



ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織切片の臨床プロテオーム解析における基礎パラメータの検討

小野川 徹^{1,2}, 高舘 達之¹, 三上 紗弥香^{3,4}, 竹村 太郎⁵, 前田 めぐみ⁶, 吉田 寛¹, 乙供 茂¹, 前田 晋平¹, 福田 哲也³, 板東 泰彦³, 碓井 史彦⁴, 箕輪 貴司⁵, 花形 信孝⁵, 西村 俊秀⁷, 海野 倫明^{1,2}

- 1) 東北大学病院 肝胆膵外科
- 2) 東北大学大学院医学系研究科 附属創生応用医学研究センター
- 3) 株式会社 バイオシス・テクノロジーズ
- 4) エーエムアール株式会社
- 5) 独立行政法人 物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合センター
- 6) ライカマイクロシステムズ株式会社
- 7) 東京医科大学 第一外科学講座



はじめに

ホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-Fixed Paraffin Embedded: FFPE) 組織切片は、患者の確定診断や治療方法・成績情報が付随しているため、バイオマーカー探索・開発に非常に有用な臨床検体である。

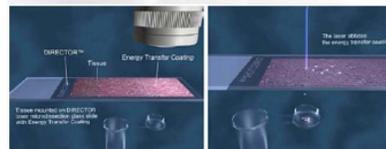
最近、FFPE 組織ブロックを出発材料に用い、網羅的にプロテオーム解析 (グローバル解析) を行い、候補タンパク質を Selected Reaction Monitoring (SRM) アッセイにより定量解析 (ターゲット解析) する戦略が活発に実践され、その有効性が示されてきている。

当科も専門疾患である胆道癌・膵臓癌 FFPE 組織ブロックから外科診療に貢献するバイオマーカータンパク質を探索・検証をしている。

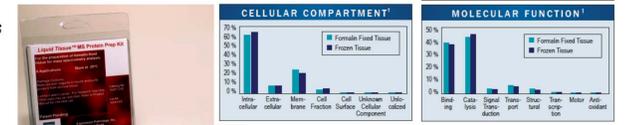
(本大会: A7 胆道癌・P14 膵臓癌で発表)

しかしながら、手術検体に対する最も一般的な組織固定法であるホルマリン処理過程の実際は、方法手技の標準化・標準化が進められているが、成書の方法に加えていると工夫がなされ、経験的な要素が大きく占めることも原因し、いまだ医療機関の間で同一ではないのが現状である。同一施設内の対象症例間でも厳密には“ばらつき”が生じてしまうことが避けられない。

Leica LMD 6000-7000
Combines High Laser Power and High Repetition Rates



Director Laser Microdissection Slides
(Expression Pathology, Gaithersburg, MD, USA)



Liquid Tissue® MS Prep Kit
(Expression Pathology, Gaithersburg, MD, USA)
1) Proteomic Analysis of Formalin-fixed Prostate Cancer Tissue
Brian L. Hood et al. Mol Cell Proteomics. 2005 Nov;4(11):1741-53

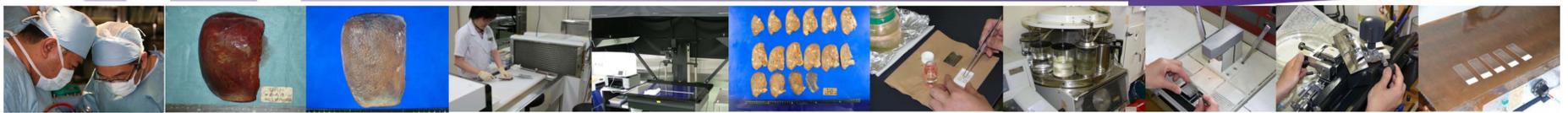
Zaploous® LC/MS System
(AMR, Inc., Tokyo, JAPAN)



・既に病院内に大量に保管されている実臨床の FFPE 組織の“ばらつき”は、バイオマーカー探索・プロテオーム解析結果にどう影響を与えるのか?
・また、単一施設での症例集積が困難な稀少疾患等の解析は、他施設に保管されたものと比較可能であろうか?

FFPE 組織切片作製までの標準的プロセス

手術にて剥離・血行遮断を行い標本を摘出、郭清リンパ節の提出、マクロ写真撮影、家族への説明後、ホルマリンに (ある時間後) 一定時間 (1~2 日程度) 浸漬する。その後病変部を切出し、剖面撮影、脱脂・脱水パラフィン浸透、包埋し FFPE が完成する。

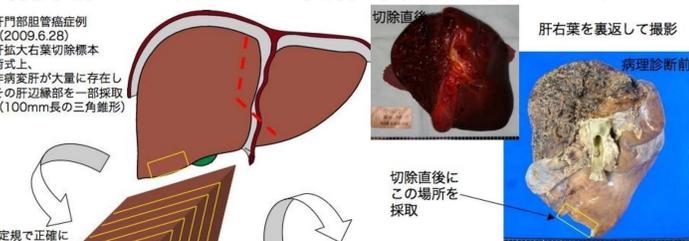


手術	標本整理	ホルマリン固定	切り出し・剖面撮影	脱水・パラフィン包埋	施設内保管	薄切・伸展
・組織摘出までの血流遮断時間 (同一術式でも異なる)	・切離断端の迅速病理診断 ・マクロ写真撮影 ・組織周囲の郭清リンパ節摘出 ・御家族への説明	・ホルマリン浸漬までの時間 ・濃度・組成 (病理主導・コスト) ・浸漬時間・温度	・臨床医・病理医同席にて集積した症例を一斉に切り出し ・病理部業務時間 (症例数・複数科の存在) ・再固定が必要な場合あり ・確定診断のため再切り出しが必要な場合あり	・密閉式自動包埋装置 ・脱水: エタノール or メタノール ・中間剤: キシロール or クロロホルム	・保管温度・時間	・伸展温度・時間 ・切片使用までの保管温度・時間

ホルマリン処理過程には
1) 浸漬時間・温度, 2) 濃度・組成, 3) パラフィン包埋までの時間等、プロテオーム解析に影響を与え得る多くの基礎的パラメータがある。

検討サンプル作成方法

肝拡大葉切除標本の非病変部肝組織を用い、FFPE 作製開始時間・包埋までの時間・薄切までの時間・伸展時間を一致させた 7 種類の固定処理後 FFPE サンプルと未固定凍結サンプル作成した。

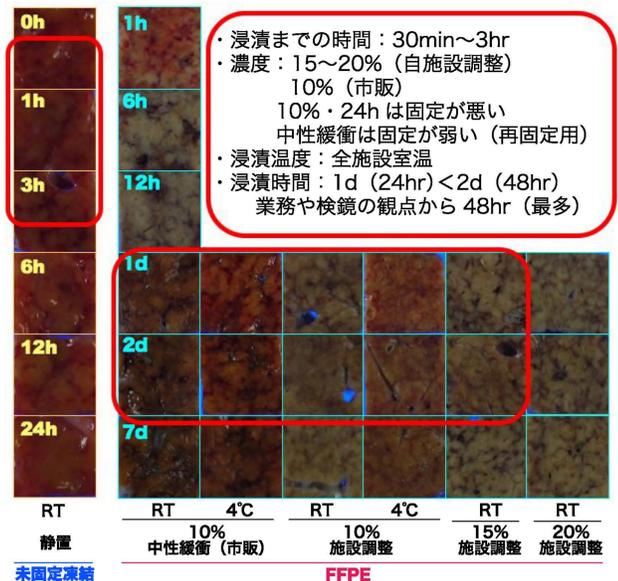


FFPE 用肝組織は、実臨床に沿うべく、摘出後 1hr 生食ガーゼ下で静置 (仮想標本整理時間=当科最大時間) 後に各種ホルマリン固定条件にて処理した。凍結用は、直ちに OCT compound 包埋した。Leica LMD6000 にて肝細胞を dissection Lipid Tissue MS Prep kit にて前処理。

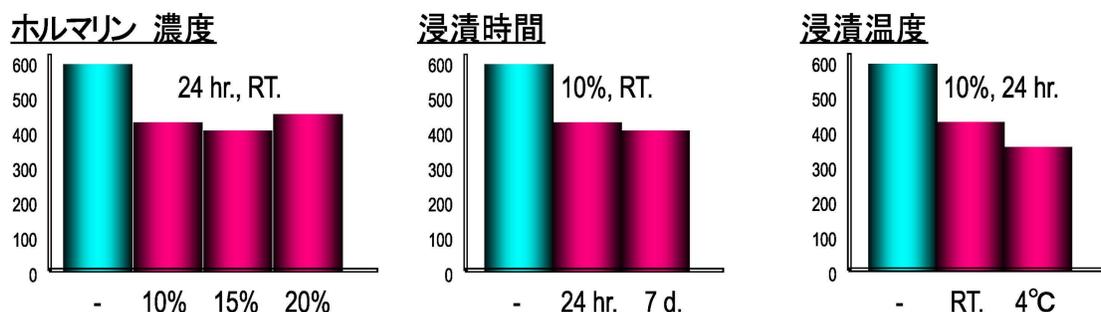
臓器	大きさmm	保存形態	浸漬前処理	ホルマリン濃度	希釈	温度	浸漬時間	備考
1 ヒト肝臓	10x10x5	凍結切片	-	-	-	-	-	薄切後EtOH: acetate (19:1) 3min固定
2 ヒト肝臓	10x10x5	FFPE	なし	10%	水 (自施設調整)	室温	24h (1日)	一般的固定法その1
3 ヒト肝臓	10x10x5	FFPE	なし	15%	水 (自施設調整)	室温	24h (1日)	東北大学病院病理部での固定法その1
4 ヒト肝臓	10x10x5	FFPE	なし	20%	水 (自施設調整)	室温	24h (1日)	過固定条件その1
5 ヒト肝臓	10x10x5	FFPE	なし	10%	水 (自施設調整)	室温	168h (1週間)	過固定条件その2
6 ヒト肝臓	10x10x5	FFPE	なし	10%	水 (自施設調整)	4°C	24h (1日)	一般的固定法その2
7 ヒト肝臓	10x10x5	FFPE	なし	10%	中性緩衝 (市販)	室温	24h (1日)	東北大学病院病理部での固定法その2
8 ヒト肝臓	10x10x5	FFPE	PBS洗浄	10%	中性緩衝 (市販)	室温	24h (1日)	プラズマ蛋白質の可及的除去

ホルマリン固定処理方法の違いが、同定ペプチド数・タンパク数などプロテオーム解析結果に与える影響につき検討した。(測定装置・条件は、本大会: A7・P14 で参照)

東北地方基幹 10 病院 (500 床以上) の現況



結果と考察 (同定タンパク質数: 1 サンプル 3 回測定, merge)



- ・直ちに凍結したサンプルと比較し、当科最大標本整理所要時間 1hr 後にホルマリン浸漬したサンプルでもタンパク質は 8 割程度は同定可能であり、当院病理部では 15%・48hr 原則としていたが、ホルマリン濃度・浸漬時間等、実臨床の場で発生しうる“ばらつき”範囲では、同定ペプチド数・タンパク質数に有意差はなかった。(Gene ontology 解析でも有意差はなかった: submitted)
- ・以上より、摘出後速やかにホルマリンに浸漬し、固定を開始することが重要であることが示唆された。
- ・10% 中性緩衝ホルマリンでの冷蔵庫内浸漬は、かえって固定が不十分であることが少なくなく、当院病理部では検鏡診断の観点から推奨していないが、同定タンパク質数も有意差はないが最も少なかった。

まとめ

凍結標本の作成が可能な施設は限られ、また肝胆膵疾患は手術症例が少ないため、プロスペクティブに集積するには労力と時間がかかり困難であった。一方、FFPE 標本を用いた研究の最大の利点は、膨大な数の試料が予後情報などの臨床データを加えた状態でアーカイブされており、レトロスペクティブな解析が容易な点である。また、大規模解析や単一施設での症例集積が困難な稀少疾患等の解析は、多施設での標本を使用しうる可能性がある。本手法は、膨大な FFPE 組織を所有する外科学教室にとって、これらを宝の山に変えるかも知れない大変魅力的な研究手法である。標本を最大限に利用することが可能な外科ならではのアイデア・デザインにより臨床に役立つ新知見を見出すことができれば幸いである。