

## 遺伝子解析における細胞診材料の有用性

◎佐々木 伸也<sup>1)</sup>

地方独立行政法人 堺市立病院機構 堺市立総合医療センター<sup>1)</sup>

近年、がん遺伝子情報の急速な発展や分子標的薬の開発の進歩により、病理検体を用いた遺伝子検査が急速に広がりつつある。病理組織検体の解析に用いられる検体はホルマリン固定パラフィン切片（以下 FFPE）が多いが、腫瘍細胞の含有率が低い症例や、DNA 採取が困難な症例には細胞診材料が有用な場合がある。今回、細胞診材料からの遺伝子解析が有用であった 2 症例を報告する。

症例 1：60 歳代男性、200X 年に肺癌と診断され、EGFR 解析で 19del を認め、TKI 療法が開始された。4 年後に増悪がみられ右肋骨の転移巣から EGFR の T790M 検出を目的に生検が行われた。骨組織を含む生検材料では標本作成に脱灰操作が必要であり、脱灰操作により DNA が損傷する可能性が考えられたため、捺印細胞診と細胞保存液に検体を入れボルテックスで細胞を剥がし、遠心して集細胞を施行した細胞診標本作製した。生検材料、細胞診材料から EGFR 解析を行った。結果 1：ボルテックスで細胞を剥がし、遠心して集細胞を施行した細胞診標本のみ解析可能であった。

症例 2：70 歳代男性、200X 年に肺腺癌（癌性胸膜炎、Th1 椎体転移）cStage IV と診断され、胸水セルブロックでの EGFR 解析で 19del を認め、TKI 療法が開始された。200X+1 年、胸水の増加にて EGFR T790M 検出を目的に胸水細胞診が施行された。多数の炎症細胞に混じり、極少数の癌細胞を認めた。炎症細胞が多く腫瘍含有率が低い検体なので、比重の異なる細胞固定液を用いて炎症細胞を除去し腫瘍含有率を上げて EGFR 解析を行った。結果 2：19del 変異を認めたので、胸水中の腫瘍細胞の EGFR 変異を検出できた。

考察：FFPE で DNA 抽出が困難な症例や、組織が採取できない炎症細胞の多い体腔液では、採取法に工夫をすれば、細胞診材料を用いることが遺伝子解析に有用と考えられた。

連絡先：堺市立総合医療センター 臨床検査技術科  
電話番号：072-272-1199

## Digital PCR を用いた *MYD88* L265P 変異検出法の確立

◎物部 真恵<sup>1)</sup>、姫野 真由子<sup>1)</sup>、張 允禧<sup>1)</sup>、白石 祐美<sup>1)</sup>、丸岡 隼人<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】*MYD88* L265P 変異は、原発性マクログロブリン血症 (WM) の 90%以上に認められる遺伝子変異で、IgM 型 M 蛋白血症を伴う他の B 細胞性腫瘍、特に形質細胞への分化傾向を示す marginal zone lymphoma (MZL) での陽性率が極めて低いことから両者の鑑別に有用である。当院では、細胞分離による B 細胞の濃縮後、ダイレクトシーケンスにて変異の検出を実施しているが、手技が煩雑な上に、検出可能な腫瘍細胞比率は 0.5%程度が限度であった。近年、核酸の検出と定量に対する新しいアプローチ法として Digital PCR が普及してきた。従来のリアルタイム定量 PCR に比べて、標準曲線を必要としない絶対定量や希少対立遺伝子の検出が可能である。今回、我々は Digital PCR を用いた *MYD88* L265P 変異検出法を確立したので報告する。

【対象】2012 年 4 月～2017 年 6 月の期間において全例 *MYD88* L265P 変異解析済の WM 患者 16 例の骨髓血、MZL 患者 16 例の組織検体を対象とした。陰性コントロー

ル (野生型) として、健常人末梢血を用いた。

【方法】DNA 抽出: 試薬は Maxwell RSC Whole Blood DNA Kit (Promega)、機器は Maxwell RSC を使用した。Digital PCR: 試薬は TaqMan<sup>TM</sup> SNP Genotyping Assays (Thermo Fisher Scientific) を使用した。また、WM 患者骨髓血から抽出した DNA を健常人末梢血 DNA で希釈し、変異 DNA 比率が 5%、1%、0.5%、0.25%、0.1% のサンプルを調整後、検出感度を算出した。陰性コントロールは同条件で測定した。

【結果】変異 DNA 比率が 5% では、 $4.667 \pm 0.626$  (%), 0.5% では  $0.543 \pm 0.160$  (%), 0.1% では  $0.177 \pm 0.068$  (%) であり、陰性コントロールは  $0.005 \pm 0.009$  (%) であることから、感度は 0.1% とした。また、*MYD88* L265P 変異解析済検体との一致率は 100% であった。【結語】Digital PCR を用いた *MYD88* L265P 変異検出法は、初発時に腫瘍細胞比率の低い WM 患者検体においても、簡便かつ高感度に検出が可能であった。連絡先: 078-302-4321 (内線: 3540)

## 骨髄血・リンパ節と髄液で軽鎖制限の異なる細胞集団を認めた悪性リンパ腫の一例

◎白石 祐美<sup>1)</sup>、姫野 真由子<sup>1)</sup>、張 允禧<sup>1)</sup>、物部 真恵<sup>1)</sup>、丸岡 隼人<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】悪性リンパ腫のフローサイトメトリー (FCM) 検査において、同一患者であっても解析対象の組織によって、表現型が異なる腫瘍細胞集団を認める事例を稀に経験する。今回、骨髄血、リンパ節とは軽鎖制限が異なる細胞集団を髄液中に認めたが、遺伝子再構成検査によって同一クローンであると判明した症例を経験したので報告する。【症例】60歳代女性。突然の後頸部痛および複視が出現し、その後頭痛、嘔吐、血圧の上昇を認めた。3週間経過後も軽快しないため、当院脳神経内科を受診。血液検査でLDH、sIL-2Rの著明な上昇と、末梢血血液像で異常リンパ球、CTで全身リンパ節腫大を認め、悪性リンパ腫疑いのため血液内科に転科した。後にリンパ節生検により、High-grade B-cell lymphoma with MYC and BCL2 and BCL6 rearrangements) と診断された。【方法】骨髄血、髄液、リンパ節検体でFCMと免疫関連遺伝子再構成検査を実施した。次いで、ダイレクトシーケンス法により遺伝子配列を確認した。【結果】FCMでは、骨髄血中にCD10+CD20+CD21-

CD45+Kappa-Lambda+を示す細胞集団を全体の53%に認めた。また、リンパ節検体においても同様の表現型を示す細胞集団を明確に認めた。一方で、髄液中にはCD10+CD20+CD21-CD45+Kappa+Lambda-を示す細胞集団を33%に認め、他の検体とは軽鎖制限に違いが見られた。遺伝子検査では、いずれの検体もIgH再構成は陰性であったが、IgK(B) (V<sub>κ</sub>-Kde and intronRSS-Kde) とIgL (V<sub>λ</sub>-J<sub>λ</sub>) の再構成が陽性となった。ダイレクトシーケンス法による配列解析では、いずれの検体も同一の配列が認められた。【まとめ】FCMにおいて骨髄血、リンパ節と軽鎖制限が異なる細胞集団を髄液中に認めたが、シーケンス解析により、同一クローンの腫瘍細胞が存在する可能性が高いことが判明した。FCMでの微小残存病変の検査時に、初回検査時の腫瘍細胞の表現型にのみ着目すると、このような事例では腫瘍細胞を見落とししてしまうおそれがあるので、注意が必要である。連絡先 078-302-4321(内線 3540)