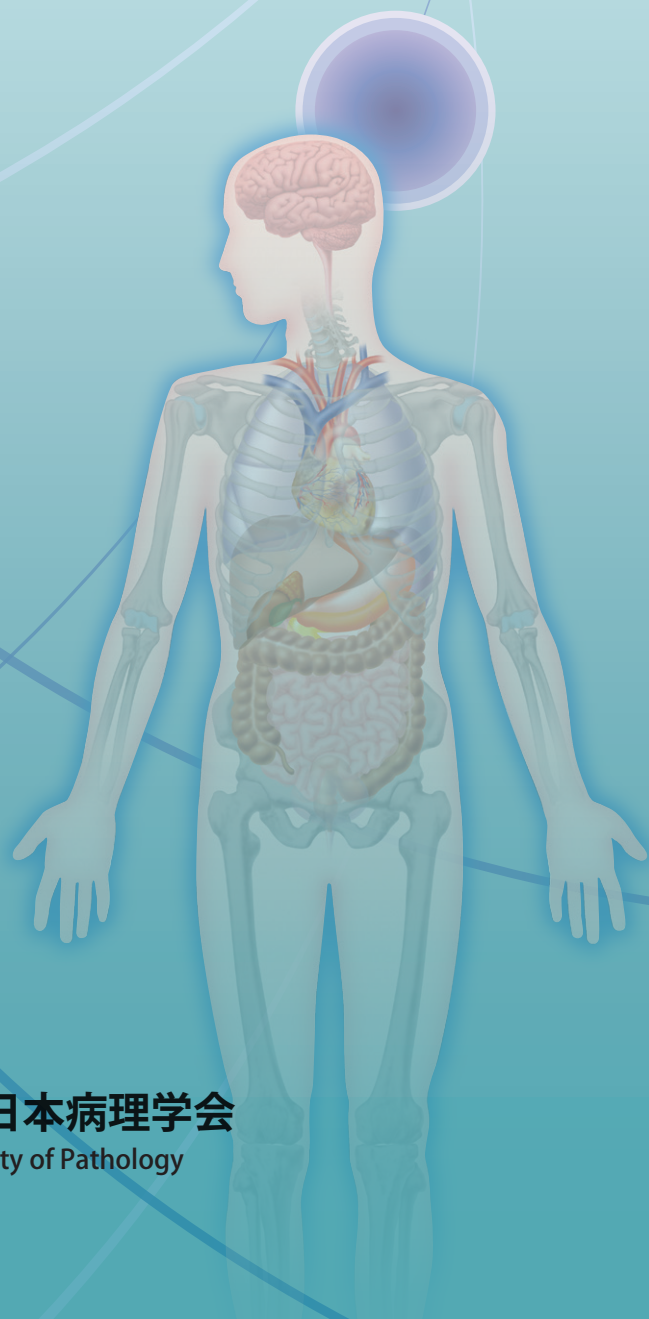


ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程



一般社団法人 日本病理学会
The Japanese Society of Pathology

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程

初版作成担当

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

委員長 小田 義直

委員 畑中 豊, 桑田 健, 森井 英一, 金井 弥栄, 落合 淳志

本規程策定にあたって

近年、悪性腫瘍の病理組織・細胞検体を用いた体細胞遺伝子検査は急増しており、今後は次世代シーケンサー等の新規技術を用いたゲノム診断（遺伝子パネル検査）の臨床導入が見込まれている。一般社団法人日本病理学会（以下、本学会）では、ゲノム等オミックス研究に適した質の高い病理組織検体を全国のバイオバンク等で収集できることを目指して『ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程』（以下、研究用規程）を2016年3月に策定し、我が国の病理医・臨床医・臨床検査技師・バイオバンク実務者における病理組織検体の取扱い指針を示した。これに続き本学会では、ゲノム診断検討委員会および医療業務委員会の連携のもとワーキンググループを設置し、今後日常診療下での実施が想定されるがんゲノム診断での使用に耐えうる病理組織・細胞検体に関する『ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程』（以下、診療用規程）を策定することとした。

本診療用規程では、ゲノム診断で要求される病理組織・細胞検体のうち、とくに最も利用が見込まれ、検体の取り扱い方法により検体の品質差が生じやすいホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE）検体の適切な作製・保管方法について示した。本診療用規程が、がんゲノム医療中核拠点病院や連携拠点病院をはじめとする実際の診療にゲノム情報を用いる医療機関のみならず、日常業務下で作製される病理検体が今後のゲノム診断に供される可能性のあるすべての医療機関の病理医や病理技師、さらには検体採取にかかわる臨床医を対象とした実用の書となるよう心がけた。なお「ゲノム診療」の対象範囲については、今後の技術革新や知見の集積、ゲノム診療環境の整備状況等を踏まえ刻々と変化していくことが想定されるが、現時点では、医薬品の投与可否判定等の診断に用いられることを重視し、「コンパニオン診断薬等に該当する体外診断用医薬品の製造販売承認申請に際し留意すべき事項について」¹、もしくは「遺伝子検査システムに用いるDNAシーケンサー等を製造販売する際の取扱いについて」²に基づき薬事承認され、保険診療下ですでに実施されている製品（体外診断用医薬品および医療機器）、もしくは「がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会 報告書」³で示された制度設計のなかで、今後承認および保険診療下での実施が想定される製品で適用可能となる検体品質と位置付けている。本診療用規程の初版では、現在臨床研究等で用いられている高い網羅性を有する遺伝子パネル解析やエクソーム解析等で要求される検体品質については副次的な取扱いとしたが、今後薬事承認および保険適用等の状況を踏まえ、適時改訂・更新を行う必要があると考える。本診療用規程では、その根拠となる実証データを合わせて呈示した。当該データの取得にあたっては、当学会において実施した検討のほか、複数の公的研究プロジェクト（研究班）および複数のゲノム診断関連企業の協力を得て行った。

¹コンパニオン診断薬等に該当する体外診断用医薬品の製造販売承認申請に際し留意すべき事項について（平成26年2月19日付厚労省課長通知：<https://www.pmda.go.jp/files/000159090.pdf>）

²遺伝子検査システムに用いるDNAシーケンサー等を製造販売する際の取扱いについて（平成28年4月28日付厚労省課長通知：<https://www.pmda.go.jp/files/000213137.pdf>）

³がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会 報告書（<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000166310.pdf>）

本診療用規程は、日本病理学会およびその他関連学会が行うがんゲノム診療従事者向け教育・研修プログラムでの教育ツールとしても利用される予定である。本診療用規程が、今後本格的にゲノム診断を用いた病理診断および日常業務の一助となることを期待する。

平成30年3月1日

一般社団法人日本病理学会

理事長 深山 正久

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程
ワーキンググループ委員長 小田 義直

目 次

1. 診療における病理組織・細胞検体の現状	1
2. ホルマリン固定パラフィン包埋組織・細胞検体の適切な取扱い	3
2.1 プレアナリシス段階	4
a) 固定前プロセス	4
b) 固定プロセス	5
c) 固定後プロセス	7
2.2 アナリシス段階	8
a) FFPEブロックの選択と薄切およびHE染色標本へのマーキング	8
b) FFPE検体からの核酸抽出	10
3. 検体取扱いに関する実証データ	13
4. 参考資料	39
補遺	42

日常の病理組織診断では、生検もしくは手術等により採取・切除された組織のFFPE検体や新鮮凍結検体等が主として用いられるが、その大部分を前者が占め、形態診断に加え、生体分子の検索を目的とした分子診断に供される。また細胞診断を目的に採取された細胞検体のうち、穿刺吸引や体腔液採取などによって得られた一部の細胞検体からも、FFPE検体(セルブロック)の作製が行われており、平成28年の診療報酬改定において当該標本作製が算定可能となったことを背景に、近年その利用が高まっている。こうした組織・細胞のFFPE化は、室温下における長期保管や繰り返しの検索を可能にし、さらには様々な技術開発により、最近では網羅的な分子解析が可能となったことから、診療のみならず、研究における利用が加速している。研究利用においては、FFPE化による核酸やタンパク等の生体分子の変性を最小限にとどめ、新鮮検体により近づけた検体作製が望まれるが、このような研究利用までを意識した検体の取り扱いは多くの医療機関で困難と考えられてきた。しかしながら次世代シーケンシング法(next-generation sequencing; NGS)もしくはmassively parallel sequencing; MPS、以下NGS)などの新規技術の臨床導入を目前に控え、今後診療を目的として作製されるすべてのFFPE検体に対し、これら技術を用いたゲノム診断での利用に耐えうる一定水準以上の品質が求められるようになり、対応が急務となっている。

FFPE検体を用いた分子診断のプレアナリシス段階では、多数の影響因子が知られており、各施設におけるこれらの情報(条件)の把握は検体を採取・提出する臨床医、標本作製担当者およびその管理者においては不可欠といえる(表1)。このうち固定プロセスで用いられるホルマリンは、核酸やタンパクに化学的および物理的修飾を引き起こし、検体品質にきわめて大きな影響を与えることが広く知られており、これまでも肺癌、乳癌、胃癌、大腸癌における治療効果予測検査(いわゆるコンパニオン診断)関連のガイドラインやガイダンスなどにおいて、固定プロセスに関する推奨が示されている。また固定前プロセスの管理、特に臓器の摘出後から固定までの時間(冷虚血時間; cold ischemic time)は、生体分子の不可逆的変化を最小化するうえで極めて重要であり、このプロセスが不適切な場合は、作業手順の見直しにより大きな改善が期待できる。

表1 FFPE検体を用いた分子診断のプレアナリシス段階における主な影響因子

プレアナリシス 段階の工程	工程の主な 責任・担当者	影 響 因 子
固定前プロセス	臨床医 (検体採取医)	・血流停止から摘出までの時間(温虚血時間; warm ischemic time) ・摘出から固定までの時間(冷虚血時間; cold ischemic time) ・組織の大きさ
固定プロセス	病理医 病理技師	・ホルマリン固定液の組成や濃度, pH ・ホルマリン固定の時間や温度 ・ホルマリン固定時の固定液容量と組織量の比率 ・固定液の組織浸透法(浸漬, 注入, マイクロウェーブ加速など)
固定後プロセス	病理医 病理技師	・組織プロセッサのタイプおよび機器試薬の交換頻度 ・脱水・透徹条件(試薬の種類, 温度, 時間など) ・パラフィン浸透条件(パラフィンの種類, 温度, 時間など)

診療を念頭においた遺伝子パネル解析におけるFFPE検体の利用は、複数の国内の臨床研究プロジェクトで進んでいる。大規模ゲノムスクリーニング研究プロジェクト(SCRUM-Japanプロジェクト)では、消化器がんを対象としたGI-SCREEN試験において日常診療下で作製された2000例以上のFFPE検体が解析に用いられている。このプロジェクトでは、参加20施設からFFPE検体が提出されているが、検体品質には施設間差が認められており^{実証データ①}、FFPE検体の品質の現状に関する重要なデータが得られている。また国立がん研究センターにおいて行われている、標準治療を終了したがん患者を主な対象とした約100遺伝子の遺伝子パネル検査(NCCオンコパネル検査)を行う臨床研究プロジェクト(TOP-GEARプロジェクト)では、200例以上の多がん種のFFPE検体が用いられている。このプロジェクトではDNA品質に関する指標を確立するなど^{実証データ②}、FFPE検体を使用した遺伝子パネル検査の国際基準準拠下での院内実施の検証等が行われている。

2017年には厚生労働省主導のがんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会が立ち上げられ、当該医療の推進に必要な薬事承認や保険適用等の制度設計が議論されており、2017年7月時点において表2のような整理・区分が示されている。このうち保険診療下で遺伝子パネル検査の実施が想定されている区分では、病理部門を有する医療機関に対し、NGS等の新規技術での使用に耐えうる検体作製が求められることが予想される。上述のGI-SCREEN試験では、こうした区分に該当すると考えられる小型および比較的網羅性の高い遺伝子パネルが使用されており、現行のルーチン検体の品質と遺伝子パネルのサイズとの関係を理解するうえで参考となる^{実証データ①}。

分子診断を高い精度で行うためには、検査の成否を左右する検体の品質管理は極めて重要である。治療選択に直結しているコンパニオン診断において、不適切な処理が行われた検体の使用が原因で検査が実施できない、あるいは誤った結果がもたらされた場合は、患者の治療機会の損失につながり、大きな不利益を被ることとなる。多遺伝子の検査情報を保証しなければならないゲノム診断(遺伝子パネル検査)においては複数遺伝子を対象とするため、その結果の質を保証するためには、現行の単一遺伝子検査以上に、より厳格な検体の品質管理が求められることに十分留意しなければならない。2017年10月に日本臨床腫瘍学会、日本癌治療学会、日本癌学会の三学会合同で発刊された「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1.0版)」においても、適切に品質管理された検体の使用が言及されており、本診療用規程を参考にすることが明記されている^{文献1}。

表2 本邦において今後想定されるNGSを用いたゲノム診療の臨床導入当初の形態*

ゲノム関連検査の種類	実施主体	診療制度
薬事的に確立した検査項目のみ(コンパニオン診断薬)	各医療機関・衛生検査所にて実施	薬事承認・保険診療
医学的に意義がある遺伝子のパネル検査(承認された医薬品のない遺伝子を含む)(NGSパネル)	一定の要件を満たす医療機関を指定(がんゲノム拠点(仮))	(必要に応じて先進医療の実施を経て)薬事承認し、保険診療可とする
全ゲノムシーケンス・免疫関連検査等	一定の要件を満たす医療機関での実施	先進医療を活用した保険外併用療養で対応

*: 本表は「がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会」資料を一部改変し作成

(<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000162155.pdf>).

本診療用規程では、主としてがんゲノム診断の今後の臨床導入への速やかな対応を目指し、最も利用が見込まれ、臨床研究を積極的に行う先端的医療機関のみならず、診療を専らとする一般医療機関においても要求される検体品質を保持したFFPE検体の適切かつ標準的な取扱い方法（プレアナリシス段階）を以下に定める。またゲノム診断に供するFFPEブロックの選択方法や薄切方法などのアナリシス段階の一部の作業プロセスについてもあわせて解説する。

FFPE検体では、形態診断に影響を及ぼさず、また免疫組織化学法による分子診断（とくにコンパニオン診断）で推奨される検体作製が同時に求められるため、固定時間の際立った短縮化は困難であり、固定による核酸やタンパクの一定の変性は不可避となる。FFPE検体は、血液等の液状検体に比べかなり多くの工程と時間を経て作製されるため、病理技術・診断業務のリソースに限りのある医療機関においては、僅かな作業改善においても大きな負担となる可能性があるが、可能な限り本診療用規程の推奨に準じた対応を求めたい。

本診療用規程は、先行策定された研究用規程に加え、後述の実証データや文献情報等に基づき、以下の凡例に従い推奨するものであり、「診療ガイドライン」等に見るようなEBMに基づいた推奨グレードは挙げていない。推奨については、日常診療におけるベストプラクティスとして推奨される事項（clinical recommendation; C）と、ゲノムスクリーニング（網羅性の高いゲノム解析）に基づいた介入研究や保険診療外のゲノム診断等への利用が考慮される場合に推奨される事項（research recommendation; R）に区分した。なお本推奨は今後のゲノム診断状況を踏まえ、適時改訂・更新が必要であると考える。

凡 例

- (C)： 日常診療において推奨される事項
- (R)： 臨床研究等への利用を考慮する場合に推奨される事項
- (N)： 回避すべき事項

2.1 プレアナリシス段階

a) 固定前プロセス

《切除・採取直後の組織の取扱い》

1. 手術により切除された組織は、摘出後は速やかに冷蔵庫など4℃下で保管し、1時間以内、遅くとも3時間以内に固定を行うことが望ましい (C) 文献2, 研究用規程1
2. 内視鏡的に切除等された消化管組織など、比較的小型の組織については、速やかに固定液に浸漬し固定を行うことが望ましい (C)
3. 生検により採取された組織は、速やかに固定液に浸漬し固定を行う (C)
4. ホルマリン固定パラフィン包埋化を行う細胞検体は、必要な前処理を適切に行ったのちに、可及的速やかに固定液に浸漬し固定を行う (C)
5. 手術により切除された組織においては、摘出後30分以上室温で保持することは極力回避する (N)

[補足説明]

- ^{1補} これまでの報告では、乳癌の切除から固定までの時間が、ISH法(*HER2*)では2時間、IHC法(ホルモン受容体)では1時間を超えると、検査結果に影響を与えるとされており^{文献3}、これを踏まえ、乳癌のASCO/CAPのガイドラインでは1時間以内の固定を推奨している^{文献2}。
- ^{1補} 一般的な固定液であるホルマリンの浸透速度は1mm/時間程度であることを考慮し、とくに手術検体では、切り出しまでに十分な固定が行える程度の厚みまで、固定前に適切に入割することが推奨される (C) 文献4。
- ^{1-3補} 臨床研究等への利用を考慮する場合、いずれの組織も切除・採取後は可及的速やかに固定液に浸漬し、固定を行うことが求められる (R) 研究用規程1。
- ^{1,5補} 固定前プロセスの煩雑さ等から、一般に、生検検体に比べて手術検体のほうが、核酸品質や単位体積/面積あたりの収量が低くなる場合が多い (C) 実証データ②③, 文献5。
- ^{4補} 細胞検体のうち、体腔液検体については、固定前に細胞検体の集塊化処理を行う。この処理法(セルブロック作製法)は、遠心分離細胞収集法や細胞固化法に大別され、それぞれ複数の方法が存在し現在用いられているが、いまだ標準化されていない。これら処理法におけるゲノム診断への利用の適否については不明であるが、国内では、細胞固化法であるアルギン酸ナトリウム法、遠心分離細胞収集法である遠心管法やクライオバイアル法などは比較的多くの施設で用いられ、コンパニオン診断などでの使用には耐えうることが確認されている^{文献6}。

b) 固定プロセス

《ホルマリン固定液の組成》

6. ホルマリン固定液の組成は、酸性や非緩衝ではなく、中性緩衝ホルマリン溶液を固定に用いることが望ましい (C)
7. ホルマリン濃度は10%(3.7%ホルムアルデヒド)を用いることが望ましい (C)

【補足説明】

- 6.7 補 現在実施されているIHC法を用いた複数のコンパニオン診断において、すでに10%中性緩衝ホルマリン溶液が推奨されている(表3)。IHC法によるタンパク発現の検索は、ホルマリン固定液の組成と濃度に影響を受けることが示されている^{文献7}。また ΔC_t 値やDIN値を指標としたDNA品質に関する検討においても10%中性緩衝ホルマリン溶液の使用を支持する結果が得られている^{研究用規程2}。
- 6.7 補 国際共同企業治験等においてFFPE検体の提出が求められる際、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定されたFFPE検体との条件が必須となる場合もある。

表3 コンパニオン診断関連ガイダンス等における固定プロセスの推奨^{文献2, 8-15}

がん種	効果予測マーカー	検査対象分子	検査法	推奨ホルマリン固定液	推奨ホルマリン固定時間
乳癌	HER2	タンパク	IHC法	10% NBF	6～72時間 <6時間は回避
	<i>HER2</i>	DNA	ISH法		
	ER/PgR	タンパク	IHC法		
肺癌	<i>EGFR</i>	DNA	リアルタイムPCR法等	10% NBF	6～48時間
	ALK	タンパク	IHC法		
	<i>ALK</i>	DNA	FISH法		
	<i>ROS1</i>	RNA	RT-PCR法	10% NBF	手術検体 18～36時間 生検検体 4～24時間
	PD-L1	タンパク	IHC法	10% NBF	6～48時間
胃癌	HER2	タンパク	IHC法	10% NBF	6～48時間
	<i>HER2</i>	DNA	ISH法		
大腸癌	<i>RAS</i> (<i>KRAS/NRAS</i>)	DNA	PCR-rSSO法	10% NBF	6～48時間
悪性黒色腫	<i>BRAF</i>	DNA	リアルタイムPCR法等	—	—

10% NBF; 10%中性緩衝ホルマリン(neutral buffered formalin), —; 記載なし

《ホルマリン固定時間》

8. 組織検体（手術検体，内視鏡的に切除された検体，生検検体）では，コンパニオン診断等の推奨を考慮し（表3），6～48時間の固定を行うことが望ましい（C）実証データ④⑤，研究用規程2
9. 固定不良（固定不足・過固定）による品質劣化は回避しなければならない（N）

《ホルマリン固定処理に使用する固定液量》

10. ホルマリン固定に使用する固定液の容量は，組織量に対し10倍量の固定液を用いることが望ましい（C）

《ホルマリン固定処理時の温度》

11. ホルマリン固定時の処理温度は，室温でよい

【補足説明】

- 8補 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知られており，特にシトシンの加水分解に伴う脱アミノ化によりウラシルに置換し，その後のPCR増幅反応によってチミンが生成（C>T置換）することが知られている^{文献16, 17}。この反応は固定時間の延長により増加し，72時間から顕著となることから，48時間以内の固定が望ましい（C）実証データ④～⑦。
- 8補 気管支腔内超音波断層法（EBUS）等を用いて生検採取される微小な組織検体や細胞検体では，より短い固定時間で処理が完了するため，業務上支障のない範囲で固定時間の短縮化（たとえば6～24時間）に努めることが望ましい^{文献12}。
- 8補 固定不良，特に7日間以上固定された検体では，NGS用のライブラリーの作製（特に網羅性の高い遺伝子パネルを使用する場合）が困難となる（N）実証データ④⑤，研究用規程2,3。
- 8補 手術検体において診療残余の病変部が存在し，将来のゲノム診断利用を考慮しうる場合，もしくはゲノム診断を目的として再生検を行う場合などでは，核酸の保存に優れた非ホルマリン系固定液の使用を考慮してよい（R）研究用規程4。

c) 固定後プロセス

《脱灰処理》

12. 硬組織を含む検体をゲノム診断に供する可能性がある場合は、酸脱灰を回避し (N), EDTA 脱灰を行うべきである (C) 研究用規程 5

《組織のプロセッシング》

13. 従来型の組織プロセッサ（密閉式自動固定包埋装置）の使用は問題ないが、使用薬剤の管理（交換頻度等）の影響については不明である。また迅速型（連続迅速自動固定包埋装置）では、いまだ十分なデータは得られていない

《FFPE ブロックの保管》

14. FFPE ブロックの保管は、室温でよいが、多湿を避け冷暗所が望ましい (C)。ゲノム診断を目的として作製された FFPE ブロックは、冷蔵下の保存が望ましい (R) 文献 18

《未染色 FFPE 標本の保管》

15. 未染色 FFPE 標本の形態で保管する場合は、低温保管やパラフィンコーティングなどの核酸品質劣化を防止する対応を行うことが望ましいが、原則薄切後時間が経過した未染色 FFPE 標本のゲノム診断への使用は避け (N)、可能な限り FFPE ブロックから再薄切をすることが望ましい (C)

【補足説明】

- ¹⁵ 補 パラフィンコーティングは、マニュアル・マイクロダイセクションや核酸抽出等の作業へ影響を与える場合があります。

2.2 アナリシス段階

a) FFPE ブロックの選択と薄切およびHE 染色標本へのマーキング

《FFPE ブロックの選択》

1. ゲノム診断に供する検体は、病理診断時に作製されたHE 染色標本の観察や病理診断報告書の記載等に基づき、解析に必要な腫瘍量を有するFFPE ブロックを、原則病理医が選択する。このとき出血や壊死、炎症細胞などの非腫瘍細胞が多いブロックの使用は可能な限り避ける (C, R)
2. 同一患者において、切除・採取時期が異なる検体が複数存在する場合は、作製時期が最新の検体を第一選択とすべきである (C, R) 実証データ⑧～⑫

《FFPE ブロックの薄切および未染色標本の作製》

3. FFPE ブロックの薄切時には、検体ごとにミクロトーム刃を交換するなど、他検体のコンタミネーションに十分注意する。またグローブを着用するなど、核酸分解防止に努めることが望ましい (C)

《HE 染色標本による確認とマーキング》

4. ゲノム診断用に作製した未染色 FFPE 標本から、再度 HE 染色標本を作製し、原則病理医が標本上にマーキングするとともに腫瘍量（総腫瘍細胞数）や腫瘍割合（標本中の全細胞に占める腫瘍細胞の％）を判定する (C) 文献19

【補足説明】

- ^{2補} FFPE ブロックの核酸品質は経年劣化していくことが明らかとなっている 実証データ⑧～⑫。経年による影響は、NGS の場合、使用する遺伝子パネルにより異なるが、作製後3年以内のFFPE ブロックの使用が望ましい (C, R) 実証データ⑧、文献20。
- ^{2補} FFPE ブロックは、保管開始とともに検体品質指標（ ΔCt 値）やNGS 解析の成功率が変化するなど、核酸品質が経年劣化することがGI-SCREEN 試験の結果から明らかになっており、可能な限りFFPE ブロック作製時期が新しいものを用いることが望ましい (C) 実証データ⑧。
- ^{4補} 一般にパネル検査に必要なDNA 量は10 ～ 500ng である。ただし必要な量は使用する遺伝子パネルやNGS 機器の種類によって異なることから、腫瘍量や腫瘍割合の判定を担当する病理医は、その把握が必要である (C, R)。

- 4補 1有核細胞から得られるDNA収量は6 pg程度と見積もられる。仮に10 ngのDNAを得る場合には約2000細胞(未染色標本上では腫瘍細胞が豊富なエリアが少なくとも60~100mm²程度)からの抽出が必要とされている^{文献21}。
- 4補 腫瘍割合について、SNV(single nucleotide variant)やIndel(small insertion and deletion)などの変異検出では30%以上、CNA(copy number alteration)検出を含む場合は50%以上の腫瘍細胞を含むように、また遺伝子発現量の測定では、可能な限り非腫瘍細胞を含まないようにすることが望ましい。腫瘍割合が満たない場合は、用手的に非腫瘍部分の除去(マニュアル・マイクロダイセクション)が必要となる(C, R)。なおNGSを用いたがん遺伝子パネルによるターゲットシーケンシングでは、通常ターゲット領域のシーケンス・カバレッジを250 ~ 500x以上として、変異アレル頻度(variant allele frequency; VAF)の検出閾値を5 ~ 10%とすることが推奨されている^{文献20 ~ 22}。
- 4補 HE染色標本観察時の腫瘍割合を病理診断報告書へ記録しておくことが望ましい。非腫瘍組織の除去操作を実施した場合は、実施した旨と除去操作実施後の腫瘍割合をゲノム診断報告書へ記載する(C)。

b) FFPE 検体からの核酸抽出

《核酸抽出》

5. ゲノム診断に使用する核酸抽出試薬は、診療での使用に適した標準化された市販キットの使用が望ましい (C)。また使用する各ゲノム診断法において推奨されている市販の核酸抽出キットがある場合には、それを用いることが望ましい (C, R)

《核酸の純度および収量の確認》

6. 抽出した核酸は、分光光度計等によるA₂₆₀/A₂₈₀比の測定や、DNAについては蛍光法によるdsDNA濃度の測定等を行い、純度や収量を確認することが必要である (C, R)

《核酸品質の確認》

7. 核酸抽出を行ったFFPE検体が長期保管されている場合や過固定等による核酸の品質低下が懸念される場合、核酸品質の確認が推奨される (C, R)

【補足説明】

- ^{5補} 市販の核酸抽出キットを用いたFFPE検体からの核酸抽出においては、キット間で純度や収量に差異があり、選択には注意が必要である^{文献23}。
- ^{5補} ホルマリンにより生成した化学修飾（シトシン塩基の脱アミノ化）を核酸抽出時に酵素的（ウラシル-DNA N-グリコシラーゼ；UNG）に除去・校正することにより、アーティファクトを有するリードの生成を抑える（ホルマリン固定により生じた変異を正しい塩基配列に戻す）ことが可能である
実証データ¹²、文献¹⁷。
- ^{6補} FFPE検体から抽出した核酸の純度を示すA₂₆₀/A₂₈₀比は、一般にDNAでは1.7～1.9程度、RNAでは1.9～2.1程度の範囲とされており、低値を示す場合はタンパク等の混入が考えられ注意を要する。またDNA中にRNAが混入した場合、A₂₆₀/A₂₈₀比はやや高値を示す^{文献24}。また他の混入物の確認のためA₂₆₀/A₂₃₀比やA₂₂₀～A₃₂₀間のスキヤニングについても確認をすることが望ましい。
- ^{7補} 核酸品質確認方法には、ΔCt値をはじめ、表4のような指標が知られている。

表4 FFPE 検体の核酸品質確認のための主な指標

指 標	対 象	説 明
Ct値/ΔCt値	DNA/RNA	リアルタイムPCR (DNA) もしくはリアルタイムRT-PCR (RNA) 法により得られるCt値を用いて核酸品質を評価する方法で、特殊な機器を必要としない簡便な方法である。DNA品質評価では、異なる長さの2種のアンプリコンサイズ (例: 50～100 bp 程度の短鎖アンプリコンと、100～300 bp 程度の長鎖アンプリコンなど) から得られるCt値の差 (ΔCt値) を指標とする方法が、一般に用いられている。国内大規模ゲノムスクリーニング研究 (SCRUM-Japan/GI-SCREEN 試験 ^{文献25)} においては、2000例を超えるFFPE検体に対し、Thermofisher社が開発したΔCt値アッセイが行われ、その有用性が示されている。
DIN	DNA	DIN (DNA Integrity Number) はアジレント社のAgilent 2200/4200 TapeStationシステムを用いたGenomic DNA ScreenTape assayで測定したデータをgDNAの分解度に応じて1～10にスコア化された値であり、FFPE検体のDNA品質評価が可能である。
Q-value	DNA	Q-valueは国立がん研究センター中央病院が開発したDNAの品質指標であり ^{文献26} 、リアルタイムPCR法を用いて得た測定値 (Ct値) を蛍光法による測定値 (dsDNA濃度) で割った値である。Q-value 0.2以上におけるシーケンス (NCCオンコパネルv2使用時) の成功率は約85%である。
DV ₂₀₀	RNA	DV ₂₀₀ はイルミナ社が開発したRNAの品質指標であり、AATI社のFragment Analyzer またはアジレント社のAgilent 2100 bioanalyzerを用いて、200ヌクレオチド以上のRNA断片の割合を算出する。DV ₂₀₀ による品質区分は、>70%の場合はHigh、50～70%の場合はMedium、30～50%の場合はLow、<30%はToo degradedとしており、<30%のFFPE検体では、RNAシーケンスのライブラリー調製への使用を推奨していない。

本診療用規程策定にあたっては、ゲノム診断の実用化を目指した臨床研究を推進している、以下の研究班等およびこれに関係している医療機関および研究機関および関連企業の協力を得て、実証データおよび参考データを収集し、編集・編纂を行った。

●協力・連携研究班等

厚生労働科学研究費 研究班

先端のがん医療実施のための地域完結型病理診断および臨床・病理連携ネットワークの構築に関する研究(【H26-がん政策-一般-005】研究期間：2014年度～2016年度)

研究代表者 桑田 健

国立がん研究センター研究開発費 研究班

がんゲノム情報を用いた全国レベルでのprecision medicine体制構築に関する研究(【28-A-5】研究期間：2016年度～2018年度)

研究代表者 吉野 孝之

国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)委託事業 研究班

産学連携全国がんゲノムスクリーニング事業SCRUM-Japanで組織した遺伝子スクリーニング基盤を利用した、多施設多職種専門家から構成されたExpert Panelによる全国共通遺伝子解析・診断システムの構築および研修プログラムの開発(【17ck0106233h0002】研究期間：2016年度～2018年度)

研究開発代表者 吉野 孝之

がんゲノム個別化医療の実現に向けた遺伝子診断共通カリキュラム構築と教育・研修プログラムの実証的開発研究(【16ck0106232h0001】研究期間：2016年度～2018年度)

研究開発代表者 西尾 和人

●実証解析担当機関および協力機関等

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

病理診断科/病理部

丸川 活司, 畑中 佳奈子, 三橋 智子, 松野 吉宏

国立病院機構 北海道医療センター(連携病理診断実施医療機関)

広瀬 徹, 高橋 宏明

国立がん研究センター

《SCRUM-Japan/GI-SCREEN-Japanプロジェクト》

東病院 病理・臨床検査科

桑田 健

東病院 消化管内科

吉野 孝之

東病院 臨床研究支援部門トランスレーショナルリサーチ推進部

バイオバンク・トランスレーショナル リサーチ支援室

岡本 渉, 須藤 智久, 三木 いずみ

先端医療開発センター 臨床腫瘍病理分野

藤井 誠志

先端医療開発センター ゲノムトランスレーショナルリサーチ分野(柏)

土原 一哉

《TOP-GEARプロジェクト》

先端医療開発センター ゲノムトランスレーショナルリサーチ分野(築地)

市川 仁, 久保 崇, 河野 隆志

中央病院 臨床検査科

角南 久仁子, 落合 淳志

中央病院 先端医療科

山本 昇

近畿大学医学部

ゲノム生物学教室

西尾 和人, 坂井 和子

腫瘍内科部門

武田 真幸

外科学教室

光富 徹哉

特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム(JMAC)

《経済産業省・国際標準共同研究開発事業：医療用バイオチップ実用化促進に向けたヒト核酸の測定プロセスに関する国際標準化》

的場 亮, 山本 伸子, 中江 裕樹

●実証解析実施協力企業(五十音順)

イルミナ株式会社

株式会社キアゲン

サーモフィッシャーサイエンティフィックライフテクノロジーズジャパン株式会社

シスメックス株式会社

株式会社DNAチップ研究所

株式会社理研ジェネシス

●調査協力企業(五十音順)

アジレント・テクノロジー株式会社

イルミナ株式会社

株式会社医学生物学研究所

エムエス機器株式会社(アジェナバイオサイエンス)

株式会社キアゲン

サーモフィッシャーサイエンティフィックライフテクノロジーズジャパン株式会社

サクラファインテックジャパン株式会社

シスメックス株式会社

株式会社DNAチップ研究所

ナノストリングテクノロジー

バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

株式会社理研ジェネシス

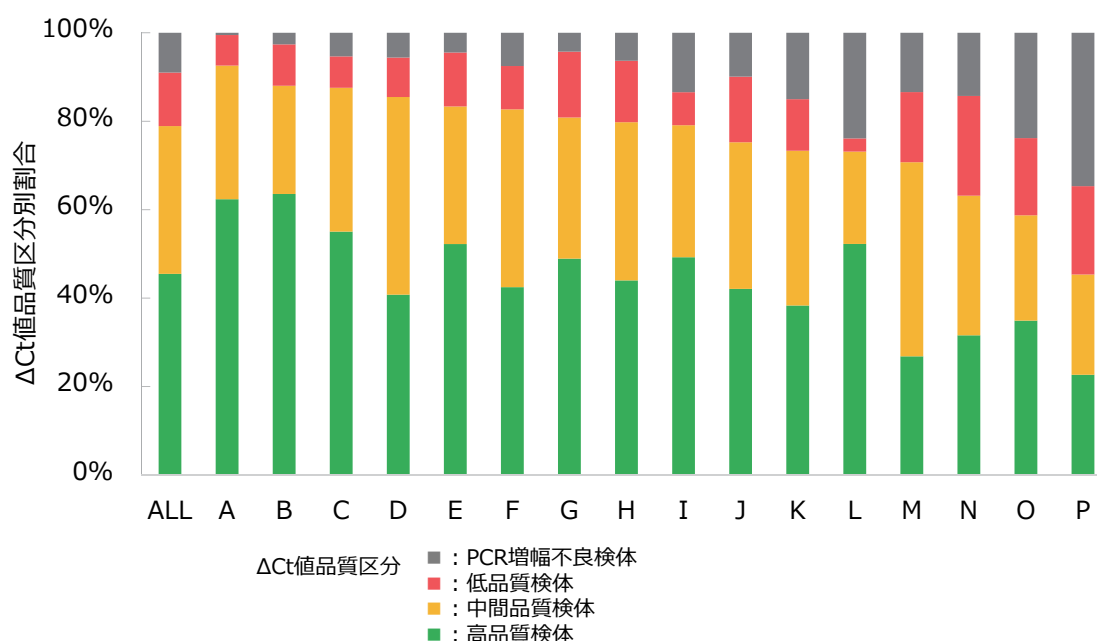
ロシュダイアグノスティックス株式会社

実証データ

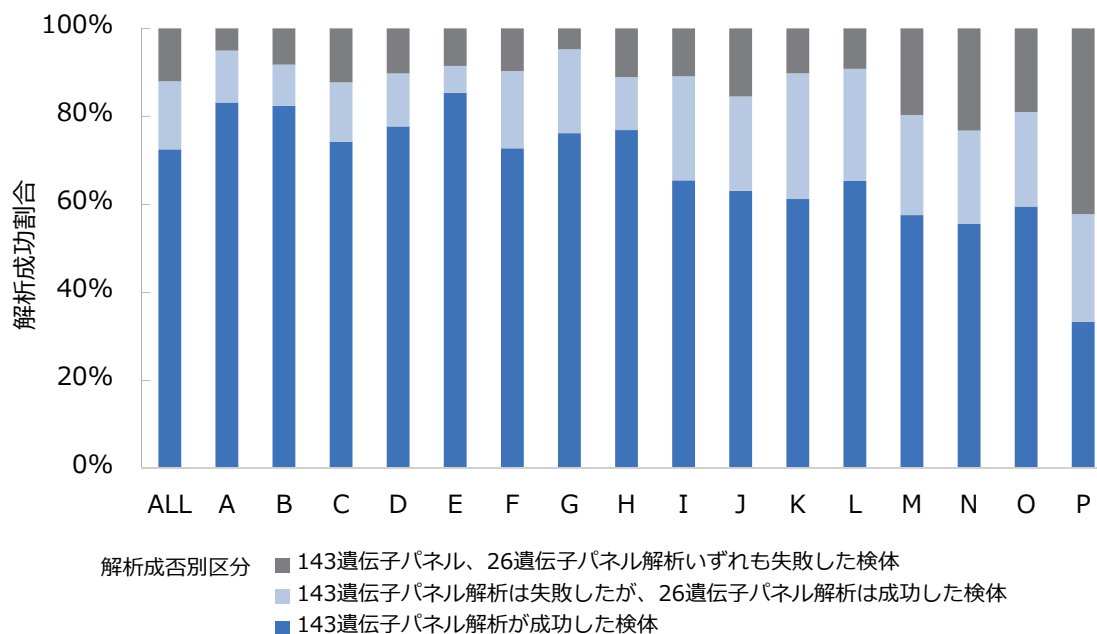
日常診療下で作製されたFFPEブロックの遺伝子パネル検査適用性と核酸品質の施設間差

《内 容》

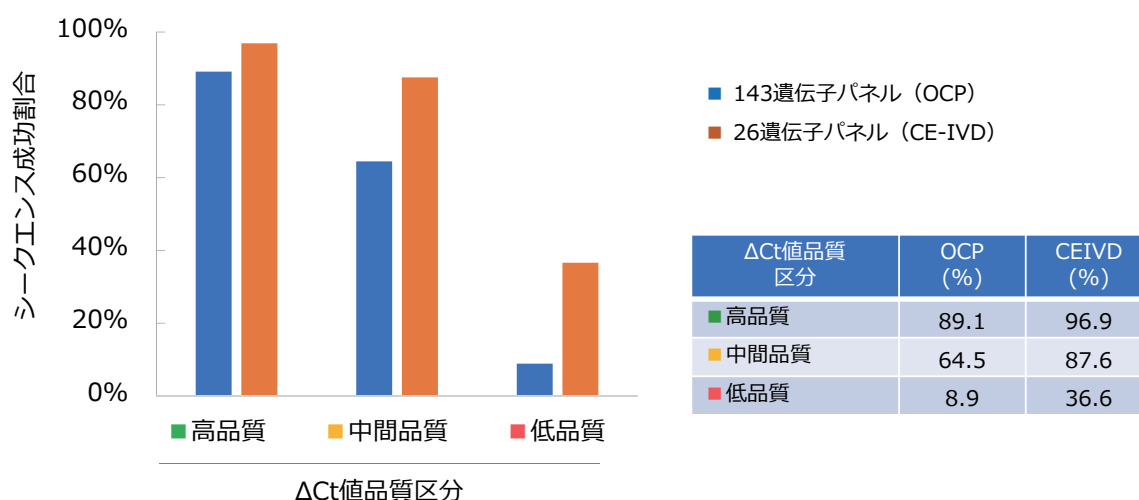
- ・ 国内大規模ゲノムスクリーニング研究プロジェクト SCRUM-Japan/GI-SCREEN 試験参加 20 施設から提出された診療時に作製された消化器癌の FFPE 検体（生検および手術検体）2866 検体のうち、40 症例以上の検体提出を行った施設を対象に解析した。
- ・ FFPE 検体をサーモフィッシャー・サイエンティフィック社の米国 CLIA ラボへ送付し、同ラボの手順書に従った検査が実施された。必要に応じてマニュアル・マイクロダイセクションが実施され、DNA および RNA 抽出後に Δ Ct 値アッセイによる確認が行われた。品質基準を満たした検体を対象に、Ion PGM™ システムを用いたターゲットシーケンシング（Oncomine Cancer Research Panel (OCP; 143 遺伝子）および Oncomine Solid Tumour DNA/Fusion Transcript kit (CE-IVD; 26 遺伝子）；サーモフィッシャーサイエンティフィック社）が行われた。



- Δ Ct 値に基づき検体を3つの区分（高品質，中間品質，低品質）に分類し，Ct 値が得られなかった検体はPCR 増幅不良検体とした。全体（上図；All）では高品質検体が45%，中間品質検体が33%，低品質検体またはPCR他増幅不良検体は21%を占めた。40 症例以上の検体提出を行った16施設における検体品質の施設間差は顕著だった。



- ΔCt 値が得られた検体(高品質, 中間品質, 低品質)における網羅性の高いパネル(143遺伝子パネル)および小型のパネル(26遺伝子パネル)解析での成否については, 前図と同様の結果が得られ, 低品質検体またはPCR他増幅不良検体の割合が大きい施設では, 両パネルの不成功割合も高かった. この集計においても16施設における施設間差は顕著であった. 全体(上図; All)では, 網羅性の高いパネルが成功した検体は73%, 小型のパネルのみが成功した検体が15%, 両パネルが不成功となった検体は12%であった.

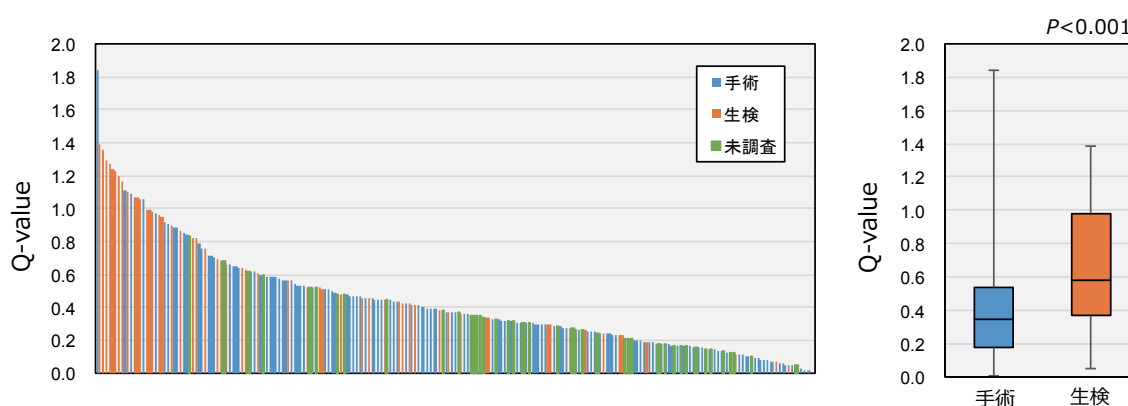


- 各品質区分別のシーケンス成功割合では, 高品質検体では143遺伝子パネルの成功割合は約89%, 26遺伝子パネルでは約97%であった.

日常診療下で作製されたFFPEブロックから得られたDNAの品質

《内 容》

- ・ TOP-GEARプロジェクト第1期（登録期間：2013年4月～2016年5月）において解析対象となった233症例の多がん種のFFPEがん組織検体について、得られたDNAの品質を検討した。
- ・ 本プロジェクトでは、Q-value (qPCR測定DNA量／蛍光法測定二本鎖DNA量)をFFPE検体由来DNAの品質値として用い、手術検体と生検検体を分けて、評価を行った（他院取り寄せ検体のため未調査を含む）。

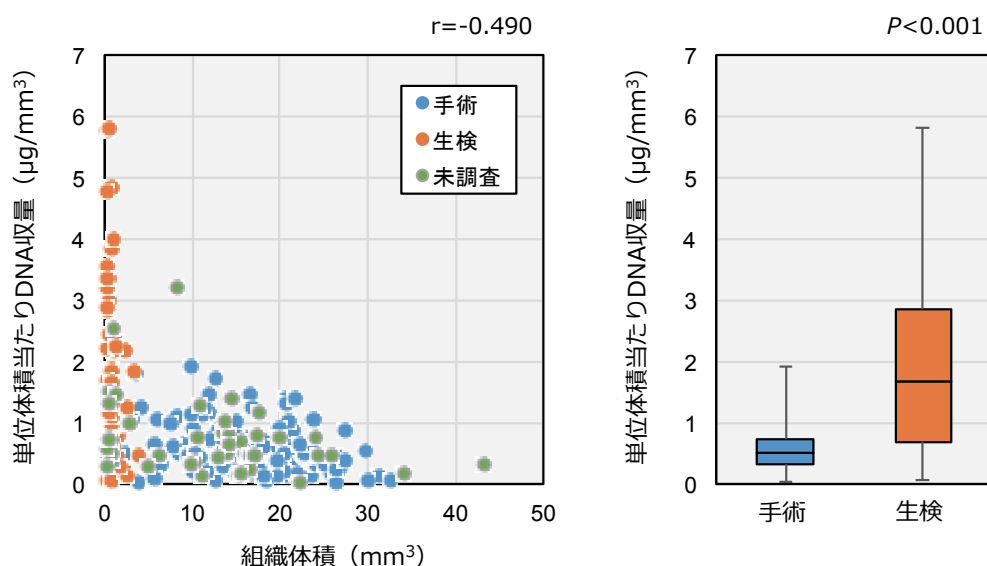


- Q-valueは検体ごとに大きく異なる。手術検体より生検検体の方が、品質が良い傾向が見られた。

日常診療下で作製されたFFPEブロックから得られたDNAの収量

《内 容》

- ・ TOP-GEARプロジェクトの第1期において解析対象となった233症例の多がん種のFFPEがん組織検体について、使用した組織体積と得られたDNA収量を調査した。
- ・ 本プロジェクトにおいては、10 μm $\times$ 5の薄切からキアゲン社のQIAamp DNA FFPE Tissue Kitを用いてDNAを抽出した。組織断面積を計測し、その測定値に50 μm をかけて組織体積を計算し、手術検体と生検検体を分けて評価を行った(他院取り寄せ検体のため未調査を含む)。

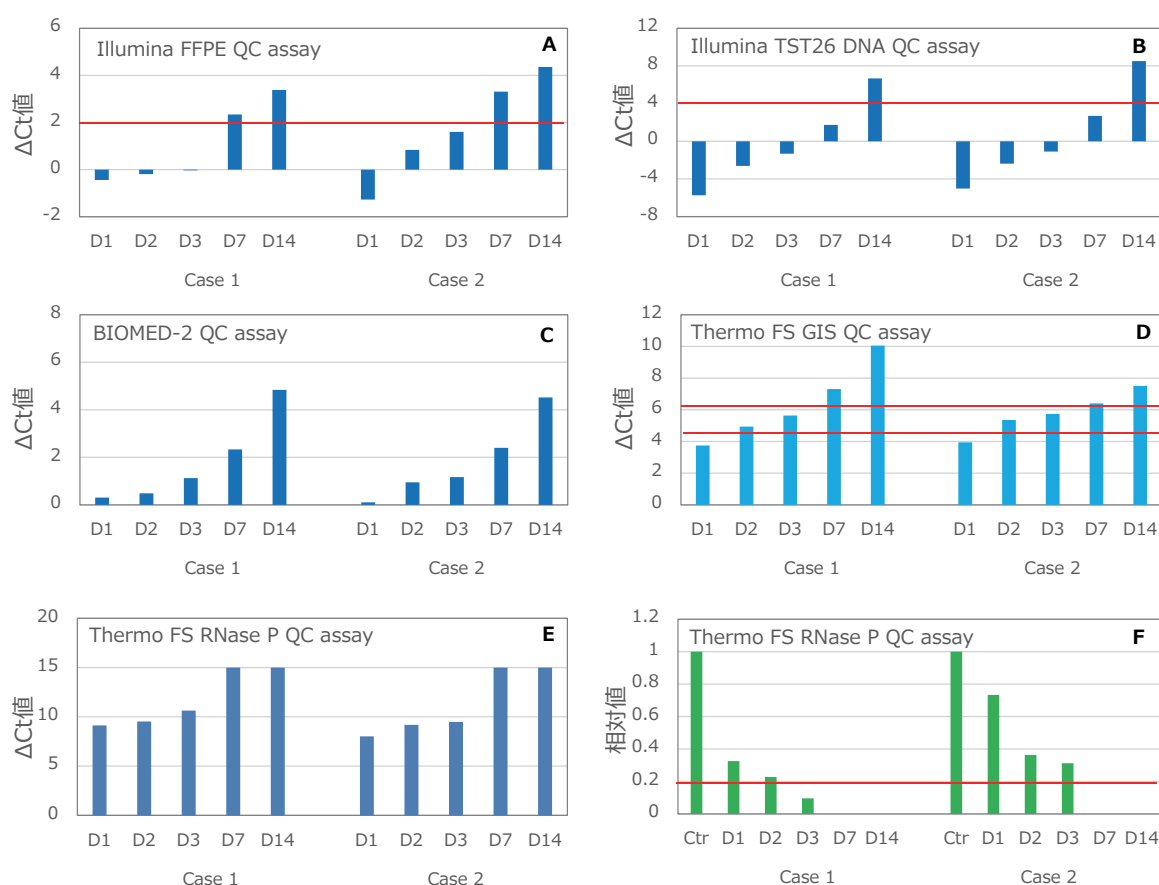


- 単位体積当りのDNA収量は検体ごとに大きく異なる。手術検体より生検検体の方が、単位体積当りのDNA収量が高い傾向が見られた。

ホルマリン固定時間延長が検体品質およびNGS用ライブラリー調製に与える影響

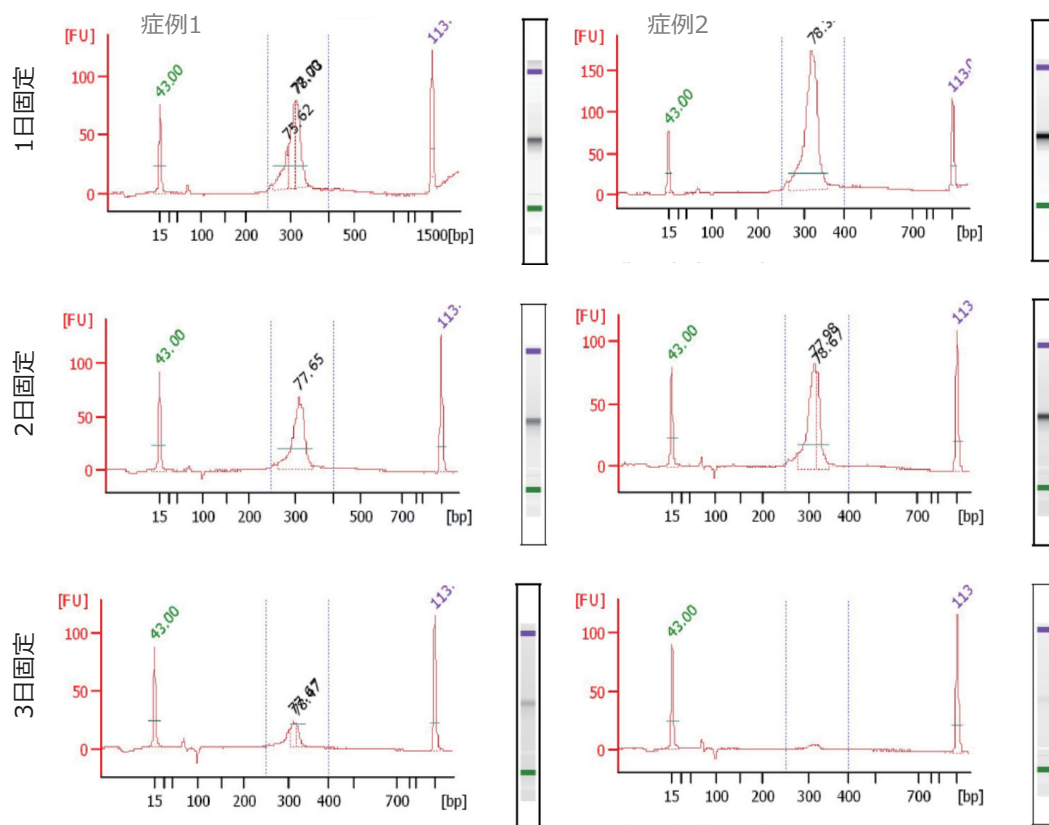
《内 容》

- ・ 単一施設において、切除後のホルマリン固定時間(1, 2, 3, 7および14日)の影響を確認するために精度管理用に作製された大腸癌手術検体を用いて検討した.
- ・ 市販のFFPE 組織用DNA 抽出キット (キアゲン社)を用いてDNA 抽出を行ったのちに, リアルタイムPCR法を用いたDNA 品質の確認を行い, 品質基準を満たした検体を対象に, MiSeq システム(イルミナ社)を用いたアンプリコンシーケンス(TruSeq Amplicon Cancer Panel ; イルミナ社)のライブラリー調製を行った.



- 本遺伝子パネルで使用が推奨されているイルミナ社FFPE QC assayを用いた Δ Ct値測定による品質確認では, 7日および14日固定検体は基準を満たさなかった(A; 赤線はカットオフ). 他のアッセイにおいても同様の結果が得られた(B-F).

- 前述のGI-SCREEN試験では、特定のハウスキーピング遺伝子のアンプリコンサイズの異なるプライマーセットを用いたアッセイにより、3つに区分化（高品質、中間品質、低品質）されている(D)。この検討では、FFPEブロック作製後3年の検体を使用しているが、固定2日間のものでは ΔCt 値は品質区分が中間品質となっている。RNase P遺伝子のアンプリコンサイズの異なるプライマーセットを用いたアッセイでは、通常の ΔCt 値測定ではなく(E)、検量線を利用した指標が推奨されている(F)。各アッセイについては補遺3を参照。



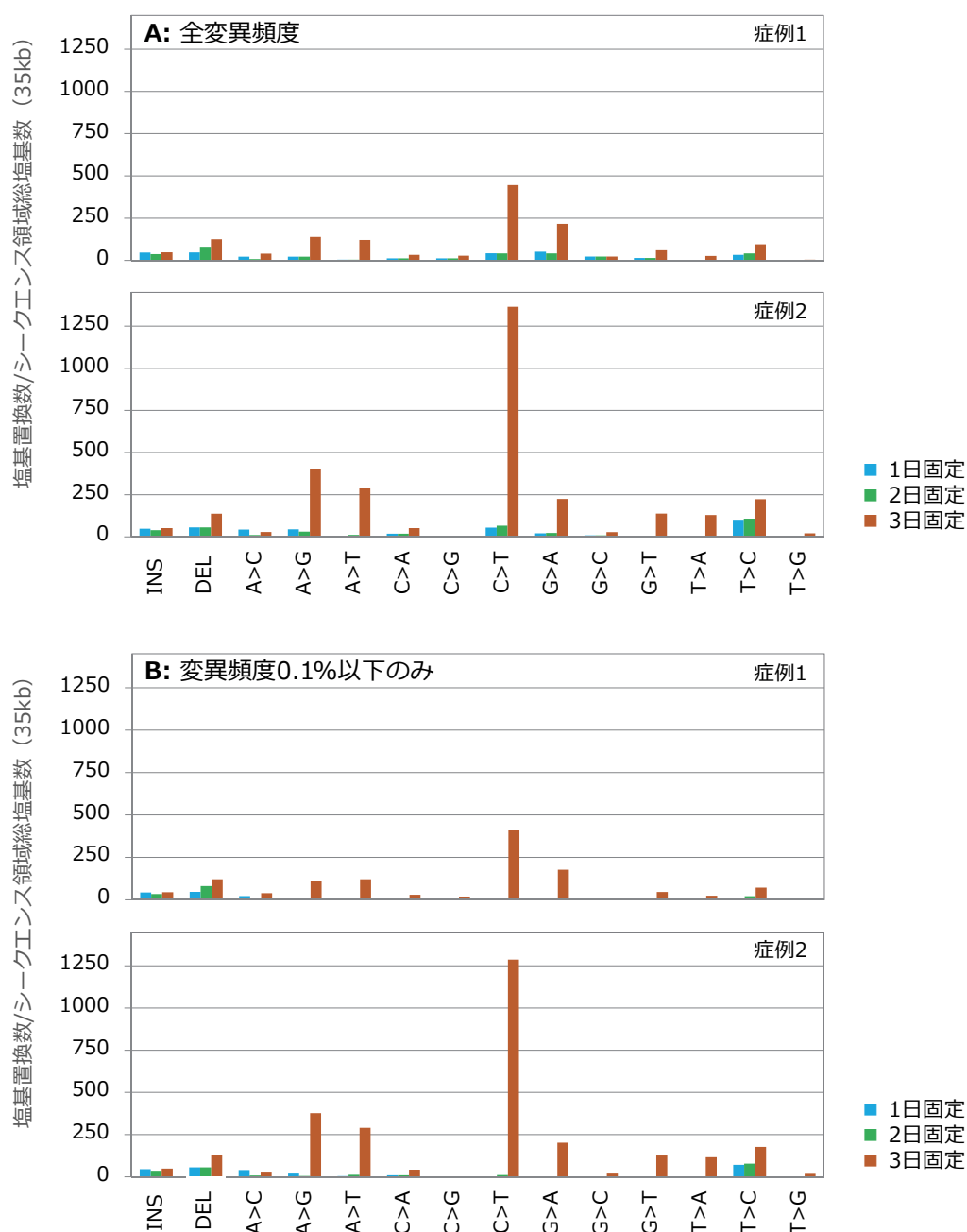
Library QC	Case 1					Case 2				
	D1	D2	D3	D7	D14	D1	D2	D3	D7	D14
Average size [bp]	309	311	311	320	321	315	312	318	312	316
Size distribution [%]	4.7	8.3	9.1	13.4	13.4	6.2	7.3	10.9	12.4	13.6
Concentration [ng/uL]	11.1	9.0	3.9	0.8	1.1	25.7	12.1	1.1	0.5	0.6

- 150ngのDNAを用いてライブラリー調製し、アジレント社の2100 bioanalyzerを用いて、ライブラリー QCの確認を行った。イルミナ社FFPE QC assayによる ΔCt 値測定の品質確認で検体QCの基準に満たなかった7日固定および14日固定検体では、ピークが観察されなかった。1日、2日、3日固定検体では、すべての検体においてピークが確認されシーケンス結果が得られたが、症例2の3日固定検体のピークは微小であった。

ホルマリン固定時間延長による塩基置換アーティファクト生成への影響

《内 容》

- ・ TruSeq Amplicon Cancer Panel(イルミナ社)を用いたアンプリコンシークエンスによる解析を、1、2および3日間固定した2症例の大腸癌手術検体を用いて検討した。
- ・ サンプル調製に関する詳細は実証データ④を参照。



-
- ΔC_t 値等を指標にDNA 品質を検討したところ、7日固定および14日固定検体は当該遺伝子パネル使用上の品質基準を満たさず、またライブラリー作製が不成功となったため、本検討では1日、2日および3日固定検体のみを用いた。
 - 得られたシーケンスデータの解析を行ったところ、固定1～3日の間で、総リード数、リード深度に大きな偏りは認められなかった。
 - 本遺伝子パネルのシーケンス領域の総塩基数(35kb)における各タイプの塩基変化数を解析したところ、C>T置換をはじめ、A>G置換、A>T置換などの塩基変化数の増加が、ホルマリン固定3日目から急速に顕著になった(A)。固定によるアーティファクト変化である可能性が高いと判断される変異頻度が0.1%以下のものに絞り、再解析をおこなったところ、塩基変化数は全塩基変化数(A)と近似した数となった(B)。

ホルマリン固定時間延長による総リード数への影響

《内 容》

- ・ 2種の小型遺伝子パネル (GeneRead Actionable Insight Tumor Panel (12 遺伝子) [AIT12]; キアゲン社および TruSight Tumor 15 Kit (15 遺伝子) [TST15]; イルミナ社)を用いたアンプリコンシークエンスによる解析を, 1日, 3日および7日固定を施した4検体(大腸癌2例, 肺癌1例, 胃消化管間質腫瘍(GIST)1例)を用いて検討した.
- ・ TST15についてはリアルタイムPCR法を用いたDNA品質の確認を行い, 品質基準を満たしていることを確認し, 解析を行った(実証データ④ - 検体QCチェックデータB).
- ・ AIT12を用いた遺伝子変異パネル解析では40ngのdsDNAを用いてライブラリー作製を行い, ライブラリー QCを行った後に, GeneReader システム(キアゲン社)で解析を行った.
- ・ TST15を用いた遺伝子変異パネル解析では20ngのdsDNAを用いてライブラリー作製を行い, ライブラリー QCを行った後に, MiSeq システム(イルミナ社)で解析を行った.

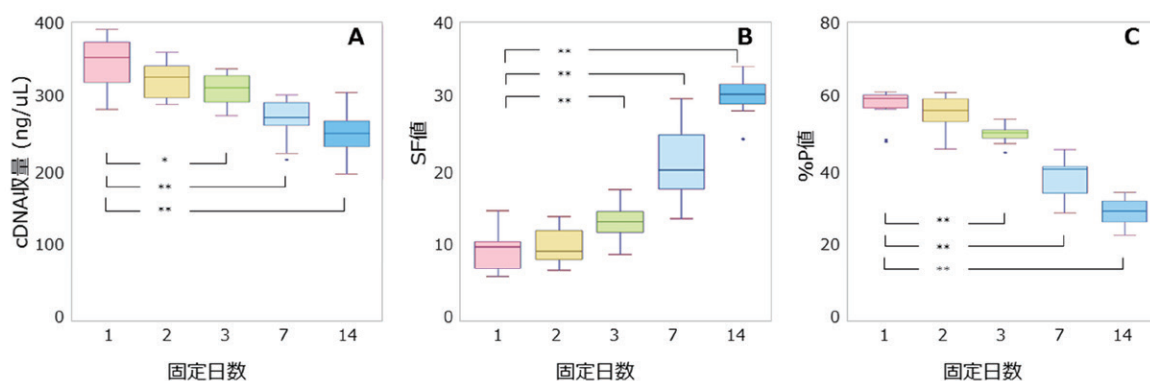


-
- いずれの小型遺伝子パネルにおいても、1～7日固定検体での解析が可能であり、核酸品質が低いFFPE検体に対して特に有用であることが推察された。一方、総リード数は、ホルマリン固定時間が延長するに従い、減少した。なお、固定時間延長に伴う総リード数の減少は、使用する遺伝子パネルによってその影響の度合いは異なる。

ホルマリン固定時間がマイクロアレイ測定へ与える影響

《内 容》

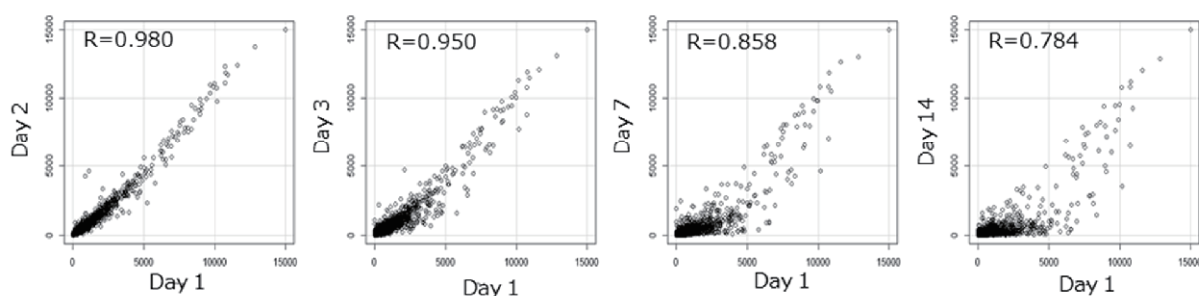
- ・ 乳癌再発予後予測検査で使用されているマイクロアレイ法 (GeneChip Human Genome U133 + 2.0 arrays; アフィメトリクス社) における固定の影響を検討するため、1, 2, 3, 7 および 14 日固定を施した乳癌検体 (11 例) を用いて検討した。
- ・ 各検体から抽出された RNA 100ng を用いて cDNA の合成を行い、その収量確認を行った後に、マイクロアレイへのハイブリダイゼーション及び蛍光強度の検出を実施した。



- 逆転写反応後の cDNA の収量、マイクロアレイの QC 項目である SF 値^{*1} および %P 値^{*2} について検討を行ったところ、いずれの項目においても、3 日固定以降有意な変化が認められた (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

*1 全プローブ発現量の平均蛍光強度を反映する値であり、平均蛍光強度を一定の値まで補正するための係数で示される。高値はアレイが暗いことを意味し、サンプル品質や手順等に問題があり、適切に測定できていないことを表す。

*2 全プローブのうち発現しているプローブの割合であり、一定割合以下の場合には適切に測定できていない可能性が高く、マイクロアレイデータの信頼性が低いことを表す。

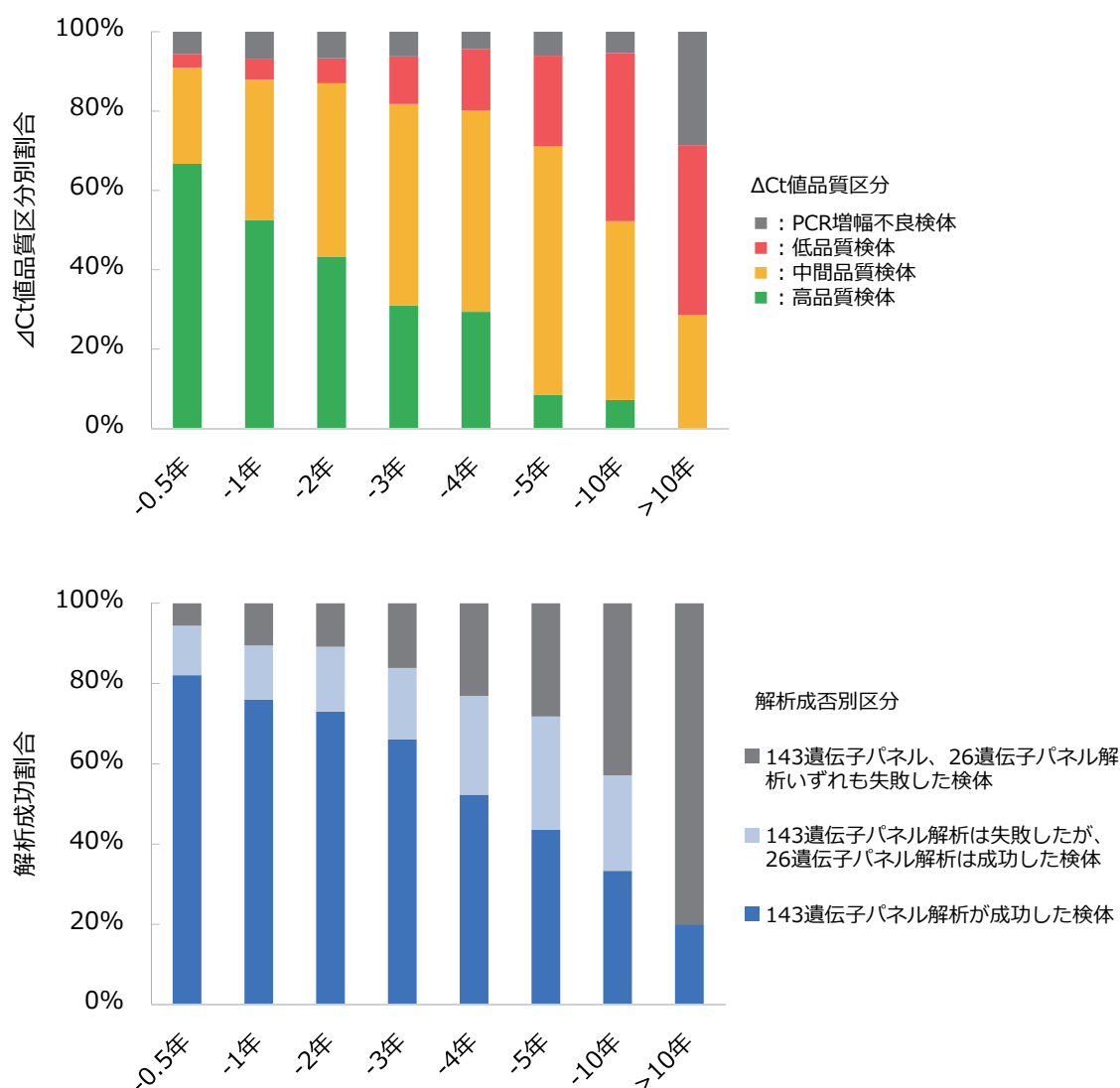


-
- マイクロアレイ全体のプローブ発現量に与える影響について、固定時間1日を対照とした相関解析を実施したところ、固定時間延長に伴い相関係数が低下し、とくに発現量の低いプローブの相関が著しく低下した。

FFPE ブロック保管期間がDNA 品質に与える影響

《内 容》

- ・ GI-SCREEN 試験参加 20 施設から提出された診療時に作製された消化器癌のFFPE 検体（生検および手術検体）のうちパネル解析が実施された 2668 検体を対象に調査した。
- ・ サンプル調製の詳細は実証データ①を参照。

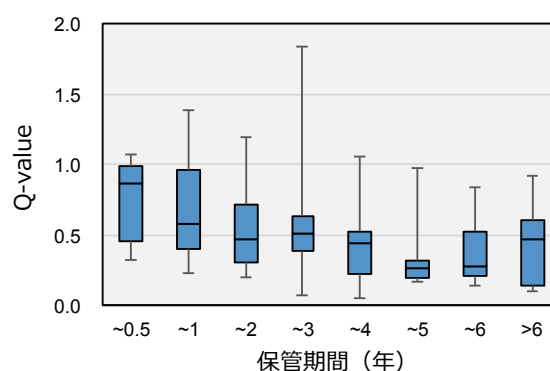
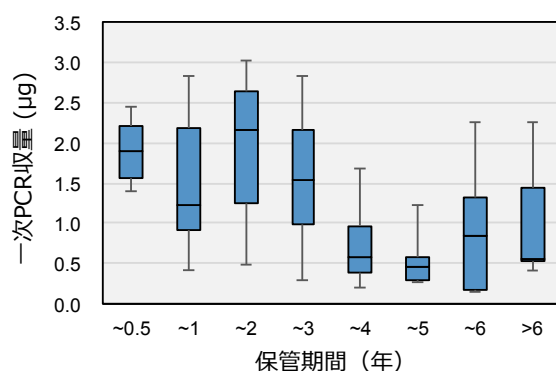


- 高品質検体の割合は、経年的に低下する一方、低品質検体の割合は増加した(上図)。また解析の成否についても同様の傾向が認められた(下図)。

FFPE ブロック保管期間がDNA 品質に与える影響

《内 容》

- ・ TOP-GEARプロジェクト第1期前半において実際にNCCオンコパネル解析を行った131症例のFFPEがん組織検体について、パラフィンプロックの保管期間の影響を検討した。
- ・ これらの情報が得られた検体について、一次PCR収量及びQ-valueと比較した。一次PCR収量については、SureSelect XT Reagents単独でNGSライブラリーを調製した検体に限定した。

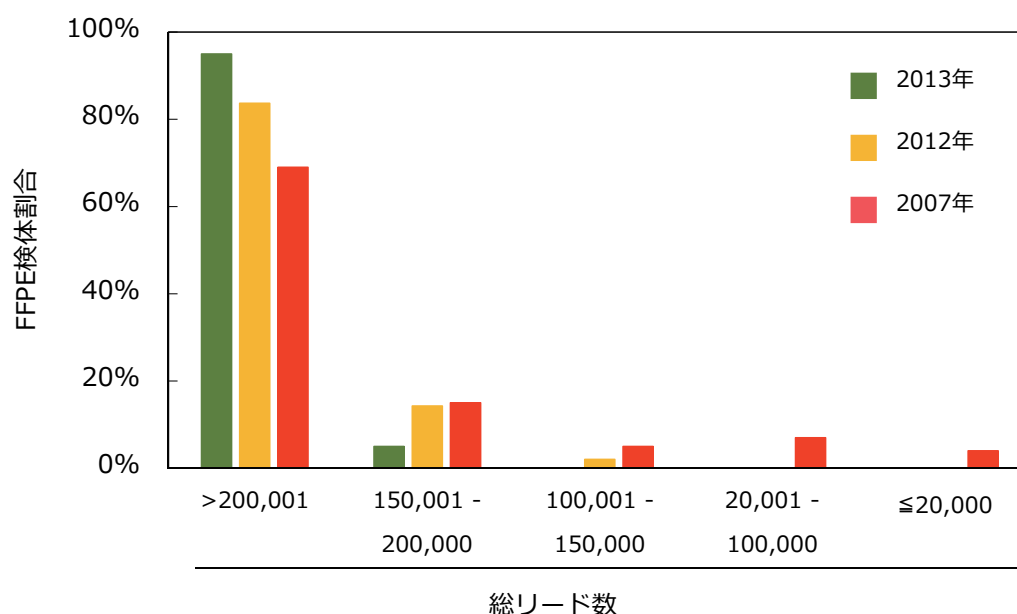


- FFPE 検体由来DNAの一次PCR収量及びQ-valueは、パラフィンプロックの保管期間と一定の相関を示した。FFPE 検体の長期保管が、DNAの品質不良を引き起こすと考えられた。

FFPE ブロック保管期間がRNA 品質(総リード数)に与える影響

《内 容》

- ・ 非小細胞肺癌169症例のFFPE組織検体から抽出したRNAを用いて検討した。使用したFFPEブロックの作製年は、100検体が2007年、49検体が2012年、20検体が2013年であった。
- ・ 半導体シーケンサー Ion PGMシステムを用いて、Ion AmpliSeq™ RNA Fusion Lung Cancer Research Panel（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）でのアンプリコンシーケンシングを行った(測定解析は2014年に実施)。

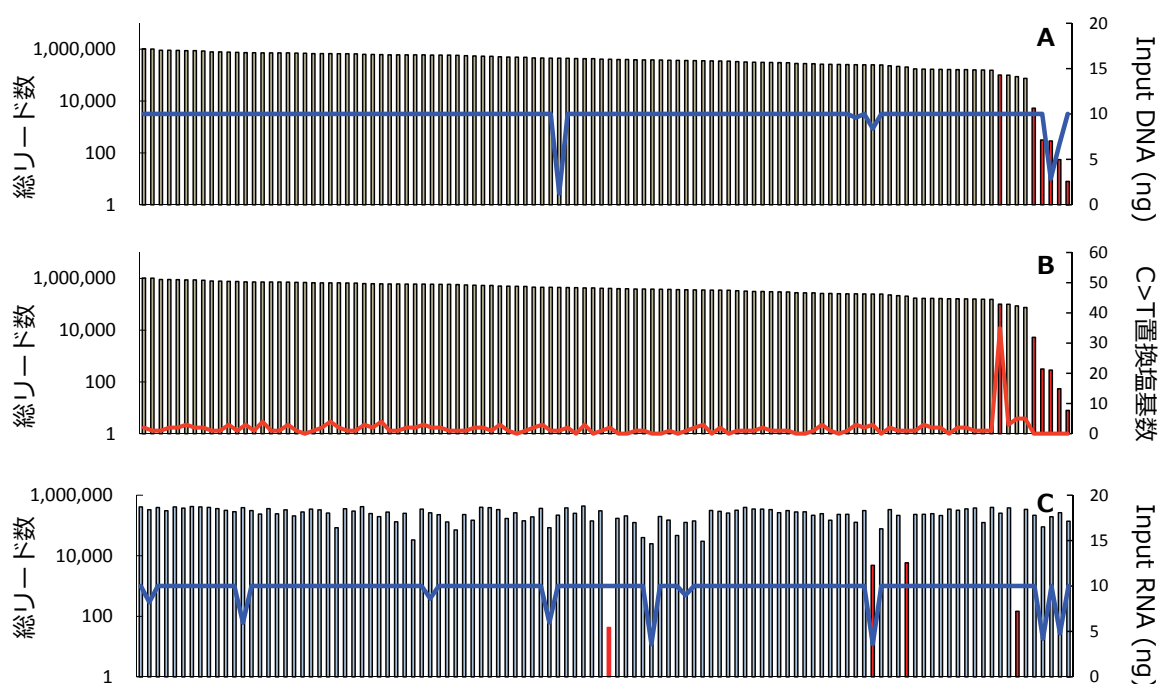


- 本融合遺伝子解析パネルにおける総リード数の中央値は、2013年作製のブロックでは288,838(最小値157,085－最大値431,332)、2012年作製ブロックでは257,516(最小値149,998－最大値435,890)、2007年作製ブロックでは282,887(最小値4,987－最大値562,580)であった。
- 169検体のうち、総リード数が20,000以下となり評価困難と判断された4例はすべて2007年作製ブロックであった。2007年作製ブロックは、2012年や2013年に比べて取得リード数の低下が認められ、経年劣化の影響が考えられた。

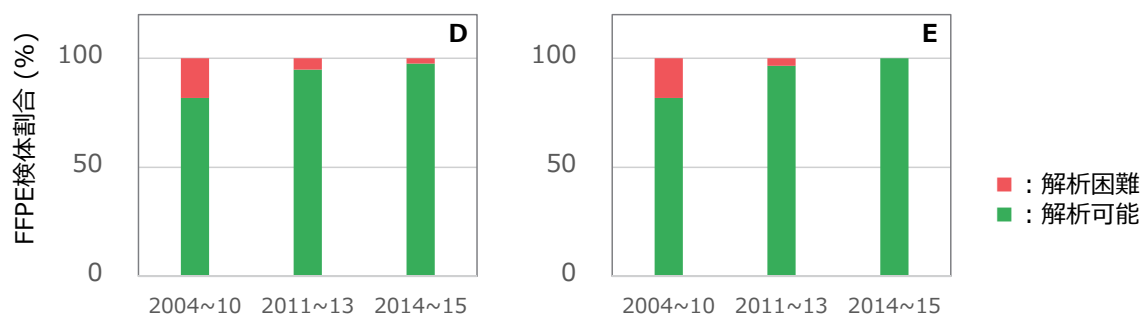
FFPE ブロック保管期間がDNAおよびRNA 品質(リード数)に与える影響

《内 容》

- ・ 非小細胞肺癌110症例のFFPE検体からDNAおよびRNAを抽出した。DNAおよびRNAは、PicoGreen dsDNA 定量試薬およびPicoGreen RNA 定量試薬（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）を用いて定量した。アンプリコンシーケンスでの遺伝子変異解析および融合遺伝子解析には、DNA、RNAともに最大10 ngを使用した。
- ・ Ion PGMシステムを用いて、DNAよりIon AmpliSeq™ Colon and Lung Cancer Panel、RNAよりIon AmpliSeq™ RNA Fusion Lung Cancer Research Panel（サーモフィッシャーサイエンティフィック社）でのアンプリコンシーケンスを行った（測定解析は2014年～2015年に実施）。



- DNAを用いた遺伝子変異パネル解析では、総リード数の中央値は412,715であった。110検体のうち、5検体で総リード数が50,000以下となり、また1検体で十分な総リード数が得られたものの、C>T置換数が35と高い値を示し、解析困難と判定された(A, B)。
- RNAを用いた融合遺伝子パネル解析では、総リード数の中央値256,836であった。110検体のうち、4検体で総リード数が20,000以下となり、解析困難と判定された(C)。

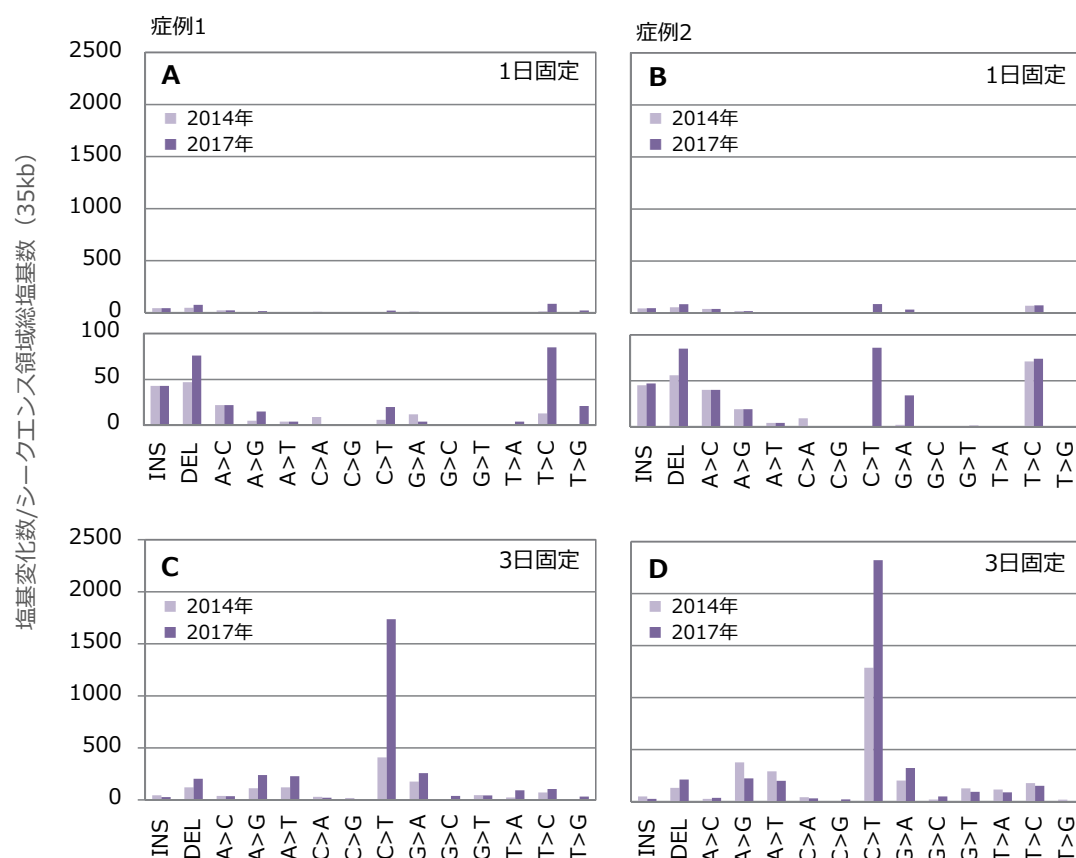


- DNAを用いた遺伝子変異パネル解析において、解析実施年から4年以上経過（2004～2010年に作製）したFFPE検体では解析成功率は81.8%（n=11）、3年以内（2011～2013年に作製）の検体では94.8%（n=58）、解析実施年（2014～2015年に作製）の検体では97.6%（n=41）であった（D）。
- RNAを用いた融合遺伝子パネル解析において、解析実施年から4年以上経過（2004～2010年に作製）したFFPE検体では解析成功率は81.8%（n=11）、3年以内（2011～2013年に作製）の検体では96.6%（n=58）、解析実施年（2014～2015年に作製）の検体では100%（n=41）であった（E）。

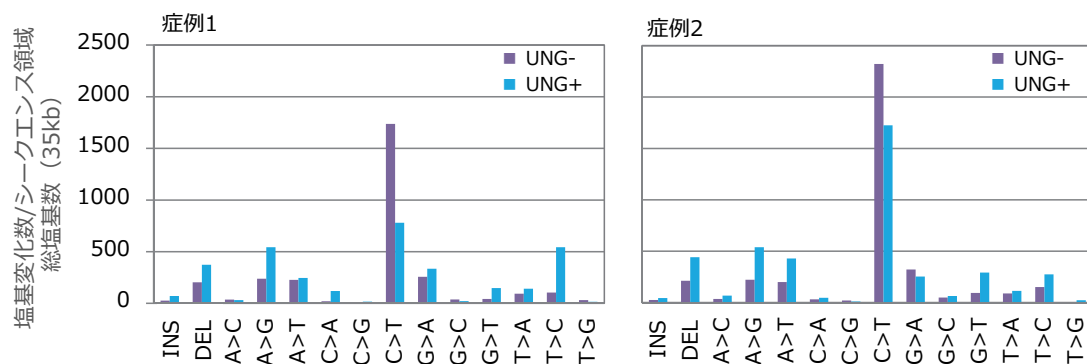
FFPE ブロックの保管期間延長による塩基置換アーティファクトの生成とUNG 処理によるアーティファクトの除去効果

《内 容》

- ・ 1日および3日固定を施した2症例の大腸癌手術検体を対象に TruSeq Amplicon Cancer Panel(イルミナ社)を用いたアンプリコンシーケンスによる解析を実施した。解析は2014年(FFPE ブロック作製直後)および2017年(作製3年後)の2回実施した。
- ・ 2017年に実施した解析では、UNG 処理の効果を確認するため、3日固定検体を用いて、2種の核酸抽出キット(QIAamp DNA FFPE Tissue Kit [処理なし]およびGeneRead DNA FFPE Kit [処理あり]; キアゲン社)を用いた比較検討を行った。



- 1日および3日固定検体ともに、長期保管期間により、各塩基変化アーティファクトが増加し、特に C>T 置換では顕著であった (A, B の下図は、上図の拡大)。長期保管期間により増加した塩基変化数は、保管当初の塩基変化数に比例していた。



- UNG 処理の有無のキット間比較においては、処理なし(UNG-)に比べ、処理あり(UNG+)の検体で、C>T 置換塩基数が低減した。一方、T>C 置換など一部の置換種では置換塩基数が増加した。総リード数および平均リード深度は、UNG+で8倍以上高くなったことから、すでに報告されているように UNG 処理により、DNA 品質の改善が期待されるが、効果が一様ではないことから、実施にあたっては事前検討により効果の程度を確認し、UNG 処理の要否を判断することが望ましい。

A. 研究用規程(ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程)

日本病理学会・ゲノム病理診断検討委員会/ゲノム病理組織取扱い規約委員会作成, 2016年
<http://pathology.or.jp/genome/>

1. 第3部「摘出から固定まで」推奨記載および実証データ①: 固定までの時間・固定時間・ホルマリンの種類と濃度のDNAの品質に対する影響
2. 第3部「固定液の濃度と種類」推奨記載および実証データ②: 固定時間・ホルマリンの種類と濃度のDNAの品質に対する影響
3. 第3部「固定時間」推奨記載および実証データ⑧: 固定時間・ホルマリンの種類と濃度のDNAの品質に対する影響
4. 第3部「固定液の濃度と種類」推奨記載および実証データ⑤: ホルマリンを含まない固定液のゲノムDNAの品質への影響
5. 第3部「脱灰」推奨記載および実証データ⑫: 脱灰方法のゲノムDNAの品質に対する影響

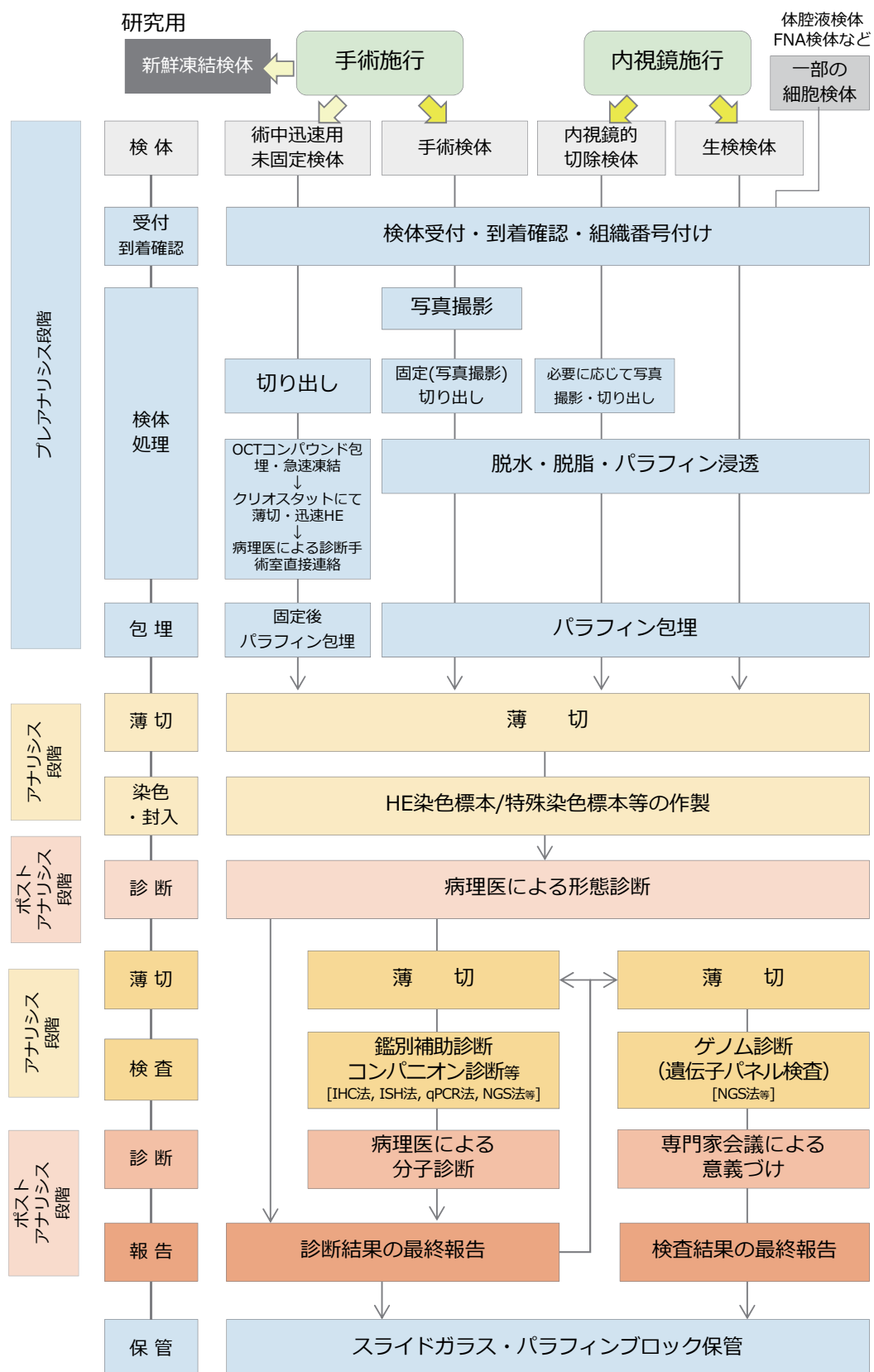
B. 文 献

1. 日本臨床腫瘍学会, 日本癌治療学会, 日本癌学会合同・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作成ワーキンググループ作成: 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1.0版), 2017年.
2. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Clin Oncol. 2010; 28: 2784-95.
3. Khoury T, Sait S, Hwang H, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Mod Pathol. 2009; 22: 1457-67.
4. Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. Am J Pathol. 2002; 161: 1961-1971.
5. 平成28年度 日本医療研究開発機構 (AMED) 調整費研究事業「オミックス研究用生体試料の取扱いに関する報告書(2017年8月1日版)」, 2017年
6. 平成27年度 厚生労働科学研究費補助金「先端的がん医療実施のための地域完結型病理診断および臨床・病理連携ネットワークの構築に関する研究一分担研究報告書」, 2016年

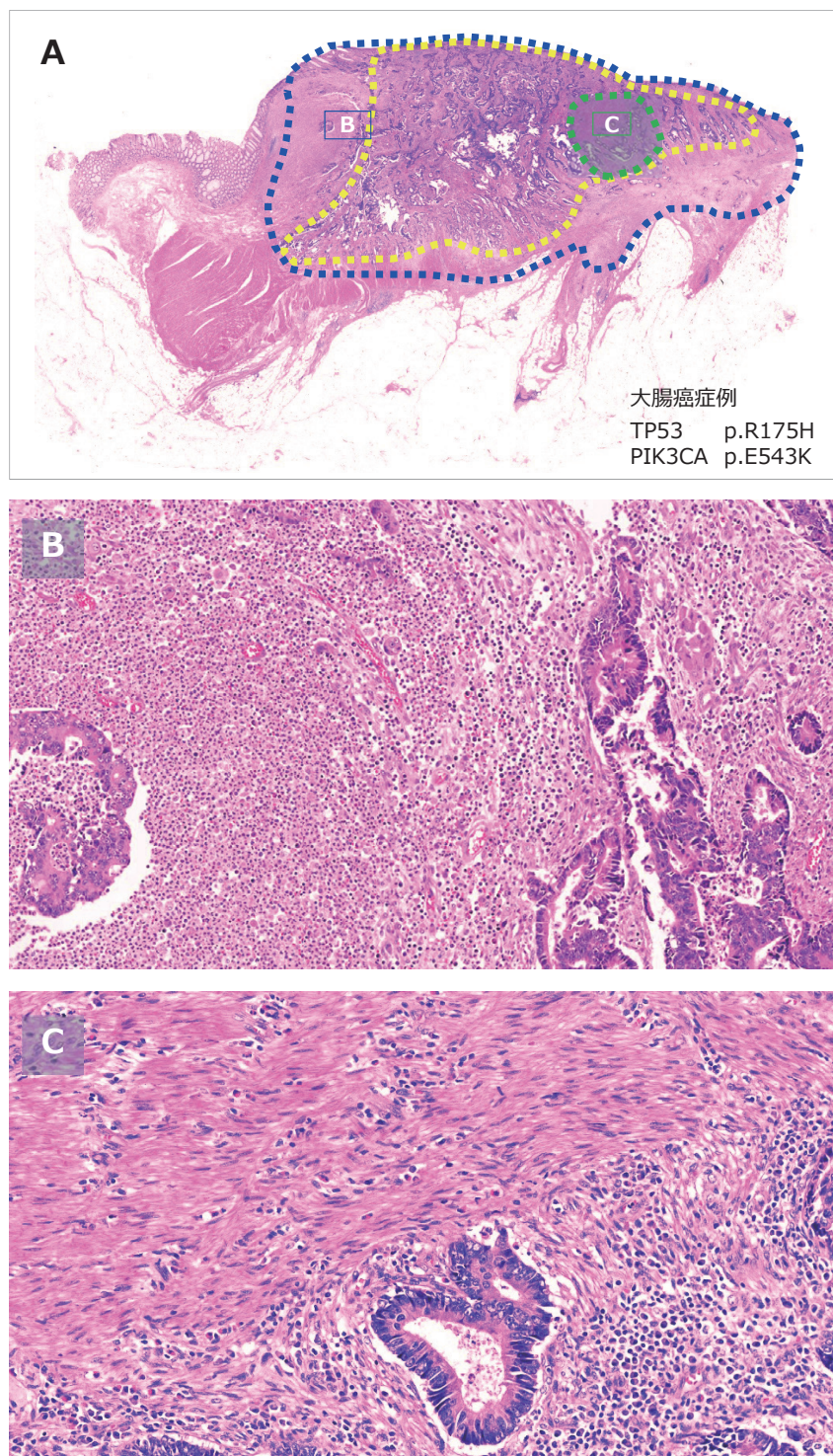
-
7. Sato M, Kojima M, Nagatsuma AK, et al. Optimal fixation for total preanalytic phase evaluation in pathology laboratories: a comprehensive study including immunohistochemistry, DNA, and mRNA assays. *Pathol Int.* 2014; 64: 209-16
 8. 日本病理学会 編：胃癌・乳癌 HER2 病理診断ガイドライン(第1版). 金原出版. 2015 年
 9. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. *J Clin Oncol.* 2013; 31: 3997-4013.
 10. 日本肺癌学会 バイオマーカー委員会作成:肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き(第3.05 版). 2016 年.
 11. 日本肺癌学会 バイオマーカー委員会作成：肺癌患者における ALK 融合遺伝子検査の手引き (第2.1 版). 2015 年.
 12. Lindeman NI, Cagle PT, Beasley MB, 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.* 2013; 8: 823-859.
 13. 日本肺癌学会 バイオマーカー委員会作成：肺癌患者における ROS1 融合遺伝子検査の手引き (第 1.0 版). 2017 年.
 14. 日本肺癌学会 バイオマーカー委員会作成：肺癌患者における PD-L1 検査の手引き (第 1.0 版). 2017 年.
 15. 日本臨床腫瘍学会 編：大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイダンス(第3版). 2016 年.
 16. Williams C, Pontén F, Moberg C, et al. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol.* 1999; 155: 1467-71.
 17. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem.* 2015; 61: 64-71.
 18. von Ahlffen, Missel A, Bendrat K, et al. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One.* 2007; 2: e1261.
 19. Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol.* 2014; 67: 923-31.

-
20. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, et al. Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing–Based Oncology Panels : A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn.* 2017; 19: 341–365.
 21. Chen H, Luthra R, Goswami RS, et al. Analysis of Pre-Analytic Factors Affecting the Success of Clinical Next-Generation Sequencing of Solid Organ Malignancies. *Cancers.* 2015; 7: 1699–1715.
 22. New York State Department of Health. "Next Generation" Sequencing (NGS) guidelines for somatic genetic variant detection. 2016; Updated and Revised.
 23. Janecka A, Adamczyk A, Gasińska A. Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Anal Biochem.* 2015; 476 :8-10.
 24. Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, et al. DNA Qualification Workflow for Next Generation Sequencing of Histopathological Samples PLoS ONE. 2013; 8: e62692.
 25. Yoishino T. SCRUM-Japan GI-SCREEN: The nationwide cancer genome screening projects for gastrointestinal cancer in Japan. *Annals of Oncology* 26 (Suppl 7): vii5, 2015.
 26. Tanabe Y, Ichikawa H, Kohno T, et al. Comprehensive screening of target molecules by next-generation sequencing in patients with malignant solid tumors: guiding entry into phase I clinical trials. *Mol Cancer.* 2016; 15: 73.

補遺1：病理部門におけるFFPE検体の作製と分子診断・ゲノム診断での使用の流れ



補遺2：ゲノム診断利用のためのHE染色標本のマーキング例



(A) 大腸癌標本の全体像。青線；腫瘍細胞が広がっている範囲。黄線；ゲノム診断に用いる範囲。緑線；一部トリミングがのぞましい範囲。(B) 腫瘍細胞塊がみられるものの好中球が多数存在するため使用は避ける。(C) 腫瘍細胞がみられるものの、形質細胞や筋層など非腫瘍細胞が多く存在することから使用は避ける。

本規程の冊子版の配布および英語版の公開は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 委託事業「産学連携全国がんゲノムスクリーニング事業 SCRUM-Japan で組織した 遺伝子スクリーニング基盤を利用した、多施設多職種専門家から構成された Expert Panel による全国共通遺伝子解析・診断システムの構築および研修プログラムの開発」平成 29 年度 調整費によるグラントサポートを受け、行われたものである。

ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程

平成30年3月1日 初版発行

発行人 一般社団法人 日本病理学会
理事長 深山正久

〒113-0034 東京都文京区湯島1-2-5 聖堂前ビル7階

TEL 03-6206-9070

FAX 03-6206-9077

<http://pathology.or.jp/>

E-mail: jsp-admin@umin.ac.jp

「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」は、ホームページにも掲載しております。



The Japanese Society of Pathology

<http://pathology.or.jp/>