

## 骨軟部腫瘍の融合遺伝子検査～multiplex PCR を用いて～

◎林原 弘武<sup>1)</sup>

地方独立行政法人大阪府立病院機構 大阪国際がんセンター<sup>1)</sup>

## 1. 骨軟部腫瘍と遺伝子検査

骨軟部腫瘍とは骨や軟部組織から発生する腫瘍の総称であり、分類は約 200 種類と多岐にわたる。1 つ 1 つの腫瘍は稀で、発症頻度が低い希少がんの 1 つである。このように組織型が多いことや希少性が高いことから、病理診断が極めて困難な場合がある。

骨軟部腫瘍の中には特異的な融合遺伝子が確認されているものがあり、遺伝子検査によって病理診断が変わり治療方針に大きく影響を与えた症例も報告されている。2020 年に改訂された軟部腫瘍 WHO 分類第 5 版では遺伝子異常による腫瘍の分類が追加されており、病理診断の精度を向上させ適切な治療を行うために遺伝子検査を行うことは非常に有意義である。

## 2. 当センターにおける骨軟部腫瘍融合遺伝子検査の運用について

手術や生検にて組織を採取し、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程に準じてホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を作製する。軟部腫瘍診療ガイドライン 2020 に準じて、組織像や免疫染色のみで診断の確定が困難な場合など、組織診断を行う際に必要であれば病理医から遺伝子検査室に検査依頼が出される。

現在当センターでは保険収載されている 3 遺伝子を含む 21 の融合遺伝子について検査体制が整っている。

## 3. multiplex PCR を用いた骨軟部腫瘍融合遺伝子検査について

FFPE 標本由来の核酸を検体として用いる場合、ホルマリン固定によって核酸の断片化が起こるため、PCR での検出を行う際は産物長が 100-300bp となるように primer を設計することが望ましい。ブレイクポイントが多く報告されている融合遺伝子の場合は、1 つの primer の組み合わせでは検出できない可能性があることを考慮して複数の組み合わせの primer を用いて PCR を行う必要がある。しかしながら、singleplex PCR で行うと検査に必要な核酸量が増えるため、検体の有効活用のためにも multiplex PCR で検出することが望ましいことがある。当センターで検査体制を構築した融合遺伝子のうち 2 遺伝子について multiplex PCR を用いて検出を行っている。

本発表では検査系の確立にあたって工夫した点を実際の症例を用いて検討し、multiplex PCR の有用性と今後の展望について説明する。

連絡先：大阪国際がんセンター 臨床検査部門 遺伝子検査室 06-6945-1181 (内線：5222)

## 免疫低下患者を守る：マルチプレックス PCR による日和見感染症ウイルス検出の最前線

◎白石 祐美<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>

【はじめに】当院細胞遺伝子検査室では、2002年の設立以来造血器腫瘍関連検査を主として担ってきたが、その中で培ってきた検査技術とノウハウを活かして、2022年4月から網羅的日和見感染症ウイルス検査を担当するに至った。とりわけ長期にわたって免疫不全状態に陥る造血幹細胞移植後の患者においてはウイルス再活性化のリスクが高く、迅速かつ高感度な検査体制の整備が重要である。現在、血液内科に加え、脳神経内科や膠原病リウマチ内科からの検査依頼も増加しており、その臨床的重要性はさらに高まっている。本シンポジウムでは、我々が確立したマルチプレックス PCR 法による網羅的日和見感染症ウイルス検査の概要と実績、臨床での事例について紹介する。

【検査概要】検出対象は、EBV, HHV-7, VZV, HSV-1, HSV-2, BKV, ADV, HHV-6, CMV, HHV-8, JCV, およびパルボウイルス B19 の 12 種類である。Inazawa らの文献(Journal of Medical Virology 87:1427-1435,2015)を参考に、マルチプレックス PCR 法を利用した独自のプライマー・プローブセットを設計した。ウイルス量は日本テクノサービス株式会社のスタンダード試薬を用いて検量線を作成し算出した。核酸抽出試薬は PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit(ThermoFisher Scientific), PCR 試薬は SsoAdvanced Universal Probes Supermix(Bio-Rad Laboratories)を使用した。依頼項目は、スクリーニング検査として 12 種類のウイルス測定を一括でオーダーする検査項目と、個別に任意のウイルスを選択できる単独検査項目を設定した。

【検査実績】検体数は 2022 年度から 2024 年度にかけて 830 件, 1,043 件, 1,294 件と増加傾向にあり、当該検査は臨床において着実に浸透している。このうち、スクリーニング検査の依頼があったものは 957 件、個別のウイルス定量検査の依頼があったものは 2,210 件であり、特に CMV・EBV の依頼件数が多くみられる。依頼元は血液内科が最多であった。検体種は末梢血が最も多く、次いで髄液や尿の頻度が高かった。

【事例】臨床での事例を紹介する。

①50 代男性。造血幹細胞移植後 day5 の悪性リンパ腫患者。発熱が見られ、CMV 再活性化が否定できない状況であった。「造血幹細胞移植ガイドライン」に基づく CMV 検査のスタンダードは CMV 抗原血症検査(CMV アンチジェネミア法)であるが、ドナー細胞生着前の段階では白血球が著しく低値であり、必ずしも有効な結果が得られない。そこで血漿中 CMV-DNA 定量の依頼が出され、 $1.63 \times 10^5$ copies/mL と高値であることが判明した。この結果より、いち早くレテルモビルによる治療介入につなげることができた。

②60 代男性。造血幹細胞移植後 day7 の骨髄異形成腫瘍患者。肉眼的血尿が出現し、シクロフォスファミドの副作用とウイルス性出血性膀胱炎の鑑別のため、尿中ウイルス検査が提出された。結果は JCV が  $3.34 \times 10^7$ copies/mL と高値であり、大量輸液などの対症療法が実施された。以上の二症例ともに、日和見感染症ウイルス検査の結果が治療に直結しており、重要な役割を果たしていた。

【最後に】当院の日和見感染症ウイルス検査の特徴として、LDT(Lab Developed Test)の採用による大幅なコスト削減が挙げられる。試薬コストは約 1,300~2,900 円と、非常に安価に検査可能である。また、検査所要時間は最短 90 分であり、当日中の結果報告が可能である点は院内検査ならではの大きな利点である。全国の医療施設の中には、新型コロナウイルス感染症緊急包括支援交付金等により導入されたりリアルタイム定量 PCR 機器の利活用に苦慮していると聞き及ぶこともあるが、本検査はその一つの選択肢となりうることを提言したい。

連絡先：細胞遺伝子検査室 078-302-4321(内線 3540)

## 肺癌マルチプレックス PCR 検査の院内化

◎南 智也<sup>1)</sup>、沖 理紗<sup>1)</sup>、加藤 ゆり<sup>1)</sup>、出口 陽菜<sup>1)</sup>  
兵庫県立がんセンター<sup>1)</sup>

近年のがん診療において、分子標的治療薬の適応可否を決定するために遺伝子検査が必須となってきており、PCR 反応や次世代シーケンス(以下 NGS)を用いた様々な遺伝子検査が次々と保険収載されている。特に非小細胞肺癌においては、EGFR, ALK, ROS1, MET 等の複数のドライバー遺伝子の変異を治療開始前に検索することが肺癌診療ガイドラインでも推奨されており、一次治療から標的遺伝子の変異に対する分子標的治療の投与が可能である。従来は、複数の単一遺伝子変異検査を併用し、ドライバー遺伝子変異の検索を行っていたが、検体ロスが生じることや検査所要時間(TAT)が長いこと等の問題があり、マルチプレックス PCR や NGS により一度に複数のドライバー遺伝子変異を検出可能なマルチプレックス検査が次々と開発され、多くの施設でマルチプレックス検査に置き換わりつつあるのが現状である。

当院では、2016年8月よりリアルタイム PCR 法を用いた EGFR 遺伝子の単一遺伝子検査を院内で開始した。その後、LDT 検査にて高解像度融解曲線分析やダイレクトシーケンス、免疫組織化学染色等を実施することで分子標的治療薬の対象遺伝子の増加に対応してきた。しかしながら、マルチプレックス検査でのみ承認される薬剤も増え、単一遺伝子検査の組み合わせでは対応できなくなってきたことから、2022年1月より AmoyDx マルチ PCR パネルを院内に導入した。

2025年7月現在までに498例の検査を実施し、解析成功率100%(病理評価で不適正症例を除く)、TATは約5日間(内科症例は3.7日間)と導入前に比べて非常に簡便で迅速に検査結果が得られるようになった。また、検査結果はドライバー遺伝子変異のいずれも陰性の割合が約44%に対し、陽性の割合は約56%であり、腺癌のみに限れば変異陽性率は約73%で EGFR 遺伝子変異は約42%を占め、単一遺伝子検査の結果と同等の高い変異検出率が得られている。

講演当日は、AmoyDx マルチ PCR パネルの実施状況に加え、導入の際に工夫した点、院内化のメリット、検査運用面での工夫等についても紹介する