



## ゲノム診療におけるプレアナリシス段階

### 検体採取からホルマリン固定までの適切な標本の取り扱いについて

尾本明穂<sup>1)2)</sup>, 上林悦子<sup>1)2)</sup>, 宮部友暉<sup>1)2)</sup>, 嶋村成美<sup>1)2)</sup>  
 西野俊博<sup>1)2)</sup>, 植田正己<sup>1)2)</sup>, 畑久勝<sup>2)</sup>, 塩原正規<sup>1)3)</sup>  
 苗村智<sup>1)3)</sup>, 馬場正道<sup>1)3)</sup>

- 1) 済生会滋賀県病院 病理診断センター
- 2) 済生会滋賀県病院 臨床検査科
- 3) 済生会滋賀県病院 病理診断科

#### 要旨

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体は、がんゲノム医療における分子病理診断に用いることができるが、正確な診断のためには日常業務での適切な検体処理が求められる。その中で最も重要な工程が「固定」である。検体品質に大きな影響を与えることから、固定液は10%中性緩衝ホルマリン液を用い、固定時間は6~48時間で行うことが望ましい。また、検体採取から固定液に入れるまでの時間を短くすることが重要であり、手術により切除された検体は極力室温放置を避け、速やかに固定液に浸漬することが望ましい。固定液は検体が完全に浸かるよう組織量に対し10倍量を用い、手術検体によっては固定前に適切に切開・入割することも必要である。デジタル化の進む医療現場において、病理診断センターでの業務は手作業の占める割合が高いが、分子病理診断を高い精度で行うため、今後も日常業務に邁進していきたい。

#### はじめに

近年、がんゲノム医療における分子病理診断では、ホルマリン固定パラフィン包埋 (以下、FFPE) 検体が解析に用いられるようになった。組織・細胞のFFPE化は、室温での長期保管や繰り返し検索が可能であり、核酸やタンパク質等の変性を最小限にとどめることができる。しかし、日常業務において適切な検体処理を施したFFPE検体でなければ、正確な結果を得ることはできない。今回は、その検体品質を保つための工程 (プレアナリシス段階) の中で特に重要な、「固定」について提示する。

がんゲノム医療におけるプレアナリシス段階と

は、病理の日常業務の1つで検体採取からFFPE検体を作製するまでの工程のことである (図1)。

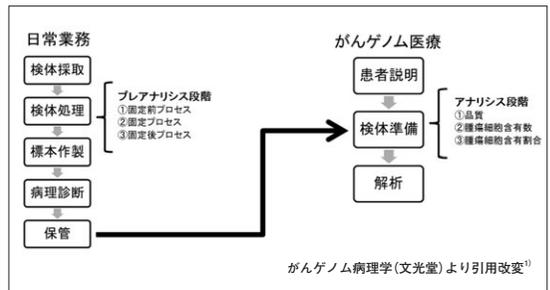


図1 日常業務とがんゲノム医療における検体の取り扱い

プレアナリシス段階で適切な処理を施した検体でなければ、がんゲノム医療に支障をきたす可能性がある。

### 固定の目的

固定は日常病理診断においても重要な工程で、以下のような目的で行われる<sup>2)</sup>。

- ① 自家融解や腐敗の防止
- ② 組織・細胞形態の保持
- ③ 細胞内外の物質の保持
- ④ 組織に適度な硬度を与える
- ⑤ 染色性の向上
- ⑥ ゲノム診療におけるDNA・RNA・タンパク質の保持

特に、自家融解や腐敗を防止し、細胞の構造を保持することで、室温下での長期保管や繰り返し検索が可能となる。

### 固定液と固定時間

固定液は、10%中性緩衝ホルマリン液を用いることが推奨されている。固定時間は、固定不足・過固定を回避するため6～48時間が望ましいとされている<sup>3)</sup>。

当院では、手術標本は可能な限り翌日切り出しを施行し、必要な場合に追加固定を行っている。

### 固定における注意点

固定不良は分子病理診断に必要なDNA・RNA・タンパク質のクオリティを極端に低下させるため、検体採取から固定液に入れるまでの時間を短くすることが重要である。

ゲノム研究用・診療用病理組織検体の取扱い規程では、手術により切除された検体については極力室温放置を避け、速やかに4℃で冷蔵保存し、摘出後1時間以内、遅くとも3時間以内に固定液に浸漬することが望ましいとされている<sup>3)</sup>。そして、生検組織や内視鏡的に切除された組織については、速やかに固定液に浸漬することが望ましいとされている<sup>3)</sup>。

また、速やかに固定液に浸漬されたとしても、過固定は核酸品質の劣化を招くため、回避しなくてはならない。

図2はリアルタイムPCR法により対照DNAとの間の $\Delta CT$ 値(増幅効率)を測定したものである。Ct値はDNAの有意な増加が見られるときのサイクル数を示しており<sup>1)</sup>、 $\Delta CT < 4$ であれば、次世代シーケンサーによる癌関連遺伝子の変異検索のためのライブラリ作成が可能と期待される<sup>3)</sup>。

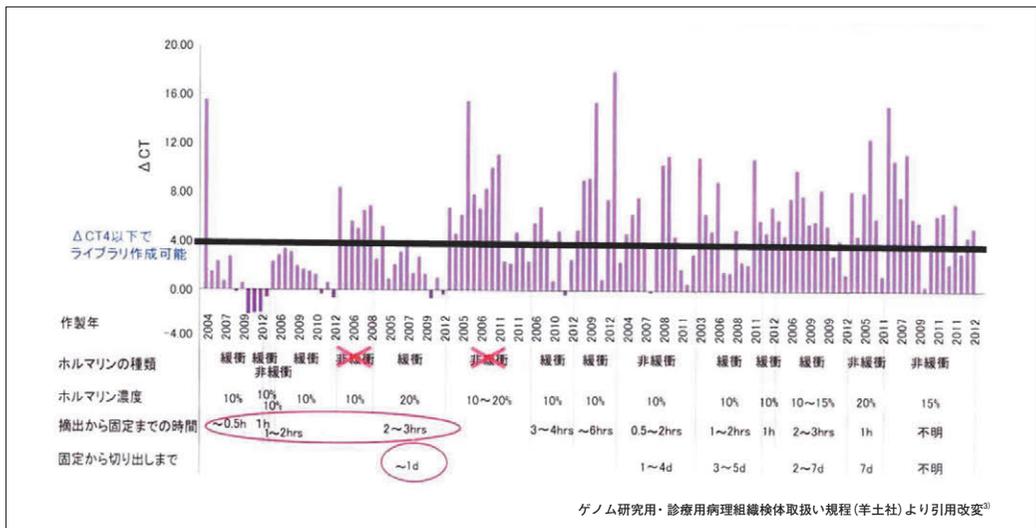
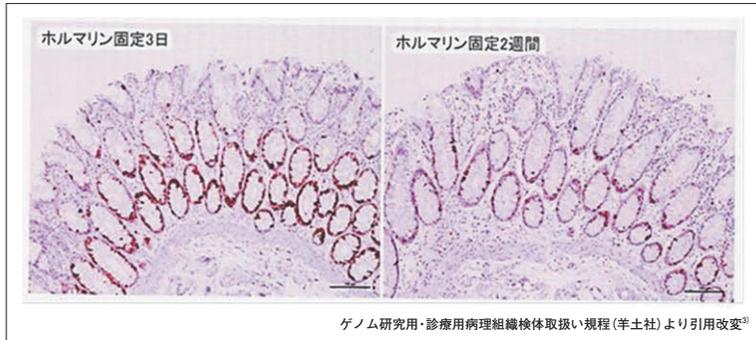


図2 固定までの時間・固定時間・ホルマリンの種類と濃度のDNAの品質に対する影響

$\Delta CT < 4$ であれば、DNA解析が可能とされる。



**図3 過固定によるKi-67免疫染色の一例**

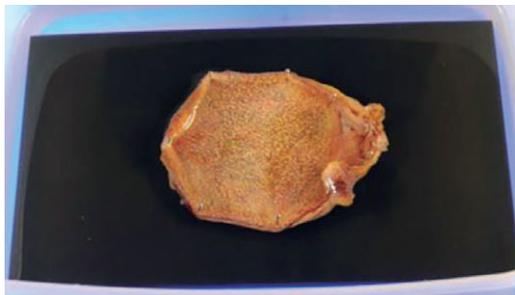
左は固定時間が適切な検体、右は過剰に固定された検体である。過剰な固定では染色性が低下し、正しい結果が得られない。



**図4a 胃**



**図4b 大腸**



**図4c 胆嚢**

消化器検体は、組織を切開後、粘膜面を上にしてゴム板に広げ、虫ピンで留めて提出される。

そのためDNA解析が可能な標本のほとんどは、先述した10%の中性緩衝ホルマリン液を使用し、摘出から固定までの時間が3時間以内であり、切り出しを翌日までに行ったものであることが分かる。図3からも、固定時間により染色性に差が生じていることが分かる。

### 固定液の量と検体の前処理

固定液は検体が完全に浸かるよう組織量に対し10倍量を用いる。ホルマリンの浸透速度は1mm/時間程度であるため、手術検体では固定前に適切

に切開・入割することも必要である。

消化器検体は、粘膜面が観察できるように組織を切開後、粘膜面を上にしてゴム板に広げ、虫ピンで留めて提出される(図4a, 4b, 4c)。組織が手術室より病理診断センターに届けられた後、我々が組織とゴム板との間に隙間を空け、貼り付けた面、漿膜面からも固定液が浸透しやすいようにしている(図4d)。また、隆起性病変も全体が浸かるように注意している(図4e)。

乳腺のように厚みがあり、かつ大きな臓器、脂肪が多い臓器は固定液が内部まで浸透しにくいいため、図4fのように入割が重要になる。

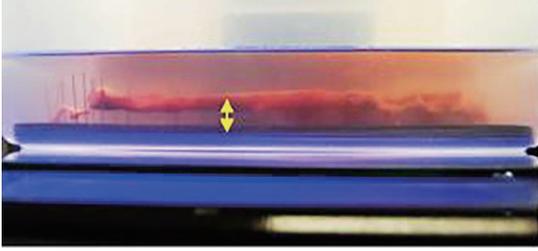


図4d

組織とゴム板との間に隙間を空け、貼り付けた面からも固定液が浸透しやすいようにしている。



図4e 隆起性病変

組織全体が固定液に浸かるようにしている。



図4f 乳腺

脂肪が多い臓器は固定液が組織内部まで浸透しにくいいため、入割している。



図4g 肝臓

充実性臓器は固定液が浸透しにくいいため、割面を多く入れ、ゴム板と組織の間にガーゼを挟んでいる。

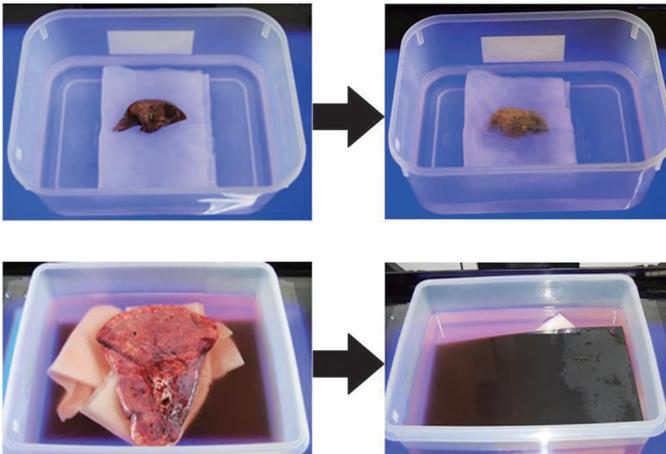


図4h 肺

気管支内に固定液を注入し、組織全体が固定液に浸かるよう表面をガーゼ等で覆い、ゴム板でおさえている。

肝臓等の充実性臓器でも固定液が浸透しにくいいため、割面を多く入れる必要がある。さらに図4gの検体では、執刀医が固定液の浸透をよくするためゴム板と組織の間にガーゼを挟んでいる。

肺では固定の促進と形を整えるため、執刀医が

気管支内に固定液を注入する。また、肺は空気を大量に含んでおり固定液に浮かんでしまうため、検体全体に固定液が行き渡るように表面をガーゼ等で覆い、ゴム板でおさえる等の処理後、提出される(図4h)。

## ま と め

病理標本作製の中で、ホルマリンによる固定が一番重要な作業工程といっても過言ではない。特に分子病理診断においては、固定不良により解析に用いるDNA・RNA・タンパク質のクオリティーが極端に低下し、結果に影響を及ぼす。FFPE検体を用いた分子病理診断は今後も増加していくと考えられ、正確な診断のためには日常業務での適切な標本作製が不可欠である。デジタル化の進む医療現場において、病理診断センターでの業務は手作業の占める割合が高いが、患者の有益となるよう臨床科や各方面と益々協力し、日常業務に邁進していきたい。

## 参 考 文 献

- 1) 田中伸哉, 西原広史(編集):がんゲノム病理学. 文光堂. 2021.
- 2) 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会(監修):病理検査技術教本. 丸善出版. 2017.
- 3) 一般社団法人 日本病理学会(編集):ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 羊土社. 2019.

---

論文受付:2023年6月26日 論文受理:2023年7月20日