

細胞診と遺伝子検査-実用化に向けて

龍見重信 1)、藤井智美 2)、西川武 1)、畠山陽子2) 3)、
東千陽 1)、鈴木久恵 1)、竹内真央 1)、武田麻衣子 2)、
伊丹弘恵 2)、森田剛平 2)、内山智子 2)、大林千穂 2)

1) 奈良県立医科大学附属病院 病院病理部

2) 奈良県立医科大学 病理診断学講座

3) 奈良県立医科大学 循環器内科



第46回日本臨床細胞学会近畿連合会学術集会

COI開示

筆頭演者名： 龍見 重信

今回の演題に関して開示すべきCOIはありません。



遺伝子検査について

様々な臓器や腫瘍に対して多様な遺伝子検査（単一検査、パネル検査）が行われているが、
現在最も感度よく、かつ実用的である検体は、
ホルマリン固定パラフィン包埋(formalin fixed paraffin embedded, FFPE)組織である。

**ホルマリン固定はタンパク質の安定性がよく、
組織の長期保管が可能であるものの・・・**



◆FFPEを用いた遺伝子検査のハードル

- ① ホルマリン固定による核酸の断片化
- ② 組織量の限界

→ 経気管支肺生検等の小さな組織では、病理診断後に単一遺伝子検査でさえ検体不十分として実施できないことがある。

検査対象を FFPE だけでなく、細胞診検体を用いることができれば対象症例や用途を拡大できる可能性がある。



◆細胞診検体の利点

① 患者に対する侵襲が小さい

② 核酸が良好に保存される

← アルコール系固定液で、核を全て含む

③ 悪性細胞を確認できる

→ リキッドバイオプシーとは異なる



◆細胞診検体の利点

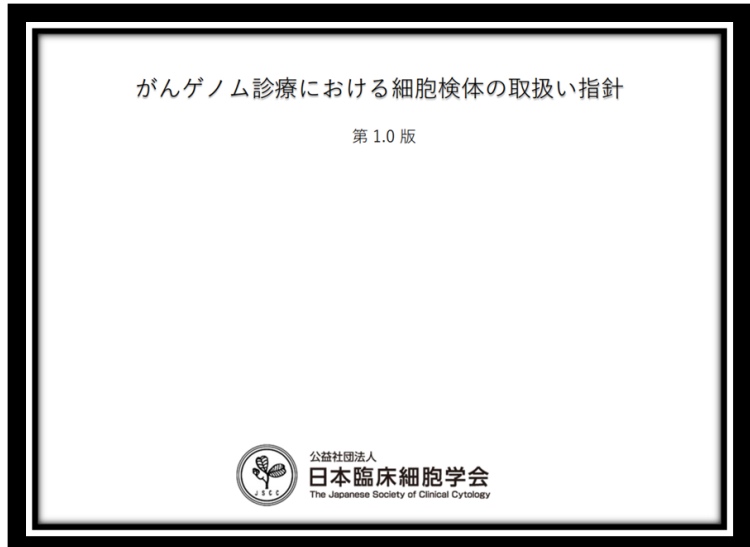
① 患者に対する侵襲が小さい

② 核酸が良好に保存される

← アルコール系固定液で、核を全て含む

③ 悪性細胞を確認できる

→ リキッドバイオプシーとは異なる



3. 細胞検体の適切な取扱い.....	11
3.1 検体処理前の取扱い.....	13
3.2 液状化検体細胞診 (LBC) 検体.....	15
3.2.1 LBC 検体作製.....	15
3.2.2 腫瘍細胞含有割合の評価.....	15
3.2.3 核酸抽出法.....	15
3.2.4 その他留意点.....	16
3.3 ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) セルブロック検体.....	19
3.3.1 セルブロック作製.....	19
3.3.2 腫瘍細胞含有割合の評価.....	19
3.3.3 核酸抽出法.....	20
3.3.4 その他留意点.....	20
3.4 塗抹標本.....	23
3.4.1 既染標本の取扱い.....	23
3.4.2 未染標本の取扱い.....	23



◆当院での遺伝子検査への細胞検体の利用モットー

残余検体を徹底的に使い尽くす

- 喀痰残余検体を用いた*EGFR*変異検査
- 膵EUS-FNA残余検体を用いた*K-ras*変異検査




喀痰での *EGFR* 変異遺伝子検出



Article

Molecular Analysis of Liquid-Based Cytological Specimen Using Virtually Positive Sputum with Adenocarcinoma Cells

Takeshi Nishikawa ¹, Tomomi Fujii ^{1,*}, Shigenobu Tatsumi ¹, Aya Sugimoto ¹, Yoko Sekita-Hatakeyama ¹, Keiji Shimada ², Masaharu Yamazaki ³, Kinta Hatakeyama ¹ and Chiho Ohbayashi ¹

¹ Department of Diagnostic Pathology, Nara Medical University School of Medicine, 840 Shijo-cho, Kashihara, Nara 634-8521, Japan; ntakeshi@naramed-u.ac.jp (T.N.); statsu@naramed-u.ac.jp (S.T.); a_sugimoto@naramed-u.ac.jp (A.S.); yhatakeyama@naramed-u.ac.jp (Y.S.-H.); kpathol@naramed-u.ac.jp (K.H.); ohbayashi@naramed-u.ac.jp (C.O.)

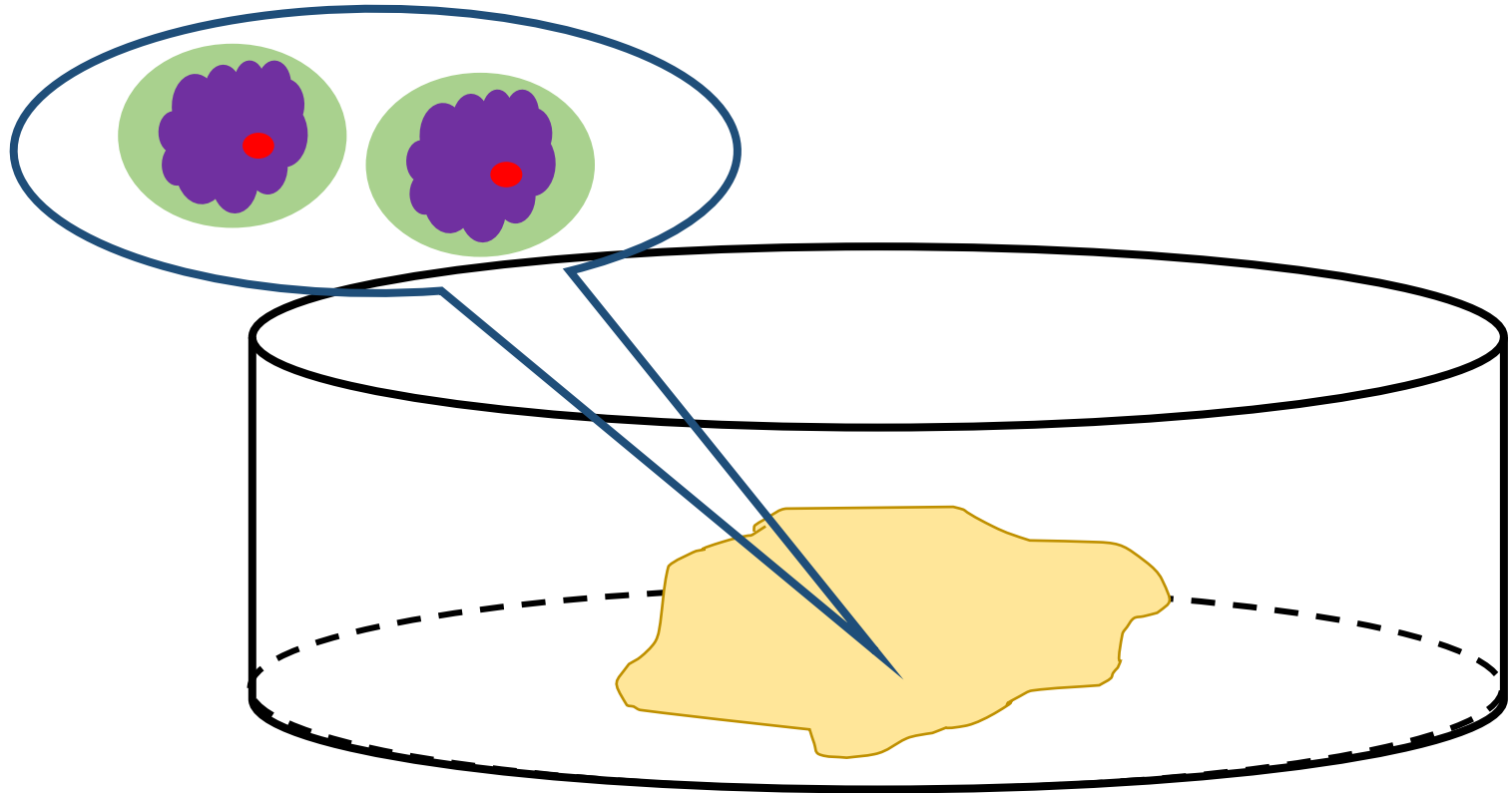
² Department of Diagnostic Pathology, Nara City Hospital, Nara 630-8305, Japan; k-shimada@nara-jadecom.jp

³ Department of Central Clinical Laboratory, Nara Medical University Hospital, Nara 634-8521, Japan; masayama@naramed-u.ac.jp

* Correspondence: fujiit@naramed-u.ac.jp; Tel.: +81-744-22-3051 (ext. 4307); Fax: +81-744-23-5687

Received: 9 January 2020; Accepted: 3 February 2020; Published: 5 February 2020





- ① 固定液によるPCR効率の差は？（ホルマリン有？無？）
- ② 抽出キットによるPCR効率の差は？（細胞用？FFPE用？）
- ③ 一体どれくらいの細胞があれば遺伝子変異を検出できるのか？



◆固定液と抽出キットによるPCR効率の差について (前準備)

➤ 肺癌細胞培養株

- H1299(mutation(-))
- HCC827(*EGFR* exon 19 Deletion)
- H1975(*EGFR* exon 21 L858R/ exon 20 T790M)

➤ 細胞固定液

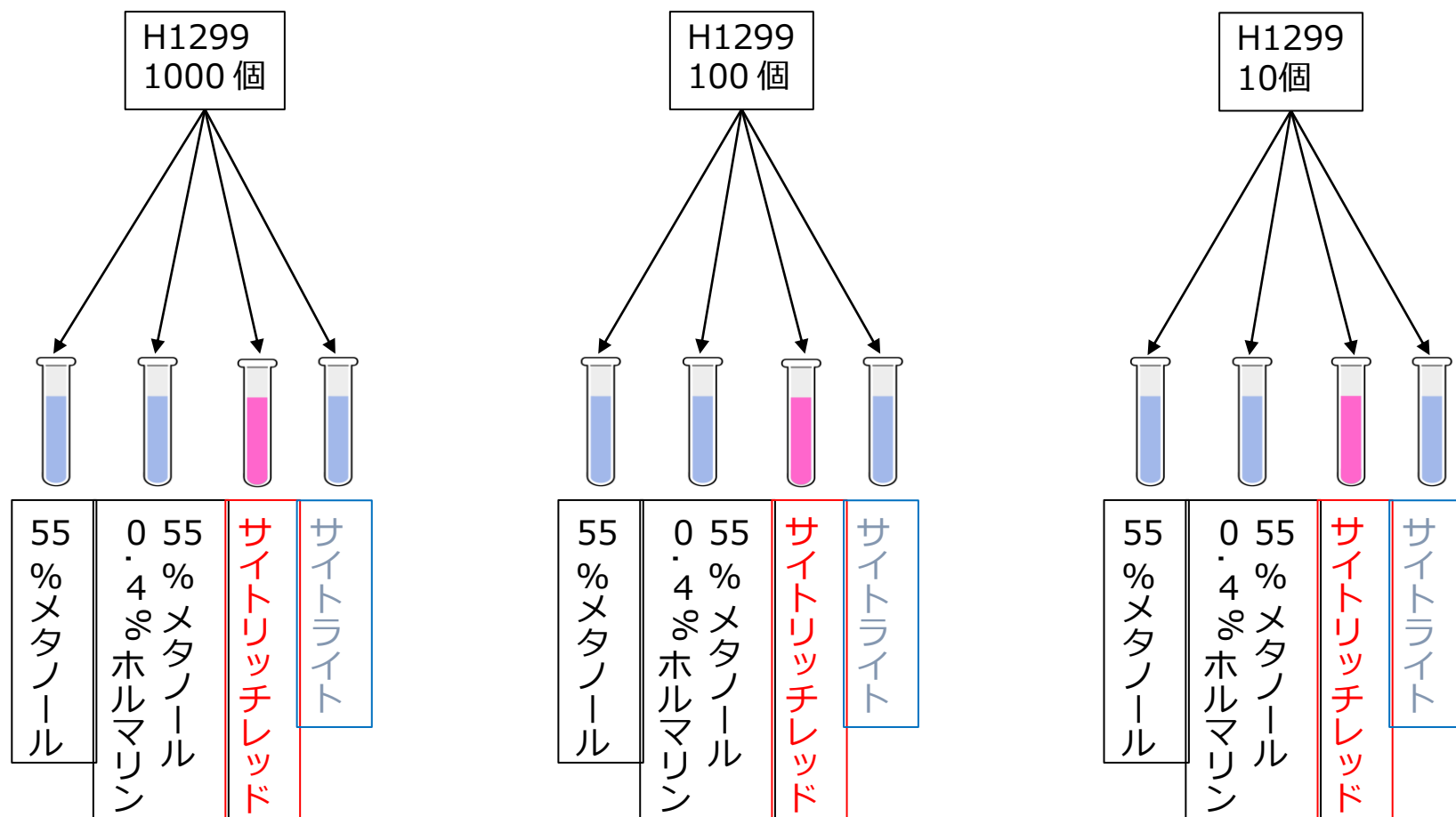
- 55%メタノール
- 55%メタノール+0.4%ホルマリン
- サイトリッチレッド (BD社)
- サイトライト (HOLOGIC社)

➤ DNA/ RNA抽出Kit

- QiAamp® DNA Mini kit (細胞用)
- QiAamp® DNA FFPE Tissue Kit (パラフィン切片用)
- miRNeasy Mini kit (細胞用)
- miRNeasy FFPE Kit (パラフィン切片用)



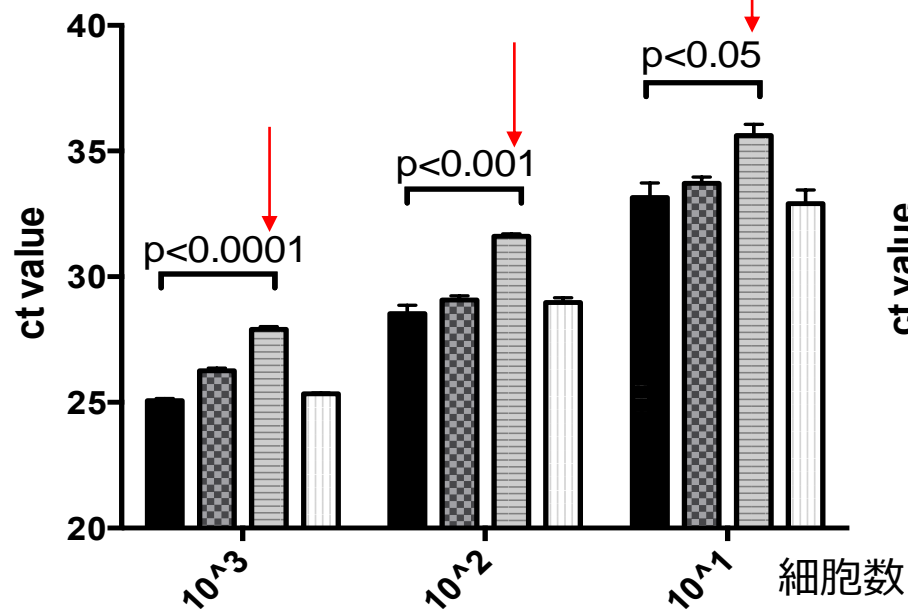
- H1299細胞培養株を細胞数1000、100、10個に調整し、以下4種類の固定液で5日間固定後、細胞用、FFPE用の2種類の抽出キットでDNAを抽出、Ct値を測定



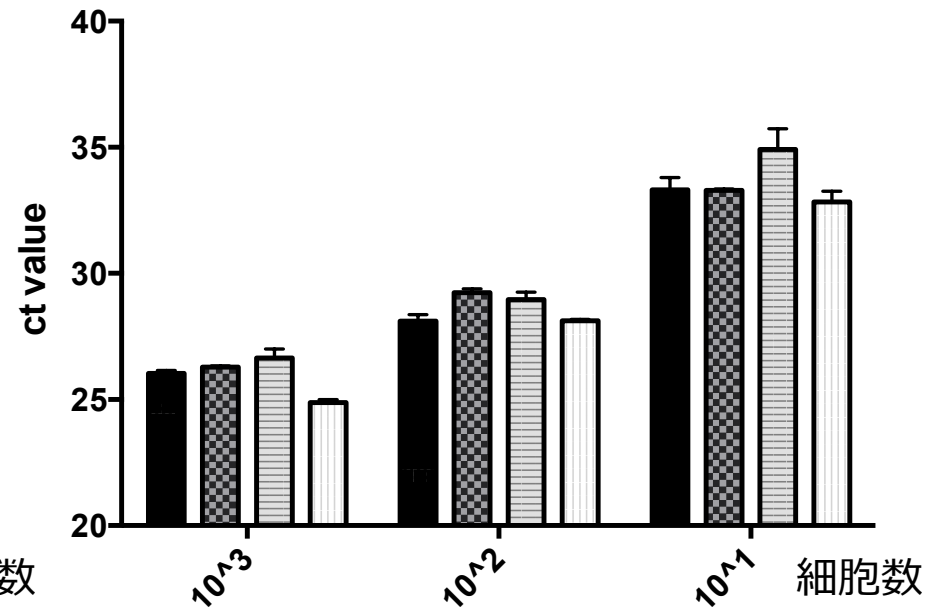
EGFR DNAのCt値

- 55%メタノール
- 55%メタノール・0.4%ホルマリン
- サイトリッチレッド (ホルマリン: +)
- サイトライト (ホルマリン: -)

細胞用抽出キット



FFPE用抽出キット

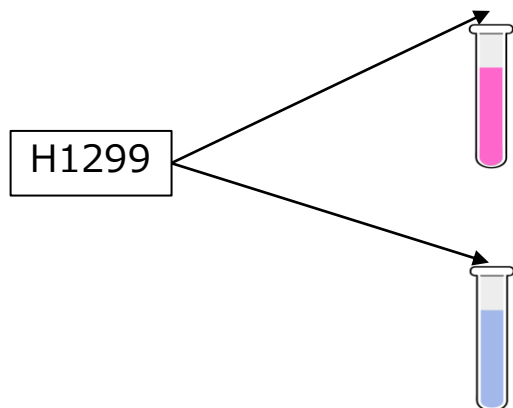


FFPE用抽出キットを用いることでPCR効率が改善された

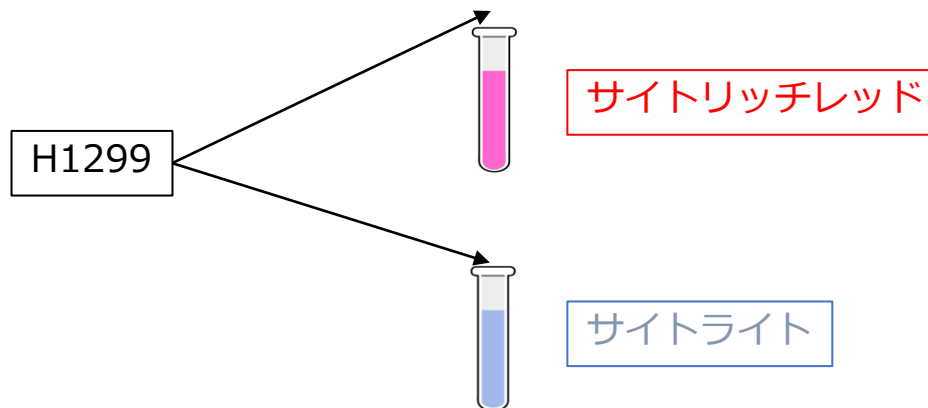


- H1299細胞培養株を以下**2種類**の固定液で**2日間**と**14日間**固定後、**細胞用**と**FFPE用**の2種類の抽出キットでDNAとRNAを抽出、Ct値を測定

2日間固定



14日間固定



DNA : *EGFR*

RNA : Actin mRNA / TTF-1 mRNA



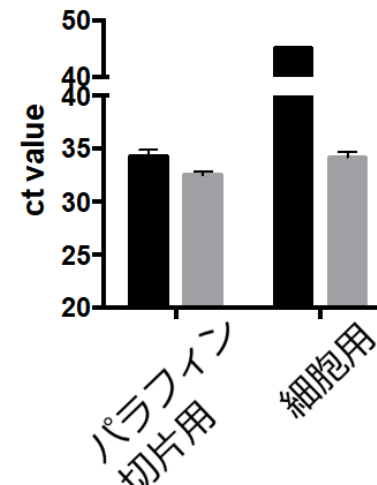
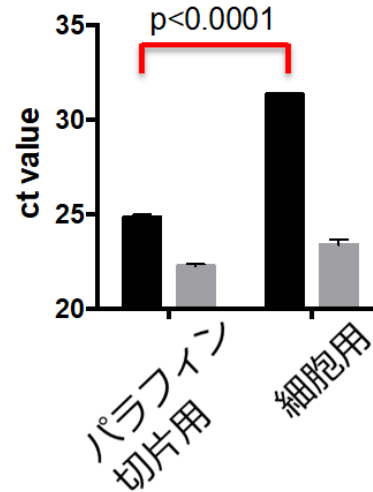
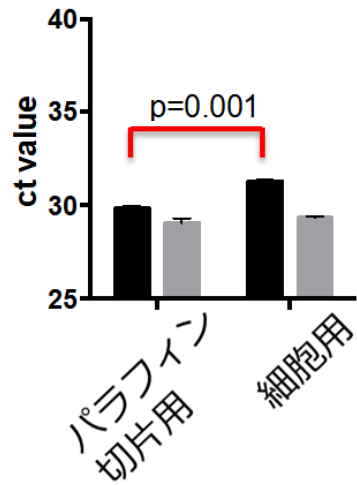
固定液と核酸抽出キットによるCt値

EGFR DNA

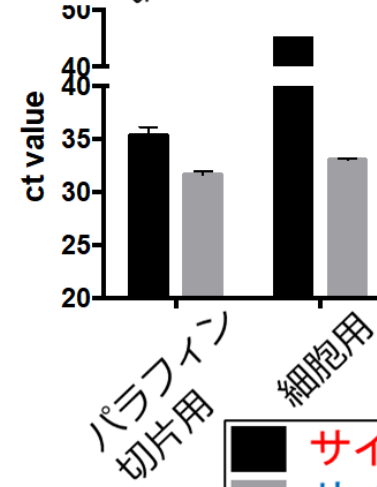
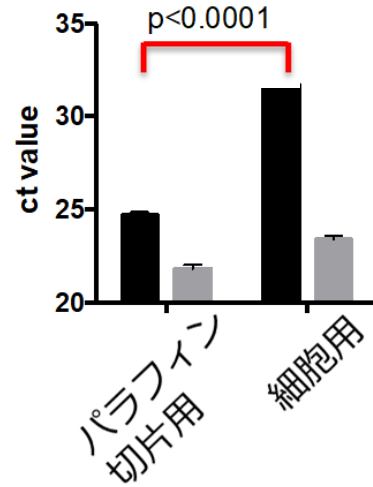
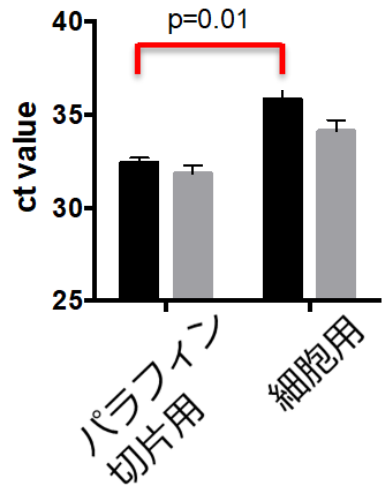
Actin mRNA

TTF-1 mRNA

2 days



14 days



■ サイトリッチレッド
■ サイトライト

RNAも、FFPE用抽出キットを用いることでPCR効率が改善された

◆ 喀痰LBC検体での遺伝子変異検出限界について (本番)

➤ 方法

陰性の喀痰LBC検体に、*EGFR*変異陽性肺癌培養細胞（HCC827、H1975）をそれぞれ100～個添加し、**擬似陽性喀痰**を作製。

サイトリッチレッドで固定後、以下を検討した。

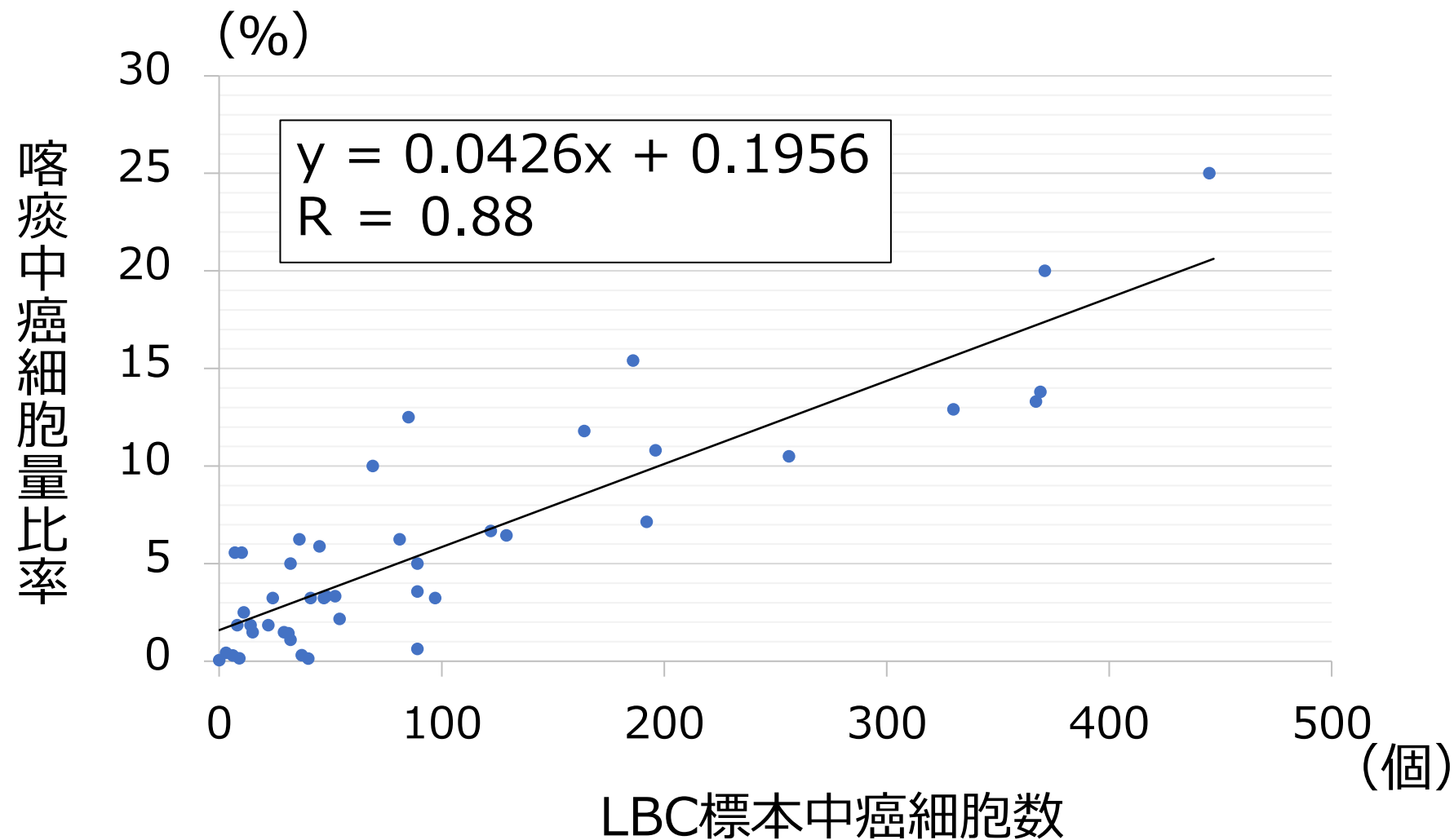
- ① **喀痰中の癌細胞量の比率**（添加癌細胞/喀痰中の細胞数：n=44）
- ② **喀痰LBC標本への出現癌細胞数**（n=44）
- ③ **EGFR変異検出**(HCC827：n=23、H1975：n=21)

➤ 測定法

- ・ 喀痰中細胞数　： 液状化喀痰検体1mL中の有核細胞数を目視測定
- ・ 標本中癌細胞量　： LBC標本全視野に出現する癌細胞数を目視測定
- ・ **EGFR変異検出**　： **FFPE用キットでDNA抽出**
RT-PCR(F-PHFA法) でEGFR変異検出

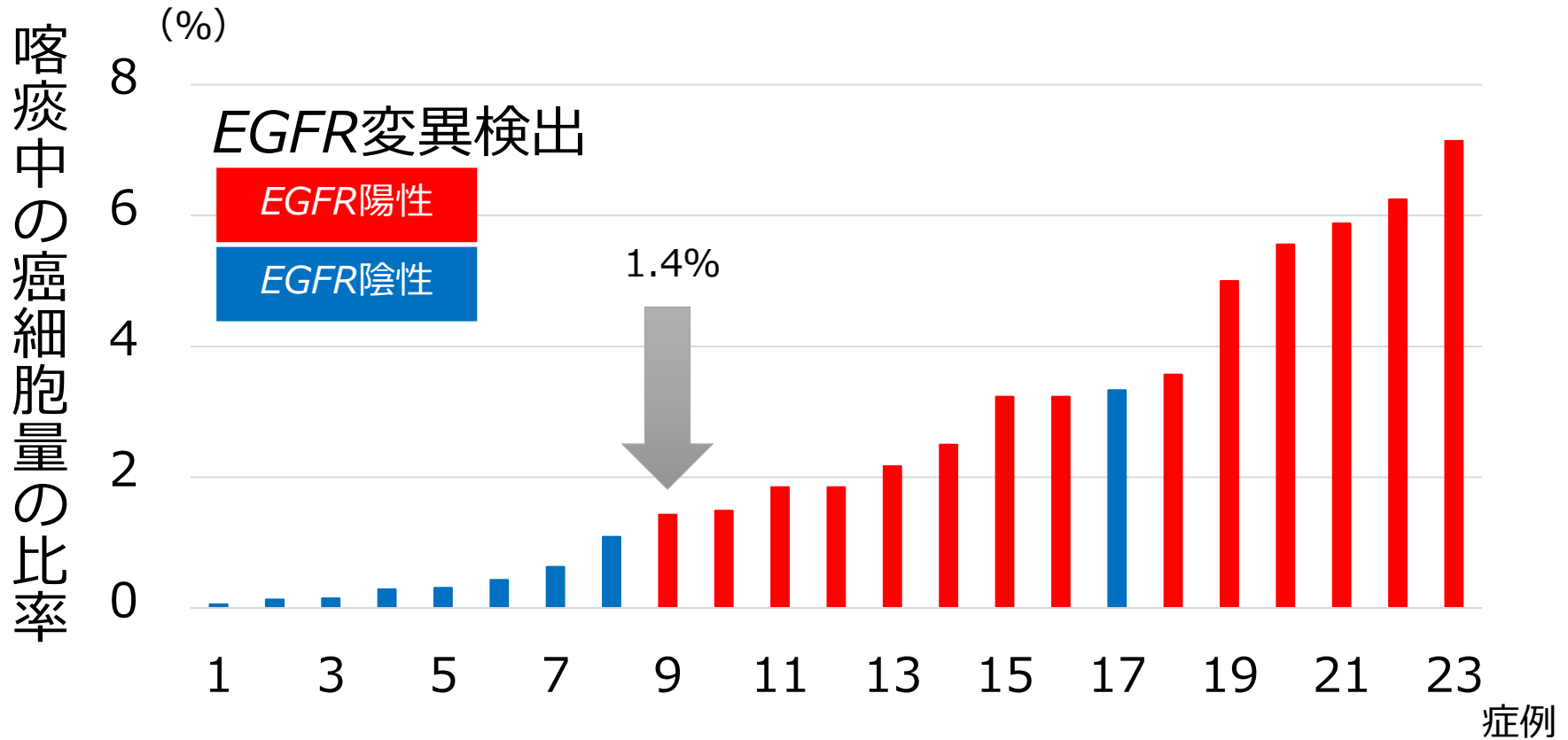


喀痰中癌細胞量比率とLBC標本中出现癌細胞数



LBC標本中出现する癌細胞数から喀痰中の癌細胞比率の推定は可能

HCC827における出現癌細胞の比率とEGFR検出

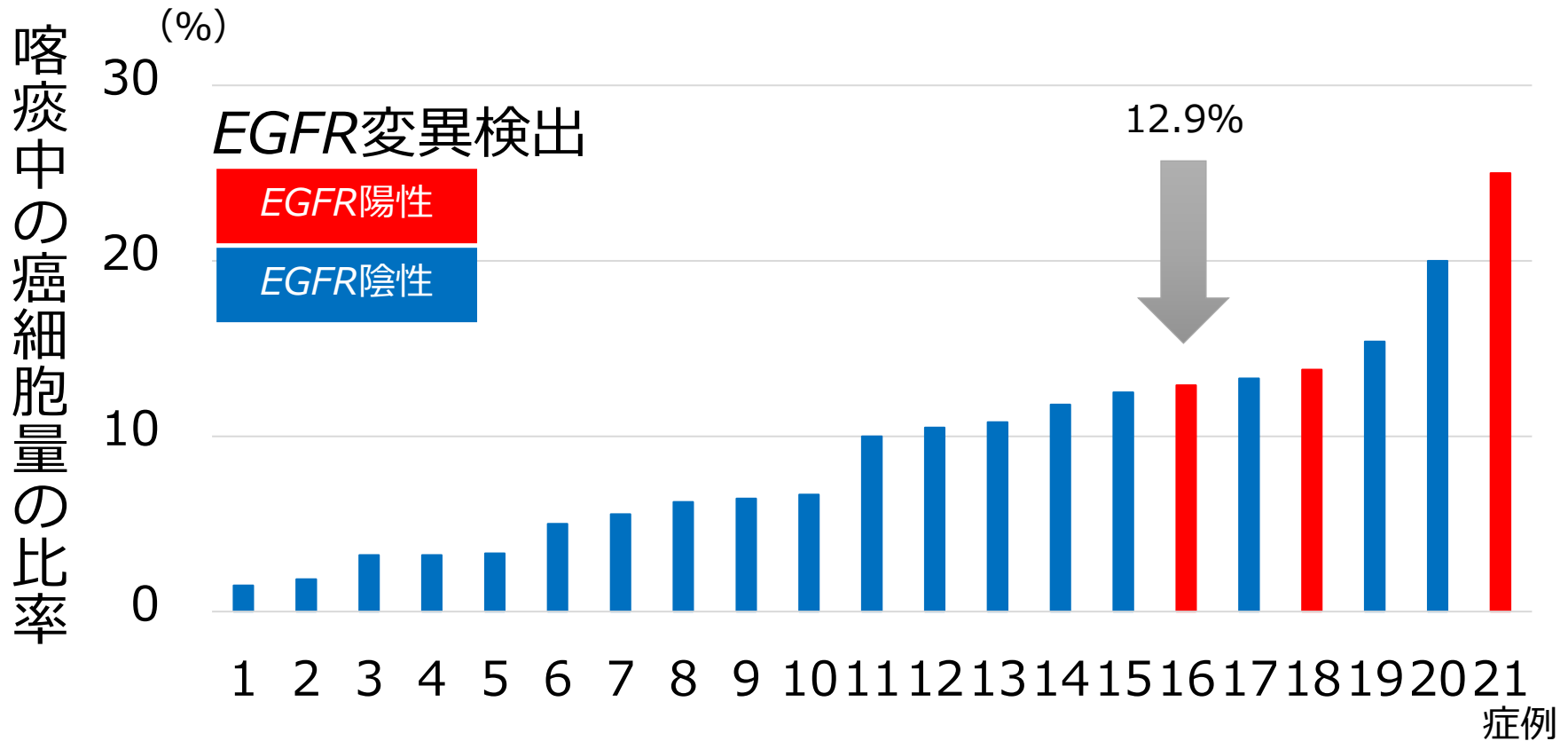


陽性14件 平均癌細胞の比率 3.65% (1.43 – 7.14)

陰性 9件 平均癌細胞の比率 0.71% (0.06 – 3.33)

LBC標本中に29個以上の癌細胞でEGFR exon 19 Deletionは検出可能

H1975における出現癌細胞の比率とEGFR検出



陽性 3件 平均癌細胞の比率 17.23% (12.9 – 25)

陰性18件 平均癌細胞の比率 8.18% (1.49 – 20)

パパニコロウ標本中に298個以上の癌細胞でEGFR exon 21 L858R/
exon 20 T790M



◆F-PHFA法とNGSとの比較

➤ 方法

擬似陽性喀痰検体を用いて、next-generation sequencing (NGS) による解析を試みた。

➤ 症例数：16症例

- ・ HCC827：11例 (F-PHFA法によりEGFR(+))10例・ (－) 1例)
- ・ H1975：5例 (F-PHFA法によりEGFR(+))3例・ (－) 2例)

➤ 核酸品質評価：Tapestation4200(Agilent)

- ・ 核酸濃度(ng/μl)
- ・ DNA Integrity Number(DIN)
- ・ フラグメント化の指標(1-10)

➤ 測定機器、パネル：Miniseq (Illumina)

Ampliseq Cancer Hot spot V2 (Illumina)



結果：HCC827肺癌培養細胞

NGS症例	喀痰細胞数	腫瘍細胞数 (HCC827)	Cytology (all field)	F-PHFA法	NGS
1	8,000	500	81	Ex19 del	p.E746_A750del (ELREA/-)
2	10,000	500	89	Ex19 del	(-)
3	15,500	500	97	Ex19 del	p.E746_A750del (ELREA/-)
4	33,500	500	15	Ex19 del	p.E746_A750del (ELREA/-)
5	9,000	500	10	Ex19 del	p.E746_A750del (ELREA/-)
6	27,000	500	14	Ex19 del	p.E746_A750del (ELREA/-)
7	15,500	500	24	Ex19 del	(-)
8	15,000	500	52	(-)	(-)
9	20,000	500	11	Ex19 del	p.E746_A750del (ELREA/-)
10	38,000	500	8	Ex19 del	p.E746_A750del (ELREA/-)
11	8,500	500	45	Ex19 del	p.E746_A750del (ELREA/-)



結果：H1975肺癌培養細胞

NGS症例	喀痰細胞数	腫瘍細胞数 (H1975)	Cytology (all field)	F-PHFA法	NGS
1	8,000	2,000	445	T790M(+), L858R(+)	T790M(+), L858R(+)
2	10,000	2,000	371	(-)	(-)
3	15,500	2,000	330	T790M(+), L858R(+)	(-)
4	15,000	2,000	367	(-)	(-)
5	14,500	2,000	369	T790M(+), L858R(+)	T790M(+), L858R(+)

F-PHFA法による*EGFR*変異検出と比較して、
NGSの方が検出感度が低かった。

F-PHFA法とNGSとの一致率

Exon19 deletion : 82%

T790M/L858R : 80%



ここまでのまとめ

- **核酸の抽出には、FFPE用抽出キットの使用が効率的であった。**
- **喀痰には炎症細胞や細菌も多く見られますが、EGFR変異遺伝子の検出は可能であった。**
- **細胞診残余検体の腫瘍含有比率の推測はLBC標本上から可能であった。**



膵EUS-FNAでの*K-ras*変異遺伝子検出



RESEARCH ARTICLE

K-ras mutation analysis of residual liquid-based cytology specimens from endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration improves cell block diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma

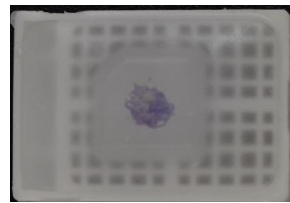
Yoko Sekita-Hatakeyama¹, Takeshi Nishikawa¹, Mao Takeuchi¹, Kouhei Morita¹, Maiko Takeda¹, Kinta Hatakeyama^{1*}, Tokiko Nakai¹, Tomoko Uchiyama¹, Hiroe Itami¹, Tomomi Fujii¹, Akira Mitoro², Masayuki Sho³, Chiho Ohbayashi¹

1 Department of Diagnostic Pathology, Nara Medical University, Kashihara, Nara, Japan, **2** Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University, Kashihara, Nara, Japan, **3** Department of Surgery, Nara Medical University, Kashihara, Nara, Japan

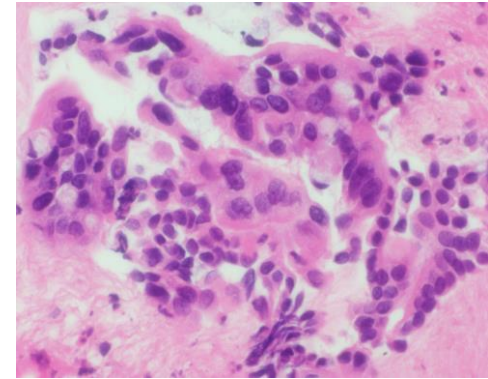
* kpathol@naramed-u.ac.jp



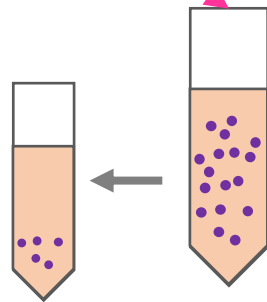
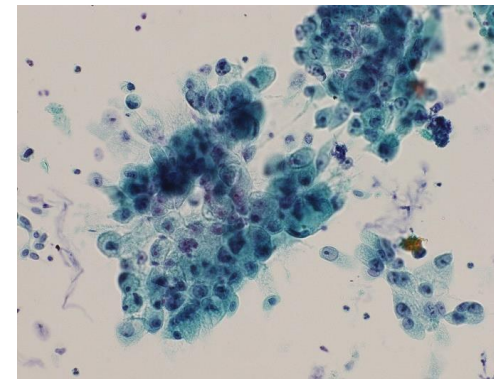
サイトリッチレッドに投入



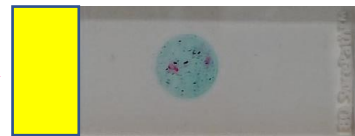
組織診標本



細胞診標本



LBC残細胞



KRAS変異遺伝子検出可能？



◆LBC残余の遺伝子変異検査への適合性の検討

- 細胞固定液：サイトリッチレッド（BD社）
- 核酸抽出Kit：QiAamp® DNA FFPE Tissue Kit (パラフィン切片用)
- 症例：EUS-FNAを受けた81症例の細胞診残検体
- 残余LBCのDNAを用いて*K-ras*遺伝子変異検査：RT-PCR（F-PHFA法）
 - exon2：G12D、G12V、G12C、G12R、G12S、G12A、G13D
 - exon3：Q61H



EUS-FNAサンプルの*K-ras*変異

診断名	N数		変異の種類と内訳			
	症例	陽性 (%)	G12D	G12V	G12R	Q61H
膵管癌	62	48 (77%)	23 (48%)	18 (38%)	3 (6%)	4 (8%)
神経内分泌腫瘍	2	0	0	0	0	0
充実性偽乳頭状腫瘍	2	0	0	0	0	0
膵管内乳頭粘液性腫瘍	2	1	1	1	0	0
良性	13	1	0	0	1	0
合計	81	50	24	19	4	4



まとめ

- **核酸の抽出には、FFPE用抽出キットの使用が効率的であった。**
- 細胞診検体からのPCR法を用いた単一遺伝子変異検査および次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異検査は可能であった。
- **細胞診残余検体からも遺伝子変異の検出が可能であったことは、検体を余すことなく、有効に利用できることに繋がる。**

