

令和3年度厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）  
「検体検査の外部精度管理調査における組織構築に向けた研究」

白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の現状と今後の対応：  
日本医療検査科学会での委員会活動の成果を踏まえて

研究協力者 村上正巳 群馬大学医学部附属病院検査部

### 研究要旨

ゲノム医療の実用化に向けた体制整備が求められているなかで検体検査の品質・精度の確保に関連した法改正も行われ、遺伝子関連検査の外部精度評価の重要性が増している。現在、国内の機関により実施されている遺伝子関連検査の外部精度管理調査は病原体核酸検査が中心で、日本臨床衛生検査技師会が行っている結核菌群の定性、HBV-DNA 定量、HCV-RNA 定量の3項目であり、ヒト遺伝子関連検査（体細胞遺伝子検査、遺伝学的検査）については広域の実施体制が整備されておらず、国内での体制づくりが急務である。国内で実施体制の整っていない現状では、CAP、EMQN等の国際的大規模外部精度評価プログラムに参加する必要がある。

日本医療検査科学会（旧日本臨床検査自動化学会）の遺伝子・プロテオミクス技術委員会では、2002年より白血病培養細胞の凍結乾燥試料を用いて白血病関連遺伝子検査の施設間差の現状把握とその是正に向けて外部精度評価を実施してきた。白血病培養細胞の凍結乾燥品はRNA解析用試料として安定性に優れ、実際の血液サンプルと同様にRNA抽出過程から確認することができることから、WHOの一次標準物質としても利用されており、実用性が高い。

遺伝子・プロテオミクス技術委員会におけるこれまでの白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の取り組みより以下の結果が得られた。

- ① 外部精度評価の試料として培養細胞の凍結乾燥品が有用であることが明らかとなった。
- ② 培養細胞の凍結乾燥試料は、培養細胞の種類（Kasumi-1, THP-1, KOCL-48など）を変えることにより、多種類で低頻度の融合遺伝子に対応した試料を比較的容易に作製することができ、標準化の進んでいない測定項目の標準物質としても利用可能である。
- ③ 白血病関連遺伝子検査においても標準化の進んだISキット・IVDキットでは、臨床化学検査のようにSDI評価が可能である。Log Reductionでの比較は補正方法の異なるLDTを含めた評価に利用できる。
- ④ 白血病関連遺伝子検査では、多くの施設でLDTを使用しているが、このような外部精度評価を通じてISキット・IVDキットとの違いを正確に把握しておくことが重要であると考えられる。一方で、検出感度付近の施設間差が大きく、その原因究明と対策が今後の取り組むべき課題である。

白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の取り組みは、日本医療検査科学会の助成金や委員会活動経費を用いて、遺伝子・プロテオミクス技術委員会のワーキンググループ活動として実施してきた。その結果として外部精度評価の方法論は確立できおり、今後白血病関連遺伝子検査の外部精度評価を定期的実施するための体制整備と費用の確保が必要と考える。

## A. 研究目的

ゲノム医療の実用化に向けた体制整備が求められているなかで検体検査の品質・精度の確保に関連した法改正も行われ、遺伝子関連検査の外部精度評価の実施が求められている。本研究では、白血病関連遺伝子検査を例にとり、我が国における遺伝子関連検査の外部精度評価の現状と課題を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

日本医療検査科学会は、1961年にオートアナライザー研究会として設立された。1965年臨床化学自動分析研究会、1969年臨床検査自動化研究会、1981年日本臨床検査自動化学会、2013年一般社団法人日本臨床検査自動化学会を経て、2020年一般社団法人日本医療検査科学会となって現在に至っている。2000年に日本臨床検査自動化学会に遺伝子検査技術委員会が設置された。同委員会の活動として、日本臨床検査自動化学会茂手木研究助成金を用いて2002年に最初の造血器腫瘍核酸増幅同定検査の外部精度評価を Major *BCR-ABL1* mRNA 定性検査をルーチンで実施している23施設（大学病院17施設、一般病院2施設、検査センター4施設）を対象に実施した。以来、白血病培養細胞の凍結乾燥試料を用いて白血病関連遺伝子検査の施設間差の現状把握とその是正に向けて外部精度評価を実施してきた。本研究において、日本医療検査科学会の遺伝子・プロテオミクス技術委員会の白血病関連遺伝子検査ワーキンググループでのこれまでの取り組みを踏まえて白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の現状と課題について検討した。

## C. 研究結果

表1に *BCR-ABL1* mRNA 定量検査の標準化と日本医療検査科学会の遺伝子・プロテオミクス技術委員会の活動ならびに関連する動向の経緯を示した。遺伝子関連検査では、白血病の微小残存病変（MRD）の検出に対して RT-PCR 法の有用性が確立され、いち早く造血器腫瘍核酸増幅同定検査が保険収載された。

2002年11月第1回外部精度評価を参加23施設（表2）で培養細胞（K562とHL60）の凍結乾燥品を用いて Major *BCR-ABL1* mRNA 定性検査について実施した。その結果、同検査に用いる RT-PCR 法には多くの分析誤差要因が存在することが明らかとなった。さらに、MRD の検出に加え治療効果モニタリングの必要性和リアルタイム PCR 法の普及から PCR 定量検査が多く利用されるようになり、定性検査に加えて定量検査での施設間差の調査が必要となった。

表1 *BCR-ABL1* mRNA定量検査の標準化と遺伝子・プロテオミクス技術委員会の活動ならびに関連する動向

| 年       | 自動化学会/その他標準化の動向  |
|---------|--|
| 1989    | RT-PCR法 (MRDの検出)   |
| 1990年代～ | <i>BCR-ABL1</i> のRT-PCR法による検出が普及   |
| 1998    | 造血器腫瘍核酸増幅同定検査 (6ヶ月に1回) 2,000点  |
| 1999    | リアルタイムPCR法 (MRDの検出+治療効果モニタリング)   |
| 2001    | ABLキナーゼ阻害剤(Imatinib)による分子標的治療  |
| 2002    | 11月 第1回外部精度評価(定性)  |
| 2003    | ・IRIS試験(論文報告)<br>・RQ-PCR標準化(EAC program)   |
| 2004    | 11月 白血病関連遺伝子検査アンケート調査  |
| 2005    | 10月 NIHコンセンサス会議 (ISの提唱)  |
| 2006    | Conversion Factor(CF)の概念 推奨される内部コントロール遺伝子(ABL, BCR, GUS)   |
| 2007    | ・ <i>WT1</i> mRNA定量が保険承認 (1ヵ月に1回) 2,000点<br>3月 第2回外部精度評価(定性・定量)  |
| 2008    | ・Major <i>BCR-ABL1</i> mRNA核酸増幅精密測定(TMA法)が保険承認1,200点<br>・8月 第3回外部精度評価(予備調査)  |
| 2009    | ・次世代チロシンキナーゼ阻害剤<br>・ELNの判定規準   |
| 2010    | ・WHO 一次標準物質<br>・血液細胞核酸増幅同定検査 (2ヶ月に1回) 2,000点<br>・5月BML CF取得、10月SRL CF取得  |
| 2011    | ・6月千葉大学CF取得、二次標準物質(市販品)  |
| 2012    | ・造血器腫瘍遺伝子検査 (1ヵ月に1回) 2,100点<br>・Major <i>BCR-ABL1</i> mRNA (TMA法) 1,200点<br>・ <i>WT1</i> mRNA定量 2,520点,<br>・染色体検査2,730点<br>・免疫関連遺伝子再構成2,520点 |
| 2013    | 9月 第3回外部精度評価( <i>BCR-ABL1</i> 定量)  |
| 2014    | ・Digital RT-PCRの利用<br>・According to Stop Imatinib (A-STIM) study   |
| 2015    | ・Major <i>BCR-ABL1</i> mRNA(IS) 2,520点<br>・4月 アンケート調査  |
| 2016    | 4月 第4回外部精度評価( <i>BCR-ABL1</i> 定量)  |
| 2018    | 9月 第5回外部精度評価(4項目定量・定性)   |

表2 外部精度評価参加施設一覧

| 第1回           | 第2回            | 第3回           | 第4回            | 第5回                |
|---------------|----------------|---------------|----------------|--------------------|
| 北海道大学医学部附属病院  | 北海道大学病院        | 北海道大学病院       | 北海道大学病院        | 北海道大学病院            |
| 東北大学医学部附属病院   | 札幌医科大学医学部附属病院  | 札幌医科大学医学部附属病院 | 札幌医科大学医学部附属病院  | 札幌医科大学医学部附属病院      |
| 山形大学医学部附属病院   | 岡山大学医学部歯学部附属病院 | 札幌医科大学附属病院    | 群馬大学医学部附属病院    | 市立札幌病院             |
| 新潟大学医学部附属病院   | 青森県立中央病院       | 獨協医科大学病院      | 獨協医科大学病院       | 東北大学医学部附属病院        |
| 自治医科大学附属病院    | 新潟大学医学部総合病院    | 群馬大学医学部附属病院   | 筑波大学附属病院       | 獨協医科大学病院           |
| 筑波大学医学部附属病院   | 新潟大学医学部歯学部付属病院 | 東京大学医学部附属病院   | 千葉大学医学部附属病院    | 筑波大学附属病院           |
| 千葉大学医学部附属病院   | 新潟大学医学部歯学部付属病院 | 東京大学医学部附属病院   | 千葉大学医学部附属病院    | 千葉大学医学部附属病院        |
| 榊エスアールエル      | 山口大学医学部附属病院    | 榊三菱化学メディエンス   | 榊ビー・エム・エル      | 榊ビー・エム・エル          |
| 榊ビー・エム・エル     | 筑波大学附属病院       | 東京大学医学部附属病院   | 榊S1メディエンス      | 榊S1メディエンス          |
| 榊三菱化学ビーシーエル   | 九州大学病院         | 東京大学医学部附属病院   | 国立がん研究センター中央病院 | 榊S1メディエンス          |
| 榊大塚東京アッセイ研究所  | 埼玉県立がんセンター     | 東京大学医学部附属病院   | 東京大学医学部附属病院    | 榊エスアールエル           |
| 東京医科歯科大学      | 榊ビー・エム・エル      | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 国立がん研究センター中央病院     |
| 東京大学医学部附属病院   | 千葉大学医学部附属病院    | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 慶應義塾大学病院           |
| 北里大学病院        | 榊三菱化学ビーシーエル    | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 横浜市立大学附属市民総合医療センター |
| 東海大学医学部附属病院   | 東京医科歯科大学       | 東京大学医学部附属病院   | 榊ビー・エム・エル      | 名古屋大学医学部附属病院       |
| 信州大学医学部附属病院   | 東京大学医学部附属病院    | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 名古屋大学医学部附属病院       |
| 信州大学医学部附属病院   | 慶應義塾大学病院       | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 奈良県立医科大学付属病院       |
| 名古屋大学医学部附属病院  | 榊エスアールエル       | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 京都大学医学部附属病院        |
| 三重大学医学部附属病院   | 神奈川県立がんセンター    | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 京都大学医学部附属病院        |
| 天理よろづ相談所病院    | 北里大学病院         | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 天理よろづ相談所医学研究所      |
| 倉敷中央病院        | 静岡県立総合病院       | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 奈良県立医科大学附属病院       |
| 広島大学医学部附属病院   | 信州大学医学部附属病院    | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 大阪大学医学部附属病院        |
| 長崎大学医学部附属病院   | 金沢大学           | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       | 長崎大学病院             |
| 宮崎医科大学医学部附属病院 | 名古屋大学医学部附属病院   | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       |                    |
|               | 三重大学医学部附属病院    | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       |                    |
|               | 京都大学医学部附属病院    | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       |                    |
|               | 天理よろづ相談所医学研究所  | 東京大学医学部附属病院   | 榊エスアールエル       |                    |

2007年3月第2回外部精度評価を参加31施設(表2)でPCR定量検査を含めた白血病関連遺伝子検査の施設間差の把握を目的に実施した。新たに培養細胞(K562:BCR-ABL1 b3a2 type と NB4:PML-RARA bcr1 type)の凍結乾燥品試料を作製し、さらにcDNA試料も用いて定量法の誤差要因の大きさを調べた。その結果、測定法の標準化には報告の際の補正式の統一化と標準物質の使用が必要であるとの結論が得られた。

分子標的治療薬の治療効果判定については国際的な大規模多施設臨床試験が行われ、その際、BCR-ABL1 定量検査の国際的な標準化が必要となった。リアルタイムPCR法によるPCR定量検査は、5 log に渡る測定レンジを持ち高感度に測定できることから分子標的治療薬による治療効果判定のモニタリングに欠かせない検査法となった。しかしながら、施設によりコピー数算出の際のDNA濃度の求め方、内部(内在性)コントロール遺伝子、報告値の単位や算出方法に違いがあるため報告値が大きく異なることが問題となる。報告値の違いを解消するために、唯一Major BCR-ABL1 mRNA 定量検査において国際標準化が行われている。はじめは、リファレンスラボに検体を送り補正係数であるConversion Factor (CF)を取得して測定値を合わせる方法が採られていた。2010年に国際標準化のため、WHOが一次標準物質として2種類のcell line (K562 と HL60)の混合濃度系列による凍結乾燥品パネルを作製した。このWHO一次標準物質には、推奨される3つの内部コントロール遺伝子別に表示値が%BCR-ABL1として付けられ、これを用いて測定値を国際標準値(International Scale :IS)へ変換する。

遺伝子・プロテオミクス技術委員会では、WHOの一次標準物質と同様に培養細胞の凍結乾燥品を作製し、日本でCFを取得していた3施設で値付けを行い、自家製の二次標準物質として、市販品の二次標準物質と同じ計算法で参考変換係数を求める第3回外部精度評価を2013年9月に参加12施設(表2)で行った。参加施設へ参考IS変換係数を報告したが、国内のIS未報告施設では、IS報告の導入により施設間差を半減できる可能性があることが示された。

凍結乾燥品のWHO一次標準物質は数に限りがあるため、二次標準物質の製造機関(メーカー)にのみ供給され、一般的な施設では使用できない。そこで、常用の凍結乾燥品の二次標準物質を作製し、2016年に国際的なリファレンスラボ44施設を対象

としてその有用性の調査が行われた。この調査に我が国からの参加施設はなく、我が国においても同様の凍結乾燥品を用いた二次標準物質の作製が急務とされた。そのような中で、国内では WHO 一次標準物質に基づく国際標準化 (IS) キットが保険収載された [シスメックス (S 社) と大塚製薬 (O 社)]。

遺伝子・プロテオミクス技術委員会では、二次標準物質を有する IS キットによる施設間差是正の効果を調べるため、第 3 回と同じロットの試料を用いて、IS キット (S 社 4 施設、O 社 4 施設) を含めた第 4 回外部精度評価を 2016 年 4 月に参加 14 施設 (表 2) で実施した。その結果、IS キットの使用により、施設間差が前回の第 3 回外部精度管理に比べ半減していた。また、自家調整試薬法 (LDT) 使用施設でも二次標準物質の使用により IS キットでの施設間差に近づけられる可能性が示唆された。

2018 年 8 月第 5 回外部精度評価では、Major *BCR-ABL1* mRNA 定量検査の他に minor *BCR-ABL1*, *PML-RARA*, *WT1* mRNA 定量と要望のあった定性検査を加えた調査を参加 20 施設 (表 2) で実施した。これらの測定項目は、IS キット、LDT、保険収載 (IVD) キットと多彩であり、白血病関連遺伝子検査の施設間差を検討した。*BCR-ABL1* と *PML-RARA* については、検出感度付近から測定レンジを広くとり Log Reduction でも比較し報告形式によらずに評価できるようにした。

Major *BCR-ABL1* mRNA 定量検査については、IS キットが市販されたことにより一定の施設間差を維持できるようになったが、LDT を使用する施設では大きな施設間差を示していた。LDT については、市販の二次標準物質を用いて IS で報告することが可能であるが、実施している施設は見られなかった。LDT の Major *BCR-ABL1*, *PML-RARA* mRNA 検査において、特に検出感度付近での施設間差が大きいことが課題であるが、検出感度の正確な把握にはインクジェット技術を利用して反応ウェルプレートへ遺伝子を 1 コピーから正確に注入する技術 (DNA 標準プレート) を開発しているリコー社の技術を利用することを検討している。

*WT1* mRNA 定量検査については、IVD キットが広く使用され施設間差が少なくなっていた。LDT を使用している施設では、IVD キットとの違いを正確に把握しておくことが重要と考える。*WT1* mRNA 定量検査の国際標準化については、ヨーロッパのキアゲン (旧 Ipsogen) 社キットと日本の IVD キットの両者が併存しており、特に標準化の取り組みは行われていない。

#### D. まとめと考察

2002 年に開始された 5 回にわたる日本医療検査科学会の遺伝子・プロテオミクス技術委員会白血病関連遺伝子検査ワーキンググループにおける外部精度評価の取り組みより、WHO の一次標準物質としても利用されている白血病培養細胞の凍結乾燥品は RNA 解析用試料として安定性に優れ、実際の血液サンプルの様に RNA 抽出過程から調べることができ外部精度評価用の試料として実用性が高いことが示された。加えて、培養細胞の凍結乾燥試料は培養細胞の種類 (Kasumi-1, THP-1, KOCL-48 など) を変えることにより、多種類で低頻度の融合遺伝子に対応した試料を比較的容易に作製することが可能であり、今後は標準化の進んでいない測定項目の標準物質としても利用可能と考えられる。白血病関連遺伝子検査においても標準化の進んだ IS キット・IVD キ

ットでは、臨床化学検査で行われているように SDI 評価が可能である。また、Log Reduction を用いた比較は補正方法の異なる LDT を含めた評価に利用できものと考えられた。白血病関連遺伝子検査では LDT を使用している施設があるが、このような外部精度評価を通じて IS キット・IVD キットとの違いを正確に把握しておくことが重要と思われる。

第 5 回外部精度評価において、改めて検出感度付近の施設間差が大きいことが明らかとなったことを受けて、第 6 回の外部精度評価として、qPCR 法の検出限界値 (LOD) /定量限界値 (LOQ) を正確に求めることのできる調査が計画されている。リコー社では、インクジェット技術を利用して反応ウェルプレートへ遺伝子を 1 コピーから正確に注入する技術を開発している (DNA 標準プレート)。現在、この DNA 標準プレートと各施設での健常者 RNA 抽出液を用いて、各施設における LOD/LOQ を算出する第 6 回外部精度評価の実施を検討している。

日本医療検査科学会の遺伝子・プロテオミクス技術委員会白血病関連遺伝子検査ワーキンググループでは、自家製調製の培養細胞凍結乾燥試料を用いてこれまで 5 回の外部精度評価を実施してその有用性を実証してきたが、その際の外部精度評価参加施設のアンケート調査からも継続的な外部精度評価の実施と体制整備が望まれている。白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の取り組みは、日本医療検査科学会の助成金や委員会活動経費を用いて、遺伝子・プロテオミクス技術委員会のワーキンググループ活動として実施されてきた。その結果、白血病関連遺伝子検査の外部精度評価の方法論は確立できたものとする。

今後外部精度評価の取り組みを継続し、毎年定期的には実施するためには、本研究報告で提案されている遺伝子関連・染色体検査版の共通外部精度評価事業 (national external quality assessment: NEQAS) 全体情報収集共有システム等と連携した体制整備と IVD 製造企業、コンパニオン治療薬企業、衛生検査所と治験ラボなどの企業受益者、検査を実施する医療機関や衛生検査所などの参加受益者の受益者負担による費用の確保が必要と考える。遺伝子検査外部精度管理の専任機能を有する特定非営利法人 (NPO 法人) の設立、ならびに NPO 法人を軸とする体外診断薬・機器開発・製造・販売メーカーを含む企業コンソーシアムを立ち上げ、将来的には受益者負担による自走可能な恒久的組織に移行することが望まれる。