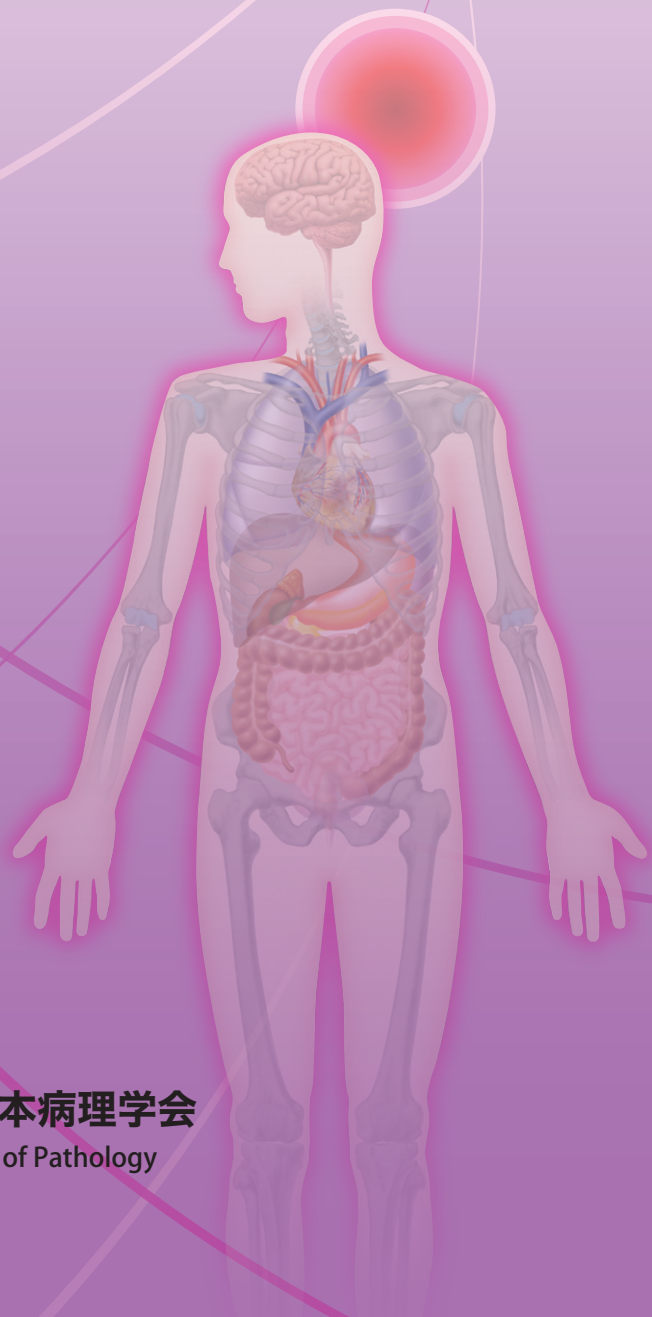


ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程

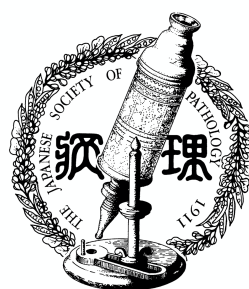
第2版



一般社団法人 日本病理学会
The Japanese Society of Pathology

ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程

第2版



The Japanese Society of Pathology

一般社団法人 日本病理学会

ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 第2版の序

『ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 初版』を日本病理学会が策定して発出した当時、遺伝子パネル検査は保険収載されておらず、がんゲノム医療は臨床実装に程遠かった。病理組織検体を用いたゲノム等オミックス解析は、主として研究目的で実施されていたが、病理組織検体の質がデータ駆動型研究の成否を握るほど重要であることが、我が国の研究者の間で必ずしも認識されていなかった。適切に採取・保管された高品質の組織検体を用いなければ、信頼に足る解析結果は得られない。当時、十分な品質の検体を用いなかったために、臨床のブレイクスルーになる知見を得られなかった研究者も少なくなかったと推測する。

そこで日本病理学会では、我が国の大学・医療機関・バイオバンク等で、病理診断に支障をきたさない(研究に同意してくださった患者さんに不利益を及ぼさない)適切な採取部位から、ゲノム等オミックス解析に適した質の高い病理凍結組織検体を採取・保管し、また質の高いホルマリン固定パラフィン包埋標本作製することができるように、研究用規程の初版を策定した。研究用規程の特徴は、研究者の経験や感覚を記載するのではなく、実際に組織を種々の方法で採取・保管・標本作製したのち実証的に解析を行い、データへの影響を評価して、まさに「科学的な根拠のある標準手順書」として編集した点にある。組織取扱い手順の記載と独自の実証解析データを並べて読むことができる手順書は、国際標準化機構(ISO)においても尊重され、2024年に発出された技術文書ISO15189に、本規程の英文版(Pathol Int 68: 63-90, 2018, doi: 10.1111/pin.12631)が引用された。

研究用規程発出以来日本病理学会では、毎年『ゲノム病理標準化講習会』を開催し、我が国の病理医・臨床医(特に研修医等)・臨床検査技師・バイオバンク実務者の方々に、本規程についてよく知っていただけるように努めてきた。この講習会では、研究用規程の解説に加え、第一線の病院で研究用規程を遵守していかに関ゲノム研究に供する病理組織検体を収集・保管するか、研究用規程を遵守すればどのようなバイオバンクが構築できるか、バイオバンク検体を用いてどのような研究成果を挙げられるかといったテーマでの講義も行っている。研究用規程の策定と講習会の実施により、病理組織検体の品質に細心の注意を払うことがいかに重要であるかとの認識を広めるのに貢献できたと考える。

今般、毎年の『ゲノム病理標準化講習会』の受講者から質問をいただく事項についての実証解析データを追加し、『ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 第2版』を編集した。従来研究用規程は、診療用規程と合本し『ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程』として羊土社より一般書籍として刊行していたが、実証解析データの追加のたびに速やかに読者にお届けするため、第2版以降はpdf版として日本病理学会より広く無償配布することとした。病理医・臨床検査技師の皆様には、この研究用規程を身近において質の高い病理組織検体を収集し、研究基盤構築にひきつづき必須の貢献を成していただくようお願いする。病理組織検体を用いた解析研究に従事するすべての研究者の皆様には、この研究用規程を活用して、自ら質の高い検体を収集するか、検体の収集・保管工程にかかる関係者の労力を認識した上で、検体の特性を熟知していただき、個別化医療に資するデータ駆動型研究の成果を挙げていただくことを期待する。

2025年7月1日

一般社団法人日本病理学会

理事長 小田 義直

ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程策定委員会

・ゲノム病理標準化講習会委員会 委員長

金井 弥栄

第2版策定に寄与した委員等

日本病理学会ゲノム研究用病理組織検体取扱い規定策定委員会

金井 弥栄 (委員長)
新井 恵吏 (副委員長)
加藤 洋人
潮見隆之
田口 健一
宮城 洋平

日本病理学会ゲノム病理標準化講習会委員会

金井 弥栄 (委員長)
新井 恵吏 (副委員長)
佐々木 毅
滝野 寿
田口 健一
増田しのぶ
宮城 洋平

第2版策定のための実証解析研究に従事した研究者等

慶應義塾大学医学部

金井 弥栄
新井 恵吏
藏本 純子
田 迎
藤本 真央

神奈川県立がんセンター臨床研究所

宮城洋平
佐藤慎哉
笠島理加
吉原光代

九州がんセンター臨床研究センター¹・病理診断科²

田口 健一^{1,2}
古賀 裕²
山本 将義²

(順不同)

ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 初版の序

ゲノム等オミックス解析技術が長足の進歩を遂げつつある今日にあっては、臨床試料の解析に基づくデータ駆動型研究が、疾患発生・進展・治療応答性等の分子基盤を明らかにして、バイオマーカー開発や創薬標的の同定に帰結すると期待されている。特に、がん等の疾患の現場から採取された病理組織検体の解析は、ゲノム医療実現のために不可欠である。検体に付随する詳細で正確な臨床病理情報とならんで、病理組織検体の質は、このようなデータ駆動型研究の成否の鍵を握っている。適切に採取・保管された病理組織検体は、信頼に足る高い品質の解析を可能にして、予防・診療に資する知見を生み出す。このような病理組織検体を、多くの医学研究者に提供できるようにするため、諸施設でバイオバンクを整備・運営しようとする動きも盛んである。他方では、適切に採取・保管されなかったために質のばらつきの多い検体で解析を行い、解釈不能なアーティファクトに難渋する研究者や、質の高い検体を揃えようとの意欲を持ちながら、適切な方法がわからず難渋するバイオバンク実務者も少なくない。そこで、一般社団法人日本病理学会は、ゲノム等オミックス研究に適した質の高い病理組織検体を全国のバイオバンク等で充分数収集できるようにするため、『ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程』（以下、本規程）を定める。

本規程は、第1部「研究用病理組織検体の適切な採取部位」、第2部「凍結組織検体の適切な採取・

保管・移送方法」、第3部「ホルマリン固定パラフィン包埋標本の適切な作製・保管方法」よりなり、特に第2部・第3部は実際に種々の条件で病理組織検体を採取・保管した豊富な実証解析データに基づいて編集した。このような実証解析は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構委託事業「オーダーメイド医療の実現プログラム」の一環として行った。日本病理学会ゲノム病理組織取扱い規約委員会(委員長 金井弥栄)に所属し、各施設においてバイオバンクの構築・運営に従事しかつ分子病理学研究を行う日本病理学会員が主体となって、第2部・第3部のための実証解析を進めた。日本病理学会ゲノム病理診断検討委員会(委員長 小田義直)の委員は、第1部の編集にあたった。さらに、本規程を広く我が国のゲノム研究に資するものとするため、バイオバンクジャパン(BBJ)・ナショナルセンターバイオバンクネットワーク(NCBN)・国立病院機構(NHO)・日本臨床腫瘍研究グループ(JCOG)・日本小児がん研究グループ(JCCG)・日本癌学会(JCA)を代表する委員よりなる「ゲノム研究用試料に関する病理組織検体取扱いガイドライン審議会(委員長 中金斉)」による審議・承認を経ている。

本規程は、病理組織検体の収集・保管の方法を具体的に記述した実用の書であり、実証データを参照することで各施設の実情にあった取扱い方法を選択して頂けると考えている。本規程は、冊子・webページ(<http://pathology.or.jp/genome/index.html>)等で公開するとともに、近く本規程内容の理解を助けるe-ラーニングシステムを開講する予定である。さらに、ゲノム病理標準化センター(<http://genome-project.jp>)では、本規程に準拠した実習を含む講習会を定期的で開催している。これらの機会を通して、我が国の病理医・臨床医(特に研修医等)・臨床検査技師・バイオバンク実務者の方々に、病理組織検体の取扱い方に精通して頂ければ幸いである。また研究者の方々には、病理組織検体の収集にかかる労力を理解し、各検体の特性を熟知して、解析に臨んで頂くよう期待する。本規程を、データ駆動型研究の推進とゲノム医療の実現のためにご活用頂くようお願いしたい。

2016年3月1日

一般社団法人日本病理学会

理事長 深山 正久

ゲノム病理診断検討委員会委員長 小田 義直

ゲノム病理組織取り扱い規約委員会委員長 金井 弥栄

初版策定に寄与した委員等

日本病理学会ゲノム病理組織取扱い規約委員会

金井 弥栄（委員長）	石川 俊平
西原 広史	加藤 洋人
宮城 洋平	竹内 朋代
田口 健一	佐々木 毅
鶴山 竜昭	小田 義直

ゲノム研究用試料に関する病理組織検体取扱いガイドライン審議会

中金 斉（委員長・NCBN）	松村 保広（JCOG）
中川 英刀（オブザーバー・BBJ）	志田 大（JCOG）
松原 大祐（BBJ）	中村 健一（JCOG）
新飯田 俊平（NCBN）	大喜多 肇（JCCG）
後藤 雄一（NCBN）	檜山 英三（JCCG）
山城 勝重（NHO）	小森 隆司（JCCG）
寺本 典弘（NHO）	三木 義男（JCA）
北川 智余恵（NHO）	落合 淳志（JCA）

初版策定のための実証解析研究に従事した研究者等

国立がん研究センター研究所

金井 弥栄

後藤 政広

吉田 輝彦

尾野 雅哉

日本病理学会

澁谷 亜矢子

慶應義塾大学医学部

金井 弥栄

新井 恵吏

尾島 英知

藏本 純子

国立がん研究センター中央病院

平岡 伸介

谷口 浩和

前島 亜希子

助田 葵

九州大学大学院医学研究院

小田 義直

山元 英崇

大石 善丈

三浦 史仁

北海道大学大学院医学研究科

西原 広史

毛利 普美

森谷 純

竹浪 智子漆

戸 万紗那大

森 優子

北海道大学病院臨床研究開発センター

加瀬谷 美幸

森 こず恵

藤井 恭子

北斗病院 病理診断科

赤羽 俊章

神奈川県立がんセンター臨床研究所

宮城 洋平

笠島 理加

九州がんセンター臨床研究センター

田口 健一

京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センター

鶴山 竜昭

阿比留 仁

幸田 晴康

東京医科歯科大学難治疾患研究所

加藤 洋人

石川 俊平

東京医科歯科大学疾患バイオリソースセンター

森田 圭一

稲澤 譲治

筑波大学医学医療系

竹内 朋代

野口 雅之

坂下 信悟

筑波大学附属病院

中川 智貴

佐賀大学医学部

相島 慎一

東京医科大学

山口 浩

(順不同)

目 次

ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 第2版の序-----	i
ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 初版の序 -----	iii
第1部 研究用病理組織検体の適切な採取部位-----	1
第1部の図版-----	10
第2部 凍結組織検体の適切な採取・保管・移送方法-----	31
第2部の根拠となる実証解析データ-----	47
第3部 ホルマリン固定パラフィン包埋標本の適切な作製・保管方法-----	67
第3部の根拠となる実証解析データ-----	75

研究用病理組織検体の適切な採取部位

はじめに

病理医は手術検体に対して癌の悪性度や病変の拡がり、術前治療の効果判定などを診断する。そのために手術検体をホルマリン固定した後に肉眼診断に基づいて病変部を中心とした必要部分を切り出す。この必要部分は癌取扱い規約等のルールに基づいて決定されている。

一方、ゲノム研究用の組織検体は生体内での状態に限りなく近い状態での凍結保存が理想である。そのためには、手術検体がホルマリンで固定される前の新鮮な状態で病変部を正しく見分け、病変のviableな細胞集団を可能な限り迅速に採取することが肝要である。

しかし、研究用の病理組織検体採取のために病理診断に必要な部分を誤って採取してしまうなど病理診断を阻害することがあってはならない(図1)。

したがって、研究用の組織試料はあくまで手術検体の病理診断に必要な部分を除いた部分、いわゆる残余材料から採取されるべきものである。

第1部は新鮮手術検体の残余材料から、viableな病変組織をホルマリン固定前に標準的な方法で採取できるよう、推奨する組織検体採取部位・方法をまとめて提示することを目的とする。

凡例

- (E): (A) よりもさらに高い品質等が期待できる場合があるが、作業量が過大である等のため、必須とはいえない事項
- (A): 推奨される事項
- (B): (A) が実施不可能である場合に次に推奨される事項
- (N): 回避すべき事項
- (L): 法令等により規定されている事項

内容について

- ベストプラクティスの形で記載するが、必ずしも実施しなければならないという訳ではない（凡例参照）。
- 腫瘍は多様であるため完全に定式化することは困難であるが、共通する内容も多いため、総論と臓器別の各論で構成する。総論では採取部位のみならず、より良い採取を行うために必要な事項について述べる。各論では臓器特異的内容について示す。主要五大癌（肺癌・胃癌・大腸癌・乳癌・子宮癌）に関する記述が中心となるが、脳腫瘍や小児がんといった希少がんもこの規約に準拠して採取を行うことが望ましい。
- 切り出しの解説書ではない。ゆえに各臓器に対する切り出し方法についての詳細は該当する癌取扱い規約等を参考にすること。

【総論】

1. 採取の原則

- 第1部で対象とする研究用組織検体はホルマリン固定前の新鮮組織検体である。採取した検体から抽出され解析対象となるのはDNA・RNA・タンパク質であり、いかなる解析にも使用できる質の高い検体を採取するためには、新鮮検体のなかから適正な部位を選択し、適正な手順で採取することが求められる(A)。
- 原則として、研究用組織検体採取の際にも、その基盤としての正確な良悪性の判定や組織型診断、あるいは病期の決定が重要であることは言うまでもなく、研究用組織検体採取のために病理診断に影響が出るような事態は厳に慎むべきである(N)。
- 多くの病理診断ではホルマリン固定後に手術標本の切り出しを行い、適正に作製されたHE標本の検鏡により腫瘍の範囲等を決定する。この切り出しは主に癌取扱い規約等に準拠した形で行われるが、病理診断を阻害しない適正な研究用組織検体採取を行うために各癌種における取扱い規約等を理解しておく必要がある(A)。

2. 採取のために知っておくべきこと

- **採取目的：**どのような目的で検体が病理部門に提出されるのかを理解しておく(A)。本規程の対象となる検体は原則治療を目的とした手術検体で通常その残余材料から検体採取を行う(A)。しかし、化学療法等の施行前や肺癌診療で遺伝子解析のために行われるRe-biopsyの際の検体は量的に少ないことが多いものの研究においても重要な検体であるため、事前に病理診断や遺伝子解析に必要な組織量を把握しておき、提出された組織検体に残余材料が発生する可能性があれば研究用組織検体として採取することも考えておく必要がある(E)。そのため、解析手法とその検体必要量について理解しておくことも望ましい(E)。
- **病変の情報収集：**術前画像診断や検体検査結果等の臨床データ、術前カンファレンス等への参加により病変の場所や大きさ、拡がりなどを確認しておく(E)。感染症の有無についても確認する(A)。
- **検体提出時期と提出される検体の状態：**臨床医(外科医等)の標本整理前でかつホルマリン固定前に採取を行うためにこの時間内のどの段階で標本にどういう形で関わることになるかを理解しておく(A)。提出時期としては術中迅速、摘出直後、または手術終了後があげられる。検体の状態としては部分切除標本、全摘標本、臓器合併切除標本などである(A)。これら情報を把握することにより、採取の事前準備に役立てる(A)。

3. 採取のルールを各施設で決定しておく

- **採取担当者**：病理医、臨床医、臨床検査技師、バイオバンク実務担当者等(第2部【採取者】4.・5.参照)。
- **採取対象**：網羅的に行う(E) か特定臓器・疾患、希少癌のみ行う(A) か。境界病変、良性病変も対象とする(E) か。治療後であっても明らかに腫瘍が残存する場合には採取する(図4)(E)、など。
- **採取場所**：手術室(A)、手術標本整理室(A)、病理切り出し室(A)など。コンタミネーションや感染が起りにくいよう空調や作業スペース・動線に配慮された場所が望ましい。
- **採取準備**：研究用検体採取の予定日時が決まったらスタッフへの周知を行う(A)。常時対応できる体制を整えておくことも望ましい(E)。採取に必要な物品、例えば保存容器や切り出し用メス(複数必要)、液体窒素等を準備する(A)。
- **標本受け取り時の注意**：標本受け取りの際に臨床上の問題点や目的を明確にしておく(A)。標本の左右、表裏等のオリエンテーション、切除断端や合併切除臓器等を確認する(A)。割を入れる方向なども可能であれば確認する(A)。できるだけ速やかな作業を心がける(A)。

4. 採取部位選択- 腫瘍の同定

以下の手順で行う。

1. 提出された手術検体に対して頭側、尾側あるいは口側、肛門側などのオリエンテーションをつける(図8、図11)。事前に決められたマーキング等を利用してよい。
2. 事前に収集した画像の情報等と照らし合わせながら腫瘍の存在場所を確認する。必要に応じて腫瘍に割を入れる。
3. 腫瘍の範囲を正常と異なる形状、色調、硬度から決定する。そのためには腫瘍が存在する臓器の正常な肉眼像を知っておく必要がある。形状には隆起、陥凹、潰瘍、結節、腫瘤などがある。色調は多くは灰白色だが、黒色、赤色、黄色などがある。色調の差はホルマリン固定後には認識しやすいが、固定前には困難なことがあるため、常日頃から固定前と固定後の色調の変化について知っておくことも大事である。胃や大腸などの管腔臓器は形状が、肺や肝臓などの実質臓器は色調や硬度が重要になる。

3. 採取部位の選択- 割の入れ方について

- 割を入れる方向の決定には病理診断のための切り出しがどのようになされるかをシミュレーションしながら行う必要がある。この切り出す方向を決定するのに重要な因子は最大腫瘍径と腫瘍の拡がりである。
- 最大腫瘍径は原則組織の収縮などのアーティファクトのかからないホルマリン固定前に測定することになっているが、早期病変などの同定困難な腫瘍もあるので施設内で計測のルールを決めておく。

- 腫瘍の拡がりとは各臓器において決められた解剖学的部位への腫瘍浸潤の有無によって評価される。そのため、決められた解剖学的部位や他臓器への浸潤が疑われる場合にはその部分には割をいれないように注意し (N)、この評価が困難になることがないように割を入れる方向を決定しなければならない。
- 特に、実質臓器における検体採取の為の割の入れ方は重要である。画像と肉眼像・組織像と比較しやすいように、割を入れる方が望ましい(A) が、部分切除や断端近傍に腫瘍が存在し断端評価が不可欠な場合などは、画像の比較にこだわらずに病理学的評価が可能な断面を出すことを優先する(E)。臨床情報を最も知る臨床医が割を入れるのも選択肢の一つである(A)。
- 実質臓器に割を入れる場合、最大腫瘍径を測定できるようにしなくてはならない(図16) (A)。その際、肉眼的に腫瘍の範囲がわかりにくい症例があること、新鮮標本に入れた断面はホルマリン固定後に凹凸ができるためトリミングが必要になることなどから固定後に顕微鏡的観察を行った上で最大腫瘍径を決定するために最大断面から若干ずらして割をいれることもある(図8、図10、図11)。
- 実質臓器の腫瘍から研究用検体を採取する場合は病理診断のための割の対面から採取する(A)。最大腫瘍径を評価するための断面から研究用組織検体の採取をおこなってはならない(N)。臓器内での腫瘍内圧が高い腫瘍では断面から膨隆する。膨隆部は切り出しの際にトリミングするため、採取を行っても病理診断に影響は出ない(図17、図35) (A)。しかし、内部に間質成分が多い腫瘍の場合、断面から膨隆しないので検体採取の際に腫瘍径に影響を与える腫瘍のスライスが必要になることがある(図20-26)。この場合、スライス厚の記録が必要である(A)。
- 直交する方向で割をいれる場合は新たな面出しのためのトリミングは不要で、一定の厚さでの正確な切り出しが可能となるが、断面の写真に採取時の切れ込みが入ってしまうなどの問題がある。
- 腺癌や乳癌などのように肉眼的な同定が困難な場合も少なくない。このような場合、固定後の変形を憚って出来るだけ小さな切れ込みから採取を行おうとすると、却って標本に不規則な凹凸が出来てしまったり、腫瘍部が採取されなかったり、などの弊害が生じる。腫瘍の肉眼観察や良好な操作の確保のために十分な割を入れ、採取後の固定時に縫合やピンで固定したりすることによって断面を平滑に保つ様々な工夫を施す方が、診断・研究のどちらにとっても望ましいことがある。ただし、腫瘍が小さく不明瞭な場合や、血管構築あるいは他臓器との関係などの複雑な解剖学的領域に腫瘍がおよぶ場合などは固定前の切開が難しい場合は無理をしないことも必要である。

6. 採取部位の決定

- 癌部と非癌部 (適切な対照部位) の双方から検体を採取する(A)。この場合、採取器具は別にする(A)。やむを得ない場合には非癌部から先に採取した後に癌部の採取を行う(B)。これは、癌部検体が非癌部検体へ混入するのを防ぐためである。

-
- 写真撮影による採取部位の記録があるのが望ましい(E)。写真は採取前後と固定後のトリミング前の撮影が望ましい(E)。
 - 採取部位には出血(赤色ないし黒色)・壊死巣(黄色無構造)(図17、図18)を避け、viableな腫瘍組織(瑞々しい、断面から膨隆する)を選択しなければならない(図18)。Viableな腫瘍組織を選択するには更に腫瘍の特性を最も表す部分はどこかを考えながら行わなければならない(E)。均一であれば浸潤部・非浸潤部、腫瘍先進部(境界部)・腫瘍内部などであり、不均一性が認められる場合は量的に多い部分か断面から著明に膨隆するなど悪性度が高いと考えられる組織から採取する(A)。できれば、癌部の複数箇所から組織を採取することが望ましい(図17)(E)。肉眼的な色調や形状が異なる腫瘍成分があれば、分化度や組織構築の違いなどが示唆されるため、各々について採取する(E)。先進部は正常細胞のコンタミネーション、腫瘍内部については出血・壊死、変性部分を採取する可能性があるため注意が必要である(N)(図20)。
 - 変性が加わっているところは細胞の状態が悪い、あるいは、細胞数が少ない可能性があるため、避けなければならない(N)。胃癌、大腸癌などの管腔臓器に発生する腫瘍は中心部で潰瘍を形成することが多いため腫瘍辺縁を採取する(図2、図5、図7)(A)。逆に隆起性病変など表面でびらんをつくっている場合もあるため、注意を要する(N)。
 - 性状による注意事項
 - 潰瘍：中心部の壊死を採取しない(N)。
 - 出血：腫瘍内に、赤色ないし黒色調に見える(図18)。
 - 壊死：腫瘍内・潰瘍中心部などに、黄色調に見える(図17、図18)。
 - 線維化：白色調、境界不明瞭で硬い(図18)。採取は避けた方がよいが、他に採取可能な領域がなければ採取しておく。
 - 粘液：粘液が多い場合 変性が少ないところ、粘液が少なく腫瘍細胞のみで構成されている部分を選ぶ(図14)。
 - 粘液腫様間質：基本的に細胞成分は多くない。
 - 嚢胞：嚢胞壁内に隆起性病変や壁が厚くなっているところを採取する(図30-32)。ただし、前者の場合、診断の必要量は必ず残す。腫瘍細胞のみからの情報を得たい場合は、腫瘍間質が乏しく組織が軟らかい部分が好ましい。転移や治療後の病変では高率に壊死や変性が加わっていることが多いため、できるだけ壊死部を避ける。
 - 形状による注意事項
 - Polypoid：基部を確認し、損傷しないように割をいれる(図33、図34)。食道癌の癌肉腫など。ただし、表面にびらんが多い時などは壊死部分が多い可能性があるため注意が必要。
 - Scirrhouis：線維性に硬い部分には腫瘍細胞数が少ないことが多い。可能な限り腫瘍細胞成分が多いところを選ぶ。スキルス胃癌では壁が特に厚い箇所を選ぶ。
-

● 採取禁忌 (N)

腫瘍の種類に関係なく、腫瘍の体積が小さい場合は必要最小限の標本採取に努める。切除断端(剥離断面や血管、胆管の断端)付近に腫瘍成分を認める場合は、病理学的な評価が大事であるので標本採取は控える(図14、図19、図21-26)。

術前に良悪性の判定が困難であった腫瘍や、腫瘍か過形成結節などの非腫瘍性病変であるのか判断がつかない場合には、組織診断を優先させるために十分量の病変が残せることを確認した上で、診断を妨げないように採取する。

病変が小さい場合(例外:新鮮検体の採取自体を目的としている場合)

腫瘍本体やその進展範囲の同定が難しい場合(図15)

● 肉眼診断困難例

境界不明の癌の辺縁、早期肝細胞癌などでは、新鮮標本での腫瘍の同定が困難であるため、採取しない判断をすることも大事である(図3、図4、図6、図17、図27-29)。

管内進展・上皮内進展の先進部

良悪性の判定困難な病変

腫瘍・非腫瘍の判定困難な病変 採取前の術中迅速、捺印細胞診が有効

● 非癌部からの採取

非癌部は癌の発生母地と考えられる部位を採取する(図2)。

非癌部にも病変がありうることを認識しておく。微小な腫瘍性病変や炎症など。後者には肝炎、膵炎、間質性肺炎などが挙げられる。

腫瘍近傍や腫瘍の末梢領域には腫瘍随伴性の炎症細胞浸潤や線維化を認めやすく、切離面の近くでは焼灼の影響による熱変性があるので可能な限り避ける。

7. 組織採取後の取り扱い

- オリエンテーションをつけるための糸等のマーキングは外してしまわないように注意する(A)。ただし、研究用組織採取後継続して標本整理を行う場合はこの限りではない。
- 実質臓器で割を入れた後は可能な限り縫合する方が望ましい(図8、図10)。乳腺、肺、骨軟部、膵臓などがその代表例である。縫合などを行わない場合、ホルマリン固定によって新鮮検体に変形したまま固定され、切り出しの際に腫瘍剖面を出すためのトリミングが十分にできないなど病理診断が阻害される可能性がある(図35、図36)。

8. サンプルの量について

- 組織採取は病理診断を阻害しない限り多い方が望ましい(A)が、同一症例からの組織採取が多すぎると採取部位間違いなど管理を困難にする(N)ため、ある程度上限を決めておく。

【各論】

胃癌・大腸癌（図1-7）

- 進行癌は最深部を採取しない。
- 早期癌は採取しない。
- 潰瘍を形成している場合は壊死の混入を避ける。
- 断端に関する部分を採取しない。

肺癌（図8-10）

- 肺癌ではホルマリン注入が必要であるため、漏れを少なくするためにも割は必要最小限にする。
- 最大割面をずらして割を入れる。割面から膨隆することはあまりない。腫瘍中央部は線維化、大きい腫瘍では壊死している場合があるため、注意する。辺縁でviableと思われる部位を正常部の混入に注意しながら採取する。
- 胸膜に近い場合は割を入れる際に最も胸膜が嵌入した部位を避ける(図9)。

乳癌（図11-15）

- 非浸潤癌を採取対象とするかどうか事前に決定しておく。
- 浸潤癌でも1cm未満と病変が小さい症例においては、病理医と相談して採取可能と判断された場合のみ、病理診断を阻害しないよう採取量に注意して採取する。
- 粘液癌、嚢胞を伴う癌は採取場所に注意が必要である。その際、採取によって病変をなくしてしまわないよう注意する。

肝臓癌（図16-20）

- 肝細胞癌は割面から膨隆するため、膨隆した部分からの採取が可能である(図17)。また、腫瘍内の不均一性のよく見られる腫瘍の一つであり、複数箇所からの採取が望まれる(図17)。
- 境界不明瞭な早期肝細胞癌では、新鮮標本での腫瘍の同定が困難であり、固定後には背景肝で観察される組織構築が不明瞭化した部分が癌部を示唆する所見となるが、採取しない判断をすることも大事である(図17)。
- 肝内胆管癌では肝細胞癌と異なり、割面から膨隆せず、腫瘍内部に線維化を伴うことが多いため、採取は腫瘍辺縁から行う(図18)。この際、正常組織の混入に注意する(図20)。

腓癌（図21-32）

- 腫瘍の中心部と思われる部分に主腓管に垂直に割を入れる。腓周囲の脈管、臓器との関係や断端が不明瞭にならないように注意する。
- 肉眼的に白色硬結を呈し、境界不明瞭なことが多く、同定し難い。更には線維形成を腫瘍内に認め、採取した組織内の腫瘍細胞成分は少ない。
- 組織採取のため割を入れた部分はホルマリン固定後の切り出し時には変形していることが多いため、組織採取後に割を入れた部分を速やかに縫合糸で閉鎖し、組織採取による切除標本の変形を極力防ぐことが必要である。

子宮体癌（図33-36）

- 非癌部の採取について、正常子宮内膜は高齢者の場合萎縮していることがあるので、子宮内膜以外の別の近傍正常組織や末梢血などを採取しておくことも考慮する。
- 筋層浸潤の最深部が評価できるよう割の入れ方には注意する。
- 隆起性病変の場合、頂部で壊死・出血していることがあるので注意が必要である。
- ポリープ状病変の場合、基部が外れないように注意する。

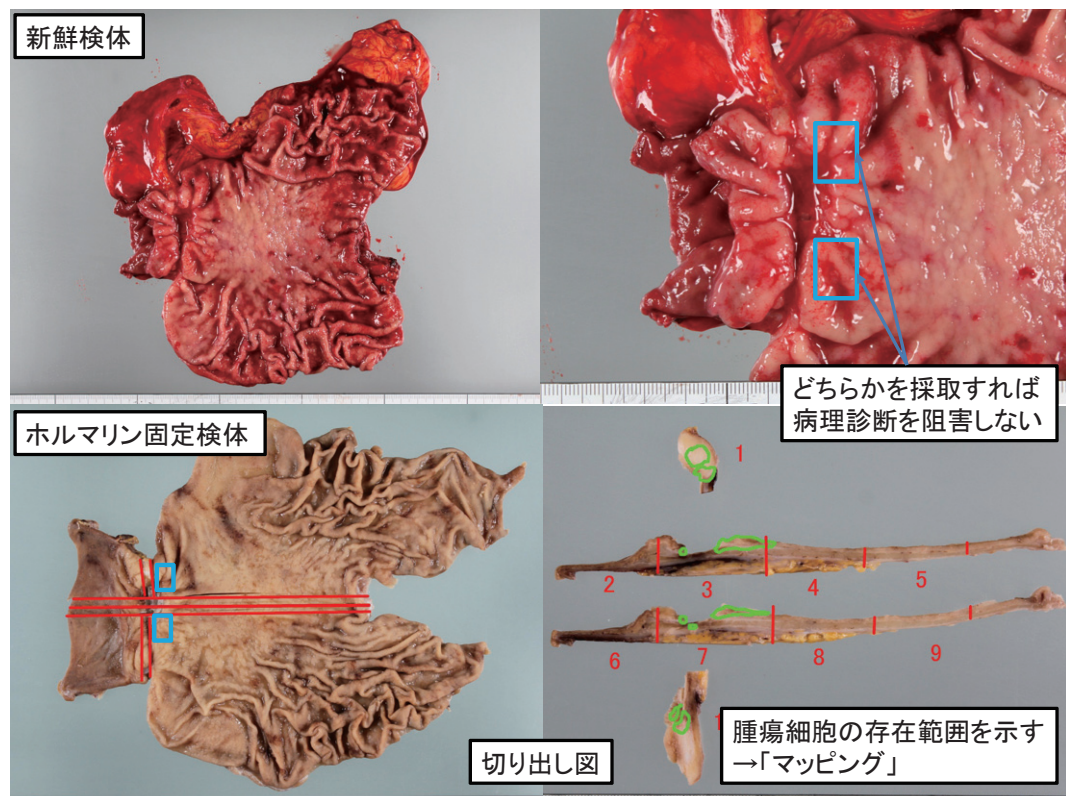
卵巣腫瘍（図37、図38）

- 大小様々であり、採取量については大きなものは診断に差し支えないが、小さなものに対しては必要最小限に絞る必要がある。
- 腫瘍内の不均一性が見られることがあるため、複数箇所から採取する。
- 嚢胞性変化をきたしている場合は、隆起部や壁肥厚部を採取しておく。少量の場合、病理診断を優先し、無理に採取しない。
- 境界病変については採取対象とするかどうか決めておく。その際、後の病理診断で診断が変わりうることを認識しておく。採取部位の組織がわかるよう採取検体の一部の凍結切片あるいは捺印細胞診、あるいは固定後に対応する部位の切り出しを行っておく。

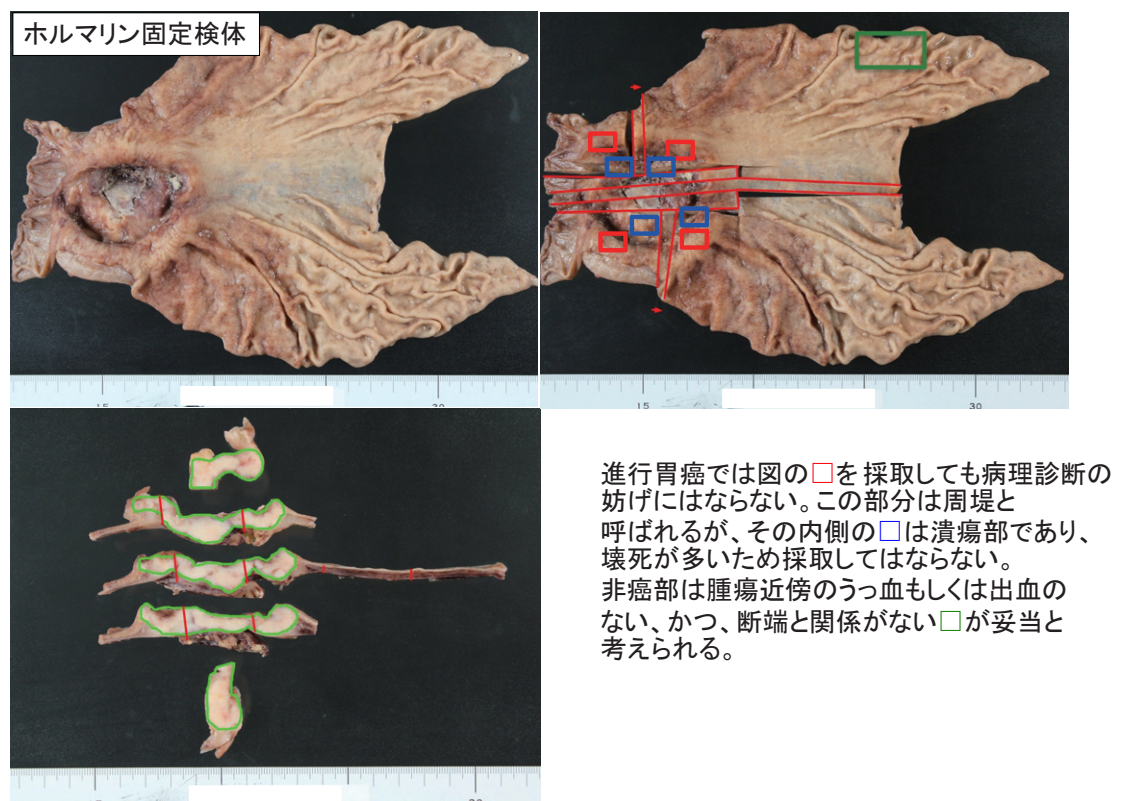
軟部腫瘍（図39）

- 希少症例、診断困難と思われる症例は可能な限り組織検体を採取しておく。
- 腫瘍によっては腫瘍内不均一性が認められる腫瘍があり、複数箇所からの採取が求められる。

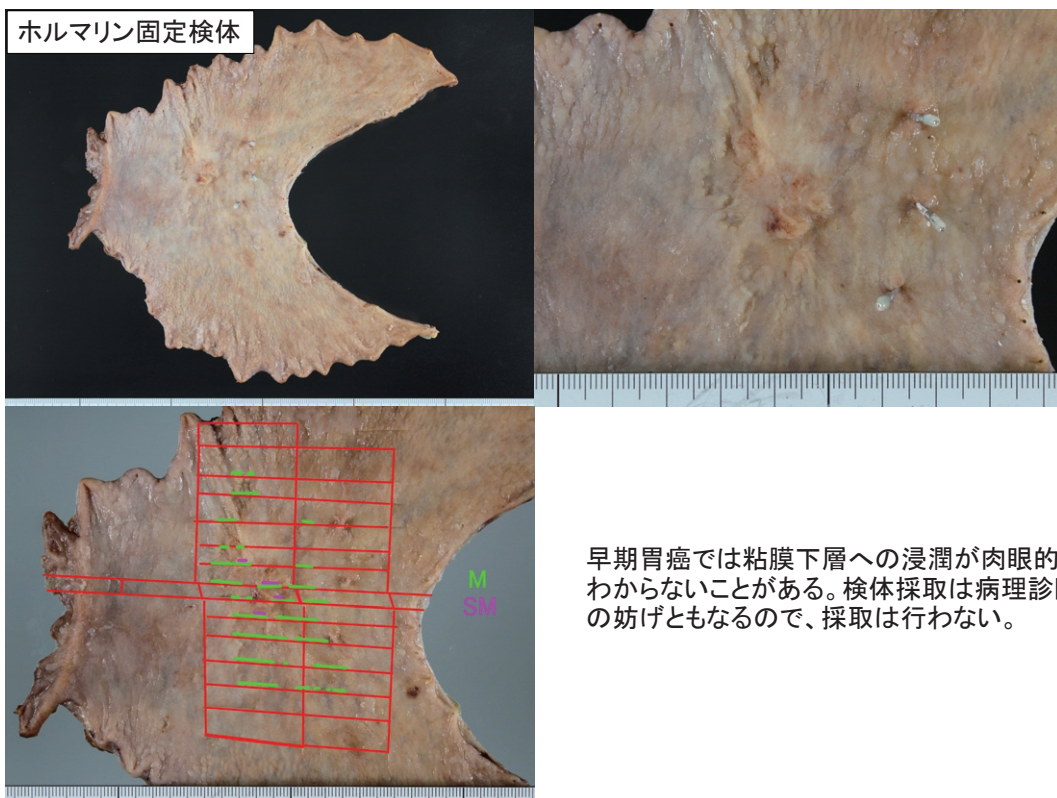
胃癌・大腸癌 <図 1>



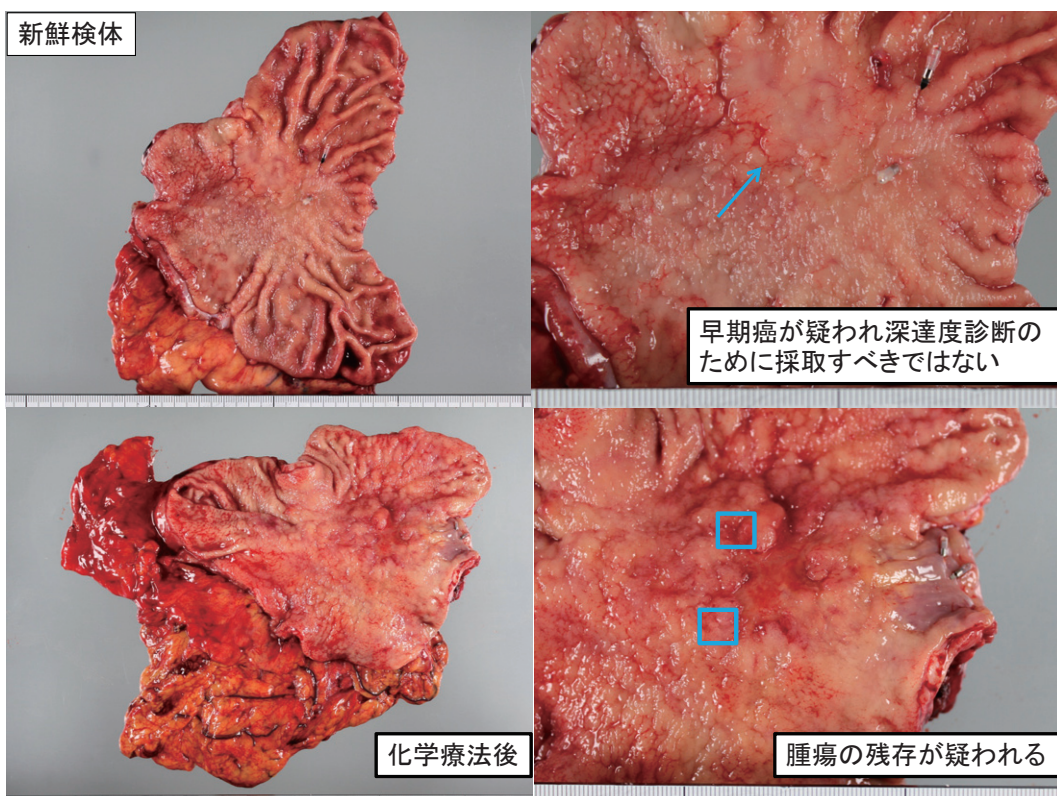
<図 2>



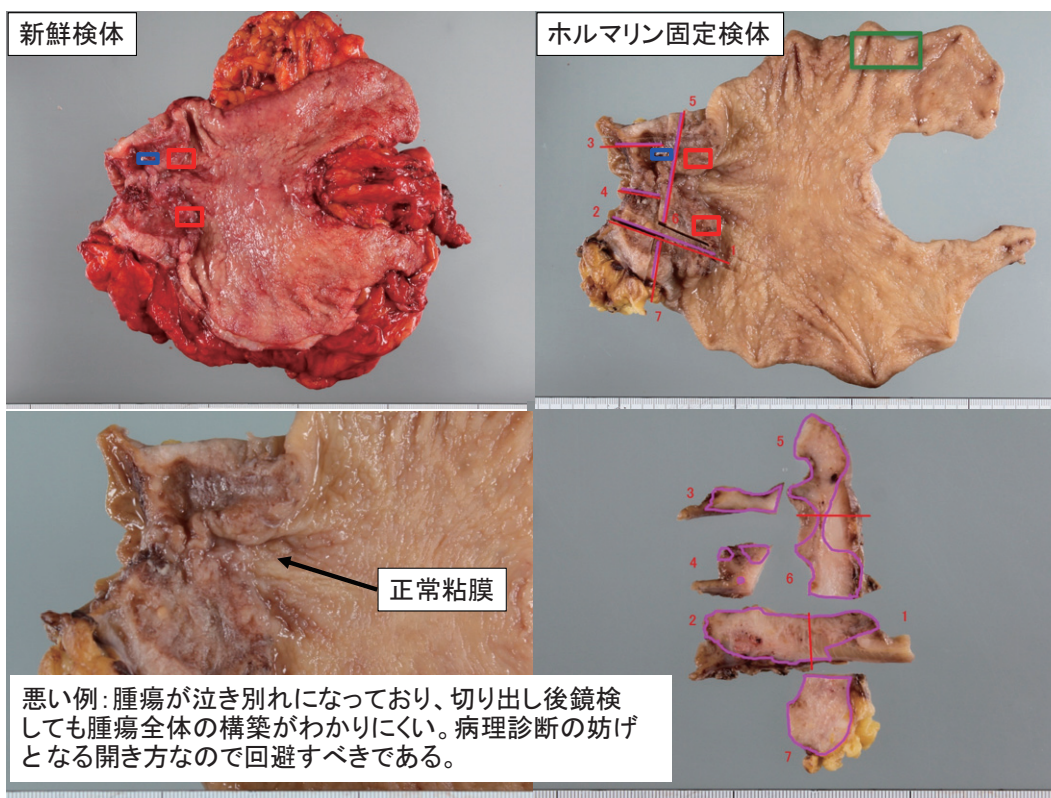
<図3>



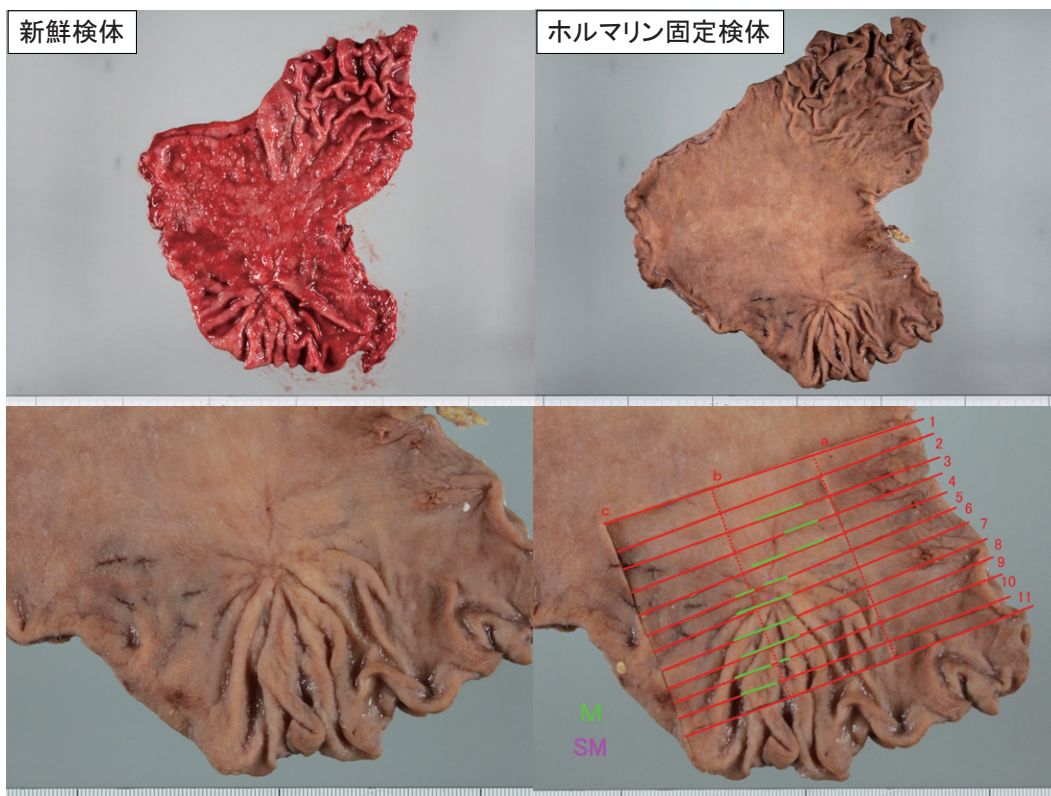
<図4>



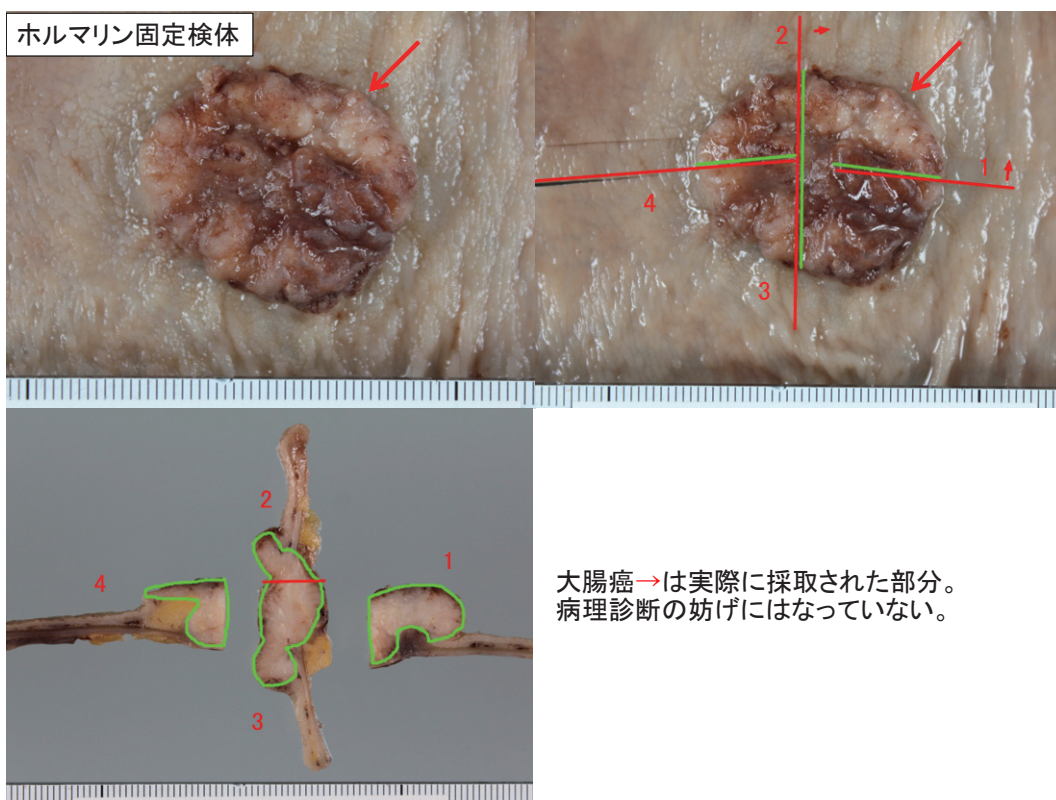
<図 5>



<図 6>

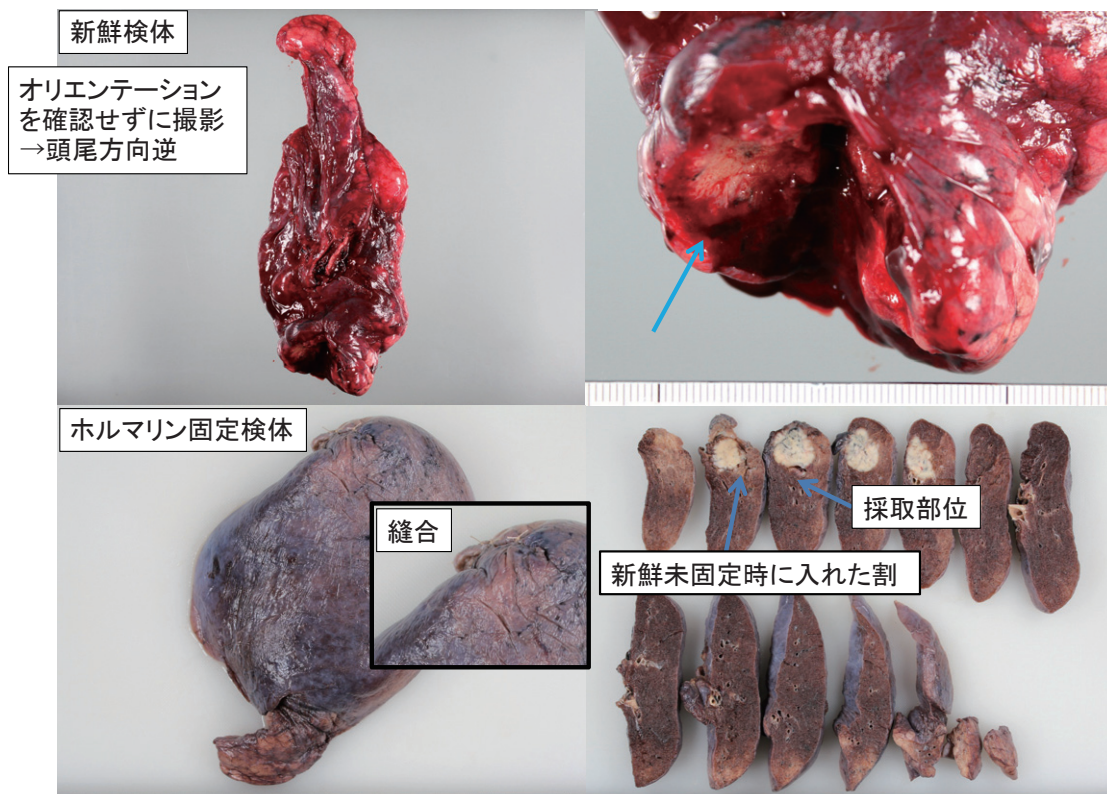


<図7>



肺癌

<図8>



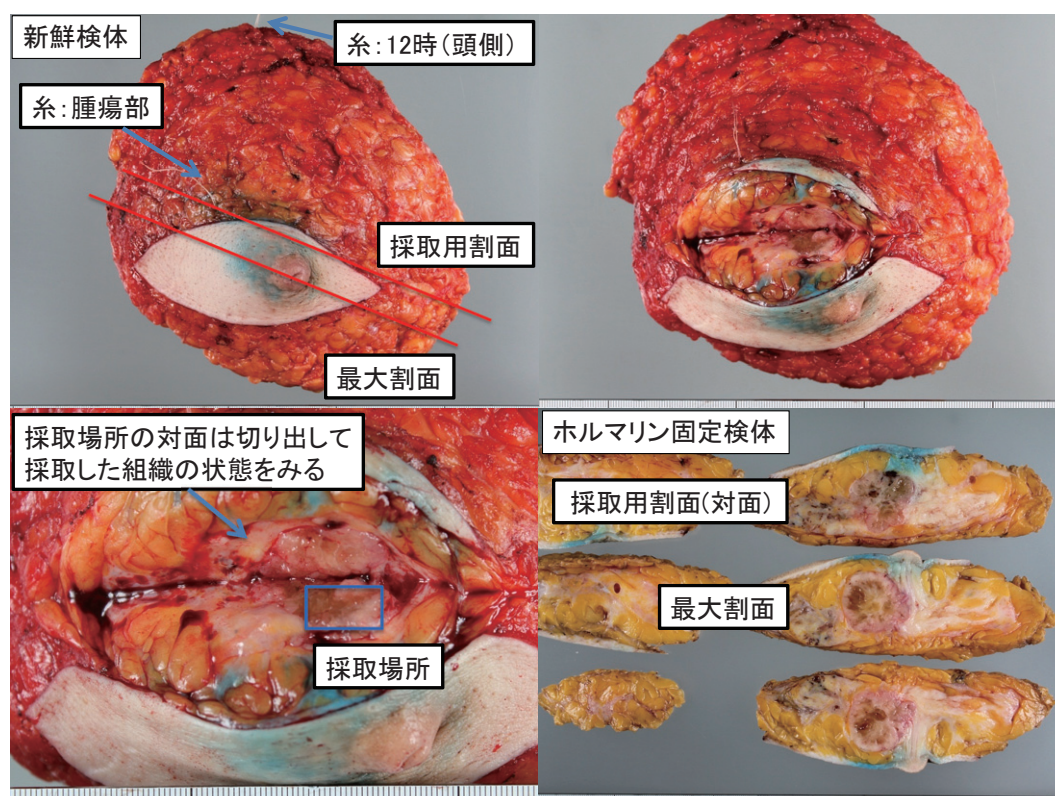
<図 9>



<図 10>



乳癌 <図 11>



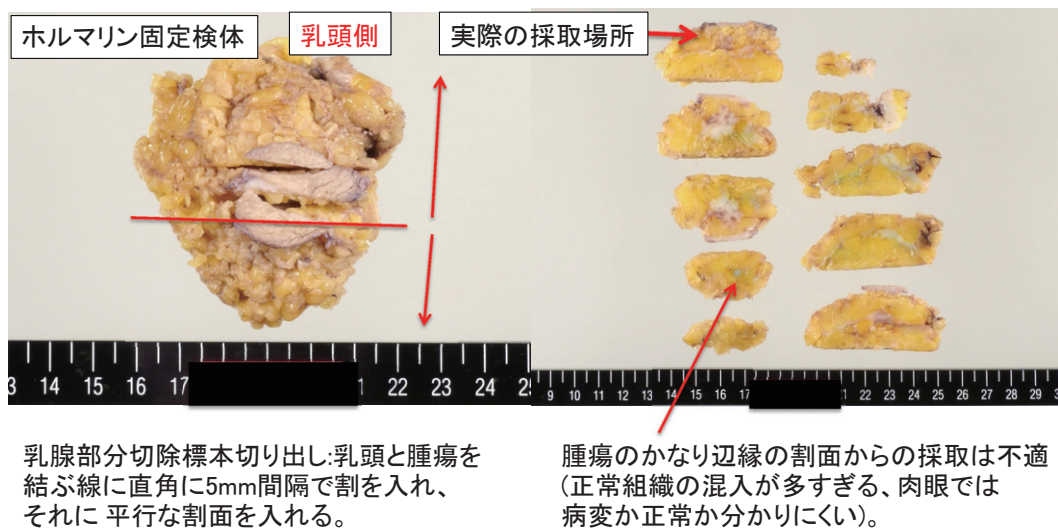
<図 12>



乳腺全摘標本切り出し:乳頭と腫瘍を結ぶ線に平行で腫瘍中心を通る線に割を入れ更にそれに平行な割を入れる。

腫瘍最大割面からの採取は行わない。それよりやや辺縁の割面から採取する。

<図 13>

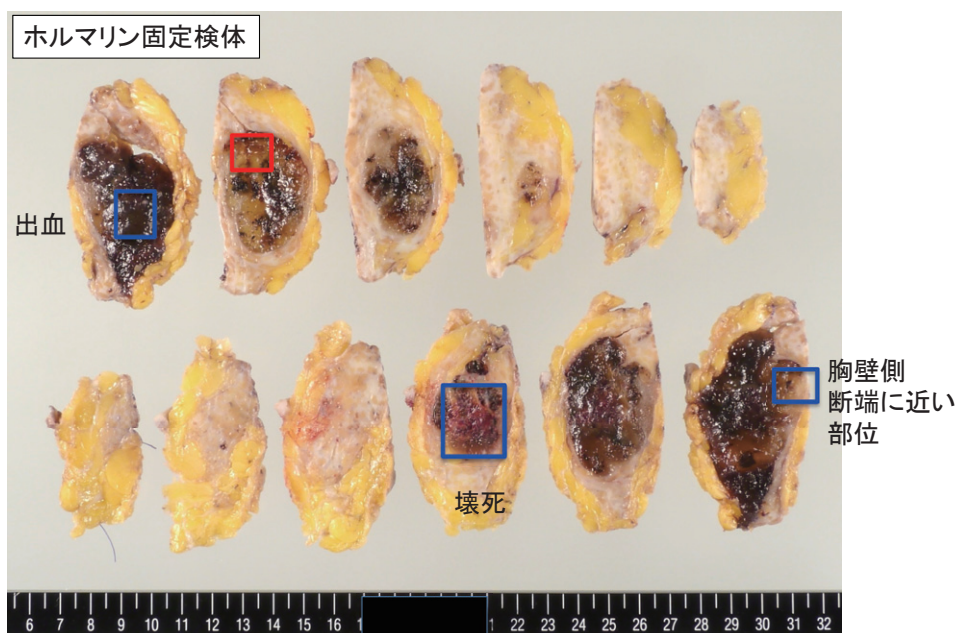


<図 14>

組織採取に不適切な部位

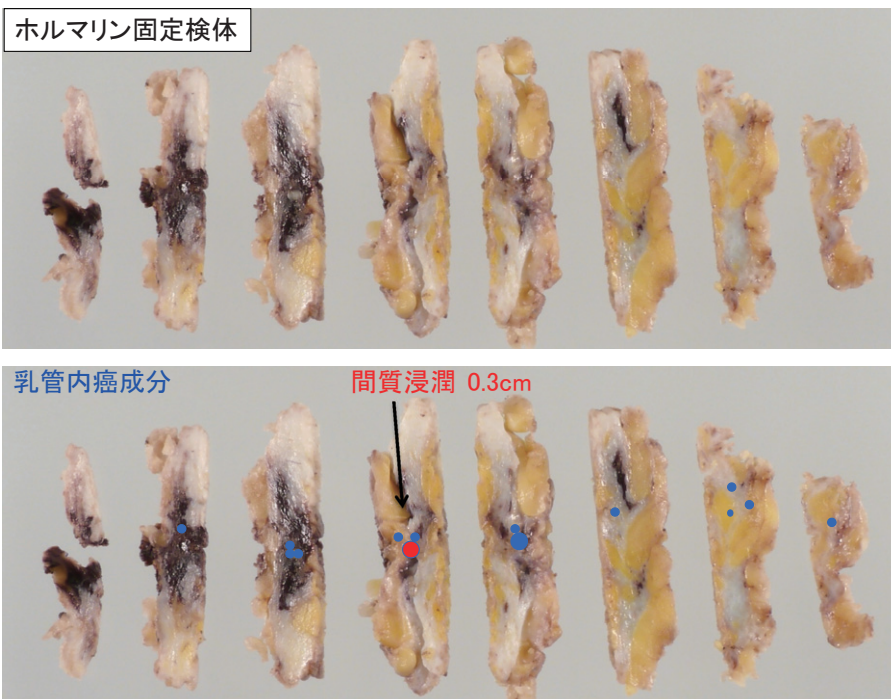
□適切:粘液癌に典型的なゼラチン様の断面。出血、壊死はない。

□不適切:出血、壊死あり。断端検索に影響する部位でもある。

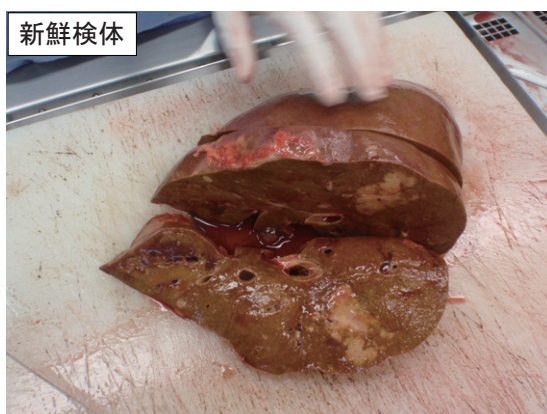


<図 15>

組織採取に不適切な例
(肉眼的に病変が不明瞭、浸潤癌が極めて小さい)

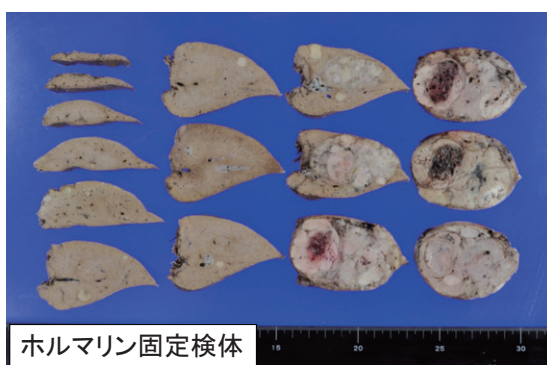


肝臓癌 <図 16>



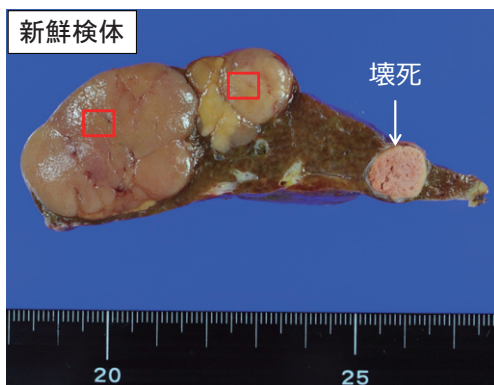
割の入れ方

腫瘍の最大断面ができるように断面を作製する。
新鮮標本では過剰な力を入れず、刃を何度も
往復させない。



最大断面に平行な1-2cmの間隔で切開を
加え、標本を並べて写真撮影する。
全割する腫瘍最大断面のみの拡大写真も
撮っておくとよい。

<図 17>

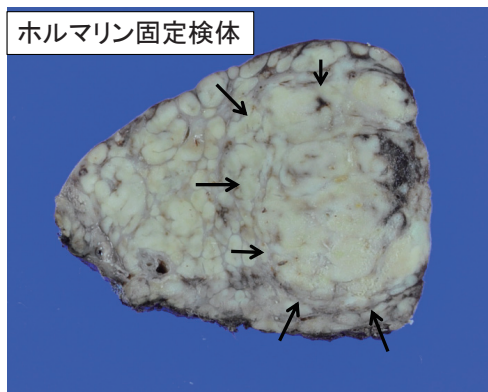
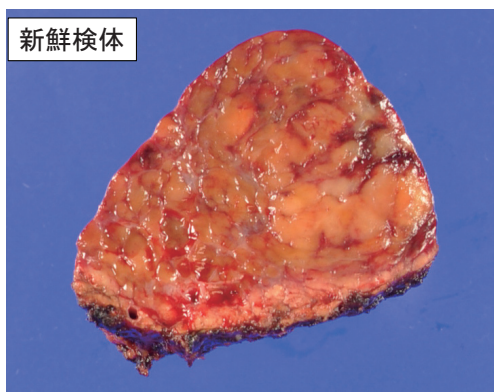


結節性腫瘍の新鮮標本は断面から腫瘍が膨隆するので、標本採取しやすい。

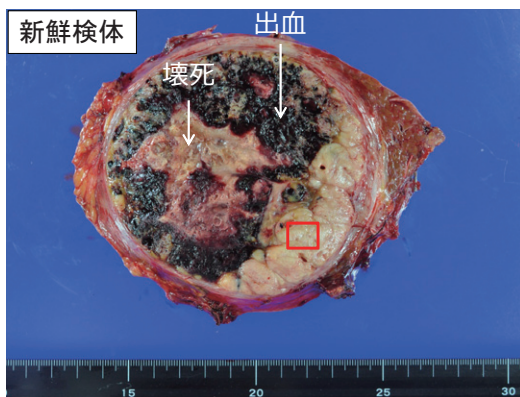
左下;新鮮標本。

右下;固定後標本。

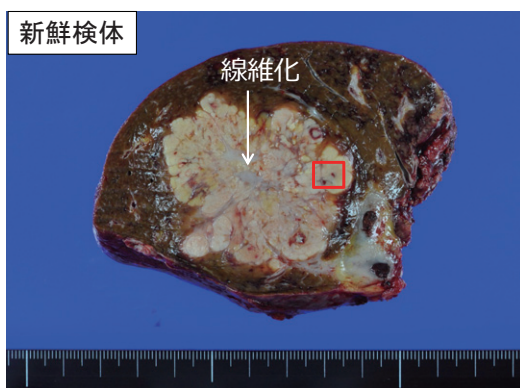
境界不明瞭な早期肝細胞癌では、新鮮標本での腫瘍の同定が困難であり、固定後には背景肝で観察される組織構築が不明瞭化し、幾分わかりやすくなることがある(高分化肝細胞癌例)。



<図 18>

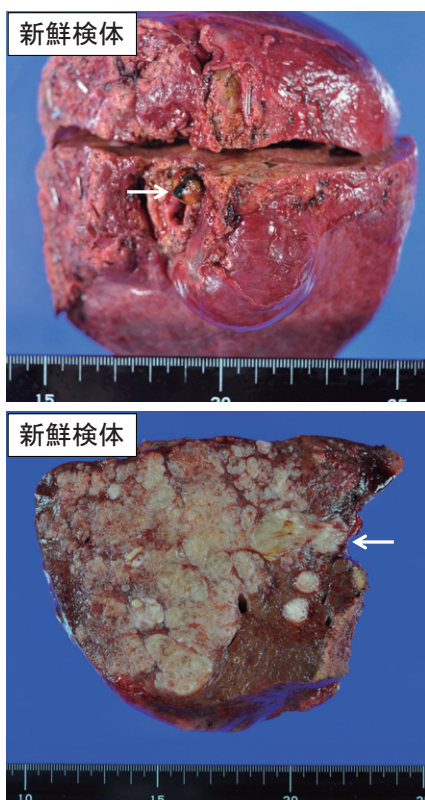


標本採取は、出血・壊死・線維化などがな部位から行うことが理想的である。



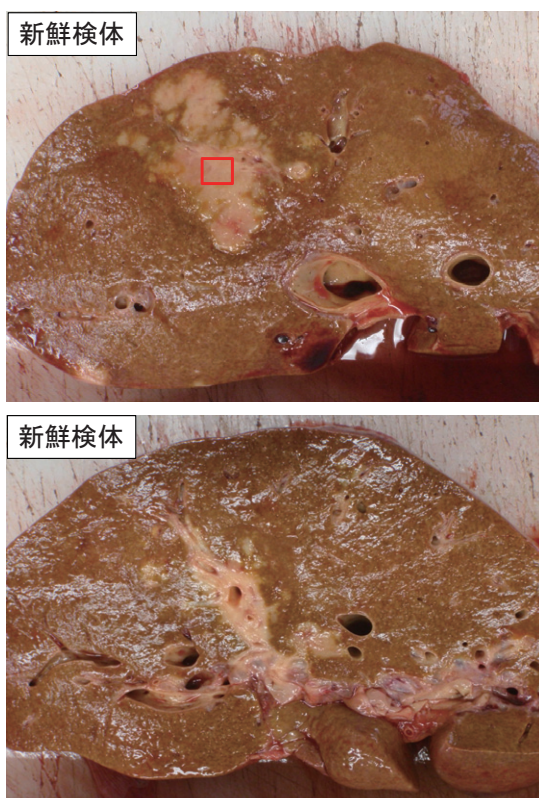
腫瘍細胞のみからの情報を得たい場合は、腫瘍間質が乏しい、組織が柔らかい部分が好ましい(□)。

<図 19>



上:切除断端に門脈内腫瘍栓(→)を認める。
下:腫瘍切除断端に腫瘍成分を認める(←)。
断端での病理学的評価を重視し、標本採取は控える。

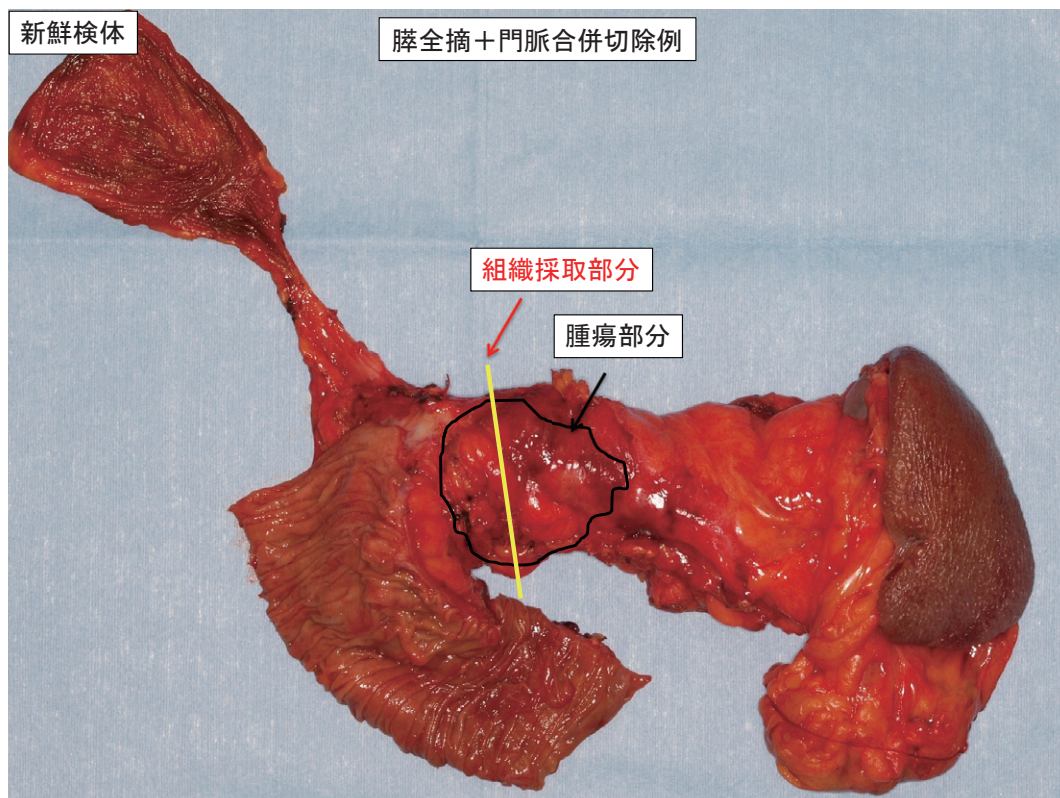
<図 20>



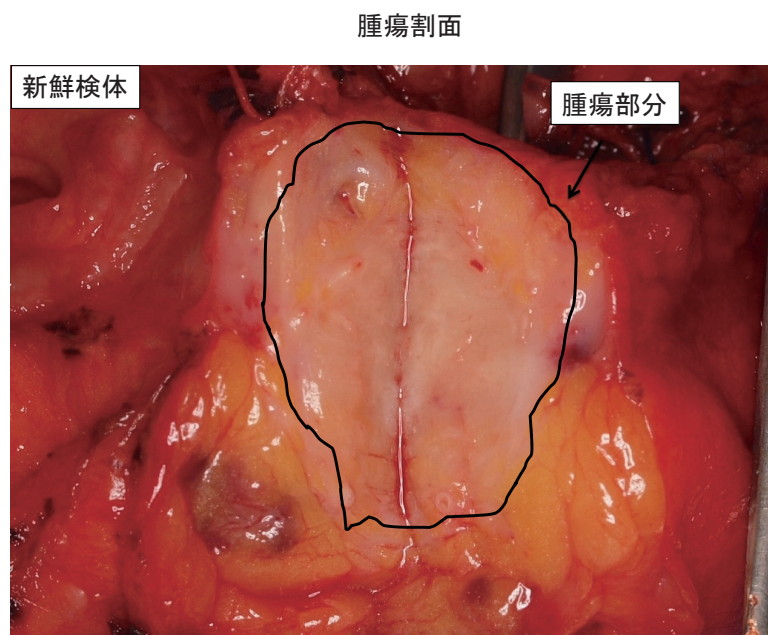
肝内胆管癌では腫瘍の境界は明瞭であるため腫瘍の同定は容易であるが(上)、

グリソン鞘に沿った浸潤形態を示す場合は、間質成分の混在が避けられない(下)。

脾癌 <図 21 >



<図 22 >

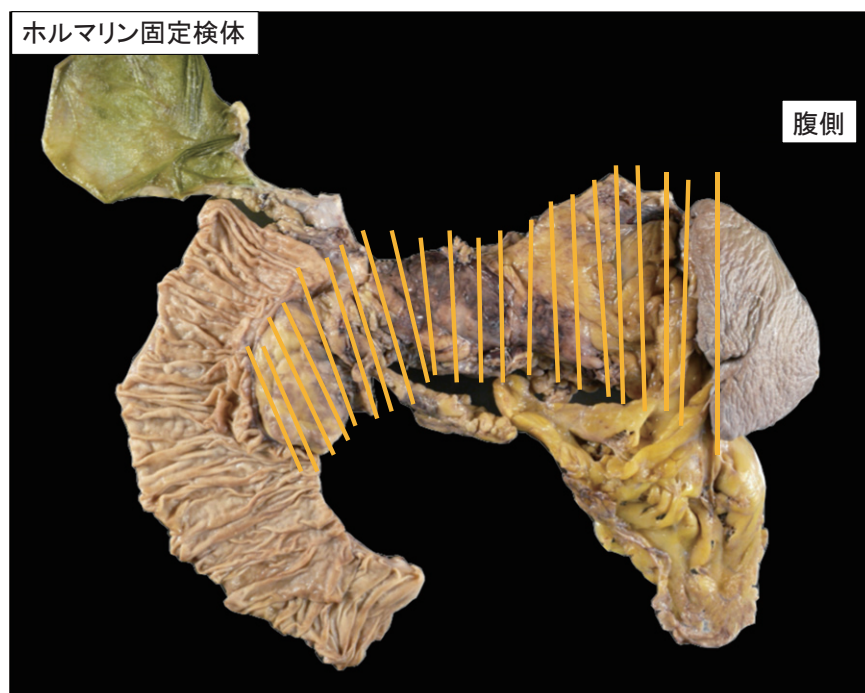


断面は白色調から黄色調を呈している。約0.5cmほどの厚さで薄く切り、そのうちの白色調部分を採取。

<図 23 >

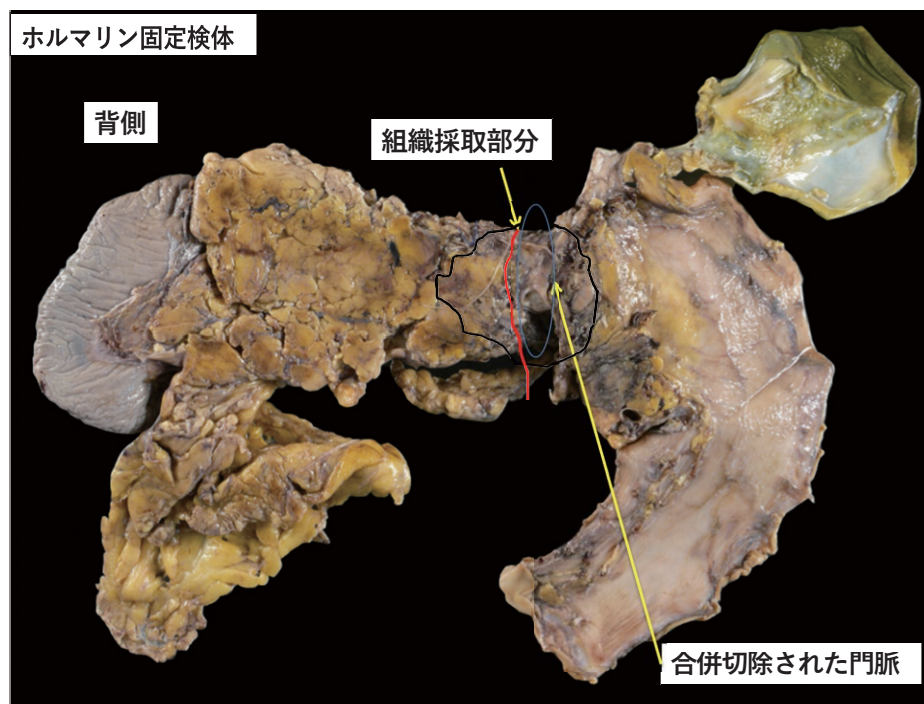


<図 24 >



切り出しの際、取扱い規約に準じて主膵管に垂直に割を入れる。
膵組織は全て切り出される。

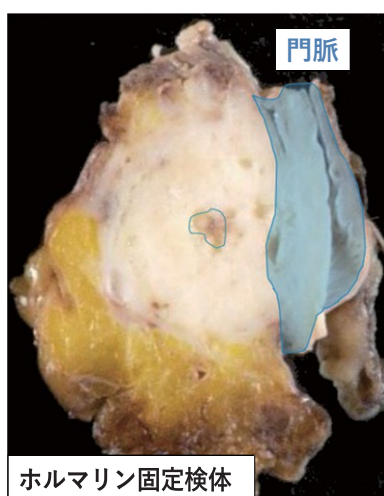
<図 25 >



門脈の脾付着部に近接しないように留意しながら、
腫瘍部に組織採取のための割を入れる。

<図 26 >

門脈近傍の断面像

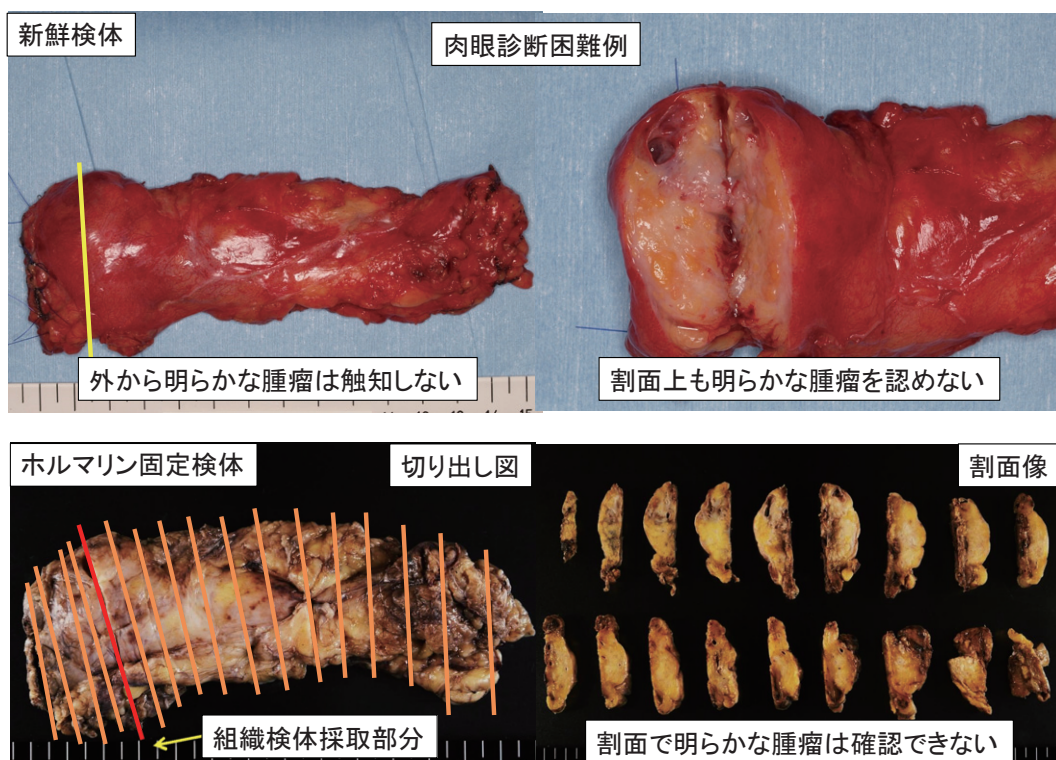


門脈合併切除症例で腫瘍の局在が門脈に近接している場合、門脈部分で割を入れてしまうと門脈浸潤部の面がうまく出ずに門脈浸潤の有無が診断不能になってしまう可能性がある。

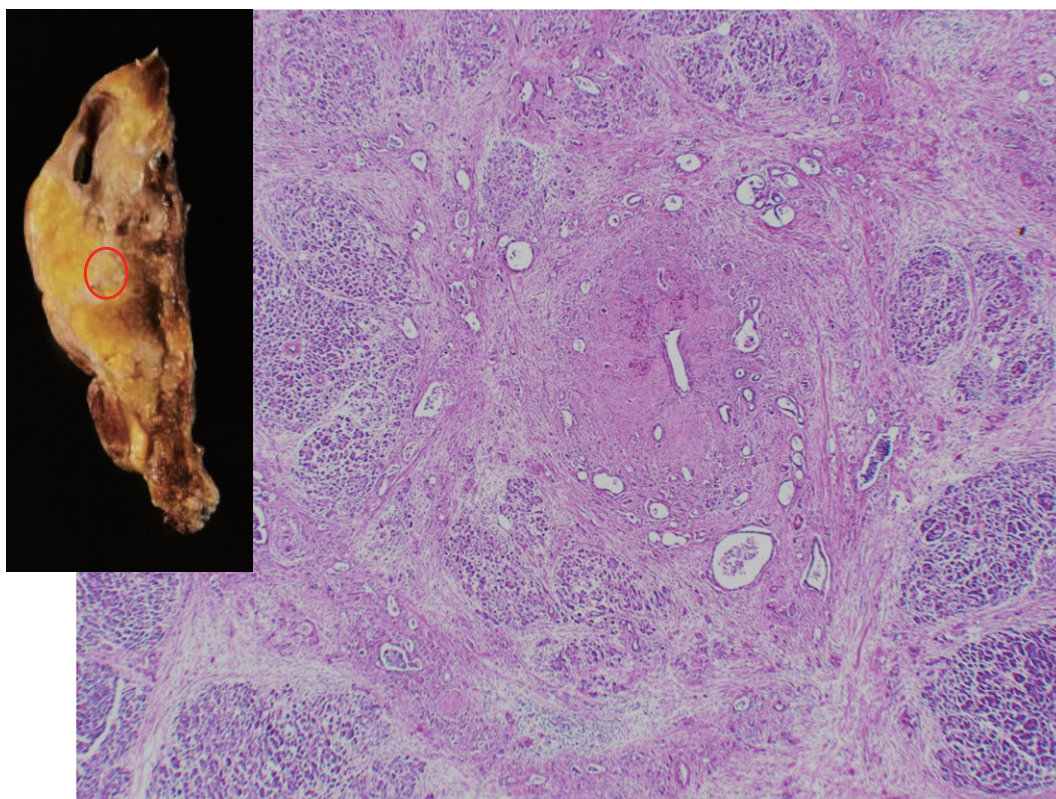
➡ 背側の門脈付着部を確認、その部分に割が入らないように留意する。

脾頭十二指腸切除検体における胆管・十二指腸や、脾体尾部切除検体における脾動静脈などにも、同様の注意を要する。

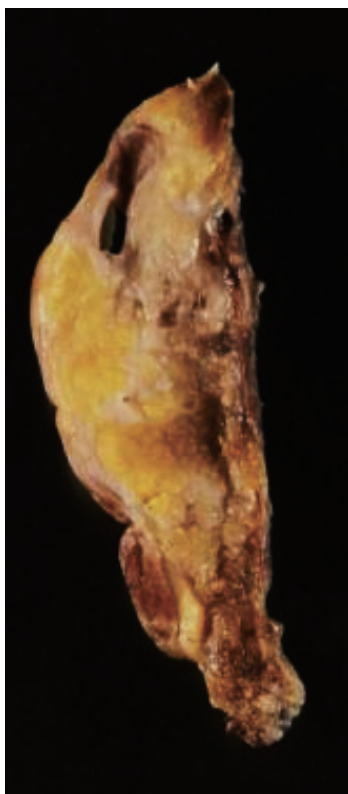
<図 27 >



<図 28 >



<図 29 >

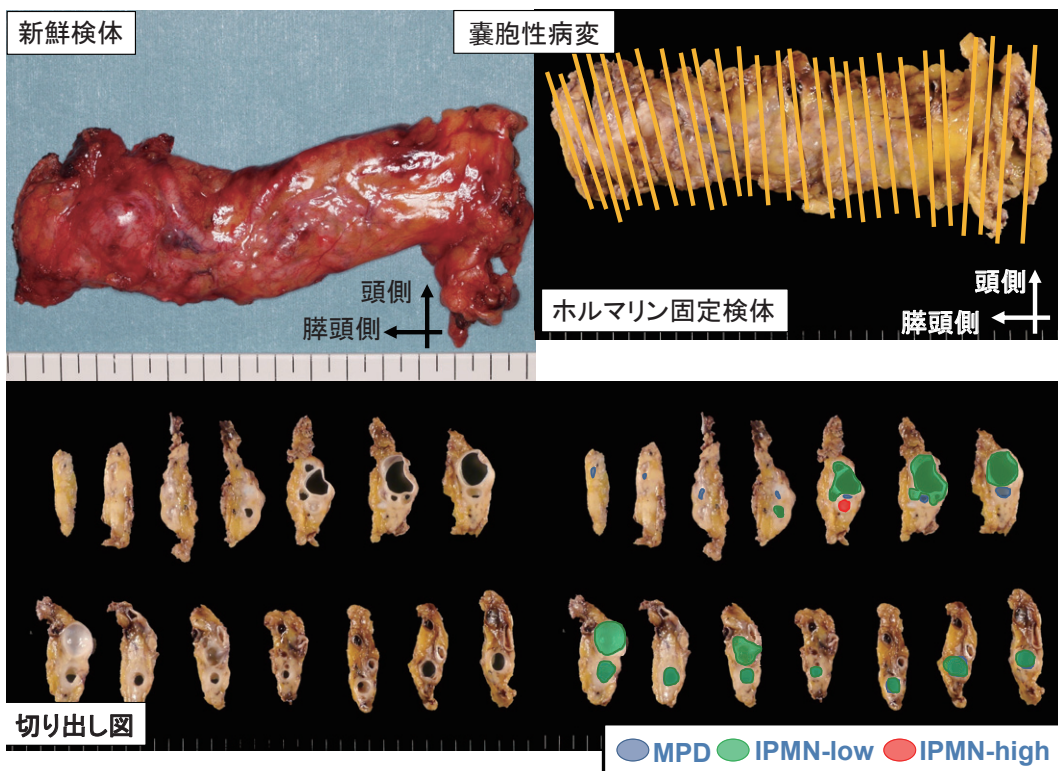


検体採取時、腫瘤非触知の場合肉眼的に腫瘍の位置を確認するのは困難である。

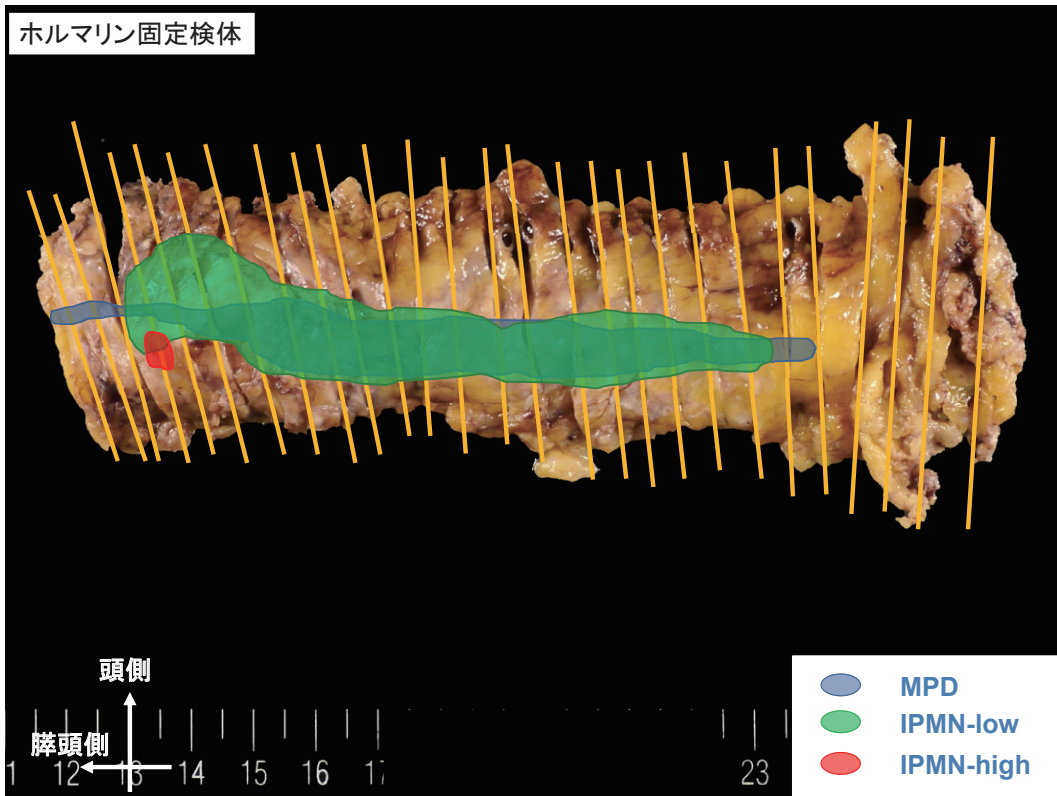
固定の際、採取部断面が平面にならず、凹凸が出来る。そのため、断面を平面にするためのトリミングが必要になる。この場合、検体のロスが不可避となる。

→小病変の場合、このロス部分に病変があると診断不能の可能性があるので、採取しない。

<図 30 >



<図 31 >

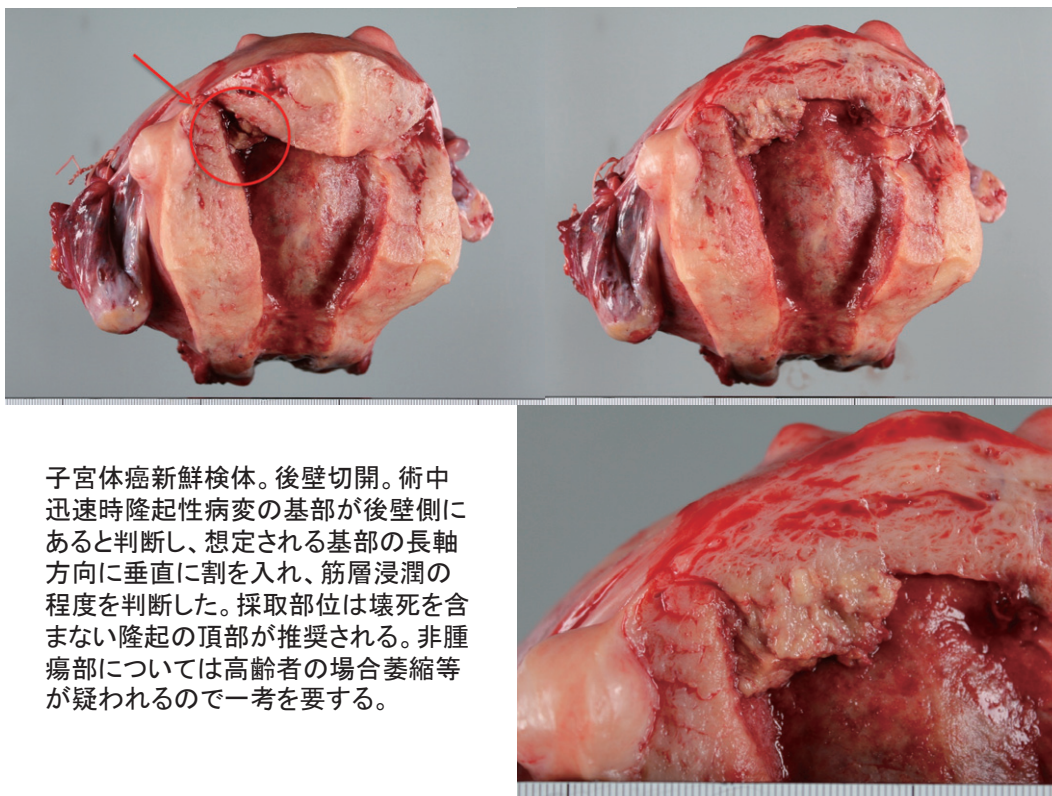


<図 32 >

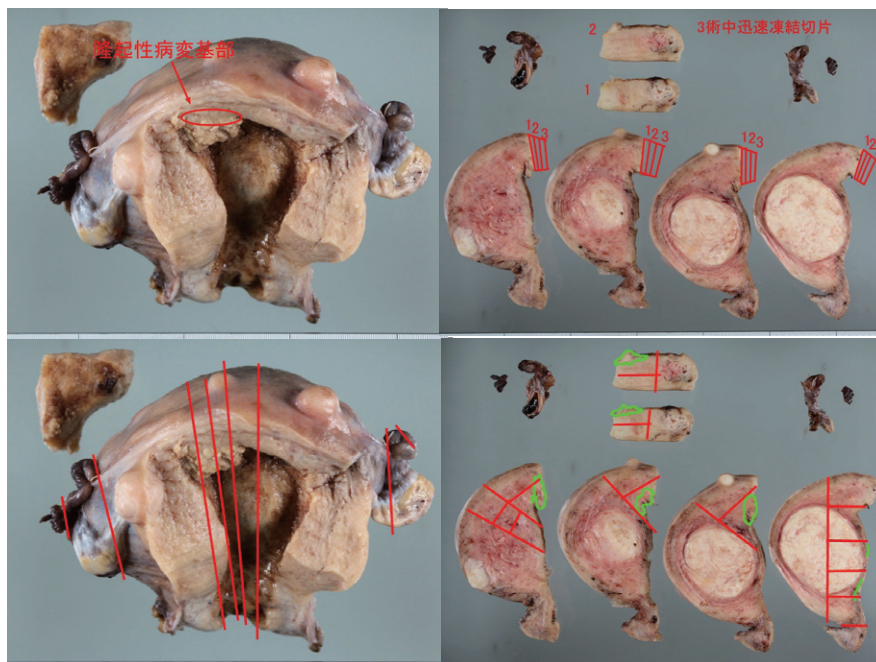


嚢胞性病変を伴う場合、腫瘍の位置を同定するのが困難な場合がある。嚢胞内の壁肥厚部あるいは隆起部が対象となる腫瘍部であることが多いが、組織採取過剰で診断不能にならないように採取量には注意が必要である。

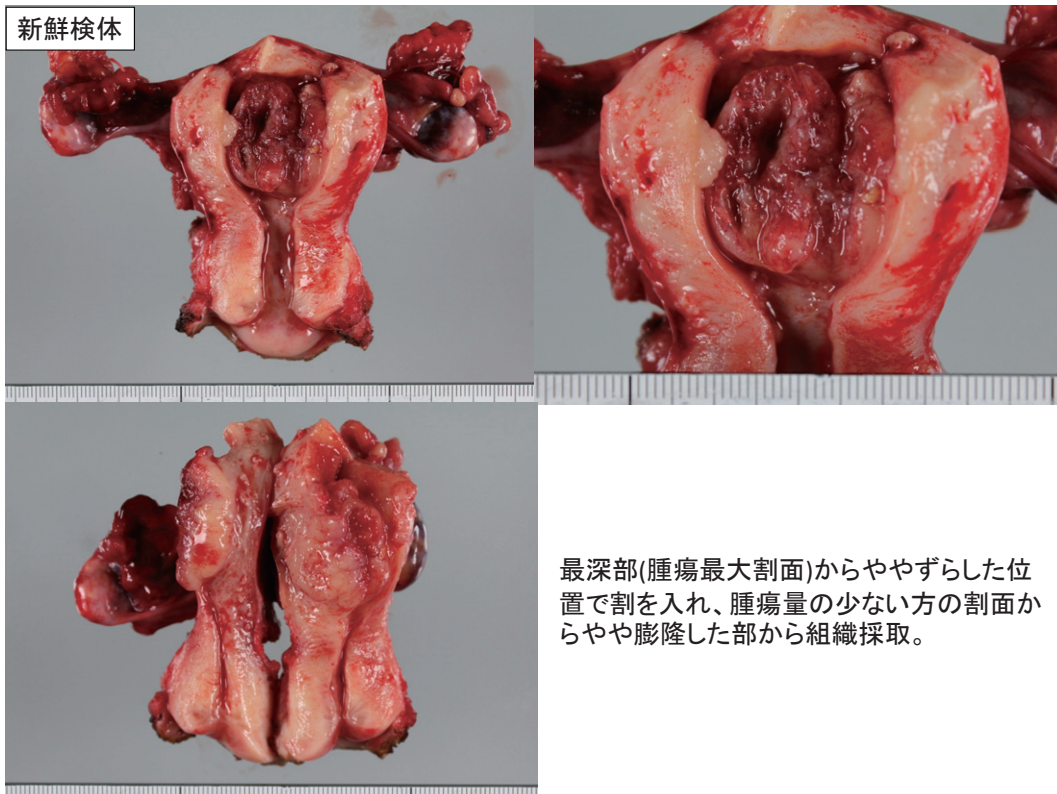
子宮体癌 <図 33 >



<図 34 >



<図 35 >



<図 36 >

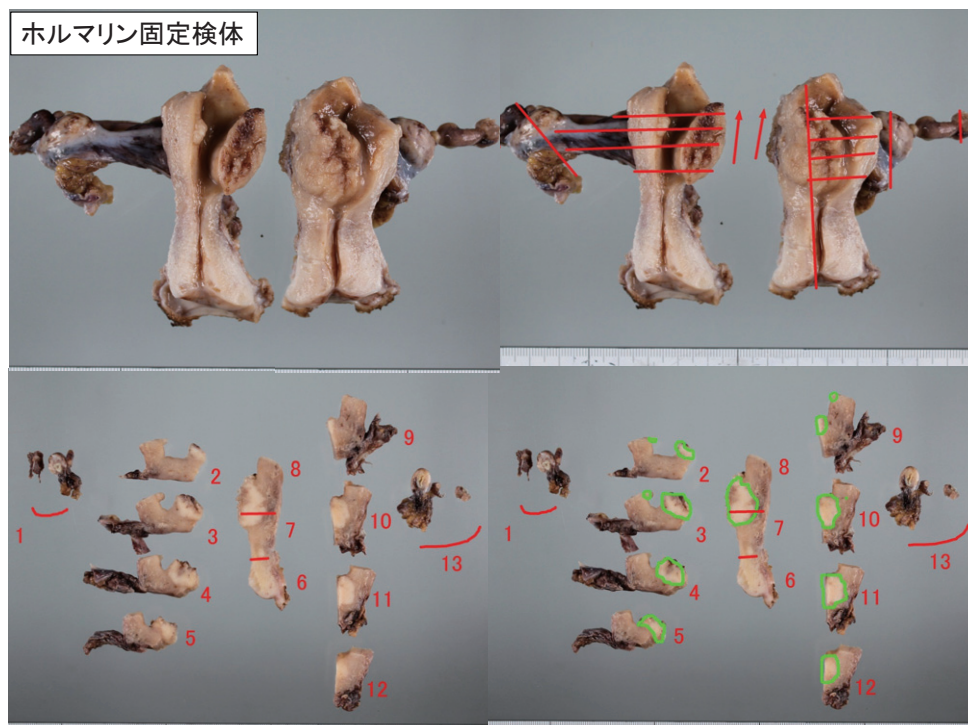


図35ホルマリン固定検体。固定用ボードへの固定が不十分だったため、やや屈曲した形で固定され、通常以上のトリミングが必要となった。

卵巣腫瘍 <図 37 >



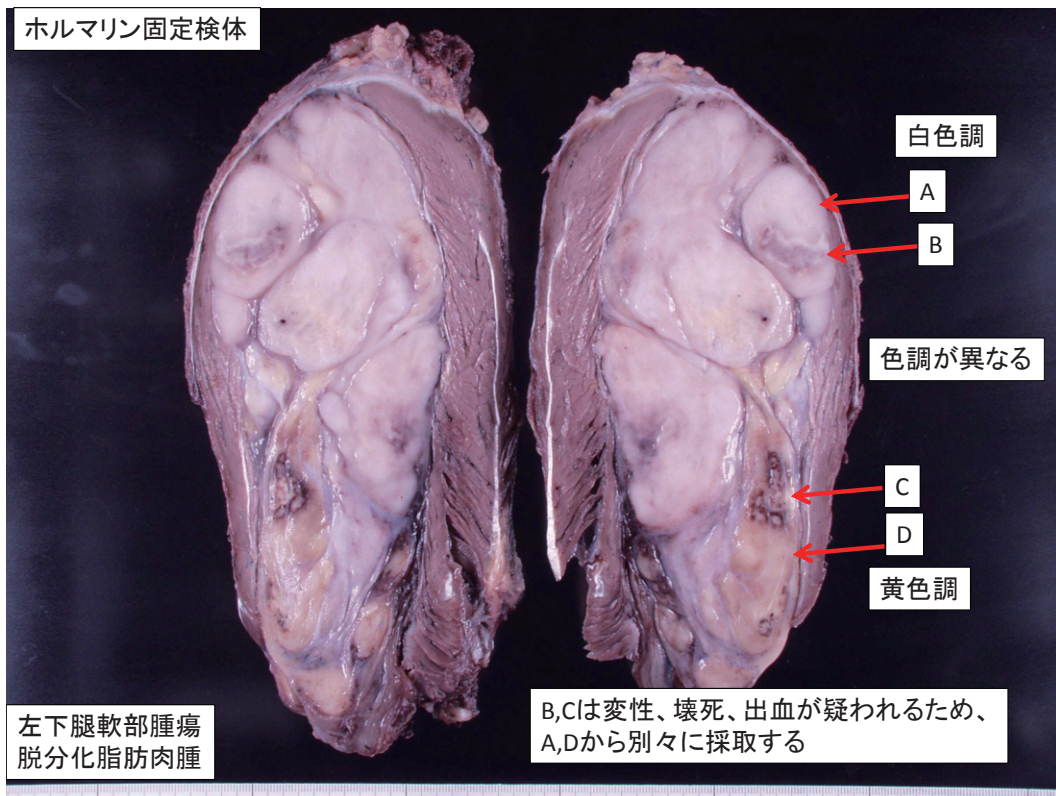
Ovary, Serous adenocarcinoma

<図 38 >



本症例の病理診断は、malignant mixed epithelial tumor (clear cell adenocarcinoma and endometrioid adenocarcinoma) であった。

軟部腫瘍 <図 39>



凍結組織検体の適切な採取・保管・移送方法

DNA・RNA・タンパク質等の変性を最小限にし、高い品質を保持して長期の保管を可能にし、将来に亘って広汎な解析に供せるよう汎用性を最大にすることを目指し、ゲノム研究等に供する病理凍結組織の適切な取扱い方法を定める。

凡例

- (E): (A) よりもさらに高い品質等が期待できる場合があるが、作業量が過大である等のため、必須とは言いがたい事項
- (A): 推奨される事項
- (B): (A) が実施不可能である場合に次に推奨される事項
- (N): 回避すべき事項
- (L): 法令等により規定されている事項

【採取対象】

1. 第1部「研究用病理組織検体の適切な採取部位」の記載の通り、手術標本より、病理診断に支障を来さず（患者に不利益を及ぼさず）、核酸・タンパク質等の変性の予測される出血・壊死巣等を回避し、適切な採取部位よりゲノム研究等に用いる組織検体を採取する（A）。

注: 包括的同意等に基づくバイオリソースバンキング等に際して、生検標本を診療後余剰検体と見なされることが多いと考えられる。そこでまず、手術標本より採取したゲノム研究等に用いる組織検体の取り扱いについて定める。

注: 個別同意に基づく場合等、生検標本をゲノム研究等に用いる場合は、本規程第2部【急速凍結】16.以降に準拠して扱う。

2. 例えば、癌症例であれば、癌部と非癌部（適切な対照部位）の双方から検体を採取する（A）。
（第1部 6. 採取部位の決定 参照）

注: 一般に癌組織にはheterogeneityがあるが、肉眼所見に不均一性が認められる場合等は特に、癌部の複数箇所から組織を採取することが望ましい（E）。

3. 採取部位について最低限の記載を残すべきである（A）。

例 体部小弯側

注: 写真・シェーマへのおおよその部位の記入、近接する部位より作製したルーチンの病理診断等のためのブロック番号の記録、等の手段により、採取部位に関する情報が研究者に伝達されるように計らうこともさらに望ましい（E）。

注: 病変部の複数箇所から組織を採取した場合等においては、特記すべき肉眼所見の文章による記載等を行うこともさらに望ましい（E）。

【採取者】

4. 各症例の手術標本において、組織検体の採取の可否、適切な採取部位、適切な採取組織量を、望ましくは**病理専門医**が判断する（**E**）。あるいは、**病理診断学に精通**し、十分な肉眼病理診断能力を備えた、**担当診療科等の臨床医**が判断することも望ましい（**A**）。
5. 研修医・臨床検査技師・その他のバイオバンク実務者が採取を行う場合には、**ゲノム病理標準化講習会**ならびに**日本病理学会webページ**における**e-ラーニングシステム**等で研修を行った上で、第1部「研究用病理組織検体の適切な採取部位」の記載に従い、また必ず**病理専門医**あるいは**病理診断学に精通した担当診療科等の臨床医の監督の下で採取を行う**（**B**）。

【採取時間】

6. 手術検体から、**可及的に速やかに**ゲノム研究等に用いる組織検体を採取する**(A)**。

[実証データ ①・②]

注: 手術検体が手術標本整理室等に提出されたのち、入割・肉眼診断・写真撮影等のかたわら組織検体の採取を行う場合、最も速やかに作業すれば、**【急速凍結】16.までを摘出後30分以内**に実施できると考えられる。

注: 手術検体を室温で長時間保持することは極力回避する**(N)**。[実証データ ①・②]

7. 可及的に速やかに採取を行えない場合には、手術検体を冷蔵庫(4℃)等に保管するものとする。**4℃保管3時間以内**を目安にして組織検体を採取する**(B)**。[実証データ ①・②]

注: 最終的に得られた核酸等の品質は、バイオバンクの採取・保管条件よりも、提供を受けた**研究者側の手技に依存する**場合がある。[実証データ ③]

8. バイオバンク等から研究者に試料を提供する際に、時間・温度等の項目を含む、当該施設における標準手順書を開示する必要がある**(A)**。また、当該施設における**標準手順を逸脱した場合は、試料付随情報に、時間・温度等逸脱した事項の記録を含める必要がある (A)**。

注: 採取時間あるいは摘出後採取までの所要時間・採取までの保持温度は、正確に記録することが望ましいが、当該施設における標準手順に従って採取している限りは、試料の質の予測が可能であるので、時間・温度の記録は全症例において必須ではない **(E)**。標準手順を逸脱した場合は、上記8.のように対処する。

注: 診療録等を閲覧して当該症例の術中疎血時間を記録する労力は研究における必然性に鑑みて過大であり、全症例において必須ではない **(E)**。ただし、試料が疎血時間の影響を受けやすい解析を含む研究に供される等、研究者の求めがある場合には、疎血時間を開示できる体制をとることが望ましい **(A)**。

【採取量】

9. 採取量については4. に示した通り病理専門医あるいは病理診断学に精通した担当診療科等の臨床医の判断によるが、病理診断に特段の支障がなく適切な採取部位が確保できる場合は、**半小指頭大（ $1 \times 0.5 \times 0.3\text{cm}$ 程度、50-100mg 程度）**の組織を採取することが適切である（A）。

注: 極少量の組織を用いても有益な解析を行う余地があるので、採取量が半小指頭大に満たないことを持って、採取を見合わせるにはあたらない（B）。

注: 組織の湿重量による補正等が必要となる解析を行う可能性が高い場合には、精密計量器をもって採取組織の湿重量を測定することが望ましい。但し、秤量作業により急速凍結までの時間が遅延する弊害があり、細切した個々の組織片が研究者に提供されるため、採取全量の秤量は必ずしも研究者を利するとは限らない。細切した個々の組織片毎の秤量は、急速凍結までの時間を更に遅延させる。よって、湿重量の秤量を必須要件とはしない（E）。

【組織の処理】

10. 9.で採取した組織を**1辺2-3mm 角程度にまで細切する (A)**。

注: 使用細片以外の凍結・融解の反復を防ぎ、核酸分解酵素等の活性化を防いで速やかに質の高い解析を行うため、急速凍結前の組織の細切は必須である (A)。

11. 望ましくは、2-3mm 角組織片1個を1チューブに収納する(E)。保管容器の容量に制限がある場合には、**チューブの内壁に個々の組織片を相互に離して貼付**するようにし、複数の組織片を1チューブに収納する (A)。

注: チューブの内壁に相互に離して貼付しておけば、使用時に、残りの組織片を含めたチューブ全体の温度が上昇するより先に、必要個数のみ鑷子等で素早く引き剥がすことができる。

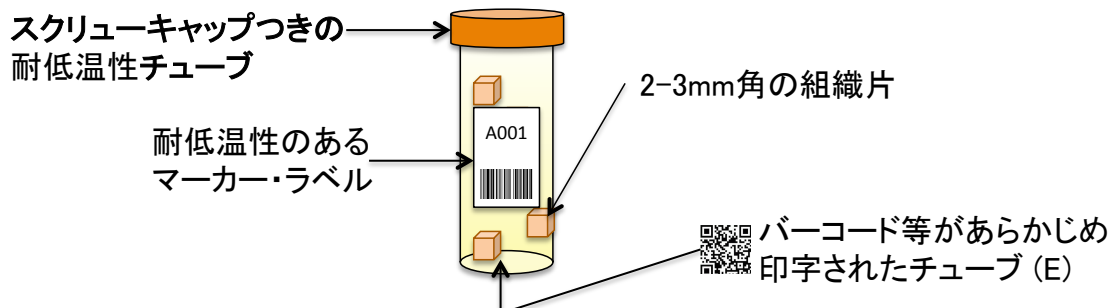
注: 複数の組織片を1チューブに収納する場合は、1.5mLないし2mL の容量のチューブが扱いやすいが (A)、組織片1個を1チューブに収納する等の場合はこの限りでない。

12. **耐低温性のあるチューブを用いる(A)**。匿名化番号等をチューブに記載するか貼付する場合、**耐低温性のあるマーカー・ラベル等を用いる (A)**。

注: チューブ・マーカー・ラベル等は、各施設の保存庫等で実際に耐低温性を確認してから採用することが望ましい (E)。

注: 各施設の管理体制に応じて、匿名化番号のバーコード等があらかじめ印字されたチューブを用いることも推奨される(E)。

13. 万一の温度変化に備える (液体窒素の膨張による事故を防ぐ)ため、**スクリューキャップつき**のチューブを用いる(A)。



14. 癌部・非癌部等各採取部位から、11. のチューブを複数本作製する（A）。

注: 複数の組織片を1チューブに収納している場合にも、複数箇所に保管したり、複数の研究者への提供を行う便等を考え、必ず複数本のチューブを作製する（A）。

注: 各施設等において合意が得られた場合、また特に液体窒素保存容器中で高い品質を維持して保管が可能である場合、解析手技が進歩した将来における研究使用に備えて、複数採取したチューブの一部を特に長期保管する(例として10年以上等)ことも望ましい（E）。

15. 核酸庇護剤が多種類市販されており、チューブ内において核酸庇護剤に組織片を浸漬して凍結する手技が多用されている。但し、核酸の質を確実に保持するとともに、試料の汎用性を高めるため、可及的に速やかな組織の採取と急速凍結が可能な施設においては、核酸庇護剤を使用しないことも推奨される。

注: 核酸庇護剤中で凍結した組織を核酸抽出手技に供した場合、DNAの品質は概して影響を受けない。

【実証データ ④】

注: 核酸庇護剤の種別により、RNA に対する効果にはかなりのばらつきがある。核酸庇護剤を使用しようとする場合は、各施設において実際に核酸を抽出して品質を検証した上で、適切な核酸庇護剤を選択するべきである。【実証データ ⑤】

注: 核酸庇護剤中で凍結した組織を核酸抽出手技に供した場合、核酸庇護剤を用いずに凍結した組織から核酸を抽出する場合に比して、核酸庇護剤の融解を待つ工程が増える等するため、抽出したRNAの品質がかえって低下する場合がある。【実証データ ⑤】

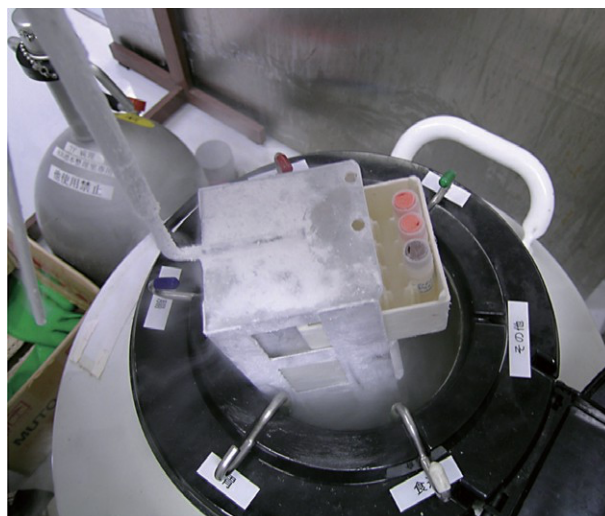
【急速凍結】

16. 14.で複数本ずつ作製したチューブを液体窒素に浸漬し、急速凍結を行う(A)。6.で述べたように、最も望ましくは、手術標本摘出後30分以内に急速凍結を実施する(A)。

注: 液体窒素を容れたコルク栓付きデュワー瓶(2重壁断熱容器)等にチューブを浸漬して急速凍結する(A)。



注: 頻繁に(連日多数の)試料を採取する施設においては、容量30ないし50L程度の比較的小型の急速凍結用液体窒素保存容器を、新鮮未固定の手術標本を扱う手術標本整理室等に常設し、14.で作製したチューブを速やかに収納して急速凍結を行うのが効率的である(E)。この場合、充分凍結した試料を定期的に長期保管場所までまとめて運搬することが出来る。



注: 手術標本整理室等において液体窒素の調達が困難である施設では、ドライアイス・アセトン等による凍結が可能である(B)。[実証データ ⑥・⑦]

注: 手術標本整理室等において液体窒素の調達が困難であるが、手術標本整理室内に超低温槽(-80℃)を常設できる施設においては、超低温槽(-80℃)に速やかにチューブを収納することも可能である(B)。[実証データ ⑥・⑦]

【長期保管】

17. 16.で急速凍結したチューブは、最も望ましくは、研究使用に供すまで**液体窒素保存容器**
(-180℃程度)に保管する**(A)**。

注: ここで「長期保管」とは、研究使用に供すまでの期間保管することをさすが、一般的に5ないし10年以上の保管を期して設備・標準手順を定めるべきである。

注: 標準的には**気相の液体窒素保存容器**を用いる**(A)**。保管場所等が確保できる場合には、病原微生物のコンタミネーションを避ける等の観点から、アイソサーマル式等全面気相の液体窒素保存容器を用いることが更に望ましい**(E)**。但し、大型で設置に高額の経費を要するため、全面気相の液体窒素保存容器の導入の是非は施設の判断による。

注: 長期保管場所までの施設内搬送にも、液体窒素を容れたコルク栓付きデュワー瓶(2重壁断熱容器)等、熱伝導率が小さい十分断熱性能を備えた容器を使用する。

注: 長期保管のため液体窒素保存容器に収納する等の作業は、通常手行的に行うが、試料の温度変化を最小限にするため、**極力手早く行う**ものとする**(A)**。

注: チューブに印字された匿名化番号バーコード等を識別し自動出入庫を行うシステムを備えた液体窒素保存設備等を用いることも、屋外大型貯槽ならびに液体窒素の自動供給システムを備えた液体窒素保存設備等を用いることも、品質保持と省力化の観点から更に望ましい**(E)**。但し、大型で設置に高額の経費を要するため、長期保管設備は各施設等の判断に基づいて選択するものとする。

18. 長期保管のため液体窒素保存容器に収納するとともに、試料の付随情報・保管場所等を、
適切な管理アプリケーション・カタログデータベース等に登録する(A)。

<参考>

バイオバンク実務者等がカタログデータベース入力する際の実資料とするため、試料採取者に対して試料と共に提出する“試料登録票”等に標準的に記載を求める項目は以下の通りである。(誤入力を防ぐために、試料採取者による発生源入力のデータベースを構築することも望ましい。)

- ①**手術(採取)年月日**: 西暦年月日、病理ID が未発番の場合、同一患者の複数回の手術を区別するために必須である。
- ②**試料採取者**: 試料を用いた研究の共同研究者となり、バイオバンクからの払い出し可否を判断する、バイオバンクコンタクトパーソン等 [担当病理医、各診療科の臨床医等]が決められている場合、その氏名を記載する。
- ③**患者氏名**: カatalogデータベースに合致するよう、カタカナ姓名、漢字姓名、あるいはその両者等書式を指定する。

④ 患者ID

⑤ 病理ID: 検体採取時にすでに発番されている施設においては、同一患者の複数回の手術を区別するために記載を求める。

⑥ 提出診療科: 提出診療科はカタログ検索キーワードになりうるので、誤記入を防ぐために、あらかじめ全診療科名を列記し、その中から選択することを試料採取者に求める。

⑦ 感染症: 試料管理・研究利用に際し確認の必要な診断名をあらかじめ列記し、その中から選択することを試料採取者に求める、“その他”の項に自由記載を許す。

⑧ 性別: 電子カルテと連動したバイオバンクのカタログデータベースが完備され、患者IDから自動入力できる施設においては必須ではない。

⑨ 手術(採取)時年齢: 研究使用時等には、電子カルテ等から採取当時の年齢を自動抽出しにくいので、採取時に記載を求める。

⑩ 臨床診断: 自由記載、カタログにおいては部分一致検索等に用いる。

但し、正確な診断名からの検索を可能にするには、病理診断確定後にバイオバンクのカタログデータベースを電子カルテ・院内がん登録等に連動させ、ICDコード・MEDIS 管理番号等から検索できるようにする必要がある。

⑪ 採取臓器: 試料管理に際し分類収納等に用いる可能性がある場合、自由記載は不可とし、あらかじめ臓器名を列記しておき、その中から選択することを求める。WHO 腫瘍分類臓器コード等を用いても良い。

⑫ チューブ本数: T(癌部・病変部) ○本、N(非癌部・対照部) ○本。

⑬ 試料付随情報

T1: 採取部位 (例 体部小弯側、ブロック番号#, 採取部位を記入した臓器写真・シェーマも添付できるようにする)。肉眼所見等の自由記載も許す。

T2: 同様に採取本数分の記載を求める。

N1: 採取部位 (例 体部小弯側、ブロック番号#, 採取部位を記入した臓器写真・シェーマも添付できるようにする)。肉眼所見等の自由記載も許す。

N2: 同様に採取本数分の記載を求める。

⑭ 施設の標準手順から逸脱: “あり”・“なし”より選択する。ありの場合状況説明の自由記載とするが、摘出後実際に凍結までに要した時間と凍結まで臓器を保管した温度(室温、4℃等)を必ず記載に含めるよう求める。

・以下は、施設の標準手順から逸脱していない場合必須ではないが、施設内でコンセンサスが得られ無理なく記載できる場合に記載してもよい。

- 摘出時間 (24 時制○時○分)、採取凍結時間 (24 時制○時○分) あるいは
摘出後凍結までの時間 (約○分)
- 術中阻血時間 (約○分)
- 湿重量 (○mg)

19. 長期保管に、液体窒素保存容器(-180℃程度)にかえて、**超低温槽 (-80℃)**を用いることも可能である**(B)**。この場合も、望ましくは16. に述べたように液体窒素に浸漬して急速凍結し、手早く超低温槽に収納する**(A)**。

注: 超低温槽 (-80℃) に組織を長期保管したのち抽出したDNA・RNA・タンパク質の品質は、液体窒素保存容器に長期保管した組織から抽出したそれらに比べて、**低下する場合**がある (DNA・RNA についていえば、特に10年以上経過したのち品質が低下する場合がある)。【**実証データ⑧・⑨・⑩**】

注: 汎用性を高めるために液体窒素保存容器中の長期保管が推奨されるが、-80℃に長期保管した組織から抽出したDNA・RNAを用いても、特段問題なく実施できる解析項目は多いので、実行可能性にも鑑みて長期保管温度は各施設等の判断に基づいて選択するものとする **(B)**。試料を利用する研究者は、保管試料の品質に応じた適切な解析項目を選択するべきである**(A)**。このため、【**実証データ⑧・⑨・⑩**】を参照されたい。

20. 長期保管に、**冷凍庫 (-20℃)**を用いることは**回避すべきである (N)**。
21. 試料を提供するバイオバンク等の施設は、保管試料の特性・品質に関する情報を研究者に提供する目的で、バイオバンク試料を用いた利活用研究の成果(刊行論文等)を適宜webページ等で公開することが望ましい **(A)**。
22. 試料を提供するバイオバンク等の施設が、少数の試料について定期的に**抜き取り実証解析**等を行い、結果を公表することはさらに望ましい**(E)**。全試料において核酸のintegrityを示す指標を実測し、公開・添付して試料を提供することがさらに望ましいが、実行可能性に鑑みて必須とは言えない **(E)**。
23. 長期に亘る保管期間中の故障・事故等の可能性を考慮し、可能であれば温度管理記録を残すことが推奨される **(E)**。
24. 長期に亘る保管期間中の事故・災害等の可能性を考慮し、バックアップとするために、可能であれば遠隔地の別施設等に分散して保管することも望ましい**(E)**。

【凍結組織切片作製】

25. 10.で組織を細切する際に、0.5×0.5×0.2cm大の1-2片を別に取り、術中迅速診断用組織標作製の要領で、凍結組織切片作製用包埋剤(いわゆる **Optimal Cutting Temperature [OCT] compound**)に包埋し、ドライアイス・アセトン等で凍結し、超低温槽 (-80℃)に保管することも推奨される(E)。

注: OCT包埋標本作製時の氷晶の形成を避けるため、包埋用の組織を一度OCT compoundに浸漬し、新しいOCT compound で包埋し急速凍結することがすすめられる(E)。

26. OCT包埋標本を超低温槽 (-80℃)中で長期保管する際には、パラフィルム等で厳重に包装し密閉性の高い容器に収納する等、試料の**乾燥を防ぐ**ように充分留意しなければならない。

注: 乾燥したブロックからは、概して剪断化した核酸しか抽出できない (N)。

注: 良好な条件で長期保管した試料においては核酸の品質は概して保持されているが、解析前に、抽出した核酸の品質検証をブロックごとに行うべきである。 [実証データ ⑪]

注: OCT包埋標本から薄切の後HE 染色標本あるいは免疫染色標本等を作製して鏡検することにより、研究者に提供する組織の**病変細胞 (癌細胞)含有率**の情報を提供することができる。組織標本の鏡検で癌細胞含有率を算出するには下記の(a)(b)がある。(b)でも有益な知見が得られる場合があり、実行可能性に鑑みて各施設で (a) または (b) を選択するべきである。 [実証データ ⑫]

(a) 対象複数視野の癌細胞数をカウンターを用いて極力正確に計測し、同様に計測した全細胞数で除す方法 (E) と、

(b) 低倍率at a glanceで10% 未満、10% 以上20% 未満、以後10% 毎等に大別する方法 (A) がある。

注: OCT包埋標本から薄切の後HE 染色標本を作製して組織像を観察し、マイクロダイセクションを実施するか、あるいは未染標本からそのまま核酸を抽出する等して、各種の解析に供することができる。各種解析に際しては、薄切が反応を利する場合と、包埋剤の混入が反応を阻害する場合がある。特に、OCT compound が核酸のカラム精製・タンパク質分析等を阻害する場合がある。

OCT包埋標本作製には、組織像を確認できる利点があり、種々の解析が可能であるが、乾燥を防ぐ等管理に細心の注意を要すのみならず、癌細胞含有率評価を含むバンキング作業量が格段と増加する。よって、各施設における実行可能性に鑑みて、十分なコンセンサスが得られた場合にのみOCT包埋標本を作製すべきである。

【研究使用】

27. 研究者に試料を提供するため液体窒素保存容器等から試料を取り出す作業は、標準的には用手的に行うが、他の試料への影響を最小限にするため**極力手早く作業する**(A)。

注: 組織片を収納したチューブはドライアイス上に取り出すなどし、研究者への提供あるいは移送開始まで、極力試料の質を保持するように努める(A)。

28. 試料の提供情報・使用量等を、適切な管理アプリケーション等に登録する(A)。

注: 残余組織片・抽出した核酸・解析結果の返納を求めるバイオバンク等においては、使用歴(研究者・研究課題等)を特に詳細に管理アプリケーション等に記録する(E)。

【移送】

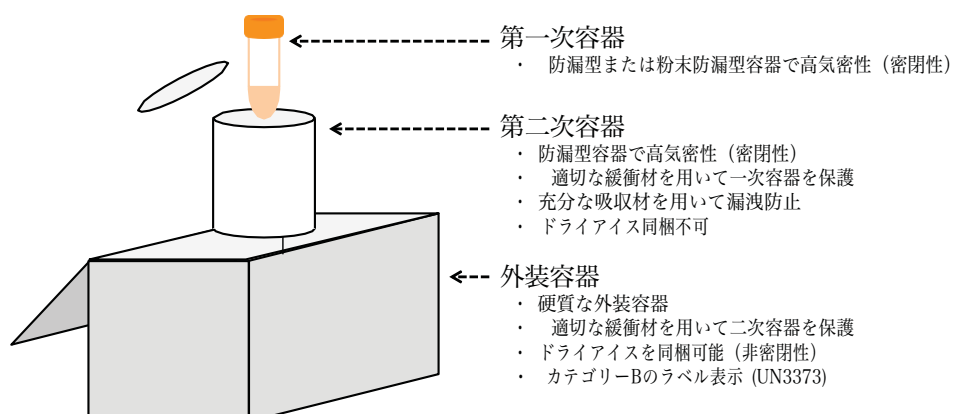
29. 長期保管設備を持たない施設等においては、組織を収納したチューブをデュワー瓶中の液体窒素やドライアイス・アセトンに浸漬して十分に凍結した後、液体窒素保存容器を持つ施設等へ適切な手段で移送する。また、遠隔地の研究者に試料を提供する際にも、適切な手段で移送する。
30. 通常、温度保持が期待される非密閉移送容器（簡易的には発泡スチロール容器）にドライアイス等を充填し、冷凍便により運送業者に輸送を委託する（A）。

注: -80℃等の温度保持を保証し、温度記録用のチップを内蔵した移送容器等を用いる生体試料専門運送業者もある（E）。

但し、完全に凍結した組織の数日内の輸送であれば、-80℃等の温度保持を保証する専門運送業者に委託せず、ドライアイス充填発泡スチロール容器を用いた冷凍便等で移送しても、抽出した核酸等の品質の低下は明らかでない。[実証データ ⑬・⑭]

31. 世界保健機構(WHO) 感染性物質の輸送規則による生物由来物質カテゴリー B(UN3373)（その物質への曝露によって、健康なヒトまたは動物に恒久的な障害や、生命を脅かす様な、あるいは致死的な疾病を、引き起こす可能性のある状態で輸送される感染性物質 [カテゴリーA]ではないヒト由来試料）を航空機により輸送しようとする場合は、「航空機による爆発物の輸送基準等を定める告示(国土交通省)」の定める3重包装容器を用いなければならない（L）。

航空機による爆発物等の輸送基準等を定める告示（国土交通省）の定める
臨床検体（カテゴリーB）輸送のための3重包装容器



【 バイオセーフティ 】

32. 感染性病原体を含むのは一部の症例であるとしても、バンキング実務等を行うことによって曝露の可能性が生じる場合は、実務者に対してリスクとなる。したがって、**全ての試料はバイオハザードとして扱う**べきである（L）。

33. バイオバンクの管理者等は、下記文書等を参照し、安全操作マニュアル等を策定し、全実務者がそれらを確実に理解できるよう配慮する（L）。

- 国立感染症研究所病原体等安全規程
- National Cancer Institute Best Practices Biospecimen Resources
- WHO: Biorisk management: laboratory biosecurity guidance
- OECD: Best Practice Guidelines for Biological Resource Centres

34. 実務者等は安全操作マニュアル等をよく読み、これに従って業務を遂行しなければならない。さらに、管理者等は実務者に適切な実習を提供しなければならない（L）。

注: 具体的には、実験室における一般的な安全管理措置に加え、臨床現場におけるのと同様の予防措置を求める。具体的には、作業中手袋とフェースシールド等を着用し、手洗いを励行する。

注: 特に病理医・病理に関わる臨床検査技師の感染リスクが高い結核の感染予防について充分配慮する。

35. 飛沫やエアロゾルによって曝露する可能性がある場合は、国立感染症研究所病原体等安全規程に定めるバイオセーフティレベル2に準じ、試料の容器を開ける際、安全キャビネット内でこれを行う（L）。

36. バイオバンク等の全ての実務者がB型肝炎ワクチン接種等を受けられるようにし、曝露した全ての実務者が曝露後の検査を受け、経過観察され、追跡されるように取りはからわなければならない（L）。

【試料の廃棄】

37. 試料提供者から研究利用への同意の撤回があるときなど、病理凍結組織を廃棄する必要がある場合には、手術等に伴って発生する病理廃棄物（摘出臓器、組織、郭清に伴う皮膚等）と同様に廃棄し、廃棄日・廃棄理由等を管理アプリケーション等に記録する。

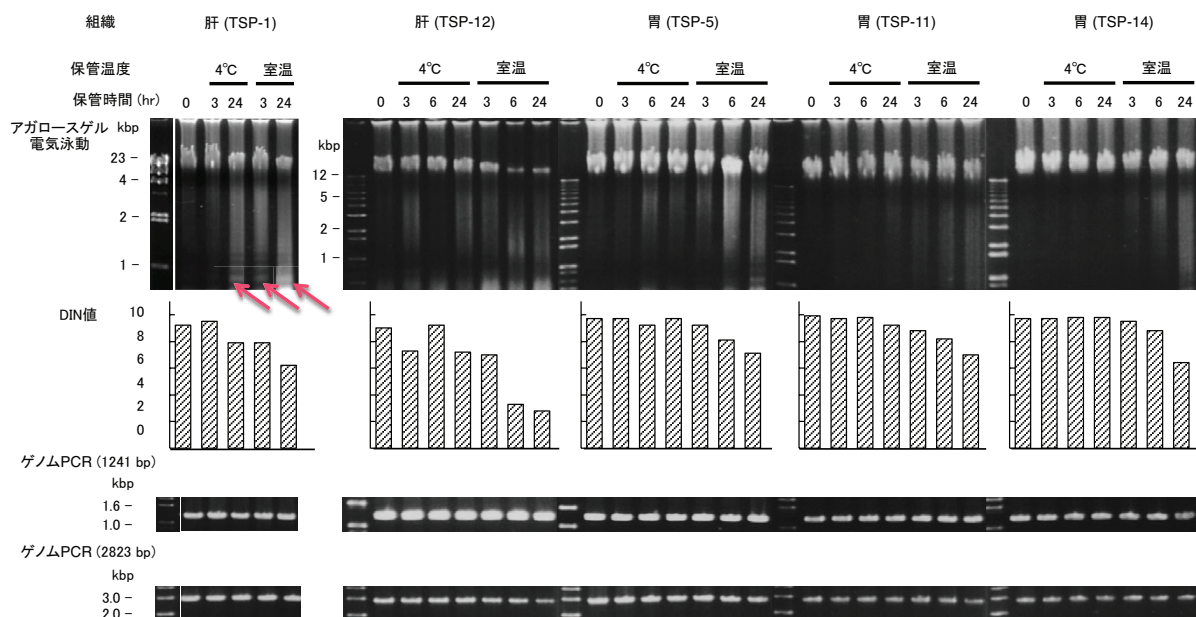
第2部の根拠となる実証解析データ

【実証データ ①】

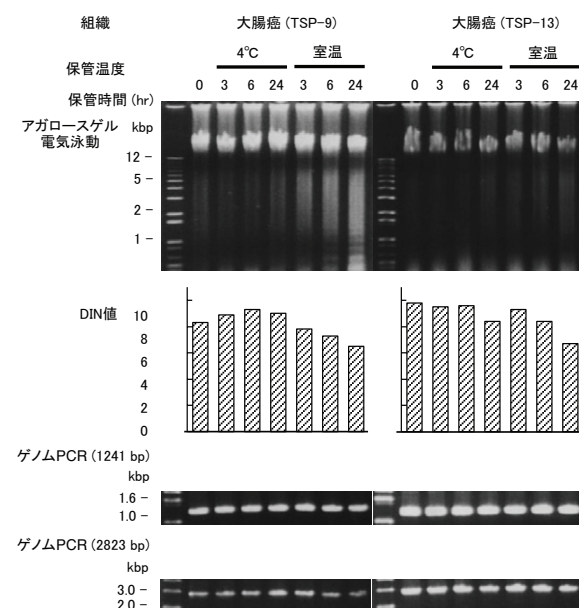
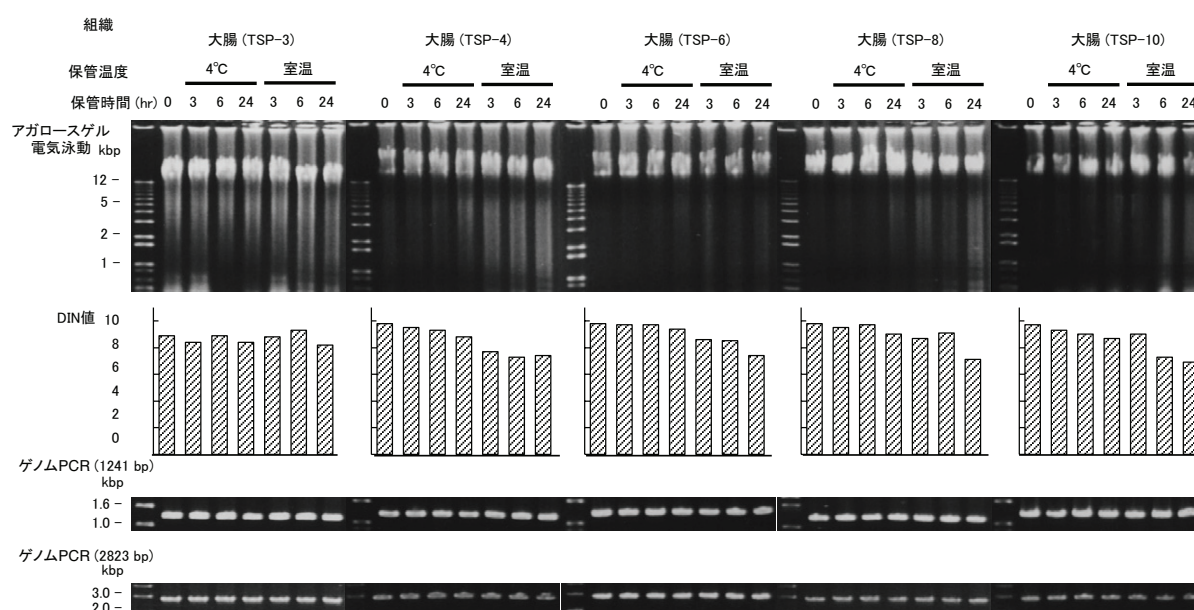
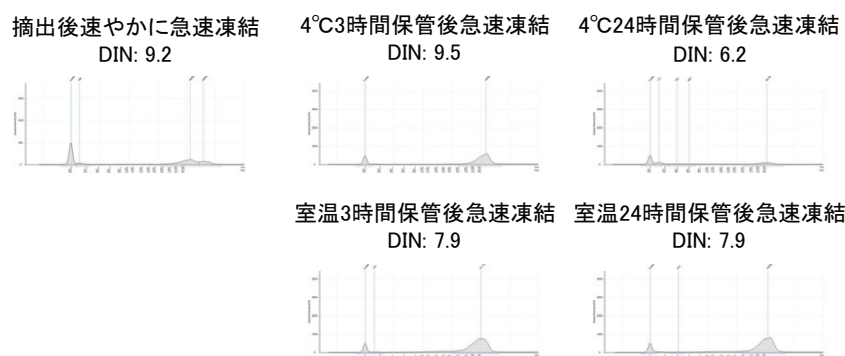
急速凍結までの時間・保管温度のゲノムDNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した2-3mm角ほぼ等大の組織片において、急速凍結までの時間・保管温度を変えたのち(#1-#7)、フェノール・クロロフォルム法でゲノムDNAを抽出し、その品質を比較した。
- 比較する急速凍結までの処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結
 - #2: 4℃ 3時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #3: 4℃ 6時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #4: 4℃ 24時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #5: 室温 3時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #6: 室温 6時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #7: 室温 24時間保管後液体窒素により急速凍結
- DNAの品質評価は、アガロースゲル電気泳動、2200 TapeStation システム(Agilent) によるDNA integrity number(DIN)測定、増幅長1241 bpならびに2823 bpのゲノムPCR反応により行った。

急速凍結までの時間・保管温度のゲノムDNAの品質に対する影響



肝 (TSP-1) におけるDIN値測定



急速凍結までの時間・保管温度のゲノム DNA の品質に対する影響

手技	解析数	収量 (μ g)	A_{260}/A_{280}	DIN	
				平均 $\pm$ 標準偏差	#1 に対する P 値 (Welch- t 検定)*
#1 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結	12	190.0 $\pm$ 104.0	1.87 $\pm$ 0.03	9.5 $\pm$ 0.5	—
#2 4°C 3 時間保管後液体窒素により急速凍結	12	206.5 $\pm$ 173.2	1.88 $\pm$ 0.04	9.2 $\pm$ 0.7	0.350
#3 4°C 6 時間保管後液体窒素により急速凍結	11	196.0 $\pm$ 90.3	1.87 $\pm$ 0.03	9.4 $\pm$ 0.3	0.749
#4 4°C 24 時間保管後液体窒素により急速凍結	12	197.1 $\pm$ 117.5	1.87 $\pm$ 0.03	8.8 $\pm$ 0.7	<u>0.0162</u>
#5 室温 3 時間保管後液体窒素により急速凍結	12	195.2 $\pm$ 106.0	1.89 $\pm$ 0.02	8.5 $\pm$ 0.8	<u>0.00165</u>
#6 室温 6 時間保管後液体窒素により急速凍結	11	164.8 $\pm$ 174.2	1.88 $\pm$ 0.05	7.8 $\pm$ 1.6	<u>0.00277</u>
#7 室温 24 時間保管後液体窒素により急速凍結	12	192.8 $\pm$ 105.6	1.88 $\pm$ 0.03	6.6 $\pm$ 1.3	<u>0.000000600</u>

* $P < 0.05$ のとき下線を付した

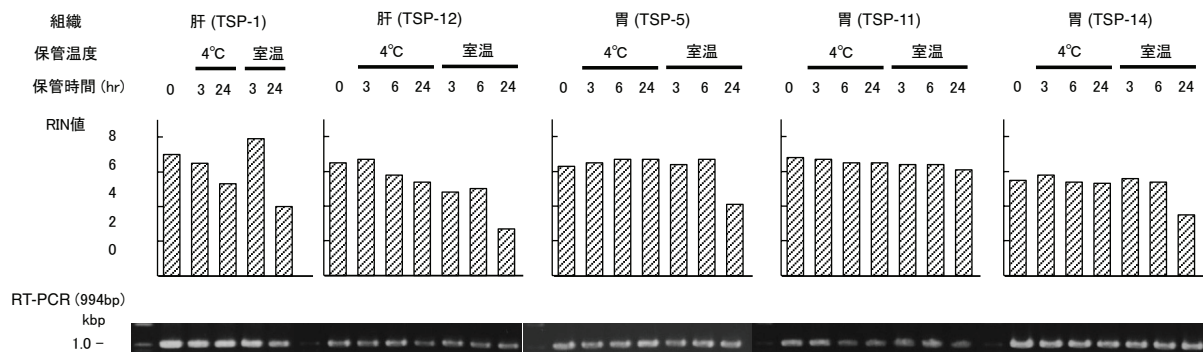
- いずれの処理方法においても、2800 bp 程度の DNA 断片の PCR 増幅が可能であったが、肝 TSP-1 の 4°C 長時間保管ならびに室温保管においては、アガロースゲル上でゲノム DNA の剪断化を認める(→)。
- 肝 TSP-1・TSP-12 においては、急速凍結までの時間・保管温度の差異による DIN 値の低下が顕著である。
- DNA の品質には臓器による差異があることがうかがえる。消化管検体においては、肝に比して 4°C 長時間保管ならびに室温保管による DNA の品質への影響が概して軽度である。
- 但し、検証した全検体における解析でも、4°C 24 時間保管ならびに室温保管により DIN 値の低下は有意であった ($P < 0.05$)。
- 摘出後急速凍結までを可及的に速やかに行うべきであり、直ちに処理が出来ない場合も 4°C 短時間の保管で急速凍結を行うことが望まれる。
- [実証データ①]の限りでは 4°C 6 時間の保管を妨げるものではないが、[実証データ②]において 4°C 6 時間で一部の臓器においては RNA の品質低下が認められるので、4°C 保管 3 時間程度を目安に急速凍結を行うべきと結論した。

[実証データ ②]

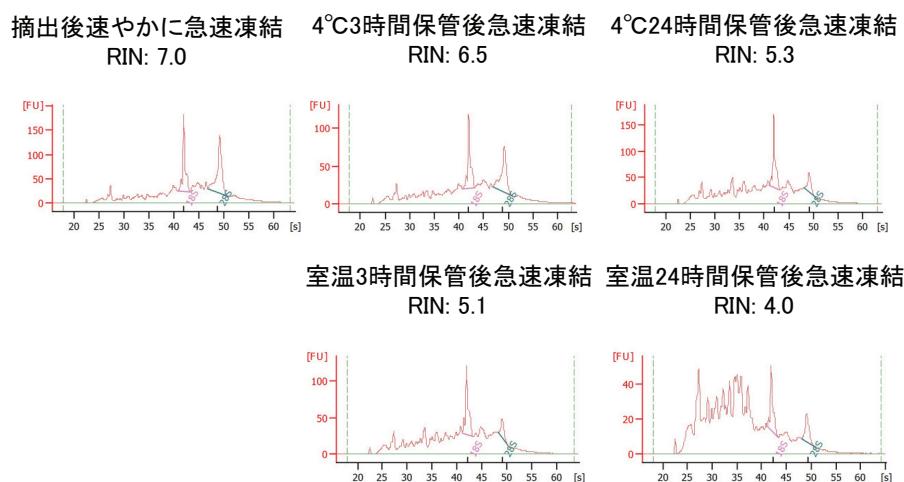
急速凍結までの時間・保管温度のRNAの品質に対する影響

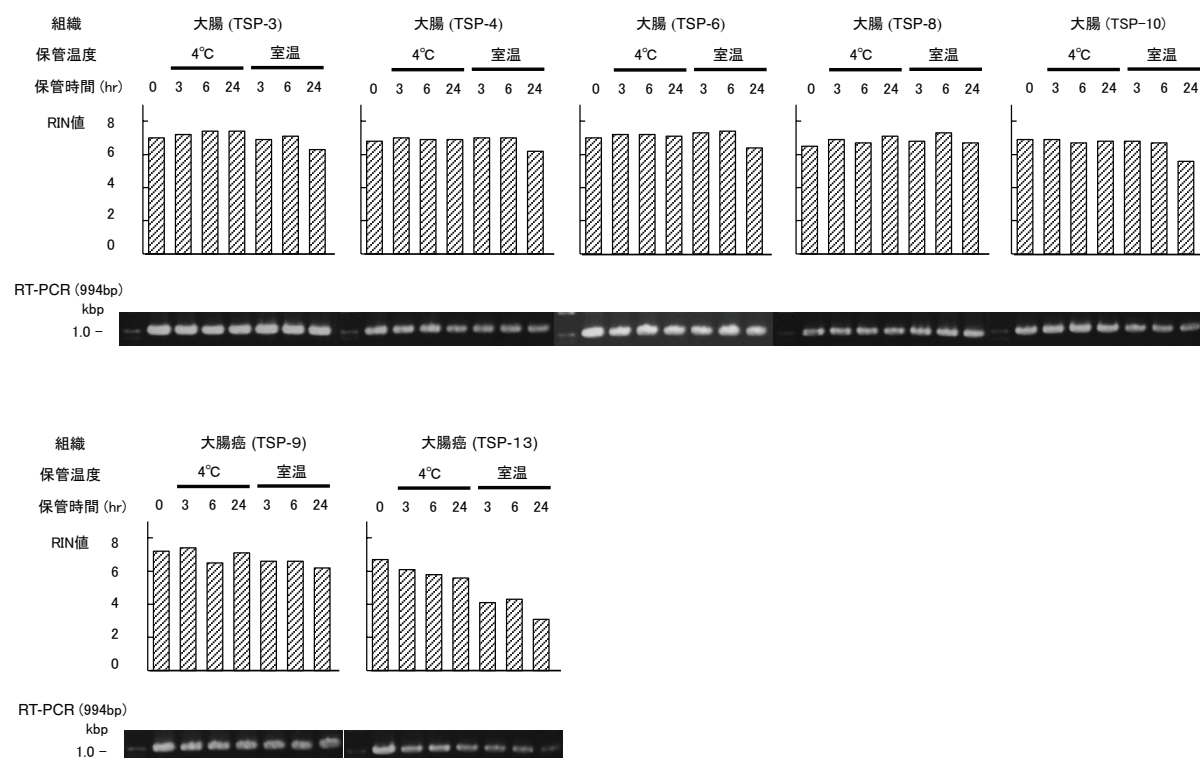
- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した2-3mm角ほぼ等大の組織片において、急速凍結までの時間・保管温度を変えたのち(#1-#7)、TRIzol(Thermo Fisher)により全RNAを抽出し、その品質を比較した。
- 比較する急速凍結までの処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結
 - #2: 4℃ 3時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #3: 4℃ 6時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #4: 4℃ 24時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #5: 室温 3時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #6: 室温 6時間保管後液体窒素により急速凍結
 - #7: 室温 24時間保管後液体窒素により急速凍結
- RNAの品質評価は、2100 Bioanalyzerシステム(Agilent)によるRNA integrity number(RIN)測定、増幅長994 bpの逆転写(RT)-PCR反応により行った。

急速凍結までの時間・保管温度のRNAの品質に対する影響



肝 (TSP-1) におけるRIN値測定





急速凍結までの時間・保管温度の RNA の品質に対する影響

手技	解析数	収量 (μg)	A_{260}/A_{280}	RIN	
				平均 $\pm$ 標準偏差	#1 に対する P 値 (Welch- t 検定)*
#1 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結	12	118.3 $\pm$ 53.0	2.10 $\pm$ 0.07	6.7 $\pm$ 0.5	—
#2 4°C 3 時間保管後液体窒素により急速凍結	12	98.4 $\pm$ 49.0	2.13 $\pm$ 0.14	6.7 $\pm$ 0.5	0.759
#3 4°C 6 時間保管後液体窒素により急速凍結	11	91.5 $\pm$ 36.7	2.12 $\pm$ 0.06	6.5 $\pm$ 0.6	0.445
#4 4°C 24 時間保管後液体窒素により急速凍結	12	101.1 $\pm$ 41.0	2.10 $\pm$ 0.07	6.4 $\pm$ 0.8	0.359
#5 室温 3 時間保管後液体窒素により急速凍結	12	102.6 $\pm$ 47.8	2.11 $\pm$ 0.06	6.2 $\pm$ 1.0	0.129
#6 室温 6 時間保管後液体窒素により急速凍結	11	85.3 $\pm$ 45.1	2.12 $\pm$ 0.14	6.4 $\pm$ 1.0	0.353
#7 室温 24 時間保管後液体窒素により急速凍結	12	81.1 $\pm$ 42.7	2.11 $\pm$ 0.08	5.1 $\pm$ 1.5	<u>0.00312</u>

* $P < 0.05$ のとき下線を付した

- RNAの品質には臓器による差異があることがうかがえる。検討した限りでは消化管特に胃粘膜検体においては、肝に比して4°C長時間保管ならびに室温保管によるRNAの品質への影響が概して軽度である。
- このため、検証した全検体において解析すると、室温で長時間保管しない限りRIN値の低下は有意でない ($P < 0.05$)。
- 但し、肝 TSP-1・TSP-12においては、急速凍結までの時間・保管温度の差異によるRIN値の低下が顕著である。肝 TSP-12・大腸 TSP-9等において4°C保管6時間でRIN値の低下が開始している。
- 多様な臓器の検体の悉皆的収集を行う施設等にあつては、摘出後急速凍結までを可及的に速やかに行うべきであり、直ちに処理が出来ない場合も、4°C保管3時間以内に急速凍結を行うべきであると結論した。

【実証データ ③】

抽出手技のRNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体(種々の臓器)の同一部位(L1-7)より採取した7組の2-3mm角ほぼ等大の組織片において、同一条件(-80℃)で保管後、異なる手技でRNAを抽出し、その品質を比較した。
- RNAの品質評価は、2200 TapeStation システム(Agilent)によるRIN測定により行った。

抽出手技のRNAの品質に対する影響



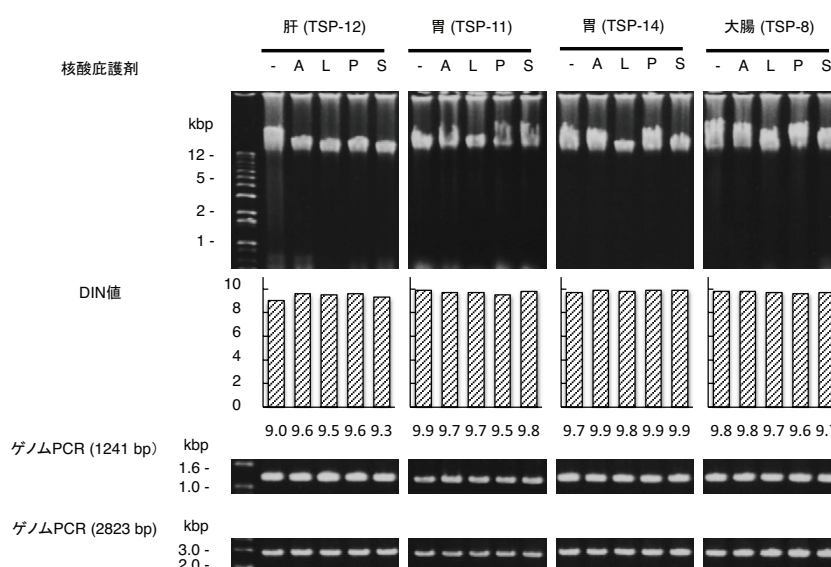
- 同一検体・同一保管条件でも、抽出手技により大きく異なる結果が得られた。自動抽出装置を用いている限りでは、実施可能な解析に制限のある低品質のRNAしか得られない検体L1, L2, L4, L6においても、融解させずに液体窒素中で粉砕することで高品質のRNAが得られた。
- 最終的に得られるRNAの品質は、バイオバンクの採取・保管条件よりも、提供を受けた研究者側の手技に依存する場合がある。バイオバンク業務従事者は、必要に応じて、適切に手技を選択するようバイオバンクユーザーである研究者に注意を喚起すべきである。また、RNAを自ら抽出して研究者に提供しようとするバイオバンクにおいては、適切な手技を選択しなければならない。

【実証データ ④】

核酸底護剤のゲノムDNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した2-3mm角ほぼ等大の組織片において、各種核酸底護剤に浸漬して液体窒素中で一定期間保管後、フェノール・クロロフォルム法でゲノムDNAを抽出し、その品質を比較した。
- 比較する処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに核酸底護剤を用いず液体窒素により急速凍結
 - #8: 摘出後速やかに核酸底護剤Aに浸漬して液体窒素により急速凍結
 - #9: 摘出後速やかに核酸底護剤Lに浸漬して液体窒素により急速凍結
 - #10: 摘出後速やかに核酸底護剤Pに浸漬して液体窒素により急速凍結
 - #11: 摘出後速やかに核酸底護剤Sに浸漬して液体窒素により急速凍結
- DNAの品質評価は、アガロースゲル電気泳動、Agilent 2200 TapeStationシステムによるDIN測定、増幅長1241 bpならびに2823 bpのゲノムPCR反応により行った。

核酸底護剤のゲノムDNAの品質に対する影響



手技	解析数	収量 (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	DIN	
				平均 ± 標準偏差	#1 に対する P 値 (Welch-t 検定)
#1	12	190.0 ± 104.0	1.87 ± 0.03	9.5 ± 0.5	-
#8	4	361.7 ± 186.6	1.90 ± 0.05	9.8 ± 0.1	0.0958
#9	4	197.9 ± 112.7	1.93 ± 0.06	9.7 ± 0.1	0.208
#10	4	308.0 ± 70.2	1.90 ± 0.07	9.7 ± 0.2	0.494
#11	4	304.8 ± 103.7	1.93 ± 0.06	9.7 ± 0.3	0.447

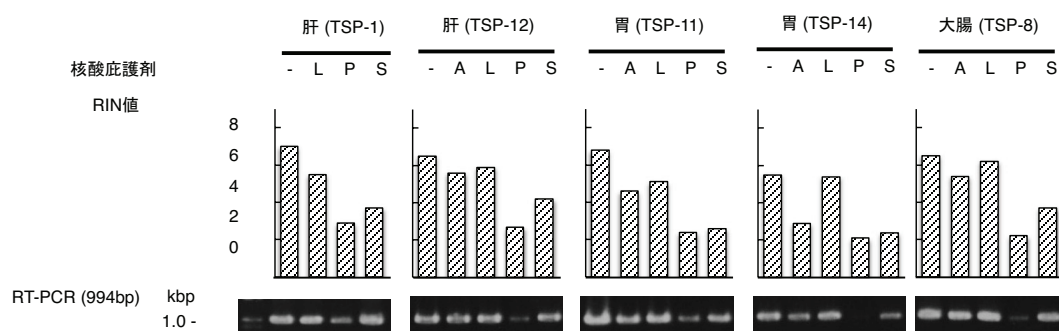
- 核酸底護剤中で凍結した組織を核酸抽出手技に供した場合、DNAの品質は概して影響を受けない。

【実証データ ⑤】

核酸底護剤のRNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した2-3mm角ほぼ等大の組織片において、各種核酸底護剤に浸漬して液体窒素中で一定期間保管後、TRIzol(Thermo Fisher)により全RNAを抽出し、その品質を比較した。
- 比較する処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに核酸底護剤を用いず液体窒素により急速凍結
 - #8: 摘出後速やかに核酸底護剤Aに浸漬して液体窒素により急速凍結
 - #9: 摘出後速やかに核酸底護剤Lに浸漬して液体窒素により急速凍結
 - #10: 摘出後速やかに核酸底護剤Pに浸漬して液体窒素により急速凍結
 - #11: 摘出後速やかに核酸底護剤Sに浸漬して液体窒素により急速凍結
- RNAの品質評価は、2100 Bioanalyzerシステム(Agilent)によるRIN測定、増幅長994 bpのRT-PCR反応により行った。

核酸底護剤のRNAの品質に対する影響



手技	解析数	収量 (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RIN	
				平均±標準偏差	#1に対するP値 (Welch-t検定)*
#1 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結	12	190.0±104.0	1.87±0.03	9.5±0.5	-
#8 摘出後速やかに核酸底護剤Aに浸漬して液体窒素により急速凍結	4	96.0±44.0	2.08±0.05	4.6±1.2	0.0409
#9 摘出後速やかに核酸底護剤Lに浸漬して液体窒素により急速凍結	5	98.8±41.3	2.08±0.04	5.6±0.4	0.000455
#10 摘出後速やかに核酸底護剤Pに浸漬して液体窒素により急速凍結	5	69.3±45.6	2.08±0.03	2.5±0.3	0.0000000000852
#11 摘出後速やかに核酸底護剤Sに浸漬して液体窒素により急速凍結	5	88.1±37.5	2.07±0.05	3.3±0.8	0.000233

*P<0.05 のとき下線を付した

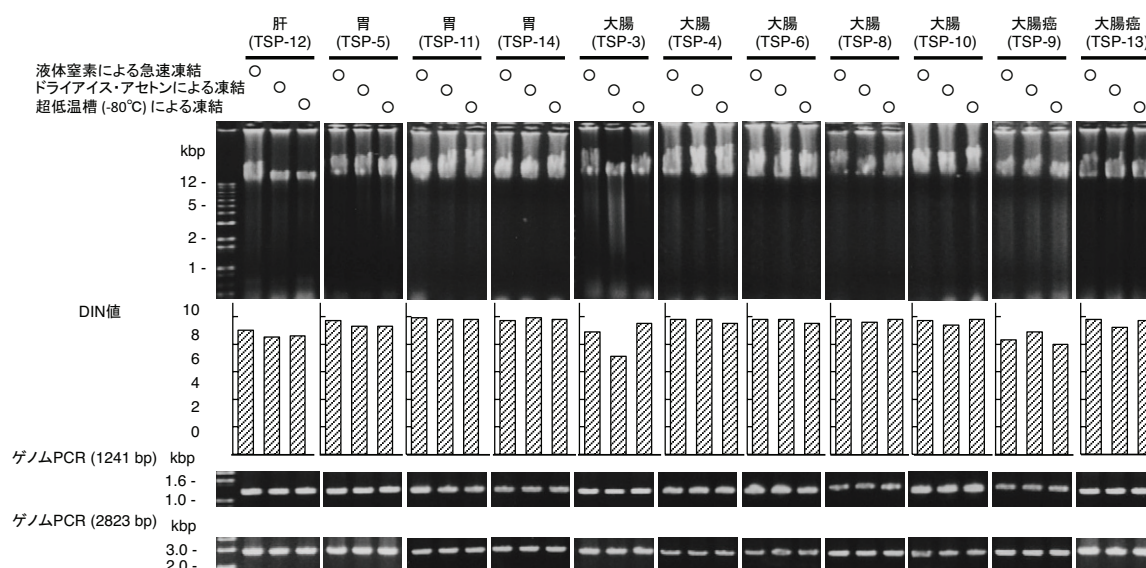
- 核酸底護剤の種別により、RNAに対する効果にはかなりのばらつきがある。
- 核酸底護剤中で凍結した組織を核酸抽出手技に供した場合、核酸底護剤を用いずに凍結した組織から核酸を抽出する場合に比して、核酸底護剤の融解を待つ工程が増える等するため、抽出したRNAの品質がかえって低下する場合がある。

【実証データ ⑥】

凍結方法のゲノムDNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した2-3mm角ほぼ等大の組織片において、凍結方法を変えて一定期間保管後、フェノール・クロロフォルム法でゲノムDNAを抽出し、その品質を比較した。
- 比較する処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに組織検体を取めたチューブを液体窒素に浸漬して急速凍結
 - #12: 摘出後速やかに組織検体を取めたチューブをドライアイス・アセトンに浸漬して凍結
 - #13: 摘出後速やかに組織検体を取めたチューブを超低温槽(-80℃)に凍結保管
- DNAの品質評価は、アガロースゲル電気泳動、2200 TapeStation システム(Agilent)によるDIN測定、増幅長1241 bpならびに2823 bpのゲノムPCR反応により行った。

凍結方法のゲノムDNAの品質に対する影響



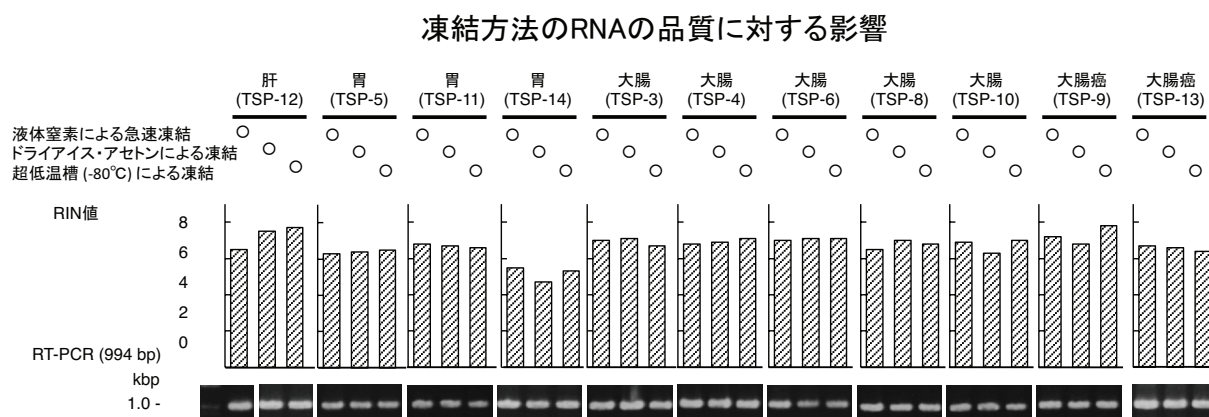
	手技	解析数	収量 (μg)	A_{260}/A_{280}	DIN	
					平均±標準偏差	#1に対するP値 (Welch-t検定)
#1	摘出後速やかに液体窒素により急速凍結	12	190.0±104.0	1.87±0.03	9.5±0.5	—
#12	摘出後速やかにドライアイス・アセトンにより凍結	11	162.3±79.3	1.87±0.03	9.2±0.8	0.370
#13	摘出後速やかに超低温槽(-80℃)に凍結保管	11	158.1±65.8	1.89±0.04	9.4±0.6	0.866

- 液体窒素に替えてドライアイス・アセトン等で凍結を行った場合でも、解析に供するまでの保管期間が短期であれば、DNAの品質に顕著な影響はない。

【実証データ ⑦】

凍結方法のRNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した2-3mm角ほぼ等大の組織片において、凍結方法を変えて一定期間保管後、TRIzol(Thermo Fisher)により全RNAを抽出し、その品質を比較した。
- 比較する処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに組織検体を取めたチューブを液体窒素に浸漬して急速凍結
 - #12: 摘出後速やかに組織検体を取めたチューブをドライアイス・アセトンに浸漬して凍結
 - #13: 摘出後速やかに組織検体を取めたチューブを超低温槽(-80℃)に凍結保管
- RNAの品質評価は、2100 Bioanalyzerシステム(Agilent)によるRIN測定、増幅長994 bpのRT-PCR反応により行った。



手技	解析数	収量 (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RIN	
				平均±標準偏差	#1に対するP値 (Welch-t検定)
#1 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結	12	190.0±104.0	1.87±0.03	9.5±0.5	—
#12 摘出後速やかにドライアイス・アセトンにより凍結	11	77.9±45.5	2.11±0.07	6.6±0.7	0.881
#13 摘出後速やかに超低温槽(-80℃)に凍結保管	11	87.3±53.0	2.10±0.08	6.8±0.7	0.577

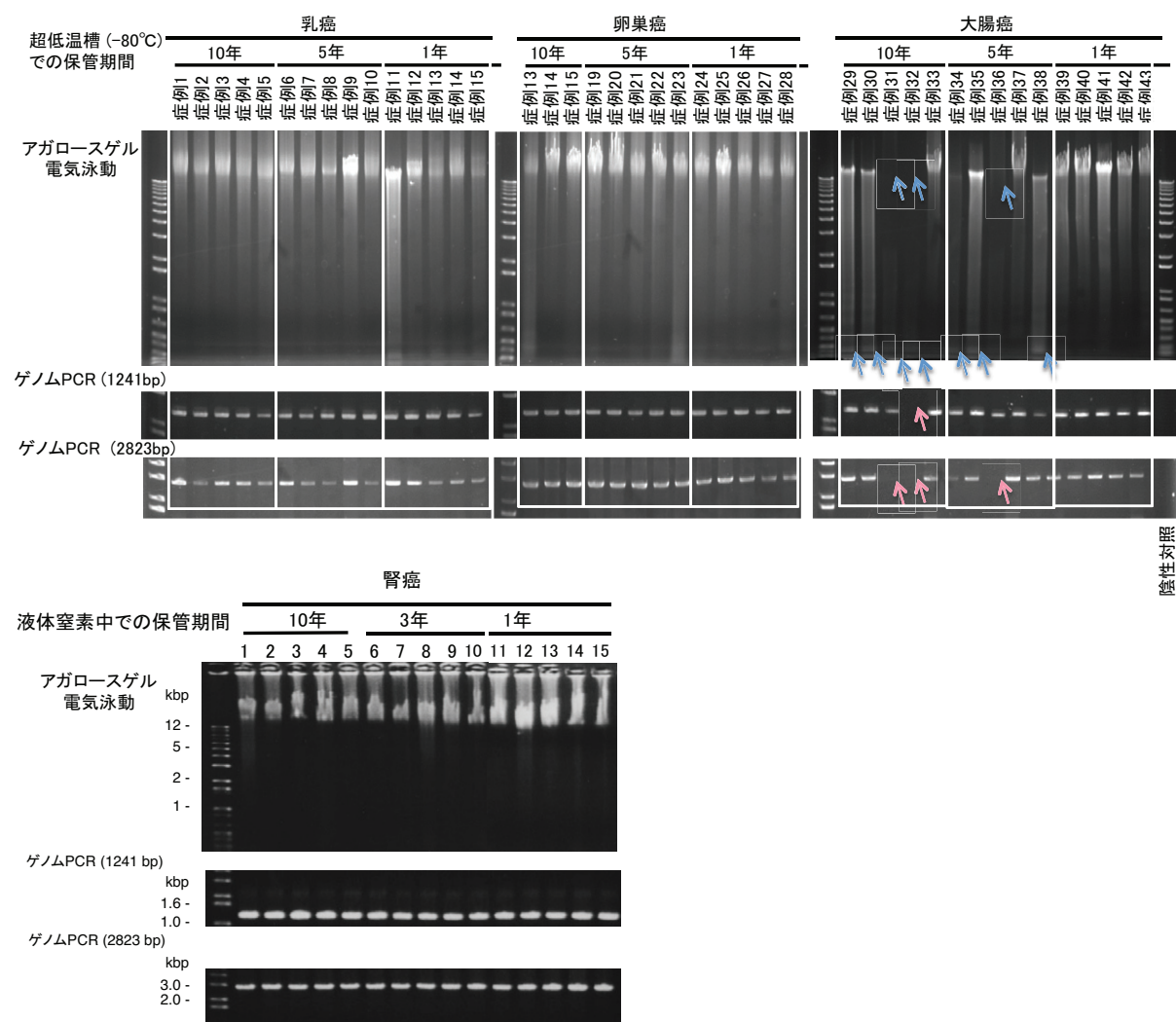
- 液体窒素に替えてドライアイス・アセトン等で凍結を行った場合でも、解析に供するまでの保管期間が短期であれば、RNAの品質に顕著な影響はない。

【実証データ ⑧】

長期保管温度のゲノムDNAの品質に対する影響

- 超低温槽(-80℃)ならびに液体窒素保存容器(-180℃)において長期保管した検体から、ZR-Duet™ DNA/RNA MiniPrep(Zymo Research)ならびにフェノール・クロロフォルム法でゲノムDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動、増幅長 1241 bp ならびに 2823 bp のゲノム PCR 反応により DNA の品質評価を行った。

長期保管温度のゲノムDNAの品質に対する影響

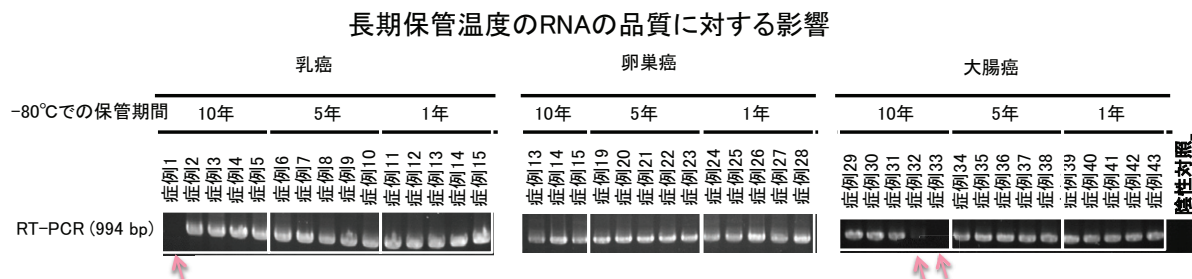


- 超低温槽(-80℃)における長期保管(5-10年)を行った一部の検体で、高分子量DNAを表すバンドが消失してゲノムDNAの剪断化を認め(青矢印)、増幅長 1241 bp ないし 2823 bp のPCRで増幅が見られない(赤矢印)。
- これに対し液体窒素における長期保管では、同様の剪断化ならびにPCR failureはまれである。
- -80℃保管によりDNAの品質が低下する可能性が考慮されるので、特に長期に保管した検体を用いようとする場合は、核酸の品質を充分検証してから解析を行うことが望ましい。

【実証データ ⑨】

長期保管温度のRNAの品質に対する影響

- 超低温槽(-80℃)ならびに液体窒素保存容器(-180℃)において長期保管した検体からZR-Duet™DNA/RNA MiniPrep(Zymo Research)ならびにTRIzol(Thermo Fisher)により全RNAを抽出し、2100 Bioanalyzer システム(Agilent) によるRIN 測定、増幅長994 bpのRT-PCR 反応によりRNAの品質評価を行った。



- 超低温槽(-80℃)における長期保管(10年)を行った一部の検体で、増幅長994 bpのRT-PCRで増幅が見られない(赤矢印)。これに対し液体窒素における長期保管では、同様のPCR failureはまれである。

長期保管温度のRNAの品質に対する影響

保管温度	臓器	保管期間	解析数	RIN 値	
				平均±標準偏差	保存期間1年に対する P値 (Welch-t検定)*
-80℃	乳腺	1年	5	8.0±0.5	—
		5年	5	7.9±0.4	0.793
		10年	5	5.0±2.9	0.0875
	卵巣	1年	5	7.3±0.6	—
		5年	5	6.8±2.2	0.620
		10年	3	5.4±3.4	0.419
	大腸	1年	5	7.9±1.0	—
		5年	5	6.2±2.0	0.127
		10年	5	4.4±2.3	<u>0.0253</u>
-180℃	腎	1年	11	7.4±1.9	—
		5年	2	7.1	0.860
		10年	12	6.8±0.8	0.444

* $P < 0.05$ のとき下線を付した

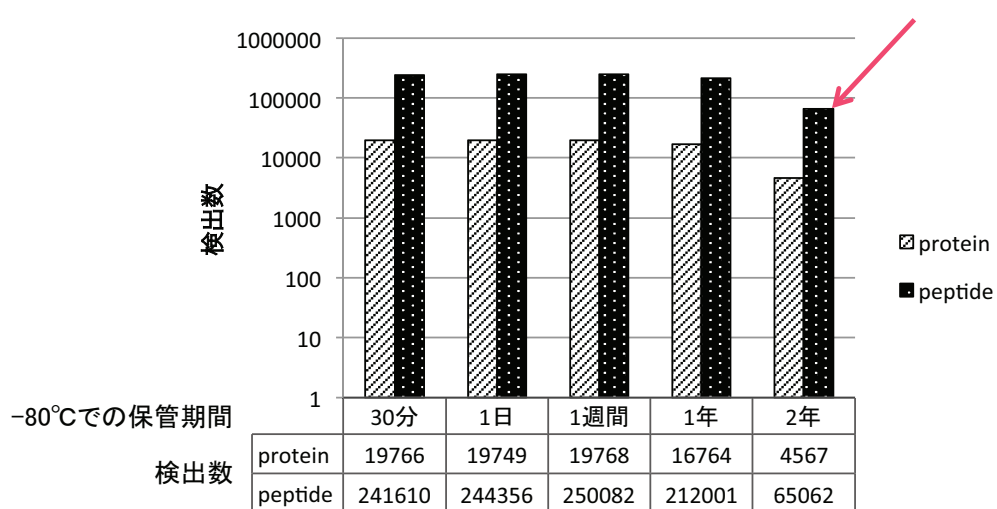
- 同一症例から得られた検体の比較ではないが、超低温槽(-80℃)における長期保管(10年)を行った検体ではRIN値が低い傾向を認めた。液体窒素(-180℃)における長期保管では、同様の傾向を認めない。
- -80℃保管によりRNAの品質が低下する可能性が考慮されるので、特に長期に保管した検体を用いようとする場合は、核酸の品質を充分検証してから解析を行うことが望ましい。

【実証データ ⑩】

超低温槽(-80℃)における保管のタンパク質の品質に対する影響

- 超低温槽(-80℃)において最大2年間保管した肝臓組織に、組織1g当たり3mlのプロテアーゼインヒビターを含むRIPA bufferを加え組織の分散・破碎を行った。さらにサンプルを常法によりゲル化、洗浄、脱水、還元処理、トリプシン消化後、liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry(LC/ESI-QTOF MS)によるプロテオーム解析を行った。

長期保管のプロテオーム解析に対する影響

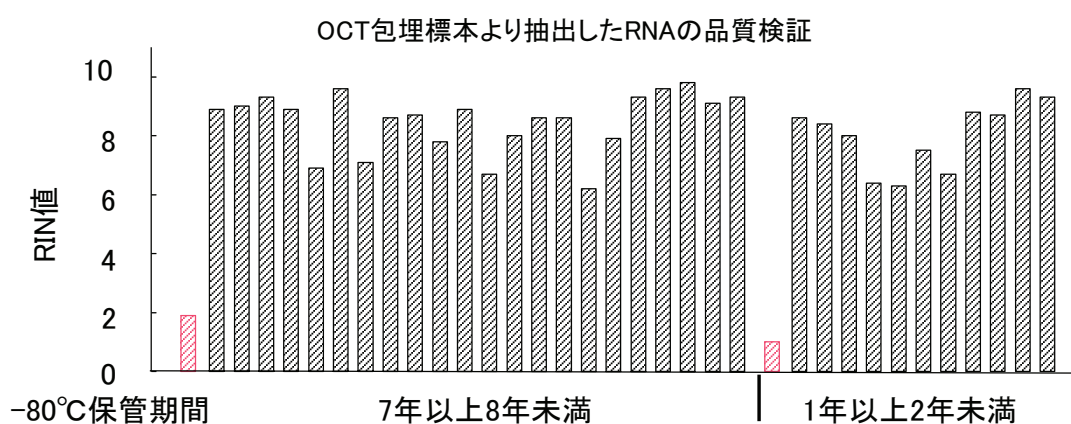


- -80℃保管で2年以上経過すると、検出タンパク質数・ペプチド数が減少することがわかった。
- これに対し液体窒素における長期保管では、同様のプロテオーム解析の障害はまれである。
- -80℃保管によりタンパク質の品質が低下する可能性が考慮されるので、特に長期に保管した検体を用いようとする場合は、タンパク質の品質を充分検証してから解析を行うことが望ましい。

【実証データ ⑪】

OCT包埋標本より抽出したRNAの品質

- 胆道癌連続手術検体よりOCT包埋標本を作製して超低温槽(-80℃)に長期保管し、薄切して常法により全RNAを抽出し、2100 Bioanalyzer システム(Agilent)によりRIN値を測定した。



■ :乾燥等により極端に品質が低い検体(保管期間が短くても、乾燥等の影響で出現する)
■ :極端に品質が低い検体を排除し、RIN値6.0以上の検体を以後の解析に供した

- 同一保管期間であっても、極端にRIN値の低い検体が散見され(赤)、超低温槽内での乾燥等の影響と考えられた。パラフィルム等で嚴重に包装し密閉性の高い容器に収納する等、OCT包埋標本の乾燥を防ぐことが肝要と考えられた。
- 乾燥した標本等を回避し、RIN値6.0以上の215検体を以後の解析に供した。解析に供した215検体に限ってみると、保管期間とRNAの品質の関係は以下の通り。

OCT 包埋標本の超低温槽 (-80℃)における保管期間と RNA の品質				
保管期間	解 析 数	A_{260}/A_{280}	RIN 値	
			平均±標準偏差	保存期間 1 年未満に対する P 値 (Welch- <i>t</i> 検定)
1 年未満	18	2.05±0.06	8.1±0.5	—
1 年以上 2 年未満	11	2.03±0.16	8.0±1.2	0.789
2 年以上 3 年未満	20	2.11±0.13	8.5±0.8	0.0848
3 年以上 4 年未満	21	2.04±0.11	8.4±0.9	0.291
4 年以上 5 年未満	13	2.05±0.22	8.6±0.9	0.0752
5 年以上 6 年未満	27	2.05±0.08	8.0±1.1	0.534
6 年以上 7 年未満	26	2.04±0.08	8.5±0.9	0.0957
7 年以上 8 年未満	22	2.08±0.07	8.5±1.0	0.148
8 年以上 9 年未満	21	2.06±0.07	7.9±0.9	0.396
9 年以上 10 年未満	30	2.07±0.07	8.0±1.0	0.507

- 乾燥等によりした極端にRIN値の低い検体を回避すれば、良好な品質のRNAを抽出することができ、超低温槽(-80℃)における長期保管によっても顕著な品質の低下は見られない。

【実証データ ⑫】

At a glanceの癌細胞(癌細胞)含有率評価の意義

- 非小細胞肺癌10検体のHE染色標本において、病理医が低倍率at a glanceで10%未満、10%以上20%未満、以後10%毎というように癌細胞含有率を評価した。同一標本より抽出したゲノムDNAを用いTruSeq Cancer Panel(Illumina)を用いて得られたリード深度と変異アリル頻度の解釈に、at a glanceで評価した癌細胞含有率データが有用であった例を示す。

アンプリコンシーケンシング		病理医の at a glance の評価による腫瘍細胞の割合 (%)	結果の解釈
リード深度	変異アリル 頻度 (%)		
45989	48.76	90	癌細胞含有率 $\times 0.5$ = 変異アリル頻度 → 片アリルに変異か?
3560	50.22	80	癌細胞含有率 $\times 0.5$ = 変異アリル頻度 → 片アリルに変異か?
2321	59.11	80	癌細胞含有率 $\times 0.5$ = 変異アリル頻度 → 片アリルに変異か?
17684	53.15	90	癌細胞含有率 $\times 0.5$ = 変異アリル頻度 → 片アリルに変異か?
6309	3.53	10	癌細胞含有率 $\times 0.5$ = 変異アリル頻度 → 片アリルに変異か?
5113	54.57	30	癌細胞含有率から想定される変異アリル頻度と異なり概ね50% → ヘテロ接合体あるいは生殖細胞系列変異
133	11.28	80	変異アリル頻度と癌細胞含有率が合わない → リード深度も浅く artifact があるいは heterogeneity
5279	83.16	80	癌細胞含有率 = 変異アリル頻度 → 両アリルに変異か?
8335	51.22	20	癌細胞含有率から想定される変異アリル頻度と異なり概ね50% → ヘテロ接合体あるいは生殖細胞系列変異
14506	9.27	80	変異アリル頻度と癌細胞含有率が合わない → heterogeneity か?

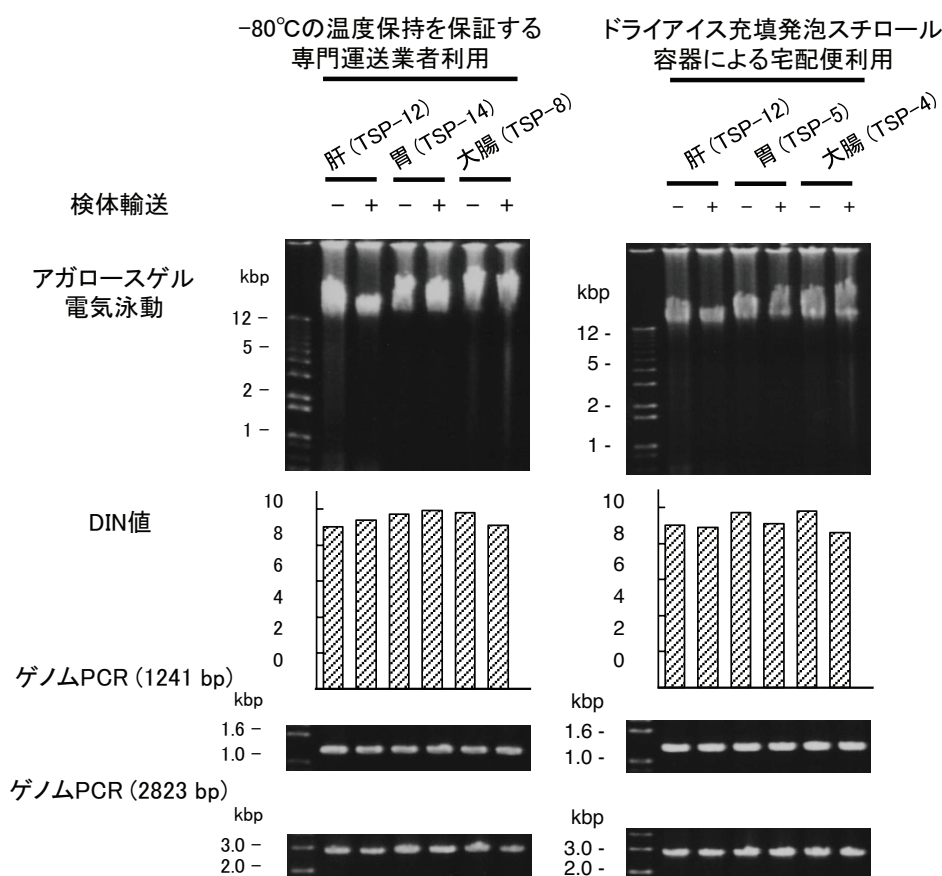
- 癌細胞数・全細胞数をカウンターを用いて計測することなく、低倍率at a glanceで評価しても充分有益な知見が得られる場合がある。

[実証データ ⑬]

検体輸送方法のゲノムDNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した2-3mm角ほぼ等大の組織片を、速やかに液体窒素により急速凍結し液体窒素中に一定期間保管した後、輸送方法を変えて検体を輸送し、フェノール・クロロフォルム法によりゲノムDNAを抽出して、その品質を比較した。
- 比較する処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、輸送なし
 - #14: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、-80℃等の温度保持を保証し温度記録用のチップを内蔵した移送容器等を用いる専門運送業者により2日間輸送
 - #15: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、ドライアイス充填した発泡スチロール容器を用いて宅配便により2日間輸送
- ゲノムDNAの抽出ならびに品質評価は同一実験室で同一実験者が行った。DNAの品質評価は、アガロースゲル電気泳動、2200 TapeStation システム(Agilent)によるDIN測定、増幅長1241 bpならびに2823 bpのゲノムPCR反応により行った。

輸送方法のゲノムDNAの品質に対する影響



検体輸送方法のゲノム DNA の品質に対する影響

	手技	解析数	収量 (μg)	A_{260}/A_{280}	DIN	
					平均 $\pm$ 標準偏差	#1 に対する P 値 (Welch- t 検定)
#1	摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、輸送なし	12	190.0 $\pm$ 104.0	1.87 $\pm$ 0.03	9.5 $\pm$ 0.5	—
#14	摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、 -80°C を保持して2日間輸送	3	260.7 $\pm$ 119.2	1.89 $\pm$ 0.03	9.5 $\pm$ 0.4	1.00
#15	摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、ドライアイス充填発泡スチロール容器を用いて宅配便により2日間輸送	3	269.7 $\pm$ 157.5	1.92 $\pm$ 0.02	8.9 $\pm$ 0.3	0.0705

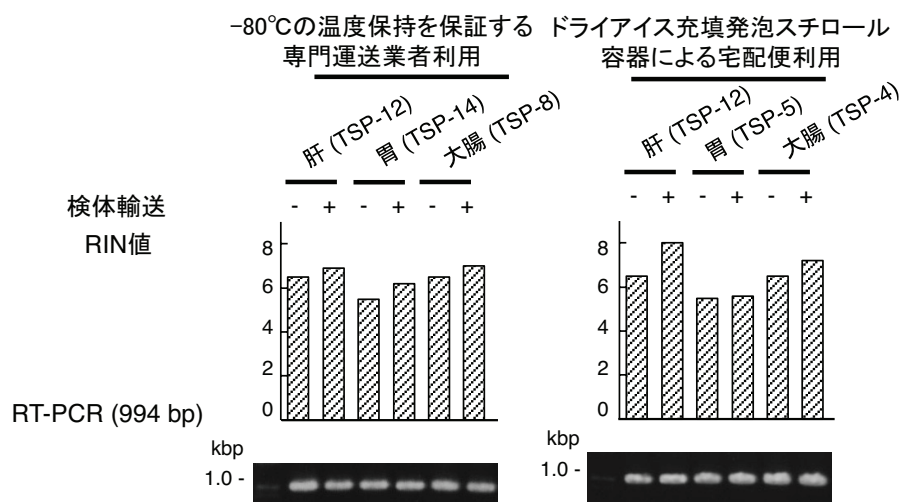
- 輸送前の採取・保管方法が適切であれば、検体輸送方法はゲノム DNA の品質に顕著な影響を与えない。

[実証データ ⑭]

検体輸送方法のRNAの品質に対する影響

- 同一症例手術検体の同一部位(非癌部)より採取した2-3mm角ほぼ等大の組織片を、速やかに液体窒素により急速凍結し液体窒素中に一定期間保管した後、輸送方法を変えて検体を輸送し、TRIzol (Thermo Fisher)により全RNAを抽出し、その品質を比較した。
- 比較する処理方法は以下のとおり。
 - #1: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、輸送なし
 - #14: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、-80℃等の温度保持を保証し温度記録用のチップを内蔵した移送容器等を用いる専門運送業者により2日間輸送
 - #15: 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、ドライアイス充填発泡スチロール容器を用いて宅配便により2日間輸送
- 全RNAの抽出ならびに品質評価は同一実験室で同一実験者が行った。RNA品質評価は、2100 Bioanalyzer システム(Agilent)によるRIN測定、増幅長994 bpのRT-PCR反応により行った。

輸送方法のRNAの品質に対する影響



検体輸送方法の RNA の品質に対する影響

手技	解析数	収量 (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	RIN	
				平均±標準偏差	#1に対するP値 (Welch-t検定)
#1 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、輸送なし	12	190.0±104.0	1.87±0.03	9.5±0.5	-
#14 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、-80℃を保持して2日間輸送	3	123.9±18.1	2.10±0.01	6.7±0.4	0.955
#15 摘出後速やかに液体窒素により急速凍結、ドライアイス充填発泡スチロール容器を用いて宅配便により2日間輸送	3	36.6±38.8	2.07±0.03	6.9±1.2	0.759

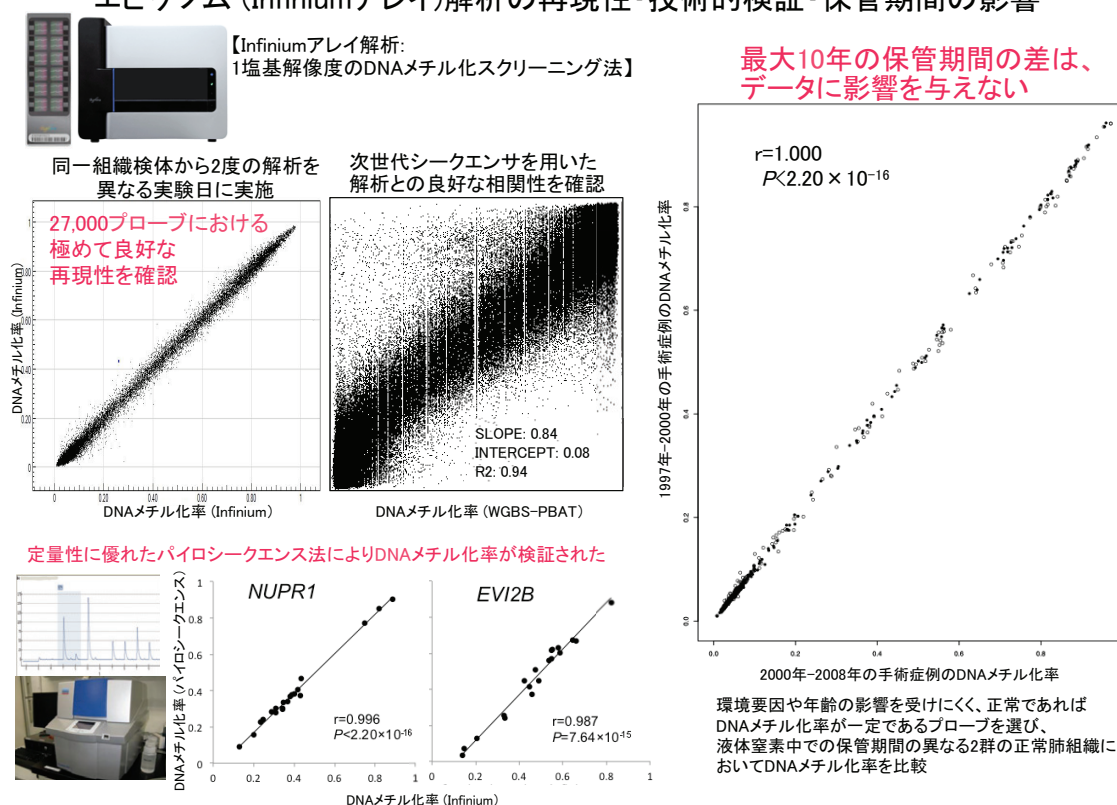
- 輸送前の採取・保管方法が適切であれば、検体輸送方法はRNAの品質に顕著な影響を与えない。

【参考データ ①】

本規程にEならびにAで示した手技を用いて採取・保管した組織検体におけるエピゲノム解析例

- 諸臓器がんの病理組織検体において、Infinium Human Methylation Array(Illumina)を用いて、ゲノム網羅的DNAメチル化解析を実施した。

エピゲノム (Infiniumアレイ)解析の再現性・技術的検証・保管期間の影響



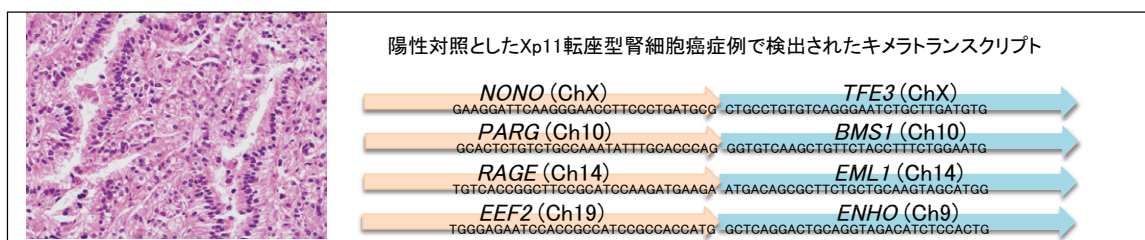
- Infinium 解析の再現性・信頼性が示され、長期保管がエピゲノムデータに影響を与えないことがゲノム網羅的解析で検証された。
- 諸臓器がんそれぞれにおいて、発癌要因や臨床病理像とよく相関する症例の層別化・病態診断マーカー開発・エピゲノム異常で発現制御される治療標的候補同定に到った。
(Pathol Int 74:167-186, 2024. doi: 10.1111/pin.13418. 等)
- 本規程にEならびにAで示した手技を用いて採取・保管した組織検体を用い、信頼性の高い解析を実施することができ、また新規知見を得ることが出来る。

【参考データ ②】

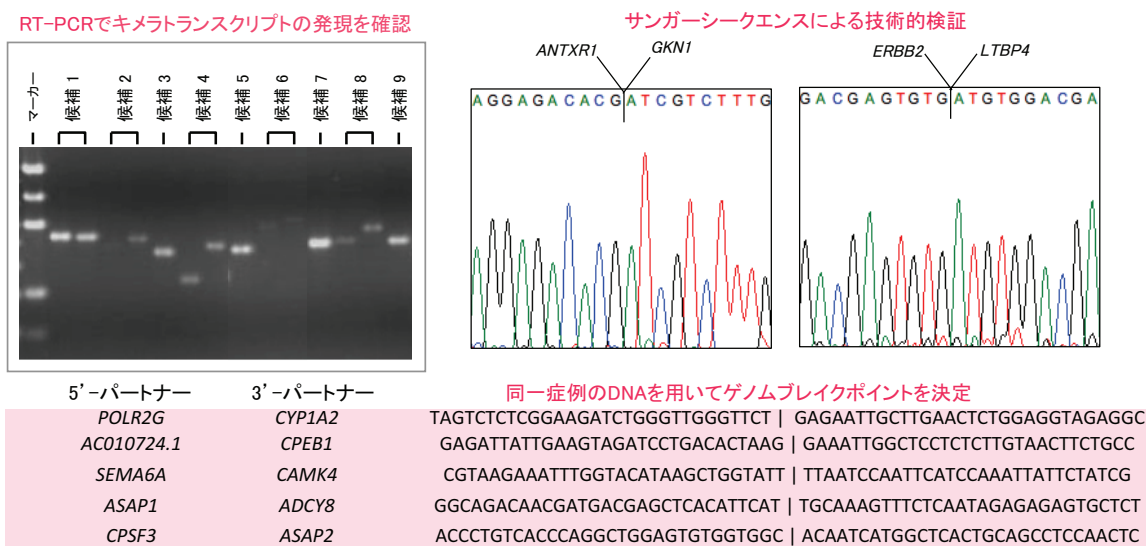
本規程にEならびにAで示した手技を用いて採取・保管した組織検体におけるトランスクリプトーム解析例

- 腎細胞癌 に対する腎摘除術標本の癌部・非癌部より採取し液体窒素中に保管した検体において、RNA-シーケンシングを行った。

次世代シーケンサを用いたRNA-シーケンシングの例



腎淡明細胞癌68症例において、合計26個の新規キメラ転写物を同定



- 陽性対照としたXp11転座型腎細胞癌において、既に報告されているTFE3を含むキメラトランスクリプトが確かに確認され、加えて新規のキメラトランスクリプトも検出された。
- 腎淡明細胞癌症例において、合計26個の新規キメラ転写物を同定し、ゲノムブレイクポイントを確認して、キメラ転写物生成の臨床病理学的意義を明らかにした。
- 本規程にEならびにAで示した手技を用いて採取・保管した組織検体を用い、信頼性の高い解析を実施することができ、また新規知見を得ることが出来る。

ホルマリン固定パラフィン包埋標本の 適切な作製・保管方法

DNA・RNA・タンパク質等の変性を最小限にし、高い品質を保持して長期の保管を可能にし、将来に亘って広汎な解析に供せるよう汎用性を最大にすることを目指し、ルーチンの病理診断に加え、ゲノム研究等にも供し得るホルマリン固定パラフィン包埋標本の適切な作製方法を以下に定める。

手術検体・生検検体のホルマリン固定パラフィン包埋標本は、主としてルーチンの病理診断のために作製される。特に研究に供する目的でルーチンとは別にパラフィン包埋標本作製する施設においても、手術検体の固定・切り出し等の工程はルーチンの取り扱いと不可分である。よって、各施設において病理診断のためにホルマリン固定パラフィン包埋標本作製する常法を尊重する一方で、可能な限り本規程の推奨する事項を盛り込むことを求める。

凡例

- (E): (A) よりもさらに高い品質等が期待できる場合があるが、作業量が過大である等のため、必須
とは言いがたい事項
- (A): 推奨される事項
- (B): (A) が実施不可能である場合に次に推奨される事項
- (N): 回避すべき事項
- (L): 法令等により規定されている事項

【摘出から固定まで】

1. 摘出後は可及的に速やかに固定液に浸漬し、固定を行う（A）。
2. 直ちに固定の行えない施設にあっても、摘出臓器は冷蔵庫（4℃）等に保管し、3時間程度以内に固定を行うことが望ましい（B）。[実証データ ①]

注: 摘出臓器を30分以上室温で保持することは極力回避する（N）。

3. 固定不良は回避しなければならない（N）。

注: 固定不良はDNA・RNA・タンパク質の質を極端に低下させる。

注: 一般的な固定液であるホルマリンの浸透速度は1mm/時間程度であることを考慮し、必要な固定時間を確保する必要がある。固定前に、切り出しまでに十分な固定が行える程度の厚みまで、適切に入割することが必要である（A）。

【固定液の濃度と種類】

4 非緩衝(酸性ホルマリン溶液)ではなく、**中性緩衝ホルマリン溶液**を固定に用いることが望ましい (A)。[実証データ ①・②]

5. DNAを抽出して遺伝子変異解析を行うこと等を主眼に考える場合は、20%ホルマリン (7%ホルムアルデヒド)よりも、**10%ホルマリン** (3.5%ホルムアルデヒド)を固定に用いることが望ましい (A)。[実証データ ①・②]

注: 但し、RNAを用いた解析のためには、20%ホルマリン (7%ホルムアルデヒド)を用いる等して、DNAを用いた解析の至適条件に比してより充分な固定を行う方が、恐らくRNaseが完全に失活する等するため、良好な解析結果が得られる場合がある。[実証データ ③]

従って、試料利活用研究の目的に応じて、固定条件を選択すべきである。

注: ホルマリンを含まない組織固定液が複数種開発され、市販されている。組織学的観察に充分耐え [実証データ ④]、核酸・タンパク質等の保存にすぐれることが確認されている市販品もある。 [実証データ ⑤・⑥]

尚、ホルマリンを含まない組織固定液を用いる場合も、RNAの解析のためには、DNAの解析の至適条件に比してより充分な固定を行う方が、良好な解析結果が得られる場合がある。 [実証データ ⑦]

作業量は過大となるが、ホルマリンを混入させずに稼働可能な標本作製装置を有する等し、関係者の合意が得られた施設においては、研究に供する目的で、ルーチンのホルマリン固定パラフィン包埋標本とは別に、ホルマリンを含まない組織固定液で固定したパラフィン包埋標本作製することも推奨される (E)。

【固定時間】

6. 過固定を回避し、こまめに切り出しを行うことが望ましい(A)。手術の翌日(24時間以内)に切り出しを行うことが最も望ましいが(E)、術後3日以内であれば核酸等のかなり良好な保持が期待できる(A)。[実証データ①・②・③・⑧]

注: 1週間を超えるホルマリン固定は回避することが望ましい(N)。[実証データ⑧・⑨]

7. [標本作製施設(病理検査室)における、いわゆる“金曜日問題”について]

土曜日ないし日曜日等の休暇中継続してホルマリンに浸漬し固定時間が延長することの影響を避けるため、金曜日に提出されたホルマリン固定検体を退勤時にエタノールに退避し、月曜日出勤時にホルマリン固定を再開するとの慣行がある。このようなエタノール退避により、DNA・RNAの品質指標は短時間固定の対照に近づく。

[実証データ⑩・⑪]

注: RNAの品質に関しては、エタノール退避により短時間固定の対照に近づくことで、より十分な固定による品質保持の効果がかえって失われる傾向が窺える。

[実証データ⑪]

特にDNAを用いた解析を行う場合、エタノール退避は有効と認められる(A)。但し顕著な差異ではなく、研究目的であれば、金曜日に提出されエタノール退避を行わなかった希少例の検体等を、研究対象とすることに差支えはない(B)。

【未染標本の取扱い】

8. 一般に、未染標本からの核酸抽出は薄切後可及的に速やかに行うことが推奨され、研究の必要から一定期間未染標本を保存する際には4℃に保管すべきとも考えられている。但し、極端に長期間でなければ、室温に保管しても核酸の品質には概して影響を与えない。【実証データ ⑫】

9. 未染標本のパラフィンコートを行う施設が少なくない。未染標本表面のパラフィンコートにより、塵埃や物理的損傷を軽減できるが、核酸の品質には概して影響を与えない。【実証データ ⑫】

注: 未染標本をパラフィンコートした場合、解析時には嚴重に脱パラフィンを行う必要が生じる。

【実証データ ⑫】

注: 未染標本をパラフィンコートしなくても、免疫組織化学的検討に特段の支障がない場合がある。

【実証データ ⑬】

10. 研究の必要から一定期間未染標本を保存する際には、直射日光への曝露等極端な悪条件は避けるべきである（N）。

【過去の既存試料の研究利用】

11. 研究目的では、ホルマリン固定パラフィン包埋標本作製から長年月経過していても、希少症例であるため解析対象としたい場合や、長期予後の判明した症例の既存試料を用いることで、重要な知見が得られると期待される場合がある。一定数の症例の核酸の品質は保持されていると期待されるので、研究目的を達するためには**標本作製後4年以上経過した症例**を解析対象に含めることにも意義がある（B）。

注: DNAの品質は標本作製から3年程度は概ね保持されている（A）。4-6年程度経過した症例を研究対象としても、解析可能な品質を保持する症例は一定数存在する。【実証データ ⑭】

注: RNAの品質はDNAに比して若干早く、標本作製から2年程度で低下を始める。但し、その後の低下は必ずしも顕著でない場合がある。【実証データ ⑮】

注: 研究目的で標本作製後4年以上経過した症例を解析対象候補とした場合は、あらかじめ核酸の品質を確かめてから実際の解析を開始すべきである（B）。

【脱灰】

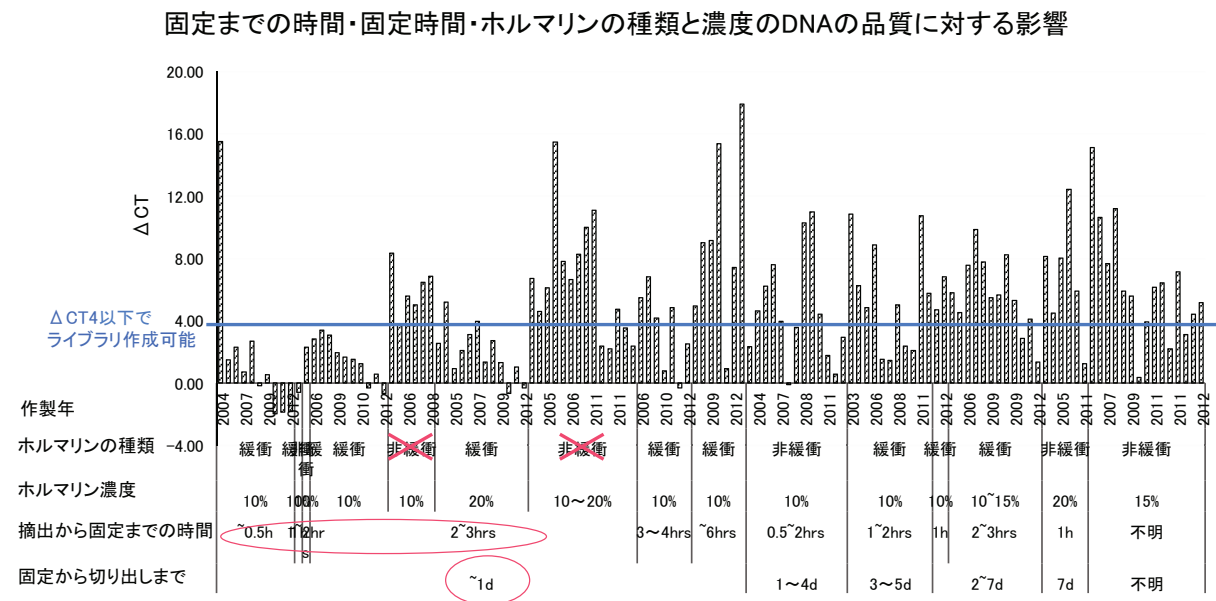
12. 硬組織を含む検体をゲノム研究に供する可能性がある場合には、急速脱灰(Plank-Rychlo法)を回避し (N)、EDTA による緩徐脱灰を行うべきである(A)。[実証データ ⑬]

第3部の根拠となる実証解析データ

【実証データ ①】

固定までの時間・固定時間・ホルマリンの種類と濃度のDNAの品質に対する影響

- 多施設共同研究に参画する15施設において、ルーチンの病理標本作製業務における、平均的な手術検体の固定までの時間・固定時間・ホルマリンの種類と濃度に関する聞き取り調査を行った。
- 上記15施設で作製したホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い、TruSight Tumor (Illumina) によるDNAの品質検証として、リアルタイムPCR法により対照DNAとの間の ΔCt 値を測定した($\Delta Ct < 4$ であれば、次世代シーケンサによる癌関連遺伝子の変異検索のためのライブラリ作製が可能と期待される)。

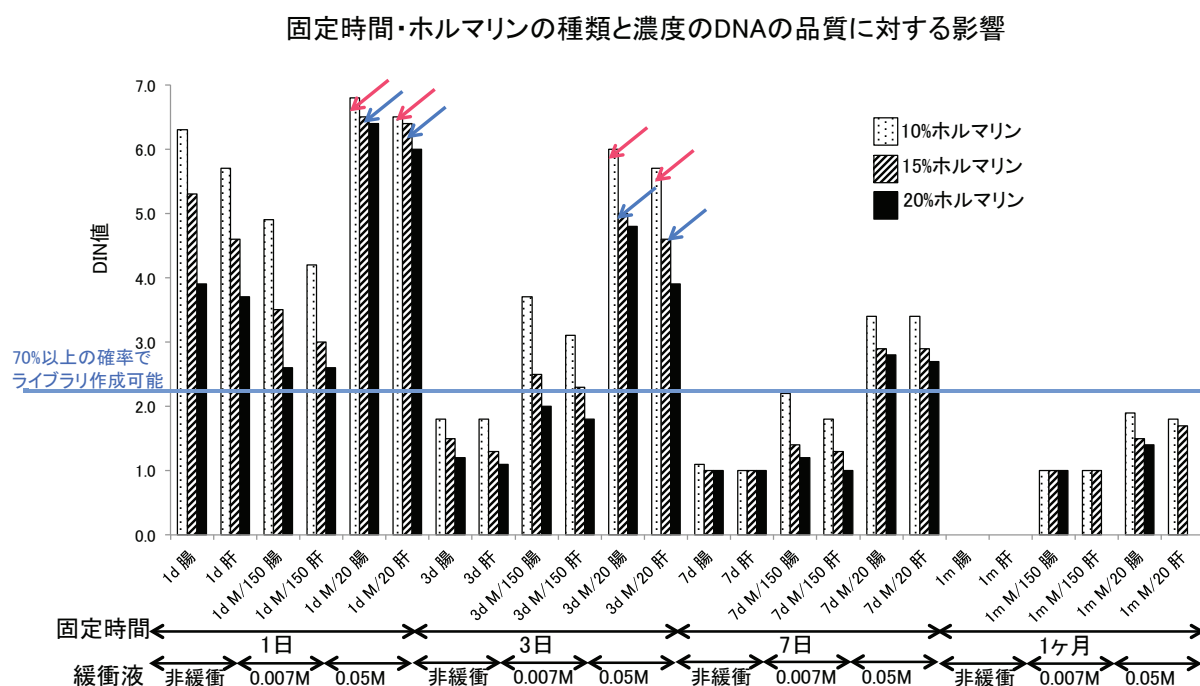


- 複数施設でのルーチンの病理標本作製業務に基づく知見で、摘出後10%緩衝ホルマリンで速やかに（3時間以内程度を目安に）固定し、翌日に切り出しを行うことが望ましいと考えられた(A)。

[実証データ ②]

固定時間・ホルマリンの種類と濃度のDNAの品質に対する影響

- 単一施設において、死後3時間以内に実施された病理解剖例から得られた大腸粘膜と肝臓を用いて解析した。
- FFPE Tissue DNA kit (Qiagen) によりゲノムDNAを抽出し、Tape station - genomic DNA(Agilent)を用いてDIN値を測定した。ここでは、DIN値2.3以上で(青線)、アンプリコンシークエンシングが可能なライブラリ作製が70%以上の確率で可能と考える。

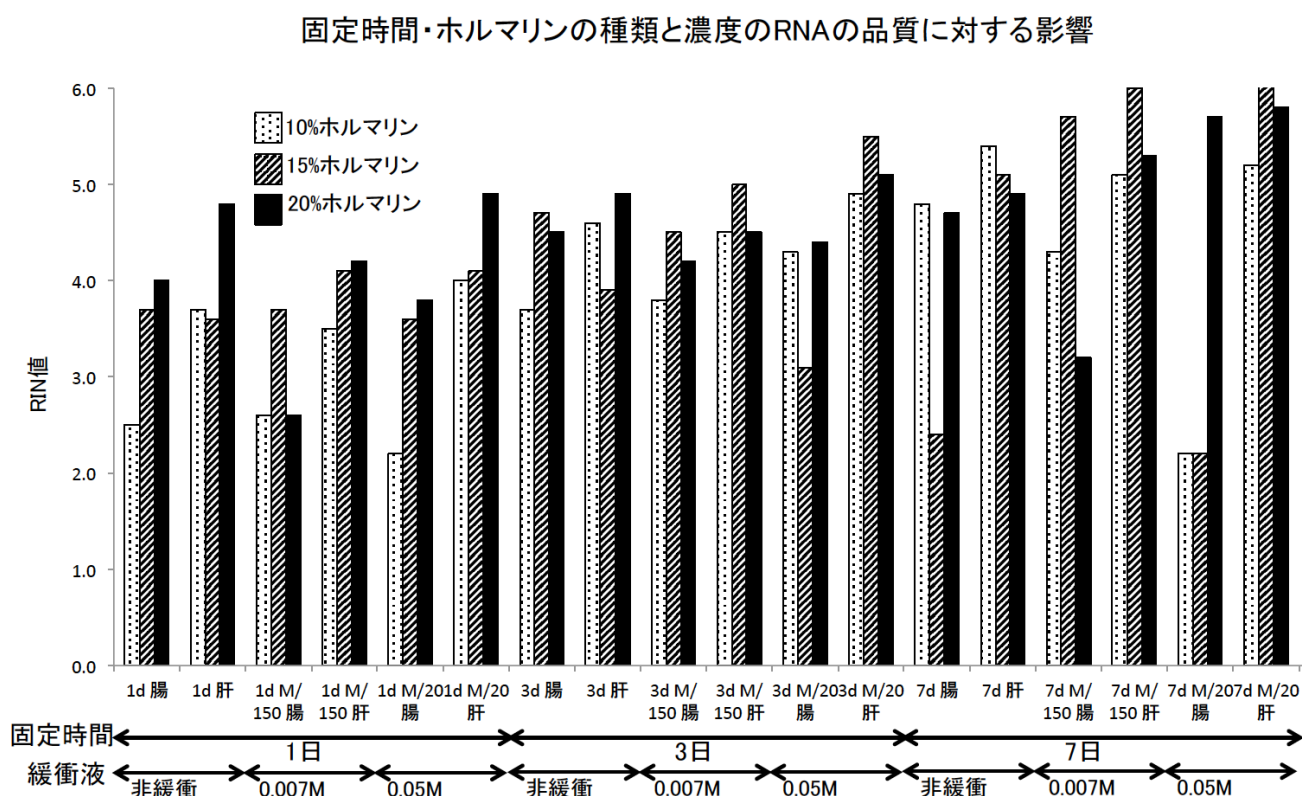


- 高緩衝(0.05M) 10%ホルマリン1-3日以内の固定が望ましい(赤矢印) **(A)**。形態の保持等に留意するならば、1-3日以内の固定であれば、高緩衝としてホルマリン濃度を上げることも可能である(青矢印) **(B)**。固定時間を3日以内まで短縮出来ない施設においては、高緩衝ホルマリンを用いることが必須である **(B)**。非緩衝ホルマリンであれば、解析可能であるのは1日以内の固定までと考えられた **(B)**。

【実証データ ③】

固定時間・ホルマリンの種類と濃度のRNAの品質に対する影響

- 単一施設において、死後3 時間以内に実施された病理解剖例から得られた大腸粘膜と肝臓を用いて解析した。
- QIAsymphony (Qiagen) により全RNAを抽出し、2100 Bioanalyzer システム (Agilent) を用いてRIN 値を測定した。

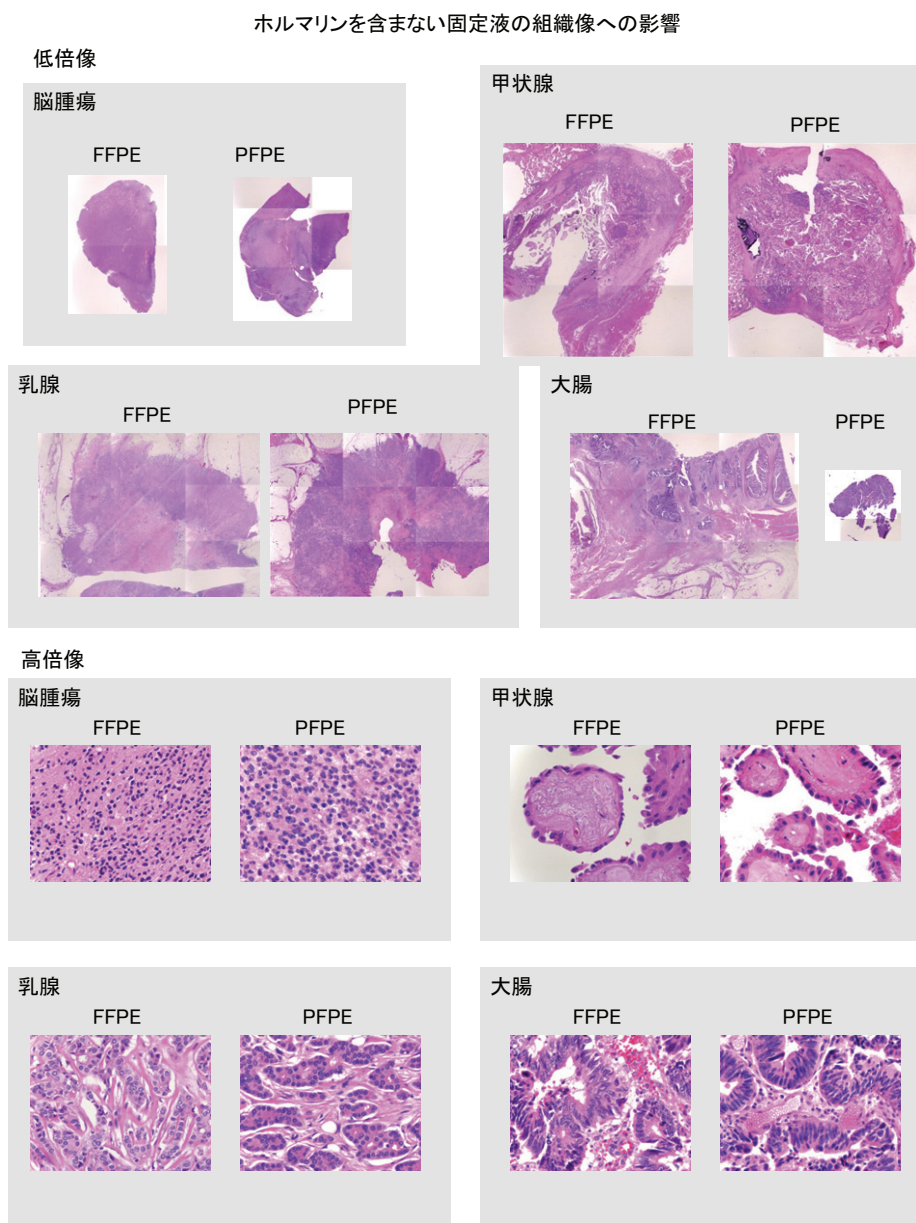


- 第3部【実証データ ②】のDNAの品質に対する影響とは異なり、15 ないし20% ホルマリンの方が、10%ホルマリンに比して、高い品質が得られる傾向にある。また、3-7日固定の方が、1日間の固定に比して、高い品質が得られる傾向にある。すなわち、RNAを用いた解析のためには、DNAを用いた解析の至適条件に比してより充分な固定を行う方が、恐らくRNase が完全に失活する等するため、良好な解析結果が得られる場合がある。試料利活用研究の目的に応じて、固定条件を選択すべきと考えられた。
- データを示していないが、1ヶ月の固定では、RNA についても品質は著しく低下しばらつきが顕著となる(N)。

【実証データ ④】

ホルマリンを含まない固定液の組織像への影響

- ホルマリンを含まない固定液としてPAXgene(Qiagen)を用いた。
- 脳腫瘍・甲状腺癌・乳癌・大腸癌の同一症例の手術検体より、ホルマリン固定パラフィン包埋標本（FFPE）とPAXgene固定パラフィン包埋標本(PFPE)を作製し(脳腫瘍・甲状腺癌・乳癌症例においてはほぼ等大の対面から、大腸癌は別部位から)、HE染色標本を観察して形態への影響を評価した。



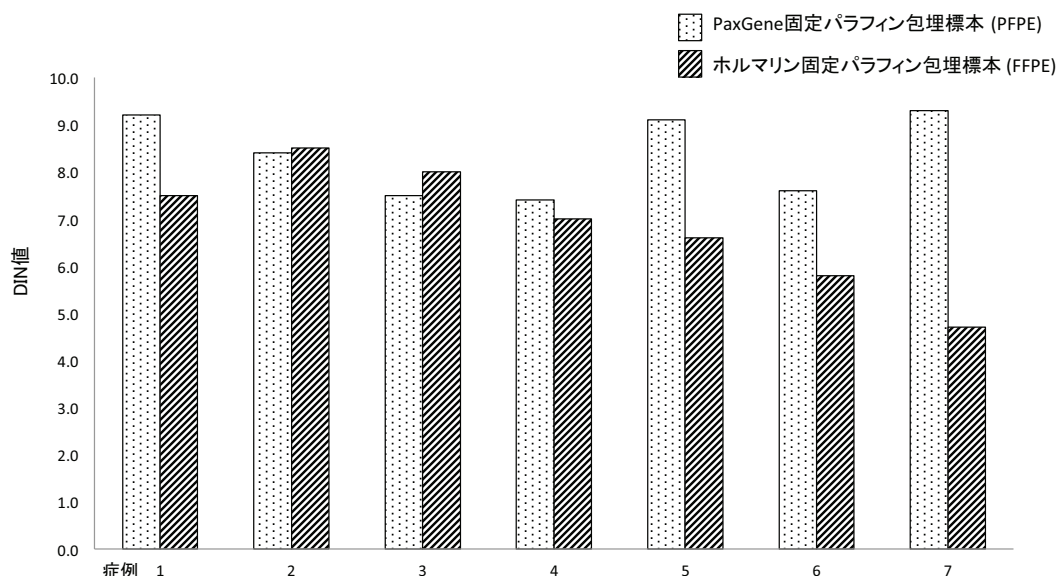
- FFPE・PFPE間で低倍像・高倍像に顕著な差異を認めない。PAXgene固定液は組織像に顕著な影響を与えないと考えられた。

【実証データ ⑤】

ホルマリンを含まない固定液のゲノムDNAの品質への影響

- 卵巣癌・胃癌・肺癌同一症例の手術検体より、10%中性緩衝ホルマリンで3-5日固定してFFPE標本を作製し、PAXgene Tissue containerで4-6時間固定してPFPE標本を作製した。8μm切片2-4枚よりQIAasympyphony(Qiagen)を用いてゲノムDNAを抽出した。

ホルマリンを含まない固定液のゲノムDNAの品質への影響



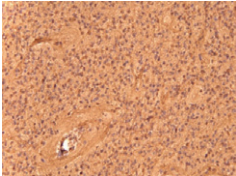
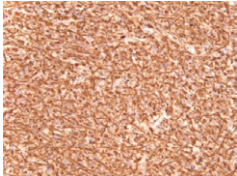
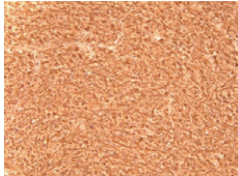
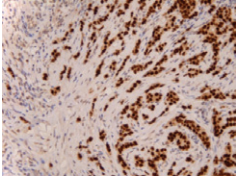
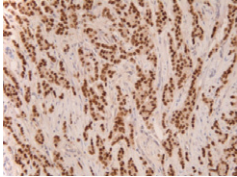
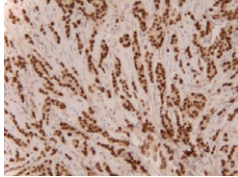
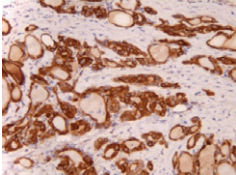
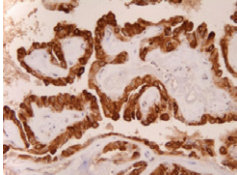
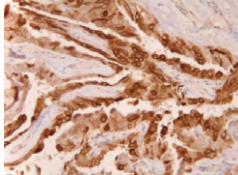
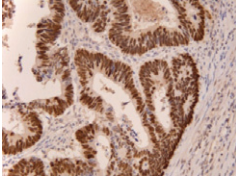
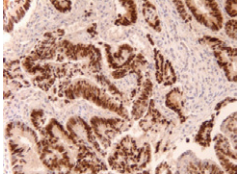
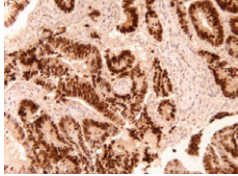
手技	解析数	収量 (μg)	A_{260}/A_{280}	DIN	
				平均±標準偏差	#1 に対する <i>P</i> 値 (Welch- <i>t</i> 検定)
FFPE	7	4.01±1.98	1.93±0.03	6.87±1.31	—
PFPE	7	7.90±3.90	1.97±0.24	8.36±0.85	0.067

- ゲノムDNAの品質は概して同等かPFPEの方が良い傾向を示したが、本検討の限りでは統計学的に有意な水準に達しなかった。
- 次に同じゲノムDNA検体を用いComprehensive Cancer Panel(Qiagen)で癌関連遺伝子変異検索を行ったところ、FFPEとPFPEのDIN値に明らかな差を認めない検体2・3・4においては、検出された変異に明らかな差を認めなかった。これに対し、FFPEにおいてDIN値が低値である検体1・5・6・7においては、ホルマリン固定によるシトシンの脱アミノ反応に基づくアーティファクトを含むC/T置換の頻度が高く、有意な変異と見なすリード数の閾値を適切に設定する必要があると考えられた。
- PFPE標本から抽出したゲノムDNAを用い信頼度の高い解析を実施し得るが、FFPE標本においても適切に条件を設定すること等により変異解析等が可能と考えられる。

【実証データ ⑥】

ホルマリンを含まない固定液の免疫組織化学への影響

- 脳腫瘍・甲状腺癌・乳癌・大腸癌の同一症例の手術検体より、ホルマリン固定パラフィン包埋標本（FFPE）とPAXgene固定パラフィン包埋標本(PFPE)を作製し(脳腫瘍・甲状腺癌・乳癌症例においてはほぼ等大の対面から、大腸癌は別部位から)、各種抗体を用いて免疫組織化学への影響を評価した。

	FFPE	PFPE	
	実施施設に於けるルーチンの抗原賦活法 (40分)	抗原賦活 (5分)	実施施設に於けるルーチンの抗原賦活法 (40分)
脳腫瘍症例 GFAP (ニチレイ)			
乳癌 ER (ニチレイ)			
甲状腺癌 汎サイトケラチン (ニチレイ)			
大腸癌 p53 (Dako)			

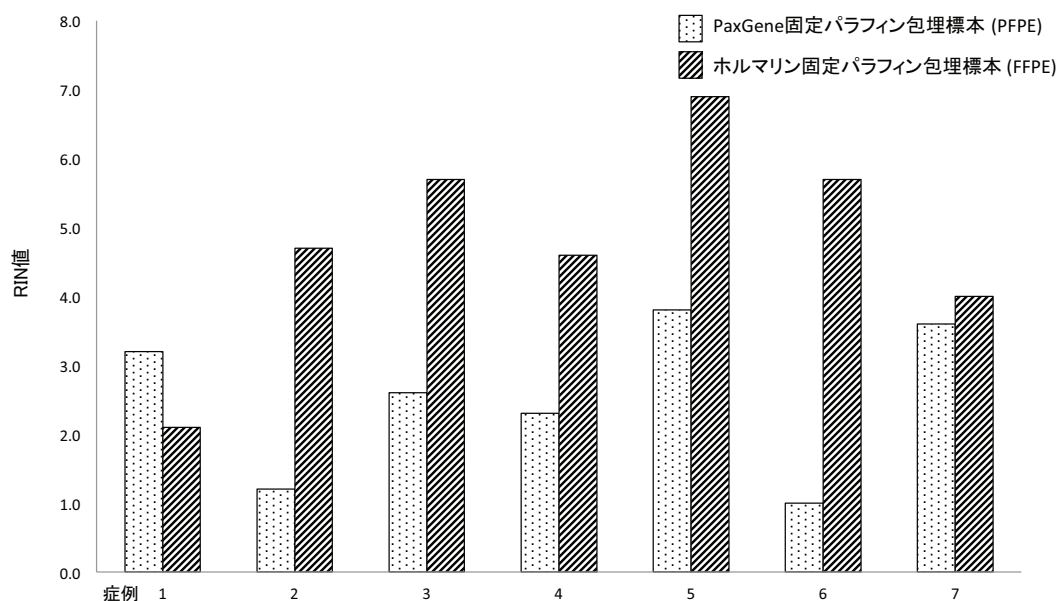
- 本検討の限りでは、実施施設のルーチンの抗原賦活法(40分)でPFPEの非特異的染色性が若干高いが、抗原賦活を短時間(5分)とすることにより良好な結果が得られている。PAXgene固定は免疫組織化学に適していると考えられた。

【実証データ ⑦】

ホルマリンを含まない固定液のRNAの品質への影響

- 卵巣癌・胃癌・肺癌同一症例の手術検体より、10%中性緩衝ホルマリンで3-5日固定してFFPE標本作製し、PAXgene Tissue containerで4-6時間固定してPFPE標本作製した。8μm切片2-4枚よりQIASymphony(Qiagen)を用いて全RNAを抽出した。

ホルマリンを含まない固定液のRNAの品質への影響



手技	解析数	収量 (μg)	A_{260}/A_{280}	DIN	
				平均±標準偏差	#1 に対する <i>P</i> 値 (Welch- <i>t</i> 検定)*
FFPE	7	5.53±3.32	2.00±0.06	4.81±1.53	—
PFPE	7	8.80±4.54	2.04±0.03	2.53±1.11	<u>0.023</u>

**P*<0.05 のとき下線を付した

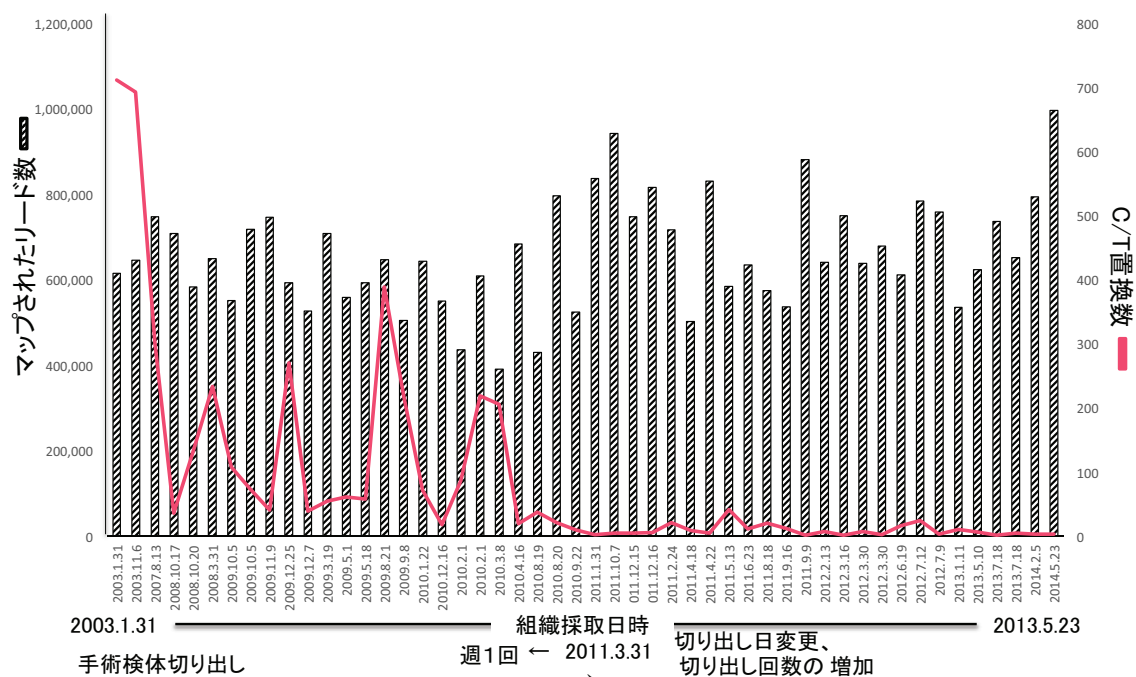
- 本検討の限りでは、RNAの品質は概して同等かPFPEにおいて低下していた。4-6時間のPAXgene固定では、固定不良を起こしたと推測される。RNaseの失活が充分でない等の理由で、RNAを用いた解析は、DNAを用いた解析に比して固定不良の影響を受けやすいと推測される。特にRNAを用いた解析を行おうとする場合、PAXgene固定は12-24時間行うべきであると考えられた。

【実証データ ⑧】

過固定のゲノムDNAの品質への影響

- 合計53症例の大腸癌および子宮体癌手術検体のホルマリン固定パラフィン包埋標本(FFPE)よりゲノムDNAを抽出、比較Ct法による品質評価を行った。品質基準を満たしたゲノムDNA10ngを用い、半導体シーケンサ Ion PGMを用いてIon AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2(Thermo Fisher)によりアンプリコンシーケンスを行い、癌関連遺伝子変異検索を行った。
- 比較Ct法はTaqMan® RNaseP Detection Reagent Kit (Thermo Fisher)およびTaqMan® MGB遺伝子発現Kit (Thermo Fisher) を用いて行った。short amplicon(86 bp) /long amplicon(256 bp) のCt値の相対値比(QC値)は平均0.82で、94%の検体(50症例)がThermo Fisher社が推奨する品質検証値(QC値)0.2を満たした。QC値を満たしたゲノムDNAからは塩基配列解析に十分な量のライブラリーを合成することができた。
- QC値が基準を満たした50症例では、平均マップリード数638,661、マップ率93%、平均リード深度2,759が得られ、全症例においてアンプリコンシーケンスによる塩基配列解析が充分実施可能であった。但し、十分なマップリード数、マップ率、リード深度が得られても、ライブラリーを作製する際のPCRでの増幅効率に標的遺伝子間で差が生じていることがあるので、断片化が進んだDNAを解析する際には、この点を十分に注意する必要がある。

過固定のDNAの品質に対する影響



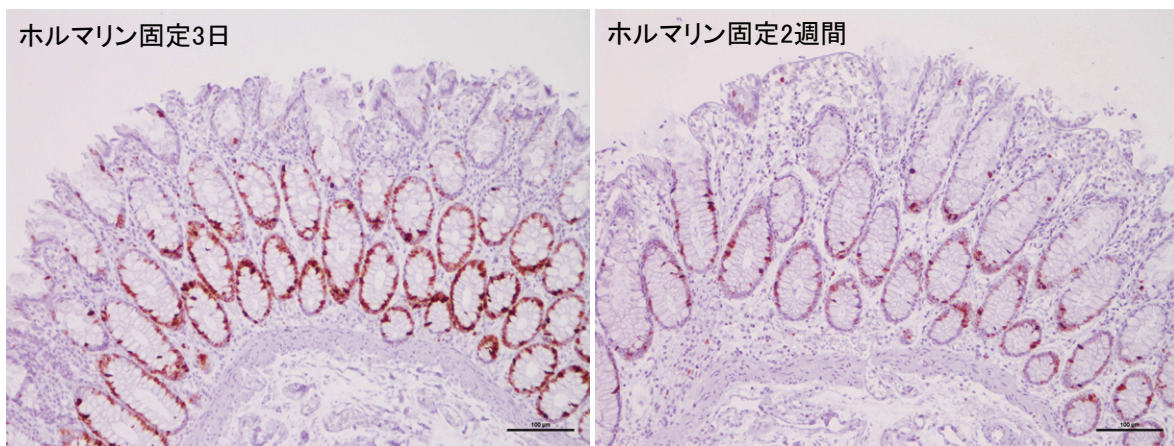
- また、ホルマリン固定によるシトシンの脱アミノ反応に基づくアーティファクトを含むC/T置換の頻度は2010年3月以前に採取された検体において高く、2010年4月以降に採取された検体において著減していた(赤色折れ線)。当該施設において2011年3月末日から切り出し日の調整による各臓器の固定時間の短縮を計り、2012年3月末日からは週2回、2013年4月1日からは毎日切り出しを行って、切り出しまでの期間が2-3日となっている。C/T置換の頻度は、経年劣化に加えて固定時間に大きな影響を受けると考えられた。
- 適切な解析を行うために、原則として1週間を越える過固定は回避すべきであると考えられた(N)。

【実証データ ⑨】

過固定の免疫組織化学への影響

- 同一症例の大腸粘膜(正常)からホルマリン固定時間を変えて、パラフィン包埋標本を作製し、抗Ki-67抗体(MIB-1) (Dako)を用いた免疫組織化学的検討を行った。

過固定のimmunoreactivityに対する影響

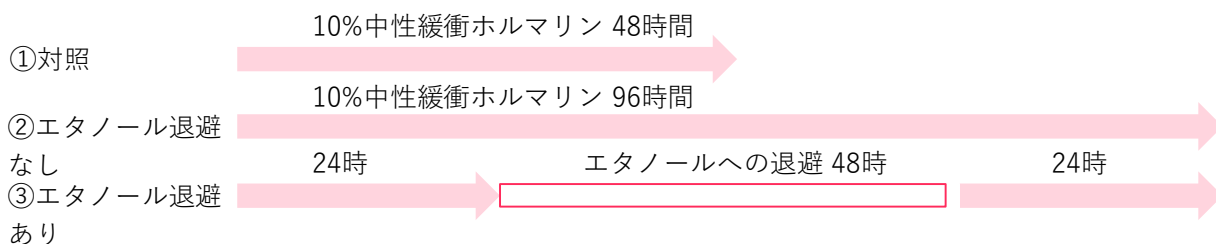


- 過固定により正確なMIB-1標識率評価が阻害されたと考えられた。適切な解析を行うために、過固定は回避すべきであると考えられた(N)。

[実証データ ⑩]

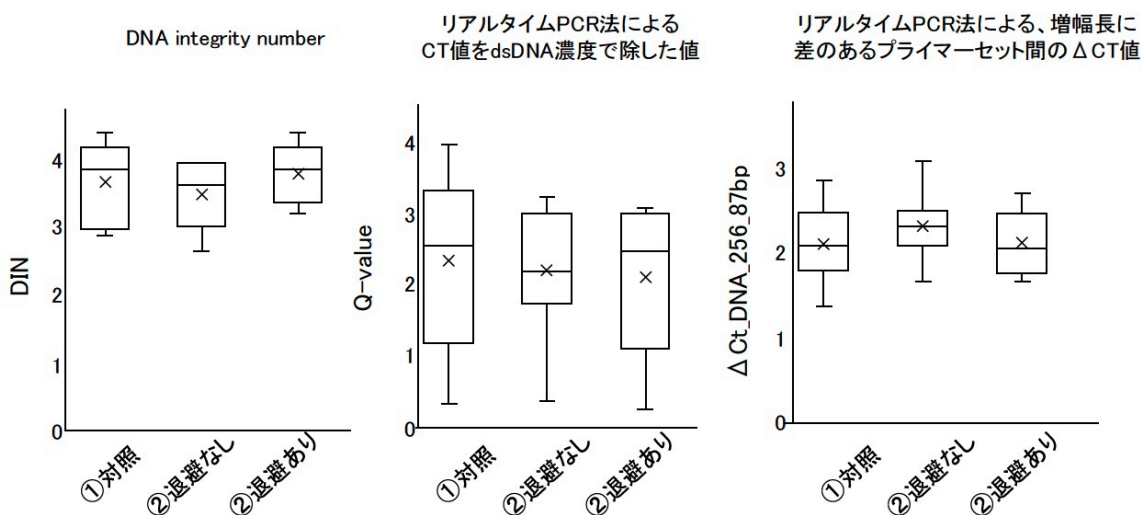
エタノール退避のDNAの品質への影響

- 大腸癌・肺癌・乳癌計5例の新規手術検体において、各症例の病理診断に支障をきたさない部位から、3組織片をルーチンの標本作製とは別にとりわけ、下記の方法でそれぞれ固定し、パラフィンブロックを作製した。



- ①は標準的な固定時間の対照、②は金曜日に提出された検体を月曜日まで連続してホルマリン固定した状況を模したものの、③は土曜日・日曜日にエタノールに退避した状況を模したものである。

3種類のDNA品質指標による比較

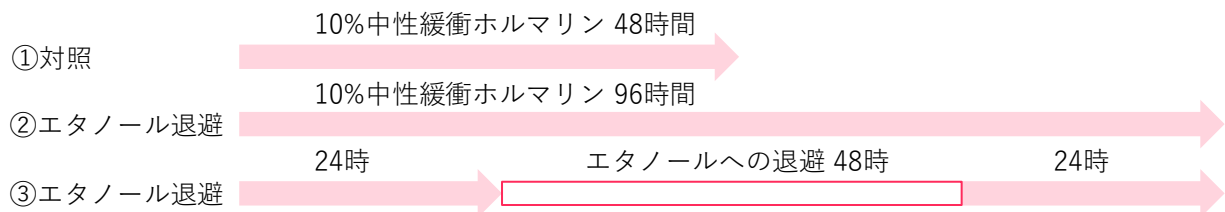


- いずれの指標においてもエタノール退避により対照に近づいており、48時間固定が求められる診療目的の遺伝子パネル検査等においてエタノール退避は有効である **(A)**。エタノール退避しておけば、金曜日の生検を回避したり、休日出勤して48時間固定を厳守することは必須でない可能性がある。
- いずれの群間にも統計学的に有意な差異はなかった。研究目的であれば、研究対象とすべき貴重な症例については、エタノール退避の有無にかかわらず、研究に用いることが妥当と考えられる **(B)**。

[実証データ ⑪]

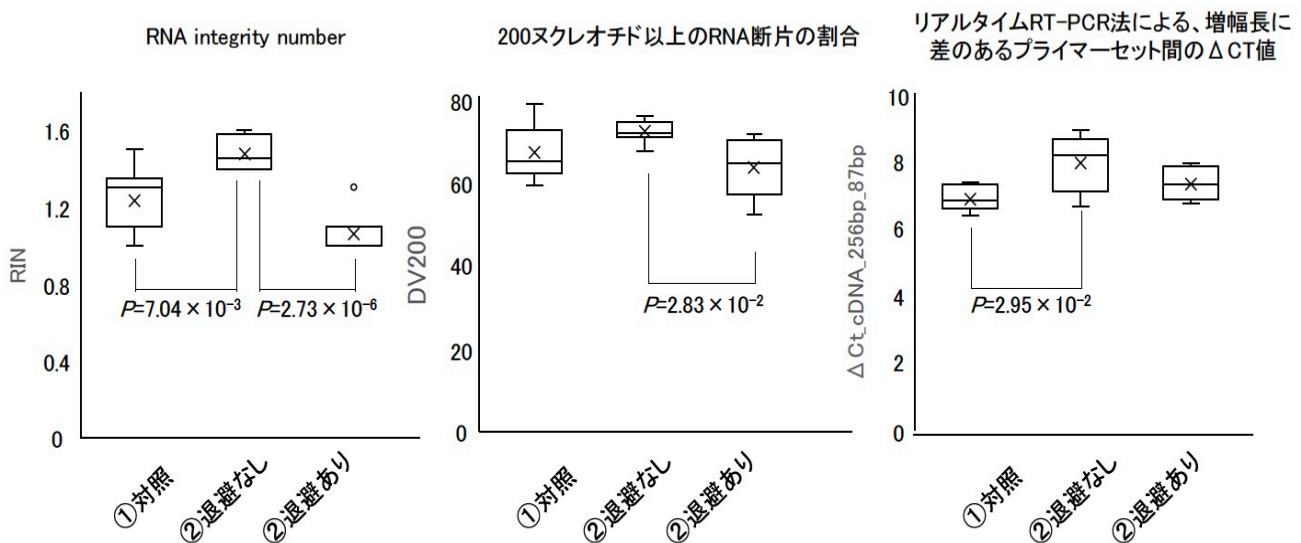
エタノール退避のRNAの品質への影響

- 大腸癌・肺癌・乳癌計5例の新規手術検体において、各症例の病理診断に支障をきたさない部位から、3組織片をルーチンの標本作製とは別にとりわけ、下記の方法でそれぞれ固定し、パラフィンプロックを作製した。



- ①は標準的な固定時間の対照、②は金曜日に提出された検体を月曜日まで連続してホルマリン固定した状況を模したものの、③は土曜日・日曜日にエタノールに退避した状況を模したものである。

3種類のRNA品質指標による比較

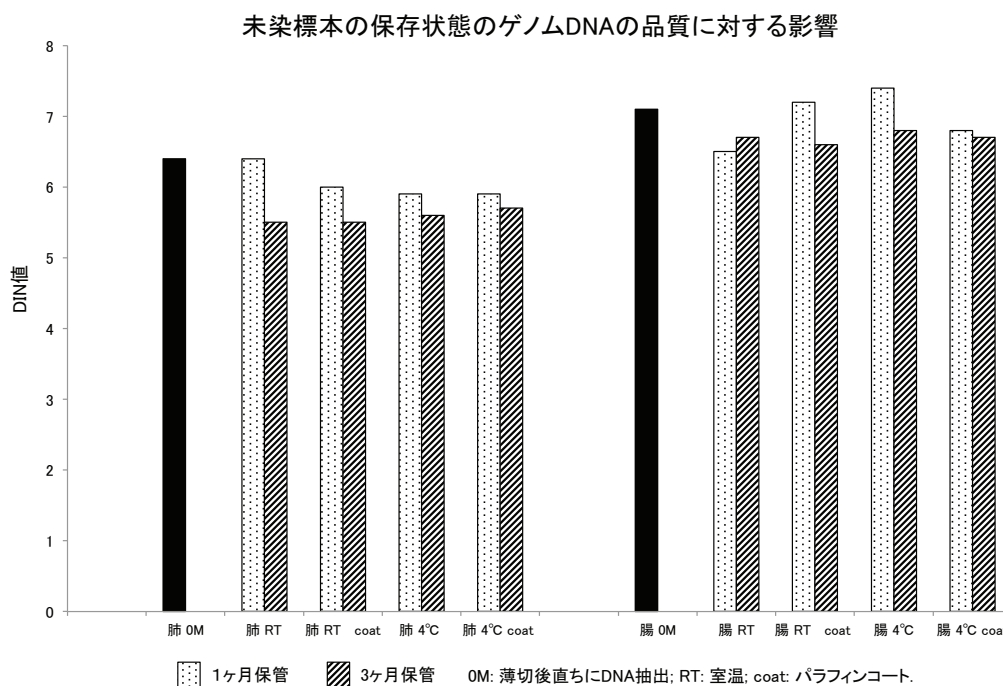


- RIN・DV200において、②の十分な固定の方が①の対照より高い品質が保たれる傾向が窺える。 ΔCt 値においては、長いRNA断片が保たれていても、短い増幅長のPCR効率がより優れるために、②で対照に比し品質が劣るかのよう逆転して見えていると推測される。
- RNAの品質指標をみても、エタノール退避により対照に近づける効果があることが確認された。

【実証データ ⑫】

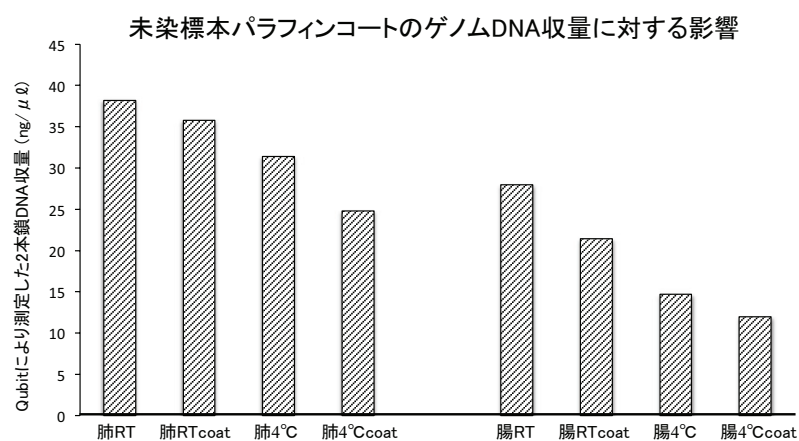
未染標本の保存状態のゲノムDNAの品質等に対する影響

- 大腸・肺手術検体をホルマリンで3日間固定し、パラフィン包埋したブロックを5μm厚で薄切した未染標本について、以下の保管条件を比較した。
 - パラフィンコートせず室温保管
 - パラフィンコートして室温保管
 - パラフィンコートせず4℃保管
 - パラフィンコートして4℃保管
- それぞれ保管1ヶ月ならびに3ヶ月で保管したのち、キシレンで脱パラフィンし、QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen) を用いてゲノムDNAを抽出した。
- 2本鎖DNAの収量はQubit システム (Thermo Fisher) により評価し、DNAの品質はTapeStation システム (Agilent) によりDINを測定して評価した。



- 1ヶ月保管に比し3ヶ月保管の方がDIN値が若干低下するものの、3ヶ月保管した未染標本も充分DNAを用いた解析に供せると考えられる。
- 室温あるいは4℃保管の別、未染標本表面のパラフィンコートの有無は、DNAの品質に顕著な影響を与えない。

- 同時期に抽出を行った3ヶ月保管の収量を比較すると、脱パラフィンの工程を入念に行う必要があること等から、本検討においてはパラフィンコートした未染標本からのゲノムDNAの収量が低下する傾向が伺えた。



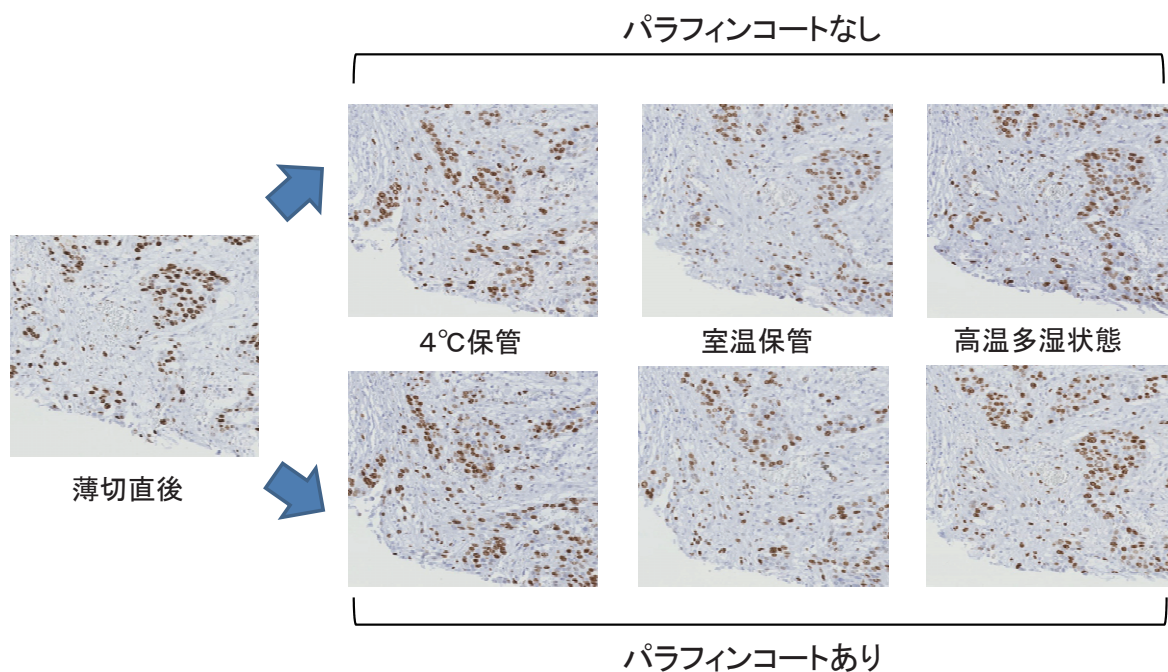
【実証データ ⑬】

未染標本の保存状態の免疫組織化学への影響

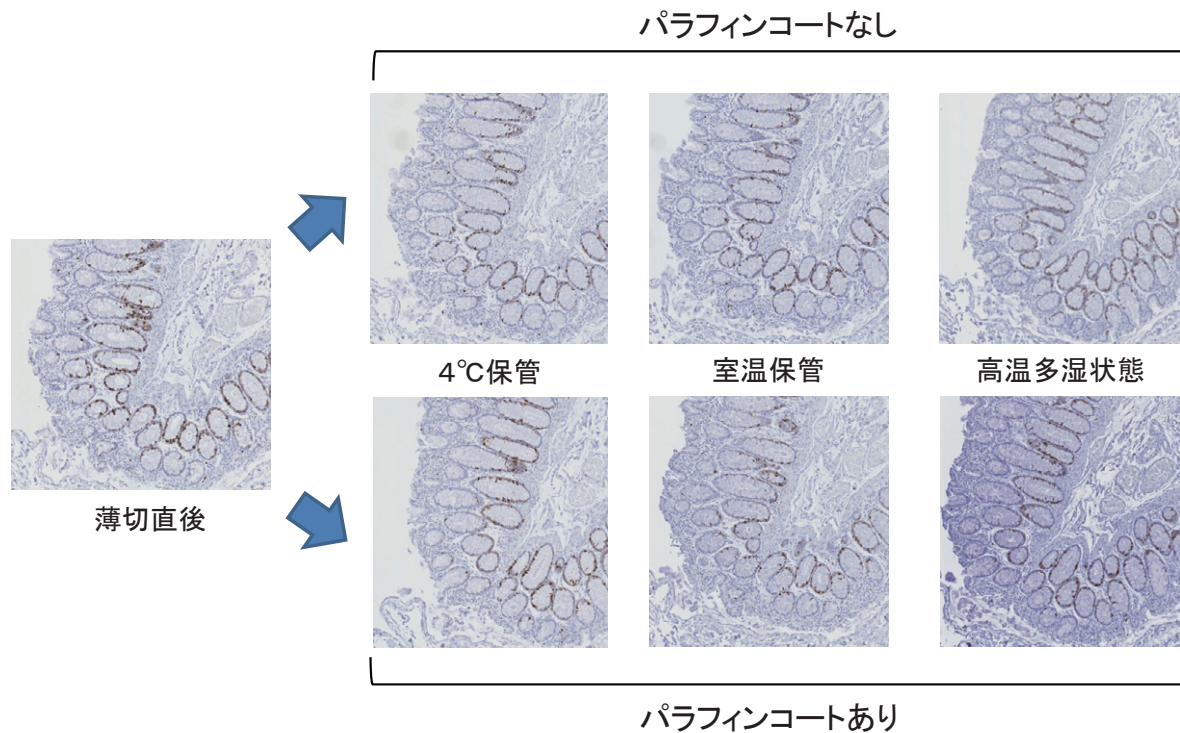
- 大腸・肺手術検体をホルマリンで3日間固定し、パラフィン包埋したブロックを 5 μ m 厚で薄切した未染標本について、2ヶ月間以下の保管条件に置き、抗 Ki-67 抗体(MIB-1)を用いた免疫組織化学に供した。

パラフィンコートせず室温保管
 パラフィンコートして室温保管
 パラフィンコートせず4℃保管
 パラフィンコートして4℃保管
 パラフィンコートせず高温多湿環境に保管
 パラフィンコートして高温多湿環境に保管

未染標本の保管条件のimmunoreactivityに対する影響
 抗Ki-67抗体(MIB-1)を用いた免疫組織化学(肺)



抗Ki-67抗体(MIB-1)を用いた免疫組織化学(大腸)



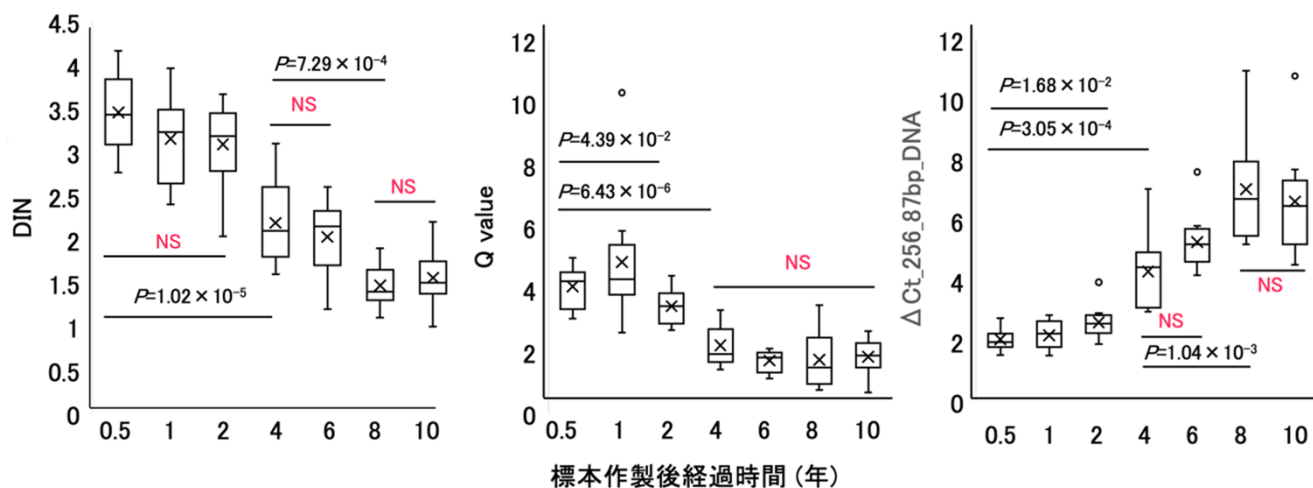
- 薄切直後に比して若干の染色性低下を認めるものの、いずれの検体もMIB-1標識率の評価を困難にする程度ではなく、またパラフィンコートにより染色性に顕著な差異は見られない。

[実証データ ⑭]

既存試料の研究利用におけるDNAの品質の経年劣化

- 研究目的では、4年以上経過した希少症例や長期予後の判明した症例を解析対象としたい場合があるので、どこまで遡れるか目安を示すことを目指した。
- 過去10年以上、10%中性緩衝ホルマリン48時間程度の固定を継続している施設において、0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10年前の、大腸癌・肺癌・乳癌各年5例ずつ、合計105症例の未染標本からDNAを抽出して品質検証を行った。

3種類のDNA品質指標による比較



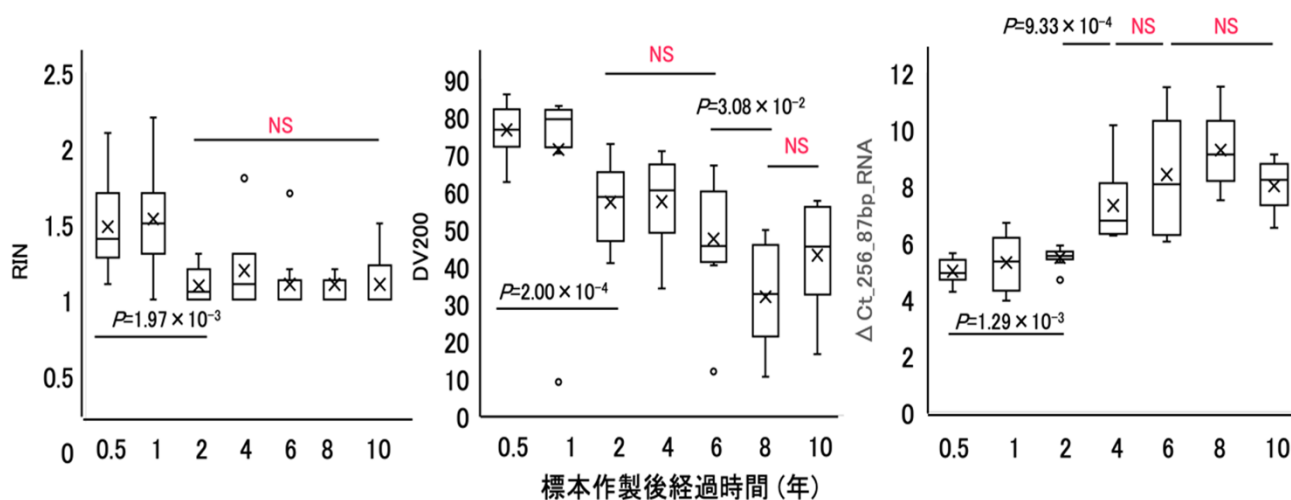
- DIA値で見ると、DNAの品質は標本作製から3年程度は概ね保持されている **(A)**。Q値・ ΔCt 値においても、3年以内の劣化は顕著とは言えない。
- 研究目的で過去に遡って解析対象候補症例を選定しても、4-6年以降必ずしも時間依存的な品質の低下を認めるとは言えず、解析可能な品質を保持する症例は一定数存在すると期待される **(B)**。

[実証データ ⑮]

既存試料の研究利用におけるRNAの品質の経年劣化

- 研究目的では、4年以上経過した希少症例や長期予後の判明した症例を解析対象としたい場合があるので、どこまで遡れるか目安を示すことを目指した。
- 過去10年以上、10%中性緩衝ホルマリン48時間程度の固定を継続している施設において、0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10年前の、大腸癌・肺癌・乳癌各年5例ずつ、合計105症例の未染標本からRNAを抽出して品質検証を行った。

3種類のRNA品質指標による比較



- RNAの品質はDNAに比して若干早く、標本作製後2年程度で劣化を始める。
- 他方で、2年目以降の経年劣化は必ずしも顕著ではない (B)。

【実証データ ⑬】

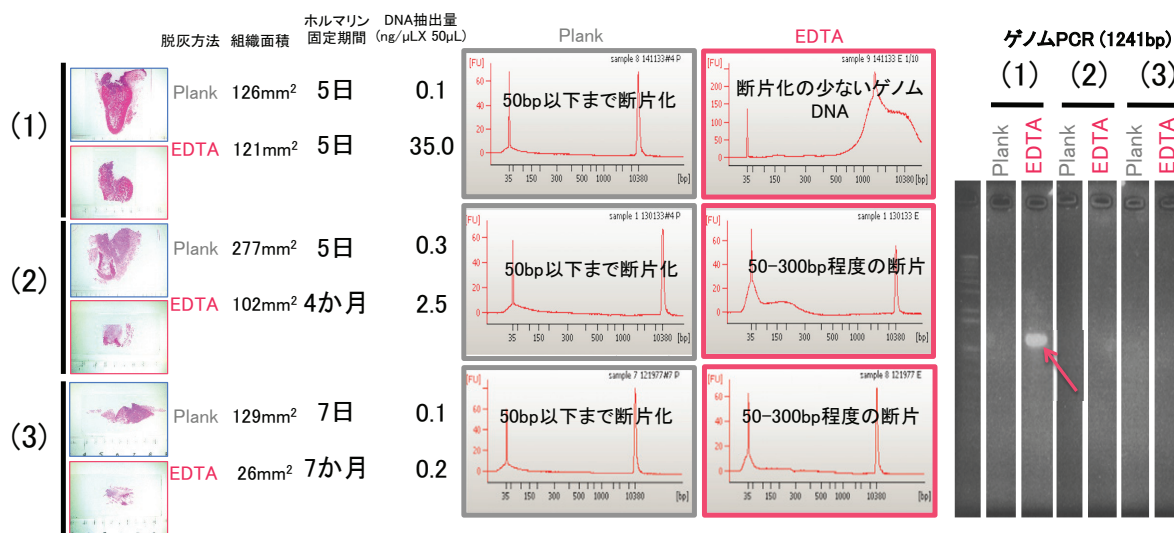
脱灰方法のゲノムDNAの品質に対する影響

- 歯肉扁平上皮癌により顎骨切除された同一症例において、ホルマリン固定後に、以下のブロックを作製し(FEPE)、合計20μm厚以上の薄切標本よりQIAamp DNA FEPE Tissue Kit(Qiagen)にてゲノムDNAを抽出し、以下のDNAの品質を比較した。

#ルーチンの病理組織診断用に Plank-Rychlo 法で急速脱灰したのちにパラフィン包埋(Plank)

研究用に10%EDTAで緩徐脱灰したのちにパラフィン包埋(EDTA)

脱灰方法のゲノムDNAの品質に対する影響



- ホルマリン固定期間が数日以内かつEDTA緩徐脱灰を施行したFEPEブロックから、断片化の少ないゲノムDNAが抽出できる場合がある(赤枠・赤矢印) (A)。
- EDTA脱灰でも脱灰前のホルマリン固定期間が長期にわたる場合は、ゲノムDNAの断片化(約500-300 bp程度)を認める(N)。
- ルーチンの病理組織診断用の急速脱灰(Plank-Rychlo法)では、ゲノム解析可能な品質のゲノムDNAの抽出は困難である(N)。

[参考データ ①]

実際のホルマリン固定パラフィン包埋標本(生検検体・手術検体)から抽出できるゲノムDNAの量と質

- 信頼性のある解析を行うには、質の高い充分量の核酸を得ることが必要である。研究計画の策定に際して参考とするため、実際の組織標本から得られたゲノムDNAの量と質のデータを例示する。
- HER2を治療標的とした肺癌個別化治療のためHER2ならびにHER2関連分子の過剰発現・遺伝子増幅・遺伝子変異を探索する観察研究に供した、ルーチンの病理診断のために作製したホルマリン固定パラフィン包埋標本(生検検体・手術検体)の、ルーペ像・Nanodrop(Thermo Fisher)で測定した抽出DNA量・Qubit(Thermo Fisher)で測定した2本鎖DNA量・TruSight Tumor(Illumina)によるDNAの品質検証としてリアルタイムPCR法により測定した対照DNAとの間の ΔCt 値を以下に示す。

ホルマリン固定・パラフィン包埋標本から抽出できる核酸の量と質の例

ルーチン (3-5 μ m厚)
標本枚数

Nanodrop測定

OD260/280

抽出DNA量 (ng)

Qubit 測定

抽出DNA量 (ng)

ΔCt

5

2.15

3320

865

1.76

ルーチン (3-5 μ m厚)
標本枚数

Nanodrop測定

OD260/280

抽出DNA量 (ng)

Qubit 測定

抽出DNA量 (ng)

ΔCt

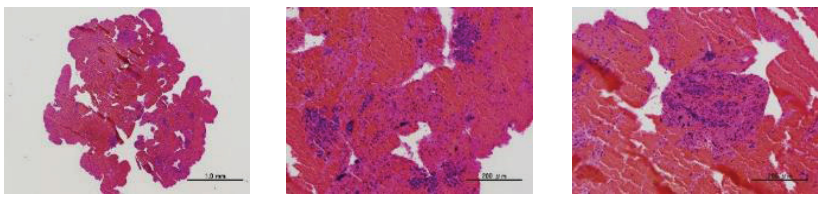
13

9.26

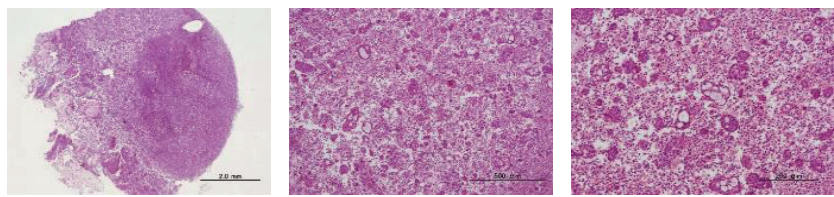
465

78.5

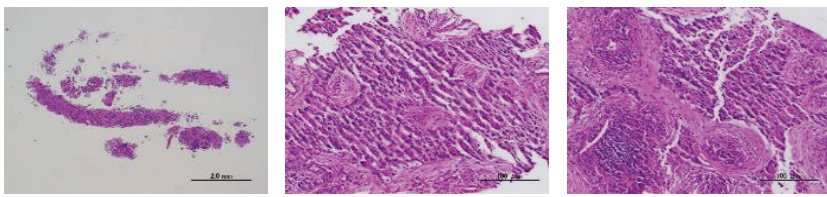
1.85



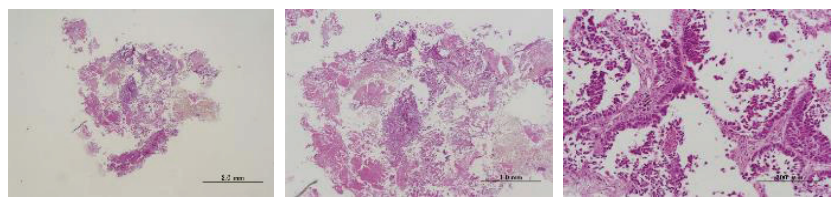
ルーチン (3-5 μ m厚) 標本枚数	Nanodrop測定		Qubit 測定	Δ CT
	OD260/280	抽出DNA量 (ng)	抽出DNA量 (ng)	
7	3.19	1025	421	-0.63
6	5.56	705	245.5	
5	2.34	819	129.2	



ルーチン (3-5 μ m厚) 標本枚数	Nanodrop測定		Qubit 測定	Δ CT
	OD260/280	抽出DNA量 (ng)	抽出DNA量 (ng)	
12	1.99	27090	5600	0.14
6	1.98	15687	2796.5	



ルーチン (3-5 μ m厚) 標本枚数	Nanodrop測定		Qubit 測定	Δ CT
	OD260/280	抽出DNA量 (ng)	抽出DNA量 (ng)	
7	2.51	2035	308	3.50
7	2.35	2190	302	
4	2.21	1467	215.95	



ルーチン (3-5 μ m厚) 標本枚数	Nanodrop測定		Qubit 測定	Δ CT
	OD260/280	抽出DNA量 (ng)	抽出DNA量 (ng)	
5	2.29	2450	665	-0.67
10	2.04	5915	1580	

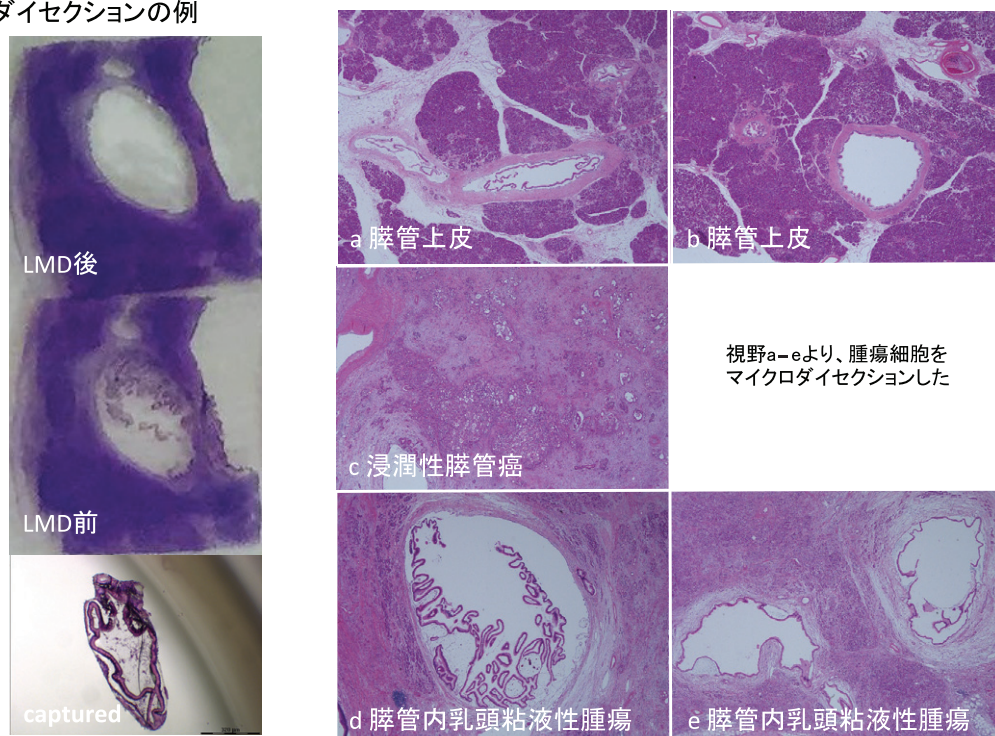
- 50症例の試験で(平均値 $\pm$ 標準偏差)、薄切枚数 10.3 ± 7 枚、Nanodropで測定した抽出DNA量 13798 ± 27585 ng、Qubitで測定した2本鎖DNA量 4403 ± 8539 ngであった。ルーチンのホルマリン固定パラフィン包埋標本から、広汎な解析に必要な核酸が抽出できる場合が多いと考えられる。

【参考データ ②】

ホルマリン固定パラフィン包埋標本から得たマイクロダイセクション検体から実際に抽出されたゲノムDNAの量と質

- 研究計画の策定に際して参考とするため、実際のレーザーマイクロダイセクション (LMD) 検体から得られたゲノムDNAの量と質のデータを例示する。

膵腫瘍手術検体ホルマリン固定パラフィン包埋におけるレーザーキャプチャーマイクロダイセクションの例



- 膵腫瘍手術検体において視野a-eの腫瘍細胞をマイクロダイセクションした。以下に実際に抽出したゲノムDNAの量と質を示す。

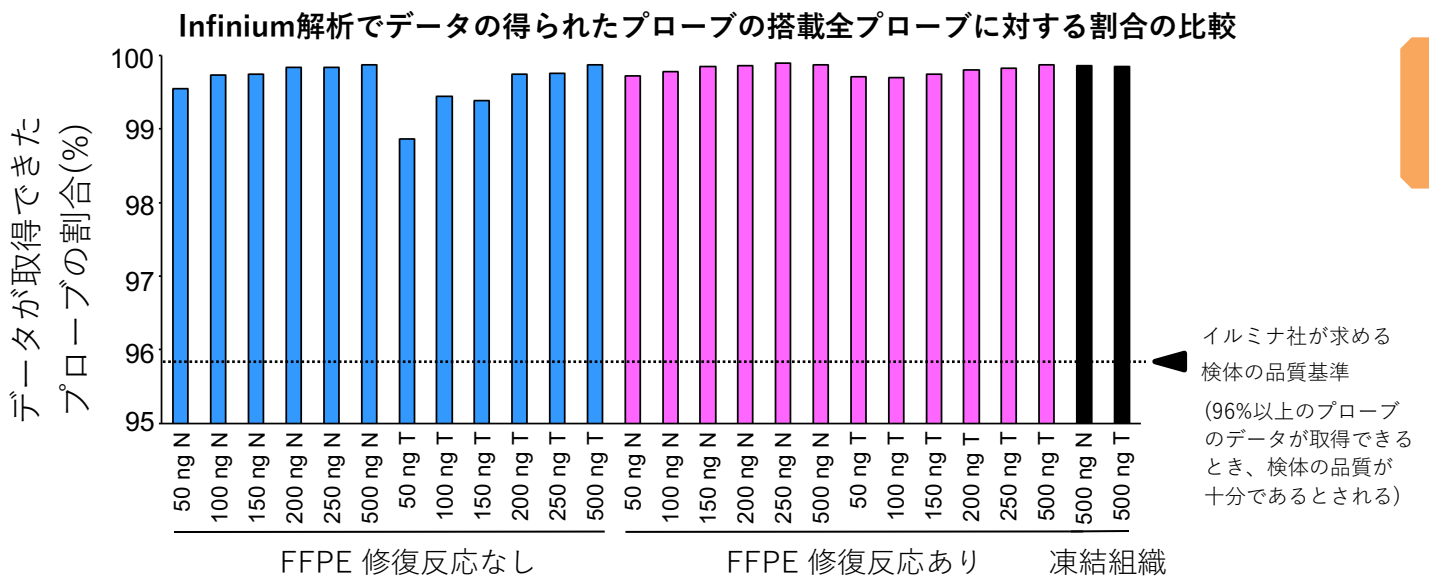
視野	10 μ m 厚 標本枚数	細胞数	OD260/280	Qubit 測定 2 本鎖 DNA 量 (ng)
a	4	22560	2.55	79.8
b	6	17670	1.98	75.6
c	2	15000	1.77	83.7
d	4	40000	1.74	187.5
e	5	15000	1.86	83.4

- ルーチンのホルマリン固定パラフィン包埋標本からのマイクロダイセクションによっても、各種解析に耐える核酸が抽出できる場合がある。

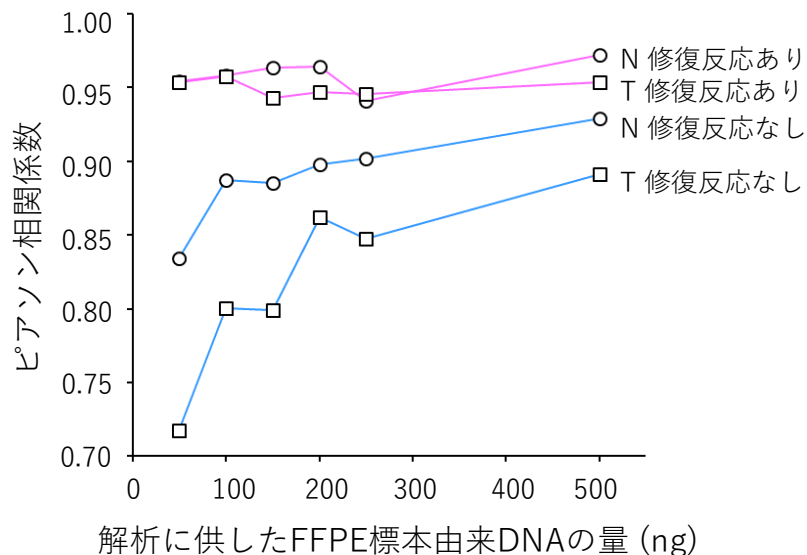
【参考データ ③】

本規程にEならびにAで示した手技を用いて作製したホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本から抽出した微量のゲノムDNAを用いたエピゲノム解析例

- 腎淡明細胞型腎細胞癌に対する腎摘除術標本を10%中性緩衝ホルマリンで1-3日固定した後作製したパラフィン包埋標本の、非癌部 (N) ならびに癌部 (T) より10 μ m厚の薄切標本を作製し、GeneRead DNA FFPE Kit (Qiagen社) を用いてゲノムDNAを抽出した。PicoGreen dsDNA定量試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、2本鎖DNA量を定量した。
- 反応に用いる2本鎖DNA量を50 ng・100 ng・150 ng・200 ng・250 ng・500 ngと段階的に変え、さらにFFPE DNA Restore kit (Illumina社) による修復反応の有無を変えて、Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina社) によるゲノム網羅的DNAメチル化解析を行った。
- FFPE標本から得られた結果を、ゴールドスタンダードである同一症例の凍結組織から抽出したゲノムDNA 500 ng を用いた結果と比較した。



FFPE標本と同一症例の凍結組織のデータとの一致



- 本規程にEならびにAで示した手技を用いて作製したホルマリン固定パラフィン包埋標本においては、50ngという少量のゲノムDNAから出発しても、特に酵素による修復反応を行うことなどにより、ゴールドスタンダードである同一症例の凍結組織における結果とよく一致する、質の高いメチロームデータを得ることができた。
- 生検検体やマイクロダイセクション検体においても、エピゲノム解析が実施可能と期待される (Pathol Int 68:633-635, 2018. doi: 10.1111/pin.12716)。

ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程 第2版

2025年7月1日

発行人 一般社団法人 日本病理学会
理事長 小田義直

〒101-0041 東京都千代田区神田須田町2-17 神田INビル6階

TEL 03-6206-9070

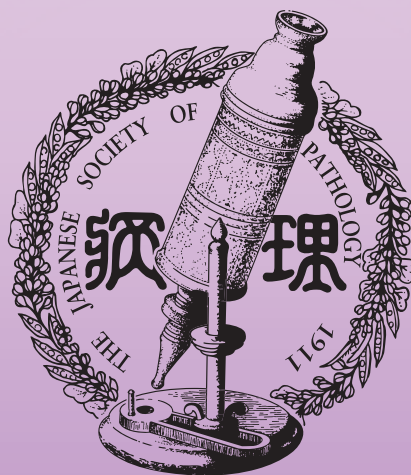
FAX 03-6206-9077

<https://pathology.or.jp/>

E-mail: jsp.office@pathology.or.jp

「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程」は、ホームページにも掲載しております。

<https://pathology.or.jp/genome/index.html>



The Japanese Society of Pathology

<https://pathology.or.jp/>