

# 肺がん遺伝子変異の検出率向上を目的とした病理検査室の取り組み

(地方独立行政法人京都市立病院機構京都市立病院 臨床検査技術科)

宮城 華那子 野田 みゆき 井上 翔太 田中 志穂 竹腰 友博 山田 雅

## 要 旨

肺がんにおける遺伝子変異検出は、分子標的薬選択に必須の検査であり、その精度が重要であるが、マルチプレックス検査はシングルプレックス検査と比較し、感度が低いことが課題である。そこで我々は遺伝子変異検出率向上を目的に、生検検体では量不足による解析不能防止のため、必要な薄切枚数を増加し、手術検体では核酸品質低下防止のため、ホルマリン固定条件を工夫した。その結果、遺伝子変異検出率が向上したので、報告する。  
(京市病紀 2025; 45: 18-22)

Key words : 肺癌コンパニオン診断, EGFR 遺伝子変異, 肺癌マルチプレックス検査, 遺伝子変異検出率

## 諸 言

がんは、様々な遺伝子変異が原因で発生するとされており、それぞれの遺伝子変異に対する分子標的薬が開発されている<sup>1),2)</sup>。その分子標的薬の使用に際し、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed, paraffin-embedded : FFPE) 検体を用いてコンパニオン診断 (companion diagnostics : CDx) を行うことで、分子標的薬使用の適否を決定しており、がん診療において重要な役割を果たしている。

肺癌においても発癌の原因となる遺伝子は複数存在し、治療薬選択の決定にはドライバー遺伝子を検索し、その結果に応じた分子標的治療薬を選択することが、日本肺癌学会の「肺癌診療ガイドライン2024年版」で推奨されている<sup>1)</sup>。

肺癌 CDx としてシングルプレックス検査 (シングル検査) とマルチプレックス検査 (マルチ検査) がある。従来、肺がんの遺伝子検査の多くが単一遺伝子の変異のみを対象としたシングル検査で行われていたが、近年は低頻度のドライバー遺伝子検出のため、複数の遺伝子を同時に解析可能なマルチ検査が主流となっている<sup>3)</sup>。

当院で採用しているマルチ検査には「AmoyDx® 肺癌マルチ遺伝子 PCR パネル (AmoyDx)」と「オンコマイン™ Dx Target Test マルチ CDx システム (オンコマイン Dx)」がある。AmoyDx はリアルタイム PCR 法を、オンコマイン Dx は NGS 法を測定原理とし、両検査ともに CDx 対象の 7 遺伝子を解析し、未承認の遺伝子を含めると AmoyDx では 11 遺伝子、オンコマイン Dx では 46 遺伝子を解析している。

しかし、マルチ検査は複数の遺伝子変異を同時に検出できる利点がある一方で、感度の低さが課題となっている。その原因として、マルチ検査ではシングル検査よりも検体量が多く必要である他、FFPE 中の核酸品質が解析結果に影響することが挙げられる。

EGFR 遺伝子変異は非小細胞肺癌のドライバー遺伝子として 30~40% を占め最も高頻度である。日本肺癌学会バイオマーカー委員会による「EGFR 遺伝子変異率を基にしたバイオマーカー検査の適正性に関するアンケート調査 (第一報)」において全国 197 施設の EGFR 遺伝子

変異検出率は、マルチ検査においてシングル検査の検出率を約 10% 程下回り、EGFR 変異陽性患者の一部が偽陰性となることが指摘されている<sup>4)</sup>。

今回我々は、マルチ検査における肺がん遺伝子変異の検出率向上を目的とし、病理検体の取り扱いを変更し、精度保証の指標として EGFR 遺伝子変異検出率を当院と全国平均で比較したので報告する。

## 方 法

### 1. 生検検体の検体量不足の改善策

AmoyDx の検体量は未染色スライド 5 μm 厚 10 枚で、腫瘍含有率が 20% 以上必要であり、オンコマイン Dx の検体量は未染色スライド 5 μm 厚 10 枚で、腫瘍含有率が 30% 以上必要である。双方とも、腫瘍含有率が基準に満たない場合は、マクロダイセクションを実施するが、特にオンコマイン Dx では、4 mm<sup>2</sup> 以上の組織面積が必要である。

検体量不足による解析不能防止のため、2022 年 10 月から検査に必要な薄切枚数の算出を導入した。HE 染色標本を顕鏡し、腫瘍含有率の高い部分をマーキングし (図 1)、そのマーキング部分の組織面積を測定し、面積から必要な提出枚数を算出する。AmoyDx では組織面積が 1.5 mm<sup>2</sup> 以下の場合、オンコマイン Dx では組織面積が 4 mm<sup>2</sup> 以下の場合、両検査ともに提出枚数を 10 枚以上に増加させる。

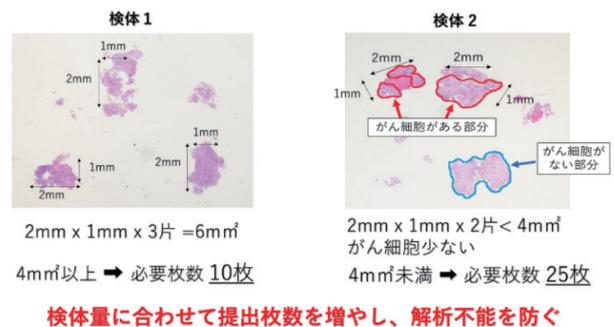


図 1 方法①生検検体量不足の改善策：検査に必要な薄切枚数の算出

2. 手術検体の核酸品質低下防止策

2023年2月より、核酸品質低下防止のため、以下の対策を導入した。血液が混入したホルマリンは一度洗い流し、新鮮なホルマリンに入れ替える工程を実施する。さらに、肺は空気を含み浮遊するため、全体的にホルマリンに浸漬するよう検体をガーゼで覆い固定する。この方法により、検体全体が均一にホルマリンで固定され、核酸の品質が維持されるようにした(図2)。

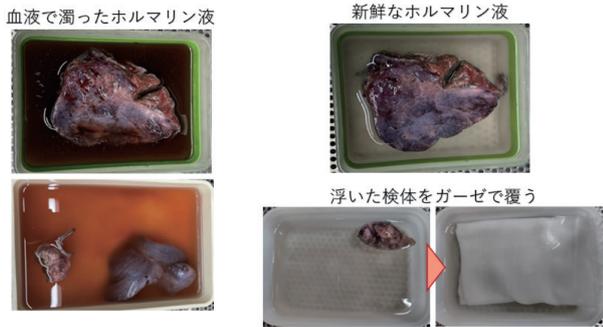


図2 方法②手術検体の核酸品質低下防止策：ホルマリン固定の工夫

3. 比較検討方法

遺伝子変異検出率を次の期間において比較した。当院の2022年1月～12月および2023年1月～12月における期間と、全国197施設の2022年1月～12月における期間で比較した。

(1) マルチ検査における全遺伝子変異検出率の2022年と2023年の比較

当院のAmoyDxとオンコマインDxにおけるEGFRを含むALK、ROS1等、肺癌ドライバー遺伝子の全遺伝子変異検出率を取り組み前の2022年と、取り組み後の2023年で比較した。

(2) マルチ検査におけるEGFR遺伝子変異検出率の2022年と2023年の比較

当院のAmoyDxとオンコマインDxにおけるEGFR遺伝子変異のみの検出率を取り組み前の2022年と、取り組み後の2023年で比較した。

(3) 当院の2022年のマルチ検査におけるEGFR遺伝子変異検出率と全国平均の比較

生検検体のAmoyDxにおけるEGFR遺伝子変異検出率と、手術材料のオンコマインDxにおけるEGFR遺伝子変異検出率を、当院の2022年と全国平均で比較した。

(4) 当院の2023年のマルチ検査におけるEGFR遺伝子変異の検出率と全国平均の比較

生検検体のAmoyDxにおけるEGFR遺伝子変異検出率と、手術材料のオンコマインDxにおけるEGFR遺伝子変異検出率を、当院の2023年と全国平均で比較した。

(5) 当院の2023年のマルチ検査におけるEGFR遺伝子変異検出率と全国平均のシングル検査のEGFR遺伝子変異検出率の比較

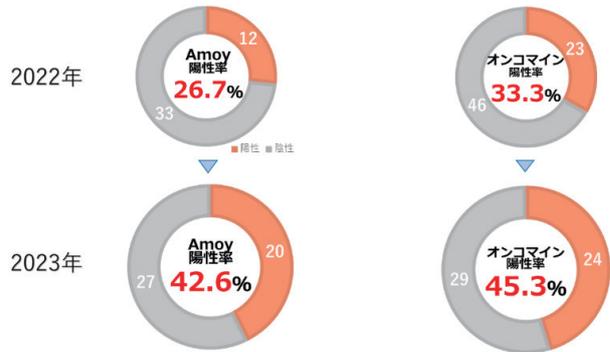
生検検体のAmoyDxにおけるEGFR遺伝子変異検出率と、手術材料のオンコマインDxにおけるEGFR遺伝子変異検出率を、当院の2023年と全国平均のシングル検査で比較した。

結 果

(1) マルチ検査における全遺伝子変異検出率の2022年と2023年の比較

Amoy Dxの全遺伝子変異検出率は、2022年においては45件中12件(26.7%)であったのに対し、2023年には47件中20件(42.6%)となった。また、オンコマインDxでの検出率は、2022年の69件中23件(33.3%)から、2023年には53件中24件(45.3%)となり(表1)、双方で10%以上検出率が向上した。

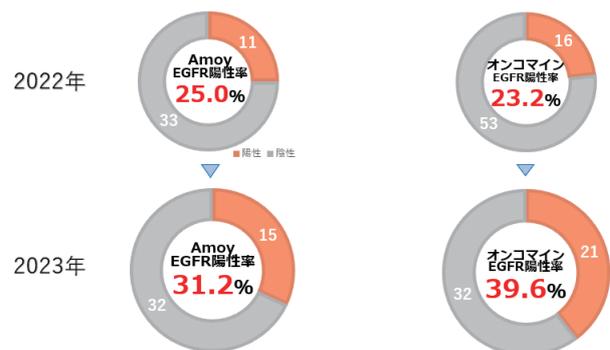
表1 マルチプレックス検査における全遺伝子変異検出率



(2) マルチ検査におけるEGFR遺伝子変異検出率の2022年と2023年の比較

Amoy DxのEGFR遺伝子変異検出率は、2022年においては44件中11件(25.0%)であったのに対し、2023年には47件中15件(31.2%)となった(表2)。また、オンコマインDxでの検出率は、2022年の69件中16件(23.2%)から、2023年には53件中21件(39.6%)となり(表2)、EGFR遺伝子変異においても、双方の検査で検出率が向上し、特にオンコマインDxでは10%以上向上した。

表2 マルチプレックス検査におけるEGFR遺伝子変異検出率



- (3) 当院の2022年のマルチ検査におけるEGFR遺伝子変異の検出率と全国平均の比較

生検検体のAmoyDxにおける当院の2022年のEGFR遺伝子変異検出率は、42件中11件(26.2%)であり、全国平均は27.6%であった(表3)。手術検体のオンコマインDxにおける2022年のEGFR遺伝子変異検出率は、53件中13件(24.5%)であり、全国平均は30.2%であった(表3)。AmoyDxは同程度で、オンコマインDxでは全国平均をやや下回る結果であった。

表3 2022年 マルチ検査におけるEGFR遺伝子変異検出率

AmoyにおけるEGFR遺伝子変異検出率			オンコマインにおけるEGFR遺伝子変異検出率		
	全国平均	2022年 当院		全国平均	2022年 当院
生検 検体	27.6% (91施設)	26.2% (11/42)	手術 検体	30.2% (100施設)	24.5% (13/53)

- (4) 当院の2023年のマルチ検査におけるEGFR遺伝子変異の検出率と全国平均の比較

生検検体のAmoyDxにおける当院の2023年のEGFR遺伝子変異検出率は、45件中14件(31.3%)であり、全国平均は27.6%であった(表4)。手術検体のオンコマインDxにおける2022年のEGFR遺伝子変異検出率は46件中17件(37.0%)であり、全国平均は30.2%であり(表4)、双方の検査において全国平均を上回った。

表4 2023年 マルチ検査におけるEGFR遺伝子変異検出率

AmoyにおけるEGFR遺伝子変異検出率			オンコマインにおけるEGFR遺伝子変異検出率		
	全国平均	2023年 当院		全国平均	2023年 当院
生検 検体	27.6% (91施設)	31.1% (14/45)	手術 検体	30.2% (100施設)	37.0% (17/46)

- (5) 当院の2023年のマルチ検査におけるEGFR遺伝子変異検出率と全国平均のシングル検査のEGFR遺伝子変異検出率の比較

EGFRシングル検査を生検で10例以上実施した60施設での平均は37.5%であり、当院の2023年の生検AmoyDxの検出率は、47件中15件(31.9%)であった(表5)。EGFRシングル検査を手術検体で10例以上実施した20施設での平均は42.9%であり、当院の2023年の手術検体オンコマインDxでは53件中21件(39.6%)であった(表5)。当院マルチ検査におけるEGFR遺伝子変異の検出率について、シングル検査の全国平均と比較した結果、生検検体および手術検体ともにシングル検査の検出率に近づけることが出来た。

表5 EGFR変異検出率 シングルプレックス検査との比較

	全国平均 シングル EGFR検出率	2023年 当院 マルチにおける EGFR検出率
生検検体	37.5% (60施設)	31.9% (15/47)
手術検体	42.9% (20施設)	39.6% (21/53)

## 考 察

EGFR遺伝子変異のシングル検査はリアルタイムPCR法を測定原理としており、Hot spot領域の変異に対する検出が対象で、マイナー変異には対応していない一面もある。一方、マルチ検査においてはRETなど低頻度のドライバー遺伝子の検出も可能であるが、検体量が多く必要で核酸品質も解析結果に影響を与えるため、検出感度は一般にシングル検査の方が高いとされており<sup>3)</sup>、それらを踏まえ考察する。

まず、生検検体の検体量不足の改善策について考察する。生検検体は、一般に微小であることが多いが、マルチ検査のオンコマインDxでは特に、NGSを測定原理としているため、一定量の検体量が必要である。検体量を考慮せず出検すると、解析不能になるリスクが高く、生検検体の無駄な消費や治療開始の遅延を招く可能性がある。したがって、各症例における検体量と腫瘍含有率に基づき、必要枚数を適切に判断して出検することで、微小検体でも検体量不足による解析不能を防止に繋がったと考えられる。また、腫瘍細胞の周囲には、リンパ球や線維芽細胞など、変異の無い非腫瘍細胞が多く存在する。それらの細胞も一括して解析を行うと、解析は成功するものの、バリエーション頻度(variant allele frequency: VAF)が低くなり、偽陰性の原因となる。そのため、マイクロダイゼクションを行うことで、検体中の腫瘍含有率が上昇し、偽陰性の防止に繋がり、検出率向上の要因になったと推測する。

次に、手術検体の核酸品質低下防止策について考察する。手術検体では固定前プロセスの煩雑さなどから、生検検体に比べ、核酸品質や核酸収量が低くなる傾向がある<sup>5)</sup>。核酸品質低下の原因としては、核酸の断片化が挙げられる。NGSを用いた解析法では、特に核酸の断片化がターゲット領域の増幅を妨げる原因となる。未固定の状態は、組織中に含まれる核酸分解酵素の影響を受け、核酸の断片化をもたらす、品質低下を招くこととなる<sup>6), 7)</sup>。さらに、組織中に含まれる壊死成分や赤血球も核酸分解酵素を含有しており、核酸品質低下の原因となるとされている<sup>5)</sup>。ホルマリン固定の改善策を実施することで、核酸の品質保持が可能となり、遺伝子変異の検出率向上に寄与したと考えられる。その他に、当院では、P因子診断の障害になる可能性が懸念されるものの、臨床医が臓器摘出後に検体の腫瘍部分に割を入れ、固定を行って

ることも核酸品質保持に有用であり、検出率向上の結果に大きく影響した可能性もある。

また、マルチ検査の2年間での提出数100件のうち解析不能例はなく、EGFR シングル検査へ提出した件数は10件に留まっていた。それら10件は、臨床医はマルチ検査を希望していたが、病理で解析不能になる可能性が高いと判断し、やむを得ずシングル検査へ提出した件数である。検査の大部分をマルチ検査に提出しているにも関わらず、これらの取り組みにより検出率を向上できたことは、患者に有益な治療がもたらされたものと思われる。

## 結 語

今回我々は、生検検体では量不足による解析不能防止のため症例ごとに必要な薄切枚数を算出し、手術検体では核酸品質低下防止のためホルマリン固定条件を改善する取り組みを行った。それらの取り組みにより、マルチ検査における肺がん遺伝子変異の検出率は向上した。

肺癌診療における病理検体を用いた遺伝子変異の検出は分子標的薬選択に重要な役割を果たす。低頻度遺伝子変異検出のため、マルチ検査が施行されているが、偽陰性となった場合、治療の機会を逸することになり、患者に不利益を及ぼす。今回の取り組みにより、臨床医のマルチ検査に提出したいという要望に応えながら、マルチ検査と比較し感度が良いとされるシングル検査の検出率に引けを取らない結果が得られた。

今後も、さらに精度の高い遺伝子検査を目指し、過固定や未固定による核酸品質低下防止策を講じて、さらなる遺伝子検査の精度向上に努めていきたい。

## 引 用 文 献

- 1) 石川 仁(ガイドライン検討委員会委員長)：肺癌診療ガイドライン—悪性胸膜中皮腫・胸腺腫様含む2024年版 ver1.1 [internet]. <https://www.haigan.gr.jp/publication/guideline/examination/2024/> [accessed 2025.8.15]
- 2) Meina Wang, Poy S Herbset, Chris Boshoff : Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer. *Nat Med* 2021 ; 27(8) : 1345-1356.
- 3) 日本肺癌学会バイオマーカー委員会編：肺癌患者におけるバイオマーカー検査の手引き. 2) バイオマーカー検査の流れとマルチプレックス遺伝子検査(2025年8月作成) [internet]. <https://www.haigan.gr.jp/publication/guidance/inspection/> [accessed 2025.8.15]
- 4) 日本肺癌学会バイオマーカー委員会：EGFR 遺伝子変異検出率に関するアンケート結果(バイオマーカー委員会より). EGFR 遺伝子変異率を基にしたバイオマーカー検査の適正性に関するアンケート調査(第一報) [internet]. <https://www.haigan.gr.jp/news/796/> [accessed 2025.8.15]
- 5) 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 [internet]. [https://pathology.or.jp/genome\\_med/](https://pathology.or.jp/genome_med/) [accessed 2025.8.15]
- 6) C Williams, F Pontén, C Moberg, et al : A high frequency of sequence alterations is due to formalin fixation of archival specimens. *Am J Pathol* 1999 ; 155(5) : 1467-71.
- 7) Hongdo Do, Alexander Dobrovic : Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues : causes and strategies for minimization. *Clin chem* 2015 ; 61(1) : 64-71

## Abstract

## Our Approach to Improve the Detection Rate of Gene Mutations in Lung Cancer

Kanako Miyagi, Miyuki Noda, Shouta Inoue, Shiho Tanaka, Tomohiro Takegoshi and Masashi Yamada

Department of Clinical Laboratory Technology, Kyoto City Hospital

Gene mutation testing in lung cancer is essential for selecting molecularly targeted drugs, and its accuracy is critical. However, multiplex assays often have lower sensitivity compared to singleplex assays. Therefore, to improve mutation detection rates, we increased the number of tissue sections in biopsy specimens to prevent analysis failure due to insufficient sample volume. In surgical specimens, we optimized formalin fixation conditions to preserve nucleic acid quality. As a result, the gene mutation detection rate improved, and we report these findings.

(J Kyoto City Hosp 2025; 45:18-22)

Key words: Companion diagnosis of lung cancer, EGFR gene mutations, Multiplex test for lung cancer, Detection rate of gene mutations