



動物病理検体の標準化

病理検体の取り扱いについて

病理検査では、適切な方法で組織を固定することが重要です。形態観察だけでなく、免疫染色や遺伝子検査の結果に影響するため、不適切な固定により診断結果や治療選択が変わることがあります。同じ条件で組織を固定し、標本を作製することにより、診断精度を向上することができます。そこで、動物病理検体の標準化を目的にプロトコルを作成しました。

固定条件により検査結果が変化する例

- 組織検査(細胞が収縮し、本来の細胞形態および大きさと異なる)
- 特殊染色(グラム染色等の染色性が低下する)
- 免疫染色(細胞マーカーや増殖活性マーカーが偽陰性/偽陽性となる)
- 遺伝子検査(クローナリティ検査の結果が偽陰性となる)

プロトコルの内容

- 組織の固定方法
- 病理検査を活用するためのポイント
- マージン評価のポイント

対象

動物の病理組織検査を実施する以下の機関で広く活用されることを期待します

- 動物病院/病理診断会社
- 家畜保健衛生所/食肉衛生検査所
- 実験動物の病理検査を実施する機関

プロトコルの作成について

日本獣医病理学専門家協会の支援を受けて、獣医病理学教員交流会メンバーから構成される動物病理検体標準化(Standardization of Animal Tissue Processing: SATP)の活動成果として、病理検体の品質向上を目的に作成されました。

SATPプロジェクトメンバー:井澤武史(大阪公立大学)、チェンバーズジェームズ(東京大学)、畑井仁(岩手大学)、道下正貴(日本獣医生命科学大学)、渡邊謙一(帯広畜産大学)。

2023.3.28. ver1



組織の固定方法

以下の推奨プロトコルは動物の病理検体の品質向上を目的に作成されました。本プロトコルの利用により、病理診断の精度が向上し、臨床獣医師に多くの情報が還元されることが期待されます。①-⑤の項目で構成され、組織固定のポイントについて、すべきこと(下線)、してはいけないことを挙げ、その理由を脚注で説明しています。

① 固定液について (一般的な病理検査の場合) *1

- ✓ 10%中性緩衝ホルマリンを使用する*2
- ✓ 固定する組織の10倍の容量の固定液に組織を浸漬する*3
- ✓ ホルマリン固定は室温で行う(冷蔵しない)

*1 眼球、骨格筋など特殊な組織、および電子顕微鏡観察など特殊検査については、依頼先の診断獣医師に相談し、適切な固定液を使用してください。

*2 ホルマリンは36%程度のホルムアルデヒドを含む水溶液であり、毒物及び劇物取締法の劇物に指定されています。また、ホルムアルデヒドは国際がん研究機関によりグループ1(ヒトに対する発がん性あり)に指定されています。特に、ホルマリン原液を希釈する作業はホルムアルデヒドの暴露濃度が高くなります。動物病院におかれましては、希釈済みの固定液(10%中性緩衝ホルマリンとして販売されているもの:3.6%程度のホルムアルデヒドを含む)を購入し使用することを強く勧めます。尚、組織サンプルを浸漬したホルマリン溶液につきましては、劇物には該当しません(固定組織の不純物/廃液としてホルムアルデヒドが含まれていると解釈されます)。ただし、その場合も危険物(毒性を有する刺激物)ですので、送付の際に内容物が漏れることが無いように十分に注意ください。郵送する場合は、差出人が獣医師であることを明示ください。

*3 組織が大きいため10倍容量の固定液に浸漬することが難しい場合は、3倍以上の容量の固定液に浸漬ください。

② 組織の採取から固定まで

- ✓ 採取後に速やかに組織を固定液に入れる*4,5
- ✓ 透明で口が広いネジ蓋のプラスチック容器またはヒストパックを使用する*6
5mm以下の組織片は容量が小さいプラスチックチューブを使用する*7
- ✓ 複数部位から組織を採取する場合は、別容器を使用するなど、確実に検体が区別できるようにする
- ✓ 固定液以外の液体(生理食塩水など)に組織を浸漬しない
- ✓ ピンセットで組織を強く摘まない、小さな組織は電気メスを使わない*8
- ✓ 小さな組織を乾いたガーゼなどに付けない*7

*4 手術中に組織を固定液に入れることが困難な場合は、組織を生理食塩水で湿らせたガーゼで包み乾燥を防ぎ、膿盆やシャーレなどに入れて手術が終わるまで冷蔵庫で保管ください。

*5 特に、内視鏡や針生検などの小さいサンプルは速やかに固定液に入れてください。

*6 狭い容器に入れると、組織が挫滅および変形するだけではなく、固定組織を取り出せなくなります。不透明の容器は検査漏れの原因となるので使用しないでください。送付中に破損した場合に非常に危険ですので、ガラス容器は使用しないでください。

*7 小さな組織片を大きな容器に入れると、組織を紛失する原因になります。また、ガーゼなどに包むことも組織の紛失や挫滅の原因になりますので、組織片をそのまま小さなチューブ(セラムチューブなど)または組織包埋カセットに入れて固定してください。

*8 ピンセットなどで強く摘むと組織が挫滅し、形態評価ができません。電気メスを使用すると、切除部位から数ミリメートルの領域が焼けてしまい、形態評価ができません。



③ 検査材料について

- ✓ 厚さが 5cm 以上の組織は割を入れてから固定液に浸漬する(図1)*9,10
- ✓ 病変部の写真または手書きの図を添付する(図2)*11
- ✓ Tru-cut などの変形しやすいサンプルはメッシュ袋や分割カセットに入れる(図3)

*9 原形が分かる程度に割を入れてください。例えば、腫瘍性病変の場合は表面から腫瘍の中心まで、腫瘍の短軸方向に刃で割を入れてください。マージンの評価を希望する場合は、マージンとは反対側に割を入れてください。なお、割を入れる際は、ハサミを使用しないでください。

*10 例外的に、脳は形が歪んでしまいますので割を入れしないでください。また、脳などの大きな組織を固定する場合は、ガーゼで組織を包んでから固定液に浸漬することで臓器の歪みを防ぐことができます。

*11 検査に役立つだけでなく、ミスコミュニケーションを防ぐために重要です。特に観察したい部位がある場合は、写真や図に要望を書き込んでください。また、縫合糸などを用いて目印(頭側、尾側など)をつけると組織のオリエンテーションが分かりやすくなります。

④ マージン評価を希望する場合

- ✓ インクなどを用いてマージン部分を示す(図4)*12
- ✓ 皮膚腫瘍、消化管腫瘍は台紙に貼り付けて固定する(図5)*13
- ✓ 組織の目印や固定に注射針を使わない*14

*12 トラブル防止のため、手術に参加した獣医師がマーキングすることが望ましいです。評価を希望する部位をピンポイントでマーキングしてください。インクの塗りすぎや塗った直後に固定液に浸漬すると全体にインクが付着してしまうため注意ください。

*13 皮膚腫瘍については底部に筋肉をつけて切除した場合、筋肉の収縮によりマージン部が歪んでしまい正確な評価ができなくなります。底部を厚紙などに貼り付けることで、収縮を防ぐことができます。厚紙から組織が取れてしまう場合は、縫合糸で縫い付けてください。外科用のホチキスは組織が挫滅するので使用しないでください。

*14 サンプルを受け取り、開封する際に技術者が怪我をする原因になりますので、注射針を同封しないでください。

⑤ 固定から送付まで

- ✓ 採取した当日または翌日には発送する*15
- ✓ ホルマリン漏れを防ぐため容器の蓋を固定する(図6)*16
- ✓ 容器の本体部分に患者名と採取部位を記載する
- ✓ 組織を凍結しない*17

*15 固定から 24 時間以内に切り出し処理をすることが望ましく、72 時間以内であれば核酸などの分子が良好に保持されるからです。翌日に発送しない場合は、組織を固定液から取り出し、70%エタノールに移して保管することをお勧めします。また、24 時間固定された組織であれば、十分に固定されていますので、組織が乾燥しない程度に固定液を抜いてから発送しても問題ありません。

*16 プラスチックのネジ蓋容器を使用する場合は、蓋と容器の連結部分を覆うようにしてパラフィルムを巻くなどして、液体が漏れないように蓋を固定したうえで、さらに防水性の袋に入れてください。ヒストパックを使用する場合は、ヒートシールしたうえで、防水性の袋で3重梱包し、袋が潰されないように箱に入れて発送してください。

*17 組織を凍結するとアーティファクトにより形態観察が困難になります。特に寒冷地域では、輸送中に凍結しないように注意ください。



図1 大型の組織は割を入れてから固定する。
直径10cmの下顎骨腫瘍に割を入れた写真。

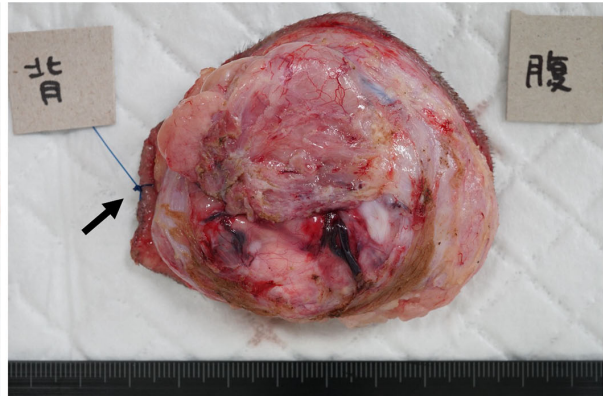


図2 皮膚腫瘍のオリエンテーション。
背側に縫合糸（矢印）で目印をつけた写真。

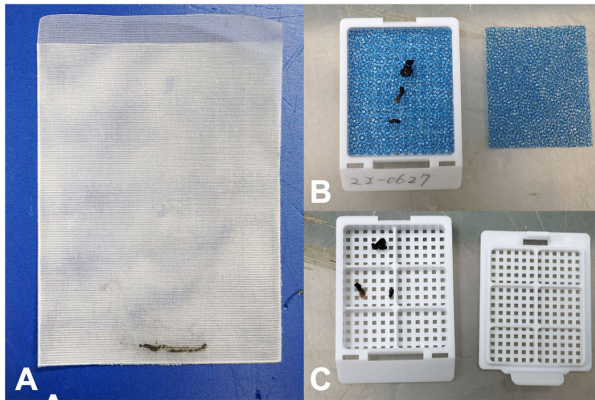


図3 変形しやすい小型サンプルの固定法。
(A) メッシュ袋に入れる。(B) スポンジに挟む。
(C) 分割カセットに入れる。



図4 消化管のマージンにインクを塗布。
切除した組織を固定する前に、綿棒等を用いて
切除縁にインクを塗布し、評価部を明確にする。

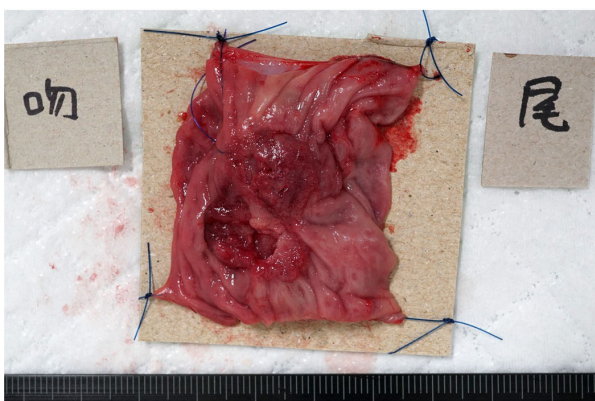


図5 消化管腫瘍を台紙に貼り付けて固定。
厚紙にサンプルを貼り付けて縫合糸などで固定。



図6 液漏れしないように容器の蓋を固定する。
広口のネジ蓋容器を使用し、蓋を締める方向に
パラフィルム等を巻いて固定する（矢印）。

病理検査を活用するためのポイント

病理検査の結果を最大限に活用するために、以下のポイントを参照ください。

1. 採取

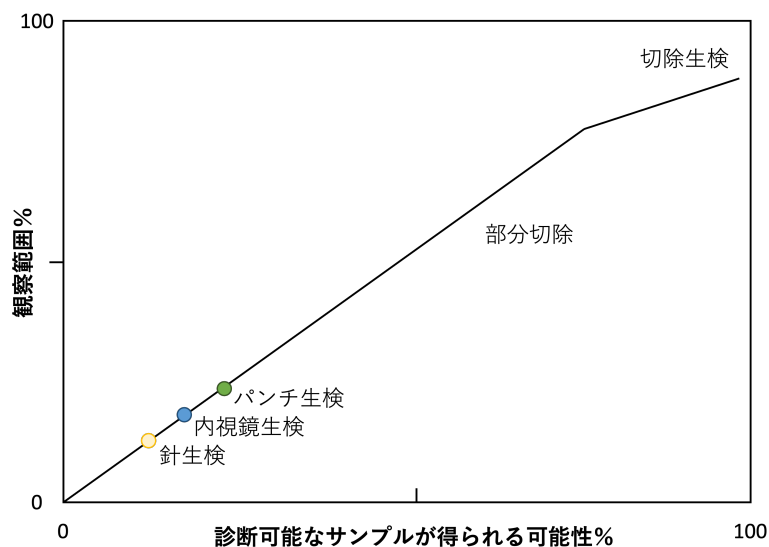
- a 適切な部位
- b 適切な大きさや数
- c 適切な固定液（種類、量）、組織の厚さが1cm以下
- d 適切なラベリング：名前、部位、オリエンテーション、マージン

2. 依頼書

- a 正確な個体情報
- b 関連する臨床経過：既往歴、病変の発見時期、病変の進行速度や増大傾向
- c 病変の描写：数、部位、分布、大きさ、色、形、硬さ、固着
- d 鑑別診断：具体的な質問、気になる点

3. 臨床像と病理結果の照合

- a 生検結果を臨床経過、他の検査結果、治療反応と照合して精査する
- b 臨床像と病理学的な評価に矛盾がある場合は、病理診断獣医と相談する



生検組織の大きさと診断の可能性のイメージ図。観察範囲が広い方が、確定診断が得られる可能性が高い。

引用

F. Yvonne Schulman. Maximizing Biopsy Results.



マージン評価のポイント

マージン評価では以下の情報が重要です。サンプル送付前に確認ください。

- 解剖学的部位：腫瘍の正確な位置
- 手術目的：完全切除（腫瘍と切除ラインの最短距離）/緩和目的/診断目的
- 画像検査：画像検査の所見
- 細胞診：細胞診の所見
- インク：外科切除後にマージン評価を希望する部位にインクを塗布^{*1}
- 病変の肉眼写真または手書きの図：マージン評価を希望する部位を図示

*1 臨床獣医がマージン評価を希望する部位にピンポイントでインクを塗布してください。切除線全体にインクを塗布すると、どこを評価すれば良いのか分からなくなります。組織の水分を拭き取った後にインクを塗布し、塗布したインクが乾いてから、組織を固定液に浸漬してください。インクが乾燥する前に浸漬すると、インクが滲んでしまい評価部位が分からなくなります。

引用

Foster RA et al. Veterinary Cancer Guidelines and Protocols. Margin Evaluation 1.0

Kamstock D et al. Recommended guidelines for submission, trimming, margin evaluation, and reporting of tumor biopsy specimens in veterinary surgical pathology. Veterinary Pathology. 2011;48: 19-31.