

# 病理標本の膜厚測定機器開発

— 膜厚標準化による標的分子評価と人工知能体系の適正化に関する研究 —

増田しのぶ<sup>1)</sup>, 中西陽子<sup>1)</sup>, 廣谷ゆかり<sup>1)</sup>, 菊池加穂里<sup>1)</sup>,  
阿部 仁<sup>2)</sup>, 向井規浩<sup>3)</sup>, 西川喜久<sup>3)</sup>

A study of development of a device to evaluate the tissue thickness of  
pathological sections:  
For adequate evaluation of biomarkers and basic platform for artificial intelligence systems  
by standardization of tissue thickness

Shinobu MASUDA<sup>1)</sup>, Yoko NAKANISHI<sup>1)</sup>, Yukari HIROTANI<sup>1)</sup>, Kaori KIKUCHI<sup>1)</sup>,  
Hitoshi ABE<sup>2)</sup>, Norihiro MUKAI<sup>3)</sup>, Yoshihisa NISHIKAWA<sup>3)</sup>

## 要旨

本稿においては、社会実装研究を開始するに至った背景と動機ならびに目標を示した。すなわち、病理診断においては標本の厚み(膜厚)が重要であること、乳癌診療においてはバイオマーカーの免疫組織学的検討により治療方法が選択されていること、免疫染色は多段階的工程を経ているが、切片の薄切における膜厚が判定に影響を与えること、を示した。本研究では、複数の膜厚コントロールシステム案の比較を行い、既存システムとの比較において開発システムに求められる要件について考察した。

## 1. はじめに

### [病理診断における組織切片の厚みの意義]

病理診断は、身体から採取された組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片 (formalin fixed paraffin embedded sections, FFPE) を用いて行なわれる。組織内の状態を適切に観察するための第一段階として、適切な検体取扱いとともに、適切な標本作製が重要となる。組織切片の厚み(以下、膜厚と称する)は、観察対象に応じて異なっており、例えば米国病理学会 (College of American Pathologist) のガイドラインでは、日常診療用 4~5 $\mu$ m, 腎生検 1~3 $\mu$ m, 骨髄検体 2~3 $\mu$ m, 組織化学用 6~15 $\mu$ m, アミロイド染色用 6~12 $\mu$ m が適切な厚みとされている<sup>1)</sup>。

例えば、図1左のように適切な厚みであれば、腫瘍細胞の核所見の詳細が観察可能で病理診断が可能であるが、図1右のように厚すぎる検体では、核の重積により腫瘍細胞の詳細な所見を読み取ることが

できず診断ができない。このように、膜厚は病理診断の基礎となる条件である。

### [乳癌診療における免疫染色結果の意義]

本研究開始の契機となった乳癌診療の薬物療法においては、バイオマーカーであるホルモン受容体 (エストロゲン受容体, ER; プロゲステロン受容体, PgR), HER2の発現状況と増殖活性マーカーである Ki67陽性率によって、治療法の選択が行われる (図2)。

すなわち、ER陽性症例には抗ホルモン薬が、HER2蛋白高発現あるいはHER2遺伝子増幅を伴う陽性には抗HER2抗体療法が、また、いずれも陰性の症例には、抗がん剤の適応となる。

HER2蛋白に対する免疫染色結果により抗HER2抗体療法の適応が決定されるため、その精度管理が重要となる。

以上の背景から、膜厚コントロールシステムの開

1) 日本大学医学部病態病理学系腫瘍病理学分野

2) がん研有明病院臨床病理センター

3) (株) 西川精機製作所

増田しのぶ: masuda.shinobu@nihon-u.ac.jp

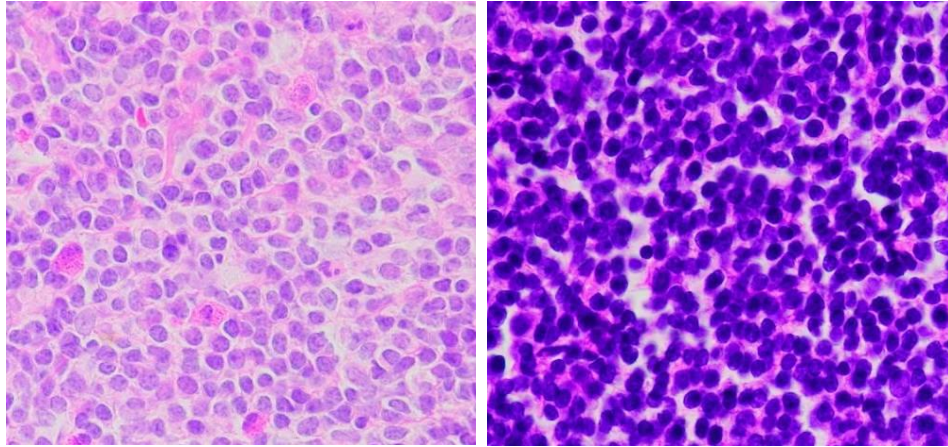


図1 慢性リンパ性白血病／小リンパ球性リンパ腫のHE染色所見  
左：適切な膜厚による標本，右：膜厚が厚すぎる標本

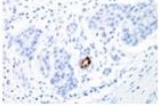
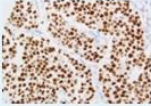
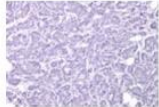
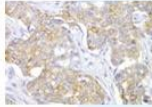
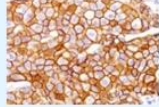
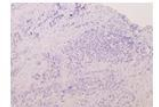
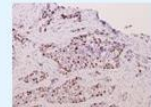
増殖刺激	受容体	陰性	陽性	治療方針
刺激: 卵巣ホルモン エストロゲン プロゲステロン	ER, PgR	陰性: 10%以下 	陽性: 10%以上 	抗ホルモン薬
刺激: 増殖因子 (EGF) (HGF)	HER2	陰性 Score 0, 1+ 	不明瞭 Score 2+  陽性 Score 3+ 	分子標的薬
増殖の程度	Ki67	陰性: 14%以下 	陽性: 14%以上 	抗がん剤

図2 乳癌診療におけるバイオマーカーの免疫染色結果と治療方針

発がんの課題であるとの認識に至り、本研究を開始することとなった。

**[免疫組織化学的検討における標本作製、染色および評価過程]**

病理標本作製工程は、図3に示すように臨床検体の固定、検体処理、薄切、染色、封入からなり、作製された病理標本が病理医により評価される。

免疫組織化学的検討は、可視化したい目的蛋白に対する抗原抗体反応をFFPE上で行い、観察する方法である。病理標本作製工程の染色の段階でさらに、多段階的な反応を行う。図2に示すように、脱

パラフィンの後、抗原性賦活化、抗原抗体反応（一次抗体、二次抗体）、発色、核染色を行い、評価される。重要な点は、免疫染色工程の前段階に薄切作業があり、この時の膜厚が判定結果にも影響を与える。

以上のように、病理診断、免疫組織化学的検討において、膜厚は重要な要素であるにもかかわらず、現在まで、十分な精度管理の対象となっていない。通常、ミクロトームを用いたFFPE薄切に際しては、厚みを設定することができる。しかしながら、薄切環境（湿度や温度）により影響を受けることが知られており、経験値の高い臨床検査技師によれば、暗黙知により調整が可能であるが、いつも適切

な膜厚で薄切されるとは限らないのが現状である。

## 2. 対象及び方法

本研究においては、膜厚コントロールのための要素検討を行う。

膜厚コントロールのための二つの案について、技術的課題の抽出および実用性について検討する。一つの案は、膜厚コントロール用標準物質を開発し、膜厚を計量線により判定する膜厚コントロールシ

テム案 (1) である (図4)<sup>2)</sup>。

もう一つの案は、FFPEの膜厚を測定する膜厚測定案 (2) であり、この場合には、既存の機器を用いた場合の課題と、本研究開発機器に求められる要件を抽出する。

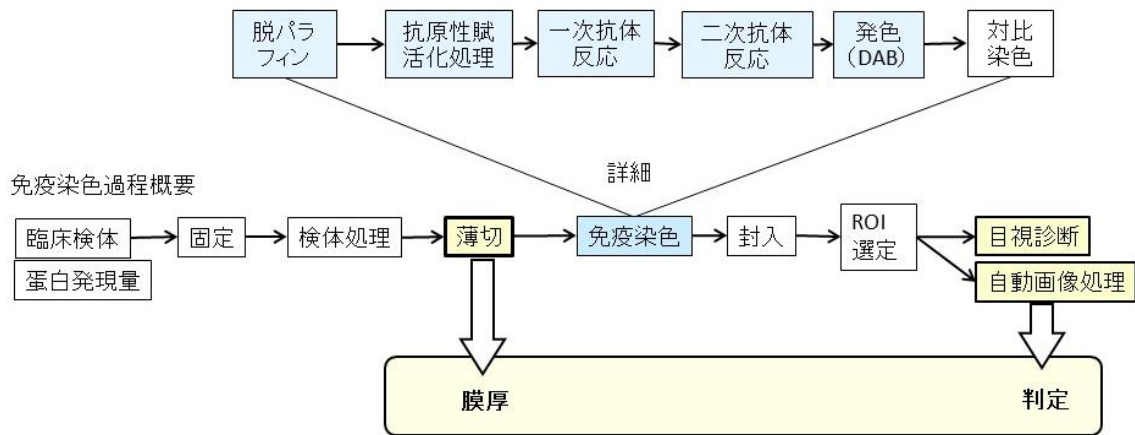


図3 標本作製過程と免疫組織化学的検討

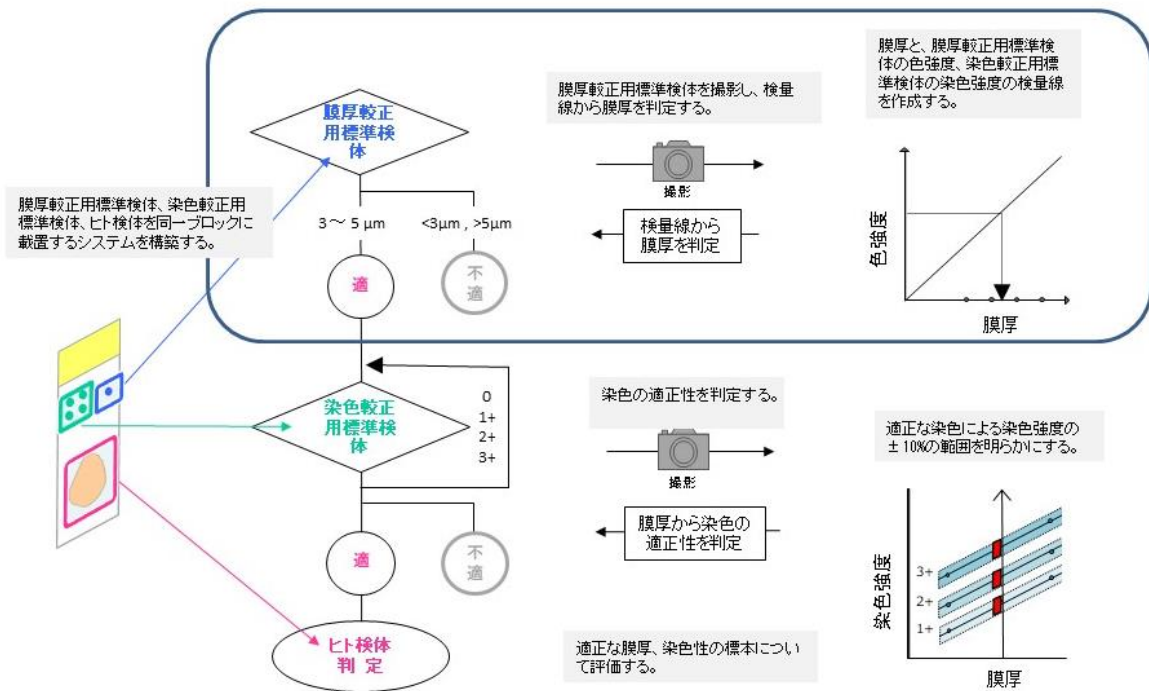


図4 膜厚コントロールシステム案 (1)

### 3. 結果

#### [膜厚コントロールのための二つの案に関する比較検討]

下表1に示すように、案(1)においては複数の実際の作業工程との整合性をとる必要があり、病理検査室の現場における実装性を鑑みるとやや難がある。一方、案(2)はより単純明快な目的志向性を有しており、案(2)を推進すべきとの結論にいたった。

### 4. 考察

#### [既存の方法を用いた膜厚測定]

現在、膜厚測定に使用可能な機器は存在しないが、工業用の非接触表面・層断面形状計測システム(光干渉方式初高精度表面形状計測)を利用して、膜厚測定を行った(図5)。

既存システムは、工業用で汎用的な用途に対応しており、高額で大型であり、手順が複雑である。これらの要素について、比較検討をおこない、開発システムに求められる要件を明らかにしていく。

### 5. 結語

本研究により、複数の膜厚コントロールシステム案の比較を行い、開発すべきシステムを考案し、既存システムとの比較において開発システムに求められる要件を明らかにすることができた。

#### 謝辞

本研究は、日本大学学術研究助成金(社会実装研究)の助成をうけて行った。

#### 文献

- 1) Lott RT, Sheppard J, Santiago E, et al. Practical Guide to Specimen Handling in Surgical Pathology. College of American Pathologists. 2018: 40-41
- 2) Masuda S, Suzuki R, Kitano Y, et al. Tissue Thickness Interferes With the Estimation of the Immunohistochemical Intensity: Introduction of a Control System for Managing Tissue Thickness. Appl Immunohistochem Mol Morphol. 2021; 29: 118-126

表1 膜厚コントロールのための二案についての比較検討

	膜厚コントロールシステム案(1)	膜厚測定案(2)
目的	標準物質を用いてコントロールするシステム	膜厚を測定する
課題	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 適切な標準物質を開発する。</li> <li>2. 再現性の高い計量線システムを設定する。</li> <li>3. 検体処理過程にどのように膜厚用標準物質を組み込むか。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 既存の測定機器で利用できるものはあるか。</li> <li>2. 既存の測定機器と比較して、どのように優位性を持たせるか。</li> </ol>

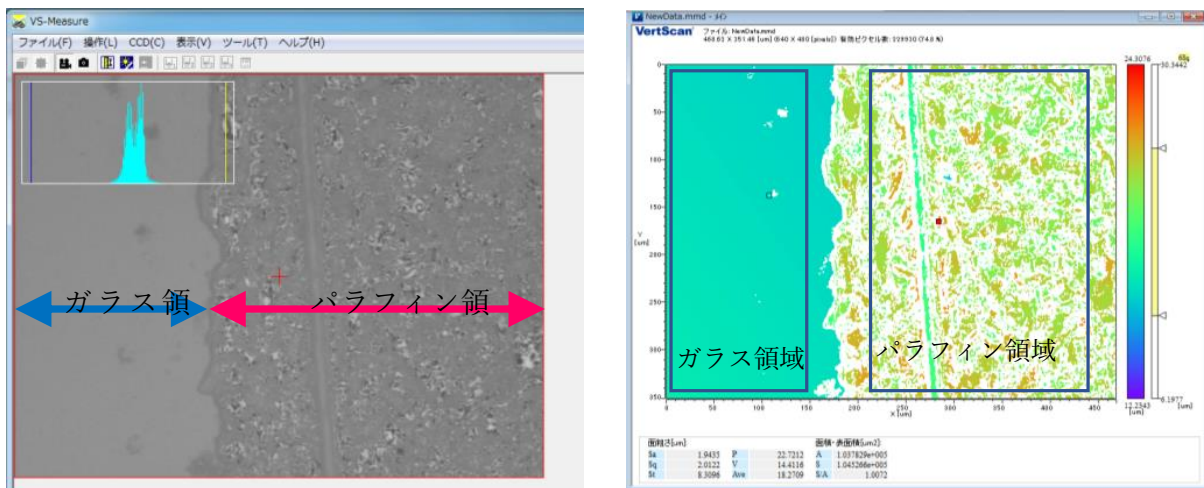


図5 非接触表面・層断面形状計測システムを用いた膜厚測定