



千葉県臨床検査技師会
病理／細胞診検査研究班合同研修会

遺伝子検査の技術と自動化について ～i-densyのご紹介～

アークレイマーケティング株式会社
学術推進チーム 横井 聖

本日の内容



- 遺伝子とは
- 遺伝子検査の実用例 EGFR、RAS
- 遺伝子の分析・原理について
- 遺伝子検査の流れと注意点
- i-densyを用いた遺伝子検査のご紹介

本日の内容



- **遺伝子とは**
- 遺伝子検査の実用例 EGFR、RAS
- 遺伝子の分析・原理について
- 遺伝子検査の流れと注意点
- i-densyを用いた遺伝子検査のご紹介

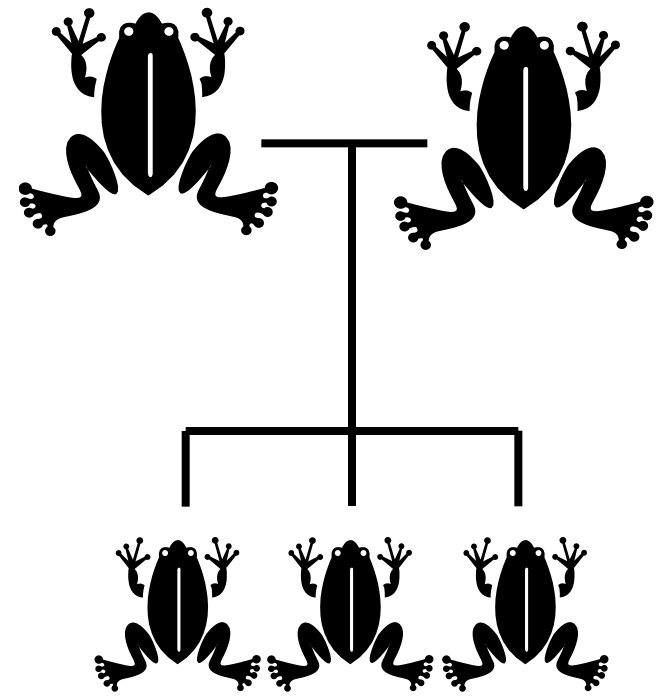
遺伝とは、なんでしょう？



生殖により両親の**形質**（性質・体質）が子に伝わる現象。

生物の親から子へと伝えられる**形質**（性質・体質）を決定する因子
→**ゲノム、遺伝子**

* **形質** = 生物の「親から子に伝わる形、性質」



カエルの子はカエル

遺伝情報の例



遺伝子	Aさん	Bさん
血液型	O型	A型
眉毛	太い	細い
目	大きい	小さい
鼻	高い	低い
あご	ふつう	しゃくれ
肌の色	黒い	白い

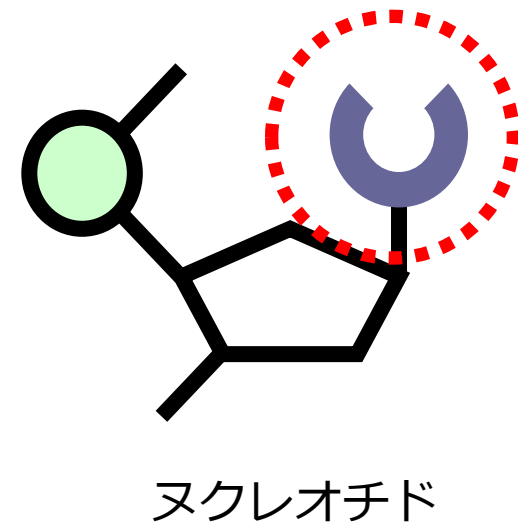
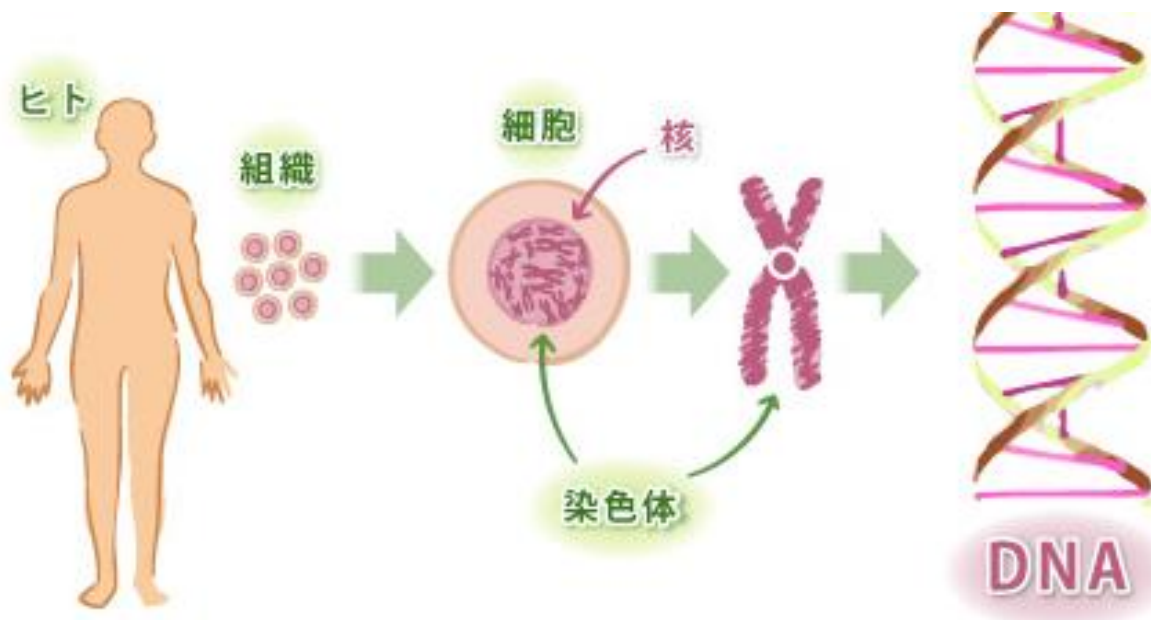
では、その実体は？



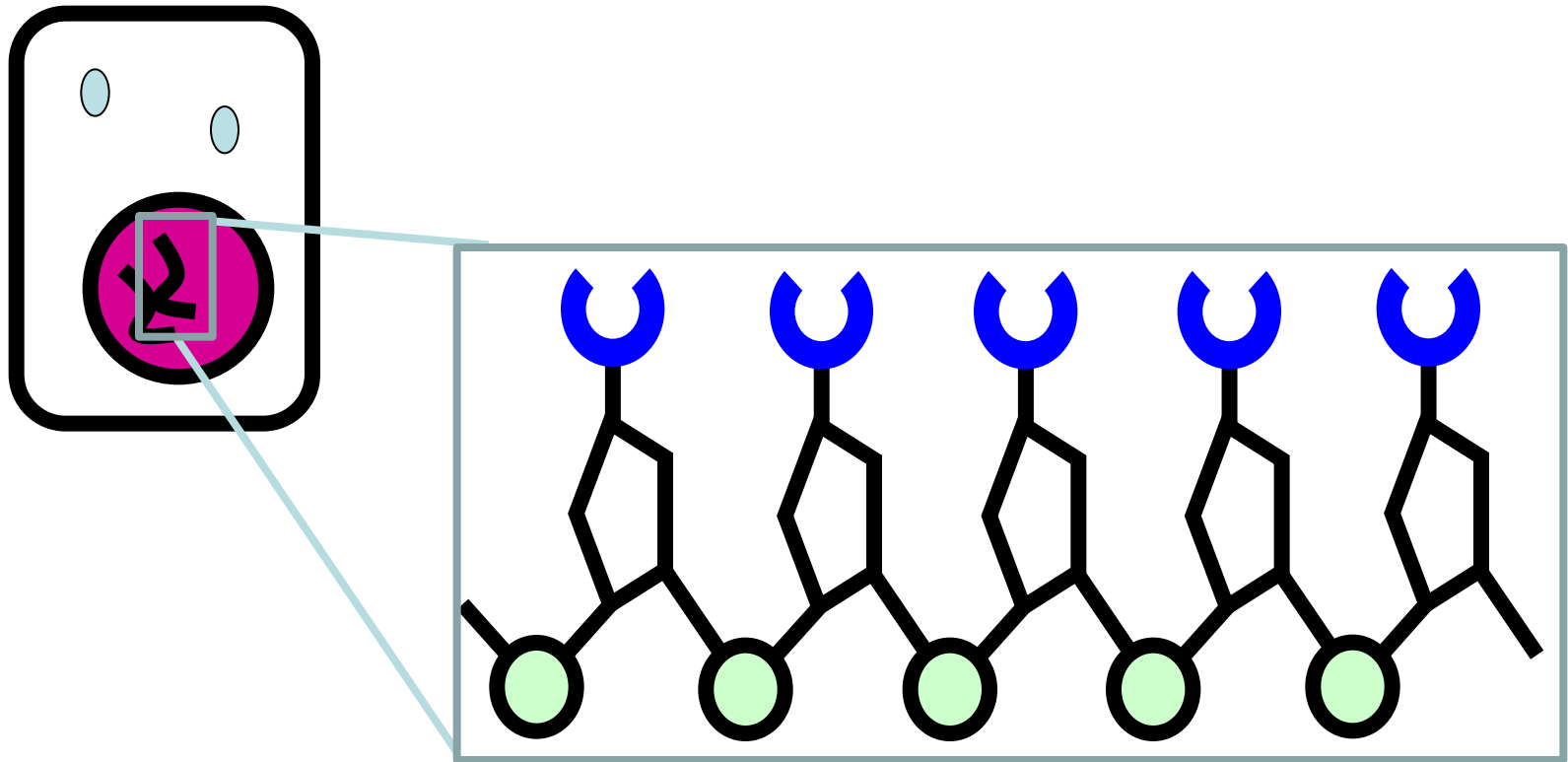
「遺伝子」とは遺伝現象を説明するための考え方。

では、その実体は？

DNA (デオキシリボ核酸)



DNAは基本単位が連なっている

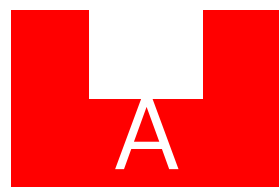
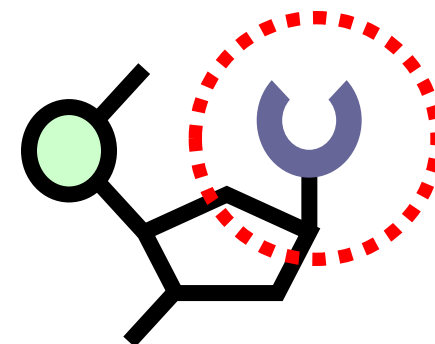


遺伝情報は塩基で決定

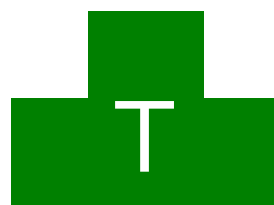
arkray

アルファベットの組合せで単語を作るように
遺伝情報を決定。

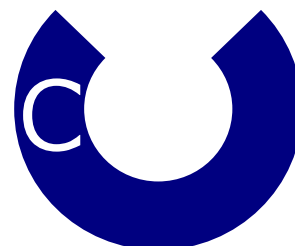
この並びを**塩基配列 (シーケンス)**とよぶ。



アデニン
(A)



チミン
(T)



シトシン
(C)

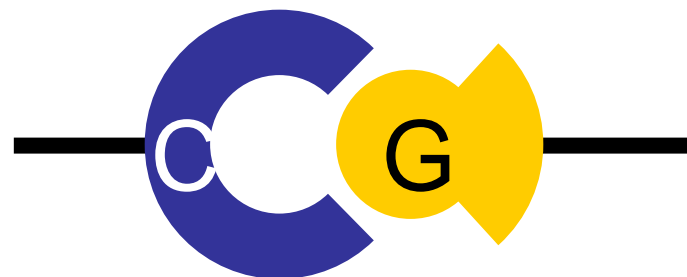
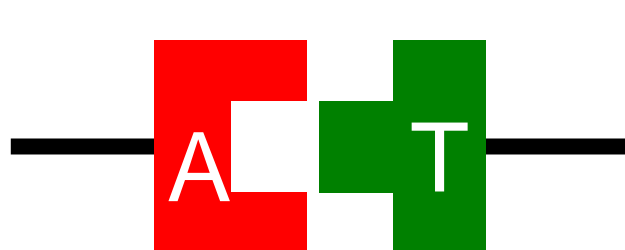
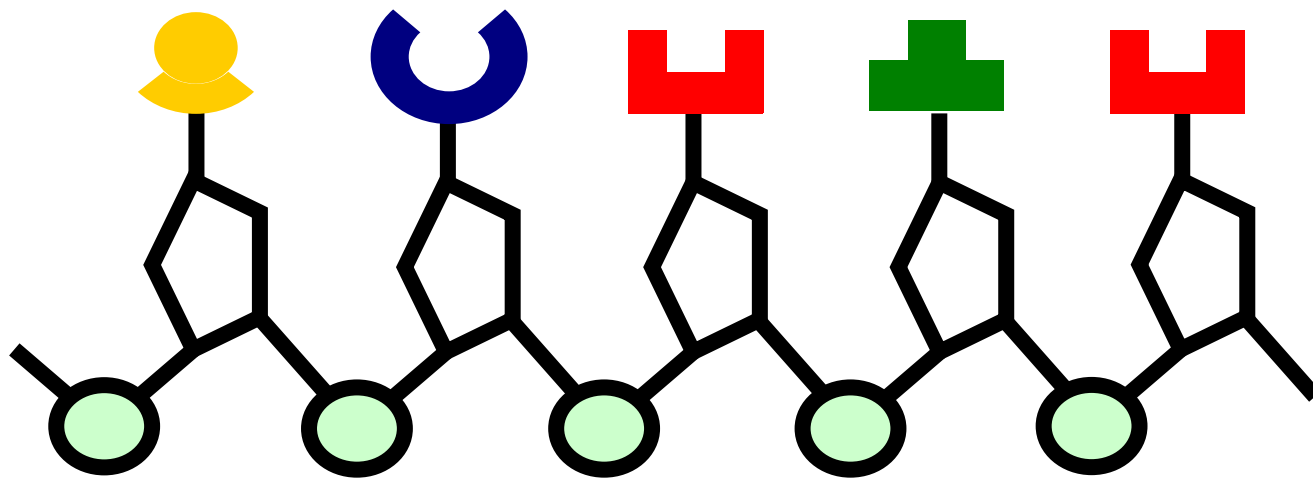


グアニン
(G)

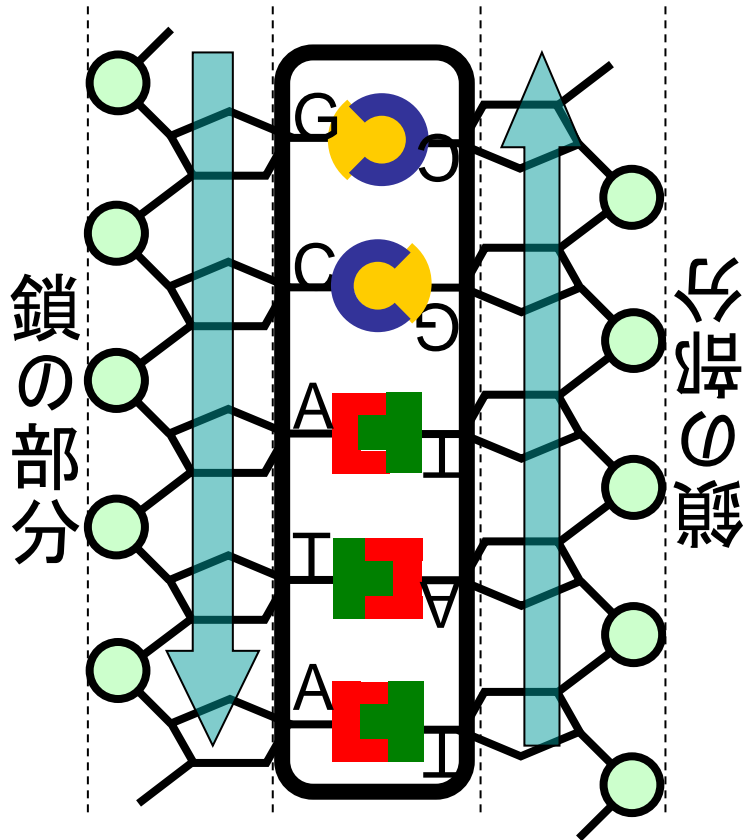
遺伝情報とヌクレオチド



4種の塩基をもつヌクレオチドが、一直線に並ぶことで「情報」になる。



遺伝子の構造



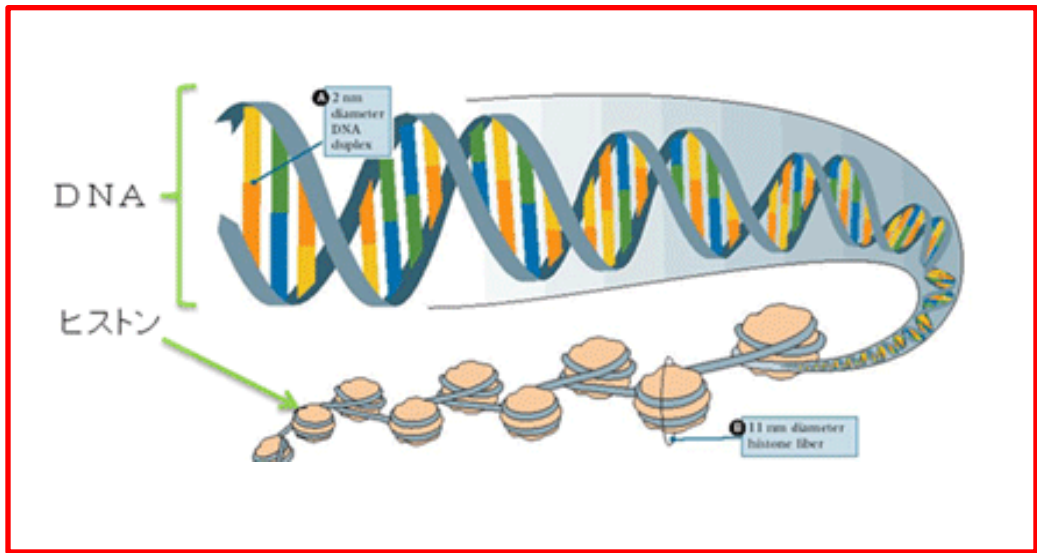
2本鎖のDNA

二重らせん構造

利点

- 安定。
- 情報の複製がしやすい。

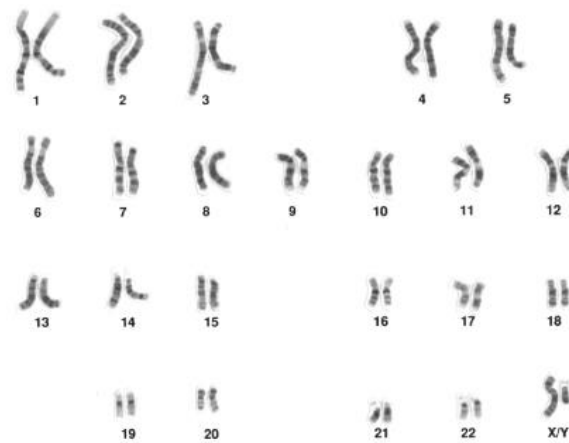
遺伝子の構造



すごく長い（約2m）ので、**ヒストン**に巻きついて収納されている。



染色体

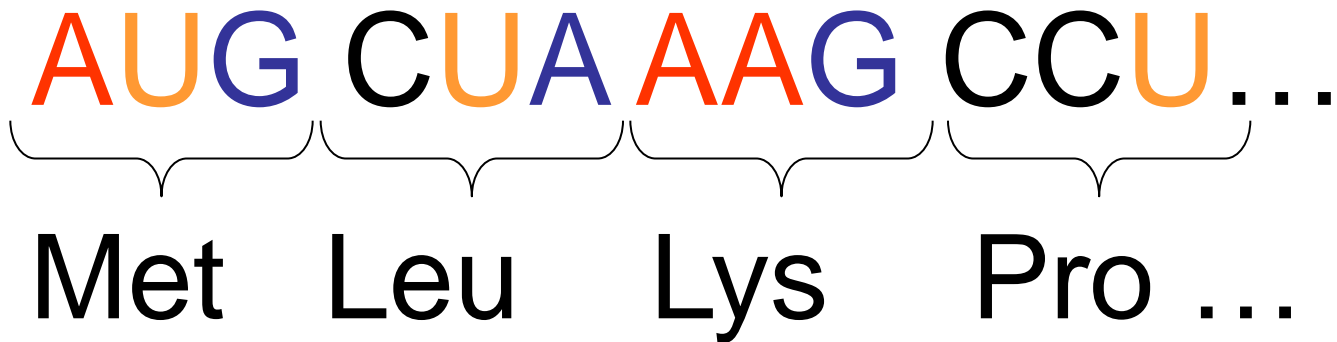


ヒトの染色体は23対

DNAの持つ情報



アミノ酸配列の情報は、DNA(mRNA)に暗号で書いてあり、暗号には読み取るルールがあります。



読み取りルール 3塩基毎に区切って読む。

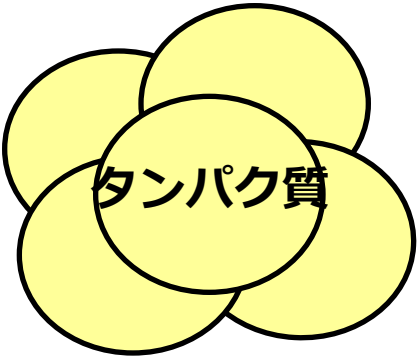
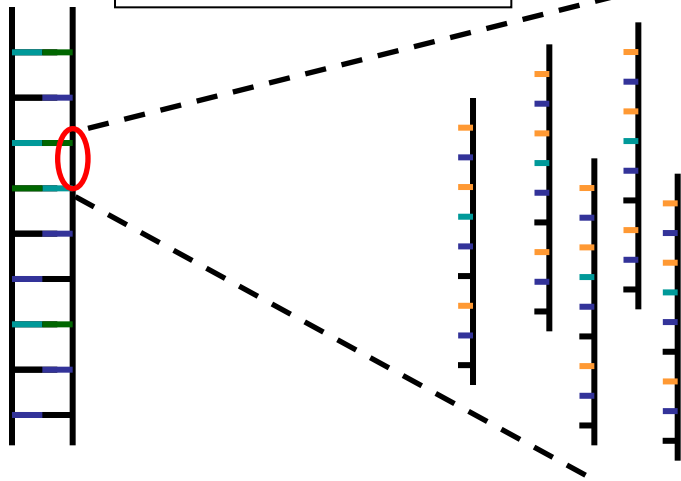
3塩基の組 = コドン

情報の流れ



転写
DNAから情報を写し取ること

翻訳
RNAからタンパク質を作ること



DNA

体の情報がすべて詰まっている
(カラダの設計図)

RNA

必要なカラダの一部を作るために、
DNAから必要な情報を写し取ったもの。
(設計図のコピー)

タンパク質

体は主にタンパク質からできている。
RNAの情報を基に作られる。
多種にわたり、それぞれ機能を持つ。

遺伝子検査と医療の関連



遺伝子検査で調べること


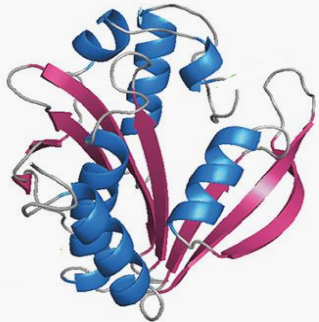

- ・癌などによる遺伝子の**変異、過剰発現**
癌の**診断**、治療効果の判定
分子標的**薬の投与可否**の判断 etc
- ・生まれ持つ遺伝子の**構造異常、多型**
遺伝子**疾患の診断**
体質、罹患リスクの判定、薬の副作用予測 etc

SNPs(スニップ(ス))とは？



Single Nucleotide Polymorphism (一塩基多型)

一塩基置換により、アミノ酸が変化する。その結果、タンパク質の機能に差が生じる。
集団内で1%以上の頻度で見られるもの。

 Aさん	ATG └───┘ Met	C TA └───┘ Leu	AAG └───┘ Lys	CCT... └───┘ Pro ...	立体構造の変化 ↓ 蛋白機能の変化 
 Bさん	ATG └───┘ Met	G TA └───┘ Val	AAG └───┘ Lys	CCT... └───┘ Pro ...	

本日の内容



- 遺伝子とは
- **遺伝子検査の実用例** EGFR、RAS
- 遺伝子の分析・原理について
- 遺伝子検査の流れと注意点
- i-densyを用いた遺伝子検査のご紹介

遺伝子関連検査の分類



受精後、または出生後に体細胞において後天的に獲得される遺伝子変異。

癌細胞に見られ、検体は癌細胞など。

病原体遺伝子検査

- ウイルス
 - HIV同定、HCV/HBV等
- 細菌類
 - 結核菌、マイコプラズマ等

遺伝学的情報として子孫に伝えられる遺伝子変異。

基本的に全身の細胞に見られ、検体は末梢血液など。

ヒト体細胞遺伝子検査

- 癌細胞特有の遺伝子変異検査
 - EGFR
 - KRAS等

ヒト遺伝学的検査

- 薬物の効果や副作用に関わる検査
 - UGT1A1、IL28B等
- その他
 - 単一遺伝子疾患、家族性腫瘍等

ファーマコゲノミクス (PGx) 検査

JCCLS遺伝子関連検査標準化専門委員会
ファーマコゲノミクス検査の運用指針

PGx検査の主な項目

◆ヒト遺伝学的検査

✓薬剤応答性

UGT1A1

CYP2C19

IL28B

CYP3A4,5

◆ヒト体細胞遺伝子検査

✓白血病・リンパ腫

JAK2

BCR-ABL

WT1 mRNA

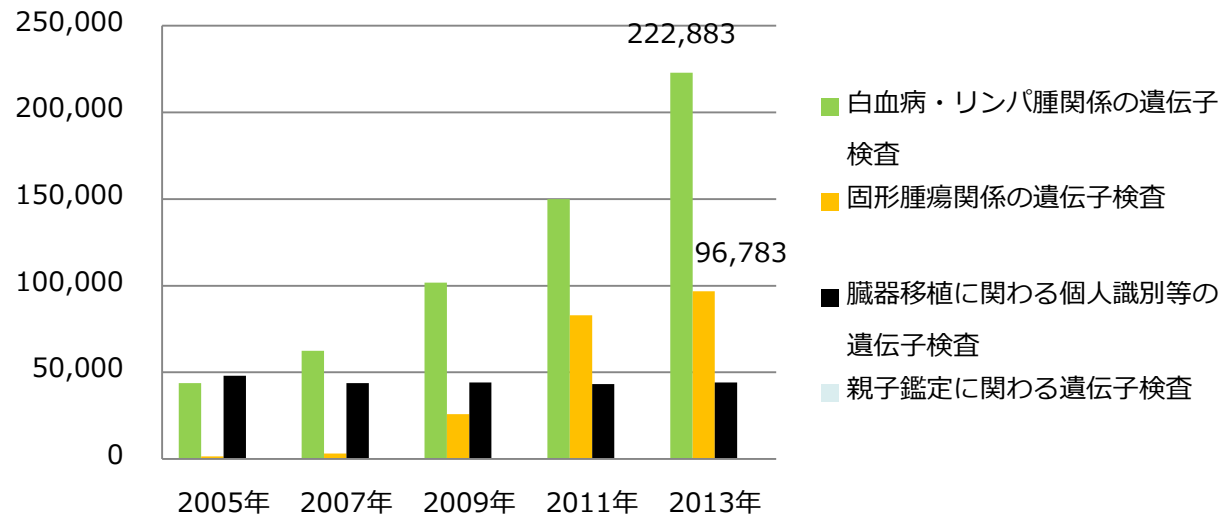
✓固形腫瘍

EGFR

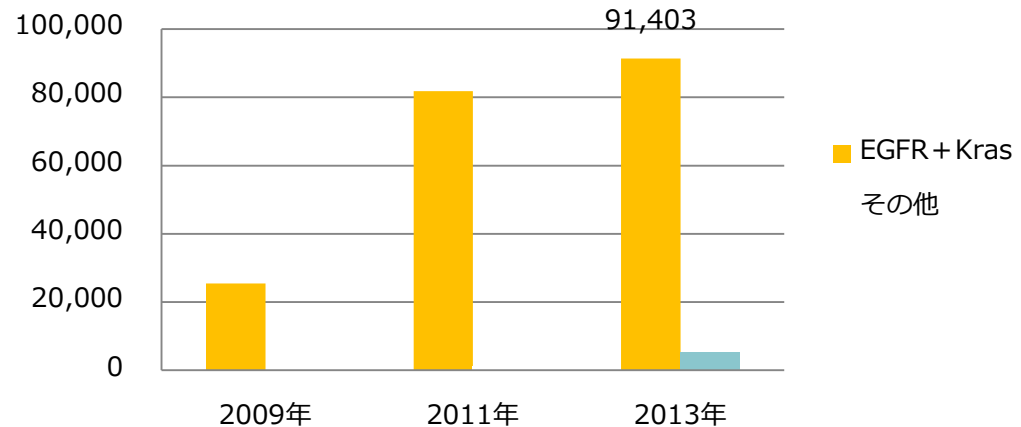
KRAS

ALK-fusion

「倫理指針」対象外項目（感染症を除く）



固形腫瘍関係の遺伝子検査



個別化医療の実践

→コンパニオン診断薬の開発



コンパニオン診断薬とは・・・

特定の医薬品の有効性や安全性を一層高めるために、その使用対象患者に該当するかどうかなどをあらかじめ検査する目的(標的分子の発現や遺伝子変異の有無、薬物代謝酵素の遺伝子多型など)で使用される診断薬。

・新しい治療薬の創薬・開発段階から並行して開発される検査

(例: 乳がん治療薬ハーセプチンにおけるHER2発現検査)

・既に開発・市販されている治療薬に対し、後に有用性が証明され開発される検査

(例: 大腸がん治療薬アービタックスにおけるKRAS遺伝子変異検査、
イリノテカンにおけるUGT1A1遺伝子多型検査)

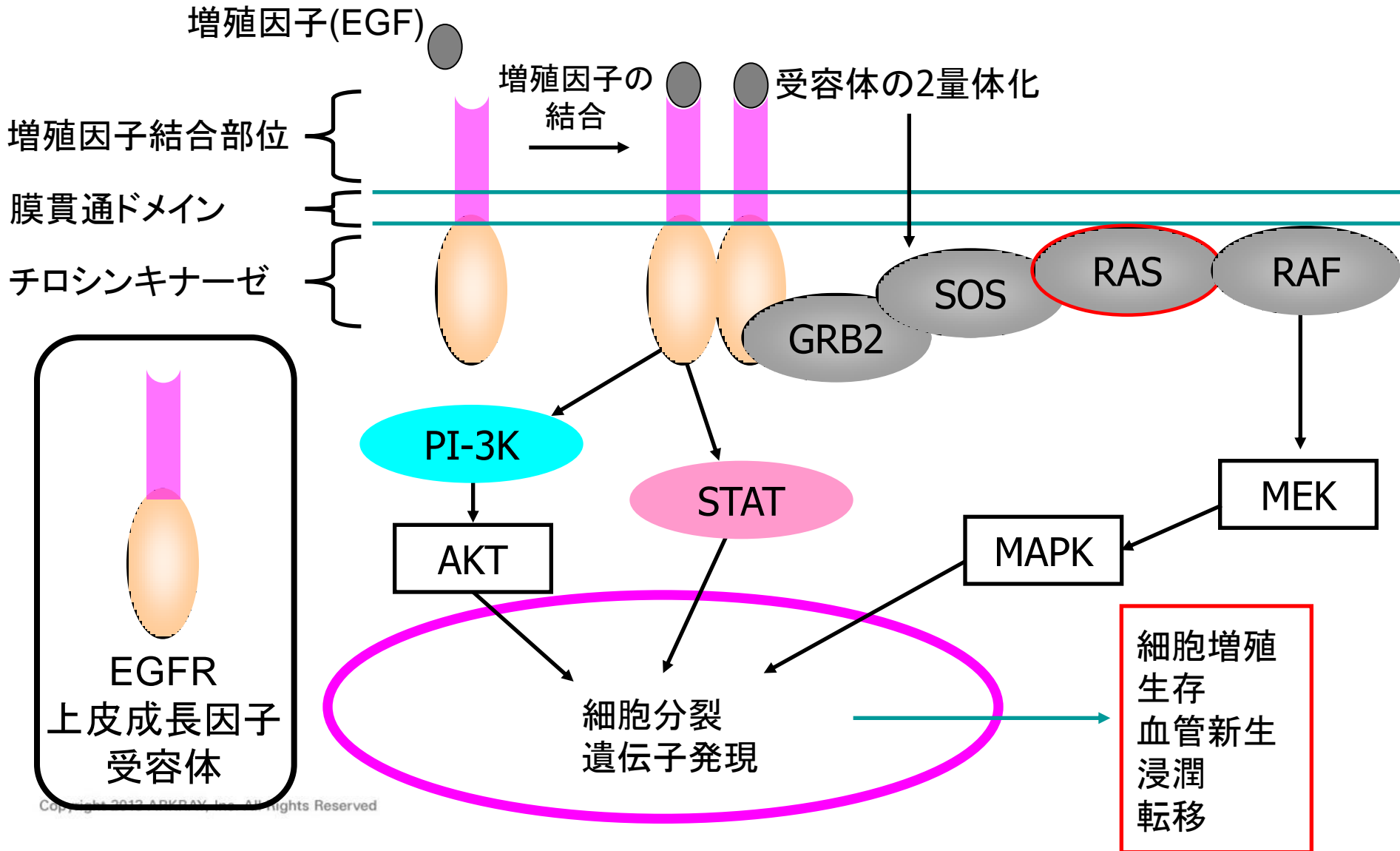


分子標的薬とコンパニオン診断薬 例

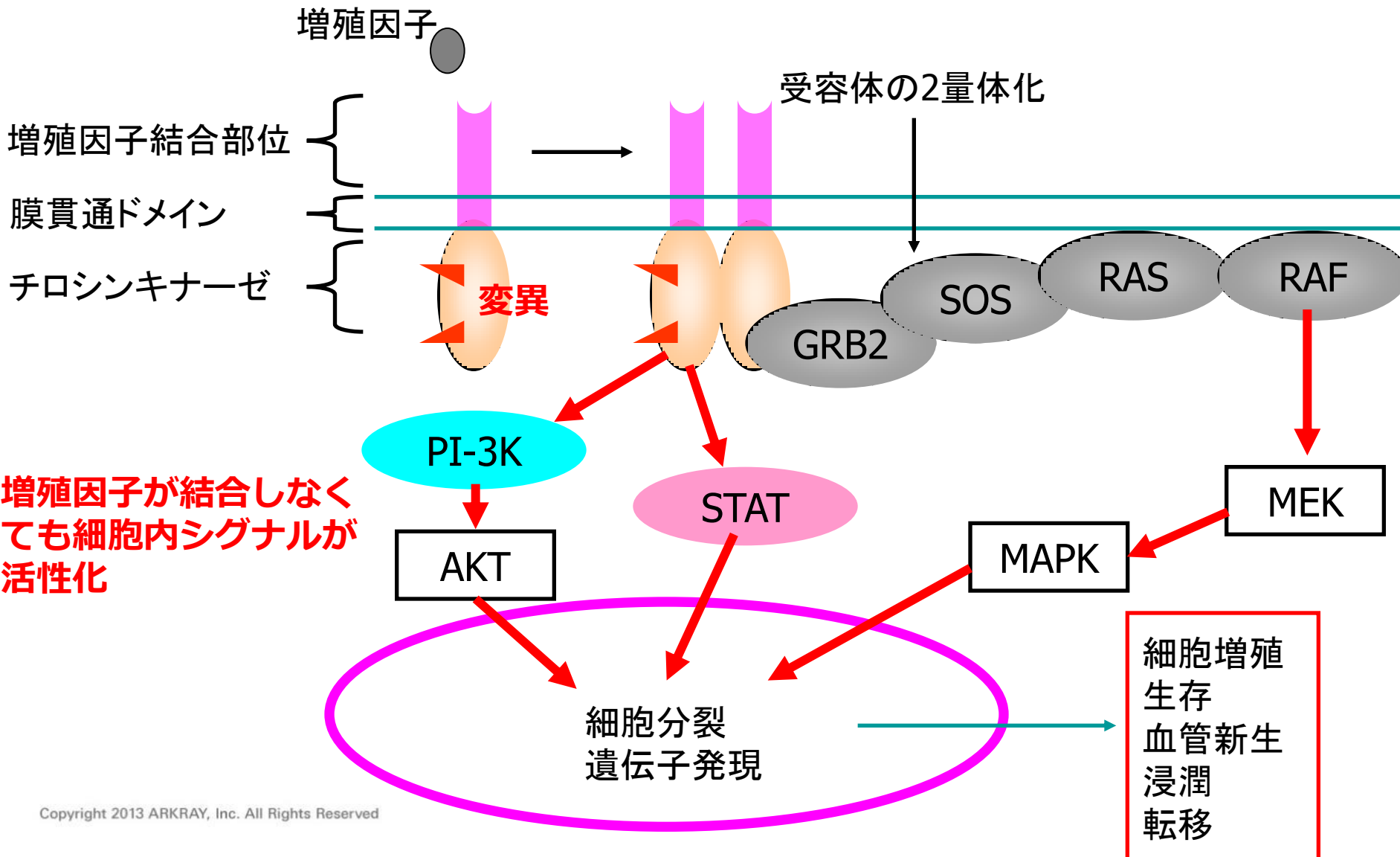


項目	HER2増幅	EGFR変異	KRAS変異	ALK転座	KIT変異
治療薬	trastuzumab	gefitinib	cetuximab	crizotinib	imatinib
適応	乳がん	非小細胞肺がん	大腸がん	非小細胞肺がん	消化管間質腫瘍
頻度	15~25%	40%	約40%	約2~5%	60~80%
ガイドライン	乳がん/胃がんにおけるHER2病理組織標本作成および病理診断のガイドライン(案)	肺がん患者におけるEGFR遺伝子変異検査の解説	大腸がん患者におけるKRAS遺伝子変異の測定に関するガイドライン	肺がん患者におけるALK遺伝子検査の手引き	GIST診療ガイド
保険点数	N005 2700点	D004-2_1-1 2100点	D004-2_1-□ 2100点	D006-4 D006-9 6520点	D004-2_1-△ 2500点

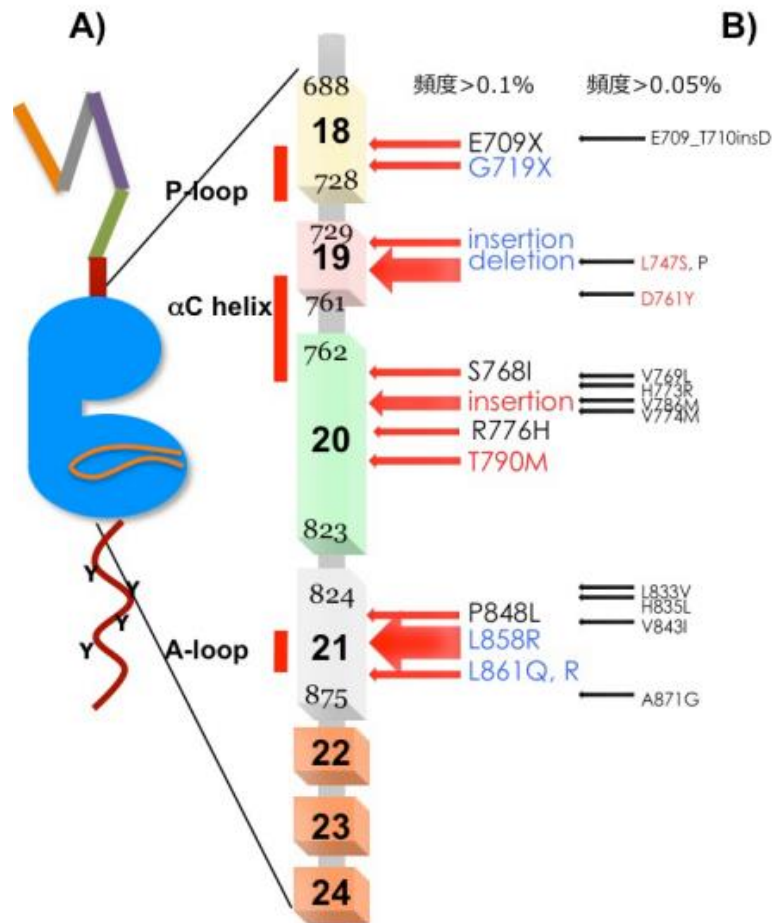
細胞増殖シグナル伝達経路



EGFR遺伝子変異が存在するがん細胞



EGFR遺伝子変異の種類

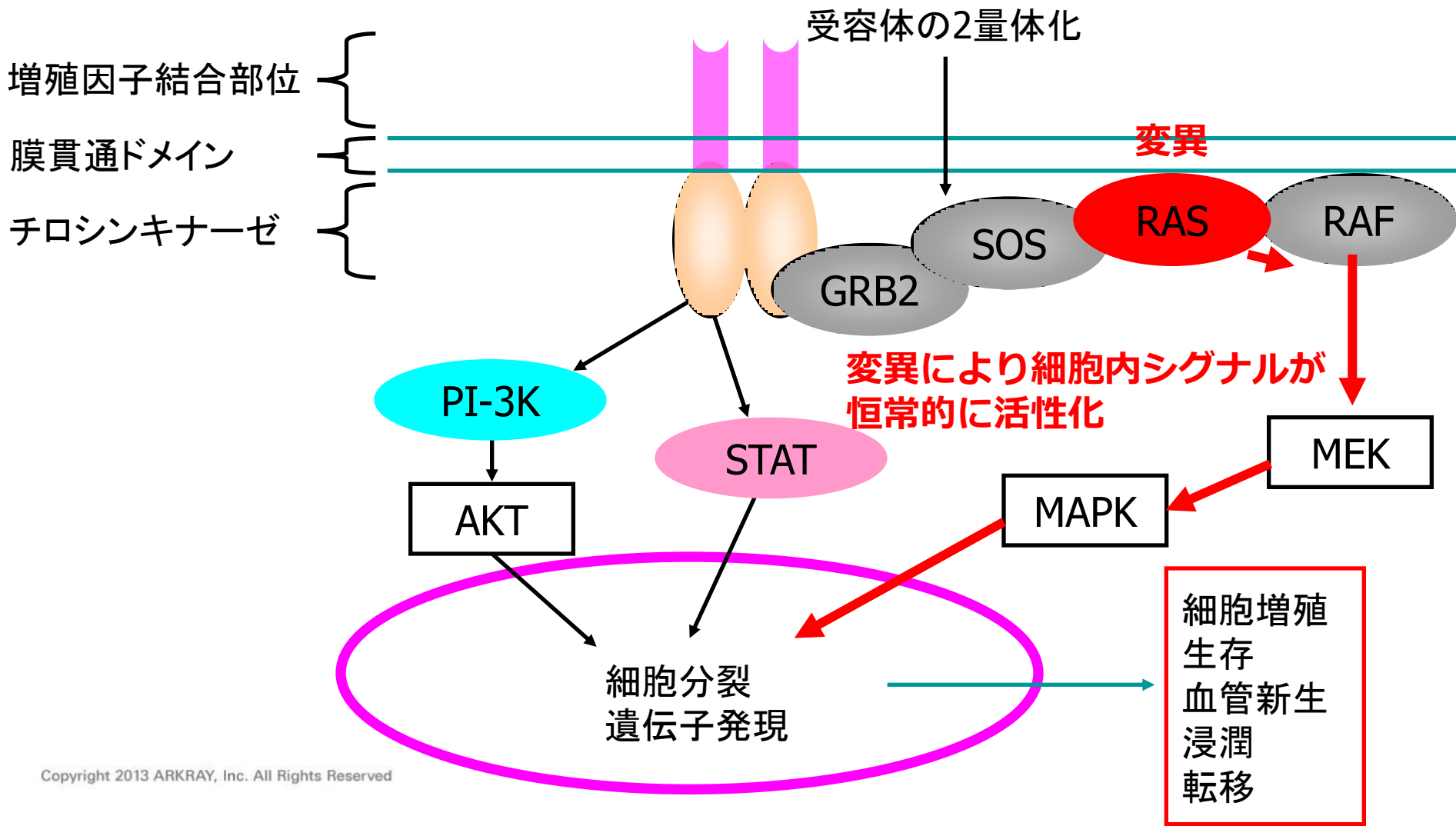


エクソン	頻度	変異	頻度	変異	頻度		
18	3.6%	E709X	1.28%	E709K	0.23%		
		G719X	1.88%	E709A	0.20%		
				G719A	0.85%		
				G719S	0.63%		
				G719C	0.40%		
		その他			1.32%		
19	29.7%	挿入変異	0.18%	I744_K745insKIPVAI	0.14%		
				その他	0.05%		
		欠失変異	29.52%	K745_E749del	0.11%		
				E746_E750del	20.75%		
				E746_E751del	0.13%		
				E746_E751del insA	0.28%		
				E746_E752del insV	0.72%		
				E747_E749del	0.11%		
				E747_E750del	0.10%		
				E747_E750del insP	1.10%		
				E747_E751del	1.07%		
				E747_E751del insP	0.29%		
		20	10.8%			E747_E752del	0.57%
				E747_E753del	0.14%		
				E747_E753del insS	1.76%		
				E747_E753del insQ	0.09%		
				その他	2.32%		
				その他	0.02%		
				S768I	0.79%		
				挿入変異	2.09%	V769_D770insASV	0.36%
						D770_N771insSVD	0.30%
						H773_V774insNPH	0.17%
				V774_C775insHV	0.10%		
				その他	1.15%		
21	55.8%			R776H	0.11%		
				T790M	5.83%		
				その他	2.14%		
				P848L	0.111%		
				L858R	52.14%		
		L861Q	1.62%				
		L861R	0.11%				
		その他	2.03%				

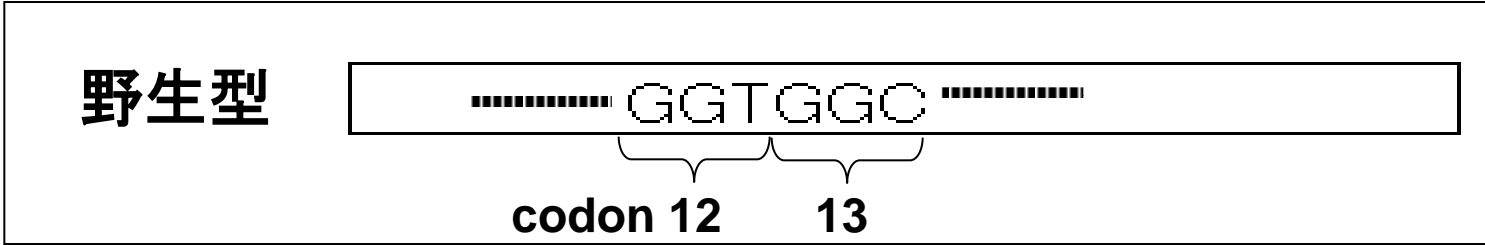
図2. EGFR遺伝子変異の種類と頻度。2014.1現在COSMICデータベースに登録されている13184のEGFR遺伝子変異のまとめ。A)キナーゼドメインと変異の関係を示す。中央に0.1%以上の頻度のもの、右に0.05%以上尾頻度のものを示す。感受性変異を青で、抵抗性変異を赤、意義不明のものを黒でしめしている。B)頻度>0.1%の変異のうちわけ。エクソン19変異もきわめて多数あることがわかる。

Copyright

RAS遺伝子変異が存在するがん細胞



K-RAS codon 12/13 mutation



1bp
mutation

2bp
mutation

AGTGGC
CGTGGC
TGTGGC
GATGGC
GCTGGC
GTTGGC
GGTGAC
GGTTGC
AATGGC
TTTGGC
CTTGGC
AGTGAC

その他の変異



	KRAS exon 2	KRAS exon 3	KRAS exon 4	NRAS exon 2	NRAS exon 3	NRAS exon 4	Total*	Method
PRIME (1st line)	40% (440/1096)	4% (24/638)	6% (36/620)	3% (22/637)	4% (26/636)	0% (0/629)	17%	Sanger法 SURVEYOR法
20050181 (2nd line)	45% (486/1083)	4.4% (24/548)	7.7% (41/534)	2.2% (12/536)	5.6% (30/540)	0% (0/532)	20%	Sanger法 SURVEYOR法
20020408 (3rd line)	43% (184/427)	4.8% (8/166)	5.0% (9/180)	4.2% (7/166)	3.0% (5/168)	1.1% (2/180)	18%	Sanger法** SURVEYOR法
OPUS (1st line)	43% (136/315)	6.8%	9.3%	7.6%	5.1%	3.4%	31%	BEAMing法
PEAK (1st line)	N/A	4% (9/225)	7% (17/223)	5% (12/224)	6% (13/225)	0% (0/223)	22%	Sanger法 SURVEYOR法
FIRE-3 (1st line)	N/A	4.3% (21/431)	4.9% (24/458)	3.8% (18/464)	2% (10/468)	0% (0/458)	16%	Pyrosequence法

*KRASエクソン2野生型に占めるKRAS/NRAS変異割合 **一部のコドンでは次世代シーケンサー法併用

大腸がん患者におけるRAS遺伝子(KRAS/NRAS遺伝子)変異の測定に関するガイドンス

悪性腫瘍遺伝子検査について



EGFR遺伝子変異検査

対象: 肺がん
(罹患者数 約9万人/年)

分子標的薬:
イレッサ(アストラゼネカ)
タルセバ(中外製薬)

薬剤費用: 約20万円/月

適応: 手術不能又は再発
非小細胞肺癌

【イレッサの奏効率】

変異無1.1%→変異有71.2%

RAS遺伝変異検査

対象: 大腸がん
(罹患者数 約10万人/年)

分子標的薬:
アービタックス
(ブリストルマイヤーズ、メルク)
ベクティビックス(武田薬品)

薬剤費用: 60万円/月

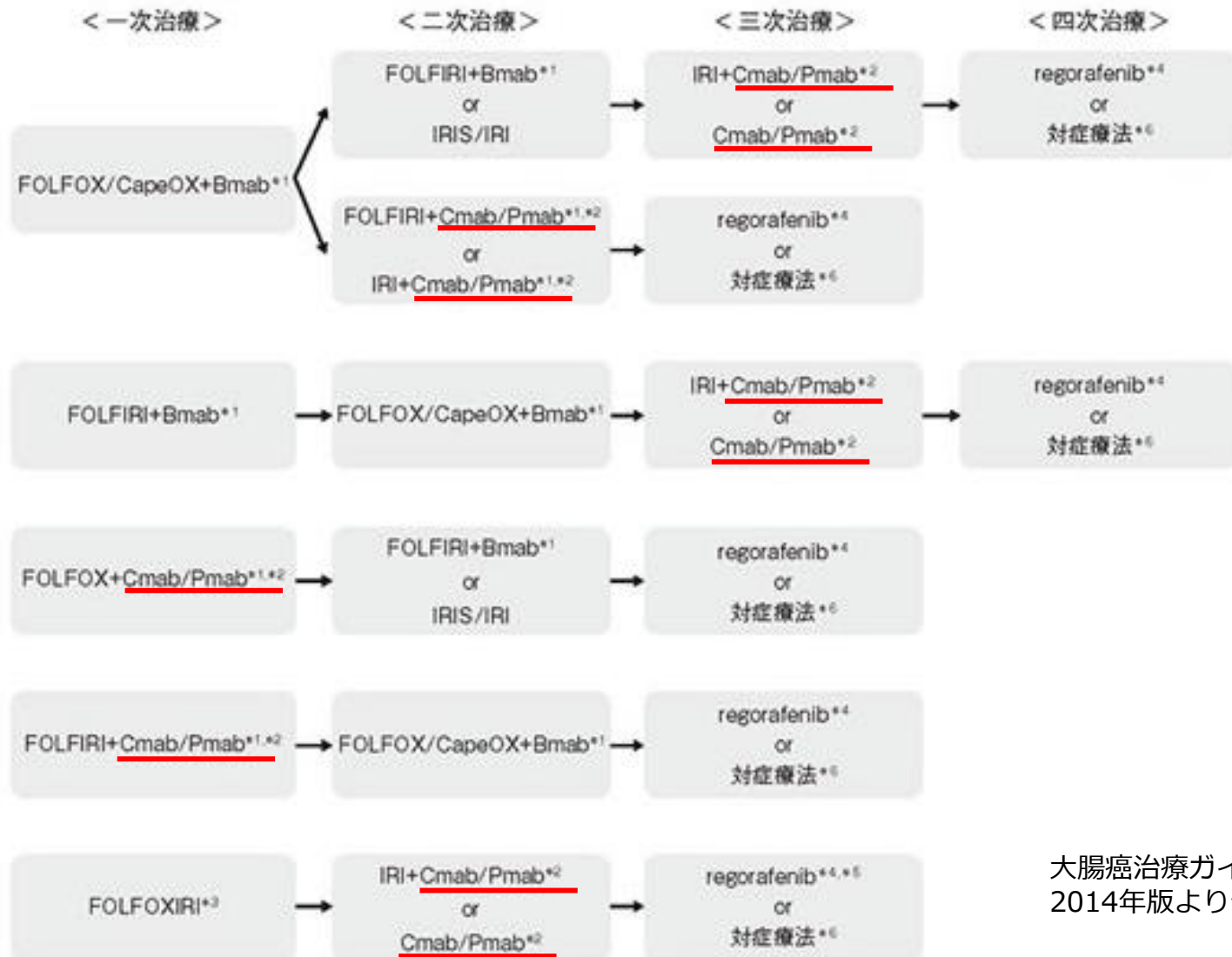
適応: 治癒切除不能な進行・再発の
結腸・直腸癌
頭頸部癌

【アービタックス奏効率】

変異無 27.6%→変異有 0%

切除不能進行再発大腸癌に対する化学療法

強力な治療が適応となる患者



大腸癌治療ガイドライン
2014年版より一部抜粋

進行期非小細胞肺癌の化学療法



IV期非小細胞肺癌の治療



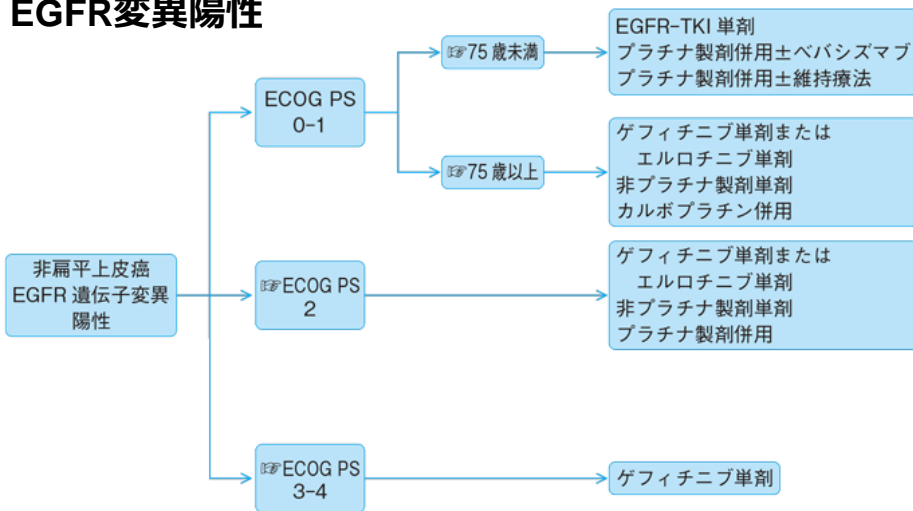
* 診断が生検や細胞診などの微量の検体の場合においては、腺癌が含まれない組織でも EGFR 遺伝子変異, ALK 遺伝子転座の検索を考慮する。

EBMの手法による肺癌診療ガイドライン2015年版より抜粋

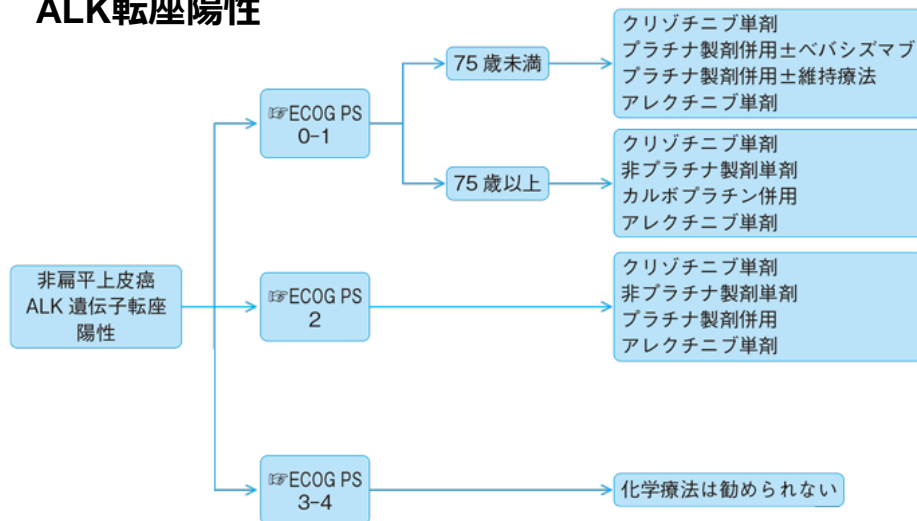
進行期非小細胞肺癌の一次治療



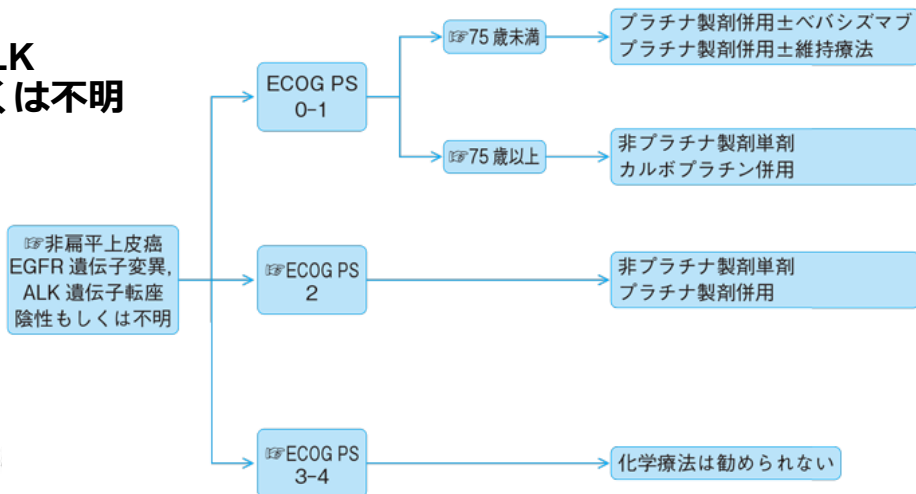
EGFR変異陽性



ALK転座陽性



EGFR / ALK 陰性もしくは不明



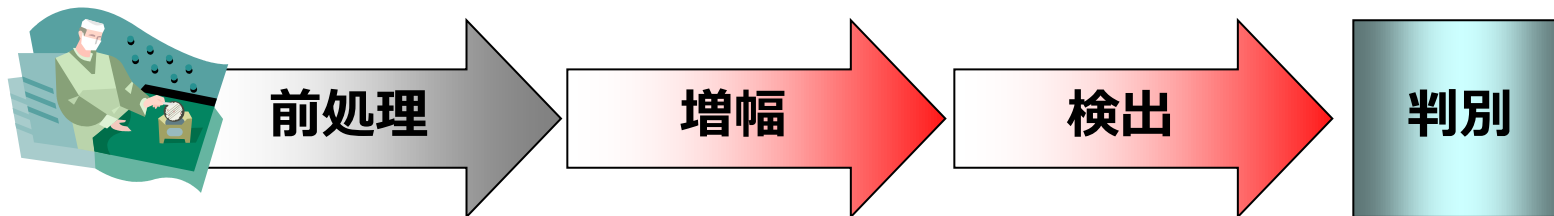
EBMの手法による肺癌診療ガイドライン
2015年版より抜粋

本日の内容



- 遺伝子とは
- 遺伝子検査の実用例 EGFR、RAS
- **遺伝子の分析・原理について**
- 遺伝子検査の流れと注意点
- i-densyを用いた遺伝子検査のご紹介

増幅、検出の自動化（技術）



シーケンサー
→



リアルタイムPCR
→



全自動遺伝子検出装置
→

i-densy、GENECUBE



遺伝子増幅技術 PCR

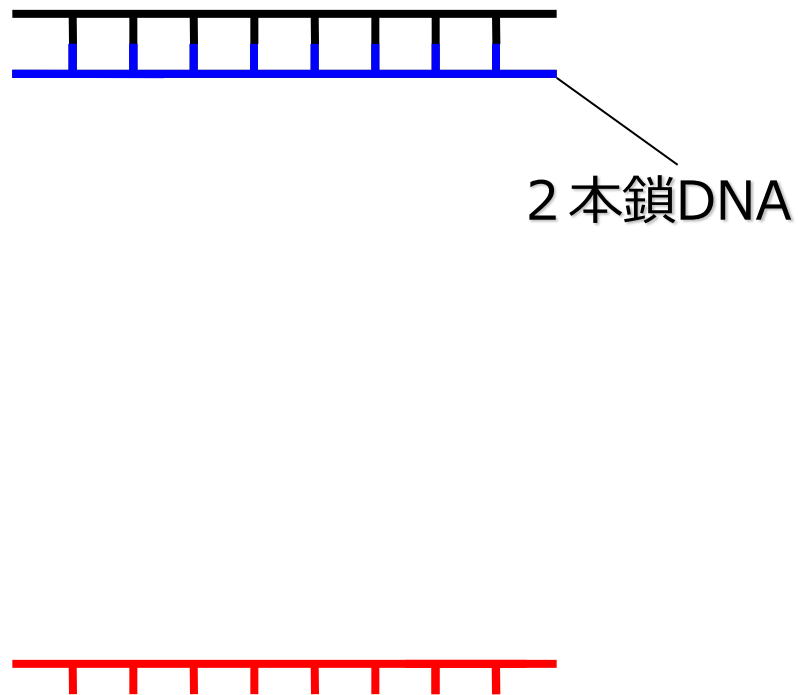
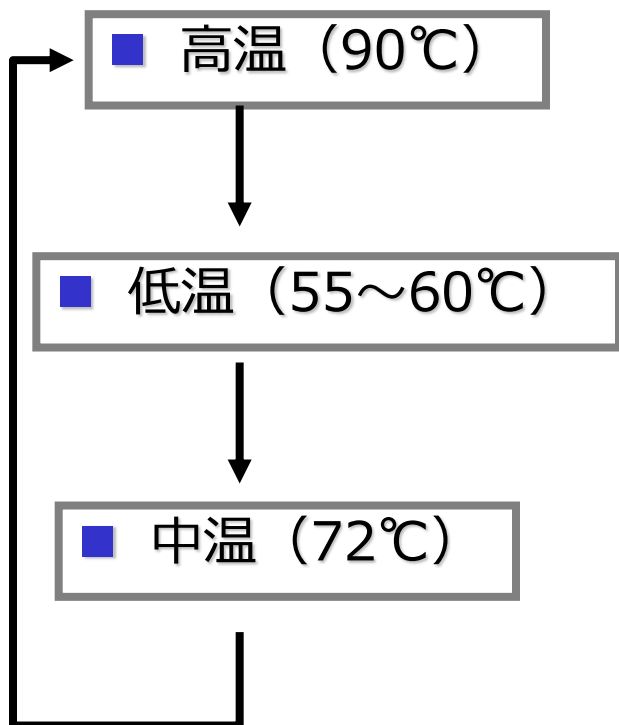


PCRの手順

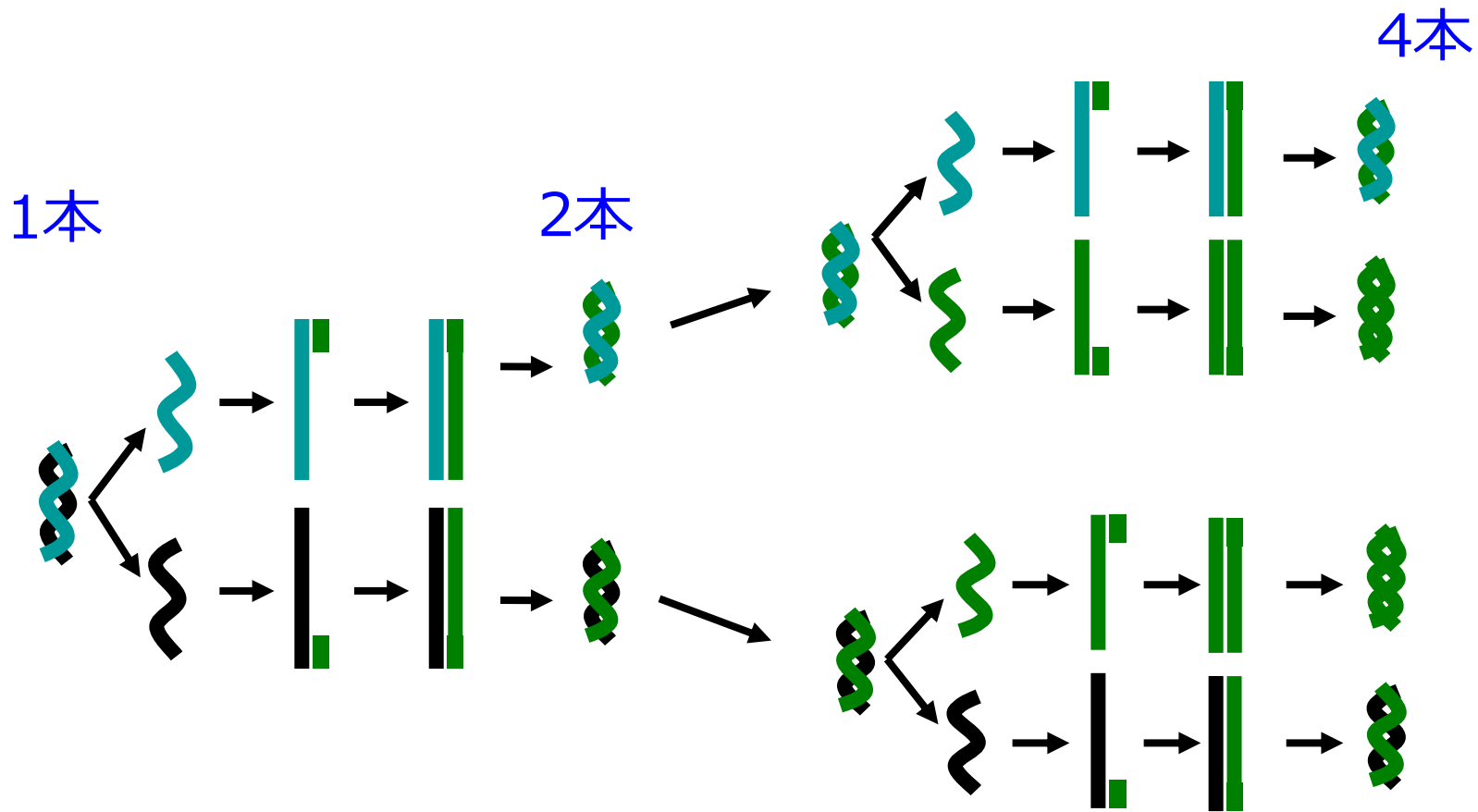
1. DNAをほどく
2. ほどいたDNAにプライマーを付ける
3. DNAポリメラーゼでDNAを合成する
4. 目的DNAの増幅



PCR反応



遺伝子增幅技術 PCR



増幅、検出の自動化（技術）



遺伝子変異、SNPの検出

- **DNAシーケンサー**
ダイレクトシーケンス法

- **リアルタイムPCR装置**

TaqManプローブ法、サイクリング法、スコーピオンアームズ法、
PNA-LNA PCR Clamp法、F-PHFA法、SMAP法、インベーター法

- **全自動遺伝子検出装置**

Q-プローブ法 (T_m解析)

- **その他**

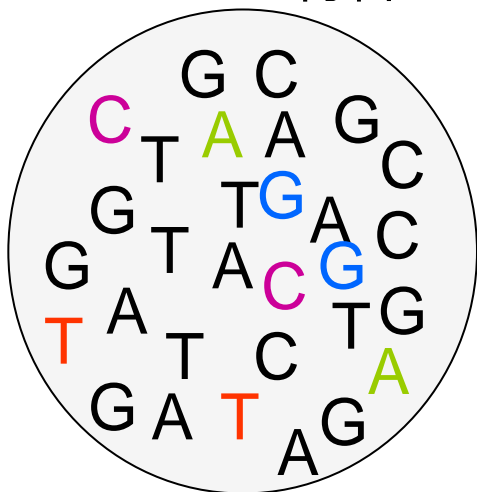
PCR-rSSO (Luminex[®]) 法、マイクロアレイ

DNAシーケンサー

原理(ジデオキシ法(サンガー法))



DNAの材料



A T G C

※ジデオキシヌクレオチド
...伸長反応をストップさせる。
A,T,G,Cで異なる蛍光が付加。

合成されていく順番



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

AGTTCATGACTA

AGTTCAT

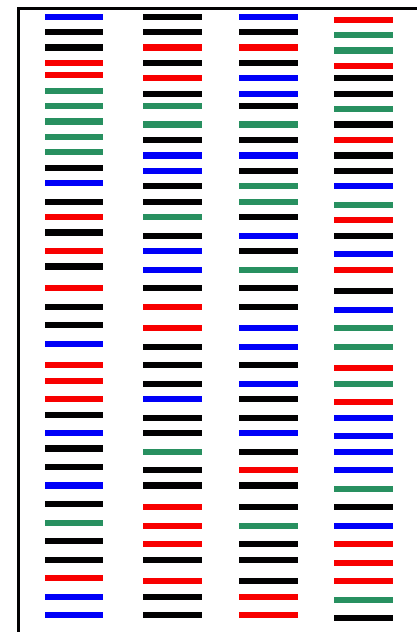
AGTTCATG

AGTTCATGA

AGTTCATGAC

AGTTCATGACT

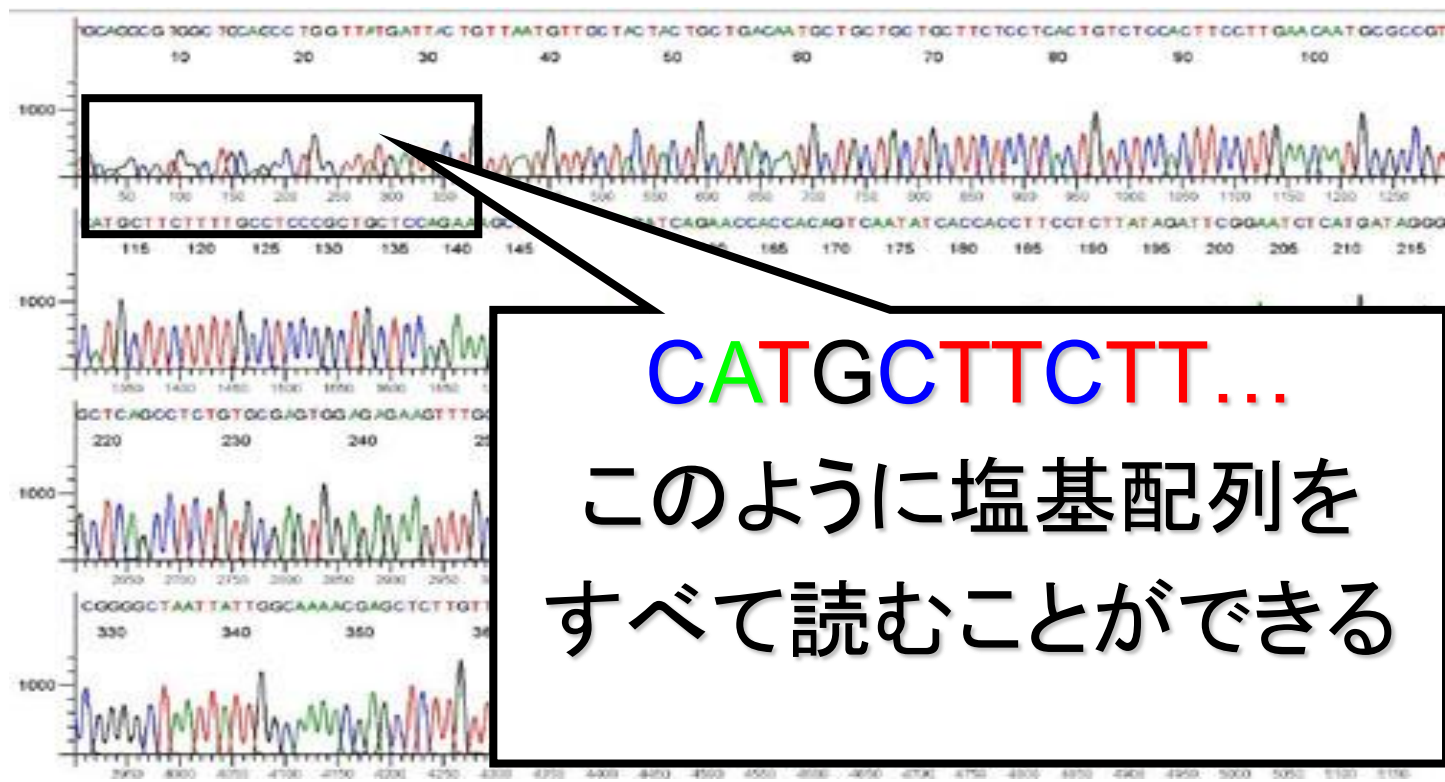
AGTTCATGACTA



DNAシーケンサー



データは波形で表されます。



Real-time PCR

arkray

Real-time PCRとは

Real-time PCRはPCRの増幅量をリアルタイムでモニターし、解析する方法であり、遺伝子発現を定量的に解析することができる。



一方で定性的な解析にもその威力を発揮する。

【装置でできる一例】

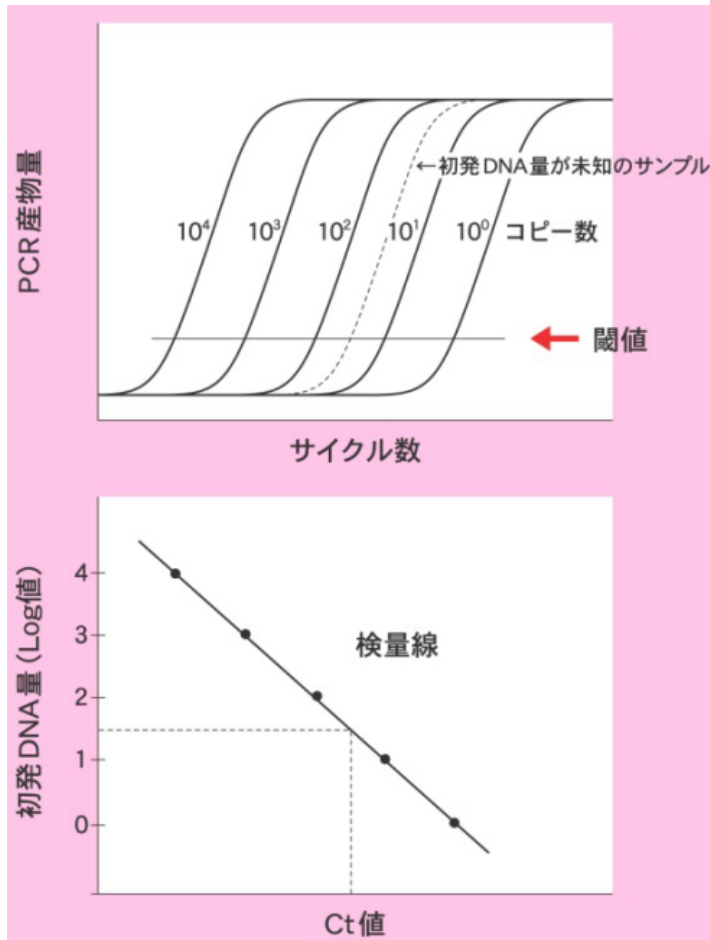
- ・ SNPs タイピング
- ・ 遺伝子変異検査



Real-time PCR



(蛍光強度)



- 蛍光強度が急激に高くなるサイクル数を検出することで、もとのDNA量を定量
- 様々な蛍光標識プローブを用いたアッセイが開発されている。
- 遺伝子発現解析、病原体検出、メチル化解析など、使用する試薬によって様々な解析が可能な汎用性がある

アレルスペシフィック リアルタイムPCR法

PCRに使用するプライマーの3'側に工夫を施して、変異型のみ特異的に増幅させる。



probe

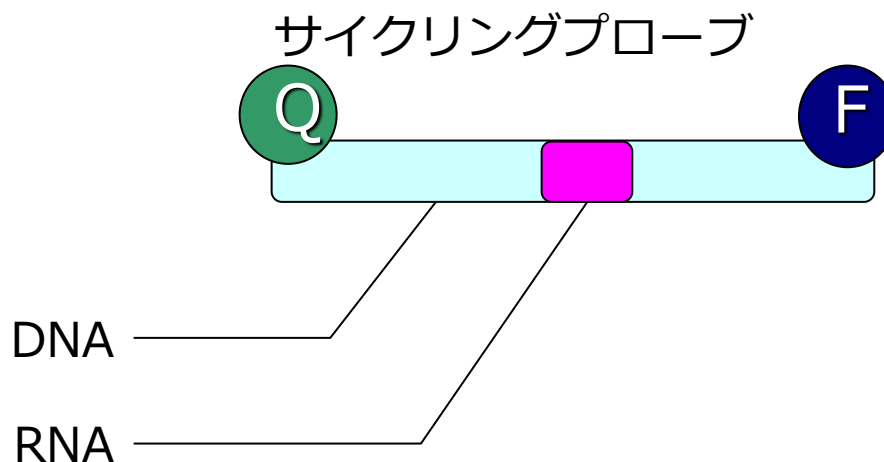


R レポーター蛍光色素

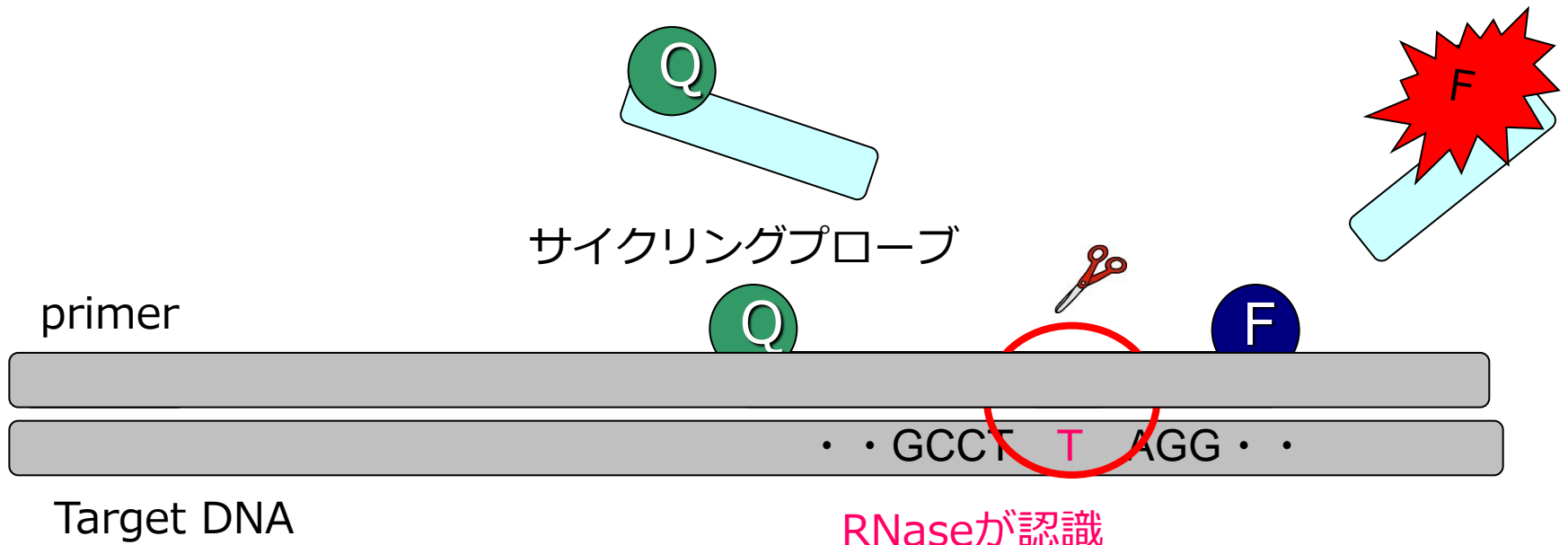
Q クエンチャー
(消光物質)

Cycleave PCR法

- 5'末端に非蛍光クエンチャー標識、3'末端に蛍光標識
- 研究分野で使用されている。
- 一塩基のみRNAで構成される。

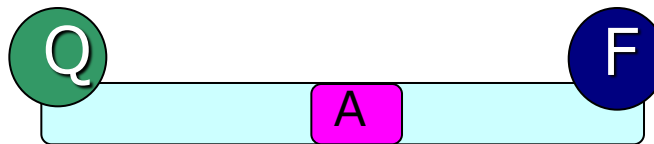


Cycleave PCR法



Cycleave PCR法

サイクリングプローブ

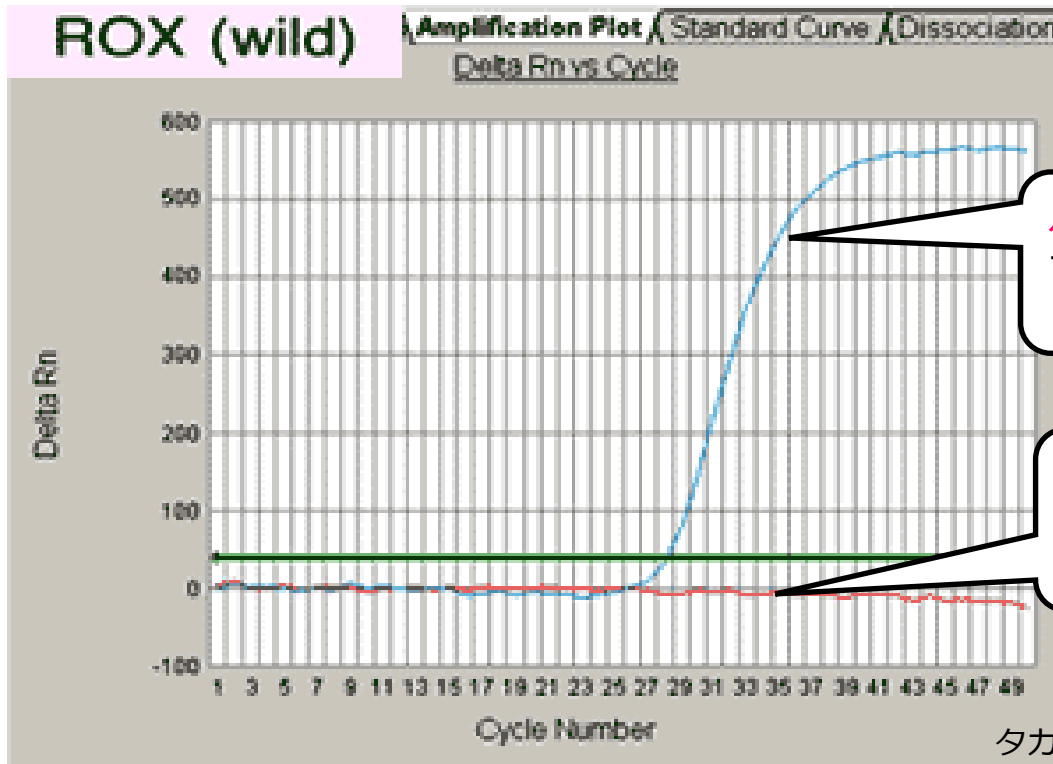


primer



Target DNA

Cycleave PCR法



パーフェクトマッチ
であれば蛍光が増強

ミスマッチであれば
蛍光は発しない

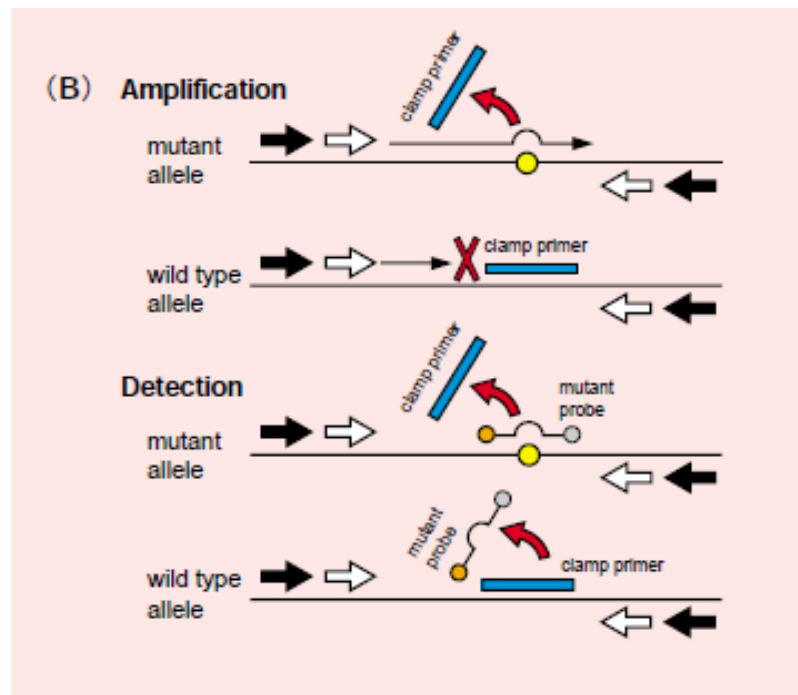
PNA LNA PCR Clamp法

peptide nucleic acid (PNA)
Locked nucleic acid (LNA)

PNA:ペプチド核酸

【特徴】

- DNAやRNAによく似た配列を持つ。
- PNA-DNA間の結合がDNA-DNA間よりも強い。
- 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性に対して耐性がある。
- 特異性が高い。
- プライマーとして機能しない。



BIO VIEW No.50 9より

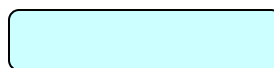


PNA LNA PCR Clamp法

PNAクランプ

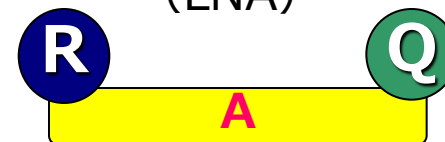


Primer

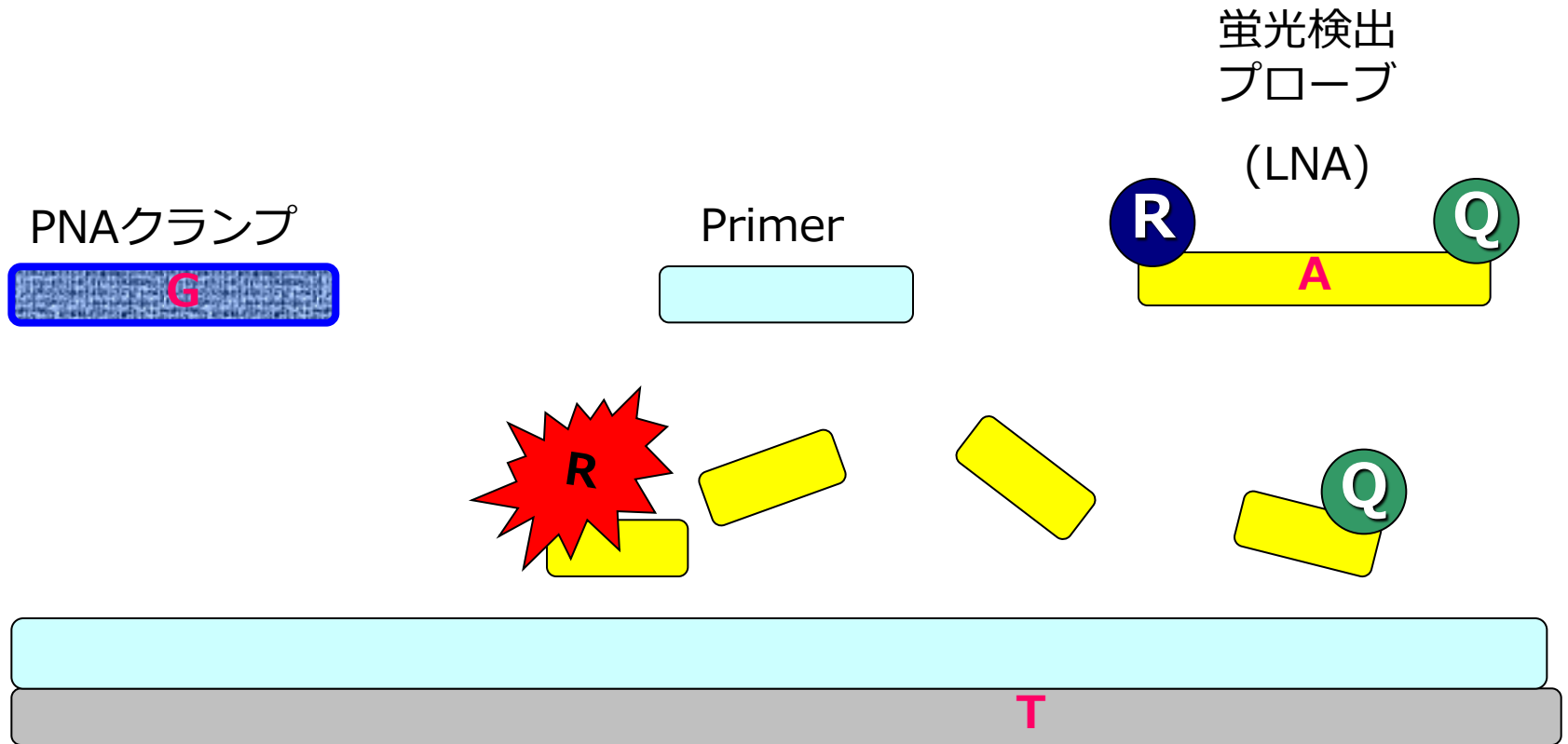


蛍光検出
プローブ

(LNA)

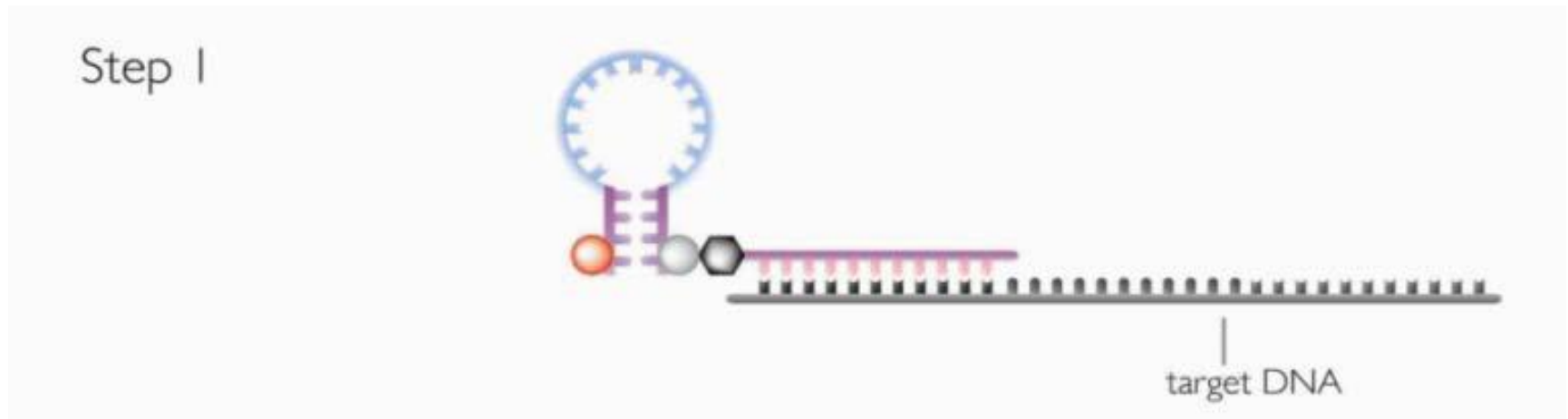


PNA LNA PCR Clamp法



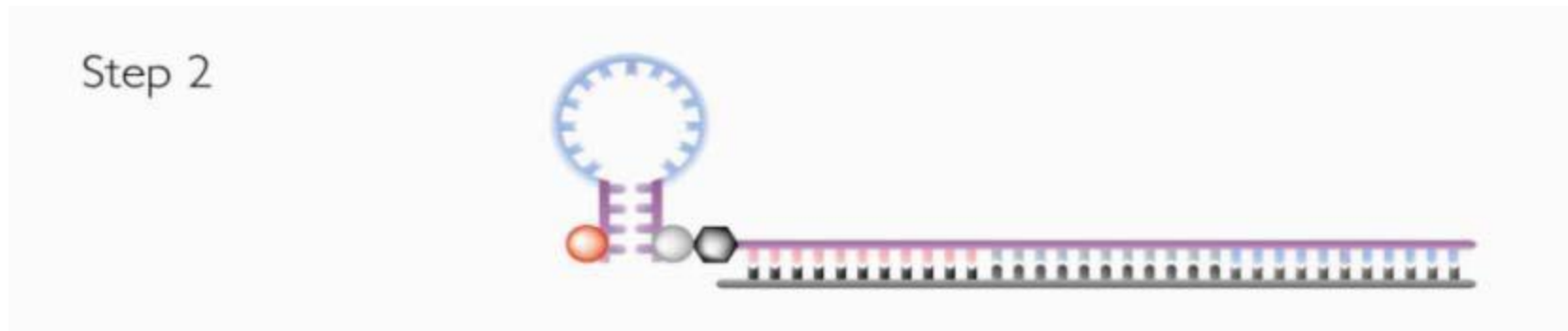


Scorpion-ARMS法



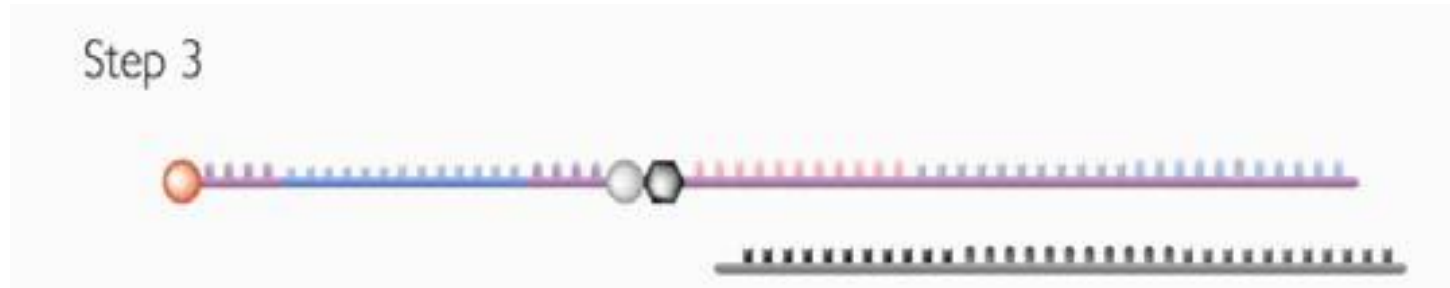
The Scorpions primer がターゲットDNAと結合

Scorpion-ARMS法



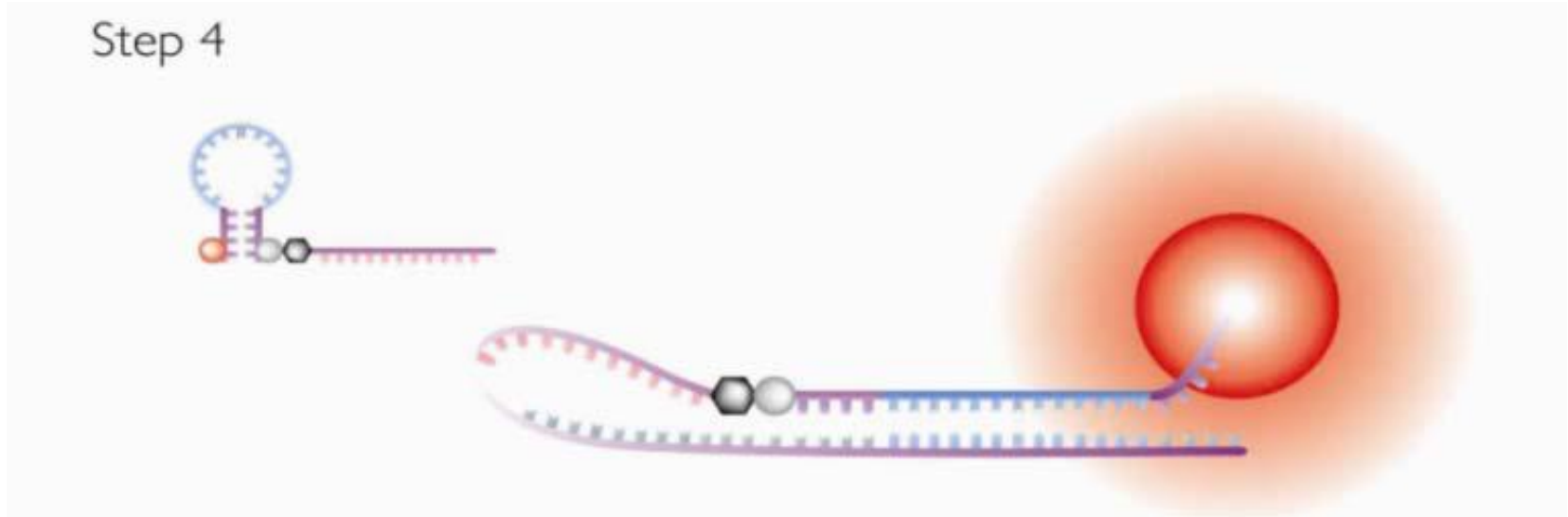
The Scorpions primer がDNA ポリメラーゼに伸長される

Scorpion-ARMS法



温度をあげることで1本鎖に変性される

Scorpion-ARMS法



- ・ 熱変性にてPCR産物を含むScorpion primerが変形し、プローブが認識する部位と結合することで、蛍光物質がクエンチャーと離れ発光する。
- ・ ターゲットDNAに結合せず伸長されなかったScorpion primerは元の形のままで発光しない。

主なEGFR変異検査の感度と特性



方法	感度 (%変異 DNA)	見いだされる 変異	欠失, 挿入の 包括的解析
直接塩基配列決定	25	既知, 未知	可
PCR-SSCP	10	既知, 未知	可
Taqman PCR	10	既知のみ	不可
Loop hybrid motility shift assay	7.5	既知のみ	可
Cycleave PCR	5	既知のみ	—
PCR-RFLP	5	既知のみ	不可
Length(fragment) analysis	5	—	可
MALDI-TOF based	5	既知のみ	不可
PNA-LNA PCR clamp	1	既知のみ	不可
Scorpion ARMS	1	既知のみ	不可
dHPLC	1	既知, 未知	可
Single molecule sequencing	0.2	既知, 未知	可
Mutant enriched PCR	0.2	既知のみ	不可
SMAP	0.1	既知のみ	不可

日本肺癌学会 EGFR解説作成委員会 2009 肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の解説

	ダイレクト シーケンス法	PCR-rSSO法	Scorpion-ARMS法	F-PHFA法
体外診断薬		MEBGEN™KRAS 遺伝子変異検出キット	TheraScreen KRAS Mutation Kit	OncoGuide KRAS 遺伝子変異検出キット
検出可能な変異	全ての変異タイプ が検出できる	G12S, G12C, G12R G12D, G12V, G12A G13S, G13C, G13R G13D, G13V, G13A	G12S, G12C, G12R G12D, G12V, G12A G13D	G12S, G12C, G12R G12D, G12V, G12A G13D
検出感度限界	10-25%	5-10%	1%	10%

日本臨床腫瘍学会

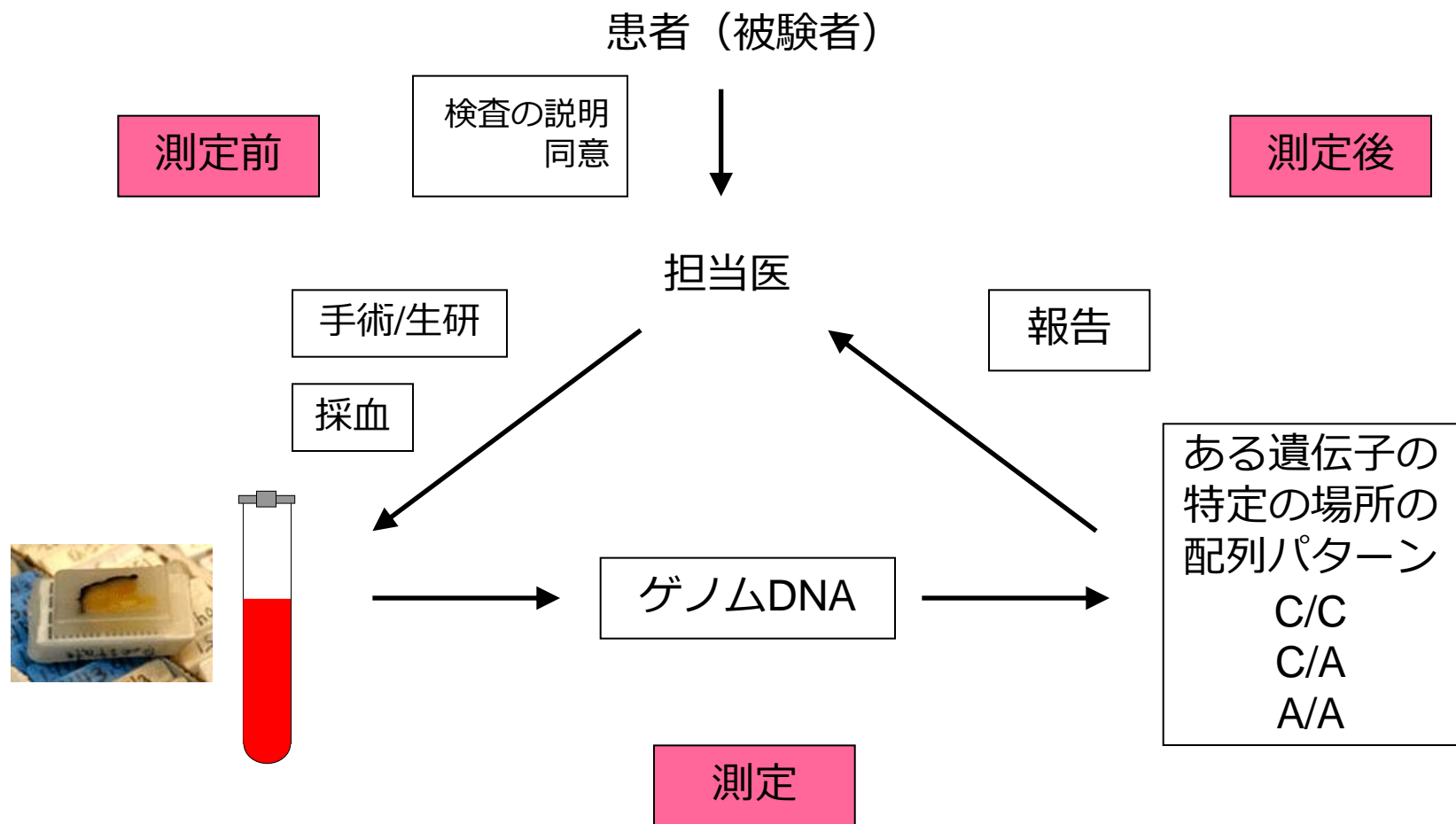
大腸がん患者におけるRAS遺伝子(KRAS/NRAS遺伝子)変異の測定に関するガイダンス 第2版 2014年

本日の内容



- 遺伝子とは
- 遺伝子検査の実用例 EGFR、RAS
- 遺伝子の分析・原理について
- **遺伝子検査の流れと注意点**
- i-densyを用いた遺伝子検査のご紹介

遺伝子検査の流れ



病理検体からの遺伝子検査



● 手術材料、生検組織

- ・パラフィン包埋組織
- ・ホルマリン固定組織



● 細胞診標本

- ・パパニコロウ染色、ギムザ染色標本など

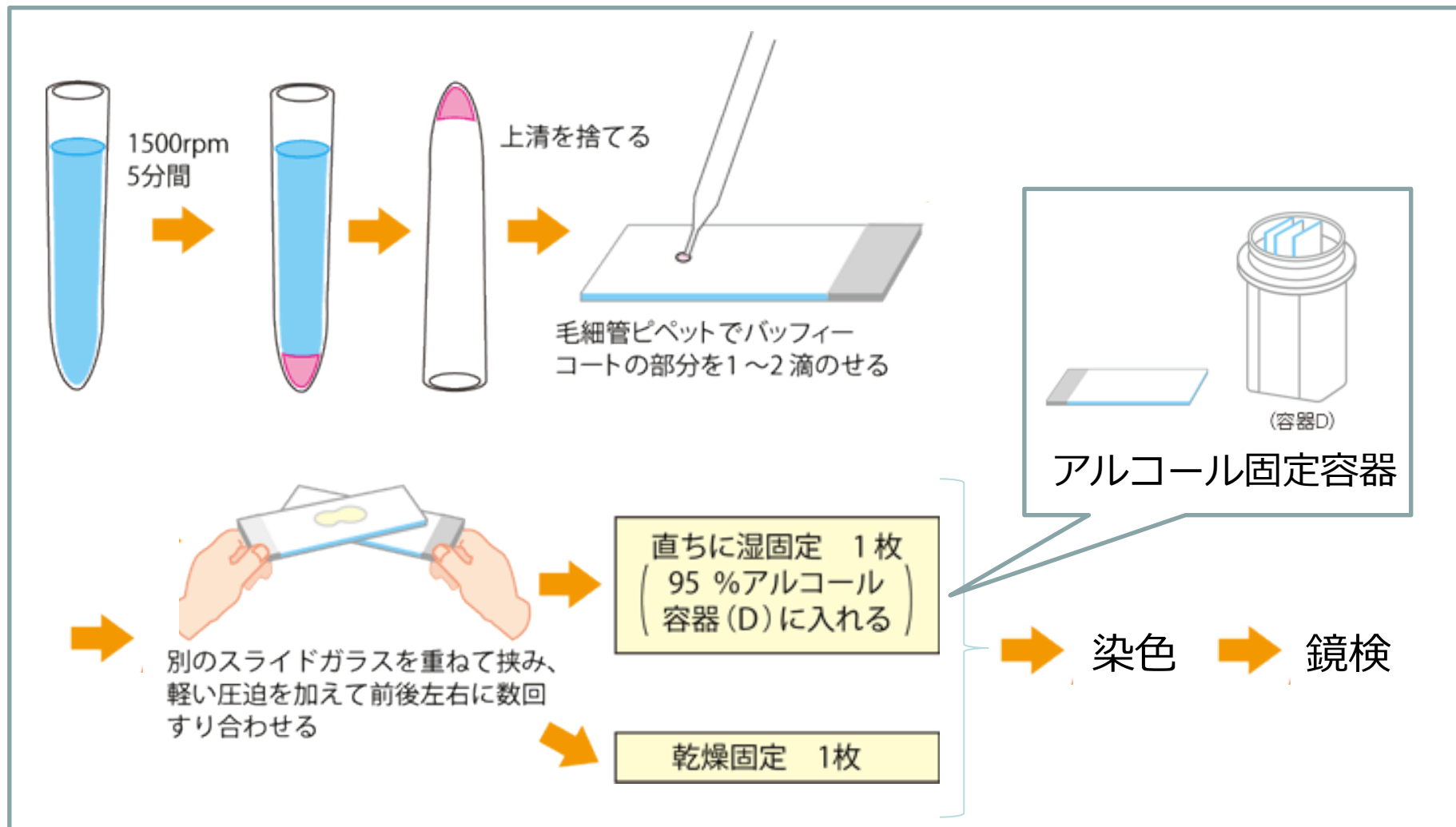
● 液状細胞診検体(LBC)、気管支洗浄液

- ・ThinPrep(和ジック社)、SurePath(BD社)など



DNAを抽出し、遺伝子検査装置へ

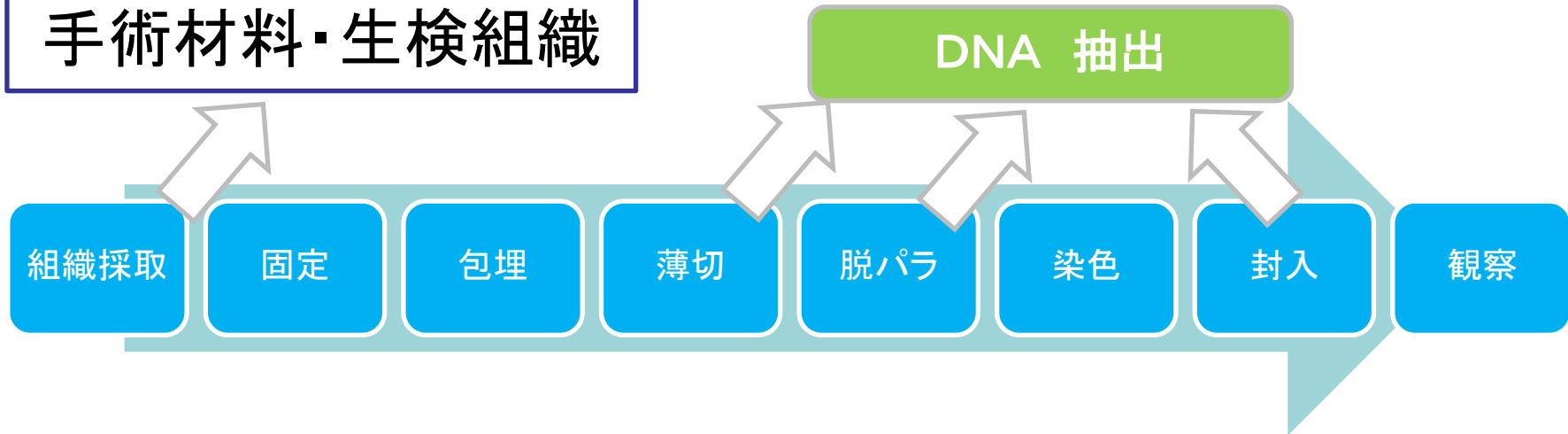
細胞診(固定の流れ)



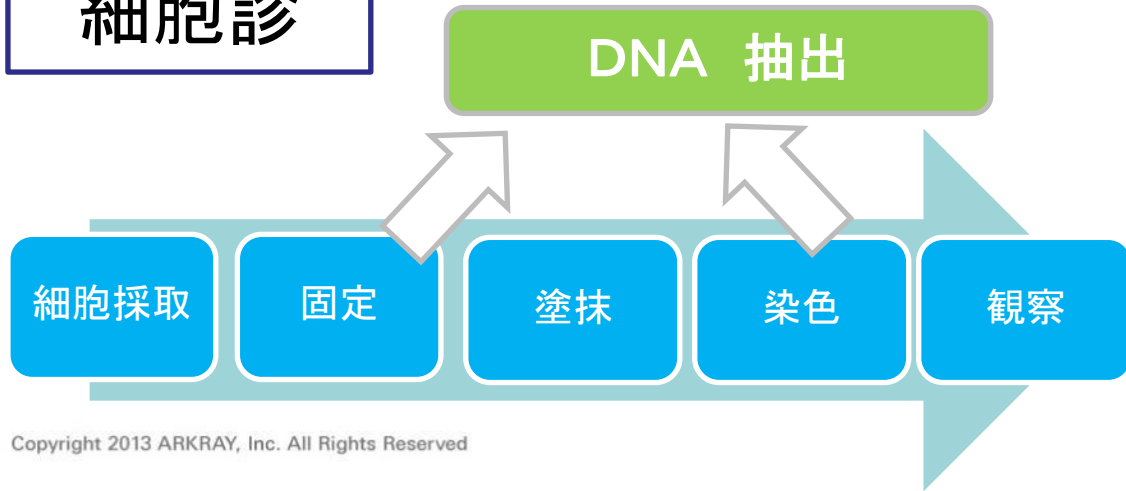
それぞれの検体での操作手順



手術材料・生検組織



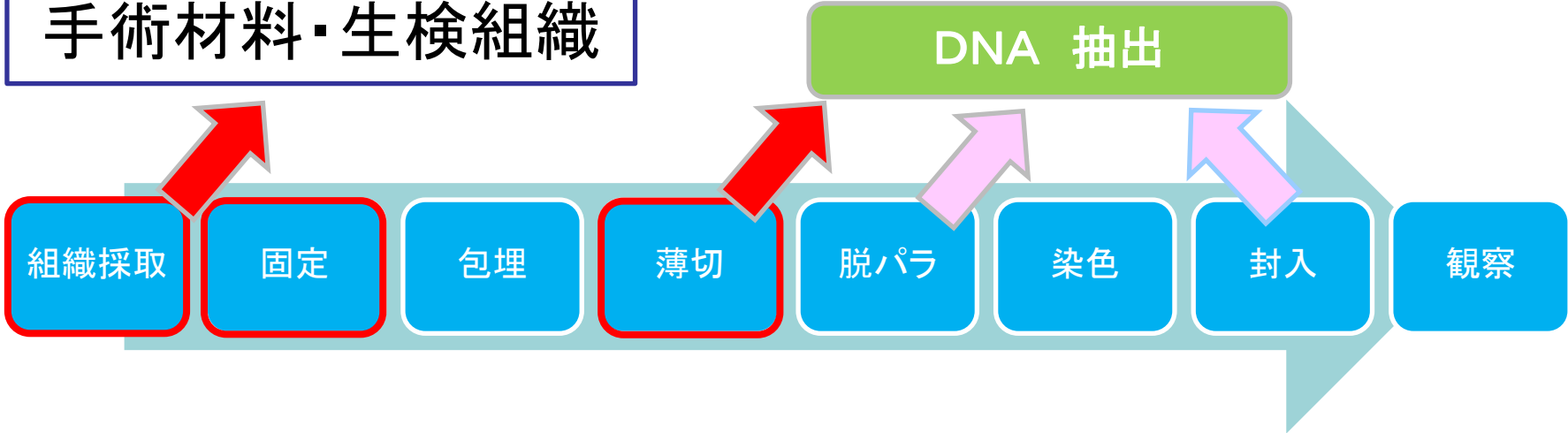
細胞診



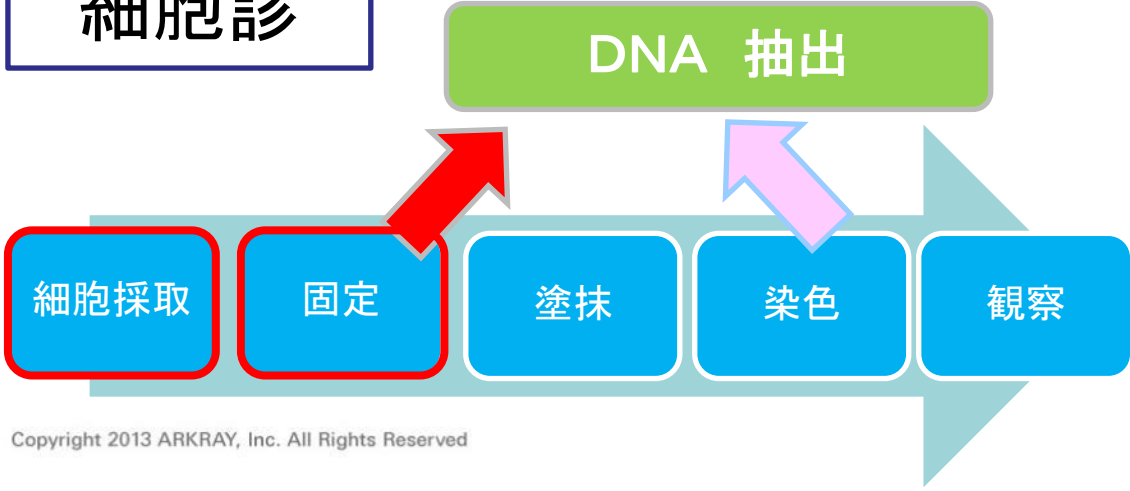
それぞれの検体での操作手順



手術材料・生検組織



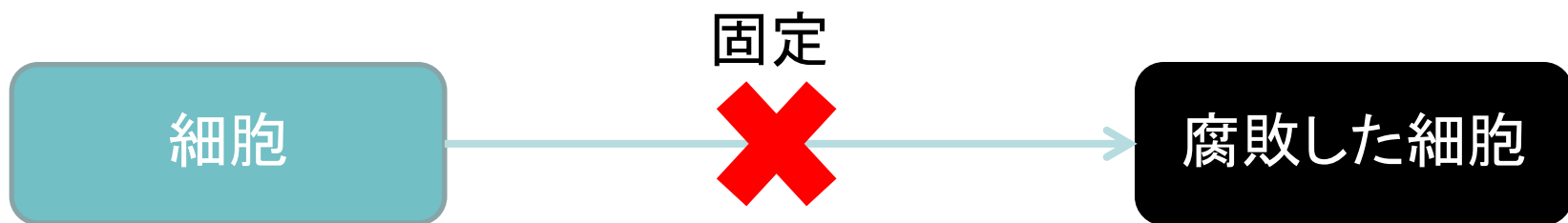
細胞診



固定とは



タンパク質の安定化を行い自己融解を阻止する
→腐りにくくする工程



診断方法	固定試薬	固定作用
手術材料・生検組織	ホルマリン固定	メチレン結合によるタンパク質の安定化
細胞診	アルコール固定	脱水+タンパク質凝固させる

※切除されてから1時間以内に中性緩衝ホルマリンでの固定が始められるべき。

(肺癌患者におけるALK遺伝子検査の手引き、乳癌HER2病理診断ガイドライン(仮))

固定までの時間が免疫染色および FISH に与える影響



Table 2 Delay to formalin fixation time and estrogen and progesterone receptors and HER2 fluorescence *in situ* hybridization

DFF time	ER			PR			HER2 FISH	
	Mean Q score(range)	Mean difference in Q score (range)	P-value*	Mean Q score (range)	Mean difference in Q score (range)	P-value*	No. of valid cases	P-value**
0 min	7 (7-7)	0 (0-0)	NA	6.75 (6-7)	0	NA	10	NA
10 min	7 (7-7)	0 (0-0)	NA	6.75 (6-7)	0	NA	10	NA
30 min	7 (7-7)	0 (0-0)	NA	6.75 (6-7)	0	NA	10	NA
1 h	7 (7-7)	0 (0-0)	NA	6 (4-7)	0.75	NS	7	NS
2 h	6.8 (6-7)	0.2 (0-1)	NS	6 (4-7)	0.75	NS	4	<0.03
4 h	6.4 (6-7)	0.6 (0-1)	NS	6 (4-7)	0.75	NS	2	<0.008
8 h	5.6 (3-7)	1.4 (0-4)	NS	5.75 (4-7)	1	NS	1	<0.004
ON	5.8 (5-7)	1.2 (0-2)	NS	5.25 (3-7)	1.5	NS	1	<0.004

NA, not applicable; NS, not significant; ER, Estrogen receptor; PR, progesterone receptor; FISH, fluorescence *in situ* hybridization;

*P-values are obtained using the sign test.

**P-value obtained using exact McNemar's test.

Thaer Khoury, et al : Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *modern pathology*(2009)22,1457-1467

FFPE(ホルマリン種類と固定時間)



GL等	ホルマリン種類	固定時間
JCCLS遺伝子検体品質管理マニュアル	10%中性緩衝ホルマリン	手術材料：室温で18～36時間 生研材料：室温3～6時間程度
大腸がん患者におけるRAS遺伝子変異の測定に関するガイダンス	10%中性緩衝ホルマリン	目安として6～48時間(組織の大きさによる)
肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き		FFPE：6～48時間 生研：1昼夜が一般的
ASCO/CAP clinical practice guideline update(2013)	10%中性緩衝ホルマリン	FISHのための検体 手術材料、生研材料ともに6～72時間以下 (乳癌におけるHER2遺伝子増幅検索における条件)
肺癌患者におけるALK遺伝子検査の手引き、HER2検査ガイド(乳癌編第4版)	上記のASCO/CAP GLを参照	上記のASCO/CAP GLを参照
Medeical Technology Vol40 No.13 2012 【今日から役立つ遺伝子検査実践マニュアル】		手術材料：室温で18～36時間 生研材料：室温で3～6時間程度
Medeical Technology Vol43 No.10 2015.10 Q&Aで学ぶ病理・細胞診領域における遺伝子検査の基本	10%中性緩衝ホルマリン	乳癌では72時間以内が推奨されるようになったが、乳癌以外、特に変異検査を行う組織では48時間以内が推奨されている。

FFPE(ホルマリン種類と固定時間)



時間がポイント！！

ホルマリン種類
ホルマリン
中性ホルマリン
(等張ホルマリン)
中性緩衝ホルマリン

固定時間	状態
24時間以下	組織収縮 細部構造崩壊
24時間 ~48時間	固定
48時間以上	組織片の脆弱化 による 収縮や膨化



48時間以上になると、DNAの断片化が起こりやすくなる
1週間を超えると検体として適さないという報告もある

組織からのDNA抽出



DNA抽出方法

組織を溶解し、タンパク質の分解等を行なう。



DNA抽出を行なう

スピнкаラムで抽出する方法

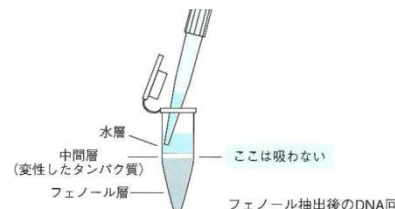
DNAカラム抽出キット



キアゲン社HPより

用手法で抽出する方法

フェノール/クロロホルム抽出
⇒エタノール沈殿(濃縮)



遺伝子工学実験ノートより

自動装置で抽出する方法

Maxwell16
磁性体シリカレンジ
を利用



プロメガ社HPより

体細胞遺伝子検査における 検体を選ぶ際の注意点



ホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロック



がん組織が全体の50%以上を占める検体を選ぶ

※HE染色標本で充分量の腫瘍細胞を確保できることを確認する。

※検体中に正常細胞の割合が多い場合は

マイクロダイジェクション等を併用し腫瘍細胞比を高める。

アポトーシス、壊死を起こしていない検体、少ない部分を選ぶ

※アポトーシス、壊死によりDNAが分解している可能性が高い

複数の材料が存在する場合には、保存期間が短い、組織内の腫瘍量が多

い、
薬物療法や放射線療法などの前治療による組織への影響が少ない、等を
勘案して選定する。

大腸がん患者におけるRAS遺伝子変異の測定に関するガイダンスより抜粋 改訂

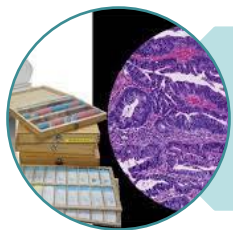
遺伝子検査を外部委託する際の注意点



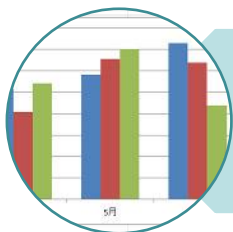
委託先で指定されている手順、方法で行う。



検査(分析)法を十分理解する。

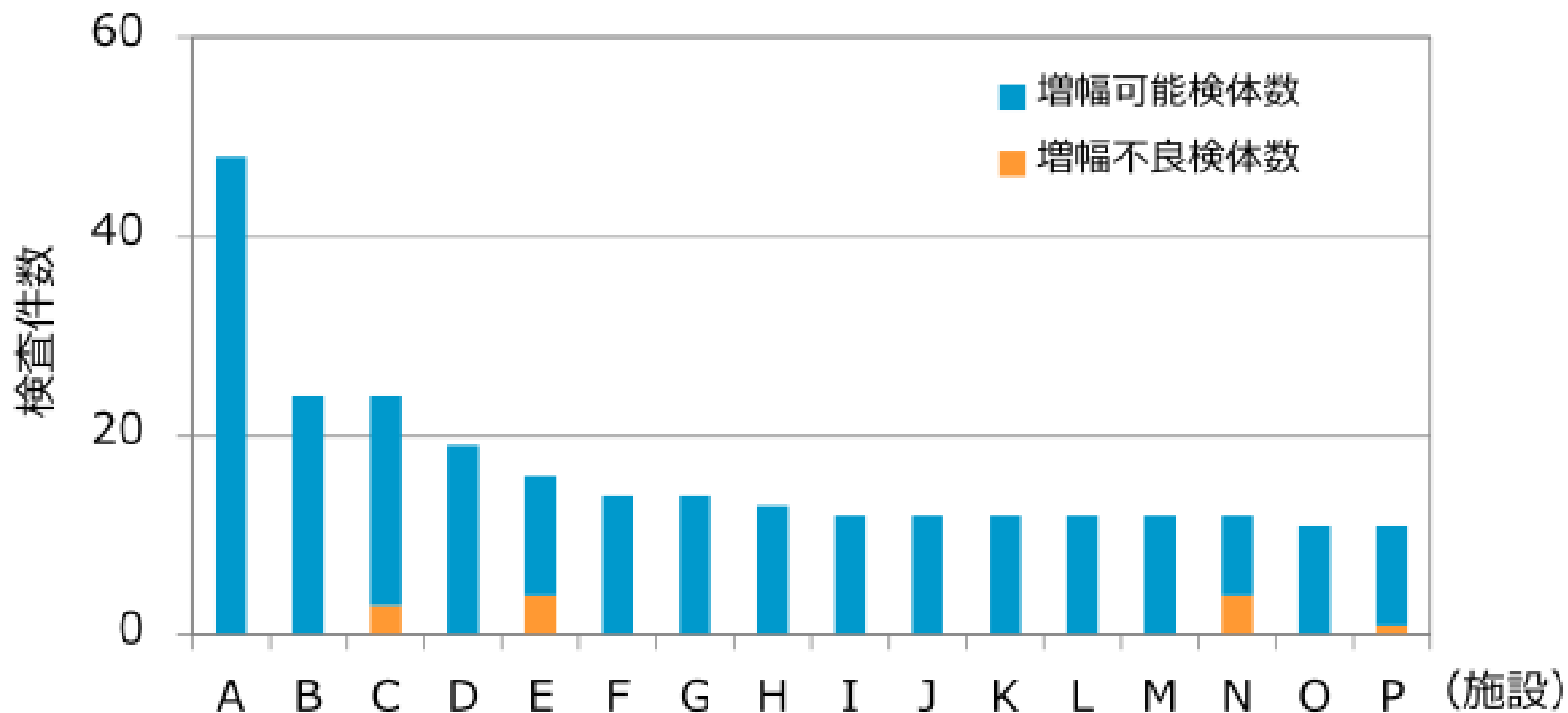


腫瘍細胞割合(%)が適切であることを確認する。



自施設の検査陽性率を把握する。

PCR法によるEGFR遺伝子検査結果と検査材料作製施設の関係



日本臨床検査標準化協議会（JCCLS） 遺伝子検査専門委員会調査 2011

検体取扱いの注意点



検体の保存について **注意点**

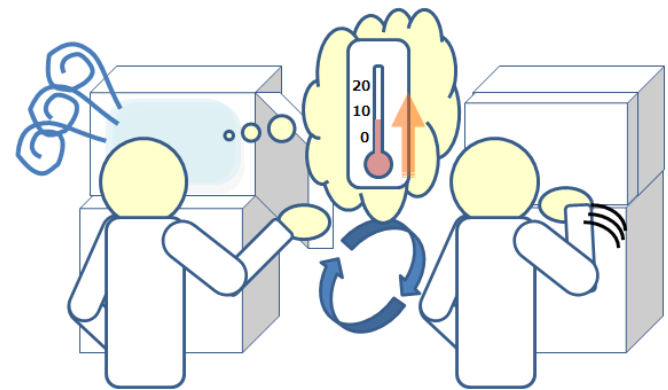
検体の保存状態が悪い場合、組織や細胞の生物活性が低下し、細胞内のヌクレアーゼにより核酸が分解される。その結果、PCR等の検出の効率が低下し、検査結果に影響を及ぼすことがある。



目的や材料によって低温保存または冷凍保存する必要があります。

【注意するポイント】

- ・ 検体はできるだけすみやかに処理をする (DNA抽出)
- ・ 凍結融解を繰り返さない
- ・ 長期間DNAを保存する場合は凍結保存をする。 (-80°Cが望ましい)



分解酵素への対策



検体の保存について

DNAやRNAを分解する酵素への対策

表 2 ヌクレアーゼ対策

ヌクレアーゼ	対策
DNase (DNA分解酵素)	<ul style="list-style-type: none">・ 121℃ 2気圧20分で分解されるので、再生使用する器具や消耗品はオートクレーブ処理をする。または、乾熱滅菌処理する。
RNase (RNA分解酵素)	<ul style="list-style-type: none">・ 121℃ 2気圧20分では、完全に不活化されない。このため、乾熱滅菌処理するかDEPC (0.1%ジエチルピロカーボネート) で処理後、121℃ 2気圧20分オートクレーブ処理し、DEPCを完全に分解してから使用する。・ RNAの溶解やRNA用試薬には、DEPC処理水を用いる。

表 3 消耗品

マスク	サージマスクを正しく着用する。
手袋	パウダーフリーのものを着用し、こまめに取り替える。
試薬容器	ポリプロピレン製のものを小分けし、使い捨てとする。
ピペットチップ	疎水性フィルター付き (滅菌済み) のものを使用する。
スポイト	エアロゾル防止のため先の細いもの (滅菌済み) を使用し、使い捨てとする。

本日の内容



- 遺伝子とは
- 遺伝子検査の実用例 EGFR、RAS
- 遺伝子の分析・原理について
- 遺伝子検査の流れと注意点
- **i-densyを用いた遺伝子検査のご紹介**



遺伝子解析装置 i-densy IS-5320 のご紹介



410(W)×450(D)×415(H) 27kg

i-densyの特長



・測定対象検体

全血、口腔スワブ懸濁液(70 μ L以上)、精製核酸4 μ Lなど

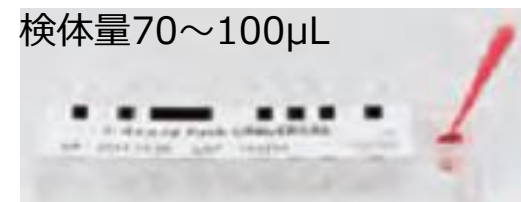
・測定時間

全血の場合

80分間/1検体

精製核酸の場合

65分間/1検体



・最大4検体同時測定

測定中追加測定可能

・測定可能変異数

1カートリッジで最大3変異を同時測定

・コンパクト設計

410(W)×450(D)×415(H)、27kg

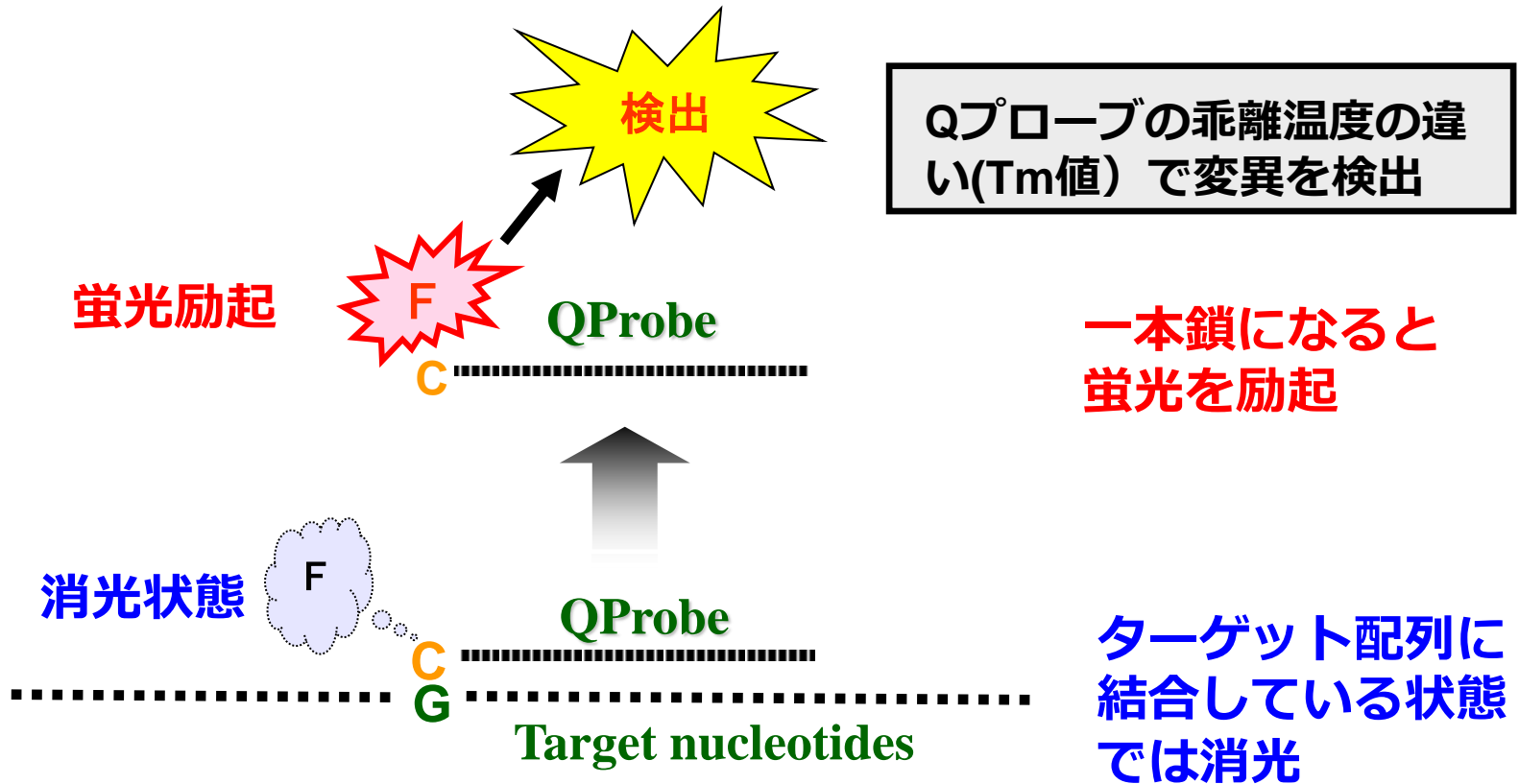
例えば、

・ IL28B + ITPA + α

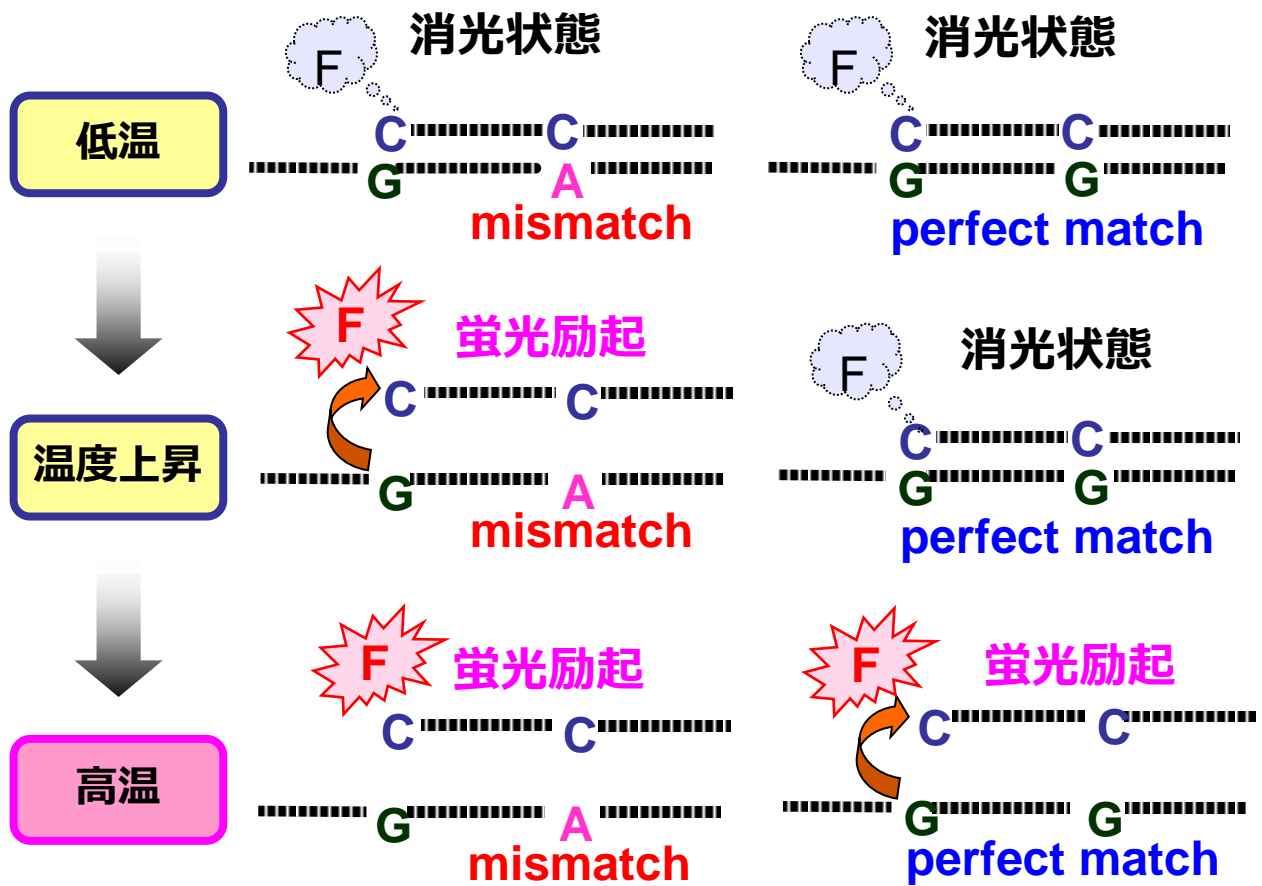
・ KRAS + BRAF など

※機器は医療機器、試薬は研究用

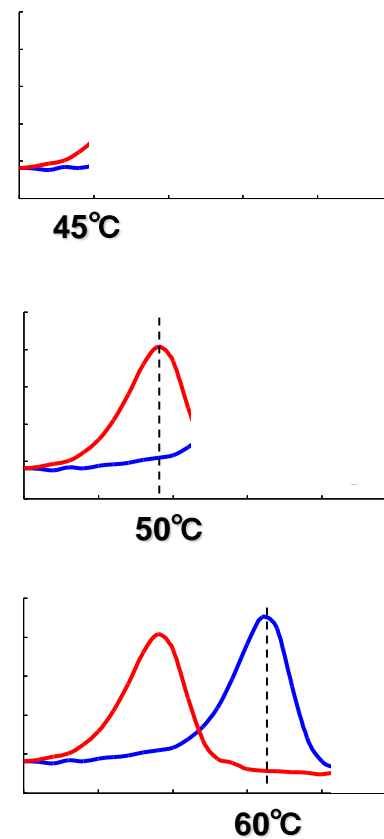
蛍光検出法の原理 (QProbe)



蛍光検出法の原理 (Tm解析法)



結果グラフ



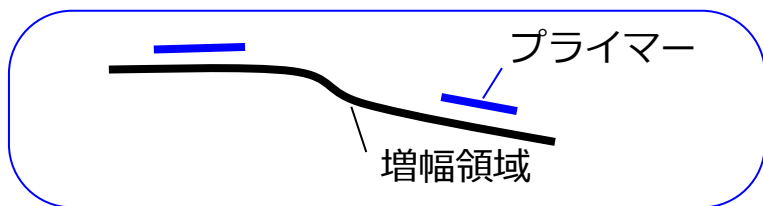
UNIVERSALによる測定



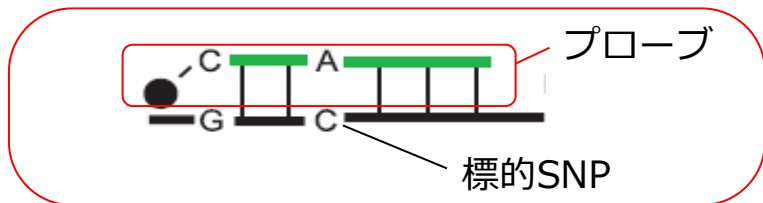
標的SNPのプライマーとプローブの配列を設計すれば、UNIVERSAL試薬を用いて**任意の項目**が測定可能です。

施設にて学会発表や文献投稿された代表的な項目

プライマー配列の設計・合成



プローブ配列の設計・合成



全血検体からの測定

- IL28B^{※1}
- CYP2C9
- CYP2C19
- JAK2
- ITPA^{※1}
- VKORC1
- CYP2D6
- UGT1A1 など

精製核酸からの測定

- KRAS^{※3}
- BRAF^{※3}
- ABL
- EGFR
- c-Kit
- など

もっと簡単にできないか...

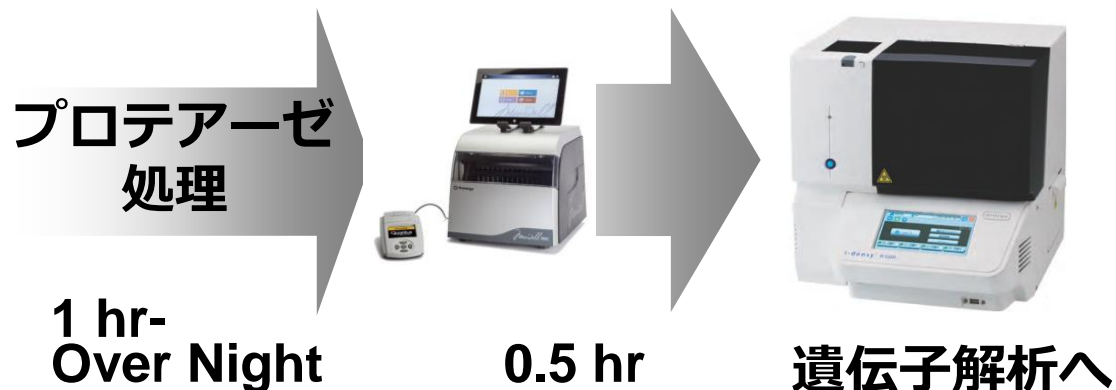


従来法

＜FFPE検体を使用する場合＞



前処理の自動化



もっと簡単にできないか...



従来法

＜FFPE検体を使用する場合＞



簡易前処理法



もっと簡単にできないか. . .



①細胞診検体
(スライドガラス)

封入剤除去→親水化→脱色

②液状細胞診検体
気管支洗浄液

沈渣→液置換

③パラフィン包埋

薄切→脱パラフィン
(10 μ m \times 5mm \times 5mm)

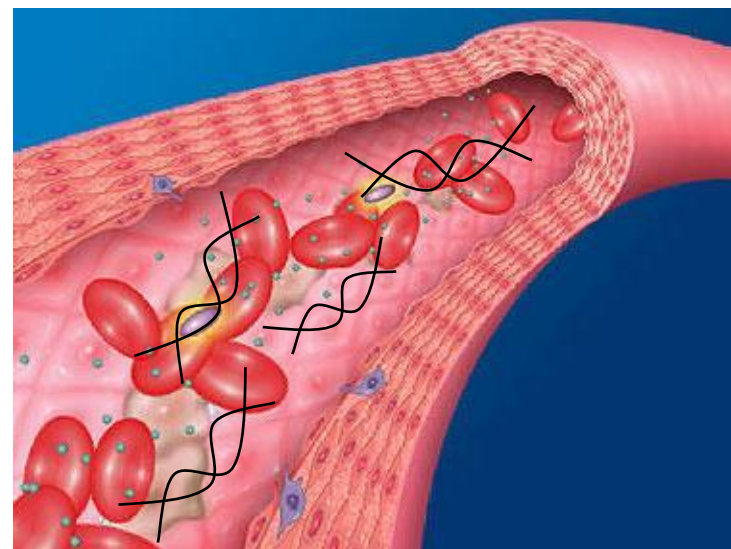
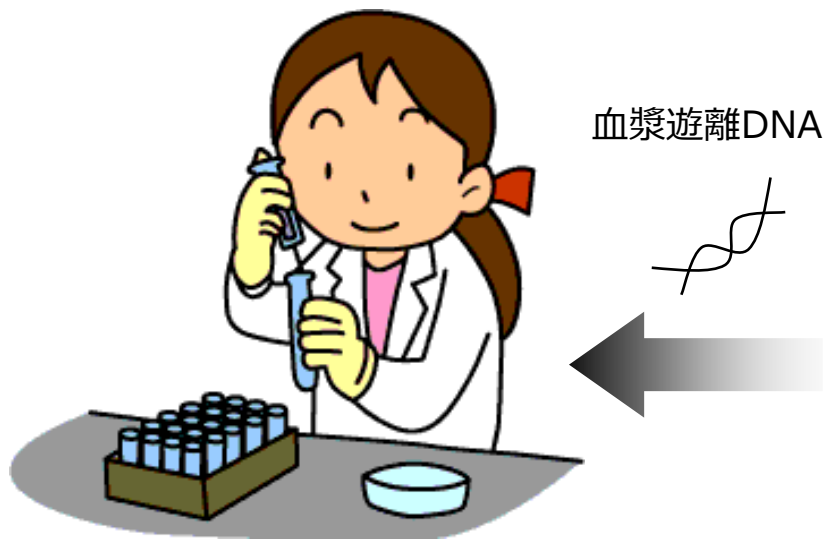
④ホルマリン固定
凍結保存組織

薄切(1mm以下)



前処理 (5~10min)
測定 (80min)

血漿からの遺伝子解析



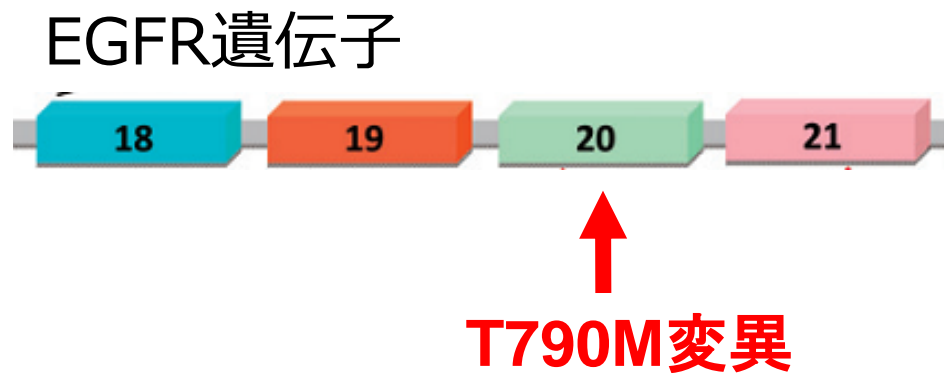
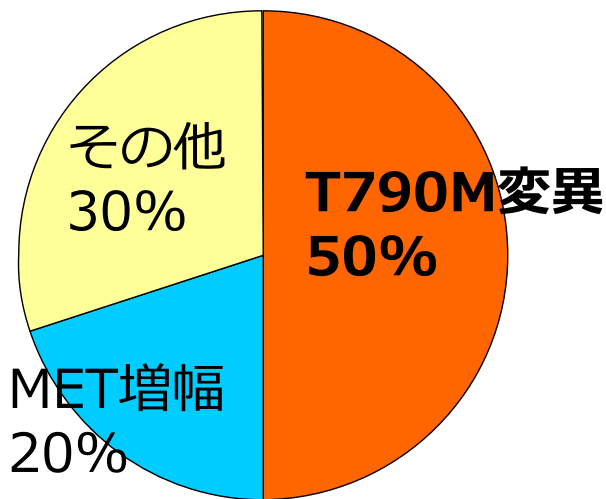
参考) 分子標的薬の耐性変異



イレッサの耐性変異(EGFR T790M)

肺癌でイレッサやタルセバなどのEGFR-TKIが奏効するほとんどの症例は**12ヶ月前後で治療抵抗性**となる。

治療抵抗性の原因



がんの治療戦略



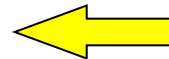
がんと診断

ターゲット遺伝子の検査

分子標的薬投与



耐性獲得



耐性遺伝子の検査

耐性に対抗した分子標的薬の投与

**耐性遺伝子の変異検査をどのような検体を用いて
行うかが今後の課題**



肺癌患者**血漿DNA**を用いた EGFR T790M変異の自動検出系の確立

【結果】

高特異性遺伝子変異検出法(MBP-QP法)にて、EGFR-TKI獲得耐性患者の50%でT790M変異を確認することができた。

血液検査で判断
イレッサの薬効
佐賀大医学部
佐賀大が新方法
肺がんの治療薬「イレッサ」の長期投与で薬効が薄れた患者に投薬を続けるかどうかを、簡単な血液検査で判断する方法を佐賀大医学部の荒金尚子・診療准教授（臨床腫瘍学）らのグループが開発した。がん細胞

肺がん治療の新検査法開発
佐賀大医学部



従来より安定した肺がん治療の薬効を確保する全自動検査装置を前に、世界標準の検査になり得ると期待を込めて、佐賀大医学部が、佐賀市の佐賀大医学部

患者様の負担が少ない採血からイレッサへの耐性変異T790Mを**定期的にモニタリング**することが可能

ご清聴ありがとうございました。

最新のシステムで遺伝子解析をサバーする全自動SNPs検査装置 i-densy はARKRAYの製品です。



オーダーメイド医療をより身近に。SNPs検査の未来形。

いま、オーダーメイド医療の実現を目指した投薬前遺伝子検査(ファーマコゲノミクス検査・PGx検査)が注目されはじめています。PGx検査の導入により最適な薬剤の選択や投薬量の最適化による副作用の回避が可能となり、その市場は2020年ごろには1,000億円以上に拡大するとも予想されています。

近年PGx検査のひとつとしてSNPs検査が実施されていますが、高価な設備と複雑な手法を必要とすることが課題とされています。

i-densy IS-5310は、SNPs検査をコンパクトなスペースで迅速に、特殊技術なしで実施できる環境を実現することで、オーダーメイド医療の発展に貢献します。

i-densy 専用ホームページ

<http://i-densy.arkray.co.jp>