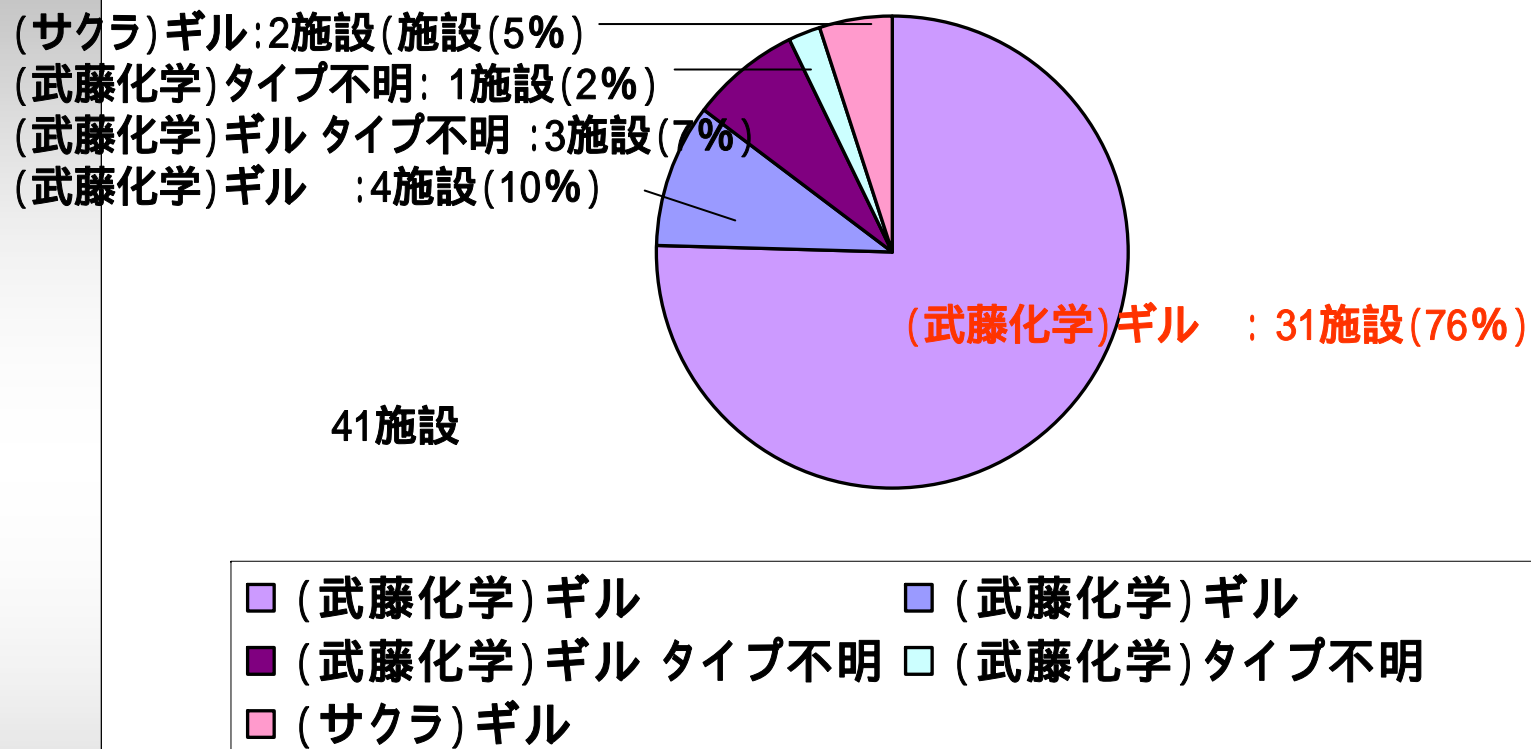
41施設中40施設が扁平上皮癌を疑う（4施設）もしくは扁平上皮癌（36施設）であった．

【アンケート集計結果】 自動染色機の使用状況



Pap.染色の自動染色機使用は、28施設(68%)であった。
平成13年度の調査では、自動染色機使用は26 / 43施設(60.5%)、
平成14年度は21 / 40施設(52.5%)、平成15年度は25 / 47施設
(53.2%)であり、自動化が進んでいた。

【アンケート集計結果】 ヘマトキシリン



メーカーは、武藤化学製が大多数を占めていた。
種類は、ギル が76%で最も多かった。
染色時間は、45秒～5分(平均2分)。

【アンケート集計結果】 核染色後の分別液

塩酸アルコール; 32 / 41施設 (78%)

濃度: 0.1 ~ 1.2% (平均0.7%)

反応時間: 3秒 ~ 2分 (平均31秒)

塩酸水; 9 / 41施設 (22%)

濃度: 0.06 ~ 2.1% (平均0.6%)

反応時間: 6秒 ~ 1分 (平均24秒)

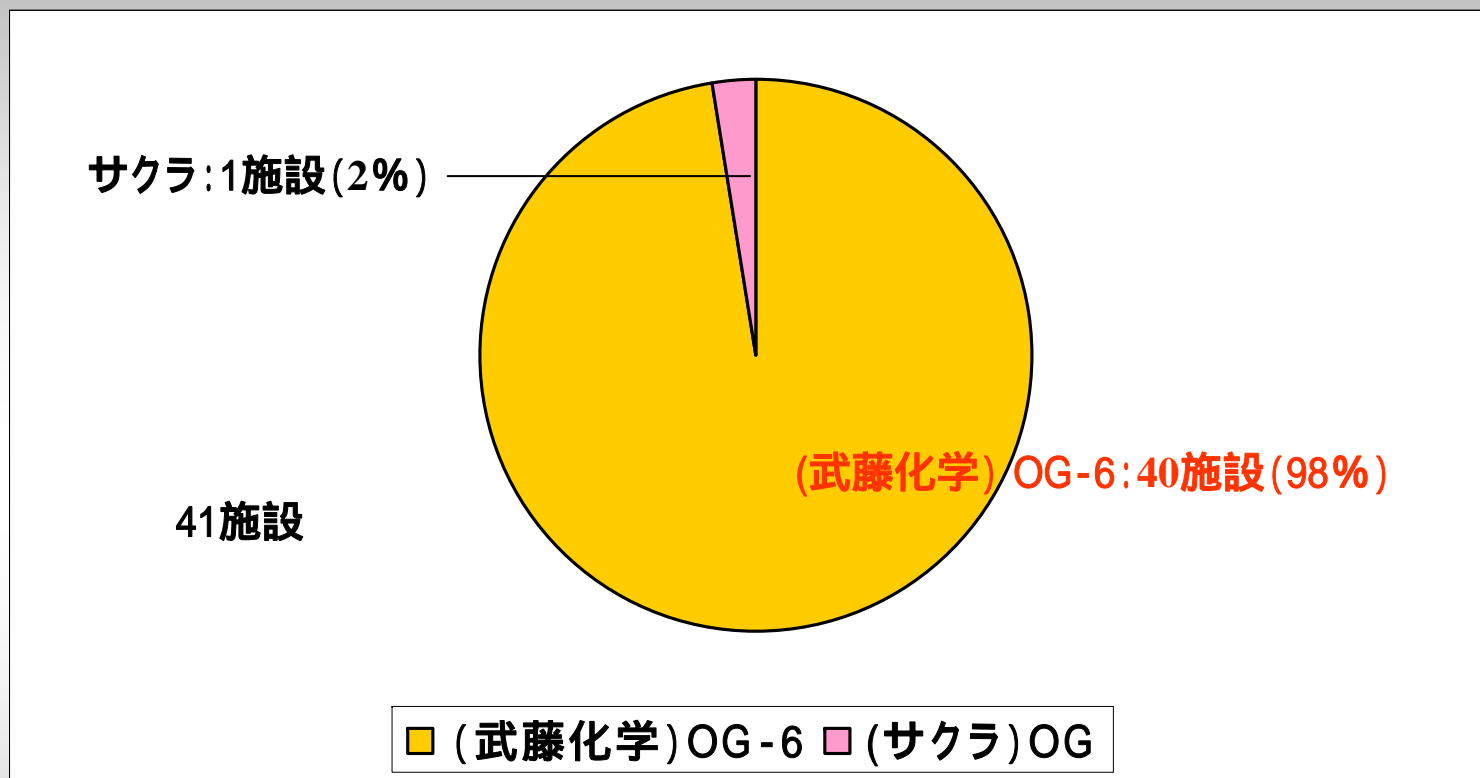
● 【アンケート集計結果】 色出し液

流水: 35 / 41施設 (85%)

アンモニア水: 1 / 41施設 (2%)

アンモニアアルコール: 5 / 41施設 (12%)

【アンケート集計結果】 OG染色液



メーカーは、武藤化学製が大多数を占めていた。
種類は、OG-6(98%)で最も多かった。
染色時間は、1～5分(平均2分)。

【アンケート集計結果】 OG染色後の分別液

100%アルコールのみ使用:17 / 41施設(41%)

槽数:1 ~ 3槽(平均2.7槽)

合計浸漬時間:5秒 ~ 9分(平均2分32秒)

95%アルコールのみ使用:23 / 41施設(56%)

槽数:1 ~ 4槽(平均1.9槽)

合計浸漬時間:5秒 ~ 4分(平均1分13秒)

●【アンケート集計結果】 リンタングステン酸の使用 4 / 41施設(10%)

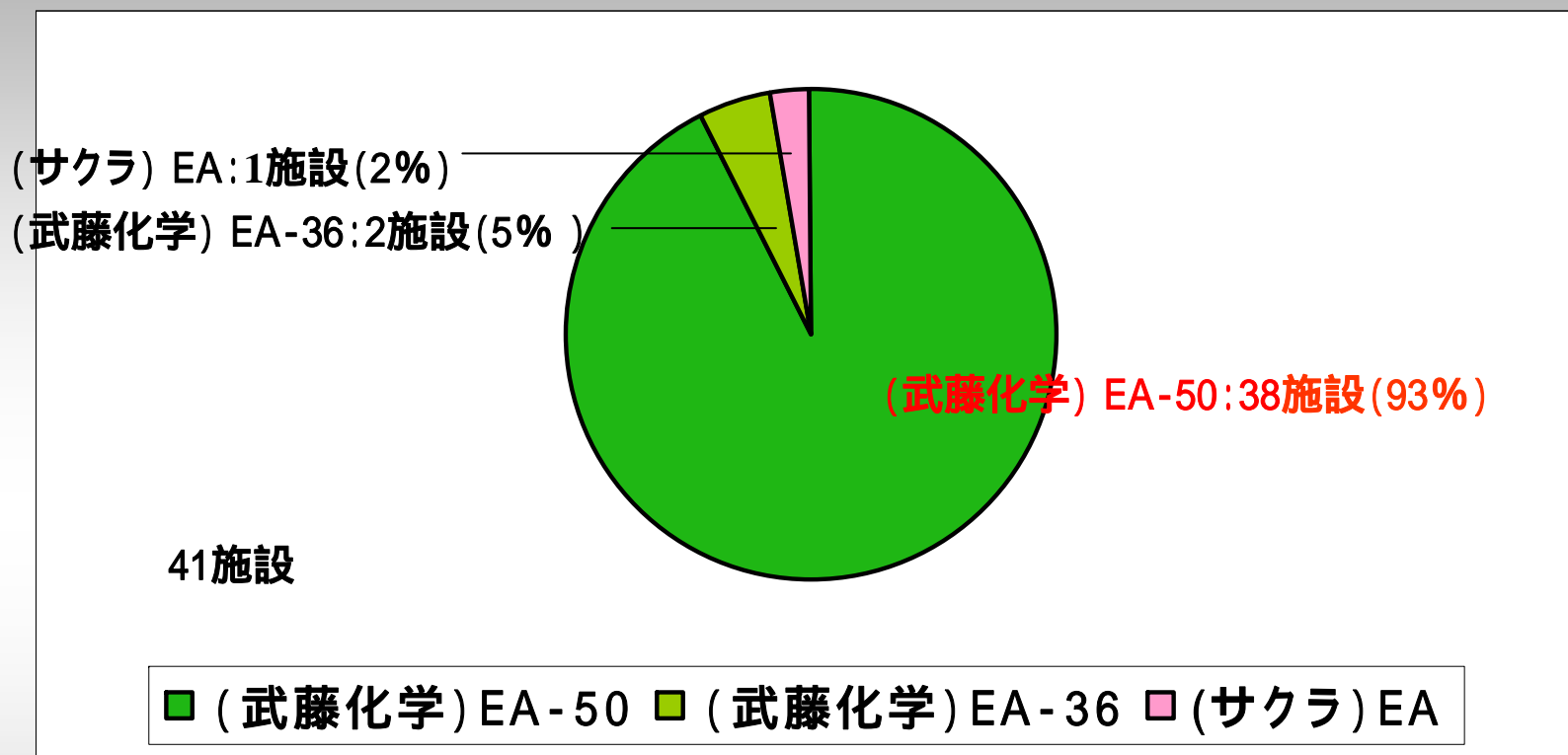
95%AL 2分, 酢酸AL 1分, リンタン 1分, 95% AL 1分

95% AL 1分, リンタン 1分, 95%AL 1分

酢酸AL 1分, リンタン 1分, 95%AL 1分

95% AL 1分, リンタン / 酢酸混合液 1分, 95%AL 1分

【アンケート集計結果】 EA染色液



メーカーは、武藤化学製が大多数を占めていた。
種類は、EA-50(83%)で最も多かった。
染色時間は、1～5分(平均3分)

【アンケート集計結果】 EA染色後の分別・脱水液

100%アルコールのみ使用: 27 / 41施設 (66%)

槽数: 3 ~ 8槽 (平均4.7槽)

合計浸漬時間: 30秒 ~ 12分 (平均3分50秒)

95%アルコールの使用有: 14 / 41施設 (34%)

槽数: 3 ~ 8槽 (平均5.2槽)

合計浸漬時間: 50秒 ~ 25分 (平均6分26秒)

【アンケート集計結果】 薬液管理について

染色液の交換時期

ヘマトキシリン:1～30日(平均8日)

OG染色液:1～30日(平均7日)

EA染色液:1～30日(平均7日)

3試薬はほぼ同時期に交換する施設が多かった

● 継ぎ足しを行っている

ヘマトキシリン:8 / 41施設(20%)

OG液:7 / 41施設(17%)

EA液:7 / 41施設(17%)

この7施設は、ヘマトキシリン、OG液、EA液の全てにおいて継ぎ足しを行っていた

【アンケート集計結果まとめ】

染色液は、少なくとも約80%の施設で同一メーカー、同一商品を使用しており、染色時間にも大きな問題がないにもかかわらず、実際の標本をみるとかなり染色性に施設間差があった。

そこでまず、これらをタイプ分けするために、次のような方法を取り、アンケート内容と対比し、施設間差について検討を行った。

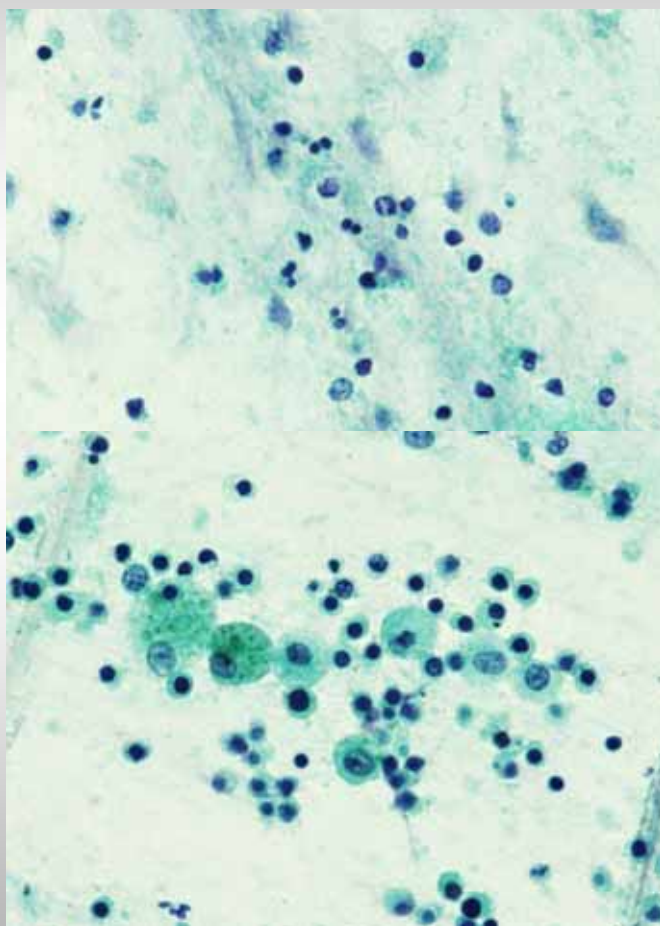
【検討方法】

ヘマトキシリンは好中球，マクロファージの核について，オレンジG，ビスマルクブラウン，エオジン，ライトグリーンは背景の粘液成分について，どの色調が優位なのかを観察し，各色素成分について「標準的な染色性」，「強い」，「弱い」の3つに大まかに分類した．

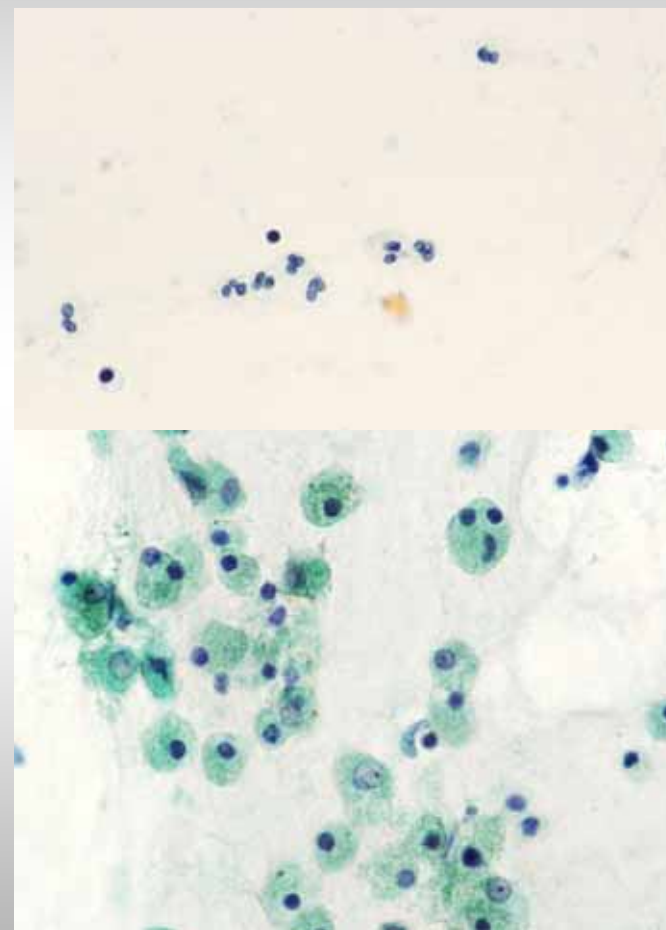
扁平上皮細胞(表層～中層型)の細胞質については，オレンジG好染細胞(黄色～オレンジ色)，オレンジG・エオジン共染細胞(オレンジ色～ピンク色)，エオジン好染細胞(ピンク色～赤色)，ライトグリーン好染細胞(青緑色)の4種類の色調に分類し，各施設200個を数え，百分率で表した．

【染色性結果】 核染色 ヘマトキシリン

染色性のやや強い施設が5施設あったが、染色時間の最も長い施設においても大差はなかった。
施設間差においては大きな影響はなかった。



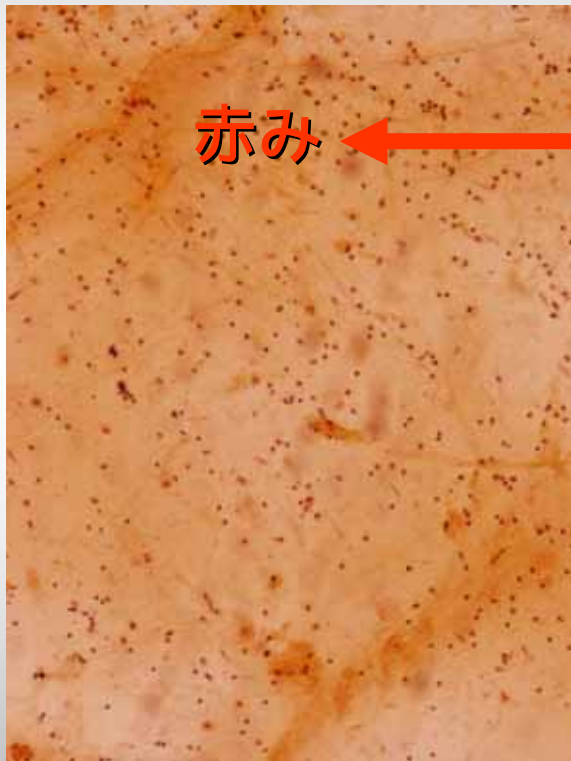
染色時間が最も長い: **染色5分**, 塩酸AL 1分



標準的な染色性(対照)

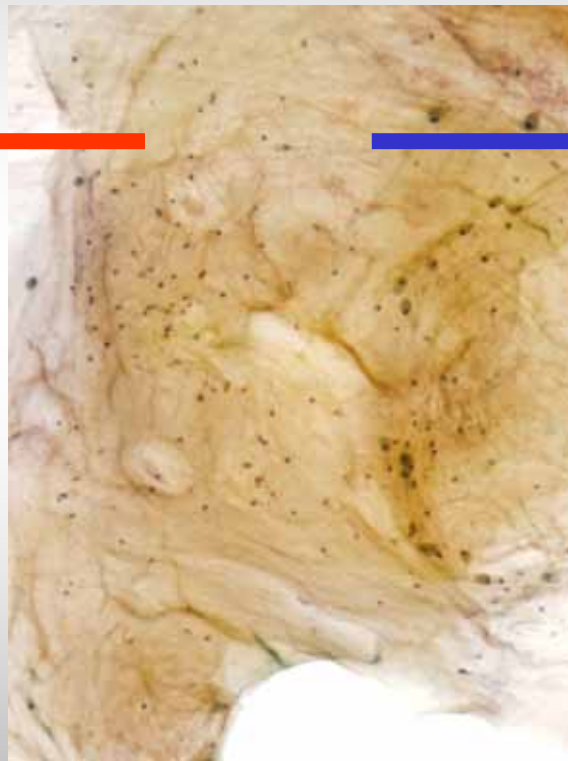
【染色性結果】 背景の粘液成分

標本全体の印象を最も大きく変えていた(面積的に広い為).
標準的な例は, オレンジG(ビスマルクブラウン), ライトグリーンおよびこれら
にヘマトキシリンの加わった混合色調で, そのバランスにより色調が大きく異
なっていた.

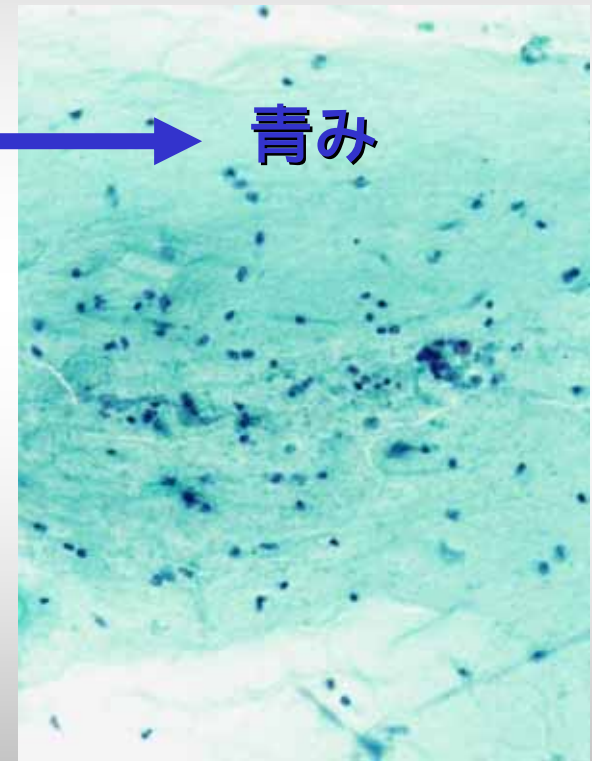


赤み ←

オレンジG(ビスマルクブラウン)優位
(レンガ色~オレンジ色)



標準的な染色性(対照)
混合色調
(淡茶色)



→ 青み

ライトグリーン優位
(青緑色)

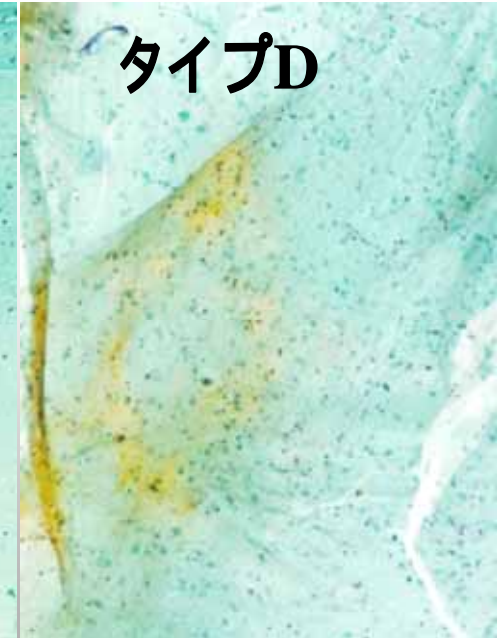
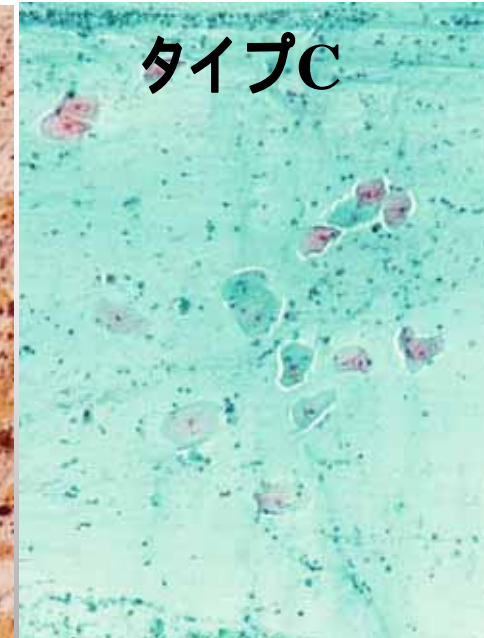
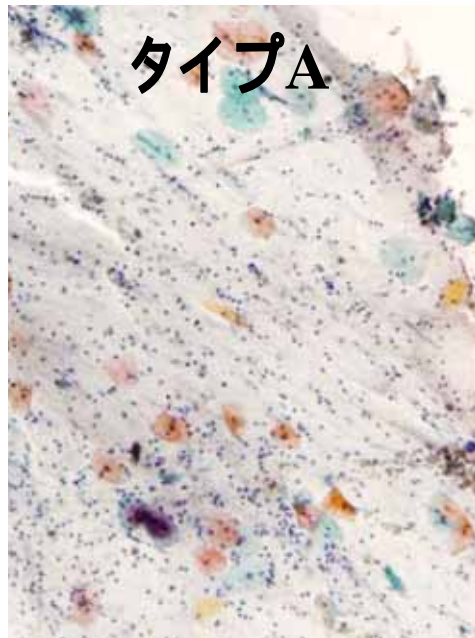
粘液の染色性から以下A) ~ D) の4タイプに分類できた

タイプA) 標準的な染色性(24 / 41施設)

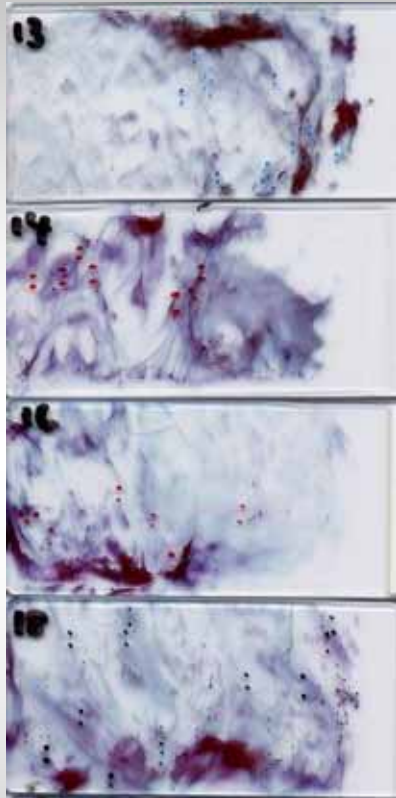
タイプB) オレンジ'Gが強く, ライトグリーンが弱い(4 / 41施設)

タイプC) ライトグリーンが強く, オレンジ'Gが弱い(9 / 41施設)

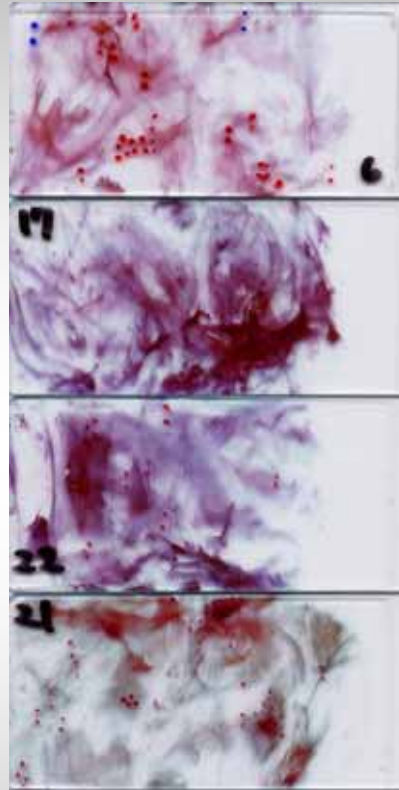
タイプD) ライトグリーン, オレンジ'Gが強く, エオジンが弱い(4 / 41施設)



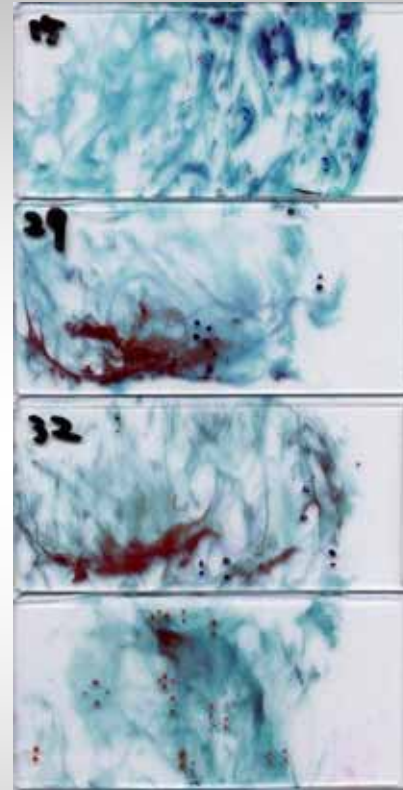
【プレパレーター一覧】



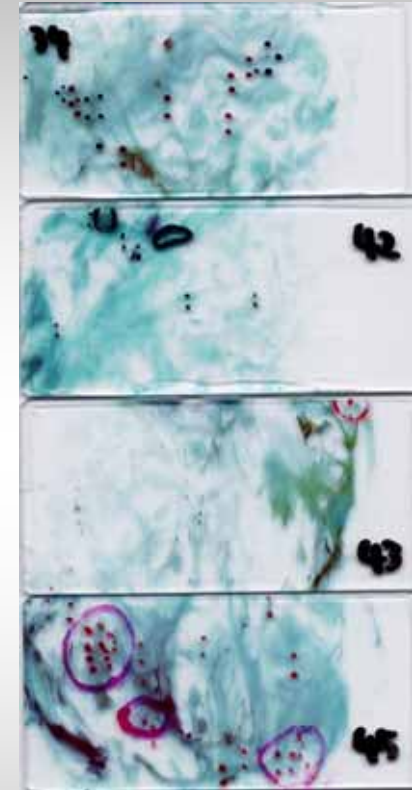
タイプ A
(標準)



タイプ B
(赤みが強い)



タイプ C
(青みが強い)



タイプ D
(青みが強い)

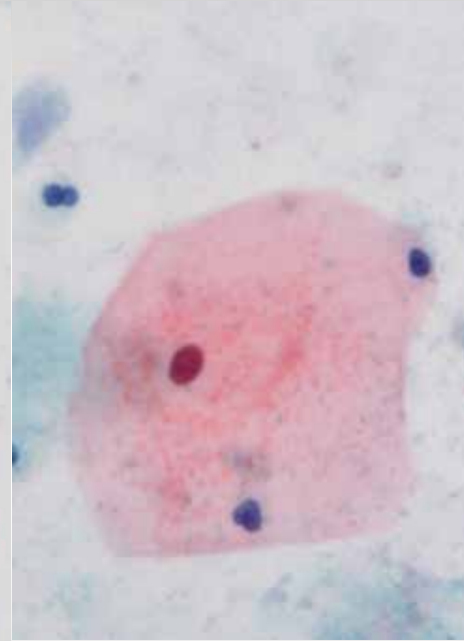
【染色性結果】 細胞数カウント
～ 扁平上皮細胞の細胞質の染色性の定義づけ～



オルセイン好染細胞
(黄色～オレンジ色)



オルセイン・エオジン共染細胞
(オレンジ色～ピンク色)



エオジン好染細胞
(ピンク色～赤色)

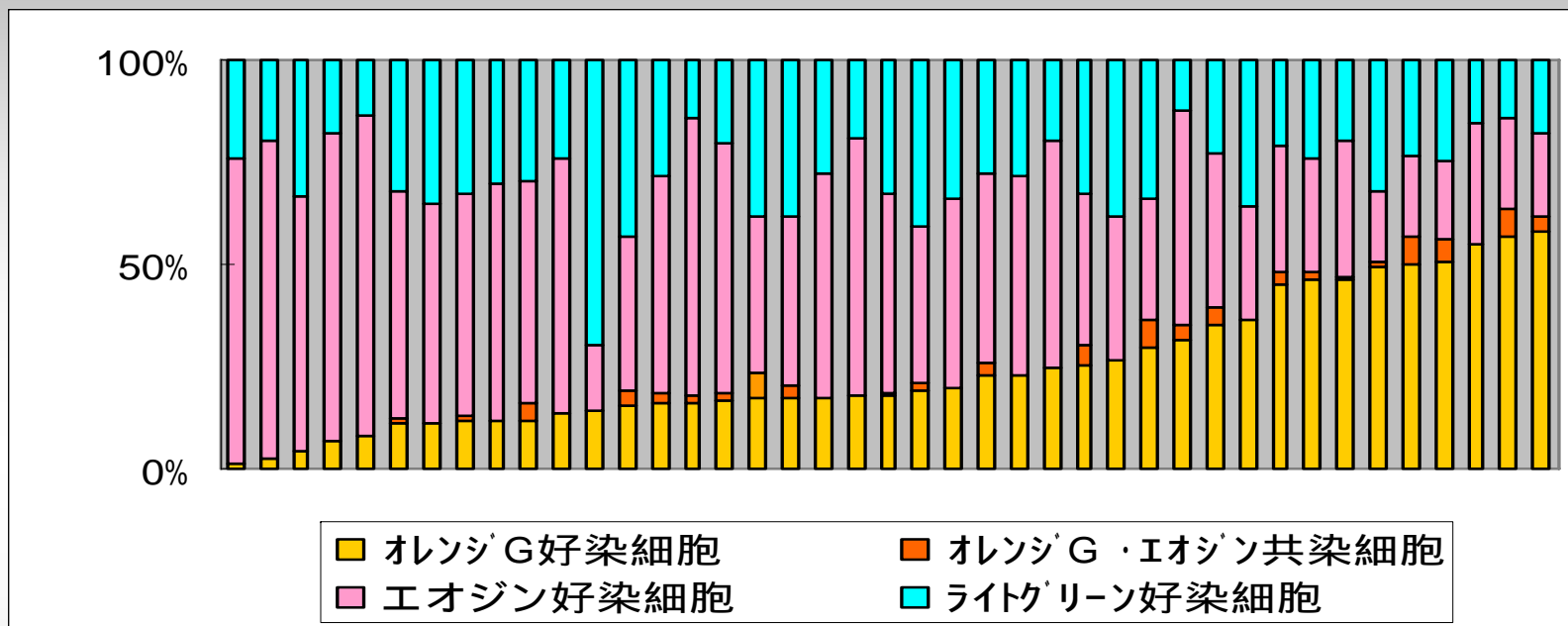


ライトグリーン好染細胞
(青緑色)

【染色性結果】 細胞数カウント

細胞質の平均比率は 23.8, 2.0, 46.1, 28.1(%)であった.

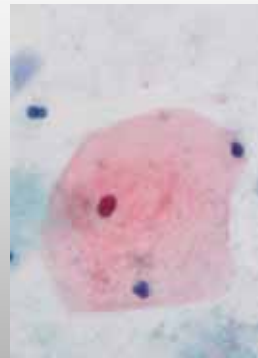
最も差の多いオレンジ'Gベースで表示;これほど施設間差があることが示された.



オレンジ'G好染細胞
(黄色～オレンジ色)



オレンジ'G・エオジン共染細胞
(オレンジ色～ピンク色)

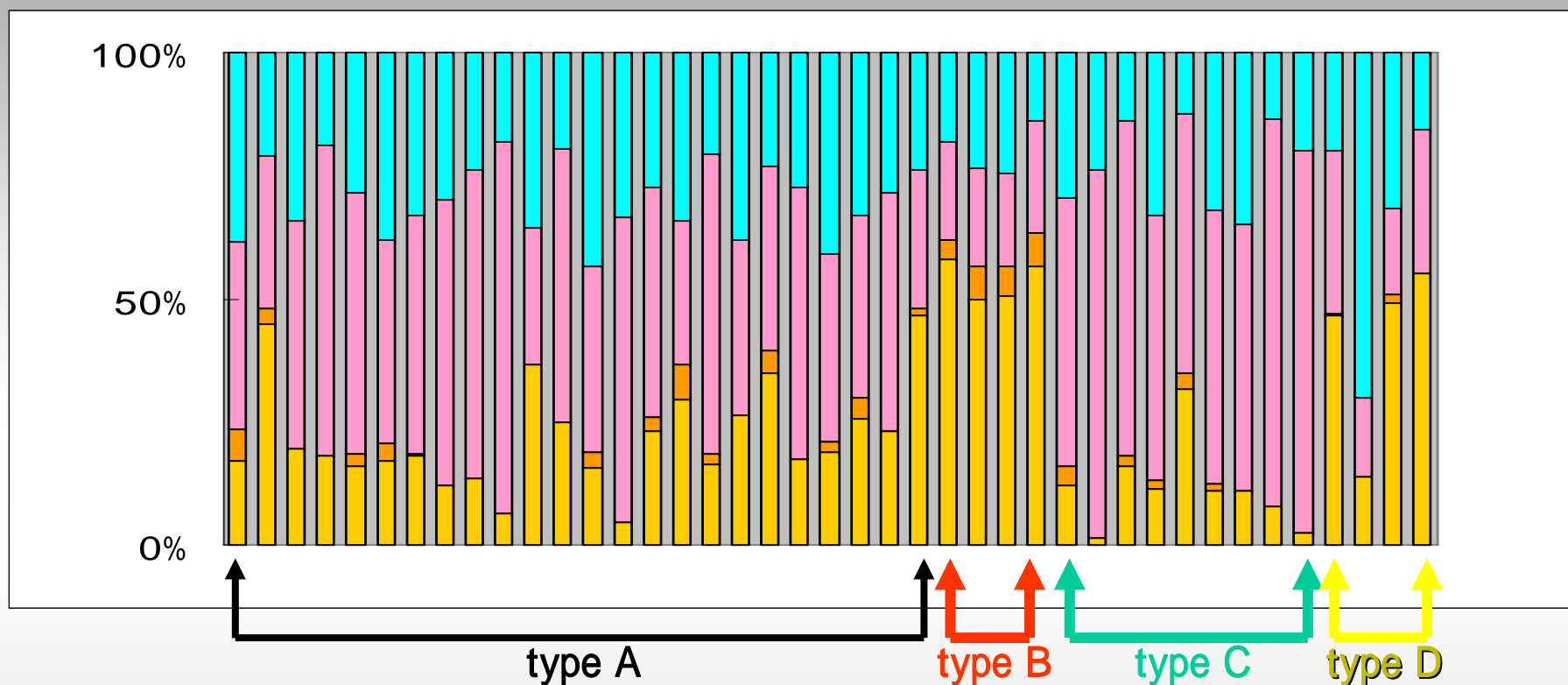


エオジン好染細胞
(ピンク色～赤色)



ライトグリーン好染細胞
(青緑色)

【染色性結果】 細胞数カウント (タイプ別に表示)



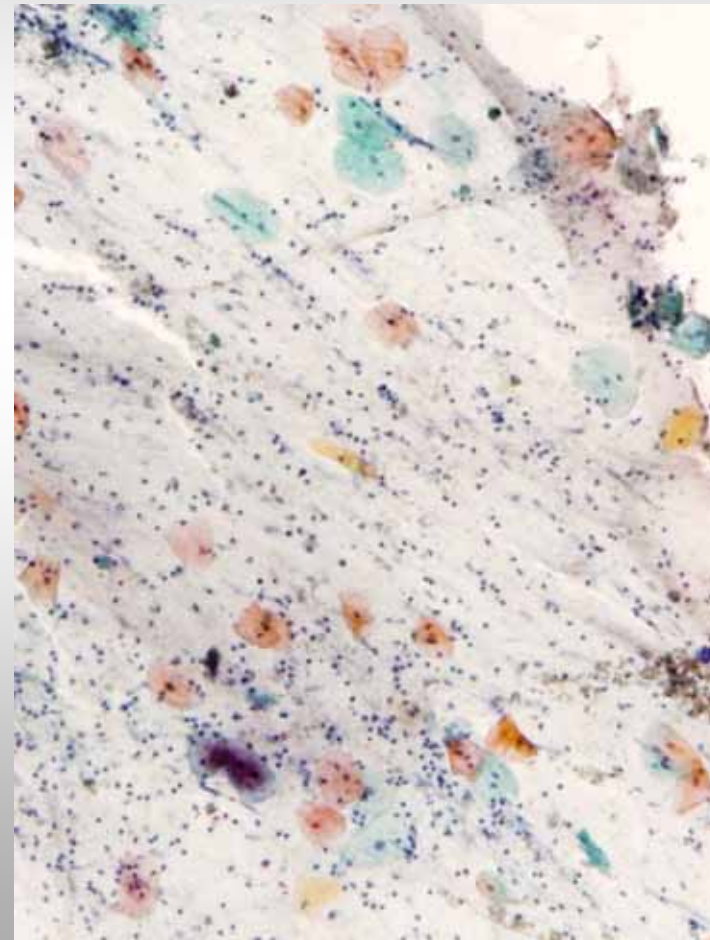
タイプA) 標準的な染色性(24 / 41施設)

タイプB) オレンジGが多く, EA成分(ライトグリーン/エオジン)が少ない傾向(4 / 41施設)

タイプC) EA成分(ライトグリーン/エオジン)が多く, オレンジGが少ない傾向(9 / 41施設)

タイプD) オレンジGが多く, エオジンが少ない傾向(4 / 41施設)

タイプA) 標準的な染色性 (24 / 41施設) :
**背景の粘液はオレンジ G (ビスマルクブラウン) および薄いライトグリーンの
の混合色調を呈し, 細胞質の染色性および分別のバランスが
よく, 各色素成分が独立して観察できた .**

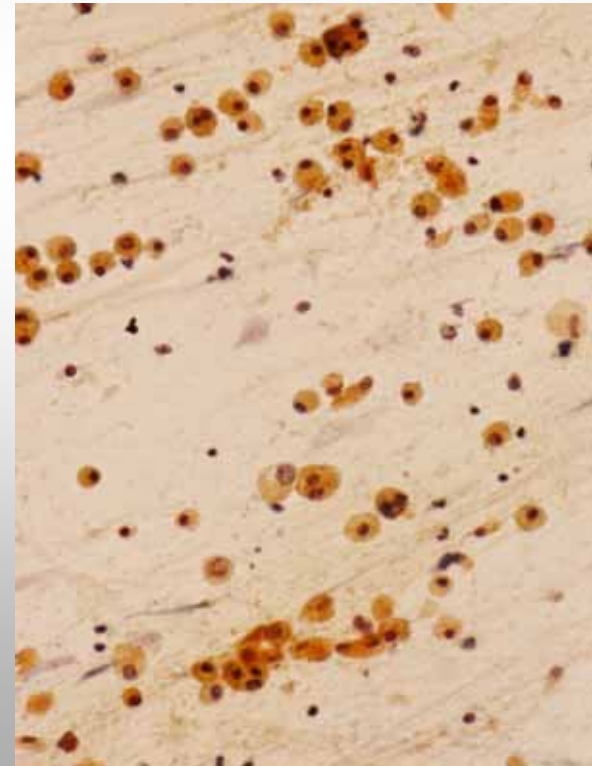
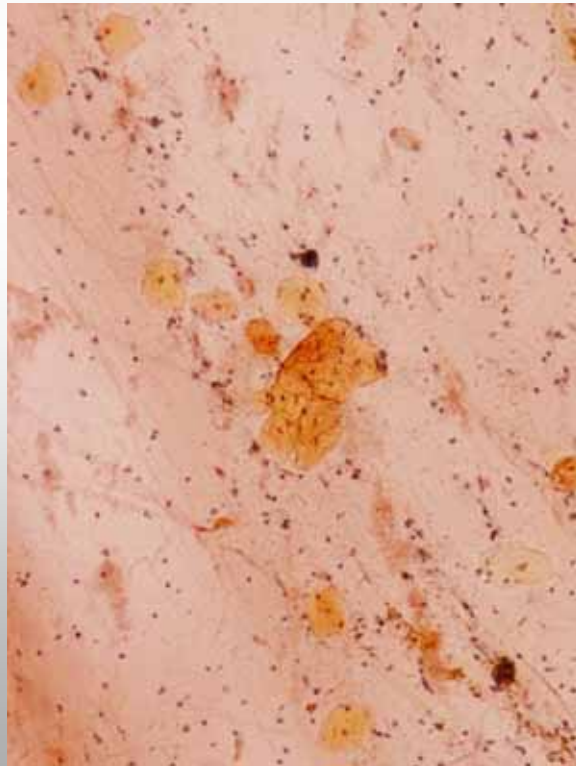
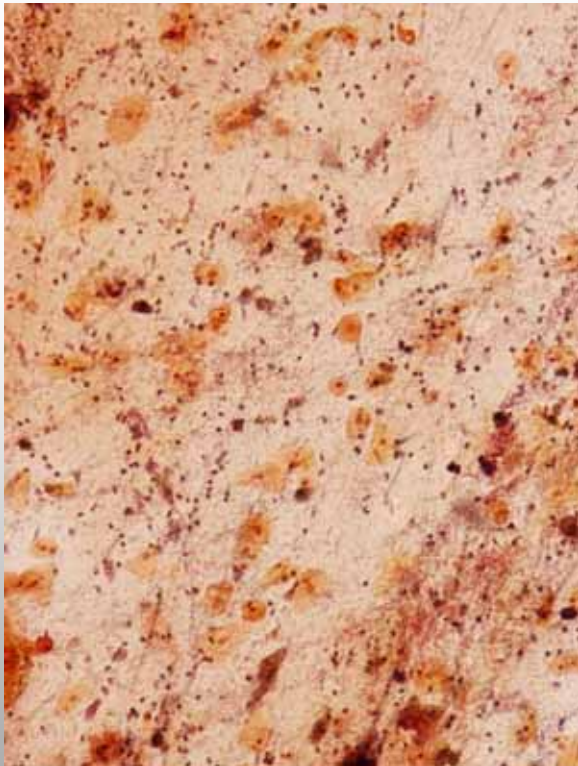


タイプA)のアンケート内容(24 / 41施設)

- 核染後の色出し液の種類:アンモニア使用(0 / 24施設)
- OG染色後のリンタングステン酸:使用(0 / 24施設)
- EA染色液の種類:EA50を使用(23 / 24施設),
EAサクラを使用(1 / 24施設),
EA36を使用(0 / 24施設)
- 染色液の管理:
EA液, OG液の継ぎ足し:あり(0 / 24施設)

アンケート内容について,タイプA)を基準とし,タイプB)~D)と照合し,相違点を解析したところ,上記 ~ が色調差の原因として挙げられた.

タイプB) オレンジGが強く, ライトグリーンが弱い(4 / 41施設)
ライトグリーンが弱いために, 粘液はオレンジG (ビスマルクブラウン)
優位の色調を呈し, 細胞質はタイプA) 標本に比べオレンジG好染
細胞の比率が非常に高かった.
またマクロファージもオレンジG優位の色調を示していた.



タイプB)のアンケート内容(4 / 41施設)

核染後の色出し液の種類:アンモニア使用(0 / 4施設)

OG染色後のリンタンゲステン酸:使用(0 / 4施設)

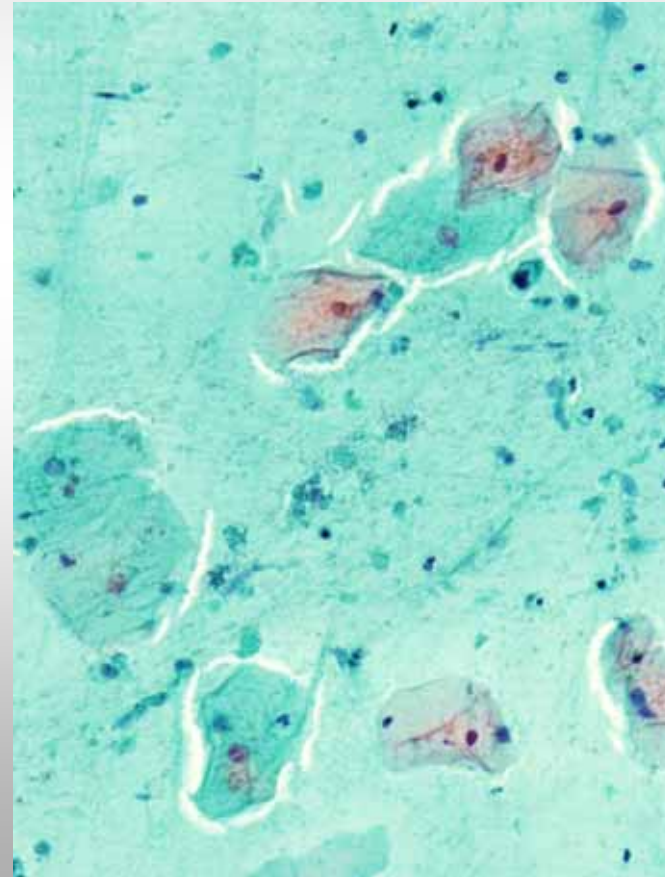
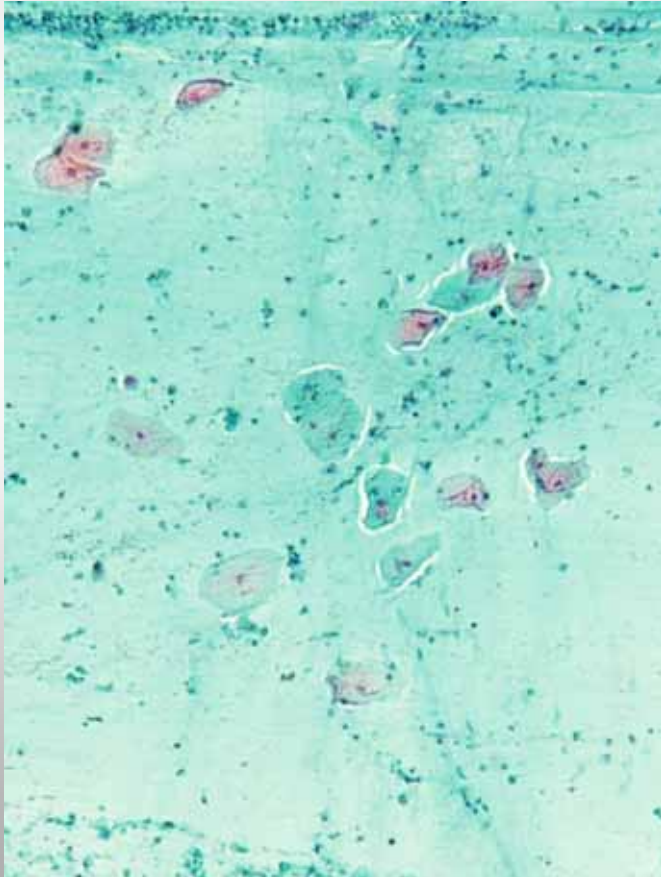
EA染色液の種類: EA50を使用(4 / 4施設)

- EA液, OG液の継ぎ足しを行っている(1 / 4施設)

< 原因推測 >

EA染色液の成分であるライトグリーンとエオジンの濃度に変化を起し, 染色性が低下したため, OG成分が強調された

タイプC)ライトグリーンが強く、オレンジGが弱い(9 / 41施設):
粘液がライトグリーンに強く染まり、細胞質はタイプA) 標本に比べ
エオジン好染細胞の比率が非常に高かった。しかしエオジンに
ライトグリーンが共染した透明感のない細胞が高頻度にみられた。



タイプC)のアンケート内容(9 / 41施設)

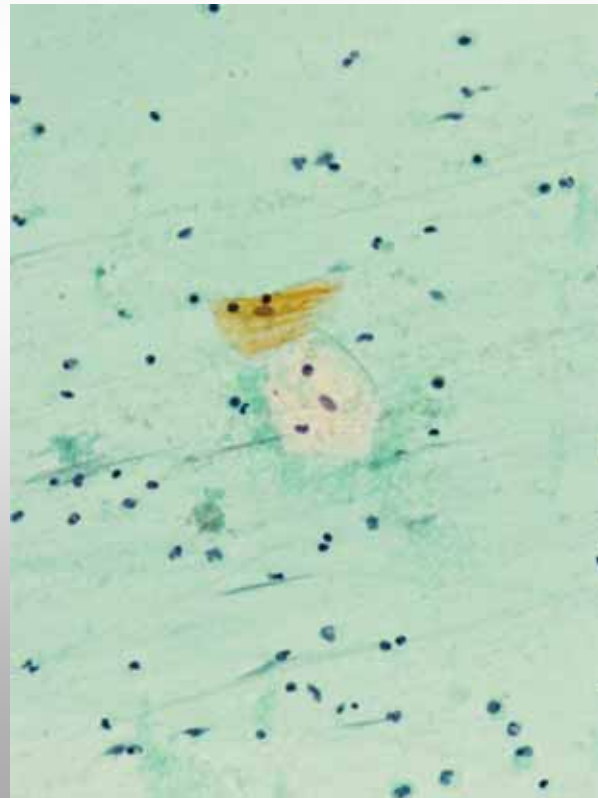
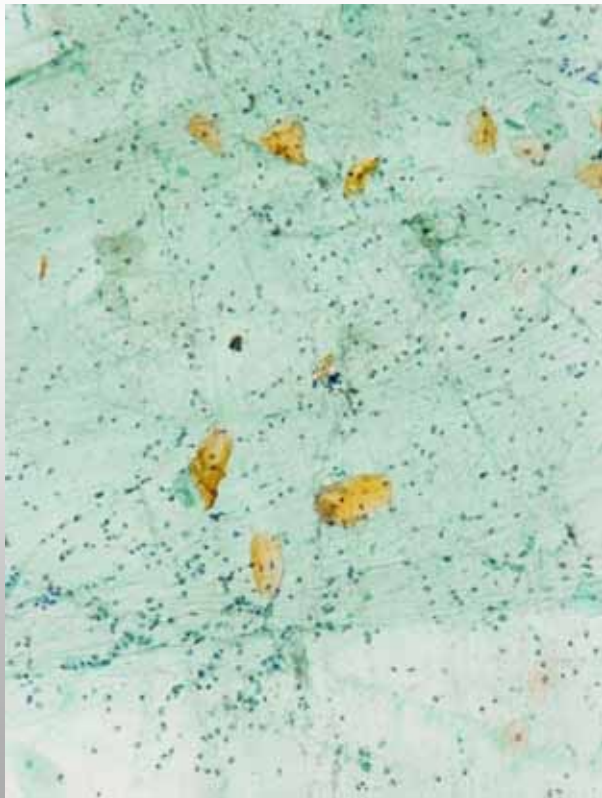
- 核染後の色出しにアンモニアを使用(3 / 9施設)
OG染色後のリンタンゲステン酸:使用(0 / 9施設)
- EA36を使用(2 / 9施設)
- EA液, OG液の継ぎ足しを行っている(5 / 9施設)

< 原因推測 >

直後2槽のアルコールを通しただけでOG染色液に浸漬した施設もあり, phの高いままではOG染色液の染色力が弱まり, 結果EA染色液の成分が強調された.

ライトグリーンの含有濃度が高い処方のため青みが強まった.
染色液の成分濃度に変化を起こし, 特にEA染色液の濃縮やバランスが崩れ, 結果青みの強さやエオジンにライトグリーンにかぶったような透明感のない細胞が増えた.

タイプD)ライトグリーン, オレンジGが強く, エオジンが弱い(4 / 41施設):
粘液がライトグリーンに強く染まり, 細胞質はA) 標本に比べ
オレンジG好染細胞の比率が非常に高い.
その反面エオジン色をとる細胞が極端に少なく, 染まりも弱かった.
またオレンジGは黄色みを帯びた光輝性の強い色調を呈していた.
ライトグリーンは共染が少なく透明感があり, このタイプ特有の色調
であった.



タイプD)のアンケート内容(4 / 41施設)

- 核染後の色出し液の種類:アンモニアを使用(3 / 4施設)
- OG染色後のリタングステン酸:使用(4 / 4施設)
- EA染色液の種類: EA50を使用(4 / 4施設)
- 染色液の管理:継ぎ足しを行っている施設(1 / 4施設)

<原因推測>

リタングステン酸を使用した特有の色調・オレンジGとライトグリーンが極端に強調される染色方法であり、そのため至適pH条件の異なるエオジンの染色性が弱まった。

<参考資料;各色素の至適pH条件>

オレンジG : pH2

ライトグリーン : pH2

エオジン : pH5

【考察】

今回、背景の粘液と扁平上皮細胞の細胞質の染色性において施設間差がみられ、4タイプに分かれた。ヘマトキシリンは、施設間差においてはあまり影響はなく、オレンジG、エオジン、ライトグリーンの3色素のバランスが、標本全体の色調に大きな影響を与えることが分かった。

色調の差をアンケートの集計結果と照合し、原因などを解析したところ、染色工程にアンモニア(強アルカリ性)やリンタンゲステン酸(強酸性)など極端にpHに変化をきたすものを用いると色調のバランスが崩れること。染色液の長期にわたる極端な継ぎ足し使用は色素濃度に変化をきたし、染色性の低下をまねくこと。色素の濃度の処方が異なる染色液(EA-36例)を使用すると、染色性は変化することなどが示唆された。

なぜ施設間差が生ずるのか？施設間差をどう考えるか？

あって当然？

全く同じ機械を使用し、同じ染色プログラムで、同じ薬液の種類・反応時間・管理方法を行わない限りは起こりうる。

使用染色液が多くの施設で同じなのに施設間差が生ずる訳は、染色・分別の時間、方法(用手法、自動染色装置)、薬液の使用頻度と交換時期、槽の数(分別過少・過剰)etc. 様々な条件が複雑に絡み合っ生ずる。

無い方がいい？

コンサルテーションなどで他院の標本をみる際に困ることがある。試薬の統一化、リンタンゲステン酸・アンモニアなどpHが大きく変動する操作を加えない、薬液をこまめに取り換える、染色液の極端な継ぎ足しは行わない、機械化(自動染色装置)などにより、極端な施設間差は随分減らせると思う。

あってもいい？

染色原理を把握した上で、好みの色調になるよう調節している？
より美しい染色性を追求する？新たなPap.染色法を考案する？

【まとめ】

Pap.染色は、多くの施設で同じ染色液を用いているにもかかわらず染色態度はさまざまであった。施設間差が多い理由として、手技の違い、染色液の管理など色々考えられるが、染色工程に関するアンケート結果のみからでは、理由付けられないことも多く、今後の課題と考えられた。

我々の行った精度管理事業は、染色性の良し悪しを評価するためのものではなく、染色方法・工程の特性を調べ、その情報を還元することが目標である。また、細胞検査士がPap.染色をうまく操り、質の高い標本を作製し、その結果、質の高い細胞判定へとつなげることが重要である。今回得た内容を踏まえ、今年度も昨年度同様にPap.染色の精度管理を行い、更なる検討を続けたいと考える。

- 千臨技細胞診検査研究班精度管理委員 -

有田茂実(千葉県こども病院)班長

村田行則(国立国際医療センター国府台病院)副班長

時田和也(JFE健康保険組合川鉄千葉病院)

小山芳徳(帝京大学ちば総合医療センター)

永澤友美(株江東微生物研究所千葉支所)

須藤一久(千葉県立佐原病院)副班長

渡邊孝子(帝京大学ちば総合医療センター)

北村真(東邦大学医療センター佐倉病院)

滝川紀子(千葉大学医学部附属病院)

仙波利寿(千葉大学医学部附属病院)