

第2回病理・細胞診検査研究班合同研修会

免疫染色・遺伝子関連検査 における精度管理

&

臨床検査技師の役割

慶應義塾大学医学部

病理学教室

腫瘍センターゲノム医療ユニット

Division of Clinical Cancer Genomics

柳田 絵美衣

本日の内容

■ 免疫染色

- ・ 染色の基礎・ pitfall
- ・ 精度管理

■ がんゲノム医療

- ・ 検査の内容
- ・ 検査のポイント・ コツ

■ 臨床検査技師の役割

酵素抗体法手順フローチャート

(ホルマリン固定パラフィン切片、ポリマー法)

脱パラフィン (キシレン→アルコール)	
水洗省略 ↓	↓ 流水洗(5 分間) ↓
内因性ペルオキシダーゼのブロッキング	
0.3%過酸化水素加メタノール (室温 30 分間)	3%過酸化水素水(室温 5 分間)

↓
流水洗(5 分間)
↓

(必要に応じて)抗原性賦活化		
加熱処理	蛋白分解酵素処理	蟻酸処理 塩酸処理
<ul style="list-style-type: none"> クエン酸緩衝液 (pH 6.0) クエン酸緩衝液 (pH 7.0) EDTA 液 (pH 8.0) など 	<ul style="list-style-type: none"> サチライシン (プロテイナーゼ) プロテイナーゼ K ペプシン トリプシン 	

↓
流水洗(5 分間)
↓
PBS で洗浄(5 分間 2 回)
↓

必要に応じて、非特異反応のブロッキング(室温 10 分間)

5% 正常動物血清

0.25% カゼイン溶液

洗浄せずに、次のステップへ

↓
一次抗体の反応 (湿潤箱中, 室温 30~60 分間) または (4 °C 一晩)

↓
PBS で洗浄, 5 分間 3 回

↓
ポリマー試薬の反応 (湿潤箱中, 室温 30~60 分間)

↓
PBS で洗浄, 5 分間 3 回

↓
DAB 溶液で発色, 鏡検しながら 2~5 分間

↓
流水洗, 5 分間

↓
ヘマトキシリンで軽く核染 → 流水洗 → 色出し → 流水洗

↓
脱水 (アルコール) → 透徹 (キシレン) → 封入

Protocol

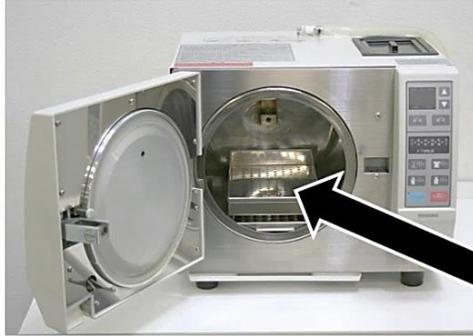
1. 薄切/転写
2. 伸展・乾燥
3. 脱パラフィン
4. 内因性ペルオキシダーゼブロッキング
5. 抗原賦活化処理
6. 非特異反応ブロッキング
7. 一次抗体反応
8. ポリマー試薬反応
9. DAB発色
10. 核染色

抗原賦活化処理

Antigen retrieval

ホルマリン固定による抗原エпитープのマスクング
立体障害により抗体の浸透性が著しく阻害される

- * 加熱処理
- * タンパク分解酵素処理
- * 酸・塩処理



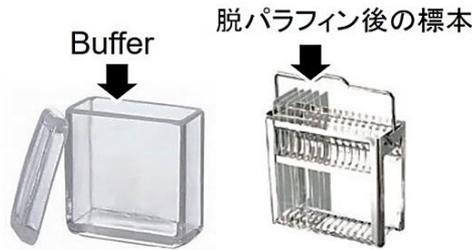
Autoclave



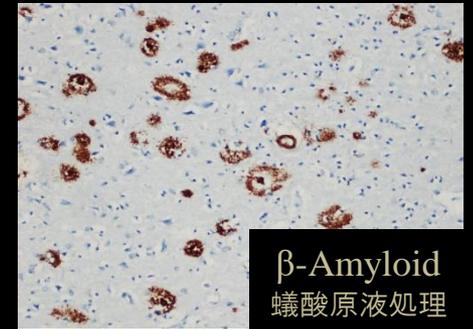
Pressure cooker

Antigen

activating



Microwave



β -Amyloid
蟻酸原液処理

架橋形成の緩和・破壊
蛋白変性
加水分解
カルシウム複合体除去

加熱処理

heat-mediated epitope retrieval

抗原性増強

核内抗原
細胞膜抗原

例：悪性リンパ腫関連マーカーは
多くはCD抗原と転写因子で構成
→熱処理は不可欠
(immunoglobulin関連を除く)

抗原性失活

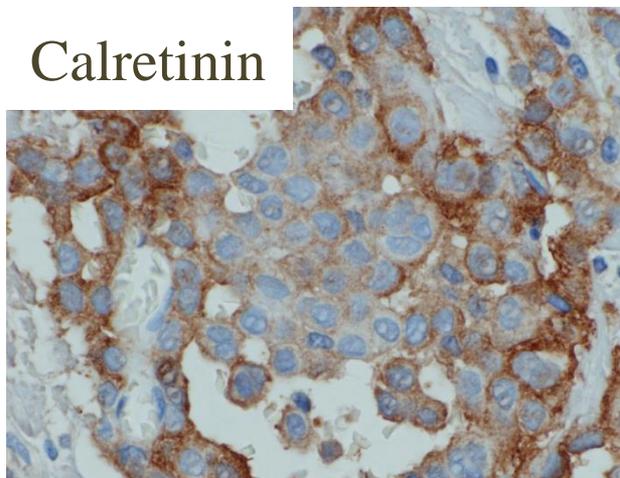
骨髄系前駆細胞マーカー
好中球エステラーゼ

Calretinin

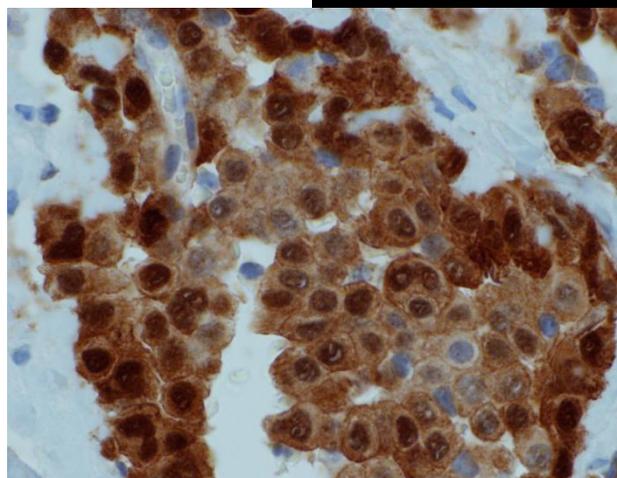
(強い加熱処理で染色性減弱)



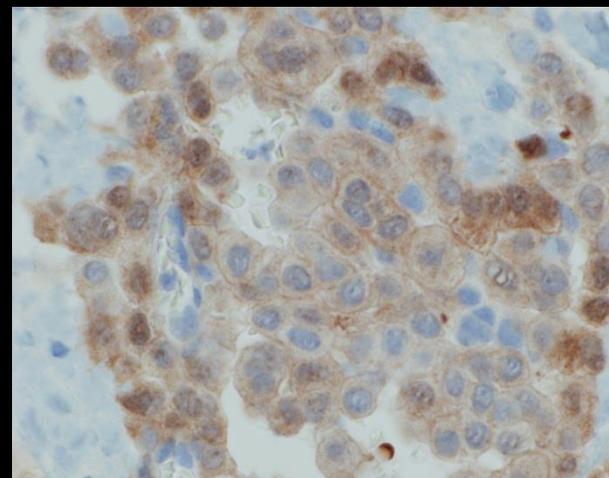
Calretinin



加熱8分



加熱30分



加熱90分

抗原性増強

免疫グロブリン・補体
コラーゲン

CK, CD抗原 (CD68・CD21)

CMV

HER2 (クローン:SV2-61 γ) etc

抗原性失活

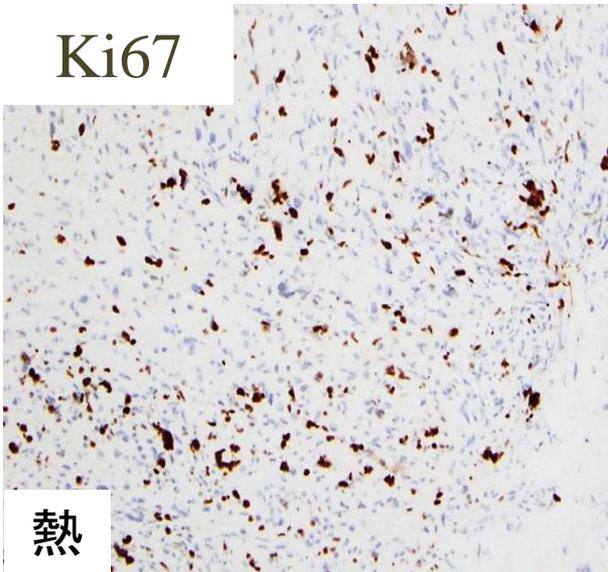
Ki67

ペプチドホルモン (一部)

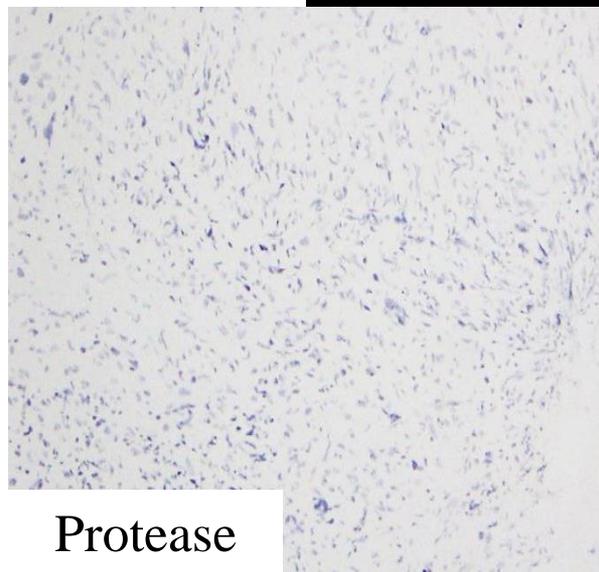
IgD, J鎖 etc

抗原性そのものが消化され陰性化

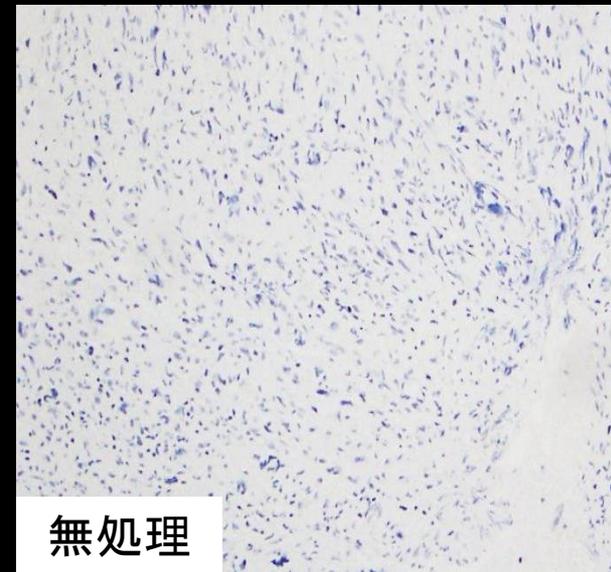
Ki67



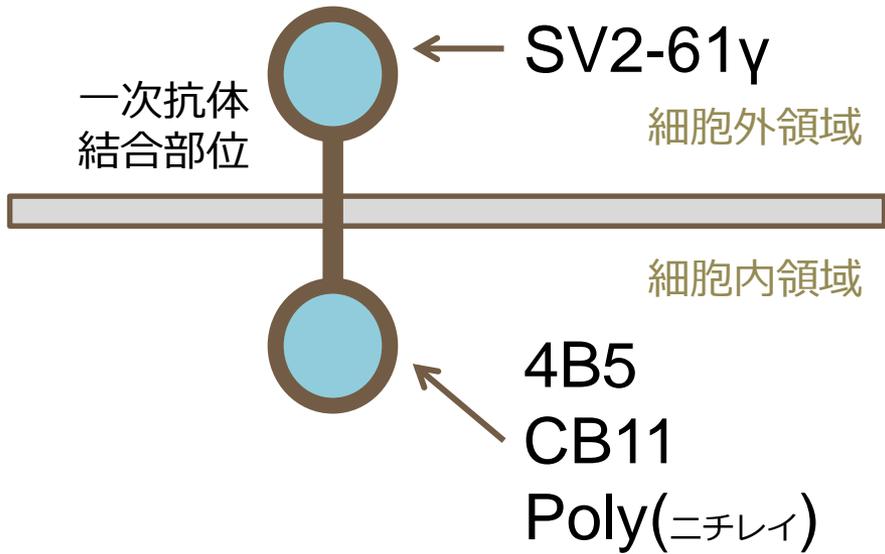
熱



Protease



無処理

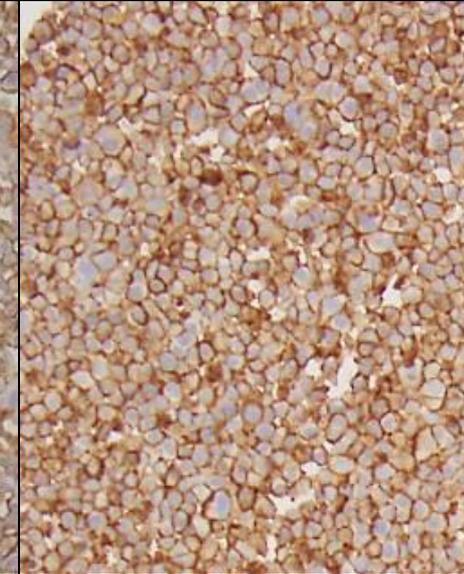
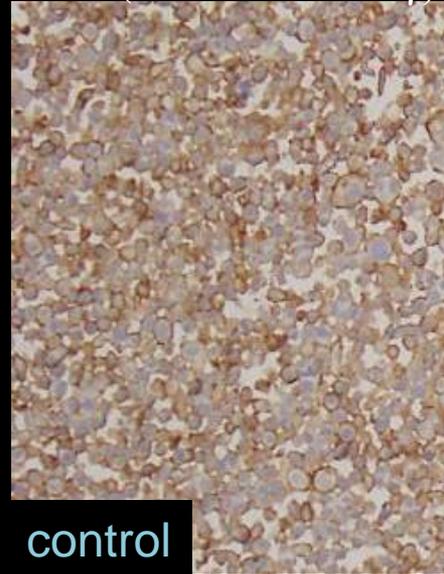


抗原抗体反応での結合部位の局在が異なるため処理の強度・内容が異なる

誤った処理では偽陰性や偽陽性となり誤診を誘導する

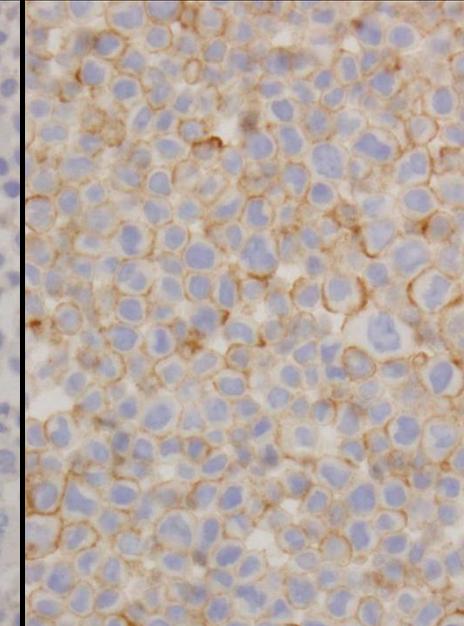
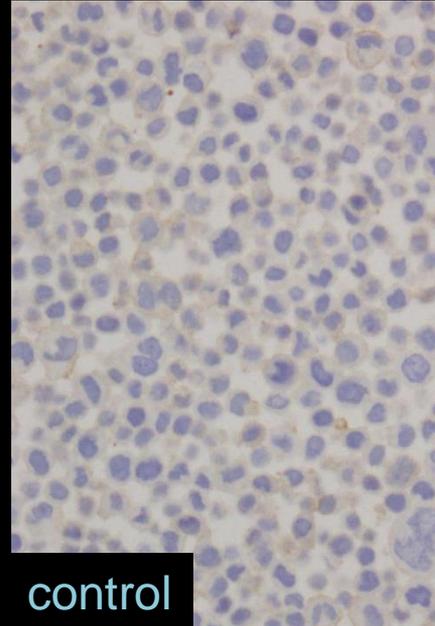
Her2(clone:SV2-61γ)

3+



Her2(clone:SV2-61γ)

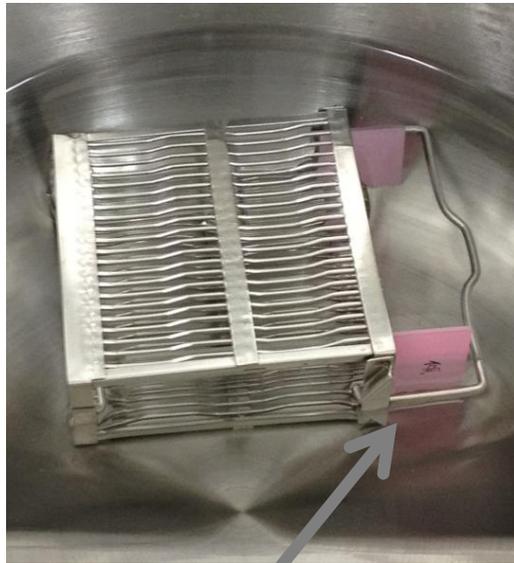
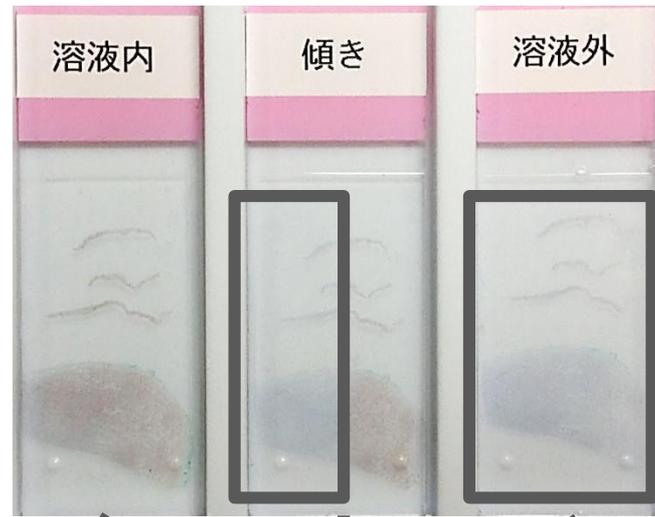
1+



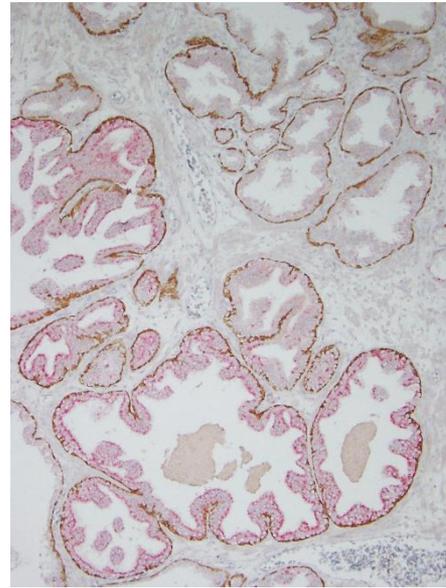
加熱処理後の乾燥

PIN4

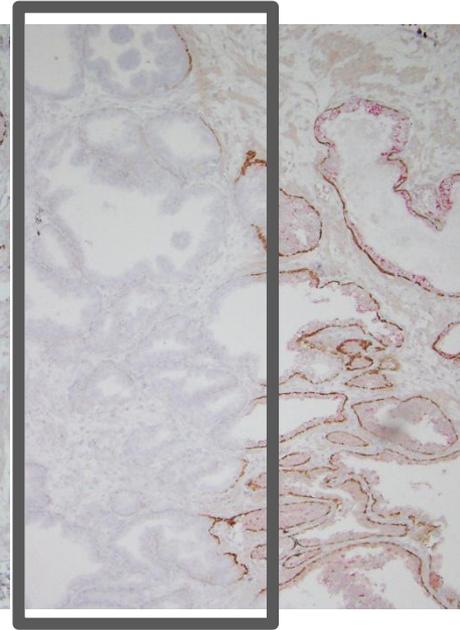
(p63+P504S+HMW)



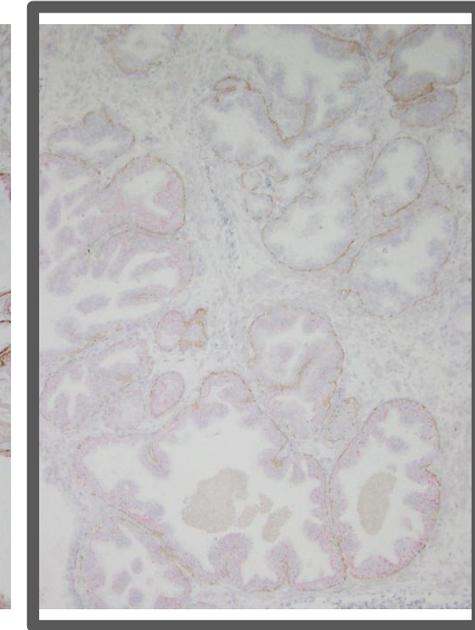
切片が溶液外
外気に触れている



溶液内で冷却

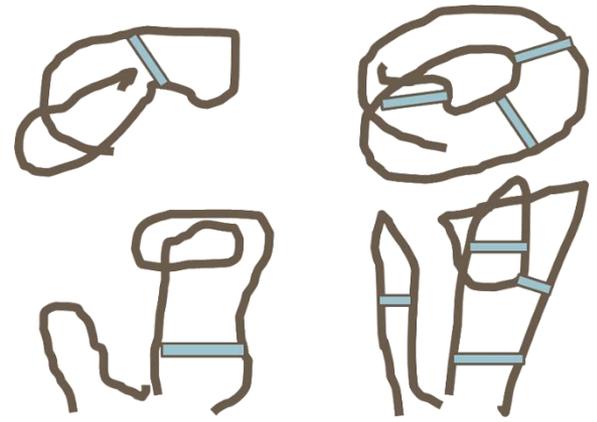
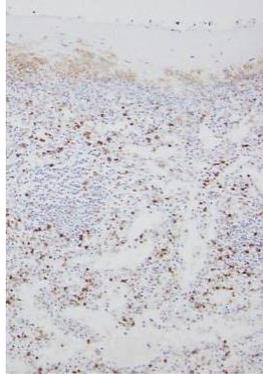
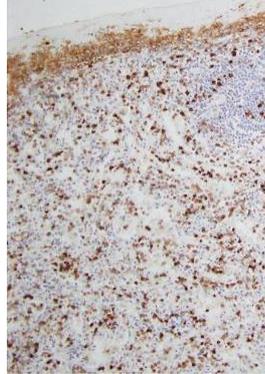


傾けて冷却



外気中で冷却

固定不足

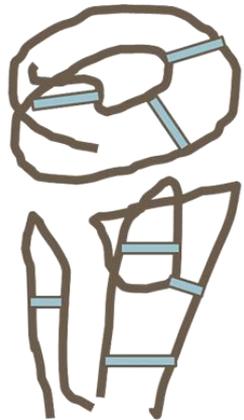
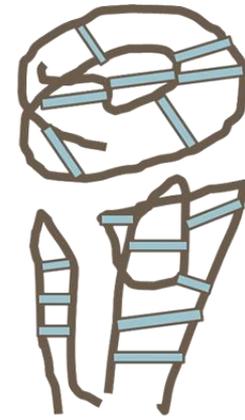
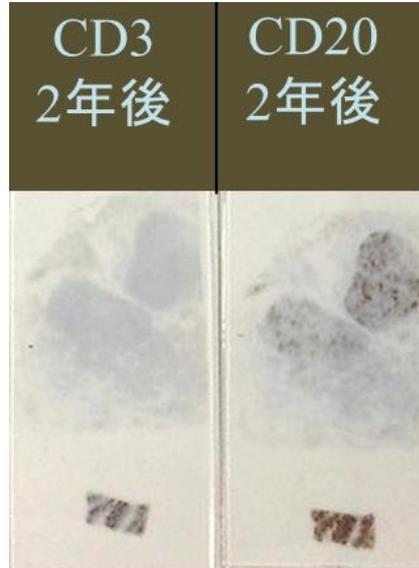
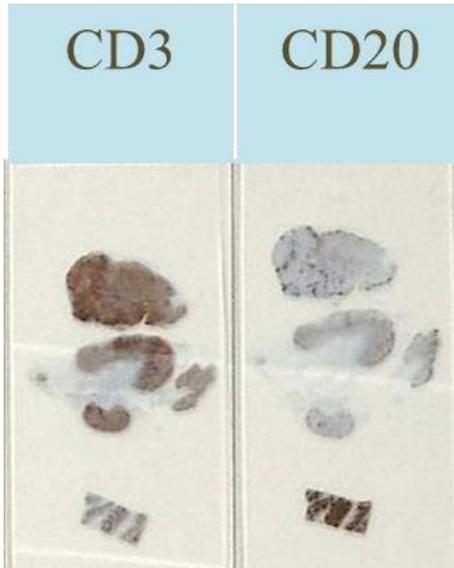


固定不十分な
タンパク分子

適度に固定された
タンパク分子

タンパク分子の揺らぎ

染色性に影響を与える要因



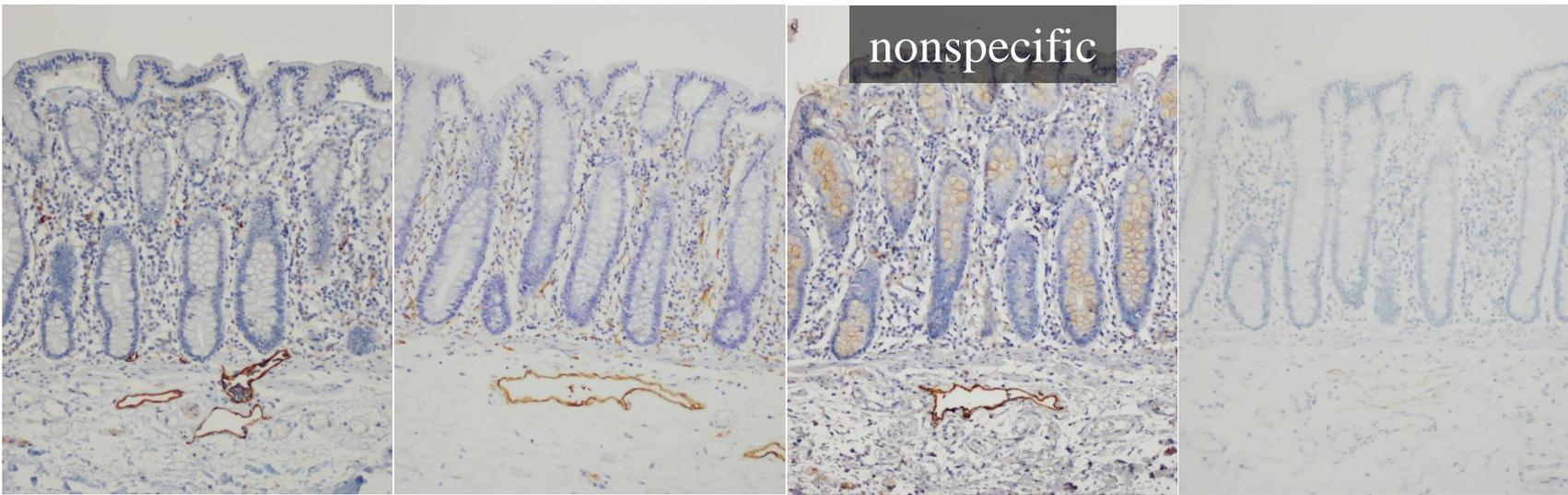
過度に固定された
タンパク分子

適度に固定された
タンパク分子

過度なマスキング

過固定

Normal colon



Excellent

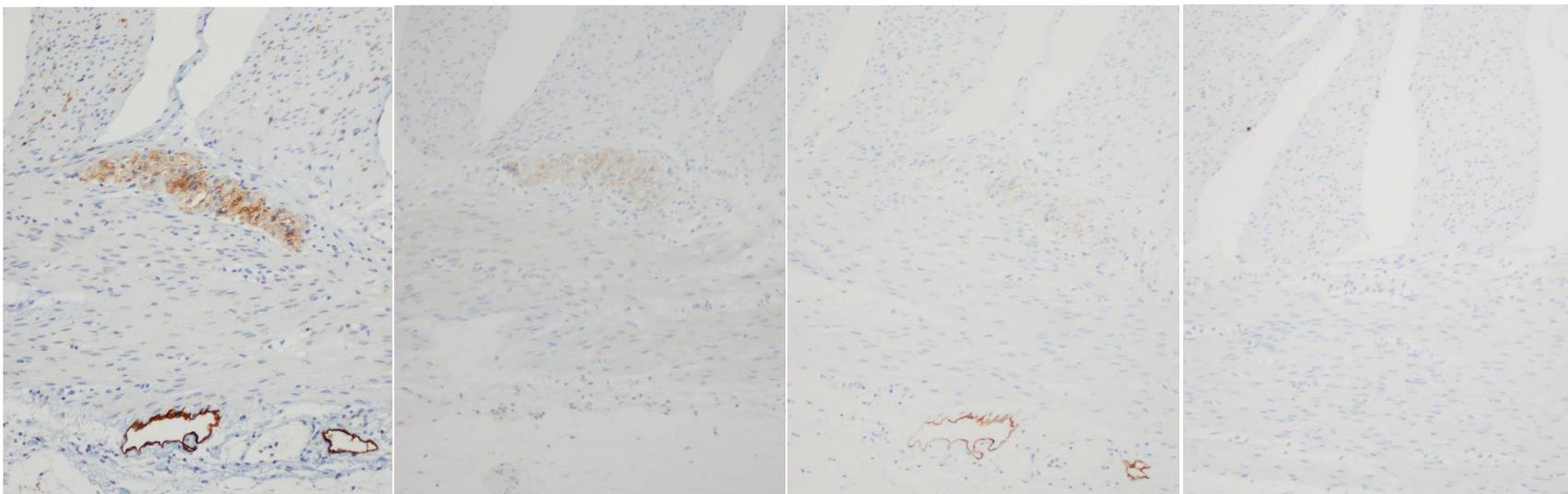


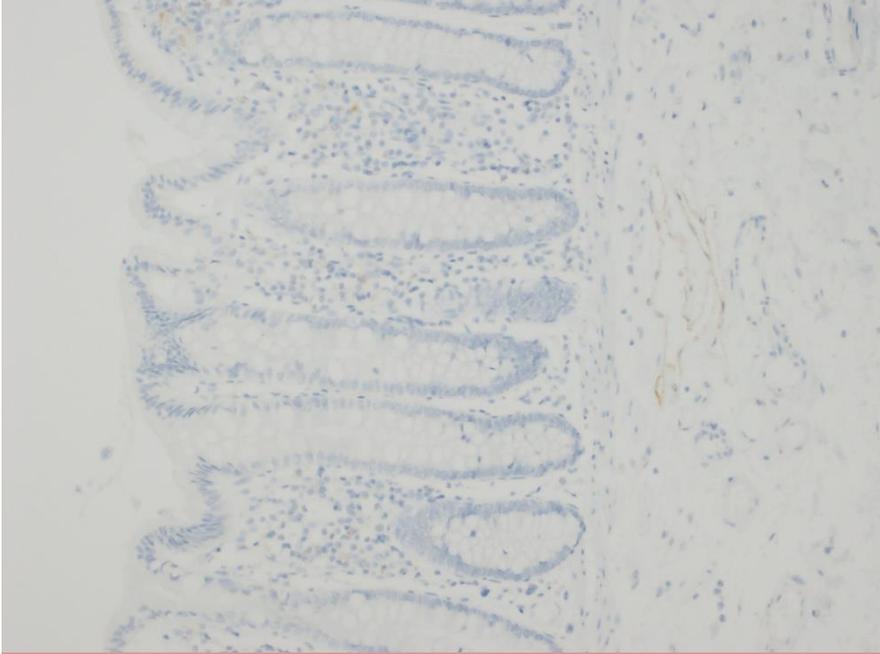
Poor

リンパ管

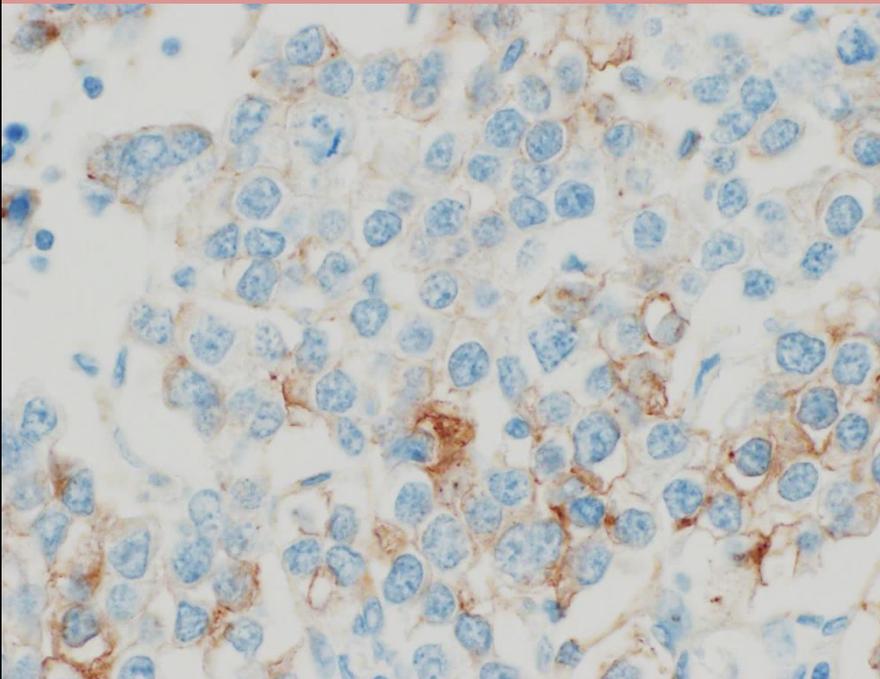
神経叢

D2-40



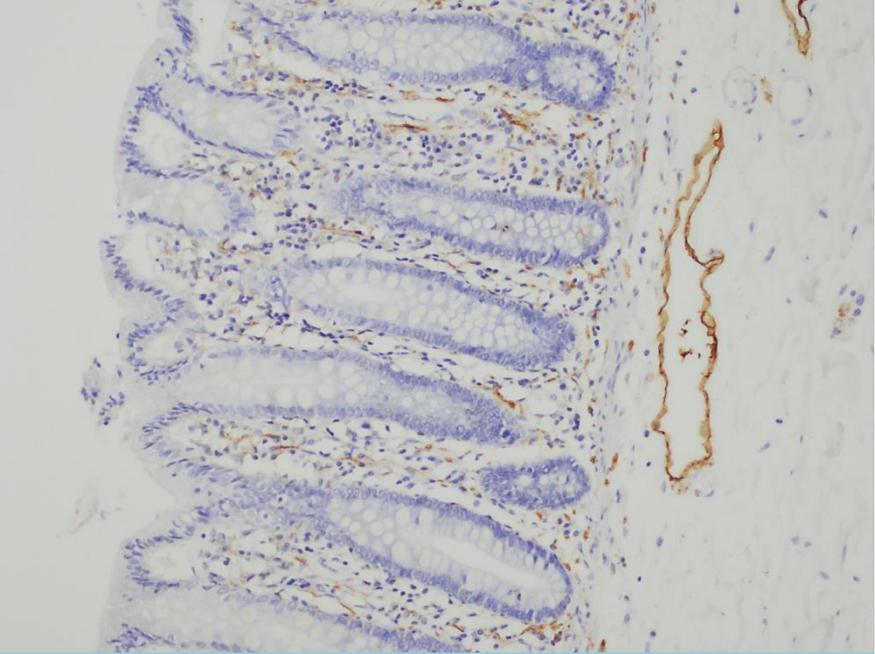


Poor

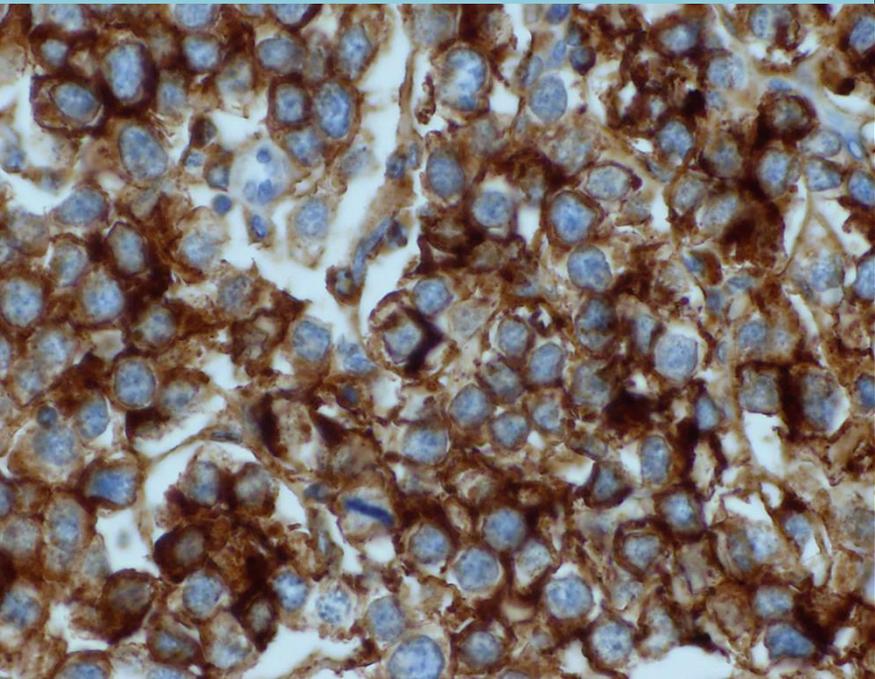


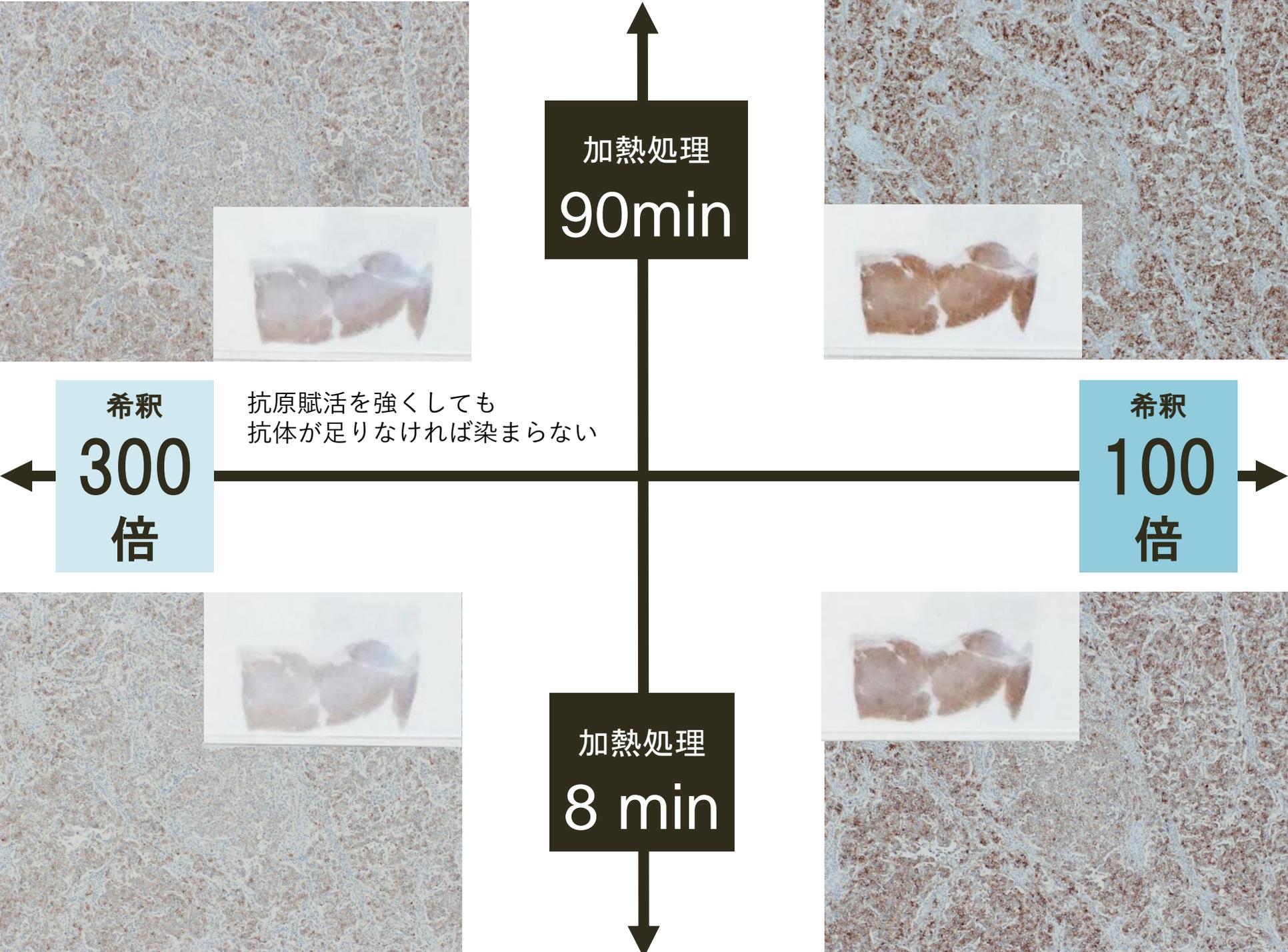
D2-40 colon

D2-40 Seminoma



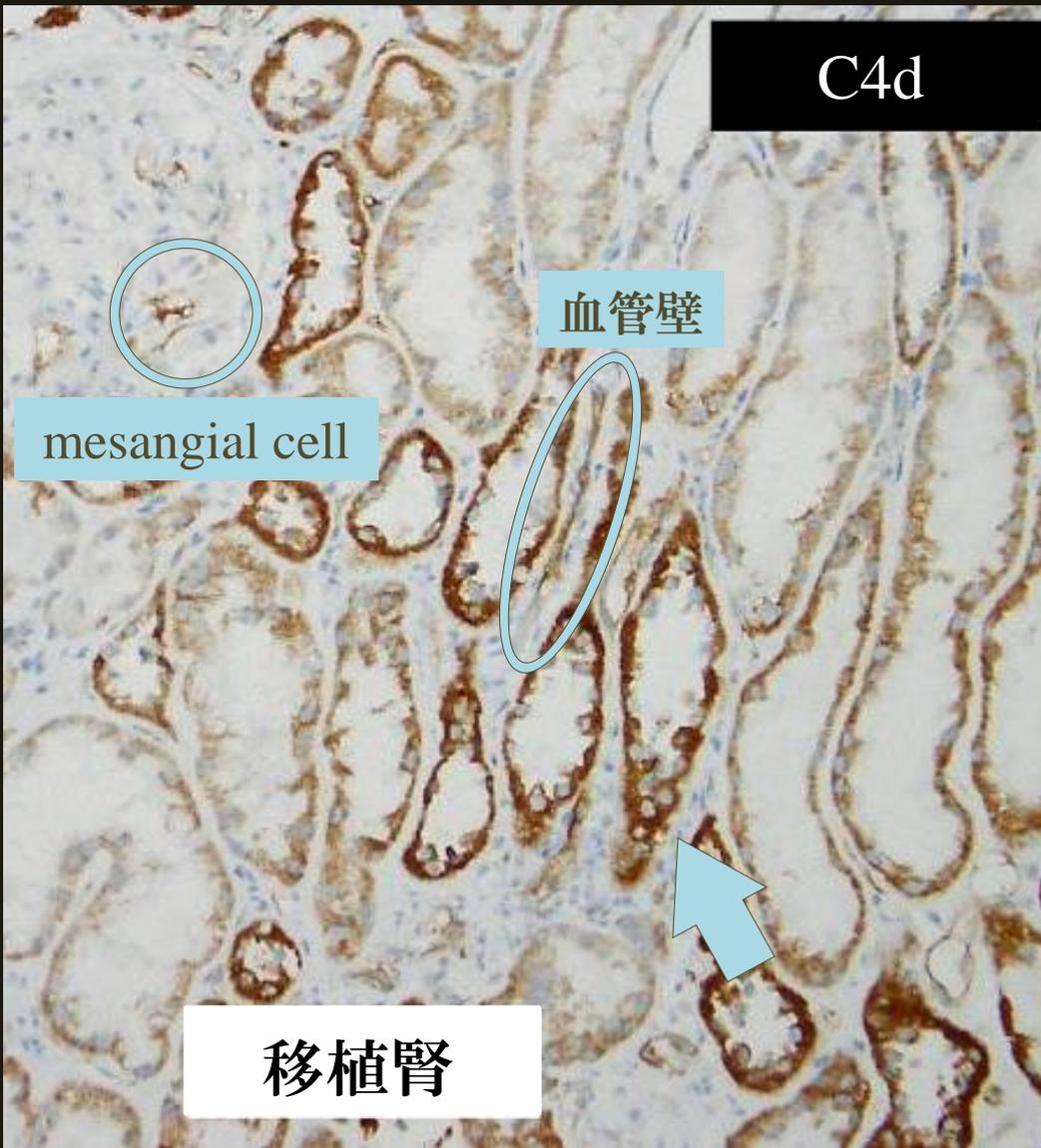
Excellent



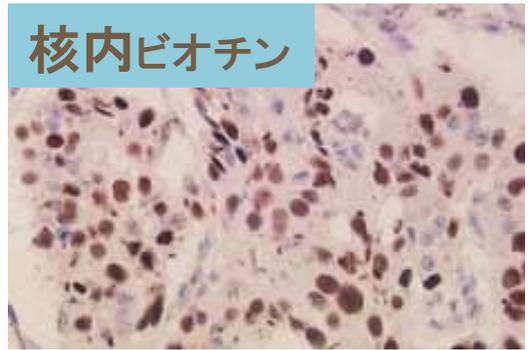


内因性ビオチン

Vitamin B7 (H)



- ・糖新生, 脂肪酸合成, アミノ酸代謝の促進に関与
- ・肝臓, 腎臓, 筋肉等に多く含有
- ・暗褐色・顆粒状



無構造核
(ウイルス感染細胞様)
Negative controlで確認

モノクローナル抗体

Monoclonal antibody

-  1個の抗体産生細胞を増殖させた細胞集団から産生.
-  構造が均一な抗体.
-  一種の抗原決定基にのみ反応 → 高い特異性

ポリクローナル抗体

Polyclonal antibody

-  精製抗原などをウサギやヤギに免疫.
→ 得られた抗血清に含まれる.
-  多種の抗原決定基を持つ → 感度が高い

NordIQC

http://www.nordiqc.org/Run-37-B15-H3/Protoc... NordIQC nordiqc.org

ファイル(E) 編集 移動(G) お気に入り(A) ヘルプ(H)

変換 選択

1 / 1 143% コラボレーション 署名 検索

Recommended protocol for CD3 (F7.2.38)

Obtained in General Module, run 37

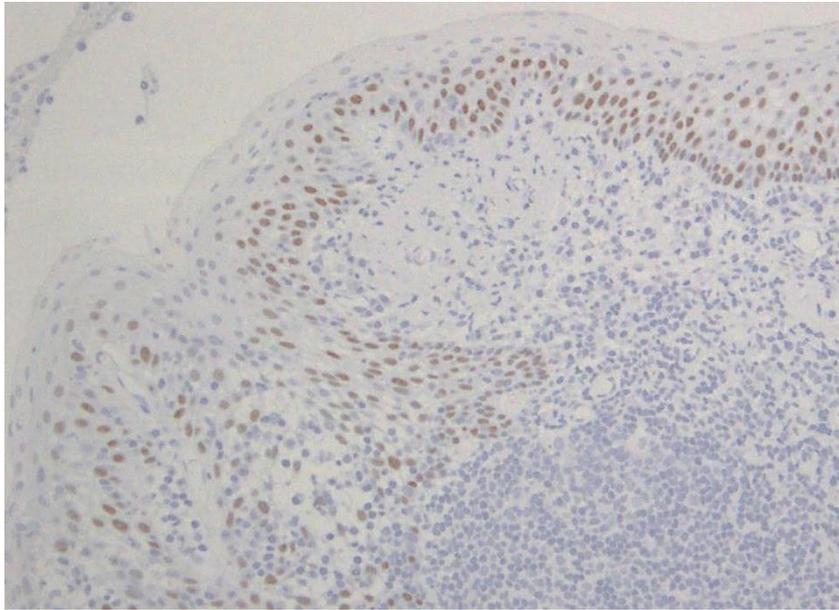
Primary antibody	
Clone	F7.2.38
Producer	Dako
Product no. (Lot no.)	M7254 (00084001)
Dilution	1:75
Diluent buffer and additive(s)	Antibody diluent S0809, Dako
Incubation time / temperature	30 min./RT
Epitope retrieval, proteolysis	
Proteolysis enzyme	None
Proteolysis time	None
Epitope retrieval, HIER	

16:55 2013/05/01

	pAb A0485	HER2-runB15	-	HER2-runB15	-
	HercepTest™ (SK001)	HER2-runB15	-	-	-
	PATHWAY® (rmAb 4B5)	-	-	HER2-runB15	-
	Oracle™ (mAb CB11)	-	HER2-runB15	-	-
Estrogen receptor alpha (ER)	6F11	-	-	-	ER-runB15
	EP1	ER-runB15	-	ER-runB15	-
	SP1	ER-runB15	ER-runB15	ER-runB15	-

Epitope	Antibody	All current protocols												Previous protocols			
		A	B	C	D	E	F	G	H	K	M	O	P	S	T	V	
ALK	mAb ALK1																Herlev, DK (Run 17) ■ Sundsvall, SE (Run 17)
	mAb 5A4																Jyväskylä, FI (Run 17)

counterstain

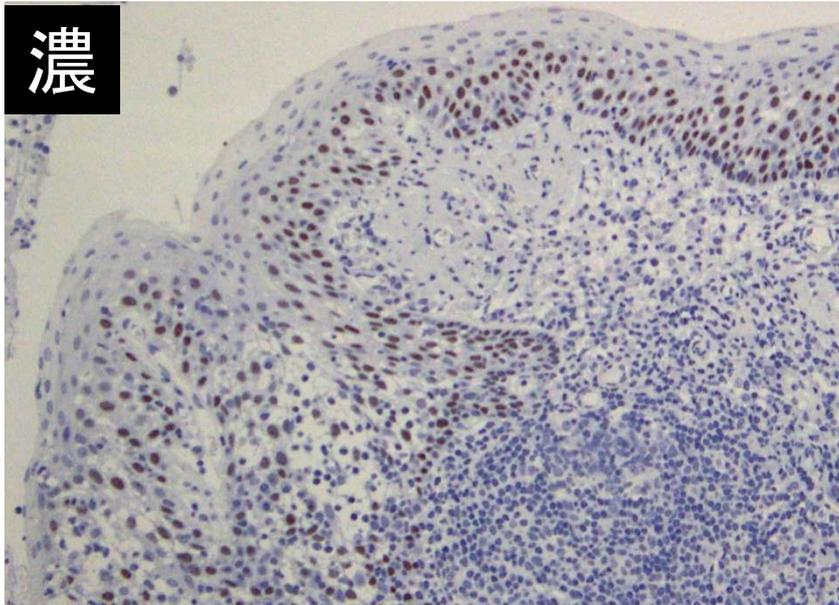


核染色の濃淡による差
(ヘマトキシリン)

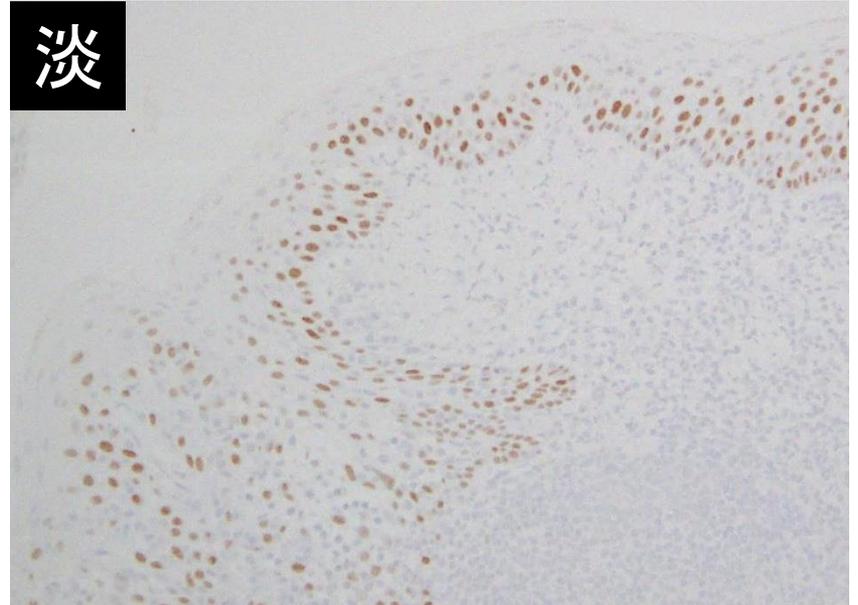
核染色とDABのコントラストにより
陽性シグナルが
確認困難な場合がある

p63

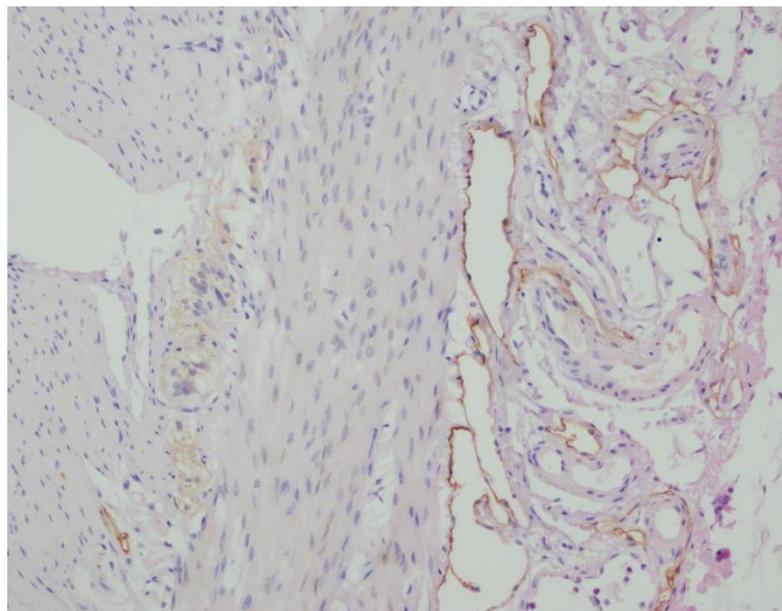
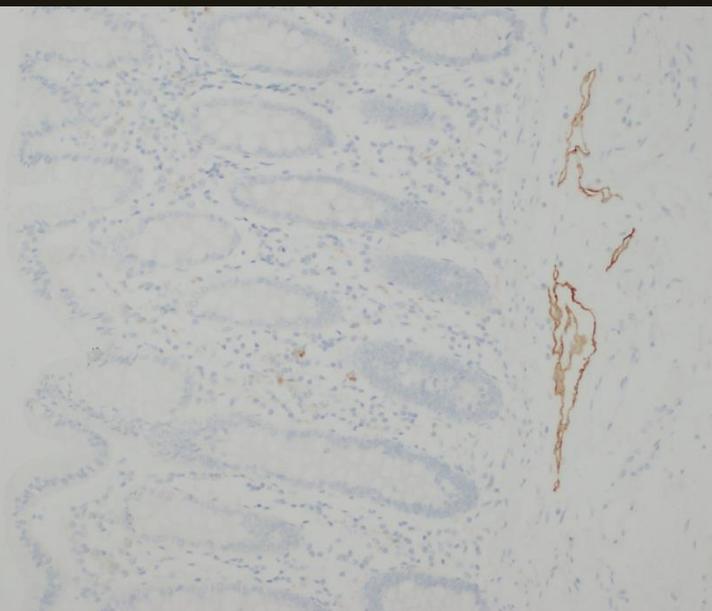
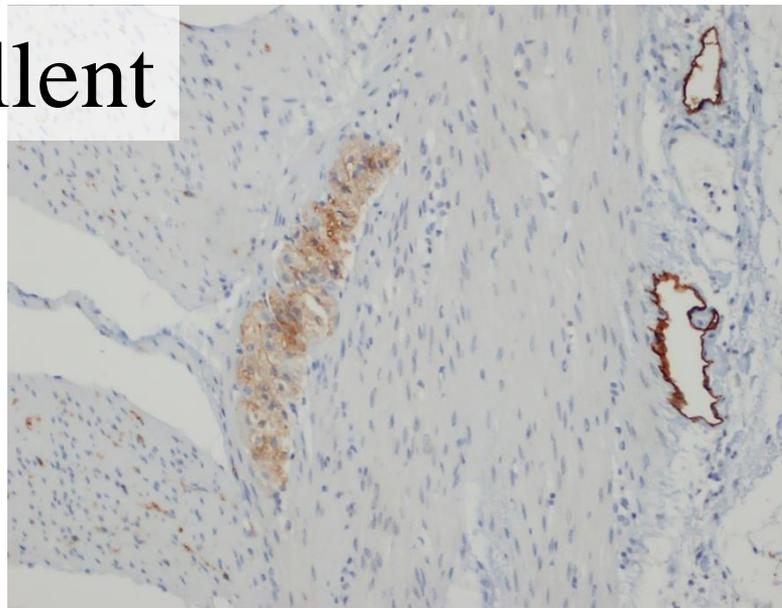
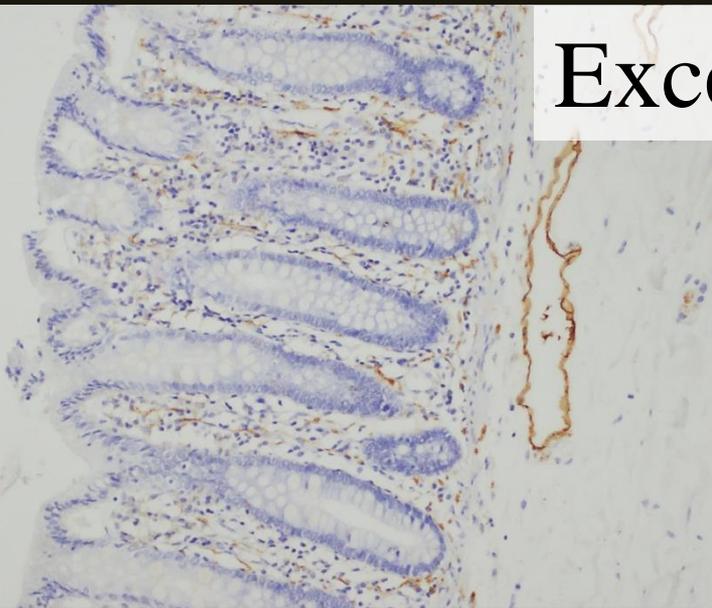
濃



淡



Excellent



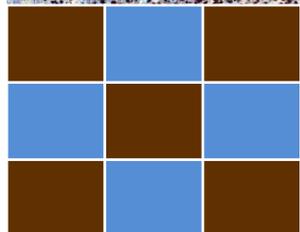
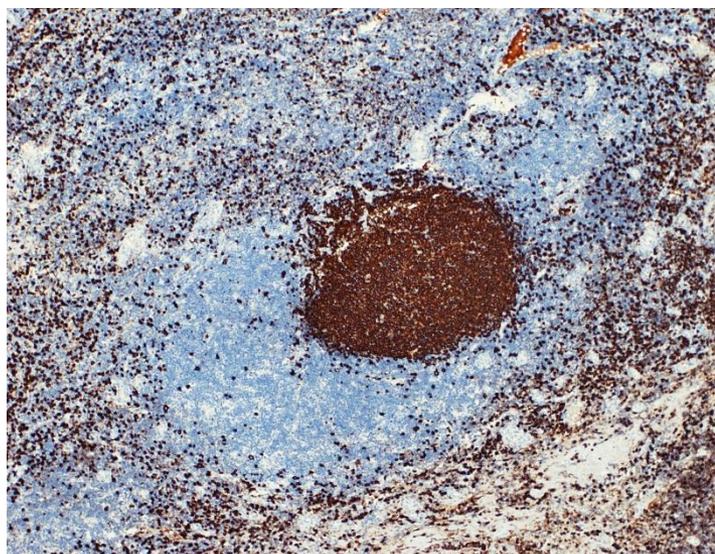
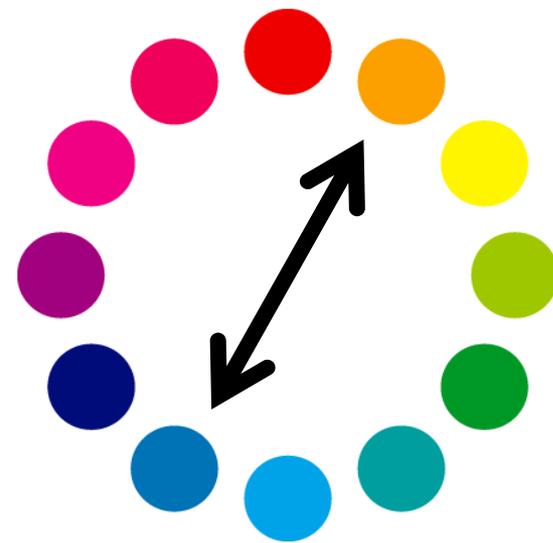
核染が薄すぎる
DABとのコントラストが低い

HEと同じ脱水・透徹系列を使用
エオジンが被る

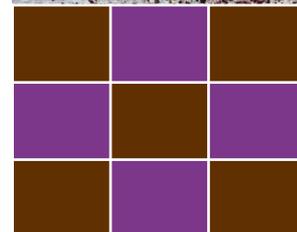
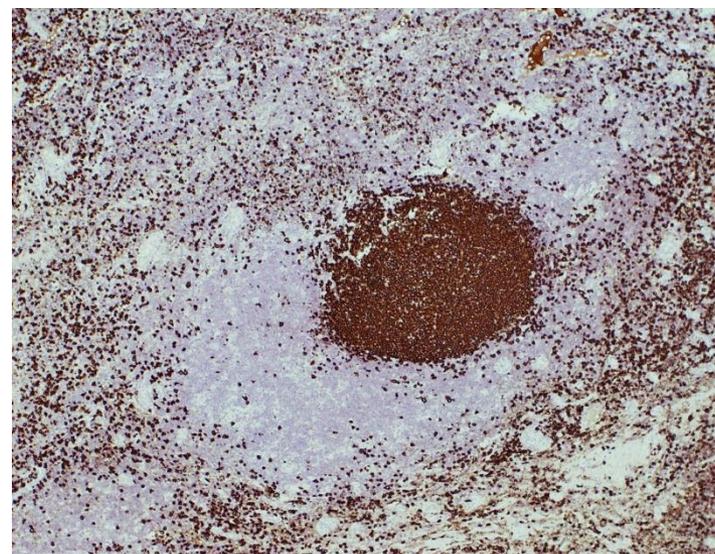
Haematoxylin

complementary color 補色

互いの色を引き立て合う
相乗効果がある



コントラスト
高い



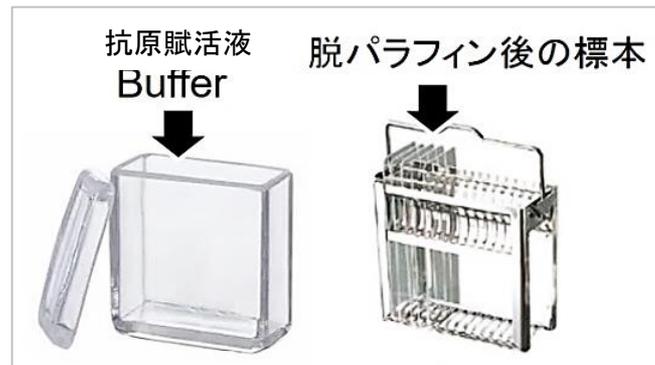
コントラスト
低い

脱灰

強酸性溶液によりタンパク質が変性

- * Androgen receptor (clone:F39.4.1)
表面脱灰でも抗原性減弱の原因となる
- * リンパ球系マーカーは影響を受けやすい

硬組織



1. 98°C程度に温めた賦活液に標本を入れる
2. 室温に冷えるまで置く

抗原性が回復することがある

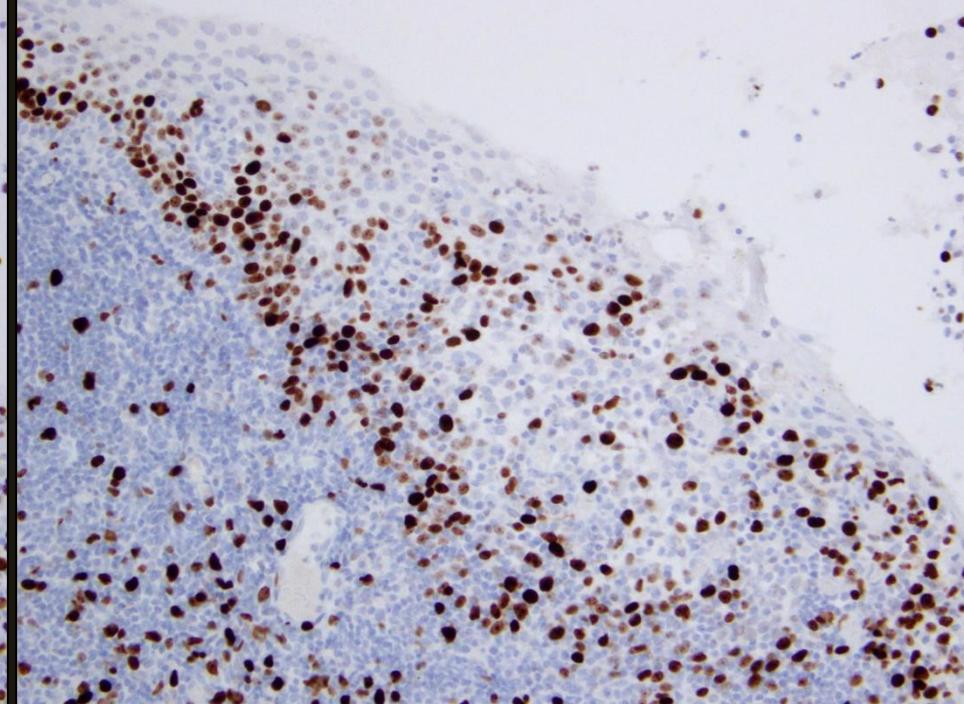
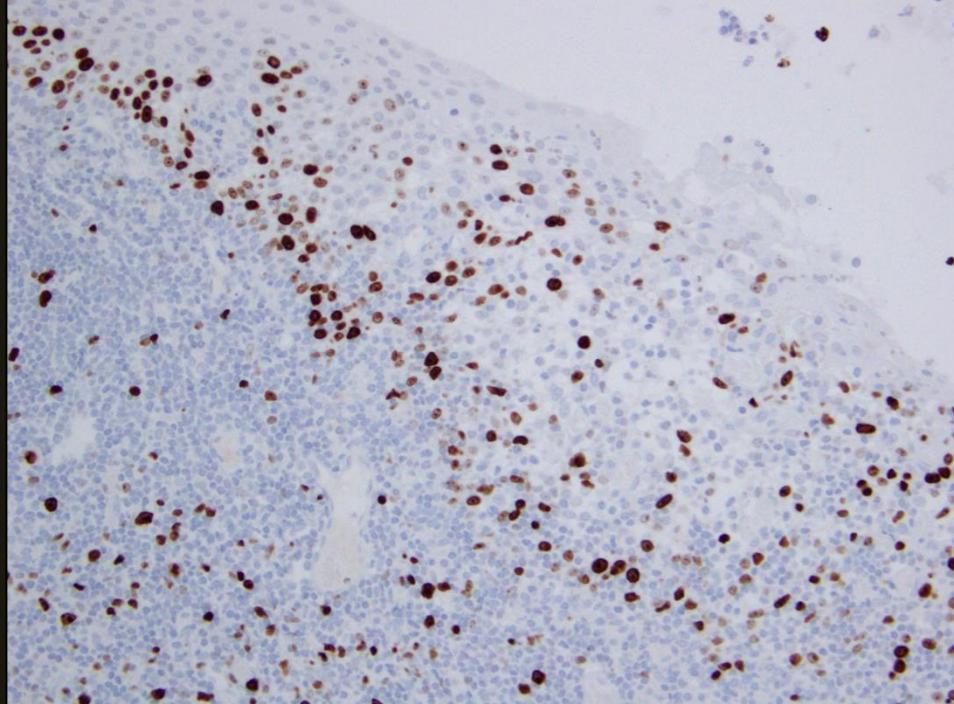
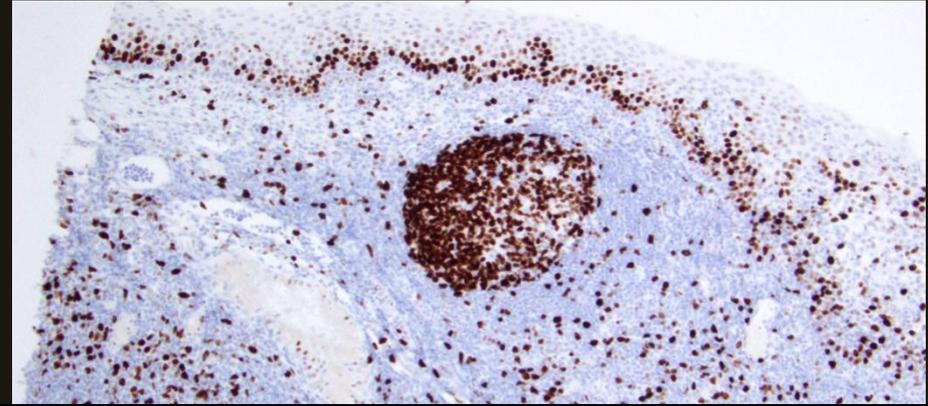
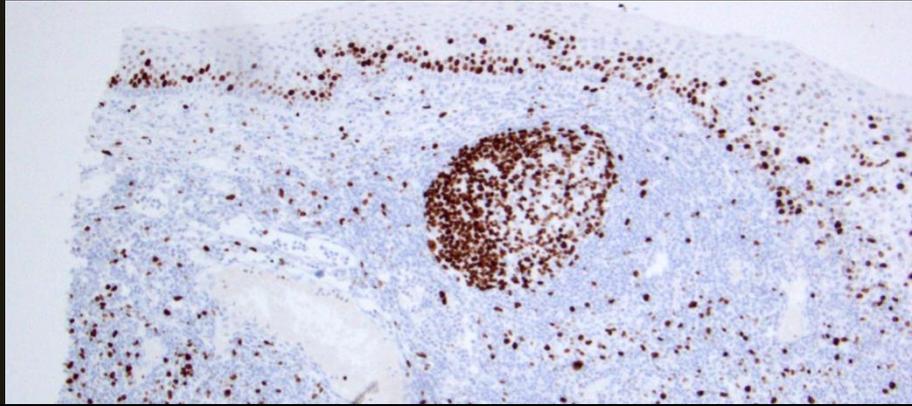
賦活

切片厚による差

Ki-67 (MIB1)

3 μ m

8 μ m



検査と技術 第46巻 第9号(9月・増刊号) 2018年9月15日発行 ISSN 0301-2611 Kansai to Chikitsu

検査と技術

臨床検査技師の「知りたい!」にこたえる

9月・増刊号

Vol. 46 No. 9 2018

現場で“パツ”と使える
免疫染色
クイックガイド

医学書院

医学書院

検査と技術

9月・増刊号

現場で“パツ”と使える

免疫染色

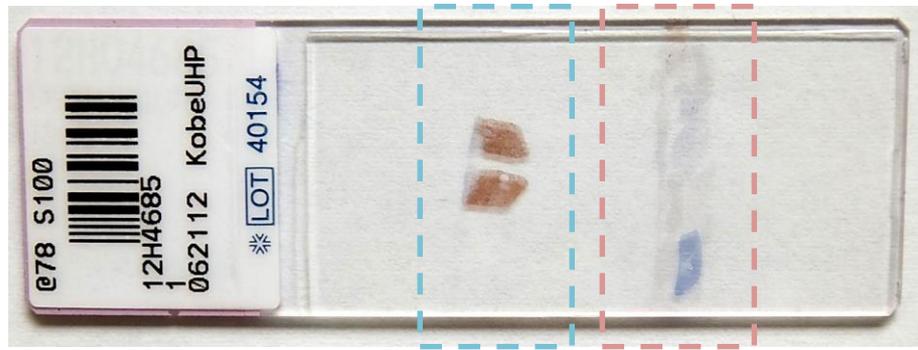
クイックガイド



企画・監修
柳田絵美衣

抗体名	Control	抗体名	Control	抗体名
α-SMA	MultiControl	Desmin	MultiControl	P504S+P63
ACTH	下垂体	DOG-1	GIST	P63
AFP	07H5640-5	E-Cadherin	MultiControl	PAX-5
ALK	10H459-1	EBER-ISH	専用	P-componen
AmyloidA	アミロイド	EMA	MultiControl	Perforin
AndrogenR	精巣	ER	専用	PE10
bcl-2	LN	Factor8	MultiControl	PLAP
bcl-6	LN	Factor13a	皮膚	PgR
Ber-EP4	MultiControl	Fastin	MultiControl	PRL
β-catenin	大腸癌	Gastrin	胃	PSA
BOB-1	LN	GCDFP-15	乳癌	S-100
C4d	MultiControl	GFAP	MultiControl	SALL4
CA19-9	膵癌	Glucagon	MultiControl	Somatosta
Caicitonin		GH	下垂体	Synaptoph
Caldesmon	MultiControl	GranzymeB	LN	TdT
Calretinin	胸膜腫	HBME-1	MultiControl	Thrombom
CD1a	皮膚	HBsAg	専用	Thyroglobu
CD3	LN	HCG	胎盤	TIA-1
			MultiControl	Trypsin
			ER2専用	TSH
			MultiControl	TTF-1
				Vimentin
				WT-1

Control

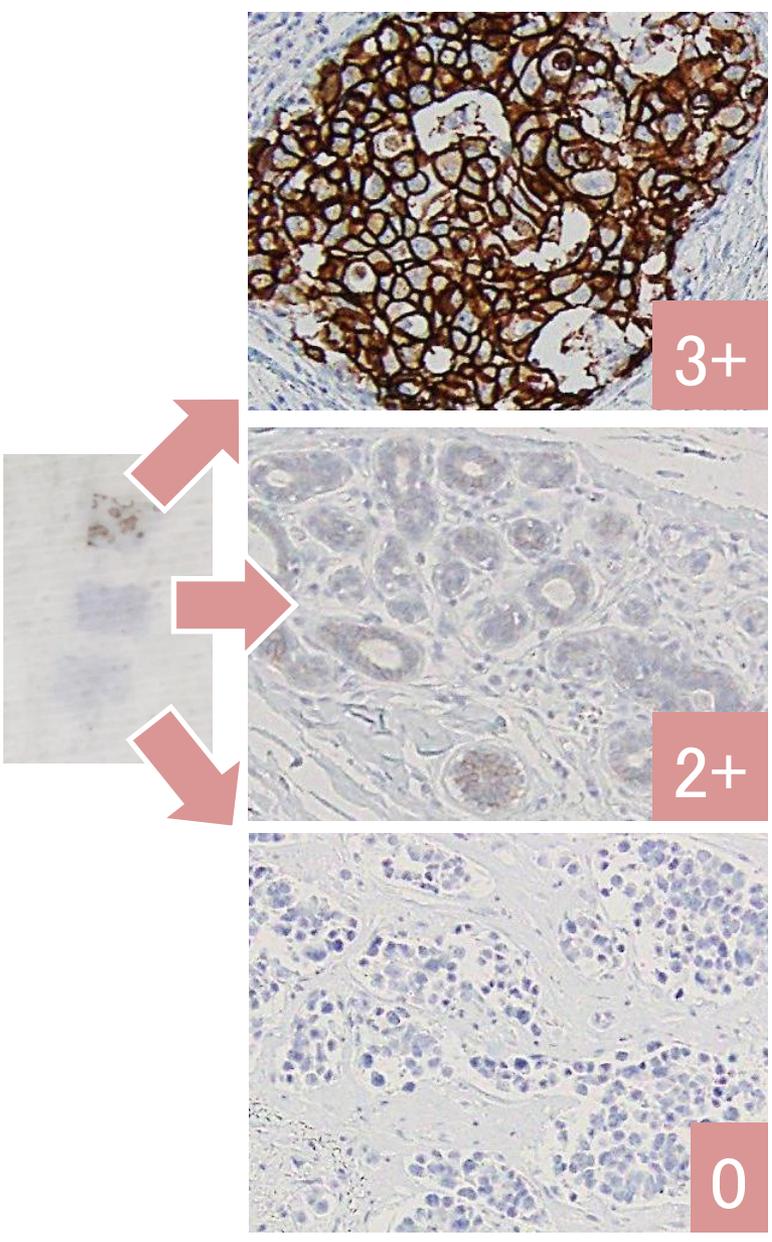


検体 Control

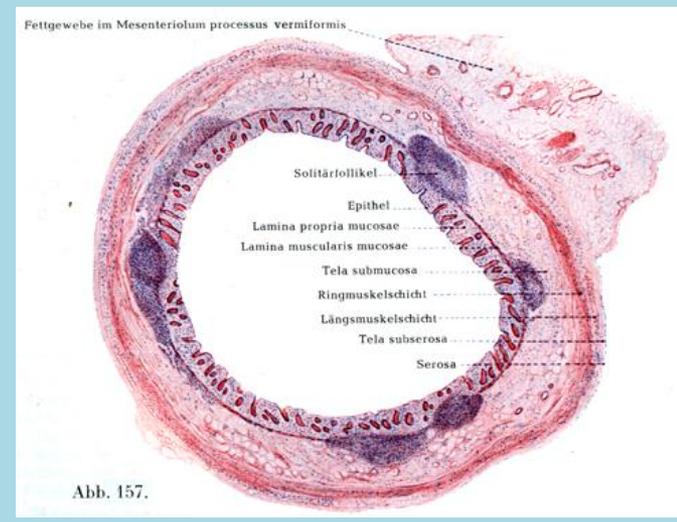


同じスライドガラスの上に
検体と**Control**をのせ
 同じ条件下で染色する

Her2 control



簡単に作れるcontrol



虫垂 appendix

- リンパ球・形質細胞
- 間質細胞
- 上皮
- 中皮
- 神経
- 白血球
- 血管
- 内分泌細胞
- 平滑筋

様々な組織・細胞が含まれる
 ある程度の抗体に対する
 Controlとして用いることが可能

抗体管理

高頻度で使用する 4°C



低頻度・劣化しやすい -80°C



- * 希釈済抗体は蛋白濃度が低いため凍結しても失活・変性しやすい
- * 活性の低い抗体の保存は液体窒素(-170°C)が薦められる
- * -80°C 保存でも徐々に力価が下がるものもある (ハプテン・IgM型mono)

抗体保存
の
Point



Point

1

希釈せず
高濃度に保つ

低蛋白濃度



変性・失活しやすい

Point

2

高濃度は 凝集の原因

濃度2～10mg/ml以下

1mg/ml以下の場合は
ウシ血清アルブミン等を加える

Point

凍結融解の反復



失活

3

分注し-20°C以下保存

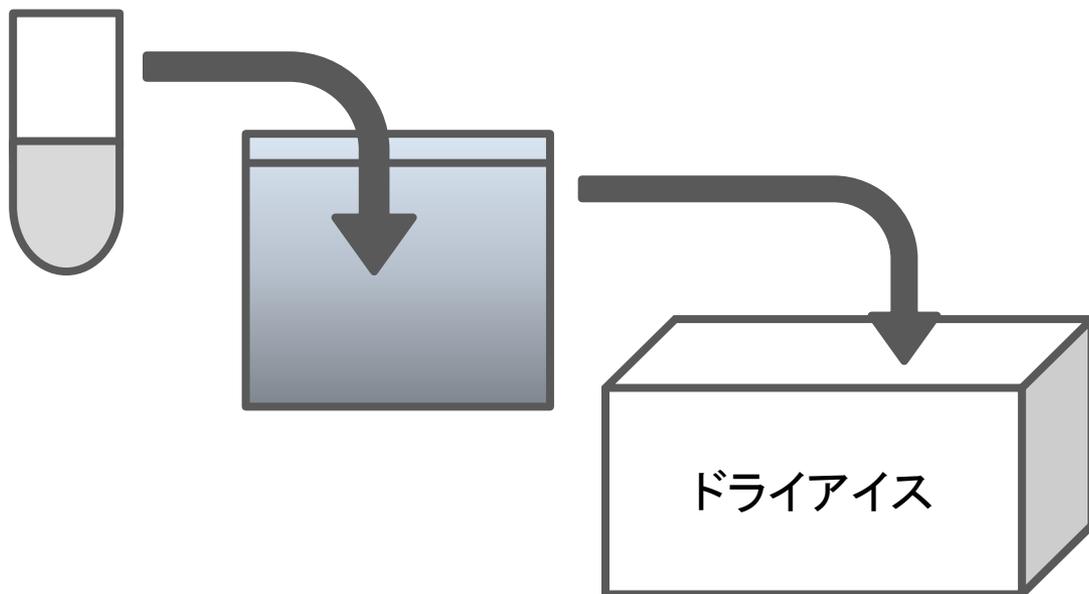
霜取り機能付きフリーザは使用しない
(繰り返し凍結融解が起こる)

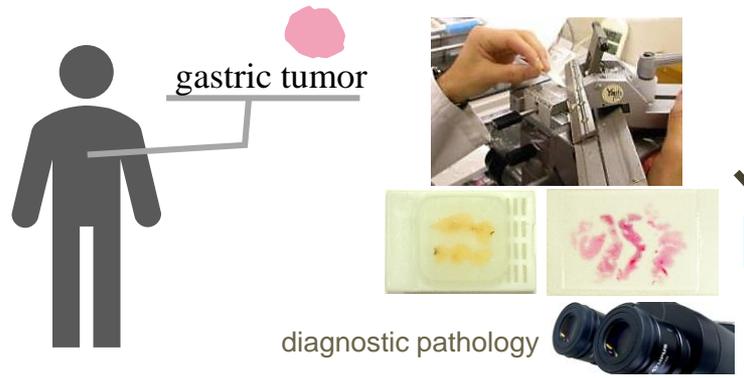
Point

ドライアイス 要注意

4

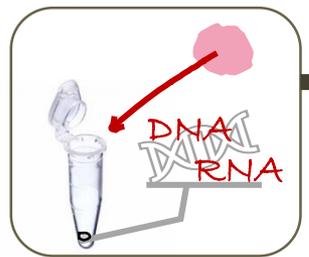
密封→ビニール袋



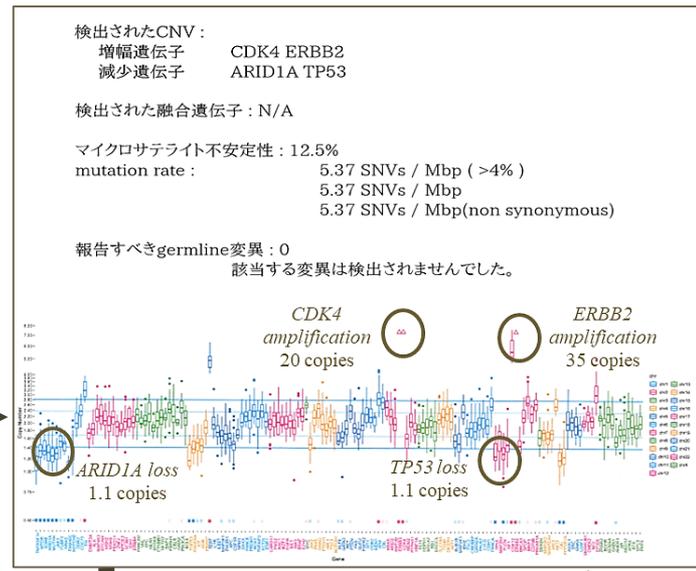


gastric cancer adenocarcinoma

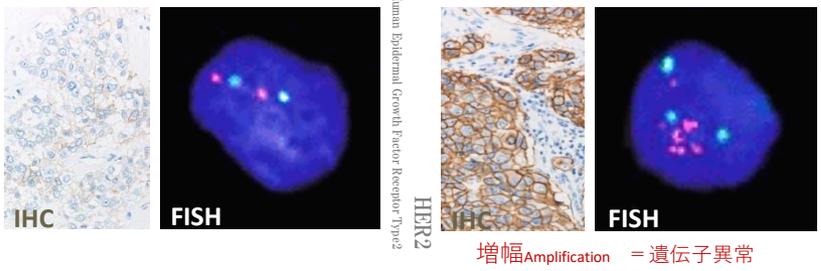
原発不明癌



薬剤耐性



Precision Medicine



標準治療

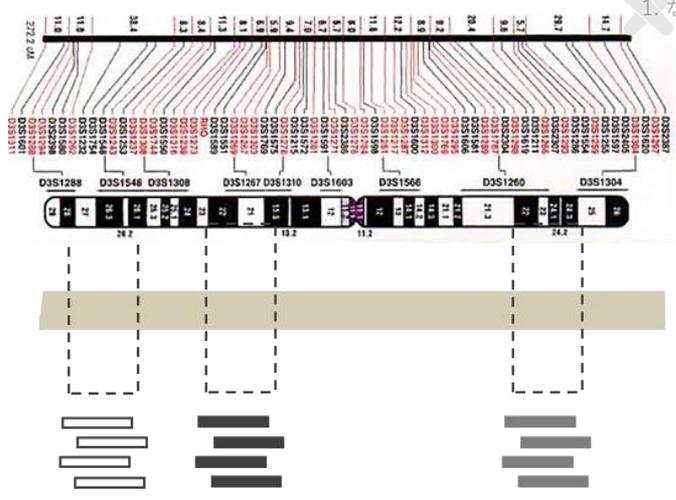
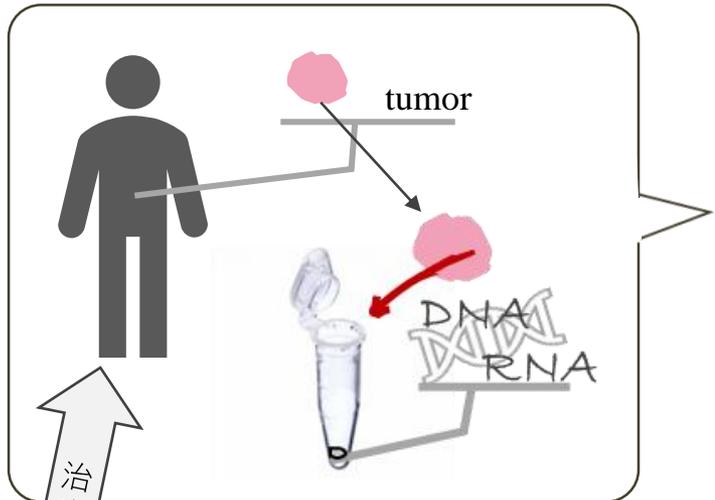
- 推奨1
 - CS療法
- 推奨2
 - XELOX療法
 - SOX療法

コンパニオン診断
Companion diagnostics
(CoDx / CDx)



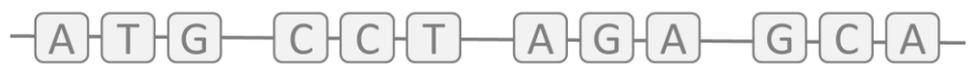
がん遺伝子変異: 5

凡例: 遺伝子名	変異 (VAF%) (COSMIC件数 / ClinVar significance / CIViC evid.level)	薬剤
Major変異	* (+) BRCA2 D1990A (47.63%) (Uncertain si)	Olaparib, プラチナ系
	* (2) TP53 Q192* (60.60%) (97 / A)	Everolimus
	* (3) PIK3CA C420R (71.40%) (-75 / Pathoge)	Sirolimus (保険適応外)
Minor変異	* (4) BRAF R389C (6.60%) (1 / Uncertain si)	Vemurafenib
	* (5) TERT H296fs (0.00%)	
	* (6) ESR1 - (56.00%)	
SNP	(+) TP53 P72R (56.36%) (35 / drug response / A)	
VUS遺伝子	CBL(3.20%) ARID2(3.00%) KMT2D(3.60%) NF2(3.50%) MLH1(4.10%)	ホルモン製剤不応性



がん発生に関する遺伝子に絞る

塩基1つ1つ読み取る



薬剤・治験

がん遺伝子変異: 5

凡例: 遺伝子名 変異 (VAF %) (COSMIC併致 / ClinVar significance / CIVIC evid.level)

Major変異

- * (+) **BRCA2 D1990A** (47.63%) (Uncertain si) → **Olaparib, プラチナ系**
- * (2) **TP53 Q192*** (60.60%) (97 / A) → **Everolimus Sirolimus** (保険適応外)
- * (3) **PIK3CA C420R** (71.40%) (L75 / Pathoge)
- * (4) **BRAF R389C** (6.60%) (1 / Uncertain si)

Minor変異

- * (5) **TERT H296fs** (0.00%) → **Vemurafenib**
- * (6) **ESR1 -** (56.00%) → **ホルモン製剤不応性**

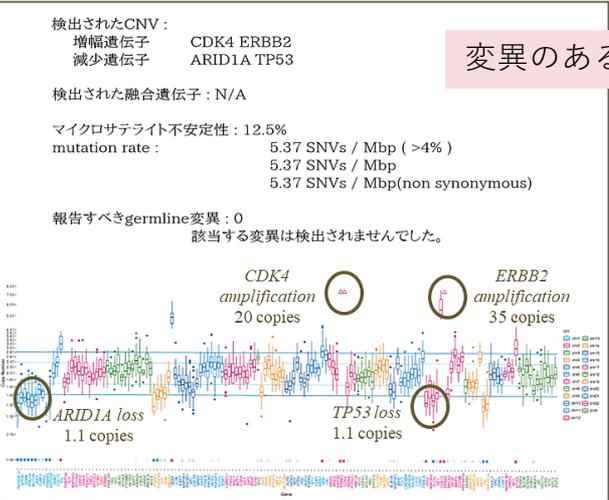
SNP

- (+) **TP53 P72R** (56.36%) (35 / drug response / A)

VUS遺伝子

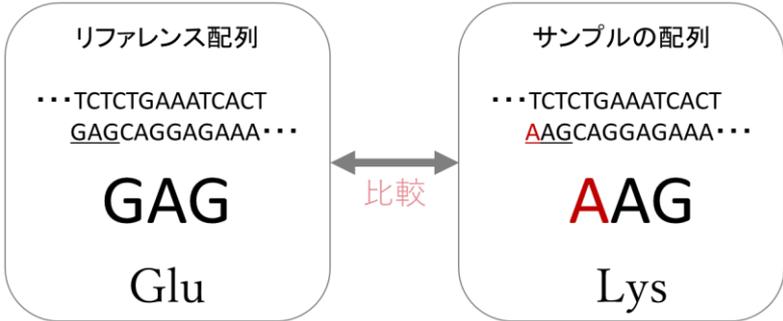
- CBL**(3.20%) **ARID2**(3.00%) **KMT2D**(3.60%) **NF2**(3.50%)
- MLH1**(4.10%)

変異のある遺伝子

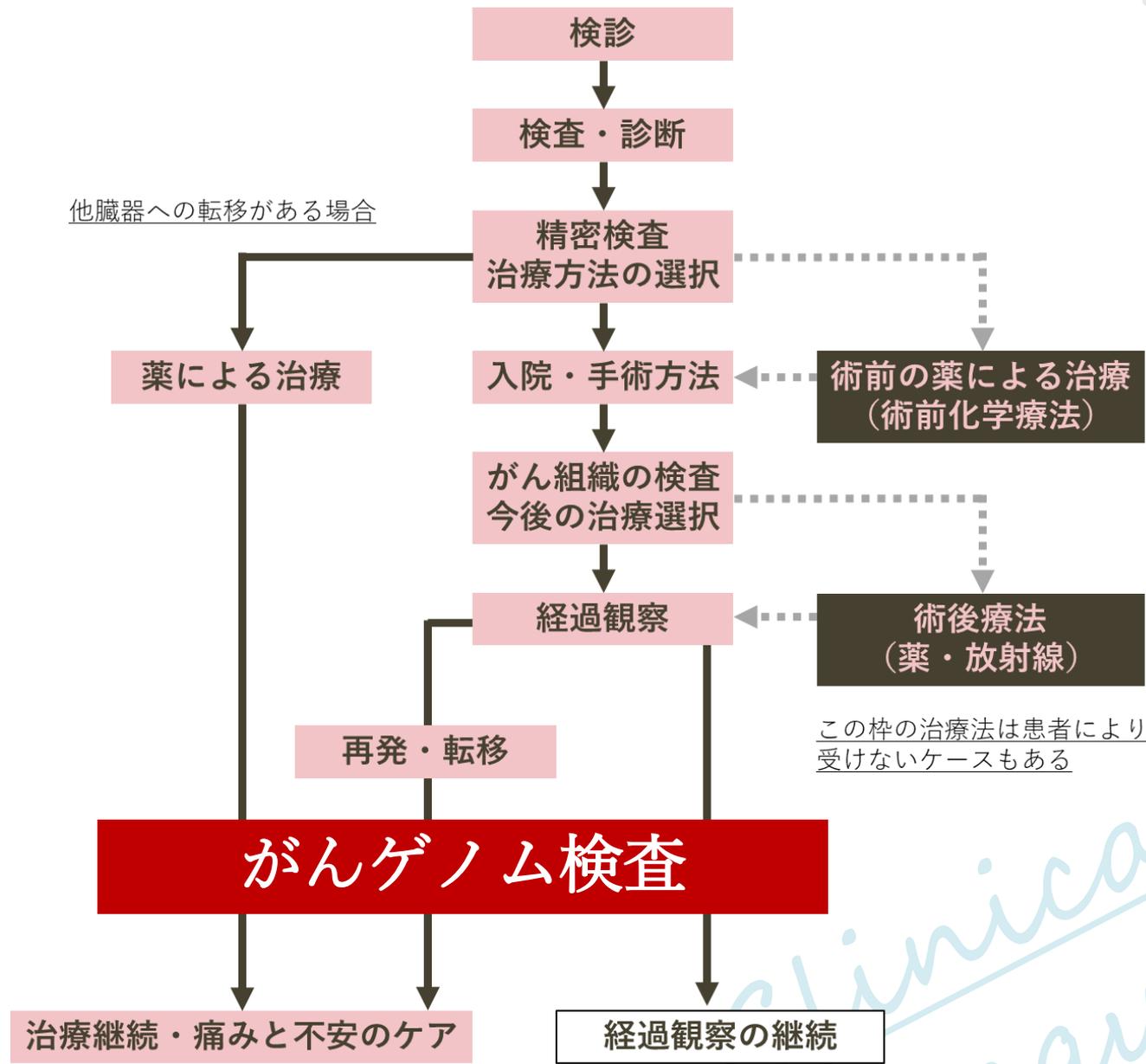


ヒトの標準的 (基本となる) 遺伝子配列

NGSで読み取った患者の 遺伝子配列

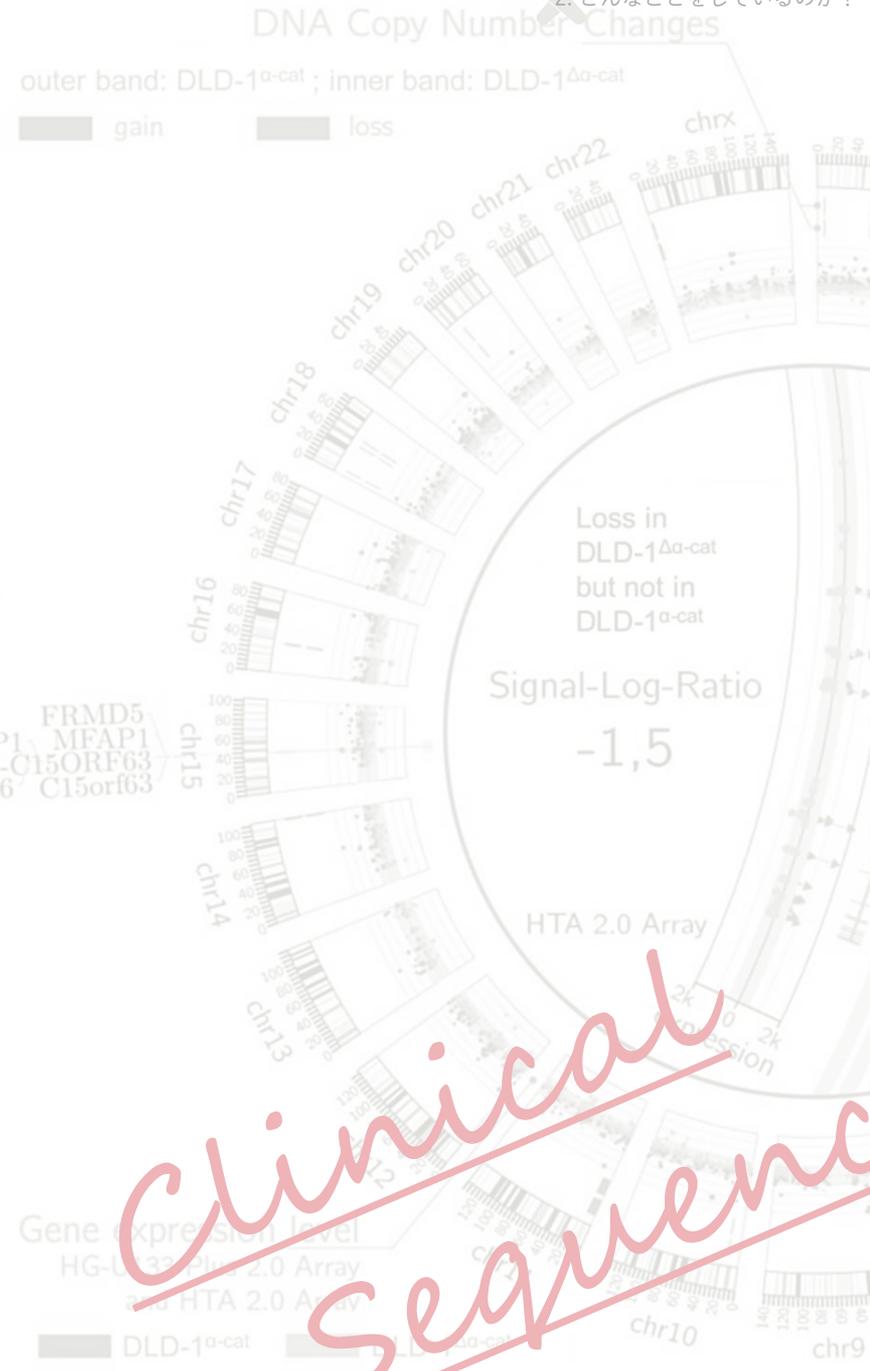
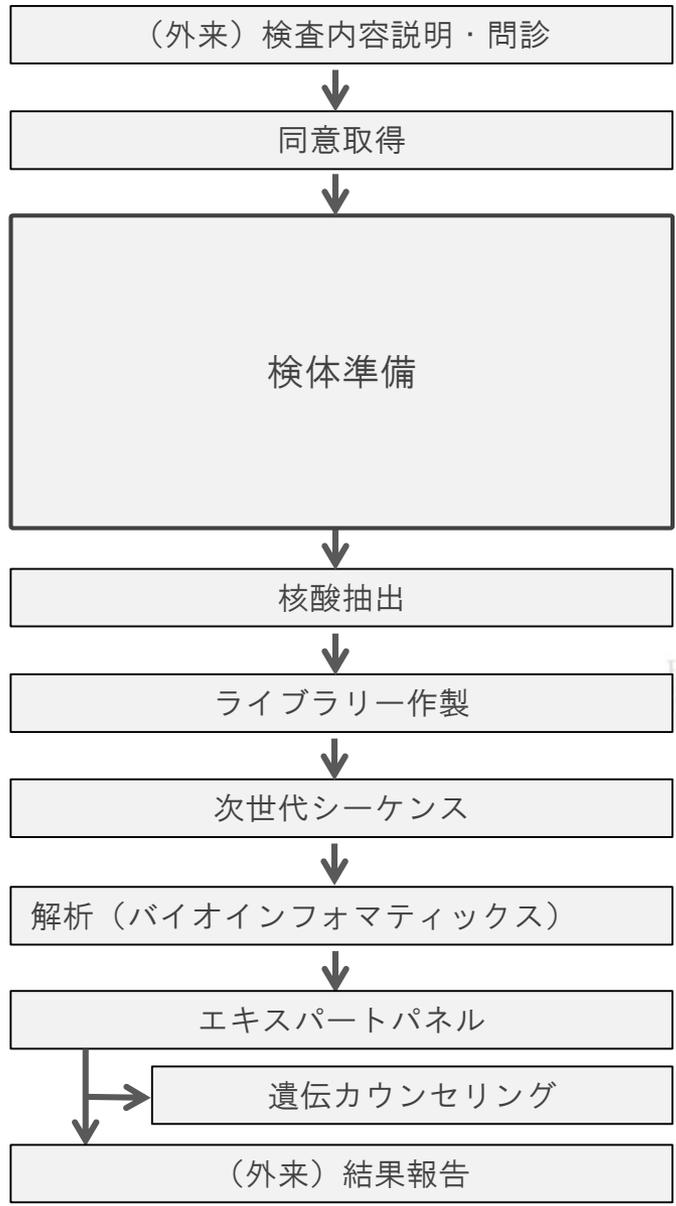


どこが違う？
何が違う？
異なることで何が起る？

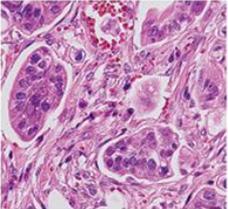


Clinical Sequence

がんゲノム医療 検査の流れ



検査の流れ



病理医が指示する
FFPE
(がん組織)の未染色標本を作製する



DNAを抽出



目的のDNA配列を増幅させる
+
ライブラリー構築する



NGSでDNA配列を一塩基ずつ読み取る

```
##fileformat=VCFv4.1
##FILTER=<ID=FS200,Description="FS > 200.0">
##FILTER=<ID=FS60,Description="FS > 60.0">
##FILTER=<ID=LowQual,Description="Low quality">
##FILTER=<ID=MQ40,Description="MQ < 40.0">
##FILTER=<ID=MQRankSum-12.5,Description="MQRankSum < -12.5">
##FILTER=<ID=QD2.0,Description="QD < 2.0">
##FILTER=<ID=ReadPosRankSum-20.0,Description="ReadPosRankSum < -20.0">
##FILTER=<ID=ReadPosRankSum-8.0,Description="ReadPosRankSum < -8.0">
```

bioinformatics

Chromosome	Start	End	Score	FDR	Gene Symbol	Longest Transcript	Over
chr9	3000013	3000043	56		FLNB		CDS-
chr9	3000232	3000250	13		ALCAM		Ustr
chr9	3001369	3001411	428		ALCAM		CDS-
chr9	3004632	3004669	105		FLNB		Ustr
chr9	3005758	3005792	13		FLNB		CDS-
chr9	3006429	3006467	20		C3orf67		CDS-

Annotation VCFの情報に遺伝子変異等の情報付加する (アミノ酸変化の有無、機能変化)

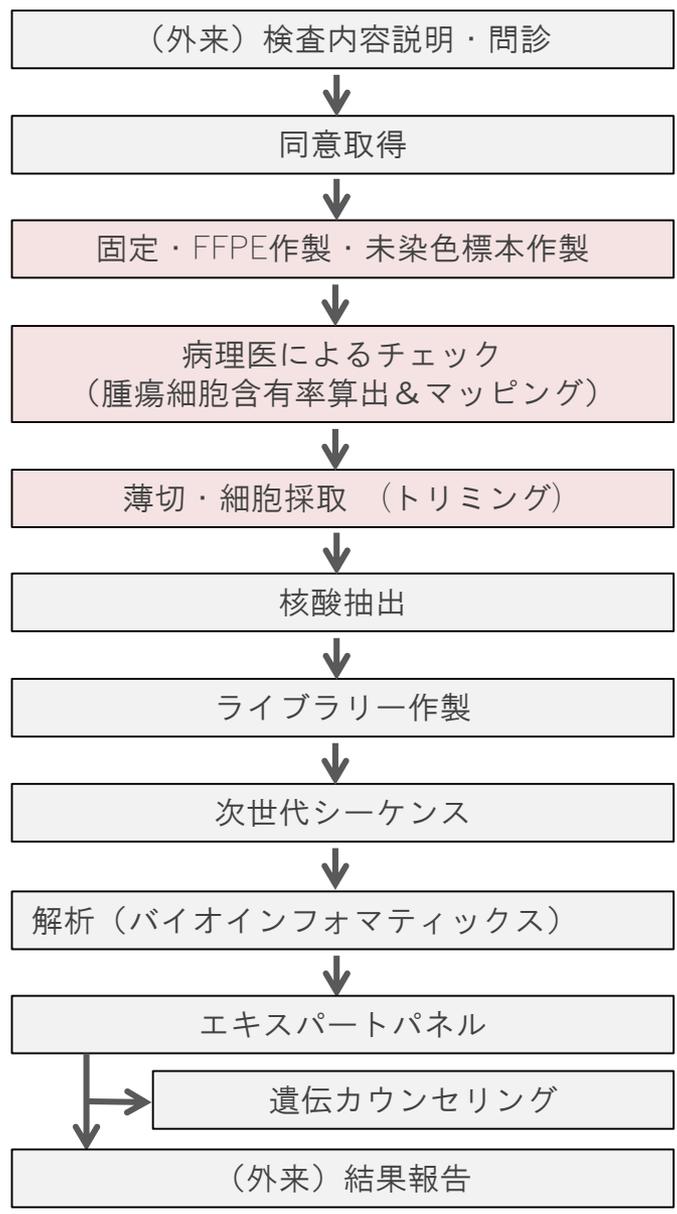
がん発生の原因となっている可能性のある遺伝子を選抜する。

エキスパートパネル

ゲノム解析結果より
治験や薬剤の情報を検索、検討する。

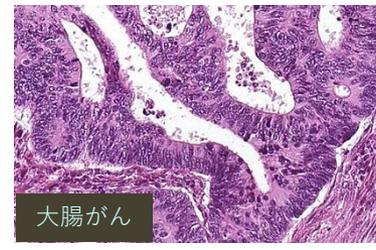
病理

腫瘍細胞含有率と 採取すべき細胞をマーキング



腫瘍細胞含有率の算出

2. どのようなことをしているのか?



鏡検・判定



病理医が腫瘍細胞が含まれる%を算出

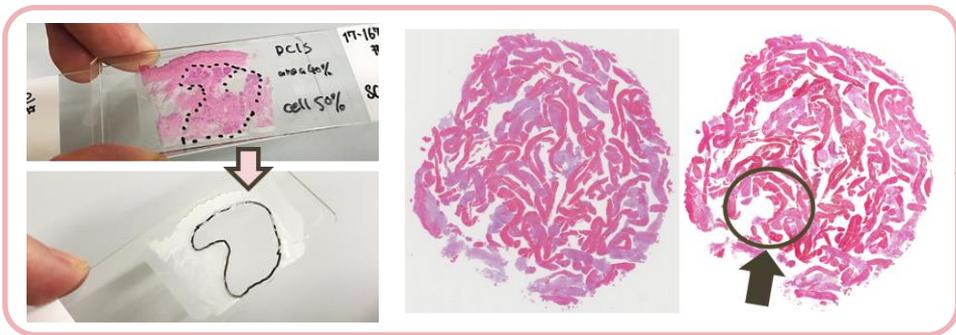


腫瘍細胞含有率

$$\frac{\text{腫瘍細胞数}}{\text{有核細胞数}}$$

マッピング & ダイゼクション

病理医がHE標本から
癌組織型と腫瘍細胞の範囲を確認する



目的の腫瘍細胞を採取する
腫瘍細胞から可能な限り多くの核酸を抽出する



遺伝子関連検査

腫瘍細胞からDNAを抽出し品質を確認する

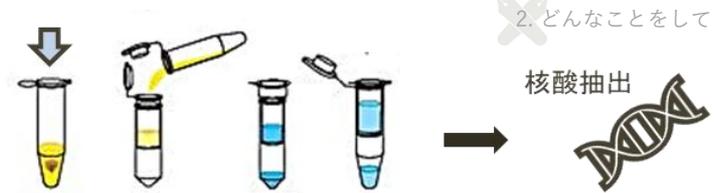


サンプル準備・破碎
迅速に組織・細胞を破碎

ライゼート調製
タンパク質変性・(タンパク質-核酸)複合体を解離
核酸分解酵素を効果的に不活性化

除タンパク質など
核酸を他の細胞内因子(タンパク質、脂質など)を分離

核酸(DNAまたはRNA)回収
目的の核酸を回収



2. どのようなことをしているのか?

抽出した核酸の品質がNGS解析に適しているかを確認



- * バイオアナライザ
 - * 蛍光光度計
 - * リアルタイムPCR
- 断片化
濃度
ΔCT



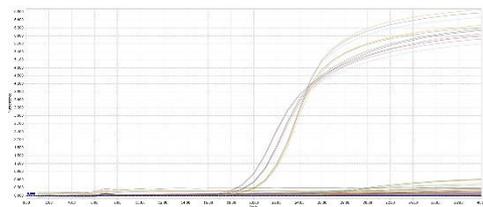
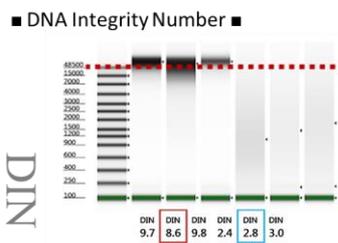
核酸の濃度測定

Invitrogen™
Qubit™ 4

Applied Biosystems®
QuantStudio®



核酸の濃度
断片化 (DIN)
CT測定



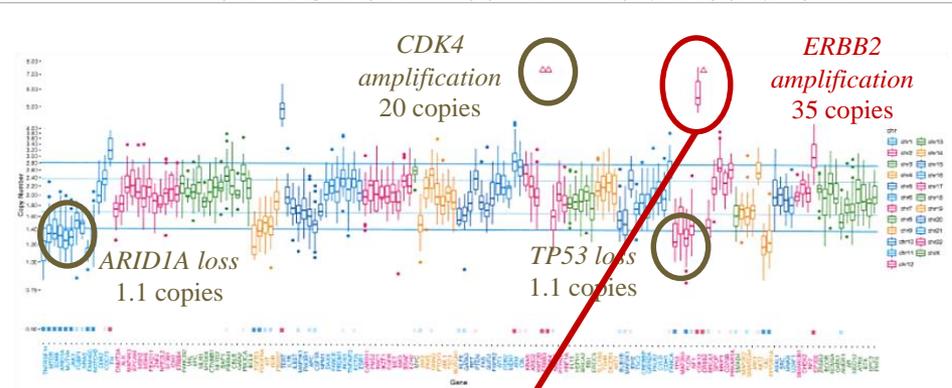
Immunohistochemistry

免疫染色・FISH

遺伝子変異がタンパク質に及ぼす結果



タンパク機能変化の有無 & 薬剤有効性は？



乳癌における術後補助化学療法の選択

Breast cancer

内因性サブタイプ
定義

治療方針

Luminal A

ER+ · HER2-

内分泌療法

内分泌療法 + 従来の抗癌剤

Luminal B

ER+ · HER2+

内分泌療法

内分泌療法 + 従来の抗癌剤

内分泌療法 + トラスツズマブ + 従来の抗癌剤

HER2-enriched

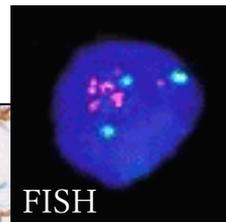
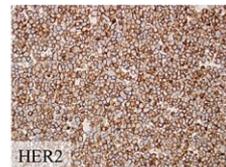
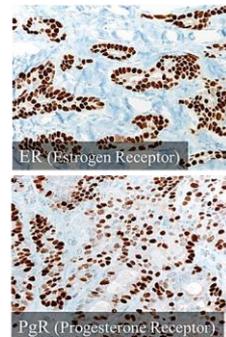
ER- · HER2+

トラスツズマブ + 従来の抗癌剤

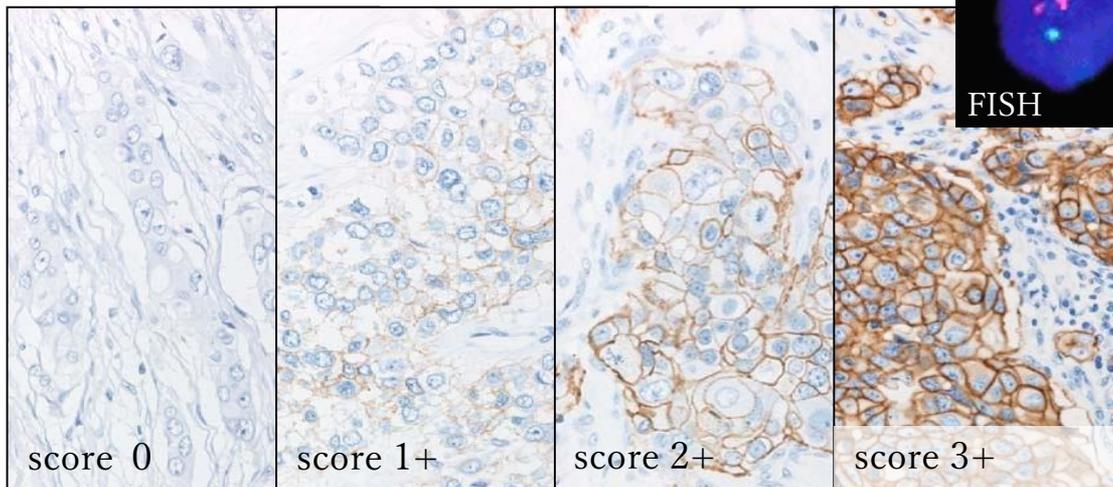
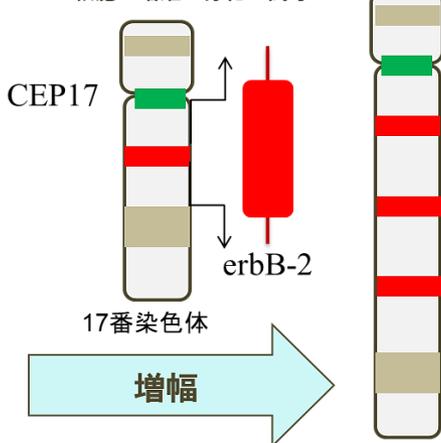
Basal-like

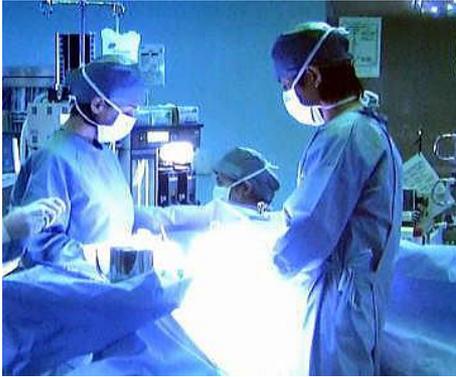
ER- · HER2-

従来の抗癌剤

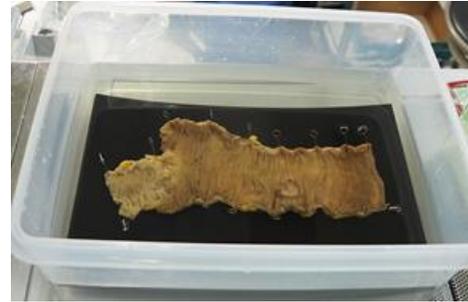


HER2遺伝子 (HER2/neu, c-erbB2)
細胞の増殖・分化に関与





摘出からホルマリン浸漬



切り出し



おさえたい

Point



① 摘出からホルマリンに浸漬するまでの時間

② ホルマリンに浸漬する時間

- ・ 固定までの時間
- ・ 固定中の時間
が核酸の品質に影響する

固定液	: 中性緩衝ホルマリン
ホルマリン濃度	: 10% (ホルムアルデヒド3.7%)
固定までの時間	: ~1時間
固定時間	: ~48時間

固定前プロセス

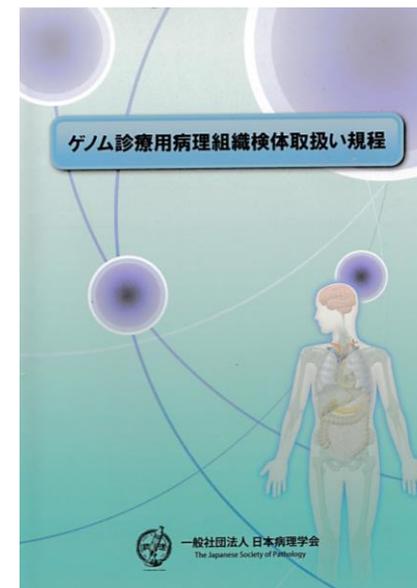
1. 摘出後は速やかに冷蔵庫など4°C下で保管し、1時間以内（遅くとも3時間以内）に固定を行う。
2. 摘出後30分以上室温で保持することは回避する。

固定プロセス

1. 中性緩衝ホルマリン溶液を用いる。
2. ホルマリン濃度は10%（3.7%ホルムアルデヒド）を用いる。
3. 6～48時間の固定を行う。
4. 固定に使用する固定液量は、組織量に対し10倍量を使用する。
5. ホルマリン固定時は室温で行う。

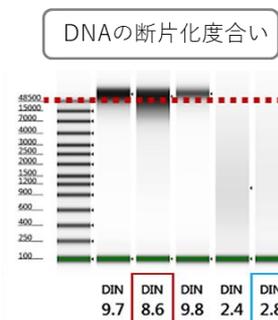
FFPE検体の核酸品質確認のための主な指標
（ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程）

指標	対象	説明
Ct値/ Δ Ct値	DNA/RNA	<ul style="list-style-type: none"> リアルタイムPCR（DNA）もしくはリアルタイムRT-PCR（RNA）法による。 Ct値を用いて核酸品質を評価。 異なる長さの2種のアンプリコンサイズから得られるCt値の差（ΔCt値）を指標とする。
DIN	DNA	<ul style="list-style-type: none"> アジレント社のAgilent 2200/4200 Tape Stationシステム。 gDNAの分解度に応じて1～10にスコア化された値。 FFPE検体のDNA品質評価が可能である。
Q-value	DNA	<ul style="list-style-type: none"> 国立がん研究センター中央病院が開発したDNAの品質指標。 リアルタイムPCR法を用いて得た測定値（Ct値）を蛍光法による測定値（dsDNA濃度）で割った値。



ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程
日本病理学会, 2018.

■ DNA Integrity Number ■

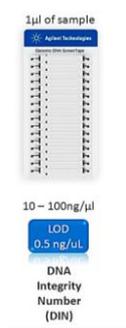


MAX : 10
（長いDNAの場合）

DNAの品質



Tape Station



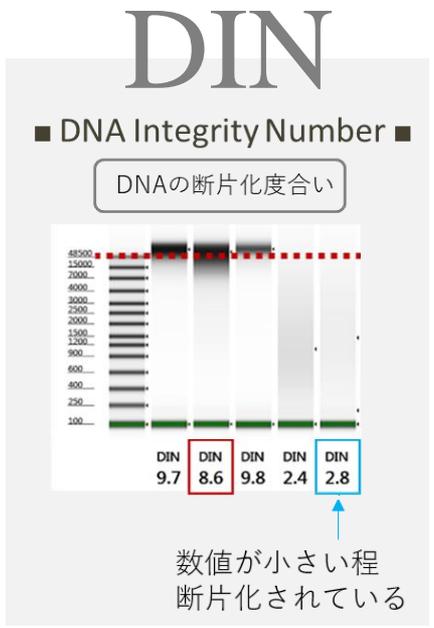
DIN DNA Integrity Number とは

DNAの断片化度合い

MAX : 10
(長いDNAの場合)

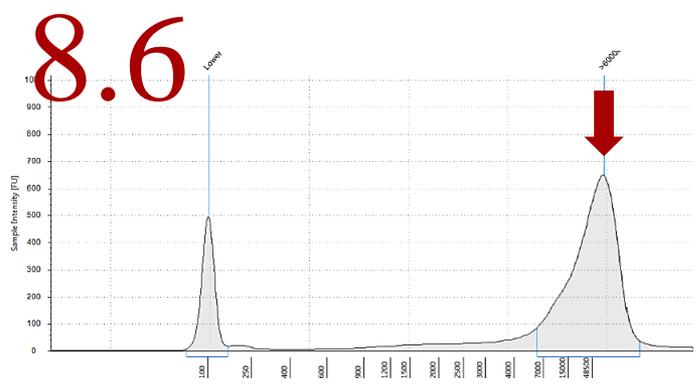


DNAが断片化すると
数値が低くなる
↓
DNA品質が悪い



数値が小さい程
断片化されている

長いDNAが多く存在

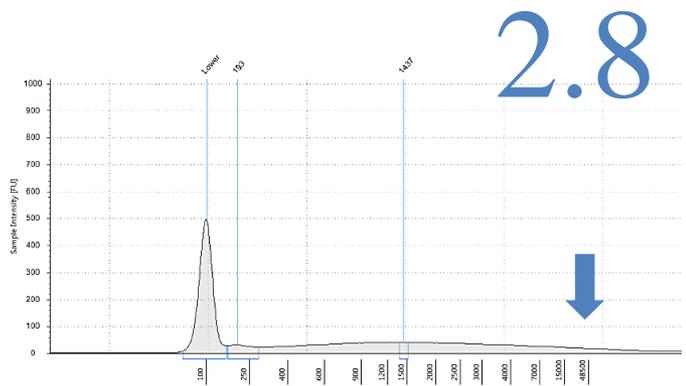


Well	DIN	Conc. [ng/μl]	Sample Description	Alert	Observations
C7	8.6	46.6	CSI169N		

Peak Table

Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/μl]	Assigned Conc. [ng/μl]	% Integrated Area	From [bp]	To [bp]	Peak Comment	Observations
100	8.50	8.50	-	63	151		Lower Marker
>60000	37.0	-	89.69	6107	>60000		
-	-	-	-	-	-		Sample Well

断片化した状態

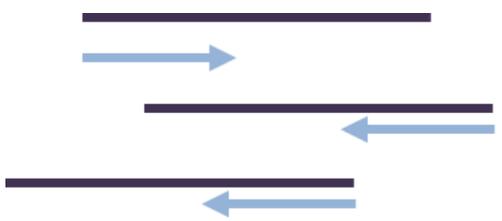
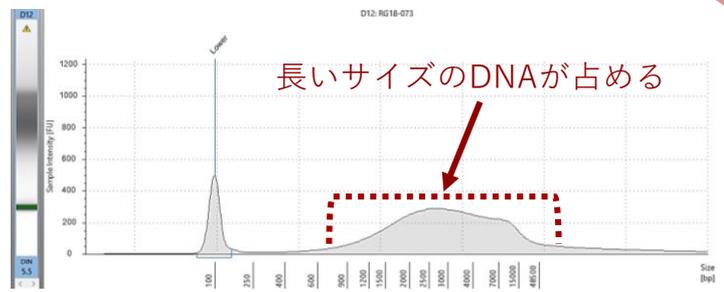


Well	DIN	Conc. [ng/μl]	Sample Description	Alert	Observations
F7	2.8	13.3	CSI 76T		

Peak Table

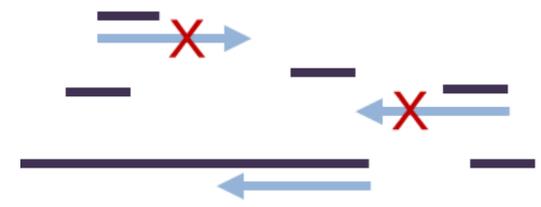
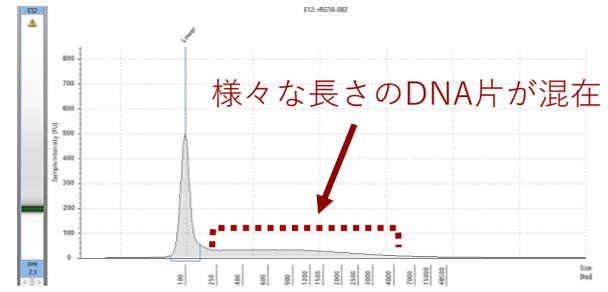
Size [bp]	Calibrated Conc. [ng/μl]	Assigned Conc. [ng/μl]	% Integrated Area	From [bp]	To [bp]	Peak Comment	Observations
100	8.50	8.50	-	60	151		Lower Marker
193	0.888	-	59.27	157	279		
1437	0.409	-	29.32	1067	1570		
-	-	-	-	-	-		Sample Well

長いDNA片が保持された検体

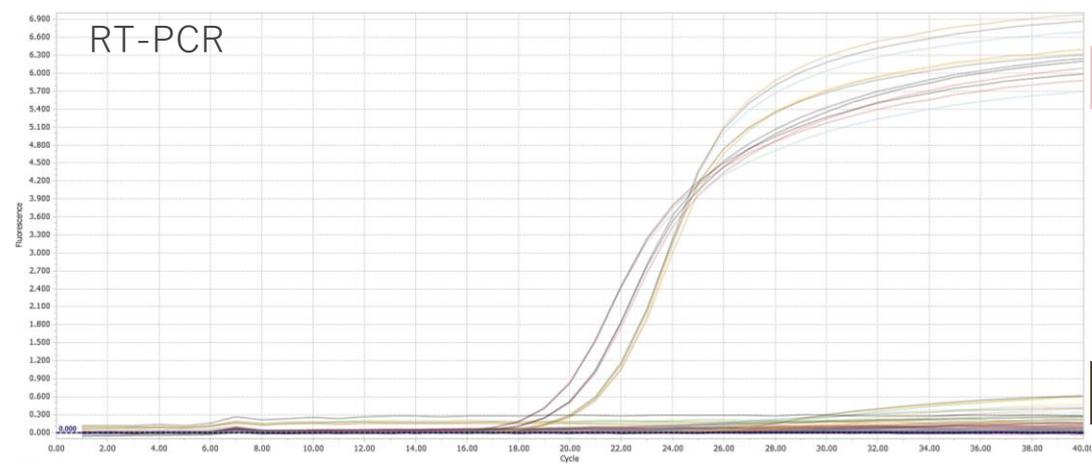


目的のDNA配列を増幅したり
プローブを結合させることができる

DNAの断片化が激しい検体



目的のDNA配列が切断せられ
プローブを結合させることが不可能



品質が良好なgDNA

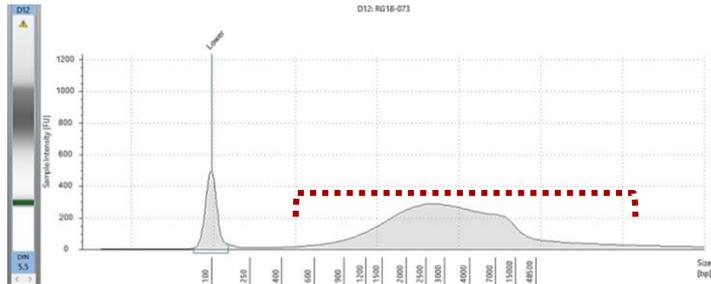
品質が不良なgDNA

PCR増幅されない

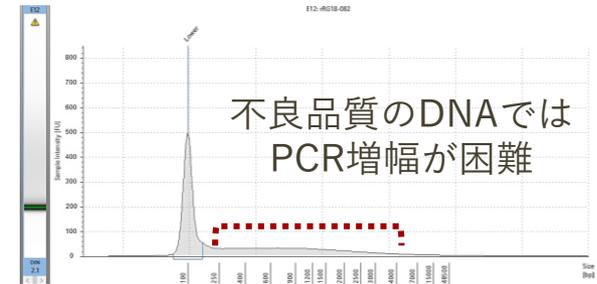
目的のDNAを増幅させることが不可能 → ターゲットの遺伝子配列を検査困難

ホルマリン固定条件は一定とし品質維持が重要

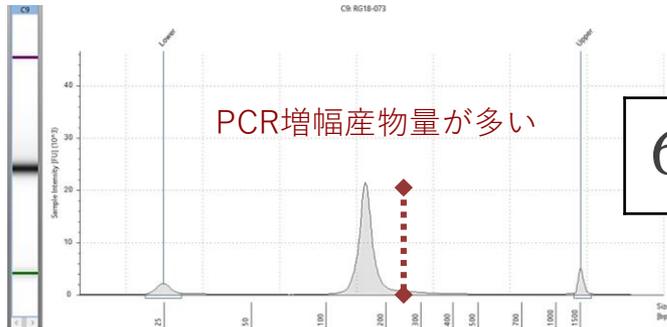
長いDNAが多く存在



断片化した状態



PCR増幅産物量が多い

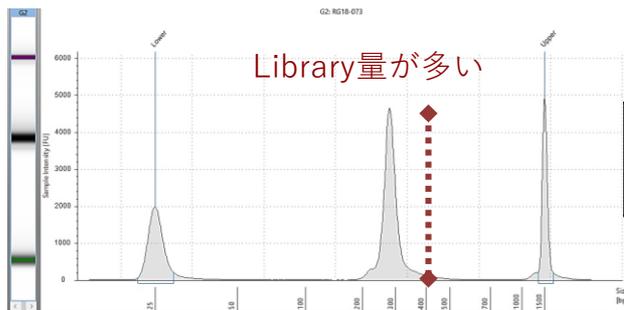


65.3	PCR アンプリコン (ng/ $\mu\ell$)	3.62
------	-----------------------------------	------

PCR増幅産物量が
少ない

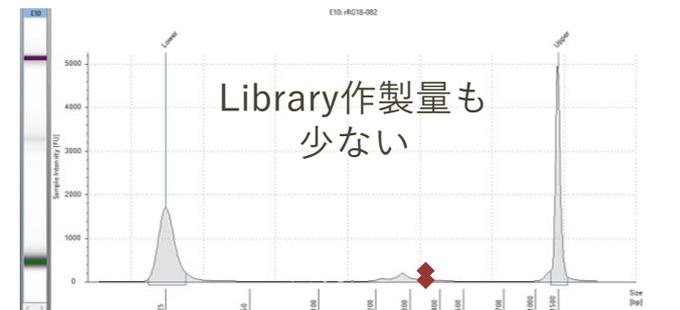


Library量が多い



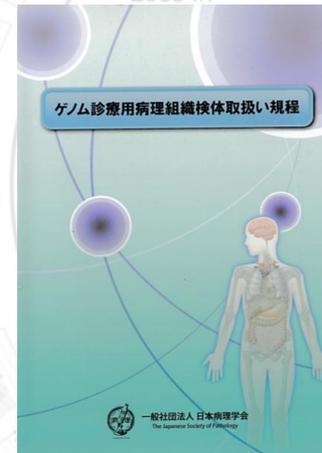
74.2	Library (nM)	3.94
------	-----------------	------

Library作製量も
少ない

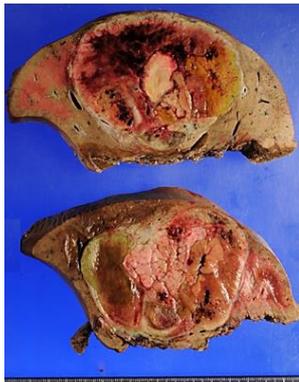


固定時間・固定液・固定液量・固定温度については具体的な数値で推奨されている。

- ・ 摘出後2時間以内に固定
- ・ 10%中性緩衝ホルマリン固定
- ・ 24時間固定
- ・ 固定液量：組織量×10
- ・ 固定温度：室温



一般社団法人病理学会 ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程, 東京, 2018.



組織の大きさや種類によって
固定液の浸透速度が異なる

固定不足や過固定となる症例も存在する。



```
##fileformat=VCFv4.1
##FILTER=<ID=FS200,Description="FS > 200.0">
##FILTER=<ID=FS60,Description="FS > 60.0">
##FILTER=<ID=LowQual,Description="Low quality">
##FILTER=<ID=MQ40,Description="MQ < 40.0">
##FILTER=<ID=MQRankSum-12.5,Description="MQRankSum <
##FILTER=<ID=QD2.0,Description="QD < 2.0">
##FILTER=<ID=ReadPosRankSum-20.0,Description="ReadPosR
##FILTER=<ID=ReadPosRankSum-8.0,Description="ReadPosR
```



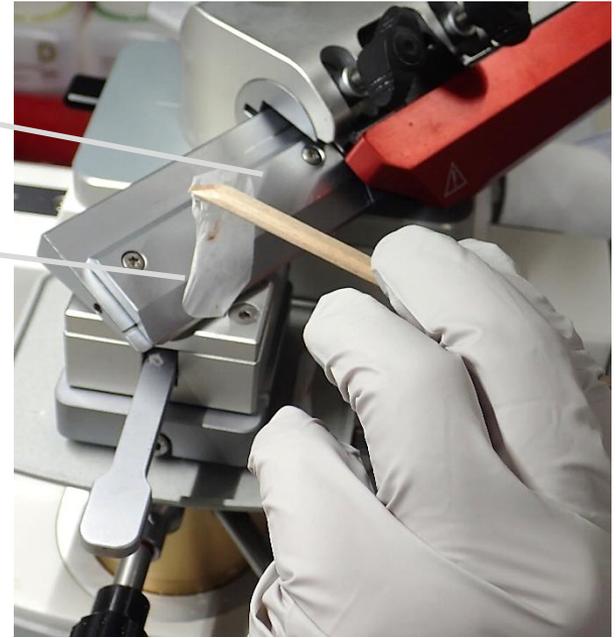
CQ不良は再検査 → 工程・所要時間 × 2



Point
Sectioning Method

薄切するブロックごとにろ紙を交換

薄切するブロックごとに替え刃を交換



複数のブロックの切片を浮かべない

ブロックごとに水槽の水を交換



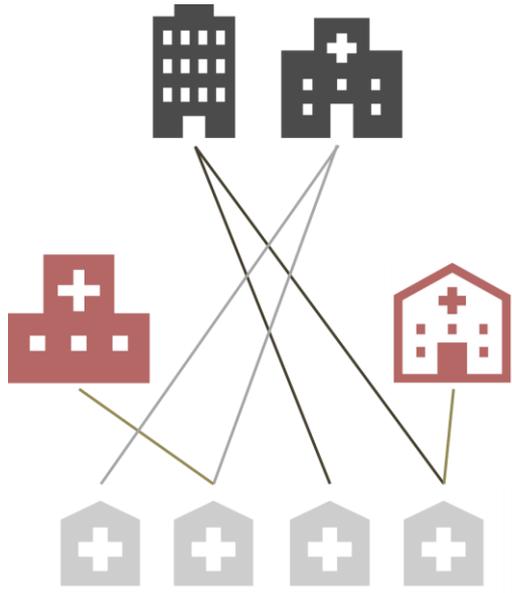
薄切するブロックごとに薄切くずを除去

検体検査の分類の見直し

一次分類	二次分類
微生物学的検査	細菌培養同定検査 薬剤感受性検査 病原体遺伝子検査
血清学的検査	血清学検査 免疫学検査
血液学的検査	血球算定検査 血液像検査 出血・凝固検査 細胞性免疫検査 染色体検査 生殖細胞系列遺伝子検査 体細胞遺伝子検査 (血液細胞による場合)
病理学的検査	病理組織検査 免疫組織化学検査 細胞検査 分子病理学的検査 体細胞遺伝子検査 (血液細胞によらない場合)
寄生虫学的検査	寄生虫学的検査
生化学的検査	生化学検査 尿・糞便一般検査

【新分類】

一次分類	二次分類
微生物学的検査	細菌培養同定検査 薬剤感受性検査
血清学的検査	免疫血清学検査 免疫血液学検査
血液学的検査	血球算定・血液細胞形態検査 血栓・止血関連検査 細胞性免疫検査
病理学的検査	病理組織検査 免疫組織化学検査 細胞検査 分子病理学的検査
寄生虫学的検査	寄生虫学的検査
生化学的検査	生化学検査 免疫化学検査 血中薬物濃度検査
尿・糞便等一般検査	尿・糞便等一般検査 寄生虫検査
遺伝子関連検査・ 染色体検査	病原体遺伝子検査 体細胞遺伝子検査 生殖細胞系列遺伝子検査 染色体検査

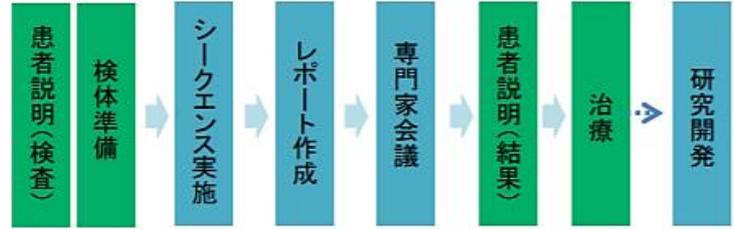


がんゲノム医療中核拠点病院

がんゲノム医療拠点病院

がんゲノム医療連携病院

がんゲノム医療の提供体制のイメージと求められる機能



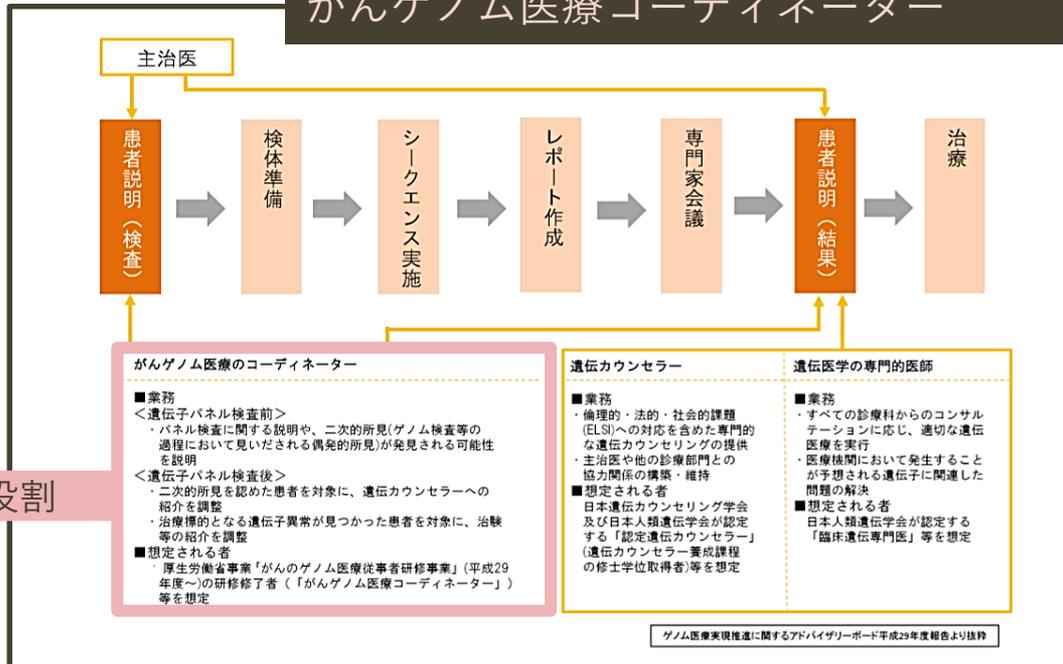
	患者説明 検体準備	シーケ ンス実施	レポート 作成	専門家 会議	患者 説明	治療	研究 開発
中核 拠点	必須	必須 (外注可)	必須		必須	必須 (※1)	必須
連携	必須	・中核拠点に依頼 ・中核拠点の会議等に参加			必須	必須 (※2)	協力

看護師
薬剤師
臨床検査技師

- ・ 検査前説明 (検査内容・二次的所見)
- ・ 検査後の調整

役割

がんゲノム医療コーディネーター



ゲノム医療実現推進に関するアドバイザリーボード平成29年度報告より抜粋

臨床検査技師による医療面接 (初診患者への対応)

1. がん遺伝子検査を受ける目的とメリット
2. 発がん機構とドライバー遺伝子について
3. 分子標的治療薬の作用機序について
4. 遺伝子異常をターゲットとして分子標的治療薬を選択できる可能性について
5. 本検査で解析するがん遺伝子について
6. 検査の概要
7. 検査工程と要する時間
8. 検査費用
9. 検査後の治療の流れとそれにともなう患者の経済的負担について
10. 現在までの外来受診患者臓器別内訳と検査結果・実績
11. 遺伝性腫瘍症候群について
12. 本検査にて発見される可能性がある遺伝性腫瘍症候群と、遺伝カウンセリングについて

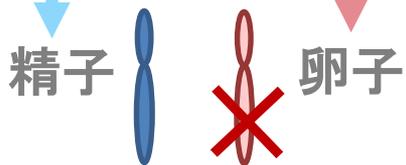
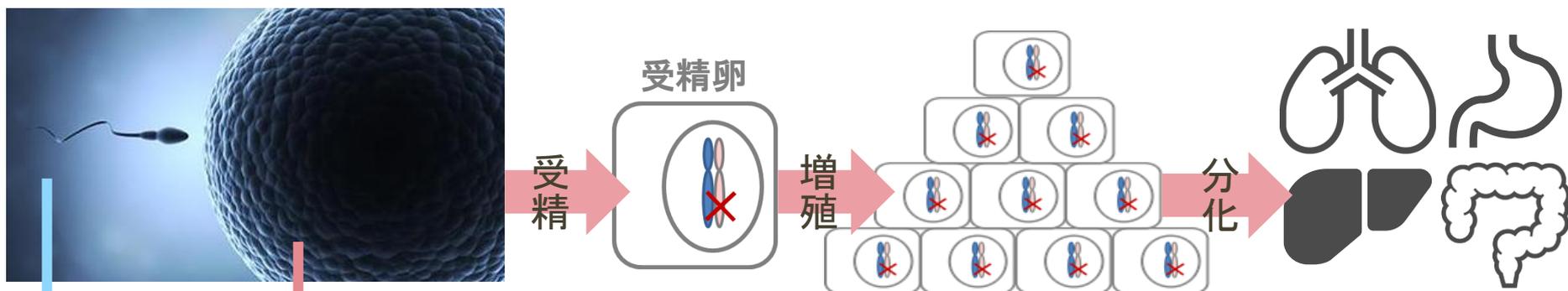


二次的所見

validation

遺伝する“がん”（遺伝性腫瘍症候群）について・・・

- 正常コントロールとして、血液由来の正常な遺伝子を調べる
- 偶然に、罹患している“がん”の遺伝性の情報が得られる場合がある



生殖細胞遺伝子変異

- ・全身の細胞に同じ遺伝子の異常が入る
- ・複数の臓器から“がん”が発生する可能性がある
- ・子孫に遺伝する可能性がある



遺伝性乳癌卵巣癌症候群
(HBOC)



Immunohistochemistry

遺伝性腫瘍の可能性確認

ゲノム解析での可能性を確認する



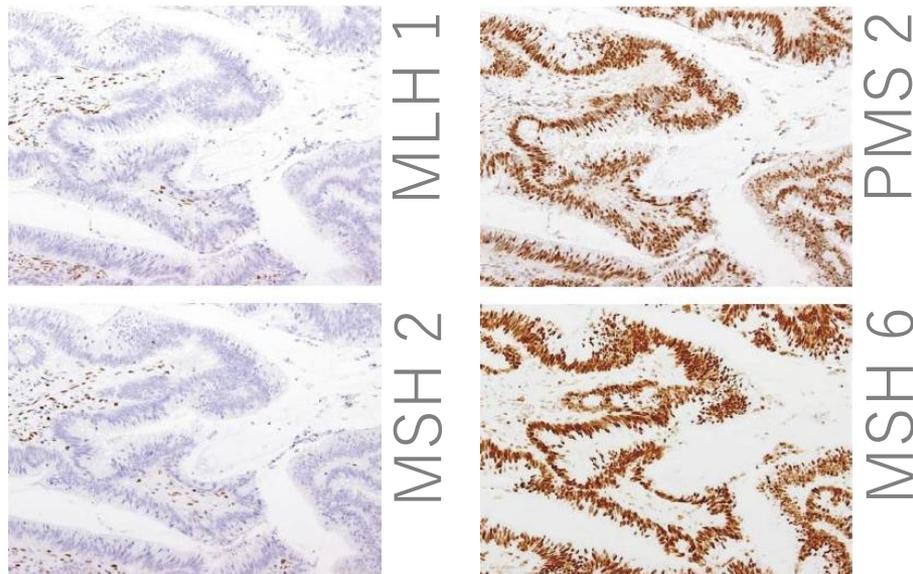
遺伝性腫瘍なのか？
(遺伝カウンセリングが必要か？)

がん遺伝子パネル検査にて
発見される可能性がある遺伝性疾患

遺伝子名	疾患名
<i>BRCA1/2</i>	遺伝性乳がん卵巣がん症候群
<i>TP53</i>	リ・フラウメニ症候群
<i>PTEN</i>	PTEN過誤腫症候群(Cowden病)
<i>MLH1/MSH2/MSH6/PMS2</i>	Lynch症候群
<i>APC</i>	家族性大腸ポリポーシス
<i>MEN1</i>	多発性内分泌腫瘍症1型
<i>RET</i>	多発性内分泌腫瘍症2型、家族性甲状腺髄様がん
<i>MUTYH</i>	MYH-関連ポリポーシス
<i>STK11</i>	Peutz-Jeghers症候群
<i>VHL</i>	フォン・ヒッペル・リンドウ病
<i>SDHB</i>	遺伝性パラガングリオーマ、褐色細胞腫症候群
<i>TSC1/TSC2</i>	結節性硬化症
<i>WT1</i>	WT1-関連Wilms腫瘍
<i>NF2</i>	神経線維腫症2型
<i>RB1</i>	網膜芽細胞腫
<i>FH</i>	遺伝子平滑筋腫腎細胞癌症候群

リンチ症候群 (遺伝性非ポリポーシス性大腸がん)

Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer HNPCC



ミスマッチ修復タンパクに対する
免疫染色パターンと疑われる変異遺伝子

	免疫染色での発現			
	MLH1	MSH2	PMS2	MSH6
<i>MLH1</i>	-	+	-	+
<i>MSH2</i>	+	-	+	-
<i>PMS2</i>	+	+	-	+
<i>MSH6</i>	+	+	+	-

使命・役割

免疫染色 IHC

がんゲノム検査 Cancer Genomics

- 検査の知識と技術を身につける
- 正しい検査を実施する
- 素早く検査を実施する

臨床病理

(日本臨床検査医学会誌)



臨床病理 第66巻第5号 (2018年5月) 別冊

原 著

がんゲノム医療における臨床検査技師の役割

柳田 絵美衣 西原 広史

Vol.66 No.5

原著

がんゲノム医療における臨床検査技師の役割

THE OFFICIAL JOURNAL OF JAPANESE SOCIETY OF LABORATORY MEDICINE



第3回 がんゲノム医療に携わる臨床検査技師の育成セミナー

がんゲノム医療を基礎から学ぶ

■ 患者への検査内容説明

講師：山田寛先生（慶應義塾大学医学部 腫瘍センターゲノム医療ユニット）

■ 病理検査と検体提出

講師：井上博文先生（岡山大学病院 病理部病理診断科）

■ 核酸の取り扱い方・検査の基礎

講師：須賀淳子先生（京都大学医学部附属病院 腫瘍内科）

■ ライブラリー作製とNGSの基礎

講師：柳田絵美衣先生（慶應義塾大学医学部 腫瘍センターゲノム医療ユニット）

■ パネル検査結果の医学的解釈(アノテーション)

講師：柿島裕樹先生（国立がん研究センター中央病院 病理科・臨床検査科）

■ エキスパートパネル

講師：赤羽俊章先生（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 病理学分野）

■ 二次的所見における遺伝カウンセリング

講師：浦川優作先生（兵庫県立がんセンター）

第4回：**岡山**
2019年
12月22日(日)

第5回：**福岡**
2020年
2月16日(日)

対象
臨床検査技師

定員：100名

参加費：無料

AMED A3

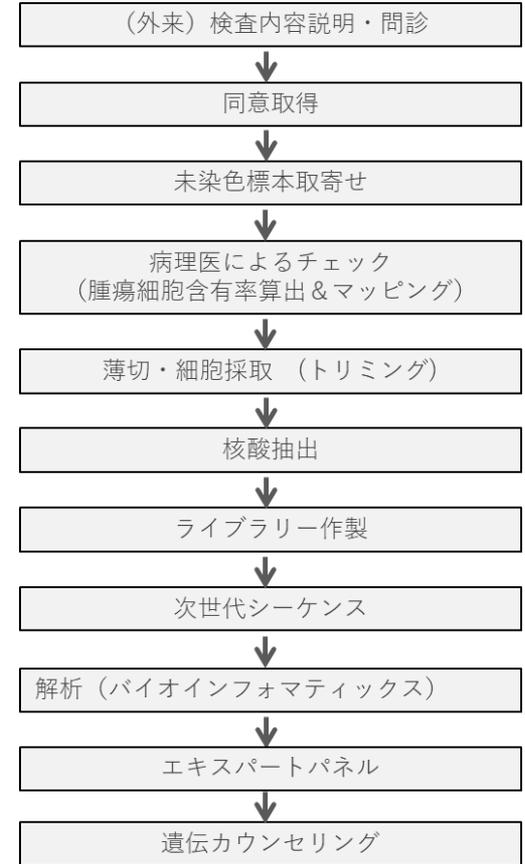
Google 検索

I'm Feeling Lucky

A-3班 ゲノム医療従事者の育成プログラム開発

<https://www.genomicx.net>

本研究事業は、「AMEDゲノム創薬基盤推進研究事業」から支援を受けて実施しています。更新情報・お知らせ 2019/07/16 第3回がんゲノム医療に携わる臨床検査技師の育成セミナー（9月16日開催） NEW 2019/06/17（終了）看護師の...



全ての工程が学べる

講師

- ・全員が臨床検査技師
- ・がんゲノム医療に従事

完全現場主義

[トップ](#)
[速報](#)
[写真](#)
[映像](#)
[雑誌](#)
[個人](#)
[特集](#)
[意識調査](#)
[ランキング](#)
[新着記事一覧](#)
[国内](#)
[国際](#)
[経済](#)
[エンタメ](#)
[スポーツ](#)
[IT・科学](#)
[ライフ](#)
[オーサー一覧](#)

Medical技師の虎の巻

柳田 絵美衣 Emmy Yanagita



柳田絵美衣

臨床検査技師（ゲノム・病理検査）、
国際細胞検査士

播磨の国出身。医学検査の“職人”と呼ばれる病理検査技師となり、細胞の染色技術を極める。優れた病理検査技師に与えられる“サクラ病理技術賞”の最年少、初の女性受賞者となる。バングラデシュやブータンの病院にて日本の病理技術を伝道。2016年春、大腸癌で親友を亡くしたことをきっかけに、がんゲノム医療の道に進み、クリニカルシーケンス技術の先駆者として奮闘中。臨床検査専門の雑誌にてエッセーを連載中。講演、執筆活動も多数。国内でも有名な臨床検査技師の一人。

記事

19

オーサーコメント

0

記事一覧

1~19/19件

年間で絞り込む ▼



がんゲノム医療 ついに保険適用へ。

厚生労働省は、患者一人一人に最適な治療法を探る目的で行う「がん遺伝子パネル検査」を、6月1日から公的医療保険の適用対象とすることを決めた。対象患者や実施施設の要件とは？

5/31(金) 7:00



ノーベル医学生理学賞の受賞！「オブジーボ」の開発に貢献。オブジーボとは？

誰かの役に立てること 情報発信

<https://afternoon.kodansha.co.jp/news/5076.html>



NEWS



【『フラジャイル』16巻発売記念】アフタヌーン10月号に掲載版を公開! 19/10/23



【漫画脚本大賞】「絵が描けない」あなたも漫画家になれる! 字だけで連載が決まる史上初の漫画賞「漫画脚本大賞」募集開始

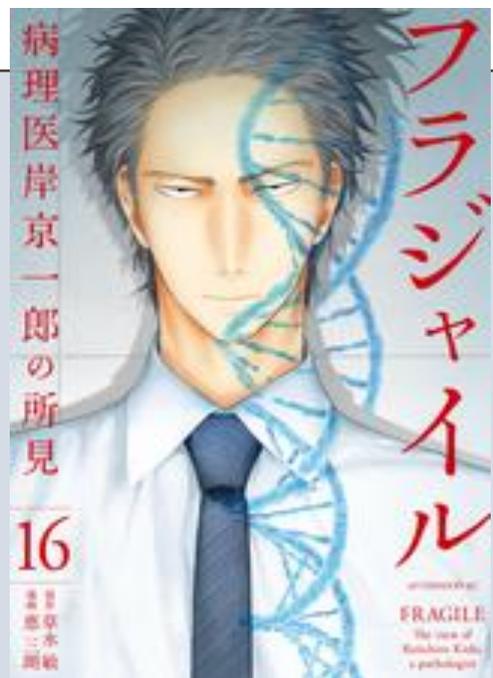


Q アフタヌーン 柳田絵美衣

アフタヌーン公式ホームページにて 作者との鼎談が公開中!

フラジャイル

病理医岸京一郎の所見



柳田をモデルに いただいています.



ゲノム病理技師 円 遼

第2回病理・細胞診検査研究班合同研修会

免疫染色・遺伝子関連検査
における精度管理
&
臨床検査技師の役割

emmyyana180sx@gmail.com

Thank you for listening



Keio University
Division of Clinical Cancer Genomics

Emmy Yanagita



2017.12.14