

201407029A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業

高速シーケンサーを用いた
包括的臨床遺伝子検査システムの構築

平成 26 年度総括研究報告書

研究代表者 萩原弘一

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究補助金

創薬基盤推進研究事業

高速シーケンサーを用いた
包括的臨床遺伝子検査システムの構築

平成 26 年度 研究報告書

目次

研究報告.	1
研究班平成 26 年度経過報告.	9
平成 26 年度 第一回班会議講演内容.	11
PMDA 対面助言最終報告	13
平成 26 年度第一回班会議.	21
第 73 回日本癌学会発表内容.	31
MINtS analyzer.	39
MINtS の性能を検証する前臨床試験および後ろ向き臨床試験 (NEJ012)	43
MINtS の性能を検証するための前向き臨床試験 (NEJ021a)	91
医薬基盤研究所によるプログラム進捗状況評価.	135
研究成果の刊行に関する一覧表.	145

厚生労働科学研究補助金 創薬基盤推進研究事業
高速シーケンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システムの構築

名簿【平成 26 年度】

研究代表者	萩原弘一	自治医科大学・総合医学第 1 講座・自治医科大学 教授 さいたま医療センター	
研究分担者	磯部宏	KKR 札幌医療センター・腫瘍内科	診療部長
〃	弦間昭彦	日本医科大学・日本医科大学附属病院・呼吸器内 教授 科	
〃	石井芳樹	獨協医科大学・獨協医科大学病院・呼吸器・アレルギー 教授 アレルギー内科	
〃	久保田馨	日本医科大学・日本医科大学附属病院・がん診療 教授 センター	
〃	小林国彦	埼玉医科大学・埼玉医科大学国際医療センター・教授 呼吸器内科	
〃	西條康夫	新潟大学・新潟大学医歯学総合病院・腫瘍内科	教授
〃	岡崎康司	埼玉医科大学・ゲノム医学研究センター・ゲノム 教授 医学	
〃	前門戸任	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がん 診療部長 センター・呼吸器内科	
〃	吉澤弘久	新潟大学・新潟大学 新潟大学医歯学総合病院 特任教授 生命科学医療センター	
〃	大泉聡史	北海道大学・北海道大学病院・第一内科	准教授
〃	鈴木朋子	公立大学法人福島県立医科大学・会津医療セン 准教授 ター・漢方医学講座	
〃	砂長則明	群馬大学・呼吸器・アレルギー内科・	助教
〃	井上彰	東北大学・東北大学病院・東北大学病院臨床研究 特任准教授 推進センター	

研究報告

- 平成 26 年度研究 -

高速シークエンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システムの構築
自治医科大学 総合医学第1講座 萩原弘一

目的：高速シークエンサーを用いて、多数の薬剤関連遺伝子を同時に測定可能で、臨床使用可能なシステムを構築する。本研究の目的は、既承認の分子標的薬等をより効果的に使用することを目的としたコンパニオン診断薬開発に相当するが、将来承認される薬剤のコンパニオン診断薬を容易に開発する手段を同時に提供する。本研究は肺癌を対象として行うが、他臓器悪性腫瘍に容易に応用可能と考えられる。

背景：ゲフィチニブ（イレッサ）に対する非小細胞肺癌の薬剤反応性がEGFR遺伝子変異の有無で規定されることが明らかになり、遺伝子変異検査が治療方針決定に不可欠となった。その後、ALK融合遺伝子、ROS融合遺伝子、RET融合遺伝子など、薬剤反応性を規定する遺伝子変異、BIM多型（現在ではエビデンスが十分ではない）など薬剤応答性関連多型が明らかになった。日本の肺癌遺伝子変異検査は、ほぼ全ての進行肺癌患者がEGFR遺伝子変異検査を受けているという、世界に冠たる業績を誇っているが、保険診療の面からは歪な状態である。日本のEGFR遺伝子変異のほとんどは未承認薬で診断されている。既承認薬は一つあるが、組織検体のみ承認で、検体の1/3を占める細胞診検体は承認外のまま検索されている。日本で発見されたALK融合遺伝子の検査は悪性リンパ腫のFISH法を流用し施行されているが、細胞診検体には承認された検査がないために、1/3の患者は検査施行不能である。ROS、RET融合遺伝子には有効性が示唆されている薬剤があるが、薬事承認された検査はない。この状況を根本的に是正するためには、多数の遺伝子全てを、組織診検体、細胞診検体双方から、迅速、安価に検索可能で、薬事承認可能な包括的遺伝子検査システムを作成する必要がある。さらに今後、癌関連遺伝子数は増加すると考えられるため、それらにも対応しつつ、検査費用をも抑えるシステムを構築する必要がある。

期待される成果：高速シークエンサーを用いて、安価に複数の肺癌治療関連遺伝子を同時測定可能なシステムを構築する。これにより、遺伝子検査費用の増加を回避しながら遺伝子情報に基づいた個別化医療が達成できる。一昨年6月14日、アメリカ最高裁で遺伝子特許が認められないことが確定したため、このようなシステムは知的財産面からも実現が容易になった。

研究計画・方法：

(1) 患者検体採取法

我々の提唱したDNA検査用検体採取法は、すでに日本の標準となっている。RNAも含んだ手順も提唱したが、ファイザー社のRT-PCR無償検査用に採用され、日本の標準になりつつある。

(2) システムのDNA部分

イルミナ社のMiSeqを用いて作成。すでに実用レベルに完成している。READあたりのエラー率は0.001を切っており、肺癌遺伝子検査の要件である「1%の癌細胞を含む検体からの変異遺伝子検出」を感度、特異度とも0.99で実現した。今後、肺癌治療に直接応用可能な新遺伝子が報告された場合も、容易に検査項目として追加可能と考えられる。

(3) システムのRNA部分

この完成が第一年度の目標であったが完成した。RT-PCR反応産物をシークエンスし、ALK融合遺伝子、ROS融合遺伝子、RET融合遺伝子の有無を同時判定する。DNA部分と同時に泳動するため、コストが抑えられる。

(4) 臨床検体での性能試験

本研究分担者を中心として収集している肺癌臨床検体を使用し、システムが良好に稼働することを検証する。研究期間内の目標：第二～三年度で臨床検体における妥当性を検証し、商業化を図る。

倫理的な配慮：「研究計画・方法」記載の手順で「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準拠した研究が可能。学内、研究参加各施設倫理委員会の承認済み。

目的：高速シークエンサーによる肺癌臨床検体包括的遺伝子検査システムの確立

必要性：現在、肺癌遺伝子検査には3つの問題点がある。(1) 分子標的薬が導入されても適切な検査がない場合がある。日本のEGFR遺伝子変異は年間50000検査行われているが、ほとんどが未承認薬で診断されている。さらに昨年ALK融合遺伝子阻害剤ザーコリが導入されたが、組織検体が必要なFISH法(悪性リンパ腫の検査を転用)しか薬事承認・保険適応が通っていないため、細胞診検体しか採取不能な患者(肺癌患者の1/3)は検査ができない。さらにROS, RET融合遺伝子が見つかったが、これらに対応する薬事承認検査はない(2) 遺伝子数の増加とともに医療費が増加する。例えば、EGFR変異陽性者を一人見つけるためには6000点が必要(陽性率30%, 一検査2000点)、ALK融合遺伝子陽性者は130000点が必要(陽性率5%, 一検査6500点)である。これ以上の検査費用は非現実的な金額となる。(1)(2)を回避するためには、複数遺伝子を同時検出可能で、全患者に適応可能な安価なシステムが必要である。

現在までに行った研究：高速シークエンサーによる遺伝子検査システムの完成した。本研究で開発中の高速シークエンサーシステムは98検体を同時検査できる。現在、日本の検査会社は一日100検体程度を検索しているため、本検査は適切な規模である。検査は、反応時間一日、泳動時間一日の二日で終了する。結果返却期間として一週間以内が適切とされているが、それに適合する。EGFR, KRAS, ALK・ROS・RET融合遺伝子を検査したときの一名あたり消耗品代は2500円程度と試算している。さらにREAD数に余裕があり、将来見つかると推定される新たな遺伝子の追加にも耐えられる。

研究期間内の目標：肺癌検体(現在、埼玉医科大学に年間送付される症例数から考察し、2年で1000例程度になると想定される)に適用し、臨床検体使用での妥当性(検査不能割合、既存のEGFR検査法PNA-LNA PCR clamp法との結果比較)を検討する(第二～第三年度)。

当該研究の特色・独創的な点：高速シークエンサーは主として基礎研究に使用されており、診断薬としての開発は遅れている。世界最大の高速シークエンサー会社であるイルミナ社の臨床開発担当者は、アジアで一名のみという(昨年末：イルミナ社の話)。新規遺伝子を容易に追加可能で、医療経済的に妥当なシステムが高速シークエンサーであることは、本システムの完成部分の結果を

見ても自明である。2013年6月14日、アメリカ最高裁で遺伝子特許が認められないことが確定し、特許の面からも本研究のような複数遺伝子を同時検索する検査は施行が容易になった。本研究は、現在までの経験を生かし、高速シークエンサー臨床応用を世界に先駆けて進めるものとなる。本研究は既にPMDAの薬事戦略相談を受けており、その助言に従って研究を進めて行く。

期待される成果、厚生労働行政への貢献：前述のように、遺伝子検査には2つの重要な問題点がある。(1) 分子標的薬が導入されても適切な検査がない場合がある。(2) 遺伝子数の増加とともに検査費が膨大なものとなる。(1)(2)を回避するためには、複数遺伝子を同時検出可能で、全患者に適応可能な安価なシステムが必要である。本研究で開発中の高速シークエンサーシステムは、98検体を同時に検査でき、現在肺癌診療に必要と考えられているEGFR, KRAS, ALK, ROS, RET遺伝子検査全てを行っても一名あたり消耗品代2500円と試算できる。98名を同時検査可能で商業的に適切な大きさである。検査は、反応時間一日、泳動時間一日の二日で終了し、臨床現場の要求する期間に結果返却できる。今後新たに発見される遺伝子も容易に追加できる。すでにシステムの半分は完成しており、良好な結果が得られている。検体採取手順から結果解析ソフトウェアまで揃っており、本研究は実用化の可能性が高い。

期待される成果：現在コンパニオン診断薬が抱えている上述の問題を全て解決できるシステムが得られる。遺伝子数の増加にも耐えられる。

厚生労働行政への貢献：本システムは、医療保険財政の圧迫を防ぎながら臨床遺伝子検査を進めることが可能であり、遺伝子変異検査の将来像を明確に示すものである。遺伝子情報に基づいた個別化医療に大きな貢献をすると考えられる。

(1) 研究目的を達成するための具体的な研究計画及び方法

検体採取法の標準化：遺伝子検査施行には、DNA, RNA分解の極力少ない検体採取法が重要である。肺癌患者の1/3は細胞診検体しか採取できないが、細胞診検体は全患者から採取可能であり、RNA保存にも適している。これを考慮し、細胞診検体を遺伝子検査標準検体とする検体採取法を作成した。図1のDNA検体の採取方法は我々が提唱したものだが、日本全国で使用される標準採取法になり、世界にも広がり始めている。この

手法が普及したことで、ほぼ全ての進行肺癌患者で遺伝子変異検査が可能になった。次いで研究代表者は、DNA, RNA双方に対応した図2の手法を提唱した。この手法は、ファイザー社をはじめ、日本の3大検査会社（SRL, 三菱, BML）が採用した。本研究では図2の手法を使用する。

DNA解析部分の作成：肺癌臨床検体は癌細胞の他に多数の正常細胞を含む。多数の正常遺伝子の存在下で、癌細胞のみが有する体細胞変異を検索する必要がある。図2の検体採取法を用いた場合、病理検査の感度より、検体全細胞の1%以上が癌細胞と推定できることを実証した(Tanaka et al. Cancer Science 98:246-52, 2007)。よって、その条件下で体細胞変異を検出できることが検査要件となる。高忠実度酵素DNA合成酵素を用いたマルチプレックスPCR(図3)によりPCRエラーを減らし、両側シーケンスでシーケンスエラーを減らすことで、上記要件を上回る正確な塩基配列決定が可能になった。検体細胞の0.1%しか癌細胞を含まない検体からEGFR, KRAS, BRAF変異が検出可能になっている(表1, 図4)。

具体的な検査手順

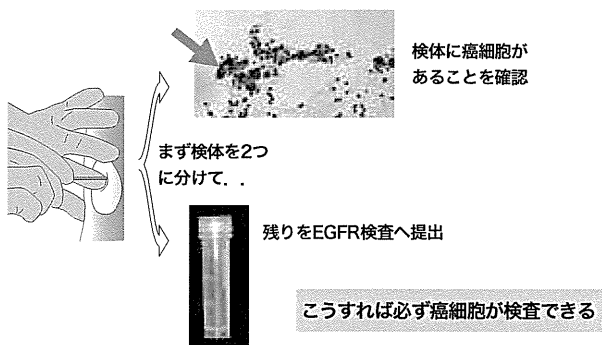


図1 DNA検体採取法。肺癌検体の標準的採取法になっている。

細胞診検体 (EGFR [高感度法], EML4-ALK [RT-PCR]同時検査用検体処理)

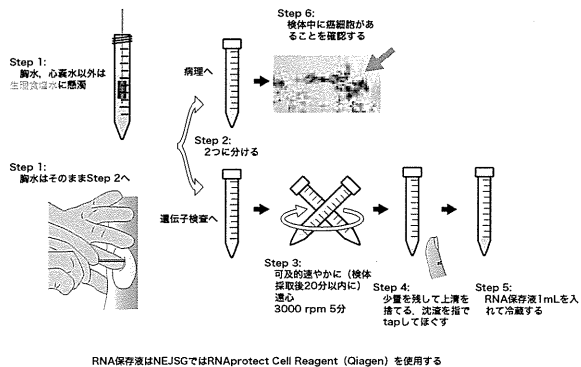


図2 DNA, RNA両方が検索できる検体採取法。不安定なRNAを臨床検体から抽出するためには手順の標準化が不可欠である。

100 bp ladder marker

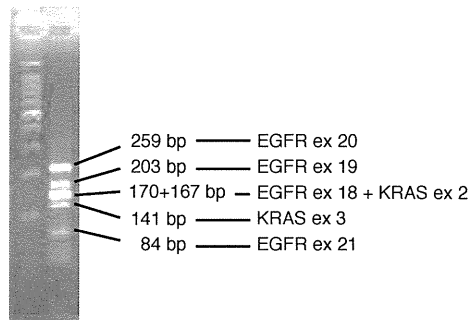


図3 本システムのマルチプレックスPCR。多数のゲノム部位を一度に増幅できる。

EGFR	変異ホットスポット	エラー率
	G719X	0.00016
	Ex19 欠失	0.0
	T790M	0.00013
	L858R	0.000017
	L861Q	0.0
KRAS		
	Codon 12	0.00034
	Codon 13	0.00039
	Codon 61	0.00046

表1 本システムでのエラー率 (Readあたり)。現在使用可能な高忠実度PCR酵素のエラー率とほぼ同等。PCR反応を利用する検査の限界に近い数字を出している。

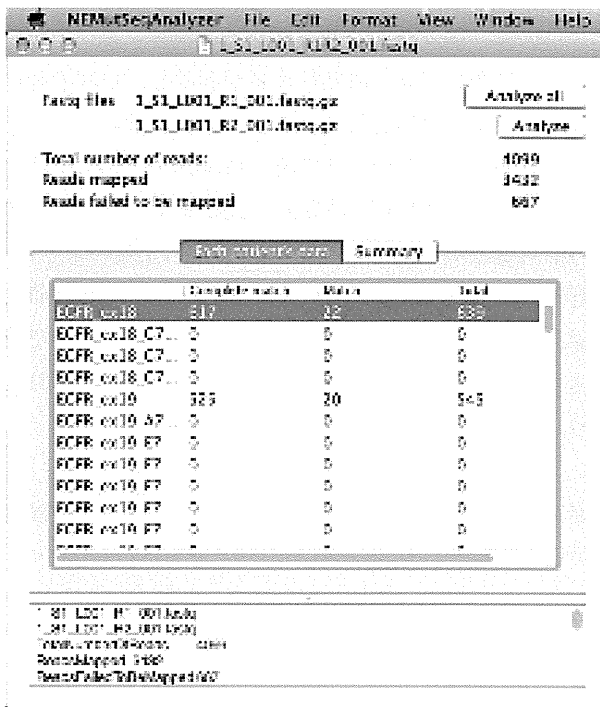


図4 データ解析ソフト画面。シーケンスデータは専用ソフトで解析する。一検体の解析時間は30秒。自作

のため、さまざまな解析アルゴリズムを容易に追加可能である。

RNA解析部分の作成：これを第一年度の目標としていたが、完成した。マルチプレックスRT-PCR増幅産物のシーケンスにより、融合遺伝子の検出を行う。DNAのように正常遺伝子のバックグラウンドがないため、高速シーケンサーのリード数が少なくても良い。前記DNA解析部分と合わせ、肺癌治療関連遺伝子の包括検索システムが完成した。今後肺癌治療に重要な新たな関連遺伝子が発表された場合、マルチプレックス数、PCR反応数を増やし、新遺伝子を追加する。

(2) 研究計画を遂行するための研究体制

システムは今年度中に完成させる（責任者：萩原弘一）。高速シーケンサーはイルミナ社のMiSeqを利用しており、イルミナ社から必要な情報提供を受けている。本研究の研究分担者全員は、以前から研究代表者とともに臨床研究グループ（北東日本研究グループ：NEJSG）を結成、活動し、すでに世界的な成果を挙げている（Maemondo et al. N Engl J Med. 362:2380-8, 2010）。この臨床研究グループを母体とし、システムの検証を行う。

(3) 複数年度の研究計画：二年目、三年目は、全システムの臨床性能試験を行う。具体的には、研究分担者が臨床検体の一部を送付し、研究責任者が検査する。全ての患者から良質の検体が採取可能であったか、全検体で信頼性の高い検査結果が得られたかを検討する。EGFR遺伝子に関しては、研究代表者が開発し、日本の肺癌患者の40%で使用されているPNA-LNA PCR clamp法（平成23年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 科学技術賞受賞）と比較する。

(4) 研究施設・研究資料・研究フィールド：上記のように、世界的業績のある研究グループ（NEJSG）が本研究に協力する予定である。同グループからは、現時点で年間1000例以上の肺癌検体が研究代表者に送付されており、十分数の試料が利用可能である。

(5) 臨床、疫学研究

本研究で作成したシステムの妥当性は、実際の患者検体を用いて検証される。本研究では介入研究は行わないが、ALK, ROS融合遺伝子が発見された場合、NEJSGが計画しているALK, ROS陽性肺癌に対するクリゾチニブ臨床研究、RET融合遺伝子が発見された場合、国立がんセンター東病院が中心となり厚生労働研究で施行しているRET融合遺伝子陽性肺癌治療の臨床研究に登録できる可能性が出てくるため、遅滞無く結果を検体

提出施設に連絡する。

最終目標である薬事承認までのロードマップ

【第一年度は以下のロードマップを掲げたが、全て達成している】

○RNA検索部分の組み込みによるシステムの完成
○すでに完成したDNA検索部分による臨床性能試験
・臨床性能試験に関しては、すでに後ろ向きサンプル（既収集サンプル100例）の検討で、PNA-LNA PCR clamp法で検出できなかった変異の検出等、良好な結果が得られている。

○前向き臨床性能試験開始（RNAシステム完成と同時に開始）

・ALK, ROS, RET融合遺伝子頻度から考えると、500例以上の検討が必要。北東日本研究グループの症例数より半年～一年かかる。

○イルミナ社とともにキット作成の提携企業を打診開始（RNAシステム完成と同時に開始）

【第二年度】

○前向き臨床性能試験を完了する

○キット作成開始

第二年度の客観的評価指標は、上記2点が全て満たされるか否かである。

【第三年度】

○前向き臨床性能試験の結果をもとに、薬事承認申請。第三年度の客観的評価指標は、薬事申請承認である。

倫理面への配慮

本研究では「ヒトゲノム・遺伝子解析研究」倫理指針に基づきながら、患者からサンプル収集を行えるよう、以下の手順を取る。

1. 参加各施設で倫理委員会承認を得る。なお、埼玉医科大学および研究分担者の大部分の施設ではすでに倫理委員会の承認が得られている。

2. 臨床検体を「研究計画」図2の手法によって分注する。分注した検体を2つに分ける。半分は各施設の手順に従い、各施設で検査会社に遺伝子解析を依頼する。これにより、通常の臨床の流れを妨げないようにする。もう半分を符号化し、埼玉医科大学に送付する。

3. 埼玉医科大学にて検索を行い、各施設に結果を返送する。本システムの結果に基づいて治療を変更することはしない。これは、本研究が介入研究になることを防ぐ

ための手段である。本研究と密接に関連した臨床研究（A L K 融合遺伝子陽性肺癌，R O S 融合遺伝子陽性肺癌，R E T 融合遺伝子陽性肺癌を対象とした研究）は，すでに計画，実施されており，それらの研究への参加を考慮できるよう，結果は遅滞無く返却する。

研究班平成 26 年度経過報告

厚生労働科学研究費補助金 創薬基盤推進研究事業

「高速シーケンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システムの構築」(H25-創薬-一般-011)

平成 26 年度第 1 回班会議プログラム

日時： 平成 26 年 8 月 30 日 (金曜日) 16:00～17:00

場所： 横浜桜木町ワシントンホテル ローズ 1

神奈川県横浜市中区桜木町 1-101-1 TEL: (045) - 683- 3111

16:00-16:30 「高速シーケンサーを用いた包括的臨床遺伝子検査システム MINtS システムの開発現況と今後の臨床試験に関して」 萩原弘一

16:30-17:00 総合討論

PMDA 対面助言最終報告



Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA)

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構

東京都千代田区 麹町 3丁目3番2号
新麹町ビル 〒100-0013

TEL 03-3506-9541(代表)
FAX 03-3506-9417(代表)

平成 26 年 3 月 24 日

埼玉医科大学 呼吸器内科
教授 萩原 弘一 先生

拝啓

ますますご清祥のこととお慶び申し上げます。平素は格別のご高配を賜り、厚く御礼申し上げます。

さて、去る平成 26 年 2 月 25 日(火)実施の薬事戦略対面助言「機戦 P45 号 コンパニオン診断システム(仮)」の相談記録をご送付申し上げます。ご査収のほど宜しくお願い致します。

お手数おかけいたしますが、同封のアンケートにご記入の上、返送いただきますよう、併せてお願い申し上げます。

敬具

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構
審査マネジメント部 薬事戦略相談課
林 克巳

TEL:03-3506-9562

FAX:03-3506-9593



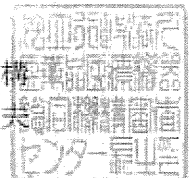
受付日・番号：平成26年1月27日・機戦P45号
識別記号：コンパニオン診断システム（仮）
相談区分：医療機器戦略相談（別に定める要件を満たす大学・研究機関、ベンチャー企業）

薬機審長発第 0320003 号
平成 26 年 3 月 20 日

埼玉医科大学 呼吸器内科
教授 萩原 弘一 殿

貴殿から平成26年1月24日付けで相談申込のあったコンパニオン診断システム（仮）の医療機器戦略相談（別に定める要件を満たす大学・研究機関、ベンチャー企業）については、以下のとおりであったことを確認する。なお、本記録に示された判断等については、提出された資料に基づき、対面助言実施時点における科学水準で行われたものであり、今後新たに得られる知見や科学の進歩等により、その妥当性についての解釈は変わりうることについて留意されたい。

独立行政法人医薬品医療機器総合機構
審査センター長 矢守 隆夫



以下の記録においては、独立行政法人医薬品医療機器総合機構の担当者を「機構」といい、相談申込者である埼玉医科大学 呼吸器内科側の担当者を「相談者」という。

1. 対面助言実施日：平成26年2月25日（火）

2. 出席者（敬称略）

機構；

<医療機器審査第一部>

岡崎 譲、三澤 雅樹、藤本 尚弘、加藤 健太郎、杉山 宗弘、富岡 稔、藤澤 大輔、望月 修一

<医療機器審査第二部>

宮本 大誠、三上 素樹

<新薬審査第五部>

藤原 康宏

<審査マネジメント部 薬事戦略相談課>

宇山 佳明、石川 廣、岩井 矩成、林 克巳

相談者；

<埼玉医科大学 呼吸器内科>

萩原弘一、井上慶明

<イルミナ株式会社>

登内未緒

3. 相談品目の概要及び相談事項

(1) 相談品目の概要

コンパニオン診断システム（仮）（以下「本品」という。）は、次世代高速シーケンサ（以下「高速シーケンサ」という。）を用い、1%の肺癌細胞を含む臨床検体から0.01以下の偽陽性率、偽陰性率で複数の分子標的薬のターゲット遺伝子（変異及び異常遺伝子）を網羅的に解析し、患者に適合する分子標的薬を選別することを意図したシステムである。検体から採取したDNA/RNAを増幅するPCR部、塩基配列を読み出す高速シーケンサ部、読み出した配列の変異及び異常該当性を判断する診断ソフトウェア、試薬一式等で構成されている。肺癌患者を対象として、*EGFR/KRAS/BRAF* 遺伝子変異及び *ALK/ROS/RET* 融合遺伝子転写物等を本品で測定し、変異及び異常の有無を統計学的に判定し、分子標的薬投与の可否判定に寄与することを目指している。

なお、本研究は「高速シーケンサを用いた包括的臨床遺伝子検査システムの構築」として厚生労働科学研究費補助金（平成25年度創薬基盤推進研究事業）の交付対象研究に採択されている。

(2) 相談事項

相談者からの相談事項は以下のとおりである。

相談事項1：複数の遺伝子異常を同時検出する本品の薬事申請を目指した開発上の課題について

相談事項2：PCR試薬及びシーケンサ試薬類の開発での留意点及び求められる品質・性能バリデーションについて

相談事項3：配列の読み出しを行うシーケンサが満たすべき品質、性能、製造要件について

相談事項4：高速シーケンサの読み出し結果を統計処理し、遺伝子DBと照合して診断結果を出力する診断ソフトウェアが満たすべき品質、性能、製造要件について

相談事項5：本品の非臨床試験における留意点について

4. 助言の概要

（本助言の前提条件）

本品の薬事規制対象製品への該当性判断については厚生労働省の結論が出ていないため、本対面助言は、本品が将来的に薬事規制対象製品に該当するとの判断が得られるという仮定の下で実施する。また、今後の薬事申請を見据えた

場合、非臨床試験、臨床試験等を実施する以前の問題点として指摘すべき内容が多数存在する。したがって、現時点で指摘可能と考えられる問題点を中心に助言する。

相談事項1：複数の遺伝子異常を同時検出する本品の薬事申請を目指した開発上の課題について

(治療薬の特定及び治療薬開発企業との共同開発)

コンパニオン診断薬（以下「CDx」という。）の薬事承認を目指した開発においては、当該診断薬での検査が必要不可欠な、対応する治療薬を特定する必要があることから、治療薬開発企業とCDx開発企業との共同開発を行う必要がある（通知1参照）。また、複数の治療薬の投与対象選択に関与する複数の遺伝子変異、融合遺伝子異常を同時検出する製品の場合には、開発初期の段階から複数の治療薬企業と情報を共有し、その全ての治療薬の開発企業とともにCDxを共同開発する必要がある。単なる検出性能の検討のみでは、CDxとしてのみならず体外診断用医薬品（以下「体外診」という。）としても承認要件は満たされないことに留意すること。

相談事項2：PCR試薬及びシーケンサ試薬類の開発での留意点及び求められる品質・性能バリデーションについて

(薬事申請者の特定)

薬事申請においては、製造販売業者となる者が、製造販売を行う品目ごとに品質管理、性能担保、供給に関する責任を負う。本品に関係する試薬類には複数の開発企業及び供給企業が関係しており、各反応プロセスや測定結果の責任が散在している状態である。本品の製造販売承認申請を見据えた場合、まず本品の製造販売業者となる者を定め、本品の一連の反応プロセス及び測定結果に対する責任の所在を決定する必要がある。また、本品の製造販売業者となる者が申請に必要な品質管理及び性能検証を行って、本品の製造販売承認申請における試験成績をとりまとめることが必要である。

(試薬類のキット化の必要性)

本品で用いる反応系に係る試薬類（DNA/RNA抽出、MultiplexPCR、検体識別PCR、Miseq内の反応系に係る一連の試薬類等）が体外診に該当する場合、本品の製造販売業者となる者は検査性能に影響する重要な工程を特定し、当該反応系の意図した性能、精度及び再現性並びにそれを確保するために必要な一連の試薬類の品質を保証（キット化）する必要がある。また、本品の製造販売業者となる者は、当該キットの品質管理と性能評価等を行い、本品の製造販売承認申請の際には操作法の妥当性を示す根拠資料を提出する必要がある。

(検体採取とサンプル抽出)

検体採取は、解析する核酸の質と量に直接関係するので、採取方法、保存方法、輸送方法に制限や最適化された方法があれば、採取部位の大きさ、温度、時間、壊死や炎症部分の比率、夾雑物の混入等の評価事項を含めてその詳細を検体毎に検討する必要がある。

喀痰や胸水などの細胞診検体は性質が変動しやすく、検査性能を保証できる癌細胞含有量の確保が必ずしも容易でないことが懸念される。そのため、製造販売後の一般化を念頭に、核酸サンプルの調製では、試薬及び器具類を含めて操作手順を規定し、解析に使用できる限界のサンプル量を決定することが必要である。また、サンプルの品質を評価する方法及び受入れの規格値(量、純度、濃度、分解度等)を決定し、サンプル抽出において使用する試薬類とその有効期限、安定性、安全性を評価する必要がある。

(再現性、性能検証)

製造販売業者となる者の責任において、併行精度(アッセイ内及びアッセイ間双方の再現性)、室内再現精度(同一施設内で、試験日、試験実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の精度)、室間再現精度(異なった施設内において測定する場合の精度)を評価し、これらが許容範囲内にあることを保証することが求められる(通知2参照)。また、再現性試験での操作手順は、製品化時の操作手順と同様であることが必要である。

上記分析的バリデーションの評価に加えて、ヒト検体で十分な精度で判定できるかの評価(既承認品、標準法との同等性試験)が必要となる点にも留意すること。

相談事項3：配列の読み出しを行うシーケンサが満たすべき品質、性能、製造要件について

(検出限界、ダイナミックレンジ)

検出限界及びダイナミックレンジ(直線性を保つ範囲)を保証する標準試験を設定し、本品の製造販売承認申請の際には検出限界及びダイナミックレンジの検証方法を明らかにし、実測データを用いて検出限界及びダイナミックレンジを説明するべきである。標準物質等の希釈測定でサンプルの検出限界量及び測定ダイナミックレンジを特定し、そのサンプル量を確保するために必要な臨床検体の量を規定し、また、使用した装置、プロトコル、検出条件も明示すべきである(通知3、通知4参照)。

(機器の較正)

PCR機器及び高速シーケンサについては、装置の出力条件、測定時間、機器間の補正方法など、解析結果に影響を与える性能の確認方法及びそれらの実際の設定条件を示すべきである。それぞれの機器に較正装置がある場合は、動作検証の方法と頻度を規定すべきである。較正装置がない場合は、陽性対照と

陰性対照等を用いた評価方法を示すべきである。

相談資料では、標準物質としてプラスミド DNA の希釈系列が使用されているが、検出性能を評価する場合には、その試料の臨床検体由来試料の濃度や純度との同一性に留意すべきである。(通知 3、通知 4 参照)。

相談事項 4：高速シーケンサの読み出し結果を統計処理し、遺伝子 DB と照合して診断結果を出力する診断ソフトウェアが満たすべき品質、性能、製造要件について

(ソフトウェアの性能評価)

本品に含まれるソフトウェアは、測定データから診断結果を導出する重要な機能を担う。現薬事法下では、ソフトウェアは有体物である高速シーケンサと一体化して申請することが可能である。また、現薬事法下ではソフトウェア単独での評価を求めるものではなく、高速シーケンサの測定結果の入力から医療情報の出力に至るまで、ソフトウェアを含めた診断システムとして、分析アルゴリズム、統計解析手法、判定方法及び出力結果の検証方法を示すことが必要である。また、測定結果の判定に用いる閾値の定義、設定根拠及び信頼性についても記載する必要がある。遺伝子変異及び遺伝子異常には多くの変異体があるので、本品で変異配列として採用した変異異常配列セットの妥当性についても説明する必要がある。なお、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」の施行に伴うソフトウェア単独での評価については現在検討されている段階であることから、時期をみて別途機構に相談することが望ましい。

(適合規格)

ソフトウェアを含む医療機器の適合規格としては、製品規格として JIS T 0601-1:2012 の 14 プログラマブル電気医用システム (PEMS)、又は当該規格と同等の規格への適合を検討する必要がある。「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」の施行後に、単体のソフトウェアの申請を想定する場合は、JIS T 2304「医療機器ソフトウェアライフサイクルプロセス」又は国際規格 (IEC62304:2006 “Medical device software — Software life cycle processes”) 等に準拠した開発を進めることが望ましい。なお、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律」の施行に伴う、ソフトウェアに関連する適合規格の取り扱いについては現在検討されている段階であることから、時期をみて別途機構に相談することが望ましい。

相談事項 5：本品の非臨床試験における留意点について

(コンタミ防止、データ取り違い対策)

サンプルの交差汚染には、別検体の混入、増幅産物の混入があり得る。これらを予防するための操作環境、設備、手順等を検討し、評価結果を残すことが

望ましい。また、検体や試薬類の入れ間違いなどの人為的ミスを防ぐ方策と確認方法を説明するべきである。

(リスク分析)

機器や反応の操作過程で、人為的及び機械的ミス等が発生する要因を分析し、必要に応じてリスク防止対策を講じるべきである。高速シーケンサ、PCR 装置については、操作ミスの場合の動作、異常時の動作、停電時の動作、正規の動作以外の状況での対応についても検討を加えるべきである。

(データ管理)

検体情報と解析結果の対応の誤りを防止する方策を説明するべきである。そのために、最終的な結果の出力のみではなく、結果出力前の数値データ等を保存すること等を検討するべきである。

<参考通知等>

必要に応じ、以下の通知を参照すること。

通知 1：平成 25 年 7 月 1 日 薬食審査発 0701 第 10 号「コンパニオン診断薬等及び関連する医薬品の承認申請に係る留意事項について」

通知 2：平成 25 年 12 月 24 日 薬機発第 1224029 号「コンパニオン診断薬及び関連する医薬品に関する技術的ガイダンス等について」

通知 3：平成 24 年 11 月 20 日 薬食機発 1120 第 5 号 「次世代医療機器評価指標の公表について」(別添 2) RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標

通知 4：平成 20 年 4 月 4 日 薬食機発第 0404002 号 「次世代医療機器評価指標の公表について」(別添 2) DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標

以上