

出國報告（出國類別：出國進修）

新加坡國立大學醫院暨癌症中心進修報告

服務機關：血液腫瘤科

姓名職稱：蘇梅玉 醫檢師

派赴國家/地區：新加坡

出國期間：113 年 8 月 11 日至 113 年 8 月 24 日

報告日期：113 年 9 月 18 日

摘要

流式細胞儀在多發性骨髓瘤 (Multiple Myeloma, MM) 最小殘留疾病 (Minimal Residual Disease, MRD) 檢測，對病情監測和治療評估是很重要的工具。這次進修的新加坡國立大學醫院擁有專業技術和先進設備提供了理想的學習平台，參訪過程中，我們觀察了實驗室的標準化操作流程、品管及多種檢體處理方法，並學習利用 Infinicyt 分析的訓練，提升了流式細胞儀的基本判讀技巧。此外，參觀幹細胞實驗室，了解新加坡國立大學醫院在幹細胞收集和保存技術上的堅持，這次的經驗對於未來提升台中榮總血液腫瘤科的相關領域的專業發展具有重要的啟發作用。

。

關鍵字：(至少一組)

新加坡國立大學醫院, 流式細胞儀, 幹細胞實驗室, MRD

目 次

一、 目的	1
二、 過程	1
三、 心得	8
四、 建議事項	9

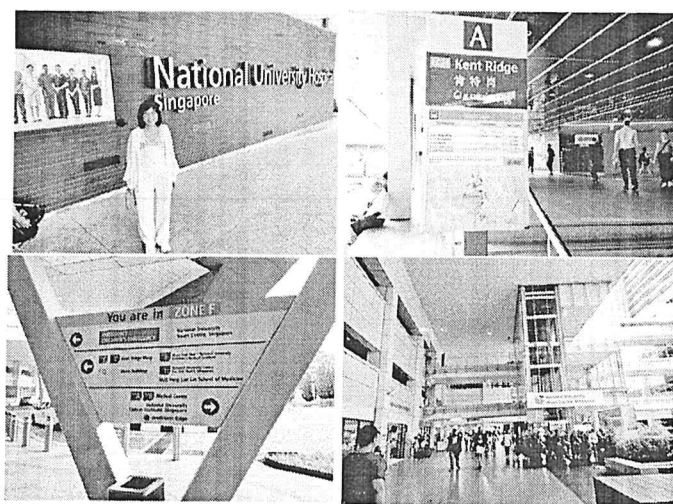
一、目的

前往新加坡國立大學醫院，主要有兩個目的：一是學習流式細胞儀最小殘留疾病 (Minimal Residual Disease, MRD) 檢測，特別是在多發性骨髓瘤 (Multiple Myeloma, MM) 的應用，二是參訪該院的幹細胞實驗室以了解其相關領域的研究進展。首先，流式細胞儀技術在多發性骨髓瘤 MRD 的檢測中具有重要的作用，能夠精確地測量微量的癌細胞，對於監測病情、評估治療效果和預測預後都至關重要。新加坡國立大學醫院在這方面的專業知識和先進設備使其成為理想的學習平台。目前本院也已經在施行 MM MRD 流式細胞儀檢測，希望通過此行吸取更多的臨床經驗，進一步提升對 MM MRD 患者的診斷，其次，參訪幹細胞實驗室，新加坡國立大學醫院在這方面的專業知識和研究成果處於國際領先地位，幹細胞技術在癌症治療和再生醫學中有很大潛力，幹細胞收集一直是血液腫瘤科實驗室重點項目，而且近年來台中榮總血液腫瘤科實驗室一直在持續精進收集幹細胞技術跟流程，希望通過此次學習和參訪，能夠提升幹細胞收集跟保存技術及自身專業技能，並為血癌患者提供更優質的治療服務。

二、過程

(一) 進修機構環境介紹

全球最佳醫院”排名 79 名新加坡國立大學醫院(National university hospital of Singapore, NUH)創立於 1985 年，鄰近新加坡國立大學位於新加坡肯特崗(Kent Ridge)，是新加坡最大的國立醫院也是新加坡唯一的綜合教學醫院。這所醫院以其先進的醫療技術和高品質的病人護理而聞名，目前一共設有 1,239 多張病床，NUH 的建築設計現代且功能性強，擁有多棟(A-H)互相連接的醫療設施。A，B 棟是醫療中心設有新加坡國立大學癌症研究所 (NCIS)，參訪的幹細胞實驗就位於 B 棟樓層、E 棟是 khoo Teck Puat 國立大學兒童醫學研究所、F 棟是急診和新加坡國立大學心臟中心 (NUHCS)、G 棟是主樓，而我受訓流式細胞儀實驗室於 G3 樓層，H 棟則是新加坡國立大學口腔醫學中心 (NUCOHS) 和新加坡國立大學楊潞齡醫學院，搭乘地鐵下肯特崗站出站即是新加坡國立大學醫院 F 棟，提供病患交通上的便利性。



(二) 新加坡國立大學醫院骨髓與流式細胞儀實驗室 (Bone Marrow and Flow Cytometry Laboratory) 團隊人員配置:

1. 醫師團隊:

臨床血液科大約有 10 幾位經驗豐富的專業醫師所組成，至少有 5 位專業的醫師具有 Eroupeflow 相關專業資格並負責流式細胞儀檢驗結果的 gating 與判讀及培訓。指導教授 Dr. Liu Te Chih：專精於流式細胞儀、血凝、血液腫瘤疾病診斷等，為新加坡國立大學醫院檢驗醫學部血液科主任兼高級顧問、新加坡國立大學癌症研究所血液腫瘤學系血液科高級顧問，同時也是 Ng Teng Fong General Hospital 血液科高級顧問

2. 實驗室設施、與技術人員配置

(1) 技術人員:

分別由 3 位專業醫檢師負責骨髓抹片染色及 5 位專業醫檢師負責流式細胞儀的操作所組成的專業團隊

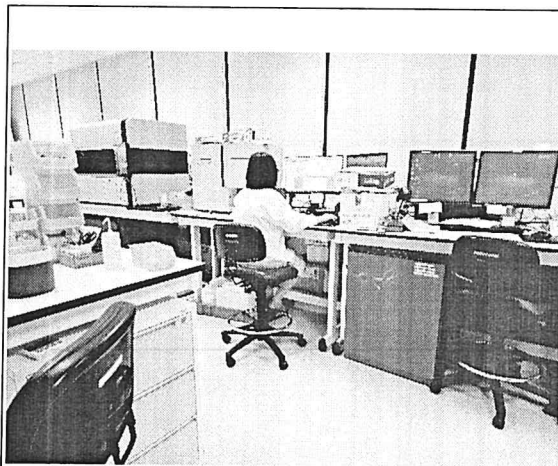
(2) 實驗室設施:

實驗室配備了最先進的流式細胞儀和顯微鏡，儀器設備主要有一台 BD FACSDuet 自動化試樣製備系統及兩台流式細胞分析儀 BD FACSLytic (中榮實驗室一台)，透過 BD FACSDuet 自動化試樣製備系統並整合 BD FACSLytic 流式細胞儀，從樣本到數據結果的自動化，整合所有資料，每一個步驟都經過嚴格的標準化流程，確保檢測結果的一致性和準確性，還有一些離心機，生物安全操作櫃，冰箱等設備

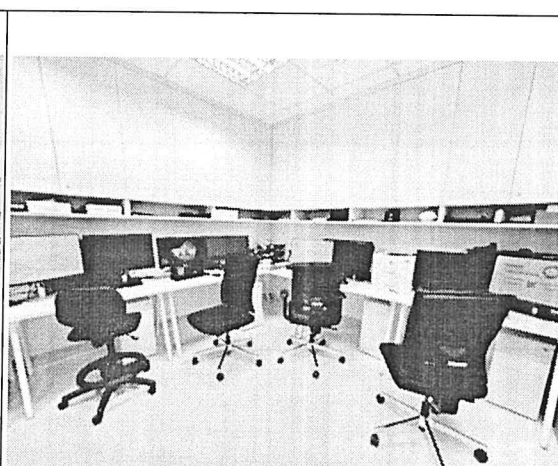
(3) Eroupeflow 分析軟體:至少 4 套的 Infinicyt 分析軟體

(4) 年檢體量

每年骨髓片大約 1000 人左右，流式細胞分析儀檢體大約 3000 左右



一台(BD FACSDuet) 自動化試樣製備系統及
兩台流式細胞分析儀 (BD FACSLytic)

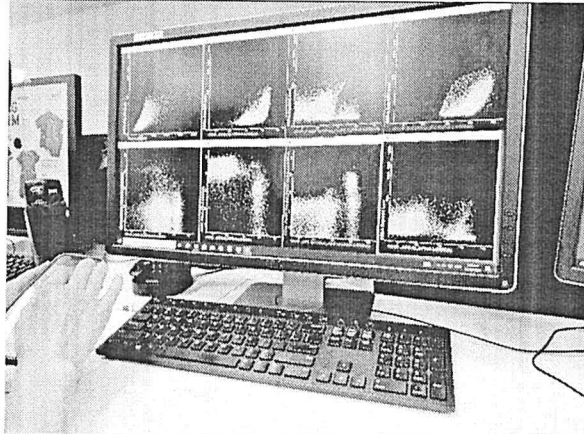


Flow cytometry 醫師結果分析判讀辦公室

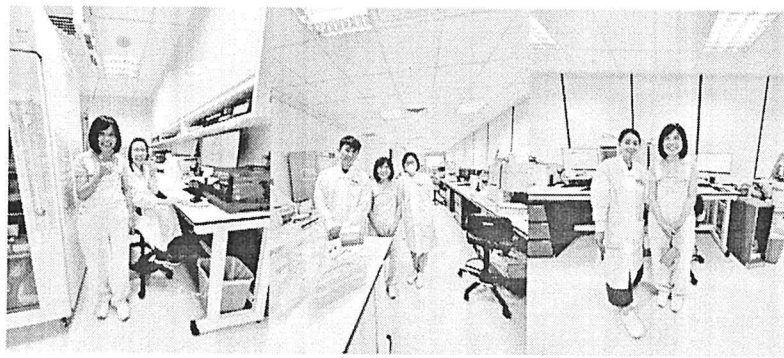
(三) 進修及見習內容：

1. 新加坡實驗室的儀器設定及白血球免疫抗原表現檢測、抗體組合及分析流程都是按照 EuroFlow 組織所公告建議設定及操作，歐洲血液腫瘤實驗室科學基金會 (European Scientific foundation for Laboratory HematoOncology, ESLHO)：隸屬於歐洲血液病學會科學工作小組，旗下分為三個組織，分別為：EuroClonality、EuroMRD 及 EuroFlow 而 EuroFlow：於 2006 年成立，由全球各地 20 個以上的診斷研究型實驗室所組成，各實驗室間透過數據及資訊、技術等交換，以涵蓋高敏感度的診斷、標準化流程及驗證，用於血液學和免疫學惡性腫瘤的診斷和預後分類，以及評估追蹤期間的治療效果，其全部流程均已通過 ISO 15189 認證。
2. 每天的開始就是閱讀實驗室的 SIP, SOP, QP 等文件，新加坡實驗室也是依據機器原廠建議進行日、月、年保養。實驗室非常注重品管，他們除了會做原廠建議每日機器常規品管外，還會增加額外的品管項目(rainbow beads)來確定每日的機器穩定性，但我也觀察到與中榮實驗室不一樣的地方，他們還增加了週品管來確認試劑背景值。
3. 檢體種類：骨髓、周邊血液、脊髓液，比較特別的是看到固體組織檢體的處理方式，這是我們實驗室目前沒有處理過的檢體類別，並紀錄其處理流程。
4. 進修實驗室已經走向專業分工化，實驗室有 5 位專業醫檢師分工很細，區分為檢體處理站、流式細胞儀上機站，品管站，文件報告整理站，標準化流程分工合作完成每日的品管跟檢驗。
5. 觀摩實驗室的各種 panel 檢體的處理，包含了 A LOT (Acute Leukemia Oriented Tube)、LST (Lymphocyte Screen Tube)、PCST(Plasma Cell Screen Tube) AML/MDS 及 MMMRD 檢體製作跟上機流程，特別是 MMMRD，因為需要更多細胞數，所以在的檢體的處理上有些許不一樣，觀察其流程並記錄，而目前我們中榮實驗室也是遵循 EuroFlow 組織所公告的處理檢體跟抗體組合標準流程。
6. 進修實驗室是 ISO 15189 醫學實驗室，CAP 認證實驗室，實驗室的 QA(Quality Assurance)除了參加 CAP 能力測試，實驗室主持人李醫師建議我們可以參加 EQA (EuroFlow quality assesment)的外部品質能力測試，於是我上了這個 EuroFlow External Quality Assessment Program 網站了解，EuroFlow 開發這個外部品質評估 (EQA) 方案，旨在監測流式細胞儀整個過程（細胞儀設置、樣品製備、數據採集和/或數據分析、解讀）並支援實驗室以最高標準實施 EuroFlow 方案。EuroFlow EQA 計劃主旨在補充跟輔助而不是取代其他已建立的能力試驗。
7. 針對與實驗室間品管、檢體處理、認證上不同處等等進行討論與交流。
8. 因為在新加坡實驗室都是醫師判讀發報告，所以特別請 Dr. Liu Te Chih 教導我基本的 Eroupeflow Infinicyt 分析軟體的 gating，經 Dr. Liu Te Chih 指導後，我更能有邏輯的、快速的進行圈選跟判讀。

Dr.Liu Te Chih 教導我基本的 Eroupeflow Infinicyt 分析軟體 gating



與 Flow 技術團隊合影



新加坡國立大學醫院 Bone Marrow and Flow Cytometry Laboratory 合影



(四) 參訪幹細胞實驗室(Stem cells lab)

- ✚ 新加坡實驗室幹細胞收集與保存技術上進行討論與分享
- ✚ 請益 DLI(Donor lymphocyte infusion)收集保存方式
- ✚ CAR-T processing 觀摩

1. 新加坡實驗室幹細胞收集與保存技術上進行討論與分享

(1) 實驗室技術人員配置:

- 新加坡幹細胞實驗室是一個有 5 位專業醫檢師所組成的大實驗室
- 一年的幹細胞收集人數大約有 300 人次
- 幹細胞收集儀器目前有 6 台預計到明年會增加到 7 台，同中榮機型(2 台)

(2) 幹細胞收集方式

連續單核球收集(CMNC)跟單核球收集方式(MNC)

(3) 幹細胞保存方式

- 液態氮保存(目前有 8 桶液態氮)，保存長達十年，並且幹細胞還會依據有 HBV 和 HCV 分開保存。
- 降溫儀 3 台
- 液態氮房間有溫控和 O₂ 監測器功能，液態氮保存的效果較好，長期細胞存活率明顯比-80°C 來得更佳，但是需要額外溫控室系統

(4) 抗凍劑 DMSO

加入裝有周邊血幹細胞抗凍袋過程中會產熱，傳統的方法是抗凍袋泡在冰塊裡面慢慢加入 DMSO 隔水冰浴冷卻降溫

- 新加坡實驗室的做法是必須在 10 分鐘內完成 DMSO 的加入，再直接放入降溫儀進行降溫
- 另一個建議是可以使用低溫鈹

(5) 參訪實驗室還會將收集的異體幹細胞血袋進行紅血球去除，以降低移植物對抗宿主疾病 (Graft-versus-host disease) 併發症的發生

- 根據 ABO 血型捐、受二者是否為 minor mismatch 或是 major mismatch 和捐贈者的特異性抗體，決定是否需要做紅血球去除，以降低排斥現象
- 新加坡實驗室建議紅血球去除方法有三種
 1. 單純離心法
 2. Density gradient method(密度梯度離心法): Ficoll
 3. Density gradient by adding hydroxyl starch:

(6) 參訪實驗室為避免冷凍袋解凍破掉而無細胞可治療的預防措施有兩種建議

- 收集時最好可以收集分裝成兩袋以上的量。
- 冷凍袋為兩層，兩層裡面都無菌，如果冷凍袋真的破掉時，重新處理到新的可以輸注的一袋裡面，但這有汙染的風險，需要先打抗生素。

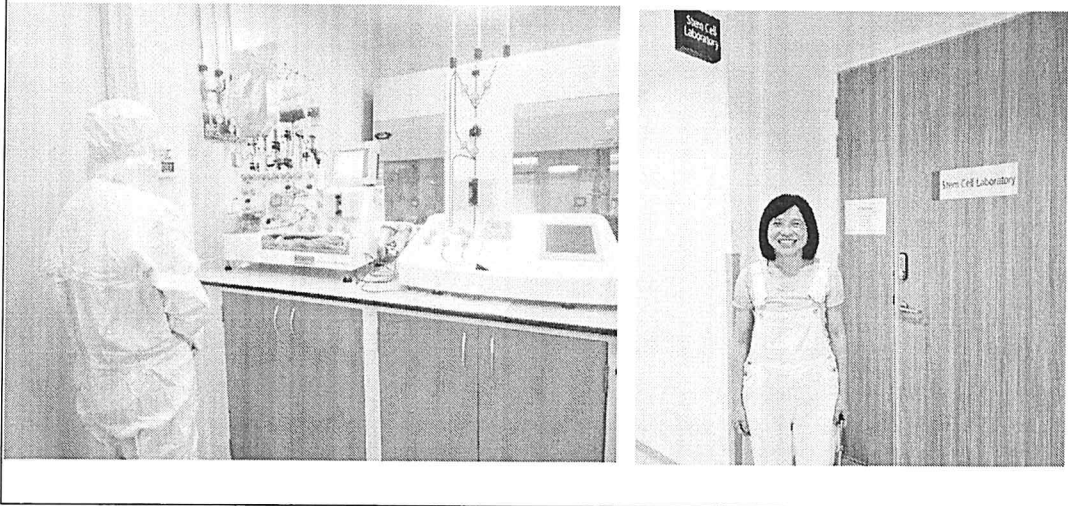
(7) 自體幹細胞品管

- 幹細胞冰存滿 2, 4, 8, 10 年，每年一次的 Viability 檢驗
- (8) 例如從慈濟拿捐贈者骨髓回來
 - 會再確認總有核細胞量(TNC) or CD34+ 存活率，也會確認一群更早的幹細胞會表現 CD133+但是 CD34-，這群細胞更不成熟，有更長存活期
- (9) 幹細胞 culture
 - 參訪單位作法是在加入 DMSO 之前打入需氧跟厭氧瓶
 - 因為幹細胞收集不易，滴滴珍貴，參訪單位做過驗證，發現只要 1 ml 檢體的培養量，通常有問題的兩天內會長出來
 - 如果是 fungal 培養,大部分 14 天會培養出來
- 2. DLI(Donor lymphocyte infusion) 收集保存方式

目前新加坡實驗室沒有單純只針對 DLI 進行收集，而是在 donor 收集幹細胞時一起進行收集

 - DLI 所需要的 T 細胞量建議 5 種 dose level: (看狀況讓醫師決定) 分別是 1xE6，10 xE6，32x E6，50x E6，100x E6
 - 實驗室組長也特別提出，發現他們如果提前在收幹細胞時一起進行細胞收集分離，細胞存活率大約 70%
 - 如果是另外請捐贈者再回來收集的，細胞存活率可以達到 90%
- 3. CAR-T 細胞治療是近代癌症治療的最大突破，結合了免疫療法、基因療法、細胞療法三大醫療特性，也是一種精準醫療，是許多復發癌症病友的重生希望
 - (1) 今天是我在新加坡進修見習的最後一天感到有點可惜，因為今天要觀摩 CAR-T 細胞製作流程的第一天，但卻是我在新加坡的最後一天，新加坡實驗室 CAR-T 整個製作不假於大藥廠或是生技公司，都是實驗室自己處理製備完成，具有自製的能力。
 - (2) 每次處理幹細胞細胞製品都是全部在無塵室裡面處理，必須穿著太空隔離衣。
 - (3) 今天只做 T cell selection，載體(vector)嵌入要隔天才能植入
 - 使用自動細胞分選培養擴增系統，機型是 CliniMACS prodigy 是一個封閉的自動化平台，能夠在單個設備中培養各種類型的細胞，整個流程至少就要五小時以上。
 - (4) 新加坡衛生單位規定，當天如要處理 vector 的檢體就不要再處理別的病人檢體。

與中榮醫師參觀幹細胞處理室與 CAR-T 細胞製作



三、心得

- (一) 首先我真的很感謝醫院及財團法人榮康醫學發展基金會大力幫忙與贊助以及滕傑林主任對我的信任在進修的道路上各種幫助與支持，可以前進到全球最有競爭力國家新加坡，並且是在全球最佳醫院”排名 79 名新加坡國立大學醫院進行參訪跟見習，我感到很榮幸和雀躍與激動，因為可以跟世界頂尖的醫療人員學習並且討論，增加自己的世界觀，也很謝謝一同在進修實驗室受訓的鄧齡喬醫師，謝謝她在生活上跟受訓時給予的幫助跟扶持。
- (二) 在新加坡國立大學醫院骨髓與流式細胞儀實驗室，這兩個禮拜我觀察到進修實驗室所使用的 EuroFlow 組織系統，在技術品質管理及人員配置上花了相當大的人力，物力來建立整個實驗室，而進修實驗室有些資深醫師也都曾前往西班牙總部 EuroFlow 組織進行標準化流程訓練，尤其是 Infinicyt 分析軟體，人員需要經過反覆的訓練，才能提供臨床正確的判讀與分析，也很感謝 Dr. Liu Te Chih 的指導，經過他的指導，我對流式細胞儀的基本判讀有了更系統的理解，這對我在未來的工作中提升專業能力具有重要意義。新加坡國立大學的流式細胞儀實驗室建立已有 20 餘年的時間，在流式細胞儀判讀上有相當的經驗累積與堅持，這也是我們未來學習與追求的目標。
- (三) 在參訪新加坡國立大學醫院的幹細胞實驗室時，我對實驗室的規模印象深刻，真的是很謝謝參訪實驗室學長對我的問題非常有耐心仔細的講解，讓我獲益良多，學長在講解的過程中，也提到實驗室成立早期從沒半個病人一直到現在的規模，一路走來也快 20 年，在期間也付出很多。我想著在幹細胞技術上需要很多的堅持，看到參訪單位對儀器設備的堅持、幹細胞收集及保存品質的堅持，專業知識的堅持、每個過程的記錄和分析，這種對品質的堅持確保了幹細胞產品的一致性和可靠性，和到現在一群對幹細胞技術充滿熱誠的專業技術員以及醫院、國家的支持，這都是所以新加坡國立大學醫院的幹細胞實驗室在國際上可以處於領先地位，他們的品質保證與成果和技術為我們提供了寶貴的經驗也是我們學習的標的。
- (四) 在新加坡國立大學醫院的見習參訪對我而言是一段非常寶貴的經歷，也拓寬了我視野，讓我體會到新加坡實驗室專業人員對品質的堅持，我將這次經驗視為我職業生涯中的重要里程碑，希望可以幫助實驗室不管在流式細胞儀 MRD 的檢測，還是幹細胞的技術，為血癌患者提供更高品質的治療服務。

四、建議事項

(至少四項，包括改進作法)

- (一) 建議血液科再增加一台血液幹細胞收集儀器，以利未來發展
- (二) 建議最好於幹細胞收集時可以收集分裝成兩袋以降低幹細胞解凍破裂風險
為了避免幹細胞冰存或是解凍破裂而無幹細胞可以輸注治療的風險，建議最好於幹細胞收集時可以收集分裝成兩袋以降低風險
- (三) 著手血液科內 flow cytometry 的標準檢體檢測，改善流式細胞儀報告品質
需要每一個 panel 收集 6-10 個正常檢體，建立正常的標準樣本。
- (四) 血液科內 flow cytometry 發展：開始多方進行 MRD 項目，尤其是多發性骨髓瘤 MRD