

日本病理学会・日本臨床検査医学会

がんゲノム検査全般に関する検査指針(案)

2022年4月×日 第1.0版

目次

<u>がんゲノム検査全般に関する指針刊行にあたり</u>	2
用語の定義・略語の説明.....	5
がんゲノム検査全般に関する指針策定ワーキンググループについて.....	7
目的.....	7
背景.....	8
スコープ.....	8
基本的原則.....	9
1. 施設の整備と管理.....	9
2. 精度の確保.....	11
3. 診療報酬に対する考え方.....	13
4. がんゲノム医療中核拠点病院等における施設要件に関して.....	14
5. ISO15189とCLIA, CAP.....	14
<u>I. 検査前の導入準備</u>	16
<u>II. 検体管理プロセス(検体採取－保存－搬送)</u>	25
<u>III. 核酸抽出プロセス</u>	33
<u>IV. 核酸解析プロセス(ライブラリ調整からシーケンシングまで)</u>	38
<u>V. データ解析プロセス(バイオインフォマティクスと結果報告)</u> エラー! ブックマークが定義されて いません。1	
<u>VI. 内部精度管理(IQC)</u> エラー! ブックマークが定義されていません。5	5
<u>VII 外部精度評価(EQA)</u>	50
<u>VIII 分析機器、試薬、解析プログラムなどの変更時の確認</u>	51
<u>IX 精度管理物質の利用</u>	53

「がんゲノム検査全般に関する指針」刊行にあたり

がんゲノム医療が開始され、がんゲノムプロファイリング検査が保険診療として実施されております。検査結果は国立がん研究センターより提供される遺伝子(ゲノム)変化、治療薬(治験)等が記載された報告書(C-CAT 調査結果)に取りまとめられます。この C-CAT 調査結果に基づいて、がんゲノム医療中核拠点病院(2021 年 8 月時点で全国に 12 病院)、がんゲノム医療拠点病院(同 33 病院)において、臨床担当医や病理医、腫瘍内科医、バイオインフォマティシャンなど複数の診療科横断による専門家会議で、1 人 1 人の患者さんごとに「個別」の治療方針等を検討するエキスパートパネルが開催されております。

この「がんゲノムプロファイリング検査」には多くの場合、手術検体等で摘出された病理組織検体、ホルマリン固定パラフィン包埋(Paraffin embedded formalin fixed: 以下 FFPE)ブロックが使用されます。この FFPE ブロックはがんなどの組織片をパラフィンに埋めて固めたもので、病理組織標本を作成し病理診断を行う際に使用されたり、長期間保管により新しい治療法、治療薬などが発見された際に、コンパニオン診断やがんゲノムプロファイリング検査等に使用し、治療薬や治験の適否などを検討したりする際に使用されています。

日本病理学会ではすでに、多機関共同研究で実証実験を実施し、エビデンスに基づいて FFPE ブロック等の取扱い等に関して「ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規程」にとりまとめ、国内では成書として市販されており書店等で入手できます。また英文論文にもまとめられ、日本だけでなく国際的にも高い評価を受けており、世界各国で実際のゲノム医療の際に参考とされております。

しかしながらその一方で、がんゲノムプロファイリング検査を実施する中で、少数ながらも検体が不適切であるなどのため検査が実施できないなどの不具合も生じており、この度、検査に関して高い技術や知見を有する、日本臨床検査医学会、臨床検査専門医との協同で、ここに初のアカデミア発の指針となる「がんゲノム検査全般に関する指針」を取りまとめました。診療の現場で活用いただき、高い水準で国民のゲノム医療に貢献するためにご活用いただきたいと考えます。

2022 年 4 月 × 日

一般社団法人 日本病理学会
理事長 北川昌伸

「がんゲノム検査全般に関する指針」刊行にあたり

ゲノム医療の実用化に向けた体制整備が進められるなかで、2018年12月に検体検査の品質・精度の確保に関する医療法等の一部改正とそれに伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令が施行され、臨床検査の品質・精度を確保するための施設基準や方法が明確化されました。この中で、遺伝子関連・染色体検査が一次分類に位置付けられるとともに、遺伝子関連・染色体検査を行う場合の精度の確保に係る責任者の配置、内部精度管理と適切な研修の実施が義務付けられ、ISO 15189の認定など検査施設の第三者認定を取得することが勧奨されました。遺伝子関連・染色体検査における検体検査の品質・精度の確保はますます重要な課題となっています。

がんゲノム医療への国民の期待が高まるなかで、2019年6月にがんゲノムプロファイリング検査が保険適用となり、がんゲノム医療中核拠点病院、がんゲノム医療拠点病院またはがんゲノム医療連携病院で実施可能となっています。さらに、2021年8月には、血漿中の遊離DNA(リキッドバイオプシー)を用いたがんゲノムプロファイリング検査が保険適用になりました。

がんゲノムプロファイリング検査を実施して診療に有益な結果を得るためには、適切な検体を準備することが重要であることは論を俟ちません。この度、病理組織検体の取り扱いをはじめとして病理学に関して高い技術と知見を有する日本病理学会と我々検体検査の品質と精度の確保に取り組む日本臨床検査医学会の協同で、「がんゲノム検査全般に関する指針」を刊行する運びとなりました。本指針を広くご活用いただき、我が国のがんゲノム医療の発展の一助になれば幸いです。

2022年4月×日

一般社団法人 日本臨床検査医学会
理事長 村上 正巳

日本病理学会・臨床検査医学会

「がんゲノム検査全般に関する指針」策定ワーキンググループ(敬称略)

【日本病理学会】

- 佐々木毅(東京大学、理事／医療業務委員長／社会保険委員長／病理診断・臨床検査あり方検討WG／ゲノム病理診断検討委員)
- 増田しのぶ(日本大学、理事／精度管理委員長／病理診断・臨床検査あり方検討WG長／ゲノム病理診断検討委員長)
- 西原広史(慶應義塾大学、学術評議員／研究推進委員／病理診断・臨床検査あり方検討WG／ゲノム病理診断検討委員)
- 田口健一(九州がんセンター、学術評議員／病理診断・臨床検査あり方検討WG／ゲノム病理診断検討委員)
- 谷田部恭(国立がん研究センター中央病院、学術評議員／研究委員会／ゲノム病理診断検討委員)
- 畑中 豊(北海道大学、学術評議員／病理診断・臨床検査あり方検討WG／ゲノム病理診断検討委員／精度管理委員／医療業務委員)
- 桑田 健(国立がん研究センター東病院、学術評議員／ゲノム病理診断検討委員／精度管理委員／医療業務委員)
- 滝野 寿(精度管理委員会／医療業務委員)

【日本臨床検査医学会】

- 宮地 勇人(東海大学、遺伝子検査担当理事)
- 前川 真人(浜松医科大学、遺伝子委員会委員長)
- 菊池 春人(済生会横浜市東部病院、精度管理委員会アドバイザー)
- 村上 正巳(群馬大学、臨床検査室医療評価委員会委員長)
- 古川 泰司(帝京大学、保険診療委員長)
- ;ワーキンググループ委員長

【特別支援委員】

- 鶴山 竜昭(京都大学、学術評議員／研究委員会／病理診断・臨床検査あり方検討WG／ゲノム病理診断検討委員)

用語の定義

- **がんゲノム検査**

この指針においては、がん患者由来の組織や細胞、血液などを用いて、診断や治療選択のためにゲノム異常をはじめとするゲノムバイオマーカー*を調べる全ての遺伝子検査を「がんゲノム検査」と定義する。

*ゲノムバイオマーカーの定義については厚生労働省課長通知「ゲノム薬理学における用語集について」参照

- **がん遺伝子パネル検査**

次世代シーケンサー等を用いて、腫瘍組織や細胞、あるいは末梢血から得られたがん由来の核酸を検体として数十～数百のがん関連遺伝子の変異等の遺伝子変化を検出する検査。本検査は、診療上の位置づけの違いから、(マルチプレックス)コンパニオン診断と、(包括的)ゲノムプロファイリング検査に大別される。いずれも遺伝子変化を検出し、最適な薬物療法の治療方針を決定することを目的としている点は共通しているが、コンパニオン診断はすでにエビデンスが確立した標準治療へのアクセスを目的としている一方、ゲノムプロファイリング検査は研究開発段階にあるエビデンスがまだ十分確立されていない治療へのアクセスを目的としている。なおがん遺伝子パネル検査は、がんゲノムプロファイリング検査とほぼ同義として使用される場合もある。

- **(包括的)がんゲノムプロファイリング検査**

次世代シーケンサー等を用いて、固形腫瘍の腫瘍組織や細胞または末梢血を検体とし、100 以上のがん関連遺伝子の変異等を解析し包括的なゲノムプロファイルの取得を行う検査。2021 年 8 月 1 日現在、保険診療においては、薬事承認されている FoundationOne CDx、FoundationOne Liquid CDx、NCC オンコパネルの 3 種類の検査が用いられている。

略語の説明

- BAM: Binary Alignment Map
- CAP: College of American Pathologists
- CLIA: Clinical Laboratory Improvement Amendments
- CNA: Copy Number Alterations
- EQA: External Quality Assessment
- FFPE: Formalin Fixed Paraffin Embedded
- HGVS: Human Genome Variation Society
- Indel: insertion/deletion

- IQ: Installation Qualification
- IQC: Internal Quality Control
- ISO: International Organization for Standardization
- JAB: Japan Accreditation Board.
- LoD: Limit of Detection
- MSI: Microsatellite Instability
- NGS: Next Generation Sequencer
- NIST: National Institute of Standards and Technology
- OQ: Operational Qualification
- PPA: Positive Percent Agreement
- PPV: Positive Predictive Value
- PT: Proficiency Testing
- QC: Quality Control
- RUO: Research Use Only
- SF: Secondary Findings
- SNV: Single Nucleotide Variant
- SOP: Standard Operating Procedure
- SV: Structural Variant
- TMB: Tumor Mutation Burden
- VCF: Variant Call Format
- VUS: Variant of Unknown Significance, Variant of Uncertain Significance

【がんゲノム検査全般に関する指針について】

◆ 「がんゲノム検査全般に関する指針」 策定ワーキンググループについて

がんのゲノム(遺伝子)検査に基づくゲノム医療が日本でも開始された。このがんゲノム検査には、次世代シーケンシング(next-generation sequencing: NGS)をはじめとする高い検査技術と精度管理が求められる。分子病態の明確化と治療法開発の統合による個別化がん治療(プレシジョン・メディシン)が推進され、現在、日本でも、がんゲノム医療中核拠点病院、がんゲノム医療拠点病院およびがんゲノム医療連携病院を中心に実施されている。しかしながら、高い技術によるゲノム検査の実施においては、その検査工程の複雑さに由来する精度の確保、検査室調整試薬 (in house)での検査、または検査室が独自に開発した検査(laboratory developed tests: LDT)の精度の確保など、従来になかった課題が新たに生じている。

日本病理学会と日本臨床検査医学会の両アカデミアは、がんゲノム検査全般に関して、国民が安心してゲノム検査等を受けられることができる検査実施体制、検査精度の確保に係る両学会の連携体制や整備指針等の策定を目的に、本ワーキンググループを結成した。がんゲノム検査においては、病理組織検体の管理には病理医(病理専門医)、血液検体等の液状検体の管理には臨床検査医(臨床検査専門医)があたっているが、さらに検査結果の解釈および精度確保全般に関しての管理のため、両アカデミアには高い知識や技術が求められている。

今後、両学会の医師(専門医)は「精度の確保に係る責任者」を一歩進めた、「がんゲノム検査全般の精度の確保に係る責任者」として、検体等の管理をはじめとした検査精度の確保に協働で深くかかわることを明言するとともに、本指針が各学会や団体等が作成あるいは策定する NGS を含む「がんゲノム検査全般の基盤」となることを期待している。

◆ 目的

「がんゲノム検査」を保険診療として遂行するためには、医療法に規定される「病院等において検体検査を行う場合の精度確保に係る基準」を満たすことが求められる。医療安全上、がんゲノム検査に関連する標本作製や検体管理など、新たに発生する多くの業務を高い精度で遂行するためには、現行の精度管理等に加えて、継続的な教育・研修の機会を維持することも必要となる。さらに病理検査室、病理診断および臨床検査室に新たに発生する様々な技術に対する診療報酬上の適切な評価も必須となる。

そこで本指針は「がんゲノム検査」全般に関する精度保証や精度管理のみならず、必要な資源・費用の目安を示すとともに、医療機関(特にがんゲノム医療を扱う医療機関)における病理専門医と臨床検査専門医の配置、並びに専門医育成プログラムの策定など、両学会連名で各関係団体に働きかける典拠となる指針を策定することを目的としている。

◆ 背景

「医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令(平成30年厚生労働省令第93号)が平成30年(2018年)7月27日に公布され、同年12月1日より施行されました。具体的には、検体検査の2次分類において、病原体核酸検査、染色体検査、生殖細胞系列遺伝子検査、体細胞遺伝子検査(血液細胞による場合)、体細胞遺伝子検査(血液細胞によらない場合)が統合され「遺伝子関連検査・染色体検査」として新たな2次分類が提案され、医療機関にも適応されることとなった。その中では、「遺伝子関連業務の経験を持つ医師・臨床検査技師等を遺伝子関連検査等の責任者(検体検査の精度確保責任者との兼任可。ただし、専門性・経験を勘案して他の職種の者が責任者になることを妨げない)として配置する」や、内部精度管理の実施、適切な研修の実施義務として、「外部精度管理調査の受検に係る努力義務、その他、検査施設の第三者認定を取得(ISO 15189)の勧奨」などが挙げられている。

一方、がんゲノム医療中核拠点病院(2021年8月時点で全国に12か所、以下:中核拠点病院)、がんゲノム医療拠点病院(同33か所、以下:拠点病院)が指定され、これらの中核拠点病院および拠点病院、およびこれらに連携するがんゲノム医療連携病院(同じく161か所、以下:連携病院)等では、NGSを用いた(包括的)がんゲノムプロファイリング検査(以下、がん遺伝子パネル検査)が保険診療で実施されている。

このNGSを用いたがん遺伝子パネル検査に関しては、主として病理組織のホルマリン固定パラフィン包埋(formalin fixed paraffin embedded, 以下、FFPE)検体を使用され、血液検体も検査の対象となっている。しかし、出検時の検体不良などのため、目的の検査が実施できなかったという問題が稀ならず指摘されており、国民医療に不利益が生じていることが危惧されている。

現在、日本ではがんゲノム検査全般に関するアカデミアからのガイダンスや指針等がない。この観点から特にFFPE検体を用いたゲノム検査体制の確立に向け、日本病理学会と日本臨床検査医学会が連携して、アカデミアとしての指針の策定が喫緊の課題であると認識し、本WGを両学会共同で組織し、「がんゲノム検査全般に関する指針」を策定することとした。

◆ スコープ

本指針では、がんゲノム検査の検体として、血液検体(血漿、血清を含む)、病理組織凍結検体、病理組織FFPE検体などを対象とし、特にNGSを用いた検査に主眼を置いた。

◆ 基本的原則

前述の「検体検査の精度管理等に関する検討会とりまとめ」および「医療法等の一

部を改正する法律」に準じて、検体検査の品質・精度を確保するための基本的原則を、日本病理学会、日本臨床検査医学会の両アカデミアからの構成員よりなるWGの合意に基づき、以下のようにまとめた。なお、『1. 施設の整備と管理』は、臨床検査の品質と能力に関する国際規格であるISO 15189:2012 の4章に記載のシステム要件に、『2. 精度の確保』については、同じく5章の技術的要件に合致する内容である。

1. 施設の整備と管理

(ア) 第三者認定の実施体制

がんゲノム医療を担当するがんゲノム医療中核拠点病院、がんゲノム医療拠点病院およびがんゲノム医療連携病院の検体検査室・病理検査室は第三者認定としてISO 15189などを取得し、その要求事項に従ってパネル検査などを活用したがんゲノム医療を行う体制を構築する。また、それら一連の作業を完遂するための設備、仕様、要員(スタッフ)を整備する。

がん遺伝子パネル検査では上記病院の自施設以外の医療機関の病理組織検体も用いられるため、上記病院以外の医療機関のうち遺伝子パネル検査用に検体提出が求められる可能性のある施設においても第三者認定の取得が望まれる。一方、がんゲノム医療中核拠点病院をはじめ、NGS を用いた解析を実施する医療機関や外部委託先の検査機関は、これに対応した第三者認定を取得する。

(イ) 精度の確保に係る責任者の配置

精度の確保に係る責任者を配置する。なお、医療法等の一部を改正する法律では、検体検査全般の精度の確保に係る責任者との兼任を認めることとされている(医療法施行規則第9条の7第2号関係)。資格要件については、遺伝子関連検査を含む臨床検査全般(検体検査を含む)の精度管理に関する専門知識を有し、相応の経験と資質が求められる^{注1)}。

(注 1):改正後医療法施行規則では、遺伝子関連・染色体検査の精度の確保に係る責任者(第9条の7第2号関係)は検体検査の業務について3年以上の実務経験及び精度管理についての3年以上の実務経験を有することが望ましいとしている。そして、医師又は臨床検査技師の他に、大学院、大学、短期大学、専門学校又は高等専門学校において分子生物学関連科目を履修した者が遺伝子関連・染色体検査の専門知識及び経験を有する他の職種の例として示されている。

しかしながら、今回の医療法改正に基づく遺伝子関連・染色体検査の精度確保の責任者としては、国家資格である医師、臨床検査技師に限定することが望ましい。臨床検査全般に関する知識と技能を有する臨床検査専門医は日本専門医機構基本領域専門医である。その他、学会などによる資格認定としては、日本臨床化学会に

よる認定臨床化学・免疫化学精度保証管理者及び日本臨床化学会と日本臨床衛生検査技師会による同管理検査技師が制度化されている。遺伝子関連・染色体検査に関しては、日本遺伝子分析科学同学院による遺伝子分析科学認定士、日本染色体遺伝子検査学会と日本臨床衛生検査技師会による認定染色体遺伝子検査技師、日本遺伝子診療学会によるジェネティックエキスパートが制度化されている。また、病理組織の取扱い全般に関しては、日本専門医機構認定の病理専門医、日本病理学会認定の分子病理専門医、日本病理学会と日本臨床検査技師会の認定による認定病理検査技師などの資格を有するものが責任を負う。がんゲノム医療推進体制におけるエキスパートパネルの構成員として、①がん薬物療法に関する専門的な知識及び技能を有する診療領域の異なる常勤の医師が複数名含まれていること、②遺伝医学に関する専門的な知識及び技能を有する医師が1名以上含まれていること、③遺伝医学に関する専門的な遺伝カウンセリング技術を有する者が1名以上含まれていること、④病理学に関する専門的な知識及び技能を有する常勤の医師が複数名含まれていること、⑤分子遺伝学やがんゲノム医療に関する十分な知識を有する専門家が1名以上含まれていること、⑥次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析等に必要なバイオインフォマティクスに関する十分な知識を有する専門家が1名以上含まれていること、⑦検討を行う対象患者の主治医又は当該主治医に代わる医師、はエキスパートパネルに参加することが求められている⁷⁾が、上記の検体検査の精度管理に関する専門知識を有する臨床検査専門医もしくは(及び)臨床検査技師もエキスパートパネルに参画し、がんゲノム医療を推進する役割を担うことが望ましい。

(ウ) 書類の整備

標準作業手順書(SOP)を作成し、業務の標準化に努め、標準化された SOP に従った方法で全操作を行う。また、作業日誌や台帳を記録し、不具合やエラー、是正の履歴を残すとともに、継続的な改善を行う。これら書類に関して、的確な報告書フォーマットを作成し、運用する。また、定期的に見直し、適切に管理・保存する。

(エ) 要員の研修、教育

検査の一連の過程に関与する者は、各業務を行うための資格を明らかにし、その業務を円滑に遂行できるよう教育・訓練を受けること、また教育すること。さらに専門資格の取得を奨励し、サポートする。

(オ) 検査機器の整備

臨床検査で用いる測定システム(分析機器、試薬等)は、意図した用途に合致し、要求事項を満足する信頼性の高い結果が得られることが保証されている必

要がある。そのため、パネル検査導入に先立ち、検査の目的に合った仕様を決定し、その要件を満たす分析機器、体外診断用医薬品(テンプレート DNA 調製試薬)、医療機器(DNA シークエンサー及び解析プログラム)、サーバー等の使用説明書、添付書類、文献などを入手して、各種 SOP を作成するとともに、各装置の据え付け時性能確認(IQ)、稼働性能適格性確認(OQ)を実施する。

(カ) 委託業務

工程の一部を外部委託する場合は、ISO 15189 などの認定を受けた検査室が責任をもってその前後の工程(検体の準備、搬送や結果報告書の受け渡しなど)を遂行するとともに、委託先の選定と評価を行う。契約内容に基づき、委託先の力量評価について定期的にレビューし、その記録を維持管理する。

2. 精度の確保※

ここでは現在行われているがんゲノムプロファイリング検査以外の手法を用いたがんゲノム検査にも拡張可能なように、がんゲノム検査の工程を、核酸抽出プロセス、核酸解析プロセス、データ解析プロセスの3つに分類して記載する。すなわち、核酸抽出までは様々な試料が対象となったとしても、NGS による核酸解析プロセス、データ解析プロセスに大きな変更を要せず、核酸抽出プロセス内の調整で対応可能と考える。

(ア) 核酸抽出プロセス: 遺伝子検査用に選定された病理標本及び遺伝子検査用に採取された血液検体から核酸抽出までをいう。

(イ) 核酸解析プロセス: 核酸の品質確認後、ライブラリを調製し NGS で解析しデータを得るプロセスをいう。

(ウ) データ解析プロセス: 核酸解析プロセスで取得したデータのバイオインフォマティクス解析(コンピュータで生データを加工、遺伝子異常の検出およびそれら遺伝子異常情報のアノテーション)から結果報告までをいう。

がん遺伝子パネル検査のフローチャート



診療に役立つ客観的医療情報の提供を目的とする臨床検査において、測定値の信頼性を保証することは、もっとも基本的で重要な事項である。そのため、これら3つのプロセス別に以下の3つの作業を行うことが極めて重要である。

- **バリデーション(品質基準の確認):**
バリデーションとは、予め適切な品質基準を設定し、プロセスごとに客観的証拠を提示することによって品質確認を行うことを言う。臨床検査は、意図した用途に合致し要求事項を満足する信頼性の高い結果が得られることが保証されている測定システム(分析機器、試薬等)を用いて実施する必要がある、プロセスごとにその妥当性を客観的な根拠を示し確認するのがバリデーション(品質基準の確認)の目的である。
- **内部精度管理:**
患者試料と近い性質を有する精度管理物質(quality control materials)を定期的に測定して継続的に監視し、患者試料の測定結果の質保証を行う。ここで使用する精度管理物質には、既知の変異を導入して人工的に構築した DNA 標品、変異既知の細胞株標品などがあげられる。また、分析の精確性をみるためには、精度管理の標準物質(reference standards)が必要である。この標準物質には、既知の変異を有する精度管理物質を使用することができるが、測定法が異なっても相互互換性(commutability)が保たれていることが望ましい。
- **外部精度評価:**

検査室間比較プログラム(外部精度管理調査、技能試験など)に参加することによって、得られた検査結果および検査結果の解釈が適正に行われているかどうかを評価・把握する。所定の性能基準を逸脱している場合は是正処置を行う。しかし、検査室間比較プログラムへの参加が不可能な場合は、標準物質、過去に検査した試料、他の検査室との試料の交換、検査室間比較プログラムで使用される精度管理物質などを測定することによって代替措置とすることができる。その場合は、予め結果を判定する基準を設定しておき、厳密に判定する。

3. 診療報酬に対する考え方

現在、がんゲノムプロファイリング検査は、保険診療として実施されており、「D006-19 がんゲノムプロファイリング検査」として、検体提出時に8,000点、エキスパートパネル開催後、患者に説明した時点で48,000点の合計56,000点が算定されている。しかしながら、この56,000点は、上記エキスパートパネル開催とその後のカウンセリングに関わる医療費を含んだ報酬であり、検査単独の費用とは見なせない。一方現状では、NGSを用いる検査そのものは、大部分が委託事業者(外注業者)によって遂行されており、受託費用は上記合計を元に決定されている。検査本体とそれ以外の医療行為に対する対価が全く分離されておらず、適切な評価を妨げている。今後検査ニーズも患者対応も多様化していく事が確実であり、それぞれの対価が明確な透明性のある評価方法が望ましい。将来的に医療機関内で検査遂行が行われる可能性を視野に入れ、検査本体や精度管理に必要なコストが調査・評価されるべきである。

また、算定は2段階となっているものの、がんゲノムプロファイリング検査に出検する際の点数評価では、病理専門医、臨床検査専門医、臨床検査技師の、標本作製技術料や精度確保に関する技術は全く評価されていないと言わざるを得ない。例えば1つの例であるが、FFPE検体を用いてがんゲノムプロファイリング検査を行う場合、十分なDNA収量を得るために、FFPE検体からの標本作製枚数(薄切枚数)が100枚を超えることもある。通常ならば標本作製に関してはN000病理組織標本作製料として1臓器につき860点(8,600円)が算定されているが、がんゲノムプロファイリング検査のための標本作製に関しては、診療報酬が独立して算定されていない。厚生労働省の「検査精度管理確保に関する」班研究(研究代表者:矢富裕)での病理学会に依頼してのアンケートでも、がんゲノムプロファイリング検査開始に伴い、全体の約70%の医療機関で、病理医、臨床検査技師ともに業務量が増えたと回答しており、また、全体の約40%の医療機関で、業務量が増えて負担になっていると回答している。その一方で、これら標本作製等に関しては診療報酬が算定されていず、部門別収支に反映されないことから、増員等の措置がなされた医療機関は1%にも満たない。さらに、がんゲノム病院以外の、患者が過去にかかった医療機関にFFPE検体がある場合には、その医療機関に出検に必要な病理組織標本作製を依頼するが、やはり診療報酬上の担保

が何もないため、標本作製に関しては、完全なボランティアとして行われており、実際には業務負担から標本作製を行うことができず、がんゲノムプロファイリング検査が出検されないという患者不利益が生じている実態もある。実際のがんゲノムプロファイリング検査を出検する医療機関への、わかりやすい診療報酬の担保を、「第3部検査」および「第13部病理診断」にて至急、整備する必要がある。

4. がんゲノム医療中核拠点病院等における施設要件に関して

現在、がんゲノム医療中核拠点病院およびがんゲノム医療拠点病院には、「診療機能」として「第三者認定を受けた臨床検査室及び病理検査室を有する」や「組織検体の取扱いが明文化されており、処理等が適切に記録される」や「シーケンスの実施について、自施設内で行う場合は、明文化された手順に従ってシーケンスが実施され、その結果が適切に記録されること」や「シーケンスの実施について、シーケンスを適切に行うことができる医療機関又は検査機関へ委託する場合は、個人情報の取扱いなどについて、適切に取り決めをした上で依頼すること」などが求められている。一方で、診療従事者に関しては、「病理検査室に病理学に関する専門的な知識及び技能を有する常勤の医師が複数名配置されている。なお、そのうち2名以上は、エキスパートパネルの構成員である」や「病理検査室に病理検体の取扱いに関する高い専門性を有する常勤の臨床検査技師が1名以上配置されている」という要件があるが、臨床検査室の要件や、臨床検査専門医の要員に関しては全く触れられていない。

血液検体を検査試料とするがんゲノムプロファイリング検査およびリキッドバイオプシーに関しても、専門的な知識及び技能を有する常勤の医師および臨床検査技師の勤務が必須であり、日本臨床検査医学会が認定する臨床検査専門医がこれに該当する。日本臨床検査医学会は、基本領域18学会の1つであり、臨床検査専門医の認定制度を実施しているが、現状ですべてのがんゲノム医療中核拠点病院およびがんゲノム医療拠点病院にはすでに臨床検査専門医が勤務しており、診療要員として、「臨床検査に関する専門的な知識及び技能を有する常勤の医師が1名以上配置」と「臨床検査室に遺伝子分析化学に関する高い専門性を有する常勤の臨床検査技師が1名以上配置」を求め、またエキスパートパネルの構成要員として「臨床検査に関する専門的な知識及び技能を有する常勤の医師1名以上」を求めるものである。

5 ISO15189とCLIA, CAP

わが国における臨床検査室(病理検査室を含む)の外部精度評価・内部品質管理評価基準としてはInternational Organization of Standardization (ISO) 15189を用いている施設が多いため、本稿ではがん遺伝子パネル検査を実施する臨床検査室の品質と能力に関する要求事項は、ISO 15189に準ずる内容とした。ただし、現行ISO 15189:2012の改定作業および関連文書作成等において、一般検査室病理検査室に固有の特徴が

あり、活発な議論がなされていることを付記する。その内容は、①外科病理試料が固形であり、分注による均質な複数の試料が存在しないため、各試料の代替性が乏しい(irreplaceable)、②手術材料・切り出し材料・試料の各段階において十分な品質の保持(integrity)が必要であり、試料全体と各試料の関係において試料の特性(主病変部、断端など)があること、③試料採取から標本作製までの多くの工程にリスクが潜在すること(multi-step and multi-risk)、④作製工程が必ずしも時系列にすすむとはかぎらない(non-chronological) こと、⑤病理検査における測定不確かさの解釈、⑥試料の保管が長期に及ぶこと(long life cycle)、⑦病理検査室のエンドポイントが解釈分析であり診断であること、などである。

ゲノム検査をはじめ、急速に発展する高度で複雑な臨床検査に対応するため、わが国においても CLIA に準じた臨床検査室の品質保証と検査の精度管理を目的とした新たな法整備が求められる。なお米国病理医会(College of American Pathologists: CAP)は、臨床検査室を対象とした臨床検査成績評価プログラム(CAP サーベイ)や臨床検査室認定プログラム(LAP)などを実施している。

I. 検査の導入前の準備※

1. 機材、試薬

1) 機材の性能

機材の選定時、実際に提出される検体数と機材の性能となる検体処理数が見合っているか確認する。NGS の場合、検査目的と必要とされる検査精度で解析可能な検体数が決まる。

なお、設置時及び使用前には機材が必要な性能仕様を達成することができ、検査に関連する要求を満たしていることを検証する必要がある。

2) 変異の種類

検査項目の遺伝子異常が検出することができる性能であるか確認する。特定のバリエーションをターゲットとするもの、プロファイリングとして広範囲にシーケンスするものなど使用する機材と試薬は大きく異なる。NGS の場合、検出可能となる遺伝子変異の種類としては、1塩基置換 (single nucleotide variant; SNV)、重複 (duplication)、挿入 (insertion)、欠失 (deletion)、挿入と欠失の組み合わせ (indel)、コピー数変異 (Copy Number Alteration: CNA)、融合 (fusion)、マイクロサテライト不安定性 (Microsatellite Instability: MSI)、腫瘍遺伝子変異量 (Tumor Mutation Burden: TMB) などがある。

3) 検体の種類と試薬

検査項目に適した検体の種類を決定し、対応した核酸抽出キット、導入する NGS で使用可能となるライブラリ調整試薬を選択する。

4) 機材の設置

①機材の技術仕様を確認し検査室が条件を満たしているか確認する。具体的な技術仕様としては、外寸と必要な周囲スペース、電力条件、環境温度や湿度などがある。

②機材の記録を管理する。具体的には管理番号、品名、型番、購入日、使用開始日、管理者、メーカーの連絡先、受取時の状態 (新品、中古) などがある。

③機材の保守については、保守計画を立案し保守作業の報告書を保管する。また保守や故障時には汚染除去などを行い作業者の安全を確保する。

④IQ (据付時適格性確認)、OQ (稼働性能適格性確認) が行えることが望ましい。

2.品質指標

品質指標については、検査工程や機材によって品質指標が異なる。各施設の精度管理責任者を中心として学会からの規程やメーカー推奨の品質指標などを参考に関係者と十分に協議し、場合によっては妥当性確認を行って品質指標の基準値や精度管理と記録の方法、基準を外れた際の対応を決定する。

なお体外診断用医薬品及び医療機器使用の場合、品質指標は添付文書に沿って評価する。

(品質指標の例)

①病理組織標本の品質指標

- ・ホルマリン固定の条件
- ・腫瘍量や腫瘍含有割合
- ・FFPE ブロックの経過年数
- ・標本作製時のコンタミネーション(nuclease を含む)の防止
- ・患者取り違い防止

②核酸の品質指標

- ・分光光度計による濃度と純度
- ・dsDNA の濃度
- ・DNA サイズの定量化が可能な電気泳動での評価(DIN、DV200 など)
- ・定量 PCR を用いた評価(Ct 値/ Δ Ct 値、Q-value など)

③ライブラリ調製の品質指標

- ・フラグメンテーション(断片化)の評価(フラグメント長)
- ・ライブラリの評価(濃度)

④アライメント前の品質

- ・ライブラリ読み取り(Yield、Cluster Density、Q30 など)

⑤アライメント結果の品質

- ・アライメント率(Aligned Bases)
- ・ターゲット領域の読み取り数(On Target)
- ・読み取り深度(Depth)
- ・カバレッジ均一性(Uniformity)
- ・デュプリケーション率
- ・不一致率 など

3.妥当性確認

1)妥当性確認計画の作成

妥当性確認計画は、使用機材、使用試薬、妥当性確認内容、実施期間、担当者などを決定し計画承認者からの承認を受ける。

妥当性確認内容においては、下記 2)分析性能の評価などを参照し各施設の精度管理責任者を中心として関係者と十分に協議し決定する。

2)分析性能の評価

分析性能の評価については、以下のような分析性能の評価項目が存在する。検査目的に応じて用いる分析性能評価を選択し妥当性確認を可能な限り幅広く行い、性能特性という形で客観的証拠を得て検査目的における要求事項を満たす。

なお体外診断用医薬品と医療機器使用の場合、メーカーによる検査目的における妥当性確認は実施済みであり性能特性として添付文書に揭示されている。よって検査実施側が検証を行い要求する性能仕様と合致すれば検査導入することが可能となる。

①真度 trueness

対照検体と検体の一致

具体例)他法(CDx など)で判定された既知バリエーションの検体との一致を確認する。

②併行精度 repeatability precision

同一(同時)条件で同じ結果が得られる精度(同時再現)

具体例)同一検体を同時に複数解析し一致を確認する。

③中間精度 intermediate precision

同一条件の一部を変化させた状況で同じ結果が得られる精度(日差再現など)

具体例)同一検体を複数回解析して一致を確認する。

④測定不確かさ uncertainty

検査結果の測定量のばらつきを生じるパラメーター

具体例)特性要因図を作成して不確かさのパラメーターを推定する。

⑤分析特異性 analytical specificity

測定対象を確実に検出する能力

具体例)陰性が陰性と判定(偽陽性がないか)されているか確認する。

⑥検出限界 detection limit

測定可能となる検査対象の最低量

具体例)検体の変異率を下げて既知バリエーションがどこまで検出できるか確認する。

⑦測定範囲 measuring interval

真度や精度が適切で報告可能な範囲

具体例)真度と精度が適切な解析サンプルで検出可能となる変異の種類を特定する。

【補足】

なお下記の具体例のように分析性能の評価項目を複数組み合わせることで妥当性確認を行うことも想定される。

・具体例 1(真度、中間精度、測定範囲)

CDx で解析済のサンプル(変異種類ごと)を複数用意し、複数回解析を実施して CDx での解析結果と変異種類の結果が一致していることを確認する。

・具体例 2(中間精度、検出限界)

同一サンプルで変異率を変化させたものを用意し、複数回解析を実施して検出可能となる変異率を確認する。

・具体例 3(併行精度、分析特異性、測定範囲)

検出したいバリエーションを持つコントロールを複数の index で標識して解析を行い、同一のバリエーションがコールされている事を確認する。

3) 妥当性確認の承認

妥当性確認内容を計画承認者へ報告し妥当性の承認を受ける。妥当性確認が不十分と判断された場合は追加の確認を実施する。

4) その他

- ・妥当性確認の方法及び手順については手順書に定める。
- ・分析性能の評価による妥当性確認の結果、検証結果は測定標準作業書の性能特性に記載もしくは識別する。

4.要員と検査室環境

1)要員(研修と技能)

- ① 検体検査全般の精度の確保に係る責任者及び遺伝子関連検査と染色体検査に係る責任者(兼任可)を配置する。
- ② 内部研修や外部研修を行った場合は研修記録を残す。
- ③ 機材の導入時は機材メーカーより機材使用に関する説明を受ける。
- ④ 業務を行う上で必要となる要員の技能を定義し定期的に評価する。
- ⑤ 認定資格取得などによる継続的専門的能力の開発に努める。

2)検査室環境

- ① 検体の確実な受領の運用構築を行う。
- ② 病理検体を扱うエリアでは、未固定検体からの感染防護及びホルマリン固定時のホルマリンからの暴露防止に留意する。
- ③ 検査の作業エリアは作業区分(感染性エリア、Pre-PCR エリア、Post-PCR エリアなど)を明確にする。
- ④ 試薬調製はクリーンベンチ、検体や核酸の取扱いは安全キャビネットで作業が行われるのが望ましい。
- ⑤ 実験台やピペットの使用前後は、UV 照射、0.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液などで拭き取りを行う。
- ⑥ ピペットは作業区分ごとに用意する。チップはフィルター付きのチップを使用する。
- ⑦ 次回バッチへの PCR 産物の持ち込みを防止する。
- ⑧ 保冷库、フリーザーについては、検体や試薬を適切に保管する為の温度管理手順を定める。
- ⑨ 検体や検査室内の資源、患者情報が許可なく利用されることを防止する。
- ⑩ 検査室認定(ISO 15189 や CAP-LAP など)を有することが望ましいが検査の実施内容によっては施設要件として必須となる場合もある。

5.文書の作成

検査工程は、手順については標準作業手順書(SOP)で文書化され、記録は作業日誌及び台帳に記載し維持管理する必要がある。

1)標準作業手順書(SOP)の作成

「医療法等の一部を改正する法律の一部施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令(医療法施行規則の一部改正)」(2018年7月27日公布、厚生労働省令第93号)の別表第1の3に示されている手順書(法律上、備えるべき手順書の範囲は医療機関、ブランチラボ、衛生検査所において異なる)及び想定される具体例を提示する(表1)。

なお文書の管理手順は手順書に定め、権限をもつ担当者が文書使用の承認を行い、作成及び改定年月日で文書の変更を識別するとともに定期的な見直しを行う。

表1 「医療法等の一部を改正する法律の一部施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令(医療法施行規則の一部改正)」(2018年7月27日公布、厚生労働省令第93号)の別表第1の3に示されている手順書と想定される具体例
(別表1の3)

作成すべき標準作業書の種類	記載すべき事項
検体受領標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 医療機関等において検体を受領するときの確認に関する事項 二. 受領書の発行に関する事項 三. 検体受領作業日誌の記入要領 四. 作成及び改定年月日
検体搬送標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 一般的な搬送条件及び注意事項 二. 搬送時間又は搬送条件に特に配慮を要する検査項目及び当該配慮すべき事項 三. 保存条件ごとの専用搬送ボックスの取り扱いに関する事項 四. 受託業務を行う場所等への搬送の過程において一時的に検体を保管するときの注意事項 五. 検体搬送作業日誌の記入要領 六. 作成及び改定年月日
検体受付及び仕分標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 検体を受け付け、及び仕分けるときの確認に関する事項 二. 検体受付及び仕分作業日誌の記入要領 三. 作成及び改定年月日
血清分離標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 血清分離作業前の検査用機械器具の点検方法 二. 血清分離室の温度条件 三. 遠心器の回転数並びに遠心分離を行う時間及び温度条件 四. 遠心分離に関して特に配慮を要する検査項目及び当該配慮すべき事項 五. 血清分離作業日誌の記入要領 六. 作成及び改定年月日

外部委託標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 医療情報の送付方法 二. 検体の送付方法 三. 検査の外部委託を行う場合の精度管理及び結果評価の方法 四. 委託検査管理台帳の記入要領 五. 作成及び改定年月日
検査機器保守管理標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 常時行うべき保守点検の方法 二. 定期的な保守点検に関する計画 三. 測定中に故障が起こった場合の対応(検体の取扱いを含む。)に関する事項 四. 検査機器保守管理作業日誌の記入要領 五. 作成及び改定年月日
測定標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 受託業務を行う場所の温度及び湿度条件 二. 受託業務を行う場所において検体を受領するときの取り扱いに関する事項 三. 測定の実施方法 四. 検査用機械器具の操作方法 五. 測定に当たっての注意事項 六. 基準値及び判定基準(形態学的検査及び画像認識による検査の正常像及び判定基準を含む。) 七. 異常値を示した検体の取扱方法(再検査の実施基準及び指導監督医の役割を含む。) 八. 測定作業日誌の記入要領 九. 試薬管理台帳の記入要領 十. 温度・設備管理台帳の記入要領 十一. 作成及び改定年月日
精度管理標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 精度管理に用いる試料及び物質の入手方法、取扱方法及び評価方法 二. 精度管理の方法及び評価基準 三. 外部精度管理調査の参加計画 四. 外部精度管理調査の評価基準 五. 統計学的精度管理台帳の記入要領 六. 外部精度管理台帳の記入要領 七. 作成及び改定年月日
検体処理標準作業書	<ul style="list-style-type: none"> 一. 検体ごとの保管期間及び条件 二. 検体ごとの返却及び廃棄の基準 三. 検体保管・返却・廃棄処理台帳の記入要領 四. 作成及び改定年月日

検査依頼情報・検査結果報告情報標準作業書	一. 情報の記録媒体及び交換方法に関する事項 二. 情報の規格及び内容確認の方法に関する事項 三. 情報の追加及び修正の方法に関する事項 四. 検査依頼情報・検査結果情報台帳の記入要領 五. 検査結果報告台帳の記入要領 六. 作成及び改定年月日
苦情処理標準作業書	一. 苦情処理の体制(指導監督医の役割を含む。) 二. 苦情処理の手順 三. 委託元及び行政への報告に関する事項 四. 苦情処理台帳の記入要領 五. 作成及び改定年月日
教育研修・技能評価標準作業書	一. 検査分類ごとの研修計画に関する事項 二. 技能評価の手順 三. 技能評価基準及び資格基準に関する事項 四. 教育研修・技能評価記録台帳の記入要領 五. 作成及び改定年月日

2) 作業日誌

- ① 検体受領作業日誌
- ② 検体搬送作業日誌
- ③ 検体受付及び仕分作業日誌
- ④ 血清分離作業日誌
- ⑤ 検査機器保守管理作業日誌
 - ・点検日時及び点検実施者名
 - ・各検査機器における保守管理上確認すべき内容
 - ・上記確認すべき事項について特に付記すべき内容
 - ・業者による定期保守点検を受けた場合はその作業内容、点検を行った業者名等
- ⑥ 測定作業日誌
 - ・検査項目ごとの実施件数
 - ・実施件数の内、検査エラー又は検査不具合の発生件数

3) 台帳

- ① 委託検査管理台帳
- ② 試薬管理台帳
 - ・試薬の有効期限
 - ・保管されている試薬の在庫

③温度、設備管理台帳

④統計学的精度管理台帳

・実施日及び実施検査項目

・実施者名

・実施結果(検査エラー値が出た場合の考察等含む)

⑤外部精度管理台帳

記入すべき事項として受検日(受検申込日、実施団体からの結果報告日等)及び外部精度管理調査実施主体名、実施結果(外部精度管理調査実施主体が作成する報告書)をもって代替可能

⑥検体保管、返却、廃棄処理台帳

⑦検査依頼情報、検査結果情報台帳

⑧検査結果報告台帳

⑨苦情処理台帳

⑩教育研修、技能評価記録台帳

参考資料

シスメックス株式会社. OncoGuide™ NCC オンコパネルシステム製品ガイド. 2019

中外製薬株式会社. FoundationOne®CDx がんゲノムプロファイル総合製品ガイド. 2019.

日本病理学会.ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程策定ワーキンググループ, ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程,東京: 一般社団法人日本病理学会; 2018.

日本適合性認定協会. ISO 15189: 2012 臨床検査室—品質と能力に関する要求事項 英和対訳版 第3版. 日本規格協会グループ; 2012.

臨床検査振興協議会. がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方(第2.0版),2109.

II. 検体管理プロセス(検体採取－保存－搬送)

II-1. 組織検体

A. 固定前プロセス

1) 検体採取

- 可能な限り大きな組織検体採取が望ましい。最も量を必要とするパネル検査で体積として 1mm^3 以上(断面積として 25mm^2 以上)必要となる。
- 必要に応じて凍結検体の採取も行う。急速に凍結する。将来的に凍結検体からも解析が可能になる可能性があるが、腫瘍細胞含量の判定のため現在はホルマリン固定標本のみが推奨されている。
- ホルマリンビン等で検体が提出される場合、ホルマリンの液量が検体体積の10倍量必要であるため検体サイズと液量のバランスに注意すること。

2) 搬送

- 採取の際、識別できるラベルを貼付すること。

検体受付、到着確認、組織番号登録

- 検体採取から検体受付、到着確認、組織番号登録までのトレーサビリティが確保されるよう実施者、実施時間の記録を行うことが望ましい。

3) 検体処理

切除・採取直後の組織の取扱い

手術により切除された組織検体(手術検体)

- 摘出後は速やかに固定を行う。速やかに固定を行うことができない場合(30分以内)には、冷蔵庫など 4°C 下で保管し、臓器の摘出後から固定までの時間(冷虚血時間; cold ischemic time)を1時間以内、遅くとも3時間以内とすることが望ましい。実際の冷虚血時間か、少なくとも推奨時間からの逸脱は病理報告書に記録をすべきである。
- 手術検体はホルマリンの注入や割入れなど適切な標本処理を行う。急速かつ均一なホルマリンの浸透のために組織厚は4-5mmを超えないようにするのが望ましい。ただし、ホルマリン固定までの処理時間は可能な限り短縮する。
- 手術検体などで止むを得ずホルマリン固定時間が長くなる検体、脱灰等が必要になることが予測される組織検体は提出された検体からパネル検査用としてホルマリン固定前に別に組織検体採取を行う。この場合、ゲノム研究用規程等を参照し、病理組織診断を妨げない程度に、提出された検体から断面積

25mm² 以上となるよう採取する。

内視鏡的に切除された消化管組織など比較的小型の組織(内視鏡等検体)

- 速やかに固定液に浸漬し、固定を行うことが望ましい。内視鏡検体などの比較的小型の検体は切除のための熱処理や冷虚血時間の影響が手術検体よりも大きくなる可能性がある。

生検により採取された組織(生検検体)

- 速やかに固定液に浸漬し固定を行う。針生検などの検体では固定の際に濾紙などに貼り付けると組織の液性成分が濾紙に吸収されてしまう可能性があるため、プラスチックプレートなどでの対応を考慮する。

ホルマリン固定パラフィン包埋化を行う細胞検体(セルブロック(体腔液検体・穿刺吸引検体由来))

- 必要な前処理を適切に行なったのちに可及的速やかに固定液に浸漬し固定を行う。

B. 固定プロセス

1)ホルマリン固定液の組成

- ホルマリン固定液の組成は、中性緩衝ホルマリン溶液を固定に用いる。
- ホルマリン濃度は 10%(3.7%ホルムアルデヒド)とする。自施設で調整する場合は調整液の濃度と pH の確認を行う。
- 固定不良を避けるため、血液や生理食塩水等による希釈で濃度が 10%以下にならないよう、使用する液量に注意する。
- ホルマリンは可能な限り複数検体で共用することは避け、個別に使用することが望ましい。

2)ホルマリン固定時間

- 組織検体(手術検体、内視鏡等検体、生検検体)では、コンパニオン診断等の推奨を考慮し、室温で6時間以上 48 時間以内(CAP では 36 時間以内)の固定を行うことが望ましい。皮膚や乳腺のような脂肪組織の割合が高い組織では 48 時間まで固定時間が必要であることから必要に応じて組織注入などの対応を考える。固定不良(固定不足・過固定)による品質劣化(特に DNA)は回避しなければならない。
- 総ホルマリン固定時間の記録が望ましい。少なくとも逸脱が生じている記録は必要である。この際、室温で行われた固定の時間と組織プロセッサーでのホル

マリン浸漬時間が主であることに注意が必要である。固定不足の場合、切り出し後の追加固定がなされるが、その固定時間の記録も念頭におく必要がある。ただし、切り出しの際に、未固定・固定不良であった場合の追加固定に対する影響の程度は不明である。

- 組織プロセッサーにより総ホルマリン固定時間を調節する。

3)ホルマリン固定処理に使用する固定液量

- 手術検体や内視鏡的に切除された検体はホルマリン固定に使用する固定液の容量は、組織量に対し、理想的には10倍量の固定液を用いることが望ましい。固定液に完全に浸漬した状態にしなければならない。

4)ホルマリン固定処理時の温度

- ホルマリン固定時の処理温度は、室温(25℃)でよい。温度依存性であるため、季節により保管場所の温度変化がある場合には固定を行う検査室の温度の管理に注意が必要である。

C. 固定後プロセス

1)脱灰処理

- 硬組織を含む検体をゲノム診断に供する可能性がある場合は、酸脱灰を回避し、EDTA脱灰を行うべきである。
- 生検検体でパラフィン包埋を行う前に骨片を確認できる場合には臨床医と病理医の協議の上、病理組織診断に影響が出ない範囲で除去しておくことも考慮する。

2)組織のプロセッシング

- 従来型の組織プロセッサー(密閉式自動固定包埋装置)の使用は問題ないが、使用薬剤の管理(交換頻度等)の影響については不明である。また、迅速型(連続式迅速自動固定包埋装置)では、いまだ十分なデータが得られていない。メーカーのメンテナンスガイドラインを遵守する。
- アルコールの適正なメンテナンスが重要である。メンテナンスが不適正だと脱水処理が不十分になるため保管中のブロック内の分子が加水分解のために変性を起こす。
- プロセッサー内での時間も含めたホルマリン総固定時間が上限を超えないようタイマーのセッティングもチェックする。

3)パラフィンのタイプ

- 高温での分子のダメージを避けるためには純度の高い融点 60℃未満のパラフ

インが推奨である。

4) FFPE ブロックの保管

- パラフィン包埋および保管前の固定不良、脱水不良を中心とした不適切なプロセッシングがあると保管組織検体で分子の変性が起こる。
- ゲノム診断を目的として作製された FFPE ブロックは、高温多湿を避け室温保管、可能であれば冷暗所での保管が望ましい。
- 未染色 FFPE 標本で保管する場合は、低温保管やパラフィンコーティングなどの核酸品質劣化を防止する対応を行うことが望ましいが、後者の場合、脱パラフィンが不十分にならないよう注意を要する。そのため、薄切後時間が経過した未染色 FFPE 標本のゲノム診断への使用は極力避け、可能な限り FFPE ブロックから再薄切をすることが望ましい。ただし、再薄切を行う際、ある一定の検体の損失には留意する必要がある。

参考資料

- J Histochem Cytochem. 2008 Nov;56(11):1033–42. doi: 10.1369/jhc.2008.951863.
- Arch Pathol Lab Med. 2010 Jul;134(7):e48–72. doi: 10.5858/134.7.e48.
- PLoS One. 2018 Sep 7;13(9):e0203608. doi: 10.1371/journal.pone.0203608.
- Arch Pathol Lab Med. 2019 Nov;143(11):1346–1363. doi: 10.5858/arpa.2019-0009-SA.

【補足事項】

がん細胞由来 DNA/RNA の抽出に使用する FFPE 検体は NCC オンコパネルではブロック作製後 3 年以内、Foundation One ではスライド薄切後 12 か月以内のものが推奨されている。ただし、その FFPE 検体の作製においては、ホルマリンの種類と固定方法・固定時間の詳細は病理学会が発刊しているゲノム研究用・診療用病理組織検体取り扱い規定集に従い、10%中性緩衝ホルマリンを用いて、組織の大きさと併せて考え固定不良・過固定を避けた固定が行われていることが望ましい。NCC オンコパネルでは 48 時間以内の固定、Foundation One では 6–72 時間の固定、オンコマイン™Dx Target Test では手術材料は 18–36 時間、生検材料では 3–6 時間を推奨している。しかし、実際にはサンプルの大きさや割の入れ方、あるいは病院内でのワークフローが影響するので、病理医や技師が中心となって各病院における検体処理の最適化を行う必要がある。なお、日常的な病理検体の精度管理に係る知識は病理医や臨床検査技師だけでなく、検体を採取し処理する外科医、内視鏡医、あるいは検体を搬送するスタッフ等、がん医療に携わる者は、阻血処理

後に臓器が摘出されて固定液に入るまでの時間(阻血時間)、固定方法、固定時間の重要性を共通の認識として共有している必要がある。

II-2 細胞検体

塗抹、擦過、穿刺吸引などで採取された細胞検体は、可及的速やかに検体処理を開始する。細胞検体は、各種方法(擦過法、すりあわせ法、引きガラス法、吹き付け法、集細胞法、捺印法、圧挫法など)により塗抹標本作製を行うほか、液状化検体細胞診(LBC, liquid based cytology)のためのLBC保存液処理やセルブロック作製のためのFFPE処理が行われる(下図)。

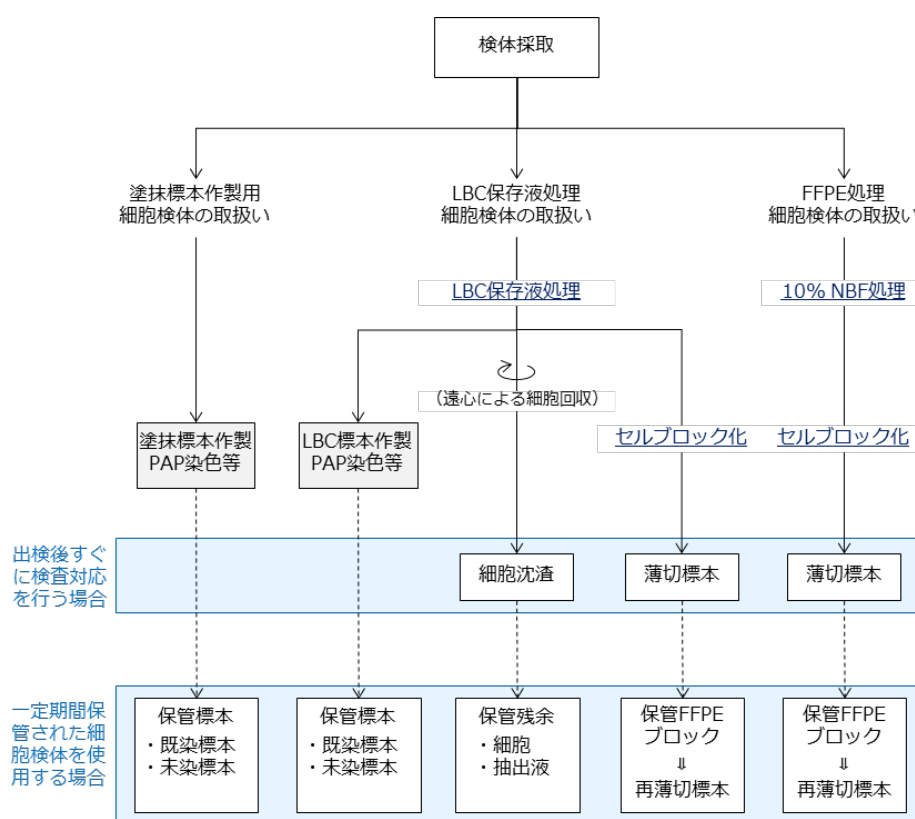


図 ゲノム検査で用いることが想定される主な細胞検体/標本種
(日本臨床細胞学会作成「がんゲノム診療における細胞検体の取扱い指針 第1.0版」より引用・一部改変)

未処理状態の細胞検体を使用する場合は、採取後、室温で放置することは極力回避し、冷蔵(4°C)で保管し、可及的速やかに塗抹標本作製もしくは核酸抽出を行うことが望ましい。凍結保管する場合は、液体窒素やドライアイスアセトン法などで急速に凍結し、マイナス 180°Cないしマイナス 80°Cにて保管する。凍結検体の場合は、融解・凍結の繰り返しは回避する。

液状化検体細胞診(LBC, liquid based cytology)検体は、採取後に可及的速

やかに LBC 保存液で処理する。LBC 保存液に浮遊させた細胞検体の場合、常温ないし冷蔵(4℃)で保管し、速やかに核酸抽出を行うことが望ましい。

FFPE 処理を行う細胞検体については、適正な細胞量を回収し必要な前処理を適切に行ったのちに、可及的速やかに 10%中性緩衝ホルマリンに浸透し固定を行うことが望ましい。細胞診断後に FFPE セルブロックを作製する場合、残検体は冷蔵保存(4℃)するのが望ましい。セルブロック作製のための前処理(細胞塊作製処理)は、遠心分離細胞収集法と細胞固化法に大別され、前者では遠心管法が、後者ではアルギン酸ナトリウム法が本邦では主に使用されている。

II-3 血液検体(白血球)、骨髄からの核酸

抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管を用いて規定量を採血した後、直ちに転倒混和を行い、採血当日に核酸抽出を行わない場合は冷蔵(2~8℃)保存する。なお、抗凝固剤(EDTA 等)入り採血管を用いた場合には、特に安定化剤を加える必要はない。ただし、長期にわたり細胞を保存する場合は超低温(-70℃以下)で保存する。骨髄検体(骨髄穿刺液)においては、規定量を専用の保存液(FBS を含んだ細胞培養液)で冷蔵(2~8℃)保存する。

II-4. 血中遊離核酸(cfDNA: cell free DNA)

1) 採取

- ・ 採血のプロセスで最も重要なのは、溶血など血球細胞の破壊を最小限に抑えることである。細胞が破壊されるとゲノム DNA が遊離し、cfDNA の検出感度が低下するためである。採血は、検査の利用目的に従い妥当性確認された方法(採血タイミング、採血針サイズ、翼状針採血の必要性、採血後の転倒混和回数等)にて行う。特定の指示がない場合は、通常の方法にて行う。
- ・ 診断薬メーカーまたは製造販売業者の添付文書もしくは、検査サービス提供者の指示書に従い、採血管を選択し、採血を行う。
- ・ cfDNA プロファイル安定化剤入りの採血管の使用が推奨される。
- ・ 専用採血管として、Streck 採血管(Streck, Inc.)、セルフリーDNA 抽出用採血管(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)、BD バキュティナ採血管(ベクトン・デイツキンソン株式会社)、パクスジーン DNA 採血管などが利用可能である。
- ・ 安定化剤入りの採血管が利用できない場合、内在性 DNase の不活性化が期待できることから、抗凝固剤として EDTA 入り採血管が他の抗凝固剤入り採血管より望ましい。
- ・ 採血後速やかに、転倒混和する。細胞の破壊による DNA 遊離を回避するため、ゆっくり混和する。転倒混和の回数は診断薬メーカーまたは製造販売業者の添付文書の記載、あるいはサービス提供者の指示書に従う。特に指定がな

い場合、6-8 回の転倒混和が推奨される。

- ・ 採血から検体の前処理、検査室外部(衛生検査所など)への輸送に関わる分析前プロセスには、検体の取り扱いに慣れた検査部スタッフが責任を持って適切に行うべきである。

2) 搬送

- ・ 血漿分離まで室温下での長時間放置などを避け、血球破壊を回避するよう注意する。
- ・ 診断薬メーカーまたは製造販売業者、もしくは検査サービス提供者の指示書に従い血漿分離を行うとともに、保管条件にも注意する。
- ・ 安定化剤入りの採血管では、cfDNA プロファイルの安定性は添付文書あるいは提供される情報に従う。検査サービス提供者からの指示書があればそちらに従う。
- ・ EDTA 入り採血管を用いた場合、測定アプリケーションによって、2 °C~ 6 °Cにて 6 時間以内であれば影響が回避可能である。時間と温度の条件に適さない場合にのみ、検査サービスの提供者は妥当性確認を行う。
- ・ 凍結にて cfDNA プロファイルは変化するため、一次サンプル(全血試料)は凍結しない。

3) cfDNA 精製前検体処理

- ・ 診断薬メーカーまたは製造販売業者の添付文書もしくは、検査サービス提供者の指示書に従い処理を行う。
- ・ EDTA 入り真空採血管を用いた場合、検体処理法は検査サービス提供者からの指示書に従い、血漿分離を行う。指示書に記載がない場合、遠心は 1600 g ~ 2500 g、2 °C~ 8 °C、10 分間行う。白血球からの核酸の混入を避けるため、血漿と細胞層の境界面を乱さないように注意し 別のチューブに移し変える。
- ・ 2 回目の遠心操作を行う。その際、14000 g ~ 16000 g、2 ~ 8 °C、10 分の条件で行う。
- ・ 高速遠心機がない場合の 2 回目の遠心操作は、より低い g、例えば 3000 g ~ 5000 g、2 °C~ 8 °C、20 分間で行う。

2) 保存

- ・ 血漿の保存は、診断薬メーカーまたは製造販売業者、もしくは検査サービス提供者からの指示書に従う。指示書がない場合、2 °C~ 8 °Cで 24 時間まで保存可能である。それ以上の長期間の保存は、-20 °C以下で行う。温度と期間については妥当性確認を行う。
- ・ cfDNA 専用採血管の場合、冷蔵保管すると凍結する恐れがあるので、室温での保管が望ましい。また、外部の衛生検査所などに搬送する場合も、室温で行う(衛生検査所の指示に従う)。

参考文献

- 1) 日本臨床検査標準協議会. 遺伝子関連検査標準化専門委員会. 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル(承認文書). 2011.
- 2) 日本臨床検査標準協議会. 遺伝子関連検査標準化専門委員会. 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル(パート2)新規測定技術・解析試料の品質管理. 2017.
- 3) 日本臨床検査振興協議会. リキッドバイオプシーによる循環血中の腫瘍由来 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) 検査の質保証に関する見解.

III. 核酸抽出プロセス

III-1 DNA および RNA の取扱いにおける一般的注意事項

NGS 解析用の DNA あるいは RNA の取扱いに際しては、一般的に以下の点に注意すべきである。

- ・ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、ピペット、ヌクレアーゼフリーでエアロゾル防止フィルター付きピペットチップを使用する。
- ・実験スペースは常にクリーンな状態にし、Biosafety Level 1(BSL1)のルールに基づき、実験を行う。

III-2 病理検体からの核酸抽出※

1. 検体選択

検査対象となる FFPE から HE 染色標本を作製し、病理診断内容を病理医が再度確認し、組織切片上における有核細胞数中の腫瘍含有率を確認する。腫瘍細胞の含有率が少ない場合は、正確なゲノム解析が困難となる場合があるため、未染色標本を作製したのち目的の腫瘍部位のみを削ぎ取り、腫瘍含有率を高める操作が必要となる。病理医は、核酸抽出をおこなう細胞域にマッピングし、トリミングをする場所を指定する。未染色標本の裏面(切片が載っていない面)に油性マジックでマーキング通りに写す。

2. 薄切

臨床検査技師は病理医の指示に沿って該当する保管ブロックを準備する。

- ・オーダ内容とブロック(サブ番号)の照合確認による患者取り違い防止は必須である。
- ・標本をスライド硝子に貼付する場合は、薄切後にガラスを準備する。システムによる印字は推奨される。また、外注では患者氏名などの個人情報の記載は避ける必要がある。
- ・薄切はガウン、手袋を着用し、検体ごとに手袋、マイクローム替刃を新しいものに交換する。
- ・切片の厚さは検査案内や検査試薬の添付文書に沿って行う。
- ・必要枚数薄切後の最後に HE 標本を付けることで、提出標本の腫瘍割合の確認に役立つ。

3. 核酸抽出

基本的には使用する DNA 抽出キットのプロトコルに従って操作を行うが、以下、代表的な手順を記載する

・ DNA

1. 脱パラフィン後のサンプルに Lysis buffer と proteinase K を加えて、ヒートブロックにてインキュベートする。
2. ヒートブロック(高温)にマイクロチューブを移し、インキュベート後、室温に戻す。
3. RNase を加えてピペッティングする。RNase は安定しているため、操作1の際に加えることも可能。
4. 室温でインキュベートする。

・ RNA

1. 脱パラフィン後のサンプルに Lysis buffer と proteinase K を加えて、ヒートブロックにてインキュベートする。
2. ヒートブロック(高温)にマイクロチューブを移し、インキュベートする。
3. 高温のヒートブロックからマイクロチューブを取り出し、氷上に置いて冷やし、その後は室温で放置。(DNase は高温下で失活するため、確実に溶液を室温に戻してから DNase を加える。)
4. DNA の混入を避けるために DNase を加えてピペッティングする。
5. 室温でインキュベートする。

4. 混在する他の細胞構成成分の除去 / 核酸回収の基本的な原理

➤ DNA **【フェノール/クロロホルム/エタノール法】**

細胞あるいは組織破碎液にフェノールを加え、蛋白を不溶化する。
上清の水層分離し、クロロホルム添加によりフェノールを除去する。

➤ DNA **【シリカカラム法】**

カオトロピック物質(グアニジン塩)の存在下で、核酸がシリカに binding する。カオトロピックの陰イオンは、水素結合・ファンデルワールス力など非共有結合を阻害する効果を持つ。この作用により水和水は放出され、シリカと核酸の間に疎水結合が形成される。この原理を利用して、DNA を選択的にシリカメンブレンに結合させ、遠心することで夾雑物や DNA 合成阻害物を除去する。

➤ RNA **【AGPC (acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction) 法】**

RNA はリボースに OH 基を持つため、DNA に比べて親水性を持つ。
細胞や組織の破碎液に酸を加えて酸性にすることで親和性を低下させる。
フェノールやクロロホルムなどを加えると DNA やタンパク質は有機層、RNA は水層へ分配される。

水層を単離してアルコール沈殿することで RNA を抽出する。

III-3 血液検体(白血球)からの DNA 抽出

1. 検体の準備

EDTA などの抗凝固剤で処理した新鮮な全血を 200 μ l \sim 300 μ l 程度用意する。凍結されている検体の場合には事前に溶解し、室温に戻す。全血には一般的に白血球が 4×10^6 to 1.1×10^7 cells/ml 程度含まれる。一般的な DNA 抽出キットを用いる場合、各キットが想定している白血球数と予定 DNA 収量を確認し、用意する血液量を決める。

2. DNA 抽出

基本的には使用する DNA 抽出キットのプロトコルに従って操作を行うが、以下、代表的な手順を記載する

1. Proteinase K 20-30 μ l に対して全血 200 μ l \sim 300 μ l を添加し、56 $^{\circ}$ C で 10-20 分間インキュベートする。その間に使用するキットのカラムなどの準備を行う。
2. 使用するキットのプロトコルに従い、インキュベートしたライセートに対して RNase やエタノールなどを添加し、キットのカラムに載せる。
3. III-2 病理検体からの核酸抽出の手順と同様に、キットのプロトコルに従い、混在する他の細胞構成成分の除去と核酸の回収を行う。

III-4 DNA の品質管理

DNA の品質管理の指標には、長さ、量、化学的純度、構造的完全性を指標とすることができる。

1. 定性

DNA の長さ(分解度)の確認には、一般的に電気泳動法が用いられる。分解度の低い良好なゲノム DNA は、高分子の DNA がはっきりと確認でき、低分子のスメア、バンドやピークは認められない。

全血や凍結組織から抽出された DNA の場合には、10kbp 以上の高分子 DNA が主体を占めるのに対し、FFPE 組織から抽出された DNA は、ホルマリンによる架橋形成によって DNA が切断され、200 bp 以下の低分子 DNA が主体となる。血漿または血清から抽出した cfDNA の場合には、その多くは 140 \sim 200 bp の長さである。高分子の DNA が認められる場合には、有核細胞由来のゲノム DNA が混入している可能性が疑われるため、cfDNA の解析にはふさわしくない。高分子 DNA は、物理的衝撃で断片化する可能性があることから、溶液を混合する際には指でそっとタッピングするなどの注意が必要である。また、可能な

限り凍結融解の繰り返しを避ける。

2. 定量

DNA の濃度はライブラリ調製効率に影響を及ぼすことから、適切な長さの dsDNA(二本鎖 DNA)のみを正確に定量することが必要である。一本鎖 DNA や RNA、ヌクレオチドの混入は正確な定量を妨げる恐れがある。紫外可視分光光度計では 260 nm 付近に吸収をもつ物質があわせて定量されてしまうため、定量値を過大に見積もる傾向がある。このため、dsDNA に選択性を示す蛍光アッセイ法などを用いて定量することが望ましい。この際、適切な頻度で検量線作成を行うことや、濃度既知の DNA を毎回測定することなどにより、できるだけ正確な測定値を得るようにする。血漿または血清から cfDNA を抽出する場合、一般的に 1 mL の血漿からは 1 ~ 50 ng の cfDNA が回収できる。病態の進行などにより幅はあるが、収量が過大である場合には有核細胞由来のゲノム DNA が混入している可能性が疑われるため、cfDNA の解析にはふさわしくない。凍結している DNA ストック溶液を NGS 用ライブラリ調製に使用する際には、使用する直前に定量することが望ましい。

3. 化学的純度

良好な DNA の化学的純度の指標は、A260/A280 の値が 1.8 ~ 2.0、A260/A230 の値が 1.0 より大きいことである。また、DNA を溶かしている溶媒に EDTA、エタノール、フェノール等が含まれる場合、ライブラリ調製試薬の反応を阻害する場合がある。製造販売業者の使用説明書を参照し、混入を避けるように提示された物質に関しては溶媒に含まれないように配慮する。

4. 構造的完全性

構造的完全性の指標として リアルタイム PCR 法により得られる Ct 値(もしくは Cq 値)を用いて核酸品質を評価する方法である。DNA 品質評価では、異なる長さの 2 種のアンプリコンサイズ(例: 50~100 bp 程度の短鎖アンプリコンと、100~300 bp 程度の長鎖アンプリコンなど)から得られる Ct 値の差(ΔCt 値もしくは ΔCq 値)を指標とする方法などが用いられている。

また電気泳動法を用いた方法として、DIN(DNA Integrity Number)値がある。この指標はアジレント社の Agilent 2200/4200 TapeStation システムを用いた Genomic DNA ScreenTape assay で測定したデータを gDNA の分解度に応じて 1~10 にスコア化された値であり、FFPE 検体の DNA 品質評価が可能である。

このほか dsDNA の割合を算定する方法がある。蛍光分光光度計を用いて dsDNA を定量し、吸光光度計で測定した DNA 濃度と比較する。

$$* \text{dsDNA の割合(\%)} = \text{dsDNA 濃度} / \text{DNA 濃度} \times 100$$

分解度の高い DNA を使用する場合は、dsDNA 濃度をもとに必要な DNA の液量を算定し、ライブラリを作製することが有効な場合もある。

III-5 RNA の品質管理

RNA の品質は、長さ、量、化学的純度、構造的完全性を指標とすることができる。

1. 定性

RNA の長さ(大きさ)の確認には一般的に電気泳動法が用いられる。NGS 解析用の RNA の品質確認には微量で解析できる機種システムを使用することが望ましい。分解度の低い良好な RNA は、28S、18S のバンドがはっきりと確認でき、低分子のスメアなバンドやピークは認められない。

2. 定量

RNA の濃度が DNA やヌクレオチドなどの混入により正確に定量されていない場合、ライブラリ調製効率に影響を及ぼす可能性がある。

3. 化学的純度

良好な RNA の化学的純度の指標は、A260/A280 の値が 1.8 ~ 2.0、A260/A230 の値が 1.0 より大きいことである。また、RNA を溶かしている溶媒に EDTA、エタノール、フェノール等が含まれる場合や検体に DNA が混入している場合、ライブラリ調製試薬の反応を阻害する場合がある。製造販売業者の使用説明書を参照し、混入を避けるように提示された物質に関しては溶媒に含まないように配慮する。

4. 構造的完全性

構造的完全性の指標として電気泳動法(バイオアナライザ等)を用いた RIN (RNA Integrity Number)値を測定する。RIN 値が 10 に近いほど RNA の品質が高い。また RIN 値と同様に、電気泳動法を用いた指標として、イルミナ社が開発した DV200 値があり、200 ヌクレオチド以上の RNA 断片の全 RNA 断片に占める割合を算出する。DV200 による品質区分は、>70%の場合は High, 50~70%の場合は Medium, 30~50%の場合は Low, <30%は Too degraded としており、<30%の FFPE 検体では、RNA シークエンスのライブラリ調製への使用を推奨していない。その他、RIS (RNA Integrity Score)などの指標がある。

IV. 核酸解析プロセス(ライブラリ調製からシーケンスまで)

IV-1 ライブラリ作成

ターゲットとなる遺伝子を解析するためのライブラリ作製方法は、裁断された核酸断片に対して相補的な配列をもつキャプチャープローブを用いて捕獲し、PCR で増幅させて解析するキャプチャーシーケンス法と、核酸断片に対して PCR プローブを用いてマルチプレックス PCR を施行して核酸配列を解析するアンプリコンシーケンス法に大別される。この両者にはそれぞれ利点・欠点があり、例えばキャプチャーシーケンス法は、融合遺伝子や比較的長い領域の欠失のような DNA の大きな構造変化を捉え、かつ DNA コピー数を算出する能力が高い。一方で、アンプリコンシーケンス法では、必要 DNA 量が少なく作業時間も短く、また安価なコストで実施できるが、標的領域の GC 比など核酸配列による PCR 増幅効率の差異が大きくなるために、増幅不良領域での解析精度の低下や DNA コピー数計算が困難になる、という特徴を有する。パネルに搭載する遺伝子は、ライブラリ作製時に反応させる target gene sequence primer (probe) のデザインによって選定することになるが、その方法論や種類は様々で、それぞれのキットによる特徴があるため、使用する検体の種類、品質、並びに標的となる遺伝子数等に合わせて選定すべきである。

IV-2 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer: NGS) のオペレーション

各ライブラリ断片はライブラリアダプターとハイブリダイズする共有結合済 DNA リンカーと共に固体表面(ビーズまたは基盤表面)上で増幅されるが、この増幅により単一ライブラリ断片に由来する DNA のクラスター群が形成され、各クラスターが個々のシーケンシング反応で作用する。

各クラスター配列は核酸取り込みの繰返しサイクルにおいて、光または蛍光シグナルの産生を介して視覚的に読み取られる。

IV-3 NGS の薬事上の取り扱いの注意点

NGS を含む DNA シーケンサーの医薬品医療機器法における取扱いについては、2016 年 4 月に厚生労働省から出された通知「遺伝子検査システムに用いる DNA シーケンサー等を製造販売する際の取扱いについて」に示されている。この通知では、以下の用語についての定義が示されている。

用語	説明
DNA シーケンサー	生体由来の試料から抽出した核酸又はこれを増幅若しくは濃縮した DNA の塩基配列を決定し出力する装置及びこれを作動するプログラ

	ムをいう。
シーケンシングサンプル調製試薬	DNA シーケンサーにより遺伝子等の塩基配列を決定する際に、検査対象とする遺伝子等の項目にかかわらず必要になる試薬をいう。シーケンサー解析用ライブラリを調製するための試薬も含まれる。
テンプレート DNA 調製試薬	疾病の診断等を目的として、生体由来の試料から抽出した核酸から特定の領域の DNA を増幅又は濃縮するために使用されるプライマーセット及び関連試薬（シーケンシングサンプル調製試薬を除く。）をいう。
解析プログラム	遺伝子等の配列情報に対して内部又は外部のデータベースを参照し、比較するなどにより、臨床的に意義のある遺伝子変異等（融合遺伝子、挿入、欠失、遺伝子多型等を含む。）の判定を行うものをいう。
DNA シーケンサー診断システム	DNA シーケンサー、シーケンシングサンプル調製試薬、テンプレート DNA 調製試薬及び解析プログラムを組み合わせることで使用することにより疾病の診断等を行うシステムをいう。

これら用語のうち試薬部分については、NGS システム間で表現が異なるため、下図に薬事承認されているプロトン測定型システム(ライフテクノロジーズ社)および SBS 型システム(イルミナ社)について用語整理した。

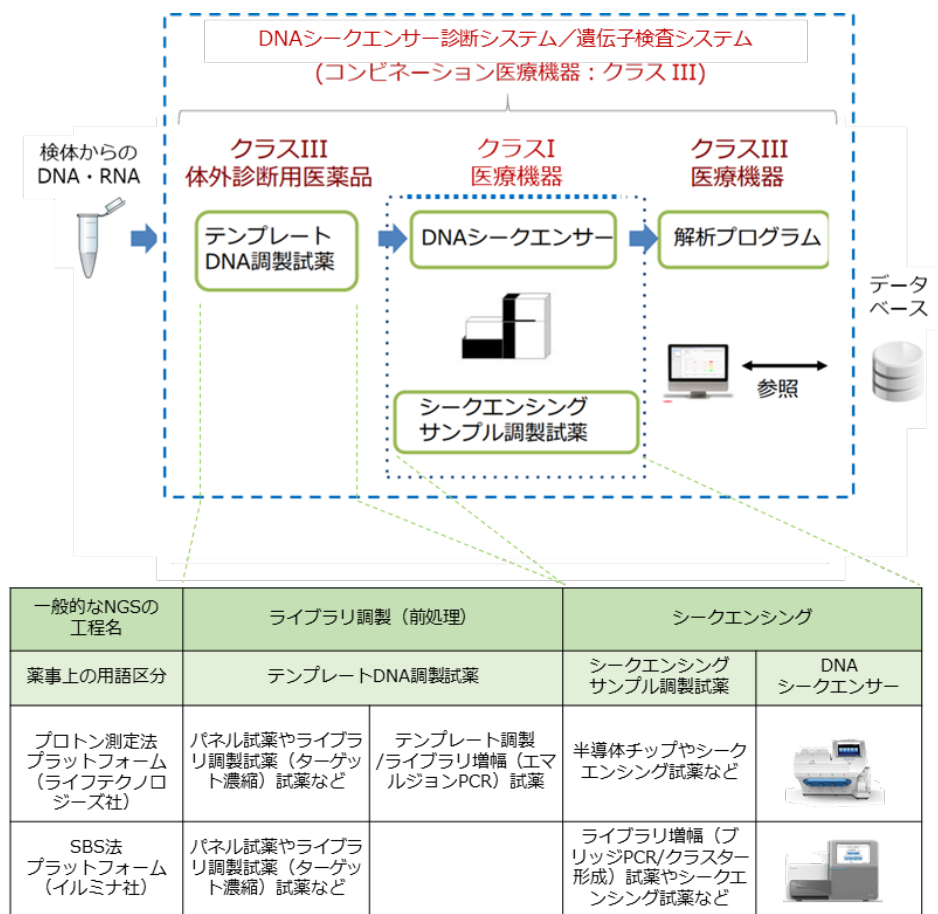


図 NGSおよび関連試薬の薬事上の位置づけと各プラットフォームでの用語の整理

保険診療下で行われる遺伝子パネル検査では、上図に示す体外診断用医薬品・医療機器として承認・認可されたものが用いられているが、現在承認されている複数のがん遺伝子パネル検査システムごとに、承認等の形態がそれぞれ異なっている。「オンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム」は、コンビネーション医療機器として承認がされている。「OncoGuide NCC オンコパネルシステム」では、使用する試薬・機器はすべて薬事承認されているが、これに含まれるものは、テンプレート DNA 調製試薬と解析プログラムのみである。一方で、「FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル」や「FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル」は、解析プログラムのみの承認となっており、試薬・機器部分は承認対象外となっている。そのため、試薬・機器の薬事承認品が流通しない当該システムの検査実施は、特定の検査機関(米国 Foundation Medicine 社)に限定される。同様の承認形態が取られている検査システムとして、生殖細胞系列遺伝子変異解析プログラム承認を得ている

BRACAnalysis 診断システムがある。なお、この通知では、研究用 DNA シークエンサーの取扱いについても言及しており、医療機関等において DNA シークエンサー診断システムを利用して疾病の診断等を行おうとする場合は、承認された DNA シークエンサー、テンプレート DNA 調製試薬及び解析プログラムが使用されることが望ましいとされているが、医療機関等において既に保有している研究用 DNA シークエンサーをやむを得ず使用する場合は、医療機関等の責任において使用することが許容される内容が示されている。

V. データ解析プロセス(バイオインフォマティクスと結果報告)

ゲノム検査の情報解析では NGS から出力された配列を解析し、人間が解釈可能なレポートの作成まで行う。現在のゲノム検査で使われる NGS では約 150 塩基程度の長さの配列しか得られないため、この配列(リード)が約 30 億塩基対のヒトゲノム中のどこからきたものかを特定(マッピング)し、ヒトリファレンスゲノムと比較してどこが変化しているのかを特定(多型・変異検出)する。さらにヒトリファレンスゲノム中の何塩基目がどのように変わったかの情報から、遺伝子への対応関係や既知の情報をデータベースから検索するアノテーションを行う。通常はこれらのステップを全自動で行う。

ゲノム検査の情報解析の一般的なステップ

ゲノム検査の情報解析は一般的に以下のようなステップで行われる。

1. シークエンス結果のクオリティチェック
2. FASTQ をヒトリファレンスゲノムへマッピング
3. 生殖細胞系列多型・体細胞変異の検出
4. アノテーション
5. キュレーション・レポート作成

V-1 シークエンス結果のクオリティチェック

シークエンサーはシークエンス結果がどの程度確からしいかを示した Base Quality を1塩基ごとに出力する。よく基準として使われる Q30 の場合、99.9%の確率で正しくシークエンスできていることを意味する。通常的全ゲノム解析、全エクソーム解析では不要な場合が多いが、シークエンスクオリティによっては問題のある部分を取り除くトリミング処理を行う場合がある。除去後の残存リードの割合が通常よりも低い場合にはシークエンスに問題が疑われる。また、シークエンサーの出力量は毎回変動するため、十分な出力があることを確認する。

V-2 ヒトリファレンスゲノムへのマッピング

シーケンサーで読まれた結果は 100 塩基から 150 塩基程度の長さしかないため、約 3 億塩基対のヒトゲノムの中のどの部分に対応するものか特定する必要がある。また、この処理をマッピングと呼び、bwa [1]がよく用いられる。その後、全ゲノム解析、全エクソーム解析などの場合にはマッピング結果をもとに PCR Duplicate および Optical Duplicate 除去を行う。これらの手法は Regier et al. [2]で標準的な手法が示されている。

マッピング結果からは以下のようなことが検証できる。

- 他の生物種のコンタミの可能性
ヒトゲノムへのマッピング率が低い場合には他の生物種のコンタミの可能性がある。例えば唾液から DNA 抽出した場合には口腔内細菌が含まれる可能性がある。
- 性別の判定
X 染色体と Y 染色体にマッピングされたリードの割合から性別が判定できる。ただし、必ずしも表現型の性別とゲノム上の性別は一致しないことに注意を要する。
- ライブラリ調製のクオリティ
PCR Duplicate の割合が通常より高い場合にはライブラリ作製に問題が発生する可能性がある。また、全エクソーム解析などのターゲットシーケンスの場合には全リードのうちターゲット領域にマッピングされた割合からキャプチャーが成功しているかどうか判定できる。もし、ターゲット領域へのマッピング率が通常より低い場合にはキャプチャー過程に問題がある可能性がある。
- 体細胞変異および多型の検出可能領域
マッピングされたリード数が十分な数があるかどうかで、どの領域で十分な変異・多型検出が可能か判定できる。また、ターゲット領域の平均 Depth を確認することで、十分なリード数が得られているか判定できる。

V-3 体細胞変異および生殖細胞系列の多型の検出

マッピングされたリードの配列とヒトリファレンスゲノムの配列を比較し、どの部分が異なっているか調べることで生殖細胞系列の多型の検出を行う。また、がん組織と血液のシーケンス結果が揃っている場合には血液からは二つのサンプルの検出結果の比較を行うことで全ゲノム解析、全エクソーム解析では GATK [3] がよく用いられる。この過程ではシーケンサーの違いや解析ソフトウェアの違いにより結果が異なる場合が多いため、事前に十分な検出能力があるか、どのようなエラーが入りやすいのか検証する必要がある。

生殖細胞系列の多型検出結果からは以下のような項目の確認が行える。

- サンプル間コンタミの検出
全ゲノム解析および全エクソーム解析の場合にはサンプル間コンタミの可能性を検出することができる [4]。

さらに体細胞変異の検出結果からは以下のような項目の確認が行える。

- 癌部、非癌部の取り違え、サンプル間コンタミの検出

もし、非癌部と癌部が別人由来の場合には通常より多い変異が検出される。通常より多い変異が検出され、その多くが日本人リファレンスパネル [5] [6]や gnomAD [7]などに登録されている SNP に一致する場合にはサンプル取り違えかサンプル間でのコンタミが疑われる。

- がん組織のクオリティ

多くの体細胞変異が検出され、その多くが既知の SNP ではなく低い Variant Allele Frequency に集中している場合、サンプルの劣化が疑われる。特にサンプルが劣化すると、5-メチルシトシンの脱アミノ化反応により、シトシンがチミンに置換される現象が多く発生する。このため、検出された変異に C→T の置換が多い場合、サンプルの劣化している可能性がある。ただし、Alexandrov *et al.* [8]でも報告がある通り、C→T の置換は通常の癌でもよく見られるため必ずしもサンプル劣化を意味しない。

V-4 アノテーション

生殖細胞系列の多型や体細胞変異の検出結果では「chr12: 25398284 C>T」のような染色体名、位置および変化した塩基の情報が主で、どの遺伝子のどのアミノ酸に対応するか、既知の文献情報があるかどうかはアノテーションのステップで付与する。

遺伝子アノテーションでは生殖細胞系列多型や体細胞変異が遺伝子にどのような影響を及ぼすかは通常 Sequence Variant Nomenclature [9]に従って表記される。通常、一つの遺伝子は複数の転写物を持つため、基準となる転写物次第で表記が変わりうる。このため、どの転写物が基準となっており、基準がどのように選ばれているか確認する必要がある。例として BRAF p.Val600Glu は p.Val640Glu として表記される場合もある。

既知の文献情報データベースとしては ClinVar、HGMD、COSMIC、CIViC などがある。文献情報は日々アップデートされているため、どのデータベースのバージョンを使ったかを記録しておく。また、解析依頼時点ではデータベースに記載がなかったために未解決となっていた症例であっても、データベースをアップデートして再解析を行うと解決する場合がある。

V-5 キュレーション・レポート作成

多くの場合、生殖細胞系列の多型や体細胞変異の検出結果は数百から数百万に上る。このため、アノテーション結果をもとに意義のある多型・変異を絞り込む必要がある。これをキュレーションと呼ぶ。絞り込みの基準はゲノム検査の目的によって異なるが、例として日本人リファレンスパネル [5] [6]で 1%以上の頻度で見られるようなも

のを除いたり、ClinVarなどで Pathogenic と報告されているものを抽出したりする。抽出基準がどのようになっているかで最終的なレポートに掲載される結果が変わるため、採用している基準を記録しておく必要がある。このようにして、最終的な解析レポートが作成される。

引用文献

- [1] Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. <http://arxiv.org/abs/1303.3997>
- [2] Regier, A. A., et al. (2018). Functional equivalence of genome sequencing analysis pipelines enables harmonized variant calling across human genetics projects. *Nature Communications*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06159-4>
- [3] McKenna, A., et al. (2010). The genome analysis toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, 20(9), 1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>.
- [4] Cibulskis, K., et al. (2011). ContEst: Estimating cross-contamination of human samples in next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 27(18), 2601–2602. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr446>
- [5] Tadaka, S., et al. (2019). 3.5KJPNv2: an allele frequency panel of 3552 Japanese individuals including the X chromosome. *Human Genome Variation*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41439-019-0059-5>
- [6] Okada, Y., et al. (2018). Deep whole-genome sequencing reveals recent selection signatures linked to evolution and disease risk of Japanese. *Nature Communications*, 9(1), 1631. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03274-0>
- [7] Karczewski, K. J., et al. (2019). Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *BioRxiv*, 531210. <https://doi.org/10.1101/531210>
- [8] Alexandrov, L. B., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463), 415–421. <https://doi.org/10.1038/nature12477>
- [9] den Dunnen, J. T., et al. (2016). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Human Mutation*, 37(6), 564–569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>

VI. 内部精度管理(IQC)

1. 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行における遺伝子関連・染色体検査の精度の確保について

医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令¹⁾が2018年12月1日より施行され、遺伝子関連・染色体検査の精度の確保に関連して責任者と内部精度管理について以下の内容が述べられている。

- 遺伝子関連・染色体検査を行う場合の精度の確保に係る責任者については、医師又は臨床検査技師(歯科医療機関においては歯科医師又は臨床検査技師)のほか、遺伝子関連・染色体検査の専門知識及び経験を有する他の職種を認めるものとする。他の職種の例としては、大学院、大学、短期大学、専門学校又は高等専門学校において分子生物学関連科目を履修した者のうち、検体検査の業務について3年以上の実務経験及び精度管理についての3年以上の実務経験を有する者が考えられる。
- 病院等が遺伝子関連・染色体検査を行う場合、その行う検査項目ごとに内部精度管理の実施が行われるよう配慮しなければならない。なお、内部精度管理の実施に努める上で留意すべき項目は、「日々の検査・測定作業の開始に当たっては、機器及び試薬に必要な較正が行われていること」、「定期的に当該病院等の管理試料等の同一検体を繰り返し検査した時の結果のばらつきを度合いを記録及び確認し検査結果の精度を確保する体制が整備されていること」とされている。なお、遺伝子関連・染色体検査以外の検体検査を行う場合については、地域医療への影響等を勘案し、内部精度管理の実施は努力義務とされた。

2. 内部精度管理に関する一般的事項

ISO 15189:2012²⁾の精度管理(5.6.2)の技術的要求事項として、「検査室は、結果が意図したとおりの品質を達成しているかについて検証する精度管理手順を構築しなければならない(5.6.2.1)」とされており、遺伝子関連検査のためのISO 15189 ガイダンス文書³⁾において以下が求められている。

- 検査施設は、施設内の質保証を定期的に評価する方針と手続きを備えておき、評価結果及び改善のために行った措置を文書化する。
- 妥当性確認されたバイオインフォマティクスパイプラインの日常的な運用には、検査室が決定した品質管理基準の監視が伴わなければならない。
- 臨床サンプル(試料)の分析中に期待される品質基準からの逸脱は、その調査と解決が要求される。

- 常に分析が正しく行われているか、品質指標をモニターする必要がある。遺伝子関連検査全般において、サンプリング、核酸抽出も重要な要素であることから、検体に近い管理物質で定期的にモニタリングすること。
- 分析プロセスのパフォーマンスを監視するには、品質管理手順を実施する必要がある。管理手順は、テストシステムの故障、環境条件の不利な点、およびオペレータのパフォーマンスに起因する即座のエラーを検出し、時間の経過とともにテストパフォーマンスの精確さと精密度を監視するように設計されている。シーケンス分析は通常、定性的分析と考えられているが、NGS は、効果的なコントロールおよびコントロール手順を考案する際に考慮すべき定性的および定量的側面の両方を有する。
- NGS の品質管理材料と測定基準は、試験の妥当性確認中に確立されるべきである。DNA 抽出、ライブラリ調製、DNA シークエンシング、インフォマティクス分析パイプラインを含む NGS 検査プロセスの各コンポーネントは、QC の材料と測定基準を確立すべきである。検査室では、適切な品質管理手順が、機械のサンプル性能、ベースコール、アラインメント、バリエーションコールを含むシーケンスプロセスのすべての側面を評価することを保証する必要がある。

3. がんゲノム検査における内部精度管理

NGS を用いたがん遺伝子パネル検査は、ステップが多く、それぞれが複雑であるため、精度管理用の品質指標は、分析プロセスごとにバリデーション時に設定すべきである。標準物質を用いたプロセス全体での精度保証が可能であるならば、それもまた有効である。実際に使用する臨床検体である FFPE サンプルや代用品としての細胞株の利用も望まれる。がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方⁴⁾において内部精度管理の例として以下が挙げられている。

- 核酸を含まない検体による汚染の確認
ライブラリ調製時に核酸を含まない検体も同様にライブラリ調製を行う。ライブラリ量、ライブラリ長ともに測定限界以下であることを確認する。もし、ライブラリができていた場合、汚染が疑われる。
- 陽性対照と陰性対照
性能確認で使用した変異(核酸)セットなどを陽性対照として、検体と同時にライブラリ調製し、シーケンスデータ解析まで行なう。陽性対照として正しい結果が得られていることを確認する。陰性対照はエラー率測定に使用したヒトゲノム標準試料を、検体と同時にライブラリ調製し、シーケンスデータ解析まで行う。なお、正常組織(血液)と腫瘍組織を同時に検査に使用する場合(マッチドペア解析)は、陰性対照の解析は必要でない。

- サンプルの取り違えによる検査ミスの防止
バーコードの記録に合わせ、サンプル識別のための合成 DNA を検体にスパイクインして、それをを用いてサンプル管理をする手法や、正常組織をペアで解析する場合には、腫瘍サンプルとの SNP 情報の一致を使って同一患者由来である検証をするなど、サンプル取り違えを防止する方策を講じる。

4. 精度管理物質

ISO 15189:2012²⁾の精度管理物質の技術的要求事項として、「検査室は、患者サンプル(試料)とできるだけ近い方法において検査システムに反応する精度管理物質を使用しなければならない(5.6.2.2)」、「精度管理物質は、手順の安定性、及び誤った結果から患者が受ける有害リスクに基づく頻度で、定期的に測定されなければならない(5.6.2.2)注記1:検査室は、可能な限り、特に判断の妥当性を確実にする臨床判断値又はその付近の管理物質の濃度を選択することが望ましい。注記2:試薬又は装置メーカーから提供された管理物質のかわりに、又は追加して、独立した第三者の管理物質の使用を考慮することが望ましい。」とされており、遺伝子関連検査のための ISO 15189 ガイダンス文書³⁾において以下が求められている。

- 精度管理物質については、国内外で利用可能な、標準物質などの情報を定期的に収集する必要がある。
- 可能な限り複数の精度管理物質の組み合わせを使用する。
- 精度管理のレベル及び種類は、重要性、分析の内容、分析の頻度、バッチの大きさ、自動化の程度及び検査の難易度と信頼性によって異なる。
- 核酸増幅検査は高感度のためクロスコンタミネーションに注意する。このため陰性コントロールの使用が望ましい。陰性コントロールは同時ランが望ましいが、シングルアッセイなどの装置の場合には代替する手段によってクロスコンタミネーションのリスクを回避する。
- 陰性結果を担保するために内部コントロールなどを使用し核酸増幅反応が正しく行われた事を担保する必要がある。
- 定量検査の場合は、複数の陽性コントロールが望ましい。
- サンプル(試料)と試薬の間にコンタミネーションがないことを確認するために陰性コントロールをすべての増幅ステップに加える必要がある。このコントロールは、実際のシーケンシングをする前に、任意の適切な方法で分析することができる。
- 最初の確認の間およびその後、定期的に HapMap 細胞株由来の DNA などの陰性コントロール、例えば NA12878 および/または NA19240 を含めて、バリエーションの検出のための分析の精確さおよび分析特異性を検証する必要がある。

- 陽性/感度のコントロールは、各ランに含める必要がある。このコントロールは、低い割合のバリエーションが一貫して同定されることを検証するために、分析感度の近くで検出されるべき各種類の複数の既知変種を含む個別にバーコードされた低陽性 DNA サンプル(試料)であることが示唆される。すべてのバリエーションではない場合、すべての標的領域を単一の対照試料に組み込むことができる場合には、規定されたローテーションスケジュールを用いるべきである。
- 採用する精度管理のレベルは、結果の妥当性を確実にするために十分でなければならない。プロセス内の各種変動値を監視するために各種の品質管理を使用することができる。サンプル(試料)のバッチごとに精度管理試料を分析することにより、システムの変動傾向が分かる。種々のブランクを使用すれば、分析対象成分からの寄与に加えて危機への寄与も明らかになる。

5. 精度管理データ

ISO 15189:2012²⁾の精度管理データの技術的要求事項として、「検査室は、精度管理の不具合事象時における患者結果の報告(リリース)を防ぐための手順を有していなければならない。精度管理ルールに違反し、検査結果に臨床的に重大なエラー(過失)が含まれている可能性があることが示された場合、結果は棄却され、エラー(過失)の状態が修正され、規定された性能仕様内であることが検証された後に関連する患者サンプル(試料)は再検査されなければならない。検査室は、最後に成功した精度管理事象後に検査された患者サンプル(試料)からの結果も評価しなければならない。精度管理データは、検査システムにおける問題を示す可能性のある検査性能におけるトレンドを検出するために、一定の間隔でレビューされなければならない。そのようなトレンドがみられた場合、予防措置が講じられ、記録されなければならない。注記:プロセス管理のための統計的手法及び非統計的手法を、検査システム性能の継続的な監視のために可能な限り使用することが望ましい。(5.6.2.3)」とされており、遺伝子関連検査のための ISO 15189 ガイダンス文書³⁾において以下が求められている。

- * 内部精度管理は、ブランク、標準物質、スパイクされたサンプル(試料)、ブラインドサンプル(試料)、繰り返し分析および精度管理試料の使用を含む様々な実態形態をとる。特に精度管理試料をモニターするために X-R 管理図、Twin-Plot、マルチルール管理法などを使用することが望ましい。

参考文献

1. 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について
2. ISO 15189:2012 臨床検査室—品質と能力に関する要求事項

3. 遺伝子関連検査のための ISO 15189 ガイダンス文書
4. がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方(第 2.0 版)

VII 外部精度評価(EQA)

2018年12月に医療法等の一部改正およびそれに伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令が施行され、この中で医療機関において遺伝子関連・染色体検査を実施する場合の外部精度管理調査の受検及びその代替方法(改正後医療法施行規則第9条の7の3第2項関係)については次のように規定されている。

- (ア) 遺伝子関連・染色体検査に関する外部精度管理調査については、結核菌の同定検査やB型肝炎ウイルス及びC型肝炎ウイルスの核酸定量検査などの調査の体制が整っているものについては、これらの検査を行う病院等の場合、受検するよう努めること。
- (イ) 外部精度管理調査の体制が整っていない遺伝子関連・染色体検査について、病院等の管理者は、自施設以外の病院等のほか、衛生検査所や大学等の研究機関と連携してそれぞれ保管・保有する検体を用いて相互に検査結果を比較して、検査・測定方法の妥当性を確認するなどの方法により、精度の確保に努めること。

また、ISO 15189で外部精度評価に相当する要求事項としては5.6.3 検査室間比較があり、下記にその要求事項の概略を示す。

5.6.3.1(参加)では、EQAなど検査室間比較への参加、その結果が逸脱した場合、是正処置を行うこと。

5.6.3.2(代替のアプローチ)で検査室間比較についての代替のアプローチとして、もし検査室間比較への参加が不可能な場合は認証標準物質、過去に検査したサンプル(試料)、他の検査室と交換した試料などの測定によって検査結果の許容性を示すこと。

5.6.3.3(検査室間比較サンプル(試料)の分析)では検査室間比較サンプル(試料)の分析は日常検査と同じ取り扱いをしなければならないこと。

5.6.3.4(検査室の遂行能力の評価)では、検査室間比較の成績を関係するスタッフでレビューされ、討議されること。

* EQAへの参加(国内の現状)

現在国内の団体によるがんゲノム検査のEQAは医療検査科学会遺伝子・プロテオミクス委員会の主催している白血病関連遺伝子外部精度評価のみである。しかし、CAPが実施し、国内では日本臨床検査医学会精度管理委員会の指導のもと実施されているCAP国際臨床検査成績評価プログラムに参加することができる項目が多く存在する。同プログラムの具体的な項目例として固形腫瘍ではパラフィン包埋切片試料とした*BRAF*、*EGFR*、*KRAS*、細胞ペレットを試料とした*EWSR1-FLI1*などの染色体転座関連肉腫検査、抽出DNAを試料とした*BRCA*が、血液腫瘍では、

DNA あるいは RNA を試料とする、*BCR-ABL*、*PML-RARA*、*CALR*などが挙げられる。

FFPE を用いたがんゲノム検査においては、II. 検体管理プロセス（検体採取—保存—搬送）が、DNA の品質に大きく影響することは先に記載されているところである。日本病理学会と日本臨床衛生検査技師会により設立された特定非営利活動法人 日本病理精度保証機構(JPQAS)では、FFPE をもちいたがんゲノム検査のための、DNA 品質や、腫瘍含有割合についての EQA を行っている。また、JPQAS は、CAP を含む国際的な病理精度保証ネットワーク (International Quality Network for Pathology)のアカデミックメンバーであり、EQA に関する国際的な情報共有をすすめながら、国内の現状に最適化したEQAを進めているところである。

また、NGS については固形腫瘍、血液腫瘍それぞれにゲノム DNA を試料とするサーベイがあり、さらにバイオインフォマティクスとして各種パネルに対してシーケンシングファイルをサーベイ試料とするものもある。従って、これらすでに EQA が実施されている検査については、CAP あるいは海外で実施されている EQA に参加することが望ましい。なお、今後国内でもさらに EQA を立ち上げていくことは喫緊の課題であり、NGS についてのパイロットスタディを行った Maekawa らの報告がある⁴⁾。また、EQA への参加が困難な場合の代替方法として、検査室間比較、保管している試料の分析が考えられる。これらの場合、もとの検査結果を示さず測定(ブラインド測定)する必要がある。

参考文献

- 1) 厚生労働省: 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について〔医療法〕
<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000402687.pdf> (2020 年 1 月 22 日アクセス)
- 2) ISO 15189:2012、臨床検査室—品質と能力に関する要求事項
- 3) 日本臨床検査振興協議会. がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方(第 2.0 版).
http://www.jamt.or.jp/data/asset/docs/20190531_ver2.0.pdf
- 4) Maekawa M. et al. Precision cancer genome testing needs proficiency testing involving all stakeholders. Scientific reports 12, 1494 (2022). doi:
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-05589-x>

VIII 分析機器、試薬、解析プログラムなどの変更時の確認

ISO 15189 で本内容に関連したものとして、以下の要求事項がある。

1. 試薬および消耗品—受入検査

試薬または手順が変更になった検査キットのそれぞれの新しい構成内容、新ロットまたは送付の検査キットは、検査への使用前に性能仕様が検証されなければならない。

1. 検査手順の妥当性確認

妥当性確認した手順を変更した場合、このような変更の影響は文書化され、適切な場合は、新たに妥当性確認が実施されなければならない。

2. 生物学的基準範囲または臨床判断値

検査室が検査手順または検査前手順を変更した場合、検査室は関連する基準範囲および臨床判断値を適用があればレビューしなければならない。

3. 検査手順の文書化

検査室が結果またはその解釈が著しく変わるような、現行の検査手順の変更を行う場合、手順の妥当性確認の後に、検査室サービスの利用者に説明しなければならない。

4. 検査結果の比較

同じ測定対象物質に対して異なる測定範囲を提供する測定システムに変更した場合や、検査方法を変更した場合、検査室は、結果の比較性におけるいかなる相違も利用者に通知し、臨床診療に対するいかなる意味合いも討議されなければならない。

この ISO 15189 の要求事項も含め、以下のように対応する。

分析機器の変更、試薬のバージョンやロットの切替え、解析プログラムやソフトウェアのバージョンなどを変更する場合、性能仕様の検証、妥当性確認の方法、利用者への通知方法などを予め決めておく。特に、それが分析結果にどれくらい大きな影響を及ぼすかによって、検証作業のレベルも考慮する。できる限り、新旧の分析体系で同じ試料を測定し、結果が許容範囲内かどうかを確認する。そのためには、以下の手順で実施することが望ましい。

- 1) 検討計画書の作成(変更対象となる機器試薬など、検討計画と評価基準、検討日時および検討者)
- 2) 妥当性確認の検証
- 3) 検討結果の報告
 - ・ 計画で示された基準を満たすこと
 - ・ 購買、製造およびサービス提供に対して適切であること
 - ・ 安全な使用および適正な使用に不可欠な製品の特性が明確であること
- 4) 審査と承認
 - ・ 要求事項が許容できないものであった場合、計画を変更して再検討を行うか、検討を中止する。

- ・ 要求事項を満たしていた場合は承認し、関係者に案内してサービス提供を開始する。
- 5) 検証された変更点を含めて文書化し、それを利用者に説明する。

* 具体例

1. 分析機器の変更

- 稼働性能適格性評価(OQ)、性能適格性評価(PQ)を行い、装置、測定系に期待されている機能、性能が得られていることを確認する。同型の機器であれば、同じサンプル(内部精度管理用試料や患者試料)で同等の結果が出るかどうかを確認する。異なった型の機器の場合は、検査導入前の準備と同様に妥当性確認を行う。

2. 試薬の切り替え

- 検査室で再バリデーション(検査の導入前の準備として行う検査仕様の決定や分析の性能評価)をする必要はないが、内部精度管理用試料を用いて、分析前プロセス、分析プロセス、分析後プロセスのそれぞれで設定した品質基準を基にした性能を確認する。

3. がん遺伝子パネルのバージョン変更

- 変更の程度により、再バリデーション(検査仕様の決定、分析の性能評価)が必要である。例えば、5%以内の遺伝子数の追加、削除であれば再バリデーションは必要ない。それ以上の変更があった場合、妥当性確認試験を実施する。

4. 解析プログラムのバージョン変更

- 変更の程度により、再バリデーション(検査仕様の決定、分析の性能評価)が必要である。フィルタリング、参照するデータベース、バイオインフォマティクスパイプラインのバージョンアップの場合は、妥当性確認が必要となる。

参考文献

- 5) ISO 15189:2012、臨床検査室—品質と能力に関する要求事項
- 6) 日本臨床検査振興協議会. がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方(第 2.0 版).
http://www.jamt.or.jp/data/asset/docs/20190531_ver2.0.pdf

IX 精度管理物質の利用

1. 測定プロセス精度管理のためのコントロールの利用

遺伝子検査(核酸検査)において、検査の正確性を保証するためには、各種コントロールの利用が非常に重要である。コントロールは外部コントロールと内部コントロールに大別されるが、その重要性はどちらも同等であり、どちらか一方のみでは検査の保証としては不十分である。核酸増幅検査は高感度があるため、クロスコンタミネーションには特に注意を払わなければならない。このため、陰性コントロールの使用は必須である。また、市販されている定量検査のための核酸増幅検査試薬は、その測定範囲全域での定量値の正確性を保証できなくてはならない。このため低値陽性コントロール・高値陽性コントロールといった、複数の濃度既知の陽性コントロールが必要である。さらに核酸増幅検査には幾つかの反応阻害要因が知られている。このため、各検体の反応性を保証することは偽陰性防止の上で重要であるが、外部コントロールのみではこれを保証できない。従って、内部コントロールもまた必須である。内部コントロールは標的核酸の抽出時から加えておくものと、増幅反応時から加えるものがある。抽出操作における標的核酸の回収率の低さに起因する偽陰性をモニターするという意味において、抽出時から用いる方がより有用である。また内部コントロールには、核酸増幅阻害の有無のみを見るものと、それ自体が更に定量標準として働くものがあるため、使用者はその特徴をよく認識した上で検査に使用する必要がある。DNA マイクロアレイや次世代シーケンシング等の多項目測定においては、測定対象とは異なる塩基配列を持つ内部コントロール核酸を添加することで、測定プロセスの精度管理を行うことができる。国内においては、産業技術総合研究所から頒布されている RNA コントロール[認証標準物質:定量解析用リボ核酸(RNA)水溶液(NMIJ CRM 6204-a)]がその用途で利用可能である。本コントロールは、既知の真核生物由来ゲノム配列等に対して類似性が低い人工配列を持つ RNA 水溶液が 5 種含まれており、RNA の質量濃度が SI 単位にトレーサブルな方法で値付けされている。これらの RNA を異なる濃度で混合したものを準備し、測定時に添加することで、その測定の結果から RNA 計測(特定の遺伝子発現量の解析等)の信頼性を評価することができる。同様に、米国では External RNA Control Consortium(ERCC)がそのような用途で利用できる内部コントロール用 RNA を開発、評価している。このうちの 96 種については、米国国立標準技術研究所(NIST: National Institute of Standards and Technology)から標準物質(DNA、認証されている特性は塩基配列)として頒布されている(NIST SRM 2374)。

2. 体細胞遺伝子検査: リキッドバイオプシー事例

リキッドバイオプシーでの固形腫瘍の体細胞遺伝子検査は、手法として次世代シーケンサー(NGS)による CGP(Comprehensive Genome Profile)の他に、特定のバリエーションをリアルタイム PCR/デジタル PCR で解析する。

リアルタイム PCR/デジタル PCR での解析を医療機関内で自ら実施する場合、精度保証のために、第三者コントロールを用いて定期的にデータを取りモニターする内部精度管理の実施が推奨される。また外部施設へ委託している場合は、第三者コントロールを定期的に Unknown サンプルとして送付し、データを記録していくことで内部精度管理となるだけでなく、外部精度評価の代替法にもつながる。

NGS による解析については、一部の施設で研究用のリキッドバイオプシーがんパネルキットを利用あるいは受託検査実施している。2021 年 8 月から、Foundation One Liquid CDx が条件付きで保険償還され、受託検査が始められている。これは検体を海外のラボに送付し測定後のデータが返却される。その他ガーダントヘルスジャパンなどが検体を受け取り解析する業務を同様に受託する動きもある。ガーダントヘルスジャパンは、今後日本国内でラボを立ち上げ解析することも検討している。固形腫瘍由来の血中遊離 ctDNA は、その濃度が非常に低く、手技の複雑さが高度に求められるため、このような外部委託での検査実施が普及する可能性が高い。こうした外部委託検査の場合、医療機関の検査室としては精度保証のために第三者コントロールを定期的に送付し、変換されるデータを保管、モニターすることで、内部精度管理の確認をすることができる。

この血中の固形腫瘍由来の ctDNA のコントロールについては、サーモフィッシャー社やホライゾン社などから提供されている。サーモフィッシャー社のコントロールは、NIST(アメリカ工業規格)及び CDC 推奨の Genome in a Bottle(GIAB)コンソーシアムのゲノムの一つである GM24385 を使用している。リキッドバイオプシーNGS パネル検査の品質確保用コントロールとして、ctDNA Frequency Ladder を提供している(AcroMetrix コントロール)。これは GM24385 細胞株のゲノムを断片化したものをベースに、COSMIC から選抜したがん関連 53 遺伝子、550 変異をショートフラグメント合成遺伝子で付加したコントロールとなっており、NGS のアッセイパフォーマンス及び Frequency の正確性(5 種類の Frequency がセット)を担保する、またバリデーション目的で使用することも可能である。

患者検体に近い製品として、GM24385 をベースに、体細胞変異部分を合成遺伝子フラグメントでスパイクインさせ約 160 bps に断片化され、マトリックスを血漿(Plasma)にしたものも提供されている。この製品は 11 遺伝子 13 変異(Indel 及び CNV 含む)で、Frequency も 5 種類提供されている。ホライゾン社からもマトリックスとして血漿あるいは Tris-EDTA の両方が使用できる cfDNA コントロールが、4 遺伝子 8 変異が 4 種類の Frequency で提供されている。

参考文献

- 1) 日本臨床検査標準協議会. 遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン解説版. 学術広告社. 東京. 2016.
- 2) 日本臨床検査標準協議会. 遺伝子関連検査のための ISO 15189 ガイダンス文書. 学術広告社. 東京. 2019.
- 3) 日本臨床検査標準協議会. 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル. 第一部. 学術広告社. 東京. 2011.
- 4) 日本臨床検査標準協議会. 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル. 第二部. 新規測定技術・解析試料の品質管理. 学術広告社. 東京. 2017.