

覚えよう 身につけよう 検査技術！

ページ項目をクリック
すると指定するページ
に移動します

輸血検査の基礎と”こつ”

NHO東京医療センター 深澤 文子

No.1 (凝集の見方)	1
No.2 (検査実施の”こつ”と部分凝集)	2～4
No.3 (交差適合試験が全部陽性になってしまう！)	5～7
No.4 (ABO血液型が決定できない！)	8～11
No.5 (新生児の輸血・臨床への結果報告方法)	12～15

生理検査(心電図)の基礎と”こつ”

NHO東京医療センター 瀬戸 茂誉

生理検査(心電図)の基礎と”こつ”No.1	16～18
生理検査(心電図)の基礎と”こつ”No.2	19～20
生理検査(心電図)の基礎と”こつ”No.3	21～22
生理検査(心電図)の基礎と”こつ”No.4	23～26

末梢血液像の標準的観察法

国立がん研究センター中央病院 熊沢 寛子

末梢血液像の標準的観察法1.白血球形態Ⅰ	27～30
末梢血液像の標準的観察法2.白血球形態Ⅱ	31～35
末梢血液像の標準的観察法3.赤血球形態・血小板形態	36～40

細菌検査

国立がん研究センター中央病院 荘司 路

国立精神・神経医療研究センター病院 望月 規央

血液培養検査	41～43
血液培養陽性時の「起因菌」「コンタミネーション」の判定について	44～46
Ⅰ(総論)	47～49
Ⅱ(各論)	50～52

病理検査

国立がん研究センター中央病院 澁木 康雄

NHO東埼玉病院 山田 晶

固定について	53～55
脱脂・脱灰について	56～58
免疫染色におけるピットフォール	59～61
凍結標本作製について	62～64

輸血検査の基礎と”こつ”

No.1 (凝集の見方)

NHO東京医療センター 深澤 文子

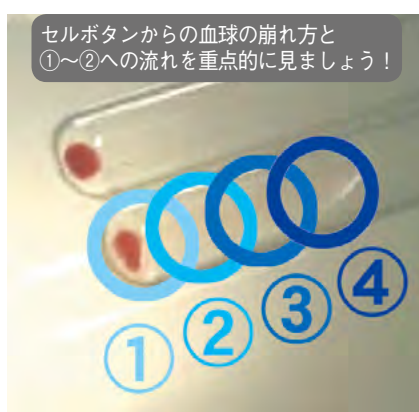
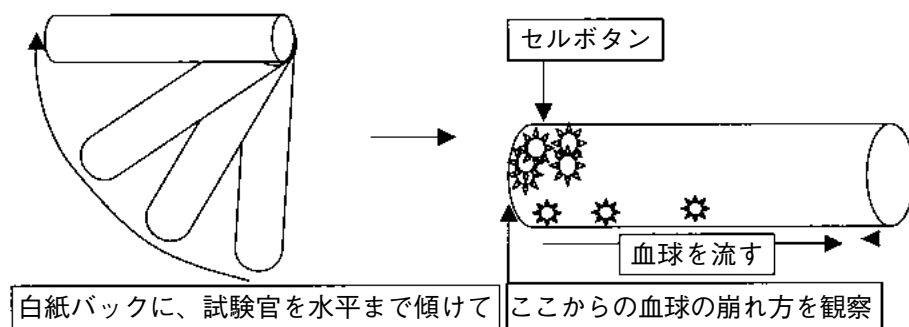
今回、第38回関信支部学会教育セミナー「検査の基礎とこつ」の内容を、何回かに分けて、まとめさせて頂く機会を頂きました。まず、第1回目は凝集の見方です。

血球浮遊液の濃度により、凝集の見え方に差がでるため、血液型ウラ血球の濃度を手本に、適切な血球浮遊液を作ることも正しい判定の第一歩です。

- ①白紙か、ビュアーの上で、判定する。(天井の電気にかざして、下からのぞくのは、やめましょう)
- ②試験管は、セルボタン(赤血球沈渣)が目線の下にくるように自分に向けて持つ。持つ本数は2本以上で、自分が同時に観察できる数。(1本ずつの観察は、他との比較ができにくいいためやめましょう)
- ③溶血を観察する。(溶血の観察は、PEG添加抗グロブリン法のように、添加後の遠心判定を行わず洗浄を行なう検査法では、洗浄前にも行なう必要があります)
- ④試験管が水平位置になるまで自分に向かって、ある程度ゆっくり傾けて、セルボタンから崩れ落ちる血球を観察し、凝集を判定する。(傾ける前には絶対に振らない、振動も与えないよう気を付けます)
- ⑤5回ほど繰り返し、血球の流れを観察・判定する。
- ⑥セルボタンが全てほぐれるまで、やさしく振って傾けては観察を続ける。(部分凝集を見逃さないためです)

輸血検査は、経験の少ない人にとっては、不安そのものです。凝集の見方がわからない、弱い凝集を見落とすかもしれない、手順に不安がある、等々…。患者の命に関わると思うとよけい緊張します。そんな不安の解消に、少しでもお役立て頂ければ幸いです。

今回は検査実施操作の”こつ”と部分凝集についてです。



写真は、(社)日本臨床衛生検査技師会発行「新輸血検査の実際」輸血検査CD-ROMより

輸血検査の基礎と”こつ”

No.2(検査実施の”こつ”と部分凝集)

NHO東京医療センター 深澤 文子

今回は、検査実施の”こつ”と部分凝集についてです。

1. 検査実施のこつ(試験管法の血液型を例にして)

1) 試験管を並べる。

- ・必ず検体番号や氏名、試薬名を記入する。
- ・東京医療センターは、図のように手前から、A B C D、A Bと記入し、抗A、抗B、Rhコントロール、抗D、A1血球、B血球と試薬を入れるようマニュアル化していますが、ABOのオモテ、ウラをまとめて行うほうが良いなど、それぞれ意見があると思います。各施設で検討して、決定しておくとう良いでしょう。



2) 血球浮遊液用試験管に生食を1mL入れておく。

3) オモテ検査用試薬を滴下。

- ・試薬のラベルと試験管の記載を確認しながら。

4) ウラ検査用に血清(血漿)を滴下し、続けて3%~5%血球浮遊液を作成する。

- ・臍帯血の場合は、Wharton's jellyの影響を避けるため、血球浮遊液を必ず1回洗浄する。
- ・血球浮遊液の濃度により、凝集の見え方に差がでます。血液型ウラ血球の濃度を手本に、適切な血球浮遊液を作ります。(よく解らなかつたらウラ血球を、血球浮遊液を作る時と同じタイプのピペットで吸い上げてみて、比較観察する)
- ・抗体試薬と血清が全て入ったら、試験管立てを持ち上げ、横や底から覗いて、入れ漏れがないか確認することが大切です。

○	B	}	ウラ試験	B血球
○	A			A1血球
○	D	}	オモテ試験	抗D
○	C			Rhコントロール
○	B			抗B
○	A			抗A
○				自己3%血球浮遊液

5) オモテ検査用試験管に、血球浮遊液を滴下する。

6) ウラ検査用試験管に、血球試薬を混和して滴下。

- ・試薬のラベルと試験管の記載を確認しながら。
- ・血球試薬は優しく確実に混和。
- ・全ての滴下が終わったら試験管の混和を忘れずに。
- ・全ての試薬や検体は十分に室温に戻してから。
- ・全操作中、試薬や検体のピペットの先端、また洗浄ビンの先端は、試験管の壁や淵に絶対触れないこと。
- ・ピペットの傾きにより、滴下量がかなり違ってきます。いつも一定な傾きを保つよう心がけます。試しに、試薬ビンからの10滴と、ピペットの10滴を比較してみて、同量になるよう傾けると良いでしょう。ちなみに1滴の標準は約50 μ Lです。

7) 遠心条件を厳守する。

900 ~ 1,000G (3,400rpm) 15秒

100 ~ 125G (1,000rpm) 1分

8) 判定 (第182号を読んでください!)

- ・判定の記録は、観察した試験管ごとに行います。後でまとめて記入しないこと。
- ・判定表に凝集の反応性 (Grade) を記録する。

「0, W+ or ±, 1+W, 1+, 2+, 3+, 4+」

背景が透明ならば、2+以上です。

- ・溶血が認められれば、Gradeの右肩に「H」や「PH (部分溶血)」と記入。部分凝集は、Gradeの右肩に「mf」を記入する。(例: 3+mf)

これら操作の注意事項は、血液型検査に限らず、全ての輸血検査に共通することでもあります。

2. 部分凝集「mf」について

"部分凝集"については、知識が有るか無いかで、発見できるかどうかが決まる、と言っても過言ではありません。色んなところでお話しているので、知っている方も多いと思いますが、まず問題を解いてみてください。

(技師学校の学生さんへの輸血実習の終了試験です)

問題: 刺傷事件

暴漢に頸動脈を切られた患者が、出血性ショックで運び込まれた。血液型の検体を採血してきた医師は、「血液型は付き添いの人が、B型だと言っている。検査は後でいいから、とにかく早くB型の赤血球製剤を10単位持って行く。」と言っている。

問1: 血液型を再検査してある赤血球濃厚液製剤は、各血液型6単位ずつしか在庫が無い。次の正しいものを1つ選びなさい。

- (ア) B型の赤血球濃厚液を10単位払い出す。
- (イ) B型の赤血球濃厚液を6単位払い出す。
- (ウ) O型の赤血球濃厚液を10単位払い出す。
- (エ) O型の赤血球濃厚液を6単位払い出す。

答: (エ)

O型は異型適合血として万能だからです。付き添いの申告は信用ならないし、血液センターの血液型ラベルは鵜呑みにしないことが鉄則です。検査技師の責任で、輸血事故の危険を回避しましょう。

問2: この患者の血液型を検査したところ、このような結果になった。再検しても同じ結果であった。

患者は救急車で赤血球輸血を受けていた事がわかった。この情報をもとに、結果について考察してみてください。

- (ア) 患者はB型。救急車の中でO型を輸血された。
- (イ) 患者はO型。救急車の中でB型を輸血された。

オモテ検査			ウラ検査			総合判定
抗A	抗B	判定	A1血球	B血球	判定	
0	3+mf	保留	3+	0	B	保留

一見 (ア) と思いがちですが、この検査結果だけでは、区別が付きません。なぜでしょう? O型にB型を輸血すると、O型患者の血管内の抗B抗体は容易に消費されてしまい、ウラ検査は、まるでB型のように見えてしまうからです。もちろんA型でも同様なことが起こり得ます。

では、その後の輸血はどうしたらいいでしょう?

救急車の中で何型が輸血されたか判明するまでは、O型を輸血し続けるしかないでしょうし、その場合の新鮮凍結血漿や血小板は、血漿中に抗Aや抗B抗体の無い、AB型を選択する必要があるでしょう。

これは、実際に起こった事例です。実はO型であった患者は、付き添いの人の申告で救急車の中でB型を輸血され、搬送された病院でもB型と判定され、計9,000mLも輸血され死亡しました。そして、B型と判定したその日の当直検査技師は、その後の裁判で責任を問われることに…。

今回は異型輸血の想定ですが、"部分凝集"は新生児や臍帯血、抗原減弱、移植、亜型等でも見られます。

最後に、水戸医療センターの岩崎副技師長さんから頂いた、抗Bに対する"部分凝集"のきれいな写真を見て頂いてお別れです。次回は「交差適合試験が全部陽性になってしまう！」の対処法です。



輸血検査の基礎と”こつ”

No.3(交差適合試験が全部陽性になってしまう)

NHO東京医療センター 深澤 文子

- ・自己抗体？
- ・不規則抗体(同種抗体)？

交差適合試験でセグメント全部が陽性になるのは、概ねこの二つが原因です。そして大抵は、自己対照が陽性なら自己抗体、陰性なら高頻度抗原に対する同種抗体です。

輸血する前には血液型を行い、当然不規則抗体検査も行いますから、この時点で何かおかしいと気付きます。冷式抗体なら血液型がオモテ・ウラ不一致になる場合もあります。怖いのは、自己抗体陽性者で同種抗体が隠れている場合です。不規則抗体検査や交差適合試験の目的は、あくまでも溶血副作用を起こす37℃で反応する同種抗体を見逃さないことです。血液型オモテ・ウラ不一致は別の機会にして、まず不規則抗体の間接抗グロブリン法(IAT)で異常があった場合から解決していきましょう。

1. 自己対照のみが陽性的場合

患者の直接抗グロブリン試験(DAT)をやってみましょう。DATは、IgG抗グロブリン単独試薬が陰性で、広範囲抗グロブリン試薬や補体単独のみ陽性の時は、寒冷凝集素や薬剤起因性を疑います。

***注意：**補体・DATは反応が増強する場合があるので、直後判定後5分～10分置いてもう一度遠心判定することが大切です。(試薬の説明書を参照してください)

IgG抗グロブリン試薬で陽性的場合は、次のような可能性について考えます。

- ・新生児：HDN(新生児溶血性疾患)
- ・大人：AIHA(自己免疫性溶血性疾患)
- ・異型輸血による溶血反応、ABO他CcEe等の異型輸血でも遅発性溶血副作用(DHTR)が起り得る
- ・移植臓器内のドナーリンパ球が産生する抗体
- ・血漿分画製剤等からの移入抗体
- ・抗生剤やドーパミン等の薬剤起因性

そこで、診断名、年齢、最近の輸血歴、投薬状況、溶血状況等、必要な情報を集める。また健常者にもDAT陽性者がいることも考え合わせ、結果の解釈をします。

情報に異常がなく、同種抗体が陰性的の場合は通常、濃厚赤血球輸血には支障がありません。しかし、HDNや、三ヶ月以内に輸血歴がありDHTRが疑われる患者には、赤血球の抗体解離同定を行って、抗体陰性血の選択を行わなければなりません。

***参考：**DT解離

赤血球沈渣(3回以上洗浄)1容+生理食塩液1容+
DT解離液2容
蓋をして激しく混和、蓋を取り37℃5分加温
(蓋を取る時、液が飛び散らないよう注意)
3400rpm5分遠心し、上層を分離して使用

2. スクリーニング血球交差適合試験)と自己対照の両方が陽性の場合

自己抗体を疑うが、反応増強剤や、寒冷凝集素の影響も視野に入れて考えます。

反応増強剤(アルブミンやLISS、PEG)を入れずに、基本的な60分加温IgG・IATを行う。洗浄時、37℃の温水を使うことで、陰性化する場合もある。また、PEG添加のIgG・IATで温水洗浄を行ってみるのも良い手です。これで陰性化することもあるので60分法より時間短縮になり効率的です。

陰性化に成功したら、その方法で交差適合試験を行えば、ほとんどの場合問題なく輸血できます。同時進行で抗体の同定をします。

・抗体が同定された場合

対応する抗原陰性血を選択するのが一般的です。しかし、その抗体に対しての抗原が陽性で自己抗体と決定されたら、抗原陰性血を輸血するか、自己抗体を無視し患者と同型にするかは、担当医と相談します。同種抗体産生予防のため、患者と同型が良いとの意見もあるからです。例えば、患者の抗原性がDCcEEで、抗E自己抗体陽性だとEを避けてe抗原陽性血を輸血することになり、異型輸血になってしまいます。最近では、Rh型のみでなく、臨床的意義の高いKidd、Duffy、Diego抗原についても、患者と同型の輸血を支持するとのエビデンスが増えています。

・抗体も同定されず、陰性化にも成功しなかった場合

血清(血漿)中の自己抗体の吸収を試みます。PEGによる自己抗体吸収法は、前処理もなく比較的簡便に実施でき、またルーチンの試験管法の交差適合試験をPEG法に変えれば、常に手元に持つことができ便利です。

PEG 2容と記載してある本もありますが、市販のPEG試薬を使う場合は、自己血球1容+自己血清(血漿)1容+PEG 1容がお勧めです。吸収後の血清(血漿)を用いて不規則抗体検査や、交差適合検査を行います。もし吸収が不十分な場合は、この上層に1容の自己血球を追加し、再度吸収操作します。

* 自己血球による自己抗体の吸収

自己血球 1 容 + 自己血清 (血漿) 1 容 + PEG

1 容、37℃ 15分加温、3400rpm5分遠心し、上層を分離して使用



同種抗体が存在する場合は、対応する抗原陰性血を選択します。同種抗体陰性の場合にも、同種抗体産生予防のためRh-hr型同型を輸血することをお勧めします。Kidd、Duffy、Diegoも同型ならもつと良いでしょう。AIHA等で貧血している場合、なるべく輸血を避けることも基本なので、担当医と良く相談しましょう。洗浄血の輸血などという、ほとんど無効なことは、なるべく避けたいものです

* 吸収後の血清(血漿)を用いた交差適合試験

主試験: IgG・IAT (PEG 1容添加済みなので、血清4滴 + 製剤セグメントの3%血球1滴加えて加温後、洗浄、IgG抗グロブリン試薬を2滴加えて遠心判定する。

副試験: 実施できないので、製剤セグメントの血液型を確認する。

自己対照: 解離していない血球を使う場合は、当然(+)となる。

3. スクリーニング血球(交差適合試験)が陽性、自己対照が陰性の場合

抗体の同定を行いましょう。同定できれば、その抗原を避けて輸血します。しかし、全てのパネル血球に同様な凝集が起ってしまった場合は、高頻度抗原に対する同種抗体と思ってまず間違いありません。血液センターに抗体同定と適合血の選択をお願いします。準備期間などを担当の医師と相談しましょう。高頻度抗原に対する同種抗体は、適合血の選択をしなければならないものもありますが、心配なく輸血できるものもあります。日本輸血・細胞治療学会会告の赤血球型検査(赤血球系検査)ガイドラインを参照してください。これはインターネットで検索すればすぐ読むことができます。さらに、認定輸血検査技師制度協議会カリキュラム委員会編のスタンダード輸血検査テキスト・第2版(通称・白本)、日本臨床衛生検査技師会編の新輸血検査の実際(通称・黒本)を読めば、あなたも直ぐに認定輸血検査技師です。次回は「ABO血液型が決定できない!」についてです。

輸血検査の基礎と”こつ”

No.4 (A B O血液型が決定できない！)

NHO東京医療センター 深澤 文子

オモテ・ウラ不一致！

重型ですか？慌ててはいけません。まず担当医に連絡し、すぐには血液型が決定できないことを知らせましょう。輸血の予定なども確認しておくことが大切です。ついでに患者の情報も仕入れましょう。

緊急時には、**O型赤血球・A B型血漿や血小板の選択も考慮します**。緊急輸血の場合は、反応パターンにもよりますが、抗HレクチンによりH抗原(+)をチェックしておくで安心です。それでは、重型検査をするまえに、いろいろな確認事項を潰していきましょう。

● 再現性はあるか？

検査者、試薬を変えるなどしてもう一度検査してみる。

抗A・B試薬は、唾液中の血液型物質により反応性が弱まるので、検査中のおしゃべりは禁止です。試験管の汚染等でも反応性が変わってしまいます。

● 不規則（同種）抗体・自己抗体・寒冷凝集が影響？

O型血球の反応を確認するため、不規則抗体スクリーニングをやってみる。**(当然ですがスクリーニング血球はO型です)** また、直接抗グロブリン試験 (DAT) も確認しておきます。

⇒ 冷式抗体の影響の場合

- ・ 血清（漿）、血球を別々に暖めて再検
- ・ 血球を37℃生理食塩液でプレ洗浄後再検
- ・ ウラ：間接抗グロブリン法で行う
- ・ ウラ：酵素法（プロメリン法）で行う

プロメリン法を行って消えれば、冷式抗Mなどの影響を予測できます。寒冷凝集が強すぎる場合は、採血時から加温して検体を運ぶ工夫も必要です。（ケーキの保冷剤を恒温槽にて温め、暖かい保冷ジェルの中に試験管を入れて運ぶなど、工夫している施設もあります。）ウサギ血球ストローマを用いた寒冷凝集吸着試薬も市販されています。余談ですが最近地球温暖化と節電のせい、使う機会がめっきり減りました。（本当は不規則抗体検査で、生理食塩液法が省略されるためのようです。）

⇒ 温式自己抗体の影響の場合

- ・ オモテ：

クロロキンや、グリシン塩酸/EDTAで解離後の血球を用いて、再検してみる。

- ・ ウラ：

自己抗体吸収後に再検してみる。（単純にポリエチレングリコール（PEG）で吸収を行うか、グリシン塩酸/EDTAで解離後の血球でPEG吸収を行って再検）

(PEG吸収については184号を読んでください)

しかし、解離を行うと、一部の抗原で変性や破壊が起ることも認識しておかねばなりませんし、同様に吸収も自己抗体と一緒に一部の同種抗体も除かれてしまう、との報告もあるようです。記憶にとどめておきましょう。

- 血清（漿）中の蛋白の影響か？（高 γ グロブリン血症？生化学のデータを確認しましょう。）
オモテ：血球を1回洗浄して再検してみる。
ウラ：連鎖形成？生理食塩液置換で凝集像を観察する。
- 輸液（高分子血漿増量剤等）の影響ではないか？
再採血の検体にて標準法を再検してみる。
- 新生児ではないか？
新生児は母親由来の抗体を持っている場合があり、ABO型については、3歳ぐらいまでは抗原も抗体も未発達の場合がある。
- 臍帯血ではないか？（183号参照）
- 白血病などでの抗原性の低下はないか？
- 卵巣癌・胃癌などで血清（漿）中の型物質が異常増加し、抗A・B血清が中和されていないか？
オモテ：血球を1回洗浄して再検してみる。
- 低（無） γ グロブリン血症、高齢者などで抗A・B抗体の低下と欠損はないか？
- 異型輸血？（最近の輸血はなかったか？）
- ABO型違いの移植はなかったか？
- 感染の影響による血球膜の変化（T化など）はないか？

病状によっては、今回は判定保留でよい、担当医と相談しましょう。

ところで、T化ってなに？

重症感染症等により、赤血球膜が損傷を受けて起こる。輸血血液血漿中の抗Tと反応し、交差適合試験の副試験が全て陽性になることで発見される場合が多い。溶血性副作用を起こすことあり。副試験を省略しているところは、注意が必要です。

では、最近の東京医療センターのオモテ・ウラ不一致症例です。一緒に考えてみてください。

*症例① 泌尿器科 前立腺針生検予定 62歳♂

オモテ検査			ウラ検査			総合判定
抗A	抗B	判定	A1血球	B血球	判定	
4+	0	A型	1+	3+	保留	保留

これを見て、どう考えますか。A型かな～？ですね。

⇒ 免疫グロブリンや輸液の影響？

血清（漿）中の蛋白は正常で輸液は受けていない。

⇒ 寒冷凝集の影響でA 1血球に凝集する？

前述のような、いろいろなやり方で暖めて再検してみましたが、同様の結果でした。

⇒ ウラ試験のプロメリン法では、A 1血球に対する（1+）が陰性化した。

⇒ 冷式抗体の影響でA 1血球に凝集する？

不規則抗体検査をやってみました。

生理食塩液法で、全ての血球に（w+～1+）、PEG-IATでも若干弱くなる印象を受けるが同様の結果でした。プロメリン法では全て陰性。

自己対照も陰性。DATは陰性。血液型のウラ試験のプロメリン法でA 1血球に対する（1+）が陰性化したので、よくある抗Mかな？と思ったのですが、違いました。ちなみに患者のM抗原は陰性でしたが。

反応増強剤（アルブミンやLISS、PEG）を入れない基本的な60分加温IgG-IATでも、ま

た洗浄に37℃の生理食塩液を使っても陰性化しない。これで反応増強剤に対する反応も否定されました。自己対照は陰性でしたので、自己抗体では無いと思いましたが、一応、温式PEG、冷式PEG双方で吸収を試みました。当然結果は（w+～1+）でした。

A型の血液10本と交差適合試験を行いました。全て（w+～1+）と変わらないので、ウラ血球や不規則抗体用血球試薬中の血球保護液（アルセバー液）に対する反応でも無さそうです。

⇒ 不規則性抗Aを持ったA型？

不規則抗体検査の血球はO型で、その血球にも全て（w+～1+）のため、抗Aでは無さそうです。

⇒ 輸血歴無し

⇒ 移植歴無し

⇒ 外来のため再採血できず

残るは、高頻度抗原に対する抗体の影響と思いますが、皆さんはどう思いますか？生理食塩液法で陽性、プロメリン法で陰性、間接抗グロブリン法で陽性の高頻度抗原に対する抗体って何かな？良く知られている抗JMHは、酵素法に反応しないことが多いのですが、生食法でも多くは陰性です。悪性腫瘍だとプロテアーゼインヒビターが上昇し、プロメリンなどの酵素活性を阻害するので、酵素法に反応しないことがあるとの話も聞きます。フィシン2段法だと、すでに血球が酵素処理されているので、プロテアーゼインヒビターの影響を受けませんが、残念ながら検体量に限りがあり実施していません。HTLA（High Titer Low Avidity）を示す抗体か、抗体価も測ってみたかったところです。

と言うわけで、日赤に精査に出そうと思ったのですが、輸血の必要無しとのことで、精査できず決着がついていません。結果は、詳しい検査情報をつけて「判定保留」で返しました。もし、高頻度抗原に対する抗体であったとしても、輸血する場合は、A・B型転移酵素（トランスフェラーゼ）等でオモテ検査の信憑性を確認する必要があるようです。

ところで、A・B型転移酵素ってなに？

O型血球をA型やB型に変える血清（漿）中の酵素のことで、A型の人はA転移酵素を持っています。もちろんB型の人はB転移酵素を持っています。

● 亜型の検索

先日、日本人によくあるB亜型の検索を行いましたので、これを例に簡単に紹介します。

症例② 救命救急センター 熱中症 66歳♀

オモテ検査			ウラ検査			総合判定
抗A	抗B	判定	A1血球	B血球	判定	
0	0	O型	4+	0	B型	保留

これを見て、どう考えますか。

⇒ 抗B抗体が弱いO型か？

免疫グロブリンに異常は無く、A1血球に対する反応も強いので、否定的です。

⇒ B抗原が弱いB型か？

反応パターンからBm型が疑われ、精査しました。結果は以下の通りです。

- ・ 血清（漿）中のB型物質が証明された。
- ・ 血清（漿）中のB型転移酵素が証明された。
- ・ 吸着解離試験で、B抗原が証明された。

以上の結果から、Bm型と思われましたが、家計調査など遺伝子型の決定ができないため、B亜型として報告しました。この患者は、抗Hレクチンの反応は（4+）、B血球に対するPEG-IATは陰性のため、輸血の適応はB型としました。このような場合、必ずしも亜型を決定する必要はありません。輸血する血液型を決定してあげることが大切です。患者の血球が抗Hに反応する場合は、間接抗グロブリン法にて血液型ウラ検査を行って不規則性抗A、抗B抗体を確認し、それを避けて輸血します。検査法詳細を含め、ボンベイ型など特殊な場合についても、この機会に黒本（新輸血検査の実際）を読んでみて頂けたらと思います。

既にお気づきと思いますが、通常の試薬以外に必要なものは、ほんの少しです。少なくとも輸血を行う施設では、いざと言うときのために備えておきたいものです。

普段使う輸血用試薬以外で最低限備えておきたい試薬

- クロロキン試薬
（できればグリシン塩酸/EDTAのキットも）
- PEG試薬（IATと共用）
- 抗Hレクチン（できればA 1レクチンとA・B型転移酵素測定キットも）
- ジクロロメタン・ジクロロプロパン（DT）解離液
（184号参照）

次回は最終回です。新生児の輸血と、臨床への報告方法について考察します。

輸血検査の基礎と”こつ”

No.5(新生児の輸血・臨床への結果報告方法)

NHO東京医療センター 深澤 文子

1. 新生児の輸血

成育医療センター等以外では、稀なこととは思いますが、産科やNICUがある施設では、常に心づもりをしておきたいものです。生後4ヶ月未満では、免疫抗体の産生は不十分であり、胎児新生児溶血性疾患（HDFN）は、母親の胎盤を移行するIgG抗体が原因といわれています。移行抗体は、抗D抗体などの不規則抗体のみならず、ABO抗体も考慮しなければなりません。母と児のABO血液型により、可能性のある抗A・抗B抗体についても検査します。例えば、母B型、児A型なら、母から児に移行した抗A抗体が溶血を引き起こす可能性があるからです。

不規則抗体検査：

児血漿（血清）では移行してくる抗体が捉えにくい場合もあるため、できれば母親血漿（血清）を検査し、対応する抗原陰性血を選択します。

東京医療センターでは妊娠前期と後期に不規則抗体を検査し、陽性なら抗体価を測り産科と連携を取っています。そのため、出産前からHDFNの可能性について、ある程度予測をつけることができます。例外として、胎児や新生児ではLewis抗原は未発達のため、HDFNを起こさないことも知っておきましょう。

余談ですが、妊娠中の検査は、5年前検査室側から産科に提案し実現しました。妊婦にとっては安全性が高まり、検査室にとっては不規則抗体検査が増えることで増収につながり、そして自動機購入の一助ともなりました。

抗A・抗B抗体：

児血漿（血清）とA₁血球、B血球で、IgG間接抗グロブリン試験（できればPEG-IAT）を行います。

児のオモテ血液型に対応する抗A抗B抗体が陽性なら、必ずO型赤血球を選択します。交換輸血には、合成血等を用います。

例：児の血液型オモテA型で、抗A抗体陽性なら、A型を輸血してはならない。O型赤血球を選択する。交差適合試験は、母親血漿（血清）を用いてPEG-IATで主試験を行う。副試験は行わず、製剤セグメントのO型を確認する。（東京医療センター・マニュアルより）

ABO型による新生児溶血性疾患

児の血漿（血清）中の抗A抗B抗体価が8倍以上か、母親血漿（血清）中のIgG抗体価がDTT（ジチオスレイトール）処理後512倍以上あれば、ABO不適合妊娠を疑う。（IgMを失活させる試薬は、2-ME（2-メルカプトエタノール）よりDTTのほうが、扱い方と安定性の両面で使い易いと思います。経験ではDTTは0.01Mに調整して-20℃以下で冷凍すれば、既知検体の測定で1年以上使用可能でした。）

IgG抗体価の測定は、PEG等の反応増強剤を使わない間接抗グロブリン法で行い、(1+)を終点とする方法が一般的です。

2. 臨床への結果報告方法

亜型を発見した場合や、不規則抗体が陽性であった場合等には、担当医への報告は不可欠です。まず、何か変だなと思った時点で、精査が必要なことを報告しましょう。ついでに、患者情報の聞き取りを行います。電子カルテの場合は、患者状況を詳細に把握することができますし、検査技師もカルテに記載することができ便利です。基本的な担当医への報告事項は、科内で決めておくことが大切です。

それでは実際の症例での報告例を紹介します。

* 症例①産婦人科 妊娠14週（妊娠回数3回）39歳♀

抗E抗体陽性

○月○日不規則抗体検査において抗E抗体が検出された。生涯E抗原を避けて輸血する必要があるため、患者携行用【血液型情報カード】を発行する。

患者のRh抗原性はDCCeeのため、赤血球製剤は、E抗原とc抗原陰性血を選択輸血する。その場合、日本人適合率は約43%である。

東京医療センターでは、抗E抗体が同定されてRhの表現型がDCCee等の場合、抗体追加産生のリスクを考慮しc抗原も避ける、つまりRh表現型を合わせて輸血しています。これについては各施設で話し合い、それぞれで決定しておくとい良いでしょう。手術予定患者の場合は、準備に時間がかかることも報告し、準備量の相談をします。

この症例のように、もし患者が妊婦であった場合には、さらに次のように追加して報告します。

患者が妊婦であった場合の追加報告

抗E抗体は、胎児新生児溶血性疾患（HDFN）の原因となる場合があるため、抗体価を測定した。

実施日 抗体価

○月○日 256倍

（注：抗体価は頻回測定する人が多い。その場合は1回目からの結果を、順次ならべて報告します）

Re○vePanelA LotNoRA687 CellNo.3 (R2R2)使用

AABB (American Association of Blood Banks Technical Manual) には、抗体価16倍以上が有意でありHDNをモニタリングする必要があるとの記載がある。（注：抗体価16倍以下の場合には「妊娠18週から2～4週ごとに抗体価の測定を繰り返すことが望ましいとの記載がある」などと報告します）

抗体価測定には、抗原ホモ接合O型血球を使用します。パネルの中の血球を使用すると簡便です。使用した血球の記録も残しておきましょう。また、検体は凍結しておき、次の検体と同時測定し、精度のチェックを行います。

文献の記載事項など輸血担当が知りうる情報も報告し、胎児の状況など臨床医と情報共有すると、今後の抗体価測定のスケジュールも把握し易くなります。要望があれば、関連文献のコピーも用意します。

この症例は、その後さらに抗体価が上昇し、頻繁にモニタリングしていた胎児の活動性が低下し、37週で誘導分娩になりました。しかし、出生後速やかに交換輸血が実施され回復した症例です。

例文中にある【血液型情報カード】は、5年前輸血システム導入時、都立駒込病院から書式を頂いて使用しています。実際の書式を紹介しましょう。

血液型 情報カード		東京医療センター H19. 08. 20. 発行	
氏名	●●●●●●	性別	女
生年月日	T. 2. ●	患者ID	●●6●48
ABO血液型	A	不規則抗体前回検査日	2007/08/08
Rho (D) 抗原	+		
不規則抗体	有		
抗E			

注意事項

- * 輸血を受ける時はその医療機関の担当医に、この血液型情報カードを御提示ください。
- * 検査結果は検査時期、検査法などによって変わることがあります。
- * 輸血前には一般に再検査が必要となります。
- * ご不明な点は下記にご連絡ください。

お問い合わせはこちらに：
〒152-8902 東京都目黒区東が丘 2-5-1
国立病院機構 東京医療センター 血液管理室
Tel. 03-3411-0111

また最近では、チーム医療の一環として、検査技師が直接患者に【血液型情報カード】について説明し、血液型や不規則抗体の簡単な説明書とともに手渡しています。あと1例、185号で紹介したB亜型の報告例を紹介します。

*症例② 救命救急センター 熱中症 66歳♀

緊急輸血の必要性無し

ABO型の亜型が示唆された場合の報告例

オモテ検査、ウラ検査が不一致となり、精査を行った。

オモテ検査			ウラ検査			総合判定
抗A	抗B	判定	A1血球	B血球	判定	
0	0	O型	4+	0	B型	保 留

●抗Hレクチンに対する反応：陽性（4+）

血球上に正常B型より強いH抗原を認める。

●血漿中のB型物質：有

抗B抗体を添加し凝集抑制があるかで判定する。

抗B抗体添加：128倍、生食添加：512倍。凝集価で2管差以上あり、B型物質の存在を認める。

●抗B抗体による吸着解離試験：陽性（1+）

血球上に弱いB抗原を認める。

●B型転移酵素：有

患者：4倍、正常B型：128倍

正常より弱いが血漿中にB型転移酵素を認める。

●不規則性の抗B抗体：認めず

PEGクームス法によるB血球ウラ試験：陰性

精査の結果、Bm型が示唆されたが、家系調査等遺伝子型が決定できないため、B亜型と判定した。

輸血に際しては、不規則性の抗B抗体を認めないことから通常のB型を輸血する。

このように、精査結果の詳細を報告します。これらの検査は必ず正常対照をおきますが、正常対照の結果報告は必要な部分だけで良いと思います。また、必ずしも、正式名称にこだわらなくても良いので、臨床医にわかり易い表現を心がけましょう。

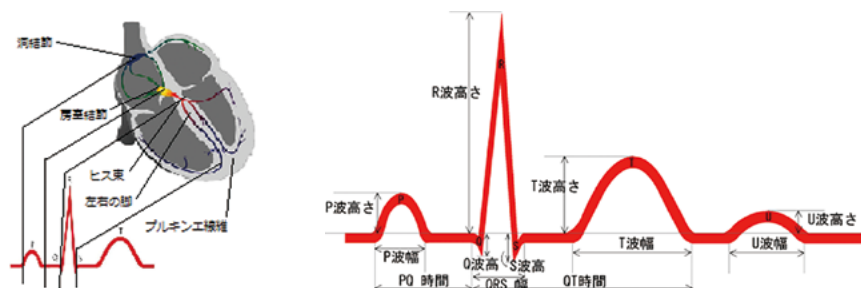
最後に、5回にわたって【輸血の基礎と"こつ"】に御付合い頂き、有難うございました。輸血担当者が知っておくべき基礎を中心に、なるべくわかり易く実例を挙げて書いたつもりです。輸血の仕事は多岐にわたっており、これはほんの一部でしかありません。しかし、適合する輸血血液を選択することは、検査技師に任せられた、やりがいのある面白い仕事だと感じています。本稿が皆様にとって、輸血の専門書を紐解く、よい機会になってくれればと願ってやみません。

《基礎編》

1. 心電図でなにがわかる？

不整脈、心筋の異常（虚血性心疾患、心房および心室の肥大、心筋炎、心筋症）電解質異常、自律神経障害、薬剤の影響などがわかります。この中でも特に心電図の得意とする疾患は、虚血性心疾患と不整脈といえます。他の疾患については、心臓疾患診断の1つの手段となりますが、心電図だけで診断することはできません。

2. 刺激伝導系と心電図波形



洞結節で発生した電気興奮は心房内に伝わり心房が興奮するとP波を形成します。また心房を通過し心室に伝わるとQRS波が描かれ、興奮が収まるとT波が描かれます。誘導によってはT波の後には小さな波が描かれている場合があります。これをU波と呼びます。

■ワンポイント

U波の極性は、通常T波の極性と同一で正常例ではaVR以外は陽性であり、T波と融合する場合も多いです。陰性U波を確認したら虚血を疑ってみる必要もあります。

3. 心電図の誘導法＜四肢＞

・標準肢誘導

I 誘導:右手と左手間の電位差。II 誘導:左足と右手間の電位差。

III 誘導:左足左手間の電位差。

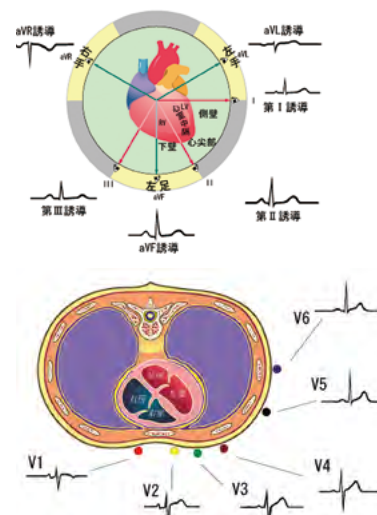
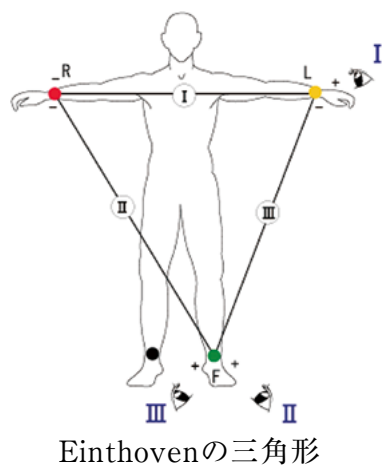
・単極肢誘導

その誘導部位の電圧をそのまま記録しようとしたものですがそのままでは波形が小さいので、これを大

きくする意味の誘導aV誘導が用いられています。aVR誘導:右肩から心臓を見る誘導。

aVL誘導:左肩か

ら心臓を見る誘導。aVF誘導:心臓ほぼ真下から見る誘導。



4. 心電図の誘導法＜胸部＞

心電図の胸部誘導は、右図のように水平面で心臓を様々な角度から眺めた誘導です。

＜胸部誘導＞

- V 1：第4肋間胸骨右縁
- V 2：第4肋間胸骨左縁
- V 3：V 2とV 4の中間
- V 4：第5肋間で左鎖骨中線上の点
- V 5：V4と同じ高さで左前腋窩線上
- V 6：V4と同じ高さで左中腋窩線上



■ワンポイント

誘導が反映する心臓の部位

I、aVL:左室前側壁、高位側壁。II、III、aVF:心室下壁。V1、V2:右室、左室後壁。V3、V4:心室中隔、左室前壁。V5、V6:左室側壁を示します。

5. 心電図記録時の注意点

- ・電極は正しく装着します。(特に心筋梗塞の場合は、心電図波形が時間と共に変化するため胸部誘導は前回と同じ位置に付ける必要があるので注意を要します。)
- ・筋電図ができるだけ入らないように注意します。(緊急時は体動も多く、筋電図が混入するが多いため、できるだけ筋電図が入らないよう努力します。どうしても筋電図が混入する場合はフィルターを使います。)
- ・心電図波形の確認をします。(波形をよく見て電極の付け間違いがないか確認します。また、電極を外す際も電極が正しく付いていたか確認しながらはずします。)

6. 心拍数の見かた

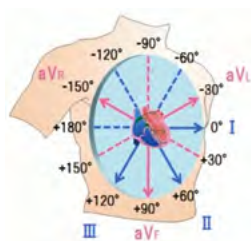
心電計の紙送り速度は25mm/秒です。記録用紙の1mmの升目は $1(\text{mm}) \div 25(\text{mm}/\text{秒}) = 0.04(\text{秒})$ 、5mmごとの太い線の間隔は $0.04(\text{秒}) \times 5 = 0.20(\text{秒})$ です。心拍数は60(秒)をR-R間隔で割って求めます。心拍数(拍数/分) = $60 \div (\text{R-R間隔})$



■ワンポイント

まず5mmごとの太線上のR波を探し、次のR波が来るまで5mmごとに300、150、100、75と数えていくと、すばやくだいたいの心拍数が数えられます。

7. 電気軸を読む



電気軸とは、心臓の電気的中心を軸とした傾きを前面から見た平面（垂直面）

投影したときの水平軸に対する角度のことです。心臓の電気的中心は、前額面から後ろに向かって貫いているような形で左右に振れます。心室筋の肥大、虚血性心疾患などは大きくこの振れに関与して

います。例えば、左室肥大、左脚ブロックや肥満などは、左に振れ、右室肥大、右脚ブロックは右に振れます。このように電気軸を求めることは重要なことですが、最近ほとんどの心電計が軸を計算してくれます。また簡単なQRSの軸偏位の求め方を下表に示しました。

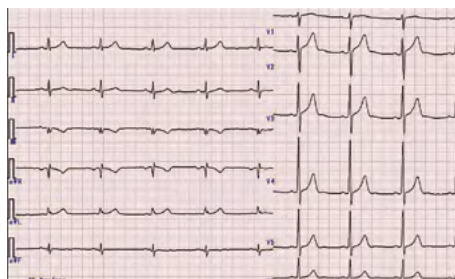
	I 誘	II 誘導
正常軸	+	+
左軸偏位	+	－
右軸偏位	－	+

* 各誘導でQRS波の平均振幅が陽性の場合を（+）,陰性の場合を（－）とする。

8. 心電図を読む順序

<見逃しの少ない心電図の読み方>

- ①R-R間隔（整か？不整か？）
- ②QRSに先行したP波があるか？
- ③P波の高さ・幅は（幅0.06～0.10sec、高さ2.5mm以下）
- ④PQ間隔は（0.12～0.20sec）
- ⑤異常Q波はあるか？
- ⑥QRS波の高さ・幅・形状は？（幅0.06～0.10sec）
- ⑦ST-Tの変化は？
- ⑧QT間隔は（0.36～0.44）
- ⑨電気軸は何度か？



■ワンポイント

上記の順序で心電図を読んでいけば見逃しが少なくなると思います。判読項目が幾つもありますが、数多く判読し慣れてくると、さほど大変さは感じなくなってきました。絶えず疑いの目を持ちながら読み進めることが重要なことです。

《徐脈・頻脈・不整脈編 1》

1. 徐脈

心拍数は毎分60未満です。P波からQRS、T波へと続く関係は正常で同一波形を示します（図1）。

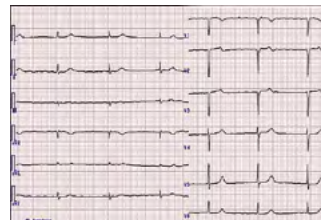


図1 徐脈

■ワンポイント

原因として、迷走神経の緊張、スポーツ心臓、洞機能不全、薬剤（ β 遮断薬、Ca拮抗剤）などがあります。基礎疾患があれば別ですが、一般的に洞性徐脈は治療の対象となりません。

2. 頻脈

心拍数は毎分100以上です。洞結節からの興奮が頻繁となっている状態で、洞調律の状態は変わっていません。徐々に脈が速くなっていくこと、血圧は正常かあるいは上昇します（図2）。

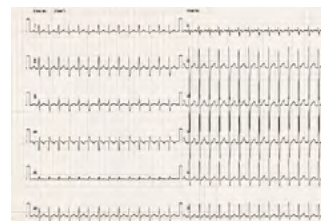


図2 頻脈

3. 上室性期外収縮

R-R間隔は突然短縮を呈します。QRSの形状は洞調律と同じです。期外収縮に先行するP波を認めます（図3）。



図3 上室性期外収縮

・心房性期外収縮

心房内に異所性興奮が発生し、本来の洞調律で予想される心房興奮より早い時点に出現する心房興奮です。

*心房性：房室接合部より上位で生まれるもの。

*房室接合部性：房室接合部付近で発生する場合。

上記両者を判断するにはP波の形や出現時期を比較する必要があります。そのためにP波が明瞭でなく、判別が容易ではない場合には、心房性と房室接合部性と合わせて上室性と称されます（図4）。

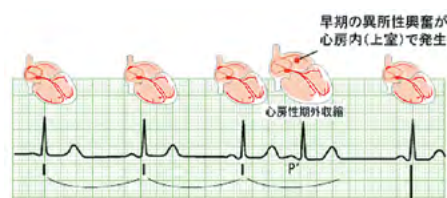


図4 上室性期外収縮

■ワンポイント

自覚症状が強い場合はホルター心電図により不整脈との関連を明確にすることが必要です。発作性心房細動や心房頻拍へ移行することもあります。

4. 心室性期外収縮

R-R間隔は突然短縮を呈します。期外収縮のQRSは幅広く、期外収縮に先行するP波を認めません（図5）。

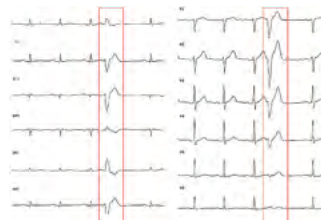


図5 心室性期外収縮

・2段脈

洞収縮と期外収縮が交互に現れます

（図6）。

・3段脈

洞収縮2つに期外収縮1つのリズム

(図7)。

・心室性期外収縮の危険度 (Lown分類)

Grade0：心室期外収縮なし。

Grade1：散発性

(1個/分または30個/時間以内)

Grade2：散発性

(1個/分または30個/時間以上)

Grade3：多形性 (期外収縮波形の種類が複数あるもの)

Grade4a：2連発

Grade4b：3連発

Grade5：短い連結期

(R on T現象) (図8)



図6 2段脈

図7 3段脈



図8 Lown分類

■ワンポイント

基礎疾患に心筋梗塞がある場合にて、Lown分類3以上のタイプを観察した場合は、直ちに医師に連絡し、適切な指示を受ける必要があります。基礎疾患を有さない場合においても、このような不整脈を捉えた場合には、念のために、医師に連絡をとっておく必要があります。

5. 心房細動

P波が消失し、細かいf波 (350 ~ 600/min) が出現します。

R-R間隔は不規則を呈します (図9)。



図9 心房細動

■ワンポイント

心房細動を高率に伴う疾患には心臓弁膜症があり、特に僧帽弁狭窄症や閉鎖不全症などが上げられます。さらに、甲状腺機能亢進症が原因となることがあります。また、明らかな心疾患を有さない場合でも見られることがあり、加齢による発生頻度が高い。心房細動における合併症の1つとして心房内での血栓形成が上げられます。血栓が左心房内に発生した場合、それが原因となって、脳塞栓を引き起こすことがあります。これを予防するために抗凝血薬療法が必要となることがあります。

6. 心房粗動

P波が消失し鋸波状F波 (250 ~ 300/min) が出現します。R-R間隔が規則的で、2対1、3対1房室伝導を呈します。心房細動と粗動の違いは心房の興奮回数で区別されます (図10)。



図10 心房粗動

《不整脈編-2》

1. AVブロック(第1度)

PQ時間は延長しますが、R-R間隔は一定です (図11)。

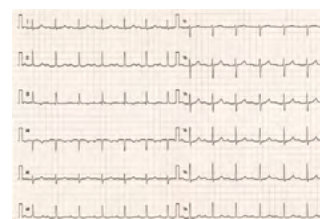


図11 第1度AVブロック

2. AVブロック(第2度: Mobitz I 型)

PQ時間が徐々に延長し、QRSが脱落します。この周期を Wenckbach型周期と言います (図12)。

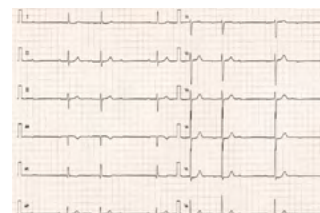


図12 Mobitz I 型

■ワンポイント

Mobitz I 型ブロックの多くは予後良好で、症状のない限り治療の必要のない場合が多いです。

3. AVブロック(第2度: Mobitz(Ⅱ型))

PQ時間の延長はなくQRSが脱落します。P-P間隔が一定のP波のみが出現します (図13)。

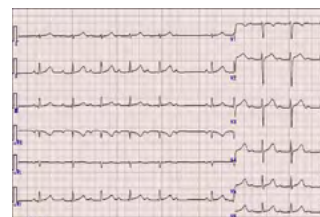


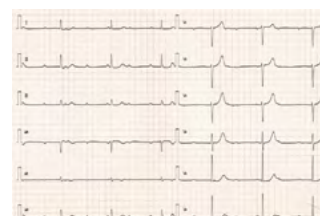
図13 Mobitz II 型

■ワンポイント

Mobitz II 型はHVブロックによる場合が多く一般に予後不良で、ペースメーカー植え込みが必要となる場合が多いです。

4. AVブロック(第3度)

P波とQRS波は無関係でそれぞれの周期で出現します。P-P間隔に比較してR-R間隔が長くなります (図14)。



■ワンポイント

第3度AVブロックは、高度な房室伝導障害により、心房からの興奮が心室に全く伝導されない状態です。心室は房室接合部以下の刺激中枢の自動能により、独自に興奮します。しかし、興奮の中枢が下位に移るに従って興奮発生能力が低下するため、その結果徐脈となります。心房と心室の収縮時期が連動していないため、心室への血液供給が不均一となり、かつ徐脈を生じるため、心拍出量や血圧が低下することが多いです。

《ブロック部位による分類》

ブロック部位は、ヒス束を中心にそれより上位の房室結節内(AH)ブロック、ヒス束内(BH)ブロック、ヒス束より下位のヒス束遠位(HV)ブロックに分類されます。

	AHブロック (房室結節内)	BHブロック (ヒス束内)	HVブロック (ヒス束遠位)
補充収縮	50/分程度	40/分程度	30/分程度
QRS幅	Narrow QRS	Narrow QRS	Wide QRS

《原因疾患》

AHブロック：迷走神経の過緊張や急性下壁心筋梗塞の合併でしばしばみられますが数日で回復します。

HVブロック：サルコイドーシスやアミロイドーシスなどの変性疾患や心筋炎稀に急性心筋梗塞の合併で起こると改善しないことが多いです。



5. 洞不全症候群

洞機能の低下により洞性徐脈、洞停止、洞房ブロックなどが複合して発生します（図15）。

以下の3つの型に分類されます。

I 型：持続性の洞性徐脈

II 型：洞停止または洞房ブロック

III 型：徐脈頻脈症候群

(bradycardia-tachycardia syndrome)

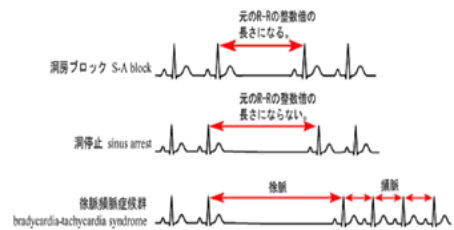


図15 洞不全症候群

■ワンポイント

心房細動や心房粗動、発作性上室性頻拍などを合併する場合があります。しかし、比較的予後の良いものが多いことも特徴です。徐脈の傾向が強く、めまい・失神などの症状があり、その原因が本症であると確認された場合にはペースメーカーの適応となります。

6. ペースメーカー

電気刺激によるスパイク信号を呈します。P波の前にスパイクがあれば右房刺激、QRSの前にスパイクがあれば右室刺激です（図16）。

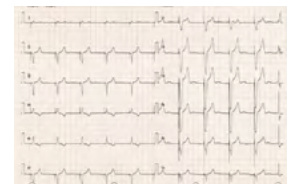


図16 ペースメーカー

■ワンポイント

適応となる病変は、基本的に徐脈性不整脈であり、房室ブロックと洞不全症候群、徐脈性心房細動に大別されます。

《虚血性心疾患・注意したい波形、アーチファクト編》

1. 心筋梗塞と狭心症

心筋梗塞は主として血栓性閉塞機序により冠動脈の血流が途絶し、その結果、末梢灌流領域の心筋壊死をきたす疾患です。一方、狭心症とは冠動脈の異常による一過性の心筋虚血発作を呈する疾患で、主として冠動脈の器質的狭窄に起因し、労作によって生じるものを労作性狭心症、冠動脈の攣縮（スパズム）により安静時に生じるものを冠攣縮性狭心症と分類します。

2. 冠動脈

右冠動脈（RCA：Right coronary artery）は左室下壁のみならず右室や左室中隔の一部に加え洞結節や房室結節などの刺激伝導系へも血液を供給しています。左冠動脈は左前下行枝（LAD：Left anterior descending coronary artery）と左回旋枝（LCX：Left circumflex coronary artery）とに分枝します。LADは左室前壁をはじめ心室中隔と左室側壁の一部に血液を灌流します。LCXは左室後下壁と側壁の一部を灌流しています（図1）。

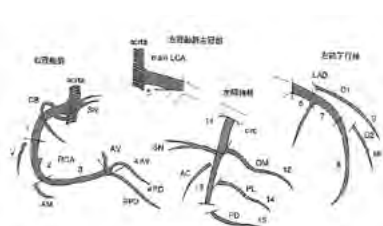


図1 冠動脈の区分

■ワンポイント

心筋壊死は冠動脈閉塞が生じてから、およそ3時間以内で灌流領域の心内膜側にとどまり、その数時間後に虚血領域の80%が壊死に陥るといわれています。このため6時間以内に血流を再開する必要があるため、迅速かつ的確な診断が要求されます。

3. 心筋梗塞の診断

心筋梗塞は持続する胸痛・心電図変化および血清酵素の上昇などによって診断されます。CKをはじめとした酵素の上昇は発症後早くても3～4時間後となるため、急性期では心電図や心エコーの所見が極めて重要となります。実際に急性貫壁性心筋梗塞の経時的な心電図変化を提示します。ご

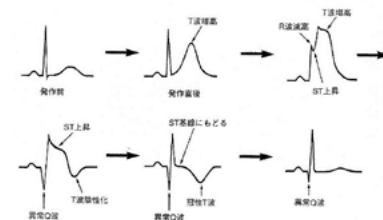


図2 経時的な心電図変化

く初期にはT波が増高するのみにとどまります。次いで特異的にSTが上昇します。次第にR波は減高しはじめ、STは基線に復し、発症後数時間から12時間で異常Q波を形成し、T波は陰転化します（図2）。

■ワンポイント

近年、心筋梗塞早期において高い診断感度を有する人心臓由来脂肪酸結合蛋白（H-FABP）やトロポニンTが全血で簡便かつ迅速に測定可能になりました。

4. 労作性狭心症

冠動脈に器質的狭窄が存在し、運動などの労作により心筋の酸素需要が供給を超えた場合に狭心痛が出現し、同時に心電図変化が見られます。所見：I、aVL、V3、V4、V5ではST低下を認めます。発作時にST低下（aVRは上昇）を認めます（図3）。

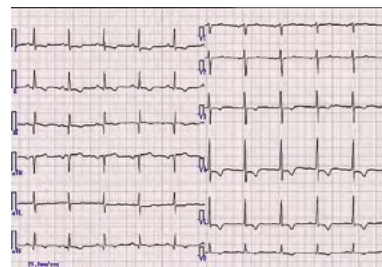


図3 労作性狭心症

■ワンポイント

狭心症の運動負荷心電図の診断基準

- ①ST下降のtypeを見極める②ST下降の回復時間が重要
- ③ST下降のみならず、U波にも注目します。水平または下り傾斜型ST下降について（マスター 2階段試験:0.05mV以上）上行傾斜型ST下降（0.2mV以上）ST上昇（0.1mV以上）

5. 心筋梗塞

急性期では危険な不整脈、心源性ショック、心臓破裂、心不全などが出現しやすく、死亡率も高く、正確な診断と適切な処置が要求されます。所見：V1、V2、V3、V4、V5にST上昇著明。T波増高を認めます（図4）。



図4 心筋梗塞

■ワンポイント

心筋梗塞の診断ポイントとして、①異常Q波（Rの高さの1/4以上の深さを持ち、かつ幅が0.04秒以上）②ST上昇③冠性Tがあります。高位後壁梗塞や心内膜下梗塞はこれらの典型的な心筋梗塞の特徴と異なる所見を示します。

6. 下壁梗塞

左室の下壁すなわち横隔膜面に生じた心筋梗塞です。右冠動脈あるいは左冠動脈回旋枝の閉塞によっておこり、高位後壁心筋梗塞を合併する場合があります。II、III、aVFで異常Q波がみられ、STの上昇、冠性Tが出現します。所見：II、III、aVFで異常Q波を認め、ST上昇、冠性Tが出現します（図5）。



図5 下壁梗塞

■ワンポイント

房室結節を灌流する房室結節動脈はRCAの末梢から分枝し、迷走神経の分布も密であることより徐脈・低血圧反射を生じやすく、このため房室ブロックもしばしば合併します。高度房室ブロック合併例では梗塞サイズが大きく予後は不良です。

7. 側壁梗塞

所見：I、aVLとV5、V6で異常Q波がみられます（図6）。

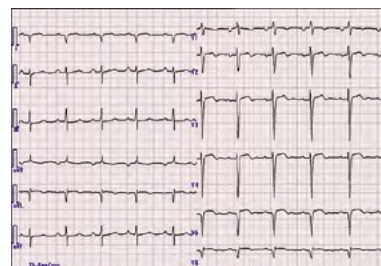


図6 側壁梗塞

8. 梗塞部位の同定

ST上昇、異常Q波、冠性T波の出現誘導がそれぞれV1～V4ならば前壁（中隔）、I、aVL、V5、V6ならば左室側壁、II、III、aVFの場合には左室下壁の心筋梗塞と診断されます（図7）。



図7 梗塞部位の同定

9. 電極装着ミス

所見：aVR、aVLの波形が逆です。I誘導の波形が逆転しています。このため右手、左手の装着ミスと考えます（図8）。



図8 電極装着ミス

■ワンポイント

装着・外しの時はもちろん、波形での確認を常に心がけます。

実際に、東京医療センターでは左右電極装着ミス防止のため右手のみ壁にかける工夫を行っております（図9）。

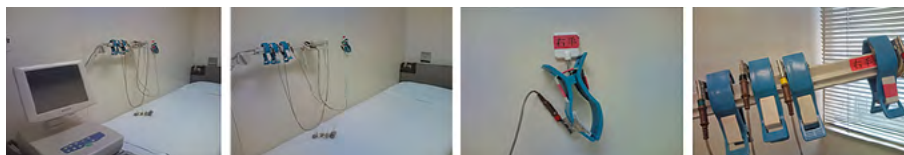


図9 東京医療センター心電図室

10. アーチファクト（筋電図）

所見：細い棘のような波が混入します（図10）。

■ワンポイント

力を抜いてもらいます。寒い場合には室温調節やバスタオルなどを掛けて対応します。四肢に筋電図が混入する場合腕の付け根に付けてみます。



図10 アーチファクト（筋電図）

11. アーチファクト（呼吸）

所見：胸部誘導に基線の動揺が見られます（図11）。

■ワンポイント

電極が動かないように一時的に呼吸を止めてもらいます。

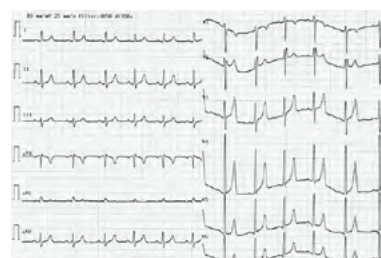


図11 アーチファクト（呼吸）

12. アーチファクト（接触不良）

所見：I 誘導の波形がフラットです（図12）。

■ワンポイント

左手の接触抵抗不良のため、新しい電極に変えます。またアーチファクトにはノイズ、交流障害、筋電図、基線の揺れなどがあり、どのアーチファクトであるか鑑別して、そのアーチファクトの影響を受けている電極を見つけることが大切です。

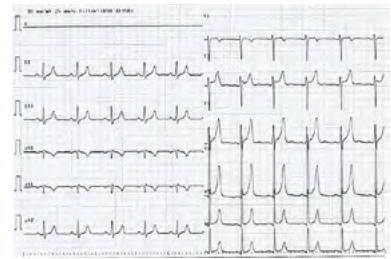


図11 アーチファクト（接触不良）

《最後に》

4月から就職された方、新たに生理検査に配属された方、また当直で心電図を取る方など、業務にも慣れてきたかと思います。慣れてくると電極の左右付け間違いや胸部誘導の付け間違いなどを起こす時期です。

心筋梗塞などの重大な心電図変化などを見落とさないように常に緊張感をもち、初心を忘れず業務に取り組んでいただけたら幸いです。また、本文を載せるにあたり、東京医療センター生理検査スタッフや故高橋祥慈副技師長に厚くお礼申し上げます。

末梢血液像の標準的観察法1.

白血球形態 I

国立がん研究センター 中央病院
臨床検査部 熊沢 寛子

1. はじめに

血液形態学は17世紀初頭の顕微鏡の発明、19世紀のエールリッヒによる三価酸染色の発見に始まります。エールリッヒは血液形態学の創始者、近代血液学の父と呼ばれています。その後、パッペンハイムはこれらの染色を使って血液形態学を確立しました。20世紀前半にはペルオキシダーゼ染色や超生体染色等が考案されました¹⁾。

それ以来、鏡検法による血液像検査は一滴の血液から短時間に染色・観察ができ、多くの情報を発信してくれることから重要な臨床検査項目としての地位を確立し続けています。

しかし、血液像は観察者の技能により同じ標本から発信される情報量に差があること、施設により伝統的に継承されている分類基準に差があり他施設との比較を行っていないこと、現場では先輩から伝えられた「間違った基準」が脈々と存在することなどが指摘されてから久しく、再現性よく細胞を鑑別できるかを目的とした標準化の重要性が提唱されてきました。現在は日本検査血液学会標準化委員会の血液形態検査標準化小委員会が日本臨床検査医学会、日本臨床衛生検査技師会とともに作業を進めている標準化案が本邦の基準になりつつあります。

血液像検査とは白血球、赤血球、血小板の3系統の細胞を観察し、各細胞の量的異常や形態異常から血液疾患を診断します。血液は全身を循環している臓器で、種々の病態において影響を受け異常を示すため、この検査は血液疾患に限らず、炎症性疾患、アレルギー性疾患などのスクリーニング検査として広く実施されています²⁾。

本シリーズでは上記の標準化案に準じて日常検査での末梢血液像の標準的観察法を第1回は白血球形態 I として一般的白血球分類、第2回は白血球形態 II として幼若細胞や形態異常などの異形成所見、第3回は赤血球形態・血小板形態について若干の解説を行います。

2. 細胞分類を始めるにあたり

- 1) 標本は抗凝固剤としてEDTA塩を使用し、採血後なるべく短時間で標本を作成します。
- 2) 標本の塗抹はウエッジ法、染色はライト・ギムザ染色かメイ・グリュンワルド・ギムザ染色を行います。
- 3) 血算値等のデータを参照します。血算細胞数とともに自動血球分析装置による細胞の大きさや内部構造の違いを利用して測定した白血球5分類や各種異常フラグを参照します。必要に応じて生化学や免疫血清などの結果も参照します。
- 4) 顕微鏡を弱拡大で細胞数の量的観察と標本全体を把握します。血算値と標本の細胞数を観察して量的観察を行い、血算値と量的に開きがあれば標本が適切に塗抹されていない可能性があります。最適鏡検部位は標本の引き終わり側で赤血球が接して密でな

く均一なところから赤血球2個の重なりが50%以内の部分を選択して100個カウントします。通常は400倍を用いて好中球（桿状核球・分葉核球）、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球の分類をしますが、分類においては百分率の値だけでなく実数を考慮します。細胞数が多い場合や異常細胞が観察される場合は200個以上カウントし、異常細胞や封入体については油浸1000倍に切り替えて観察します²⁾

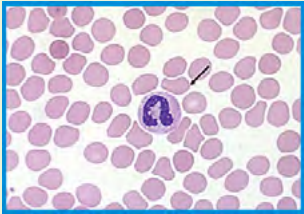
3. 末梢血液像基準値

2012年に日本臨床検査医学会で覚えやすいように細かな数字は極力丸めて、きりの良い数字にした学生用共通基準値範囲が発表されました、桿状核好中球0～5%、分葉核好中球40～70%、好酸球1～5%、好塩基球0～1%、単球0～10%、リンパ球20～50%です³⁾。

4. 白血球の形態

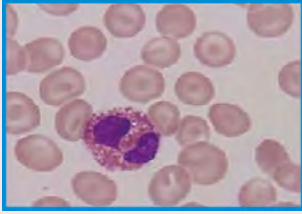
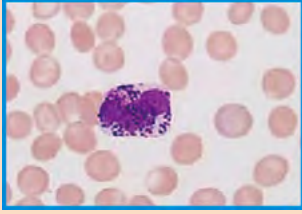
好中球（桿状核球・分葉核球）、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球、異形リンパ球について各細胞の特徴を示します、異型リンパ球はよく観察される細胞なので特徴を示します。最近では異型リンパ球という名称から反応性リンパ球と呼ばれるようになってきています。

1) 好中球の桿状核球と分葉核球の鑑別

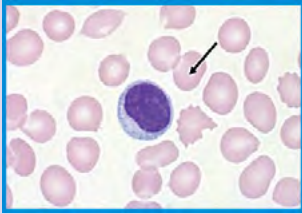
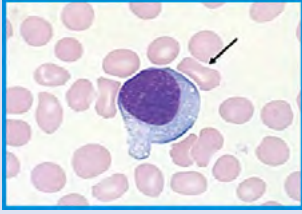
桿状核球	直径12-15 μ m、長径と短径の比率が3：1以上の長い曲がった核を持つ。核クロマチンは粗剛である ⁴⁾ 。	 細菌などの体内異物の貪食・除去⁵⁾
分葉核球	直径12-15 μ m、核は2～5個に分葉し、分葉した核の間はクロマチン構造が見えない核糸でつながる。核クロマチンは粗剛である。核糸が確認できないものは桿状核球と分類する。ただし、核が重なり合って分葉核球か桿状核球かが明確でないときは分葉核球と分類する ⁴⁾ 。	

写真：日本検査血液学会HP

2) 好酸球・好塩基球・単球の鑑別

好酸球	円形で好中球よりもやや大型であり、エオシンで橙赤色に染まる比較的大型で丸く一様な二次顆粒が細胞質に充満しているのが特徴である。核は通常2分葉しており、好中球よりも丸く眼鏡様の形態をしていることが多い ²⁾ 。	 寄生虫除去やアレルギー反応への関与⁵⁾
好塩基球	好塩基球好中球に比べやや小型の円形細胞で、青色アニリン色素によって暗紫色の大型（大小不同）の顆粒が特徴的である。この顆粒は水溶性であるため染色・水洗中に溶出してしまい、空胞のようにみえることがある。核は分葉しているが、顆粒が核の上ののることがあり、核形が明瞭でないことがある ²⁾ 。	 即時型アレルギーへの関与⁵⁾
単球	正常末梢血に存在する白血球の中で最も大きく直径20-30 μm 。類円系の細胞で、核は腎臓形ないし馬蹄形である。核網は薄く、レース様などと表現される。細胞質は広く不透明な水色を呈しており、微細な赤紫色のアズール顆粒を有しているが、微細すぎて光学顕微鏡では見えないことがある。細胞質に空胞を認めることがある ²⁾ 。	 細菌などの貪食、T細胞に抗原提示、腫瘍細胞の直接貪食、炎症性サイトカインの産生⁵⁾

3) リンパ球と異型リンパ球（反応性リンパ球）の鑑別

リンパ球	直径9-16 μm で、細胞質は比較的広いものから狭いものまでである。色調は淡青色から青色を呈する。なお、アズール顆粒を認める場合がある。核は類円形で、核クロマチンは集塊を形成しクロマチン構造が明かでない ⁴⁾ 。	 B細胞は抗体産生・抗原記憶、T細胞は細胞障害・他のリンパ球やマクロファージの調整、NK細胞は腫瘍、ウイルス感染細胞の排除⁵⁾
異型リンパ球	直径16 μm （赤血球直径のおおよそ2倍程度）以上で細胞質は比較的広い。色調はリンパ球に比較し好塩基性（青色）が強い。なお、アズール顆粒、空胞を認める場合がある。核は類円形、時に変形を呈する。核クロマチンは濃縮しているがリンパ球に近いものからパラクロマチンの認められるものまでである。核小体が認められるものもある。判定が困難な場合はリンパ球との相違点を記載する ⁴⁾ 。	 種々なウイルス感染で反応性に末梢血中出现⁵⁾

5. まとめ

白血球形態の観察では、各細胞の分布状態とともに大きさや形と核、細胞質、顆粒などの性状をよく観察し、特に好中球の形態では核異常・顆粒異常・封入体・空胞などの異形成所見、リンパ球の形態では異型リンパ球の存在などに注意します。幼若細胞の出現もあるので、成熟段階を理解しておくことが肝心です。幼若細胞の検出は造血器腫瘍や骨髄破壊性病変の可能性があります。白血球増加がある場合は、反応性の増加か、腫瘍性疾患かを鑑別することが重要です³⁾。

参考文献

- 1) 柴田 昭：近代血液学の建設者.
シスメックス株式会社 学術部, 2001.
- 2) 日本検査血液学会編 スタンダード検査血液学（第2版）.
医師薬出版, 2008.
- 3) 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編 臨床検査の
ガイドラインJSLM2012 検査値アプローチ／症候／疾患.
宇宙堂八木書店, 2012.
- 4) 日本検査血液学会標準化委員会 血液形態標準化小委員会
(HP<http://www.jslh-sc.com/>).
(HP<http://www.jslh-sc.com/>).
- 5) 医療情報科学研究所編 病気がみえるvol.5血液（第1版）.
メディックメディア, 2008.

末梢血液像の標準的観察法2. 白血球形態Ⅱ

国立がん研究センター 中央病院
臨床検査部 熊沢 寛子

1. はじめに

前回は末梢血液像の基本的観察法と通常観察される細胞について紹介しました。今回は末梢血液像に出現する幼若細胞と白血球形態異常について述べます。

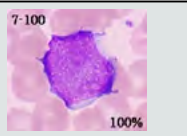
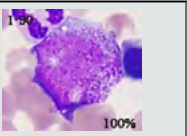
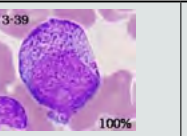
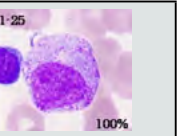
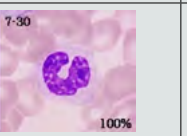
正常状態で末梢血に芽球が出現することはありません。骨髓球や後骨髓球は感染症での好中球の急増期や汎血球減少症からの回復期に一過性に認められます。白血球形態異常とは、正常の形態像から逸脱した形態の総称で、細胞質の異常と核の異常からなり、先天性と後天性形態異常に分類されます。後天性形態異常は、腫瘍性の形態異常と感染症などによる反応性の形態異常に分類されます。

2. 幼若細胞の分類

1) 顆粒球系の分化

顆粒球は造血幹細胞から骨髓芽球→前骨髓球→骨髓球→後骨髓球→桿状核球→分葉核球の順に分化します。分化の早い段階で好中球系、好酸球系、好塩基球系それぞれの分化経路は分かれますが、光学顕微鏡で区別できるのは特殊顆粒が産生される骨髓球以降です。普通染色では骨髓芽球以降の細胞の同定が可能になり、細胞分裂・増殖能をもつのは骨髓球までです。顆粒球系幼若細胞の分類基準を表1に、顆粒球系細胞の分化・成熟過程の代表的形態を図1に示しました。好酸球は分類が必要なときは好中球の核の形態変化に準じ、好酸性骨髓球、好酸性後骨髓球に分類します。好塩基球は好塩基性特殊顆粒を有する細胞を分類するのは難しく、好塩基球として一括します。病的な場合は「幼若好塩基球」などと分類します。

図1. 顆粒球系細胞の分化・成熟過程 日本検査血液学会HPを一部改

			
骨髓芽球	前骨髓芽球	前骨髓芽球	骨髓芽球
			
後骨髓芽球	後骨髓芽球	桿状核球	分葉核球

2) 単球系の分化

単球は造血幹細胞から単芽球→前単球→単球の順に成熟し、単球が血管から組織中に移行すると、より成熟したマクロファージに分化します。

3) リンパ球系の分化

リンパ球は造血幹細胞→リンパ芽球→前リンパ球→リンパ球の順に成熟します。機能や

細胞表面マーカーによってB細胞・T細胞・NK細胞に分けられますが、普通染色での判別は形態学的に特徴のある例えばATL細胞などの腫瘍細胞以外は困難です。

3. 形態異常所見の観察

血液細胞は、細胞の直径、N/C比、核の位置と形態、核クロマチン構造、核小体の有無、細胞質の色調や顆粒の有無などにより分類します。形態異常の判別は細胞の大きさや形と染色性の観察から始めます。核は偏在性などの位置の異常、形の変化、核クロマチン構造、核膜の厚さや明瞭性、核小体の有無（数、大きさ、形など）、核内封入体の有無などを観察します。細胞質はN/C比、細胞膜の整・不整、色調、核周明庭の有無、顆粒の有無（数、大きさ、色調の異常など）、封入体の有無（アUEL小体、デーレ小体など）、空胞の有無などを観察します。

表1. 顆粒球系幼若細胞の分類基準

細胞名	直径 (μm)	N/C比	核の位置 核の形態	核クロマチン構造	核小体	細胞質
骨髓芽球 myeloblast	10-15	60-80% 程度	やや中央に 位置する	網状繊細	あり、やや 白みがある	青色、顆粒は 認めない
前骨髓球 promyelocyte	15-20	50-70% 程度	偏在する	繊細、骨髓 芽球に比較 しやや粗造	認めるこ とが多い	青色、 アズール顆粒 (一次顆粒)を 認める
骨髓球 myelocyte	12-20	30-50% 程度	類円形	粗造	なし	特殊顆粒 (二次顆粒)を 認める、青色 が薄れアズール 顆粒は残存し ても良い
後骨髓球 metamyelocyte	12-18	20-40% 程度	陥凹を認める (ただし長径と短 径比は3:1未満)	粗造 一部塊状	なし	ほとんどが特 殊顆粒で占め られる

日本検査血液学会HPを表に改変

4. 代表的な形態異常

1) 中毒性顆粒

普通染色で好中球の細胞質に青紫色に染まるやや大型の顆粒で、好中球のアズール顆粒の発育過程に異常が生じ、アズール顆粒が残存したものと考えられています。重症感染症、妊娠中毒症、X線照射、G-CSF使用などによる顆粒形成期の障害で生じ、顆粒の未熟性や発育遅延を示します。重症の細菌性感染症などでデーレ小体とともに観察されます。

2) 無（脱）顆粒性好中球

普通染色で好中球の顆粒がほとんど染まらないか、または染まらないもので、急性骨髓性白血病や骨髓異形成症候群の好中球にみられることがあります。

3) デーレ小体

普通染色で好中球の細胞質にみられる好塩基性の青染する斑点で、粗面小胞体の塊といわれ、細胞質の部分的成熟障害を示します。重症感染症、火傷、化学療法後などにみられます。先天性にみられるものとしてMay-Hegglin異常症があります。May-Hegglin異常症では、巨大血小板の出現と血小板減少の所見もみられます。

4) アウエル (Auer) 小体

FAB分類M0とM7を除く急性骨髄性白血病の骨髄芽球、単芽球の細胞質中にみられることがある紫赤色の針状構造物です。アウエル小体が細胞質に多数を占める細胞をfaggot cellと呼びFAB分類M3に特徴的な所見です。

5) 過分葉

5分葉以上を過分葉と呼びます。巨赤芽球性貧血、尿毒症、骨髄異形成症候群で観察され、特に巨赤芽球性貧血では早期発見に有用な検査所見です。先天的な過分葉はUndritz異常やDavidson異常がありますが、非常に稀な疾患です。

6) 低分葉 (Pelger-Huet核異常)

ペルゲル核異常とは正常の核分葉が進まず、成熟顆粒球が桿状から2分葉の状態にある先天性異常です。好中球は棍棒様、眼鏡様、ダンベル様などと形容されます。後天性のものを偽性ペルゲル異常 (pseudo-Pelger-Huet) と呼び、急性白血病、骨髄異形成症候群などで見られます。

7) 空胞形成

単球と形質細胞の細胞質には正常細胞でも空胞をもつものがありますが、その他の細胞における空胞形成は細胞の退行変性で生ずると考えられています。空胞形成は敗血症で最もよくみられるため、細菌感染症の診断に有用です。

8) 輪状核球

好中球の核がドーナツのように輪の形をしたもので、骨髄異形成症候群や急性白血病などの血液腫瘍疾患で見られます。

9) 巨大好中球

巨大好中球は正常好中球の約2倍の大きさがあります。白血球増加症や巨赤芽球性貧血などで末梢血中に増加します。

10) Jordan異常

先天性異常であり普通染色で顆粒球の細胞質に空胞を認め、空胞は脂肪染色で陽性を示します。顆粒球の細胞質内に脂肪が蓄積したもので、脂肪はトリグリセライドと考えられています。

11) Alder-Reilly顆粒異常

先天性異常であり普通染色で好中球の細胞質に灰黒色、濃紫褐色、暗赤色にみえる比較的粗大な顆粒が密に分布しており、好酸球の顆粒も好塩基性に染色されます。単球とリンパ球のアズール顆粒も正常のアズール顆粒より大きいといわれています。アルダー顆粒異常はムコ多糖類の過剰蓄積によるものと考えられています。

12) Chediak-Higashi症候群

普通染色ではほぼすべての好中球の細胞質に淡青色または淡紫赤色にみえる巨大(0.5～2.5 μ m)顆粒が数個みられます。Chediak-Higashi症候群の好中球系幼若細胞のアズール顆粒の形態は正常ですが、成熟していくことによりアズール顆粒は融合して巨大顆粒を形成します。

13) ゲンプレヒトの核影

正常塗抹標本でも少数認められ、塗抹時に細胞が壊れ、核も壊れて丸く広がった人工的産物です。しかし、多数見られる場合は、壊れやすい細胞が多いことを示しており、慢性リンパ性白血病や急性白血病症例の標本に出現しやすいといわれています

14) ドラムスティック

正常女性の好中球の約1～3%にみられる盲腸様の核突起物です。

15) 異型（反応性）リンパ球

リンパ球の非腫瘍性変化を異型（反応性）リンパ球として捉えます。正常塗抹標本でも少数認められることがあります。異型（反応性）リンパ球は抗原に反応してDNA合成が盛んな細胞が多く、形態的には正常リンパ球より大きく、細胞質は青みが強く、核クロマチンが繊細で核小体を有します。EBV感染症（伝染性単核症）などのウイルス性疾患で出現します

白血球形態異常の判定基準案を表2、顆粒球の代表的な形態異常の種類と疾患を表3、代表的な形態異常を図2に示します。

表2. 白血球形態異常の判定基準案

血球細胞	形態異常	表現方法	記載
白血球	核の形態異常	0.5%以上	(+)
〃	顆粒の減少、消失、分布異常	認めれば	(+)
〃	中毒性顆粒	紫褐色の粗大顆粒	(+)
〃	空胞変性	0.5%以上	(+)
〃	封入体、貪食	認めれば	(+)
〃	左方移動	桿状核球の優位、幼若顆粒球の出現	(+)
〃	右方移動	過分葉(5～6分葉以上)を認めれば	(+)
〃	過分葉	好中球やそれ以外の細胞に認めれば	(+)
〃	顆粒リンパ球	原則として3個以上の顆粒を有するリンパ球(2,000/ μ L以上)	(+)

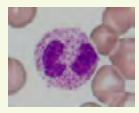
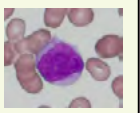
日臨技：血液形態検査に関する勧告法. 1996を一部改変

表3. 顆粒球の代表的な形態異常の種類と疾患

	形態の特徴	先天性疾患	後天性疾患(病態)
細胞質の異常	顆粒の増加	Alder-Reilly異常	中毒性顆粒(重症感染症) G-CSFの使用
〃	無(脱)顆粒		骨髓異形成症候群、急性 骨髓性白血病
〃	アウエル小体		急性骨髓性白血病
〃	巨大顆粒	Chediak-Higashi 症候群(CHS)	Pseudo-CHS(急性白血病、 骨髓異形成症候群)
〃	RNA封入(デーレ小体)	May-Hegglin異常	中毒性封入体(重症感染 症、デーレ小体)
〃	空胞	Jordan異常	中毒性ないし変性産物(重 症感染症など)
核の異常	過分葉	Undritz異常	巨赤芽球性貧血、尿毒症、 骨髓異形成症候群
〃	低分葉	Pelger-Huet異常	骨髓異形成症候群、 Pseudo-Pelger-Huet異常 (急性白血病、骨髓異形成 症候群)
〃	ドラムスティック	Turner症候群 Klinefelter症候群 XXX Female	

スタンダード検査血液学(第2版)一部改変

図2. 代表的な形態異常細胞質の異常

細胞質の異常				核の異常	
中毒性顆粒	無(脱)顆粒性 好中球	デーレ小体	Auer小体	過分葉	低分葉 (Pelger核異常)
					
好中球の細胞質に青紫色に染まるや大型の顆粒。重症感染症、妊娠中毒症G-CSF使用、X線照射、Alder-Reilly異常	好中球の細胞質の顆粒がほとんど染まらない、または急性白血病、骨髄異形成症候群	好中球の細胞質に見られる好塩基性の青染する斑点。重症感染症、火傷、化学療法後、May-Hegglin異常症	骨髄芽球、単芽球の細胞質中にみられる赤紫色の針状構造物。急性骨髄性白血病	多分葉化した細胞核で、5分葉異常。巨赤芽球性貧血、遺伝性核過分葉症	桿状から2核葉までの好中球が円形、ダンベル様、眼鏡様、棍棒様Pelger-Huet異常、偽Pelger異常(MDS、白血病、抗癌剤投与)

平成22年9月15日発行 広島市医師会だより (第533号付録)

5. まとめ

末梢血へ芽球が出現すると腫瘍性疾患を疑いますが、近年はG-CSF投与などによる芽球の出現があり臨床所見の検討も重要です。また正常芽球に比べ腫瘍性の芽球には形態異常があります。今回は主に顆粒球系細胞の形態異常について述べましたが、末梢血には腫瘍性リンパ球の出現もあり、各種のリンパ腫のごとの形態学的特徴についての勉強も肝心です。標本上に同一形態像が観察される場合は、腫瘍性疾患を疑って観察します。細胞の観察は普通染色だけでは同定できないことが多々あります。ペルオキシダーゼ染色、エステラーゼ染色、PAS染色などの特殊染色から形態異常を質的に同定することも重要です。

形態異常は一部の先天性疾患や白血病を除けば直ちに疾患の診断には直結しませんが、疾患のスクリーニングとして重要な検査所見です。臨床的に重要な形態異常の所見は、報告書に記載することを推奨します。

参考文献

- 1) ビジュアル臨床血液形態学. 江南堂, 1999
- 2) 白血球/「好中球」「好酸球」「好塩基球」「単球」「リンパ球」WBC
(<http://www.naoru.com/hakkekkyuu.htm>)
- 3) 日本検査血液学会編 スタンダード検査血液学 (第2版).
医師薬出版, 2008.
- 4) 日本臨床衛生検査技師会形態検査標準化ワーキンググループ: 血液形態検査に関する勧告法
- 5) 日本検査血液学会標準化委員会 血液形態標準化小委員会 (<http://www.jslh-sc.com/>).
- 6) 医療情報科学研究所編 病気がみえるvol.5血液 (第1版).
メディックメディア, 2008.
- 7) 第20回博多シンポジウム「よめる技師のスキルアップ」, 2001.
- 8) 平成22年9月15日発行 広島市医師会だより (第533号付録)

末梢血液像の標準的観察法3.

赤血球形態・血小板形態

国立がん研究センター 中央病院
臨床検査部 熊沢 寛子

1. はじめに

赤血球形態は貧血の重要な手がかりとなり、その情報を臨床に提供することにより、貧血をはじめ血液疾患の診断やその後の治療効果に貢献できます。さらに肝疾患・腎疾患・脂質代謝異常・DIC等の病態においても赤血球形態に特徴的な異常がおこり、臨床的意義が高い情報源となります。血小板の主な機能は一次止血（粘着・放出・凝集）です。血小板形態では大きさが重要であり、特発性血小板減少性紫斑病、慢性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などの骨髄増殖性疾患、血小板産生低下からの骨髄機能の回復時、先天性血小板異常症等に重要な所見です。

2. 赤血球形態

赤血球の成熟過程は幹細胞→前赤芽球→塩基好性赤芽球→多染性赤芽球→正染性赤芽球→網赤血球→赤血球の順です。赤血球が赤く見えるのは、細胞質内にヘモグロビンを含んでいるためです。成熟赤血球の形態は、中央の両面が凹んだ無核の細胞で直径7～8μmです。凹んだ場所をcentral pallorと呼び、正常では赤血球直径の1/3を超えることはありません。赤血球形態異常を奇形赤血球、大小不同、赤血球の集合、赤血球内構造異常の順に述べます。（表1、表2、表3、表4、図1を参照）

1) 奇形赤血球

- (1) 破碎赤血球 (schizocyte)：細血管に血栓が発生すると赤血球の流れが悪くなり血流によって赤血球の耐え得る限界以上の外力が加わり、赤血球膜は進展せずに引き裂かれます、形態は引き裂かれた部分が鋭角や突起状となります。血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP)、播腫性血管内凝固症候群 (DIC)、骨髄移植血栓性微小血管障害 (BMT-TAM)、溶血性尿毒症症候群 (HUS) などの重篤な病態で見られるために臨床的意義が高く重要な奇形赤血球です。心臓・大血管障害でも出現します。
- (2) 涙滴赤血球 (dacryocyte)：赤血球の一部がのびて涙の滴のように見えます。髄外造血の際に脱核が円滑に進まず有核赤血球が末梢血に出現し、核は変形能が悪いため脾臓通過時に静脈洞内皮間隙に引っかかり脱核の際に変形すると考えられています。原発性骨髄線維症、癌の骨髄転移などで出現します。
- (3) 球状赤血球 (spherocyte)：central pallorを欠き厚みが増し直径が減少した赤血球で、小円形状で全体がヘモグロビンの色調に濃染します。球状赤血球は変形能が悪く、浸透圧抵抗も低下して溶血しやすくなります。遺伝性球状赤血球症、自己免疫性溶血性貧血、赤血球寿命が近づくことなどで出現します。
- (4) 楕円赤血球 (elliptocyte)：長円形の赤血球で遺伝性楕円赤血球症等で出現します。

- (5) 有棘赤血球 (acanthocyte) : 細胞周囲に突起があり、突起の分布・大きさ・長さが不規則で先端が丸く非対称です。血漿の脂質異常、アルコール性肝硬変、脾摘後、遺伝性の神経・筋肉疾患等でも出現します。
- (6) ウニ状赤血球 (echinocyte) : 細胞周囲に突起があり、ウニのような短い棘状突起が均等に多数見られます。血球内のATPが減少しCaの増加、Kの減少が生じて脱水状態となりウニ状に変形します。
- (7) 口唇状赤血球 (stomatocyte) : 赤血球の淡染部が円形でなく唇をわずかに開いた口のように見え、遺伝性口唇赤血球症、Rh null syndrome、アルコール性肝障害等で出現します。
- (8) 標的赤血球 (codocyte) : 容積に比べ表面積が大きく、細胞の中心にヘモグロビンが凝縮し、赤血球の中央に隆起が生じて標的状に見えます。小型標的赤血球はサラセミア、鉄欠乏性貧血等で認められ、大型標的赤血球は胆道閉塞性肝疾患で出現します。
- (9) 鎌状赤血球 (drepanocyte) : 異常ヘモグロビン症 (HbS) でアフリカ系黒人に多く常染色体劣性遺伝疾患です。低酸素状態で細長い杆状の重合体として検出されます。
- (10) 非薄赤血球 (leptocyte) : 厚みが薄くヘモグロビンの含有量が少ない赤血球です。

2) 大小不同

- (1) 大小不同症 (anisocytosis) : 正常赤血球の直径は7 ~ 8 μ mですが、それ以上の変動の著しいものを大小不同症といいます。その中には小型赤血球が目立つmicrocytosisと大型赤血球が目立つmacrocytosisがあります。microcytosisには赤芽球の段階で小さくなるものには、ヘモグロビン合成障害による鉄欠乏性貧血・鉄芽球性貧血・サラセミア等があります。骨髓から放出された後に小さくなるものには、物理的作用による赤血球の断裂により起こり、微小血管障害性溶血性貧血・心弁膜置換後・重度の火傷等があります。Macrocytosisは巨赤芽球性貧血、溶血性貧血や急性出血時の網赤血球増加等で出現します。

3) 赤血球の集合

- (1) 連銭形成 (rouleaux formation) : 赤血球がお互い広い面で数珠つなぎになる現象です。赤血球の表面は陰性に荷電し互いに反発しあって接近することはありません。しかし、中性荷電した軸比の大きい物質が赤血球表面に結合すると、この分子の両端が赤血球に架橋して赤血球は等間隔で配列します。M蛋白血症を呈する多発性骨髄腫やマクログロブリン血症、高フィブリノーゲン血症などで見られます。
- (2) 赤血球凝集 (red cell agglutination) : リンパ系腫瘍、ウイルス感染症、亜急性心内膜炎等で二次的に産生される寒冷凝集素により赤血球凝集が起こります。

4) 赤血球内構造異常

- (1) 塩基性斑点 (basophilic stippling) : リボゾームが集合したものが赤血球内に青く濃染した散在点状斑点として染まります。鉛やベンゼン中毒によるヘム合成の抑制で出現します。

- (2) ジョリー小体 (Howell-Jolly body)：赤血球内に正染色赤芽球の核と同じ赤紫色に染まる濃縮した小体で、核質の遺残物です。
- (3) パッペンハイマー小体 (Pappenheimer body)：紫青色に染まり赤血球内に1～2個見られます。含鉄赤血球の可染鉄部が染まったものです。
- (4) ガボット環 (Cabot's ring)：赤血球や赤芽球に丸い輪または8の字形に紫赤色または白く抜けたもので、赤芽球の遺残物と考えられています。
- (5) 有核赤血球 (nucleated red cell)：出生直後は末梢血に有核赤血球が見られますが、成人健常者では認めません。腫瘍の骨髄転移、溶血が強く骨髄での十分な補充が成されないための髄外造血などで出現します。
- (6) マラリア原虫 (Plasmodium)：マラリア原虫は血液および組織寄生の病原体です。三日熱、四日熱、熱帯熱、卵形マラリアの4種類があります。

表1. 赤血球形態分類基準

赤血球形態の観察に際しては弱拡大、または中拡大で標本全体を観察し、全体の赤血球形態の変化を理解したうえで強拡大（1000倍）観察し、本ホームページに掲載されている画像（以下HP画像）に示した典型的な形態変化を記載する。典型的でない赤血球形態変化を示すものは他の奇形赤血球（other poikilocyte）として一括記載する。
大小不同（anisocytosis） 正常赤血球直径の変動幅（ $8 \pm 1 \mu\text{m}$ ）を越えた赤血球が一視野中30%以上とする。 赤血球の直径をマイクロメーターで一度は確認することが望ましい。
多染性（polychromasia） 「青みがかった赤血球」とし、その判定境界はHP画像（70%以上）に従う。
奇形赤血球（poikilocyte） 「種々の不整形を示す赤血球の総称」とし、表現方法は以下の通りとする。 その判定境界はHP画像（70%以上）に従う。

日本検査血液学会HP

表2. 赤血球形態表現方法

正常赤血球 discocyte	多染性赤血 polychromasia	球状赤血球 spherocyte	楕円赤血球 elliptocyte
口唇状赤血球 stomatocyte	標的赤血球 codocyte	非薄赤血球 leptocyte	ウニ状赤血球 echinocyte
有棘赤血球 acanthocyte	涙滴赤血球 dacryocyte	鎌状赤血球 drepanocyte	破碎赤血球 schizocyte

* 赤字は臨床的有用性の高い奇形赤血球

日本検査血液学会HP

表3. 赤血球形態表現方法 - 奇形赤血球について -

異常を示す赤血球形態の全視野に占める割合と表現方		球状:spherocyte、破碎:schizocyte、涙滴:dacryocyteは出現比率が低くても臨床的重要性は高いので以下の基準とする	
異常を示す赤血球の比率	表現方法	異常を示す赤血球の比率	表現方法
0～3%未満	—	0～1%未満	—
3%以上～10%未満	1+	1%以上～3%未満	1+
10%以上～20%未満	2+	3%以上～10%未満	2+
20%以上	3+	10%以上	3+
必要によっては赤血球に対するpoikilocyteの比率を算定、（赤血球中のpoikilocyteとして%で求める）			

日本検査血液学会HP

表4. 赤血球・血小板形態異常の判定基準案

血球細胞	形態異常	表現方法	記載
赤血球	連鎖形成	認めれば	(+)
〃	赤血球凝集	認めれば	(+)
〃	大小不同	大赤血球または小赤血球の混在率が30%以上	(+)
〃	不同色素性	低色素性赤血球の混在率が30%以上	(+)
〃	多染性	2%以上認めれば	(+)
〃	奇形	3%以上認めれば(球状、破碎、涙滴は1%) 認めれば	(+)
〃	封入体	白血球分類実施中1個でも認めれば	(+)
血小板	大型血小板	赤血球と同大(4~8 μ m):5%以上	(+)
〃	巨大血小板	赤血球より大(8 μ m以上):5%以上 or1/100WBC	(+)
〃	顆粒異常	消失、色調の変化、分布異常:5%以上	(+)
〃	形態異常	種々の形態異常:5%以上	(+)
〃	凝集	5個以上の血小板同士が凝集している場合	(+)
骨髓巨核球	小型の骨髓巨核球	前骨髓球の大きさまで2個以上認めれば	(+)
〃	円形核の骨髓巨核球	単核で円形核の巨核球で2個以上認めれば	(+)

日臨技：血液形態検査に関する勧告法、1996を一部改変

図1. 臨床的有用性の高い奇形赤血球

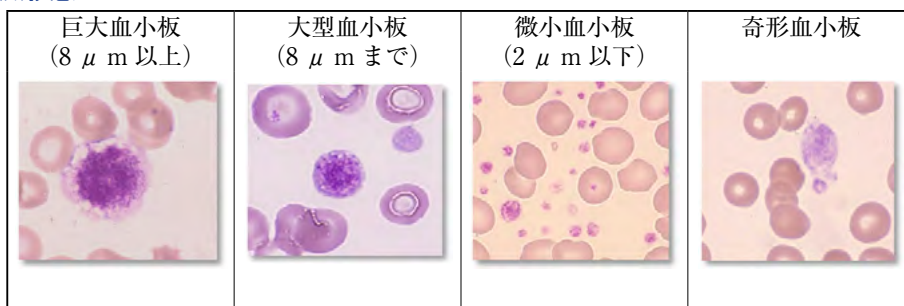


日本検査血液学会HP一部改

3. 血小板形態

血小板の成熟過程は巨核芽球→前巨核球→血小板非産生巨核球→血小板産生巨核球→裸核(ロールの分類)です。血小板系細胞は、核分裂は起きますが細胞質の分裂を伴わない内分裂の形式で2N、4N、8Nと倍増して成熟します。正常では16Nの巨核球の頻度が最も多く。成熟と共に胞体内にアズール顆粒が出現、その後分離膜が形成され細胞質がちぎれるようにして末梢血に血小板が放出されます。血小板は直径2~4 μ m、円系または楕円形で核を持たず、 α 顆粒と濃染顆粒という細胞内顆粒を有しています。赤血球大(8 μ m)までを大型血小板、8 μ m以上のものを巨大血小板、2 μ 以下は微小血小板と呼ばれています。(表4、図2参照)

図2. 血小板形態



KYUSHU UNIVERSITY HP

1) 巨大血小板 (giant platelet): 先天性ではベロナール・スーリエ症候群、メイ・ヘグリン異常、フェチュナー症候群等があり、後天性では慢性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群等の骨髄増殖性疾患で出現します。

2) 大型血小板 (large platelet): 特発性血小板減少性紫斑病、骨髄の血小板産生低下時から骨髄機能の回復期に血小板数の増加に先立ち出現します。

3) 微小血小板 (microthrombocyte): 本態性血小板血症、ウイスコット・アルドリック症候群で観察されます

4) gray platelet: 血小板の α 顆粒を欠損しているため、普通染色では淡灰色に染まります

5) 小型の骨髄巨核球、円形核の骨髄巨核球: 骨髄異形成症候群等で出現することがあります

4. まとめ

末梢血で観察される赤血球と血小板の形態について記載しました。赤血球と血小板の観察時には、自動血球分析装置で測定される赤血球指数、網赤血球数、MPV、若幼血小板 (IPF) などを参照することも肝心です。

末梢血液像観察に際しては、血液関連学会から発信される標準的観察法の進捗状況を確認しながら個人差、施設間差がない観察と表記をすることを推奨します。

参考文献

- 1) ビジュアル臨床血液形態学. 江南堂, 1999
- 2) 日本検査血液学会編 スタンダード検査血液学 (第2版). 医師薬出版, 2008.
- 3) 日本臨床検査技師会形態検査標準化ワーキンググループ: 血液形態検査に関する勧告法
- 4) 日本検査血液学会標準化委員会 血液形態標準化小委員会 (HP<http://www.jslh-sc.com/>).
- 5) 医療情報科学研究所編 病気がみえるvol.5血液 (第1版). メディックメディア, 2008.
- 6) 第20回博多シンポジウム「よめる技師のスキルアップ」, 2001
- 7) KYUSHU UNIVERSITY HP

血液培養検査

国立がん研究センター 中央病院

病理・臨床検査科 荘司 路

血液培養検査は、血流感染の起因菌を検出するうえで最も重要な検査として位置づけられており、細菌が検出された場合その臨床的意義は大きく、検査室からの血液培養陽性報告は、患者の治療方針に直接影響を及ぼす可能性がある。今回、微生物を担当する技師として「血液培養検査」について再度確認してみよう。

1. 血液培養検査の実施

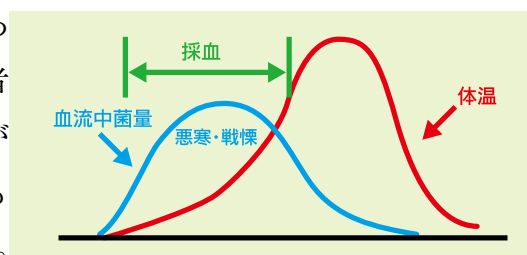
血液培養検査は、敗血症や菌血症、感染性心内膜炎が疑われる場合や不明熱の場合に実施される。原則として全身性炎症反応症候群（SIRS）診断基準に準ずる。

（主な臨床症状）

- ・ 38℃以上の発熱、または36℃以下の低体温
- ・ 白血球増加、特に未熟なまたは桿状核球への左方移動を伴う場合（10,000/ μ L以上の白血球の総末梢白血球数）
- ・ 顆粒球減少（1,000/ μ L未満の成熟した多核白血球）
- ・ 心拍数が90/分以上
- ・ 呼吸数20/分以上またはPaCO₂が32mmHg以下
- ・ ショック、悪寒、硬直
- ・ 重症局所感染（髄膜炎、心内膜炎、肺炎、腎盂腎炎、腹腔内膿瘍等）

2. 採血のタイミング

採血は、抗菌薬投与前に実施するのが原則であるが、やむなく抗菌薬投与が開始されている患者では、1～3日中止後に実施する。抗菌薬投与が中止できない場合は、血液中の抗菌薬濃度が最も低い時期（次回、抗菌薬投与前）に採血を実施する。



採血のタイミングは、血流中の細菌量が最も多いとされる、悪寒戦慄が出現時や発熱の初期が最適である。

3. 採取ボトルのセット数

血液培養検査のための採血は、1セット採取ごとに20mL（好気ボトルに10mL、嫌気ボトルに10mL）採取部位を変えて2セット以上採取することが推奨されている。血液培養の複数セット採取は、重篤な感染症の起因菌検出の感度をあげる。また培養陽性時の皮膚常在菌などのコンタミネーションが考えられる菌種が分離された場合の解釈にも必須である。微生物を担当する技師は、自施設の複数セット採取状況を把握し、複数セット採取が実施されていない診療科には、複数セット採取を働き掛けることが必要である。

真の感染症では、別々の部位から採取した複数の血液培養セットが陽性となる。一

方、1セットまたは2本のうち1本のみから皮膚常在菌や環境由来菌が検出された場合、コンタミネーションと判断されることが多い。しかし、Candida spp.、S. aureus、S. pneumoniae、P.aeruginosaなどは、1セットのみの陽性であっても血流感染の真の起因菌として早急な治療開始が必要である。

4. 陽性時の対応

血液培養陽性の結果は、患者の治療方針の決定にすぐに影響を及ぼす可能性があるため、迅速な対応を必要とする。陽性時のグラム染色結果の形態から推測される菌種、陽性ボトルの本数などの確かな情報を担当医師へ報告する。また、血液培養と同時期に培養検査を実施している他の検体（カテーテル、随時尿、膿瘍等）からの検出菌についても報告するとよい。

（血液培養ボトル陽性時の肉眼的所見と推定される菌）

肉眼的所見	推定菌
溶血	Streptococcus属 Staphylococcus属 Listeria属 Clostridium 属 Bacillus属
混濁	グラム陰性桿菌 Staphylococcus属 Bacteroides属
ガス産生	グラム陰性桿菌 嫌気性菌
菌膜形成	Pseudomonas属 Bacillus属 酵母様真菌
凝固	Staphylococcus aureus
菌塊	Streptococcus属 Staphylococcus属
絨毛状の浮遊物	糸状菌

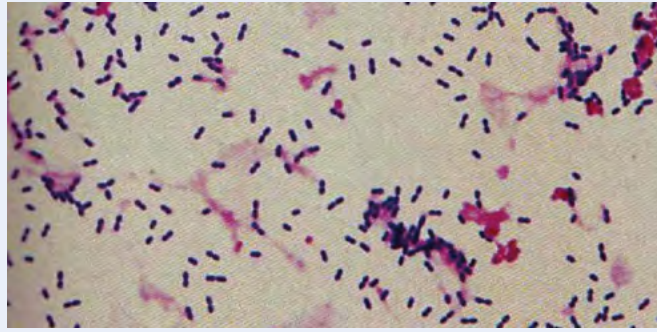
微生物検査ナビより引用



（陽性時の中間報告の一例）

〇〇日採取の血液培養2セットからグラム陽性球菌が、検出されました。

染色形態から Staphylococcus 属が疑われます。 同日に提出されたカテーテル培養からは S. epidermidis が検出されています。



(陽性時の中間報告の一例)

〇〇日採取の血液培養からグラム陽性双球菌が、検出されました。染色形態から肺炎球菌が疑われます。採尿が可能な患者様であれば、『尿中肺炎球菌抗原検査』の実施をお勧めします。

同定・薬剤感受性結果確定後は、担当医や感染症専門医、ICT 等と、患者の状態、使用抗菌薬についてディスカッションすることが、微生物担当技師のスキルアップに繋がると思われる。

参考文献

- 1) 松本哲哉, 満田年宏 訳:CUMITECH 血液培養検査ガイドライン, 医師薬出版, 東京, 2007
- 2) 満田年宏 血液培養 血流感染症診断のための重要な検査 シスメックス・バイオメリュー株式会社
- 3) 堀井俊伸, 大塚和久 微生物検査ナビ 栄研化学株式会社

血液培養陽性時の「起因菌」 「コンタミネーション」の判定について

国立がん研究センター 中央病院
病理・臨床検査科 荘司 路

はじめに

感染症診断において血液培養検査は重要であり、ICTおよび微生物検査室が中心となり血液培養採取の啓発が進められ着実に定着しつつある。その一方で検査室では、血液培養陽性件数も増加し、その分離菌の解釈に迷うケースも日常しばしば経験される。

血液からの検出菌は、原則として『起因菌』と判断される。そのため、培養ボトルに血液を入れるまでの過程で外から菌が混入すると、誤った臨床判断を招き、患者に多大な負担を与えかねない。血液培養陽性時には検査室では、分離菌が真の起因菌かコンタミネーションかを見極める必要がある。以下に血液分離菌におけるコンタミネーションの判断基準について述べる。

1. 分離菌種

一般に、Coagulase-negative Staphylococci (CNS)、Corynebacterium spp.、Propionibacterium spp.、などの皮膚の常在菌やBacillus spp.など環境由来菌は血液培養を汚染させる代表的な菌種である。これらの菌種の中でもCNSは、カテーテル関連血流感染症の代表的な起因菌でもあるが、真の血流感染症を示すのはわずか20%程度である。一方、Escherichia coliなどの腸内細菌科やPseudomonas aeruginosaなどグラム陰性桿菌の多くは血流感染の起因菌として認識されているが、時に採血部位からの汚染菌として検出されることもある。いずれも汚染か否かの判断は、菌種のみで行うことはできない。

2. 採血部位と消毒

血液培養検査において検体採取は、大変重要な工程であり、十分な訓練を受けたスタッフが、厳密な無菌的操作により実施する必要がある。肘の静脈採血が一般的であり、70%イソプロパノールで消毒後に空気乾燥して、次の処理として1～2%ヨード、またはポピドンヨードを用いる方法が推奨されている。これらの消毒薬が最大限に効果を引き出すためには、1.5～2分の時間を要するが、血液培養採取者の多くはしばしば急いでいて、無菌的な状態を得る事無く血液採取をする場合が多い。一方、鼠径部からの採取は、腸球菌や腸内細菌が混入する危険性もあり、培養陽性時の起因菌・コンタミネーションの判断に影響を与える。

また使用する血液培養ボトルについても、刺入部にキャップがしてあっても無菌性を保つためのものでは無いため、使用時にボトルのフリップキャップを外し、ボトルの刺入部分を忘れずにアルコール綿で消毒する必要がある。

3. 採取ボトルのセット数

血液培養の複数セット採取は、重篤な感染症の起因菌検出の感度をあげるだけでなく、培養陽性時に皮膚常在菌などのコンタミネーションが考えられる菌種が分離された場合の

解釈にも必須である。真の感染症では、別々の部位から採取した複数の血液培養セットが陽性となる。一方、1セットまたは2本のうち1本のみから皮膚常在菌や環境由来菌が検出された場合、コンタミネーションと判断されることが多い。

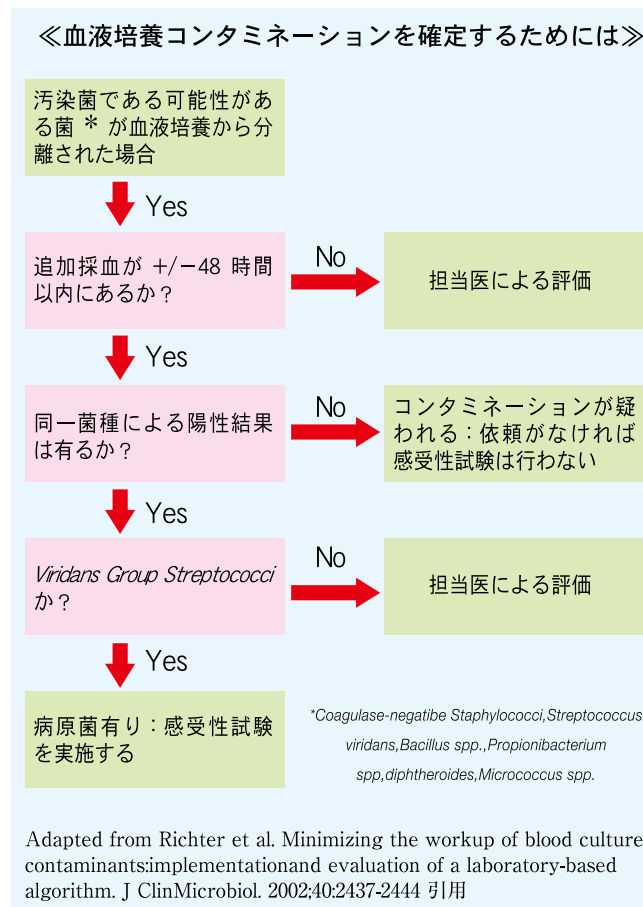
しかし、*Candida* spp.、*S. aureus*、*S. pneumoniae*、*P. aeruginosa*などは、1セットのみの陽性であっても血流感染の真の起因菌として早急な治療開始が必要である。また、カテーテル感染例などでも1セットのみしか血液培養が陽性にならない場合もあるため、真の起因菌かの判断には、カテーテル挿入部の局所所見、発熱などの全身所見、炎症反応も考慮する必要がある。

4. 培養陽性までの所要時間

真の菌血症が疑われる患者の血液中の細菌量は、血液培養採取時に混入する菌量に比べるとはるかに多く存在し、95～97%が培養開始から3日で陽性となることが多い。コンタミネーションか否かを判断するうえで、培養開始から陽性になるまでの時間についても考慮することが重要である。

まとめ

CNS、*Corynebacterium* spp.、*Propionibacterium* spp.、などの皮膚常在菌や*Bacillus* spp. など環境由来菌は、一般的にコンタミネーションと判断されることが多いが、化学療法中の患者や免疫不全の患者においては重篤な感染症を引き起こす起因菌にもなりうる。患者の症状や全身状態、身体所見、治療内容・経過、他部位（カテーテル先端や膿瘍など）培養検査やその他検査結果等も考慮しコンタミネーションか否かを総合的に判断する必要がある。このため血液培養検査結果のみでの判断は危険である。



参考文献

- 1) 松本哲哉, 満田年宏 訳: CUMITECH 血液培養検査ガイドライン、医師薬出版, 東京, 2007
- 2) 満田年宏 血液培養 血流感染症診断のための重要な検査 シスメックス・バイオメリュー株式会社
- 3) Pien BC, Sundaram P, Raoof N, Costa SF, Mirrett S, Woods CW, Reller LB, Weinstein MP. Duke University Medical Center, Durham, NC, USA. The clinical and prognostic importance of positive blood cultures in adults. Am J Med. 2010 Sep;123(9):819-28. doi: 10.1016/j.amjmed.2010.03.021.
- 4) Rahkonen M, Luttinen S, Koskela M, Hautala T. True bacteremias caused by coagulase negative Staphylococcus are difficult to distinguish from blood culture contaminants. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012 Oct;31(10):2639-44

腸内細菌科の同定法・I（総論）

国立精神・神経医療研究センター病院

臨床検査部 望月 規央

はじめに

現在、多くの微生物検査室では、自動測定装置の専用パネルや簡易同定キットを用いて菌の同定が行われている、これらの方法は簡便であるが、一方で高コストかつ検査技師の経験と知識不足を招いている。今回のシリーズでは、腸内細菌科の同定法を初心者に判り易く解説したいと考えている。もう一度「IMViC試験」を思い出しながら、復習してみよう。

1 グラム陰性桿菌の分類

好気培養で発育するグラム陰性桿菌は、腸内細菌科、ビブリオ科、パストツレラ科、ブドウ糖非発酵菌群に大別される（表 I - 1）。腸内細菌科とブドウ糖非発酵菌は原則、血液寒天培地、チョコレート寒天培地、BTB乳糖寒天培地、MacConkey寒天培地すべての培地で発育するが、ビブリオ科、パストツレラ科は菌種によって発育できる培地が異なる。例として耳漏由来臨床分離株の培養結果を示す（図 I - 1）。① *Klebsiella pneumoniae*（腸内細菌科）④ *Pseudomonas aeruginosa*（非発酵菌群）は全ての培地に発育が認められる。② *Vibrio alginolyticus*（ビブリオ科）は食塩要求菌のため、食塩が含まれていないBTB乳糖寒天培地やMacConkey寒天培地には発育できない。③ *Haemophilus influenzae*（パストツレラ科）はXV因子要求菌のため、チョコレート寒天培地にしか発育できない。

2 腸内細菌科の定義

腸内細菌科の定義を示す（表 I - 2）。腸内細菌科は、ほとんどの菌種がオキシダーゼ試験陰性であり（*Plesiomonas shigelloides*のみ陽性）、簡易的な腸内細菌科の鑑別法として有用である。しかしブドウ糖非発酵菌群で、*Acinetobacter*属、*Stenotrophomonas maltophilia*などはオキシダーゼ陰性であり、「オキシダーゼ試験陰性＝腸内細菌科とは限らない事に注意すべきである。培地集落の性状で鑑別出来ない場合、OF培地もしくはTSI培地に接種して、ブドウ糖の分解形式（OF形式）を確認する。

3 腸内細菌科の分類

腸内細菌科は、IPA（TDA）反応、硫化水素（ H_2S ）産生、VP（Voges-Proskauer）反応により、第1～4群に大別される（表 I - 3）。また乳糖分解菌群として*Escherichia*属、*Citrobacter*属、*Klebsiella*属、*Enterobacter*属があげられるが、臨床分離株の中には乳糖非分解株もあり、注意が必要である。

4 腸内細菌科の同定に必要な鑑別培地

腸内細菌科の同定には、様々な反応試験および各種糖分解能の確認が必要である。腸内細菌科の同定に用いられている代表的な確認培地を示す（表 I - 4）。ここに挙げた確認培地で、臨床的に重要な腸内細菌科の大半が同定可能である。しかし*Salmonella*属、*Shigella*属、*Escherichia coli*など、血清型別試験が必要な菌種の同定には注意が必要である。

表 I-1 グラム陰性桿菌の分離培地での発育

分 離 培 地	発 育 (コロニーの形成)			
血液寒天培地	+	+	± ⁵⁾	+
チョコレート寒天培地	+	+	± ⁵⁾	+
BTB 乳糖寒天培地	+	± ⁴⁾	—	+
MacConkey 寒天培地	+	± ⁴⁾	—	±
TCBS寒天培地	—	+	—	—
オキシダーゼ試験	— ³⁾	+	+	± ⁶⁾
運動性	±	+	—	±
菌 種	腸内細菌科	ビブリオ科 ¹⁾	パストツレラ科 ²⁾	非発酵菌群

+: 発育あり, 陽性 —: 発育なし, 陰性

- 1) ビブリオ科: *Vibrio* 属, *Aeromonas* 属
 2) パストツレラ科: *Pasteurella* 属, *Haemophilus* 属, *Actinobacillus* 属
 3) *Plesiomonas shigelloides* (旧ビブリオ科)のみ陽性
 4) *Aeromonas* 属は発育, *Vibrio* 属は菌種毎の食塩要求性によって異なる
 5) 発育因子, または発育に炭酸ガスを必要とする菌種がある
 6) *Acinetobacter* 属, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia mallei* は陰性

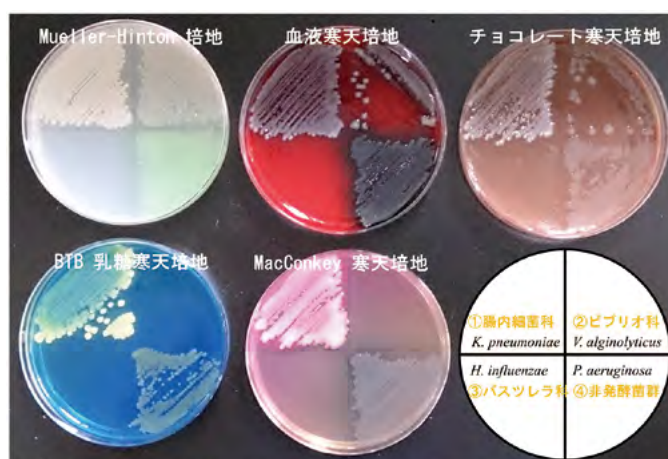


図 I-1 グラム陰性桿菌の各種培地での発育

表 I-2 腸内細菌の定義

・通性嫌気性のグラム陰性桿菌 (無芽胞菌) ・普通寒天培地に発育する ・ブドウ糖を24時間以内に発酵的に分解して酸を産生する (ガスを産生する菌と産生しない菌がある) ・ほとんどの菌種が周毛性鞭毛を有して運動性がある (<i>Klebsiella</i> 属, <i>Shigella</i> 属, <i>Tatumella ptyseos</i>, <i>Yersinia pestis</i> は非運動性) ・硝酸塩を還元して亜硝酸塩にする ・オキシダーゼ試験が陰性である (<i>Plesiomonas shigelloides</i> はオキシダーゼ試験陽性)

表 I-3 腸内細菌の生化学性状による分類

第1群	IPA反応 (+)	<i>Proteus</i> spp.	<i>Providencia</i> spp.
	H ₂ S産生 (-/+)	<i>Morganella morganii</i>	
	VP反応 (-/+)	<i>Rahnella aquatilis</i>	<i>Tatumella ptyseos</i>
第2群	IPA反応 (-)	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.
	H ₂ S産生 (+)	<i>Edwardsiella tarda</i>	
	VP反応 (-)		
第3群	IPA反応 (-)	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Enterobacter</i> spp.
	H ₂ S産生 (-)	<i>Serratia</i> spp.	<i>Hafnia alvei</i>
	VP反応 (+)	<i>Cedecea</i> spp.	<i>Ewingella americana</i>
第4群	IPA反応 (-)	<i>Escherichia</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.
	H ₂ S産生 (-)	<i>Yersinia</i> spp.	(<i>Citrobacter</i> spp.)
	VP反応 (-)	<i>Salmonella</i> Paratyphi A	<i>Kluyvera</i> spp.

赤は臨床材料からの分離頻度が高い菌または临床上重要な菌種

表 I-4 腸内細菌に用いられる確認培地

培地名	斜面	高層	注意点
TSI培地 	①乳糖・白糖分解 ②ブドウ糖分解(発酵) ③ガス発生 ④硫化水素(H ₂ S)産生	乳糖・白糖分解 (赤→黄) ブドウ糖分解 (赤→黄) ガス発生(亀裂) H ₂ S産生(黒色)	斜面が黄変の場合、乳糖か白糖の一方、または両方を分解。
SIM培地 	①IPA反応 ②硫化水素産生 ③インドール産生 ④運動性	IPA反応(表層部褐色) H ₂ S産生(黒色) インドール(Kovac試薬→赤) 運動性(穿刺部周囲混濁)	腸内細菌科のH ₂ S産生はTSI培地で判定。 IPAはKovac試薬滴下前に判定。
LIM培地 	①リジン脱炭酸反応 ②インドール産生 ③運動性	リジン脱炭酸反応 陽性(→黄→紫)、陰性(→黄) インドール反応(赤色) 運動性(穿刺部周囲混濁)	リジン脱炭酸反応陽性では培養中、一度黄変してから紫色に戻る。
VP半流動培地 	①VP反応 (Voges-Proskauer反応)	VP反応 (KOH+αナフトール→桃赤色)	40%KOH試薬とαナフトール試薬を滴下、15分後に判定。
シモンズのクエン酸塩培地 	①クエン酸塩利用	クエン酸塩利用 (緑→青色)	フタをきつくしめてしまうと偽陰性なる(空気に十分触れさせる)
DNA培地 	①DNase 産生	DNase 産生 (青→赤紫色)	斜面部中心に一本線を引く様に菌を接種すると陰陽性の色調が明瞭。

参考文献

- 1) John G. Holt, et al: Bergey's Manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9th ed. Lippincott, Philadelphia, 2000
- 2) Patrick R. Murray, et al: Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY. 9th ed. ASM Press, Washington DC, 2007
- 3) 小栗豊子(編): 臨床微生物検査ハンドブック 第4版. 三輪書店, 東京, 2011
- 4) 日本臨床微生物学会: 腸管感染症検査ガイドライン. 日本臨床微生物学会雑誌 第20巻. 日本臨床微生物学会, 2010
- 5) 山中學, 吉野二男, 清水加代子(編): 新臨床検査技師講座11微生物学 第1版. 医学書院, 東京, 1986
- 6) 栄研化学株式会社: 栄研マニュアル 第10版. 栄研化学株式会社, 東京, 1996

腸内細菌科の同定法・Ⅱ（各論）

国立精神・神経医療研究センター病院

臨床検査部 望月 規央

はじめに

前回は、腸内細菌科の定義や分類、同定に必要な鑑別培地について述べた。今回は、具体的な腸内細菌科の生化学性状などを確認したいと思う。基本的な生化学性状を覚えておけば、日常使用している自動機器のパネル判定における菌種同定の確認に、きっと役立つものと、私は確信している。

1 集落（コロニー）からの菌種推定

分離培地上の集落の特徴から推定可能な腸内細菌を示す（表Ⅱ-1）。注意点は、同一菌種でも菌株毎に個性があり、典型的な性状（集落形態・糖分解など）とは異なる場合がある。しかし典型的な糖利用能や生化学陽性反応が陰性化する事があっても陽転化は起こらない。具体的には、乳糖分解菌種の中に乳糖非分解株は存在するが、乳糖非分解菌種で乳糖分解株は存在しない。

表Ⅱ-1 集落性状から推定可能な腸内細菌

特 徴	推定可能な菌種
乳 糖 分 解	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Citrobacter</i> spp.
黒色集落 (H ₂ S:SS寒天培地)	<i>Salmonella</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Proteus</i> spp.
赤色素産生	<i>Serratia marcescens</i> （数%）
ムコイド型集落	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> （まれ）
SWARMING（遊走）	<i>Proteus</i> spp.（血液・チョコレート寒天培地）
アンモニア臭	<i>Proteus</i> spp., <i>Morganella</i> spp., <i>Providencia</i> spp.

2 腸内細菌科の生化学鑑別性状

第1～4群別に、代表的な腸内細菌科の生化学鑑別性状のフローチャートを示す（図Ⅱ-1）。また、第1～4群の代表的な菌種の確認培地における性状写真を示す。（図Ⅱ-2～5）。



図Ⅱ-1 腸内細菌科の生化学鑑別性状

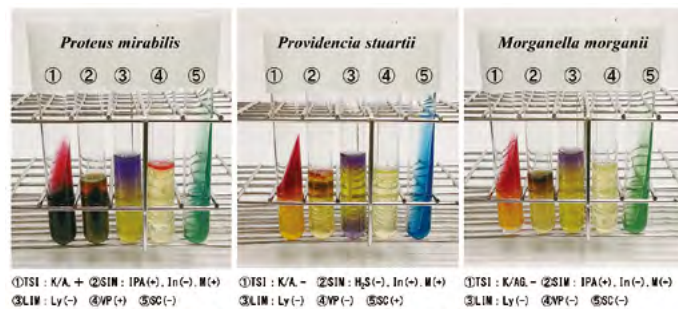


図 II-2 第1群の確認培地における性状

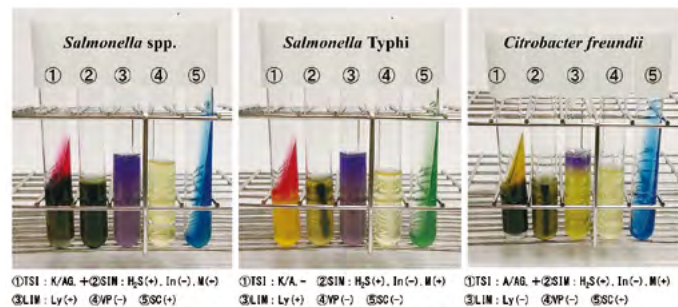


図 II-3 第2群の確認培地における性状

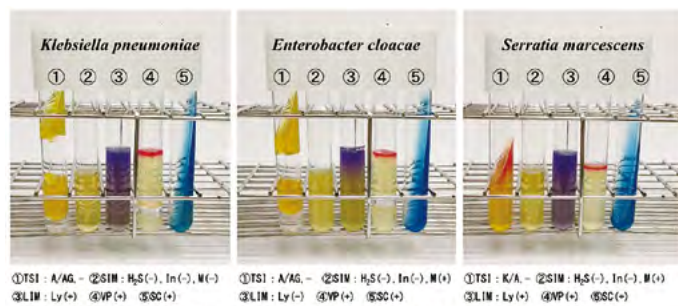


図 II-4 第3群の確認培地における性状

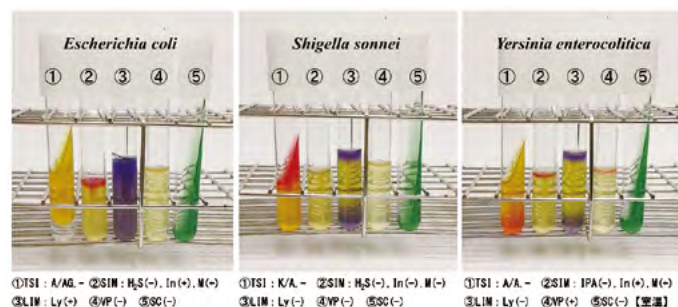


図 II-5 第4群の確認培地における性状

おわりに

腸内細菌科の同定は、それぞれの菌種における基本的なパターンを覚える事が大切である。多くの菌を同定し、集落を睨みながら、経験を重ねる事を望んでやまない。

参考文献

- 1) John G. Holt, et al: Bergey' s Manual of DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. 9th ed. Lippincott, Philadelphia, 2000
- 2) Patrick R. Murray, et al: Manual of CLINICAL MICROBIOLOGY. 9th ed. ASM Press, Washington DC, 2007
- 3) 小栗豊子 (編) : 臨床微生物検査ハンドブック 第4版. 三輪書店, 東京, 2011

- 4) 日本臨床微生物学会：腸管感染症検査ガイドライン．日本臨床微生物学会雑誌 第20巻．日本臨床微生物学会，2010
- 5) 山中學，吉野二男，清水加代子（編）：新臨床検査技師講座11微生物学 第1版．医学書院，東京，1986
- 6) 栄研化学株式会社：栄研マニュアル 第10版．栄研化学株式会社，東京，1996

固定について

国立がん研究センター中央病院 病理・臨床検査科

澁木 康雄

はじめに

固定とは、採取された組織や細胞の自家融解や腐敗を防ぎ、可能な限り生きていたときに近い状態に保つためにおこなう作業であり、診断に適した良質な標本作製の上で欠かすことのできない非常に重要な工程のひとつである。今回は、主に生検検体と細胞診検体について、この固定作業で注意を要する点について概説する。

固定液として、組織においては一般的に10～20%ホルマリンが用いられることが多く、近年では、免疫組織化学的検索における抗原性の保持や遺伝子検査における核酸断片化の進行遅延などの観点から、中性緩衝ホルマリンの使用が推奨されている。細胞診においては、主に95%アルコールが用いられる。

1 検体採取から固定までの時間

組織においては、採取後なるべく早めに固定液に浸透する必要がある。これは、その後のHE染色や特殊染色、免疫組織化学染色に影響するだけでなく、近年、重要性を増してきている遺伝子学的検査にも影響を及ぼすからである。核酸の分解は時間とともに進み、固定まで室温で2時間以上放置された場合には、FISH（fluorescence in situ hybridization）法において、核の解像度の低下やシグナルの低下がみられ、判定に影響を及ぼす恐れがあるとの報告もある¹⁾。

細胞についても同様であり、体腔液や喀痰のように冷蔵保存で、ある程度形態が保持されるものもあるが、生理食塩水で洗浄された検体などは、冷蔵保存をしても細胞の変性は避けられず、胆汁や腠液なども細胞変性を来しやすいので、採取後は速やかに処理を要する^{2,3)}。また、処理の際は、スライド塗抹後は直ちに固定液に浸透することが大事であり、これを怠ると細胞が乾燥し観察困難な標本となってしまう（図1）。

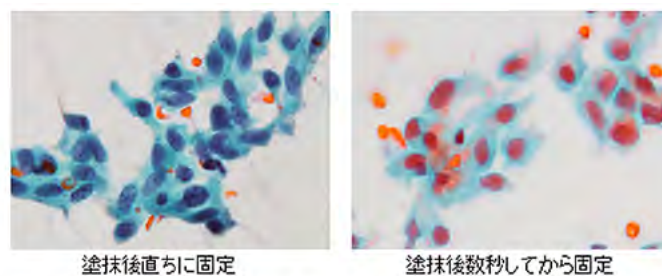


図1 同一症例のパパニコウ染色標本:塗抹後直ちに固定したものは良好な染色性を示すが、塗抹後数秒してから固定したものでは、乾燥による膨化変性が著しく、核のクロマチンパターンなど詳細な所見がとれない。

2 固定温度

通常は室温でおこなわれるが、組織材料において、至急処理したい場合などに固定液を温めて使用することがある。ただし、この場合、加熱し過ぎや長時間固定してしまうと免疫組織化学染色において染色強度の低下や陰性化を起こす恐れがある。また、核酸においても断片化を起こしやすくなる。どうしても至急で処理したい場合には、これらの影響があること

を考慮しておく必要がある。同様に、室温でおこなっているつもりでも、あまりにも日当たりのよい場所等で固定をおこなっているとこのような影響を受けている可能性もあるので注意が必要である。

3 固定時間

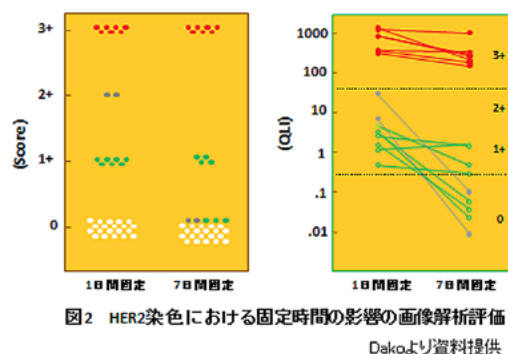
近年の分子標的治療薬を中心とした個別化治療において、体外診断薬の承認を得た検査試薬を用いた免疫組織化学染色は欠かすことのできない検査となっているが、これらの試薬を使用する場合に、気をつけなければならないもののひとつが固定時間である。例えば乳癌や胃癌における分子標的治療薬の一つであるトラスツズマブの適応の有無のためにおこなう抗HER2抗体を用いた免疫組織化学染色であるが、トラスツズマブ病理部会が作成したガイドラインにおいては、6時間以上48時間以内の固定時間が推奨されており⁴⁾、各メーカーの添付文書も概ね同程度の時間が記載されている。実際に一週間以上の過固定をおこなってしまった場合の染色性およびHER2スコアの低下などの報告（図2, 3）や自験例もある⁵⁾。また、固定時間が短い、いわゆる固定不良状態においても、組織や細胞が崩壊して、構成成分が流出することによる染色性の低下や染色ムラが起りうることもある。従って、年末年始などの長期間に固定液に浸透させたままという事態は極力避けたい。

細胞診における固定時間は、一般的には15分以上とされているが、急ぐ場合には5分程度でも十分である。また、組織同様に長期間の固定は望ましくないが、どうしても避けられない場合は冷蔵保存が望ましい。

おわりに

実際には、臓器の種類や検出したい物質などによって、用いる固定液の種類や固定温度、固定時間などは様々であるが、今回は、あくまで一般的な病理組織および細胞診検査における固定での注意点を述べた。

日常業務において病理検査に携わっていない人でも、当直時や時間外に病理検査用の検体を受け取らなくてはならない場合もあると思われる。その場合、病理検査担当者に連絡がつくようであれば、確認をして処理をするのが最も望ましいが、連絡がつかない場合には、組織材料はホルマリンに浸透して室温放置、細胞診検体に関しては冷蔵庫保存というのが無難な方法かと思われる。



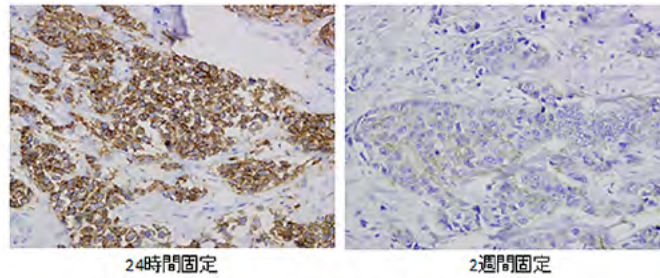


図3 HER2(3+) 症例。24時間固定では、良好な染色性を示すが、過固定(2週間)では、著明な染色性の低下が認められた。

参考文献

- 1) Thaer Khouryl., et al.: Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Modern Pathology., 2009; 22, 1457-1467.
- 2) 細胞検査士会：細胞診標本作製マニュアル（体腔液）. 2008.
- 3) 細胞検査士会：細胞診標本作製マニュアル（体腔液）. 2003.
- 4) トラスツズマブ病理部会：HER2検査ガイド（第三版）. 2009.
- 5) 澁木康雄: 病理・細胞診検査の安全管理 1)検体受付・固定・切り出し・包埋. Medical Technology., 2014; 42(1), 25-28.

脱脂・脱灰について

NHO千葉医療センター

山田 晶

はじめに

ブロック作製においては、十分に固定した材料を包埋装置にかけるが、脂肪を多く含む組織や骨組織などは、脱脂や脱灰操作を事前に行う必要がある。今回は、検査室で良く使用されている試薬を用い、その操作法を概説する。

1. 脱脂

このような経験はないだろうか？（図1）

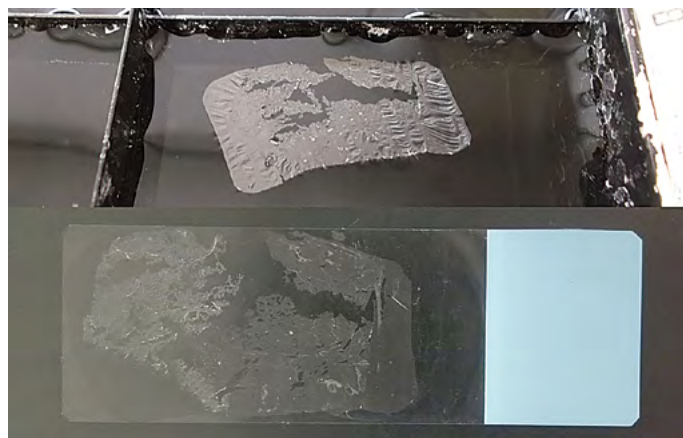


図1 脱脂不足の標本は薄切後に水槽に浮かせた段階や、進展させるとバラバラになってしまう。

少量の脂肪組織は包埋過程のエタノールやキシレンで脱脂が行われている。しかし乳腺組織や脂肪腫などの脂肪成分を多く含む組織はパラフィンが十分に浸透出来ず、薄切が困難なばかりでなく伸展時に切片がバラバラになってしまう。このような標本にならないために脱脂操作を行う必要性がある。

脱脂には有機溶剤が使用される。検査室ではエタノール、メタノール、キシレン、クロロホルム、アルコール系とキシレンやクロロホルムとの混合液などが用いられている。

エタノール、メタノールは脂肪の溶出量は少なく、次いでキシレン、クロロホルム、キシレン混合液、クロロホルム混合液の順に溶出量が多かった。2時間後ではキシレン混合液とクロロホルム混合液との差はあまりみられなかった。（図2）

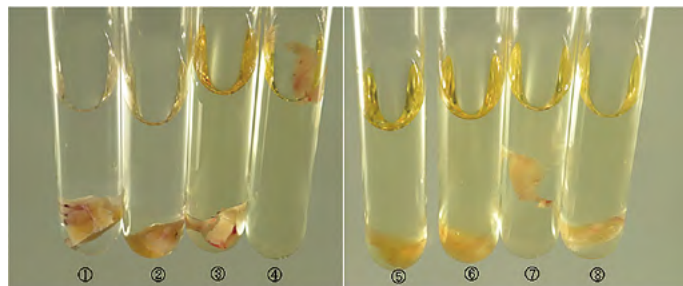


図2 ①～⑥の各溶液に脂肪組織を入れ攪拌しながら2時間脱脂の溶出状態

	1 時間後	2 時間後
①エタノール	ほとんど溶出なし	ほとんど溶出なし
②メタノール	ほとんど溶出なし	ほとんど溶出なし
③キシレン	ほとんど溶出なし	若干溶出
④クロロホルム	ほとんど溶出なし	若干溶出
⑤エタ・キシ混合液	若干溶出	溶出あり
⑥メタ・キシ混合液	若干溶出	溶出あり
⑦エタ・クロ混合液	溶出あり	溶出あり
⑧メタ・クロ混合液	溶出あり	溶出あり

組織は適切な大きさに切り出し、またエタノールによる脱水操作も重要である。(図3)

①・②はサンプリング過多で隙間なく切り出し、③・④は適度の隙間を持たせている。また②・④は4時間の脱水操作を行っている。2時間脱脂後（エタ・キシ混合液）では①～③は脱脂不十分で黄色い脂肪組織が残っているが、④は組織に透明感があり脱脂が完了していることがわかる。ブロックに隙間なく組織を詰めると脱脂液の浸透が悪く脱脂効果が低下する。したがって脱脂液に入れる前には必ずエタノールに2～4時間攪拌しながら入れ脱水操作を行うことにより良好な脱脂効果が得られる。

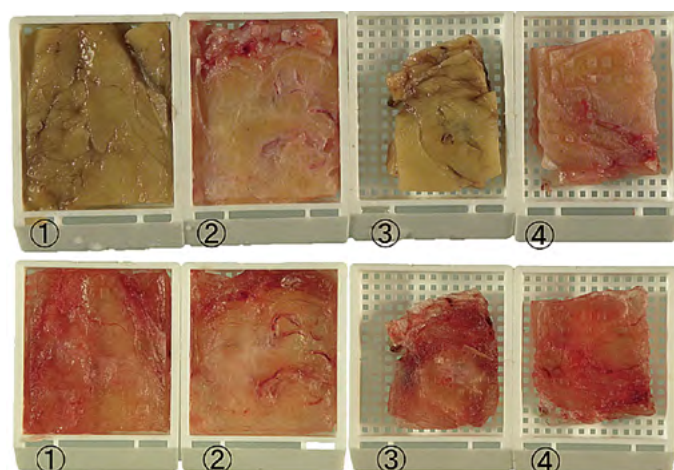


図3 上段は脱脂前のサンプリング大きさの違いや脱水の有無のブロック。下段は2時間後の脱脂状況である。
④以外は黄色い脂肪が残り脱脂が完了していない。

2. 脱灰

組織標本をミクロトームで薄切する時、その組織に石灰を含む硬組織が含まれていると刃こぼれを起こし良好な標本作成が出来ない。こうした組織を薄切できる硬さにする必要がある。脱灰法は種々あるが今回は、強酸性（塩酸）・中性（EDTA）・迅速脱灰液（プランク・リュクロ）の脱灰液で染色性を比べてみた。強酸性の脱灰液は、プランク・リュクロ同様に迅速な脱灰が可能であるが、染色性に影響を及ぼす。中性の脱灰液は組織への損傷が少なく染色性も良好だが脱灰に長時間を要する。

脱灰は塩酸やプランク・リュクロだと椎骨3～4時間で、EDTAだと1～2日で完了する。脱灰液は組織1g に対し50～100mL以上使用し、1日2回は液交換することが望ましい。カルシウムは下層に沈殿し脱灰効果を下げるので糸等で吊るし攪拌しながら脱灰する。(図4)

骨成分に含まれる脂肪が脱灰を妨げるため、脱灰液に入れる前に必ず脱脂を行う。酸性脱灰液は炭酸ガスが発生するため蓋で密閉しない。また、酸性脱灰液を使用した場合は組織の膨化を防ぐために中和剤として硫酸リチウムや硫酸ナトリウムに半日程度浸す必要がある。

染色性はEDTAが良好な染色性を呈しているが、塩酸およびプランク・リュクロは核の染色性がエオジン好性を呈している。(図5)



図4 十分な量の脱灰液を使用する。

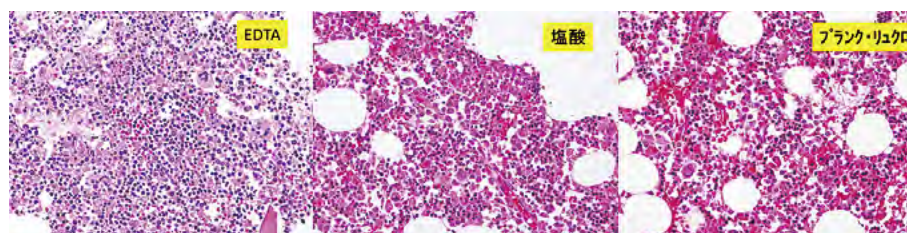


図5 塩酸ではヘマトキシリンの染色性が EDTA と比べ著しく低下している。プランク・リュクロも塩酸ほどではないが低下している

おわりに

脱脂液に用いるクロロホルムは、平成26年11月に特定化学物質に指定されており、検査室の環境に配慮が必要である。自動包埋装置の普及や進歩に伴い、ブロック作製のクオリティが上昇している。しかしながら良質なブロックを作成するには、包埋装置にかける前の固定や脱脂、脱灰が非常に重要である。この操作を怠ると如何に良い機器を使用しても、良好な標本作成が出来ないことを念頭に置いて欲しい。

免疫染色におけるピットフォール

国立がん研究センター中央病院 病理・臨床検査科

澁木 康雄

はじめに

現在の病理診断において、免疫染色は欠かすことのできないツールのひとつであるが、思ったような染色結果が得られず、その原因や対処法について相談されることがしばしばある。

実際の免疫染色における手順は、多くの施設において、抗原の賦活化から一次抗体のクロールや希釈倍率の選択、プロトコルの作成などが適切に行われているのではないかと考える。今回は、その染色作業以外の要因に起因するピットフォールについて、工程別にいくつかの例を提示する。

工程別のピットフォール

①検体採取から固定まで

検体採取後は、なるべく速やかに固定し、適切な固定条件を順守する必要がある（詳細については、関信支部ニュース200号「固定について」を参照されたい）。

②脱脂・脱灰操作

これらの操作が適切に行われないと前号にも記載があるように、当然良質な標本は作製されない。特に脱灰に関しては免疫染色の結果に大きく影響を及ぼすことがあることを理解しておく必要がある。

一般的にも広く用いられている塩酸（強酸性）やK-CX、プランク・リュクロ（迅速脱灰液）などはEDTA（中性）に比べ短時間で脱灰が可能であるが、その反面、染色性の低下を招くおそれがある。ブロック作製後の表面脱灰では、その傾向が顕著に表れ、数時間放置しただけで、著しい染色性の低下を招く抗体が多数存在する（図1）。表面脱灰を行う際にはなるべく短時間の処理を心掛け、最大でも1時間を超えないようにする必要がある。また、ブロック作製前の脱灰操作においても免疫染色を施行する可能性の高いブロックは、多少時間を要してもEDTAなどの中性脱灰液を用いると間違いは少ない。

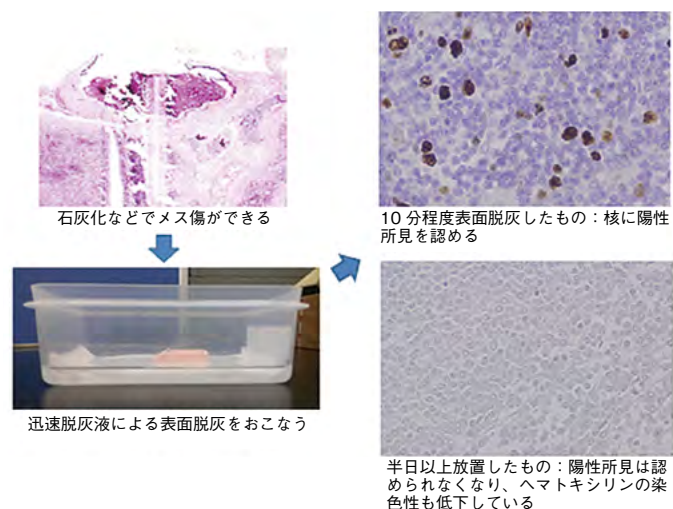


図1. 表面脱灰による免疫染色への影響の1例 抗 Ki-67 抗体(clone;MIB-1)による免疫染色像

③薄切

切片の厚さも少なからず染色性に影響を与えることがある。乳癌HER2ガイドラインなどでは、免疫染色における適切な検体は4 μ mとされており、実際に多くの施設でも3～4 μ m前後の切片厚で行われていると思われるが、薄すぎる切片や厚すぎる切片は染色性に影響を及ぼすおそれがある（図2）。

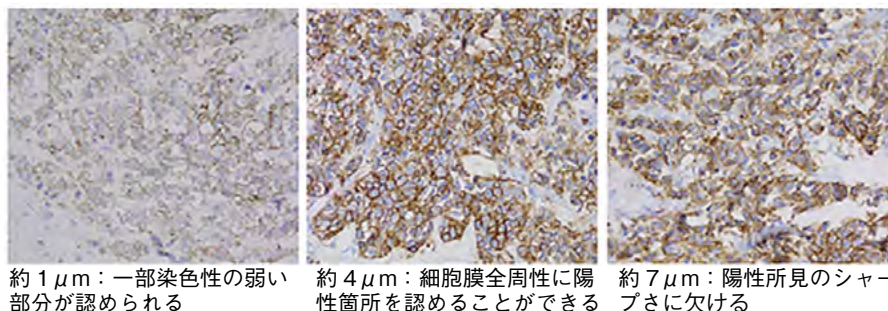


図2. 切片厚の違いによる影響の1例 (HER2免疫染色：スコア3+症例)

更に切片の剥がれを防止するための乾燥作業にも注意が必要である。薄切・進展後に孵卵器などで熱を加えて乾燥させている施設も多いかと思われるが、長時間の熱を加えた乾燥は染色性の低下を招くおそれがある。従って連休などの長期休暇の際には十分な注意が必要となる（図3）。

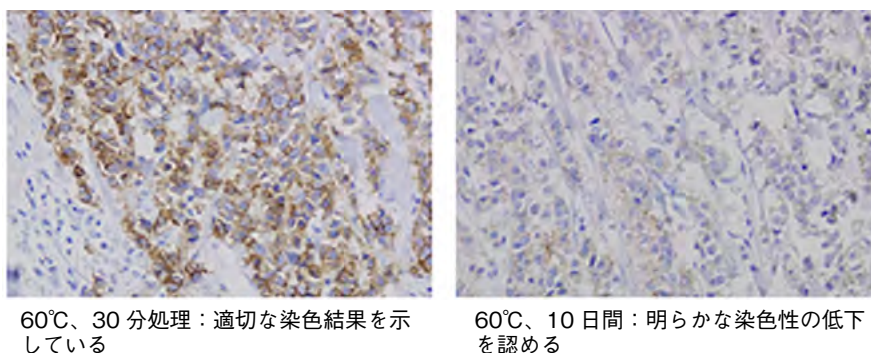
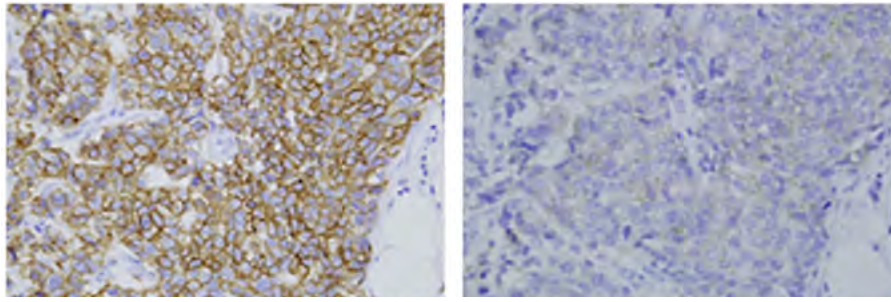


図3. 薄切後の乾燥による影響の1例 (HER2免疫染色：スコア3+症例)

④切片の保存

乳癌HER2ガイドラインにおいては、薄切から6週間以上放置された未染色標本は、免疫染色には適さないとされている。実際に長期間保存した標本では、著しい染色性の低下がみられることがある（図4）。従って長期間放置されたものや他院から取り寄せた未染色標本が陰性であった場合の結果の解釈には注意が必要である。また、どうしても保存する場合には、なるべく冷暗所で保存し、可能な限り早めに染色することを心掛けたい。



薄切翌日に染色：適切な染色結果を示している

薄切後半年間室温に放置し染色：著しい染色性の低下を認める

図4. 薄切後の保存による影響の1例(HER2免疫染色：スコア3+症例)

おわりに

免疫染色においては、実際の染色手技以外にも様々なピットフォールが存在する。今回は、その中でも代表的なものをいくつか提示した。

病理検査に携わる技師は、染め上がった標本をそのまま病理医に提出するのではなく、必ず染色性を確認し、問題がある場合には、その原因を可能な限り究明し、その後の役に立てるような対策を講じる必要がある。

参考文献

- 1) トラスツズマブ病理部会: 乳癌HER2検査ガイド（第4版）. 2015.

凍結標本作製について

NHO東埼玉病院 臨床検査科 山 田 晶

はじめに

通常病理組織診断は、検体採取後に固定や切り出し等を経て、標本提出までに1日から長くて1週間以上を要する検体もある。しかし、手術中などすぐに診断結果が必要な場合もある。病変部の良悪の判定、切除断端部への腫瘍の有無、リンパ節転移の有無などを判断し、速やかに診断しなくてはならない。今回、クリオスタット（図1）を用いた迅速時における凍結標本作製時の注意点を概説する。



図1. 主流はハンドルを回す回転式ミクロトームを冷凍庫の中に組み込んだような構造になっており庫内は試料の状態に合わせて $-15^{\circ}\text{C} \sim -25^{\circ}\text{C}$ くらいの温度が適温。

凍結標本は、ホルマリン等で固定をしていない生の組織を用いて作製する。基本的な凍結標本作製の流れは、目的とする病変部を切り出し包埋剤に埋没した後、冷媒に入れ速やかに凍結する。凍結したブロックをクリオスタットで薄切しスライドガラスに切片を貼付する。切片を固定してH.E染色を施し標本として提出する。これらの工程を如何に速やかに行い、質の高い標本作製するかが重要である。

切り出しの注意点として、永久標本同様に切り出し組織の大きさと包埋皿の大きさを合わせること。包埋皿は、プラスチック製皿より金属製皿（テフロン加工されているとより良い）を使用の方が望ましい。熱伝導性が高く急速に凍結することが出来る（図2）



図2. ①プラスチック製皿 ②金属製皿 ③テフロン加工した金属製皿

切り出す標本は、時に生理食塩水に浸したガーゼに包まれて提出される。生理食塩水や血液が付着していた時は、組織が傷つかぬよう注意しながら余分な水分を取り除く。これは、細胞外の水分凍結による氷の結晶生成を防ぐためである（図3）。凍結点である0℃から-7℃までの温度範囲を最大氷結晶生成帯といい、この最大氷結晶生成帯を速やかに通過させることにより氷の結晶生成を最小限に抑えることが可能である。冷媒は、液体窒素、アセトン、イソペンタン、ヘキサンなど様々な冷媒がある。液体窒素は最も温度が低く、急速凍結が可能であるが、管理面に課題がある。通常は、アセトン、イソペンタン、ヘキサンにドライアイスを加えた液体を用いる事が多い（表1）。

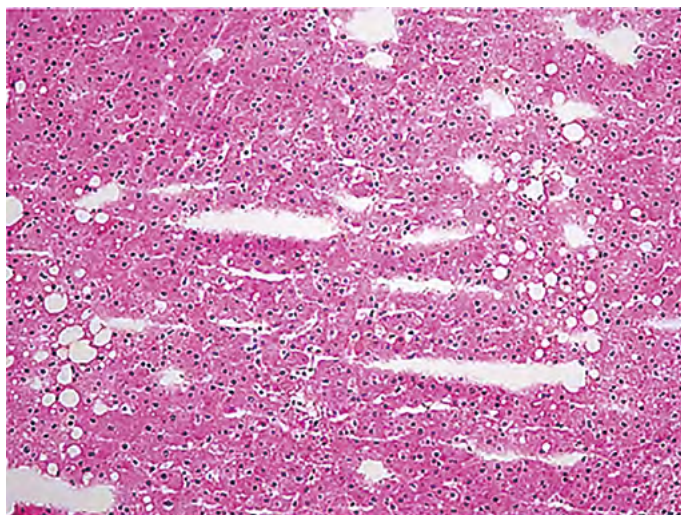


図3. 最大氷結晶生成帯が長く氷晶によるアーチファクト

冷 媒 等	温度(℃)	冷 媒 等	温度(℃)
液体窒素	-196	ドライアイス・アセトン	-78.5
ドライアイス・イソペンタン	-78.5	ドライアイス・ヘキサン	-78.5
ドライアイス・エタノール	-78.5	液化炭酸ガス	-78.5
液化プロパン	-188	冷却スプレー	-30
クリオスタット冷却板	-40		

表1. 主に使用されている冷媒

また、冷媒を入れる容器も様々である（図4）。ステンレス製容器①と保温型弁当箱②は安価で簡便に使用できる。両容器とも冷凍庫にて保管し使用時にドライアイスを入れ使用する。ステンレス製容器は、検体数が多いとすぐに冷媒が温まってしまうが、保温型弁当箱は保温性に優れ複数個のブロックを作製することが可能である。凍結ブロック作製装置③はドライアイスの準備が不要で、操作性に優れているが高価である。



図4. ①ステンレス製容器②保温型弁当箱③凍結ブロック作製装置

薄切時はブロックの温度が重要である。実質臓器は-20℃前後、脂肪を多く含む臓器は-30℃以下が薄切に適している。過冷却すると、メスと平行にひび割れが生じスダレ様になる。凍結が緩いとメスに切片が付着しシワを生じる（図5）。



図5. ①過冷却②適温③冷却不足

脂肪を含む検体も工夫を要する。乳がんの断端やセンチネルリンパ節は脂肪に包まれたまま検査室に提出されることが多い。センチネルリンパ節は被膜を傷つけないよう可能な限り脂肪を取り除くとより良い標本作製出来る（図6）。また乳腺の断端は、包埋剤に界面活性剤や家庭用洗剤を加えたものを使用すると薄切しやすい。

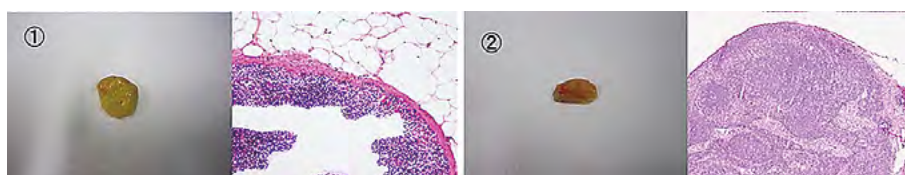


図6. ①は脂肪を付着したまま作製②は脂肪を取り除いて作製

余談だが、特に冬季に起こりやすい現象で切片をスライドガラスに貼り付けるときに、静電気で切片が浮き上がり上手く貼れない事がある。そんな時は指に軽く水を付けスライドガラスの裏面を軽くなぞると静電気を防ぐことが出来る。

固定液も各施設様々で、メタノール等のアルコール単独固定やホルマリンとアルコールの混合液、さらに酢酸やクロロホルムを加えた固定液もある。メタノール等の単独固定はクロマチン構造が不明瞭化するとの報告もあるので注意したい。

まとめ

術中迅速病理診断時は短時間の間により良い標本作製することが重要である。凍結切片はパラフィン切片と比較して、クオリティが低くなりがちであるが、如何にパラフィン切片と同等の標本作製できるかを各個人が考えながら工夫することが肝要と考える。

参考文献

- 1) 堤 寛, 平澤 浩: 新鮮凍結切片の作り方, 病理と臨床 2004, 5: 515-518
- 2) 朝隈蓉子, 福島範子, 多賀 正: 凍結切片作製法の一工夫, 1988 6: 1239-1240
- 3) 特定非営利活動法人 病理技術研究会: 基礎病理学 (初版)