原 著

パパニコロ染色に用いるヘマトキシリン液の検討

国立がんセンター細胞診

山岸紀美江 渡部 庸一 塩沢 勇治
 額 額 博 上井 良夫 田嶋 基男

はじめに

最近, 病院, 検査所等の用排水規制は厳しくなり注1~4, 細胞診に用いる染色液, 固定液の中にも検討を要するものが多数ある. 特に, 水銀をその成分中に含むハリスヘマトキシリン液は, 早急にその使用法と排水処理法を検討しなくてはならないものの1つである. 今回数種のヘマトキシリン液を試験し, ハリスヘマトキシリン液に代わるパパニコロ染色のための核染色液を得たので報告する.

材料と方法

1. 検討したヘマトキシリン液の条件

以下の条件を備えている液について試験検討を行った.

- (1) パパニコロ染色の核染色液として用いる.
- (2) 核染色法は原則として regressive 法¹⁾——過剰に染色し酸で分別する方法——を用いる.
- (3) 染色液の調製が容易なこと.
- (4) 染色液の保存が良く, 長期間有効であること.
- (5) 染色液成分中に有害物質を含まないこと.
- (6) 染色液の保守, 維持の容易なこと.
- (7) 染色液が市販された場合, 高価でないこと.
- (8) 核染色色調は対照染色色調とよく適合すること.
- (9) 核染色時間は1~3分以内であること.

2. 検討したヘマトキシリン液の種類

(1) 日本製 Gill-2	ヘマトキシリン末を
0.19~2 g/1,000 ml 含む.
(2) 米国製 Gill-1	
(3) 日本製 Gill-4	ヘマトキシリン末を
3.6~4 g/1,000 ml 含む.
(4) 米国製 Gill-2	
(5) 日本製 Gill-5	ヘマトキシリン末を
5~5.3 g/1,000 ml 含む.
(6) 米国製 Gill-3	
(7) 日本製 Lillie Mayer	

対照として日本製と米国製のハリスヘマトキシリン液を用いた. 日本製の(1), (3), (5), (7)液については, 酢酸を加えた場合と加えない場合についても検討した.

染色液の組成は表1に示した.

3. 検体の塗抹法と固定法

喀痰9件のうち, 7件の新鮮材料をすり合わせ塗抹し, 95%エタノール固定, 2件はサコマノ固定処理し, すり合わせ塗抹を行った. 胃洗浄液2件は遠沈し, 沈渣をすり合わせ塗抹, 95%エタノール固定を行った.

胸水, 腹水それぞれ4件ずつは新鮮材料を遠沈し, 沈渣を末梢血液方法で塗抹し, 95%エタノール固定を行った. 以上合計19件について検討を行った.

4. 染色方法

パパニコロ染色原法に準じて, サクラ精機製パパニコロ自動染色機を用いて染色した.

染色過程は以下のごとくである.

(1) 70%エタノール	15 秒間
(2) 流水水洗	20 秒間
(3) ヘマトキシリンにて核染色	1~2 分間
(4) 流水水洗	20 秒間
(5) 0.25%塩酸水で分別	5 秒間

On Use of Hematoxylin Solution without Harmful Chemicals for Papanicolaou Stain

Kimie YAMAGISHI, C.T., I.A.C., Yoichi WATANABE, C.T., I.A.C., Yuji SHIOZAWA, C.T., I.A.C., Hiroshi KOKETSU, M.D., Yoshio UEI, M.D., F.I.A.C. and Motoo TAJIMA, M.D., F.I.A.C.

Clinical Cytology, National Cancer Center
 昭和54年7月6日受付

注1 大平正芳: 政令第131号, 官報, 15688号: 6, 1979.

注2 東京都下水道局総務部庶務課編: 下水道法の一部改正の施行にともなう届出のしおり, 1~15, 1976.

注3 東京都下水道局編: 工場, 事業場の排水規制, 1~4, 1976.

注4 東京都下水道局編: 工場排水規制のあらまし, 1~21, 1978.

表1 ヘマトキシリン液の組成

	Gill-2 Japan	Gill-1 U.S.A.	Gill-4 Japan	Gill-2 U.S.A.	Gill-5 Japan	Gill-3 U.S.A.	Lillie Mayer Japan
Hematoxylin (g)	2.0	1.9	4.0	3.6	5.0	5.3	5.0
Sodium iodate (g)	0.2	0.2	0.42	0.4	0.52	0.5	0.52
Aluminum sulfate (g)	17.6	14.4	35.2	55.0	44.0	80.5	
Glacial acetic acid (ml)	(20)	(20)	(40)	40	(60)	60	20
Ethylene glycol (ml)	250	250	250	250	250	250	
Distilled water (ml)	730	730	730	710	730	690	700
Aluminum ammonium sulfate (g)							50
Glycerin (ml)							300

- (6) 流水水洗, 色出し 3 分間
 (7) 70%エタノール 15 秒間
 (8) 80%エタノール 15 秒間
 (9) 95%エタノール 15 秒間
 (10) OG-6 2 分間
 (11) 95%エタノール 20 秒間
 (12) 95%エタノール 15 秒間
 (13) 95%エタノール 15 秒間
 (14) EA-50 3 分間
 (15) 95%エタノール 20 秒間
 (16) 95%エタノール 20 秒間
 (17) 95%エタノール 15 秒間
 (18) 100%エタノール 30 秒間
 (19) 100%エタノール 20 秒間
 (20) 100%エタノール 20 秒間
 (21) キシロール 30 秒間
 (22) キシロール 30 秒間
 (23) キシロール 30 秒間
 (24) 封入

なお, 流水はすべて水道水を用いている。pH は約7である。

5. 染色結果判定の基準

(1) 対照染色との調和

核色調は OG-6, EA-50 による細胞質染色とよく調和する紫色調を良好とし, 褐色調は不可とした。

(2) 核内構造, 特にクロマチン構造の明瞭さ。

(3) 核小体, カリオゾーム, 性クロマチンの染別。

以上の観点から指導医3名, 細胞検査士3名がそれぞれ別に, 染色液名を伏せて判定し, 集計をした。

成 績

試験検討した結果を, A——優秀, B——良好, C——使用不可に分け, 表2に示し, 表2をまとめて表3に

示した。

検体別に染色結果をみると, 喀痰では, 日本製 Gill-5, 米国製 Gill-3 が良好であった。他の Gill 液は日本製, 米国製とも不良となる例が多かった。特に検体の性状が血性検体, 唾液様検体, 粘稠な検体では染色結果は不良になった。サコマノ法処理した細胞はかなり収縮し, 核は濃染傾向に染色された。

胃洗浄液は, どの染色液でも良好に染色された。体腔液は日本製が米国製より染色結果は良好であった。日本製の中ではヘマトキシリン末の含有量の多い製品の方が少ない製品より染色結果は良好であった。染色液に氷酢酸を加えた場合と加えない場合の両者を比較した結果, 染色態度, 染色時間にほとんど差は認められなかった。

以上の結果から, 染色性の良好なヘマトキシリン液は日本製の Gill-5 と Lillie Mayer であった。これらの液はハリスヘマトキシリン液に比べ, 液の保守管理上も優れている。すなわち, ハリスヘマトキシリン液は, 液上部, 染色バット, 染色かご等に浮上物, または沈殿付着物を生じやすく, 使用前に濾過しなくてはならず, また器具に付着した物質を洗い流すのも困難であるが, 上記の液にはまったく沈殿付着物, 浮上物は認められなかった。

考 案

水質汚濁防止法^{注1}, 下水道法^{注2}における総水銀の規制値はともに 0.005 p.p.m. である。ハリスヘマトキシリン液 1 l 中には酸化第二水銀 HgO, 2,500 mg 含まれている。このうち水銀量は約 2,315 mg である。下水道に 1 l のハリスヘマトキシリン液を規制値以内に稀釈して排水するには約 463 トンの水を必要とする。日常染色中に染色かごやスライドグラスに付着して排水中に失われるハリスヘマトキシリン量は 15 枚用染色かごで 1 回に約 3~5 ml, 20 枚用染色かごで約 5~8 ml, 50 枚用染

表 2 ヘマトキシリン各液の染色結果

		Gill-2 Japan	Gill-1 U.S.A.	Gill-4 Japan	Gill-2 U.S.A.	Gill-5 Japan	Gill-3 U.S.A.	Lillie Mayer Japan	Harris Japan	Harris U.S.A.
Sputum	1	B	B	B	A	A	A		A	C
	2	A	A	A	C	A	A		A	B
	3	C	C	C	C	A	A		A	A
	4	B	B	B	A	A	A		A	A
	5	A	A	A	A	A	A		A	A
	6	C	C	C	B	B	B		A	B
	7	B	B	B	B	B	B		A	
	8	B				B		B	B	
	9	B				B		B	B	
Gastric washing	1	B	A	A	A	A	A		A	A
	2	A	A	A	A	A	A		A	A
Pleural effusion	1	B	C	B	C	B	C	A	A	
	2	B				A		A	A	
	3	B				A		A	A	
	4	C				A		B	B	
Peritoneal effusion	1	C				A		A	A	
	2	A				A		B	A	
	3	C				B		A	A	
	4					A			A	

A: Excellent, B: Good, C: Poor

表 3 染色結果まとめ

	Specimens	Excellent (%)	Good (%)	Poor (%)
Gill-2 Japan	18	22	50	28
Gill-1 U.S.A.	10	40	30	30
Gill-4 Japan	10	40	40	20
Gill-2 U.S.A.	10	50	20	30
Gill-5 Japan	19	68	32	
Gill-3 U.S.A.	10	70	20	10
Lillie Mayer Japan	9	56	44	
Harris Japan	19	84	16	
Harris U.S.A.	8	63	25	12

色かごで約 10~12 ml である。それぞれの水銀量は約 6.9~11.6 mg, 約 11.6~18.5 mg, 約 23.2~27.8 mg である。

これらを規制値内に希釈するにはそれぞれ, 約 1.4~2.3 トン, 約 2.3~3.7 トン, 約 4.6~5.6 トンの水が必要とする。しかし通常染色中の流水量は 10 秒間で約 1 l, 5 分間で約 30 l であるから明らかに規制値を超過している。病院では一般に 1 日 1 床 1 トンの水を使用しているといわれているので, 総排水量からみると 1 l のハリスヘマトキシリン液中の水銀だけなら規制値以内に希釈し

て排水することの出来る施設もあろう。しかし病院にはほかにも規制される物質の排出は多数あり, この方法は不可能に近い。そこで使用したら何かの処理方法, たとえば水銀はイオン交換法, または化学処理方法を行うのが望ましい。しかしこれらの方法は場所, 費用, 用具を必要とするので出来る限り有害物質を含まない代替品に代えていく方向が望ましい。

ハリスヘマトキシリン液の代替品として病理組織標本のヘマトキシリンエオジン染色に広く用いられている Mayer 液を当初考えた。しかし, この液は染色液有効期間が約 1~3 カ月以内で短いこと, および核染色色調は褐色調になりやすく OG-6, EA-50 との調和を欠くこと, 以上 2 点から採用し得なかった。

1974 年 Gill ら²⁾ により発表された Half-oxidized hematoxylin は, 1977 年東京で行われた C.T. (I.A.C.) 試験にも用いられ, 米国ではかなり使用されている³⁾。

今回, 米国製と日本製を比較検討し, 日本製の方が染色結果良好であった。Gill ら^{2,3)} は, 細胞診にはヘマトキシリン末を 1 l 中に 2 g 含む処方を推薦しているが, われわれは 5 g 含む液で良好な結果を得た。Gill ら²⁾ は核の色調を blue~blue-black を良好としているのに対して, われわれはハリスヘマトキシリン液の色調に近い

dark-purple を良好としたことによる差かとも考えられる。われわれは全員暗青色調を良好な染色態度とはしなかった。

核小体を鮮明な赤色調に染め出すには、核染色法は progressive 法——核を適度に短時間で染色し分別を行わない方法——の方が regressive 法より優秀である。すなわち regressive 法では核 DNA のほかに核内物質、RNA、細胞質等も共染し、それらを稀塩酸水で分別するが、しばしば十分に分別し得ず、核小体とクロマチンの識別が困難であったり、核小体付着クロマチンが濃染して核小体形態を明確に観察し得ないことがある。ただし、progressive 法では染色時間が非常に短いため、腺癌細胞の立体的集塊や、厚目の塗抹標本では染色むらを生じやすい。そこでわれわれは regressive 法を用いつつ、核小体も鮮明に染色しうる時間として 1~2 分間を採用し、良好な結果を得た。

癌細胞診スクリーニングにおいて、淡染傾向の標本は見落しの原因になりやすい。やや濃染傾向の標本では見落しは少なくなり、スクリーニング時検鏡者の疲労は少なくなる。ただし、濃染傾向の標本ではやや読み過ぎになりやすい。われわれがパパニコロ染色において、ヘマトキシリン液を核染色に用いるのは、DNA の組織細胞化学的指標として用いているのではなく、細胞形態の概観を観察するために用いるのであるから、ヘマトキシリン末を多量に含む Gill 液を regressive 法で用いるのは良好な方法であると考えられる。

なお、染色過程中、流水水洗には水道水を用いたが、pH 7 より著しく低い場合水道水は色出しには向かないので、Gill らの用いている Scott⁴⁾ 水を用いるか、弱アルカリ水を用いる方が良いと思われる。また、退色の原因の一因として水道水中の成分が影響することも考えられるので、一度沸騰させ冷却した水を利用すればガス成分については安全であろう。

さらに Gill 液は使用前の濾過は必要ないが、細胞の cross-contamination 防止のため使用後に濾過する必要があることをつけ加えておく。

結 語

1. パパニコロ染色のハリスヘマトキシリンの代替品

としてギルヘマトキシリンおよび、リリーマイヤーヘマトキシリンは有用であった。

2. ギルヘマトキシリンは 1 l 中にヘマトキシリン末を 5 g 含む処方が染色良好であった。

3. 日本製は米国製ギルヘマトキシリンより優秀な染色結果を示した。

4. 核染色時間は 1~2 分間が良好であった。

Summary

The cytological diagnosis of malignancy is based on nuclear findings. Hematoxylin solution is used to demonstrate this nuclear detail. Formula for making hematoxylin solution most often used for smears is Harris.

Recently, harmful chemicals; Cd, As, Hg, Cr, P, CN, PCB, etc., are limited in use. Harris hematoxylin solution contains plenty of mercuric oxide. We have to care about use of it.

Our present study was hematoxylin solution without harmful chemicals. Based on our results, two useful formulas for making hematoxylin solution were Gill and Lillie Mayer for Papanicolaou stain.

文 献

- 1) Danos, M. L.: The Papanicolaou staining procedure — Compendium on cytopreparatory techniques —; Tutorial proceedings, 4(2): 10~15, 1976.
- 2) Gill, G. W., Frost, J. K. and Miller, K. A.: A new formula for a half-oxidized hematoxylin solution that neither overstains nor requires differentiation, Acta Cytol., 18: 300~311, 1974.
- 3) Gill, G. W. and Miller, K. A.: Staining —, Compendium on cytopreparatory techniques —, Tutorial proceedings, 4(2): 16~33, 1976.
- 4) Scott, S. C.: On successive double staining for histological purposes (preliminary note). J. Path. Bact., 16: 390~398, 1911~1912. 2) より引用.