

NPM1 遺伝子変異-微小残存病変(MRD)における Laboratory Developed Test(LDT)定量法の開発

◎内山 裕貴¹⁾、鈴木 孝一朗¹⁾、元岡 大祐²⁾、中田 潤³⁾
一般財団法人阪大微生物病研究会¹⁾、大阪大学微生物病研究所²⁾、大阪大学医学系研究科³⁾

【はじめに】急性骨髄性白血病（AML）の約 30%に認められる NPM1 遺伝子変異は、疾患の予後予測や治療方針の決定において極めて重要な分子マーカーである。代表的な変異型である MutA、MutB、MutD をはじめとし、複数の変異タイプが報告されており、これら変異を保有する症例では、治療後の微小残存病変（MRD）の定量は再発リスクの予測や治療効果判定に有用とされる。現在、NPM1 変異の MRD 測定には市販のキットが使用されているが、①対応可能な変異型が限られていること、②高コストであること、③海外製品であることから供給安定性に課題がある。これらの問題を解決すべく、本研究では、国内で安定的に供給可能な、かつ低コストで多様な NPM1 変異型に対応可能な MRD 定量法における LDT の開発を目指した。

【対象・方法】まずは、人工合成 DNA を活用し、独自設計したプライマーならびにプローブにおける反応性について TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR により確認した。続いて、NPM1 変異を有する AML 患者の骨髄液由来 PBMC から RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA

を合成後、リアルタイム PCR により NPM1 変異 mRNA の定量を実施し、ABL 遺伝子を内在性コントロールとして相対定量（NPM1 / ABL [%]）を行った。また、本検出系の妥当性を評価するため臨床検体 13 件を活用し、陽性基準を $\text{NPM1 / ABL (\%)} = 0.1\%$ として市販のキットとの一致率を調べた。

【結果】人工合成 DNA において、独自設計したプライマーならびにプローブにおいて、リアルタイム PCR により高感度に検出できること確認した。また、MutA 変異を有する臨床検体において、市販のキットでの測定結果と比較した結果、陽性一致率 100%（6/6）、陰性一致率 100%（7/7）であった。

【考察・まとめ】本研究により開発した NPM1 変異-MRD 定量法(LDT)は、市販のキットと同等以上の性能を有し、かつ安価・安定供給という点で大きな優位性を示した。主要な変異型（MutA、B、D）に加え、多様な変異型への適応が可能であることから、広範な AML 患者への応用が期待される。

デジタル PCR を用いた多発性骨髄腫の *TP53* 欠失評価に関する検討

◎井上 麻比留¹⁾、白石 祐美¹⁾、丸岡 隼人¹⁾、福田 真恵¹⁾、大野 彩¹⁾、大山 幸永¹⁾、高澤 駿太¹⁾、川井 順一¹⁾
独立行政法人 神戸市民病院機構 神戸市立医療センター 中央市民病院¹⁾

【はじめに】多発性骨髄腫(MM)の *TP53* 欠失は重要な予後因子である。*TP53* 欠失は通常、外注検査での蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)法を用いて行われるが、報告までに時間を要する点や腫瘍細胞割合が低い場合に感度が低下する点が課題である。デジタル PCR(dPCR)によるコピー数多型(CNV)解析が FISH 法の代替法となる可能性がある一方で、参照遺伝子の選定や形質細胞分離の影響については不明な部分が多いため、今回検討を行った。

【方法】FISH 法で *TP53* 欠失陰性と判定された MM 患者(陰性群)7 例、および欠失陽性の MM 患者(陽性群)3 例の骨髄液を対象とした。参照遺伝子は RNase P とテロメラーゼ逆転写酵素(TERT)を用いた。腫瘍細胞割合の変化が *TP53* 欠失評価に与える効果を検討するため、形質細胞分離を行い、陽性群においては形質細胞分離前後、陰性群においては分離後の CNV を測定した。陰性群の測定値から参照範囲(平均±2SD)を設定し、その下限値を下回るものを *TP53* 欠失陽性と定義した。

【結果】陰性群における CNV は、RNase P を参照とした場

合は 2.00 ± 0.10 、TERT を参照にした場合は 1.95 ± 0.22 であった。陽性群 3 例中 2 例では、形質細胞分離後に CNV 低下がより明瞭となった(RNase P : $1.68 \rightarrow 1.22$ 、 $1.94 \rightarrow 1.48$)。残りの 1 例では、RNase P を参照遺伝子とした場合、分離後の CNV は 2.07 と低下は明確でなかったが、TERT では 1.02 と明らかな低下を認めた。

【考察】dPCR による *TP53* の CNV 解析は FISH 法による結果と完全一致し、迅速かつ当日中の結果報告が可能な欠失評価法として有用であった。また、形質細胞分離により腫瘍細胞割合が高まることで CNV 低下がより明瞭となり、検出感度が向上した。一部症例では参照遺伝子間で結果の乖離を認めたことから、複数の参照遺伝子を用いた比較検討が *TP53* 欠失評価に有用であると考えられた。【結論】dPCR を用いた CNV 解析において参照遺伝子の選定および形質細胞分離は重要であることが示され、迅速かつ高感度な *TP53* の欠失評価が可能となった。

連絡先 細胞遺伝子検査室 078-302-4321(内 3540)

遺伝子検査室の属人化解消に向けた体制再構築と安全管理体制の強化

◎塚田 野乃香¹⁾、菅野 圭佑¹⁾、江藤 正明¹⁾、西原 永潤²⁾、宮内 昭³⁾、赤水 尚史²⁾
医療法人 神甲会 隈病院 臨床検査科¹⁾、医療法人 神甲会 隈病院 内科²⁾、医療法人 神甲会 隈病院 外科³⁾

【背景】以前の当院の遺伝子検査室は、特定の技師1名に依存する属人化した体制であり、業務の標準化と検査の質に課題を抱えていた。今回、技師2名による複数人体制へと再構築を図り、業務の標準化および安全管理体制を強化したプロセスとその効果について報告する。

【方法】体制の再構築にあたり、以下の2点を重要課題として改善に取り組んだ。①業務の標準化と効率化：詳細な業務マニュアルの作成、従来の運用見直し②検体管理と安全・個人情報保護対策：同意書連動のExcel台帳による検査依頼の早期把握、採血管の廃棄ルールの確立と運用、外部の研究機関への検体移送時における匿名化番号の運用確立と移送漏れ防止体制の構築、Excelを用いた検体リストによる管理の徹底、誤報告防止に向けた検査結果報告時におけるダブルチェックの必須化

【結果】①検体処理から結果報告、付随する周辺業務までを網羅するマニュアルを作成した。これにより業務の個人差が解消され、統一された手順で業務を遂行できるようになった。また、マニュアルを基盤とした業務共有が容易になり、スタッフ間の協力

体制が強化され、検査業務全体の効率化を達成した。②同意書発行に連動したExcel台帳による一元管理(検索・閲覧)を利用したリアルタイムな情報共有により、検査依頼の早期把握、見落とし防止が可能となった。さらに、外部の研究機関への検体移送時には、個人情報保護の観点から完全に匿名化した番号を用いる運用を徹底した。検体リストへの入力ミスを防止するため、バーコードリーダーを導入し、検体とリストの照合精度を大幅に向上させた。あわせて、検査の進捗状況ステータスごとに色分けし、視覚的に識別可能にした。

【考察】本取り組みにより、特定技師への依存から脱却し、2名体制による安全かつ持続可能な遺伝子検査体制を構築できた。特に、マニュアルの標準化、進捗の視覚化といった業務効率化にとどまらず、「同意書確認によるタスク漏れ防止」と「匿名化番号の徹底による個人情報保護」という、医療安全および倫理的リスク管理の双方において、検査室側が主体的なチェック機能を備えられたことは、検査の質保証において極めて重要な意義を持つと考えられる。

連絡先:078-371-3721

バイオバンクにおける臨床検査技師の役割

◎勝亦 柚衣¹⁾、佐藤 伊都子²⁾、森本 耕平¹⁾、白杉 郁¹⁾、中村 恵宣¹⁾、今西 孝充²⁾、千藤 莊²⁾、松岡 広¹⁾
国立大学法人 神戸大学医学部附属病院 バイオリソースセンター¹⁾、国立大学法人 神戸大学医学部附属病院²⁾

【目的】神戸大学医学部附属病院バイオリソースセンター（BRC）は、診療現場で得られる生体試料および診療情報を研究へ提供することを目的として設置された。医師、臨床検査技師、薬剤師、技術員の計7名で研究計画段階から終了まで一貫した支援を行っている。ニーズドリブン型の運用を特徴とし、共同研究機関との協議に基づき、診療科および検査部・輸血部・病理部と連携し最適な試料・情報の収集体制を構築している。本発表では、当センターにおける臨床検査技師の役割について報告する。【取り組み】①ニーズの把握：研究者の要望に基づき、検体条件、検査結果、提出状況、見込み件数、収集時刻などを事前に調査・共有し、必要な臨床情報とともに実施可能性を評価する。②研究計画の立案：臨床研究計画作成時に技術的観点から助言し、検体取扱いや品質確保に加え、採取方法や運用上の課題を整理する。③開始前準備：標準作業手順書（SOP）整備、試料移転書作成、各診療科の協力が必要な場合は運用マニュアルを作成し周知する。さらに研究輸送に際しては配送業者手配や日程調整、スケジュール管理を行う。④

研究実施・管理：検査部との連携体制のもと、全血や血清・血漿、凝固検体、尿等の検体を制限時間内および温度条件下で収集する。多くの検体は搬送システムにより前処理され工程の標準化とタイムログ管理がなされている。⑤検体収集と保管：検査技師は検査結果および臨床情報に基づき検体の適合性と品質を評価し、LIMSにより入出庫・保管・払出を一元管理する。提供時には必要な臨床情報および品質情報を付与し温度管理下で輸送する。⑥関連情報：研究成果を基に学術発表等を行い、バイオリポジトリ技術管理士（BiTA）の取得を目指し、専門性の向上を図る。【結語】BRCにおける臨床検査技師は研究の各段階に関与し、その役割は研究の質と効率を担保するうえで不可欠であり円滑な遂行に寄与している。バイオバンクの国際標準規格ISO20387 取得に加え、検査部のISO15189に基づく品質管理体制と連携することで、試料・情報の信頼性はさらに向上した。以上より、バイオバンクにおける臨床検査技師は高品質な提供の中核を担っていることが示された。
連絡先-078-382-5111