

総 説

やさしい眼病理診断(4)

沖坂 重邦

眼病理教育研究所

IV 眼病理検査の手順(2)

生検, 細胞診, 凍結切片

1. 生 検

生体組織の一部を切除して組織病理診断をつけることを生検(biopsy)という。眼瞼, 結膜, 角膜, 眼窩の生検の行われた症例の組織病理診断には, 腫瘍のみでなく炎症もかなり含まれている(表1~5)。

生検標本のどこをどのように切り出して顕微鏡標本にするかは, 通常病理医により, その肉眼的所見の判断を基準として行われている。しかし眼組織の場合, 実際に組織を採取した手術医でないと, その組織の病巣の方向性の確認が難しいことが多々あるので, 病理医と相談の上, 術者自身がみたいと思う所が標本に出るように切り出すことも考慮するとよい。充実性腫瘍のように厚さのある組織は幅4mm以下の組織片に切り出すと固定がよくなる。眼組織は比較的硬く, 小さいものが多いから, 片刃安全剃刀を使うと挫滅の少ない組織片を切り出すことができる。3mm以上の大きさの検体は, 半分に切出し, 一方を組織病理検査室に組織病理診断を依頼し, 他方は5%ホルマリンに保存し, 必要に応じて免疫組織化学, 電子顕微鏡などによる検索を行うようにするとよい。通常, 病理検査室では, パラフィン包埋, ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色をルチーンとしている。眼組織の鏡検に際しては, periodic acid Schiff (PAS)染色, Massonトリクローム染色もよく用いられる。

生検の切除標本は固定前によく観察し, できれば写真撮影を行っておくとよい。組織標本の採取時には, 鑷子で組織を把持せず糸をかけて牽引するなどして, 組織をできるだけ挫滅しないように, 生体と同じような形態に保たれたまま固定されるように配慮する必要がある。結膜は鑷子と剪刀(あるいはメス)で容易に切除できるが, 強膜パンチを使用すると挫滅の少ない標本が得られやすい。検体を生理食塩水に浸けたまま放置してはいけない。結膜のような切除組織は, そのまま固定液に入ると収縮彎曲して方向性が失われるので, 表面を上にして濾紙, medical quick absorber(MQA)あるいは脱水した胡瓜の薄切片の上にのせて生体と同じ状態に伸展さ

表1 眼瞼の生検組織の病理診断

炎症: 眼瞼炎(化膿性肉芽腫), 麦粒腫, 霰粒腫, 伝染性軟属腫, 尋常性疣贅, サルコイドーシス, 結節性筋膜炎 良性表皮腫瘍: 乳頭腫, 偽上皮腫性過形成, 角化棘細胞腫, 脂漏性角化症 前癌性表皮腫瘍: 日光(老人性)角化症, 表皮内有棘細胞癌 色素性腫瘍: 雀卵斑, 単純黒子, 悪性黒子, 母斑, 青色母斑, 太田母斑 良性嚢胞: 汗腺嚢胞, 表皮貯留嚢胞, 類表皮嚢胞, 類皮嚢胞, 面皰 皮脂腺腫瘍: 皮脂腺過形成, 皮脂腺腺腫 毛包腫瘍: 毛孔腫, 毛母腫(石灰化上皮腫), 毛包腫, 外毛根鞘腫, 毛髪上皮腫 汗腺腫瘍: 汗管腫, エクリン汗孔腫, 乳頭状汗腺腫, アポクリン嚢胞腺腫, エクリン汗嚢腫 黄色腫 類壊死性黄色肉芽腫 神経線維腫 神経鞘腫(シュワノーマ) 顆粒細胞腫 アミロイドーシス
悪性腫瘍 基底細胞癌 扁平上皮癌 皮脂腺癌 悪性リンパ腫 悪性黒色腫 外毛根鞘癌 汗腺癌 Merkel細胞腫 横紋筋肉腫 転移性腫瘍

せてから固定液に入れる(図1)。この際, 標本を乾燥させないように手際よく行う必要がある。胡瓜と組織片を一体として細切して標本として包埋すると観察したい組織面の標本が得られやすい。胡瓜の代わりにMQA, 濾紙に組織を付着させた場合には細切前にMQA, 濾紙を除いて細切するか, 細切しない場合には脱水あるいは包埋前に組織をMQA, 濾紙から剥がす必要がある。眼瞼, 角膜などの薄い表層切除片の採取に際しては円刃あるいは剥離刃を用いて切除し, 結膜と同様に処理する。トラベクレクトミー時に採取した強角膜切片はMQAなどの上にトラベクルムを上にして伸展させ, 固定液に

表 2 結膜の生検組織の病理診断

炎症
霰粒腫
化膿性肉芽腫(血管腫性肉芽腫)
サルコイドーシス
アミロイドーシス
春季カタル
巨大乳頭結膜炎
フリクテン
上皮性腫瘍
良性上皮腫瘍：乳頭腫，偽上皮腫性過形成，角化棘細胞腫，嚢胞
前癌性上皮腫瘍：日光角化症，扁平上皮内癌
悪性上皮腫瘍：扁平上皮癌，粘液性類表皮癌
付属器(涙丘)腫瘍：多形腺腫，好酸性顆粒細胞腫，皮脂腺癌
色素性腫瘍
メラノーシス
色素性母斑：上皮内母斑，上皮下母斑，複合母斑，若年性黒色腫，青色母斑，太田母斑
悪性黒色腫
軟部組織腫瘍
若年黄色肉芽腫
線維黄色腫
胎児性横紋筋肉腫
血管腫
神経線維腫，神経鞘腫(シュワノーマ)
奇形腫，過誤腫
類皮腫，脂肪類皮腫
骨腫
造血器腫瘍
続発性腫瘍

表 3 角膜の生検組織の病理診断

炎症
翼状片，春季カタル輪部型，角膜フリクテン，トラコーマ
薬剤アレルギーによる輪部濾胞，上輪部角結膜炎
腫瘍
類皮腫，乳頭腫，上皮内癌，扁平上皮癌，悪性リンパ腫
悪性黒色腫

入れる。硝子体手術時に剝離切除した網膜前膜・網膜下組織も MQA などの上に貼り付けて固定液の中に入れる。硝子体手術時の細胞塊の生検については 3 の 2 で述べる。涙腺の生検では，上円蓋部結膜外側に小切開を加え，5 mm³大の眼瞼部涙腺を切除する。虹彩だけは，濾紙，MQA の上のにせて固定すると，色素上皮細胞が濾紙，MQA に付着してしまうので，微細な鑷子で把持したまま固定液に入れる。

組織標本の鏡検したい面を下にして包埋し薄切標本を作製するが，眼科で取り扱う標本は通常小さいので，病理検査室で細切時包埋のオリエンテーションをつけることが困難な場合が多い。そこで，病理医の理解が得られる場合には，臨床医は手術終了時に手術顕微鏡下で組織標本を安全剃刀を用いて見たい面の切出しを行い，病理

表 4 眼窩生検，眼窩内容組織の病理診断

特発性眼窩炎症(炎症偽腫瘍)
甲状腺眼症(Graves 病)
特異的眼窩炎症：サルコイドーシス，Wegener 肉芽腫症，木村病，特発性血栓静脈炎，結節性多発動脈炎，全身性エリテマトーデス(SLE)，有痛性外眼筋麻痺，多発性線維硬化症，アミロイドーシス
感染症(眼窩蜂巣炎)
細菌：インフルエンザ菌，連鎖球菌，黄色ブドウ球菌
真菌：ムコール，アスペルギルス
寄生虫：エキノコックス，有鉤条虫，有棘顎口虫，肺吸虫，東洋眼虫
嚢胞：類皮嚢胞，粘液嚢胞，嚢胞
涙腺部腫瘍：涙腺炎，多形腺腫，反応性リンパ組織過形成，嚢胞，悪性リンパ腫，腺様嚢胞癌，多形腺癌
続発性腫瘍
眼内腫瘍：悪性黒色腫，網膜芽細胞腫
眼瞼腫瘍：基底細胞癌，皮脂腺癌，悪性黒色腫，副鼻腔腫瘍
結膜腫瘍：扁平上皮癌，悪性黒色腫
リンパ腫，白血病：反応性リンパ組織過形成，悪性リンパ腫，白血病
血管腫：海綿状血管腫，毛細血管腫，血管内皮腫，血管周囲腫，リンパ管腫
粘液腫，脂肪腫：皮様脂肪腫，脂肪肉腫，粘液腫
転移性腫瘍：乳癌，前立腺癌，大腸癌，肺癌
末梢神経腫瘍：神経鞘腫(シュワノーマ)，神経線維腫，神経腫
視神経腫瘍：髄膜腫，神経膠腫
線維性腫瘍：線維性組織球種，線維腫
骨・軟骨腫瘍：骨腫，化骨脂肪腫
横紋筋肉腫
組織球腫瘍
悪性黒色腫

検査依頼書にどのように細切したかを図示しておくのも一法である。角膜移植時に得られた母角膜は短冊状に 3~4 分割し，中央と端を光学顕微鏡(光顕)に回し，残りは 5%ホルマリンに保存しておくことを推奨する。トラベクレクトミー時に採取された強角膜片は固定後 MQA からはがし，輪部に垂直な面で 2 分する。硝子体手術時に剝離切除した網膜前膜や網膜下組織は MQA から剝がして伸展されたまま次のステップに回す。組織標本が大きければ，一部を 5%ホルマリン中に保存しておくこと凍結切片作製など他の検索にも好都合である。

2. 角結膜細胞診¹⁾

1) 塗抹・擦過標本

角膜・結膜の感染性疾患(細菌，クラミジア，真菌，アカントアメーバ，ヘルペスウイルスなど)，アレルギー性疾患などの診断に用いられる。基本手技として，まずオキシプロカイン(ベノキシール®)で点眼麻酔を行う。感染性結膜炎では，瞼結膜から円蓋部にかけてスパーテルで擦過し，分泌物または眼脂を採取してスライドグラス上に塗布する。アレルギー性疾患では，硝子棒で上眼瞼結膜をマッサージした後，分泌物だけを採取してスライドグラスに塗布する。感染性角膜潰瘍では，潰

表 5 角膜移植母角膜の臨床診断

円錐角膜
角膜炎(角膜潰瘍)
細菌性角膜炎
真菌性角膜炎
ウイルス性角膜炎：単純ヘルペス，帯状ヘルペス
アcantアメーバ角膜炎
トラコーマ
蚕食性角膜潰瘍
水疱性角膜症：白内障術後，近視手術後
角膜変性：帯状角膜変性，球状角膜変性，角膜脂肪変性
角膜ジストロフィ
角膜上皮ジストロフィ：Meesmann 若年性遺伝性角膜上皮ジストロフィ，角膜上皮基底膜ジストロフィ
Bowman 膜ジストロフィ：Reis-Bücker ジストロフィ，前部モザイクジストロフィ
角膜実質ジストロフィ：顆粒状角膜ジストロフィ，斑状角膜ジストロフィ，格子状角膜ジストロフィ，膠様滴状角膜ジストロフィ，アミロイド角膜ジストロフィ，Scyhnyder 結晶状ジストロフィ
角膜内皮ジストロフィ：先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィ，後部多形性角膜ジストロフィ
角膜葉傷：Stevens-Johnson 症候群，アルカリ腐食
角膜移植後混濁

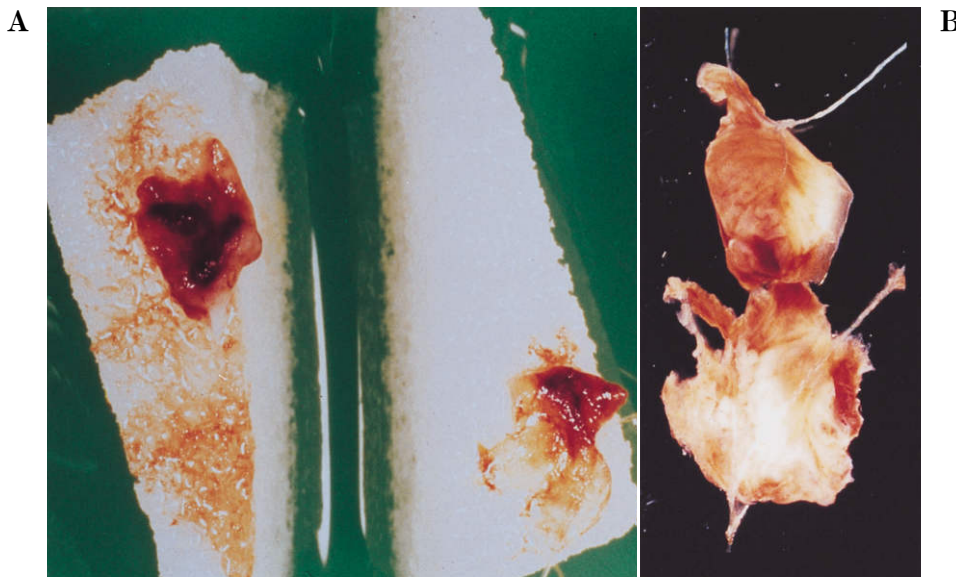


図 1 翼状片組織の固定の仕方。

A：medical quick absorber (MQA) にのせて固定液に入れた後細切のために固定液から出したところ。
 B：MQA を除去したところ。

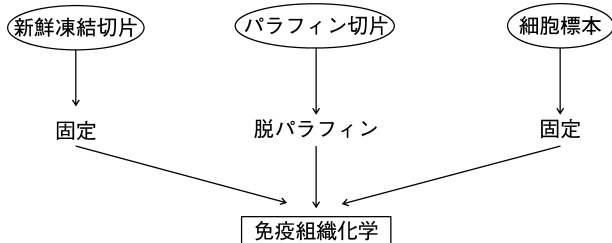


図 2 角結膜疾患の塗抹・擦過標本の染色手順。

瘍の辺縁部を擦過し，スライドガラスに塗布する。

固定法としては，火炎固定(グラム染色)，メタノール固定(グラム染色，ギムザ染色，パパニコロウ染色，

PAS 染色)，アセトン固定(免疫組織化学)，未固定(パーカーインク KOH 法)があるが，目的とする染色法によって異なる。

染色方法を図 2 に示す。細菌性結膜炎・角膜炎では，グラム染色を第一選択とする。グラム陽性は濃紫色・青色，グラム陰性は赤色・桃色に染色される。グラム陽性球菌であれば，ブドウ球菌，連鎖球菌，グラム陰性桿菌であれば緑膿菌，セラチア，ヘモフィルス属，モラクセラ属である。封入体結膜炎では，ギムザ染色で封入体(Prowazek 小体)を上皮細胞の細胞質内に核よりも紫色に濃染する顆粒として観察する方法と蛍光抗体法(Micro Trak クラミジアトラコマティスダイレクトテ

表 6 Impression cytology の標本作製手順¹⁾

1) 準備
① 点眼麻酔：オキシプロカイン(ベノキシール®)
② 開眼器装着
③ 検体採取部位の水分の除去，表面の乾燥
2) 検体採取
・メンブランフィルター：MILLIPORE®, pore size 0.22 μm (Millipore Co., Bedford, MA, USA) を 3×6 mm 程度の大きさに切って使用
・採取法：光沢のない rough surface が採取部位に接するようにフィルターを置き，その上から硝子棒で数回圧迫した後，鑷子で剝離
3) 固定
・10% 中性ホルマリン：10 分間
4) 染色(PAS 染色)
・PAS 染色キット® (武藤化学) を用いた染色が簡便で染色性も良好
① 流水洗浄：15 分間
② 1% 過ヨード酸：10 分間
③ 溜水水洗：5 分間×2 回
④ シッフ試薬：30 分間(37°C)または 40 分間(室温)
⑤ 亜硫酸水：5 分間×2 回
⑥ 流水洗浄：5 分間
⑦ 核染色(カラッチヘマトキシリン)：30 分間
⑧ 流水洗浄：1 分間
⑨ 色出し(温水または PBS)：10 分間
⑩ 脱水(上昇アルコール系列)：70%・80%・90%・95%・100% 各 5 分間
⑪ キシレン：白色のメンブランフィルターが透明になるまで浸透
⑫ 封入：フィルターの厚みがあるため，封入剤を十分に使用

スト®)がある。アレルギー性結膜炎では，分葉核をもち，細胞質内に赤色顆粒をもつ好酸球の証明が診断上重要であるので，血液の一般染色であるギムザ染色またはハンセル染色(エオジノステイン®)が第一選択となる。角膜真菌症ではパーカーインク KOH 法，グラム染色で菌子や胞子が青色に染色される。アカントアメーバ感染では，標本中にはシストはパーカーインク KOH 法とギムザ染色で青色，グラム染色と PAS 染色で赤色として観察されるが，trophozoite はほとんど観察されない。

2) 剝離標本(Impression cytology)

ミリポアフィルタを角結膜に貼り付けた後ゆっくりと剝がし，上皮細胞層を採取し PAS 染色をすると，杯細胞，角化上皮，アカントアメーバのシストを観察することができる。基本手技を表 6 に示す。上輪部角結膜炎では，拡大した細胞質と濃染した核を特徴とする角化上皮細胞の存在と杯細胞の消失をみる。Sjögren 症候群でも扁平上皮化生(角化および杯細胞消失)を認める。

3. 前房水・硝子体液の細胞診²⁾

前房水・硝子体液の細胞診を施行すれば，細菌，真菌，アメーバ感染症では好中球が大部分を占めているが，原因菌も同定可能である。犬蛔虫症，水晶体起因性眼内炎では好酸球がみられる。ぶどう膜炎ではリンパ球

が主体であるが，好中球が多くみられることもある(ペーチェット病)。

典型的な腫瘍は問題ないが，非典型的な臨床像を呈するような症例(眼内悪性リンパ腫，転移性腫瘍，網膜芽細胞腫，白血病の眼内再発など)では細胞診が役立つ。

Schwartz 症候群では，前房水中に視細胞外節がみられるが，電子顕微鏡による観察が必要である³⁾。

1) 前房水・硝子体液の塗抹標本

注射筒に採取した前房水，硝子体液，あるいは硝子体手術で切除・吸引した硝子体をスライドガラス上に滴下し，風乾後，10% ホルマリンまたはアセトンで 10 分間固定する。染色法として HE，PAS，ギムザ染色などを施行する。

2) 硝子体手術中の硝子体切除液の処理

硝子体手術終了時に時間的余裕がなければ手技①，時間的余裕があれば手技②，③を施行すればよい。

① 50 ml の遠沈管に移し，ホルマリン原液を 1/10 量加え混合しておく。その後，1,000~3,000 回転で 10~20 分遠沈する。大部分の上清を捨て，遠沈管を振り沈殿した細胞を浮遊させ，スライドガラスに滴下し，風乾させる。HE，PAS，ギムザ染色などをする。

② 50 ml の遠沈管に移し，1,000 回転で 10 分遠沈する。大部分の上清を捨て遠沈管を振り，スライドガラス上に滴下して風乾させる。乾いたスライドガラスを 10% ホルマリンあるいはアセトンに 10 分間固定後，HE，PAS，ギムザ染色などをする。

③ 50 ml の遠沈管に移し，1,000 回転で 10 分遠沈する。上清を完全に除去して，沈殿に 10% ホルマリンあるいは 2.5% グルタルアルデヒドを加え，生検用のペレット状の細胞塊として固定し，パラフィンあるいはエポキシ包埋ブロックから光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡により鏡検する。ペレット状の細胞塊は崩れ易いので寒天に包埋後，細切してパラフィンあるいはエポキシ包埋ブロックを作製することもある⁴⁾。

4. 凍結切片

組織を凍結して薄切した標本は，① HE 染色による術中迅速診断，② 脂肪染色による皮脂腺癌，角膜脂肪変性などの確定診断，③ 免疫組織化学による組織中の抗原の検索に用いられる。

術中迅速診断は，手術中の患者の今後の治療方針を決定するのに影響する情報を得るために適応となる。例えば，切除断端における腫瘍細胞の有無(追加切除の必要性の有無)，リンパ節転移の有無(切除範囲やリンパ節郭清の範囲の決定)，術前に予想されなかった病変の病理診断，術前に診断のついていなかった病変の病理診断が適応となる。術中迅速診断は病理医にとって日常の病理診断に比べるとプレッシャーが非常に大きいので⁵⁾，術者は病理医と術前に情報を交換し，適応を十分に検討して依頼すべきである。凍結切片作成にはアーティファク

トの生ずる危険性があるので、全組織を凍結切片にまわすのではなく、必ず半割は通常の病理検査を依頼する必要がある。

眼瞼の皮脂腺癌が疑われる時には、HE 染色のみでなく、oil red O 脂肪染色による検索も依頼する必要がある。術前に皮脂腺癌が疑われていない場合でも、摘出組織の半割を 5%ホルマリン中に保存しておけば、後に追加検索も可能である。

本総説の連載に当たり、執筆の機会をお与え下さいました日本眼科学会編集委員会に深謝いたします。また、執筆にご協力いただきました防衛医科大学校西川真平教授、順天堂大学村上 晶教授に感謝いたします。

文 献

- 1) 庄司 純, 稲田紀子, 立花敦子: 角結膜組織の細胞診・病理組織診断のテクニック. あたらしい眼科 17: 481-489, 2000.
- 2) 松尾俊彦: 前房水および硝子体液の簡便な細胞診. あたらしい眼科 17: 491-501, 2000.
- 3) 沖坂重邦: 眼病理アトラス. 文光堂, 東京, 7, 1992.
- 4) 小幡博人, 森 樹郎, 平形明人: 眼内悪性リンパ腫の診断—硝子体の寒天包埋と網膜生検. 眼科 46: 1085-1097, 2004.
- 5) 向井 清: 病理診断の流れとその運用. 石川栄世, 他(編): 外科病理学, 第3版, 文光堂, 東京, 5-23, 1999.