

研究

当院遺伝子検査室の開設と稼働状況

橋本義昭¹⁾，浦 安美²⁾，塔村亜貴²⁾，河野富士子¹⁾，米田登志男¹⁾，
楠木晃三¹⁾²⁾，大徳邦彦³⁾

¹⁾広島赤十字・原爆病院 検査部

²⁾広島赤十字・原爆病院 輸血部

³⁾広島赤十字・原爆病院 臨床検査管理医

Establishment and operation status of the genetic testing unit, department of clinical laboratory, in Hiroshima Red Cross Hospital & Atomic-bomb Survivors Hospital

要旨

遺伝子検査の将来性・必要性を考慮し，当院検査部・輸血部に遺伝子検査室の設置を計画，平成26年4月造血器腫瘍遺伝子を対象とした遺伝子検査室の開設が実現した。その準備段階で，開設の許可申請，場所の確保，機器・試薬・物品の選定，検査実施の為の情報収集・検討，人員確保が課題となった。造血器腫瘍を対象とする体細胞遺伝子検査は，未だHome-Brew（自家製）の方法で分析されている領域が多く，知識・技術・経験が要求されるが，検査経験のある技師の協力・指導により分析方法を構築することができ，開設の為の課題も短期間でクリアされた。現在，造血器腫瘍遺伝子15項目を検査しているが，マニュアル作業が多く，PCR工程はメイン・サブ担当によるダブルチェック体制としている。平成26年度の院内への造血器腫瘍遺伝子検査の依頼件数は9ヵ月で359件，そのうちMajor及びminor BCR/ABL1 mRNAが216件と58件（60.2%と16.2%）であった。今後は遺伝子検査技術の維持・向上と分野の拡大，後進の育成が課題である。

Yoshiaki Hashimoto, et al : ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 49 : 36-41,2016(2015.11.30 受理)

KEYWORDS

遺伝子検査室，造血器腫瘍，Home-Brew，PCR

はじめに

遺伝子関連検査は従来の検体検査から更なる業務拡大を目指すに相応しい，非常に有望な分野である。当院においても関連する外注委託件数は増加傾向にあり，その必要性から臨床側より検査結果の早期報告が望まれていた。しかし現状では病原体核酸検査，特に抗酸菌・肝炎ウィルスが先行して体外診断用試薬・機器が使用され日常業務化されているものの，固形がんや造血器腫瘍など体細胞遺伝子検査に関しては開発途上段階で，Home-

Brewでの検査法の実施が必要となる領域が未だ多い。このようなHome-Brewの遺伝子検査を実践する検査室の開設には，何がどれだけ必要か，運用していく為の技術をいかに取得していくか，業務量はどの程度なのかなど，知識・技術を有する技師が当検査室には在籍していなかったこともあり，不明な点が多々あった。

平成26年4月に将来的な遺伝子検査の必要性を考慮し，造血器腫瘍を対象とした遺伝子検査室が開設され，その後1年を経過した。

開設当時、遺伝子検査についての知識・技術・経験に乏しかった筆者が、遺伝子検査室の準備期間から開設するまでの経過、日常の業務を行なう中で体感したことを報告する。

【開設のきっかけ】

当院の血液内科は、1日の外来患者数228.9名、入院患者数129.8名（平成26年度実績）で医師10名が在籍しており、1年365日外来診療を実施、新規患者受け入れを行なっている。これに関連する染色体、FISH、遺伝子検査（造血器腫瘍、ウィルスなど）などの検査は年々増加の一途を辿っており、これらを全て委託していた。結果報告までに遺伝子検査で1週間、染色体検査で2週間かかっていた。全ての外部委託金額は平成20年度には3億円にのぼり、更に造血器腫瘍遺伝子検査は院内で分析を実施していなかったことから、施設基準を満たせず保険請求が行なえていなかった。

これら問題を打開すべく、「将来を見据えた戦略が必要」との臨床検査管理医の提言をきっかけとして、平成25年8月遺伝子検査室に関する情報を収集し、更に実績豊富な技師の技術指導の協力を取り付け、開設準備が進められた。

【開設の為の準備】

〈遺伝子検査室開設の許可申請〉

まず、検査技師長が血液疾患の治療を担当する血液内科・小児科医師に遺伝子検査室の立ち上げ構想に対して協力を要請し、平成25年9月病院長宛てに「遺伝子検査室の立ち上げについての趣意書」を提出した。造血器腫瘍遺伝子検査の施設基準に係る届出を地方厚生局に提出し、院内で検査を実施することで、収入増加、経費削減の他、がん診療拠点病院としての質が向上されることを検体検査管理医と検査技師長が病院幹部に説明、遺伝子検査室の立ち上げに理解を求めた。その結果、平成26年1月に開設の許可があり、その後、技術指導の目的で経験者の当院への平成26年度勤務が決定した。この際の試算では院内と外注の収支分岐点は年間約300件であり、平成25年度の外注依頼実績は426件であった（図1）。

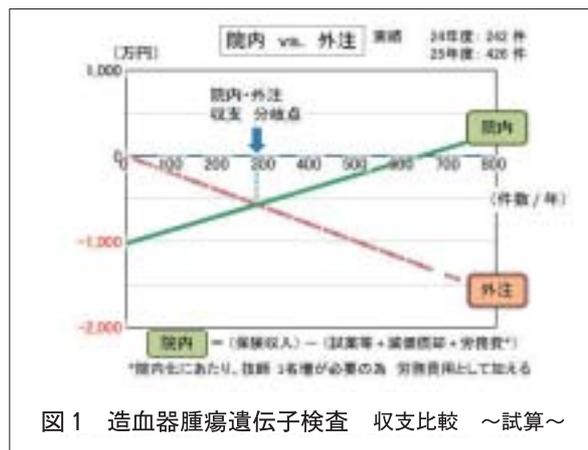


図1 造血器腫瘍遺伝子検査 収支比較 ～試算～

〈場所の確保〉

開設の為に必要なスペースを約20平米と仮定して、事務部門との話し合いの末、検体検査室から170m離れている閉鎖病棟の一室約13平米に仮設置した（図2-1、図2-2、図3）。



図2-1 遺伝子検査室 内部



図2-2 遺伝子検査室 内部

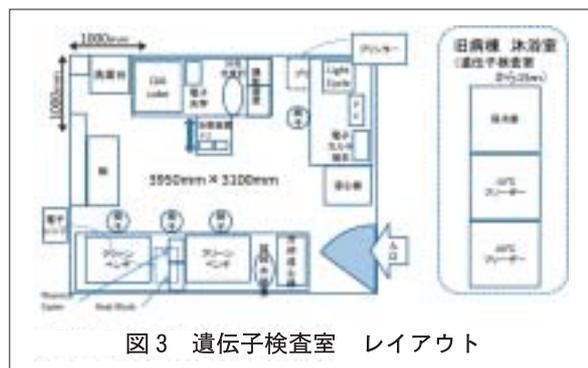


図3 遺伝子検査室 レイアウト

PML/RAR, CBF β /MYH11, ETV6(TEL)/AML1, NPM/ALK, DEK/CAN, FIP1L1-PDGFR, MLL/AF4, MLL/AF9, MLL-ENL, E2A/PBX1 (以上キメラ mRNA 定性、RT-nested PCR 法), JAK2V617F 変異 (DNA SNP 解析). 依頼件数は月 30~60 件 (平均 40 件程度) である. 2 台のクリーンベンチは RNA 作業用と DNA 作業用で区別し, 検体・陽性コントロールや増幅産物によるコンタミネーション防止の為に操作工程の区切り毎に UV 照射と清掃を行なっている.

依頼の大半は骨髓液・末梢血液中のキメラ mRNA の検出であり, 核酸の抽出も RNA が多数を占める. 検査対象の mRNA は全 RNA の数%であり, 当院では病状・治療に影響されて検体中の単核球数が減少している場合を考慮し, 検体量を最大限に使用してより多くの mRNA を採取できるよう ISOGEN LS (和光純薬, AGPC 変法) を使用してマニュアル抽出を行なっている. 作業工程は 5~15 分と小刻みに操作が加わり, 約 2 時間で RNA 抽出が完了する (図 4).



図 4 ISOGEN LS を用いた RNA の抽出工程

その後, 抽出した RNA 濃度測定, cDNA 合成, PCR (1st, 2nd), 泳動, 検出と続く (表 2, 表 3, 表 4). 全ての工程の所要は 6~7 時間である. 血液・骨髓液からの RNA 抽出, 特に定量検査を行なう場合は 4~6°C で 2 時間保存可能とされている⁴⁾. ただし検体提出

表 2 cDNA 合成工程

試薬・試料	使用量
Random 6mers (50 μ M)	2 μ L
dNTP Mixture (10mM each)	2 μ L
鋳型 RNA (125ng/ μ L 相当)	18 μ L
65°C 5min. 氷上で急冷	
上記 RNA/Primer Mixture	20 μ L
5 \times PrimeScript Buffer	8 μ L
RNase Inhibitor (40U/ μ L)	1 μ L
PrimeScript RTase (200U/ μ L)	2 μ L
RNase free dH ₂ O	9 μ L
穏やかに攪拌	
30°C 10min.	
42°C 30min.	
95°C 5min. 氷上で急冷	

表 3 PCR から泳動撮影まで

(例: MLL/AF9 mRNA, BCR/ABL mRNA 検査例)

Internal Control	メイン検査		サブ検査		検出結果
	Internal Control	Negative Control	Positive Control	Sample	
1st PCR	+	-	+	+	陽性
2nd PCR	+	-	+	+	陽性

① PCR 検出後, 増幅産物を 1 μ L で 70°C で 10 分間インキュベートし, Master Mix (Taq) を追加して PCR を再行する (陽性コントロール) / PCR-PCR 陽性コントロールにて, PCR 検出 陽性 陽性陽性

Master Mix (Taq) 1.0 μ L, PCR 検出 陽性 陽性陽性

表 4 PCR 手技

試薬・試料	使用量
① PrimeScript RTase (200U/ μ L)	2 μ L
② 鋳型 RNA (125ng/ μ L 相当)	18 μ L
③ PrimeScript Buffer (5 \times)	8 μ L
④ RNase Inhibitor (40U/ μ L)	1 μ L
⑤ Random 6mers (50 μ M)	2 μ L
⑥ dNTP Mixture (10mM each)	2 μ L
⑦ RNase free dH ₂ O	9 μ L

①-⑦は標準マニュアルにて記載されている

が午後に行なわれることが多い為, 午後に一括して RNA 抽出と濃度測定を行ない翌勤務日の午前中に以降の作業を行なっている. RNA の抽出時間を考慮すると検体の提出は午後 2 時頃までが理想であるが, 血液内科の外来診療は夕刻まで続くため終業直前に検体が提出されることもある. また緊急を要する AML M3 や ALL が疑われる新規患者が搬入された時には終業後や休日問わず抽出を行なうが, 翌日までには結果が出るように時間外もしくは呼び出し対応している.

PCR 工程のプロトコールは, sense/anti-sense プライマーの混合・テンプレート DNA の添加など数 μ L 量のピペッティングが続き, 混合間違いや未添加などミスを起こしかねない為, 細心の注意が要求される. 遺伝子検査から得られる結果が確定診断に係る重要性を考慮し, PCR 工程はメイン・サブ 2 名実施によるダブルチェック体制で行ない, アッセイ毎に内部コントロールとしてハウスキーピング遺伝子である GAPDH mRNA を, 陽性・陰性コントロールにて正確さ, 精密さの

チェックとしている。

DNA を試料とする場合は、カラム法（抽出キット QIAamp DNA mini kit, 機器 QIAcube, 共に QIAGEN）で抽出, JAK2V617F 変異は wild, mutant 2 種の検出用 TaqMan Probe (両末端蛍光標識) を使用し LightCycler® 96 (以下 LC96, Roche) の end point genotyping assay を行なっている。変異解析を対象とした場合, DNA は 4°C 冷蔵で 3 日保存可能であり, 抽出の時間調整を行ないやすい。抽出はヒートブロックと高速遠心機 (15,000r.p.m) があれば抽出機器がなくても実施でき, 1 時間弱で終了する。PCR 工程は 8 連 PCR チューブに調整した試薬を分注, テンプレート DNA の添加後 LC96 で増幅・検出を行ない所要時間は 1.5 時間で終了する。基本的には 2~3 件の依頼を Batch で実施している。

遺伝子という特殊性を考慮し, いずれの報告書もネットワーク環境未接続の PC 上で画像データを貼り付けして作製している。その報告書を検体検査システムへスキャナー取込みにより PDF ファイル形式で保存している。

遺伝子検査室開設後に WT1 や Major BCR/ABL mRNA 定量についても院内化を検討したが, 保険申請可能な体外診断薬が発売されたこと, それを使用した場合コスト面で全く折り合わないことを理由に現段階では導入を見送っている。

【運用実績】

平成 26 年度の院内への依頼件数は 9 ヶ月で 359 件, そのうち Major 及び minor BCR/ABL mRNA が 216 件と 58 件 (60.2% と 16.2%) であり, 続いて JAK2V617F 変異解析が 43 件 (12.0%) であった。保険請求も同年 6 月から算定が開始され, 10 ヶ月間で 8,505,000 円が請求申請されている。そして院内での試薬・消耗品代は, 項目によって若干異なるが 1 件あたり 5,000 円程度であった。1 名の技師増員による人件費増加分を加えても, 全てを外部委託した場合と比較すると収支状況は改善されており, 年間 300 件以上で院内化が有利という概ね試算どおりとなった。平成 27 年度上半期件数は 280 件と前年度を上回るペースで増加しており, 更に収支改善が進むと予想される。

【マンパワーの問題】

平成 27 年 9 月現在, 1 日平均 Major-BCR/ABL1 mRNA 定性で 2 件程度依頼されている。この現状で人的余裕を考えた場合, RNA 抽出作業中は 5~15 分毎に作業が入り現場を離れにくい, RNA から cDNA の合成・PCR による増幅・電気泳動の工程は約 40~50 分の待ち時間が発生する。この間に行なう各種試薬やプライマーミックスの準備, 泳動用アガロースゲルの作製など遺伝子検査に必要な作業を除き, 余力が生じる時はマンパワーの有効利用が可能である。

1 日 2 件程度の業務量であれば PCR の工程以外は技師 1 名で充分であるが, 4~6 件提出されることもあり, マニュアル工程がほとんどを占める為に負担がかなり大きい。それも考慮したうえで, 人員配置への配慮が必要と考える。

【今後について】

現在新たな項目については, Epstein Barr Virus (EBV) DNA 定量の導入を検討している。(平成 27 年 9 月現在) また近年, 急速に有用性が拡大している病原体や固形がんなどの遺伝子検査においても, 関連部署とも連携しながら当院検査室での遺伝子検査の更なる充実を図っていきたい。最も懸念されるのが Home-Brew の分析プロトコルを構築できる人材の育成であるが, 基本知識・技術の習得を目的として遺伝子技術関連の認定制度などを有効に活用していくことが有用である⁴⁾。まずは筆者が先陣を切り, 日本遺伝子分析科学同学院の主催する認定制度, 遺伝子分析科学認定士 (初級) を取得した。著しく進歩を遂げている遺伝子分野に対応していくためには, 情報収集を欠かすことができない。今後も引き続き認定資格取得をはじめ, 研修会参加など積極的継続的に行なっていく必要がある。

【結語】

造血器腫瘍を検査対象とした遺伝子検査室が開設され, 検査結果の早期報告, 依頼件数・保険収入が増加, コスト削減を図ることが出来た。また末梢血・骨髓細胞形態と細胞表面マーカーに加え, 遺伝子検査の院内実施により, 3 法による早期総合的診断が可能となっ

た。当院の場合、実現できた理由は指導者の存在が大きく、また血液内科からの依頼の多い環境であり、幸運であったことは事実である。遺伝子検査室が稼働し根付こうとしている今、現在の技術レベルを維持・向上させ、

新たに展開させていくことがこれからの目標である。

本論文の要旨は第50回日本赤十字社医学会総会（2014年10月、熊本）にて発表した。

【文献】

- 1) 横田浩充：今日から役立つ 遺伝子検査実践マニュアル, Medical Technology, 医歯薬出版, Vol.40 (13) 1564-1570, 2012
 - 2) 日高恵以子：今日から役立つ 遺伝子検査実践マニュアル, Medical Technology, 医歯薬出版, Vol.40 (13) 1545-1550, 2012
 - 3) 日本遺伝子分析科学同学院 遺伝子分析科学認定士制度委員会編集：遺伝子検査技術.144-147, 宇宙堂八木書店, 2007
 - 4) 日本臨床検査同学院通信 臨時増刊第2号, 2012
-