

免疫血清分野

尿一般分野

病理分野

細胞診分野

血液一般分野

生化学分野

先天性代謝異常分野

微生物分野

検体採取から固定までの組織の取扱い方法について

～ゲノム病理診断のために～

検査科病理・細胞診係（病理担当）

はじめに

病理検査に用いられている組織の固定は、組織の自家融解による腐敗をおさえ、細胞の構造を保持することによって、室温下における長期保管や繰り返しの検索を可能にしています。しかし一方、固定のし過ぎは細胞の抗原性を変化させ、免疫染色での染色性を低下させたり、DNAの変性・細断化により遺伝子検索を困難にさせます。

近年、悪性腫瘍における病理組織を用いた遺伝子検査は急増しており、分子標的薬の開発に伴い、今後もゲノム・バイオマーカー検査における免疫組織化学的な分子診断の重要性はさらに増していくと思われま

そこで今回は、平成30年3月に日本病理学会から発行された「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」（以下、規程）(写真1)に基づき、各医療機関で検体採取をされてからホルマリン固定をし、当検査センターに提出されるまでの、組織の適切な取扱い方法についてご紹介いたします。

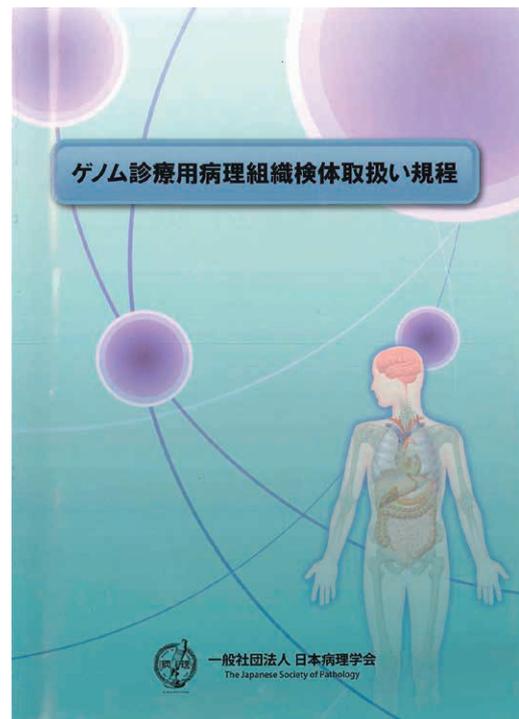


写真1

1. 切除・採取直後の組織の固定について

臓器および組織の摘出後から固定までの時間は、生体分子の不可逆的变化を最小化するうえで極めて重要な取扱いとなっています。

[固定前プロセス]

- ①内視鏡的切除等された消化管組織、生検については、**速やかに固定液に浸漬し、固定を行うことが望ましい。**

②手術材料により切除された組織においては、摘出後は速やかに**冷蔵庫など4℃以下で保管し、1時間以内、遅くとも3時間以内^{*}に固定を行うことが望ましい。また、摘出後30分以上室温で保持することは極力回避する。**

※ただし、乳癌の ASCO/CAP のガイドラインでは1時間以内の固定開始を推奨しています。(HER2、PgR、ER 免疫染色に影響をあたえるため。)

一般的な固定液であるホルマリンの浸透速度は1mm/時間程度であることを考慮し、手術検体では、切り出しまでに十分な固定が行える程度の厚みまで、固定前に適切に入割することが推奨されます。

2. 採取組織のホルマリン固定について

採取組織の検体品質は、ホルマリン固定液の組成と濃度、時間に大きな影響を受けます。規程では以下の方法が推奨されています。

[固定プロセス]

《ホルマリン固定液の組成》

10%中性緩衝ホルマリン溶液を固定に用いることが望ましい。

緩衝液を用いることにより核酸への影響を最小限におさえることができます。

また、ホルマリン濃度が高くなるとホルマリン固定速度が進行し、核酸分解リスクが上がります。

当検査センターではこの規程に従い、平成30年3月より10%中性緩衝ホルマリン溶液に移行しております。(インフォメーション No.2018-11参照 平成30年3月20日配布)

《ホルマリン固定時間》

組織検体（内視鏡的切除された検体、生検検体、手術検体）では、コンパニオン診断等の推奨を考慮し（表1）、**6～48時間の固定**を行うことが望ましい。

表1 コンパニオン診断等における固定時間の推奨

がん種	効果予測マーカー	推奨ホルマリン固定時間
乳癌	HER2、ER/PgR	6～72時間、<6時間は回避
肺癌	PD-L1	6～48時間
大腸癌	RAS(KRAS/NRAS)	6～48時間

* 固定後72時間以降から核酸の断片化や核酸塩基の化学修飾が顕著に増加する。

固定不良（固定不足・過固定）による品質劣化は回避しなければならない。

固定不足（写真2、3）または7日以上固定された検体は網羅性の高い遺伝子パネルにおいて検索困難となる。

組織の中心部まで固定が適切に行われた場合、写真4、5のような状態になります。

組織の中心部が赤く、固定が十分に行えていない状態



写真2 脂肪組織



写真3 肺組織

組織の中心部まで十分に固定が行われた状態

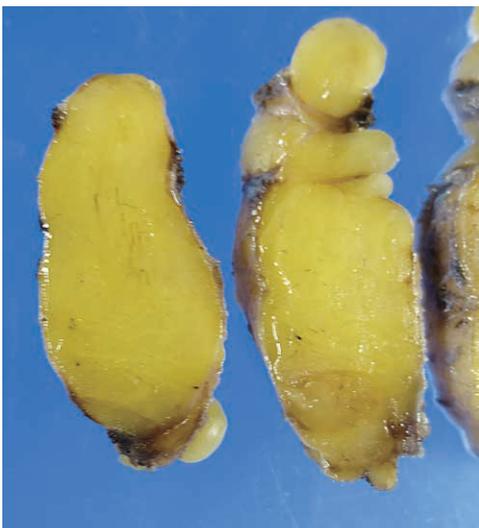


写真4 脂肪組織

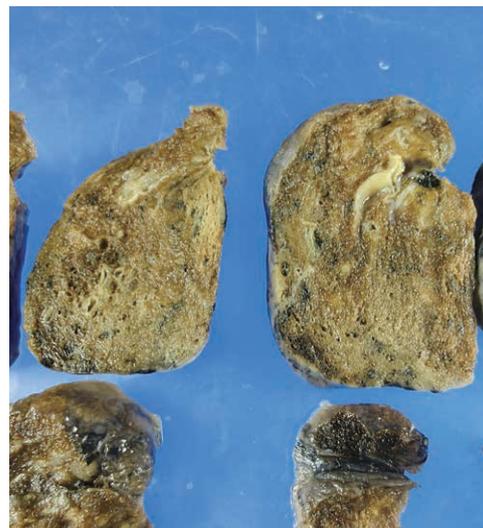


写真5 肺組織

《ホルマリン固定処理に使用する固定液量》

ホルマリン固定に使用する固定液の容量は、**組織量に対し10倍量の固定液**を用いることが望ましい。(写真6、7)

適量



写真6 皮膚組織

組織に対してホルマリンが少ない



写真7 皮膚組織

※写真2～7は検査センターで撮影

《ホルマリン固定処理時の温度》

ホルマリン固定時の処理温度は室温でよい。

室温以上の場合、核酸分解酵素により核酸が早く分解し、低温では、浸透が悪くなるので、提出時は室温でお願いいたします。

おわりに

「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」によって、これまでの検体前処理方法と変わる点はございませんが、組織のより良い取扱い方法のポイントとして、今回紹介させていただきました。

ホルマリン固定検体を適切に取扱うことは、品質保持に大変有用であり、今後、より急増すると思われるゲノム病理診断を正確に行うことが可能となります。当検査センターにおいても、学会や研修会に積極的に参加し、新しい情報を収集するとともに、検体の品質を保つよう日々精度管理に努めてまいります。今後ともご理解とご協力の程よろしくお願いいたします。

参考資料：

1. 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 平成30年3月1日 初版発行 (ホームページ <http://pathology.or.jp/> でご覧いただけます。)
 - ※黒枠および表1はゲノム診療用病理組織検体取扱い規程より一部引用させていただいております。

担当：磯田 紀子、平佐 あい (病理・細胞診係)
 監修：仙谷 和弘 先生 (広島大学大学院医歯薬保健学
 研究科 分子病理学研究室)

*広島市医師会臨床検査センターだよりはウェブページでもご覧いただけます。 <http://www.labo.city.hiroshima.med.or.jp/>