

試料解析研究計画のために 臨床医が知っておくべき 最低限の病理に関する基礎知識

国立がん研究センター東病院病理・臨床検査科
渡邊麗子

第22回JCOG臨床試験セミナー（中級編） 2020年3月15日 日曜日
国立がん研究センター中央病院 8F共用会議室より中継



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

臨床試験の流れ（病理検体を用いる場合）

- 立案・プロトコール作成



- 試料収集（前向き/後ろ向き）



- 試料解析・データ収集



- 発表・論文化



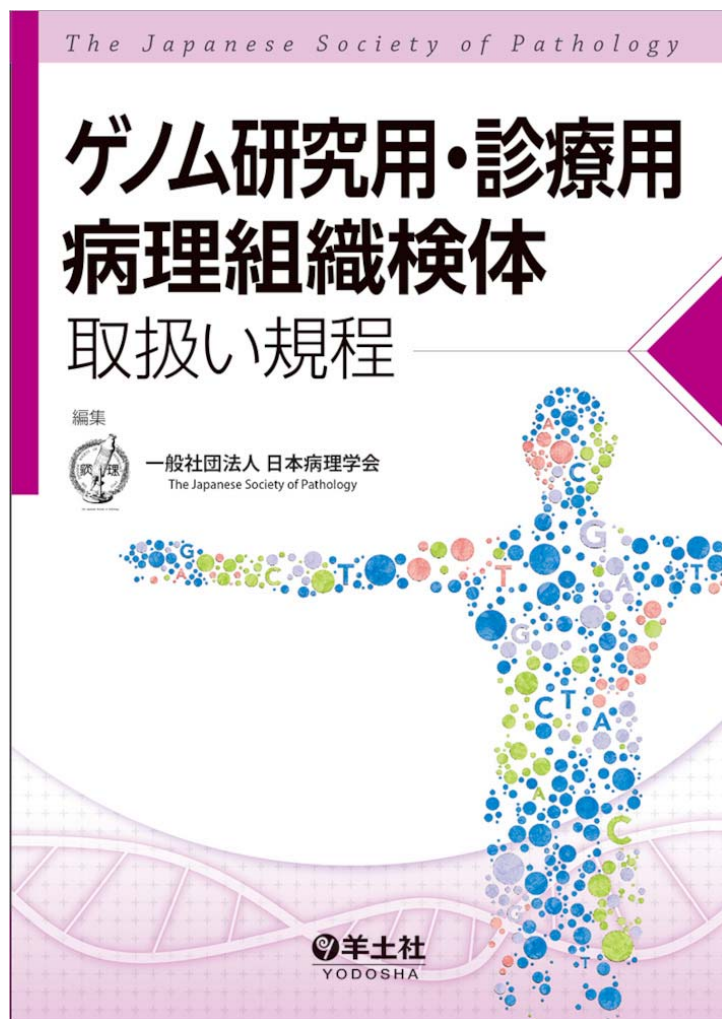
国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

ねらい

- 病理検体を扱う際に知っておきたいミニマムエッセンス
- 知っておいたほうが良い知識（「病理標本」の何たるか）
 - プロトコール作成に役立つ
 - 質の高い試料収集
 - 質の高い検討結果
 - 臨床現場にも応用可



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East



- <http://pathology.or.jp/genome/index.html>
- http://pathology.or.jp/genome_med/



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

本日のお話

1. 標本とは
2. 新鮮（生）標本とパラフィン（永久）標本
3. 新鮮標本と永久標本の検体取扱い方法
4. 病理中央診断（セントラルレビュー）
5. プロトコール作成の際の留意点



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

1. 標本とは



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

標本とは (Specimen)

- 統計学的には、**母集団の特性を推定するために抽出し調査対象とする部分集合**を指す。
- 自然科学：鉱物、動物、植物 （個体/群体）
- 医学生物学：（組織/細胞） . . .

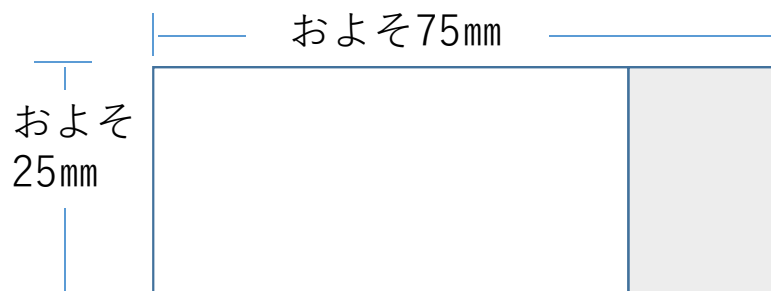
→ 繰り返し観察し、データ取得・保存を可能とする。



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

プレパラート（ドイツ語：Präparat）

- 顕微鏡観察を行うにあたり観察対象（試料）を検鏡可能な状態に処理したもの
- 「スライドガラス（グラス）」を使用＝“スライド”とも称される
- （英）Microscope slide



フロスト部（すりガラス状）

- ・ プレパラートの情報を記載
 - ラベル貼付
 - 直接記載（鉛筆は消えない）



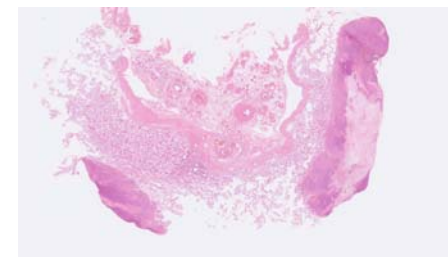
国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

プレパラートの作成方法

- 検体をスライドガラスの上に載せる v.s. 薄く切って載せる
 - 前者：細胞診
 - 後者：組織診（薄切）



- **固定処置：保存性**
- **染色処置：可視化**



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

病理標本とは

- 病理学的検索を目的に抽出されたサンプル
- 臨床現場→**病理検査室へ提出・処理されたもの**
- 検索対象：生体の**組織、細胞**
- 検索内容：**形態、タンパク質**発現、**核酸**（DNA, RNA）の状態



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

2. 新鮮（生）標本と パラフィン（永久）標本



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

病理標本作成過程

プレアナリシス
= (病理検査室前)

臨床医の先生の采配が重要

標本採取

搬送・受付

ホルマリン固定

脱脂・脱灰

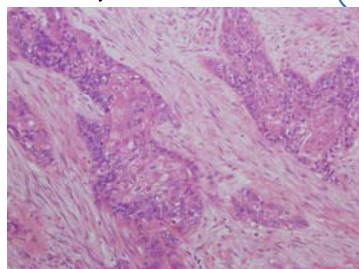
パラフィン包埋

薄切

脱パラフィン



H&E染色
(特殊) 染色



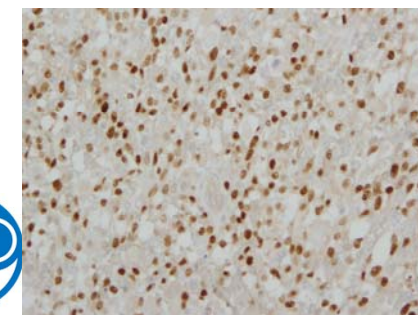
染色

抗原賦活 (酵素/加温処理)
一次抗体反応/二次抗体反応

脱水・透徹・封入

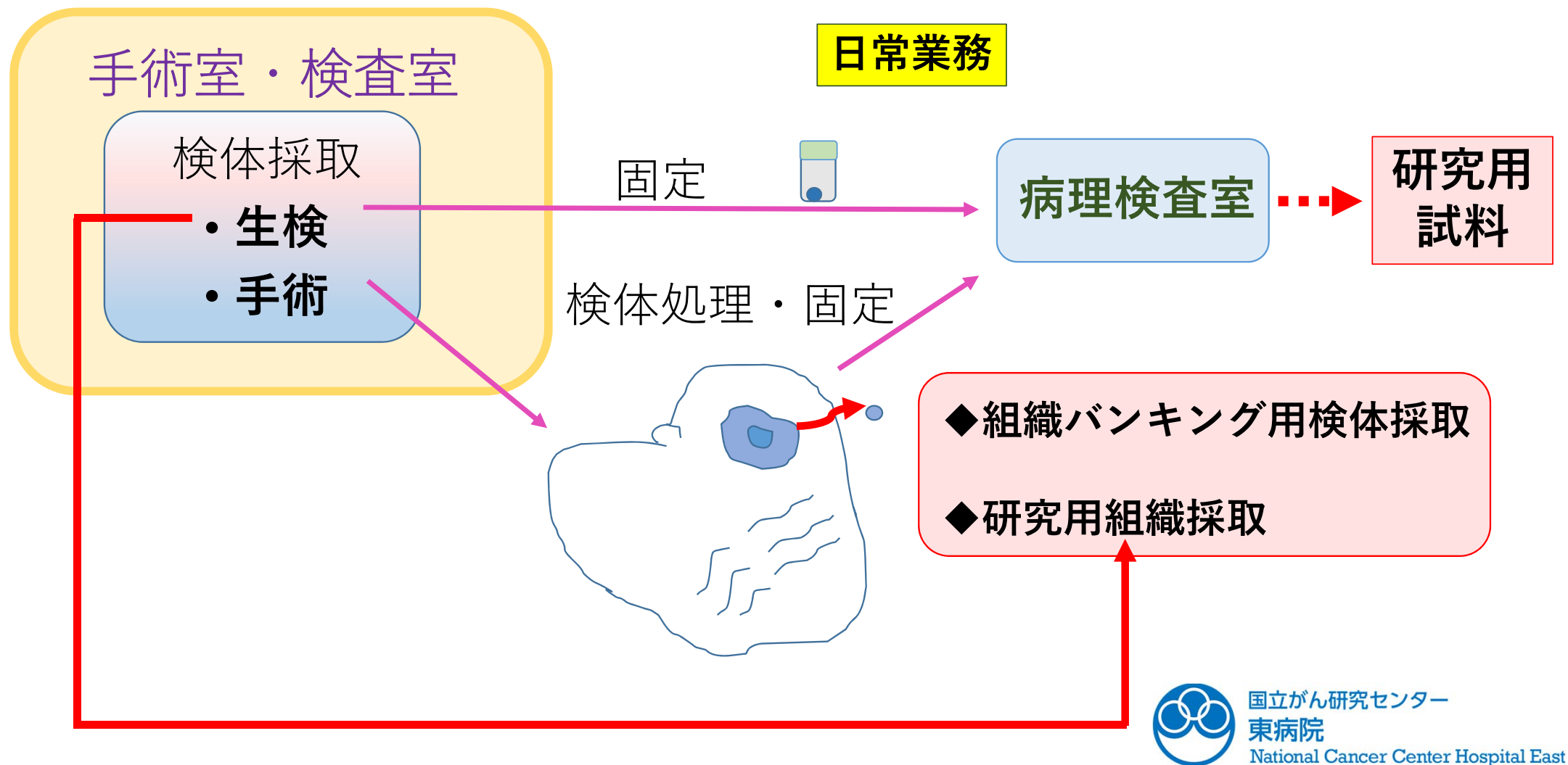
検鏡

免疫染色



East

新鮮標本採取



パラフィン永久標本

- パラフィン（＝ろう）で包埋した（＝固めた）標本
- 細胞間・中の水分がパラフィンで置換される
→ 保存性を持たせ、薄切することを可能とする
- 包埋：パラフィンや合成樹脂などで試料を固める作業



ホルマリン → エタノール → キシレン → パラフィン



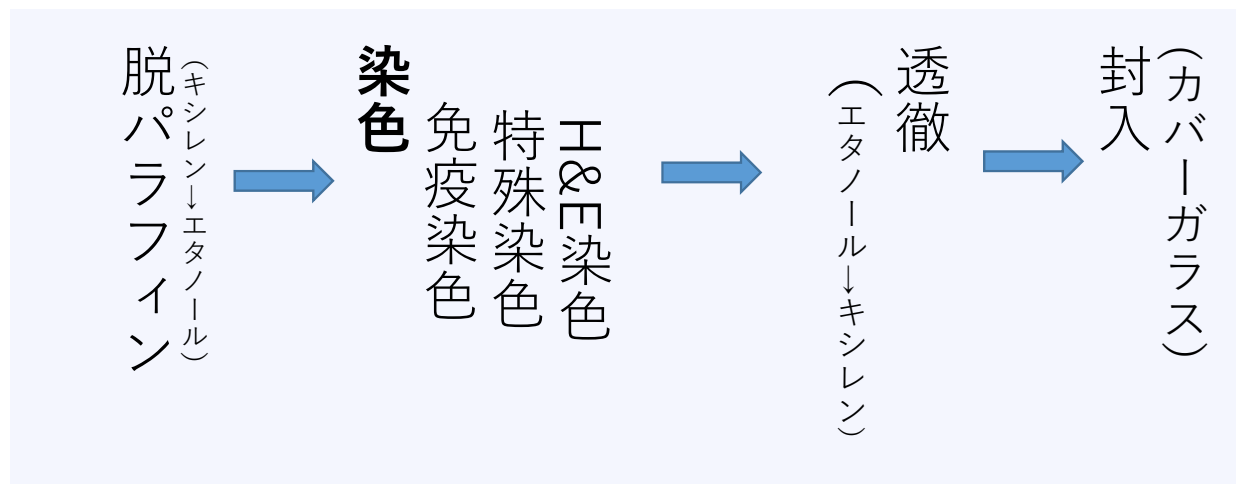
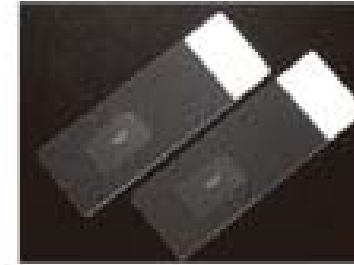
“パラフィンプロック”



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

薄切

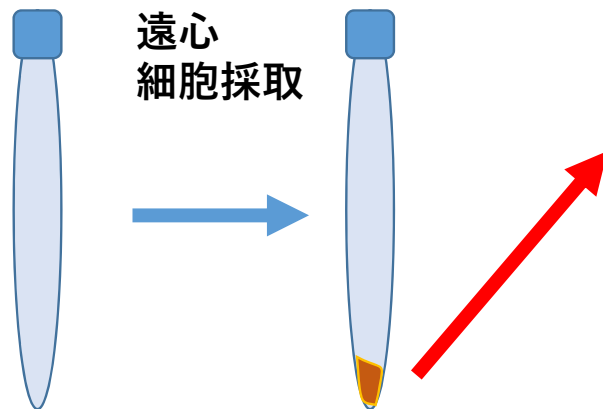
- ミクロトームで3～5 μm 厚さに切る
- スライドガラスの上に載せる（＝未染標本）
- 形態観察のためには「染色」を行う



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

細胞診

- 基本は**エタノール固定**=細胞をそのままスライドガラスへ（スメア、捺印 など）
- **体腔液**（胸水、腹水など）中の細胞を回収し、あるプロセスを経て「**永久標本**」として取り扱われることがある（**セルブロック**）。



- ホルマリン固定
 - パラフィン包埋
 - 薄切・染色
- ↓
- プレパラート作成



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

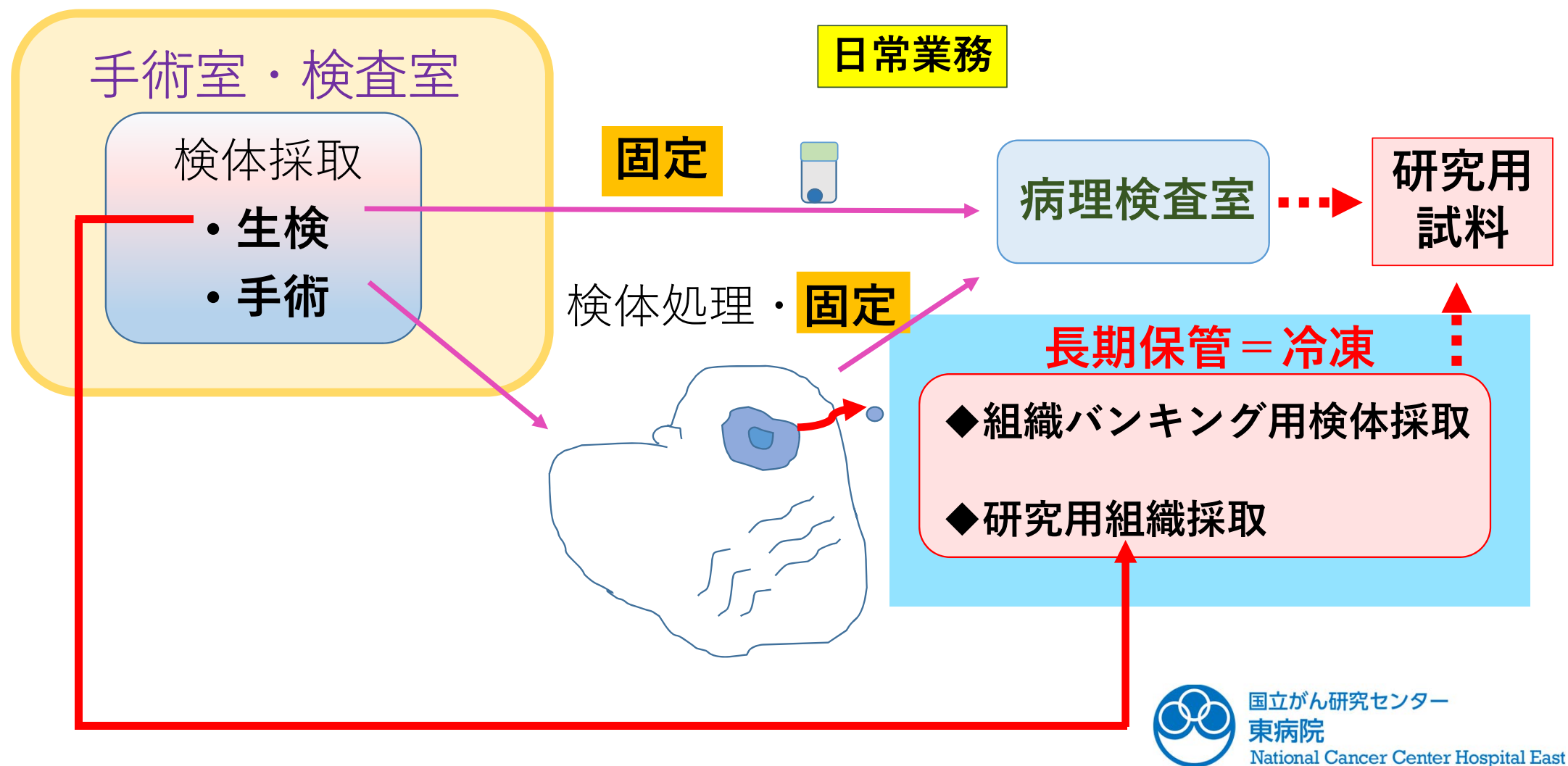


3. 新鮮標本と永久標本の検体取扱い方法



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

新鮮標本採取



固定とは (Wikipedia)

**生物試料を自己分解や腐敗による劣化から
保護するための処理**

物理学的：凍結

化学的：ホルマリン、アルコール

ゲノム解析のために良質な 新鮮標本である条件

採取後、可及的速やかに凍結した検体

核酸の大敵であるDNase, RNaseの活性を止め、
タンパク質の三次構造の変性を極力抑える！



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

ゲノム解析のために良質な
新鮮（パラフィン）標本である条件

採取後、可及的速やかに凍結（固定）した検体

核酸の大敵であるDNase, RNaseの活性を止め、
タンパク質の三次構造の変性を極力抑える！



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

保管方法

- 冷蔵・凍結により、より長い時間の保存が可能

- **4°C**（冷蔵庫）：**簡便、一時的な保管、**
（凍結させてはいけないタンパク質の解析用）

- - **20°C**（冷凍庫）：**簡便、ゲノム検索には不向き**
 - - **80°C**（ディープフリーザー、超低温槽）：**長期保管用**
 - - **180°C**（液体窒素）：**急速凍結、長期保存用（推奨）**



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

- 液体窒素（沸点 -196°C ）
- 容器は適切に使用
- 気化した場合は約700倍に膨張（爆発の危険！）
- 大気に触れすぎると大気中の酸素が液化→「液体酸素」
（これも爆発の危険！）



- ディープフリーザー＊（超低温槽： -80°C ）＊霜取り機能がないもの
- 温度センサーの設置
- 扉のパッキンや霜の付着に注意



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

ホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いた分子診断のプレアナリシス段階における主な影響因子

プレアナリシス段階の工程	工程の主な責任・担当者	影響因子
固定前	臨床医（検体採取者）	• 血流停止から摘出までの時間 • 摘出から固定までの時間 • 組織の大きさ
固定	病理医・病理技師	• ホルマリン固定液の組成や濃度、pH • ホルマリン固定の時間や温度 • ホルマリン固定時の固定液容量と組織量の比率 • 固定液の組織浸透法（浸漬、注入、マイクロウェーブ加速など）
固定後	病理医・病理技師	• 組織プロセッサのタイプおよび機器試薬の交換頻度 • 脱水・透徹条件（試薬の種類、温度、時間など） • パラフィン浸透条件（パラフィンの種類、温度、時間など）

（日本病理学会編「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 2018年 より抜粋、一部改変）



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

良質な病理標本のためのポイント

- 固定前に関する事項（時間・温度）
- 固定に関する事項（ホルマリン、検体サイズ）
- 固定後に関する事項（固定時間・保存条件）



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

良質な病理標本のためのポイント

- 固定前に関する事項（**時間・温度**）
- 固定に関する事項（ホルマリン、検体サイズ）
- 固定後に関する事項（固定時間・保存条件）



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

固定前：乳癌の場合（診療レベル）

- 乳癌の切除から固定までの時間がISH法（*HER2*）では2時間、IHC法（ホルモン受容体）では1時間を超えると検査結果に影響を与えるとされており、これを踏まえASCO/CAPガイドラインでは**1時間以内の固定**を推奨している

（J Clin Oncol, 2010:28; 2784-95, Mod Pathol, 2009:22; 1457-67）。



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

その他の臓器も . . .

- 生検検体：速やかに固定液に浸漬する
- 内視鏡的切除検体：観察後速やかに固定液に浸漬する
- 手術検体：摘出後速やかに冷蔵庫など4°C下で保管し、
1時間以内、遅くとも3時間以内には固定を行うことが
望ましい（J Clin Oncol, 2010:28; 2784-95）。



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

手術検体 取扱いのポイント

- ・摘出後30分以上の**室温保持は極力避ける**
- ・観察・記録、写真撮影、ご家族への説明などは手早く！



誰か固定しておくか、4℃に保管しておいて～！！



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

良質な病理標本のためのポイント

- 固定前に関する事項（時間・温度）
- 固定に関する事項（ホルマリン、検体サイズ）
- 固定後に関する事項（固定時間・保存条件）



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

ホルマリン

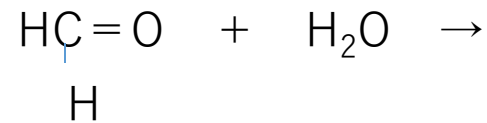
- 毒物および劇薬取締法：“医薬用外劇物”に指定
- 別名：ホルムアルデヒド水溶液（36.5 ~37.5 w/w%含有）
- 常温保存
（低温ではパラホルムアルデヒドとして析出してしまう）
- 固定液として**推奨**される調整方法：
10%中性緩衝ホルマリン溶液 = 3.7%ホルムアルデヒド



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

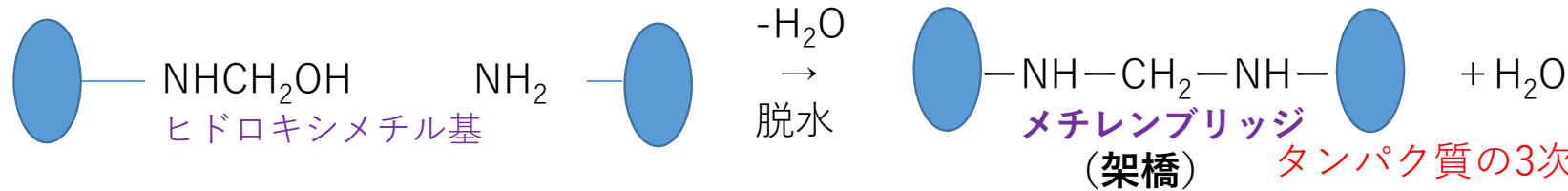
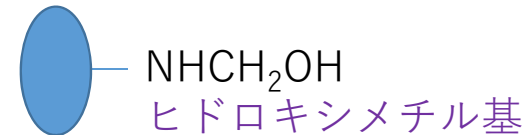
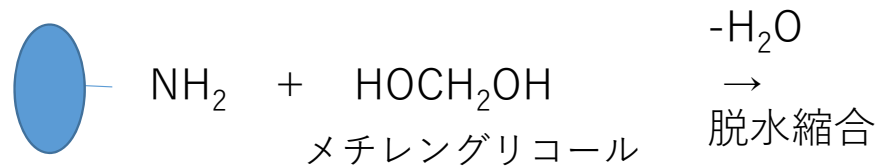
ホルマリンの固定作用＝タンパク質の架橋反応

CH_2O
ホルムアルデヒド



HOCH_2OH
メチレングリコール

水溶液中でホルムアルデヒドの多くが水和したメチレングリコールの形で存在

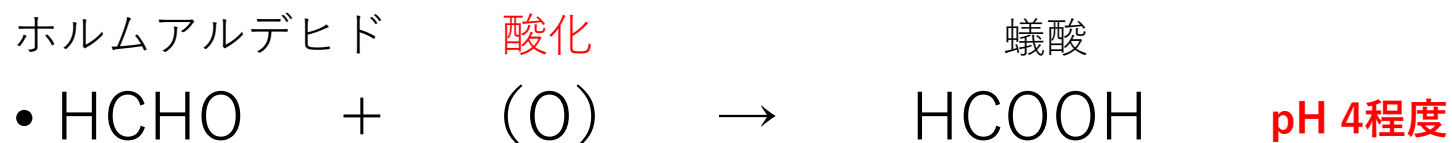


タンパク質の3次構造をより高分子化
→タンパク質の**変性**・生命活動の停止



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

ホルマリンの pH



- 酸性環境による染色性や免疫染色（抗原抗体反応）の低下
- 緩衝液で中性にした緩衝ホルマリン液が推奨



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

固定に必要なホルマリン容量

- 固定対象の組織量に対し**5～10倍量**（目分量でよいです）
- **新鮮なものを使用**
- 血液などで汚染されてしまったものは**新しいものへ交換**

**【注意】 密閉容器を使用のこと
（ホルマリン槽を使用の場合は蓋をきちんと占める）**



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

ホルマリン浸透時間

- 1時間で1mm（＝3時間：3mm、24時間：2.4cm）
- ★ホルマリン液をできる限り早く組織へ到達させるために
 - 表面積を広くする
 - 血液を除去
 - 検体内へのホルマリン注入、還流
- 注意：組織の変形に備えて（断端評価）
 - むやみに割を入れるのは控えて！



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

良質な病理標本のためのポイント

- 固定前に関する事項（時間・温度）
- 固定に関する事項（ホルマリン、検体サイズ）
- 固定後に関する事項（**固定時間・保存条件**）



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

固定時間

- 固定時間が短いと・・・

- 固定不良により標本の質が低下

- ・ 構成分子の崩れ・流出 → 染色性の低下
 - ・ ホルマリン浸透のムラ → 染色性の不均一性

- 固定時間が長いと

- 架橋反応の進行 → 核酸・タンパク質の品質・抗原性の低下

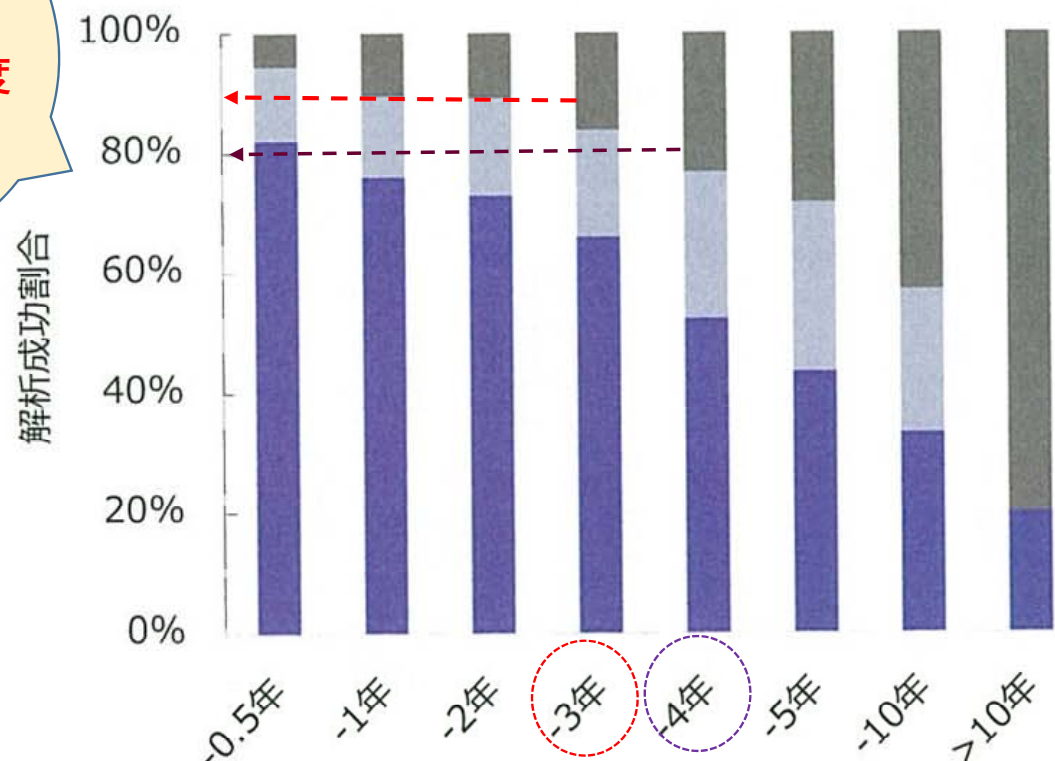
- ・ 核酸の断片化
 - ・ 核酸塩基の化学修飾：シトシンの加水分解に伴う脱アミノ化 → ウラシル置換

(理想固定時間： **6～48時間**) ★**過固定は極力避ける**



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

3-4年経過したブロックでも8割程度の成功率が得られる



保存

解析成否別区分

- 143遺伝子パネル、26遺伝子パネル解析いずれも失敗した検体
- 143遺伝子パネル解析は失敗したが、26遺伝子パネル解析は成功した検体
- 143遺伝子パネル解析が成功した検体

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程
(平成30年) 31頁より (日本病理学会)

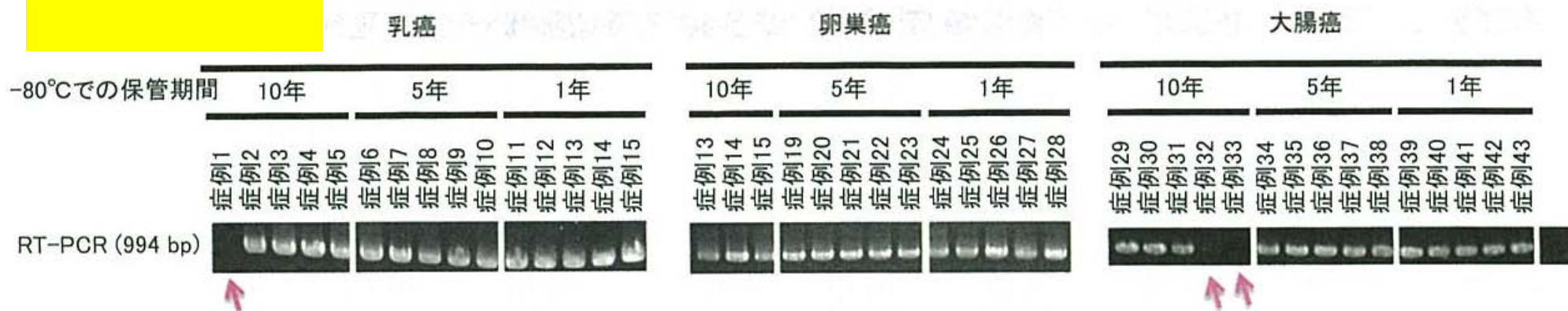
- 高品質検体の割合は、経年的に低下する一方、低品質検体の割合は増加した(上図)。また解析の成否についても同様の傾向が認められた(下図)。



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

保管(1)

長期保管温度のRNAの品質に対する影響



- 超低温槽（-80℃）における長期保管（10年）を行った一部の検体で、増幅長994 bpのRT-PCRで増幅が見られない（→）。これに対し液体窒素における長期保管では、同様のPCR failureはまれである。

RNA:液体窒素での長期保管が理想的

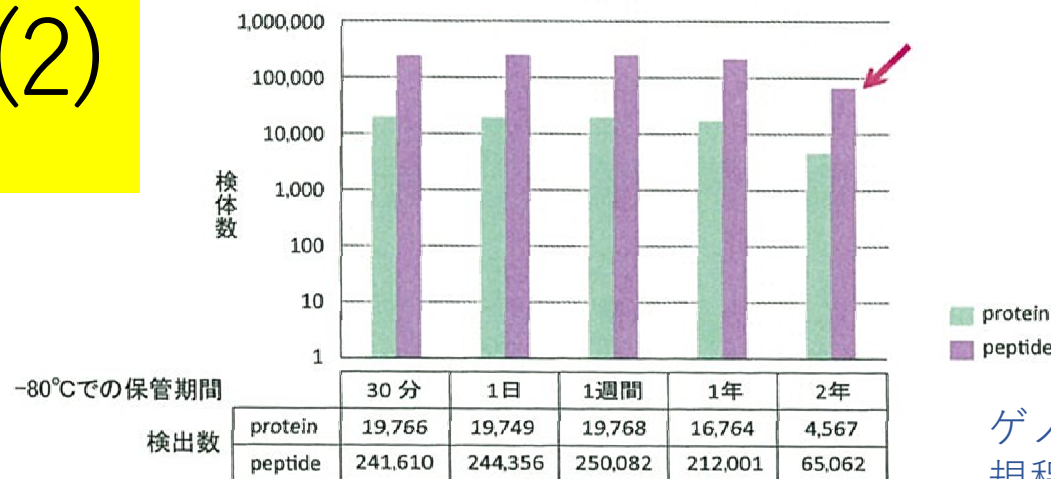
ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程 2019
75頁（日本病理学会）



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

保管(2)

長期保管のプロテオーム解析に対する影響



タンパク質も液体窒素での
長期保管が理想的

ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い
規程 2019 76頁（日本病理学会）

- -80℃保管で2年以上経過すると、検出タンパク質数・ペプチド数が減少することがわかった（→）。
- これに対し液体窒素における長期保管では、同様のプロテオーム解析の障害はまれである。
- -80℃保管によりタンパク質の品質が低下する可能性が考慮されるので、特に長期に保管した検体を用いようとする場合は、タンパク質の品質を充分検証してから解析を行うことが望ましい。



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

《ここまでのまとめ》

- **生検検体**：速やかに固定液に浸漬する
- **内視鏡的切除検体**：観察後速やかに固定液に浸漬する
- **手術検体**：摘出後速やかに冷蔵庫など4°C下で保管し、1時間以内、**遅くとも3時間以内には固定**を行うことが望ましい（J Clin Oncol, 2010;28; 2784-95）。
- **十分量のホルマリン溶液**を使用し、状況に応じて前処理を適切に行う。



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

新鮮標本からの採取時の留意点



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

新鮮標本からの採取時の留意点 (1)

1. 後日行われる病理学的検索に支障を起こさないこと

- 診断に十分な腫瘍量の確保 (研究用検体はあくまでも臨床の「余剰」)
- 断端部と腫瘍の位置関係の保存 (病理診断評価に悪影響を及ぼさない)
- 深達度 (最深部) 評価
= 最大割面はなるべく触らない

2. 採取検体の質を考慮すること

- 壊死・出血部は避ける
- 異なる肉眼所見→可能であれば2か所採取も考慮



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

手術材料からの検体採取

- 病理検査を行い最終判断をする病理医の立会いのもと行うのがベスト
- 病理医不在あるいは病理医が立ち会えない状況では？



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East



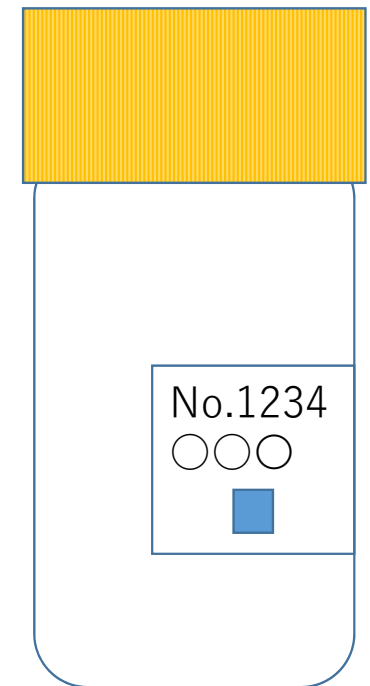
新鮮標本からの採取時の留意点 (2)

3. 非癌部の採取

- 腫瘍細胞の**コンタミネーション**に配慮
- 腫瘍部より先に採取

4. 採取チューブの確認（あらかじめ用意）

- スクリューキャップ（膨張による破裂に備える）
- 耐低温性*
- ラベル情報：症例照合



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

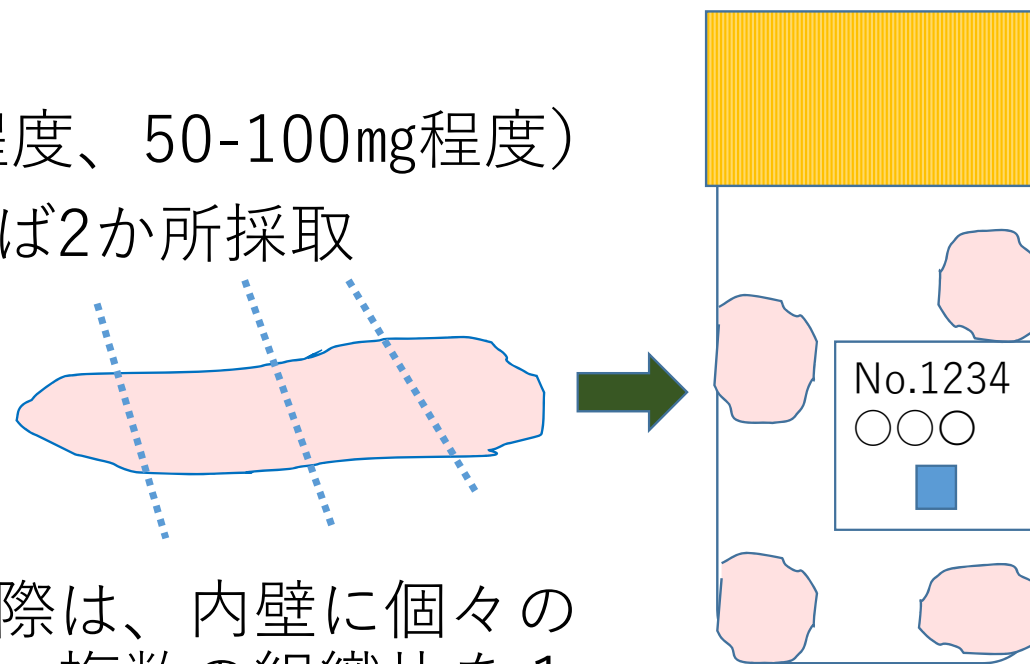
新鮮標本からの採取時の留意点 (3)

5. 検体サイズ

- 半小指頭大 ($1 \times 0.5 \times 0.3$ cm程度、50-100mg程度)
- 異なる肉眼所見→可能であれば2か所採取

6. 細切

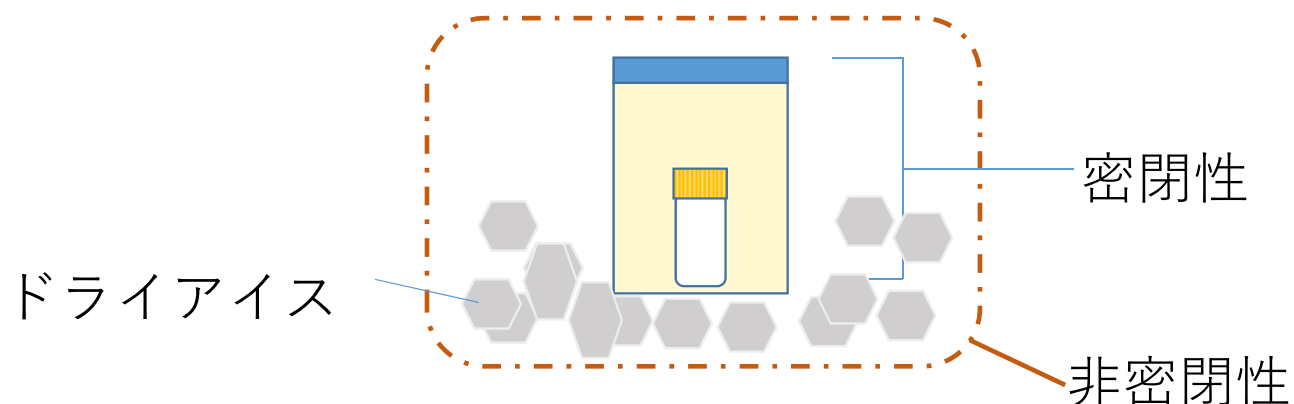
- 2～3mm角を目安
- チューブの本数に制限がある際は、内壁に個々の組織片を相互に離して貼付し、複数の組織片を1チューブに収納する。



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

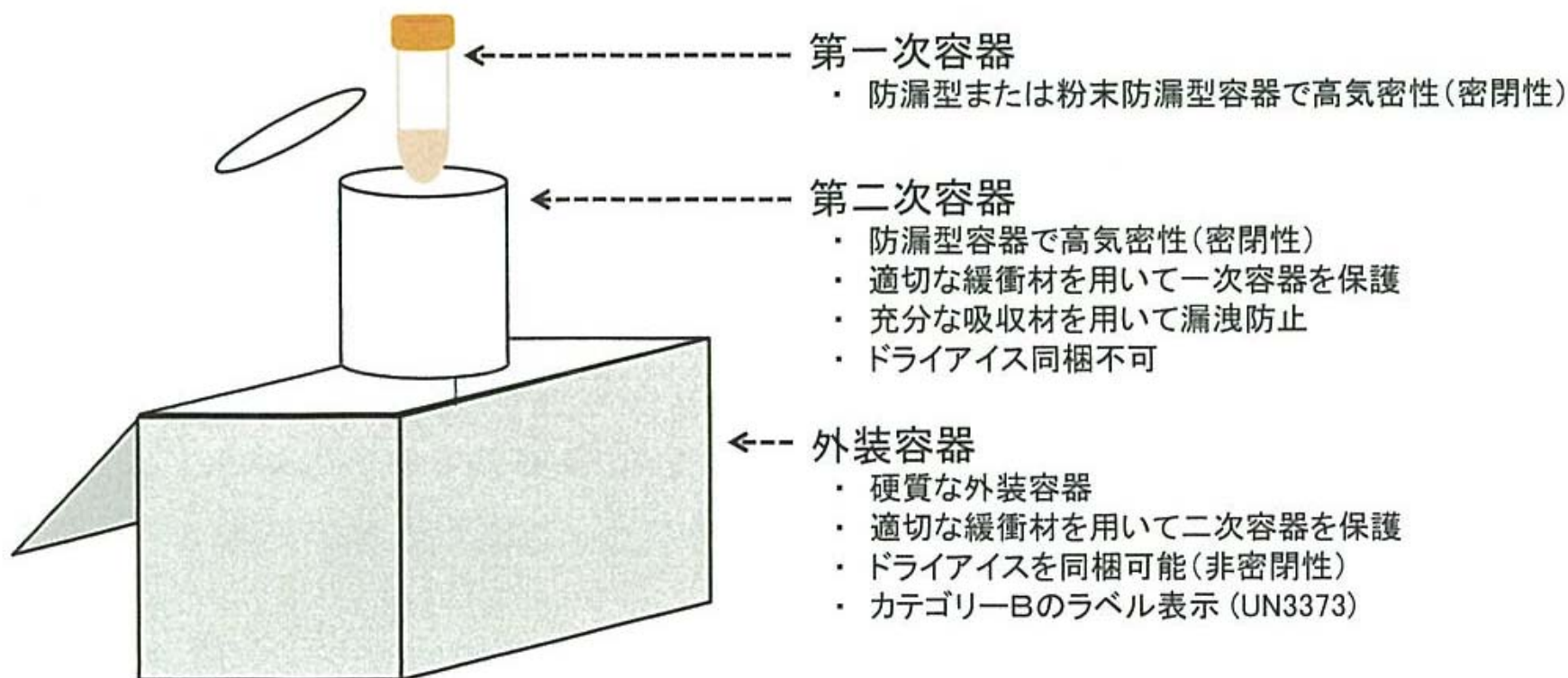
新鮮検体の輸送方法(凍結チューブ)

- 温度保持が期待される非密閉移送容器（発泡スチロール容器など）にドライアイス等を充填し、冷凍便により発送



(注意) 受けとり側に事前連絡を！
年末年始、GWやハッピーマンデー前の金曜日は避ける

航空機による爆発物等の輸送基準等を定める告示(国土交通省)の定める
臨床検体(カテゴリーB)輸送のための3重包装容器



ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 平成28年 42頁 (日本病理学会)



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

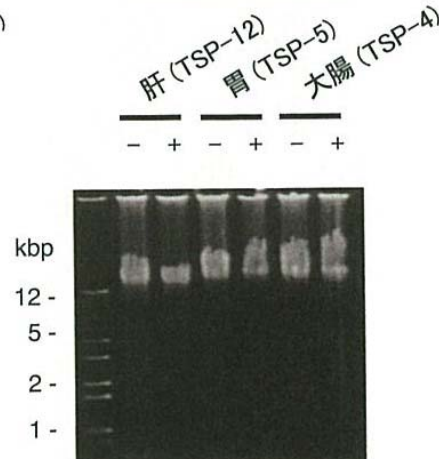
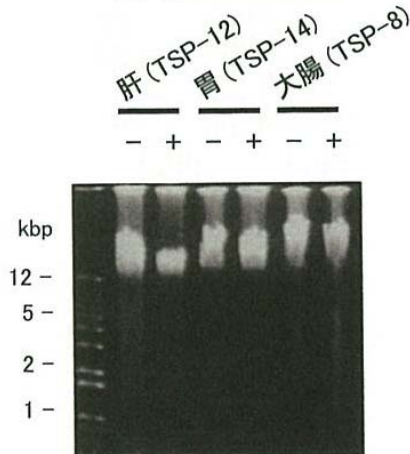
輸送方法のゲノムDNAの品質に対する影響

-80℃の温度保持を保証する
専門運送業者利用

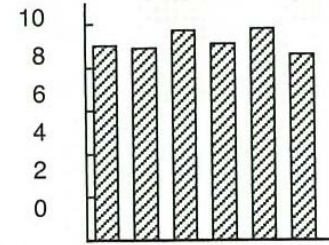
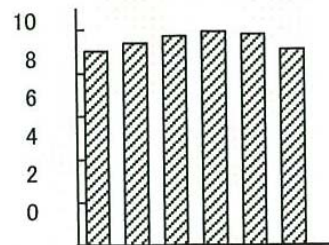
ドライアイス充填発泡スチロール
容器による宅配便利用

検体輸送

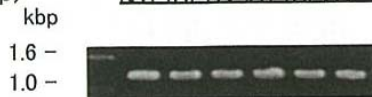
アガロースゲル 電気泳動



DIN值



ゲノムPCR (1241 bp)



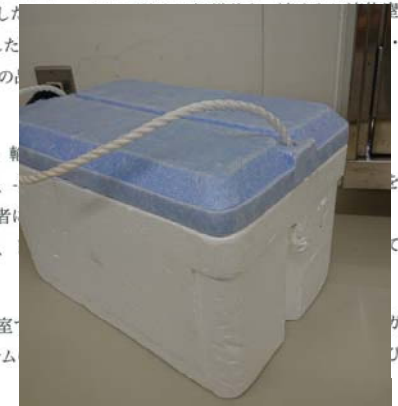
ゲノムPCR (2823 bp)



【実証データ ⑬】

検体輸送方法のゲノムDNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した細胞により急速凍結し液体窒素中に一定期間保管したクロロフォルム法によりゲノムDNAを抽出して、その
- 比較する処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、輸送
 - #14: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、-80℃で内蔵した移送容器等を用いる専門運送業者へ依頼
 - #15: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、宅配便により2日間輸送
- ゲノムDNAの抽出ならびに品質評価は同一実験室でクロスゲル電気泳動、2200 TapeStation システムにより2823 bpのゲノムPCR反応により行った。



輸送前の採取・保管方法が適切であれば、
ドライアイス充填発泡スチロール容器を用
い、宅配便で輸送してもゲノムDNAの品質
に顕著な影響は与えない（2日間の場合）。

ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程
平成28年 60頁（日本病理学会）



4. 病理中央診断（セントラルレビュー）



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

病理学の祖 Rudolf Virchow (1821～1902)

“Omnis cellula e cellula”

「全ての細胞は細胞から生じる」

病気は特定の細胞やその細胞の
グループしか病気にならない：

組織（形態）病理学



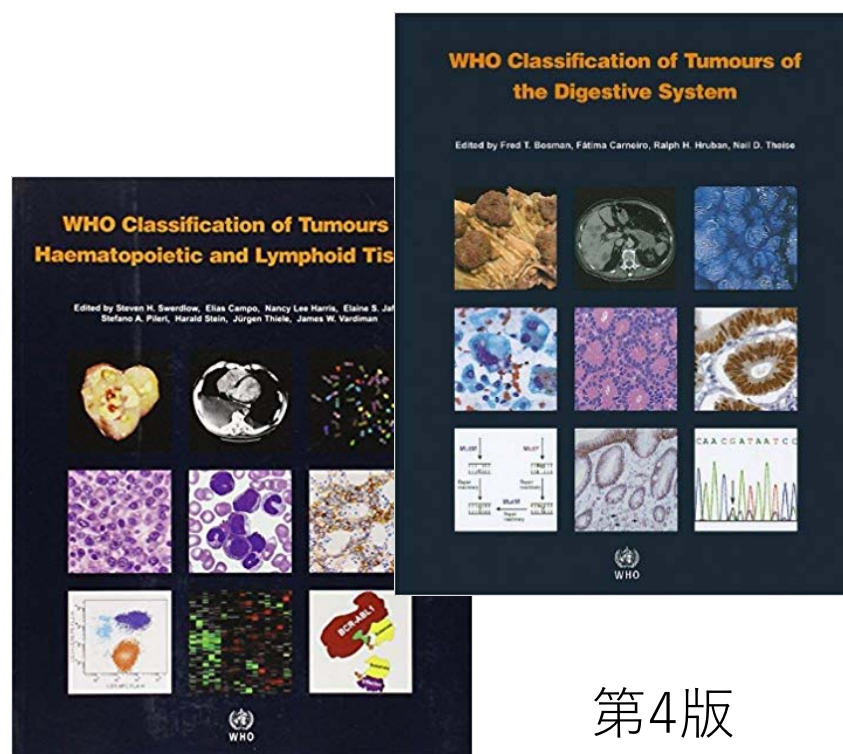
Wikipediaより



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

WHO Blue Book

世界のがんの診断の基準



第4版



第5版



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

病理解析研究に関して

- **形態・診断**の再評価（例：セントラルレビュー）・・・**H&E**, その他
- **タンパク質**発現の評価（例：HER2).....H&E + **免疫染色**
- **核酸**の抽出・検索（例：遺伝子パネル検査）..... **未染標本**

ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）が汎用

=Formalin Fixed Paraffin Embded)



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

パラフィンブロック選出に際する問題

- 良質な切片の選択（目的腫瘍細胞の含有率）
 - ★ 生検と手術材料の両方がある場合
- 硬組織を含むブロックについて（脱灰操作の有無）
- ブロックの寿命



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

ゲノム解析のために良質なパラフィン (永久) 標本である条件



採取後、可及的速やかに**固定**を行った検体

- ✓固定採取時刻、固定時刻、固定時間が管理されている検査室
(精度管理)
- ✓多少なりとも組織像で質の良し悪しは判断できる
(壊死・融解、変性、固定不良)



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

硬組織を含むブロックについて

- **脱灰操作**：標本を薄切するために硬組織の無機塩（カルシウム分）を抜く工程
→ **固定時間の短縮と脱灰操作の省略**が可能となるように生検ビンに軟らかい腫瘍成分のみを提出するのも一案（**病理検査室へ相談**）
- **中性緩衝脱灰**（EDTA） v.s. **酸脱灰**（KCX, Plank-Rychlo法など）

	EDTA（中性脱灰）	酸脱灰
長所	• 染色性やその後の核酸抽出・検索作業への影響が少ない	• 低コスト • 早い
短所	• 時間がかかる • 高コスト	• 染色性の低下 • 遺伝子解析用検体には不向き



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

パラフィンブロックの寿命

- 3年以内が望ましい



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

パラフィンブロックの寿命

- 3年以内が望ましい
- 3年以上はダメ？



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

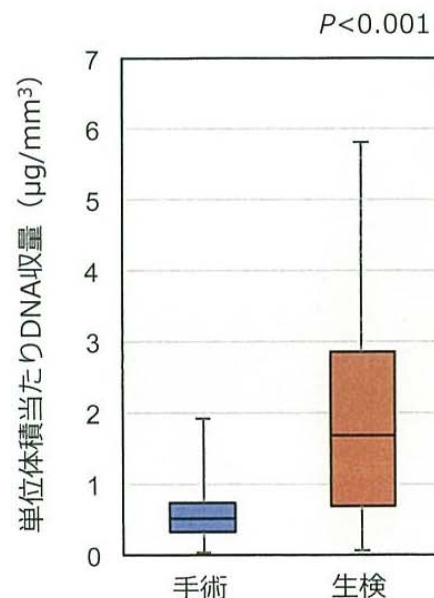
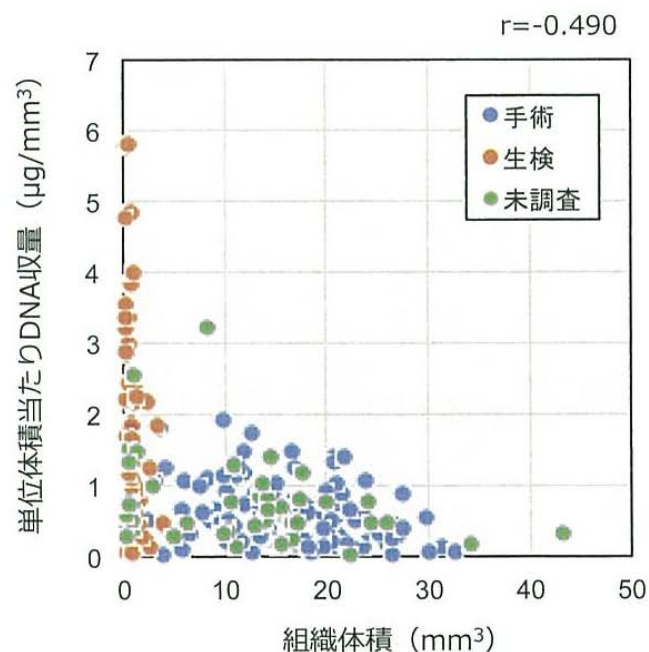
パラフィンブロックの寿命

- 3年以内が望ましい
- 3年以上はダメ？ → **組織量が十分あるほうが、新しい微小検体よりも核酸収量がよい場合がある。**



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

生検と手術材料の両方があるとき (遺伝子学的検索を目的とする場合)



単位体積あたりの
DNA収量は生検検体
の方が高い傾向にある

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程（平成30年）22頁より
（日本病理学会）

- 単位体積当たりのDNA収量は検体ごとに大きく異なる。手術検体より生検検体の方が、単位体積当たりのDNA収量が高い傾向が見られた。



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

がんゲノムプロファイル検体の推奨条件

	FoundationOne® CDx (中外製薬)	OncoGuide™ (sysmex)
腫瘍細胞比率	最適30%以上 最低20%以上	20%以上
腫瘍細胞面積 腫瘍量など	25mm ² (5mm四方) : 5μm × 10枚 25mm ² 未満の場合は枚数追加	10μm × 5枚 総DNA濃度 20ng/μl以上

- 腫瘍細胞比率と腫瘍絶対含有量がともに備わっているのが理想
- 腫瘍量が少ないと解析不能に陥る
- 多少古くても十分な腫瘍量がある方がよい (? 状況をよく考えて !!)



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

生検と手術材料の両方があるとき (遺伝子学的検索を目的とする場合)

- ブロックの古さ (3年以内が理想)
 - 腫瘍組織量 & 腫瘍細胞比率
- +
- 固定条件
 - 脱灰操作の有無

注) 病理中央診断用プレパラートを選出しなければならない場合は
どの切片が適当かを病理医へ確認したほうがベター



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East



5. プロトコール作成の際の留意点

プロトコール（病理関係）についての留意点（1）

・正しい用語を使用する

●標本 ●検体 ●切片 ●プレパラート

・文書内では可能な限り用語を統一する

（注：図と本文中の説明など）

- 未染色プレパラート
- 未染標本
- 未染スライド

・正しい内容を記載する

- ○：10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定
- ×：10% 中性緩衝ホルムアルデヒド溶液で固定



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

プロトコール（病理関係）についての留意点（2）

正しく適切なプロセスを書く

（例）作業工程について

- 最深部を含む最大割面を作成し (✕)
- 原則、病変の辺縁部からの採取 (◎)

📌 病理医が行う病理標本の切りだしマニュアルは診断目的である。

研究用検体採取の方法を記す際には、病理医が後日、組織検索をするために
できるだけ影響の少ない方法を選択・記載すべきである



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

プロトコール（病理関係）についての留意点（3）

- （2）薄切の厚さ：核酸抽出用か、HE/免疫染色用か

👉 「10 μ m厚の未染標本を用意」→単に核酸抽出目的だけの用意で大丈夫？

- （3）核酸抽出を行ったパラフィンプロックとその病理診断との紐づけ

👉 病理診断（形態観察）との紐づけがなかったために、その後のデータの意味付けが困難になる場合が・・・

- （4）プレパレートやパラフィンプロックの返却方法

👉 借りる方法ばかりに意識がいて、返却方法が書かれていない・・・

- （5）新たに病理検査室へ作業を依頼する場合の消耗品や人件費の出所

👉 病理組織切片はタダではできません

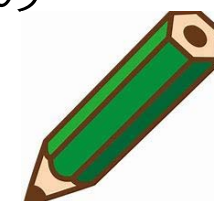


国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

施設で作製・提出される未染標本に付されるID (ラベル情報) について

【明らかにしてほしいこと】

- 施設の病理検査室で薄切を実施するにあたり、スライドガラスの
フロスト部に何を書いたら良くて、何を書いてはいけないのか



★個人情報保護と検体取り違い防止の観点から

- 提出スライドガラス：すべてに？ 1枚だけ？
 - 複数枚のスライドガラス：どのように振り分けられるのか
- 用意する総数、内訳などを丁寧に記載



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

参考文献

- ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 一般社団法人日本病理学会 編
• <http://pathology.or.jp/genome/index.html>
- ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 一般社団法人日本病理学会 編
• http://pathology.or.jp/genome_med/
- ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程
• 一般社団法人日本病理学会 編 羊土社



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

【Take home message 1】

- 摘出後30分以上**室温保持は極力避ける**
 - やむを得ないときは冷蔵庫**4°C下で保管**
 - 生検検体：**速やかに固定液に浸漬する**
 - 内視鏡的切除検体：観察後**速やかに固定液に浸漬する**
 - 手術検体：、1時間以内、**遅くとも3時間以内**には固定を
- 十分量のホルマリン溶液を使用
(状況に応じて前処理を適切に行う)



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

【Take home message 2】

- 病理検体のプロセスを知ろう：不明な点は検査室へ教えてもらう
- 標本選定：最適な状況で行えるように
 - 固定までの時間と温度管理+固定の質（検体サイズとホルマリン量）
 - 脱灰操作の有無、腫瘍部の選定（質、比率、経年劣化との兼ね合い）
- 研究プロトコール作成にあたり：
 - 目的に合致した試料の選定・プロセスになっているか
 - 正確かつ適切な内容か
- 自施設の病理検査室の協力を得るために：
 - 用意する総数、内訳などを丁寧に伝える
 - フロスト部の記載情報は的確に伝えて



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East



国立がん研究センター
東病院
National Cancer Center Hospital East

ご質問 (1)

- **骨を含む試料**の、解析に悪影響を及ぼしにくい保存方法
(固定・脱灰など)

Answer: **EDTA液**を推奨

脱灰操作にはいくつかのプロセスが加わる

(固定→脱脂→ホルマリン再固定→水洗→脱灰→中和→水洗→パラフィン包埋)

- **検体サイズは重要**
- **あらかじめ腫瘍部分だけを採取する方法も一案**

ご質問 (2)

・血液サンプルから**がん由来のexosome内の遺伝子、たんぱく**を解析する際、検体採取から-80度保存、解析までの正しい取り扱い方法を知りたい

Answer: DNA, RNAの取扱いと基本的には同じ

速やかな凍結

コンタミネーション防止（清潔な場所・清潔な器具）

凍結保存用チューブ

冷凍庫の温度管理