

原 著

## 病理組織標本中の疑コンタミネーション組織に対する DNA 解析による識別

長岡中央総合病院、病理部；臨床検査技師<sup>1)</sup>、病理医<sup>2)</sup>

長谷川秀浩<sup>1)</sup>、五十嵐俊彦<sup>2)</sup>

目的：胃癌手術後の患者の腹膜から摘出された結節の病理組織標本に認められた腫瘍組織が患者本人に由来するものであるのか標本作製過程でコンタミネーションしたものであるかを DNA 解析により調べた。

方法：パラフィン包埋された結節と腫瘍組織それぞれから抽出された DNA をサンプルとして 3 番、5 番、12 番染色体上に存在する短塩基縦列反復配列の回数を PCR 法により解析を行なった。

結果：解析に用いた遺伝子領域の塩基の反復回数を示す泳動パターンは全て異なっていた事から病理組織標本中に認められた腫瘍組織は標本作製する過程で混入したコンタミネーション組織と判断された。

結論：病理組織検体の取り違いの可能性やコンタミネーションが疑われる組織が認められた際の識別法として法医学的技術を用いた遺伝子解析法は極めて厳密に個体識別が可能な事から客観的判断材料として有用な手段であった。

キーワード：病理組織標本、コンタミネーション、短塩基縦列反復配列 (Short tandem repeat : STR)、個体識別

### 緒 言

病理診断は組織学的に診断を確定する事であり、その後の患者の治療に大きく影響を及ぼす事から決して間違いが在ってはならない検査業務である。しかし、正確・確実な検体処理と標本作製が要求されているもののその作業工程のほとんどは基本的に手作業であることから標本作製に携わる検査技師は医療事故に直結するリスクが大きいと言える。病理診断を行なう上で検体の取り違いや紛失、シビアナコンタミネーションは致命的なミスであり、その発生を防止する為にそれぞれの施設において発生防止のためのトレサビリティを確立するなどの対策が講じられている (1) - (3)。

特に生検材料において、採取された臓器の部位と個数が同一であり、取り違いや誤認である事が認識不可能な状況の中で標本が病理診断へと提出された場合、その双方が良性または悪性である時には各々の正確な真実は不確定ながらも最悪な事態は回避できるものの片方が悪性であり、もう一方が良性と判断され依頼者に間違った報告がなされ摘出手術が施行された際には

被害患者には甚大な肉体的、精神的苦痛を与える。現実には様々な注意が払われているながらも全国各地において検体の取り違いを原因とした医療訴訟が後をたたない。

今回、我々は病理組織標本に認められた腫瘍組織がコンタミネーションしたのか否かを判断するにあたり、簡易でかつ識別能力が高い方法として、それぞれの組織から抽出された DNA のマイクロサテライト領域の短塩基縦列反復配列 (Short tandem repeat : STR) の解析が判断根拠として有用だった事例について報告する。

### 対象および方法

#### 1：症例

症例は35才女性、2006年に他院にて胃癌と診断され幽門側胃切除が施行された。術後の病理検査で *por2*, *sci*, *se*, *ly1*, *v1*, *DM(+)*, *n2+* との結果から進行度 stage IV と判断され、当院にて化学療法による治療が行なわれていた。2009年4月に腹痛が出現し精査にて空腸の通過障害と診断され開腹術が施行された。術中、腹膜に直径0.5cm 大の結節が認められたため切除され病理検査に提出された。その組織像は緻密性結合組織からなり悪性所見は認められなかった。しかし、結節に隣接して明らかに悪性と判断される組織の混在が認められた (図1)。その組織型は胃癌のそれとは異なる事から播種は否定的であったが他の患者からの腫瘍組織がコンタミネーションしたのか本人由来の組織かの判断が求められた。

#### 2：DNA 抽出

パラフィン包埋された結節および腫瘍組織それぞれの組織からスモールスケール抽出法により組織を採取し TaKaRa DEXPAT を添加し能書に沿って DNA 抽出を行なった (4)。さらに居雑物除去のため抽出液 100 $\mu$ l を採取し 100% エタノール 200 $\mu$ l と 3M 酢酸ナトリウム 10 $\mu$ l を加え -80 $^{\circ}$ C のデープフリーザー内で DNA を析出させた後、低温高速遠心分離機にて 16000rpm で 30 分間 DNA 沈降を行い 70% エタノールで洗浄し乾燥後、TE 液に溶解し DNA サンプルとした。

#### 3：STR マーカーと PCR 条件

DNA 解析による個人識別に利用可能な遺伝子情報

報の中で、今回解析に用いた塩基配列はホルマリン固定パラフィン包埋組織から抽出されたDNAにも使用可能と判断されたD5S818と3番染色体上のvWA、5番染色体上のD3S1358の3種類のSTR領域である。DNA解析に用いたSTRマーカーの詳細については表1にプライマーの配列は表2に示す。PCR反応液は全量を20 $\mu$ l系とし、その組成はd-DW:14 $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer with 15mM MgCl<sub>2</sub>:2 $\mu$ l、2mM dNTP:2 $\mu$ l、25pM F-primer:0.5 $\mu$ l、25pM R-primer:0.5 $\mu$ l、Ampli Taq GoldIU、DNAサンプル1 $\mu$ lで調整しDNA増幅にはプログラムテンプコントロールシステムPC707 (Astec Japan)を使用した。サーマルプログラムは95 $^{\circ}$ C10分のHot startの後、denature 94 $^{\circ}$ C1分、annealing 50 $^{\circ}$ C1分、extension 72 $^{\circ}$ C1分を40サイクル繰り返しLast extensionとして72 $^{\circ}$ C10分間伸張させた。

#### 4: 増幅産物の確認

PCR反応液3 $\mu$ lを12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動後、エチジウムブロマイド(EtBr)染色を施しUVイルミネーターにより増幅産物の泳動パターンの確認を行なった。

### 結 果

個体識別のために実施したSTRマーカーの泳動パターンは図2に示すように全て異なっていた事から二つの組織は異なる人物に由来する組織と判断され、本事例は標本製作過程の段階に混入したコンタミネーション組織である可能性が極めて高いと判断された。

### 考 察

病理検査室で作製された病理組織標本の中には通常、そこには在り得ない組織が出現する場合も極稀に存在する。そのような場合、病理医はその経験に裏打ちされた主観的、客観的判断力において、その組織の存在自体の有無を含めて判断を行ってきた。病理標本作製過程で異なる組織が混入した可能性がある場合、病理医にその判断責任を託し続けるだけでなく標本作製する検査技師側が客観的に自らで証明しうる解析技術の確立こそが必要であり病理診断の精度を維持向上するためにも最も必要とされるべきものと考えられる。

バイオマトリックスとは血液型、指紋、静脈パターン、虹彩、DNAなどにより個人を識別する方法あり、各種セキュリティシステムや犯罪捜査、親子鑑定などに用いられてきた。このような生物学的個人識別技術の発展に伴いOta等は病理組織標本内のコンタミネーションが疑われた組織について誰に由来する臓器の一部であるかを証明する方法として血液型物質に対する免疫組織化学染色により混入した組織の識別を行なった(5)。その後、血液型抗血清を用いた識別方法が病理検査室ではコンタミネーションや検体の取り違えの確認方法として広く普及し定着している。しかし、この方法を用いた個体識別法では高い確率で同一の血液型に一致し、判断困難な場合や腫瘍部分において血液型物質は合成阻害される事から偽陰性化を起こすな

どの問題がある(6)。これらの問題を解決する為到我々は疾患に関係なく、更に精度の高い識別可能な方法として法医学領域で用いられている識別技術の中で病理組織に応用可能な技術の確立が必要であると考えた。病理組織材料から抽出されたDNAからも個人が断定可能な方法としてマイクロサテライト領域の短塩基縦列反復配列の回数を検索する事による個体識別が可能であると判断した。STRは両親に由来する遺伝子領域であり、その反復回数は他人では当然であるが、親や兄弟間においても異なるため厳密な個人識別法としてこの部分の解析を行なうことが望ましいものと判断された。実際、日本の警察や米国FBIをはじめ世界各国において犯罪捜査における個体識別法として用いている方法であり、専用の解析ソフトによる解析では一度に13種類のSTRを検出できるAmpFLSTR SGM Plus PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Japan) や Power Plex (Promega) がキットとしてすでに市販されている。双方ともPCRで増幅されるフラグメントを解析するためには専用のキャピラリー式電気泳動システムと解析ソフトが必要であり、それにより僅かな波形の違いをも読み取る事が可能である。丸川等はこれ等、市販されているキットを用いてHE標本内および細胞診スメア標本内に認められたコンタミネーションが疑われた組織や細胞集団の判別を行なった(7)。しかし、この一連のシステムは個人を識別する能力については充分であるが解析に要する試薬や器機にかかる設備投資は極めて高額であり現実的ではない。市販されているSTRマーカーは通常、犯罪捜査における個人識別を念頭に作製されており、その識別能力は最大で地球上の全人口を網羅できる数値になると言われているが、我々が病理検査室で直面している問題はそのような地球規模の話ではなく顕微鏡を通して見える良性の組織像の脇にたまたむ癌細胞の小さな集団や検体の取り違えなどの過失が起きてしまった場合の個人と個体を証明または否定するための客観的事実を持って問題を解決するというレベルの技術である。今回、我々が使用したSTRマーカーのうちD5S818を解析するためのプライマーの塩基配列はLi Jin等により、vWFについてはC.kimpton等、さらにD3S1358についてはHua Li等により報告されており合成費用は数千円と極めて安価である(8)-(10)。同時にこれ等のSTRマーカーによって増幅される両親由来の二本のフラグメントは、そのほとんどは通常のアクリルアミドゲルで泳動パターンの違いを識別する事が可能であり特別な解析システムの必要はない。更に、この3種類のSTRマーカーの日本人における出現頻度はvWA:1/11.5、D3S1358:1/4.1、D5S818:1/7.3と報告されておりSTRマーカー3種類の泳動パターンが偶然に一致する確率は1/344.2となる(11)。これに血液型や性別などの因子を含めると最大で約1/7000であることから、この識別能力をもってすればプレバート上の問題は充分解決できるものと考えられた。今回、我々が用いた解析法は形態学的に判別困難なコンタミネーションが疑われた症例について個体を識別する客観的な判断材料として用いる事は極めて有用であると判断された。

参 考 文 献

1. 田直樹, 込山真実, 安田玲子. 当院における検体取り違いに対する取り組み. 神臨技誌. 2009; 44(2): 1-6.
2. 詰浩一. 当院における検体過誤防止に対する取り組み. 神臨技誌. 2009; 44(2): 7-10.
3. 磯崎勝. 病理検査におけるデジタル画像の有有用性. 神臨技誌. 2009; 44(2): 11-8.
4. 野口雅之. 分子生物学的手法に用いる検体の保存. 病理と臨床. 1996; 14(臨時増刊号): 234-7.
5. Ota M, Fukushima H, Akamatsu T, et al. Availability of immunostaining methods for identification of mix-up tissue specimens. *Am.J.Clin.pothole*. 1989;92:665-9.
6. Murata K, Egami H, Shibata Y, et.al. Expression of blood group-related antigens, ABH, Lewis(a), Lewis (b), Lewis(x), Lewis(y), CA19-9 and CSLEX1 in early cancer, intestinal metaplasia, and uninvolved mucosa of stomach. *Am J Clin Pathol* 1992;98:67-75.
7. 丸川活司, 吉田繁, 伊藤智雄. 病理検査における縦列反復配列 (Short tandem repeat) 解析を用いた個人識別解析法. 検査と技術. 2006; 34(9): 831-835.
8. Li Jin, Peter A, et al. Defining microsatellite alleles by genotyping global indigenous human populations and non-human primates. *J. Forensic sciences*. 1996; 23:496-9.
9. Kimpton C, Walton A, Gill P. A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Human Molecular Genetics*. 1992;1(4):289.
10. Li H, Schmidt L, Wei M et al. Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352;D3S1358;D3S1359. *Human Molecular Genetics*. 1993;2(8):1327.
11. 中西祥徳, 橋本良明 改定 PCR 実験ノート PCR を用いた個人識別 2 版 東京: 羊土社; 2005; 154-64.

英 文 抄 録

Original article

Genetic individual identification of paraffin-embedded pathological preparations to rule out the sporadic contamination of other patient's tissue during preparation of paraffin sections of pathological examination

Nagaoka Central General Hospital, Department of pathology; medical technologist<sup>1)</sup>, pathologist<sup>2)</sup>  
Hidehiro Hasegawa<sup>1)</sup>, Toshihiko Ikarashi<sup>2)</sup>

**Purpose:** Tissue contamination of other patient in paraffin-embedded preparation prevented accurate pathological diagnosis. But these technical errors were inevitable in a routine processing because a large number of specimens of plural patients were handled in a same box during tissue preparation at a time. A case with tissue contamination fragments was examined to confirm them as the contamination of another patient by a forensic gene analysis.

**Method:** Peritoneal tissue with few cancer cells from postoperative patient of gastric cancer was genetically examined whether this cancer fragment was derived from correct patient himself or contamination of other patient. Paraffin-embedded specimens were sectioned and used for genetic analysis. Short base tandem repeat sequence (Short tandem repeat: STR) analysis on chromosome #3, #5, and #12 was done by Polymerase chain reaction (PCR).

**Results:** As for all the electrophoretic patterns of STR, the contamination specimen was very different from the correct individual one.

**Conclusion:** The forensic genetic analysis is very useful for an individual identification with pathological specimens. Correct individual pathological specimens was discriminated from other patient's ones as so-called contamination.

**Keyword:** pathological specimen, contamination of other person's tissue, short base tandem repeat sequence (Short tandem repeat: STR), genetic individual identification

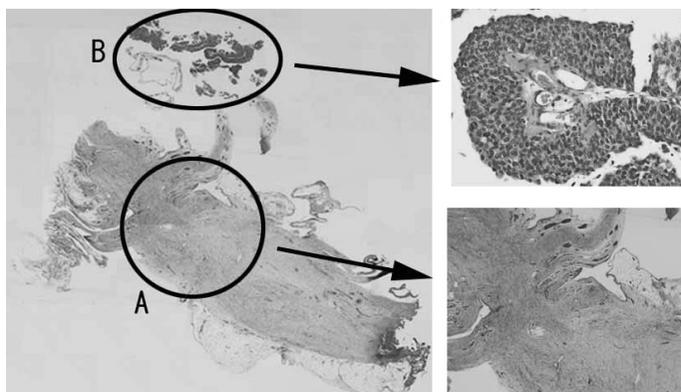


図1 作製された病理組織標本とその拡大

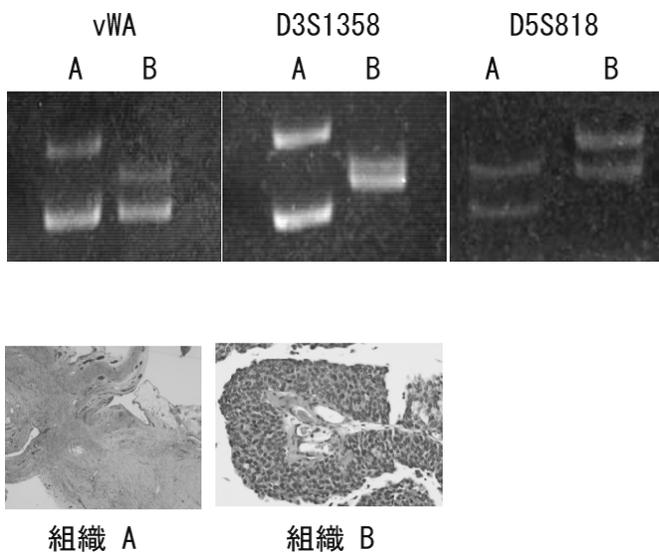


図2 各 STR マーカーの泳動パターン

表1 DNA 解析に用いた STR マーカとその電気泳動パターン

STR	存在する染色体	Allele の種類	増幅産物 (bp)	日本人での一致率
vWA	12p12	8	157-197	11.5人に1人
D3S1358	3p	7	114-142	4.1人に1人
D5S818	5q21-31	8	135-171	7.3人に1人

表2 DNA 解析に用いた STR マーカのプライマーシーケンス

vWA	vWA1	5'-CCC TAG TGG ATG ATA AGAATA ATC-3'
	vWA2	5'-GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG-3'
D3S1358	F	5'-ACT GCA GTC CAA TCT GGG T-3'
	R	5'-ATG AAA TCA ACA GAG GCT TG-3'
D5S818	F	5'-GGG TGA TTT TCC TCT TTG GT-3'
	R	5'-TGA TTC CAA TCA TAG CCA CA-3'