

日本肺癌学会バイオマーカー委員会編 肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き

3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い

(2024 年 4 月改訂 v2.0)

目 次

(1) ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織に関する注意事項	2
1. 手術検体取扱いにおける注意事項 (術中からホルマリン固定まで)	2
2. 生検検体取扱いにおける注意事項 (採取からホルマリン固定まで)	2
3. パラフィン包埋後の取扱いについて	4
(2) 新鮮凍結組織検体の取扱いに関する注意事項	4
(3) 細胞検体の取扱いに関する注意事項	4
(4) 血漿検体の取扱いに関する注意事項	5
(5) 遺伝子パネル検査を行う際の検体取り扱い上の注意点	5
1. 腫瘍細胞含有割合	5
2. 標本組織量	8
(6) 検査精度の確保	10
参考文献	11
付表 検査対象となる検体*	12

日本肺癌学会バイオマーカー委員会

宗 淳一, 畑中 豊, 荒金 尚子, 後藤 功一, 阪本 智宏, 里内 美弥子, 枝園 和彦, 須田 健一, 朝重 耕一, 松本 慎吾, 三窪 将史, 谷田部 恭, 横内 浩, 清水 淳市, 豊岡 伸一

進行期非小細胞肺癌症例において、コンパニオン診断を目的としたバイオマーカー検査の実施が不可欠となっており、近年その範囲は周術期まで拡大している¹。使用する検体種は、組織、細胞、血漿検体の3つに大別されるが、主として組織検体、特にマルチプレックスコンパニオン診断（マルチ検査）やがんゲノムプロファイリング検査といった遺伝子パネル検査では、ホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin fixed and paraffin-embedded; FFPE）組織検体が用いられている²。最近の患者還元型の臨床研究において、全エクソームシーケンス解析や全トランスクリプトーム・シーケンス解析では FFPE 組織検体が、全ゲノムシーケンス解析では新鮮凍結組織検体が、それぞれ用いられるようになっており、これらを視野に入れた組織検体の取り扱いも日常診療上重要になりつつある。細胞検体については、セルブロックは FFPE 組織検体に準じ運用されている。一方、未固定検体もしくはアルコール固定検体は単一遺伝子を対象としたコンパニオン診断（シングル検査）では比較的良好に用いられてきたものの、マルチ検査が主流となってからは、その使用は減少していた。しかし細胞検体での使用を念頭に開発されたディープシーケンシングによる高感度なマルチ検査システムの臨床導入により、2023 年より徐々に使用が増加しつつある。ここではバイオマーカー検査に用いる検体とその取扱いに関する基本的事項について記す（章末の付表も参照されたい）。

（1）ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織に関する注意事項

1. 手術検体取扱いにおける注意事項（術中からホルマリン固定まで）

手術検体では、固定前プロセスの煩雑さなどから、一般に、生検検体に比べて、核酸品質や単位体積・面積あたりの核酸収量が低くなる場合が多いといわれる。手術中の切除組織と交通する脈管、特に栄養する動脈の結紮が開始点とされ、体外に摘出されるまで時間は「温虚血時間（warm ischemia time）」と呼ばれ、“低酸素をはじめとするストレス応答開始”に加えて、“酵素活性が保たれる体温下にある”ことから、組織試料の質に大きな影響を与えるとされ

る。次に、体外に摘出された組織が、凍結またはホルマリンなどで固定されるまでの間は、「冷虚血時間（cold ischemia time）」と呼ばれ、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程³では、ゲノム解析結果に影響が少ない摘出後の管理法として、摘出後は速やかに冷蔵庫など 4℃下で保管し、遅くとも 3 時間以内に固定を行うことが望ましいとしている⁴。また、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ことが推奨されている。慣習として、手術終了時に家族の目前で腫瘍に割を入れて術後説明を行う場合があるが、ゲノム診療や感染症対策などを考えると、これらの術後標準操作手順（standard operating procedure ; SOP）はいち早く“正しいゲノム診断”を重視した SOP に見直す時期に来ているといえる。手術検体に割を入れる際は、“最大割面をずらして割を入れる”、“胸膜変化を有する部分、特に、最も胸膜が嵌入した部分は避けて割を入れる”、“ホルマリン注入時の漏れを少なくするため、必要最小限の割にする”、などの注意が必要である⁵。

ホルマリン固定液は、10%中性緩衝ホルマリンを用い、サンプル量の 10 倍で固定することが推奨されている。固定推奨時間は、6～48 時間（72 時間まで許容）であり、一般的な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て、必要時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³、気道（脈管）からホルマリン液をシリンジなどで十分に注入することが推奨される。ホルマリン固定による核酸品質への影響として、核酸の断片化や核酸塩基の化学修飾が知られ、特に「C>T 置換（シトシン（C）の加水分解に伴う脱アミノ化によりウラシル（U）に置換し、PCR 増幅反応によってチミン（T）が生成すること）」が報告されている^{6,7}。なお手術による切除組織の取り扱いや固定方法については肺癌取扱い規約第 8 版補訂版を参照されたい⁸。

2. 生検検体取扱いにおける注意事項（採取からホルマリン固定まで）

病変の局在・大きさや、施設で実施可能な手技に応じて、超音波内視鏡下穿刺吸引法（EUS-FNA）、肝・骨生検、外科的生検などの適当な検体採取方法を選択する必要がある。

気管支内視鏡検査では特に検体が微小であり、様々な工夫が必要である。末梢肺結節に対する腫瘍生検では、仮想気管支鏡画像やナビゲーションの併用は病変への確実な到達を容易にし、気管支腔内超音波断層法（EBUS）にガイドシース法（EBUS-GS 法）もしくは細径気管支鏡（EBUS-UT 法）を併用することで再現性が高まり、数多くの検体の採取が可能になる。ただし同一部位で生検を重ねると、後半になるにつれて出血によるアーチファクトが発生する可能性を考慮する必要があり、採取部位を少しずつ変更するなどの工夫をする。一度の生検で大きな検体を採取するために、可能であれば大型の生検鉗子やガイドシースキットを用いる。関与気管支が腫瘍辺縁にしか到達しないような病変では、末梢での経気道的針穿刺後に鉗子生検を行うことでより腫瘍細胞割合の高い検体が採取される。また、経気道的生検方法のクライオバイオプシーでは、大きな検体が採取可能で、DNA・RNA 量は鉗子生検の約3倍で、NGS 解析成功割合は有意に高いとの報告がある⁹。

超音波ガイド下経気管支針生検（EBUS-TBNA）では、19～25G 穿刺針が使用可能で、22G 針で NGS 解析が十分に可能であったとする報告がある¹⁰。腫瘍細胞含有割合の低下を回避するためには、エラストグラフィを含めた超

音波所見による穿刺部位の決定（図 1A）、slow pull 法（図 1B）や迅速細胞診（ROSE 法）の併用が有効である¹¹。

胸水貯留例においては、胸水細胞診検体やセルブロックが確定診断やその後の遺伝子検査に提出されていることが多かったが、腫瘍細胞割合は低いことに注意が必要である。胸腔鏡下に壁側胸膜を生検することで質の高い検体が多く採取可能で、局所麻酔下に安全に施行できるので、可能であれば考慮してもよい。

（本項目については、国立がん研究センター東病院 呼吸器内科の桐田圭輔先生の協力を得た）

生検検体では、周囲環境により検体全体が即座に影響を受ける可能性があるため、採取後は、速やかに固定液に浸漬し固定をすることが推奨されている。固定液は、サンプル量の 10 倍量の 10%中性緩衝ホルマリン液を用い、固定時間を 6～48 時間以内にすることが推奨されている³。

なお、各種生検検体の特徴や取扱いの留意点については、章末の付表ならびに肺癌診療ガイドライン 2023 年版¹を、ホルマリン固定後からパラフィン包埋における注意事項については、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程³をご

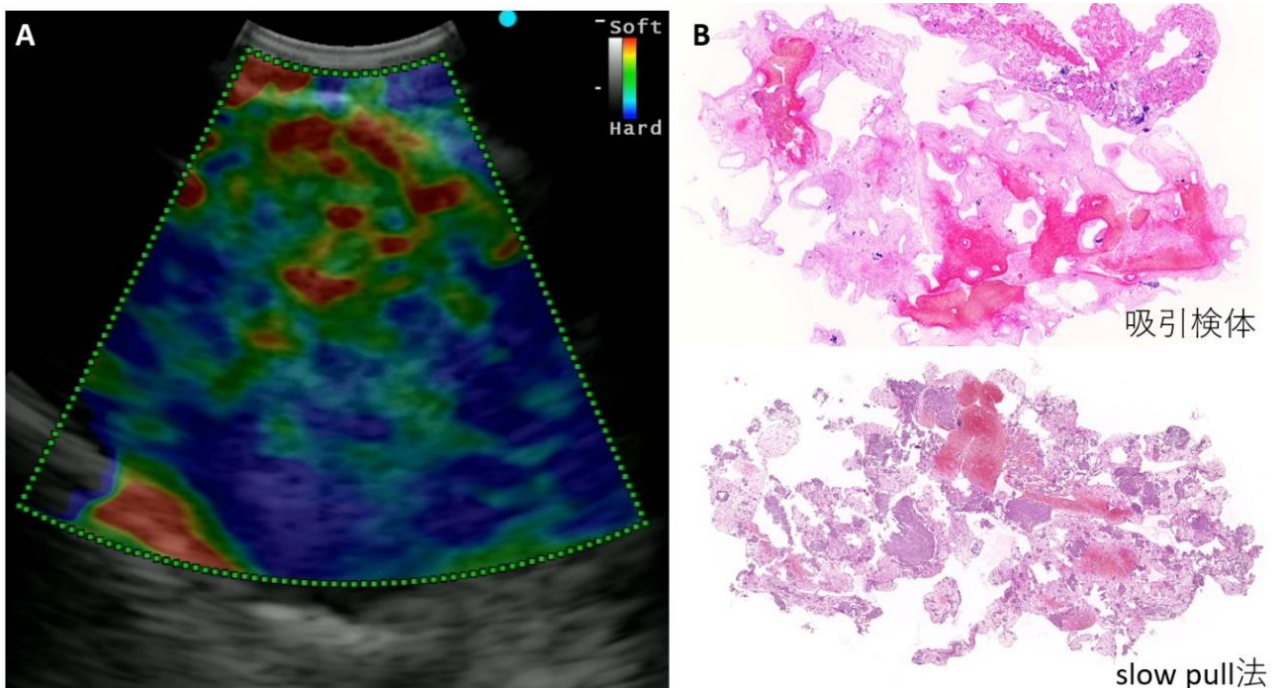


図 1. 生検採取の注意点

A. エラストグラフィではリンパ節内での硬さが評価可能であり、硬い部位（青）から穿刺を行うことで良質な検体が採取できる。

B. EBUS-TBNA 検体での吸引検体（上段）と slow pull 法（下段）の比較。吸引検体では血液の混入が多く、腫瘍細胞が十分採取されていない。

参考いただきたい。

3. パラフィン包埋後の取扱いについて

パラフィン包埋後の検体（FFPE ブロック）の保管は、室温でよいが、多湿を避け冷暗所が推奨されている。ただ、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との意見もある¹²。経年により FFPE ブロックは劣化するが、その次世代シーケンス（NGS）検査に対する影響は、使用する遺伝子パネルで異なるが、作製後 3 年以内の使用が望ましいとされる^{3,13}。

FFPE ブロックを薄切した組織切片は、スライドガラスにマウントさせて提出する。各バイオマーカー検査において規定されている必要枚数の未染色標本作製し、そのうちの 1 枚を HE 染色し腫瘍細胞の存在を確認することが推奨される。特に微小な生検検体では、病理診断の後に再薄切した場合には、腫瘍部分あるいは組織そのものがなくなってしまうことがあるので注意を要する。病理診断時にバイオマーカー検査の実施が予定されている場合は、標本作製前に行うトリミングによるロスを最小限にするために、あらかじめ病理診断用の未染色標本作製時にバイオマーカー検査用標本を余分に作製しておくことも有用である⁵。

検体中の腫瘍細胞の存在状態は様々であるため、病理診断報告書に腫瘍量や腫瘍含有割合を記録しておくことが推奨される。またマクロダイセクションを実施した場合は、その旨と実施後の腫瘍量や腫瘍含有割合を記録することが推奨される。また検査センターへ外注する場合、検査に供した検体の HE 染色標本（マクロダイセクションを行う際に、腫瘍部のマーキングを行った HE 染色標本）は、可能な限り検査後にも再確認できるようにしておくことが望ましい⁵。

（2）新鮮凍結組織検体の取扱いに関する注意事項

新鮮凍結組織検体は、最も高品質の DNA や RNA を抽出可能であるが、同時に DNase や RNase の酵素活性も保持されており、検体の取扱いを迅速に行わなければ、核酸品質を急速に低下させるおそれがあるため、注意を要す

る。手術室などで割を入れ採取する場合も多いが、腫瘍細胞含有量が不明なため、顕微鏡的に確認する必要がある。周囲の炎症が強い腫瘍、粘液産生が高度な腫瘍、中心部線維化巣が広範な腫瘍では、腫瘍細胞が採取されず偽陰性になることがある。腫瘍細胞を確認する手段としては、「①凍結腫瘍組織を薄切し、HE 標本作製し、その標本で腫瘍細胞の存在および占有割合を確認する」「②採取時に割を入れ、その片割れを凍結組織とし、残りの割面で FFPE 組織標本作製し確認する」などの方法がある¹⁴。

（3）細胞検体の取扱いに関する注意事項

細胞検体は、組織の穿刺吸引・擦過などにより採取される非液状検体と、体腔液・洗浄液などの液状検体に大別され、検体採取後は可及的速やかに検体処理を行うことが推奨されている。非液状検体は、塗抹法や液状化検体細胞診（liquid-based cytology: LBC）法で処理され、液状検体は、塗抹法・LBC 法に加えてセルブロック法で処理されることが多い。検体採取エリアと検体処理エリアが離れている場合など、処理に時間を要するならば、検体を氷冷、もしくは冷蔵保管（4℃）することが望ましいとされる（LBC 保存液の場合は、常温保存も可能だが、直射日光を避け、高温・多湿環境を回避する）。

セルブロック以外の液状検体は、採取検体が十分量あれば、ペア検体として 2 つに分けることが推奨される。1 つは、通常の細胞診として用い、形態学的診断に加えて、腫瘍含有量の評価を行う。もう 1 つは、核酸抽出用として保管しておく。保管の際は、遠心分離後に上清を廃棄した細胞成分を -80℃ で凍結保存するか、冷蔵で長期間保蔵可能な細胞診検体保存容器（GM 管など）を用いることも可能である。

セルブロック作製では、採取～検体処理（遠心分離・上清廃棄）までできるだけ冷蔵（4℃）保存を行い、可及的速やかにホルマリン固定（10% 中性緩衝ホルマリンが推奨）し、6～24 時間程度の固定を行うことが推奨されている⁵。セルブロック作製法は複数知られており、遠心分離細胞収集法と細胞固定法に大別される。前者では遠心管法が、後者ではアルギン酸ナトリウム法が、比較的多くの施設で用いられているが、本邦ではそれぞれ 4～5 種程度

の作製法が用いられていることがこれまでの調査研究で明らかとなっている⁵。セルブロックの包埋やブロック保管については、前述の FFPE 組織の取扱いに関する注意事項と同様である。

なお、一般に NGS パネル検査に必要な DNA 最低量は 10ng 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⁵。1つの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。NGS パネル検査に必要な DNA 最低量である 10 ng を得る場合には約 2,000 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 60～100 mm²程度）からの抽出が必要とされている^{5,15}。

（４）血漿検体の取扱いに関する注意事項

血漿検体は、組織検体と異なり、腫瘍細胞の割合や DNA の質、量に基づいて評価できないため、血液採取、血漿の分離、血漿検体の保管に至るプレアナリシスの段階において適切に扱われた検体を使用すべきである（付表）。血液採取（採血）手技が血液成分に大きな影響を及ぼすため、日本臨床検査標準協議会から出されている「標準採血法ガイドライン」改訂版(GP4-A3)などのガイドラインに基づいた正しい採血法を用いることが重要である。採血管は、血漿用採血管である EDTA 採血管が用いられることが多いが、血漿 CGP 検査では、医療機器認証を受けた指定のセルフリーDNA 抽出用採血管を原則使用する（FoundationOne Liquid がんゲノムプロファイルでは「Roche セルフリーDNA 抽出用採血管」、Guradant360 CDx がん遺伝子パネルでは「Streck 採血管（cell-free DNA BCT）」が採用されている）。特に採血後の検体を長

時間室温で放置すると、血球成分の崩壊や DNA の分解の原因につながる¹⁶。また、血漿成分を分離する際に血球成分が混入すると、有核細胞由来のゲノム DNA が混入するため、腫瘍由来のゲノム DNA が希釈され、偽陰性となる可能性があることは注意しなければならない。通常の EDTA-2K の採血管を使用した場合、血漿の分離は、採血後 6～8 時間以内に行うことが推奨される。血漿分離後の血漿検体は、15～30℃で 1 日間、2～8℃で 3 日間、-25～-15℃で 12 カ月、そして-70℃以下の場合は 12 カ月保管可能である。

（５）遺伝子パネル検査を行う際の検体取り扱い上の注意点

遺伝子パネル検査に用いられる検体はいずれも FFPE 標本が推奨されている。新鮮凍結組織や凍結細胞診検体からの解析も可能であるが、腫瘍細胞含有割合を評価することが必要である³。FFPE 標本であれば、手術切除標本、生検検体、セルブロック検体を用いることが可能であるが、解析に適しているかどうかについては腫瘍細胞含有割合および標本組織量によって決定される（日本肺癌学会、肺癌診療ガイドライン 2023 年版:CQ16 の表 1～2 参照）¹。

1. 腫瘍細胞含有割合

次世代シーケンサー（NGS）等の臨床導入を契機に、より重要性が高まった評価項目であり、解析対象となる組織における有核細胞のうち、腫瘍細胞の核が占める割合を意味する。ダイセクションを行って提出組織の一部を解析に用いる場合は、ダイセクションする領域における有核腫

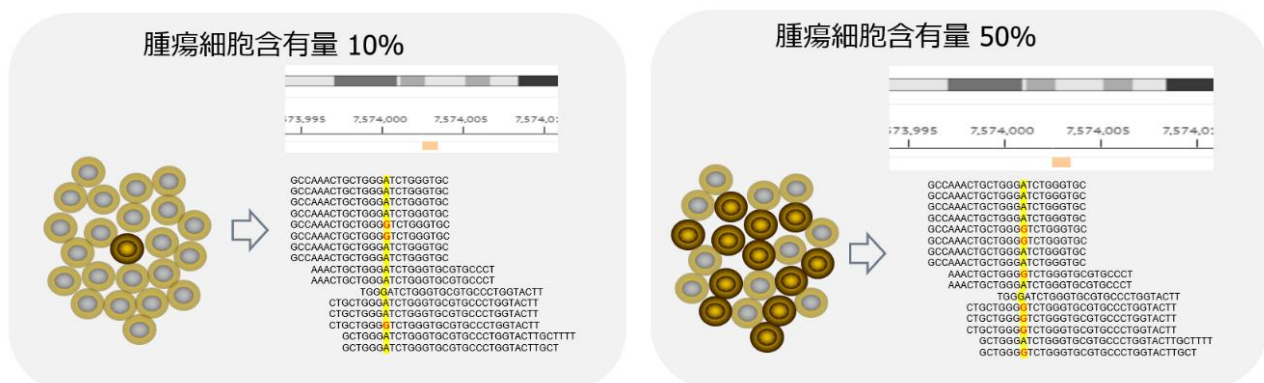


図 2. 腫瘍細胞含有割合の違いによる変異アリル頻度の違い

瘍細胞割合となる。この腫瘍細胞含有割合が重要になる理由としては、図 2 に示すように、腫瘍細胞含有割合が低いと得られるシーケンスデータにおける変異アリル頻度が低くなるためである。変異の検出はシーケンスされるリード数と関連し、シーケンスエラーなどで発生する偽陽性と区別するため、カットオフ値は統計学的に安全域を設けて設定されている（図 3）。そのため、規定以下の腫瘍細胞量以下であった場合は、変異アリル頻度がカットオフ値より低くなる場合があり、偽陰性を示す場合もある。公表されている最小検出限界(Limit of Detection ; LOD)をもとに考えると、オンコマイン DxTT では、EGFR 変異 L858R は 10.6%、Ex19Del は 8.8%の腫瘍細胞含有割合がないと検出できず、BRAF V600E 変異は 12.8%以上の腫瘍細胞含有割合が必要となる。

腫瘍細胞含有割合は、腫瘍細胞を正確に同定することができる病理診断医の評価が必須となる。しかしながら、遺伝子パネル検査では厳密に求められる指標であり、腫瘍細胞占有率（面積での割合）と混同される場合もあることから注意が必要である（図 4）。

また、病理診断医の評価は、これまでの経験をもとに判断されることが多く、その場合過剰評価する傾向があることが知られている¹⁷⁻¹⁹。その 1 つの原因として、具体的

にどのように計測すべきについての詳細な説明に乏しいことが挙げられ、その方法についての解説を受けることで改善することが報告されている¹⁹。代表的な例を以下（図 5-8）に提示したので参照されたい。

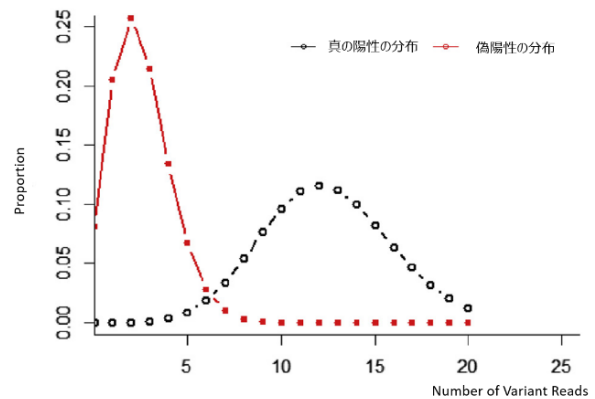


図 3. シーケンスエラー1%とした場合の偽陽性の2項分布および腫瘍細胞10%で250リードシーケンスした場合の真の陽性についての2項分布。低い変異アリル頻度の場合、真の陽性と偽陽性が重なることがある。（J Mol Diagn 2017;19:341-365より引用）
Reproduced with permission from Elsevier (2021)

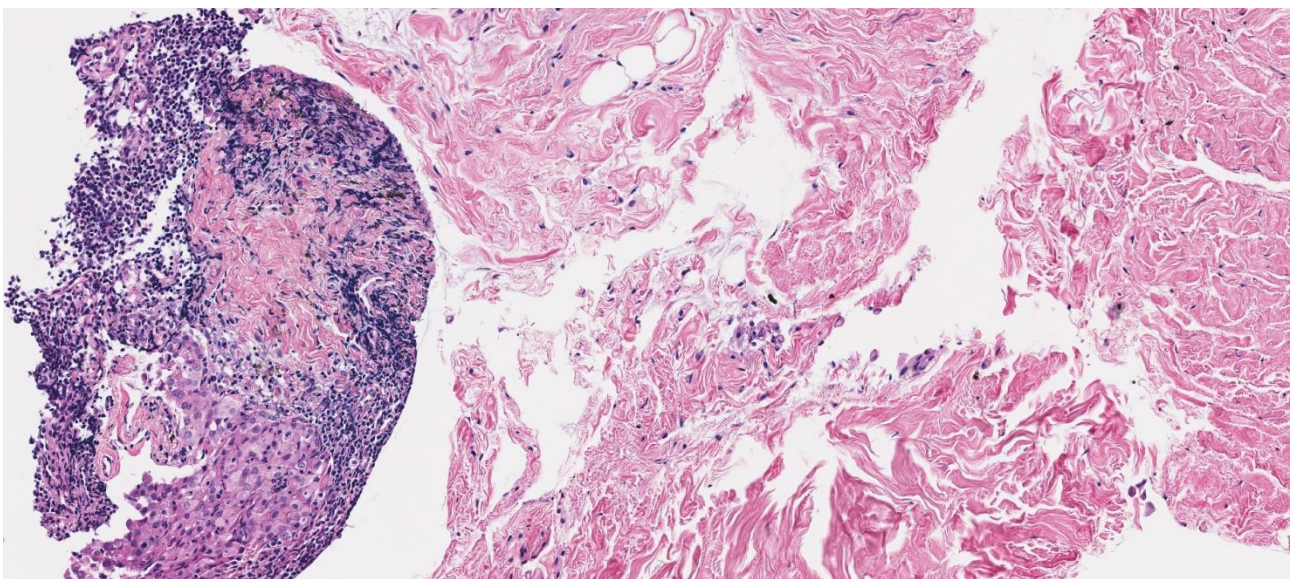


図 4. 肺扁平上皮癌リンパ節転移巣の針生検組織の例。面積としては線維性結合組織が70%を占めているが、左断片（リンパ球浸潤と腫瘍細胞からなる）に対し、線維性結合組織の有核細胞数は無視できるほど少ない。また、リンパ球は小さな面積しかもたないため、単位面積としては、腫瘍細胞1つあたり3〜7つのリンパ球が占めることになる。遺伝子パネル検査ではDNAでの比較となるため、占有面積ではなく、有核細胞比率で考える必要がある（この写真では有核腫瘍細胞含有割合は15%となる）。

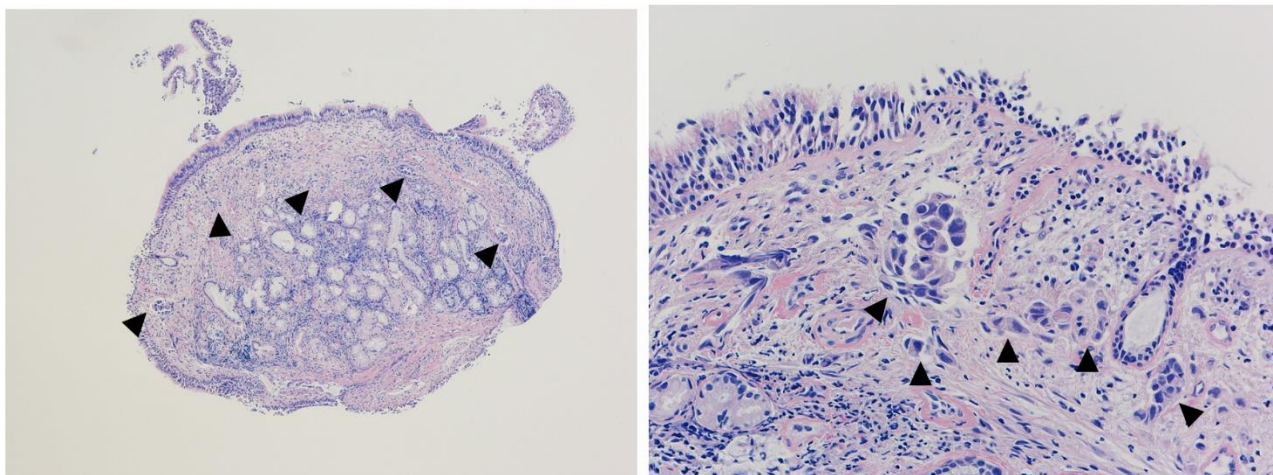


図 5. TBLB 生検組織の例。主としてリンパ管内に存在する腫瘍細胞を▲で示した。このような場合においても診断としては腺癌とされるため、腫瘍細胞含有割合の確認は重要である。

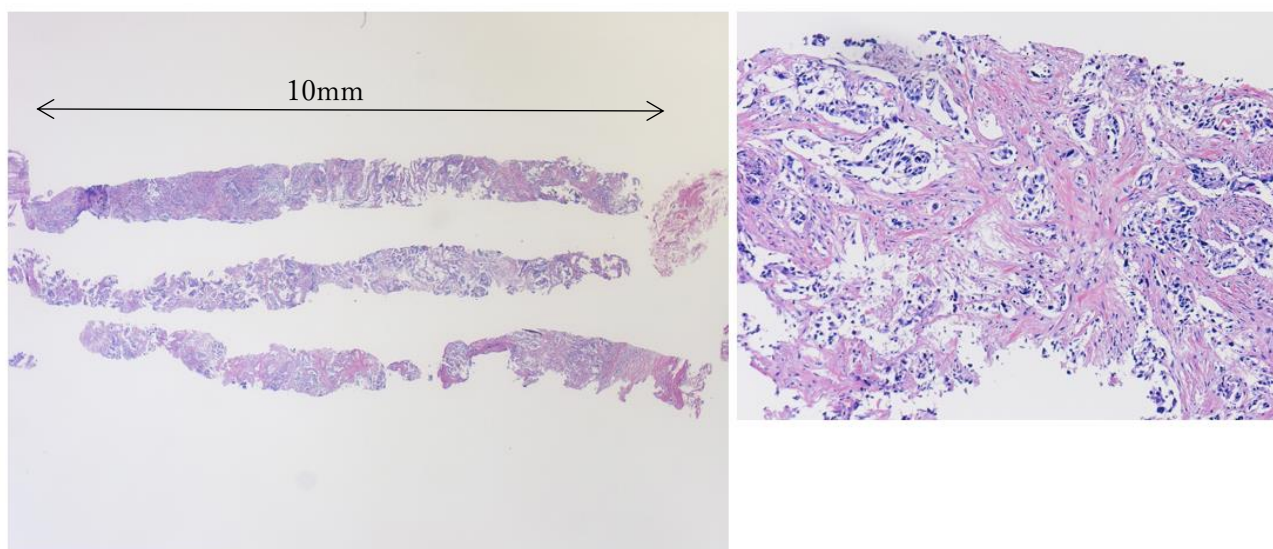


図 6. 肺腫瘍針生検組織の例。ほぼ均一に右拡大像のように腫瘍細胞が分布している。おおむね 30%程度の腫瘍細胞含有割合である。また、組織量としても $10\text{mm} \times 1\text{mm} \times 3\text{本} = 30\text{mm}^2$ となり、5mm 厚未染標本 10 枚で、オンコマイン DxTT, NCC オンコパネル, F1CDx のいずれに対しても解析に適した検体といえる。

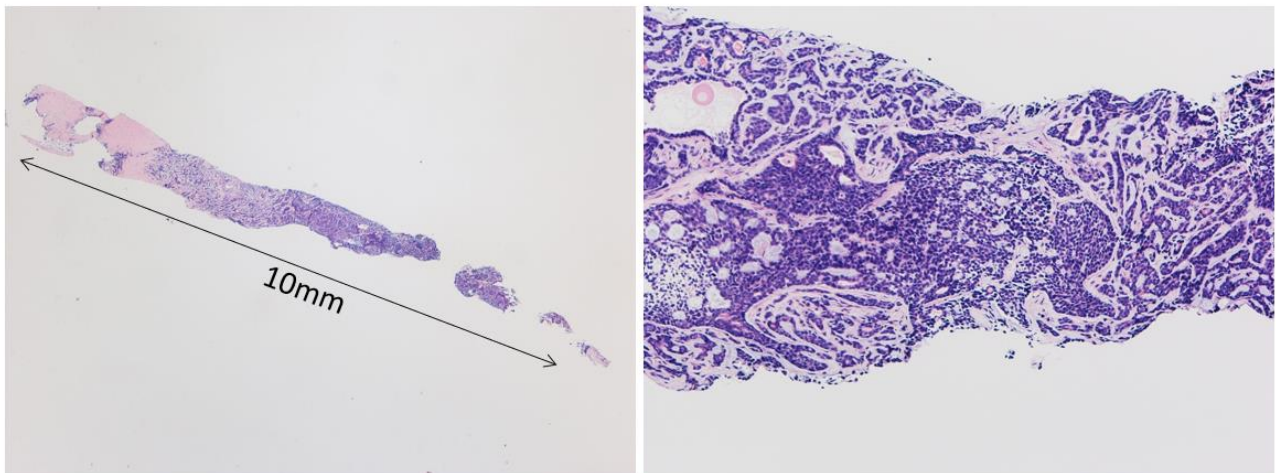


図 7. 肺腫瘍針生検組織の例。唾液腺腺様嚢胞癌の転移。10mm 大の針生検組織であり、太さ 1mm と考えると 10mm^2 の面積を有することになる。間質成分には有核細胞が少ないため、ほぼ右図の腫瘍組織からなっており、腫瘍細胞含有割合は 70% と評価される。このような例では、 $5\mu\text{m}$ 厚未染 10 枚でオンコマイン DxTT, NCC オンコパネルは解析可能であるが、F1CDx の場合は基準である 1mm^3 の組織量を満たすため、20 枚の未染標本が必要となる。

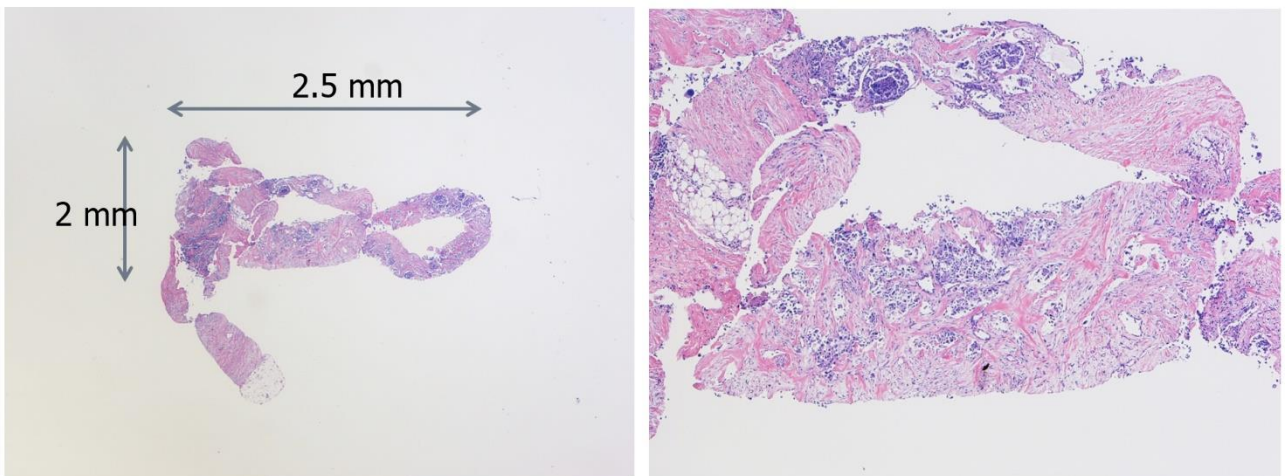


図 8. 肺腫瘍針生検組織の例。組織量としては 5mm^2 であるが、腫瘍細胞含有割合は 15% であり、オンコマイン DxTT, NCC オンコパネル, F1CDx いずれも解析に適さない。単一遺伝子検査が推奨されるが、30%以上の腫瘍細胞含有割合が求められる ROS1 AmoyDx 融合遺伝子キットにおいても不適切検体となり、ROS1 のコンパニオン診断においてもこの検体は不可能と評価される。

2. 標本組織量

それぞれの検査法によって必要とされる組織量が異なる。また、手術切除標本、生検検体、セルブロック検体など検体によって腫瘍サイズが大きく異なっており、実際に未染標本何枚を提出すべきかは腫瘍含有割合ともあわせて症例ごとに判断する必要がある。一部の例を以下(図 9-11)に示したので参照されたい。

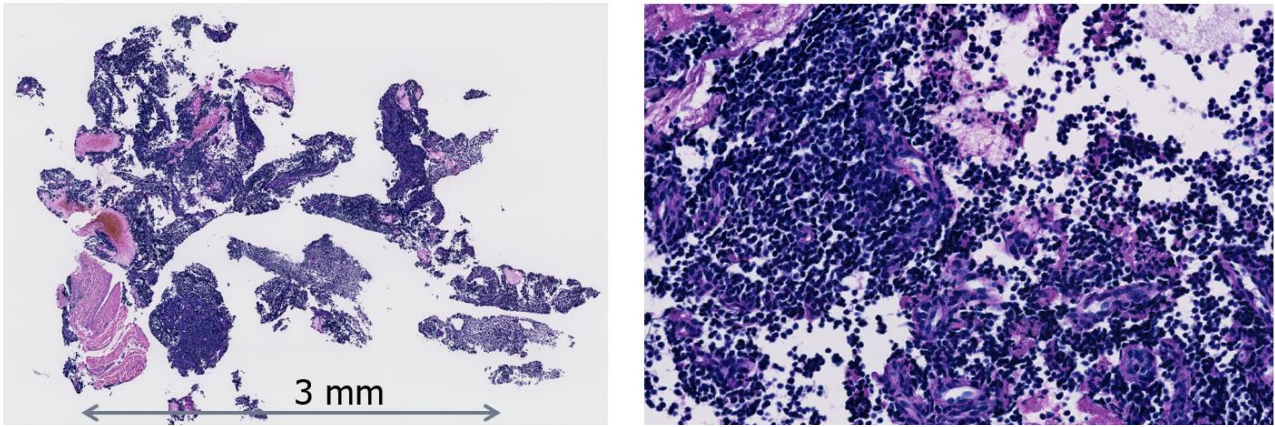


図 9. 軟部転移巣針生検組織の例。3mm 大の小さな組織であり、 6mm^2 大のサイズしかないが、80%の腫瘍細胞含有割合で腫瘍細胞が密集している。そのため、1,288ng の DNA が抽出され、いずれの遺伝子パネル検査も施行可能である。

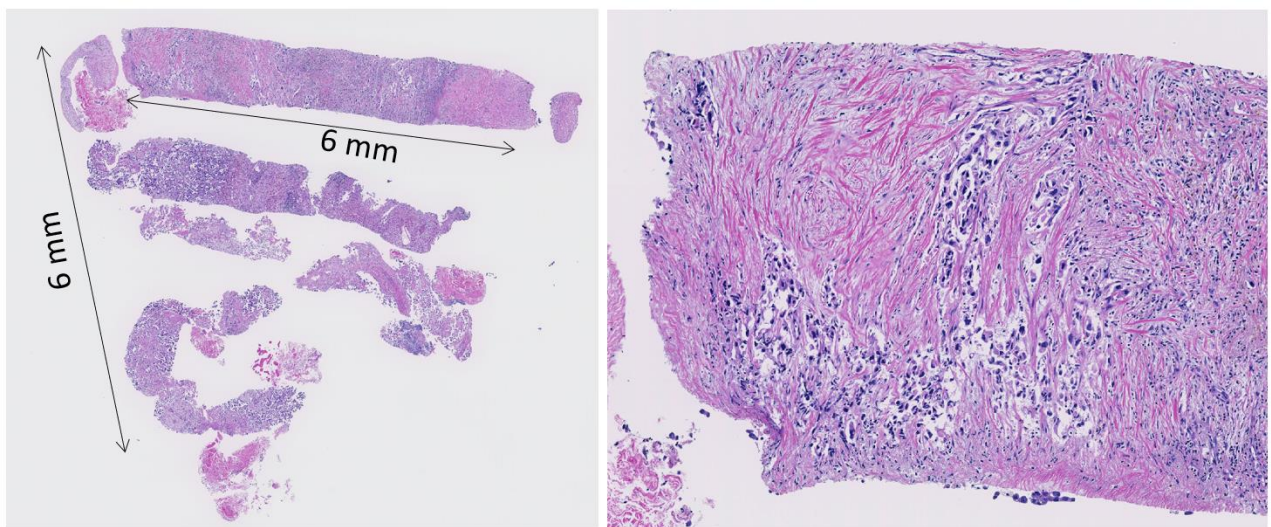


図 10. 肺腫瘍針生検組織の例。組織量としては 20mm^2 程度、腫瘍細胞含有割合は 30%であり、オンコマイン DxTT, NCC オンコパネル, F1CDx いずれも解析可能である。しかしながら、腫瘍細胞に変性傾向がみられ、DNA としては 10.3ng しか抽出されず、解析に足りる DNA が得られなかった。

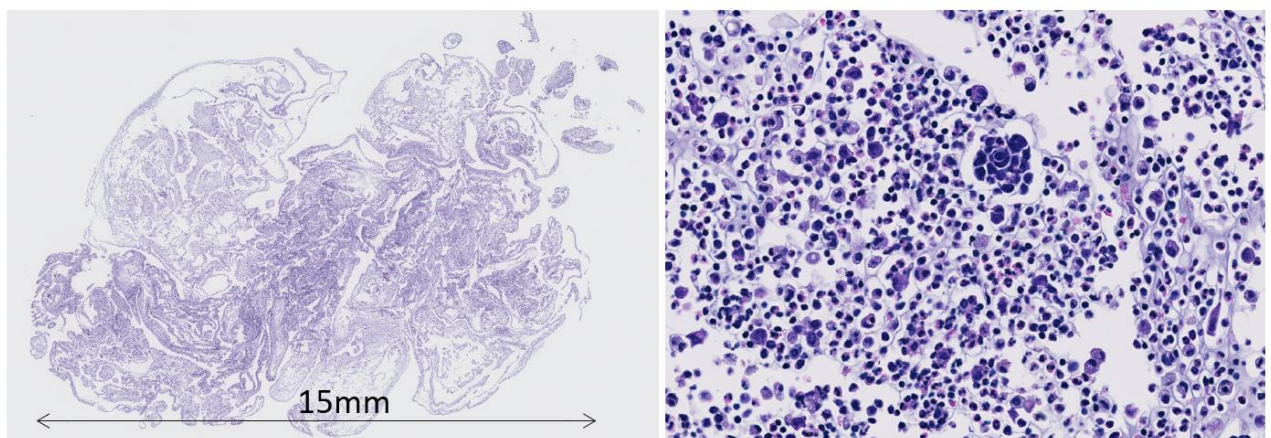


図 11. 小細胞癌の悪性胸水に対してのセルブロックの例。細胞量としては十分にあり、DNA も 408.5ng 抽出されたが、腫瘍細胞含有割合は 1%以下であり、パネル検査には適さない。胸水ではしばしば多数の炎症細胞やマクロファージが混在し、マイクロダイセクションもできないことから、適切な腫瘍細胞含有割合を得るのが難しい。

(6) 検査精度の確保

医療法等の一部を改正する法律の一部の規定が、平成30年12月1日に施行され、医療機関、衛生検査所等における遺伝子関連・染色体検査の精度の確保が医療法の枠組みに組み入れられた。これに伴い、この確保のために設けるべき以下の基準として示された。

- 1) 遺伝子関連検査・染色体検査の責任者の配置
- 2) 内部精度管理の実施、適切な研修の実施義務
- 3) 外部精度管理調査の受検

これに加え、検査施設の第三者認定を取得することを当面、勧奨することになった。第三者認定としては、国際規格である ISO15189 や米国病理学会（College of American Pathologists ; CAP）の臨床検査室認定プログ

ラム(Laboratory Accreditation Program ; LAP) などが知られている。また、がんゲノム医療中核拠点病院等の指定要件では、がんゲノム医療中核拠点病院・拠点病院の診療機能として第三者認定を受けた臨床検査室、病理検査室を有することとされていることを受け、本邦においては、ISO15189 認定を取得する施設が増加しており、2023年10月時点で、肺癌バイオマーカー検査で最も多く供される FFPE 組織検体を取り扱う病理検査室で認定を取得している医療機関は全国で約 200 施設にまで広がっている。これら多くの施設では「病理組織標本作製」に係る項目の認定を取得しているが、院内においてバイオマーカー検査、体細胞遺伝子検査を実施する場合は、上記に加え「遺伝子関連検査・染色体検査」に係る項目の認定取得が求められる。

参考文献

1. 日本肺癌学会. 肺癌診療ガイドライン 2023 年版. 2023.
2. 畑中 豊., 菊地 順子., 畑中 佳奈子. ガンゲノム診療における組織・細胞・血漿検体の取扱いと使い分け. 肺癌. 2022;62(Suppl):5.
3. 日本病理学会. ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 2018.
Hatanaka Y, Kuwata T, Morii E, Kanai Y, Ichikawa H, Kubo T, et al. The Japanese Society of Pathology Practical Guidelines on the handling of pathological tissue samples for cancer genomic medicine. *Pathol Int*. 2021; 71(11): 725-740.
4. Hammond M. E., Hayes D. F., Dowsett M., Allred D. C., Hagerty K. L., Badve S., 他. 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;28:2784-2795.
5. 日本臨床細胞学会. ガンゲノム診療における細胞検体の取扱い指針 第 1.0 版. 2021.
Morii E, Hatanaka Y, Motoi N, Kawahara A, Hamakawa S, Kuwata T, et al. Guidelines for Handling of Cytological Specimens in Cancer Genomic Medicine. *Pathobiology*. 2023; 90(5): 289-311.
6. Williams C., Pontén F., Moberg C., Söderkvist P., Uhlén M., Pontén J., 他. A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol*. 1999;155:1467-1471.
7. Do H., Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*. 2015;61:64-71.
8. 日本肺癌学会. 臨床・病理 肺癌取扱い規約 第 8 版補訂版. 2021.
9. Udagawa Hibiki, Kirita Keisuke, Naito Tomoyuki, Nomura Shogo, Ishibashi Masayuki, Matsuzawa Reiko, 他. Feasibility and utility of transbronchial cryobiopsy in precision medicine for lung cancer: Prospective single-arm study. *Cancer Science*. 2020;111:2488-2498.
10. Doods Christophe, Vander Borgh Sara, Yserbyt Jonas, Testelmans Dries, Wauters Els, Nackaerts Kristiaan, 他. A Randomized Clinical Trial of Flex 19G Needles versus 22G Needles for Endobronchial Ultrasonography in Suspected Lung Cancer. *Respiration*. 2018;96:275-282.
11. He X., Wu Y., Wang H., Yu G., Xu B., Jia N., 他. Slow-pull capillary technique versus suction technique in endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration for diagnosing diseases involving hilar and mediastinal lymph node enlargement. *Ther Adv Respir Dis*. 2020;14:1753466620907037.
12. von Ahlfen Silke, Missel Andreas, Bendrat Klaus, Schlumpberger Martin. Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. *PLOS ONE*. 2007;2:e1261.
13. Jennings L. J., Arcila M. E., Corless C., Kamel-Reid S., Lubin I. M., Pfeifer J., 他. 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.
14. 日本病理学会. ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程. 2014.
Kanai Y, Nishihara H, Miyagi Y, Tsuruyama T, Taguchi K, Katoh H, et al. The Japanese Society of Pathology Guidelines on the handling of pathological tissue samples for genomic research: Standard operating procedures based on empirical analyses. *Pathol Int*. 2018; 68(2): 63-90.
15. Chen H., Luthra R., Goswami R. S., Singh R. R., Roy-Chowdhuri S. Analysis of Pre-Analytic Factors Affecting the Success of Clinical Next-Generation Sequencing of Solid Organ Malignancies. *Cancers (Basel)*. 2015;7:1699-1715.
16. Merker Jason D., Oxnard Geoffrey R., Compton Carolyn, Diehn Maximilian, Hurley Patricia, Lazar Alexander J., 他. Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. *Journal of Clinical Oncology*. 2018;36:1631-1641.
17. Smits Alexander J. J., Kummer J. Alain, de Bruin Peter C., Bol Mijke, van den Tweel Jan G., Seldenrijk Kees A., 他. The estimation of tumor cell percentage for molecular testing by pathologists is not accurate. *Modern Pathology*. 2014;27:168-174.
18. Viray H., Li K., Long T. A., Vasalos P., Bridge J. A., Jennings L. J., 他. A prospective, multi-institutional diagnostic trial to determine pathologist accuracy in estimation of percentage of malignant cells. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137:1545-1549.
19. Mikubo M., Seto K., Kitamura A., Nakaguro M., Hattori Y., Maeda N., 他. Calculating the Tumor Nuclei Content for Comprehensive Cancer Panel Testing. *J Thorac Oncol*. 2020;15:130-137.

付表 検査対象となる検体*

検体種	検体説明
組織検体	【ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織検体】 薄切した組織切片はスライドガラスにマウントさせて提出する。各バイオマーカー検査において規定されている必要枚数の未染色標本作製し、そのうちの 1 枚を HE 染色し腫瘍細胞の存在を確認することが推奨される。特に微小な生検検体では、病理診断の後に再薄切した場合には、腫瘍部分あるいは組織そのものがなくなってしまうことがあるので注意を要する。病理診断時にバイオマーカー検査の実施が予定されている場合は、あらかじめ病理診断用の未染色標本作製時にバイオマーカー検査用標本を余分に作製しておくことも有用である。 検体中の腫瘍細胞の存在状態は様々であるため、病理診断報告書に腫瘍量や腫瘍含有割合を記録しておくことが推奨される。またマクロダイセクションを実施した場合は、その旨と実施後の腫瘍量や腫瘍含有割合を記録することが推奨される。また検査センターへ外注する場合、検査に供した検体の HE 染色標本（マクロダイセクションを行う際に、腫瘍部のマーキングを行った HE 染色標本）は、可能な限り検査後にも再確認できるようにしておくことが望ましい。ホルマリン固定には、10%中性緩衝ホルマリン液が標準的に用いられており、固定時間は 6～48 時間が推奨されている。[1, 2] ※各種生検材料の取扱い [1] ✓ 病変の局在・大きさや、施設で実施可能な手技に応じて、適当な検体採取方法を選択する必要がある。肝・骨生検や超音波内視鏡下穿刺吸引法（EUS-FNA）、外科的生検を考慮する場合は、他科との連携が重要である。気管支内視鏡検査では特に検体が微小であり、様々な工夫が必要である。 ✓ 末梢肺結節に対する腫瘍生検では、仮想気管支鏡画像やナビゲーションの併用は病変への確実な到達を容易にし、気管支腔内超音波断層法（EBUS）にガイドシース法（EBUS-GS法）もしくは細径気管支鏡（EBUS-UT 法）を併用することで再現性が高まり、数多くの検体の採取が可能になる。ただし同一部位で生検を重ねると、後半になるにつれて出血によるアーチファクトが発生する可能性を考慮する必要がある。採取部位を少しずつ変更するなどの工夫をする。一度の生検で大きな検体を採取するために、可能であれば大型の生検鉗子やガイドシースキットを用いる。関与気管支が腫瘍辺縁にしか到達しないような病変では、末梢での経気道的針穿刺後に鉗子生検を行うことでより腫瘍細胞割合の高い検体が採取される。 ✓ 近年国内承認された経気道的生検方法のクライオバイオプシーでは、大きな検体が採取可能で、採取組織から得られた DNA・RNA 量は鉗子生検の約 3 倍であった。 ✓ 超音波ガイド下経気管支針生検（EBUS-TBNA）では、19～25G 穿刺針が使用可能で、22G 針で NGS 解析が十分に可能であったとする報告がある。腫瘍細胞含有率の低下を回避するためには、エラストグラフィを含めた超音波所見による穿刺部位の決定、slow pull 法や迅速細胞診（ROSE 法）の併用が有効である。 ✓ 胸水貯留例では、胸水検体やセルブロック検体が、バイオマーカー検査に提出されていることが多いが、腫瘍細胞割合は低く、注意が必要である。胸腔鏡下に壁側胸膜を生検することで質の高い検体が多く採取可能で、局所麻酔下に安全に施行できるので、可能であれば考慮してもよい。 【新鮮凍結組織検体】 最も高品質の DNA や RNA を抽出可能であるが、同時に DNase や RNase の酵素活性も保持されており、検体の取扱いを迅速に行わなければ、核酸品質を急速に低下させるおそれがあるため、注意を要する。手術室などで割を入れ採取する場合も多いが、腫瘍細胞含有量を顕微鏡的に確認する必要がある。周囲の炎症が強い腫瘍、粘液産生が高度な腫瘍、中心部線維化巣が広範な腫瘍では、腫瘍細胞が採取されず偽陰性になることがある。腫瘍細胞を確認する手段としては以下の方法がある：①凍結腫瘍組織を薄切し、HE 標本作製し、その標本で腫瘍細胞の存在および占有割合を確認する。②採取時に割を入れ、その片割れを凍結組織とし、残りの割面で FFPE 組織標本作製し確認する。[3]

3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い

細胞検体	【体腔液細胞検体】 胸水などの体腔液細胞検体は、腫瘍細胞含有割合が低い場合があり、細胞診標本上での確認が必須である。後述のセルブロック検体およびその HE 標本の作製も考慮されたい。
	【擦過細胞および穿刺吸引細胞検体】 当該検体では適切に腫瘍から採取されれば腫瘍細胞に富んだ検体を採取することができることが報告されている。これら検体については塗抹標本（スメア標本）からの核酸抽出が可能であるが、腫瘍細胞含有割合の確認が必須である。
	【その他細胞検体】 気管支洗浄液（BAL）などの検体では、正常細胞が混入することが多く、腫瘍細胞に富んだ検体を採取することが比較的困難な検体であり、通常感度のバイオマーカー検査法での使用はあまり推奨されない。
	【セルブロック検体 (FFPE 細胞検体)】 胸水などの細胞検体からのセルブロックの検査使用の重要性が増している。セルブロックでの保管により、FFPE 組織検体同様、CDx や鑑別診断などを目的とした IHC 法や FISH 法による解析が、繰り返し可能となる。また腫瘍細胞の含有割合の確認も容易となる。セルブロック作製法は複数知られており、遠心分離細胞収集法と細胞固化法に大別される。本邦ではそれぞれ 4～5 種程度の作製法が用いられていることがこれまでの調査研究で明らかとなっている [4]。前者では遠心管法が、後者ではアルギン酸ナトリウム法が、比較的多くの施設で用いられている [4]。
血漿検体	血漿検体は、組織検体と異なり、腫瘍細胞の割合や DNA の質、量に基づいて評価できないため、血液採取、血漿の分離、血漿検体の保管に至るプレアナリシスの段階において適切に扱われた検体を使用するべきである [5]。特に採血後の検体を長時間室温で放置すると、血球成分の崩壊や DNA の分解の原因につながる。また、血漿成分を分離する際に血球成分が混入すると、有核細胞由来のゲノム DNA が原因で、偽陰性となる可能性があることは注意しなければならない。通常の EDTA-2K の採血管を使用した場合、血漿の分離は、採血後 8 時間以内安定である。血漿分離後の血漿検体は、15～30℃で 1 日間、2～8℃で 3 日間、-25～-15℃で 12 カ月、そして -70℃以下の場合は 12 カ月保管可能である。血漿 CGP 検査では、医療機器認証を受けた指定のセルフリー DNA 抽出用採血管を原則使用する（FoundationOne Liquid がんゲノムプロファイルでは「Roche セルフリー DNA 抽出用採血管」、Guradant360 CDx がん遺伝子パネルでは「Streck 採血管（cell-free DNA BCT）」が採用されている）。
1. 日本肺癌学会「肺癌患者における次世代シーケンサーを用いた遺伝子パネル検査の手引き（第 2.0 版）」 Yatabe Y, Sunami K, Goto K et al., Multiplex gene panel testing for lung cancer patients. Pathol Int. 2020;70(12):921-931.	
2. 日本病理学会「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」 Hatanaka Y, Kuwata T, Morii E et al., The Japanese Society of Pathology Practical Guidelines on the handling of pathological tissue samples for cancer genomic medicine. Pathol Int. 2021;71(11):725-740.	
3. 日本病理学会「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規程」 Kanai Y, Nishihara H, Miyagi Y et al., The Japanese Society of Pathology Guidelines on the handling of pathological tissue samples for genomic research: Standard operating procedures based on empirical analyses. Pathol Int. 2018;68(2):63-90.	
4. 日本臨床細胞学会「がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針（初版）」	
5. ASCO/CAP ジョイントレビュー: Merker JD, Oxnard GR, Compton C et al., Circulating Tumor DNA Analysis in Patients With Cancer: American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists Joint Review. J Clin Oncol. 2018 1;36(16):1631-1641.	

*本表は、日本肺癌学会ホームページ「肺癌バイオマーカー各種検査の手引き 各種検査の手引き」「3. バイオマーカー検査に用いる検体とその取扱い」から転載