

染色性の管理

医学系部門 基礎社会医学班
法村 真一

1. はじめに

私が配属されている分子病理学研究室は主にがんの発生・進展について消化器系及び泌尿器系を中心とした分子病理学的研究を行っている。また、教育として病理医の育成をメインとしており、教職員及び大学院生含めて15人が在籍している。

その中で私は病理組織標本作製と病理解剖の介助を担当している。

2. 病理組織標本とは

厚さ3 μ mというミクロの世界で展開され、色々な色素によって染色を施した標本は、顕微鏡越しに見えるプレパラート上の絵画のようなものであり、その表現方法は様々である。その中で最もポピュラーなのがヘマトキシリン・エオジン(以下HE)染色である。HE染色はヘマトキシリンとエオジンの2つの色素で表現する。ヘマトキシリンは細胞核を青紫色～赤紫色に染め、エオジンは細胞質及び結合組織等を淡紅色～赤色に染める。その染色の最適な色調は“薄すぎず・濃すぎず”である。ただしその色調には人それぞれの好みがあり、分子病理学研究室のスタッフ15人それぞれの好みに応じて表現するのは困難な為、診断に支障がない標本作製に努めている。また、HE染色を補助する形で特殊染色や免疫染色を行っている。特殊染色や免疫染色には何十種類もの染色があり全ての染色性を管理する必要がある。

3. 染色性を管理する

病理組織標本にはHE染色をはじめ何十種類もの特殊染色・免疫染色があり、染色性を日々チェックし染色性の質(Quality)を保持している。長年において病理組織標本作製の仕事をやり続けると、この“保持する”という観点を疎かにしがちである。染色でき

た結果がすべてであり、染色した標本が不可な標本であってもそれが可であるとして提出しがちになってくる。そのような事を長年続けた場合、自分自身の染色性の基準というものが曖昧になる。曖昧にならない為にもそれぞれの染色ごとに基準を設ける必要がある。

(1) 染色性を左右する要因を考える

染色性を管理する前に、染色性を左右する要因を考えなければならない。左右する要因は様々で組織ブロックを作製する工程で生じる要因、染色工程で生じる要因があり、染色結果が良くない場合、見極めが必要になってくる(表1)。

(2) 管理する方法

ブロック作製過程で生じる要因は偶発的な原因が主で、未然に防ぎようがない場合がある。今回は、染色時に生じる要因について、染色性を管理する方法を説明する。

① 工程の管理

染色方法は色々な方法があり、標準的な方法がないのが現状である。その為、選定を行う必要がある。選定方法については、何種類かの方法について染色を行い安定した結果を得られる事及び染色過程が簡単である事、また他施設において染色評価が高いプロトコールを採用するようにしている。時には、インターネットにて情報を得る場合がある。染色方法には色々なやり方があり、一元的に管理する必要がある。

表 1. 染色性を左右する要因

ブロック作製工程	染色工程
固定不良, 組織乾燥 過脱灰, 切片厚の問題 等	試薬調製ミス, 技術者 のテクニカルエラー, 等

② 試薬の管理

染色試薬には従来は自己調製試薬が良い結果を生むという考えが多く見られた。しかし、染色結果が不明瞭の場合、試薬調製ミスなのか、染色過程での技術的なミスなのか不透明な場合が多く見られた。そこで、品質管理されたメーカー調製品に変更する事で技術者のテクニカルなエラーのみが染色性を左右する要因とした。

③ 手技の管理

染色手技としては染色壺を用いる方法、染色液を直接垂らす上乗せ法の 2 種類ある。それぞれのやり方について利点と欠点があり、安定した結果を出せる方法として染色壺を用いる方法を採用している。また、染色性を安定させる方法として、染色工程の途中で染色の色彩がうまく染まっているか確認するようにしている。

④ コントロール切片の作製

コントロール切片を用いて客観的に評価する事は重要な事である。いくら染色手技が上達した、染色試薬が良いものを使っているとしてもやはり偶発的なミスは誰にでも発生する。その偶発的なミスを回避する為に用いるようにしている。

4. 実用例(HE 染色と特殊染色)

(1) HE 染色

冒頭でも述べたが、HE 染色は細胞や構成組織をヘマトキシリンとエオジンの 2 種類の色素で表現する染色である。この染色の染色態度を一定及び美しく保つ必要がある。

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色	
操作)	
1. 脱バラ・流水水洗	
2. 核染 GMヘマトキシリン 1分30秒~5分 (1.5倍マイヤーヘマトキシリン 10~15分) (マイヤーヘマトキシリン 16分~20分)	
3. 流水水洗	
4. 色だし 1%炭酸リチウム飽和液 約10秒	
5. 流水水洗 2分 (炭酸リチウムをしっかりと落とす)	
6. 染色 エオジン 1分30秒~4分 (大気中の炭酸ガスを吸収して変質するのが早いので染色時間を調節する)	
7. 脱水・透徹・封入	
薄いHEを濃く染める方法	
I. カバーガラスをはずし、下降系列のアルコールにつける。	
II. 水洗	
III. ヨウ素酸水溶液 (PAS染色で使用するもの)につける。	
【脱色され、かつ酸化されるのでヘマトキシリンが染まりやすくなる】	
IV. 通常の HE 染色	
試薬)	
① マイヤーのヘマトキシリン液 ヘマトキシリン調整の欄を参照	
② GMのヘマトキシリン及び1.5倍ヘマトキシリン (武藤化学)	
③ エオジン液:	
1%水溶性: 1%アルコール性=10:3	150ml 作製
	水溶性 115ml: アルコール性 35ml (酢酸 1滴)
	180ml 作製
	水溶性 138ml: アルコール性 42ml (酢酸 1滴)

図 1. 実際使用しているプロトコール

① 工程及び技術の管理

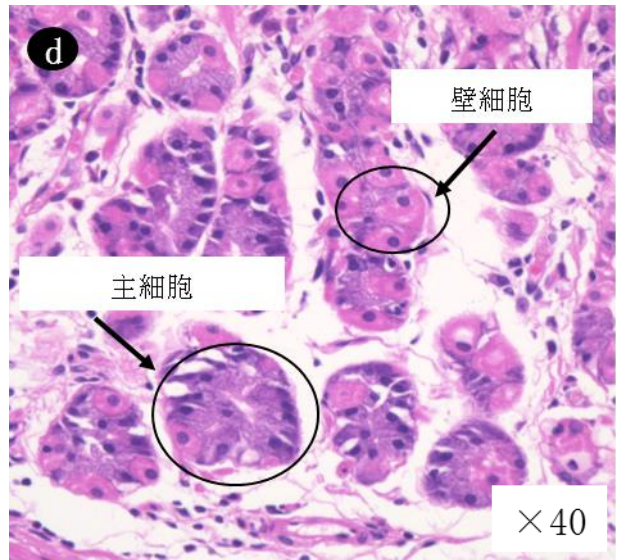
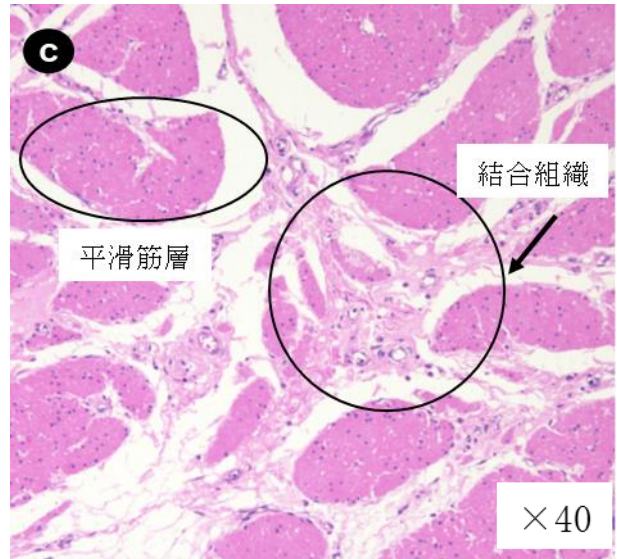
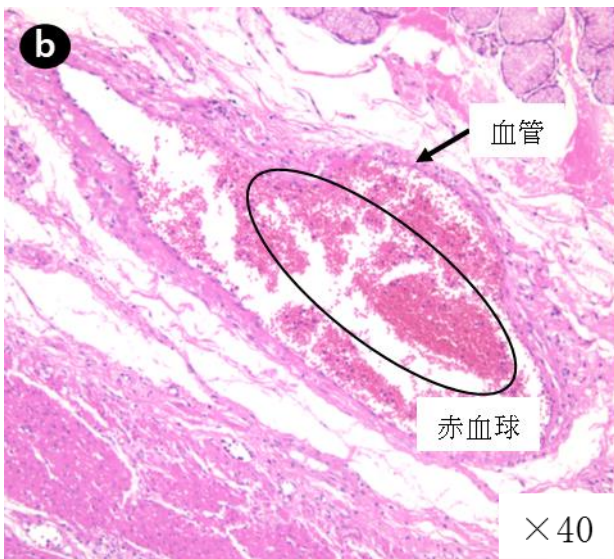
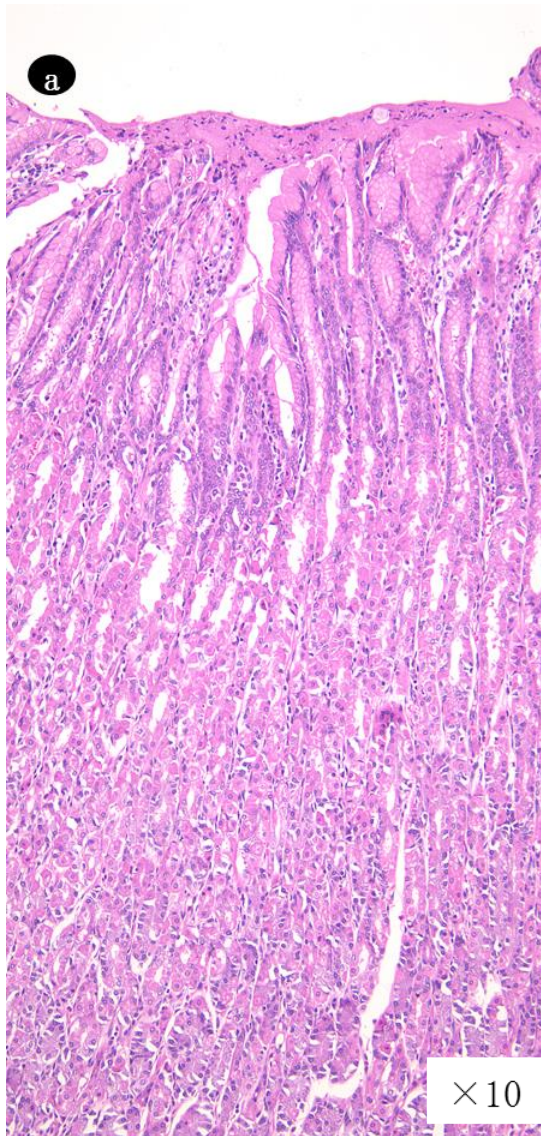
HE 染色は施設により手法、使用する試薬は異なる。図 1 に示すようにプロトコールを定め、使用する試薬を統一する事により個人間の人為的過誤を最小限に防ぐようにしている。

② 試薬管理

HE 染色で一番問題になるのが試薬の劣化による色調変化の問題である。特にエオジンは炭酸ガスを吸収し変質が起こる為、1週間に1回の交換を目安としている。また、ヘマトキシリンは2~3週間に1回の交換を目安とし、約500枚を基準に交換するようにしている。

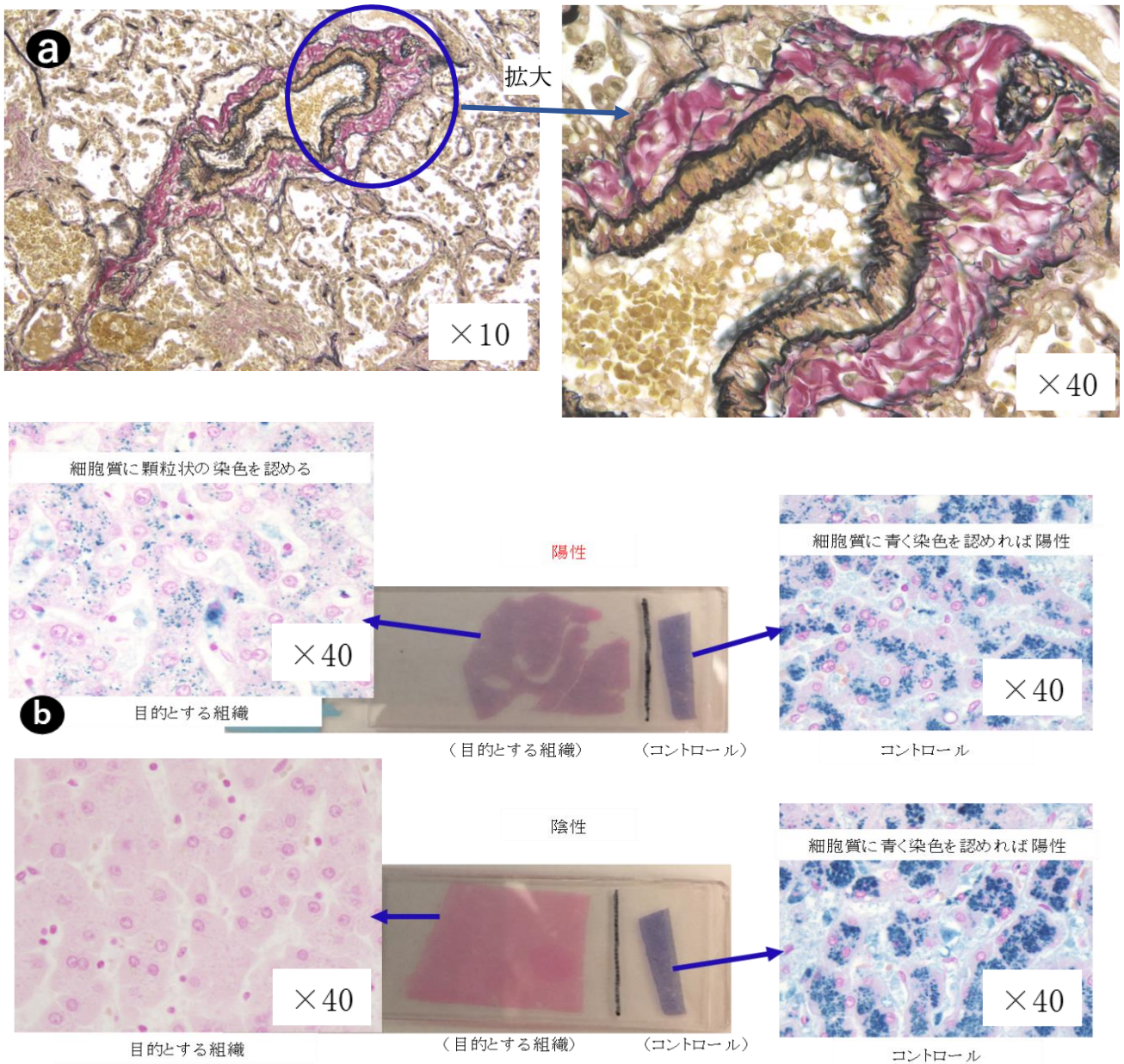
③ 染色性の確認

日頃の標本の染色性の管理について、主に胃の正常組織像をコントロールとしチェックするようにしている(図 2)。また、染色途中で染色性に不安があった場合、例えば、ヘマトキシリンの染色性を確認するならば、色出し後に核や膠原繊維、血管壁などが染まっている事を鏡検し確認するようにしている。



- a 胃組織上皮粘膜像である。弱拡大の観察にて核の染色が目に見つ先に飛び込んでくるような核の染まり方を心掛ける。また、共染していないか確認する。
- b 赤血球は血管内や組織中に存在する。赤血球の染色性が良好である事、血管とのコントラストについて確認する。
- c 平滑筋層の中には結合組織があり、結合組織中には血管や血液細胞等が存在する。それぞれのコントラストについて確認する。
- d 胃底粘膜の深層には主細胞と壁細胞がある。主細胞は細胞質が顆粒状あるいは空胞状でピンクがかって青に染まり、壁細胞は赤い顆粒状の細胞質を持ち赤に染まる。その2つの細胞間の色調の差を確認する。

図2. 評価方法



a: 内部コントロール: 肺の EVG 染色である. 血管には弾性線維と膠原繊維が存在するので, 染め分けについて確認する.

b: 外部コントロール: 肝臓の鉄染色である. 組織中に存在しない物質や微生物等については図に示すようにスライドガラス上に陽性切片を一緒に載せ染色を行う. 陽性切片が染まり手技と試薬に問題がない事を確認する必要がある.

図 6. 内部と外部コントロールの一例

③ コントロール

図 6 にて特殊染色で行っている 2 種類のコントロールの使用例について示す. 特に外部コントロールの陽性対象を用いる染色の場合は常に用いる必要がある. なぜなら, 微生物や真菌の証明には目的とする組織標本にいない事がほとんどだからである. そこで, 陰性であるという事を証明する為には陽性対象を用いて外部コントロールが染まっている事で染色

技術や試薬に問題がない事を証明する. その上で組織標本が陰性と判断出来るからである.

5. 染色に困った, 自身がないと思ったら

うまく染まらない, うまく染まっているか分からないと考える事が必ず訪れる. 現に私は過去に 1 つの染色を染めるのにどうやったらうまく染まるのか? どのやり方が適正なのか? 試行錯誤して 10 回以上やり直した

事もある。その時思ったのは成功する事ばかり考えるのではなく、沢山失敗し試行錯誤する事で知識や技術を身につける事を学んだ。そういった経験から今の染色の手法、管理の在り方が生まれた。また、染色標本の染まりが不安ならば知っている人に聞きに行くようなコミュニケーションツールを作り、依頼者に相談してディスカッションを行うようにした。このような事をコツコツやり信頼関係を築くようにしている。

6. まとめ

染色性を管理する為には、工程・試薬・技術・コントロールといった事前管理をしっかりやる必要がある。また、仕事は依頼者との信頼関係で成り立っており信頼関係を構築していく為にはコミュニケーションが必要である。今後は、当研究室のみならず外に発信していくようにしたい。