

ORIGINAL ARTICLE

肺手術検体からマルチプレックス遺伝子検査解析を成功させるための検体処理方法に関する探索的研究

松浦陽介¹・内堀 健²・二宮浩範³・一瀬淳二¹・
中尾将之¹・奥村 栄¹・西尾誠人²・文 敏景¹

An Exploratory Study of Specimen Processing Methods for Successful Multiplex Genetic Analyses Using Lung Surgical Specimens

Yosuke Matsuura¹; Ken Uchibori²; Hironori Ninomiya³; Junji Ichinose¹; Masayuki Nakao¹; Sakae Okumura¹; Makoto Nishio²; Mingyon Mun¹

¹Department of Thoracic Surgical Oncology, ²Department of Thoracic Medical Oncology, Cancer Institute Hospital, Japanese Foundation for Cancer Research, Japan; ³Division of Pathology, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Japan.

ABSTRACT — **Objective.** Perioperative treatment of non-small cell lung cancer is becoming more precise, and multiplex genetic analyses using next generation sequencing will inevitably be required even for surgical cases. Appropriate specimen processing is important for successful multiplex genetic analyses of surgical specimens. We therefore validated the specimen processing method for lung surgery at our hospital and obtained indicators that should be observed for successful multiplex genetic analyses from surgical specimens. **Methods.** Thirty patients with clinical stage IA3-IIIa non-small cell lung cancer scheduled for surgery were prospectively enrolled. Rapid intraoperative specimens were fixed in 10% formalin and surgical specimens in 20% formalin, and each was submitted to the OncoPrint™ Dx Target Test® Multi-CDx System (ODxTT). The success rate of the ODxTT analysis of each specimen and the quantity of nucleic acids extracted from each specimen were compared. The correlation between the quantity of nucleic acids extracted from the surgical specimens and the time required for the specimen processing process was also evaluated. **Results.** The success rate of the ODxTT analysis was 100% for both specimens. The extracted quantities of nucleic acids of both DNA and RNA were significantly higher in the surgical specimens than the rapid intraoperative specimens. No significant correlation was observed between the quantity of nucleic acids and the time required for specimen processing. **Conclusion.** The success rate of the ODxTT analysis was 100% for lung surgical specimens fixed in 20% formalin. The use of 20% formalin may be considered in institutions where it is difficult to process surgical specimens as recommended.

(JLCC. 2024;64:11-16)

KEY WORDS — Non-small cell lung cancer, Next generation sequencing, OncoPrint™ Dx Target Test®, Surgical specimens, Quantity of nucleic acid

Corresponding author: Yosuke Matsuura.

Received September 26, 2023; accepted October 17, 2023.

要旨 — **目的.** 非小細胞肺癌の周術期治療は個別化に向かい、今後は手術症例でも、次世代シーケンサーを用いたマルチプレックス遺伝子検査が求められる。手術検体からマルチプレックス遺伝子検査を成功させるためには適切な検体処理が重要となる。そこで本研究では、当院の肺手術検体処理方法を検証し、手術検体からマルチ

プレックス遺伝子検査を成功させるための指標を得ることを目的とした。**方法.** 手術予定の臨床病期 IA3~IIIa 期非小細胞肺癌 30 症例を前向きに検討した。各症例の迅速病理診断用検体を 10% ホルマリン、手術検体を 20% ホルマリンで固定し、各々をオンコマイン™ Dx Target Test® マルチ CDx システム (ODxTT) に提出した。各検

がん研究会 有明病院呼吸器センター ¹外科, ²内科; ³がん研究会がん研究所病理部。

論文責任者: 松浦陽介。

受付日: 2023 年 9 月 26 日, 採択日: 2023 年 10 月 17 日。

体の ODxTT の解析成功率、各検体から抽出された核酸濃度を比較した。また、手術検体から抽出された核酸量と検体処理行程に要した時間との相関を評価した。**結果**。いずれの検体も ODxTT の解析成功率は 100% であった。抽出された核酸濃度は、DNA、RNA 共に手術検体の方が有意に高値であった。核酸量と検体処理行程に

要した時間とは有意な相関は認められなかった。**結論**。20%ホルマリンで固定した肺手術検体でも ODxTT は解析成功率 100% であり、推奨通りの処理が難しい施設では、その使用が検討され得る。

索引用語——非小細胞肺癌、次世代シーケンシング、オンコマイン™ Dx Target Test®, 手術検体、核酸量

目 的

ADAURA 試験の結果を基に、オシメルチニブが epidermal growth factor receptor (EGFR) 変異陽性非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC) に対する術後補助化学療法として承認された。^{1,2} ALINA 試験や LIBRETTO-432 試験など他のドライバー遺伝子変異を標的とした術後補助化学療法の治験も進行中で、NSCLC は周術期も個別化治療の時代となりつつある。今後は手術症例においても、次世代シーケンサー (next generation sequencer, NGS) を用いたマルチプレックス遺伝子検査が求められることは必至である。手術検体は生検検体よりも検体量の確保が容易ではあるが、マルチプレックス遺伝子検査解析の成功には適切な検体処理が重要とされる。日本病理学会ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程では「臓器摘出後室温に 30 分以上放置することは極力避け、可及的速やかに 4°C 以下で冷所保存し、1 時間以内、遅くとも 3 時間以内に 10% 中性緩衝ホルマリン (neutral-buffered formalin, NBF) で固定を行い、固定時間は DNA・タンパク質検出には 6~48 時間・RNA 検出には 18~36 時間とすること」とある。³ 他方、同ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程には「DNA を用いた解析を主眼とする場合は 10% NBF を固定に用いることが望ましいが、RNA を用いた解析には、20% NBF を用いて十分な固定を行う方が良好な解析結果が得られる場合があり、試料活用研究の目的に応じて、固定条件を選択すべき」とある。⁴ 実際、10% NBF 固定では、検体が大きいほどリボスクレアーゼが完全に失活せず RNA の解析不成功率が増加する報告があり、⁵ これは、他癌種よりもコンパニオン診断に RNA を対象分子とする遺伝子が多い NSCLC では懸念事項といえる。³

当院では、肺手術検体の処理を外科医が行い、固定不良防止のため現在も 20% NBF を用いている。また、治験など固定条件が限定される場合に備え術中迅速病理診断用検体 (以下、迅速検体) の一部を 10% NBF で固定している。本研究ではその工程を検証し、手術検体を用いてマルチプレックス遺伝子検査を成功させるための指標を得ることを目的とした。

当院での肺手術検体処理行程 (Figure 1)

①肺を摘出後、手術室で腫瘍部へ入割し、迅速検体、研究用検体を採取する (Figure 1A, 1B)。

②迅速検体の一部は直ちに 10% NBF に浸け、翌診療日、すなわち月~木曜日の検体は翌日まで (24 時間以内)、金曜日の検体は翌月曜日まで (72 時間以内) 固定する。

③摘出肺は病理部へ運ばれ、患者家族へ術後説明がなされるまでは庫内温度 2~4°C の冷蔵庫で冷所保存する (Figure 1C~1F)。

④術後説明が終了した後にホルマリン固定作業へ移る。腫瘍入割部の胸膜を軽く縫合し、20% NBF を経気管支または肺実質からシリンジを用いて注入して摘出肺を末梢まで十分に拡張させた後、20% NBF で満たされた容器の中に投入し切出し日まで保存する (Figure 1G)。

⑤当科の手術日は毎週月・水・木・金曜日、手術検体の切出し日は毎週水・金曜日と定められている。水曜日に前週木・金曜日と同週月曜日分、金曜日に同週水曜日分の検体切出しが実施される。

上記工程のうち、①、③、④は呼吸器外科、②、⑤は病理部が担当している。

対象と方法

試験デザイン

臨床病期 IA3~IIIA 期、肺葉切除実施予定の NSCLC 症例のうち、文書による同意を取得できた患者を対象とした。本研究は、がん研究会有明病院倫理審査委員会の承認を得た (承認番号: 2022-GB-086)。

対象患者に手術を実施後、手術検体を通常通り処理した。検体処理の各工程に要した時間、すなわち、①~③ (肺摘出~冷蔵保存まで = 室温放置時間)、①~④ (肺摘出~ホルマリン固定まで = 冷阻血時間)、④~⑤ (ホルマリン固定時間) を記録した。また、対象患者の臨床病理学的背景 [年齢・性別・臨床病期・術式・組織型・病理学的腫瘍径/浸潤径・病理病期・シングルプレックス検査での EGFR 遺伝子変異や anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子の有無] を調査した。

マルチプレックス遺伝子検査にはオンコマイン™ Dx

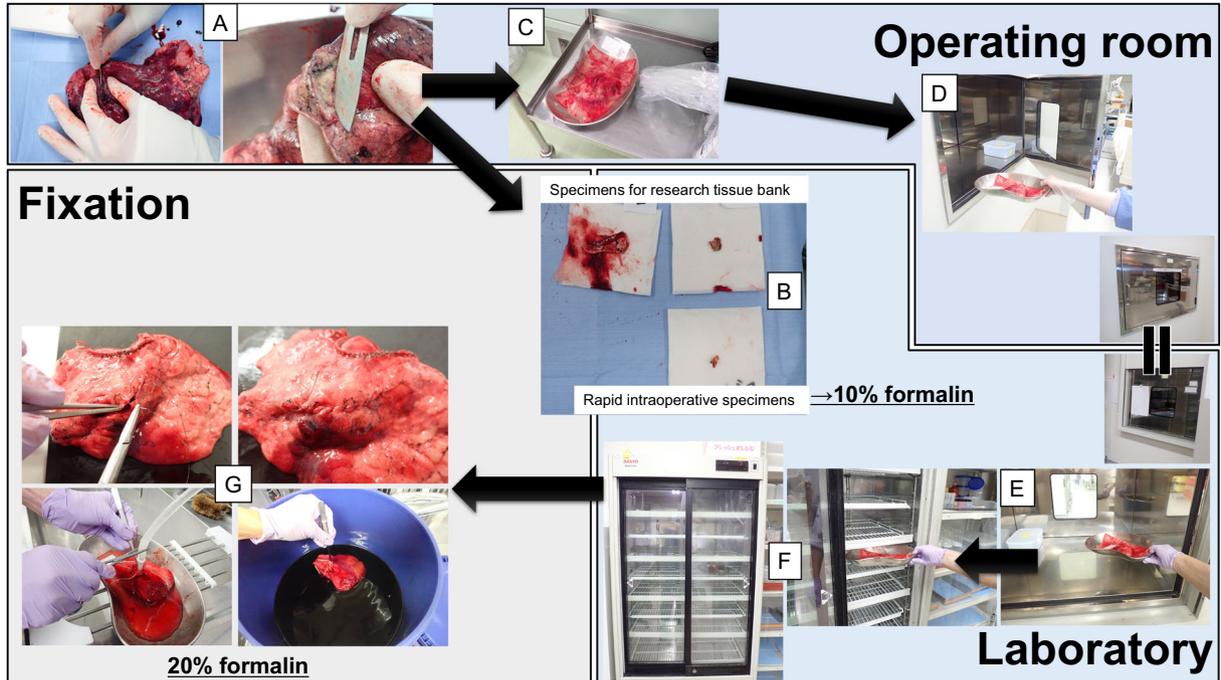


Figure 1. Surgical specimen preparation process in our institute.

Target Test[®]マルチ CDx システム (ODxTT) を用いた。ODxTT は、2019 年 6 月に本邦で初めて保険収載された、DNA・RNA 上の 46 遺伝子の変異を同時に検出する NGS で、当院ではマルチプレックス遺伝子検査の第一選択としている。

10% NBF で固定した迅速検体、20% NBF で固定した手術検体を、各々パラフィン包埋し、5 μ m に薄切した未染スライド 5 枚を肺専門病理医が腫瘍細胞の有無および量（腫瘍含有率 20% 以上であること）を確認した後、ODxTT へ提出した。いずれの検体にもマイクロダイセクションは実施しなかった。主要評価項目は各検体の ODxTT の成功率とした。また、副次評価項目として各検体から抽出された核酸（DNA, RNA）濃度 [ng/ μ l] を比較した。更に、手術検体から抽出された核酸量と腫瘍径や処理行程に要した時間との相関の有無、シングルプレックス検査（EGFR, ALK）と ODxTT との一致率を評価した。核酸の抽出並びに定量は、株式会社 LSI メディエンスおよびサーモフィッシュアテクノロジー株式会社 に委託した。核酸抽出は AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いたカラム法で行われ、核酸定量は Qubit[®] 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて測定された。EGFR 遺伝子変異はコバス[®] EGFR 変異検出キット v2.0 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)、ALK 融合遺伝子はヒストファイン ALK iAEP[®] キット (株式会社ニチレイ バイオサイエンス) を用いて評価した。

統計解析

2 群間の比率の比較にはフィッシャーの正確検定、連続変数の比較にはウィルコクソン符号付順位和検定を用いた。手術検体から抽出された核酸量と病理学的腫瘍径・室温放置時間・冷阻血時間・ホルマリン固定時間との相関をスピアマンの順位相関係数で評価した。統計解析は EZR ver. 1.61 (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。⁶

結果

2022 年 11 月から 37 例を前向きに登録した。5 例で NSCLC 以外の診断となり、2 例で迅速検体が ODxTT 提出には不適切と判断され、最終的に 30 例計 60 検体を ODxTT に提出した。Table 1 に 30 例の詳細を示す。手術検体の室温放置時間、冷阻血時間、20% NBF での固定時間は中央値で各々 12 分、113 分、43 時間で、肺摘出から概ね 20 分で冷蔵庫へ移され、3 時間以内にはホルマリン固定が完了していた。ホルマリン固定時間は多くの症例で 40 時間を超え、一般的に推奨されている 6~48 時間よりは長めであった。

ODxTT の成功率は迅速検体、手術検体いずれも 100% であった (Figure 2)。各検体から抽出された核酸濃度 (DNA, RNA) の中央値は、迅速検体 13.9 ng/ μ l, 19.6 ng/ μ l ; 手術検体 19.5 ng/ μ l, 27.3 ng/ μ l で、DNA, RNA 共に手術検体で有意に高値であった (各々 $p < 0.001$, $p = 0.002$)

Table 1. Patient Characteristics and Time Required for Each Step of the Surgical Specimen Processing Procedure

Overall cohort, n=30	
Variables	
Age [years], median (range)	68 (36-85)
Male sex, n (%)	17 (57)
Clinical stage, n (%)	
IA3/IB/IIA/IIIB/IIIA	15 (50)/9 (30)/2 (7)/3 (10)/1 (3)
Operative procedure, n (%)	
RUL/RML/RLL/LUL/LLL/RMLL	12 (40)/1 (3)/4 (13)/5 (17)/7 (23)/1 (3)
Tumor histology, n (%)	
Adenocarcinoma	25 (83)
Squamous cell carcinoma	3 (10)
Others	2 (7)
Pathological tumor size [mm], median (range)	27 (11-60)
Pathological invasion size [mm], median (range)	24 (9-60)
Pathological stage, n (%)	
IA1/IA2/IA3/IB/IIA/IIIB/IIIA/IVA	1 (3)/7 (23)/3 (10)/11 (37)/1 (3)/4 (13)/2 (7)/1 (3)
Time required for each step of the surgical specimens processing	
Time left at room temperature [min.], median (range/IQR)	12 (8-34/9-16)
Cold ischemic time [min.], median (range/IQR)	113 (57-370/93-144)
Duration of fixation in 20% formalin [hr.], median (range/IQR)	43 (36-126/40-106)
Turnaround time of ODxTT [days], median (range/IQR)	13 (10-18/12-15)

RUL, right upper lobectomy; RML, right middle lobectomy; RLL, right lower lobectomy; LUL, left upper lobectomy; LLL, left lower lobectomy; RMLL, right middle and lower lobectomy; IQR, interquartile range; ODxTT, Oncomine™ Dx Target Test®.

(Figure 2). 手術検体での核酸量と腫瘍径、各工程に要した時間とは、DNA, RNA 共に有意な相関は認められなかった (Figure 3). 本研究で検出された遺伝子変異を Figure 4 に示す. ODxTT とシングルプレックス検査との一致率は、EGFR 変異では不一致例を 2 例 (Figure 4) 認めたため 93% (28/30 例). また、ALK 融合遺伝子はいずれも未検出のため 100% であった.

考 察

本研究は、当院の肺手術検体から ODxTT を提出し、その解析成功率や、成功に関連する抽出核酸量を前向きに評価した.⁷ 手術検体の ODxTT 解析成功率は 100%. また、治験などに使用される 10% NBF で固定された検体と比較し、抽出された核酸濃度 [ng/μl] は DNA, RNA 共に有意に高かった. 当院で手術検体に用いるホルマリン濃度並びに固定時間は現在推奨されている条件から逸脱する点はあるものの、手術検体は ODxTT に適切に活用可能な状況にあると考えられた.

ホルマリン固定は病理組織の適切な利活用に必須の工程である. その濃度が高いほど組織への浸透が速く迅速な固定が可能となる. 一方、濃度が高すぎると表面のみが硬化し内部が未固定になったり細胞構造が変化し核酸

の質の低下に繋がったりする.⁸ そのため、病理組織の固定、特にコンパニオン診断を行う場合には 10% NBF を用いることが推奨されている.³ しかしながらそれらは、他臓器で蓄積されたデータによるもので、肺固有のものではない.⁸

肺は臓側胸膜に包まれており、肺内の腫瘍がホルマリンと接触し難い特有の構造である点に留意する必要がある. そのため、肺手術検体の固定方法として、病変部への入割や注入固定が推奨されている.⁸ 入割には注入したホルマリンの漏出を防ぎつつも十分な固定が可能な加減が必要とされる.⁴ また、注入固定は、経気管支注入のみでは不十分とされ、経肺動静脈注入の併用が推奨されている.⁸ つまり、肺手術検体に 10% NBF を用いる場合には、その構造の特性に着目した固定法を徹底しなければ固定不十分、ひいてはマルチプレックス遺伝子検査の解析不成功に繋がる可能性がある.

本研究では臨床病期 IA3 期以上と比較的大きめの病変を対象とし、外科医が普段通り検体処理を行い、工程を記録した. その結果、室温から冷蔵庫への移動は比較的迅速になされていたが、そのほかの工程に要した時間は推奨される条件を逸脱したものが少なくなかった. それにも関わらず ODxTT は全例で成功した. また、各工

	Rapid intraoperative specimens	Surgical specimens	p-value
Success rate of ODxTT	100%	100%	1.000
Quantity of nucleic acid [ng/μl], median (range/IQR)			
DNA	13.9 (4.1–50.0/11.6–15.9)	19.5 (11.9–62.0/17.3–20.5)	<0.001
RNA	19.6 (4.7–49.5/10.8–34.8)	27.3 (9.6–72.0/21.4–40.5)	0.002

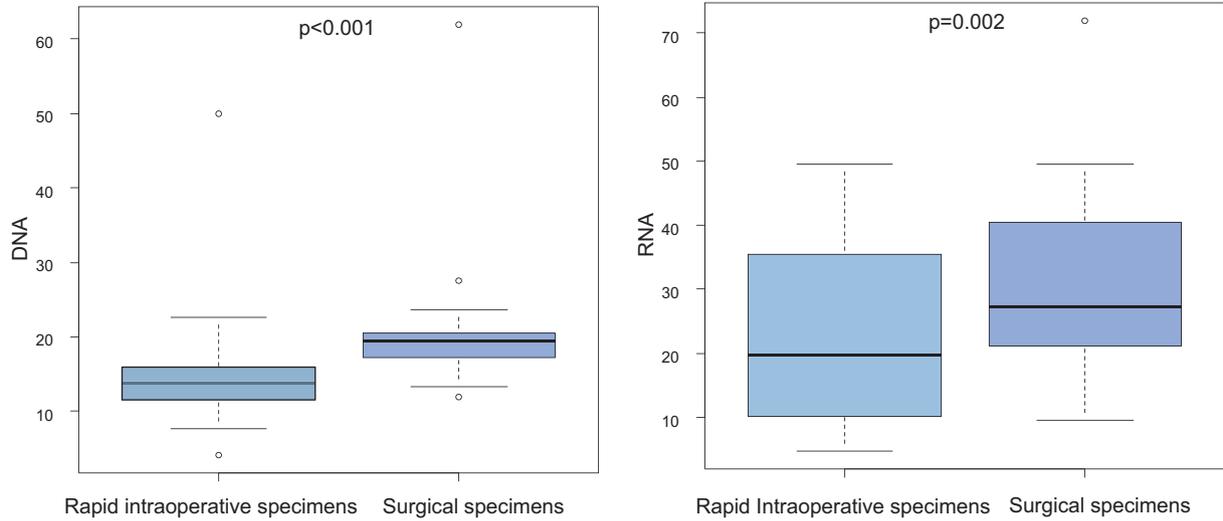


Figure 2. The comparison of the success rate of ODxTT and the quantity of nucleic acids between rapid intraoperative specimens and surgical specimens. ODxTT, Oncomine™ Dx Target Test®; IQR, interquartile range.

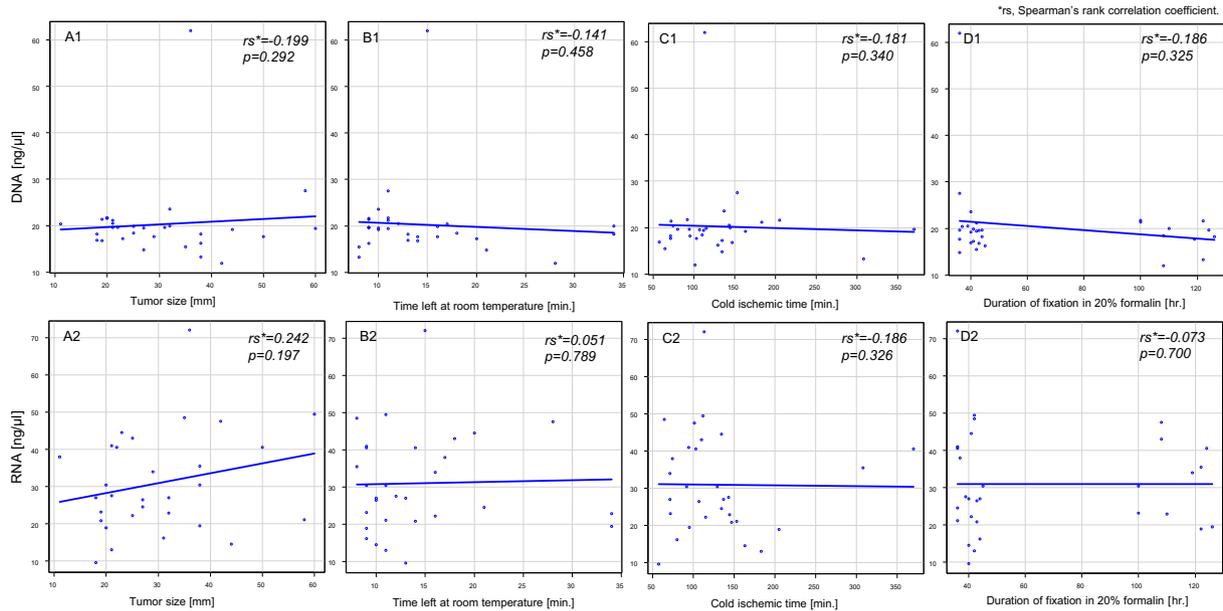


Figure 3. Correlations between nucleic acids and the tumor size (A1, 2), time left at room temperature (B1, 2), cold ischemic time (C1, 2), and formalin fixation time (D1, 2).

程に要した時間と抽出された核酸量とに有意な相関は認められていなかった。以上より、①摘出肺を迅速に冷蔵庫へ移動させておくこと、②胸膜に包まれた肺特有の構造に留意しながらホルマリン固定を行うこと、そして③手術検体が大きい場合や推奨される検体処理工程の遵守

が難しく、10% NBF では固定不良が危惧される場合の改善策として20% NBF の使用を考慮すること、が肺手術検体からマルチプレックス遺伝子検査を提出する際の解析成功率を改善させる選択肢と考えられた。

本研究の限界として、①単施設の検討であり肺手術検

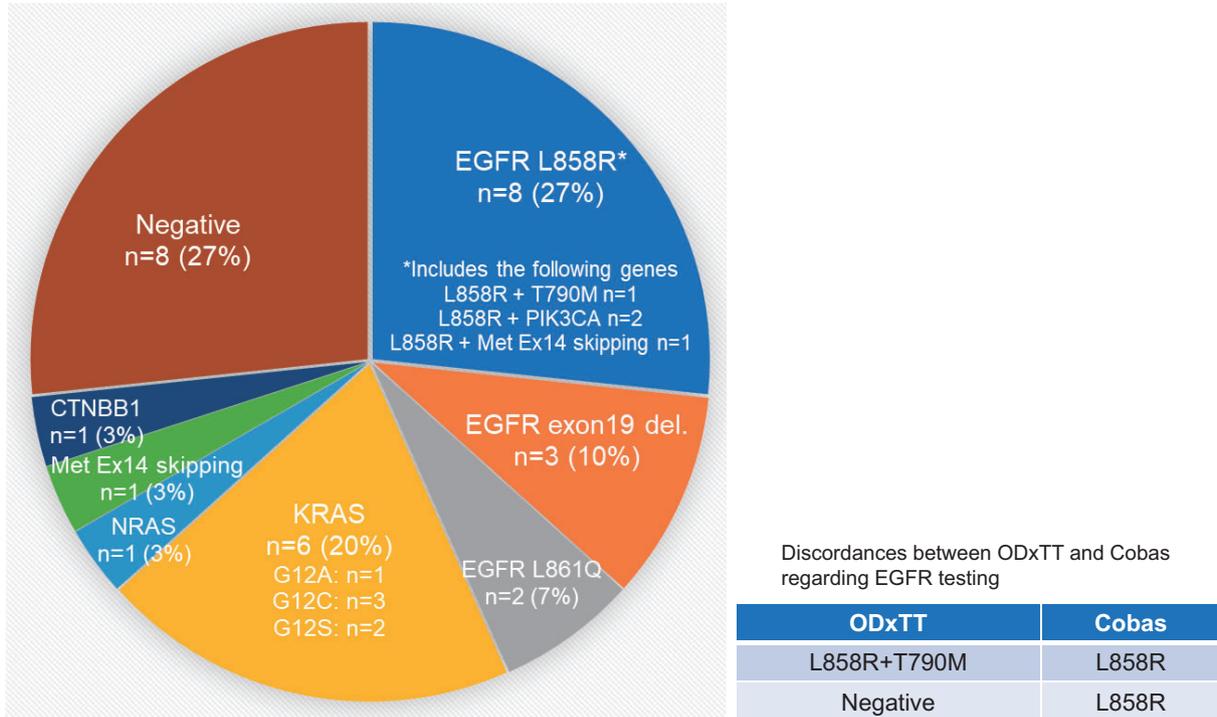


Figure 4. Details of the detected genetic alterations in the study and any discordances between ODxTT and Cobas EGFR Mutation. Test v2 regarding with EGFR testing. ODxTT, Oncomine™ Dx Target Test®.

体を処理する環境や方法は当院独自のものであること、②30例という限られた症例数から得られた結果であること、③使用したマルチプレックス遺伝子検査はODxTTに限定していること、が挙げられる。今後、実地臨床でも手術検体をマルチプレックス遺伝子検査に提出する機会が増えることが予想される。それによって得られる知見が蓄積されれば、施設間の差によらない継続可能な検体処理方法が確立していくことが期待される。

結 語

①ホルマリン固定前の冷所保存、②肺特有の構造に留意したホルマリン固定処理の徹底、および③固定不良の起きやすい肺手術検体に対しては20% NBFの使用を考慮すること、がODxTT解析成功率改善に繋がる可能性が示唆された。

本論文内容に関連する著者の利益相反：西尾誠人 [日当・講演料]アストラゼネカ、小野薬品、武田薬品、中外製薬、イーライリリー、ファイザー、BMS

謝辞：本研究に協力頂いた、がん研究会有明病院呼吸器セン

ター外科 玉川 達、浦部 貴史、立花 太明、鈴木 あゆみ、川原 光恵、各先生に心より感謝申し上げます。

REFERENCES

1. Wu YL, Tsuboi M, He J, John T, Grohé C, Majem M, et al. Osimertinib in resected EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2020;383:1711-1723.
2. Tsuboi M, Herbst RS, John T, Kato T, Majem M, Grohé C, et al. Overall survival with osimertinib in resected EGFR-mutated NSCLC. *N Engl J Med.* 2023;389:137-147.
3. 日本病理学会, 編集. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 2018. http://pathology.or.jp/genome_med/pdf/textbook.pdf
4. 日本病理学会, 編集. ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程. 2016. <https://pathology.or.jp/genome/hyouhon/index.html>
5. 畑中 豊, 木下一郎, 秋田弘俊. 肺癌バイオマーカー検査の変遷と今後の展開. *肺癌.* 2022;62:15-25.
6. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:452-458.
7. 榊原里江, 本多隆行, 三ツ村隆弘, 桐村 進, 大久保憲一, 宮崎泰成. オンコマイン™ Dx Target Test®の検査成功に関連する因子の探索. *肺癌.* 2021;61:932-938.
8. 蔦 幸治. 肺癌診断に必要とされる適切な病理検体の取扱い. *肺癌.* 2019;59:123-127.