

出國報告（出國類別：進修）

2024 日本鏡檢血球型態與分子檢驗 技術進修心得報告

服務機關：高雄榮民總醫院/

病理檢驗部 急診檢驗室

姓名職稱：李潔美 醫事檢驗師

派赴國家：日本

出國期間：2024/12/23-2025/03/21

報告日期：2025/04/29

摘要

職在日本筑波大學附屬醫院為期三個月的進修經歷，進修目的包括學習進階的尿沉渣型態辨識、分子基因檢測技術以及次世代定序技術。日本在尿沉渣鏡檢有 8 成以上仰賴人工鏡檢，並以 S stain 讓上皮細胞的型態清晰可見，也可提高異常檢體的檢出率。在分子基因檢測技術習得 DNA/RNA 萃取技巧，傳統 PCR 與 Real-Time PCR 檢測技術與定性及定量結果分析，也學習到白血病基因檢測的項目與練習白血病血液抹片型態判讀。最後也見習 NGS 操作流程，共可分為 RNA 萃取、Library 製備、定序及資料分析四大步驟，雖然在 NGS 實驗室沒有親自操作檢體，但過程中也受益良多。未來也希望能將所學應用於本院，提升同仁型態辨識能力，也期望能提供更多的檢測項目供臨床對於白血病或癌症基因有更多的發現。

關鍵字:尿沉渣型態辨識、白血病基因檢測、白血病血球型態、次世代定序。

目次

一、 目的	4
二、 過程	4
三、 心得	26
四、 建議事項	27
附錄.....	28

一、 目的

此次進修主要是由高雄榮民總醫院 113 年行政院退輔會公務人員出國進修人員遴選到日本筑波大學附屬醫院(University of Tsukuba Hospital)為期三個月的短期進修。筑波大學附屬醫院為筑波大學醫學專業的教育研究場所，為日本通過公立三級甲等醫院的評定(如同台灣醫學中心等級)，總共有 2647 位員工，共可提供 809 個病床供病患入院治療。筑波大學附屬醫院位於日本茨城縣筑波市，以研究為發展的城市，故也有日本矽谷之別名。日本的尿沉渣型態學是非常厲害的，故希望可以在這裡學習到如何辨識進階型的尿沉渣細胞；另分子基因實驗室提供多種白血病相關的基因檢測項目，希望未來可以協助醫院提供完整的白血病基因檢測服務，讓臨床醫師可以及時診斷與評估病患預後是否再復發的成效。最後也希望能觀摩 NGS 操作流程，雖然目前這邊的 NGS 僅研究用，並無用於臨床報告的提供，但若能從中了解實驗原理、步驟及品質管理，也可以幫助院內未來建置多項由本院自行檢測的 NGS 項目的實驗流程。



圖一、筑波大學附屬醫院樣貌

二、 過程

這 3 個月到筑波大學附屬醫院見習，主要的訓練安排由南木融技師進行 3 個月的訓練課程。此次訓練的課程可分成 4 大部分，包含：

1. 尿沉渣鏡檢型態訓練。
2. 白血病基因檢測，癌症基因檢測與感染性病毒檢測
3. 血球鏡檢型態訓練。
4. NGS 基因檢測技術。

1.第一週與第二週(12/23-1/5)

12/23 到筑波大學附屬醫院報到並先到 Ninomiya House 了解宿舍的周遭環境，再來到醫院時先熟悉筑波大學附屬醫院的環境，筑波大學附屬醫院總共有分成 Keyaki Building、A 棟、B 棟、C 棟、D 棟與 F 棟，而實驗室主要位於 C 棟的 3 樓。在 IRO 中心健翔先生幫忙介紹環境之後，就到了實驗室與 Suzuki 醫師面談，也到了遺傳基因實驗室、輸血檢查室、鏡檢實驗室以及 i-Laboratory 參觀。

- (1) 在遺傳基因實驗室有提供基因的檢測，包含 BCR-ABL、JAK gene mutation...

分子檢驗項目。微生物的自動化設備包含 Vitek 2、Vitek MS、BacT/ALERT。

- (2) 在輸血檢查室，則學習到他們的緊急 O 型血是以資訊化的方式進行緊急 O 型血發血程序，而且如果在已知血型且抗體篩檢為陰性時，他們也只做 ABO 血型，並不會再做 cross-matching 的試驗，除非是有執行 bone marrow transplantation 的病患才會做交叉試驗。

- (3) 在鏡檢實驗室看到尿液檢體所有相關檢查在同一實驗室，包含尿液十項化學、尿沉渣以及尿液生化檢測。在尿沉渣設備是使用 sysmex UF5000，影像的部分則用 TOYOBO 染色尿沉渣檢體，依千惠醫檢師敘述，尿沉渣檢體他們仍有 80%是以人工方式進行鏡檢，與台灣實驗室的運行模式其實是有差別的。

- (4) i-Laboratory 實驗室是在醫院以外的一棟實驗室，為 TMER(Tsukuba Medical Laboratory of Education and Research)與 TILL(Tsukuba i-Laboratory LLP)兩個商業組織的所在地。TMER 主要負責教育和研究支援的特定非營利組織；TILL 主

要負責院外醫院、住院檢體與其他診所的檢體，也有負責 24 小時的檢查(筑波大學附屬醫院的血液、生化與免疫檢體外包由 i-Lab 執行)。前台有檢體處理區、血液分析儀、尿液分析儀、Arkary 6060(Osmometer)半自動檢測儀、Hitachi 生化分析儀與 Roche c801 免疫分析儀(自動化軌道串接)、HbA1c 檢測儀、過敏原檢測(Phaladia)，也有分子檢驗的實驗室，內有 NGS 定序儀但主要為研究用。實驗室參訪後，也跟隨著南木融 檢查部技師長規劃這三個月的課程，第一個月會到鏡檢實驗室學習尿沉渣型態以及遺傳基因實驗室學習分子檢測技術。接下來第二與第三個月，主要會到 i-lab 與 NGS 實驗室做學習。

2.第三週 (1/6-1/12):一般檢驗-尿沉渣鏡檢學訓練

日本在尿沉渣鏡檢的推廣一直是台灣醫檢界推崇的國家，在國內曾聽過多場由日本尿沉渣專家所演講的型態鏡檢課程，一直以來也是我很想要學習的領域。這次有機會到日本當然也要學習尿沉渣鏡檢的課程。一般檢驗實驗室的配置為尿化學設備(Eiken US3500 與半自動 US1200)、尿液生化檢驗(Hitachi)與尿沉渣設備(Sysmex UF5000 與 TOYOBO μ -Scanner)以及 5 台顯微鏡進行人工尿沉渣鏡檢。實驗室收到的尿液檢體是放於尿杯(約 25mL)中，再經由人工的方式進行簽收與分裝，會需要這麼多檢體的原因主要是臨床醫師若追加檢驗時，可以從剩餘尿杯中分裝尿液進行檢驗，但全天需要 1 位醫檢師進行人工分裝的作業(每天約有 500 隻尿液檢體，其中有 200 隻含有尿沉渣檢驗)，非常繁瑣。而遇到檢體為須避光檢驗時，實驗室會提供避光管進行分裝，不需再用錫箔紙包裝，我覺得是可以在我們醫院評估若需要避光的檢驗也可以用避光管(如圖二)採檢，可減少檢驗前忘記以錫箔紙避光送檢或放置過久造成檢體光解的問題。另外當檢體冷藏產生結晶沉澱造成混濁時，醫檢師會取 60-70°C 的溫水將檢體放置其中回溫 1 分鐘，檢體會從混濁變為清澈，再將檢體進行尿化學儀器分析，可減少檢體受到干擾的問題。尿沉渣分析儀器的使用，可能是因為他們 80%的尿沉渣檢驗會以人工方式鏡檢，所以在儀器的使用效能並沒有太多著墨。後續在尿沉渣鏡檢的訓練，主要著

重於 Atypical cell、Renal Tubular Epithelial Cell、Urothelial Epithelial cell、RBC morphology(Isomorphic and Dysmorphic RBC) and Special urine particles。其中有一個特別的尿沉渣型態為 Mulberry body(圖三)，可以用來輔助診斷 Fabry Disease。透過 Sterheimer Stain 可將上皮細胞的細胞核與細胞質分別染色藍色與紫紅色來做區分，可以更清楚的了解上皮細胞的種類，也能夠早期發現是否有異常細胞的存在，後續也會在發報告時提供給醫師輔助診斷病人是否有腎臟或膀胱等問題。而在每支尿液上都會標示檢體科別來源，我覺得可以幫助醫檢師了解病患就診的科別，以及尿沉渣時要特別注意是否有某些細胞存在，例如：免疫風濕科與腎臟科的病患要特別注意是否有 cast 的沉渣、小兒科的病患則是要特別注意是否有 crystal 或 cast 的沉渣、而泌尿科的病患則是要注意是否有 Atypical Cell 的存在。也很謝謝訓練單位的醫檢師非常熱心的指導，讓我可以在尿沉渣的學習有更進階的提升(圖四)。



圖二、避光採檢尿管



圖三、Mulberry bodies



圖四、與一般檢驗醫檢師合影

3.第四週 (1/13-1/19):遺傳子實驗室-分生訓練

第二部分想要學習的重點，就是學習分子生物的基因檢測技術。這裡實驗室的檢測項目總共有 60 項，可區分為五大種類：白血病基因檢測、癌症基因檢測、WT-1 mRNA、免疫相關的遺傳基因與病毒感染檢測。而在筑波大學附屬醫院檢體量分布每年約有 6000 件檢體，檢體分布如下表：

	Leukemia	Cancer	WT-1 mRNA	Virus*
檢體量(件)/年	1700	2400	1000	700

*Virus 不包含 COVID-19 PCR

在醫檢師的人力配置上，總共有 7 位醫檢師進行臨床基因檢測，基因檢測流程可分成四大步驟：

- (1) 檢體萃取(Extraction):可分成 DNA 與 RNA 兩種。
- (2) 檢體增幅(Amplification): 透過 PCR。
- (3) 解析(Analyze): 可分成定性(Qualitative)與定量(Quantitative)。
- (4) 報告書(Report): 整理實驗結果並進行完報。

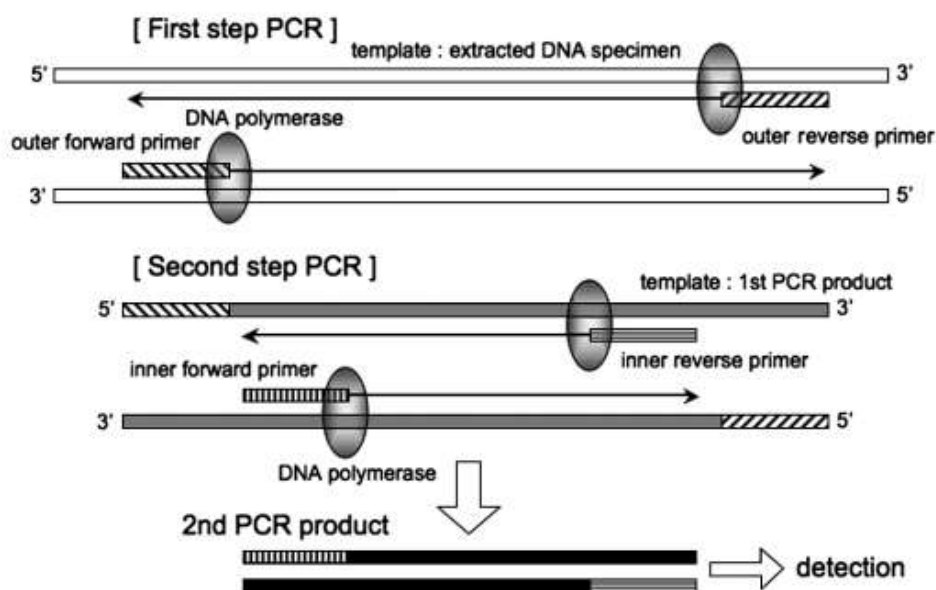
這一週的學習內容包含 RNA 萃取，RNA 合成至 cDNA，二次 PCR 檢測 ABL-BCR (major:P210, 550bp 與 minor:P190,300 bp)，電泳分析定性結果，Real-time PCR 分析定量結果。

- (1) RNA 萃取:是利用 AGPC(Acid Guanidium Phenol Chloroform)的原理進行萃取，所使用的 KIT 為 Nippon 公司所生產的 ISOGEN，試劑成分含有 Phenol 與 Guanidium，與實驗室自行配置的 Lysis Buffer(500mL DEPC 水中含有 0.6057g Tris 與 3.75 g Ammonian chloride)，可將檢體進行溶解或均質化。接著再加入 chloroform 將檢體分成水層、中間層與有機物層，在水層的溶液中即含有欲萃取 RNA，接著再以 Isopropanol 與 70% Ethanol 以 15000rpm,4°C,15 分鐘的低溫高速離心將 RNA 沉澱下來，最後再以 21μ L RNase Free H₂O 進行溶解即完成萃取。

(2) cDNA 合成: 所需 RNA 總量為 $1\mu\text{g}$, RNase Free H_2O 與檢體體積合計為 $9.5\mu\text{L}$ 。故會利用公式計算所需加入的檢體體積(即 1 除以 RNA 濃度=檢體體積 $[\mu\text{L}]$; 9.5 -檢體體積= RNase Free H_2O 水量), 配置好之後會再加入 $9.5\mu\text{L}$ 的 Mixture(內含 10X RT PCR Buffer 、 MgCl_2 、 dNTP Mixture 、 Random 9mers 與 RNase Inhibitor) 與 $1\mu\text{L}$ 的 Reverse Transcriptase , 放入 ProFlex PCR machine(Applied BioSystem)以 30°C 10 分鐘、 43°C 30 分鐘、 99°C 5 分鐘以及 4°C 5 分鐘進行 cDNA 合成。

(3) Nested PCR 檢測 ABL-BCR gene:

Nested PCR 是一種 PCR 的改良模式(圖五), 透過兩次的 PCR 放大提升檢體敏感度與特異性。第一次 PCR 主要是將少量檢體放大, 增加檢測的敏感度; 接著再以第二組 primer 進行 PCR, 可檢測出待測物, 也可提升檢測的特異性。



圖五、 Nested PCR 步驟圖

Reference: 高橋 輝行 et al; 結核性髄膜炎の遺伝子診断: PCR 法による診断の進歩と今後の展開; 臨床神経学 53 卷 11 号 (2013: 11)

【First PCR】→ ABL1+BCR1: Major(210)

ABL-1 primer sequence $5' -\text{GACCCAGCCTTGGCCATTTT}-3'$

BCR-1 primer sequence 5' -CAGAGAGAGAAGAGGGCGAA-3'

ABL1+BCR3: Minor(190)

ABL-1 primer sequence 5' -GACCCAGCCTTGGCCATTTT-3'

BCR-3 primer sequence 5' -AACAGTCCTTCGACAGCAGC-3'

【Second PCR】➔ ABL2+BCR2 :Major(210)

ABL-2 primer sequence 5' -ACACCATTCCTCCATTGTGAT-3'

BCR-2 primer sequence 5' -AAGGCTACGGAGAGGCTGAAG-3'

ABL1+BCR3: Minor(190)

ABL-2 primer sequence 5' -ACACCATTCCTCCATTGTGAT-3'

BCR-4 primer sequence 5' -CACGCCGCAGTGCCATAAG-3'

【PCR Program】➔

Stage 1: 94 °C 5 mins

Stage 2: 94 °C 1 mins ➔ 60 °C 1 mins ➔ 72 °C 1 mins 30sec (35 cycles)

Stage 3: 72 °C 10 mins ➔ 4 °C ∞

(4) 電泳分析檢測 ABL-BCR gene 定性結果:

PCR 產物 50µ L+ 10µ L Loading dye 到檢體混和均勻，並各取 5µ L 檢體加入 2.5% agarose gel 進行電泳分析，ABL-BCR(major) size 為 550 bp，ABL-BCR(minor) size 為 300 bp。

(5) Real-time PCR 檢測 ABL-BCR gene 定量操作與結果:

配置標準品序列稀釋(10X)並劃出檢量線，每個標準品與檢體皆需檢測兩次，以確保無混和不均的問題。

S1 (10 ⁵)	S1 (10 ⁵)	S2 (10 ⁴)	S2 (10 ⁴)	S3 (10 ³)	S3 (10 ³)	S4 (10 ³)	S4 (10 ³)	S5 (10 ¹)	S5 (10 ¹)	S6 (TE)	S6 (TE)
Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Positive Control							

Mix 配置 Protocol，並在 96-well 各加入 50 µ L 的 Mix:

	N=5	N=10	N=20	N=40	N=50	N=1
--	-----	------	------	------	------	-----

Master Mix	125	250	500	1000	1250	25
Primer F(20 μ M)	12.5	25	50	100	125	2.5
Primer R(20 μ M)	12.5	25	50	100	125	2.5
Probe(5 μ M)	12.5	25	50	100	125	2.5
TE	87.5	175	350	700	875	17.5

Std 檢量線檢體加樣體積各 1 μ L，檢體與 Positive Control 則各加入 2 μ L 進行 qPCR 反應。

Major Real-time PCR:

Probe:5' -FAM-CAGCGGCCAGTAGCATCTGACTTTGA-TAMRA-3'

Forwards:5' -GCATTCCGCTGACCATCATCAATA-3'

Reverse:5' -TCCAACGAGCGGCTTCAC-3'

Minor Real-time PCR:

Probe:5' -FAM-AAACCAAAAATGGCCAAGGCTGGG-TAMRA-3'

Forwards:5' -GGCGAGGGCGCCTTCCATGGAG-3'

Reverse:5' -GGCGTGATGTAGTTGCTTGGGA-3'

【Real-Time PCR Program】➔

Hold Stage: 50°C 2 mins ➔ 95 °C 10 mins

PCR Stage: 95 °C 15 secs ➔ 60 °C 1 mins (45 cycles)

4.第五週 (1/20-1/26):遺傳子實驗室-分生訓練

這週進行的是 EBV 與 HHV-6 Viral Load 檢測，一開始先進行 DNA 萃取，實驗

室所使用的是 NIPPON 公司所生產的 ISOSPIN Blood & Plasma DNA 萃取 KIT。萃取的原理是利用 Sodium Iodine 的方式，先加入 Proteinase K 與 200 μ L 的檢體以及 200 μ L 的 BE buffer 以 56 $^{\circ}$ C 加熱 10 分鐘，再加入 200 μ L 99.5% Ethanol 充分混和 15 秒，再利用 column 進行 DNA 的抓取，並經過兩次的清洗後，再以 100 μ L Elution buffer 進行 DNA 的收集，最後再測定萃取後的 DNA 濃度、A260/A280 以及 A260 OD 數值。

再進行 Real-Time PCR 檢測 EBV 與 HHV-6 的定量結果，同 BCR-ABL 方式要先進行標準品序列稀釋並且畫出檢量線，並依照不同的 Primer 檢測 EBV 與 HHV-6。

S1 (10 ⁵)	S1 (10 ⁵)	S2 (10 ⁴)	S2 (10 ⁴)	S3 (10 ³)	S3 (10 ³)	S4 (10 ²)	S4 (10 ²)	S5 (10 ¹)	S5 (10 ¹)	S6 (TE)	S6 (TE)
Sample 1	Sample 1	Sample 2	Sample 2	Control High	Control Low						

Mix 配置 Protocol，並在 96-well 各加入 20 μ L 的 Mix:

	N=5	N=10	N=20	N=40	N=50	N=1
Master Mix	125	250	500	1000	1250	25
Up (2 μ M)	12.5	25	50	100	125	2.5
Primer R(20 μ M)	12.5	25	50	100	125	2.5
Probe(5 μ M)	12.5	25	50	100	125	2.5
TE	87.5	175	350	700	875	17.5

Std 檢量線檢體加樣體積各 1 μ L，檢體與 Positive Control 則各加入 2 μ L 進行 qPCR 反應。

EBV Real-Time PCR:

Probe:5' -FAM-TGTACACGCACGAGAAATGCGCC-TAMRA-3'

Up:5' -CGGAAGCCCTCTGGACTTC-3'

Down:5' -CCCTGTTTATCCGATGGAATG-3'

【Real-Time PCR Program】➔

Hold Stage: 50 $^{\circ}$ C 2 mins➔ 95 $^{\circ}$ C 10 mins

PCR Stage: 95 °C 15 secs → 60 °C 1 mins (45 cycles)

HHV-6 Real-Time PCR:

Probe: 5' -FAM-AGCCACAGCAGCCATCTACATCTGTCAA-TAMRA-3'

Up: 5' -TTTGCAGTCATCACGATCGG-3'

Down: 5' -AGAGCGACAAATTGGAGGTTTC-3'

【Real-Time PCR Program】 →

Hold Stage: 50°C 2 mins → 95 °C 10 mins

PCR Stage: 95 °C 15 secs → 62 °C 1 mins (50 cycles)

Real-Time PCR 之後接著會進行 viral load 數值計算，有兩種呈現方式 → copy 數量 / 10⁶ 個細胞 或 copy 數量 / μ g DNA 公式計算如下：

- ◆ OD of DNA * 50 = Concentration of DNA
- ◆ Concentration of DNA / 5μ L DNA 含量 * (Elution Buffer 體積) * Qty data = 200μ L 中的 copy number
- ◆ WBC 數量 / μ L * 200 = 200μ L 檢體中的 WBC 數量
- ◆ 200μ L 檢體中的 WBC 數量 / 10⁶ = 10⁶ 檢體中有多少 WBC 數量
- ◆ 200μ L 中的 copy number / 10⁶ 檢體中有多少 WBC 數量 = copy 數量 / 10⁶ 個細胞

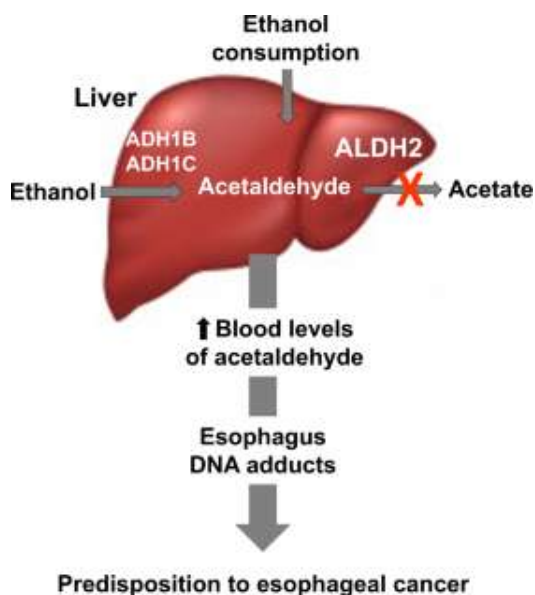
【結果一】

- ◆ Qty data * 1000 (ng → μ g) / 5μ L DNA 含量 * (Elution Buffer 體積) = copy 數量 / μ g DNA 【結果二】

5. 第六週 (1/27-2/2): 遺傳子實驗室-分生訓練

這週進行的是 ALDH2 基因檢測的實驗，用來檢測代檢者是否有乙醛代謝不全的基因(圖六)，ALDH2 基因變異主要在於第 487 個 nucleotide 中原本為 G，變異

為 A，而在不同的 primer 設計上可以檢測出 NN(有活性)，DD(無活性)，ND(部分活性)的不同型別，進而判斷病患是否有 ALDH2 基因的變異而造成飲酒時容易臉紅的症狀。



圖六、酒精代謝與 ALDH2 gene 關聯圖

(Reference: Rachel A. Montel et al, Can gene therapy be used to prevent cancer? Gene therapy for aldehyde dehydrogenase 2 deficiency (2022) ; Cancer Gene Therapy volume 29, pages889 – 896

實驗步驟可分成 DNA 萃取-> PCR Amplification -> 電泳分析結果

DNA 萃取的流程【使用 Promega Maxwell RSC Genomic DNA Kit AS1880】：

從口腔用棉棒挖取檢體並放入含有 300μ L 的 Lytic Enhancer (LE2)與 30μ L Proteinase K，靜置 1 分鐘後放入 56°C 的加熱器加熱 20 分鐘。再加入 300μ L Lysis Buffer。接著再打開 Kit 中的鋁箔反應試劑將檢體加入反應槽中並進行 35 分鐘的 DNA 萃取，萃取完畢後則以 20000g 2 分鐘離心(可將磁珠離心到管壁邊緣)並將 Elution Tube 中將檢體進行 DNA 濃度之量測。

PCR Amplification:

Forward Primer: CATAACCCCCAAGAGTGATTTC

Reverse Primer for N type: CCCACACTCACAGTTTTTCACATC

Reverse Primer for D type: CCCACACTCACAGTTTTTCACATT

反應管溶液配製:

10X Buffer	5.0 μ L
dNTP	4.0 μ L
Primer F(20 μ M)	1.5 μ L
Primer R(20 μ M)	1.5 μ L
DEPC+ Sample (Total 100ng)	37.3 μ L
TaKaRa Ex Taq HS	0.7 μ L

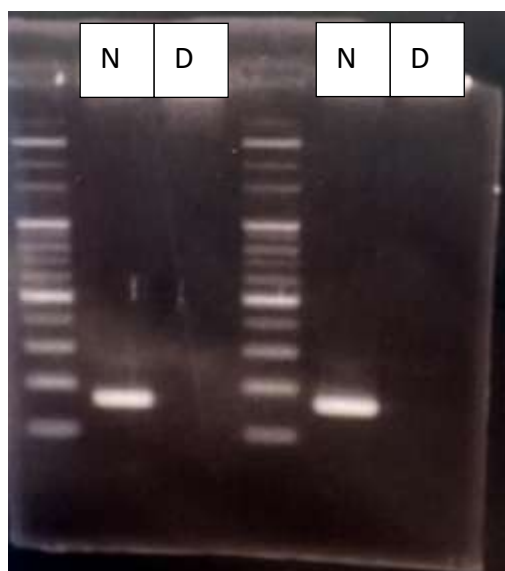
【PCR Program】→

Stage 1: 94 °C 5 mins

Stage 2: 94 °C 30sec → 65 °C 30sec → 72 °C 30sec (35 cycles)

Stage 3: 72 °C 10 mins → 4 °C ∞

電泳分析結果(圖七): 兩個檢體皆為 NN type，為正常表現的基因型



圖七、 ALDH2 電泳圖

這週也參加第 23 回關東甲信支部・首都圏支部遺傳子・染色體檢查研討會，會議主題為:現今基因醫療進步與基因相關檢查，議程包含:染色體檢查的基礎介紹、基因檢查實驗室的檢體品質把關與認證作業相關文件介紹、臨床檢查室基因檢查演進與臨床醫檢師在癌症基因醫療中所扮演的角色。會議中有提及萃取核酸時有些要注意的地方，包含:(1)萃取時要穿戴手套與口罩，才可以避免 DNase 或 RNase 的混入 (2)避免物理性的劇烈 Vortex，容易造成核酸片段化 (3)RNA 需要保

存在超低溫的環境，DNA 則是在-20℃的環境，但也要避免重複解凍的情況 (4)
要避免使用酸性的水避免造成核酸的水解。

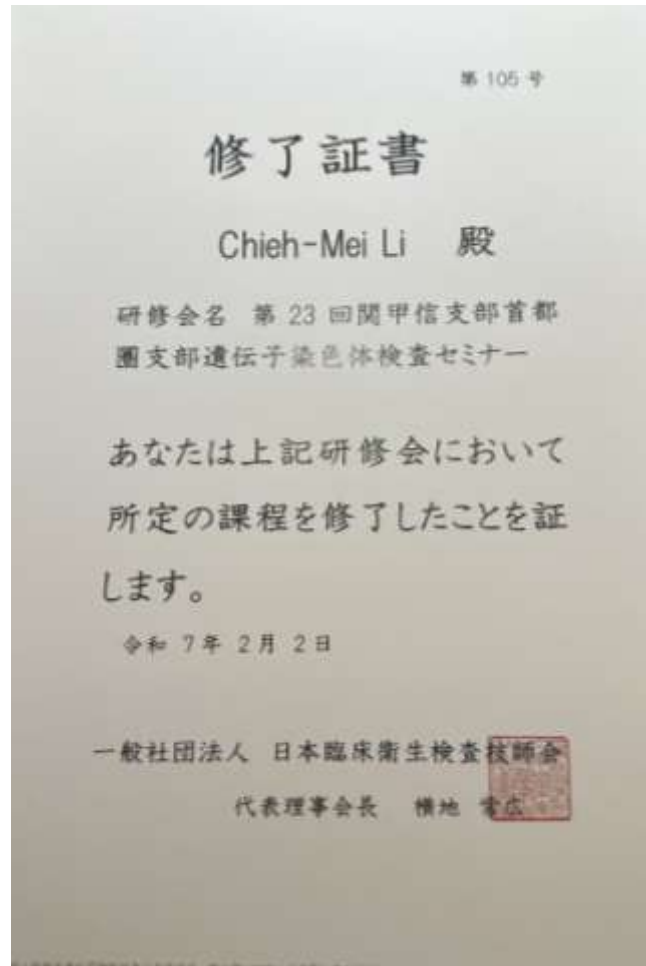
在基因檢查的實驗室也提及要在人機料法環五大方面進行品質確保，(1)人員: 是否有經過訓練、能力考核通過之授權以及持續進修的紀錄 (2)機器:儀器的適格性確認(即儀器安裝時要確認其合格性、儀器效能要合格、儀器操作的合格性)、儀器管理(包含:儀器一覽表、儀器配置圖、供應商評估)、儀器維修(儀器故障時要有明確公告不可使用之告示牌、除汙的步驟與儀器維修後要如何確認是否已修復的紀錄)、儀器保養(日保養紀錄、定期保養計畫與紀錄、替代機台的使用確認紀錄)、儀器操作(包含人員教育訓練與儀器操作步驟)、溫度設備的查驗(加熱器)、PIPETTE 與電子天平的定期校正紀錄與計時器的定期校正 (3)材料(即試劑與消耗品): 若為 IVD 的試劑，是否有進行驗證；若為 LDT 的試劑，是否有進行妥當性的確認；而在試劑與消耗品的部分也強調要有庫存管理 (4)方法: 內部品管、外部能力試驗或外部實驗室比對的替代方案 (5)環境: PCR 操作之檢驗前中後規劃(圖八)。



圖八、分子病理檢查室環境圖

另外有一堂課程提到醫檢師在癌症醫療的角色，日本從 2019 年就將 NGS 基因檢測納入健保給付，執行至 2024 年總共有 273 家醫院有加入癌症基因的醫療小組，其流程包含:事前準備、向患者說明及取得同意、檢體採集、檢體執行、專家小組會議、向患者說明、進行治療以及檢查後費用申請。這些流程需要開單醫

師、病理醫師、藥師、醫檢師及護理師多職類參與以提供多方的意見來替病人找出基因的突變位點與治療的方向。而醫檢師也可以在其中多多了解檢體品質的要求、如何檢測檢體以及資料分析如何產出報告這三大領域持續精進(圖九)。



圖九、遺傳子染色體檢查研修會證明

6.第七週 (2/3-2/9):遺傳子實驗室-分生訓練

這個禮拜進行的分子基因檢測為 FLT3-ITD 基因檢測，是用來檢測 AML 的預後因子。首先利用 DNA Extractor WB Kit(和光純藥工業株式會社)進行 DNA 萃取，

同樣是以 Sodium Iodide 方法進行萃取。10mL 溶血劑(實驗室自行泡製，同 RNA 萃取步驟)加入血液檢體進行混合溶解，再加入酵素反應液與蛋白質分解液於 37℃ 進行 1 小時的反應；接著再加入 NaI 與 Isopropanol 讓 DNA 變成白色棉狀(肉眼可見)，再以 Washing Solution A 與 B 進行沖洗，再將檢體放於室溫乾燥 2 小時，最後以 100 μ L TE buffer 進行回溶即可完成 DNA 萃取。PCR 反應時需要 DNA 濃度調整為 100-150 ng/ μ L。

反應管溶液配製:

10X Buffer	5.0 μ L
dNTP	4.0 μ L
Primer F	2.0 μ L
Primer R	2.0 μ L
DEPC+ Sample (Total 250ng)	36.3 μ L
ExTaq	0.7 μ L

【PCR Program】→

Stage 1: 94 °C 5 mins

Stage 2: 94 °C 1 min → 56 °C 1 min → 72 °C 2 min (35 cycles)

Stage 3: 72 °C 10 mins → 4 °C ∞

電泳分析結果 (圖十):



圖十、 FLT3-ITD 電泳圖

FLT3-ITD gene 為 wild type，於電泳圖中會看到一個大約 300bp 的 band；若為 mutant type 則於電泳圖會看到 duplex band，與 wild type 的 band 很接近，所以在電泳時可調整加入 2.5 μ L 的檢體進行電泳，可讓兩個 band 較清楚可見。

而實驗室也分享臨床案例中，病人在 PB smear 沒有看到 Blast，在 BM 有看到 few Blast，在 FISH 結果顯示 CEP-8(+)，FLT3-ITD 以一般的 PCR program 及 primer 分析時有看到兩條 band 但不是分得很清楚，所以實驗室再利用另一對 primer 與不一樣的 PCR program 去抓不同位點的 FLT3-ITD，結果就出現清楚的兩條 band。這樣的案例也顯示基因檢測的結果，有時需要與其他報告的結果檢視其合理性，避免臨床醫師在結果判讀與診斷時產生不一致的狀況。

CALR mutation 的檢測步驟為 DNA extraction ->PCR 電泳分析->將變異的 band 將 gel 切下並送至定序公司進行定序分析。定序結果約 2-3 天會回傳，再將定序結果取至 NCBI BLAST 進行基因序列的比對，即可知道 CALR gene 是否有出現 mutation。CALR gene 主要位於 exon 9 的突變，有多個 variants 的突變位點，但主要是以 52-bp deletion(Type1) 與 5-bp insertion(Type2) 用於診斷 Essential Thrombocythemia 與 Primary Myelofibrosis 為最常見的組合(Type 1 出現的頻率> Type2)。若為 wild type 在電泳結果會顯示 298 bp 的一條 band；若為 25-bp deletion(Type1)在電泳圖會出現三條 band(分別為 normal+ 25bp deletion/ normal/ 25 bp deletion)；若為 5-bp insertion 則會出現 1 條 band，要透過定序結果看看是否有 5 bp 的 nucleotide 出現 double wave。

在進行定序後的基因比對，在報告核發的格式在 wild type 可以正常產出 417 個 amino acid，但如果是 Type 1 的 25-bp deletion，在第 367 個 amino acid 會從 L 突變成 T，造成有 45 個 amino acid 與 wild type 不同，在報告核發時會為 p. L 367 fs* 46 CALR gene type I mutation。若為 Type 2 的 5-bp insertion，在第 385 個 amino acid 會從 K 突變成 N，造成有 46 個 amino acid 與 wild type 不同，在報告核發時會為 p. K 385 fs*47 CALR gene type II mutation。

7.第八~九週 (2/10-2/23):遺傳子實驗室-分生訓練

原本的安排是於第八週進行最後一週分生訓練，訓練主題為 Virus Screening

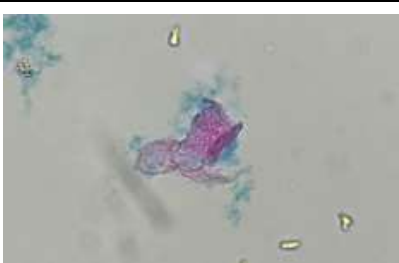
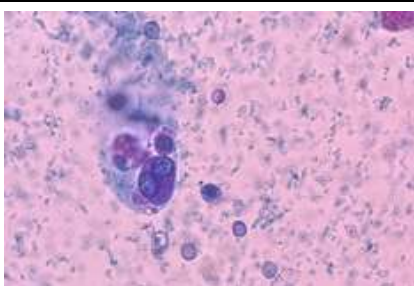
Test，主要透過 Real-Time PCR 先篩選 CMV、HHV6、Adenovirus、VZV、B19、BK Virus、JC Virus、HSV1 and HSV2。每一個 panel 皆會檢測 DEPC/ Positive Control/ Negative Control/ Sample。結果判定需要 DEPC 與 NC 無產物出現，PC 需要有產物出現且 Ct 值要在 $\pm 2SD$ 以內才可判定 Sample 的結果是陽性或陰性。若為陽性的結果則需進行下一步的相對定量分析才可計算出檢體的 Viral Load。

但因訓練期間沒有注意到身體的狀況，所以發生了急性腎盂腎炎的症狀，因反覆高燒與發冷的症狀不斷，於日本體驗急診就醫與住院治療的過程。在日本的急診就醫掛號時就有明確告知需等候的時間，因當日我是在晚上掛急診，雖然前面只有 4 位病患候診，但仍需等待 2 小時才可看到醫生，也因為沒有日本保險的身分，所以醫師其實很仔細地先以問診的方式了解我可能的病因，並以最精簡的檢查方式-即尿液化學檢測來判定我是否為急性腎盂腎炎，當然後續也有建議要進行尿液培養來決定正確的抗生素，但因當時的症狀很不舒服所以就先請醫師開抗生素讓我回家服用並休息。隔天的症狀即使在服用抗生素與退燒藥之後，仍然還是高燒到 40 度以上，故實驗室的同事則幫忙我轉介到原本訓練的筑波大學附屬醫院進行住院治療，雖然聽到住院一週要花費 100 萬日幣的就醫費用，但因為已經沒有體力再回宿舍觀察，所以就接受醫院以點滴與抗生素的治療方式住院觀察；經過 1 週的住院出院觀察後，於 2/20 回醫院持續進行訓練。

8.第十週 (2/24~3/2):鏡檢尿液訓練

這週延續第三週的鏡檢訓練，複習尿液檢體的作業流程與辨識尿液沉渣的型態。從尿沉渣中看到不常見的腎小管上皮細胞，包含:蝌蚪型 RTE、洋梨型 RTE、類

圓形 RTE、圓形 RTE、丸形 RTE，也看到特別的足細胞(Podocyte)的沉渣，細胞質為平滑，有時單核或雙核，雙核的細胞大小不一(如圖十一~十六)；也看到許多。另也於訓練期間也評估 UF-5000 尿沉渣設備檢測非鱗狀上皮細胞(簡稱 NEC)與異形 RBC 的檢測效能。UF-5000是利用流式細胞學原理進行尿液沉渣檢測的分析儀，透過藍光鐳射定量、定性或半定量人類尿液中的下列十七項參數，做為篩檢或臨床實驗室的病患診斷輔助。而在訓練期間評估了 11 隻有 NEC>0 / μ L 的檢體，約有 5 成的檢體中可見到 RTE、Urothelial cell；另也評估 13 隻有 RBC Mixed? Flag 的檢體，約有 7 成的檢體的確可見 Dys RBC。

 圖十一、snake-like RTE	 圖十二、洋梨型 RTE
 圖十三、類圓形 RTE	 圖十四、圓形 RTE
 圖十五、丸型 RTE	 圖十六、足細胞

9.第十一週(3/3~3/9):血球型態訓練

這週訓練主要分成兩大部分，(1)白血病週邊血血液抹片計數 (2)參觀日本 Roche 及 Sysmex 公司。白血病週邊血血液抹片計數總共練習了約 20 片白血病的抹片，

透過自己計數與臨床醫檢師的結果進行比較，也對於異常血球型態與醫檢師一起討論，歸類 AML 與 CML 血球型態與臨床數據差異以及 ALL 與 CLL 血球型態與臨床數據的差異。透過此次訓練，也提醒我要建立正常血片、白血病與異常血片的玻片庫，不僅可方便用於教學上，也可以讓線上同仁有更多抹片庫可以參考增強血液抹片型態辨識能力。

AML 與 CML 歸納表

	AML	CML
細胞種類	大量原始骨髓細胞 (Myeloblasts)	所有顆粒細胞發育階段可見
細胞大小	大，核仁明顯	大小不一，從骨髓球到成熟嗜中性球
Auer rods	常見 (尤其在 M2、M3 型 AML)	無
嗜鹼性球	少見	增多 (嗜鹼性球 >3% 幾乎可確診 CML)
血小板	減少	正常或增加
白血球總數	可能升高或降低	顯著升高 (>100,000/ μ L)
背景血球	全血球減少 (貧血、血小板減少)	白血球增多，但紅血球與血小板可能正常

ALL 與 CLL 歸納表

	ALL	CLL
細胞大小	大	小
細胞種類	淋巴母細胞 (Lymphoblasts)	小型成熟淋巴球
染色質	細緻，核仁明顯	濃縮，呈塊狀 (棋盤格狀)
核仁	1~2 個明顯核仁	不明顯
細胞質	藍色，較少	極少
特殊細胞	無 Auer rods	破碎細胞 (Smudge cells)
背景變化	全血球減少	白血球多，血小板可能正常或減少

Roche 公司參訪心得

3/4 由實驗室主管內藤麻美(Naito Asami)帶領至 Roche 公司參訪，公司介紹 Cobas 生化免疫自動化設備、血液凝固設備、POCT 管理(圖十七)。關於 POCT 管理有

詢問關於檢驗科是否要定期與 POCT 單位進行檢體比對，公司專員回覆需要定期執行，即使是不同型號的設備，也建議需要執行檢體比對以評估兩套設備的相關性及趨勢。而在外部能力試驗的檢體是否要提供給 POCT 單位執行，如何分配檢體的操作，公司專員詢問實驗室主管的經驗，內藤麻美主管認為可以挑選一個 POCT 單位作為 Reference，其他 POCT 則透過檢體比對的方式進行相關性評估即可。而公司專員也分享國外執行 POCT 的文獻，文獻中有評估 POCT 的管理可以檢視各個 POCT 單位的 Precision 表現是否逐年下降，人員訓練的百分比是否逐年成長至 100%才可操作儀器，儀器維修與故障次數，也可以做為日後實驗室 POCT 管理時監控的一些管理指標參考。



圖十七、Roche 公司參訪

Sysmex 公司參訪心得

3/6 與 TMER 理事長 Komatsu 與實驗室主管內藤麻美到 Sysmex 參訪尿液儀器(UF1500/UF5000)，血凝儀器(CN3000/6000)與血液儀器(XN-Series，包含 XR-50、XR-10、SP50、DI-60、BT-50 與 TA-01)(圖十八)。其中最有興趣的是 CN3000 設備，操作上與現有設備並無太大差異，但在結果的圖形判讀儀器中有專家系統，會告訴醫檢師這支檢體無報告的原因與處理方式，可以方便新進醫檢師在操作時清楚要如何處理報告。



圖十八、Sysmex 公司參訪

10.第十二週(3/10~3/16):NGS 訓練

NGS 實驗室位於筑波大學內，早上由石橋先生先介紹整個實驗室的環境，也說明

NGS 的流程，包含 Extraction→Library Preparation→Sequencing→Data Analysis。

前面的步驟為 Wet Lab 操作流程，分別為 RNA purification→ RNA QC→ Library

Preparation→Library QC→Sequencing→Raw data 匯出。此次訓練直接從 RNA 萃取後的步驟開始進行學習，首先利用 Nanodrop 測定 RNA 濃度，再利用 Agilent Bioanalyzer RNA 6000 Pico/ Nano Kit 進行 RIN number 測定其 RNA 品質。RIN number 的好壞會決定後續 DNA fragmentation 的處理時間，通常 RIN number 介於 7-10，DNA fragment 時間需要花費 15 分鐘處理；若 RIN number 介於 3-7，DNA fragment 時間需要花費 8 分鐘處理；若 RIN number 介於 0-3，DNA fragment 時間需要花費 2 分鐘處理。最後進行 Library Preparation 時，要將檢體稀釋為 6uL 中有 100ng RNA 才可進行後續實驗。這週也到筑波大學 Innovation Medical Research Institute 參觀機器人設備，學校於 2016 年開發機器人設備人(Maholo) (圖十九&二十)。目前學校總共有 5 台機器人設備，其中有 2 台主要執行 cell culture，另外 3 台則執行基因分析的作業(包含 RNA 萃取、PCR 分析)，村谷匡史教授(Masafumi Muratani, Ph.D.)也分享機器人操作 RNA 萃取與 Library preparation 的結果與人工(即教授本人)操作的結果是一致的，而且由機器人做出的結果也比較不會被質疑；甚至在當時 COVID-19 疫情嚴峻時，也透過機器人的協助進行 RNA 萃取與定序分析，發揮很大的功效。不過因為採購價格昂貴且還有每年的維護儀器費用，程式販售後也無法隨時配合修正，所以目前只有筑波大學才看的到這個設備。

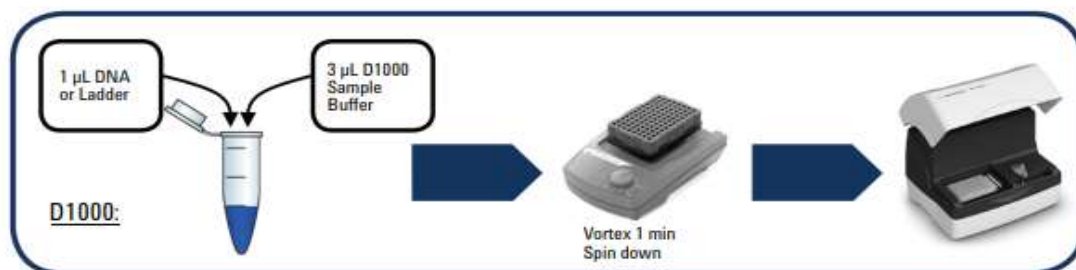


圖十九、機器人拿取冰箱試劑



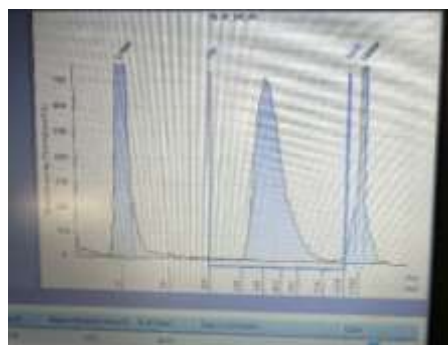
圖二十、機器人自動夾取 96 well

Library Preparation 在實驗室是由機器人負責操作，操作完需要進行 Library Quality Check。實驗室是利用 Agilent Technologies 所販售的 Agilent D1000 ScreenTape System 或 Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System(通常濃度低於 4nM 就會選擇此 KIT)。取用 3 μ L 的 Sample Buffer 與 1 μ L 的 sample 進行混和並放入 Agilent 2200 Tape Station instrument 進行分析(圖二十一)。



圖二十一、Library QC 檢測流程

結果出來後會檢視 Library preparation 的 peak 是否位於 Low peak 跟 High Peak 之間且最高峰的 peak 會位於 300bp，若圖形超出此範圍的話，代表 Library Preparation 的品質不好。同時也會檢視 Library preparation 的濃度，若低於 0.5nM 則不適合用於 sequencing(通常會用 2nM)(圖二十二)。



圖二十二、Library QC 結果

11.第十三週(3/17-3/21):NGS 訓練與辦理離院手續

這週學習的是 Sequencing and Data Analysis，從 NextSeq 定序儀完成的結果為 BCL file，但如果要進行資料分析的話，就必須在儀器匯出 FAST Q file(但須有更多的硬碟儲存空間)或者利用程式碼將資料轉換成 FAST Q file。在這邊也學習製作 Heat Map(檢視序列的一致性)、Box Plot 以及 Principle Component

Analysis(檢視定序的品質)。比較可惜的是因為實驗室所操作的檢體大多為研究機構的來源，所以檢體種類大多為老鼠或細胞，與實際臨床上收到的檢體處理流程與資料分析過程可能有些落差，若日後有機會，希望之後也可以到實際操作臨床檢體的 NGS 實驗室進行資料分析的學習。

最後一天的訓練，也跟筑波大學附屬醫院的檢查部同仁好好道謝與道別，也製作報告向大家介紹高雄榮總以及病理檢驗部，大家聽了報告之後，對我們醫院也非常有興趣，也回饋希望有機會可以到我們醫院參觀與學習。最後也完成離院手續，結束這 3 個月在日本進修的生活。

三、心得

感謝醫院院部長官與單位主管的支持與鼓勵，讓我有機會可以到國外進修。到日本進修的 3 個月說長不長，說短也不短，可以有充裕的時間好好學習筑波大學附屬醫院的鏡檢沉渣型態辨識、分子基因檢測白血病與癌症基因技術、白血病血液抹片型態辨識與 NGS 技術；也有閒暇的時間可以體驗日本生活。在這邊也體驗到日本人親切友善的態度；也感受到日本醫檢師在工作上的盡心盡力，致力於臨床檢驗的工作以提供準確的報告，也在臨床工作中將所負責的行政事務完成。

四、 建議事項

1. 針對需避光的尿液檢體，可找尋合適的廠商，購置具有避光功能的採集尿管，不須在收集檢體後立即用鋁箔紙包裹避光，也不用擔心忘記避光而需要重新採檢的問題。
2. 對於 Urine RBC Morphology，目前日本臨床技師協會(JAMT)和台灣的社團法人台灣醫事檢驗學會(TSLM)皆提出 Dysmorphic RBC 的報告格式分為 Minor、Moderate 以及 Major，且有提供對照表可以清楚知道 Dysmorphic RBC 的數值範圍，建議醫院也可以比照兩個學會提出的格式進行修正，可簡化檢驗流程。
3. 強化醫檢師血球型態辨識能力，建立白血病玻片庫與其他血液疾病玻片庫，可用於新進醫檢師與醫檢實習生教育訓練及在職醫檢師在職訓練用，進而提升整體醫檢師辨識血球型態能力。
4. 擴增白血病基因檢測項目，在日本檢測白血病基因項目有 40 項，白血病基因檢測不僅可用於白血病診斷，也可提升檢測是否有復發的可能性。但因目前基因檢測由 LDT 管理，需申請的文件繁瑣需要投注人力方可建置完整的白血病基因檢測套組，建議可評估增加人力建置白血病基因檢測項目。
5. 尿液常規檢驗若可以提升發現異常細胞的能力，例如：Non-Squamous Epithelial、Dysmorphic RBC、Atypical Lymphocyte 或者泌尿道感染的細菌革蘭氏染色結果，可以提供更多訊息讓醫檢師可以進一步利用染色(S stain)確認是否有異常細胞的存在，也可以提供給醫師更多尿沉渣的報告結果。
6. 人才培育是非常重要的，目前出國進修僅限於公職身分的同仁可以提出申請。院內也有許多優秀的契約醫檢師，建議院內出國進修經費也能提供契約人員有管道可以提出申請，讓大家都能有機會到其他醫院或是其他國家擴展國際觀與視野，一起讓高雄榮總變得更好！

附錄



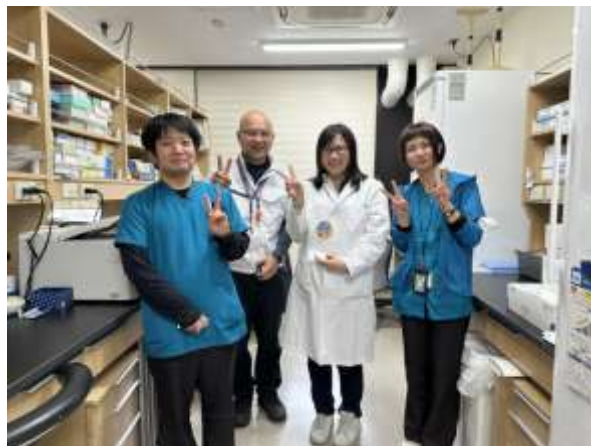
領取結訓證書與實驗室的夥伴合影



與鏡檢實驗室的夥伴合影



與遺傳子實驗室的夥伴合影



與 NGS 實驗室的夥伴合影



與 iLab 實驗室的夥伴合影