

令和4年度厚生労働行政推進調査事業費補助金(厚生労働科学研究事業)  
「遺伝子関連・染色体検査」の精度の確保に係る基準の明確化に関する研究  
分担研究報告書

遺伝子関連検査の質保証に関する基本的考え方、特に外部精度評価に関して  
(日本臨床検査振興協議会、遺伝子関連検査に関する小委員会の見解)

研究協力者 前川真人 (浜松医科大学医学部 臨床検査医学 教授)

研究要旨

全ての検査に質保証は必須であり、遺伝子関連検査においても同様である。その基本の3本柱として、バリデーション、内部精度管理(IQC)、外部精度評価(EQA)がある。このうち、EQAは多くの人や機関がシステム化を目指して企画・実践していかなければならない。しかし、本邦では十分に行われているとは言えない。さらに、遺伝子関連検査のうち、NGSを用いたがんゲノム検査などの多くは海外の検査機関に外部委託されている。このゲノム情報という貴重な日本の資源を今後のゲノム研究、および医療や治療法開発に活用していくためにも、ゲノム検査を内製化し、周辺産業を活性化していくことが重要である。そして、検査の内製化に質保証は必須であるため、諸外国のように国際規格を有するEQA提供機関、およびそのEQAプログラムを承認・監督する機関を整備して、適切にEQAを実施できるシステム体系を国内に構築することが重要である。それによってこそ、正確な検査結果を元に最適な診療を行うことができる。

A. 研究目的

検体検査を行う場合、導入時の分析法の妥当性確認・検証(IVD試薬の場合は検証のみ)、内部精度管理(IQC)、外部精度評価(EQA)が重要であり、遺伝子関連検査においても同様である。特に、がん遺伝子パネル検査などの次世代シーケンサー(NGS)を用いた検査に関しては、病理標本の準備、核酸抽出、ライブラリ調製、シーケンシング、配列アラインメント、変異検出、変異の意義づけという複数のプロセスからなり、それぞれが複雑な検体検査であり、さらに、ライブラリ調製から変異の意義づけに至るプロセスに関わる技術やデータベースは進化途上にあり、これまでの臨床検査とは大きく異なった側面を有している。従って、我々は「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」を策定し、2019年6月4日に第2.1版を公開した<sup>1)</sup>。その中で、がん遺伝子パネル検査の各プロセス(分析前プロセス=検体採取、ホルマリン固定、病理組織標本作製、腫瘍細胞比率を含む遺伝子検査用病理組織標本の確定、確定標本からの核酸抽出; 分析プロセス=ライブラリ調製からシーケンシング; 分析後プロセス=バイオインフォマティクス解析から結果報告)で管理し、検査導入前に実施すべき分析的性能評価(バリデーション)、および分析前、分析、分析後の各プロセスにおける品質基準の確認、内部精度管理(IQC)、外部精度評価(EQA)を行うべきとした。すなわち、バリデーション、IQC、EQAは検体検査の質保証における3本柱であると言えよう。また、「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」を2022年3月14日に公開した<sup>2)</sup>。ここでも、プロセスごとに分類し、それぞれの操作時に留意すべき点、品質基準などを提示した。

本稿では、3本柱のうちの一つ、EQAの本邦の状況およびNGS検査におけるEQAのあり方について、日本臨床検査振興協議会、遺伝子関連検査の小委員会でまとめた見解の一部を紹介する<sup>3)</sup>。

## B. 外部精度評価(EQA)

EQAは、他施設と比して自施設の検査の性能をみるもので、一般的には多施設が参加する外部精度評価プログラム(通称、精度管理調査)を受検することをいう。このプログラムに参加することで、自施設が目標値からどれくらい外れているかを定期的に調べることができる。遺伝子関連検査は、プロセスが多い分、使用する機器・試薬の種類も多く、かつ研究用途のものが含まれる。従って、信頼に足る結果を得るためにはEQAは必須である。また、遺伝子関連検査のEQAは、受検者はもちろん、提供者にとっても広く各種の測定法の特性や利点・欠点を知るための貴重な機会である。そして、EQAによって検査室のパフォーマンスが向上することはこれまでの歴史が物語っている。

### 1. EQAの定義

日本工業規格 JIS Q17043:2011(ISO/IEC 17043:2010)適合性評価—技能試験に対する一般要求事項<sup>4)</sup>では、「医療分野の技能試験提供者には、技能試験スキーム及び／又はより広義のプログラムとして外部精度管理(EQA, External Quality Assessment)という用語を用いるものがある」と注記されているが、技能試験(Proficiency Testing; PT)と外部精度管理調査(External Quality Assessment; EQA)は同義的に使用されている場合が多い。さらに、ISO 15189 では「検査室は、検査結果及び検査結果の解釈に適切な検査室間比較プログラム(外部精度管理調査プログラム、技能試験プログラム、など)に参加しなければならない。」(5.6.3.1)としている。IFCC Molecular Diagnostic Committee(C-MD)はEQA/PTに4つの方法があるとして、技能試験、基準検査室で既に解析された試料の再検査、持ち込み試料による評価、そして検査室間で試料を交換する検査室間比較を挙げている(図1)。

JIS Q17043:2011(ISO/IEC 17043:2010)では、試験所間比較(Interlaboratory Comparison; ILC)とPTは別々の項立てで説明されている。すなわち、[3.4 試験所間比較(interlaboratory comparison)]では、試験所間比較は「事前に定めた条件に従って、二つ以上の試験所が、同一品目又は類似品目で行う、測定又は試験の企画、実施及び評価。」とされ、[3.7 技能試験(proficiency testing)]では、技能試験は「試験所間比較による、事前に決めた基準に照らしての参加者のパフォーマンスの評価。」と説明されている。WHOのEQAの説明でも試験所間比較はRechecking/Retestingに含まれ、技能試験がないような特殊検査の場合に限って行われる予備的な方法とされている<sup>5)</sup>。

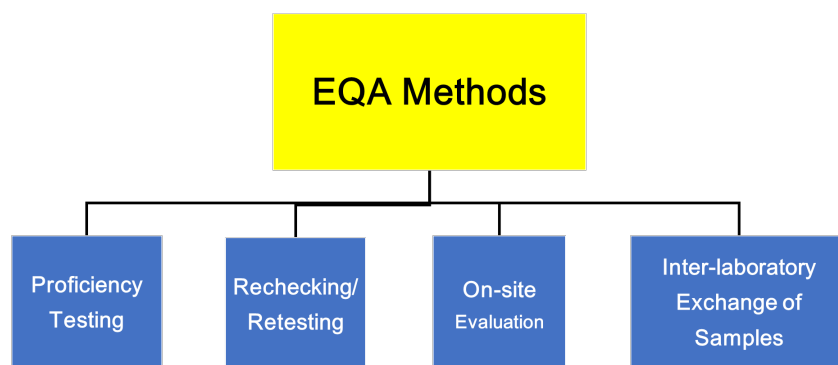


図1. 外部精度管理調査(EQA)の4つの方法

## 2. EQAの意義

EQAによって得られる利点としては、以下のものがあげられる<sup>5,6)</sup>。

- 異なった方法を含む多施設の性能と結果を比較できる。
- 測定試薬や手技・方法に関する系統的な問題点や早期の警告を知ることができる。
- 測定法の質に関する客観的な証拠を得ることができる。
- 改良が必要な箇所を示してくれる。
- トレーニングの必要性を示してくれる。

総じて、その検査室が信頼できる結果を生み出せるかどうかを判定し、問題点を理解し改善に繋げることができ、教育的効果を得ることができる。また、方法別の特性や使用率も知ることができる。

## 3. 国内のEQA

国内の技能試験(PT)としては、日本臨床衛生検査技師会、日本医師会、日本衛生検査所協会、全国労働衛生団体連合会、各都道府県の医師会・技師会などが行っているが、日常臨床検査項目をカバーするのみであり、特殊検査項目は企業がユーザー対象に行うクローズドの調査のほか、CAPサーベイ<sup>7)</sup>など海外のものに依存しているのが現状である。CAPはISO/IEC 17043認定を取得しているが、先述した国内の団体はISO/IEC 17043認定を取得していない。国内で臨床検査分野の技能試験提供者としてISO/IEC 17043認定を取得しているのは、シスメックス株式会社・精度管理センターのみであるため、まずは国内の技能試験を全国規模で主催している機関はISO/IEC 17043認定を取得するべきである。さらに、諸外国のように特殊な検査の技能試験も遂行できる認定機関を国策で整備されることを願う。既に法整備で遅れ、遺伝子関連検査の多くを海外に委託し、臨床検査の後進国となっている日本の復権を目指すため、法整備して対応すべきである。

すなわち、ISO/IEC 17043認定の取得者が提供する技能試験を公的機関が審査・認定し、その技能試験を実施するという仕組みを法的に規定するべきである。すなわち、米国を例にあげると、CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) という法律の下で技能試験を受検することを規制され、ISO/IEC 17043認定を受けているCAP (College of American Pathologists) などが技能試験を開発・実施、それをCMS (Centers for Medicare & Medicaid Services) と CDC (Centers for Disease Control and Prevention) が承認・監督するという体系を構築することが理想であり、その体系化を目指すべきである。しかしながら、本邦ではこれらの仕組みが全く構築されていないため、NGS検査については次項のように実施することを提案する。

### C. NGS 検査の国内版 EQA 実施の具体案

EQA プログラムを施行するためには、ISO 17043 認定を受けた EQA 提供者が管理し、調査試料の準備、結果の解釈・評価を行うためのチーム編成をして望むべきである<sup>8)</sup>。そのチームには、EQA に習熟し全体を統括する者のほか、病理検体を使用する場合は病理医、遺伝子関連検査に習熟した臨床検査専門医、分子生物学技術の専門家、バイオインフォマティクスの専門家、調査対象とする検査の臨床的有用性を判断できる臨床医を組み込むべきである。また、その検査に精通した複数のリファレンスラボを選択して、模範回答を得ることが重要である。なお、結果の評価前に、評価規準<sup>注)</sup>を決めておいて、2人以上で評価して照合するのがよい。ここで注意したいことは、CAPのように技能試験を提供する側とCMSやCDCのようにそれを承認・監督する立場と、役割を振り分けることを考慮すべきである。これを、臨床検査

関連団体を含め、既存の組織や機関を活用しながら産官学が協力して早急にシステム化することが重要である。

調査試料は複数準備して、典型的なホットスポットの結果を有する試料と、頻度は高くはないが臨床的意義のある上級者用の試料を組みあわせるのが望ましい。前者は正解を導くのが必須な regulatory EQA で、後者は educational EQA として検査の質を向上させるために行う<sup>9)</sup>。

EQA の全体の流れとしては、できるだけ実際の診療に近い形が望まれる。図2の③がそれにあたる。一方では、プロセスごとに評価することによって、どのプロセスに課題があるかが推定できる。例えば NGS を使用した検査の場合、核酸抽出、NGS wet 解析、バイオインフォマティクス(BI)解析で分けるのが妥当と考える。すなわち、各プロセス、および複数のプロセスとして品質指標を設定し<sup>1)</sup>、その指標に応じて評価規準を決めて評価する。そして、検査目的と臨床的意義に応じて測定法を選択することが重要である。

基本的には、どんな方法を用いたとしても、同じ結果が得られることが望まれるが、方法によっては分析感度や測定範囲などの検査性能が異なるため、必要とする結果が得られないかもしれない。そのため、各測定法の限界を知るべきであり、EQA によってその情報が得られることを周知・共有すべきである。

特に、バイオインフォマティクスで使用するソフトウェア、データベースも多種多様であるため、どのような調査試料を用いて、どのように評価するのか、先述したように EQA プログラム自体を審査・評価する機関を設置して稼働させることも重要である。

注) 目標に対するよりどころ、判断などの規範となるよりどころ、という観点で「規準」と表した。英語では criteria に相当する。一方、行動や判断の根拠となる物や数値である「基準」は standard となる。

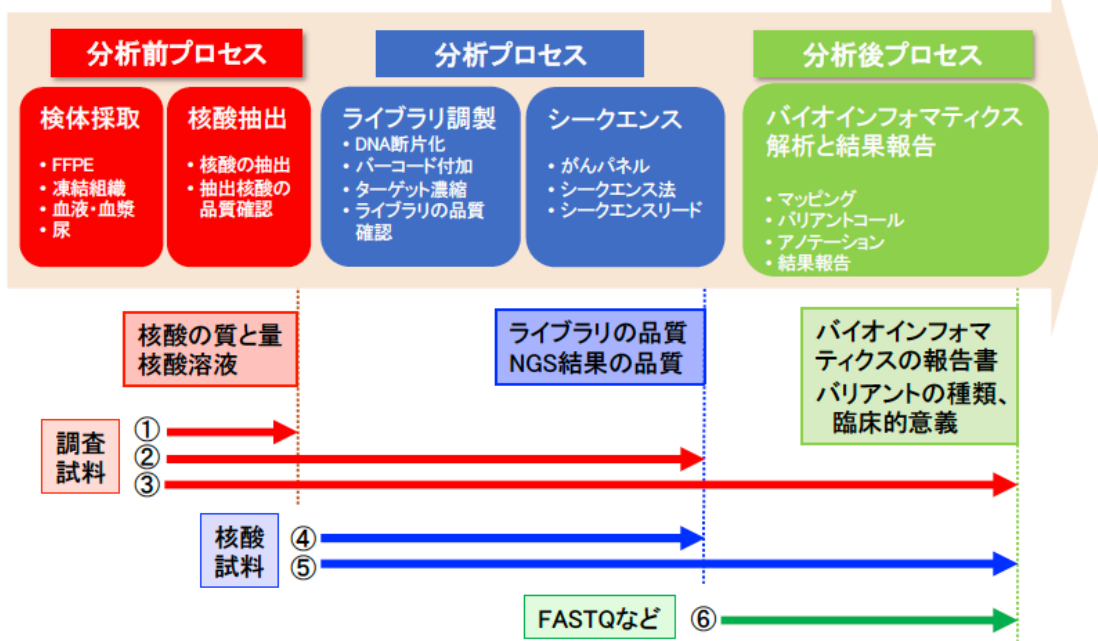


図2. NGS 検査のフローチャートと EQA スキーム (がん遺伝子パネル検査を例として)

- 核酸を含む試料 ①②③ 核酸抽出プロセス、NGS 分析プロセス、BI プロセス
- 核酸試料 ④⑤ NGS 分析プロセス、BI プロセス
- FASTQ ファイル ⑥ BI プロセス



表1. がん遺伝子パネル検査の測定条件と品質指標 (QI)

作業工程	測定条件など	調査するQI	調査対象
DNA抽出	DNA抽出試薬 (キット名) 核酸自動抽出機 (機器名)	抽出DNA溶液、DNA定量値、 品質: $\Delta$ Ct値 ( $\Delta\Delta$ Cq)、DIN値、Q-value	①②③
ライブラリ調製	解析法 (アンプリコン、キャプチャー) 試薬名・製造販売元、IQC試料	DNA量、フラグメントサイズ断片のピーク長	②③ ④⑤
シーケンス 反応	NGSの種類	カバレッジ (標的領域) のデプス (読み深度)、カバレッジの均一性・網羅性、クスタ密度、クスタバスフィルタ、リードバスフィルタ、Q30、総リード数、ユニークリード数、ユニークリード率、平均深度、オンターゲット率 FASTQファイル	
バイオインフォ マティクス	解析ソフトウェア データベースの種類とバージョン	BAM, VCFなどのファイル、 バリエーションの種類、 臨床的意義 (病的変異、VUS)	③⑤⑥

#### D. まとめ

全ての検査に質保証は必須である。その基本の3本柱として、バリデーション、IQC、EQA があると考えられる。このうち、前2者は個々の検査室が自身で行うべきものであるが、EQA は多くの人や機関がシステム化を目指して企画・実践していかなければならない。しかし、本邦では十分に行われているとは言えない。さらに、遺伝子関連検査のうち、NGS を用いたがんゲノム検査などの多くは海外の検査機関に外部委託されている。ゲノム立国を目指すのであれば、ゲノム検査を内製化し、周辺産業の活性化が必要と考える。そして、検査の内製化に質保証は必須であるため、諸外国のように国際規格を有する EQA 提供機関、およびその EQA プログラムを承認・監督する機関を整備して、適切に EQA を実施できるシステム体系を構築することが重要である。それによってこそ、正確な検査結果を元に最適な診療を行うことができる。

#### 文献

- 1) 臨床検査振興協議会、ゲノム検査に関する小委員会. 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2.1 版). (2019年6月)  
[https://www.jpclt.org/common/upload\\_data/websta00000301/file/【確定版】基本的考え方\\_ver2.1.pdf](https://www.jpclt.org/common/upload_data/websta00000301/file/【確定版】基本的考え方_ver2.1.pdf)
- 2) 臨床検査振興協議会、遺伝子関連検査の小委員会. 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. (2022年3月)  
<https://www.jpclt.org/news/detail/20220314093506/>
- 3) 臨床検査振興協議会、遺伝子関連検査の小委員会. 遺伝子関連検査の質保証に関する基本的考え方、特に外部精度評価に関して. (2023年3月)  
<https://www.jpclt.org/news/detail/20230327092844/>
- 4) JIS Q 17043:2011 (ISO/IEC 17043:2010) 適合性評価—技能試験に対する一般要求事項.  
<https://kikakurui.com/q/Q17043-2011-01.html>
- 5) WHO. Overview of External Quality Assessment (EQA).  
<https://www.who.int/publications/m/item/overview-of-external-quality-assessment-eqa>

- 6) Laudus, N.; Nijs, L.; Nauwelaers, I.; Dequeker, E.M.C. The Significance of External Quality Assessment Schemes for Molecular Testing in Clinical Laboratories. *Cancers* **2022**, *14*, 3686. <https://doi.org/10.3390/cancers14153686>.
- 7) CAPサーベイ. <https://www.cgikk.com/cgicapsurvey.html>
- 8) Han van Krieken, et al. Guideline on the requirements of external quality assessment programs in molecular pathology. *Virchows Arch* (2013) 462:27-37. DOI 10.1007/s00428-012-1354-4
- 9) Badrick T, et al. Differences between educational and regulatory external quality assurance/proficiency testing schemes. *Clin Chem* 68: 1238-1244, 2022.