

別添資料(1):リアルタイムPCRにおける外部精度評価の参考資料 (検索キーワード: external quality assessment, external quality assessment scheme, EQA, Proficiency Testing, PT, real time PCR, reverse transcription quantitative PCR, CAP, 外部精度評価, 外部精度管理, リアルタイムPCR)

| No. | 論文   | 論文の概要  | EQAの概要   | EQAで提供された試料   | EQA参加施設  | EQAに含まれる分析工程とその測定方法  | EQAで求められた品質指標   | EQAの結果  |
|-----|--|--|--|---|--|--|---|---|
| 1   | Ramsden SC, Daly S, Geilenkeuser WJ, et al. <b>EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR.</b> Clin Chem. 2006;52(8):1584-1591. doi:10.1373/clinchem.2005.066019   | このEQAスキームは、リアルタイムPCRにおける技術面での標準化のための要求事項とそのニーズが記載されている。このプロジェクトで開発された試薬デザインと統計ツールは、EQA標準化のためのベンチマークとすることができる。                    | EQUAL project(EU)が実施したTaqMan real-time PCRのEQAプログラム。EQUALより検査室に試薬、サンプルを送付し、 <b>Ct値を比較</b> する   | ・ABL遺伝子プライマー及びTaqManプライマー<br>・検量線用ABL標準プラスミド(copy数の異なる5検体)<br>・テストDNA検体(copy数の異なる3検体: T1, T2, T3)<br>・テスト細胞株検体(2検体: C1, C2)<br>・詳細な作業手順書  | EUを中心に、計103施設が参加                                       | 分析前: RNA抽出<br>分析中: TaqMan real-time PCR<br>分析後: Ct値からcopy数を算出  | ・検量線<br>・T1, T2, T3のABL copy数<br>・C1, C2のABL copy数<br>※T1, T2, T3検体の真値はEQUALの測定値<br>※C1, C2の真値はEQUALの測定値  | ・テストDNA検体 (T1, T2, T3) について、93検査室中、74検査室が正確な推定値を測定し、品質指標をパスした。<br>・解析の実施を任意としたテスト細胞株検体 (C1, C2) については、75検査室中、48検査室が95%信頼区間内の測定値であった。  |
| 2   | Fu Y, Zhang R, Wu Q, Zhang J, Bao L, Li J. <b>External quality assessment of p210 BCR-ABL1 transcript quantification by RT-qPCR: Findings and recommendations.</b> Int J Lab Hematol. 2019;41(1):46-54. doi:10.1111/ijlh.12919                           | 中国初のEQAにおいて、偽陽性や偽陰性など、p210 BCR-ABL1検出に関する様々な問題点が発見された。これらの問題を解決することにより、p210 BCR-ABL1の検出性能を向上させ、中国における検査室診断能力を強固なものにすることができる。     | 中国初のp210 BCR-ABL1検査のEQAスキーム。NCCLからRNAサンプルを送付し、71施設の <b>コピー数を比較</b> する  | ・患者検体のcDNAからプラスミドにクローニングされたBCR-ABL1およびBCR, GUSB, B2M, ABL1を大腸菌で発現させたRNA<br>・armored RNA<br>・凍結乾燥品<br>・%BCR-ABL1 ratios 10.0% (Level 1(L1)), 1.0%-10.0% (L2), 0.1%-1.0% (L3), 0.01%-0.1% (L4), <0.01% (L5)を配布。一部重複を含め、10サンプルを配布。 | 中国の71施設<br>・病院の臨床検査室66施設<br>・商業検査センター3施設<br>・試薬メーカー2施設 | 分析前: RNA抽出<br>・TRIzol, Spin columns<br>分析中: real-time PCR<br>・市販のキット, LDT<br>分析後: Ct値及びcopy数の算出  | ・統計解析には、SPSS 17.0/GraphPadPrism 5.0を使用したp210-BCR-ABL1/CGガウス分布は、コルモゴロフ=スミルノフ検定による正規性について検定した。<br>・実験グループ間の差は、対応のあるt検定と一元配置分散分析にかけた<br>・ピアソン相関分析でp210%BCR-ABL1/CG比の高低調査をした  | ・参加66施設のうち、p210のBCR-ABL1測定結果の変動係数 (CV%)は、60.0% から 100.0% の範囲で大きなばらつきが認められた。<br>・24 の国際スケール (IS) 検査室では、結果の CV% が 82.4% から 61.6% に減少した。<br>・また、偽陰性および偽陽性の結果が今回の EQA で認められた。   |
| 3   | Haselmann V, Ahmad-Nejad P, Geilenkeuser WJ, et al. <b>Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA).</b> Clin Chem Lab Med. 2018;56(2):220-228. doi:10.1515/ccim-2017-0283 | このパイロットEQAスキームにより、検体量、cfDNA定量法、ジェンタイプング・プラットフォームの選択において最もばらつきが大きくなり、臨床的影響が大きいことが明らかになった。品質保証のために、手順とワークフローの調和を図ることが急務であることが示された。 | RfB (Reference Institute for Bioanalytics)およびEMQN(European Molecular Genetic Quality Network)が実施した <b>循環腫瘍細胞DNAを対象としたEQA</b> スキーム。EU圏42施設にDNAサンプルを配布し、 <b>BRAF, KRASの既知/リアントの検出性能を比較</b> する。測定方法は、 <b>リアルタイムPCR、キャピラリーシーケンシング、パイロシーケンシング、NGS</b> など。 | ・腫瘍細胞株から分離・断片化されたgDNAをスパイクインした2mL human K3 EDTA plasma (CE certified material, in.vent DIAGNOSTICA GmbH).<br>・KRASおよびBRAFの9つの既知/リアント。MAF 0-10%の3サンプルを配布   | EU圏37施設が参加(EU圏42施設にサンプル送付)                             | 分析前<br>・保管: 試料の保管期間と条件、資料受領から精製までの期間と条件、血漿1mLあたりのcfDNA分離量の平均値とCV値と作業時間と溶出量<br>・cfDNA抽出法: RSC ccf Plasma Kit (Promega), Maxwell_Circulating NA (Promega), Chemagic Viral (Chemagen), QiaSymphony Circulating DNA Kit (Qiagen), EeasyMAG (BioMerieux), QIAamp circulating nucleic acid (Qiagen), RealLine Extraction (BIORON Diagnostics), NucleoSpin Plasma XS (Machery Nagel), MagMax cell-free DNA Isolation (ThermoFisher), QIAamp DNA blood Mini (Qiagen), PME free-circulating DNA Extraction (Analytik Jena), Cobas cfDNA Sample Preparation (Roche), Quick-cfDNA Serum and Plasma (ZymoResearch)<br>・cfDNA抽出QC: Qubit, Quantifluor, Nanodrop, PicoGreen, qPCR, Agarose gel<br>分析中<br>・各種測定法: dPCR, real-time PCR, NGS, Sangar sequencing, Pyrosequencing, other<br>分析後<br>・リアントの同定 | ・保管: 期間<br>・RNA抽出: cfDNA濃度<br>・リアント同定: genotyping<br>※標準検体のDNA濃度は、LINE1-79bp-qPCR assayによる実測値により決定。<br>※標準検体のBRAF V600EのMAFはBEAMing (digital droplet PCR)と allele-specific amplification-PCRによる実測値により決定。<br>※標準検体のKRASコドン12/13の一般的な変異のMAFは、cold-PCRと pyrosequencingによる実測値により決定。 | ・検体が送られた42施設のうち、72.3%の施設が、cfDNAを用手法で分離、62.5%の施設は、血漿全量でcfDNA分離に使用、38.5%の施設で遺伝子型判定のために抽出されたcfDNAを10%以上使用することが明らかとなった。<br>・核設定量に使用された方法のうち、PicoGreenは最も低い変動係数 (33.7%) を示した。<br>・ジェンタイプングでは、11種類の手法が報告され、最もエラー率が高かったのはサンガーシーケンシング法で、最も低かったのはデジタルPCRのような高感度の方法であった。合計で197の遺伝子型が決定され、全体のエラー率は6.09%であった。                 |
| 4   | 日本臨床検査自動化学会 遺伝子・プロテオミクス技術委員会 第5回 Major BCR-ABL1 mRNA 定量の外部精度管理   |  | 国内における <b>Major BCR-ABL1, minor BCR-ABL1, PML-RARA, WT1のmRNA定量の外部精度管理</b> プログラム。   | ・Major BCR-ABL1 mRNA 定量: 5 バイアル<br>・Minor BCR-ABL1 mRNA 定量: 1 バイアル<br>・PML-RARA (bcr1) mRNA 定量: 5 バイアル<br>・WT1 mRNA 定量: 2 バイアル<br>※2x10^6個の細胞/バイアル<br>※凍結乾燥品  |  | 分析前<br>・RNA抽出: Isogen(ニッポンジーン社) 1ml、または、Buffer RLT(溶解液)(QIAGEN 社) 350μlをバイアルに加え、指定のプロトコルでRNA抽出する<br>分析中<br>・real-time PCR<br>分析後<br>・実測値、報告値の算出  | ・RNA抽出: RNA濃度、A260/A280比<br>・real-time PCR: ターゲットmRNAの実測値 (定量値)、報告値 (補正值)   |   |
| 5   | CAP国際臨床検査成績評価プログラム微小残存病変 (MRD,MRD1,MRD2)   |  | <b>CAP</b> サーベイプログラム。 <b>BCR-ABL1またはPML-RARA融合転写物の測定</b> により白血病の腫瘍組織量をモニタリングかつ診断している施設向けのサーベイ。   | BCR-ABL1 p190, BCR-ABL1 p210, PML-RARAについて、滅菌水に入ったRNA試料3本が送付される   |  | 施設指定の手順にて実施  |   |   |
| 6   | Normanno N, Fenizia F, Castiglione F, et al. <b>External quality assessment for EGFR mutations in Italy: improvements in performances over the time. ESMO Open.</b> 2017;2(2):e000160. Published 2017 May 26. doi:10.1136/esmoopen-2017-000160           | このEQAスキームで得られた結果は、EGFR検査をする検査室において、診断方法の改善、ガイドラインや教育プログラムの更新、最適な治療法を特定するための高品質なバイオマーカー検査を患者に提供するのに役立つと思われる。                      | イタリアの臨床腫瘍学会と病理学会がFFPEサンプルを配布し、 <b>非小細胞肺癌EGFRのリアントの同定結果を調査したEQA</b> スキーム。測定方法は、 <b>リアルタイムPCR、サンガーシーケンシング、パイロシーケンシング</b> など。   | ・非小細胞肺癌検体<br>・腫瘍含有量50%以上のFFPE<br>・10μmのスライドを10サンプルずつ配布  | ・2011年: 47施設<br>・2013年: 86施設<br>・2015年: 92施設           | 分析後<br>・EGFRのジェンタイプング: サンガーシーケンシング、パイロシーケンシング、リアルタイムPCR、MassArray, Therascreen EGFR RGQキット、NGS<br>※2011年には、エクソン18-21のダイレクトシーケンシング、エクソン19欠失のフラグメント解析、p.L858R検出のための対立遺伝子識別ベースのリアルタイムアプローチ、Therascreen EGFR RGQキットがサンプル解析に使用された。また、2013年には、使用した材料の妥当性をさらに確認するために、次世代シーケンサー (NGS) を追加的な確認方法として導入   | 配布試料中のEGFR遺伝子のエクソン18、19、20、21変異の存在可能性を検査し、出荷日から3週間以内に結果を提出すること  | ・ダイレクトシーケンシングの使用は2011年の78.7%から2015年にはわずか14.1%に減少したが、パイロシーケンシングとリアルタイムPCRの使用は逆に増加した。<br>・ダイレクトシーケンシングを使用した施設が不合格となった数は、単一のスキームを分析した場合と3つのEQAを組み合わせた場合の両方で、他の方法を使用して不合格となった数よりも有意に高かった。<br>・2011年と2013年には、参加施設の約29%がプログラムの第1段階で不合格となったのに対し、2015年には13%の施設が不合格となり、より高感度で堅牢な手法への切り替えにより、優良施設の割合を増加させることが可能であることが示唆された。 |