

令和元年12月14日(土)

第2回病理・細胞診検査研究班合同研修会

(第1回千葉県・茨城県病理・細胞診検査研究班合同研修会)

「千葉県内病理標本の標準化を目指して」 ～免疫染色に影響を与える諸条件の検討～

千葉県認定病理検査技師推進協議会

東邦大学医療センター佐倉病院 山崎利城

はじめに

千葉県認定病理検査技師推進協議会は、県内における病理標本作製技術の標準化推進と各種検査ガイドラインの普及活動を目的および活動指針としており、2018年8月の千臨技病理・細胞診検査研究班合同研修会において県内31施設のプレアナリシスにおける現状についてアンケート調査結果を報告した。また、2019年2月に千葉県で開催された日臨技首都圏支部・関甲信支部研修会において『病理・細胞診における標準化と精度管理の確立に向けて』というテーマでパネルディスカッションを企画し、上記アンケート調査結果を基に、お招きした講師の先生方や研修会参加者で意見交換を行った。

今回我々はプレアナリシスの脱脂・脱灰・再固定・ベーキング・伸展における諸条件が免疫染色に及ぼす影響について再確認することを目的に検討を行った。

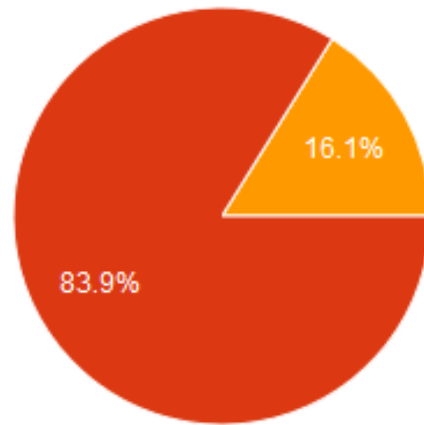
検討項目

- 脱脂
- 脱灰
- 再固定
- ベーキング
- 伸展

脱脂

34. 乳腺などの脂肪の多い組織に対し、自動包埋装置にかける前に予備脱脂を行いますか

31件の回答



● 未回答
● 行う
● 行わない

35. 予備脱脂に用いる有機溶剤【複数回答可】 31件の回答

メタノール	5施設
エタノール	8施設
アセトン	2施設
キシレン	4施設
クロロホルム	3施設
キシレン+エタノール	12施設
クロロホルム+アルコール	7施設

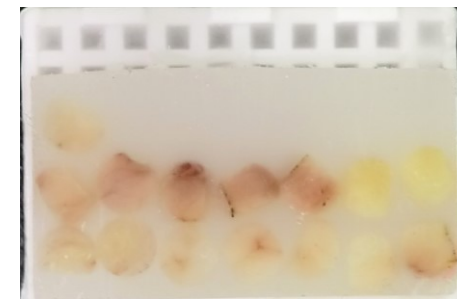
脱脂 方法

- 使用脱脂液

メタノール、エタノール、キシレン＋エタノール、キシレン＋クロロホルム

- ブロックでの検討

十分に固定された組織(大腸癌)を上記脱脂液に**24時間**、**1週間**、**2週間**浸漬しFFPEを作製した。それぞれの条件で作製したブロックから、皮膚科用5mmパンチでくり抜き同一ブロック(アレイブロック)とし薄切厚の差をなくした。未処理をコントロールとしp53染色を行った。



アレイブロック

- 切片での検討

薄切スライド(大腸癌、乳癌)を脱パラフィン後、上記脱脂液に**24時間**浸漬した。未処理をコントロールとしp53、ki67、Her2* 染色を行った。

ブロックでの検討 p53染色(大腸癌)

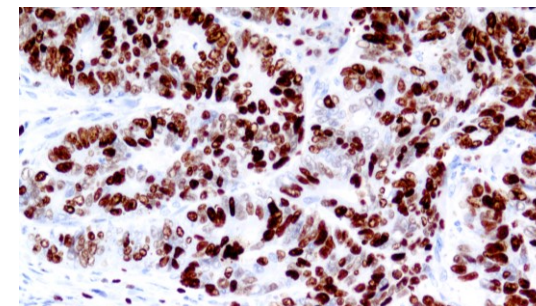
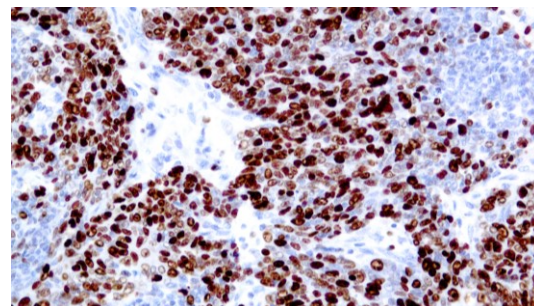
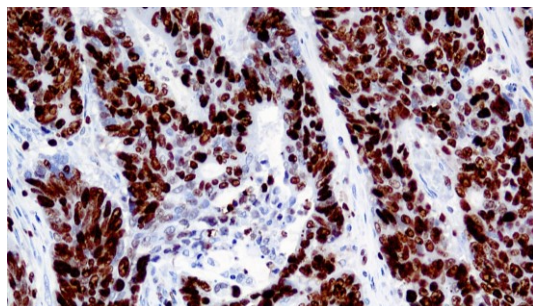
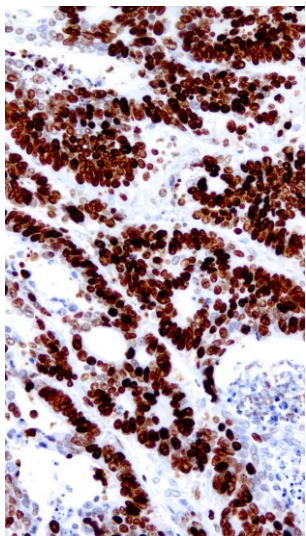
24時間

1週間

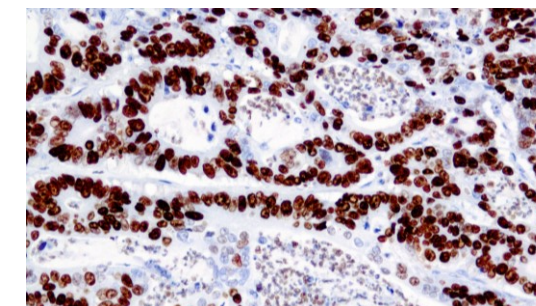
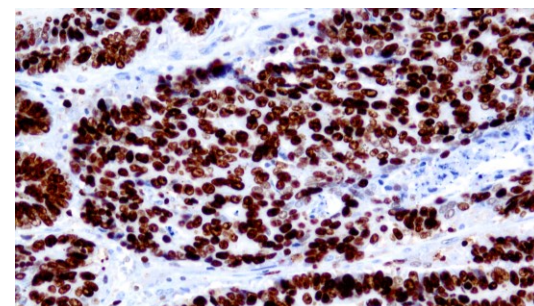
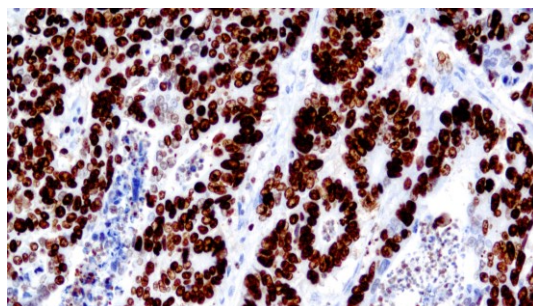
2週間

メタノール

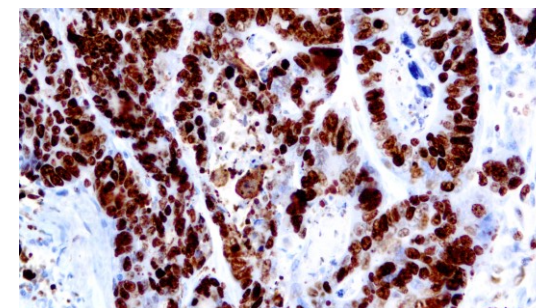
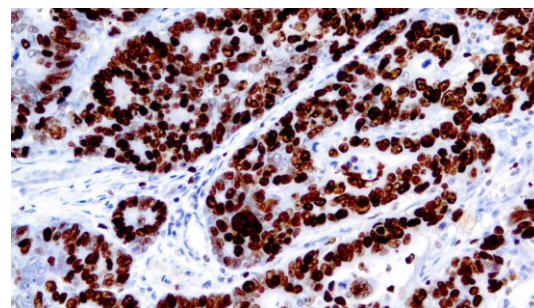
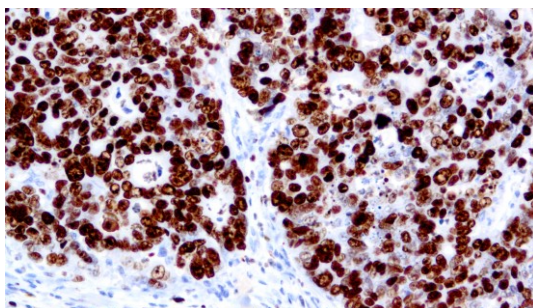
コントロール



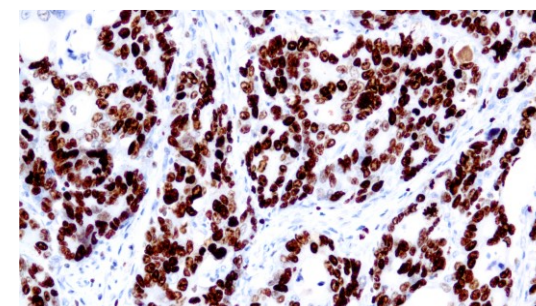
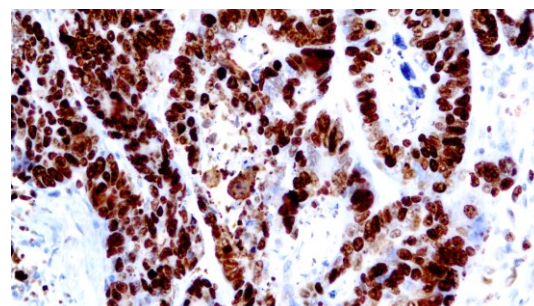
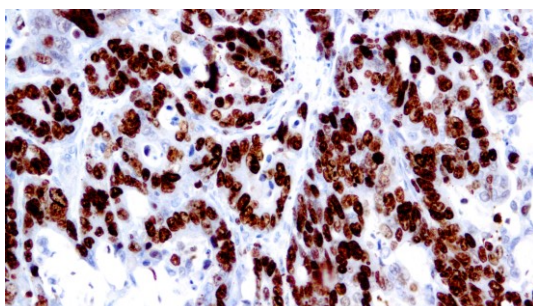
エタノール



キシレン
エタノール



キシレン
クロロホルム



切片での検討

コントロール

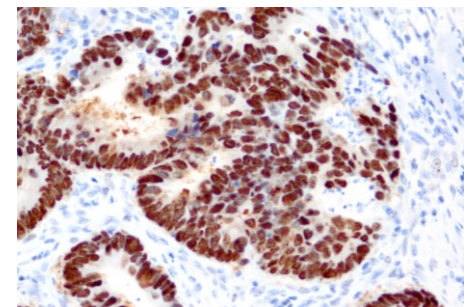
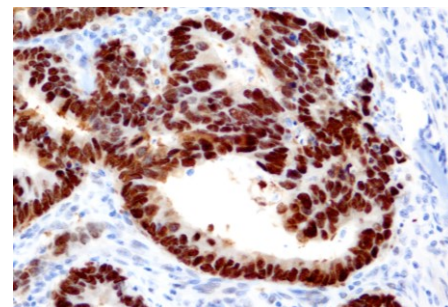
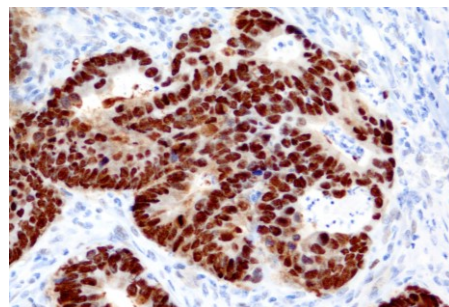
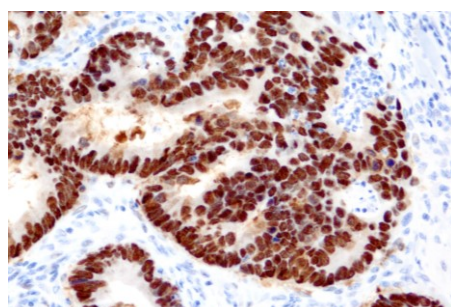
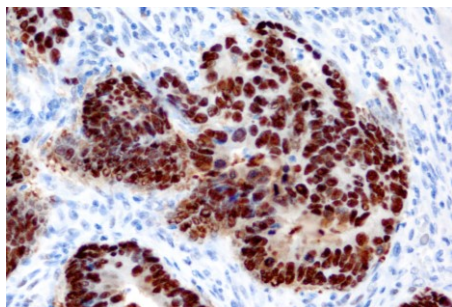
メタノール

エタノール

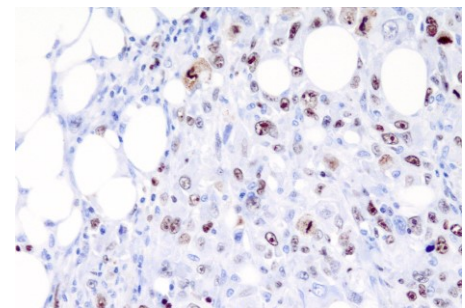
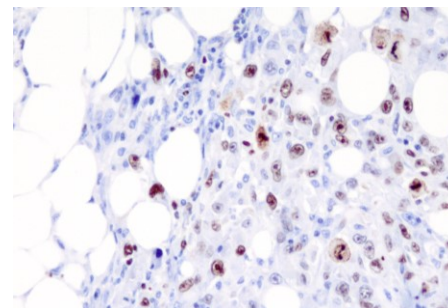
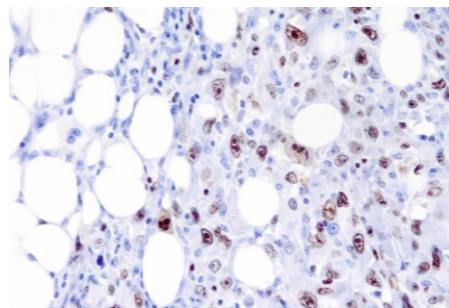
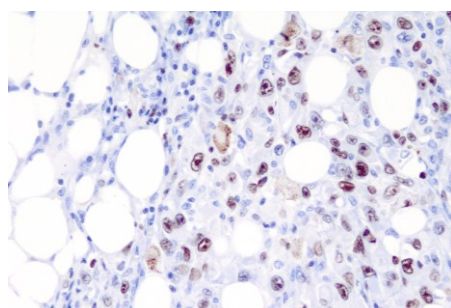
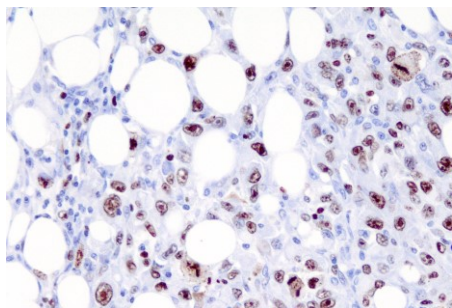
キシレン+
エタノール

キシレン+
クロロホルム

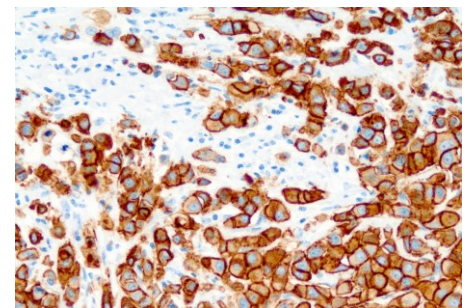
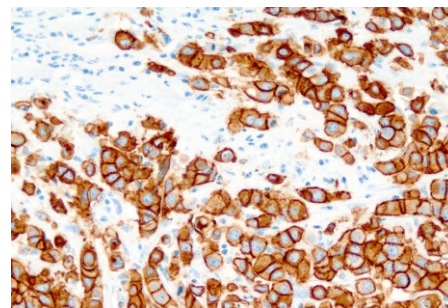
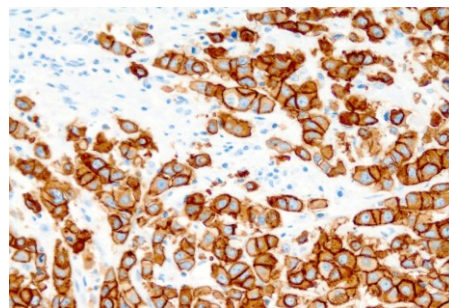
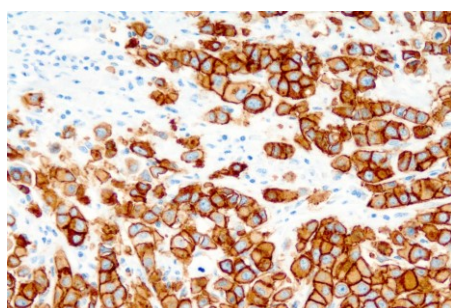
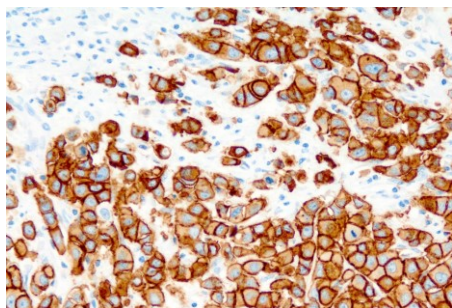
p53
(大腸癌)



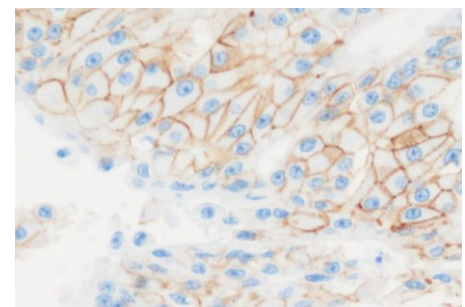
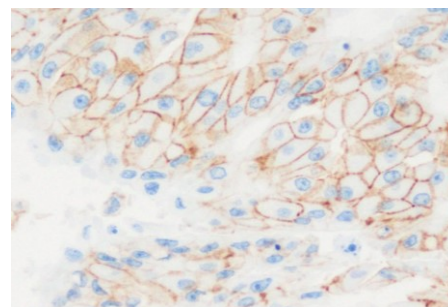
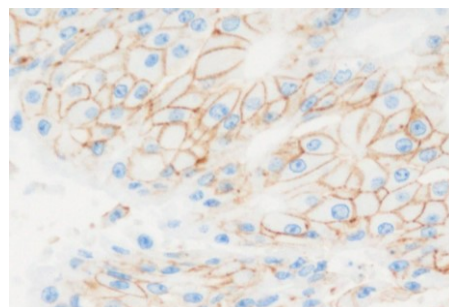
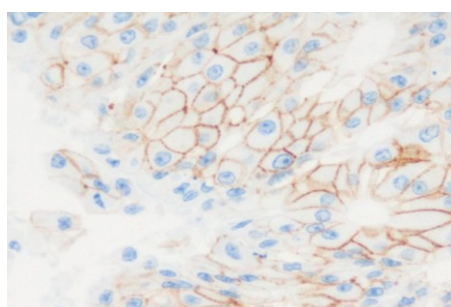
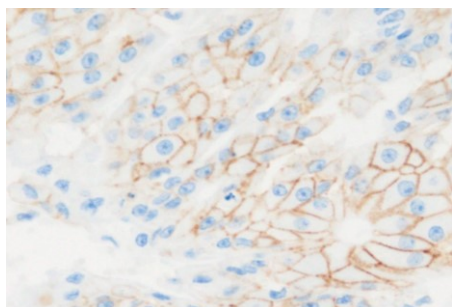
Ki67
(乳癌)



Her2
3+
(乳癌)



Her2
2+
(乳癌)

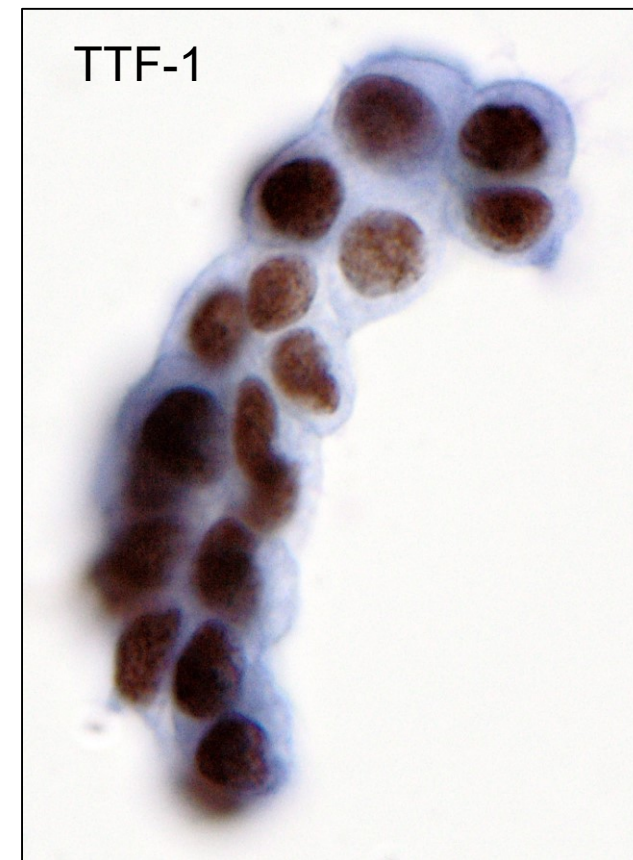


長期間のアルコール保存

細胞診免疫染色用コントロール
(アルコールに細胞を浮遊させている)

スライドガラスに滴下・乾燥させる
直ちに染色可能

2016年9月作製コントロール
3年近く染色性が保たれている



4℃保存

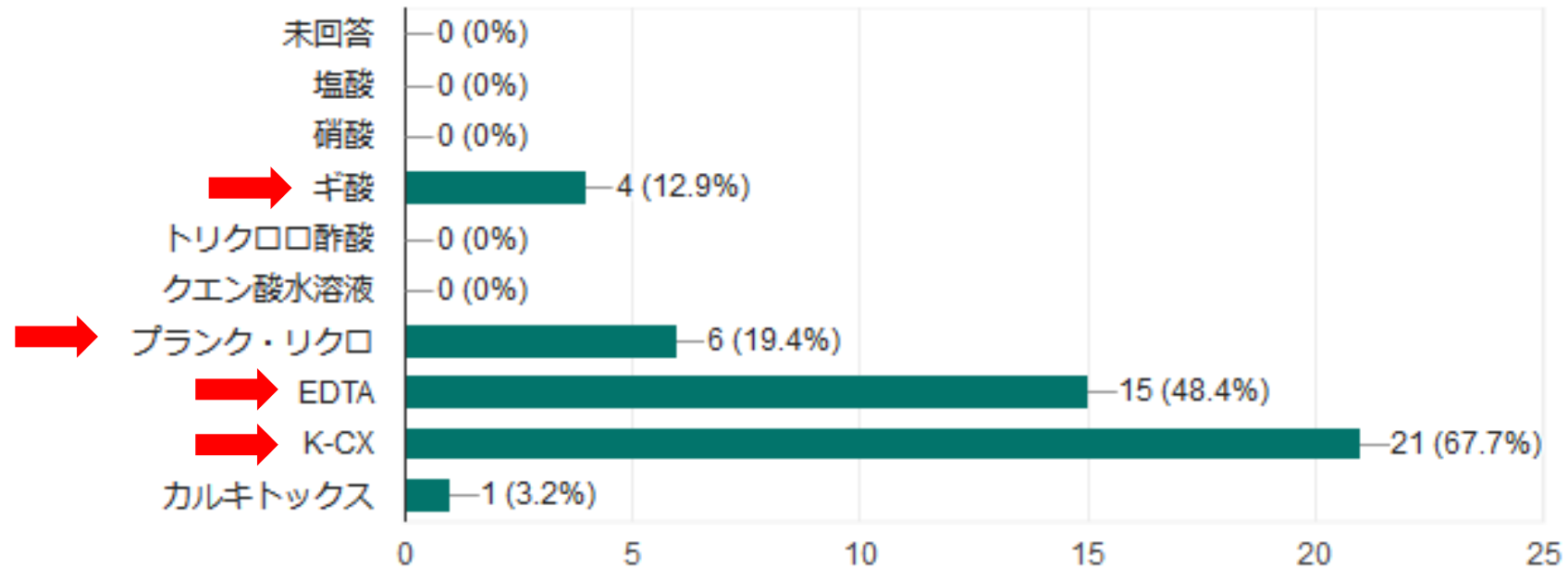
サイトリッチレッドにて24時間固定→PEG/エタノールへ移す

佐藤ら,「免疫細胞化学染色のコントロール作製法」, 第55回細胞学会秋季大会

脱灰

38. 貴施設で使用している脱灰液【複数回答可】

31 件の回答



※ K-CX〔株式会社ファルマ〕、カルキトックス〔富士フィルム和光純薬(株)〕
→塩酸とキレート剤を主成分とした脱灰液

脱灰 方法

①4℃	②室温	③EDTA長期間	④面脱灰
ギ酸 ブランク・リクロ EDTA KCX	ギ酸 ブランク・リクロ EDTA KCX	1週間 2週間 3週間 4週間 5週間	ギ酸 ブランク・リクロ EDTA KCX

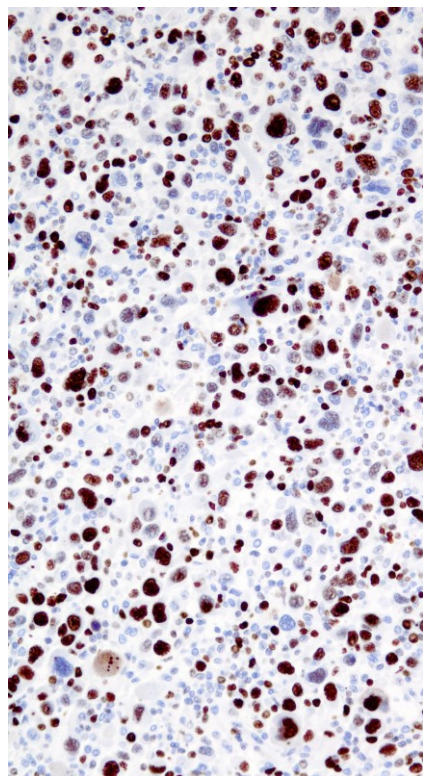
- 条件①4℃、②室温はよく固定された組織を各種脱灰液に4日間浸漬後、FFPEを作製した。条件③EDTA長期間は、よく固定された組織を1~5週間浸漬後、FFPEを作製した。①②③で作製したブロックそれぞれから、皮膚科用5mmパンチでくり抜きアレイブロックとし、①②ki67染色を行い、③は多種の抗体を用い染色性を検討した。
- ④面脱灰は各種脱灰液に2時間、24時間浸漬し免疫染色への影響をみた。

ki67 肺癌(多形癌)

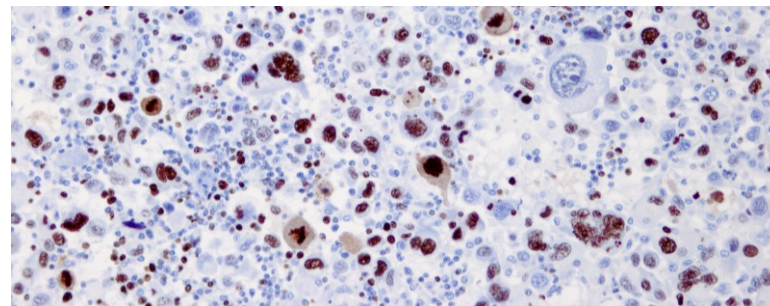
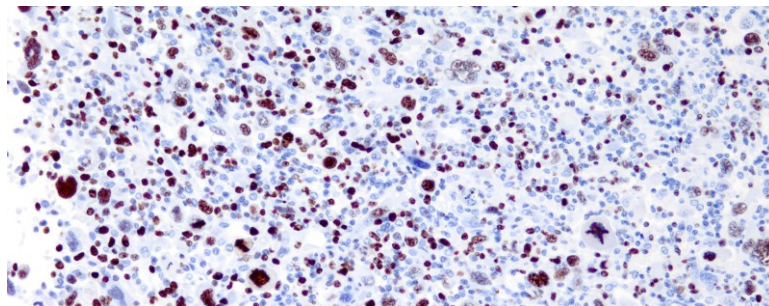
①4°C, 4日間浸漬

②室温, 4日間浸漬

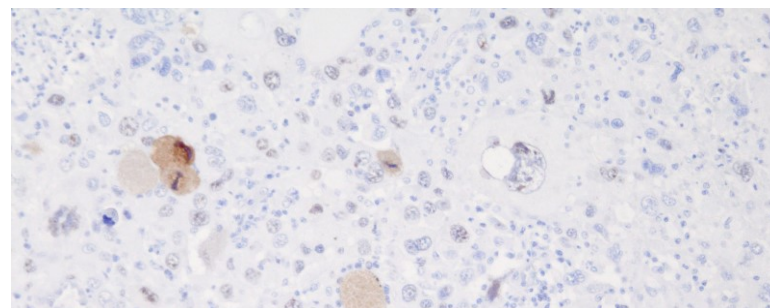
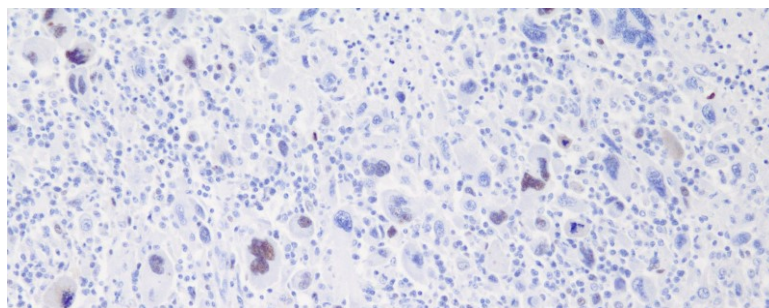
コントロール



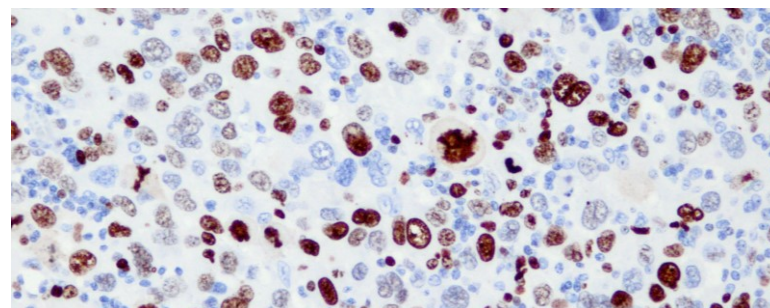
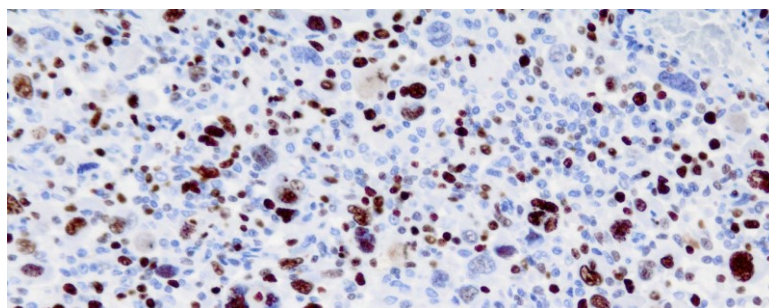
ギ酸



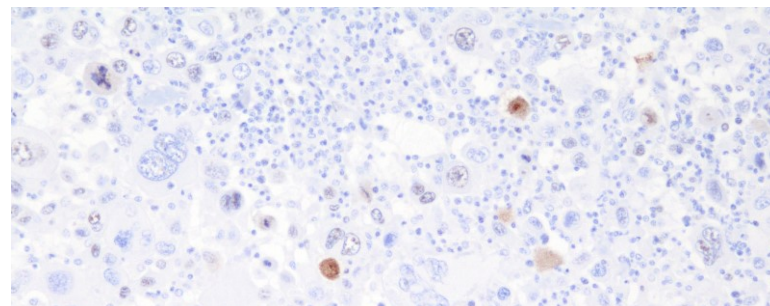
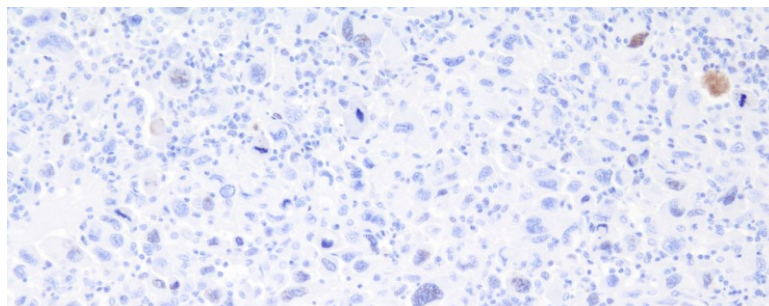
プランク・リクロ



EDTA



KCX



③ EDTA 長期間

【含まれる組織】

肺腺癌
肺扁平上皮癌
乳癌
尿路上皮癌
大腸癌



コントロール
1 週間
2 週間
3 週間
4 週間
5 週間

核内抗原

ki67, p53, CDX2, TTF-1, p40, ER, GATA3, HNF4a, p63

細胞質

CK7, CK20, CK5/6, AE1/AE3, EMA, CEA

細胞膜

E-Cadherin, Podoplanin (D2-40)



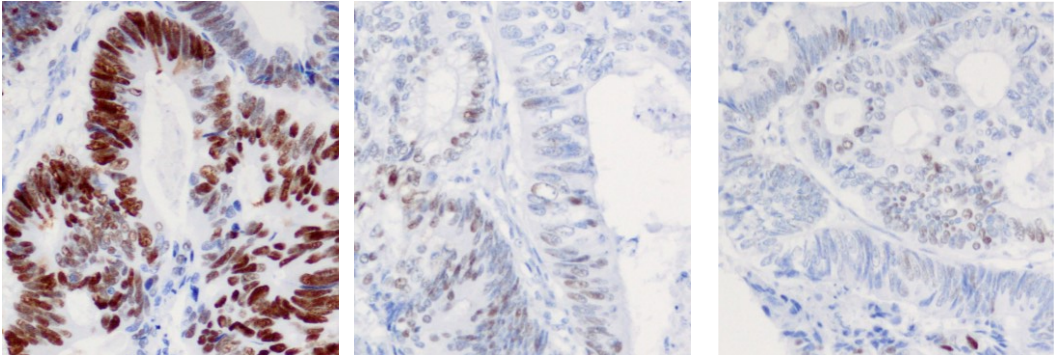
5週間のEDTA浸漬でも染色性の減弱はみられなかった

④面脱灰

抗体名	面脱灰時間	ギ酸	プ ランク・リクロ	EDTA	KCX
CD3	1~2時間	—	—	—	—
	24時間	—	↓	—	↓
CD4	1~2時間	—	—	—	—
	24時間				
CD20	1~2時間	—	—	—	—
	24時間	—	—	—	—
CD34	1~2時間	—	—	—	—
	24時間				
CD56	1~2時間	—	↓	—	↓
	24時間				
Podoplanin	1~2時間	—	—	—	—
	24時間	—	—	—	—

抗体名	面脱灰時間	ギ酸	プ ランク・リクロ	EDTA	KCX
Synaptophysin	1~2時間	—	↓	—	↓
	24時間	—	↓	—	↓
S100	1~2時間	—	↓	—	↓
	24時間	—	↓	—	↓
ALK	1~2時間	—	↓	—	↓
	24時間	—	↓	—	↓
TTF-1(8G7G3/1)	1~2時間	—	↓	—	↓
	24時間				
p53	1~2時間	—	↓	—	↓
	24時間	—	↓↓	—	↓↓
CDX2	1~2時間				
	24時間	—	↓↓	—	↓↓

コントロール プランク・リクロ 24時間 KCX 24時間



p53(大腸癌)

—, 変化なし; ↓, 減弱; ↓↓, ~消失

面脱灰は、どれくらいの深さまで影響があるか

①ギ酸	②プランク・リクロ	③EDTA	④KCX
表面から0-10μm	表面から0-10μm	表面から0-10μm	表面から0-10μm
50μm	50μm	50μm	50μm
100μm	100μm	100μm	100μm
300μm	300μm	300μm	300μm
500μm	500μm	500μm	500μm
1000μm	1000μm	1000μm	1000μm

肺腺癌組織(5mm大)からFFPEを作製、面出し後、各種脱灰液に24時間浸漬した。軽く面を出し、免疫染色用切片(4μm、1枚)とDNA抽出用切片(5μm×5枚)を採取し、これを0~10μmとした。

そこから50μmまで40μm削り、続いて100μmまで50μm削り、300μmまで200μm削り、500μmまで300μm削り、1000μmまで500μm削りそれぞれで免疫染色用切片、DNA抽出用切片を採取した。

免疫染色はTTF-1(8G7G3/1)を実施、DNAはEGFR(L858R)、BIOMED2(100-400bp)を増幅*した。
増幅後、キャピラリー電気泳動装置でバンドを確認した。

*すべてのDNA濃度を揃えてPCRを行った

TTF-1

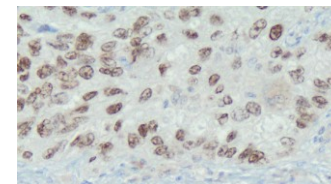
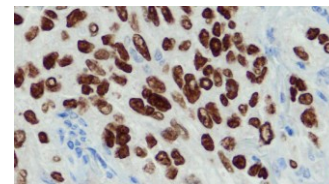
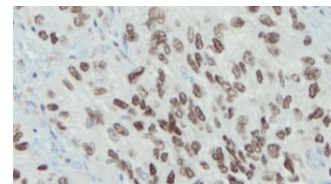
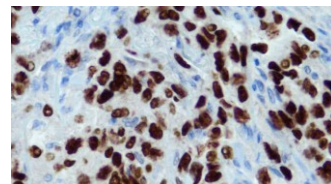
①ギ酸

②フランク・リクロ

③EDTA

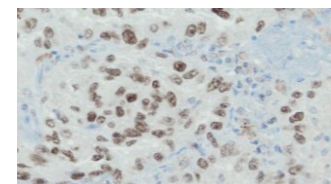
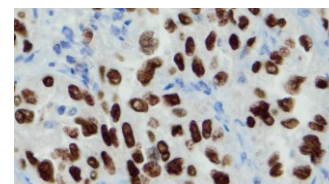
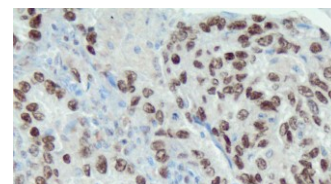
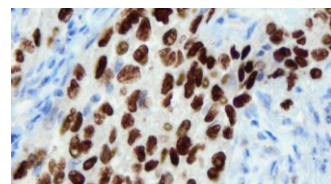
④KCX

0-10 μ m



0-10 μ m

50 μ m



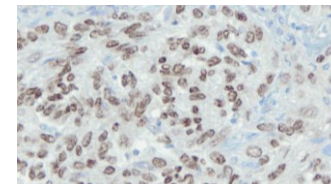
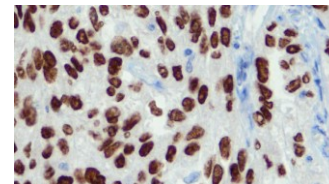
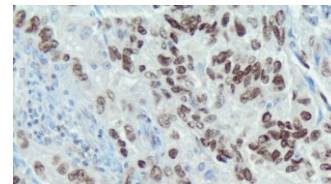
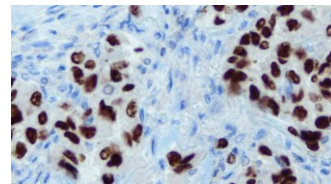
50 μ m

100 μ m



300 μ m

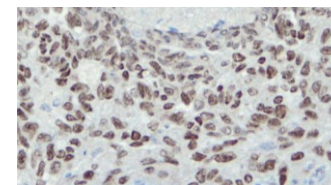
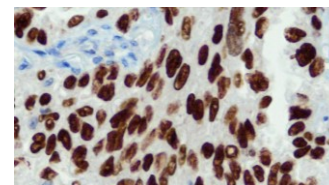
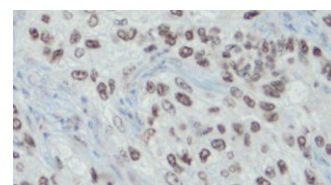
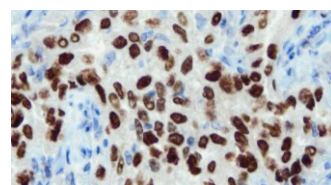
100 μ m



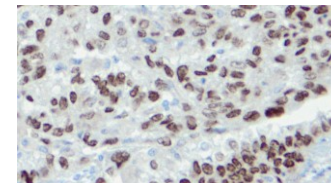
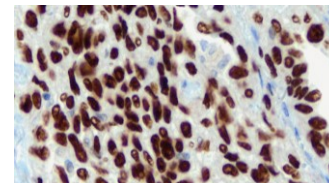
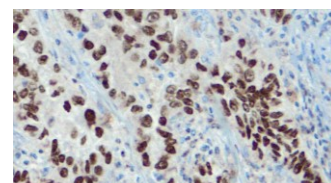
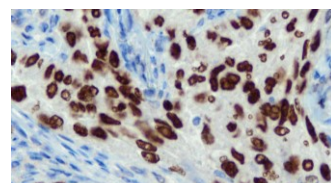
500 μ m

1000 μ m

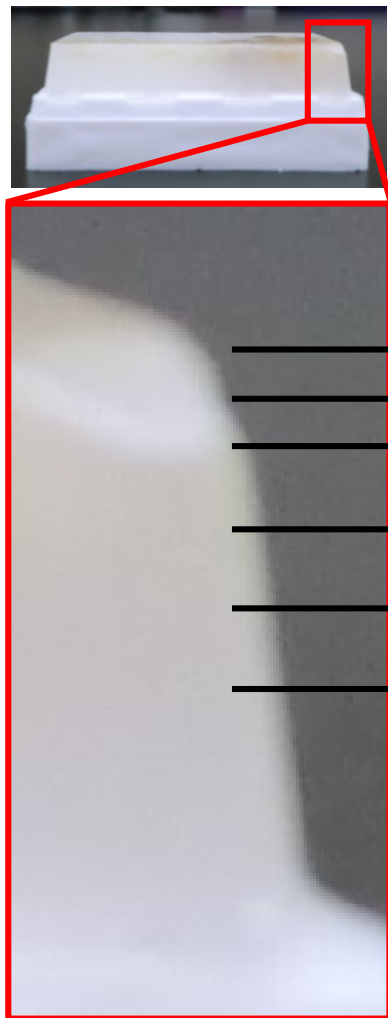
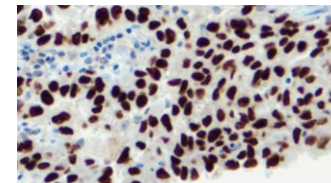
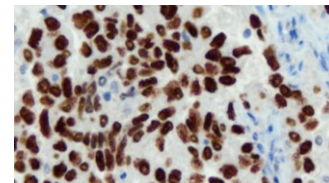
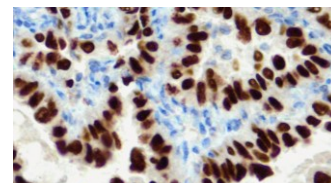
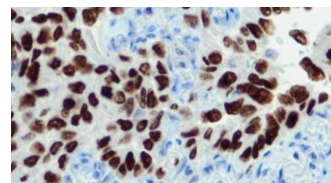
300 μ m



500 μ m

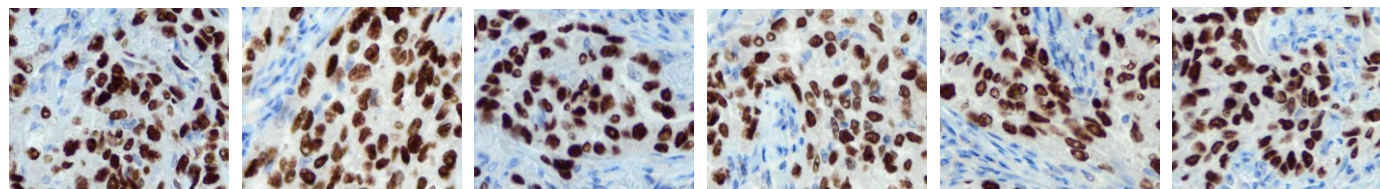


1000 μ m



①ギ酸

TTF-1



コントロール

0-10μm

50μm

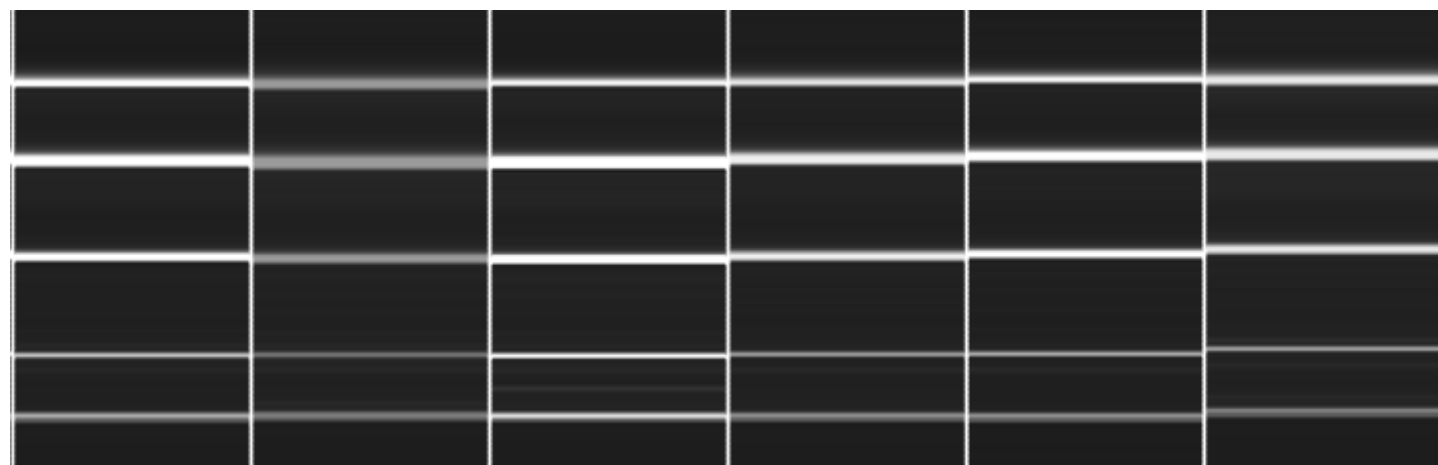
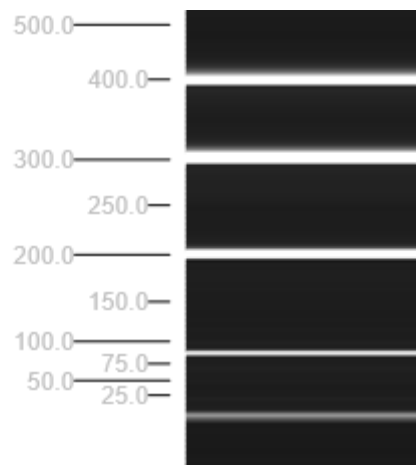
100μm

300μm

500μm

1000μm

BIOMED 2
100-400



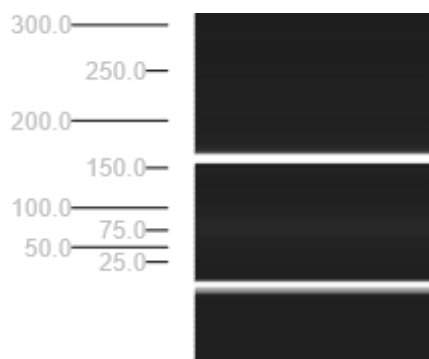
◀400bp

◀300bp

◀200bp

◀100bp

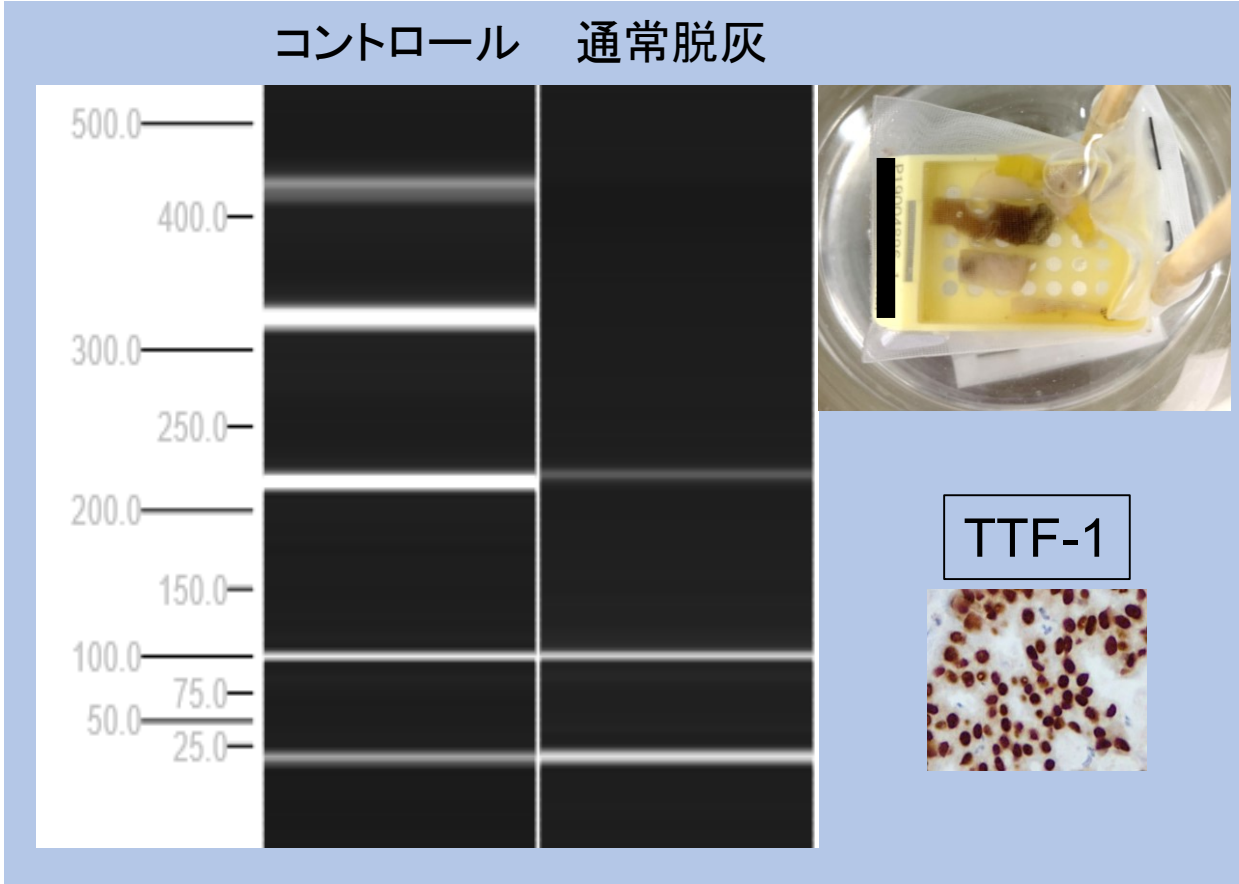
EGFR L858R



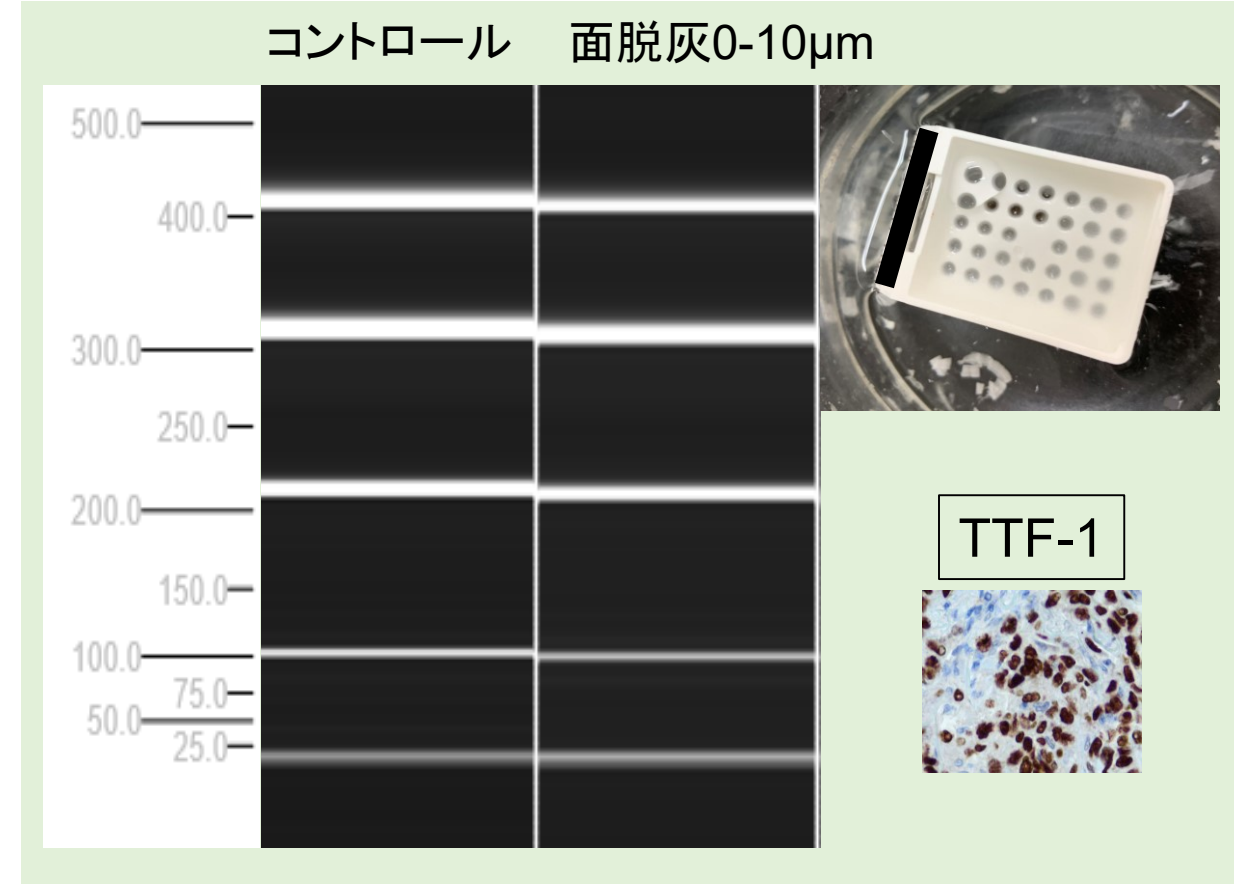
◀L858R

ギ酸は処理方法でDNAへの影響に差がみられる

【通常脱灰】



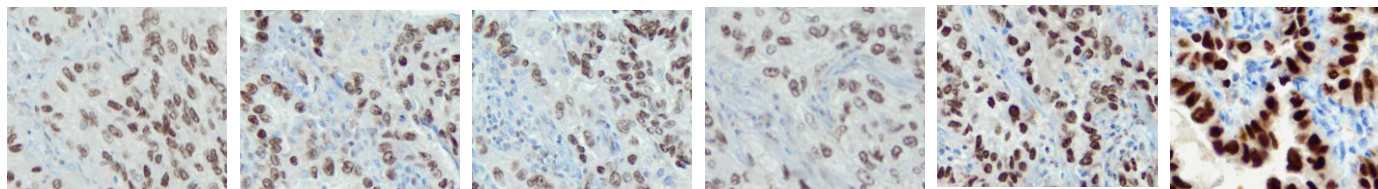
【面脱灰】



通常のギ酸脱灰(24時間)ではDNAの断片化が強くみられるが、
面脱灰(24時間)では乏しい

② プランク・リクロ

TTF-1



コントロール

0-10μm

50μm

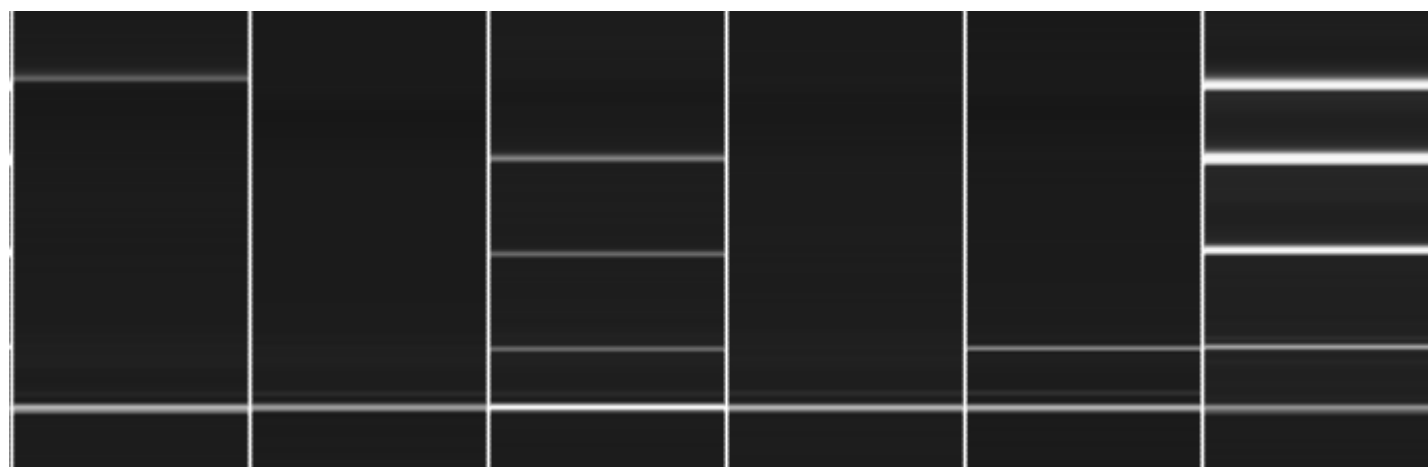
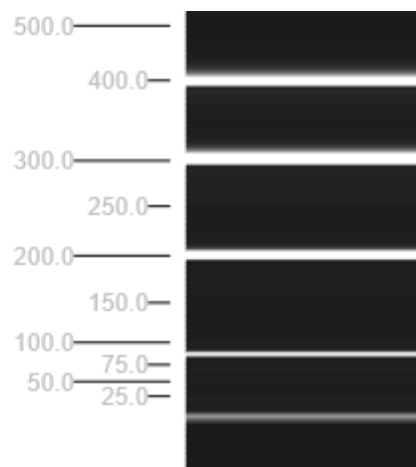
100μm

300μm

500μm

1000μm

BIOMED 2
100-400



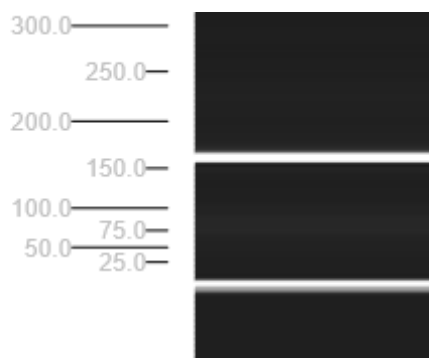
◀400bp

◀300bp

◀200bp

◀100bp

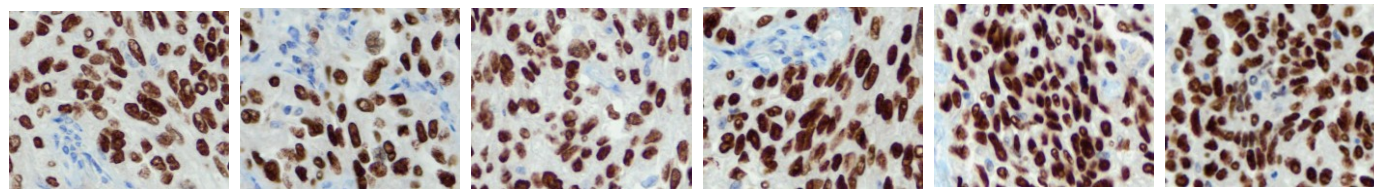
EGFR L858R



◀L858R

③EDTA

TTF-1



コントロール

0-10μm

50μm

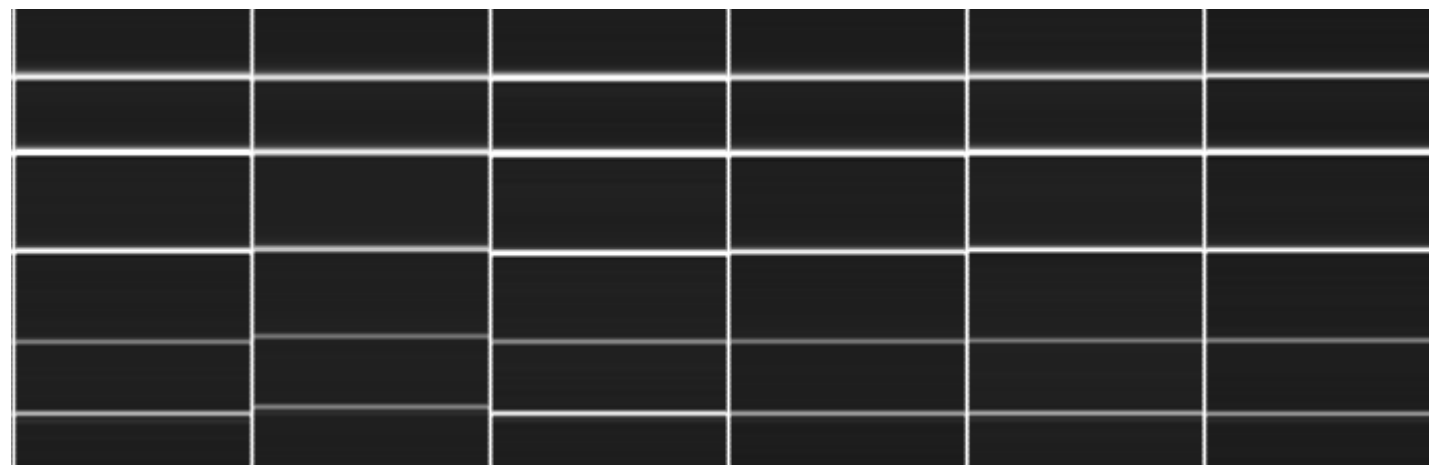
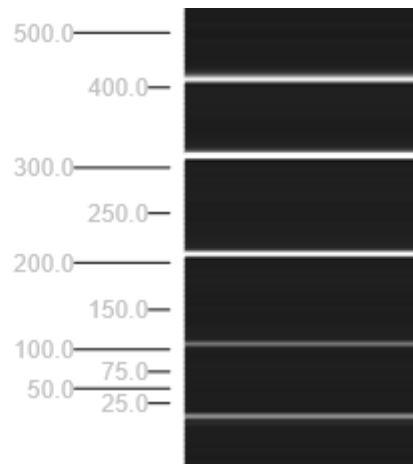
100μm

300μm

500μm

1000μm

BIOMED 2
100-400



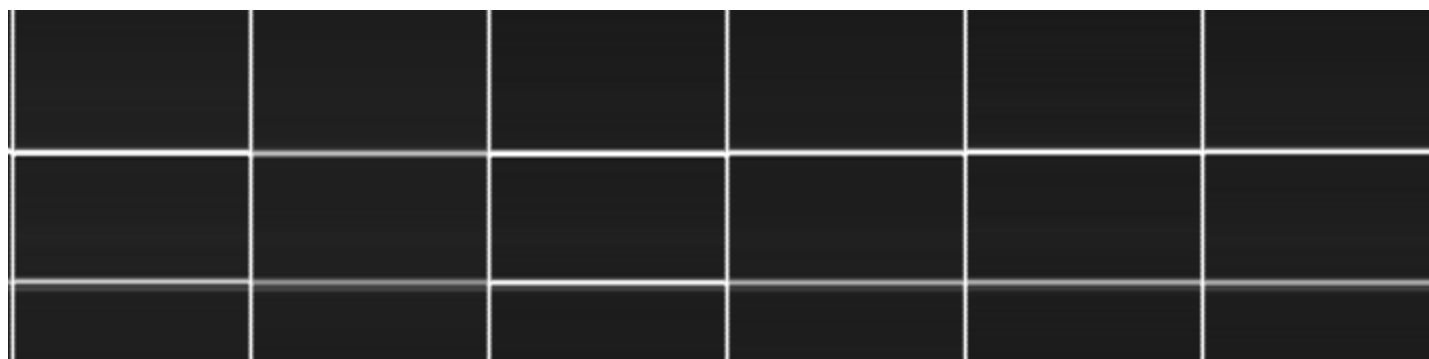
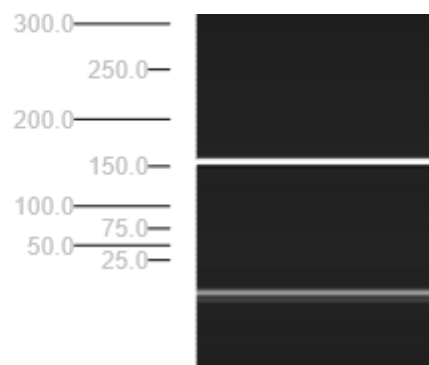
◀400bp

◀300bp

◀200bp

◀100bp

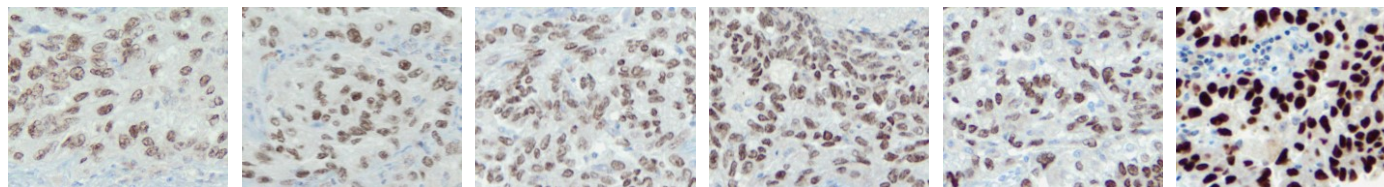
EGFR L858R



◀L858R

④KCX

TTF-1



0-10μm

50μm

100μm

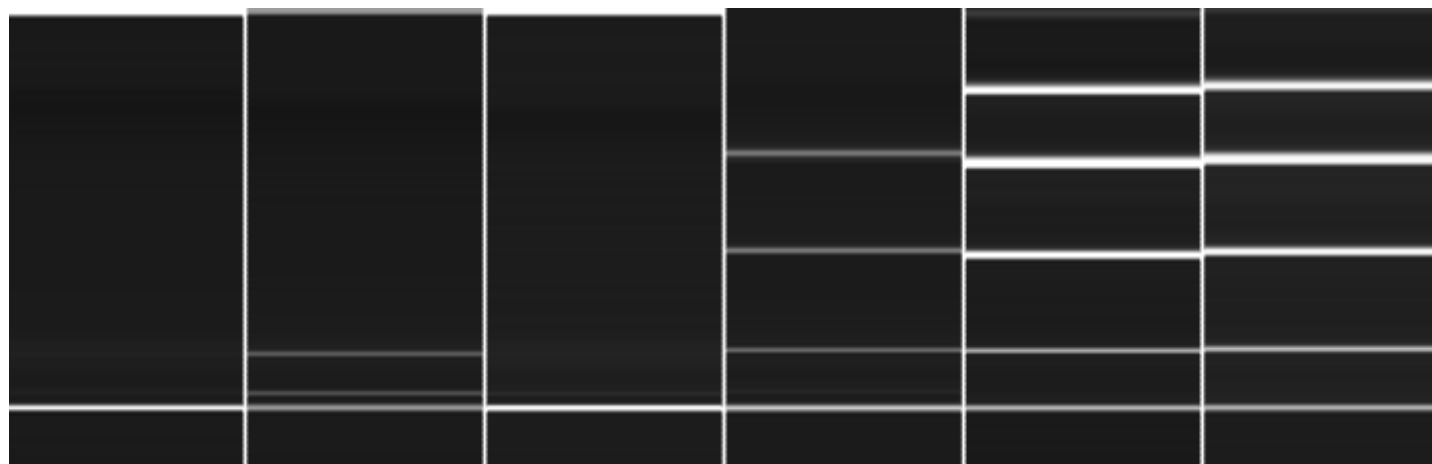
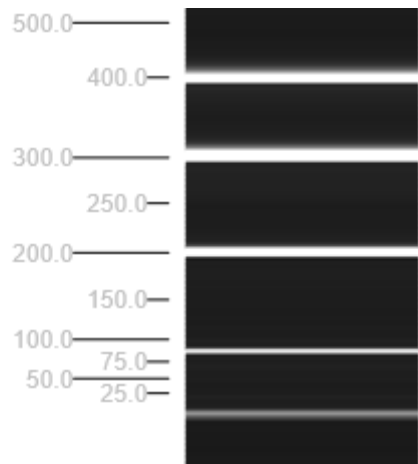
300μm

500μm

1000μm

コントロール

BIOMED 2
100-400



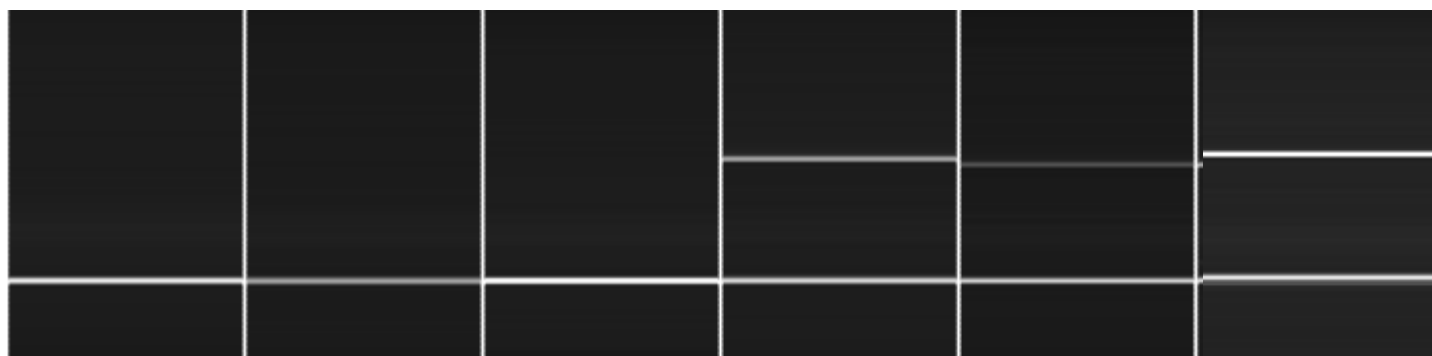
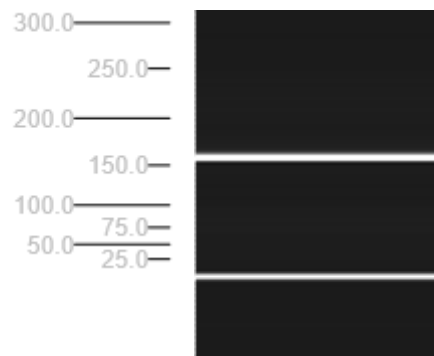
◀400bp

◀300bp

◀200bp

◀100bp

EGFR L858R

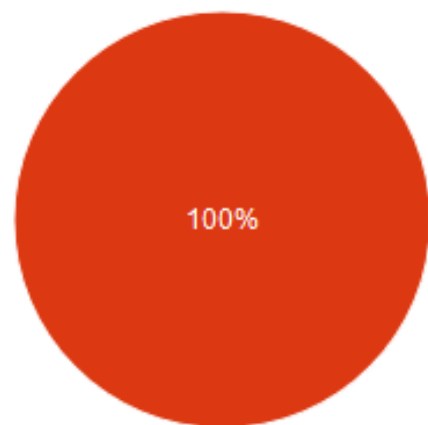


◀L858R

再固定

30. 切り出しの際、固定不良の組織に対して追加固定を行いますか

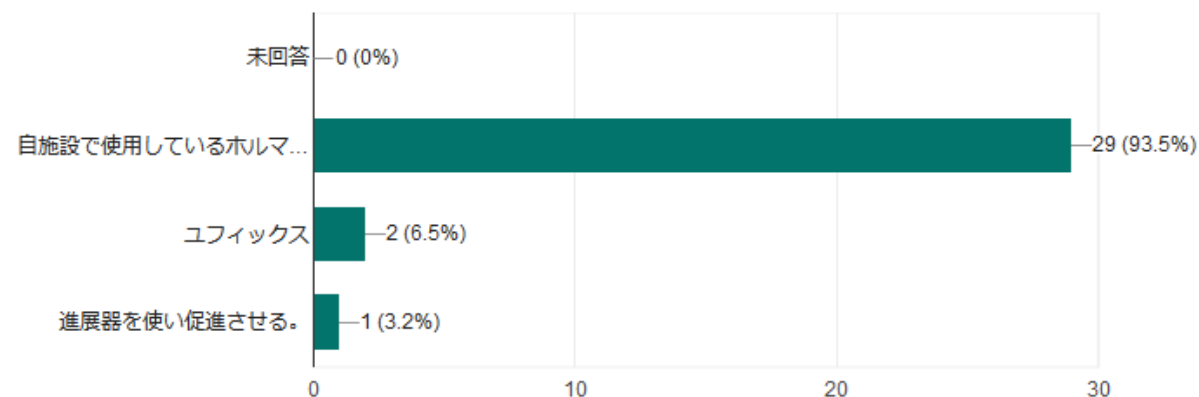
31 件の回答



- 未回答
- 行う
- 行わない

31. 追加固定を行う場合の固定液【複数回答可】

31 件の回答



※ ティッシュテック・ユフィックス〔カラファインテックジャパン(株)〕
→ホルマリンとメタノールを基材とした迅速固定液、ホルマリンは約50%濃度、pH中性

再固定 方法

- ①半固定状態の組織を室温、37℃、60℃の10%緩衝ホルマリンにそれぞれ1時間、3時間、24時間浸漬後、FFPEを作製した。
- ②半固定状態の組織を室温、37℃、60℃のユフィックスにそれぞれ1時間、3時間、24時間浸漬後、FFPEを作製した。
- ①②条件で作製したそれぞれのブロックから、皮膚科用5mmパンチでくり抜きアレイブロックとして薄切厚の差をなくし、ki67染色を行った。

10%緩衝ホルマリン

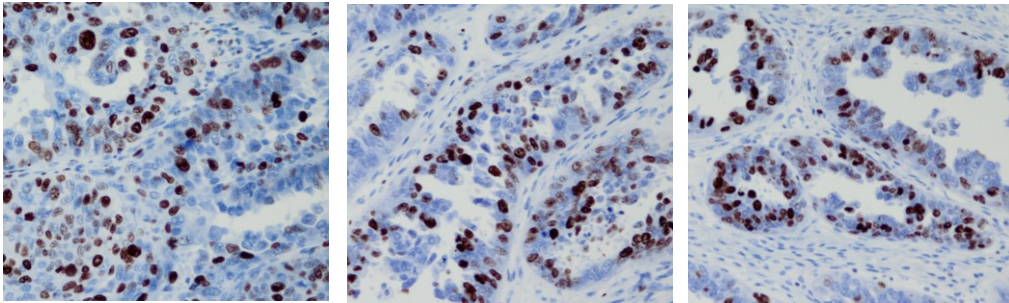
Ki67(大腸癌)

室温

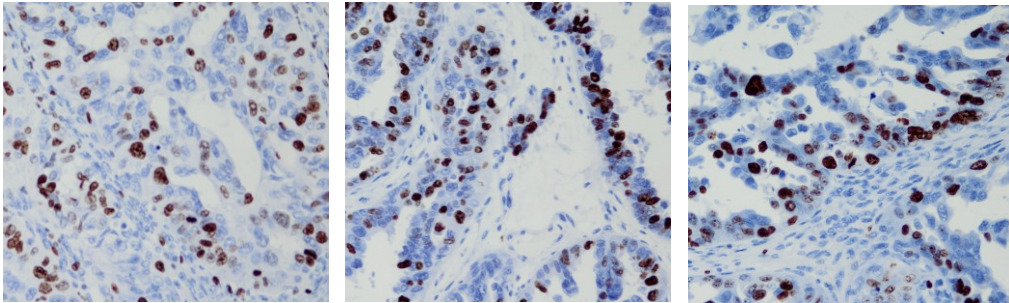
37°C

60°C

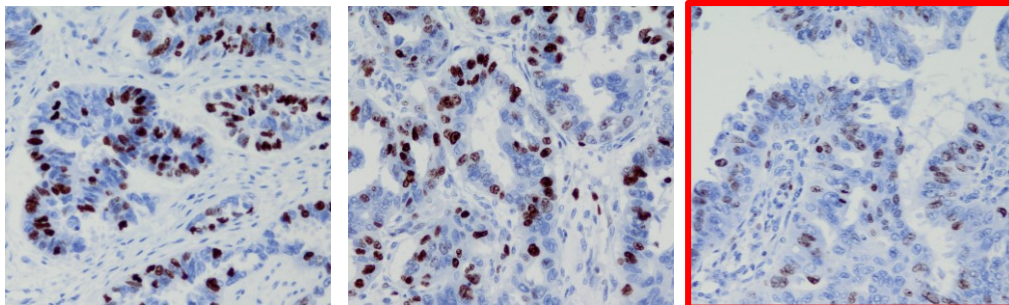
1時間



3時間



24時間



ユフィックス

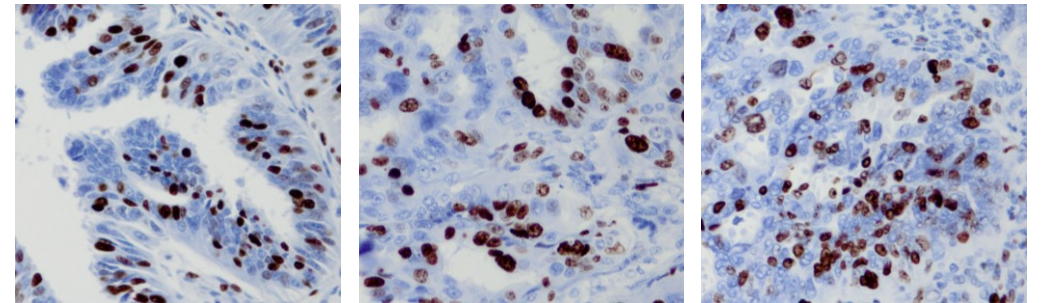
Ki67(大腸癌)

室温

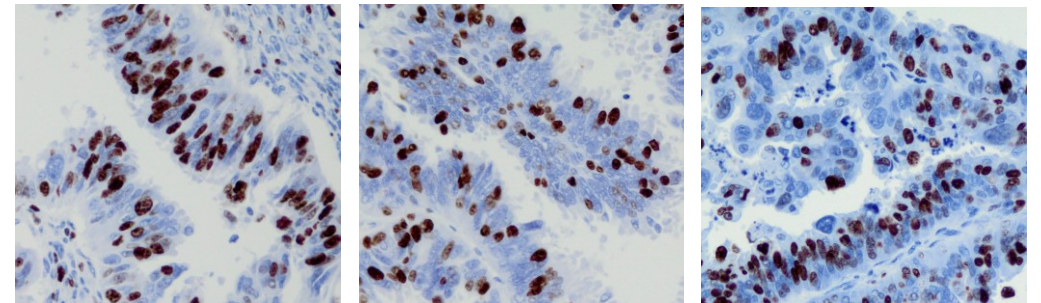
37°C

60°C

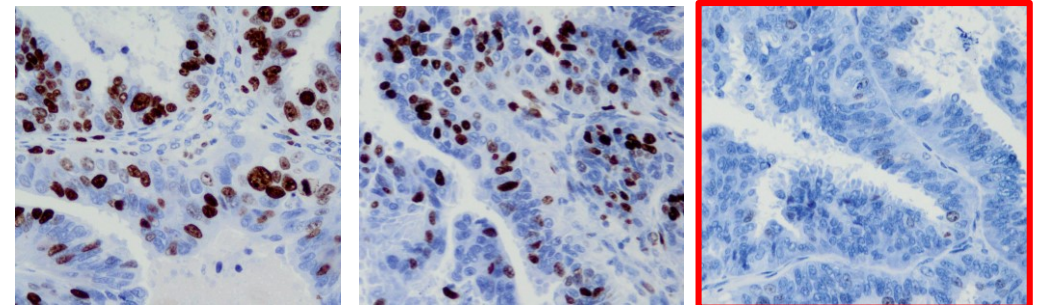
1時間



3時間



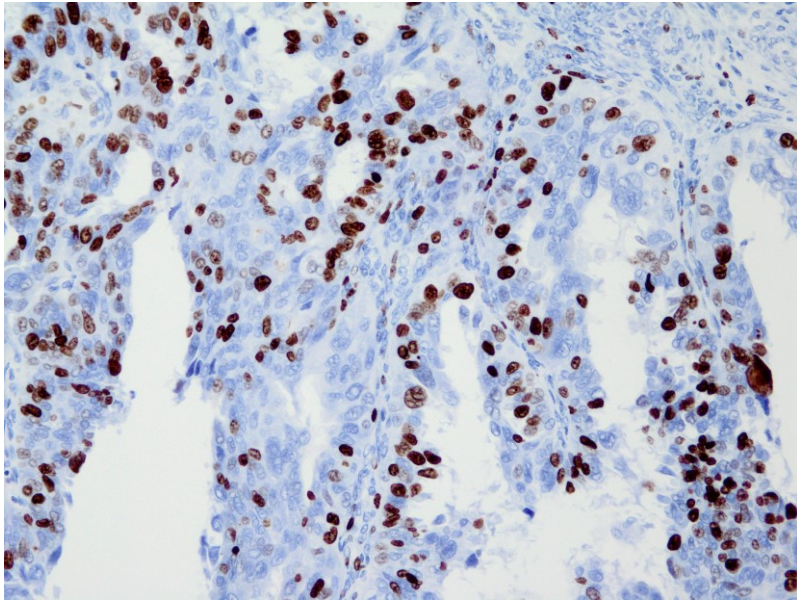
24時間



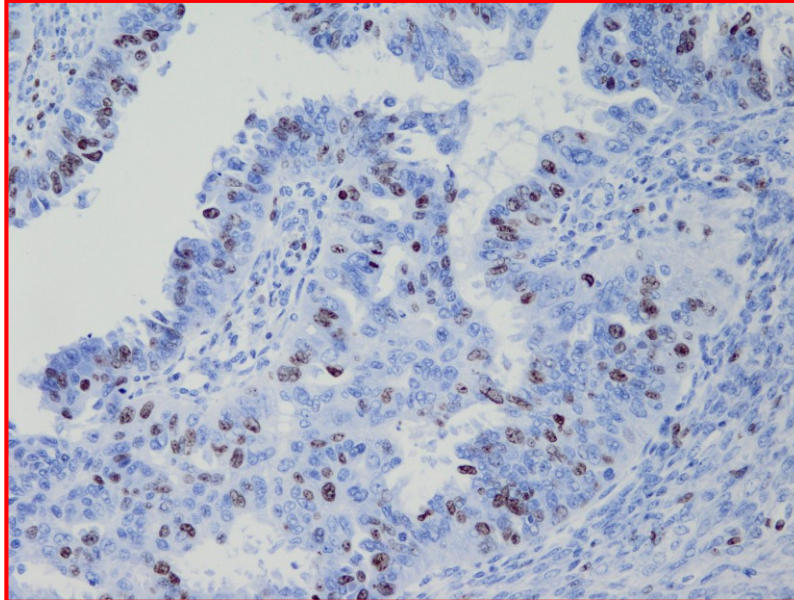
60°C加温の24時間 再固定は減弱する

Ki67(大腸癌)

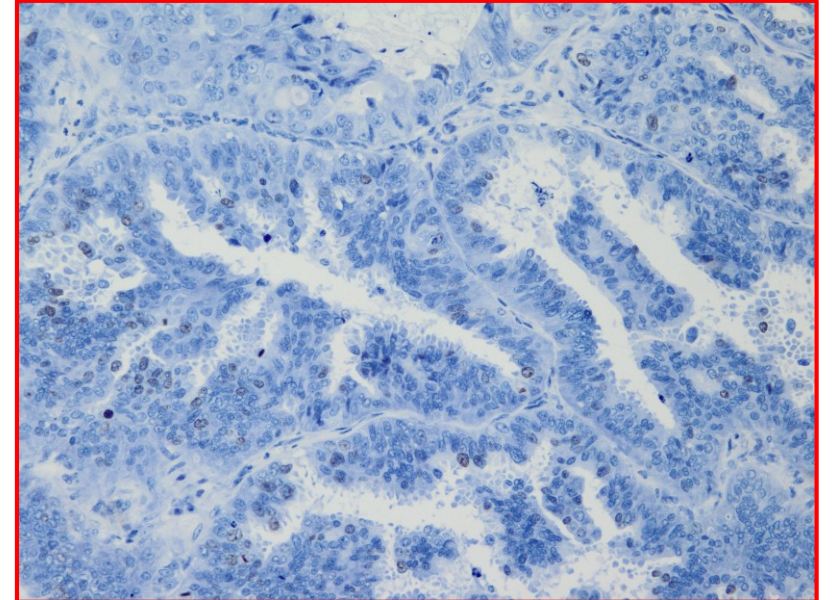
コントロール



10%緩衝ホルマリン



ユフィックス



ベーキング

通常 of 免疫染色、ER/PgR、Her2 (IHC)、HER2 (ISH)、ALK (IHC)、ALK (ISH)、PD-L1 におけるベーキング
時間と温度のアンケートより

時間 / 温度	37℃	40℃	45℃	46℃	50℃	51℃	60℃	65℃	66℃	68℃	60～70℃	95℃	97℃	98℃	100℃	総計
10～20分				4									1		3	8
30分			7			6	17			7						37
40分								11					1	2		14
60分					4		35				7	4				50
60～120分							7		3							10
180～240分	3															3
Over night	24	1														25
不明	7															7
総計	34	1	7	4	4	6	59	11	3	7	7	4	2	2	3	154

ベーキング 方法

①37℃

1時間
オーバーナイト
1週間
2週間

②60℃

1時間
オーバーナイト
1週間
2週間

切片を①37℃、②60℃でそれぞれ1時間、オーバーナイト、1週間、2週間ベーキング。
Her2*、ki67、PD-L1**染色を行った。

ベーキング

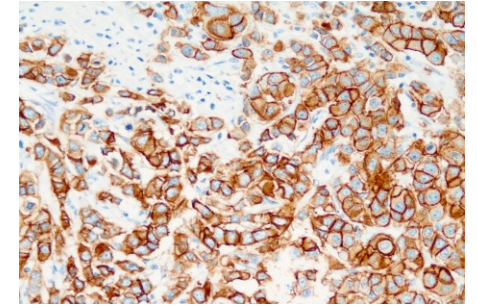
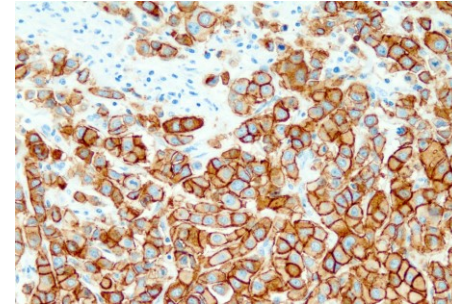
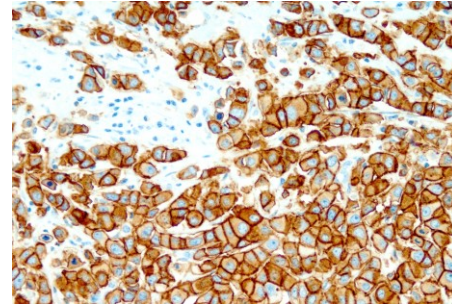
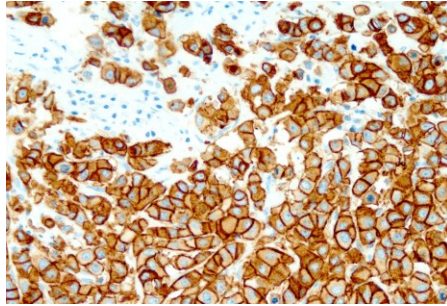
1時間

オーバーナイト

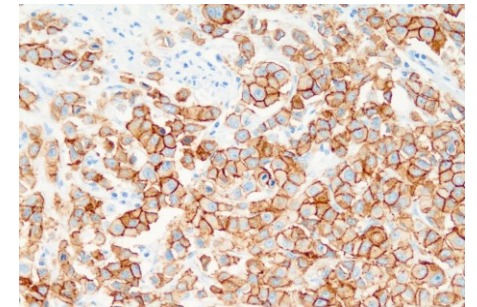
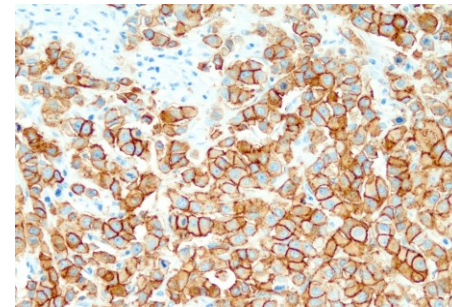
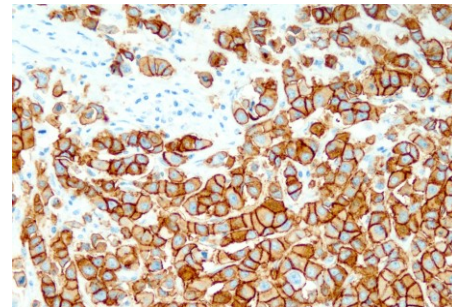
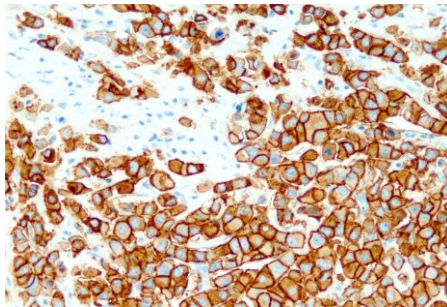
1週間

2週間

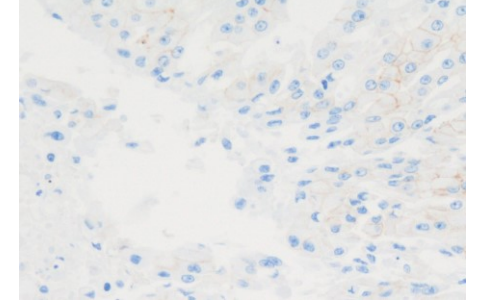
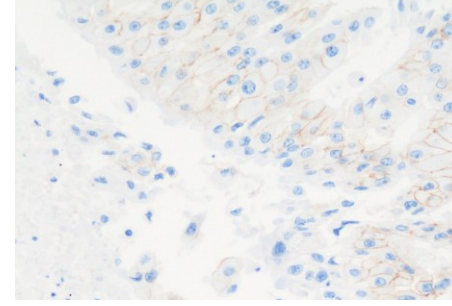
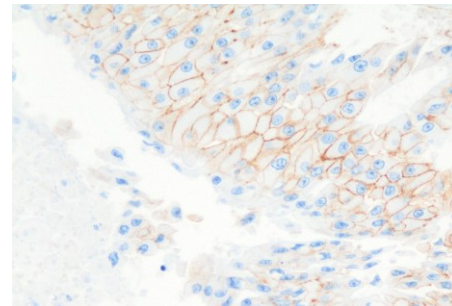
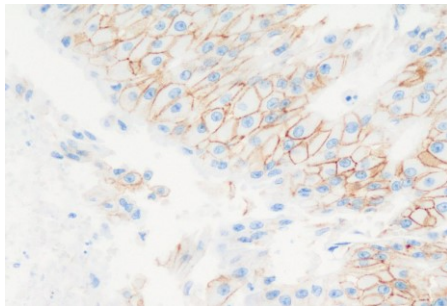
37°C



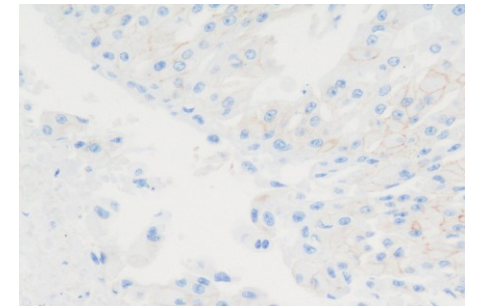
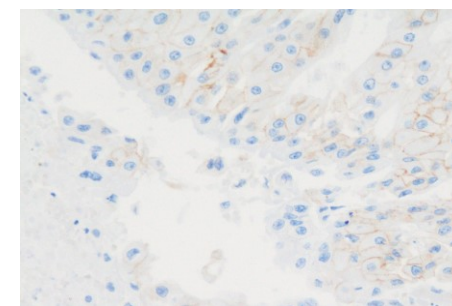
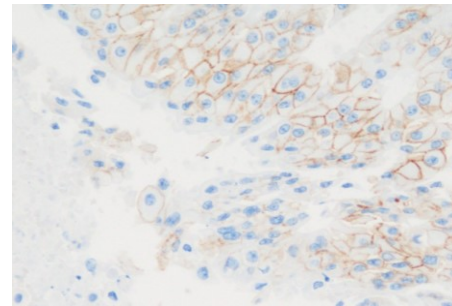
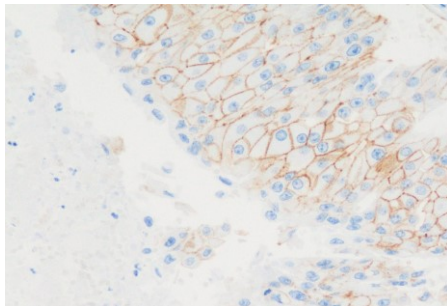
60°C



37°C



60°C



Her2
3+

Her2
2+

ベーキング

1時間

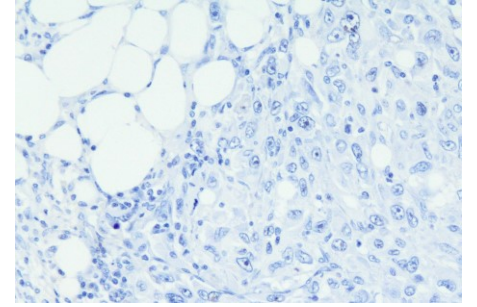
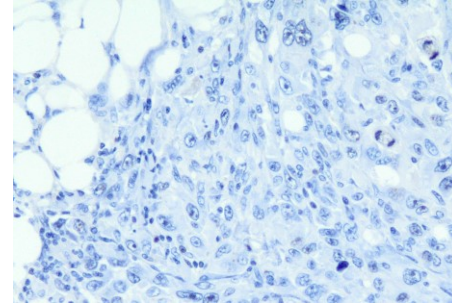
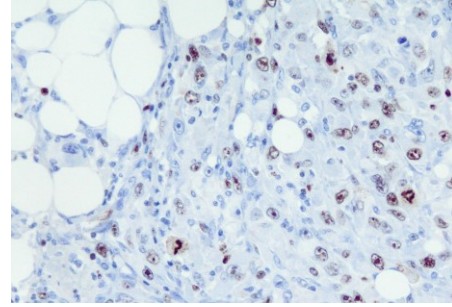
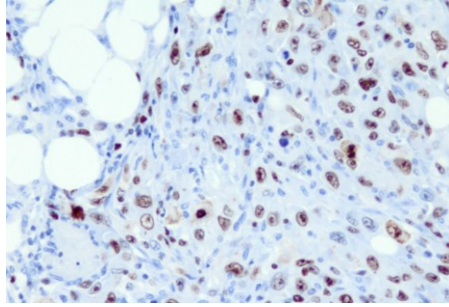
オーバーナイト

1週間

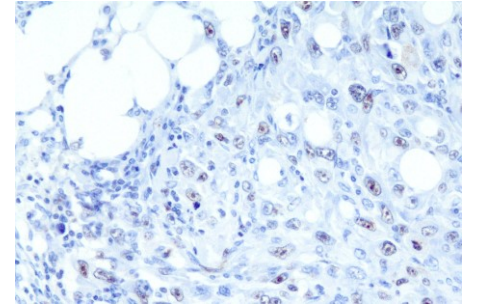
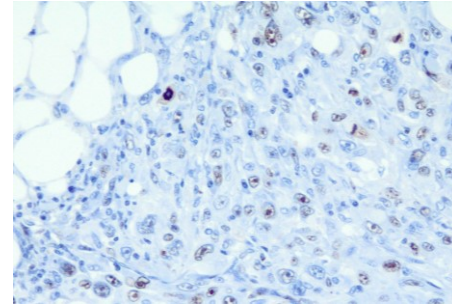
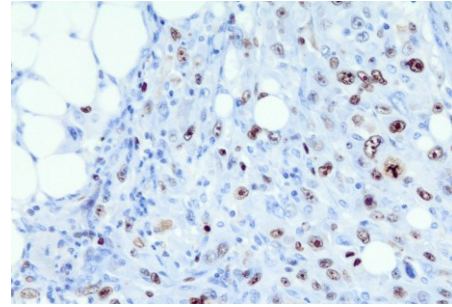
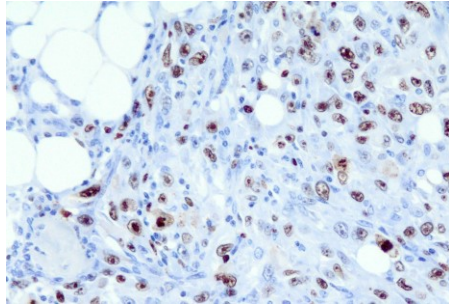
2週間

37°C

ki67

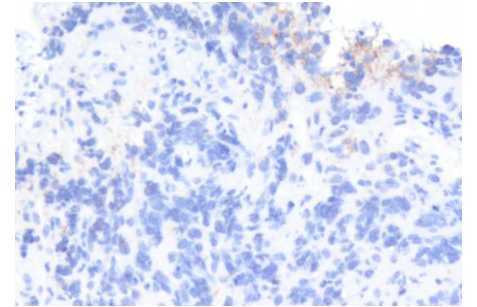
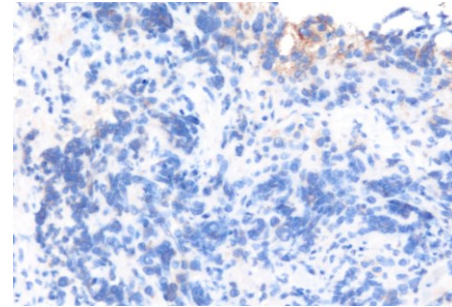
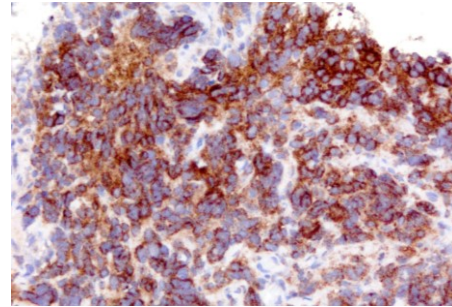
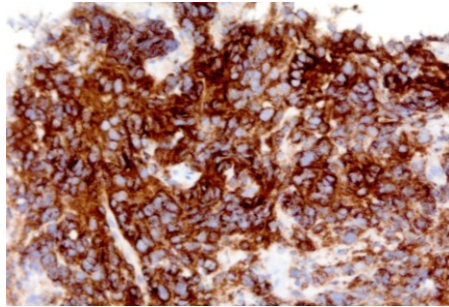


60°C

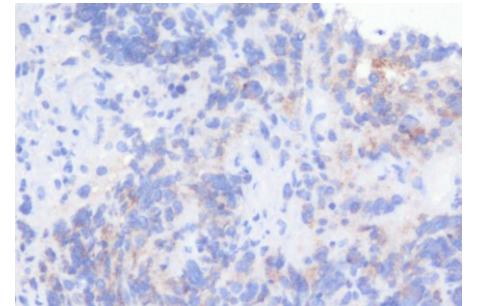
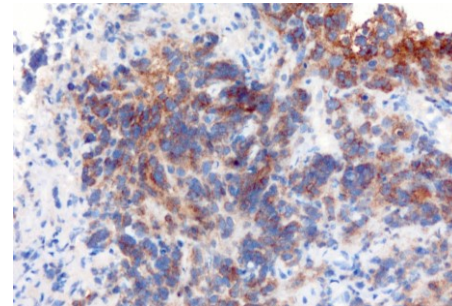
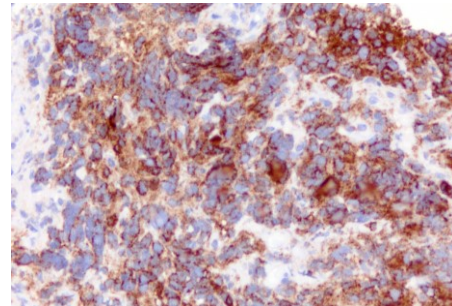
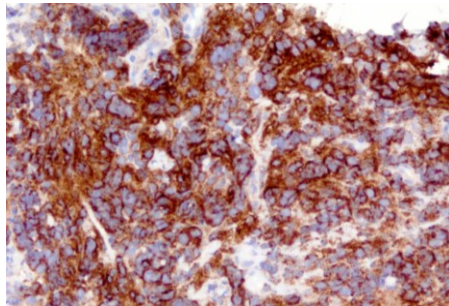


37°C

PD-L1

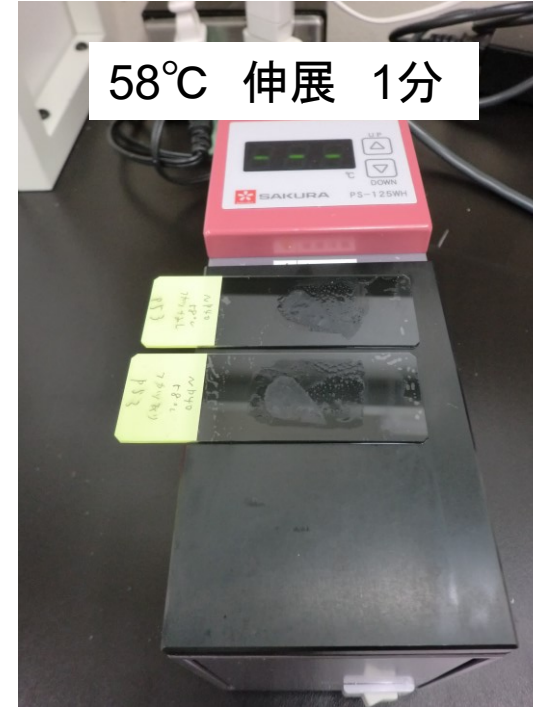


60°C



伸展

45°C	1分
51°C	1分
58°C	1分



- 上記条件で伸展、60°C・1時間乾燥後、Her2 *、ki67染色を行った。

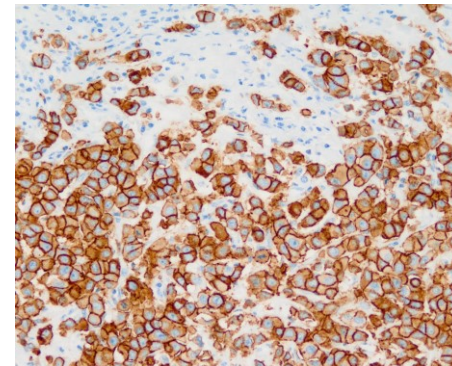
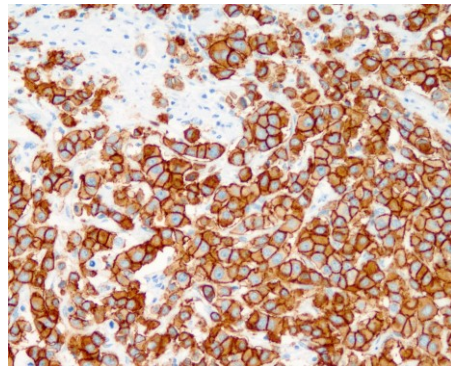
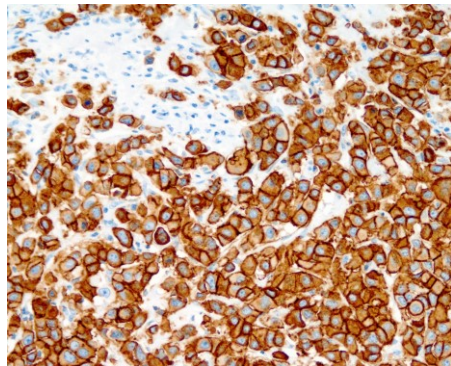
伸展温度による差

45°C

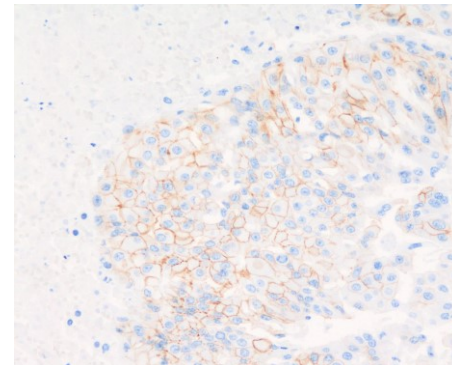
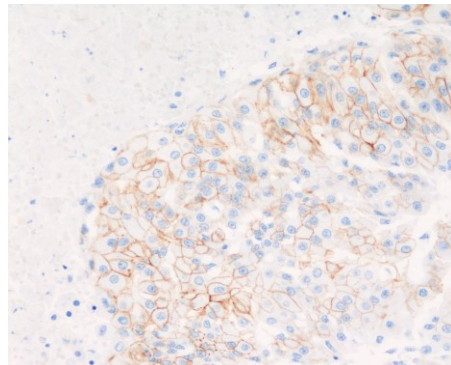
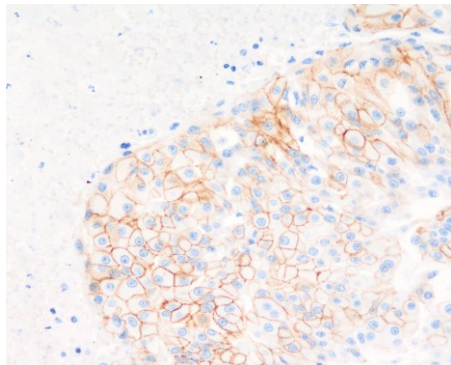
51°C

58°C

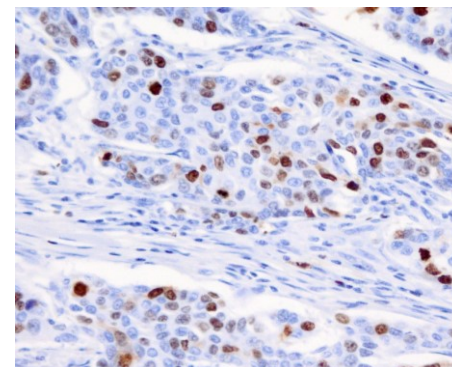
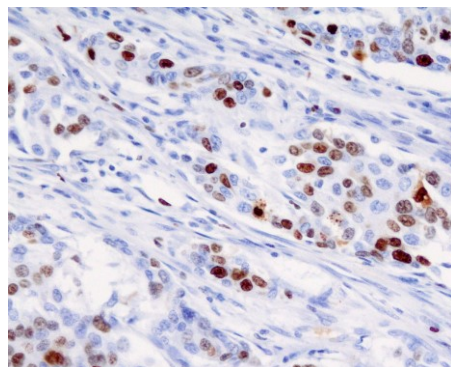
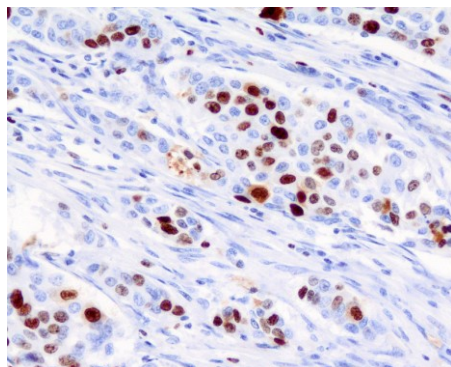
Her2
3+



Her2
2+



ki67

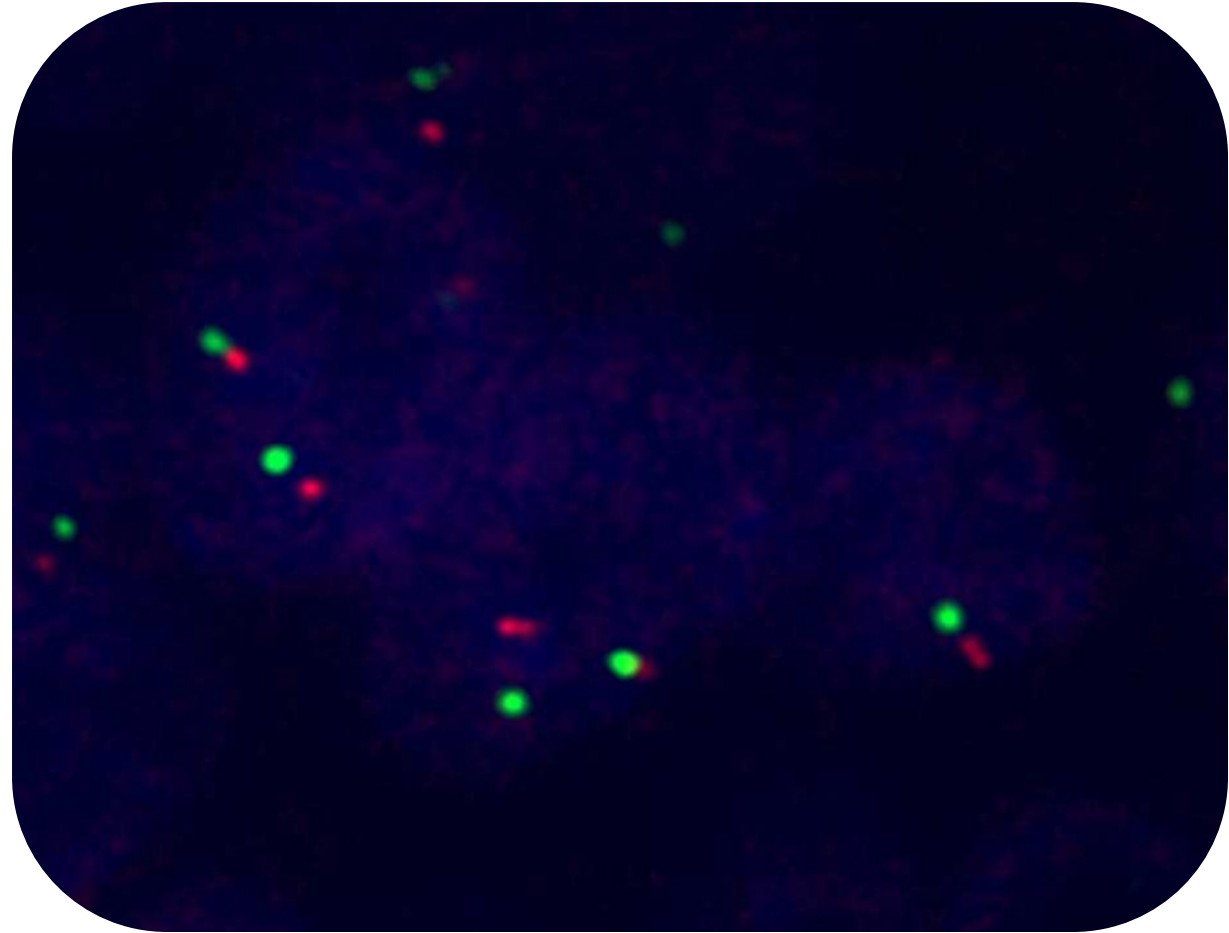


58°C伸展 FISH

CDKN2A/CEP9 FISH FFPEプロトコール

1. 水道水で伸展. 乾燥
2. 脱パラフィン
3. Image-iT(アセチル化)30分
4. Hcl 20分
5. 熱処理 98°C, 20-40分
6. 酵素処理 37°C, 3分
7. 15%緩衝ホルマリン 3分
8. 0.1%NP40/2XSSC 30分
9. Denature 80°C, 5分
10. Hybridization 37°C, 16時間~
11. 洗浄
12. DAPI封入

CDKN2A SpectrumOrange/
CEP® 9 SpectrumGreen Probe



影響はなかった

観察: KEYENCE_BZ9000

高温伸展だけでFISHが出来る！？

💡 NP40/2XSSCで伸展したらどうだろう

CDKN2A/CEP9 FISH
FFPEプロトコール

1. 高温伸展 NP40/2XSSC
VS 水道水、乾燥

2. 脱パラフィン

Image-iT (アセチル化) 30分

Hcl 20分

熱処理 98°C, 20-40分

酵素処理 37°C, 3分

15%緩衝ホルマリン 3分

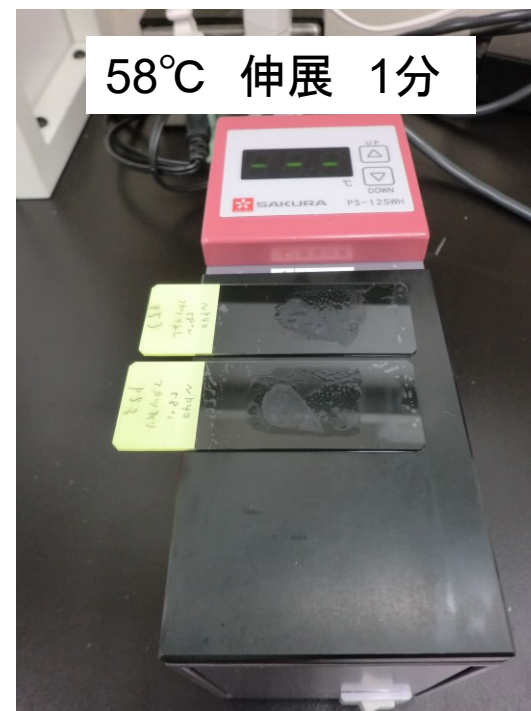
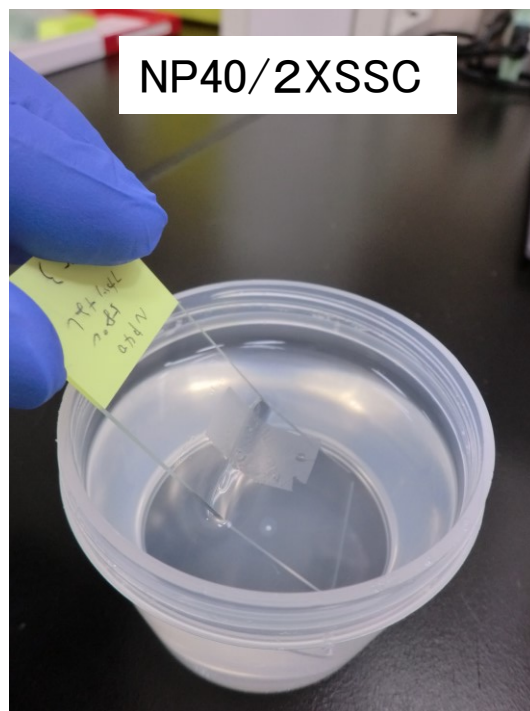
0.1%NP40/2XSSC 30分

4. Denature 80°C, 5分

5. Hybridization 37°C, 16時間~

6. 洗浄

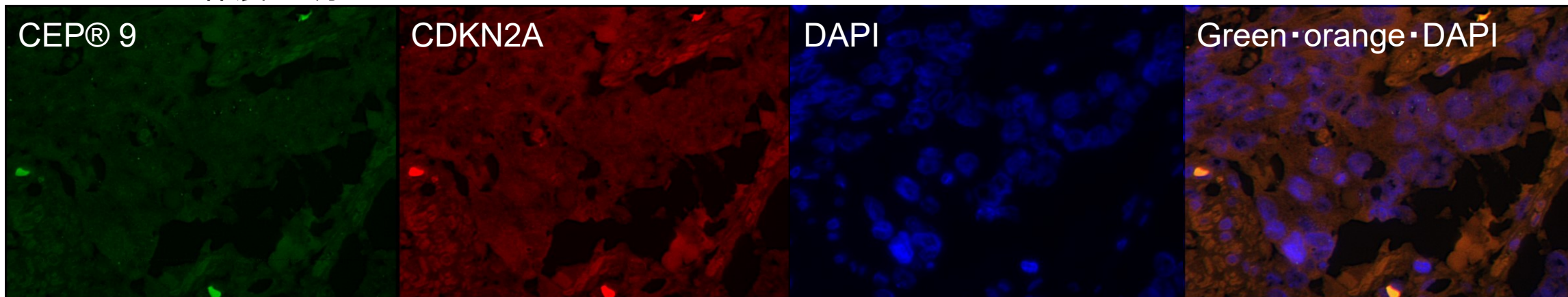
7. DAPI封入



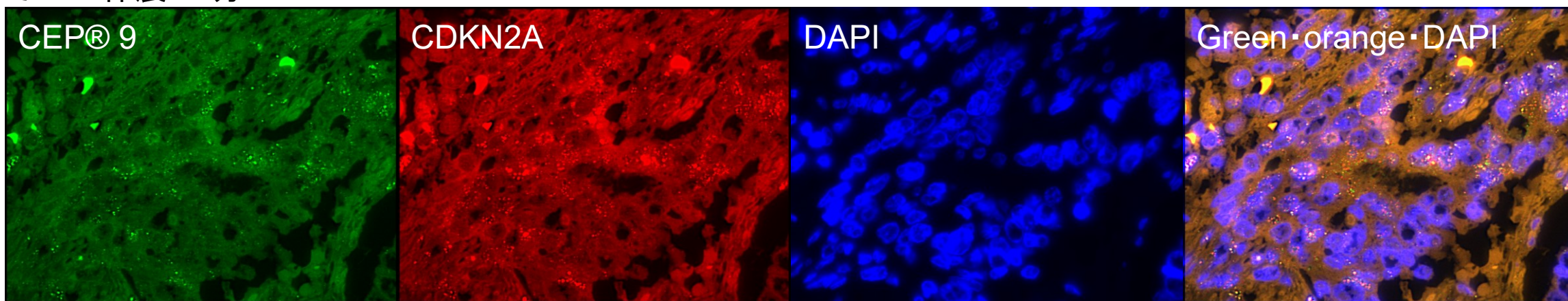
NP40/2XSSC vs 水道水

CDKN2A SpectrumOrange/
CEP® 9 SpectrumGreen Probe

NP40/2XSSCで58℃伸展 1分



水道水で58℃伸展 1分



シグナルは確認できなかったが、水道水に比べNP40/2XSSCでの伸展で
非特異的反応が抑えられた

観察: KEYENCE_BZ9000

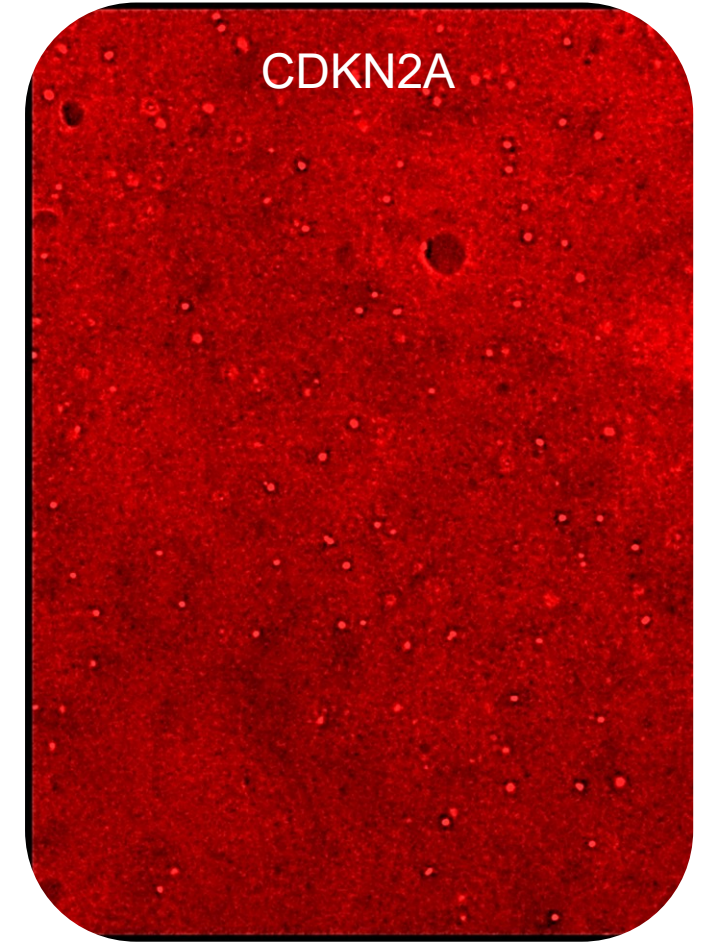
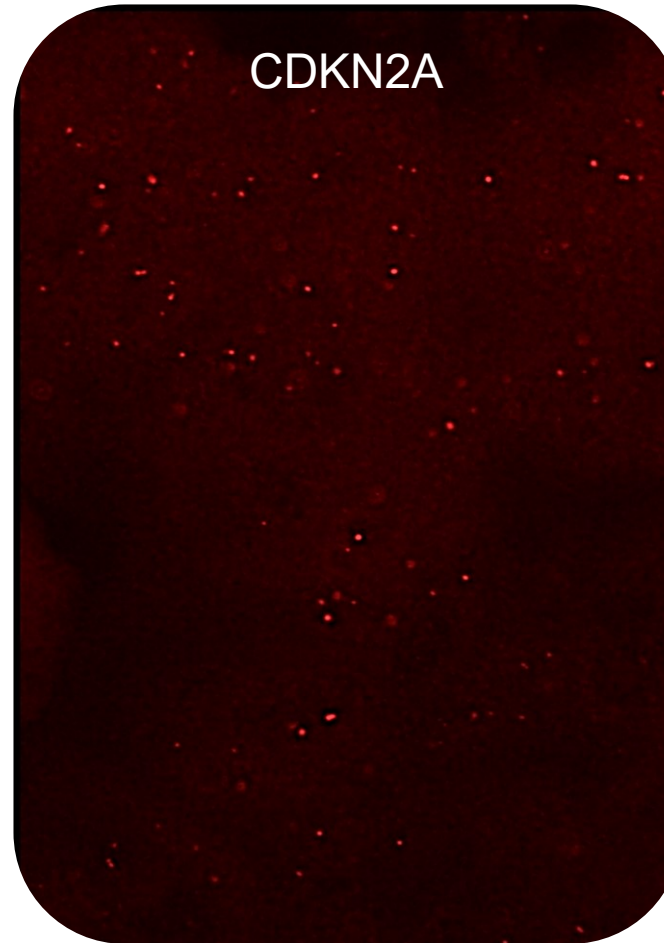
NP40/2XSSC vs 水道水 非特異反応の差

NP40/2XSSC伸展

水道水 伸展

CDKN2A/CEP9 FISH
FFPEプロトコール(簡易)

1. 高温伸展 NP40/2XSSC
or 水道水. 乾燥
2. 脱パラフィン
Image-iT(アセチル化)30分
Hcl 20分
3. 熱処理 98°C, 20分
酵素処理 37°C, 3分
15%緩衝ホルマリン 3分
0.1%NP40/2XSSC 30分
4. Denature 80°C, 5分
5. Hybridization 37°C, 16時間~
6. 洗浄
7. DAPI封入



CDKN2A SpectrumOrange/
CEP® 9 SpectrumGreen Probe

まとめ

【脱脂液】

- ・脱脂液の種類や長期間の浸漬で免疫染色に影響はない

【脱灰】

- ・ギ酸は脱灰方法で核酸への影響が違う
- ・プランク・リクロ、KCXでは蛋白、核酸レベルで影響がみられる
- ・免疫染色・核酸検査を考慮するならEDTAが推奨される

まとめ

【再固定】

- ・ホルマリンの種類に関係なく高温での長時間再固定は染色性が減弱する

【ベーキング】

- ・37℃・60℃ともに1週間以上のベーキングで染色性が減弱する
- ・37℃長期ベーキングは60℃長期ベーキングに比べ、染色性の減弱が強くみられる抗体もあった

【伸展】

- ・高温伸展では染色性が若干減弱する



お問い合わせ
東邦大学医療センター佐倉病院
病院病理部 山崎利城
0434628811(2450)
yamazaki@sakura.med.toho-u.ac.jp