『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 1.0 版）』に関するご意見募集について

2018 年 12 月 3 日
臨床検査振興協議会

臨床検査振興協議会ゲノム検査に関する小委員会において、がんの病理組織を試料とした次世代シークエンサー（NGS）を用いたがん遺伝子パネル検査に焦点をあて、試料の準備から結果報告までの品質・精度の確保について検討し、今般、『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 1.0 版）』を発行いたしました。がんゲノム医療の臨床応用が加速度的に進む中、ゲノム医療における検体検査の品質確保の一助とすべく、まずは第 1.0 版を発行いたしましたが、今後各所からのご意見をもとにさらなる改定を進めていく予定でございます。

つきましては、広く皆様からのご意見を賜るべく、本件に関するご意見を下記の要領で募集いたします。なお、お寄せいただいたご意見に対する個別の回答はいたしかねますので、あらかじめ御了承願います。

記

1. ご意見募集期間
   - 2018 年 12 月 3 日（月）から 2018 年 12 月 28 日（金）まで
2. ご意見の募集対象
   - 『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 1.0 版）』
3. ご意見の提出方法
   - 以下のアドレスに E メールでご提出願います。
     - 宛先：臨床検査振興協議会　ゲノム検査に関する小委員会　宛て
     - メールアドレス：　jpclt@jpclt.org
4. ご意見の提出上の注意

   ご提出していただくご意見については、日本語でお願いいたします。

   また、個人の場合は住所・氏名等の連絡先を、法人の場合は法人名・法人の主たる事務所の所在地及び連絡先を記載してください。（ご意見の内容に不明な点があった場合等の連絡・確認のために使用します。）

   なお、ご提出いただいたご意見については、氏名及び住所その他の連絡先を除き、公表させていただくことがありますので、あらかじめ御了承ください。

以上

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 1.0 版）

臨床検査振興協議会

第 1.0 版作成日:2018 年 10 月 30 日

臨床検査振興協議会　医療政策委員会
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作成メンバー

委員長	前川　真人	（日本臨床検査医学会；浜松医科大学医学部臨床検査医学）
委員	安部　正義	（日本臨床検査薬協会；アークレイマーケティング（株））
	加藤　智行	（日本臨床衛生検査技師会）
	繁田　勝美	（日本臨床検査薬協会）
	滝野　寿	（日本臨床衛生検査技師会）
	田澤　裕光	（日本衛生検査所協会；（株）エスアールエル）（～平成 30 年 5 月 31 日）
	堤　正好	（日本衛生検査所協会；（株）エスアールエル）
	登　勉	（日本臨床検査専門医会；小山田記念温泉病院）
	東　俊一	（日本衛生検査所協会；（株）エスアールエル）（平成 30 年 6 月 1 日～）
	松井　啓隆	（日本臨床検査専門医会；熊本大学大学院生命科学研究部）
	松下　一之	（日本臨床検査医学会；千葉大学医学部附属病院検査部）
	横田　浩充	（日本臨床検査医学会；東邦大学理学部教育開発センター臨床検査課程）
オブザーバー	近藤　直人	（日本臨床検査薬協会；理研ジェネシス/シスメックス（株））
事務局	西田　美和	（日本臨床検査薬協会；ロシュ・ダイアグノスティックス（株））
	渡辺　玲子	（日本臨床検査薬協会；シスメックス（株））

目次

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
はじめに. 4
背景. 4
スコープ. 5
基本的原則. 6
1. 施設の整備と管理 6
2. 精度の確保 7
おわりに. 9

【品質基準と品質保証の具体例】 10
1. 検査の導入前の準備 10
2. 検査前プロセス(検体採取から核酸抽出まで) 11
3. 検査プロセス(ライブラリ調製からシークエンシングまで;wet-lab process) 12
4. 検査後プロセス(バイオインフォマティクスと結果報告;dry-lab process). 14
5. 内部精度管理(IQC). 15
6. 外部精度評価(EQA) 16
7. 試薬ロット、バージョンなどの変更時の確認 16
8. SF(secondary findings)所見への対応 17
9. 標準物質(Reference materials) 17
10. (補足) ISO 15189 と CLIA、CAP. 18
11. 引用文献. 19
12. その他、関連参考資料. 21
13. 別添資料. 22

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

はじめに

次世代シークエンサー（NGS）を用いたがん遺伝子パネル検査（以下、“パネル検査”とする）は、病理標本の準備、核酸抽出、ライブラリ調製、シークエンシング、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、それぞれが簡単ではなく複雑な検査である。特に、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異なった側面を有している。しかしながら、各プロセスでの品質・精度の確保が必要不可欠であることは疑いがない。そこで、患者の治療方針を決定するエキスパートパネルに、精確で品質・精度の確保されたパネル検査の結果を届けるための基本的考え方を述べる。

背景

遺伝子関連検査技術の進歩により、ゲノム情報が単一遺伝子疾患の診断やがん治療分野のコンパニオン診断検査の結果として実臨床に用いられるようになってきた。また、数多くの遺伝子変異を一度に包括的に検査するNGSを用いたパネル検査が実施され、患者ごとの有効な薬剤の選択等に用いられるようになってきた。技術の進歩に基づく臨床応用が拙速と思われるほどに進められてきたと言っても過言ではない。それに対して、臨床検査の品質・精度の確保の重要性も議論されてきた。

2016年10月にゲノム情報を用いた医療等の実用化推進タスクフォースがまとめた「ゲノム医療等の実現・発展のための具体的方策について（意見とりまとめ）」（以下、“TF意見とりまとめ”とする）[1)]では、特にゲノム医療等の質の確保について、「遺伝子関連検査の品質・精度を確保するためには、遺伝子関連検査に特化した日本版ベストプラクティス・ガイドライン等、諸外国と同様の水準を満たすことが必要であり、厚生労働省においては関係者の意見等を踏まえつつ、法令上の措置を含め具体的な方策等を検討・策定していく必要がある。」と意見の一致をみた。日本版ベストプラクティス・ガイドラインは、日本臨床検査標準協議会の遺伝子関連検査標準化委員会で策定されたものであり、遺伝子関連検査の精度保証のための検査の利用と実施における一般的原則とベストプラクティスがまとめられている[2, 3, 4)]。

前述のTF意見とりまとめを受けて、検体検査の品質・精度の確保が明確化された「医療法等の一部を改正する法律」（2017年6月14日公布、平成29年法律第57号）が公布され、2018年12月1日に施行されることになった。その後、「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）が公布され、その第9条の7の2および第9条の7の3に遺伝子関連・染色体検査の精度確保についての外部精度管理調査を含む精度保証に努める義務が明記されている。また、第9条の8および別表第1の3には、検体処理標準作業書を作成し、検体の保管期間・条件、返却および廃棄の基準、台帳への記入要領等を記載することが明示されている。これらの検体検査の管理や手順書に関することはISO 15189で示されている内容と一致する。

一方で、がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会が2017年3月に厚生労働省に設置され、同年6月に報告書が公表された[5)]。ここには、「既存治療薬の選択（コンパニオン診断）だけでなく、広く治療に係る医学的判断に資するパネル検査や、さらに広範囲なゲノム解析を行うことが想定される。」と記載されている。また、「ゲノム解析（ゲノム検査）の質確保は必要不可欠である。」との記載もある。その後、診療体制の整備が加速度的に進み、2018年2月にがんゲノム医療中核拠点病院11施設が指定され、それぞれの連携病院が3月末に指定

された[6]。また、2018 年 4 月から、国立がん研究センターでは、パネル検査システムを用いて行う「個別化医療に向けたマルチプレックス遺伝子パネル検査」が先進医療 B として承認され、運用が開始された。がんゲノム医療の推進にあたり、留意すべきことはゲノム検査の分析性能の評価と品質・精度の確保である。なぜならパネル検査による遺伝子異常プロファイリングの結果が治療方針策定に用いられるからである。一方、がんゲノム医療中核拠点病院とがんゲノム医療連携病院ではパネル検査が開始されるが、2017 年 12 月に通知された「がんゲノム医療中核拠点病院等の整備について」（平成 29 年 12 月 25 日局長通知、健発 1225 第 3 号）[7]においても、「外部機関による技術能力についての施設認定を受けた臨床検査室を有すること」との記載にとどまり、実質的な方法論に関する議論がない状況である。今後、パネル検査が保険適用により普及する際には、本検査の分析性能を担保し、精確な検査結果を報告し、適正な診療につなげることが重要である。このような状況を鑑み、日本臨床検査医学会遺伝子委員会は 2017 年 11 月に「ゲノム医療における検体検査の品質確保に関する提言（がんゲノム医療推進を踏まえて）」[8]を公表した。主旨は、医療としての遺伝子関連検査では、精確な検査結果を得るために分析的妥当性の確保が重要であり、それを医療関係者だけでなく、医療政策立案者と国民の理解が必要であるというもので、改めて注意喚起を行った。

この提言を受けて、パネル検査をどのように実施すればよいか、何に留意して行うのがよいか、前述したこれまでの議論によってまとめられた原則に従って、具体案を策定することとした。

スコープ

パネル検査は、がん細胞でどのような遺伝子異常があり、どのような治療が有効かを判定するために行われ、結果を元に専門家らで構成されるエキスパートパネルにより医学的な解釈を行い、患者に説明し治療に入る。得られた結果が正しくなければ、最適な治療につながらない。医療目的で施行する遺伝子関連検査であるため、改正医療法に則り、医師または臨床検査技師の責任者の管理の下、検査の品質・精度の確保を行った上で実施し、結果を返却する必要がある。従って、がんの病理組織を試料としたがんゲノム検査の体細胞遺伝子変異解析に焦点をあてて、試料の準備から結果報告までの品質・精度の確保の基本的考え方を示す。なお、この検査によって検出される遺伝性腫瘍などの生殖細胞系列変異、血液を試料としたリキッドバイオプシーについては、本稿では取り上げないこととする。

基本的原則として、「検体検査の精度管理等に関する検討会　とりまとめ」（平成 30 年 3 月 30 日、検体検査の精度管理等に関する検討会）[9]に基づき、医療法改正による検体検査の精度の確保および遺伝子関連検査の精度の確保に則り、パネル検査を最も的確に行うための方策を提言する。

さらに基本的原則を補うべく、品質基準と品質保証に関わる手順の具体例を以下の方針に従って記載する。パネル検査は、病原体核酸検査などの他の遺伝子関連検査と比較して大きく異なり、数多くのステップからなっているという特徴がある。各ステップでのチェックポイントもあるが、大きく3つのプロセス（検査前プロセス＝検体採取から核酸抽出、検査プロセス＝ライブラリ調製からシークエンシング、検査後プロセス＝バイオインフォマティクス解析から結果報告）で管理するのが望ましい。そこで、それらのプロセスを記載しつつ、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）、および検査前、検査、検査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）についての具体例を示し、基本的考え方として提示する。

基本的原則

パネル検査も診療のための遺伝子関連検査の一つであるので、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 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。

(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。また、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、ゲノム診療用病理組織検体取扱いについては日本病理学会と日本臨床衛生検査技師会による認定病理検査技師などが制度化されている。

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次世代シークエ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 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。

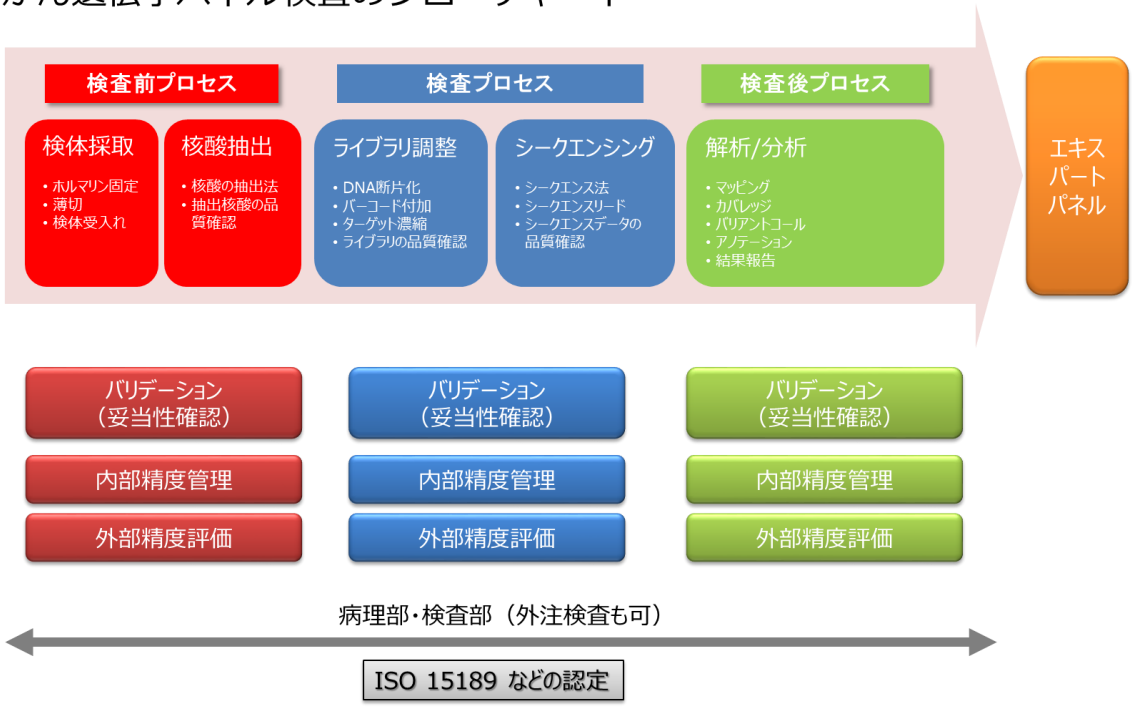
2. 精度の確保

臨床検査の品質・精度の確保のためには、ISO 15189:2012 の5章に記載されている技術的要件を満たすことが大切である。それには検査工程が検査前プロセス、検査プロセス、検査後プロセスの3つに分けて記載されている。パネル検査の品質・精度の確保においても妥当であり、3つのプロセスは以下のように考えて管理するのが適切である。

- 検査前プロセス: 病理検体の採取から核酸抽出までを言う。
- 検査プロセス: 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言う。
- 検査後プロセス: 検査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言う。

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り、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 標品などの市販品を利用すればよい。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。

おわりに

臨床応用を目的としたNGSによるシークエンシングは、今後も技術の進展に伴って進化を続けることが予測される。全エクソーム解析や全ゲノム解析の臨床応用もそれほど遠いことではないと考えられる。しかしながら、それぞれの技術を何らの保証や検証もせずに使用することは、誤った結論を導き、間違った治療につながる危険性を有している。精確な個別化がん診療を実現するためには、がん組織の正しいゲノムプロファイリングから始めることが重要であり、NGSを用いたがんゲノムプロファイリングの信頼性を高めるためには、多領域にまたがる専門家（診療科臨床医、病理医、臨床検査医、臨床検査技師、バイオインフォマティシャン、薬剤師、看護師、企業、専門家団体、政府機関）が一丸となって、各種情報を共有してアプローチすることが必須である。

【品質基準と品質保証の具体例】

基本的原則を満たすために行うべき、品質基準と品質保証に関わる手順の具体例を示す。

1. 検査の導入前の準備

1-1. パネル検査仕様の決定

① 解析対象の遺伝子リストと遺伝子変異の種類

- 解析対象とする遺伝子のリストと遺伝子変異検査項目（種類）を提示する。
  がんと関連する遺伝子変異検査項目には、一塩基置換（Single Nucleotide Variant, SNV）、挿入欠失(Insertion and deletion, Indel)、コピー数変異（Copy Number Alteration, CNA）、融合遺伝子（Fusion Gene）、構造変異（Structural Variant, SV）、マイクロサテライト不安定性（Microsatellite Instability, MSI）、腫瘍変異負荷（Tumor Mutation Burden, TMB）などがある。
- これらの遺伝子変異検査項目とその対象とする遺伝子リストを定義する。
- 技術的な理由等により解析対象遺伝子領域内で検出が難しい部位がある場合は、その領域も示す。

② 解析方法（アンプリコン法、キャプチャー法）、体外診断用医薬品のキット、医療機器（NGS および解析プログラム）の種類を決定する。

③ 検査対象とするがん種（例：非小細胞性肺がん、固形がん全般など）、検体種別（例：腫瘍部検体としてホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE）組織切片、対応する正常組織として血液など）を決定する。

④ 分析性能の評価

- それぞれの変異検査項目に関して、以下のような分析性能を評価する。各用語の定義については、『13. 別添資料（1）』を参照のこと。
  - 正確度または真度（accuracy）
  - 精度、再現性（precision； repeatability、reproducibility）
  - 分析感度（analytical sensitivity；limit of detection）
  - 分析特異度（analytical specificity）
  - 頑健性（robustness）
  - 報告範囲（reportable range）
  - 参照範囲（Reference range or reference interval (normal values)）
- 品質基準を設定するにあたっては、基準値を決める元となったデータを示す必要がある。ただし、体外診断用医薬品、医療機器からなるシステム（DNA シークエンサー、テンプレート DNA 調製試薬、解析プログラムから構成される）を購入して分析性能の評価を行う場合は、この限りでは無い。診断システムの仕様書の基準値を採用しないで、より厳しい基準値を設定する場合は、その根拠となるデータを示す。

1-2. 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 を参考に必要な SOP を作成する（詳細は、『13. 別添資料（2）』を参照のこと）。

パネル検査に特有の事項を以下に示す。

- 測定標準作業書
  - 検査仕様に則した解析対象遺伝子、変異の種類(SNV, Indel, CNA, TMB, MSI、Fusion 等)、変異ごとの検出限界を明記する。
  - 解析対象遺伝子領域内で検出が難しい領域がある場合はそのリストを提示する。
  - プロセス毎の品質基準を明示し、基準を逸脱した場合の対応についても記載する。
- 精度管理標準作業書
  - プロセス毎の内部精度管理、外部精度評価について記載する。
- 分析性能評価標準手順書
  - 試薬ロットの変更、がん遺伝子パネル及び解析プログラムのバージョンなどの変更時の検証項目についても記載する。その場合は、変更内容・程度に即して規定しておくことが必要となる。

1-3. 据付時適格性確認（IQ）

実際に使用する場所に設置した状態で、装置の仕様が適正か、装置が正常に作動するか、安全機能も含めて確認する。検査に使用するすべての装置の据付時適格性確認と教育訓練を完了する。

求められる書類の例：

- 据付時適格性確認報告書
- 要員への機器操作教育訓練とその記録

1-4. 稼働性能適格性確認（OQ）

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種々の試験を通して確認する。

求められる書類の例：

- 稼働性能適格性確認報告書

2. 検査前プロセス（検体採取から核酸抽出まで）

2-1. 試料の準備

パネル検査に使用する腫瘍組織については、第三者認定を受けた病理検査室が、「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」[10]（日本病理学会）に則って準備した FFPE 検体を使用する。

腫瘍組織においては、腫瘍率、切片の厚さ、組織の大きさと必要な枚数、H&E 染色スライドの作成要否など、（正常細胞とのペア検査の場合）血液検体を得るための採血量と採血管（抗凝固剤）の種類を規定する。また、検体採取の時期および部位の情報は、がん細胞の遺伝子変異（体細胞変異）結果に影響するため、臨床上重要である。臨床検体（組織を含む）が初回治療時、治療後のどの時期に採取されたか、また、再発・転移部から採取されたかを記録に残すことを規定する。その他、注意事項も必要に応じて付記する。

例:

- 腫瘍組織としては、腫瘍率 20%以上の FFPE 切片、厚さ 5 μm、大きさは 5 mm × 5 mm の組織スライドを 10 枚以上。HE 染色済みスライドを 1 枚作製する。
- 腫瘍率が 20%に満たない場合は、マクロダイセクションによって腫瘍率を上げるよう努力する。この際、リンパ球浸潤が強いと、腫瘍率が期待値よりも少なくなるため、注意して判定する。
- 固定不良による核酸の品質劣化を極力回避するため、組織の切除・採取後速やかに固定液に浸漬し固定を実施するのが望ましい。(シトシン(C)のデアミネーションによる遺伝子増幅時の C から T へのトランジションを避けるために、ホルマリン固定、長時間の保管に注意する。特に、DNA 量が少ない場合に影響を受けやすい。)
- 正常組織とのペアで検査する場合、EDTA-2K 採血管で全血 2 ml を採取する。

2-2. 核酸の抽出

FFPE 切片、血液からの核酸(DNA、RNA)の抽出・精製法(核酸抽出・精製試薬(キット名を表記))、品質確認を行う方法を規定する。抽出した核酸(DNA、RNA)の品質基準を設定し、この基準を満たすことを確認し、次工程であるライブラリ調製に進む。品質基準を満たさなかった場合、SOP に定めた方法で対応する。

2-3. 抽出核酸の品質基準

抽出した核酸の量および品質について基準を定める。ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 [10]に記載の指標を参考にする。なお、抽出核酸の定量は、蛍光測定法(Qubit、Picogreen 法など)で行い、核酸の品質(主に断片化の程度を評価)は、ΔCt 値(ΔΔCq)、DIN 値、Q-value、DV200 で評価する。

品質基準の例:

腫瘍組織	量	品質
DNA	200 ng 以上	ΔΔCq　2 以下
RNA	500 ng 以上	DV200 値　30%以上

2-4. その他の注意事項

- 抽出した核酸を直ぐに分析に供しない場合、DNA は冷蔵または冷凍、RNA は-80℃以下で保存する。
- 増幅前の核酸は、コンタミネーションを避けるため、遺伝子増幅産物とは別の場所に保管する。
- 抽出核酸の収量が限られているので、品質管理のために使い切ってしまうことのないよう、実際に採取可能な総量とそれぞれのステップで使用可能な量についても考慮すること。

3. 検査プロセス(ライブラリ調製からシークエンシングまで;wet-lab process)

3-1. ライブラリ調製とシークエンス解析

DNA の断片化、アダプターライゲーションとバーコード付加(ライブラリ調製)、ターゲット濃縮などによる解析用ライブラリ調製およびシークエンスリードを生成するまでの方法を規定する。注意事項も付記する。

例:

- コンタミネーションを防ぐために、アダプターライゲーションおよびバーコード(インデックス)付加までの作業と PCR 増幅前後の作業は別の場所で行う。
- 使用するシークエンス試薬の特性を理解し、結果として得られる偽陽性、偽陰性に対応する。

3-2. ライブラリの品質基準

ライブラリ調製後、適切な品質チェックを行い、シークエンス解析に進んで良いかどうかを判断する。
予め指標を設定する。指標として、DNA 量、フラグメントサイズを用いる。

品質指標の例:

	DNA 量	フラグメントサイズ 断片のピーク長
ライブラリ調製後	500 ng 以上	250-400 bp
濃縮後(解析用ライブラリ)	2 nM 以上	300-450 bp

3-3. シークエンスデータの品質基準

NGS 解析から得られるデジタルデータである FASTQ ファイル情報を解析することは dry-lab process ではあるが、wet-lab process が適正に行われたかの品質・精度を確保するための根拠である。従って、以下の項目を参考に予め基準値を設定し、wet-lab process がその基準を満たしているかどうかを確認する。

なお、NGS は迅速に効率よく広範囲の DNA 配列を読むのに便利であるが、その正確性は、リード長、ヒトゲノム参照配列へのシークエンスリードのマッピング率などによって影響され、特に単調で同一の塩基の繰り返しや GC 含量の多い配列では読み落としや読み間違いが起きやすいことを認識しておくべきである。研究レベルでは許容されるレベルであっても、患者の診断・治療に直結するクリニカルシークエンスでは、十二分にその正確性と再現性を担保し、以下の品質指標に関して妥当性を確認しておくべきである。また、これらの品質指標は内部精度管理にも利用することができる。それぞれの説明は『13. 別添資料(4)』を参照されたい。

- Depth of coverage (カバレッジ(標的領域)のデプス(読み取り深度)
- Uniformity of coverage (カバレッジ(標的領域)の均一性・網羅性)
- GC bias (GC バイアス)
- Transition/transversion ratio (Ti/Tv 比)
- Base call quality scores (ベースコール品質スコア)
- Mapping quality (マッピングの品質)
- Duplicate read success rate and removal of duplicate reads (重複リードの割合と除去)
- First base read success (リードの1塩基目の成功率)
- Decline in signal intensity(シグナルインテンシティの減衰)
- Strand bias(DNA 鎖間のバイアス)

シークエンスランの品質指標と基準値の例

品質指標	基準値	
クラスタ密度	170 – 230 x 10^3/mm^2	
クラスタパスフィルター	85%以上	
リードパスフィルター	95%以上	
Q30	80％以上	
	（がん組織）	（正常細胞）
総リード数	40,000,000	20,000,000
ユニークリード数	20,000,000	10,000,000
ユニークリード率	50％	50％
平均深度（中央値）	600 x	400 x
オンターゲット率	25％	25％
100x 以上で読まれている領域の割合	95%	95%

4. 検査後プロセス（バイオインフォマティクスと結果報告；dry-lab process）

4-1. 解析法

シークエンスリードをヒトゲノム参照配列にマッピングし、バリアントコール、アノテーション後、結果を報告する。

4-2. 品質基準

wet-lab process の最後の部分が dry-lab process の始まりになるため、3-3 のシークエンスデータの品質基準と同様に重要である。

バイオインフォマティクス・パイプラインによる解析時に必須の品質指標は Depth of coverage（標的領域の読み取り深度）、Uniformity of coverage （標的領域の均一性・網羅性）、ベースコール品質スコアなどである。さらに、GC バイアス、マッピング品質（非標的領域にマップしたリードの割合、重複したリードの割合）もシークエンス反応の性能やバイオインフォマティクス解析をモニターするのに使用される。これらの品質指標の意味は、『13. 別添資料（4）分析性能を評価するための指標の例』を参照されたい。

クリニカルシークエンスは、バイオインフォマティクス・パイプラインが適正な品質を有しているかどうかを確認した上で行う。その際のベストプラクティスと CAP および Association of Molecular Pathology で合意された推奨事項が 17 個あるので、『13. 別添資料（3）』として掲載する。

4-3. 検査の結果報告

NGS 解析が適正に行われ、バイオインフォマティクス解析に適合する VCF ファイルが作成されている場合、引き続いて行われるエキスパートパネルでの決定の際に判断しやすく、かつ十分な情報を含む結果報告書を作成することが望ましい。以下に報告書の内容を例示する。

① 患者の匿名化番号、性・年齢、臨床情報、依頼医師名
② 検体種別（FFPE、新鮮凍結検体など）
③ 検体採取の時期（初発時か再発時か）・部位（原発・転移）
④ 病理診断名
⑤ 病理検体番号
⑥ 検体中の腫瘍細胞の割合（%）
⑦ DNA の量と質
⑧ 受付日、報告日
⑨ パネル検査の方法（パネル名、アンプリコン法かキャプチャー法か、使用した参照配列など）
⑩ NGS 解析の QC（カバレッジのデプス・均一性、ベースコール品質スコア、マッピングの品質、重複率など）
⑪ 遺伝子変異の種類、臨床的意義[注2)]（病的変異、VUS） データベースの種類およびそのバージョン
⑫ 生殖細胞系列遺伝子変異（二次的所見（SF）の有無）
⑬ 遺伝子変異の詳細情報（分子機能、疾患との関連、薬剤感受性、参考資料）

（注2） パネル検査で検出された遺伝子変異の意義については、日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会合同の次世代シークエンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイダンス[11)]を参考にする。エビデンスレベルが別表として掲載されている。併記されている米国3学会合同ガイダンス[12)]も参考にする。

4-4. データの保存と管理

バイオインフォマティクス・パイプラインは、OS、ソフトウェア、パイプライン全体が変更された時にデータを再確認できるのがよい。しかしながら、バイオインフォマティクス・パイプラインには多数のファイルが存在するため、全てを保存するのは現実的でない。従って、College of American Pathologists (CAP) NGS ワークグループは、重要なファイルとして FASTQ, BAM, VCF の保存を推奨している。

保存期間は、例えば、診療録と同じ5年間保存するなど、自施設の規則に従って行う。

5. 内部精度管理（IQC）

常に分析が正しく行われていることを確認するため、品質指標をモニターする必要がある。シークエンス解析では定性的な結果が多いが、定量的なデータも多く得られる。QC 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るべきである。内部精度管理の例を以下に示す。

- 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、シークエ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、シークエンスデー

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。

しかしながら、パネル検査は検査費用が高価なこともあり、経済的な理由から、毎回陽性対照、陰性対照を測定することは困難なことも想定される。従って、マッチドペア解析を行う場合は、正常検体の解析結果が予め設定した品質基準を満たしていることで陽性対照の代替とすることも検討の余地がある。また、人工的に構築した検体（合成核酸）の他、ハウスキーピング遺伝子の内在性配列を利用するなど、適切な指標を工夫・設定すればよい。

NGS シークエンシングのバリデーションおよび内部精度管理を行う上で、分析性能を評価するための指標の例を『13. 別添資料（4）』に示す。

6. 外部精度評価（EQA）

外部精度評価としては、外部精度管理調査/技能試験（PT）、もしくはそれに代替する方法（施設間チェック、ブラインド試験など）を年に2回行うのが望ましいが、国内での PT 実施体制の整備は今後の課題である。CAP サーベイでは 28 遺伝子からなる SNV と Indel 変異を含んだ NGS 検査の調査が行われているが高価である（約 30 万円／年間 1 回）。国内での PT 施行が望まれる。

代替方法による PT、すなわち施設間チェック、ブラインド試験（ブラインドでの再測定）を行う場合、核酸抽出法、シークエンスケミストリ、遺伝子パネル、バイオインフォマティクス・パイプラインが異なった複数施設との間で行うのがよい。それは、方法間で利点・欠点があり、検出可能・不可能な遺伝子異常が異なるからである。もし、同じ方法でのみ行うと、検出できない遺伝子異常に気づかない危険性がある。

PT 用のサンプルとしては、理想的には遺伝子変異を有する患者 DNA が望ましいが、現実的には困難であるため、市販の標準物質（ヒト細胞株由来の DNA、合成 DNA、編集した DNA）や電子データ（FASTQ、BAM ファイル）を利用する。標準物質(核酸)を使用した場合には、wet-lab process のシークエンス以降の PT が行われ、電子データを用いた場合には dry-lab process のバイオインフォマティクス・パイプラインの PT が行われることになる。

7. 試薬ロット、バージョンなどの変更時の確認

試薬ロットの切り替えやがん遺伝子パネルおよび解析プログラムのバージョンなどの変更があった場合、どの程度の確認作業を行うのかを予め決めておく。

- 試薬ロットの切り替え
  検査室で再バリデーション（1. 検査の導入前の準備　1－1. 検査仕様の決定　④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、2. 検査前プロセス、3. 検査プロセス、4. 検査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。

- 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（1. 検査の導入前の準備　1－1. 検査仕様の決定　④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。

- 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（1．検査の導入前の準備　1－1．検査仕様の決定　④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。

8.　SF（secondary findings）所見への対応

生殖細胞系列遺伝子変異が疑われる場合は、「ゲノム医療における情報伝達プロセスに関する提言―がん遺伝子パネル検査と生殖細胞系列全ゲノム/全エクソーム解析について―【初版】」[13)]を参照して遺伝カウンセリングを行うなど適切に対応する。

同提言では、開示すべきSF所見が疑われる場合の検査精度についても言及しており、生殖細胞系列変異が疑われた場合には、正常血液細胞などでの確認、場合によっては他の方法で再検をした上で、報告するのが望ましいと記載されている。生殖細胞系列遺伝子変異を患者に返す場合には、遺伝子関連検査の検査精度を慎重に判断することが重要である。

9.　標準物質（Reference materials）

バリデーション、内部精度管理、外部精度評価に使用可能な標準物質には以下のようなものがある。

- 国内で入手可能な標準物質：

(1)　Horizon
Genome In A Bottle コンソーシアムによる全ゲノム標準サンプル（FFPE フォーマットで提供）。
https://www.horizondiscovery.com/reference-standards/q-seq-hdx/genome-in-a-bottle
https://www.rikengenesis.jp/product_db/category01/item_2

- 海外で入手可能な標準物質：

(1)　NIST
Genome In A Bottle コンソーシアムが作製したコントロール
https://www-s.nist.gov/srmors/detail.cfm?searchstring=genome

(2)　SeraCare
Seraseq™NGS Reference Materials (RUO)　NGS コントロール
https://www.seracare.com/products/controls-and-reference-materials/ngs-reference-materials-ruo/

(3)　AcroMetrix
AcroMetrix Quality Control
http://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/product-brand/acrometrix.html

その他、購入可能な参照物質供給メーカーリスト

- Commercial Sources of Reference Materials (alphabetical order)
  https://www.amp.org/resources/validation-resources/
- Advanced Biotechnologies
- Asuragen
- Diagnostic Hybrids
- Invivoscribe
- LGC Standards
- Maine Molecular Quality Controls
- Molecular Controls
- QIAGEN Marseille (formerly Ipsogen)
- Qnostics
- Vircell Microbiologists
- Zeptometrix

10. （補足） ISO 15189 と CLIA、CAP

CLIA は米国の臨床検査室の品質保証基準(法律)であり、米国においてはヒト検体を使用する全ての臨床検査室がCLIA に適合し登録・認証されることが求められている。わが国における臨床検査室（病理検査を含む）の外部・内部評価基準としてはISO 15189 を用いているため、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。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。

11. 引用文献

1) ゲノム情報を用いた医療等の実用化推進タスクフォース,「ゲノム医療等の実現・発展のための具体的方策について(意見とりまとめ)」(2016 年 10 月 19 日)
https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10601000-Daijinkanboukouseikagakuka-Kouseikagakuka/0000140440.pdf (アクセス日:2018/08/27)

2) 日本臨床検査標準協議会(JCCLS),「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」(平成 28 年 3 月)

3) 日本臨床検査標準協議会(JCCLS),「遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル」(平成 23 年 12 月)

4) 日本臨床検査標準協議会(JCCLS),「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」(平成 29 年 10 月)

5) がんゲノム医療推進コンソーシアム懇談会,「報告書 ～国民参加型がんゲノム医療の構築に向けて～」(平成 29 年 6 月 27 日)
https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10901000-Kenkoukyoku-Soumuka/0000169236.pdf (アクセス日:2018/08/27)

6) がんゲノム医療中核拠点病院・がんゲノム医療連携病院の一覧表(平成 30 年 4 月 1 日現在)
https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000199651.pdf (アクセス日:2018/08/27)

7) がんゲノム医療中核拠点病院等の整備について(平成 29 年 12 月 25 日、健発 1225 第 3 号)
https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000190014.pdf (アクセス日:2018/08/27)

8) 日本臨床検査医学会,「ゲノム医療における検体検査の品質確保に関する提言(がんゲノム医療推進を踏まえて)」(2017 年 11 月)
https://www.jslm.org/committees/gene/gene20171121.pdf (アクセス日:2018/08/27)

9) 検体検査の精度管理等に関する検討会,「検査の精度管理等に関する検討会 とりまとめ」(平成 30 年 3 月)
https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-10801000-Iseikyoku-Soumuka/0000200534.pdf (アクセス日:2018/08/27)

10) 日本病理学会,「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」(平成 30 年 3 月 1 日)
http://pathology.or.jp/genome_med/(アクセス日:2018/10/30)

11) 日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会合同,「次世代シークエンサー等を用いた遺伝子パネル検査に基づくがん診療ガイダンス(第 1.0 版)」(2017 年 10 月 11 日)
https://www.jsmo.or.jp/about/doc/20171011_01.pdf (アクセス日:2018/08/27)

別表1　エビデンス分類　http://www.jsmo.or.jp/about/doc/20171011_02.pdf （アクセス日：2018/08/27）

12) Li MM, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. J Mol Diagn 19: 4-23, 2017

13) 「ゲノム医療における情報伝達プロセスに関する提言 ―がん遺伝子パネル検査と生殖細胞系列全ゲノム/全エクソーム解析について―【初版】」（2018 年 3 月 21 日）：AMED ゲノム創薬基盤推進研究事業, ゲノム情報研究の医療への実利用を促進する研究（ゲノム創薬研究の推進に係る課題解決に関する研究 ） A-②：ゲノム情報患者還元課題「医療現場でのゲノム情報の適切な開示のための体制整備に関する研究」
https://www.amed.go.jp/content/000031253.pdf （アクセス日：2018/08/27）

14) Roy S, et al. Standards and guidelines for validating next-generation sequencing bioinformatics pipelines. A joint recommendation of the Association for Molecular Pathology and the College of American Pathologists. J Mol Diagn 20: 4-27, 2018

15) Gargis AS, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. Nat Biotechnol 30: 1033-1036, 2012

16) Jennings LJ, et al. Guidelines for validation of next-generation sequencing – based oncology panels. A joint consensus recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. J Mol Diagn 19: 341-365, 2017.

12. その他、関連参考資料

A) NY 州保健局のガイドライン

- Oncology – Molecular and Cellular Tumor Markers "Next Generation" Sequencing (NGS) guidelines for somatic genetic variant detection
  https://www.wadsworth.org/sites/default/files/WebDoc/Updated%20NextGen%20Seq%20ONCO_Guidelines_032016.pdf（アクセス日：2018/08/29）

B) FDA Guidance

- Use of Public Human Genetic Variant Databases to Support Clinical Validity for Genetic and Genomic-Based *In Vitro* Diagnostics (Document issued on April 13, 2018)
  https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm509837.pdf （アクセス日：2018/08/28）
- Considerations for Design, Development, and Analytical Validation of Next Generation Sequencing (NGS) – Based In Vitro Diagnostics (IVDs) Intended to Aid in the Diagnosis of Suspected Germline Diseases (Document issued on April 13, 2018)
  https://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM509838.pdf（アクセス日：2018/08/28）

C) NGS onco-panels authorized by FDA（2018/4/12 現在）

- FoundationOne CDx, which was approved in November 2017, and can detect genetic mutations in 324 genes
  https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf17/P170019B.pdf （アクセス日：2018/08/28）
- MSK-IMPACT, also approved in November 2017, which can detect genetic mutations in 468 genes
  https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/DEN170058.pdf （アクセス日：2018/08/28）
- Oncomine Dx Target Test, approved in June 2017, which can detect genetic mutations in 23 genes
  https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/P160045B.pdf （アクセス日：2018/08/28）

D) Kurnit KC, et al. Precision Oncology Decision Support: Current Approaches and Strategies for the Future. Clin Cancer Res 24(12): 2719-2731, 2018

E) Lih C-J, et al. Analytical Validation of the Next-Generation Sequencing Assay for a Nationwide Signal-Finding Clinical Trial. Molecular Analysis for Therapy Choice Clinical Trial., J Mol Diagn 19: 313-327, 2017

F) Gargis AS, et al. Assuring the Quality of Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology and Public Health Laboratories. J Clin Microbiol 54: 2857-2865, 2016

G) Richards S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology., Genet in Med 17: 405-424, 2015

H) Kim J, et al. Good Laboratory Standards for Clinical Next-Generation Sequencing Cancer Panel Tests., J Pathol Transl Med 51(3):191-204, 2017

I) Aziz N, et al. College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests. Arch Pathol Lab Med 139(4): 481-493, 2015

13. 別添資料

別添資料（1）：分析性能の評価（バリデーション；validation）[15, 16)]

（文献 15 の Supplementary Table 1. CLIA regulatory standards and workgroup definitions for the validation and ongoing quality control of Sanger sequencing and NGS を改変）

1) Accuracy （正確度または真度）

定義等	参照配列において、被検アッセイと比較対照アッセイ間 の一致程度の指標 標準物質（参照配列）は、① 限定された疾患関連の変異を含むもの ②疾患関連ではないが同様のタイプの変異セット（SNVs、Indels など）の2タイプがある。
特記事項	• 正確度（accuracy）として、PPA（positive percentage agreement）と PPV（positive predictive value）を使用することができる。 ただし、対照法および評価に用いる変異セット（変異の種類、領域の長さ、genome context など）の選定方法は、今後も議論が必要である。 例） 異なる変異率を含む試料の場合は、最低 20 回（核酸抽出に始まる全行程を 20 回）測定する。変異率の幅ごとに計算する。例えば 5～10%、10～20%の幅に入る変異をまとめて、精度を求める。変異率がほぼ均一な試料の場合、変異率の異なる試料(例えば、検出限界付近、検出限界の 2 倍、検出限界の 5 倍)を調製する。各試料最低 20 検体(同上)測定して、変異率毎に計算する。 • カバレッジ：正確度は、シークエンスカバレッジやシークエンスされる領域内の特定の位置でのベースコールの回数に依存するので、指標設定の際には注意が必要である。 • 品質スコア：プラットフォーム固有のアルゴリズム（たとえば Phred-like quality score など）により計算される品質スコアは、プラットフォーム間で比較できないので注意が必要である。

2) Precision （精度、再現性）

定義等	繰り返し測定して、どの程度同じ結果が得られるかの指標
特記事項	Repeatability (within-run precision) 併行精度: 検査室、検査者、装置、試薬などの分析条件を変えずに、同じ検体を短時間内に繰り返し分析する時（併行条件）の精度 Reproducibility (between-run precision) 再現精度: 測定の原理・方法、測定者、測定装置、使用条件、場所、時間などを変えて測定を行った場合の精度（同じ配列結果が得られる程度）のこと。同一検査室での再現性を室内再現性（intermediate precision）、異なる検査室間での精度を室間再現性（reproducibility）という。被検体はラボ間で共有されることも可能。 例） N=3 で変異の種類ごとに再現性を求める。変異率または変異率の幅毎に再現性を求めることも考慮する。可能であれば、後述する頑健性試験の下限、上限での再現性も別途計算する。 注） 核酸配列を確認するためには、同じ DNA を解析するが、経費がかかる。代替として、標的領域のカバレッジの分布測定値などの他の関連指標を用いることも評価する上で有用である。

3) Analytical sensitivity（分析感度）

定義等	変異の検出感度（limit of detection (LOD)による性能確認）
特記事項	確認方法: カバレッジ、遺伝子変異の種類や配列によって変わる。標的領域におけるカバレッジ閾値で評価すべき。 例）各変異に検出限界付近の変異率を持った変異を 5 回測定して、5 回とも陽性であることを確認する。

4) Analytical specificity（分析特異度）、エラー率

定義等	偽陽性がないことの確認（存在しない配列変異を検出しない確率）
特記事項	カバレッジ、遺伝子変異の種類や配列によって変わる。フルワークフローで、閾値（許容範囲）となるカバレッジで確認。 例） 配列が良く研究されているヒトゲノム標準試料(例えば Genome In a Bottle)を 3 人以上解析して、その検査固有のエラー率(100 - 特異度)を求める。エラー率は 2%以下であることが望ましい。 特異度（%） = [真陰性/(真陰性 + 偽陽性)] * 100

5) Robustness（頑健性）

定義等	分析法のパラメータに変動があっても、その影響を受けないでいられる分析手順の能力の尺度による確認
特記事項	例） 検査の仕様に記載されている核酸量の下限、中間、上限量から検査を開始して、真度、感度、特異度、再現性に対する核酸量の影響を調べる。可能であれば、核酸の分解度(断片化後のフラグメント長)の異なる試料を人工的に調製する。同様に分解度と各種試験性能に及ぼす影響を確認する。

6) Reportable range（報告範囲）

定義等	検査室は、測定において品質・精度の指標が許容範囲内であった場合、測定結果（ゲノム領域）として報告することができる。
特記事項	検査する領域を決定し、分析困難な領域を特定する。例えば、反復領域、Indel、アレル脱落（allele drop-outs）など。方法論による違いを明らかにしておく。（キャプチャー法なのか、濃縮法なのかを特定しておくこと。） 例）ターゲット領域濃縮方法、PCR 法とハイブリダイゼーション法により分析困難な領域が異なる場合がある。

7) Reference range or reference interval (normal values)（参照範囲）

定義等	NGS で得られる結果の reference range（本文書では参照範囲と訳す）は、分析対象とする集団で見られる遺伝的多様性の範囲を意味する。
特記事項	１人１人の遺伝子配列は一卵性双生児以外では異なっており、一塩基多型や欠失・挿入、繰り返し配列、構造変異など種々の遺伝子配列の違いがある。これらは、頻度の違いによって遺伝子多型や遺伝子変異と呼ばれるが、それらの存在を踏まえた上での遺伝子配列のゆらぎの範囲と言える。 特定の病気を有する患者を除いた一般集団で普通に見られる配列（すなわち参照範囲である）とは違った配列が検出された場合、それが被験者の一般集団でどれくらいの頻度で存在するか、健常人や各種疾患のデータベースと比較して判断されることになるため、遺伝子配列の多様性についてのデータベースは非常に貴重である。

別添資料（2）：「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）
別表第 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	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	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	（略）
血清分離標準作業書	（略）
外部委託標準作業書	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	（略）
測定標準作業書	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　測定に当たつての注意事項 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	一　精度管理に用いる試料及び物質の入手方法 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	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
検体依頼情報・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

備考

一　血清分離のみを行う者にあつては、検体受付及び仕分標準作業書、測定標準作業書、精度管理標準作業書、検体処理標準作業書、検査依頼情報・検査結果報告情報標準作業書並びに教育研修・技能評価標準作業書を作成することを要しない。

二　血清分離のみを行う者にあつては、血清分離標準作業書の記載すべき事項として検査結果報告台帳の記入要領を求める。

三　血清分離を行わない者にあつては、血清分離標準作業書を作成することを要しない

別添資料（3）：NGS バイオインフォマティクス・パイプラインの妥当性確認のためのコンセンサス推奨見解

（Roy らの文献、Table 2 Consensus Recommendation Statements for NGS Bioinformatics Pipeline Validation より引用改変 [14]）

① 使用するバイオインフォマティクス・パイプラインのバリデーションを遂行する。それにより、そのバイオインフォマティクス・パイプラインの性能と欠点、限界を理解しておく。例えば、配列既知の標準物質を使用して行う。

② バリデーションの際には、NGS 解析に熟練した専門家（遺伝子検査室責任者など）の監督下で行う。

③ バリデーションは、そのバイオインフォマティクス・パイプラインのデザイン、開発、適合化、熟知が終了してから行う。

④ バリデーションは、実際にラボで行う環境下で実施する。

⑤ バリデーションは分析に使用されるバイオインフォマティクス・パイプラインの全ての要素について行い、各要素は責任監督者の校閲、承認を受ける。

⑥ デザインと実施には、患者個人情報の保護を確実に行う。

⑦ バリデーションは、活用する目的（症例、試料、標的遺伝子、バリアント種類など）に適ったものでなければならない。

⑧ 検査室はバイオインフォマティクス・パイプラインのデザイン、実施、妥当性確認が、適合する検査室認定標準や規定に従ったものであることを保証しなければならない。

⑨ バイオインフォマティクス・パイプラインは分析法の一部であり、その要素とプロセスは検査室認定標準や規定に従って作成、記録されていること。

⑩ 検体の識別は、バイオインフォマティクス・パイプラインの各ステップを通して保護されなければならない。すなわち、検体取り違いなどはあってはならない。

⑪ 精度管理と品質保証のパラメータが、妥当性確認を通して評価され、満足できる性能と証するために使用されなければならない。

⑫ シークエンスデータのフィルタリングや加工は妥当性が確認されたものを使用し、的確に文書化し記録しておく必要がある。

⑬ バイオインフォマティクス・パイプラインによって生成された各データファイルは、ネットワークによる転送や移動によってデータの安全性が脅かされてはならない。すなわち、ゲノム情報の漏洩やファイルの破損などが生じてはならない。安全性を担保し、適切にデータの健全性を保証する必要がある。

⑭ インシリコバリデーションをバイオインフォマティクス・パイプラインのバリデーションのために使用しても良い。ただし、ヒト試料を用いたバリデーションに置き換えるものではない。基本的には各種サンプルの FASTQ ファイルを用いて技能試験を行う。

⑮ バイオインフォマティクス・パイプラインのバリデーションは、高品質で臨床的にも保証された代表的なバリアントセットを確認して行う。なお、その際、異なった方法で生成されたリファレンスデータを使用することが望ましい。なぜなら、似通った方法で得られたデータセットは、往々にして同じ間違いを生じているからである。バリアントの種類による適切なバリデーションの品質基準は報告されるべきである。

⑯ 臨床検査室はソフトウェア生成 HGVS バリアントの命名(http://varnomen.hgvs.org/)とアノテーションの正確性を保証し、それがマニュアルでレビューされたり修正されたりする必要がある時には的確に行い、正しい結果を返却しなければならない。

⑰ バイオインフォマティクス・パイプラインの要素のいずれかに顕著な変更がなされた時には必ず補足的なバリデーションが必要である。

別添資料（4）： 分析性能を評価するための指標の例 [15, 16]

（文献 15 の supplementary Guidelines / Table 2: Metrics needed to evaluate analytical performance of NGS sequencing run: considerations for validation and ongoing quality control より引用改変）

品質指標	バリデーション	QC
カバレッジ（標的領域）のデプス（読み取り深度） [Depth of coverage]	標準アッセイコンディションの特定の標的領域のデプスの特徴を確認しておくこと。適切なデプスを定義することは、興味のある領域の適切な sensitivity と specificity を定義するために必要である。	デプスの閾値が検証範囲外であった場合は、その領域は他の手法（たとえばサンガーシークエンシング）で分析されるか追加評価が必要とされる。
カバレッジ（標的領域）の均一性・網羅性 [Uniformity of coverage]	信頼できるシークエンシング結果を生むために、標的領域のデプスの網羅性を確立する必要がある。	カバレッジ（標的領域）の均一性・網羅性をモニター、バリデーションし、確立された値と比較する必要がある。
GC バイアス [GC bias]	GC バイアスはシークエンシング反応の効率に影響をあたえ、標的領域のカバレッジの網羅性に影響を与える。アッセイにおけるゲノム全領域の GC バイアスの量を検証段階で決定しておく必要がある。	テストパフォーマンスにおける変化を同定するために、GC バイアスをランごとにモニターすべきである。
Transition/ transversion ratio (Ti/Tv 比)	transitions to transversions（Ti/Tv）比を、公開されている値と比較する必要がある。	テストパフォーマンスにおける変化を同定するために、（Ti/Tv）比をランごとにモニターすべきである。
ベースコール品質スコア [Base call quality scores]	バリデーションで許容できる塩基コールクオリティスコアの閾値を設定する必要がある。また、設定されたクオリティスコアより低い塩基コールをもつリードを排除するようなフィルタープログラムを用意する必要がある。（Q スコア 10 の場合、その塩基が間違いである確率が 10%、（Q スコア 20 の場合 1%、（Q スコア 30 の場合は 0.1%） ロングリードをシークエンシングする技術では、大きな Indel を同定する場合、配列の長さと塩基レベルの正確性は重要でないことから、アライメントにおいてより低い塩基のクオリティでも許容できる。	1リードにおけるクオリティスコアと S/N 比のクオリティを計測して、ランごとに S/N 比のクオリティをモニターする必要がある。 機器間のクオリティ値をお互い比較することはできない。

マッピングの品質 [Mapping Quality]	マッピング・クオリティはリードがゲノム上の位置に適切にマップされるか、という不確実性を示す指標である。 バリデーションでは、テストにおいて特定の標的領域のみにマップされるリードだけを解析すべきである。 非標的領域にマップされるリード及び、重複配列を除くようなフィルタープログラムを用意する必要がある。	標的領域にマップしないリードの割合をランごとにモニターする。リードが参照配列にマッチしない時、適正に分析されていないと考えられるため、それらのリードは除外されるべきである。 キャプチャー法等のエンリッチメントステップを含む方法では、マッピング品質が悪いのは、非特異的な増幅、標的DNAでないもののキャプチャー、コンタミネーションの結果かもしれない。
重複リードの割合と除去 [Duplicate read success] Removal of duplicate reads	クローナル・アンプリコンの結果に由来する重複リード（最も高いクオリティ値をもったリードを除いて、のこり全ての）をアライメントの過程で除去するフィルタープログラムを用意する必要がある。	アレルの偏りを防ぐために、モニターされるべきである。
リードの1塩基目の成功率（一部の機種にのみ適応可能） [First base read success - only applicable for limited platforms]	いくつかの機種ではアッセイ中の初期における配列リードの評価が可能で、クオリティスコアや、決められたクオリティフィルタをパスしたリード数を決めることができる。アッセイバリデーションで、定められたクオリティフィルタをパスしたリード数を定める必要がある。	シークエンシング工程の早い段階で確立したクオリティフィルタに合格したクオリティスコアとリード数を評価することで、コンタミネーションのモニター、適切なサンプルローディングの確認、ランが成功するだろうことを判断できる。 規定された品質パラメータを満たさなかった時はランを停止させることができる。
シグナルインテンシティの減衰 [Decline in signal intensity]	アッセイバリデーションで、正常パフォーマンス範囲とシグナル強度の想定される減衰を確定するために、予想されるシグナル強度を評価すべきである。（リード長にわたるシグナル強度は機種依存である。）	ランごとにシグナル強度の減衰をモニターすべきである。シグナルインテンシティの突然の減少または上昇はシーケンシングケミストリーにおけるエラーを示している。
DNA 鎖間のバイアス [Strand bias]	DNA 鎖間のバイアスは、フォワード鎖とリバース鎖から得られる情報が異なる時に生じる。どれくらいのバイアスであれば、結果に問題が生じないかを確認する。	全てのサンプルで鎖間のバイアスをモニターするべきである。