

DLBCL における *CD79B*^{Y196}・*MYD88*^{L265P} 遺伝子変異のアレル特異的 PCR 法による検出

©木曾 那由¹⁾、國宗 勇希²⁾、中原 由紀子²⁾、岡山 直子²⁾、児玉 雅季²⁾、熊野 由美子²⁾、藤井 智大³⁾、西岡 光昭²⁾
山口大学大学院医学系研究科¹⁾、山口大学医学部附属病院²⁾、山口大学医学部³⁾

背景・目的:びまん性大細胞型 B リンパ腫(diffuse large B-cell lymphoma:DLBCL)は最も発生頻度が高く、全リンパ腫の 30-40%を占めている。DLBCL は遺伝子変異により、いくつかのサブグループに分類できることが明らかになった。特に予後不良因子として同定された *CD79B* と *MYD88* 遺伝子変異は予後予測や治療法の選択のために重要であり、臨床的意義が高い。本研究は、*CD79B* と *MYD88* 遺伝子変異のスクリーニング法として、アレル特異的 PCR (AS-PCR)法を開発し是非を検証した。

方法: *CD79B*^{Y196} もしくは *MYD88*^{L265P} 遺伝子変異を組み込んだプラスミド DNA を対象として基礎的条件の決定を行い、同様の検体で変異検出感度についても検討した。さらに本院で DLBCL と診断された症例(4 件)のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 標本を用いて検証を行った。

DNA 抽出は Maxwell® RSC FFPE Plus DNA Kit (Promega) を用いた。プラスミド DNA 及び FFPE 抽出後 DNA をダイレクトシーケンス法(3500 Series Genetic Analyzers)を用いて行い、並行して AS-PCR との変異検出感度比較をした。

結果: PCR の最適条件は *CD79B*^{Y196} 変異(アニーリング温度 66℃、35 サイクル)、*MYD88*^{L265P} 変異(アニーリング温度 64℃、35 サイクル)であった。AS-PCR において *CD79B*^{Y196} 変異は変異率 10%、*MYD88*^{L265P} 変異は 5%が検出感度であるのに対しシーケンスは約 20%であった。患者検体 4 例の FFPE 抽出 DNA においても両変異ともに AS-PCR で変異を検出可能であった。

考察:本結果より AS-PCR はシーケンスよりも高感度な変異検出法であり、FFPE 抽出 DNA においても検出可能であった。さらに AS-PCR は通常の PCR と同様の手順のみで行うことが可能であり、シーケンスと比較して簡便かつ低コストというメリットもある。

結語:本研究では、DLBCL 患者の *CD79B*^{Y196} 変異と *MYD88*^{L265P} 変異検出のスクリーニング法として AS-PCR 法が有用であることを示した。

“連絡先—0836-85-3753”

OSNA 法における遺伝子増幅検出装置 RD-200 の基礎的検討

◎村上 晶子¹⁾、谷口 裕美¹⁾、岡本 愛¹⁾、森本 麻里¹⁾、西村 真智子¹⁾、近藤 瑠璃¹⁾、三河 芽生¹⁾、高須賀 康宣¹⁾
愛媛大学医学部附属病院 検査部¹⁾

【はじめに】OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) 法はリンパ節の可溶化から遺伝子増幅反応を1段階で行い、リンパ節中のサイトケラチン(CK)19mRNAを増幅し検出することで、リンパ節へのがん転移の判定補助を迅速に行うことが可能な方法であり、術中診断として用いられている。今回、測定機器更新目的で、RD-200の基礎的検討を行ったので報告する。

【方法】対象：当院検査部にCK19mRNA測定依頼のあった37検体を用いた。内訳は、2021年5月～12月のリンパ節可溶化液の-80℃保存11検体と、2021年12月～2022年2月の依頼日当日の26検体(ルーチン検体)であった。機器・試薬・リンパ節可溶化液の作成方法：[新規検討] 遺伝子増幅検出装置 RD-200・リノアンプ CK19・リンパ節前処理装置 RP-10、[従来] 遺伝子増幅検出装置 RD-100i・リノアンプ BC・用手にて作成した。(機器・試薬は全てシスメックス株式会社) 【結果】①同時再現性：陰性および陽性2濃度の標準液を用いて4回同時測定した。陰性標準液はすべて陰性、陽性2濃度の標準液では CV

1.84%、1.32%であった。②日差再現性：2濃度のコントロールを4日間測定し CV 3.87%であった。③判定一致率：凍結保存検体は81.8% (9/11)、ルーチン検体は92.3%

(24/26)であった。④判定不一致4検体の詳細：RD-100i:(+)/RD-200:(-)の2検体は増幅反応阻害作用の強いカットオフ値付近の検体である可能性が考えられた。RD-100i:(+)/RD-200:(-)の2検体は、カットオフ値付近の測定再現性による判定不一致の可能性が考えられた。⑤検体到着から結果報告までの検査所要時間の平均はRD-100iでは43.5分、RD-200は28.5分であった。

【まとめ】OSNA法を測定原理とするRD-200の基礎的検討を行った結果、RD-100iとの判定一致率は良好であった。RD-100iで(+I)判定の増幅反応阻害検体については、RD-200の試薬改良によりその影響が小さくなり、陰性か陽性かの明確な結果判定が可能となった。また測定時間の短縮によって検査所要時間も短縮され、より迅速な結果報告が可能となり、術中検査であるOSNA法においてRD-200は有用であると考えられた。 連絡先 089-960-5598

当院でのインフルエンザウイルスにおけるバロキサビル耐性変異ウイルスの調査

real-time PCR を用いた PA I38 耐性変異ウイルス検出の検討

◎上杉 里枝¹⁾、仲井 富久江¹⁾、石松 昌己¹⁾、岡崎 希美恵¹⁾、大石 智洋²⁾、近藤 英生³⁾
川崎医科大学附属病院 中央検査部¹⁾、川崎医科大学附属病院 臨床感染症科²⁾、川崎医科大学附属病院 輸血部³⁾

【目的】インフルエンザウイルス（Flu）は、今シーズン COVID-19 感染症の減少と共に、再度、感染者を認めており、COVID-19 同様に院内での拡大の恐れがある Flu に対し、その防止策を立てることは非常に重要である。抗インフルエンザ薬のバロキサビルは、インフルエンザの予防の適応も取得し、特に本剤は1回の内服のみというコンプライアンスの良さからも、実際に、当院においても Flu の院内発生時に拡大予防としての使用を考慮している。しかし、本剤については、発売後に、Flu の PA 蛋白質の 38 番目のアミノ酸が変異（I38T/M/F）している耐性ウイルスの検出が報告されており、注視する必要がある。そこで、本剤を院内発生時の拡大予防に使用する際の参考とするため、当院において発生した Flu に対し、バロキサビル耐性変異ウイルス検出の有無を調査した。

【方法】2022 年 10 月から 2023 年 5 月までに、当院において鼻咽頭スワブによる採取後の検体を用い、インフルエンザ抗原定量検査「ルミパルス® Flu-A&B」（富士レビオ株式会社）を施行し、Flu 陽性と判定された検体につき、まず

は Flu のタイプを検出する real-time PCR を施行した。その後、既報に基づき、Real-time PCR 法を用い、薬剤耐性変異（I38T）部位を検出するプライマーおよび TaqMan MGB プローブを設定した。

【結果】インフルエンザ抗原定量検査にて陽性と判定された 26 検体につき、Flu のタイプを検出する real-time PCR を施行したところ、2 検体は陰性であり、陽性 24 検体は全て Flu A 型で、うち H3N2 が 23 株、H1N1 が 1 株であった。この 24 検体に対し、バロキサビル耐性変異（I38T）部位を検出する real-time PCR を施行したところ、I38T 変異のある株は検出されなかった。

【考察】今回の検討ではバロキサビル耐性変異ウイルスは検出されなかったが、昨今の感染対策緩和によるインフルエンザの再度の流行拡大が懸念される状況下で、本剤の使用が今後増加する可能性が高く、本研究のような病院での臨床検体における調査は、院内や地域での状況を知り、インフルエンザ対策を進める上での貴重な情報になり、有用であると考えられる。 086-462-1111（内線 23113）