

愛知県臨床検査標準化ガイドライン

# 病理組織学的検査

標準作業書

【検体受付から薄切】

第1版

平成21年3月

愛知県臨床検査標準化協議会

AiCCLS : Aichi Committee for Clinical Laboratory Standardization

## 発刊によせて

愛知県臨床検査標準化協議会  
会長 大野 和美

近年、医療情勢の悪化や医療保険制度改革などの影響を受けて、医療崩壊が“点”から“面”へと変化し進んできている。このような医療環境の中で、医療施設の運営には医療社会情勢、医療技術評価、DRG/PPS、EBM、クリニカルパス、リスクマネジメントなどのキーワードのもと、総合的な経営能力が求められている。限られた枠の中でいかに良質な医療と効率の良い医療サービスを安定的に供給していくかがこれからの医療施設運営のキーポイントで、EBMによる学問的な裏付けと標準化を必要とする医療評価の時代となっている。我々の医療を取り巻く環境は大きく変化し、すでに『チーム医療』を無くしては臨床検査技師の職域も成り立たない状況となっている。臨床検査技師だからこそ、今まで培った知識や経験によって検査データが理解でき、また患者さんのためになる検査につながることから、臨床検査技師がチーム医療に参画することは意義があると確信する。

このように、現代の医療に纏わる様々な要求に関して臨床検査は非常に重要な位置を占めている。そして、この様々な要求にこたえるために、臨床検査に必要とされていることは、精度管理と検査データの標準化である。これに関しては、愛知県は先輩諸氏の努力により愛知県医師会精度管理委員会、愛知県臨床検査標準化協議会（当会）など精度管理および検査データの標準化に関する活動が他県と比較して進んでいるものと自負している。

一例として、当会は既に3編の標準化ガイドラインを出版した。これに続き、今回新たに病理組織標準作業書が完成した。これまで病理診断は、癌の存在を明らかにすることが最も重要な意義を有していたが、しかし、現在では病理組織評価のなかに、分子標的薬の使用に適した症例かどうかを決定する必要が出てきた。このような要求にこたえるためには、免疫染色だけでなく遺伝子検索を含めた解析を行えるような検体取り扱いの標準化が必要である。このガイドラインが皆さんに利用され、病理組織検査標準化の第一歩に寄与する事を期待する。

2009年3月

## 目次

はじめに	1
キーポイント	2
検査業務フローチャート	3
Ⅰ. 固定	4
Ⅱ. 検体受付と処理	6
Ⅲ. 切り出し	8
Ⅳ. パラフィン包埋	12
Ⅴ. 薄切	15
Ⅵ. 参考文献	19
Ⅶ. 編集後記	24

## はじめに

病理組織検査の目的は、患者疾病の診断に向けて、形態的な側面から適切な情報を主治医に提供し、診療に貢献することである。これには標本作製過程における検体取り扱いが重要な要素であり、機械化が困難な現状では、技師の“質”が問われる分野である。

近年、病理組織検査が関連する医療事故が報じられるようになり、リスクマネジメントに関する関心も高くなってきている。具体的には検体の取り違いによる医療過誤や、不適切な処理による検体の紛失や損傷などが問題となり、これらの防止には適切な標本作製方法の遵守や運用の徹底が重要である。検体の取扱いは各種「癌取り扱い規約」等に記載されているが、消化管の生検検体など、取り扱いが検査技師に委ねられている検体処理の手法は、それぞれ独自の方法で行なわれているのが現状で、技術水準も一様であるとは言いがたい。また、標本作製や過誤の防止をどのように行なうべきかとの質問を受ける機会も多い。平成 17 年度に行われた愛知県臨床検査標準化アンケート調査で標準作業書に取り上げてほしい項目として、事故防止に対する要望が多かったことから関心の高さがうかがえる。そこで、病理検査研究班では、病理組織検査標準化の重要性を痛感し、適切な標本作製法、遵守事項、事故防止に必要な事項などを標準作業書として順次取り上げることにした。

本標準作業書は、日常検査における“コツ”や“工夫”を盛り込み、主に初心者の技師を対象として、検体取り扱い方法、切り出し方法、包埋方法、薄切方法等の有力な参考書、手引書となることを目的としている。

正しい病理組織診断に達するための知識、技術を習得するうえで役立てば幸いである。

## 病理組織学的検査のキーポイント

病理組織学的検査は、組織の肉眼所見の観察、記載に始まり、続いて固定し、その後、病理医による「切り出し」が実施され、臨床検査技師が標本作製する。その標本を病理医が観察し、臨床情報との総合的評価のもとに病理組織診断されるまでの過程（図1）をさす。この診断によって臨床医が治療方針を決定し、患者への治療を施行していくうえでの基本となる検査である。

### キーポイント

- ① 固定
- ② 切り出し
- ③ 包埋
- ④ 薄切
- ⑤ 染色・封入
- ⑥ 病理医による診断
- ⑦ 報告書の作成

切除標本の場合では的確な切り出しをすることが、正しい最終の病理組織診断が得られる基本条件といえる。

いずれが欠けても診断が患者の治療に貢献されないことになる。さらに、電子顕微鏡、免疫組織化学、分子病理学的検査等が必要とされる場合もある。

①、②、③、④、⑤業務を担う臨床検査技師の重要性は高く、標本の良否が病理組織診断そのものの結果を左右する。さらに、病理医と臨床検査技師との信頼関係も重要である。

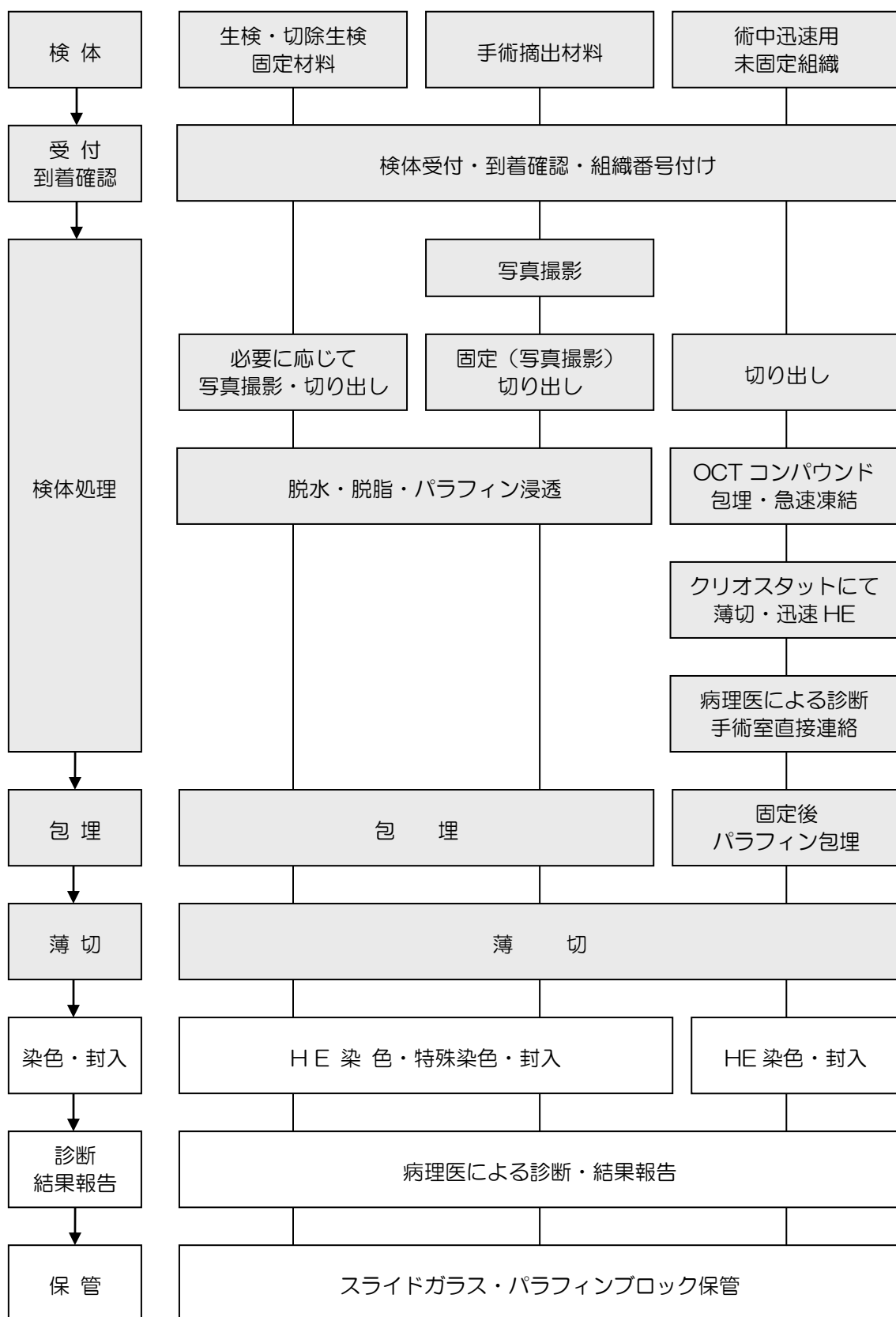


図1 検査業務フローチャート

## I. 固定

組織はできるだけ新鮮な状態で肉眼的観察を行い、速やかに固定液に浸漬しなければならない。採取された瞬間から組織は自家融解が始まり、腐敗が進行する。標本の良し悪しは固定によって決まるといっても過言ではない。

目的にかなった固定法を厳守することにより、パラフィン切片でヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、一般特殊染色、免疫組織化学染色、戻し電子顕微鏡検査や、脱灰操作をおこなっても組織への影響が少なく、安定したデータを得ることができる。

日常の病理検査では10～20%ホルマリン固定液がよく用いられる。但し、腎生検や human epidermal growth factor receptor type 2（HER2）検索等に用いる材料の固定液は10%中性緩衝ホルマリンを用い、固定時間を厳守する。

### 1. 固定の目的

- A) 組織・臓器の自家融解、腐敗を停止させる。組織や細胞の主要構成成分である蛋白質を安定化、不溶化し、細胞内成分の流出を防ぎ、形態の保持をする。
- B) 組織に一定の硬度を与え、標本作製過程での変形を防ぎ、薄切を容易にする。
- C) 色素や試薬を用いて光学的に観察可能にする。

### 2. 材料による固定方法

#### A) 生検 biopsy

生検材料は小さなものが多く、そのまま各種固定液中に浸漬すればよい。特に小さい組織片は、ピンセットで強くつまんで挫滅を起こさないように注意し、固定液に入るまで乾燥させないようにする。固定容器は、組織片の取り残しが無いよう透明な広口容器を使用することが重要である。

#### B) 切除生検 excisional biopsy（一定の大きさ、形態を持つ組織）

ESD(endoscopic mucosal dissection)、EMR（endoscopic mucosal resection）、ポリペクトミー（polypectomy）とは、内視鏡直視下で胃、腸、食道などの粘膜病変部全体あるいはポリープ全体を切除するもので、病変の良悪の判定および根治的切除を目的とする。

#### \*注意

ESD（図2）、EMR材料は、近位断端（PM：proximal margin）、遠位断端（DM：distal margin）などの向きが重要なため、採取したらすぐにマークをしてゴム板等にステンレスピンで止め、ホルマリンに浸漬する。

#### C) 手術による摘出 surgical excision または resection

治療目的で、外科的に組織、臓器の一部あるいは全体を切除、摘出し、病変の組織学的性状の検討、病変の進行度あるいは広がり、リンパ節転移の有無等の検討を行う。

## 処理法

各臓器の癌取扱い規約等に従う。(詳細は規約を参照)

### \* 注意

- ・ 依頼書には、術野や病変部の肉眼所見(形、色、硬さ)、大きさ(病変部の縦横径、近位断端、遠位断端からの距離)、重量などを測って図示、記載する。
- ・ 感染性の疑いのある材料では肉眼的観察は後回しにする。
- ・ 臨床医が患者家族への説明や、摘出材料の写真撮影等で材料が乾燥することが懸念されるため指導を徹底する。
- ・ 最近では病理検査以外の目的で、新鮮材料を必要とする診療科もあり、後の切り出しに支障の無いように病理側と臨床側の連絡を密にする。
- ・ 消化器切除材料は固定すると、筋層、粘膜ともかなり収縮する〔特に食道(図3 a、3b)では著明〕のでゴム板等に置いてゆったりと広がる位置で、粘膜と筋層を重ねてステンレスピン等で止めるようにする。特に切除断端(図4)には注意を払う必要がある。
- ・ 肺切除材料は、経気管支的にホルマリン液を注入し、膨らませてから固定液に浸漬し、中と外両方から固定されるようにする。太い気管支を有さない部分切除肺は、ホルマリン液を外から注射器で注入する。浮くのでガーゼやペーパータオル等をかけておく。
- ・ 乳房切除材料は、そのまま固定液に浸漬すると内部の固定がきわめて不十分になるため、注射器に入れたホルマリン液を、全体にまんべんなく注入してから固定液に入れるとよい。human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2)の免疫組織学的検索や FISH 法による検索では、ホルマリン固定時間が長すぎると検出率が低下する。したがって HER2 検索に用いる材料の固定時間は 10%中性緩衝ホルマリンを用いて、48時間以内の固定時間を厳守する。浮くのでガーゼやペーパータオル等をかけておく。
- ・ 子宮癌切除(図5)材料では、子宮腔部から子宮頸部が広く平らに固定されるように止める。円錐切除材料(図6)も同様に処理する。
- ・ ピンで止めたとき、組織の裏面がゴム板等と密着してしまうと固定液が浸透しないので、組織とゴム板等の間にガーゼやペーパータオル等を数枚入れ、組織を少し持ち上げて止めると良い。
- ・ 近位断端(PM)、遠位断端(DM)、左右などの方向はマークする。
- ・ 肝臓や、腎臓の腫瘍など充実臓器の大型切除標本の場合、そのまま固定液に入れると中心部が固定不良になるので、適度の厚さにスライスしてから固定する必要がある。また、割を入れた実質臓器も互いに密着しないよう、間にガーゼやペーパータオル等をはさむとよい。



## II. 検体受付と処理

受付は基本作業であり、検体の取り違えや紛失には厳重な注意が必要である。可能ならば検体持参者と共に患者氏名と検体を照合する。受付番号の書き間違えには十分注意する。

1. 病理組織検査依頼伝票と検査材料とを同時に受付ける。
2. 容器内に検査材料の有無、固定液の適正、氏名、年齢、臓器や採取部位、検体個数、臨床診断名、臨床所見などの記載漏れがないかを確認したうえで、検体の到着確認・受付登録し、依頼伝票、材料容器に同じ番号を付す。

### 【申込用紙添付の確認と記載事項の確認】

- A. 患者氏名（ID ナンバー）
- B. 年齢(生年月日)、性別
- C. 切除日
- D. 臓器、採取部位、個数など
- E. 臨床診断
- F. 病歴（臨床情報）
- G. 感染検体表示

### \*注意

- ・ 依頼書と検体の両方がそろっていない場合は、原則として受付けるべきではない。
- ・ 間違いがあるときは、訂正を依頼する。
- ・ 固定液が不適切または不十分な検体が提出された場合にはチェック方式のワークシート（表1）にその旨を記録する。
- ・ 記載事項に関して不備がある時は、主治医に連絡をとり確認すると同時に、チェック方式のワークシートにその旨を記録する。
- ・ 検体受付拒否の場合には、記録簿（表2）に記入し、患者氏名、拒否の理由を記載する。記録簿は1ヵ月単位、1年単位で集計し、必要があると認めた場合には臨床側に忠告する。

表 1 固定液が不適切または不十分な検体の記録  
(2008年1月1日～2008年1月31日)

日付	患者名・標本番号	問題点	処置
1/5	ABC・1234	骨髓生検がアルコールに入って提出された	血液内科に専用固定液を供給
1/15	DEF・2345	凍結切片用検体がホルマリンに入って提出された	手術室の職員に固定に関する教育を行った
1/25	GEH・3456	生検材料が生理食塩水には入って提出された	ホルマリンの入った固定容器を主治医に供給
1/30	IJK・4567	子宮内膜生検がアルコールに入って提出された	産婦人科の職員に固定に関する教育を行った

表 2 検体受付拒否の記録  
(2008年1月1日～2008年1月31日)

日付	患者名・ID	検体受付拒否の理由	処置
1/5	ABC・123456	申込書がなかった	手術室に連絡して、適切な申込書を受け取った
1/10	DEK・134567	検体容器ラベルと申込用紙の身元の不一致	手術室に連絡して、身元確認を行った
1/20	CDE・145678	外科材料の3番目検体が検査室に届いていなかった	検体を探し出し、再提出した
1/25	FJK・156789	申込書がなかった	再発防止のため、手術室の主任と会議を行った

### Ⅲ. 切り出し

切り出しとは、臓器・組織から病理組織標本作製のために部位を選び、切り取ることで、適切な切り出しが正確な病理組織学的診断につながる。

原則として切り出しは病理医が実施するが、臨床検査技師も切り出し方法については熟知することが望まれる。

#### 1. 生検組織の取り扱い、切り出し、包埋時の注意点

##### A) 検体の取り違いを防ぐ

切り出し、包埋の際の取り違いは起こってはならないことである。そのためには、臨床からの依頼票、検体容器についているラベル、報告書の患者氏名、ID 番号、病理番号などを厳密に確認する。

次に、内視鏡生検（図 7）などの場合では、臨床で採取した組織数と実際容器に入っている組織片の数を確認する。この際、採取部位が番号などにより特定されていれば、診断もその番号に従って行うことになるので、ブロック、標本にその番号を明記する。小組織片が多数あり、それらを同一切片上で標本にする場合、鏡検時に観察しやすいよう組織を配列（図 8）すると良い。

極小検体は包埋処理中に紛失や検体の取り違いが起こる可能性があるため、包埋処理を行う前に大きさ、色、形などを記録することが必要である。このような作業は切り出し業務の一環として行い確認、記録する。検体を目の細かいカセットに入れ、さらに周囲を目の細かいテフロン袋で包むことで紛失を防止できる。

##### B) 同一種類の検体を続けて処理するのを極力避ける

例えば、胃生検が多数続く場合、組織片の個数が異なるものを処理するとか、その間に他の種類の検体（内膜、大腸、皮膚など）を処理すると、取り違いを防ぐと同時に万が一取り違えた場合にも標本上で識別できる。

##### C) 別の症例の組織コンタミネーション

胎盤の絨毛（図 9、図 10）はコンタミネーションを起こしやすいことはよく知られている。コンタミネーションの原因は多くの場合、切り出し時のピンセットや、メス、カッティングボードについた組織片が次の症例の組織に付着してしまうためである。症例間でメスを変えるか、付着した組織をよくぬぐい去ることが肝要である。万が一、標本にコンタミネーションがみられた場合は、それがパラフィンブロックに存在しているか否か確認し、今後のためブロックから削り取っておく必要がある。

## 2. 切り出し時の注意点

切り出し時に注意しなければならない点として、包埋中のパラフィンの浸透と薄切時の切片を作製する面が重要である。特に、薄切面の反対側に墨でのマーキングや、ヘマトキシリン等で色付けしておく。同一臓器で多くの組織を切り出して、各組織の順序や方向を指定する必要があるときは、墨汁や朱墨等で番号やマーキングをしておけば便利である。

### A) 切り出し組織片の大きさ及び厚さ

大きさは一般的には通常よく使用しているカバーガラスの大きさ（25×50mm）に十分おさまる大きさに整形する。組織の厚さはパラフィンの浸透も考慮して厚さ 3mm 以下、大きさは通常のカセットの 60～70%がよい。

### B) 切り出しかたのコツ

切り出しに用いる刃物は鋭利なものをを用いることが大切で、切れ味が鈍っていると組織を挫滅することがある。はさみは組織の挫滅が著しいので切り出しには使用しないほうが望ましい。

切り出し組織面は薄切時の粗削り・面出しで切り進む分だけ考慮し、若干ずらしておくとうい。

切り出し台は組織の挫滅やナイフの刃の不要な損傷を防ぐために形が崩れず、かつ軟らかい材質のものを使用するとよい。

### ①ポリペクトミー、ESD、EMR 材料の切り出しかた（図 11、図 12a～12c）

消化器病変の多いわが国では、ポリペクトミーによるポリープ摘出材料が提出されることが非常に多く、ポリープは有茎性と無茎性の場合に分けられる。有茎性の場合にはストークを含めた標本作製することが肝要で、この場合、tubular adenoma（管状腺腫）が多いが、その際に一部で癌を合併することがしばしばある。その癌が粘膜筋板を越えているか、またストークへの浸潤があるか、断端への癌の浸潤あるいは異型細胞の有無の検索が必要となる。

#### ・ 茎幅が 2mm 以上の病変

ブロックの粗削り分を考慮して、茎の中心から 1mm ずらして、2mm 間隔で切り出す。  
（中心部以外の組織片もすべて標本とする）

#### ・ 茎幅が 2mm 未満の病変

茎は切り出さずに、茎全体が含まれるブロックとし、粗削りと薄切で茎の中心が出るようにする。

・ 無茎性ポリープや ESD、EMR の場合には断端および筋板が病変から近いため、癌化した場合にその粘膜下浸潤および断端への浸潤の有無が重要な問題となり、固定に注意が必要である。断端に直角に大きさに応じて複数個正しく切り出すことが重要であり、その際に標本上で筋板および断端の観察が容易となるように心掛けることが大切である。

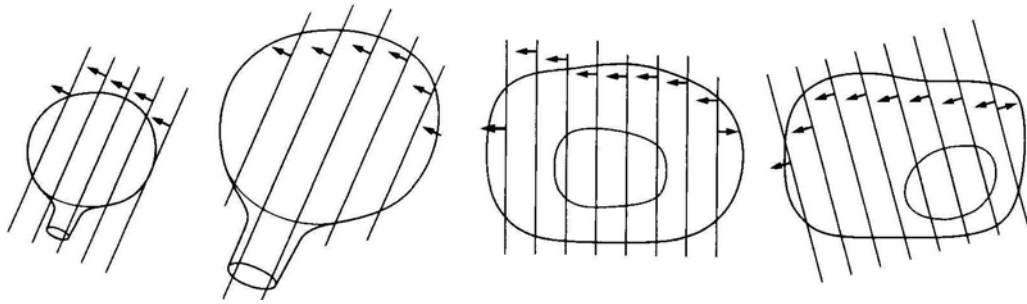


図11 (胃癌取り扱い規約より引用)

内視鏡的切除標本の切り出し方

### ②経尿道的前立腺切除術 (TUR-P) 材料

- ・採取された全切片を検索することが望ましい。
- ・切除量が多く、全切片の検索が不能の場合は約 10g を 6 スライドにし、残る 10g 毎に 1 スライドを作製する (図 13a、図 13b)。



図 13a 約 1g



図 13b 約 2g

### ③組織切り出し時に除去すべきもの

- ・術時の縫合糸は薄切の障害となるので、できるだけ除去しておく。ただし、過去の手術時の縫合糸が関連した肉芽腫などの病変は仕方がない。
- ・ペッツ釘や金属クリップは薄切できないので、多少の組織の損傷を伴ってもあらかじめ除去する。組織損傷の原因を記録簿等に記載し、記録として残しておく。

### ④組織切り出し時に確認すべきもの

- ・結石、石灰化物は薄切の障害になるので、あらかじめ脱灰操作を行う。予期せぬ石灰化が生じた場合は、表面脱灰を行うとよい。

### 脱灰法

脱灰とは骨や石灰質などの硬い組織を薄切可能な状態にするため、主要成分のカルシウム (Ca) を溶出させ組織を軟化させる操作をいう。

前処理として十分な固定が必要で、脱脂を行うと脱灰がより速く進む。

### 3. 手術材料の切り出し部位の設定

標本の組織学的検索の主眼点は、ひとつは病変の組織学的性状の検討であり、もうひとつは病変の進行度あるいは広がりへの検討である。患者の術後の治療方針や予後判定に重要な情報を提供する上で、両者の目的に合った切り出しが要求される。

#### A) 病変の組織学的性状の検討

病変の組織学的性状の検討のためには、主病変の中心部位及び病変周辺との境界部位、肉眼所見の異なる部位からの組織片を切り出す。

#### B) 病変の進行度あるいは広がりへの検討

病変の広がりを見るためには、水平方向への広がりと垂直方向の広がりとの両者を十分に確認でき、三次元的観察が可能となるように切り出す。この広がりへの検討には、切除組織断端部の病変の有無や遠隔部位の転移なども含めた病変の確認ができるように切り出す。

#### C) 切り出し基準線の設定

組織の切り出しでは原型が失われるので、肉眼所見での病変が再構築できるように基準線を設けた切り出しを行うことが必要である。

#### D) 切り出しの記録の方法

肉眼所見と組織所見とを対比するためには切り出しの記録が必要である。この記録が病変に対する病理所見の総合的な再構築を可能とする（図 14）。以下の記録の方法がある。

- ・ スケッチ（イラストレーション）の活用
- ・ 複写機の利用
- ・ 写真撮影
- ・ コンピュータによる画像処理

#### 便利な道具

インク：悪性腫瘍の全摘標本における最も重要な病理学的項目の一つに、腫瘍の断端評価が挙げられる。前立腺癌等の全摘標本にあらかじめインクを塗布（図 14a、14b）し、切り出しを行う。インクを数種類使用すると標本作製部位が把握しやすくなる。

マップ：手術材料等の切り出し時にスライドガラス収納用マップ（プラスチック製）を使用すると番号間違いが少なくなる（図 15）。

## IV パラフィン包埋

病理組織標本作製する場合、パラフィン浸透が不十分であると薄切時に障害が生じ、 $2\sim 3\mu\text{m}$ の切片が困難となり、染色性も不良となる。できあがった標本は、収縮、変形、亀裂が生じ、組織構築の詳細な観察が困難になり、ひどい場合には病理組織診断が不可能となる。

現在、病理組織標本作製の目的で常用されているのはパラフィン包埋法で、この過程は、脱水・脱脂→脱水剤の除去および中間剤への置換→パラフィンの浸透から構成されており、脱水→中間剤処理→パラフィン浸透過程は密閉式自動固定包埋装置（図14）で、包埋・パラフィンブロック作製は包埋センター（図15）で行なっている施設が多い。



図14 密閉式自動固定包埋装置



図15 包埋センター

### 1. 脱水、脱脂

生体臓器の約70~80%は水分であり、組織に純度の高いパラフィンを浸透させるためには、この組織内水分を可能なかぎり除去する必要がある。脱水剤としては、エタノールやメタノールなどのアルコールを使用し、水分とアルコールを置換することにより脱水を行う。

処理操作を繰り返し行うごとに、アルコール濃度は使用することにより低下していくことになる。とくに第1槽目は、ホルマリン水溶液がそのまま相当量持ち込まれるため、アルコール濃度の低下が激しい。第2槽目以降も徐々に濃度が低下していくことになる。このため、アルコールは5~7槽使用し、組織内の水分を順次アルコールに置換し、十分な脱水を行うことが大切である。

### 2. 中間剤処理

つぎに、アルコールはパラフィンと親和性がなく、この仲立ちをする溶剤としてキシレン、クロロホルムあるいは低毒性のキシレン代替品などを使用し、パラフィンが効率よく組織中に浸透できるように組織中のアルコールをこれらの有機溶媒で置換する。この中間剤処理工程も段階希釈であり、中間剤は3槽通すことが望ましい。

### 3. パラフィン浸透（表1）

パラフィン浸透用には、融点が 56～60℃程度のパラフィンが使用される。最終的に組織に浸透させるパラフィンはキシレン、クロロホルムなどの有機溶媒を含まない純度の高いものであることが要求される。パラフィン第1槽や第2槽には、組織を処理することにキシレンやクロロホルムなどが持ち込まれるため、パラフィン槽は4槽準備することが望ましい。

#### A. 中間剤処理、パラフィン浸透を確実にを行うためのポイント

- ・ 各薬液の交換、落第の手順を決め、薬液管理をしっかりと行う。
- ・ 各薬液の量は、処理中に組織が十分浸るように規定量充填する。
- ・ 組織の中心部まで薬液がよく浸透するように、組織片の厚さはできるかぎり薄くする。
- ・ 脱水剤にメタノールを使うことにより、脱水効率を高めることができるが、組織の収縮がエタノールより強く、劇物試薬なので、エタノールを使用したほうが安易である。
- ・ 脱水列のアルコール、中間剤列の代表的なキシレン（クロロホルム）は適度に加温することにより浸透性を高めることができる。37～40℃程度に加温することにより、室温（20℃前後）に比べ組織中への浸透効率を約2倍高めることができる。
- ・ 脂肪の多い組織（乳房切除材料など）はあらかじめ、キシレンとエタノールの等量混合液等にて十分な脱脂をする。加温すると脱脂が促進される。

表3 組織処理プログラム例（組織の厚さが3mmの場合）

槽番号	薬液名	時間 (h)	温度 (℃)	P/V	Mixing
1	95%エタノール	1	37	on	fast
2	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
3	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
4	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
5	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
6	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
7	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
8	キシレン	1	37	off	fast
9	キシレン	1	37	off	fast
10	キシレン	1	37	off	fast
11	パラフィン	1	62	off	fast
12	パラフィン	1	62	on	fast
13	パラフィン	1	62	on	fast
14	パラフィン	1	62	on	fast

P/V：加圧と減圧の繰り返し  
 Mixing (fast)：処理槽中の薬液の排出・吸入サイクル12分ごとに実施



#### 4. 包埋・パラフィンブロック作製 (図16a~16e)



図16a  
パラフィンを包埋皿に分注する



図16b  
組織片を薄切面が包埋皿の底につくように上から押さえる



図16c  
包埋カセットを上に乗せ、不足であれば更にパラフィンを分注する



図16d  
冷却板上でパラフィンを固化させた後、包埋皿を取りはずす

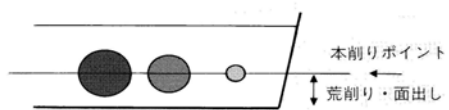


図16e 組織片の大小がある場合の包埋断面図



図17 ダンパー

#### 便利な道具

・ダンパー (図17)：前立腺、乳腺等の針生検材料を平らにパラフィンブロック包埋する際に使用すると便利である。

## V 薄切

薄切は次のステップである各種染色を施すために必要な操作で、パラフィン包埋されたブロックをマイクロームにてマイクロン ( $\mu\text{m}$ ) 単位の厚さで薄く切り、スライドガラスに貼り付けるまでの工程をいう。

### 1. マイクロームの種類

パラフィン用は滑走式、回転式に分けられ、わが国においては特に滑走式のユング型 (図 18) が普及している。刃台が水平な滑走路を滑り、徐々にせり上がってくる組織を薄切するタイプである。最新のマイクロームはクロスローラーベアリング (図 19) を用いて滑走をより滑らかにしている。

### 2. マイクローム刀

マイクロームの刃は以前、一本刃を用いていたが、最近では替刃式が主流である。荒削りと本削り用のそれぞれの替刃が同時装着可能なマイクロームホルダーが開発され、替刃の着脱もワンタッチで行えるホルダーも市販されている。

替刃は数社から市販されているが、刃の特性によってそれぞれ用途が異なっている。

#### A) ナイフの取り付け

刃支持台を滑走面先端に移動し、刃を横からスライドするようにさし込み、荒削りおよび本削り部位がちょうど薄切するブロックの位置になる位置で固定する。固定はしっかりしておかないと、薄切の際にアーチファクトを起こす原因となる。

#### B) ナイフの引き角と逃げ角

- ・逃げ角：マイクローム刀と組織薄切面との成す角である。通常は  $2\sim 3^\circ$  前後である。最新の機種では逃げ角の設定が固定式で、変更できないタイプもある。
- ・引き角：マイクローム長軸に対する刃の角度である。大体  $45\sim 60^\circ$  (図 20) くらいで引く。

### 3. マイクロームの設置位置

マイクロームは精密機械のため、振動する機械の傍らや、不安定な作業台上に設置してはならない。良質な切片が得られないばかりか、思わぬ事故を招きかねない。刃の支持台が手前に滑らないよう水平に設置し、滑走面は円滑に動くように専用機械油を塗っておく。

照明は左前方上部より、ブロック表面にあたるようにセッティング (図 21) すると、荒削りの際に標本全部が面として現れているかどうかの確認が可能である。

パラフィン融点と室温の差は  $35\sim 45^\circ\text{C}$  の差があることが望ましい。

表4 実際に薄切作業をする際に準備する用具および器具

マイクローム刃	薄切切片を拾う小道具	マップ
替え刃	刷毛、筆	金属製載せガラス型
スライドガラス	ガーゼ、濾紙、ティシュペーパー	メス、ナイフ
専用機械油	切片浮かし水槽	染色カゴ
パラフィン伸展器	温浴	鉛筆、ペン

#### 4. 薄切の実際の手順

##### A) 荒削り

###### ①ブロックの設置

標本ブロックを試料台（クランプ）に取り付けて固定する。不十分な場合には、大きい標本や子宮筋腫などの硬い標本において薄切切片の厚さに不均一性が生じ、非常に見にくい標本になってしまう。

ブロックには方向性がある。全体的には横長に取り付けたほうが縦長よりも組織の歪みが少ない。また、一般的に組織の軟らかいほうから先に刃が当たるように取り付ける。しかし、今日では替え刃の進歩と、包埋条件の改良により、よほどの標本でない限り神経を使わなくてよい。

###### ②面出し

荒削りの段階である程度の最終的な面出しも行う。次の本削りのステップで余分な薄切を行わなくてもよい程度に仕上げる。薄切面を観察し、薄切する面が全て表面に出ていることを確認してから本削りに移行する。包埋の段階で必ずしもまっすぐに埋めてあるとは限らないので、切り出し時の記憶をたどりながら、必要な部位が間違いなく標本となって薄切されるように調整する。

##### B) 本削り

冷却しているブロックを薄切する場合には、操作を迅速に行わなければならない。時間がかかってしまうと、本削りの際にブロック表面の温度が上昇し、上手く薄切出来ない。

一般的に、切片の切れ味は先端アール、引き角、摩擦抵抗の大小に比例し、引き角の大小に反比例、切片の歪みは先端アール、同部の摩擦抵抗に比例する他、刃線の長さにも比例し、逆に切削速度、切片の厚さ、引き角の大小に反比例する。

組織の種類および染色の種類によって薄切切片の厚みを変える。例えば腎臓の基底膜や、骨髄、リンパ節などは細胞単位の観察が必要で、厚みのある切片では細胞が重なって見え、診断に支障があるので1~2 $\mu$ mの厚さで薄切する。また、逆に脳などの中枢神経系や結合織、アミロイドの沈着などを観察したい場合には、多少厚めの5~6 $\mu$ m切片を薄切する。

- ・ カーリング対策

薄切時、切片が端からくるくと巻いてしまう現象を「カーリング」と言うが、水に浮かせてからカーリングを解くことは難しい。可能ならば薄切しながら切片を伸ばすことが望ましい。準備した小紙片または箸のような先の尖った道具の先端に水分を含ませ、切片切り始め（カーリングの始まり）の部分（図22a）を近づけると、切片が小紙片等に付着する。そのままメスを手前に引く速度と同じ速度で、この小紙片等を上方に引き上げるようにすると（図22b）、切片は自らカーリングせずに伸びた状態（図22c）で取ることができる。水の入った水槽に小紙片等と一緒にそのまま水中に沈めると切片だけが浮く。

- ・ 本削りと湿気

多くの施設ではブロックを冷却して薄切し、薄切されにくいときには息をブロック表面に吹きかけて薄切している。連続切片を切る場合や、大量のブロックを薄切するような施設では標本ブロック加湿器を用いて薄切を行うとよい。

- ・ 薄切によって生ずるアーチファクト

マイクロームホルダーやブロック固定器のネジが十分に締められていなかったり、滑走面の潤滑油が十分に塗られていない場合、また、刃を引く速度が一定でなかったり、刃の切れ味が悪く、しかもメス傷がついていた場合などは、診断に支障のきたす標本ができる可能性があるので注意を要する。

### C) 切片の伸展

薄切切片は底面（光沢のある面）を下向きにして静かに水面に浮かせる。気泡、ゴミは、スライドグラスに貼り付けた後からでは取れないのでこの時点で取っておく。切片は水の表面張力と加温によるパラフィンの軟化によって全周方向から引っ張られて皺がある程度伸びる。

水は水道水でも構わないが、気泡が付着してアーチファクトの原因となるので、蒸留水を用いている施設も多い。また、同じ水を何日も交換せずに使用すると、雑菌の繁殖が起こり、切片上に菌が染色されることもしばしば起こる。蒸留水をいったん沸騰させたて、湯冷ましした水を用いるとよい。

ブロックを冷却して薄切した場合には、設定した微動目盛りの厚さよりも実際は厚めに切れている。水に浮かせた切片の色目で大体の切片の厚さが判断できる。

### D) スライドグラスへの貼付

水面に浮いている切片を、スライドガラスにてすくい上げる（図 23）。貼り付ける位置の修正は可能なので適当な位置に貼り付ける。切片が剥がれやすい銀染色等の場合はコーティングガラスを使用すると良い。光学顕微鏡では倒立の虚像を観察するため、考慮して貼り付ける（図 24）。スライドガラス上の貼り付ける位置を決めておけば、染色後鏡検する際に顕微鏡のステージをあまり動かさずにすむ。

### E) 伸展板・乾燥

パラフィンの融点（通常のパラフィン融点は 56~60℃）を考慮し、伸展板の設定温度はこれを上回らない 48℃前後が望ましい。伸展板上で、できるだけ長く放置するか、

37℃のフラン器内にて切片を十分に乾燥させる。迅速に染色する場合には、水切りの状態にもよるが、60～65℃前後のパラフィン溶融器に入れ、パラフィンが溶けた状態であれば、染色可能である。

## 参考文献

- 1) 長村義之：外科病理マニュアル，第1版，文光堂，東京，1992
- 2) 武藤哲一郎：大腸，病理と臨床 1：53-65，1983
- 3) 畠 榮、真鍋俊明：病理技術の精度管理，病理と臨床 19：1328-1333，2001
- 4) 山本格士、鳥居良貴：検査と技術増刊号 26：89-93，1998
- 5) 岩井志男、宮平良満、岡部英俊、ほか：検査と技術増刊号 26：93-97，1998
- 6) 滝野 寿、長屋清三：検査と技術増刊号 26：98-106，1998
- 7) 北條昭次：パラフィン包埋基本技術，Medicai Technology 34：759-961，2006
- 8) 日本胃癌学会編：胃癌取り扱い規約，第13版，金原出版，東京，1999
- 9) 日本泌尿器学会・日本病理学会編：前立腺癌取り扱い規約，第3版，金原出版，東京，2001
- 10) 都築豊徳、前田永子：前立腺，外科病理マニュアル，病理と臨床（臨増）26：291-296，2008
- 11) 標本道場：<http://www.sakura-finetek.com/doujyou/doujyou.html>
- 12) 佐野 豊：組織学研究法，第3版，南山堂，東京，1970
- 13) 三友善夫、高山昇二郎：臨床検査講座12，病理学，医歯薬出版，東京，1978

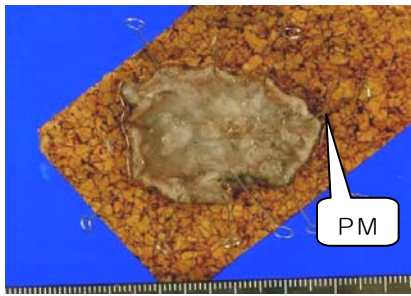


図2 ESD 材料固定後



図3a 食道癌手術材料



図3b 食道癌手術材料固定後

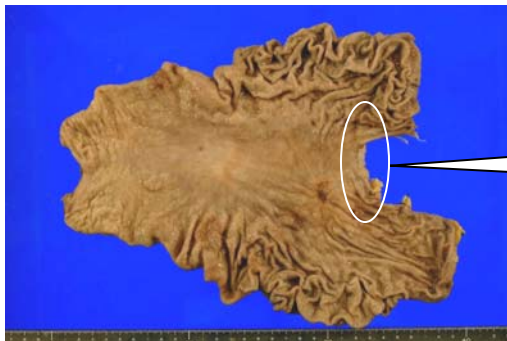


図4 胃癌手術材料固定後

切除断端には特に注意を払う必要がある



図5 子宮癌材料固定後



図6 子宮頸癌円錐切除例

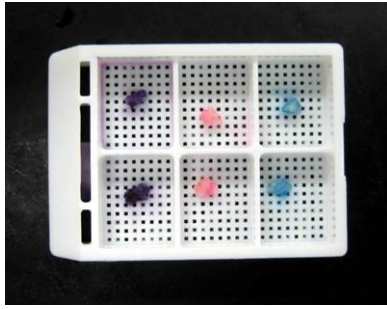


図7 胃生検材料

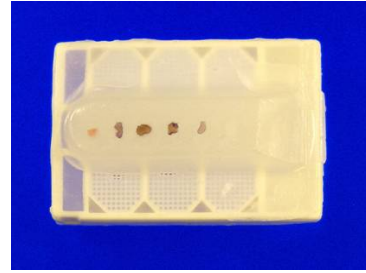


図8 胃生検パラフィンブロック例



図9 胎盤絨毛

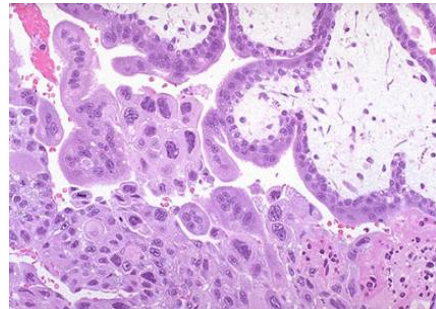


図10 胎盤絨毛 HE 染色

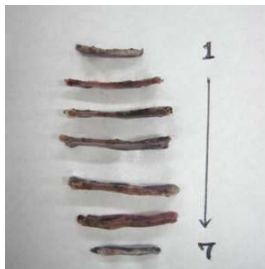


図 12a ESD 切出し例



図 12b カセットに入れた状態

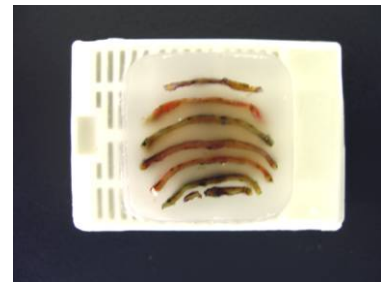


図12cパラフィンブロック

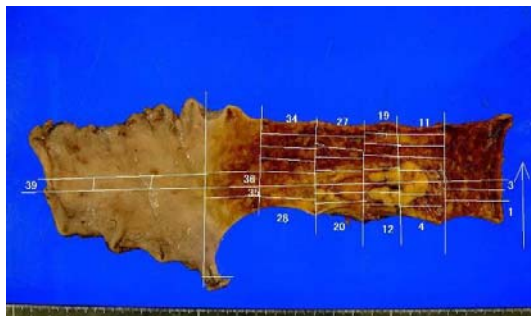


図 13 食道癌切出し例





図 14a 前立腺癌全摘例（インク塗布後）

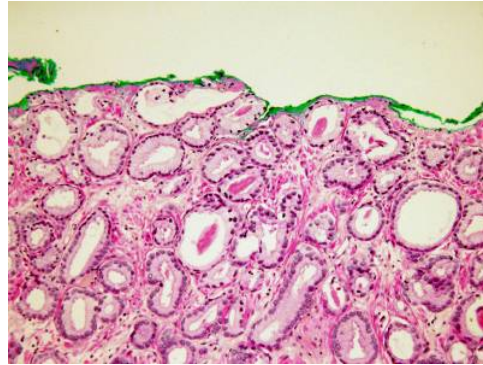


図 14b インクによる断端評価（陽性例）

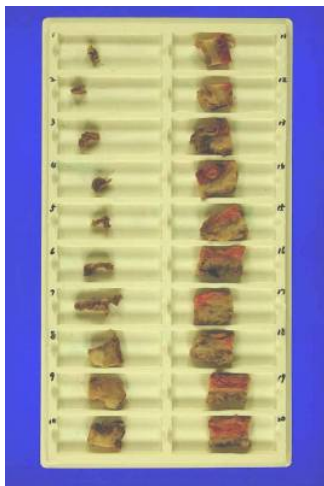


図 15 切出し後、標本マップに並べた状態



図 18 滑走式マイクローム



図 19 クロスローラーベアリング式マイクローム



図20 ナイフの引き角



図21 ミクロトーム等の設置例



a



b



c

図22 カーリング対策

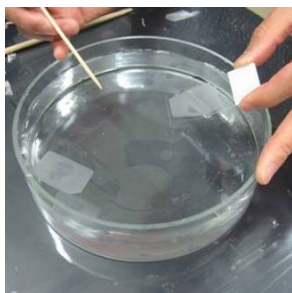
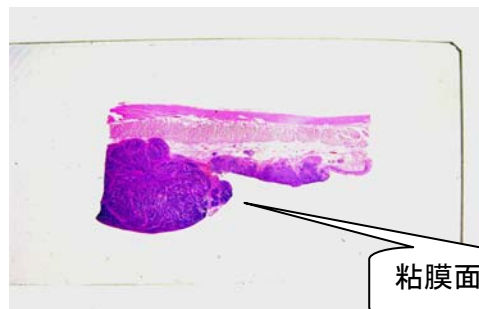


図23 切片をすくい上げる



粘膜面を下方に

図24 HE染色ルーペ像

## 編集後記

近年、医療をとりまく環境の急速な変化により、他施設への患者紹介や、セカンドオピニオンを求める患者さんが大幅に増加している。その際に診断の根拠となっている検査結果の一部資料として、病理組織標本の貸し借りが行われる。その際、他施設の標本を供覧する機会があるが、時に染色性が不十分な標本に遭遇する。いうまでもなく、病理組織検査の目的は、患者疾病の診断に向けて、形態的な側面から適切な情報を主治医に提供し、診療に貢献することである。

正確かつ迅速に質の高い標本を作製するためには、検体採取後から始まる各作業工程において豊富な知識、経験、技術が必要である。しかし、現実には病理検査室では熟練した“質”の高い技師が常時担当できるとは限らず、特に新人技師が配属された場合には標本の取り扱いについての注意を徹底させるなどの配慮が必要である。

病理分野において、他施設の作業を見学する機会は少なく、各施設独自の方法が伝統的に受け継がれているのが現状であるが、今後は、基礎講座を通じて、標準化を目指すべきである。パブリックコメントを求めた際、薄切作業時の切片を浮かべる水槽位置を統一したほうが良いとの意見をいただいた。以前、西三河地区有志の勉強会で「薄切」を取り上げ、各施設の参加者が実演したところ、切片を浮かべる水槽をマイクロトームの左側に設置する施設や、右側に設置する施設があり、また、薄切切片を拾い上げる小道具も、竹串、筆、割り箸を加工したものなど様々であった。作業効率が高く、適切な薄切切片が作製できれば良いので、統一は困難であると考えた。

本標準作業書は、各作業工程の中で注意すべき点、工夫などを盛り込み、新人でも理解して作業ができるように編集したつもりではあるが、不十分な点が多々あると思われる。改定を重ね、満足できる標準作業書になることを切望し、リスクマネジメントやH E染色標準化に向けて役立てば幸いである。

梅村 寿男

ガイドライン作成委員会（病理組織検査）

作成委員長	梅村 寿男	（厚生連安城更生病院）
委員	滝野 寿	（名古屋市立大学大学院）
委員	山本 司	（豊橋市民病院）
委員	井上 正朗	（碧南市民病院）
委員	小熊 孔明	（名古屋記念病院）
委員	迫 欣二	（厚生連豊田厚生病院）
委員	加藤 浩	（春日井市民病院）

問い合わせ先

愛知県臨床検査標準化協議会事務局

〒450 - 0002

名古屋市中村区名駅五丁目 16 番 17 号

花車ビル南館 1 階

（社）愛知県臨床衛生検査技師会事務所内

Tel 052・581 - 1013

Fax 052・586 - 5680

愛知県臨床検査標準化協議会  
愛知県臨床検査標準化ガイドライン  
病理組織学的検査標準作業書  
【検体受付から薄切】  
第1版

発行 平成 21 年 3 月

発行所 愛知県臨床検査標準化協議会

発行者 大野 和美

編集者 松本 祐之・所 嘉朗・梅村 寿男