

ホルマリン固定後パラフィン包埋肺腺癌検体からの DNA 抽出濃度について： 次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析のために

佐藤征二郎¹⁾・市川 寛²⁾・島田 能史²⁾

永橋 昌幸²⁾・若井 俊文²⁾・土田 正則¹⁾

井筒 浩³⁾・兒玉 啓輔³⁾・中田 光隆³⁾

1) 新潟大学大学院医歯学総合研究科 呼吸循環外科学分野（第二外科）

2) 新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器・一般外科学分野（第一外科）

3) デンカ株式会社 デンカイノベーションセンター ライフイノベーション研究所
ダイアグノスティックス研究部

Association between Histopathological Findings and Concentration of Extracted DNA from Formalin - fixed Paraffin - embedded Samples of Lung Adenocarcinoma: comprehensive analysis of genome alterations using next - generation sequencer

Seihiro SATO¹⁾, Hiroshi ICHIKAWA²⁾, Yoshifumi SHIMADA²⁾,
Masayuki NAGAHASHI²⁾, Toshifumi WAKAI²⁾, Masanori TSUCHIDA¹⁾,
Hiroshi IZUTSU³⁾, Keisuke KODAMA³⁾ and Mitsutaka NAKADA³⁾

1) Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

2) Division of Digestive and General Surgery, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

3) Diagnostics Research Department, Life Innovation Research Institute,
Denka Innovation Center, Denka Company Limited

要 旨

【緒言】近年、次世代シーケンス技術の開発が進み、高速シーケンサーを用いて、微量 DNA から短時間で多検体のシーケンスが可能となり、がんゲノムの網羅的解析から、がん個別化医療のバイオマーカーとして、ドライバー遺伝子変異の探索が盛んに行われるようになった。次世代シーケンサーを用いて多数の遺伝子異常を同時に検査するクリニカルシーケンスが期待されてきているが、その際に問題となるのは臨床検体の取り扱いである。従って、本研究の目的は、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を想定した際の、肺腺癌組織より抽出した DNA 量や質を組織亜型、分化度の違いから検討し、また、実際に必要とされる臨床検体（FFPE スライド）量を考察することとした。

Reprint requests to: Seihiro SATO
Division of Thoracic and Cardiovascular Surgery,
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences,
1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先：〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
呼吸循環外科学分野（第二外科） 佐藤 征二郎

【方法】肺癌手術を施行され、凍結切片を有する肺腺癌68症例のホルマリン固定後パラフィン包埋(FFPE)検体をHE染色にて評価し、腫瘍胞巣に含まれる全細胞含有面積に占めるがん細胞含有率20%以上の63例を解析対象とした。組織亜型の内訳は、置換性増殖優位型腺癌(lepodic)が5例、乳頭状増殖優位型腺癌(papillary)が44例、腺房状増殖優位型肺腺癌(acinar)が5例、充実性増殖優位型腺癌(solid)が2例、粘液腺癌(mucinous)が7例であった。各FFPEブロックから連続切片20 μ m, 2枚よりDNAを抽出した。単位面積当たりのDNA抽出濃度や断片化(Q-ratio:[129 bp]/[41 bp])について組織亜型間で比較し、また、解析に必要とされる臨床検体量(腫瘍面積)を考察した。

【結果】単位面積当たりのDNA抽出濃度は中央値4.20 ng/ μ L(範囲: 0.32 ng/ μ L/mm² - 19.25 ng/ μ L/mm²)であった。Q-ratioについては中央値1.03(範囲: 0.79 - 1.57)とすべて基準値以上であった。組織亜型間においては抽出されたDNAの単位面積当たりの濃度では置換性増殖優位型腺癌は粘液腺癌と比較し、単位面積当たりのDNA抽出濃度が有意に多かった($p = 0.046$)。粘液非産生型腺癌は有意に粘液産生型腺癌より単位面積当たりのDNA抽出量は多かった($p < 0.01$)。また、分化度間の単位面積当たりのDNA抽出量では中・低分化腺癌は有意に高分化腺癌より単位面積当たりのDNA抽出量は多かった($p = 0.012$)。腫瘍面積とDNA抽出量につきPearsonの相関係数を算出すると、 $r = 0.486$, $p < 0.01$ と有意に正の相関を認めた。必要最低腫瘍面積の算出では30 mm²当たりのDNA抽出量は平均29.0 \pm 23.4 ng/ μ L(範囲: 3.86 ng/ μ L - 116.5 ng/ μ L)であり、全症例において基準となる3.75 ng/ μ Lをクリアした。

【結語】肺腺癌では、粘液産生の有無、分化度がDNA抽出量に影響を与えることが分かった。腫瘍胞巣面積、癒痕巣の割合から全細胞面積を算出しそこに含まれるがん細胞含有率($\geq 20\%$)を確認し、必要最低全細胞面積をクリア出来る切片枚数を確保することが肝要であると思われる。

キーワード: 次世代シーケンサー, 肺癌, ホルマリン固定パラフィン包埋検体, DNA抽出, DNA濃度, 最低必要全細胞面積

緒 言

近年では、サンガー法を原理としない方法で塩基配列の決定を行う次世代シーケンス技術の開発が進み、高速シーケンサーを用いて、微量DNAから短時間で多検体のシーケンスが可能となった。これにより、がんゲノムの網羅的解析が可能となり、がん個別化医療のバイオマーカーとして、がんの発生や進展に寄与する遺伝子変異、いわゆるドライバー遺伝子変異の探索が盛んに行われるようになった¹⁾。そして、このゲノムバイオマーカーに基づいたがん分子標的治療は、従来の殺細胞性の抗がん剤による治療と比較し顕著な有効性を示すことがいくつかのガンで明らかになり、がん個別化医療を促進する契機となった。このように、分子標的薬の治療標的あるいは奏効性バイオマーカーとなる遺伝子異常が多数同定される中で、一つ一

つの遺伝子異常に対して独立の検査を行うことは非効率的であり、次世代シーケンサーを用いて多数の遺伝子異常を同時に検査する臨床的シーケンスが期待され国内外で開始されている²⁾⁻⁴⁾。

肺がんは現在、本邦におけるがん死因の1位であり、年間約7万人(全世界では137万人)の死の原因となっている⁵⁾。近年、米国を中心に行われている大規模な遺伝子解析により、肺がんのうち頻度の高い組織型である肺腺癌と肺扁平上皮癌における有意な遺伝子異常が同定され、報告されている⁶⁾⁷⁾。特に、肺腺癌においては受容体チロシンキナーゼのシグナル経路に関わり治療標的となりうる遺伝子の変化が75%で認められたとされている。現在、我が国においてはEGFR遺伝子変異に対するgefitinib⁸⁾⁹⁾、erlotinib¹⁰⁾¹¹⁾、afatinib¹²⁾¹³⁾、ALK融合遺伝子変異に対するcrizotinib¹⁴⁾¹⁵⁾が分子標的薬として認可されている。

表 1 臨床病理学的因子

		全対象症例 N=68	解析症例 N=63
Predominant classification	lepidic predominant	5	5
	papillary predominant	49	44
	acinar predominant	5	5
	solid predominant	2	2
	mucinous adenocarcinoma	7	7
Grade	well	37	35
	moderate or poor	31	28

その他, R1ET 融合遺伝子変異に対する vandetanib の第 II 相試験や ROS1 融合遺伝子変異に対する crizotinib の第 II 相試験が進行中である。

このように遺伝子異常を網羅的に解析することで治療標的として可能性のある遺伝子変異や融合遺伝子などが多く解明されていく中で, クリニカルシーケンスが臨床応用された際に問題となるのは臨床検体の取り扱いである。肺がんは代表的な組織型だけでも, 腺癌, 扁平上皮癌, 小細胞癌があり, 肺腺癌に限ってみても組織亜型がいくつか存在し, また同一腫瘍組織内に複数の組織亜型が混在することが一般的である¹⁶⁾。さらに, 浸潤性肺腺癌の場合では中心部に壊瘍巣を形成することが多く, 腫瘍胞巣に占める全細胞含有率が非常に幅広い値をとる。そのために, 個々人より抽出された DNA の質, 量が次世代シーケンサーでの解析に妥当な検体であるのかを明確にすることは重要なことである。

以上より本研究の目的は, 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を想定した際の, 肺腺癌組織より抽出した DNA 量や質を組織亜型, 分化度の違いから検討し, また, 実際に必要とされる臨床検体 (FFPE スライド) 量を考察することとした。

対象と方法

1. 対象

2005 年から 2015 年までに新潟大学医歯学総合

病院にて肺癌手術を施行され, 凍結切片を有する肺腺癌 68 症例を全対象とした (表 1)。組織亜型分類として predominant classification の内訳は, 置換性増殖優位型腺癌 (lepidic) が 5 例, 乳頭状増殖優位型腺癌 (papillary) が 45 例, 腺房状増殖優位型肺腺癌 (acinar) が 5 例, 充実性増殖優位型腺癌 (solid) が 2 例, 粘液腺癌 (mucinous) が 7 例であった。

2. FFPE 切片の作製

1 個当たり 3-5 mm 角凍結切片を使用し, 10% 中性ホルマリンで固定しハラフィン包埋ブロック (FFPE) を作製。固定日数は全例 12-24 時間以内とした。各 FFPE ブロックから 4 枚の連続切片 (4 μ m を 2 枚, 20 μ m を 2 枚) を作製。4 μ m の切片は HE 染色下での検鏡に用い, 腫瘍細胞の存在している腫瘍胞巣部を選択しマーキングした。次に対物 10 倍の顕微鏡下で, その領域のがん含有率を評価した。その後, プレパラートのマクロ画像を撮影し, Photoshop elements ver. 14.0 (Adobe Systems, Inc., San Jose, CA, USA) を用いてマーキング領域の面積を測定した。

3. FFPE 切片からの DNA 抽出

20 μ m 未染プレパラート 2 枚を用いて HE 染色スライドにマーキングされた領域と同じ部位の腫瘍胞巣部の組織を採取した。DNA の抽出には BiOstic FFPE Tissue DNA Isolation Kit (MO Bio

Laboratories) を用いた。抽出した DNA は Nano DropTM2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、260 nm と 280 nm の吸光度比 ($A_{260/280}$)、及び 260 nm と 230 nm の吸光度比 ($A_{260/230}$) を測定して純度を評価した。 $A_{260/280}$ が 1.8 以上および $A_{260/230}$ が 1.9 以上の場合を高純度と判定した。

二本鎖 DNA 濃度 (dsDNA) の測定には Quant-iTTM dsDNA High-Sensitivity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) と Qubit[®]3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) を用いた。我々が行っている次世代シーケンサーによる遺伝子解析では 1 回の測定にあたり 150 ng の二本鎖 DNA が必要である。DNA 抽出後の検体量は $40\mu\text{L}$ であることから、最低必要濃度を $3.75\text{ ng}/\mu\text{L}$ と設定した。また今回は、がん特異的遺伝子変異を確実に検出するにはがん細胞含有率が 20 % 以上であることが必要であるので、全細胞含有面積 (正常肺胞上皮細胞, リンパ球, がん細胞など) に占めるがん細胞含有率がそれ以下の検体は検討から除外した。

DNA の断片化は KAPA Human Genomic DNA

Quantification and QC Kit (KAPA Biosystems) を用いて評価した。129 bp と 41 bp の配列に対する primer を用いて Real time qPCR にて DNA の増幅を行い、DNA 断片化比 (Q-ratio : [129 bp]/[41 bp]) を求めた。Q-ratio > 0.1 の場合に次世代シーケンサーによる遺伝子解析が可能であると判断した。

4. 統計学的解析

連続変数の 2 群間比較には Mann-Whitney U test を、多群間比較には Kruskal Wallis test をそれぞれ用いた。また、2 変数間の相関は Pearson's correlation coefficient を用いた。 $p\text{-value} < 0.05$ の場合を統計学的に有意な差と定義した。全ての統計学的解析は SPSS Version 22.0 (SPSS, Inc., an IBM Company) を用いた。

結 果

1. 肺癌 FFPE 検体からの DNA 抽出

肺癌 68 検体の HE スライドより腫瘍巣部位

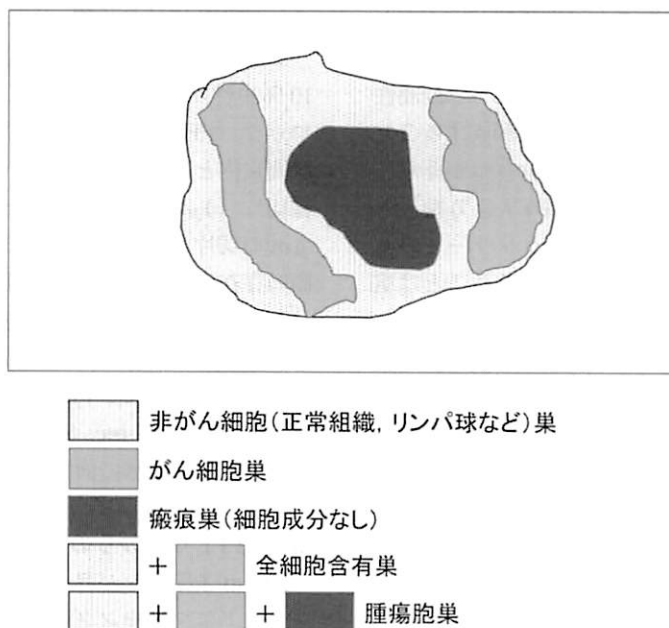


図1 腫瘍胞巣部における全細胞含有面積 (がん細胞巣, 非がん細胞巣), 瘢痕巣のシェーマ

表 2 肺腺癌 FFPE 検体からの DNA 抽出結果

N=63		
全細胞含有面積	中央値(範囲)	5.07(1.15-18.10)
腫瘍巣部位における癌痕含有率(%)	中央値(範囲)	40(5-85)
DNA 抽出濃度(ng/μL)	中央値(範囲)	4.20(0.32-19.25)
単位面積当たりの DNA 抽出濃度(ng/μL/mm ²)	中央値(範囲)	0.73(0.13-3.88)
Q-ratio: 129bp/41bp	中央値(範囲)	1.03(0.79-1.57)
A260/280 *	中央値(範囲)	2.02(1.90-2.11)
A260/230 *	中央値(範囲)	1.98(1.08-2.32)

* DNA 抽出濃度/FFPE 2 枚 ≥ 3.75 ng/μL(32 症例)

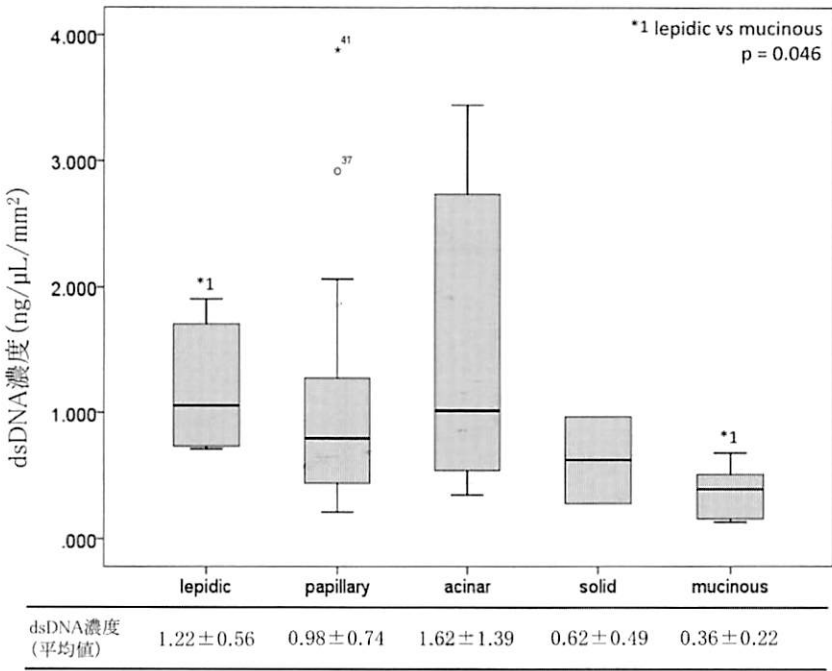


図 2 肺腺癌組織亜型別の DNA 抽出結果
置換性増殖優位型腺癌は粘液腺癌と比較し、単位面積当たりの
DNA 抽出濃度が有意に多かった (p = 0.046)。

における全細胞含有面積、全細胞含有面積に対するがん細胞含有率を算出した (図 1)。全細胞含有面積におけるがん細胞含有率が 20 %を超えていた症例は 63 例であり、これ以下の解析対象症例とした (表 1)。肺癌 63 検体の FFPE 切片 2 枚

(20 μm/枚) からの DNA 抽出結果を表 2 に示した。また、標本中における細胞成分がほとんど認められない癌痕含有率も算出した。FFPE 切片 1 枚当たりの全細胞含有面積は中央値 5.07 mm² (範囲：1.15 mm²-18.10mm²) であった。63 検体

から抽出された DNA 濃度は中央値 4.20 ng/ μ L (範囲: 0.32 ng/ μ L - 19.25 ng/ μ L) であった. 全細胞含有渠における単位面積当たりの DNA 抽出濃度は中央値 0.73 ng/ μ L (範囲: 0.13 ng/ μ L/mm² - 3.88 ng/ μ L/mm²) であった. Q-ratio については中央値 1.03 (範囲: 0.79 - 1.57) とすべて基準値以上であった. 2 枚の FFPE から DNA 抽出濃度が 3.75 ng/ μ L 以上を満たしていた症例は 36 例あったが, その群では A_{260/280} や A_{260/230} の値も良好で, 次世代シーケンサーによる解析に十分な濃度と質を有する DNA が抽出されることが分かった.

2. 肺腺癌組織学的所見と DNA 抽出結果の関係

肺腺癌を組織学的に亜分類し, 各検体から抽出された DNA の単位面積当たりの濃度を図 2 に示す. 置換性増殖優位型腺癌は粘液腺癌と比較し, 単位面積当たりの DNA 抽出濃度が有意に多かつ

た ($p = 0.046$). 粘液非産生型腺癌と粘液産生型腺癌とに分類した際の単位面積当たりの DNA 抽出濃度を図 3 に示すが, 粘液非産生型腺癌は有意に粘液産生型腺癌より単位面積当たりの DNA 抽出量は多かった ($p < 0.01$). 分化度の違いから単位面積当たりの DNA 抽出濃度を検討してみたが, 中・低分化腺癌では有意に高分化腺癌より単位面積当たりの DNA 抽出量は多かった ($p = 0.012$) (図 4).

3. 腫瘍面積と DNA 抽出量

全細胞含有面積と DNA 抽出量につき Pearson の相関係数を算出すると, $r = 0.486$, $p < 0.01$ と有意に正の相関を認めた (図 5). 分化度ごとに全細胞含有面積と DNA 抽出量につき同様に Pearson の相関係数を算出してみた. 高分化腺癌では $r = 0.579$, $p < 0.01$, 中・低分化腺癌では $r = 0.492$, $p < 0.01$ いずれも有意に正の相関を

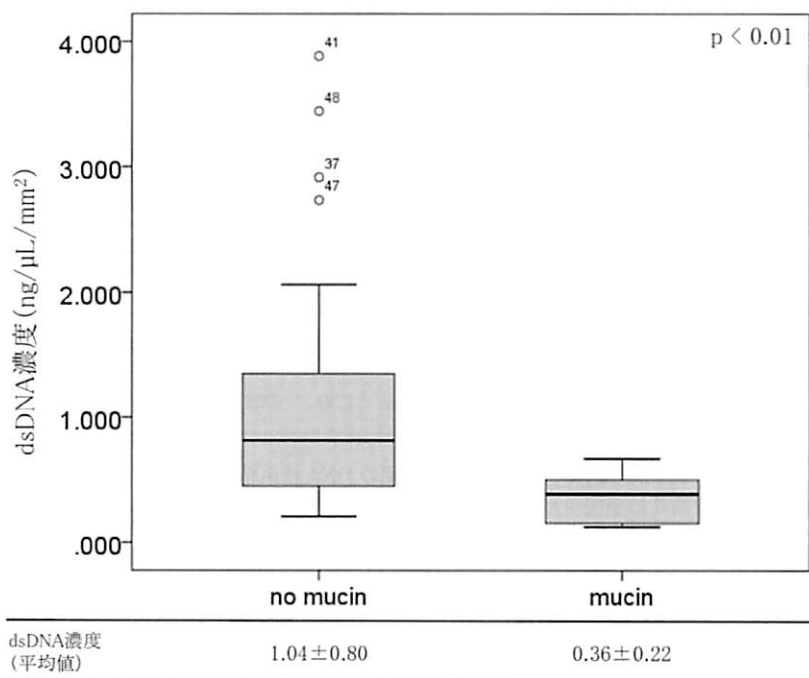


図 3 非粘液産生型と粘液産生型腺癌の DNA 抽出結果
粘液非産生型腺癌は有意に粘液産生型腺癌より単位面積当たりの DNA 抽出量は多かった ($p < 0.01$).

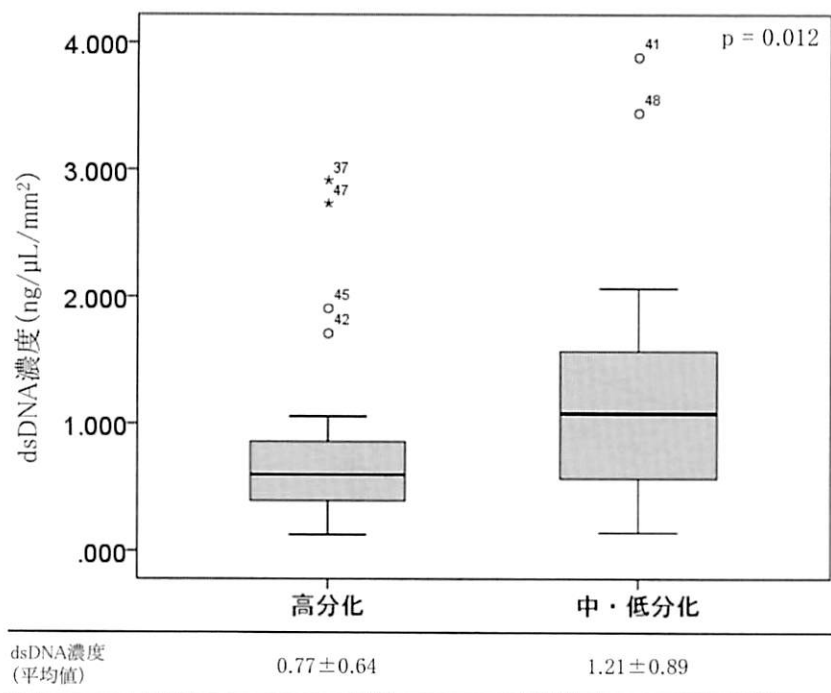


図4 分化度別の DNA 抽出濃度の関係
中・低分化腺癌では有意に高分化腺癌より単位面積当たりの DNA 抽出量は多かった ($p = 0.012$).

認めた。

次世代シーケンサー分析に必要な DNA 抽出濃度を得るためには、どの程度の全細胞含有面積が必要であるのかを考察した。はじめに、今回の 63 検体において全細胞含有面積を 20 mm^2 とした場合の DNA 抽出濃度は平均 $19.3 \pm 15.8 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (範囲: $2.57 \text{ ng}/\mu\text{L} - 77.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$) であり、基準となる $3.75 \text{ ng}/\mu\text{L}$ をクリアする症例は 63 例中 60 例 (95.2%) であった。次に、全細胞含有面積を 30 mm^2 とした際の DNA 抽出濃度は平均 $29.0 \pm 23.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (範囲: $3.86 \text{ ng}/\mu\text{L} - 116.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$) であり、基準となる $3.75 \text{ ng}/\mu\text{L}$ を全例クリアした。

考 察

今回われわれは、肺腺癌腫瘍組織の FFPE 検体から DNA を抽出し、組織亜型や分化度別に DNA

抽出濃度を比較検討した。また、次世代シーケンサーを用いたクリニカルシーケンスが実用化された際に必要とされる質の高い DNA 量と必要最低全細胞面積との関係を検討した。

肺腺癌の特徴として、肺胞上皮置換型増殖以外には浸潤癌であり、腫瘍中心部に炭粉沈着を伴う瘢痕が形成され、浸潤巣を形成している。腫瘍胞巣周囲には多数の線維芽細胞が増生し、弾性線維の凝集、厚い膠原線維が観察される。これらの所見は間質への浸潤を示しているが、各個人によってその割合に大きな幅がある。今回の研究でもそうであったが、腫瘍胞巣における細胞成分のほぼ認められない瘢痕巣の占める割合は 5% ~ 85% と非常に幅広かった。また、浸潤型肺腺癌には置換性増殖優位型腺癌、乳頭状増殖優位型腺癌、腺房状増殖優位型肺癌、充実性増殖優位型腺癌、粘液腺癌など様々な組織亜型が存在し、同一腫瘍組織内に複数の組織亜型が存在することが一般的であ

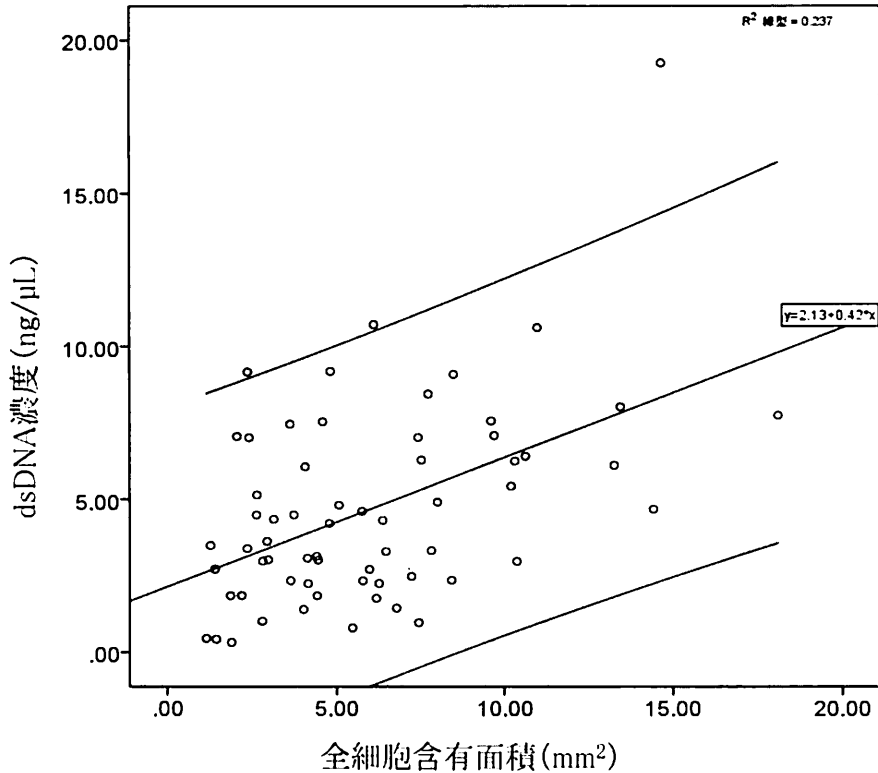


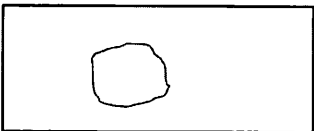
図5 腫瘍面積とDNA抽出濃度の関係

腫瘍面積とDNA抽出濃度とは正の相関関係を認める($r = 0.486$, $p < 0.01$).
しかし、決定係数は $R^2 = 0.237$ と小さく、予測精度は低い。

る。本研究では、組織亜型ごとの単位面積当たりのDNA抽出量の比較検討においてはほぼ有意差を認めず、概して一様に扱ってよいものと考えられた。しかし、検体数の問題はあるにしろ、粘液腺癌においては、非粘液腺癌と比較し、単位面積当たりのDNA抽出量は有意に少なく、解析に必要とする検体量に関しては注意が必要ではないかと思われた。分化度では、中・低分化腺癌では有意に高分化腺癌より単位面積当たりのDNA抽出量は多かった。これについては、高分化腺癌は細胞密度が低く、中・低分化腺癌では細胞密度が高くなることが影響していると考察できる¹⁶⁾。以上より、次世代シーケンサーでの肺腺癌の解析におけるDNA量は、粘液産生腺癌、高分化腺癌で少なく、検体の取り扱いには慎重である必要があ

る。一方、DNAの質、つまり断片化については、本研究では -80°C の凍結切片を本文中にあるプロトコールの処置を行い、DNA抽出量が十分な検体においては解析しうる結果であったと考えられた。

以上を基に、次世代シーケンサーに必要と思われる検体量につき検討してみた。はじめに大前提として、全細胞含有面積とDNA抽出量に関しては正の相関があった。本文にもあるように、必要全細胞含有面積を 20 mm^2 とした場合、平均DNA抽出量は $19.3\text{ ng}/\mu\text{L}$ (範囲: $1.8\text{ ng}/\mu\text{L}$ - $210.6\text{ ng}/\mu\text{L}$)であり、63症例のうち60例(95.2%)が基準値である $3.75\text{ ng}/\mu\text{L}$ をクリアしていたが、3症例では必要量に満たなかった。この3症例はいずれも粘液腺癌(うち2例は高分化)であ

外科切除標本 (腫瘍胞巣部:10mm×10mm)		全細胞含有率	面積	20 μ m未染枚数	
		100%	100mm ²	1枚(100mm ²)	適
		50%	50mm ²	1枚(50mm ²)	適
		10%	10mm ²	3枚(30mm ²)	適

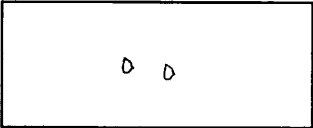
生検標本 (腫瘍胞巣部:2mm×2mm×2個)		全細胞含有率	面積	20 μ m未染枚数	
		100%	8mm ²	4枚(32mm ²)	適
		50%	4mm ²	8枚(32mm ²)	適
		10%	0.8mm ²	40枚(32mm ²)	非現実的

図6 実際の検体処理イメージ

外科切除標本と生検標本における解析に必要とされる臨床検体量
(腫瘍面積)をイメージし、示す。

り粘液により全細胞含有面積を過大評価した可能性が示唆される。そこで、必要全細胞含有面積を30 mm²とした場合は、平均 DNA 抽出量は 29.0 ng/ μ L (範囲: 3.86 ng/ μ L – 116.5 ng/ μ L) で、全症例が基準値をクリアしており、30 mm²を最低必要全細胞含有面積と考えるのが妥当ではないかと思われた。実際のイメージを図6に示し、外科切除標本と生検検体とで検討してみたい。はじめに、外科切除検体の場合は、例えば腫瘍胞巣面積が10 mm×10 mmであった際、全細胞含有率が100%であった場合には100 mm²となり20 μ m未染1枚でも前述の30 mm²の最低必要面積をクリアすることとなる。線維性組織を含む瘢痕巣が胞巣面積の50%程度を占めていた場合でも、未染1枚で50 mm²の全細胞含有面積が得られ、最低必要面積を超えることが可能となる。では、大部分が線維性組織からなり全細胞含有率が10%であった場合は、未染1枚からは10 mm²の全細胞含有面積しか得られず、最低3枚のFFPEが必要となる。次に、生検検体であるが、例えば腫瘍胞巣面積が2 mm×2 mmが2個あった際、全細胞含有率が100%であった場合には8 mm²となり20 μ mの未染が4枚あれば前述の30 mm²の必要面積をクリアすることとなる。線維性組

織を含む瘢痕巣が胞巣面積の50%程度を占めていた場合は、未染8枚で32 mm²の全細胞含有面積が得られ、必要面積を超えることが可能となる。しかし大部分が線維性組織からなり全細胞含有率が10%であった場合は、未染1枚からは0.8 mm²の全細胞含有面積しか得られず、最低40枚のFFPEが必要となり、現実的ではないと思われる。

以上より、生検検体からでも次世代シーケンサーに適切なDNA抽出は十分可能であるが、線維化が多く混在する生検検体からは得られる腫瘍面積は少ないため、次世代シーケンサーでの遺伝子解析用には数個の生検検体を確保することが望ましいと思われる。

今回の検討においては、68例中5症例において全細胞含有面積に占めるがん細胞含有率が20%を満たさず、検討対象症例外となった。しかし貴重な検体サンプルであることを考慮すれば、がん細胞含有部位が全細胞含有面積の20%を超えるようにスクレープ等の工夫をすることで、除外症例を減ずることができるであろうと考える。

結 語

肺腺癌では、同一腫瘍組織内に複数の組織亜型が存在することが一般的であるが、組織亜型別では概してDNA抽出量に影響を与えないことが分かった。しかし、粘液腺癌ではそれ以外と比較し、DNA抽出量は低く注意が必要である。腫瘍中心部に線維性組織からなる癒瘍巣が少なからず形成され、各個人によってその割合に大きな幅があるため、HE染色切片の検鏡は必須と考えられる。その上で、腫瘍胞巣面積、全細胞含有率を算出し、必要最低全細胞面積をクリアする切片枚数を確保することが肝要である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、今回の研究に際して各種のコーディネートを担当されたデンカ株式会社稲田太郎氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, Robinson JT, Garraway LA, Golub TR, et al: Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 505: 495 - 501, 2014.
- 2) Fox JL: Master Protocol for squamous cell lung cancer readies for launch. *Nat Biotechnol* 32: 116 - 118, 2014.
- 3) Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, Wang K, Downing SR, He J, et al: Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 31: 1023 - 1031, 2013.
- 4) Yoh K, Matsumoto S, Tsuchihara K, et al: The Lung Cancer Genomic Screening Project for Individualized Medicine in Japan (LC-SCRUM-Japan): Screening for RET and ROS1 fusions in advanced EGFR mutation negative nonsquamous lung cancer and development of molecular targeted therapy. *J Clin Oncol* 32 (Suppl.): 2014 (ASCO 2014, Abstr. 8055)
- 5) 公益財団法人日本対がん協会『肺がんの基礎知識』: www.jcancer.jp/about_cancer_and_checkup/
- 6) The Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature* 511: 543 - 550, 2014.
- 7) The Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489: 519 - 525, 2012.
- 8) Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, et al: Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (WJTOG 3405): an open label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 11: 121 - 128, 2010.
- 9) Maemondo M, Inoue A, Kobayashi K, Sugawara S, Oizumi S, Isobe H, et al: Gefitinib or chemotherapy for non-small-cell lung cancer with mutated EGFR. *N Engl J Med* 362: 2380 - 2388, 2010.
- 10) Zhou C, Wu YL, Chen G, Feng J, Liu XQ, Wang C, et al: Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicenter, open-label, randomized, phase 3 study. *Lancet Oncol* 12: 735 - 742, 2011.
- 11) Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, et al: Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EUR TAC): a multicenter, open-label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 13: 239 - 246, 2012.
- 12) Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al: Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol* 31: 3327 - 3334, 2013.
- 13) Wu YL, Zhou C, Hu CP, Feng J, Lu S, Huang Y, et al: Afatinib versus cisplatin plus gemcitabine for first-line treatment of Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer harbour -

- ing EGFR mutations (LUX - Lung 6): an open - label, randomized phase 3 trial. *Lancet Oncol* 15: 213 - 222, 2014.
- 14) Solomon BJ, Mok T, Kim DW, Wu YL, Nakagawa K, Mekhail T, et al: First - line crizotinib versus chemotherapy in ALK - positive lung cancer. *N Engl J Med* 371: 2167 - 2177, 2014.
- 15) Shaw AT, Yeap BY, Solomon BJ, Riely GJ, Gainor J, Engelman JA, et al: Effect of crizotinib on overall survival in patients with advanced non - small - cell lung cancer harbouring ALK gene rearrangement: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 12: 1004 - 1012, 2011.
- 16) 深山正久, 野口雅之, 松野吉宏: 腫瘍病理鑑別診断アトラス 肺癌. 文光堂, 2015.

(平成 28 年 3 月 15 日受付)