

遺伝子関連検査
検体品質管理マニュアル
Tentative Guideline
(暫定文書)

特定非営利活動法人
JCCLS 日本臨床検査標準協議会
JCCLS 遺伝子関連検査標準化専門委員会

平成21年 2月

特定非営利活動法人 日本臨床検査標準協議会 (Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards, JCCLS) の事業内容と承認文書について

血液や便、尿等の検体を採取して、異常な成分の有無や通常含まれる成分の変化量を調べて患者さんの診断、治療、経過観察または健診に役立てる検査が臨床検査です。本標準協議会 (JCCLS) は臨床検査の普及や質の向上を目指して、米国の同様な団体 (CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute, 旧 NCCLS) をモデルとして関連する医学会、行政 (厚生労働省や政府系機関)、産業界 (臨床検査関連企業) の代表者を中心に 1985 年に設立されました。JCCLS の活動を推進する主な委員会は、JCCLS の常任理事が主幹する常置委員会とテーマごとに専門家からなる専門委員会とに分類できます。前者の主な委員会は、標準物質委員会、認証委員会、常任理事会などがあり、後者の場合は遺伝子関連検査標準化専門委員会、標準採血法検討委員会、ISO/TC212 国内検討委員会などが組織され活動をしております。

これらの委員会によって、臨床検査の標準化に関する調査研究事業、標準化に必要な標準物質の認証事業および指針等の文書作成事業等が行われています。JCCLS で作成された指針文書は各界の識者が参加し、国際的なルールに則り協議され承認されたもので、適切な指針として取り扱われることが期待されます。

なお、「遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル」は JCCLS の協議手順に則り作成され、以下の文書記号が付与されています。

文書記号 **MM5-T1** について

MM : Molecular Methods

5 : JCCLS で承認された文書番号

T1 : Tentative Guideline (暫定文書) 1 版

なお、Tentative Guideline は公開後、約 1 年かけて関連する多くの識者から意見を求め、それらを反映した Approved Guideline (承認文書) として公開してまいります。

また JCCLS からは以下の承認文書が作成されています。

- GP1-P3 JCCLS 指針「尿沈査検査法」 GP : General Laboratory Practices
P3 : Proposed (提案文書) 3 版
- GP2-P1 「外部精度評価 (EQA) 標準化のためのガイドライン」
- GP3-P1 JCCLS 指針「尿試験紙検査法」
- GP4-A1 JCCLS Approved Guideline「標準採血法ガイドライン」
A1 : Approved Guideline (承認文書) 1 版

目 次

遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル Tentative Guideline (暫定文書) 公開に際して.....	4
遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル Tentative Guideline (暫定文書) 掲載に際して.....	5
はじめに.....	6
第1章 遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル策定の背景.....	8
1. 国際的動向.....	8
2. 我が国の取組み(遺伝子関連検査標準化専門委員会の検討体制)	9
2.1 検体品質管理マニュアル検討(WG-2 委員会)の設置.....	9
2.2 検体品質管理マニュアル検討(WG-2 委員会)活動の背景.....	9
3. 検体品質管理の現状分析	11
3.1 不適切な検体の性状と測定への影響に関する実態調査.....	11
3.2 遺伝子関連検査の測定前プロセス(プレアナリシス)の現状と課題.....	12
3.2.1 遺伝子関連検査全般.....	12
3.2.2 病原体遺伝子検査	13
3.2.3 体細胞遺伝子検査	13
3.2.4 遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)	13
4. 検体品質管理マニュアルの作成.....	14
第2章 遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル.....	16
1. 遺伝子関連検査における検体保存と運搬	16
1.1 病原体遺伝子検査における検体保存と運搬	18
1.1.1 血清・血漿等	18
1.1.2 尿.....	18
1.1.3 喀痰	19
1.2 体細胞遺伝子検査における検体保存と運搬.....	20
1.2.1 組織・組織切片	20
1.2.2 血液(白血球).....	21
1.2.3 尿・糞便	22
1.3 遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)における検体保存と運搬	23
1.3.1 外部委託による遺伝学的検査の実施.....	23
2. 遺伝子関連検査における検体取扱い	25
2.1 病原体遺伝子検査における検体取扱い.....	25
2.1.1 血清	25
2.1.2 血漿	26
2.1.3 喀痰	28

2.1.4	糞便	29
2.1.5	尿	30
2.1.6	血液(白血球)、骨髄	31
2.1.7	胸水、腹水、心嚢液、腓液、気管支肺胞洗浄液(BALF)等	33
2.1.8	リンパ節、固形組織(生検、手術材料)	34
2.2	体細胞遺伝子検査における検体取扱い	35
2.2.1	リンパ節、固形組織(生検、手術材料)	35
2.2.2	ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック	37
2.2.3	血液(白血球)、骨髄	39
2.2.4	胸水、腹水、心嚢液、腓液、気管支肺胞洗浄液(BALF)、尿(沈渣)、喀痰	42
2.2.5	培養細胞	43
2.3	遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)における検体取扱い	45
2.3.1	血液(白血球)	45
2.3.2	口腔粘膜	47
2.3.3	毛髪	47
2.3.4	爪	48
2.3.5	血痕	49
2.3.6	臍帯(へその緒)	50
3.	遺伝子関連検査における検体採取	51
3.1	病原体遺伝子検査における検体採取	51
3.1.1	主なウイルス感染症	51
(1)	肝炎ウイルス	51
(2)	急性呼吸器感染症原因ウイルス	51
(3)	下痢症原因ウイルス	52
(4)	脳炎原因ウイルス	52
(5)	無菌性髄膜炎原因ウイルス	53
(6)	EBウイルス(Epstein-Barr virus:EBV)	53
(7)	サイトメガロウイルス(Cytomegalovirus:CMV)	54
(8)	ヒトパルボウイルス B19(Human parvo virus B19)	54
(9)	ヒトパピローマウイルス(Human papilloma virus:HPV)	55
(10)	HTLV-I(Human T-lymphotropic virus type I:ヒト T リンパ球向性ウイルス-I 型)	55
(11)	HIV(Human immunodeficiency virus:ヒト免疫不全ウイルス)	56
3.1.2	主な細菌感染症	56
(1)	結核菌・非定型抗酸菌	56
(2)	レジオネラ菌	57
(3)	マイコプラズマ ニューモニエ(<i>Mycoplasma pneumoniae</i>)	57
(4)	クラミジア ニューモニエ/シッタシ(<i>Chlamydia pneumoniae/psittaci</i>)	58
(5)	クラミジア トラコマティス(<i>Chlamydia trachomatis</i>)	58

(6) 淋菌(<i>Neisseria gonorrhoeae</i>)	59
(7) MRSA (Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> :メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)	59
3.1.3 真菌・その他	59
(1) 病原性真菌	59
(2) ニューモシスチス イロベチー (<i>Pneumocystis jiroveci</i>)	60
3.2 体細胞遺伝子検査における検体採取	61
3.2.1 固形腫瘍の遺伝子検査	61
(1) 膵癌の K-ras 遺伝子(<i>KRAS</i>)変異解析	61
(2) 肺癌の EGFR 遺伝子(<i>EGFR</i>)、K-ras 遺伝子(<i>KRAS</i>)変異解析	61
(3) 大腸癌の p53 遺伝子(<i>TP53</i>)、K-ras 遺伝子(<i>KRAS</i>)変異解析	62
(4) GIST の c-kit 遺伝子(<i>KIT</i>)、PDGFR α 遺伝子(<i>PDGFRA</i>) 変異解析	62
3.2.2 造血器腫瘍の遺伝子検査	63
(1) 白血病細胞の微小残存病変(MRD)の検出	63
(2) 悪性リンパ腫細胞の微小残存病変(MRD)の検出	63
3.3 遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)における検体採取	64
3.3.1 遺伝学的検査	64
3.3.2 保険収載された単一遺伝子疾患(遺伝病的検査)	64
第3章 今後の課題と展望	66
1. 今後の課題と検討の方向性	66
2. 検体品質管理マニュアル作成の意義と効果	67
おわりに	68
参考資料	69
1. 参考文献	69
2. 参考ガイドライン等	69
3. 略語集	71
4. 遺伝子関連検査標準化専門委員会およびWG-2 委員会名簿	72
4.1 遺伝子関連検査標準化専門委員会 委員名簿	72
4.2 WG-2 委員会名簿	74

遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル Tentative Guideline (暫定文書)公開に際して

特定非営利活動法人 日本臨床検査標準協議会(JCCLS)は臨床検査医学の分野において、標準化を通じて最終的には良質な医療の一端を国民の皆様方に提供することを設立の趣旨に掲げ、1985年より活動を展開しております。

標準化は臨床検査項目の測定値の標準化以外に、検査に関連する分野および検査自体に関する概念や取扱い等ガイドラインも対象としております。

JCCLSでは標準化に関連する多くの委員会が活動しておりますが、平成18年の秋口より、遺伝子関連検査に関する関連学会や団体において情報や意見の交換等を通じて、国内における遺伝子関連検査全体の受け皿として機能することを目標に新たに活動を開始してまいりました。平成18年および平成19年における活動内容は本標準協議会のホームページ(URL:<http://www.jccls.org/>)の受託事業に掲載されております。

さて、その成果の一つとして、表題の「遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル」を作成いたしました。遺伝子関連検査は検体の収集、保管、運搬等の管理が非常に重要であり、検査の最初のステップとして検体の種類や検査の目的に応じて適切に処理される必要があります。本マニュアルは検査を実施する施設および外注をする施設を対象に作成したもので、関係者の皆様方が本マニュアルを日常の業務にご活用戴ければ、望外の喜びでございます。

末筆ながら、本マニュアル作成にご尽力を戴いた JCCLS 遺伝子関連検査標準化専門委員会 渡邊清明委員長と委員の皆様方および WG-2 委員会の宮地勇人委員長と委員の皆様方、並びに貴重なご意見を戴いた各方面の皆様方に深甚なる感謝の意を表します。

平成21年2月

特定非営利活動法人 日本臨床検査標準協議会(JCCLS)
会長 濱崎 直孝

遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル Tentative Guideline
(暫定文書)掲載に際して

「遺伝子関連検査標準化専門委員会」は 2006 年に経済産業省より 2 年間にわたって「遺伝子関連検査標準化調査研究」の事業を委託され、極めて活発に活動を展開しております。委託を受けた背景の一つとして、2007 年 5 月に遺伝子関連検査の質的保証のため各国が行うべき政策等を明らかにする「分子遺伝学的検査における質保証に関する OECD ガイドライン」が勧告として採択された事があります。一方、国際標準化機構(ISO)の第 212 技術委員会でも我が国の発議により、遺伝子検査の標準化が議論されてきた経緯もあります。

「遺伝子関連検査標準化専門委員会」の目的は、このような国際的な動向に的確に対応するために、遺伝子関連検査に関わる学会や団体からの委員を組織し、活発なる意見や情報交換を通じ、国際的に遺伝子検査の標準化を確保すると同時に将来のあるべき姿を追求することにあります。

約 3 年間にわたる本委員会活動の成果の一つに、遺伝子関連検査を実施する前段階の検体の採取、保管、運搬等の取扱いに関する本マニュアルの作成があります。このマニュアルは本委員会およびその委員会(WG-2)により作成いたしました。

なお、本委員会には、日本遺伝子診療学会、日本人類遺伝学会、日本臨床化学会、日本臨床検査医学会、日本臨床衛生検査技師会、日本臨床検査自動化学会等から委員を選出して戴き、また、経済産業省や厚生労働省の方々にもオブザーバーとしてご参加を戴きました。さらに、WG-2 委員会には(社)日本衛生検査所協会や大学病院で遺伝子検査に熟知している専門の技術者の方々にご参加を戴き、鋭意マニュアルの作成にご尽力を戴きました。

本マニュアルは以上のように、この分野の多くの専門家の意見を集約した我が国初の遺伝子検査の検体取扱いの指針であり、Tentative Guideline(暫定文書)として作成されました。今後はこの文書に関して、約 1 年をかけて関連する多くの識者のご意見を賜り、Approved Guideline(承認文書)を作成してまいります。

是非、本マニュアルを日常の遺伝子検査業務でご活用を戴き、精度管理の向上に資するようお願いを申し上げます。

なお、最後に本マニュアルの作成に多大な貢献をされた WG-2 委員会の宮地勇人委員長をはじめ、WG-2 委員各位および遺伝子関連検査標準化専門委員各位に深感申し上げます。

平成 21 年 2 月
JCCLS 遺伝子関連検査標準化専門委員会
委員長 渡邊 清明

はじめに

特定非営利活動法人(NPO法人)日本臨床検査標準協議会(Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards: JCCLS 以下、NPO法人日本臨床検査標準協議会という)の遺伝子関連検査標準化専門委員会の作業部会(以下WG-2委員会)では、この度、「遺伝子関連検査¹における検体品質管理マニュアル」(以下本マニュアルという)を策定した。

本マニュアル策定の目的は、遺伝子関連検査の測定精度保証のために、検査利用者から測定実施者における検体管理、すなわち検体採取、運搬および保存において、適正な検体を確保し不適切な検体由来する検査誤差を回避するためである。測定精度を確保するには、測定結果に大きく影響する測定前のプロセス(プレアナリシス)における作業工程の標準化が必要である。しかしながら、この作業工程の標準化がなされていない。その理由の1つとして、検体採取、運搬および保存における標準化マニュアルが今まで整備されていなかった点が挙げられる。本マニュアルは、我が国において初めて、包括的かつ実践的な標準化マニュアルとして策定された。

本マニュアルの構成は、第1章では、「遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル策定の背景」、第2章では「遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル」、第3章では「今後の課題と展望」を記載した。第2章「遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル」では、「推奨される運用方法」を示すとともに、検体品質不良を回避するため、測定目的・検体種類別に不適切な検体性状と測定結果への影響、品質不良の回避法と対処方法を記載した。これら理論背景に基づき、検体個別の測定精度を確保するために、各々の検体性状を把握した上で、適切な処理を選択していただきたい。なお、遺伝子関連検査の分類は、NPO法人日本臨床検査標準協議会の遺伝子関連検査標準化専門委員会による分類、すなわち病原体遺伝子検査、体細胞遺伝子検査、遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)にしたがい記述した。

本マニュアルの記述内容は、検体採取、運搬および保存と多様な段階に付随する要因を考慮しながら、学会雑誌等の論文から引用可能なエビデンスの採用を目指した。しかしながら、測定前のプロセスは多様な段階に付随する要因が多く、論文にて引用可能な記述は限られている。このため、論文として発表されていないが、背景理論が明確で、経験的に実績があるものは本マニュアルの記述に取り入れた。

本マニュアルの利用者は、病院検査室や登録衛生検査所等の検査実施者のみならず、検査利用者または検体提出に関与する者(検体採取者、運搬者等)全てが対象となる。医療機関において、検体採取は、医師、看護師ときに患者本人であり、検体運搬、保存の担当者に

¹ 遺伝子関連検査の分類・定義(①病原体遺伝子検査、②ヒト体細胞遺伝子検査、③ヒト遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査))については、第1章 3.2.1.遺伝子関連検査全般の項を参照のこと。

はさらに多くの職種が関与している。遺伝子関連検査の社会的浸透を考慮すると、検体採取、運搬、保存に関して、医療機関のみの検査実施状況を上回る多様な影響要因が発生することが懸念される。このため、記述は医療従事者以外の人々にも読んで理解してもらえるような表現、用語の使い方を意識した。

本マニュアル策定のために行った全国調査において、遺伝子関連検査の測定は、病院検査室において実施する項目や検体数が限られ、登録衛生検査所等の外部機関で受託される場合が多いことが判明している。この場合、病院検査室は外部委託の窓口となることが多い。このような状況を鑑みて、病院検査室では、検査利用者または検体提出に関与する者に対して、また外部受託機関(登録衛生検査所、遺伝情報取扱い事業者等)においては、委託者(医療機関等)に対して本マニュアルを遵守するよう情報提供することを要望したい。さらに、遺伝子関連検査用の試薬・機器(前処理、測定等)を製造販売する事業者においても、その使用者に対して、同様の情報提供を要望したい。なお、医療機関以外で行われる遺伝子関連検査、さらには研究(臨床治験を含む)として遺伝子解析を実施している施設においても、本マニュアルの趣旨を十分認識し、遵守することを要望したい。

本マニュアルは、その活用と遵守により、個別の遺伝子関連検査における、適正な検体の確保、不適切な検体に由来する検査誤差の回避を通して、測定精度の向上さらには、遺伝子関連検査に基づく良質な医療またはヘルスケアの推進に寄与することが期待される。まずは、多くの検査機関にて御使用いただき、記述不足等指摘事項があればご連絡いただきたい。

第1章 遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル策定の背景

本章では、遺伝子関連検査をめぐる国際動向と、それらを基にしたNPO 法人日本臨床検査標準協議会における各種取組み(遺伝子関連検査標準化専門委員会およびWG-2 委員会の設置等の検討体制の構築、遺伝子関連検査の測定前プロセス(プレアナリシス)に関する現状分析と課題の整理等)を概説し、本マニュアル策定の背景を示した。

1.国際的動向

ヒトゲノム全塩基配列の解読により、従来の単一遺伝子解析を中心とした研究は、長足の進歩を遂げ、それに呼応し生活習慣等環境要因と遺伝要因が複雑に関係する薬物反応、疾患感受性(易罹患性:病気のなりやすさ)、太りやすさ等の体質との関係を調べる研究へと拡大してきた。近年、その成果も報告されつつあり、疾患の早期診断、治療さらに予防への応用が期待される。

このような中、遺伝子関連検査は、臨床の領域のみならず、一般の社会生活に確実に浸透し始めている。医療機関を介さず、利用者から直接依頼を受けて遺伝子を検査し、疾患感受性(易罹患性:病気のなりやすさ)を判断する体質遺伝子検査・リスク検査や検査結果に基づく食事・運動メニューの提供サービス等、多様な事業形態が出現しつつある。

一方、遺伝学的検査は、生涯変化しない個人の遺伝情報を明らかにする検査であることから、検査実施時のインフォームド・コンセント、個人遺伝情報の保護、検査に用いる試料の品質管理、検査前後の遺伝カウンセリング体制の整備等、慎重に取り扱うべき課題が存在している。

このような情勢の中、遺伝子関連検査については、標準化や精度確保の必要性が従来から指摘されてきたが、この問題をめぐり最近の国際的な動きは活発になっている。

OECD²では、遺伝子関連検査の共通課題を解決するため、国際的に調和された基準を作成する必要性を提起し、2007年5月に遺伝子関連検査の質的保証に関する勧告を採択、各国が行うべき政策等を明らかにする「分子遺伝学的検査における質保証に関するOECDガイドライン³」:(以下、「OECDガイドライン」という)を公開した。

² OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development: 経済協力開発機構。

先進国間の自由な意見交換・情報交換を通じ、1)経済成長、2)貿易自由化、3)途上国支援(これを「OECDの三大目的」と称す)に貢献することを目的とする。現在加盟国は以下の30か国。

(1) EU加盟国(19か国): イギリス、ドイツ、フランス、イタリア、オランダ、ベルギー、ルクセンブルク、フィンランド、スウェーデン、オーストリア、デンマーク、スペイン、ポルトガル、ギリシャ、アイルランド、チェコ、ハンガリー、ポーランド、スロバキア

(2) その他(11か国): 日本、アメリカ合衆国、カナダ、メキシコ、オーストラリア、ニュージーランド、スイス、ノルウェー、アイスランド、トルコ、韓国

³ OECDガイドライン: OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing: 分子遺伝学的検査における質保証に関するOECDガイドライン。

<http://www.oecd.org/dataoecd/33/11/39274808.pdf>

一方、国際標準化機構(ISO⁴)の第212技術委員会(TC212⁵)でも、我が国の発議で2004年6月のISO/TC212総会において遺伝子検査の標準化が議論され、2005年2月に新規作業項目提案として正式に議題として上程された。その後、OECDにおけるガイドライン策定作業とISO/TC212における提案の連携を図るため、2005年12月に両機関は書簡を交換し、作業を加速させることに合意した。

そして、2007年5月に開催されたISO/TC212総会において、我が国の提案が承認され(Resolution No.209)、臨床検査分野の遺伝子関連検査の質保証と能力要求に関する標準化の検討を開始することとなった。

2.我が国の取組み(遺伝子関連検査標準化専門委員会の検討体制)

2.1 検体品質管理マニュアル検討(WG-2委員会)の設置

遺伝子関連検査の標準化に関する国内外の情勢を踏まえて、遺伝子関連検査の全体像を広くカバーし、幅広い視野から今後我が国が対処すべき方策等の検討を行うことを目的として2006年度にNPO法人日本臨床検査標準協議会に「遺伝子関連検査標準化専門委員会」を組織して、産学官が一同に参加する新たな検討体制を整備した。本委員会は、遺伝子関連検査標準化専門委員会とその下に設置された二つの作業グループ(WG-1委員会およびWG-2委員会)から構成された。新たに設置されたWG-1委員会では、2007年5月に勧告として採択された「OECDガイドライン」を受けて、我が国で実施されている各種遺伝子関連検査を対象とした「遺伝子関連検査に関するベストプラクティス・ガイドライン」の検討を行い、WG-2委員会では、検査結果に大きな影響を及ぼす検体の取扱いについて検討し、「検体品質管理マニュアル」を策定することとした(委員については、参考資料4参照)。

2.2 検体品質管理マニュアル検討(WG-2委員会)活動の背景

NPO法人日本臨床検査標準協議会の2006年度遺伝子関連検査標準化専門委員会では、経済産業省委託の標準化フェジビリティスタディ事業において、我が国における遺伝子関連検査の現状について情報収集し、標準化の課題を整理した。遺伝子関連検査の標準化の取組みとして、病原体遺伝子検査の一部では測定器具・試薬のキット化、一部の測定作業の自動化が進められ、広く用いられている。

しかしながら、白血病や固形腫瘍を対象とした体細胞遺伝子検査や、単一遺伝子病・個人識別等の遺伝学的検査では、測定器具・試薬のキット化や測定作業の自動化がなされて

⁴ ISO: International Organization for Standardization. 電気分野を除く工業分野の国際的な標準である国際規格を策定するための民間の非政府組織。本部はスイスのジュネーヴ。スイス民法による非営利法人。日本からは日本工業標準調査会(JISC)が加盟。

<http://www.iso.org/iso/home.htm>

⁵ TC212: ISO Technical Committee for Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems : 臨床検査および体外診断検査システムに関する技術委員会

http://www.iso.org/iso/standards_development/technical_committees/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.html?commid=54916

おらず、また、測定精度を保証する、標準物質の作製・運用や外部精度評価は、病原体遺伝子検査の一部に留まっている。

遺伝子関連検査は、病原体遺伝子検査、体細胞遺伝子検査、遺伝学的検査の3分野に大別され、検体の測定や検査結果の取扱い等については各検査で違いがみられるが、検体の取扱いについては各検査に大きな違いはなく共通する部分が多い。さらに、診断の確定に直結する遺伝子関連検査の測定過程と測定結果は、検体の品質に大きく左右されることから、検体の取扱いは測定精度を保証する上で、極めて重要である。しかしながら、検体の取扱いについて、これまで十分な検討がなされなかった。この原因としては、①測定法の開発については、企業の経済的なインセンティブが働くが、検体の取扱いはこの対象外となっていること、②多種多様の検査材料が必要であるためにそれらの入手が極めて難しく研究の対象となりにくいこと、が挙げられる。

このような状況を踏まえ、測定精度を保証するために必要な、検査機器・試薬・測定者による施設間のばらつきの解消、精度の維持・向上のためには、測定結果に大きく影響する測定前のプロセス(プレアナリシス)における作業工程の標準化、特に、検体の品質管理が優先的に取り組むべき重要な課題であるとの結論にいたった。

3. 検体品質管理の現状分析

3.1 不適切な検体の性状と測定への影響に関する実態調査

検体品質管理のマニュアルを策定するために必要な情報を把握するため、検査目的および検体の種類ごとに、不適切な検体の性状と測定への影響について実態調査を行った。この調査は、大学病院3施設、登録衛生検査所4施設および診断薬メーカー1社の計8施設を対象に行われた。その結果、以下のように多岐にわたる検査材料が利用されていることが明らかとなり、これらの検体種類ごとに、不適切な検体性状と測定への影響、さらに現行の回避法を整理した。

検体の種類は、①病原体遺伝子検査の材料、②体細胞遺伝子検査の材料、③遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)の材料の3分類とした。①病原体遺伝子検査の材料として、血清、血漿、尿、喀痰、糞便および患部ぬぐい液等、②体細胞遺伝子検査の材料として、血液(白血球)、骨髓、胸水、腹水、心嚢液、膝液、喀痰、気管支肺胞洗浄液(BALF)、尿(沈渣)、リンパ節、固形組織(生検、手術)、ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック、凍結切片作製用包埋組織ブロック、細胞診検査材料(患部擦過細胞等)、剖検材料(組織)、培養細胞、CD34 リッチ移植細胞等、③遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)の材料として、血液(白血球)、口腔粘膜、毛髪(毛根細胞)、爪、血痕、臍帯等を挙げた。

なお、遺伝子関連検査の測定前のプロセス(プレアナリシス)の実態調査の詳細については、NPO 法人日本臨床検査標準協議会 平成19年度「遺伝子関連検査標準化調査研究 成果報告書」を参照されたい(http://www.jccls.org/active/trust/19report_genetic.pdf)。

3.2 遺伝子関連検査の測定前プロセス(プレアナリシス)の現状と課題

本項では、遺伝子関連検査の分類と定義を示すとともに、遺伝子関連検査の測定前のプロセス(プレアナリシス)に関わる現状と課題を、現在の動向を踏まえて以下に整理した。

3.2.1 遺伝子関連検査全般

現在、我が国で実施されている遺伝子関連検査^(*)は、感染症の原因となるウイルス・細菌等(HCV、HBV、結核菌、クラミジア、淋菌等)の外因性因子を調べる病原体遺伝子検査と、ヒトの遺伝子を検査するヒト遺伝子検査の2分野に大別される。さらに、ヒト遺伝子検査は、白血球や固形腫瘍細胞に見られる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(遺伝子検査)と単一遺伝子疾患(遺伝病)の診断や、移植に関わるHLAの遺伝子型、ファーマコゲノミクス(Pharmacogenomics:PGx 薬理ゲノム学)、多因子疾患の易罹患性(疾患感受性:病気のなりやすさ)に関わる一塩基多型(Single Nucleotide Polymorphisms :SNPs)を検査する遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)・個人識別の2分野に分けられる。

なお、「遺伝子関連検査標準化専門委員会」では、これまで用いられてきた「遺伝子検査」の用語を次のように分類・定義し、①～③を総称して「遺伝子関連検査」とした。

(*): 遺伝子関連検査の分類と定義

①病原体遺伝子検査(病原体核酸検査)

ヒトに感染症を引き起こす外来性の病原体(ウイルス、細菌等微生物)の核酸(DNAあるいはRNA)を検出・解析する検査

②ヒト体細胞遺伝子検査

癌細胞特有の遺伝子の構造異常等を検出する遺伝子検査および遺伝子発現解析等、疾患病変部・組織に局限し、病状とともに変化し得る一時的な遺伝子情報を明らかにする検査

③ヒト遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)

単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物等の効果・副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査等、ゲノムおよびミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報(生殖細胞系列の遺伝子解析により明らかにされる情報)を明らかにする検査

以下、特に断らない限り、①②③をそれぞれ、①病原体遺伝子検査、②体細胞遺伝子検査、③遺伝学的検査と簡潔に表記することとする。

これら遺伝子の塩基配列等を標的として検出する遺伝子関連検査の工程には、測定前のプロセス(プレアナリシス)(検査依頼、検体採取、保存、運搬、検体・試料の前処理、核酸抽出)、測定プロセス(増幅、検出)、測定後プロセス(結果報告、解釈、利用)の3つのプロセスがある。また、遺伝子関連検査の測定プロセスでは、多様な遺伝子解析技術が用いられているが、その測定精度は検体採取から検査材料の前処理までの測定前のプロセス(プレアナリシス)における作業要因に最も大きく影響される。このため、測定精度の確保には、測定

プロセスとともに、測定前のプロセス(プレアナリシス)が適正に行われることが不可欠である。

しかし、実際の測定前のプロセス(プレアナリシス)では、次のような課題が核酸抽出工程に影響し、測定精度低下の要因となっている。

- ① 物理的性状、化学的性状、増幅阻害因子となる干渉物質の存在等、検体の性状は多様であるが、それらを客観的に評価する方法がない。
- ② 検体の性状に応じて、それに適した個別の処理方法が必要となるが、その対応は施設や測定者(検査者)によって異なる。
- ③ 検体採取とその後の検体処理の方法は手作業(用手法)で行うことが多く、作業担当者・測定者により技術差がある。

3.2.2 病原体遺伝子検査

病原体遺伝子検査においては、各病原体について複数の検査がすでに保険収載され、検査に用いる試薬のキット化が進んでいる。しかしながら、対象となる検体の採取部位、検体の種類や性状は多様で、測定前のプロセス(プレアナリシス)はその性状に応じて異なるものとなる。また、その多くは手作業で、作業方法は施設や測定者ごとに異なっており、標準化されていない。このため、検査材料から核酸を抽出する作業工程の標準化や既知の標準物質を用いた検査の品質保証体制の確立が重要な課題である。

3.2.3 体細胞遺伝子検査

体細胞遺伝子検査においては、疾患病態や治療効果の指標となる定量的測定値が広く用いられるため、より高い精度と感度が求められる。腫瘍組織を用いた遺伝子検査では、病原体遺伝子検査と同様の留意事項に加え、腫瘍細胞分画の分離および正常細胞混入による結果への影響の評価が必要である。このため、病原体遺伝子検査と同様、測定前のプロセス(プレアナリシス)の標準化、検査により得られた結果の解釈、評価方法の標準化等が重要な課題である。

3.2.4 遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)

遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)で得られる結果は、個人の将来の健康状態を高度に予見することができ、これは検査対象者の家族や親族にも重要な意味を持つ。また、遺伝子型を確定するために行われる検査は、生涯変わらない結果であるため通常は再検査されることなく、その結果が診療記録として永続的に引き継がれる。

一方、医療機関を介さず、利用者から直接依頼を受けて遺伝子検査を受託し、疾患感受性(易罹患性)等を判断する体質遺伝子検査・リスク検査(易罹患性遺伝子検査)や、検査結果に基づく食事・運動メニューの提供サービス等、多様な事業形態が出現しつつある。このような事業においては、測定精度に大きく影響する検体採取と保存、運搬、核酸の抽出等、測定前のプロセス(プレアナリシス)には医療関係者以外に多様な関係者が介在する。このため、遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)については、検査により得られた結果の解

積や評価方法とともに、検体採取と保存、運搬、核酸の抽出等の測定前のプロセス(プレアナリシス)の標準化や利用者への啓発が重要な課題である。

4. 検体品質管理マニュアルの作成

遺伝子関連検査は、病原体遺伝子検査、体細胞遺伝子検査、遺伝学的検査ごとに用いられる検体の取扱いが異なるため、これまでは検査担当者の経験や技術等により、検査の品質が維持されており、一般化されにくく、広く普及しづらい側面があった。

また、遺伝子関連検査に用いる各種の検体は、検体の採取と保存、運搬、核酸の抽出等の多様な段階において適切に処理される必要があるため、それらに付随する要因を考慮する必要がある(表1を参照)。

表1 遺伝子関連検査における検体品質管理法

	不適切な性状	運搬保存	原因と影響	指標	抽出前の分析法	抽出後の分析法	対処方法と回避方法
病原体遺伝子検査							
体細胞遺伝子検査							
遺伝学的検査							

このため本マニュアルでは、遺伝子関連検査の3つの分野(病原体遺伝子検査、体細胞遺伝子検査、遺伝学的検査)で用いられる代表的な検体を挙げ、それら検体の取扱いに関して「推奨される運用方法」及び各種検体の(1)不適切な性状、(2)原因、(3)対処方法、(4)回避方法を具体的に示すとともに、遺伝子関連検査の対象となるウイルス・細菌、血液、組織等の各種検体の採取時の要件を明確化した。

一般的に、遺伝学的検査では、血液(白血球)から抽出されたDNAが検査に使用されている。また、検査の目的に応じて、血液(白血球)以外に、皮膚線維芽細胞、羊水細胞、絨毛細胞、臍帯血、Bリンパ芽球様細胞株や遺伝生化学の分野では血清等も検査に用いられることがある。さらに、検査の目的によっては、口腔粘膜や口腔液が用いられる場合もある。

なお、本マニュアルで取扱う遺伝学的検査のスコープが「単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物等の効果・副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査等、ゲノムおよびミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報(生殖細胞系列の遺伝子解析により明らかにされる情報)を明らかにする検査」であることから、これら遺伝学的検査に用いられる代表的な検体である血液(白血球)等について記載し、染色体検査に用いられる各種の培養細胞や遺伝生化学検査に用いられる血清等の検体については記載していない。

今後は、本マニュアルを基に検体の品質管理が適切に行われ、測定前のプロセス(プレアナリシス)

ナリシス)の標準化が広く浸透することにより、遺伝子関連検査が普及し、さらに有用な技術の開発や診療への応用も加速されるものと期待される。

第2章 遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル

本章では、遺伝子関連検査に用いる検体(試料)の品質の管理方法について、臨床検査領域で得られている経験的な検体の安定性および論文等に記載された報告を基に、検体保存と運搬(1項)及び検体取扱い(2項)に分けて、「推奨される運用方法」を示すとともに、正しく保存されなかった場合の「不適切な性状」について、その「原因」、「対処方法」および「回避方法」について記載した。また、3項では、遺伝子関連検査に用いる検体採取の要件を整理し、明確化した。

1. 遺伝子関連検査における検体保存と運搬

遺伝子関連検査に用いる検査材料は、他の検査と同様に採取直後に使用し検出・測定することが望ましい。しかしながら、医療の領域では多様な要因により、検体を室温、冷蔵または冷凍保存し、検査室または検査施設へ運搬し、検査を実施する場合がある。また、測定後の試料は再検査を目的として、さらに一定期間保存されることになる。この間、測定対象とする微生物や細胞等の状態が変化し、遺伝子関連検査の結果に影響を与える可能性がある。したがって、試料は検査実施まで適切に保存し、抽出した核酸は抽出前検体とともに適切に保存する必要がある。

一般に、研究領域で実施される遺伝子関連検査においては、核酸(DNA/RNA)を高純度に抽出するケースが多い。また、高純度に抽出されたDNAはたとえ室温でも比較的安定に保存できると考えられている。しかしながら、臨床検査の領域では迅速性を重視していることから核酸を必ずしも高純度で精製せず、比較的純度の低い状態で測定材料とする場合がある。一方、RNAの安定性はその抽出条件に大きく依存し、抽出条件ごとに設定された保存条件を守らないと、検査結果(値)に大きく影響する可能性がある。また、抽出されたRNAは保存安定性が非常に悪いことが知られている。

抽出試薬が体外診断薬の場合は、その添付文書に検体の適切な保存条件が明記されているため、この条件を正しく守って保存・測定することが重要である。また、研究用試薬を用いる場合でもその説明書の指示に従うのみならず、製造元等に問い合わせ、必要に応じて核酸の保存条件を別途評価すべきである。

(1)核酸の保存温度

高純度に抽出した核酸を保存する場合に、核酸の種類や目的に応じて適切な保存方法を選択する必要がある。特に、RNAは分解されやすく不安定であることから長期・短期の保存に関わらず、超低温(−70℃以下)で保存する必要がある。

一方、ヒトゲノム等高分子ゲノムDNAは、凍結融解によりDNA鎖にニック(キズ)が入ったり、切断等の可能性があるため、Tris-EDTA緩衝液にて冷蔵(2~8℃)保存が推奨される。抽出されたDNAは冷蔵(2~8℃)保存で少なくとも1年間以上安定である。なお、高分子ゲノムDNAを超低温(−70℃以下)で長期間保存する場合には、凍結融解・凍結乾燥を避けるために、小分けして密閉保存することが推奨される。

(2)保存容器

保存容器としては、核酸の吸着が最も少ないと考えられるポリプロピレン製の小型チューブが推奨されるが、微量の核酸を保存する場合にはそのチューブの内側をシリコン等でコーティングする必要がある。通常のディスポーザブルチューブは高熱により熱成型されるため、DNase(DNA分解酵素)やRNase(RNA分解酵素)は混入していないと考えられるが、製品にその旨が明記されているものの使用を推奨する。

ここでは抽出前の試料の保存安定性について主に記載しているが、核酸の保存安定性については前述の内容を参考に特別な場合のみ記載した。なお、ウイルスや細菌等を測定する場合、各検体における標的遺伝子の安定性はその対象ごとに異なり複雑であることから、それらの特性を踏まえた取扱いが必要である。

(3)検体の運搬

遺伝子関連検査に用いられる検体を他の検査室に送付する場合は、予め検体を送付する旨を送付先に連絡し、検体の受領漏れがないように配慮する。さらに、検体の取違いを防ぐために、検体には検体の識別情報を明瞭に表示し、検体とともに検査依頼書等の検体情報を送付する。また、検体に記載する患者名等は必要に応じて匿名化する。

遺伝子関連検査に用いられる検体の運搬は、他の検査と同様に、検体ごとに定められた適切な保存条件にて短時間で行うことが望ましいが、施設間の運搬は長時間を要する場合がある。検体を他施設に運搬する際には、運搬中の検体の保存条件、特に保存温度をコントロールすることが重要である。なお、運搬に使用する容器は、発泡スチロール等の保温性が優れ、検体等が潰れにくい容器を使用する。

検体運搬中の保存温度は、冷凍(−20℃以下)、冷蔵(4~10℃)、室温(17~28℃)の3条件が一般的であり、冷凍ではドライアイス、冷蔵では保冷剤等を冷媒として使用する。また、室温においても必要に応じて蓄温剤を使用する。運搬容器に入れる冷媒等の量は、検体の梱包時のみならず、開梱時の運搬容器内の温度も予測して調整する。特に、検体を海外に発送する等運搬に長期間を要する場合には、運搬途中でドライアイスの補充等を行い、検体の保存温度の管理を厳密に委託できる運送会社に依頼する等の配慮が必要である。

検体の受領者は、検体および検査依頼書等の検体情報、検体の保存状況(保存温度、検体の破損状況の有無等)を確認した後、直ちに検体を適切な保存温度・場所にて保存する。

1.1 病原体遺伝子検査における検体保存と運搬

1.1.1 血清・血漿等

ウイルスを検出するための検査において、対象となるウイルスの培養が困難であること、あるいは培養が可能であっても培養に長時間を要することから、病原体遺伝子検査が広く実施されている。血液を採血後、HCV および HIV では 6 時間以内、HBV では 24 時間以内に血清または血漿に分離することが推奨され、この条件下でのウイルス量の測定は、その結果に大きく影響しないことが確認されている。また、分離後の血清・血漿は冷蔵(2~8 °C)で 5 日間程度保存できるが、長期間保存する際は凍結保存が推奨される。HBV を測定する場合は-20°C以下、HAV、HCV、HEV の RNA 測定用検体は-70 °C以下に凍結することが望ましい。

この他、血中の CMV や HSV 等は比較的安定であると報告されている。

以上の報告から、ウイルス試料は血清・血漿中においては比較的保存安定性が高いと考えられる。

(1) 不適切な性状

沈殿物が発生している、色調が異常、凍結乾燥している等。

(2) 原因

高温下での長時間の放置、凍結融解の繰り返し等正しい条件下で保存されなかったことが原因と考えられる。

(3) 対処方法

原則として、高温下での保存等不適切な状態で検体が保存された場合には、再採血が必要となる。再検査では抽出済みの核酸が適切に保管されていれば、それを用いることができる。試料の凍結融解の回数を記録しておくこと。

(4) 回避方法

検査室において、試料の保存温度および保存日数を規定し、試料に保存日を付記して正しい温度条件で保存することが重要である。

1.1.2 尿

クラミジアや淋菌の核酸検査には尿(男性)が用いられる。尿は冷蔵(2~8 °C)で保存し、4 日以内に核酸抽出処理することが望ましい。抽出済み核酸の安定性は抽出条件に依存するが、標準的な方法で正しく抽出が行われた場合、DNA は冷蔵(2~8 °C)で1週間以上安定である。なお、長期間保存する場合には凍結保存が望ましい。

(1) 不適切な性状

細菌等が繁殖し、白濁した状態等。

(2) 原因

不適切な採取容器、保存温度下で長時間放置された等、正しい条件下で保存されなかったことが原因と考えられる。

(3) 対処方法

初回検査では再採取の必要がある。再検査では抽出済みの核酸が適切に保管されていれば、それを用いることができる。試料の凍結融解の回数を記録しておくこと。

(4) 回避方法

検査室において、試料の保存温度および保存日数を規定し、試料に保存日を付記して正しい温度条件で保存することが重要である。

規定された条件外で保存された試料は測定に用いないこと。

1.1.3 喀痰

結核菌群を対象とする核酸検査では、一般に喀痰が検査材料として用いられる。喀痰の品質管理は結核菌群の検査において非常に重要である(結核菌検査指針2007参照)。喀痰の肉眼的品質指標としてはMiller&Jonesの分類が一般に用いられる。また、核酸検査においてはNALC-NaOH処理を行い、リン酸緩衝液で懸濁した試料が用いられているが、懸濁試料の保存安定性については詳細なデータは報告されていない。懸濁液は経験的に冷蔵(2~8℃)では1週間、凍結では長期保存が可能である。懸濁試料は凍結融解を繰り返さないように小分けして凍結保存することが推奨される。抽出済み核酸の安定性は抽出条件に依存するが、標準的な方法で正しく抽出が行われた場合、DNAは冷蔵(2~8℃)で1週間以上安定である。なお、長期間保存する場合には凍結保存が望ましい。

(1) 不適切な性状

粘性部分がなくなっている喀痰は不適切な条件で保存された可能性がある。

(2) 原因

高温下での長時間の放置、凍結融解の繰り返し等正しい条件下で保存されなかったことが原因と考えられる。

(3) 対処方法

初回測定の場合は喀痰を採り直す。再検査の場合は、適切な条件で保存された核酸を用いることができる。試料の凍結融解の回数を記録しておくこと。

(4) 回避方法

検査室において、試料の保存温度および保存日数を規定し、試料に保存日を付記して正しい温度条件にて保存することが重要である。規定された条件外で保存された試料は測定に用いないこと。

1.2 体細胞遺伝子検査における検体保存と運搬

今日、ヒトゲノム解析の進行に伴い、SNPs 解析等臨床に利用できる情報が蓄積されつつある。また、DNA マイクロアレイ技術の開発により、これまでより網羅的な遺伝子解析(遺伝子発現解析や遺伝子型解析)が実施されるようになっている。これらの情報を応用し、臨床研究領域では多様な遺伝子検査が実施されている。このような検査において遺伝子発現解析の対象となる RNA は不安定であり、試料や操作者(検査者、研究者等)に由来する RNase(RNA 分解酵素)等の混入により分解される可能性がある。したがって、RNA を測定用試料として取扱う際には、十分な配慮が必要である。

なお、RNA は臨床検査領域でも、シリカメンブレン等へ吸着させ比較的高純度に精製する場合がほとんどである。精製した RNA の純度の確認方法としては、従来から行われてきた分光光度計による、 A_{260}/A_{280} 比の確認、アガロースゲル(変性)による電気泳動に加え、最近では比較的簡便な Microchip Gel によるリボゾーム RNA(rRNA)のサイズ(28S、18S)や rRNA の比率計算が一般的となっている。

精製した RNA 試料は通常は -70°C 以下で凍結し保存することが望ましい。しかしながら、超低温冷凍庫が設置されていない施設もあり、 -20°C 以下で凍結保存されている例が多く見られる。このため、試料を保存する冷凍庫の性能を熟知し、凍結融解や凍結乾燥を避ける等、保存条件を十分検討する必要がある。一般に RNA 試料は凍結融解を避け、小分けした後に保存することが推奨されるが、実際には試料が極微量であるため 1 本で凍結保存する例が多いと考えられる。この場合、一部を cDNA に変換して保存しておくことも推奨される。

正確な遺伝子発現の定量を目的とする検査の場合、あるいは発現量が低く高感度に検出を必要とする場合には、組織・細胞が自己融解を起こさない状態で検体からの RNA 抽出を速やかに行う必要がある。

なお、検体を後日使用する場合は、核酸安定化に適切な方法(検査目的、検体種別、保存方法、保存期間、核酸種等によって異なる)にて保存する。

1.2.1 組織・組織切片

近年、DNA マイクロアレイを利用した発現プロファイルの比較が臨床診断に応用される可能性が示されており、これらの検討における新鮮組織材料の状態については、すでにいくつかの報告がなされている。中でも、骨髄における転写因子、サイトカイン等の mRNA の発現量は、採取後の時間の経過により大きく変動することが報告されており、十分な注意が必要である。また、最近では試料に添加する RNA 安定化剤が販売され、すでに用いられているが、回収できる total RNA の量や、その分子量の分布パターンそのものに変動はないが、個々の遺伝子レベルでは変動が認められることも報告されている。これらの検査では、検体採取から核酸を抽出するまでの条件を一定に決め、目的とする遺伝子の変化を事前に確認しておくことが重要である。

生検組織や手術により摘出された組織の扱いはさらに複雑となる。組織では一般

に小さな組織塊や対象となる部分を切片とし、直ちに核酸抽出の処理を実施するか、液体窒素を用いて急速に凍結して組織を保存する必要がある。組織を用いた研究でも試料の保存条件とRNAの変化については注意が必要である。

癌の遺伝子検査では組織切片が用いられる場合がある。癌細胞特異的な遺伝子発現を調べるためには、凍結組織作製用包埋剤に包埋し、凍結した検体のマイクロダイセクション(顕微鏡下で、癌細胞のみを採取する方法)が実施されている。マイクロダイセクションでは各装置専用の処理方法にしたがい、適切に処理することが重要である。

(1) 不適切な性状

凍結融解等が繰り返され、細胞が破壊されているような状態の検体は不適切である。病理組織等固定液を用いる場合は核酸が十分回収できない可能性がある。PCRの試料とする場合、切片の作製工程からクロスコンタミネーションに十分注意する必要がある。

(2) 原因

直ちに凍結等適正な処理がなされなかった場合、凍結融解が繰り返された場合等正しい条件下で保存されなかったことが原因と考えられる。

(3) 対処方法

初回検査の場合、小分けされた別の凍結保存検体からの再抽出、または組織の再採取の必要がある。再検査では抽出済みの核酸が適切に保管されていれば、それを用いることができる。

(4) 回避方法

検査室において、試料の保存温度および保存日数を規定し、試料に保存日を付記して正しい温度条件で保存することが重要である。規定された条件外で保存された試料は測定に用いないこと。

1.2.2 血液(白血球)

白血病等を対象とした遺伝子検査では、血液細胞より抽出した核酸(DNA/RNA)を用いる。フィコール等による比重遠心分離やセルソーター等による分離・分画した白血球や全血が主として用いられる。

なお、血液中には、DNA や RNA そのものが存在していることが報告されており、これらは血球や組織に由来する細胞の分解で生じたものと考えられている。最近、これらの試料を用いた癌の診断が研究されている。これらの核酸は血中では安定に存在することが報告されており、生体内で血中に放出された核酸は何らかの保護を受けている可能性がある。なお、通常、血清や血漿に核酸を添加した場合、直ちに分解されることが知られている。

(1) 不適切な性状

細胞が破壊されているような状態の検体は不適切である。

シリンジ採血時に陰圧を強くかける、または抗癌剤を使用している場合等白血球が破壊され、核酸抽出に影響する可能性がある。

(2) 原因

高温下での長時間の放置、凍結融解の繰り返し等正しい条件下で保存されなかったことが原因と考えられる。

(3) 対処方法

小分けされた別の凍結保存試料からの抽出のやり直し、または血液の再採取の必要がある。再検査では抽出済みの核酸が適切に保管されていれば、それを用いることができる。

(4) 回避方法

- 1)検査室において、試料の保存温度および保存日数を規定し、試料に保存日を付記して正しい温度条件にて保存することが重要である。規定された条件外で保存された試料は測定に用いないこと。
- 2)試料の輸送に際しては、細胞等が壊れない容器で輸送する。

1.2.3 尿・糞便

尿中にはDNAが存在し、癌の検査等に使用可能である。また、糞便中に排出されるDNAやRNAを用いた結腸・直腸癌の検査も実施されているが、糞便は食物由来成分や雑菌の宝庫であり、これらが遺伝子増幅反応を阻害することが報告されており遺伝子関連検査の試料として用いる場合には、検体の前処理等に十分注意する必要がある。

(1) 不適切な性状

細菌等が繁殖し、白濁した状態等。

(2) 原因

不適切な採取容器、保存温度下で長時間放置された等、正しい条件下で保存されなかったことが原因と考えられる。

(3) 対処方法

初回検査の場合、再採取の必要がある。再検査では抽出済みの核酸が適切に保管されていれば、それを用いることができる。試料の凍結融解の回数を記録しておくこと。

(4) 回避方法

検査室において、試料の保存温度および保存日数を規定し、試料に保存日を付記して正しい温度条件にて保存することが重要である。規定された条件外で保存された試料は測定に用いないこと。

1.3 遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)における検体保存と運搬

近年、いわゆる単一遺伝子疾患の原因遺伝子が同定され、現在、多種多様な手法を用いて遺伝学的検査が実施されている。また、遺伝学的検査の実施施設も多様であり、特に稀な単一遺伝子疾患の遺伝学的検査は、研究機関を中心に実施されている。このため、稀な単一遺伝子疾患の遺伝学的検査を実施する際には、医療機関(委託施設)と研究機関(受託施設)で試料の運搬が発生する場合がある。

遺伝学的検査では、一般的に血液(白血球)が検査に使用されている。また、遺伝学的検査の目的に応じて、口腔粘膜が用いられる場合がある。口腔粘膜は、専用綿棒等を用いて採取されるが、個体差、採取条件の違い等により回収できる DNA 量に差が見られる。このため検査の目的に応じて、適正に検体の採取を行い、適切な保存状態で検体の運搬を行う必要がある。これらの生体試料の運搬に際しては、感染の防御や検体の破損等への配慮が必要である。

1.3.1 外部委託による遺伝学的検査の実施

遺伝学的検査は、被検者(患者)本人のみならず、家族や血縁者の遺伝情報をも明らかになる場合があるため、遺伝学的検査の実施にあたってはインフォームド・コンセントが不可欠であり、必要に応じて遺伝カウンセリングを行う必要がある。

また、遺伝学的検査を他の施設に依頼する場合には、個人遺伝情報の保護の観点から、各種安全管理措置(組織的・人的・物理的・技術的安全管理措置等)を講じた上で、患者名を匿名化するとともに、検体採取から検査結果の報告に至る全ての過程において検体および検査情報の取扱いには十分な注意が必要である。

さらに、検査終了後の検体の取扱いについても、被検者を含めた関係者と事前に取り決めておく必要がある。

通常、遺伝学的検査では被検者から採取した血液(白血球)が検体となる。血液の採取は資格を持った医療関係者が本人を確認した上で採血する。

また、検査の目的に応じて口腔粘膜等の被検者本人が採取可能な試料を検体とする場合においても、責任のある第三者が検体採取に立会い被検者本人と検体の確認を行うなどの配慮が必要である。

採取した検体は連結可能匿名化し、適切な条件で保存する。

また、検体運搬中に検体情報が付された検体が紛失することがないように、検体と検査依頼書を一体化して厳密に管理し、運搬する必要がある。

なお、検体の施設間の運搬は、関係者が直接運搬を行うか、施設間における検体運搬体制が特別に確立されている場合以外は、宅配便等の一般の運搬システムを利用することになる。検体の運搬手段は、運搬システム全体の安全性、信頼性、所要時間等を考慮して選択する必要がある。

運搬に使用する容器は、発泡スチロール等の保温性が優れ、潰れにくい容器を使用し、用いる検体の種別に応じた適切な保存温度で送付する。

検査実施施設では、検体の受領および検査の依頼内容について確認し、検査依頼書の情報に基づき検査を実施する。また、検査のプロセスや結果を適切かつ正確に記録として保管管理し、検査実施中や検査結果の報告後の問い合わせ等に対応できるよう努めるとともに、必要に応じて実施する検査の分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性に関する情報等を検査依頼施設に情報提供する必要がある。

検査結果は依頼者のみに報告する。この際、第三者に検査結果が漏洩することを防ぐために、報告書は外から透けて見えない厚手の封筒に入れ、検査依頼施設(依頼者)に親展扱いにて送付する。また、郵便や宅配便等の一般の運搬システムを利用する場合は、報告書の紛失を防ぐために、配達記録が残る方法にて送付する。

検査に用いた検体や抽出した核酸(DNA/RNA 等)は、検査依頼施設との取決めに従い、再検査のために一定期間保管した後、原則として適切に廃棄するか、検査依頼施設に適正な保存条件を守り返却する。

検査結果を受け取った検査依頼者は、検査結果の匿名化を解除し、被検者の検査結果として診断に使用する。

2. 遺伝子関連検査における検体取扱い

本項では、遺伝子関連検査に用いる検体(試料)の取扱い方法について整理を行った。

2.1 病原体遺伝子検査における検体取扱い

病原体遺伝子検査は、外来病原微生物のゲノム DNA あるいは RNA を特異的に検出することにより、疾患の原因となる病原体を特定することが目的である。したがって、目的とするウイルスや細菌を確実に採取できる方法で、感染症の病態や病期、あるいは感染様式に合わせて最も適切な検査材料を選択することが重要である。

現在、体外診断用試薬キットの普及により、血清、血漿、喀痰、尿および患部ぬぐい液等が一般的な病原体遺伝子検査の検体となっている。

ここ数年は、冬期にノロウイルスによる嘔吐・下痢症が流行することが多く、糞便検体での病原体遺伝子検査の実施数が増大している。その他の検査材料については、病原体の局在の特殊性や検査目的に応じて多種多様なものが採取される。主に、末梢血、脳脊髄液、患部擦過物、気管支肺胞洗浄液(BALF)、患部生検組織等がある。

これらの検体採取においては、採取方法や条件次第で検査の品質が損なわれる恐れがあり、取扱い方法の標準化が望まれる。日常の検査でよく見られる不適切な検体の性状、そのような状態になったと考えられる原因、性状不良検体を救済するための対処方法および再発を防ぐための回避方法について、以下に代表的材料ごとに列挙する。

2.1.1 血清

血清分離剤入り真空採血管を用いて規定量の末梢血を採血し、室温で1時間前後採血管を横に寝かせて放置して凝固を完了させ、直ちに遠心分離(1,190 G (重力加速度)[半径 170 mm ローターでは 2,500 rpm]、4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間)する。なお、凝固促進剤が添加された真空採血管を用いる場合には、凝固のための放置時間は短縮される。

病原体遺伝子検査用検体は、専用採血管から検査に必要な量だけを使用することが望ましく、別の容器に分注することは避ける。なお、遠心分離後、すぐに検査しない場合には、元の採血管の分離血清を直接凍結保存(-20°C 以下)する。

(1) 不適切な性状

血清の色調が透明な赤褐色～赤色を呈している。あるいは黄緑色を呈している。

(2) 原因

赤橙色～赤色を呈しているのは溶血によるヘモグロビン混入、黄緑色～抹茶色を呈しているのは黄疸によるビリルビン混入等が原因と考えられる。

前者のヘモグロビン混入は、真空採血管を使用する限り、強度の陰圧負荷等採血時の物理的な作用による溶血で起きることはほとんどないが、遠心分離前に誤って検体を凍結、または遠心加重(G (重力加速度))と時間が不十分な遠

心分離で、赤血球が分離剤の下層に完全に移行しないまま凍結保存したために、検査時の再融解で溶血を招くことが起こり得る。

(3) 対処方法

ビリルビン混入の場合は、採血時の患者の病態に起因するものであり、再採血での回避は難しい。そのため、できる限り核酸以外の夾雑物を除去できる効率の高い核酸抽出法を選択して処理する。一般的にはフェノール/クロロホルム抽出や、塩析後にエタノールやイソプロパノール等で沈殿させる精製法よりも、フィルターまたはメンブレンや磁性粒子等に核酸を吸着させて、混在する夾雑物を洗浄除去する方式の精製法の方が遺伝子増幅の反応阻害物の影響を軽減できることが多い。なお、検出試薬に内部標準が組込まれていれば、遺伝子増幅反応の阻害の影響を把握でき、偽陰性の発生を回避できるが、内部標準がない場合には、プラスミド DNA を検体から抽出した DNA 溶液または cDNA 溶液に既知量を添加し、その増幅効率の良否で阻害物質の影響を確認することも可能である。

(4) 回避方法

採血管の陰圧を残さずに規定量を採血し、完全に凝固反応を終わらせ、速やかに適正な条件で遠心分離を行うという、一連の作業の基本を忠実に守れば、血清は最も安定した核酸増幅検査が可能な材料である。核酸検査で常用される血清分離済み採血管を直接凍結する場合には、遠心分離直後の血清層の色調や濁り、分離剤の下層に沈み切らなかった血餅の残存の有無等を十分に観察してから冷凍庫に保管する必要がある。この時点で、色調について経験値によって定めた基準を超えている場合には再度採血を検討すべきである。

2.1.2 血漿

血漿は、抗凝固剤として EDTA を用いる。ACD (acid citrate dextrose) や CPD (citrate phosphate dextrose) を使用しても、EDTA と同様に分離血漿を遺伝子増幅検査に供することができる。

(1) 不適切な性状

- 1) フィブリンが析出している。あるいは粘性が高い。
- 2) 濁りや沈渣物の状態から、多量の白血球が混入していることが疑われる。
- 3) ヘパリンが混入している。

(2) 原因

1) EDTA 真空採血時に、速やかに十分な転倒混和を行わないと凝固系がゆっくりと進行し、血漿分離後に時間を経てからフィブリンが析出する。影響が軽度の場合には粘性を帯びた状態となることがある。また、抗凝固剤を使用せずにシリンジ採血し、直後に EDTA 採血管に移した場合にも凝固系は進行し始めるので同様の状態を招く。

- 2) G :遠心加重(重力加速度)や時間等遠心の条件が不十分なために、白血球、特に比重の軽いリンパ球や血小板が血漿の下層に分布し、血漿部分を分取するときにそれらの白血球と一緒に吸引してしまうことによって起こる。特に HIV のように T リンパ球に感染して増殖するウイルスの血漿中 RNA を経時的にモニターする場合には、リンパ球を検体に混入させてしまうと正確な定量値を得ることができなくなる。
- 3) 遺伝子検査用には、EDTA、ACD、CPD 等の抗凝固剤を使用することが基本であるが、PCR 等核酸増幅反応の阻害は、ヘパリン真空採血管やヘパリンを用いたシリンジで採血し、血漿を分離したことが原因で起きることが多い。また、IVH(中心静脈栄養法)や人工透析等、カテーテルを留置している患者では血栓防止のためにヘパリンが使用されることが多く、血中濃度によってはそれが核酸増幅検査に直接影響することがある。(ヘパリン混入がごく微量(0.05 単位)であっても、PCR 反応での DNA 増幅が抑制される。)

(3) 対処方法

- 1) 血漿検体では、ウイルス粒子がフィブリン線維に絡めとられて不均一な分布状態になり、正しい定量測定結果が得られない場合がある。ディスポーザブルのピペットチップでの攪拌(かくはん)、あるいはホモジナイズによってできる限り均一化(ウイルス粒子を分散)させた後に遠心し、液面の表層を慎重に分取したものを核酸抽出用の検体とする。
- 2) 再度、適切な条件で遠心分離(1,710 G (重力加速度)[半径 170 mm ローターでは 3,000 rpm]、4 °C、10 分間以上)し、振動や衝撃でペレットを崩すことのないように注意して表層から血漿を分取する。血漿での遺伝子検査の多くはウイルス核酸の増幅であるので、血球を沈殿させる程度の遠心が検査結果に影響を与えることはない。
- 3) 既存のヘパリン真空採血管で採取された検体を手にしないう限り、核酸増幅反応に阻害的影響が感じられても、その原因をヘパリンと特定することは難しい。ただし、検出試薬に内部標準が組込まれていれば、その増幅効率の良否によって阻害的影響を実際のデータとして把握することができる。内部標準がない場合には、プラスミド DNA を検体からの抽出 DNA または cDNA 溶液に既知量を添加し、その増幅効率の良否で阻害物質の影響を確認することも可能である。

ヘパリン血漿を検体とする場合には、血球のように遠心・洗浄を繰り返すことでヘパリンを除去することはできないので、フィルターまたはメンブレンや磁性粒子等を用いた核酸抽出試薬によりできる限りヘパリンの影響を低減してウイルス核酸を精製する。また、抽出核酸の heparinase(ヘパリン分解酵素)処理によるヘパリン除去が有効な場合がある。

最も手軽にできる措置は、核酸検体を希釈することによって阻害的影響が

解かれることがないかを確認することであるが、ターゲットの核酸も一緒に希釈されて検出限界以下となる危険性があることに注意が必要である。

(4) 回避方法

- 1) EDTA 真空採血管を用いて採血し、直ちに 10 回以上転倒混和して凝固反応を完全に阻止する。
- 2) 低速冷却遠心機で遠心分離 (1,710 G (重力加速度) [半径 170 mm ローターでは 3,000 rpm]、4 °C、10 分間以上) することにより完全な Buffy coat (buffy coat) 層となる。振動を与えないように静かに遠心機から採血管を取り出して、血漿分画の表面を避けて中層から検査に必要な最小限の量を静かに慎重に分取することで血球の混入を防ぐ。
- 3) EDTA 真空採血管を必ず使用する。また、ヘパリン採血される細胞性免疫検査や染色体検査用血液を共用することも避ける。生体内にヘパリンが投与されている場合には、その影響が取り除かれたことを確認してから再採血する。また、カテーテルから採血する場合には、最初に採取した数 ml (カテーテル容量の 2~3 倍) の血液はヘパリンの影響度を考慮して廃棄し、続けて採取した血液を使用するようにする。

2.1.3 喀痰

喀痰検体は、被検者自身が強く深く咳をして気管支から排出して採取する場合と、サククションで吸引して採取する場合がある。主に、結核菌、非定型抗酸菌等の感染症の診断に用いられる。

(1) 不適切な性状

- 1) ほとんどが粘性のない唾液だけで占められている (Miller & Jones の分類の S (M) 痰)。
- 2) 多量の血液が混入している。

(2) 原因

- 1) 被検者自身の排出の方法が不十分か、あるいは喀痰の分泌自体が軽微であることが原因と考えられる。
- 2) 気管支等の気道から出血していることが原因と考えられる。

(3) 対処方法

- 1) 喀痰成分がほとんど含まれない場合には、抗酸菌や非定型抗酸菌等、検出目的の病原体が存在せず、検査結果が偽陰性となる可能性があるため、再度、代替え検体として蓄痰、胃液、気管支肺胞洗浄液、気管支擦過物等の採取を検討する。
- 2) 検体に滅菌蒸留水を 5~10 倍量加えて 15 分間程度置き、赤血球を溶血させてから遠心し沈殿物を核酸抽出処理に供することとするが、本来の喀痰は粘性が強く、この状態では遠心 (1,190 G (重力加速度) [半径 170 mm ローターで

は2,500 rpm]、4 °C、10 分間)しても沈まないことが多いので注意を要する。その後、上清を静かに可能な限り吸引除去し(廃棄せず別容器に回収しておくことが望ましい)、粘液に包まれた細胞成分や細菌等を含む喀痰部分をNALC(N-アセチル-L-システイン)や蛋白分解セミアルカリプロテアーゼ(SAP、商品名「スプタザイム」、「プレソルブ」等)等で溶解して粘性を解き、生理的食塩水やPBS等で遠心洗浄後(1,190 G(重力加速度)[半径170 mmローターでは2,500 rpm]、4 °C、10 分間)、沈渣物を核酸抽出処理に供する。この検体前処理手順が使用する検査試薬で規定されている場合にはそれに準じる。遠心洗浄後の沈渣物が白色に近くなれば、後の工程で反応阻害を招くことはほとんどないと考えてよい。

(4) 回避方法

血液の多量混入により、喀痰の遠心沈渣物へのヘモグロビン混入が避けられず、PCRやTMA等の遺伝子増幅反応に阻害的影響の出ることが懸念される。この場合には、再度、喀痰採取を試みることを望ましいが、あくまでも呼吸器疾患を有する被検者の病状に合わせて対処する必要がある。唾液しか採取されなかった場合も同様であり、被検者が自力で喀痰を排出することが困難な状態であればサクションにより採取する、または胃液を検体として用いることを検討する。

2.1.4 糞便

近年の糞便検体での病原体遺伝子検査は、ほとんどウイルス性下痢症の診断を目的として行われるのが実状である。そのため、採取される糞便の多くは下痢症状が最盛期の水様便である。二次感染の拡大を防ぐ目的で感染源の検査として、その後、回復期の間を経時的に採取した糞便中からウイルスが検出されなくなるまで検査が繰り返される。その他、頻度は低いですが腸管出血性大腸菌の同定やベロ毒素遺伝子の検出等も行われる。

(1) 不適切な性状

採便後、当日のうちに凍結保存(-20 °C以下)されなかったため、腐敗が進行したことが考えられる。しかし、測定前検体をどのように分析してもそれを察知することは困難である。外観の変化として把握できないことから、目的とする病原体の核酸検出感度に悪影響が生じている可能性が高い。

(2) 原因

室温に長時間放置したことが原因となり雑多な細菌が繁殖し目的病原体の検出感度が低下して陰性化する、あるいは非特異的増幅が起こる可能性もある。また、細菌が産生する蛋白質や核酸の分解酵素により、ウイルス核酸が分解され陰性化することもある。

(3) 対処方法

排便直後から数時間以内の糞便中細菌やウイルスの存在状態を、速やかな

凍結保存によって維持できなかつた場合には、事実上、元の状態に戻すことは不可能である。上記のような原因で検体を変質させてしまった場合には、その程度を数値化することもできない。

(4) 回避方法

核酸検査に求められる要件を正しく被検者に理解させ、採便後、室温保存する時間を最小限にするよう心がけ、早期に冷蔵保存、長期の場合は凍結保存が望ましい。特に、医療機関外での採便となった場合には、採取時間、検体保管時の温度条件および保管経過時間を記録する。

2.1.5 尿

病原体遺伝子検査用に採取される尿検体は、そのほとんどが淋菌やクラミジア等による STD (性感染症) の診断を目的とするものである。通常は起床時の早朝第一尿を用いる。また、胎児や新生児のサイトメガロウイルス感染症の診断にも出生後の初尿が用いられることがある。

(1) 不適切な性状

色調が血尿やビリルビン尿が疑われるものである場合、多量の沈渣物の析出が見られる場合等がある。

(2) 原因

血尿は、病原体の増殖により、患部である尿道や膀胱に炎症が生じ、出血したことが原因となる。

析出物は検体を冷蔵保存したことが原因で生じることが多い。

(3) 対処方法

検査材料からの核酸抽出および精製に際し、多量の血球成分の混入を避けるためには低速での遠心分離(430 G(重力加速度)[半径 170 mm ローターでは 1,500 rpm]、室温、5 分間)により除去が可能であるが、凍結保存された尿検体では融解時に溶血するため、ヘモグロビンの混入は避けられない。

なお、ウイルスが検出対象の場合には遠心上清を用いることができるが、細菌が検出対象の場合には、不用意に遠心すると菌体が沈殿する危険性があるため上清の使用に際しては注意を要する。むしろ採尿管を十分に転倒混和して検体を均一化することが重要である。特に析出物は検体を冷蔵保存したことが原因で生じていることが多いため、検査のために分取する前に、検体を 37°C で 30 分間程度インキュベートして、できる限り溶解させることも考慮する。夾雑物の影響を最小にするにはフィルターまたはメンブレンや磁性粒子等を用いた核酸抽出試薬を選択すると良い。

さらに、夾雑物が遺伝子増幅反応に及ぼす阻害的影響を実際に確認するためには、検出試薬に内部標準が組込まれていれば、それによって影響を把握できるが、内部標準がない場合には検出下限に近い既知コピー数のプラスミド

DNA で別途添加回収試験を行うことが望ましい。なお、影響が認められたときには、核酸検体を希釈することで遺伝子増幅反応が回復することもあるが、同時に検出のターゲットも一緒に希釈されて感度限界以下となり、偽陰性となる危険性があるので注意を要する。

(4) 回避方法

感染症の診断が目的であるので、病原体のゲノム DNA や RNA を最も高率に回収できる時期を選んで採尿することが重要である。淋菌やクラミジアの感染部位においては、排尿によって病原体が洗い流されて偽陰性になることのないように、起床して最初に排出される尿を採取することが最良である。その場合には、膿、白血球、赤血球、脱落した上皮細胞等が多量に混入することもある。これらヒトの細胞に由来するゲノムDNA や RNA は、本来の検出目的の病原体のターゲットではないため、極力混入は避けたいが、病原体の回収が全てに優先するため、ある程度の混入はやむを得ない。

2.1.6 血液(白血球)、骨髄

抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管を用いて規定量を採血した後、直ちに転倒混和を行い、採血当日に核酸抽出を行わない場合は冷蔵(2~8 °C)保存する。なお、抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管を用いた場合には、特に安定化剤を加える必要はない。ただし、菌血症や敗血症の原因となる病原体を検出する場合には、室温で長期間保存しておくことと検出感度が低下することがあるため、長期にわたり細胞を保存する場合は超低温(-70 °C以下)で保存する。骨髄検体(骨髄穿刺液)においては、規定量を専用の保存液(FBS を含んだ細胞培養液)で冷蔵(2~8 °C)保存する。

(1) 不適切な性状

- 1)フィブリンが析出している検体では、フィブリンの影響で遠心分離による菌体の回収が阻害され、均一なサンプリングができなくなる。このため定量検査を行う場合には定量性に欠く検査結果となることが懸念される。なお、フィブリンの析出は、採血管内の検体の流動性や検査実施時のピペッティング操作等により確認することができる。
- 2)PCRを用いる検査では、検体中にPCR阻害物質であるヘパリンが混入していると、PCR 増幅不良による検出不能や偽陰性となることが懸念される(ヘパリン混入がごく微量(0.05 単位)であっても、PCR 反応での DNA 増幅が抑制される)。ヘパリンの混入を目視により見分けることはできないため、採血管のラベル情報について十分留意する。骨髄検体では抗凝固剤にヘパリンを用いて採取する場が多いため、注意を要する。
- 3)検体中の菌血症や敗血症の原因となる病原体の菌量が検出感度限界に近い場合は、検出不能になる場合がある。

(2) 原因

- 1)フィブリン析出は、抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管の未使用、採血後直ちに転倒混和を行わなかったこと、転倒混和が不十分であること等が原因であると考えられる。
- 2)ヘパリンの混入は、ヘパリンを抗凝固剤として使用した採血が主な原因と考えられる。これには、他の検査目的のためにヘパリン採血管で採取された血液を遺伝子検査に用いる場合等も該当する。また、血液透析や血栓溶解等の治療を目的としてヘパリン投与した患者より採取した血液においても、ヘパリンの混入が懸念される。
- 3)検体中の菌量は検体採取時の患者の状態による。

(3) 対処方法

- 1)核酸抽出前に検体中のフィブリンを凝集しない程度まで物理的に破碎し、検体中にフィブリンを十分に分散させてから、フィブリンごとサンプリングする。DNA 抽出においては proteinaseK (蛋白質分解酵素) 処理の際に、DTT (dithiothreitol) を添加することでフィブリンの分解を促進できる。
- 2)文献では、フィルターまたはメンブレンや磁性粒子等に核酸を吸着させて、混在する夾雑物を洗浄除去する方式の精製法を用いた核酸抽出キットを用いることにより、ヘパリンの影響を減らすことができるとされているが、完全に取り除くことはできない。ヘパリンの影響は、heparinase (ヘパリン分解酵素) を加えて、混入しているヘパリンを完全に消化することで解消できる。
- 3)菌血症や敗血症の原因となる病原体の菌量が少ない検体では、proteinaseK (蛋白質分解酵素) 処理を行うことにより DNA 抽出効率が上がり、検出可能となる場合がある。

(4) 回避方法

- 1)フィブリン析出は、抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管を用いた検体採取後直ちに十分な転倒混和を行うことで防止することができる。
- 2)核酸検査においてはヘパリン採血管を使用しない。ヘパリン投与した患者の場合は、血中のヘパリンが消失した後の採取が望ましいが、治療中の場合等ヘパリンの混入を避けられない場合は、検査依頼書等に「ヘパリン治療中」であることを記載して検査担当者に情報を提供する。また、骨髄検体についてもヘパリンを含んでいることを記載し、検査担当者に情報を提供する。なお、骨髄検体から核酸を抽出する際には、検体採取時のヘパリンが残存しないよう細胞の洗浄を十分に行う等の注意を要する。
- 3)検体中の菌血症や敗血症の原因となる病原体の菌量は、検体採取時の患者の状態によることから、検査結果の評価は検査の検出感度を考慮して行う。

2.1.7 胸水、腹水、心嚢液、脾液、気管支肺胞洗浄液(BALF)等

採取後の各検体は冷蔵(2~8℃)して保存する。長期にわたり保存する場合は超低温(-70℃以下)で保存する。

(1) 不適切な性状

- 1)溶血等の影響によりヘモグロビン等の血球成分が多量に混在している場合は、PCRで増幅阻害により検出感度が低下することが懸念される。なお、血液成分の混入の程度は、ヘモグロビン量の測定、鏡検による白血球数の測定、検体の色調を半定量することにより確認することができる。
- 2)フィブリンが析出している検体では、遠心分離による菌体の回収が障害され、正確なサンプリングができなくなる。このため定量検査を行う場合には定量性に欠く検査結果となることが懸念される。なお、フィブリンの析出は、試験管内の検体の流動性や検査実施時のピペッティング操作等により確認することができる。
- 3)膿性の検体は雑多な菌が混入しているため、アルカリ熱処理によるDNA抽出では検出不能になる可能性がある。なお、膿性の状態は目視あるいは鏡検により確認することができる。

(2) 原因

- 1)検体採取時の血液成分の混入が原因と考えられる。
- 2)検体採取時の膿性分泌物の状態による。

(3) 対処方法

- 1)血液成分が混入した検体は、滅菌蒸留水を添加して溶血させ、遠心分離後の沈渣からDNA抽出の前処理を行うことにより、PCR増幅阻害の影響が改善される場合がある。また、PCR阻害物質の濃度を下げることが目的として、抽出したDNA溶液を希釈してPCR反応に添加することが有効な場合がある。
- 2)核酸抽出前に検体中のフィブリンを凝集しない程度まで物理的に破碎し、検体中にフィブリンを十分に分散させてから、フィブリンごとサンプリングする。DNA抽出においてはproteinaseK(蛋白質分解酵素)処理の際に、DTT(dithiothreitol)を添加することでフィブリンの分解が促進する。
- 3)検体中での細菌の増殖を防ぐために検体の保存条件は厳守する。核酸抽出の前処理液を通常より多くして、界面活性剤と蛋白質変性剤による夾雑物の除去を行う。

(4) 回避方法

- 1)検体採取時の血液細胞成分の混入を回避する。
- 2)胸水等はフィブリンの析出により採取後に凝固する場合があります、採取容器にクエン酸ナトリウムまたはEDTAを添加した容器を使用する。
- 3)検体は膿性分泌物がない状態のときに採取する。

2.1.8 リンパ節、固形組織(生検、手術材料)

生検または手術により採取した後、組織の自己融解による核酸の分解を防ぐために、直ちに超低温(−70℃以下)で保存する。この際、病変部分のみを切り分けて保存することが望ましい。結核菌検査では、形態学的手法により病変部分を確認することができる。

(1) 不適切な性状

- 1) 検体が大きすぎる場合は、検査対象となる病変部の割合が小さくなり、病変部以外の組織により希釈されることになるため、結果の偽陰性化を招く恐れがある。なお、結核菌検査では、形態学的手法を用いて視覚的に病変部分を確認することができる。
- 2) 胃生検組織を用いた *H. pylori*(ヘリコバクターピロリ)検査、肝生検組織を用いた HCV(C型肝炎ウイルス)や HBV(B型肝炎ウイルス)検査では、赤血球の混入による PCR 増幅不良により偽陰性結果の可能性が懸念される。なお、赤血球の混入の状態は、目視による赤褐色状態、ヘモグロビン濃度の測定により確認することができる。

(2) 原因

- 1) 検査対象とした組織から病変以外の部分を取り除いていないことが原因と考えられる。
- 2) 検体として採取した組織に血液が混入していることが原因と考えられる。

(3) 対処方法

- 1) 検査対象外の細胞成分の混在を可能な限り防ぐ方法として、形態観察を行いながら視覚的に検査対象となる細胞成分を回収する方法が有用である。レーザーマイクロダイセクションを用いた方法は、凍結組織切片を作製し、スライドガラス上の組織切片から検査対象となる細胞成分を正確に回収することが可能であるが、専用の設備が必要となる。一方簡便な方法としては、剃刀等を用いてスライドガラス上のパラフィン切片からできるだけ不要な細胞成分を含まないように検査対象となる細胞成分を手動的に回収する方法が挙げられる。
- 2) フィルターまたはメンブレンや磁性粒子等に核酸を吸着させて、混在する夾雑物を洗浄除去する方式の精製法を用いた核酸抽出キットを用いることにより、PCR 増幅阻害の影響を抑えることができる。

(4) 回避方法

- 1) 検体採取時に病変部位を切り分けて保存する。また、目視において正確な識別が難しい場合においても、できるだけ検査対象外の組織を取り除くことは重要である。
- 2) 生検または手術により採取した固形組織において血液成分の混入は避けられない。

2.2 体細胞遺伝子検査における検体取扱い

体細胞遺伝子検査は、癌細胞の DNA 検査、遺伝子発現解析等、病状とともに変化する一時的な遺伝子情報を明らかにする検査で、癌、白血病、肉腫等、悪性腫瘍全般において、①悪性/非悪性の鑑別、②悪性度の評価、③悪性腫瘍細胞の早期検出、④転移癌/多重癌の鑑別等を主な目的として、多様な手法を用いて解析が行われている。

体細胞遺伝子検査では、癌細胞等病変を示す細胞が検査の対象となる。このため、主な検体は血液と固形組織であるが、病変を示す細胞が含まれる胸水、腹水、心嚢液、膝液、喀痰、気管支肺胞洗浄液(BALF)、尿(沈渣)を検査材料とすることもある。検体採取時には、検査対象となる病変細胞のみを分画採取することができないため、ほとんどの検体に病変細胞周辺の正常細胞が混入することになる。多数の正常細胞が混入した場合、癌細胞中の突然変異が検出されなくなる等、偽陰性になることも懸念されるため、検査結果の判定には十分注意が必要である。

また、最近では病理診断で使用したホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックを検体とした体細胞遺伝子検査の要望が増加している。ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックは病理診断後も長期間保存されているため、レトロスペクティブな病態把握、形態学的な診断との併用といった面で特に威力を発揮する他、新たな検査が開発されるたびに組織を採取する必要がなくなる等患者にとっても利点は多い。一方、ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックは、ホルマリン固定による DNA の変性や組織中の DNase 活性の残存等により、そのほとんどで DNA が断片化されてしまうことや、不適切な DNA 抽出による不純物質等の残存により、検出不能となる場合も少なくない。このため、ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックからの DNA の検出には、高純度に抽出できる方法の採用や、抽出 DNA の質の評価、短い DNA 断片を検出対象とする等の工夫が必要である。DNA の断片化はホルマリン固定条件に大きく影響されるため、今後は病理診断(形態学的検査・診断)に影響がなく、DNA の断片化が発生しにくい固定方法の標準化が望まれる。

さらに、新鮮組織、血液細胞および培養細胞から抽出した DNA を用いてサザンブロット法や DNA ゲノムライブラリー作製等を行う場合には、高分子 DNA を高純度に調製する必要がある。高分子 DNA は剪断力等物理的な力で容易に切断されるため、新鮮な検体または新鮮凍結した検体を用い、物理的な攪拌を避け DNA を抽出する必要がある。

2.2.1 リンパ節、固形組織(生検、手術材料)

生検または手術により採取した後、自己融解による核酸の分解を防ぐために、直ちに超低温(−70℃以下)で保存する。この際、検査対象となる病変部分のみを切り分けて保存することが望ましい。

遺伝子発現解析において正確な定量を目的とする場合は、検体採取後直ちに(2

時間以内に) 遺伝子検査の前処理を行う。直ちに RNA を抽出できない場合は、RNA 安定化に適切な方法 (検査目的、検体種別、保存期間によって、RNA の安定化方法は異なる。5 mol/L グアニジンイソチオシアン酸を用いて検体の変性処理を施した場合、室温で1週間程度保存できる。)にて検体を処理し、RNA 抽出時まで保存する。抽出した RNA は -70 °C 以下の超低温にて保存する。抽出した RNA の凍結融解は RNA 劣化の原因となり、偽陰性の結果を生じさせる可能性があるため、繰り返さないように注意する。

(1) 不適切な性状

- 1)検査対象となる病変部の細胞成分に比して正常細胞や非腫瘍細胞等の検査対象外の細胞成分の混在が大きい検体では、対象外の細胞成分により希釈されることになるため、結果の偽陰性化を招く恐れがある。なお、検体中の病変部分の占める割合は、凍結組織切片を用いた形態学的手法により確認することができる。
- 2)組織が壊死している場合またはアポトーシスを起こしている場合は、すでに組織中の DNA が分解しているため、DNA 検査においては検査結果が得られなくなる懸念される。壊死状態は HE 染色、アポトーシスの状態は TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) 法を用いた形態学的手法により確認することができる。また、DNA 抽出後の電気泳動では、壊死した組織中の DNA は分解を起こしているため、電気泳動ではスメア状の結果が得られる。また、アポトーシスを起こしている組織中の DNA はヌクレオソーム単位 (185bp) で分解されているため、電気泳動ではラダー状に検出される。
- 3)凍結切片作製用に専用包埋剤で包埋した組織は、包埋剤に PCR 阻害作用があるため、PCR を用いた検査では検査結果が得られなくなる懸念される。

(2) 原因

- 1)生検または手術による検体採取時に、検査対象となる病変組織と対象外の組織を目視で明瞭に区別できない場合は、検査対象外の組織の混入が避けられないことがある。
- 2)検体として採取した組織が、すでに壊死またはアポトーシスを起こしている。
- 3)凍結組織切片作製用に専用包埋剤で包埋している。

(3) 対処方法

- 1)検査対象となる病変細胞の割合が低い場合においても目的の遺伝子変異を特異的に検出できる、高感度な検出法を用いる。あるいは、検査対象外の細胞成分の混在を可能な限り防ぐ方法として、凍結組織切片を作製し、形態観察を行いながら視覚的に検査対象となる細胞成分を回収する方法が有用である。レーザーマイクロダイセクションを用いた方法は、スライドガラス上の組織切片から正確に検査対象となる細胞成分を回収することが可能であるが、専用の設備が必要となる。一方簡便な方法としては、剃刀等を用いてスライドガラス上の組織切

片からできるだけ不要な細胞成分を含まないように検査対象となる細胞成分を
用手的に回収する方法が挙げられる。形態観察により細胞成分を回収したものを
治療対象患者の選別等の診療を目的とする検査に供する場合は、病理専門
医による細胞成分の確認が不可欠である。

- 2)壊死またはアポトーシスにより低分子化した DNA を検出するために、検出対象
とする DNA 断片の長さを短く設定する等の工夫が必要である。
- 3)包埋剤は PBS に可溶であるため、核酸抽出前に検体を PBS で十分に洗浄し、
凍結切片作製用包埋剤を除去する。

(4) 回避方法

- 1)検体採取時に検査対象となる病変組織を切り分けて保存する。また、目視にお
いて正確な識別が難しい場合においても、できるだけ検査対象外の組織を取り
除くことが重要である。
- 2)細胞の壊死およびアポトーシスは生体内で起きる現象であり、検査該当組織が
壊死またはアポトーシスを起こしていた場合にそれらの影響を回避することは
できない。壊死あるいはアポトーシスが起きている検体は検査対象としない。
- 3)遺伝子検査の実施が予定されている場合は、凍結切片作製用包埋剤の使用
は避ける。凍結切片作製用包埋剤を使用した場合は、検査依頼書等で凍結切
片作製用包埋剤を使用している情報を検査担当者に伝える。

2.2.2 ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック

病理診断に用いる検体は、生検または手術により組織を採取した後、直ちに 10～
20 %ホルマリン固定液に浸漬し適切な固定処理を行う。固定後の組織は直ちにパラ
フィン包埋し、組織ブロックを作製する。遺伝子関連検査にホルマリン固定パラフィ
ン包埋ブロックを用いる場合には、薄切標本はマイクロームにより 5～10 μ m 程度で
作製する。検体間の相互汚染を避けるため、薄切時は、検体ごとにマイクロームの刃を
替える等の配慮も必要である。

一般に推奨される固定液は 10 %中性緩衝ホルマリンであり、固定時間の目安は手
術材料では室温で 18～36 時間、生検材料では室温 3～6 時間程度である。10 %中
性緩衝ホルマリンによる固定は、緩衝作用を持たない 10～20 %ホルマリンによる固
定と比較して、核酸の断片化の進行が遅延するとの報告がある。また室温もしくは低
温 (4 $^{\circ}$ C) で保存されたパラフィン包埋組織ブロック中では核酸は分解されることは少
なく長期間保持されている。

(1) 不適切な性状

- 1)ホルマリン固定処理は組織中の核酸の断片化を伴うため、一般にサザンブロッ
ト法等高分子 DNA を用いる検査には適さない。さらに、低分子の核酸を対象と
する PCR を用いた検査においても検査結果に影響を与えることがある。また、
PCR 反応において不正確な増幅が起こることがあるため、検査結果の判定は

慎重に行わなければならない。検体の過固定や未固定等検査対象としての適性を判定する簡便な方法としては、HE 染色や免疫染色を用いた形態学的手法があり、これによりある程度の推定が可能である。また核酸の断片化の状態を直接検出する方法として、DNA の場合には、DNA 抽出後に電気泳動により確認する方法、既知 DNA 断片長 (β -globin やビタミン D レセプター等のハウスキーピング遺伝子を対象とする) の PCR 増幅の成否をみる方法、リアルタイム PCR を用いた増幅速度の状態により評価する方法が挙げられる。一方 RNA の断片化を判定する場合には、精製した RNA の純度を確認する方法 (分光光度計による A_{260}/A_{280} 比の確認)、アガロースゲル (変性) を用いた電気泳動で確認する方法、リボゾーム RNA (rRNA) や GAPDH (グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ) や β -actin 等のハウスキーピング遺伝子の発現状態を確認し RNA の分解の程度を評価する方法等が挙げられる。

2) 検査対象となる病変部の細胞成分に比して検査対象外の細胞成分 (正常細胞や非腫瘍細胞等) の混在が大きい検体では、検出標的が希釈されることになるため、結果の偽陰性化を招く恐れがある。なお、検体中の病変部分の占める割合は、HE 染色等による形態学的手法により確認することができる。

(2) 原因

1) 組織中の核酸は、固定前の不適切な組織の取扱い (固定液へ浸漬するまでの時間が長い等) やホルマリン固定中に生じる内因性の核酸分解酵素による自己融解、ホルマリン固定における蛋白質の架橋形成、固定液中に生成されるギ酸による酸性化等の影響により断片化する。ホルマリン固定が原因で引き起こる断片化の程度は、固定液の種類、固定時間や温度により大きく影響を受ける。

2) 検査対象となる病変部の細胞成分に比して検査対象外の細胞成分 (正常細胞や非腫瘍細胞等) の混在が大きいパラフィン包埋組織ブロックを検体とした。

(3) 対処方法

1) ホルマリン固定処理により低分子化した核酸を検出するために、検出対象とする DNA 断片の長さを短く設定する等の工夫が必要である。なお、著しい核酸の断片化を伴うことが懸念される検体での検査は、信頼性の高い結果を得るためにも検体の特性を十分に把握、理解した上で検査を実施することが重要である。特に過去に作製したパラフィン包埋組織ブロックを対象に検査を行う場合や病態把握のためのレトロスペクティブ解析を行う場合は注意を要する。

2) 検査対象となる病変細胞の割合が低い場合においても目的の遺伝子変異のみを検出できる、高感度な検出法を用いる。あるいは、検査対象外の細胞成分の混在を可能な限り防ぐ方法として、形態観察を行いながら視覚的に検査対象となる細胞成分を回収する方法が有用である。レーザーマイクロダイセクションを用いた方法は、スライドガラス上のパラフィン切片から正確に検査対象とな

る細胞成分を回収することが可能であるが、専用の設備が必要となる。一方簡便な方法としては、剃刀等を用いてスライドガラス上のパラフィン切片からできるだけ不要な細胞成分を含まないように検査対象となる細胞成分を手動的に回収する方法が挙げられる。形態観察により細胞成分を回収したものを治療対象患者の選別等の診療を目的とする検査に供する場合は、病理専門医による細胞成分の確認が不可欠である。

(4) 回避方法

- 1) 遺伝子検査が予定されている場合は、病変部分の一部を病理検査用とは別に遺伝子検査用として超低温(−70℃以下)に凍結保存し、核酸の断片化の影響を受けていない検体を確保しておくことは重要である。その上で、ホルマリン固定した組織を遺伝子関連検査に用いる場合は、検体の固定前処理およびホルマリン固定処理は低温で行い、且つ可能な限り固定処理を短時間で行うことが望ましい反面、とくに病理診断に用いる検体は、組織形態や構築の保持や安全性等病理組織標本作製における業務上の制約等から、室温下で一定時間の固定が必要な状況にあり、これらの兼ね合いを理解することが肝要となる。したがってホルマリン固定処理による核酸のある程度の断片化は避けられないが、以下の点について留意することにより、不良検体となることを回避することが可能となる。固定前の処理では、特に手術材料のような大きな組織については、ホルマリンが検体の中心部まで浸透して完全に固定されるまでに時間がかかるため、固定液に浸ける前に固定液が浸透しやすい4~5 mm程度の厚さの組織として短時間で固定した後に切り出しを行うことにより核酸の断片化を回避できる。固定では組織の大きさとホルマリンの浸透時間が重要となる。通常10%ホルマリンは室温で1時間に1 mm程度浸透することが報告されており、生検材料および手術材料ともに固定時間の設定の目安となる。
- 2) 同一病変において複数のパラフィン包埋組織ブロックが在る場合は、HE染色等による形態学的手法により、病変細胞部分の多いパラフィン包埋組織ブロックを検体として選択する。パラフィン包埋組織ブロックが一つしかない場合においても、HE染色等による形態学的手法により病変細胞の存在を確認しておく。

2.2.3 血液(白血球)、骨髓

血液は、抗凝固剤(EDTA等)入り採血管を用いて規定量を採血した後、直ちに転倒混和を行い、採血当日に核酸抽出を行わない場合には冷蔵保存する。検査の目的により、血球成分を分離回収する必要がある場合は、その処理を行う。骨髓検体においては、規定量を専用の保存液(FBSを含んだ細胞培養液)で冷蔵(2~8℃)保存する。

遺伝子発現解析において正確な定量を目的とする場合は、検体採取後直ち(2時間以内)にmRNAを含むtotal RNAの抽出を行う。直ちにRNAを抽出できない場

合は、RNA 安定化に適切な方法(検査目的、検体種別、保存期間によって異なる。5 mol/L グアニジンイソチオシアン酸を用いて検体の変性処理を施した場合、室温で1週間保存できる)にて検体を処理し、RNA 抽出時まで保存する。抽出した RNA は -70°C 以下の超低温にて保存する。なお、抽出した RNA の凍結・融解は RNA 劣化の原因となり、偽陰性の結果を生じさせる可能性があるため、繰り返さないように注意する。

遺伝子変異解析を目的として DNA 抽出を行う場合は 3 日以内であれば検体を室温にて保存しても影響はない。ただし、サザンブロット法等の高分子 DNA を必要とする検査では 24 時間以内、PCR 法等高分子 DNA を必要としない検査では 3 日以内にそれぞれ DNA 抽出を行うことが望ましい。なお、長期にわたり保存する場合は、バフィーコートを分取する等の適切な細胞処理の後に超低温(-70°C 以下)にて保存する。

また、血球成分を分離せずに、全白血球から DNA を抽出して検査に使用する場合は、採取後の検体を直ちに凍結保存してもよい。ただし、DNA の回収量は減少する。検体の凍結・融解は核酸劣化の原因になるため、繰り返さないように注意する。なお、検体を長期にわたり保存する場合は超低温(-70°C 以下)にて保存する。

造血幹細胞移植(骨髄移植)の前処置等により白血球数が極端に少なくなっている患者を対象に検査を行う場合には、白血球数確保のために規定量の数倍の検体量が必要となる場合があるので注意する。

(1) 不適切な性状

- 1) 検体中の全細胞のうち、検査対象とする細胞に比して正常細胞や非腫瘍細胞等の検査対象外の細胞成分の割合が多い検体では、検出対象が希釈されることになるため、結果の偽陰性化を招く恐れがある。なお、検体中の検査対象となる細胞の割合は、血液像検査・骨髄像検査により確認することができる。
- 2) フィブリンが析出している検体では、フィブリンの影響により検体中の白血球が検体中に均一に分布しなくなる。このため定量検査を行う場合には定量性に欠く検査結果となることが懸念される。なお、フィブリンの析出は、採血管内の検体の流動性や検査実施時のピペッティング操作等により確認することができる。
- 3) PCRを用いる検査では、検体中に PCR 阻害物質であるヘパリンが混入している場合、PCR 増幅不良による検出不能や偽陰性となることが懸念される。ヘパリンの混入を目視により見分けることはできないため、採血管のラベル情報について十分留意する。骨髄検体では抗凝固剤にヘパリンを用いて採取するケースが多いため、注意を要する。

(2) 原因

- 1) 検体採取時に検査対象細胞のみを分画して分取することは困難であり、正常細胞の混入は避けられない場合が多い。
- 2) フィブリン析出は、血液の場合は抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管の未使用、骨

髄の場合は専用の保存液(FBS を含んだ細胞培養液)の未使用、もしくは採血後直ちに転倒混和を行わなかったこと、転倒混和が不十分であること等が原因であると考えられる。

- 3)ヘパリンの混入は、ヘパリンを抗凝固剤として使用した採血が主な原因と考えられる。これには、他の検査目的のためにヘパリン採血管で採取された血液を遺伝子検査に用いる場合等も該当する。また、血液透析や血栓溶解等の治療を目的としてヘパリン投与した患者より採取した血液においても、ヘパリンの混入が懸念される。

(3) 対処方法

- 1)検査対象細胞の割合が低い場合においても目的の遺伝子変異のみを検出できる、高感度な検査法を用いる。
- 2)核酸抽出前に検体中のフィブリンを凝集しない程度まで物理的に破碎し、検体中にフィブリンを十分に分散させてから、フィブリンごとサンプリングする。DNA抽出においては proteinaseK (蛋白質分解酵素) 処理の際に、DTT (dithiothreitol) を添加することでフィブリンの分解を促進することができる。
- 3)文献では、フィルターまたはメンブレンや磁性粒子等に核酸を吸着させて、混在する夾雑物を洗浄除去する方式の精製法を用いた核酸抽出キットを用いることにより、ヘパリンの影響が少ないとされているが、完全に取り除くことはできない。ヘパリンの影響は、heparinase (ヘパリン分解酵素) を加えて、混入しているヘパリンを完全に消化するか、白血球を分取した後、生理的食塩水で少なくとも2回以上、白血球分画を洗浄することで解決できる。

(4) 回避方法

- 1)検査対象とする細胞の割合が低い検体では、フィコール等による比重遠心分離法、抗体法、セルソーター等により検査対象細胞を分画したものを検体とする。なお、白血病の病勢の高い時は、腫瘍細胞からの mRNA が多数を占めること(ドミナント)から、通常は混入してくる正常リンパ球由来の mRNA の発現による影響は少ない。
- 2)フィブリン析出は、血液の場合は抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管、骨髓の場合は専用の保存液(FBS を含んだ細胞培養液)を用いた検体採取後直ちに十分な転倒混和を行うことで防止することができる。
- 3)遺伝子検査においては原則としてヘパリン採血管を使用しない。ヘパリンを投与した患者の場合は、血中のヘパリンが消失した後の採取が望ましいが、ヘパリン治療中の場合等ヘパリンの混入を避けられない場合は、検査依頼書等に「ヘパリン治療中」であることを記載して検査担当者に情報を提供する。また、骨髓検体についてもヘパリンを含んでいることを記載し、検査担当者に情報を提供する。なお、骨髓検体から核酸を抽出する際には、検体採取時のヘパリンが残存しないよう細胞の洗浄を十分に行う等の注意を要する。

2.2.4 胸水、腹水、心嚢液、脾液、気管支肺胞洗浄液(BALF)、尿(沈渣)、喀痰

採取後の各検体は冷蔵(2~8℃)して保存する。検査目的により、特定の細胞成分を分離回収する場合は、その処理を行う。

遺伝子発現解析において正確な定量を目的とする場合は、検体採取後直ち(2時間以内)に mRNA を含む total RNA の抽出を行う。直ちに RNA を抽出できない場合は、RNA 安定化に適切な方法(検査目的、検体種別、保存期間によって異なる。5mol/L グアニジンイソチオシアン酸を用いて検体の変性処理を施した場合、室温で1週間保存できる)にて検体を処理し、RNA 抽出時まで保存する。抽出した RNA は -70℃以下の超低温にて保存する。抽出した RNA の凍結・融解は RNA 劣化の原因となり、偽陰性の結果を生じさせる可能性があるため、繰り返さないように注意する。

遺伝子変異解析を目的として DNA 抽出を行う場合、サザンブロット法等の高分子 DNA を必要とする検査では 24 時間以内、PCR 法等高分子 DNA を必要としない検査では 3 日以内にそれぞれ DNA 抽出を行うことが望ましい。DNA 検査を目的として検体を長期にわたり保存する場合は次のように保存する。

○ 胸水、腹水、心嚢液、脾液、気管支肺胞洗浄液(BALF) : 検体を遠心分離(760 G(重力加速度)[半径 170 mm ローターでは 2,000 rpm]、室温、10 分間)した後、沈渣を PBS にて洗浄する。再度遠心分離した後、上清を捨て沈渣のみを超低温(-70℃以下)で保存する。

○ 尿(沈渣) : 検体を遠心分離(6,000 G(重力加速度)[半径 80 mm ローターでは 8,200 rpm]、室温、2 分間)した後、上清を捨て沈渣のみを超低温(-70℃以下)で保存する。

○ 喀痰 : 超低温(-70℃以下)で保存する。

(1) 不適切な性状

- 1) 検体中の全細胞のうち、検査対象とする細胞に比して正常細胞や非腫瘍細胞等の検査対象外の細胞成分の割合が多い検体では、対象外の細胞成分により希釈されることになるため、結果の偽陰性化を招く恐れがある。なお、検体中の検査対象となる細胞の割合は、形態学的手法を用いて視覚的に確認することができる。
- 2) フィブリンが析出している検体では、遠心分離による細胞の回収が障害され、均一なサンプリングができなくなる。このため定量検査を行う場合には定量性に欠く検査結果となることが懸念される。なお、フィブリンの析出は、試験管内の検体の流動性や検査実施時のピペッティング操作等により確認することができる。

(2) 原因

- 1) 胸水、腹水、心嚢液、脾液、喀痰、気管支肺胞洗浄液(BALF)、尿(沈渣)等の検体は、病変部分を直接的に採取する方法ではないため、正常細胞等検査

対象外細胞の混入は避けられない場合が多い。

2) 検体採取時の血液成分の混入が原因と考えられる。

(3) 対処方法

1) 検査対象細胞の割合が低い場合においても目的の遺伝子変異のみを検出できる、高感度な検出法を用いる。

2) 核酸抽出前に検体中のフィブリンを凝集しない程度まで物理的に破碎し、検体中にフィブリンを十分に分散させてから、フィブリンごとサンプリングする。DNA抽出においては proteinaseK (蛋白質分解酵素) 処理の際に、DTT (dithiothreitol) を添加することでフィブリンの分解が促進する。

(4) 回避方法

1) 検査対象とする細胞の割合が低い検体では、フィコール等による比重遠心分離法、抗体法、セルソーター等により検査対象細胞を分画したものを検体とする。

2) 胸水等は、フィブリンの析出により採取後に凝固する場合があります、採取容器にクエン酸ナトリウムまたは EDTA を添加した容器を使用する。

2.2.5 培養細胞

培養細胞を遠心管に回収した後、遠心分離(300 *G*(重力加速度)[半径 170 mm ローターでは 1,250 rpm]、室温、5 分間)し、沈渣(細胞)を超低温(−70 °C以下)にて保存し、核酸抽出に用いる。

遺伝子発現解析において正確な定量を目的とする場合は、検体採取後直ち(2 時間以内)に mRNA を含む total RNA の抽出を行う。直ちに RNA を抽出できない場合は、RNA 安定化に適切な方法(検査目的、検体種別、保存期間によって異なる。5mol/L グアニジンイソチオシアン酸を用いて検体の変性処理を施した場合、室温で 1 週間保存できる)にて検体を処理し、RNA 抽出時まで保存する。抽出した RNA は −70°C 以下の超低温にて保存する。抽出した RNA の凍結・融解は RNA 劣化の原因となり、偽陰性の結果を生じさせる可能性があるため、繰り返さないように注意する。

(1) 不適切な性状

培養細胞の凍結保存液中に含まれている凍結防止剤(DMSO)の影響を考慮しておく必要がある。なお、DMSO は PCR 反応の特異性を高めるために用いられることがあるが、抽出した核酸(DNA/RNA)溶液中に DMSO が残存している場合には増幅効率を低下させたり、DMSO に含まれる蛍光物質が DNA 濃度測定時のバックグラウンドになったりする可能性がある。

(2) 原因

凍結防止剤(DMSO)は、培養細胞を冷凍保存する際に細胞の凍結を防ぐ目的で使用されており、抽出した核酸に DMSO が残存したことが原因と考えられ

る。

(3) 対処方法

核酸抽出前に培養細胞を PBS 等で十分に洗浄し、凍結防止剤(DMSO)を除去する。

(4) 回避方法

凍結防止剤(DMSO)が使用されている場合は、検査依頼書等にその旨を記載して検査担当者に情報を提供する。

2.3 遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)における検体取扱い

遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)は、単一遺伝子疾患の遺伝学的検査等、一生変化しない遺伝学的情報を明らかにする検査で、(1)患者(発症者)を対象にした確定診断のための検査、保因者検査、発症前検査、易罹患者検査(疾患感受性検査)、薬理遺伝学的検査、出生前検査、新生児スクリーニング等の遺伝学的検査、(2)移植目的に患者および供給者の HLA タイプを明らかにするための遺伝子型検査、(3)DNA を用いた親子鑑定、個人識別等の DNA 鑑定がある。

遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)では、血液が主な検体として用いられるが、低侵襲で採取できる口腔粘膜、毛髪(毛根細胞)、爪等が検体として用いられることがある。また、法科学的な DNA 鑑定では鑑定試料として血痕や、個人を特定する検体として誕生時の記念として保存されている臍帯が検査に用いられることもある。

なお、造血幹細胞移植(骨髄移植)、臓器移植を受けた人が検査対象となる場合は、検体に提供者由来の血液や組織が含まれる可能性がある。このため、検体採取前に臓器移植実施の有無の確認を行う必要があり、検査対象者が臓器移植経験者である場合には、提供者由来の組織が含まれない組織を検体とする。

血液から抽出した DNA を用いてサザンブロット法や DNA ゲノムライブラリー作製等を行う場合には、高分子 DNA を高純度に調製する必要がある。高分子 DNA は剪断力等物理的な力で容易に切断されるため、新鮮な検体または新鮮凍結した検体を用い、物理的な攪拌を避け DNA を抽出する必要がある。

なお、遺伝学的検査は、患者本人のみならず、家族や血縁者の遺伝情報をも明らかにする場合がある。このため、検査実施に当たってはインフォームド・コンセントが不可欠である。また、検体は医療機関で採取する血液等の他に、検査対象者自身が採取できる口腔粘膜や毛髪等もあるが、検体の本人確認を確実にを行うために、検体採取は対面にて実施することが必要である。

2.3.1 血液(白血球)

血液は、抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管を用いて規定量を採血した後、直ちに転倒混和を行い、採血当日に核酸抽出を行わない場合は冷蔵保存する。なお、3 日以内であれば室温にて保存しても影響はない。ただし、サザンブロット法等の高分子 DNA を必要とする検査では 24 時間以内、PCR 法等高分子 DNA を必要としない検査では 3 日以内にそれぞれ DNA 抽出を行うことが望ましい。また、血液を採取後凍結保存する場合には、検体を直ちに凍結保存してもよいが、検体の凍結・融解は核酸劣化の原因になるので、繰り返さないように注意する。なお、血液を長期にわたり保存する場合は超低温(−70℃以下)にて保存する。

造血幹細胞移植(骨髄移植)の前処置等により白血球数が極端に少なくなっている患者を対象に検査を行う場合には、検体としての白血球総数確保のために規定量の数倍の検体量が必要となる場合があるので注意する。

血液の採取は資格を持った医療関係者が、検査対象者を確認した上で実施する。

(1) 不適切な性状

- 1)フィブリンが析出している検体では、フィブリンの影響により検体中の白血球が検体中に均一に分布しなくなる。なお、フィブリンの析出は、採血管内の検体の流動性や検査実施時のピペッティング操作等により確認することができる。
- 2)PCRを用いる検査では、検体中にPCR阻害物質であるヘパリンが混入している場合、PCR 増幅不良により検出不能となることが懸念される。ヘパリンの混入を目視により見分けることはできないため、採血管のラベル情報に十分留意する。

(2) 原因

- 1)フィブリン析出は、抗凝固剤(EDTA 等)採血管の未使用、採血後直ちに転倒混和を行わなかったこと、転倒混和が不十分であること等が原因であると考えられる。
- 2)ヘパリンの混入は、ヘパリン採血管を使用した採血が主な原因と考えられる。この中には、他の検査目的のためにヘパリン採血管で採取された血液を遺伝子検査に流用する場合等も該当する。また、血栓溶解等の治療を目的としてヘパリン投与した患者より採取した血液においても、ヘパリンの混入が懸念される。

(3) 対処方法

- 1)核酸抽出前に検体中のフィブリンを凝集しない程度まで物理的に破碎し、検体中にフィブリンを十分に分散させてから、フィブリンごとサンプリングする。DNA抽出においては proteinaseK (蛋白質分解酵素) 処理の際に、DTT (dithiothreitol)を添加することでフィブリンの分解を促進することができる。
- 2)文献では、フィルターまたはメンブレンや磁性粒子等に核酸を吸着させて、混在する夾雑物を洗浄除去する方式の精製法を用いた核酸抽出キットを用いれば、ヘパリンの影響が少ないとされているが、完全に取り除くことはできない。ヘパリンの影響は、heparinase (ヘパリン分解酵素)を加えて、混入しているヘパリンを完全に消化するか、白血球を分離した後、生理的食塩水で少なくとも 2 回以上、白血球分画を洗浄することで解決できる。

(4) 回避方法

- 1)フィブリン析出は、抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管を用いた検体採取後直ちに十分な転倒混和を行うことで防止することができる。
- 2)遺伝学的検査においては原則としてヘパリン採血管を使用しない。ヘパリンを投与した患者の場合は、血中のヘパリンが消失した後の採取が望ましいが、ヘパリン治療中の場合等ヘパリンの混入を避けられない場合は、検査依頼書等に「ヘパリン治療中」であることを記載して検査担当者に情報を提供する。

2.3.2 口腔粘膜

綿棒(スワブ)を用いて頬内側を数回擦過して口腔粘膜を採取後に直ちに風乾により綿棒(スワブ)を乾燥させ、室温で保存する。口腔粘膜採取後の綿棒(スワブ)を乾燥させずに密閉したビニール袋や試験管に保管する等、綿棒(スワブ)を湿潤な状態に放置すると、共存する DNA 分解酵素の影響により口腔粘膜中の DNA は急激に分解する。このため、口腔粘膜採取後の綿棒(スワブ)を直ちに乾燥させることが不可欠である。

なお、口腔粘膜は検査対象者自身が採取できる検体であるが、検体の本人確認を確実にを行うために、検体の採取は責任のある第三者が検査対象者を確認した上で対面方式にて実施する必要がある。

(1) 不適切な性状

飲食や授乳の直後に採取した検体では、食物や母乳の混入による DNA 抽出あるいは検査結果への影響が懸念される。

(2) 原因

口腔内に飲食物や母乳が残った状態で口腔粘膜を採取した場合に、口腔粘膜と同時に綿棒(スワブ)に飲食物や母乳が採取される可能性がある。

(3) 対処方法

ヒト DNA を特異的に検出する検査方法を用いることにより、飲食物由来 DNA の影響を排除する。母乳の影響は DNA 鑑定による個人識別検査により母由来 DNA の混入の程度(割合)を確認する。

(4) 回避方法

飲食や授乳の影響は 30 分程度で消失するので、飲食または授乳後 30 分程度経過してから採取する。また、水で口腔内をすすぎ、食物・母乳の影響を除いた後に採取する。

2.3.3 毛髪

毛抜き等で毛髪を抜去した後、乾燥状態にて室温で保存する。毛髪中のゲノム DNA は主に毛根細胞に存在するが、毛幹部分には極めて少ないため、ゲノム DNA を検出する場合は毛根細胞が付着していることを確認する。また、脱落毛では抜去した毛髪に比べて DNA 回収量が極端に落ちる。検体の由来を確実なものとするためにも脱落毛を検体とすることは避けるべきである。

ミトコンドリア DNA は毛幹部からも検出されることがあるが、他の組織からの DNA と比較してヘテロプラスミーの結果となることが多いため、結果の判定は慎重に行う必要がある。

なお、毛髪は検査対象者自身が採取できる検体であるが、検体の本人確認を確実にを行うために、検体の採取は責任のある第三者が検査対象者を確認した上で対面方式にて実施する必要がある。

(1) 不適切な性状

- 1) 整髪剤や毛染め剤等を使用した毛髪については、PCR 増幅不良となる可能性がある。整髪剤や毛染め剤の使用の有無は検査対象者からの聞き取りの他、毛染め剤については染料の測定、鏡検により確認する。
- 2) 抽出した DNA 中に残存するメラニンの影響により PCR 増幅不良となる可能性がある。

(2) 原因

- 1) 整髪剤の成分が PCR 反応を阻害する可能性がある。また毛染め剤の酸化の影響により毛幹中の DNA が断片化している可能性がある。
- 2) DNA 抽出工程におけるメラニンの除去が不十分であることが原因と考えられる。

(3) 対処方法

- 1) DNA 抽出前に毛髪検体をエタノールで洗浄し、整髪剤を除去する。また、低分子化した DNA を検出するために、検出対象とする DNA 断片の長さを短く設定する等の工夫が必要である。
- 2) DNA 抽出の1反応に供する検体(毛髪)量を減らし、DNA 抽出操作におけるメラニン除去の効率を上げる。また、DNA 抽出時の除蛋白工程は、メラニンの除去に適している方法(例:NaI 法はフェノール法よりもメラニンの除去に適しているとの報告がある)を用いる。メラニンによる PCR 阻害の影響を抑えるために、抽出した DNA を希釈して PCR に用いる。

(4) 回避方法

- 1) 検査対象者から整髪剤および毛染め剤の使用の有無について聞き取りを行い、検査依頼書等を通じて検査担当者に情報を提供する。
- 2) DNA が検出されない場合は、検査材料を変更する。

2.3.4 爪

採取前には爪と指の隙間を良く洗い、垢(あか)やごみをできるだけ取り除き、マニキュアは予め除光液等で拭き取る。爪切りで爪の先端の白い余剰部分(爪甲遊離部の部分)を採取した後、室温で保存する。他人由来の爪が混入しないように、患者ごとに専用の爪切りを使用する等の配慮が必要である。

なお、爪は検査対象者自身が採取できる検体であるが、検体の本人確認を確実にを行うために、検体の採取は責任のある第三者が検査対象者を確認した上で対面方式にて実施する必要がある。

(1) 不適切な性状

大きく切り取られた爪をそのまま DNA 抽出に用いると、蛋白質分解酵素処理において検体が完全に溶解しない場合があり、DNA 回収量が低下する可能性がある。

(2) 原因

爪の成分である繊維状硬蛋白質(ケラチン)は、蛋白質分解酵素処理により消化されにくい物質であり、検体が完全に消化されないことが原因と考えられる。

(3) 対処方法

DNA 抽出時の蛋白質分解酵素処理において、検体が完全に溶解されない場合は、溶解された成分より DNA 抽出を続行する。

(4) 回避方法

DNA 抽出に用いる検体は予め小さく(1 mm×1 mm 程度)切断し、蛋白質分解酵素による消化効率を上げる。

2.3.5 血痕

血液を白色のろ紙に滴下した後に直ちに風乾により十分に乾燥させ、室温にて保存する。

法科学鑑定 of 検体では、血液は多様な物質に付着していることがある。付着している物質から血痕のみを採取できる場合は血痕を剥がし取るか、蒸留水等で湿らせた綿棒(スワブ)で血液成分を採取して直ちに乾燥させた後、室温にて保存する。付着している物質に血液が浸み込んでいて、血液成分のみを回収できない場合は、付着している物質ごと回収し、乾燥させて室温にて保存する。

なお、DNA 鑑定においては、血痕採取前と採取後の記録を検体採取の記録として残す必要がある。

(1) 不適切な性状

法科学鑑定 of 検体において、血液が DNA と分離されない物質と混合している場合は、PCR 増幅不良あるいは電気泳動におけるバンドシフトの原因になることがある。

(2) 原因

法科学鑑定 of においては、血液は多様な物質に付着した状態で発見されるため、DNA 抽出操作により除去されない物質が含まれることが原因と考えられる。

(3) 対処方法

DNA 抽出法による夾雑物除去の効率は、混合している物質により異なると考えられるため、検体ごとに DNA 抽出方法を検討する必要がある。

(4) 回避方法

法科学鑑定 of においては、すでに物体に付着している血液を試料とするため、不特定な物質の混入は避けられない。サンプリングに綿棒(スワブ)を使用する場合は、DNA 抽出に影響を及ぼさない専用の綿棒(スワブ)を用いる。

2.3.6 臍帯(へその緒)

ここでは DNA 鑑定における個人を特定する検体として、誕生時の記念として乾燥状態で保存してある臍帯を対象とする。臍帯は胎児由来であるが膠様結合組織であるため、DNA は臍帯自体からはほとんど回収されず、臍帯内に残った臍帯血由来の細胞が DNA 抽出の対象となる。

臍帯に付されている情報を、検体採取の記録として残す。

(1) 不適切な性状

臍帯の外部に母体由来と考えられる血痕等が付着している。

(2) 原因

母体血の付着は、臍帯採取時に母体血等の除去が不完全であったことが原因と考えられるが、臍帯の保存は本来 DNA 抽出を目的としていないため、母体血等の付着はやむを得ない。

(3) 対処方法

臍帯の外部に血痕が付着しているか否かにかかわらず、DNA 抽出前に臍帯の外部を PBS または生理的食塩水で洗浄する。また、DNA 鑑定による個人識別により 2 人以上の DNA 型が検出された場合は、必要に応じて母の DNA 鑑定を行い、検出された DNA 型の由来を特定する。

(4) 回避方法

誕生時の記念として採取される臍帯は、目視による血液等の付着が確認できなくても、母体由来組織が付着していると想定して DNA 抽出操作前に臍帯外部を PBS または生理的食塩水で洗浄する。

3. 遺伝子関連検査における検体採取

本項では、遺伝子関連検査に用いる検体(試料)の採取方法について整理した。

3.1 病原体遺伝子検査における検体採取

3.1.1 主なウイルス感染症

(1) 肝炎ウイルス

肝炎ウイルスとしては、A 型肝炎ウイルス(HAV)、E 型肝炎ウイルス(HEV)、B 型肝炎ウイルス(HBV)、C 型肝炎ウイルス(HCV)、および HBV をヘルパーとする D 型肝炎ウイルス(HDV)が知られている。これら以外に肝炎を引き起こすウイルスとしては EB ウイルス(EBV)、サイトメガロウイルス(CMV)、単純ヘルペスウイルス(HSV) 等がある。HAV と HEV は主として経口感染、HBV、HCV および HDV は血液を介して感染する。

ウイルス性の肝炎が疑われた場合には、通常は血清、あるいは EDTA 採血後に分離した血漿が検体として用いられる。病原体遺伝子検査に用いる検体の保存は、HBV を測定する場合は -20°C 以下、HAV、HCV、HEV の RNA 測定用検体は -70°C 以下に凍結することが望ましい。また、凍結融解は繰り返さないよう留意する。抗ウイルス剤治療後にウイルスが完全に排除されたことを確認する場合には、肝生検組織を検体として用いて超高感度な核酸増幅検査が行われることもある。また、研究的には肝細胞内の HCV の活動性指標としてマイナス鎖 RNA の検出が、同様に HBV の活動性指標として cccDNA(covalently closed circular DNA) の検出が試みられることもある。

なお、HAV、HEV は一過性の急性肝炎で、慢性化することはない、急性期に採取された血清を検体とする。また、血中からウイルスが消失後も糞便中に長く排泄されやすいという特徴があるため、糞便も重要な検体として用いられる。

(2) 急性呼吸器感染症原因ウイルス

急性呼吸器感染症の原因ウイルスとして、インフルエンザウイルス、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス(ポリオウイルス以外)、ライノウイルス、アデノウイルス等がある。

原因ウイルスを特定するための検体としては以下のものが主に採取される。核酸検査用の検体採取はウイルス分離のための採取法に準ずる。

1) 咽頭拭い液の採取

0.5 %BSA 加 PBS(-)を 2 ml 入れたチューブと手で折ることができる木軸綿棒を準備し、咽頭全体を綿棒の先端で擦過して検体とする。綿の部分チューブの液体に浸け、激しくリンスして管壁で綿の部分を搾り、綿棒を捨てる。綿棒の軸を折り、先をチューブの液に差し込んだままにしてもよい。

2) 鼻腔洗浄液の採取

被検者の頭部を 45 度ほど後方に傾け、生理的食塩水 3~5 ml を入れたゴム製のバルブを鼻腔に差し込み、バルブをつまんで生理的食塩水を鼻腔内に注入する。直ちに手を緩め、陰圧の力を利用して鼻腔内の生理的食塩水をバルブの中

に回収し、検査用の検体とする。この操作には被検者の協力と巧みな操作技術が必要である。鼻腔内に注入した生理的食塩水が戻らないまたはバルブの中に注入され残った生理的食塩水のためにウイルス濃度が薄まるという欠点がある。

3) 鼻咽頭分泌液の採取

途中にトラップ容器の付いたビニールチューブを鼻腔最奥部まで挿入し、陰圧で鼻咽頭分泌液を採取する。鼻咽頭(上咽頭)には耳管も開口しており、なおかつ乳児や低年齢幼児では鼻咽頭分泌液が潤沢にある。インフルエンザウイルスやRSウイルスは、咽頭拭い液よりも鼻咽頭分泌液において分離率が高く、核酸検査用検体としても好ましいものと考えられる。また、咽頭拭い液採取用の堅い綿棒ではなく、細く動きがフレキシブルな綿棒を用いて、鼻腔口から耳孔を結ぶ平面を想定して鼻腔の最下縁に沿って注意深く挿入し、行き止まりの最奥部に数秒置いて綿棒を引き抜いて鼻咽頭分泌液を採取する方法もある。

4) うがい液の採取

できるだけ少量のPBSまたは生理的食塩水でうがい液を採取して検体とする。ただし、検体容量が多くなった場合、全量からウイルス核酸を抽出することは難しく、検査結果に影響を及ぼすことがあり、注意が必要である。検体は、急性期に採取し、採取後速やかに検査する。保存する場合は凍結する必要がある。

(3) 下痢症原因ウイルス

急性感染性下痢症の原因ウイルスとして、ロタウイルス、アデノウイルス、カリシウイルス、アストロウイルス(ノロウイルス、サポウイルス)、パルボウイルス、コロナウイルス、エンテロウイルス、インフルエンザウイルス等がある。ロタウイルスやインフルエンザに伴う胃腸炎、カリシウイルス(カキ関連食中毒)は冬期に多く、エンテロウイルスは夏期に、アデノウイルス、散発例のカリシウイルス等は通年下痢患者の便から検出される。

これらのウイルスの多くは、腸粘膜の細胞で増殖して強い下痢や、嘔吐をもたらす。ウイルス粒子は糞便中に極めて多く排出される(糞便1g中に数億個以上存在)。核酸検査による病原体の検出には、症状の最盛期に採取した便が用いられるが、ノロウイルスでは吐瀉物が検体とされる場合もある。しかし、糞便中に比べて吐瀉物中のウイルス量は非常に少ないため、免疫アッセイで病原体を検出することは難しく、高感度なPCR法の適用が望まれる。

(4) 脳炎原因ウイルス

ウイルス性脳炎は、ウイルスが脳の組織に直接感染して発症する一次性脳炎と、脳以外の臓器が感染症に罹ったことによって生じる二次性(感染後)脳炎に大別される。一次性脳炎は、単純ヘルペスウイルス(HSV)脳炎、日本脳炎等が代表的であり、二次性脳炎は、麻疹(はしか)、流行性耳下腺炎(おたふくかぜ)、風疹等から起こるケースが多く見られる。

これらのウイルス性脳炎に対しては、ウイルス分離やウイルス核酸の検出のような病原体診断が重要な手段となる。急性脳炎の場合、検査の対象となる病変部は脳組織であることから脳脊髄液(Cerebrospinal fluid:CSF)が有用である。CSFは、治療前の急性期に採取するのが望ましく、また、採取時、血液の混入等がないよう十分注意する必要がある。患者が死亡した場合には脳実質を病変部として検査に用いる。

(5) 無菌性髄膜炎原因ウイルス

無菌性髄膜炎の原因ウイルスは、その多くはエコーウイルス、コクサッキーBウイルス等のエンテロウイルスであり、他のエンテロウイルス感染症と同様、日本では毎年夏季を中心に流行する疾患であるが、秋～冬季にも発生が認められる。ムンプスウイルス、単純ヘルペスウイルス等、他のウイルス感染に起因する髄膜炎もある。エンテロウイルスによる髄膜炎の症状は発熱を主徴とし、頭痛、悪心、嘔吐等を伴う場合があるが、一般的には予後は良好である。流行するエンテロウイルス血清型および流行の程度は、通常年ごとに異なり、主要な感染経路は糞口感染、一般的な潜伏期間は4～6日程度とされる。

病原体遺伝子検査の検体としては、ウイルス分離の場合と同様に、糞便、髄液、口腔・咽頭拭い液等が用いられる。検体を接種したウイルス培養液を用い、ウイルスを増幅、塩基配列を決定し相同性検索によりウイルスを同定する方法も近年多数報告されている。

検体は発症後、早期に採取し、速やかに検査する。保存する場合は凍結する。ただし、まだエンテロウイルスの検査法は標準化されておらず、検査の目的により、適切な材料を選択し、適切な方法を使い分ける必要がある。

(6) EBウイルス(Epstein-Barr virus:EBV)

EBVは、 γ ヘルペスウイルス亜科に分類される。主としてBリンパ球やある種の上皮系細胞に初感染し、その後潜伏感染する。EBVは主として唾液を介して伝播し、思春期以降の初感染では伝染性単核球症を発症する他、ウイルス関連血球貪食症候群や慢性活動性EBウイルス感染症(chronic active EBV infection:CAEBV)等を引き起こす。加えてEBVは腫瘍ウイルスとして上咽頭癌やホジキンリンパ腫、NK/Tリンパ腫、胃癌、日和見リンパ腫等にも関与すると考えられている。

病原体遺伝子検査としてEBVの存在を確認するには血清、血液、髄液、咽頭拭い液等、多種類の検体が対象となる。末梢血単核球中のEBVDNA定量はCAEBVの診断に有用である。その他病変部組織が用いられるが、検索部位に有意なEBウイルスゲノムの存在が確認されれば、さらにサザンブロット法により感染細胞のクロナリティの解析が行われる。

(7) サイトメガロウイルス(Cytomegalovirus:CMV)

CMV は、 β ヘルペスウイルス亜科に分類され、初感染後脊髄や末梢血単核球と顆粒球-マクロファージ前駆細胞に終生潜伏感染する。初感染時にまれに伝染性単核球症様候群等を引き起こすが、通常は不顕性に経過する。しかしながら、妊婦の初感染により経胎盤的に胎児に感染し、巨細胞封入体症の原因となる。肝脾腫、黄疸、出血斑、小頭症、脳石灰化像、脈絡網膜炎等が認められ、予後不良が多い。不顕性感染と思われても後に難聴や知能障害が見られることがあり、長期の経過観察が必要となる。また、原発性免疫不全症の小児、腎移植や造血幹細胞移植(骨髄移植)等の患者、AIDS や悪性腫瘍患者等、免疫抑制状態にある宿主では、CMV による間質性肺炎、肝炎、脳炎、網膜炎、腸炎等の感染症が問題となる。

病原体遺伝子検査の材料として、血清・血漿、脳脊髄液、眼房水、羊水等が CMV 感染の活動性の指標となり、診断的意義が高い。近年、臓器移植後および先天性 CMV 感染症の診断には、血液中の CMV DNA 定量検査が有用とされている。その他、先天性 CMV 感染症の診断には生後 3 週間以内の尿、間質性肺炎の診断には気管支肺胞洗浄液(BALF)や肺組織、CMV 肝炎の診断には肝組織、CMV 感染の活動性の判定には末梢血白血球や血清、脳炎の診断には脳脊髄液、網膜炎の診断には眼房水を用いる。

核酸増幅検査によって CMV 感染症を診断する際には、①患者の免疫状態を考慮に入れること、②可能な限り感染局所からの検体を用いること、③必要に応じて定量的な判定を行うこと等が重要である。

(8) ヒトパルボウイルス B19(Human parvo virus B19)

ヒトパルボウイルス B19 は伝染性紅斑の原因ウイルスであり、頬に発疹が出現する 7~10 日ぐらい前に微熱や風邪様の症状が見られることが多く、この時期にウイルス血症を起こしている。予後は概ね良好な疾患であるが、溶血性貧血患者が本ウイルスに感染すると重症の貧血発作を生じることがあり、要注意である。その他、関節炎、関節リウマチ、血小板減少症、顆粒球減少症、血球貪食症候群、免疫異常者における持続感染も知られている。さらに注意すべきものの一つに妊婦感染による胎児の異常(胎児水腫)および流産がある。

培養法が確立されていないことから、病原体の証明には核酸検査が行われる。ドットブロット法やサザンブロット法による核酸検査を行うためには、ウイルス血症時期の血液を採取する必要がある。PCR 法では、少なくとも IgM が検出される期間中は血清検体からウイルス DNA を検出することができる。また、本ウイルスは他のウイルスに比べて加熱やフィルター等による不活性化・除去が容易でないため、各種の血漿分画製剤中への混入の可能性を否定し得ない。以上のような各ケースに応じてウイルスが最も多く存在する生体材料を適時採取することが必要になる。血清での検査が基本ではあるが、それ以外に臨床症状により、関節液、末梢血白血球、骨髄液、羊水、臍

帯血、血液製剤等が用いられることがある。

(9) ヒトパピローマウイルス(Human papilloma virus:HPV)

HPV は、現在、HPV ゲノム DNA の塩基配列に基づいて 100 タイプ以上の型に分類され、各型は感染する部位によって、皮膚型と粘膜型に分類される。さらに粘膜型は、泌尿器および頭頸部の粘膜上皮に感染し、子宮頸癌、頭頸部癌等の悪性病変発症に関与する高リスク群と、尖形コンジローマ、乳頭腫等の良性病変発症に関与する低リスク群に分類される。

HPV は培養系が確立されていないことから、核酸検査により検出する。高リスク群の検出は子宮頸癌検診の際、細胞診と併用する場合があります。頸管壁を専用の採取器具により擦過し、検査材料とする。近年、欧米では採取した擦過細胞をアルコール固定液に懸濁させて保存し、サイトスピン標本を作製して細胞診を行う、液状細胞診(Liquid Based Cytology:LBC)が主流となっており、この LBC 検体が最も好ましい材料とされている。子宮頸部癌への進展に対するヒトパピローマウイルスの関与を調べるためには癌部組織切除片を用いて PCR 法や *in situ* ハイブリダイゼーション法による解析が行われる。尋常性疣贅や尖圭コンジローマ等の原因となる低リスク群の診断には、皮膚生検組織を用い、PCR 法や *in situ* ハイブリダイゼーション法により本ウイルスの存在や型判別検査が行われる。

(10) HTLV-I (Human T-lymphotropic virus type I:ヒト T リンパ球向性ウイルス- I 型)

HTLV-I は成人 T 細胞白血病・リンパ腫(adult T-cell leukemia/lymphoma:ATLL) や HTLV-I 関連脊髄症(HTLV-I associated myelopathy /tropical spastic parapalysis:HAM/TSP)、ぶどう膜炎(眼)等の原因ウイルスである。ウイルスはヒト T 細胞に感染後、プロウイルス DNA の形で組み込まれ、HTLV-I キャリアとなる。リンパ球中のプロウイルス DNA により伝播する。発症頻度は ATL でキャリア 1,000 人中 1 人、HAM で年間キャリア 10 万人中 3 人程度である。主な感染経路は母乳による母子垂直感染であり、他には輸血や極めて稀ではあるが夫婦間伝播(ほとんど男性から女性)等がある。

キャリアの検査は通常は血清中 HTLV-I 抗体の測定であるが、判定が不明確で困難な場合には、末梢血白血球から抽出したゲノム DNA を用いた PCR 法によるプロウイルス DNA 検査が併用される。特に母乳から感染したか否かを乳幼児で診断する場合には、母親からの移行抗体が消失した後、抗体価が上昇してくると判断される時期までの間は、プロウイルス DNA を PCR 法で高感度に捉えることが唯一の手段である。ただし、コンタミネーションによる偽陽性反応、末梢血白血球が十分回収されない場合、あるいは増幅阻害による偽陰性等、結果の解釈は注意を要する。HAM やぶどう膜炎等、局所で本ウイルス感染 T 細胞やプロウイルス DNA 量の増加によって引き起こされた疾患の原因を検査するためには病変部を反映する部位からの検体採取が望ましく、髄液や眼房水等も検査の対象となる。ATL の診断には、腫瘍化した T リンパ

球の染色体ゲノム DNA に挿入された HTLV-I のプロウイルス DNA をサザンブロット法で検出し、そのバンドパターンから感染 T 細胞のモノクローナルな増殖が証明されなければならない。このときに用いる検査サンプルは末梢血異常細胞、リンパ節や皮膚組織の病変からの抽出 DNA となる。

(11) HIV (Human immunodeficiency virus: ヒト免疫不全ウイルス)

HIV (HIV-1 および HIV-2) は、AIDS (後天性免疫不全症候群) の原因ウイルスである。HIV は、感染者の血液、精液、膣分泌液等の体液の他、組織や臓器等に存在し、主な感染経路として、感染者との性的接触、HIV 汚染血液との接触、感染母体からの母子感染等が知られている。

病原体診断法としての核酸検査として、核酸増幅法を用いた HIV RNA 定量、プロウイルス DNA 検出、サブタイプ同定および薬剤耐性遺伝子検出等がある。HIV 感染者の血中の HIV RNA 定量検査は、病態把握、治療薬の効果判定、病態の進行の予測に有用である。検査材料は血清または血漿が用いられる。血漿検体の採血にはクエン酸ナトリウムか EDTA を使用する。ヘパリンは PCR 増幅反応を阻害するため使用を避ける。また、HIV は比重の小さなリンパ球に感染しているため、遠心分離によるバフィーコート形成が不十分な状態で血漿を分取すると、沈みきらないリンパ球が混入する場合があるため、正確に血漿中のウイルス量をモニタリングする上では、注意が必要である。HIV プロウイルス DNA 検査は、HIV 抗体陽性の母親から生まれた新生児の診断等に有用であり、HTLV-I と同様に末梢血白血球から抽出したゲノム DNA を検体とする。血漿中の HIV RNA 量はウイルスの増殖度の指標であり、RNA 量が多いほど CD4 陽性リンパ球数が早期に減少し AIDS へと進行しやすいとされるが、プロウイルス DNA 検査ではこのようなウイルスの活動性の評価はできない。薬剤耐性遺伝子検査は、血液中のウイルス粒子より抽出したウイルス RNA を用いる。

HIV 感染症は早期に感染者を発見することが極めて重要である。血中にウイルスが存在し輸血等により HIV 感染を起こしうる期間を感染性ウィンドウ期といい、抗体検査で 22 日、抗原抗体同時検査で 18 日に対し、核酸増幅法による NAT 検査 (nucleic acid amplification test) で 11 日と計算され、HIV RNA および HIV プロウイルス DNA 検査は早期診断に有用である。

3.1.2 主な細菌感染症

(1) 結核菌・非定型抗酸菌

結核と非定型抗酸菌の診断や鑑別を正確かつ迅速に行うことは、治療法の選択、予後の推定、集団感染・院内感染防止等から極めて重要である。塗抹検査は迅速に検出できる反面、感度は低く、結核菌と非定型抗酸菌の鑑別ができない。培養検査は、菌種の同定、薬剤感受性検査が可能であるが、同定まで長期間を要する。病原体遺伝子検査は、従来法と組み合わせることにより迅速診断として極めて有用である。

検査法には、検体からの直接検出法と分離された菌株の同定、薬剤耐性遺伝子の同定等がある。

主要な検体は喀痰であるが、他に気管支肺胞洗浄液(BALF)、気管支吸引粘液、胃液、糞便、髄液、胸水、腹水、尿、膿、膿瘍壁および肉芽、臓器等、極めて多様な材料が用いられる。精度の高い検出には、これらの検体種から病変を反映した適切な材料を選択すること、および検体の品質管理が重要である。特に多く利用される喀痰は、下気道病変を反映した良質のものを採取する必要があり、唾液の混入を避け、膿性部分を採取する。注意点としては、できるだけ早朝起床時に十分うがいをして採取すること、抗結核剤投与前に採取することである。良質の喀痰を採取するには、患者の適切指導、および関連医療スタッフの協調が重要である。採取にはマスク、手袋を着用して感染予防に努める。胸水等はフィブリンの析出により採取後に凝固する場合があります、採取容器にクエン酸ナトリウムまたはEDTAを添加した容器を使用する。血液は阻害物質となるため混入は避ける。滅菌容器に採取された検体は、乾燥を避け、特に外部に漏れないよう完全に密閉する。

(2) レジオネラ菌

レジオネラ症はレジオネラ属菌が原因で起こる感染症の総称で、予後良好なポンティアック熱型と、重症例の多い肺炎型(レジオネラ肺炎)の大きく二つに分けられる。ポンティアック熱型は、発熱、悪寒、筋肉痛、関節痛、倦怠感、頭痛等の風邪症状を示すが数日で回復する場合が多い。一方、肺炎型は進行が早く、2~10日の潜伏期間の後、初期には全身倦怠感、頭痛、筋肉痛等で始まり、数日以内に39℃以上の高熱、乾性咳やときに湿性咳、胸痛、膿性痰、呼吸困難といった呼吸器疾患の症状が現れ、しばしば48時間以内に重篤化する。また、四肢の振戦、意識混濁等の神経症状が現れることもある。

検査材料は、菌を分離培養する場合と同様に、抗菌薬投与前に採取された喀痰、気管支肺胞洗浄液(BALF)、気管内吸引物、胸水、肺組織等の呼吸器由来の検体が主として用いられるが、心嚢液、髄液、血液等も検体となり得る。一般に血球や細胞等の成分が大量に入っているとPCR反応が阻害されやすいので、気管支肺胞洗浄液(BALF)や胸水、気管内吸引物等を使用することが望ましい。また、感染源の特定に、(濃縮した)冷却塔水、浴槽水、給湯水等の環境検体を用いる場合もある。

(3) マイコプラズマ ニューモニエ(*Mycoplasma pneumoniae*)

本菌によって起こる疾患は、主に、気管支炎と肺炎である。原発性異型肺炎の30~40%がマイコプラズマ肺炎でありクラミジア肺炎とともに高い割合を占めている。比較的若年齢層に多く発生するが全年齢層に見られる。マイコプラズマ肺炎は、以前は4年ごとに周期的な流行が見られたため、‘オリンピック肺炎’と呼ばれたことがあったが、現在では周期的な流行は見られなくなっている。合併症としては、発疹、溶血性貧血、

関節炎、中耳炎、髄膜炎、末梢神経障害、心外膜炎、収縮性心膜炎等があり、中枢神経系合併症を併発した場合には重症となることもある。

検体は、主に咽頭スワブである。しかし、合併症の症状がある場合には胸水、髄液、細胞組織等を検査する場合もある。咽頭スワブの採取時の注意は、滅菌綿棒で咽頭の後壁を強くこすり取るようにすることである。本菌は、咽頭の粘膜細胞に付着しているので、多くの粘膜細胞が綿棒でこすり取られるようにすることが重要である。また、本菌は乾燥に弱く、冷蔵にも弱いため、検体が乾かないようにし、長期保存する場合は-70℃以下で保存することが望ましい。

(4) クラミジア ニューモニエ/シッタシ (*Chlamydia pneumoniae/psittaci*)

*C.ニューモニエ*は気管支炎、肺炎の起因菌であるが、喘息や冠動脈アテロームとの関連も報告されている。抗体陽性率は4~5歳から急激に上昇し、成人では50~60%が陽性となる。*C.シッタシ*は重篤な肺炎(オウム病、トリ由来)を起こし、死亡例も報告されている。抗体調査から日本では年間100名程度の患者が出ているものと推定される。

*C.ニューモニエ*の検体は、鼻咽腔・咽頭スワブ、喀痰、気管支肺胞洗浄液、剖検組織等が用いられるが、通常は鼻咽腔・咽頭スワブが主に用いられる。滅菌綿棒を鼻咽腔あるいは咽頭後壁にあてて、回転させて採取する。核酸検査用にはそのまま滅菌試験管に入れて4℃またはドライアイス凍結で輸送する。一方、*C.シッタシ*の核酸検査では、ヒトからの検体は*C.ニューモニエ*と同様であるが、感染源として疑われるトリからは、生きたままであれば総排泄口スワブや糞便が、死亡個体からは肝臓、脾臓、肺、腸管等が用いられる。

(5) クラミジア トラコマティス (*Chlamydia trachomatis*)

*C.トラコマティス*は、性感染症 (sexually transmitted diseases:STD) の原因菌であり、全STD患者の約40%を占めている。本菌は尿道炎や子宮頸管炎、子宮付属器炎等、骨盤内感染症の他、産道感染により新生児結膜炎、肺炎等を起こすが、成人では無自覚感染も多く、健常妊婦の数%に陽性例が見られる。

検体は、女性では子宮頸管スワブを用いる。採取時には、まず頸管粘液を拭って除去した後、子宮頸管を滅菌綿棒で回転させながら擦過する。擦過後の綿棒は、核酸検査用にはそのまま滅菌試験管に折って落とし込み、密栓をして4℃またはドライアイス凍結で輸送する。女性の場合、感染範囲が広く、腹腔内感染があっても子宮頸管から検出できないこともあり、その場合は症状と内診所見で異常を確認する必要がある。男性では尿道に滅菌綿棒を挿入し擦過する。核酸検査は高感度なため、早朝の男性初尿検体でも十分検出できる。尿は4℃に保存し、早めに遠心処理を行うか、それができない場合には-70℃に凍結保存する。咽頭感染を疑う場合には、咽頭スワブを採取する。新生児肺炎では鼻咽頭スワブ、封入体結膜炎では眼粘膜のスワブ

等を採取する。

(6) 淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)

淋菌は性感染症の原因菌であり、男性尿道、女性子宮頸管に主に感染する。淋菌は炭酸ガス要求性であるため、通常環境では生存することができず、性感染症としてヒト-ヒト感染が主な感染経路である。本菌の感染は泌尿生殖器や咽頭に留まらず、血行性に播種し、関節炎、肝炎、心内膜炎、髄膜炎等を起こし、いわゆる播種性淋菌感染症 (disseminated gonorrhoeal infection: DGI) を呈し得る。

検査材料は、急性尿道炎の膿尿および分泌液、慢性患者では前立腺分泌液、前立腺マッサージ後の排泄尿、膿分泌液等で、DGI の疑いでは血液(特に皮疹からの採取)、膝関節液、咽頭粘液、直腸粘液からも検出されることもあり、本菌の感染病態を念頭に置いて検体採取を進める必要がある。咽頭スワブ材料では、方法(キット)により口腔内のナイセリア属細菌との交差反応があるため、淋菌咽頭感染症の診断には注意が必要である。

(7) MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*:メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)

MRSA は黄色ブドウ球菌が耐性化した病原菌であり、医療従事者からもときに分離されるが、健常人ではキャリアのまま過ぎ、容易には発症しない。発症に至る患者側の因子としては、①高齢者、②未熟児、白血病を含めた免疫不全状態の患者、③消化器系、あるいは心疾患等の手術が施行された患者、④糖尿病等の基礎疾患を有する患者、等が挙げられる。このような患者に①感染予防的に抗菌薬が使用されていること、②カテーテル類が挿入されていること、③入院が長期に渡っていること、等の要因が加わると、患者の鼻腔や咽頭に付着した MRSA が、抗菌薬の投与と共に、ときに菌交代現象を起こして異常に増殖し、時に敗血症や呼吸器感染症、あるいは MRSA 腸炎といった感染症を惹起する。これらの患者では、血液や喀痰、あるいは糞便等を用いて細菌検査を行う。または保菌状態を知るため院内感染の原因菌である MRSA や緑膿菌等をチェックすることもある。MRSA は、*mecA* 遺伝子の有無を PCR 法によって確認することで鑑別することができる。

3.1.3 真菌・その他

(1) 病原性真菌

真菌症の場合、遺伝子診断の主な対象となるのは、通常の原因菌の分離培養が困難な深在性真菌症である。カンジダ症、クリプトコッカス症、アスペルギルス症、接合菌症等のように、本邦で見られる深在性真菌症のほとんどは、病原性の弱いヒトや動物常在菌、環境中の腐生菌を起因菌としているため、検体は血液、髄液、生検組織片等が用いられる。いずれも本来無菌的であり、健常人においては通常は陰性である。したがって、これらの検体から特定の真菌の核酸が検出されれば、当該真菌によ

る感染症と診断される。最適検体は病型によっても異なり、例えば真菌血症では血液、真菌性髄膜炎では髄液、肺感染症では喀痰、肝膿瘍では肝生検組織片から最も検出されやすい。これらの深在性真菌症の諸病型のみならず、表在性真菌症や深部皮膚真菌症の場合でも、局所病巣組織片や搔爬片または膿等、適切な検体を用いれば診断は可能である。

(2) ニューモシスチス イロベチー (*Pneumocystis jiroveci*)

ニューモシスチス肺炎は、酵母様真菌であるニューモシスチス イロベチー (*Pneumocystis jiroveci*) が原因菌の肺炎である。以前はニューモシスティス カリニ (*Pneumocystis carinii*) による肺炎とされ、「カリニ肺炎」と呼ばれ、原因菌は原虫に分類されていた。正常な免疫能を持つ場合発症することは稀であり、後天性免疫不全症候群 (AIDS)、化学療法やステロイド剤長期内服等による免疫低下時に発症する日和見感染症の一つである。

検体は、肺生検材料、気管支肺胞洗浄液、喀痰等である。多くの人々が不顕性に感染しているため、高感度なPCR検査法で検出された場合でも、必ずしも肺炎が起こっているわけではないので結果の判断には注意が必要である。本菌はその偽足により肺胞上皮に強固に付着しているために容易に喀痰中に出ない場合があり、染色による従来の検査法では検出し難いときに核酸検査を補助的に併用することは有効である。

3.2 体細胞遺伝子検査における検体採取

3.2.1 固形腫瘍の遺伝子検査

(1) 膵癌の K-ras 遺伝子(*KRAS*)変異解析

本検査は、悪性腫瘍遺伝子検査(D 004-15 2,000 点)の対象項目として平成 19 年 6 月より保険適用が可能となっている。膵癌では、その 90 %近くで K-ras 遺伝子変異が認められ、そのほとんどがコドン 12、13、61 の点突然変異であり、特にコドン 12 に集中していることが知られている。したがって、膵癌の診断の際に用いられる画像検査や膵液細胞診検査を補完する検査として古くから利用されてきた。しかし、膵管上皮の過形成や慢性膵炎、膵嚢胞といった非腫瘍病変においても、高感度な検出系を用いる事により同様の遺伝子変異が検出されることが多いため、臨床的意義は必ずしも高いとは言えないという一面もあり、臨床診断の際には、臨床情報や他の検査結果等と併せて慎重に取扱う必要がある。なお、膵癌の診断時の状況から、外科的に切除した膵癌組織が K-ras 変異解析の検体となることは稀であり、通常は ERCP (endoscopic retrograde cholangio-pancreatography:内視鏡的逆行性胆管膵管造影)で採取された膵液が主な試料となる。膵液以外の材料としては、胆汁、十二指腸の乳頭開口部の洗浄液、膵管のブラシ擦過細胞診試料、膵癌組織の針生検試料等が用いられる。

(2) 肺癌の EGFR 遺伝子(*EGFR*)、K-ras 遺伝子(*KRAS*)変異解析

肺癌における EGFR 遺伝子、K-ras 遺伝子変異解析についても、悪性腫瘍遺伝子検査(D 004-15 2,000 点)の対象項目として平成 19 年 6 月より保険適用が可能となっている。現在、肺癌における EGFR 遺伝子変異は、分子標的治療に際して、治療薬の適用の可否や治療法の選択、薬効評価の指標として広く利用されている。なお、EGFR 遺伝子変異は、肺腺癌の約 40 %に認められ、変異は EGFR 蛋白のチロシンキナーゼ活性部位をコードする exon 18、19、20、21 に集中しており、exon 18、20、21 では点突然変異が、exon 19 では欠失が主として認められる。また、分子標的治療薬であるゲフィチニブやエルロチニブと遺伝子変異の関係では、特にゲフィチニブの場合においては、exon 18、19、21 に変異が認められると感受性を示すが、逆に exon 20 に変異が認められると耐性を示すことが知られている。

一方、肺癌における K-ras 遺伝子変異については、EGFR 遺伝子変異と異なり、主にコドン 12、13 に点突然変異が認められるが、同変異が認められると薬効は期待できないことが知られている。肺癌における分子標的治療薬の適用は、切除不能または再発癌であるため、原発巣を切除した際の手術材料や生検材料を用いるか、あるいは試料の外科的採取が困難な場合には、前記試料に代えて癌細胞が含まれる胸水、気管支肺胞洗浄液(BALF)、心嚢液、細胞診擦過細胞、ホルマリン固定パラフィン包埋組織などが用いられる。

(3) 大腸癌の p53 遺伝子(*TP53*)、K-ras 遺伝子(*KRAS*) 変異解析

大腸癌における p53、K-ras 遺伝子の点突然変異や LOH (loss of heterozygosity) の解析は、古くから大腸癌の発癌モデルの研究や肝転移のリスク等、悪性度評価の指標として様々な手法を用いて解析が行われてきた。検体としては、外科的に切除された新鮮癌組織が主として用いられ、診断目的よりも研究目的で解析されることがほとんどである。また、さらなる研究的な試みとして、糞便中に存在する大腸癌細胞を対象として、これらの遺伝子変異をマーカーとして高感度に捉えようという解析も行われてきたが、現状では費用対効果の点で便鮮血検査に替わるものにはなり得ていない。

しかしながら、大腸癌に対しても分子標的治療が行われるようになったことに加え、最近では、分子標的治療薬であるセツキシマブやパニツムマブの臨床効果が、K-ras 遺伝子変異の有無により有意に異なるという知見が相次いで報告されている。今後は膵癌や肺癌だけではなく、大腸癌における K-ras 遺伝子変異検査についても悪性腫瘍遺伝子検査 (D 004-15 2,000 点) の保険適応が期待される。

なお、検査の実施に際して用いられる検体としては、外科的に切除された新鮮癌組織や代替組織として内視鏡的に採取された生検組織が用いられているが、今後はホルマリン固定パラフィン包埋組織が唯一の解析用試料となる場合が多くなることが予想されるため、解析手段の工夫や検査結果の解釈により慎重を期すほか、新たな技術の確立といったことが重要な課題となってくる。

(4) GIST の c-kit 遺伝子(*KIT*)、PDGFR α 遺伝子(*PDGFRA*) 変異解析

GIST (消化管間質腫瘍) に関連する遺伝子検査である c-kit 遺伝子変異解析は、悪性腫瘍遺伝子検査 (D 004-15 2,000 点) の保険適用が可能となっている。本検査も「肺癌における EGFR 遺伝子変異」と同様、「GIST における c-kit 遺伝子変異」の報告以来、治療薬の適用の可否や治療法の選択、薬効評価の指標として広く利用されている。なお、c-kit 遺伝子変異は GIST の 60~80 % に認められ、そのほとんど (80~90 %) が欠失、点突然変異、挿入といった様々な種類の変異として exon 11 に生じる。前記以外には、exon 9 における重複挿入や exon 13、17 における点突然変異等が知られている。

一方、PDGFR α 遺伝子変異は、c-kit 遺伝子変異の認められない GIST の半数に認められ、欠失、点突然変異、挿入と言った様々な種類の変異が exon 12、18 に、点突然変異が exon 14 に生じる。また、いずれかの遺伝子変異を持つ GIST では、変異の認められない GIST に比してイマチニブやスニチニブといった分子標的治療薬に対する反応性が良いことが知られている。特にイマチニブに対しては、c-kit 遺伝子の exon 11 に変異を有する GIST では極めて臨床効果が高いことが分かっているが、変異の箇所や種類の違いによって効果が異なることも示唆されている。なお、c-kit 遺伝子の exon 11 以外の exon や PDGFR α 遺伝子変異については、exon 11 ほど高い臨床効果は得られない事も知られている。

GIST における投薬治療は、切除不能例や術後再発例が対象となるため、遺伝子変

異解析に用いる検体は微量な生検組織やホルマリン固定パラフィン包埋組織が主となるが、前述のように変異の箇所や種類が多岐に渡るため、解析手段／手法に工夫が必要となってくるほか、品質の高いDNAが十分量得られない場合は解析そのものが困難になることがあるため、検体の採取には注意が必要である。

3.2.2 造血器腫瘍の遺伝子検査

(1) 白血病細胞の微小残存病変(MRD)の検出

本検査は血液細胞核酸増幅同定検査(D 006-2 2,000点)として、別途厚生労働大臣の定める施設基準に適合していることを地方社会保険事務局長に届け出た保険医療機関において、6ヶ月に1回を限度として算定できる。また、CMLにおけるMajor *BCR/ABL* キメラ mRNA については、末梢血をTMA法による体外診断用医薬品試薬キットを用いて検査した場合に限り、前述の施設基準の適否や、施設内検査/外注検査に関わりなく、保険適用(D 006-3 1,200点)が可能である。

BCR/ABL キメラ mRNA 検査を代表的な例として、染色体転座によって生じるキメラ mRNA をリアルタイム RT-PCR 定量法により、高感度に検出することは造血器腫瘍の日常検査として多用されている。いずれも造血幹細胞のレベルで腫瘍化した疾患であるので、MRD を確実に検出するには治療後の骨髄液を検体とすることが理想である。しかし、被験者の負担を考慮すると侵襲性の高い骨髄穿刺を検査の度に頻繁に行うことは控えたく、末梢血での検査で MRD を検出することが求められる。*BCR/ABL* キメラ mRNA 検査においては、慢性骨髄性白血病(CML)では骨髄液と末梢血ではほぼ同様の検査結果を得ることができるが、治療後の急性リンパ性白血病(ALL)では末梢血での検査は不適切となるので注意が必要である。

(2) 悪性リンパ腫細胞の微小残存病変(MRD)の検出

免疫関連遺伝子再構成は、PCR法、LCR法またはサザンブロット法により、悪性リンパ腫、急性リンパ性白血病または慢性リンパ性白血病の診断の目的で検査を行った場合に、6ヶ月に1回を限度として、前述(1)の施設基準の如何や、施設内検査/外注検査に関わりなく、保険適用(D 006-6 2,400点)が可能である。

悪性リンパ腫の治療としては、腫瘍を形成した病変部のリンパ節組織や皮膚組織を外科的に切除することが第一の処置となるが、*BCL2/IGH* 転座を有する濾胞性リンパ腫では標準的な抗癌剤化学療法レジメン(CHOP療法)に加え、分子標的抗体薬リツキシマブの効果が期待できる。特に本リンパ腫細胞は末梢血に流出しやすい特徴を持つため、薬効評価のための MRD 検出には末梢血を検体として用いることが可能である。

3.3 遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)における検体採取

3.3.1 遺伝学的検査

遺伝学的検査(生殖細胞系列遺伝子検査)は、広義の定義では、「生殖細胞系列のDNA配列の変異または遺伝するゲノム配列の変化を検出するものであり、単一遺伝子疾患の確定診断や病態の診断、発症前診断、保因者診断のための遺伝学的検査、個人の薬剤応答性検査、個人の健康に対する影響(易罹患性)の予見、健康管理に影響するような遺伝素因(体質)の検査、親子鑑定などの個人識別検査等」が挙げられる。

なお、これら遺伝学的検査のうち発症前診断や保因者診断などのための遺伝学的検査は無症候の個人に対して実施されることがあり、その結果は被検者個人の将来の健康状態を予見できる可能性があるのみならず家族にも重要な意味を持つことになる。

このため、遺伝学的検査の実施に際しては、個人遺伝情報の倫理的・法的・社会的課題を念頭に置いた取扱いが求められる。さらに、遺伝子型を確定するために行われる検査は、通常再検査されることなく、その結果が診療記録として永続的に引き継がれる。したがって、遺伝学的検査を実施する前や検査結果報告後に、被検者とその家族に適切なレベルの各種の支援を提供することが重要となる。なお、支援の中心となる各種の情報提供を行う際には、被検者の要望や必要に応じて十分な遺伝学的知識のある臨床遺伝専門医、認定遺伝カウンセラー等の専門家と連携する必要がある。

以上のように、遺伝学的検査の実施に際しては、その特性を十分に考慮したうえで、検査に用いる検体を採取する必要がある。

また、遺伝学的検査では様々な解析技術が用いられており、ゲノム・遺伝子(核酸; DNA/RNA)解析のみならず、各種の染色体分析技術(CGHアレイ法、FISH法、SKY法等)や遺伝生化学的手法も利用されている。

さらに、遺伝学的検査に用いられる試料としては、血液(白血球)から抽出されたDNA以外に、検査の目的に応じて、皮膚線維芽細胞、羊水細胞、絨毛細胞、臍帯血、Bリンパ芽球様細胞株や口腔粘膜や口腔液が用いられ、遺伝生化学の分野では血清等も検査に用いられることがある。

なお、本マニュアルでは、遺伝学的検査として、「単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物等の効果・副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査等、ゲノムおよびミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報(生殖細胞系列の遺伝子解析より明らかにされる情報)を明らかにする検査」を対象として、核酸(DNA/RNA)を用いた検査を取り上げている。

3.3.2 保険収載された単一遺伝子疾患(遺伝病学的検査)

遺伝病学的検査は、単一遺伝子疾患や先天代謝異常症を対象とする代表的な遺伝学的検査であり、新たに「D 006-4 2,000点 遺伝病学的検査」として分類された。本検査のうち、ア～ウは平成18年4月より、エ～スは平成20年4月より、保険適用が可能となった。また、これら遺伝病学的検査の実施に際しては、新たに検体検査判断料の名目

で遺伝カウンセリング加算(D 026 500点 検体検査判断料)が可能となった。

これら遺伝病的検査の実施に際しては、科学的妥当性(分析的妥当性、臨床的妥当性、臨床的有用性)のみならず倫理的・法的・社会的諸問題への留意が必須である。このため、検査に用いる検体の採取に際しては、被検者の人権や各種留意事項に配慮する必要がある。

なお、遺伝病的検査において検体となる主な材料には血液(白血球)、培養細胞、口腔粘膜等である。

以下に、遺伝病的検査の保険収載内容を示す。

D 006-4 遺伝病的検査

(1) 遺伝病的検査は以下の遺伝子疾患が疑われる場合に行うものとし、患者1人につき1回算定できる。

ア デュシェンヌ型筋ジストロフィー	イ ベッカー型筋ジストロフィー
ウ 福山型先天性筋ジストロフィー	エ 栄養障害型表皮水疱症
オ 家族性アミロイドーシス	カ 先天性QT延長症候群
キ 脊髄性筋萎縮症	ク 中枢神経白質形成異常症
ケ ムコ多糖症Ⅰ型	コ ムコ多糖症Ⅱ型
サ ゴーシェ病	シ ファブリ病
ス ポンペ病	

(2) (1)のアからクまでに掲げる遺伝子疾患の検査は、PCR法、DNAシーケンス法、FISH法またはサザンブロット法による。(1)のケからスまでに掲げる遺伝子疾患の検査は、酵素活性測定法、DNAシーケンス法または培養法による。

(3) 検査の実施に当たっては、厚生労働省「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」(平成16年12月)および関係学会による「遺伝学的検査に関するガイドライン」(平成15年8月)を遵守すること。

D 026 検体検査判断料

遺伝カウンセリング加算は、臨床遺伝学に関する十分な知識を有する医師が、区分番号「D 006-4」遺伝病的検査を実施し、患者またはその家族に対し当該検査の結果に基づいて療養上の指導を行なった場合に算定する。

なお、遺伝カウンセリングの実施に当たっては、厚生労働省「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」(平成16年12月)および関係学会による「遺伝学的検査に関するガイドライン」(平成15年8月)を遵守すること。

第3章 今後の課題と展望

本章では、遺伝子関連検査の測定前のプロセス(プレアナリシス)に関わる「今後の課題と検討の方向性」と「検体品質管理マニュアルの作成の意義と効果」を示した。

1. 今後の課題と検討の方向性

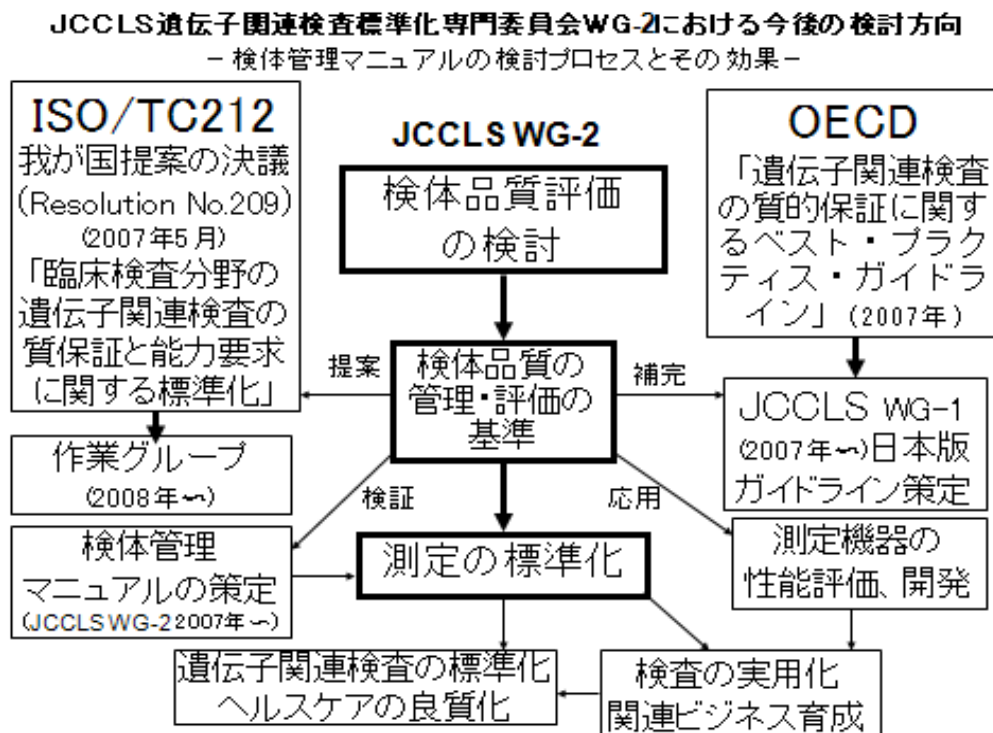
今後は、この検体品質管理マニュアルで提起した課題を検討するため、検査に利用される多様な試料について、試料の物理的性状、化学的性状を分析し、それらの性状が検査結果にどのような影響を与えるか調査する必要がある。

また、試料の保存方法、凍結・融解処理等測定前の管理条件の違い、検査方法(高感度検出、定量測定、一塩基変異検出、DNA/RNA 検出等)により、影響がどのように異なるのかを明らかにし、検査の質を確保するために試料が有すべき指標(物理的性状、化学的性状)とその基準値を設定する必要がある。

さらに、上記の結果を踏まえ、試料が有すべき指標をスコア化し、スコアの重み付け(スコアリング)により試料の品質規格(評価基準および手法)を作成するとともに、試料の管理手法をマニュアル化することが必要である。

なお、これらの検討の方向性を以下の図1に取りまとめた。

図1 検討の方向性



2. 検体品質管理マニュアル作成の意義と効果

検体品質管理マニュアルの作成とその活用により、次のような多種多様な社会的な効果が期待できる。

- (1) 検査の妥当性や有用性を見極めるのに必要な多数の症例を収集し、比較分析することが可能となることから、ヒト遺伝子に関する研究や遺伝子関連検査の保険適応が促進されることにより普及の段階が早まり、国民が技術の恩恵を受けられる。
- (2) 病気の早期発見等の新しい診断方法、薬物反応(薬の副作用のリスク)の判断材料として活用できる。
- (3) 病気になりやすさ・太りやすさ等の体質を把握する健康サービス産業の健全な発展を促し、個人による健康管理・健康増進が可能となる。
- (4) 国際的に試料の品質管理の手法や評価法が定まっていない現在、我が国が他国に先駆けて検体の品質の管理評価の基準を明確化・標準化することは、その規格に基づく製品開発(試料採取容器、試料処理剤さらに測定機器等の開発と実用化)の国際規格への採用の可能性があり、測定機器の適正な性能評価に基づく製品開発の面でも国際競争力の強化に寄与することが期待される。
- (5) 特に我が国から発議した「臨床検査分野の遺伝子関連検査の質保証と能力要求に関する標準化」が ISO/TC212 で承認され検討する方向が示されているため、本委員会にもその成果を反映させることが可能となる。

おわりに

遺伝子関連検査において、測定精度を確保するには、測定結果に大きく影響する測定前のプロセス(プレアナリシス)における作業工程の標準化が必要である。本マニュアルは、個別の遺伝子関連検査において、測定前のプロセス(プレアナリシス)に由来する誤差を回避し、測定精度の向上に寄与することが期待される。本マニュアルの記述には、エビデンスが不十分なものもあり、検証作業が必要である。検体の多様な性状がどのように核酸抽出や測定工程に影響するか不明な点が多い。このため、影響の評価や回避の手法は必ずしも確立していない。

このような背景のもと、NPO法人日本臨床検査標準協議会の遺伝子関連検査標準化専門委員会WG-2委員会では、検体の品質評価システムの開発を進めている(第3章 今後の課題と展望)。測定前に検体の品質を客観的に評価できれば、それに基づく核酸抽出や測定作業の工夫、測定結果への影響評価と回避が可能となり、個別の検体において測定精度の向上につながると考えられる。また、今後の技術革新、すなわち検体の品質を確保するための試薬、機器、システムの開発により、測定前の作業はより簡素化、合理化していくものと予想される。

このように今後、測定前のプロセスに関して、新たな技術開発とエビデンス蓄積が予想される。本マニュアルは、これらを反映するよう必要に応じて改訂を行う予定である。まずは、本マニュアル発行を契機に、より適切な測定前のプロセス(プレアナリシス)による検査実施、および関連する技術開発や情報蓄積が進むことを期待したい。

参考資料

1. 参考文献

1. 古庄敏行、井村裕夫 監修・編集:臨床 DNA 診断法 金原出版 1995.
2. 国立感染症研究所・地方衛生研究所全国協議会編:病原体検出マニュアル 2003.
3. 日本臨床検査自動化学会遺伝子検査技術委員会編:一目でわかる遺伝子検査マニュアル 29:suppl.2, 2004.
4. 性感染症 診断・治療ガイドライン 2006:日本性感染症学会誌 17(1), 2006. 日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会 編:結核菌検査指針 2007.
5. 河野茂 編集:深在性真菌症臨床診断マニュアル、メディカルレビュー社 1997.
6. 遺伝子検査技術 -遺伝子分析化学認定テキスト- 克誠堂出版 2007.
7. 遺伝子診療学-遺伝子診断の進歩と遺伝子治療の展望-日本臨床社 2005 増刊号
8. (社)日本臨床衛生検査技師会編:遺伝子・染色体検査編集部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 2003.
9. 宮地勇人:遺伝子検査のプレアナリシス 日本臨床検査自動化学会誌 28 (3):157-163, 2003.
10. 宮地勇人:-遺伝子技術の進歩と臨床検査-生物物理化学 48:151-157, 2004.
11. 宮地勇人: 遺伝子検査 -診断とリスクファクター 臨床検査 51(12):1293-1298, 2007.
12. 笹野公伸 他:特集企画/ホルマリン固定パラフィン包埋標本からどこまで遺伝子検策は可能か? 臨床検査 50(7):713-802, 2006.
13. 宮地勇人:遺伝子の取り扱い
臨床検査の正しい仕方-検体採取から測定まで-:72-76, 2008.

2. 参考ガイドライン等

1. OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing
<<http://www.oecd.org/dataoecd/43/6/38839788.pdf>>
「分子遺伝学的検査における質保証に関する OECD ガイドライン」(2007年5月)
2. 「ヒト遺伝子検査受託に関する倫理指針」
(平成13年4月10日策定 平成16年9月16日改正 平成19年4月1日改正:
社団法人日本衛生検査所協会)
<<http://www.jrcla.or.jp/>>
3. 「ヒトゲノム研究に関する基本原則」
(平成12年6月14日:科学技術会議生命倫理委員会)
<http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/shisaku/gensoku.htm>
4. 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」
(平成13年3月29日策定 平成16年12月28日全部改正 平成17年6月29日
一部改正:文部科学省、厚生労働省、経済産業省)
<http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/genome/04122801.htm>

5. 「遺伝学的検査に関するガイドライン」(平成 15 年 8 月:日本遺伝カウンセリング学会、日本遺伝子診療学会、日本産科婦人科学会、日本小児遺伝学会、日本人類遺伝学会、日本先天異常学会、日本先天代謝異常学会、日本マススクリーニング学会、日本臨床検査医学会)
<<http://jshg.jp/> <http://jshg.jp/resources/data/10academies.pdf>>
6. 「疫学研究に関する倫理指針」
(平成 14 年 6 月 17 日 平成 17 年 6 月 29 日一部改正 平成 19 年 8 月 16 日全部改正:文部科学省 厚生労働省)
<<http://www.niph.go.jp/wadai/ekigakurinri/>>
7. 「臨床研究に関する倫理指針」
(平成 15 年 7 月 16 日 平成 16 年 12 月 28 日全部改正 平成 20 年 7 月 31 日全部改正:厚生労働省)
<<http://www.imcj.go.jp/rinri/main/02.htm>>
8. 「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」
(平成 16 年 12 月 24 日通達、平成 18 年 4 月 21 日改正)
<<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/seisaku/kojin/dl/170805-11a.pdf>>
9. 「経済産業分野のうち個人遺伝情報を用いた事業分野における個人情報保護ガイドライン」(平成 16 年 12 月:経済産業省)
<<http://www.meti.go.jp/policy/bio/Cartagena/seimei-rinri/files/keisanshoguideline.pdf>>
10. 「個人遺伝情報を取扱う企業が遵守すべき自主基準」
(平成 20 年 3 月:NPO法人個人遺伝情報取扱協議会)
<<http://www.cpiqi.or.jp/>>
11. 「遺伝医療をすすめる際に最低限必要な遺伝医学の基礎知識」
(信州大学医学部附属病院遺伝子診療部)
<<http://genetopia.md.shinshu-u.ac.jp/genetopia/basic/basic1.htm>>

3. 略語集

略称と正式名称を以下に記載した。

- 1) SNPs (single nucleotide polymorphisms) :一塩基多型
- 2) PGx (pharmacogenomics) :ファーマコゲノミクス、薬理ゲノム学
- 3) HAV (hepatitis A virus) :A 型肝炎ウイルス
- 4) HBV (hepatitis B virus) :B 型肝炎ウイルス
- 5) HCV (hepatitis C virus) :C 型肝炎ウイルス
- 6) HDV (hepatitis D virus) :D 型肝炎ウイルス
- 7) HEV (hepatitis E virus) :E 型肝炎ウイルス
- 8) EBV (Epstein-Barr virus) :EB ウイルス
- 9) CAEBV (chronic active EBV infection) :慢性活動性 EB ウイルス感染症
- 10) CMV (cytomegalovirus) :サイトメガロウイルス
- 11) HSV (herpes simplex virus) :単純ヘルペスウイルス
- 12) HPV (human papilloma virus) :ヒトパピローマウイルス
- 13) HTLV-I (human T-lymphotropic virus type I) :ヒト T リンパ球向性ウイルス-I 型
- 14) HIV (human immunodeficiency virus) :ヒト免疫不全ウイルス
- 15) MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) :メチシリン耐性黄色ブドウ球菌
- 16) ERCP (endoscopic retrograde cholangio-pancreatography) :内視鏡的逆行性胆管膵管造影
- 17) LOH (loss of heterozygosity) :ヘテロ接合性喪失
- 18) TUNEL 法:TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling 法
- 19) GAPDH:グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ
- 20) DTT:dithiothreitol
- 21) G (gravitational acceleration) :遠心加重(重力加速度)
- 22) EMR (endoscopic mucosal resection) :内視鏡的粘膜切除術
- 23) MRD (minimal residual disease) :微小残存(白血病)病変
- 24) BALF (broncho-alveolar lavage fluid) :気管支肺胞洗浄液
- 25) CSF (cerebrospinal fluid) :脳脊髄液
- 26) DGI (disseminated gonorrhoeal infection) :播種性性淋菌感染症

4. 遺伝子関連検査標準化専門委員会およびWG-2 委員会名簿

4.1 遺伝子関連検査標準化専門委員会 委員名簿(平成 21 年 2 月現在)

委員長

渡邊清明 国際医療福祉大学教授(日本臨床検査専門医会会長、
NPO 法人日本臨床検査標準協議会常任理事)

副委員長

宮地勇人 東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学教授(日本臨床検査医学会遺
伝子委員会委員長、日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度試
験委員会委員長、日本臨床検査自動化学会遺伝子プロテオミクス技術委
員会幹事)

堤 正好 株式会社エスアールエル学術情報部担当課長(日本人類遺伝学会遺伝
学的検査標準化準備委員会委員、日本臨床検査医学会遺伝子委員会委
員、日本遺伝子診療学会倫理問題委員会委員、日本衛生検査所協会遺
伝子検査受託倫理審査委員会委員、個人遺伝情報取扱協議会理事長)

委員(五十音順)

濱崎直孝 NPO 法人日本臨床検査標準協議会会長

上田國寛 神戸常盤大学学長(日本臨床化学会監事、日本遺伝子診療学会監事)

河合 忠 国際臨床病理センター所長(ISO/TC212 国内検討委員会委員長)

北村 聖 東京大学医学教育国際協力研究センター教授

小杉眞司 京都大学医学部教授(日本人類遺伝学会・遺伝学的検査標準化準備委員
会委員長・評議員・倫理審議委員会委員・遺伝カウンセリングセミナー実行
委員、日本遺伝子診療学会理事・評議員・技術委員会委員、日本臨床検
査医学会評議員)

田澤義明 ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社 IVD 事業本部マーケティング部門部
門長

千葉光一 (独)産業技術総合研究所計測標準部門副部門長

登 勉 三重大学大学院医学系研究科臨床検査医学分野教授(日本臨床化学会
理事長)

野村文夫 千葉大学大学院医学研究院教授(日本臨床検査自動化学会遺伝子プロテ
オミクス技術委員会委員長、日本人類遺伝学会遺伝学的検査標準化委員
会委員、日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度委員会委員)

福嶋義光 信州大学医学部教授(日本衛生検査所協会遺伝子検査受託倫理審査委
員会委員長、日本人類遺伝学会理事・倫理審議委員会委員長、日本遺
伝子診療学会副理事長、日本遺伝カウンセリング学会理事、全国遺伝子
医療部門連絡会議理事長)

- 船渡忠男 東北福祉大学健康科学部医療管理経営学科教授(日本臨床化学会遺伝子検査専門委員会副委員長、日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度教本作成委員会委員長、日本臨床検査自動化学会遺伝子プロテオミクス技術委員会副委員長、日本遺伝子診療学会技術委員会委員長)
- 堀 友繁 (財)バイオインダストリー協会事業推進部部長
(日本遺伝子診療学会技術委員会委員、EuroGentest 評議員)
- 山森俊治 三菱化学メディエンス株式会社遺伝子検査部長(日本遺伝子診療学会技術委員会委員、日本衛生検査所協会遺伝子検査受託倫理審査委員会委員)
- 横田浩充 東京大学医学部付属病院臨床検査技師長(日本臨床検査医学会遺伝子委員会委員、日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度あり方委員会委員長、日本臨床検査自動化学会遺伝子プロテオミクス技術委員会委員、日本臨床衛生検査技師会関東甲信越地区遺伝子・染色体セミナー世話人代表、PCR 感染症研究会会長)
- 吉倉 廣 元国立感染症研究所長(名誉所員)

オブザーバー

- 石川智久 東京工業大学教授
- 作田竜一 経済産業省製造産業局生物化学産業課事業環境整備室長
- 吉澤由香 経済産業省製造産業局生物化学産業課知的財産・標準化係長
- 小倉 悟 経済産業省産業技術環境局環境生活標準化推進室課長補佐
- 横瀬栄二 経済産業省産業技術環境局知的基盤課課長補佐
- 上野弘昭 厚生労働省医政局経済課医療関連サービス室技術管理係
- 蛭間 功 (財)日本規格協会

事務局

- 藤橋和夫 NPO 法人日本臨床検査標準協議会事務局長

4.2 WG-2 委員会名簿

委員長

宮地勇人 東海大学医学部基盤診療学系臨床検査学教授(日本臨床検査医学会遺伝子委員会委員長、日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度試験委員会委員長、日本臨床検査自動化学会遺伝子プロテオミクス技術委員会幹事)

副委員長

堤 正好 株式会社エスアールエル学術情報部担当課長(日本人類遺伝学会遺伝学的検査標準化準備委員会委員、日本臨床検査医学会遺伝子委員会委員、日本遺伝子診療学会倫理問題委員会委員、日本衛生検査所協会遺伝子検査受託倫理審査委員会委員、個人遺伝情報取扱協議会理事長)

委員(五十音順)

神山清文 株式会社エスアールエル羽村ラボラトリー病理・遺伝子検査課主任
佐々木政人 ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社 IVD 事業本部マーケティング部門 MD マーケティング部部長(日本臨床検査医学会遺伝子委員会委員)
長谷雄蔵 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社執行役員営業本部長
船渡忠男 東北福祉大学健康科学部医療管理経営学科教授(日本臨床化学会遺伝子検査専門委員会副委員長、日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度教本作成委員会委員長、日本臨床検査自動化学会遺伝子プロテオミクス技術委員会副委員長、日本遺伝子診療学会技術委員会委員長)
横田浩充 東京大学医学部付属病院臨床検査技師長(日本臨床検査医学会遺伝子委員会委員、日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度あり方委員会委員長、日本臨床検査自動化学会遺伝子プロテオミクス技術委員会委員、日本臨床衛生検査技師会関東甲信越地区遺伝子・染色体セミナー世話人代表、PCR 感染症研究会会長)
山口敏和 株式会社ビー・エム・エル臨床ゲノム部次長
山森俊治 三菱化学メディエンス株式会社遺伝子検査部長
(日本遺伝子診療学会技術委員会委員、日本衛生検査所協会遺伝子検査受託倫理審査委員会委員)

オブザーバー

作田竜一 経済産業省製造産業局生物化学産業課事業環境整備室長
吉澤由香 経済産業省製造産業局生物化学産業課知的財産・標準化係長
玉井哲男 社団法人日本分析機器工業会医療機器委員会副委員長

事務局

藤橋和夫 NPO 法人日本臨床検査標準協議会事務局長

マニュアル検討協力者

秋山英雄 東レ株式会社先端融合研究所主任研究員(バイオチップコンソーシアム運営委員)

斎藤由美子 株式会社サードウェイブジャパン臨床開発部長

澤上一美 プレシジョン・システム・サイエンス株式会社研究開発本部マネージャー

竹田真由 東北福祉大学感性福祉研究所

畑中 豊 ダコ・ジャパン株式会社病理検査標準化・精度管理推進室

日吉和彦 財団法人化学技術戦略推進機構戦略推進部部長研究員

特定非営利活動法人 日本臨床検査標準協議会 (Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards : JCCLS) の概要について

1. 沿革

1967年に臨床検査の標準化と質的改善を目的として、College of American Pathologistsの呼びかけによりNCCLS(現在はCLSIに名称変更)が設立され、また、1979年にはヨーロッパの先進各国間でECCLS(European Committee for Clinical Laboratory Standards)が設立された。このような国際的な標準化の動きに対応するために日本臨床病理学会(現在は日本臨床検査医学会に名称変更)が中心となり、日本臨床化学会、日本医科器械学会(現在は日本医療機器学会に名称変更)および日本臨床検査自動化に呼びかけ、4学会が設立発起団体となり、学協団体、政府系機関および企業等に呼びかけを行い、1985年に設立総会を開催し、JCCLSが正式に発足した。

現在、JCCLSは厚生労働省、経済産業省、(独)産業技術総合研究所などの政府および政府系機関からなる特別会員(9会員)、学協団体からなる正会員(33会員)、企業からなる賛助会員(55会員)および個人賛助会員(26会員)等で構成されている。

2. 組織

JCCLSは会長を中心とする常任理事会が実務上の執行機関であり、会長、副会長(2名)および常任理事(6名)で構成されている。これら役員は2年の任期であり、JCCLS理事会および総会を通じ選任される。この常任理事会の下には9つの常置委員会があり、常任理事は委員長としてそれぞれの委員会を運営管理する。代表的な委員会としては「標準物質委員会」「認証委員会」「国際委員会」等であり、JCCLSの設立の趣旨である標準化活動に邁進している。

3. 臨床検査標準化活動の実績

JCCLSは本邦における臨床検査の標準化を標榜する唯一の機関であり、国内は無論、国際的にも関連する主要な会議への参加やその役割を担ってきている。主な最近における事例としては、国内において、メートル法条約の下で制定された国際計量連絡委員会の一部署として臨床関係分科会が設立され、血清ベースの常用参照標準物質の管理・運用はJCCLSが主体となり活動をしている。平成20年度から厚生労働省が実施した「標準的な健診・保健指導プログラム」で測定される血液検査の8項目の標準物質の提案がこの事例として該当する。また、国際的にはISO/TC212、JCTLM(トレーサビリティに関する合同委員会)等への対応が挙げられる。このようにJCCLSは標準化に関する種々の国内外の会議への参加、出版、教育、講演、標準物質の作製・管理・運用等が挙げられるが、最近では政府または政府系機関から「臨床検査用標準物質の研究開発」「遺伝子関連検査標準化調査研究」等の委託事業も受託し、また、JCCLSの出版物の一部が国のガイドライン(標準採血法ガイドライン)として運用されるなど、その存在意義が多いに高まってきている。