

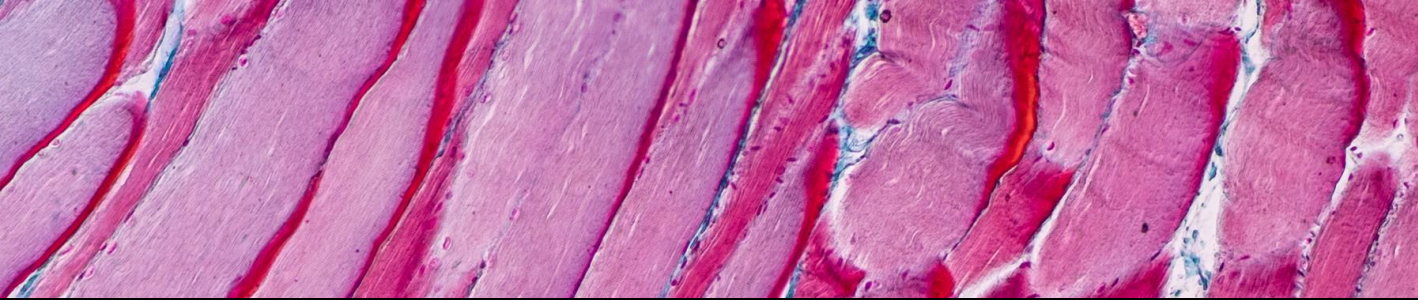
PHC社

FFPEワークフローセミナー

【セミナー資料】

2020年2月28日(金)

- 資料の学内限定公開についてはPHC株式会社の許可を得ておりますが、資料および音声データの二次配布については固く禁止させていただきます
- 問題が発生した場合、全てのセミナーデータを削除し、以降の公開ができなくなりますので、くれぐれもご注意ください



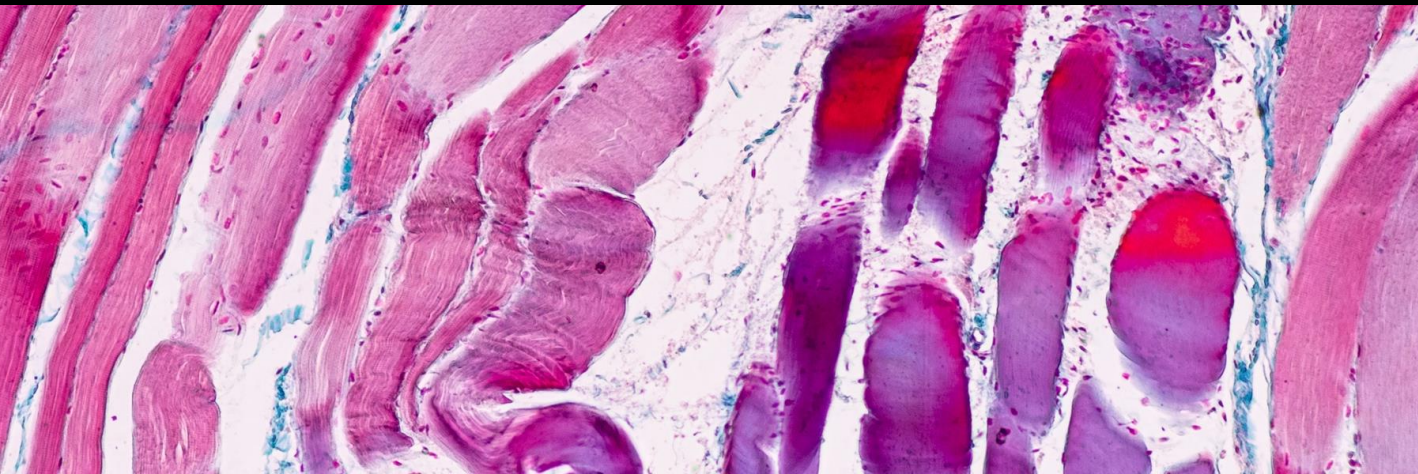
FFPE標本を用いた病理学的解析法の ワークフロー

～FFPE標本作成から遺伝子解析等への応用まで

PHC K.K.

Shinya Abe Ph.D

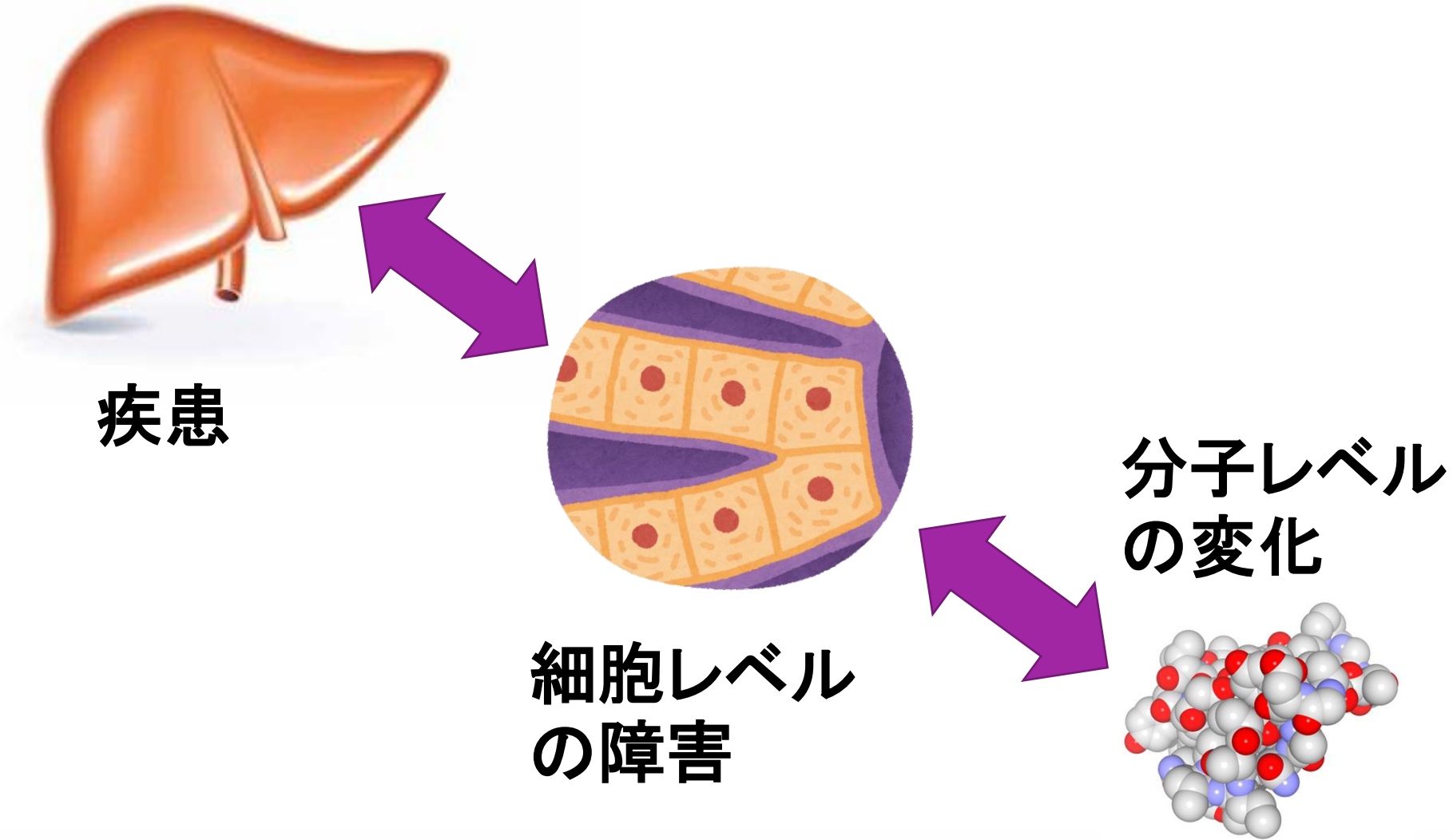
2020/2/28



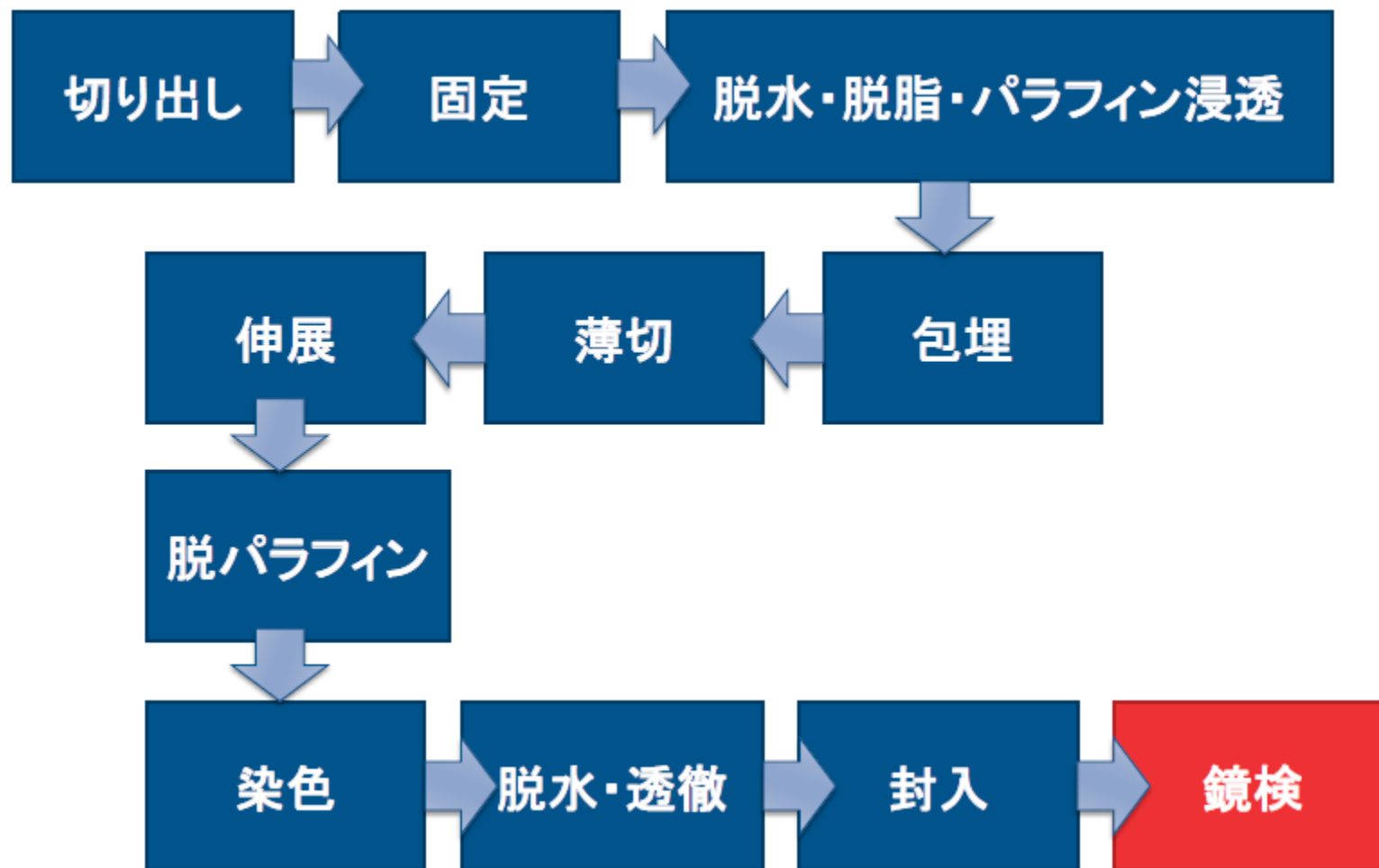
病理切片作製に必要な装置類



病理学的解析について



FFPE切片標本作成の流れ



固 定

タンパク質の固定

- 凝固型: タンパク質の溶解度を減少させ、また疎水結合を破壊することによるもの。これによりタンパク質は変性し、析出・凝集して不活化される。
→ **アルコール固定**
- 変性型: 生体分子間に共有結合をつくることによるもの。これにより可溶性のタンパク質なども細胞骨格や生体膜などに固定され、機械的強度も高まる。→ **ホルマリン固定**

10%中性緩衝ホルマリン

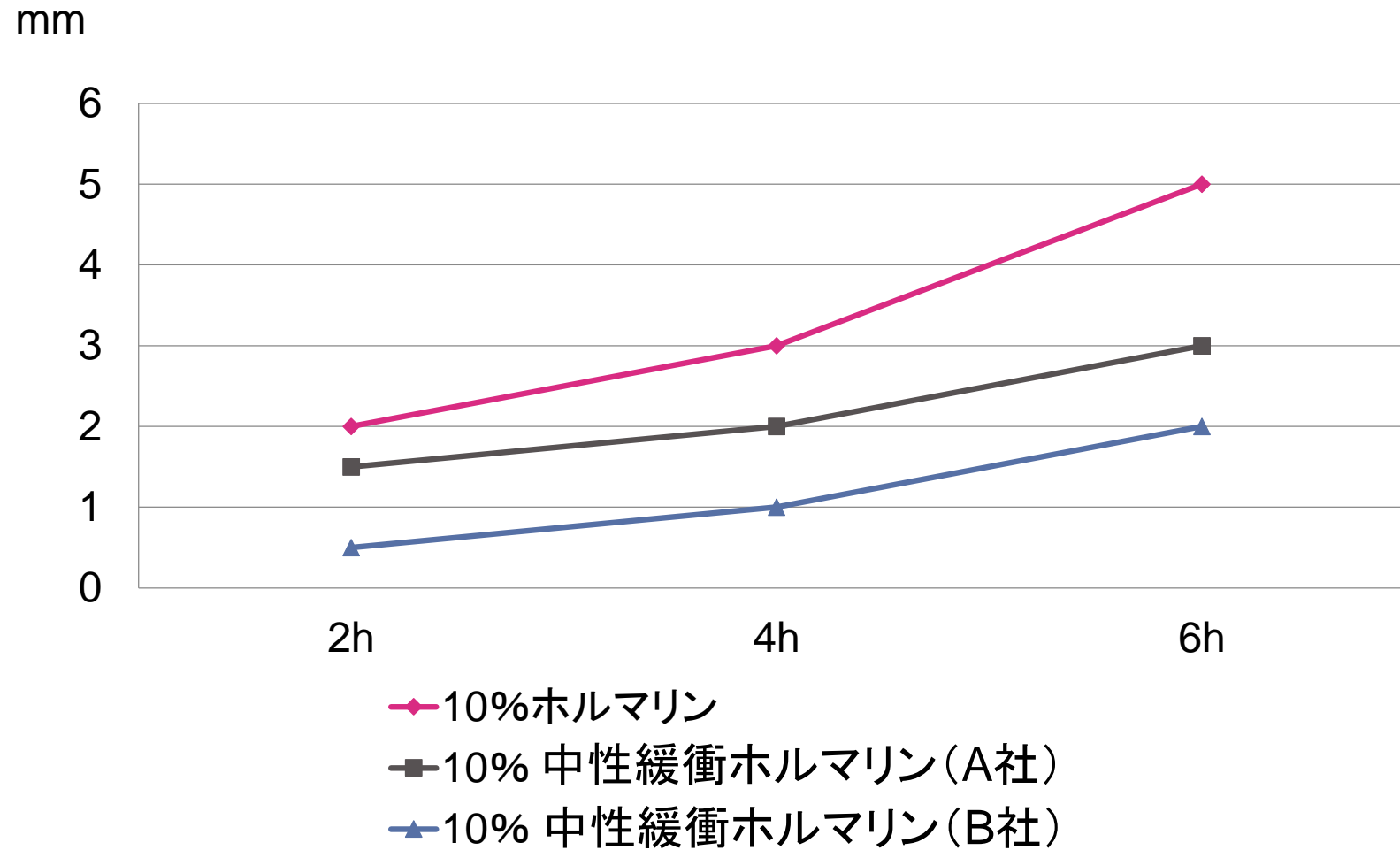
ホルマリン:38~40%ホルムアルデヒド溶液

中性:pH7.4

緩衝:pHを一定に保つ

ホルムアルデヒド+水→蟻酸+メタノール

ホルマリンの浸透力の違い



10%中性緩衝ホルマリンは組織に
1時間で1mm浸透する

推奨固定時間: 6~72時間

過固定による影響

- 組織の収縮が起こる。
- 免疫染色の染色性が落ちる。
- DNA、RNAの回収率が落ちる。

よい組織標本を作製するための固定条件

- 材料が小さいこと
- 材料は新鮮で自家融解がないもの
- 切り出しは鋭利な刃物を使用し、組織の圧座を生じないもの
- 材料は乾燥させない

固定法について



脱灰

骨組織や石灰化した組織は、物理的に硬いため薄切が困難になる。この時、脱灰処理を行うことで、スムーズな薄切が可能になる。

- ・プランク・リクロ (Plank-Rychlo) 法
酸を用いて、石灰成分を除去。
大きな骨組織向け。
- ・EDTA法
EDTAのキレート作用を用いた脱灰法。
石灰化組織、小さい骨組織向け。

脱脂

脂肪分が多い組織は、脱水不良になるため、包埋前に脱脂処理を行うと良い。

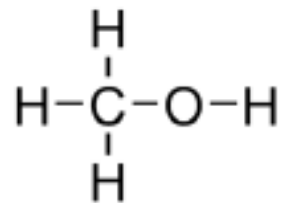
- ・アセトン
- ・キシレン・アルコール混合液(1:1)
- ・メタノール・クロロホルム混合液

37°C程度に加熱して、1h～一晩行うと良い。

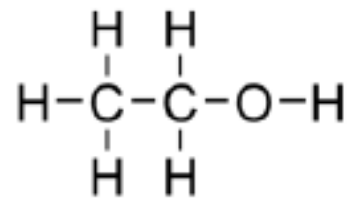
組織内に脂肪があればその脂肪より深部に存在する水分の流出が妨げられる。

完全脱水のために脱脂が必要なら、脱水剤の選択には脂肪を溶かす能力も合わせて考慮しなければならない。

脂肪に対する溶解力という観点からは炭素数の多い方が有利であり、エタノールはメタノールに勝る。



メタノール



エタノール

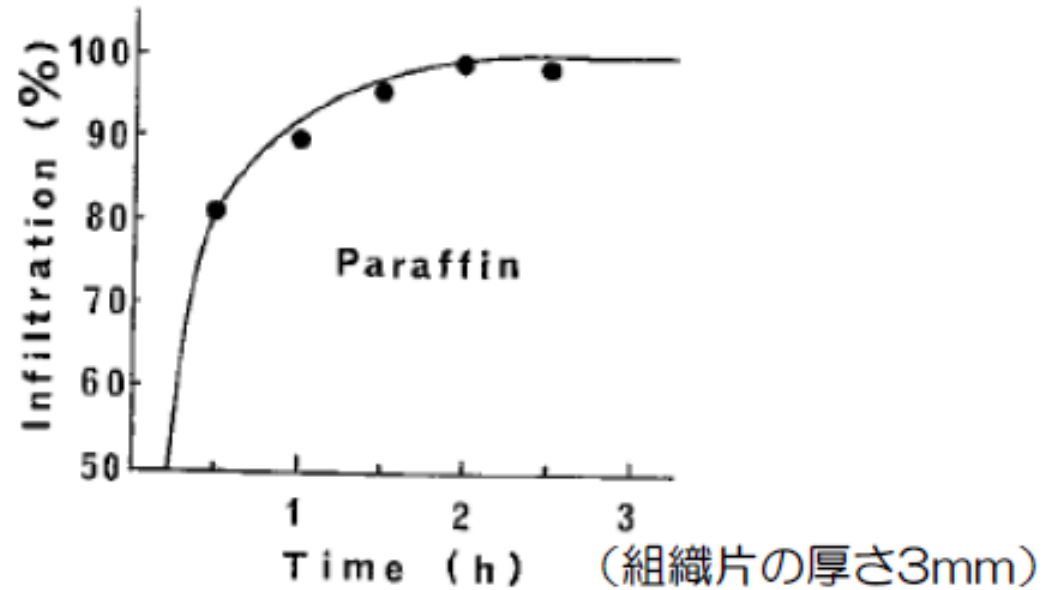
パラフィン浸透

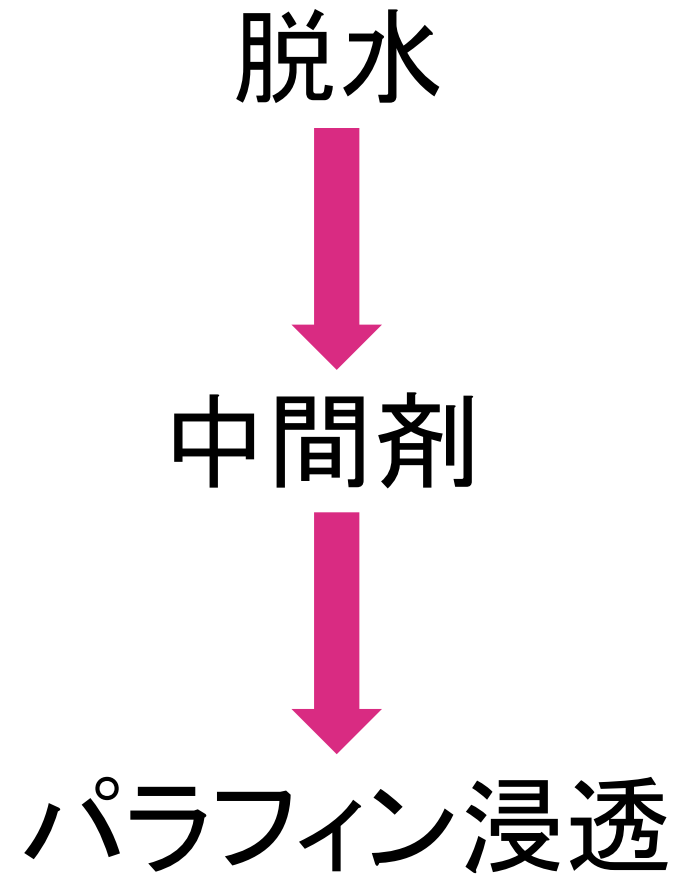
パラフィン浸透の目的

組織を顕微鏡で観察するには薄い切片(3～4 μm)を作製しなければならない。そのため組織にパラフィンを浸透させ、固化することによって薄切をしやすくすること。

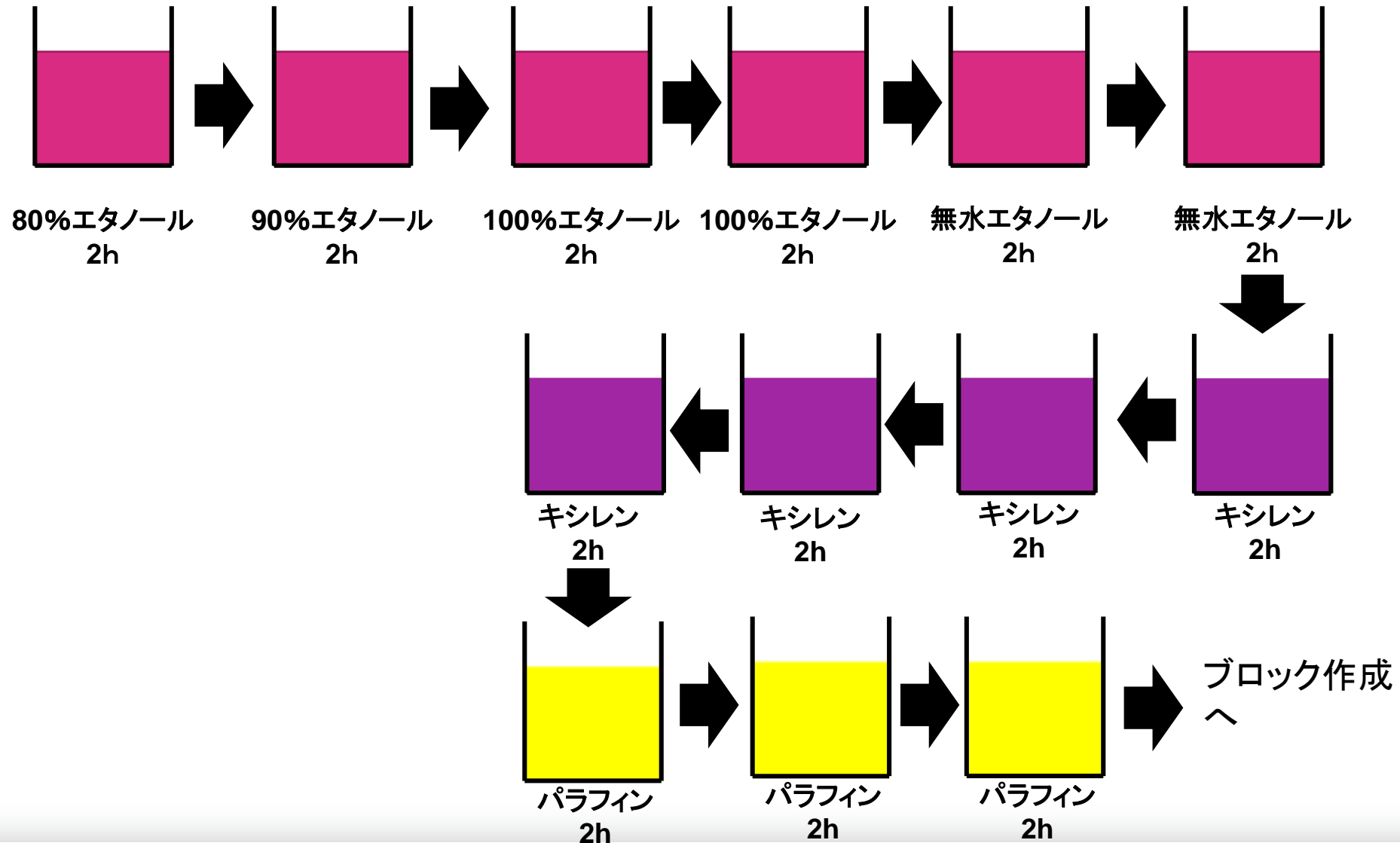
パラフィン浸透速度

融点58～60℃のパラフィンを使用し、63℃において浸透速度を測定した結果、浸透は約1.5～2時間で終了した。





パラフィン浸透・包埋法(旧式)





- ・現在、作業環境面からも**密閉型自動包埋装置**が用いられる。
- ・固定、脱水、中間剤、パラフィン浸透を自動で行える。
- ・薬液の温度を上げたり、チャンバー内の圧力を変化させることで、速やかに標本を作成することが可能。

表3 組織処理プログラム例（組織の厚さが3mmの場合）

槽番号	薬液名	時間 (h)	温度 (℃)	P/V	Mixing
1	95%エタノール	1	37	on	fast
2	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
3	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
4	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
5	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
6	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
7	エタノール (99.5%)	1	37	on	fast
8	キシレン	1	37	off	fast
9	キシレン	1	37	off	fast
10	キシレン	1	37	off	fast
11	パラフィン	1	62	off	fast
12	パラフィン	1	62	on	fast
13	パラフィン	1	62	on	fast
14	パラフィン	1	62	on	fast

P/V：加圧と減圧の繰り返し

Mixing (fast)：処理槽中の薬液の排出・吸入サイクル1 2分ごとに実施

パラフィン浸透促進に必要な条件

1. 振盪しなくてもできるが、**振盪した方が2倍**またはそれ以上に速い。
2. 室温(22°C)より38°Cのほうが**約2倍**速い。



振盪させ、温度をかけるとパラフィン浸透は促進する

脱水の目的

- ・組織の70%は水分。
- ・固定液にも水が含まれる。
- ・パラフィンと水は相性が悪い。
- ・水の残存は、標本に悪影響。

- ① 脱水力が大きいこと
- ② 脱水中に組織を損傷、溶血させないこと
- ③ 中間剤との相溶性がよいこと
- ④ 毒性が低いこと
- ⑤ 取り扱いが安易なこと
- ⑥ 安価なこと

主に使用される脱水剤の種類

メタノール

エタノール

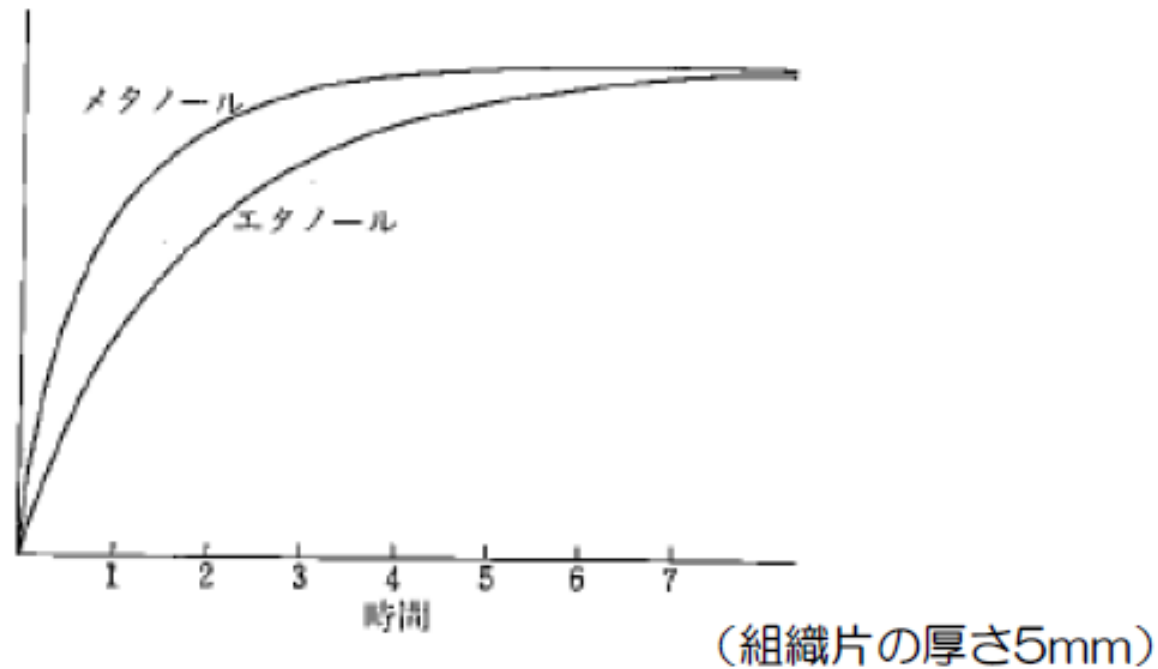
イソプロピルアルコール

病理用アルコール(市販品)

メタノールとエタノールの比較

脱水剤の組織への浸透速度はメタノールの方が早い

メタノール4~5時間 エタノール約8時間



組織片の厚さと脱水速度

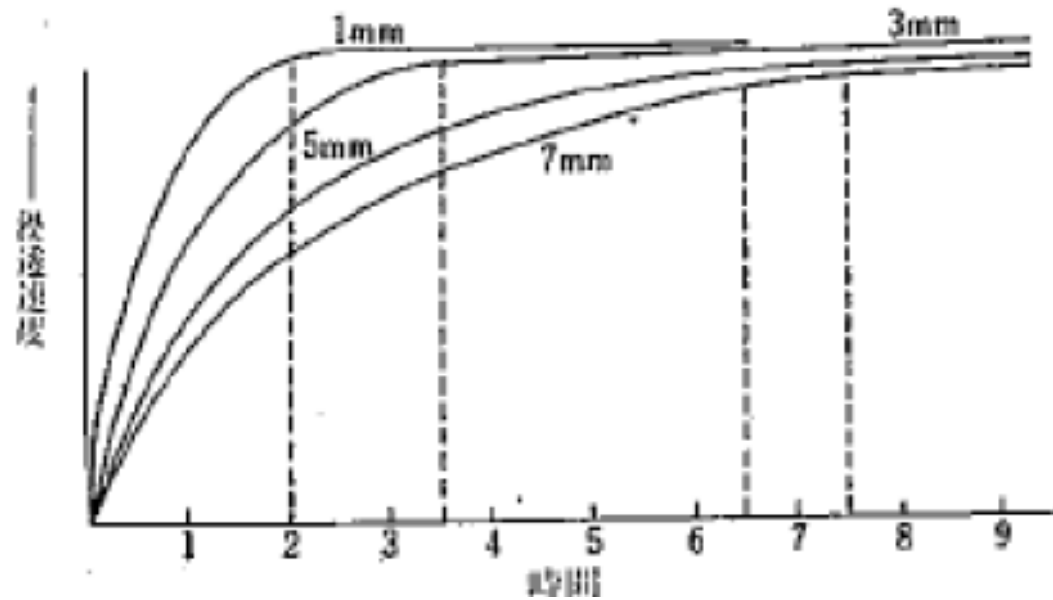
アルコールの浸透、流出の平衡時間

1mm厚の組織片 2時間

3mm厚の組織片 3～4時間

5mm厚の組織片 6～7時間

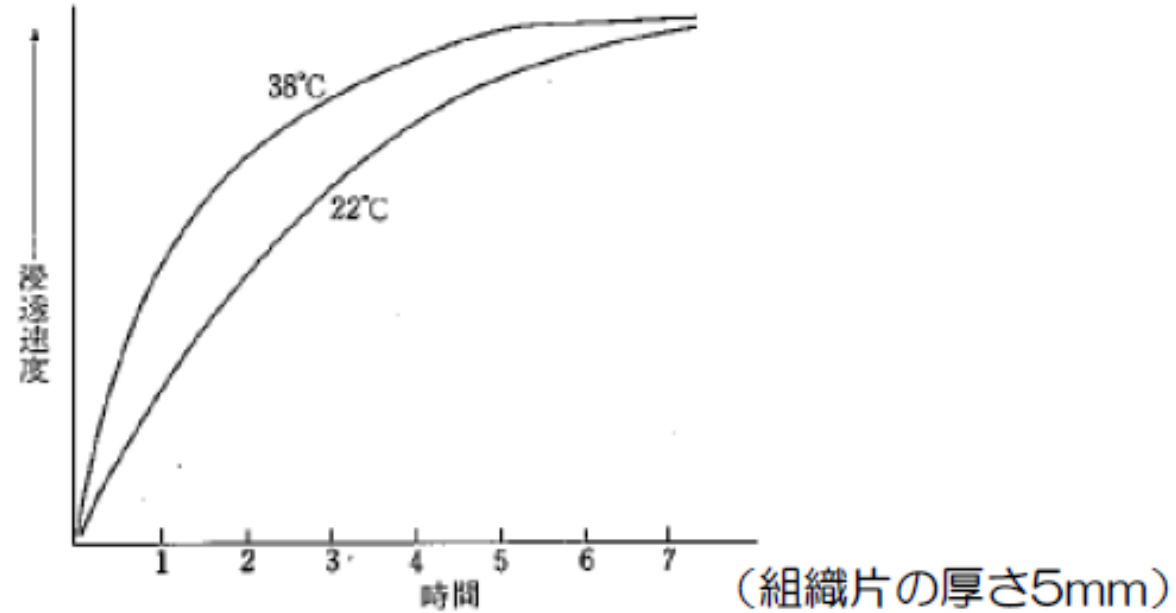
7mm厚の組織片 7～8時間



脱水剤：エタノール
組織片：20×25mm
温度：20～25℃
攪拌：スターラー300rpm

加温効果

- ① 38°Cでははじめの3時間に浸透促進効果がみられる。
- ② 40°C以上の加温は組織硬化を招き、浸透速度を低下させる。



- 🌸 脱水剤として使用されているのは主にアルコール類
- 🌸 脱水速度、価格ではメタノール
(エタノールの脱水速度は約1/2)
- 🌸 組織の収縮変形についてはエタノール、メタノール
間に差はない(最終的には1~2%収縮)
- 🌸 組織の硬くなり方はメタノールの方が少ない
- 🌸 但し、メタノールはエタノールより毒性が強い
(メタノール200ppm、エタノール1000ppm 米国産業衛生専門家会議)

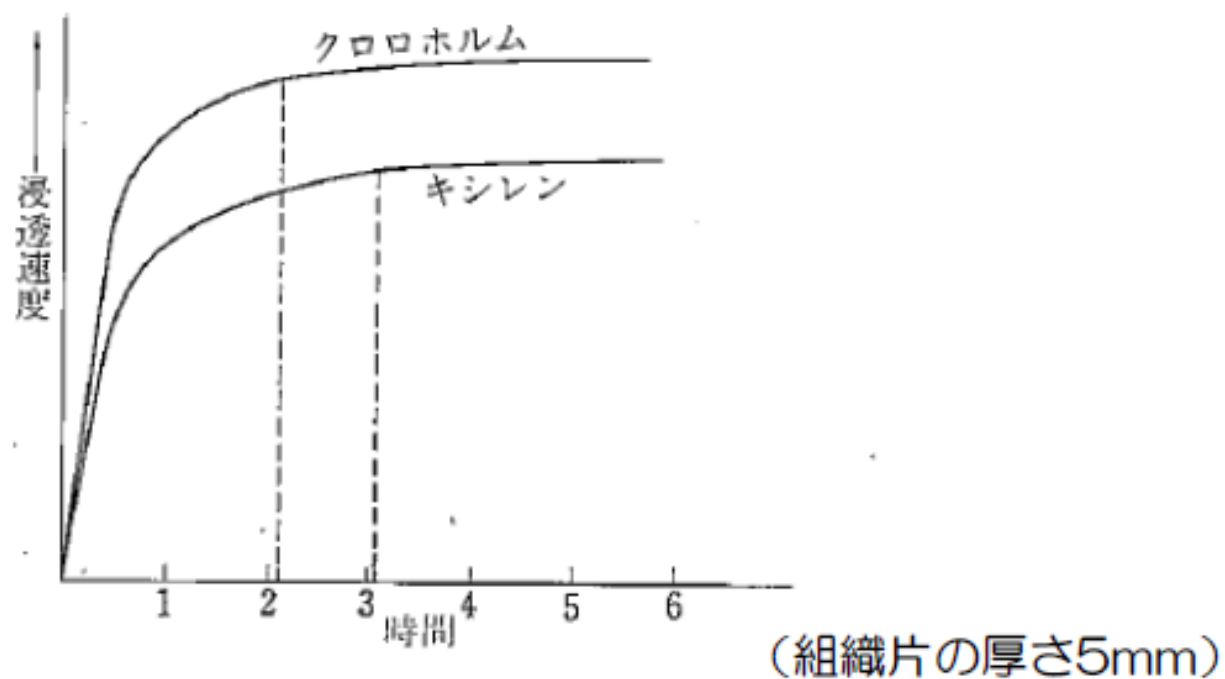
- ① アルコール、パラフィンと相溶性があること
- ② パラフィンから蒸発しやすいこと
- ③ 組織を損傷、溶血させないこと
- ④ 毒性が低いこと
- ⑤ 取り扱いが安易なこと
- ⑥ 安価なこと

主に使用される中間剤の種類

- ・クロロホルム
- ・キシレン
- ・代替キシレン

中間剤の浸透速度

中間剤の組織への浸透速度は脱水剤に比べてかなり早い
クロロホルム約2時間 キシレン約3時間







代替キシレン(クリアライト3)



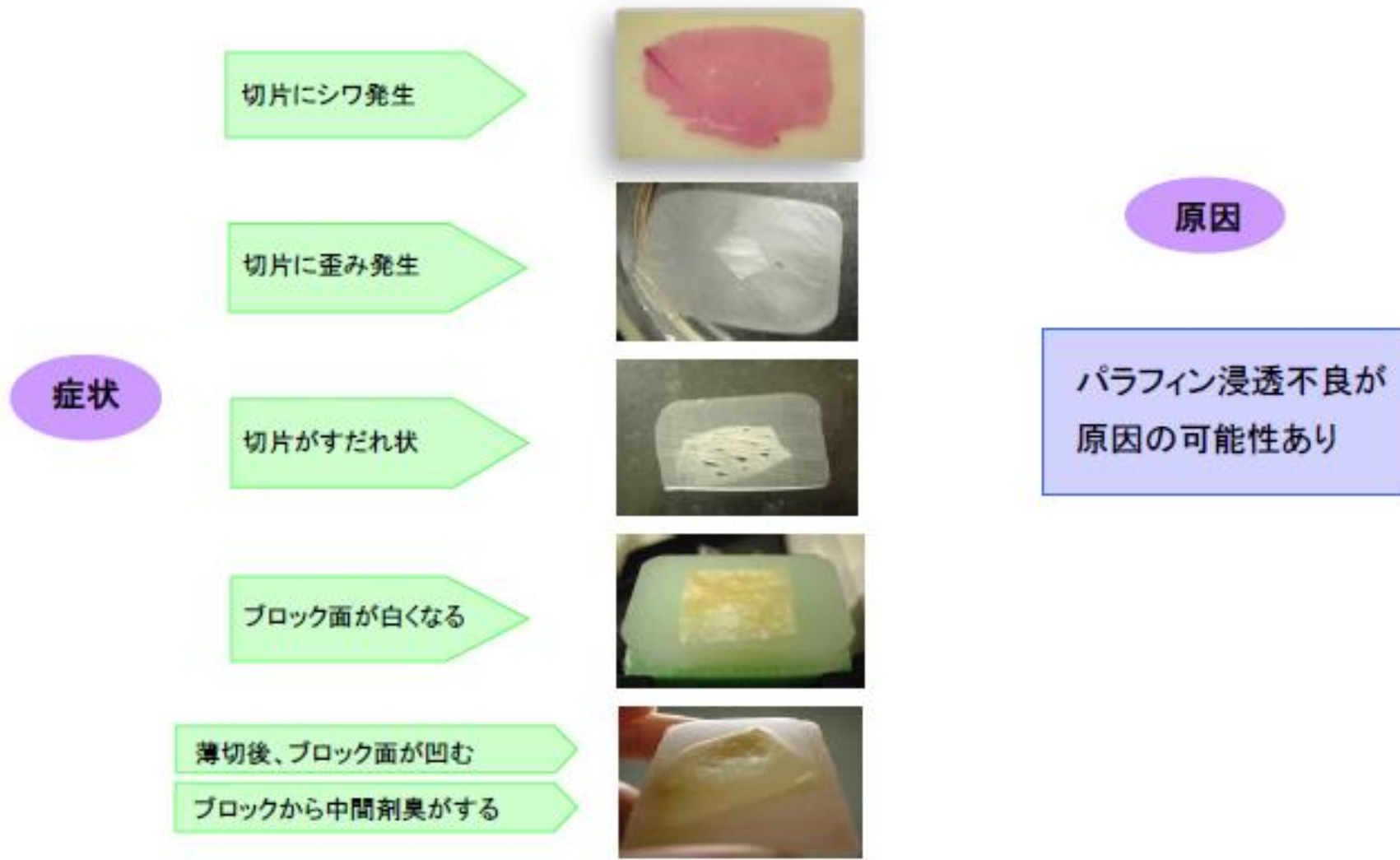
- ・キシレンは作業環境測定対象の有機溶媒。
- ・人体への障害もある。
- ・ドラフト内での使用など制限がある。

- 包埋処理での脱脂、染色工程の脱パラや透徹に使用可能
- 包埋装置や自動染色装置でも使用可能
- 毒性の高いベンゼン環を含まない構造
- 非常に低臭

-  中間剤として使用されているのは主にクロロホルム、キシレン(代替キシレン、リサイクルキシレン)
-  浸透速度ではクロロホルム(キシレンは約2/3と遅い)
-  キシレンの方が沸点は高いので、パラフィン内での滞留時間は長い
-  但し、クロロホルムはキシレンより毒性が強い(クロロホルム50ppm、キシレン100ppm)

- ・しっかり固定する
固定不足の場合、脱水時組織にゆがみが生じる
- ・できるだけ新しい試薬を使用する。

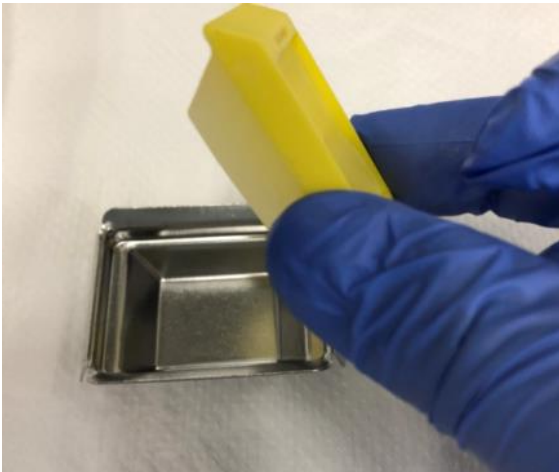
パラフィン浸透不良が及ぼす薄切への影響



パラフィン包埋

パラフィン包埋

金型に、パラフィン包埋したサンプルと、パラフィンを流し込んでブロックを作成する。



薄切

薄切法について

マイクロームを用いて2～5 μ mにスライスする。

滑走式マイクローム



回転式マイクローム



セクショントランスファーシステム(STS)



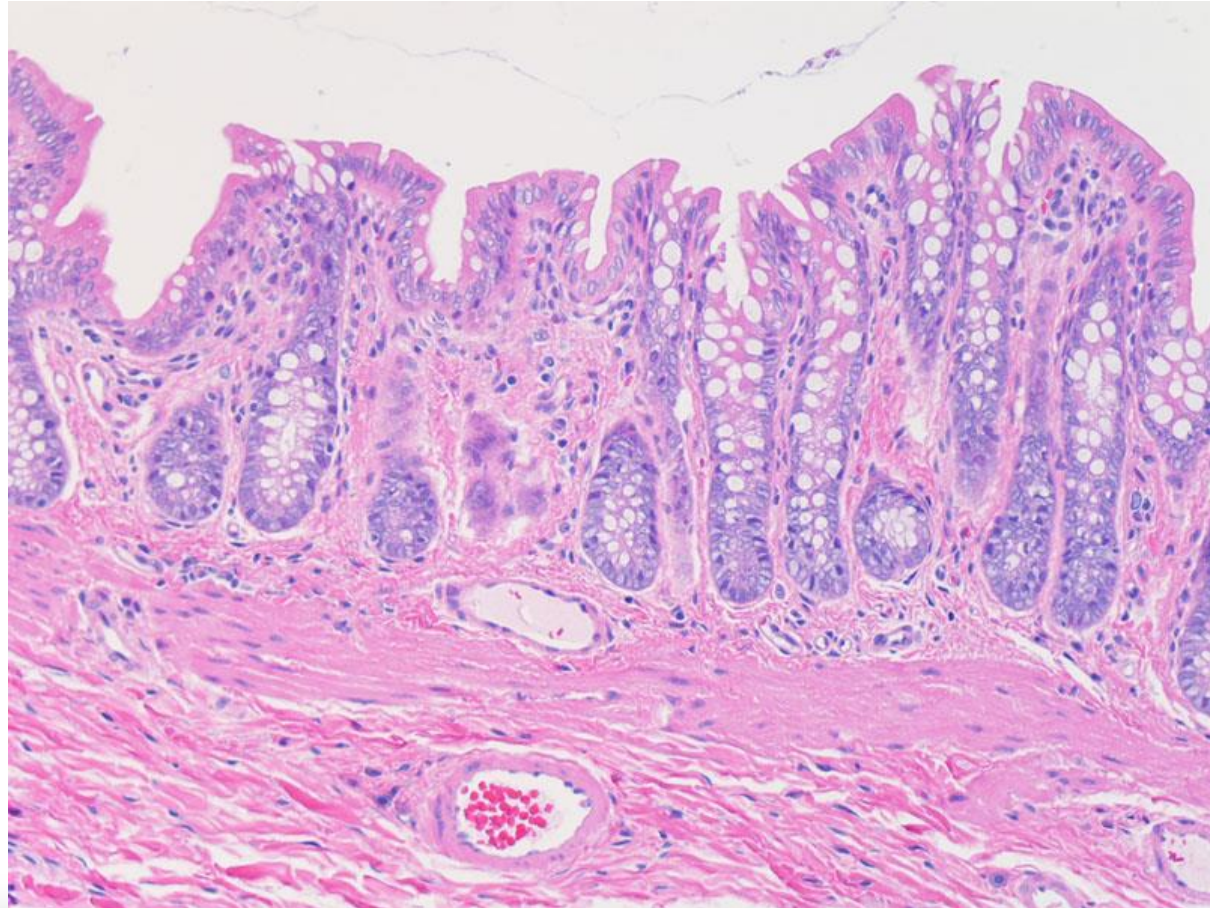
スライドガラスの選択

- コーティングなし
- シランコーティング
- Poly-L-lysineコーティング



HE染色について

Hematoxylin で核を紫色に、Eosinで細胞質をオレンジ色に染める染色法。



一般的なHE染色の Protocol

- ①キシレン
- ②：キシレン
- ③：キシレン
- ④：100%エタノール
- ⑤：100%エタノール
- ⑥：70%エタノール
- ⑦：蒸留水
- ⑧：ヘマトキシリン溶液
- ⑨：1%塩酸アルコール
- ⑩：流水水洗
- ⑪：エオジン溶液
- ⑫：70%エタノール
- ⑬：100%エタノール
- ⑭：100%エタノール
- ⑮：キシレン
- ⑯：キシレン
- ⑰：キシレン

脱パラフィン

染色

透徹



脱パラフィン

- ①キシレン
- ②：キシレン
- ③：キシレン
- ④：100%エタノール
- ⑤：100%エタノール
- ⑥：70%エタノール

脱パラフィン

切片上のパラフィンを取り除く目的で行う。

HE染色に限らず、染色液のほとんどは親水性。

染色

- ⑦ : 蒸留水
- ⑧ : ヘマトキシリン溶液
- ⑨ : 1%塩酸アルコール
- ⑩ : 流水水洗
- ⑪ : エオジン溶液

} 染色

目的の色素で組織を染め出す。

核:ヘマトキシリン {
マイヤーのヘマトキシリン(進行性染色:分別不要)
カラッチのヘマトキシリン(退行性染色:分別要)

細胞質:エオジン

- ⑫ : 70%エタノール
- ⑬ : 100%エタノール
- ⑭ : 100%エタノール
- ⑮ : キシレン
- ⑯ : キシレン
- ⑰ : キシレン

} 透徹

封入剤に合わせた試薬に置換していく。

一般的な封入剤はキシレン溶性の樹脂
蛍光染色等は水溶性の封入剤を用いる。

自動染色装置 (ジェミニAS)



- 一連の染色プログラムを自動で実行することができる。
- 自動なのでタイムカウントやドーゼの移動などの手間が大幅に省ける。
- 複数の染色プログラムを実行できる。

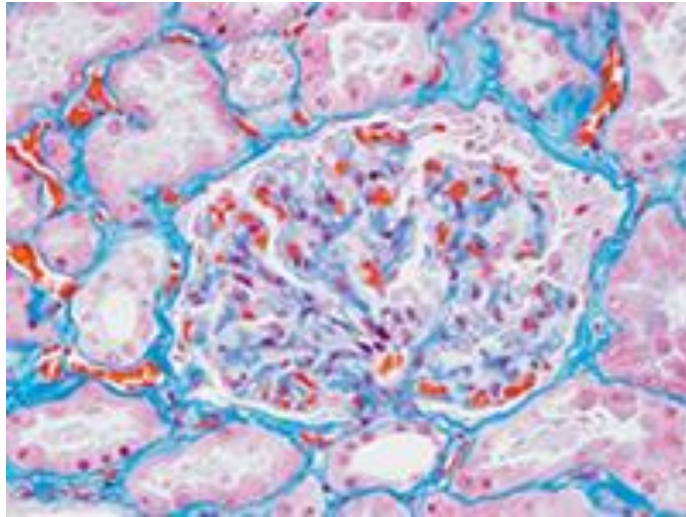
特殊染色

染色法	目的
ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色	一般染色
エラスチカ・ワンギーソン染色	弾性線維
アザン染色	膠原線維・筋線維
マッソン・トリクローム染色	膠原線維・筋線維
過ヨウ素酸メセナミン(PAM)染色	腎糸球体
銀染色(鍍銀法)	細網線維
PAS染色	多糖類・上皮性粘液
アルシアン青染色	酸性粘液多糖類

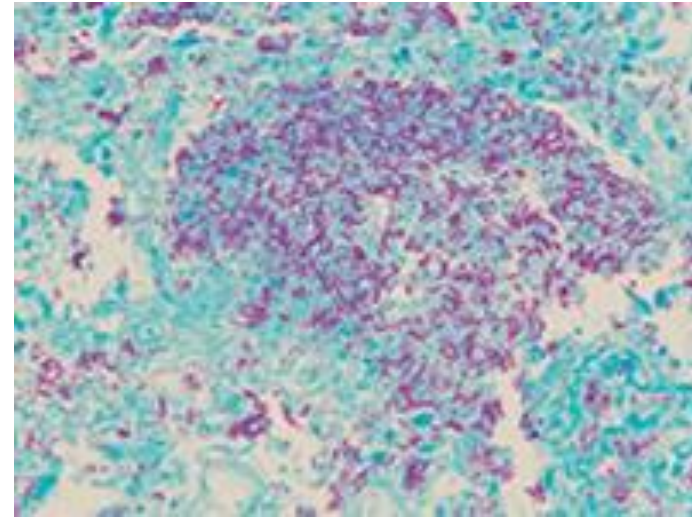
染色法	目的
ベルリン青染色	鉄染色
コンゴ赤染色	アミロイド
グロコット染色	真菌
チール・ネルゼンの抗酸菌染色	抗酸菌染色
グリメリウス法(好銀性染色)	脾ラ氏島A細胞・内分泌組織
フォンタナ・マッソン染色	メラニン
ギムザ染色	ヘリコバクターピロリ菌

特殊染色

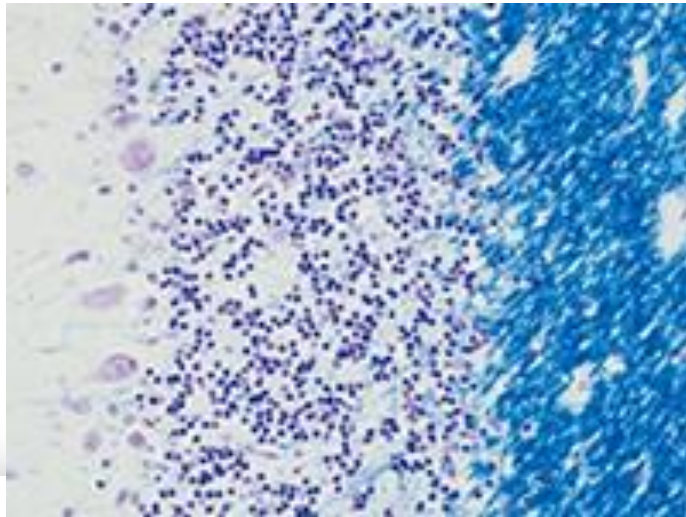
マッソントリクロム染色



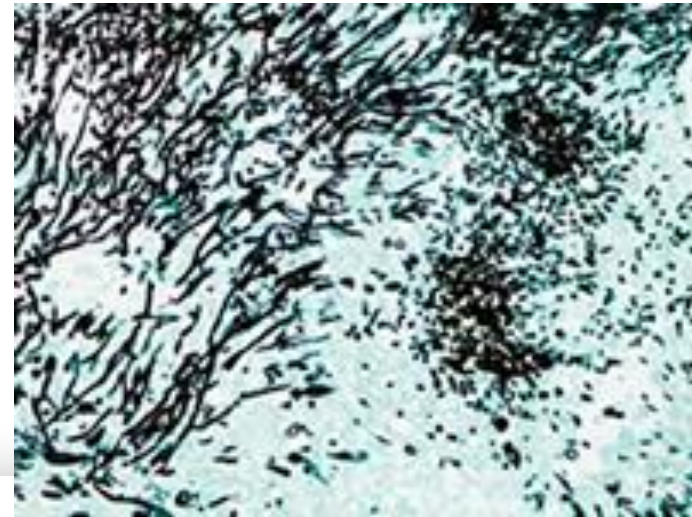
チールネルゼン染色



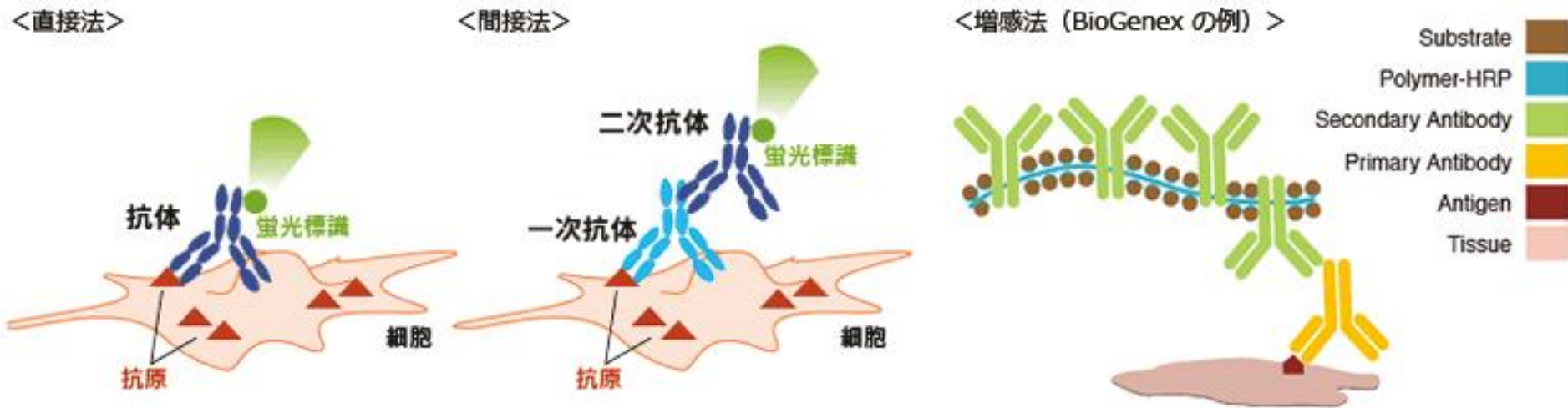
KB染色

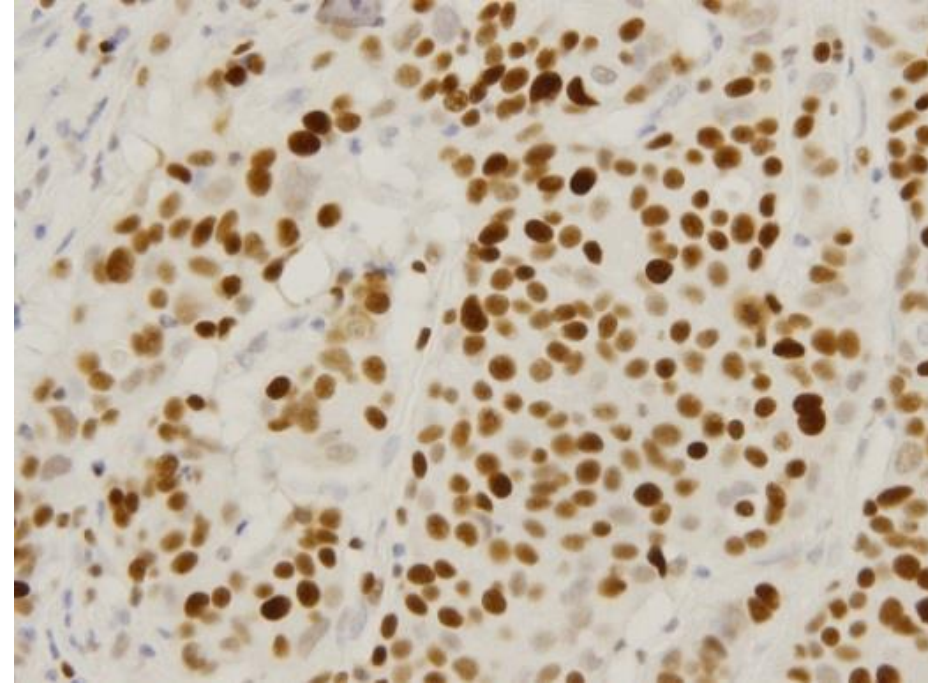
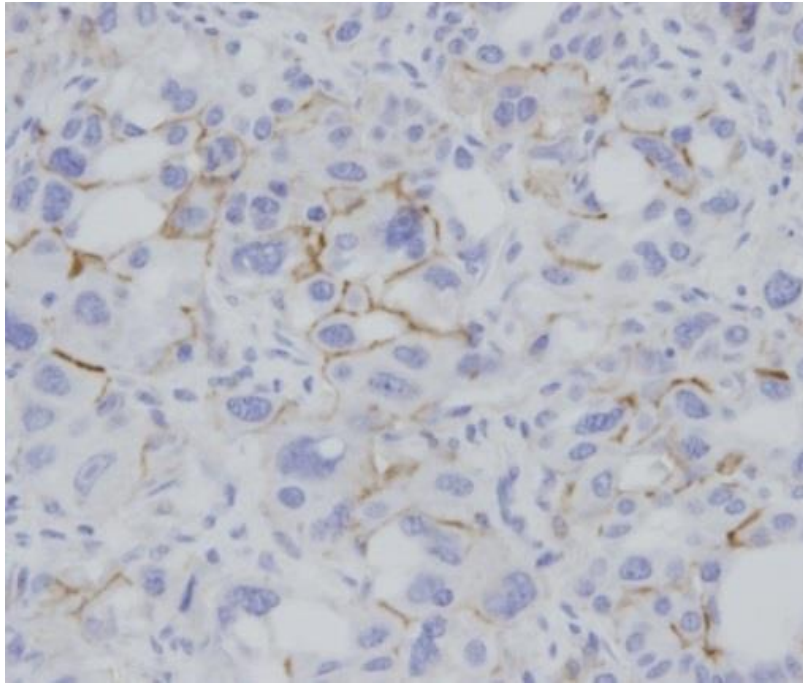


グロコット染色



抗原抗体反応を用いた染色法。標本上のどの場所に目的抗原が存在するか確認できる。
化学発色のほか、蛍光抗体を用いる方法も可能。

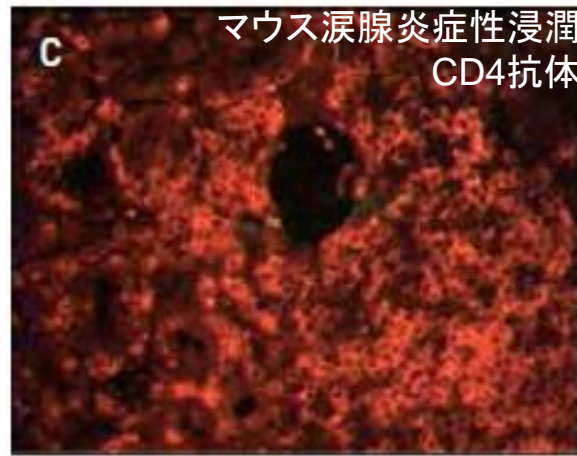
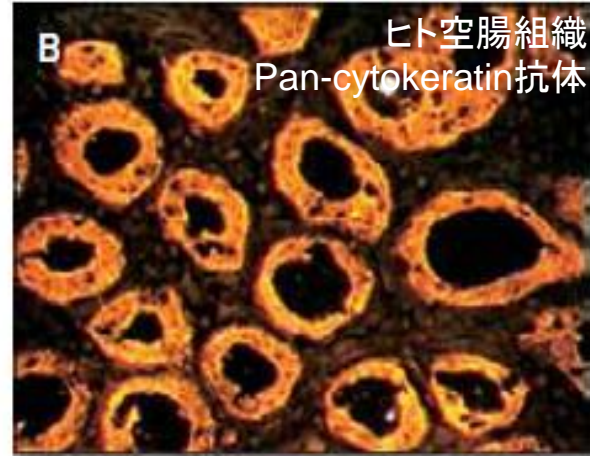
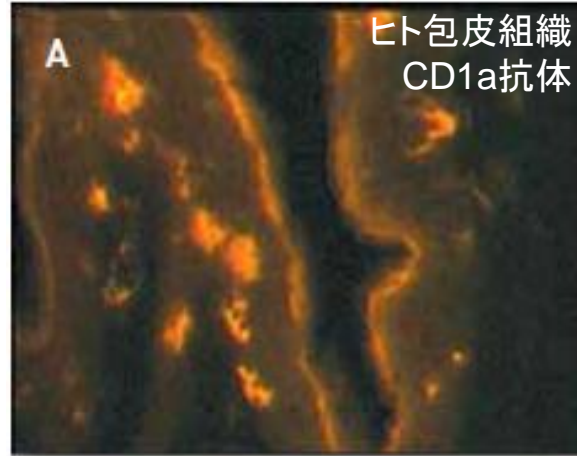




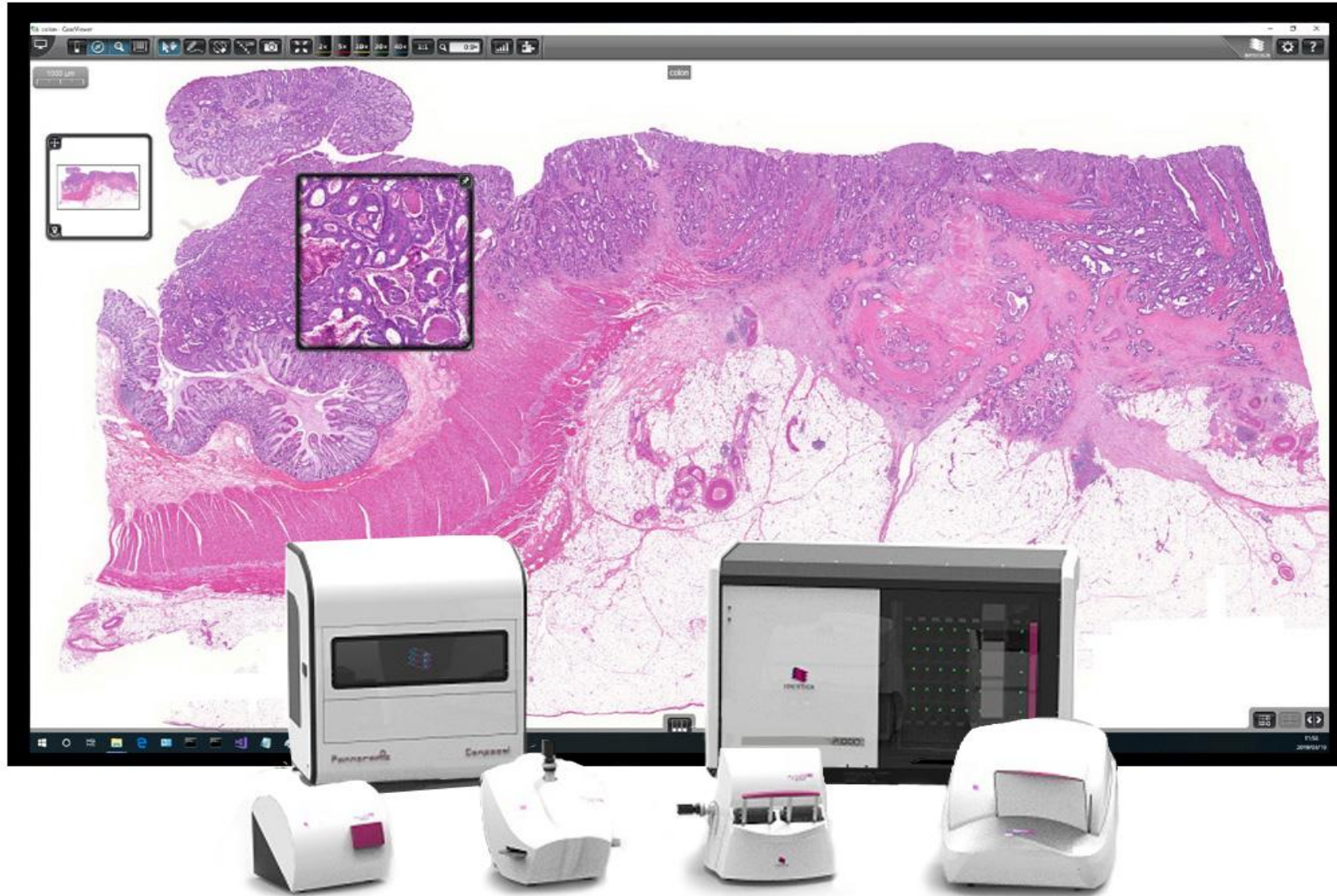
DAB発色

(3,3'-DIAMINOBENZIDINE, Tetrahydrochloride)

免疫組織化学染色

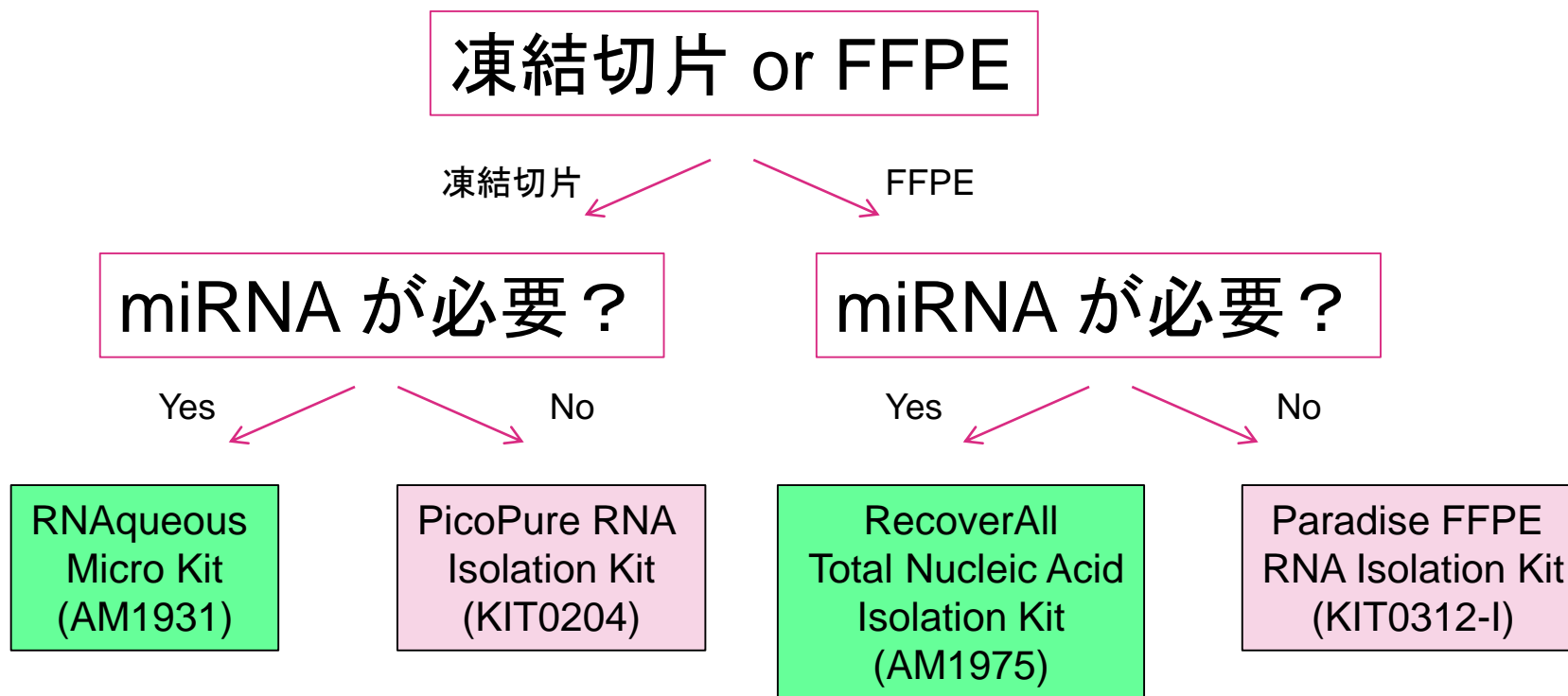


バーチャルスライド(WSI)



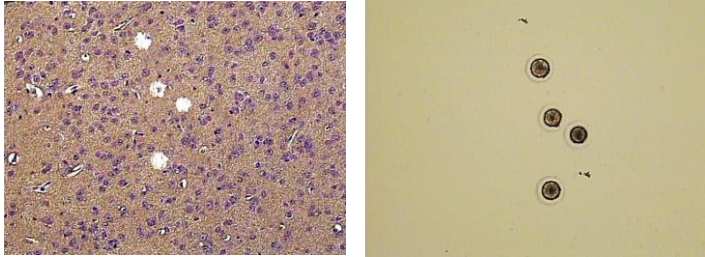
核酸の抽出

ホルマリン固定によってDNA、RNAは一部破損しているが、抽出することが可能である。
ただし、固定前の検体に比べて、DNA、RNAの品質は悪い。

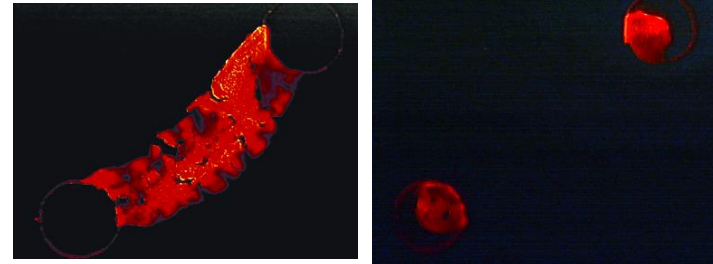


マイクロダイセクション

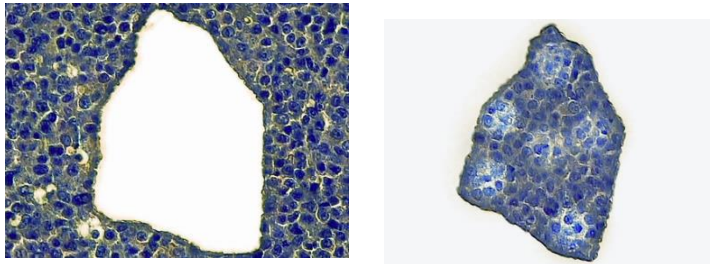
Frozen Mouse Brain



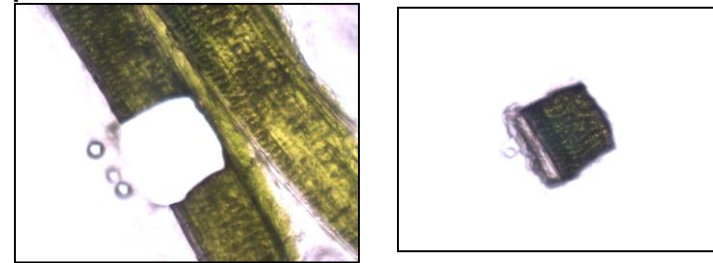
Drosophila Embryo X-gal-Stained Fluorescence



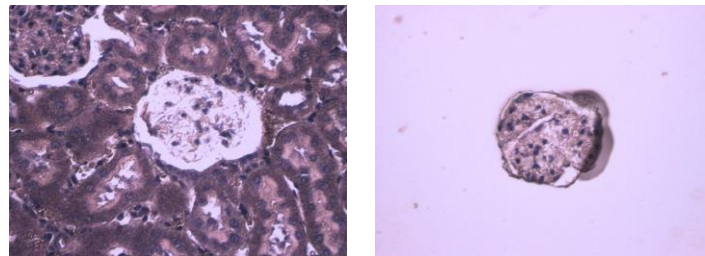
FFPE Human Bone Marrow



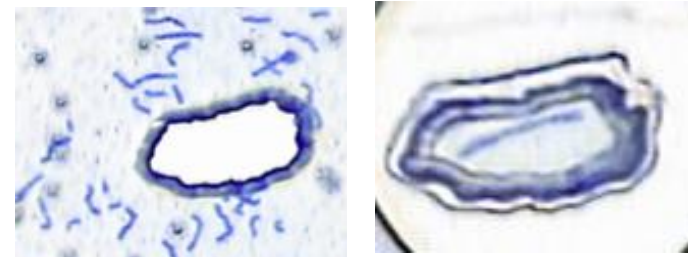
plant



FFPE Rat kidney section



Human Chromosome, Peripheral Lymphocyte
Giemsa stained



検体

1) 未染標本スライド (FFPE)

検体量: 厚さ5 μm × 5~10枚

- 目安
- ・外科生検の場合: 厚さ5 μm × 5枚以上
 - ・針生検の場合: 厚さ5 μm × 9枚以上

2) 凍結組織 (FF)

検体量: 凍結組織 100 mg

検体の腫瘍部位の要件

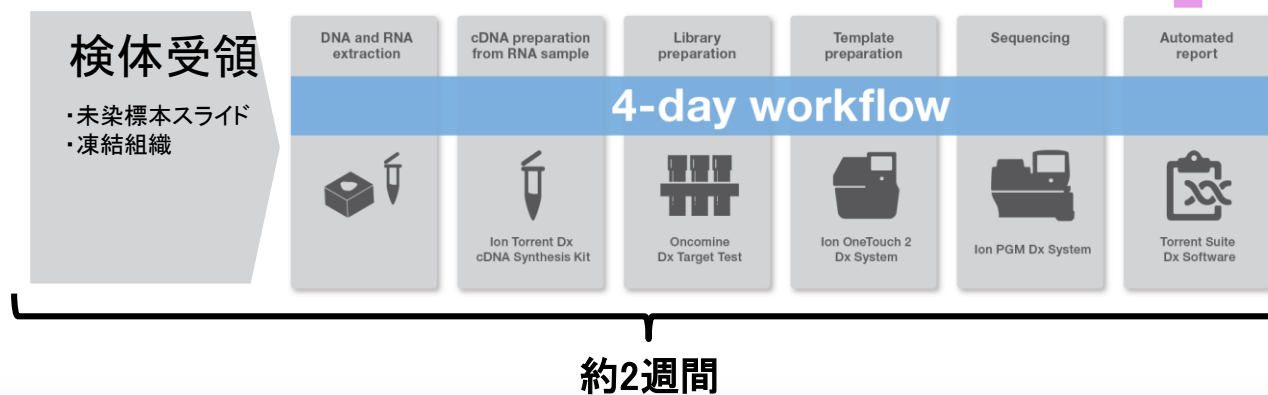
病理検査材料

30%以上の腫瘍細胞が含有されていること

留意事項

- ①腫瘍細胞含有率が30%未満の場合は変異があっても検出できない可能性がある。
- ②病理検査材料は、組織のホルマリン固定により核酸が断片化されているため、固定液の種類や組成、固定時間、固定後の検体の保存状態によっては解析不可能なことがある

BRAF V600E変異
の有無をレポート



FFPE切片の作成手法は非常に伝統的(歴史の長い)手法です。

保存も簡単で様々な解析に利用できます。

手技は少々コツが必要です。弊社でもサポート致します。

不明な点はお問い合わせください。

Thank you!