

Ⅱ. 病理組織検査 (戸田 好信)

【 固定→切り出し→脱水→ 包埋→薄切→染色→鏡検 】

1. 固定

細胞、組織成分の変性を防ぎ、標本作製過程における組織の変質を防ぐために行う。

種類：ホルマリン固定、アルコール固定、ブアン固定など

固定液の量は、組織に含まれる水分や浸透効果を考慮して十分な量が望ましい。組織片の10倍量が目安となる。固定時間は組織片の大きさ、固定液の種類による浸透性や組織に与える影響、温度などにより異なるが、通常用いる10%ホルマリン固定の場合24時間から48時間固定を行う。

2. 切り出し

切り出しの目的は、大きな組織をそのまま顕微鏡標本とするには無理があるので肉眼的に判断し、病変部、正常部を含み、病変部が及ぼす意味が検索でき、最大限の情報が含まれるように切り出すことが重要である。

3. 脱水

組織のままでは柔らかすぎて顕微鏡的に組織を観察できるほど薄く切ることができない、そのため組織に強度を与えるために、適当な材料の中に包埋する。現在ではパラフィンがよく用いられている。脱水は、パラフィン包埋を行うためには水分があるとその部分にはパラフィンが浸透しないので、組織中に含まれる水分を除くために行う。通常はアルコールを用いて水分を取り除く。また組織中の脂肪を除く脱脂の効果もある。

4. 包埋

パラフィン包埋するために脱水過程で組織中に浸透したアルコールを除く必要がある。そのために、アルコールとパラフィン共通の溶媒となる、キシレンあるいはクロロホルムを浸透し、その後パラフィンを浸透し組織中にはパラフィンのみが含まれるようにする。必要とする面が出るように包埋し各組織片ごとにブロックとする。

5. 薄切

顕微鏡下で組織を観察するには、薄い組織切片に染色を施すことが必要となる。そのため、組織片を連続的に薄切するために、マイクロトームを用いる。マイクロトームにはスライディング式マイクロトームとロータリー式マイクロトームがある。代表的なものとしてユング

型マイクロトームがあり、滑走式である。

6. 染色

パラフィンブロックより薄切した切片はその状態では顕微鏡下で観察することができないので、顕微鏡で観察に適した状態にするために染色を施し、種々の細胞構造を明らかにする必要がある。染色には脱パラフィン、染色、脱水、透徹、封入という行程がある。

1) 脱パラフィン

(1) キシレン・Ⅰ	5分
(2) キシレン・Ⅱ	5分
(3) キシレン・Ⅲ	5分
(4) 100%エタノール	2分
(5) 100%エタノール	2分
(6) 90%エタノール	2分
(7) 70%エタノール	2分
(8) 水洗	2分
(9) 種々の染色	

2) 脱水、透徹、封入、鏡検

(1) 70%エタノール	1分
(2) 90%エタノール	1分
(3) 100%エタノール	1分
(4) 100%エタノール	1分
(5) キシレン・Ⅰ	2分
(6) キシレン・Ⅱ	2分
(6) キシレン・Ⅲ	2分
(7) 封入	
(8) 鏡検	

【 実習に際して準備するもの 】

[固定、切り出し、脱水、包埋]

・メッシュ	・ホッチキス
・切り出し用メス	・ピンセット
・ハサミ	・脱水用ガラス容器
・アセトン	・アルコール
・キシレン	・パラフィン
・包埋皿	・ナイフ
・スパーテル	・ガスバーナー
・ブロック	・パラフィン溶融器

[薄切]

・マイクロトーム	・シャーレ
・ビーカー	・マイクロトームメス
・替え刃	・ピンセット
・筆	・スライドグラス
・標本立て	・孵卵器
・伸展器	・マイクロトーム油
・氷	

[染色, 鏡検]

- | | |
|-----------|---------|
| ・染色バット | ・染色 |
| ・ピンセット | ・濾紙 |
| ・封入剤 | ・カバーグラス |
| ・キシレン | ・エタノール |
| ・蒸留水 | ・顕微鏡 |
| ・ディスプレイ手袋 | ・ロート |

【 実際上の注意点 】

1. 固定

- ・10%ホルマリンで24時間固定する。

2. 切り出し

- ・標本にした場合、多くの情報が最大限出るように切り出しをする。
- ・包埋時を念頭に入れておき、面を水平に切る。

3. 脱水

- ・組織中の水分、脂肪分を取り除くため液の汚れに注意する。

4. 包埋

- ・薄切がしやすいようにパラフィンに包埋。
- ・台木付けを考えて包埋。
- ・パラフィンが固まる前にすばやく包埋する。
- ・固める場合は流水中で素早く固める。
- ・組織の間隔を適当にとり、切り分けられるようにする。

a) 包埋順

- ・臓器別にまとめて包埋

b) 包埋方向

- ・皮膚ならば上皮、皮下組織が出るような向き。
- ・結合組織、弾性線維などの走行に注意する。

c) 包埋面

- ・標本にする面を下に包埋する。
- ・面全体を水平に包埋する。

5. 台木づけ

- ・面が水平になるように付ける。
- ・パラフィンブロックと台木はしっかり付ける。
- ・スパーテルで十分にパラフィンを溶かす。

6. 薄切

a) ミクロトームの構造

b) 薄切原理

c) 荒削り, 面出し

d) 本削り(3~5 μ m)

e) 薄切の方向, ブロックを付ける方向

7. 薄切時に起こる問題

- a) カーリング: メスの切味がよいと発生する
- b) 切片の収縮, 歪み: 引き角とメスの切味により左右される
- c) メスマーク: 替え刃の一部分が欠けることにより発生する
- d) びびり: メス, ブロックの固定不十分, 台木づけ不十分
- e) メスの喰い込み: 組織が硬い場合, 逃げ角が大きすぎる場合
- f) 薄切切片の厚さの不均一
- g) 同一切片上での厚さの不均一: 台木づけ不十分
- h) 切片に亀裂が入る: メスの切れ味が悪い, 引き角が大きい
- i) ブロック面が白く見える: 荒削りの仕上げ不足, パラフィンの浸透不足
- j) 切片のしわ

8. 薄切切片の処理中に起こりやすい問題

- a) 切片裏面の泡
- b) 切片の折れ曲がり

9. 伸展中に起こりやすい問題

- a) 伸びが悪い: 伸展温度が低い
- b) しわの発生
- c) 切片下の気泡
- d) 切片が広がる: 伸展温度が高すぎる, パラフィンの融点が低い場合

10. 貼り付け

- ・各スライドで, 同じ位置, 同じ向きに拾う。
- ・上皮をしたにする。

11. 染色

Hematoxylin Eosin (HE) 染色

[脱パラフィン → ヘマトキシリン → 水洗 → エオジン → 脱水 → 封入]

○染色過程において注意すること

a) 脱パラフィン

- ・切片は乾かさない。
- ・液を十分にきる
- ・液の汚れを確認する。

b) ヘマトキシリン

- ・過染しすぎないように注意

c) 水洗

- ・核の染まり具合を鏡検

d) エオジン

- ・強めに染める

e) 脱水

- ・70%アルコールでエオジンの色も抜ける。

f) 封入

- 切片のキシロールをよく切る。
- 切片は乾かさない。
- カバーガラスに指紋を付けない。
- カバーガラスをとき気泡に注意。
- 余分な封入剤を吸い取る。

参考文献

1. 病理組織標本作製技術，日本病理学会編
2. 組織学研究法，南山堂
3. 病理組織染色ハンドブック，医学書院IV-1.