

第46回日本臨床細胞学会近畿連合会学術集会  
教育講演  
2021年10月3日@奈良県橿原文化会館

# 遺伝子パネル検査の 細胞診検体への適応にむけて

大阪大学大学院医学系研究科 病態病理学・病理診断科  
森井 英一

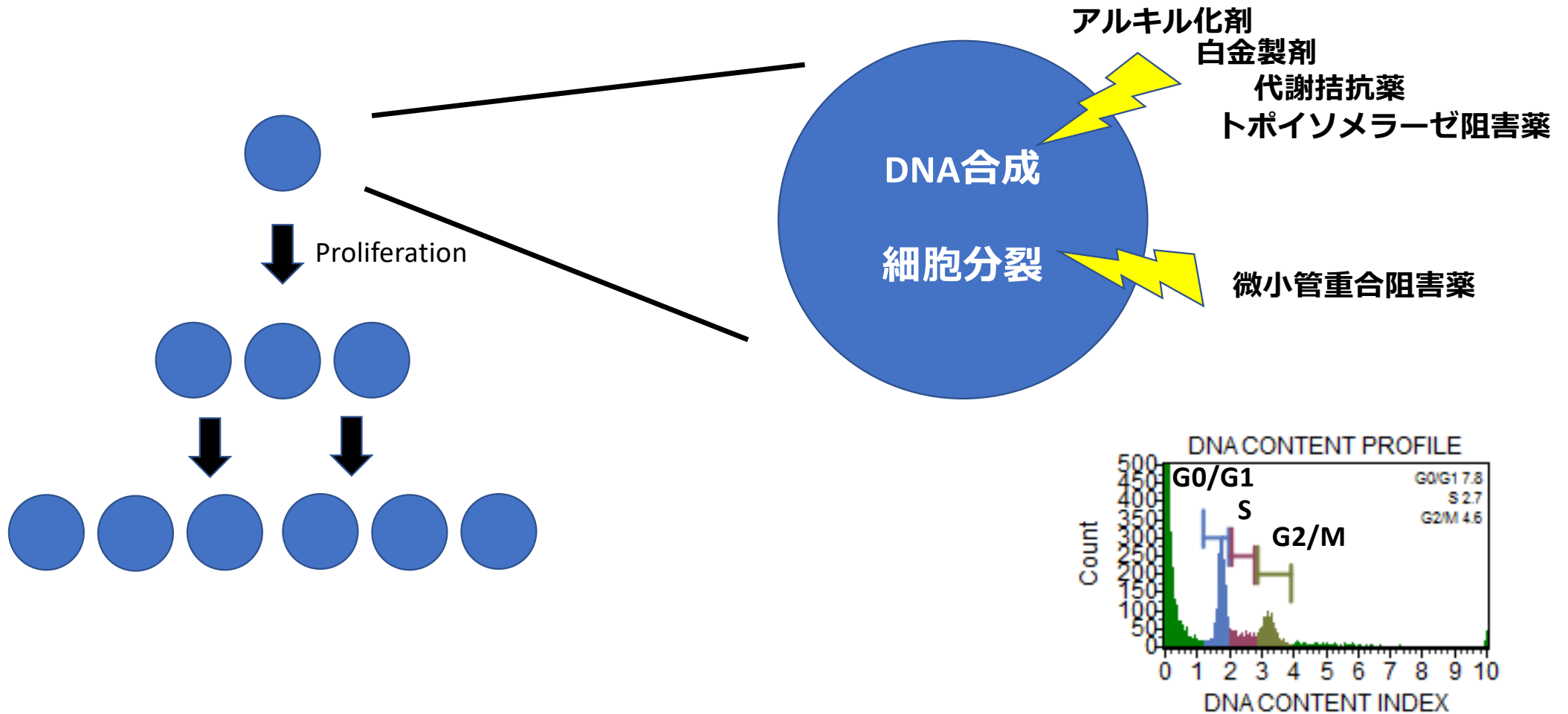
# 第46回日本臨床細胞学会近畿連合会

## COI開示

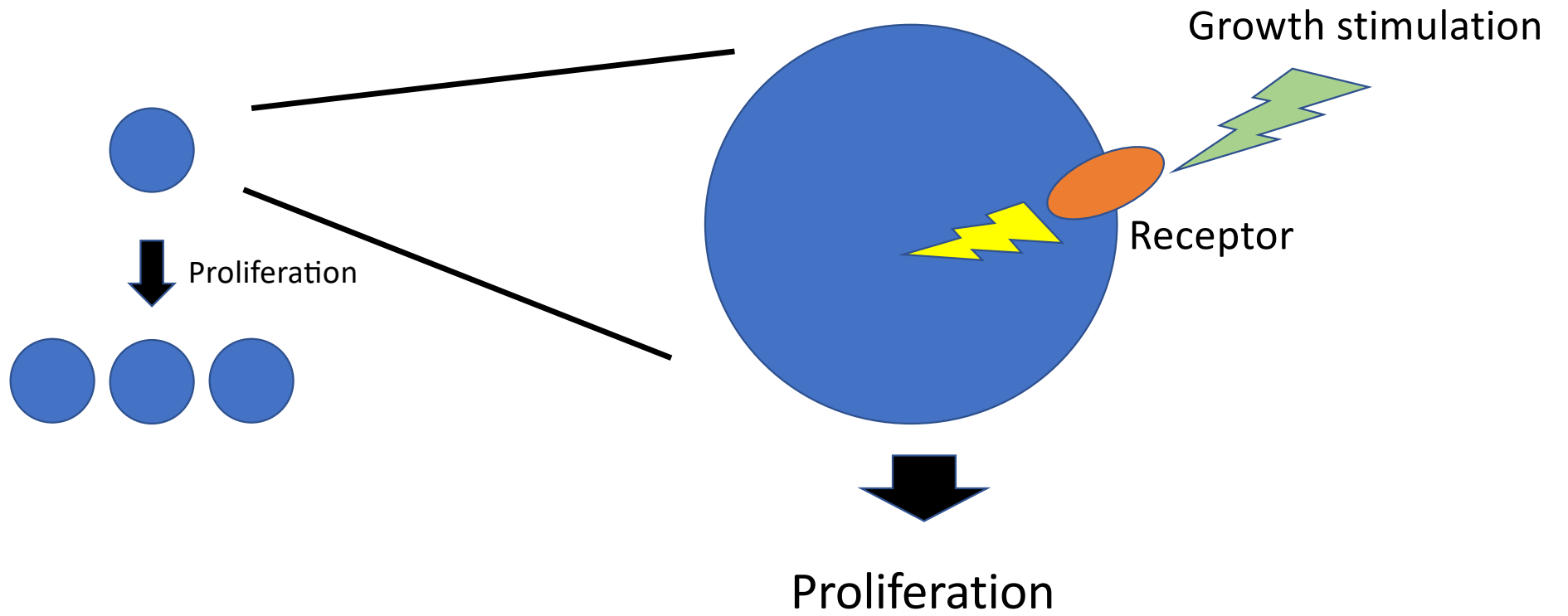
森井 英一

今回の演題に関し、特に開示すべきCOIはありません

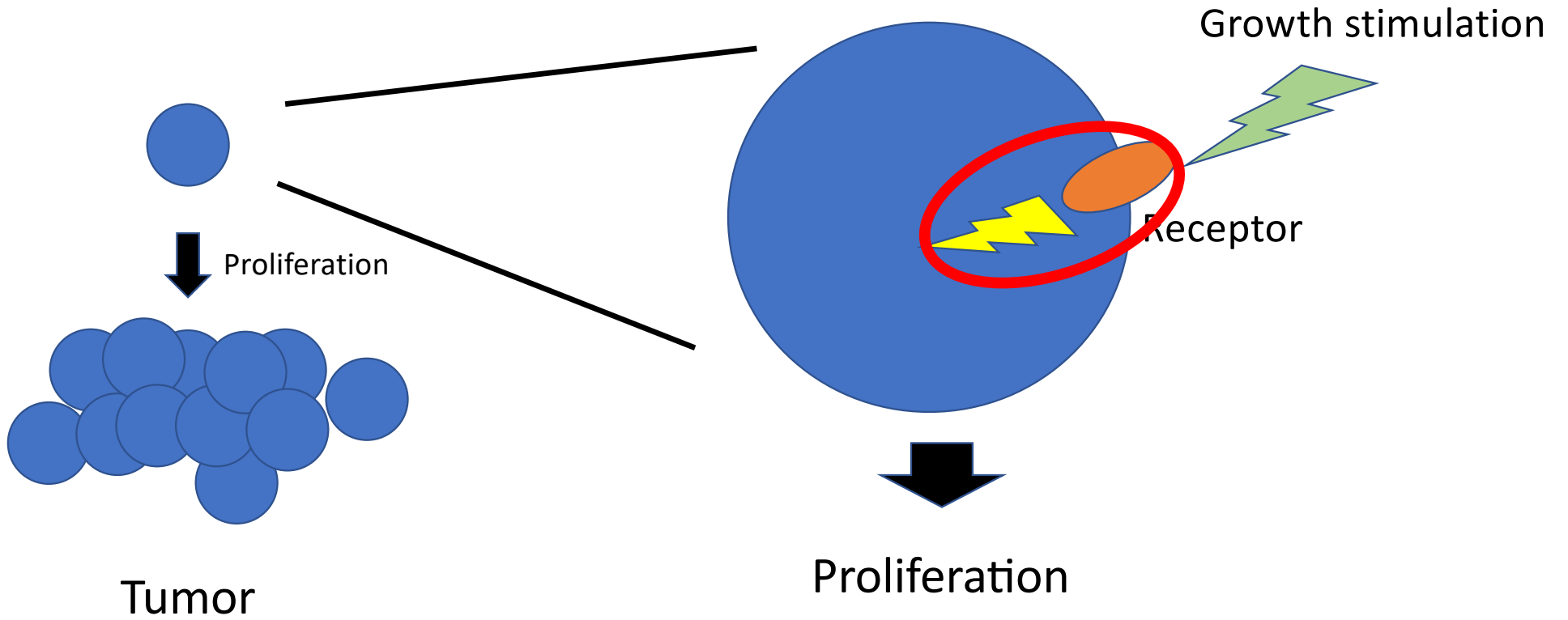
# 腫瘍細胞を破壊するために



# 細胞増殖

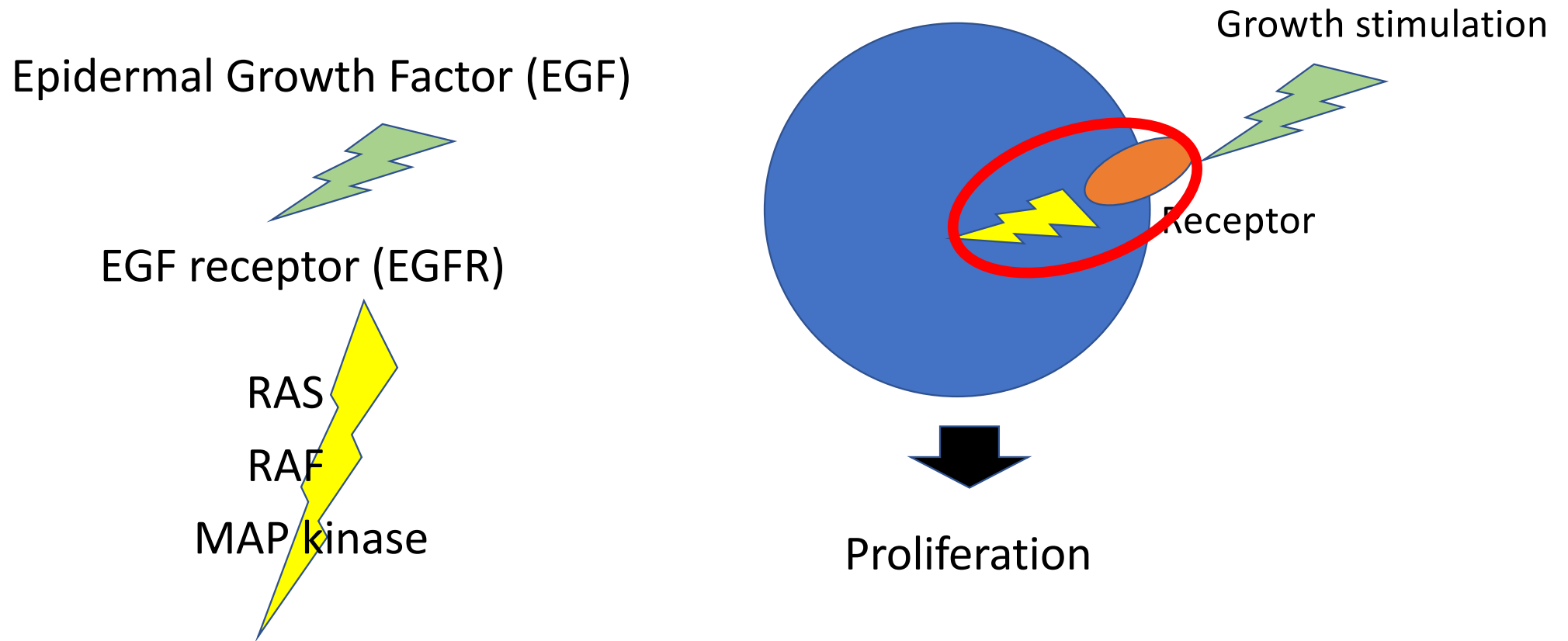


# 腫瘍とは



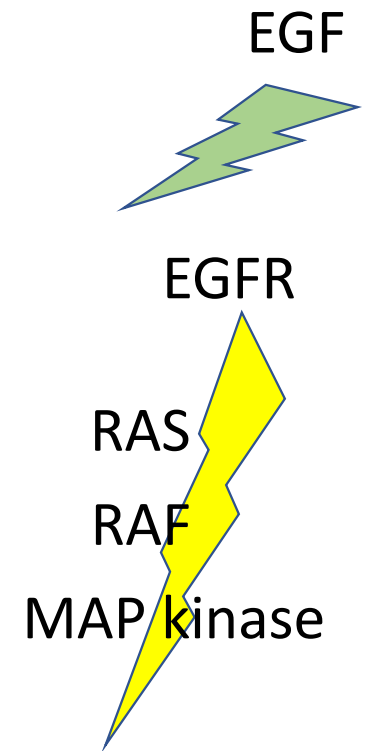
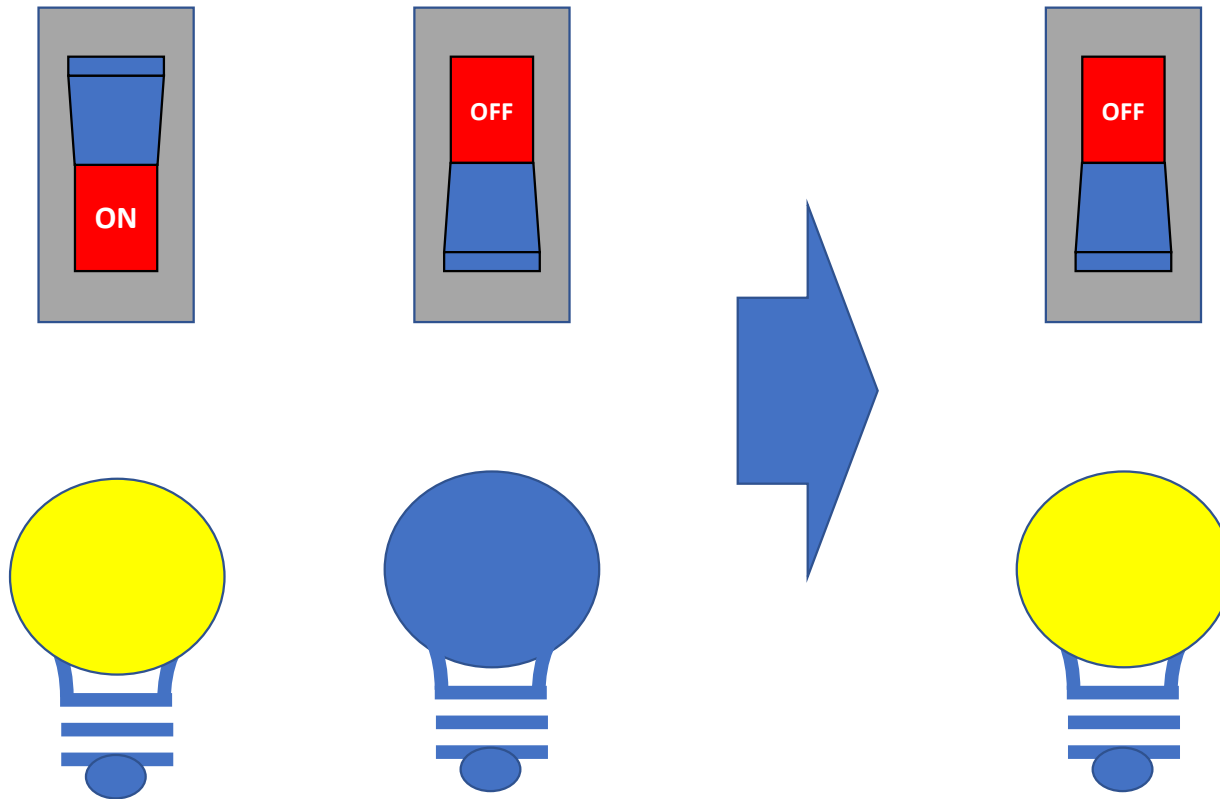
Growth regulation is disrupted.

# 腫瘍とは



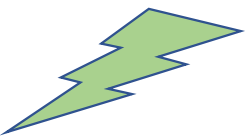
EGFがなくてもEGFRがONになってしまう遺伝子変異 ⇒ 腫瘍へ

# 腫瘍とは




# 腫瘍とは

Epidermal Growth Factor (EGF)

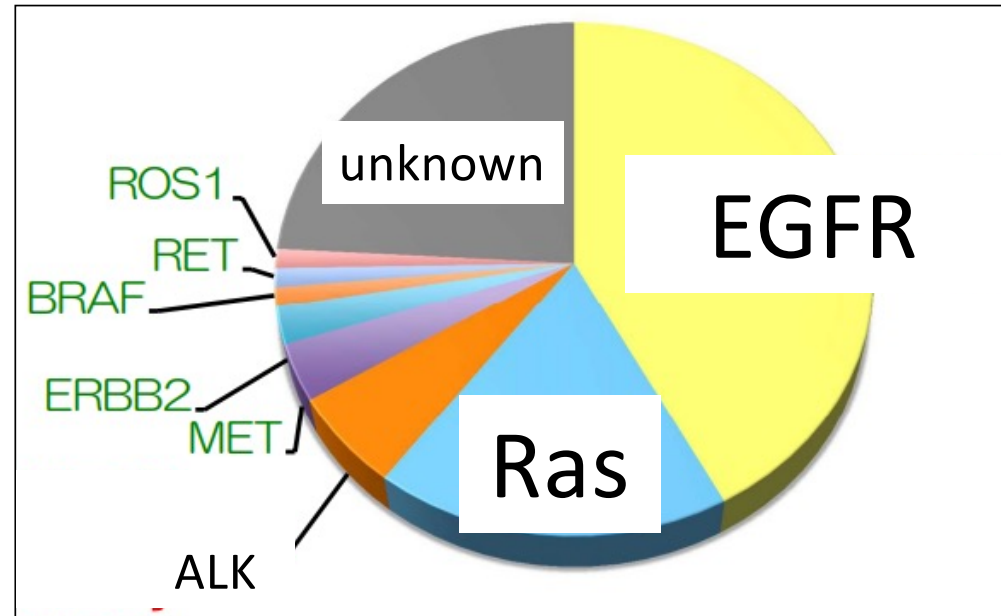


EGF receptor (EGFR)



RAS  
RAF  
MAP kinase

Gene mutation responsible for lung cancer





# 分子標的療法

No EGF  
EGF receptor (EGFR)


Signal OFF

EGF  
EGF receptor (EGFR)

Signal ON

No EGF  
Mutated EGFR

Erlotinib etc



# 分子標的療法の有用性

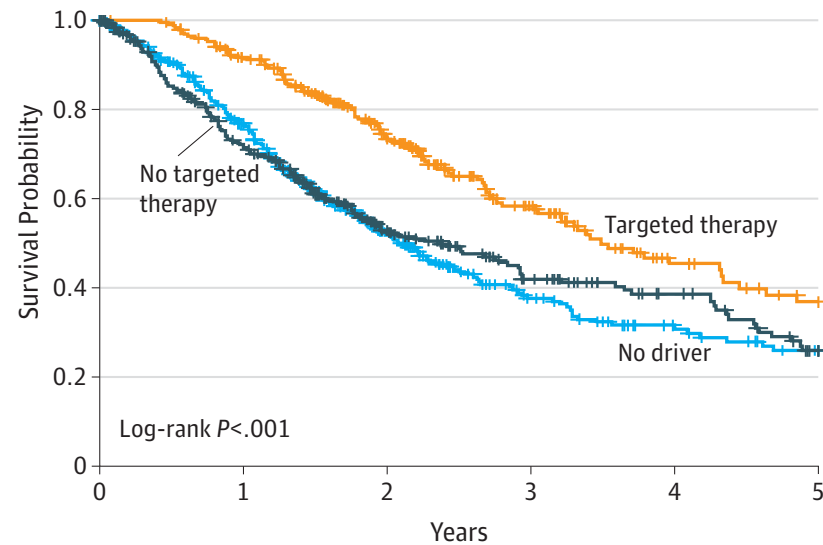
## Original Investigation

### Using Multiplexed Assays of Oncogenic Drivers in Lung Cancers to Select Targeted Drugs

Mark G. Kris, MD; Bruce E. Johnson, MD; Lynne D. Berry, PhD; David J. Kwiatkowski, MD; A. John Iafrate, MD; Ignacio I. Wistuba, MD; Marileila Varela-Garcia, PhD; Wilbur A. Franklin, MD; Samuel L. Aronson, ALM, MA; Pei-Fang Su, PhD; Yu Shyr, PhD; D. Ross Camidge, MD, PhD; Lecia V. Sequist, MD; Bonnie S. Glisson, MD; Fadlo R. Khuri, MD; Edward B. Garon, MD; William Pao, MD, PhD; Charles Rudin, MD, PhD; Joan Schiller, MD; Eric B. Haura, MD; Mark Socinski, MD; Keisuke Shirai, MD; Heidi Chen, PhD; Giuseppe Giaccone, MD; Marc Ladanyi, MD; Kelly Kugler, BA; John D. Minna, MD; Paul A. Bunn, MD

JAMA. 2014;311(19):1998-2006. doi:10.1001/jama.2014.3741

**A** Patients with an oncogenic driver mutation who did and did not receive targeted therapy, and patients without an oncogenic driver



# 分子標的療法の問題点

Cost of drugs for molecular target therapy is high.



Necessity of patient selection

Molecular target therapy-responsible cases = Target mutation-positive cases

**腫瘍に適した分子標的療法を選択しないといけない。  
腫瘍における遺伝子異常を知ることが必要。**

# 遺伝子検査に用いられる検体の種別

第60回 日本臨床細胞学会春期大会  
シンポジウム9（指定）：ゲノム（molecular cytology）医療現場最前線

## 今後のゲノム診療における細胞診のあり方： 学会における取り組み

### 日本臨床細胞学会 ゲノム診療時代における細胞診のあり方検討ワーキンググループ

畑中 豊<sup>1</sup>, 元井 紀子<sup>2</sup>, 濱川 真治<sup>3</sup>, 河原 明彦<sup>4</sup>, 長友 忠相<sup>5</sup>, 桑田 健<sup>6</sup>,  
小田 義直<sup>7</sup>, 岡本 愛光<sup>8</sup>, 前田 一郎<sup>9</sup>, 佐藤 之俊<sup>10</sup>, 森井 英一<sup>11\*</sup>

<sup>1</sup>北海道大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門

<sup>7</sup>九州大学大学院医学研究院 形態機能病理学

<sup>2</sup>国立がん研究センター中央病院 病理・臨床検査科

<sup>8</sup>東京慈恵会医科大学 産婦人科

<sup>3</sup>公立昭和病院 臨床検査科

<sup>9</sup>聖マリアンナ医科大学 病理学

<sup>4</sup>久留米大学病院 病理診断科・病理部

<sup>10</sup>北里大学医学部 呼吸器外科学

<sup>5</sup>大阪大学医学部附属病院 病理部

<sup>11</sup>大阪大学大学院医学系研究科 病態病理学・病理部

<sup>6</sup>国立がん研究センター東病院 病理・臨床検査科

\*ワーキンググループ委員長

2019年 6月 9日 京王プラザホテル

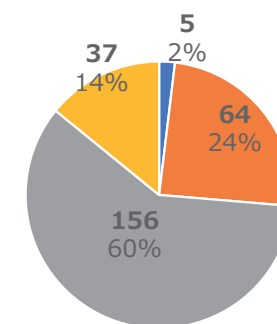
## 今後のゲノム医療を念頭においた 細胞検体の使用状況に関する調査

調査期間：2019年4月4日～4月26日

調査対象：認定施設全854施設中  
760施設へメール配信  
262施設から回答

調査内容：以下について質問

- (1) ご施設に関する質問
- (2) 液状細胞診（LBC）に関する質問
- (3) セルブロックに関する質問
- (4) コンパニオン診断に関する質問



■ がんゲノム医療中核拠点病院  
■ がんゲノム医療連携病院  
■ その他  
■ 不明

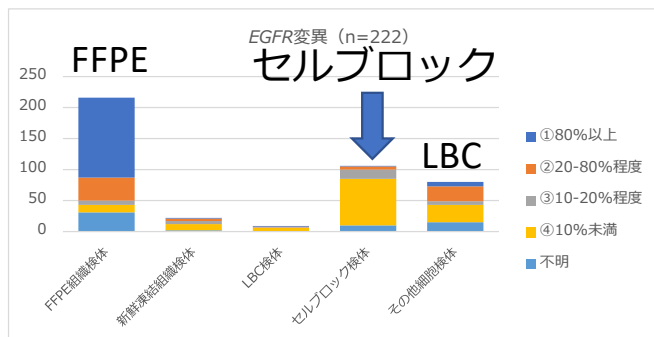
ご協力ありがとうございました



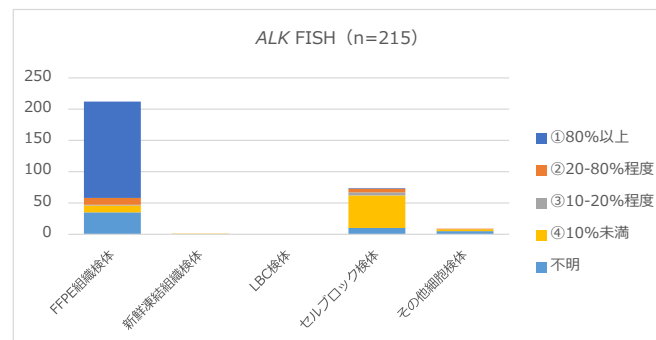
Motoi N, Hatanaka Y, Hamakawa S, Kawahara A, Nagatomo T, Kuwata T, Oda Y, Okamoto A, Maeda I, Sato Y, Morii E. Clinical Genomic Test on Cytology: Current Status and Future Perspective in Japan (JSCC Working Group on Cytological Roles in Genome Medicine Era). 20th International Congress of Cytology; 2019/5/5; International Convention Centre Sydney (Sydney, Australia) 2019.

元井 紀子. 細胞診検体を用いたがんゲノム検査：日本での現状と推進への課題（要望講演15）. 第58回日本臨床細胞学会秋期大会; 2019/11/17; 岡山コンベンションセンター（岡山）2019. p. 407

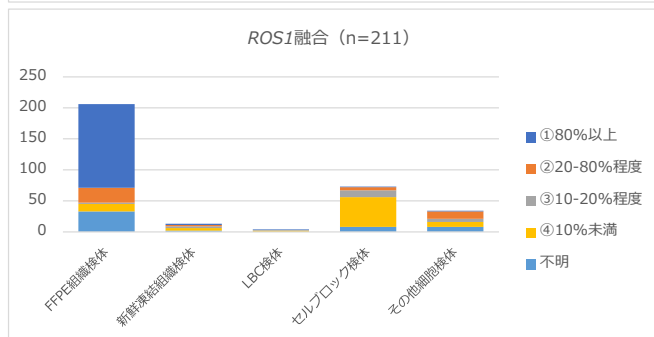
# 遺伝子検査に用いられる検体の種別



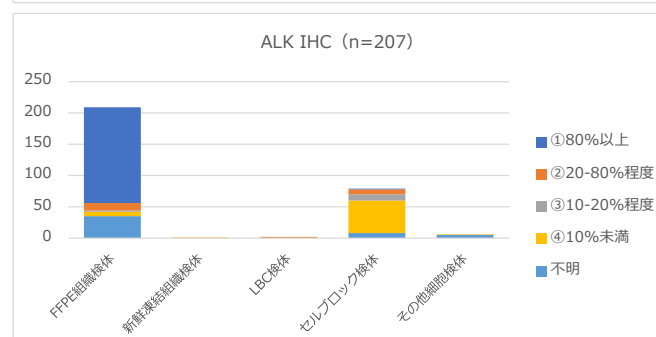
EGFR変異



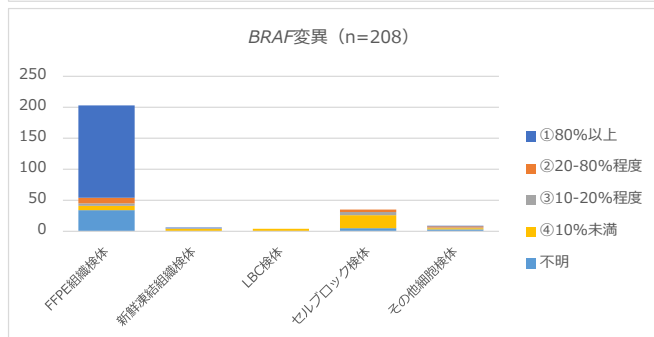
ALK FISH



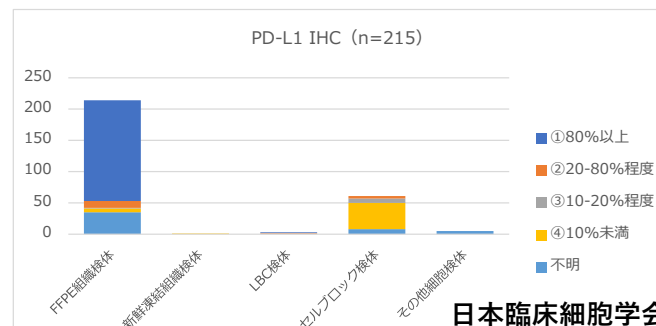
ROS1融合



ALK IHC

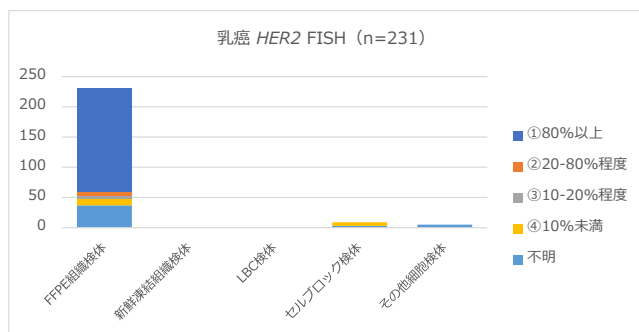


BRAF変異

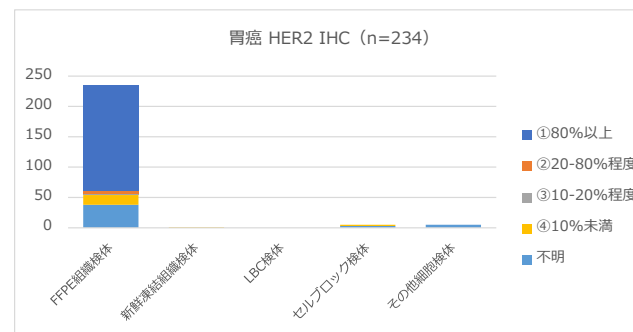


PD-L1 IHC

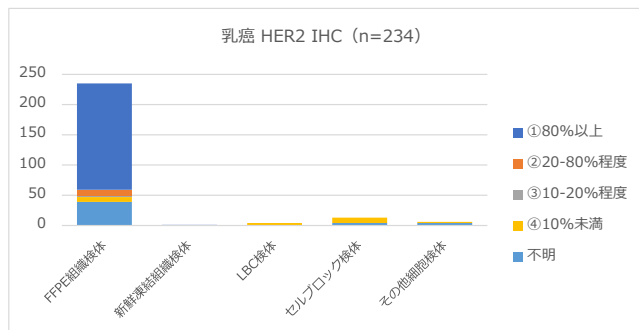
# 遺伝子検査に用いられる検体の種別



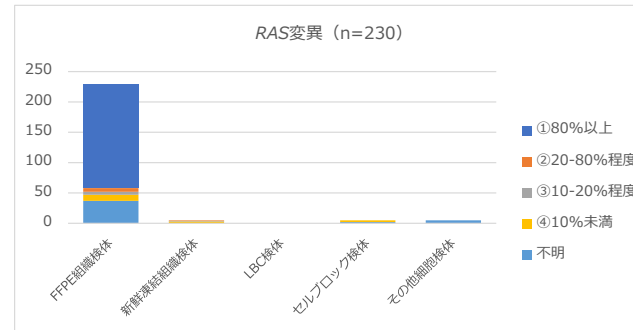
HER2 FISH



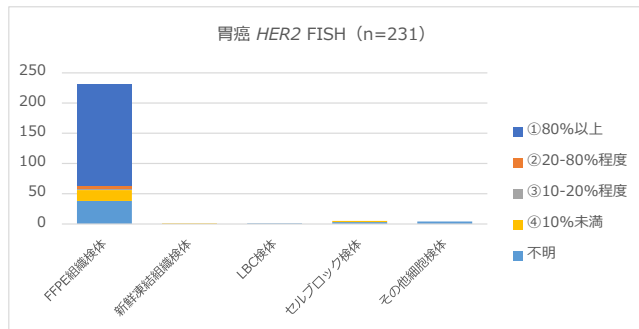
HER2 IHC



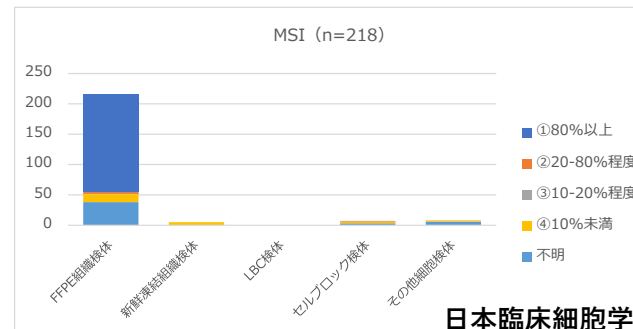
HER2 IHC



RAS 変異



HER2 FISH



MSI

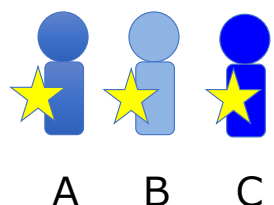
# 遺伝子検査に用いられる検体の種別

- ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織検体が主流

**FFPEを最もよく使い、その管理を行なっている病理部門のがんゲノム医療における役割が増している**

# がんゲノム医療における病理の役割の変化

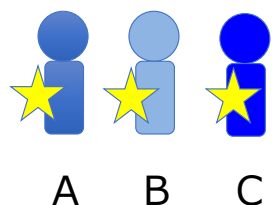
Before molecular target therapy era



→ 同じ薬剤 → 改善／副作用／重症化

★ はどのようなタイプの腫瘍であるか

After molecular target therapy era



→ A, B, Cにおける  
腫瘍の特性解析

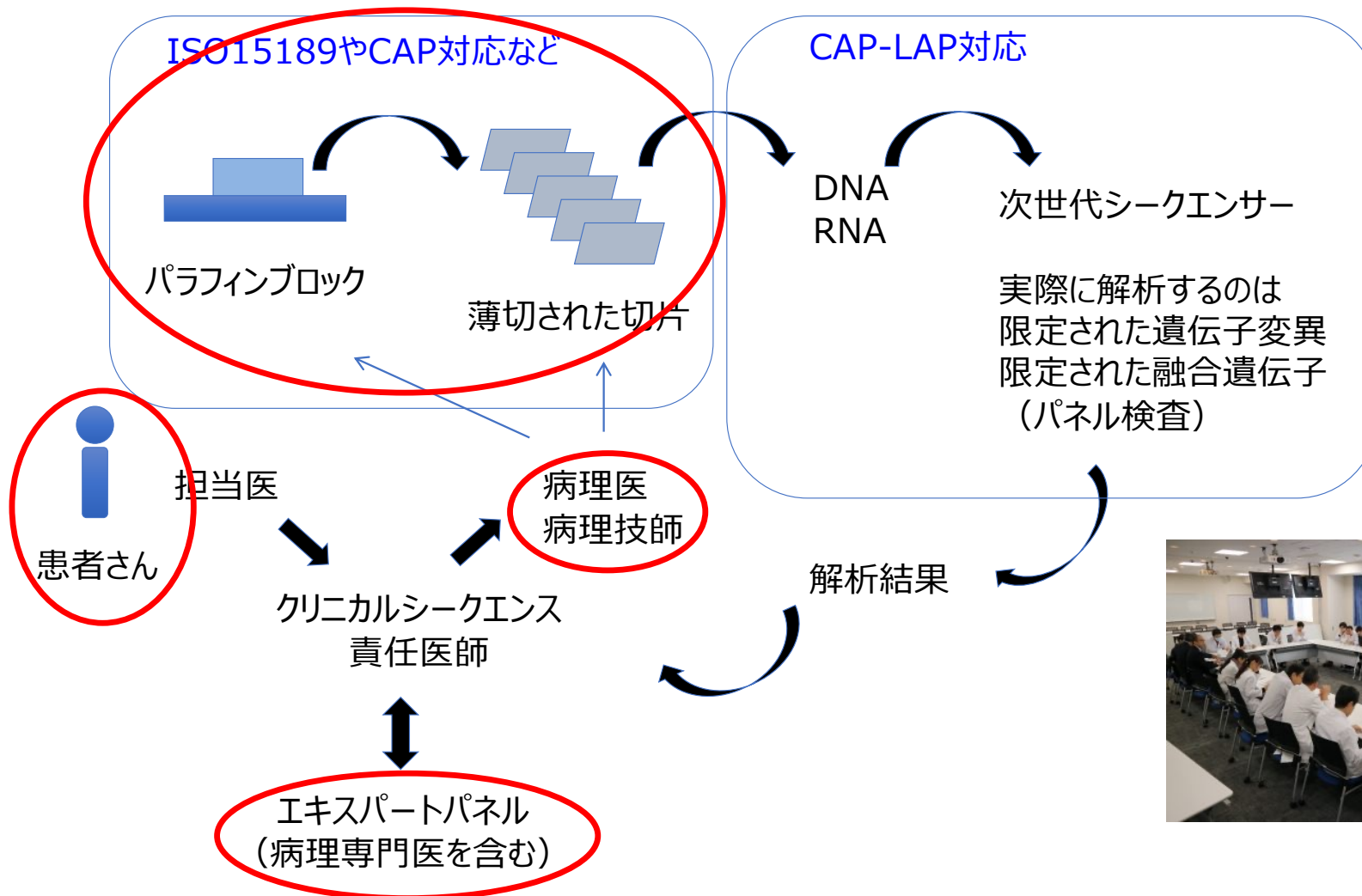
→ 各々に最適な治療法や  
薬剤の選択  
(効果を最大に、副作用  
を最小に)

腫瘍はどのような変異をもつのか。  
解析対象の標本に腫瘍はあるのか。  
あるなら、どの程度の腫瘍細胞比率か。

+ DNAなどの  
質の保証



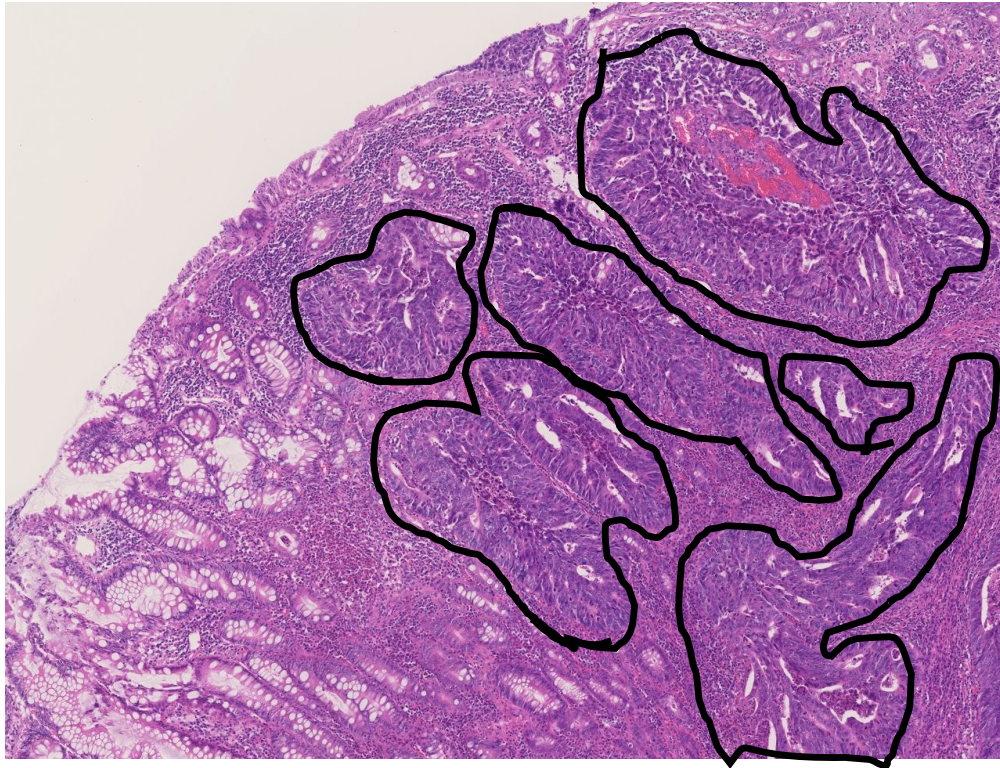
# がんゲノム医療における病理の役割



# がんゲノム医療における病理の役割

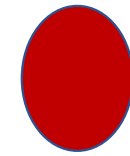
- FFPE検体全般の品質管理(ゲノム診療対応)
- 対象症例の病理組織検体の確認
  - ①病理組織診断
  - ②腫瘍率判定
  - ③残余検体の量の把握
- パネル検査の結果をふまえてgenotypeを病理診断に還元

# 腫瘍細胞比率



大腸癌 HE染色

腫瘍の面積比では約50%



腫瘍細胞



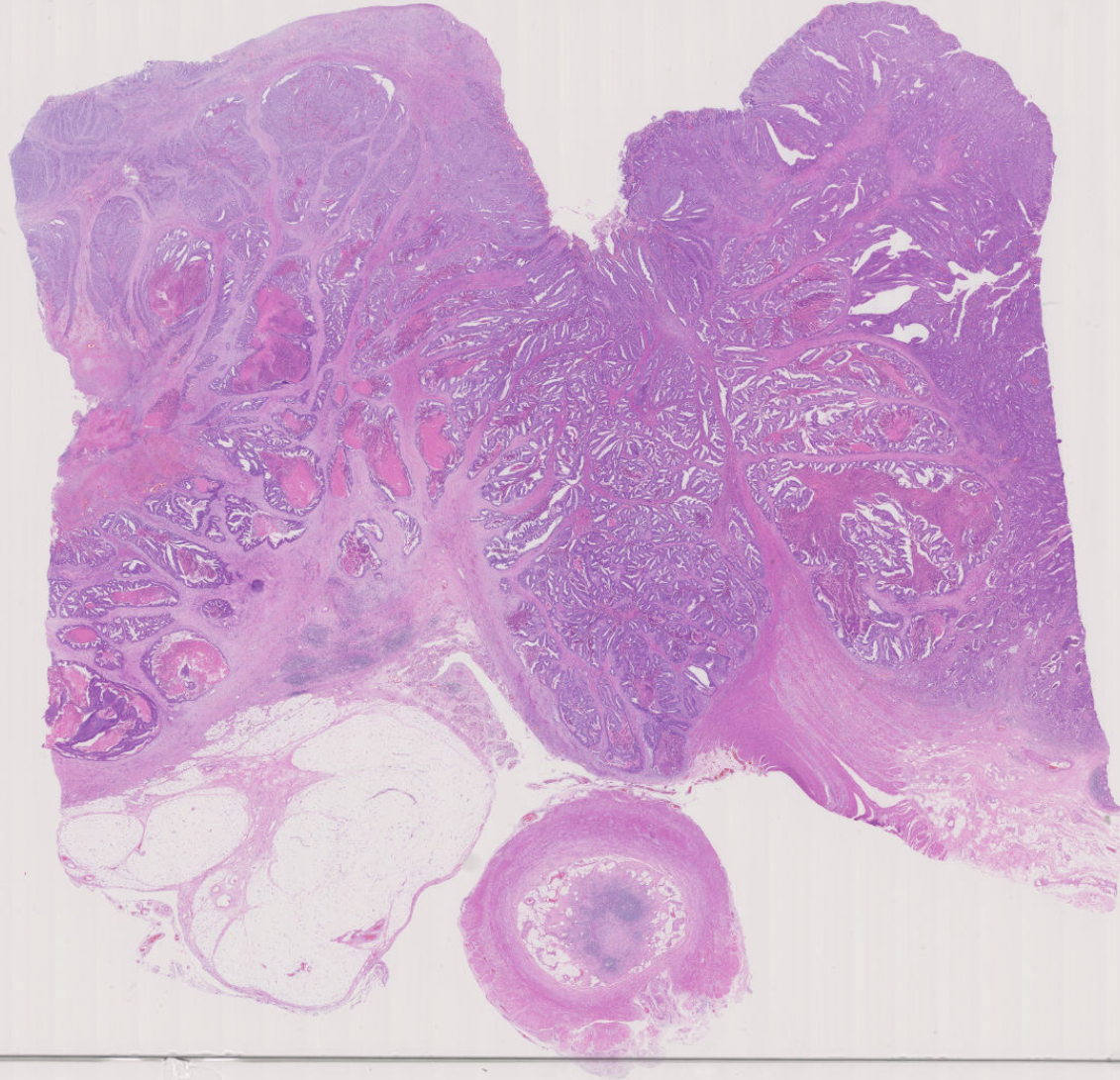
リンパ球

腫瘍細胞数の比率では約20%

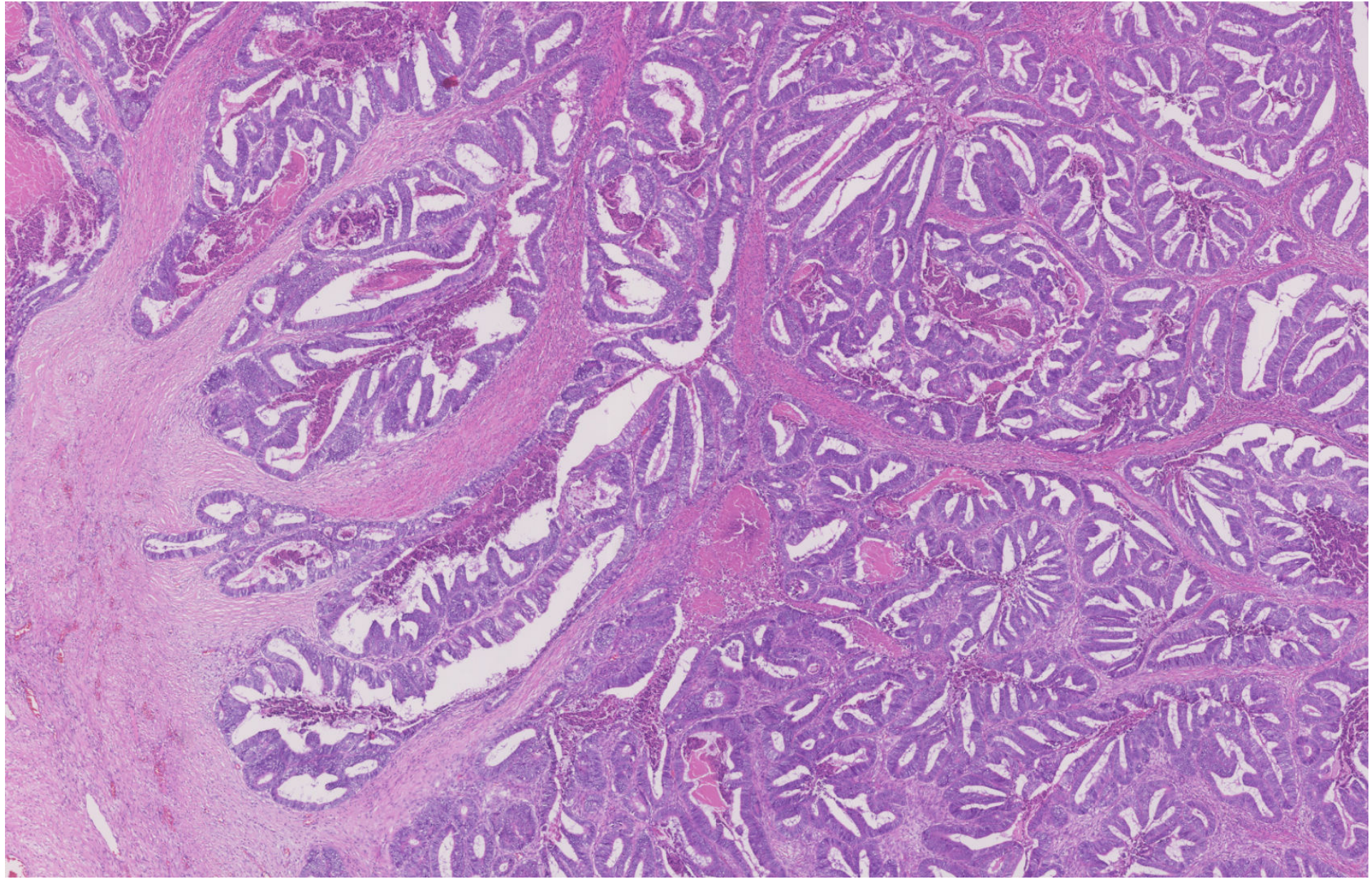
66 F  
二重癌症例  
(盲腸癌・S状結腸癌)

前田大地先生より借りました

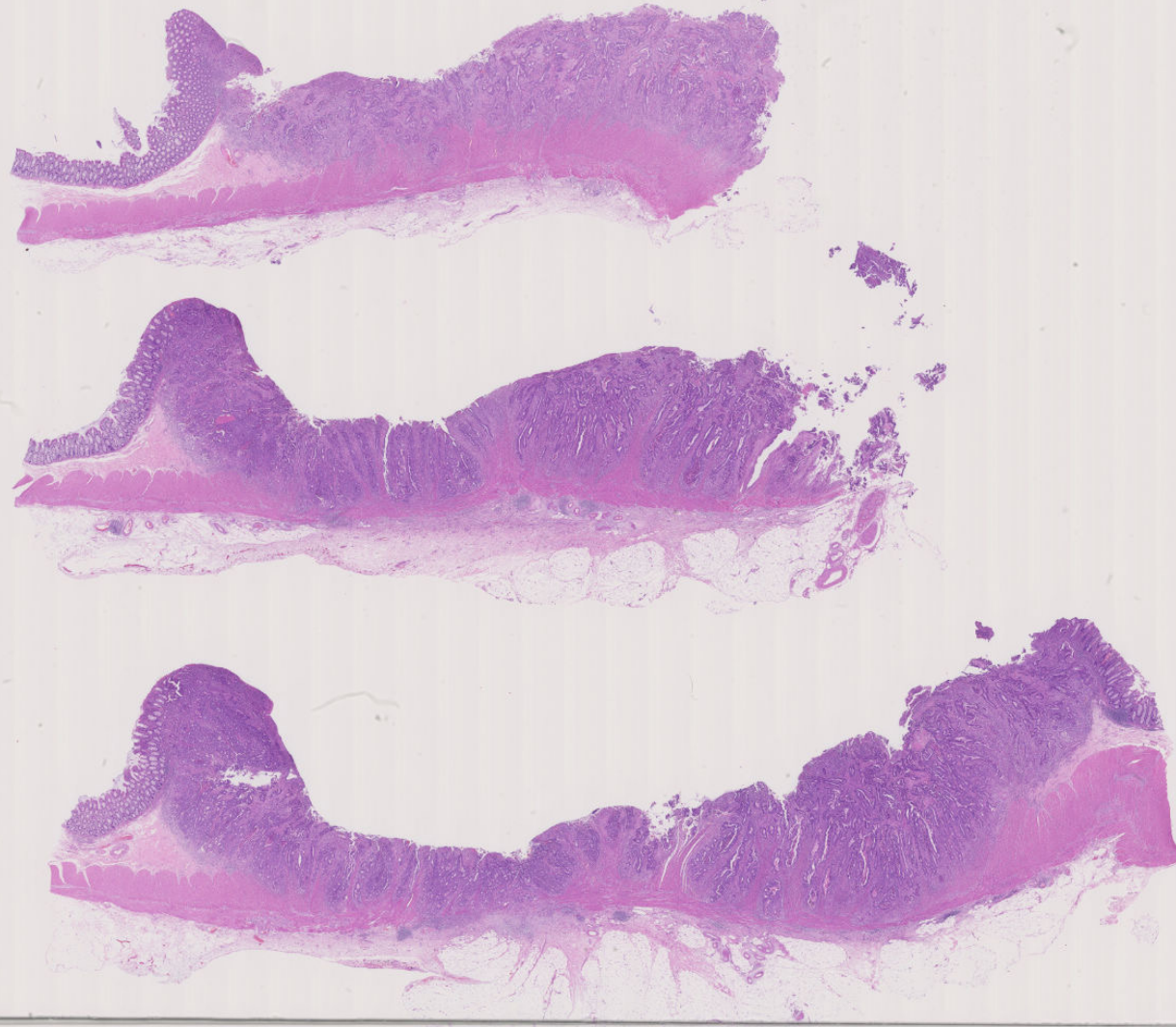
# 手術検体(盲腸癌)



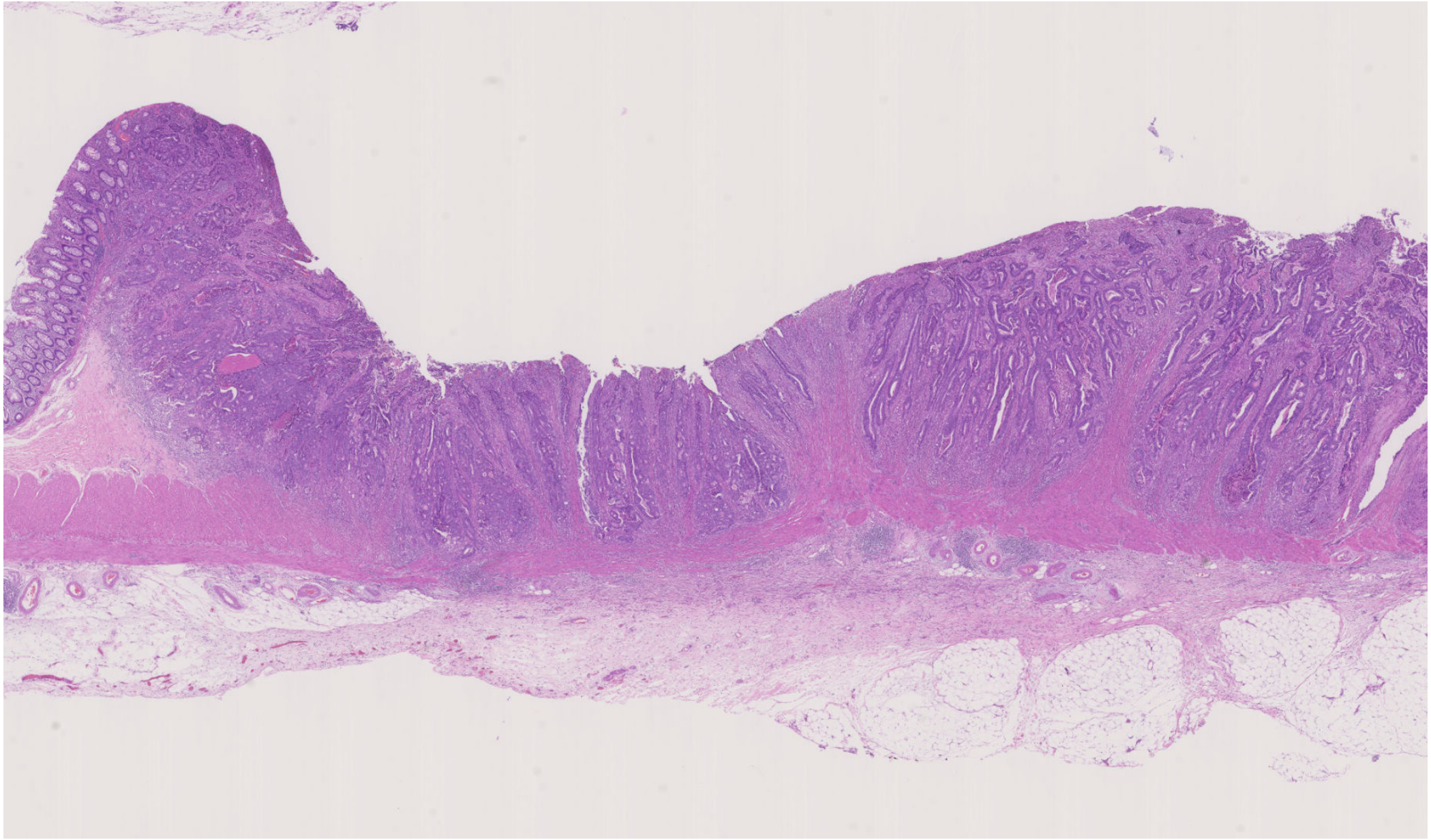
5 mm



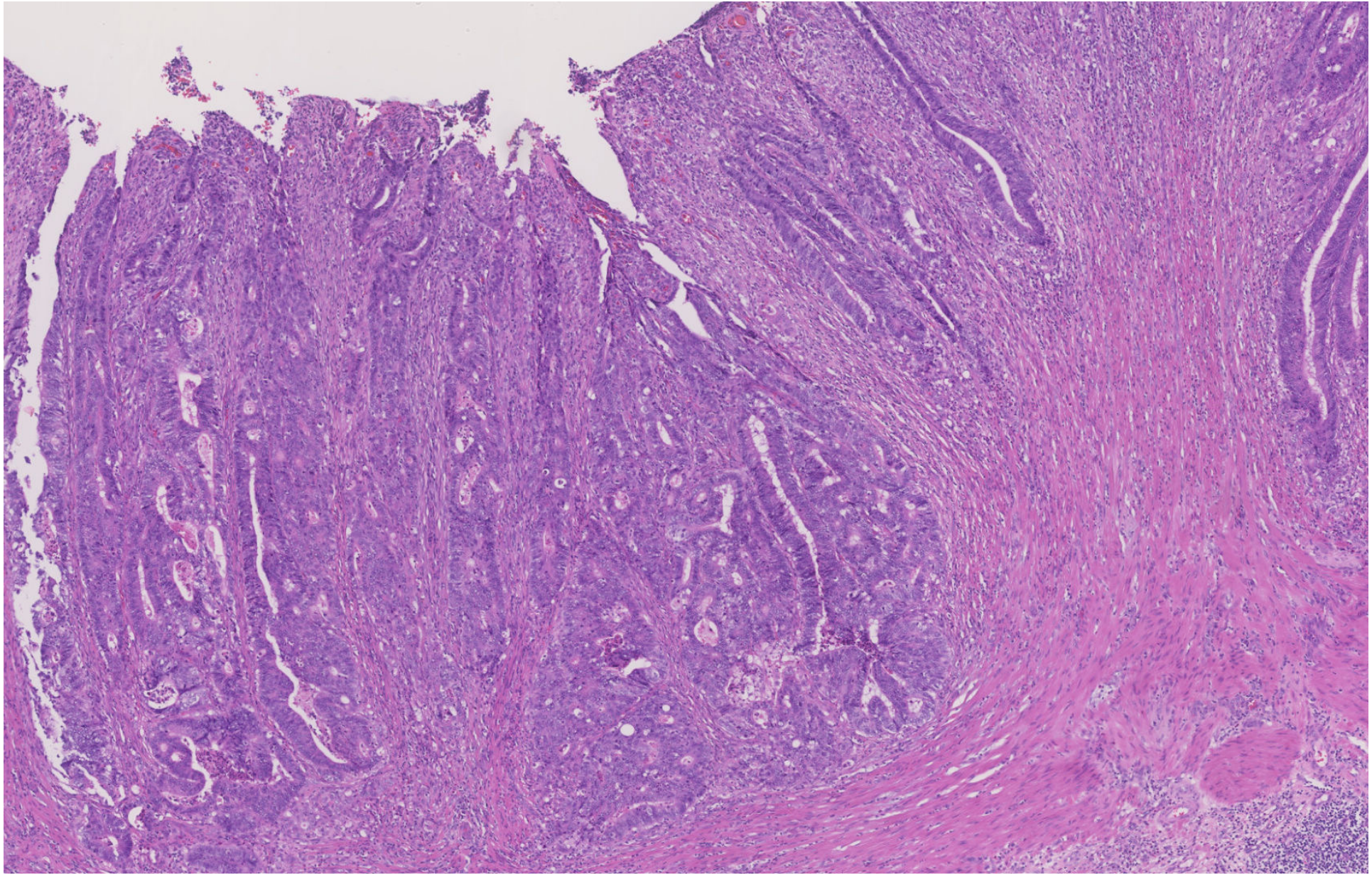
# 手術検体(S状結腸癌)



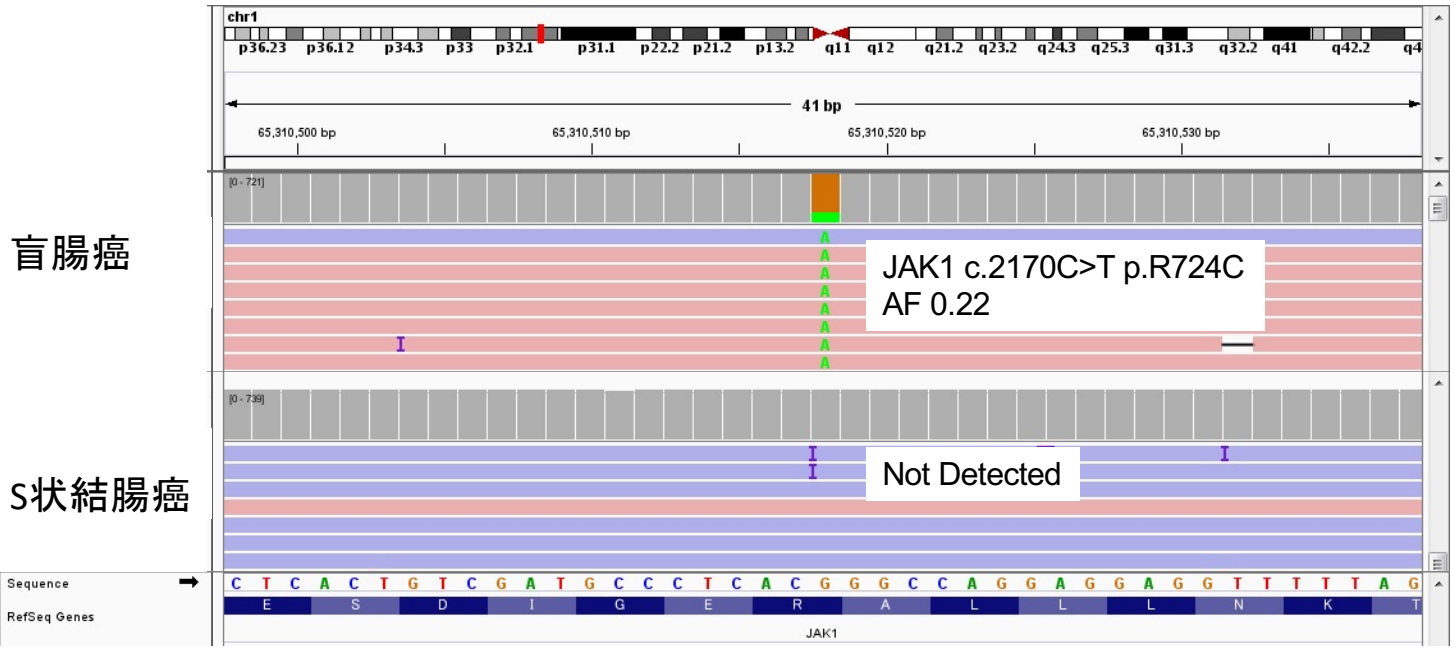
5 mm

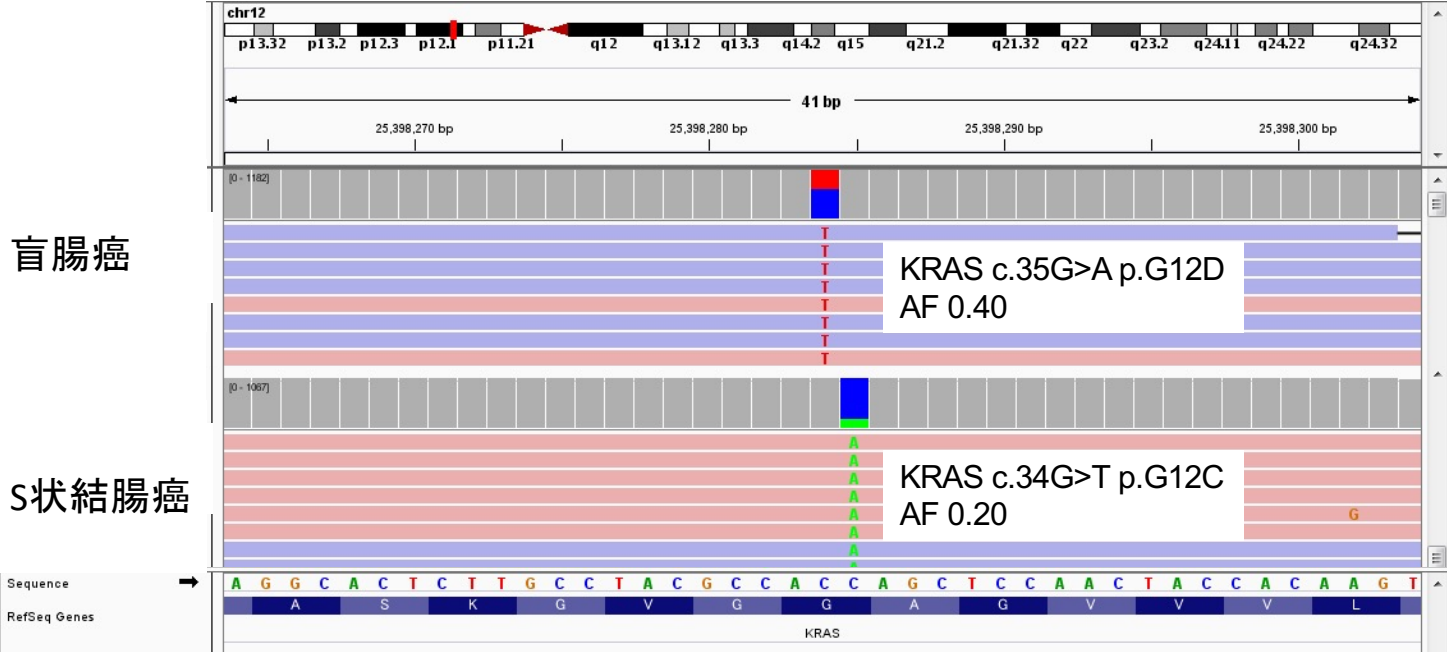






盲腸癌	S状結腸癌
<p>① <b>KRAS c.35G&gt;A (p.G12D)</b> chr12:25398284, missense COSM521 Gain of Function</p> <p>② <b>JAK1 c.2170C&gt;T (p.R724C)</b> chr1:65310518 missense COSM3741347 Gain of Function</p>	<p><b>KRAS c.34G&gt;T (p.G12C)</b> chr12:25398285 missense, COSM516 Gain of Function</p>





# 遺伝子検査に用いられる検体の種別

- ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織検体が主流
- 細胞診検体としては、肺癌遺伝子検査におけるコンパニオン診断であるEGFR変異検査、ROS1融合遺伝子検査、ALK IHC検査、PD-L1 IHC検査、BRAF遺伝子変異検査は、セルブロックでも実施されている

FFPE組織検体が主として用いられているが、検体処理方法やブロックの保管状況等が理由で使用不可もしくは解析不能となる場合が少なくない



細胞診検体への期待が高い

# 遺伝子異常の検出に細胞診を用いる際の利点と懸念

## 利点

- 低侵襲である
- 固定や保存次第であるが核酸の品質が概して良好である

## 懸念

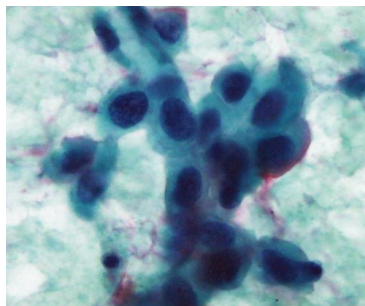
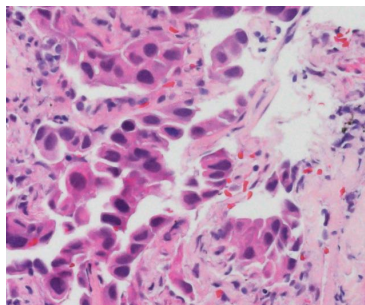
- 標本作製、保存方法、核酸抽出手法が標準化されていない
- 腫瘍細胞の量が少ないことが多い
- 腫瘍細胞比率をカウントする必要がある

# 組織検体と細胞検体の特性

	組織検体		細胞検体				
検体採取法	手術切除 内視鏡的切除	生検採取 穿刺吸引等	穿刺吸引・擦過等		体腔液・洗浄液等		
			塗抹法	LBC法	塗抹法	LBC法	セルブロック法
腫瘍細胞量	多	少	極少～少	極少～少	様々	様々	様々
検体処理	ホルマリン固定 パラフィン包埋	ホルマリン固定 パラフィン包埋	主に 95% エタノール	18-67% エタノール/ メタノール	主に 95% エタノール	18-67% エタノール/ メタノール	ホルマリン固定 パラフィン包埋
核酸品質	悪い場合あり	比較的良い	かなり良い	かなり良い	かなり良い	かなり良い	比較的良い
腫瘍細胞含有 割合の確認	易	易	難しい症例 がある	易	難しい症例 がある	易	易
遺伝子パネル の適用性	様々なパネルに 対応可	大型パネルを用 いた NGS 検査が 不可な場合あり	腫瘍細胞量が極少の場合は NGS 検査が不可な場合あり		腫瘍細胞量が極少の場合は NGS 検査が不可な場合あり		大型パネルを用 いた NGS 検査が 不可な場合あり

がんゲノム医療における細胞検体の取扱い指針より

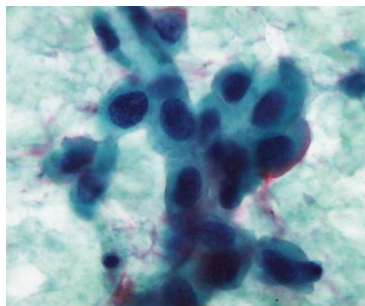
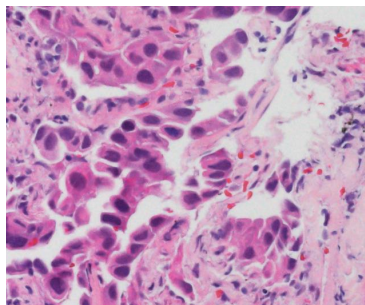
# 病理・細胞診検体から得られる情報



- 形態的情報
- 抽出した核酸より遺伝子変異情報
  - 単一遺伝子検査
  - NGSを用いたがん遺伝子パネル検査  
(複数の遺伝子変異を一気に調べる)



# 病理・細胞診検体から得られる情報



- 形態的情報
- 抽出した核酸より遺伝子変異情報
  - 単一遺伝子検査
  - NGSを用いたがん遺伝子パネル検査  
(複数の遺伝子変異を一気に調べる)

# ゲノム医療に細胞診を

## 利点

- 低侵襲である
- 固定や保存次第であるが核酸の

## 懸念

- 標本作製、保存方法、核酸抽出
- 腫瘍細胞の量が少ないことが多い
- 腫瘍細胞比率をカウントする必

実証データが必要

実証データ担当・協力機関等 (五十音順)

### 大阪大学

病態病理学・病理診断学講座

森井 英一, 前野 悦子

病理部

長友 忠相, 西野 勝, 藤埜 友稀奈

阪大微生物病研究会 病理診断課

高橋 美恵, 真継 典子

### 北里大学病院

呼吸器外科

佐藤 之俊, 松尾 由紀子

病院病理部

吉田 功, 山下 和也

### 久留米大学病院

病理診断科・病理部

河原 明彦, 安倍 秀幸, 高瀬 頼妃呼,

村田 和也, 秋葉 純

### 公立昭和病院

臨床検査科

濱川 真治, 櫻井 勉

病理診断科

吉本 多一郎

### 国立がん研究センター中央病院

病理診断科

元井 紀子, 福原 萌, 時田 和也,

澁木 康雄, 谷田部 恭

### 国立がん研究センター東病院

病理・臨床検査科

桑田 健, 中井 登紀子

臨床検査部

中村 信之

### 北海道大学病院

ゲノム・コンパニオン診断研究部門

畑中 豊, 奥村 麻美, 南家 綾江

臨床研究開発センター

畑中 佳奈子, 燕 果歩, 加瀬谷 美幸,

森 こず恵, 葛西 瑞穂

病理診断科/病理部

安孫子 光春, 石田 裕子, 松野 吉宏

# 指針の必要性

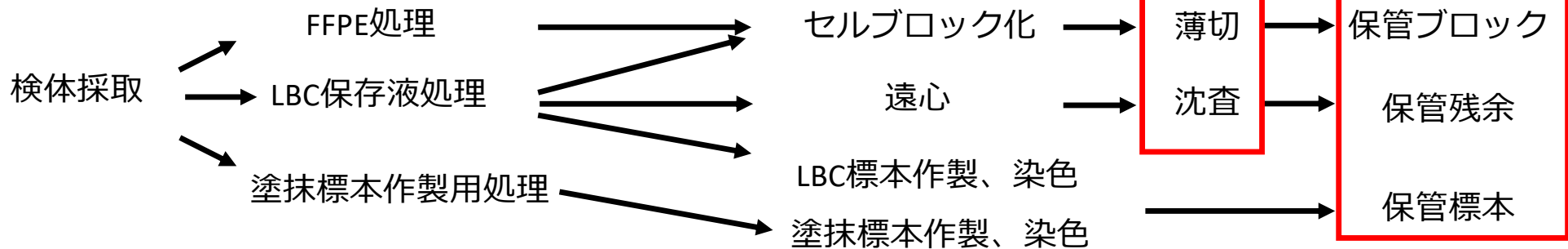
文献データ

実証データ

がんゲノム診療上は

- 何に気をつければいいのか
- どの程度までは大丈夫なのか
- 何が推奨されるのか

腫瘍細胞比率、核酸抽出



がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

初版



公益社団法人  
日本臨床細胞学会  
The Japanese Society of Clinical Cytology

# がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

— 作成担当 —

公益社団法人 日本臨床細胞学会

ゲノム診療時代における細胞診のあり方検討ワーキンググループ

委員長	森井 英一	(大阪大学大学院 医学系研究科 病態病理学)
委員	畑中 豊	(北海道大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門)
	元井 紀子	(国立がん研究センター中央病院 病理診断科)
	河原 明彦	(久留米大学病院 病理診断科・病理部)
	濱川 真治	(公立昭和病院 臨床検査科)
	桑田 健	(国立がん研究センター東病院 遺伝子診療部門)
	長友 忠相	(大阪大学医学部附属病院 病理部)
	小田 義直	(九州大学大学院 医学研究院 形態機能病理学)
	岡本 愛光	(東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)
	田中 良太	(杏林大学医学部 呼吸器・甲状腺外科学)
	伊豫田 明	(東邦大学医学部 外科学講座 呼吸器外科学分野)
	前田 一郎	(北里大学北里研究所病院 病理診断科)
	佐藤 之俊	(北里大学 医学部 呼吸器外科学)
協力委員	松尾 由紀子	(北里大学 医学部 呼吸器外科学)
	中村 信之	(国立がん研究センター東病院 臨床検査部)
	中井 登紀子	(国立がん研究センター東病院 病理・臨床検査科)
	福原 萌	(国立がん研究センター中央病院 病理診断科)
	時田 和也	(国立がん研究センター中央病院 病理診断科)
	山口 知彦	(九州大学病院 病理診断科・病理部)
	竹中 将貴	(東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)
	川畑 絢子	(東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)

※実証データ担当者および協力者は「細胞診材料の取扱いに関する実証データ」の項に記載

# がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

- 検体処理前の取扱い
- 液状化検体細胞診(LBC)検体
- ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)セルブロック検体
- 塗抹検体

# がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

- 検体処理前の取扱い
- 液状化検体細胞診(LBC)検体
  - ✓ LBC検体作製
  - ✓ 腫瘍細胞含有割合の評価
  - ✓ 核酸抽出法
  - ✓ その他留意点
- ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)セルブロック検体
- 塗抹検体

# がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

- 検体処理前の取扱い
- 液状化検体細胞診(LBC)検体
  - ✓ LBC検体作製
  - ✓ 腫瘍細胞含有割合の評価
  - ✓ 核酸抽出法
  - ✓ その他留意点
- ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)セルブロック検体
  - ✓ セルブロック検体作製
  - ✓ 腫瘍細胞含有割合の評価
  - ✓ 核酸抽出法
  - ✓ その他留意点
- 塗抹検体



# がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

- 検体処理前の取扱い
- 液状化検体細胞診(LBC)検体
  - ✓ LBC検体作製
  - ✓ 腫瘍細胞含有割合の評価
  - ✓ 核酸抽出法
  - ✓ その他留意点
- ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)セルブロック検体
  - ✓ セルブロック検体作製
  - ✓ 腫瘍細胞含有割合の評価
  - ✓ 核酸抽出法
  - ✓ その他留意点
- 塗抹検体
  - ✓ 既染標本の取扱い
  - ✓ 未染標本の取扱い

# 検体処理前の取扱い

## 《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する<sup>実証データ①</sup>

# 検体処理前の取扱い

## 《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する<sup>実証データ①</sup>
2. 生理食塩水に浮遊させた細胞検体の場合，冷蔵（4℃）で保存し，可及的速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ①</sup>

# 検体処理前の取扱い

## 《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する<sup>実証データ①</sup>
2. 生理食塩水に浮遊させた細胞検体の場合，冷蔵（4℃）で保存し，可及的速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ①</sup>
3. 液状化検体細胞診（LBC, liquid based cytology）検体は，採取後に可及的速やかにLBC保存液に保存する<sup>実証データ④⑤</sup>

# 検体処理前の取扱い

## 《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する<sup>実証データ①</sup>
2. 生理食塩水に浮遊させた細胞検体の場合，冷蔵（4℃）で保存し，可及的速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ①</sup>
3. 液状化検体細胞診（LBC, liquid based cytology）検体は，採取後に可及的速やかにLBC保存液に保存する<sup>実証データ④⑤</sup>
4. LBC保存液に浮遊させた細胞検体の場合，常温ないし冷蔵（4℃）で保存し，速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ④⑤</sup>

# 検体処理前の取扱い

## 《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する<sup>実証データ①</sup>
2. 生理食塩水に浮遊させた細胞検体の場合，冷蔵（4℃）で保存し，可及的速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ①</sup>
3. 液状化検体細胞診（LBC, liquid based cytology）検体は，採取後に可及的速やかにLBC保存液に保存する<sup>実証データ④⑤</sup>
4. LBC保存液に浮遊させた細胞検体の場合，常温ないし冷蔵（4℃）で保存し，速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ④⑤</sup>
5. 凍結する場合は，液体窒素やドライアイスアセトン法などで急速に凍結し，マイナス180℃ないしマイナス80℃にて保存し，速やかに核酸抽出することが望ましい<sup>文献7</sup>

# 検体処理前の取扱い

## 《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する<sup>実証データ①</sup>
2. 生理食塩水に浮遊させた細胞検体の場合，冷蔵（4℃）で保存し，可及的速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ①</sup>
3. 液状化検体細胞診（LBC, liquid based cytology）検体は，採取後に可及的速やかにLBC保存液に保存する<sup>実証データ④⑤</sup>
4. LBC保存液に浮遊させた細胞検体の場合，常温ないし冷蔵（4℃）で保存し，速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ④⑤</sup>
5. 凍結する場合は，液体窒素やドライアイスアセトン法などで急速に凍結し，マイナス180℃ないしマイナス80℃にて保存し，速やかに核酸抽出することが望ましい<sup>文献7</sup>
6. 未処理の細胞検体を室温で放置することは極力回避する<sup>実証データ①</sup>

# 検体処理前の取扱い

## 《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する<sup>実証データ①</sup>
2. 生理食塩水に浮遊させた細胞検体の場合，冷蔵（4℃）で保存し，可及的速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ①</sup>
3. 液状化検体細胞診（LBC, liquid based cytology）検体は，採取後に可及的速やかにLBC保存液に保存する<sup>実証データ④⑤</sup>
4. LBC保存液に浮遊させた細胞検体の場合，常温ないし冷蔵（4℃）で保存し，速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ④⑤</sup>
5. 凍結する場合は，液体窒素やドライアイスアセトン法などで急速に凍結し，マイナス180℃ないしマイナス80℃にて保存し，速やかに核酸抽出することが望ましい<sup>文献7</sup>
6. 未処理の細胞検体を室温で放置することは極力回避する<sup>実証データ①</sup>
7. LBC保存液に浮遊させた細胞検体の保存は，直射日光を避け，高温，多湿環境を回避する



# 検体処理前の取扱い

## 《検体採取から検体処理開始までの取扱い》

1. 塗抹，擦過，穿刺吸引などで採取された細胞検体は，可及的速やかに検体処理を開始する<sup>実証データ①</sup>
2. 生理食塩水に浮遊させた細胞検体の場合，冷蔵（4℃）で保存し，可及的速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ①</sup>
3. 液状化検体細胞診（LBC, liquid based cytology）検体は，採取後に可及的速やかにLBC保存液に保存する<sup>実証データ④⑤</sup>
4. LBC保存液に浮遊させた細胞検体の場合，常温ないし冷蔵（4℃）で保存し，速やかに核酸抽出を行うことが望ましい<sup>実証データ④⑤</sup>
5. 凍結する場合は，液体窒素やドライアイスアセトン法などで急速に凍結し，マイナス180℃ないしマイナス80℃にて保存し，速やかに核酸抽出することが望ましい<sup>文献7</sup>
6. 未処理の細胞検体を室温で放置することは極力回避する<sup>実証データ①</sup>
7. LBC保存液に浮遊させた細胞検体の保存は，直射日光を避け，高温，多湿環境を回避する
8. 凍結検体の場合は，融解・凍結の繰り返しは回避する<sup>文献7</sup>

# 実証データ1

## 実証データ① 検体処理前の取り扱い

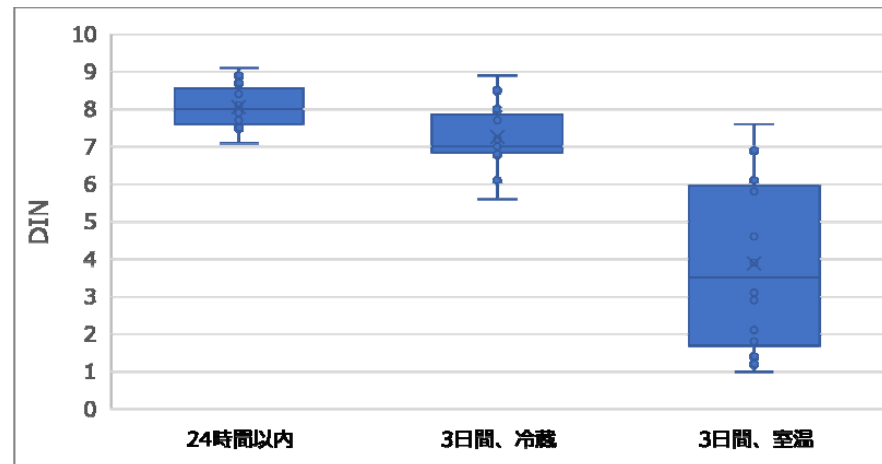
### 穿刺針洗浄液・擦過細胞診等の検体処理開始までの一時保管時間

#### 【検討内容】

《検体》肺癌手術検体（13症例）の新鮮検体の腫瘍剖面から擦過細胞検体を採取し、生理食塩水中に細胞浮遊液検体を作製した。1検体の細胞浮遊液から、可及的に等分に分注した検体を用いた。核酸抽出までの温度および時間の保管条件の影響を検討した。

《方法》比較検討条件として、①室温 24時間 ②室温 72時間 ③4℃ 72時間とした。核酸は、市販のDNA抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit [キアゲン社]）を用いて、プロトコルの通りにDNA抽出を行った。全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）を用いてDIN値を測定した。

# 実証データ1



図：生理食塩水の浮遊細胞検体における保管時間・温度の影響

## 【検討結果/図の説明】

- DNA品質（DIN値）の変化は、冷蔵で3日間保管した検体では、DIN値の低下は緩やかであり、室温24時間保管のDIN値との有意な差は認められなかった。室温で3日間保管した検体では、室温24時間保管と比較して、DIN値の低下が認められ、また一部の症例では急激な低下を認めた。
- 核酸抽出は可及的速やかに開始することが推奨される。長時間の保管については、冷蔵下で3日以内であれば、比較的DNA品質の低下が抑えられる。

# 実証データ4

## 実証データ④ LBC検体作製法

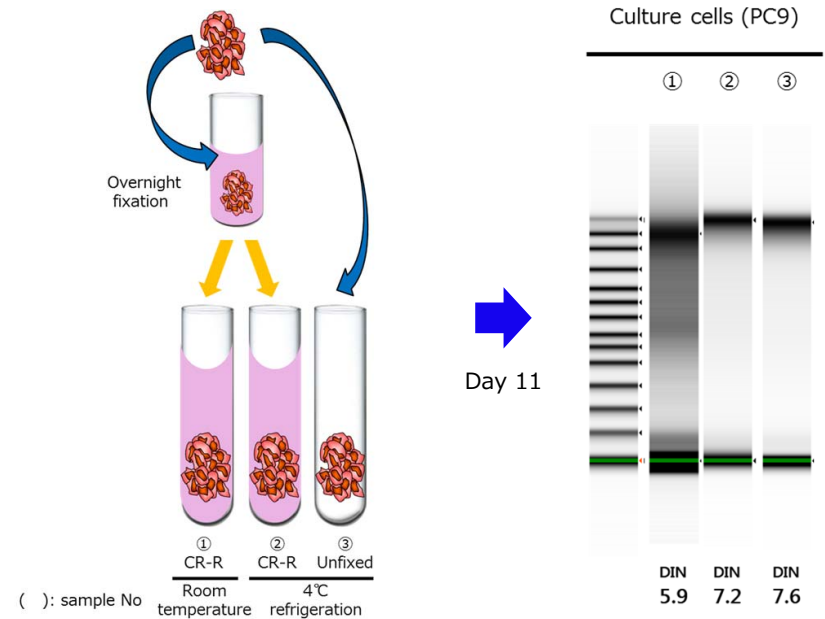
### LBC保存液における最適な検体の保管方法

#### 【検討内容】

《検体》 CytoRich Red（非婦人科用, [ベクトン・ディッキンソン社]）で固定した培養細胞（PC9）を下記の①②③の状態です11日間保存した。その後DNAを抽出し、室温保存と冷蔵保存のどちらがDNA品質に影響を与えるのか否かを比較した。

- ① CytoRich Red 室温保管
- ② CytoRich Red 冷蔵（4℃）保管
- ③ 未固定（対照） 冷蔵（4℃）保管

《方法》 DNA抽出方法は, QIAamp DNA Mini Kit [キアゲン社]を使用した。DNA抽出後に全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）を用いてDIN値の確認を行った。



#### 【検討結果/図の説明】

- 比較した試料のDIN値に顕著な差はみられなかったが、室温よりも冷蔵（4℃）のDIN値がよい傾向であった。
- 冷蔵（4℃）した場合、LBC保存液と未固定検体（対照）に顕著な差はみられなかった。

# 実証データ5

## 実証データ⑤ LBC検体作製法

### 細胞における冷蔵保管 日数とDNAへの影響

#### 【検討内容】

《検体》CytoRich Red（非婦人科用，[BD社]）で固定した培養細胞（PC9）を下記の①②の状態ですべて10日間冷蔵保管した。その間、DNAを継続的に抽出し、保管日数がDNA品質に影響を与える影響を確認した。

① 細胞をCytoRich Redに懸濁して冷蔵（4℃） 2, 4, 6, 8, 10日間保管

② 未固定の細胞を遠心後にペレット状態にして冷蔵（4℃）2, 4, 6, 8, 10日間保管（対照）

《方法》DNA抽出方法は、QIAamp DNA Mini Kit [キアゲン社]を使用した。DNA抽出後にDIN値（全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）の確認を行った。また、パパニコロウ染色による形態観察も行った。

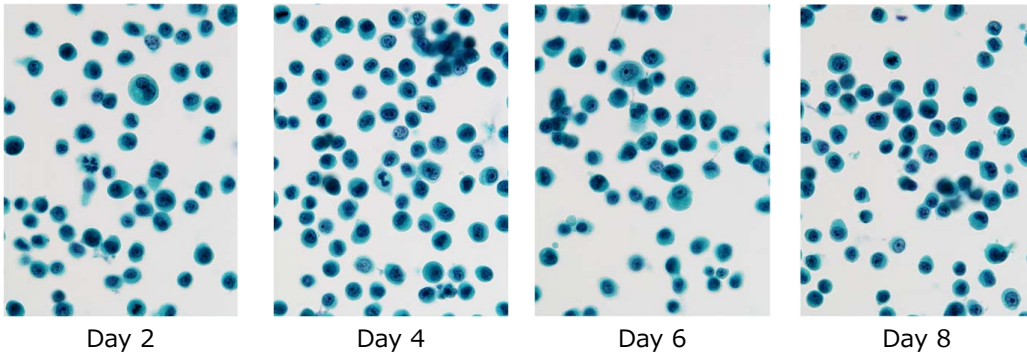
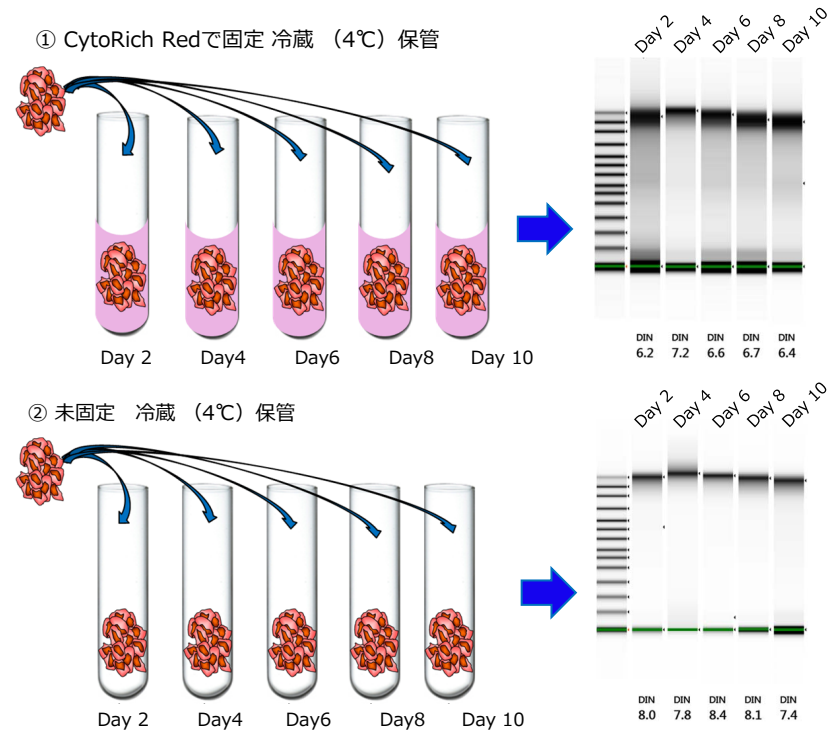


図 パパニコロウ染色の細胞像



#### 【検討結果/図の説明】

- LBC保存液と未固定細胞における冷蔵保管日数とDNAへの影響は、1週間後でもほとんどなかった。
- LBC保存液における冷蔵保管日数と細胞形態への影響は、1週間後でもほとんどみられなかった。

# 検体処理前の取扱い

## 《その他の注意点》

9. 細胞検体のコンタミネーションを回避するために、作業環境を整える 文献7
10. 複数の腫瘍や腫瘍内で異なる性状部位から採取する場合は、部位が同定できるように識別符号を付与する 文献7
11. 体腔液（胸水，腹水など），尿などの液状検体は，検体量と含まれる細胞量により適切な検体処理法を選択することが望ましい
12. 形態学的に標的細胞の有無を確認することが望ましいが，検体量が少ない場合，細胞形態診断とゲノム診断のどちらを優先するかは，あらかじめ取り決めをしておくことが望ましい
13. 検体量と細胞量が十分な場合は，複数の保存方法を併用することを考慮してもよい ※「3.2 LBC検体」参照

# がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針

- 検体処理前の取扱い
- 液状化検体細胞診(LBC)検体
  - ✓ LBC検体作製
  - ✓ 腫瘍細胞含有割合の評価
  - ✓ 核酸抽出法
  - ✓ その他留意点
- ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)セルブロック検体
  - ✓ セルブロック検体作製
  - ✓ 腫瘍細胞含有割合の評価
  - ✓ 核酸抽出法
  - ✓ その他留意点
- 塗抹検体
  - ✓ 既染標本の取扱い
  - ✓ 未染標本の取扱い

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要十分な数の有核細胞の回収を行う 文献7



# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要十分な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要十分な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要十分な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要十分な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献①</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい  
腫瘍細胞含有割合の評価
5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する<sup>実証データ②</sup>

## 核酸抽出法

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要十分な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい  
腫瘍細胞含有割合の評価
5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する<sup>実証データ②</sup>

## 核酸抽出法

ホルマリンを含むLBC保存検体における核酸抽出

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要な十分な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい  
腫瘍細胞含有割合の評価
5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する<sup>実証データ②</sup>

## 核酸抽出法

### ホルマリンを含むLBC保存検体における核酸抽出

6. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は核酸の収量や質に影響するため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③,文献10</sup>

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい  
腫瘍細胞含有割合の評価
5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する<sup>実証データ②</sup>

## 核酸抽出法

### ホルマリンを含むLBC保存検体における核酸抽出

6. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は核酸の収量や質に影響するため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③,文献10</sup>
7. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、長時間の加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去は核酸の質の低下につながるため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③</sup>

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要十分な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい  
腫瘍細胞含有割合の評価
5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する<sup>実証データ②</sup>

## 核酸抽出法

### ホルマリンを含むLBC保存検体における核酸抽出

6. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は核酸の収量や質に影響するため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③,文献10</sup>
7. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、長時間の加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去は核酸の質の低下につながるため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③</sup>

### ホルマリンを含まないLBC保存検体における核酸抽出



# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要十分な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい  
腫瘍細胞含有割合の評価
5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する<sup>実証データ②</sup>

## 核酸抽出法

### ホルマリンを含むLBC保存検体における核酸抽出

6. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は核酸の収量や質に影響するため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③,文献10</sup>
7. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、長時間の加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去は核酸の質の低下につながるため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③</sup>

### ホルマリンを含まないLBC保存検体における核酸抽出

8. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は、キット手順書より短時間で行うことができる<sup>実証データ③</sup>

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい  
腫瘍細胞含有割合の評価
5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する<sup>実証データ②</sup>

## 核酸抽出法

### ホルマリンを含むLBC保存検体における核酸抽出

6. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は核酸の収量や質に影響するため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③,文献10</sup>
7. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、長時間の加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去は核酸の質の低下につながるため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③</sup>

### ホルマリンを含まないLBC保存検体における核酸抽出

8. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は、キット手順書より短時間で行うことができる<sup>実証データ③</sup>
9. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去を省略することができる<sup>実証データ③</sup>

## その他留意点

# LBC検体

## LBC検体作製

1. ゲノム解析に必要な数の有核細胞の回収を行う<sup>文献7</sup>
2. 採取された細胞は速やかにLBC保存液で浮遊固定する
3. 固定時間に関しては各社LBCの取扱いに従う
4. 腫瘍細胞の分布や比率の評価が形態学的に容易な標本作製法が望ましい  
腫瘍細胞含有割合の評価
5. パパニコロウ染色や免疫細胞化学染色などで腫瘍細胞を確認する<sup>実証データ②</sup>

## 核酸抽出法

### ホルマリンを含むLBC保存検体における核酸抽出

6. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は核酸の収量や質に影響するため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③,文献10</sup>
7. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、長時間の加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去は核酸の質の低下につながるため、適切な条件で実施する<sup>実証データ③</sup>

### ホルマリンを含まないLBC保存検体における核酸抽出

8. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、プロテイナーゼK溶液によるタンパク質の溶解は、キット手順書より短時間で行うことができる<sup>実証データ③</sup>
9. 市販のFFPE組織用DNA抽出キットを用いてLBC保存液からDNAを抽出する場合、加熱による核酸とホルマリンのクロスリンクの除去を省略することができる<sup>実証データ③</sup>

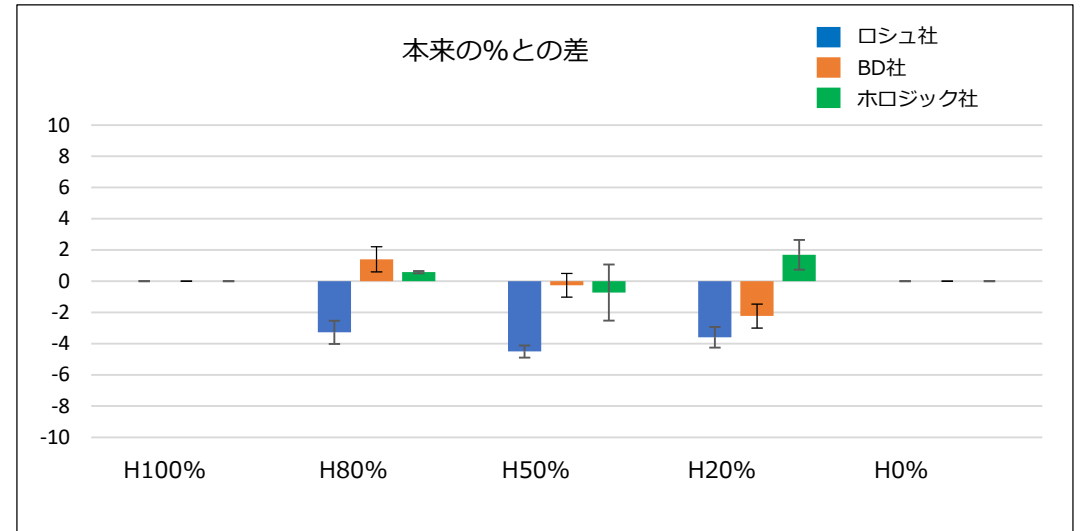
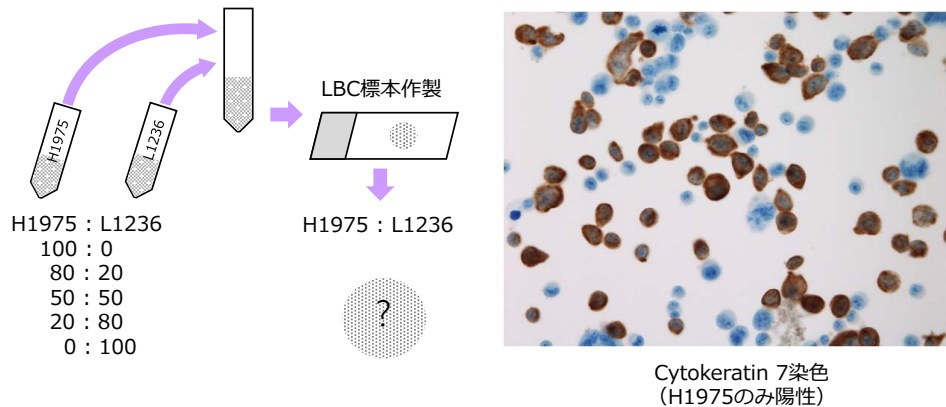
## その他留意点

10. 概ね6か月以上長期保管したLBC検体をゲノム検査に用いることは極力回避する

# 腫瘍細胞含有割合

## 実証データ② 腫瘍細胞含有割合評価法

LBC標本作製前後における腫瘍細胞含有割合の変化を解析



- 棒グラフは, LBC標本作製前の懸濁液における腫瘍細胞比率とLBC標本における腫瘍細胞比率との差を示している. 上述のようにロシュ社のLBC検体では, 標本作製後ではH1975細胞の比率が最大で約4%低くなる傾向にある.
- 大きな差ではないが, 上述の傾向があることを理解して腫瘍含有割合を評価する必要がある.

# 核酸抽出方法

## 実証データ③ 核酸抽出法

### 各LBC保存液検体における至適核酸抽出方法

#### 【検討内容】

《検体》肺腺癌細胞株（NCI-H1975,  $6.7 \times 10^5$  cells/test）を、LBC保存液（CytoRich Red およびCytoRich Blue（非婦人科用, [BD社]）で固定し（24時間）、そこから得られる沈渣を用いて検討した。

《方法》市販のFFPE組織用DNA抽出キット（QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [キアゲン社] およびMaxwell FFPE Plus DNA Kit [プロメガ社]）を用いて、さまざまな時間・温度のプロテイナーゼKによる前処理を行ったのちにDNA抽出を行った（溶出量50 $\mu$ L）。吸光度法（NanoDrop [サーモフィッシャー社]）と蛍光法（Qubit [サーモフィッシャー社]）を用いて濃度測定、全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）を用いて核酸品質の確認を行った。

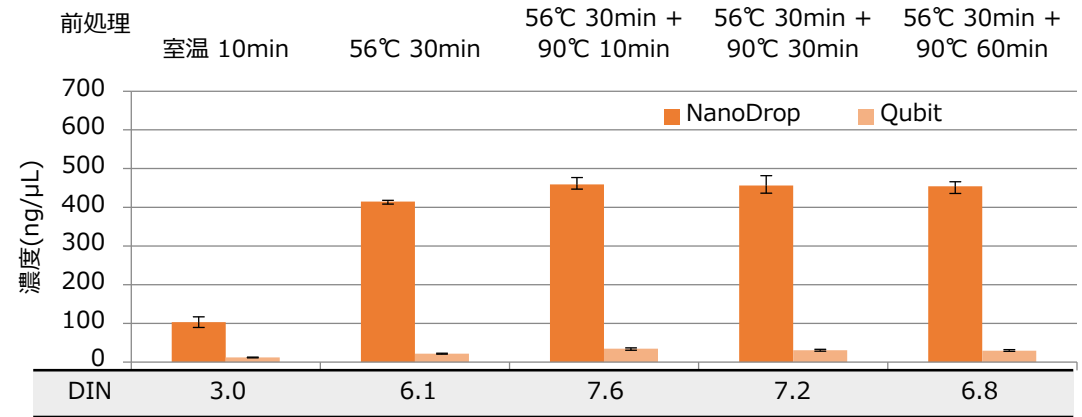


図 LBC保存液検体（CytoRich Red）を用いた至適核酸抽出方法（QIAamp）の検討

#### 【検討結果/図の説明】

- NanoDropを用いた吸光度による測定では濃度は、56°C、90°Cの前処理を加えることで有意に上昇した。Qubitを用いた蛍光法の濃度は、56°C、90°Cの前処理を加えることで段階的に大きくなった。この際、90°Cの処理時間は10~60分（推奨）の間で、濃度に大きな差を認めなかった。
- DIN値を指標としたDNAの品質の比較では、56°C、90°Cの前処理を加えることで段階的に上昇した。この際、90°Cの前処理時間が長くなるほど低下する傾向が認められた。

# 核酸抽出方法

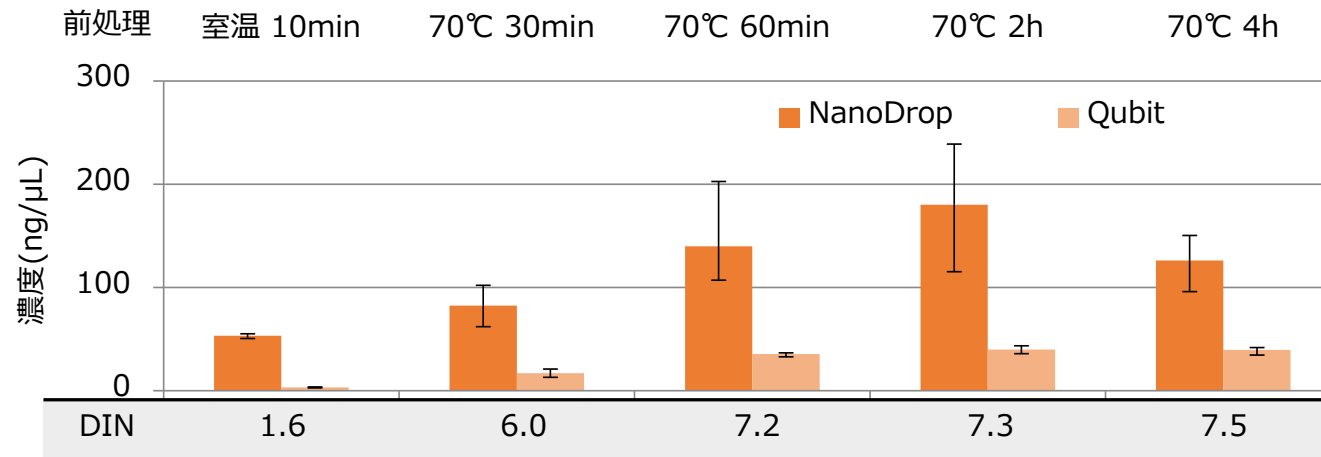


図 LBC保存液検体（CytoRich Red）を用いた至適核酸抽出方法（Maxwell）の検討

## 【検討結果/図の説明】

- NanoDropを用いた吸光度法による濃度は、前処理時間が2時間までは時間に比例して上昇し、4時間で低下した。Qubitを用いた蛍光法の濃度は、前処理時間が1時間までは時間とともに上昇し、その後4時間までは差が認められなかった。
- DIN値を指標としたDNAの品質の比較では、前処理時間が1時間までは時間に比例して大きくなり、その後4時間までは差が認められなかった。

# 核酸抽出方法

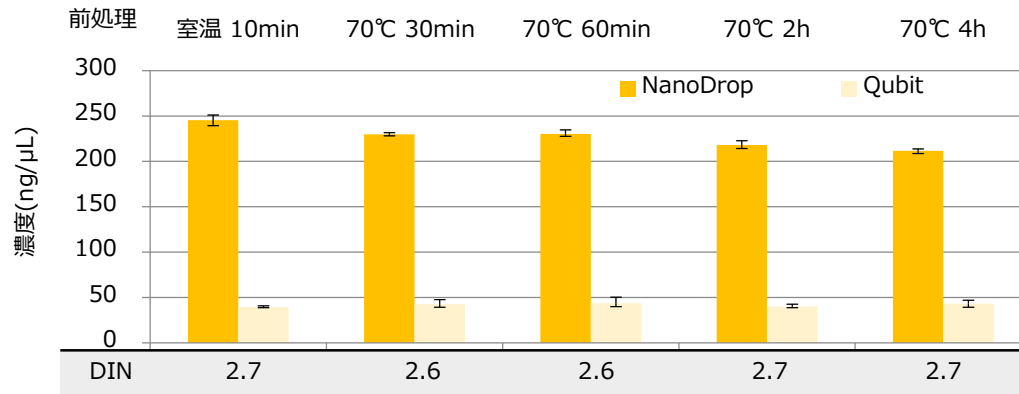


図 LBC保存液検体 (CytoRich Blue) を用いた至適核酸抽出方法 (Maxwell) の検討

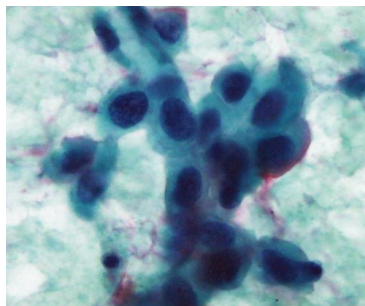
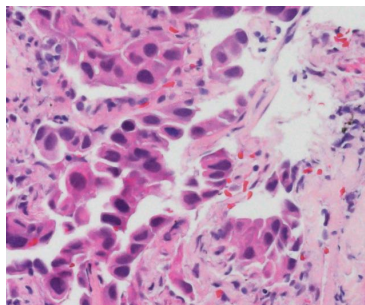
## 【検討結果/図の説明】

- NanoDropを用いた吸光度法による濃度は、前処理時間が長くなるほど低下する傾向が認められた。Qubitを用いた蛍光法の濃度は、いずれの処理時間でも収量に大きな差を認めなかった。
- DIN値を指標としたDNAの品質の比較では、いずれの前処理時間でも差を認めなかった。

\* 固定液と抽出法の組み合わせにより、プロテイナーゼK処理の至適条件が異なる。その際、CytoRich BlueよりもCytoRich Redで固定した場合に、前処理工程の違いがDNAの収量と品質に与える影響が大きい。

\* NanoDropとQubitの測定値は必ずしも相関があるとは言えず、解釈には注意が必要となる。

# 病理・細胞診検体から得られる情報



- 形態的情報
- 抽出した核酸より遺伝子変異情報
  - 単一遺伝子検査
  - NGSを用いたがん遺伝子パネル検査  
(複数の遺伝子変異を一気に調べる)

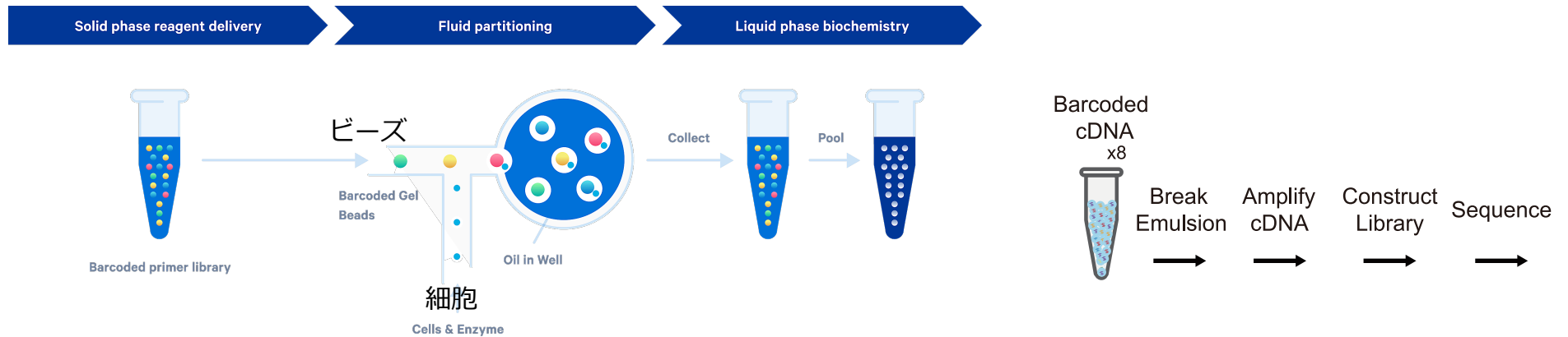


# まとめ

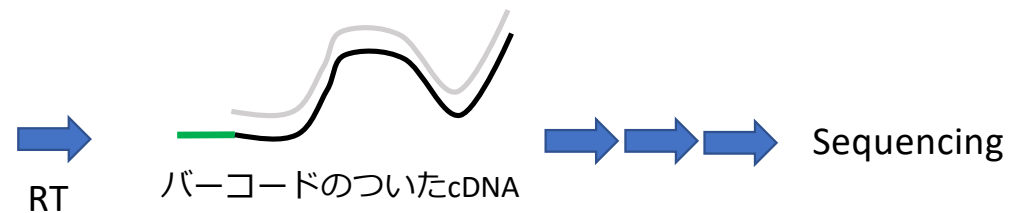
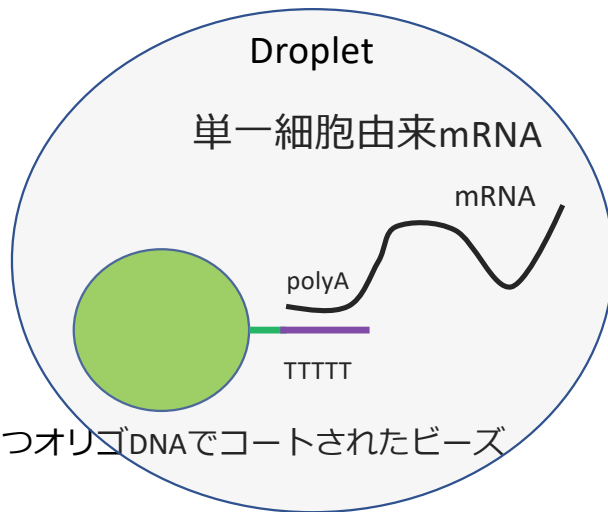
(あと少しあります)

- 細胞診検体から、形態の情報以外に遺伝子変異情報も得られる。
- Molecular target therapyが導入されたため、形態保持のみならず、遺伝子の品質保証も重要である。
- 細胞診検体は検体の量が少ないという問題点があるが、遺伝子の品質は比較的良好である。
- ゲノム医療が実装されている現在、細胞診検体の取扱いにも注意が必要である。

# 単一細胞におけるRNA-seq

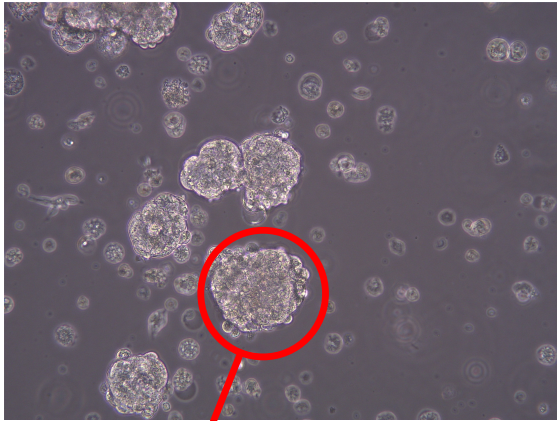


<https://www.10xgenomics.com/technology>

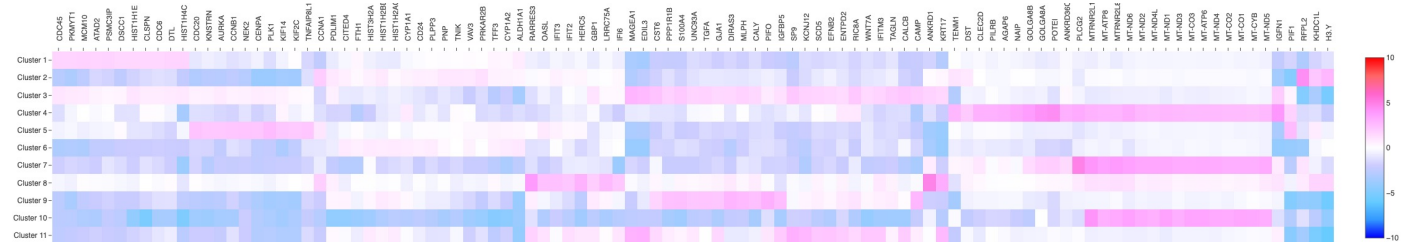
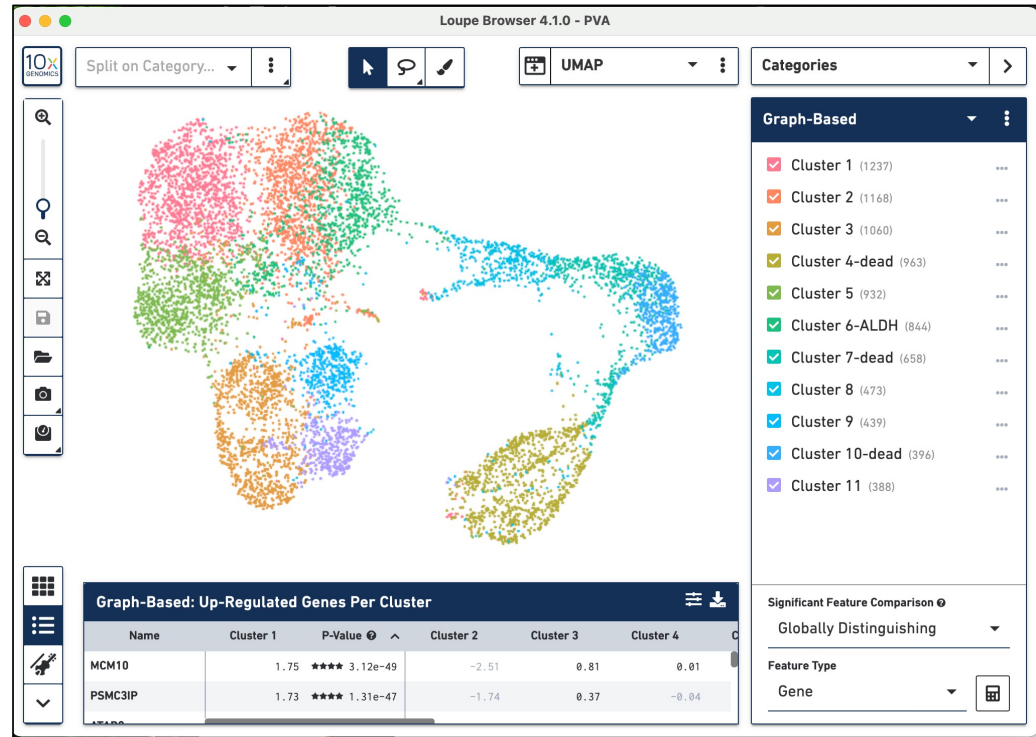
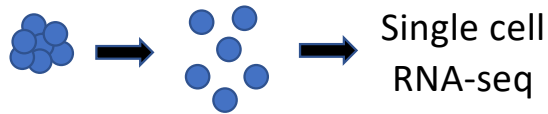


分子バーコードをもつオリゴDNAでコートされたビーズ

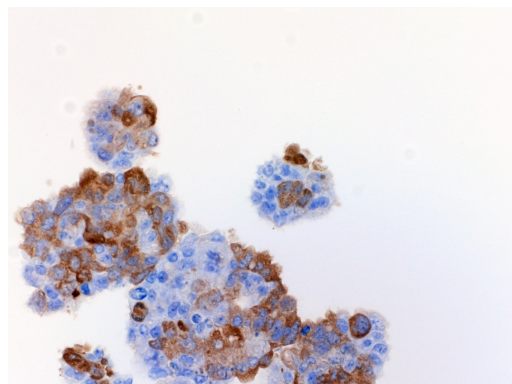
# 単一細胞におけるRNA-seqの例



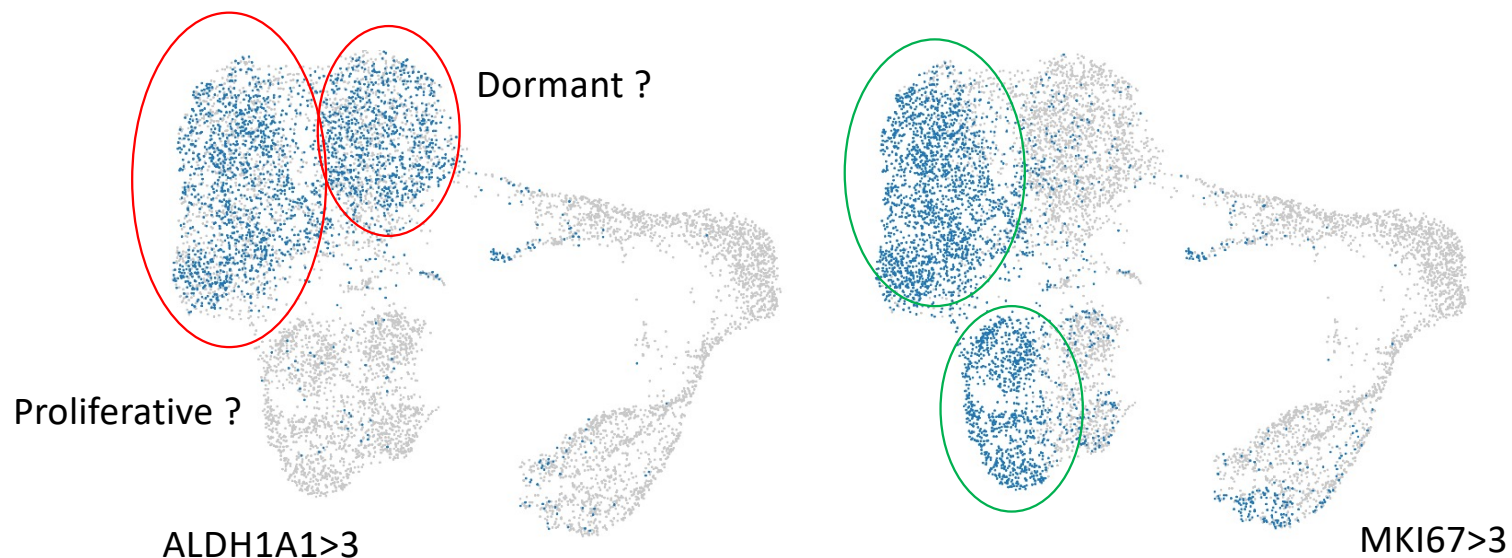
細胞株を3D培養したもの



# 単一細胞におけるRNA-seqの例

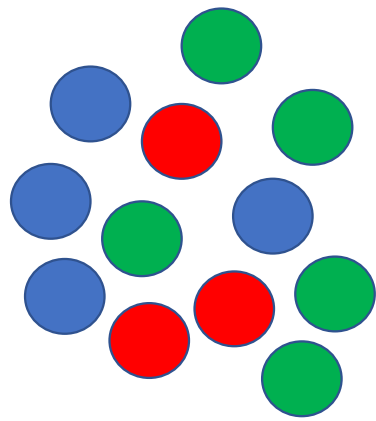


ALDH1A1染色

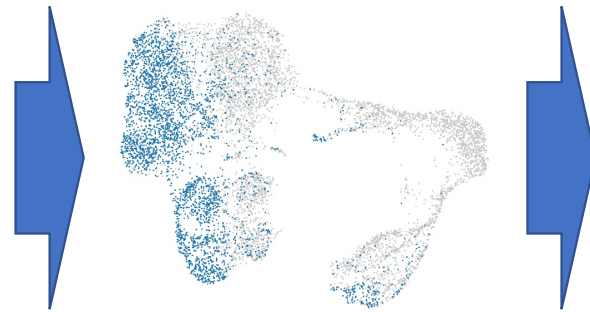


ある特定の遺伝子がONとなっている細胞群の特徴を把握することができる

# Single cell RNA-seqと細胞診



- 腫瘍細胞
- 正常上皮細胞
- 炎症細胞



Single cell RNA-seq

● に特徴的に発現する遺伝子



● における遺伝子変異

どんな細胞がコンタミしても大丈夫  
腫瘍細胞に特徴的な遺伝子変異がわかるので  
がんゲノム医療時代には最適な方法

しかし、そもそも腫瘍細胞に特徴的に発現する  
遺伝子とは？

腫瘍細胞も層別化できるかもしれない。  
形態と遺伝子の相関関係がわかるかも

# 謝辞

- 畑中 豊 (北海道大学病院 ゲノム・コンパニオン診断研究部門)  
元井 紀子 (国立がん研究センター中央病院 病理診断科)  
河原 明彦 (久留米大学病院 病理診断科・病理部)  
濱川 真治 (公立昭和病院 臨床検査科)  
桑田 健 (国立がん研究センター東病院 遺伝子診療部門)  
長友 忠相 (大阪大学医学部附属病院 病理部)  
小田 義直 (九州大学大学院 医学研究院 形態機能病理学)  
岡本 愛光 (東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)  
田中 良太 (杏林大学医学部 呼吸器・甲状腺外科学)  
伊豫田 明 (東邦大学医学部 外科学講座 呼吸器外科学分野)  
前田 一郎 (北里大学北里研究所病院 病理診断科)  
佐藤 之俊 (北里大学 医学部 呼吸器外科学)  
松尾 由紀子 (北里大学 医学部 呼吸器外科学)  
中村 信之 (国立がん研究センター東病院 臨床検査部)  
中井 登紀子 (国立がん研究センター東病院 病理・臨床検査科)  
福原 萌 (国立がん研究センター中央病院 病理診断科)  
時田 和也 (国立がん研究センター中央病院 病理診断科)  
山口 知彦 (九州大学病院 病理診断科・病理部)  
竹中 将貴 (東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)  
川畑 絢子 (東京慈恵会医科大学 産婦人科学講座)

実証実験にご協力いただいた多くの先生方

本連合会学術集会会長  
座長の労をとっていただいた

大林千穂先生  
若狭朋子先生