

生化学部門

免疫血清部門

尿一般部門

細菌部門

先天性代謝異常部門

血液一般部門

病理部門

細胞診部門



病理診断における固定の重要性

検査科病理部門

固定操作は良い標本を作製するための第一歩です。病理診断では、基本染色はヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）ですが、病理医の判断で必要に応じて、特殊染色や免疫染色を追加することがあります。そうすることでより正確な診断をすることが可能となります。これらの染色結果を大きく左右するのが「固定」です。正しく「固定」することは、固定以降に続く各過程をスムーズに行うことができるばかりか、良い標本を作製することにもつながります。

1. 固定の目的

- ①組織の変性・融解からの保存（生体から取り出された組織の自己融解による腐敗防止。）
- ②形状および構造の安定化（標本作製過程における薬品、熱などの影響による組織片の変質、変形をできるだけ少なくする。）
- ③染色性の増強
- ④組織成分の溶出の防止
- ⑤抗原性の保持

▼一般的な日常組織固定液について

a.10～20%中性緩衝ホルマリン(PH7.2 前後)

ホルマリン原液(ホルムアルデヒドを 37%含む溶液)に第一リン酸ナトリウム、第二リン酸ナトリウム、精製水を混合し、PH を 7.2 前後にしたもの。

【長所】一般染色や免疫染色の固定にもよく、抗原性の保持も 10%ホルマリンに比較して良好です。組織を障害することが少ないので、長期固定・保存に適しています。ホルマリン色素の沈着が少なく、細胞質の固定が酸性ホルマリンより優れています。また、骨髄材料にも適しています。

【短所】組織への浸透性は酸性のものより落ちます。軽い溶血を起こす傾向があります。

b.10～20%ホルマリン(PH3～4)

ホルマリン原液を水道水で10～20%に希釈したもの。作製後約1日で使用可能。緊急で必要な場合、60℃に加熱すれば30分で使用可能。

【長所】組織への浸透性がよく、作製しやすい固定液です。

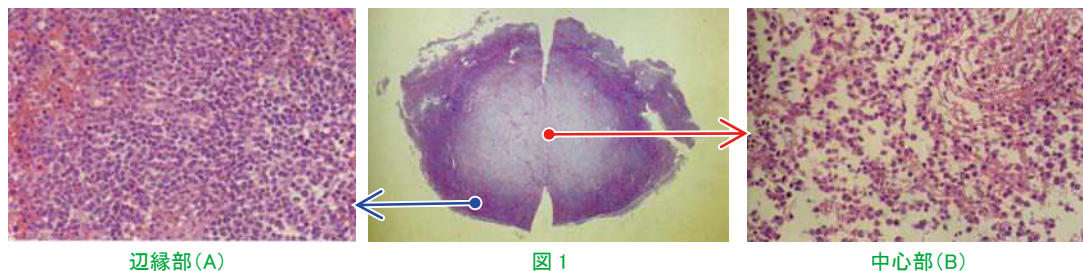
【短所】細胞質も核も収縮気味となります。ホルマリン色素の沈着物が付きやすいといわれています。また、保存中にギ酸を生成するため酸性を呈し、染色性が低下します。

▼固定不良・過固定となった標本

a.一般染色

HE染色および特殊染色で組織構築の欠落や染色不良がおき、ご提出いただいた検体が診断に至らないこともあります。

固定不良



例として大きさ4×3×2.5cmのリンパ節を示します(図1)。割を入れずに固定し検査室に提出されたものです。このルーペ像でも染色性の違いが明らかなように組織の辺縁部(A)は固定良好ですが、中心部(B)は細胞と細胞の間隙が目立ち、細胞も萎縮しています。概して固定不良の組織は、パラフィン包埋過程での影響を大きく受けて収縮、歪みを生じ、細胞の形態も異常となります。

過固定

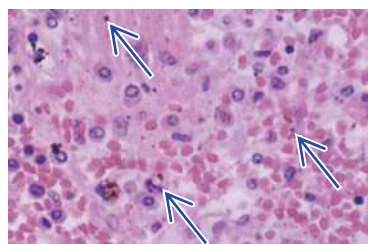


図2

ホルマリン色素の沈着が起きやすく、ホルマリン固定の長い組織では、しばしば黒褐色顆粒状の沈着物が認められます（図2）。

b.免疫染色

一般染色のみでは確定診断に至らない病変の確認・補助として大きな役割を果たしています。当検査センターでも病理医の指示のもと免疫染色を行い、病理診断の精度の向上を目指しています。固定不良では過染や不染を起こし、過固定では多くの抗体の場合、染色性は弱くなります。

固定不良

サイトケラチン*

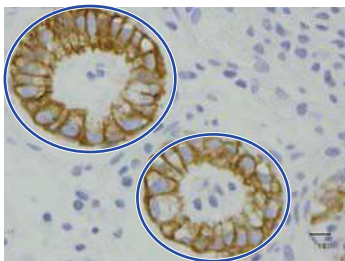


図3(固定良好)

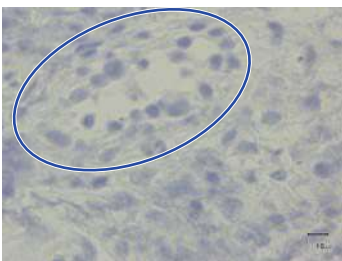


図4(固定不良)

図3: 腺上皮細胞が褐色に発色しています。

図4: 腺管構造・細胞構築は崩れ発色されていません。

*サイトケラチン: 上皮細胞に陽性

過固定

HER2 蛋白

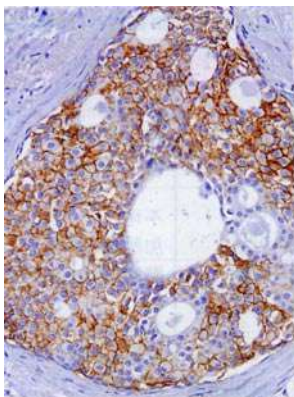


図5(24時間固定)

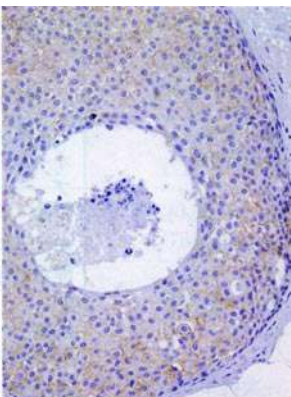


図6(同一症例を6か月10%ホルマリン固定)

図5: HER2 蛋白発現部が強く染色され明瞭です。

図6: 過固定による影響で染色性の減弱化が起こり、発現部位が不明瞭です。

2. 固定方法

- ❖ 組織採取後、すみやかに固定液に入れてください。
- ❖ 病理医がわかりやすいよう、問題部位や方向を特定したい場合には目印(図7参照)をつけ、依頼書に記入してください(例:「糸側が乳頭側を示す」)。

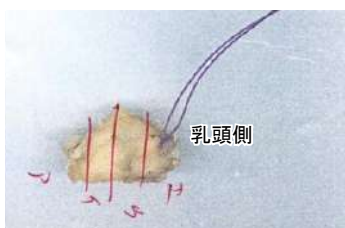


図7 糸を使った目印の一例



図8 ピンを使った固定の一例

採取方法	Biopsy	採取番号を記入した濾紙などに生検材料を貼り付け、速やかに固定液に入れる。または採取番号ごとに容器を変えて固定液に入れる。
	EMR、ESD	ゴム板、発砲スチロールの板などにムシピンで固定する。
手術材料	食道、胃、腸、胆嚢、など	粘膜面が観察できるように切開する。扁平のものは変形しやすいので、板などに粘膜面を上にし、ムシピンで貼り付けて固定液に入れる。(貼り付けた面が固定不良や固定ムラになりやすいので、竹串やキムタオルなどを置き、組織と板の間に隙間を作るとよい)
	肝、腎、脾、子宮など	臓器と臓器、容器と臓器が重積したり密着しないようにそれぞれの間にガーゼなどを挟んで固定効果を上げる工夫をする。できれば、診断に影響しない程度に、割を入れたりスライスしたりして固定することが望まれる。
	肺	空気を大量に含んでいるので、固定液上に浮かぶ。臓器表面を数枚のガーゼで覆っておき、割面にガーゼを挟んでおく。気管支内に固定液を注入し、固定促進と肺の整形を行うことがある。
	乳房	必要に応じ腫瘍部分に割を入れたり(割は取り扱い規約に沿って入れる)、注射器で組織の多数箇所へ直接固定液を注入したりする方法もある。
	膵臓	膵液による自己融解が早いので特に速やかに固定液に入れる。

a.固定温度

室温

b.固定液の量および容器

- ・組織の 5～10 倍以上の液量が必要です。（固定液の成分は、固定が進むほど消費されます。そのため固定液の量が少ないと組織液で固定液が希釈され、十分組織が固定されません。）
- ・組織に対して十分な大きさを持ち、さらに広口のものを使用してください。（容器が小さいと組織変形を起こすことがあり、また口が狭い容器は検体が固定により硬くなり、容器を壊さなければ検体を取り出せなくなる場合があります。）
- ・無色透明なものをご使用ください。（生検など小さい組織のものは、容器の外からも確認できることが望ましいです。）



A B C
図9 固定液の量および容器の一例

A：容器の大きさ、液量ともに適正

B：組織が浮遊しており、全面が固定されず不適

C：容器が小さく固定液の量が明らかに少なく不適

c.固定の速度および浸透性

- ・固定速度は一般的に1時間に1mm程度といわれています。肝臓や脾臓等の充実性臓器や充実性腫瘍においては一昼夜でも数mm程度とされています。また、固定液を振盪すると固定は促進されます。
- ・ホルマリン濃度が高いほど浸透性は良いため、生検や小さい組織で、短時間で固定を済ませたい場合には高濃度のものを使うとよいといわれています。しかし、大きな組織や被膜のある組織は、表面硬化により固定液の内部浸透を妨げ逆効果になることがあります。従って、一般的なホルマリン濃度は10～20%とされています。

d.ホルマリンの保管

ホルマリンは医薬用外劇物に指定されており、2008年3月1日より特定化学物質の第3類から第2類へ変更され取り扱いが厳しくなりました。

当検査センターでは、右写真のように厳重に保管し、排気装置のある密閉された室内にて取り扱っています。

白地に赤字で「医薬用外劇物」と表示することが義務づけられています。
また、施錠して厳重に管理することが求められています。



以上、固定の重要性について記載しました。

良好な染色標本を作るには、迅速で適正な固定操作が非常に大切です。現在当検査センターでは、特殊染色や免疫染色時に、固定不良や過固定などによって発生する非特異反応への対応として、「偽陰性」「偽陽性」の判定の基準となる「対照標本」をご依頼の検体標本と同時に染色することで、質の高い標本作製を心がけています。

また、標本作製後は、全例当検査センターの技師により標本の良悪のチェックを行うことで精度管理に努めています。その後、病理医（広島大学大学院分子病理の先生方）が診断した上で先生方に結果をお届けしています。

ご提出いただきました検体につきましては、より精度の高い診断結果を臨床医の先生方、患者さまにお届けできるよう、今後とも努力していきたいと考えています。

担当:矢口裕子(病理)
文責:前田亮(臨床部長)

《予告》

次号は細胞診部門から、「細胞診における固定の重要性」をお届けいたします。