

病理組織細胞学実習における実習項目数増数の工夫

佐々木 信 敬*

【要 旨】 国家試験出題基準では、病理組織細胞学の特殊染色は、約 40 種類が挙げられているが、従来の実習方法では実習可能な特殊染色の種類は数多くなかった。より多くの特殊染色を実習で体験できるように、染色法の効率的な組み合わせ、共通の試薬を用いる染色法の組み合わせ、準備や後片付けの時間を短縮させるための工夫、について検討した。これらを検討・解析することにより実習法が改善され、1 回 3 時間、12 回の実習で約 20 種の染色法を行うことが可能になった。

【キーワード】 病理学、病理検査学、病理組織細胞学、特殊染色、実習

緒 言

国家試験出題基準では、病理組織細胞学の実習項目である特殊染色は、約 40 種類が挙げられている。しかし、主として時間的制約により、実習可能な特殊染色の種類は限られている。筆者が病理組織細胞学実習を担当した期間は、平成 5 年度から平成 19 年度までの 15 年間である。その間、より多くの特殊染色を実習で体験できるように、新たな手順を開発し、実際に試みてきた。その過程で特に、染色法の効率的な組み合わせ、共通の試薬を用いる染色法の組み合わせ、準備や後片付けの時間を短縮させるための工夫、について検討した。これらを検討・解析することにより実習法が改善され、1 回 3 時間、12 回の実習で、出題基準の約半数の 20 種程度の染色法を実習で行うことが可能になった。本稿では、その間に検討して工夫した実習方法と、各染色法の手順について紹介する。

I. 基本的実習方法

病理組織細胞学実習に割り当てられた実習時間は、1 日 3 時間、週に 3 日連続で 4 週間、計 12

回である。実習学生は短期大学時、4 年制大学時ともに 3 年次の学生約 20 人であり、各班 6~7 名の 3 班に分けて染色を行わせた。この実習には細胞診の検体処理法、電顕標本作製法が含まれているので、それらを除いた時間が、今回紹介する特殊染色法に割り当て可能な時間である。

各種染色法のための切片は、病理学実習で作製したパラフィンブロックから薄切しておいたもの(1 班あたり 150~200 枚)を用いた。脂肪染色には、病理学実習においてラットの臓器から作製しておいた、1 班あたり 30~60 枚の凍結切片を用意した。染色液は調整済みの市販品を用いず、実習時に学生に作製させた。長時間を要するシッフ液、ゴモリのアルデヒド・フクシン液、ワイゲルトのレゾルシン・フクシンの作製、およびメチル緑の精製については、実習以外の時間に筆者が立ち会い実施させた。

II. 特殊染色の実習方法の改善のために検討した事項

1. 染色の重要度の検討

国家試験出題基準にある 40 種類の特殊染色法をすべて行うことは不可能と予想されたので、ま

*公立大学法人 愛媛県立医療技術大学保健科学部臨床検査学科 生体情報学講座 nsasaki@epu.ac.jp

表1 検討した特殊染色法、今回使用した略語、今回評価した重要度

染色法	略	重要度	染色法	略	重要度
アルシアン青	AB	◎	免疫組織化学	IHC	◎
アルシアン青-PAS	AB-PAS	◎	クリューパー-バレーラ	KB	◎
アザン・マロリー	AM	◎	メチル緑-ピロニン	MGP	○
ベルリン青	BB	◎	マッソントリクローム	MT	◎
ボディアン	Bdn	◎	オルセイン	Orc	△
グロコット	Gct	◎	オイル赤 O	ORO	◎
コンゴ赤	CR	◎	過ヨウ素酸メセナミン銀	PAM	◎
エラスチカ・ワンギーソン	EVG	◎	過ヨウ素酸シッフ	PAS	◎
フォンタナー-マッソン	FM	◎	パパニコロウ	PAP	◎
フォイルゲン反応	F-R	△	リンタングステン酸ヘマトキシリン	PTAH	○
ゴモリのアルデヒド・フクシン	GAF	◎	シュモール反応	S-R	○
グリメリウス	Grm	◎	ズダン黒 B	SBB	◎
ホール法	HI-M	○	トルイジン青	TB	○
ホルツァー	Hlz	△	渡辺鍍銀	W-Ag	◎

◎；最重要、○；重要、△；免疫染色で代用可

ず最初に、国試への出題頻度等を考慮し、表1に示した28種類について検討した。これでもまだ多いので、実際の医療の現場での重要度を考えて、実習に必須とは思われない染色法を選択する目安とした。染色手順は文献^{1)~3)}に準じた。

2. 同日に行える実習法の組み合わせの可能性に関する基礎的検討

病理組織細胞学実習は2コマで、コマ間の休み時間を入れて、実際の実習時間は13:00~16:10の190分となるが、この時間内に同時に行うことができる染色法の組み合わせについて検討した。染色にかかる時間が同じような染色法を1つの群として、2群に分けた、第1群は1コマである約90分以内に行うことが可能な群である。第2群は2コマ、つまり90~180分かかる染色法である(表2)。第1群の染色数よりも、第2群の染色法の方がやや多かった。120分以上かかる染色法もあり、更に第2群から、2日に分けて行う方が教育効果がよい染色を分けた。これに加えて、それぞれの染色法には試薬調整の時間がかかるので、この時間も考慮した。なお、120分以上かかるが、PAM染色、PTAH染色(順大変法)⁴⁾などは実習時間内に実施可能であり、これらの染色法は年度によっては、一夜法を採らなかった。

表2 染色にかかる時間によるグループ分け

第1群(90分以内)		第2群(90分以上)		
染色名	染色時間	染色名	実習中の染色時間	一夜法
AB	75	AB-PAS	180	
BB	60	AM	120~180	
CR	75	Bdn	120	不可欠
GAF	60	EVG	150	
HI-M	20	FM	140	不可欠
Hlz	40	F-R	90	
MGP	20~40	Gct	150	
ORO	20~75	Grm	120	不可欠
PAP	30	IHC	120~180	同日可能
S-R	30	KB	40~60	不可欠
TB	10~30	MT	90	
W-Ag	55~80	Orc	60~180	
		PAM	180	同日可能
		PAS	100	
		PTAH	80~180	同日可能
		SBB	15~150	

一夜法：二日に亘って染色

3. 共通試薬

試薬が共通する染色法を同日に行えば、準備時間を短縮できるので、共通する試薬を必要とする染色法を表3に列挙した。4種類以上の染色法に共通する試薬類は、酢酸を除いて13種類と多く、

表3 各染色法に共通する試薬

	H ₂ SO ₃	塩化金	AgNO ₃	FeCl ₃	HCl	KMnO ₄	PIA	KER	(COOH) ₂	ハイポ	H	PA
AB-PAS	○			○	○		○				○	
Bdn									○	○		
EVG				○					○		○	○
FM		○	○					○		○		
F-R	○				○		○					
GAF	○				○	○						○
Gct	○	○	○							○		
Grm			○					○		○		○
Hlz						○			○			○
MT				○	○						○	
Orc	○					○						
PAM		○	○				○		○	○		
PAS	○				○		○					
BB					○			○				
PTAH	○					○			○		○	
S-R				○				○				
W-Ag		○	○			○			○	○		

KER ; ケルンエヒトロート, PA ; 飽和ピクリン酸, PIA ; 過ヨウ素酸

実習全体の短縮化に大きく貢献すると考えられた。

4. 準備と後片付け時間の短縮

準備にかかる時間を短縮するために、脱パラ・水和は、実習室を開放しておき、休憩時間や放課後などを利用して、実習当日までに完了するように指導した。なお、糖質を証明する染色では、脱パラで止めておき、水和は実習当日に実施させた。このことにより、学生に対して時間外の拘束時間が生じたが、実習時間に占める準備時間は短縮できた。

次に準備と後片付けの両方にかかる時間を短縮するために、また、染色液等を班毎に作製させ、かつ実習後は廃棄させるので、資源の無駄遣いを極力少なくする目的で、作製する試薬液量は必要最低限量(染色液は1班あたり40~50ml, または150~200ml ; 分別液はそれぞれの整数倍)を、比例配分した処方で作製させた。表4にPTAH液の処方を示す。

次いで、同じく準備と後片付けの時間を短縮するために、以下の工夫を行った。即ち、ドーズの数を削減させるために、染色液の大半が親水性であることに着目し、同じドーズを用いて染色液と

表4 PTAH液の処方

試薬等	本法	通常法 ^{1)~3)}
ヘマトキシリン	150mg	1000mg
50%エタノール	1.5ml	10ml
精製水	120ml	800ml
10%PTA水溶液	30ml	200ml
5%過マンガン酸K水溶液	0.53ml	3.52ml
総量	約150ml	約1000ml

分別液を入れ替えた。つまり、1枚ずつ入れる数工程を除いて、切片は入れ替えずに、染色液を注ぎ易い容器に移し、切片を入れたドーズに直接水を入れて水洗し、次の染色液あるいは分別液を、水洗したドーズに直接入れるという方法を用いた(写真)。このことにより、通常法^{1)~3)}のドーズ数8.1個に対して、1.1個まで減らすことができた(表5)。

これらの結果、準備と後片付けの時間が短縮でき、染色法そのものに費やす時間の確保が可能になったが、最後に示した工夫には欠点として、水洗後のドーズ内壁の水滴により、次の染色液の濃度が低下する可能性が予想された。この方法によ



写真 ドーゼ数の削減法

1. 特染の一工程(A液で染色中、次のB液は作製後の状態である)。2. Step 1(切片を入れたままA液を容器に移す)。3. Step 2(ドーゼに直接、水道水を注ぎ水洗)。4. Step 3(B液と交換)。

る染色液の希薄化の程度を知るために、4種類のドーゼについて以下の方法で実験を行った。即ち、各種類8個、合計32個のドーゼに水を満たした。ドーゼの水を捨てた後に2、3回、口を下に向けて通常の速度で振り、水を切った。次いで、乾重量を測定済みのティッシュペーパーでドーゼ内壁をぬぐい、その重量を量ることにより、ドーゼ内に残った水の量を算出した。これを32個のドーゼについて実施し、以下の式から希薄化率を算出した(表6)。

希薄化率(%)

$$= \text{水滴の重量(mg)} / \text{ドーゼの容積(ml)} \times 100$$

5. 実際の実習の1例

1~4. で解析した点を考慮した結果、アレンジできた実際の実習の1例を表7に示した。なお、今回の検討で最も重要なことは、限られた実習時間にできるだけ多くの染色法を体験することであ

るが、同時平行して複数の染色を行っても教育効果は極めて悪いと考えられるので、異なる染色法は時間をずらして行うようにした。

III. 考 察

筆者は、対象の学生が検査技術専攻であるからには、在学中にこそ、一通りの重要な特染手技を体験させておくことに意義があると考え。学内実習で実施できなかった特染は、病院実習で体験させてもらえればよいという意見もあるが、施設によって実施される特染の種類が異なっているので、学生間に体験できたか否かの格差が生じる可能性がある。また、病院においては、特に作製に手間暇がかかる染色液や緩衝液は通常、出来合いの市販品が使用されており、自ら希望しない限り、学生は染色液の作製を体験することはない。染色液や緩衝液は個々の試薬の性質などを理解させる

表 5 使用ドーズ数の比較

染色名	本 法			通常法 ^{1)~3)}		
	200ml	50ml 溝付き	両ドーズ	200ml	50ml 溝付き	両ドーズ
AB	1	0	1	4	0	4
AB-PAS	1	0	1	10	0	10
AM	1	0	1	8	0	8
Bdn	0	1	1	0	9	9
CR	0	1	1	0	4	4
EVG	1	0	1	9	0	9
FM	0	1	1	0	10	10
F-R	1	0	1	5	0	5
GAF	1	0	1	12	0	12
Grm	0	1	1	0	10	10
Gct	0	1	1	0	10	10
HI-M	1	0	1	2	0	2
Hz	2	0	2	12	0	12
KB	1	0	1	14	0	14
MGP	1	0	1	3	0	3
MT	1	0	1	12	0	12
Orc	1	0	1	6	0	6
PAM	0	1	1	0	11	11
PAP	1	0	1	12	0	12
PAS	1	0	1	6	0	6
PTAH	1	0	1	6	0	6
BB	1	0	1	6	0	6
S-R	1	0	1	4	0	4
TB	3	0	3	3	0	3
W-Ag	1	0	1	15	0	15
計	22	6	28	149	54	203
平均	0.88	0.24	1.12 *	5.96	2.16	8.12 *
±SD	0.42	0.36	0.22	4.04	3.28	3.24

* p<0.01 (t-test)

表 6 ドーズ内水滴(mg)による染色液の希薄化率(%、※)

ドーズの 番号	200ml		200ml(PC製)		200ml, 溝付き		50ml, 溝付き	
	水滴	希薄化率	水滴	希薄化率	水滴	希薄化率	水滴	希薄化率
1	686	0.34	530	0.27	1150	0.58	390	0.78
2	640	0.32	1061	0.53	584	0.29	395	0.79
3	1274	0.64	740	0.37	944	0.47	434	0.87
4	482	0.24	545	0.27	1104	0.55	440	0.88
5	1281	0.64	538	0.27	674	0.34	593	1.19
6	953	0.48	584	0.29	854	0.43	380	0.76
7	1190	0.60	970	0.49	1146	0.46	442	0.88
8	1250	0.63	710	0.36	926	0.57	308	0.62
平均	970	0.48 ^{a)}	710	0.35 ^{b)}	923	0.46 ^{c)}	423	0.85 ^{a,b,c)}
±SD	279	0.14	161	0.08	164	0.08	55	0.11

※ 切片とバスケットの水滴による希薄化は除外した。PC；ポリカーボネート、

^{a-c)} p<0.05 (t-test)

表7 実習スケジュールの1例

10月30日(水)			
	13:00	14:00	15:00
A班	PAS		F-R
B班	PAM ①		
		W-Ag	KB ①
C班	細胞診の準備	H-M	S-R
合同	W-Ag用アンモニア銀液原液 / 銀染色一般用塩化金液		

10月31日(木)			
	13:00	14:00	15:00
A班	Gct		FM ①
		Grm ①	
B班	KB ②		ORO
		PAM ②	
C班	電顕技術		PTAH ①
合同	Gct用メセナミン銀液原液 / FM用アンモニア銀液原液 / Grm用緩衝液原液		

①、②は一夜法における初日と二日目を表す。

表8 本法の長所と短所(通常法^{1)~3)}との比較

	項目	本法	通常法
長所	1染色あたりのドーズの個数	1.1±0.2 ^{a)}	8.1±3.2 ^{a)}
	試薬量	少	多
	実習時間に占める染色操作以外の時間	短	長
	作業スペース	広	狭
	染色中の事故(容器転倒など)	少	多
	ガラス器具の破損事故	少	多
	水・洗剤使用量	少	多
短所	学生のコミュニケーション能力育成効果	大	小
	試薬調整時の混雑 / 混乱	多	少
	染色時間	1.05	1
	時間外の拘束(学生)	+	±
	時間外の拘束(教員)	3+	2+
	染色液の希薄化	2+, ※	+

^{a)} p<0.01 (t-test) ※: 水滴をぬぐえば通常法と同じになる。

ためにも、最初から作製させるべきであると考え

る。
本法による実習の長所と短所を、通常法^{1)~3)}による実習と比較して、表8に挙げたが、短所はほとんどないように見える。特に、使用器具の小型化およびドーズ数の削減により、作業スペースを拡張することができたことは、画期的なこと

であった。即ち、複数の顕微鏡やマップを置けるスペースの確保、染色中の容器転倒事故の減少などの効果があった。また、使用器具の小型化および器具数の削減は、持ち運び時や洗浄中の破損事故の減少にもつながった。

時間内に実習を終えるためには、自班のみならず他班の学生との協力も不可欠であり、コミュニ

ケーション能力の育成その他の波及効果が生じた。即ち、班毎に異なる染色を課したので、学生たちは実施済みの班との情報交換により、失敗を回避させるように努めていた。万が一、ある染色を失敗した場合には、他班が当該染色を実施する時に、染色列を借りて、場合によっては2回、再挑戦させることができた。なお、切片を配布した貴重症例を失敗した場合は、切片をできる限り脱色⁵⁾させ、再度染色するように指導した。

一方、本法による実習の最大の欠点として、多種類の染色液作製に必要な試薬、機器(天秤・攪拌器など)、および器具(計量用具・容器など)の数が多く、特に、実習開始後2、3回の慣れないうちは、試薬調整の際に天秤周辺の混雑あるいは混乱がみられた。これに関しては、なるべく試薬類が共通する特染同士を組み合わせることにより、混雑・混乱を最小限にすることができた。機器および器具に関しては、他教科の実習室から足りない物を借り出して間に合わせた。

本法のもう一つの欠点として、ドーズ内壁の水滴による染色液の希薄化がある。通常法においても、切片やバスケットの水滴による希薄化は避け難いが、本法ではそれが更に促進される。特に、50ml溝付きドーズの希薄化率は、200mlドーズの約2倍であったことから(表6)、本法で50mlのみを使う場合は、染色液の希薄化による劣化促進に注意を払う必要がある。しかしながら、これらの問題は水滴をぬぐうことにより解消することができ、この操作による時間的ロスは無視できると考えられる。

ここで報告した実習内容は、一見、詰込み過ぎと思えるが実施可能である。ゆとり教育の見直し

が行われている昨今、試していただける価値は充分あると思われる。将来、卒業生が豊富な実習体験を糧に精進し、積極的に病理医あるいは臨床医に働きかけ、3Kをものもしない病理屋の一員として、今以上に頼りにされる時代が到来することを願いつつ、本報告を終える。

IV. 結 語

今回報告した方法により、18~22種類、つまり国家試験出題基準に挙げられている特染の約半数を、1回の実習が3時間、12回分の実習で実習項目に採り上げることができた。

謝 辞

本稿で紹介した工夫については、同じ期間同僚であった江島 栄教授(現 NTT 西日本大阪病院病理科部長)に多くの助言をいただいた。この場を借りて深く感謝する。

文 献

- 1) 月刊 Medical Technology 別冊. 染色法のすべて. 東京: 医歯薬出版 1988.
- 2) 病理技術研究会, 編集. 病理標本作り方. 東京: 文光堂 1992.
- 3) 水口國雄, 編集. 新染色法のすべて. 東京: 医歯薬出版 1999.
- 4) 川島 徹, 三田村美紀子, 佐久間由子, 藤林真理子. 迅速PTAH染色. 病理技術 1983; 28: 36.
- 5) 日本病理学会, 編集. 病理技術マニュアル 3 病理組織標本作製技術 下巻 染色法. 東京: 医歯薬出版 1981.