

薄切済み未染色コントロール切片の保存法

浜松医科大学病理学第一講座

五十嵐久喜 梶村春彦

はじめに

病理検査においてパラフィン包埋組織を薄切する際、面だしによる組織の損失等や昨今の種々の検索項目の要請頻度を考慮すると、依頼項目以外の予備や染色を行う際に用いる陽性コントロール用として、未染切片を多数作製しておくことが賢明である。その使用は薄切直後でないことが多く、その一方でパラフィン切片の長期保存が抗原性の低下を招く可能性があると言われている。実際は、抗原賦活化法の進歩によりある程度長期保存された切片でも比較的安定した抗原性を維持するものもあるが、Estrogen Receptor、Ki-67、p53タンパク等さまざまな抗原性が薄切後、経時的に低下するといった報告も多く、それは、組織が外気と触れることによる酸化、さらには熱や湿度などの室内環境が大きく関与しているとされている^{1)~4)}(図1~4)。抗原性の低下を遅延させる方法としては、パラフィンで覆ってnitrogen desiccation chamber内で保存することを推奨するむきもあるが¹⁾、一定の評価が定まっているわけではなく、多くの施設では単に4℃にて保存している。しかも、その保存管理にはかなりの枚数のスライドガラスを使うわけであるから、スペースの確保、ガラスの扱いなど細心の注意が必要なものもあり手間である。また、これらの保存に使われる剥離防止用スライドガラスは種類にもよるが3ヵ月~半年くらいから接着性の劣化が生じ始めると言われており、組織を貼り付けた状態で保存しても使用時に、たとえば免疫染色の前処理などの段階で剥離する可能性がある。今回は、スライドガラスに張り付け4℃保存する代わりに、切片を特定の繊維シート(濾紙)に貼り付け保存し、必要時に再度水槽で剥離させスライドガラスに貼り付け使用する方法⁵⁾を紹介する。

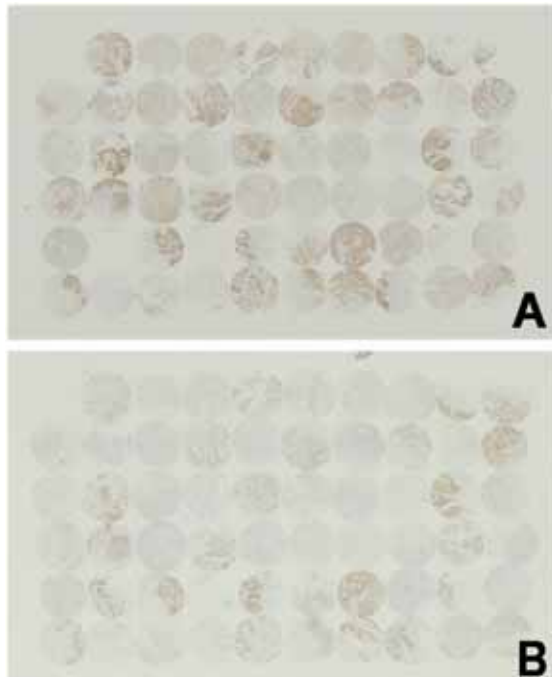


図1 薄切切片の長期保存による抗原性の変化-1

大腸癌組織マイクロアレイ切片を抗 p53 遺伝子産物マウスモノクローナル抗体(DO-7)で染色。

A: 薄切直後、B: スライドケース内にて2年間、室温保存。

長期保存された切片は、症例によっては著しい抗原性の低下が認められる。

ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス) 使用

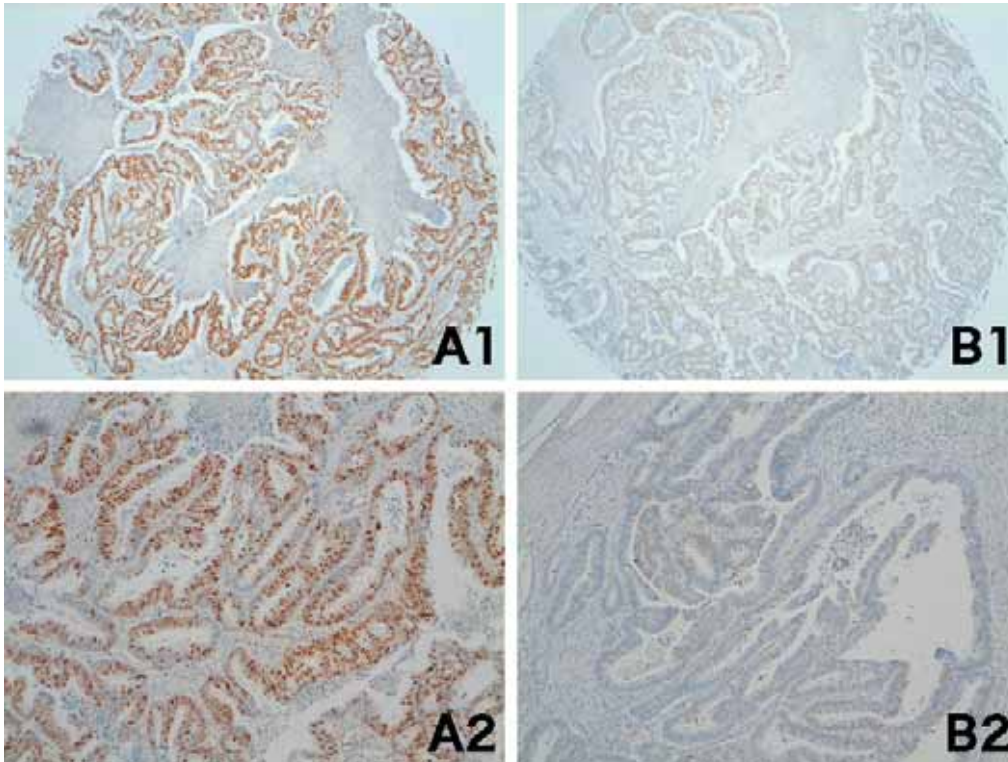


図2 薄切片の長期保存による抗原性の変化-2

大腸癌組織を抗 Ki-67 抗原マウスモノクローナル抗体 (MIB-1)で染色.

A : 薄切直後、B : スライドケース内にて2年間、室温保存.

B は抗原性の低下が著しく、増殖能検索を目的とする場合、labeling index に影響をあたえる.

ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス) 使用

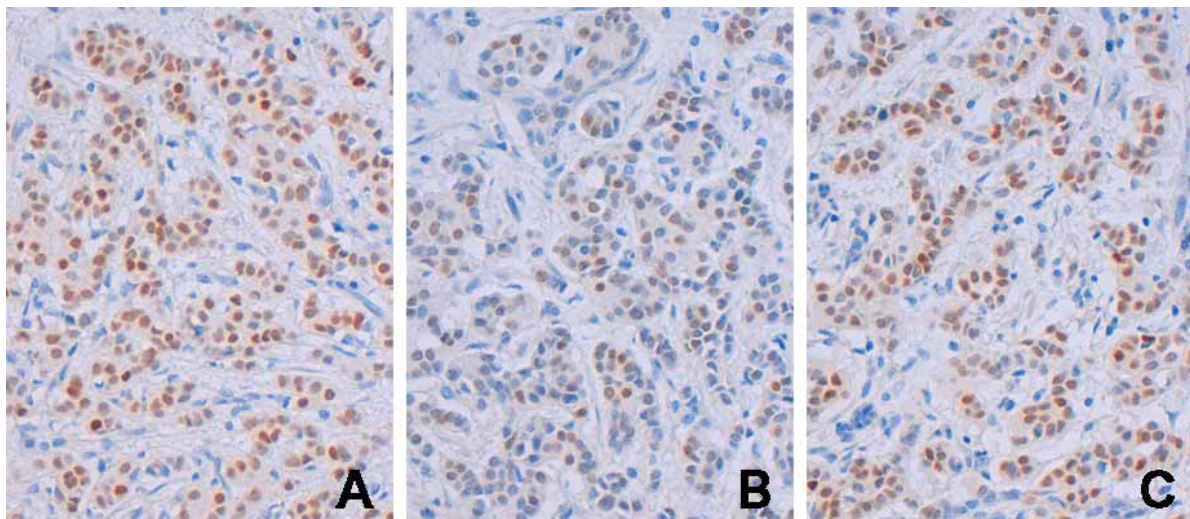


図3 薄切片の短期保存による抗原性の変化-1

乳癌組織を抗エストロゲンレセプターモノクローナル抗体 (1D5) (ニチレイバイオサイエンス) で染色.

A : 薄切直後、B : 室温にて2ヵ月放置、C : 保存シートにて2ヵ月、4 保存.

B の室温にて2ヵ月放置した切片は、抗原性の著しい低下を認める.

C は薄切直後と比べても変化が無いことがわかる.

ER/PgR (MONO) ユニバーサルキット (ニチレイバイオサイエンス) 使用

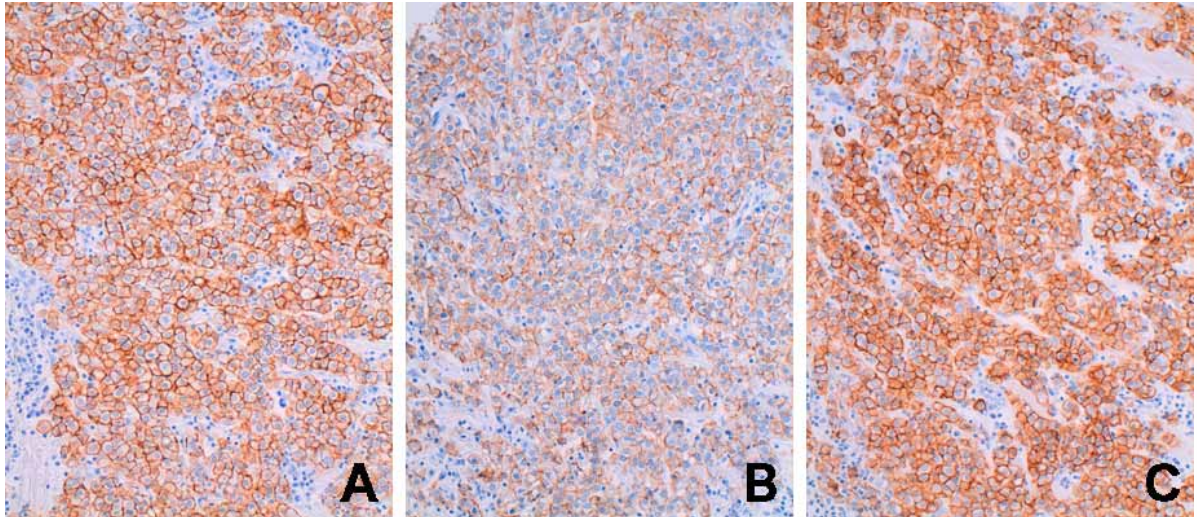


図 4 薄切片の短期保存による抗原性の変化-2

乳癌組織を抗ヒト HER2/ *neu* 遺伝子産物モノクローナル抗体 (SV2-61) (ニチレイバイオサイエンス) で染色。

A: 薄切直後、B: 室温にて 2 ヶ月放置、C: 保存シートにて 2 ヶ月、4 ヶ月保存。

B の室温にて 2 ヶ月放置した切片は、抗原性の著しい低下を認める。

C は薄切直後と比べても変化が無いことがわかる。

ヒストファイン HER2 キット (MONO) ユニバーサルキット (ニチレイバイオサイエンス) 使用

濾紙の種類と使用方法

パラフィン切片の剥離の容易さ・剥離の際に生じる亀裂のおこりにくさ等から、その支持体密度が低く濾過時間の速い特定の多孔性繊維シート (濾紙) が推奨される (東屋医科器械)。

ミクロトームにより薄切され、水槽に浮かべたパラフィン切片を濾紙に貼り付け、反り返し防止のためペーパータオル上で自然乾燥させる。乾燥後にチャック付ポリ袋等に入れ 4℃ で保存する (図 5)。

使用に際しての留意点として、組織が貼り付いた側を下にして水槽に浮かべ自然剥離もしくは図 6 を参考に剥離する。つまり、面はうらがえしになる。濾紙は多孔質であるため、組織側を上に向けた状態では、剥離時に多数の小気泡が切片裏に付着するからである。

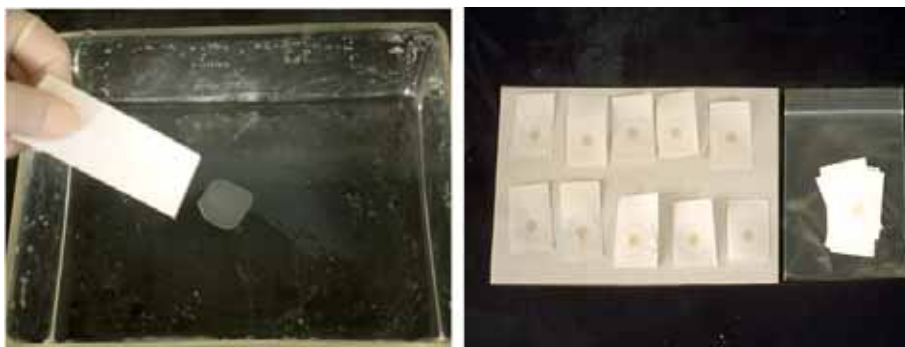


図 5 保存シートを用いた切片の保存法

薄切した切片を濾紙に貼り付け、ペーパータオル上で自然乾燥させる。乾燥後はチャック付きの袋に入れて 4℃ で保存する。

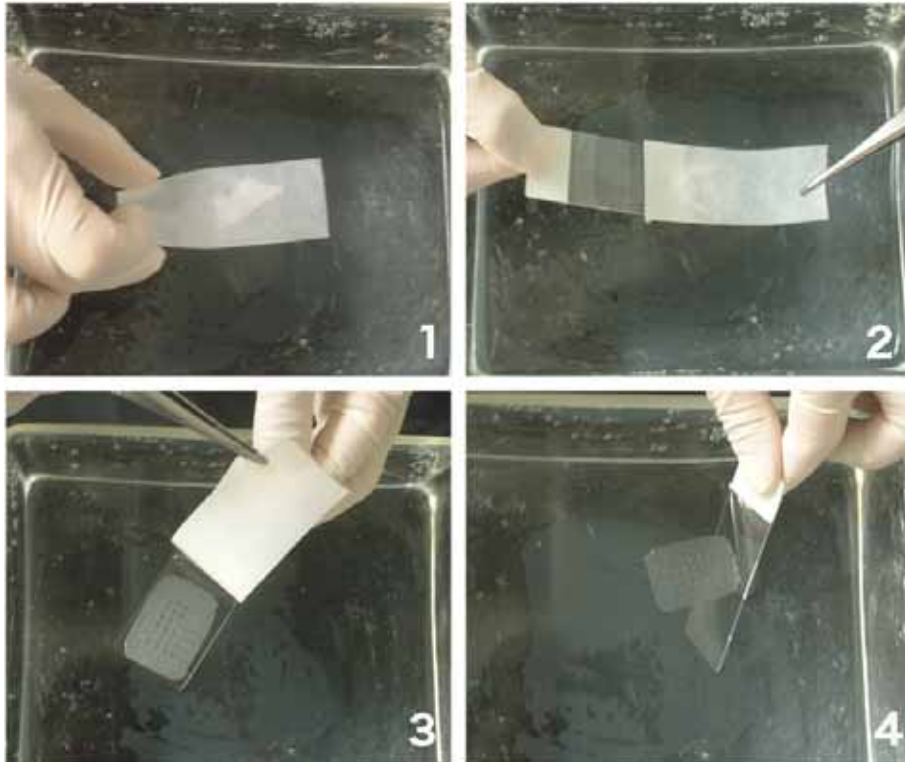


図 6 保存シートの使用方法

- 1 組織面を下に向けて水槽に浮かべる.
- 2 スライドガラスで組織の貼り付いた保存シートをすくい上げる
(水をたっぷり含ませた状態が望ましい).
- 3 少し時間を置き、ゆっくりと保存シートを剥離する.
- 4 今一度水槽に浮かべる.

まとめ

これまで一般的に行われていた未染標本の 4 保存では、前述した保管スペース等で苦慮する点もあったが、この方法では専用のスライドガラス用の保存箱を必要とせず、チャック付ポリ袋等に数多く重ねて入れアルバムなどにて保管できるため場所を取らない(図 7)。われわれは、この方法を導入してから 1 年以上経過するが、長期保存されたパラフィン組織切片の剥離時間がわずかに延長すること以外に、染色性や切片の状態などの変化は認めていない。また、多くの場合、過去に保存したいいわゆる切り余し切片は、全てを使いきれずにスライドガラスと一緒に処分されることになる。切片付のスライドガラスは、廃棄の際には特別な注意が必要であり、廃棄費用もかさむ(地域により異なるものの、ガラスくず、且つバイオハザードのカテゴリーになり、その廃棄容器も高価である)。日常業務上、必要最低限のスライドガラスを使用するというだけで無駄を軽減できる。また、われわれは、IHC 用、ISH 用、FISH 用、さらには特殊染色の陽性コントロール(アミロイド、ER、PgR、HER2、CD117、CMV、Ki-67、HPV、EBER 等)として、組織あるいはセルブロックから 2~3mm 径をマイクロアレイヤーでくり抜き新たにブロックを作製し、さらにこの保存シートを採用している。そうすることで、オーダーのあった染色をする際に陽性コントロール切片としてこの保存シートより剥離した切片と当座の検体を同時に貼り付けることができ、それはスライドガラスや抗体、DNA プローブなどの使用量節約や同一条件下で判定できるなど実用面での利点も大きい(図 8)。とりわけ、将来にわたって必要かもしれない未染色スライド標本を何枚も要求されるような症例については特に有用である。またこれらを、一定条件下で多施設に配布使用することが容易になるので、内外の種々の染色の精度管理の際の標準化や、多施設間の共同研究や治験としての提出にも効果的ではないかと期待する。



図7 保存シートに貼り付けた切片の保管例
 チャック付きの小袋に入れた切片をアルバムにまとめて管理し、
 4 で保存している。



**図8 保存シートを利用した
 コントロール切片の使用例**

乳癌組織切片に HER2 陽性コントロール
 (3+), (1+)を同時に貼り付け、抗ヒト
 HER2/ *neu* 遺伝子産物モノクローナル抗
 体 (SV2-61)で染色。

内部精度管理やコントロール切片自体の
 抗原性チェックとして役立つ。

参考文献

- 1) Kyle A DiVito, Lori A Charette, David L Rimm and Robert L Camp :Long-term preservation of antigenicity on tissue microarrays. *Laboratory Investigation* (2004) 84, 1071-1078
- 2) Philippe Bertheau, Dominique Cazals-Hatem, Vronique Meignin, et al.,: Variability of immunohistochemical reactivity on stored paraffin slides. *J Clin Pathol* 1998;51:370-374
- 3) Timothy W. Jacobs, John E.Prioleau,et al.,: Loss of Tumor Marker-Immunostaining Intensity on Stored Paraffin Slides of Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1054-9
- 4) Jennifer H. Fergenbaum,1 Montserrat Garcia-Closas,et al.,: Loss of Antigenicity in Stored Sections of Breast Cancer Tissue Microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13(4):667-672
- 5) 五十嵐久喜,他: パラフィン切片の保存に関する一考案(濾紙による貼付け法). *医学検査*.2006,55 : 443