

<特集「がんのゲノム医療」>

ゲノム医療における病理組織検体の取扱い

田中 顕之*, 小西 英一

京都府立医科大学大学院医学研究科人体病理学

Handling of Pathological Specimens in the Era of Genomic Medicine

Noriyuki Tanaka and Eiichi Konishi

Department of Pathology,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Sciences

抄 録

ゲノム医療の進歩は目覚ましいものであり、とくに悪性腫瘍のコンパニオン診断や網羅的遺伝子解析の進歩は使用できる分子標的薬の選択肢を増やしてくれるものである。ゲノム医療の根幹である病変の核酸はホルマリン固定パラフィン包埋された病理組織検体（FFPE）から抽出されたものであり、その精度がゲノム医療の良し悪しを左右するといっても過言ではない。核酸の精度は多くの因子によって左右されることが知られている。本稿では日本病理学会が策定した「ゲノム診断用病理組織検体取扱い規程」に基づいた適切な病理標本の取扱い方法について解説する。

キーワード：ゲノム医療，病理組織検体，FFPE（formalin fixed paraffin embedded），核酸。

Abstract

The recent advances in genomic medicine, especially in the field of malignant tumors, has brought vast opportunities for personalizing a patient's therapy. The base of genomic medicine lies in the nucleic acid (DNA/RNA) extracted from the patient's formalin fixed paraffin embedded (FFPE) pathological specimen. The nucleic acid is susceptible to various factors, which lead to degradation, contamination, etc. In this article, we will discuss appropriate handling of pathological specimens based on the guidelines made by The Japanese Society for Pathology.

Key Words: Genomic medicine, Pathological specimen, FFPE, Nucleic acid.

令和4年2月10日受付 令和4年2月26日受理

*連絡先 田中顕之 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上路梶井町465番地

nntanaka@koto.kpu-m.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.131.04.319

はじめに

現在、がんに対する薬物療法では、5-FUやプラチナ製剤など、従来のcytotoxicな薬物療法に加えて、HER2やALKなど、がんの特異的な分子を標的とした分子標的治療薬が用いられるようになりつつあり、さらにその開発が盛んに行われている。また、分子標的治療薬の感受性あるいは抵抗性は標的とするがんの遺伝子変異によって決まるため、手術あるいは生検によって得られたがん組織から核酸を抽出し、解析する遺伝子検査が行われるようになってきている。遺伝子検査には、個別の分子標的治療薬の適否の有無を調べるコンパニオン診断 (CDx) 検査や標準的な治療法が終了した患者に次の治療法を決めるために腫瘍組織から抽出した核酸を次世代シーケンサー (NGS) で解析する網羅的遺伝子解析 (CGP) があり、現在薬事承認されているものも増えつつある。

ここで問題となるのは、いかにして精度の良い核酸を採取するかになる。そのため、以前は、切除あるいは生検された検体のうち病変と思われる領域を未固定の状態の一部採取し、液体窒素などで瞬時に凍らせて保管し、必要時に核酸抽出を行うことが行われていた。しかし液体窒素の保管場所などの設備的な制約や、長時間にわたる保管の難しさから現在ではごく限られた施設でのみ行われている。

近年組織診断に用いられる病理標本のもととなるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体から核酸を抽出する技術が確立され、FFPE検体さえあれば、過去の手術検体や生検検体から比較的容易に核酸抽出が行われるようになった。また、NGSなどに代表されるDNAシーケンスの技術の進歩により、数枚の未染色FFPE検体から数十種以上の遺伝子が同時に解析できるようになり、実臨床でも導入されている。

一方で、少量のコンタミネーションで誤った結果が導かれる危険性も指摘されている。また、生検検体などの小検体である場合には、未染標本を作製する途中に病変がなくなってしまうなど、限りある医療資源としての有効な利用法に

ついで議論もある。さらに、DNAの断片化が進んだFFPE検体ではNGS解析自体が不可能になることもあり、FFPE検体の品質管理の重要性が浮き彫りになってきている¹⁾。

がんゲノム医療の急速な発展やこのような問題の指摘を受けて、2016年および2018年に、日本病理学会が中心となって「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程」と「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」をそれぞれ策定した^{2,4)}。本稿では日常診療の病理検体の取扱いを策定した「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」を中心に、遺伝子検査法に対応した病理組織検体の取扱い^{3,4)}について解説する。

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程

本規約は2018年に、日本病理学会に策定したものであり、診療におけるゲノム・遺伝子の診断での利用を踏まえて、FFPE病理組織検体を対象としている。対象とする範囲はプレアナリシス段階とアナリシス段階の二段階からなる。

1. プレアナリシス段階

ここで対象とするのは病理組織標本が出来上がるまでの段階であり、固定前プロセス、固定プロセス、固定後プロセスに細分化することができる。この段階の推奨事項などを表1に示す。対象とする職種については病理医や病理検査技師にとどまらず、特に固定前プロセスにおいて、臨床医 (検体採取医) が担当者となっていることを認識することが重要である⁴⁾。

もっとも重要なのは、標本摘出後の迅速なホルマリン固定であるといっても過言ではない。生検などの小検体は採取後すぐにホルマリン固定し、内視鏡切除検体や小手術切除検体はゴム板などに張り付けて固定するのが望まれる。手術検体はホルマリン固定するまでの間は室温ではなく、冷蔵保存 (4℃下) し、最長3時間以内、できれば1時間内の固定が望まれる²⁾⁵⁾⁶⁾。また、ホルマリンの浸透は1mm/hであることから、大きな手術検体では適宜割をいれて固定することが望まれる⁷⁾。

また、固定液の組成や濃度によってIHCの検

出や抽出された核酸の精度にも影響がみられることが報告されており、固定液は10%の緩衝入りホルマリンが推奨される²⁾⁸⁾。これは免疫組織化学染色 (IHC) を使用する複数のCDxでも

推奨されている⁵⁾⁹⁾¹⁰⁾。

核酸に対するホルマリン固定液の影響として、塩基置換 (C>T) などがよく知られている¹¹⁾¹²⁾ (図1)。これらの変化は固定後72時間以降に顕

表1 ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程のプレアナリス段階の推奨事項

ステップ	推奨事項
固定前	<ul style="list-style-type: none"> ・切除標本は、摘出後速やかに冷蔵庫など(4°C下)に保存し、1時間以内、少なくとも3時間以内にホルマリン固定を行う。ホルマリンの浸透を促進するため、必要に応じて割を入れる。 ・内視鏡切除標本や生検標本は、摘出後速やかに3時間内にホルマリン固定を行う。 ・細胞診検体は、必要な前処置を行ったうえで、速やかに固定を行う。
固定	<ul style="list-style-type: none"> ・固定液は濃度10%の中性緩衝ホルマリン液を用いる。 ・固定時間は検体の大きさによるが、6-48時間以内が望ましい。 ・使用する固定液の容量は、組織量に対して10倍量の固定液を用いる。 ・ホルマリン固定液の温度は室温でよい。
固定後	<ul style="list-style-type: none"> ・ゲノム診療に用いる可能性がある場合、EDTA脱灰を行う。 ・FFPEブロックの保存は、多湿を避けた、冷暗所(室温でも構わない)でよい。 ・ゲノム診療へは、可能な限り、再薄切したFFPE標本を用いる。

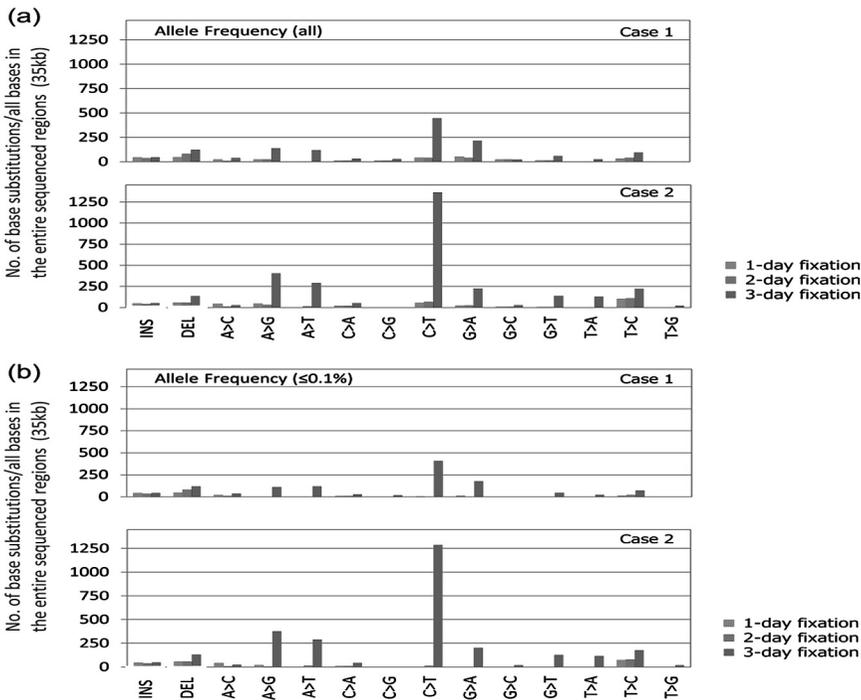


図1 ホルマリンの長期固定に伴う塩基置換の頻度

大腸癌2症例を1-3日間固定してからDNAを抽出してシーケンシングを行った結果、解析したすべてのアレル (a) および0.1%以下のアレルを対象とした場合 (b) のいずれにおいてもC>T, A>G, A>Tの塩基置換が固定後3日目に有意に増加している。(文献3より許可を得て再掲載)

著に出現することが示されており²³⁾、固定は6-48時間が望ましいとされる根拠となっている。ただし、EBUSで得られた微小検体や細胞診のセルブロック検体は過固定を防ぐために6-24時間の固定が望ましいとされる⁹⁾。

標本内に骨組織などの硬組織が含まれている場合、EDTA脱灰が推奨される²⁾

また保存に当たってFFPE検体は室温で保存可能であるが、湿度の低い冷暗所²⁻⁴⁾や冷蔵(4℃)保存が推奨される¹³⁾。

2. アナリシ段階

プレアナリシ段階を経て作成された病理組織標本を用いて、核酸抽出などの作業を行う。この段階の推奨事項を表2に示す。原則として使用されるべきFFPE検体は病理医によって確認されるが、なるべく血液や壊死物、非腫瘍性細胞が含まれていない検体が選ばれることが望まれる¹⁴⁾。この段階で、重要となるのは提出される標本の腫瘍細胞比とFFPE標本の経年劣化であり、それについて解説を追加する。

1) 腫瘍細胞比

NGS解析では、解析の段階で発生する非特異的な遺伝子変異データ(ノイズ)を除外するために、一定の頻度より少ない頻度で発生する遺伝子変異は除外される仕組みとなっている。このため、検体内に含まれている腫瘍組織が少なく、目的の体細胞遺伝子変異が検体内の腫瘍細胞すべてにあったとしても、カットオフ値未満となり、ノイズとして認識されてしまい、存

在する遺伝子変異が検出されないことがある。そのため、NGS解析では、提出される組織における腫瘍細胞の割合(腫瘍細胞数比)を確認する必要がある。また、非腫瘍細胞が多く含まれている検体では、腫瘍細胞比を上げるために、非腫瘍細胞領域を削り落とす作業(マクロダイセクション)を行う必要がある。

使用するNGS検査によって異なるが、一般に必要なDNA量は10-500ng(腫瘍細胞2000個以上)であるといわれている²⁴⁾。腫瘍細胞比においても、SNV(single nucleotide variant)やIndel(small insertion and deletion)などの検出には30%以上(最低20%以上)、CNA(copy number alteration)の検査には50%以上が望ましいとされる⁴⁾¹⁵⁾¹⁷⁾。

2) FFPEブロックの経年劣化

ホルマリンの固定に伴い、DNAの塩基置換などが生じることが報告され、検体のホルマリン長期固定に対する警鐘の根拠とされてきた³⁻⁵⁾¹¹⁾¹²⁾。(図1)

また、FFPEブロックに含まれている核酸の経年劣化が知られており、FFPEブロックの推奨保存条件などが提唱されている⁷⁾。Guyardらが同一のFFPEブロックから4-6年の保存期間を介して抽出されたDNAが明らかに劣化していることを報告し¹⁸⁾また、国立がん研究センター東病院が主体となって実施されている産学提携全国がんゲノムスクリーニング(SCRUM-Japan/GI-SCREEN)において病理組織検体とNGS解析の比較を行ったところ、特に作製から4年以上経

表2 ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程のアナリシ段階の推奨事項

推奨事項
<ul style="list-style-type: none"> ・ゲノム診療に用いるFFPEブロックは解析に十分な腫瘍量を含んでいて、出血や壊死、炎症細胞な非腫瘍性細胞を可能な限り含んでいないブロックを選ぶ。 ・FFPEブロックの薄切時にはコンタミネーションに十分注意する。 ・未染FFPE標本作成時に、未染標本とともにHE標本を作製して、標本に腫瘍細胞の位置をマーキングするとともに腫瘍細胞割合を算出する。 ・核酸抽出には診療での使用に標準化された市販キットの使用が望ましい。 ・各ゲノム診断法で推奨される市販キットがある場合、そのキットの使用が望ましい。 ・抽出された核酸は、分光光度計や蛍光法による濃度測定を行い、純度や収量を確認すべきである。 ・抽出された核酸が長期保存されていた場合、品質の確認が推奨される。

過したFFPE病理組織検体を用いた場合、Large panel（100以上の遺伝子を解析するNGS検査）の成功率が50%程度に減少することが分かった²⁴⁾。（図2）

このため、同一患者において、複数の検体が存在する場合、作成時期が最新の検体を第一選択にすることが推奨されている³⁾⁴⁾¹⁹⁾。

ゲノム診断用の核酸を抽出するためには、標準化された市販キットを使用することが望まれる。抽出キットによって純度や抽出量が異なることや、各ゲノム診断法で推奨されるキットが異なる場合もあるので、注意する必要がある²⁰⁾。

抽出された核酸は分光光度計を用いてのA260/A280比（DNAの場合1.7-1.9，RNAの場合

1.9-2.1）を測定することで純度を検査することが望まれる³⁾²¹⁾。

また、抽出されたのちに保存された核酸は変性の可能性があるため、Ct値やDIN値、Q-valueやDV200の測定で、品質の測定が望まれる¹⁹⁾。

おわりに

本稿では、日本病理学会が策定した「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」において、検体採取からFFPE検体の選別までの段階における推奨事項を中心に、病理医および臨床検査技師、臨床医（検体採取医）が知っておくべき知識について概説した。ゲノム医療が本格的になりつつある昨今では、本稿で示した推奨事項の

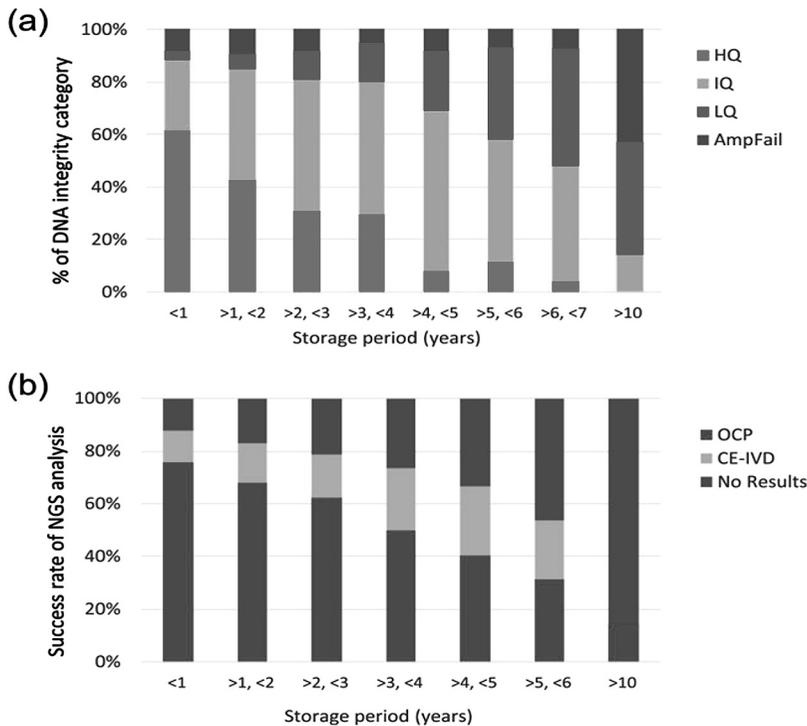


図2 SCRUN-Japan/GI-SCRUM projectにおいて、FFPEブロック保存期間に伴うDNA精度の影響
消化器癌のFFPE検体2573個から抽出されたDNAの品質の解析。(a) FFPE検体の保存期間が長期になると抽出されたDNAが高品質である検体の割合が低下する。(b) NGS解析の成功率もFFPE検体の保存期間が長期になると低下する。

略語: HQ: high quality, IQ: intermediate quality, LQ: low quality

OCP: Oncomine Cancer Panel, CE-IVD: Oncomine Solid Tumor DNA/Fusion Transcript Kit

(文献3より許可を得て再掲載)

実施は、検体の固定・切り出し法の相違や自施設における遺伝子検査実施の有無にかかわらず、遵守されるべきことと思われる。

疑問があれば、自施設の病理医とよく相談し、将来にわたり、貴重なゲノム医療の基本となる

FFPEの適切な作製や保存を心がけていただきたい。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Bass BP, Engel KB, Greytak SR, Moore HM. A review of preanalytical factors affecting molecular, protein, and morphological analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue: how well do you know your FFPE specimen? *Arch Pathol Lab Med.* 138: 1520-1530, 2014.
- 2) Kanai Y, Nishihara H, Miyagi Y, Tsuruyama T, Taguchi K, Katoh H, Takeuchi T, Gotoh M, Kuramoto J, Arai E, Ojima H, Shibuya A, Yoshida T, Akahane T, Kasajima R, Morita KI, Inazawa J, Sasaki T, Fukayama M, Oda Y. The Japanese Society of Pathology Guidelines on the handling of pathological tissue samples for genomic research: Standard operating procedures based on empirical analyses. *Pathol Int.* 68: 63-90, 2018.
- 3) Hatanaka Y, Kuwata T, Morii E, Kanai Y, Ichikawa H, Kubo T, Hatanaka KC, Sakai K, Nishio K, Fujii S, Okamoto W, Yoshino T, Ochiai A, Oda Y. The Japanese Society of Pathology Practical Guidelines on the handling of pathological tissue samples for cancer genomic medicine. *Pathol Int.* 71: 725-740, 2021.
- 4) ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 一般社団法人日本病理学会. 羊土社. 2019.
- 5) Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, Fitzgibbons PL, Francis G, Goldstein NS, Hayes M, Hicks DG, Lester S, Love R, Mangu PB, McShane L, Miller K, Osborne CK, Paik S, Perlmutter J, Rhodes A, Sasano H, Schwartz JN, Sweep FC, Taube S, Torlakovic EE, Valenstein P, Viale G, Visscher D, Wheeler T, Williams RB, Wittliff JL, Wolff AC. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 28: 2784-2795, 2010.
- 6) Khoury T, Sait S, Hwang H, Chandrasekhar R, Wilding G, Tan D, Kulkarni S. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Mod Pathol.* 22: 1457-1467, 2009.
- 7) Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *Am J Pathol.* 161: 1961-1971, 2002.
- 8) Sato M, Kojima M, Kawano Nagatsuma A, Nakamura Y, Saito N, Ochiai A. Optimal fixation for total preanalytic phase evaluation in pathology laboratories: a comprehensive study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays *Pathol Int.* 64: 209-216, 2014.
- 9) Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, Chitale DA, Dacic S, Giaccone G, Jenkins RB, Kwiatkowski DJ, Saldivar JS, Squire J, Thunnissen E, Ladanyi M. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *Arch Pathol Lab Med.* 137: 828-860, 2013.
- 10) Ebi H, Bando H, Taniguchi H, Sunakawa Y, Okugawa Y, Hatanaka Y, Hosoda W, Kumamoto K, Nakatani K, Yamazaki K. Japanese Society of Medical Oncology Clinical Guidelines: Molecular Testing for Colorectal Cancer Treatment, 4th edition. *Cancer Sci.* 111: 3962-3969, 2020.
- 11) Do H, Dobrovic A. Sequence Artifacts in DNA from Formalin-Fixed Tissues: Causes and Strategies for Minimization. *ClinChem* 61: 1 64-71, 2015.
- 12) Williams C, Pontén F, Moberg C, Söderkvist P, Uhlén M, Pontén J, Sitbon G, Lundeberg J. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol.* 155: 1467-1471, 1999.
- 13) von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples *PLoS One.* 5; 2: e1261, 2007.
- 14) Fujii S, Yoshino T, Yamazaki K, Muro K, Yamaguchi K, Nishina T, Yuki S, Shinozaki E, Shitara K, Bando H,

- Mimaki S, Nakai C, Matsushima K, Suzuki Y, Akagi K, Yamanaka T, Nomura S, Esumi H, Sugiyama M, Nishida N, Mizokami M, Koh Y, Abe Y, Ohtsu A, Tsuchihara K. Histopathological factors affecting the extraction of high quality genomic DNA from tissue sections for next-generation sequencing. *Biomed Rep.* 11: 171-180, 2019.
- 15) Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, Normanno N, Edsjö A, Rouleau E, Solé F, Thunnissen E, Timens W, Schuuring E, Dequeker E, Murray S, Dietel M, Groenen P, Van Krieken JH; European Society of Pathology Task Force on Quality Assurance in Molecular Pathology; Royal College of Pathologists. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol.* 67: 923-931, 2014.
- 16) Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 19: 341-365, 2017.
- 17) Chen H, Luthra R, Goswami RS, Singh RR, Roy-Chowdhuri S. Analysis of Pre-Analytic Factors Affecting the Success of Clinical Next-Generation Sequencing of Solid Organ Malignancies. *Cancers (Basel)* 7: 1699-1715, 2015.
- 18) Guyard A, Boyez A, Pujals A, Robe C, Tran Van Nhieu J, Allory Y, Moroch J, Georges O, Fournet JC, Zafrani ES, Leroy K. DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Arch.* 471: 491-500, 2017.
- 19) Fujii T, Uchiyama T, Matsuoka M, Myojin T, Sugimoto S, Nitta Y, Okabe F, Sugimoto A, Sekita-Hatakeyama Y, Morita K, Itami H, Hatakeyama K, Ohbayashi C. Evaluation of DNA and RNA quality from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue for next-generation sequencing - Retrospective study in Japanese single institution. *Pathol Int.* 70: 602-611, 2020.
- 20) Janecka A, Adamczyk A, Gasińska A. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Anal Biochem.* 476: 8-10, 2015.
- 21) Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G, Lawlor RT, Scarpa A. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *PLoS One.* 8: e62692, 2013.

著者プロフィール



田中顕之 Noriyuki Tanaka

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科人体病理学・助教

略歴：2007年3月 岡山大学医学部卒業

2007年4月 手稲溪仁会病院

2010年4月 総合病院国保旭中央病院 臨床病理科

2014年4月 岡山大学病院病理診断科

2018年4月 関西医科大学病院病理診断科

2020年4月 京都第一赤十字病院病理診断科

2021年4月～現職

専門分野：外科病理全般（特に胆膵病理および呼吸器病理）

- 主な業績：1. Tanaka N, Yoshida H, Suzuki Y, Harigaya K. Relative expression of hMena11a and hMenaINV splice isoforms is a useful biomarker in development and progression of human breast carcinoma. *Int J Oncol*, **45**: 1921-1928, 2014.
2. Matsumoto K, Ohara T, Fujisawa M, Takaki A, Takahara M, Tanaka N, Kato H, Horiguchi S, Yoshida R, Umeda Y, Fushimi S, Yagi T, Matsukawa A, Okada H. The relationship between the PD-L1 expression of surgically resected and fine-needle aspiration specimens for patients with pancreatic cancer. *J Gastroenterol*, **54**: 1019-1028, 2019.
3. Fujii Y, Matsumoto K, Kato H, Saragai Y, Takada S, Mizukawa S, Muro S, Uchida D, Tomoda T, Horiguchi S, Tanaka N, Okada H. Diagnostic Ability of Convex-Arrayed Endoscopic Ultrasonography for Major Vascular Invasion in Pancreatic Cancer. *Clin Endosc*, **52**: 479-485, 2019.
4. Takada S, Kato H, Saragai Y, Muro S, Uchida D, Tomoda T, Matsumoto K, Horiguchi S, Tanaka N, Okada H. Contrast-enhanced harmonic endoscopic ultrasound using time-intensity curve analysis predicts pathological grade of pancreatic neuroendocrine neoplasm. *J Med Ultrason (2001)*, **46**: 449-458, 2019.
5. Saito T, Tsuta K, Honda O, Ishida M, Yamaka R, Tanaka N, Ishida K, Utsumi T, Maru N, Matsui H, Taniguchi Y, Hino H, Kurata T, Murakawa T. Prognostic impact of mucin spread, tumor cell spread, and invasive size in invasive mucinous adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, **146**: 50-57, 2020.
6. Mizukawa S, Kato H, Matsumoto K, Muro S, Akimoto Y, Uchida D, Tomoda T, Yamamoto N, Horiguchi S, Tsutsumi K, Inoue H, Tanaka N, Okada H. Effectiveness of Menghini-Type Needles for Endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration of Pancreatic Masses. *Dig Dis Sci*, **66**: 3171-3178, 2021.