

原 著

## がん遺伝子検査において重要な核酸品質保持を目的とした FFPE 検体作製プロセスの見直しと改善について

岡山赤十字病院 病理部<sup>1)</sup>, 病理診断科<sup>2)</sup>

梅野 里奈<sup>1)</sup>, 田村麻衣子<sup>2)</sup>, 都地 友紘<sup>2)</sup>, 伊東 優花<sup>1)</sup>,  
石崎 愛理<sup>1)</sup>, 増田 雅史<sup>1)</sup>, 斎藤利江子<sup>1)</sup>, 林 栄子<sup>1)</sup>,  
林 敦志<sup>1)</sup>

(令和4年9月2日受稿)

### 要 旨

2019年6月に次世代シーケンサー(NGS)を用いた新たながん遺伝子パネル検査が保険収載されたことで、全国的にがん遺伝子パネル検査数は年々増加している。遺伝子検査に用いる検体は従来、未固定検体であったが、近年ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体を用いた検査が可能になった。それにより、今まで以上に検体の取り扱いを厳密に管理する必要が出てきた。当院は2021年度にがんゲノム医療連携病院に指定され、2022年度よりがんゲノム外来を開始している。今後増加するであろうNGSを用いたがん遺伝子パネル検査のために、核酸品質を担保する必要があると考えた。今回、当院から包括的がんゲノムプロファイリング(CGP)検査目的に岡山大学病院へ提出した固形がん検体23件のうち、核酸品質の確認(QC)を実施した検体17件の結果をもとに、FFPE検体の作製プロセスの見直し、変更を行った。その結果、プロセス変更後において検体の核酸品質に改善がみられた。

**Key words** : formalin-fixed paraffin-embedded ; FFPE, next-generation sequencers ;  
NGS, comprehensive genomic profiling ; CGP, quality control ; QC

### 緒 言

がん遺伝子検査数は全国的に年々増加しており、従来はコンパニオン診断(companion diagnostics ; CDx)目的に、1回の検査で1種類の遺伝子異常を検出する検査(singleplex)のみであったが、近年はオンコマイン Dx Target Test マルチ CDx や2019年6月に保険収載された OncoGuide™ NCC オンコパネルシステム、FoundationOne® CDx がんゲノムプロファイル等のNGSを用いた数十から数百個の遺伝子異常を一度に調べることができるがん遺伝子パネル検査(multiplex)が普及しつつある<sup>1)</sup>。

2019年~2021年に当院から提出した固形がんに対するがん遺伝子検査の種類と検査数の推移(図1)をみても、がん遺伝子パネル検査数が増加してきていることが分かる。当院は2021年度にがんゲノム医療連携病院に指定され、2022年度からが

んゲノム外来を開始しており、今後がんゲノム医療の拡充が予想される。遺伝子検査に用いる検体は従来、未固定検体であったが、近年は手術あるいは生検などで採取された組織のホルマリン固定パラフィン包埋(formalin-fixed paraffin-embedded ; FFPE)検体で検査可能になった。但し、その際に提出するFFPE検体は、これまでの組織・細胞形態の保持のみを重視した処理方法ではなく核酸品質の保持にも配慮した処理方法で、作製された検体であることが求められる。核酸品質はホルマリン固定時間に大きく左右されることが知られており<sup>2)</sup>、過固定は核酸品質を確実に低下させる。今後増加していくであろうがん遺伝子検査を高い精度で実施するために、当院のFFPE検体の取り扱いをホルマリン固定を中心に見直し、改善を行った。

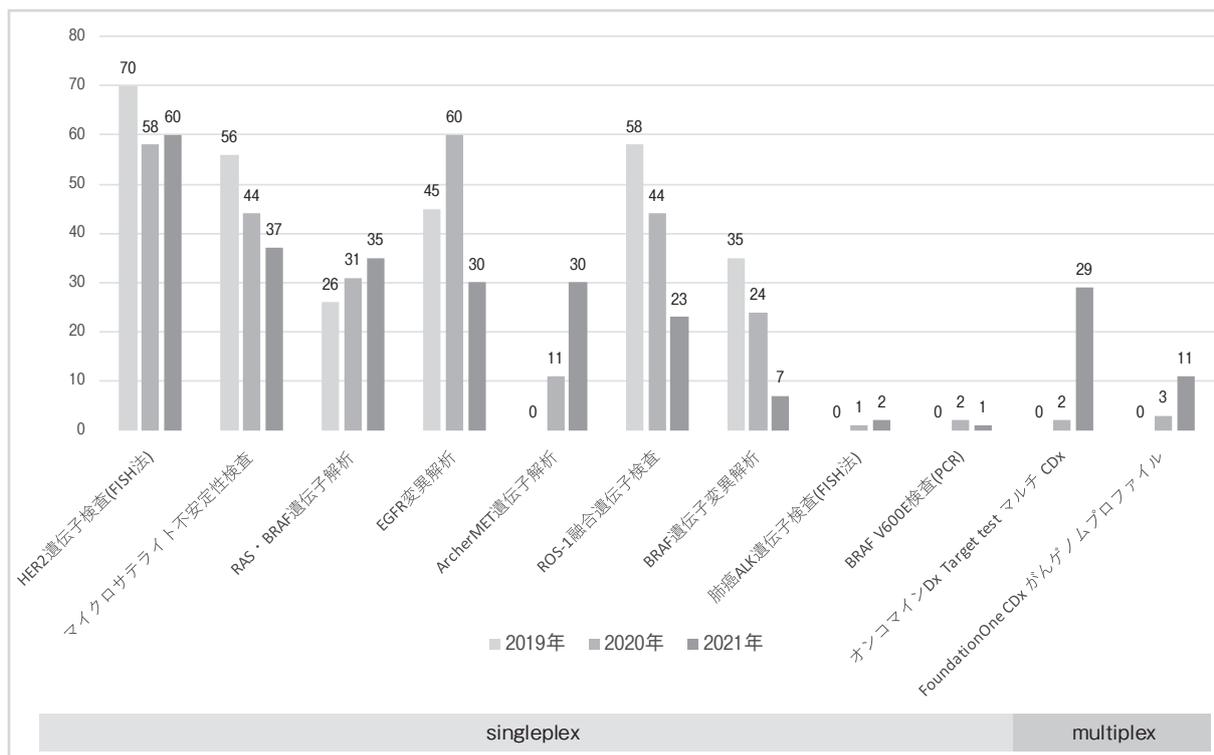


図1 固形がんに対するがん遺伝子検査の種類と検査数の推移 (2019年-2021年)

## 対象と方法

対象は当院で2019年5月～2021年11月に採取され、岡山大学病院に包括的がんゲノムプロファイリング (comprehensive genomic profiling ; CGP) 検査目的で提出した固形がん検体23件のうち核酸品質の確認 (quality control ; QC) を実施した17件である。当院でFFPE 検体作製後、検体を岡山大学病院に提出し、DNAの抽出を行った。今回はDNA Integrity Number (DIN) を指標として、核酸品質を評価した。DINはDNAの断片化を反映する指標であり、DNAの分解度を1～10の10段階にスコア化した値である (1～10 ; 1 = 完全に分解された状態, 10 = ほとんど分解されていない状態)<sup>3)</sup>。DINとシーケンス解析の成功率を検討した文献によると、スコア4.0以上であれば、74%の確率でシーケンス解析が成功するとされている<sup>4)</sup>。よって、今回の検討ではDINが4.0以上であれば良好な核酸品質であると評価し、4.0未満であればDNAが分解され断片化が進んだ状態であり、核酸品質が低下していると評価することとした。

QCより得られた結果とゲノム診療用病理組織検体取扱い規程の推奨条件 (表1)<sup>5)</sup>を参考に、2020年5月中旬よりFFPE 検体作製において、核

酸品質に大きな影響を及ぼすとされているプレアナリシス段階のうち、病理検査技師が責任を担う固定プロセスと固定後プロセスについて見直しを行い、従来法と変更後の方法で核酸品質に変化がみられるかを検討した (表2)。

## 結 果

QCを実施した検体17件の採取日、採取臓器、ホルマリン固定時間、QC結果を表にまとめた (表3)。検体は肝臓7件、膵臓4件、胃3件、胸膜1件、リンパ節1件、縦隔1件であった。DINが4.0未満であったのは、2019年5月～2020年6月に採取された検体で3件あり、測定不能となった検体は2件であった。また、この期間で固定時間が48時間以内であった検体は4件、48時間を超えた検体は1件であり、平均固定時間は26.6時間であった。2020年10月～2021年11月に採取された検体においては、DIN 4.3～6までの範囲に12件全てが収まっており、平均値は5.3であった。また、平均固定時間は22.9時間であった。さらに、標本1枚当たりのDNA収量はDINが4.0未満であった検体で数値が小さい傾向にあった。臓器間におけるDINに大きな差はみられなかった。

表1 FFPE 検体作製の取扱い推奨条件（文献5より抜粋）

| プレアナリシス段階の工程 | 工程の主な責任・担当者    | 推奨条件   |
|--------------|----------------|--|
| 固定前プロセス      | 臨床医<br>(検体採取医) | ◇手術材料は30分以上室温保持は極力回避し、さもなくば冷蔵庫保管後1時間以内、遅くとも3時間以内に固定<br>◇生検材料、細胞検体は速やかに固定                               |
| 固定プロセス       | 病理医<br>病理検査技師  | ◇10%中性緩衝ホルマリンを使用<br>◇組織検体は6～48時間固定推奨<br>◇室温固定でよい<br>◇固定不良（固定不足、過固定）による品質劣化は回避すべき<br>◇組織量に対し10倍量の固定液を使用 |
| 固定後プロセス      | 病理医<br>病理検査技師  | ◇使用薬剤の管理に注意する<br>◇脱灰：酸脱灰を避け、EDTA 脱灰を推奨<br>◇FFPE ブロック保管：室温可、冷暗所<br>◇未染色標本保管：低温、パラフィンコートなど時間が経った物は避け、再薄切 |

表2 ホルマリン固定・固定後プロセスにおける変更点

| プレアナリシス段階 | 変更前   | 変更後  |
|-----------|---|--|
| 固定プロセス    | 病理検査技師の土日出勤なし<br>金曜日採取検体の固定時間（72時間以上）   | 病理検査技師の土日出勤あり<br>金曜日採取検体の固定時間（大幅に短縮）               |
| 固定後プロセス   | 自動固定包埋装置の薬液（脱水アルコール）は10回で交換<br>自動固定包埋装置のプログラム開始は遅延開始とする<br>悪性疑いの検体以外の硬組織はギ酸（酸脱灰）を使用 | 5回で交換<br>即時開始で1槽目の待機時間を減らす<br>硬組織全例にEDTA（中性脱灰）液を使用 |

表3 QC を実施した17件の採取日、採取臓器、ホルマリン固定時間とQC結果

| 採取日            | 採取臓器                  | 固定時間<br>(時間) | DIN  | 標本1枚当たりの<br>DNA 収量 (ng) |
|----------------|-----------------------|--------------|------|-------------------------|
| 2019/5/7 (火)   | liver                 | 19           | 1.7  | 11.2                    |
| 2020/1/30 (木)  | liver                 | 21.5         | 1.9  | 74.5                    |
| 2020/3/26 (木)  | liver                 | 22           | 測定不能 | 68                      |
| 2020/5/8 (金)   | stomach               | 49           | 2.3  | 32.2                    |
| 2020/6/30 (火)  | pancreas              | 21.5         | 測定不能 | 7.8                     |
| 2020/10/7 (水)  | stomach               | 23           | 5.2  | 565                     |
| 2020/12/17 (木) | pancreas              | 20.5         | 4.3  | 276                     |
| 2020/12/24 (木) | liver                 | 26.5         | 6.1  | 193                     |
| 2021/1/18 (火)  | stomach               | 26           | 6.2  | 452                     |
| 2021/5/6 (木)   | paraaortic lymph node | 17.5         | 5.7  | 187.5                   |
| 2021/5/6 (木)   | pancreas              | 24           | 4.3  | 148.5                   |
| 2021/6/28 (月)  | liver                 | 21           | 4.9  | 116.5                   |
| 2021/8/10 (火)  | pleura                | 26           | 6    | 770                     |
| 2021/9/7 (火)   | liver                 | 18           | 4.5  | 188                     |
| 2021/10/21 (木) | mediastinum           | 23.5         | 4.3  | 37.5                    |
| 2021/11/16 (火) | pancreas              | 26           | 5.8  | 201                     |
| 2021/11/19 (金) | liver                 | 23           | 5.7  | 720                     |

## 考 察

ホルマリン固定による核酸品質への影響として、核酸の断片化のほか、核酸塩基の化学修飾がある<sup>6)</sup>。特にシトシンが、加水分解に伴う脱アミ

ノ化によりウラシルへ置換され、その後のPCRによってチミンが生成（C > T 置換）されることが知られている<sup>7)8)</sup>。その結果として本来生じていないはずの点突然変異が偽陽性として検出され、遺伝子検査の結果に影響を及ぼすことになる。この

反応は固定時間の延長によって増加し、72時間（3日）から顕著となることより、48時間（2日）以内の固定が推奨されている。核酸品質において、適切な固定時間は重要な因子であり、微小な組織検体ではより短い時間で固定が完了するため、その影響を受けやすい。よって、業務上支障のない範囲で固定時間の短縮化に努めることが望ましいとされている<sup>5)</sup>。今回 QC を実施した検体で、DIN 4.0未満または測定不能であった検体 5 件に注目すると、固定時間が48時間以内であった検体が4件、48時間を超えた検体が1件であり、ほとんどが推奨条件を守れていた。1件のみが基準を1時間超えていたが、前述した通り、核酸品質への影響は72時間から顕著となるため、49時間の固定時間がDINに大きな影響を与えた可能性は低いと考えた。にもかかわらず、5件の検体でDINが低下しており、その原因を考えると、まず第一にホルマリン固定後プロセスにおける自動固定包埋装置の脱水プログラムの設定に問題があった可能性が挙げられた。さらに、ゲノム診療用病理組織検体取り扱い規程の推奨条件をもとに、DINに影響を与える可能性のある作業工程の見直しを行い、2020年5月中旬より当院のFFPE検体取り扱いのホルマリン固定・固定後プロセスにおいて、以下3点の内容を変更した。①自動固定包埋装置の脱水プログラム、②金曜日採取の検体取り扱い、③脱灰液の種類である。

まず①について、木曜日に採取された検体は、金曜日に処理を行うため、自動固定包埋装置のプログラムの設定上、ホルマリンが多く溶け出している可能性のある1槽目の脱水アルコールに長く浸漬する「遅延開始プログラム」での運用になっていた。そのため、検体が過固定になり核酸品質に影響を及ぼしていたのではないかと考えた。変更後は脱水アルコール1槽目の処理時間を1時間とし、「即時開始プログラム」にすることで、1槽目の浸漬時間は最長10時間以上であったところから、1時間に大幅に短縮された。さらに、10回繰り返し使用していた脱水アルコールを5回で交換することとし、脱水アルコールへのホルマリン溶出蓄積量をなるべく減らすことで、検体へ及ぼすホルマリンの影響を減少させた。

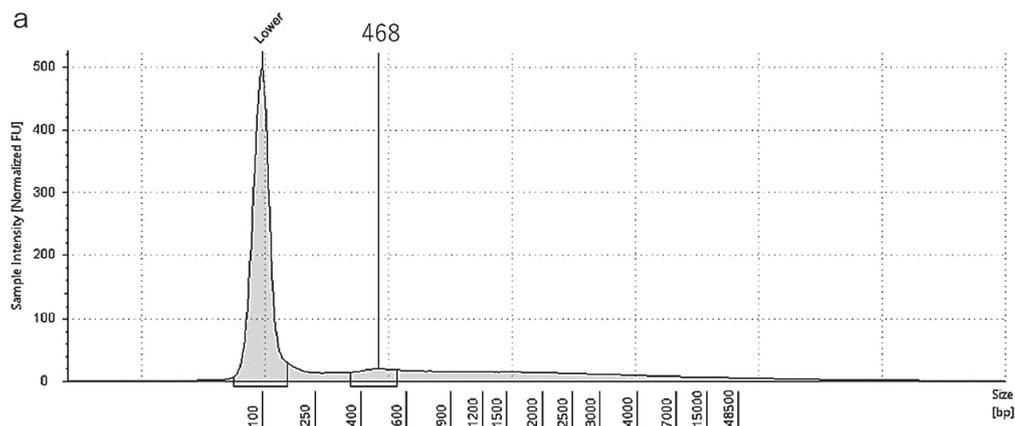
続いて②について、金曜日に固形がん疑いでがん遺伝子検査に提出予定の検体が採取された場合、これまでは土日の間ホルマリンに浸漬し続け

ることになり、ホルマリンから取り出す月曜日には固定時間は72時間を超え過固定になっていた。それを病理検査技師が土日の間に出勤し、検体をホルマリンから取り出し処理を進めることとした。それにより、金曜日に採取した検体の固定時間を大幅に短縮することができた。

最後に③について、硬組織を含む検体には固定後プロセスにおいて脱灰処理を施すことがある。脱灰方法には主に酸を用いた急速脱灰法とEDTAを用いた緩徐脱灰法が使用される。ゲノム診療用病理組織検体取り扱い規程では、遺伝子検査に提出する可能性がある場合は、酸脱灰を回避し、EDTA脱灰を行うよう推奨されている。特に酸脱灰を行った場合は、DNA、RNAだけでなくタンパク発現も検出困難となることがある<sup>9)</sup>。当院では2020年度以前は、悪性腫瘍の可能性のある検体のみを選択的にEDTA脱灰し、その他の検体は脱灰時間の短縮を目的に酸脱灰の一つであるギ酸脱灰を用いていた。しかし、臨床診断の段階では分かっていたいなかった悪性腫瘍が病理診断で明らかになる可能性があることを考え、2020年度より硬組織を含む検体全てをEDTA脱灰するように変更した。それにより、脱灰後検体に残ったギ酸が自動固定包埋装置内の溶液に溶け出し、他の検体に影響を及ぼす可能性もなくなった。

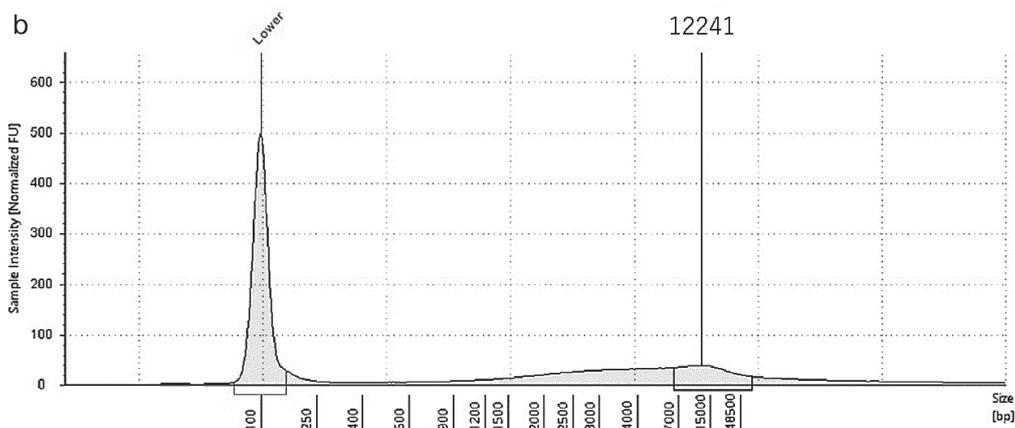
以上の取り組みを開始して以降、十分量腫瘍が含まれている検体のDINは全て4.0以上であり、良好な核酸品質であることが確認できた。また、DNA収量が比較的少ない検体でも、プロセス変更後はDIN 4.0以上の品質を保つことができていた。さらに、DINに加えて詳しく断片化をみる方法として高感度電気泳動試験があり<sup>10)</sup>、同一患者の1回目に採取した検体（DIN 2.3）と再生検した検体（DIN 6.2）に対してこの試験を実施した。その結果を比較すると、DNAのサイズが明らかに変化しており、再生検した検体においては比較的サイズの大きいDNAの量が増加していることが分かった（図2）。DNAのサイズが保持されていない場合、その後の検査に支障をきたし解析できなくなる可能性があるため<sup>11)</sup>、DNAの品質管理はがん遺伝子検査において大変重要である。

また、今回のプロセス変更による病理組織診断に必要なHE染色・免疫組織化学染色などへの影響はみられなかった。



Sample Table

| Well | DIN | Conc. [ng/μl] | Sample Description | Alert | Observations                                   |
|------|-----|---------------|--------------------|-------|--|
| C1   | 2.3 | 5.25          |                    |       | Sample concentration outside recommended range |



Sample Table

| Well | DIN | Conc. [ng/μl] | Sample Description | Alert | Observations |
|------|-----|---------------|--------------------|-------|--------------|
| B1   | 6.2 | 10.0          |                    |       |              |

図2 同一患者検体における DIN と DNA のサイズ比較 (base pair ; bp)

a. 1 回目に採取した検体 (DIN 2.3, DNA サイズの量的ピーク468 bp) と b. 再生検した検体 (DIN 6.2, DNA サイズの量的ピーク1224 bp) に対して高感度電気泳動試験 (High sensitivity D1000) を実施した結果, プロセス変更後における DNA のサイズ (bp) が明らかに変化しており, 再生検した検体では比較的大きな DNA の量が増加していることが分かる。

## がん遺伝子検査に対する病理部のその他の取り組み

病理部におけるがん遺伝子検査に対する近年の取り組みを以下に記す。

2016年より病理部で作製していたホルマリンを調整済みの10%中性緩衝ホルマリンに変更し, 院内で使用するホルマリンを推奨条件に沿って統一した。

採取された検体中の腫瘍の有無や性状の確認を病理検査技師が行う迅速細胞診 (Rapid On-Site cytologic Evaluation ; ROSE) を活用することで,

がん遺伝子検査に提出可能な検体の確保につながっている。また, ROSE で確認した陽性検体と陰性検体を分けて FFPE 検体作製をすることで, 標本の腫瘍割合を上げる取り組みを実施している。

2020年1月27日より手術検体の固定開始時刻の記載を臨床医に依頼し, 固定時間の管理を開始した。また, 同時期に切り出しの時間を午後から午前に変更し, 手術検体の固定時間の短縮を図った。

がん遺伝子検査に提出する未染色標本作製時に, 核酸除去剤を用いたマイクロトームの清掃や替刃交換を検体ごとに行い, コンタミネーション防止対策を徹底している。また, 未染色標本の前後

に HE 染色標本を作製し、腫瘍成分の消失がないかを確認した後に、検査会社に提出するようにしている。

## 結 論

今回、CGP 検査目的で提出した検体に QC を実施し、その結果とゲノム診療用病理組織検体取扱い規程の推奨条件をもとに FFPE 検体作製の取り扱いを見直した。それによって、従来よりも核酸品質の向上を図ることができた。

CGP 検査は、2022年の現時点においては、標準治療が終了した患者にとって次の治療への最後の手がかりであり、保険診療として検査を受けることができるのは患者 1 人につき 1 回と決まっている非常に重要な検査である。さらに、検査結果を得るまでに時間がかかる検査であるため、検体不良等での再検査は回避しなければならない。当院は2022年度よりがんゲノム外来を開始しており、岡山大学病院での QC を経ることなく、検体を直接検査会社に提出することになる。当院には QC を行う設備がないため、核酸品質を担保するためには、今まで以上に厳密に検体取り扱いを管理する必要があると考える。

今後とも病理部として、より臨床との連携を図り、がんゲノム医療に貢献していきたい。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

## 謝 辞

本論文投稿にあたり岡山大学病院 医療技術部ゲノム医療総合検査室 井上 博文 様にご協力頂きました。厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会：次世代シーケンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイドライン(第2.1版)，2020. <https://www.jsmo.or.jp/about/doc/20200310.pdf>
- 2) 日本病理学会：ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会, 2016. <https://genome.pathology.or.jp/index.html>
- 3) Schmidt E : DNA Integrity Number (DIN) によるゲノム DNA 分解度の客観的評価. Access Agilent, 2015. [閲覧日：2022年8月8日]<https://www.chemagilent.com/accessagilent/article.php?page=201503-05>
- 4) 西原広史：がんゲノム医療の新展開～遺伝子パネル検査の果たすべき役割について～. *Animus* **23**(4)：19-26, 2018.
- 5) 日本病理学会 ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程策定ワーキンググループ：ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 日本病理学会, 東京, 2018.
- 6) Quach N, Goodman MF, et al : In vitro mutation artifacts after formalin fixation and error prone translesion synthesis during PCR. *BMC Clin. Pathol.* **4** (1) : 1, 2004.
- 7) Do H, Dobrovic A : Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase. *Oncotarget* **3** (5) : 546-558, 2012.
- 8) Do H, Dobrovic A : Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues : causes and strategies for minimization. *Clin. Chem.* **61**(1) : 64-71, 2015.
- 9) 蔦 幸治：肺癌診断に必要とされる適切な病理検体の取扱い. *肺癌* **59**(2) : 123-127, 2019.
- 10) 関根郁夫, 村谷匡史, 他：がんゲノム医療 結果報告書の読み方と患者への伝え方～エキスパートパネルの実際～, 28-33, 医学と看護社, 東京, 2020.
- 11) 田中伸哉, 西原広史：がんゲノム病理学 (第1版), 文光堂, 東京, : 104-108, 2021.

<Abstract>

**Review and improvement of formalin-fixed paraffin-embedded sample preparation procedure for nucleic acid quality control which is essential for genetic testing for cancer**

Rina Umeno<sup>1)</sup>, Maiko Tamura<sup>2)</sup>, Tomohiro Toji<sup>2)</sup>, Yuka Ito<sup>1)</sup>,  
Eri Ishizaki<sup>1)</sup>, Masafumi Masuda<sup>1)</sup>, Rieko Saito<sup>1)</sup>, Eiko Hayashi<sup>1)</sup> and Atsushi Hayashi<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pathology, <sup>2)</sup>Department of Diagnostic Pathology, Japanese Red Cross Okayama Hospital

Since the new cancer multi-gene panel testing using next-generation sequencers (NGS) has been covered by insurance in Japan from June 2019, the number of NGS testing has increased all over Japan year by year. While conventional samples that were used for gene testing had been non-fixed samples, the test using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples has recently become available. The use of FFPE samples for testing requires more strict quality control of the samples. Designated as one of the Cooperative Hospitals for Cancer Genomic Medicine since fiscal year 2021, our hospital opened the Outpatient Cancer Genome Medicine in fiscal year 2022. The

frequency of cancer multi-gene panel testing may increase in the future, and we believe that quality control of nucleic acids in the cancer multi-gene panel testing using NGS is important. Accordingly, we conducted a review and improved the FFPE sample preparation procedure based on 17 samples that were subjected to nucleic acid quality control (QC) among 23 fixed cancer samples that were sent from our hospital to Okayama University Hospital for comprehensive genomic profiling (CGP). As a result, the quality of nucleic acids has improved since modification of the FFPE sample preparation procedure.