

図2：組織採取から固定までの時間の病理組織標本への影響。a～d：HE染色。e～h：Ki-67 (30-9)染色。a, e：固定までの時間1時間。b, f：固定までの時間3時間。c, g：固定までの時間6時間。d, h：固定までの時間24時間。バー：100  $\mu$ m。

剥脱の範囲は腺管全体にまで及んだ。粘膜筋板、粘膜下層においては、組織学的変化は乏しかった（図2）。

Ki-67 (30-9)の染色性は良好で、明らかな違いはみられなかった。500 bp までのDNAと252 bp までのcDNAのPCRはすべて増幅された。

当院における現状調査（2013年4月～7月）において、ほとんどのケースでは組織採取から3時間以内に固定されていたが、固定までの時間が6時間のケースもみられた（図3）。

#### 考察

今回の検討から、FFPEを長期保存すると、抽出したDNAのPCR成功率が低下することが示された。DNAにおける2100バイオアナライザーの測定結果も、FFPEの年代が古くなるにつれて、グラフの山が左側にシフトしているため、分解が進行し、それに従ってPCRの成功率も低下していると考えられる。文献的には過去数十年前のFFPEからの遺伝子増幅に成功した報告もされている。一方、臨床検査においてはすべての検体において安定した評価を行う必要性があり、3

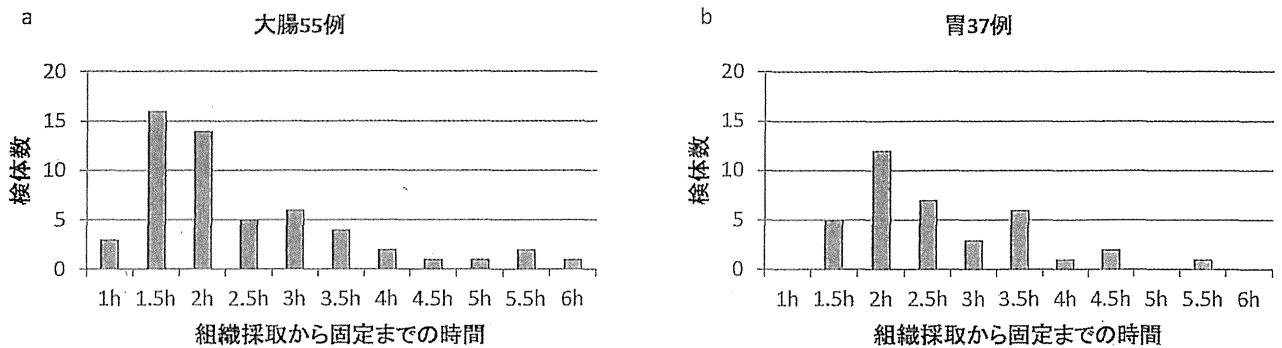


図3: 国立がん研究センター東病院における組織採取から固定までの時間。a: 大腸55例。b: 胃37例。

年以上経過した FFPE で PCR 成功率が低下し、DNA の断片化が進行している結果は注目すべきと考える<sup>10)</sup>。PCR 条件やプライマーの配列を検討することにより、PCR を用いた遺伝子増幅の成功率は改善する可能性が考えられるが、一定の結果が得られるかは明らかでなく、断片化の少ない検体を使用することは重要と考える<sup>11)</sup>。DNA の分解率と RNA の品質維持期間は胃と大腸で異なり、胃は大腸より DNA の分解率が高く、RT-PCR に対する mRNA の品質維持期間も短い傾向がみられた。組織採取から固定までの時間はほぼ6時間以内と思われるが、今回の結果には内因性、外因性の複数の原因があると思われる、今後検討する必要がある。免疫染色では、Ki-67 (30-9) の染色性に明らかな低下がみられなかったことから、少なくとも本抗体 (30-9) は長期保存 FFPE でも使用可能と考えられる。一方で、抗体による影響の差も考えられ、さらなる検討が必要と考える。

組織採取から固定までの時間に関する検討において、その時間が長くなると、まず組織形態像の変化が出現することが判明した。組織採取から6時間で、表層上皮の剥脱が認められ、次第に程度が悪化した。組織採取から固定までの時間が長くなると、標本の観察が困難となり、診断に影響を及ぼすことが考えられる。これまでの固定液や固定時間の研究と同様、固定までの時間も固定条件の重要な要素と考えられてきたが、固定までの時間の明確な目安は提案されていなかった。特に手術検体は組織採取された後にリンパ節のクリアランスなどで固定までの時間が必要なことがある。我々の施設の調査においても、組織採取から固定まで長時間かかる事があり、その現状も踏まえると組織採取後6時間以内での固定開始が実践的な目安として推奨されると考える。一方、乳癌領域では1時間以内の固定を推奨している文献があり、他の臓器および抗体を用いた検討をしていくべきと考える<sup>12,13)</sup>。また、

組織採取から固定までの時間が臨床的に影響を与えることを認識してもらい、速やかな固定が行われることを希望する。

#### まとめ

FFPE は、作製後 DNA, RNA の劣化が進むことが判明した。病理診断において一定の結果を報告するために DNA では3年以内の使用が推奨される。また、病理標本の劣化を考慮し、組織採取から6時間以内に組織を固定することが推奨される。

#### 文献

- 1) Zarbo RJ, The oncologic pathology report. Quality by design. Arch Pathol Lab Med. 2000; 124: 1004-1010.
- 2) Matsuda Y, Fujii T, Suzuki T, Yamahatsu K, Kawahara K, Teduka K, et al. Comparison of fixation methods for preservation of morphology, RNAs, and proteins from paraffin-embedded human cancer cell-implanted mouse models. J histochem Cytochem. 2011; 59: 68-75.
- 3) Nykänen M, Kuopin T. Protein and gene expression of estrogen receptor alpha and nuclear morphology of two breast cancer cell lines after different fixation methods. Exp Mol Pathol. 2010; 88: 265-271.
- 4) Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. Arch Pathol Lab Med. 2007; 131: 18-43.
- 5) Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, Bartlett J, Coombes RC, Cuzick J, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. J Natl Cancer Inst. 2011; 103: 1656-1664.

- 6) Nofech-Mozes S, Vella ET, Dhesy-Thind S, Hanna WM. Cancer care ontario guideline recommendations for hormone receptor testing in breast cancer. *Clin Oncol.* 2012 ; 24 : 684-696.
- 7) Sato M, Kojima M, Nagatsuma AK, Nakamura Y, Saito N, Ochiai A. Optimal fixation for total pre-analytic phase evaluation in pathology laboratories. A study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays. *Pathol Int.* 2014 ; 64 : 209-216.
- 8) Ludyga N, Grünwald B, Azimzadeh O, Englert S, Höfler H, Tapio S, *et al.* Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Arch.* 2012 ; 460 : 131-140.
- 9) Takano EA, Mikeska T, Dobrovic A, Byrne DJ, Fox SB. A multiplex endpoint RT-PCR assay for quality assessment of RNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *BMC Biotechnol.* 2010 ; 10 : 89.
- 10) Wang W, Kumar P, Schwarz M, Malone G, Haworth A, Kumar S. PCR amplification of 40 year-old paraffin-embedded tumour tissues : Comparison of four different DNA extraction and purification methods. *Int J Oncol.* 1994 ; 5 : 453-457.
- 11) Dietrich D, Uhl B, Sailer V, Holmes EE, Jung M, Meller S, *et al.* Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One.* 2013 ; 8 : 10 : e77771. doi : 10.1371/journal.pone.0077771
- 12) Fitzgibbons PL, Dillon DA, Alsabeh R, Berman MA, Hayes DF, Hicks DG, *et al.* Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 ; 138 : 595-601.
- 13) Yildiz-Aktas IZ, Dabbs DJ, Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2012 ; 25 : 1098-1105.

別刷請求先 :

〒 277-8577 千葉県柏市柏の葉 6-5-1  
 国立がん研究センター東病院臨床開発  
 センター臨床腫瘍病理分野  
 落合 淳志

(論文受付 2014年 8月 19日)

(採用決定 2014年 11月 17日)

