

◀症例報告▶

気管支鏡下生検による小検体を用いたオンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム検査の当院の現状

頼田顕辞¹, 和田有加里¹, 小原昌彦¹, 豊田優子², 水野圭子¹, 安岡香¹,
筒井宏行¹, 坂東弘基², 森田優², 岡本悠里², 辻和也³

要旨：非小細胞性肺癌に対するドライバー遺伝子変異の理解の進歩に伴い、複数の分子標的治療薬が出現し、その選別を迅速に行えるようにオンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム検査 (ODxTT 検査) が2019年より保険収載された。それに伴い、遺伝子パネル検査に適した病理検体が提供できる体制が全国的にとられるようになったが、個々の症例では検体が適正かどうか、特に気管支鏡下生検で得られた小さな検体では悩むことが少なくない。本ケースシリーズ研究の目的は、気管支鏡下生検検体を用いた ODxTT 検査が施行された非小細胞性肺癌患者を対象とし、ODxTT 検査が適切に行えたかどうかを後ろ向きに確認し、小検体でも ODxTT 検査を成功させる要因を検討することである。症例集計期間は2020年12月から2021年の11月までの1年間で、対象症例に対して年齢、性別、腫瘍径、生検回数、ODxTT 検査に適した生検回数、ODxTT 検査に提出する組織断面の総面積、腫瘍割合等の臨床病理学的項目を抽出した。結果は、対象症例は11例で、1例のみ抽出核酸収量が低く ODxTT 検査不能となったが、それ以外は全例解析可能であった。いずれも腫瘍細胞割合は30%を超える検体で、提出する未染スライド数を15枚もしくは20枚であった。提出組織断面積が1mm²未満となる症例が3例あり、そのうちの1例が検査不能となっており、検査不能症例における生検組織断面で観察される腫瘍細胞数は620個と最も少ない数ではあった。組織断面積が1mm²未満の小検体であっても、規定の腫瘍細胞割合を確認し、かつ細胞数が十分量あると見込める検体であれば、検査が可能な症例を経験した。気管支鏡下生検検体を用いた ODxTT 検査には、提出検体中に腫瘍細胞の質と量が確保できるよう、臨床医、病理医、病理技師の各自の努力と連帯が必要と思われる。

キーワード：オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム (ODxTT)、非小細胞性肺癌、経気管支生検 (transbronchial biopsy)、直視下生検 (endobronchial biopsy)、病理診断

はじめに

非小細胞性肺癌の治療は、2004年のEGFR遺伝子変異の発見以降、ALK, ROS1, BRAF, METなど、治療標的となり得るドライバー遺伝子変異が次々と明らかになり、それらを標的とした分子標的薬剤の出現により、進行・再発の非小細胞性肺癌の予後は向上してきている¹。以前は分子標的治療薬の適応を判定するコンパニオン診断薬 (CDx) は、各遺伝子変異と1対1対応となっており個別に検査をする必要があったが、2019年6月より次世代シー

ケンシング (NGS) 技術を用いたオンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム (ODxTT) による遺伝子パネル検査 (以下 ODxTT 検査) が保険収載され、非小細胞性肺癌の複数のドライバー遺伝子を同時に調べることができるようになり、迅速な分子標的薬の選択と使用が可能となっている。それに伴い、提出検体の質が要求されるようになり、病理検体を用いる場合、ホルマリン固定までの時間、固定の方法や時間、保存期間などが重視されるようになった。また、検体の量として、検体の核酸量は10ng以上、腫瘍細胞割合は30%以上が必要とされており²、手術検体を用いる場合は検体の量に困ることは少ないが、生検のような小検体を扱う場合、腫瘍細胞割合が30%を超えていても、組

¹ 高知赤十字病院 病理診断科部

² 〃 呼吸器内科

³ 〃 糖尿病・腎臓内科

組織断面積が1 mm²前後しかない小検体の場合に検体の量が十分であるかの判断が難しいことが少なくない。最近では、ODxTT 検査には組織断面積が1 mm²以上の検体を使用することが好ましいとの報告がみられるが^{3, 4}、実際の気管支鏡下生検検体は組織断面積が1 mm²を下回るものが少なくなく、そのような検体でODxTT 検査を施行せざるを得ないことを経験する。本検討は、気管支鏡下生検検体を用いてODxTT 検査が施行された非小細胞性肺癌患者を対象とし、ODxTT 検査が適切に行えたかどうかを後ろ向きに確認し、小検体でもODxTT 検査を成功させる要因を検討することである。

対象と方法

当院で2020年12月から2021年11月までの1年間で、ODxTT 検査を施行した非小細胞性肺癌症例の27例の内、検査に使用された検体が気管支鏡を用いて採取された生検検体である症例を対象とした。生検方法として経気管支生検(transbronchial biopsy)と直視下生検(endobronchial biopsy)が用いられた。ODxTT 検査に提出する生検検体は、腫瘍細胞割合が30%以上となるように、腫瘍が存在する生検組織を全て選んだ。提出物は、これらの生検組織から作製した未染標本スライドを5 μm厚で15枚もしくは20枚とした。検討のために、患者の年齢、性別、腫瘍の存在する部位、腫瘍径、生検方法、生検検体個数を抽出した。経気管支鏡検査は、気管支鏡としてBF-P290(Olympus, Tokyo, Japan)を使用し、症例に応じてガイドシース併用気管支内超音波断層法(EBUS-GS)を併用した。生検鉗子は、EBUS-GS 使用時には最大外径が1.5 mmであるFB-233D(Olympus)を使用し、EBUS-GSを使用しない場合は、最大外径が1.8 mmであるFB-19C-1(Olympus)を用いた。

組織学的な評価項目として、腫瘍の含まれる生検個数、ODxTT 検査に適した生検個数、ODxTT 検査に提出する組織断面の総面積、総腫瘍面積、総壊死面積、腫瘍細胞割合、ODxTT 検査に提出した未染標本スライド数を計測した。組織切片の長さや面積は、デジタルカメラ(DP27, Olympus)を搭載した顕微鏡(BX53, Olympus)で撮影し、cellSens standard ソフトウェア(version 2.2, Olympus)を用いて計測した。統計処理はStatView 5.0(SAS

Institute Inc., Car, NC, USA)を用いた。

結果

ODxTT 検査の検体として気管支鏡下生検検体を用いた症例は11例であり、10例が検査可能と判定され、1例は抽出核酸収量が低く検査不可能であった(検査成功率91%)。これらの患者背景は、平均72歳(55歳から87歳)で、性別は男性が8例、女性が3例であり、腫瘍の存在する領域、最大腫瘍径、生検方法、EBUS-GSの使用の有無は表1にまとめた。最大腫瘍径の平均は4.4 cm(1.2~7 cm)であった。

腫瘍の組織型、生検個数、腫瘍が含まれる生検個数、ODxTT 検査に提出した生検個数と未染標本スライド枚数、ODxTT 検査に提出する生検組織断面の総面積と、生検組織断面に含まれる腫瘍と壊死の総面積を表1にまとめた。生検個数は平均6個(5~8個)であり、腫瘍を含む生検個数の全生検個数に占める割合は平均66%(17~100%)であった。腫瘍が含まれる生検組織で、ODxTT 検査が可能な生検個数の割合は平均81%(25~100%)であり、腫瘍細胞割合は平均で56%であった。ODxTT 検査に提出した検体の組織断面の総面積は平均で2.8 mm²であり、EBUS-GSを使用した症例では平均2.2 mm²、EBUS-GSを使用しない症例では平均3.3 mm²であり、EBUS-GSの使用の有無で組織の総面積に有意差はなかった。3症例で組織断面の総面積は1 mm²を下回っていた。ODxTT 検査に提出した検体には、出血が多かれ少なかれ含まれており、腫瘍組織に凝固壊死を伴う症例もみられ、壊死の総面積が腫瘍総面積を超える症例が2例みられた。

検査不可能な1症例(症例11)は、組織断面の総面積は1 mm²未満であり、初回に作製したHE切片では腫瘍細胞割合は30%、そこに含まれる腫瘍細胞数は420個であった。しかし、転移性腫瘍との鑑別のために行った免疫染色の切片では腫瘍細胞割合は50%、腫瘍細胞数は620個に増加しており、ODxTT 検査が可能かもしれないと判断された。同じく組織断面の総面積が1 mm²未満であるがODxTT 検査可能であった他の2症例(症例3, 7)については、症例3は腫瘍細胞割合が74%で腫瘍細胞数が639個、症例7は腫瘍細胞割合が72%で腫瘍細胞数が1097個であった。これら3症例はいずれも未染標本スライ

表1 気管支鏡下生検を用いて ODxTT 検査が施行された非小細胞性肺癌11例の臨床病理所見

症例	年齢	性別	腫瘍部位	最大腫瘍径 (cm)	採取方法	EBUS-GS	腫瘍の組織型	全生検個数	腫瘍を含む生検個数 (全生検個数に占める割合%)	ODxTT 検査に提出した生検個数 (提出未染標本スライド枚数)	ODxTT 検査に提出する組織断面			
											総面積 (mm ²)	総腫瘍面積 (mm ²)	総壊死面積 (mm ²)	腫瘍細胞割合 (%)
1	72	M	RL	5.5	TBB+EBB	(+)	SqCC	8	4 (50)	2 (15)	2.16	1.61	0	75
2	71	M	LU	1.2	TBB	(+)	SqCC	5	5 (100)	5 (15)	2.99	2.35	0.48	70
3	87	M	RU	7	TBB	(+)	SqCC	5	4 (80)	4 (20)	0.71	0.48	0	74
4	78	M	RL	4	TBB	(+)	SqCC	8	5 (63)	3 (20)	3.07	0.66	1.01	45
5	69	M	RL	2.4	TBB	(+)	SqCC	8	6 (75)	5 (15)	2.14	0.57	1.04	69
6	55	M	RM	7	EBB	(-)	SqCC	6	3 (50)	3 (15)	3.79	1.14	0.49	47
7	83	F	RU	4.7	TBB+EBB	(-)	Adeno	6	1 (17)	1 (20)	0.95	0.32	0	72
8	75	F	LL	1.6	TBB	(-)	SqCC	5	2 (40)	2 (20)	2.33	0.77	0	32
9	57	M	RU	6	TBB	(-)	NSCLC	7	6 (86)	5 (20)	5.02	2.6	0	43
10	71	M	RL	4	EBB	(-)	Adeno	5	5 (100)	5 (20)	6.65	4.12	0	36
11*	72	F	LU	5.4	TBB	(-)	Adeno	6	4 (67)	1 (20)	0.89	0.41	0	50

略語: ODxTT, オンコマイン TM Dx Target Test マルチ CDx システム; M, 男性; F, 女性; RL, 右下葉; LU, 左上葉; RU, 右上葉; LL, 左下葉; TBB, transbronchial biopsy; EBB, endobronchial biopsy; EBUS-GS, endobronchial ultrasonography with a guide sheath; SqCC, 扁平上皮癌; Adeno, 腺癌; NSCLC, 非小細胞性肺癌; ※抽出核酸量が低く ODxTT 検査が不可能

ドは20枚(組織切片の厚さとしては100 μ m に対応する)を提出していた。検査可能・不可能症例における検体の量的な差はあまりないように思われるが、検査不能例の腫瘍細胞割合が50%に対して、検査可能例では70%をいずれも超えていた。尚、組織断面に含まれる腫瘍細胞数が同程度であった症例11と症例3において、提出した未染標本スライドに含まれる推定腫瘍細胞数は、厚さが100 μ m の組織切片に含まれる腫瘍細胞の数に相当し、腫瘍細胞の直径の平均がいずれも12 μ m 程度で、腫瘍細胞密度が一樣な検体と仮定すると、症例11で4960個(620個 \times 8)、症例3で5112個(639個 \times 8)の腫瘍細胞を提出できたと推定できる。

考察

ODxTT 検査の添付文書には検体の DNA や RNA の必要濃度がそれぞれ 0.83ng/ μ L 以上、1.43ng/ μ L 以上、さらに腫瘍細胞割合は30%以上が必要であると記載されている。この必要濃度に対応する核酸量は10ngとされており、この量を得るには2000個程度の細胞が必要とされている⁵。手術検体を用いる場合は検体の量に困ることは少ないが、生検のような小検体を扱う場合、腫瘍細胞割合が30%を超えて、尚且つ2000個以上の細胞を

ODxTT 検査のために提供できるか、これらの判断が病理医には求められる。小検体で検査可能かどうかの判断が難しいのは、初回作製 HE 切片で検査可能と判断しても、ODxTT 検査のために追加で作製する切片に同程度の腫瘍量が必ず含まれるという保証はなく、ODxTT 検査に用いる切片では腫瘍量が少なくなってしまう可能性があるためと思われる。そのため、小検体の場合は、ODxTT 検査が可能かどうかはやってみないと分からないことが少なくない。検査会社によっては、推奨される未染標本スライドを5 μ m の厚さで5~10枚と記載しているが、小検体で5枚では検体不足になる可能性があることから、検体の大きさが4mm未満の場合は未染標本スライドを15枚以上に増やすことが推奨されている⁶。当院では病理技師の努力により15枚もしくは20枚を提出できているため、提出未染標本スライド数としては十分と考えられる。

今回の我々の経験では、気管支鏡下生検を用いた ODxTT 検査は91%で検査可能であり、同様の生検鉗子が使用された ODxTT 検査成功率と比較して遜色ない結果であった^{3,7}。検査不可能な1症例(症例11)は検体の断面積として1mm未満の小組織であった。同じく検体の断面積が1mm未満の症例は2例(症例3,7)認められたが、こちらは検査可能と判定された。結果の項目で述べた通り、検査不可

能であった症例 11 で 4960 個、検査可能であった症例 3 で 5112 個の腫瘍細胞を外注に提出できたと推定でき、いずれも推奨される 2000 個の細胞量は確保できていると予想され、かつ細胞割合も 30% 以上を満たしていた。症例 11 と症例 3 における違いとしては、腫瘍細胞割合が異なることだけであり、非腫瘍細胞が検査に影響した可能性はあるが、症例 11 で検査不可能となった正確な理由は特定できなかった。症例 11 では免疫染色用に検体を薄切した後に未染標本スライドを作製しており、腫瘍細胞数が極端に減少してしまった可能性はあるが、完全に推測の域をでない。最近の報告では、ODxTT 検査に用いる組織断面積は 1mm²以上となることを推奨している^{3,4}。当院の経験からも、組織断面積 1mm²未満の検体では、腫瘍細胞割合と腫瘍細胞数が基準を満たしていると推定できても、検査不可能な症例を経験した。ただし、同様の小検体でも検査成功例を 2 例経験しており、小検体であっても腫瘍細胞割合や提出検体内の総細胞数に配慮すれば、ODxTT 検査は一応可能であると思われる。

ODxTT 検査結果が 100% 得られるようにする努力としては、腫瘍量の確保が重要な課題と思われる。鉗子で必要な生検個数（生検数）は推奨されていないが、複数回の生検は必須と思われる。学会報告レベルでは、1.9mm の鉗子のみで生検した 33 症例（生検数中央値が 9）、1.9mm と 1.5mm の鉗子を両方使用した 50 症例（生検数中央値は 10）、1.5mm の鉗子のみで生検した 20 症例（生検数中央値は 8.5）、それぞれにおいて ODxTT 検査解析成功率は 85%、84%、70% と報告されている⁷。当院ではこの報告例よりも生検数は少ないが、1.5mm の鉗子を用いた 5 症例は、平均生検数が 6.8 回（5～8 回）で、ODxTT 検査解析成功率は 100% であり、当院では今のところ生検数が 6 回でも ODxTT 検査は可能であった。この生検数を引き続き確保することは大切と思われる。

また、遺伝子パネル検査に使用する検体は、出血や壊死が多く含まれるブロックの使用は可能な限り避けることが推奨されている。対象症例には表 1 のように壊死を含む症例が 4 例含まれ、2 例においては腫瘍面積よりも壊死面積の方が優勢であった。また、全症例で多少の出血を伴っていたが、出血については分布が複雑で定量することが困難であった。ODxTT 検査に提出した検体は、小検体のためトレンジングができなかったことから出血や壊死を含

んでいたと予想される。壊死を含んでいたと予想される検体の ODxTT 検査で、解析不可能な症例はなかった。また、解析不可能症例であった症例 11 では腫瘍面積を超えない程度の出血を伴っていたが、出血の点においては解析成功となった症例 3 の方が検査提出検体中に出血が多く含まれると推定できた。腫瘍細胞割合や細胞数が基準を満たしていれば、多少の出血や壊死は許容できるかもしれない。

ODxTT 検査は、病理検体を用いる場合、上記のように組織の量の評価は大切であるが、それと同等に検体の質の確保も重要な課題である。具体的には①固定に適切なホルマリン溶液を使用しているか（10% 中性緩衝ホルマリン溶液）、②採取した検体を速やかにホルマリン固定しているか、③固定時間、④検体の保管年数（作製後 3 年以内のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを使用しているか）への配慮が必要である⁸。固定時間は ODxTT 検査の添付文書 2 やゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程⁸には 6～48 時間以内が推奨されている。肺癌の遺伝子検査に対する検体の取り扱いに関する論文⁹⁻¹¹でも上記の固定時間が許容されることが示されている。ただし、微小な組織検体の場合は、それだけホルマリンが組織全体に行き渡る時間が短くて済むため、固定時間は 6 時間から 12 時間の間が核酸の質が最もよいとの結果も知られている⁹⁻¹¹。そのため、今回のような小検体に対しては固定時間が 48 時間では過固定となる可能性があることは把握しておく必要がある。今回の 9 症例の正確な固定時間は算出できないが、いずれも生検の翌日までに検体処理が行われていることは確認でき、固定時間はいずれも 24 時間を超えなかった。当院では基本的に気管支鏡検査が週末に施行されることはないが、生検が金曜日に採取された場合、土日の二日間ホルマリン固定されると固定時間が 48 時間を超えてしまうことが問題となっており、その点に関しては臨床医・病理医の双方がこの課題を認識することがまずは必要と思われる。

結語

ODxTT 検査に、気管支鏡下生検による小検体を用いた非小細胞性肺癌の 11 症例を経験した。ODxTT 検査成功率は 91%（10/11 症例）であった。検査不可能症例は、提出した生検組織の断面積が

1 mm未満の小検体であったが、同様の小検体を用いた他の2症例では検査が成功しており、検査不可能となった正確な要因は特定できなかった。生検組織の断面積が1 mm未満の小検体では、ODxTT検査が不可能となる場合があることを念頭におく必要がある。ODxTT検査成功のためには、腫瘍組織の量を高める臨床側の配慮と、検査に提出する腫瘍組織の質と量を増やす病理側の努力が必要と思われる。

謝辞

肺生検の際に介助して下さった看護師等のスタッフ、ODxTT検査に関わる医事課のスタッフに、深甚なる謝意を表す。

参考文献

- 1 Takeda M, et al.: Clinical application of amplicon-based next-generation sequencing to therapeutic decision making in lung cancer. *Ann Oncol* 26: 2477-2482, 2015.
- 2 オンコマイン TM Dx Target Test マルチ CDx システム. 添付文書, (承認事項一部変更承認による改訂) 第8版, 2021年9月.
- 3 Murakami S, et al.: Suitability of bronchoscopic biopsy tissue samples for next-generation sequencing. *Diagnostics (Basel)*. 11, 2021.
- 4 Nemoto D, et al.: Tissue surface area and tumor cell count affect the success rate of the Oncomine Dx Target Test in the analysis of biopsy tissue samples. *Thorac Cancer*. 12: 194-200, 2021.
- 5 Chen H, et al.: Analysis of pre-analytic factors affecting the success of clinical next-generation sequencing of solid organ malignancies. *Cancers (Basel)*. 7: 1699-1715, 2015.
- 6 三窪 将ほか: 肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の手引き. 第2.0版, 日本肺癌学会バイオマーカー委員会, 2021.
- 7 坂口 直ほか: 当院における気管支鏡鉗子生検の鉗子径によるオンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システムの解析成功率の検討. 第177回日本呼吸器内視鏡学会関東支部会. Vol.43., オンライン開催, 日本呼吸器内視鏡学会 P563, 2021.
- 8 一般社団法人日本病理学会: ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. 東京, 羊土社, 2019.
- 9 Lindeman NI, et al.: 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. *J Thorac Oncol* 8: 823-859, 2013.
- 10 Lindeman NI, et al.: 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.
- 11 Lindeman NI, et al.: 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. *J Mol Diagn* 15: 415-453, 2013.

