

ORIGINAL ARTICLE

マイクロウェーブ処理ホルマリン固定後の二糖類液浸漬法による  
含気型微小肺癌の術中病理診断の検討  
—容易に部位が同定でき断端評価も確実な迅速診断法の検証—

細田 裕<sup>1</sup>・川原 譲<sup>2</sup>・若山 恵<sup>3</sup>・篠原直宏<sup>4</sup>

Microwave-assisted Frozen Sectioning Followed by Disaccharide Steeping  
Improved Pathological Diagnosis During Surgery  
for Small Adenocarcinoma of the Lung

Hiroshi Hosoda<sup>1</sup>; Yutaka Kawahara<sup>2</sup>; Megumi Wakayama<sup>3</sup>; Naohiro Shinohara<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Division of Thoracic Surgery, <sup>2</sup>Division of Diagnostic Pathology, Tokyo Kyou Sai Hospital, Japan; <sup>3</sup>Department of Pathology, Toho University Omori Medical Center, Japan; <sup>4</sup>Division of Clinical Pathology, Hokushin General Hospital, Japan.

**ABSTRACT** — **Objective.** It is difficult to accurately define the size of lung lesions based on ground-glass opacities by computed tomography (CT), and diagnosis is usually made pathologically. Even the commonly use interpretations of prevalent frozen-section technique has some difficulties in the diagnosis detection of lesions appearing as ground-glass opacities, and in obtaining pathological information for a definitive diagnosis. In this study, we aimed to make a precise pathological diagnosis of lesions using the Noguchi classification, and accurately determine safe surgical margins by new fixation methods. **Methods.** We evaluated a microwave frozen section followed by sucrose steeping of small adenocarcinoma of the lung specimens intraoperatively. We examined 15 patients with early lung cancer undergoing video-assisted thoracic surgery with CT guidance followed by frozen-section examination. All resected lung specimens were fixed by an injection of 20% formalin solution that had been warmed by microwave irradiation to a minimum temperature of 65°C. Expanded and fully fixed specimens were cut into 2-3 mm sections, enabling easy detection of small lesions. Specimens were washed and steeped in 20% sucrose solution or trehalose solution for 30-60 seconds, to avoid crystallization of the water in the specimen, and then thin sliced sections were obtained using the usual cryostat method. All frozen specimens were compared with corresponding permanent sections regarding the diagnosis, the distance from the cut end of the specimen, fixation and staining ability, including immunohistochemical assessment. **Results.** All frozen section specimens were consistent with the corresponding permanent sections from the point of view of morphology. There was no significant difference in the distance from the lesion to the surgical margin on the lung specimens. **Conclusion.** The method described was not only helpful for locating small adenocarcinoma that cannot be detected by palpation, but also provided easy evaluation of its morphology according to the Noguchi classification, as well as the surgical margin.

(JLCC. 2011;51:67-71)

**KEY WORDS** — Microwave fixation, Sucrose steeping, Trehalose, Frozen section diagnosis, Lung cancer

Reprints: Hiroshi Hosoda, Division of Thoracic Surgery, Tokyo Kyou Sai Hospital, 2-3-8 Nakameguro, Meguro-ku, Tokyo 153-8934, Japan (e-mail: hosoda@tkh.meguro.tokyo.jp).

Received November 9, 2010; accepted January 24, 2011.

**要旨** — **目的.** CTで発見されるすりガラス状陰影 (GGO)を呈する微小肺癌様病変の診断は結局、病理組織

診断に依存する。しかし、現在広く行われている凍結標本を用いた迅速病理診断では、含気臓器である肺は、一

国家公務員共済組合連合会東京共済病院 <sup>1</sup>呼吸器外科, <sup>2</sup>病理部; <sup>3</sup>東邦大学大森医療センター病理部; <sup>4</sup>JA 長野厚生連北信総合病院病理検査科。

別刷請求先: 細田 裕, 国家公務員共済組合連合会東京共済病

院呼吸器外科, 〒153-8934 東京都目黒区中目黒2-3-8 (e-mail: hosoda@tkh.meguro.tokyo.jp).

受付日: 2010年11月9日, 採択日: 2011年1月24日。

度割を加えると虚脱し、切除した肺のどこに病変があるのか特定できない場合がある。このような症例に対して我々はマイクロウェーブ処理ホルマリン固定と二糖類液（蔗糖またはトレハロース）浸漬法で術中病理診断法を行っている。今回その有用性について評価した。方法。我々の施設において過去5年間に行ったCTガイドマーキング併用鏡視下肺部分切除症例15例について検討を行った。切除標本は、切除後ステープラーをはずさず注射器で20%ホルマリンを十分注入する。マイクロウェーブを照射加熱し65℃まで加温し、2~3mm厚で連続切片として切り出す。これにより、病変は容易に発見できる。病変部の切片を20%蔗糖液（現在は20%トレハロー

ス溶液）に浸漬した。次いで通常通りクライオトームで薄切し、これを迅速診断とした。一方対応する面の標本はそのままパラフィン包埋切片とし、後日その診断ならびに、断端の距離の計測を行った。結果。迅速標本における野口分類を含む病理診断ならびに、切除縁の断端距離などに差はなく、ほぼ同等のものと評価できた。考察。我々の鏡視下部分切除に際して行っている迅速診断法は、病変の検出、野口分類を含む病理診断、病巣から切除までの距離の評価では非常に有用と思われた。

索引用語——マイクロウェーブ固定、蔗糖浸漬、トレハロース、凍結標本、肺癌

## 緒言

近年、画像機器の急速な発展によって画像診断や手術の方法に関しては、さまざまな工夫がなされている。当施設においても肺癌検診におけるヘリカルCTや人間ドックなどで10mm前後の微小の含気型腺癌が頻繁に見つかるようになってきている。このような症例に対して、すべて胸腔鏡下肺部分切除などの手術を行うことはコンセンサスを得られた方法ではないと考えられる。しかし微小病変については結局病理診断を経なければ結論を出せないこともまた事実である。我々は、このような症例に対して、CTガイドマーキング併用胸腔鏡下肺部分切除を行ってきたが、手術に際し、これまで行ってきたマイクロウェーブ処理ホルマリン固定と、蔗糖溶液浸漬法で凍結標本を作製する微小含気型肺癌の迅速病理診断法の検証を行った。

この診断法の必要性は次の点から生まれた。

1. CTガイド下マーキングをしていても、実際には位置がずれることが多く、微小病変検索に、ストレスを感じる。発見不能でなくとも、かなり病巣を損傷することがある。
2. 通常の迅速診断法では、野口分類<sup>1</sup>が難しい。（上記の理由も関与）
3. 非固定凍結標本では切除断端の評価が不正確であるため、根治性の評価ができない。
4. マイクロウェーブを使用したホルマリン固定のみでは、肺胞内の水分は氷晶化してクライオトームによる薄切切片の作製が困難である。

## 対象

2004年6月から2008年11月までに当院で手術を行った肺癌症例のうち、切除標本の触診で、病変部位の

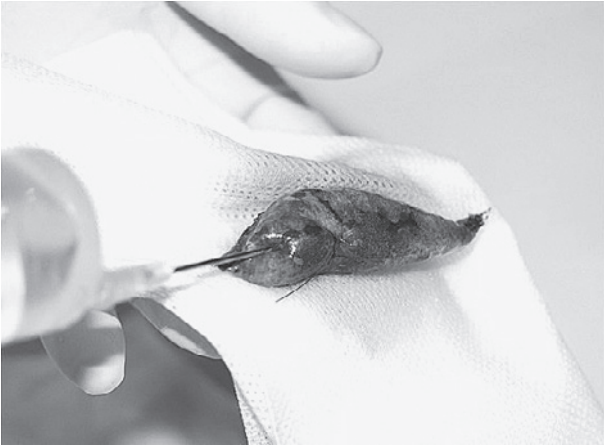
特定が困難と予想された肺野末梢型、小型肺癌症例15例を対象とした。今回の症例に関しては他院を含め、2年以上CTでフォローされ、患者側の希望にて手術を選択した症例で、かつ、病理学的特徴、予想される経過などに関して十分なインフォームドコンセントを得た症例についてのみ検討を行った。

## 方法

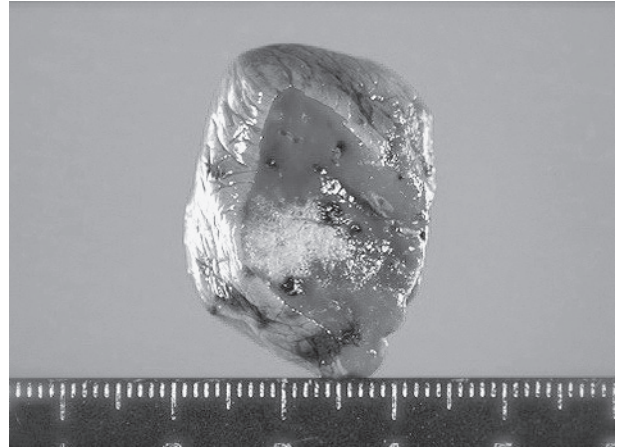
触診では局在を確認しにくいと思われる病変を対象（Figure 1）としているため、全例、CTガイド下にマーキングを行ってから、胸腔鏡下に病変を自動縫合器で切除（楔状部分切除）をしている。切除された肺に自動縫合器のステープルのついたまま、シリンジを用いて20%緩衝ホルマリンを注入し（Figure 2）、十分に肺を膨張させる。そしてビーカーなどの耐熱容器に入れ、マイクロウェー



Figure 1. CT scan reveals a ground-glass opacity, which was not detected by palpation, in the left upper lobe.



**Figure 2.** Injection of 20% formalin into the resected specimen.



**Figure 4.** A small adenocarcinoma can be seen on the cut surface of the specimen.



**Figure 3.** Microwave irradiation of the specimen, and fixation for 3 minutes at around 65°C.



**Figure 5.** Steeping in 20% saccharose or trehalose solution reduced the water crystallization of the lung specimen. This step yielded adequate frozen sections even after formalin fixation.

ブオーブンに入れ 500 W, 80 秒加温し, 65°C 程度で急速固定を行う (Figure 3). 固定後, 2~3 mm で切り出し, 病巣を発見する (Figure 4). そして切除断端の評価を行いながら, 20% 蔗糖 (またはトレハロース) 溶液に浸漬する (Figure 5). これにより, 凍結時の氷晶 (クリスタル) 形成を防止する. この工程がないと, 通常のクライオスタートによる薄切ができない. 蔗糖溶液を軽くぬぐった後, 凍結用包埋剤 (OCT コンパウンド) に包埋して, 液体窒素で凍結する. 十分凍結し, 通常通り, クライオトームで薄切が可能である.<sup>2</sup>

ホルマリン加温固定の場合, スライドガラスから脱落しやすいので, シランコートのスライドガラスを使用し, 脱水, 染色を行い, 検鏡する.

## 結果

対象症例は 15 例で, 男性 : 女性 = 7 : 8 であった. 組織型は気管支肺胞上皮型 (BAC) が 14 例, 乳頭状腺癌が 1 例であった. 野口分類では type A 6 例, type B 5 例, type C 2 例であった.

腫瘍の大きさは, 6.0~22.0 mm で平均  $11.7 \pm 5.4$  mm であった. 凍結標本における切除断端距離は  $9.0 \pm 4.0$  mm, パラフィン標本における切除断端距離は  $9.3 \pm 3.7$  mm であった (Table 1).

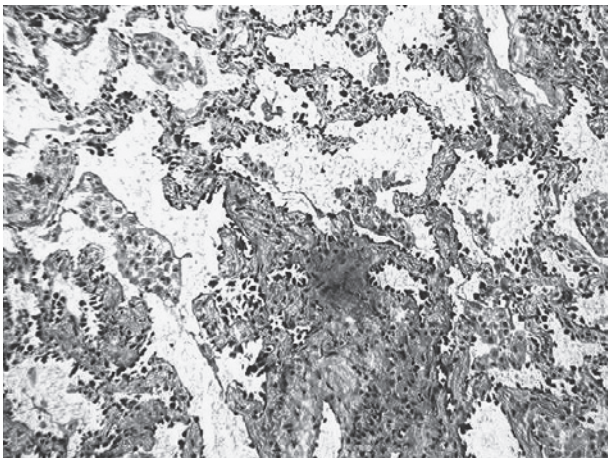
病巣の探索について, マイクロウェーブ処理ホルマリン固定法を用いた術中迅速診断では, 触診で局在が不明確な病変について, 検出率は 100% で, 診断不能の症例



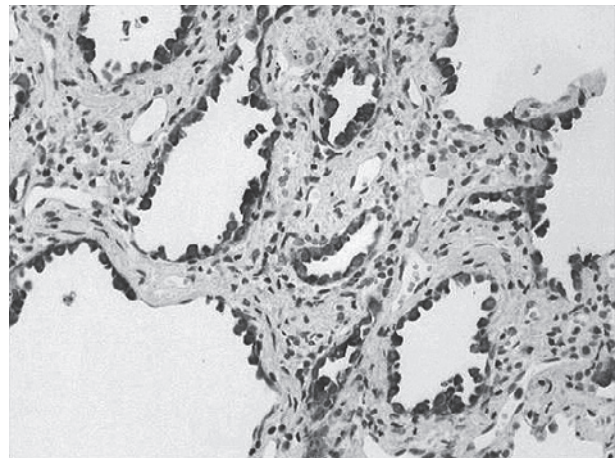
**Table 1.** Patient Characteristics

Case	Age	Gender	Pathology	Noguchi classification	Maximum tumor dimension	FS margin	PS margin	Final procedure	Multiple lesions
1	54	f	BAC	A	9 mm	8 mm	12 mm	partial resection	
2	71	f	BAC	B-C	9 mm	6 mm	6 mm	lobectomy	+
3	41	m	BAC	A	6 mm	8 mm	10 mm	partial resection	
4	54	f	BAC	A	15 mm	6 mm	9 mm	segmentectomy	+
5	64	f	BAC	B	8 mm	7 mm	9 mm	partial resection	
6	44	f	BAC	A	7 mm	11 mm	16 mm	partial resection	
7	65	f	BAC	A	6 mm	5 mm	6 mm	partial resection	
8	58	m	BAC	A	6 mm	9 mm	8 mm	partial resection	
9	78	f	BAC	B	10 mm	11 mm	10 mm	partial resection	
10	58	f	BAC	B-C	15 mm	3 mm	3 mm	lobectomy	
11	68	m	PAP	C	15 mm	16 mm	16 mm	lobectomy	
12	70	m	BAC	C	20 mm	7 mm	6 mm	lobectomy	
13	82	m	BAC	B	18 mm	18 mm	13 mm	partial resection	
14	60	m	BAC	B	10 mm	12 mm	7 mm	partial resection	
15	66	m	BAC	B	22 mm	8 mm	9 mm	lobectomy	+
62.2		m 7, f 8*			11.73 mm	9.0±4.0 mm	9.3±3.7 mm	9 P, 5 L, 1 S†	

\*m: male, f: female, †P: partial resection, L: lobectomy, S: segmentectomy.



**Figure 6.** Frozen section: microscopic image of a frozen section (hematoxylin-eosin [HE] stain ×10) reveals the ground-glass opacity to be bronchioloalveolar carcinoma. The lesion measured 8 mm in maximum dimension.



**Figure 7.** Immunohistochemical staining of the frozen section was easily performed with CEA. CEA: carcinoembryonic antigen.

はなかった。

薄切前に蔗糖液浸漬工程を省略すると、標本が水晶化して、検鏡可能な切片の作製は不可能であった。

切除断端の距離評価に関しては、凍結標本と、パラフィン包埋標本で、ほとんど差はなく (paired t-test:  $p=0.654$ )、ほぼ同等な評価が可能であった。迅速診断後の永久標本では HE 染色 (Figure 6) のみならず、CEA 免疫染色 (Figure 7) や EVG 染色性も問題なかった。

## 考 察

肺野末梢型の小型肺癌 (特に 1 cm 前後の ground-glass opacity; GGO) の病変を発見したらすぐに切除することは、risk-benefit の見地から必ずしも推奨される方法とはいえない。実際に経過を観察していると、2 年以上全く変化しない病変も多いうえ、炎症や forcal fibrosis であった例もある。一方、野口分類<sup>1</sup>をふまえた画像診断法の精度も十分と考えられ、<sup>3</sup> 早期の微小腺癌 (野口 A~B 型) では、縮小切除が行われている。<sup>4,6</sup> また、近年の報告で、腺癌の micropapillary pattern 型や、mixed sub-

type など、画像診断上は比較的小さな GGO を呈しているにもかかわらず、予後不良な例もあり<sup>7</sup> 可及的速やかな診断と治療を要する場合もある。従って、必要な場合に的確かつ簡便な方法で術中迅速病理診断が可能かどうかは重要な問題となってくる。

触知できない病巣切除標本における病巣の探索に、レーザービームと CT を用いた標本の 3 次元的切り出し法などの報告<sup>8</sup> も見られるが、特殊な施設のみに限定されると考えられる。また迅速診断における野口分類診断法<sup>1</sup> についても組織構築の評価が重要であるから、虚脱した肺では特殊な経験が必要と考えられる。術中迅速病理診断に際して迅速弾性線維染色を行い、線維化の程度を評価する方法なども報告があり<sup>9</sup>、含気型肺癌病巣を上手く切り出した場合は優れた方法と考えられる。

切除断端の評価に関しても、虚脱肺の迅速標本では、断端の洗浄細胞診で実績を出している施設もあるが<sup>10</sup>、特殊な施設での難易度の高い検査であると考えられる。

我々は、肺の胸腔鏡下生検ないし切除において、自動縫合器を用いて部分切除した肺標本を術中診断するにあたり、CT マーキングの精度やマーカーの術中 migration の経験、すなわち必ずしもマーカーは腫瘍近傍にないという問題、標本に割を入れ、肺が虚脱すると、病変が行方不明になるという問題、虚脱肺では組織学的に切除断端の評価が難しいといった問題を解決すべく、臨床的に必要な病理学的情報を簡便にかつ的確に得ることを目的として工夫を行った。

マイクロウェーブ処理ホルマリン固定法自体は、通常の凍結標本と比べてその利点について報告がなされている<sup>11,12</sup>。しかし含気型の肺病変における問題は、マイクロウェーブ処理ホルマリン固定後の肺胞内の水分が凍結した組織の氷晶化であった。クライオトームでは氷晶を多量に含む組織の薄切は非常に困難であり、野口分類<sup>1</sup> の正確な評価は期待できなかった。これを可能にしたのは、蔗糖液によるわずか 30~60 秒の浸漬によるもどし工程であり、非常に単純な工程の追加のみで容易な標本作製が可能となった。

第 1 例目の報告<sup>2</sup> 以来、少しずつ工夫を重ねてきたため氷晶防止の蔗糖液や、ホルマリン溶液濃度などが現在と異なるが、基本的な作業工程にはほぼ変更なく 10 年を経ている。また、現在は蔗糖液浸漬の代わりに、20% トレハロース溶液を用いた浸漬法を導入しているが、切片作製時の凍結標本の粘性を低減することができ、さらに切片の作製が容易となった。染色性にも問題はない。また、最近ではマイクロウェーブ処理によるホルマリン固定標本でも遺伝子の解析なども可能になってきており、培養が必要な病変以外は、局在、組織構築診断、断端評

価がすべて簡便にかつ迅速に行うことができている。迅速標本と後日作製した通常のパラフィン包埋標本を比較した結果でも、野口分類や腫瘍の大きさ、断端距離などにおいて差はなく、必要な免疫染色による評価も問題なかった。以上の観点から、ごく微小な肺癌、特に含気型の早期腺癌の探索法と、臨床的な病理診断法にとって有用な方法と考えられた。

留意点として、加熱ホルマリン蒸気による環境汚染に対しては十分な設備上、安全管理上の注意と対策が必要であることはいうまでもない。

## REFERENCES

1. Noguchi M, Morikawa A, Kawasaki K, Matsuno Y, Yamada T, Hirohashi S, et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*. 1995;75:2844-2852.
2. 細田 裕, 篠原直宏, 小嶋紀子, 丸山光一, 半田幸雄, 内田守道, 他. 早期肺癌の術中迅速病理診断における工夫. 胸部外科. 2001;54:913-916.
3. 瀬戸真由美, 栗山啓子, 木戸尚治, 黒田知純, 東山聖彦, 児玉 憲, 他. 小型腺癌の thin-section CT と野口らの病理組織学的分類との比較検討. 肺癌. 1997;37:841-848.
4. 前原孝光, 田尻道彦, 石和直樹, 石橋 信, 尾下文浩, 山田耕三, 他. 肺野末梢型小型腺癌に対する積極的縮小手術の試み. 肺癌. 1999;39:145-151.
5. 大和 靖, 相馬孝博, 吉谷克雄, 土田正則, 青木 正, 渡辺健寛, 他. 線維化巣のほとんどない肺野末梢型細気管支肺腺癌切除例の検討—積極的縮小手術の可能性について. 肺癌. 1998;38:109-115.
6. 田尻道彦, 亀田陽一, 前原孝光, 石和直樹, 野田和正. 腫瘍最大径 10 mm 以下の末梢部微小肺癌における、臨床病理組織学的特徴と予後及び縮小手術の適応に関する検討. 肺癌. 1998;38:847-853.
7. Suzuki K, Asamura H, Kusumoto M, Kondo H, Tsuchiya R. "Early" peripheral lung cancer: prognostic significance of ground glass opacity on thin-section computed tomographic scan. *Ann Thorac Surg*. 2002;74:1635-1639.
8. 綾部貴典, 松崎泰憲, 清水哲哉, 原 政樹, 富田雅樹, 榎本雄介, 他. 肺癌すりガラス状陰影の部位同定の工夫. 胸部外科. 2006;59:377-382.
9. 蔦 幸治, 横瀬智之, 石井源一郎, 川村公彦, 小林幸弘, 岩崎聖二, 他. 術中迅速病理診断における肺癌の線維化巣評価の工夫. 病理と臨床. 2004;22:91-94.
10. 東山聖彦, 尾田一之, 岡見次郎, 前田 純, 児玉 憲, 中山富雄, 他. 肺癌手術における術中洗浄細胞診. MOOK 肺癌の臨床 2008~2009. 東京: 篠原出版新社; 2008:117-128.
11. Kennedy A, Foulis AK. Use of microwave oven improves morphology and staining of cryostat sections. *J Clin Pathol*. 1989;42:101-105.
12. Reed W, Erichsen A, Roald B. Rapid supplementary fixation in frozen sections: microwave versus conventional fixation. A double-blind comparative study. *Pathol Res Pract*. 1991;187:824-827.