

INVITED REVIEW ARTICLE

肺癌診断に必要とされる適切な病理検体の取扱い

蔦 幸治¹

Handling of Appropriate Histological Samples Required to Make an Accurate Lung Cancer Diagnosis

Koji Tsuta¹

¹Department of Pathology and Laboratory Medicine, Kansai Medical University, Japan.

ABSTRACT — With the progression of molecular diagnostic methods, histological samples have come to be used as a source for the histological diagnosis as well as for detected protein expression and genomic alterations, which are treatment prediction factors. A formalin-fixed paraffin-embedded sample allows for easy handling in daily practice and long-term storage in most pathology departments. However, fixation with chemical modification using formalin is a well-known mechanism that affects the protein and genetic quality. We must also examine a number of factors (such as cold ischemic time, composition of formalin, quantity of the fixative, fixation time, and paraffin temperature) and determine the appropriate conditions in order to minimize the negative effects on constructing the material.

(JLCC. 2019;59:123-127)

KEY WORDS — Formalin fixed paraffin-embedded sample, Cold ischemic time, Composition of formalin, Fixation time, Paraffin temperature

Corresponding author: Koji Tsuta.

要旨 — 近年の検出技術の進歩とともに、病理検体は形態診断のみでなく、治療予測因子であるタンパク質発現や遺伝子診断の重要な情報供給源となってきた。日常診療での取扱いや長期保管などの観点から病理部では主にホルマリン固定パラフィン包埋検体を使用されているが、ホルマリンの化学修飾による固定はタンパク質や遺伝子の質に影響を与えることが知られている。それ以外

にも多数の影響因子（冷阻血時間、固定液の種類、固定時間、パラフィン温度）とそれらの適切な条件を知ることによって、標本作製工程で起こりうる負の影響を最小限に抑えた検体の作製が可能となる。

索引用語 — ホルマリン固定パラフィン包埋検体、冷阻血時間、固定液の種類、固定時間、パラフィン温度

はじめに

生検検体や手術検体の病理診断には、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE) が顕微鏡による形態観察での構築の保持が良好であることから広く利用されている。また、FFPE 検体は凍結検体と比較し取扱いが容易で長期間の保管も可能であり、コスト面でも大きな利点がある。さらに、組織型推定や治療薬選択に用いられる免疫組織化学的手法も FFPE 検体で染色条件が最適化されたものが多く、現在、多くの免疫組織化学的手法に使

用されている。一方、後述するごとく FFPE の欠点のために研究的な遺伝子解析には凍結検体を使用されることが多い。

近年、次世代シーケンサー (NGS) などの遺伝子解析技術の向上により、FFPE 検体の欠点である変性の加わった核酸からも網羅的な遺伝子解析が可能となり、FFPE 検体は遺伝子情報を提供する重要な検体の一つとしても認識されてきている。つまり、良好な形態像の保持、免疫組織化学的手法のための抗原性の保持、遺伝子解析のための DNA、RNA の保持などの多くの用途に、

¹関西医科大学臨床病理学講座。

論文責任者：蔦 幸治。

同時に使用可能な標本作製が必須である。

しかしながら、ホルマリンによる固定はアルデヒドにより核酸やタンパク質に化学的および物理的修飾を引き起こすことで、固定を行っている。生体分子の変性を最小限にとどめるFFPE標本作製が望まれるが、適切なFFPEブロックの作製には多数の影響因子が知られており、これらの把握は標本作製担当者およびその管理者において不可欠といえる。固定前工程では冷阻血時間、固定工程では固定液の量・固定時間、固定後工程では標本作製工程・保管方法などが影響する¹²と考えられており、それぞれの工程での検体取扱い上の注意点について解説を行う。

固定前工程

(A) なぜ固定が必要なのか

組織や細胞は血流が遮断されたと同時に自己融解が始まる。固定とは組織や細胞の自己融解を抑えて、生きていた状態になるべく近い状態に保つ処置で、細胞形態と組織構造の安定化、タンパク質分解酵素の不活性化により生きている状態の構造と物性をそのまま維持することを目的としている。つまり、阻血などによる生命活動の停止と同時に自己融解は進行していくので、可及的速やかに固定を開始することが重要である。

固定には物理固定法と化学固定法があり、物理固定法は急速凍結や乾燥が知られている。化学固定法は凝固型固定と変性型固定があり、凝固型固定は細胞診検体で主に用いられるアルコール固定が、変性型固定は生検検体や手術検体で用いられるホルマリン固定が代表的な方法である。

(B) 冷阻血時間

臓器摘出から固定までの時間を冷阻血時間というが、それを最小限にすることが自己融解による変性を最小限にするためには重要である。実際、乳腺切除検体では固定が1時間遅れることでhuman epidermal growth factor 2受容体の発現が11%の症例で陰性化することが報告されている。³ また、神経内分泌腫瘍などの悪性度評価に重要な分裂像は生検検体よりも手術検体で増加する傾向があるが、その原因の一つとして冷阻血時間が影響するとの報告がある。⁴

以上より、手術検体を含むホルマリン固定検体はすべて、可及的速やかに固定処置が行われることが理想であるが、摘出後、手術手技の継続などで速やかな固定が困難な場合には、検体を冷蔵庫などで4℃下で保管することで検体の変性を最小限にできる。しかしながら、冷蔵保管は遅くとも3時間以内にとどめて、適切な固定を行うことが望ましい。⁵ 冷阻血時間の短縮は臨床各科の協力が重要である。

固定工程

(A) ホルマリン固定とは

ホルマリンは、ホルムアルデヒドの水溶液のことで、無色透明・刺激臭があり、強力な架橋反応を起こすため、生体に有害な液体である。生物の組織標本作製のための固定・防腐処理に広く用いられている。

ホルマリンに含まれるホルムアルデヒドは主に組織中のタンパク質のアミノ基に結合し、さらに架橋形成することで、タンパク質の立体構造を損なわせ、酵素活性、輸送、分泌などの様々な生物活性を働かなくさせる作用により種々の分子が固定され、機能は完全に停止する。タンパク質同様に核酸の塩基部分のアミノ基とも結合し、架橋反応を引き起こし、核酸の断片化や核酸の損傷が生じる。

(B) ホルマリンの組成

ホルマリン溶液には、ホルムアルデヒドの濃度や緩衝液の有無の組み合わせで様々な種類のもので販売されている。ホルマリンの浸透力からみると、濃度が50%までは濃度が高いほど固定力が強く早く固定できるが、濃度が高いと表面の硬化が進み内部が未固定になったり、過硬化による細胞構造の変化により検体にダメージを与えることが知られている。このため、病理組織の固定には濃度10%（3.7%ホルムアルデヒド）が理想的である。

ホルムアルデヒドは非緩衝水溶液中では徐々に酸化されてギ酸を生じ、pH4程度の酸性を示す。この酸性化による影響を軽減する目的で、リン酸緩衝液を加えることによってpHを7.4~7.6程度に調整されたものが中性緩衝ホルマリンと呼ばれている。また、現在使用されている複数のコンパニオン診断においては、10%中性緩衝ホルマリンの使用が推奨されている。以上の点からは、日常の検体固定には10%濃度の中性緩衝ホルマリンを使用すべきであるが、平成29年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書 病理検査サーベイ報告の1129施設からの回答では、10%中性緩衝ホルマリンの使用は生検検体で58.9%、手術検体で46.1%にとどまっており、国内の多くの施設ではコストの面や浸透性の面などから、非緩衝のものや高濃度のものが使用される傾向があるようで改善が望まれる。

(C) 検体の大きさとホルマリン量

ホルマリンの浸透は1mm/時間程度であることを考慮し、切り出しまでに十分な固定が行える程度の厚みまで、固定時に検体に入割や注入固定を行うことが望ましい。

肺では気管支からの注入固定を行うことが重要であるが、膨らみの悪い領域には注射器による肺実質への注入や、肺の重量が重い検体では肺胞内の滲出が多いことが

想定されるので、気管支からの注入では固定が不完全になる可能性が高く、肺動脈などの血管からの注入を併用することも推奨される。

固定液の量も固定に影響を与えると考えられ、検体の大きさに比して10倍量を用いることが望ましい。また、ホルマリンの使用は1検体につき1回とすべきである。ホルマリンの使い回しは検体に含まれる体液によりホルマリンが希釈されて濃度が低下するのみでなく、腫瘍細胞のコンタミネーションの可能性も考慮されるので、使い回しは避けるべきである。

これらの検体処理は、臨床医任せの施設が多いように思うが、病理医が固定工程に積極的に関与すべきと筆者は考えている。

(D) 固定時間

用いられる各コンパニオン診断薬の推奨の固定時間を遵守するのは当然であるが、残念ながら、各コンパニオン診断薬により固定時間に幅が認められる。基本的には、6～48時間の固定を行うことで多くの診断薬の推奨時間内になると考えられる。原則として、生検や手術検体も含め、翌日に切り出しなどの処理を行うことが望ましいが、生検などの小さな検体の場合は、前述のごとく、ホルマリンの浸透は1mm/時間程度であるので、過固定にならないような配慮も重要である。正確な固定時間を守るために、施設によっては固定開始時間を記載するような工夫も行われている。

DNAは緩衝ホルマリン溶液を用いても、72時間を超える固定であると遺伝子の断片化が進行し、遺伝子解析が困難な症例が増加することが知られている。⁵ また、断片化のみでなく、ホルマリン固定は加水分解に伴う脱アミノ化により、シトシンがウラシルに置換されPCR増幅反応でチミンが生成される、C>T置換が生じうる。この反応は固定時間の延長により増加し、72時間から顕著となることが知られている。⁶

固定は化学反応であるために、温度による影響を受ける。温度が高いほど固定は進行するが、温度が高いと未固定部分の変性が進行するので、室温での固定が標準的であるが、冬場などは室温が低下し固定不良になることがあるので注意が必要である。

日本国内では、ハッピーマンデーなどの影響で3営業日(72時間以上)切り出しが行われない施設も多いと考えられる。休日出勤などで対応することも一案であるが、各施設の運営母体にも大きく依存する問題でもあり、臨床医のみでなく技師、病院の運営部門を巻き込んだ対応策の構築が重要と考えられる。

固定後工程

(A) カセット詰め

手術検体は、カセットに入る大きさ・厚さで切り出しを行う。生検検体では、複数のコアを1カセットに詰めるとブロック庫のスペースの節約にはなるが、遺伝子解析に用いる検体の場合は、腫瘍を有さないコアが同一切片に含まれることによる野生型遺伝子を有する細胞の増加による目的遺伝子の希釈や、頻回の薄切によるブロック損耗に対応すべく、複数のカセットに分けてブロックを作製することが望ましい。⁷

また、小型の検体を認識しやすくするためにエオジン色素で検体をマーキングする施設があるが、fluorescence *in situ* hybridizationによる遺伝子検索でエオジンによる自家蛍光でシグナルの識別が困難になることがあるので、避けるべきである。⁸

(B) 脱灰処理

肺癌の主病巣ではあまり問題になることはないが、骨転移病巣が検索対象となる場合は脱灰処理に注意が必要である。脱灰には酸を用いた急速脱灰法とEDTAを用いた緩徐脱灰法が主に使用されているが、特に酸脱灰を行った場合は、DNA、RNAだけでなくタンパク発現も検出困難となることが多く、避けるべきである。EDTA脱灰はDNAの保存状態は良く、また免疫染色も可能な場合が多い。しかしながら、コンパニオン診断薬では、脱灰検体でのデータがないことから推奨されていないものもあるので、可能な限り骨片を除いた非脱灰標本作製が重要である。技師・病理医と臨床医との臨床情報の共有が重要であると考えられる。

(C) 脱水、透徹、パラフィン浸透、パラフィン包埋

カセット詰めされた検体は、アルコール脱水→透徹→パラフィン浸透→パラフィン包埋工程へ進む。脱水からパラフィン浸透の工程は自動化された器械で行われる施設が大部分を占めると考えられる。まず、アルコール脱水から開始されるが、ホルマリン固定が不良な状態でアルコール脱水工程を行うと、検体がアルコール固定となる可能性がある。ロシュ・ダイアグノスティクス社のベンタナOptiView ALK (D5F3) キットでは、アルコール固定検体でのALK発現の著減が報告されており、注意が必要である。

また、パラフィン包埋時の温度は60℃を超えないことがアジレント・テクノロジー社のPD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」キットでは指示されており、注意が必要である。

(D) ブロック選択

1細胞あたりDNAは6pg、RNAは20pg得ることができると考えられている。NGSのパネル診断では10ng

から 250 ng 程度の DNA 量が要求されるので、十分量の腫瘍細胞が含まれた検体を選択されなければいけない。また、変異検出には腫瘍細胞含有率 30% 以上、コピー数異常検出には腫瘍細胞含有率 50% 以上の検体であることが望ましいとされている。驚くことに、腫瘍含有量 20% をカットオフとした場合 38% の検体で腫瘍含有量を過剰評価しているとの報告がある。⁹ 病理医は腫瘍面積で腫瘍含有率を評価しがちで、炎症細胞の浸潤を過小評価する傾向が影響していると考えられる。面積ではなく腫瘍細胞数で含有率を判定するよう心がけるべきである。

(E) 薄切

薄切とはマイクロトームを使用し、パラフィンブロック検体を数 μm 程度の薄さに切る工程である。通常の組織切片作製や免疫組織化学的手法に用いる検体の薄切では、3~4 μm 厚の標本を作製することが多い。検査技師は組織を最大面で標本にするように指導されており、1 ブロックに複数検体が含まれているとブロックの損耗が起こりやすくなる。また、数 μm の厚さで均一な切片を得るためにはマイクロトームの刃とブロック面が平行になるようにブロック表面の荒削りを行う必要があるが、頻回の薄切の依頼はブロックの損耗につながるため注意が必要である。

遺伝子診断用の薄切ではマイクロトームの清浄を心がけ、検体ごとに刃を交換するなど既薄切検体からのコンタミネーションに注意することが大事である。また、技師の皮膚片の混入や、ブロックへの息吹きかけによる DNase 混入の可能性にも注意が必要である。

(F) ブロックの保管

タンパク質の保持は免疫組織学的な解析では、細胞質抗原は約 60 年とかなり古いブロックでも保たれていたが、核抗原と細胞膜抗原（特に CD31）は 15 年程度で抗原性の低下が報告されている。¹⁰

また、DNA の収量に関しては時間経過に依存しないとの論文があるが、収量が十分であっても断片化率が高くなると考えられる。¹¹ 抽出方法や解析手法により差が存在するが、おおむね 3 年以内の検体であれば変性の少ない検体が得られると考えられる。⁵

標本作製全般に関わる問題

(A) コンタミネーション

以前の検出機器の感度では問題にならなかったレベルのコンタミネーションが、高感度な装置を用いるゲノム医療では問題になることが考えられる。

ホルマリン固定では、複数検体の固定液が混在する固定槽では組織片の遊離・付着が起こりうる。また、タッパーなどで個固定を行っていてもホルマリンの使い回し

を行っている時、同様の遊離・付着が起こりうる。

切り出しの順序も重要で、非腫瘍性検体からの切り出しを行い、脆い腫瘍性病変の切り出しは最後に回すなどの工夫も重要と考えられる。症例ごとにピンセットや刃、まな板などの洗浄を心がけることも重要で、コストの問題があるがディスプレイ製品を使用することも考慮される時代になる可能性がある。

現状では対策が難しいが、パラフィン浸透装置内でのカセットからの検体の遊離・混入も問題になると考えられる。

薄切では、遺伝子解析用検体ではコンタミネーションや分解酵素の混入を避けるために、手袋・マスクの着用が必須である。また、1 検体の処理ごとに手袋やマイクロトームの清掃、刃の交換、水槽の水の交換が必要である。

実際、NGS の解析では 5% 以上の他の DNA の混入を来した症例は 3% で、検体 DNA 量が少ないものでコンタミネーションを起こすものが多いことが報告されている。¹² NGS 解析時には、ハプロタイプを同時に解析することでコンタミネーションに気づくことが可能で、フルプルーフだけでなくフェイルセーフな考えも合わせた病理検体処理が重要である。¹²

(B) 質の確認

前述のごとく、様々な因子の組み合わせで検体の品質が変化すると考えられるので、精度管理を行っていくことが重要と考えられる。

免疫組織化学的手法の質の管理には、陽性・陰性コントロールを染色時に入れるだけでなく、内因性コントロールを意識したブロック選択も重要である。

核酸は収量のみでなく質の確認が必須と考えられる。質の確認にはリアルタイム PCR による短鎖、長鎖アンプリコンサイズの増幅サイクル数の比 (Ct/ Δ Ct 値) や、近年 TapeStation (Agilent Technologies) など DNA では DNA integrity number (DIN) 値や RNA では断片の割合を示す DV200 (200 bp) が、質確認には有用と報告されている。これらの基準は、遺伝子検査前の各検体の質の確認のみでなく、定期的に検体のスクリーニングを行うことで、各施設の標本作製の問題点や低品質検体の原因究明に役立つと考えられる。

結 語

FFPE 検体で、概説の 3 項目の要求事項をより良質に保持するような八方美人的な固定液の開発が行われている。PAXgene[®] Tissue System (PreAnalytiX) はタンパクのクロスリンクを形成することがなく、同一組織で組織解析および高品質な RNA, miRNA, DNA の精製が可能な固定液である。種々の組織で有用性の検討が行われ、良好な HE 染色態度や良好な核酸の保持能力が報告され

ているが、免疫染色ではホルマリン固定標本と同等の染色性を示す抗体が多いが発現が低下する抗体も報告されている。¹³

また、固定できる検体は、大きさが4×4×10 mm 大までであり、コストも高く4℃以下での保管が推奨されるなどまだまだ問題が多い方法で、完全にホルマリン固定液を置き換える能力を有しているとはいえないようであるが、今後の改善や低コスト化が進めばホルマリン固定に置き換わる日が来る可能性も考えられる。

本論文内容に関連する著者の利益相反：葛 幸治 [講演料など] MSD, Cook Japan, 中外, ロシュダイアグノスティック [原稿料など] MSD [専門的助言・証言] SRL, アストラゼネカ

REFERENCES

- Groelz D, Sobin L, Branton P, Compton C, Wyrich R, Rainen L. Non-formalin fixative versus formalin-fixed tissue: a comparison of histology and RNA quality. *Exp Mol Pathol*. 2013;94:188-194.
- Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:4436-4443.
- Lee AH, Key HP, Bell JA, Kumah P, Hodi Z, Ellis IO. The effect of delay in fixation on HER2 expression in invasive carcinoma of the breast assessed with immunohistochemistry and in situ hybridisation. *J Clin Pathol*. 2014;67:573-575.
- Lehr HA, Rochat C, Schaper C, Nobile A, Shanouda S, Vijgen S, et al. Mitotic figure counts are significantly overestimated in resection specimens of invasive breast carcinomas. *Mod Pathol*. 2013;26:336-342.
- 小田義直, 畑中 豊, 桑田 健, 森井英一, 金井弥栄, 落合淳志. ゲノム診療用病理組織検体取扱規程. 初版. 日本病理学会; 2018. http://pathology.or.jp/genome_med/pdf/textbook.pdf
- Akbari M, Hansen MD, Halgunset J, Skorpen F, Krokan HE. Low copy number DNA template can render polymerase chain reaction error prone in a sequence-dependent manner. *J Mol Diagn*. 2005;7:36-39.
- Aisner DL, Rumery MD, Merrick DT, Kondo KL, Nijmeh H, Linderman DJ, et al. Do More With Less: Tips and Techniques for Maximizing Small Biopsy and Cytology Specimens for Molecular and Ancillary Testing: The University of Colorado Experience. *Arch Pathol Lab Med*. 2016 [Epub ahead of print].
- 若井 進, 横澤香倫, 中村祥子, 渋谷康雄, 古田 耕. 【病理診断に役立つ分子生物学】(第1部) 病理診断に役立つ分子生物学の手技と知識 FISH法. *病理と臨床*. 2011; 29(Suppl):28-37.
- Smits AJ, Kummer JA, de Bruin PC, Bol M, van den Tweel JG, Seldenrijk KA, et al. The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Mod Pathol*. 2014;27:168-174.
- Grillo F, Bruzzone M, Pigozzi S, Prosapio S, Migliora P, Fiocca R, et al. Immunohistochemistry on old archival paraffin blocks: is there an expiry date? *J Clin Pathol*. 2017;70:988-993.
- Watanabe M, Hashida S, Yamamoto H, Matsubara T, Ohtsuka T, Suzawa K, et al. Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods. *Exp Ther Med*. 2017;14:2683-2688.
- Sehn JK, Spencer DH, Pfeifer JD, Bredemeyer AJ, Cottrell CE, Abel HJ, et al. Occult Specimen Contamination in Routine Clinical Next-Generation Sequencing Testing. *Am J Clin Pathol*. 2015;144:667-674.
- Belloni B, Lambertini C, Nuciforo P, Phillips J, Bruening E, Wong S, et al. Will PAXgene substitute formalin? A morphological and molecular comparative study using a new fixative system. *J Clin Pathol*. 2013;66:124-135.