

MSI検査とがん遺伝子パネル検査を目的とした 膵管癌EUS-FNA 標本の評価

内科 服部 直・高谷 昌宏・渋谷 香苗・辻本 優梨
山本 洋輔・岡崎 右京・松尾 優・村上 詩歩
山本 峻平・高田 斎文・高島 健司・筑木 隆雄
多田 俊史・高木慎二郎・堀 伸一郎・中村進一郎
岡田 裕之

要旨

当院での膵管癌に対するEUS-FNA標本に対して、MSI検査およびがん遺伝子パネル検査への検体提出が可能かどうかについて検討した結果、それぞれ70%、80%という良好な結果であった。当院での実際の検査手順と組織採取率向上のための取り組みについて報告する。

I. はじめに

膵管癌は予後不良な疾患である。手術例のみならず多数を占める手術非適応例においても診断のために超音波内視鏡下穿刺吸引法（EUS-FNA：endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration）での検体採取が広く行われている。

一方、膵管癌においてもprecision medicineが臨床の場に導入されている。生殖細胞変異のBRCA1/2, PALB2, ATM, TP53, MLH1, STK11/LKB1, APC, CDKN2A, SPINK1/PRSSIが高リスク遺伝子と言われており⁽¹⁾、特にPARP（poly ADP-ribose polymerase）阻害薬は2020年12月にBRCA遺伝子変異陽性の治癒切除不能膵癌におけるプラチナ系抗がん剤を含む化学療法後の維持療法に対して承認された。またマイクロサテライト不安定性（MSI：microsatellite instability）を示すケースは膵癌では低頻度であるものの、該当する場合は免疫チェックポイント阻害剤による治療を行うことができる。

2019年6月よりがん遺伝子パネル検査が保

険収載され、簡便かつ安全に検体採取可能なEUS-FNAが癌の病理診断に加えて新たな役割を担うようになった。しかし採取・作成された組織標本がこれらの検査に適していないことがしばしばあり、本検査実施上の問題とされている。EUS-FNA検体によるがん遺伝子パネル検査の解析成功率は56.7%であったとの報告もあり⁽²⁾、検体採取や検体処理の工夫による成績向上が課題とされてきた。

II. 当院での提出標本作成までの流れと検体の評価方法

1. 検体採取

超音波内視鏡（OLYMPUS GF TYPE UCT260）下にAcquire[®]（Boston Scientific社製）22G針もしくはEZ shot 3Plus[®]（OLYMPUS社製）22G針を用いて20ccの陰圧をかけ吸引法により検体を採取する。

2. 検体回収

検体をLEDビューアー[®]（FUJIFILM社製）（図1）上の時計皿に取り出し、病理検査技師が肉眼的に観察して回収する（MOSE：macroscopic on-site evaluation（図2））。組織診断のみを目的とするときは固形成分全てを、MSI検査や遺伝子パネル検査目的の場合は腫瘍細胞割合を高めるため白色成分（図3）のみを回収する。

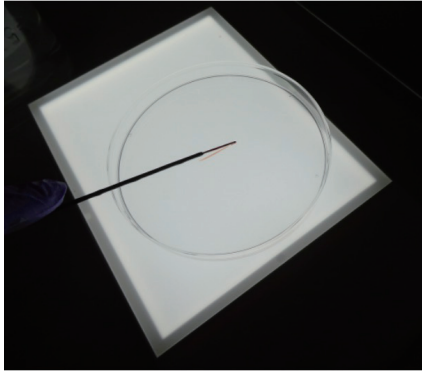


図1 LEDビューアー® (FUJIFILM社製)
LEDビューアー®上の時計皿にEUS—FNAで採取した検体を押し出し、肉眼的に観察する。

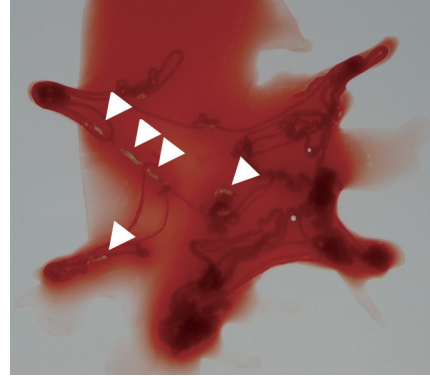


図3 白色検体
MOSEで肉眼的に観察される白色検体（白矢印）



図2 MOSE (macroscopic on-site evaluation)
時計皿上にスタイレットで押し出された検体を病理検査技師が肉眼的に観察し、白色検体の有無を確認し回収する。

3. 標本作製

10%中性緩衝ホルマリン液で固定後にパラフィン包埋しFFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) 検体を作製。薄切しスライドガラス標本を作成する。

4. 標本の評価と必要組織量

病理医がMSI検査またはがん遺伝子パネル検査に提出可能かどうかを評価する。

当施設では遺伝子パネル検査にFoundationOne® CDxを採用しており、この検査では未染色標本スライドガラス上の腫瘍細胞の割合が30%以上、MSI検査では50%以上必要である (表1)。

表1 当院での病理組織特殊検査における必要組織量と処理方法

検査項目	腫瘍割合	腫瘍量	必要組織標本	ガラス	検体保存条件	注意事項	固定条件	脱灰	
NCCオンコパネル	20%以上	4×4mm 16ml	10μ×5枚	ノンコート	冷蔵	3年以内 200ng以上のDNA量が必要	48時間以内 中性緩衝ホルマリン	不可	
Foundation One® CDx	最適30%以上 最低20%	5×5mm 25ml	4-5μ×10枚	HE 1枚	コーティング	室温	進展乾燥加熱不可	6-72時間 中性緩衝ホルマリン	不可
	肝臓は2倍量								
	採血	2ml	EDTA2K入り				当日は冷蔵 冷凍保管で3日		
MSI	50%以上		5μ×5-10枚	HE 1枚	ノンコート	室温	3年以内	連続切片でマーキング必要	不可
	50%以下	5×5mm 25ml	25mlの場合20枚						

Ⅲ. 対象と検討項目

当院で2019年1月から2020年12月の間にEUS-FNAにより膵管癌と診断された125例のうち、経過中に主治医がprecision medicineを想定し、検体評価を依頼した症例を対象とした。以下の2項目について検討した。①MSI検査への提出と解析の可否の割合 ②がん遺伝子パネル検査への提出と解析の可否の割合。

Ⅳ. 結果

125例中33例のEUS-FNA標本に対してMSI検査への提出可否評価が依頼された(図4)。提出可能と評価されたものは23例(70%)であった。検体不良症例(図5)では大部分が血液成分でありマクロダイセクションを行っても腫瘍細胞割合が20%以下であった。このような症例ではMOSE時の肉眼観察では赤色検体が大部分であった。良質な検体が得られた症例(図6)ではマクロダイセクション後の腫瘍細胞割合は60%であった。MOSE時の肉眼観察では多くの白色検体が観察された。

23例中12例がMSI検査に提出されすべて問題なく解析されたが、全例陰性であった(図4)。125例中10例に対してがん遺伝子パネル検査へ

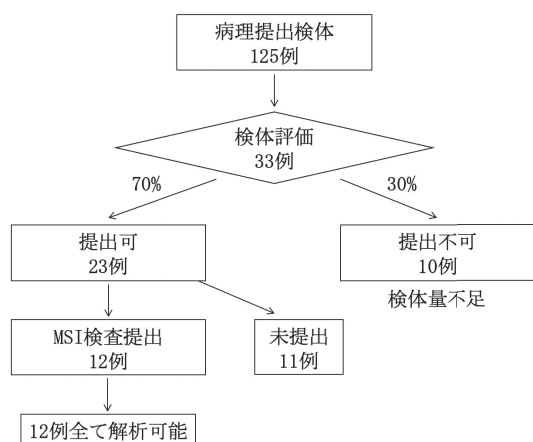


図4 MSI検査への提出可否評価結果

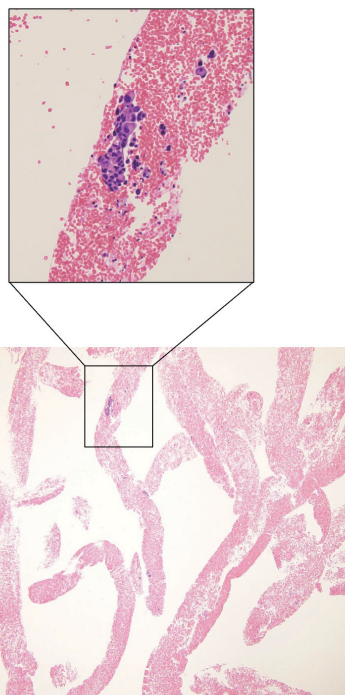


図5 検体不良例のHE標本(ルーペ像と鏡検)
検体不良の本症例では大部分が血液成分でありマクロダイセクションを行っても腫瘍細胞割合が20%以下であった。MOSE時の肉眼観察では赤色検体が大部分であった。

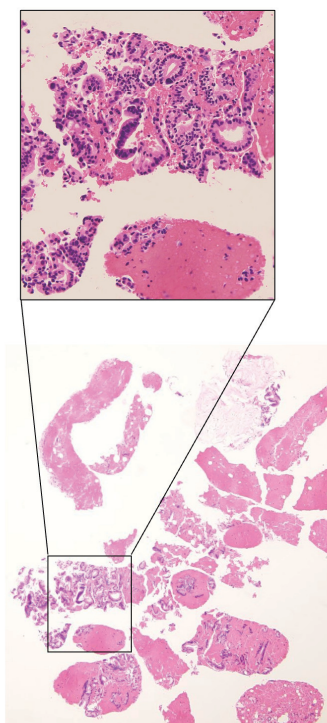


図6 良質な検体のHE標本(ルーペ像と鏡検)
良質な検体が得られた本症例ではマクロダイセクション後の腫瘍細胞割合は60%であった。MOSE時の肉眼観察では多くの白色検体が観察された。

の提出可否評価が依頼された（図7）。提出可能と評価されたものは8例（80%）であった。このうち3例がFoundationOne®CDxに提出されすべて問題なく解析され、1例は対応する薬剤があるアクションナブル遺伝子異常が検出された。

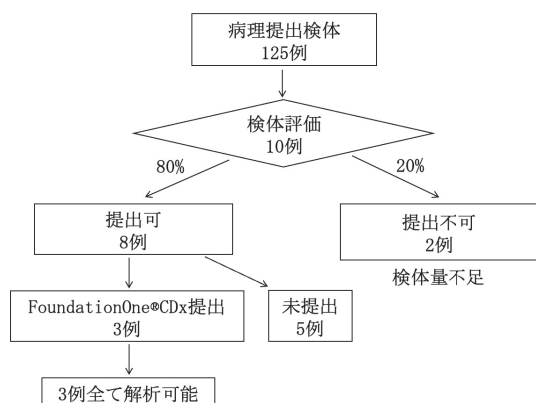


図7 がん遺伝子パネル検査への提出可否評価結果

VI. 考察

当院では期間中、MSI検査では70%、FoundationOne®CDxでは80%の症例で検査に提出可能な検体が得られた。遺伝子パネル検査では提出可能とされた検体は全て最終段階まで解析がおこなわれており、病理医による提出可否の判断は適切であったと考えられた。さらに提出可能な標本を増やすという成績向上のためには、検体採取と検体処理それぞれのプロセスを改善する余地があると考えた。

EUS下の検体採取時に穿刺後にストロークを行う際に病変内で穿刺針の方向を扇状に移動させる *fanning* 法の有効性が報告されており⁽³⁾、当院でも可能な限りは行うようにしている。また病変内でストロークを行う際の穿刺針内の吸引圧に関して空の注射器で陰圧をかける吸引法や、検体採取時に穿刺針内のスタイレットをゆっくりと抜去してわずかな吸引圧を期待する *slow pull* 法⁽⁴⁾ 等があり、*slow pull* 法は吸引法に比べて血液混入が少ないため高い腫瘍割合が得られることが期待される。当施設では基本

的に20ccの吸引圧での吸引法を採用しているが、血液の逆流などがあれば *slow pull* 法に切り替えている。一方、穿刺針の選択も重要とされている。当院では22G針を第一選択としている。針の形状は、従来の細胞診を主とした目的として使用されてきた22G FNA針よりも、組織診断を目的としたフランシーン形状の22G FNB (*fine needle biopsy*) 針の方が採取した組織の面積及び核酸抽出量において良好であったと報告⁽⁵⁾されている。当院でも期間の後半は膀胱癌からの検体採取の場合はFNB針を使用するようになった。これはフランシーン形状のBoston Scientific社製のAcquire®の方が従来型FNA針であるOLYMPUS社製のEZ shot 3Plus®よりも提出可能な白色検体が多く得られる印象を我々も持ったためである。

以上より成績向上のため検体採取の段階では穿刺の技術面はもちろんのこと、吸引方法や穿刺針などを症例に応じて選択することが重要であると考えられた。当施設ではEUS-FNAで得られた検体を時計皿上にスタイレットで押し出し、肉眼的に白色成分の有無を確認して回収するMOSEを取り入れている。MOSEで白色検体の量が少ない場合は追加穿刺を行っている。しかし白色調に見える検体でもフィブリン、線維性成分、壊死、粘液など診断に有用ではない成分であることがあるため、可能なら細胞診検体をその場で染色して有用な検体採取が行われているかどうかの迅速診断を行うROSE (*rapid on-site evaluation*) の導入を行う事でさらなる成績向上が得られるかもしれない。

遺伝子パネル検査においてFFPE検体はホルマリン固定などの操作によるDNAの断片化や化学的修飾の問題があるため検体採取時だけでなく、病理検査室でのプラパラート標本作製の際にも適切な検体取り扱いが必要となる。日本病理学会からはゲノム診療用病理組織検体取り扱い規程が定められている⁽⁶⁾。当院では病理医の管理の下に、病理検査部門の技師が厳密な検体取り扱いと処理を行っている（表1）。このこ

とで最終的にゲノム診断の厳しい基準に適合する組織標本が作製されているものと思われた。

腫瘍内の空間的（原発巣内の不均一性や転移巣と原発巣の違い）または時間的（治療前後での違い）不均一性の解決策として血中遊離DNAを用いた解析がある。2020年3月にFoundationOne[®] Liquid CDxが承認され、病変からの生検が困難な患者でも遺伝子パネル検査が実施できるようになった。しかし腫瘍量が少ないため検出されない場合があることや偽陰性の問題があるとされ、さらに保険適応の点も鑑み、慎重に適応を判断する必要がある。

Ⅶ. おわりに

当施設でのEUS-FNAにより採取された検体が、MSI検査やがん遺伝子パネル検査への提出が可能であるかどうかについて検討したところ、現状では満足できる結果であった。これはEUS-FNAでの検体採取や病理検査部門での検体処理がおおむね適切に行われていることを示しているものと思われた。今後はさらなる成績向上を目指すとともに、リキッドバイオプシーをうまくゲノム医療に導入する体制を整えるべき時勢になっていると思われる。

文献

- 1) Kodai Abe, et al. Hereditary pancreatic cancer. *International Journal of Oncology* 2021; 26(10):1784-1792.
- 2) Izawa N, Morizane C, Takahashi H, et al. The nationwide cancer genome screening project in Japan, SCRUM-Japan GI-SCREEN: Efficient identification of cancer genome alterations in advanced pancreatic cancer. In: *Annals of Oncology Abstract Book of the 43rd ESMO Congress*(ESMO 2018). 2018: 216.
- 3) Bang JY et al. randomized trial comparing fanning with standard technique for endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration of solid pancreatic mass lesions. *Endoscopy* 2013 ; 45 : 445-50.
- 4) Nakai Y, Isayama H, Chang KJ et al. Slow Pull Versus Suction in endoscopic Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration of Pancreatic Solid Masses. *Dig Dis Sci* 2014 ; 59 : 1578-85.
- 5) Asokkumar R, et al. :Comparison of tissue and molecular yield between fine-needle biopsy (FNB) and fine-needle aspiration (FNA) : a randomised study .*Endosc Int open* 7 : E955-E963, 2019.
- 6) 一般社団法人 日本病理学会 ゲノム診療用病理組織取扱い規程 .2018.