

次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析における ホルマリン固定パラフィン包埋サンプル作製方法 および微小検体からの DNA 抽出に関する検討

島田 能史¹⁾・永橋 昌幸¹⁾・市川 寛¹⁾・亀山 仁史¹⁾
坂田 純¹⁾・小林 隆¹⁾・若井 俊文¹⁾・奥田修二郎²⁾
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消化器・一般外科学分野 (第一外科)
- 2) 新潟大学大学院医歯学総合研究科バイオインフォマティクス分野
- 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 ダイアグノスティクス研究部

Preparation of Formalin - fixed Paraffin - embedded Tissues and DNA Extraction from Tiny Specimens for Comprehensive Analysis of Gene Mutation Using Next - generation Sequencer

Yoshifumi SHIMADA¹⁾, Masayuki NAGAHASHI¹⁾, Hiroshi ICHIKAWA¹⁾, Hitoshi KAMEYAMA¹⁾,
Jun SAKATA¹⁾, Takashi KOBAYASHI¹⁾, Toshifumi WAKAI¹⁾, Shujiro OKUDA²⁾,
Hiroshi IZUTSU³⁾, Keisuke KODAMA³⁾ and Mitsutaka NAKADA³⁾

- 1) *Division of Digestive and General Surgery, Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences*
- 2) *Bioinformatics laboratory, 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】次世代シーケンサーによってがん薬物療法の効果を予測する driver mutation を網羅的に解析することが可能となり、がん薬物療法は個別化治療の時代に入りつつある。最大で数百程度までのがん関連遺伝子変異を対象にした target sequencing では日常臨床で普及しているホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin - fixed paraffin - embedded: FFPE) サンプルを利用することができる。FFPE サンプル作製に際しては、DNA の質と量の確保が重要である。FFPE サンプルでは、ホルマリン固定による DNA の断片化が生じるため、各医療施設での病理標本固定条件が DNA の質に影響する。一方、生検材料などの微小検体においても、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析に耐える DNA の量が確保できるか否かは臨床上の重要な問題である。

Reprint requests to: Yoshifumi SHIMADA
Division of Digestive and General 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
消化器・一般外科学分野 (第一外科) 島田 能史

本研究の目的は、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析のための FFPE サンプル作製方法を確立すること、および微小検体からの DNA 抽出方法を明らかにすることである。また、実際に FFPE サンプルを用いて次世代シーケンサーによる癌の遺伝子変異解析が可能であることを明らかにすることである。

【方法】

- 1) 過去に作製された 10%酸性ホルマリン固定 FFPE サンプルを用いて、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析が可能か否かを検討した。
- 2) FFPE サンプル作製時のホルマリン固定法を標準化するために、ホルマリン種類および固定時間の条件を変えて FFPE サンプルを作製し、DNA 濃度と DNA の断片化を評価した。
- 3) 次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析に必要な最低限のサンプルサイズを決定するために、組織採取面積の条件を変えて DNA を抽出し、それぞれの DNA 濃度を測定した。
- 4) 生検材料を用いて次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析が可能か否かを明らかにするために、生検材料から DNA を抽出し、DNA 濃度を測定した。
- 5) 次世代シーケンサーによる固形癌の遺伝子変異解析ツール (CancerPlex[®]) にて、大腸癌外科切除 100 症例の 10%中性緩衝ホルマリン固定 FFPE サンプルを使用し、415 の重要な癌の遺伝子変異を解析した。そして、1 症例あたりの遺伝子変異数、および変異の頻度が高い遺伝子を求めた。

【結果】

- 1) 過去に作製された 10%酸性ホルマリン固定 FFPE では、DNA の断片化が高度であり、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を行うことができなかった。
- 2) 固定液の種類に関わらず、ホルマリン固定時間が経過すると DNA の断片化が進行した。しかし、10%中性緩衝ホルマリンでは、10%酸性ホルマリンと比較して DNA の断片化が起りにくかった。
- 3) 20 μ m 未染プレパラート 1 枚から 3 \times 3 mm の組織採取を行うことで最低限の DNA 濃度を確保できた。
- 4) 生検材料においても 20 μ m 未染プレパラート 1 枚から組織採取を行うことで最低限の DNA 濃度を確保できた。
- 5) 大腸癌 100 症例で全例に有意な癌の遺伝子変異が検出され、1 症例あたりの遺伝子変異数は中央値 10 (範囲: 2-49) であった。大腸癌 100 例全体で 247 種類の癌の遺伝子変異が検出可能であった。

【結論】次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析において理想的な FFPE サンプルを作製するためには、10%中性緩衝ホルマリンを使用し、固定時間は 24 時間程度として必要最低限とすることが肝要である。また、生検材料などの微小な検体からも次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析が可能であることから、この技術の適応範囲は広く、より多くの患者に適切ながん薬物療法の提案ができるものと期待される。

キーワード：次世代シーケンサー、ホルマリン固定パラフィン包埋、DNA 抽出、DNA 濃度、DNA 断片化

緒 言

近年のがん薬物療法の進歩は目覚ましく、これ

までに難治とされてきたがん腫においても有効な分子標的薬の開発が進み、予後が改善されている。さらに、がん薬物療法の効果を予測する driver

mutation (がんの増殖に大きく関わる遺伝子変異)の発見により、がん薬物療法は個別化治療の時代に入りつつある。がん薬物療法の個別化治療を推進するために、薬物療法の効果を予測する driver mutation を網羅的に解析する試みがなされている。従来、遺伝子変異検出には Sanger 法や高感度 PCR 法などが用いられてきたが、網羅的に多くの遺伝子変異を検出する方法として最適とは言えない。そこで、遺伝子変異を網羅的に短時間で解析することができる次世代シーケンサーの臨床応用が期待されている¹⁾²⁾。

次世代シーケンサーを利用して遺伝子変異に関する情報を得るための方法としては、whole genome sequencing, whole exome sequencing, そして target sequencing の3つがある³⁾。最大で数百程度までのがん関連遺伝子変異を対象にした target sequencing は、配列を読む領域を短く設定できるため、ホルマリン固定によりある程度断片化が進んだ DNA も解析可能である。よって、target sequencing では日常臨床で広く普及しているホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-fixed, paraffin-embedded: FFPE) サンプルを利用することが可能である^{4)~8)}。

次世代シーケンサーのみならず、核酸を用いる全ての遺伝子変異解析においては新鮮凍結検体が望ましいと考えられている。しかし、日常臨床での普及と保管などの利便性などを考慮すると、新鮮凍結検体よりも FFPE が理想に近いサンプルであると考えられる。FFPE サンプル作製に際しては、DNA の質と量の確保が重要である。FFPE サンプルでは、ホルマリン固定による DNA の断片化が生じるため、各医療施設での病理標本固定条件 (ホルマリン濃度、中性緩衝/非緩衝、固定時間) が DNA の質に影響する。また、実際の臨床現場では大小様々なサンプルが採取されるため、生検材料などの微小検体においても解析に耐えうる DNA の量が確保できるか否かは臨床上的重要な問題である。

本研究の目的は、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析のための FFPE サンプル作製方法を確立すること、微小検体からの DNA 抽出方法を

明らかにすることである。また、実際に FFPE サンプルを用いて次世代シーケンサーによる癌の遺伝子変異解析が可能であることを明らかにすることである。

方 法

1. 10%酸性ホルマリン固定 FFPE サンプルの解析, 10%中性緩衝ホルマリン固定 FFPE サンプル作製, DNA の抽出と quality check

1) 後向き症例 (10%酸性ホルマリン固定) FFPE サンプルの解析

はじめに、10%酸性ホルマリン固定 FFPE サンプルを用いて、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析が可能か否かを検討した。2002年1月から2005年12月までの間に作製された手術切除材料4例 (大腸癌2例と胃癌2例) の10%酸性ホルマリン固定 FFPE サンプルを使用し、以下の3)~5)の方法で DNA の抽出および quality check を行った。

2) 前向き症例 (10%中性緩衝ホルマリン固定) FFPE サンプル作製プロトコール

手術材料の腫瘍部分を、非腫瘍部分を含む形で5mm厚にスライスし、10%中性緩衝ホルマリンで24時間固定した。次に80%エタノールに2時間浸漬した後に、自動包埋装置によりパラフィン中に包埋した。そして、以下の3)~5)の方法で DNA の抽出および quality check を行った。

3) 連続切片作製

FFPE サンプルから3枚の連続切片 (4 μ m, 20 μ m, 20 μ m) を作製した。1枚目の4 μ m切片は HE 染色を行い、拡大カラーコピーをとった。その後 HE 染色標本を検鏡し、HE 染色標本とカラーコピーにそれぞれ癌部のマッピングを行い (図1)、カラーコピーはファイリングし保管した。

4) スクレーピングと DNA 抽出

レーザーマイクロダイセクション法による組織採取は、熱による組織変性の影響が加わるため、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析に適さない。したがって、組織採取はスクレーピング法にて行った。HE 染色標本と20 μ m 未染プレパラ

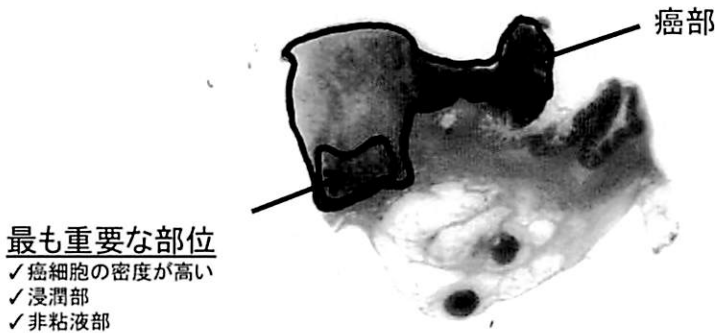


図1 HE染色標本のマッピング

スクレーピングを行う癌部をマーキングで囲い、その中で最も重要な部位(癌細胞の密度が高い、浸潤部、非粘液部)をさらにマーキングした

表1 スクレーピング方法

試薬：

- 95%エタノール
- 無水エタノール

機器：

- 鑷子2本(1本はアルコールに浸った剃刀をとる際に使用する。1本はスクレープされた組織をエッペンチューブに入れる際に使用する。)
- 剃刀
- DNA 低吸着性チューブ：1.5 mL DNA LoBind Microcentrifuge tubes
- 恒温器
- ボルテックス

手順：

1. 腫瘍量の多いFFPEを選択する
2. HE染色標本1枚、20 μ m未染2枚を準備する
3. HE染色標本のカラーコピーをとり、HE染色を鏡し癌部を確認し、カラーコピーに癌部のマッピングを行う
4. HE染色標本にマジックで癌部を書き込む
5. 20 μ m未染をスライドガラス立てに立てて65 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートする
6. 溶けたワックスをキムワイプでふき取る
7. サンプルと同数の剃刀を準備しておき、無水エタノールに浸しておく
8. HE染色標本の上に20 μ m未染プレパラート1枚を重ねる
9. 剃刀を使用して癌部をスクレーピングする
10. スクレープされた組織をDNA低吸着性チューブに入れる

ートを重ね合わせ、2枚目と3枚目の20 μ m未染プレパラートの癌部からスクレーピングを行った(表1)。スクレーピングは最も癌細胞の密度が高

い部位を中心に、癌部をなるべく多く含むように行った。次に、採取した組織からDNAを抽出した(表2)。

表2 DNA抽出方法

試薬：

- BiOstic FFPE Tissue DNA Isolation Kit (MO Bio Laboratories)

機器：

- ヒートブロック
- DNA 低吸着性チューブ：1.5 mL LoBind Microcentrifuge tubes (Fisher Scientific / Eppendorf)
- ボルテックス
- 卓上遠心機

手順：

1. FFPE 組織切片の入ったチューブに 180 μ L の Solution FP1 を添加する
2. ネガティブコントロール用にチューブを用意し、180 μ L の Solution FP1 を添加する
3. 20 μ L の Solution FP2 を添加後、ボルテックスで 20 秒間攪拌し、軽く遠心する
4. 20 μ L の Solution FP3 (冷蔵保存) を添加後、ボルテックスで 3 秒間攪拌し、軽く遠心する。
5. 55 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートする
6. ヒートブロックからチューブを取り出し、90 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートする
7. 13,000 \times g で 1 分間遠心する
8. 下層 (水層) を新しい 2 mL Collection Tube に移す
9. 200 μ L の Solution FP4 を添加後、ボルテックスで 3 秒間攪拌し、軽く遠心する
10. 200 μ L の Solution FP5 を添加後、ボルテックスで 3 秒間攪拌し、軽く遠心する
11. サンプル (<620 μ L) を Spin Filter にアプライし、10,000 \times g で 1 分間遠心する
12. フロースルー液を捨て、同じチューブの上に Spin Filter を再度乗せる
13. 500 μ L の Solution FP6 を Spin Filter にアプライし、10,000 \times g で 1 分間遠心する
14. 新しい 2 mL Collection Tube に Spin Filter を乗せる
15. 洗浄のため 500 μ L の Solution FP7 を Spin Filter にアプライし、10,000 \times g で 1 分間遠心する
16. フロースルー液を捨て、同じチューブの上に Spin Filter を再度乗せ、13,000 \times g で 2 分間遠心する
17. 新しい 2 mL Collection Tube に Spin Filter を乗せる
18. 50 μ L の Solution FP8 を Spin Filter にアプライし、室温で 5 分間放置した後、10,000 \times g で 1 分間遠心する

溶出液を 1.5 mL Microcentrifuge LoBind tube に移す

FFPE, Formalin fixed paraffin embedded

5) Quality check

分光光度計 (NanoDrop™2000) を用いて、DNA 純度を評価した。DNA 純度は、260 nm と 280 nm の吸光度比 (260/280) と 260 nm と 230 nm の吸光度比 (260/230) を用いて評価した。260/280 が 1.8 以上を、260/230 が 1.9 以上を示すときに核酸が高純度であるとみなし、純度が低いとみなされる場合には、280 nm に極大吸収を持つタンパク質、あるいは 230 nm に極大吸収を持つその他不純物が混入している可能性を示す。不純物が含まれる場合、次世代シーケンシングを行う際の PCR 反応を阻害する可能性があり、不純物は出来る限り少ない方が望ましい。

Qubit®3.0 Fluorometer を用いた蛍光アッセイにより、二本鎖 DNA 濃度を測定した。次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析に使用されるのは二本鎖 DNA である。われわれが行っている解析では 1 ランあたり 150 ng の二本鎖 DNA が必要である。DNA 抽出後の検体液量は 40 μ L であるこ

とから、最低必要濃度を 3.75 ng/ μ L と設定した。

KAPA Human Genomic DNA Quantification and QC kit を用いて、qPCR 法により DNA 断片化の程度を評価した。ヒトゲノム上の特定の部位を認識する primer を用いて 129 bp と 41 bp の DNA の増幅を行い、それぞれの濃度の比から DNA 断片化比 (Q-ratio : [129 bp]/[41 bp]) を求め、Q-ratio > 0.5 の場合に高品質であると定義した。

2. FFPE 作製方法および微小サンプルからの DNA 抽出に関する実験

前述の FFPE サンプル作製方法と DNA 抽出方法のプロトコルを基本として、以下の 1) ~ 3) について検討した。

1) ホルマリン種類、固定日数、エタノール浸漬時間と DNA 断片化の関係

大腸癌手術切除材料を用いてホルマリン種類、ホルマリン固定日数、そしてホルマリン固定後の 80% エタノール浸漬時間の条件を変えて 17 個の

表3 ホルマリン種類、固定日数、エタノール浸漬時間ごとのホルマリン固定パラフィン包埋サンプル作製プロトコル

FFPE 番号	ホルマリン	ホルマリン 固定日数	80%エタノール 浸漬時間
1	10%中性緩衝	1	2
2	10%中性緩衝	2	2
3	10%中性緩衝	3	2
4	10%中性緩衝	4	2
5	10%中性緩衝	5	2
6	10%中性緩衝	6	2
7	10%中性緩衝	7	2
8	10%中性緩衝	1	24
9	10%中性緩衝	1	48
10	10%中性緩衝	1	72
11	10%酸性	1	2
12	10%酸性	2	2
13	10%酸性	3	2
14	10%酸性	4	2
15	10%酸性	5	2
16	10%酸性	6	2
17	10%酸性	7	2

FFPE, Formalin fixed paraffin embedded

FFPE サンプルを作製した (表 3)。そして、それぞれの FFPE サンプルから連続切片 ($4\mu\text{m}$ HE 染色 1 枚, $20\mu\text{m}$ 未染プレパラート 1 枚) を作製し、癌部からのスクレーピング法にて DNA を抽出し、DNA 純度、二本鎖 DNA 濃度、Q-ratio を測定した。

2) スクレーピングによる組織採取面積と DNA 濃度の関係

大腸癌手術切除材料を用いて FFPE サンプルを 3 個作製した。それぞれの FFPE サンプルから連続切片 ($4\mu\text{m}$ HE 染色 1 枚, $20\mu\text{m}$ 未染プレパラート 1 枚) を作製し、癌部からのスクレーピングの面積を変えて DNA 抽出を行った。そして、それぞれの面積での二本鎖 DNA 濃度を測定した。

3) 生検材料による DNA 抽出と二本鎖 DNA 濃度

胃癌生検材料を用いて 2 個の FFPE サンプルを作製し、それぞれの FFPE サンプルから連続切片 ($4\mu\text{m}$ HE 染色 1 枚, $20\mu\text{m}$ 未染プレパラート 6 枚) を作製した。そして、各 FFPE サンプルで $20\mu\text{m}$ 未染プレパラート 1, 2, 3 枚というように、 $20\mu\text{m}$ 未染プレパラートの累積枚数を変えて DNA を抽出し、それぞれの累積枚数から抽出した DNA における二本鎖 DNA 濃度を測定した。

3. CancerPlex[®]による遺伝子変異解析

CancerPlex[®]は、次世代シーケンサーを用いた癌の遺伝子変異解析ツールであり、固形癌におい

て 400 以上の重要な遺伝子変異を同時に解析することが可能である⁹⁾。大腸癌外科切除 100 症例の 10% 中性緩衝ホルマリン固定 FFPE サンプルを用いて、CancerPlex[®]により 415 の癌に関連する遺伝子変異について解析し、1 症例あたりの癌の遺伝子変異数を求めた。

結 果

1. 後向き症例 (10% 酸性ホルマリン固定) FFPE サンプルの解析

4 症例の DNA 純度は、いずれも高純度と判定された。しかし、DNA 断片化の指標である Q-ratio はそれぞれ、0.052, 0.056, 0.036, 0.013 であり、Q-ratio の cut-off 値である 0.5 を大きく下回る結果であった。

2. FFPE 作製方法および微小サンプルからの DNA 抽出に関する実験

1) ホルマリン種類、固定日数、エタノール浸漬時間と DNA 断片化の関係

10% 中性緩衝ホルマリンでは固定時間に伴う二本鎖 DNA 濃度の変化を認めなかったが、10% 酸性ホルマリンでは固定時間に伴って二本鎖 DNA 濃度の低下を認めた (図 2A, 2C)。固定液の種類に関わらず固定時間に伴って Q-ratio は低下し (図 2B, 2D)、10% 中性緩衝ホルマリンの

図 2A 10% 中性緩衝ホルマリン固定
二本鎖 DNA 濃度 (ng/ μL)

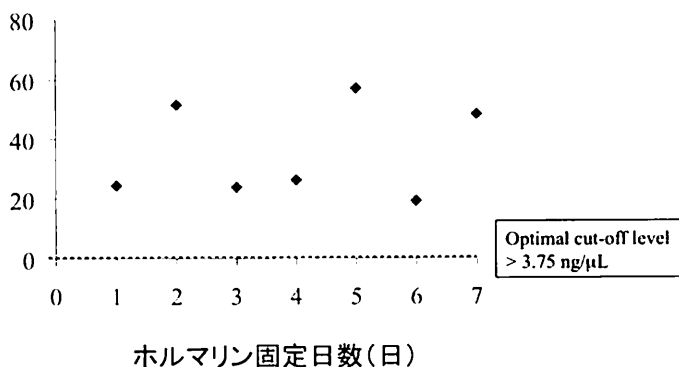


図 2B

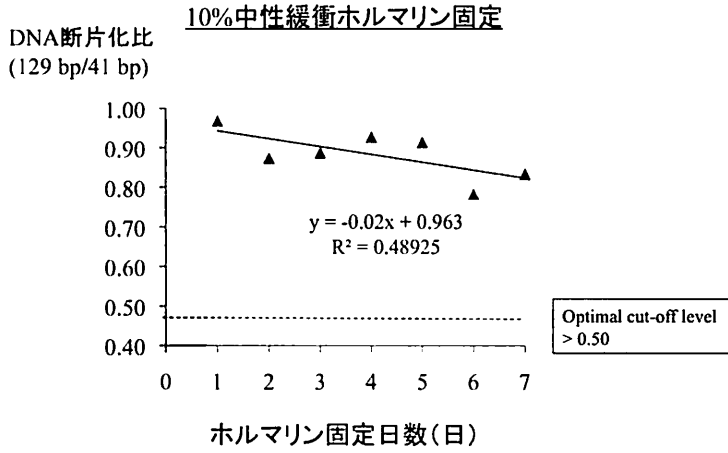


図 2C

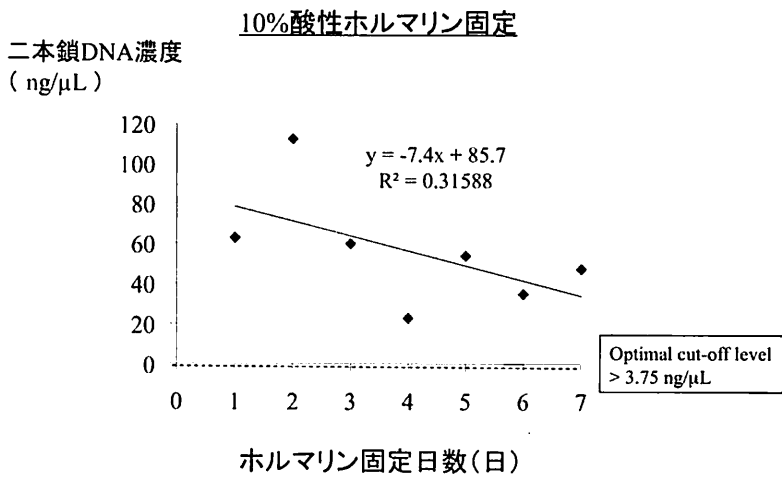


図 2D

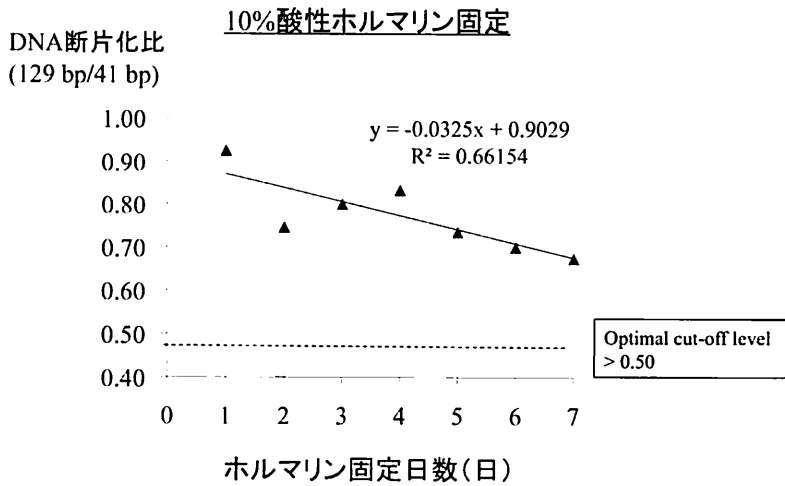


図 2E

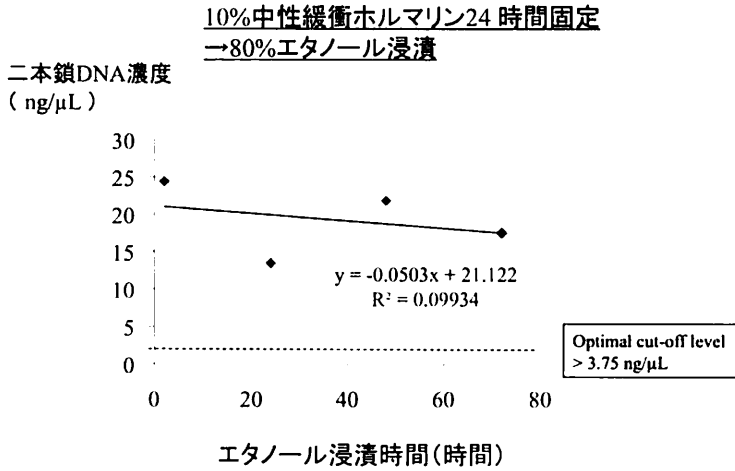


図 2F

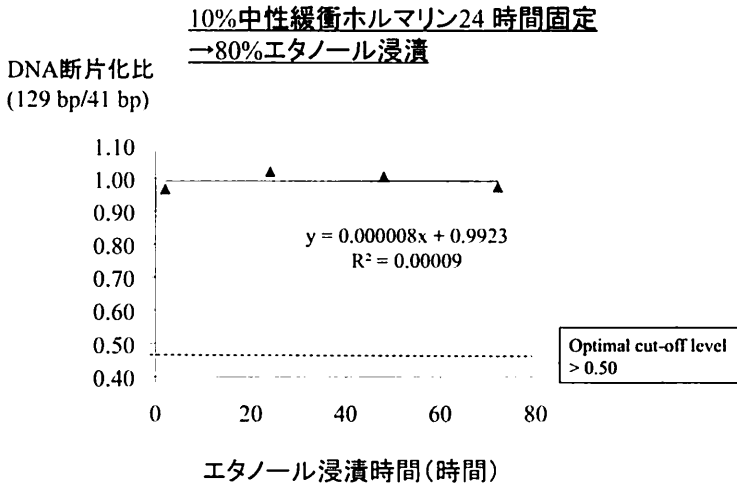


図 2 ホルマリン種類, 固定日数, エタノール浸漬時間と
二本鎖 DNA 濃度および DNA 断片化との関係

- A : 10%中性緩衝ホルマリンによる固定日数と二本鎖 DNA 濃度
- B : 10%中性緩衝ホルマリンによる固定日数と DNA 断片化比
- C : 10%酸性ホルマリンによる固定日数と二本鎖 DNA 濃度
- D : 10%酸性ホルマリンによる固定日数と DNA 断片化比
- E : エタノール浸漬時間と二本鎖 DNA 濃度
- F : エタノール浸漬時間と DNA 断片化比

Q-ratio は 10%酸性ホルマリンと比較して良好であった (図 2B, 2D). エタノール浸漬時間に伴って二本鎖 DNA 濃度は低下するが, Q-ratio の低下は認めなかった (図 2E, 2F). 260/280 および 260/230 を用いて DNA 純度を評価すると, い

ずれの FFPE サンプルも高純度と評価された.

2) スクレーピングによる組織採取面積と二本鎖 DNA 濃度の関係

組織採取面積が大きくなるにしたがって二本鎖 DNA 濃度は上昇した. 20 μ m 木染プレパラート 1

枚から3×3mmの組織採取を行うことで、次世代シーケンサーに必要な最低限の二本鎖DNA濃度である3.75 ng/μLを越えた(図3)。

ラートの累積枚数が増えると二本鎖DNA濃度は上昇した。20μm未染プレパラート1枚から組織採取を行うことで二本鎖DNA濃度が3.75 ng/μLを越えた(図4)。

3) 生検材料によるDNA抽出と二本鎖DNA濃度
各FFPEサンプルにおいて、20μm未染プレパ

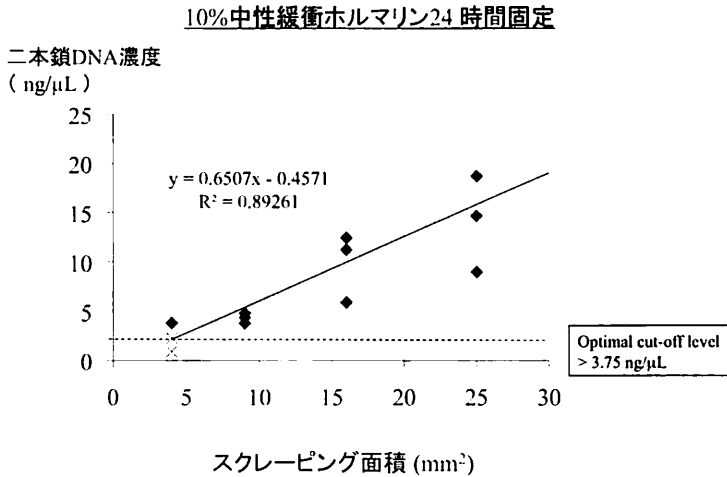


図3 組織採取面積と二本鎖DNA濃度との関係
20μm未染プレパラートから組織採取面積を変えてDNAを抽出し、二本鎖DNA濃度を測定した

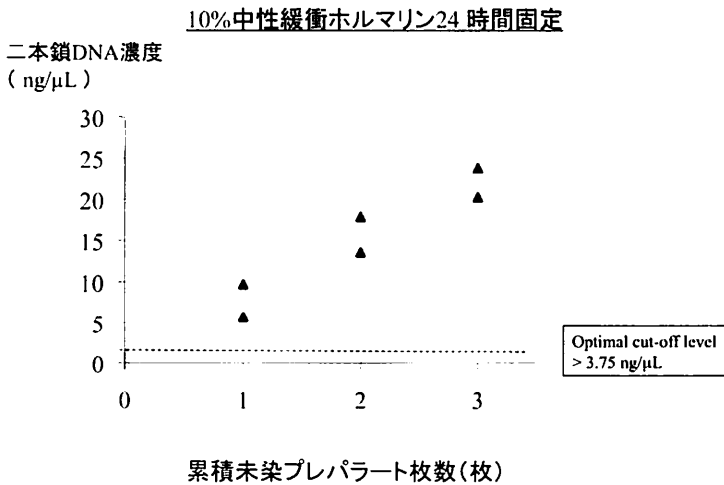


図4 生検サンプルにおける20μm未染プレパラート累積枚数と二本鎖DNA濃度との関係
20μm未染プレパラート1, 2, 3枚からそれぞれDNAを抽出し、二本鎖DNA濃度を測定した

3. CancerPlex[®]による遺伝子変異解析

大腸癌 100 症例で全例に有意な癌の遺伝子変異が検出され、1 症例あたりの遺伝子変異数は中央値 10 (範囲：2-49) であった。大腸癌 100 例全体で 247 種類の癌の遺伝子変異が検出可能であった。

考 察

今回われわれは、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析のための FFPE サンプル作製方法、および微小検体からの DNA 抽出方法について検討した。また、実際に FFPE サンプルを用いて次世代シーケンサーによる癌の遺伝子変異解析を行い、以下の結果を得た。

- 1) 過去に作製された 10 %酸性ホルマリン固定 FFPE では、高度な DNA の断片化を認めた。
- 2) 固定液の種類に関わらず、ホルマリン固定時間が経過すると DNA の断片化が進行した。しかし、10 %中性緩衝ホルマリンでは、10 %酸性ホルマリンと比較して DNA の断片化が起こりにくかった。
- 3) 20 μ m 未染プレパラート 1 枚から 3 \times 3 mm の組織採取を行うことで次世代シーケンサーによる解析に必要な最低限の DNA 濃度を確保できた。
- 4) 生検材料においても 20 μ m 未染プレパラート 1 枚から組織採取を行うことで必要最低限の DNA 濃度を確保できた。
- 5) CancerPlex[®]による癌の遺伝子変異解析において、大腸癌 100 症例で全例に有意な癌の遺伝子変異が検出された。次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析においては、これらの結果を勘案しつつ FFPE サンプルの作製および DNA 抽出にあたるべきと考えられた。

中性緩衝ホルマリン中では、ホルマリンの分解はゆっくりと進行していくため、DNA の品質を損なうホルマリン分解産物の産生が抑制される。よって、組織固定液としては一般に中性緩衝ホルマリンが推奨されている¹⁰⁾。今回のわれわれの検討では、10 %酸性ホルマリン固定による後向き

症例の FFPE は、DNA 断片化のため次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析に使用できないことが明らかとなった。一方、10 %中性緩衝ホルマリン固定 FFPE では、DNA の断片化が起こりにくく、DNA 濃度も高いため、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析において理想的な FFPE であると考えられた。

FFPE 作製時のホルマリン固定は、DNA の断片化やヌクレオチドの架橋形成など、遺伝子変異解析への悪影響をもたらすことが明らかとなっている¹⁰⁾。ホルマリンが組織へ浸透していく速度が約 1 mm 毎時であることを考慮すると、長時間にわたるホルマリン固定は不要である。しかし、ホルマリン固定時間はサンプル作製者の勤務体制など社会的要因によっても影響を受けるため、一定にすることは容易ではない。例えば、連休前に採取された臨床検体のホルマリン固定時間は、必要以上に長くなってしまいう可能性がある。本研究では、ホルマリンの種類に関わらず、固定時間が長くなると、DNA の断片化が進行することが確認された。一方、ホルマリン固定後に 80 %エタノールに浸漬すれば、少なくとも 72 時間は DNA の断片化は進行しないことが明らかとなった。つまり、ホルマリン固定から FFPE サンプル作製までに日数がかかる場合は、ホルマリン固定を 24 時間程度とし、その後は 80 %エタノールに浸漬するようにして DNA の断片化を防止すべきである。

日常臨床では、大小様々なサンプルが採取されるため、微小な検体からも遺伝子変異解析が行えるか否かは臨床上の重要な問題点である。近年、消化器癌の領域では術前補助化学療法が施行される機会が増加している。術前補助化学療法において個別化治療を推進するためには、術前の生検によって得られた微小なサンプルから遺伝子変異解析を行い、その患者に合った薬剤を選択する必要がある。今回われわれは、生検材料の FFPE サンプルにおいても 20 μ m 未染プレパラート 1 枚で必要最低限の DNA 濃度を確保できることを明らかとした。これにより、今後は術前の生検サンプルから DNA を抽出し、次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を行うことも可能になると考え

られる。

結 論

次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析において理想的な FFPE サンプルを作製するためには、10%中性緩衝ホルマリンを使用し、固定時間は24時間程度として必要最低限とすることが肝要である。また、生検材料などの微小な検体からも次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析が可能であることから、この技術の適応範囲は広く、より多くの患者に適切ながん薬物療法の提案ができるものと期待される。

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感謝いたします。

文 献

- 1) Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* 487: 330-337, 2012.
- 2) Cancer Genome Atlas Research Network: Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513: 202-209, 2014.
- 3) 洪 泰浩: 腫瘍の遺伝子情報の臨床への応用。がん分子標的治療 12: 71-75, 2014.
- 4) Chan PK, Chan DP, To KF, Yu MY, Cheung JL and Cheng AF: Evaluation of extraction methods from paraffin wax embedded tissues for PCR amplification of human and viral DNA. *J Clin Pathol* 54: 401-403, 2001.
- 5) Signoretti S, Murphy M, Cangi MG, Puddu P, Kadin ME and Loda M: Detection of clonal T-cell receptor gamma gene rearrangements in paraffin-embedded tissue by polymerase chain reaction and nonradioactive single-strand conformational polymorphism analysis. *Am J Pathol* 154: 67-75, 1999.
- 6) 津田 均, 広橋説雄: ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックよりの DNA の抽出。病理と臨床 5: 1377-1379, 1987.
- 7) 福重智子, 石黒晶子, 山田 梢, 菊間幹太, 溝口幹朗, 竹下盛重: ホルマリン固定パラフィン包埋切片からの DNA 抽出法の検討。日染色体遺伝子検会誌 29: 49-54, 2011.
- 8) 福島義之, 谷中昭子, 村上和美, 阿部由紀子, 越坂卓也, 原 啓高, 鮫島千裕, 岸 義朗, 金山 誠, 吉野孝之: 切除不能再発大腸癌におけるホルマリン固定パラフィン包埋組織検体を用いた KRAS コドン 12・13 変異のハイスループットスクリーニング法。癌と化療 38: 1825-1835, 2011.
- 9) KEW Group: CancerPlex[®]. <<http://www.kewgroup.com/products-solutions/cancerplexsm>>.
- 10) 日本臨床検査標準審議会 遺伝子関連検査標準化専門委員会(編): 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル。学術広告社, 東京, 2011.

(平成27年11月24日受付)