

## LBC 後検体における HPV ハイリスク型ジェノタイプ検査の実用性について

◎白柳 真麻<sup>1)</sup>、山本 章史<sup>1)</sup>、中西 めぐみ<sup>1)</sup>、木原 孝則<sup>1)</sup>、木谷 美紀<sup>1)</sup>、綾城 正子<sup>1)</sup>、井戸田 篤<sup>1)</sup>  
地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立成人病センター<sup>1)</sup>

【はじめに】ヒトパピローマウイルス(Human papillomavirus: HPV)の持続感染は子宮頸癌の主要原因であり、ハイリスク型ジェノタイプとして13種類の遺伝子型が知られている。液状化検体細胞診(Liquid Based Cytology: LBC)は、細胞検体処理法の一つである。LBC 後検体を用いた HPV ハイリスク型ジェノタイプ検査は、患者から採取された検体を最大限有効に活用できる点、ひいては患者の身体的負担を軽減できる点からも有用である。今回我々は HPV ハイリスク型ジェノタイプ検査について、LBC 後検体を用いた時の影響および実用性について検討した。

【対象と方法】検体の採取、および LBC の標本の作製は、Cellprep (Biodyne)を用いた。DNA 抽出には、QIAamp MinElute Media Kit(QIAGEN)を用いた。LAMP 法による電流検出型 DNA チップ法を原理とした、クリニチップ HPV(SEKISUI)およびジェネライザー GLH-2C601(東芝)を用いて、HPV ハイリスク型ジェノタイプ検査をおこなった。  
①患者のインフォームドコンセントを得て同時に採取された LBC 後検体と、遺伝子検査用検体 27 症例を比較検討し

た。②再現性は、同一検体 2 症例の検査を 5 回おこなった。③LBC による HPV キャリーオーバー有無の比較は、陽性検体の LBC 後に未使用ブランク検体の LBC をおこなったものを 3 検体用いた。

【結果】①は 27 症例中 25 症例にてジェノタイプが一致した。しかし、2 症例にて一部異なったジェノタイプの検出を認めた。②は 1 症例にて一部異なったジェノタイプの検出を認めた。③は 3 検体全てにおいて核酸抽出の指標である β グロビンが陰性であった。

【考察】今回の検討では一部異なるジェノタイプを検出した。推測される理由としては、検体中の感染細胞数および抽出された HPV DNA 量に由来する測定感度の差が考えられる。今回の検討では、LBC におけるキャリーオーバーは発生しなかった。LBC 細胞診検査と並行して実施できることから、LBC 後検体を用いた HPV ハイリスク型ジェノタイプ検査は有用な方法と思われる。

## COLD-PCR による変異遺伝子検出感度の向上

JAK2-V617F 検出を例に

◎山本 駿<sup>1)</sup>、丸岡 隼人<sup>1)</sup>、白石 祐美<sup>1)</sup>、野本 奈津美<sup>1)</sup>、吉田 昌弘<sup>1)</sup>、山内 容子<sup>1)</sup>、老田 達雄<sup>1)</sup>  
独立行政法人 神戸市民病院機構 神戸市立医療センター 中央市民病院<sup>1)</sup>

【導入】変異遺伝子の検出は多くの場合、正常細胞と変異を有する細胞の混在した状況下で行われる。それ故に変異細胞が少ないサンプルにおいて検出が困難なことがある。骨髄増殖性腫瘍における JAK2-V617F の検出は診断価値が極めて高いが、変異細胞が少なく検出が困難な事例も存在する。変異遺伝子の検出感度を上げる方法として COLD-PCR (COamplification at Lower Denaturation temperature PCR) が注目されている。COLD-PCR とは PCR 反応における熱変性の温度を野生型遺伝子の Tm 値より低い温度 (critical temperature: Tc) にすることで変異を含む DNA を優先的に増幅させる手法である。我々はこの手法に着目し、COLD-PCR の有用性を JAK2-V617F の検出を例に検討した。【方法】JAK2 両アレル変異細胞株である Human Erythroblast Leukemia Cell Line (HEL) より抽出した DNA を健常者より抽出した野生型のプール DNA で希釈したサンプルを用いた。JAK2-V617F を含む領域に対するプライ

マーを用いて、通常の PCR (熱変性 98°C) と COLD-PCR (Tc 76.2°C, 野生型 DNA の Tm 値 -1°C) をそれぞれ用いた HRM (High Resolution Melting) 法およびダイレクトシーケンズで検出感度を比較した。【結果】通常の PCR を用いた場合、HRM 法およびダイレクトシーケンズの両者において 10% まで検出可能であった。一方、COLD-PCR を用いた場合は両者で 0.5% まで検出することが可能であり、通常の PCR を用いた場合に比べ検出感度が 20 倍向上した。

【結語】我々は JAK2-V617F 検出において、COLD-PCR を用いることで検出感度の大幅な向上に成功した。今後、体腔液における EGFR 変異や RAS 変異の検出、造血器腫瘍における変異遺伝子の微小残存病変の検出への応用が期待される。

連絡先 078-302-4321 (内線 3540)

## 大腸癌の原発巣と転移巣における K-ras 遺伝子変異の比較

©飯田 貴雄<sup>1)</sup>、水野 幸恵<sup>1)</sup>  
福井県立病院 検査室<sup>1)</sup>

【目的】大腸癌における K-ras 遺伝子変異解析は抗 EGFR 抗体薬の効果予測に必須のものとなっており、当院では 2012 年 1 月より院内で遺伝子変異解析を実施している。抗 EGFR 抗体薬は治癒切除不能な進行・再発例に用いられるため、解析する検体に原発の手術材料のみならず、生検材料や転移検体が用いられることがあり、検体の量や質、臓器による K-ras 遺伝子変異の結果の差を確認しておく必要がある。今回、我々は大腸癌の原発巣と転移巣における K-ras 遺伝子変異を比較したので報告する。

【対象と方法】治癒切除不能な進行・再発大腸癌の原発巣と転移巣の K-ras 遺伝子変異の比較可能であった 16 例を対象とした。検体としてホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。2012 年 1 月以前は外部委託検査会社のダイレクトシーケンス法で解析した。院内検査での測定方法は TaKaRa DEXPAT(TaKaRa)または QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(Qiagen)で DNA 抽出を行い、Shifted Termination Assay (STA) 法を原理とする KRAS Mutation Analysis Reagents (TrimGen)を使用した。測定機器は 3500Dx Genetic Analyzer

(Life Technologies)を使用し、フラグメント解析にて K-ras 遺伝子の Exon 2 codon 12, 13 の 12 種類の点突然変異を測定した。

【結果・考察】K-ras 遺伝子に変異が認められたのは 16 例中 5 例であった。原発巣と転移巣の比較した結果、変異箇所を含め、すべて一致した。この結果より、大腸癌における K-ras 遺伝子変異解析に用いる材料は原発巣でも転移巣でも良く、頻回に測定する必要はないと考えられる。

連絡先：0776-54-5151（内線 2613）

## 安心安全な採血業務に向けた当院の取り組み

©谷川 崇<sup>1)</sup>、河村 美里<sup>1)</sup>、改田 幸子<sup>1)</sup>、久保 繁美<sup>1)</sup>、畑中 重克<sup>1)</sup>  
府中病院<sup>1)</sup>

## 【はじめに】

採血は医療現場において長年にわたり行われてきた医療行為である。臨床検査技師が採血に携わるとは検査精度を上げるためにも有用とされ、当院は H24 年から外来採血を担当している。基本的には安全な医療行為といわれているが、頻度は少ないものの合併症の発生がある。また、患者さま間違い、採取管の取り違え、針刺しによる感染やコミュニケーション不良など、様々なリスクが存在している。当院では、これらのリスクに対し採血技術、医療安全、感染管理、接遇を含めた研修を行っているため、その研修方法を報告する。

【研修方法】新人研修においては、血管・神経の走行、採血手順、採取管の取り扱い、採血説明、手指衛生等の基礎的講義を一通り行った後、患者さまを想定し採血シュミレータを用いて翼状針の持ち方、刺入角度等の基礎的手技、採血説明ならびに手指衛生を実施。採血技術、医療安全、感染管理、接遇を含めた一連の動作を評価。次のステップとして職員ボランティアで練習、当院独自のチェックシート

を用い研修習熟度を評価した後、患者さまに対して採血を実施することになっている。また、年度初めに採血の合併症、採取管の取り扱い等について勉強会を実施し基礎知識を復習している。感染管理面からは手指消毒や手袋着用、針の廃棄等の手順を一覧化、医療安全面からは患者氏名や採取管の確認手順の統一、そして採血に関してのインシデントの共有を行っている。接遇面に関しては当院接遇トレーナーから患者様との接し方、挨拶の仕方などの研修会を実施している。これら医療安全面、感染管理面、接遇面を含めた採血の一連動作を、患者さまの呼び出しから、氏名確認、採取管確認、手指消毒等の流れについてデモンストレーションを行い標準化している。

【効果】この研修方法は採血業務を始めてから試行錯誤で構築したため、現時点での効果確認は十分ではないが、デモンストレーションによる標準化により手指消毒・手袋着用のタイミングや採取管確認方法などが理解できたとの声が聞かれている。発表時には効果を確認し報告する。

府中病院臨床検査室 0725-43-1234