

病理診断アトラス (21)

展望：病理診断の未来—臨床へのかけ橋—

東京女子医科大学医学部病理学（第一）
東京女子医科大学病院病理診断科

コバヤシ マキオ
小林 槇雄

（受理 平成 23 年 1 月 18 日）

Atlas of Diagnostic Pathology (21)

Future Prospects of Diagnostic Pathology: A Bridge Between Physicians and Patients

Makio KOBAYASHI

Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine
Department of Surgical Pathology, Tokyo Women's Medical University Hospital

The Department of Pathology has been engaged in research, diagnosis and teaching.

Surgical pathology has become increasingly significant in the field of pathology. The Department of Surgical Pathology operates with the cooperation of the Department of Pathology. There are two different approaches expected of pathology in present and future practice. One is to be included among the investigative fields of medical science and cell biology of the human body. The other is to remain a basic field for clinical medicine, which in its mission, is a good partner and critic of clinical medicine to keep up with the growing demand for maintaining a close relationship with clinical medicine. The fellowship is expected to facilitate cross talks between pathologists and physicians, which will lead to the contribution of the discovery of new diseases and the elucidation of their mechanisms based on morphology. Since we have archives of paraffin blocks, including over 10,000 autopsy specimens that were accumulated in the past century, a new molecular approach described here will lead to the establishment of disease profiles in Japan in the future.

Key Words: diagnostic pathology, immunohistochemistry, *in situ* hybridization, molecular pathology, accurate control

はじめに

寺岡 慧前編集委員長（名誉教授）の発案で企画された特集「病理診断アトラス」も、学内外の病理診断に関わる人々の友情と協力により、完成した。臓器ごとの専門医により執筆されたアトラスを閉じるにあたり、はじめに本学での病理診断部門の変遷について記し、次いで現状と将来への展望を述べてみたい。

病理診断部門の変遷

本学における病理診断は、病院病理科（現病理診断科）が講座から離れ、独立した診療支援部門として設けられ、心臓血管研究所、脳神経、消化器病、

腎センターを除く学内診療各科の生検・外科手術材料の病理診断業務を行ってきた。平成 5 年 2 月に細田 瑛一院長の下で、中央検査部門の再編計画の一環として、また将来計画の過渡的方策として、それまで独立して運営されてきた科は、中央検査部の管理下で運営された。その後、平成 9 年 2 月に、「病理のあり方委員会」における議論を総括して病理部門の再編と出発に向けての最終答申が教授会に提案され、病理部門再編の具体策が承認された。

平成 12 年、委員会のメンバーであった第二講座主任教授笠島 武教授が退任されて、後任として小田 秀明教授（東京大学分子病理）を第二講座主任教授



Fig. 1 Rapid Histoprocessing System (Milestone Co.)

として迎えることができた。平成9年7月から、消化器病センターの生検材料と細胞診断を病院病理科と第一講座が分担してきたが、平成16年5月に旧消化器病センター2階に病院病理検査室が完成し、その後、すべての診断業務がほぼ統合されて、現在に至っている。

平成19年9月21日には、厚生労働省医道審議会標榜部会において「病理診断科」の標榜が承認され、平成20年2月27日の国会において「医療法施行令の一部を改正する政令」が公布されて、4月1日から標榜が実施された。本学では、平成21年4月に附属病院に診療科としての病理診断科が誕生した。

ふり返って、昭和61年9月の第100回日本病院病理医協会交差点での熱のこもった議論、昭和63年の第76回日本病理学会総会の議を経て、実に20年余を経て、学会および学会員にとり念願の診療科が実現した¹⁾。

病理診断の現状と将来

現在、病理診断の精度を高め、診療に適切に対応するための新しい研究技術の開発と導入が進んでいる。いくつかの施設において、既に迅速固定包埋法の導入で、同日診断 Day Pathology が実現し、患者サービスの向上と在院日数の短縮などに貢献するものとして定着しつつある。一方、診療チームの一員として、高度で、迅速な業務と共に、安全な検査室の環境整備が求められ、病理検体から得られる情報の網羅的解析、分子標的治療の適応決定のための免疫組織化学のルーチンワークを含め、標準化に向けての精度管理が必要であることは言うまでもない。

1. 病理診断の迅速化

医療技術の進歩は、臨床検査の迅速化を促進し、既に血液・生化学検査では以前の TAT (受付から結果報告までの所要時間 Turn around Time) が数日を要したのに、現在は1,2時間に短縮している。病理部門においても、最近、3時間ほどで病理標本の作製を可能にする迅速固定、包埋装置が実現した。マイクロエーブのコンピューターによる制御と固定液に特徴があり、通常固定からパラフィン包埋までが1時間ほどの工程である。この装置が、現実に汎用されるためには、なお解決すべき技術的課題が残されているが、生検材料では、実際に試用してみると、時間が短縮できることが確認できた。

われわれも、マイルストーン社製 RHS (Rapid Histoprocessing System) を用いた迅速病理作成システムを導入したが、本装置は、特殊なマイクロエーブの技術と新たに開発された脱水・脱脂を同時に行う専用の薬液 (JFC 液) による迅速処理とキシレンを用いない安全な作業環境に特徴がある (Fig. 1)。生検検体に関しては、固定、脱水・脱脂、パラフィン浸透を約1時間で処理し、これまでの機器に比べて5倍の処理能力がある (Fig. 2)。包埋、薄切、染色、封入の工程、病理専門医の顕微鏡診断を含む受付から診断報告まで約3~4時間で行うことが可能で、迅速化への貢献が期待できる²⁾。この機器を用い、出来上がった hematoxylin-eosin (HE) 標本と各種特殊染色、免疫染色の質は診断に十分で、mRNA の保存も良好であった。

2. 免疫組織化学, *in situ* hybridization, 電顕の診断学的意義

病理診断は、生検・手術により得られた組織材料から染色標本を作製し、顕微鏡で観察することで行われる。通常は HE 染色が汎用されるが、特殊染色を

Fig. 3 CK19 expression of cholangiocellular carcinoma (100×)

Fig. 4 Histopathology of diffuse astrocytoma (HE stain, 200×)

Fig. 5 Ki-67 positive glioma cells, less than 4%, in diffuse astrocytoma (200×)

Fig. 6 Recurrent tumor histology showed anaplastic astrocytoma (HE stain, 200×)

Fig. 7 Ki-67 positive cells in recurrent tumor, more than 10% (200×)

Fig. 8 p53 gene product expression in recurrent tumor (200×)

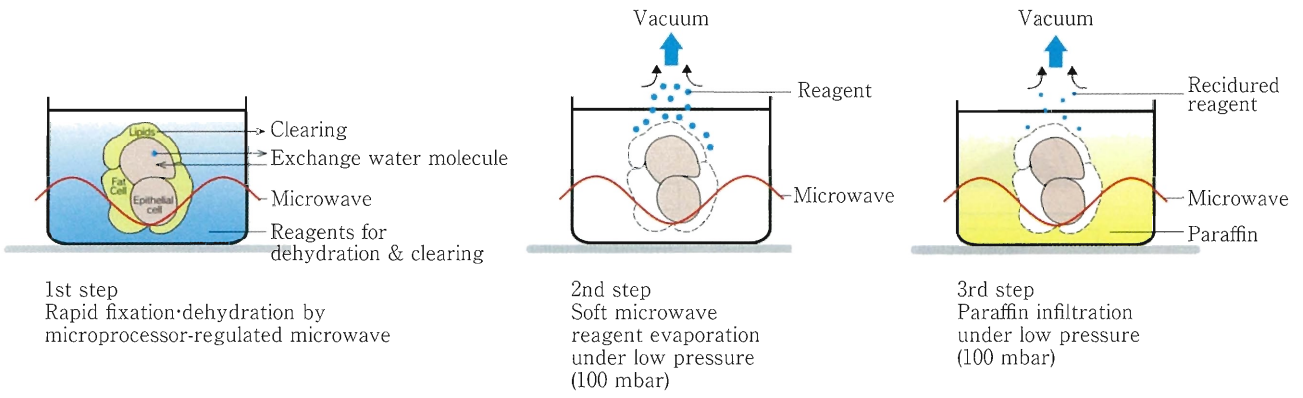
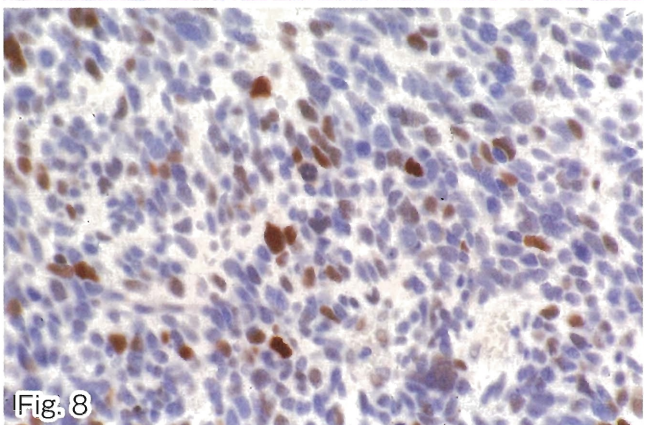
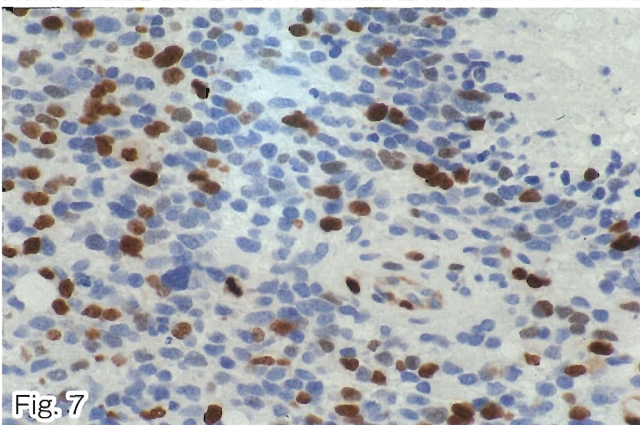
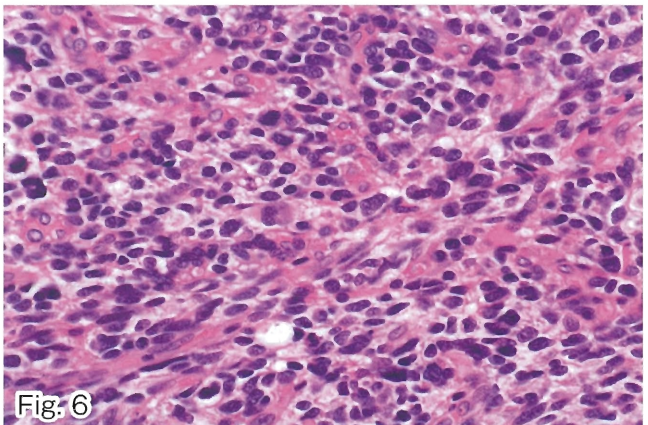
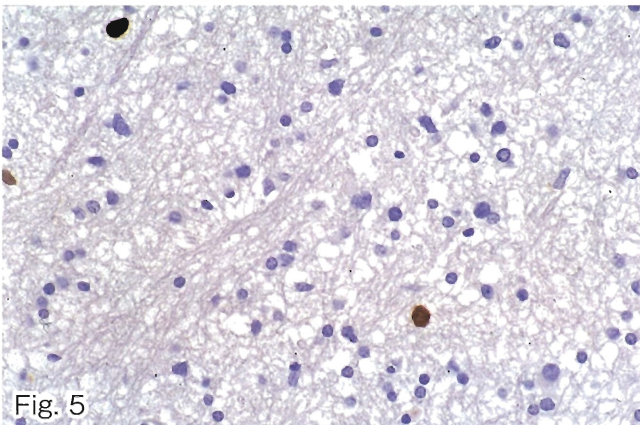
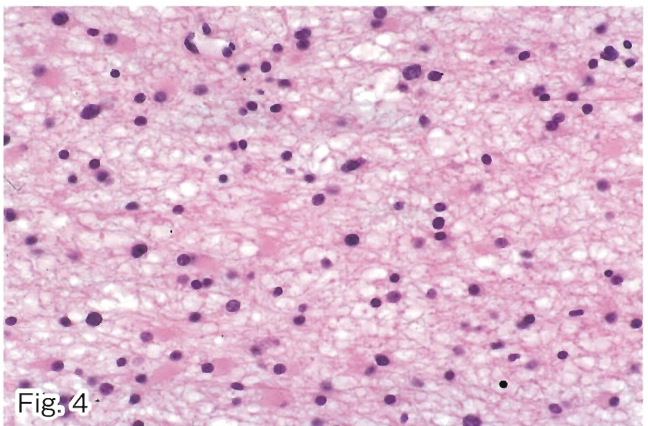
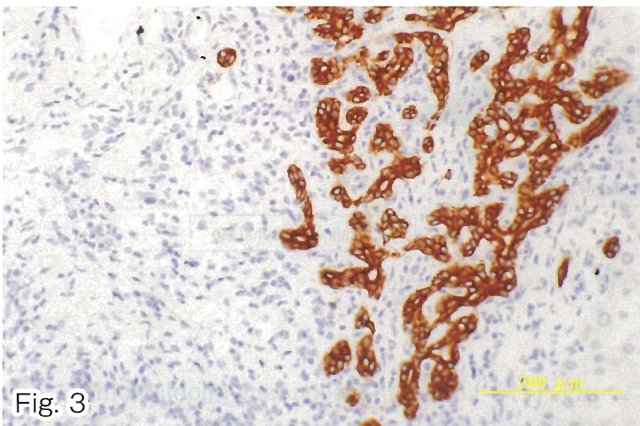


Fig. 2 Processing step of RHS (Courtesy of Milestone Co.)



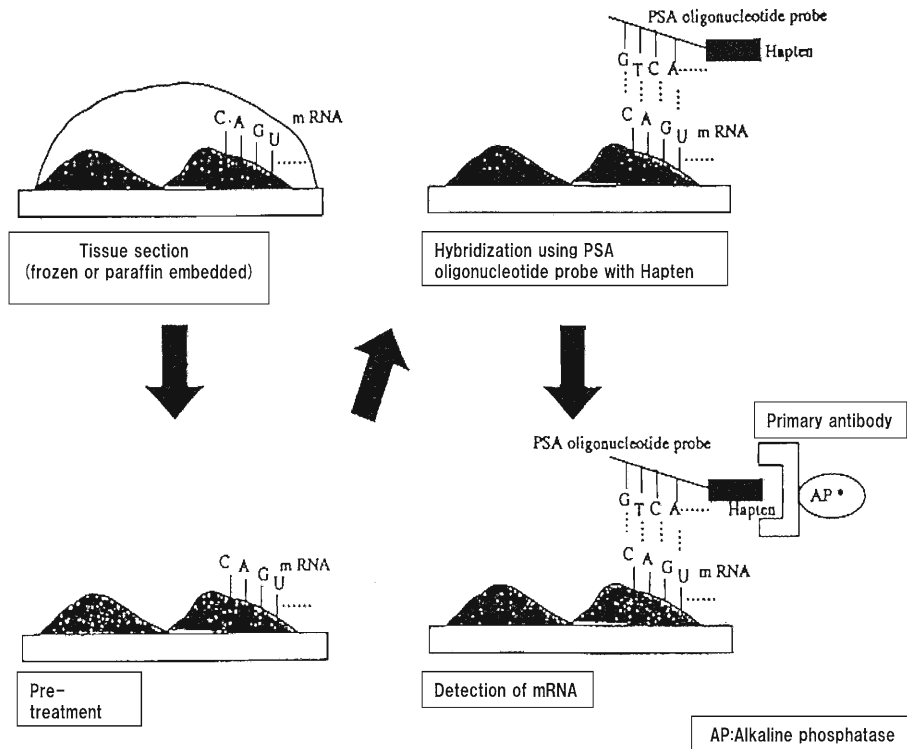


Fig. 9 Processing schema of *in situ* hybridization

加えることで更に精度の高い診断が可能となる。特殊染色は、結合組織、多糖類、病原体、無機物質、内分泌細胞、中枢神経組織をそれぞれ染め分けるが、近年、特異抗体を用いた免疫組織化学染色（免疫染色）が開発され、腫瘍マーカー、リンパ球の表面形質、免疫グロブリン、ホルモン受容体、がん関連遺伝子等の局在の証明において有用性が高い。

免疫染色は、診断を目的とする場合や、腫瘍の悪性度の評価、さらには、ホルモン受容体 HER2 や c-kit など治療方法の選択を目的とする場合など、応用範囲が広がっている³⁾。

腫瘍細胞が産生する特異物質の証明や臓器により発現の異なる上皮性マーカーであるサイトケラチンは、CK7 と CK20 との組み合わせにより原発性あるいは転移性腫瘍の鑑別が可能となる（胆管上皮癌 CK19 : Fig. 3）。Ki-67 (DAKO MIB-1, Novacastra MM1) は、細胞増殖能の評価に用いられ、G0 期以外の細胞周期にある細胞の核に発現する。乳癌において、核分裂像の少ない Ki-67 標識率の低い腫瘍群では、5 年生存率で評価した予後は良好であるとされる。但し、陽性細胞を顕微鏡下で計測し、500~1,000 個に占める標識率を計算するが、染色手技と評価に施設間で較差のあることに注意を要する。

1) 症例 脳腫瘍 : Secondary glioblastoma

生検で低悪性度グリオーマ (diffuse astrocytoma, grade II : Fig. 4) と診断され、標識率は 4% 以下 (Ki-67 : Fig. 5) であったが 2 年後に再発した。再発した腫瘍の組織像は高悪性度グリオーマ (anaplastic astrocytoma, grade III : Fig. 6) で、標識率は 10% を超え (Fig. 7)、さらに腫瘍細胞の核に変異 p53 遺伝子蛋白が発現していた (Fig. 8)。

in situ hybridization 法 (Fig. 9) は、組織内に存在する抗原を核酸の塩基配列との相補的結合を利用して、目的とする物質の mRNA の存在を証明する技術である。

2) 症例 甲状腺乳頭癌 (thyroid papillary carcinoma : Fig. 10)

腫瘍組織での Ca 沈着と浸潤に関与する分泌蛋白オステオポンの免疫染色で局在が証明されたが、*in situ* hybridization により mRNA の発現が確認された⁴⁾ (Fig. 11, 12)。

免疫組織化学の発展により、腫瘍診断に貢献してきた電顕の役割は急激に失われつつある。しかし、現在でも微細構造を詳細に観察することで、形態診断と病理発生を理解し、病理診断に果たす電顕の価値は不変であると確信する。電顕観察で、細胞間接着装置である desmosome や tight junction は上皮

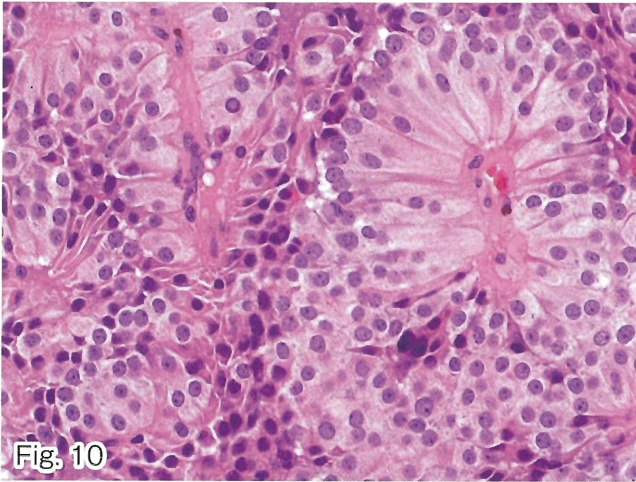


Fig. 10

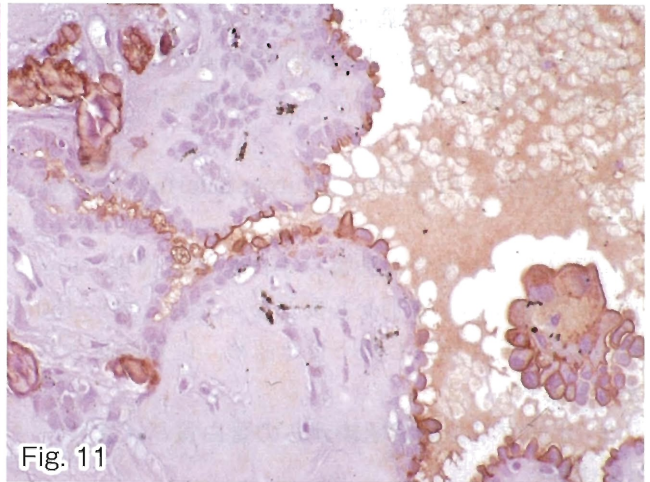


Fig. 11

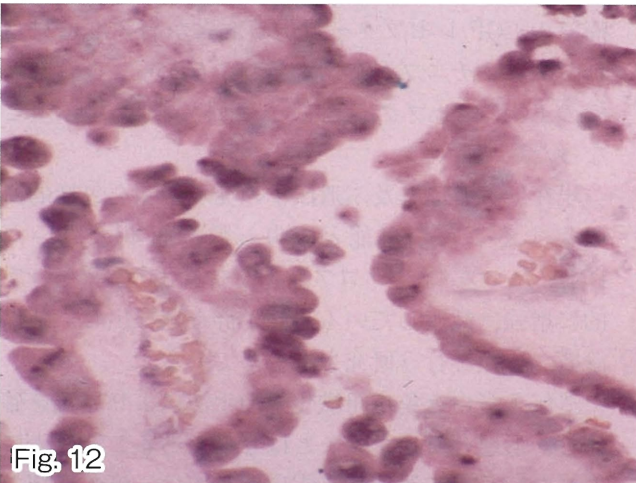


Fig. 12

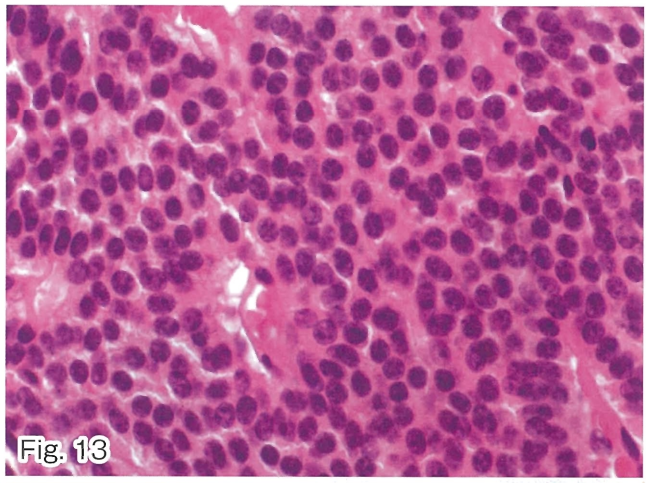


Fig. 13

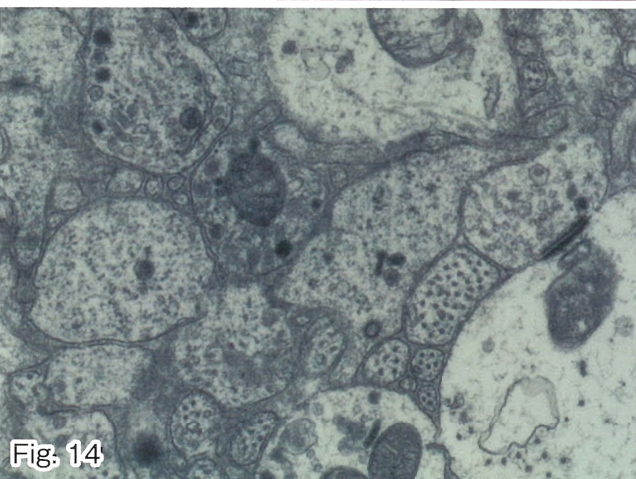


Fig. 14

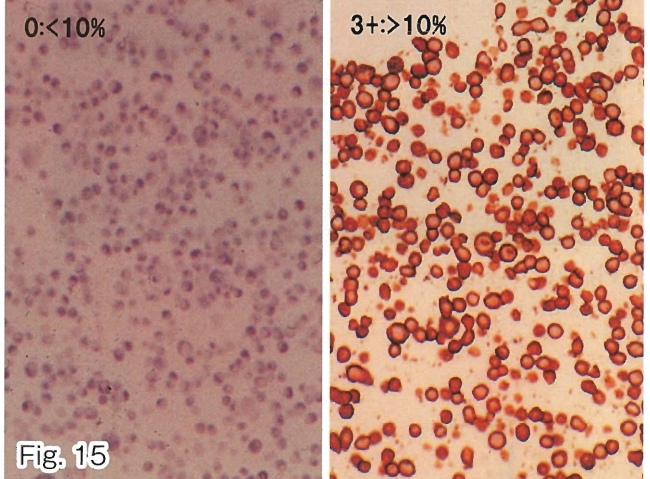


Fig. 15

Fig. 10 Histopathology of papillary carcinoma of thyroid gland (HE stain, 400 \times)

Fig. 11 Immunostain positive for osteopontin of tumor cells (200 \times)

Fig. 12 Osteopontin mRNA expression in tumor cells demonstrated by *in situ* hybridization (200 \times)

Fig. 13 Histopathology of small round cell tumor (HE stain, 200 \times)

Fig. 14 Electron micrograph showed morphological feature of PNET (30,000 \times)

Fig. 15 Immunohistochemical detection of HER2 protein

性腫瘍の特徴として鑑別に重要であるし、melanosome や Birbec 顆粒などの診断的価値の高い細胞内構造物の観察も有用性が高いことを認識すべきである。

3) 症例 Primitive neuroectodermal tumor (PNET)

6歳男児の上腕骨の腫瘍は小円形細胞腫瘍 (Fig. 13) の特徴を示し鑑別が必要となったが、100~150 nm の神経分泌顆粒と微小管を認め、確定診断された (Fig. 14)。

3. ホルマリン固定組織からの蛋白質バイオマーカー探索

われわれの手元には、長期にわたり収集された膨



Fig. 16 System of laser microdissection (Cell Robotics Inc.)

大な数のホルマリン固定組織が、未開拓のプロテオソーム情報源として存在している。既に、進行乳癌に対して、癌遺伝子の受容体型チロシンキナーゼ HER2 を DNA レベルで遺伝子増幅を同定し、治療薬として開発されたヒト化モノクローナル抗体トラスツマブの適応を決定する HER2 検査の有用性に関しては、論じるまでもない (Fig. 15)。

同様の分子標的薬として消化管間質腫瘍 (gastrointestinal tumor (GIST)) に対するチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブがあり、c-kit 活性を抑制する理論的背景から、診断確定と治療適応の評価のため c-kit 発現の確認を多くの施設で実施している。近年、肺癌での EGF レセプター遺伝子変異が高頻度に見られ、ゲフィチニブが有効であることから、進行肺癌での EGF レセプター遺伝子変異の検索も必須となった。

現在、数万にも及ぶ遺伝子の発現情報を包括的に収集することが可能となり、腫瘍組織を用いた DNA チップ、マイクロアレイ解析により、腫瘍特異的に増強、減弱している遺伝子群を選び出し、腫瘍診断、分類を行う研究も進行している。

遺伝子蛋白を免疫組織化学的手法により発現を確認し、形態と対比することは容易であることは先に述べた。しかし遺伝子異常に関しては、癌の微細な領域での DNA, RNA を抽出して検討することが重要であるが、最近開発されたレーザーマイクロダイセクション (laser microdissection : LMD) 装置⁵⁾により精度の高い情報を得ることが可能である。

LMD は、顕微鏡下で組織標本の微細な領域をレーザーにより切り取り、採取する装置 (Fig. 16) である。機器はレーザー、レーザーモジュールおよび制御ソフトウェアから構成される。われわれはラ

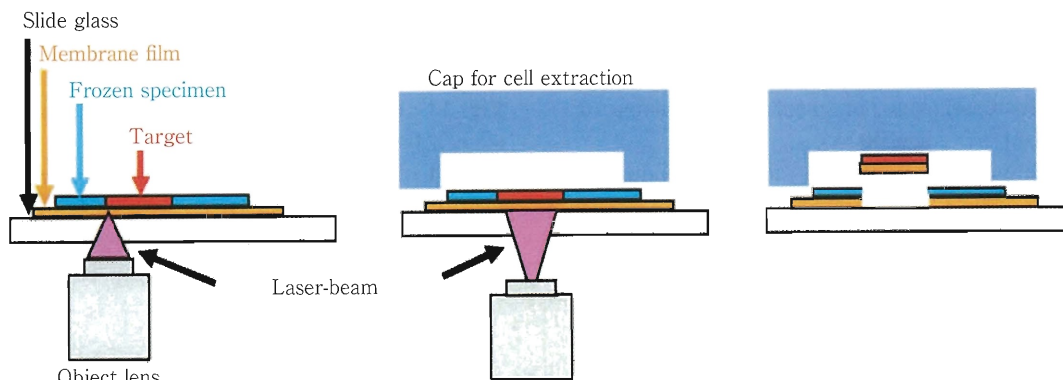


Fig. 17 Cell extraction from tissue after laser-beam dissection

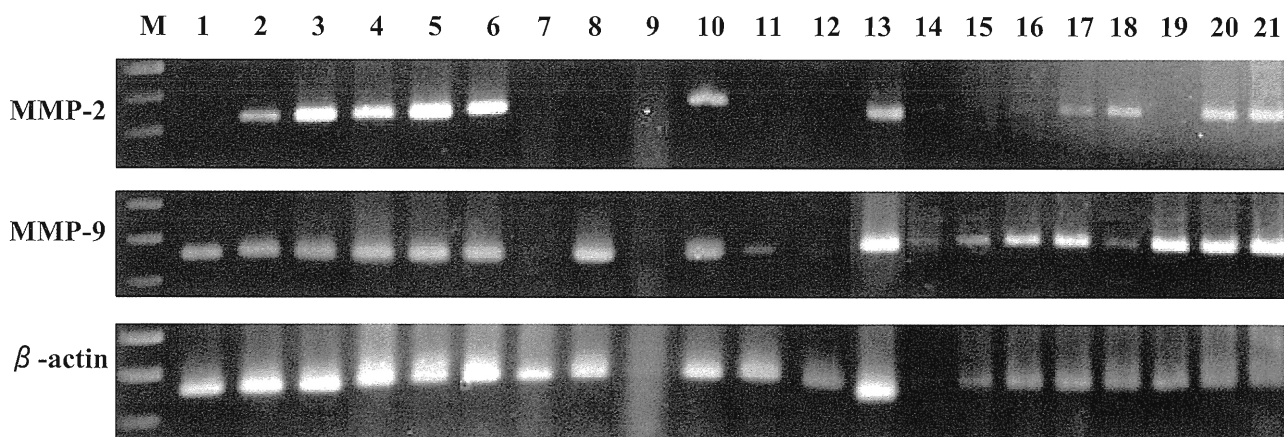


Fig. 18 Amplification of MMP-2, -9 and β -actin mRNA by RT-PCR (Courtesy of ref. 6)

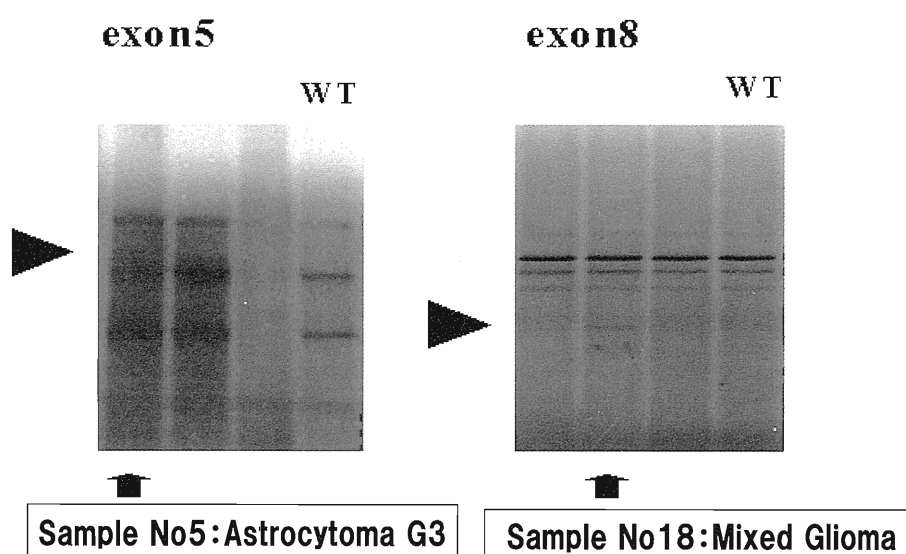


Fig. 19 *p53* gene mutation analysis of human glioma (Courtesy of ref. 6)

イカ社製 LMD 装置を用いているが、組織採取の方法がレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (laser capture microdissection : LCM) と LMD とで若干異なるが、基本的には、スライドガラス上にフィルムを固定して、フィルム上に数~10 μ m 程度のパラフィン包埋ないし新鮮凍結組織標本を載せる。LMD では、紫外線レーザーが用いられ、照射により目的とする組織部位の細胞が切り取られ、回収される (Fig. 17)。

実際に LMD により分子病理学的解析を行った研究を紹介する⁶⁾。

細胞外基質の代謝に関与する一群の酵素群 matrix metalloproteinase (MMPs) は、ドメイン構造と基質特異性から 5 群に分類されている。このうち MMP-2 および MMP-9 はゼラチンや IV 型コラーゲンを分解するゼラチナーゼ群で、癌の浸潤や転移に

関与している。

手術材料を用い、12 例の脳腫瘍 (低悪性度グリオーマ 4 例 : 高悪性度グリオーマ 8 例) を解析した。ホルマリン固定組織から作製した標本を用い、LMD により細胞を採取して、核酸を抽出後、RNA の発現解析を RT-PCR 法で、次いで DNA を抽出し、PCR 法による標的遺伝子の増幅と PCR-SSCP 法により変異を検出し、DNA ダイレクトシーケンス法で変異の解析を行った。この結果、浸潤性格の強いグリオーマほど、MMP-9 が有意に過剰発現し (Fig. 18)、定量法で、MMP-9 の定量値と組織型との間で相関がみられ ($p < 0.05$)、一方、MMP2 の定量値は、腫瘍に広汎な浸潤、播種、再発などを認めた症例との間で相関を認めた ($p < 0.05$)。 *p53* 遺伝子変異については、MMP-2 および MMP-9 の定量値や発現解析の結果とは相関を認めなかった (Fig. 19)。

提示した免疫染色による局在の観察と RT-PCR による mRNA の発現解析と定量化, p53 遺伝子解析は, 形態学的検索とともに腫瘍の再発浸潤に関する有用な情報を提供する。

このように LMD を用いると, きわめて微細な領域の採取が可能となるが, ごく少数の細胞から抽出された微量の DNA, RNA あるいは蛋白の解析は技術的に困難を伴い, この課題の解決にむけ, 蛋白処理のための様々な工夫が報告されている。

4. 病理診断と精度管理, リスクマネージメント

病理部門における精度管理は, 他の検体検査の精度管理と比べ, 曖昧で解決すべき課題が山積している。病理診断に関する精度管理に関しては, これまでも問題点が指摘されてきた。本学では, 診断内容は診断後, 講師以上のスタッフがダブルチェックする院内の体制が整備されつつある。必要に応じた学内外のコンサルテーションシステムを確立することで, 精度の高い診断と病理診断の標準化も可能となる。

同様に, リスクマネージメントは, 病理業務, 診断の場で作業確認のためのマニュアルの作成や, 確認のための作業, 緊急時の院内体制を整備することが急務である。複雑な院内システムの中で発生しうる医療過誤, 診療関連死を対象として, 医療の安全にむけて第三者の立場で行動できるのも病理医であるといえる。

おわりに

病理学講座・病理診断科は, 臨床医学全般の病理学的診断に責任をもち, 剖検によりこれを評価し, 診療への関与と共に広い領域の研究と教育を分担する。いふなれば, 病理学は, 基礎と臨床とのかけ橋

の役割を果たしてきたし, これからも担い続けて欲しい学問である。

ヒトゲノムの解析により, 疾患の発症に関わる遺伝子が同定された現在, この膨大な情報を扱い, 病気の原因と病態を解明し, 治療法開発にむけて揺るぎない基盤を構築する壮大な夢の実現に向けて, 本学における病理診断部門の役割は, 以前にもまして増大していくことになるだろう。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本学病理部門の統合実現を, 温かく見守ってくださった故吉岡守正学長, 笠島 武教授 (前病理学第二講座教授), 河上牧夫教授 (前病院病理科教授), 小田秀明教授 (病理学第二講座教授), 病理部門の発展を支えた診断医各位, 常に協力を惜しまれなかった技師各位に深甚の謝意を表したい。

文 献

- 1) 深山正久: 外科病理学の過去, 現在, そして近未来. 病理と臨床 **26** (臨時増刊): 2-10, 2008
- 2) Lowenfels AB: Same-day pathology reports with a rapid tissue-processing method. J Am Coll Surg **207**: 320-325, 2008
- 3) Lerwill MF: Current practical applications of diagnostic immunohistochemistry in breast pathology. Am J Surg Pathol **28**: 1076-1091, 2004
- 4) Zhu H, Kato Y, Tanaka R et al: Osteopontin expression in papillary thyroid carcinoma. Acta Histochem Cytochem **32**: 281-285, 1999
- 5) Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD et al: Laser capture microdissection. Science **274**: 998-1001, 1996
- 6) Komatsu K, Nakanishi Y, Nemoto N et al: Expression and quantitative analysis of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human glioma. Brain Tumor Pathology **21**: 105-112, 2004