

平成28年度静岡県臨床検査技師会
精度管理報告会
病理細胞部門

アンケート集計結果

静岡県立総合病院
病理学部 岩崎朋弘

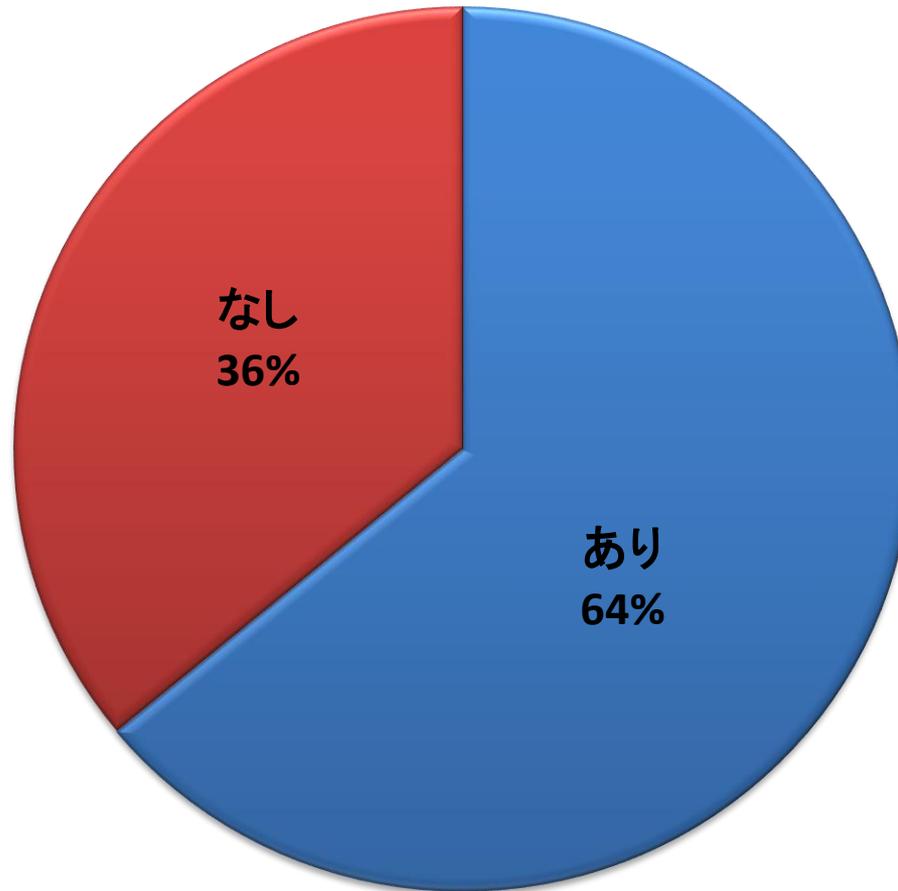
共通アンケート

 プレアナリシスにおける作業工程について
－固定操作－

 プレアナリシスにおける作業工程について
－包埋・ブロック作製－

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（生検材料）

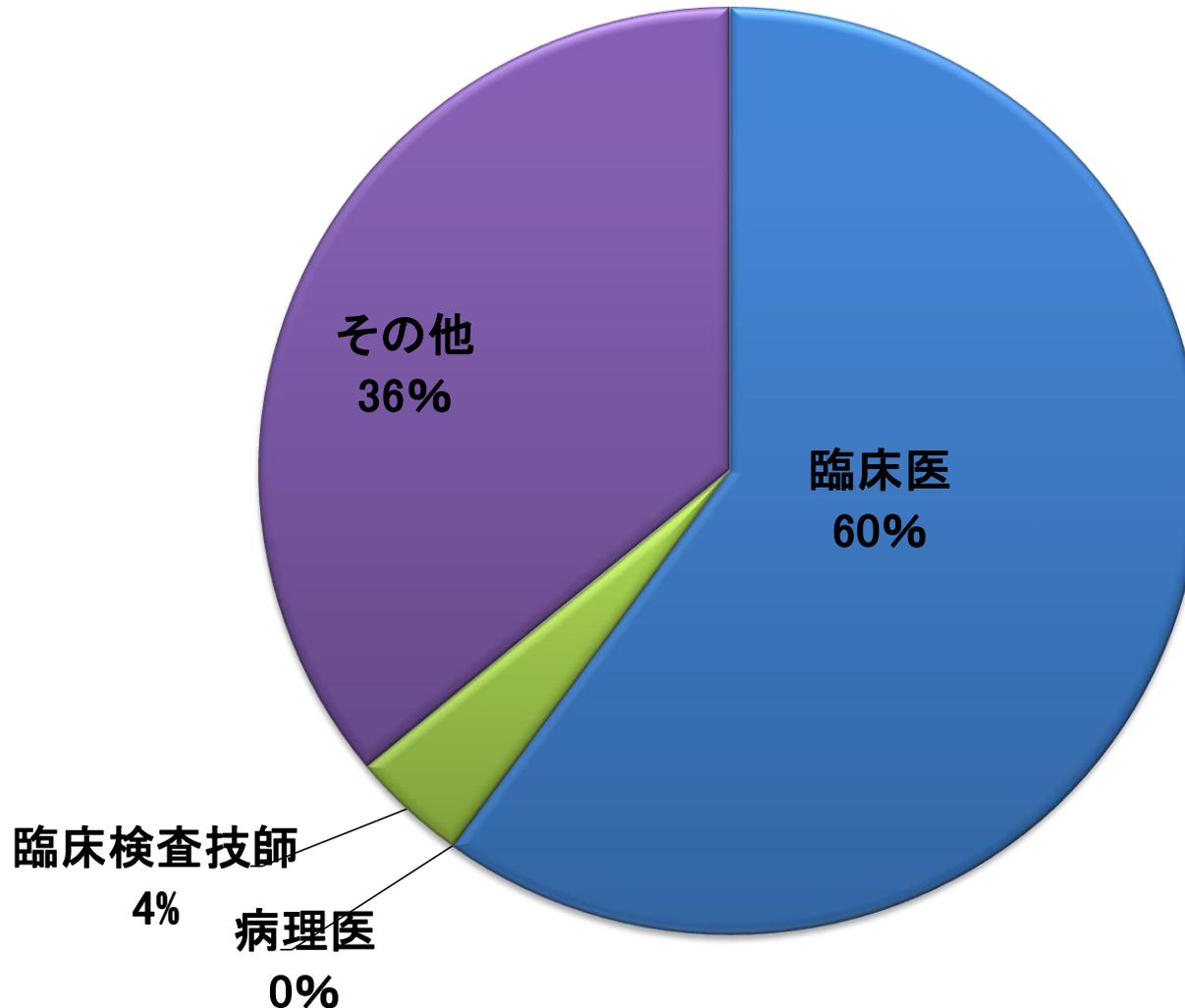
施設内ルールやマニュアルの作成



N=25施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（生検材料）

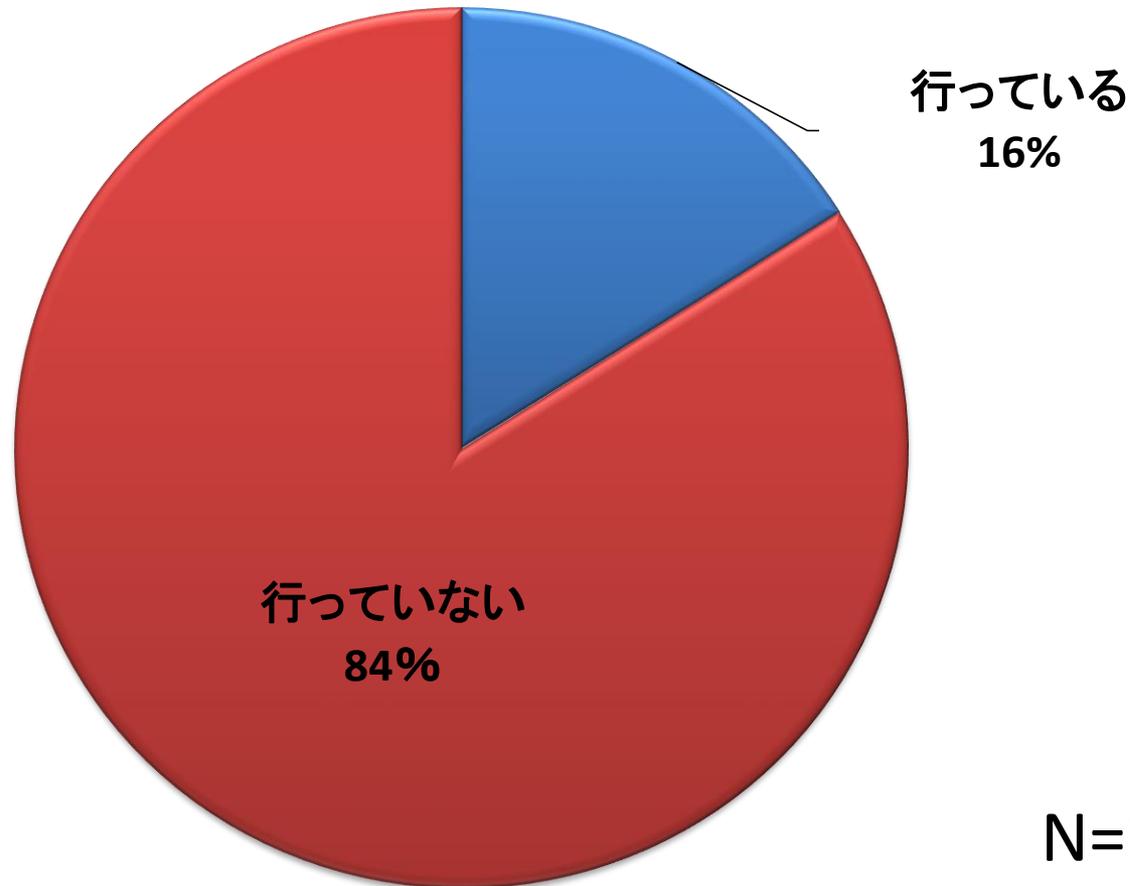
誰が固定操作を行いますか？



N=25施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（生検材料）

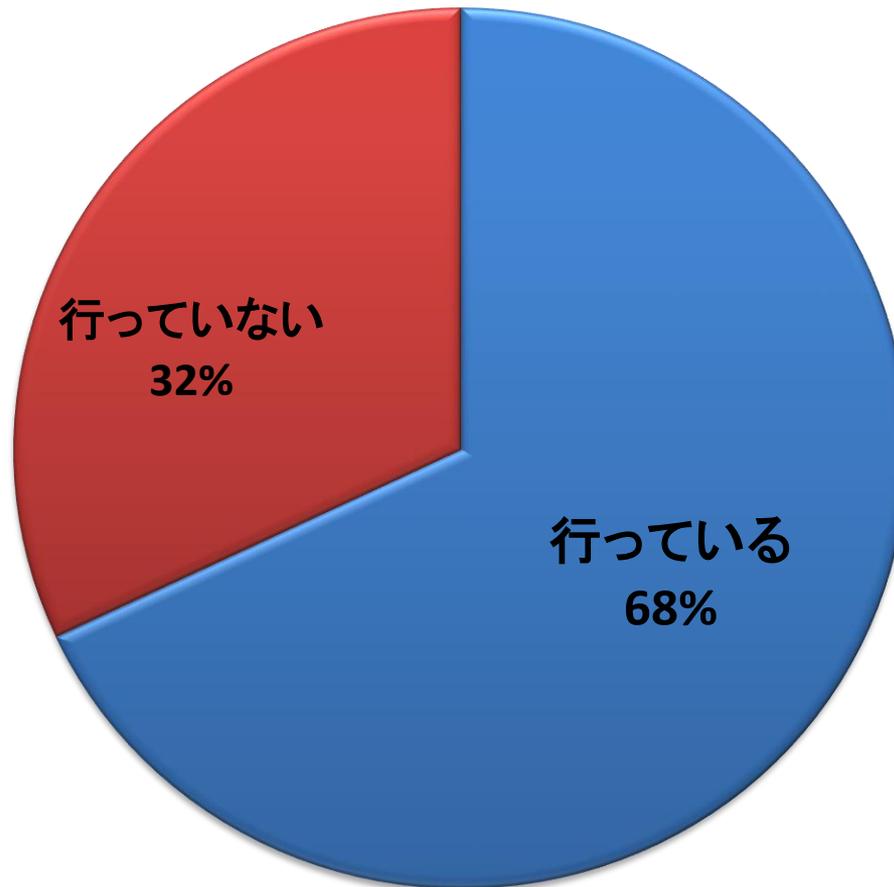
検体の採取時刻/固定開始時間の記録
（臨床側の協力）を行っていますか？



N=25施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（生検材料）

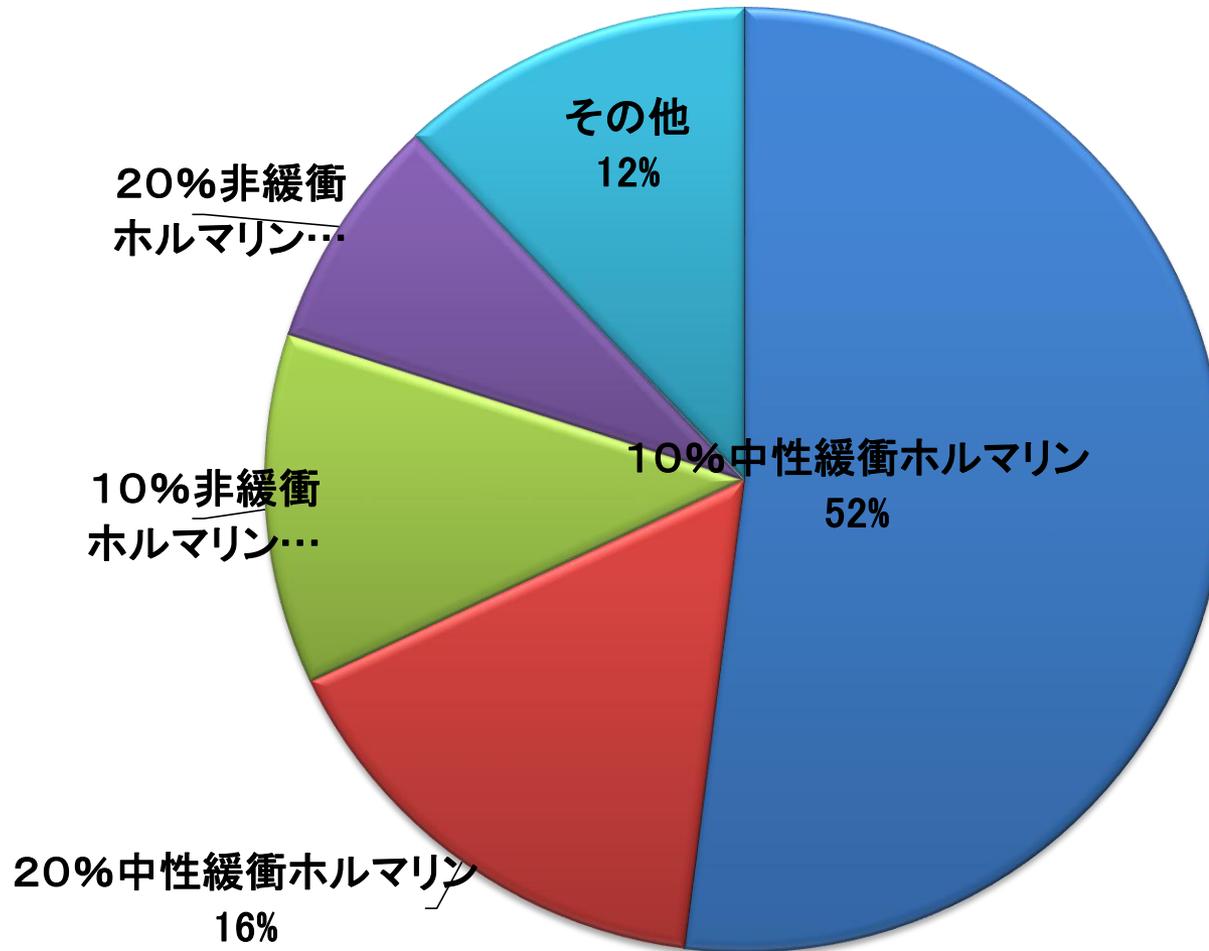
固定時間管理（過固定や半固定の防止）を
行っていますか？



N=25施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（生検材料）

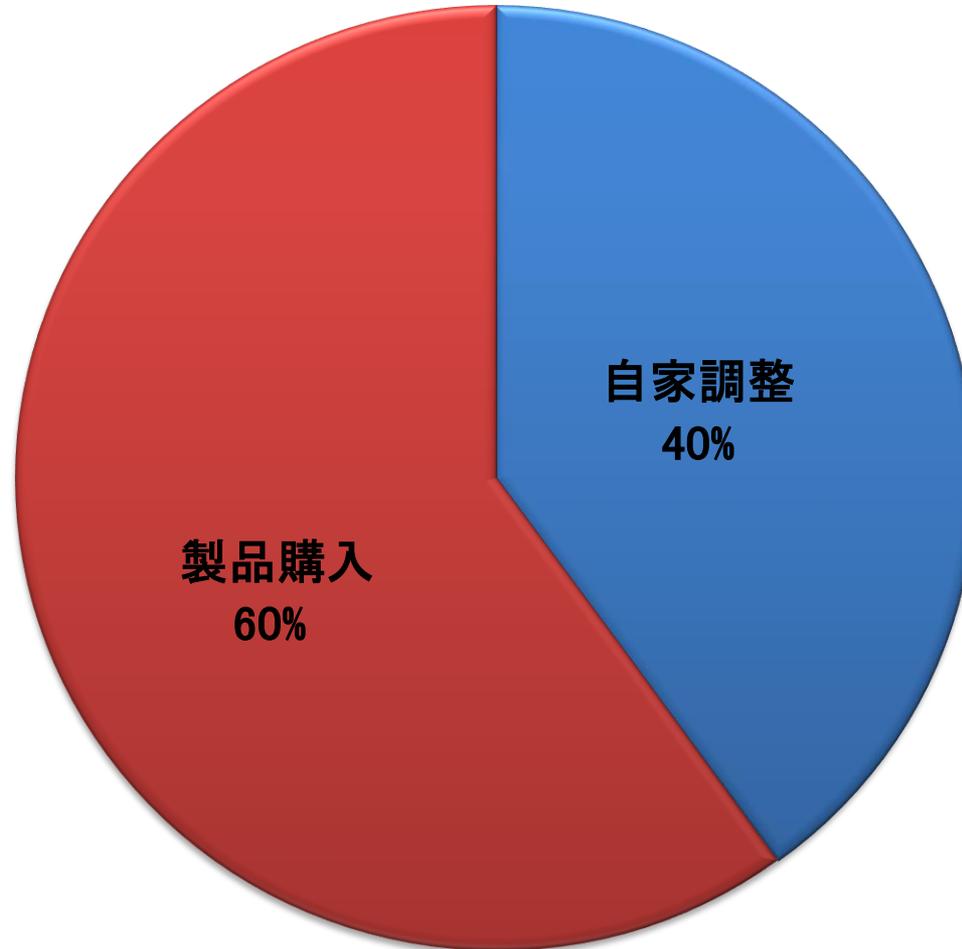
固定液の種類と濃度



N=25施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（生検材料）

固定液の調整



N=25施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（生検材料）

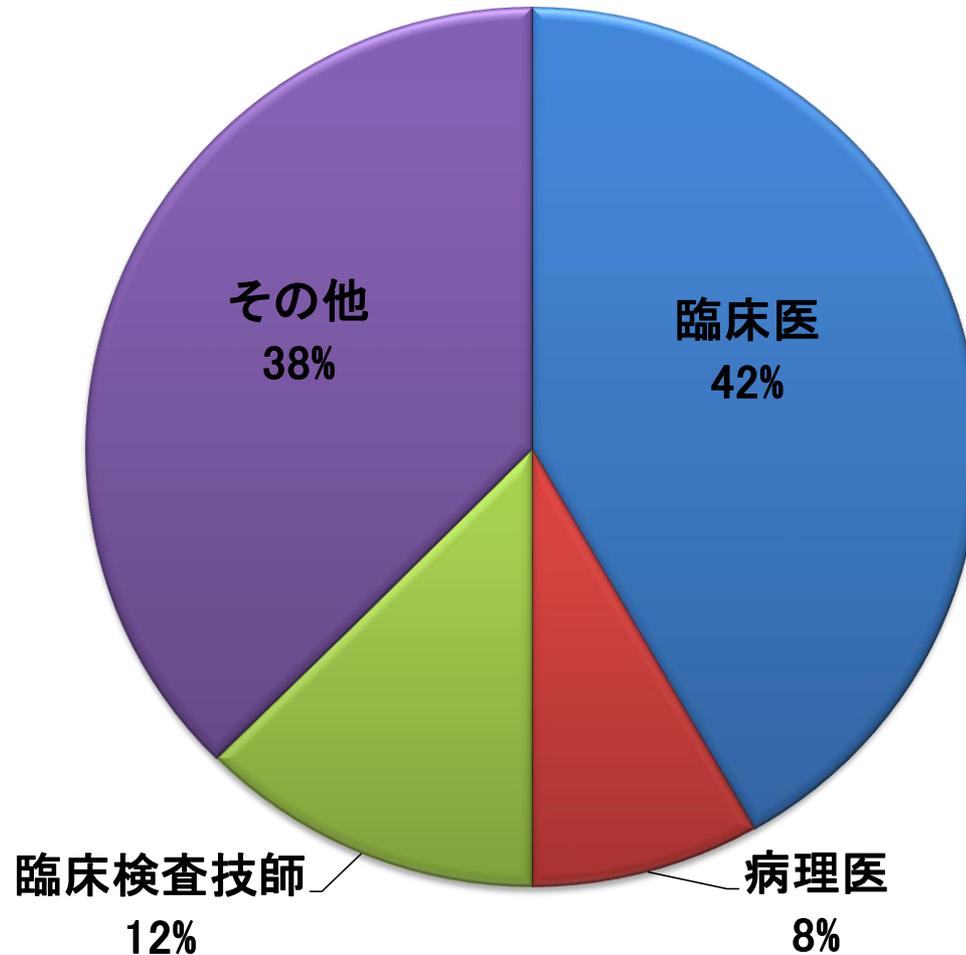
<固定液製品購入（メーカー、商品名）>

- ・武藤化学 : 20%中性緩衝ホルマリン
10%中性緩衝ホルマリン
- ・和光純薬 : 20%中性緩衝ホルマリンpH7.4
10%中性緩衝ホルマリン
マスクドホルム10N
- ・日本ターナー : マスクドホルム
- ・ユーアイ化学 : 10%中性緩衝ホルマリン
- ・関東化学 : 中性緩衝ホルマリン（10%と20%等量混合）
- ・日本ケミコート化成 : 20%中性緩衝ホルマリン

n=25施設

プレアナリシスにおける作業工程について —固定操作—(大型・手術材料)

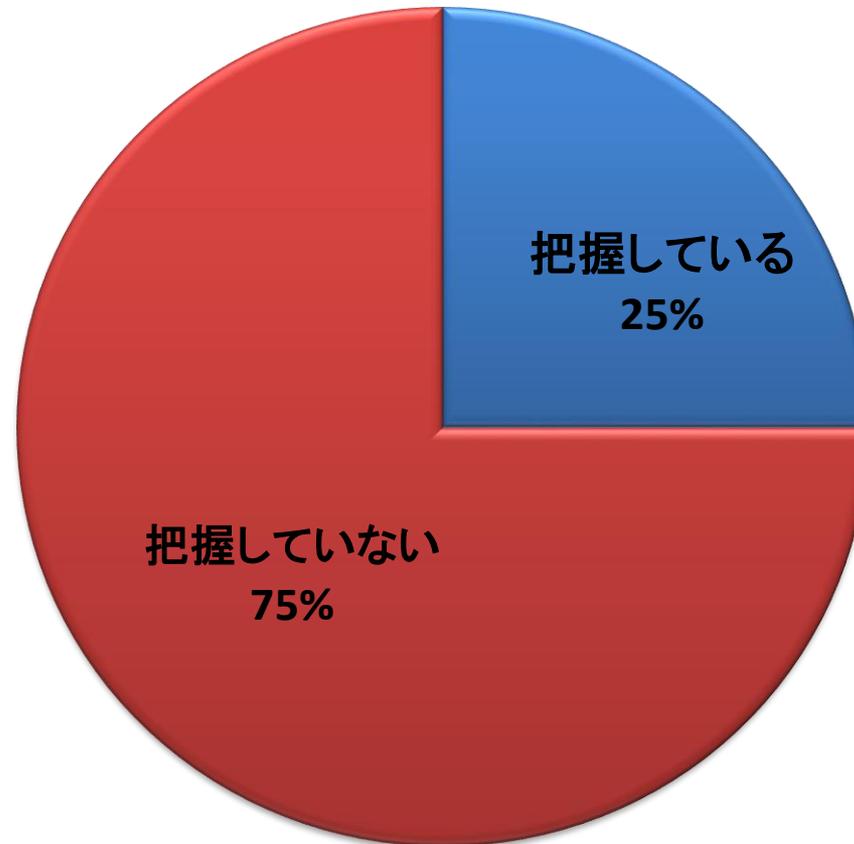
摘出臓器の固定操作(切開、割入れ含む)は
誰が行いますか？



n=24施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（大型・手術材料）

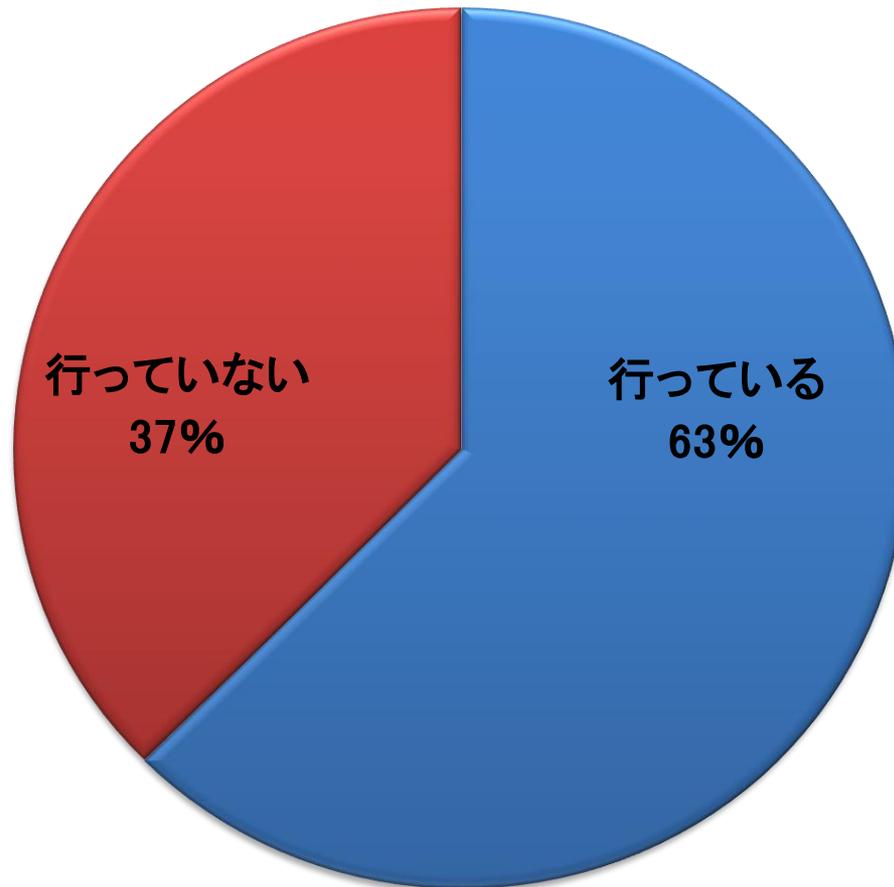
臓器摘出から固定液に浸漬されるまでの
時間について



n=24施設

プレアナリシスにおける作業工程について —固定操作—(大型・手術材料)

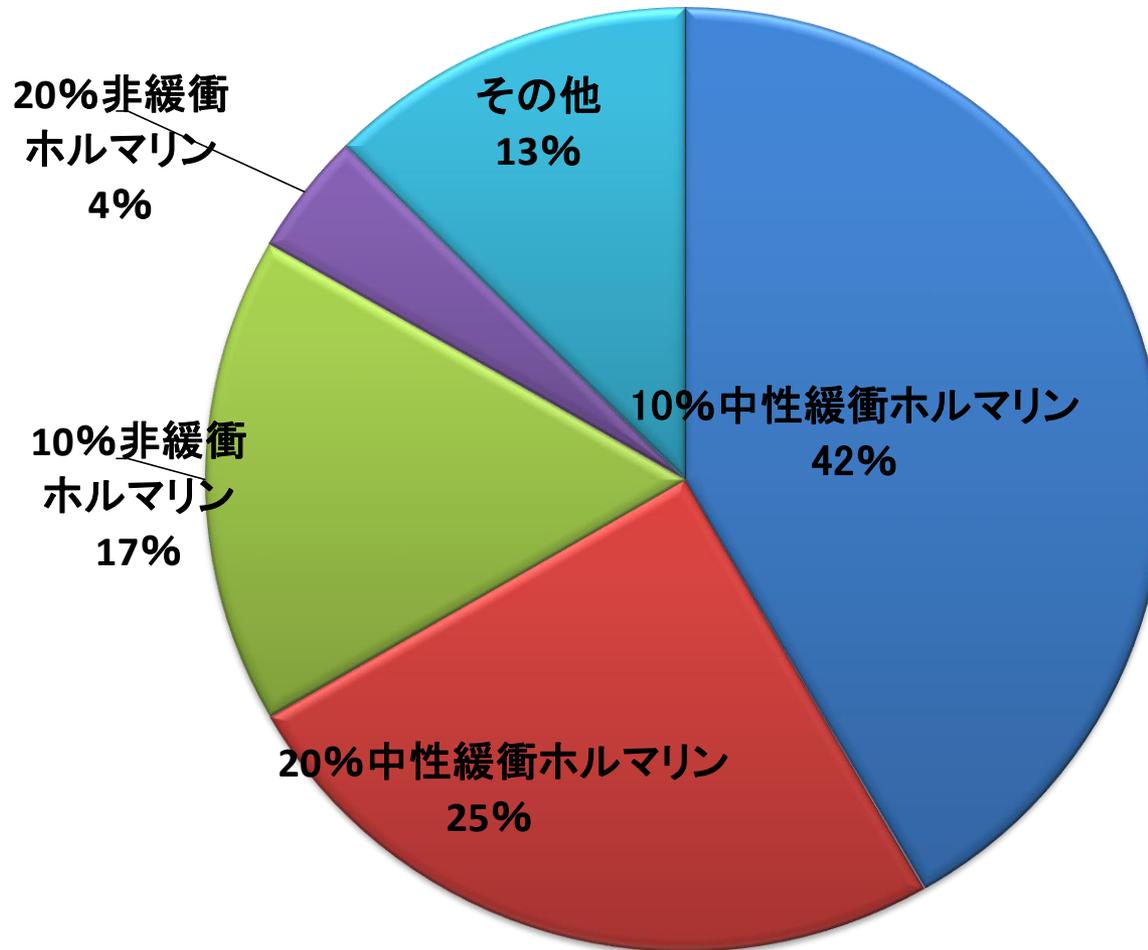
固定時間管理(過固定や半固定の防止)を
行っていますか？



n=24施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（大型・手術材料）

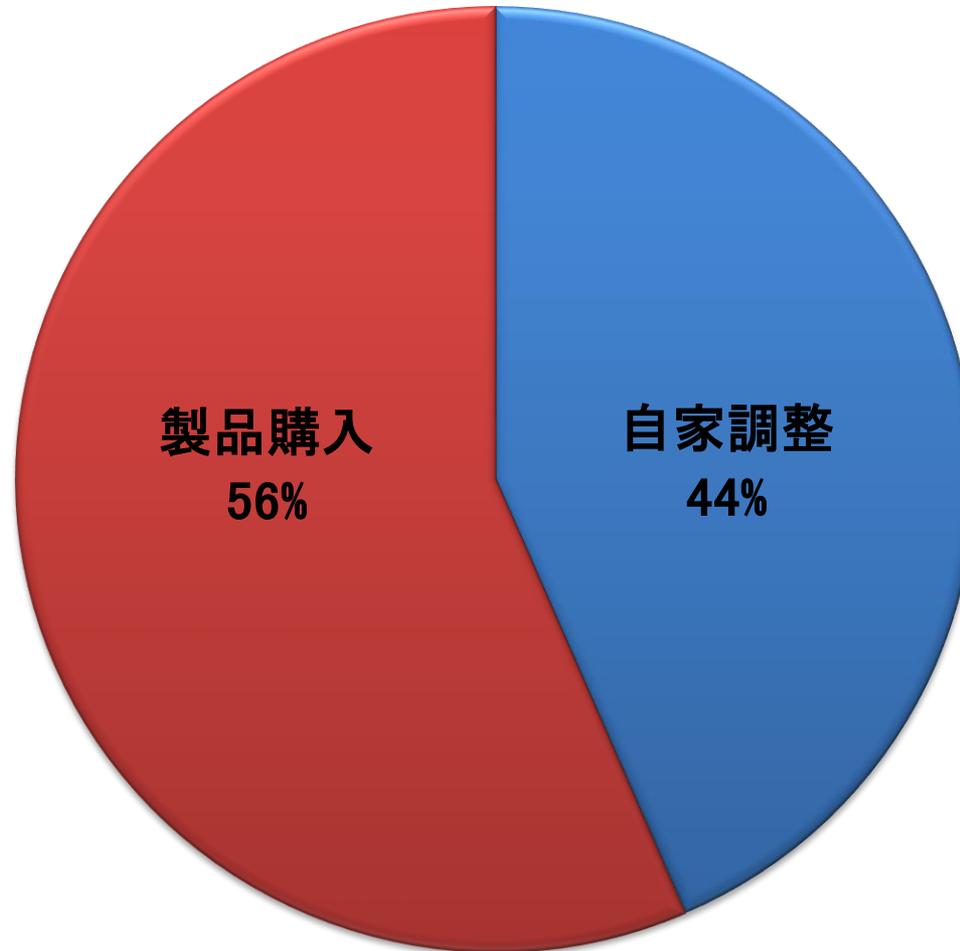
固定液の種類と濃度



n=24施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－（大型・手術材料）

固定液の調整



n=23施設

プレアナリシスにおける作業工程について －固定操作－(大型・手術材料)

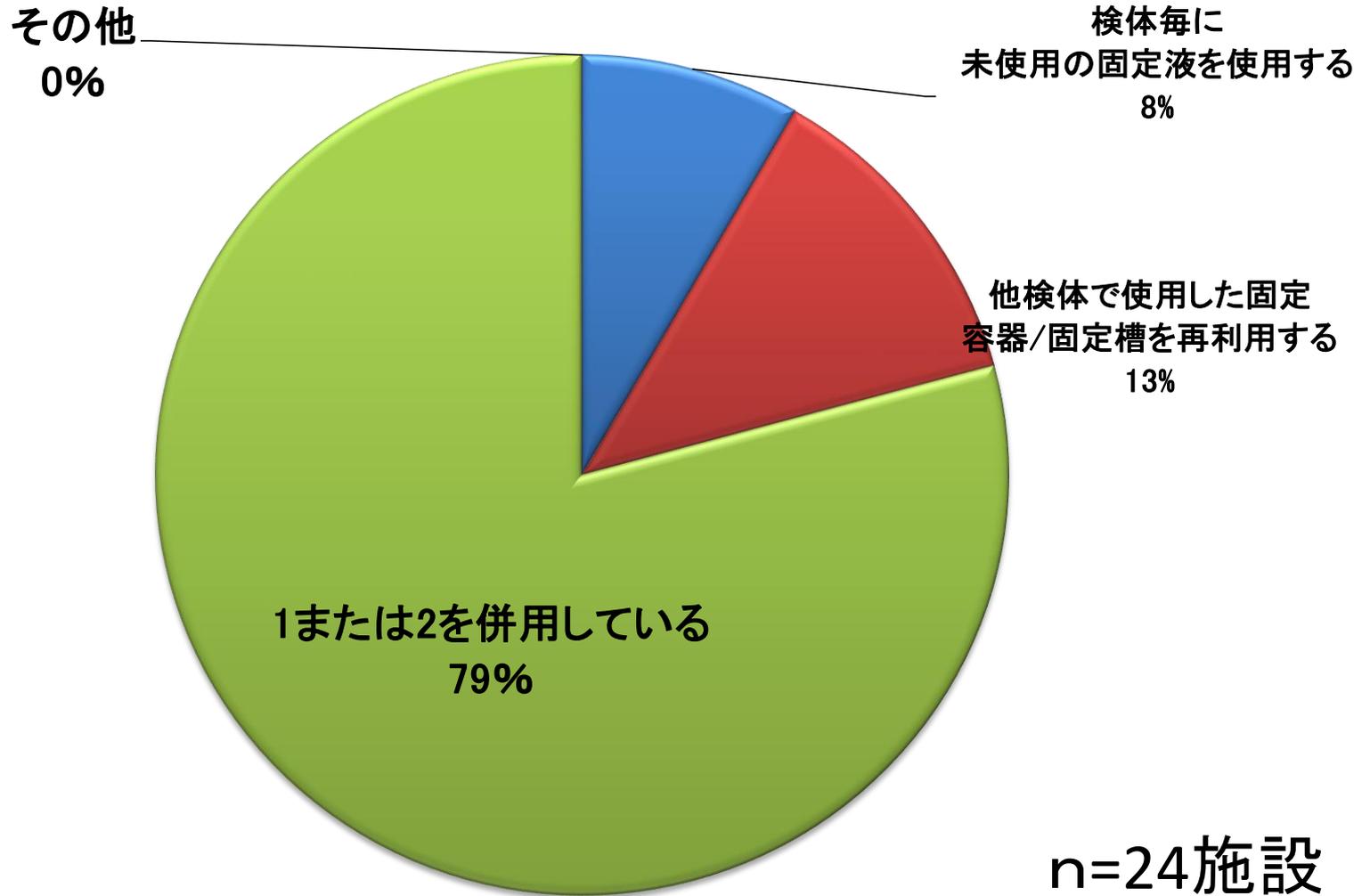
<固定液製品購入(メーカー、商品名)>

- ・武藤化学 : 20%中性緩衝ホルマリン
10%中性緩衝ホルマリン
- ・和光純薬 : 20%中性緩衝ホルマリンpH7.4
10%中性緩衝ホルマリン
マスクドホルム10N
- ・日本ターナー : マスクドホルム
- ・ユーアイ化学 : 10%中性緩衝ホルマリン
- ・関東化学 : 中性緩衝ホルマリン(10%と20%等量混合)

n=24施設

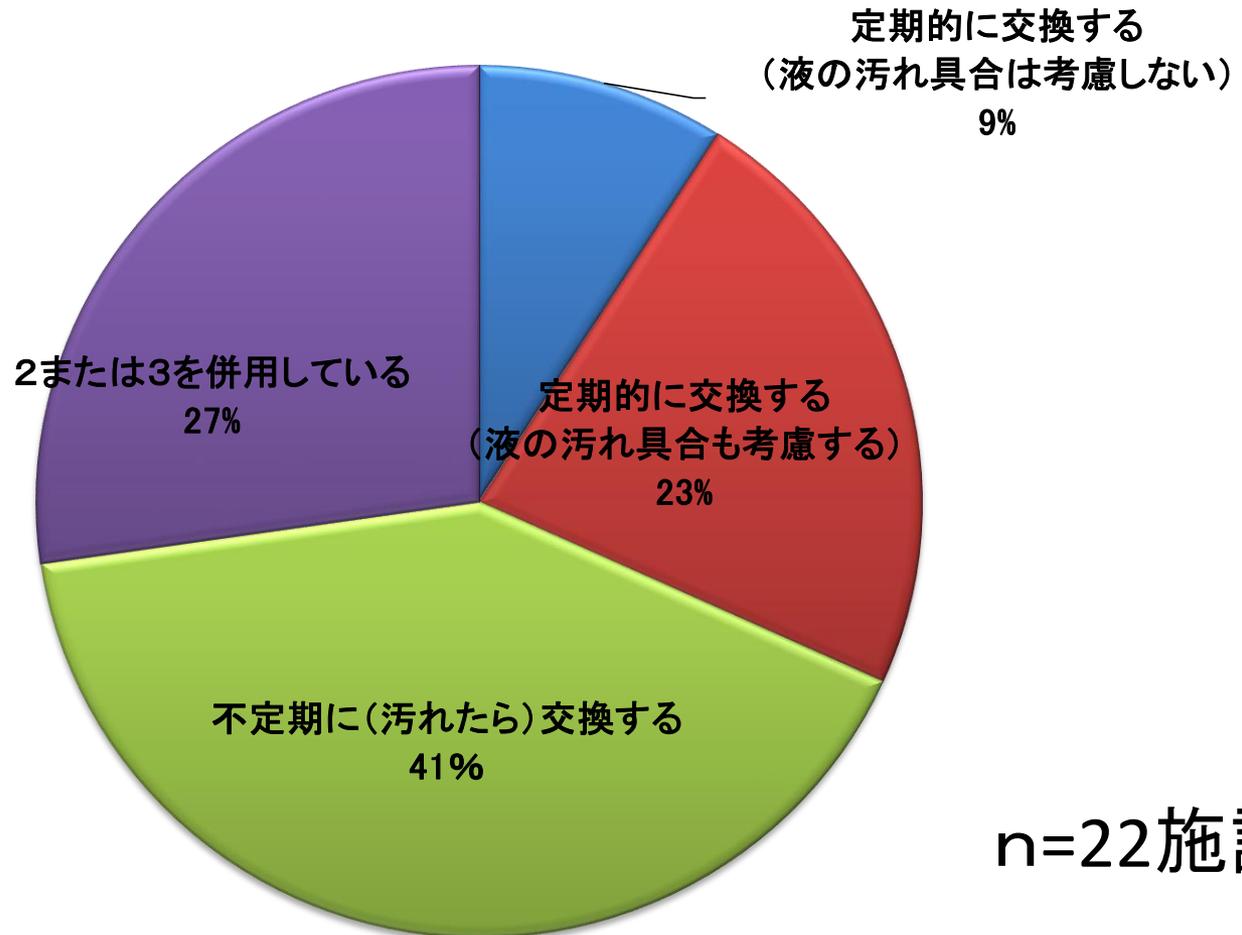
プレアナリシスにおける作業工程について —固定操作—(大型・手術材料)

固定液の使用方法について



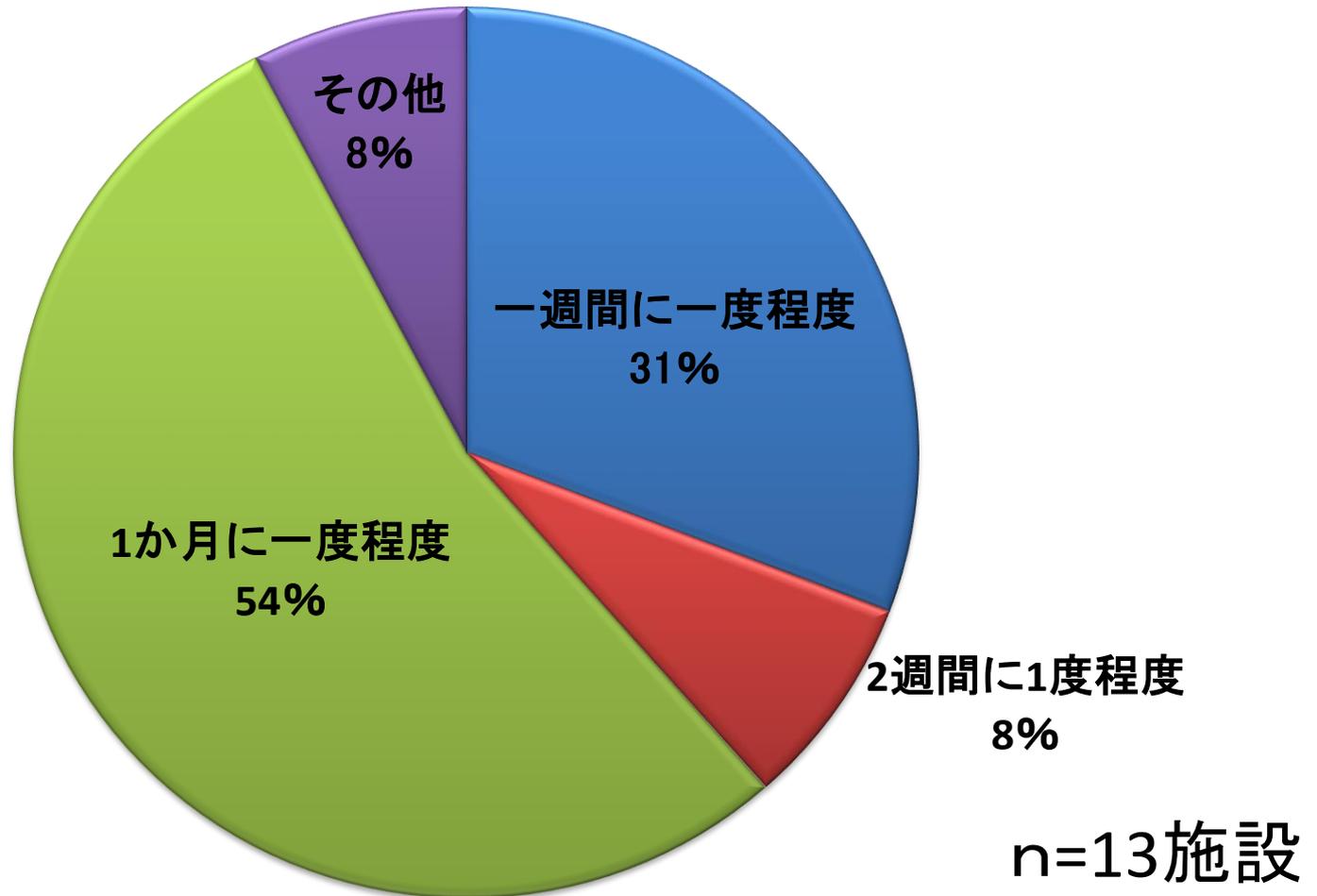
プレアナリシスにおける作業工程について —固定操作—(大型・手術材料)

固定液を再利用している場合、
その交換目安について



プレアナリシスにおける作業工程について —固定操作—(大型・手術材料)

定期的に交換する場合の頻度は？



ホルマリンと各種ホルマリン固定液

市販のホルマリン → 35～40%ホルムアルデヒド水溶液
(重合防止剤メタノール10～15%含有)

ホルマリンを低温で保管すると、ホルムアルデヒドのポリマーの「パラホルムアルデヒド」の白色の沈殿が生じる。

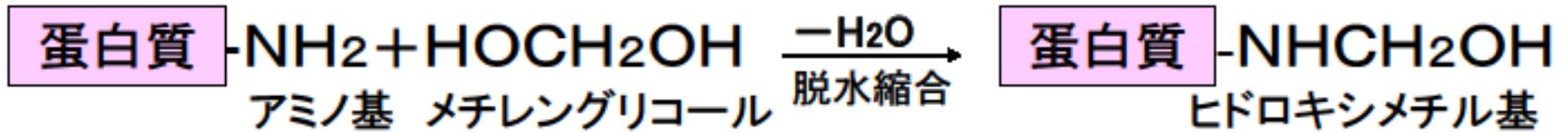
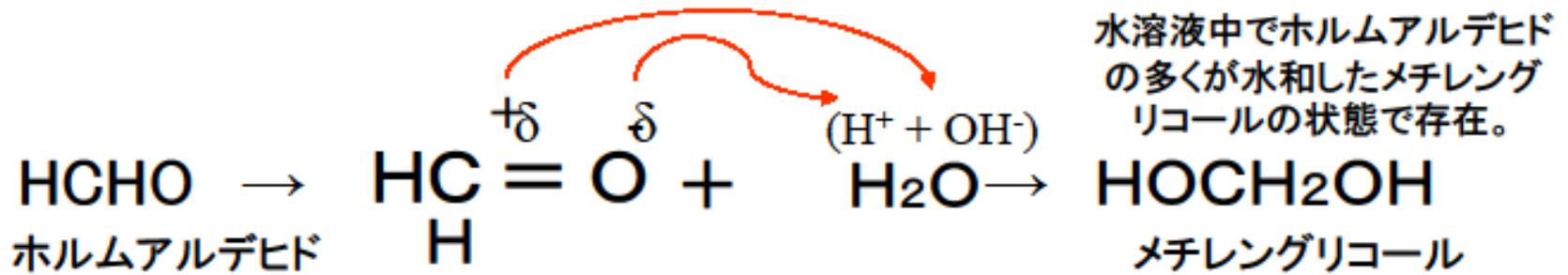


(O)

ホルマリンのpH値: 約3～4 ($\text{HCHO} \rightarrow \text{HCOOH} \rightarrow \text{HCOO}^- + \text{H}^+$)
ホルムアルデヒド ギ酸

ホルマリン固定液の種類	調製法、pH、他
10,15,20%ホルマリン	ホルマリン原液を、精製水で10-5倍に希釈。 10%ホルマリンのpH: 約4～4.5
10,15,20%中性緩衝ホルマリン	ホルマリン原液を中性リン酸緩衝液で希釈
10,15,20%中性ホルマリン	沈降性炭酸カルシウム pH6.8～7.0 沈降性炭酸マグネシウム pH7.2～7.0

ホルマリン固定の原理/ホルムアルデヒドと蛋白アミノ基の反応



ホルムアルデヒドにより組織蛋白質分子内、分子間で**メチレンブリッジ(架橋)**が形成 → 蛋白質をより高分子化し、蛋白質の三次構造を変化させ、蛋白質や他の成分を溶出しにくくさせ、組織を固定する。

(注:このメチレンブリッジは、標本作製の水洗過程で、その一部が加水分解し、アミノ基等が元の状態のフリーのアミノ基NH₂になる。)

ホルマリンの固定速度や固定効果の因子

1)ホルマリン濃度:10%,15%,20%ホルマリン(中性緩衝ホルマリン)

低い ← 固定液の濃度 → 高い

遅い ← 固定速度 → 速い

有効成分ホルムアルデヒド濃度が高いほど固定力が強く、固定速度が速い。

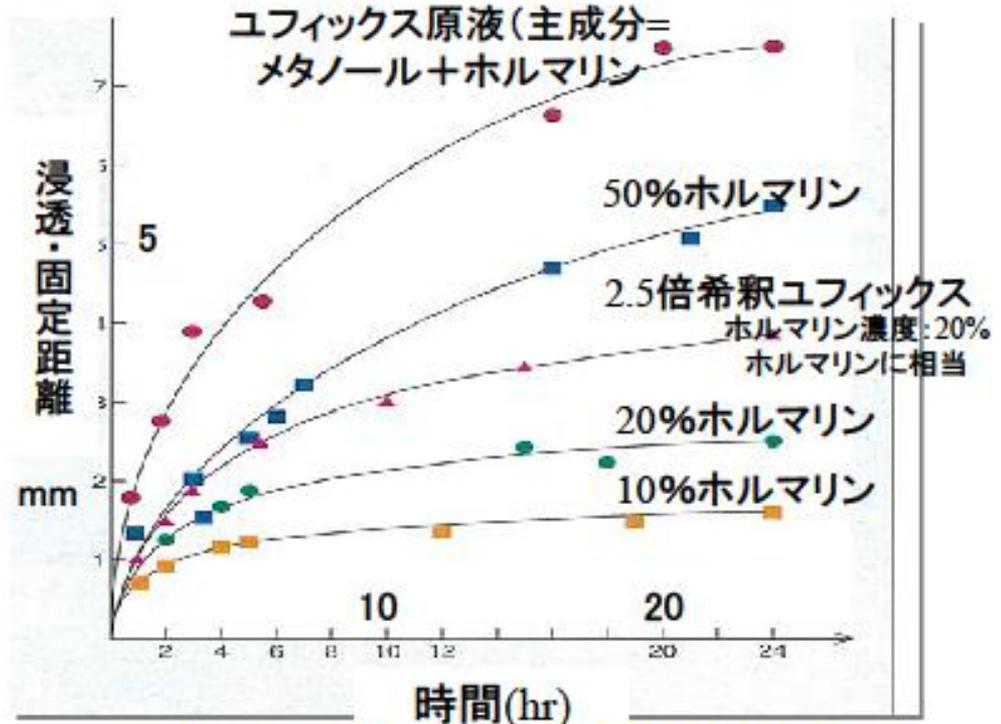
2)ホルマリン固定液の種類

固定速度:ユフィックス>ホルマリン>中性緩衝ホルマリン

(ホルムアルデヒド濃度が同一の場合)

サクラ迅速固定液ユフィックス

ユフィックスの成分	分量
ホルマリン原液	50%
メタノール	37.5%
中性緩衝液	12.5%
消臭物質	少量



浸透・固定距離は、組織の色調の変化で測定

サクラファインテック株式会社 様より

ホルマリンの固定速度や固定効果の因子

3) 固定時間と組織の厚さ

固定液の浸透・固定速度 : $d = k\sqrt{t}$

d=浸透距離(mm)、k=各固定液固有の定数、t=時間

固定液(溶媒)	k(定数)
10%ホルマリン	0.78
エタノール	1.0

組織深部ほど、固定液の浸透・反応に時間がかかる

→ **固定する組織はできるだけ薄い方がベター。通常は4mm以下の厚さがよい(固定だけでなく、脱水・中間剤処理・パラフィン浸透等も考慮して)**

4) 固定温度

低い ← 固定温度 → 高い

遅い ← 固定速度 → 速い

温度が高いほど、固定液成分の拡散・浸透が速く、固定が速い。但し、加温すると組織の収縮や組織が硬化や、ホルマリン未浸透部位(組織中心部位)での組織変性リスクがある。そこで通常固定は室温で実施。加温する場合、37-45℃。

5) 固定液の量

組織の量に対して通常10~20倍量以上の固定液の使用が望ましい。

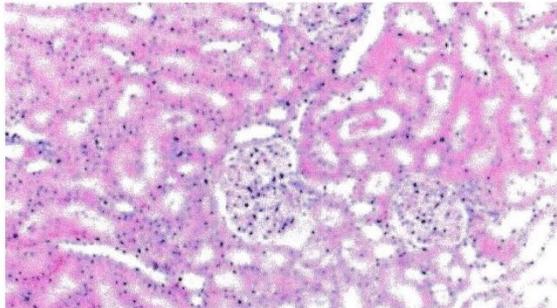
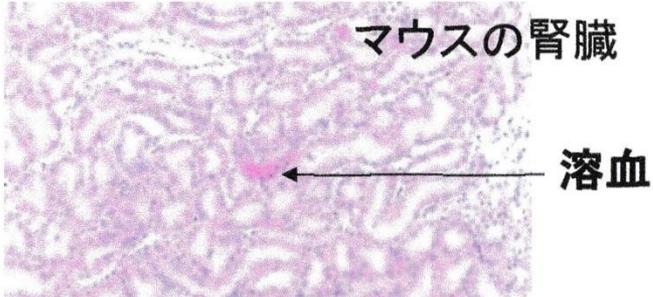
また固定液は、コンタミを防ぐことも考慮し、1回限り使用とする。

6) 固定液の振盪ないし攪拌

固定液の振盪ないし攪拌により、組織により新鮮な固定液が接触するので、固定速度は速くなる。

ホルマリンと中性緩衝ホルマリンの違い

	ホルマリン	中性緩衝ホルマリン
pH	約 4	約 7
固定速度	速い(固定力が強いので)ホルマリンの反応性はpH 4位で最大となり、弱酸性のホルマリンの固定速度は速い。	遅い(固定力はやや弱いので)中性領域でのホルマリンの反応性はやや低く、またリン酸緩衝剤成分のイオンがホルムアルデヒドの蛋白への親和において競合するので、(非緩衝)ホルマリンに比べ、中性緩衝ホルマリンの固定速度は遅くなる。
固定時間	弱酸性領域で、ホルマリンの固定力は最大になるので、中性緩衝ホルマリンに比べ、固定時間が短くてよい。	固定力がやや弱いので、固定時間を長くする必要あり。 HER2検査などのため10%中性緩衝ホルマリンを使用する施設が増えているが、固定時間が短いと固定不十分になる傾向あり(HE染色で核の染まりが薄い、ないしぼやける)。
<p>HER2推奨固定条件(10%中性緩衝ホルマリン:6~72時間) 固定時間短くても長くても抗原性に影響を与える。 A) 6時間未満 : 固定不十分で成分拡散・溶出リスク大 B) 72時間を超える: 抗原のマスキングが増大</p>		

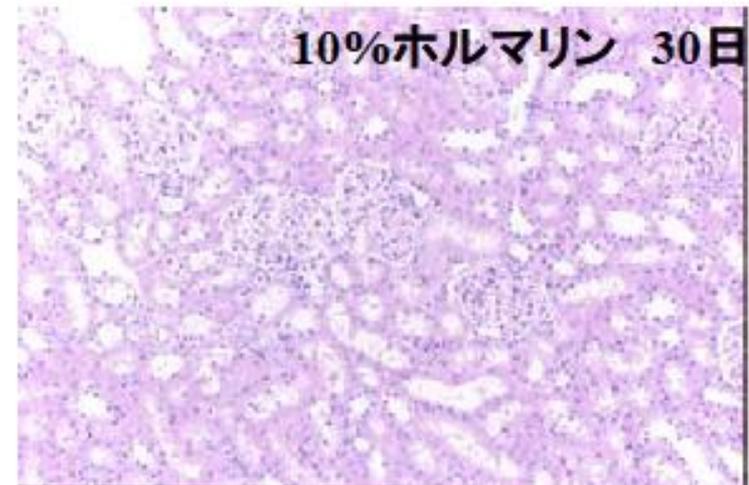
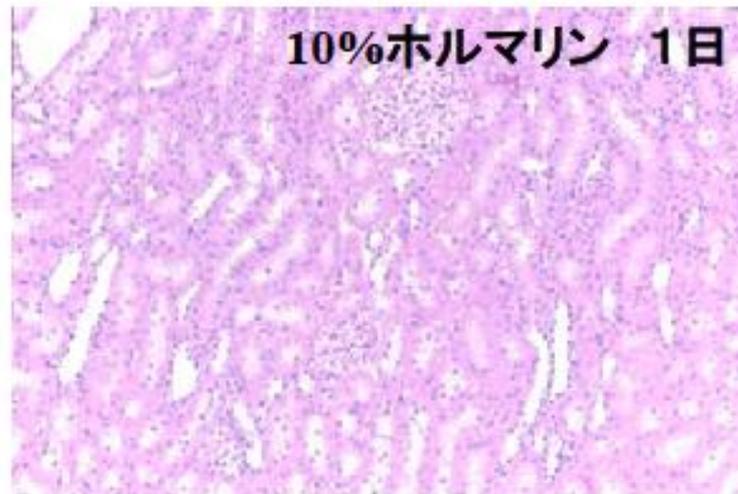
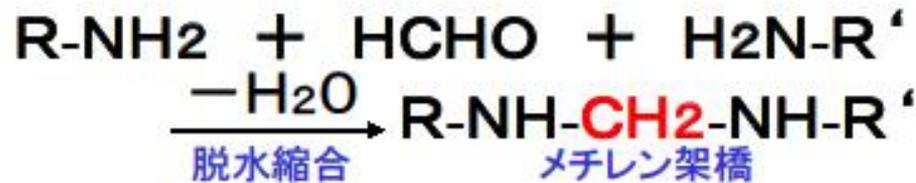
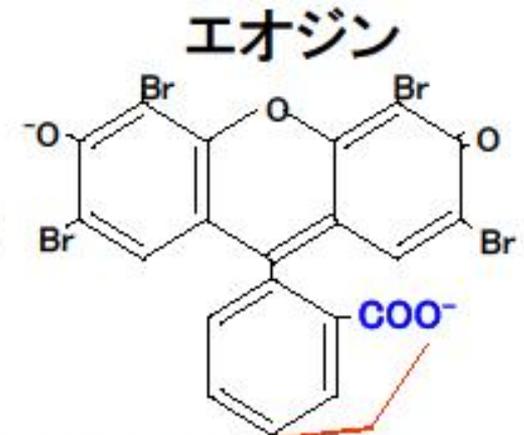
	ホルマリン	中性緩衝ホルマリン
問題点	①ホルマリン中ギ酸で酸性→組織蛋白質の荷電状態の変化→構造の変化 (抗原性、酵素活性低下のリスクあり)	①中性なので、組織蛋白の荷電状態を変化させない→抗原性、酵素活性低下リスク小
	②溶血のリスクほぼなし  10%ホルマリン 7日	②溶血のリスクあり  20%中性緩衝ホルマリン 7日
	③ホルマリン色素の形成 赤血球の破壊により溶出したヘモグロビンと蟻酸(ホルマリンの有効成分ホルムアルデヒドが酸化されて生じる蟻酸)が反応してホルマリン色素が生じる。 ホルマリン色素は、必要に応じて飽和ピクリン酸95%エタノールで処理して除去する。	③ホルマリン色素形成のリスクほぼなし

ホルマリン固定の染色への影響

①組織の好酸性の低下

(酸性色素のエオジンが親和しにくい)

原因 : エオジンが親和する蛋白質アミノ基がホルマリンによるメチレンブリッジによりブロックされ、立体障害等のためエオジンの親和が阻害される。

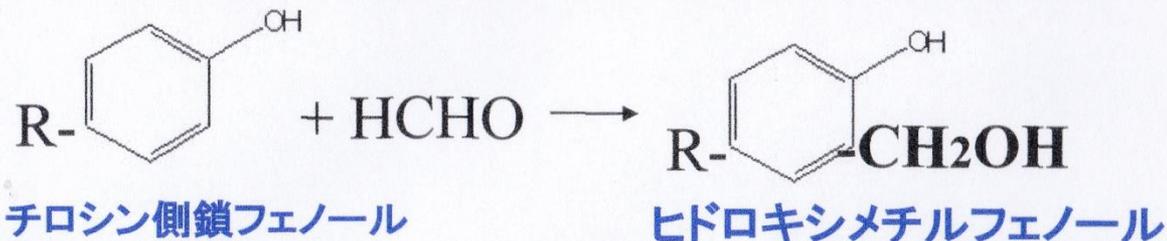


参考:ホルマリン固定骨髓組織切片のギムザ染色では、ホルマリン固定により組織の好酸性化が低下し、エオジンの赤色の染まりが抑制される。 マウス 腎臓

ホルマリン固定の染色、免染、核酸DNAへの影響

②長期固定による染色性の大幅な低下

ホルマリンの蛋白質(チロシンフェノール、トリプトファンインドール等)への反応(不可逆反応)が進み、組織蛋白質はホルマリンで高度に架橋され、色素や抗体蛋白質の親和が立体障害のため大きく阻害される。



③抗原のマスキング

④核酸DNA : 塩基アミノ基同士間、及び塩基と蛋白質間でメチレン架橋の形成。
DNAのホスホジエステル基の加水分解でDNAの断片化

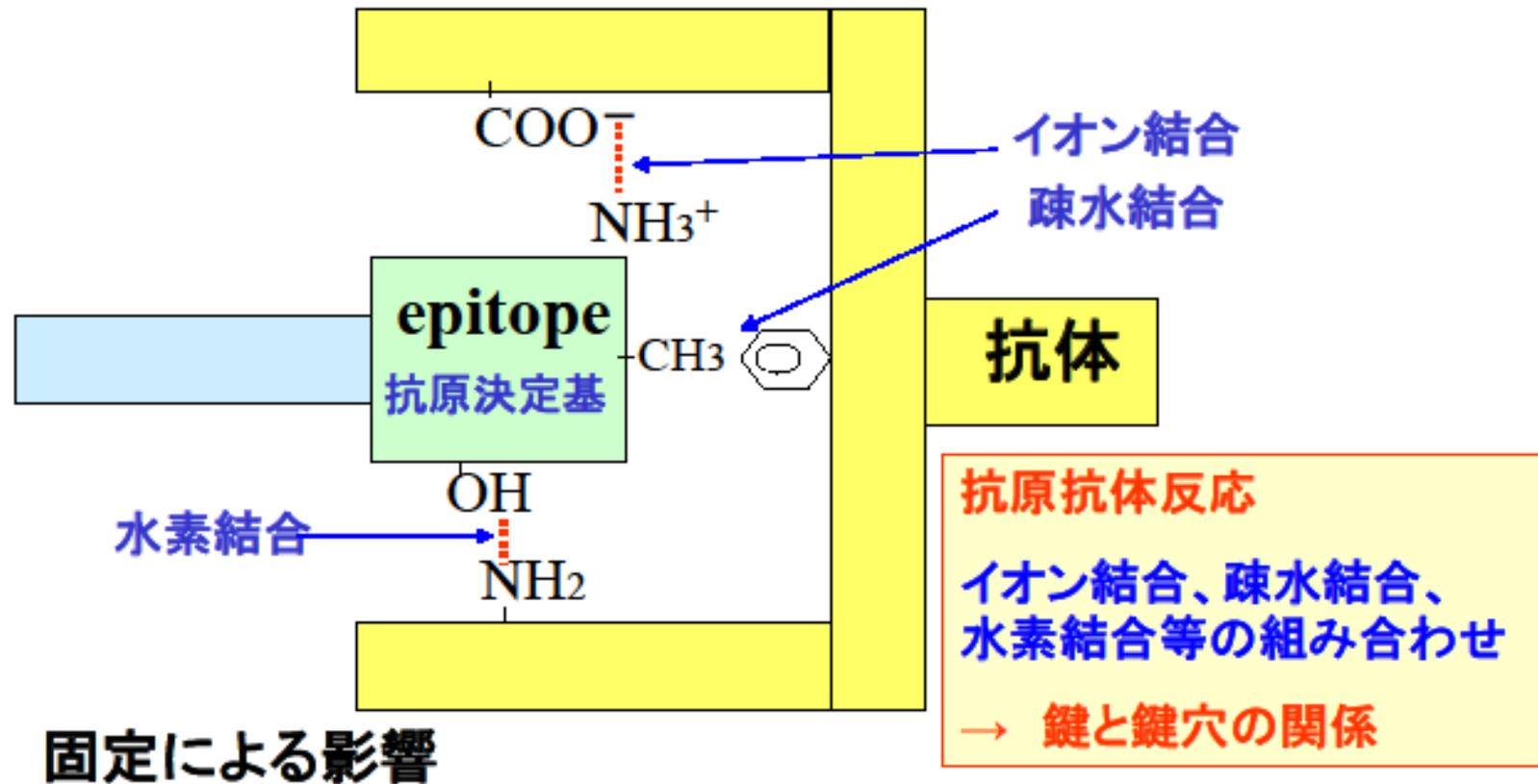
固定の諸条件により、固定の程度が異なる！

- ①組織の厚さや種類
- ②固定液の種類や濃度
- ③固定時間・温度
- ④その他

組織の化学的物理的変化の程度が異なり(メチレン架橋度、立体構造の変化の程度、他)、染色が影響される

抗原の種類とホルマリン固定の抗原性への影響

抗原の種類: 蛋白質、ポリペプチド、糖蛋白、リポ蛋白、
糖脂質、多糖類、他



- ①メチレンブリッジの形成により、抗体蛋白質の抗原へのアクセスが阻害
- ②蛋白分子内・間のイオン・疎水・水素結合が変化し、蛋白のコンホメーション(立体構造)が変化

ホルマリン固定の長所と短所(抗原性の低下)

長所	<p>蛋白質と化学反応しメチレン架橋により、分子内・分子間で蛋白質を高分子化し不動化、不溶化</p> <ul style="list-style-type: none">①形態保存が良好で、HE染色標本と比較容易②抗原の不動化、不溶化良好<ul style="list-style-type: none">→ 標本作製過程での抗原の拡散、溶出のリスクが小
短所・抗原性の低下	<ul style="list-style-type: none">①エピトープの近くの蛋白アミノ基NH_2とホルマリンの化学反応<ul style="list-style-type: none">・蛋白質分子内・間の架橋で網目が形成され、エピトープのマスクング → 立体障害(大分子の抗体が抗原に到達困難)・コンホメーション(立体構造)の変化 → 抗体の抗原への結合が阻害される②エピトープ上化学官能基(NH_2, 他)とホルマリンの化学反応<ul style="list-style-type: none">・モノクローナル抗体の結合性の低下