

標本道場・初心者編 伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

Q

パラフィン切片の伸展方法を教えてください。

A

パラフィン切片の伸展には方法、温度、時間、切片下の水量、水切り、乾燥などの因子が複雑に関与します。

はじめに

伸展とは、薄切により歪んだパラフィン切片をもとの形に戻すことと、後に行う染色でスライドガラスから切片の剥離を防ぐことを目的に行います。

伸展は、切片を①載せる、②伸展する、③乾燥するの工程からなります。

パラフィンブロック薄切面とH・E標本の大きさを比較すると組織の大きさ(生検、手術材料など)、臓器の種類を問わず一致していないことがあります。この場合、標本の方が大きくなっていることがほとんどです(図1)。そしてこれら標本の多くにみられる「シワ・気泡・過伸展・剥離」などは伸展工程が一因となります。

パラフィン切片の伸展技術のポイントを工程にそって解説します。加えて伸展に関する私どもの実験データを示します。



図1 パラフィンブロックとH・E標本を比較すると一致しないことがあります。(膨化していることがあります。)(組織:扁桃)

標本道場・初心者編 伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

①載せる

【載せる位置】

組織の大きさや形状は様々ですが、フロスト部分を除いたスライドガラスの中心部に組織の中心を合わせるのが通常です。自動封入装置を使用する場合は、機器の特性と使用するカバーガラスのサイズなどから、載せる位置を決定する必要があります。

【載せる枚数】

ブロックの大きさによってはスライドガラスに切片を複数枚載せることがあります。

検査材料を複数のブロックに分ける場合や連続切片を要する場合は複数の切片を載せることにより1枚のスライドガラス上にまとめることができます。

ただし、1ブロック:1スライドガラスで管理する場合は、この限りではありません。

複数枚の切片を載せるときは、スライドガラス辺縁に接しないこと、機器で使用するカバーガラスの領域を超えないことなどに注意します。

【載せる方向】

施設により取り決めがあると思いますが、生検組織などはフロスト側より組織採取部位に付加された番号の順に並べる、皮膚や消化管などは、鏡検時に上皮が上に観察できるように載せます。

②伸展する

【伸展方法】

通常はパラフィン伸展器を用います。伸展器には伸展板式と湯浴式及び湯伸ばしがあり温度調節が可能です。1つの機器で湯浴式と伸展板式の機能を有するものもあります。また、伸展器自体に傾斜をつける装置が附属するものなどがあり、これは伸展しながら水抜きすることを目的としています。機器を用いない方法として湯伸ばしがあります。またスライドガラスには色々な特性がありますので、伸展は使用するスライドガラスの種類に合った方法を選択する必要があります。

今回、

「水切り」：切片をスライドガラスに載せ伸展する前にスライドガラスの余分な水をペーパータオル等で吸水する操作。

「水抜き」：切片を伸展した後に、切片とスライドガラスの間にある水を除去。

と定義しています。

伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

「伸展板式」: 水に浮かべた切片をスライドグラスに載せ伸展板に置く手順で行います。伸展板とスライドグラスのわずかな隙間を水が埋めて、伸展板の温度が均一に伝わります。伸展板上に水滴を載せその上にスライドグラスを置きます。

「湯浴式」: 薄切で水に浮かべた切片を一度スライドグラスに載せ、浴槽に切片を再浮遊することで伸展します。加温により浴槽の壁に気泡が発生している場合は切片に付着する可能性があるため、筆などであらかじめ除去します。

「湯伸ばし」: 湯浴式と同様に行います。通常温度を測ることはなく、伸展状態をみて感覚的な「湯加減」で行われます。

【伸展温度と時間】

包埋に使用しているパラフィンの融点より10～15℃低い温度が適温とされています。通常用いられるパラフィンは融点58～60℃ですので、伸展温度は45～50℃となります。

伸展時間は明確ではありません。「十分に伸展したら」という表現に留まります。つまり、組織は採取の方法や部位によって大きさ、形、硬さなど含まれる成分に違いがあるため伸展に要する時間は一定ではありません。肉眼的に伸展板上あるいは湯浴により伸展し始める様子は確認できますが、どの時点で完了しているかは明らかではありません。

【伸展後の水抜き】

いずれかの方法により十分伸展したら、切片とスライドグラスの間にある水を除去し接着させます。

基本的な技術は、スライドグラスを立てて、流れてくる水をペーパータオルで吸い取ります。切片の辺縁から接着しますので水が流れ出ない場合は、スライドグラスをペーパータオル上でトントンと軽く叩きます。それでも流れ出ない場合は組織のない部分を少し破ります。

③乾燥する

【切片の乾燥】

乾燥は水分を完全に除去することを目的とし、パラフィンが溶けない温度で伸展板あるいは孵卵器を用いる方法とそれよりも高温のパラフィン熔融器(65℃)を用いる方法があります。その他に温度や時間設定のできるスライド乾燥器という機器もあります。

伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

伸展に関する実験データ

【シワの状態からみる伸展条件と伸展の経時的变化】

1. 「薄切で生じるシワの状態」

薄切による（マイクローム替刃の切れ味を含む）シワの違い（図2）。

薄切により生じるシワはマイクローム替刃の切れ味のみには依存するわけではありません。未伸展の切片を観察すると、薄切した方向以外にもいくつかのシワが確認されることがあります。

生じた全てのシワが伸展すれば問題はありますが、薄切により色々な歪が生じることが証明されました。良好な標本は良い条件での薄切が大切と考えます。

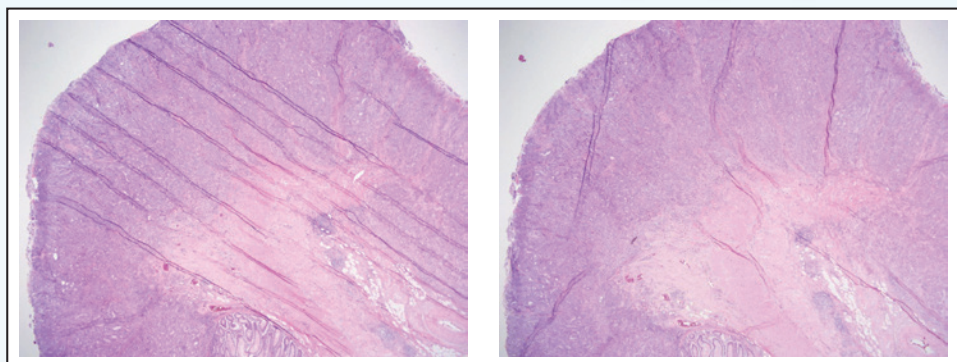


図2 薄切による（マイクローム替刃の切れ味を含む）シワの違い（組織：大腸手術材料）

未伸展の切片状態を比較するとシワの数や方向が異なります。切れ味の悪い替刃の場合、一定方向であることから薄切によりシワの原因は複雑であると考えられます。

左：切れの悪い替刃 右：切れの良い替刃

2. 「伸展が完了する温度と時間」

10%中性緩衝ホルマリン固定の大腸癌の手術材料から3 μ m切片を作製し、伸展板式と湯浴式による伸展の温度と時間の違いをシワの数により比較した結果を表1～表3に示します。（数字はシワの数で0を伸展完了と判定）

水切り有りの伸展では、40℃は全てにおいて、45℃は1分30秒、50℃は30秒までシワが見られます。55℃は見られませんでした。つまり、45℃2分、50℃1分、55℃15秒で伸展は完了しています（表2）。湯浴式は37℃による伸展時間に差がなく、いずれもシワが見られます。47℃は6秒以上の伸展によりシワが見られません（表3）。

伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

表1 伸展板式の温度と時間による伸展状態（水切りなし）

	伸展なし	伸展15秒	伸展30秒	伸展1分	伸展1分30秒	伸展2分	伸展3分	伸展10分	伸展20分	伸展30分	伸展60分
40℃	58	34	21	11	5	6	4	0	0	0	0
45℃		1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
50℃		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55℃		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

伸展完了は40℃10分、45℃1分30秒、50℃と55℃は15秒でした。

（数字はシワの数で0を伸展完了と判定）

表2 伸展板式の温度と時間による伸展状態（水切りあり）

	伸展なし	伸展15秒	伸展30秒	伸展1分	伸展1分30秒	伸展2分	伸展3分	伸展10分	伸展20分	伸展30分	伸展60分
40℃	93	20	12	7	11	12	10	6	16	25	20
45℃		6	2	4	1	0	0	0	0	0	0
50℃		2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
55℃		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

40℃はいずれの時間においても伸展不良でした。

伸展完了は45℃2分、50℃1分、55℃は15秒でした。

（数字はシワの数で0を伸展完了と判定）

表3 湯浴式の温度と時間による伸展状態

	伸展0秒	伸展3秒	伸展6秒	伸展10秒	伸展15秒	伸展30秒	伸展45秒	伸展1分	伸展2分
37℃	55	42	51	44	47	62	80	70	54
47℃		4	0	0	0	0	0	0	0

37℃はいずれの時間においても伸展不良でした。

47℃は6秒で伸展完了でした。

（数字はシワの数で0を伸展完了と判定）

【温度と時間のほかに伸展に影響する因子】

1. 「切片とスライドガラスの間にある水の量」

表2では、伸展の条件として温度と時間を比較した結果、40℃では時間に関係なく伸展不良でした。しかし、伸展板式40℃で水切りをしない状態で10分静置するとシワはなく良好に伸展されます（表1）。この現象から「切片とスライドガラスの間にある水の量」も伸展に影響していることがわかります。水が多いと切片はス

標本道場・初心者編 伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

ライドグラス上を移動します。少なれば伸展が完了する前に切片はライドグラスに接着し伸展不足となります。シワの数から伸展状態を把握し、シワが見られない時点を伸展完了とし、伸展法別に温度と時間を比較しました。

2. 「切片の載せる位置による影響」

ライドグラスを立てて水切りをする際に過度に膨らみ、集まる水の量によっては切片が破裂することがあります。

【切片の接着までの時間】

切片の辺縁から乾燥が始まりライドグラスに接着するので、その前に伸展が完了していないとシワなどの伸展不良となります。

伸展板に載せる前の水切りの有無と温度の違いで切片周囲の乾燥までの時間を表4に示します。

表4 伸展温度と水切りの有無による乾燥の違い

平板式 伸展温度	水切りの 有無		15秒	30秒	1分	1分 30秒	2分	2分 30秒	3分
45℃	なし	自然流出 の有無	○	○	○	○	○	○	○
		乾燥 の有無							
45℃	あり	自然流出 の有無	○	○					
		乾燥 の有無			●	●	●	●	●
50℃	なし	自然流出 の有無	○	○	○	○	○		
		乾燥 の有無				●	●	●	●
50℃	あり	自然流出 の有無	○	○					
		乾燥 の有無			●	●	●	●	●

水の自然流出の有無により切片周囲の乾燥状態を比較すると、伸展温度が高く水切りをした場合に乾燥は早くなります。

- 自然流出した場合
- 自然流出しない場合を乾燥と判定
- 自然流出する場合としない場合

標本道場・初心者編

伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

伸展板式で水切りをせず 45℃ の条件では 3 分経過しても、水は自然に流出します。50℃ は 1 分 30 秒を経過すると切片の接着が始まり、2 分では自然に流出する場合としない場合があり、2 分 30 秒を超えると自然に流出できないほどの接着をします。伸展板に載せる前にペーパータオル上に 15 秒たてた「水切り」後に伸展した場合、45℃ と 50℃ は差がなく 1 分で自然流出ができないほど切片の接着がみられました。

【伸展が良好でもシワ?】

伸展後は十分に水切りをしますが、乾燥を気にするあまりスライドグラスを強く振ったり、水抜きが不十分な状態で乾燥に進むことによりシワが生じます。

図 3 は水抜き不十分な状態でパラフィン熔融器 (65℃) に入れたときに見られたシワと切片の剥離です。

湯浴式では、パラフィンが軟化し切片の辺縁が接着しやすいので水抜きに注意します。

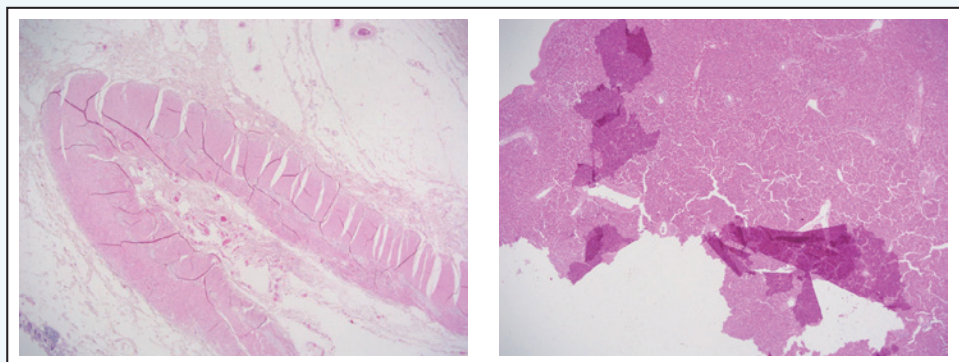


図3 不十分な水抜きが原因で生じたアーチファクト

伸展後に十分な水抜きをしない状態でパラフィン熔融器 (65℃) で乾燥をした場合、シワと切片の剥離を認めます。(左:大腸 右:肝臓)

標本道場・初心者編 伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

切片の乾燥

「伸展板上で乾燥」

40℃、45℃、50℃、55℃において水切りによる切片剥離の有無を表5に示します。40℃、10分以降の条件で剥離はみられませんでした。また、同じ温度設定で水切りをせず、同様に伸展から乾燥を行った場合は、全てにおいて剥離がみられます(表6)。この場合は切片とスライドガラスの間にある水の量が多いため、乾燥に時間を要することが考えられますが、60分でも剥離したため、色々な因子が影響することが示唆されました。

表5 伸展板上での乾燥(水切りによる切片剥離の有無)

	5分	10分	15分	20分	25分	30分	45分	60分
40℃	△	○	○	○	○	○	○	○
45℃	×	×	×	×	×	○×	×	○×
50℃	×	×	×	×	×	×	×	○×
55℃	×	×	×	×	×	×	×	○×

伸展板の温度と乾燥時間では、40℃と45℃以上の温度で切片の剥離に差が見られます。

- 剥離なし
- △ 切片面積の50%程度が剥離している
- × 切片面積の95%以上が剥離している
- × 両方

表6 伸展板上での乾燥時間(水切りなし時の違いによる切片剥離の有無)

	5分	10分	15分	20分	25分	30分	45分	60分
40℃	×	×	×	×	×	×	×	×
45℃	×	×	×	×	×	×	×	×
50℃	×	×	×	×	×	×	×	×
55℃	×	×	×	×	×	×	×	×

水切りをしない場合は、いずれの温度・時間においても、切片の剥離が見られます。剥離面積は切片の95%以上でした。

- 剥離なし
- △ 切片面積の50%程度が剥離している
- × 切片面積の95%以上が剥離している
- × 両方

標本道場・初心者編 伸展

帝京大学医学部附属溝口病院
臨床病理部

山田正人、湯澤和彦、
福田 学、吉野美由紀、
山本恵美

「湯浴式の伸展と乾燥」

湯浴式 37℃と 47℃により伸展時間は2分、乾燥は 37℃（孵卵器）と 65℃（パラフィン熔融器）で行った結果を表7に示します。

湯浴式で伸展した場合は伸展温度、乾燥温度に関係なく全てにおいて切片の剥離はみられませんでした。37℃の低温でありながらも切片が軟化しスライドグラスへの接着が亢進したものと考えます。

表7 湯浴法伸展と乾燥時間の違いによる切片剥離の有無

湯浴	伸展時間	乾燥温度	5分	10分	15分	20分	25分	30分	45分	60分
37℃	2分	37℃	○	○	○	○	○	○	○	○
		65℃	○	○	○	○	○	○	○	○
47℃		37℃	○	○	○	○	○	○	○	○
		65℃	○	○	○	○	○	○	○	○

湯浴温度および乾燥温度に関係なく、全ての切片に剥離は見られません。

○ 剥離なし
△ 切片面積の50%程度が剥離している
× 切片面積の95%以上が剥離している
○× 両方

おわりに

パラフィン切片伸展技術のポイントを示します。

伸展のしっかりとした病理技術を理解し、実行することにより良質な病理標本作製を行うことが大切です。

1. 良い条件で薄切することにより、発生するシワの数は少なく伸展不良のリスクが軽減されます。
2. 伸展は方法、温度、時間、切片とスライドグラス間の水量が関与しています。
3. 伸展不良はパラフィン融点に対し伸展温度が低く、切片下の水量が少ないことが原因となります。
4. シワは伸展不良のほかに、水切り不十分のまま高温で乾燥すると生じます。また、切片下の水切りの技術によっても発生します。
5. 水抜き
切片周囲が接着し切片下の水が残った状態で乾燥工程に進むと剥離の原因となります。
伸展→水切り→伸展の手順を繰り返し、水抜きを確実にを行います。