

日本臨床検査自動化学会
第8回遺伝子・プロテオミクス技術セミナーテキスト

平成19年9月26日(水) 18:00~20:30 301号室(会議センター3F)

司会 野村 文夫(千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学)
船渡 忠男(京都大学医学部保健学科検査技術学専攻情報理工医学講座)

テーマ1 : 検査部遺伝子検査室の立ち上げとあり方について P2
講師 横田浩充 (東京大学医学部附属病院検査部)

テーマ2 : 臨床志向型プロテオーム解析の現状と将来像
網羅的から選択的解析へ P6
講師 中西豊文 (大阪医科大学総合診断治療学講座臨床検査医学教室)

テーマ3 : 移植医療とウイルス検査 P8
講師 清水則夫
(東京医科歯科大学難治疾患研究所フロンティア研究室ウイルス治療学)

「検査部遺伝子検査室の立ち上げとあり方について」

東京大学医学部附属病院 検査部

横田 浩充、佐藤優実子、影山祐子、小野佳一、矢富 裕

はじめに

当部の遺伝子検査室は未来の臨床検査室を担う大きな期待を背負い平成6年7月に設置されました。これにより研究検査として実施していた造血管腫瘍遺伝子検査(平成4年から実施)を日常業務として本稼働しました。平成8年にはコバスアンプリコア法による結核菌遺伝子検査を細菌検査室で、HCV RNA 定性検査を遺伝子検査室で開始しました。現在は24項目の検査を実施しております。

遺伝子検査は、迅速診断、確定診断、体質診断、治療法の決定、予後判定、感度高く治療効果を判定できるなど多くの利点を有します。しかしながら、医療費抑制策の中、遺伝子検査の院内実施、拡張には制約がかっております。一方で、医療経済を考慮しながらも、積極的な診療支援、先端医療を支える臨床検査の導入や開発、教育、実用的な研究が責務であります。

本セミナーでは当部の遺伝子検査室を紹介し、病院の特色や臨床ニーズに沿った遺伝子検査室の立ち上げとあり方を考えてみたいと思います。

1. 遺伝子検査室の立ち上げに必要な設備・機器

1-1. 検査室の整備

遺伝子検査の施行にあたり、下記の3室(3つのエリア)の設置が望まれます。

1)核酸抽出エリア

特に結核菌など感染性微生物の遺伝子検査を実施する場合は、細菌検査室などの相当な設備があるエリアでの施行が望まれます。すなわち、生物学的安全基準レベル2以上で Class の安全キャビネット内で検体前処理や核酸抽出を行います。安全キャビネットの使用前後は、感染性生物に適合した消毒薬でキャビネット内を消毒します。消毒後は、次亜塩素酸溶液で清掃し、70%エタノール(消毒用アルコール)で拭き取ります。また、RNAを扱う場合は、クリーンベンチ内での抽出操作が望まれます。

2)試薬調整エリア

PCR法で使用する試薬の調整は、ヌクレアーゼやPCR産物の試薬へのコンタミネーションを防ぐため、他の遺伝子検査を行うエリアとは別にします。

3)遺伝子増幅と検出エリア

PCR法により増幅された遺伝子産物は高濃度であるため、これによる検査室の汚染は、コンタミネーションの原因となります。したがって、PCR産物を電気泳動し検出する際は他の遺伝子操作をするエリアとは隔離した部屋を設けます。

1-2. PCR 遺伝子検査に最小限必要な機器

- 1) オートクレーブ(試薬・器具類の滅菌用)
- 2) 微量高速冷却遠心機
- 3) ボルテックスミキサー(核酸抽出時の細胞のホモジナイズに使用)
- 4) マイクロカプセル型遠心機(核酸抽出、試薬分注時のスピンドウンに使用)
- 5) 核酸濃度測定専用の分光光度計
- 6) サーマルサイクラーあるいはリアルタイム PCR などの遺伝子増幅装置
- 7) ミニゲル電気泳動装置(PCR 産物の電気泳動)
- 8) UV 照射型トランスイルミネーター(PCR 産物の電気泳動の確認と撮影に必要)
- 9) ポラロイド写真撮影装置(核酸電気泳動図の記録用)
- 10) 電子レンジ(アガロースの溶解)
- 11) 超純水採水装置

1-3. 消耗品関連

- 1) マイクロピペット(10 ~ 100 μ L 可変式、100 ~ 1000 μ L 可変式)・・・エア毎に用意
- 2) フィルター付きチップ(10 μ L、100 μ L、1000 μ L)
- 3) トランスファーピペット・・・核酸抽出時の上清除去に使用
- 4) 1.5mL マイクロチューブ
- 5) 0.2mL マイクロチューブ
- 6) ディスポーサブル手袋・・・パウダーフリー、滅菌済み。

1-4. 医療廃棄物の処理

遺伝子検査の廃棄物には、一般廃棄物、感染性廃棄物、有害化学廃液などがあります。遺伝子増幅された核酸は、次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理したのちに感染性廃棄物と同様に取り扱います。

2. 遺伝子検査室のあり方について

2-1. 遺伝子検査の種類と各部門の役割

当部で実施している遺伝子検査を大別すると以下の三つになります。(1)細菌・ウィルスなどの病原体を対象とする病原微生物遺伝子検査。(2)造血器・固形腫瘍などの後天的に生じた病変部細胞の遺伝子変異・発現を調べるヒト体細胞遺伝子検査。(3)生涯変化せず次世代に受け継がれる個人の生命情報を解析するヒト遺伝子検査です。(3)のヒト遺伝子検査には薬剤応答性遺伝子検査やHLA 遺伝子型判定が含まれます。ヒト遺伝子検査の代表として遺伝性疾患がありますが、社会・倫理的問題・制約が大きく検査部での実施には至っておりません。

現在、遺伝子検査は検査各部門の日常検査として定着しました。病原微生物遺伝子検査は感染制御部・細菌検査室、ヒト体細胞遺伝子検査のうち固形腫瘍、リンパ腫など

病理学的遺伝子検査は病理部門、ヒト遺伝子検査のうち HLA 遺伝子型判定は輸血部門で実施しております。これらの遺伝子検査が各部門に定着した理由は専門知識無しには有益な遺伝子検査結果が得られないためです。遺伝子検査室では次項 2-2～2-3 の遺伝子検査を実施しております。造血器腫瘍の遺伝子検査が主体であるため要員は定期的に血液検査室へローテーションしております。

2-2. 造血器・悪性腫瘍遺伝子検査

慢性骨髄性白血病を代表とする造血器腫瘍には各病型に特徴的な染色体異常、遺伝子異常(相互転座に伴うキメラ mRNA の形成)が知られています。本検査は、病型の早期確定診断、治療法の決定に、また、光学顕微鏡による検査では検出困難な微少残存病変を感度良く検出できるため、各種治療後の効果判定に頻用されており、50 件/月の検査を施行しております。現在ではその定性的診断にとどまらず、微少残存病変モニタリングのための定量検査が不可欠となり、Real-time PCR 法にて対応しております。血液内科、無菌治療部と連携を取り検査を拡充しております。近年では急性骨髄性白血病に対する予後判定、層別化治療の側面から FLT3 - ITD 検出を、好酸球増多症候群の治療法決定に FIP1L1-PDGF mRNA 検出を、骨髄増殖性疾患に JAK2 遺伝子変異検出を実施しております。

また、胃・食道外科との連携により採取液(腹水、腹腔内洗浄液)を対象とした腫瘍遺伝子検査(CEA mRNA)を実施しております。これは平成 18 年から保険適応となった検査であり、臨床的有用性が確立されつつあり今後の普及が期待されます。

2-3. 薬剤応答性遺伝子検査

平成 17 年 7 月より臨床ゲノム診療部、企画情報運営部、薬剤部、検査部および消化器内科、循環器内科、神経内科などの診療科を中心として Pharmacogenomics Working Group (P-G-WG)を立ち上げ、薬剤応答性遺伝子検査の院内実施を進めております。平成 18 年 8 月には消化性潰瘍、逆流性食道炎などの治療、ピロリ菌の除菌に使用されるプロトンポンプ阻害薬(PPI)の代謝に関与する CYP2C19 遺伝子多型検査を開始し、これまでに 29 例の検査実施しております。また、本年 8 月より CYP2C9、VKORC1 を対象としたワーファリン遺伝子検査を実施しております。本検査により、薬剤代謝酵素遺伝子型、薬物代謝・動態、臨床(処方、効果、危険・有害事象の回避)が有機的に連結した個別薬物療法を実施する病院、検査部としての参画モデルを提案できるものと考えております。国内の大学病院において、検査部遺伝子検査室、薬剤部、ゲノム診療部、臨床各科が連携して、個別薬物療法に取り組んでいる施設は少数です。薬剤応答性遺伝子検査の結果が、患者診療へ即時的にフィードバックできる医療体制は、患者への最適な医療の提供のみならず、今後の臨床検査の位置づけを向上させるものと期待しております。

2-4. 遺伝子検査室の ISO 認定

当検査部は本年 1 月 19 日付けで、ISO 15189「臨床検査室-品質と能力に関する特定

要求事項」の認定を受けました。遺伝子検査の多くは確立された方法がなく、各施設で実施方法や感度は大きく異なります。検査の品質維持の上で、ISO の要求事項である標準作業書(SOP)の作成、機器・試薬の管理、精度管理、機器の点検、文書・記録の管理など ISO の重要性を再認識しました。ISO 取得は今後の遺伝子検査室のあり方に重要と考えておりますので、取得への取り組みも紹介したいと思います。

おわりに

医療経済を考慮しながらも遺伝子検査による先端的診療・臨床支援の追究は重要と考えております。遺伝子検査は疾患の診断や治療効果、体質診断など直接診療に貢献していることから、幅広い領域で臨床応用がなされ、益々その必要性が高まるものと予想しております。

遺伝子検査の利点は診療に直結する点にあり、この目的を達成できる遺伝子検査こそが必要であります。適正な臨床検査の施行が叫ばれている昨今において実施すべき遺伝子検査項目は選定されなければなりません。遺伝子検査室の立ち上げには、各病院の特色、臨床ニーズに沿った検査室の運営・構築を目指さなければならないと考えております。

東大病院検査部の遺伝子検査項目

1. C型肝炎遺伝子検査

HCV genotype 判別

2. 造血器腫瘍遺伝子検査

同定検査

p210 BCR-ABL mRNA、p190 BCR-ABL mRNA、AML1-MTG8 mRNA、PML-RAR mRNA、

CBF -MYH11 mRNA、TEL-AML1 mRNA、MLL-LTG4 mRNA、MLL-LTG9 mRNA、E2A-PBX1 mRNA、DEK-CAN mRNA、FLT3-ITD mRNA、FIP1L1-PDGF mRNA、JAK2 遺伝子変異(V617F)

定量検査

p210 BCR-ABL mRNA、p190 BCR-ABL mRNA、AML1-MTG8 mRNA、PML-RAR mRNA、

CBF -MYH11 mRNA、WT1 mRNA

3. 穿刺液、採取液を対象とした腫瘍遺伝子検査

CEA mRNA の検出

4. 薬剤応答遺伝子検査

CYP2C19、CYP2C9、VKORC1

中西豊文

大阪医科大学 総合診断治療学講座 臨床検査医学教室

ヒトゲノム計画完了によってヒトゲノムは2万2千個余り存在することが判明し、それを設計図に様々なタンパク質が合成され、更にその発生、分化、成長、老化過程で種々変化していく。それら発現タンパク質を網羅的・定性的に解析する時代から、選択的・定量的解析へ移り変わっている。それらプロテオーム解析によって得られる膨大な情報を有効に活用し、病気の原因、発症機序、また治療薬開発に繋げていく事が重要である。

今回の特別講演では、臨床志向型プロテオーム解析の現状と将来像について、これまでの我々グループの研究結果(自己抗体を標的にした癌診断マーカー検索など)を交えて解説する。

[プロテオーム解析(プロテオミクス)]

90年代に始まった本プロテオーム解析は、単に分離手段として2次元電気泳動を、その解析手段として質量分析計を用いて発現タンパク質を1つでも多く同定する事が主目的であった。しかし、その後研究対象が拡大し構造解析のみならず、タンパク質の機能を含めた総合的なプロテオーム解析(ペプチド、リン酸化たんぱく質、RNA-タンパク質複合体)が主流となり、ゲノム研究と肩を並べる大規模な研究までに成長してきた。今後は、より一層の技術革新と蓄積データの有効利用が望まれる。

[自己抗体を標的にした癌診断マーカー検索(Autoantibodiomics)]

癌(腫瘍)マーカーとは、癌(腫瘍)細胞の異常増殖によって直接分泌される癌特異抗原(癌特異的マーカー: フェトプロテインや癌胎児性抗原など)あるいは体液中に発現される癌増殖関連抗原(癌増殖関連マーカー)などが知られている。それらマーカーは、癌(腫瘍)の存在の有無やその進行度を診断するだけでなく、原発臓器と悪性度の鑑別に有用である。また、癌治療の経過観察や予後判定のマーカーなど非常に重要な検査項目である。しかし、癌(腫瘍)抗原を直接検出し、早期診断あるいはスクリーニング検査に応用する際、微小な早期癌あるいは前癌段階では、組織内で産生される抗原量は極めて少量で血中レベルとなると更に微量となり、測定上非常に制約を受ける。そこで、癌(腫瘍)抗原以外にも「宿主側が癌の存在によって防御的に産生する物」=自己抗体も癌マーカーとして知られている。例えば、抗ヒトp53(癌抑制遺伝子産物)に対する自己抗体は肺癌、乳癌、消化器&泌尿器系癌患者の10~30%が陽性であり、癌マーカーとして注目されている。Hanash教授らの研究グループは、プロテオーム手法を用い、肺癌患者血清中に存在する自己抗体を標的に肺癌マーカー候補の検索した結果、肺Adenocarcinoma患者血清中に37~40%の頻度でAnnexin-I&IIに対する自己抗体の存在を明らかにした。この報告を契機に本手法を用いて癌(腫瘍)マーカー候補が数多く発見・同定された。癌(腫瘍)抗原に対する自己抗体の検出は、癌組織片を用いた遺伝子解析法と比較して、検体(血

清)の入手が容易であり、測定手法も比較的簡便であり、同定された癌マーカーが臨床医学の現場で応用が期待される。

1)非ホジキンリンパ腫診断マーカー検索

培養 B リンパ球系細胞株 (Raji 細胞) を可溶化緩衝液にて処理し試料を得た。非ホジキンリンパ腫 (NHL) 25 例、多発性骨髄腫 (MM) 12 例、急性リンパ性白血病 (ALL) 4 例、急性非リンパ性白血病 (ANLL) 2 例など計 101 例の造血器疾患症例の血清を分析した。

[結果] NHL 患者血清より、 $pI 7 \sim 9$ 、 $40 \sim 80 kDa$ 付近に 5 個の陽性バンドを見出した。ECL 陽性バンドに対応する複数スポット (銀染色ゲル) の一つから L-plastin を同定した。その自己抗体陽性頻度は NHL では $21 / 25$ であり、この自己抗体は造血器癌の診断マーカーとなり得る可能性がある (特願 2007-76543)。

2)肺癌及び食道癌診断マーカー検索

培養ヒト肺癌細胞株 (A549) 食道癌細胞株 (TE-2) を可溶化緩衝液にて処理し試料 = 癌抗原とした。

[結果] 抗 エノラーゼ、シャペロニン、ペルオキシレドキシシン-6 抗体 (特許申請済) など新しい 8 種類の癌マーカー候補を見出した。

[文 献]

1. T.Nakanishi et.al., J.Chromatogr.B 838:15-20, 2006.
2. Y.Fujita et.al., Clin.Cancer Res 12:6415-6420, 2006.
3. T.Nakanishi et al., Ann Clin Biochem *in press*.
4. Y.Fujita et. al., International Journal of Cancer *submitted*

移植医療とウイルス検査

清水則夫

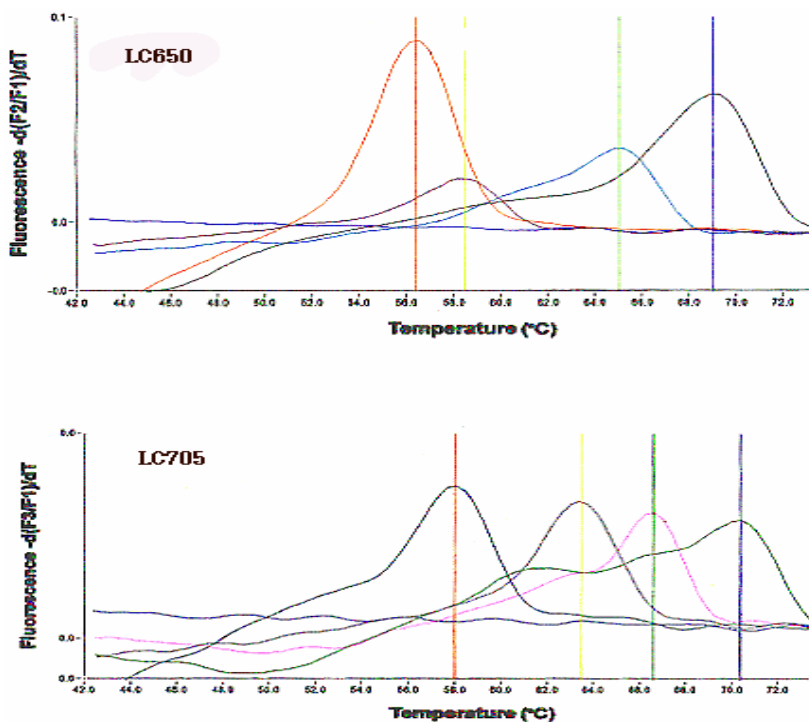
東京医科歯科大学難治疾患研究所フロンティア研究室 ウイルス治療学

近年、臓器・造血幹細胞移植の症例数の増加に伴い、臓器を介したウイルス感染あるいは移植時の免疫抑制に伴う持続感染ウイルスの活性化が問題となるケースが増えている。臓器移植分野では、移植臓器の不足を補うために実施された病気腎移植の際に肝炎ウイルスに汚染された臓器が使用された例が発覚し、また、中国などの外国で移植を受けウイルスに感染するケースも報告されている。韓国の調査によると、中国で移植を受けた韓国人のうち 6.5%が B 型あるいは C 型肝炎ウイルスに感染したことが報告されている。これらのケースはドナー検査が不十分であったのが原因で、国内での通常の移植の際には厳重にウイルス検査が行われるため、そのような事態は非常にまれであり（検査漏れがあったケースも少数ではあるが報告されている）、問題は移植臓器の不足をどう克服するかにある。一方、移植前から患者に持続感染していたウイルスが移植に伴う免疫抑制下で活性化し、重篤な疾患を引き起こし患者の予後に大きく影響を与えるケースが多数報告されている。具体的には、ヘルペスウイルス科に属する EB ウイルス (EBV) によるリンパ増殖性疾患 (LPD)、サイトメガロウイルス (CMV) による間質性肺炎・腸炎、ヒトヘルペスウイルス 6 型 (HHV-6) による肺炎・脳炎、およびアデノウイルス (AdV) による出血性膀胱炎や JC ウイルス (JCV) による進行性多巣性白質脳症が主なものである。特にヘルペスウイルス科のウイルス群は、初感染の後に持続感染状態となり、リンパ球、マクロファージ、あるいは神経節に潜伏し終生感染が持続するのが特徴で、大多数の成人は複数のヘルペスウイルスを保有している。例えば EB ウイルスは多くの場合小児期に母親の唾液から感染するが、小児期に感染が成立しない場合でも思春期に感染が成立し、その後終生持続感染状態となり唾液にウイルスを排出し続ける（幼少期に感染が成立すると重篤な症状を呈する場合は稀であるが、思春期以降に初感染を受けると伝染性単核症を発症することがある）。したがって、移植患者を術後クリーンな環境に置いても、すでに感染している持続感染ウイルスの再活性化の防止には役立たない。実際、生体肝移植に際して、潜伏感染している EBV による LPD 発症が問題となるが、定期的に末梢血中 EBV ゲノム量を測定し、そのデータに基づいて免疫抑制剤の投与量を調節することにより LPD の発症防止が防止できることが報告されている。

一方、造血幹細胞移植においては、移植前処置として抗がん剤投与や放射線の

全身照射によりレシピエントの免疫系を破壊するため、持続感染ウイルス再活性化による移植後感染症がより大きな問題となる。最近、ドナー負担が無い・迅速に移植ができる・HLA 不一致への許容度が高い、などの理由により臍帯血移植が注目されている。臍帯血に含まれる造血幹細胞の絶対数が限られているため成人への臍帯血移植には制約があったが、複数臍帯血を同時に移植する手法が開発されたこともあり、今後臍帯血移植の症例数が増加するものと見込まれる。臍帯血移植の欠点として移植後の血液学的・免疫学的再構築が骨髄移植に較べて遅延するため、臍帯血移植では移植関連死亡が50%に達するとの報告がある。しかも、その約半数はウイルス感染症が原因と報告されており、臍帯血移植を成功させるためには、ウイルス感染症のコントロールが極めて重要である。また、移植患者は移入した免疫細胞あるいは再構築された免疫系が宿主を攻撃する移植片対宿主病（GVHD）を発症することが多いが、皮疹や下痢などの臨床症状がウイルス感染症と類似しているため、GVHD とウイルス感染症の鑑別診断が必要となる。GVHD の治療は免疫抑制の強化が、また、ウイルス感染症の治療には免疫抑制の緩和が必要となり、治療法が正反対となるため、効果的に治療するためには正確な鑑別診断が必要となる。移植患者における持続感染ウイルスの動態には不明な点も多く、GVHD、ウイルス感染症ともに治療が遅れて致命的になるケースもあるため、多数のウイルスを同時・迅速・高感度に検出できる新しいウイルス検査法の導入が必要である。

我々は、移植後のウイルス感染症・白血病再発の治療法として、ドナーのTリンパ球を活性化増幅して投与する免疫療法を開発を行っている。本セミナーではその詳細には触れないが、リンパ球投与によるGVHDの発症リスクを低減するため、活性化増幅したドナーCD4陽性Tリンパ球のみを投与する「活性化CD4-DLI (Donor Lymphocyte Infusion)」として現在臨床研究が進められている。再生医療・細胞治療を行う際には、体外で培養した細胞の安全性を担保することが極めて重要である。我々は、細胞製剤へ安全性試験として持続感染ウイルスを含む複数のウイルスをマルチプレクスPCR法により同時・迅速・高感度に検査できるシステムを開発した(下図参照)。現在、キャピラリーPCR機(LightCycler: ロッシュ、50サイクルのPCRが25分程度で完了)、自動核酸抽出装置(EZ1: キアゲン、DNA, RNAを細胞から30分程度で抽出)を使用し、B型およびC型肝炎ウイルス・レトロウイルス・8種類のヘルペスウイルス・AdVなどを含め、合計16種類のウイルスを約2時間で検査し、細胞治療製剤の安全性試験法として実用化した。



図の説明 8組のプライマーを使用したマルチプレックス PCR: 2種類の蛍光色素で標識した合計8組の Hybriprobe による検出とメルティング温度解析により、1本のキャピラリーで8種類のウイルスの検出、同定が可能になる

すでに述べたように、GVHD とウイルス感染症の鑑別や抗ウイルス剤の選択のため原因ウイルスの同定は移植成績を向上させるうえで極めて重要である。我々は、開発した上記の検査法を用いて造血幹細胞移植患者の末梢血、尿のウイルス検査を行い、移植患者におけるウイルス動態に関する検討を行った。その結果、多くのサンプルから EBV、CMV、HHV-6、BKV、AdV が検出され、しかも複数のウイルスが同時に検出されたケースも多数あった。この結果は、造血幹細胞移植患者の体内では症状は無くても複数の持続感染ウイルスが活性化している場合が多く、ウイルス感染症と GVHD との鑑別診断や抗ウイルス薬選択の難しさを示している。

本講演では、新しいウイルス検査系の開発と移植患者のウイルス動態解析の詳細について解説する予定である。