

査読者より投稿写真としての質の不良は指摘されず、論文資料としてVSは十分な画質を有することが確認できた（論文2, 4, 5, 7）。

#### D. 考察

コンサルテーション症例診断意見作成におけるVSの有用性については、症例数も少ないことより明確な結論は導き出せないが、難解症例が多くを占めるコンサルテーション症例においても、従来 of 標本による診断意見作成とほぼ同等の診断意見作成が十分可能と考えられる。また、コンサルタントは自身が担当する症例の病理組織像をあらかじめVSにより確認できることは、コンサルタントの方々にとっても、有益なことと考えられる。難解なコンサルテーション症例の病理組織像のVSをコンサルテーションで使用する点において注意すべき点などは、今後、VS診断意見作成症例を集積し、診断意見作成におけるVSの有用性、改善すべき点などを評価したいと考えている。以上のことは、コンサルテーション症例のVSをReference data base (RDB)として今後公開する上で、非常に有益な情報となると示唆される。

研究論文用の病理組織画像としてVS画像は十分使用可能であることが確認できた。現状は、病変のルーペ像、弱拡大像が主体であるが、中一強拡大像、免疫染色画像などの論文用病理画像の作成もVSにおいて行なえるか否か検討する価値が十分あるものと考えられる。

#### E. 結論

VSのみで診断意見作成依頼登録された症例の診断意見作成は、ほぼ問題なく行なえた。

VS病理画像はPeer reviewが行なわれる病理学術雑誌の資料として十分の品質を有することが確認できた。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hasebe T, Tamura N, Okada N, Hojo T, Akashi-Tanaka S, Shimizu C, Tsuda H,

Shibata T, Sasajima Y, Iwasaki M, Kinoshita T. p53 expression in tumor-stromal fibroblasts is closely associated with the nodal metastasis and outcome of patients with invasive ductal carcinoma who received neoadjuvant therapy. Hum Pathol 41, 262-270, 2010

2) Hasebe T, Okada N, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Sasajima Y, Tsuda H, Kinoshita T. Grading system for lymph vessel tumor emboli significant outcome predictor for invasive ductal carcinoma of the breast. Hum Pathol 41, 706-715, 2010

3) Hasebe T, Tamura N, Iwasaki M, Okada N, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shimizu C, Shibata T, Sasajima Y, Tsuda H, Kinoshita T. Grading system for lymph vessel tumor emboli: significant outcome predictor for invasive ductal carcinoma of the breast who received neoadjuvant therapy. Mod Pathol 23, 581-592, 2010

4) Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Sasajima Y, Kinoshita T, Tsuda H. p53 expression in tumor-stromal fibroblasts forming and not forming fibrotic foci in invasive ductal carcinoma of the breast. Mod Pathol 23, 662-672, 2010

5) Okada N, Hasebe T, Iwasaki M, Tamura N, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Sasajima Y, Kanai Y, Kinoshita T. Metaplastic carcinoma of the breast. Hum Pathol 41, 960-970, 2010

6) Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Sasajima Y, Kinoshita T, Tsuda H. Atypical tumor-stromal fibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast. Am J Surg Pathol 35, 325-336, 2011

7) Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shimizu C, Andoh M, Fujiwara Y, Shibata T, Sasajima Y, Kinoshita T, Tsuda H. Atypical tumor-stromal fibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast treated with neoadjuvant therapy. Hum Pathol 2011

(Epub ahead of print)

8) Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Sasajima Y, Kinoshita T, Tsuda H. Prognostic significance of mitotic figures in metastatic mammary ductal carcinoma to the lymph nodes. Hum Pathol 2011 (in press)

## 2. 学会発表

1) 長谷部孝裕 CIS病理診断コンサルテーションシステム、3年間のまとめ、第99回日本病理学会総会、2010年4月27-29日、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

- |           |     |
|-----------|-----|
| 1. 特許取得   | なし。 |
| 2. 実用新案登録 | なし。 |
| 3. その他    | なし。 |

## 多施設共同臨床研究におけるVSの活用

研究分担者 白石 泰三 三重大学医学研究科腫瘍病理学 教授

### 研究要旨

ヴァーチャルスライドシステム（以下VS）の用途として多施設共同臨床研究への応用の可能性を追求した。VS上での病理診断の再現性、後方視的解析の可能性、データの安定保存につき検討を行うため症例を蓄積している。

#### A. 研究目的

ヴァーチャルスライドシステム（以下VS）の用途としては教育、コンサルテーションが主として考えられているが、機器の普及と共にその応用面の拡大が迫られている。前立腺癌に関する多施設共同臨床研究（高リスク前立腺癌に対する小線源・外照射併用放射線療法における補助ホルモン治療の有効性に関する臨床研究、TRIP STUDY）、およびがんワクチン療法の臨床研究に病理医として関与してきた立場から、この方面へのVSの応用について、利点および問題点を中心に検討する。

具体的には1) 病理標本のVS化、2) データ保存、3) VS上での所見の判読および再現性、について検討を加える。

#### B. 研究方法

1) 前立腺癌に関する多施設共同臨床研究；限局性の前立腺癌に対する新しい治療法の適応、効果と病理学的因子（Gleason スコアなど）との相関を件とする研究において、送られてきた生検標本をVS化、データをHTML形式に変換し蓄積する。VS上でGleasonスコア等の病理学的因子を判定し、元の標本での結果と対比する。新たな病理学的因子を設定し、その判定がVS標本上で可能か検索する。

2) がんワクチン療法の臨床研究；本療法適応を決めるため施行された免疫染色標本を判定し、陽性例はVS化し、データをHTML形式に変換し蓄積する。VS上で免疫染色結果を判定し、元の標本での結果と対比する。

（倫理面への配慮）

臨床研究であり、全例で患者の同意が得られている。

#### C. 研究結果

本年度からの参加であり、現在は症例の蓄積中である。なお、免疫染色標本のVS化に際して、特に染色結果が弱陽性の場合には通常のHE標本とは撮像条件を変更する必要があった。

#### D. 考察

限局性の前立腺癌に対しては密封小線源永久挿入治療が行われるようになったが、その適応、あるいは予後予測因子として生検標本の分化度分類（Gleason スコア）が重要である。新しい治療法の有用性を検証するさまざまな臨床研究が行われている。このような臨床研究には中央病理医診断は必須である。病理診断の対象は生検標本であり、診断後は短期間で返却する必要がある。また、症例の蓄積後、あらたな病理学的因子を検証する事態が生じる可能性があり、生検標本を保管しておく必要がある。これらの解決法としてVSの活用が検討された。このような臨床研究は予後調査が含まれ研究期間は数年以上継続することが多い。機器およびOSを含むソフトウェアのバージョンアップが不確定要素で、研究期間中に機器更新が必要となったときに、VSのソフトウェアが新しいOSに対応しているか不確定である。この危険性を回避するため、VSをHTML化し、市販のブラウザソフトで閲覧可能な形式に変換して保存することは重要

である。将来的にはVSデータファイルの標準化が望まれる。

がんワクチン療法の適用には腫瘍細胞が標的となる抗原物質を発現していることが前提で、免疫染色にて確認が行われる。研究参加施設で候補患者がみられた場合には腫瘍組織のパラフィンブロックが送付される。免疫染色を行い、陽性細胞の比率および染色強度の判定を行っている。染色標本はデータセンターで集中管理されるため、病理医の手に保存標本はなく、VS化している。染色結果の判定自体は顕微鏡下で行っているが、標本作製枚数の軽減に役立つ。また、後方視的に治療効果と免疫染色結果との相関を検討する場合にもVS化は有用と思われるし、将来的にはVS化画像上で染色結果の自動定量が可能となれば再現性も向上する。

#### E. 結論

ヴァーチャルスライドシステムは従来考えられていたような、教育やコンサルテーションの分野だけでなく、多施設臨床研究においても有用と思われる。ただし、機器の基本設計時にそのような使用が想定されていないこともあり、検証が必要と思われる。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Kuroiwa K, Shiraishi T, Ogawa O, Usami M, Hirao Y, Naito S. Discrepancy between local and central pathological review of radical prostatectomy specimens. J Urol, 183:952-957, 2010.

2) Kuroiwa K, Shiraishi T, Naito S. Gleason Score Correlation Between Biopsy and Prostatectomy Specimens and Prediction of High-grade Gleason Patterns: Significance of Central Pathologic Review. Urology, 77:407-411, 2011.

#### 2. 学会発表

1) 黒瀬顕、三浦康宏、吉見直巳、猪山賢一、森谷卓也、白石泰三、渡辺みか、松野吉宏、澤井高志、バーチャルスライドを利用したコンサルテーションシステムの確立、日本病理学会、2010年4月27日-29日、東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- |           |    |
|-----------|----|
| 1. 特許取得   | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他    | なし |

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）  
分担研究報告書

地域特性に対応したVS活用事例の集積と広報

研究分担者 有廣 光司 広島大学病院病理部 准教授

### 研究要旨

国内外で報告されているバーチャルスライド（VS）活用事例や工夫点などを収集・集約して、これらを基に広報、啓蒙、活用促進を行うことを目的として研究を開始した。その結果を踏まえて今後期待されるVS活用の選択肢の一つとして、VSで取込まれた画像データ全体の専用ソフトウェアによる画像解析の臨床応用への可能性と実用性を探った。すわなち乳癌における治療方針の決定に不可欠であるコンパニオン診断としてホルモンレセプター、HER2及びKi-67の発現について多数症例を用いて検討した。殊にKi-67については病理医の目視による評価と画像解析による評価との比較、目視と画像解析によるデータと予後との関係の比較を行い、画像解析の有用性について検討する。

更に前班研究から継続していた中四国地域におけるVSを用いたコンサルテーションシステムを稼働させ、可及的にこれを利用した。

### A. 研究目的

VS活用の選択肢の一つとして、VSで取込まれた画像データ全体の専用ソフトウェアによる画像解析の臨床応用への可能性と実用性を探ることが目的である。すわなち乳癌における治療方針の決定に不可欠であるコンパニオン診断としてホルモンレセプター、HER2及びKi-67の発現について多数症例を用いて検討する。殊にKi-67については病理医の目視による評価と画像解析によるデータと予後との関係の比較を行い、画像解析の有用性について検討する。

### B. 研究方法

本学の女性乳癌症例で、術後5年以上の経過観察が可能な症例を対象に、各症例の主腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋切片でエストロゲンレセプター、HER2及びKi-67について免疫組織化学的染色を行い、組織切片全体をNanozoomer（浜松ホトニクス社）によりVSデータとして画像解析ソフトウェアDefiniens（CTC Lab社）を用いて解析した。同一標本について病理医の目視による評価を行い、VSデータとの比較と予後との相関の有無について検討する。

（倫理面への配慮）

倫理的に、また利益相反に関しても特に問題は無い。

### C. 研究結果

現在、多数症例についてKi-67の免疫組織化学的染色標本を対象に、目視による評価とDefiniensによる評価を行っている。その結果、2x2cm大の組織切片中に含まれる腫瘍細胞数は最高100万ないし150万個であり、切片全体の陽性数を目視により正確に評価することは困難であることが分かった。また陽性核においても染色強度は様々であり、かつ核小体のみが陽性になる例も観察され、どのような染色強度や陽性局在を取り上げればよいのかについても判断が困難であることが分かった。

一方、VSで取り込まれた組織切片全体のデータは容量が大きいため、これを画像解析するためには切片の大きさにより1例についてホルモンレセプターやKi-67では最長約30分間、HER2では約1時間を要することが分かった。

### D. 考察

現状では病理医の目視により乳癌細胞の

核を500-2000個観察してその中の陽性細胞核の比率を算出しているが、画像解析によると2x2cm大の組織切片中に含まれる腫瘍細胞数は最高100万ないし150万個であり、目視による観察では腫瘍組織のごく一部のみに評価しているに過ぎず、観察者間の食い違いを避ける事ができない。またKi-67陽性像については、染色強度がばらつく例や核小体のみが陽性になる例があり、どのような染色性を陽性像と見做すかについても一定の見解はない。一方、乳癌の化学療法の世界適応基準の一因子としてKi-67の陽性率が利用されることになるが、評価方法の標準化がされる前にそのカットオフ値が具体的な数値として設定される方向が示されている。このような混乱が予想される状況に対して染色強度別の再現性のある評価系を提供できる意義は大きいと考える。また厚生労働省の補助により全国のがん拠点病院などに配備されたVSシステムを具体的に活用するための選択肢の一つを提案できよう。更に各がん拠点病院が周辺施設から免疫組織化学的染色標本を預かり受け、受託検査として解析すれば地域における真のがん診療の均霑化に貢献できる可能性も見えて来る。

一方、VSで取り込まれた画像データの画像解析においては現行のソフトウェアを用いた場合、解析に要する時間は1例あたり30-60分間であることから、その運用については帰宅前に解析をスタートさせ夜間の時間帯を利用して解析を行うなどの工夫が必要である。

画像解析における最大の課題は解析対象となる腫瘍細胞などの細胞と非対象となるリンパ球や間質細胞との識別である。目視ではかなりの精度でこれらを行っていると考えられるが、目視でも必ずしも識別が容易ではない細胞が混在する例があり、形態学的手法の限界でもある。従来は画像解析により識別が困難な細胞があることを根拠に画像解析は時期尚早とする議論が多かったが、目視による識別にも限界があることを容認した上で、客観性や再現性のある評価が可能な画像解析を有効に利用する方向にシフトすべきであろう。

## E. 結論

VSを用いた画像解析の長所を有効に利用する方向にシフトするべきであろう。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Arihiro K, Oda M, Ogawa K, Tominaga K, Kaneko Y, Shimizu T, Ohnishi S, Oda M, Kurita Y, Taira Y, Fujii M and Tanaka M. Comparison of evaluations of hormone receptors in breast carcinoma by image-analysis using three automated immunohistochemical stainings. *Experimental and Therapeutic Medicine* 1: 927-932, 2010.

### 2. 学会発表

なし。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

- |           |       |
|-----------|-------|
| 1. 特許取得   | 特になし。 |
| 2. 実用新案登録 | 特になし。 |
| 3. その他    | 特になし。 |

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
松野吉宏	臨床試験と病理中央診断	産科と婦人科	77(5)	67-71	2010
畑中豊、久保田佳奈子、松野吉宏	分子病理診断の標準化と精度管理	病理と臨床	29(4)	346-352	2011
Sawai T, Uzuki M, Kamataki A, Tofukuji I.	The state of telepathology in Japan.	J Pathol Inform	1(1)	13-18	2010
澤井高志、黒瀬頭、中尾正博、小川恵美子、元田敏浩	世界ではじめての超高速インターネット衛星“きずな”(WINDS)を用いた遠隔病理診断(テレパソロジー)の実証実験	医学のあゆみ	233(4)	319-324	2010
澤井高志	バーチャルスライドの教育への応用	医学のあゆみ	234(4)	288-291	2010
澤井高志、長村義之、吉見直己、中尾正博、小川恵美子、松尾聡、熊谷一広、笠井啓之	超高速インターネット衛星“きずな”(WINDS)を用いた遠隔病理診断(テレパソロジー)の実証実験(第2報) - 岩手-東京-沖縄の3地点を結んでのバーチャルスライドによる遠隔カンファランス	医学のあゆみ	235(2)	204-212	2010

黒瀬顕、澤井高志	病理診断均てん化を目指したバーチャルスライドの利用実績	病理専門医部会報		1-2	2010
澤井高志	エッセイ教授のつぶやき「顕微鏡実習は必要か、不要か？」	Frontiers in Rheumatology & Clinical Immunology	4(2)	64-65	2010
Yamashiro K, Tagami M, Azuma K, Nakamura A, Kato O, Taira K, Azuma M, Takeda H, Suzuki H.	Cytodiagnosis through use of a z-axis video by many volunteer observers. A promising tool for external quality assessment.	Cyto-pathology	22	88-94	2011
山城勝重、鈴木宏明	術中迅速病理診断にテレパソロジーシステムを活用した10年の経験から考えること、総合医学会報告、シンポジウム「遠隔診断—国立病院機構のネットワークを活かした新たな取り組み」	医療	64(1)	29-31	2010
東学、丸川活司、中村厚志、田中浩樹、東恭吾、山城勝重	北海道地方におけるバーチャルスライド活用した病理組織染色外部精度管理報告	医学検査	59(7)	835-841	2010
Hasebe T, Tamura N, Iwasaki M, Okada N, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shimizu C, Shibata T, Sasajima Y, Tsuda H, Kinoshita T.	Grading system for lymph vessel tumor emboli: significant outcome predictor for invasive ductal carcinoma of the breast who received neoadjuvant therapy.	Mod Pathol	23	581-592	2010
Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Sasajima Y, Kinoshita T, Tsuda H.	p53 expression in tumor-stromal fibroblasts forming and not forming fibrotic foci in invasive ductal carcinoma of the breast.	Mod Pathol	23	662-672	2010



Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Sasajima Y, Kinoshita T, Tsuda H.	Atypical tumor- stromal fibroblasts in invasive ductal carcinoma of the breast.	Am J Surg Pathol	35	325-336	2011
Hasebe T, Iwasaki M, Akashi-Tanaka S, Hojo T, Shibata T, Sasajima Y, Kinoshita T, Tsuda H.	Prognostic significance of mitotic figures in metastatic mammary ductal carcinoma to the lymph nodes.	Hum Pathol			in press
Kuroiwa K, Shiraishi T, Ogawa O, Usami M, Hirao Y, Naito S.	Discrepancy between local and central pathological review of radical prostatectomy specimens.	J Urol	183	952-957	2010
Kuroiwa K, Shiraishi T, Naito S.	Gleason score correlation between biopsy and prostatectomy specimens and prediction of high- grade gleason patterns: significance of central pathologic review.	Urology	77	407-411	2011
Arihiro K, Oda M, Ogawa K, Tominaga K, Kaneko Y, Shimizu T, Ohnishi S, Oda M, Kurita Y, Taira Y, Fujii M, Tanaka M.	Comparison of evaluations of hormone receptors in breast carcinoma by image-analysis using three automated immunohistochemical stainings.	Experimental and Therapeutic Medicine	1	927-932	2010

## 特集

婦人科がん臨床試験参加に必要な知識

## 10. 臨床試験と病理中央診断

まつのよしひろ  
松野吉宏\*

北海道大学病院病理部 (JCOG 病理委員会)\*

## 要旨

臨床研究における患者登録のための適格基準のなかにあつて、病理診断は適格性に関する最も基本的な判断因子の一つである。病理中央診断は、それぞれの患者登録施設で下された施設病理診断を、その診断根拠となった標本を一括してレビューすることにより、登録患者の適格性を保証する目的で行われる。多くの場合は各施設から事後的に標本を回収してレビューされるが、円滑かつ確実に実施するためには、施設病理医の全面的協力が欠かせない。

Key Words 病理診断, 中央診断, 品質保証

標準的治療の確立を目指す臨床研究では、複数の施設が解析対象症例を持ち寄つて、試験的治療法の有効性や安全性などを評価する。解析対象として登録される症例には一定の適格基準を満たしていることなど、試験遂行に対する徹底した品質管理が求められる。研究実施計画(プロトコール)の作成にあつて、対象とする患者の年齢幅や、全身状態、病理診断、種々の検査値や病期などの疾患・病態に関する適格基準はもちろん、治療の内容および実施方法、許容される副作用への対応など、治療効果判定に影響を与えると推定される因子はあらかじめ綿密に検討される。実際の登録や治療の実施に際しても、プロトコールに記載された取り決めが遵守されることが厳しく求められ、臨床研究グループによっては研究参加施設(患者登録施設)を訪問して診療録の監査を行っている。放射線

治療施設にあつては、その照射線量のモニタリングを定期的に行うなどの精度管理業務が遂行される。いずれも、ともすれば診断・治療の施設間較差に翻弄されかねない多施設共同臨床試験の品質を保証するための努力である。病理診断の施設間較差があるとすれば、当然これも臨床試験の品質保証活動の対象に入ってくる<sup>1)</sup>。

病理中央診断とは何か、  
なぜ必要か

患者登録のための適格基準のなかにあつて、病理診断はその患者に当該治療が行われることが適切であるかどうか(病理学的適格性があるか否か)の最も基本的な判断因子の一つである。病理中央診断 pathology central diagnosis (多くの論文等では中央病理診断 central pathology diagnosis という語もほぼ同義に用いられる)

は、それぞれの患者登録施設で下された施設病理診断 local (institutional) pathology diagnosis を研究実施者（実際には研究実施者の依頼を受けた当該領域のエキスパートとされる病理医）が一括してレビューし、登録患者の適格性を保証する目的で行われる。中央診断の実施方法には、施設病理診断に基づいて症例登録ならびに治療を実施した後、結果解析の段階において診断レビューを行って不適格例を除外する retrospective review と、症例登録前に病理診断レビューを行って適格例のみを本登録し、当該治療を開始する prospective review がありうるが、後者ではレビュー結果を待つ時間が必要であるために個々の患者への治療開始が遅れる場合が多いことから、中央診断はほとんどの場合 retrospective に行われている。

臨床試験先進国である米国では、Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) が多数の臨床試験における施設病理診断と病理中央診断の不一致に関して徹底した検討を行った<sup>2)</sup>。その結果をもとに、一般に病理診断による不適格症例が10%以上混じうような腫瘍では、実施にあたって中央診断を行うことが求められる。換言すれば、病理診断の不一致が10%以内であるような疾患群を対象とする（または、10%以内に収まる適格基準が設定されるような）臨床試験では、病理中央診断が必須という根拠は今のところ存在しない。中央診断の必要ながんとそうでないがんの識別をすることは重要であるが、わが国独自のデータは皆無といってよく、したがって研究実施者から中央診断を求められた場合これを無用であるとする数値的根拠を欠き、または逆に病理医からみて中央診断が望ましいと直感しても、多くのリソースを費やして中央化を実施すべきであると主張するだけの根拠に乏しいのが現状である。

病理学的不適格例を生ずる割合は、当該臨床試験において病理診断をどこまで求めるのかに

大きく依存することに注意を要する。たとえば、卵巣原発腺癌であることのみを適格基準とした場合には病理学的適格性は極めてよく保たれるであろうが、腺癌のなかでも類内膜腺癌に限定した場合、さらに異型度 G3 に限定した場合などは10%程度の不一致は当然想定されて然るべきであろう。つまり適格基準の要求が高度、ないし細分化されるに従って施設病理診断が不適格となる危険性は大きくなり、専門家によるコンセンサス診断による適格性の保証が必要となる、という関係にある。

## わが国における臨床試験と病理中央診断

わが国では、よくデザインされ科学性の高い多施設共同臨床研究自体の歴史が浅く、病理中央診断も当然のことながら経験が少ないといえる。公的研究資金による規模の大きい治療研究と密接に関連したものとしては、1988年頃に国立がんセンター・下山らの主導により Lymphoma Clinico-Pathology Panel (LCPP) が組織され、がん専門病院のリンパ腫約500例を8人の病理医でレビューしたのが、おそらく病理診断領域での系統的活動としては最初ではないかと思われる<sup>3)</sup>。悪性リンパ腫の病理診断は専門医にとってもしばしば難解であるが、このLCPPプロジェクト研究によって治療選択の根拠となる組織型識別において診断一致率が許容範囲内でないことが明らかとなって以来、JCOG リンパ腫研究グループが行う悪性リンパ腫治療研究においては原則として病理中央診断が実施されている。この後、この活動はわが国におけるがんの多施設共同臨床試験を推進する代表的組織である JCOG (日本臨床腫瘍研究グループ: Japan Clinical Oncology Group) に引き継がれ、リンパ腫や乳癌、脳腫瘍、軟部腫瘍等に範囲を広げて実績を増しつつある<sup>4)</sup>。また婦人科悪性腫瘍化学療法研究機構 (JGOG) や、稀少腫瘍の

多い小児腫瘍領域でも日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)に代表される明確な組織構築をもつ多施設共同臨床研究組織が運営されており、病理中央診断が実施されて研究の質の向上に大きく貢献している<sup>5)</sup>。また、個別研究としては乳癌、消化管腫瘍、前立腺癌や悪性中皮腫、糸球体腎炎など多彩な領域で病理中央診断が臨床研究の一部として実施され、実績を上げている。

JCOGでは臨床試験の品質管理に関連する専門領域の知識・情報を集積して適切な試験が遂行されるよう、計画・立案・遂行にあたっての検証・指導・助言を任務とする各種専門委員会を設けており、外科委員会、放射線治療委員会とならんで、病理診断に関する諸問題を解決するため病理委員会が2002年に立ち上げられた。現在は、委員を委嘱された6名の病理専門医により運営されている。最近では、リンパ腫のほかに軟部肉腫や肺腫瘍、胸膜腫瘍、脳腫瘍、乳癌などを対象とする種々の多施設共同臨床試験において、JCOG病理委員会やデータセンター、ならびに各研究事務局との連携を基盤として病理中央診断が実施もしくは計画されている。

## 病理中央診断の実施上の問題点

臨床試験の規模にもよるが、登録患者の施設病理診断をすべてレビューすること、またその標本やデータを管理することは決して少なくない作業量である。そこには下記のように解決すべき問題点が少なくなく、研究実施者(臨床医)と病理医、双方にとって有形無形の不利益を生じている。

- ①腫瘍種類や研究内容によって、病理診断中央化が真に必要なか否かの判断根拠が明確でない。
- ②優れた費用対効果や検体・情報の安全性確保、レビュー結果の適切な取扱いを実現する

ために必要な、標準の実施手順や方法論が確立されていない。

- ③研究実施側(研究事務局、中央機構)から施設(病理部門)に対する説明や配慮が不十分である。
- ④施設病理部門において、共同研究や中央診断への理解や協力体制・環境が未成熟である。
- ⑤複数の臨床試験間における中央診断の質的較差が保証されていない。

中央診断によるレビュー結果の取り扱いについていえば、中央診断と施設診断の不一致が一定程度に生ずることは、いわば当然である。本来、そのような病変に対してのみ中央診断が行われるからである。一方、保険診療上、診療録に記載される病理診断は唯一無二であるべきで、その診断は施設病理医が作成・発行する病理診断報告書に記載されるものである。これは施設病理医の責任であり、権利でもある。万一これと異なった中央診断の結果を得た場合でも、当該病変に関するすべての情報を把握しているはずの施設病理医がその結果に同意する限りにおいて、自らの責任において追加・訂正報告書を発行したときはじめて、その検体に対する病理診断となりうると考えられる。そうでない場合は、研究データとして発生した外部専門家による事後的診断意見にすぎず、これは標本コンサルテーションにおける場合と同様であると思われるが、この点に関しても診療現場は混乱しているのが現実であろう<sup>6)</sup>。

こうした問題点に対し解決の糸口をつかみ、また実際の運用を円滑に進めるためには、施設での病理業務の実情や、病理検体・レビュー結果の取り扱いに精通した病理専門家などからなる何らかの機構が、臨床医と生物統計家を主力とする臨床研究グループとの調停に関与し、病理医の実情を代弁する必要がある。JCOGやJPLSGでは病理委員会がそうした立場からの発言を行っている<sup>7)</sup>。特に日常の診療業務以外

で各施設の病理部門にかかる負担をどのように解決して貢献すべきなのかは、施設内でのその場しのぎの工夫に依存している現状にあると思われ、そうである限り病理中央診断の、ひいては多施設臨床研究の基盤が決して盤石とはいえないと思われる。

## 研究参加施設における臨床医と病理医との関係

病理中央診断を計画・実施する臨床試験の研究実施者（研究事務局）は、多くの場合臨床医である。したがって、各施設で行われる病理診断部門の事情に対する配慮が必ずしも行き届くとは限らない。逆に、筆者のもっている印象を述べれば、ほとんどの場合試験参加に関わる各施設での院内コンセンサス形成があまりにも不十分である。研究事務局や各施設において臨床事項の取りまとめを担当する臨床医（施設コーディネーターなどとよばれる）は、病理中央診断を要求する試験に参加するかしないかを検討する段階で、施設病理部門の責任者に対して少なくとも下記の点について十分な説明と相談を行い、理解と協力を得る努力を惜しまべきではない。それは臨床試験の円滑な遂行と質の保証のために必要な努力であることに気づいて欲しい。

- ①研究の目的や必要性、研究計画全体の内容について
- ②病理中央診断の必要性、診断過程や結果開示について
- ③施設病理標本の提出・保管・返却の手順や予定症例数、経費負担について

研究協力の必要性を自施設の病理担当者へも十分に説明し、前もって施設としての協力を理解と同意を得るべきであるのは最低限のルールである。病理検査室にとっては多忙な日常業務に加えての臨床研究用標本作製・提出は、少なからぬ時間的・経済的負荷のかかる作業であ

り、また中央診断は施設病理医にとって、自身の信念に基づく病理診断を他者が検閲するものであると negative に受け取られ、ことさらに反感を感じられることもあるであろう。不十分な意思疎通を契機とする各施設における臨床医と病理医との不信感は、提出標本の選択やのちに必要になる場合のある追加情報収集、また中央診断の報告過程において、その両者ばかりでなく研究実施者や中央診断担当病理医との関係にも齟齬をきたし、ひいては臨床試験の信頼性に陰を落とすことにもなるので厳に避けねばならない。研究実施者はこの点に十分すぎるほどの配慮をなすべきであり、JCOG 病理委員会では、新規に開始される多施設共同臨床試験のうち病理中央診断を実施するものの研究実施者や施設担当臨床医に対して、参加施設の病理部門への協力要請が必要経費の問題も含めて適切に行われるよう、十分な配慮を促す文書を配布するようにしている<sup>8)</sup>。

## おわりに

優れた外科病理診断を鮮やかに下し、疾病の発生・生物学や臨床病理学的研究に貢献することに職業的喜びを感じてきた各施設の病理医にとっては、多施設共同臨床試験という規模の大きい共同研究に基だ不慣れであり、研究へのあまりにも地味な関わり方に少なからぬ抵抗もあるであろう。しかしながら、病理学的にもよく品質管理された臨床研究で得られる成果は、必ずや診療に大きなインパクトを与えるはずである。優れた臨床医・研究者なればこそ、自施設の病理医の快い研究協力が得られる術を見出していただきたい。

## 謝辞

本稿執筆にあたり、厚生労働省がん研究助成金・指定研究・福田班「多施設共同研究の質の

向上に関する研究」(14指-4), 同・計画研究・長谷川班「がん診療を標準化するための病理診断基準の確立に関する研究」(16-6)の研究成果の一部を用いた。

## ● 文 献

- 1) 松野吉宏：がん治療の多施設共同研究における病理診断の精度管理. 病理と臨床 2001; 19; 1335-1339.
- 2) Gilchrist, KW, et al: Statistical and empirical evaluation of histopathologic reviews for quality assurance in the Eastern Cooperative Oncology Group. Cancer 1988; 62; 861-868.
- 3) 下山正徳・他：専門病理医による非ホジキンリンパ腫の病理診断とホルマリン固定標本によるTBマーカー免疫診断の一致率：LCPD (Lymphoma clinicopathology panel) による共同研究. 癌の臨床 1993; 39; 739-765.
- 4) <http://www.jcog.jp/index.htm>
- 5) Nakagawa A, et al: Pathology review for paediatric non-

Hodgkin's lymphoma patients in Japan; a report from the Japan association of childhood leukaemia study (JACLS). Eur J Cancer 2004; 40; 725-733.

- 6) 松野吉宏：コンサルテーションと病理中央診断. 病理と臨床, vol. 27 臨時増刊号「病理学と社会」(深山正久・樋野興夫・坂元亨宇・中山淳・羽場礼次編集), 文光堂, 2009; pp56-63.
- 7) 松野吉宏：多施設共同臨床試験における病理中央診断の現状とそのあり方. 病理と臨床 2004; 22; 1172-1176.
- 8) <http://www.jcog.jp/basic/org/committee/pathologic.html#sop>

---

## 著者連絡先

〒060-8648  
北海道札幌市北区北14条西5丁目  
北海道大学病院病理部  
松野吉宏

---

## 分子病理診断の標準化と精度管理

畑中 豊\* 久保田佳奈子\*  
松野吉宏\*

## はじめに

タンパクや核酸分子の状態把握のために行われる免疫組織化学 immunohistochemistry (IHC) 法や *in situ* ハイブリダイゼーション *in situ* hybridization (ISH) 法は、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE 検体) を対象とした検索において日常病理診断上欠くことのできない検査手法となっている。1990年頃より普及が進んだ IHC 法は、2000年以降の自動化の流れにより、多くの施設でルーチン検査<sup>注1</sup>として本格的に導入され、現在では腫瘍鑑別や悪性度評価、病原体の同定等の補助診断法として一般化している。また分子標的治療の登場を契機に、IHC 検査や ISH 検査は治療対象患者の選別に用いられるようになった。こうした標的分子の有無や異常を検出する検査薬を治療薬と組み合わせて行う併用的診断はコンパニオン診断と呼ばれ、がん個別化医療の中心的役割を担っている<sup>1)</sup>。さらに近年、遺伝子変異検査などの体細胞遺伝子検査<sup>注2</sup>においても、FFPE 検体が利用されるようになり、対象材料 (パラフィンブロック) の選択、腫瘍細胞をエンリッチする場合の核酸抽出エリアの特定等に病理医が携わるようになった。最近では体細胞遺伝子検査を病理診断部門で実施、もしくは窓口となり外注するケースが増えつつある。こうした FFPE 検体を用いた検査が分子病理診断の柱をなす一方で、これら検査の標準化や精度管理は十分とはいえず、一部の検査項目を除き本格的な取り組みが必要となってきた。

本稿では分子病理診断で行われている検査のうち FFPE 検体を用いる検査にフォーカスし、それら検査における標準化や精度管理の問題点について述べるとともに改善に向けた取り組みについて紹介する。

\*北海道大学病院病理部/北海道大学大学院医学研究科分子病理診断学

## I. 分子病理診断に用いられる検査の現状

一般に検査は、プレアナリシス段階 pre-analytic phase, アナリシス段階 analytic phase, ポストアナリシス段階 post-analytic phase の三段階に大別され、検査の標準化を含め精度管理を実践する上で重要な分類となっている<sup>2-3)</sup>。これを踏まえ FFPE 検体を用いた分子病理診断として現在実施されている検査とそれらの各段階における作業を表1にまとめた。特にアナリシス段階において、組織切片上で反応を進める IHC 検査や ISH 検査は概ね手法が画一化されているのに対し、核酸抽出サンプルを用いて行う体細胞遺伝子検査では多くの手法が用いられており、状況が大きく異なる。これら検査の保険適用状況を表2に示す。分子病理診断において、コンパニオン診断を目的とした項目は、IHC 検査では estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR), HER2, EGFR, ISH 検査では HER2 のみとごく一部ではあるものの、これら検査は全て臨床妥当性が確認され標準化された体外診断用医薬品 *in vitro* diagnostics (IVD) が使用されており、また診療報酬点数表では個別の項目と保険点数が設定されている。一方、体細胞遺伝子検査の多くは IVD 未承認の研究用試薬で実施されており、点数表上は個

注1: 平成20年の診療報酬改定において病理診断が第3部 検査から第13部へ新設移行されたことに伴い、診療報酬点数表上は IHC 法や ISH 法を用いた検索は「染色」や「標本作製」の用語が適用されるようになったが、国際的にこれら検索には通常「test」や「testing」といった用語が用いられているため本稿では「検査」という用語を使用した。

注2: 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS)・専門家委員会では、これまで一般に用いられてきた「遺伝子検査」の総称を「遺伝子関連検査」とし、さらにこれを「病原体遺伝子検査」「ヒト体細胞遺伝子検査」「ヒト遺伝学的検査 (生殖細胞系列遺伝子検査)」へと分類・定義したため、これらの用語を使用した。

表1 分子病理診断で用いられる検査とその段階別の作業

検査段階	〈組織タンパク関連検査〉 IHC 検査	〈組織遺伝子関連検査〉 ISH 検査	〈遺伝子関連検査〉 体細胞遺伝子検査
プレアナリシス段階 [作製作業]	検体採取 → 切り出し → ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック作製		
	切片作製	切片作製	(切片作製 →) 核酸抽出
アナリシス段階 [解析作業]	IHC 法 ・前処理 (抗原賦活処理) ・検出 (染色)	FISH 法, BRISH 法 ・前処理 ・検出 (染色)	Direct sequence 法 Scorpion-ARMS 法 PNA-LNA PCR clamp 法 PCR-invader 法 Cycleave 法 Luminex 法 PCR-SSCP 法 など
ポストアナリシス段階 [判定・診断作業]	定性的判定 半定量的判定 定量的 (計数的) 判定	定量的 (計数的) 判定	各基準に準じた判定

[ ] は分子病理診断の場合の主な作業。

表2 主な分子病理診断関連の検査項目と保険適用

カテゴリー	〈組織タンパク関連検査〉 IHC 検査	〈組織遺伝子関連検査〉 ISH 検査	〈遺伝子関連検査〉 体細胞遺伝子検査
コンパニオン診断項目	第13部 N002 1 ER (乳癌) 720点 第13部 N002 2 PgR (乳癌) 690点 第13部 N002 3 HER2 (乳癌・胃癌) 690点 第13部 N002 4 EGFR (大腸癌) 690点	第13部 N005 HER2 (乳癌・胃癌) 2,500点	第3部 D004-2 1 悪性腫瘍遺伝子検査 2,000点 ・肺癌 (EGFR) ・大腸癌 (KRAS) ・GIST (KIT, PDGFRA)
補助診断項目	第13部 N002 5 その他 400点 ※4種類以上の抗体を用いた場合は1,600点を加算	第3部 D004-2 1 悪性腫瘍遺伝子検査 2,000点 ・骨軟部腫瘍 ※脳腫瘍や悪性リンパ腫なども対象となる場合がある	第3部 D006-6 免疫関連遺伝子再構成 2,400点 ・悪性リンパ腫 (IgH, TCR) 第3部 D004-2 1 悪性腫瘍遺伝子検査 2,000点 ・肺癌 (KRAS)

別項目化されていない。補助診断項目においてはいずれの検査においても IVD 承認品が皆無に近い状況にあり、その多くはやはり研究用試薬で実施されている。特に IHC 検査は、研究用試薬として市販されている特異抗体を入手すれば、検査として取り入れることが容易なことから、多くの施設で100項目以上の検査が日常行われており、そのため検査と研究の境界がわかりづらくなっている。

## II. IHC 検査の標準化と精度管理

### 1. IHC 検査の現状把握

本検査における標準化と精度管理については、前述のとおりコンパニオン診断項目と補助診断項目では状

況が大きく異なる。ER, PgR, HER2などのコンパニオン診断項目は、体外診断用医薬品の使用や標準化プロトコルの遵守などが進んだことで標準化は浸透し、現在取り組みの中心は検査の精度管理を含め、診断精度向上へと移行している (次項参照)。これに対し補助診断項目はその大部分が研究用試薬を用いて行われている上、抗原賦活処理や染色といったアナリシス段階の作業が各施設の状況に合わせてカスタマイズされたために多様化してしまっており、研究手法のような検査形態をとっている。それゆえ補助診断項目部分の標準化は大きな遅れをとっているが、各項目の検査実施件数やその施設間差などの実態が把握できていない状況にあり、取り組みへの足がかりが見出しにくくなっている。



表3 IHC検査実施件数の上位40項目

順位	IHC検査項目	平均年間実施件数	検査占有率(%)
1	Ki-67	357	6.5
2	p53	243	10.9
3	cytokeratin (pan)	227	15.0
4	D2-40	223	19.0
5	CD20	213	22.9
6	CD3	209	26.7
7	estrogen receptor	195	30.2
8	progesterone receptor	187	33.6
9	HER2	173	36.7
10	CD34	149	39.4
11	CD79a	140	42.0
12	CD10	134	44.4
13	$\alpha$ -SMA	134	46.8
14	S100	132	49.2
15	CD68 (KPI, PGM1)	106	51.2
16	cytokeratin 7	104	53.0
17	BCL2	97	54.8
18	CD56 (NCAM)	95	56.5
19	p63	90	58.1
20	CD5	87	59.7
21	cytokeratin 20	82	61.2
22	synaptophysin	77	62.6
23	vimentin	75	64.0
24	chromogranin A	75	65.3
25	TTF-1	74	66.6
26	desmin	70	67.9
27	CK-HMW (34 $\beta$ E12)	63	69.1
28	CD31	54	70.0
29	EMA (E29)	49	70.9
30	CD117/KIT	48	71.8
31	cyclin D1	47	72.7
32	CK-LMW (CAM5.2)	46	73.5
33	PIN cocktail	42	74.3
34	CD30/Ki-1	41	75.0
35	myeloperoxidase	37	75.7
36	CD4	37	76.3
37	CEA	37	77.0
38	cytokeratin 5/6	36	77.7
39	kappa chain	36	78.3
40	lambda chain	36	79.0

こうした背景から、我々は厚生労働省がん研究助成金「がん診療を標準化するための病理診断基準の確立」に関する研究班(長谷川班)で平成19年度にパイロット調査を行い、さらにこれを踏まえ平成22年度に本調査を後継班であるがん研究開発費研究班(津田班)において実施した。この調査は国内24施設(このうちがん拠点病院は21施設)を対象にIHC検査項目別の実施件数に関する実態調査を行った。全対象施設から集計したIHC検査実施項目の総数は284項目(施設別の年間実施項目数では最少の施設は65項目、最多の施設は186項目)であった。284項目のうち上位

40項目とその累積検査占有率を表3に示した。上位項目にはコンパニオン診断項目(ER, PgR, HER2)が含まれるほか、補助診断項目では悪性度評価・良悪性鑑別(Ki-67, p53など)、脈管同定(podoplanin/D2-40, CD34など)、悪性リンパ腫、神経内分泌腫瘍、消化管間質腫瘍や軟部腫瘍の鑑別、原発臓器推定等に関わるマーカーやパネルが含まれ、パネルについては平成22年の診療報酬改定で1,600点加算の対象となっている(「N002 免疫染色(免疫抗体法)病理組織標本作製」に関する通知)。24施設の平均年間IHC検査実施件数は約5,500件で、上位30項目で全体の約70%、上位40項目で全体の約80%、上位60項目で全体の約90%を占めており、少なくとも上位40~60項目がルーチン検査上の必須項目とみなせるように思われた<sup>4)</sup>。

## 2. IHC検査標準化への取り組み

IHC検査は長らく保険点数が低い状況が続き、さらにこの10年の自動化の浸透はさらに検査コストを上げることになり、検査現場ではコスト抑制のための技術的対応を余儀なくされていた。特に特異抗体試薬については、精度管理上予め最適化されたready-to-use(RTU)タイプの抗体試薬の使用が望ましいにもかかわらずコスト面から敬遠され、低コスト化が可能な精製抗体がこれまで好んで使用されてきた。つまり各施設での染色条件検討や希釈作業の実施、使用期限を越えた凍結保管など、試薬コスト抑制への努力が行われていた反面、これを人的コストでまかなうといった構造が続いていた。しかし平成22年の診療報酬改定でIHC検査の補助診断項目は400点への引き上げ、そして対象疾患が限定されているとはいえ4項目以上の場合には1,600点の加算とプラス改定が行われ、十分とはいえないものの、ようやく標準化の議論が可能な状況となった。今後はこれを契機に、コンパニオン診断用試薬と同様に、RTUタイプの抗体試薬の使用などが望まれる。またこうした試薬は、通常専用の抗原賦活処理試薬と検出試薬、そして完全自動化された免疫染色機との一体的使用が前提となっており、アナリシス段階の標準化では、これを念頭に置くことが肝要である。

一方規制面においても大きな問題が横たわっている。保険診療上実施される検査では体外診断用医薬品の使用が原則となっているが、RTU抗体を含め抗体試薬の多くは前述のとおり未承認のままとなっている。病理診断領域における先発品IVDの開発は、企業の研究者、対象疾患を専門とする病理医や臨床医、その他の医学研究者などにより進められ、治験・臨床

試験などにおける臨床有用性の確認(特コンパニオン診断薬の場合)、臨床性能試験ならびに安定性試験の実施を経て薬事申請を行い、最終的に承認取得となる<sup>5)</sup>。このとき承認品の添付文書には上記試験にて臨床妥当性が確認された検査手法が記載されることになり、遵守すべき標準化法となる。また後発品としてIVDが開発される場合も、先発品との相関性確認を行った後は概ね同様の流れとなる。しかしIVD承認された試薬がない項目ではこうしたプロセスを経ないため方法は標準化されないままとなり、未承認試薬間の性能差についても把握されないまま検査が実施されているのが実情である。

前述の上位項目のうち、補助診断項目でIVDとして承認が得られている項目は、CD20, CD3, pan-cytokeratin (CK), vimentin, S100, desmin, kappa/lambda chainなど10項目にも満たない状況であり、検査件数が多いKi-67やpodoplanin/D2-40をはじめ大部分の補助診断項目は今も研究用試薬として用いられている。現在市販されているRTU抗体試薬の多くは欧米で既に承認が得られたものが輸入されているため、染色性は一定レベル担保され実用上問題はないように思われるが、高額な規制関連コストや市場環境などの問題を抱える現状では、今後も本邦での承認申請が進まない状況が続くことが予想され憂慮すべき状況にある。

### 3. IHC検査精度管理への取り組み

一般に検査、特にアナリシス段階の精度保証 quality assuranceは施設内で検査手法の管理を行う内部精度管理 internal quality controlと検査データの施設間差の調査・管理を行う外部精度評価 external quality assessmentに大別され<sup>6)</sup>、両面での取り組みが不可欠となる。本邦のIHC検査においては、後者は十分に体制が整備されていないことから、精度管理は現状内部精度管理に頼らざるをえない状況となっている。アナリシス段階の内部精度管理には標準物質に相当する陽性コントロール組織の利用が重要となる。前述の津田班の調査研究の際に並行して行ったアンケート調査では、86%の施設がIHC検査時に陽性コントロール組織を使用しているものの、全てのIHC検査に対し行っている施設は14%にとどまっている。また陽性コントロール組織を使用する形態は、検体組織と同一スライド上に配置するかたちを採用している施設は50%、検体組織と陽性コントロール組織を各々染色するかたちを採用している施設は38%、両方を採用している施設は12%であった<sup>4)</sup>。

当院では2000年頃より全てのIHC検査において、検体組織と同一スライド上に陽性コントロール組織を配置する内部精度管理を開始し、2010年より組織マイクロアレイ(TMA)の利用を開始した。また津田班における研究の一環として、IHC検査実施件数上位項目に対応できる陽性コントロールTMAのデザインについて検討を行っており、搭載するコア数や組織の組み合わせについて全身主要臓器からなる組織マイクロアレイを作製し、データの集積を現在進めている(図1)。

### III. 組織ISH検査の標準化と精度管理

コンパニオン診断項目として実施されているHER2を除外すると、その他の項目は未だ研究的要素を残したまま検査が実施されており、標準化や精度管理は議論にくい状況となっている。ISH検査のほとんど全ては現在FISH法で実施されている。自動化が中心となっているIHC検査とは異なり、アナリシス段階の多くの処理ステップは用手法で行われており、そのため、アナリシス・エラーを招来しやすい状況にはある。検査の成否はFISHシグナルの有無を検体組織中の内部コントロール細胞で確認することにより可能となることから、陽性コントロール組織は必ずしも必要とはならないが、検体組織でプレアナリシス・エラー(不適切な固定など)が起こっている場合には原因が特定できないことから、当院ではIHC検査同様、陽性コントロール組織を検体組織と同一スライド上に配置しFISH染色を行っている。

一方、ポストアナリシス段階においては、FISHシグナルのカウント作業は検査精度に大きな影響を与える要因の一つとなっている。ISH検査は遺伝子増幅の判定を行うほか、悪性リンパ腫や軟部腫瘍でみられる相互転座や脳腫瘍1p/19qのように染色体欠失を検出・判定する場合にも用いられる。判定方法にあたっては解析する腫瘍細胞数、陽性のカットオフ(異常細胞の割合)、相互転座判定については分離シグナル間の距離など基準設定が重要となるが、特に相互転座や染色体欠失の判定においては、検査基準に関するコンセンサスはほとんど得られていない。またFISHの判定は暗視野で限られたエリアのみを対象に行い、さらに解析対象となる細胞核は観察者の主観で判定することから、観察者間誤差を生じやすい。特に胃癌のHER2遺伝子増幅など組織にheterogeneityがみられる場合、暗視野の判定ではばらつきを生じやすくな

#### IV. 体細胞遺伝子検査の標準化と精度管理

近年大腸癌 KRAS 変異検査や肺癌 EGFR 変異検査など体細胞遺伝子検査において FFPE 検体を用いた検査が急増している。国内の体細胞遺伝子検査のアナリシス段階は、その大部分が大手検査センターにおいて集約的に実施されている状況にある。肺癌 EGFR 変異検査など検査項目によっては各検査センターで採用されている検査手法が異なるため、検査センターごとに検査の標準化が行われ、またこれに則った精度管理も日常厳密に行われている。それゆえこの段階の検査精度は現在のところ一定水準を維持しているといえる。一方で核酸を対象とする検査はとりわけプレアナリシス段階の影響を受けやすいことから、FFPE 検体の作製プロセスは検査の成否を決定する極めて重要な段階といえる。体細胞遺伝子検査では、抗体や核酸プローブとの反応性回復を目的とした賦活処理を行うことができないため、深刻な核酸断片化はそのままアナリシス段階の PCR 反応へ影響を与え致命的となる。それゆえホルマリン固定などにより受ける影響は賦活処理が可能な IHC 検査や ISH 検査に比べ大きいといえ、今後の FFPE 検体作製にあたっては遺伝子関連検査での使用も十分念頭に置き作業を行う必要がある。

こうした状況のなか、日本臨床検査標準協議会 (JCCLS)・遺伝子関連検査標準化専門委員会では、検体の品質管理による検査精度確保を目的とし「遺伝子関連検査の検体品質管理マニュアル」を策定し 2009 年に公表した<sup>7)</sup>。本マニュアルは 2009 年 2 月の厚生労働省の先進医療専門家委員会で先進医療申請において遵守すべき要件として採択されている。また現在、同委員会では産学からなるワーキンググループを設け、血液検体、喀痰検体、組織検体を柱とした遺伝子関連検査のプレアナリシスに関する情報収集と検証作業を行っており、本活動の一環として我々は組織検体に関する検討を進めている。この検証作業での課題の一つに、検体の品質に関する指標の設定が挙げられる。特に FFPE 検体の作製時に行われるホルマリン固定は核酸断片化への影響が大きく、検体の品質を事前評価できることが検査上望ましい。

現段階での核酸の品質管理方法として、DNA を評価する場合は、DNA 抽出サンプルをアガロース電気泳動で確認する方法や、既知 DNA 領域の PCR 増幅の成否をみる方法、リアルタイム PCR 法を用いた増

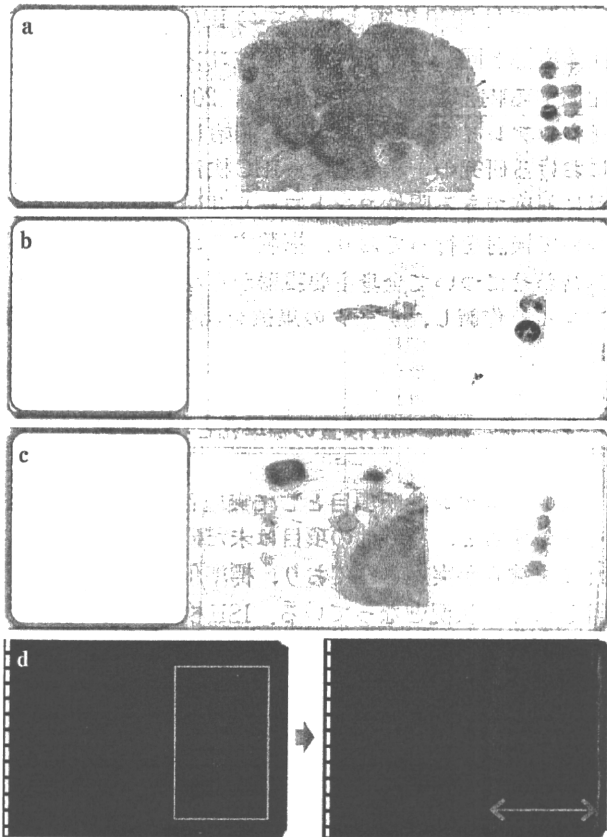


図1 内部精度管理用組織マイクロアレイ (TMA)

a, b: 現在試験的に作製・使用している補助診断項目用 TMA。上位項目用は扁桃、虫垂、肝臓、膵臓を含めたΦ2mmの8コア TMA で検討を進めている (a)。また使用頻度の高い悪性リンパ腫 マーカー用には扁桃と虫垂からなるΦ3mmの2コア TMA を使用している (b)。これらの TMA は1週間分に相当する枚数をまとめて薄切し、スライドグラスに TMA を事前に載せた状態で保管するようにし負担軽減を図っている。

c, d: コンパニオン診断用は HER2, ER, PgR, EGFR の4項目をカバーした4コア TMA (乳癌3コアと大腸癌1コア) を作製使用している (c)。これらの項目ではより厳密な管理が求められるため、薄切後の切片にパラフィンコーティング (d の両矢印、写真ではカケンジェネックス社のパラメートを使用) を行い、酸化による劣化を防止し、また長期保存可能な状態にしている。

る。最近では IHC 法と同様にアナリシス段階の完全自動化とポストアナリシス段階での明視野観察が可能となった明視野 ISH (bright-field *in situ* hybridization: BRISH) が HER2 など一部の項目で実用化され、本邦でも先ごろ承認された。ISH 検査の標準化や精度管理上の利点の多い技術であることから今後の普及が見込まれる。

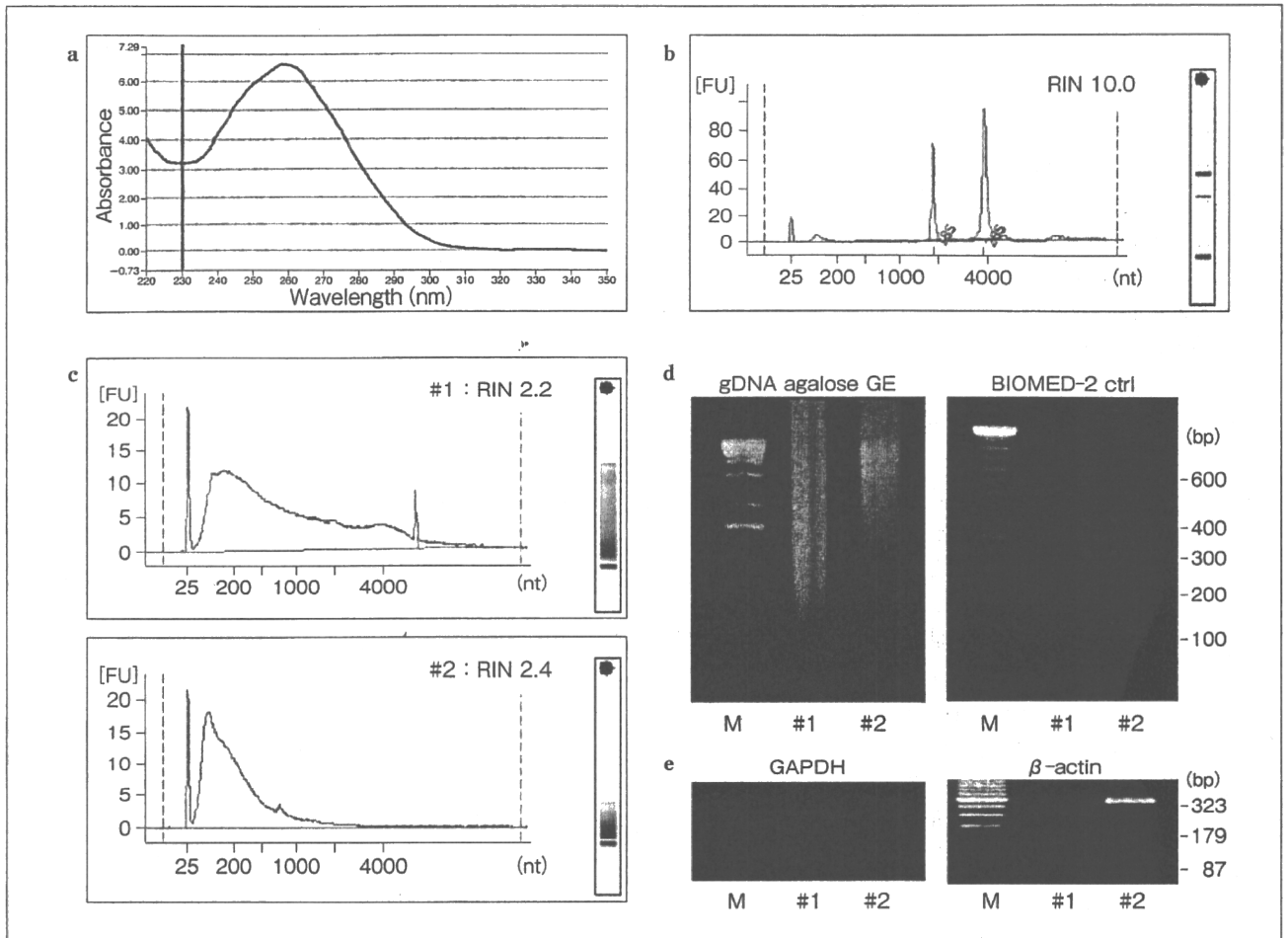


図2 核酸の品質評価 a: 吸光度 A260/A280 比による核酸品質確認。カラム法を用いた FFPE 検体からの DNA 抽出液では比はおよそ 1.9~2.1 となる (JCCLS・遺伝子関連検査標準化専門委員会調査)。抽出に問題があった場合は A230 の値が高値を示すため A260/A230 比が低くなる場合があるため、この比の確認も必要である。b: マイクロチップ型電気泳動装置を用いた RIN 値による RNA 品質確認。培養細胞などから良好に RNA 抽出ができた場合などは高い RIN 値を示す。c: RIN 値を用いた FFPE 検体等の品質確認。通常の FFPE 検体ではしばしば RIN 値は低値を示す (上段, #1)。核酸安定性が高いとされるアルコール系固定液 (ここではキアゲン社の PAXgene を使用) で固定したパラフィン検体でも RIN 値は同程度となり (下段, #2)。こうした検体の品質評価に RIN 値は適していないようである。d: DNA の品質確認。従来から用いられている抽出ゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動と BIOMED-2 コントロール・プライマー・セットを用いたマルチプレックス PCR の結果。サンプル #1 に比べ #2 のほうが DNA 断片化の程度が低く、特に PCR の結果では 400bp のサイズの増幅で差が顕著である。e: ハウスキーピング遺伝子 RT-PCR による RNA の品質確認。GAPDH (108bp) と  $\beta$ -actin (87, 179, 323bp) のうち、長いサイズ ( $\beta$ -actin 323bp) において #1 と #2 間の差が確認可能である。

幅速度の状態により評価する方法が挙げられる。一方 RNA を評価する場合は、精製した RNA の純度を吸光度 A260/A280 比により確認する方法、rRNA, GAPDH,  $\beta$ -actin などのハウスキーピング遺伝子の発現状態を RT-PCR 法により確認する方法、28S/18S rRNA の比を確認する方法が知られている<sup>6)</sup>。近年マイクロアレイ研究の普及に伴い、解析サンプルの核酸断片化をみる指標として、RNA integrity number (RIN) 値の使用が研究領域で一般化しつつある<sup>8)</sup> (図

2)。RIN 値はマイクロチップ型電気泳動装置 (Agilent2100 バイオアナライザ) を用いて得られる 18S や 28S rRNA やその分解物のエレクトロフェログラムをデジタル解析し RNA の分解度をアルゴリズムにより算出した数値であり、RIN 値は品質の低い 1~高い 10 の 10 段階で表される。RIN 値はしばしば FFPE 検体の品質の確認に用いられるが、臨床材料で用いる場合には固定条件などが良く、保存状態が比較的良好な場合であってもしばしば低値を示すことから、新鮮材料の