

工 夫

乳癌の術中迅速診断の標本作製について —マイナス80℃における凍結法の一考案—

長岡中央総合病院、病理部；臨床検査技師

大橋 珠紀、長谷川秀浩、石澤 重一

乳癌術中迅速診断において、乳腺組織は薄切困難な脂肪組織が多く迅速標本作製に苦慮する。我々は、脂肪組織の薄切至適温度が-30℃以下であることに着目し、手持ちのディープフリーザーと廉価な有機溶剤を使用した超低温度下(-80℃)での凍結法を考案した。これにより、良好な乳癌術中迅速標本作製が可能となったので報告する。

キーワード：乳癌、脂肪組織、術中迅速診断、標本作製、凍結法、超低温、-80℃

緒 言

我が国の乳癌の死亡率は女性のライフスタイルの変化や食生活の欧米化などにより近年増加傾向にあり、2005年女性部位別悪性新生物死亡率では消化管系・肺癌に続いて第5位であった。(1)

乳癌手術において、肉体的侵襲の軽減や美容的な目的などから、乳腺組織の摘出範囲の縮小化に伴い、センチネルリンパ節への転移や乳房温存術での断端への癌浸潤の有無などの診断において、術中迅速病理診断(以下、迅速診断)は必要不可欠なものとなっている。(2)(3)

しかしながら、脂肪組織の多い乳腺組織は良好な術中迅速標本(以下、迅速標本)の作製に苦慮する事が多い。

そこで今回我々は、脂肪組織の薄切至適温度が-30℃以下であることに着目(4)し、手持ちのディープフリーザーを使用した超低温度下(-80℃)での凍結法を考案し、若干の検討を加えたので報告する。

材 料 と 方 法

当院における乳癌の迅速診断件数(表1)と乳腺組織の術中迅速標本における特徴

当院での乳癌に関わる迅速数は年々増加(図1)し、昨年は全迅速診断数の25%であった。2006年以降センチネルリンパ節への転移の有無の依頼が始め、センチネルリンパ節と断端材料の組み合わせが年々増加している(図2)。特に、乳房温存手術時における断端の診断時には、断端のみより、センチネルリンパ節との組み合わせが多くなっている。更に以前と比べると提出される断端材料は摘出部位の全周に及び、迅速標本にすると多いものでは8~10個程度、症例によって

は左右に及ぶこともあり、一件の手術において迅速時に提出される標本作製数が増加している。それはより摘出材料が縮小化されていることや画像診断で不明瞭なEIC(extensive intraductal component)を伴う癌巢(5)などがあり、術中での断端の迅速診断がより慎重に取り扱われ、重要なものとなっていると考えられる。しかしながら、標本作製数が増えていることにより、作業に費やす時間が必ずしも迅速性が高いとは言えない現状があった。

また乳腺は脂肪組織の多い組織であり通常の-30℃程度の凍結法では薄切に苦慮することがしばしばあり、これも又、作業効率を欠く要因の一つであり、更には標本の仕上がりにも問題があった。

そこで今回は、乳腺組織に適する迅速標本作製法について検討をする。

超低温(-80℃)凍結法

<条件>

以下の条件を満たす精度の高い迅速標本作製法の改良を必要と考えた。

- 1) 作業の効率化・迅速性
- 2) 標本の仕上がり良好
- 3) 低コスト

<材料>

凍結容器：SAKURA Tissue-Tek Cryomold

包埋剤：ユーアイ(株)ホワイト ティッシュコート

固定液：自家製(ホルマリン・エーテル・エタノール)

凍結用冷媒剤：イソペンタン・アセトンなどの有機溶剤

クリオスタット：SAKURA Tissue-Tek Cryo3

スライドグラス：Silane Coating (MUTO-GLASS)

<方法>

- ① 凍結用冷媒剤をディープフリーザー(-80℃)にて保管・冷却しておく。(作業時の保冷性を高めるため、発砲スチロール製の箱などに容器を入れ保管しておくともよい。)(図3-a)
- ② 包埋容器に迅速材料と包埋剤を入れ、スプレー式迅速凍結剤を軽く噴射し、金属支持台と接着させる。
- ③ 作業直前の取り出した①に②をピンセット等で静かに入れ、30秒~1分放置⇒凍結完了(図3-b)(この際、凍結容器内に複数個の検体を同時に入れる事が可能)
- ④ クリオスタットにて薄切 5µm

- ⑤ 固定液浸透 1分
- ⑥ 迅速 HE 染色

比較検討

当施設での従来法と超低温凍結法による各冷媒剤での標本の仕上がりの違いや、以下の項目について比較検討をした。

- ・当施設での従来法：代替フロンガスのスプレー式迅速凍結剤を使用。各検体をつづつ凍結し、凍結時の温度は-30℃程度と思われる方法。(乳腺以外の迅速標本作製には簡易で特に問題なく使用されている方法)
- ・各冷媒剤：融点が低く-80℃でも凍結をしないイソペンタン・アセトン・エタノールを使用。
- ・検討項目：凍結時間・全工程(凍結～薄切～染色)時間・冷媒剤の反復利用の可否・冷媒剤の価格

結果

- 1) 従来法と超低温凍結法との標本の仕上がりの違いを以下の表にまとめた(表2)。

イソペンタン・アセトン・エタノール共に5μmの厚さでもきれいに薄切され、脂肪組織の中に乳腺の腺管構造が保持され、核所見も明瞭であった。一方、スプレー式の従来法では5μmの厚さではきれいに薄切されずに、脂肪組織が切れ、重なることで標本の観察が困難となった。また、10μmにおいて、乳腺組織がようやく確認できたが、腺管構造が保持されず、また核所見も萎縮してみられた。

- 2) 従来法と超低温凍結法による各冷媒剤での比較検討(表3)

- ① 凍結時間：従来法では1分程度で凍結完了するが、一検体ずつ凍結しなければならないので、検体数の時間がかかるのに対し、超低温凍結法では複数同時凍結可能で、30秒～1分程度で完了する。
- ② 全工程時間：従来法では検体数6～8個程度で、約40分を要したが、超低温凍結法では凍結時間・薄切時間が短縮され、全工程作業時間は約20分程度で完了する。
- ③ 冷媒剤の反復利用の可否：従来法ではスプレー式で使い捨てであるのに対し、超低温凍結法の冷媒剤は繰り返し利用が可能である。ただし、エタノールは包埋剤が作業時に再冷却を目的に繰り返し使用すると冷媒剤に溶け出してしまうため、実用的でないと考えた。
- ④ 冷媒剤の価格：従来法は2500円(300ml)、超低温凍結法において、イソペンタン2900円(500ml)・アセトン750円(500ml)・エタノール1900円(500ml)であった。
- ⑤ 標本の仕上がり：1)の結果より、従来法では乳腺の迅速標本としては不適となり、超低温凍結法ではいずれの冷媒剤でも適であった。
- ⑥ 総合評価：①～⑤より、従来法より今回考案した低温凍結法が優れ、また各冷媒剤ではアセトン

が揮発性や価格の面より最適であると判断した。

補足(図4) 乳腺断端など特に脂肪組織の多い場合の標本作製

脂肪組織が多く、特に薄切が困難な場合は以下の方法を実施する。

- ① ディープフリーザー(-80℃)にて保管冷却しておいた有機溶剤の冷媒剤にドライアイスを入れ、保冷時間を持続させる。
- ② クリオスタットにて薄切を20～30μmと厚く設定する。
- ③ 固定液をスポイトで滴下する。
- ④ 迅速 HE 染色(色出しに炭酸リチウムを使用)を行う。

薄切した切片は通常より厚く、固定液にそのまま浸透させると剥がれてしまうため、固定液をスポイトなどで滴下する事がポイントとなっている。この方法で実施したところ、アセトンを使用した超低温凍結法による標本は脂肪組織の構造を保持したまま観察できた(図4)。しかしながら、ドライアイスは保管が難しいため、術中迅速が必須な症例の場合には、事前連絡が必要となる。

考察

有機溶剤を使った超低温下(-80℃)での凍結法はスプレー式迅速凍結剤を使用した従来法に比べて、乳腺の迅速標本としては良好な仕上がりであった。これは、-80℃の凍結において脂肪が薄切しやすくなった事と、組織を急速に凍結させる事で最大氷結晶生成帯時間すなわち氷の結晶をつくる時間を短く通過するので、アーチファクトの少ない良好な標本ができると考えられる。(4)

また、今回考案した凍結法は手持ちのディープフリーザーを利用するだけで、当施設としては特別な道具を用意する必要はなく、提出数の多い検体材料を素早く、同時に凍結させる事で迅速性の向上に繋がり、また精度の高い標本作製に成功をした。また、いくつかの有機溶剤の検討では、アセトンが揮発性や価格の面などから最適であると思われた。

以下に超低温凍結法の利点をまとめる。

- ① 凍結作業を複数個の検体を同時にできる⇒凍結作業時間の短縮
 - ② -80℃下での凍結により、脂肪組織の薄切が容易となる⇒薄切時間の短縮・標本の仕上がり良好
 - ③ 凍結用冷媒剤は反復使用が可能であり、従来のスプレー式迅速凍結剤を使用した方法(使い捨て)より価格が安い⇒低コスト化
- よって、前述した条件を満たす方法と考える。

まとめ

今後、マンモグラフィなどの普及により、より微小な癌が発見され、手術による切除部位は縮小されるものと予測される。よって、術中の迅速病理診断の重要性は更に増すものと考えられ、今回の考案と検討は大変有意義であると思われる。

文 献

1. 厚生統計協会編、性・部位別にみた悪性新生物死亡数の推移(表15)、「国民衛生の動向」、厚生統計協会、東京、2007; 49.
2. 日本乳癌学会、乳癌取り扱い規約、第16版、金原出版、東京、2008; 6.
3. 浅井 広子ら、High-Throughput な迅速凍結標本の作製. 医学検査 2002; 51(8): 1121~6.
4. 吉村 忍、術中迅速病理診断における迅速組織標本作製技術. Medical Technology 2007; 35(11): 1175~83.
5. 坂元吾偉、上皮性腫瘍 [悪性] 浸潤性乳管癌、乳頭腺管癌、取り扱い規約に沿った腫瘍鑑別診断アトラス「乳腺」、文光堂、東京、1992; 27.

英 文 抄 録

Invention Report

Invention of deep frozen method at -80°C for improving frozen section specimen rich of fatty tissue on intraoperative rapid histopathological diagnosis of breast cancer

Nagaoka General Hospital, Department of pathology;
Medical technologist
Tamaki Ohashi, Hidehiro Hasegawa, Shigekazu Ishizawa

In the intraoperative rapid histopathological diagnosis by frozen section specimens during the operation of breast cancer, it was very difficult to slice breast tissue consisted of a lot of fatty tissues because fatty tissue could not be sliced easily. In the intraoperative rapid histopathological diagnosis by frozen section specimens during the operation of breast cancer, it was very difficult to slice breast tissue consisted of a lot of fatty tissues because fatty tissue could not be sliced easily. We paid our attention to the slice optimum temperature of the fatty tissue being equal to or less than -30°C and invented the deep frozen method at -80°C using the existing freezer with inexpensive organic solvents. We hereby report our invention technique to get better specimens during rapid histopathological diagnosis of breast cancer.

Key words: breast cancer, fatty tissue, intraoperative rapid histopathological diagnosis, improvement of frozen section specimen, deep frozen method at -80°C

表1 当院における乳癌の迅速診断件数

		2004年	2005年	2006年	2007年	2008年
全術中迅速件数		122	113	103	150	175
乳癌に関わる件数		14 (11%)	19 (17%)	19 (18%)	35 (23%)	44 (25%)
術中迅速材料	リンパ節のみ	0	0	10	7	22
	リンパ節+断端 (リンパ節+断端+腫瘍)	0	0	5	17(1)	21(3)
	断端のみ(断端+腫瘍)	9	18(2)	3	7(2)	1(1)
	その他 (腫瘍の良悪性など)	5	1	1	4	0

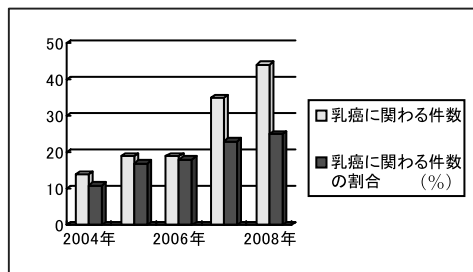


図1 当院における乳癌に関わる迅速診断件数と全体における割合

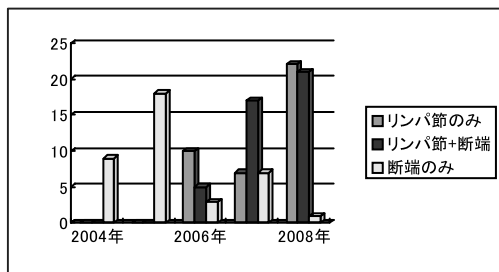


図2 当院における乳癌の術中迅速材料別の件数

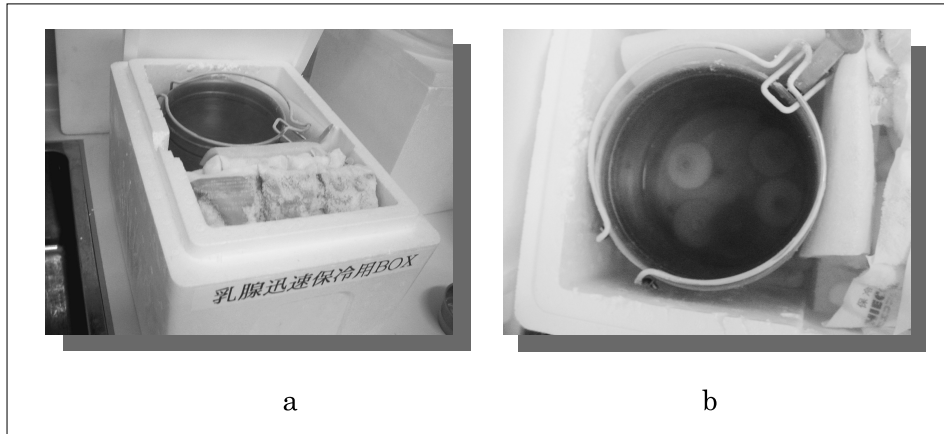


図3 超低温凍結法の手技 a: 冷媒剤の保管冷却 b: 複数検体の凍結中

表2 従来法と超低温凍結法との標本の仕上がりの違い

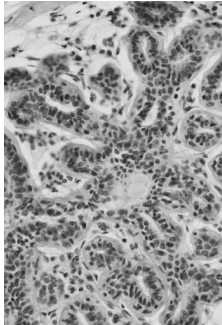
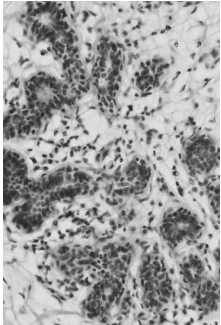
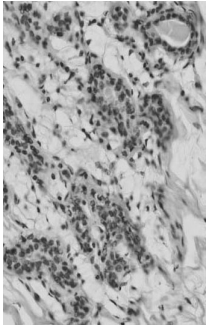
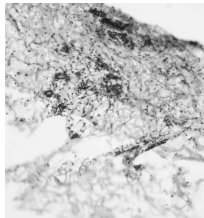
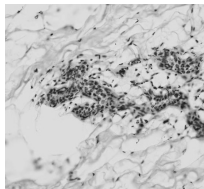
超低温凍結法 (−80℃)			従来法 (−30℃)
イソペンタン	アセトン	エタノール	スプレー式凍結剤
			
5 μ m × 20	5 μ m × 20	5 μ m × 20	5 μ m × 20
			
			10 μ m × 20

表3 従来法と超低温凍結法による各冷媒剤での比較検討

	超低温凍結法 (-80℃)			従来法 (-30℃)
	イソペンタン	アセトン	エタノール	スプレー式凍結剤
融点	-160℃	-90℃	-117℃	—
沸点	28℃	56.5℃	78℃	—
凍結時間	30秒~1分(複数検体同時凍結可能)			1分×標本数
全工程時間*	約20分			約40分
標本の仕上がり	○	○	○	△
繰り返し使用	○	○	△	×
価格**	¥2900 (500ml)	¥750 (500ml)	¥1900 (500ml)	¥2500 (300ml) ***
総合評価	○	◎	△	×

* 標本数：6~8個程度の場合 ** 関東化学 特級 *** 参考価格
 ○：適 △：許容範囲 ×：不適 ◎：最適

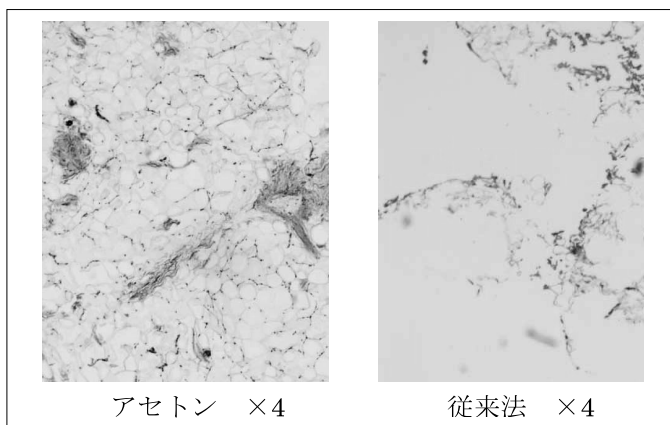


図4 補足：特に脂肪組織の多い場合の標本作製について
 (アセトンを使用した超低温凍結法による標本は脂肪組織の構造を保持したまま薄切できている)

2009/10/17 受付 (2009-08)