

oncotype DX<sup>®</sup>

Breast Recurrence Score

# オンコタイプDX 乳がん再発スコア<sup>®</sup>プログラム 検体作製ガイド

監修：大迫 智先生

公益財団法人 がん研究会 がん研究所 病理部

公益財団法人 がん研究会 有明病院 病理部





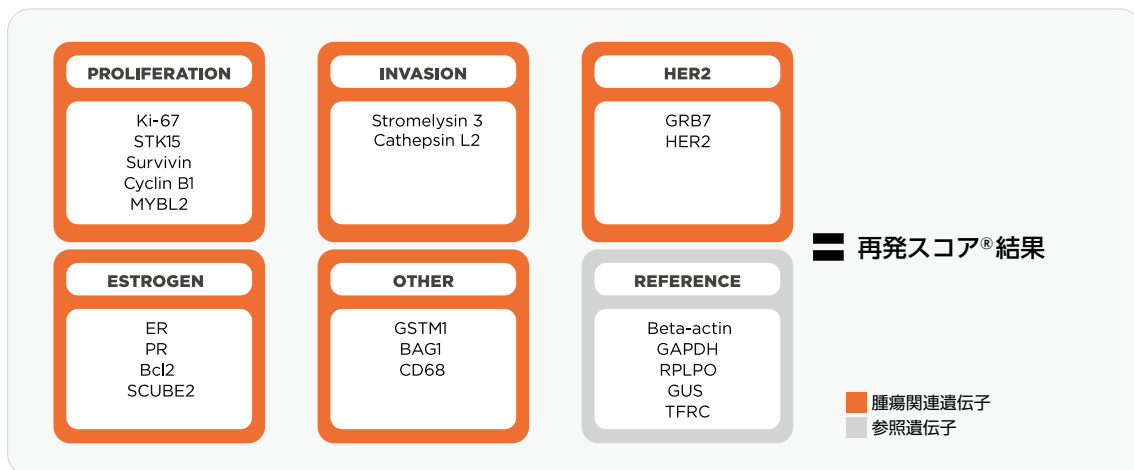
## 検査の対象

オンコタイプDX乳がん再発スコアプログラム(以下、本検査)の対象は、以下の2つの条件を満たす早期浸潤性乳癌患者です。

- ホルモン受容体陽性\*かつHER2陰性  
\*エストロゲン受容体(ER)陽性かつ/またはプロゲステロン受容体(PgR)陽性
- リンパ節転移陰性、微小転移またはリンパ節転移陽性1～3個

## 解析遺伝子

本検査はリアルタイム定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR法)を用いて腫瘍組織内における以下21遺伝子(腫瘍関連遺伝子16個、参照遺伝子5個)の遺伝子発現量を測定します。



## 得られる情報

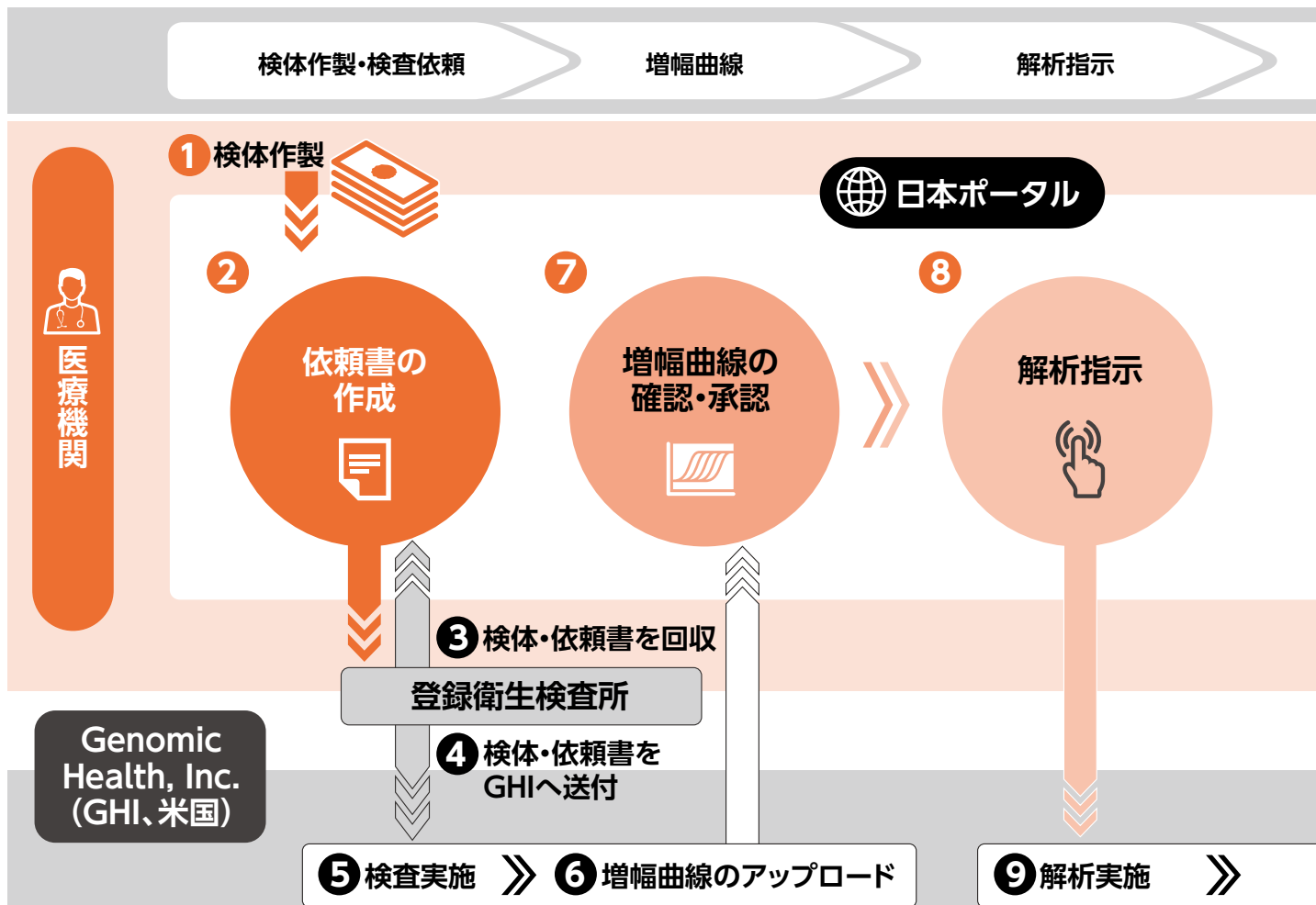
結果報告書では、再発スコア結果や定量的単一遺伝子スコアとともに、補助資料(9年遠隔再発率、化学療法の上乗せ効果、参考：臨床試験データ)を提示します。

- 再発スコア  
解析遺伝子の発現レベルを基に、0～100の再発スコア結果を算出します。
- 定量的単一遺伝子スコア  
ER、PgRおよびHER2遺伝子について、RT-qPCR法で測定した遺伝子のRNA発現量を示します。ただし、それらは品質管理を目的とした情報であり、検査結果を表すものではありません。

## 検査フロー

本検査は、エグザクトサイエンス株式会社の日本ポータル（以下、日本ポータル）にて、検査依頼、解析指示、解析結果の確認などを行うことができます。医療機関が作製した検体・依頼書は、登録衛生検査所（株式会社エスアールエル：以下、SRL）にて回収、Genomic Health, Inc.\*（以下、GHI）に送付され、本検査が行われます。

※：Genomic Health, Inc. は本検査を開発した会社で、エグザクトサイエンス株式会社が所属する Exact Sciences Corp. の一員です。



### GHI

#### ⑤検査実施

受領した検体及び依頼書を基に、検査を実施します。

#### ⑥増幅曲線のアップロード

日本ポータル上に増幅曲線をアップロードします。

✉ アカウント作成時に登録いただいたメールアドレスに通知

#### ⑨解析実施

増幅曲線から再発スコア®結果を算出し、リンパ節転移の有無と算出された再発スコア結果に基づいた結果報告書を作成します。

#### ⑩再発スコア結果報告書のアップロード

GHIが再発スコア結果報告書を日本ポータル上にアップロードします。

### GHIにおける検査プロセス

#### 1) 検体の受付

依頼書に記載されている検体管理番号とスライドガラスに記載されている検体管理番号が一致しているかを確認し、検査が開始されます。一部の検体スライドにヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）を行います。

#### 2) 検体の評価

HE染色スライドを用いて、病理医による検体の組織量・質の評価を行います\*。

#### 3) 検査の開始

未染色スライドの腫瘍組織からRNAを抽出します。

※:検体が基準を満たしていない場合には、検体の再提出を依頼することもあります。

解析結果  
最終報告書

解析結果  
検査報告書

11

最終報告書の  
受け取り・  
ダウンロード・印刷



登録衛生検査所

12 検査報告書のお届け

10 再発スコア結果報告書のアップロード

#### 4) RNA定量

抽出されたRNAの収量を定量します。

#### 5) 逆転写

RNAを逆転写し、cDNAに変換します。

#### 6) qPCR

cDNAをリアルタイムPCR装置を用いて定量します。

#### 7) 増幅曲線の解析

再発スコア結果を算出します。

### 医療機関

#### ① 検体作製

検体作製について、詳しくは6-8ページを参照ください。

#### ② 依頼書の作成

日本ポータルに患者情報、医師・医療機関の情報、検体情報などを  
入力し、依頼書を印刷します。

#### ⑦ 増幅曲線の確認・承認

GHIがアップロードした増幅曲線を日本ポータル上で確認します。

#### ⑧ 解析指示

日本ポータル上で、解析開始を指示します。

#### ⑩ 最終報告書の受け取り・ダウンロード・印刷

日本ポータル上で作成された最終報告書(PDF)を確認し、  
ダウンロードまたは印刷をします。

### 登録衛生検査所

#### ③ 検体・依頼書を回収

医療機関から検体・依頼書(SRL入力用、SRL営業所控、検査依頼書/  
封入用)を回収します。

#### ④ 検体・依頼書をGHIへ送付

検体・依頼書(検査依頼書/封入用)をGHIに送付します。

#### ⑫ 検査報告書のお届け

医療機関に登録衛生検査所が発行する検査報告書をお届けします。

### 検体の種類

- 腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体をご提出いただきます。
- 手術または生検 (針生検など) で採取された組織で作製してください。
- 脱灰処理を行った検体も受け付けていますが、RNAの品質低下により検査が実施できない場合があります。

### 検体の固定方法

- 固定液は、ホルマリン溶液を用いてください<sup>※1</sup>。
- ホルマリン溶液の濃度、種類 (中性緩衝、非緩衝) および固定時間などについての規程はありません。
- 固定不良や過固定などの検体では、RNAの品質低下により検査が実施できない場合があります。
- 固定方法を含むFFPE検体の適切な取扱いについては、日本病理学会『ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程』を引用した本冊子10~11ページを参照ください。
- FFPE 検体の作製に関して施設基準がある場合は、その基準に従って行ってください。

※1：日本病理学会『ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程』の92ページまたは131ページを参照ください。

### FFPEブロックの選択

- 2mm以上の浸潤した腫瘍、または不連続の場合は切片全体で5%以上の腫瘍細胞が必要です<sup>※2</sup>。
- 複数のブロックがある場合は、以下の条件を考慮して最適なブロックを1つ選択してください。
  - ① より大きな浸潤部位を含むブロック
  - ② 腫瘍内で悪性度が異なる場合は、最も悪性度が高いブロック
  - ③ 固定が良好なブロック
  - ④ 切開・摘出生検や摘出標本からの腫瘍組織採取などによる空洞が含まれないブロック
- ブロックに出血、壊死、または脂肪組織が含まれていても構いません。それらはRNAを多く含まないため、検査結果に大きな影響を与えません。

※2：微小浸潤癌 (1mm以下) は受け付けていません。また、浸潤径が2mm以下の腫瘍の場合、検査結果を出すことができない可能性があります。

### 提出スライドの作製

**注** シランなどのコーティングスライドをご使用ください。

- FFPE ブロックから厚さ5 $\mu$ mの連続組織切片を薄切し、未染色スライド (プレパラート) を15枚作製してください<sup>※3</sup>。
  - ① スライドは、25mm x 75mmサイズを使用することを推奨しています (最大でも26mm x 76mmまでとしてください)<sup>※4,5</sup>。
  - ② スライドに載せる切片の向きは、必ず揃えてください<sup>※6</sup>。
  - ③ 伸展器の使用は、パラフィンを溶かし、マイクロダイセクションが必要となった場合に組織の切断が困難になることがあるため、使用をお控えください。
  - ④ 未染色スライドにカバーガラスを載せないでください。
- マイクロダイセクションはGHIで実施するため、ご施設で行っていただく必要はありません。

※3 本検査では、切片の最小表面積は規定していません。

※4 検体ごとに毎回新しいマイクロトームブレードを使用してください。

※5 薄切の際は、素手での操作は避け、使い捨ての手袋などを使用してください。

※6 薄切片掬いの際は、コンタミネーションを防止するために清潔な水を使用してください。

## スライドへの必要情報の記載 (図1)

- 作製したスライドには、依頼書(日本ポータル上)に登録した検体管理番号を記載してください。
- 検体管理番号の記載は、英数字、記号、スペースを使用していただけます。
- 日本ポータル上とスライド上に記載の検体管理番号に軽微な齟齬(ハイフンかスペースの違い、ハイフン以降の枝番の有無)などがある場合は、依頼書(日本ポータル上)の検体管理番号を正として扱います。
- 日本ポータル上とスライド上に記載された検体管理番号に大きな齟齬がある場合は、医療機関へのお問い合わせが発生するため、検査結果の提供に通常より時間がかかる場合があります。  
(日本ポータル上: S22-123、スライド上: S23-123)
- 薄切された順序が分かるように、各スライドにシーケンス番号(1~15)を記載してください。
- エグザクトサイエンス® 検体輸送用BOXの上蓋にあるバーコードラベルを各スライドに貼付してください。
- バーコードラベルは、GHI送付用の依頼書「検査依頼書/封入用」の指定箇所(図2)にも貼付してください。
- 検体管理番号、シーケンス番号、バーコードラベルが揃っていない場合は、お問い合わせさせていただくか、解析に時間がかかることがありますのでご注意ください。



## 検体の提出方法

- スライドを乾燥させた後、エグザクトサイエンス® 検体輸送用 BOX に同梱されているオブジェクトケース (5枚入り×3個) に入れてください。
- オブジェクトケースとGHI送付用の依頼書『検査依頼書 / 封入用』をエグザクトサイエンス検体輸送用 BOX に入れて、室温で保管してください。

\* ご提出いただいた検体の返却はできません。



エグザクトサイエンス検体輸送用BOX

EXACT SCIENCES		検査依頼書/封入用 OR000000000	SRL ID-0 ラベル貼り付け位置
オンコタイプ DX 乳がん再発スコアプログラム Requisition Form			
SECTION I. PATIENT INFORMATION		SECTION II. ORDER INFORMATION	
JP-PT12345678 Anonymized Patient ID (EXAS管理ID) 01/01/1900 Anonymized Patient DOB (Day/Month/Year) (匿名化生年月日) <input checked="" type="checkbox"/> Female <input type="checkbox"/> Male		dd/mm/yyyy Order Date (Day/Month/Year) (検査依頼日) SRL, Inc. Distributor (登録衛生検査所) 1 検体数	
		OHIO-2, ODX Breast 項目名・項目コード OR000000000 Order ID (依頼ID)	
ORDER DECLARATION			
(1) 患者さんの乳がんは、検査対象である。 (2) 正確な臨床情報を提供している。 (3) 私はこの依頼を行う権限を有する医師である。 (4) 患者さんから検査を行うことの同意を取得していると共に、ポータルに入力された患者の個人情報、エグザクトサイエンス株式会社、株式会社エスアールおよびGenomic Health, Inc.(米国)に検査目的で提供され、また個人情報の一部は、本検査の測定・解析機関であるGenomic Health, Inc.(米国)および、製造販売元であるエグザクトサイエンス株式会社に提供され、本検査の品質向上や品質維持のために用いられることがあることを患者に説明し、同意を取得している。 <input checked="" type="checkbox"/> 上記の点を確認しました。			SRL ID-1ラベル貼り付け位置
<small>オンコタイプDX乳がん再発スコアはGenomic Health, Inc.の登録商標です。Exact SciencesはExact Sciences Corporationの登録商標です。©2021エグザクトサイエンス株式会社</small>			

GHI送付用の依頼書『検査依頼書 / 封入用』

## 検体の再提出方法

- 初回提出時の検体の性状によっては、検査が実施できない場合があります。希望により、再度検体の提出が可能な場合があります。
- 再提出する場合は、日本ポータルにて新たに検査依頼を提出してください。
- その際は、必ず元の依頼に記載されたものと同じ患者 ID、任意で患者氏名を入力されていた場合は同じ氏名を入力し、検査依頼をしてください。

\* 詳しくはポータルユーザーガイドの 37 ページをご参照ください。

## 検体の追加提出方法

- 初回提出時の検体の性状によっては、検体を追加で提出していただく場合があります。
- 追加の検体が必要となった場合は、SRLより検査依頼医師宛に追加検体の提出が可能かどうかの連絡が届きます。
- 追加提出が可能な場合は、指定された枚数のスライドをご用意ください。
- SRLより日本ポータルの該当依頼の検査依頼書にコメント\*がアップデートされた旨、連絡があります。
- 追加スライドの提出準備が完了し、検査依頼書にコメントが記載されていることを確認した後に、「検査依頼書 / 封入用」(Requisition Form3枚目)を印刷し、検体と共に SRL に提出してください。

\* 詳しくはポータルユーザーガイドの 47 ページをご参照ください。

※ Additional: ○○ slides (DIRECT TO: GAICHU-KAKARI) と示されます。



---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

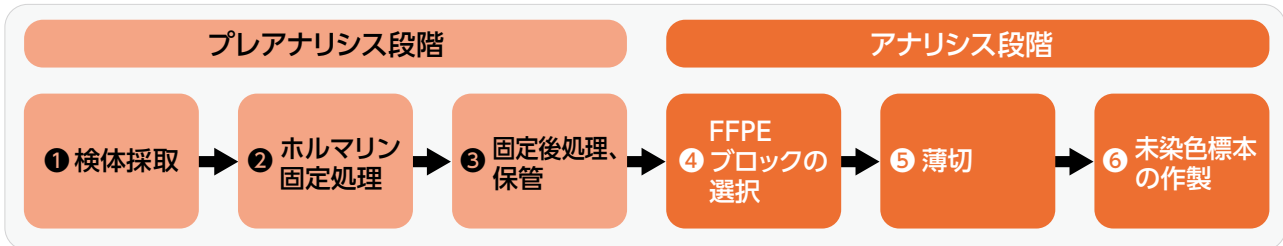
---

国内におけるFFPE検体の取扱い規程（参考情報<sup>※</sup>）

※参考情報として『ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程』を掲載しておりますが、この規程に沿って作製された検体以外も受け付けています。

- FFPE 検体では、プレアナリシス段階において多数の影響因子が知られています<sup>1)</sup>。本検査を高い精度で行うためにも、FFPE検体の品質管理は重要です。
- 本項では、プレアナリシス段階における FFPE 検体の適切かつ標準的な取扱い方法について紹介します。

## 本検査における医療機関による FFPE 検体作製の流れ



日本病理学会 編. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. P.129-155、羊土社、2019 より作成

【ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程】<sup>1)</sup>

## ホルマリン固定パラフィン包埋組織・細胞検体の適切な取扱い—プレアナリシス段階

## a) 固定前プロセス

## 《切除・採取直後の組織の取扱い》

1. 手術により切除された組織は、摘出後は速やかに冷蔵庫等 4℃ 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 (C)。
2. 内視鏡的に切除等された消化管組織等、比較的小型の組織については、速やかに固定液に浸漬し固定を行うことが望ましい (C)。
3. 生検により採取された組織は、速やかに固定液に浸漬し固定を行う (C)。
4. ホルマリン固定パラフィン包埋化を行う細胞検体は、必要な前処理を適切に行った後に、可及的速やかに固定液に浸漬し固定を行う (C)。
5. 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 (N)。

## [補足説明]

- 1- 補: ●これまでの報告では、乳癌の切除から固定までの時間が、ISH 法 (HER2) では 2 時間、IHC 法 (ホルモン受容体) では 1 時間を超えると、検査結果に影響を与えるとされており、これを踏まえ、乳癌の ASCO/CAP のガイドラインでは 1 時間以内の固定を推奨している。
  - 一般的な固定液であるホルマリンの浸透速度は 1mm/ 時間程度であることを考慮し、特に手術検体では、切り出しまでに十分な固定が行える程度の厚みまで、固定前に適切に入割することが推奨される (C)。
- 1~3- 補: ●臨床研究等への利用を考慮する場合、いずれの組織も切除・採取後は可及的速やかに固定液に浸漬し、固定を行うことが求められる (R)。

## ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程における凡例

- (C): 日常診療において推奨される事項  
 (R): 臨床研究等への利用を考慮する場合に推奨される事項  
 (N): 回避すべき事項

## b) 固定プロセス

### 《ホルマリン固定液の組成》

6. ホルマリン固定液の組成は、酸性や非緩衝ではなく、中性緩衝ホルマリン溶液を固定に用いることが望ましい (C)。
7. ホルマリン濃度は 10% (3.7% ホルムアルデヒド) を用いることが望ましい (C)。

#### [補足説明]

- 6、7- 補: ●現在実施されている IHC 法を用いた複数のコンパニオン診断において、すでに 10% 中性緩衝ホルマリン溶液が推奨されている。IHC 法によるタンパク質発現の検索は、ホルマリン固定液の組成と濃度に影響を受けることが示されている。また  $\Delta Ct$  値や DIN 値を指標とした DNA 品質に関する検討においても 10% 中性緩衝ホルマリン溶液の使用を支持する結果が得られている。
  - 国際共同企業治験等において FFPE 検体の提出が求められる際、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定された FFPE 検体との条件が必須となる場合もある。

### 《ホルマリン固定時間》

8. 組織検体(手術検体、内視鏡的に切除された検体、生検検体) では、コンパニオン診断等の推奨を考慮し、6 ~ 48 時間の固定を行うことが望ましい (C)。
9. 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 (N)。

### 《ホルマリン固定処理に使用する固定液量》

10. ホルマリン固定に使用する固定液の容量は、組織量に対し 10 倍量の固定液を用いることが望ましい (C)。

### 《ホルマリン固定処理時の温度》

11. ホルマリン固定時の処理温度は、室温でよい。

#### [補足説明]

- 8- 補: ●ホルマリン固定による核酸品質への影響として、核酸の断片化の他、核酸塩基の化学修飾が知られており、特にシトシンの加水分解に伴う脱アミノ化によりウラシルに置換し、その後の PCR 増幅反応によってチミンが生成 (C>T 置換) することが知られている。この反応は固定時間の延長により増加し、72 時間から顕著となることから、48 時間以内の固定が望ましい (C)。

## c) 固定後プロセス

### 《脱灰処理》

12. 硬組織を含む検体をゲノム診断に供する可能性がある場合は、酸脱灰を回避し (N)、EDTA 脱灰を行うべきである (C)。

**⚠ 本検査では、脱灰処理を行った検体も受け付けていますが、RNAの品質に影響を与える可能性があります。**

### 《組織のプロセッシング》

13. 従来型の組織プロセッサ(密閉式自動固定包埋装置)の使用は問題ないが、使用薬剤の管理(交換頻度等)の影響については不明である。また迅速型(連続迅速自動固定包埋装置)では、いまだ十分なデータは得られていない。

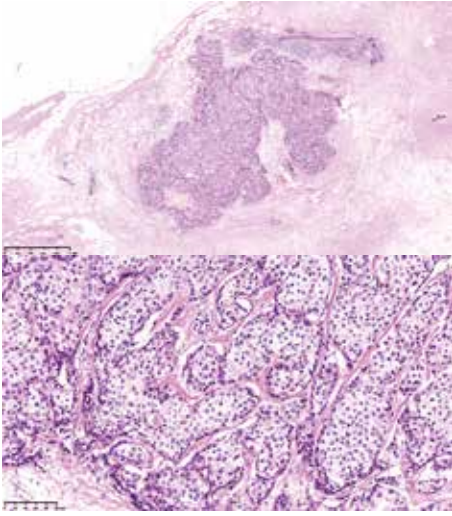
### 《FFPEブロックの保管》

14. FFPEブロックの保管は、室温でよいが、多湿を避け冷暗所が望ましい(C)。ゲノム診断を目的として製された FFPE ブロックは、冷蔵下の保管が望ましい (R)。

### 《未染色 FFPE 標本の保管》

15. 未染色 FFPE 標本の形態で保管する場合は、低温保管やパラフィンコーティング等の核酸品質劣化を防止する対応を行うことが望ましいが、原則薄切後、時間が経過した未染色 FFPE 標本のゲノム診断への使用は避け (N)、可能な限り FFPE ブロックから再薄切をすることが望ましい (C)。

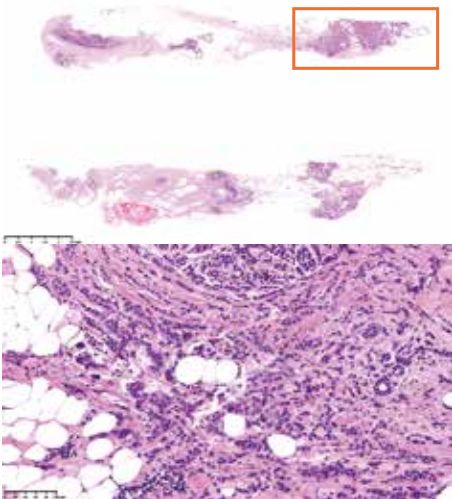
## 手術検体



- 術式：Bt+SN
- 組織型：浸潤性乳管癌
- 浸潤径：3mm
- 核グレード：2
- ER(+), PgR(+), HER2(1+), Ki67：35%
- リンパ節転移：0/3
- 術後 TNM 分類：pT1aN0M0
- 腫瘍細胞割合：60%
- 癌の面積：5.0mm<sup>2</sup>

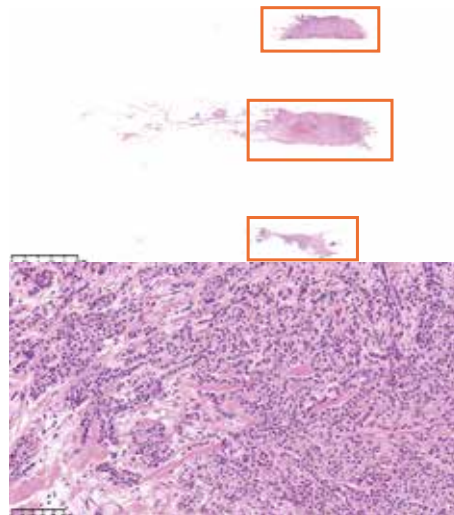
## 針生検検体

## 1. 吸引式乳房組織生検



- 針サイズ：13ゲージ
- 組織型：浸潤性乳管癌
- 標本上の最大浸潤径：3mm
- 核グレード：1
- ER(+), PgR(+), HER2(0)
- 術前 TNM 分類：cT1bN0M0
- 腫瘍細胞割合：25%
- 癌の面積：3.8mm<sup>2</sup>

## 2. コア針生検



- 針サイズ：14ゲージ
- 組織型：浸潤性乳管癌
- 標本上の最大浸潤径：3mm
- 核グレード：1
- ER(+), PgR(+), HER2(1+)
- 術前 TNM 分類：cT1aN0M0
- 腫瘍細胞割合：70%
- 癌の面積：5.8mm<sup>2</sup>

## 監修医コメント

オンコタイプ DX 乳がん再発スコア<sup>®</sup>プログラムは、癌の遺伝子発現から再発スコアを算出する多遺伝子アッセイです。その再発スコアから、内分泌療法単独の9年遠隔再発率および化学療法の上乗せ効果を予測することで、個々の患者さんに適した薬物療法の選択をサポートします。

本検査では、癌のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用います。そのため、本検査を高い精度で実施するためには、ホルマリン固定、ブロック選択、未染色スライド作製および提出の各段階で検体の適切な取扱いが不可欠です。適切な検体作製・提出の一助として本冊子をご活用ください。

## 検査の対象

**Q1** 本検査の対象について、浸潤径は関係しますか？

下記 Q2 に記載のある検査可能な組織型で、2mm以上の浸潤した腫瘍または不連続の場合は切片全体で5%以上の腫瘍が含まれる検体をご提出ください。

**A1** 非浸潤性癌や微小浸潤癌(Paget 病を含む)は対象外です。また、浸潤径が2mm以下の腫瘍の場合、検査結果を出すことができない可能性があります。

**Q2** 本検査で検査ができない組織型はありますか？

組織型については、以下をご確認ください。

**A2** 一部の稀な組織型はエビデンスがないために、検査の対象外です。また、葉状腫瘍や非上皮性腫瘍は、検査の対象外です。

## 検査可能な組織型は以下の通りです。

- I. 上皮性腫瘍
  - B-3. 浸潤癌
    - a. 浸潤性乳管癌
      - (1) 腺管形成型 (2) 充実型
      - (3) 硬性型 (4) その他
    - b. 特殊型
      - (1) 浸潤性小葉癌 (2) 管状癌
      - (3) 篩状癌 (4) 粘液癌
      - (5) 髄様癌 (6) アポクリン癌
      - (7) 化生癌 (8) 浸潤性微小乳頭癌
      - (11) その他
        - ・浸潤を伴う被包型乳頭癌
        - ・浸潤を伴う充実乳頭癌
        - ・神経内分泌癌
        - ・印環細胞癌
        - ・脂質分泌癌
        - ・好酸性癌
        - ・グリコーゲン淡明細胞癌

## 検査不可能な組織型は以下の通りです。

- I. 上皮性腫瘍
  - B-1. 非浸潤癌
    - a. 非浸潤性乳管癌 (DCIS)
    - b. 非浸潤性小葉癌 (LCIS)
  - B-2. 微小浸潤癌
  - B-3. 浸潤癌
    - b. 特殊型
      - (9) 分泌癌 (10) 腺様嚢胞癌
      - (11) その他
        - ・粘表皮癌 ・多型癌
        - ・脂腺癌 ・腺房細胞癌
        - ・筋上皮癌
  - B-4. Paget 病
- II. 結合織性および上皮性混合腫瘍
- B. 葉状腫瘍
- III. 非上皮性腫瘍
  - A. 間質肉腫
  - B. 軟部腫瘍
  - C. リンパ腫および造血器腫瘍

日本乳癌学会『臨床・病理 乳癌取扱い規約 第18版』に基づき分類

**Q3** 術前内分泌療法を行った症例の手術検体で検査することは可能ですか？

**A3** 可能です。ただし、本検査は術前内分泌療法施行後の乳癌組織に対する妥当性は確認されていないことをご理解の上ご依頼ください。術前内分泌療法前の生検検体などがあれば、そちらをご提出いただくことを推奨しています。

**Q4** 乳房内に再発した症例は検査の対象になりますか？

**A4** 再発症例は検査の対象外となります。

## 検体の選択

**Q5** 両側乳癌や多発癌の場合、どの検体を提出すればよいでしょうか？

**A5** 最も悪性度が高い検体を提出いただくことを推奨しています。  
また、複数の検体を検査することも可能ですが、詳細は弊社担当者にご確認ください。

**Q6** リンパ節転移巣の検体を提出することは可能ですか？

**A6** リンパ節転移巣の検体は受け付けておりません。原発巣の検体をご提出ください。これまで本検査の臨床試験ではすべて原発巣のみを使用しているため、検査の妥当性が確認されていません。

**Q7** 検体が15枚に満たない場合はどうしたらいいですか？

**A7** ポータル上で検査依頼の入力時、3| 検体「検体に関する追加コメントや補足説明」にその旨を入力してください。  
入力例 :8 slides

---

### 参考文献

1) 日本病理学会 編. ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程. P.129-155、羊土社、2019



**文献請求先及び問い合わせ先**

エグザクトサイエンス株式会社  
〒100-6509

東京都千代田区丸の内 1 丁目 5 番 1 号  
新丸の内ビルディング 9F EGG Japan

**カスタマーサービス**

フリーダイヤル：0120-639-323

受付時間：午前 9 時～午後 5 時（土日祝日および弊社休業日を除く）

Email : [cs-japan@exactsciences.com](mailto:cs-japan@exactsciences.com)