

# 遺伝子・染色体検査部門

精度管理事業部員：鈴木 翔太（大阪大学医学部附属病院 生殖医療センター）

実務担当者：山本 浩二（独立行政法人地域医療機能推進機構 中京病院）

山田 敦子（愛知医科大学病院）

## I. はじめに

本年度は、SARS-CoV-2核酸増幅検査について不活化ウイルスを使用したサンプルサーベイを実施した。また、遺伝子検査の基礎と検体取り扱いに関する文章設問を出題した。

## II. 対象項目

### 1. SARS-CoV-2核酸増幅検査 サンプルサーベイ

- 1) 不活化ウイルス溶液1(試料101)
- 2) 不活化ウイルス溶液2(試料102)
- 3) 不活化ウイルス溶液3(試料103)

### 2. 文章設問

(評価対象設問5問、評価対象外設問1問)

## III. 設問について

- ① 設問1～5：遺伝子検査の基礎・検体取り扱い
- ② 設問6：遺伝子検査の応用問題(評価対象外)

## IV. 参加施設数について

SARS-CoV-2核酸増幅検査への参加は58施設、文章設問への参加は42施設であった。

## V. 評価基準

試料101～103、設問1～5について評価を設定した。正解をA、不正解をDと設定し評価した。

評価	正解	不正解
評価 A	正解	「基準」を満たし、極めて優れている
評価 D	不正解	「基準」から極めて大きく逸脱し、早急な改善が必要

## VI. 調査結果

試料101～103、設問1～6の正解および正解率を表2、表3に示した。

	正解	正解率(%)
試料 101	②陽性	96.6
試料 102	②陽性	89.7
試料 103	①陰性	100.0

	正解	正解率(%)
設問 1	②病原体遺伝子検査は、生きた細菌およびウイルスのみを検出する。	95.1
設問 2	③FISH 法の判定は、すべての細胞で同じ蛍光シグナルを示していることを確認しなければならない。	90.2
設問 3	④ホルマリン固定時の検体保管は冷蔵(4℃)で行うことが望ましい。	100.0
設問 4	④組織の固定時間は 6 時間以上 72 時間以内が推奨される。	82.9
設問 5	③汚染防止のため検査区域は第 1 室(検体のサンプリングと前処理)、第 2 室(増幅の前段階の作業を行う)、第 3 室(増幅と増幅後の作業を行う)の最低でも 3 つ必要である。	83.3
設問 6	①Forward プライマー AGGCCTGCTGAAAATGACTGA Reverse プライマー TCAAGGCACTCTTGCTACG	92.7 (評価 対象外)

## VII. 解説および考察

### 1. SARS-CoV-2核酸増幅検査 サンプルサーベイ

SARS-CoV-2核酸増幅検査のサンプルサーベイとして、不活化ウイルス溶液を試料として使用し、核酸抽出工程と核酸増幅工程の精度管理調査を行った。コントロール試料はInactivated SARS-CoV-2 Whole Virus(関東化学株式会社)を使用し、2種類の陽性試料(試料101、102)を作成した。陰性試料(試料103)には、健康人末梢血より作成したヒトリンパ球浮遊液を使用した。なお、同浮遊液は陽性試料101、102にも同じ濃度を添加して作成した。

参加施設の使用解析機器(キット)をそれぞれ核酸抽出法別に図1に示した。なお、同じ抽出法と思われる回答(全自動機器のキット専用抽出/機器による自動抽出など)については同じものと見なして示した。最も使用の多い機器・キットはGeneXpert、ID NOWが各9施設であり、次いでLoopampEXIAが7施設(キット専用抽出が6施設)、SmartGeneが6施設であった。

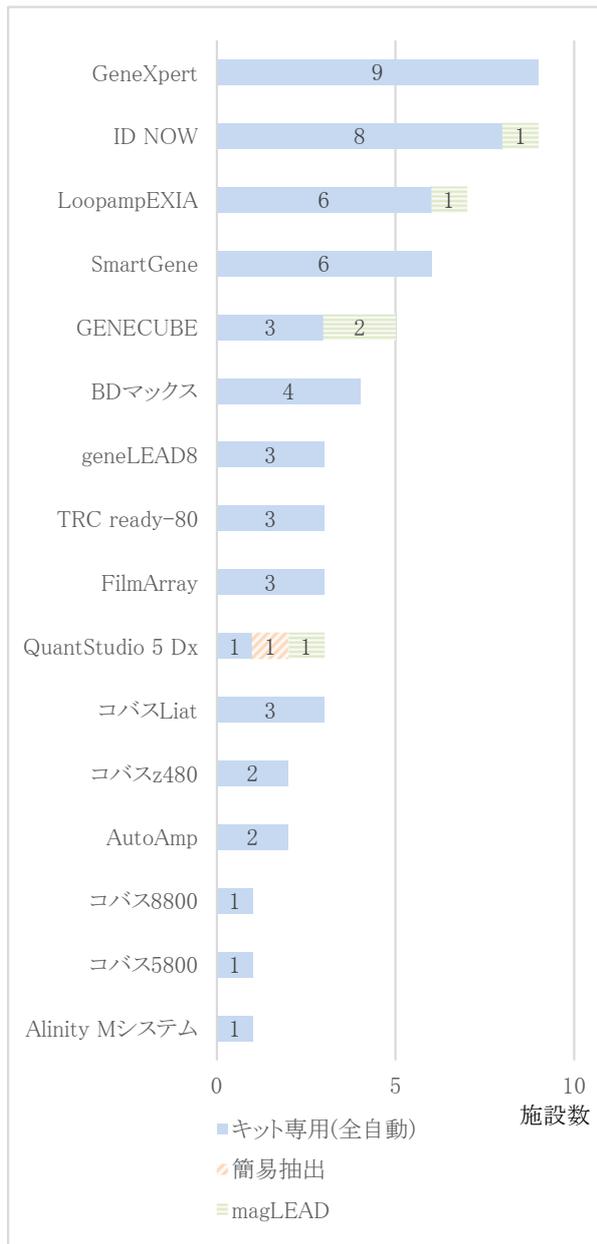


図1

1) 試料101

高コピー数試料として、不活化ウイルス量60,000コピー/mLを100 μL(総量6,000コピー)配布した。

58施設のうち、陽性の回答が56施設(96.6%)、陰性の回答は2施設(3.4%)であった(図2)。陰性の回答であった施設の使用解析機器は、LoopampEXIA(キット専用抽出)とSmartGeneが各1施設であった。両キットの解析結果については、試料102とともに後述する。

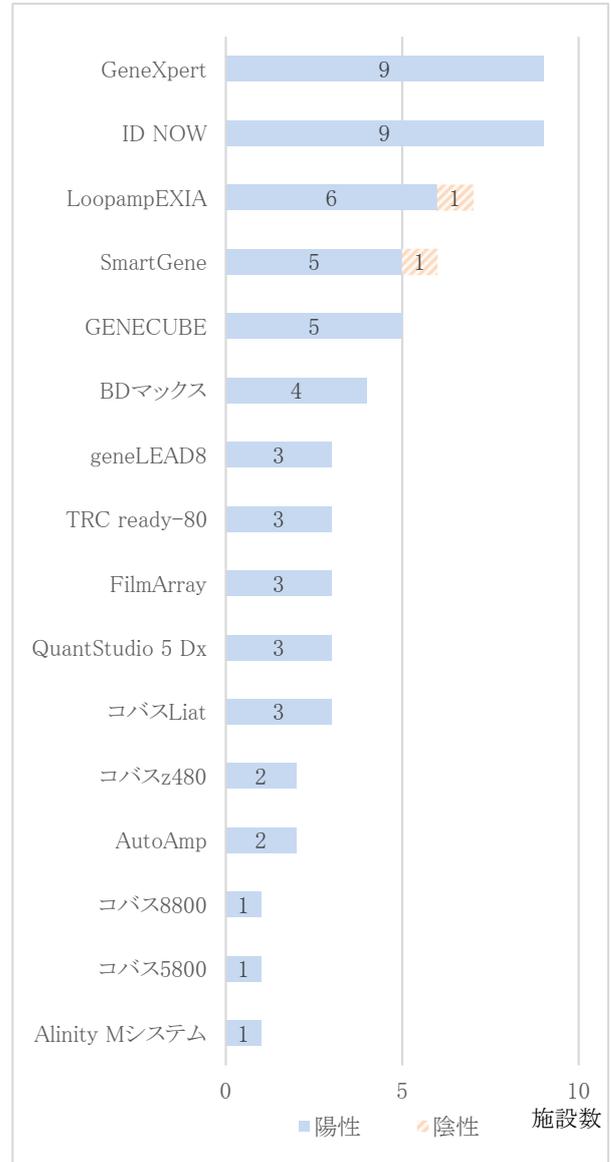


図2

2) 試料102

低コピー数試料として、不活化ウイルス量20,000コピー/mLを100 μL(総量2,000コピー)配布した。

58施設のうち、52施設が陽性(89.7%)、6施設が陰性(10.3%)の回答であった(図3)。陰性であった施設の使用解析機器は、SmartGeneが3施設、LoopampEXIA(キット専用抽出)が2施設、TRC ready-80が1施設であった。解析機器別の陽性率は、LoopampEXIA(キット専用抽出)が66.6%、TRC ready-80が66.6%、SmartGene

が50%であった。

SmartGeneの陽性施設の定量値(Ct値)の回答は40～43/45であったため、2,000コピーは検出限界近くであったことが伺えた。また、試料101で陰性の施設は試料102では陽性であり、抽出過程によるバラつき等がある可能性が考えられた。TRC ready-80の陰性施設に関しては、唾液を含めた液状検体を取り扱っておらず、核酸抽出を行うことが困難であったことが確認できおり、そのまま試料を測定したため、試料に含まれるタンパク質やリンパ球などの阻害の影響を受けたためと考えられた。LoopampEXIA(キット簡易抽出)を使用している施設の陽性率は66.6%であり、回答にバラつきがみられた。また、キット簡易抽出以外の抽出法を使用している施設は陽性であった。キット簡易抽出法は4 mLの抽出液に試料100 μLを添加するため試料が希釈されてしまい、LoopampEXIAの検出感度60コピー/テスト以下(試料101は146コピー/テスト、試料102は4.9コピー/テスト)となるため、回答にバラつきが生じたものと考えられた。

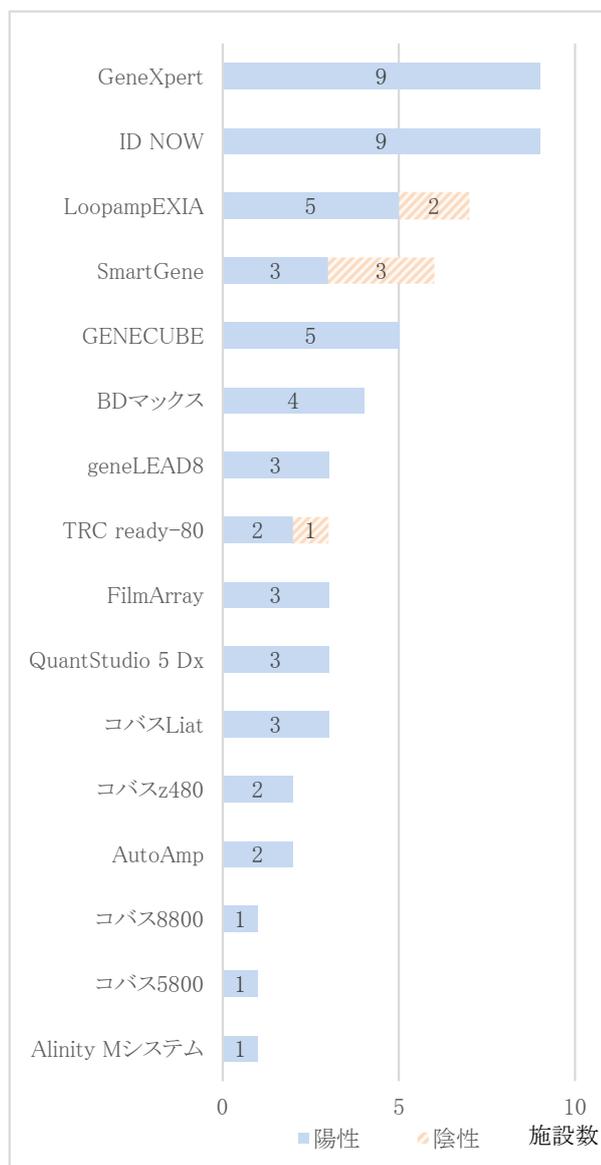


図3

### 3) 試料103

陰性試料としてヒトリンパ球浮遊液を100 μL配布した。58施設のすべてが陰性の回答であった。

試料101、102の結果からSmartGeneとLoopampEXIA(キット専用抽出)は使用施設が比較的多いものの、陽性率が低値であった。特にLoopampEXIA(キット専用抽出)は、操作は簡便であるものの、市販の核酸抽出キットと比較すると感度低下の懸念があり使用の際には十分な注意が必要であると考えられた。

## 2. 文章設問1～6

### 1) 設問1

各種遺伝子関連検査について、誤っているものを選んでください。

- ① 病原体遺伝子検査は、ヒト以外の核酸を対象とした検査である。
- ② 病原体遺伝子検査は、生きた細菌およびウイルスのみを検出する。
- ③ 体細胞遺伝子検査は、ヒト細胞を対象とした検査である。
- ④ 体細胞遺伝子検査は、限局性の遺伝子変異を対象とするため、細胞の選別が重要である。
- ⑤ 生殖細胞系列遺伝子検査は、ヒトの生涯変化しないゲノムを対象とした検査である。

回答	回答数	割合(%)
②病原体遺伝子検査は、生きた細菌およびウイルスのみを検出する。	39	95.2
③体細胞遺伝子検査は、ヒト細胞を対象とした検査である。	1	2.4
⑤生殖細胞系列遺伝子検査は、ヒトの生涯変化しないゲノムを対象とした検査である。	1	2.4

### 【正解】 ②

病原体遺伝子検査は、標的となる病原体の核酸を検出する検査のため、死んだ病原体であっても、標的の核酸が残存していれば検出する。

### 2) 設問2

蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)法について、誤っているものを1つ選んでください。

- ① DNAプローブを用いて標的DNAを検出する方法である。
- ② 蛍光シグナルを観察することで、間接的に標的DNAの増加・減少を検出することが可能である。
- ③ FISH法の判定は、すべての細胞で同じ蛍光シグナルを示していることを確認しなければならない。
- ④ 2色の融合プローブを用いることで、塩基配列の再結合による遺伝子変異が検出可能である。

- ⑤ FISH法は、分子標的治療薬の有効性診断に用いられる。

回答	回答数	割合(%)
②蛍光シグナルを観察することで、間接的に標的 DNA の増加・減少を検出することが可能である。	1	2.4
③FISH 法の判定は、すべての細胞で同じ蛍光シグナルを示していることを確認しなければならない。	37	90.3
④2色の融合プローブを用いることで、塩基配列の再結合による遺伝子変異が検出可能である。	3	7.3

【正解】 ③

FISH法では、すべての細胞で同じシグナルを示すわけではない。正常細胞と異常細胞が混在している場合もあり、疾患によってはシグナル数の比で判定する。シグナルの違いにより目的の遺伝子の有無のほか、数、位置、異常などを判定する。ネクローシス部分や核の境界があいまいな部分、強度の弱いシグナル、非特異的なシグナル、バックグラウンドが高いシグナル、核の境界を決定するための対比染色が不十分な核などは、カウントする際に除外する。

3) 設問3

ゲノム診療用病理組織検体取り扱いにおいて、プレアナリシス段階(固定前プロセス)での検体取り扱いについて誤っているものを1つ選んでください。

- 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など4℃下で保管し、1時間以内、少なくとも3時間以内に固定を行うことが望ましい。
- ② 臓器の摘出後から固定までの時間を冷虚血時間という。
- ③ ホルマリン固定液の組成は、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。
- ④ ホルマリン固定時の検体保管は冷蔵(4℃)で行うことが望ましい。
- ⑤ ゲノム診断を目的として作製されたホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)ブロックは、冷蔵(4℃)の保存が望ましい。

回答	回答数	割合(%)
④ホルマリン固定時の検体保管は冷蔵(4℃)で行うことが望ましい。	41	100.0

【正解】 ④

ホルマリン固定時の処理温度は、室温でよい。

4) 設問4

1. 胃癌HER2検査について誤っているものを1つ選んでください。

- ① 分化型胃癌は未分化型胃癌に比較し HER2 過剰発現率が高い。
- ② HER2 過剰発現の腫瘍内不均一性は HER2検査対象となる胃癌で約20～80%の頻度で認められる。
- ③ 原発部位と転移部位における、HER2過剰発現の一致率は約80%以上である。
- ④ 組織の固定時間は6時間以上72時間以内が推奨される。
- ⑤ 乳癌とは異なり、全周性ではなく基底膜および側方側の細胞膜のみに陽性反応が認められる場合もある。

回答	回答数	割合(%)
②HER2 過剰発現の腫瘍内不均一性は HER2 検査対象となる胃癌で約 20～80%の頻度で認められる。	2	4.9
④組織の固定時間は6時間以上72時間以内が推奨される。	34	82.9
⑤乳癌とは異なり、全周性ではなく基底膜および側方側の細胞膜のみに陽性反応が認められる場合もある。	5	12.2

【正解】 ④

6時間以上48時間以内が推奨される。

5) 設問5

結核菌の核酸増幅検査について、正しいものを1つ選んでください。

- ① 結果が陰性なら結核を否定できる。
- ② 一般的な体外診断薬で *Mycobacterium tuberculosis* と *Mycobacterium bovis* を区別できる。
- ③ 汚染防止のため検査区域は第1室(検体のサンプリングと前処理)、第2室(増幅の前段階の作業を行う)、第3室(増幅と増幅後の作業を行う)の最低でも3つ必要である。
- ④ ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の増幅産物は、感染対策の観点からオートクレーブで処理することが推奨される。
- ⑤ リファンピシン耐性菌は inhA 遺伝子変異を有する。

回答	回答数	割合(%)
② 一般的な体外診断薬で <i>Mycobacterium tuberculosis</i> と <i>Mycobacterium bovis</i> を区別できる。	2	4.8
③ 汚染防止のため検査区域は第1室(検体のサンプリングと前処理)、第2室(増幅の前段階の作業を行う)、第3室(増幅と増幅後の作業を行う)の最低でも3つ必要である。	35	83.3
④ ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の増幅産物は、感染対策の観点からオートクレーブで処理することが推奨される。	2	4.8
⑤ リファンピシン耐性菌は <i>inhA</i> 遺伝子変異を有する。	3	7.1

【正解】 ③

- ① 結果が陰性でも結核は否定できない。
- ② 結核菌群は区別不可である。
- ④ 増幅産物には感染性が無いのでオートクレーブ処理は必要無い。かえって増幅産物を飛散させコンタミネーションの温床となる可能性があるため、オートクレーブ処理は厳禁である。
- ⑤ リファンピシン耐性は *rpoB* 遺伝子変異を有する。

6) 設問6

次の配列は KRAS 遺伝子の配列です。太字下線部で示した場所がホットスポットである p.G12 のポジションです。この領域の遺伝子変異を増幅できるプライマーセットを1つ選んでください。

GGTATTTTGGAAATAATTTTTCATATAAAGGTG  
AGTTTGTATTTAAAAGGTAAGTGGGAGTATTTG  
ATAGTGTATTAACCTTATGTGTGACATGTTCTA  
ATATAGTCACATTTTTCATTATTTTATTATAA  
GGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAAGTGTG  
GTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCT  
TGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGG  
ACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAATCCTT  
GTTTTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCAT  
TCTTTGATACAGATAAAGTTTCTCTGACCATT  
TTCATGAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTG  
AAAGTTAAGTTATCTGAAATGTACCTTGGGTTT  
CAAGT

- ① AGGCCTGCTGAAAATGACTGA  
TCAAGGCACTCTTGCCTACG
- ② TTTTCATATAAAGGTGAGTTT  
TGAAAATGTGACTATATTAGAA
- ③ TTTTCATATAAAGGTGAGTTT  
AGGCCTGCTGAAAATGACTGA

- ④ CGTAGGCAAGAGTGCCTTGA  
TACAGCTAATTCAGAATCATT
- ⑤ AGGCCTGCTGAAAATGACTGA  
CGTAGGCAAGAGTGCCTTGA

回答	回答数	割合(%)
① Forward プライマー AGGCCTGCTGAAAATGACTGA Reverse プライマー TCAAGGCACTCTTGCCTA CG	38	92.7
⑤ Forward プライマー AGGCCTGCTGAAAATGACTGA Reverse プライマー CGTAGGCAAGAGTGCCT TGA	3	7.3

【正解】 ①

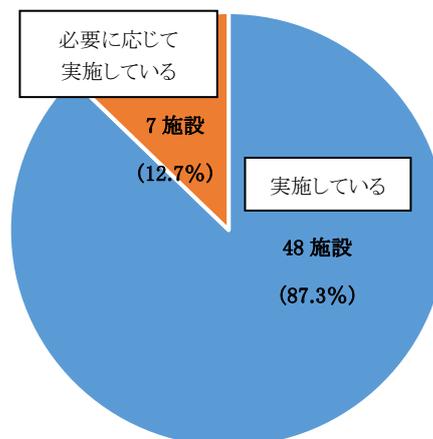
PCRには増幅したい領域を挟む2本のプライマーが必要である。正鎖の5'末端側で1本のプライマーを3'末端方向に設計し、もう片方は正鎖の相補鎖を用いて相補鎖の5'末端から3'末端方向に設計する。

- ② ターゲット領域が挟めていない。
- ③ ターゲット領域が挟めていない且つ2本目のプライマーが逆向きの相補配列でない。
- ④ ターゲット領域が挟めていない且つ2本目のプライマーが逆向きの相補配列でない。
- ⑤ 2本目のプライマーが逆向きの相補配列でない。

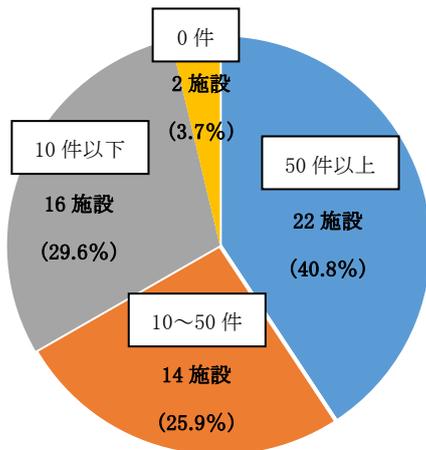
4. アンケート調査結果

1) SARS-CoV-2 核酸増幅検査の実施状況についてお答えください。

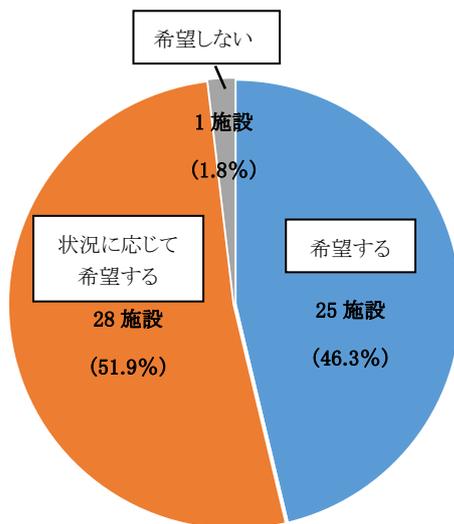
① 現在、SARS-CoV-2 核酸増幅検査を院内で実施していますか。



② 2023年5月(5類感染症へ移行後)以降、SARS-CoV-2 核酸増幅検査の月間検査数(おおよその平均)は何件ですか。



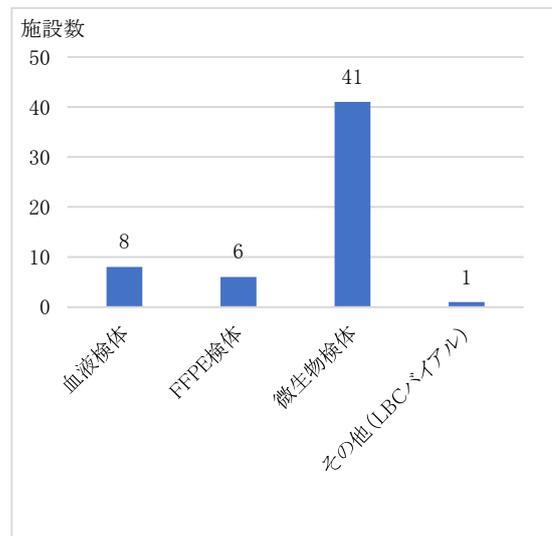
③ 今後SARS-CoV-2核酸増幅検査のサンプルサーベイの参加を希望しますか。



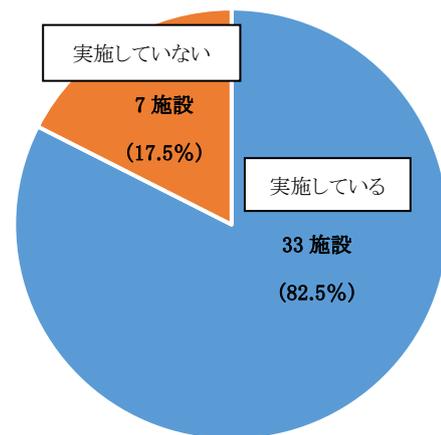
SARS-CoV-2 遺伝子検査の実施状況について、調査を行った。5類感染症移行後の現在(2023年8~9月調査)の実施状況は、必要に応じて実施も含めて、すべての施設が実施しているという回答であった。1か月あたりの実施数は、各施設でさまざまであったが、50件以上実施している施設も多かった。また、来年度のサンプルサーベイの参加希望は、ほぼすべての施設が希望する、状況に応じて希望するという回答であった。実施数も比較的多く、参加希望も多いため、来年度も引き続きサーベイを実施したいと考える。

2) 遺伝子検査の実施状況について教えてください。

① 自施設で実施している核酸抽出を教えてください。(複数回答可)



② 自家調整試薬や研究用試薬を用いた遺伝子検査を実施していますか。



③ ②で実施していると回答したご施設で、実施している項目を教えてください。

実施している遺伝子検査の項目
FLT3-ITD,FLT3-TKD,IDH,CALR,MPL、融合遺伝子
白血病キメラ遺伝子、JAK2、遺伝子再構成
HHV-6、ムンプスウイルス
膀胱癌 K-ras 遺伝子検査
FISH 検査
Filmarray 呼吸器パネル、Mycoplasma など含む STD
EGFR,MET,RET,KRAS,BRAF

院内での遺伝子検査の実施状況について、調査を行った。実施している核酸抽出の対象(材料)は、微生物検体が大多数で最も多く、血液検体、FFPE検体を取り扱っている施設は少数であった。また、その他に自家調整等で遺伝子検査を実施していると回答した施設は6施設で、白血病関連や体細胞がん関連等の遺伝子検査や感染症関連検査などであった。

## VIII. まとめ

遺伝子染色体検査部門の精度管理調査として、昨年度に引き続きSARS-CoV-2核酸増幅検査のサンプルサーベイと、文章設問による知識調査を行った。サンプルサーベイは58施設から回答を得られ、文章設問は計42施設から回答を得られた。

SARS-CoV-2サンプルサーベイでは、高濃度の陽性試料(試料101)、低濃度の陽性試料(試料102)、陰性試料(試料103)の3種類の試料を配布して実施した。昨年度からの改善点として、低濃度の陽性試料のコピー数を1,000コピー／tubeから2,000コピー／tubeへと高濃度に変更した。また、陰性試料および陽性試料の希釈液に、ヒトリンパ球浮遊液を使用して陰性対象とした。試料101は96.6%で評価A、試料102は89.7%で評価A、陰性の試料103はすべて評価Aであった。試料を改善したことにより、低濃度の陽性試料でも多くの解析機器・キットで良好な正解率が得られた。一部の解析機器(特にLoopampEXIAとSmartGene)では回答が分かれる結果であり、抽出方法によって結果が不安定となることが伺えた。また、アンケートでは来年度の参加を希望する回答が大多数であり、今後の調査では解析機器別に評価基準を検討していきたいと考える。

文章設問は、遺伝子検査の基礎的な内容と検体取り扱いに関する設問を5問で調査を実施した。また、評価対象外の応用設問として塩基配列の設問を1問出題した。評価対象外設問も含めてすべての設問で80%以上の正解率であり、良好な結果であった。

遺伝子検査の実施状況についてアンケート調査を行った。SARS-CoV-2遺伝子検査は、5類感染症移行後も相当数実施していることが分かった。また、核酸抽出や遺伝子検査の実施状況は、微生物検体以外の実施数は少数であった。今回のサンプルサーベイの結果からも、核酸抽出の工程は差が生じやすいことが伺えた。今後のサンプルサーベイにて抽出工程を対象とした実施内容を検討していきたいと考える。

今回、昨年度に引き続きSARS-CoV-2遺伝子検査のサンプルサーベイを実施した。COVID-19は2023年5月に5類感染症へ移行し、検査数も少なくなっているが、昨年度と同数の参加数であった。来年度の参加希望の声も多く、引き続き調査を実施していく予定である。院内実施数の多いSARS-CoV-2検査のサーベイを通して、遺伝子検査全体の精度保証に取り組んでいく所存である。

## IX. 参考文献

1. 社団法人 日本臨床検査技師会：臨床検査技師のための遺伝子・染色体検査ガイドブック，株式会社 高山，2003.
2. 南木融，大木圭子：Medical Technology臨時増刊号Vol.40 No.13 今日から役立つ 遺伝子検査実践マニュアル，医歯薬出版，2014，p.1571-1579.
3. 社団法人 日本臨床検査技師会：遺伝子染色体検査

の基礎と臨床応用，株式会社 東広社，2010.

4. 日本臨床検査同学院：遺伝子検査技術 - 遺伝子分析化学認定士テキスト，宇宙堂八木書店，2007.
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，2018.
6. 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会：遺伝子・染色体検査技術教本，丸善出版株式会社，2019.
7. 一般社団法人 日本病理学会：胃癌HER2病理診断ガイドライン，2015.
8. 胃がん HER2 検査病理部会作成：HER2 検査ガイド 胃がん編 第三版，2014.

## X. 問い合わせ先

〒565-0871

大阪府吹田市山田丘2番15号

鈴木 翔太

TEL：06-6879-5111(代表)

E-mail：glorious0312@gmail.com