

染色体遺伝子検査の品質保証のための指針

日本染色体遺伝子検査学会監修 第3版改訂版

編集委員：石黒晶子¹⁾，上野一郎²⁾，奥山虎之³⁾，大星航⁴⁾，長田誠⁵⁾，柿島裕樹⁶⁾，郡司昌治⁷⁾，佐藤悦子⁸⁾，佐藤謙一⁹⁾，柴田典子¹⁰⁾，鈴木翔太¹¹⁾，園山政行¹²⁾，高橋裕之¹³⁾，南木融¹⁴⁾，福塚勝弘¹⁵⁾，藤澤真一¹⁶⁾，藤巻慎一¹⁷⁾，吉田繁¹⁸⁾，若井進¹⁹⁾

所属：1) 福岡大学医学部，2) 香川県立保健医療大学名誉教授，3) 国立成育医療センター，4) 国際医療福祉大学成田保健医療学部，5) 群馬パース大学保健科学部，6) 国立がん研究センター中央病院，7) 名古屋第一赤十字病院，8) 雪の聖母会聖マリア病院，9) 国際医療福祉大学福岡保健医療学部，10) 愛知県がんセンター，11) 有限会社 胎児生命科学センター，12) 株式会社 ビー・エム・エル，13) 旭川医科大学病院，14) 筑波大学附属病院，15) 天理よろづ相談所医学研究所，16) 北海道大学病院，17) 東北大学病院，18) 北海道医療大学，19) 国立国際医療研究センター病院

Key words：標準化，染色体・遺伝子検査，精度保証，臨床検査室

前文

臨床検査における分子細胞遺伝学の急速な進歩とEBM（evidence based medicine）の普及により，染色体遺伝子検査の診断的価値は増大している．しかし，検査法の技術革新があまりにも急速なため，検査の精度管理や倫理的諸問題がそれに追いついていないのが現状である．これについて，新たに2018年12月1日から施行された

「医療法等の一部を改正する法律(平成29年6月14日公布 法律第57号)」で，精度管理の重要性も指摘された．

このような状況下で，染色体遺伝子検査を実施する技術者は，新しい技術を学びながら，常に検査の標準化や精度管理を念頭に置き，質の高い検査結果を報告するよう努力しなければならない．

今回発行する『染色体遺伝子検査の品質保証のための指針』は，2010年に発行した「染色体遺伝子検査標準化のガイドライン 2010」を基とし，2014年に改訂を行った第2編を修正，加筆した改訂版であり，会員の蓄積した経験とデータに基づき，適切な検査方法と操作手順，検査結果の判定に至るまで提言している．今後多くの会員の追試と検証により，さらに内容を充実させ，染色体遺伝子検査の精度保証に寄与することを願っている．

染色体検査とFISH検査については，すでにガイドラインが出されているが¹⁾，具体的な標準化の方法と精度管理には言及されていない．染色体検査は，自家調製試薬を使用し各施設の長年の経験から施設独自の方法で実施されており，検査法の標準化が困難である．本指針では，特定の方法に限定せず会員の経験とデータに基づいた適切な検査法，操作手順，検査結果の判定法を提言している．検査法のみならず医療法への対応，精度管理の実践，検査室の運用における参照資料として，染色体検査従事者は一読されて活用されることを望む．なお，医療法の改正で指摘された外部精度管理については，2019年より本会の外部精度管理委員会により染色体G分染外部精度管理が開始され，核型分析について今後の貢献が期待される．

遺伝子検査は，検体の採取，保存および運搬，検体の前処理と核酸の抽出，核酸の増幅および検出，結果の解析と報告書の作成，データ管理という検査工程で行われる．しかし，同じ検査でも検査材料，測定する遺伝子領域，測定方法，用いる機器や試薬などは多種多様である．そこで本指針では，用いる遺伝子検査方法のいかに関わらず，「遺伝子検査の品質保証のために必要な基本的な考え方」を検査工程に沿って示した．

なお、本指針は、診療目的に実施する、ヒトの体内から抽出された染色体および核酸検査を対象とした臨床検査に適用するもので、それ以外の目的や染色体遺伝子研究には言及しない。

参考文献

- 1) 遺伝学的検査としての染色体検査ガイドライン. 日本人類遺伝学会, 2006年10月17日

| | |
|--------------------------------|----|
| 内容 | |
| 第1章 染色体遺伝子検査の品質保証 | 9 |
| 1. 法改正における要求事項 | 9 |
| 1.1 検体検査の分類の見直し | 9 |
| 1.2 遺伝子関連・染色体検査の責任者の配置の義務化 | 9 |
| 1.3 精度の確保に係る各種標準作業書・日誌等の作成の義務化 | 10 |
| 1.3.1 各種標準作業書等 | 10 |
| 1.3.2 各種作業日誌 | 10 |
| 1.3.3 各種台帳 | 10 |
| 1.4 検体検査の精度の確保のために努めるべき事項 | 11 |
| 2. 外部認証 | 11 |
| 2.1 人材 | 12 |
| 2.1.1 資格 | 12 |
| 2.1.2 教育訓練・評価 | 12 |
| 2.2 環境 | 12 |
| 2.2.1 作業エリア | 12 |
| 2.2.2 アクセス制限 | 12 |
| 2.2.3 監視 | 12 |
| 2.3 器材（機器，試薬，消耗品） | 12 |
| 2.3.1 受入検査 | 12 |
| 2.3.2 使用に関する指示 | 12 |
| 2.3.3 校正・保守 | 12 |
| 2.3.4 在庫管理 | 12 |
| 2.3.5 自家調整試薬 | 12 |
| 2.3.6 記録 | 12 |
| 2.4 検査前プロセス | 13 |
| 2.4.1 利用者への情報提供 | 13 |
| 2.4.2 試料の搬送，受領 | 13 |
| 2.5 検査プロセス | 13 |
| 2.5.1 検査手順の採用 | 13 |
| 2.5.2 標準作業書の作成 | 13 |
| 2.6 精度管理 | 13 |
| 2.6.1 内部精度管理 | 13 |
| 2.6.2 外部精度管理 | 13 |
| 2.7 検査後プロセス | 13 |
| 2.8 報告 | 14 |
| 2.9 情報システム | 14 |
| 第2章 染色体検査 | 15 |
| 1. 機器・作業の環境 | 15 |
| 2. 検査の受付 | 15 |

| | | |
|-------|------------------|----|
| 2.1 | 検体と依頼書の照合 | 15 |
| 2.1.1 | 検査依頼書の記載事項確認 | 15 |
| 2.1.2 | 検査依頼書：遺伝学的検査 | 15 |
| 3. | 検体の採取 | 16 |
| 3.1 | 血液（末梢血液，臍帯血，胎児血） | 16 |
| 3.2 | 骨髄液 | 16 |
| 3.3 | リンパ節 | 16 |
| 3.4 | 羊水 | 16 |
| 3.5 | 子宮内容物 | 16 |
| 4. | 浮遊培養 | 17 |
| 4.1 | 培養液 | 17 |
| 4.2 | 培養条件 | 17 |
| 4.3 | 培養操作 | 17 |
| 4.3.1 | 血液 | 17 |
| 4.3.2 | 骨髄液，体腔液 | 17 |
| 4.3.3 | リンパ節 | 18 |
| 5. | 定着培養 | 18 |
| 5.1 | 培養液 | 18 |
| 5.2 | 培養条件 | 18 |
| 5.2.1 | 羊水の培養 | 18 |
| 5.2.2 | 流産絨毛（子宮内容物）の培養 | 19 |
| 5.2.3 | 腫瘍組織の培養 | 19 |
| 6. | 低張・固定処理 | 19 |
| 6.1 | 低張処理 | 19 |
| 6.2 | 固定処理 | 19 |
| 7. | 標本作製 | 20 |
| 7.1 | 標本作製法 | 20 |
| 7.2 | 各種分染法 | 20 |
| 7.2.1 | G分染法 | 20 |
| 7.2.2 | Q分染法 | 21 |
| 7.2.3 | C分染法 | 21 |
| 7.2.4 | NOR分染法 | 21 |
| 8. | 核型分析 | 21 |
| 8.1 | 画像取り込み | 21 |
| 8.2 | データ解析 | 21 |
| 8.2.1 | 末梢血の核型分析 | 21 |
| 8.2.2 | 骨髄液，体腔液の核型分析 | 22 |
| 8.2.3 | リンパ節の核型分析 | 22 |
| 8.2.4 | 羊水の核型分析（フラスコ法） | 23 |
| 8.2.5 | 羊水の核型分析（直接法） | 23 |

| | | |
|-------------|----------------------------|----|
| 8.2.6 | 流産絨毛（子宮内容物） | 24 |
| 8.2.7 | 腫瘍組織の核型分析 | 24 |
| 9. | 報告書作成とデータ管理 | 24 |
| 9.1 | 報告書の要素 | 24 |
| 9.2 | データ管理 | 24 |
| 10. | 染色体検査の精度管理 | 25 |
| 10.1 | 遺伝子関連・染色体検査の精度の確保に係る責任者の設置 | 25 |
| 10.2 | 標準業務手順書の作成 | 25 |
| 10.3 | 検査装置の管理 | 25 |
| 10.4 | 試薬の管理 | 25 |
| 10.5 | 作業工程の管理 | 25 |
| 10.6 | 内部精度管理の実施 | 26 |
| 10.7 | 比較プログラムの受検，または代替手段の構築 | 26 |
| 10.8 | 検査施設の第三者認定の取得 | 26 |
| 11. | 教育 | 26 |
| 第3章 FISH 検査 | | 27 |
| 1. | 機器・作業の環境，受付 | 27 |
| 2. | 中期核 FISH 検査 | 27 |
| 2.1 | 中期核 FISH 検査の適応 | 27 |
| 2.2 | 中期核 FISH 検査の注意点 | 27 |
| 2.3 | プローブの有効性の確認 | 27 |
| 2.4 | プローブの感度と特異性の確認 | 28 |
| 2.5 | 分析の基準 | 28 |
| 3. | 間期核 FISH 検査 | 28 |
| 3.1 | 間期核 FISH 検査の適応 | 28 |
| 3.2 | 間期核 FISH 検査の注意点 | 28 |
| 3.3 | プローブの有効性の確認 | 28 |
| 3.4 | カットオフ値の決定と感度・特異性の確認 | 29 |
| 3.5 | 分析の基準 | 29 |
| 4. | FISH 検査法 | 29 |
| 4.1 | 標本の作製 | 29 |
| 4.2 | エージング | 30 |
| 4.3 | 前処理 | 30 |
| 4.4 | 脱水 | 30 |
| 4.5 | 変性 | 30 |
| 4.5.1 | 別々に変性させる方法 | 30 |
| 4.5.2 | 合わせて直接変性させる方法 | 30 |
| 4.6 | ハイブリダイゼーション | 30 |
| 4.7 | 洗浄 | 30 |
| 4.7.1 | ホルムアミドを用いる方法 | 31 |

| | | |
|---------|--|----|
| 4.7.2 | ホルムアミドを用いない方法 | 31 |
| 4.8 | 封入 | 31 |
| 4.9 | 蛍光顕微鏡による観察 | 31 |
| 5. | データ解析 | 31 |
| 5.1 | カウントから除外する細胞 | 31 |
| 5.2 | 陰性の細胞 | 31 |
| 5.3 | 陽性の細胞 | 31 |
| 5.3.1 | dual color dual fusion translocation probe の場合 | 31 |
| 5.3.2 | break apart probe の場合 | 32 |
| 6. | 報告書の作成とデータ管理 | 32 |
| 7. | 検査の精度管理 | 32 |
| 7.1 | 品質モニタリング | 32 |
| 7.2 | その他の精度管理 | 32 |
| 8. | mFISH (multi-color FISH) | 32 |
| 8.1 | mFISH 検査の適応 | 32 |
| 8.2 | mFISH 検査の注意点 | 32 |
| 8.3 | プローブの有効性の確認 | 33 |
| 8.4 | 分析の基準 | 33 |
| 9. | 染色体 CGH (Comparative Genomic Hybridization) | 33 |
| 9.1 | 染色体 CGH の注意点 | 33 |
| 9.2 | 染色体 CGH の分析基準 | 33 |
| 10. | アレイ CGH | 34 |
| 10.1 | アレイ CGH の注意点 | 34 |
| 11. | SNP アレイ | 34 |
| 11.1 | SNP アレイの注意点 | 35 |
| 12. | 組織 FISH | 35 |
| 12.1 | 材料 | 35 |
| 12.2 | 標本の作製 | 35 |
| 12.3 | 前処理 | 36 |
| 12.4 | 固定 | 36 |
| 12.5 | 変性とハイブリダイゼーション | 36 |
| 12.6 | 洗浄 | 36 |
| 12.7 | 封入 | 36 |
| 12.8 | 蛍光顕微鏡による観察 | 36 |
| 12.9 | データ解析 | 37 |
| 12.10 | 注意事項 | 37 |
| 12.11 | 組織 FISH 検査の精度管理 | 37 |
| 12.11.1 | 精度管理用切片の作成方法 | 37 |
| 12.11.2 | 精度管理用切片の貼り付け | 38 |
| 12.11.3 | 精度管理の方法 | 38 |

| | |
|---|----|
| 第4章 遺伝子検査 | 40 |
| 1. 遺伝子検査の分類 | 40 |
| 2. 遺伝子検査室の環境 | 40 |
| 2.1 核酸混入の原因物質 | 40 |
| 2.2 混入する媒体 | 40 |
| 2.3 混入防止の対策 | 41 |
| 3. 検査の受付 | 41 |
| 3.1 品質管理で考慮すべきポイント | 42 |
| 3.1.1 検査依頼書 | 42 |
| 3.1.2 検体受付 | 42 |
| 4. 検体採取 | 42 |
| 4.1 品質管理で考慮すべきポイント | 42 |
| 4.1.1 採取容器と取扱い | 42 |
| 5. 検体の保存 | 43 |
| 5.1 品質管理で考慮すべきポイント | 43 |
| 5.1.1 保存方法 | 43 |
| 6. 検体の運搬と輸送 | 44 |
| 6.1 品質管理で考慮すべきポイント | 44 |
| 6.1.1 物理的安定性の確保 | 44 |
| 6.1.2 温度管理 | 44 |
| 6.1.3 依頼書と検体の照合管理 | 45 |
| 7. 検体の前処理と核酸の抽出 | 45 |
| 7.1 品質管理で考慮すべきポイント | 45 |
| 7.1.1 核酸の抽出効率 | 45 |
| 7.1.2 核酸の純度 | 46 |
| 7.1.3 核酸の汚染が少ない方法 | 46 |
| 8. 核酸の検出 | 46 |
| 8.1 PCR法 | 46 |
| 8.1.1 品質管理で考慮すべきポイント | 46 |
| 8.2 RT-PCR法 | 48 |
| 8.2.1 品質管理で考慮すべきポイント | 49 |
| 8.3 核酸の定量 | 50 |
| 8.3.1 品質管理で考慮すべきポイント | 51 |
| 9. NGSを用いた病理分野の遺伝子関連検査についての留意点（検査の依頼まで） | 53 |
| 9.1 病理プレアナリシス，病理アナリシスの対応 | 53 |
| 9.2 遺伝子関連検査に提出するFFPE切片の留意点 | 53 |
| 9.3 検査の依頼（検査会社への外部委託を想定） | 54 |
| 10. 検査データの管理 | 54 |
| 10.1 品質管理で考慮すべきポイント | 54 |
| 11. 検査の精度管理 | 54 |

| | | |
|--------|-------------------------------------|----|
| 11.1 | 品質管理で考慮すべきポイント | 54 |
| 11.1.1 | 検査体制と記録の整備 | 55 |
| 11.1.2 | 精度管理手法の確立 | 55 |
| 12. | 遺伝子検査の倫理原則 | 56 |
| 13. | 遺伝子情報の収集 | 58 |
| 13.1 | 塩基配列情報 | 58 |
| 13.2 | バリエーション頻度情報 | 58 |
| 13.3 | 遺伝性疾患情報 | 58 |
| 13.4 | 腫瘍と塩基配列バリエーション | 59 |
| 13.5 | 塩基配列バリエーションの臨床的意義 | 59 |
| 13.6 | 塩基配列バリエーションのタンパク質機能への影響度を予測するウェブツール | 59 |
| 14. | 検査の安全管理 | 59 |
| 14.1 | 生物学的危険物質 | 59 |
| 14.2 | 化学的危険物質 | 60 |
| 14.3 | 物理的危険物質 | 60 |
| 15. | 教育活動 | 60 |

第1章 染色体遺伝子検査の品質保証

1. 法改正における要求事項

医療法等の一部を改正する法律（検体検査関係）（平成29年法律第57号 平成29年6月14日公布）の概要について以下にまとめた。

1.1 検体検査の分類の見直し

医療技術の進歩に合わせて検体検査の分類を柔軟に見直すため、検査の分類を厚生労働省令で定めることを規定。遺伝子関連・染色体検査を新設し各部門にわたっていた項目を統合(医療法等の一部を改正する法律施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について 医政発0810第1号 平成30年8月10日)

| 一次分類 | 二次分類 |
|-------------|---|
| 微生物学的検査 | 細菌培養同定検査 薬剤感受性検査 |
| 免疫学的検査 | 免疫血液学検査 免疫血清学検査 |
| 血液学的検査 | 血球算定・血液細胞形態検査 血栓・止血関連検査 細胞性免疫検査 |
| 病理学的検査 | 病理組織検査 免疫組織化学検査 細胞検査 分子病理学的検査 |
| 生化学的検査 | 生化学検査 免疫化学検査 血中薬物濃度検査 |
| 尿・糞便等一般検査 | 尿・糞便等検査 寄生虫検査 |
| 遺伝子関連・染色体検査 | 病原体核酸検査 体細胞遺伝子検査 生殖細胞系列遺伝子検査 染色体検査 |

1.2 遺伝子関連・染色体検査の責任者の配置の義務化

原則、業務経験を有する医師または臨床検査技師。ただし、専門性・経験を勘案して他の職種の者が責任者になることを妨げない。（改正後医療法施行規則第9条の7 第2号関係）

1.3 精度の確保に係る各種標準作業書・日誌等の作成の義務化

(改正後医療法施行規則第9条の7第3号、第4号及び第5号関係)

1.3.1 各種標準作業書等

血清分離標準作業書，外部委託標準作業書，検査機器保守管理標準作業書，測定標準作業書，精度管理標準作業書，検体処理標準作業書，苦情処理標準作業書，検査依頼情報・検査結果報告情報標準作業書，教育研修・技能評価標準作業書

業務案内書（衛生検査所では検査案内書），検体受領標準作業書，検体搬送標準作業書，検体受付及び仕分標準作業書

1.3.2 各種作業日誌

検査機器保守管理作業日誌，測定作業日誌

検体受領作業日誌，検体搬送作業日誌，検体受付及び仕分作業日誌，血清分離作業日誌

1.3.3 各種台帳

試薬管理台帳，温度・設備管理台帳，統計学的精度管理台帳，外部精度管理台帳，検体保管・返却・廃棄処理台帳，検査依頼情報・検査結果情報台帳，教育研修・技能評価記録台帳

検査結果報告台帳，苦情処理台帳，委託検査管理台帳

※網掛けはブランチラボ（院内業務委託）・衛生検査所が追加で備えるべきとした書類

詳細な記載事項

1) 検査機器保守管理標準作業書については，医療機器の添付文書，取扱説明書等をもって検査機器保守管理標準作業書とすることも認められる。

2) 測定標準作業書については，検査項目ごとに以下の事項について，可能な限り多くのものを盛り込むことが望ましい。なお，血清分離に関する事項は測定標準作業書に含めるものとする。

定義，臨床的意義，測定方法及び測定原理，検査手順（フロー等），基準範囲及び判定基準，性能特性（測定感度，測定内変動等），検査室の環境条件，検査材料（検体量，採取条件等），試薬，機器，器具及び消耗品，管理試料及び標準物質の取扱方法，検査の変動要因，測定上の注意事項，異常値を示した検体の取扱方法，精度管理の方法及び評価基準，参考文献等

3) 検査機器保守管理作業日誌に保守管理を行う担当者が記入すべき事項としては，以下のものが考えられる。

点検日時及び点検実施者名，各検査機器における保守管理上確認すべき内容，上記確認すべき事項について特に付記すべき内容，業者による定期保守点検を受けた場合はその作業内容，点検を行った業者名等

4) 測定作業日誌に記入すべき事項としては，以下のものが考えられる。

検査項目（細菌顕微鏡検査，感染症免疫学的検査，血球算定検査，総タンパク，総ビリルビン等検査の細項目をいう）ごとの実施件数，実施件数の内，検査エラー又は検査不具合の発生件数

5) いずれの作業日誌も記録の頻度としては，検体検査を実施した都度又は週～月単位が望ましい。

6) 試薬管理台帳に記入すべき事項としては，以下のものが考えられる。

試薬の有効期限，保管されている試薬の在庫

7) 統計学的精度管理台帳に記入すべき事項としては，内部精度管理を実施した場合，以下のものが考えられる。

実施日及び実施検査項目，実施者名，実施結果（検査エラー値が出た場合の考察等含む）

8) 外部精度管理台帳に記入すべき事項としては、外部精度管理調査を受検した場合、以下のものが考えられるが、実施結果（外部精度管理調査実施主体が作成する報告書）をもって代替可能とする。

受検日（受検申込日、実施団体からの結果報告日等）及び外部精度管理調査実施主体名

9) 各標準作業書、各作業日誌及び各台帳の作成に当たっては、検査機器保守管理標準作業書及び測定標準作業書については既存のマニュアル等を活用することとして差し支えない。

10) 各作業日誌及び各台帳については、作業の内容に応じて整理統合して差し支えない。

1.4 検体検査の精度の確保のために努めるべき事項

1) 外部精度管理の実施義務（改正後医療法施行規則第9条の7の3第1項関係）

2) 外部精度管理調査の受検およびその代替方法（施設間における検査結果の相互確認）に係る努力義務（改正後医療法施行規則第9条の7の3第2項関係）

外部精度管理調査の体制が整っていない遺伝子関連・染色体検査について、病院等の管理者は、自施設以外の病院等のほか、衛生検査所や大学等の研究機関と連携してそれぞれ保管・保有する検体を用いて相互に検査結果を比較して、検査・測定方法の妥当性を確認するなどの方法により、精度の確保に努めること。

3) 適切な研修の実施義務（改正後医療法施行規則第9条の7の3第3項関係）

4) 検査施設の第三者認定を取得すること（ISO 15189等の取得）を当面、勧奨することとする。

参照法律、政令、省令

1) 医療法等の一部を改正する法律(平成29年6月14日公布 法律第57号)

2) 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行期日を定める政令(平成30年7月27日公布政令第229号)

3) 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う関係政令の整理に関する政令(平成30年7月27日公布 政令第230号)

4) 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令(平成30年7月27日公布厚生労働省令第93号)

5) 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について(平成30年8月10日付け 医政発0810第1号 厚生労働省医政局長通知)

2. 外部認証

検査データの正確性を含む全ての技術要件、管理運営要件を総合的に保証する外部認証制度として、日本適合性認定協会によるISO 15189認定制度、米国保健福祉省所属機関による臨床検査室改善法（Clinical Laboratory Improvement Amendments ; CLIA）認証制度、米国病理学会（College of American Pathologists ; CAP）による臨床検査室認定プログラムがある。最終的に文書化、記録化を求めている点は共通しており本質において差はない。施設ごとに認証取得の目的を吟味し選択することが望まれる。以下にISO 15189:2012「臨床検査室—品質と能力に関する要求事項」を参考に遺伝子染色体検査領域での留意事項を例示する。

2.1 人材

2.1.1 資格

染色体遺伝子検査は、一定の資格を満たした要員により実施される。そのために、検査を行う要員、検査結果の報告に責任をもつ要員、検査室の運営に責任をもつ要員の資格を定義し文書化する。この定義には、少なくとも関連する教育訓練の結果、経験、技術、学会等認定資格の保有が含まれる。

2.1.2 教育訓練・評価

教育訓練は、導入時および一定期間ごとに実施され、任務遂行に必要な技術、検査室の管理運営、情報システム、安全衛生、倫理、守秘義務を含める。教育訓練実施後は、あらかじめ設定した基準に基づき、達成度を評価する。実施した教育訓練および評価の結果を記録し、関係者が容易に利用できる方法で保管する。

2.2 環境

2.2.1 作業エリア

遺伝子領域では、コンタミネーション防止、検査者の安全確保を目的とした作業エリアの区分けを行う。染色体領域では、培養時のコンタミネーション防止、標本作製時の化学薬品による健康被害予防、検査者が解析に集中できる静かな環境、に配慮した作業エリアの区分けを行う。

2.2.2 アクセス制限

検体、試薬、情報の紛失を防ぐため、部外者の作業場所への立入制限、施錠可能な作業場所や保管場所を確保する。

2.2.3 監視

検査結果に影響する環境条件を監視する。例として、試薬や検体の保管場所に使用している作業エリア、保管庫、保冷库、染色体領域における標本作製エリアの室温、湿度がある。

2.3 器材（機器、試薬、消耗品）

2.3.1 受入検査

使用開始に先立ち、必要な性能を有していることの検証作業（据付時適格性確認、運転時適格性確認など）を行う。そのために、あらかじめ必要な性能を定義する。

2.3.2 使用に関する指示

取扱説明書、試薬添付文書、検査室内で作成した手順書をいつでも利用できる状態に維持する。

2.3.3 校正・保守

校正や補正、およびそれらに準ずる調整が行われた場合は、実施日を記録する。検査室の日常点検、製造業者による点検を計画する。

2.3.4 在庫管理

試薬、消耗品の在庫管理システムを構築する。在庫保管場所では、検証前の試薬と検証後の試薬とを分離する。

2.3.5 自家調製試薬

自家調製試薬は、試薬名称、調製者、調製日、有効期限が直接または参照できる状態に維持する。

2.3.6 記録

機器においては、機器名称、製造業者名、型式、シリアル番号、受取日、使用開始日、設置場所、受入検査の記録、保守や修理の実施日・予定日、日常点検記録の各記録が、リスト、配置図により維持される。記

録の保管期間は、公的な規定に従うほか、器材の使用期間もしくはそれ以上の期間で設定する。試薬、消耗品の在庫管理においては、受取日、有効期限、ロット番号、使用開始日を含める。

2.4 検査前プロセス

2.4.1 利用者への情報提供

検査の依頼から結果受領までに必要な情報がいつでも利用できる。この情報には、検査室の所在地、業務時間、依頼方法、患者試料の種類、採取容器、患者試料の採取時の指示・採取後の保管方法および搬送方法、(必要な場合)患者の同意取得の有無、検査室の試料受入可否基準、検査方法(原理)、結果解釈に必要な検査の性能に関する情報、個人情報保護に関する検査室の方針、検査室のアドバイス・苦情の照会先が含まれる。

2.4.2 試料の搬送、受領

試料が適切な条件(温度、所要時間、梱包、保存剤等)で搬送されたことを担保できる。試料の受入時に、受入可否基準に合致していることを評価する。

2.5 検査プロセス

2.5.1 検査手順の採用

使用する検査手順は、検査の目的を満たし、妥当性確認済の手順(対外診断薬、権威ある教科書または学術雑誌、広くコンセンサスが得られている標準法またはガイドラインなど)を採用する。検査室独自の方法(laboratory developed test ; LDT)を採用する場合、妥当性確認済の手順に準じた検証を可能な限り行う。妥当性確認済の手順を採用する場合でも、日常検査に必要な程度の検証を行う。

2.5.2 標準作業書の作成

標準作業書に掲載する情報は、検査の目的、原理および測定方法、性能特性、試料の種類、患者の準備、容器および添加剤の種類、器材および試薬、環境および安全管理、校正手順、操作ステップ、精度管理手順、干渉および交差反応、結果計算法の原理、基準範囲および臨床判断値、結果の報告範囲、結果が測定範囲外の場合の結果の決定方法、警戒値および緊急異常値、臨床的解釈、変動要因、参考資料が含まれる。

2.6 精度管理

2.6.1 内部精度管理

患者試料に近似する試料を測定系に投入し評価するが、それが困難な測定系の場合、装置から得られる分析パラメータ、複数の検査者による二重チェックなど、特定の工程の品質を担保する情報群の総和により評価することも許容される。

2.6.2 外部精度管理

外部精度管理プログラムが存在する場合は参加し、存在しない場合でも代替法を構築する。代替法には、内部精度管理に使用しているのとは別の既知試料、過去に測定した試料、保存細胞、他施設との試料交換が許容される。

2.7 検査後プロセス

一次試料、二次試料(核酸、中間反応物、カルノア固定細胞)の保管について、目的、期間、アクセス方法、安全な廃棄の手順、および二次利用を認める場合はその手順を定める。

2.8 報告

報告書の様式および媒体，報告手段を定める。報告内容は，正確，明瞭，簡潔であり，結果の解釈に影響を与える情報を含む。中間報告，最終報告，再報告，訂正報告を行う場合，それが識別できる。

2.9 情報システム

患者の機密を維持することに最大限配慮したハードウェア，ソフトウェア構成とする。
システムを利用するすべての要員の権限と責務を定義し，相応のアクセス制限や機能制限と連動する。

第2章 染色体検査

1. 機器・作業の環境

染色体検査は分裂時の細胞を対象とするため、検体採取から培養終了まで無菌的に操作しなければならない。

- 1) 培養操作はクリーンベンチ内で行う。
- 2) 操作中は検査衣，マスク，手袋を着用し，不要な会話は慎む。
- 3) 検査室内は常に清浄を保つ。
- 4) 検査室内の汚染と検査過誤を極力防止するため，検査従事者以外の検査室への出入りを制限する。
- 5) 廃棄物は施設の基準に従い適切に処理する。
- 6) 化学物質，火気，電気の取扱いは，施設の安全基準を遵守する。
- 7) 一日の作業終了後はクリーンベンチの紫外線灯を点灯し，実験テーブルを清掃し消毒用アルコールで清拭する。
- 8) 検査に使用する水は超純水または純水とする。

参考文献

- 1) Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008 (Update: May 2019)

2. 検査の受付

2.1 検体と依頼書の照合

検体と依頼書を照合し，氏名，依頼書の記載内容，検体の性状等を確認する。不備や不明な事項がある場合，依頼者や検体提出先へ直ちに確認する。

2.1.1 検査依頼書の記載事項確認

- 1) 被検者の基本属性（患者番号，氏名，性別，生年月日）
- 2) 検体提出日
- 3) 依頼元（医療機関名または診療科），依頼医師氏名
- 4) 検査材料，採取日
- 5) 検査項目
- 6) 臨床診断名または検査目的
- 7) 臨床所見，検査歴，治療歴
- 8) 骨髄移植歴

2.1.2 検査依頼書：遺伝学的検査

上記に加え遺伝学的検査では以下の項目が記載されていることを確認する。

- 1) 家族歴や家系図
- 2) 検査材料，採取日（出生前診断では妊娠週数）

- 3) 被検者が遺伝カウンセリング¹を受けている
- 4) インフォームド・コンセント²を得ている
- 5) 被検者の氏名を連結可能な匿名化³し検査を外部に委託する場合は、特に注意を払う。
- 6) 出生前診断では妊娠週数

3. 検体の採取

検体はすべて無菌的に採取し、できるだけ早く検査室に搬入し培養を始める。検体を遠隔地に輸送する場合は、冷蔵にて輸送とし、24時間以内に培養を開始することが望ましい。細胞を培養するため、検体は凍結してはならない。検体の残りは、分析に適した標本が作製できるまで2℃～8℃の保冷庫にて保管する。

3.1 血液（末梢血液，臍帯血，胎児血）

ヘパリン採血管あるいはヘパリン処理⁴した注射器で1～5 mL採血する。

3.2 骨髄液

腸骨あるいは腰椎から骨髄穿刺し、ヘパリン処理した注射器で採取する。採取後、できるだけ速やかに培養する。十分な骨髄液が得られない場合や末梢血液に芽球が出現している場合には、末梢血液やその他の体腔液を使用することもある。

3.3 リンパ節

外科的切除または生検した検体は、培養液あるいは滅菌PBSに入れるか、滅菌生食で濡らしたガーゼに包み乾燥しないよう注意して運搬する。

3.4 羊水

妊娠15週後半～18週ごろ、超音波ガイド下で経腹的にヘパリン処理した注射器で15～20 mLを無菌的に採取し、滅菌試験管に入れる。母体由来の細胞の混入を避けるため、採取直後の数 mLは取り分け、使用しないことが望ましい。

3.5 子宮内容物

外部に検査を委託する場合、流・死産絨毛、胎盤などは1 g以上採取し、基礎培地に10倍量の抗生物質⁵を添加した洗浄液で洗浄後、新たな洗浄液に入れて2℃～8℃の保冷庫で輸送する。

¹ 遺伝カウンセリング：遺伝医学に関する知識およびカウンセリングの技法を用いて、対話と情報提供を繰り返しながら、遺伝性疾患をめぐり生じる医学的あるいは心理的問題を軽減することを支援すること。

² インフォームド・コンセント：被検者が、検査や治療にあたり、担当医師から検査に関する十分な説明を受け、その検査の目的、方法、精度、限界、結果の開示方法及び予測される不利益などを理解し、自由意思に基づいて検査や治療について同意すること。

³ 匿名化：ある人の個人情報法令、本指針又は研究計画に反して外部に漏洩しないように、その個人情報から個人を識別する情報の全部又は一部を取り除き、代わりに個人と関わりのない数記号を付すことをいう。匿名化には、数記号と個人の情報の対応表を残し最終的に個人を特定できる連結可能匿名化と、対応表を残さない連結不可能匿名化がある。

⁴ 抗凝固剤ヘパリンナトリウムは20単位前後/mLで使用する。ノボ・ヘパリンの場合は5単位前後/mLで使用する。

⁵ 抗生物質-抗真菌剤(100×)：penicillin 100単位/mL, streptomycin 100 µg/mL, amphotericin B 0.25 µg/mL

4. 浮遊培養

浮遊培養に限らず全ての培養操作の一般的注意事項は次のとおりである。

- 1) 滅菌器材と非滅菌器材との混用，接触を避ける。
- 2) 培養液の交換は滅菌ピペットで行い，容器の口から直接に分注，廃棄しない。
- 3) 開口した培養ボトル上を横切って操作をしない。
- 4) 汚染はボトルの口元から起こるため，ピペットの先をボトルの口元に触れないようにする。

4.1 培養液

血液，骨髓液，リンパ節を対象とする浮遊培養では，10～20 %ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 培地を使用する。培養液はフェノールレッドを含有し，pH 7.2～7.4 で橙色，pH 8 以上で赤紫色，pH 6.8 以下で黄色に変化するので，色調を常にチェックする。抗生物質は細菌や真菌による汚染を防止するために適量以内使用し，必要があれば抗真菌剤を加える。培養液は 4 °C で保存し，1 ヶ月以内に使用する。グルタミンは分解しやすいので使用直前に 0.3 % の割合で添加する。グルタミンを添加後に保存する場合は-80 °C の保冷庫で保管し，数ヶ月以内に使用する。

4.2 培養条件

培養は 2 個以上のシャーレ，フラスコまたはプラスチック試験管を使用して，37 °C の 5 % 炭酸ガス湿潤培養装置の中で培養する。培養装置の故障から検体を守るために 2 つの培養装置に分けて培養するのが望ましい。

4.3 培養操作

4.3.1 血液

遺伝学的検査では，血液 0.5～1.0 mL を培養液 10 mL に加え，T リンパ球の分裂刺激剤である (phytohemagglutinin-M; PHA) を培養液に最終濃度 10 µg/mL (メーカー指示の濃度を参照のこと) または 2～3 % 濃度になるように添加し，72 時間培養する。培養中は，PHA による赤血球凝集を解し内容を均一させるために，1 日 1 回培養器を攪拌するとよい。

また，白血球を分離して培養する場合，200 × g で 10 分間遠心後，滅菌パスツールピペットで上清を除去し，赤血球の混入を避けて上層の白血球ペレットのみ 0.5 mL を採取し培養液に加え，PHA を添加し 72 時間培養する。

培養開始 3 日目，標本作製の 1～2 時間前にクリーンベンチ内でコルセミドを 0.05～0.1 µg/mL 添加し培養を継続する。

4.3.2 骨髓液，体腔液

原則的に分裂刺激剤を培養液に入れずに，短期 (一晚) 培養を行う。培養液中の細胞数は 1～2×10⁶/mL に調整する。培養終了前の 40 分～2 時間前にコルセミドを 0.02～0.05 µg/mL 添加する。腫瘍細胞の世代時間とコルセミドの影響を考慮して，低濃度のコルセミド 0.002～0.003 µg/mL を添加し，一晚培養する方法もある。検体量が十分であれば，疑われる血液疾患に合わせて，直接法や 3 日間，あるいはそれ以上の培養を併用する。直接法はコルセミドを 0.02～0.05 µg/mL 添加した培養液で，40 分～4 時間培養を行うが分裂細胞の回収や品質は不良である。リンパ性腫瘍では，B 細胞系の腫瘍が疑われるとき LPS (lipopolysaccharide) を 5 µg/mL，T 細胞系腫瘍が疑われるときに PWM (poke weed mitogen) を 0.1～1 µg/mL，または PHA を前述の濃度で添加して 3 日間培養により，腫瘍細胞に由来した分裂細胞を形成できる場合がある。

4.3.3 リンパ節

5 × 5 mm 程度の組織片をシャーレに移し、脂肪や血液、壊死組織を十分に取り除き、鋭利なはさみかメスで細切する。組織内の腫瘍細胞をできるだけ取り出す。大きな組織片などを除去するためにナイロン製メッシュなどで分離し、200 × g で 10 分間遠心して細胞を回収する。以降の培養処理は、骨髄液の培養操作に準じて行う。

5. 定着培養

5.1 培養液

羊水や絨毛の培養には、羊水細胞の初代培養用として開発された多種類のホルモンと細胞成長因子を含む培地 AmnioMAX™ (GIBCO) などを使用する。調製した培養液は 2 週間以内に使用する。凍結乾燥試薬は溶解後に小分けして -20℃ に保存し、数カ月以内に使用する。

腫瘍組織の培養には、20 % ウシ胎児血清添加 D-MEM/F-12 培地を使用する。抗生物質を使用する場合は適量以内とし、必要があれば抗真菌剤を加える。グルタミンを添加した培養液は 1 ヶ月以内に使いきる量に分注して、-80 °C で保管して解凍後は 4 °C で保存する。

5.2 培養条件

5.2.1 羊水の培養

25 mL フラスコまたはディッシュを使用して行う。3 つに分けて培養するのが望ましいが、細胞数が少なければ 2 つに分けて 37 °C の 5 % 炭酸ガス培養装置の中で培養する。細胞密度が適正であることを倒立顕微鏡下で確認しておく。2 つに分けた場合は、初回の培養液交換時に上清を集めて 3 つ目を作る。酸素分圧を 5 % とすることで、細胞の増殖が良好になる。培養装置の故障から検体を守るために、2 つの培養装置に分けた培養が望ましい。追加した分析が必要になる場合に備えて、常にバックアップ細胞の培養を継続しておく。

羊水は 200 × g で 10 分間遠心する。沈渣は 1 培養当たり 0.5 mL の羊水を残して上清を捨てる。沈渣を再浮遊し、少量 (2 mL 程度) の培養液を入れ培養を開始する。4~5 日目に初回の培養液を交換するまでは静置し、決して動かさない。倒立顕微鏡で増殖を確認できたら、半量ずつ培養液を交換する。この時点で全く増殖が確認されない場合は主治医に連絡し、羊水の再採取を含めた検討を行う。以後は 2 日に 1 回、半量ずつ培養液交換をし、ハーベスト前日にも培養液を交換する。間接法 (フラスコ法) と直接法のどちらを用いてもよい。直接法はモザイクの判定に有利であり、間接法は各種分染法が可能で良質の核型が得られる。

1) 間接法 (フラスコ法)

25 mL フラスコを用い定着培養を行う。培養液を交換し十分に発育増殖したコロニーが 3 つ以上得られるまで培養を続ける。培養終了前の 2~3 時間前にコルセミドを 0.05~0.1 µg/mL 添加する。試験管に全ての培養液を移し、PBS(-)⁶ で 2 度洗浄した後にトリプシン/EDTA⁷ を加え、37 °C で 15 分間保温して剥離した

⁶ Dulbecco's phosphate-buffered saline カルシウム、マグネシウム不含。オートクレーブ滅菌する。作製後、2 °C ~ 8 °C での保管で 6 ヶ月間使用。

⁷ 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 4Na

定着細胞を試験管に集める。200 × g で 10 分間遠心後に上清を捨て、低張処理に移る。

2) 直接法

ディッシュを用い定着培養を行う。培養用カバーガラスあるいはディッシュの表面に形成されるコロニーの増殖を倒立顕微鏡で確認しながら、生着したコロニーが表面の 70 %程度になるまで培養を続ける。培養終了の 2~3 時間前にコルセミドを 0.05~0.1 µg/mL 添加する。

5.2.2 流産絨毛（子宮内容物）の培養

羊水の培養操作に準じる。絨毛の場合は以下の前処理が必要である。無菌的状况の下で母体の脱落膜や血液などを取り除き、絨毛だけを得る。絨毛を無菌的にハサミで細切し、約 10 mg の絨毛に対して、トリプシン/EDTA 2 mL を加え、15 分おきに優しく転倒混和しながら 37 °C の恒温槽で 60 分加温する。遠心分離後に上清を捨て、コラゲナーゼ/DNase 消化液⁸を添加した PBS(-) 8 mL を加え、37 °C で 15 分ごとに静かに転倒混和しながら 90 分間処理する。遠心分離後に上清を捨て、培養液を加えて混和し、再度遠心分離後に上清を捨て、3 つに分けて培養する。

5.2.3 腫瘍組織の培養

腫瘍組織は無菌状况の下で、脂肪組織などの腫瘍以外の組織を取り除き、腫瘍組織を無菌的にハサミで粥状になるまで細切する。粥状になった組織に組織の量に応じてコラゲナーゼを加え（コラゲナーゼの種類、濃度、量、処理時間は腫瘍の種類により異なる）、ピペットで吸い上げることができるまで消化する。このとき組織が一塊の餅状になっていた場合は DNase1 を加える。コラゲナーゼの酵素活性は血清で阻害されないため、培養液を加え遠心して酵素液を除き、最後に少量の培養液を加えフラスコに撒く。コラゲナーゼ処理をしない場合は、粥状になるまで細切した組織を直接フラスコに滅菌したスパーテルで蒔いて、組織が乾燥しない程度の少量の培養液を入れ、定着培養を開始する。2~3 日後、組織塊から細胞が出てきたら培養液を増やす。顕微鏡で腫瘍細胞の増殖を確認しながら生着した細胞がフラスコ表面の 70 %程度になるまで培養し、コルセミドを 0.05 µg/mL 添加する⁹。長期間の培養では、繊維芽細胞などの正常組織成分が優位に増殖してくる可能性があることに留意する。試験管に全ての培養液を移し、PBS(-)で 2 度洗浄した後にトリプシン/EDTA を加え、37 °C で 15 分間保温して剥離した定着細胞を試験管に集める。200 × g で 10 分間遠心後に上清を捨て、低張処理に移る。

6. 低張・固定処理

6.1 低張処理

コルセミド処理後の細胞を試験管に移し、200 × g で 10 分間遠心し、沈渣を残して上清を取り除き、0.075 M KCL の低張液を 3~5 mL 加え、細胞を丁寧にほぐすように十分に混和する。低張処理は 37 °C の恒温槽で 15~20 分間静置する。

6.2 固定処理

低張処理後、下層に沈んだ細胞を均一な浮遊液とするために静かに十分に混和する。カルノア固定液(メタノール：酢酸 = 3 : 1)を調整する。固定処理は最初に半固定として、低張処理の終わった液に 1 %程度の割

⁸ コラゲナーゼ/ DNase 消化液：滅菌超純水でコラゲナーゼ type 4 を 4,000 単位/mL に、DNase1 を 0.2 mg/mL に調製して 200µL ずつに分注して-20°C以下で保存しておく。

⁹ 細胞の周期の違いにより、3~16 時間。非上皮性腫瘍の場合は全て一晚処理する。

合に固定液を重層するように加え、泡立えないよう丁寧によく混和する。200×gで5～10分間遠心し、沈渣を残して上清を除去する。次にカルノア固定液を3～5 mL加えて細胞をほぐすように十分に混和する。上清が完全に透明になり沈渣が白色になるまで、遠心と固定処理を数回繰り返す。最終的に、カルノア固定液で薄いすりガラス程度となるよう細胞浮遊液に調整し、標本作製に使用する。保存する場合は、2 mL程度の保存容器にカルノア固定液で満載し、キャップの周囲をパラフィルムで密栓し-20℃の保冷庫に保存すれば、追加検査など長期に対応が可能である。

7. 標本作製

7.1 標本作製法

スライドガラスは透過率が良好で自発蛍光の少ない脱脂洗浄処理済みを使用し、高温多湿を避けて保存する。

蒸気乾燥法では、風の流れが無い場所に設置した65±4℃の恒温槽内にラックを置き、スライドガラスを乗せる。スライドガラスの2ヶ所に滴下し、1分間程度静置して乾燥させる。標本の良否は滴下した細胞浮遊液の拡がる速度と、乾燥する速度の両方に左右されるため、恒温槽の温度、滴下までの時間、細胞浮遊液の温度と濃度を調節する。拡がりが悪い場合には、乾燥する前に同じ場所に再度滴下することで改善する場合がある。

空気乾燥法では加湿器とデジタル湿度計を使用し、温度25℃前後、湿度30%～50%の環境下で水に濡らしたガーゼ上にスライドガラスを置く。細胞浮遊液をスライドガラス約1～2 cm上から中央部より端に滴下し乾燥後、対象側に同様に滴下し乾燥させる。早く乾燥する条件下では、染色体が十分に拡がらずに分染も不良となる傾向があるため、良好な拡がりとなる条件を設定する。

スライドガラス上に展開した時の細胞密度は、細胞数が100～200個/弱拡大(100倍)程度となるようにカルノア固定液で細胞浮遊液の濃度を調整する。

7.2 各種分染法

7.2.1 G分染法

染色体はメガ塩基レベルでのA/T%とG/C%の区分的なモザイク構造であり、Gバンドでは染色前に乾燥させて行うエージング(ハードニングともいう)処理が必要である。エージングは、室温～37℃で数日、50～60℃で一晩、65℃2時間程度行われている。処理後の標本を室温に戻し、PBS(-)で希釈した0.025～0.1%トリプシン¹⁰溶液に数秒～数分程度浸漬する。浸漬処理は、氷冷～37℃までの温度で実施されている。浸漬時間はトリプシン濃度、温度により分染像の良否が決まり、施設で最適な条件を設定し、標準化することが重要である。処理後、50～70%アルコールに浸漬しトリプシンの作用を止める。最後に2～5%ギムザ液¹¹で5～7分間染色し、流水水洗した後、冷風乾燥させる。トリプシン浸漬時間は、個々の検体ごとに試しスライドを用いて最適な時間を決める。

¹⁰ トリプシン: DIFCO 215240

¹¹ ギムザ液を1/15M PB (pH6.8) で調整

7.2.2 Q 分染法

基本的に G バンドパターンと同じパターンを示し、標本作製後そのまま染色できる。pH 4.5 の McIlvaine's 緩衝液¹²で調整した 12.5 µg/mL キナクリンマスタードで 10 分染色し、McIlvaine's 緩衝液で 2 回洗浄し、そのままカバーガラスで封入する。キナクリンマスタード染色後に、追加して 20 µg/mL ヘキスト 33258 で 10 分染色する二重染色法を行うと蛍光量が増強される。染色後、Glycerin と McIlvain Buffer = 1 : 1 混合液で封入し、蛍光顕微鏡で観察する。

7.2.3 C 分染法

C バンド領域は高度に反復した DNA が集積した箇所である。C バンド法はスライド標本を 0.2 N 塩酸溶液で室温 1 時間解離処理した後、超純水で 3 回洗浄する。50 °C に加温した 5 % 水酸化バリウム液¹³で 5 分間アルカリ処理を行い、超純水で 3 回洗浄する。60 °C に加温した 2×SSC¹⁴で 60 分間インキュベーションした後、純水で 3 回洗浄する。5 % ギムザ液で 20 分間染色する。染まりが弱ければ 45 分間まで延長する。

7.2.4 NOR 分染法

核小体形成体領域 NOR (nucleolus organizer region) に局在する特殊な蛋白質成分が銀染色陽性を示す。ステンレスバットに直接のせた標本に使用時に混合したゼラチン銀液¹⁵を滴下してカバーガラスをかけ、70 °C に加温したホットプレートの上で褐色になるまで加温する。標本にカバーガラスをかけたまま純水で 3 回洗浄する。

8. 核型分析

8.1 画像取り込み

染色体画像解析システムを利用する場合は、エンハンス処理で背景から染色体だけを差別化して取り出す。この処理で小さなマーカー染色体や、染色体のテロメア領域を消してしまわないように注意する。フリーハンドのマウス操作で切り離しを行って染色体を 1 本 1 本に分けて、画像解析ソフトにより各々の染色体を認識させる。効率良く染色体を解析するため、バンドが鮮明で、重なりが少なくまっすぐなメタフェーズを選択する。

8.2 データ解析

染色体核型と検査所見の標記方法は、核型記載法の国際規約 ISCN (An International System for Human Cytogenomic Nomenclature) の最新版に準拠する。G 分染した染色体を並べて核型分析するにあたって、メタフェーズ自体の異常 (分裂様式、染色体構造物、断裂、複製、小さな染色体など) が無いかを確認し、記録しておく。

8.2.1 末梢血の核型分析

1) 観察

30 個のメタフェーズを観察して染色体数を数える。数の異常や構造異常の場合は、モザイクの可能性があるので同じ核型が増加では 2 個以上、欠失では 3 個以上の存在で一つのクローンと考え、各々のクローンを代表

¹² McIlvaine's 緩衝液 (pH4.5) : 0.1 M クエン酸 27.4 mL と 0.2 M リン酸水素 2 ナトリウム 22.6 mL を混合

¹³ 5 % 水酸化バリウム液 : 使用時に Ba(OH)₂ · 8H₂O を超純水で 5 % (w/v) に溶解して作製

¹⁴ 2×SSC (saline sodium citrate) : 塩化ナトリウム 17.5 g, クエン酸ナトリウム (2 水塩) 8.8 g を超純水 1000mL に溶解後、1N NaOH で pH7.0 に調整

¹⁵ ゼラチン銀液 : 2 % ゼラチン溶液 (1 g のゼラチンに 50 mL の超純水を加えて加温溶解した後、ギ酸を 0.75 mL 加える) 1 mL に 50 % 硝酸銀溶液を 2 mL 混合し、10 分以内に使い切る。

する細胞の染色体数と顕微鏡の XY 軸の位置を記録し、核型分析を行う。データの保護と品質保証のために、必ずオリジナル画像を保管し、「真正性」「見読性」「保存性」を定められた期間担保する¹⁾。保険医療機関及び保険医療療養担当者規則 9 条で、検査所見の記録は診察完了日から 3 年間、保存義務があるとされている。

2) 分析

400～550 バンドステージで、1つのクローンについて 5 個以上の細胞を分析する。構造異常を否定するためには 550 バンドステージでの分析が必要である。構造異常のバンドを高精度分析で判定するときは、700 バンドステージ以上で判定する。

3) 記録

存在する核型すべてについて、2 個以上の細胞の核型を記録し保管する。

4) 所要日数

最終報告までの所要日数は 2 週間以内が望ましい。必要に応じて中間報告を行う。

8.2.2 骨髄液、体腔液の核型分析

1) 観察

20 個のメタフェーズを観察して染色体数を数える。染色体形態が良好な細胞だけではなく、不良なメタフェーズも観察する。不良なメタフェーズでは、特に数の異常（高 2 倍性、低 2 倍性）や微細な構造異常の見逃しに注意する。20 個のメタフェーズが観察できない場合でも、10 個以上の観察が望まれる。データの保護と品質保証のために、必ずオリジナル画像を保管する¹⁾。

2) 分析

300～400 バンドステージで分析する。1つのクローンについて 5 個以上のメタフェーズを分析する。疑われる血液疾患の病型特異的な構造異常染色体を見逃さないように注意する。染色体異常は、各々のクローンを代表する核型を分析する。核型の国際標準化を推進するため、WHO 分類に掲載されている切断点に準拠することを推奨する。

3) 記録

異常クローンが 1 つであれば 2 個の核型を記録し保管する。関連した複数のクローンがあればステムラインの 2 個の核型と、サイドラインの各 1 個の核型を記録し保管する。関連しない複数のクローンがあれば、各々のステムライン 2 個の核型と、関連するサイドラインの各 1 個の核型を記録し保管する。正常細胞のみの場合は 2 個の核型を記録し、正常と異常が混在する場合は、正常細胞は 1 核型のみ記録し保管する。

4) 所要日数

最終報告までの所要日数は 1 週間以内とする。必要に応じて中間報告を行う。

8.2.3 リンパ節の核型分析

1) 観察

メタフェーズが得られにくい場合が多いので分析可能なメタフェーズはすべて観察する。染色体異常を見逃さないために、形態の悪い（拡がりが悪い、短い）メタフェーズも分析する。データの保護と品質保証のために、必ずオリジナル画像を保管する¹⁾。

2) 分析

300～450 バンドステージで分析する。病理組織学診断などで病型が疑われるにもかかわらず正常核型の場合には、正常組織を分析していることが考えられるので、B 細胞分裂促進剤の LPS、T 細胞分裂促進剤の PWM または PHA を添加し、3 日またはそれ以上の日数培養し標本を観察する。それでも染色体異常が観察できない場合は、FISH 検査や遺伝子検査を試みる。異常クローンの存否、および染色体異常の特徴づけが

重要なので、特異的染色体異常であれば1個しか分析できない場合でも核型に記録する。核型の国際標準化を推進するため、WHO分類に掲載されている切断点に準拠することを推奨する。

3) 記録

それぞれのクローンで2個以上の核型を記録し保管する。

4) 所要日数

最終報告までの所要日数は1週間とする。必要に応じて中間報告を行う。

8.2.4 羊水の核型分析（フラスコ法）

1) 観察

少なくとも2つのフラスコで、それぞれ最低20個、合わせて40個のメタフェーズを観察して染色体数を数える。いかなる数の異常、構造異常でも記録する。モザイクを認めた場合は3つ目のフラスコで20個のメタフェーズを同様にカウントする。

2) 分析

550バンドステージでの分析を目標にする。少なくとも2つのフラスコから、各々3個合わせて6個以上のメタフェーズを分析する。モザイクを認めた場合はHsuの基準²⁾に基づいて実施する。すなわち、必ず2つのフラスコでそれぞれ標本作製し、各20細胞についてカウントする。1フラスコで染色体異常を検出した場合は、他の2つのフラスコで各々20細胞、合計60細胞についてカウントし、以下のように判定する。

- ① 3フラスコのうち、1フラスコ内で1細胞の異常の場合、レベル1の偽性モザイク
- ② 3フラスコのうち、1フラスコ内で数細胞の同じ異常を認めた場合、レベル2の偽性モザイク
- ③ 3フラスコのうち、2フラスコ以上で同一の染色体異常を認めた場合、レベル3の真性モザイク

3) 記録

2細胞以上の核型を記録する。モザイクを認めた場合はそれぞれについて2細胞以上を記録し保管する。

4) 所要日数

最終報告までの所要日数は約2週間とする。

8.2.5 羊水の核型分析（直接法）

1) 観察

3つのディッシュから、それぞれ5コロニー中の10メタフェーズずつを観察して染色体数を数える。染色体異常（正常変異を含む）を認めた場合には、1細胞のみの異常か、コロニー全体の異常かをチェックする。コロニー全体であれば同一ディッシュ（カバーガラス）内のすべてのコロニーを分析し、同じ染色体異常が他のコロニーにもあるかチェックする。いかなる数の異常、構造異常でも記録する。モザイクを認めた場合は、以下のように判定する。

- ① 1ディッシュの単一細胞のみに染色体異常を認めた場合、レベル1の偽性モザイク
- ② 1ディッシュにのみ、単一コロニーに同じ染色体異常を認めた場合、レベル2の偽性モザイク
- ③ 複数のディッシュに同じ染色体異常を認めた場合、レベル3の真性モザイク

2) 分析

400～550バンドステージで分析する。3つのディッシュ（カバーガラス）から、それぞれ2個ずつ合わせて6個以上のメタフェーズを分析する。

3) 記録

2個以上の核型を記録する。モザイクを認めた場合は各々について2個以上を記録し保管する。

4) 所要日数

最終報告までの所要日数は2週間以内とする。

8.2.6 流産絨毛（子宮内容物）

羊水の方法に準ずる。

8.2.7 腫瘍組織の核型分析

1) 観察

分裂中期像が得られにくい場合が多いので分析可能な細胞はすべて観察する。データの保護と品質保証のために、必ずオリジナル画像を保管する¹⁾。

2) 分析

300～450 バンドステージで分析する。あらかじめ、FISH 検査や遺伝子検査も試みる。異常クローンの存否、および染色体異常の特徴づけが重要なので、特異的染色体異常であれば1個しか分析できない場合でも核型に記録する。

3) 記録

2個以上の細胞の核型を記録し保管する。

4) 所要日数

最終報告までの所要日数は3週間以内が望ましい。

9. 報告書作成とデータ管理

9.1 報告書の要素

- 1) 被検者の基本属性（患者番号、氏名、年齢、性別、生年月日）
- 2) 依頼元（医療機関名または診療科と連絡先）、依頼医師氏名
- 3) 受付日、報告日
- 4) 検査施設の名称と所在地、連絡先
- 5) 材料名、採取日
- 6) 検査の指示、検査の解釈に関連する場合は固有の医療情報
- 7) 検査結果（明確・完全であり検査を熟知していない依頼者にも理解できる遺伝学的解釈を含む）
- 8) 検査の指示書に書かれた全ての情報に基づく検査結果の解釈
- 9) 検査者（認定資格を有することが望ましい）
- 10) 発行責任者（認定資格を有すること）
- 11) 場合によっては、遺伝カウンセリングやフォローアップ検査の勧めを含める。

9.2 データ管理

検査依頼書、検査報告書および付随する個人情報、書類では鍵のかかる保管庫で管理する。電子媒体による記録は、破損、紛失、改ざん、漏洩から保護するために、データのバックアップ、パスワード保護などを行う。個人が特定可能な検査情報は不特定の人がアクセスできるインターネット上には載せない。また、個人情報の受け渡しに電子メールを用いてはならない。各施設のネットワーク管理者や担当の診療情報管理士³⁾や日本医療情報学会の医療情報技師⁴⁾と連携を密にする。

10. 染色体検査の精度管理

染色体検査の精度管理については、2018年12月1日に施行された「医療法等の一部を改正する法律」（平成29年法律第57号）、および「医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令」（平成30年厚生労働省令第93号）に伴って発行された厚労省医政局長通知「医療法等の一部を改正する法律施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について」（医政発0810第1号）を念頭に置き以下を考慮する。

10.1 遺伝子関連・染色体検査の精度の確保に係る責任者の設置

医師または臨床検査技師とする。該当者がいない場合は、遺伝子関連・染色体検査の専門知識（分子生物学関連科目を履修済）及び経験（3年以上の実務経験及び精度管理についての3年以上の実務経験）を有する他職種も認める。検査報告書を承認する要員は認定資格を取得している者とする。また、検査を実施し検査報告書を作成する要員もこれに準ずる。

10.2 標準業務手順書の作成

検査過誤を軽減し、検査者間の個人差を縮小するために、標準業務手順書（操作手順書、試薬調製手順書など）を作成する。標準業務手順書マニュアルは毎年レビューし、必要に応じて改訂する。

標準業務手順書を変更する際は必ずその妥当性を検証して記録に残しておく。

10.3 検査装置の管理

炭酸ガス培養装置、保冷库、バイオクリーンベンチまたは安全キャビネット、オートクレーブ、恒温槽、遠心機、顕微鏡が対象となる。管理台帳を作成し、各機器の取扱書に準じた日常点検・定期点検を実施する。機器の交換部品を常備し、故障時の連絡先を明確にして、使用できない期間が最短となるような予防策を講じておく。特に以下の機器の管理には注意する。

- 1) 炭酸ガス培養装置は湿潤状態で 37 ± 0.25 °C の範囲で使用する。炭酸ガス濃度と温度、培養装置内の水は日次点検を実施し記録する。内蔵温度計の表示は、培養装置内に置いた標準温度計で検証する。炭酸ガスボンベは、休日中の枯渇には注意する。
- 2) 保冷库は、庫内温度の日次点検と内蔵温度計の年次点検を実施し記録する。

10.4 試薬の管理

管理台帳を作成し、市販試薬はロット番号と有効期限を記録して所定の場所で保管する。ロットの違う試薬を混ぜて使用しない。ロットを変更するときは、現ロットと新ロットで少なくとも2検体以上を重複検査し、性能の違いを記録する。自家調製試薬は、作製日、作製者、構成試薬のロット番号を記録し、期限内に使いきる量を作製して所定の場所で保管する。牛胎児血清は、線維芽細胞の樹立株などを用いて増殖能、細菌汚染や細胞分裂指数などをチェックし記録しておく。

10.5 作業工程の管理

室温と湿度を毎日計測し記録する。細胞の増殖状況や標本の出来は、染色体検査の長期的な品質管理の指標となるので、検体ごとにワークシートを作製し記録しておく。

10.6 内部精度管理の実施

広義には培養液のロット管理，炭酸ガス培養器のガス濃度やコンタミチェック，作業環境（温度・湿度）のモニタリング，余剰標本によるトリプシン処理時間の確認などの品質管理も内部精度管理の一環と位置づけられる．解析工程の日常内部精度管理として，複数検査者によるカリオグラムや核型記載の確認（ダブルチェック）が該当する．

10.7 比較プログラムの受検，または代替手段の構築

可能な限り外部団体が実施する検査室比較プログラム（外部精度管理調査）を受検する．利用可能な外部精度管理プログラムとして，CAP サーベイ（米国病理学会），染色体外部精度管理（日本染色体遺伝子検査学会）等がある．外部団体の検査室比較プログラムが存在しない場合は，施設内で代替手段を構築する．代替手段の例として，協力施設との試料交換，報告済の保存検体（カルノア固定済の細胞浮遊液）またはメタフェーズ画像，セルラインを使用することが挙げられる．

10.8 検査施設の第三者認定の取得

検査室の総合的な力量を担保するために，第三者認定を取得することが望ましい．例として，日本適合性認定協会による ISO 15189 認定制度，米国保健福祉省所属機関による臨床検査室改善法（Clinical Laboratory Improvement Amendments ; CLIA）認証制度，米国病理学会（College of American Pathologists ; CAP）による臨床検査室認定プログラムがある．

11. 教育

新人教育は個人指導を基本とする．検査工程ごとに到達目標を定め，一定期間の訓練の後に評価する．特に習得に年単位の時間を要するカリオグラム作成と核型記載については，正常核型がほぼ正確に並べられる，典型異常が認識できる，FISH 法や PCR 法など関連検査と合わせた評価ができるなど，進歩に応じた具体的な評価基準を内部で設定しておくことが望ましい．実施した教育・評価の結果をスキルマップに記録し，組織目標，個人目標設定に連動させ，検査室としても個人としてもスキル向上に活用することが望ましい．臨床検査における臨床指標の向上⁵⁾に努める．また各自で，英語と情報科学の勉強を積極的に行う．

検査業務を適切に行うために必要な知識及び技能を修得することを目的とした内部研修（症例カンファレンス，目合わせ勉強会など）を計画し実施する．また，学術団体等が行う研修会，報告会，学会など外部の教育研修の機会も活用する．

参考文献

- 1) 医療情報システムの安全管理に関するガイドライン第5版，7.3 保存性の確保について(106-110)，厚生労働省 平成 29年5月
- 2) Hsu LY et al: Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. Prenat Diagn Vol.12,555-573 (1992)
- 3) 診療情報管理士 (<http://kanrishikai.jp>)
- 4) 医療情報技師 (<http://jami.jp/jadite/new/index.html>)
- 5) 臨床検査におけるクリニカルインディケータ：検査前段階の管理技術と精度保証．日本臨床検査自化学会誌．39：9.2014.

第 3 章 FISH 検査

1. 機器・作業の環境, 受付

染色体検査に準じる。この章では市販プローブの使用について提言している。自家調整プローブの使用についてはこれに準じ、各施設の作業手順書に基づいて行う。パラフィン切片を用いた FISH 検査については **12. 組織 FISH** にて解説している。

2. 中期核 FISH 検査

2.1 中期核 FISH 検査の適応

中期核 FISH 検査の適応は以下のとおりで、使用したプローブの遺伝子座に関する情報のみを提供する。

- 1) 微細欠失症候群
- 2) マーカー染色体
- 3) 由来不明な付加染色体
- 4) 隠れた転座を含む再配列染色体
- 5) 増加または減少が疑われる染色体部分
- 6) モザイク

2.2 中期核 FISH 検査の注意点

- 1) 全染色体プローブを使用した小さな派生染色体の検索では、プローブが標的染色体の全長にわたって一様に分布していない可能性があるため偽陰性に判定される場合がある。
- 2) 中期核 FISH 検査で染色体微細重複の判定を行う場合は、ダブルドットとの判別を慎重に行わなければならない。可能ならば遺伝子検査で確認する。
- 3) 中期核 FISH 検査を診断目的に使用する場合は、あらかじめプローブの有効性、感度と特異性を確認しておかなければならない。

2.3 プローブの有効性の確認

プローブの有効性は、新規にプローブを使用する際に必ず確認する。プローブのロットが変更になる場合は、一貫性を立証するために新旧のロットで同じ患者サンプルを分析して確認するのが望ましい。

- 1) ユニーク配列プローブの有効性：最低 5 個の中期核で、プローブが標的ゲノムのみとハイブリダイズし、他のいかなる領域ともハイブリダイズしないことを確認する。クロスハイブリダイゼーションのある場合は使用しない。
- 2) 繰り返し配列プローブの有効性：最低 20 個の分裂中期核で、プローブが対象外の配列とハイブリダイズしないことを確認する。
- 3) 全染色体プローブの有効性：最低 20 個の分裂中期核で、プローブが正常染色体の全領域とハイブリダイズしており、対象外の染色体とハイブリダイズしないことを確認する。

2.4 プローブの感度と特異性の確認

新規にプローブを使用し始める際には、それぞれのゲノム標的プローブごとに、感度と特異性を判定する。正常な5人以上の中期核を用いて、各々のゲノム標的ごとに100個ずつのハイブリダイズシグナルを分析して、感度と特異性の確認を行う。

- 1) 感度：シグナルが正しいゲノム標的の位置にある中期核の割合（%）である。
- 2) 特異性：シグナルが正常な位置だけにあり、異常な位置には無い中期核の割合（%）である。

2.5 分析の基準

全ての標的ゲノムのハイブリシグナルが観察される中期核を選択して分析する。

- 1) バックグラウンドに非特異蛍光がある中期核は分析しない。
- 2) 分析スライドの枚数は1枚で十分であるが、モザイクが疑われる場合や分裂中期核の数が不足する場合はスライドを追加する。
- 3) 非モザイクの微細欠失を疑う場合は、最低30個の中期核を分析する。
- 4) 非モザイクのマーカー染色体または派生染色体を同定する場合は、最低10個の中期核を分析する。
- 5) 全ての分析は少なくとも2人で評価し、検査報告書を作成する技師は認定資格を取得していることが望ましい。
- 6) 判定したシグナルについては、最低3つの画像をFISH検査の記録として保存する。

3. 間期核 FISH 検査

3.1 間期核 FISH 検査の適応

間期核 FISH 検査の適応は以下のとおりで、使用したプローブの遺伝子に関する情報のみを提供する。

- 1) 数の異常
- 2) 重複
- 3) 欠失
- 4) 再配列染色体（隠れた転座を含む）
- 5) 性染色体構成
- 6) モザイク

3.2 間期核 FISH 検査の注意点

染色体検査によって確実に同定可能な検体は、従来の染色体検査で確認する。

- 1) 間期核 FISH 検査で以前に同定された異常の確認を行う場合は、染色体検査は必要ない。
- 2) 全染色体ペインティングプローブまたは全短腕あるいは全長腕プローブは、間期核 FISH 検査では正確に判定できない場合があるので使用しない。
- 3) あらかじめプローブの有効性、感度と特異性を確認しておく。

3.3 プローブの有効性の確認

中期核 FISH 検査法に準じて実施する。

- 1) ユニーク配列プローブの有効性：最低 5 個の中期核で中期核 FISH 検査に準じて行う。
- 2) 繰り返し配列プローブの有効性：最低 20 個の分裂中期核で中期核 FISH 検査に準じて行う。
- 3) 数種類が混在しているプローブ（例えば 18, X と Y のプローブ）の有効性は、各々のプローブごとに評価 する。

3.4 カットオフ値の決定と感度・特異性の確認

新規にプローブを使用し始める際には、各々のゲノム標的ごとに、カットオフ値（%）を決めておく。これには各々のゲノム標的ごとに正常な 10 人以上の間期核を用いて、1,000 個ずつのハイブリダイズシグナルを分析して、カットオフ値（%）を決定する。感度と特異性については、中期核 FISH 検査に準ずる。継続的にプローブを使用する場合には、新旧のロットで同じ患者サンプルを分析して、一貫性を立証するのが望ましい。

3.5 分析の基準

- 1) 細胞が壊れたり、シグナルが重なったり、高いバックグラウンドや非特異蛍光を持つ核は選択しない。
- 2) コントロールプローブを利用する場合には、コントロールプローブシグナルの予想数を持った核だけを選択する。
- 3) 明らかにダブルドットと認識できるシグナルは 1 個としてカウントする。
- 4) 複数のプローブを同時に使う場合には、異なる波長の蛍光色素を用いる。
- 5) 繰り返し配列プローブにおいて、まれに一方の相同染色体の繰り返し数が少なく、小さなシグナルとして観察される場合があるので注意する。
- 6) 数的異常の分析のためには、最低 100 個の間期核を分析する。
- 7) 全ての分析は少なくとも 2 人で評価し、検査報告書を作成する技師は認定資格を取得していることが望ましい。
- 8) 判定したシグナルについては、最低 3 つの画像を、FISH 検査の記録として保存する。

4. FISH 検査法

4.1 標本の作製

- 1) 培養リンパ球を用いて作製した染色体標本は、さまざまなプローブに対して良好な結果を得ることができる。
- 2) 直接法の血液や羊水は低張処理後にカルノア固定処理し、標本を作製する。
- 3) 凍結組織標本はそのままの使用が可能である。
- 4) カルノア固定後に -20°C ~ -30°C で保存した検体では、数年を経過した後でも FISH 検査に適した標本を作製することができる。
- 5) FISH 検査のための標本は細胞が重なり合わない程度に集まったものが望ましい。
- 6) 標本はハイブリダイゼーションに適した小さな領域に印を付けておく。
- 7) 標本作製に 90°C 以上の熱を長時間かけた標本は使用できない。

4.2 エージング

冷風乾燥後、G分染法と同様にエージングを行う。2×SSC/0.1% NP-40¹⁶を使用して37℃ 20～30分間処理を行うことで染色体の膨張を防ぎ、染色性も向上する。

4.3 前処理

標本の状態が良い標本（培養リンパ球、直接法の血液や羊水、あるいは凍結切片など）の前処理は必要ないが、シグナルの入りにくい検体の場合には、RNase¹⁷（0.1 mg/mL）処理や0.005%ペプシン消化などの前処理を実施する。

4.4 脱水

エージング、前処理後の脱水にはエタノール系列（70, 85, 100%）で各々1分間脱水し、脱水後はドライヤーで冷風乾燥する。変性後の脱水についても同様である。

4.5 変性

標本とプローブを別々に変性させる方法と、標本とプローブを合わせて直接変性させる方法のどちらを用いても良い。標本とプローブを合わせて直接変性させる方法は簡便で、ハイブリダイゼーション効率も良い。ただし、あらかじめ変性されているプローブを使用する場合には、標本だけを変性する。

4.5.1 別々に変性させる方法

変性液¹⁸の入ったコプリンジヤーは蓋を閉め、30分以上恒温槽内に置く。このとき、恒温槽にも蓋をして高温を保持するのが望ましい。使用時は直接棒温度計をコプリンジヤーに差し込んで液温73℃（±1℃）を確認しておく。2～5分間処理する。1枚標本を入れると1℃液温が下がるので、一度に処理する標本枚数は3枚以内とする。

4.5.2 合わせて直接変性させる方法

温度は74℃（±1℃）であり、ホットプレートを用いる場合は1～5分間変性させる。ホットプレートの温度は表面温度計で測定する。標本にプローブをのせ、カバーガラスをかけて、溶液の濃度変化を防止するためにペーパーボンドで周囲をシールしておく。

4.6 ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは湿潤状態を保ち、37℃で通常一晩で行う。便宜上、37℃で2～3日間行ってもハイブリダイゼーションが過剰になることはない。結果を急ぐ場合に、繰り返し配列プローブでは37℃ 30分間で十分なシグナルを得ることができる。

4.7 洗浄

洗浄方法はホルムアミドを使用する方法とホルムアミドフリーの迅速法とがあり、どちらを使用しても良い。

¹⁶ NP-40：界面活性剤

¹⁷ RNase A 使用液：2×SSC に溶解した RNase A（DNase free）10 mg/mL 保存液を、使用時に2×SSC で100倍に溶解して使用する。

¹⁸ 変性液：70%ホルムアミド、2×SSC pH 7.0～8.0 に調整

4.7.1 ホルムアミドを用いる方法

45 °Cに保温した3個の50 %ホルムアミド2×SSCで、各々10分間ずつ洗浄する。その後、45 °Cに保温した3個の2×SSC（1個目の2×SSCには界面活性剤を0.1 %添加）で、5分間ずつ洗浄する。

4.7.2 ホルムアミドを用いない方法

73 °C（±1 °C）に保温した0.4×SSC/0.3 % NP-40で2分、同温度の2×SSC/0.1 % NP-40で約30秒洗浄する。その後、室温の2個の2×SSCで1分間ずつ洗浄する。

4.8 封入

DAPI/Antifade¹⁹を使用する。

4.9 蛍光顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡はオリンパス社、ニコン社、カールツァイス社、およびライカ社、キーエンス社製が用いられている。顕微鏡のタイプとモデル使用プローブの蛍光に対応したフィルターを選んで装着する。鏡検は油浸（×100）で行う。

5. データ解析

- 1) 結果の判定は有資格者によって確認されることが望ましい。
- 2) 最低3つの画像を、FISH検査の記録として保存する。

5.1 カウントから除外する細胞

- 1) バックグラウンドが高い細胞
- 2) 集塊していて輪郭が不明瞭な細胞や、シグナルが拡散している細胞
- 3) シグナル数に不特定の過不足がある細胞

5.2 陰性の細胞

- 1) 適正な数のシグナル数がある。
- 2) シグナルが明らかにダブルドットと認識できるものは1つのシグナルと判定する。
- 3) 2つのシグナルがシグナル幅で1個以上離れて位置する **break apart probe** の場合は、目安としてシグナル1~3個以上離れた場合を陽性と考えるが、メーカー、標識領域、対象細胞、スライド作製方法により異なるので、陰性細胞についても個々で対応するのが望ましい。

5.3 陽性の細胞

5.3.1 dual color dual fusion translocation probe の場合

- 1) 2つの融合シグナルを認める。
- 2) 各々の融合シグナルは、2つのシグナルがシグナル幅で1個以内に位置する。

¹⁹ DAPI/Antifade : 退色防止剤（PBS(-)10 mlにDABCOを1.25 g加え良く攪拌後にグリセリン90 mlを加え、濃塩酸でpH 8.7に調整）で、DAPIを濃度100~200 ng/mlに調整して作成後、-20 °Cで保存する。

5.3.2 break apart probe の場合

1) 目安としてシグナル 1~3 個以上離れた場合を陽性と考えるが、メーカー、標識領域、対象細胞、スライド作製方法により異なるので、個々で対応するのが望ましい。

6. 報告書の作成とデータ管理

最終報告までの所要日数は約 1 週間以内とする。報告書には、使用したプローブ名と座位を記入する。その他は染色体検査に準ずる。検査報告書を作成する技師は認定資格を取得していることが望ましい。

7. 検査の精度管理

7.1 品質モニタリング

FISH プローブの使用にあたっては、常に以下の状態を留意し、問題があれば速やかに対策を行う。

- 1) 正しいゲノム標的シグナルが検出される。
- 2) プローブのコンタミネーションがなく、プローブの劣化もない。
- 3) 過剰なバックグラウンド、あるいは解釈できない他の技術的問題がない。

7.2 その他の精度管理

染色体検査に準じる。

8. mFISH (multi-color FISH)

8.1 mFISH 検査の適応

mFISH は 1 回の分析で、同時に全ての染色体を 24 色に色分けする方法である。24 種類の全染色体ペインティングプローブは、5 種類の蛍光色素の組み合わせで多重標識されており、専用フィルターを通して得た 5 枚の画像と、対比染色画像とをコンピュータ処理して 24 種類の染色体を識別する。mFISH 検査は、完全な核型分析の代わりにはならない。

mFISH 検査の適応は、次のとおりである。

- 1) マーカー染色体
- 2) 由来不明な付加染色体
- 3) 隠れた転座を含む由来の不明な再配列染色体

8.2 mFISH 検査の注意点

- 1) mFISH 検査の検出限界は 550 バンドレベルでの 1~2 バンドである。
- 2) mFISH によって認められる異常は、G バンド分析や FISH など他の手法によって確認する。
- 3) 切断点の決定には個別の中期核 FISH 検査や高精度分染法が必要である。
- 4) 複雑な転座では染色体の構成を熟知する必要がある。
- 5) 染色体内部の異常や欠失、転座位置を同定することはできない。

- 6) 短腕と長腕を同定することはできない。
- 7) プローブはセントロメア領域とはハイブリダイズしない。

8.3 プローブの有効性の確認

中期核 FISH 検査の、全染色体プローブの有効性確認に準じる。

8.4 分析の基準

- 1) バックグラウンドに非特異蛍光がある中期核は分析しない。
- 2) 非モザイク分析のために、少なくとも 5 個の核型を分析し評価する。
- 3) モザイクを評価するためには、少なくとも 30 個の中期細胞を分析し評価する。
- 4) 1 個しか分析できなかった場合には、参考として評価する。
- 5) 判定した結果は、最低 3 つの画像と、画像の基になるそれぞれのイメージの組み合わせを記録として保存する。
- 6) 分析の結果は検査者の総合的な評価によって行う。

9. 染色体 CGH (Comparative Genomic Hybridization)

染色体 CGH (cCGH) は染色体レベルのコピー数の減少 (loss), 増加 (gain), 増幅 (amplification) を包括的に検出する方法で、遺伝子増幅, 減少のスクリーニングとして用いられる。被検試料から抽出した DNA と、参照する正常 DNA を別々の蛍光色素で標識し、正常細胞の分裂中期の染色体上で双方を競合的にハイブリダイズする。その後染色体の長軸に沿ってハイブリダイズしたそれぞれの DNA の蛍光強度を測定し、その比 (蛍光強度比) を算出してゲノム・アンバランスを検出する。

9.1 染色体 CGH の注意点

- 1) コピー数の変化を伴わない均衡型染色体転座を検出することは不可能である。
- 2) 突然変異を見つけることができない。
- 3) 腫瘍組織から抽出した DNA を用いるので、モザイクは検出できない。
- 4) 染色体 CGH で検出することができるのは染色体レベルの異常であり、検出感度は増幅単位 (amplicon) の大きさとコピー数による。増幅が 2 倍 (1 コピーの増加) の場合、10~20 Mb 以上の大きな領域しか検出できないが、高度な増幅の場合、1~2 Mb の領域でも検出可能である。
- 5) 減少の検出には、10~20 Mb の大きさの領域が必要である。
- 6) 正常細胞を多く含む腫瘍から抽出した DNA を用いた場合、異常の検出感度が低下する。
- 7) セントロメアやヘテロクロマチン領域では反復配列数に固体差があり、蛍光強度比の定量性が欠けるため解析から除外する必要がある。

9.2 染色体 CGH の分析基準

- 1) 被検試料から抽出し、蛍光標識した DNA の大きさが 300~3,000 bp の範囲であること。
- 2) 蛍光強度比のカットオフ値は用いる蛍光顕微鏡や解析システムによるが、1 を基準 (減少も増加もない) として、減少 (loss) は < 0.8 , 増加 (gain) は > 1.2 , 増幅 (amplification) は > 1.5 を用いる場合が多い。

- 3) 各染色体, 少なくとも 10 本の平均をとる.

10. アレイ CGH

2 色の蛍光色素でラベルした検体を, 分裂中期の染色体の代わりに, クローン化 DNA 断片を含むスライドガラス (マイクロアレイ) 上で競合的にハイブリさせてコピー数を比較定量する解析技術である.

アレイ CGH (aCGH) は, スライドガラスなどの基盤上に数十万から数百万個のオリゴヌクレオチドを高密度に配置し固定するアレイ技術を用いた CGH である. 抽出した DNA と, 参照する正常 DNA を別々の蛍光色素で標識し, 基盤上に配置されたスポットエリア内で双方を競合的にハイブリダイズする. ハイブリダイズの後, スポット内の蛍光強度を測定して参照した正常 DNA との比較により, 目的とする DNA のコピー数の増幅や欠損を包括的かつ高密度に解析が可能である.

DNA 抽出後ラベリング, ハイブリダイズ, スキャニング, 数値化, 解析を行うために数日を要する. 数 10 kb の大きさのゲノムの異常を全染色体レベルで検出でき, がんや遺伝性疾患などで, 染色体コピー数の異常をスクリーニングするために用いられる.

スライドガラス上のアレイに BAC²⁰プローブを用いた場合, 解像度は 10 万塩基対であるが, 現在用いられているオリゴヌクレオチドプローブの解像度は概ね 20–80 塩基対である. さらに, 2 倍体ゲノムに生じた 1 コピーの変化を検出することのできる高精度ゲノムアレイも開発されている¹⁾.

10.1 アレイ CGH の注意点

- 1) 定量的解析精度の有効性を実証した上で解析を行う.
- 2) 染色体部分の増加や損失によるゲノム・アンバランスを検出でき, ダイソミーや突然変異を除外するものではない.
- 3) バランスのとれた再構成を除外できないが, 均衡型染色体転座であっても小さなゲノム・アンバランスがある場合は検出される可能性がある.
- 4) アレイ CGH の分析結果を確認するために, 染色体分析, FISH 検査または両親のアレイ CGH 分析などの方法を決定しなければならない.
- 5) 前後の遺伝カウンセリングが必要である.

11. SNP アレイ

一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) の解析を応用した技術で, アレイ CGH と異なり正常 DNA の参照は必要とせず, サンプル DNA のみで解析が可能である. DNA コピー数の増減の検出に加えて, SNP の分布を見ることによりヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; LOH) や, トリオ解析による片親性ダイソミー (uniparental disomy; UPD) の判定も可能である.

SNP 領域を含む配列の DNA 断片 (プローブ) を固相化したマイクロアレイに, アレイ CGH と同様に標識したサンプル DNA をハイブリダイズさせ, 蛍光をスキャニングする. 蛍光の強度を解析して数値化し, 計算値からコピー数および SNP のアレル (A or B) を判定する.

²⁰ BAC : 人工染色体の一種 (bacterial artificial chromosome)

11.1 SNP アレイの注意点

- 1) アレイ CGH と同様に、コピー数の変化を伴わない均衡型の再構成は検出できない。
- 2) 微小な DNA コピー数の増減を検出した場合、染色体均衡型転座などによる切断・再構成の可能性を考慮し、染色体分析を実施することが望ましい。
- 3) 検出したコピー数変異 (copy number variants; CNV) に含まれる遺伝子を確認し、臨床的に意義のある変異 (pathogenic) か表現型に影響しない変異 (benign) であるか、CNV データベース等を利用して判定を行う。
- 4) LOH の検出により、近親婚等による出生の由来が明らかとなる場合があることを、被験者に十分に理解してもらう必要がある。
- 5) CNV および LOH において、意義不明とされている変異 (variant of unknown significance; VUS) が多く存在し、予期せぬ所見を伴う可能性を考慮する必要がある。

12. 組織 FISH

コンパニオン診断薬として HER2 遺伝子 FISH 検査試薬^{2),3)}, ALK 融合遺伝子 FISH 検査試薬⁴⁾が市販されており、これらについては試薬添付文書に準じて検査を行うものとする。また、近年、腫瘍関連遺伝子が特定され分子生物学的解析が応用されている。脂肪肉腫は *MDM2*, *FUS*, 滑膜肉腫 *SS18*, ユーイング肉腫/PNET *EWSR1*, 中皮腫 *CDKN2A*, 乏突起膠腫 第 1 染色体, 第 19 染色体などの腫瘍関連遺伝子が知られており、特に軟部腫瘍の解析が進んでいる。また造血器系腫瘍は WHO 分類による特定遺伝子の細分化が行われている。Follicular lymphoma は *IGH/BCL2*, Burkitt's lymphoma では *IGH/MYC*, MALT lymphoma では *BIRC3/MALT1* などの解析を行うことで診断に重要な情報が得られる。

12.1 材料

ホルマリン固定パラフィン包埋材料

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 °C 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。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。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。固定液の浸透は、通常 1 mm/時間と考えられている。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 (American Society of clinical Oncology) /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^{5),6)}。

推奨固定条件 10 %中性緩衝ホルマリン液を用い、6~48 時間の固定を行うことが望ましい。しかし、金曜日の生検は、月曜日までの固定時間が 48 時間を超え、対策が必要である。長時間の固定は DNA の断片化が進み検査には適さないことがある⁷⁾。

12.2 標本の作製

剥離防止コートスライドガラスに厚さ 4~6 μm (胃癌 : 4 μm, 乳癌 : 5 μm, 肺癌 : 5 μm, その他組織により調整) のパラフィン切片を作製し、56 °C で一晚乾燥する。

12.3 前処理

- 1) キシレンで脱パラ後，ターゲット部分にダイヤモンドペンで裏から印をつける（もしくは，プローブを載せる前に耐溶剤マーカーで印をつける）。
 - 2) エタノールで脱キシレンした後，0.2 N HCl に 20 分浸漬，精製水で洗浄。
 - 3) 80 °C pH 6.0 リン酸 buffer/0.1 % NP-40 に 30 分浸漬し，常温になるまで放置する。
 - 4) 洗浄後，37 °C に加温した 0.5 % ペプシン加 0.2 N HCl 溶液に 10 分浸漬後，精製水に 3 分浸漬する。
- 前処理の重要なポイントは酵素処理である。酵素処理時間は固定条件やパラフィン切片の厚さによって異なる。また臓器でも処理時間が異なり，最適な酵素処理操作が良好なシグナルが得るには重要となる。

12.4 固定

10%中性ホルマリンに 10 分浸漬後，精製水に 3 分浸漬し，エタノール系列（70，85，100 %）で各々 1 分浸漬し，脱水する。ドライヤーで冷風乾燥する。

12.5 変性とハイブリダイゼーション

標本にプローブを載せ，カバーガラスをかけてペーパーボンドでシールする。ペーパーボンドを乾燥させてから，Hybridizer（ダコ・ジャパン株式会社）等で熱変性させ（温度と時間はプローブの添付文書に従う）。ハイブリダイゼーションは，37 °C で通常一晩行う。2～3 日間行っても過剰になることはない。

12.6 洗浄

ペーパーボンドを取り除き，遮光して 2 × SSC / 0.3 % NP-40 に浸漬し，カバーガラスがはがれたら，加温した 2 × SSC / 0.3 % NP-40 に浸漬する（温度と時間はプローブの添付文書に従う）。その後遮光して 2 × SSC に移す。

12.7 封入

DAPI を添加し，カバーガラスを被せ，最低 5 分間遮光して保存する。検体は蛍光顕微鏡で 4 時間以内に計数するか，または -20 ± 10 °C で保存し，出来るだけ早く判定を行う。（保存する場合，無蛍光マニキュアでシールすれば乾燥を防げる）

12.8 蛍光顕微鏡による観察

蛍光顕微鏡のタイプと使用プローブの蛍光に対応したフィルターを選んで観察する。

鏡検は 10～25 倍の対物レンズで計数するエリア全体を確認し，60～100 倍の対物レンズでエリアを決定しシグナルの計数を行う。

パラフィン切片による FISH 解析はシグナル評価に注意する点がある。パラフィン切片標本は薄切による核の切断が生じるためアーチファクトが発生する。細胞の大きさ，薄切切片の厚さにもよるが，20 % 近くの細胞にアーチファクトが生じることもあり，monosomy, deletion 解析の結果の評価には注意を要する。腫瘍細胞内に数 % の monosomy, deletion の異常を検出する場合，染色体異常とアーチファクトの鑑別は非常に困難と考える。したがって monosomy, deletion 解析が想定される症例は可能であれば細胞診スミア標本作製することが望ましい。

細胞診のスミアやスタンプ標本は細胞が whole cell の状態でそのまま貼りついているため，パラフィン切片とは異なり核の切断によるアーチファクトの影響を受けにくい良好な解析結果が得られる。

病理材料による FISH 法はターゲットとする異常によって正しく標本選択することが重要となる。

12.9 データ解析

判定は2名の検査技師で行う。

- 1) 組織 FISH 検査シグナルの判定はプローブメーカーが提供するガイドを参照する。
- 2) break apart probe の場合は 50 または 100 カウント中の陽性細胞の割合 (%) で判定。
- 3) 画像は検査の記録として HDD に保存し、判定結果とともに報告することが望ましい。

12.10 注意事項

- 1) 検体は、脱灰剤のような酸、強い塩基、極端な熱に曝露させると DNA が損傷を受けることが知られており、FISH 法による測定で正しい結果が得られないことがある。ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程では、硬組織を含む検体は、酸脱灰を回避し、EDTA 脱灰を行うべきであると記載されている。
- 2) 連続切片スライドの1枚を HE 染色し、壊死領域を避けて癌のエリアを探し、ダイヤモンドペン（または耐溶剤マーカー）で印を付ける。判定時も FISH スライドを観察する前に、HE 染色スライドでターゲットエリアを確認する。
- 3) 判定から除外するのは、壊死部分や核の境界があいまいな領域、バックグラウンドが明るすぎる領域、ノイズ（ゴミ）や計数の妨げになるような非特異的な強い蛍光がある領域である。
- 4) 判定時は顕微鏡のフォーカスを上下させて、核の重なりが無い事を確認し、核内のシグナルをすべて計数すること。
- 5) 生検材料を見易くするためにエオジンで着色すると、自家蛍光を持ち FISH 検査が判定不能となることが有る。
- 6) 近年市販されている蛍光 LED 光源の顕微鏡の中には、波長が合わず FISH 蛍光プローブの観察に適さないものもあるので予め確認しておく必要がある。

12.11 組織 FISH 検査の精度管理

FFPE 標本からの FISH 検査は標本由来による染色不良が起りやすく、その原因が特定しにくい。また手作業が多く、標本ごとの染色性の違いが起こることがある。このため精度管理は標本ごとに行うことが望ましい。そこで、個々のスライド標本に貼ることができる精度管理用対照切片の作製方法を紹介する。

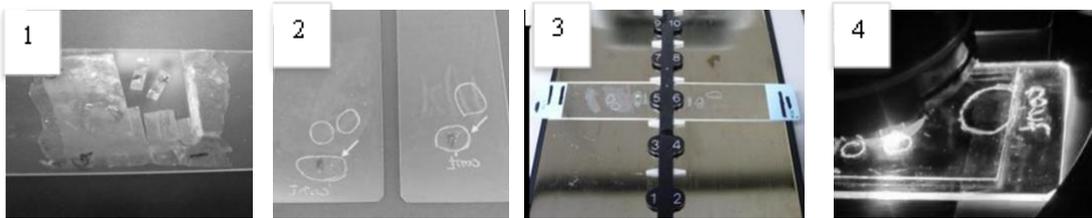
12.11.1 精度管理用切片の作成方法

- 1) スライドガラスに厚さ 4 μm の対照とするパラフィン切片を貼り付けて伸展・乾燥させた後、非水溶性封入剤を添加（25 × 40 mm で約 0.2 ml 程度）する。
- 2) カバーガラスを使って薄く塗り広げる。
- 3) 56 °C、30 分乾燥させる。
- 4) 56 °C の温浴に 20 分浸す。
- 5) カッターで端から剥いていく。
- 6) シート状の切片をアルミ箔で包み -20 °C に保存する。



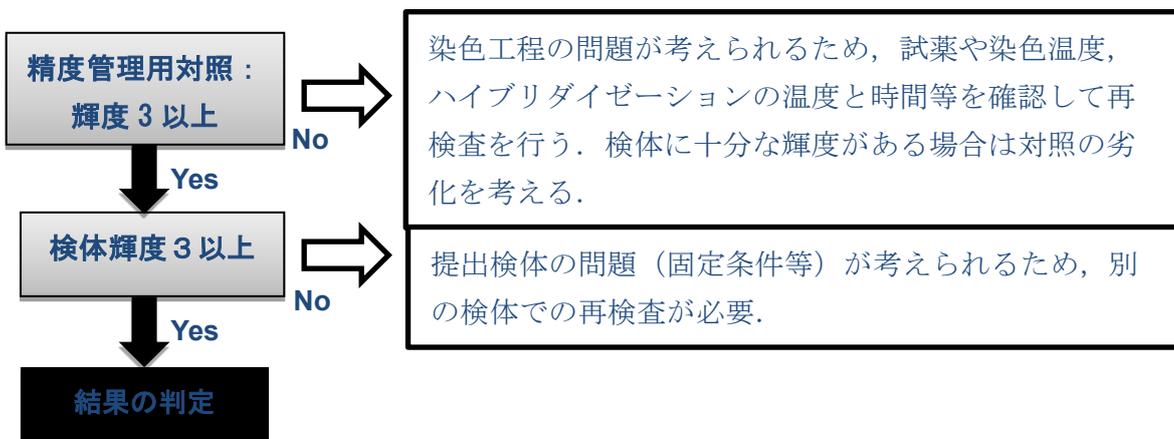
12.11.2 精度管理用切片の貼り付け

- 1) シート状の精度管理用対照切片を使用前に 2~3 mm の幅に切って使う。表裏の区別が付くように無蛍光油性ペンで文字を書いておくと良い。
- 2) パラフィン切片(シランコート)の組織が無い部分をキシロロールで拭き、水を乗せ、精度管理用切片を貼り付ける。
- 3) 65 °Cで1 時間以上ベーキングを行う。
- 4) 鏡検時に場所の確認を容易にするため、精度管理用切片を貼り付けた部位に裏からダイヤモンドペンでマーキング(cont の文字も描く)を行う。



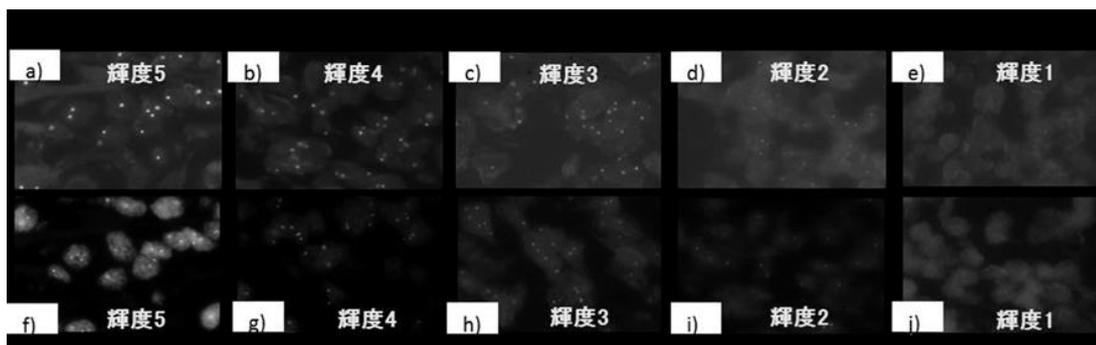
12.11.3 精度管理の方法

- 1) 毎回検査時
すべてのスライドに陰性対照を貼り付け、陰性対照と検体の輝度を 5 段階評価で記録する。判定手順と輝度の基準を以下に示す。



2) 輝度の基準

輝度 2 以下は判定不能とする。



3) 月 1 回

培養細胞または均一な組織から作成した場合は、測定者間の精度を合わせるため陰性対照と陽性細胞をカウントし、記録に残す。

4) 年 1 回以上

試薬や精度管理対照のロット変更時

***HER2, ALKに関しては判定参考値がついた精度管理用スライドが市販されているので、それを測定し、正確性を確認する。**

参考文献

- 1) Manning M, Louanne Hudgins L, FACMG, for the Professional Practice and Guidelines Committee. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. 12: 742-745. 2010.
- 2) HER2 検査ガイド ハーセプチンの適正な症例選択のための 第三版 2009 年 9 月 トラスツズマブ病理部会作成
- 3) HER2 検査ガイド ハーセプチンの適正な症例選択のために 胃癌編 胃癌 トラスツズマブ病理部会作成
- 4) ALK FISH, HER2 FISH 試薬添付文書 アボットジャパン
- 5) Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. J Clin Oncol. 2010;28: 2784-95.
- 6) Khoury T, Sait S, Hwang H, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. Mod Pathol. 2009; 22: 1457-67.
- 7) ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 一般社団法人 日本病理学会

第4章 遺伝子検査

1. 遺伝子検査の分類

遺伝子検査は、測定対象となる検体やその目的により、ウイルス・細菌等の外因性因子を調べる病原体遺伝子検査（病原体核酸検査）と、ヒトの遺伝子を検査するヒト遺伝子検査の2群に大別され、後者はさらに後天的遺伝子の変異や発現異常を調べる体細胞遺伝子検査と、生まれ持った遺伝子の型を検査する遺伝学的検査（生殖細胞系列遺伝子検査）に区分される¹⁾。

1) 病原体遺伝子検査（病原体核酸検査）

ウイルス、細菌、真菌、寄生虫など本来ヒトには存在しない外来性病原体遺伝子を検出・解析する検査。

2) ヒト体細胞遺伝子検査

白血病細胞や腫瘍細胞など疾患病変部の体細胞を対象とした遺伝子変異や遺伝子発現異常を検出する検査で、次世代に伝わらない遺伝子検査。

3) 遺伝学的検査（生殖細胞系列遺伝子検査）

生殖細胞に由来する遺伝子を対象とし、その個体が生来保有している遺伝学的情報（塩基配列等）を解析する検査。

これら遺伝子検査の工程には、測定前プロセス（依頼、検体採取、保存、前処理、核酸抽出等）、測定プロセス（核酸増幅、検出、解析）、測定後プロセス（結果報告、解釈）の3つのプロセスがある。

このうち、測定プロセスでの標準化は、各種の検査試薬や検査機器が薬事認可を受ける過程で確立しつつあるが、測定前プロセスは、検査結果に大きな影響を与えるにもかかわらず、そのほとんどが各施設の方法に委ねられている。

病原体遺伝子検査と体細胞遺伝子検査は、検体に共存する反応阻害物質の影響を回避し、高感度で特異性の高い遺伝子検出法が求められている。一方、遺伝学的検査は個人の遺伝情報を調べる検査であり、検出感度よりも特異性の高い正確な検査結果が求められる。また、検査の適用にあたり、検査から得られる情報の特性や限界を考慮し、個人の尊厳や遺伝学的情報の保護などに特別な配慮をしながら慎重に行う必要がある。

2. 遺伝子検査室の環境

遺伝子検査のほとんどは、ごく微量な核酸を増幅して検出する。したがって、検体への外部からの微量な核酸混入でも作業工程で増幅され判定結果に大きな影響を及ぼす。また、検体中に阻害物質が混入した場合は、いくら高感度な検出系を用いても検出が不可能となる場合がある。

2.1 核酸混入の原因物質

- 1) 外来物（ヒトの皮膚、髪の毛、唾液、常在菌など）
- 2) 検体間のクロスコンタミネーション
- 3) 検査済み増幅産物の残存

2.2 混入する媒体

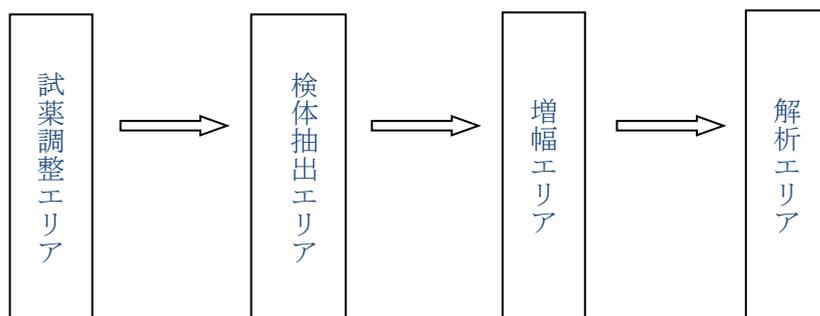
- 1) ピペッター、チップ、チューブラック、手袋、実験台などの器具類
- 2) 試薬類

3) 検体

2.3 混入防止の対策

- 1) 遺伝子検査は、病原性微生物やヒト細胞、遺伝子組換え物質などを取扱うため、検体の生物学的危険度に応じたバイオハザード²¹対策がとられた設備を必要とする。
- 2) 核酸はヒトの汗や唾液などに含まれるヌクレアーゼ²²により分解されるので、検査は清潔な検査衣、マスクおよびグローブを着用する。これらは遺伝子検査専用とし、汚染したら直ちに新しい物と交換する。
- 3) 検査材料の取り扱いには留意し、エアロゾルが発生しやすい核酸抽出工程までは安全キャビネット内で操作を行う。
- 4) 疎水フィルター付きチップや、ヌクレアーゼ（DNase, RNase）フリー製品を使用する。チューブの開閉時の操作、使用備品、操作手順にも留意する。
- 5) 検査中、周囲に検体の汚染を認めたら、直ちに70%消毒用アルコールまたは0.05%程度の次亜塩素酸ナトリウムや市販の核酸汚染除去試薬などで拭取り、常に検査環境を清潔に保つように心がける。
- 6) 検査室内外への汚染物質の流入や拡散を防止するため、検査関係者以外の検査室への出入りはできる限り制限する。

*作業工程間の汚染を防止するため、検査室（あるいは作業エリア）を区分し、作業工程が一方向に進むように設定する（下図参照）。検査器具などは可能な限りそのスペース専用とし、兼用による外部からの汚染を防止する。



参考文献

- 1) Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008 (Update: May 2019)

3. 検査の受付

²¹ バイオハザード：生物学的危険物質ともいい、生物の危険度（病原性、感染性）に応じてBSL1～BSL4に分類されている。拡散防止措置のために、それぞれのレベルに応じた安全キャビネットが必要である。国内では、世界保健機構（WHO）から出されている実験バイオセーフティ指針（www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Biosafety3）をもとに、関連学会や研究施設で具体的に指針を作成している。

²² ヌクレアーゼ：核酸を分解する酵素の総称。DNAヌクレアーゼ、RNAヌクレアーゼに分けられ、さらに基質特異性により細かく分類されている。特に検査で問題とされているのはRNAヌクレアーゼであり、汗腺（皮膚）、唾液などから分泌されており、通常のオートクレーブでは失活しない。

3.1 品質管理で考慮すべきポイント

- 1) 検査依頼書の記載内容
- 2) 遺伝学的情報など被検者のプライバシー保護の方法
- 3) 検査内容に応じた検体種別および採取法の確認

3.1.1 検査依頼書

一般的な記載内容は以下のとおりとする。

- 1) 被検者の基本属性（患者番号、氏名、性別、生年月日）
- 2) 検体提出日
- 3) 依頼元（医療機関名または診療科）、依頼医師名
- 4) 検査材料名、採取日
- 5) 検査項目
- 6) 検査目的
- 7) 臨床所見、検査歴、治療歴
- 8) その他

検査を補助する臨床的知見などが記載されていることを確認する。遺伝学的検査の場合は、上記に加え以下の項目が記載されていることを確認し、被検者の「連結可能匿名化」を行う。検査を外部に委託する場合は特に注意する。

- a. 家族歴や家系図
- b. 被検者が受けた遺伝カウンセリングの情報
- c. インフォームド・コンセントの有無

3.1.2 検体受付

検体受付では、検体ラベルの記載事項と検査依頼書が対応していることを確認したうえで、検査内容と検体採取が適切に行われていることを確認する。検体は遺伝子検査専用とし、他の検査と共用する場合は、検体の汚染防止のため優先的に分取する。

4. 検体採取

4.1 品質管理で考慮すべきポイント

- 1) 検査内容に応じた検体の選択

検査内容や標的遺伝子の存在場所（血清・血漿、細胞内）で、採取検体や後の検体前処理が異なる。

- 2) 採取容器の選択

滅菌済みでヌクレアーゼフリーの容器を用いる。検体の性状に合わせ、破損防止、保存・運搬に配慮した形状であること、さらに、医療従事者への感染防止も考慮した容器であること。

- 3) 検体の採取技術・採取時期

粘液や膿・分泌物などは、患部からの細胞採取にはばらつきが大きいので、確実に採取できる手技を確立する。糞便などの消化器や、または喀痰などの呼吸器から排菌される病原体は、排菌のタイミングにばらつきがみられるので、最低2日以上連続して検体を採取するなどの配慮が必要である。

4.1.1 採取容器と取扱い

- 1) 血液

プラスチック製の EDTA 入り採血管を使用する。感染防止のため被せ蓋式の採血管が望ましい。

2) 血清

血清分離剤入りのプレートの採血管を使用する。遠心分離後、プラスチックチューブに分取する。採取後の感染防止のため被せ蓋式チューブでの採血と分取が望ましい。

3) 血漿

プラスチック製の抗凝固剤 (EDTA, クエン酸ナトリウム, ACD, CPD など) 入り採血管を使用する。遠心分離後、プラスチックチューブに分取する。採取後の感染防止のため、被せ蓋式チューブでの採血と分取が望ましい。

4) 骨髄液

細胞検査と共用するためヘパリン採血が行われている。検体はプラスチックチューブに移す。なお、ヘパリン採血検体は PCR 反応などを阻害するので、核酸抽出の際は事前にヘパリン分解処理を行うか、シリカ吸着法などヘパリンを除去できる核酸抽出法を選択する。

5) 体腔液

気管支洗浄液、胸水、腹水、胃液、膿、尿、喀痰、分泌液などは、検体の転倒や落下、液漏れなどによる汚染に留意し、気密性の高い滅菌容器に採取する。

6) 組織、生検材料

DNA 検査の場合は、組織を細切り滅菌容器に入れ、濡れたガーゼの上など乾燥しないように 4 °C で保存する。RNA 検査の場合は、採取後、直ちにドライアイスで圧着するか液体窒素に入れて急速に凍結し、-80 °C 以下で保存する。また、蛋白質変性溶液 (市販保存液、チオシアン酸グアニジン溶液) に入れて保存することもできる。

7) 糞便

糞便全体から均等に採取し、滅菌容器に入れて 2 °C ~ 4 °C の保冷庫で保存する。

5. 検体の保存

5.1 品質管理で考慮すべきポイント

- 1) 検査内容による保存方法・温度の区別
- 2) 保存に備えた検体の取扱い

5.1.1 保存方法

1) 血液、骨髄液、培養細胞

採取後、2 °C ~ 8 °C の保冷庫で保存する。DNA は 24 時間以内、RNA はできるだけ速やかに核酸抽出を行う。血液は EDTA 採血より CPD または ACD 採血の方が細胞の保存状態がよいとされている。輸送する場合は、適量の培養液に入れ密栓して保存する。核酸抽出までに長期間保存する場合は、フィコールなどで細胞を分離し、1 回の検査に必要な量に小分けして密栓ができるネジ蓋式の滅菌プラスチックチューブに入れ -80 °C 以下で保存する。RNA の場合は、血液を専用の保存液 (市販品)、あるいは蛋白質変性溶液 (チオシアン酸グアニジン) に浸けて -20 °C 以下で保存する方法が有効である。細胞の破壊が進むと急激にヌクレアーゼが作用するので、核酸抽出が速やかに行えるようにあらかじめ採取日時を調整しておく。

2) 血清、血漿

全血で採血後、6 時間程度放置してもデータに影響はないとされているが、採取後できるだけ速やかに遠

心し、ネジ蓋式の滅菌プラスチックチューブに分離して保存する。2日以内に検査を行う場合は2℃～8℃にて保存し、それ以上長期間保存する場合は、1回の検査に必要な量に小分けし、ネジ蓋式の滅菌プラスチックチューブでDNAは-20℃以下、RNAは-80℃以下の保冷庫で保存する。庫内での部分融解や開栓時の汚染を防ぐため、検体容器を直立させた状態で保存する。検体の凍結融解の繰返しは、その都度スクレアーゼの作用を受けるので避ける。

3) 体腔液, その他

洗浄液, 胃液, 膿, 尿, 喀痰, 分泌液などは、微生物検査と同様な滅菌容器に採取し、数日なら2℃～4℃の保冷庫にて保存する。長期間保存する場合は、1回の検査に必要な量に小分けし、ネジ蓋式滅菌容器に移して-80℃以下で保存する。保存容器は密栓ができ、凍結により変形しない材質を用いる。

4) 組織, 生検材料

DNA検査では、組織を細切して滅菌容器に入れ、検体の乾燥を避け、数日なら2℃～4℃の保冷庫にて保存する。長期間保存する場合はネジ蓋式のプラスチック滅菌容器に入れ、-80℃以下で保存する。RNA検査では、組織片にした後、直ちにドライアイスで圧着するか、液体窒素に入れて急速に凍結し、-80℃以下で保存する。そのほか、検査に必要な量に小分けし、直ちにRNA検査専用の保存液か蛋白質変性溶液に浸け、-20℃以下で保存するのも有効である。

5) 糞便

1日以内に核酸抽出を行う場合は、滅菌容器に入れ2℃～4℃の保冷庫にて保存する。長期間保存する場合は便を被せネジ蓋式滅菌容器に1回の検査に必要な分量に小分けして-80℃以下で保存する。保存容器は密栓ができ、凍結により変形しない材質を用いる。

6. 検体の運搬と輸送

6.1 品質管理で考慮すべきポイント

- 1) 輸送中の物理的安定性
- 2) 輸送中の温度管理
- 3) 検体の取り違いや紛失の防止

6.1.1 物理的安定性の確保

1) 検体容器の材質

検体輸送中の容器の破損事故を防止するため、採取容器の材質はプラスチック製が適している。

2) 輸送ボックス

輸送ボックス内にスポンジなどの緩衝材を入れ、輸送中の衝撃による検体容器の破損を防止する。容器同士の衝突を防ぐため、検体を仕切りのあるラックに直立したまま梱包する。

6.1.2 温度管理

室温, 冷蔵, 冷凍それぞれの温度に対応した専用輸送ボックスを使用する。ボックス内温度は温度計, または温度シールで管理する。室温は20℃前後, 冷蔵は保冷材にて2～8℃, 冷凍はドライアイスで-20℃以下を維持できるようにする。検体や検査内容により運搬温度が決められているので, 指定された採取容器に採取後, 指定の温度で搬送する。また, 輸送中の温度変化を少なくするため, 検査項目により短時間で運搬できる輸送手段を選択する。

6.1.3 依頼書と検体の照合管理

依頼書と検体の正確な照合のほか、1 検体多項目依頼など依頼書枚数と検体数が同数でない場合もあるので、発送者と受領者間で照合のルールを決めておく。送付伝票には検体と依頼書の照合表のほか、輸送前の検体の状況も記録しておく。

参考文献

- 1) 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル（承認文書）

7. 検体の前処理と核酸の抽出

この工程は、バイオハザード対策を考慮して行われなければならない。核酸の同定および定量検査では検査結果に最も大きな影響を及ぼす工程であり、品質管理では最優先されなければならない事項である。検査目的により対象となる核酸（DNA,RNA）は異なり、検体の種類もまた多様である。実際の検体を用い、外部コントロールまたは内部コントロールを指標に、以下の観点から核酸抽出試薬の性能をあらかじめ評価しておく。

7.1 品質管理で考慮すべきポイント

- 1) 核酸の抽出効率の高い方法
- 2) 核酸の純度が高い方法（干渉物質による反応への影響の回避するため）
- 3) 核酸の汚染が少ない方法

7.1.1 核酸の抽出効率

核酸の抽出効率の低下は検出感度の低下につながる。検出感度に影響を及ぼす要因として以下のことが挙げられる。

(1) 抽出前

抽出に用いる検体量、検体の遠心などによる濃縮操作で核酸の収量は増加する。ただし、この操作により検体中に存在する阻害物質の濃度も増加することがあるので注意する。

(2) 抽出時

1) 検査材料の前処理

喀痰、胃液など粘性のある検体は、核酸抽出の前に検体の粘性を下げ均一化しておく。また、組織や固形物から核酸を抽出するときは、検体をできるだけ細かく粉砕し、細胞溶解液（界面活性剤とプロテイナーゼ）で細胞を十分溶解してから抽出を行う。RNA は、前処理時の核酸分解を抑えるため、蛋白質変性溶液に検体を浸漬しながら行う。

2) 適切な抽出方法の選択

検査材料に応じた最適な抽出方法を選択することが重要である。核酸抽出試薬は原理の違いを含め多く市販されているが、検査材料と抽出方法の組合せが不適切な場合、抽出効率や純度の低い核酸が得られ、検査結果に重大な影響を及ぼす。核酸抽出法は、核酸抽出後半の核酸の回収工程をアルコール（エタノールまたはイソプロパノール）沈殿に続き 70 %エタノールで洗浄して濃縮するバッチ方式と、シリカ粒子、またはイオン交換樹脂（担体としてカラム、メンブレン、磁性ビーズが用いられる）に核酸を吸着させ不純物をアルコールで流下洗浄した後、少量の溶解液で溶出するフロースルー（流下）方式に大別される。後者は阻害物質を効果的に除去できるといわれ検討に値する。

7.1.2 核酸の純度

1) 吸光度測定による評価

抽出精製された核酸は 280 nm に対する 260 nm の吸光度比(A_{260}/A_{280})が DNA では 1.8 以上, RNA では 2.0 以上であれば蛋白質の混入が少なく高純度とされている。また, 230 nm に対する 260 nm の吸光度比(A_{260}/A_{230})が 1 以下であれば, 核酸抽出に用いたフェノールやイソチオシアン酸グアニジン (guanidine isothiocyanate) の混入が大きいことを示している。PCR では, 1.5~2.0(A_{260}/A_{280})で増幅が可能とされており, A_{260}/A_{280} 比 1.8 以下が必ずしも検査の可・不可の判断基準ではない。偽陰性が疑われる結果が出た場合に参考とすべき値である。

2) 電気泳動による評価

核酸の質を調べることが目的である。DNA は細胞状態での長期間放置により, アポトーシスが進行し, アガロース電気泳動により低分子領域に 500 bp 前後のラダーが生じる。また, RNA では 28S rRNA が分解し低分子側に多くの RNA 断片がスメア状に現れる。キメラ mRNA の定量検査は広く行われており, 核酸抽出法と核酸保存の評価に参考とすべきである。

7.1.3 核酸の汚染が少ない方法

抽出工程で生ずる核酸の汚染を最小限に抑えるため, チューブ間で検体の移し替えが少なく, 操作が簡便な方法が望ましい。しかし, 核酸の純度が低下する結果, 偽陰性となる場合があるので注意する。

8. 核酸の検出

核酸は非常に微量であり, 通常は増幅させたくて検出を行う。その増幅方法, 検出方法は様々な方法が開発され, 利用されているが, ここでは基本的な増幅方法, 検出方法についてのみ述べ, それぞれの品質管理で考慮すべきポイントについて記載する。

8.1 PCR 法

8.1.1 品質管理で考慮すべきポイント

1) プライマー設計

目的とする場所以外の鋳型 DNA に結合せず, 増幅したい鋳型 DNA の配列に効率よく結合することがポイントになる。

(1) プライマーの長さは 20mer 前後

長すぎるとアニーリング効率が低下する。

(2) T_m 値 58 °C~65 °C かつ 2つのプライマーの T_m 値の差は 5 °C以内とする。

(3) プライマー同士の相補性, およびリピート配列を持たない。

プライマー同士でアニーリングをしてプライマーダイマーを形成したりプライマー内で 2 次構造を作ることで, 目的とする DNA とのアニーリングを阻害することがある。3' 末端に 3 ベース以上の相補的な配列を持つプライマーを避ける。

(4) GC 含有率は 40 %~60 %

(5) 3' 末端の塩基配列はアニーリングに影響が大きい。非特異的の反応を避けるため GC リッチとならないようにし, 塩基の偏りに注意する。

2) 試薬の選択と反応条件

市販の試薬系では試薬キットの指示に従い、最適化された条件での反応を実施することが基本ではあるが、増幅困難な場合、非特異的増幅が認められる場合など、以下のポイントに注意することで改善できることがある。

(1) DNA ポリメラーゼ

非特異的増幅が認められる場合、プライマーのミスプライム、プライマーダイマーの伸長が考えられる。この場合、反応液の準備を氷上で行うことで回避できる場合がある。また、ホットスタート DNA ポリメラーゼ²³、ハイフィディリティ DNA ポリメラーゼ²⁴などを目的によって使い分けることも必要である。

(2) Mg²⁺濃度

Mg²⁺を最適濃度より高い濃度に添加すると PCR 産物の収量は増加するが、非特異的増幅を増加させる可能性がある。逆に Mg²⁺が不足すると反応は進行せず、PCR 産物は得られない。

(3) dNTP

DNA ポリメラーゼの取り込みエラーは dNTP 濃度に強く依存する。一般的な市販の Taq ポリメラーゼは、0.2mM の dNTP 濃度で最大活性を示すように組成を調製している。過剰濃度の dNTP は PCR を阻害し、より低濃度の dNTP は反応の特異性を高める。しかし、長い PCR フラグメントでは、高濃度の dNTP を必要とし、使用 Mg²⁺の濃度によっても dNTP の至適濃度は変化する。

(4) PCR 増幅増強剤 (エンハンサー)

増幅が困難な GC リッチな標的 DNA の場合、DMSO (dimethyl sulfoxide)、ホルムアミドなどのミスプライミング減少、2次構造を除去するエンハンサーを添加することで増幅が認められる場合もある。

(5) PCR 条件

アニーリング温度を下げる、サイクル数を増やす、DNA ポリメラーゼやテンプレート DNA を増やすことで増幅の増強が見られる場合もあるが、非特異的反応が出やすくなる場合もあり、至適条件の設定が重要である。表に主なポイントをまとめた。

(表 PCR 対処法)

| | 増幅が無いまたは弱い場合 | 非特異的反応が認められる場合 |
|---------------------|--------------|----------------|
| DNA ポリメラーゼ | 増量 | 減量 |
| Mg ²⁺ 濃度 | 濃くする | 薄くする |
| アニーリング温度 | 下げる | 上げる |
| 伸長反応時間 | 延長 | 短縮 |
| サイクル数 | 増加 | 減らす |

3) 増幅の確認

一般的に PCR 増幅産物の確認にはアガロースゲル電気泳動またはアクリルアミド電気泳動が用いられている。

アガロースゲルは、100 bp~25 kb と広い範囲の核酸の分離に適しているが、数 bp の違いは検出できない。一方ポリアクリルアミドは、1 kb 未満の核酸の分離に適しており、条件を揃えることで 1 bp の違いも

²³ 抗体あるいは化学修飾によって活性を室温では阻害する様に設計された DNA ポリメラーゼ。

²⁴ 不正確な塩基の取り込みを回避するために 3' ~ 5' エキソヌクレアーゼ活性を持っている DNA ポリメラーゼ。クローニング、シーケンシング等の低い取り込み誤り率を必要とするアプリケーションに使用される。

検出可能となる。

ここでは一般的に使用されているアガロースゲル電気泳動について述べる。

(1) ゲル濃度・バッファー・泳動条件

電気泳動では、同じ pH（中性付近）とイオン強度を維持するため、通常、ゲルと泳動バッファーの両方に同じタイプのバッファーを使用する。

また、検出したい核酸のサイズによって最適なゲル濃度を選択する。

| ゲル濃度 (%) | 分離できる範囲 (bp) |
|----------|--------------|
| 1.5 | 200 ~ 3,000 |
| 2.0 | 100 ~ 2,000 |
| 3.0 | 25 ~ 1,000 |
| 4.0 | 10 ~ 500 |
| 5.0 | 10 ~ 300 |

Tris-acetate with EDTA (TAE) : 1,500 bp を超える断片に適し、バンドがスメアになりにくい。

Tris-borate with EDTA (TBE) : 短い断片の分離に適しているが、dsDNA は泳動が遅くなることがある。1×TAE や、0.5 ~ 1×TBE がよく使用されるが、これよりもイオン強度の高いバッファーを使用した場合、サンプルは速く泳動されるが、熱が発生しやすくサンプルの変性やゲルの損傷を引き起こすため注意が必要である。

目的とする核酸のサイズにより、電圧、泳動時間を設定する。電圧を高くすると早く泳動できるが、熱を発生することでサンプルの変性、ゲルの端と中央部分との泳動のズレが起きることがある。また、低分子を検出する場合、時間が長すぎると泳動しすぎることゲルから流れ出てしまい、検出できないこともある。

(1) 核酸ゲル染色および検出方法

核酸の可視化する方法として、感度、使用しやすさの点で蛍光色素（エチジウムブロマイド、サイバークリーン）が汎用されており、ゲルそのものに色素を含ませる方法と泳動後に染色する方法がある。前者の方が蛍光色素の使用量は少なく、簡便であるが、蛍光色素の荷電により核酸の移動度に影響を与えるため、正確な分子サイズが必要な場合は後者を用いる必要がある。

参考文献

- 1) 遺伝子・染色体検査技術教本（一社）日本臨床衛生検査技師会 監修
- 2) 遺伝子検査技術・遺伝子分析科学認定士テキスト

8.2 RT-PCR 法

RNA は細胞が破壊されると中から放出される RNase により分解されるため DNA に比べ非常に不安定であるため、検体は速やかに強力な蛋白変性剤（グアニジウム塩）を加えて RNase を変性し、RNA 抽出まで 20℃以下に保存しておく。

RNAはTaq DNAポリメラーゼによるPCRの鋳型にはならない。そのため、まず、RNAを鋳型として、逆転写酵素により相補的DNA(cDNA)を合成する。RT-PCR法は、合成されたcDNAを用いてPCR法を行う方法である。RNA依存性DNAポリメラーゼ活性を持つ逆転写酵素を用いて、鋳型RNA鎖と相補的なcDNAを合成されるが、その時形成されるRNA-DNAハイブリッドは、逆転写酵素のRNase H活性によりRNAが加水分解され一本鎖cDNAとなる。その後、cDNAを用いてPCR法を実施する。RT-PCR法には1ステップRT-PCR法と2ステップRT-PCR法がある。

8.2.1 品質管理で考慮すべきポイント

1) プライマー設計

何も考えずにプライマーを設計すると、サンプルに混入したゲノムDNAまで増幅してしまう可能性がある。そのため、DNAを増幅させないために、エクソジャンクションをまたいだプライマーを設計する必要がある。エクソジャンクションとは、イントロンを除去するスプライシング後に出来るエクソンとエクソンの接合部を示す。また、イントロンはエクソンに比べサイズが長く増幅されにくい。RNA抽出後にDNase I処理を加え、混入したゲノムDNAを分解して取り除く操作を追加することが望ましい。

その他は、基本的にはPCR法におけるプライマー設計と同様に設計すれば良い。

2) 試薬の選択と反応条件

(1) 1ステップRT-PCR法と2ステップRT-PCR法

① 1ステップRT-PCR法

RTとPCRを同一のチューブ内で連続的に行うため簡便でコンタミネーションの危険性は最小限にとどまる。解析対象の遺伝子数が少ない場合に適し、逆転写反応のプライマーは遺伝子特異的プライマー、酵素の種類はTth DNAポリメラーゼなどに限定される。

② 2ステップRT-PCR法

RTとPCRを別々のチューブ内で2段階に分けて行うためコンタミネーションの危険性は高くなるが柔軟に対応可能である。複数のPCR解析が可能であり、解析対象遺伝子数が多い場合に適する。逆転写反応のプライマーは、オリゴ(dT)プライマー、ランダムヘキサマー、遺伝子特異的プライマーから選択し、酵素は目的に応じて最適なものが選択可能である。

(2) 逆転写反応に用いるプライマーの種類と特徴

① オリゴ(dT)プライマー

リボゾームRNAは鋳型にならず、ポリAが付加しているmRNAからcDNAを合成する。mRNAのみが逆転写されるが、ポリAテールから離れた上流の場合や強固な二次構造がある場合は効率よく逆転写されない可能性がある。

② ランダムヘキサマー(ランダムプライマー)

ランダムヘキサマーを使用し、RNAの全配列を効率よく逆転写しcDNA合成する。mRNAの全配列から均一に逆転写が可能であるが、リボゾームRNAも逆転写するため、目的とする配列の転写物の割合は低くなる。

③ 遺伝子特異的プライマー

特定の遺伝子配列のみを対象とする場合、特異的配列のプライマーを用いて cDNA を合成する。特定の RNA のみを選択的に転写できるため、1 ステップ RT-PCR 法で利用できるが、複数の遺伝子の検出には不適である。

逆転写反応に用いる反応成分

逆転写酵素とプライマー、鋳型 RNA、バッファー、dNTP、ジチオトレイトール (DTT)、RNase 阻害剤、RNase free 水を用いる。

(3) 反応ステップ

① RNA の変性とプライマーのアニーリング

1 ~2 μg の RNA とプライマーを混合し、65 °C 5 分間処理後、氷水で急冷し部分的な二次構造をなくす。急冷せずに徐々に温度をもどすと、元の二次構造に戻ってしまうので注意が必要である。RNA を熱変性することによりプライマーが効率よくアニーリングし良質な cDNA 合成が可能になる。

② cDNA の合成

上記反応液に必要な試薬（逆転写酵素、バッファー、dNTP、DTT、RNase 阻害剤）を添加する。ランダムヘキサマーを用いる場合は 23 °C 10 分間インキュベートする。その後、選択した逆転写酵素に合致した至適条件で逆転写反応を行う。

③ 逆転写酵素の不活化

酵素の耐熱性を考慮し、70 ~95 °C、5 ~15 分間で酵素を不活化する。不活化しておかないとその後の PCR 反応に悪影響をおよぼす。

(4) 内部標準物質（内部コントロール）の測定

陰性コントロール、陽性コントロールの他に内部標準物質の測定が必要である。

RT-PCR 法は検体処理、RNA 抽出、逆転写反応、PCR と多くのステップからなり、誤差を生じやすく、また、検体の量や品質、反応阻害物質の混在による影響も受けやすい。RNA の品質と一連の操作をチェックする意味で内部標準物質の測定を RT-PCR 実施時に同時に測定する。内部標準物質としては、いずれの細胞や組織でも恒常的に同程度発現しているハウスキーピング遺伝子を用いる。代表的なものとして、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子、 β アクチン、ABL1 遺伝子などがあるが、その発現を調べておく必要がある。

参考文献

1) 遺伝子・染色体検査技術教本 (一社) 日本臨床衛生検査技師会 監修

8.3 核酸の定量

造血器腫瘍における微小残存病変のモニタリングやウイルス感染症の病勢モニタリングなど腫瘍細胞や病原微生物の量的変化を捉えるために核酸の定量検査の重要性は非常に大きい。核酸の定量検査で最も普及している方法は PCR によって増幅する核酸をリアルタイムにモニタリングする定量的リアルタイム PCR (以下 qPCR) 法であり、増幅する核酸をモニタリングする方法には、1) インターカラーション (DNA 結合色素) 法、2) TaqMan プローブ法、3) ハイブリダイゼーションプロローブ法の 3 種類ある。qPCR の実験方法に関しては MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR

Experiments) ガイドライン(1)があり、臨床検査においても本ガイドラインを遵守することが望ましいと考えられる。

qPCR の結果には、検体の採取、保管、運搬、核酸抽出方法と抽出核酸の品質が大きく関係する。特に mRNA プロファイルに大きく影響するので、検体の採取・保管等に関しては「遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル」を遵守する。また、鋳型核酸濃度の測定方法には分光光度計による吸光度測定、マイクロ流路分析、蛍光色素検出などの方法があるが、RNA 濃度の測定には蛍光 RNA 結合色素検出法が推奨される。核酸の抽出及び品質評価は本指針「核酸抽出」に従う。

RNA 定量では逆転写反応が必要であるが、目的とする RNA によって適切なプライマーを選択する必要がある。また、初期 RNA 量を一定に揃える必要がある。逆転写反応については、本指針「RT-PCR 法」に従う。

8.3.1 品質管理で考慮すべきポイント

qPCR の性能にはプライマーやプローブの配列と濃度、 Mg^{2+} 濃度、バッファー組成、鋳型量、反応チューブもしくはプレートの種類など様々な要因が関係する。特にプライマーやプローブの配列、濃度は重要である。近年では qPCR の試薬はマスターミックスとなっていることが多いため Mg^{2+} 濃度、バッファー組成を変更することは少ない。また、ROX 補正が必要な機器とそうでない機器があるため、機器と試薬の関係に留意する。

1) プライマー設計

基本的には通常の PCR 法のプライマー設計に従うが、アンプリコン長を 80 ~150 bp 以下とすること。アニーリング温度の設定は qPCR の特異性や増幅効率に影響するため、一般的にはフォワードプライマーとリバースプライマーの融解温度 (T_m) を揃え、60 ~65 °C とする。この場合、アニーリング温度は 60 °C 前後となるが実際のアニーリング温度は実験をおこない決定する。また TaqMan プローブ法ではプローブの T_m がプライマーの $T_m + 5$ °C になるように設計する。mRNA を定量する場合、単一エクソンではなくイントロンをまたぎ、2 つ以上のエクソンに設計することが望ましい。ターゲット遺伝子にスプライシングバリエーションが存在する場合は、定量結果に関係するバリエーションを把握する必要がある。

2) 反応性の確認

検量線を作製し PCR の増幅効率を確認する。

3) スタンダードサンプル

検量線作製に用いるスタンダードサンプルは実サンプルに近いものが望ましい。例えば、陽性サンプルから抽出した DNA や cDNA、増幅配列を組み込んだプラスミドがある。環状プラスミドでは増幅効率に違いが生じるため制限酵素で直鎖状にして使用する。また、スタンダードサンプルの希釈率は 5 ~ 7 段階が適当である。低濃度では結果のバラツキが大きくなるため希釈液には tRNA や rRNA などが含まれた溶液や市販専用希釈液を用いる。

4) Threshold の設定

ガイドラインは存在せず、一般的には自動設定で問題はない。異なるプレート間で比較する場合、手動設定で threshold を決定する必要がある。その際には指数関数的な増幅範囲内で設定する。

5) 増幅効率の算出と評価

スタンダードサンプル希釈系列の濃度や希釈倍数を X 軸、定量サイクル (quantification cycle; Cq) {機器メーカーによって閾値サイクル (threshold cycle; Ct) など呼称は異なる} を Y 軸として検量線を作製し、その傾きから PCR の増幅効率を算出する。計算式は PCR 増幅効率 = $10^{(-1/\text{slope})} - 1$ となり、通常は解

析ソフトウェアで自動算出される。理論的最大値は 1.00 (100%) であり、その際の傾きは-3.32 となる。一般的には 90 ~ 110 %が適正範囲とされている。ノーマライゼーションを必要とする場合、目的遺伝子とリファレンス遺伝子の PCR 増幅効率が近似していることが重要である。

6) 定量可能範囲

検量線によって確定された定量可能な最高コピー数から最低コピー数までである。少なくとも 3 桁以上をカバーする必要がある。検量線の直線性は決定係数 (相関係数の 2 乗, R^2) が 0.98 以上であることが望ましい。なお、インターカレーション法ではプライマーダイマー等の非特異的増幅産物も検出されるので融解曲線分析によって特異性を確認し、非特異的増幅が生じた場合には定量可能範囲から除外する。

7) 解析感度

正確に測定できるサンプル中の最小コピー数。一般的には検出限界 (Limit of detection; LOD) として表され、陽性検体の 95 %が検出される最小コピー数 (95 %CI) である。ポワソン分布による理論的限界値は 3 コピー/反応である。LOD 未満の値が算出される場合はあるが、それは正確な値ではないため報告しない。したがって、結果報告値も「0 (ゼロ)」とはならない。

8) ノーマライゼーション

mRNA の定量では抽出収量、逆転写収量、増幅効率のばらつきを最小限にするためにノーマライゼーションが必要であり、そのための適切なリファレンス遺伝子の選択が必要である^{2,3}。一般的には、GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、 β -アクチン、ユビキチン、 β 2-マイクログロブリン、HPRT 1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) などが用いられることが多い。

9) 解析

(1) 絶対定量

既知濃度のスタンダードサンプル希釈系列により作製した検量線から、測定サンプルの初期核酸濃度を算出する。

(2) 相対定量

$\Delta \Delta C_q$ 法、Pfaffl 法⁴⁾など、検量線を必要としない定量法であるが、実施にあたっては検量線を作製し増幅効率を確認する必要がある。また、リファレンス遺伝子により目的遺伝子の発現量が増減する可能性があることから、2~3 種類のリファレンス遺伝子を設定することが望ましい。

10) 精度管理

測定結果の変動や PCR 阻害物質の影響を評価するための陽性コントロールやインターナルコントロール、コンタミネーションやプライマーダイマーによる非特異的増幅を検出するための陰性コントロールが必要である。

11) コンタミネーション防止

作業エリアの区分け、エリア内で使用する機器・消耗品の専用化等によりコンタミネーションの防止に注意する。

参考文献

- 1) Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin Chem. 2009 Apr;55(4):611-22. PubMed PMID: 19246619. Epub 2009/02/28. eng.
- 2) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of

real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*. 2002 Jun 18;3(7):RESEARCH0034. PubMed PMID: 12184808. Pubmed Central PMCID: PMC126239. Epub 2002/08/20. eng.

- 3) Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of molecular endocrinology*. 2002 Aug;29(1):23-39. PubMed PMID: 12200227. Epub2002/08/30. eng.
- 4) Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. PubMed PMID: 11328886. Pubmed Central PMCID: PMC55695. Epub 2001/05/09. eng.

9 NGSを用いた病理分野の遺伝子関連検査についての留意点（検査の依頼まで）

現在、分子標的薬などの治療薬の適応判断に病理検体を用いた遺伝子関連検査が行われている。これはコンパニオン診断として適応となる病理検体に対し治療薬と体外診断薬がセットとなり検査が行われているものである。

近年、次世代シーケンサー（next generation sequencer; NGS）を用いた臨床検査への導入が進んでおり、2018年12月に病理分野でNGSを用いた初めてのコンパニオン診断が非小細胞性肺癌の *BRAF* で保険収載され、2019年6月には、*EGFR* と *ALK*, *ROS1* が追加された。さらに国内のがんゲノム医療の体制整備が進み、同時期にNGSを用いたがん遺伝子パネル検査の2製品が保険収載されている状況となっており²⁾、今後、病理分野の遺伝子関連検査の拡充は進むと思われる。ここでは、NGSを用いた病理分野の遺伝子関連検査における検査の依頼までについての留意点について述べる。

9.1 病理プレアナリシス、病理アナリシスの対応

病理に提出される手術や生検の組織診検体は、ホルマリン固定パラフィン包埋（formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE）を用いて標本が作製される。この標本作製の過程で核酸の品質が変化することが知られており、一般社団法人 日本病理学会はゲノム診療に対応する病理標本作製の条件を「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」³⁾ にエビデンスと共に掲示している。

ここでは、標本作製工程をプレアナリシス段階とアナリシス段階と分け、プレアナリシス段階を1) 固定前プロセス、2) 固定プロセス、3) 固定後プロセスとし、アナリシス段階は、1)FFPEブロックの選択と薄切およびHE染色標本へのマーキング、2)FFPE検体からの核酸抽出としている。プロセスごとにゲノム診療に対応した病理検体の適切な処理について記述されている。

詳細は「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」を参照されたい。

9.2 遺伝子関連検査に提出するFFPE切片の留意点

- 1) 薄切時はコンタミネーションに注意する。コンタミネーションには、他検体と薄切者からのヌクレアーゼの2つの可能性がある。防止策として前者は水槽の水の交換、刃の交換、後者はマスク、手袋の着用などがある。
- 2) 検出感度は検査ごとに異なる為、検出可能となる最低腫瘍細胞の比率が異なるので確認する。また腫瘍細胞の比率は、検体提出時の検体情報として必要となる場合がある。
- 3) 腫瘍細胞の比率を高めるために必要に応じてマクロダイセクションを実施する。
- 4) 他に検体の確認事項として、検体の採取部位、組織型、病理検体の採取日、切片の面積、マクロダイセク

ションの有無、FFPE 切片の必要量（薄切の厚さ、枚数）などがある。

5) FFPE 切片の面積を提出量の指標とするものがあるが DNA を核酸抽出する場合、切片上もしくは指定エリア内の腫瘍細胞の数が重要であり、切片の面積は問題がなくても細胞量が少ない際、追加の薄切が必要となる

る場合がある。

6) 外部施設からの FFPE 切片の場合、受領確認事項を定める。また必要な量に満たない際の対応についての手順も定める。

9.3 検査の依頼（検査会社への外部委託を想定）

- 1) 検査案内で検査目的と解析対象となる検体と遺伝子が合っているか確認する。
- 2) NGS にて解析可能な遺伝子異常としては、1 塩基変異（single nucleotide variants; SNV）やインデル（insertion/deletion; Indel）、コピー数異常（copy number abnormality; CNA）、マイクロサテライト不安定性（microsatellite instability; MSI）、融合（fusion）、腫瘍遺伝子変異量（tumor mutation burden; TMB）などがある。検査法により検出されるバリエーションは異なる為、検査結果の報告範囲を確認する。
- 3) 検査会社と依頼方法、検体受け渡し方法、連絡先などを確認し確実にする。
- 4) 検体不適及び解析不能の場合、検査会社からの連絡方法及び依頼医への通知方法を明確にする。
- 5) 2019 年 6 月より保険収載されたがん遺伝子パネル検査のプロファイリング検査は、がんゲノム情報管理センター(C-CAT)への登録、管理簿等の管理、エキスパートパネル開催等の留意事項を確認する⁴⁾。

10. 検査データの管理

「真正性」「見読性」「保存性」を定められた期間、担保する⁵⁾。

10.1 品質管理で考慮すべきポイント

1) 遺伝学的検査の匿名化

依頼書と検体を照合した後、被検者の ID と氏名のほか、個人が特定できる情報はすべて連結可能な匿名化をして受付を行う。外部に検査委託をする場合は、あらかじめ委託先と依頼書の様式を決めておく。また、検査情報の閲覧は以下の方法に従う。

2) 患者情報の保管と閲覧

電子媒体における検査情報の閲覧は、ID とパスワードを事前に登録した医師および検査や診療に携わった最小限の人とする。文書の閲覧においても事前に登録したスタッフに限定し、鍵のかけられる書類保管庫で厳重に保存する。

11. 検査の精度管理

11.1 品質管理で考慮すべきポイント

- 1) 精度管理のための検査体制の確立
- 2) 検査の検出感度および日間変動を管理する精度管理手法の確立

11.1.1 検査体制と記録の整備

1) 検査体制の確立

遺伝子検査は通常の検査担当者のほかに、当該分野の専門認定資格を有する者とのペアで行うことが望ましい。有資格者は検査工程の記録を基に検査が適正に行われたことを確認し、検査結果の判定が適正であることをチェックする。遺伝学的検査では、報告書の作成にあたり、臨床遺伝学専門医の意見を求めることも考慮する。

2) 検査の記録

測定標準作業書を作成するほか、検査の状態を作業記録書（試薬管理台帳、統計学的精度管理台帳、外部精度管理台帳、検査機器保守管理作業日誌、測定作業日誌に関する記録）に記載し保管しなければならない。

11.1.2 精度管理手法の確立

市販試薬以外の遺伝子検査では、検査施設が独自に試薬と精度管理試料を作製し、検査を行っている。遺伝子検査は核酸の抽出・増幅・検出などの工程があり、各工程の精度管理が必要不可欠となる。精度管理を行なう方法としては“管理試料を用いる方法”と内部標準遺伝子を用いる方法”がある。

1) 管理試料を用いた精度管理

① 目的

検体と同時に管理試料を測定することで、測定（増幅・検出）が適正に行われているかを評価する。管理試料の結果に異常を生じた場合には、①人為的ミス、②装置の不具合、③試薬の劣化などの要因が考えられるので状況を判断して適切に対処する必要がある。

② 使用方法

a. 陽性試料

核酸の同定・定量検査には、中濃度陽性試料と検出下限付近の低濃度陽性試料の2種類を核酸の抽出ステップから使用する。中濃度の陽性コントロールは試薬の添加やサンプルの分注ミスなど操作上の大きなミスを監視する。一方、低濃度の陽性コントロールは試薬の劣化など反応条件のわずかな変動など検出感度への影響を監視する。精度管理試料は、被検検体と性状が近似していることが望ましいが、入手できない場合は、陽性試料由来のゲノム核酸（DNA または RNA）、あるいは検出領域を含むプラスミド DNA、合成核酸（DNA または RNA）を濃度調整して用いる。変異解析では、野生型の精度管理試料と変異あるいは多型を有する精度管理試料の2種類を使用する。

b. 陰性試料

検体と性状が近似している陰性試料で、被検体と同様に検査の全工程を行う。コンタミネーションの影響を管理する。

2) 内部標準遺伝子を用いた精度管理

① 目的

核酸抽出工程の核酸のロスや分解、反応阻害物質の混入などによる「偽陰性」と「真陰性」との判別に用いる。また、核酸のロスや分解による定量値の低下を内在性コントロールとの比により値の補正を行う。

② 使用方法

核酸の抽出段階から検体と同一チューブ内で操作を行う。ハウスキーピング遺伝子²⁵など、検体内の内在性遺伝子を利用する内在性精度管理試料のほか、病原体遺伝子検査のように核酸抽出液に加える添加型精度管理試料がある。

a. 内在性精度管理試料

²⁵ ハウスキーピング遺伝子：細胞の生存のために、組織や細胞に関係なく常時発現している遺伝子。

遺伝子の発現定量検査では、ハウスキーピング遺伝子が頻用されている。利用に先立ち、ハウスキーピング遺伝子が負荷試験前後で、あるいは細胞間での発現量に大きな差がないことを確認して選択する。

b. 添加型精度管理試料

添加型精度管理試料も核酸抽出から検体に添加するのが望ましいが、なかには検体中にヌクレアーゼにより分解される核酸抽出法があるので、その場合は、ヌクレアーゼが失活したステップから添加する。抽出方法によっては、抽出前からの添加型精度管理試料が不可能で、核酸抽出液に添加型精度管理試料を添加し、以降の検出反応を行わなければならない場合がある。

12. 遺伝子検査の倫理原則

遺伝子関連検査のうち、倫理の対象となるのは遺伝学的検査である。しかし、がん（造血器腫瘍・固形腫瘍）の遺伝子検査であっても、被検者の生殖系列細胞と対比して診断することから、検査の前にインフォームド・コンセントを得ておくことが望ましい。遺伝子解析研究、遺伝学的検査に関する倫理は、公的機関や関連学会からガイドラインや倫理指針として多数示されているので、その主なものを下の表に示した。これらの指針は定期的に見直されるので、常に最新の情報を得るように心がけたい。

これらに共通し検査従事者が知っておかなければならない内容を次に要約した。

- 1) 遺伝学的検査は、検査の目的、検査内容、検査により得られる効果、遺伝カウンセリングとインフォームド・コンセントの方法、検査結果の開示方法、検体や検査情報の保管方法についてあらかじめ計画書を作成し、医療機関の長から承認を得ておく必要がある。
- 2) 遺伝学的検査は、医療の一部として遺伝カウンセリングの体制が整備された医療機関から依頼された検体を対象に行われる。親子鑑定、性別判定、犯罪捜査など法医学的検査は対象としない。
- 3) 遺伝学的検査の適応は、遺伝カウンセリングを通し高い透明性を持って慎重に検討されるべきである。
- 4) インフォームド・コンセントを得るときは、クライアントに十分な遺伝情報を提供し、被検者が納得したうえで、自発的な意思により決定できるよう支援しなければならない。また、途中で検査を中止することや、検査後も引き続き遺伝カウンセリングを受ける権利も有する。
- 5) 被検者の遺伝子情報は厳重に保護されており、本人の承諾なしに第三者に伝えてはならない（例外あり）。また、検体を被検者に無断で目的外に使用したり他人に譲渡したりしてはならない。

表 倫理指針およびガイドライン

| 指針, ガイドライン | 発表元 |
|----------------------------------|-------------------|
| 「人間を対象とする医学研究の倫理原則」2013年 | ヘルシンキ宣言（世界医師会） |
| 「生命倫理と人権に関する世界宣言」2005年 | ユネスコ宣言（国際連合） |
| 「ヒト遺伝情報に関する国際宣言」2003年 | ユネスコ宣言（国際連合） |
| 「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」2011年 | 日本医学会 |
| 「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」2017年 | 文部科学省・厚生労働省 |
| 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」2017年 | 文部科学省・厚生労働省・経済産業省 |

| | |
|---|---|
| 「ヒト受精胚の作成を行う生殖補助医療研究に関する倫理指針」 2017年 | 文部科学省・厚生労働省 |
| 「疫学的研究に関する倫理指針」 2008年 | 文部科学省・厚生労働省 |
| 「臨床研究に関する倫理指針」 2008年 | 厚生労働省 |
| 「遺伝学的検査に関するガイドライン」 2003年 | 遺伝医学関連10学会 |
| 「ヒト遺伝子検査受託に関する倫理指針」 2016年 | 日本衛生検査所協会 |
| 「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」 2004年 | 厚生労働省 |
| 「ファーマコゲノミクス検査の運用指針」 2012年 | 日本臨床検査医学会, 人類遺伝学会, 日本臨床検査標準協議会 |
| 「ゲノム薬理学を適用する臨床研究と検査に関するガイドライン」 2010年 | 日本人類遺伝学会, 日本臨床検査医学会, 日本臨床薬理学会, 日本 TDM 学会, 日本臨床検査標準協議会 |
| 「患者に由来する病理検体の保管・管理・利用に関する日本病理学会倫理委員会の見解」 2015年 | 日本病理学会 |
| 「造血器腫瘍ゲノム検査ガイドライン」 2018年 | 日本血液学会 |
| 「ゲノム診療用病理組織検体取り扱い規程」 2018年 | 日本病理学会 |
| 「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」 2015年 | 厚生労働省 |
| 「ヒト受精胚の遺伝情報改変技術等を用いる研究に関する倫理指針」 2019年 | 文部科学省・厚生労働省 |
| 「稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査を実施する際のベストプラクティス・ガイドライン」 2010年 | 日本人類遺伝学会 |
| 「神経疾患の遺伝子診断ガイドライン」 2009年 | 日本神経学会 |
| 「母体血を用いた出生前遺伝学的検査 (NIPT) に関する指針」 2019年 | 日本産科婦人科学会倫理委員会 |
| 「着床前診断に関する細則」 (PGT-A) 2019年 | 日本産科婦人科学会倫理委員会 |

* 指針およびガイドラインは、定期的に更新されるので最新の情報を入手する。

13. 遺伝子情報の収集

遺伝子関連検査は多種多様な病態の診断，治療方針決定，治療効果モニタリングなど幅広い目的で行われる。また，塩基配列情報と疾患原因や臨床情報との関係については日々世界中から報告されデータベース化されている。遺伝子関連検査の結果解釈にはこれら最新の情報を介する必要がある，そのためには必要なデータベースの所在を把握し必要な情報を効率よく収集できる体制を整えておくことが重要である。こうして得られた最新かつ正しい情報をもって主治医や患者などクライアントに検査結果を伝える必要がある。以下に主なデータベースサイトを記す。多くのデータベースサイトは互いにリンクしあい横断的な使用が可能となっている。

13.1 塩基配列情報

1) Entrez Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)

National Center for Biotechnology Information (NCBI) が管理する，遺伝子の染色体上の位置，配列，発現，構造，機能，ホモロジーデータなどのデータベース。種々の生物種の遺伝子情報がレコードされている。ヒトゲノム参照配列 (RefSeq) も含まれる。

2) ENSEMBL (<https://asia.ensembl.org/index.html>)

European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) と Sanger Centre が共同運用する真核生物を対象とした遺伝子配列情報データベース。Entrez Gene のヨーロッパ版。

3) Locus Reference Genomic ; LRG (<https://www.lrg-sequence.org>)

解析により得られた塩基配列のバリエーションを検証のために比較される参照配列のデータベース。(4) HGVS のバリエーション記載法では参照配列データとして LRG を使用することが推奨される。

4) Sequence Variant Nomenclature (<http://varnomen.hgvs.org>)

Human Genome Variant Society (HGVS) が推奨する世界標準的な塩基配列バリエーションの記載法が掲載される。

13.2 バリエーション頻度情報

解析により得られた塩基配列バリエーションの疾患への影響度を検討する際に，集団におけるそのバリエーションの頻度情報は重要である。

1) dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>)

NCBI が管理するヒトの single nucleotide variation, microsatellite, small-scale insertion and deletion などのバリエーションの任意集団における頻度情報が掲載されている。

2) gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>)

米国ブロード研究所が運営する，約 12 万 5 千人の Exome 解析と約 1 万 6 千人の全ゲノム解析で得られたバリエーション情報のデータベース。

3) TogoVar (<https://togovar.biosciencedbc.jp/>)

科学技術振興機構 (JST) バイオサイエンスデータベースセンター (NBDC) と情報・システム研究機構 データサイエンス共同利用基盤施設ライフサイエンス統合データベースセンター (DBCLS) が共同運用する日本人のゲノムバリエーションのデータベース。gnomAD の日本版。

13.3 遺伝性疾患情報

1) OMIM (<https://www.omim.org>)

NCBI が運営するヒトの遺伝子と遺伝子によって規定される表現型のカタログ。既知の遺伝性疾患と 1 万 6 千を超える遺伝子のエントリーがある (2019 年 9 月現在)。

2) Gene reviews (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>)

NCBI が運営する遺伝性疾患の症状や診断、遺伝学的検査、遺伝カウンセリングなどについて、専門家による解説が参照できる医療スタッフ向けの遺伝性疾患情報サイト。

3) Gene reviews 日本語版 (<http://grj.umin.jp>)

Gene reviews の許可を受け信州大学医学部附属病院遺伝子医療研究センターが運営する Gene reviews の日本語版サイト。

13.4 腫瘍と塩基配列バリエーション

1) COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>)

体細胞がんに関連する塩基配列バリエーションの情報を網羅的に集積したデータベース。バリエーションの各種分類、論文リスト、バリエーションが認められたサンプル数、原発部位およびそれぞれのサンプル数、がんサブタイプおよびそれぞれのサンプル数などが収録されている。

13.5 塩基配列バリエーションの臨床的意義

1) ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)

NCBI が運営する塩基配列バリエーションの臨床的意義を整理したデータベース。バリエーションの病原性分類 (classification)、キュレーション状況 (review status)、変異が報告された研究レコードなどが収録されている。

2) CIViC (<https://civicdb.org/home>)

がんに関連する塩基配列バリエーションの臨床的解釈を集めたオープンアクセスのデータベース。変異の各種分類、がんの種類や臓器、バリエーションのサマリー、治療薬の種類、臨床的意義、エビデンスレベルと関連する記述、論文リストなどを含む。

13.6 塩基配列バリエーションのタンパク質機能への影響度を予測するウェブツール

1) PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

2) PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/index.php>)

3) PANTHER (<http://pantherdb.org/tools/csnpscoreForm.jsp>)

先天代謝異常とその原因遺伝子、一塩基置換と易罹患性や薬剤応答性、腫瘍と遺伝子変異などに関する情報は日々更新されているが、依然、原因や発症機序が不明な症例も多い。クライアントに正確で最新の情報を伝え、最良の治療につなげるためには、国内外の医療機関や文献から最新情報を一早く入手し、診療に還元できるシステムを構築することが大切である。

14. 検査の安全管理

14.1 生物学的危険物質

遺伝子関連検査は、未知な病原体を含む検体から核酸を抽出するため、生物学的危険物質にさらされる危険性が高い。したがって、検体の前処理および核酸の抽出は安全キャビネットの中で行う。検体が周囲に付

着した場合は、直ちに消毒用アルコールか、0.5 %程度の次亜塩素酸ナトリウムで拭き取るようにする。また、次亜塩素酸ナトリウムを使用したあとは、消毒用アルコールでもう一度拭き取る。

14.2 化学的危険物質

1) エチジウムブロミド (EtBr : 核酸染色用試薬)

核酸の染色に強い発癌性がある。扱うときは必ず手袋とマスクを着用する。使用後は活性炭に吸着させて化学的危険物質として処分する。

2) フェノール (核酸抽出試薬)

タンパク質変性作用があるので試薬は手袋をして扱う。皮膚に触れたら直ちに大量の水で洗い流す。廃液はポリタンクに貯蔵し、廃棄は専門業者に依頼する。

3) クロロホルム (核酸抽出試薬)

皮膚を腐食するほか、吸入を重ねると幻覚症状が現れたり、肝細胞に障害を与えたりする。試薬の調製はドラフトの中で行う。

4) ポリアクリルアミド (電気泳動用ゲル)

粉末は飛散しやすく吸入すると神経毒となる。手袋とマスクを着用してドラフト内で試薬調製を行う。

その他、検体処理工程においてもキシレン (有機溶剤)、ホルムアミド、メタノール等 (劇物) などを取り扱う場合もあり、その保管方法、使用方法に留意する。また、使用者の健康管理、安全確保のために労働安全衛生法に基づき適切な作業環境測定、健康診断を実施する必要がある。

14.3 物理的危険物質

1) 紫外線 (ゲル撮影用)

紫外線を浴びると表皮細胞の DNA に障害を与える。ゴーグルで目を保護し、衣類やアクリル板で皮膚を保護する。

2) 放射線 (プローブ、プライマーなどの放射性同位元素による標識)

特別な管理区域を必要とするため、最近はあまり使われない。施設のラジオアイソトープ管理規定に従い一定の訓練を受けたうえで取扱う。

15. 教育活動

遺伝子検査技術の急速な進歩により、医学的な知見が年々更新し蓄積されている。このような状況下において遺伝子関連検査に従事する臨床検査技師は、最新の情報を一早く入手し、より質の高いゲノム情報を提供すべきである。そのために、遺伝子関連検査の知識と技術の向上に努め、遺伝子関連学会が主催する講習会や研修会に積極的に参加し、各自の研究スキルを高めるため英語や情報科学を積極的に学ぶ必要がある。さらに、良質な検査データを提供するため、関連学会が評価する認定資格を取得するように努めるべきである (認定資格を下記に示す)。

平成 30 年 12 月 1 日に施行された「医療法の一部を改正する法律」において、遺伝子・染色体検査の精度管理を確保することになった。精度の確保に関する責任者の配置、内部精度管理の実施、適切な研修の実施や外部精度管理の受検の努力義務などが必要となり、精度管理に関する知識の向上を積極的に行う必要がある。また、標準作業書、作業日誌や台帳関係の作成においても、各検査項目の「定義」「臨床的意義」「測定方法およ

び測定原理」「検査手順」「基準範囲および判定基準」等に関して詳細に作成する必要がある。遺伝子関連検査の各項目についての知識向上も積極的に行う必要がある。

〈認定資格〉認定臨床染色体遺伝子検査師（日臨技・本学会）、遺伝子分析科学認定士（日本臨床検査同学院、初級、1級）、臨床細胞遺伝学認定士、認定遺伝カウンセラー、ゲノムメディカルリサーチコーディネーター（日本人類遺伝学会）、ジェネティックエキスパート認定制度（日本遺伝子診療学会）

参考資料

- 1) 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル Approved Guideline(承認文書 MM5-A1) 日本臨床検査標準協議会
2011
- 2) 柿島裕樹. がん診療における遺伝子検査の現状と将来展望 がん遺伝子パネル検査の実践. 臨床病理 2019; 67: 1075-1081
- 3) 日本病理学会 ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程策定ワーキンググループ, ゲノム診療用病理組織検体取扱い規定. 一般社団法人 日本病理学会, 東京, 2018
- 4) 中央社会保険医療協議会.医療機器の保険適応について（令和元年6月収載予定）.中医協 総-1 元.5.29.
- 5) 医療情報システムの安全管理に関するガイドライン第5版, 厚生労働省, 平成 29年5月

おわりに 施行期日 本指針は、2021年@月@日より施行する。