Ⅵ．パパニコロウ染色

Papanicolaou stain

目的

パパニコロウ染色は細胞診断のための染色である。細胞診は癌の診断のための検査法で、スクリーニングとしては子宮癌や肺癌の検診に取り入れられ、穿刺吸引細胞診や擦過細胞診は、組織診断と同等の診断価値が与えられるようになり、癌の早期診断と治療において細胞診の価値はますます大きなものとなっている。

原理

OG-6 液には orange G、EA-50 液には eosin Y、lightgreen SF の酸性色素が含まれている。分子量の大きさは orange G ＜ eosin Y ＜ lightgreen SF であり、色素の拡散度は分子量の小さい orange G が大きく、lightgreen SF では少ない。細胞質構造が緻密なものには分子量の小さい色素が入りやすく、(例: 角化型扁平上皮細胞　：オレンジ好性)、疎なものには両方入りこむが、分子量の大きい色素は移動性が少なく、荷電が大きいので細胞内に吸着されやすい（例：非角化型扁平上皮細胞、腺細胞：ライトグリーン好性)。

<u>準備するもの</u>

1)　組織捺印塗抹標本

小さい組織の場合はピンセットでつまみ、スライドガラス上にころがすようにして塗抹する。

2)　固定液

95%～100%エタノールと coating 固定剤がある。coating 固定剤はポリエチレングリコールとプロピルアルコールが主成分でスプレー式と滴下式があり、細胞材料を塗抹後素早く噴霧または滴下して塗抹面を覆い、自然乾燥させる。

3)試薬

・ギル・ヘマトキシリン液
・ OG-6 液
・ EA-50 液
・ 1%塩酸アルコール
・ 1%アンモニアアルコール

染色操作

１）固定	100%エタノール	15～30 分
２）親水		
	80%エタノール	5～10 回出し入れ
	70%エタノール	5～10 回出し入れ
	流水	
３）核染色	ギル・ヘマトキシリン	2 分
４）洗浄	流水	余分な色素を洗い流す
	70%エタノール	5～10 回出し入れ
５）脱色分別	＊1	
	1%塩酸アルコール	5～8 回出し入れ
６）洗浄	流水	水が弾かなくなるまで
	70%エタノール	5～10 回出し入れ
７）核の色だし	1%アンモニアアルコール	30～60 秒
８）洗浄	70%エタノール	5～10 回出し入れ
	70%エタノール	5～10 回出し入れ
	100%エタノール	5～10 回出し入れ
９）細胞質染色	OG-6　＊2	2 分
１０）洗浄	100%エタノール	5～10 回出し入れ
	100%エタノール	5～10 回出し入れ
１１）細胞質染色	EA-50　＊2	2 分
１２）洗浄	100%エタノール	5～10 回出し入れ
	100%エタノール	5～10 回出し入れ
１３）脱水	100%エタノール	5～10 回出し入れ
	100%エタノール	5～10 回出し入れ
	100%エタノール	5～10 回出し入れ
１４）透徹	キシロール	5～10 回出し入れ
	キシロール	5～10 回出し入れ
	キシロール	5～10 回出し入れ

注意事項

＊1：核の色を脱色しすぎたらもう一度染め直す
＊2： OG-6 液と EA-50 液の染色後のエタノールはすべて 100%にする。

染色態度

・核　　暗紫色
・ 細胞質
　扁平上皮細胞
　　基底細胞　　濃青緑色
　　傍基底細胞　　濃青緑色～淡青緑色
　　中層細胞　　淡青緑色
　　表層細胞　　淡赤色～橙赤・橙黄色
　腺系細胞　　淡青緑色
　核小体　　暗赤色～暗青紫色
　赤血球　　淡赤色～淡青緑色

Ⅶ. ギムザ染色

Giemsa stain

目的

細胞診におけるギムザ染色の目的は、①湿固定によるパパニコロウ染色で細胞の剥離が多い液状検体に対して細胞保持率の高い標本作製法としての利用、②造血器腫瘍や非上皮性腫瘍の鑑別診断としての利用、③迅速細胞診としての利用があげられる。

原理

ギムザ染色液は塩基性色素のメチレン青とその酸化誘導体であるメチレンアズールとエオジンの酸性色素との混合液である。このアズール色素はエオジンと結合し、アズール青・エオジネートを形成する。これらの色素は、末端のメチル基の違い（極性の異なり）や細胞内へ浸透する分子の影響によって染色性が異なり、比較的メチル基の少ないアズール・エオジネートは細胞質のみならず核内にも浸透し、核酸のリン酸基と結合し、赤紫色調の核に染色される。一方、比較的分子の大きく、極性の強いメチレン青は、細胞質の蛋白質と結合し、青色調を呈する。

<u>準備するもの</u>

1)　ギムザ原液
2)　メイ・グリュンワルド液
3)　pH 6.4 リン酸緩衝液

染色操作

１）準備　　塗抹乾燥標本を準備
２）固定・染色
　メイ・グリュンワルド液を 10～15 滴滴下　＊1
　　1～2 分
３）染色　　リン酸緩衝液 10～15 敵を追加　＊2
　　1～2 分
４）洗浄　　ギムザ希釈液で前液を洗い流す　2～3 秒
５）染色　　ギムザ希釈液を満載　＊3　　20～30 分
６）洗浄・乾燥
　　標本の端から流水で水洗し、完全乾燥　＊4
７）透徹　　キシレン　　1～2 分

注意事項

＊1：メイ・グリュンワルド液の量が少なかったり、時間をかけ過ぎると、メタノールが蒸発し表面が膜状にムラが出来るので注意する。

＊2：リン酸緩衝液は pH6.4～6.8 を用い、メイ・グリュンワルド液とよく混和するように口で吹く。
＊3：ギムザ希釈液は使用の都度作製すること。
：流水水洗する場合は、標本の端からゆっくり水を盛り染色液の結晶が浮くようにして洗う。

染色態度

細胞質は淡青色～青藍色に、核は紫色、核小体は淡い紅色～淡青色に染まる。また、細胞質内のアズール顆粒やアウエル小体は赤色に、好中球の好中性顆粒は淡橙色に、好酸性顆粒は赤橙色に、好塩基性顆粒は濃紫色に染まる。