

令和5年度 青臨技精度管理調査報告 病理細胞部門 病理

部門長 弘前大学病院 熊谷 直哉  
精度管理委員 青森市民病院 長谷川 多紀子

I. はじめに

ベルリンブルー染色は組織標本において、3価の鉄イオン、またはイオン化しうる状態で存在するヘモジデリンを染めることが主な目的である。

今年度はベルリンブルー染色の染色評価を行った。

II. 参加施設数

15 施設 (昨年は 13 施設)

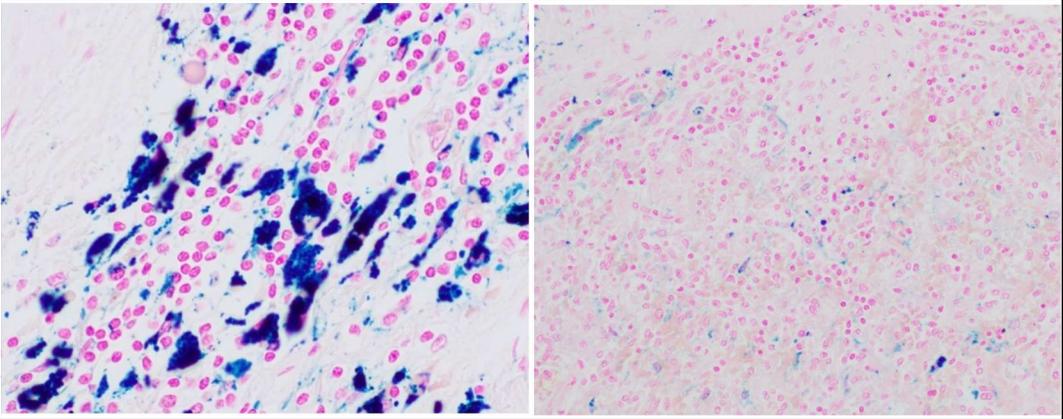
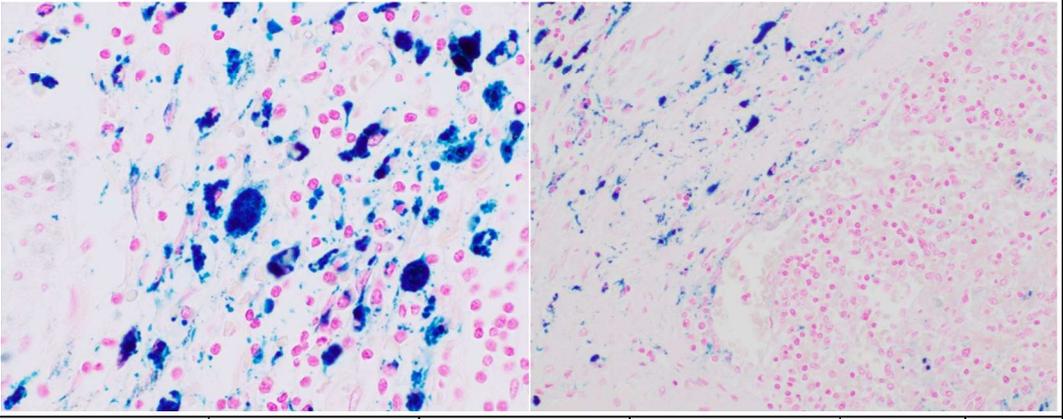
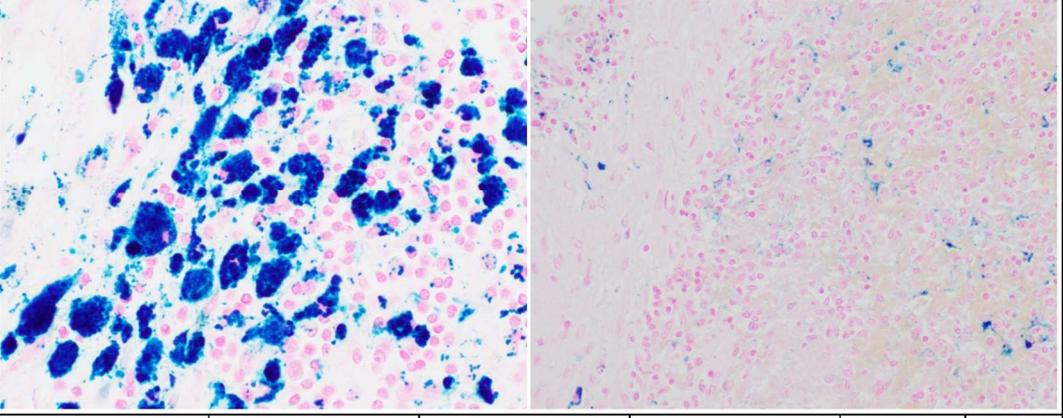
III. 調査方法

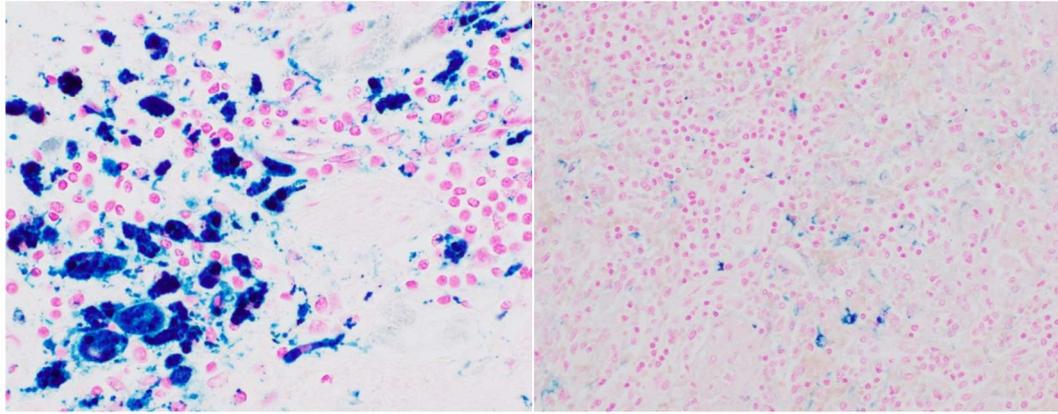
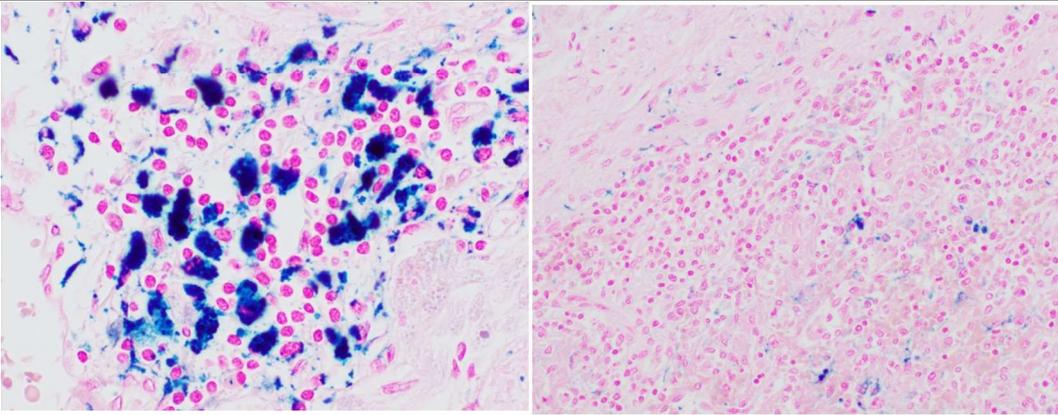
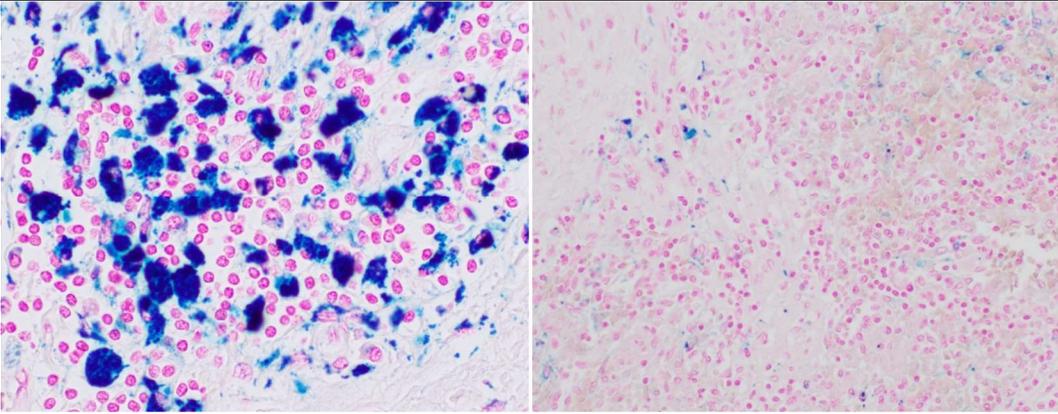
未染色スライド 2 枚(剖検材料、脾臓 3  $\mu$ m)を各施設に配布し、ベルリンブルー染色を実施していただいた。染色済スライドは当院に返送していただき、当院でベルリンブルー染色の評価を行った。

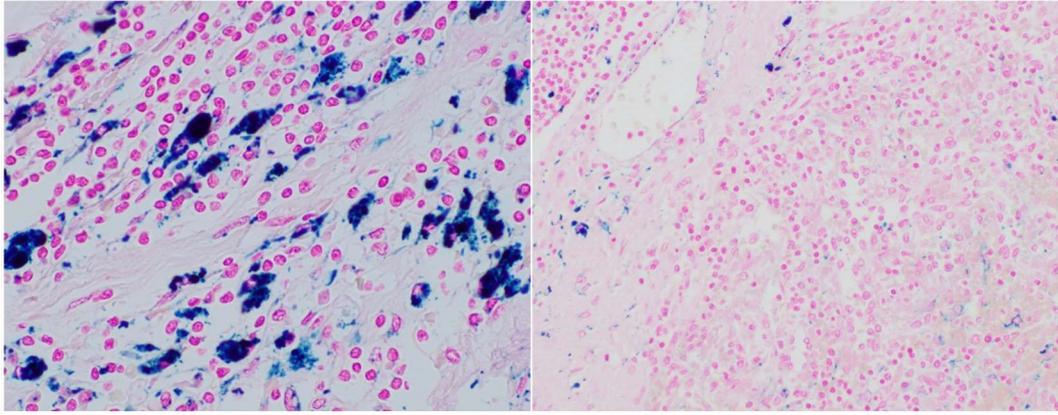
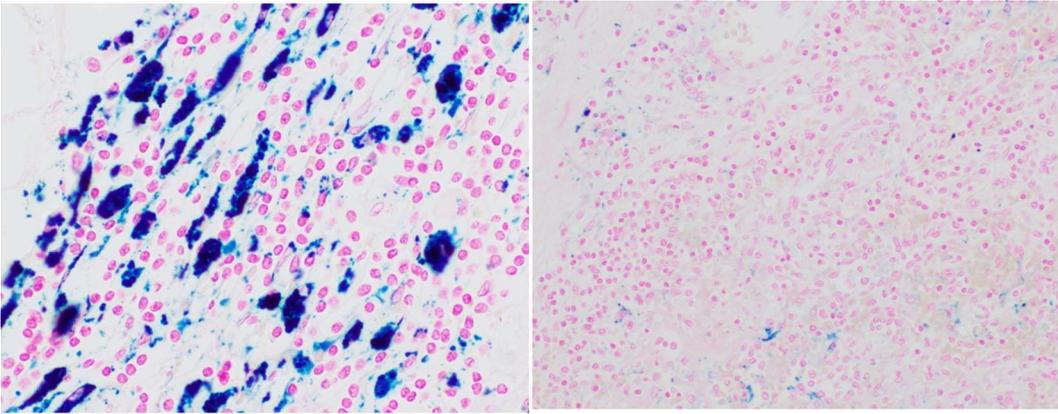
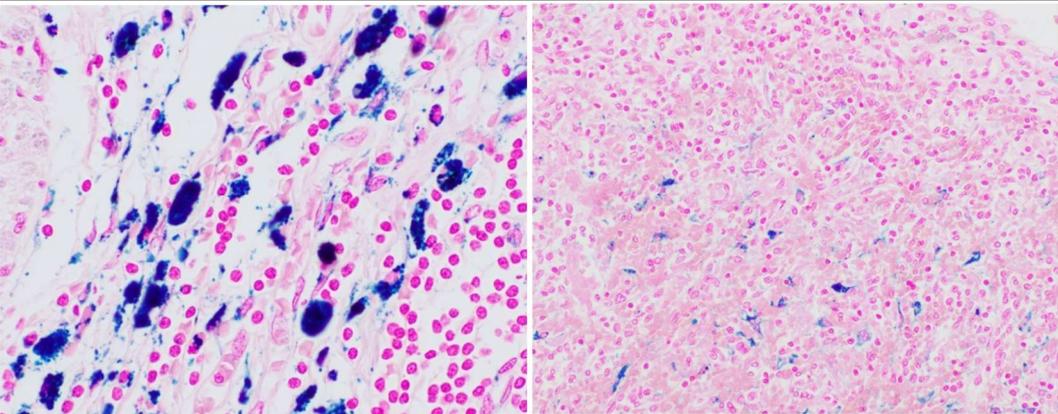
IV. サーベイの評価

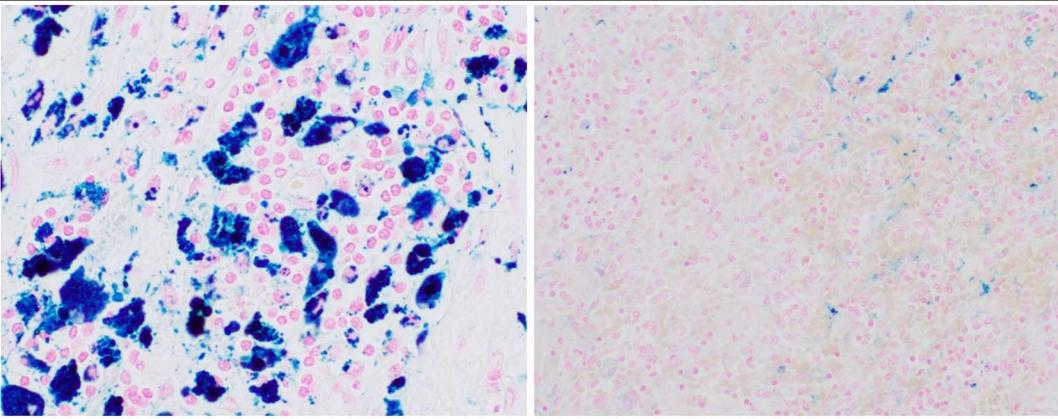
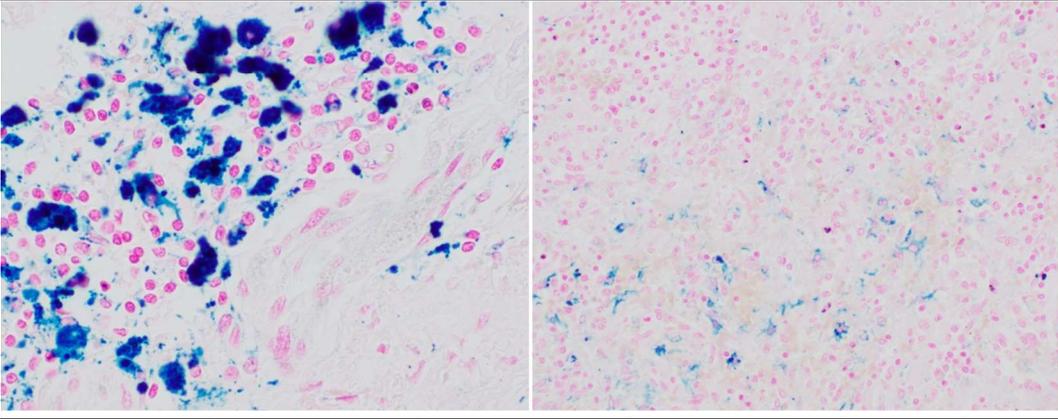
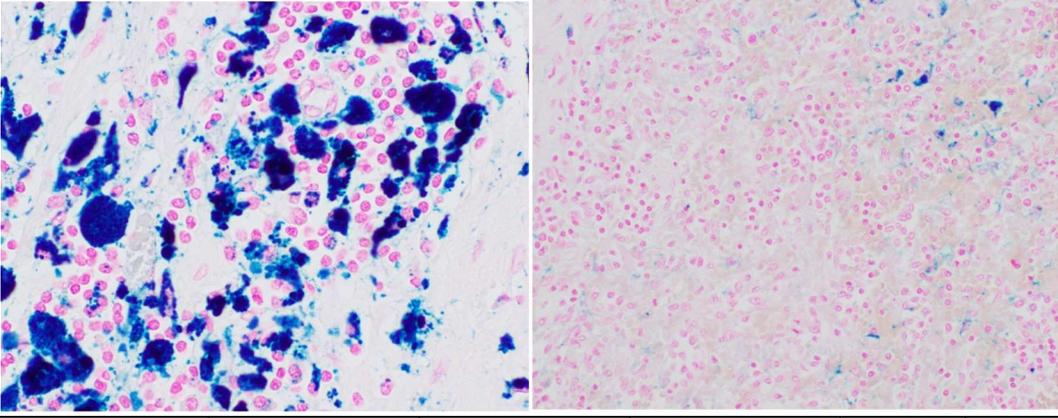
病理医 1 名、認定病理技師 1 名で、鉄顆粒の染色性、後染色・対比染色の染色性の 2 項目をそれぞれ良好 2 点、やや濃い・やや薄い 1 点、濃い・薄い 0 点とし、鉄顆粒の局在の分かりやすさ、鉄顆粒と後染色のコントラスト・バランスの 2 項目をそれぞれ良好 2 点、適 1 点、不適 0 点として評価を行った。評価者 2 名の総合点で A (良好: 16~12)、B (可: 11~6)、C (不適: 5~0) の 3 段階評価とした。

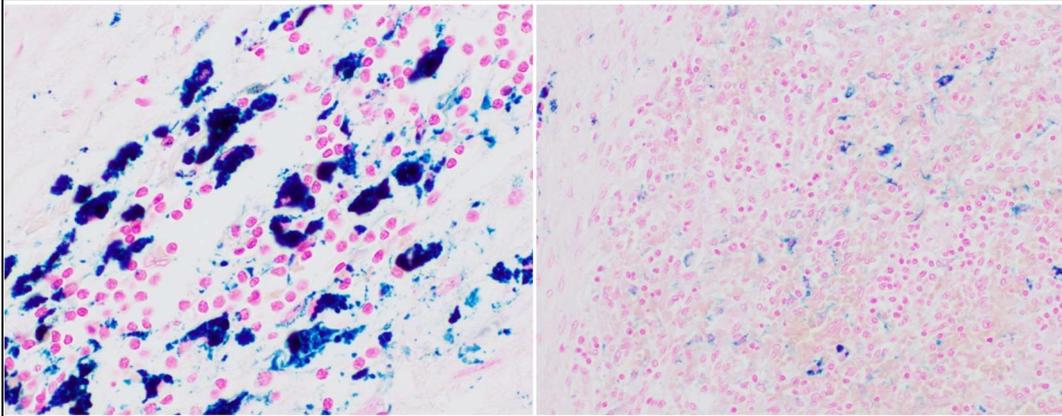
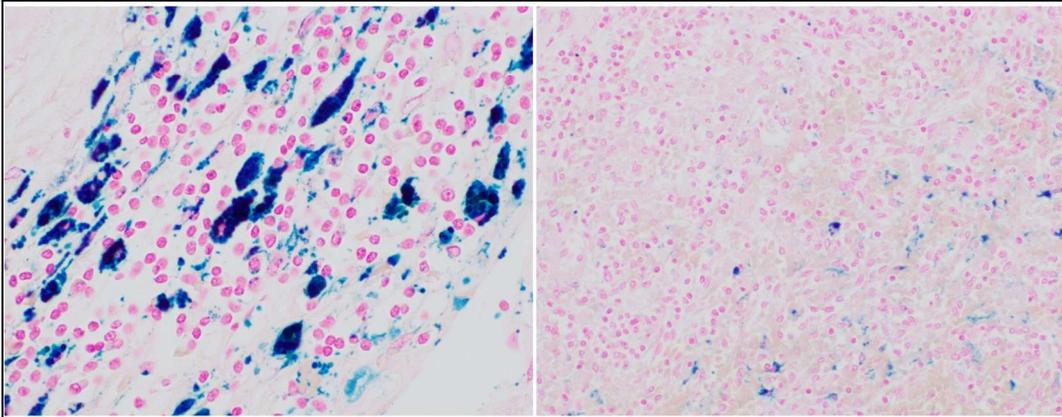
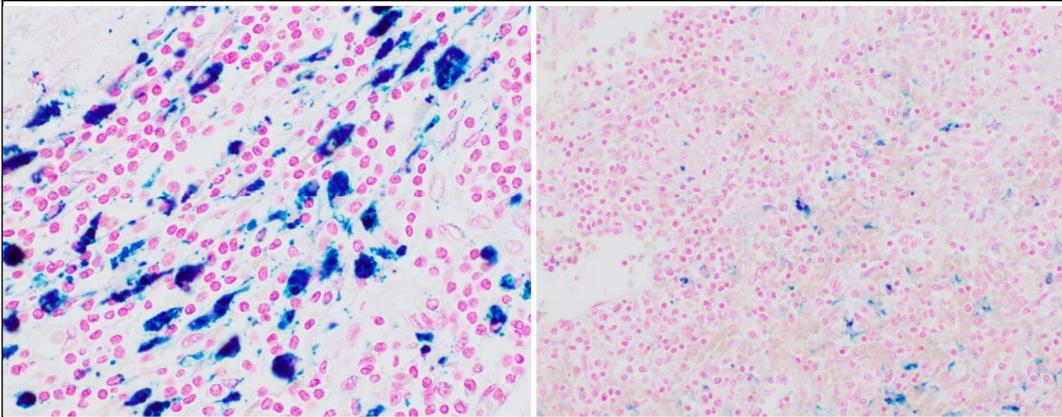
V. 各施設の染色結果と評価

施設番号 1						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		
施設番号 5						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	1(やや薄い)	2	14	A
評価者B	2	2	1(やや薄い)	2		
施設番号 26						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		

施設番号 32						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	1(やや濃い)	2	2	2	15	A
評価者B	2	2	2	2		
施設番号 34						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	1(やや濃い)	2	1(やや濃い)	2	13	A
評価者B	2	2	1(やや濃い)	2		
施設番号 38						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	1(やや薄い)	2	14	A
評価者B	2	2	1(やや薄い)	2		

施設番号 43						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		
施設番号 54						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		
施設番号 66						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	1(やや濃い)	2	1(やや濃い)	2	13	A
評価者B	2	2	1(やや濃い)	2		

施設番号 72						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	1(やや薄い)	2	14	A
評価者B	2	2	1(やや薄い)	2		
施設番号 79						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		
施設番号 89						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		

施設番号 90						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		
施設番号 91						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		
施設番号 92						
						
	鉄顆粒の染色性	局在の分かりやすさ	後染色の染色性	全体のバランス	合計点	総合評価
評価者A	2	2	2	2	16	A
評価者B	2	2	2	2		

VI. 各施設の反応液組成と染色工程

施設番号	1	5	26
ベルリン青反応液組成	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 2%塩酸水等量混合液
染色工程			
脱パラフィン			
水洗	蒸留水 2分×3回	蒸留水水洗	蒸留水水洗
ベルリン青反応液	30分	20分	30分
水洗	蒸留水 2分×3回	蒸留水 5分	流水水洗
ケルンエヒトロート	5分	5分	2分
水洗	1分	軽く流水水洗	水洗

施設番号	32	34	38
ベルリン青反応液組成	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 2%塩酸水等量混合液
染色工程			
脱パラフィン			
水洗	蒸留水水洗	流水水洗 5分、蒸留水 2分×3回	水洗
ベルリン青反応液	20分	30分	30分
水洗	蒸留水水洗	蒸留水 1分、流水水洗 5分	水洗
ケルンエヒトロート	5分	2～20分（今回は5分）	10分
水洗	流水水洗	軽く流水水洗	水洗

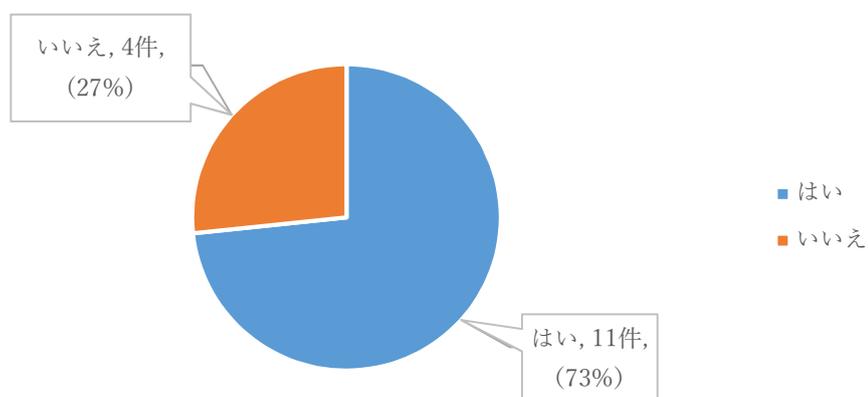
施設番号	43	54	66
ベルリン青反応液組成	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液
染色工程			
脱パラフィン			
水洗	蒸留水 2分×2回	蒸留水水洗	蒸留水水洗
ベルリン青反応液	30分	20分	30分
水洗	蒸留水 2分×3回	水洗	蒸留水水洗
ケルンエヒトロート	3分	5分	5分
水洗	流水水洗	流水水洗	素早く流水水洗

施設番号	72	79	89
ベルリン青反応液組成	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 2%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液
染色工程			
脱パラフィン			
水洗	蒸留水水洗 3回	蒸留水水洗	蒸留水 2分×3回
ベルリン青反応液	20分	30分	30分
水洗	蒸留水 3回	水洗	蒸留水 2分×3回
ケルンエヒトロート	5分	5分	5分
水洗	素早く流水水洗	水洗	軽く水洗 (5dip)

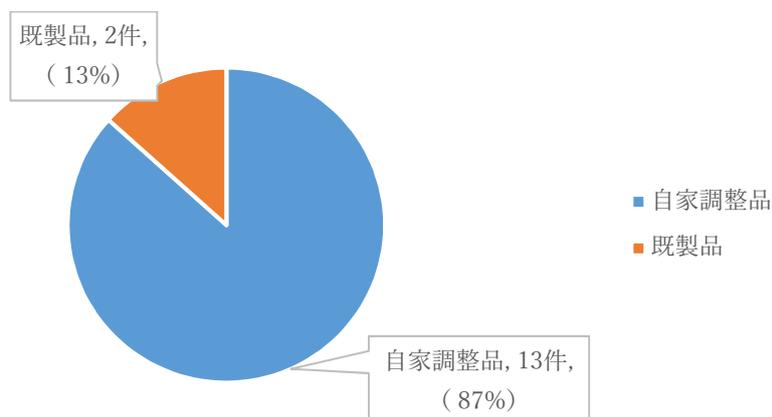
施設番号	90	91	92
ベルリン青反応液組成	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液	2%フェロシアン化カリウム 1%塩酸水等量混合液
染色工程			
脱パラフィン			
水洗	滅菌蒸留水 3回	蒸留水水洗 2回	蒸留水2分×2回
ベルリン青反応液	20~30分	30分	30分
水洗	蒸留水充分に洗浄	蒸留水3回×1~2分 (今回は2分)	蒸留水2分×2回
ケルンエヒトロート	8分	3~5分 (今回は3分)	5分
水洗	軽く水洗	水洗10秒	蒸留水 (15回ほど上下)

## VII. アンケート調査

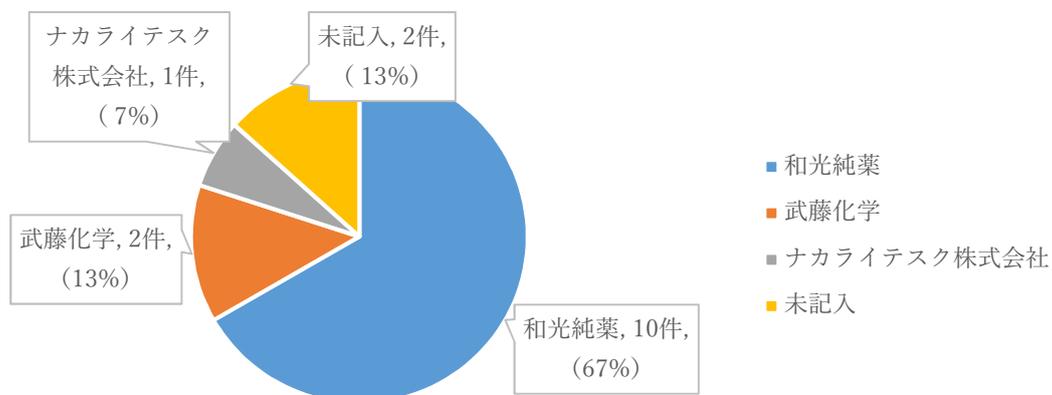
設問1：ルーチンでベルリンブルー染色を行っていますか。



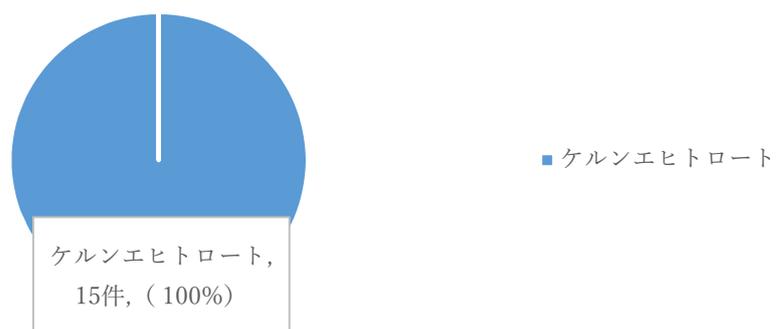
設問2：フェロシアン化カリウム反応液は既製品・自家調整品どちらですか。



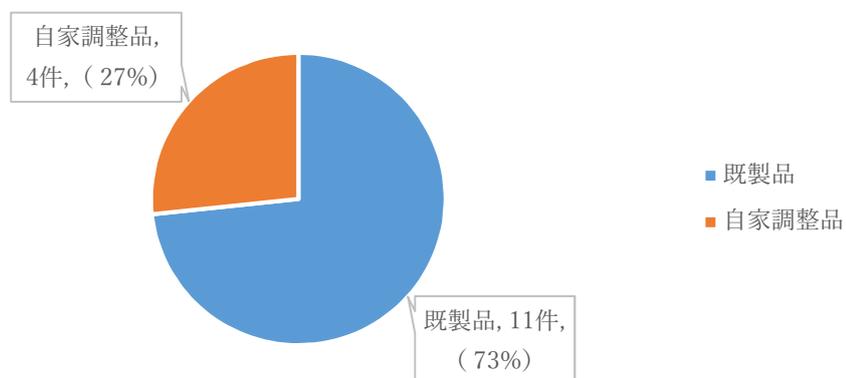
設問3：フェロシアン化カリウムのメーカーはどちらですか。



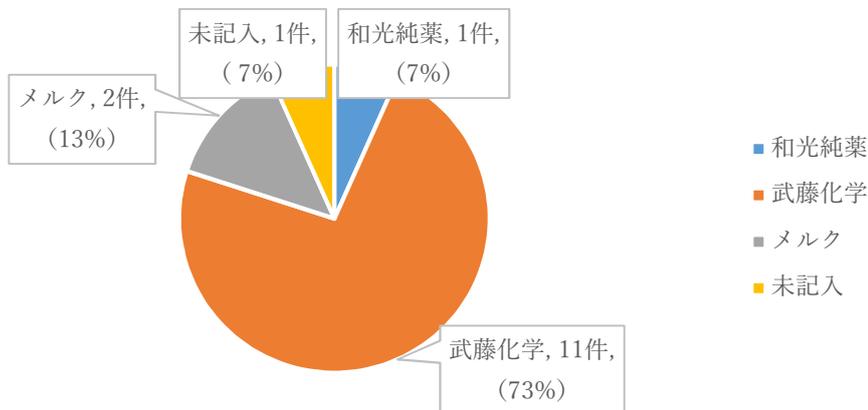
設問4：ベルリンブルー染色の後染色は何を使用していますか。



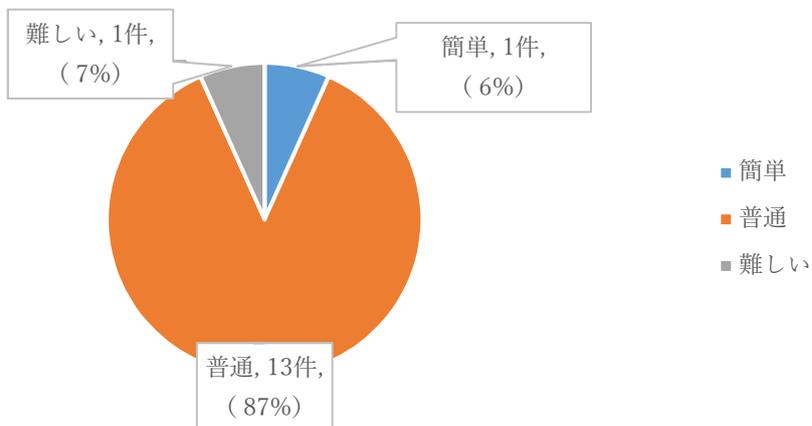
設問5：ケルンエヒトロート染色液は既製品・自家調整品のどちらですか。



設問6：ケルンエヒトロートのメーカーはどちらですか。



設問7：今回のサーベイの難易度はどうでしたか。



設問8：工夫や苦勞した点

- ・2%フェロシアン化カリウム水溶液と1%塩酸水を使用直前に混合し、ベルリン青染色液とする。
- ・水洗を十分にする。
- ・薄切時のコンタミに注意する。
- ・ベルリン青染色液前後の水洗は蒸留水使用。
- ・染色前に滅菌水にて器具を洗浄している。
- ・陽性コントロール切片と一緒に染色している。
- ・脱パラ後の染色液に入れる前に、水道水中の鉄分を考慮し、精製水の洗浄を十分行う。
- ・①ベルリン青反応液前はスライドガラス(切片)を蒸留水でよくすすぐ。
- ②ベルリン青反応液は使用直前に作製する。
- ③必ずコントロール標本も同時に染色する。
- ④ピンセット等の金属製品の鉄分混入に注意する。

設問9：今回のサーベイについての意見・質問

- ・ 忘れた頃にオーダーが出されるので、試薬管理に十分留意したい。
- ・ 他施設の染色頻度はどのようなものでしょうか？当院は1～2回/年程度です。

回答：当院は令和4年度で26件ありました。  
(マルク23件、卵巣1件、小脳1件、皮膚生検1件)

- ・ 送付された標本が1枚割れていました。

回答：申し訳ございません。

## VIII. ベルリンブルー染色について

ベルリンブルー染色は組織標本において3価の鉄イオン、またはイオン化する状態で存在するヘモジデリンは、ヘモグロビン由来の黄褐色から茶褐色の色素で、出血後の組織や細胞内に認められる。鉄代謝異常を伴う疾患、ヘモジデロシス、ヘモクロマトーシスの証明、アスベスト小体の検索として用いられる。また、血液検査においては赤芽球の鉄代謝異常の評価や血液疾患、特に骨髓異形成症候群の病型分類には必須の染色である。

染色原理は3価の鉄イオンが、フェロシアン化カリウムと結合すると、青色のフェロシアン化鉄（ベルリンブルー）が形成される。この点を利用した染色である。この反応は非常に鋭敏で3価の鉄イオンのみに反応する。この反応は鉄の存在下で速やかに反応し、青色を呈する。反応時間が長いと陽性部位ににじみが生じることがある。



組織の蛋白基質には人工的に鉄が吸着しやすく、マイクローム刃、金属製器具からの吸着に注意する記載が多い。そのため水道水の使用は避け、染色に入る前は必ず精製水で洗浄を行う。金属製のピンセットや染色かごの使用を避けることが必要である。マイクローム刃は一本刀を研磨して使用していた時代に比べ現在は樹脂コーティングが施されているため比較的影響はないと考える。

フェロシアン化鉄の感度限界は0.002 $\mu\text{g}$ と非常に微量である。市販の塩酸水には2級品で鉄100 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、特級品で20 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ 、鉄試験用無鉄の塩酸水でも0.7 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ の鉄が含まれており、いずれの塩酸を使用しても鉄の混入は理論的に避けられない。また市販の精製水も鉄含有量が0.1 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ で感度限界を上回るが、日常の病理診断においては影響がないと考えられる。調整した反応液は混合直後は淡黄色透明の液であるが、時間とともに緑色となる。フェロシアン化カリウムは鉄の作用によってその一部がferrocyanhydric acidに分解され、3価の第二鉄塩となる。この化合物が残りのフェロシアン化カリウムと反応してベルリンブルーを形成し、これが組織に非特異的な反応として吸着し、判定を困難にさせる場合がある。そのため時間が経ち、緑色を呈した反応液は使用しない。

## IX. 考察

今年度の精度管理調査はベルリンブルー染色を行った。参加施設は15施設と昨年より2施設多い参加となった。アンケート調査では約3割の施設でベルリンブルー染色をルーチンで行っていないとの回答があった。ベルリンブルー反応液は2%フェロシアン化カリウム1%塩酸水の等量混合液と2%フェロシアン化カリウム2%塩酸水の等量混合液を使用している施設があり、染色時間は20分と30分だったが、組成や染色時間による鉄顆粒の染色性の濃淡に影響は出なかった。また、フェロシアン化カリウムのメーカーによる染色性の差も明らかではなかったと考えた。ケルンエヒトロートの染色時間は最も短い施設で1分、最も長い施設で10分となっていたが、5分で染色している施設が多かった。施設によってはケルンエヒトロートの染色性にやや濃い・やや薄いの評価があったが、染色時間では染色性に差はみられなかった。今回はケルンエヒトロート染色液の組成を問わなかったため原因は不明である。ただし、ケルンエヒトロートは作製から時間の経ったものは染色性の低下があるといわれているため、やや薄いとされた施設は作製日や開封日による影響があった可能性も否定できないと考えた。

## X. まとめ

今回の評価では多少の鉄顆粒の染色性、ケルンエヒトロートの染色性ともに濃淡はあったが、いずれも問題なく全施設で良好であるA評価であった。

## XI. 参考資料

- ・日本病理学会：病理技術マニュアル3 病理組織標本作製技術（下）染色法，医歯薬出版株式会社，137-139，1981
- ・一般社団法人 日本臨床検査技師会：病理検査技術教本，丸善出版，186-189，2017
- ・月刊 Medical Technology 別冊：最新染色法のすべて，医歯薬出版株式会社，121-123，2011
- ・病理技術研究会：病理標本の作り方，文光堂，170-171，1992
- ・実践 病理組織細胞診染色法カラー図鑑〈第三版〉，近代出版，134-135，2008

## 謝辞

昨年度に続き、評価者としてご協力いただいた青森市民病院病理診断科 楠美 智巳先生に感謝申し上げます。