

令和4年度 厚生労働科学研究費補助金(地域医療基盤開発推進研究事業)
「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・染色体検査」の ISO 15189 認定審査における人材育成
-現状と今後の展望-

研究分担者 柿島 裕樹 (国立研究開発法人 国立がん研究センター中央病院)

研究要旨

近年のがん遺伝子パネル検査は、主に次世代シーケンサー (Next-Generation Sequencer: 以下 NGS) が多く用いられ、コンパニオン診断や包括的ゲノムプロファイリング (Comprehensive Genome Profile: 以下 CGP) 検査などの拡充が継続している。これらの検査は「遺伝子関連・染色体検査」の精度の確保に係る基準に該当し第三者認定の取得は勸奨となっている。またがんゲノム医療中核拠点病院等の指定要件ではがんゲノム医療中核拠点病院とがんゲノム医療拠点病院は第三者認定を受けた臨床検査室を有することが求められている。

当院では 2020 年 11 月より NGS を用いたコンパニオン診断の検査体制を構築し公益財団法人日本適合性認定協会 (Japan Accreditation Board: 以下 JAB) による ISO 15189 を認定基準とした臨床検査室の認定を受審した。審査では技術審査員とのディスカッションが実施された。

NGS を用いる検査の要員においては、シーケンシングと解析パイプラインの特性を十分留意し人材育成をする必要がある。

A.研究目的

本分担研究は、当院の NGS を用いたコンパニオン診断導入と ISO 15189 の受審経験から技術的要求事項を中心として NGS 特有の品質保証の取り組みを整理し留意すべき点や課題についてまとめ、人材育成で重要な留意事項を提示する。

以下、NGS を導入したコンパニオン診断システムと ISO 15189 審査の概要である。

1.NGS を用いたコンパニオン診断の概要

当院では 2020 年 11 月よりサーモフィッシュャーサイエンティフィックのオンコマイン Dx Target Test マルチ CDx システム (以下オンコマイン) を用いて検査を開始している。オンコマインは、NGS を用いたコンパニオン診断システムであり 2023 年 5 月現在、非小細胞肺癌における *EGFR*、*BRAF*、*ALK*、*ROS1*、*RET* の 5 遺伝子を検査対象としている。また、同月には甲状腺がん及び甲状腺髄様がんにおける *RET* の融合及び配列変異についてコンパニオン診断となり保険収載されている。

オンコマインの構成は、テンプレート調製機、濃縮機、NGS、サーバで構成されている。検査工程は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (以下 FFPE) の未染標本を検体とし推奨されている核酸抽出キットである Ion Torrent Dx FFPE Sample Preparation Kit を用いて DNA と RNA の両方を核酸抽出する。なお、核酸は定量評価のみである。必要な核酸は 10 ng であり、DNA は DNA panel、RNA は逆転写後 RNA panel で PCR を実施する。PCR 産物は末端消化と index を付加して増幅、精製しライブラリ調製する。テンプレート調製ではライブラリを混合しエマルジョン PCR 後、濃縮しライブラリ ISP を得て半導体チップにローディングし NGS にて塩基伸長反応の際に発生する水素イオンを検出し塩基配列を得る。解

析プログラムは、オンコマイン Dx Target Test JP の Assay Definition File を使用した。Torrent Suite Dx Software では検体情報入力、index の割り当て、ランモニター、判定されたバリエーションや品質指標の確認が可能である。

2.ISO 15189 審査の概要

審査名：第二段階審査詳細計画（第5回サーベイランス）

適応基準：ISO 15189:2012 英和対訳版

適応手順：JAB 200:2020 認定マニュアル

JAB RL200:2021 認定の手順（ラボラトリ）

適応指針：JAB RM300:2021 認定の補足要求事項-臨床検査室-

JAB RM320-2009「分析前後段階の品質保証」についての指針-臨床検査室-

JAB RL331:2020 計量のトレーサビリティについての指針

JAB N410:2020 認定シンボル使用規則および申請された検査項目に対する

審査日時：2021年7月30日（金）9:00～17:00

外部試料の解析：RNA サンプル、DNA サンプル、ゲノムサンプルが審査前に送付され解析を実施し BAM ファイルと報告書を JAB に送付した。審査当日は技術審査員と解析結果の報告と改善の機会についての資料提示とディスカッションが実施された。

B.研究方法

1.ISO 15189 2012 年版の要求事項への割り当て

NGS 導入時に取り組んだ品質保証体制の取り組みについて ISO 15189 2012 年版の第5章である技術的要求事項の項番に割り振って整理した。

5.1 要員

5.2 施設及び環境条件

5.3 検査室の機材、試薬、及び消耗品

5.4 検査前プロセス

5.5 検査プロセス

5.6 検査結果の品質の確保

5.7 検査後プロセス

5.8 結果の報告

5.9 結果の報告（リリース）

5.10 検査室情報マネジメント

2.ISO 15189 審査時の外部試料の測定と技術審査員とのディスカッション

ISO 15189 審査当日は JAB から依頼を受けた技術審査員と事前の外部試料の測定結果を参照しながらディスカッションが実施され有益な学びを得た。本ディスカッションの内容について ISO 15189 2012 年版の第5章である技術的要求事項の項番に該当するものを選択し当院の対応状況と比較した。

C.結果

1.ISO 15189 2012 年版の要求事項への割り当て

NGS 導入時に確認した ISO 15189 2012 年版の技術的要求事項の内容は以下のとおりである（表1）。

表 1 NGS 導入時の品質保証体制の取り組み

項目	具体的な作業
5.1 要員	<ul style="list-style-type: none"> ・ 要員記録 ・ 職務規程 ・ ライブラリ調製などの NGS 特有の操作習得 ・ BAM ファイル、VCF ファイル取扱いの習得 ・ 災害訓練記録 ・ 業務理解度チェック ・ 問題解決スキル評価 ・ 外部勉強会、学会発表出席 ・ 部署内勉強会の実施 ・ 外部研修会や学会の参加、論文などの執筆記録 ・ 遺伝子関連検査の認定資格の受検
5.2 施設及び環境条件	<ul style="list-style-type: none"> ・ 検査室の入退室記録 ・ 核酸抽出におけるエリア分け ・ Pre-PCR エリア、Post-PCR エリアの分離 ・ キャビネットの操作 ・ 作業エリアごとのピペットの分離 ・ ヌクレアーゼコンタミネーション対策 ・ 次亜塩素酸ナトリウムによるコンタミネーション対策 ・ NGS の使用環境温度に合わせた検査エリアの温湿度管理 ・ 試薬保管の保冷库、フリーザーの温度管理 ・ 温度計の検定と校正 ・ ピペットの検定と校正 ・ 劇物保管と使用記録、保管庫の鍵使用記録 ・ 適正な廃棄物処理

<p>5.3 検査室の機材、試薬、及び消耗品</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・機材受入時の性能確認（据付時適格性） ・稼働時適格性試験の定期的スケジュールの設定 ・日常保守と実施記録 ・機材異常時の対応手順の策定 ・機材番号、設置場所の記録、機材ラベルによる識別 ・修理前の汚染除去と記録 ・修理後の使用前の性能確認 ・試薬、消耗品管理、保管方法の確認 ・検体と試薬の保管場所の分離 ・未開封試薬と開封試薬の分離 ・試薬使用記録 ・試薬在庫記録 ・調整試薬のラベル表記 ・試薬ロット変更時の確認方法の策定
<p>5.4 検査前プロセス</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・NGS に対応した病理 FFPE 標本作製条件についての説明 ・検体提出方法の説明 ・体外診断薬の使用であることを説明 ・対象遺伝子とコールするバリエーションの説明 ・解析プログラムでコールされるバリエーション以外は判定されない旨の説明 ・検出感度以下の偽陰性の可能性についての説明 ・検査所要日数の提示 ・検査依頼方法の説明 ・検体受付手順の策定、検体受領記録 ・検体受入不可条件の設定 ・不適検体への対応方法の策定
<p>5.5 検査プロセス</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・検査標準作業手順書の作成 ・特性要因図の作成 ・導入時の検証（検査会社の結果との一致性、日差再現性と同時再現性、標準サンプルによる検証を実施）
<p>5.6 検査結果の品質の確保</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・内部精度管理方法の設定 ・外部精度管理調査もしくは代替えアプローチの設定 ・精度管理物質の管理 ・精度管理が外れた際の対応 ・検出感度以下の変異頻度の対応 ・精度管理レビューによる検査室の遂行能力の評価 ・解析プログラムアップデートの際の互換性確認 ・遺伝子関連検査・染色体検査の精度の確保に係る責任者の精度管理確認

5.7 検査後プロセス	<ul style="list-style-type: none"> ・報告の承認手順の策定 ・残余核酸検体、ライブラリの保管管理、廃棄手順の策定
5.8 結果の報告	<ul style="list-style-type: none"> ・報告書の報告属性の設定 ・依頼情報と報告属性の一致の確認 ・病理医への報告方法の策定 ・遺伝子関連検査・染色体検査の精度の確保に係る責任者への報告
5.9 結果報告（リリース）	<ul style="list-style-type: none"> ・報告書印刷及び病理検査システムへの報告手順の策定 ・検査不成功時の再検基準と報告手順の策定 ・報告書の改訂手順の策定 ・LOD 以下となった判定についての対応
5.10 検査室情報マネジメント	<ul style="list-style-type: none"> ・サーバ及びNAS の操作権限 ・ソフトウェアのアクセス権限 ・システムダウン時の対応と訓練の実施

LOD：検出限界（Limit Of Detection）

2.ISO 15189 審査時の外部試料の測定における技術審査員とのディスカッション

審査当日は外部試料の測定について測定結果資料を技術審査員と共に確認しディスカッションが1時間ほど行われた。

外部試料の測定結果

- ①コールされない偽陰性のバリエーションを認めた。
- ②コールされたバリエーションのうち低い変異アレル頻度（Variant Allele Frequency：以下 VAF）で NEGATIVE もしくは NO CALL と判定されているものを認めた。
- ③コールされたバリエーションのうち期待される VAF の範囲を下回ったものを認めた。
- ④RNA サンプルは Fusion が検出されており問題なし。

以上の解析結果よりディスカッションで提示された項目を表2に示す。

表2 ISO 15189 審査時のディスカッションにて提示された内容と当院の対応状況

想定される項番	ISO 15189 審査時のディスカッションで提示された内容	審査時の対応状況
5.1.8 継続的教育及び専門能力の開発	検出標的遺伝子の全ての病的バリエーションについて検出の有無を確認するためビューアを使用して目視でレビューする必要がある。	・一部対応済（BAM ファイル、VCF ファイルの取扱いは習得済、ビューアソフトは未対応）
5.4.2 患者及び利用者への情報	<ul style="list-style-type: none"> ・検出標的遺伝子の検出が出来ない病的バリエーションを特定し利用者に知らせる必要がある。 ・検出標的遺伝子の検出 VAF が有意に低下する病的バリエーションを特定して利用者に知らせる必要がある。 	・対応済（FFPE 標本作製による要因や検査試薬、解析パイプラインの性能による偽陰性の可能性を事前に説明）

	・腫瘍細胞比率が低い組織の場合に偽陰性になる可能性がある。	
5.5.1.2 検査手順の検証	バイオインフォマティクスの妥当性確認 検証を自ら行い問題がある場合はメーカーに問い合わせる必要がある。	・対応済 (解析パイプラインのアップデート時の検証方法を策定済)
5.9 結果報告 (リリース)	病的バリエーションにおいて低 VAF 5 未満の検出の場合、陰性とせず VAF の値として検出結果を報告する必要がある。	・対応済 (VAF が LOD を下回った際の対応、遺伝子関連検査・染色体検査の精度の確保に係る責任者への報告)

VAF：変異アレル頻度 (Variant Allele Frequency)

D. 考察とまとめ

近年のがん遺伝子パネル検査は主に NGS を用いた検査となっており、NGS のプラットフォームも様々なものが存在し、ターゲット遺伝子についてマルチプレックスで PCR する方法や RNA のベイトプローブを用いたハイブリッドキャプチャーなどが存在する。また NGS 特有なものとして複数の検体核酸をプールして解析することから index を付加するライゲーションの操作も加わり Wet 操作の工程が多いのが特徴である。

NGS は塩基配列のシーケンシングを実施するのみであり、検査結果として成立しない。NGS から得られる FASTQ ファイルを解析パイプラインにて BAM ファイルや VCF ファイルが作成されて初めてバリエーションを見出すことが可能となる¹⁾。このように他の検査には有しない NGS の特性を十分理解した要員によって検査が実施されなければならない。

今回 NGS を用いるコンパニオン診断を ISO 15189 の認定項目として受審し様々な取り組みを実施した。また、審査当日は技術審査員とのディスカッションで多くの気づきがあり非常に有用であった。

1. NGS 導入時に取り組んだ品質保証体制の取り組み

NGS 導入後、ISO 15189 受審の事前準備としては、日本臨床検査標準協議会の「遺伝子関連検査のための ISO 15189 ガイダンス文書」²⁾、JAB RM300：2021「認定の補足要求事項-臨床検査室-」を参照し検査手順を文書化し各種記録文書を新設した。

NGS を使用する要員の教育においては、導入時のメーカーが用意した教育プログラムと同じになるように設定した。ライブラリ調製などの Wet 操作や解析パイプライン操作の習得は NGS 特有のものである。

環境においては、Wet 操作の工程で PCR が実施される。Pre-PCR、Post-PCR のエリアの分離はすでに設定されていたがレイアウトを変更するなどして環境を改良した。

検査前プロセスでは、検査案内にあたる「検査のしおり」を利用者が閲覧できるようにし、FFPE 標本作製時のホルマリン固定による核酸の品質や腫瘍細胞比率、腫瘍内不均一性、NGS で用いる試薬や解析パイプラインの性能などにより偽陰性の可能性となる要因を記載するとともに詳細なインフォメーションは検査室で対応可能であると記載した。

検査プロセスでは、検査標準作業手順書を作成し検査手順を文書化した。体外診断薬を使用した場合、メーカー側で妥当性確認が実施されており、検査室での導入においては、検証するのみで実施することができる。検証内容としては、検査会社の結果との一致、同時再現性、日差再現性、標準サンプルを用いた検出限界 (Limit Of Detection：以下 LOD)

の検証である。

精度管理では、試薬キットに内包された陽性コントロールを用いる内部精度管理を実施しランごとに確認する。また外部精度管理評価は代替えのアプローチとして標準サンプルの定期的な測定としている。なお今後はCAPサーベイに参加する予定である。解析パイプラインのアップデートの際の同等性確認については標準サンプルを用いて確認することにした。

結果のリリースでは、VAFがLODを下回った際のNEGATIVEやNOCALLと判定された際は、遺伝子関連検査・染色体検査の精度の確保に係る責任者に報告し判断を仰ぐ手順について検査標準作業書に文書化した。

ISO 15189への対応作業を通じて、臨床検査共通のものとNGS特有の部分を考慮したものと分かれ、特に後者については審査時の重点項目になるであろうと考えられた。

2.ISO 15189 審査時のディスカッションで提示された内容と当院の対応

今回のISO 15189 受審において技術審査員とのディスカッションが実施された。審査前に送付された外部試料の解析結果が資料として配布され説明があった。

外部試料が有するバリエーションにおいてNGSの検査システムで偽陰性と判定されるものが存在した。原因としては、使用する解析パイプラインがコールしないバリエーションであった。シーケンシングと聞くと塩基配列を取得していることから全てのバリエーションを検出しているというイメージがあり利用者に知られていない可能性がある。よって事前にコールしないバリエーションは判定されないということをあらかじめお知らせしておく必要がある。

もうひとつの偽陰性の原因としてバリエーションはコールされたが低VAFとして検出されLODを下回り、検査精度上解析パイプラインがPOSITIVEと判定しないことが考えられる。このような場合、当院の対応として、VAFが得られているもののNEGATIVEやNOCALLと判定された場合、遺伝子関連検査・染色体検査の精度の確保に係る責任者へ報告し判断を仰ぐとしている。本現象が臨床検体で起きる可能性として、腫瘍細胞比率の低い検体が考えられる。各検査で最低腫瘍細胞比率はあらかじめ指定されておりLODを下回るVAFが出現する可能性は低いと思われるが発生した場合は遺伝子関連検査・染色体検査の精度の確保に係る責任者と協議し腫瘍細胞比率を高めて再検するなどの方法も選択できるようにしておく必要がある。

現在、検査室の対応として病理検体を用いた遺伝子関連検査の偽陰性の要因についてFFPE 標本作製時のホルマリン固定による核酸の品質や腫瘍細胞比率、腫瘍内不均一性、NGSで用いる試薬や解析パイプラインの性能をあげて検査案内であらかじめ利用者にお知らせしている。また実際のところは病理検体の取扱い、ブロックの選択、FFPE 標本作製は病理医と病理の臨床検査技師が実施しており、病理検体における遺伝子関連検査の偽陰性の要因については熟知している。

本審査ではBAM ファイルを提出し評価を受けたことからビューアソフトなどで各アンブリコンのリードが確認されたのではないかと考える。コンパニオン診断のNGSは報告書以外の情報を付加することは困難だがトラブル時などでメーカーとやり取りする際にもBAM ファイルやVCF ファイルを扱うことは十分想定されていたので、ダウンロードの方法は理解していた。しかしビューアソフトの使用については、コンパニオン診断ということもありその必要性について認識していなかった。今回、検査手順に入れなくてもBAM ファイルをビューアソフトで確認できる力量は必要であると認識しビューアソフトの操作について審査後研修を実施した。

コールされたバリエーションで期待される変異頻度の範囲に入らず下回ったものについては、メーカーに問い合わせたところ同一アンプリコン内で複数のバリエーションが存在すると変異頻度が低下する可能性があるとのコメントがあった。通常の臨床検体では考えにくいバリエーションの出現形態であるがメーカーに確認を取り原因が理解できた。本件に限らず不明な点や品質指標に満たない際は、メーカーに問い合わせるなどして迅速に原因を究明する必要がある。

標準サンプルを異なる NGS のプラットフォームで解析した場合、機種間差を生じる可能性は否定できない。これらの差異についての報告は少なく未解明な部分がある。NGS の外部精度管理調査を実施する試料については課題が多いとディスカッション内で話題となった。

なお審査における外部試料の測定結果に関しては、ディスカッションで根拠となる資料を提示されたが技術審査員からの指摘はなかった。外部試料の測定結果を解釈し ISO 15189 の規格と紐づけるのは容易ではないという印象を受けた。

3.NGS を検査で利用する際の人材育成の留意事項

NGS を用いたコンパニオン診断の ISO 15189 の受審を経験し、品質保証において NGS 特有な点が明確となった。検査要員に必要な力量を以下にまとめる。

- ① NGS 特有の Wet 操作であるインデックスの管理やビーズ精製についてハンドリングをマスターする。
- ② 解析パイプラインのアップデート時の検証作業を実施できる力量
- ③ 解析パイプラインで作成される BAM ファイルや VCF ファイルを理解する。ビューアソフトで確認する力量
- ④ 解析パイプラインによりコールされるバリエーションを認識し検査の概要を理解し利用者へアドバイスサービスする力量
- ⑤ 解析パイプラインでコールされないバリエーションや LOD を下回って NEGATIVE や NOCALL と判定された場合など偽陰性の可能性を原因究明できる力量
- ⑥ 品質指標を理解しモニターする。また外れた際は遺伝子関連検査・染色体検査の精度の確保に係る責任者、検査に関連する医師とコミュニケーションをとり問題解決する力量

NGS の品質保証において、検査要員は NGS のシーケンシング後の解析パイプラインにて判定が実施されていることを十分理解し偽陰性の出現や品質指標が外れていないかモニターし判断できる力量が必要である。コンパニオン診断で用いる NGS の場合は添付文書どおりの決められた操作で解析パイプラインの内容を意識しなくても結果は得られるが、トラブル時の対応や多数のバリエーションの判定を行っている以上、解析パイプラインを十分理解した力量の高い要員が検査を実施する必要があり人材育成において重要な点になると思われる。

今後、コンパニオン診断のみならず一般診療となったがんゲノム医療の CGP 検査や近い将来に展開される全ゲノム解析への展望など NGS の解析システムは多岐にわたると考えられる。医療機関や検査会社で NGS を用いた検査を実施する要員の力量は各施設で設定しているのが現状であり³⁾、必要とされる力量のラインについて国内で統一した見解が必要ではないかと考える。遺伝子関連検査の専門学会や関連団体などで課題とし展開されることを期待したい。

なお本分担研究において ISO 15189 2012 版の第 4 章については含めていないが品質マネ

ジメントシステムとして重要な取り組みであることを付け加える。

E.参考文献

- 1)加藤 護.ゲノム医療のバイオインフォマティクス・パイプライン.実験医学 2018;36(15)2645-2652.
- 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;2019.
- 3)柿島裕樹.臨床検査部門における遺伝子関連検査の人材育成の実際.日本臨床検査医学会誌 2022;70(2)402-409.