

補 遺

- S1. 細胞診材料の取扱いに関する実証データ
- S2. 調査資料

目 次

S1. 細胞診材料の取扱いに関する実証データ	
S1.1 第1版 実証データ	2
S1.2 第2版 実証データ	40
S2. 調査資料	78

S1.1 第1版 実証データ

(実証①～⑬)

細胞診材料の取扱いに関する実証データ（第1版）

本指針作成にあたっては、以下の医療機関および研究機関、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。

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

遺伝子診療部門

桑田 健

臨床検査部

中村 信之

病理・臨床検査科

中井 登紀子

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

病理部/病理診断科

安孫子 光春，石田 裕子，松野 吉宏

協力企業（五十音順）

株式会社医学生物学研究所

サクラファインテックジャパン株式会社

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

ホロジックジャパン株式会社

武藤化学株式会社

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

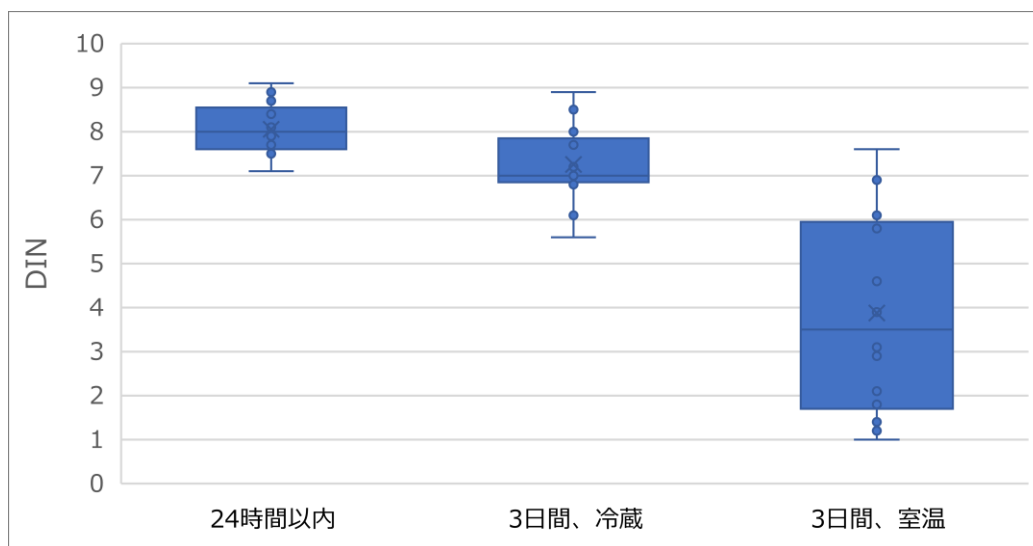
実証データ① 検体処理前の取り扱い

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）の新鮮検体の腫瘍断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 3日間 ③4℃ 3日間とした。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。



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。

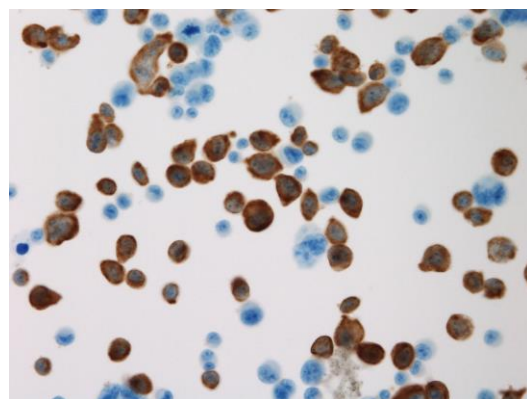
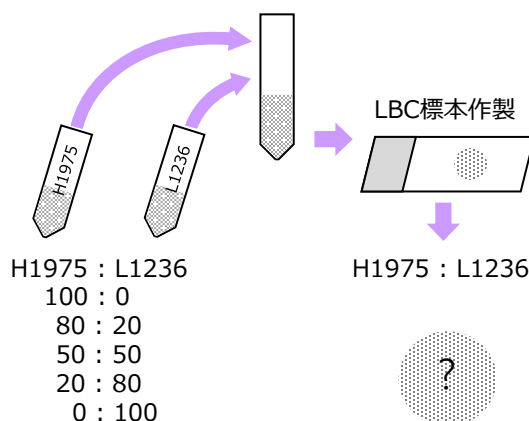
実証データ② 腫瘍細胞含有割合評価法

LBC標本作製前後における腫瘍細胞含有割合の変化の解析

【検討内容】

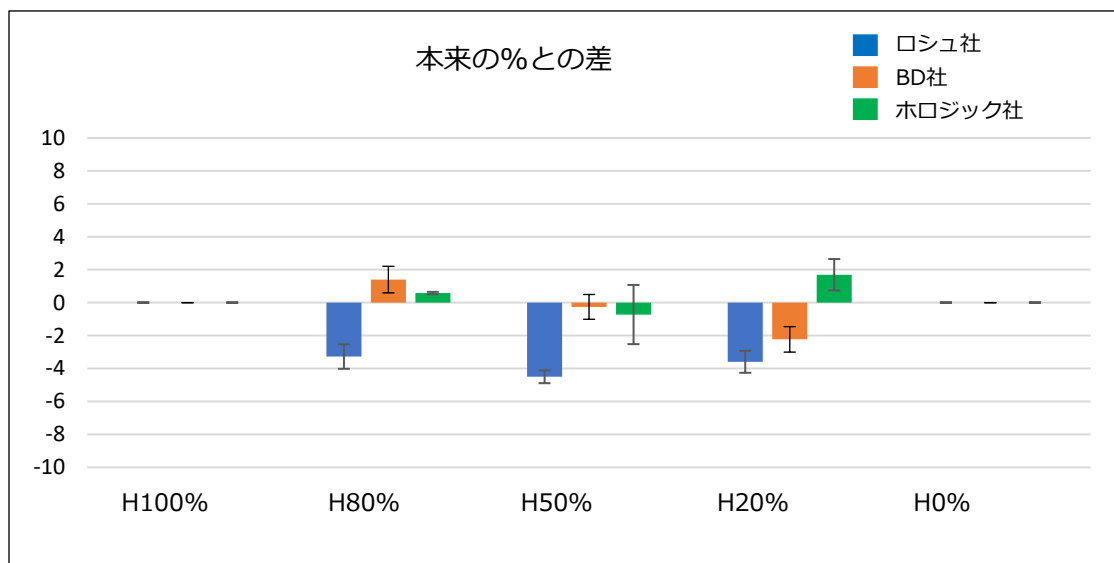
《検 体》肺腺癌細胞株（NCI-H1975）（以下，H1975）とリンパ腫細胞株（L1236）を種々の割合で混合した懸濁液からLBC標本作製し，LBC標本における肺がん細胞とリンパ腫細胞の割合と，懸濁液における割合の違いを検討した．

《方 法》肺腺癌細胞株H1975はCytokeratin7免疫染色陽性であるが，リンパ腫細胞株L1236はCytokeratin7陰性である．この性質を利用するとH1975とL1236を判別することが可能である．そこで，合計細胞数を 1×10^6 とし，H1975とL1236を100:0，80:20，50:50，20:80，0:100の割合で含む細胞懸濁液をそれぞれ調整した．各々の細胞懸濁液はロシュ社，BD社，ホロジック社指定のものを用いた．各々の細胞懸濁液より定法に従ってLBC標本作製し，Cytokeratin7免疫染色を行った．Cytokeratin7陽性，陰性の細胞を各々カウントして，両者の比率を計算した．



Cytokeratin 7染色
(H1975のみ陽性)

	Cytokeratin 7 陽性率		
H1975(H)の割合	ロシュ社 (%)	BD社 (%)	ホロジック社 (%)
H100%	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
H80%	76.72 ± 0.75	81.58 ± 1.11	80.53 ± 0.07
H50%	45.50 ± 0.39	50.01 ± 1.00	50.46 ± 1.91
H20%	16.41 ± 0.66	17.03 ± 0.29	21.41 ± 1.28
H0%	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0



【検討結果/図の説明】

- ・ H1975:L1236の割合が100:0のものをH100%, 80:20のものをH80%, 50:50のものをH50%, 20:80のものをH20%, 0:100のものをH0%とした。各々のサンプルにおいて、独立した3視野におけるcytokeratin7陽性率を調べ、その平均値を示した。
- ・ H100%ではすべての細胞がcytokeratin7陽性であり、H0%ではすべての細胞がcytokeratin7陰性であった。写真はH50%におけるcytokeratin7染色を示す。
- ・ 表に示すようにLBC標本作製前後における腫瘍細胞比率はほぼ一致はしているが、ロシュ社ではH1975細胞の比率がやや少ない傾向があった。
- ・ 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。

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, 6.7×10^5 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50μL）。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。

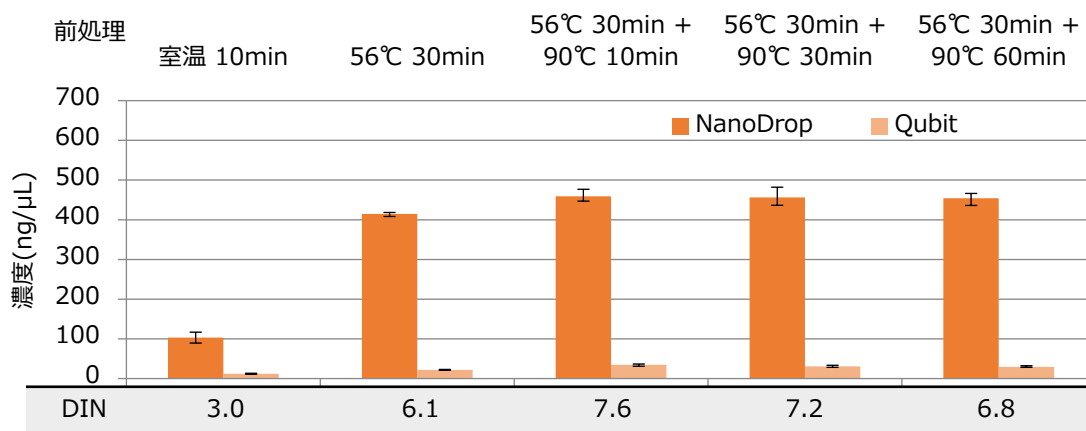


図 LBC保存液検体（CytoRich™ Red）を用いた至適核酸抽出方法（QIAamp®）の検討

【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。

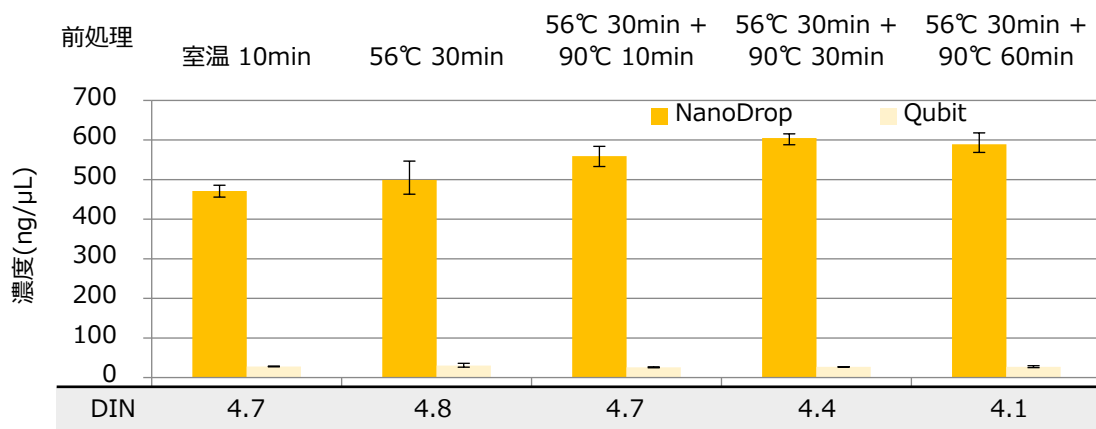


図 LBC保存液検体（CytoRich™ Blue）を用いた至適核酸抽出方法（QIAamp®）の検討

【検討結果/図の説明】

- NanoDrop™を用いた吸光度法による濃度は、56℃、90℃の前処理を加えることで上昇した。この際、90℃の処理時間が長くなるほど濃度も上昇したが、30min以上では差を認めなかった。Qubitを用いた蛍光法の濃度は、いずれの前処理時間でも濃度に差を認めなかった。
- DIN値を指標としたDNAの品質の比較では、90℃による前処理時間が長くなるほど低下する傾向が認められた。

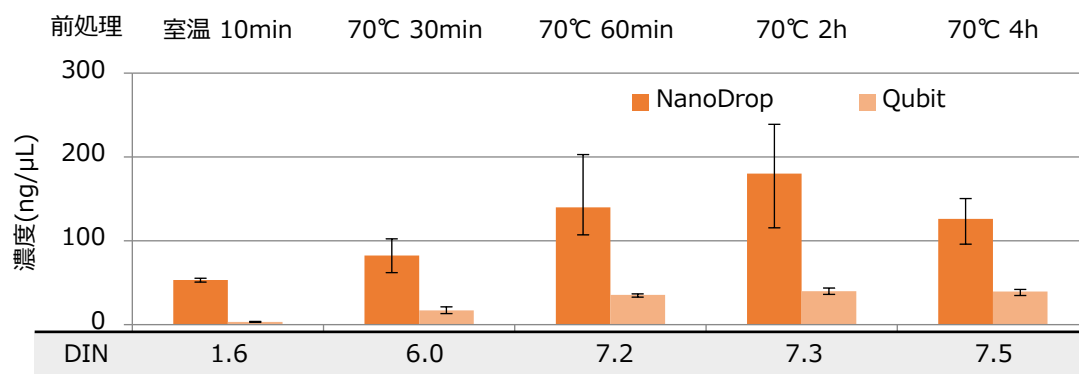


図 LBC保存液検体（CytoRich™ Red）を用いた至適核酸抽出方法（Maxwell®）の検討

【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。

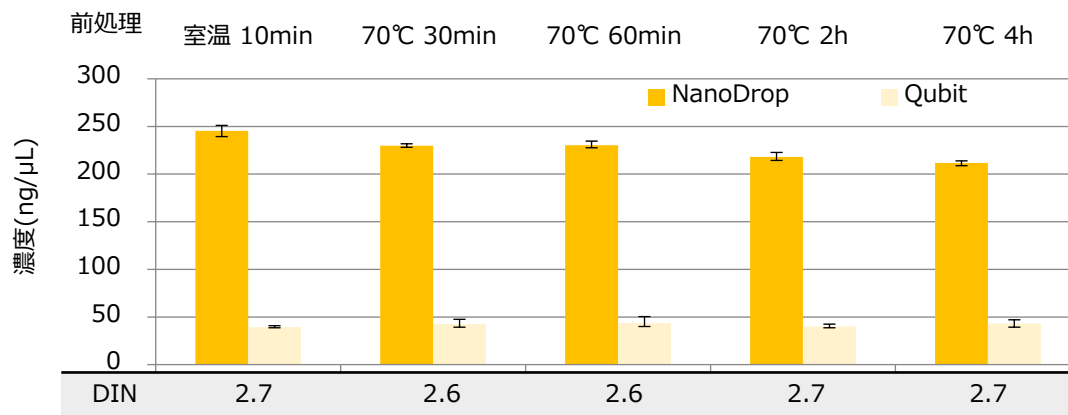


図 LBC保存液検体（CytoRich™ Blue）を用いた至適核酸抽出方法（Maxwell®）の検討

【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。

実証データ④ LBC検体作製法

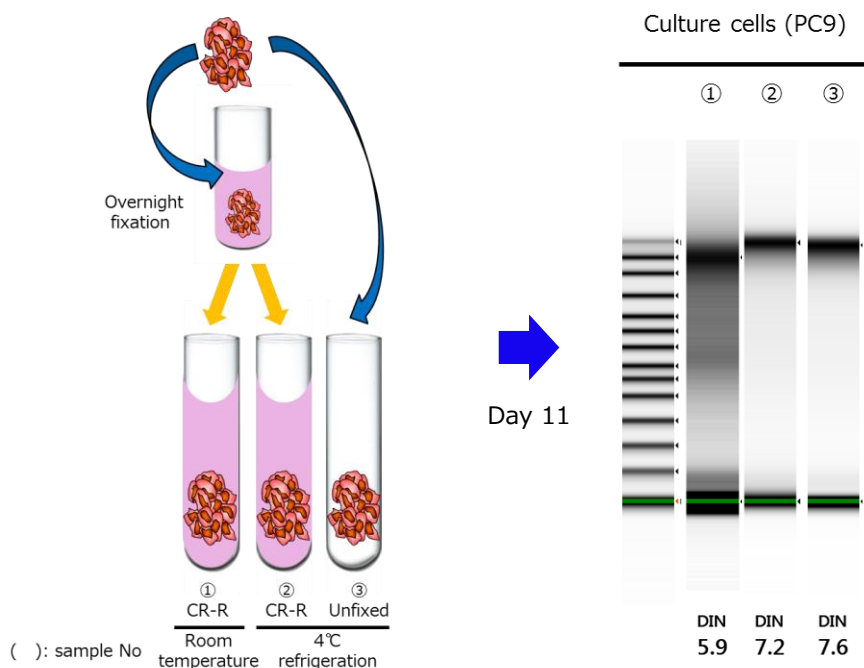
LBC保存液における最適な検体の保管方法

【検討内容】

《検 体》 CytoRich™ Red（非婦人科用，[BD社]）で固定した培養細胞（PC9）を下記の①②③の状態で11日間保管した．その後DNAを抽出し，室温保管と冷蔵保管のどちらが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 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】

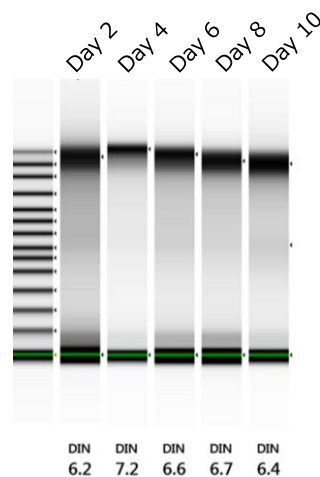
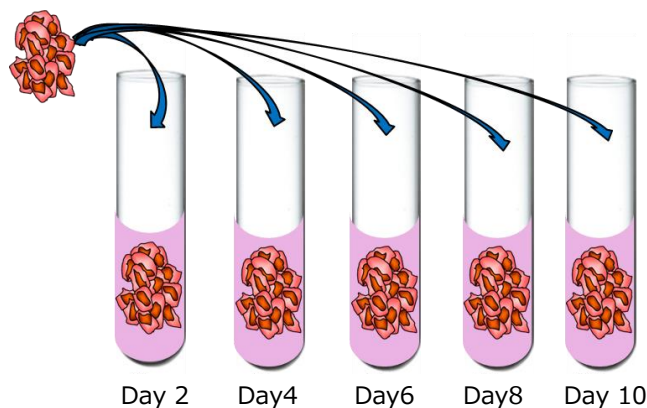
《検体》CytoRich™ Red（非婦人科用，[BD社]）で固定した培養細胞（PC9）を下記の①②の状態ですべて10日間冷蔵保管した。その間，DNAを継続的に抽出し，保管日数がDNA品質に影響を与える影響を確認した。

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

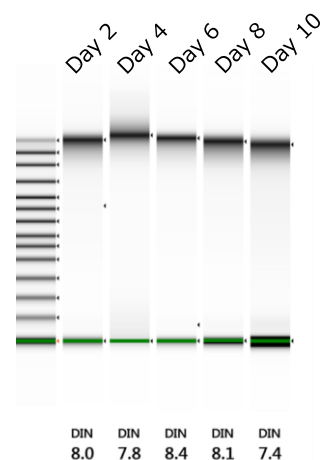
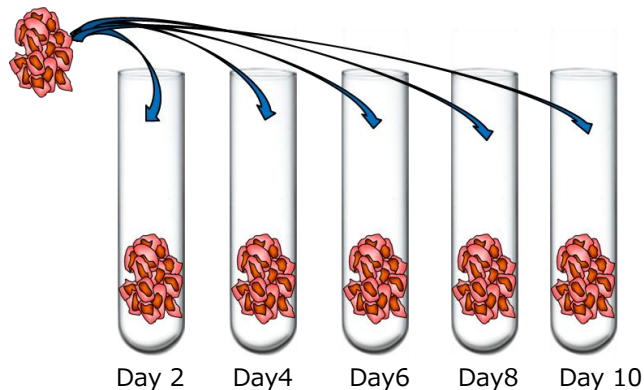
② 未固定の細胞を遠心後にペレット状態にして冷蔵（4℃） 2，4，6，8，10日間保管（対照）

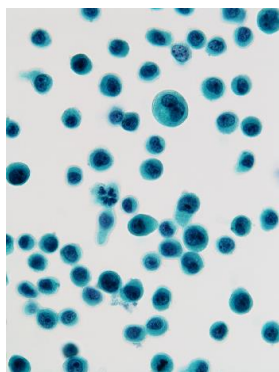
《方法》DNA抽出方法は，QIAamp® DNA Mini Kit [キアゲン社]を使用した。DNA抽出後にDIN値（全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）の確認を行った。また，パパニコロウ染色による形態観察も行った。

① CytoRich™ Redで固定 冷蔵（4℃）保管

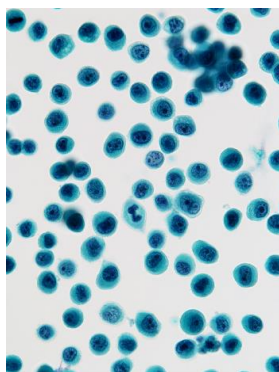


② 未固定 冷蔵（4℃）保管

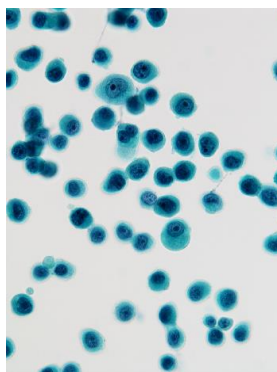




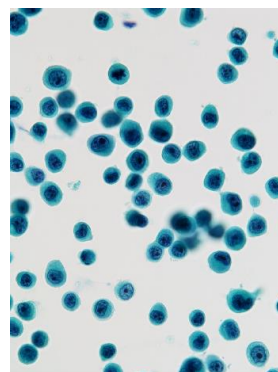
Day 2



Day 4



Day 6



Day 8

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。

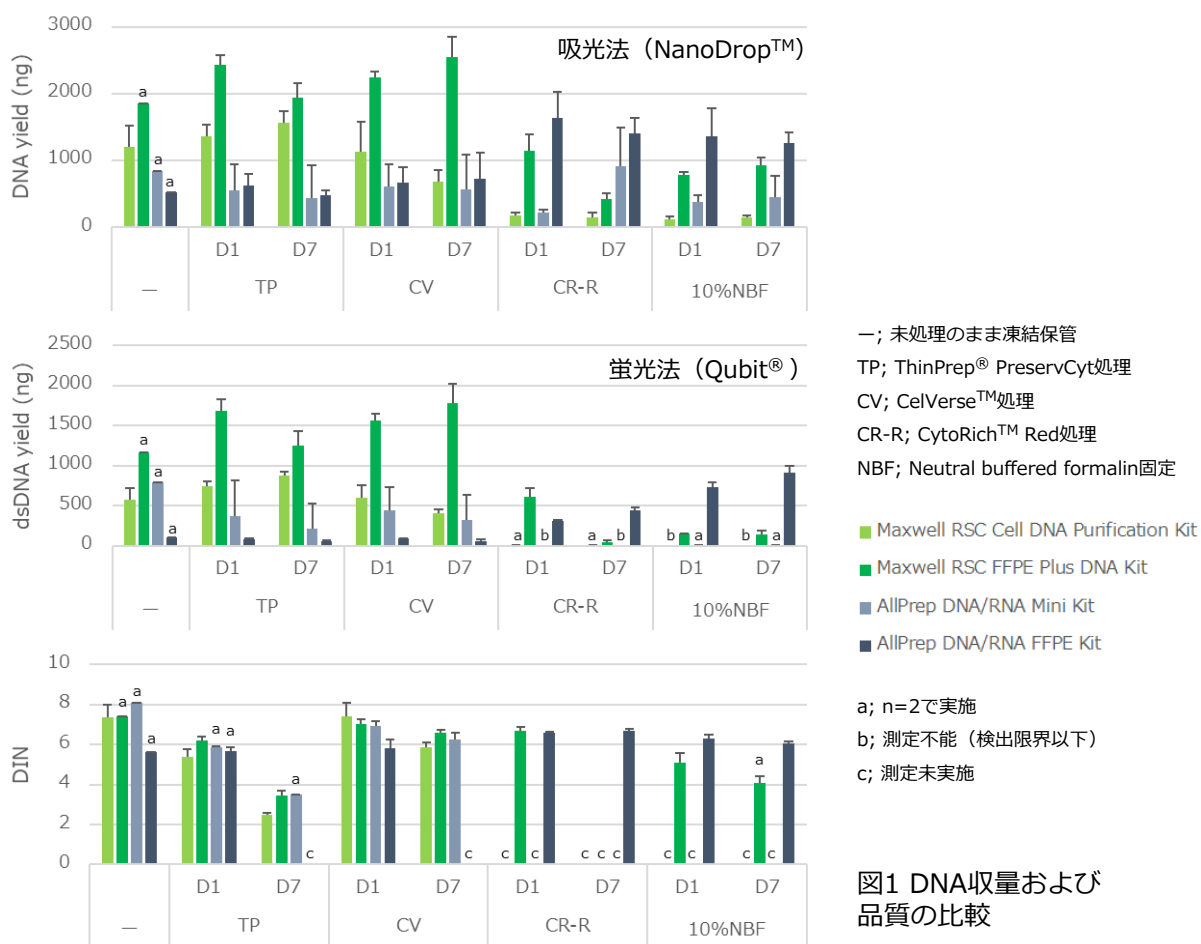
実証データ⑥ LBC検体作製法

LBC保存液処理後に長期冷凍保管を行った細胞におけるDNA/RNA収量および品質の変化

【検討内容】

《検 体》3種のLBC保存液（ThinPrep® PreservCyt, CelVerse™, CytoRich™ Red）および10% 中性緩衝ホルマリン液（NBF）により室温下で1日もしくは7日処理/固定したNCI-H2228細胞を、PBS洗浄したのちに6か月間-80℃保管した検体を用いて、長期冷凍保管によるDNA/RNAの収量/品質の変化について比較検討した。

《方 法》下図にある4種の市販核酸抽出キットを用いて、 1×10^5 個の細胞（Countess® II [サーモFS社]にて細胞数を測定）からDNAおよびRNAをそれぞれ抽出した。吸光度法（NanoDrop™ [サーモFS社]）および 蛍光法（Qubit® [サーモFS社]）により核酸濃度を、全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）によりDIN値およびDV200値をそれぞれ測定した(n=3)。長期冷凍保管による細胞形態への影響はパピニコロウ染色により確認した。



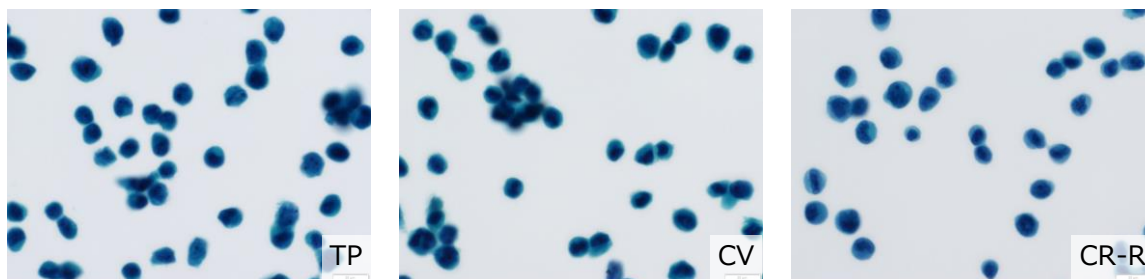
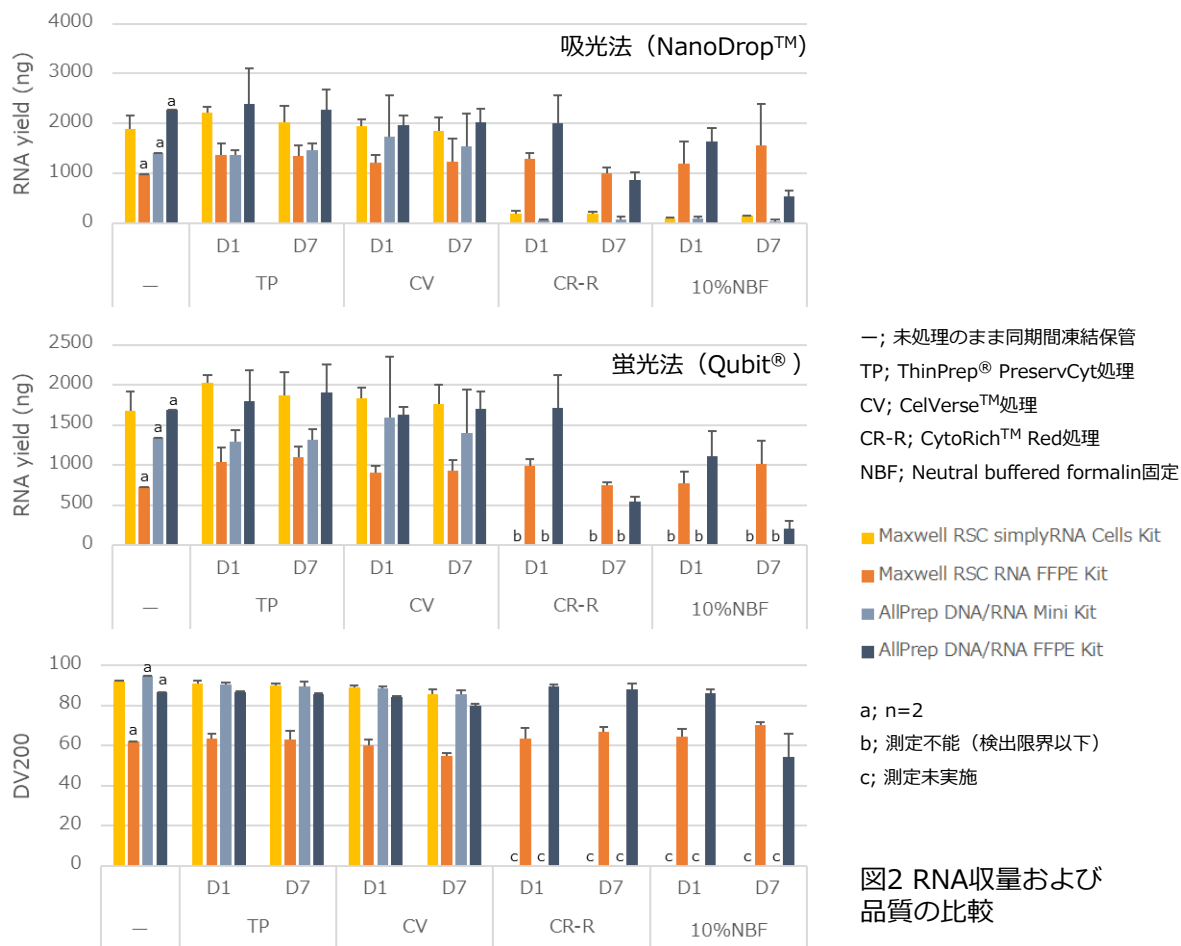


図3 細胞保存液処理(室温, 7日間)後に長期冷凍保管を行ったH2228細胞の細胞形態 (Pap染色)

【検討結果/図の説明】

- ・ LBC保存液処理後に長期冷凍保管した細胞のDNAおよびRNAの収量および品質は、未処理後に同期間凍結保管と概ね同程度であったが、LBC保存液と核酸抽出キットとの組み合わせによって、それら指標値は大きく変動した。
- ・ LBC保存液処理後に長期冷凍保管した細胞は、一定の形態観察が可能であった。

実証データ⑦ LBC検体作製法

各種LBC保存液における形態変化とDNAへの影響

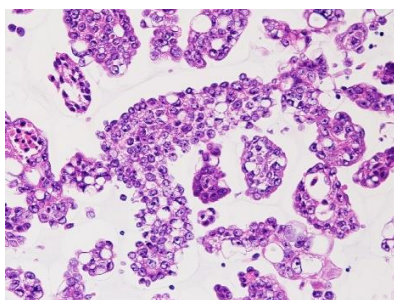
【検討内容】

《検 体》体腔液検体提出後に、以下のLBC保存液・固定液による卵巣癌臨床検体（1例のみ）を4日間保管した。アルギン酸ナトリウム法にてセルブロックを作製し、形態変化とDNAへの影響を確認した。

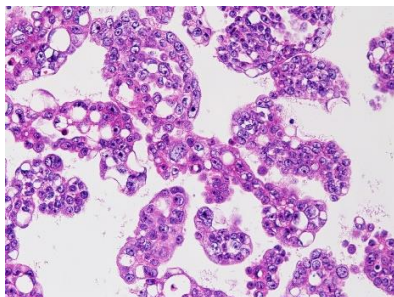
- ① CytoRich™ Red（非婦人科用 [BD社]）
- ② ThinPrep® PreservCyt（非婦人科用 [ホロジック社]）
- ③ Cellprep®（穿刺吸引，体腔液用保存液 [ロシュ・ダイアグノスティック社]）

《方 法》DNA抽出方法は、コバスDNAプレパレーションキット（FFPE）および自動抽出装置（QIAcube [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。また、HE染色による形態確認とIHC染色（WT1抗体）により染色性の確認も行った。

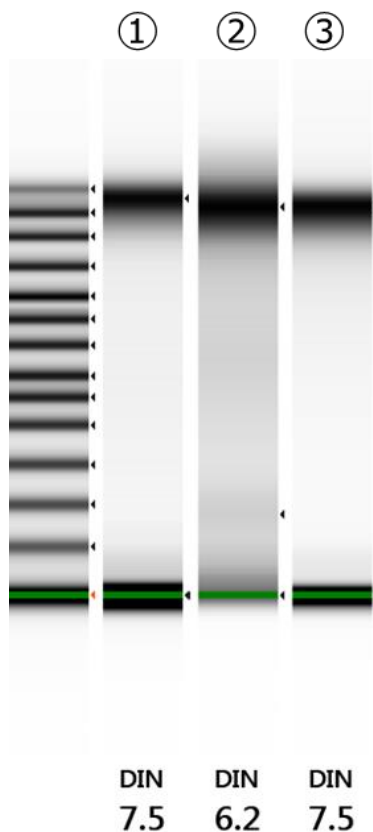
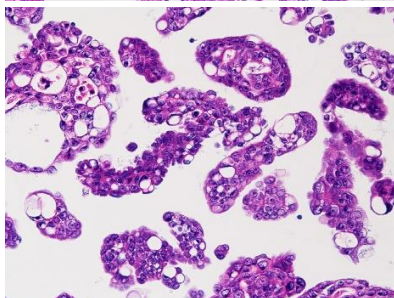
① SurePath™

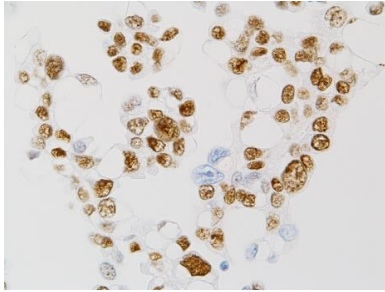


② ThinPrep®

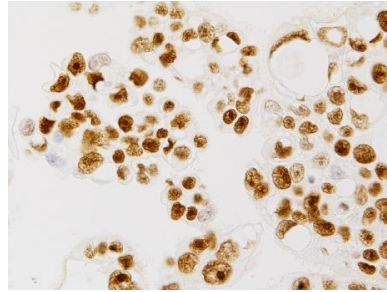


③ Cellprep®

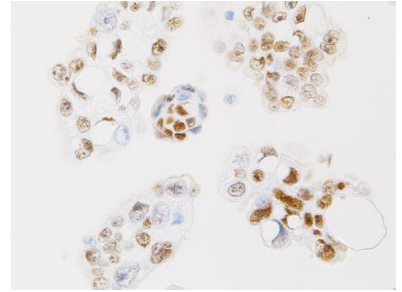




① SurePath™



② ThinPrep®



③ Cellprep®

図 LBC保存液処理後に作製されたセルブロックにおける免疫染色の染色性比較（WT1）

【検討結果/図の説明】

- ・ 各種LBC保管後のアルギン酸ナトリウムセルブロック法における形態変化（HE染色）はほとんどみられず，顕著な影響はなかった．
- ・ 各種LBC保管後のアルギン酸ナトリウムセルブロック法におけるDIN値は，比較的高品質を保っており，影響はほとんどみられなかった．
- * 各種LBC保管後のアルギン酸ナトリウムセルブロック法における免疫染色は可能である．

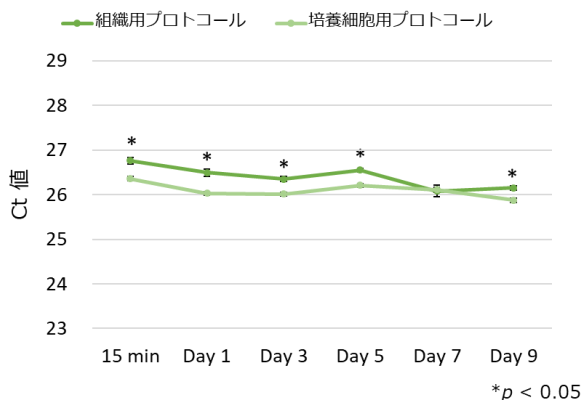
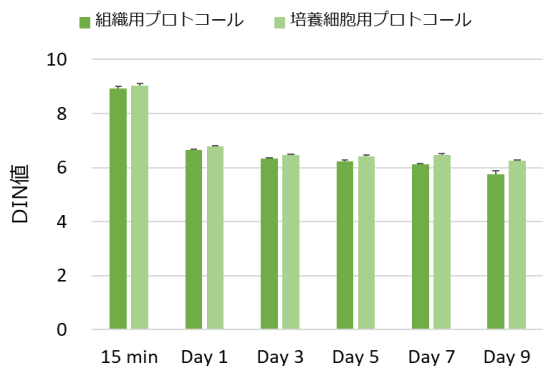
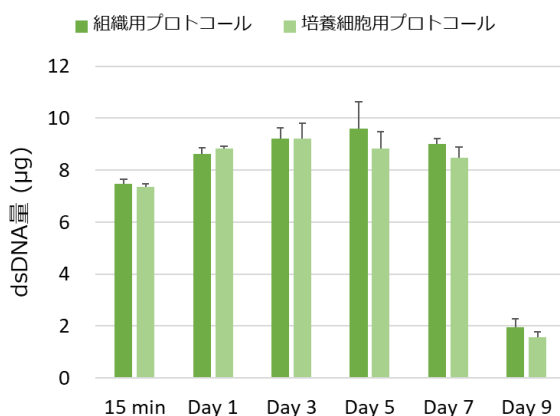
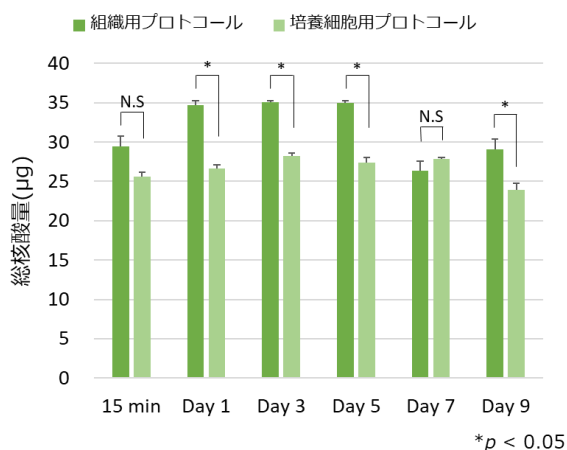
実証データ⑧ LBC検体作製法

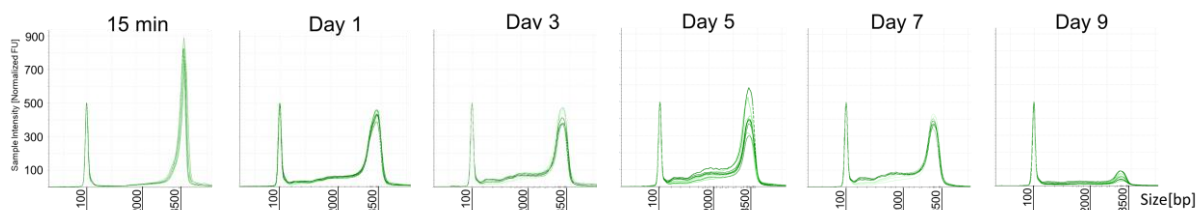
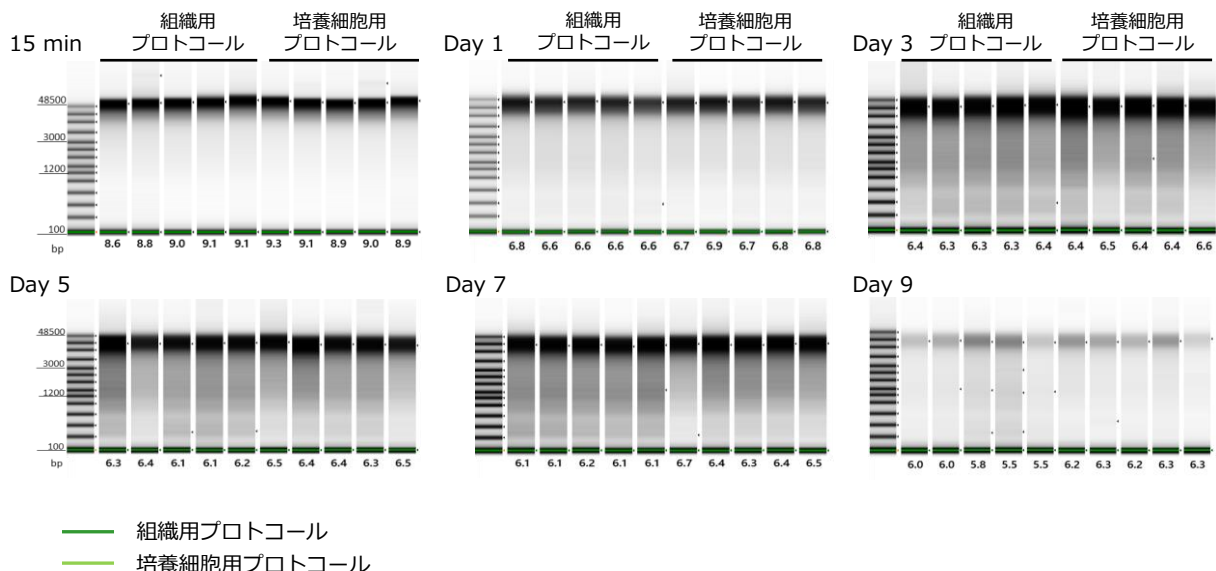
ThinPrep® PreservCytで固定した肺腺癌細胞株の保管期間と核酸抽出方法の違いがDNAの保存・安定性へ及ぼす影響

【検討内容】

《検 体》1mLのThinPrep® PreservCyt液（非婦人科用，[ホロジック社]）で 1×10^6 個のNCI-H1975細胞を固定し，室温で保管（15分，1，3，5，7，9日）した後に，2種類の方法で抽出したゲノムDNAを用いて，保管期間および抽出方法の違いがDNAの安定性に与える影響について比較検討した．（N=5）

《方 法》抽出キット（QIAamp® DNA Mini Kit [キアゲン社]）の組織用と培養細胞用の2種類のプロトコル（RNase不使用）を用いてDNAを抽出し，吸光度法（Spectrophotometer [DeNovix社]）によって総核酸量を，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）によってdsDNAの収量，DIN値を測定した．さらに，Cycleave法によるリアルタイムPCRを用いてEGFR L858R点変異を検出し，Ct値を比較することで核酸品質の評価を行った．





【検討結果/図の説明】

- ・ 総核酸量およびdsDNA量：組織用抽出方法では7日目から総核酸量が減少し，細胞用抽出方法では9日目において減少傾向にあった．抽出方法の比較では，7日目を除くすべての固定時間において，組織用抽出方法の方が高い収量が認められた．一方，dsDNA量はすべての固定時間において，抽出方法による差はほとんど認められなかった．固定時間については，9日目における急激な収量の低下（15分固定と比較して，組織用が73.7%減，細胞用が78.5%減）が認められた．
- ・ DIN値：固定1日目においてDIN値が低下し，その後は9日目までほぼ同様の値を認めた．抽出方法の違いについては，細胞用抽出方法の方が若干の高値を示したものの，ほぼ同等の値が認められた．
- ・ Cycleave PCRのCt値：固定時間の経過によるCt値の大きな変化は認められず，dsDNA量が減少した9日目においても十分に検出可能であった．抽出方法の違いによる差は，7日目を除いた固定時間において，細胞用抽出方法の方がCt値に若干の低値が認められたものの（Ct値の差は，最小が9日目の0.28，最大が1日目の0.47）大きな差は認められなかった．

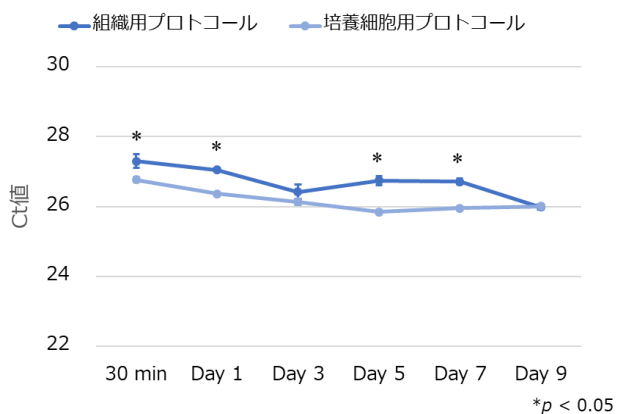
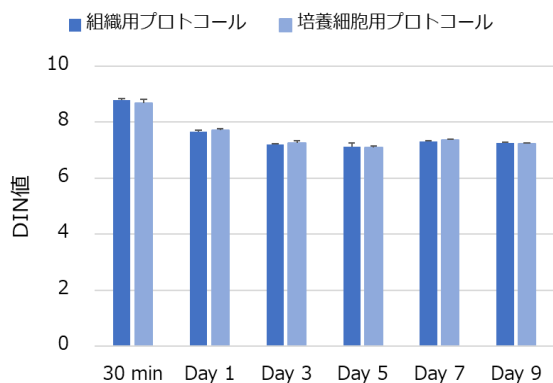
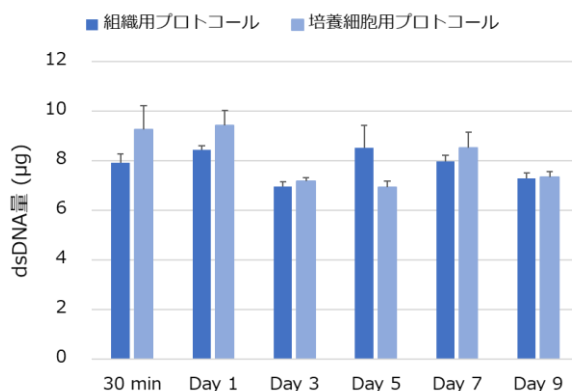
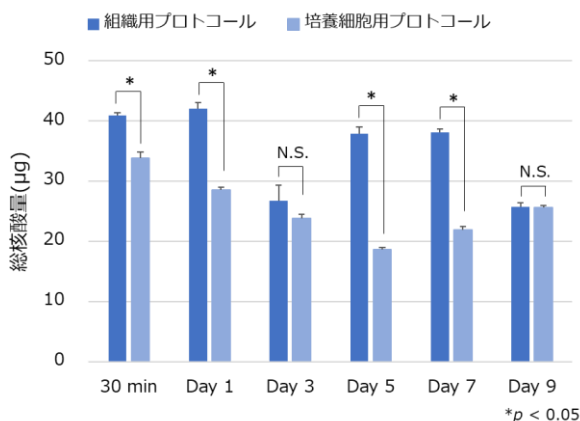
実証データ⑨ LBC検体作製法

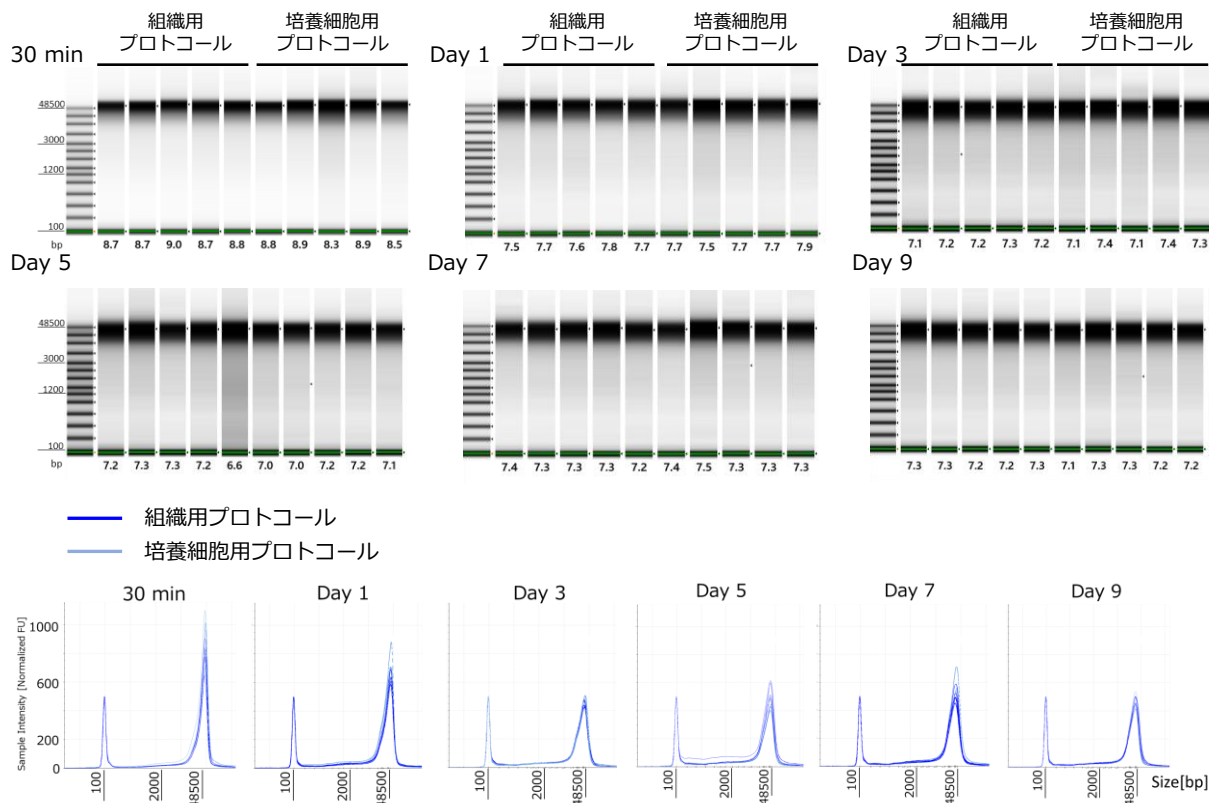
Cellprep®で固定した肺腺癌細胞株の保管期間と核酸抽出方法の違いがDNAの保存・安定性へ及ぼす影響

【検討内容】

《検 体》1mLのCellprep®（呼吸器用，[ロシュ・ダイアグノスティック社]）で 1×10^6 個のNCI-H1975細胞を固定し，室温で保管（30分，1，3，5，7，9日）した後に，2種類の方法で抽出したゲノムDNAを用いて，保管期間および抽出方法の違いがDNAの安定性に与える影響について比較検討した．（N=5）

《方 法》抽出キット（QIAamp® DNA Mini kit，[キアゲン社]）の組織用と培養細胞用の2種類のプロトコル（RNase不使用）を用いてDNAを抽出し，吸光度法（Spectrophotometer [DeNovix社]）によって総核酸量を，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）によってdsDNAの収量，DIN値を測定した．さらに，Cycleave法によるリアルタイムPCRを用いてEGFR L858R点変異を検出し，Ct値を比較することで核酸品質の評価を行った．





【検討結果/図の説明】

- 総核酸量およびdsDNA量：組織用抽出方法では3日目に核酸量が減少したが、5および7日目に再び増加し、さらに9日目では3日目と同等の量へ減少した。培養細胞用抽出方法では5日目まで徐々に減少したが、7～9日目にかけて増加し、9日目では3日目と同等量が認められた。抽出方法の比較では、3と9日目を除く全ての固定時間において、組織用の抽出方法の方が高い収量が認められた。一方、dsDNA量は組織用と細胞用の抽出方法の両者において、共に3日目に減少が認められたが、その後9日目までそれ以上の減少は認められなかった。
- DIN値：組織用と細胞用の両抽出方法において、固定1日目においてDIN値が低下し、その後は9日目までほぼ同様の値を認めた。組織用と細胞用の抽出方法における差は認められなかった。
- Cycleave PCRのCt値：固定時間の経過によるCt値の大きな変化は認められなかった。抽出方法の違いによる差は、9日目を除いたすべての固定時間において、細胞用抽出方法の方が若干の低値が認められたものの（Ct値の差は、最小が3日目の0.53，最大が5日目の0.9）大きな差は認められなかった。

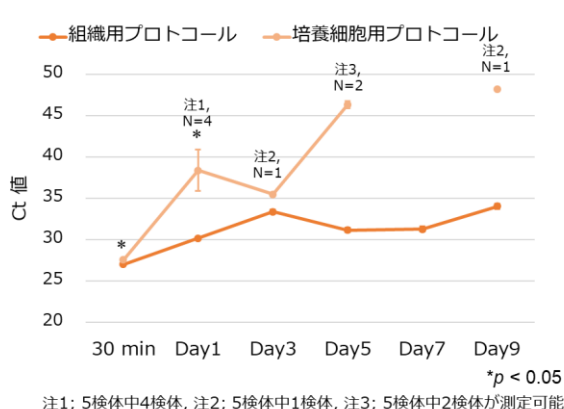
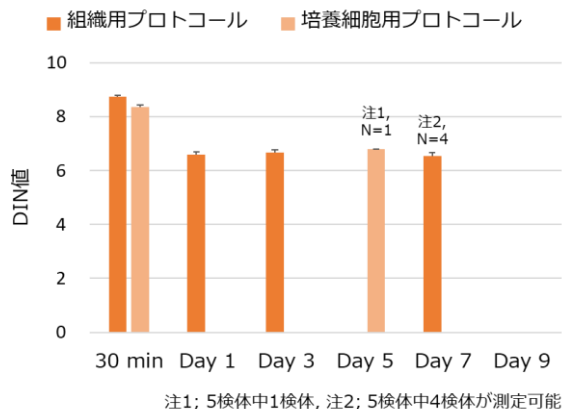
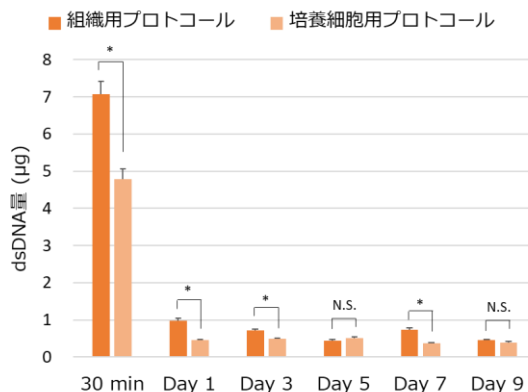
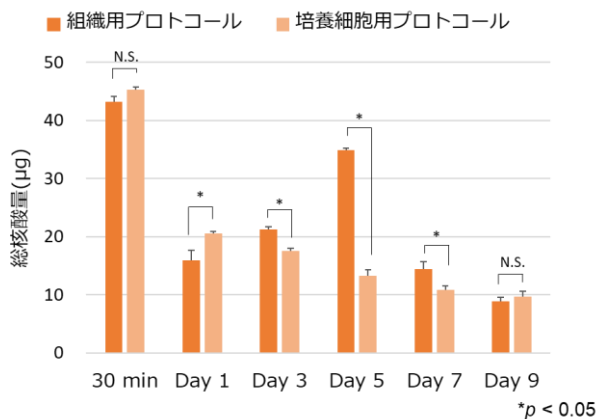
実証データ⑩ LBC検体作製法

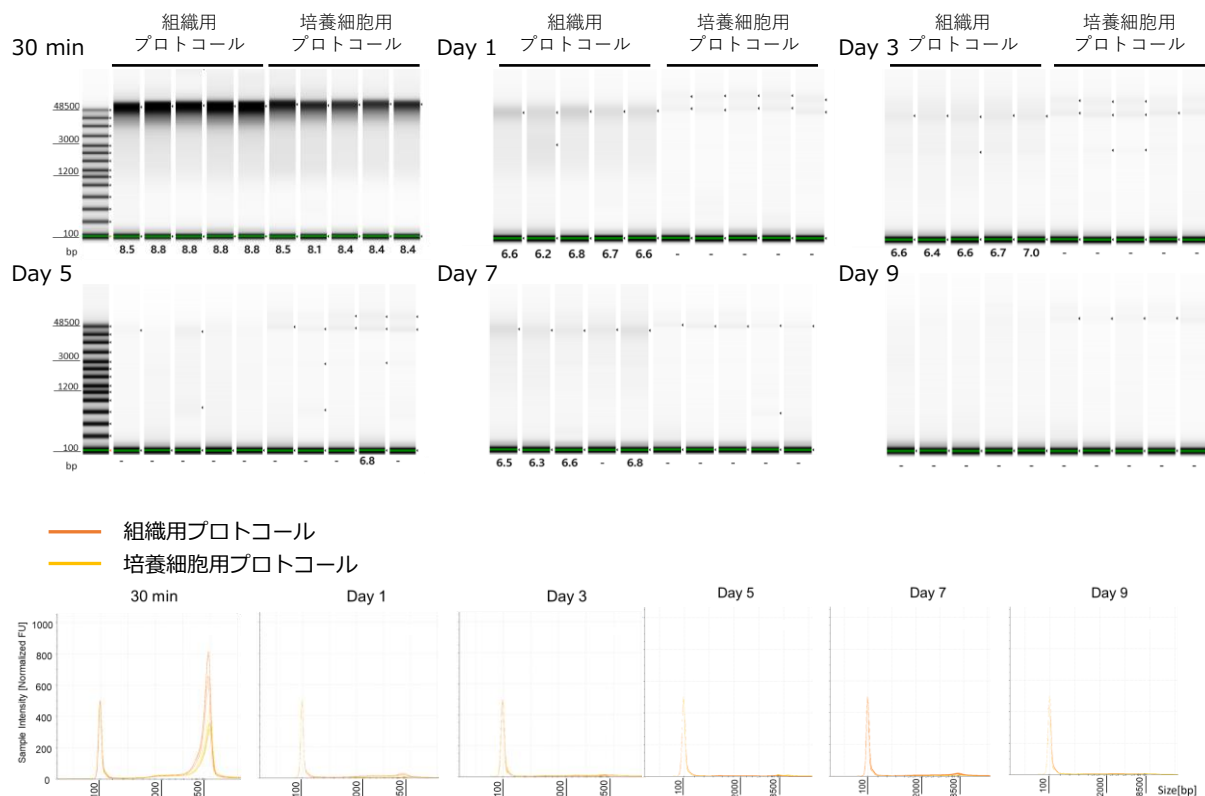
CytoRich™ Red液で固定した肺腺癌細胞株の保管期間と核酸抽出方法の違いがDNAの保存・安定性へ及ぼす影響

【検討内容】

《検 体》1mLのCytoRich™ Red（非婦人科用，[BD社]）で 1×10^6 個のNCI-H1975細胞を固定し，室温で保管（30分，1，3，5，7，9日）した後に，2種類の方法で抽出したゲノムDNAを用いて，保管期間および抽出方法の違いがDNAの安定性に与える影響について比較検討した．（N=5）

《方 法》抽出キット（QIAamp® DNA Mini kit，[キアゲン社]）の組織用と培養細胞用の2種類のプロトコル（RNase不使用）を用いてDNAを抽出し，吸光度法（Spectrophotometer [DeNovix社]）によって総核酸量を，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）によってdsDNAの収量，DIN値を測定した．さらに，Cycleave法によるリアルタイムPCRを用いてEGFR L858R点変異を検出し，Ct値を比較することで核酸品質の評価を行った．





【検討結果/図の説明】

- 総核酸量およびdsDNA量：組織用と細胞用の両抽出方法において、1日目から核酸量が半減した。組織用抽出方法の5日目において再度増加したが、その後固定時間の経過とともに減少した。抽出方法の比較では、5日目を除くすべての固定時間において、顕著な差は認められなかった。一方、dsDNA量は5日目を除くすべての固定時間において、組織用の抽出方法の方が高い収量が認められた。固定時間については、両抽出方法で1日目以降における急激な収量の低下が認められた。
- DIN値：細胞用抽出方法では固定3日目まで、細胞用抽出方法では固定30分後まで、すべての検体(N=5)が測定可能であった。5日目の細胞用抽出方法では5検体中1検体が、7日目の組織用抽出方法では5検体中4検体が測定可能であったが、これらはいずれもアジレント社が推奨する濃度(5~300ng/μL)より低濃度の為、参考値とみなす。また、一部の検体が測定不能であったが、その原因は抽出されたDNA濃度が低く、DIN測定範囲外であったためと考えられる。
- Cycleave PCRのCt値：組織用抽出方法においては、固定時間の経過とともにCt値の増加が認められた。細胞用固定方法においては、5検体すべての変異検出が可能であったのは固定30分後のみで、固定1日目では5検体中4検体、3日目と9日目では5検体中1検体、5日目では5検体中2検体が検出可能であった。抽出方法の比較では、30分を除くすべての固定時間において組織用抽出方法の方が低値を認めた。

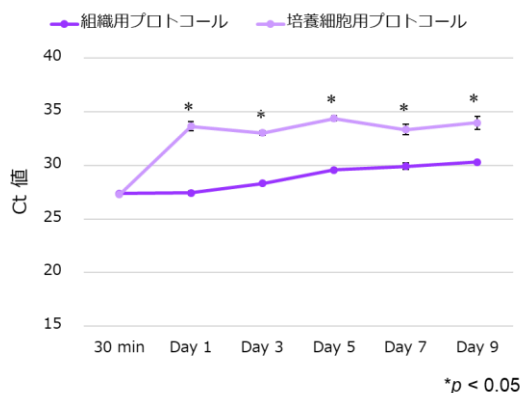
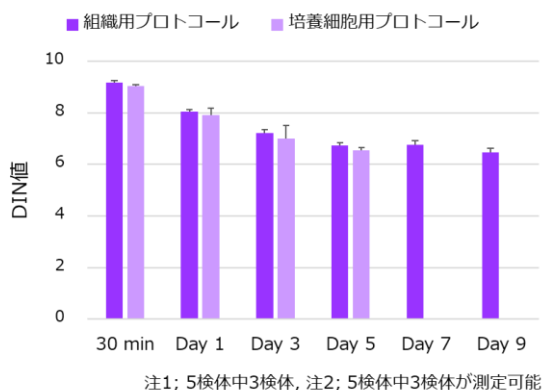
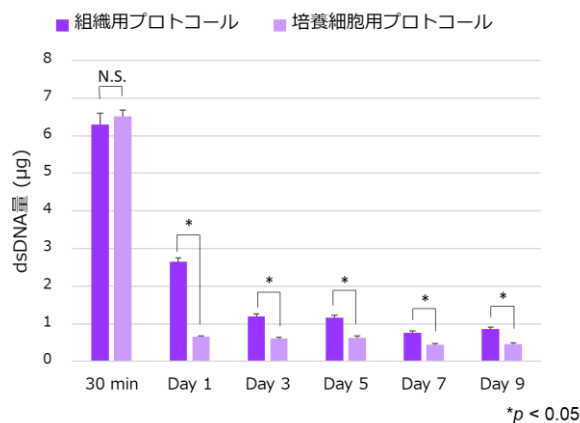
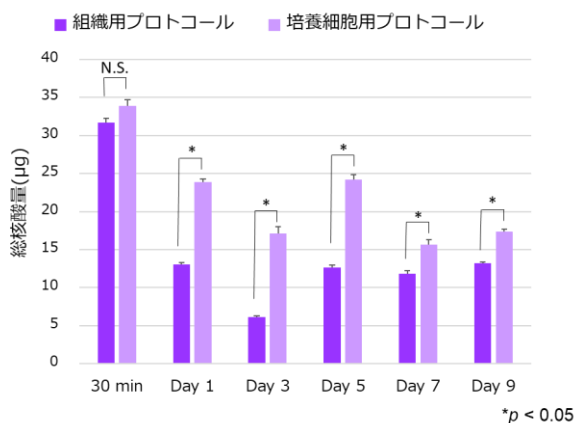
実証データ⑪ LBC検体作製法

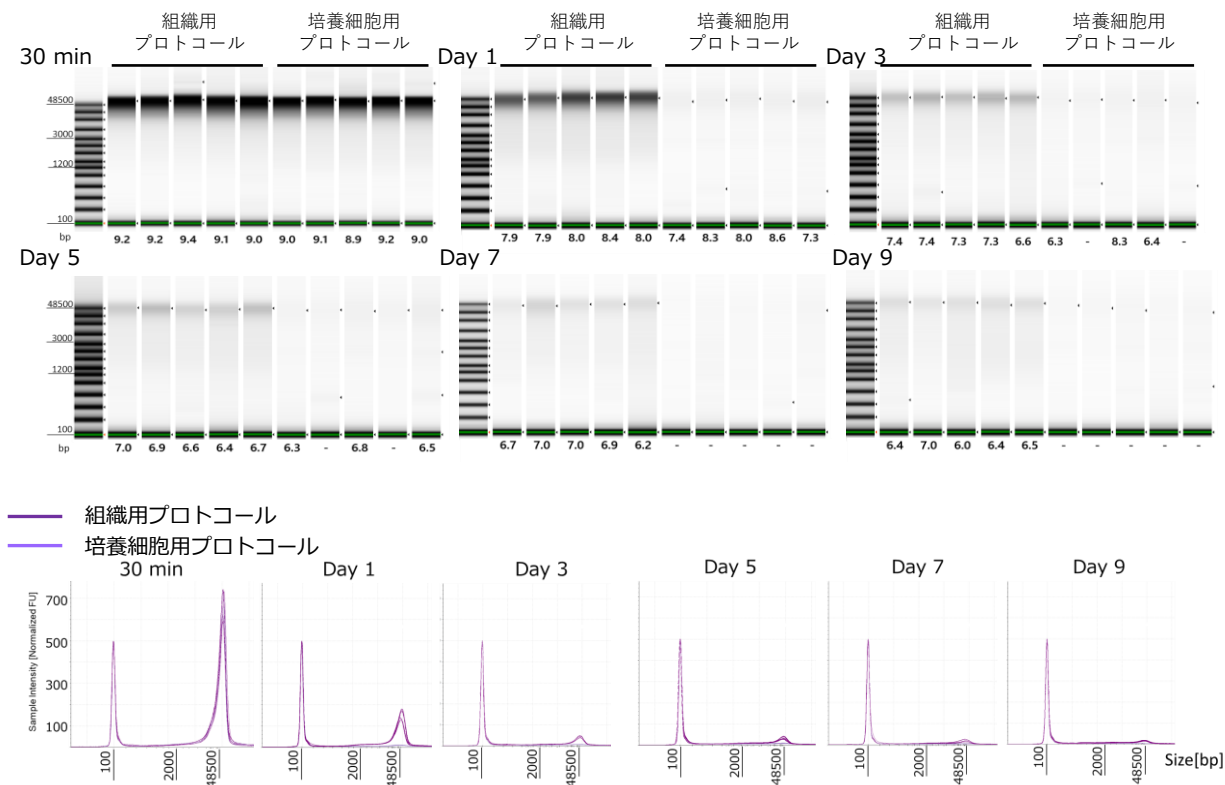
LBCプレップ2で固定した肺腺癌細胞株の保管期間と核酸抽出方法の違いがDNAの保存・安定性へ及ぼす影響

【検討内容】

《検 体》1mLのLBCプレップ2（非婦人科用，[武藤化学]）で 1×10^6 個のNCI-H1975細胞を固定し，室温で保管（30分，1，3，5，7，9日）した後に，2種類の方法で抽出したゲノムDNAを用いて，保管期間および抽出方法の違いがDNAの安定性に与える影響について比較検討した．（N=5）

《方 法》抽出キット（QIAamp® DNA Mini kit，[キアゲン社]）の組織用と培養細胞用の2種類のプロトコル（RNase不使用）を用いてDNAを抽出し，吸光度法（Spectrophotometer [DeNovix社]）によって総核酸量を，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）によってdsDNAの収量，DIN値を測定した．さらに，Cycleave法によるリアルタイムPCRを用いてEGFR L858R点変異を検出し，Ct値を比較することで核酸品質の評価を行った．





【検討結果/図の説明】

- 総核酸量およびdsDNA量：組織用の抽出方法では1日目で総核酸量が半分以下に減少し（58.8%減），3日目にさらに半減したが，5～9日目では1日目と同等の核酸量が認められた．細胞用抽出方法では，総核酸量が3日目まで徐々に減少し，5日目では1日目と，7および9日目では3日目と同等の収量が認められた．抽出方法の比較では，すべての固定時間において，培養細胞用抽出方法の方が収量が高かった．一方，dsDNA量は組織用の抽出方法で1日目に半分以下に減少し（57.9%減），その後固定時間の経過と共に減少した．細胞用では1日目に急激に減少し（89.8%減），3および5日目，7および9日目の収量はほぼ同等であった．抽出方法の比較では，30分を除くすべての固定時間において組織用抽出方法の方が高い収量が認められた．
- DIN値：固定時間の経過とともにDIN値が緩やかに減少した．30分～5日目まで抽出方法の違いによる差は認められず，固定時間の経過によるDIN値の減少傾向も同様であった．しかしながら，培養細胞用抽出方法では7および9日目のDIN値は測定不能であった．測定不能な原因としては，抽出されたDNA濃度が低く，DIN測定範囲外であったためと考えられる．
- Cycleave PCRのCt値：組織用の抽出方法において，固定3日目から固定時間の経過と共にCt値の上昇が認められた．細胞用抽出方法においては，1日目から上昇し，その後は9日目までほぼ同等のCt値であった．抽出方法を比較すると，30分を除くすべての固定時間において組織用抽出方法の方がCt値が有意に低く，30分以上固定した検体の抽出には組織用抽出方法が適している事が示された．

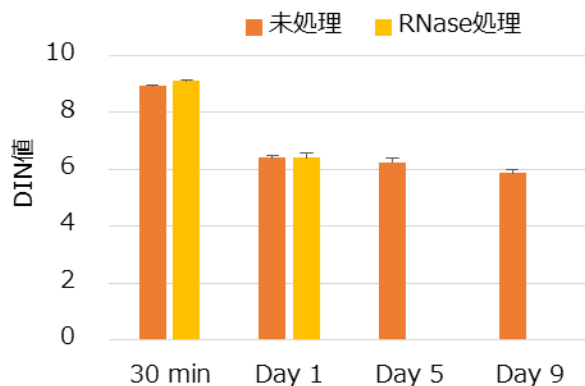
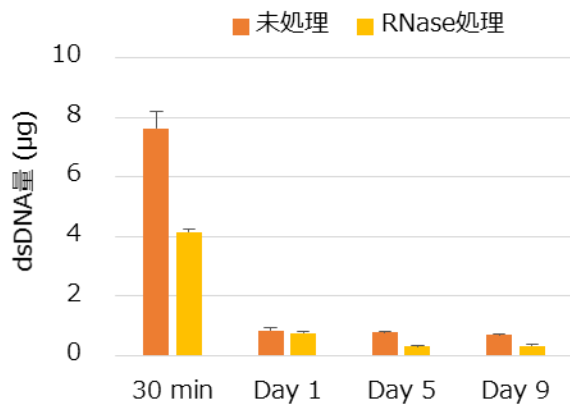
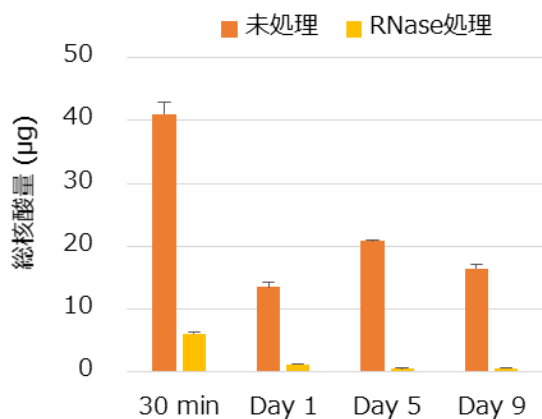
実証データ⑫ LBC検体作製法

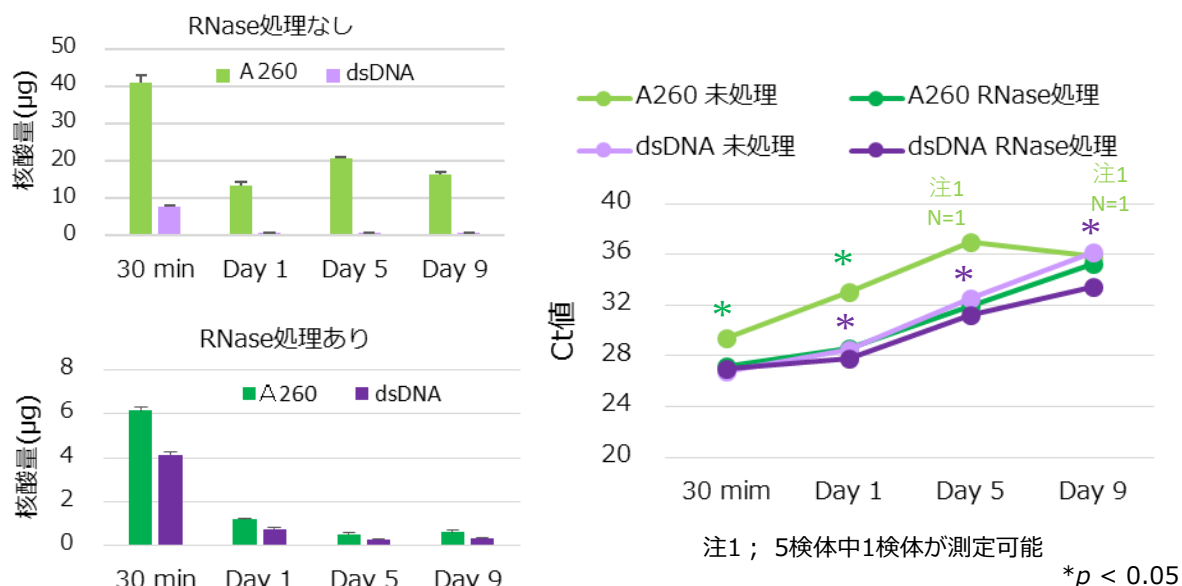
CytoRich™ Redで固定した肺腺癌細胞株の保管期間と核酸抽出方法におけるRNase処理の有無による違いがDNAの保存・安定性へ及ぼす影響

【検討内容】

《検 体》1mLのCytoRich™ Red（非婦人科用，[BD社]）で 1×10^6 個の肺腺癌細胞株検体（NCI-H1975）を固定し，室温で保管（30分，1，5，9日）した後に，RNase処理の有/無しの2種類の方法で抽出したゲノムDNAを用いて，保管期間およびRNase処理の有無の違いがPCRに与える影響について比較検討した。（N=5）

《方 法》抽出キット（QIAamp® DNA Mini kit，[キアゲン社]）の組織用のプロトコールを用いてDNAを抽出し，吸光度法（Spectrophotometer [DeNovix社]）によって総核酸量を，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）によってdsDNAの収量，DIN値を測定した．さらに，吸光度（A260）によるDNA濃度とTapeStationによるdsDNA濃度から算出した1ngのDNAを用いて，Cycleave法によるリアルタイムPCRを用いてEGFR L858R点変異を検出し，Ct値を比較することでRNase処理が遺伝子解析に及ぼす影響について評価した．



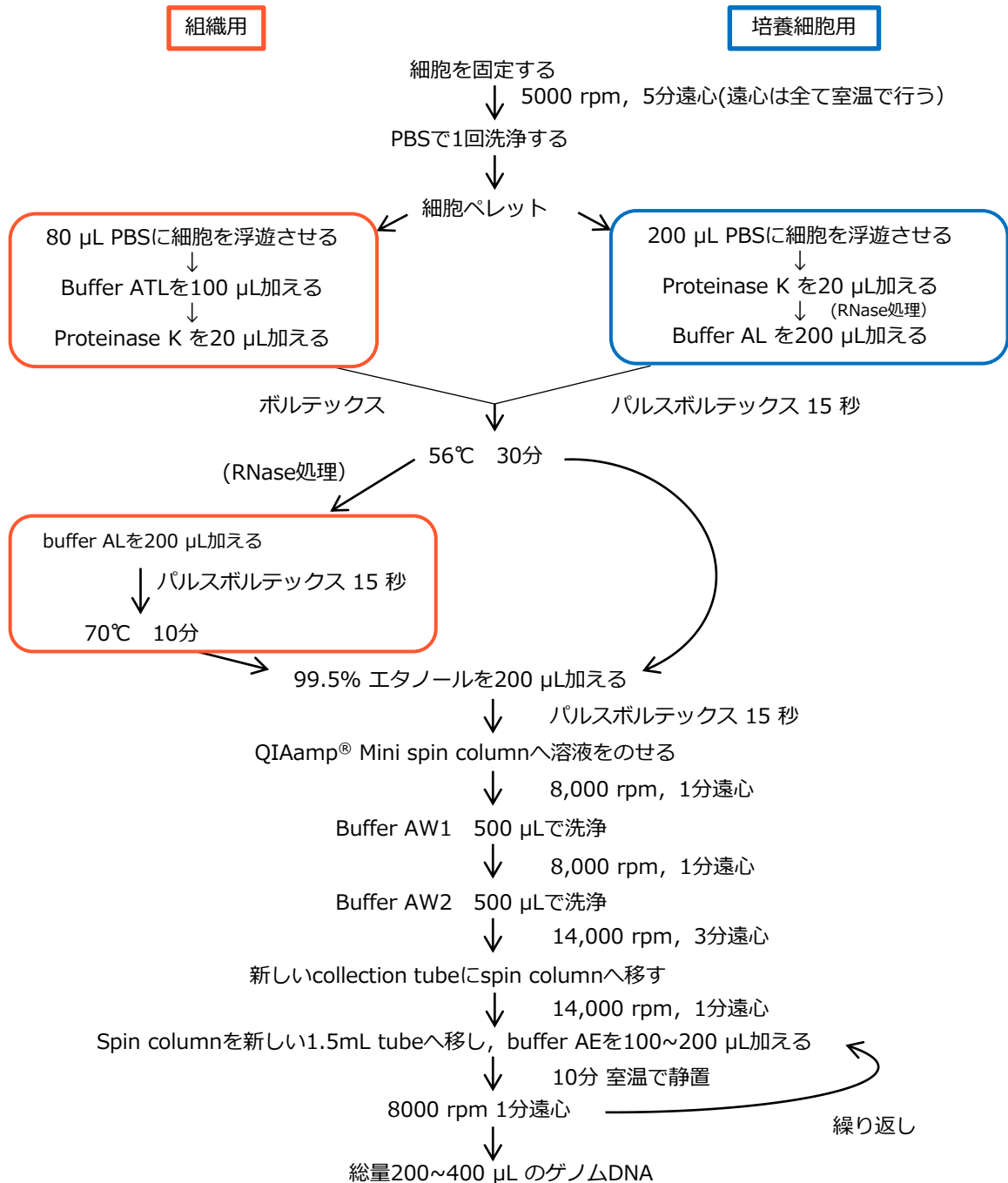


【検討結果/図の説明】

- 総核酸量およびdsDNA量：固定1日目からRNase処理/未処理の両者において核酸量の減少が認められた。RNase処理することで核酸量が大幅に減少することから、RNase未処理の検体には多くのRNAが混入していることが示された。また、dsDNA量も固定1日目から大幅に減少した。
- DIN値：RNase処理の有無はDIN値に影響を与えなかった。しかし、RNase処理したDay5およびDay9の検体は全て測定できなかった。測定不能な原因としては、抽出されたDNA濃度が低く、DIN測定範囲外であったと考えられる。また、固定1日目以降のDIN値はRNase処理の有無にかかわらず全てアジレント社が推奨する濃度(5~300ng/μL)より低濃度の為、参考値とみなす。
- Cycleave PCRのCt値：RNase処理の有無によるCt値を比較したところ、吸光度(A260)の測定によるDNA濃度から算出したものはすべての固定時間において、TapeStationによるdsDNA濃度から算出したものは30分固定を除くすべての固定時間において、RNase処理によりCt値の低下が認められた。
- * これらの結果から、PCRに用いる検体はRNase処理を行う事で検出効率が高くなることが示された。しかし、固定時間が長い場合は時間の経過によりDNA量が減少する上に、RNase処理によって得られるDNA量も減少する事を考慮する必要がある。また、RNase処理を行わずに吸光度の値から算出したDNA量を用いてPCRを行う場合、固定時間が1日目まではRNase処理を行わなくても検出が可能であるが、固定が長くなる場合はDNA溶液中に放出された過剰な変性DNAまたはRNAがPCR効率を低下させることが示唆され、実際のdsDNA量は吸光度で測定した値よりも少ないことなど、これらの点について考慮する必要がある。

補足資料：実証データ⑧～⑬の検討で使用した組織用および培養細胞用DNA抽出プロトコール
(実証データ⑫は組織用プロトコールのみ使用)

- ・ QIAamp® DNA Mini Kit [キアゲン社]を用いた抽出プロトコール（一部改変）
- ・ 組織用は英語プロトコールのDNA Purification from Tissuesを参照
- ・ 細胞用は英語プロトコールのProtocol for Cultured Cellsを参照



実証データ⑬ LBC検体作製法

LBC標本作製時の固定液によるDNAの回収量，品質の変化を解析

【検討内容】

《検 体》肺腺癌細胞株（NCI-H1975）を種々の固定液に種々の時間懸濁し，DNAの回収率，品質を検討した．

《方 法》肺腺癌細胞株（NCI-H1975）を1mLの種々の固定液に 1×10^6 /mLになるように懸濁した．用いた固定液は10%中性緩衝ホルマリン（NBF），100%エタノール，Cellprep®（穿刺吸引，体腔液用）[ロシュ社]，CytoRich™ Red [BD社]，Preserve Cyt [ホロジック社]である．各々の固定液に懸濁し，0分，30分，60分，1日，3日，7日後にDNAをQIAamp® DNA mini Kitにて抽出した．抽出後，吸光度法（NanoDrop™ [サーモフィッシャー社]）による濃度測定，蛍光法（Qubit® [サーモフィッシャー社]）による濃度測定，およびDIN値測定を行い，DNAの回収量，品質に及ぼす固定液，固定時間の影響を調べた．

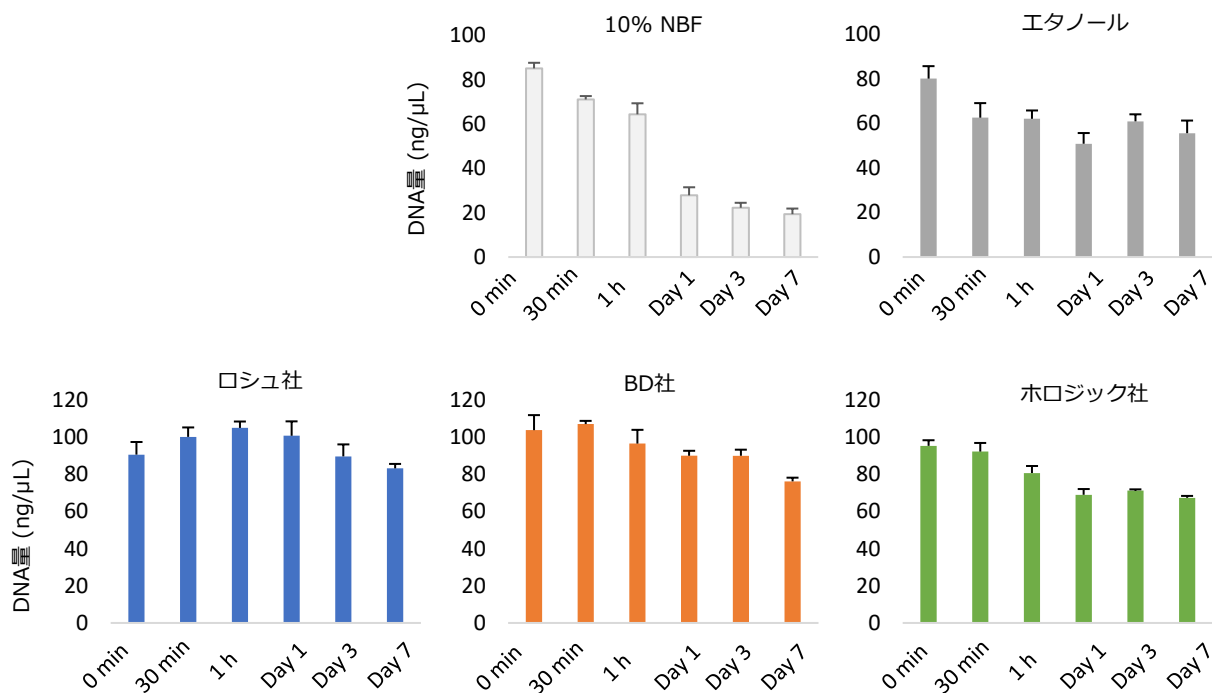


図 LBC保存液処理細胞およびその他固定処理細胞からのDNA回収量の比較
(吸光度法によるDNA濃度)

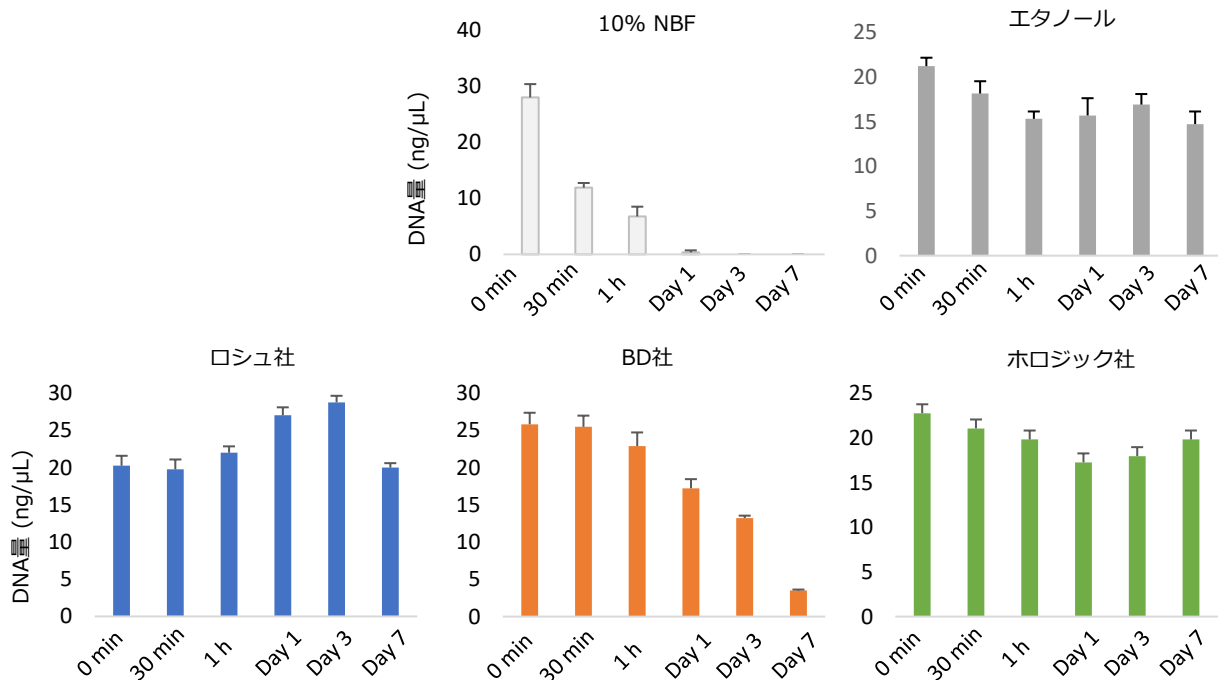


図 LBC保存液処理細胞およびその他固定処理細胞からのDNA回収量の比較
(蛍光法によるDNA濃度)

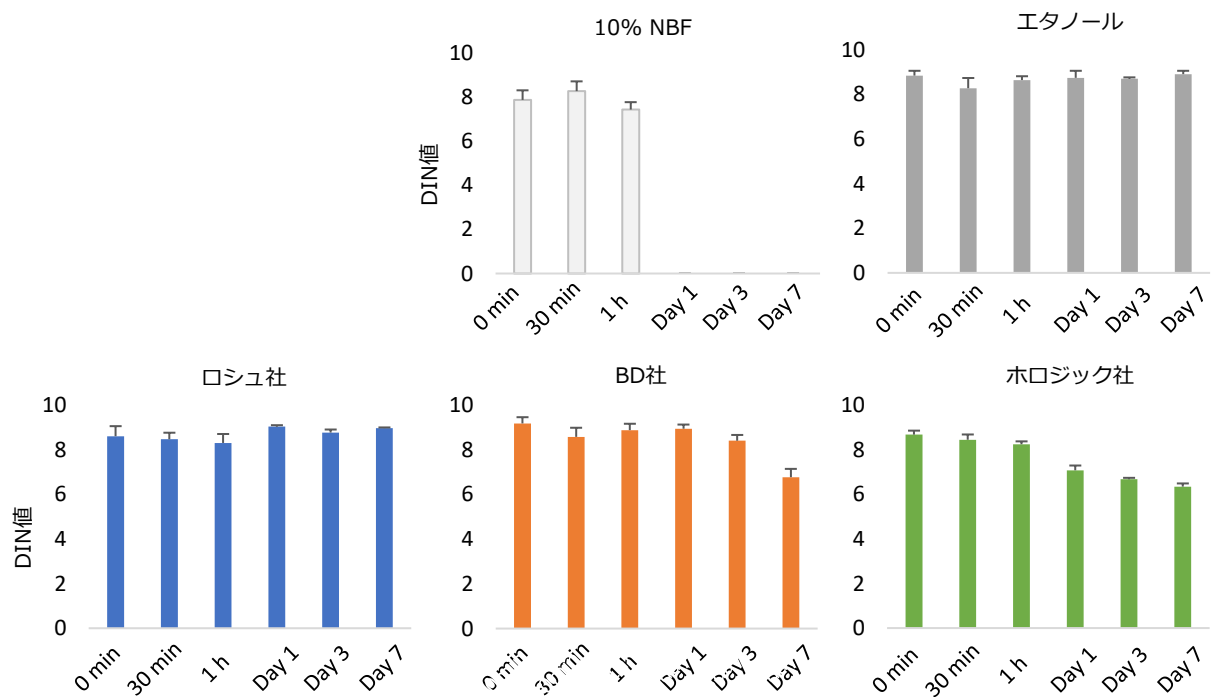


図 LBC保存液処理細胞およびその他固定処理細胞からの抽出DNAの品質比較
(DIN値測定)

【検討結果/図の説明】

- NanoDrop™によるDNA定量とQubit®によるDNA定量の違いは、前者はDNA断片やRNAなどの夾雑物も含めて検出しているのに対し、後者はdsDNAのみを検出する点である。NanoDrop™で検出したDNA量とQubit®で検出したDNA量に大きな差があることは報告されており文献²²，本結果でも確認された。
- NanoDrop™によるDNA定量でも傾向はあるが、Qubit®によるDNA定量ではホルマリン存在下におけるdsDNA量が時間とともに著減することが明らかにわかる。
- ただし、本解析ではDNA抽出はQIAamp® DNA mini Kitにより行っている。別のDNA抽出法を利用すれば適切な良質のDNAが得られる可能性がある。
- BD社のCytoRich™ Red液で7日固定するとQubit®で検出したDNA品質で低下がみられるが、松尾らの報告によれば30分CytoRich™ Red液で固定後、PBSで洗いペレット状態にすれば少なくとも4週間は品質が保たれる文献²³。
- DIN値では10% NBFで1日以上固定した検体以外は概ね良好な結果が得られた。

実証データ⑭ 腫瘍含有割合評価法（セルブロック：試験管割断法）

遠心管（試験管）法によるセルブロック標本の評価方法の確認：
試験管を用いた垂直切断面における各沈渣層の腫瘍細胞数と層分布の評価

【検討内容】

《検 体》臨床検体（胸水）84例を用いた遠心管法によるセルブロック作製

《方 法》切断可能な試験管を用いて、遠心分離によって回収された細胞沈渣に10%中性緩衝ホルマリンを重層し24時間固定した（図1-a）．固定後、試験管ごと沈渣上部（b）および垂直方向に切断し（c），脱水・パラフィン浸透（d）を経て、試験管を外した切断面にて包埋（e）・薄切染色（f）後、切断面における腫瘍細胞数（100個未満は実数値，100個以上は100個として）を評価した．赤血球層を除く有核細胞の沈渣層厚が3mmまでは、液状物と細胞層境界部から1mmまでをA層，1～2mmはB層，2～3mmはC層として評価．沈渣層厚が4mm以上については、沈渣層を3等分した各層（上層～下層とする）に出現する腫瘍細胞数について評価した（図2）．腫瘍細胞の観察には、HE染色や各種特殊染色を施して光学顕微鏡下で観察した（図3）

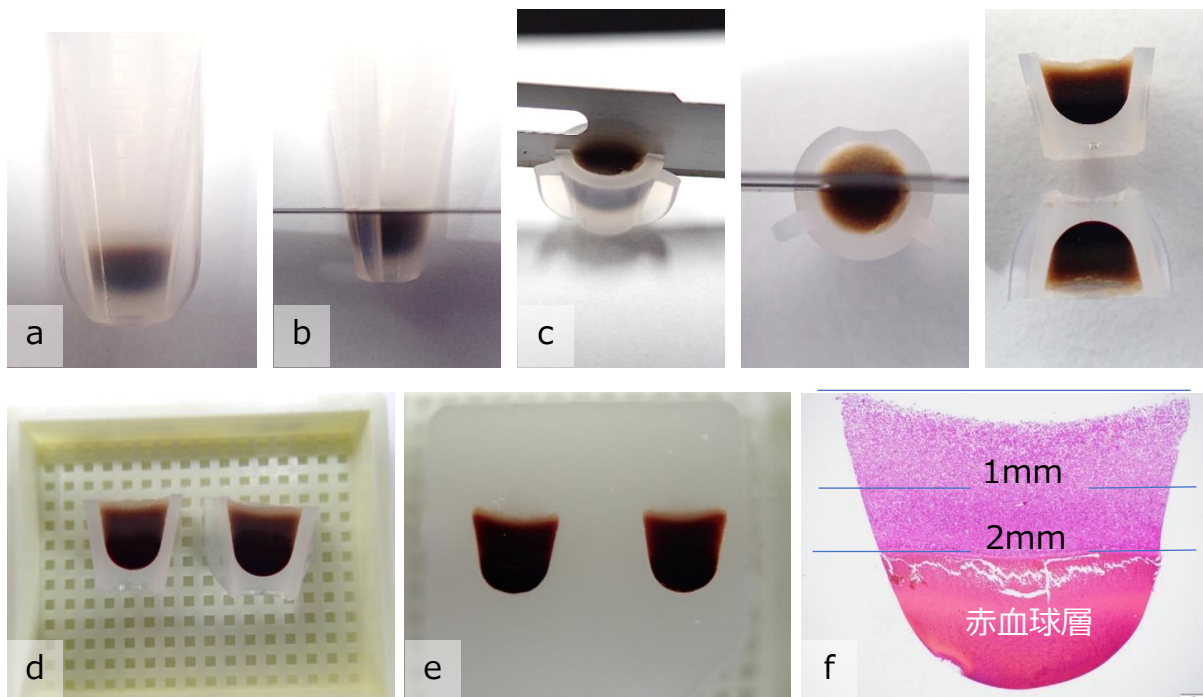


図1 遠心管法によるセルブロック作製手順

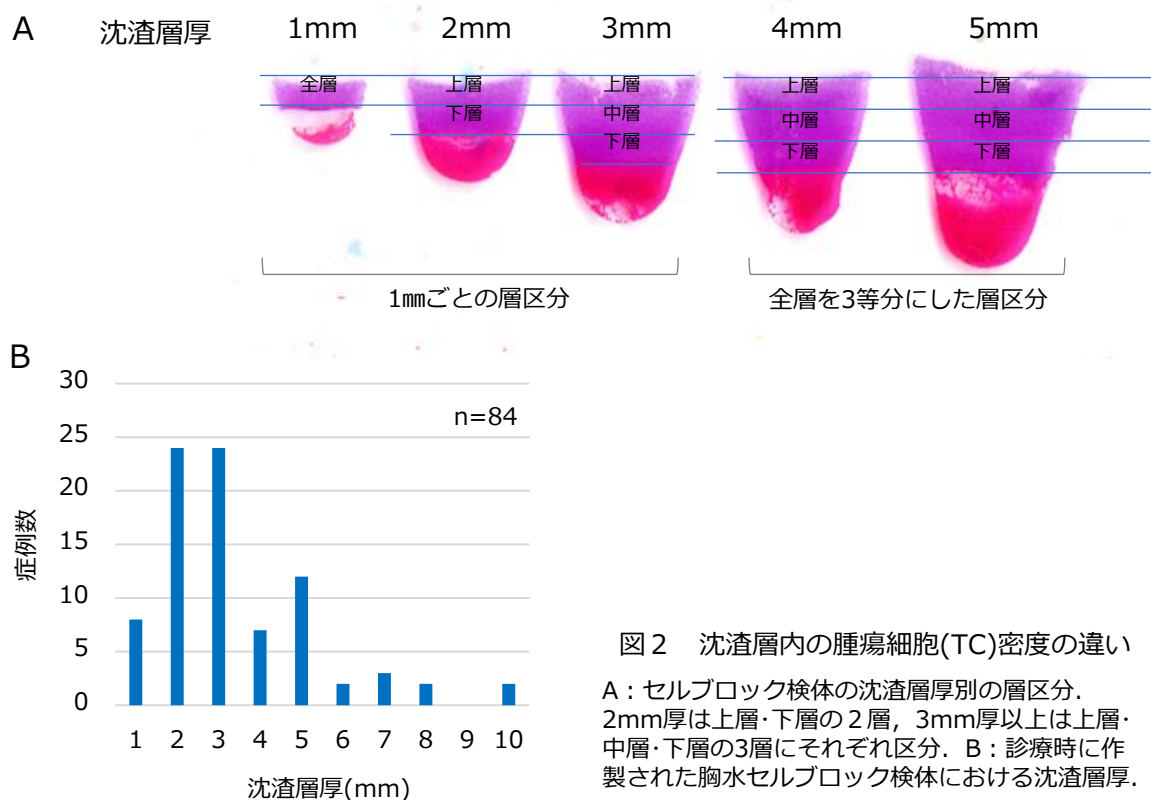


図2 沈渣層内の腫瘍細胞(TC)密度の違い

A：セルブロック検体の沈渣層厚別の層区分。
2mm厚は上層・下層の2層，3mm厚以上は上層・
中層・下層の3層にそれぞれ区分。B：診療時に作
製された胸水セルブロック検体における沈渣層厚。

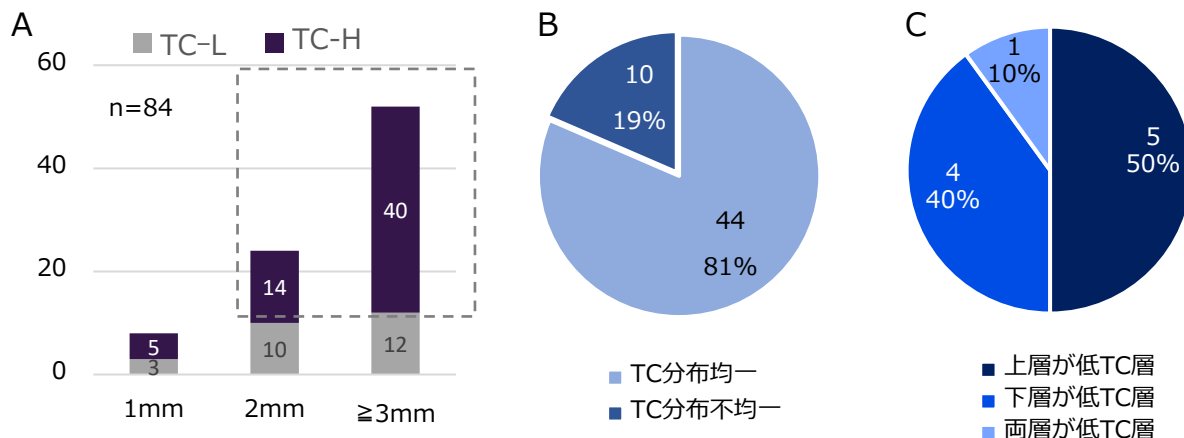


図3 各セルブロック検体中のTC密度

A：TC-H検体：上層・(中層)・下層のいずれかもしくは複数の層中に多数（100細胞以上）腫瘍細胞が存在する検体。TC-L検体：いずれの層にもTCが少数しか存在しないもしくはTCが確認できない検体。
※≥2mmの沈渣層厚TC-H検体(破線内)を用いてCB検体内細胞分布の検討に使用(B, C)。B：セルブロッ
ク検体における沈渣層内のTC分布。C：不均一なTC分布を示したセルブロック検体の内訳。低TC層：TC
が少数（100細胞未満）しか存在しないもしくは確認できない層。

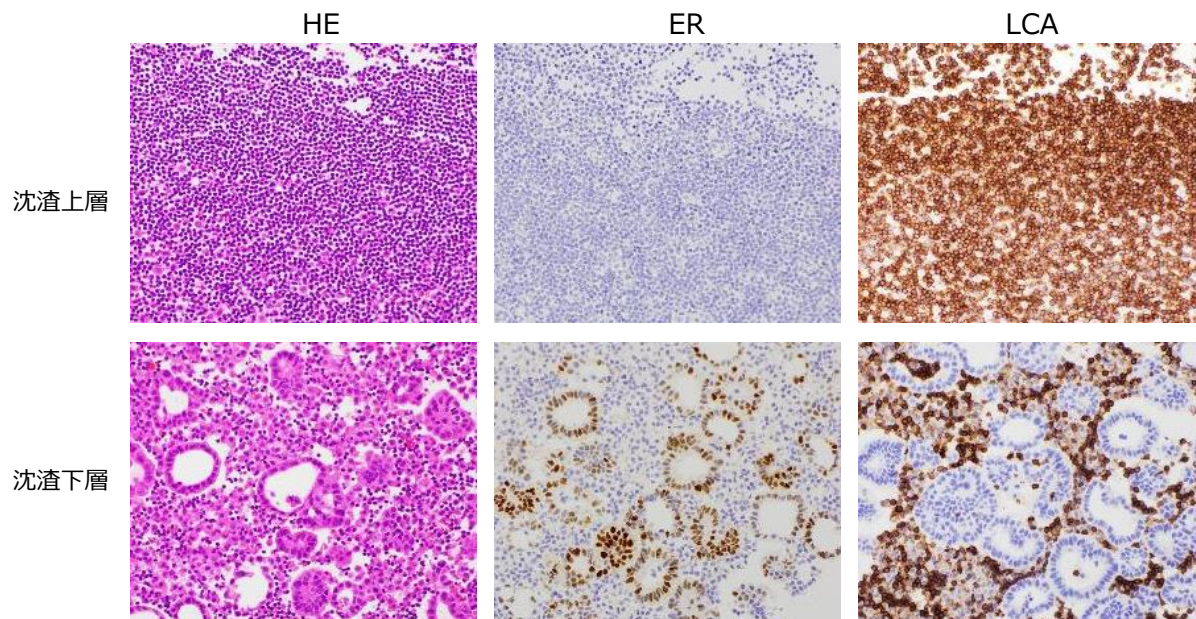


図4 不均一なTC分布を示した胸水セルブロック検体の沈渣層の例

胸水セルブロック検体における上層および下層のTC密度の違い。乳癌症例（#32）のHE染色，ERおよびLCAの免疫細胞化学染色。上層出現腫瘍細胞（上段），下層出現腫瘍細胞（下段）

【検討結果/図の説明】

- ・ 遠心管法で得られた細胞沈渣層厚は1～10（平均3.7）mmであった（図2）。
- ・ TC-H検体（上層・[中層]・下層のいずれかもしくは複数の層中にTCが比較的多く存在する検体）の割合は，沈渣層厚が3mm以上のセルブロック検体において，77%であった一方，2mmおよび1mm検体では58%および63%と，2mm以下の検体でTC密度が低くなる傾向がみられた（図3A）。
- ・ 2mm以上の沈渣層厚のTC-H検体（44例）を用いて，セルブロック中のTC分布について検討したところ，19%（10例）で不均一な分布が認められた（図3B）。また不均一な分布を示した10例のTCの偏りを確認したところ，上層のみ（5例）あるいは下層のみ（4例）でTCが顕著に減少するパターン，上層と下層の両方（1例）で減少するパターンが認められた（図3C）。これら症例では炎症細胞や組織球，反応性中皮細胞に混じてTCが観察され，偏りはこれら細胞の存在が一因となっていた（図4）。
- * 遠心管（試験管）法を用いて，10%中性緩衝ホルマリンによる重層固定により作製されたセルブロック検体では，検体のTC分布は一様ではない。そのため沈渣層の垂直切断面観察により，腫瘍細胞含有割合の評価を行うことが重要である。TCは，細胞（集塊）の大きさや細胞量，比重差によって様々な出現パターンを示す。
- * 上記方法によりセルブロックを作製する場合の注意点として，固定不良を回避するために沈渣層厚は3mmを超えないことが肝要である。多量の沈渣が遠心分離にて得られた場合は，試験管を複数本に分けてセルブロックを作製するなどの工夫が必要となる。

実証データ⑮ 核酸抽出法

FFPEセルブロック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, 5.0×10^6 cells/test) を, 10%中性緩衝ホルマリンにより固定 (24時間) 後, 遠心管法にて1.5mLマイクロチューブを用いて作製したセルブロックより得られた切片 ($10\mu\text{m} \times 6$ 枚/test) を用い検討した.

《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. 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.

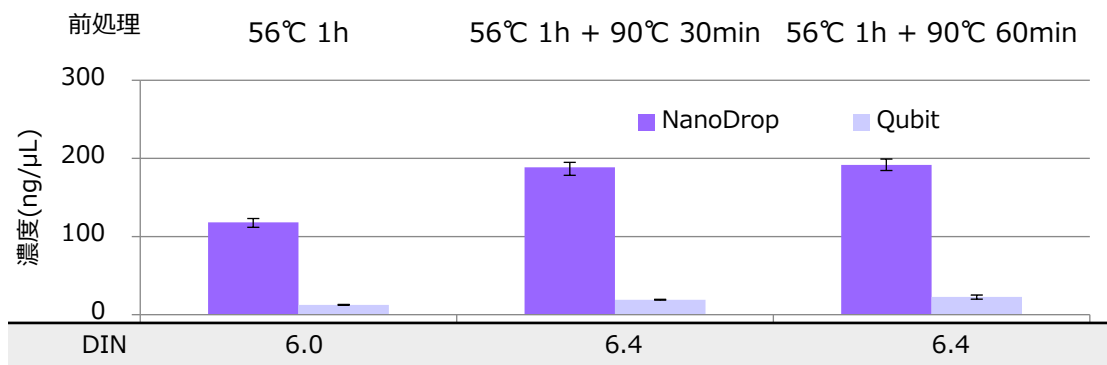


図 FFPEセルブロック検体 (10% NBF) を用いた至適核酸抽出方法 (QIAamp®) の検討

【検討結果/図の説明】

- NanoDrop™を用いた吸光度法による濃度およびQubit®を用いた蛍光法の濃度は, いずれも90℃の前処理を加えることで上昇した. この際, 90℃の前処理時間は30分, 60分の間で, 収量に差を認めなかった.
- DIN値を指標としたDNAの品質の比較では, 90℃の処理を加えることでやや高値を示した. この際, 90℃の前処理時間は30分, 60分の間で, DIN値に差を認めなかった.

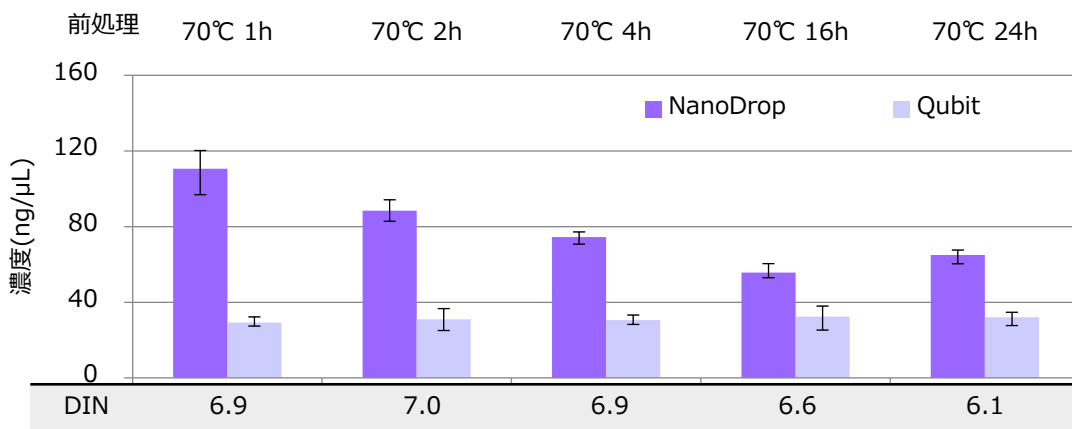


図 FFPEセルブロック検体（10% NBF）を用いた至適核酸抽出方法（Maxwell®）の検討

【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と低下する傾向が認められた。Qubit®を用いた蛍光法の濃度は、いずれの前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、16時間以上の前処理時間で低下する傾向が認められた。

* プロテイナーゼKによる前処理は、キットの推奨プロトコルよりも短時間で充分である。

* 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。

実証データ⑯ 保管検体の核酸品質

既染色標本の核酸品質の経時変化

【検討内容】

《検体》肺癌切除検体から研究用に採取した捺印細胞診の既染色保管標本を用いた。核酸抽出までの保管期間が6カ月、12カ月、24カ月、36カ月、48カ月、60カ月である各5症例、合計30例を対象とした。室温で、標本保管箱にて保管された検体を用いた。

《方法》パピニコロウ染色標本を鏡見し、塗抹細胞量に応じてスライドガラス1-4枚を用いた。カバーガラスを剥離、細胞検体を削り取り採取した。市販のDNA抽出キット（QIAamp® DNA Mini kit [キアゲン社]）を用いてDNA抽出を行った。核酸品質は、DIN（DNA Integrity Number）によるDNA分解度を評価した。DNA収量は、吸光度法（BioSpec-nano [島津製作所]）と蛍光法（Qubit® [サーモフィッシャー社]）を用いて測定した。

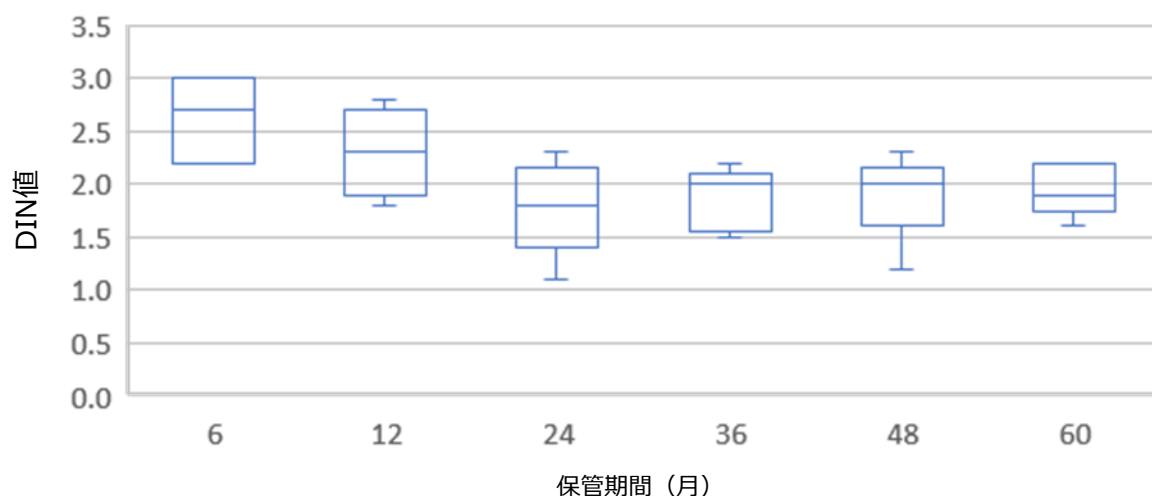


図1 既染検体の保管期間とDNA品質の変化

【検討結果・図1の説明】

- ・ DNA品質について：室温で保管された既染捺印細胞検体は、6か月以上を経過するとDIN値3以下と低値を示した。DIN値は、経時的に低下する傾向を示し、DNAの断片化が進行していることが想定された（表1）。

*長期保管検体では、核酸品質に限界があり、一般的なNGSパネル検査の対象としては推奨されない。

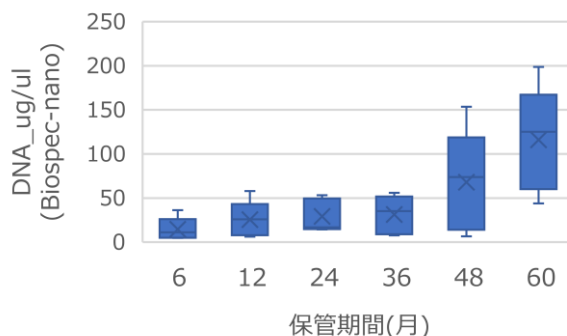
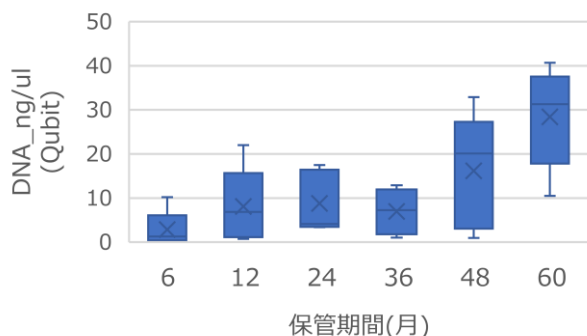


図2：既染検体の保管期間ごとのDNA収量

表1 検体保管期間とDNA品質，量のまとめ

保管期間（月）		DIN	Qubit
6	平均値	2.6333	2.8628
	度数	3	5
	標準偏差	0.40415	4.15686
12	平均値	2.3000	8.0928
	度数	4	5
	標準偏差	0.41633	8.57041
24	平均値	1.7800	8.7920
	度数	5	5
	標準偏差	0.44385	7.03558
36	平均値	1.8600	6.9480
	度数	5	5
	標準偏差	0.29665	5.15226
48	平均値	1.9000	16.1702
	度数	5	5
	標準偏差	0.41231	13.01804
60	平均値	1.9600	28.4000
	度数	5	5
	標準偏差	0.25100	11.47824
合計	平均値	2.0222	11.8776
	度数	27	30
	標準偏差	0.43264	11.70931

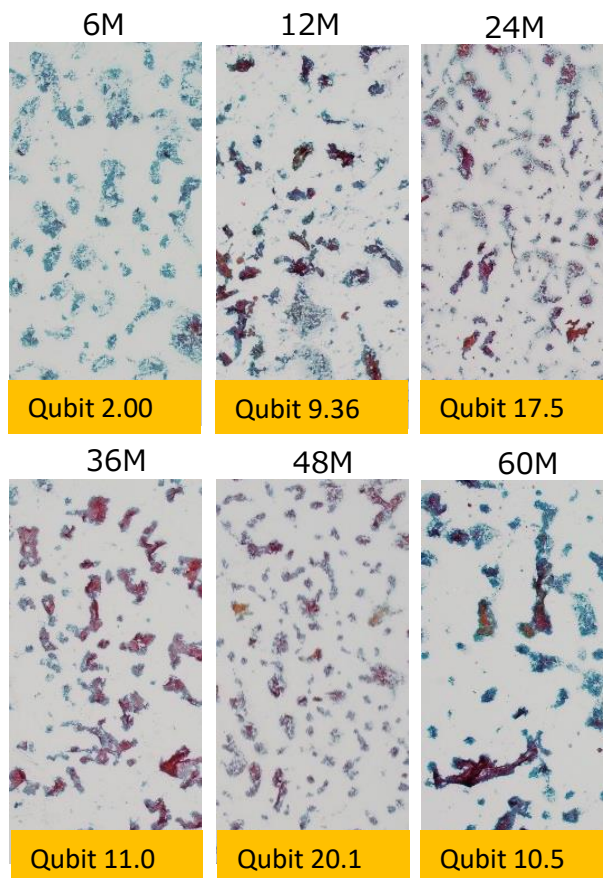


図3：代表的な細胞像
(上段：保管期間，下段：DNA収量)

【検討結果・図2の解説】

- ・ DNA量について：DNA収量は，保管時間との関係は乏しく，スライドガラス上の細胞量に依存することが示唆された（表1）．

実証データ 補表 保存液，抽出方法ごとの保存時間によるdsDNA量，DINの変化
(実証データ⑧～⑪のまとめ，絶対値と最短固定条件からの減少率を記載)

	組織用抽出方法		培養細胞用抽出方法	
ThinPrep PreservCyt	dsDNA量 (μg)	15分固定からの減少率 (%)	dsDNA量 (μg)	15分固定からの減少率 (%)
15 min	7.48		7.35	
Day 1	8.63	※	8.82	※
Day 3	9.20	※	9.22	※
Day 5	9.59	※	8.84	※
Day 7	9.01	※	8.47	※
Day 9	1.97	73.7	1.58	78.5

※最低固定時間からdsDNA量が減少せずに上昇した

	組織用抽出方法		培養細胞用抽出方法	
ThinPrep PreservCyt	DIN	15分固定からの減少率 (%)	DIN	15分固定からの減少率 (%)
15 min	8.9		9.0	
Day 1	6.6	25.6	6.8	25.0
Day 3	6.3	28.9	6.5	28.5
Day 5	6.2	30.3	6.4	29.0
Day 7	6.1	31.4	6.5	28.5
Day 9	5.8	35.4	6.3	30.8

	組織用抽出方法		培養細胞用抽出方法	
CellPrep	dsDNA量 (μg)	30分固定からの減少率 (%)	dsDNA量 (μg)	30分固定からの減少率 (%)
30 min	7.91		9.25	
Day 1	8.44	※	9.43	※
Day 3	6.96	12.04	7.19	22.3
Day 5	8.53	※	6.94	25.0
Day 7	7.96	※	8.52	7.8
Day 9	7.29	7.79	7.34	20.6

※最低固定時間からdsDNA量が減少せずに上昇した

	組織用抽出方法		培養細胞用抽出方法	
CellPrep	DIN	30分固定からの減少率 (%)	DIN	30分固定からの減少率 (%)
30 min	8.8		8.7	
Day 1	7.7	12.8	7.7	11.3
Day 3	7.2	18.0	7.3	16.4
Day 5	7.1	18.9	7.1	18.2
Day 7	7.3	16.9	7.4	15.2
Day 9	7.3	17.3	7.2	16.8

実証データ 補表 保存液，抽出方法ごとの保存時間によるdsDNA量，DINの変化
(実証データ⑧～⑪のまとめ，絶対値と最短固定条件からの減少率を記載)

	組織用抽出方法		培養細胞用抽出方法	
CytoRich Red	dsDNA量 (μg)	30分固定からの減少率 (%)	dsDNA量 (μg)	30分固定からの減少率 (%)
30 min	7.06		4.78	
Day 1	0.98	86.2	0.45	90.5
Day 3	0.72	89.9	0.49	89.8
Day 5	0.44	93.7	0.50	89.5
Day 7	0.73	89.7	0.37	92.3
Day 9	0.46	93.5	0.39	91.9

	組織用抽出方法		培養細胞用抽出方法	
CytoRich Red	DIN	30分固定からの減少率 (%)	DIN	30分固定からの減少率 (%)
30 min	8.7		8.4	
Day 1	6.6	24.7	測定不可	
Day 3	6.7	23.8	測定不可	
Day 5	測定不可		6.8	18.7
Day 7	6.6	25.1	測定不可	
Day 9	測定不可		測定不可	

	組織用抽出方法		培養細胞用抽出方法	
LBC プレップ2	dsDNA量 (μg)	30分固定からの減少率 (%)	dsDNA量 (μg)	30分固定からの減少率 (%)
30 min	6.29		6.50	
Day 1	2.65	57.9	0.66	89.9
Day 3	1.19	81.0	0.61	90.7
Day 5	1.16	81.5	0.63	90.3
Day 7	0.76	87.9	0.44	93.2
Day 9	0.87	86.2	0.46	92.9

	組織用抽出方法		培養細胞用抽出方法	
LBC プレップ2	DIN	30分固定からの減少率 (%)	DIN	30分固定からの減少率 (%)
30 min	9.2		9.0	
Day 1	8.0	12.4	7.9	12.4
Day 3	7.2	21.6	7.0	22.6
Day 5	6.7	26.8	6.5	27.7
Day 7	6.8	26.4	測定不可	
Day 9	6.5	29.6	測定不可	

S1.2 第2版 実証データ

(実証Ⅱ-①～Ⅱ-⑭)

細胞診材料の取扱いに関する実証データ（第2版）

本指針作成にあたっては、以下の医療機関および研究機関、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。

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，藤波 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

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

北里大学北里研究所病院

病理診断科

前田 一郎，星野 昭芳，小穴 良保

杏林大学

呼吸器・甲狀腺外科

田中 良太，新井 信晃，中里 陽子，
村山 みゆき

病院病理部・病理診断科

藤原 正親

久留米大学

病理診断科・病理部

河原 明彦，安倍 秀幸，牧野 諒央，
熊谷 天斗

病理学講座

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東病院

遺伝子診療部門

桑田 健

臨床検査部

中村 信之

埼玉県立がんセンター

病理診断科

元井 紀子，永田 真理乃，小林 康人
石橋 久美子

北海道大学

先端診断技術開発センター

畑中 豊，畑中 佳奈子，四宮 義貴，
奥村 麻美，南家 綾江，田中 祐実

病理部/病理診断科

石田 裕子，安孫子 光春，田中 伸哉

協力企業（五十音順）

株式会社医学生物学研究所

サクラファインテックジャパン株式会社

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

ホロジックジャパン株式会社

武藤化学株式会社

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

実証データⅡ-① 細胞検体と組織検体の遺伝子変異検出比較（実臨床検体）

肺癌診療で採取された生検組織検体と細胞検体を用いた遺伝子検査：同一患者からの遺伝子変異検出結果の比較

【検討内容】

《検 体》原発性肺癌と診断され、生検組織検体と細胞検体のペア検体で遺伝子検査を実施された35例。（埼玉県立がんセンター症例）

《方 法》 2021年4月より2022年7月までに、埼玉県立がんセンターにて、実臨床の組織検体を用いたオンコマインマルチ検査と、同一患者にて同時あるいは異時的に採取された洗浄細胞診検体を用いて院内遺伝子検査を実施した症例、35例を収集、遺伝子検査の結果を比較した。院内検査は、*EGFR*（Cobas v2, realtime PCR）, *ROS1*（LDT, RT-PCR）, *MET*（Archer MET, NGS）により検索した。

表 1 組織検体と細胞検体の遺伝子検査結果の比較（n=35）

		組織検体		
		変異陽性	検出されず	
細胞検体	変異陽性	9	0	9
	検出されず	3	23	26
		12	23	35

表2 組織検体と細胞検体の遺伝子検査結果の比較（n=35）
組織検体を正とした場合の細胞検体を用いる遺伝子検査の精度指標

感度	Sensitivity	0.75
特異度	Specificity	1
偽陰性率	False negative rate	0.25
偽陽性率	False positive rate	0
陽性的中率	PPV	1
陰性的中率	NPV	0.885
変異陽性率	Mutation rate	0.343

【検討結果の説明】

- 組織検体と細胞検体の一致は91.4% (32/35) と高かった。
- 組織診を正とした場合の細胞検体での遺伝子検査の成績は、感度 0.75, 特異度 1, 偽陰性率 0.25, 偽陽性率 0, 陽性的中率 1, 陰性的中率 0.89であった。
- 不一致は、細胞検体は変異が検出されず、組織検体のみで検出された3例であった。
- 組織検体のオンコマイン検査で、*BRAF*, *ERBB2*, *KRAS*の変異が各 1 例ずつ検出されたが、細胞検体では検索対象外の遺伝子であった。
- 細胞検体は微量であり、選択できる検査法が限られることがあり、検査法によっては検出できる遺伝子変異バリエーションが限られる点に注意が必要である。
- 細胞検体を用いる遺伝子検査は、陽性の場合には信頼性が高い。陰性の場合には偽陰性の可能性がある点に注意が必要である。

実証データⅡ-② 細胞形態と核酸品質の検討

(MSI遺伝子検査とMMR免疫染色の不一致例での検討)

原発性大腸直腸癌にて，MSI遺伝子検査とMMR免疫染色の結果不一致：細胞形態と核酸品質の比較

【検討内容】

《検 体》 原発性大腸直腸癌にてMSI遺伝子検査を実施された115例のうち，MMR免疫染色の結果が一致しなかった症例のうちダイセクション可能であった7例。（埼玉県立がんセンター症例）

《方 法》 2018年1月～12月に埼玉県立がんセンターにて，MSI検査を実施された113例について，TMAを作成し，MMR 免疫染色を実施した．MSH検査は，MSI検査キット（FALCO）を用いて検索された．免疫染色は，一次抗体としてベンタナ OptiView MLH1（M1），ベンタナ OptiView MSH2（G219-1129），ベンタナ OptiView MSH6（SP93），ベンタナ OptiView PMS2（A16-4）（いずれもロシュ社），Ventana BenchMark ULTRA（ロシュ社）を用いた自動免疫染色を実施した．MSI検査とMMR 免疫染色の結果が不一致であった症例（n=3）について，形態評価とマクロダイセクションによる核酸品質を比較した．

表 1 MSI遺伝子検査とMMR IHC検査の比較（n=115）

		MSI遺伝子		
		MSH-High	MSS/MSI-Low	
MMR IHC	dMMR	6	1	7
	Equivocal	1	0	2
	pMMR	0	106	106
		7	108	115

【結果の説明】

- MSI遺伝子検査とMMR IHC検査の一致率は高いが，少数の不一致があった（表 1）．

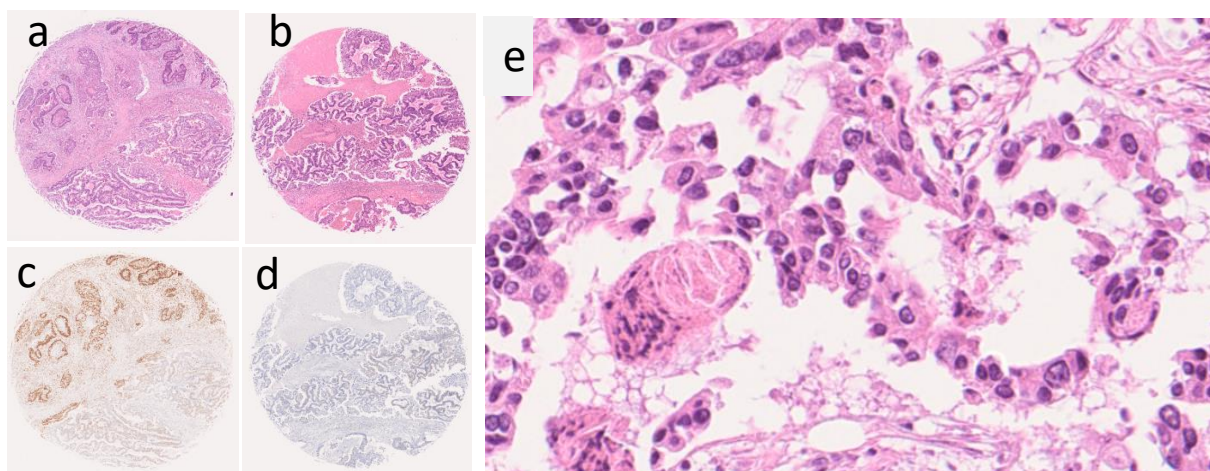


図1 不一致例の形態像（TMAコアの比較, MSH6不一致例）

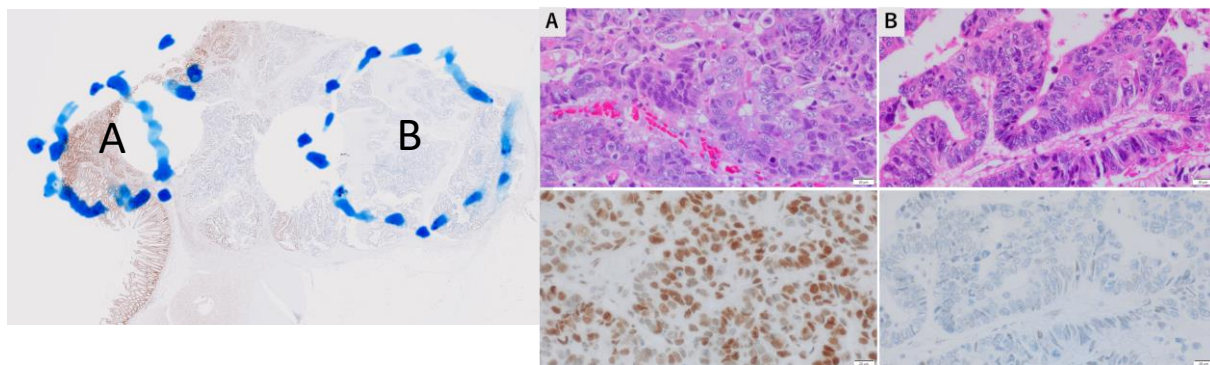


図2 不一致例の形態像（大切片）

【結果の説明】

- ・ 図1：TMAコアの不一致例（MSH6）を提示する．コアaはMSH6の染色性が保持されている（c）が，コアbでは染色性が低下（d）し，判定保留となった．コアbの強拡大像（e）では細胞の変性が強かった．（a, b, e：HE染色, c, d：MSH6 IHC）
- ・ 図2：大切片での検討では，粘膜表層（領域A）では染色性が保持されていたが，深部（領域B）で染色性の低下が認められた．固定不良の影響が示唆される．（MLH1免疫染色）
- ・ バイオマーカー検査の結果が不一致となる要因として，形態学的に壊死，変性の強い検体，固定不良の領域が選択された場合，等が挙げられる．

表2 免疫染色結果の異なる領域における核酸品質の比較

Case	IHC			DIN		RIN		DV200 (%)	
		A	B	A	B	A	B	A	B
21	MLH1	Retained	No stain*	3.3	2.6	1.0	1.0	53	52
	PMS2	Equivocal	No stain*						
87	MLH1	Lost	Equivocal	2.7	2.6	1.3	1.6	71	69
	PMS2	Lost	Lost						
99	MLH1	Retained	Retained	2.6	2.3	1.7	1.7	72	73
	PMS2	Retained	Equivocal						

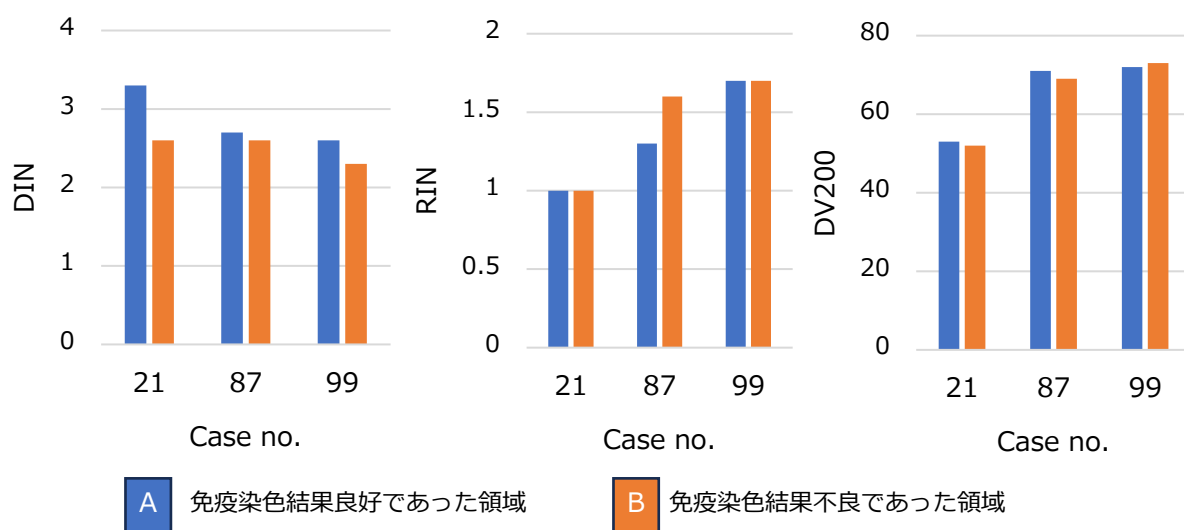


図3 不一致例の領域別の核酸品質の比較

【結果の説明】

- 免疫染色不良の領域（B）は、良好な結果を得られた領域（A）と比較して、DIN, RINを比較したところ、DNAでは核酸品質が不良となる傾向があった。RNAの品質はA, Bともに低かった。
- 核酸の品質は、組織細胞形態に反映される。変性の強い組織細胞検体では、核酸の品質は保証されない。細胞検体を用いる遺伝子検査を行う場合、腫瘍細胞形態についても注意されたい。

実証データ II-③ 体腔液未固定検体の品質

採取法別による体腔液検体のDNA・RNAの回収量と品質の違いの解析

【検討内容】

《検 体》直接穿刺後（n=9）、ドレーン貯留（n=5）および手術時（n=6）に採取された体腔液検体中のDNA・RNAの回収量と品質を検討した。

《方 法》さまざまな方法で採取された体腔液検体の沈査を50μL採取し、-80で冷凍保管した。解凍後、沈査を等量分離し、DNAをQIAamp DNA mini Kit [キアゲン社] で、RNAをRNeasy plus mini Kit [キアゲン社] で抽出した。抽出後、Nanodrop [サーモフィッシャー社] を用いた吸光度法による濃度測定およびTapeStationシステム [アジレント社] を用いたDINとRIN（DV200（%）も含める）の測定を行い、DNA・RNAの回収量、品質に及ぼす採取法の影響を調べた。

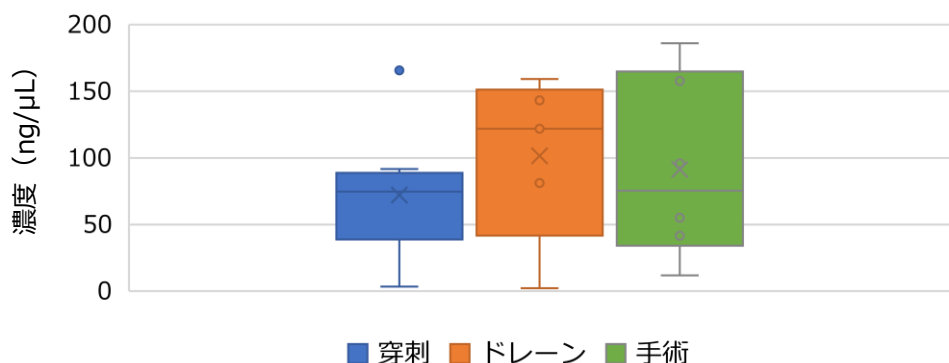


図1 採取法別による体腔液検体のDNA濃度の比較

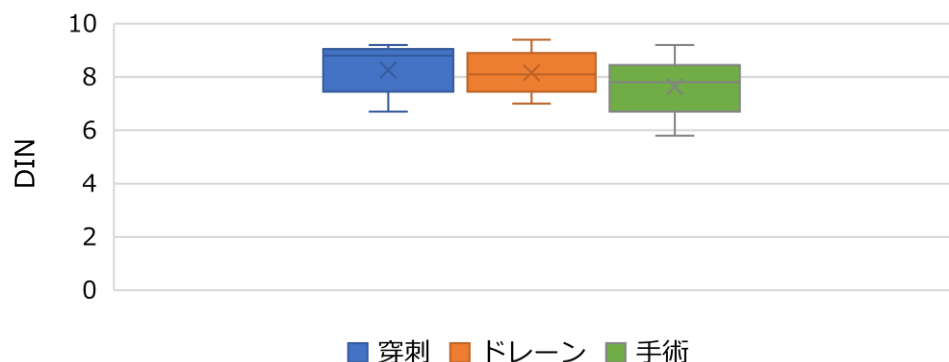


図2 採取法別による体腔液検体のDNA品質の比較（DIN）

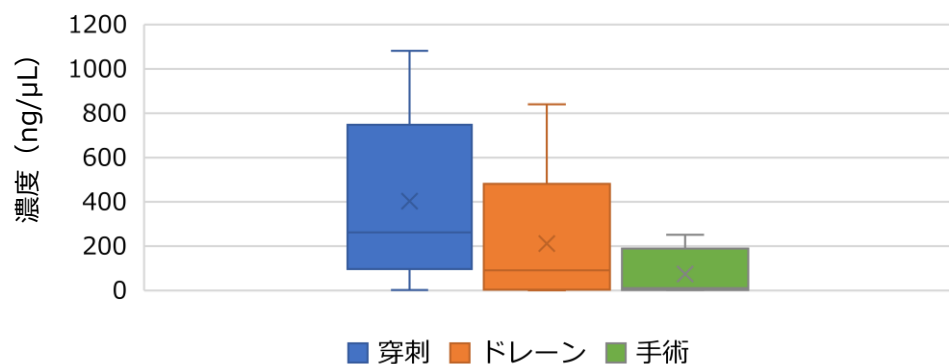


図3 採取法別による体腔液検体のRNA濃度の比較

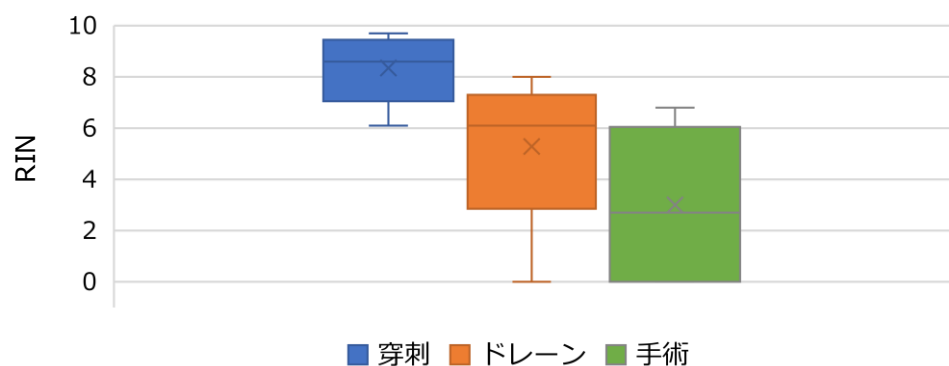


図4 採取法別による体腔液検体のRNA品質の比較 (RIN)

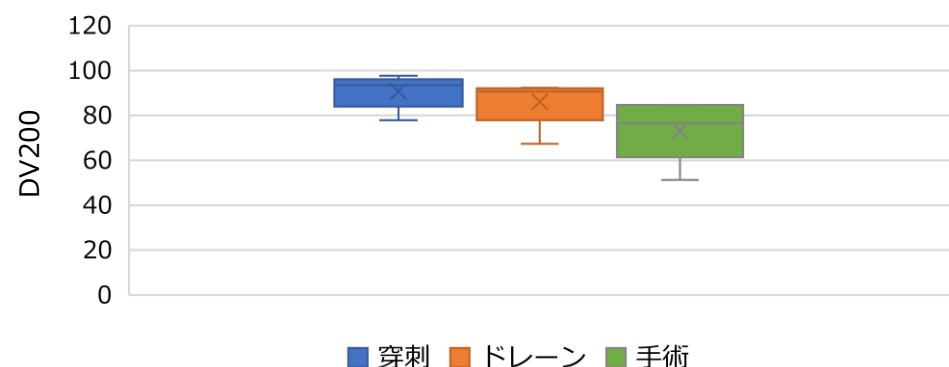


図5 採取法別による体腔液検体のRNA品質の比較 (DV200 (%))

【検討結果/図の説明】

- NanodropによるDNA回収量は直接穿刺後（中央値:74.7ng/μLと手術時（中央値:75.4ng/μL）に採取された体腔液が同等で、ドレーン貯留(中央値:121.9 ng/μL)の検体からのDNA回収量が多い傾向を示した（図1）。DINはすべての体腔液検体において大きな差はみられず、DNA品質は安定していた（図2）。
- NanodropによるRNA回収量は直接穿刺後（中央値:262.3ng/μL）の体腔液が最も回収量が多く、手術時（中央値:10.7ng/μL）に採取された体腔液検体が最も少量であった（図3）。RINは直接穿刺後（中央値:8.6）、ドレーン貯留（中央値:6.1）および手術時（中央値:2.7）に採取された体腔液検体の順に低下を示した（図4）。但し、ドレーン貯留検体の中にもRINの低い体腔液検体があった。
- RNA DV200（%）では直接穿刺後とドレーン貯留の体腔液検体は概ね良好な結果であった（図5）。

実証データⅡ-④ 臨床検体におけるLBC処理後細胞ペレットの核酸収量と品質

LBC処理細胞ペレットのDNA/RNA収量とその品質

【検討内容】

《検 体》胸水・穿刺針洗い液・気管支ブラシ洗い液・鉗子洗い液の診療残29検体。

《方 法》検体は採取後（穿刺針・気管支ブラシ・鉗子検体は生食にて洗浄後），同日にLBC固定液（CytoRich RedもしくはThinPrep）に入れ，検体0.5～1mLに対し固定液を1mL入れ冷蔵保管後，遠心し細胞ペレットとして-80℃に凍結保管した．2年以内の凍結細胞ペレットからDNAはMaxWell RSC Blood DNA kit（プロメガ社，AS1400），RNAはMaxWell RSC simplyRNA Cells Kit（プロメガ社，AS1390）を用いてDNA/RNAを抽出した．抽出後，Qubitを用いた蛍光法による濃度測定，および，DNAに対してはDIN，RNAにおいてはDV200（%）を測定しDNA/RNAの回収量・品質に影響を与える因子に関して検討した．

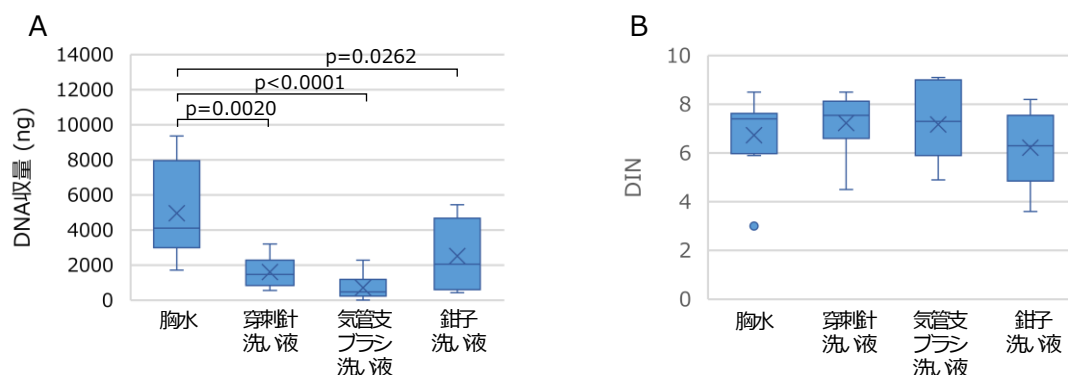


図1 LBC処理検体における採取方法別のDNA量および品質（DIN）の比較

A: 採取方法別DNA量，B: 採取方法別品質（DIN）

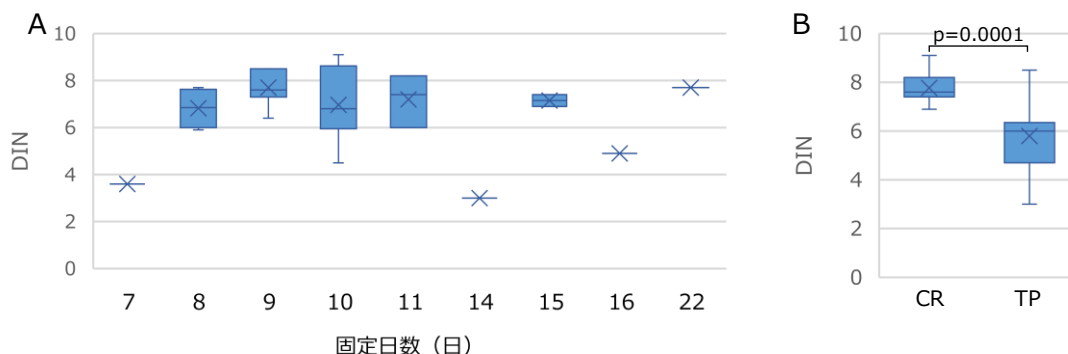


図2 LBC処理期間および処理液別の品質（DIN）の比較

A: LBC処理日数別品質（DIN），B: 処理液別品質（DIN）

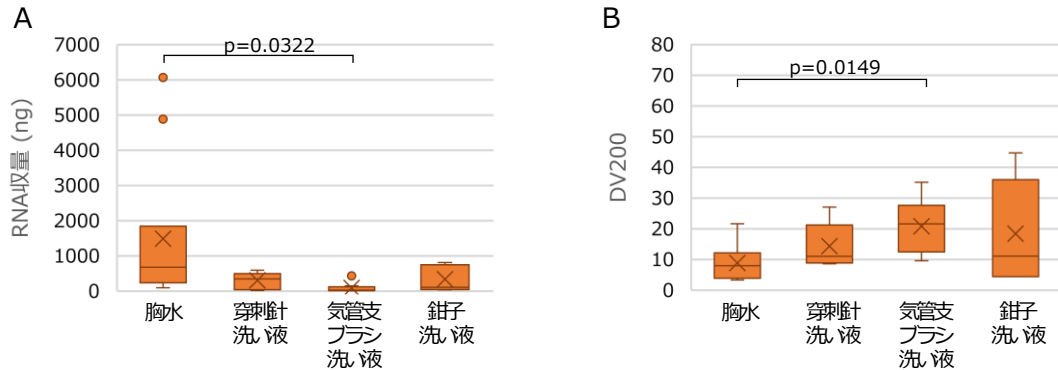


図3 LBC処理検体における採取方法別のRNA量および品質（DV200）の比較
A: 採取方法別RNA量, B: 採取方法別品質（DV200）

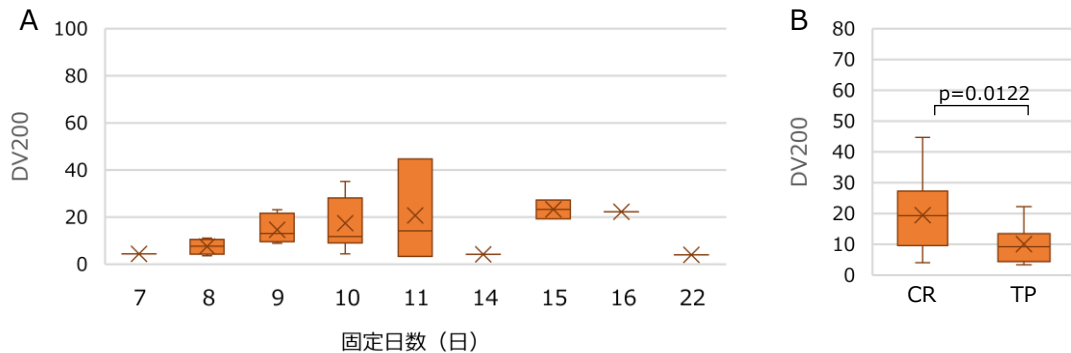


図4 LBC処理期間および処理液別の品質（DV200）の比較
A: LBC処理日数別品質（DV200）, B: 処理液別品質（DV200）

【検討結果/図の説明】

- DNAの収量は胸水が一番多く細胞数に比例しているものと考えられたが、DNAの品質に差は見られなかった（図1-A, 1-B）。処理液の比較では、DNAの品質はTPよりCR-Redがより高い品質が得られたが（図2-B），いずれの処理法でも高品質が保たれておりNGS解析に資する品質が得られていた。
- RNAの収量は胸水が一番多く、DNA同様、細胞数に比例しているものと考えられた（図3-A）。一方、その品質は胸水において低い傾向にあった（図3-B）。処理液の比較では、RNAの品質はTPよりCR-Redにおいて高い傾向が見られたが、いずれも低品質であった（図4-B）。
- 1～2週間のLBC処理における核酸品質の変化について、DNA品質は、多くの検体で比較的高かった。RNA品質は検体間のバラつきが大きく、相対的に低かった（図2-A, 4-A）。

実証データⅡ-⑤ 臨床検体におけるLBC処理後細胞ペレットの核酸収量と品質

肺癌NGS検査における検査成否に及ぼす核酸収量・品質の影響

【検討内容】

《検 体》実証データⅡ-1のうち、診療において何等かのコンパニオン診断を行っている19例を用いて肺癌コンパクトパネルによる解析（cPANEL）の解析を行った。

《方 法》19例を用いてcPANELによる解析を行った。検査結果が得られたものを成功，得られなかったものを不成功として、核酸量・品質との関係を検討した。

表1 検討19症例の内訳とcPANEL解析成功率

検体パラメーター	n	検査QC	% (#success/N)
LBC保存液	10/9	DNA成功率（全体）*	100% (19/19)
CytoRich Red/ThinPrep		CytoRich Red	100% (10/10)
		ThinPrep	100% (9/9)
検体種	6	RNA成功率（全体）*	84% (16/19)
胸水		CytoRich Red	100% (10/10)
穿刺針洗い液		ThinPrep	67% (6/9)
気管支ブラシ洗い液			
鉗子洗い液			

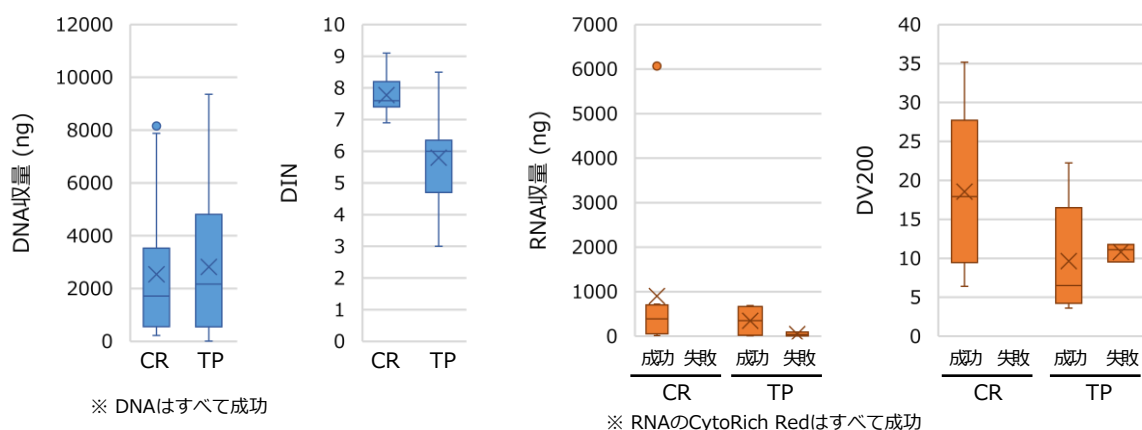


図1 DNA/RNA解析の成否と各因子の関係

【検討結果/図の説明】

- LBC処理後の凍結細胞ペレット検体を用いたcPANELの解析では、DNAはLBC処理法の種別によらず解析結果が得られた。一方、RNAは本検討では、CR-Redは全例結果が得られたが、TPでは67%の症例でのみ結果が得られた。（表1）
- RNAの解析結果が得られなかった症例においては、成功例と比較してRNA量が少ない傾向が見られたが、RNAの品質に差は見られなかった。（図1）

実証データⅡ-⑥ LBC保存液処理検体から抽出された核酸の品質

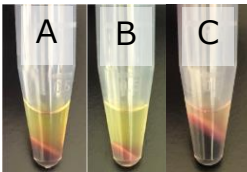
種々のLBC固定液と核酸抽出キットを用いた、体腔液検体からのDNA/RNA抽出の収量と品質を解析

【検討内容】

《検 体》3種類の体腔液検体（肺癌患者の胸水、卵巣癌患者の腹水/胸水）

《方 法》体腔液検体を5種類のLBC固定液で一晩固定後、市販（3社）の核酸抽出キットを用いてDNA/RNAを抽出し、その収量と品質を検討した。

表1 検討に用いた検体の外観と機器・試薬の一覧

体腔液検体		
		
収量測定	Qubit 3.0 Fluorometer [サーモフィッシャー社]	
核酸品質測定	TapeStationシステム [アジレント社]	
核酸抽出キット		
DNA	FFPE用	Maxwell FFPE Plus DNA Kit [プロメガ社]
RNA	FFPE用	Maxwell RSC RNA FFPE Kit [プロメガ社]
	細胞用	MaxWell RSC simplyRNA Cells Kit [プロメガ社]
DNA/RNA	FFPE用	Allprep DNA/RNA FFPE kit [キアゲン社]
		Ion Torrent Dx FFPE Sample Preparation Kit [サーモフィッシャー社]
LBC固定液		
ホルマリン非含有		CytoRich Blue [BD社] Respiratory Tract [ロシュ社] Body Fluid, FNA [ロシュ社] PreservCyt [ホロジック社]
ホルマリン含有		CytoRich Red [BD社]

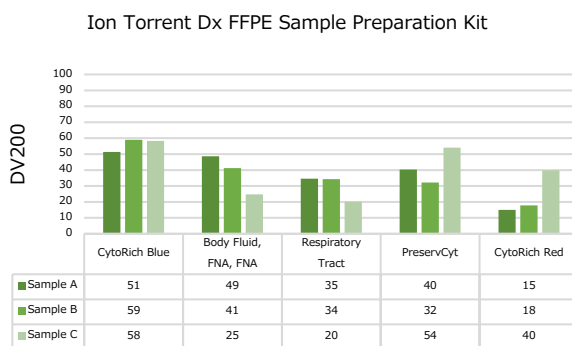
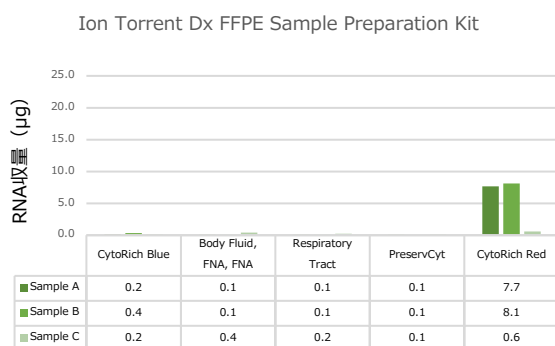
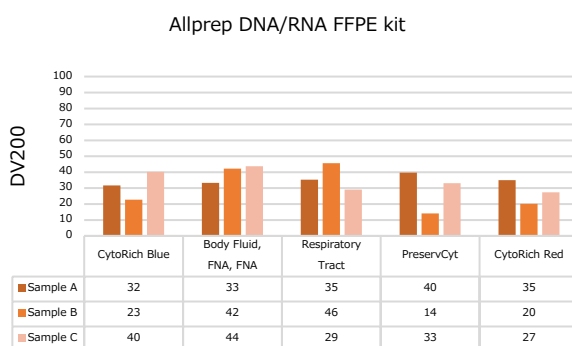
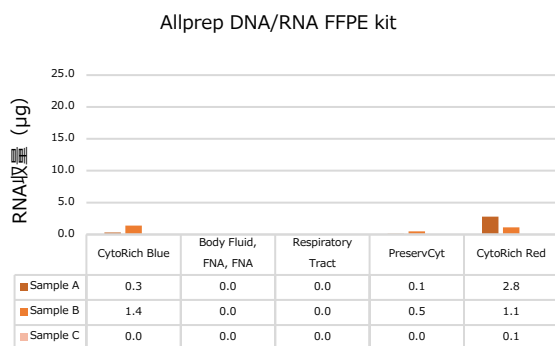
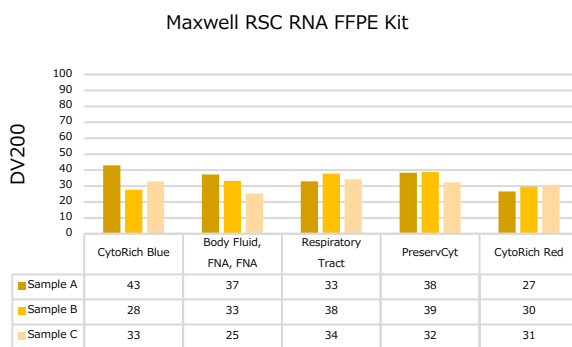
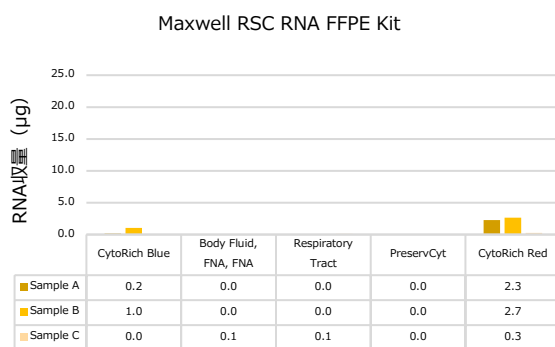
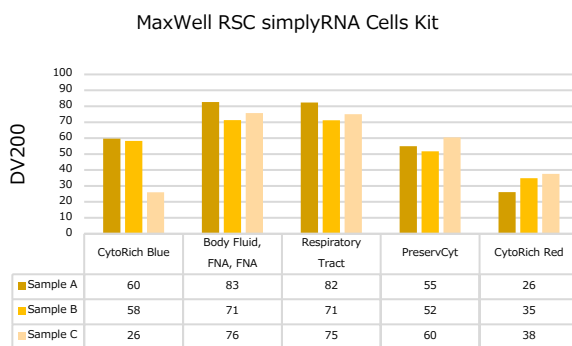
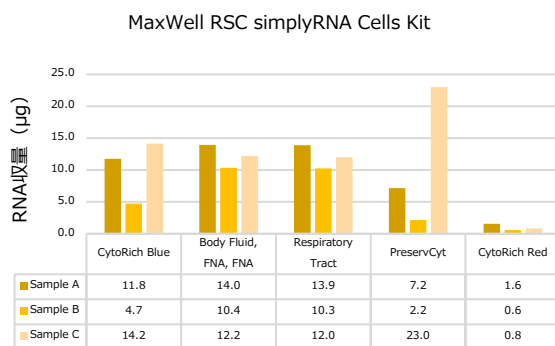


図1 RNAの収量と品質

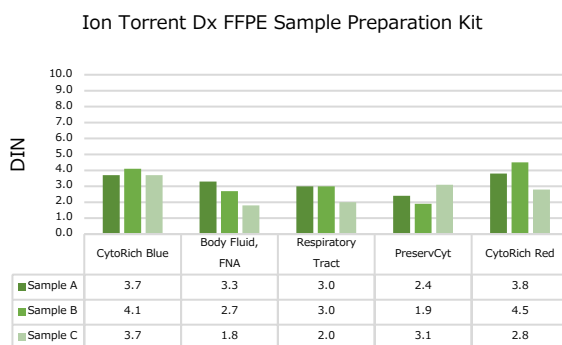
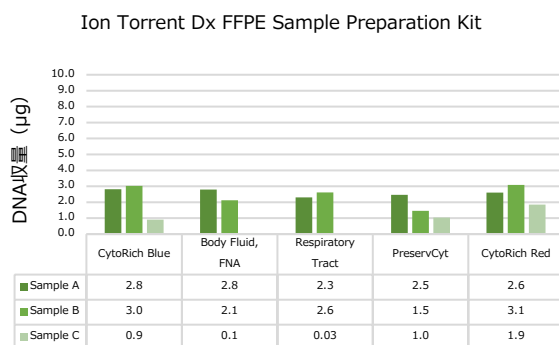
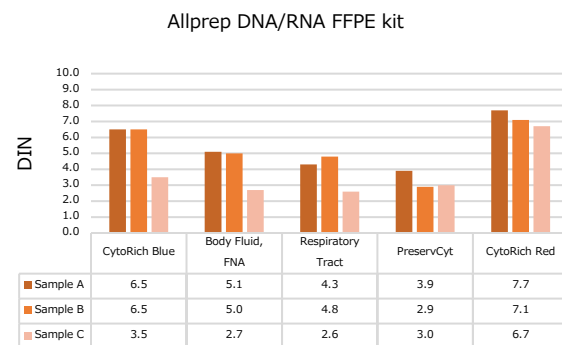
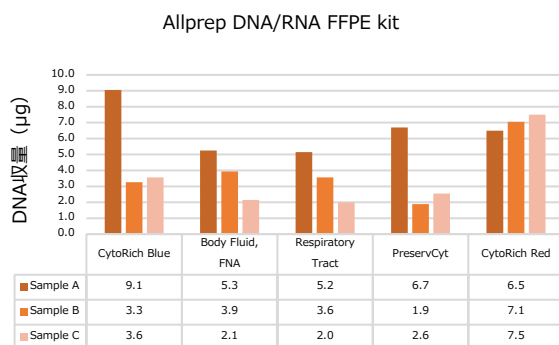
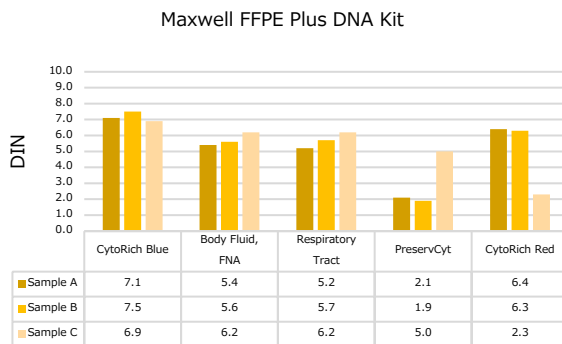
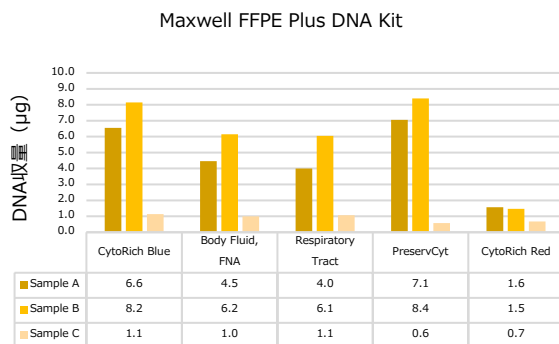


図2 DNAの収量と品質

【検討結果/図の説明】

[RNAの収量と品質]

- ・ホルマリン非含有固定液で処理された検体と細胞用のRNA抽出キットの組み合わせが適していた。
- ・ホルマリン含有固定液で処理された検体やFFPE用のRNA抽出キットは検査に適したRNAを得られない可能性がある。

[DNAの収量と品質]

- ・固定液の種類と抽出キットの組み合わせだけでなく、検体の性状や量も収量や品質に影響を及ぼす可能性がある。

実証データ II-⑦ LBC検体作製法

LBC保存検体の最適な長期保管方法の検討（実験①）

【検討内容】

《検 体》肺癌摘出標本の腫瘍断面をセルスクレーパーで3回擦過し、CytoRich Red（非婦人科，[BD社]）で固定した材料を用いた。

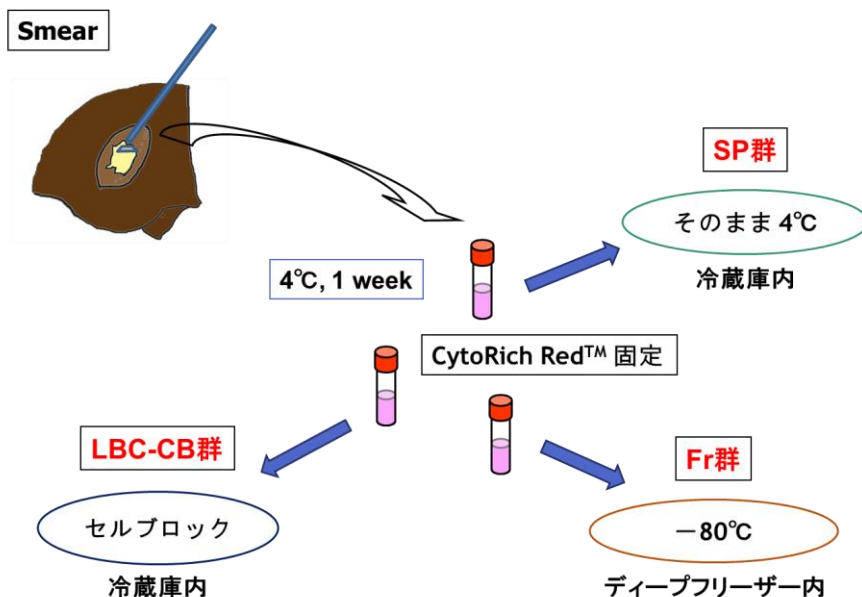
《方 法》1週間冷蔵庫内（4℃）で保管をした後に，下記の①②③の状態以最長3年間における経年劣化について調べた。

① SP群：そのまま冷蔵庫内（4℃）で保管

② Fr群：遠心分離をしてペレットをディープフリーザー内（-80℃）に保管

③ LBC-CB群：遠心分離をしてペレットを細胞浮遊液ゼリー化試薬（iPGell [ジェノスタッフ社]）で固化し，その後パラフィン包埋して冷蔵庫内（4℃）で保管

上述の3つの条件下で保管した検体を，設定したタイミング（時期）で5症例ずつ抽出し（15検体/5症例），それぞれのDNA/RNAの収量/品質の変化について比較検討した．保管期間と解析の時期としては，検体採取後に固定し1週間経過した5検体/5症例をBaselineとし，その後3群にわけた後の，1ヶ月，3ヶ月，6ヶ月，1年後，2年後，3年後の計35症例からの95検体を対象とした．核酸抽出はDNAとRNAの同時抽出キット（AllPrep DNA/RNA FFPE Kit [キアゲン社]）を用いた．蛍光法（Qubit [サーモフィッシャー社]）によりdsDNA収量，RNA収量，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，RIN，DV200（%）を測定した．



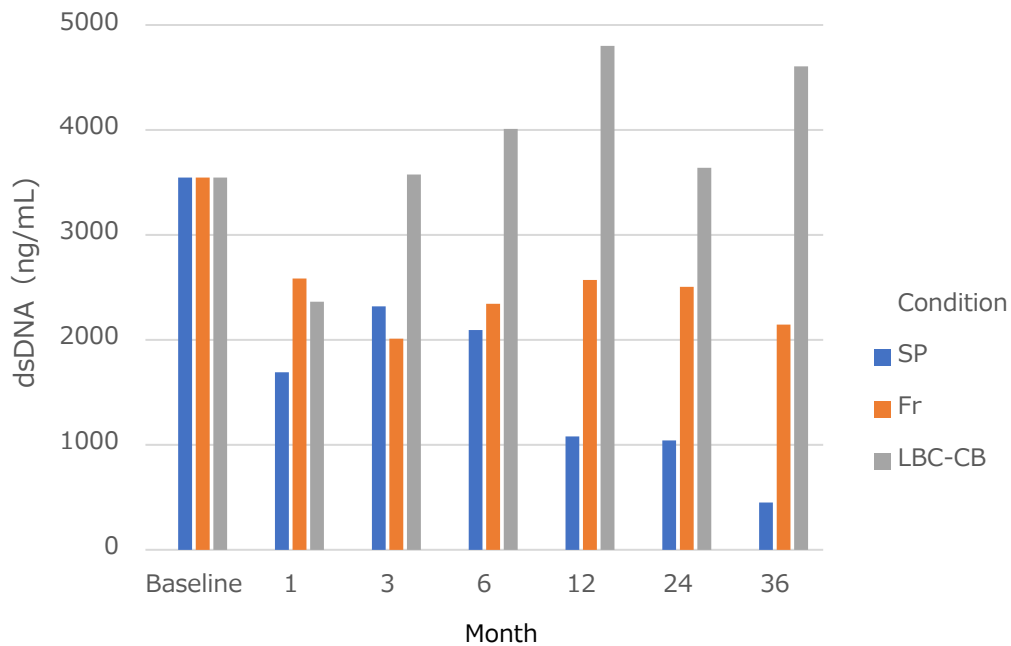
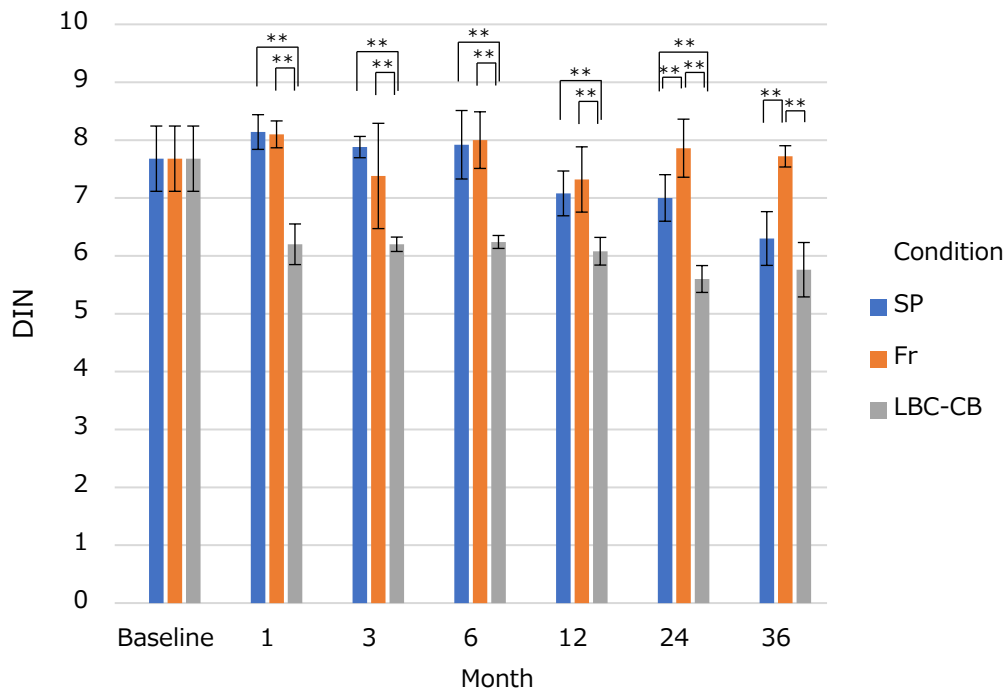


図1 各保管条件における保管期間がdsDNA収量（単位ng）に与える影響



One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc comparisons tests (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)

図2 各保管条件における保管期間がDNA品質（単位DIN）に与える影響

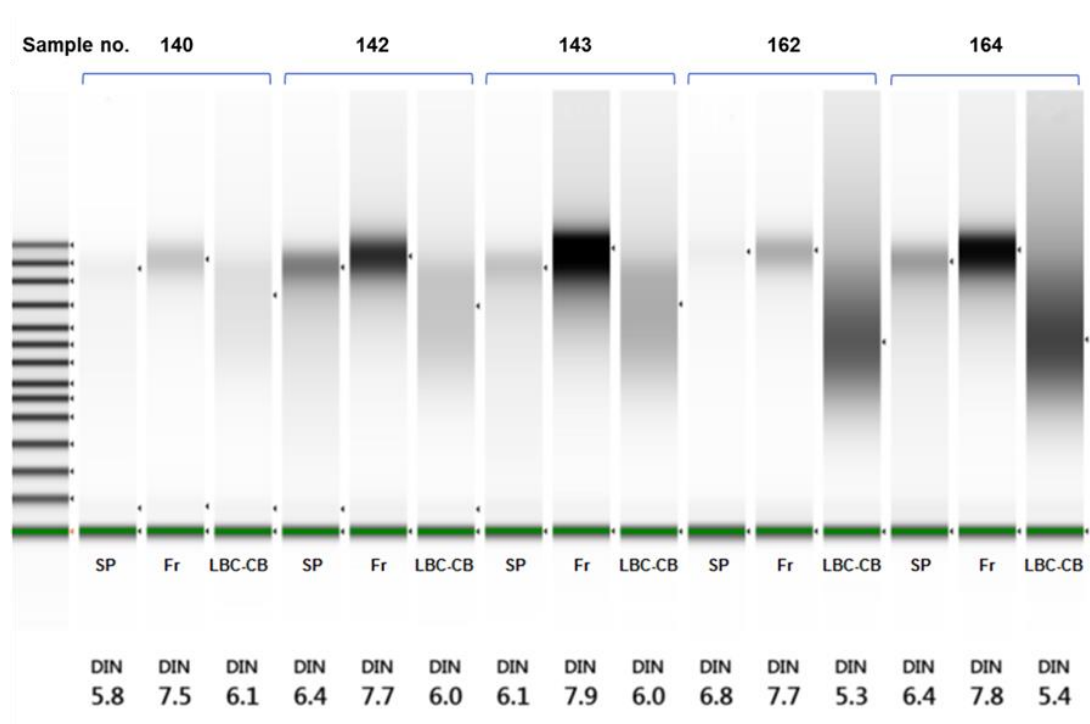


図3 3年保管検体の各症例における検体種別の電気泳動の比較

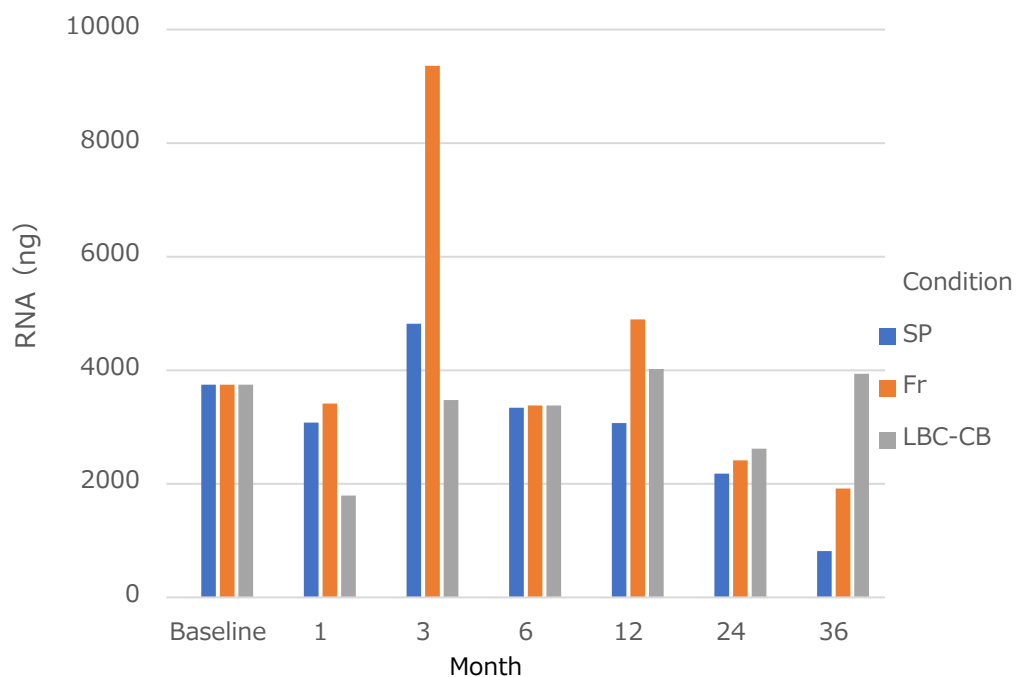
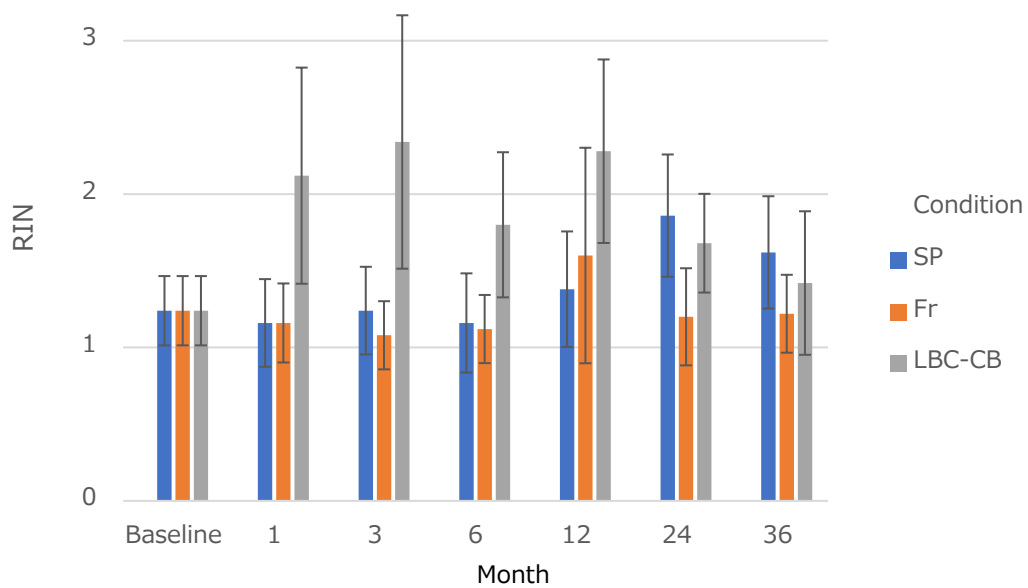


図4 各保管条件における保管期間がRNA収量（単位ng）に与える影響



One-way ANOVA followed by Bonferroni's post-hoc comparisons tests (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$)
 図5 各保管条件における保管期間がRNA品質（単位RIN）に与える影響

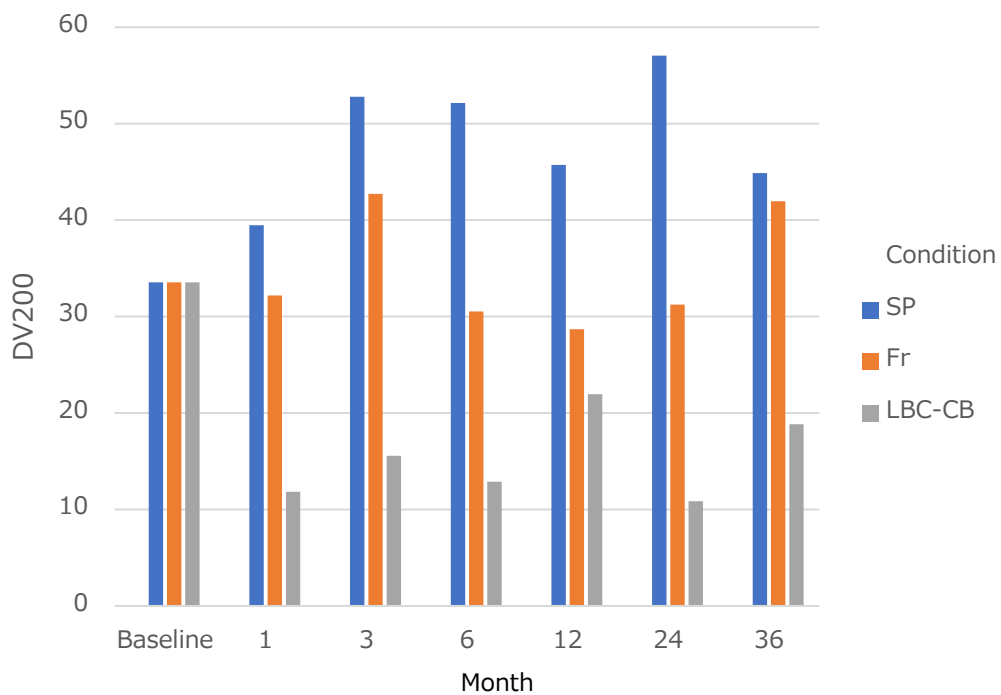


図6 各保管条件における保管期間がRNAの断片化（DV200 [単位%]）に与える影響

【検討結果/図の説明】

- dsDNA収量は保管条件の違いにより明らかに差を認め、LBC-CB群、次いでFr群においては安定的に収量を維持した。SP群では経年的に収量が減少し品質への影響が明らかであった（図1）。しかしながら電気泳動の結果においてLBC-CB群では断片化が進んでいる傾向がみられた（図3）。
- DINはFr群が最も採取時の状態を維持して、電気泳動の結果もあわせるとDNAが良質であった。LBC-CB群においては1ヶ月の時点で既にDINの低下がみられた。原因としてはパラフィン包埋の際の温度設定などが影響したと考えた（図2, 3）。
- RNA収量は保管条件の違いにより差を認め、LBC-CB群、次いでFr群の順に安定的に収量を維持した。SP群では経年的に収量が減少し品質への影響が明らかであった（図4）。
- RINは3群すべてにおいて低値であった（図5）。Baselineの段階で既に低値であることから、保管条件の違いが原因ではなく、手術場から標本を下ろし固定するまでの時間（冷虚血時間）が影響したと考える。しかしながら、その中でもLBC-CB群では固定後1か月と3か月でRINが改善しており、更にSP群では時間の経過とともにRINが若干改善していた。
- DV200（%）はSP群では良好であったが、LBC-CB群は他の群と比べ低かった（図6）。

実証データ II-⑧ LBC検体作製法

LBC保存検体の最適な長期保管方法の検討（実験②）

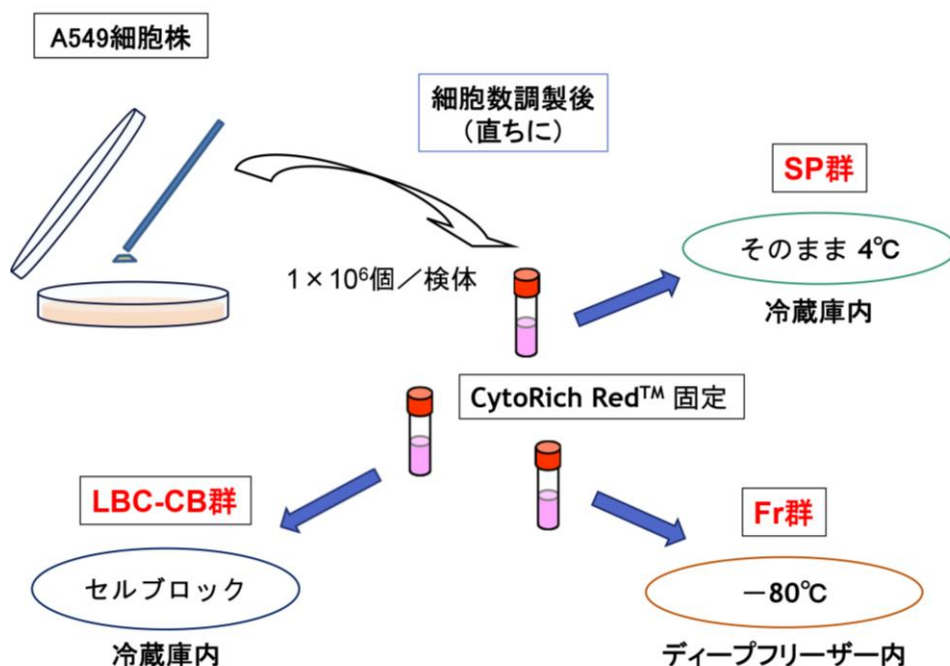
【検討内容】

《検 体》肺腺癌細胞株（A549）を1サンプルあたり 1×10^6 個に調整してCytoRich Red（非婦人科，BD社）で固定し実験①と同様の条件で保管した。

《方 法》1週間冷蔵庫内（4℃）で保管をした後に，下記の①②③の状態以最長1年間での経年劣化の影響を調べた（実験①と同様）。

- ① SP群：そのまま冷蔵庫内（4℃）で保管
- ② Fr群：遠心分離をしてペレットをディープフリーザー内（-80℃）に保管
- ③ LBC-CB群：遠心分離をしてペレットを細胞浮遊液ゼリー化試薬（iPGell [ジェノスタッフ社]）で固化し，その後パラフィン包埋して冷蔵庫内（4℃）で保管

上述の3つの条件下で保管した検体を，設定したタイミング（時期）で3サンプルずつ準備し（9検体/3サンプル），それぞれのDNA/RNAの収量/品質の変化について比較検討した．保管期間と解析の時期としては，検体採取後に固定し1週間経過した3サンプルをBaselineとし（3検体/3サンプル），その後3群にわたった後の，1ヶ月，2ヶ月，3ヶ月，6ヶ月経過したサンプルを随時解析した．実験①と同様の手順でdsDNA収量，RNA収量，DIN，RIN，DV200（%）を測定した．尚，DV200（%）のみ1年経過したサンプルも解析した．



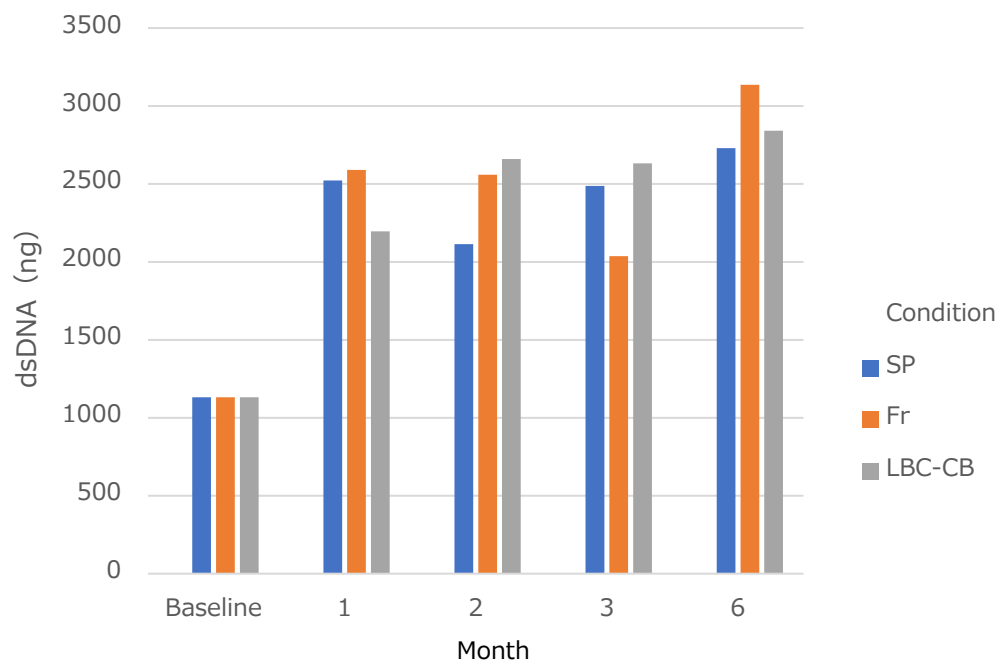


図1 各保管条件における保管期間がdsDNA収量（単位ng）に与える影響

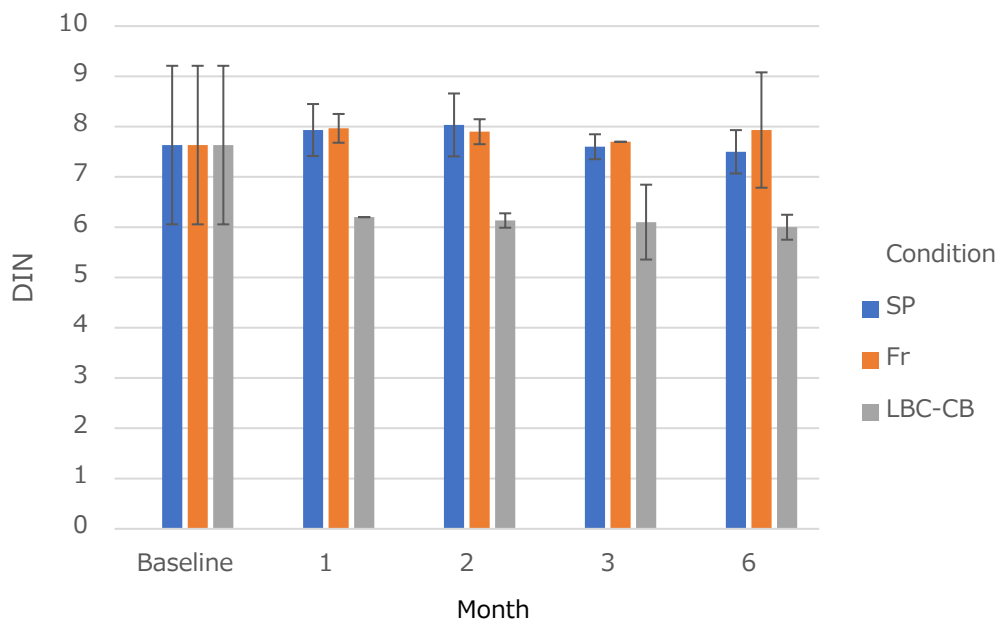


図2 各保管条件における保管期間がDNA品質（単位DIN）に与える影響

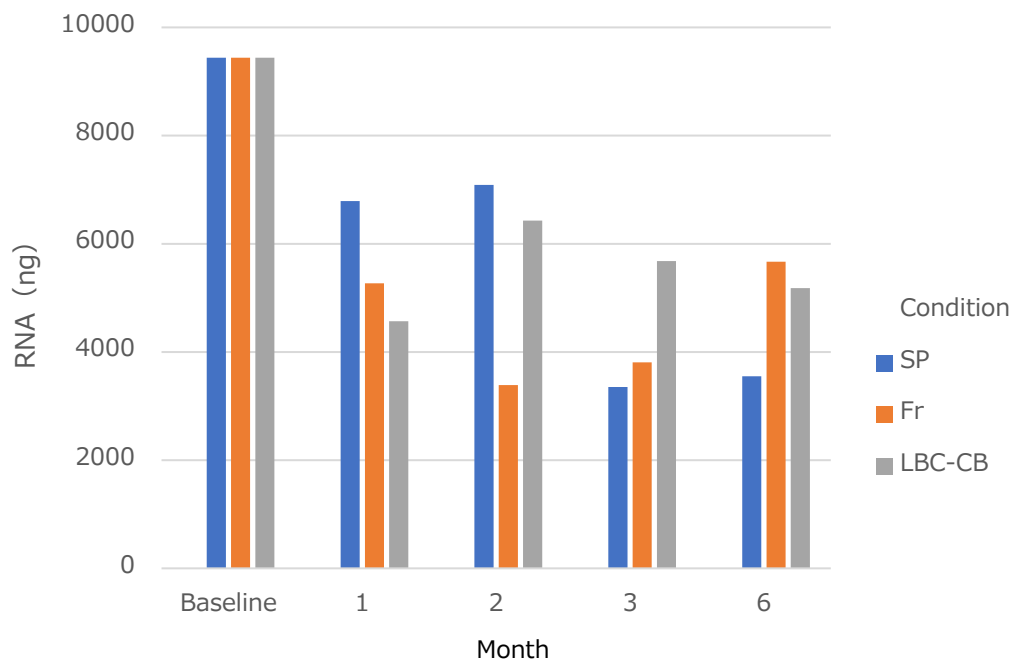


図3 各保管条件における保管期間がRNA収量（単位ng）に与える影響

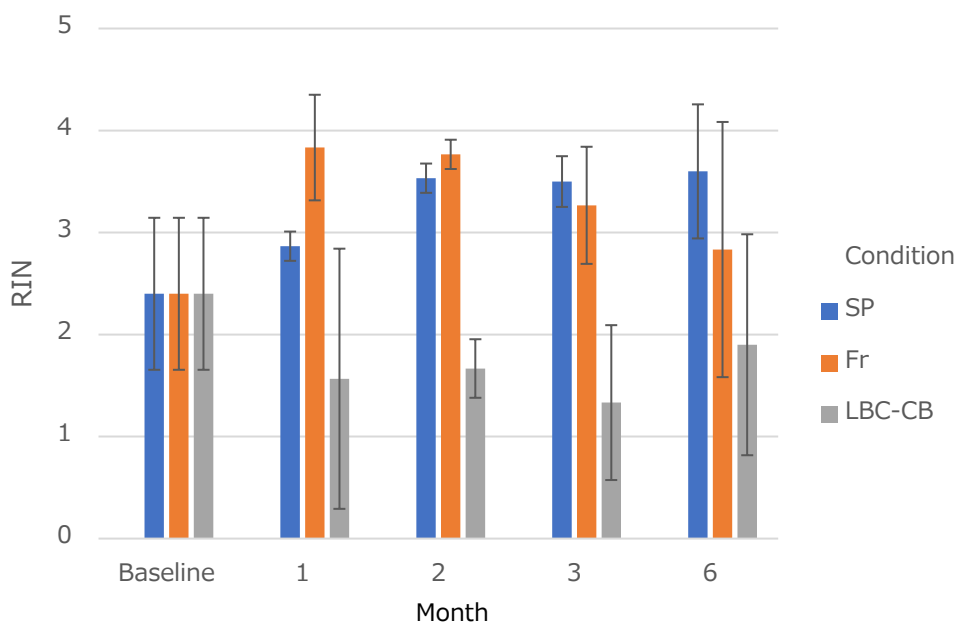


図4 各保管条件における保管期間がRNA品質（単位RIN）に与える影響

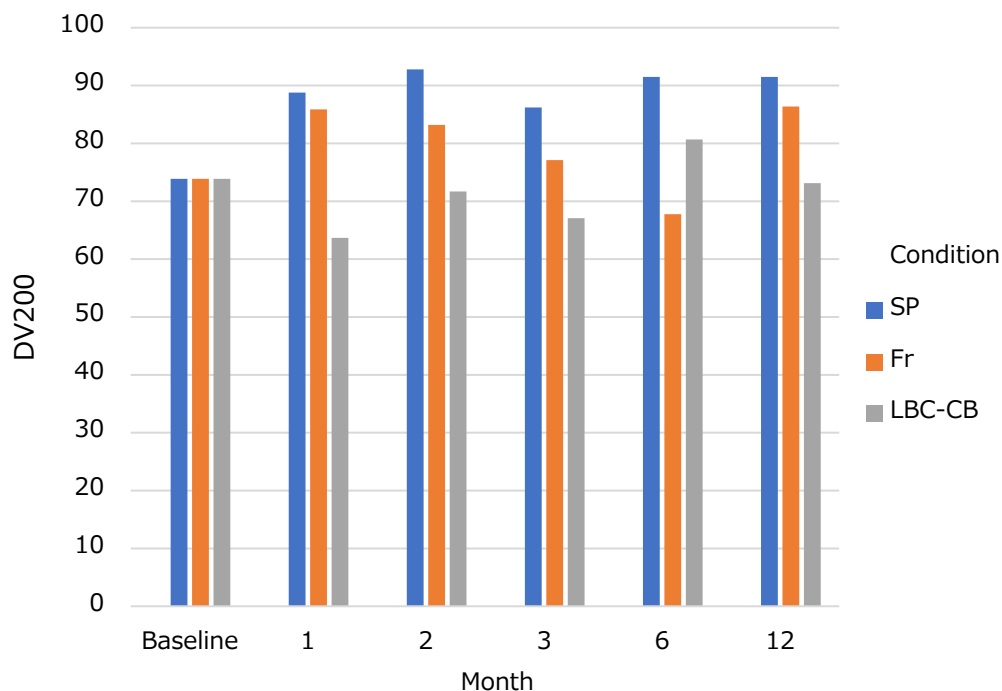


図5 各保管条件における保管期間がRNAの断片化（DV200 [単位%]）に与える影響

【検討結果/図の説明】

- dsDNA収量は保管条件の違いにより，明らかな差を認めなかった（図1）．
- DINはFr群とSP群で良好であった．LBC-CB群においては1ヶ月の時点で，既にDINの低下がみられた．原因としてはパラフィン包埋の際の温度設定などが影響したと考えた（図2）．
- RNA収量はいずれの群においても，経時的に収量が減少していた（図3）．
- RINはSP群が良好で，Fr群では安定していた．培養細胞では細胞数を調製したあと直ぐに固定する．そのため，実験①の結果でみられた冷虚血時間などの影響は少ないと考えた（図4）．
- DV200（%）はいずれの群においても経時的な変化が少なく実験①の結果とは異なった（図5）．その理由の一つとして，臨床検体ではパラフィン包埋の際の温度変化が，ヌクレアーゼ活性の差を生じ温度上昇に伴って，結果としてRNAの断片化などが進んだと考えた．

実証データⅡ-⑨ LBC検体保管条件とDNA品質の関係

臨床検体（胃癌腹水）を用いた種々のLBC検体保管条件，保管期間におけるDNA品質の解析（室温or冷蔵の2保管条件，60日・90日・365日以上 of 3保管期間）

【検討内容】

《検 体》体腔液（胃癌腹水）のバフィーコート，ロシュ社，BD社，ホロジック社の保存液（それぞれBody field fluid FNA Cellprep Solution, CytoRich Red, PreserveCyt）中で，60日 or 90日 or 365日以上，室温 or 冷蔵（4℃）で保管後，細胞浮遊液を作製した。

《方 法》細胞浮遊液 1mLをQIAamp DNA mini KitにてDNAを抽出した。抽出後，Nanodropを用いた吸光度法による濃度測定，Qubitを用いた蛍光法による濃度測定，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム[アジレント社]）によるDIN測定を行った。一部の室温365日以上保管検体ではPap染色により細胞形態を確認した。

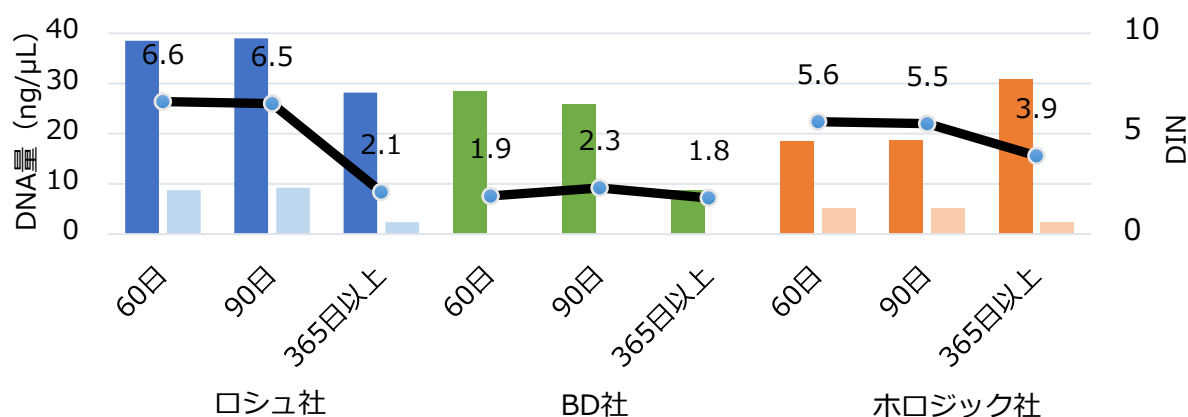


図1 室温保管におけるDNA品質

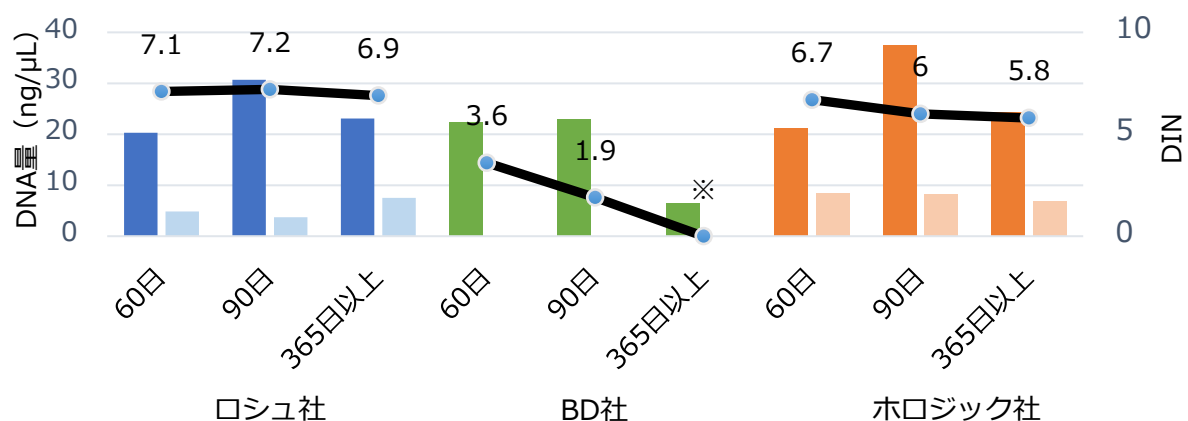
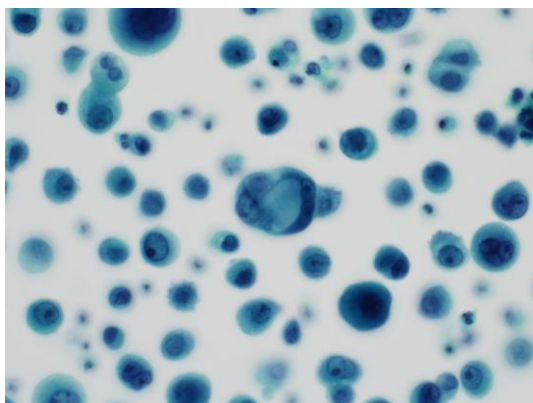
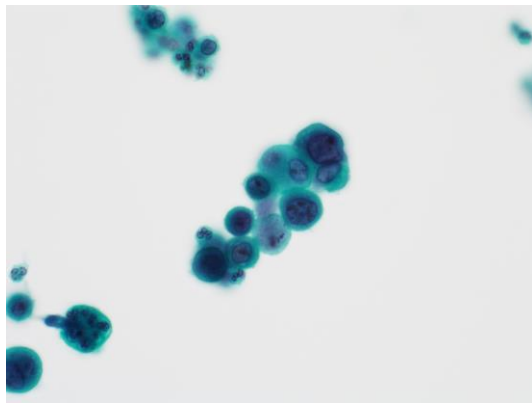


図2 冷蔵保管におけるDNA品質

DNA濃度は濃色がNanodropを用いた濃度，薄色がQubitを用いた濃度，数字はDINを示す



SurePath (BD社)



Cellprep (ロシュ社)

図3 365日以上室温で保管した腹水（胃癌）のパパニコロウ染色

【検討結果/図の説明】

- 室温保管と比較して冷蔵保管では60日、90日保管では著変はないが、365日以上 of 長期間保管では品質が保持される傾向にあった。この傾向は二本鎖DNAのみを検出するQubitで検出した場合により顕著に認められた。
- 保存液中にホルマリンが含まれるBD社の保存液ではQubitで検出した二本鎖DNAは冷蔵60日保管でもほとんど検出できなかった。ただし、細胞形態を観察する点については、BD社の保存液中で室温365日以上保管しても全く問題はなかった。
- 1例の臨床検体を用いた検討ではあるが、冷蔵で、できるだけ短期間の保管期間の検体を用いた方がDNA品質は保持される傾向にある。

実証データⅡ-⑩ LBC検体保管条件とDNA品質の関係

室温で臨床検体1種（肺癌胸水），凍結で臨床検体2種（原発不明癌胸水，肺癌胸水）の7日・30日・90日保管時のDNA品質の解析

【検討内容】

《検 体》体腔液のバフィーコートを，ロシュ社，BD社，ホロジック社の保存液（それぞれ Body field fluid FNA Cellprep Solution, CytoRich Red, PreserveCyt）中で，室温 or 凍結で7日 or 30日 or 90日保管後，細胞浮遊液を作製した。

《方 法》細胞浮遊液 1mLをQIAamp DNA mini KitにてDNAを抽出した．抽出後，Nanodropを用いた吸光度法による濃度測定，Qubitを用いた蛍光法による濃度測定，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム[アジレント社]）によるDIN測定を行った．一部の保管検体ではPap染色により細胞形態を確認した．

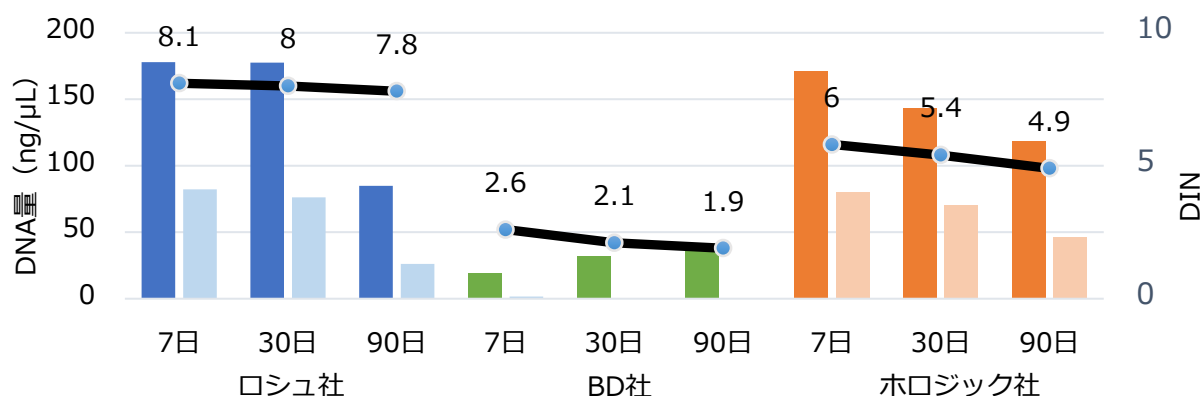


図1 室温保管した胸水（肺癌）から抽出したDNA品質

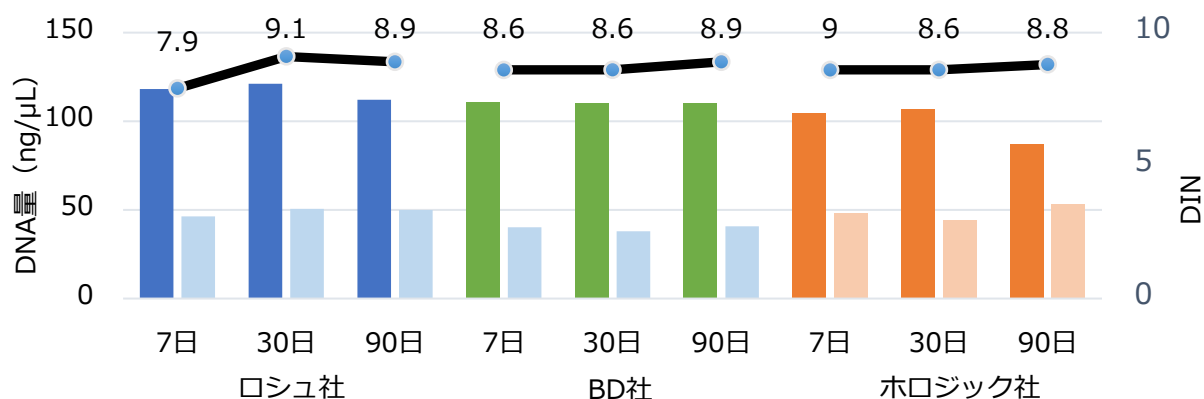


図2 凍結保管した胸水（肺癌）から抽出したDNA品質

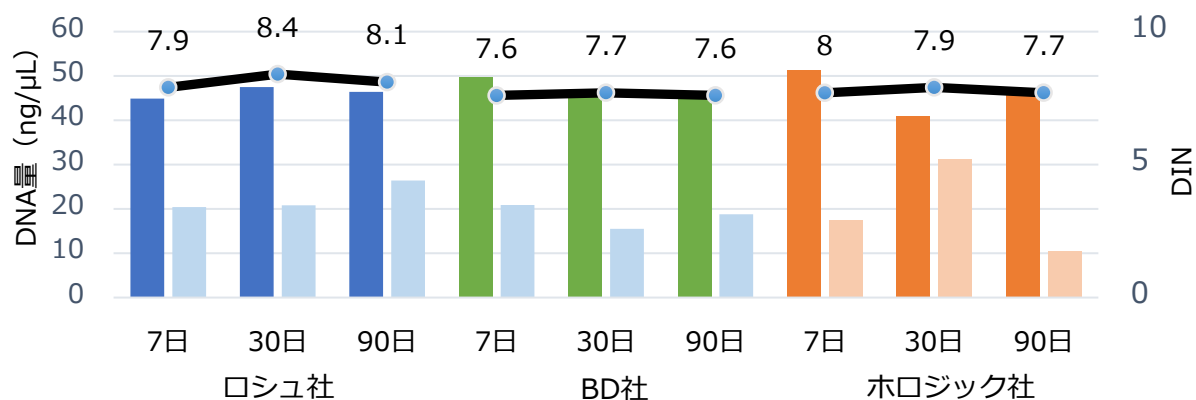


図3 凍結保管した胸水（原発不明癌）から抽出したDNA品質

DNA濃度は濃色がNanodropを用いた濃度，薄色がQubitを用いた濃度，数字はDINを示す

保管条件：室温
保管期間：90日
材料：胸水（肺癌）

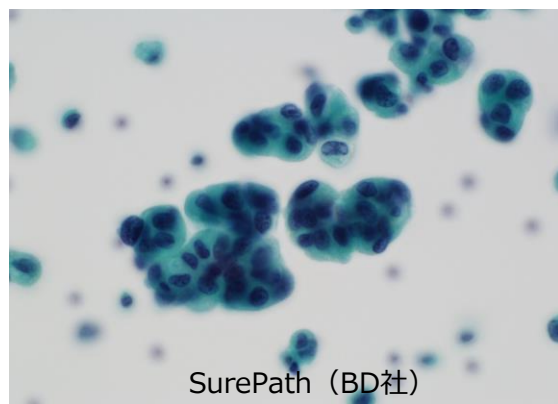
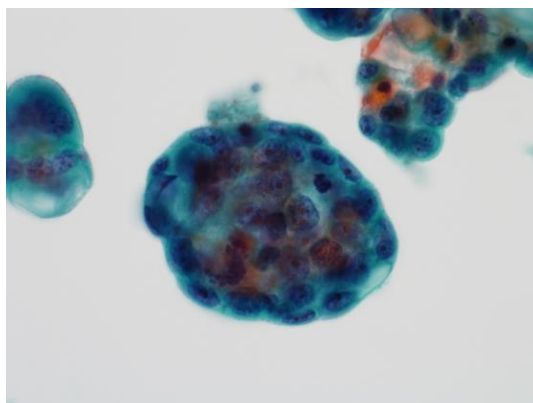
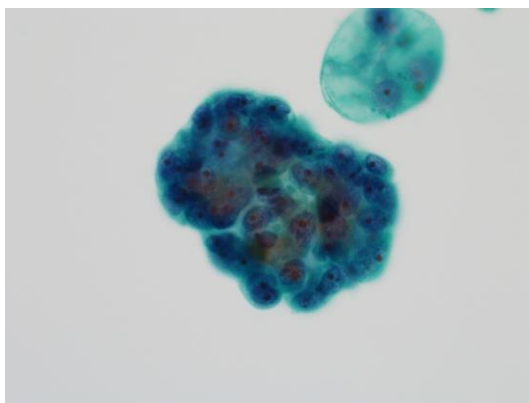


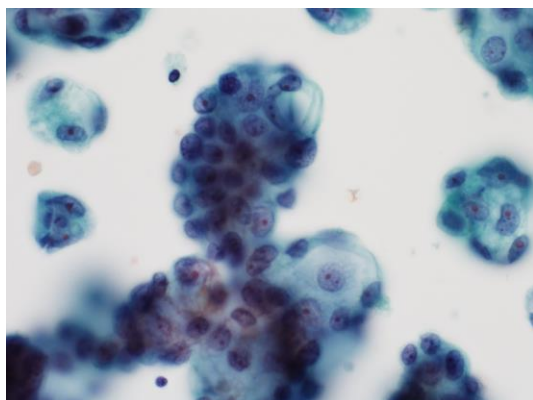
図4 90日室温で保管した腹水（肺癌）のパパニコロウ染色



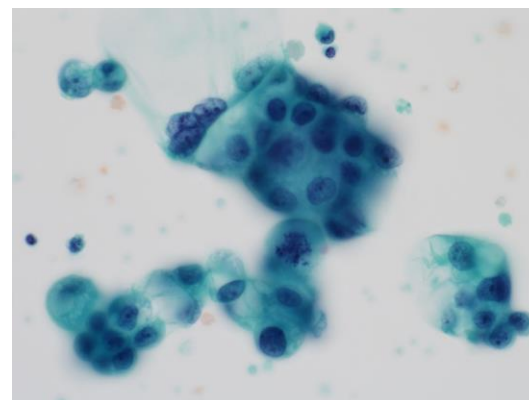
LBC保存液：Cellprep（ロシュ社）
材料：胸水（肺癌）
保管条件：凍結 保管条件：7日



LBC保存液：Cellprep（ロシュ社）
材料：胸水（肺癌）
保管条件：凍結 保管条件：90日



LBC保存液：SurePath（BD社）
材料：胸水（肺癌）
保管条件：凍結 保管条件：7日



LBC保存液：SurePath（BD社）
材料：胸水（肺癌）
保管条件：凍結 保管条件：90日

図5 各社LBC保存液で7日と90日凍結保管した腹水（肺癌）のPapニコロウ染色

【検討結果/図の説明】

- ・ 室温保管検体において、90日保管した場合、DNA収量、DNA品質ともにやや低下する傾向がみられたが、凍結保管検体においてはDNA収量、DNA品質の低下は明らかには見られなかった。
- ・ 細胞の形態について、凍結保管検体と室温保管で差異は認められなかった。
- ・ 少数の臨床検体を用いた検討ではあるが、DNA品質を保持する方法の一つとして凍結も有用であることがわかった。この場合でも形態観察上の問題点はなかった。

実証データⅡ-⑪ 乳腺穿刺吸引細胞診LBC保存液処理検体のDNAの品質評価

乳腺腫瘍細胞検体の保管期間がDNA安定性へもたらす影響

【検討内容】

《検 体》 Cellprep（ロシュ社）により乳腺腫瘍から得られた細胞検体（92症例）を，室温で保管した後に抽出したゲノムDNAを用いて，長期保管期間がDNAの安定性に与える影響について比較検討した．

《方 法》 抽出キット（QIAamp DNA mini kit [キアゲン社]）の抽出キットを用いてゲノムDNAを抽出し，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム [アジレント社]）によってDINを測定した．

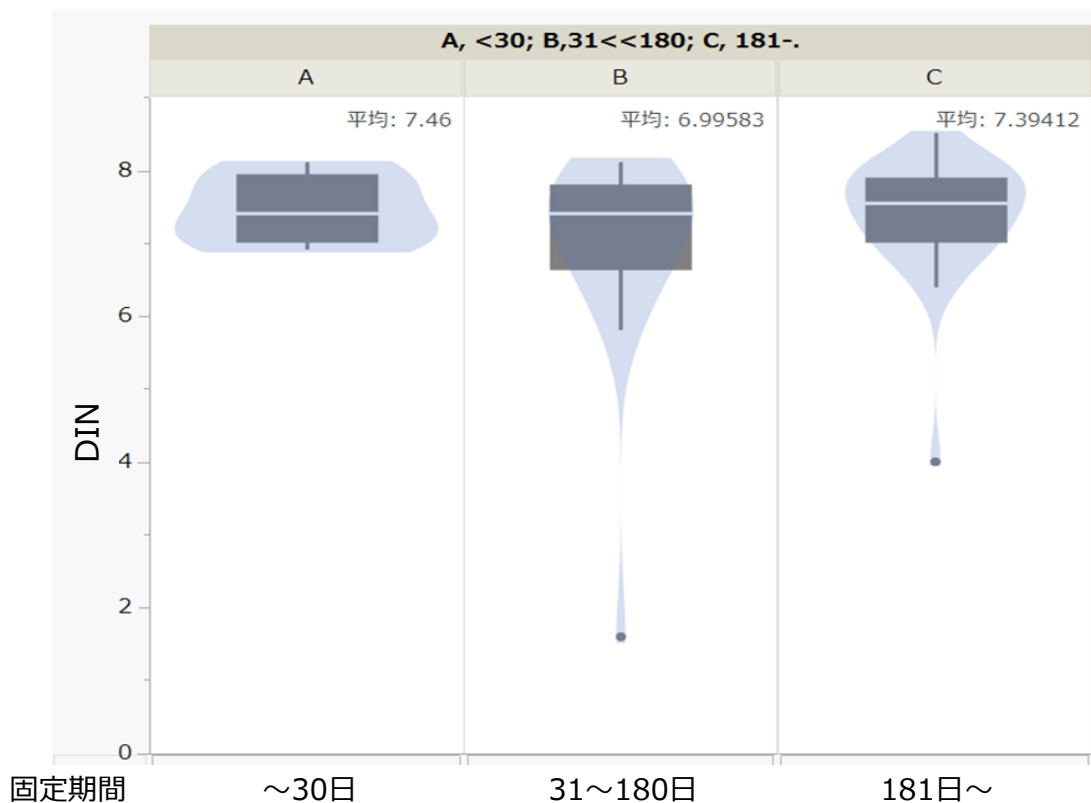


図1 室温保管した乳腺腫瘍から抽出したDNAの品質

【検討結果/図の説明】

- DINは細胞固定後30日まで，180日まで，365日までの群においてほぼ同様の値を認めた．抽出期間によるDINにおける有意差は検定されなかった．

実証データⅡ-⑫ LBC検体保管条件とRNA品質の関係

臨床検体2種（胃癌腹水，肺癌胸水）を用いたLBC保存液中での室温および冷蔵保管のRNA品質への影響

【検討内容】

《検 体》体腔液のバフィーコートを室温 or 冷蔵でロシュ社保存液（Body field fluid FNA Cellprep Solution）中で80日間保管後，細胞浮遊液を作製した。

《方 法》細胞浮遊液 1mLをQIAamp RNA mini Kitを用いてRNAを抽出した。抽出後，Nanodropを用いた吸光度法による濃度測定，Qubitを用いた蛍光法による濃度測定，全自動電気泳動システム（TapeStationシステム[アジレント社]）によるRIN測定を行った。

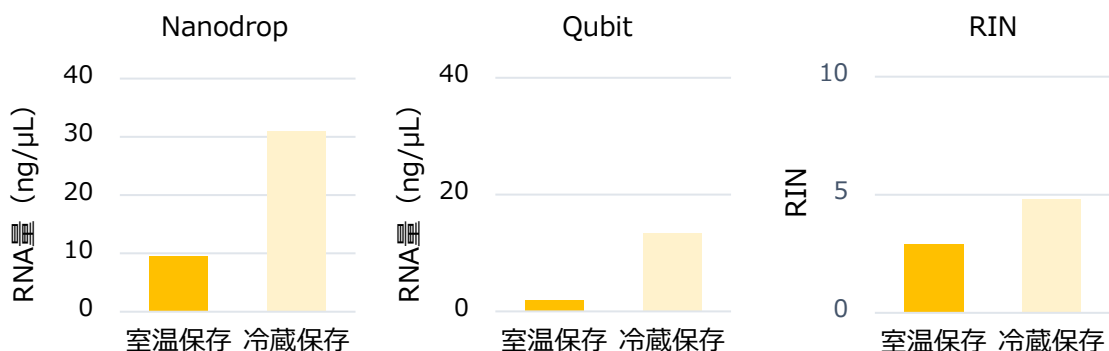


図1 腹水（胃癌）から抽出したRNA品質

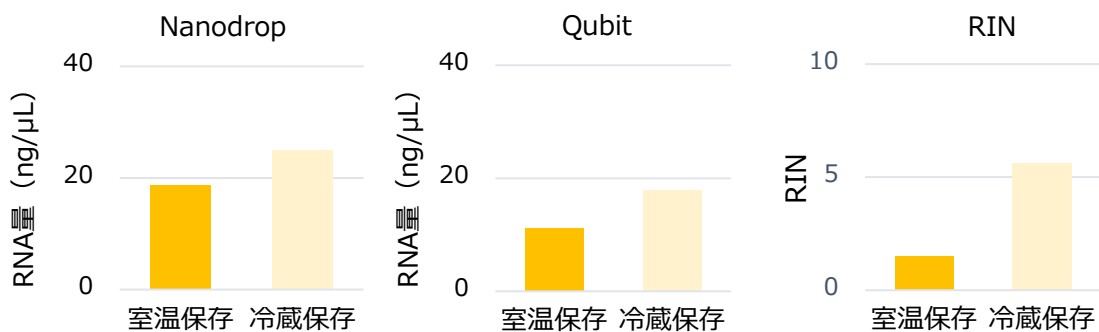


図2 心嚢液（肺癌）から抽出したRNA品質

【検討結果/図の説明】

- 臨床検体を用いた検討の結果，80日保管した場合，RNA品質は室温保管よりも冷蔵保管の方が良好な傾向があった。
- 少数の臨床検体を用いた検討ではあるが，RNA品質を保持する方法の一つとして冷蔵保管が有用であることがわかった。

実証データⅡ-⑬ 細胞材料の冷蔵保管と常温保管の核酸品質の経時的変化

臨床検体（卵巣癌腹水）を用いたセルブロック作製前の検体保管状態の核酸品質への影響

【検討内容】

《検 体》腹水細胞沈渣を500μLずつ試験管に分注し遠心分離したサンプルを用いて、

A)冷蔵（4℃）および常温（24℃）にて即固定（IF），1日間，3日間，7日間放置して保管後，非溶血・試験管法1）とLBC（RED）保管法2）によるセルブロックを作製し，核酸の品質変化について比較検討した．

B)10%NBFとLBC（RED）を用いて，固定方法（重層固定：SLFと混和固定：MF）と固定時間（1時間，1日間，3日間，7日間）後にセルブロックを作製し，核酸の品質変化について比較検討した．

《方 法》パラフィン切片を用い，市販のFFPE 組織用DNAおよびRNA 抽出キット

（Allprep DNA/RNA FFPE kit）によりそれぞれの核酸収量と，TapeStationシステム［アジレント社］を用いてDINとDV200（％）による核酸品質の評価を3回行った．

NBF：中性緩衝ホルマリン

LBC（RED）：BD CytoRich Red保存液

RS: Refrigerated storage（冷蔵4℃）

RT: Room Temperature（常温24℃）

IF: Immediate Fixation（即固定）

SLF: Sediment layer Fixation（重層固定）

MF: Mixed Fixation（混和固定）

1) 非溶血・試験管法：溶血剤による前処理なしの細胞沈渣に，10%NBFにて重層固定（SLF，24℃，1日間）後，パラフィン包埋薄切切片作製．

2) LBC（RED）処理法：溶血剤処理なしの細胞沈渣に，LBC（RED）にて固定（SLF，24℃，1日間）後，パラフィン包埋薄切切片作製．

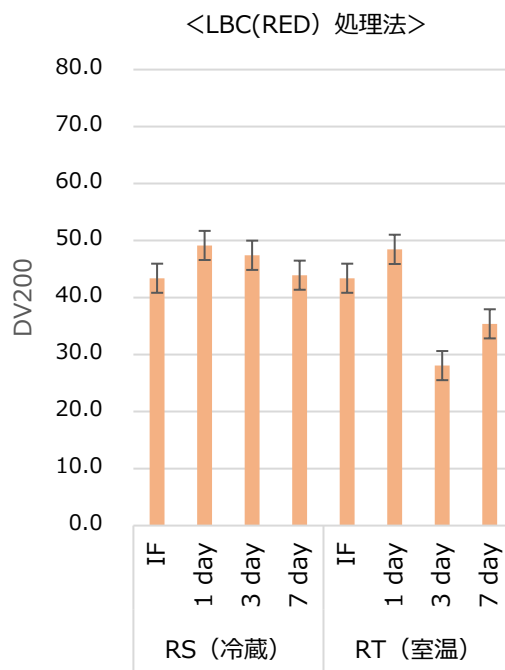
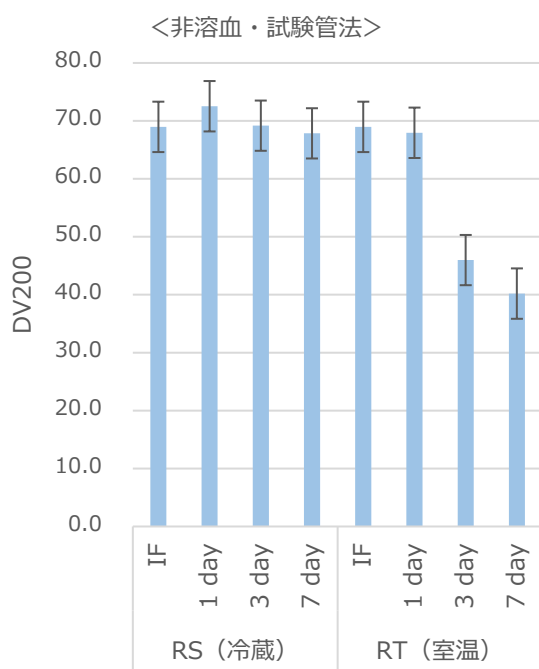
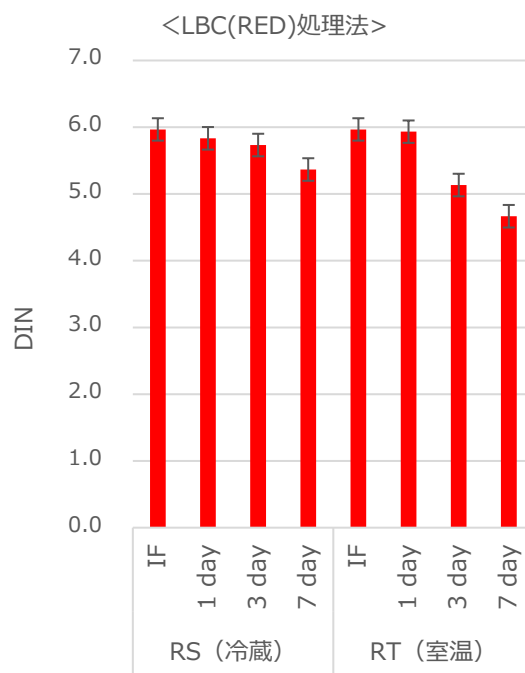
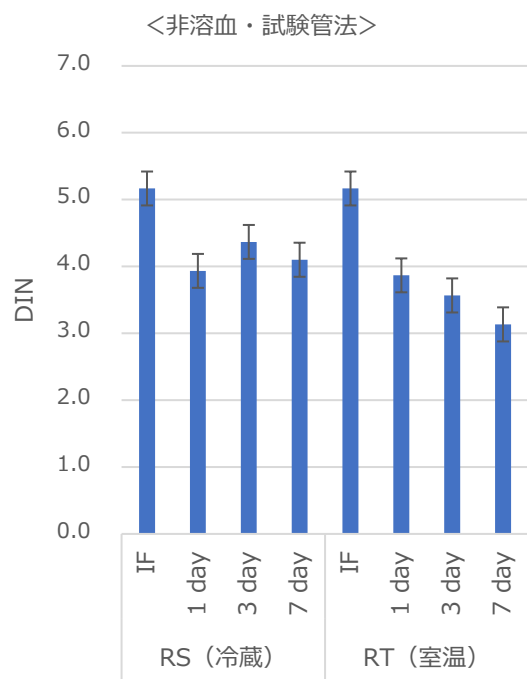


図1 保管温度（冷蔵・室温）および期間と固定方法の影響。
（上）DNA，（下）RNA

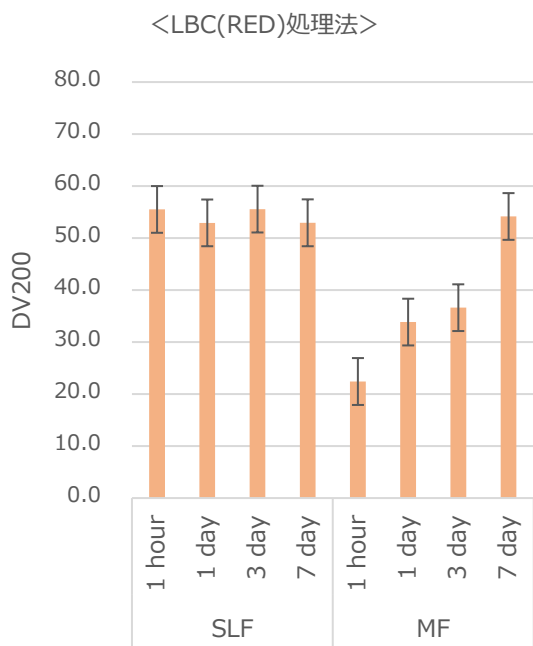
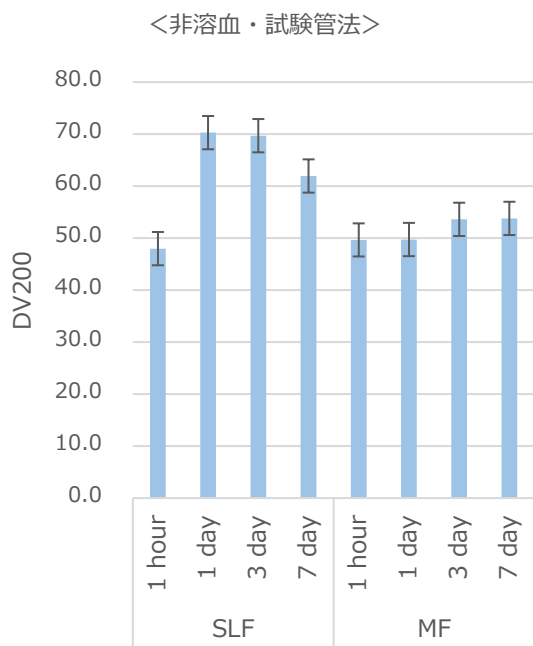
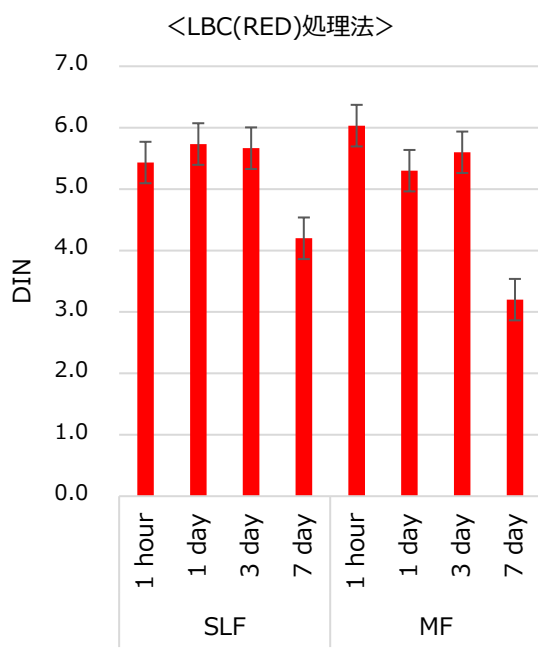
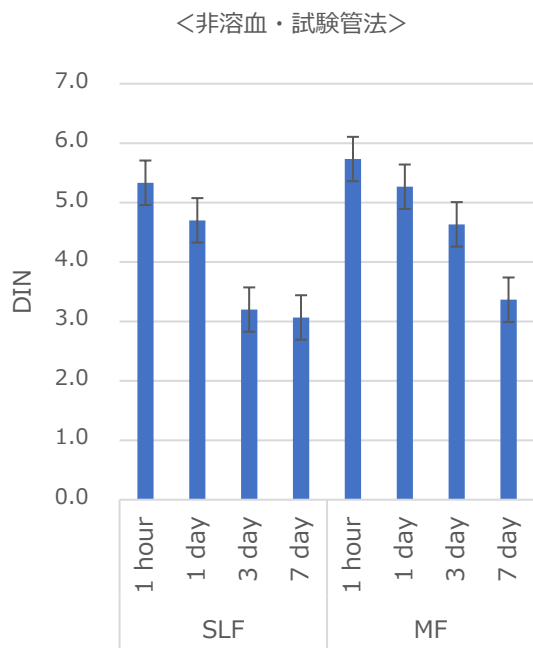


図2 固定液と固定方法の影響。
(上) DNA, (下) RNA

【検討結果/図の説明】

A)細胞保管条件と固定法の影響

- 各細胞保管条件下において、保管時間の経過とともに核酸品質が低下する傾向がみられ、特に常温（RT）保管条件下では核酸品質の低下傾向がやや強くみられた。
- 非溶血・試験管法とLBC（RED）処理法の比較において、DINについてはLBC（RED）処理法がやや良好な核酸品質が得られ、DV200（％）については非溶血・試験管法で良好な核酸品質が得られた。

B)固定液と固定方法の影響

- 非溶血・試験管法では、固定時間の延長でDINの低下傾向がみられ、特に重層固定（SLF）による3日間以上の固定では、混和固定（MF）に比べ品質低下傾向が顕著であった。
- LBC（RED）処理法では、固定時間の延長によるDINの低下傾向が緩やかであり、3日間固定まではほぼ良好な核酸品質が得られたが、7日間の処理では核酸品質低下が顕著であった。
- NBF固定液を用いた重層固定（SLF）による1時間の処理ではDV200（％）による品質低下がみられたが、1日間以降から7日間固定ではほぼ良好な核酸品質が得られた。混和固定（MF）では、1時間固定から7日間固定まで、ほぼ安定した核酸品質が得られた。
- LBC（RED）処理法では、重層固定（SLF）において1時間固定から7日間固定において、DV200（％）による核酸品質はほぼ良好であった。一方で混和固定（MF）においては1時間固定で核酸品質が著しく悪く、1日間以降7日間まで処理の延長により、核酸品質が良好であった。

実証データⅡ-⑭ 各種セルブロック作製法とパラフィンブロックの保管条件

臨床検体（体腔液）を用いたセルブロック作製前の検体保管状態の核酸品質への影響

【検討内容】

《検 体》体腔液材料9例（セルブロック作製後1年未満保管6例と3年以上保管3例）を用いた。
前処理後に固化不十分な材料には、一部アルギン酸ナトリウム法¹⁾にて固化させた。

《検 討》非溶血・試験管法²⁾を対照とし、LBC（RED）処理法³⁾と溶血法⁴⁾による各前処理法の核酸品質を比較検討した。

《方 法》セルブロックによるパラフィン切片を用い、市販のFFPE 組織用DNAおよびRNA抽出キット（Allprep DNA/RNA FFPE kit）によりそれぞれの核酸収量と、TapeStationシステム（アジレント社）を用いてDINとDV200（%）による核酸品質の評価を行った。

NBF：中性緩衝ホルマリン

LBC（RED）：BD CytoRich Red保存液

- 1) アルギン酸ナトリウム法：細胞沈渣に0.1%アルギン酸ナトリウムを添加し混和後、1 M 塩化カルシウム水溶液にて固化させ回収し、パラフィン包埋薄切切片作製。
- 2) 非溶血・試験管法：溶血剤による前処理なしの細胞沈渣に、10%NBFにて重層固定（SLF, 24℃, 1日間）後、パラフィン包埋薄切切片作製。
- 3) LBC（RED）処理法：溶血剤処理なしの細胞沈渣に、LBC（RED）にて処理（SLF, 24℃, 1日間）後、パラフィン包埋薄切切片作製。
- 4) 溶血法：0.9%シュウ酸アンモニウム水溶液10分処理後、10%NBFにて重層固定（SLF, 24℃, 1日間）後、試験管法にてパラフィン包埋薄切切片作製。

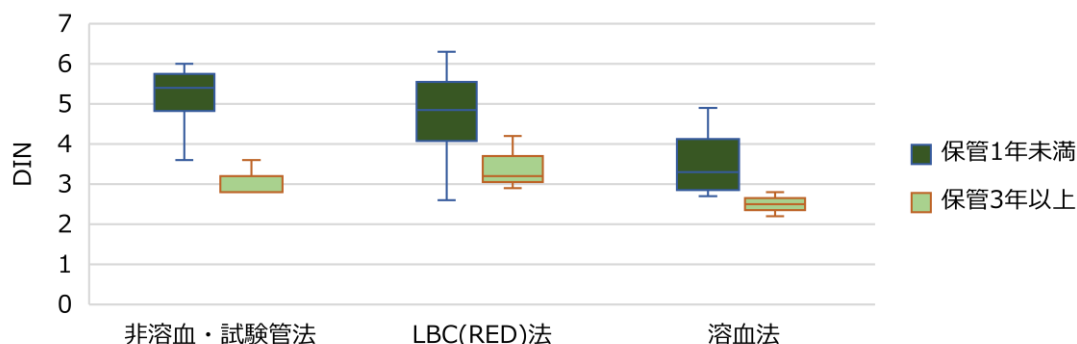


図2 セルブロック作製前処理とパラフィンブロックの保管条件がDNA品質に与える影響

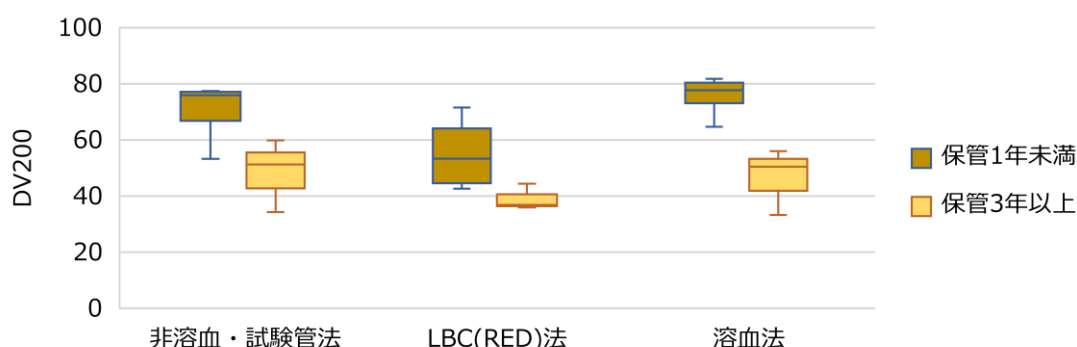


図3 セルブロック作製前処理とパラフィンブロックの保管条件がRNA品質に与える影響

【検討結果/図の説明】

<DNA (DIN) への影響>

- DNA (DIN) の核酸品質について、試験管法と比較しLBC (RED) 処理法はほぼ同等の核酸品質が得られたものの、LBC (RED) 処理法サンプルによってややバラツキがみられた。一方で溶血法ではDINの著しい低下傾向がみられた。
- セルブロック作製後1年未満のサンプルと比較して3年以上保管した材料では、全ての処理法において長期保管の影響と思われる核酸品質の明らかな低下傾向がみられた。

<RNA (DV200(%)) への影響>

- RNA (DV200 (%)) の核酸品質について、非溶血・試験管法と溶血法はほとんど品質の差異は認められなかった。
- 一方でLBC (RED) 処理では核酸品質のバラツキがみられ、非溶血・試験管法や溶血法よりも核酸品質のやや低下が認められた。
- セルブロック作製後1年未満のサンプルと比較し3年以上保管したサンプルでは、全ての処理法において長期保管の影響と思われる核酸品質の明らかな低下傾向がみられた。

S2 調査資料

(日本臨床細胞学会実施全国アンケート集計報告)

調査資料：日本臨床細胞学会実施全国アンケート集計報告

本邦におけるゲノム医療の実態を把握し、指針作成への基礎的情報を得るために、アンケート調査を行った。

【方 法】

2019年4月4日に「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への協力をお願い」を電子メールにて日本臨床細胞学会認定施設全854施設中760施設に一斉配信。4月19日までの期間に電子メールにてアンケートを回収

【アンケート内容】

施設情報

液状化検体細胞診（LBC）の実態

導入しているLBCシステムについて

セルブロックの実施件数と作製方法

肺癌の遺伝子診断の実態

乳癌、胃癌、大腸癌、固形腫瘍の遺伝子診断の実態

遺伝子検査の対象は、診療報酬点数の第3部 検査D004-2 悪性腫瘍組織検査（保険適用の体細胞遺伝子検査）を指す。

遺伝子パネル検査は、NCCオンコパネルなど先進医療や自由診療で行われている包括的ゲノムプロファイリング検査を指す。（アンケート実施当時）

【結 果】

262施設より回答が得られた（有効回答率 34%）。

1 ご施設に関する下記の項目にご回答ください。

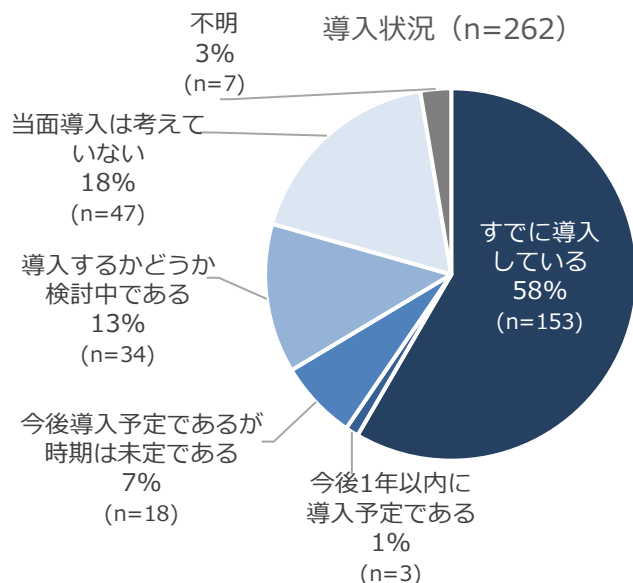
【施設区分1】大学病院 53 (20%)、がんセンター 8 (3%)、その他 197 (75%)、不明 4 (2%)

【施設区分2】がんゲノム医療中核拠点病院 5 (2%)、がんゲノム医療連携病院 64 (24%)、その他 156 (60%)、不明 37 (14%)

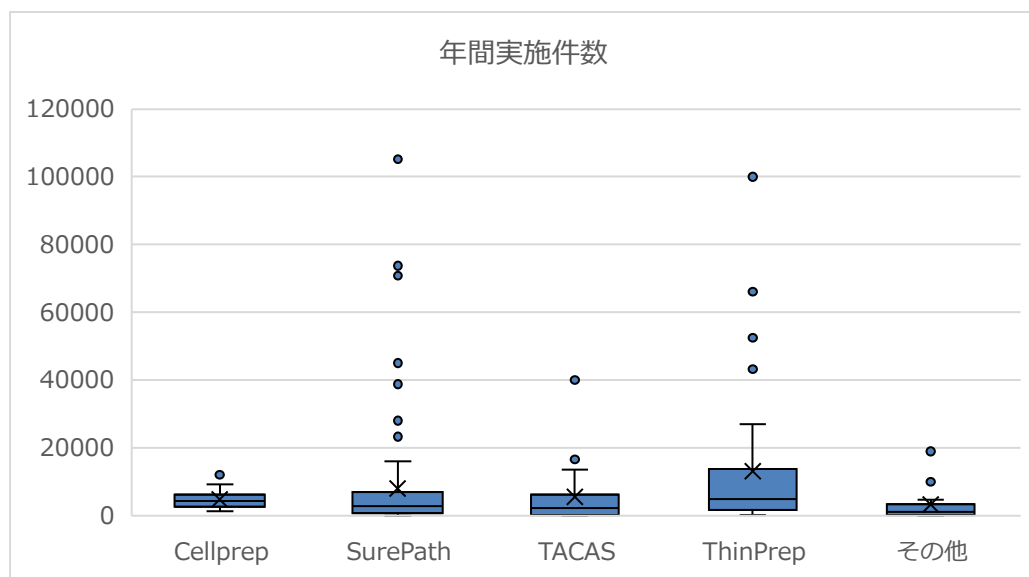
【施設区分3】都道府県がん診療連携拠点病院 44 (17%)、地域がん診療連携拠点病院 96 (37%)、その他 90 (34%)、不明 32 (12%)

2 液状化検体細胞診（LBC）に関する下記の項目にご回答ください。

2-1：LBC の導入状況をお教えてください。

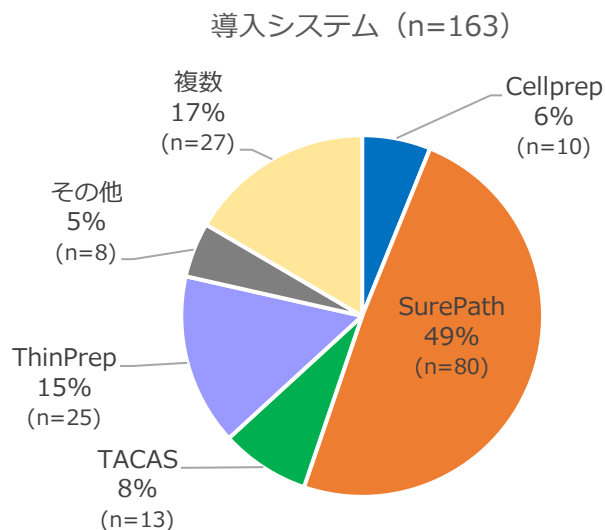


LBC は半数以上の施設ですでに導入されており、大部分の施設では導入予定であるが、18%の施設は当面の導入は考えていない。

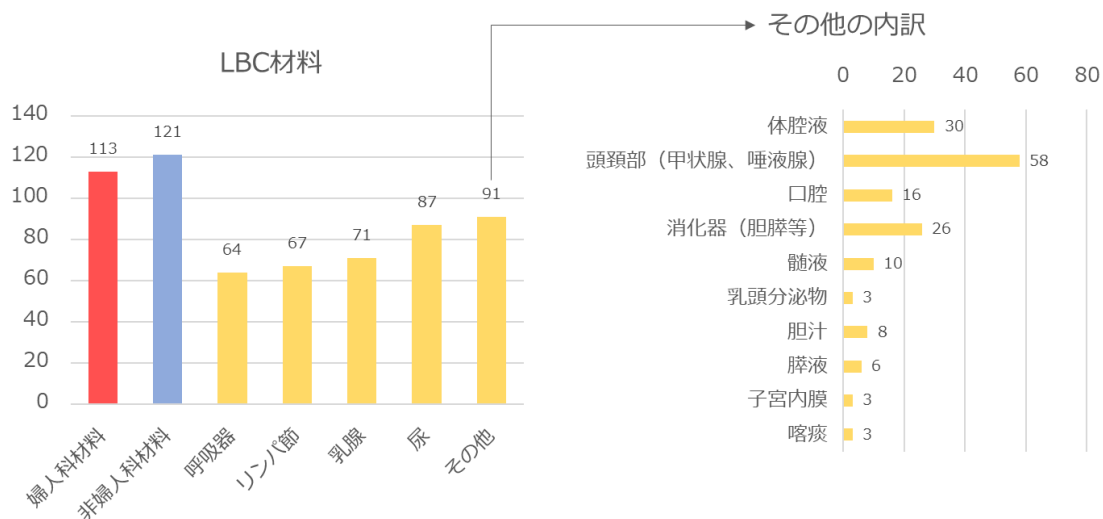


年間実施件数は、10 万件を超える実績のある検査センターを除くと年間 1000-12000 件の範囲で実施されている施設が多い。

2-2：導入している LBC システムにチェックをし、各項目にご回答ください（複数回答可）



LBC システムは、SurePath, ThinPrep の他、各社の様々なシステムが採用されている。施設によっては複数のシステムを採用している。



検体種は、婦人科、非婦人科がほぼ同様である。非婦人科の内訳は、呼吸器、リンパ節、乳腺、尿がほぼ同等の割合を占める。

導入形態

	手動	半自動	全自動	組合せ	不明	合計
Cellprep	—	9	7	—	2	18
SurePath	53	24	6	11	4	98
TACAS	14	2	2	1	—	19
ThinPrep	—	5	30	4	1	40
計	67	40	45	16	7	175

SurePath, TACAS は手動が多く、Cellprep, ThinPrep は自動化形態が多い。

保存液の種類

	婦人科	非婦人科	合計
Cellprep® Cervical, Oral Cavity Solution	10	—	10
BD SurePath™ Collection vial	52	—	52
TACAS™ GYN Vial	9	—	9
PreservCyt® Solution	36	14	50
Cellprep® Urine, CSF Solution	—	3	3
BD サイトリッチ™ ブルー保存液	—	2	2
BD サイトリッチ™ レッド保存液	—	62	62
TACAS™ Amber	—	1	1
TACAS™ Ruby	—	6	6
CytoLyt® Solution	—	2	2
その他、検体によって使い分けている	5	32	37
不明	7	6	13
計	119	128	247

非婦人科材料の内訳（全回答）：呼吸器＝65，リンパ節＝67，乳腺＝71，尿＝88，その他＝94

保存液の種類は、導入システムによるが、非婦人科検体の保存液は様々である。

3 セルブロックに関する下記の項目にご回答ください。

3-1: セルブロックの作製に関して

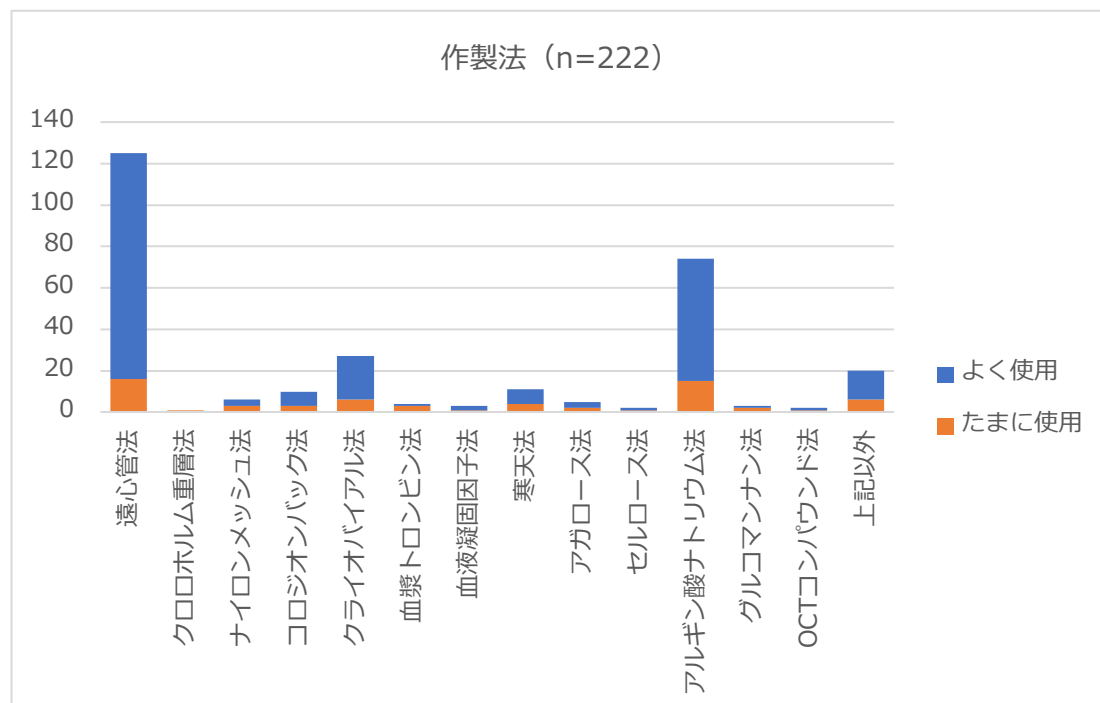
作製している施設数 222 施設 (85%)

年間件数	すべて	胸水
20 未満	69	90
20～50	65	62
50～100	34	36
100～200	23	24
200 以上	31	10

胸水検体の占める割合: 50%未満 = 37 (17%), 50-80% = 45 (20%), 80%以上 = 140 (63%)

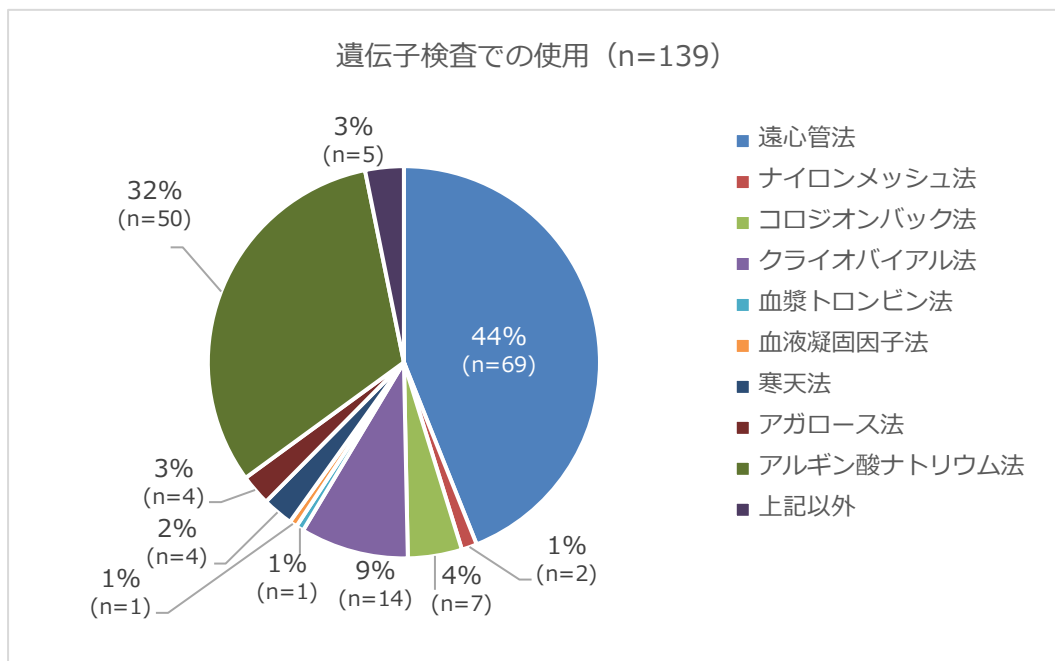
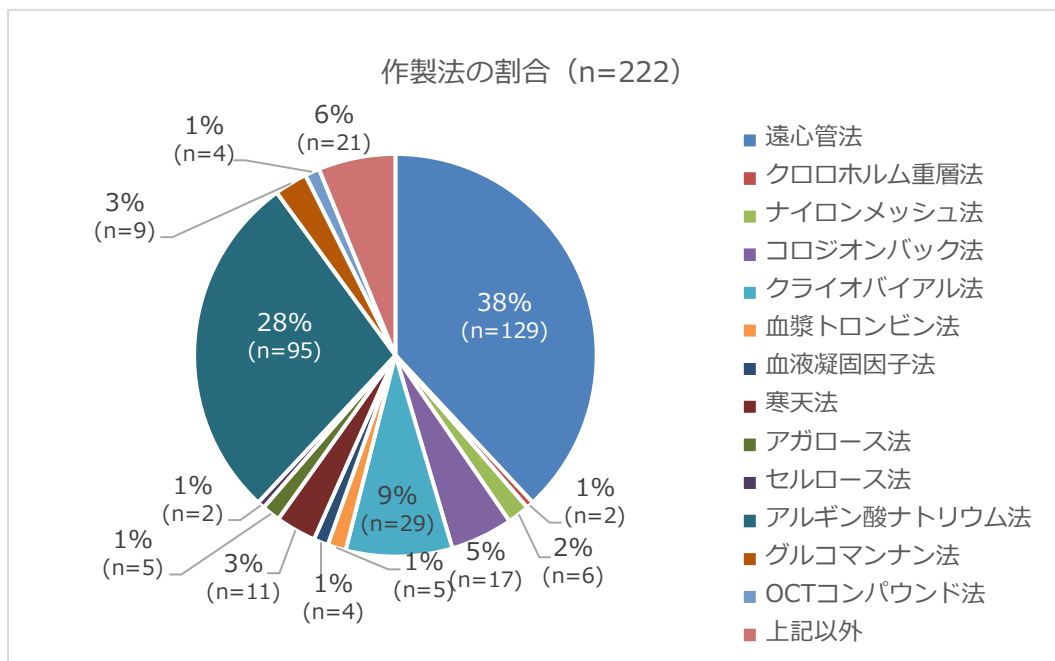
セルブロックは大部分の施設で作製しており, 胸水の占める割合が高い。

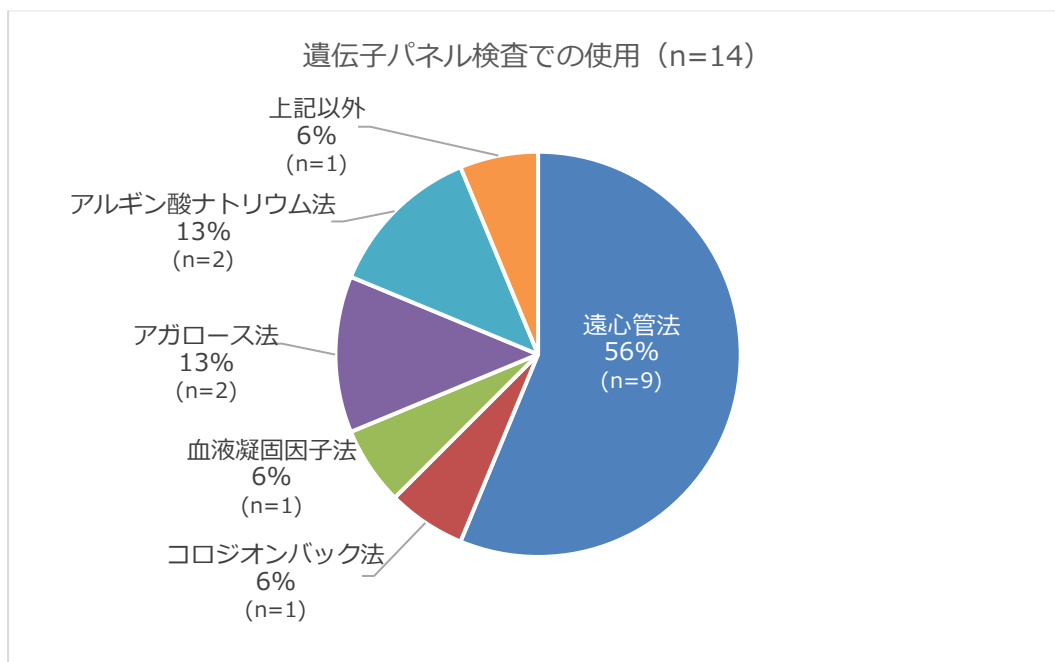
3-2: 実施しているセルブロック作製法についてご回答ください (複数回答可)



本アンケートでは, 「よく使用」全体の 20%以上の頻度, 「たまに使用」全体の 20%未満の頻度で使用する事とした。

作製法は、遠心管法とアルギン酸ナトリウム法が良く使用されている。クライオバイアル法を用いる施設が続くが、それ以外の方法は少数施設にとどまる。





4 コンパニオン診断に関する下記の項目にご回答ください。

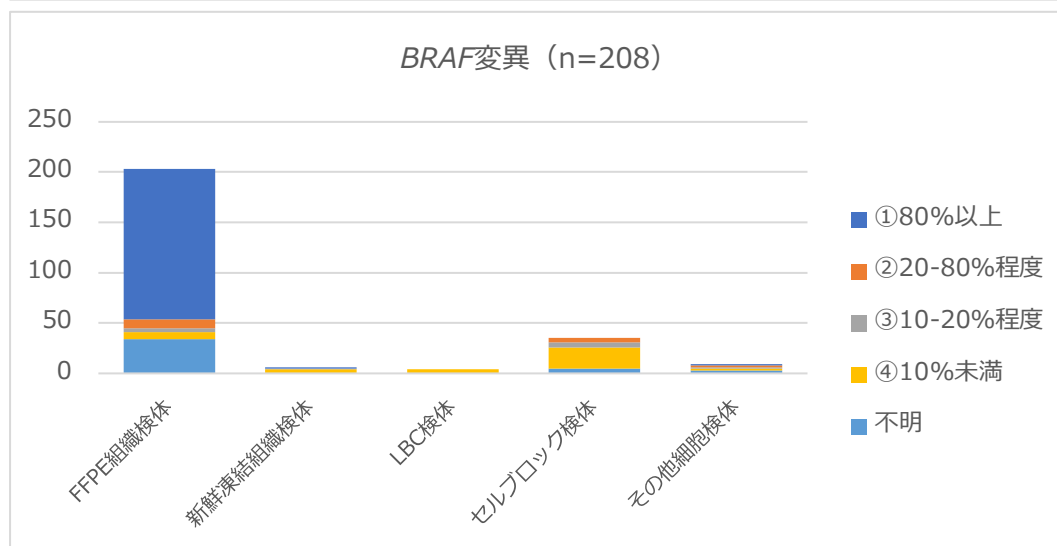
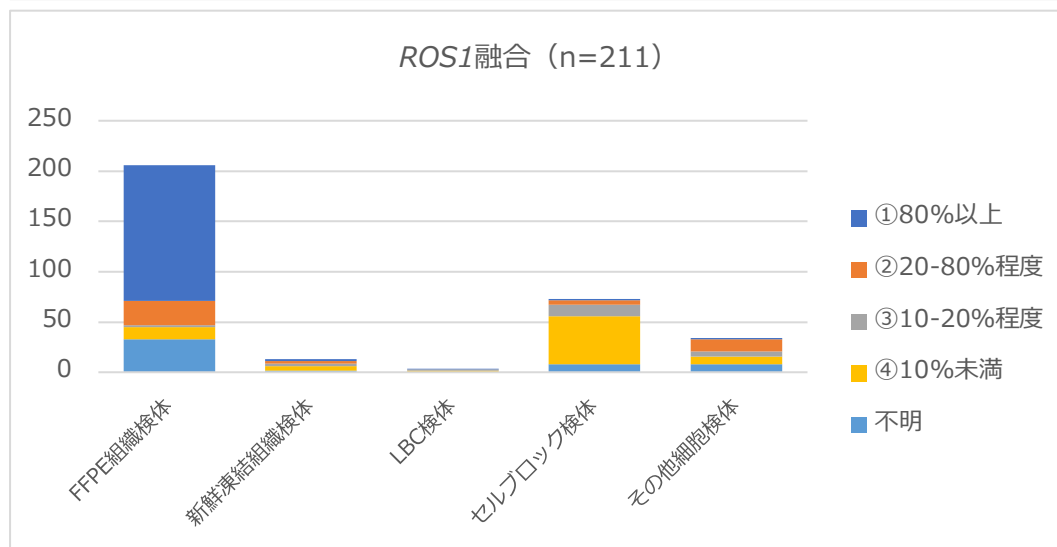
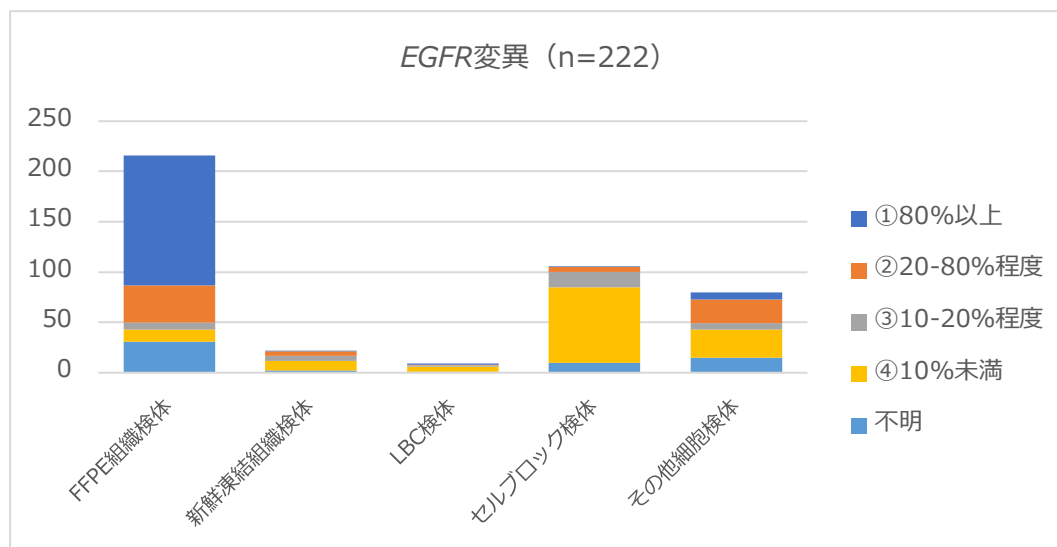
4-1 検査実施場所

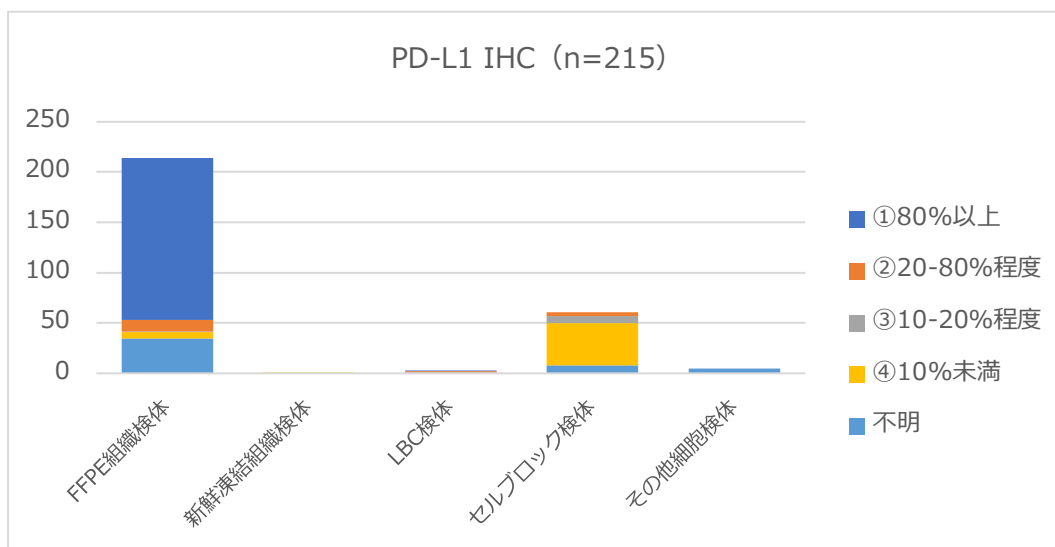
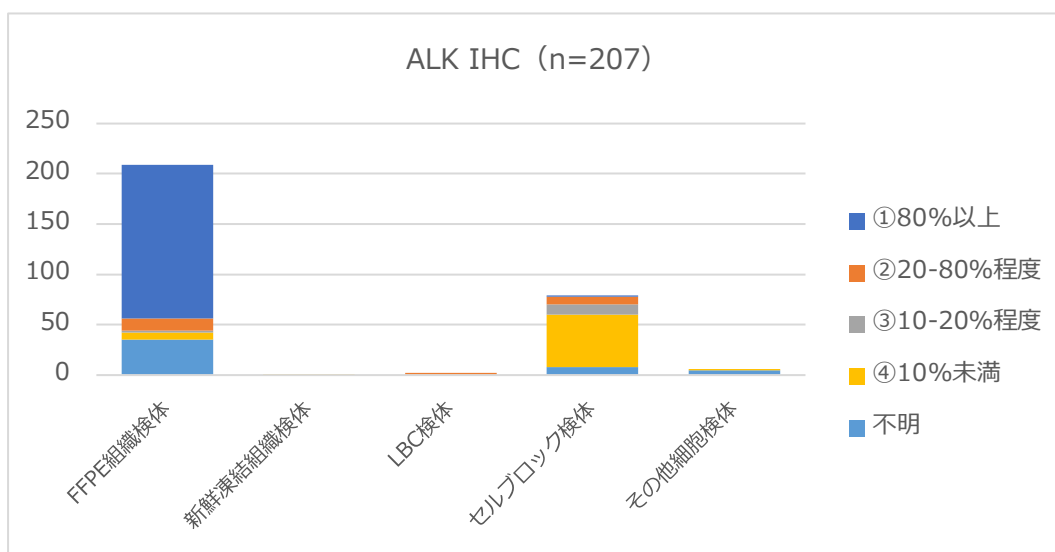
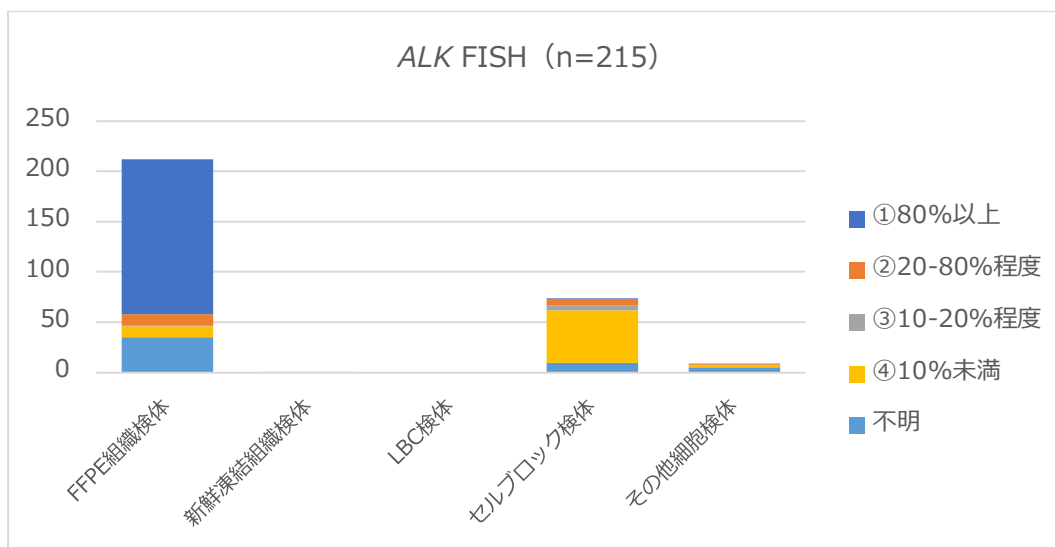
	外注	院内	両方	合計
肺癌 EGFR 変異	201	17	4	222
肺癌 ROS1 融合	202	7	2	211
肺癌 BRAF 変異 *	203	3	2	208
肺癌 ALK FISH	202	13	0	215
肺癌 ALK IHC	132	69	6	207
肺癌 PD-L1 IHC	188	25	2	215
乳癌 HER2 FISH	194	37	0	231
乳癌 HER2 IHC	61	171	2	234
胃癌 HER2 FISH	194	36	1	231
胃癌 HER2 IHC	66	166	2	234
大腸癌 RAS 変異	222	8	0	230
固形腫瘍 MSI	213	2	3	218

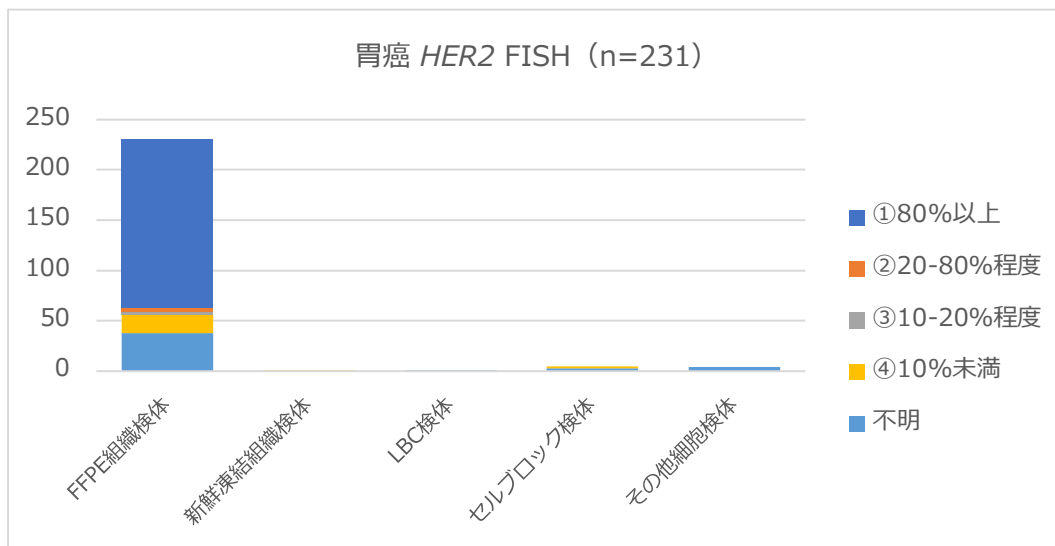
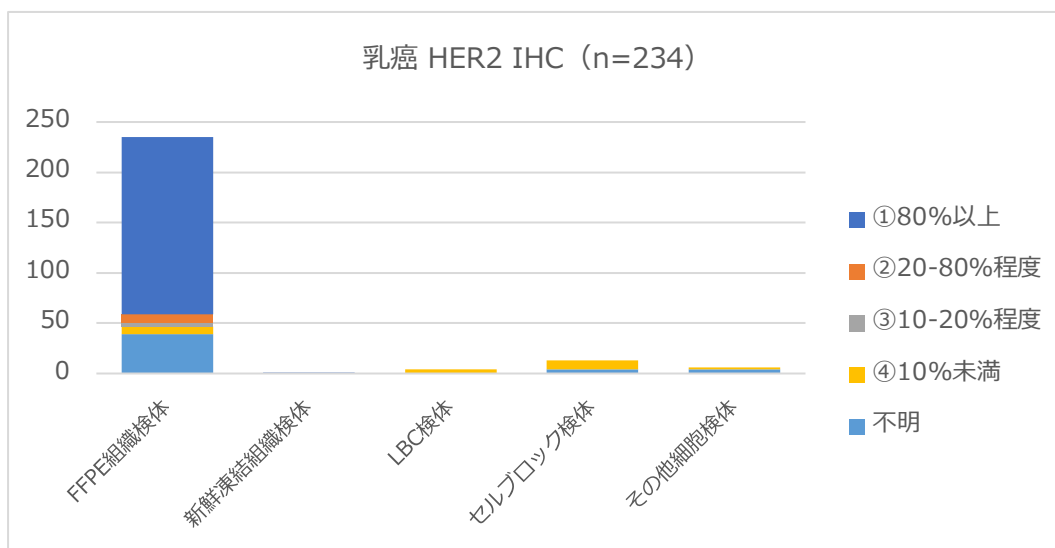
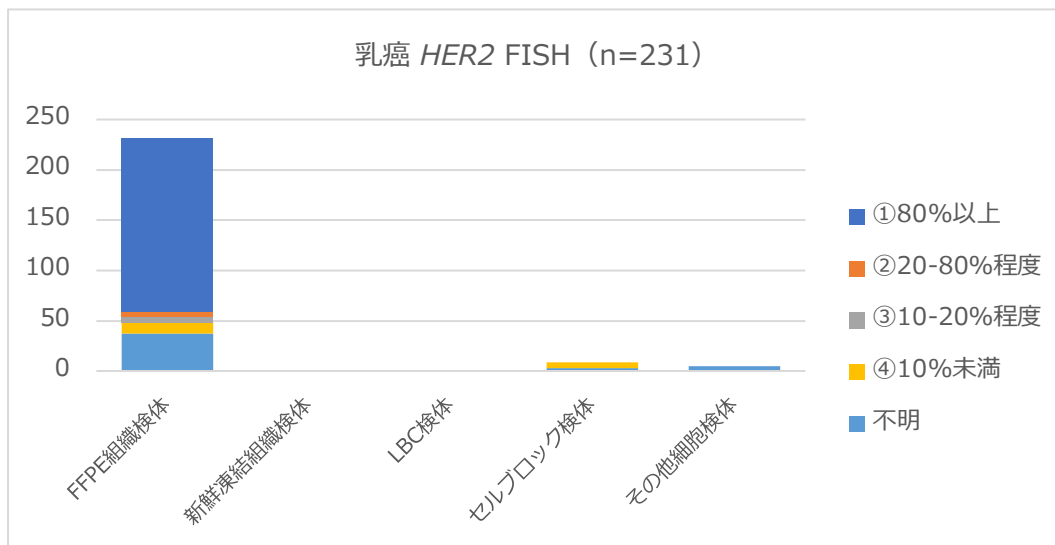
*オンコマイン BRAF

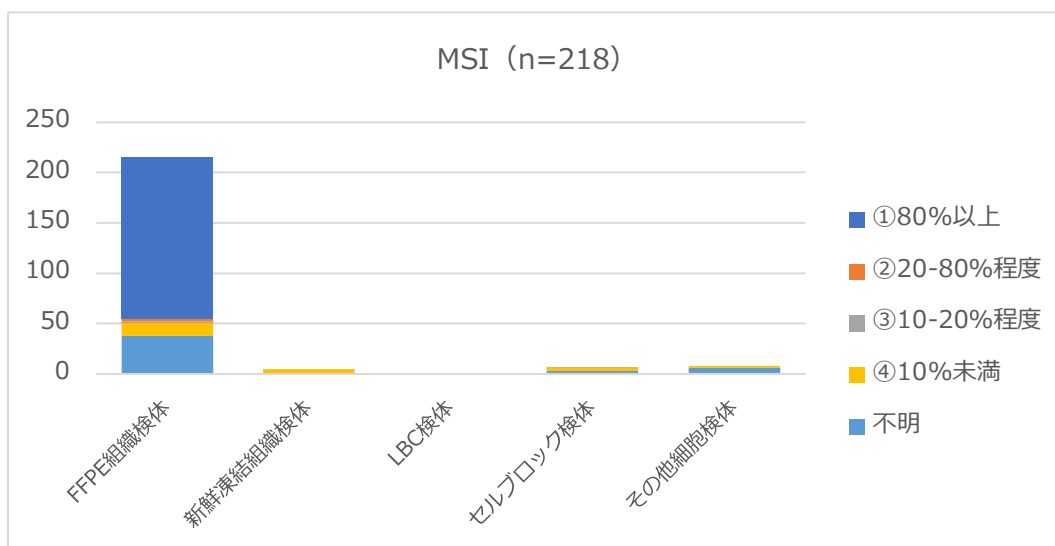
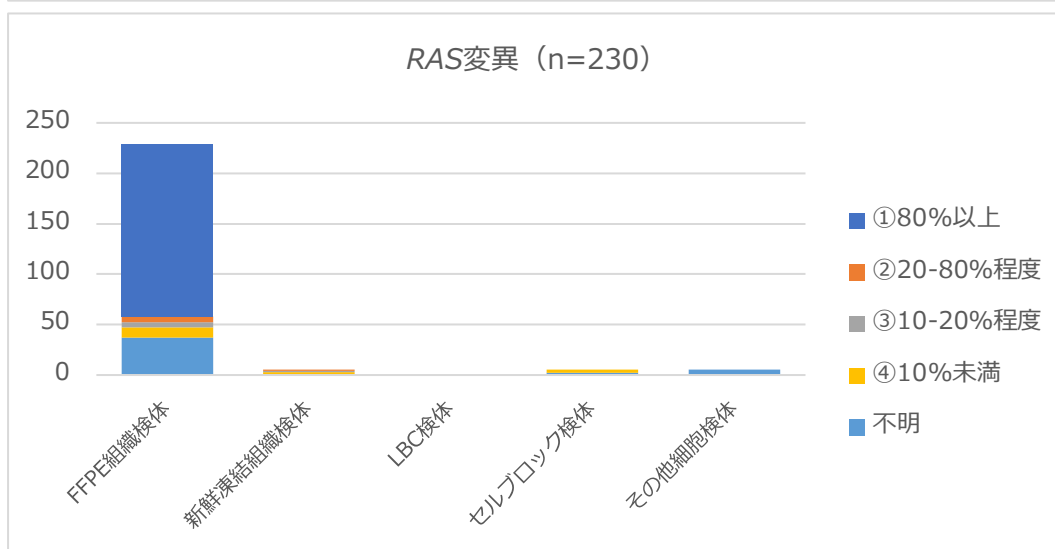
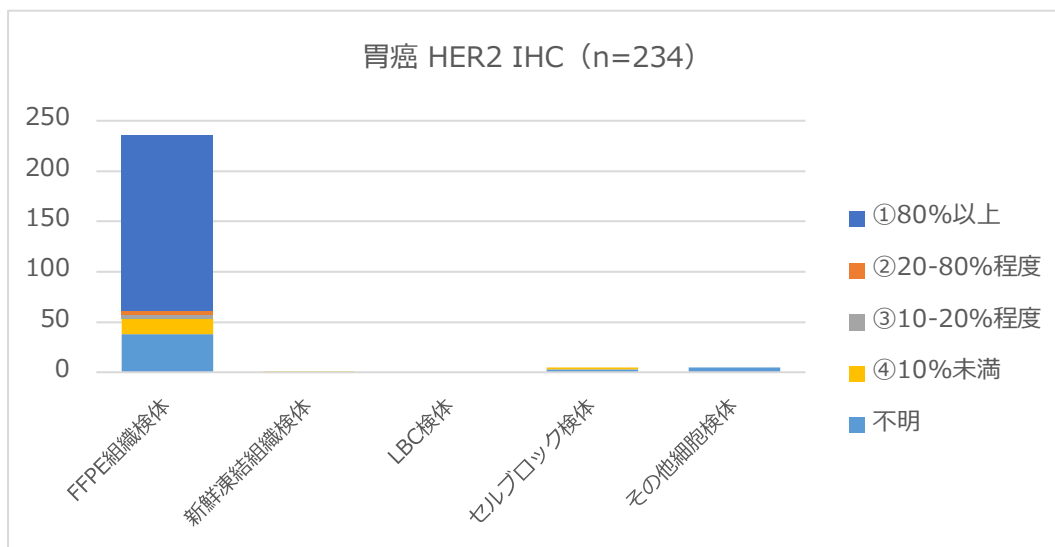
大部分のコンパニオン診断は外注で実施されている。乳癌および胃癌 HER2 IHC は院内実施が多い。

4-2 使用している検体種と全体に占める割合



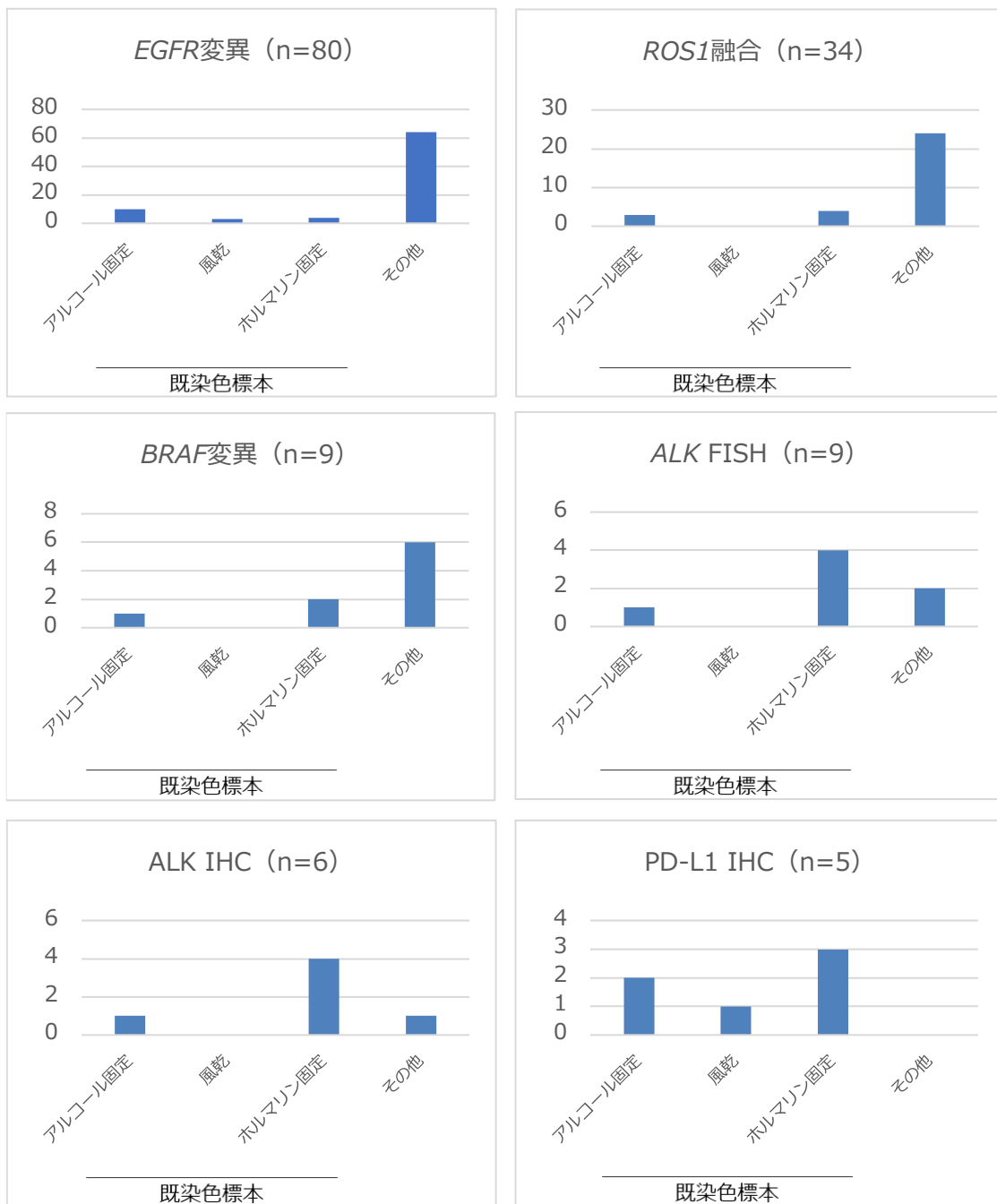


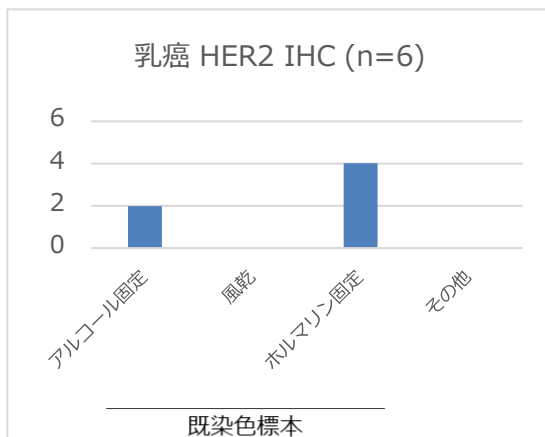
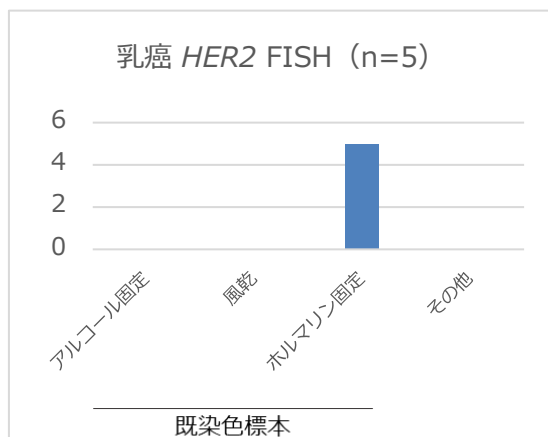
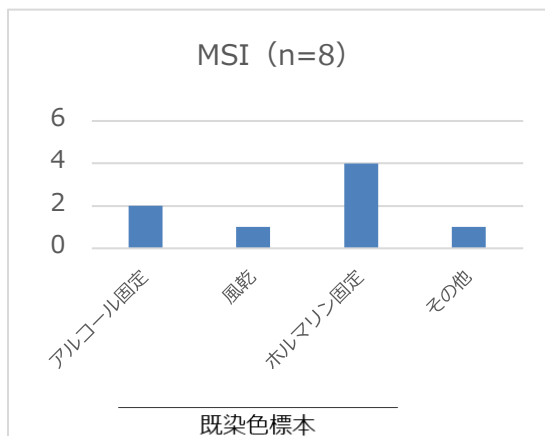
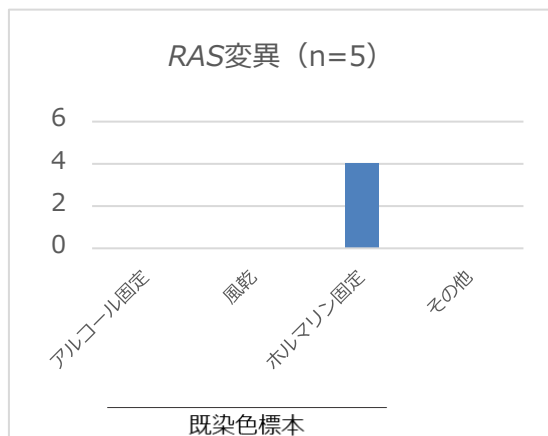
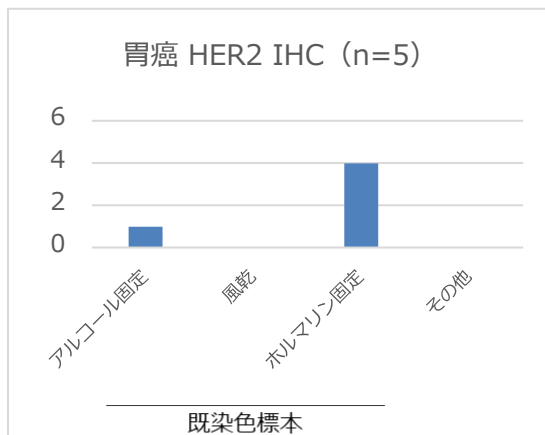
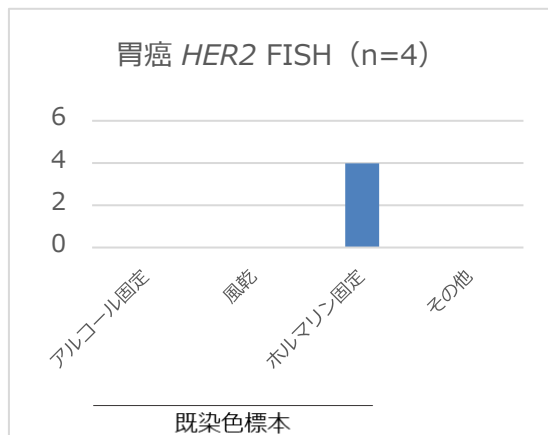




FFPE 検体が主流であるが、肺癌遺伝子検査では、コンパニオン診断である *EGFR* 遺伝子変異検査、*ROS1* 融合遺伝子検査、ALK IHC 検査、PD-L1 IHC 検査、*BRAF* 遺伝子変異検査はセルブロックでも実施されている。

4-3 その他の細胞検体の種類





セルブロック以外の検体は、肺癌 ALK, PD-L1, 乳癌, 胃癌, 大腸癌, MSI 検査で使用されている。

まとめ

本アンケート調査は、本邦最大規模のがんゲノム医療における遺伝子検査、コンパニオン診断の実態調査である。大学病院、がんセンター、一般病院を含む 231 施設の調査結果であり、多くのがんゲノム医療中核、連携、拠点病院が参加した実態に近い調査結果と思われる。

LBC、セルブロックは、細胞形態とともに遺伝子検査への応用が可能な手技であり、多くの施設で実際の診断に用いられている。セルブロック以外の細胞検体はあまり多くは使用されていないが、その中では既染標本の使用割合が高い。

LBC は、婦人科細胞診では、HPV 検査との併用でスクリーニングには有効性が示されているが、今後は非婦人科領域のがん診療へも応用が期待される。一方、LBC システムは、様々なシステム、導入形態、保存液が使用されていることが明らかになった。ゲノム診断に用いる際には、細胞検体の中に標的とする腫瘍細胞が含まれていること、腫瘍細胞割合の評価を行うことは必要で、細胞検体での品質管理、標準化が求められる。

セルブロック作製法は、遠心管法とアルギン酸ナトリウム法が主流である。遺伝子検査への活用には、標本作製法の標準化、評価方法など課題もあるが、細胞診の利点である低侵襲で検査ができる点は大きく、今後の発展が期待される。

大部分のコンパニオン診断は外注で実施されていることが明確になった。外注検査の場合、検査提出前の品質管理が検査精度を担保するためには最も重要と思われる。コンパニオン検査には、FFPE 組織検体が主に用いられているが、肺癌領域ではセルブロックなどの細胞検体も使用されている。

細胞診は、がん細胞の形態と遺伝子異常を評価できる手法として、ゲノム診断への応用が期待されるが、FFPE 組織検体と比較した欠点として、標本作製、保管方法、ゲノム解析手法が十分には標準化されていないこと、腫瘍細胞の量が少ない場合が多いことなどがあげられる。細胞診検体のゲノム医療への活用には、どのような検体が、どのような検査に使用できるかの指針策定が待たれている。

(初版担当 元井紀子)

付 記

本全国アンケート調査は、当学会 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の活動の一環として実施したものであり、20th International Congress of Cytology (2019, Sydney)¹、第 60 回日本臨床細胞学会春期大会²、第 58 回日本臨床細胞学会秋期大会³にて調査結果の報告を行った。

¹ 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.

² 畑中 豊, 元井 紀子, 濱川 真治, 河原 明彦, 長友 忠相, 桑田 健, 小田 義直, 岡本 愛光, 前田 一郎, 佐藤 之俊, 森井 英一. 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 (シンポジウム 9・(指定): ゲノム (molecular cytology) 医療現場最前線)). 第 60 回日本臨床細胞学会春期大会; 2019/6/9; 京王プラザホテル (東京) 2019. p. 142.

³ 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.