

平成30年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患政策研究事業）
分担研究報告書

難病領域の遺伝学的検査の実態を調査する研究

分担研究者 原田直樹 京都大学 iPS 細胞研究所 准教授

研究要旨

平成 30 年 12 月に改正医療法と改正臨床検査技師等に関する法律が施行された。検体検査の分類が一部変更され、遺伝子関連検査と染色体検査において新たな管理方法と精度確保規準が設定されている。国内でゲノム医療の実装が急がれるが、希少難病等を対象とした検査の実施体制を短期間に構築することは容易でないことが予測され、課題を明確にし、効果的な施策の立案と実行が求められる。以上を前提とし、初年度は難病等の患者を対象とした遺伝学的検査実施における課題を明確化するために、診療の用に供する遺伝学的検査の集約が見込まれる検査施設、および網羅的ゲノム解析や複雑なエピゲノム解析を研究として実施し、一次的な診断機能を担っている代表的な研究機関を対象として訪問調査を行った。この結果、次世代シーケンサー（NGS）を使用したパネルシーケンス検査が特定の施設に集約され、臨床応用が進められていることが明らかであった。また研究として実施した網羅的なゲノム解析結果を診療情報とする具体的手順が共通認識化されつつあり、研究の結果を適切に利用する方向性が確認できた。一方で技術難易度が高い研究的検査手法によってのみ診断が可能な疾患が存在しており、個別の対策が必要と考えられた。

A . 研究目的

ゲノム医療の実装に向けて検体検査の在り方が見直され、具体的な規準の整備が進められている。一方で希少遺伝性疾患等の患者を対象とした遺伝学的検査には、全体として対象とする遺伝子が膨大で、個々の検査項目の実数が非常に少ない特徴があり、医療機関の検査室内での実施や登録衛生検査所への外部委託が困難で、永らく研究として実施されてきた経緯がある。今回の法改正を契機として、研究室が検査を担う状況から、一部の登録衛生検査所や大学機関に検査を外部委託する方策が進められている。しかしながら、少数遺伝子を標的化したシーケンシングでは原因バリエーションを同定できず、研究的手法によって診断検査が行われる遺伝性疾患が少なからず存在し、得られた結果を臨

床検査施設において再度確認検査する仕組みの構築も急がれている。現時点の個別の課題を明確化し、将来を見越した適切な対応方法の検討が急がれる。

そこで診断を目的とした遺伝学的シーケンス検査を実施している 6 施設を 4 つのカテゴリに分類し、訪問調査を行った。

- (ア) 診療の用に供する臨床検査の集約が見込まれる 2 施設（かずさ遺伝子検査室と信州大学遺伝子医療研究センター）
- (イ) 保険適用で実施された主要な責任遺伝子バリエーションのスクリーニング検査で陰性であった患者を対象とし、先天性難聴の原因遺伝子を対象とした包括的パネルシーケンスを大規模に研究とし

て実施している研究機関（信州大学耳鼻咽喉科）

（ウ） 体系化されたエピゲノム解析手法によりインプリンティング異常症の診断検査を研究として実施している研究機関（佐賀大学分子生命学講座分子遺伝学・エピジェネティクス分野）

（エ） 未診断イニシアチブ（IRUD）およびオミックス解析拠点として網羅的ゲノム解析研究を担っている2つの研究機関（国立成育医療研究センターゲノム医療研究部と横浜市立大学ゲノム解析センター）

B. 研究方法

前述の6施設に対し、責任者へのインタビューと実地見聞で以下の項目の現況を調査した。

- 検査分類（診療の用に供する臨床検査／研究的検査）
- 対象とする疾患領域
- 保険診療としての検査実施の有無
- 施設・設備
- 標準作業書や帳票類の整備状況
- 検体搬送手段、検体受付方法
- シークエンス工程外注の有無
- 検査担当者の職位または資格
- 主要な検査機器と試薬キット
- 報告書作成方法
- 内部精度管理方法
- 外部精度管理方法
- その他特徴的な精度管理策
- 費用徴収の有無・方法等

C. 研究結果

表1に調査結果をまとめた。

診療に用に供する臨床検査は（ア）の2施設のみで実施され、両施設ともに保険診療下のものも含めて検査がなされていた。（イ）、（ウ）、（エ）では研究機関が研究として検査を実施していた。

（ア）について、かずさDNA検査室は平成29年に衛生検査所登録がなされ、厚生労働省難治

性疾患克服研究事業下の難病研究班等の個別疾患領域の専門家の要望に応じる形で次世代シーケンサー（NGS）によるパネルシーケンス検査項目が整備されていた。解析の結果、候補となった疾患原因バリエーションの臨床的解釈においては、各疾患領域の専門家が検査結果報告書にコメントを記載する仕組みが構築されていた。改正法の施行を契機として、受託メニューを拡大する対応が進められているところであった。信州大学遺伝子医療研究センターは大学病院内の研究室にNGS関連機器を集約し、遺伝性結合組織疾患や遺伝性心血管疾患等を対象としたパネルシーケンス検査態勢を整備していた。同大学の遺伝子診療外来を受診する患者・家族の検査を中心としながら、外部医療機関の検査の受け入れが進められており、国内に受け皿が存在しない保険診療下の検査や指定難病の診断を目的とした検査の開発と導入が進められていた。医療機器仕様のNGS機器による解析の結果、疾患原因候補となったバリエーションについては、遺伝子診療部内で定期開催される検討会において確認がなされていた。（イ）の信州大学耳鼻咽喉科では、先天性難聴患者を対象とした遺伝子診断と治療法開発を行う研究拠点として、民間検査センターと連携した臨床検査から研究へのフローが構築されていた。検査センターにおいて実施される代表的な原因遺伝子のスクリーニング検査で陰性となった患者の検体を集約し、難聴関連遺伝子の包括的パネルシーケンス検査が多施設共同研究として行われていた。教員が専任で解析全般を統括しており、独自の情報管理システム（LIMS）の中にデータベースが構築され、ドライ解析作業から結果報告書の作成までが一連の作業として実施されていた。検討会を経て最終的に発行する報告書には研究代表者によって臨床的解釈がコメントされ、共同研究先に返却されていた。

（ウ）の佐賀大学はインプリンティング異常症

のうち、DNA シークエンスやメチル化特異的 PCR 法等の手法だけでは原因となるバリエーションの同定が困難な Beckwith-Wiedemann 症候群 (BWS) と Silver-Russell 症候群 (SRS) の診断を目的として検査を実施していた。必ず患者と両親の検体を対象とし、最初にトリオ STR 解析と関連するインプリンティング遺伝子を標的とした MLPA 解析によりスクリーニングが行われ、候補となるエピジェネティックバリエーションやコピー数バリエーションを絞り込んだうえで Pyro シークエンス法によるエピジェネティックバリエーションの同定やサンガー法による機能喪失型バリエーションの検索が行われていた。教員の指導のもと、常勤の臨床検査技師 1 名が専任で解析を担当し、最終的な結果報告書は責任者である教室主任によって作成されていた。

なお、(イ)と(ウ)の検査結果報告書には、研究による結果であり臨床検査の結果ではないことが明記されていた。

未診断疾患イニシアチブ等の解析拠点とオミックス解析拠点としてエクソームシークエンス等の網羅的ゲノム解析を担う(エ)の2施設では、それぞれ一定のフローでゲノム解析が実施されていた。AMED 指針によりシークエンシングの wet 工程の外部機関への委託が進められており、返却されたデータセットに対し、教員の指導のもとに研究員や大学院生が種々の解析を行って疾患原因バリエーションの絞り込み～チームによる遺伝型-表現型相関解析～追加解析の検討等がなされていた。責任者のもとで最終的な解析結果が取りまとめられた後には、それぞれ AMED 研究プロジェクト毎のルールに則り結果報告がなされていた。両施設ともに研究室内にクローズネットワークが構築され、セキュリティに配慮した解析データのフローとデータセットのストレージが行われていた。

精度管理への具体的対応状況

改正法では特に遺伝子関連検査を対象とした精度管理の実行策が新たに明記されていると

ころであり

(https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_02251.html)、内部精度管理の実施が義務化され、検査施設内での質のモニタリングが必須となった。他方、外部精度管理については、新規制においても勧奨事項に留まっており、現時点では国内第3者機関が実施する外部精度管理サーベイが存在しない状況である。

(ア)施設の精度管理方法について、かずさ DNA 検査室では内部精度管理としてシークエンスラン毎にコントロールライブラリーを添加したベースコールが実施され、さらに米国国立標準技術研究所 (NIST) リファレンスゲノム試料の解析が定期的実施されていた。信州大学遺伝子医療研究センターでは、既知試料の定期的ランが内部精度管理として実施されていた。両施設ともに外部精度管理の実施策については未対応で検討中とのことであった。

研究機関のうち、信州大学耳鼻咽喉科では既知試料を定期的にシークエンスランに含める内部精度管理策、および同一試料を外部機関と同時にシークエンスして結果を比較する外部精度管理策が実行されていた。

他の精度保証策として、かずさ DNA 検査室では個々の生検体の全てにスパイク DNA を添加し、全工程においてトレースが可能なシステムを構築していた。信州大学遺伝子医療研究センターでは、NGS で検出同定した病的バリエーションの全件について、サンガー法による確認検査を追加していた。佐賀大学では同一検体を独立して二重に測定し、結果を比較することで特にメチル化の割合のバラツキの有無と GC 含有率の高い領域のサンガーシークエンス結果の確認を行っていた。信州大学耳鼻咽喉科では未知の病的バリエーションを検出した際にサンガー法での結果の確認を、国立成育医療研究センターと横浜市大では同定した病的バリエーションは全件サンガー法による確認が追加で行われていた。

D. 考察

新たな医療法と臨床検査技師法における具体的な改正ポイントは平成 30 年 3 月に公表された検体検査の精度管理に関する検討会のとりまとめ

(<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10801000-Iseikyoku-Soumuka/0000200534.pdf>) が公表された時点で初めて明らかになったものである。

がんゲノム医療の実装が推進され、提供体制の整備とメーカーによるがんパネル検査の製造承認申請や PMDA の先駆け審査として認定された状況は報道等で公知となり、順次課題が整理され解決がなされてきているように思われる。これに対して、希少遺伝性疾患を対象とした遺伝学的検査については、十分な対策が検討されることなく、改正法施行日を迎えた感が否めない。希少疾患の NGS パネルシーケンス検査がメーカーによって体外診断薬化される可能性は低く、第 3 者機関による認証、即ち ISO15189 の認定取得や CAP-LAP (米国臨床病理学会臨床検査室認定プログラム) 認定を取得することを以て LDT (検査室独自開発検査) を品質保証することが実質的対応策になるものと思われる。新規制で検査室の第 3 者認証は勸奨とされてはいるものの、一定の移行期間を経た後にはこの方法による品質保証が要件化される可能性は認識しておかねばならない。

品質管理システムでは、十分に検証された検査を、教育を受けた要員が、標準化された方法で、記録を作成しながら逸脱なく実施し、施設の承認手続きを経て結果報告を行うことが必要で、検体搬送から結果報告まで一貫した品質管理が求められるものである。希少疾患の診断を目的とし品質の高い臨床検査体制を早期に構築するためには、希少疾患を領域毎に集約し、責任遺伝子を標的化した NGS によるパネルシーケンス検査を実用化し、複数の拠点に集約して実施することが不可欠と思われる。

また、大半の単一遺伝子病では、疾患原因とな

るバリエーションが少数に限定されず、また複数の遺伝子を標的化するパネルシーケンス化が進展するなかで、内部精度管理に利用する標準試料を入手することが課題である。現時点ではバリエーションが既知の試料を利用し、できるだけ盲検化して測定し、台帳として記録しておくことが適当と思われる。外部精度管理については国内に利用可能なサーベイが存在せず、複数の施設間でクロスチェックを行うことが現実的な対応策と考えられている。しかしながら、施設間のデータを較正し、レビューする機能をどのように担保するのが課題であり、複数の学会等で検討がなされるのが望ましい。

主要な民間臨床検査センターへの外部委託が早期には見込めないなか、今回の訪問調査では、公益財団法人が運営する登録衛生検査所であるかずさ DNA 検査室への検査集約や信州大学遺伝子医療研究センターへの外部機関検査の受託体制整備に期待する状況が明らかであった。両施設の受託能増のみに依存することは遺伝医療の将来的リスクになるかもしれない、受け入れ先の分散が望まれる。

NGS 遺伝学的検査の開発においては、個別疾患領域の専門家によって臨床的妥当性が確認された遺伝子・バリエーションを対象として、検査手法の分析的妥当性を担保する具体的な手順が必要であり、ベストプラクティスとして明文化されることが望まれる。関連領域の専門家が連携し検討がなされることに期待したい。同時に、品質保証策に係る費用を盛り込んだ検査費用を適切に設定することも検討されなければならないであろう。

一方で、代謝産物の質量分析や酵素の生化学的検査で診断が可能な一部の先天代謝異常症や特定の遺伝子バリエーションに起因する一部の疾患を除き、遺伝性疾患の多くは複数の候補遺伝子のコード領域全体のシーケエンシングが求められることが多く、非症候群性疾患では網羅的なゲノム解析が第一選択検査とされる状況

が存在する。従って、研究として組織的に集約して実施される IRUD やオミックス解析拠点等は研究プロジェクトによる診断手法として継続して実施されることが求められる。なお、研究的検査で疾患原因となるバリエーションが特定された場合には臨床検査施設において当該バリエーションをピンポイントに確認する手順を経て、診療情報とすることが求められている。確認検査の受け入れ先確保が急がれ、ここでもかみず DNA 検査室が重要な役割を果たすと見込まれている。インプリンティング異常が発症に関わる BWS や SRS の診断には、複数の遺伝子座のメチル化解析を含めた体系化された検査が必要で、佐賀大学では基礎研究室が試薬コスト実費を大学事務で徴収して検査を受け入れる体制が作られていた。BWS は小児慢性特定疾患に指定されており、確定診断にはこのような複雑な解析を含む検査が必要とされ、年間数十家系のトリオ解析が実施されているものの、検査担当者の雇用の確保等、継続性が課題とされていた。難病や小児慢性特定疾患等の医療施策の前提となる診断検査を研究機関が担わざるを得ない状況があり、ナショナル医療センター等への集約や検査部門の設置が検討されなければならないように思われる。

E . 研究発表

なし。

F . 知的財産権の出願・登録状況

なし。

表 1

カテゴリー	(ア)		(イ)	(ウ)	(エ)	
施設名	かずさ遺伝子検査室	信州大学遺伝子医療研究センター	信州大学耳鼻咽喉科	佐賀大学	成育医療研究センター	横浜市立大学
分類	臨床検査(受託)/登録衛生検査所	臨床検査(一部受託)/病院内遺伝子診療部門研究室	研究的検査/大学研究室	研究的検査/大学研究室	AMED事業拠点/ナショナルセンター	AMED事業拠点/大学研究室
保険診療下の検査	有	有	---	---	---	---
対象疾患領域	単一遺伝子疾患多数	保険収載済みで検査会社が未対応の遺伝性疾患(特に結合組織疾患)、その他臨床的有用性が高い指定難病の遺伝学的検査	スクリーニング検査陰性の患者を対象とした難聴関連遺伝子の包括的パネルシーケンス	Beckwith-Wiedeman症候群、Silver-Russell症候群	IRUD、オミックス解析拠点	IRUD、オミックス解析拠点
検査場所	検査室	病院内研究室/検査室	研究室	研究室	研究室	研究室
標準作業書・帳票類	完備	完備	標準作業書整備	無	標準作業書整備中	無
検体搬送	院所委託元直送(宅配)	施設内、外部受託分は検査会社が搬入	検査会社でDNA抽出後に搬入	院所委託元直送(宅配)	検査会社でDNA抽出後に搬入	共同研究先から直送(宅配)

検体受付 / 試料トレ ース方法	LIMS / BC、スパイ クDNA添 加	台帳 / BC	LIMS / BC	台帳 / 検 体ラベル	台帳 / 検 体ラベル、 一部 BC	台帳 / 検 体ラベル
シーケン ス工程外 注	---	---	---	---	有り	有り
担当者	専任検査 員	教員、技術 職員	教員、技術 職員、大学 院生	専任技術 職員	教員、研究 員、技術職 員	教員、大学 院生、技術 職員
検査機器	NGS、 CapSeq	NGS (医療 機器仕 様)、 CapSeq	NGS、 CapSeq	PyroSeq、 CapSeq	NGS	NGS、 CapSeq
NGS 濃縮 試薬キット または塩基 配列決定 以外の手法	配列キャプ チャー法 (アジレント 社、IDT 社)	アンプリコ ン法(サー モフィッ シャー社)	アンプリコ ン法(サー モフィッ シャー社)	PyroSeq、 MLPA、	外注	外注
報告書作 成方法	個別疾患 領域の専 門医がコメ ントを付記	責任者が 確認	専門医がコ メントを付 記	責任者が 確認	責任者が 確認したデ ータセット を診断協 議会に提 出	責任者が 確認したデ ータセット を診断協 議会に提 出
精度保証 策	個々の生 検体にス パイク DNAを添 加してトレ ース	同定した病的バリエーションはサンガー法で確認	原因として頻度が高いGJB2を対象に全例にサンガーシーケンスも実施。同定した病的バリエーションはサ	同一検体を独立して二重測定	同定した病的バリエーションはサンガー法で確認	同定した病的バリエーションはサンガー法で確認

			ンガー法で 確認			
内部精度 管理	コントロール試料の ベースコー ルを毎ラン 実施。 NIST リファ レンスゲノ ム解析を定 期実施。	既知試料 を定期的 にラン	既知試料 を定期的 にラン			
外部精度 管理	無し	無し	同一試料 を外部施 設と同時に シークエン スして結果 を比較	無し	無し	無し
費用徴収 方法	受託	医事課徴 収・一部受 託	---	大学経理 掛が実費 徴収	---	---

BC: バーコードラベル; CapSeq: キャピラリーシークエンサー; PyroSeq: Pyro シークエンス