

4 病理組織学的検査の標準化（東京都版）を

視野に入れた取り組み

○藤森英雄

要 約

家畜疾病診断精度管理向上事業により、精度管理が開始されるが、病理検査部門においても同様な精度管理等が必要と考えられる。病理組織学的検査は、病理組織標本（標本）の鏡検を行う。人の医療分野では資格を持った臨床検査技師が標本作成を担っていると思われるが、家畜衛生部門では、病理担当職員が全てを行っている。標本は、病理診断に影響するため、標準化の必要性を訴える報告書もある。さらに、家畜衛生分野では、死後の時間が経過した検体が供される場合がある。

そこで、死後の経過時間の異なる鶏（死亡直後、2、17、27 時間）の標本、薄切厚を変えた（2.5、3.5、4.5、5.5 μm ）標本、水道水希釈の 10%ホルマリン液（不良固定液）で固定した標本を作製し、組織所見を比較した。その結果、死後経過の早い段階で変化が観察されたのは、腎尿細管と気管支腺などの腺細胞であった。また、薄切厚では、3~4 μm が適切と思われたが、筋線維では、より薄い標本の方が観察しやすかった。不良固定液では、膨化して空胞化したように見える組織像が観察される部位もあることが判明した。

（本演題は、口頭発表で要約と図表のみ掲載しています。）

家畜疾病診断精度管理向上事業(精度管理事業)の概要

平成27年度

精度管理検討委員会によって対象診断法を決定し、要領等を作成
(外部委員3人、家保:北海道、岩手県、神奈川県、福岡県)

- 牛ヨーネ病遺伝子検査(リアルタイム)
- 鳥インフルエンザ遺伝子検査(リアルタイム、コンベンショナル)
- 鳥インフルエンザ血清ELISA検査

- 家畜保健衛生所等による検査等の業務管理要領(案)
- 業務管理実施要領(標準作業書)のひな形(及びQ&A)
- 外部精度管理調査実施要領(案)

平成28、29年度

対象となる家畜保健衛生所による業務管理実施要領の作成

外部精度管理調査の試行

平成28年度 先行家(県)による外部精度管理調査の実施

平成29年度までに対象家保全てで実施

→対応困難、改善が必要な項目の洗い出し

→精度管理検討委員会による検討

平成30年度

農水省からの通知 → 精度管理のスタート

<平成28年度家畜衛生研修会(病理部門)・疾病対策部・講義資料より>

今後、家畜疾病診断精度管理の向上は、どこまで求められるのか？

平成28年度家畜衛生研修会(病理部門)講義で、質問

・目指すところは何か？
・経費？

→ 明確な回答は、得られなかった
(個人的な印象)

OIE? TPP?

・病理部門の検査でも、精度管理は、求められるもの？

→ 準備は必要

・業務管理要領、業務管理実施要領(標準作業書)等は、無い

・HPAI防疫演習(10月26日)で、生きた鶏を入手 → 標本作成「廃鶏だが、健康な鶏」

・この事業では、「検体の採取」は、考慮しない → 病性鑑定は「死後変化の影響」は大きい

◎病理組織標本の作製 ヒト 臨床検査技師 家畜衛生 獣医師

引用:愛知県臨床検査標準化ガイドライン

標本の良否は、診断に影響

引用:知っておきたい病理標本のアーチファクト 愛知県臨床検査技師会病理検査研究班編

病理標本のアーチファクトの原因

- 1 材料採取時: ススやピンセットによる汚染
- 2 固定: 切り出し時のコンタミ、虫ピン固定による組織破壊、脱脂不良、過脱灰
- 3 包埋: 包埋方向の間違ひ
- 4 薄切: 切り屑混入、ミス傷、角化扁平上皮の混入、チャタリング、気泡の混入
- 5 染色: 染色むら、脱水不良、封入剤不足

都家保においてアーチファクト防止を定めた手順書等はない

◎臨床検査技師では、10年以上の経験者が大多数、専門家の集団

○家畜衛生部門:標本作成は、経験少ない獣医師(人事異動)

→ 体制の割には、疾病診断としての重要度が高い

厚生労働省管轄部局では、既に取り組んでいるが、農林水産省管轄では...

精度管理の向上を目指すには、良い標本が必要

病理組織学的検査の標準化(東京都版)を視野に入れた取り組み

●切片の厚さについて
(引用:神奈川県臨床検査技師会HP)

①マイクロームの目盛と実測値の差は、厚さの設定が薄いほど大きくなり、設定よりおよそ10%厚くなる傾向があった。

②厚みのばらつきは、3.71~4.49μmの範囲で、平均4.06μm

③各施設の厚さは、3.24~4.82μmの範囲で、平均は、申告値3.12μmに対し、実測値が3.98μm

「厚みによる、影響は少ない」とされているが、「新染色法のすべて」、染色法により最適厚が提示

・標本の厚みの違いによる、組織の見え方

●「つば病理談話会」への提出標本(鶏の卵殻膜部) → **ホルマリンの希釈を水道水でやってないね、大丈夫？**

※ 常時、10%中性緩衝ホルマリン溶液(以下:ホルマリン液)を作成・使用

・水道水希釈による10%ホルマリン液(以下:不良固定液)による影響

組織の見え方 ①死後変化(経過時間の違い) ②標本の厚さ ③不良固定液

標本作成条件: 常法に従い

①密閉式自動固定 ②薄切

加湿器 (今回は未使用)

40℃

水道水

※ 湯せん時間は不定(シワ除去)

70℃冷却器

薄切厚の設定

・荒削り(20μm)

薄切(2.5~5.5μm)

③伸展・乾燥(傾斜) 40℃ (貼り付けの翌日以降に染色)

④自動染色機

・染色液(市販)

・エタノール(80, 90, 99.5%)

・キシレン

<全て交換>

滑走式マイクローム

死後経過時間の設定 **死亡してから切片固定が開始されるまでの時間**

個体NO.	体重(kg)	殺方法	死後経過時間	ホルマリン浸漬時間*	
1	2.5	放血	直後	35時間	同時に密閉式自動包埋装置で処理 ↓ 標本作成
2	2.2	放血	2時間	31時間	
3	2.7	炭酸ガス	17時間	22時間30分	
4	2.7	放血	27時間	33時間30分	

※ 切り出し後の包埋までの準備時間も含む

死亡① 14:00 → 27時間 → 死亡③ 2時間

死亡② 0:00 → 17時間 → 死亡③ 2時間

解剖前日 解剖当日

発見 朝 連絡 午前中 搬入 昼前 解剖 14:00 固定開始 17:00

今回の検体は、健康

コントロールとして、直後(最後の臓器まで30分)

① 死後経過時間の違いによる比較の結果

方法・密閉式自動固定包装装置にすべての検査が同時に処理できるように解剖時刻を調整
 ・安楽殺後は、上記解剖時刻までは、ダンボール箱に入れ、解剖室(室温約20℃)に保管
 ・解剖時刻になったら、解剖を開始し、常法に従い病理標本を作製
 ・ホルマリン浸漬(固定)時間は、22時間以上とする

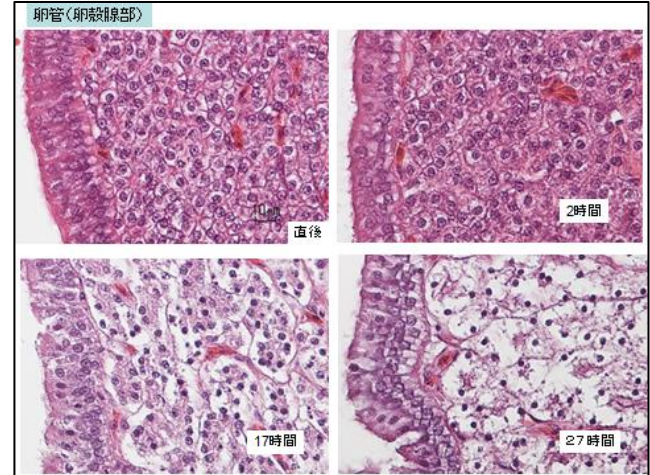
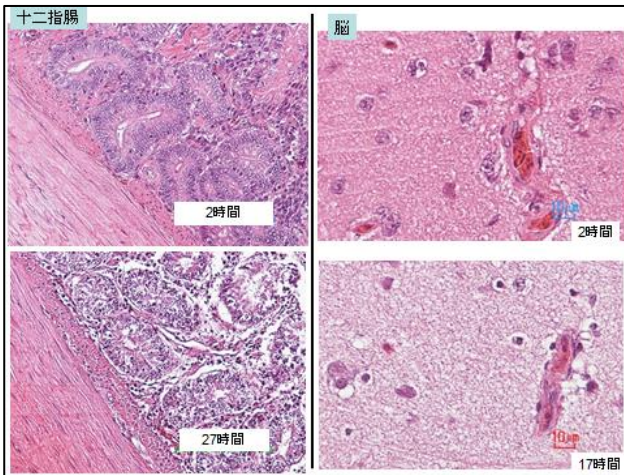
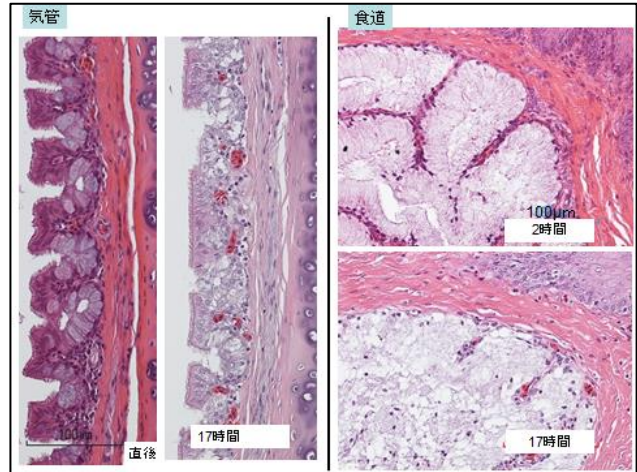
↓
 各標本を観察、比較

- ① 気管(直後、17時間)・食道(2時間、17時間)
 ② 十二指腸(2時間、27時間)・脳(2時間、17時間)
 ③ 卵管(卵殻腺部)(直後、2時間、17時間、27時間)

今回作成した標本

心臓、肝臓、腎臓、肺、気管、脾臓、脳
 その裏、食道、膵胃、筋胃、十二指腸+脾臓、小腸、盲腸
 卵巣、卵管(狭部、卵殻腺部)、胸筋、骨格筋(大腿部)

7



① 死後経過時間の違いによる比較の結果

- 粘液腺細胞が、最も早い段階で、影響を受ける(変性)
- 核が濃縮していく(核と細胞質間に空隙が見えてくる)
- 筋線維間の拡張が見られる
- 結合織に空隙が見られる



- 病畜の場合は、死後変化が急速に進行すると考えられる
- 季節によっても変化の進行速度が異なってくると考えられる
- 検体が、生前、死後どのような状態だったかは、聞き取っておく必要がある

11

② 切片の厚さによる比較

検体: ①で作成した死後直後のパラフィンブロック標本

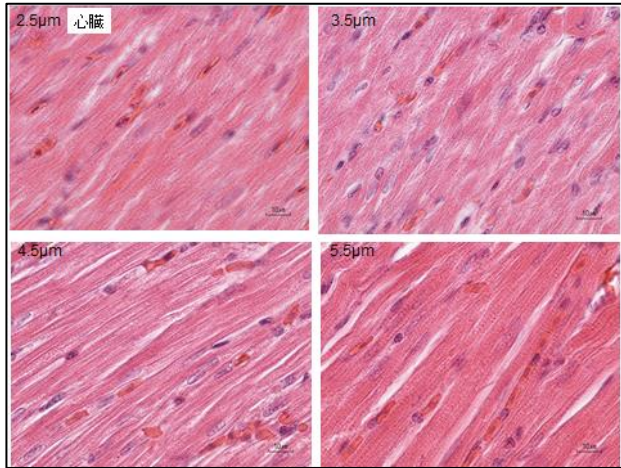
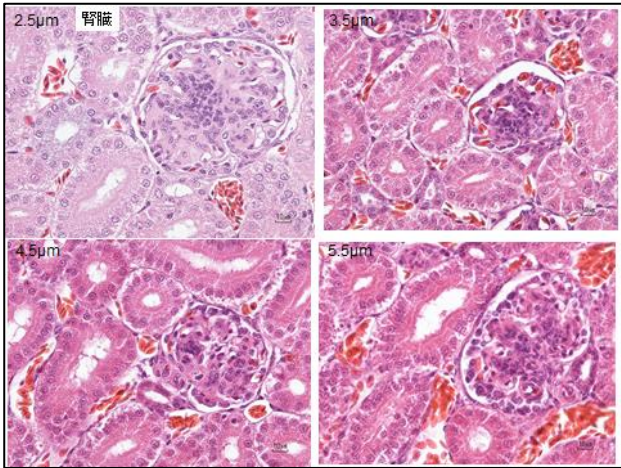
方法: マイクロームの薄切厚の設定

↓
 2.5µm、3.5µm、4.5µm、5.5µm

↓
 各標本を観察、比較

- ① 腎臓
 ② 心臓

12



◎ 切片の厚さによる比較の結果

- HE染色では、標本の見え方への影響は少ない
- 構造を観察する(染色法)には、厚みの影響はあるか？
- 筋線維は、厚いと重なってしまう
- 赤血球は、厚いと重なってしまう

↓

○切片の厚みは、作製技術に左右されると考えられるが、3~4μmで、問題ないと判断
 ○特殊染色(HE染色以外)での影響は、今後の検討課題

15

◎ 不良固定液による比較

検体: 異常卵を産むと飼養者が特定した鶏1羽

方法: 解剖後に摘出した所要臓器を2つのホルマリン液に浸漬
 (10%中性緩衝ホルマリン液、不良固定液)
 解剖後、最後の臓器浸漬まで、約30分

↓

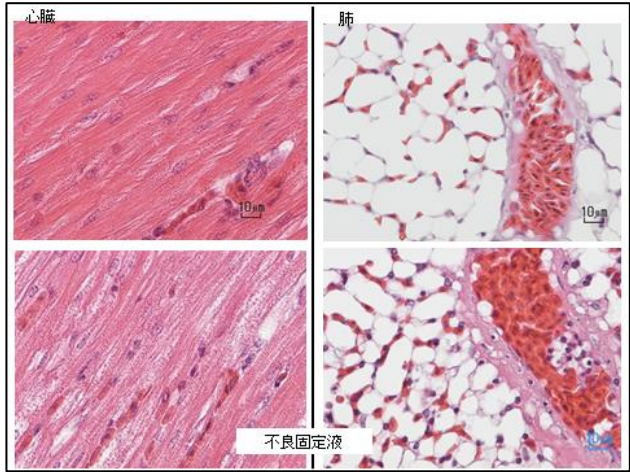
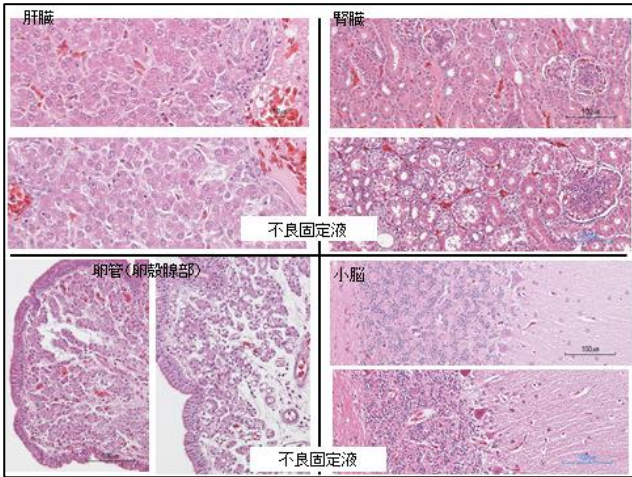
常法に従い組織切片を作成

↓

切片厚(設定値) 2.5μm

① 心臓・肺
 ② 肝臓・腎臓
 卵管(卵黄腺部)・小脳

16



③ 不良固定液による比較の結果

- 細胞が萎縮
 - 肺胞壁の細胞は膨化
 - 管腔は拡張
 - 筋線維は粗鬆化したよう
- 空胞化のような印象を受ける

- ホルモンの調整は、適正に行う(調整後のチェック)
- 市販のホルモン固定液を使用する
- 臓器に対するホルモン量(10倍量)
- 安全性が高いとされる、代替ホルモンの検討

まとめ

今後は、他の条件設定による検討などを行い、良い標本の作製ができるように努め、業務管理要領、業務管理実施要領(標準作業書)等の作成準備を開始したい