

ホルマリン固定後アルコール置換による核酸品質への影響

◎畔上 公子¹⁾、阿部 拓也¹⁾、藤井 豊¹⁾
新潟医療福祉大学¹⁾

今日、ホルマリン固定パラフィン包埋標本(以下 FFPE)によるゲノム解析は一般化している。今回、ホルマリン固定後のアルコール液に置換後の、核酸の品質に与える影響を検討した。

【対象・方法】ラット由来の肺および肝臓組織をそれぞれ1～2mm 大に切除し、10%中性緩衝ホルマリンで室温下 24 時間固定後、95%エタノールに置換した。アルコール置換後の保存期間として、1 日、3 日、5 日、7 日の 4 群を設け、これらとホルマリン固定 1 日群とを比較対象とした。すべての検体はその後パラフィン包埋し、ブロックから薄切切片を作製。DNA および RNA をそれぞれ抽出した。抽出核酸は以下の方法で評価した。純度評価：260/280 吸光度比、遺伝子増幅：RNA：RT-PCR にて GAPDH 遺伝子の増幅確認、DNA：PCR にて β -globin 遺伝子の増幅確認、増幅効率評価：比較 Ct 法にて、リアルタイム RT-PCR (SYBR Green 法および TaqMan 法) により、ホルマリン固定 1 日群を基準として Ct 値の差異から算出した。

【結果・考察】DNA の 260/280 吸光度比の平均は、ホルマ

リン固定 1 日：2.09、アルコール置換後 1 日：2.03、3 日：2.03、5 日：2.09、7 日：2.25 であり、いずれも良好な純度を示した。RNA 検体は RT-PCR にて GAPDH 遺伝子 (117bp) の増幅がアルコール置換後 7 日目まで確認され、分解が進行していないことを示した。HE 染色においても、全検体で染色性の劣化は認められなかった。このほかの PCR 結果および比較 Ct 値に関しては別途報告予定である。これらの結果より、ホルマリン固定後にアルコール置換を行うことで、核酸の品質保持が可能であると考えられた。また、連休や週末などの業務緩和にも有効である可能性が示唆された。

【結語】FFPE 検体からも良質な核酸が得られるが、FFPE 標本作製の上では、形態保持だけでなく、ゲノム解析にも供しうる標本となるよう配慮が必要である。

連絡先 025-257-4380

スルファミン酸を用いた脱灰方法の検討

◎川野 剛¹⁾、星 憲幸¹⁾

医療法人 立川メディカルセンター 立川総合病院¹⁾

【はじめに】病理組織標本の作製において、硬組織（骨、石灰化物）では薄切が困難であるため、通常は脱灰操作を行う。脱灰を行うことにより、ミクロトームでの薄切が可能となり、HE染色、特殊染色、免疫染色で診断が行われる。当院では、無機酸と有機酸の混合液であるゾロンV5（発売元：（株）ルックス）を使用してきたが、HEでの染色性のさらなる改善が得られないか検討するため、ゾロンV5に含まれているスルファミン酸に着目して、一定の知見を得られたので報告する。

【検討方法】無機酸を使用せず、また、蟻酸以外の有機酸で脱灰を検討した。現在使用しているゾロンV5に含まれているスルファミン酸を単独試薬として用い、1、3、5、7、10%水溶液を作製、脱脂後に6時間浸漬（震盪器で120rpm/min）したのち、流水水洗後、通常の包埋を行いFFPEを作製した。薄切のしやすさとHEでの染色性を従来法と比較した。使用検体は、診断済みの剖検材料（腰椎）を5mm厚にカットしたものを使用した。

【結果】倍希釈したゾロンV5と、各濃度に調整したスル

ファミン酸水溶液で脱灰した標本を比較した。前者は脱灰力が強く、無機酸の強い酸の影響か核に赤みを帯びた印象であった。後者は、やや弱い酸であり、核の染色性は良く、軟組織でのHEと変わらないコントラストが得られた。3%～10%スルファミン酸では、ほぼ抵抗感なく薄切でき、表面脱灰することなく容易に作業が行えた。

【まとめ】検体をがんゲノム医療に用いる場合、EDTAの使用が推奨されているが、当院では硬組織からの検査提出は今現在ゼロの状況である。通常脱灰を行い、HE標本、特殊染色、免疫染色で事足りているのが現状である。TATを考えると今の仕様で十分だが、染色性の改善＝病理医の診断のしやすさを考えたとき、よりきれいなHEを作製することが第一であり、スルファミン酸を脱灰液として使用することは、その一助になり得るものと考えられた。

連絡先：0258-33-3111（2041）

当院における大腸癌 HER2-FISH 法の検討

◎馬場 健太¹⁾、遠藤 浩之¹⁾、竹下 奈津子¹⁾、花野 佑輔¹⁾、鬼海 凌司¹⁾
済生会新潟病院 病理診断科¹⁾

【はじめに】大腸癌の遺伝子検査には、マイクロサテライト不安定、K-ras、RAS、BRAF V600Eに加え、2022年からHER2検査は保険適応になった。HER2タンパク過剰発現及びHER2遺伝子増幅の結果は、投与対象の患者選別や治療効果予測に欠かせない。またHER2-IHC法で、Score 2+と判定された場合はHER2-FISHを施行し、遺伝子増幅の有無を確認する必要がある。今回我々は、大腸癌におけるHER2発現率および、HER2-IHC法（ベンタナ）Score 2+であった症例において、HER2-FISHを実施して、結果を検討した。

【対象および方法】対象は2022年から2024年の3年間で大腸癌の手術材料・内視鏡検体でHER2（ベンタナ）IHC法を施行した31例中、Score 2+であった14例を用いた。なお、HER2（ベンタナ）IHC法は外注検査（BML株式会社）に依頼し、HER2-FISH法は当院にて、ヒストラHER2-FISHキット（常光株式会社）を使用して実施した。

【検討項目】①HER2 IHC法を施行した症例31例のScore分類、②HER2（ベンタナ）IHC法Score 2+であった14例におけるHER2-FISH法の判定結果の分類、③HER2（ベン

タナ）IHC法Score 2+であった14例の組織型について検討した。

【結果】①HER2-IHC法を施行した31例におけるScore分類は、Score 0が11例（35.5%）、Score 1+が6例（19.4%）、Score 2+が14例（45.1%）であった。

②HER2-IHC法にてScore 2+であった14例は、HER2-FISHにて遺伝子増幅無しは、11例（78.6%）、遺伝子増幅有りは、3例（21.4%）であった。

③HER2-IHC法のScore 2+であった14例の組織型分類としては、全例が分化型であった。

【まとめ】

HER2（ベンタナ）IHC法Score 2+であった14例の陽性率は45.1%であり、HER2-FISH法にて遺伝子増幅有りは3例（21.4%）であった。HER2（ベンタナ）IHC法Score 2+であった全例は分化型が多かった。

連絡先:025-233-6161(内線 2230)

Hepatocyte Nuclear Factor 4 α 発現に着目した子宮頸部腺系病変の病理組織学的検討

◎門田 有紀乃¹⁾、須貝 美佳²⁾

新潟大学大学院保健学研究科¹⁾、新潟大学医学部保健学科検査技術科学専攻²⁾

【はじめに】子宮頸部腺癌の多くは HPV 感染により発癌するが、HPV 非関連腺癌も少なからず存在するため、HPV スクリーニングで全ての腺癌を検出できない可能性がある。そこで我々は、全ての腺癌をより確実に検出する特異マーカーとして、Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha:HNF4 α の有用性を検討した。HNF4 α は主に消化管粘膜に発現する核内受容体であるが、肺、卵巣の粘液性腺癌の特異的マーカーとしても認識されている。正常子宮頸部では HNF4 α の発現を認めないが、肺や卵巣の粘液性腺癌の粘液形質は子宮頸部腺癌と類似性を認めるため、子宮頸部腺系腫瘍においても HNF4 α が発現すると考え、本研究を遂行した。本研究では、免疫組織化学的検索によって子宮頸部での HNF4 α の発現態度を明確にし、子宮頸部腺癌細胞の検出に対する有用性の確認および腺癌前駆病変の同定の可能性について検討した。【対象と方法】2015 年から 2020 年に新潟大学医歯学総合病院で子宮摘出術を受けた 29~79 歳の女性 194 例を対象とした。HE 標本から上皮内腺癌 25 例、子宮頸部腺癌 79 例、扁平上皮系腫瘍 54 例、および非腫瘍性病変 36 例を抽出し

た。対象切片に対し HNF4 α を一次抗体とした免疫組織化学染色を施行し、発現態度と対象部位における組織分類との関連について検討した。【結果】HNF4 α の発現について陽性群、陰性群に二分し検討した。頸部腺系腫瘍において陽性群が極めて高いのに対し、扁平上皮系腫瘍ならびに非腫瘍性病変においては、陽性群は 10%未満であった。しかし、移行帯の一部で HNF4 α 弱発現を示す腺管上皮を認めた。

【考察】HNF4 α は頸部腺系腫瘍性病変に特異的に高発現を示すことを確認した。従って、腺系異型細胞の抽出に有用なマーカーであると考ええる。また、非腫瘍性病変および扁平上皮系腫瘍性病変で、弱陽性ながら HNF4 α の発現を認めた部位は移行帯に一致し、頸部腺癌の前駆病変の好発部位に相当すると考えられる。以上より、本研究において、従来の子宮頸部癌の診断に対する特異マーカーと HNF4 α の併用により、子宮頸部の腺異形成に相当する病変の検出に寄与することが期待される。

b24m204h@mail.cc.niigata-u.ac.jp—080-5831-0617