

厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学特別研究事業)
「遺伝子関連・染色体検査」の精度の確保に係る基準の明確化に関する研究
研究協力者 研究報告書
病理 FFPE 検体の品質確保に関する調査研究

研究協力者 畑中佳奈子 日本病理学会/日本病理精度保証機構/北海道大学病院

協力者 長沢光章、滝野寿 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会
畑中豊 日本病理学会/日本病理精度保証機構/北海道大学病院

研究要旨

次世代シーケンス法 (Next generation sequencing、以下 NGS 法) を用いたがんゲノム遺伝子プロファイリング (comprehensive genomic profiling、以下 CGP) 検査やコンパニオン診断が増加し、その試料として病理診断に用いられているホルマリン固定パラフィン包埋検体 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE、以下 FFPE 検体) から抽出された核酸が使用されている。検査の結果や精度を左右する要因の一つとして、この FFPE 検体の品質確保があげられる。そこで、本研究では、この FFPE 検体の品質確保に関する取り組みに関し調査研究を行った。一般社団法人日本病理学会では、CGP 検査開始前の 2018 年に検体の取扱いに関し「ゲノム臨床用病理組織検体取扱い規程」を策定し、その中で FFPE 検体の品質を確保するための要件に関し記載している。この規程は、日本病理学会が開催する様々な講習会、また認定病理検査技師の講習会、その他臨床系の学会の講習会などでも広く周知され、CGP 検査や NGS 法を用いたコンパニオン診断検査などの検体取扱いの手引きでも多数引用されている。また、2020 年度から分子病理専門医制度を発足させ、2022 年度は 3 回目の認定を行っているが、その申請要件の一つである分子病理専門医講習会の中でも、FFPE 検体の品質確保に関する講義が行われている。外部精度評価としては、特定非営利活動法人日本病理精度保証機構が外部精度評価事業を担っており、2021 年にはすでに第 1 回目の FFPE 検体の品質評価に関するオプションサーベイを行っている。日本病理精度保証機構は外部精度評価事業を有料で行い外部精度評価事業の継続性も確立している。また、公益社団法人日本適合性認定協会 (Japan Accreditation Board; 略称 JAB) が認める技能試験としても認められている (JAB RM300; 2022 第 9 版)。このように、関連学会等ではすでに FFPE 検体の品質確保に向けた取り組みを行っている。課題としては、現在、国内で施行される CGP 検査では、検査に用いられる核酸の品質基準が明確化されているが、海外の検査機関ではその基準は公表されていないことが挙げられる。また、たとえその基準が明確化され公表されたとしても、現時点では検体提出元の各施設にて FFPE 検体の品質確認を行うことに対する保険点数はついておらず、各医療機関で継続的に行うことが難しい。

本調査研究では、CGP 検査に使用する FFPE 検体の品質確保において、関連学会が規程の策定、講習会の継続的な実施、また認定制度を設けること、外部精度評価を継続的に行う体制を確立していることが明らかとなった。

A. 研究目的

保険診療下のがんゲノム遺伝子プロファイリング (comprehensive genomic profiling、以下 CGP) 検査に用いられるホルマリン固定パラフィン包埋検体 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE、以下 FFPE 検体) の品質確保や精度管理は、病理検体を取り扱う病理部門が主体として行っている。本研究では、この FFPE 検体の品質確保や精度管理に関する一般社団法人日本病理学会や特定非営利活動法人日本病理精度保証機構の取り組みに関し調査研究を行った。

B. 研究の進め方

CGP 検査における FFPE 検体の品質確保に関する日本病理学会の取り組みと、外部精度評価事業を行う日本病理精度保証機構の取り組みを調査した。

C. 研究調査の結果と考察

1. 日本病理学会の取り組み

日本病理学会では、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE、以下 FFPE 検体) を用いた CGP 検査開始に向けて以下の取り組みを行った。

(1) ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程の策定

日本病理学会は、2019 年に保険診療に導入された NGS を用いた GP 検査開始に先立ち、2018 年 3 月に「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」(以下、規程)¹⁾を策定した。本規程では、がんゲノム医療で要求される病理組織・細胞検体のうち、とくに最も利用が見込まれ、検体の取り扱い方法により検体の品質差が生じやすいホルマリン固定パラフィン包埋検体 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE、以下 FFPE 検体) の適切な作製・保管方法について示している。すなわち、①組織固定前プロセスとして、手術により切除された組織は摘出後速やかに冷蔵庫等 4°C 以下で保管し、1 時間以内、遅くとも 3 時間以内に固定を行うことが望ましいこと、内視鏡切除検体や生検検体は速やかに固定液に浸漬し固定を行うことが望ましいこと、手術により切除された組織においては、摘出後 30 分以上室温で保持することは極力回避すること、②固定プロセスとして 10%中性緩衝ホルマリン液を用いることが望ましいこと、6~48 時間の固定を行うことが望ましいこと、固定不良 (固定不足・過固定) による品質劣化は回避しなければならないこと、固定液量は組織量に対し 10 倍量の固定液を用いることが望ましいこと、ホルマリン固定後は室温でよいこと、③固定後プロセスとして、脱灰処理は酸脱灰を回避し EDTA 脱灰を用いるべきであること、等が記載さ

れている。本規程は、日本病理学会主催の「ゲノム病理標準化講習会」「分子病理専門医講習会」に加え、一般社団法人日本臨床衛生検査技師会と一般社団法人日本病理学会が認定している認定病理検査技師のための「認定病理検査技師制度 指定講習会」や「認定病理検査技師制度 資格更新指定講習会」²⁾など、多くの講習会で病理専門医、認定病理検査技師に周知されている他、さまざまな臨床学会などでも周知され、また CGP 検査や NGS を用いたコンパニオン診断検査などの検体取扱いの手引きでも多数引用されている。なお、本規程は、現在改訂作業に入っている。

(2) 分子病理専門医認定制度に関して

CGP 検査には FFPE 検体が主として用いられるため、病理医による検体のクオリティーマネージメントや腫瘍細胞含有割合の判定等が最も重要な要素となる。さらにエキスパートパネルでは、特に病理診断と関連した分子病理学的な判断が求められることから、この双方を兼ね備えた専門性の高い知識を有する医師の育成及び認定が必要と考えられた。

日本病理学会は、ゲノム医療実現のための分子病理学の重要性にかんがみ、分子病理専門医の認定制度を設けている。病理専門医、口腔病理専門医の中で卓越した知識および技術を有する分子病理専門医及び分子病理専門医（口腔）（以下、合わせて分子病理専門医）の認定を 2019 年度より開始し、2022 年 4 月 1 日時点で 447 名を認定し、2022 年度も新規の認定を進めている。

分子病理専門医は分子病理専門医研修カリキュラムに従い、必修指定講習会として「ゲノム病理標準化講習会」、「分子病理専門医講習会」の二つを受講し、その中で ISO15189 を含めた検査室管理の重要性とともに、品質のよい病理組織検体取扱いを確認し、毎年開催される認定試験を受験し、認定されている。

また、今年度から分子病理専門医の更新も開始し、日々更新されるがんゲノム医療に対応すべく、分子病理専門医更新講習会の受講やエキスパートパネル レポートの審査を経て更新が行われている。

参考：<https://pathology.or.jp/senmoni/bunshibyouri.html>

2. 日本病理精度保証機構の取り組み

日本病理精度保証機構は病理精度管理の向上を目指し、2014 年 3 月に認証・設立された特定非営利活動法人（NPO 法人）であり、日本病理学会、日本臨床衛生検査技師会、日本乳癌学会、日本胃癌学会、日本肺癌学会、日本リンパ網内系学会等との連携の下、質の高い病理診断のために、病理技術・診断基準の標準化を目指した精度管理を実施している³⁾。本機構は、2020 年より欧州を中心とした International Quality Network for Pathology (IQN for Path)にも加盟している。

本機構では、毎年、年 2 回の外部精度評価事業を行っており、これまでは病理における免疫染色を中心とした外部精度評価を行っていたが、がんゲノム医療の開始を受け、2018 年

度から、日本病理学会と合同の調査活動として、腫瘍細胞含有割合の評価フォトサーベイを、また 2021 年度からは、オプションサーベイとして初めて FFPE 検体の核酸品質確認サーベイを実施した。この「オプションサーベイ（遺伝子パネル検査関連）パラフィブロックの DNA 品質チェック」では 309 施設が参加した。調査方法として、参加施設は、2 年半から 3 年前の間に作製され、10 x 10 mm 以上の腫瘍部を含む肺癌、ないし、乳癌、大腸癌を含む FFPE 検体を選び、10 um 厚の薄切切片を 2 枚、指定のチューブに入れたものを 2 本用意し、日本病理精度保証機構に送付した。併せて、検体に関するアンケート調査も実施した。解析担当施設（北海道大学病院 先端診断技術開発センター）では、自動核酸抽出装置（QIASymphony, キアゲン社）を用いて DNA を抽出し、吸光度法（Nanodrop）、蛍光法（Qubit）」にて濃度想定を行った。次に TapeStation システム（TapeStation 4200、アジレント社）を用いて DNA Integrity Number (DIN) を測定した。さらに、DIN 2.5 未満であった検体は、リアルタイム PCR 法を用い、ddCq 値を測定した（NGS FFPE QC キット、アジレント社）。この ddCq 値は OncoGuide™ NCC オンコパネルシステムにおいて、DNA 抽出後の品質確認に用いられており、2 未満であれば PASS と判定され、次の工程に進む。本解析では、DIN2.5 以上であれば「適正」、DIN 2.5 未満の場合には ddCq を測定し ddCq が 2 未満であれば「適正」、ddCq が 2 以上は「要精査」とした。292 施設（92%）が「適正」と評価された。結果や評価は、各施設に返却されるとともに、毎年年度末に開催される教育・研修会にて報告された。

日本病理精度保証機構では、サーベイの実施にあたり、有料で行い外部精度評価事業の継続性も確立している。また、公益社団法人日本適合性認定協会（Japan Accreditation Board; 略称 JAB）が認める技能試験としても認められている（JAB RM300; 2022 第 9 版）。2023 年度もオプションサーベイ（遺伝子パネル検査関連）として「パラフィブロックの品質チェック」を予定しており、DNA に加え、RNA に関しても検討予定である。また、クリニカルバイオバンク学会とも連携しながら、FFPE 検体を用いた NGS を用いた検査の精度管理事業を行う準備を進めている。

3. 考察

FFPE 検体の品質確保に関する取り組みとして、日本病理学会は、病理専門医、日本臨床衛生検査技師会は臨床検査技師を対象に講習会等を開催し、さらに、分子病理専門医制度、認定病理検査技師制度を設け、その品質の確保に努めている。日本病理精度保証機構においては外部精度評価事業も開始しているが、現時点では国外で行われる CGP 検査では核酸品質の基準の提示がないこと、また、各医療機関で FFPE 検体の品質を測定した場合でも、その測定に関しては保険点数がついていないことは課題と考えられる。現在の CGP 検査は、FoundationOneCDx（以下、F1CDx）検査と Onco Guide NCC オンコパネル（以下 NCC オンコパネル）検査であるが、多くの医療機関は、FFPE 検体から作製した未染標本の形で検体を提出している。この際、F1CDx 検査では、検査が海外の FMI 社

にて行われることから、FFPE から抽出される DNA の品質の基準は公表されていない。従って提出した検体の品質が基準を満たしているのか、提出機関で事前に把握することは困難である。一方で、国内で解析が行われている NCC オンコパネルでは、FFPE から抽出された DNA の品質基準が示されており、必要に応じ提出前に各医療機関で解析に必要な核酸品質の基準を満たしているか確認することはある程度可能である。ただし、品質基準が示されている場合でも、各医療機関で、提出前に提出予定の FFPE ブロックからの検体が基準を満たしているかどうかを確認することに関しては、保険点数はついておらず、多くの医療機関では実施は難しいのも現状である。

D. まとめ

本調査研究では、FFPE 検体の取扱いに関して、日本病理学会、日本臨床衛生検査技師会が、その品質の確保に関し、規程の策定や講習会を開催するなどの取り組みを行っていること、各々認定制度を設けていること、さらに外部精度評価として、日本病理精度保証機構が FFPE 検体から抽出した DNA に関する外部精度評価を開始していることがわかった。現在の CGP 検査では、検査機関への提出前に各医療機関で FFPE 検体から抽出する核酸品質に関して基準を満たしているか否かを確認する制度とはなっていないことから、検査機関に提出して初めて基準を満たしているかが判明する。NGS を用いた検査は、その遺伝子パネルにより、必要な核酸量や品質が異なることから、統一的な基準値を設けることは難しいが、一般的な品質を確保できる FFPE 検体取扱いに関して記載した「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」を用いた関連学会の講習会の継続や認定制度が、FFPE 検体の品質確保につながると考えられた。

E. 参考文献

- 1) 一般社団法人 日本病理学会 ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程
https://pathology.or.jp/genome_med/
- 2) 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会認定病理検査技師会
<https://www.jamt.or.jp/studysession/center/system04/>
- 3) 非特定営利活動法人 日本病理精度保証機構
<http://www.jpqas.jp/>