

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
遺伝関連検査に関する小委員会

1. はじめに

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)が重要である。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¹⁾。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²⁾。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。

2. 検査法のバリデーション

バリデーションで確認すべきこととして以下のものがあげられる³⁻⁵⁾。これらについて目的の性能を満たすかどうかを確認した上で、その検査・測定法を導入する。

- 分析精確度(analytical accuracy)
- 分析精度(analytical precision)
- 報告範囲(reportable range)
- 分析感度(analytical sensitivity; 検出限界; limit of detection (LOD), lower detection limit)
- 分析特異度(analytical specificity)
- その他、分析性能に関わる因子

3. 内部精度管理(IQC)

IQCは、施設内で当該の検査結果が、ばらつきが少なく行われているか、許容範囲内(管理限界内)に収まっているかを確認して管理することである。すなわち「精密さ」を主に確認する作業である。具体的に

は、同じ管理試料(市販の精度管理用物質、患者検体から調製した試料など)を測定して管理する。管理限界を外れた場合は、原因を究明し、改善することが重要である。

4. 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⁶⁾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⁷⁾。

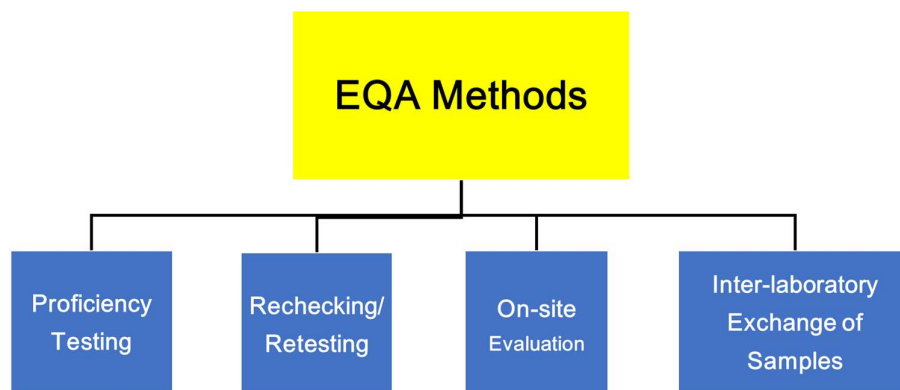


図1. 外部精度管理調査(EQA)の4つの方法

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^{7,8)}。

- 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) 国内の技能試験

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⁹⁾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。

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。

5. 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¹⁰⁾。そのチームには、EQA に習熟した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 (真値とする) を得ることが重要である。なお、結果の評価前に、評価規準^{注)}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¹⁾。

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¹⁾、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、判断などの規準となるよりどころ、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。

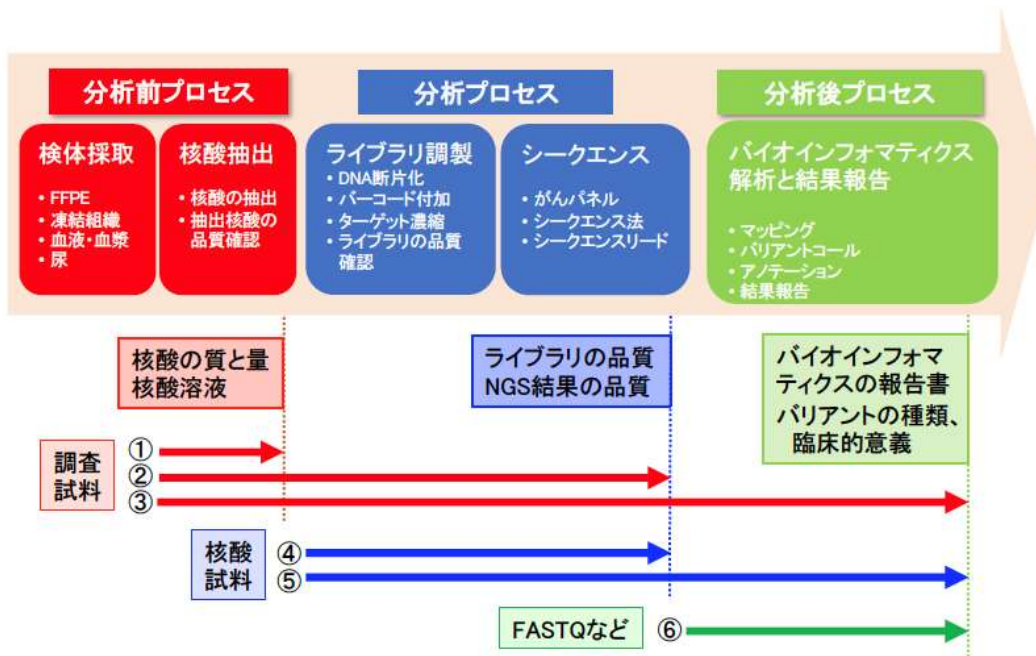


図2. NGS 検査のフローチャートと EQA スキーム (がん遺伝子パネル検査を例として)

- 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: Δ 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、クラスタ密度、クラスタパスフィルタ、リードパスフィルタ、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

6. おわりに

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提供機関を整備して、適切にEQAまで行う制度を構築することが重要である。それによってこそ、精確な検査結果を元に最適な診療を行うことができる。

参考資料

- 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
- 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.
<https://www.jpclt.org/news/detail/20220314093506/>
- 3) Gargis AS, et al. Assuring the quality of next-generation sequencing in clinical laboratory practice. Nat Biotechnol 30: 1033-1036, 2012
- 4) 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.
- 5) College of American Pathologists. All Common Checklist, CAP Accreditation Program.
<https://rankinbiomed.com/wp-content/uploads/CAP-All-Common-Checklist-06042020-1.pdf>
- 6) 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>
- 7) WHO. Overview of External Quality Assessment (EQA).
<https://www.who.int/publications/m/item/overview-of-external-quality-assessment-eqa>
- 8) 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>.
- 9) CAPサーベイ. <https://www.cgikk.com/cgicapsurvey.html>
- 10) 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
- 11) Badrick T, et al. Differences between educational and regulatory external quality assurance/proficiency testing schemes. Clin Chem 68: 1238-1244, 2022.

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. EQUAL-quant: an international external quality assessment scheme for real-time PCR. 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、 Ct値を比較 する	・ABL遺伝子プライマー及びTaqManプライマー ・検量線用ABL標準プラスミド(copy数の異なる5検体) ・テストDNA検体(copy数の異なる3検体: T1, T2, T3) ・テスト細胞株検体(2検体: C1, C2) ・詳細な作業手順書	EUを中心、計103施設が参加	分析前: RNA抽出 分析中: TaqMan real-time PCR 分析後: Ct値からcopy数を算出	・検量線 ・T1, T2, T3のABL copy数 ・C1, C2のABL copy数 ※T1, T2, T3検体の真値はEQUALの測定値 ※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。 ・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. External quality assessment of p210 BCR-ABL1 transcript quantification by RT-qPCR: Findings and recommendations. 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 コピー数を比較 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 ・armored RNA ・凍結乾燥品 ・%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 ・病院の臨床検査室66施設 ・商業検査センター3施設 ・試薬メーカー2施設	分析前: RNA抽出 ・TRIzol, Spin columns 分析中: real-time PCR ・市販のキット, LDT 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。 ・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。 ・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。 ・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。 ・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. Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA). 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 循環腫瘍細胞DNAを対象としたEQA スキーム。EU圏42施設にDNAサンプルを配布し、 BRAF, KRASの既知/リアントの検出性能を比較 する。測定方法は、 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 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). ・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 ・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 ・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) ・cfDNA抽出QC: Qubit, Quantifluor, Nanodrop, PicoGreen, qPCR, Agarose gel 分析中 ・各種測定法: dPCR, real-time PCR, NGS, Sangar sequencing, Pyrosequencing, other 分析後 ・リアントの同定	・保管: 期間 ・RNA抽出: cfDNA濃度 ・リアント同定: genotyping ※標準検体のDNA濃度は、LINE1-79bp-qPCR assayによる実測値により決定。 ※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。 ※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。 ・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。 ・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 Major BCR-ABL1, minor BCR-ABL1, PML-RARA, WT1のmRNA定量の外部精度管理 プログラム。	・Major BCR-ABL1 mRNA 定量: 5 バイアル ・Minor BCR-ABL1 mRNA 定量: 1 バイアル ・PML-RARA (bcr1) mRNA 定量: 5 バイアル ・WT1 mRNA 定量: 2 バイアル ※2x10^6個の細胞/バイアル ※凍結乾燥品		分析前 ・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 分析中 ・real-time PCR 分析後 ・実測値、報告値の算出	・RNA抽出: RNA濃度、A260/A280比 ・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)		CAPサーベイ プログラム。 BCR-ABL1またはPML-RARA融合転写物の測定 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. External quality assessment for EGFR mutations in Italy: improvements in performances over the time. ESMO Open. 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、 非小細胞肺癌EGFRのリアントの同定結果を調査したEQA スキーム。測定方法は、 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 など。	・非小細胞肺癌検体 ・腫瘍含有量50%以上のFFPE ・10μmのスライドを10サンプルずつ配布	・2011年: 47施設 ・2013年: 86施設 ・2015年: 92施設	分析後 ・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 ※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。 ・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。 ・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。

別添資料 (2) : NGSにおける外部精度評価の参考資料 (検索キーワード : external quality assurance, external quality assessment, external quality assessment scheme, EQA, proficiency testing, PT, quality control, next generation sequencing, NGS, circulating tumour DNA, ctDNA)

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	Verderio P, Ciniselli CM, Gaignaux A, et al. External Quality Assurance programs for processing methods provide evidence on impact of preanalytical variables N Biotechnol. 2022;72:29-37. doi:10.1016/j.nbt.2022.08.006	過去10年間にわたって実施した生物試料のプロセッシング方法についてのEQAIは、分析前プロセスの影響および異なるプロセッシング方法 (キット含む) の比較性能に対して、独自の証拠に基づく洞察を提供するとともに、検査室がプロセッシング方法の妥当性を確認することを支援する。	核酸抽出や末梢血単核細胞 (PBMC) の分離・凍結保存などの処理方法の性能 を6年間10種類のスキームを各施設 (施設数不明、数としては約1000件) で評価し、これまでの散発的なEQAIの結論と概ね一致することを確認した。	・全血DNA : PAXgene Blood DNA チューブ1本 ・全血RNA : PAXgene Blood RNA チューブ1本 ・全血cfDNA : モノナクレオソームが混入された安定化血液のPAXgene Blood ccfDNAチューブ1本 ・FFPE : 厚さ10µmのFFPE切片2枚 ・凍結組織 : 10 - 20mgのcryoExtract コア1個 ・saliva : Omnigene, Oral tube ・stool : 安定化便の Omnigene, Gut tube ・PMBC	過去10年間、約1000件分のデータを解析	分析前 ・自動化またはマニュアルでの抽出 ・シリカメンブレンまたは磁気ビーズ	各EQAスキームにおいて、参加者から提供された分類された前処理データおよび生産された検体の関連する品質属性 (スコア) の集中測定に基づいて実施 ・核酸抽出方法と使用キット ・溶出/バッファー ・酵素の使用 ・保存温度 ・遠心分離条件 ・分析前の重要な要因が様々な種類の検体の定量的または定性的属性に与える影響 ・時系列での検査室/パフォーマンスパターンを評価	・いくつかの例外を除き、これまでの散発的なEQAI実施による結論と概ね一致。 ・FFPE DNAについては、以前はシリカカラムベースの抽出法が磁気ビーズベースの抽出法よりも高い%dsDNAを示したが、後者は前者よりも高いPCR増幅率を示した。
2	Kirchner M, Glade J, Lehmann U, et al. NTRK testing: First results of the QuiP-EQA scheme and a comprehensive map of NTRK fusion variants and their diagnostic coverage by targeted RNA-based NGS assays. Genes Chromosomes Cancer. 2020;59(8):445-453. doi:10.1002/gcc.22853	QuiP-EQAスキームの最初のNTRK検査においてFISH及びNGSとも高い成功率でルーチンの診断が確立できることを示した。	FISHおよびRNA/DNAベースの targeted NGS (tNGS) のNTRK融合遺伝子検出への適合性 を欧州27施設で評価し、事前にチェックした答えと比較してFISHおよびtNGSベースのNTRK検査がルーチン診断環境において十分に確立できることを実証した。	・FISH : 厚さ0.5µmのFFPE ・NGS:厚さ5µmのFFPE4枚 (ローインプット) と6枚 (ハイインプット) 、およびHESスライド1枚	ドイツ (24) 、オーストリア (1) 、スイス (2) 合計27施設 ※FISH (9施設) 、NGS (18施設) NGSでは高と低インプットに分けた	分析前 ・抽出 分析中 ・ライブラリー作製: Multiplex PCRベースのアッセイ(17)、Hybrid Captureベース(1) ・シーケンシング: Illumina(8)、Thermo Fisher Scientific(10) 分析後 ・解析	・検出された変異を事前にとったデータと比較 ・NTRK 検出の経験を持つ 8 つの病理学研究所のエキスパートパネルが、標準的 RNA ベースの NGS と FISH により、異なる腫瘍タイプの NTRK 融合遺伝子 14 例と NTRK 融合陰性 10 例の内部パネル試験を事前に実施 ・陰性検体6検体、陽性検体4検体を配布	・NGSに基づく解析の感度は92.2% (65/70) , 特異度は100% (105/105) であった。 ・研究室間テストで得られたRNAベースの tNGS解析の感度は95.3% (62/65) , 特異度は100% (100/100)
3	Haselmann V, Ahmad-Nejad P, Geilenkeuser WJ, et al. Results of the first external quality assessment scheme (EQA) for isolation and analysis of circulating tumour DNA (ctDNA). Clin Chem Lab Med. 2018;56(2):220-228. doi:10.1515/ccim-2017-0283	今回のEQAでは、検体量、cfDNA定量法、ジェノタイププラットフォームの選択などに基づき多くの臨床的影響が大きかった。品質保証のために手順とワークフローの調和が必要。	ctDNAの臨床検査診断における分析品質の問題を解決 することを目的に 欧州10か国36施設から遺伝子判定のEQAを実施し、検体量、定量法、ジェノタイプのプラットフォームの選択によりばらつきや臨床的影響が出るのがわかった。	KRASコドン12/13およびBRAF V600Eの9つの既知の配列変異を分析するために、変異アレルの頻度が0%から10%の範囲で断片化したゲノムDNAを添加した2mLのEDTA-血漿3検体	欧州10か国42施設に送付され、37施設が参加。うち35施設が抽出手順を詳しく報告し、36施設が遺伝子型判定結果を提出 ※ドイツ (12) 、ベルギー (5) 、オーストリア (4) 、フランス (4) 、他	分析前 ・抽出: 自動または手動抽出で数種類のキットを使用 分析中 ・ライブラリー作製 ・シーケンシング 分析後 ・解析	・抽出を実施したタイミング、保存方法 ・抽出キットと使用血漿量 ・QC方法 ・核酸量 (添加量との比較) ・解析方法の比較 (NGSやサンガーなど) ・標準検体のDNA濃度は、LINE1-79bp-qPCR assayによる実測値により決定 ・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。 ・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。	・このEQAスキームは、cfDNAの処理と解析の複数の段階における現在のばらつきを示しており、その結果、全体のエラー率は6.09%であった。最もばらつきが大きく、臨床的影響が大きいのは、検体量、cfDNA定量法、ジェノタイププラットフォームの選択などであった。品質保証に関しては、手順とワークフローの調和が急務である。 ・NGSにおいては、マイナーアレル頻度 (MAF) 0.01%の同定に必要な分析感度を達成するためには、少なくとも2mL血漿から分離したcfDNAの全量を下流分析に使用する必要がある。 ・NanoDrop による分光光度法の標準偏差が大きいため、PicoGreenと標的遺伝子に応じたqPCR (35) が定量に最も適していることが判明。
4	Zhong Q, Wagner U, Kurt H, et al. Multi-laboratory proficiency testing of clinical cancer genomic profiling by next-generation sequencing. Pathol Res Pract. 2018;214(7):957-963. doi:10.1016/j.prp.2018.05.020	NGSに基づく検査、特に検査結果が臨床的診断に影響を与える場合に、その基準を確立することが重要であり、その基準を推測するために複数の異なるラボからのデータセットを系統的に解析する必要がある。	臨床的NGSの標準化の確立 のため、研究室間の比較を欧州15施設で評価し、異なる手法で検出された変異結果は、研究室間で非常に高い一致を示すことを確認した。	8つの肺がんおよび8つの大腸がんのFFPEから抽出されたDNA	ヨーロッパの15の分子診断研究所 ※スイスから11、ドイツから2、オーストリアから2	分析前 ・抽出 分析中 ・ライブラリー作製: アンプリコンまたはキャプチャー法 ・シーケンシング: Illumina又はThermo Fisher Scientific 分析後 ・解析	・各参加者のバリアントコールフォーマット (VCF) ファイルのバリアントを、University Hospital Zurich (USZ) のそれと比較 ・サンガーによる検証 ・インフォマティクスパイプラインの検証 ・統計解析: 318チップ上でAmpliSeq Library Kit 2.0, Ion PGM Template OT2 200 Kit, Ion PGM Sequencing 200 Kit v2. データはIon Reporter (IR) ソフトウェアにより、Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (CHP2) およびIon AmpliSeq Colon and Lung Cancer Research Panel v2 (CLP2) の標準ワークフローのデフォルト設定で標的Amplicon領域で処理	・異なるNGSサイトによって検出された変異の結果は、非常に高い研究室間の一致を示した。 ・欧州の15の研究室でPTを実施し、標準的アンプリコンシーケンシングの堅牢性、再現性、精度を裏付けること、固形がんの詳細な分子特性を高い診断感度で評価できるようになった。
5	Maekawa M, Taniguchi T, Nishio K, et al. Precision cancer genome testing needs proficiency testing involving all stakeholders. Sci Rep. 2022;12(1):1494. Published 2022 Jan 27. doi:10.1038/s41598-022-05589-x	今回の患者検体を用いた技能試験のバリッド研究により、参加施設のがんゲノム検査の現状を垣間見ることができ、現地におけるPTの実施は情報共有の場として貴重であった。さらなるがんゲノム検査の充実を図るためには、現地でPTの実施や、関係者が主催者・参加者として参加することが重要である。	検査施設で普及している次世代シーケンサー (NGS) プラットフォームやがんゲノム検査の品質を調査 するため、15施設で患者検体を用いたバリッドPTを実施し、一部を除いて病原性のバリッド検出に成功した。	浜松医科大学病院診断病理学部より入手した肺がん、大腸がん患者5名のFFPE組織と、末梢血から得られた正常試料	15施設 (12の病院臨床検査室と3の登録臨床検査室)	分析中 ・ライブラリー作製: ハイブリッドキャプチャーベース法(5)、アンプリコンベース法(10) ・腫瘍組織 (T) と正常血球 (N) におけるマッチドペアアンプリコン解析(7)、腫瘍組織のみ(8) 分析後 ・解析プラットフォーム: 遺伝子パネル (対象遺伝子、エクソンまたはホットスポットのみ) ・バイオインフォマティクス: 解析パイプライン、報告可能範囲などは各研究所によって異なる。	・同定したバリアント結果	・参加した研究室のほとんどが、密接に位置する2つのKRAS変異とEGFRの25bp欠損挿入変異を除いて、病原性バリアントの同定に成功した。逆に、EGFR L858R変異体の同定には成功し、その対立遺伝子頻度はすべての研究室で同様であった。
6	Deveson IW, Gong B, Lai K, et al. Evaluating the analytical validity of circulating tumor DNA sequencing assays for precision oncology. Nat Biotechnol. 2021;39(9):1115-1128. doi:10.1038/s41587-021-00857-z	ctDNAアッセイの標準化された技能試験のための独自の標準物質と注釈のセットおよび分析的枠組みを確立し、SEQC2 Oncopanel Sequencing Working Groupは、そのような将来の研究のための基盤作りを貢献した。	ctDNAアッセイの分析性能 を、マルチサイト、クロスプラットフォーム12施設で評価し、高い感度、精度、再現性で変異を検出した。	人工的なワイルド型DNAサンプル	米国・英国・中国・オーストラリアの12の検査室	分析中 ・ライブラリー作製: ハイブリッドキャプチャーベース法、アンプリコンベース法 ・シーケンシング: Illumina又はThermo Fisher Scientific 分析後 ・情報解析: インフォマティクスの部分は特に規定せず、ベンダーごとの内部パイプラインを使用	・カバレッジ深度と不均一性 ・感度 ・正確性 ・アッセイごとの再現性 ・インプットctDNA量と血漿からの抽出の影響 ・アンプリコン法とハイブリッドキャプチャー法の比較 ※合成コントロールDNAの配列は、予め商業ベンダー (Thermo Fisher Scientific, GeneArt) により合成され、検証された。	参加したすべてのアッセイで、約0.5%のVAFを超える変異が高い感度、精度、再現性で検出された。
7	Jones W, Gong B, Novorodovskaya N, et al. A verified genomic reference sample for assessing performance of cancer panels detecting small variants of low allele frequency. Genome Biol. 2021;22(1):111. Published 2021 Apr 16. doi:10.1186/s13059-021-02316-z	10種類のがん細胞株から作成した新しいリファレンスサンプルとその混合物は、小規模から大規模のオンコパネルの品質管理、分析精度、およびリキッドバイオアッセイのバリッドを行うための優れた機能を備えている。	オンコパネルの解析性能を適切に評価 するために、既知のポジティブおよびネガティブな (バリアント) コーディングボジションを適切に数で有する参照サンプルを開発し、6施設で評価し、オンコパネルの品質管理、分析精度、およびリキッドバイオアッセイのバリッドを行うための優れた機能を備えていることを確認した。	10種類のがん細胞株をプールしたもの、Agilent OneSeq Human Reference DNA (PN 5190-8848) 、これらの2種類を割合を変えて混合したもの	テキサス大学サウスウェスタン医療センター、Novogene, Agilent, Thermo Fisher Scientific, コーネル大学、国立心臓血液研究所 ・WES1、2: テキサス大学サウスウェスタン医療センター、Novogene ・WES3: Novogene, Agilent ・WES4: Thermo Fisher Scientific ・WGS1: コーネル大学、国立心臓血液研究所	分析前 ・抽出 分析中 ・ライブラリー作製: 4種類のWESと1種類のWGS (アンプリコンまたはキャプチャー法) ・シーケンシング: Illumina又はThermo Fisher Scientific 分析後 ・解析: GATK Haplotype, FreeBayes, Mutect1 and Mutect2, Platypus, Samtools, Sentione TNScope, VarDict, VarScan, SomaticSeqなどの変種判定方法を異なる配列戦略 (bwa-mem, bwa, bowtie2, etc) の組み合わせ	・ddPCRとの比較	個々の細胞株およびサンプル A の ddPCR と WES コンセンサス VAF 推定値を比較すると、異なるクラスからのバリアントの100%が陽性として検証され、99.65% が一致した。ddPCR解析の結果、WESの結果にはわずかなリファレンスバイアスが検出された。このバイアスは、サンプルAで測定されたバリアントのタイプランゲージの中央部で最も大きく、一般にSNVよりもindelが大きくなった。
8	Gutowska-Ding MW, Deans ZC, Roos C, et al. One byte at a time: evidencing the quality of clinical service next-generation sequencing for germline and somatic variants. Eur J Hum Genet. 2020;28(2):202-212. doi:10.1038/s41431-019-0515-1	3回のEQA結果から、臨床診断施設の高品質のNGSサービスを提供し、バリアントコーリングの能力が向上していることが示されたが、EQAの提供が直面する課題はまた複数ある。	生殖細胞変異と体細胞変異を検査する臨床診断施設の現在の要件から将来の要件まで拡張できるように設計された、NGS用のプラットフォームおよび遺伝子学的に依存しない独自のEQAスキームの開発について説明。 3回のEQA結果から、臨床診断施設はますます高品質のNGSサービスを提供し、バリアントコーリングの能力が向上していることが示された。	生殖細胞系スキーム: 塩析法で抽出したリンパ球系細胞株 (Coriell Cell Repositories, Camden, New Jersey, USA; 2015-cell line NA00536; 2016-cell line NA06926; 2017-cell line NA21070) からゲノムDNA (g.DNA) 10 µg. 体細胞系スキーム: Horizon Discovery Plc, Cambridge, UKが製造した体細胞変異体を含む遺伝子操作細胞株、または患者由来材料から得られた同一の基準細胞株。2015年には、FFPE細胞株製品 (3種類の細胞株/バックグラウンド-SW48、RKO、HCT116) におけるバリアントのマルチプラットフォームを含むHD200) から抽出したDNA 5µg。 2016年には、体細胞変異を有する細胞株 (Horizon Discovery Plc, 細胞株 HD301-KRAS Gene-Specific Multiplex Reference Standard) を含む10µm FFPE切片が、マッチした正常対照の10µm FFPE切片 (Horizon Discovery Plc, 細胞株 HD320-PI3KCA Wild Type Reference Standard) と共に提供。2017年には、乳房腫瘍FFPE切片から抽出した150ngのDNAと、マッチした正常リンパ節から抽出した150ngのDNAが提供。	3年間で合計48か国から423の異なる研究室が参加し、大部分 (75.6%) が11か国から参加	分析前 ・抽出 分析中 ・ライブラリー作製: illumina, Thermoなど ・シーケンシング: Illumina, Thermo Fisher Scientificなど 分析後 解析: 参加者の大部分 (91%) は社内のバイオインフォマティクス/パイプライン (自作または市販のソフトウェアを使用) を使用	・Agree (true positives: TP) : 期待されるバリアントと一致。Disagree (false positives: FP, false negatives: FN) : 期待されるバリアントと不一致。Extra (FP) : 予想されない箇所のバリアントであった。Missing (FN) : 期待されるバリアントが見つからなかった。 ・ddPCRとイルミナHi-SeqプラットフォームのWESを用いてメーカーにより独自に検証	NGSワークフローの定期的なEQAスキームを確立した。これは汎用的で、技術や検査状況にとらわれず、新しいプロセスやアレルを導入する新たな検査パイプラインやバイオインフォマティクス解析とシームレスに統合することができる。したがって、このEQAは、単一遺伝子検査から全ゲノム解析までの全範囲をカバーする生殖細胞系および体細胞系 (バリアント) 検査の認定に適している。 2015年には、74%の研究所がバリアント結果のコールに対して80%以上の感度を得て、同じ遺伝子を検査したときに大多数の研究所が同じバリアントを検出した (示さず) 。これは2016年に改善され、89%の検査室がバリアント結果のコールに対して80%以上の感度を得ていた (図4a) 。生殖細胞系2016/2017のFスコア>0.80は83%/93%の検査室、体細胞系は43%/71%であった。生殖細胞系のFスコア>0.95は2016/2017年それぞれ65%/82%の検査室、体細胞系は33%/43%であった。

9	<p>Kofanova O, Bellora C, Garcia Frasco S, et al. Standardization of the preanalytical phase of DNA extraction from fixed tissue for next-generation sequencing analyses. N Biotechnol. 2020;54:52-61. doi:10.1016/j.nbt.2019.07.005</p>	<p>NGS解析におけるFFPEからのDNA抽出の標準化のため、抽出とサンプルに於いた前処理のレビューと、品質指標の観点から異なる方法でサンプル調整したFFPE抽出結果を比較した。</p>	<p>(1) DNA抽出と固定組織サンプルの適格性に特に焦点を当てた固定組織DNA前処理に関するレビューと、(2) NGS指標と異なるDNA品質指標の観点から、異なる方法で固定または安定化した組織サンプルからのDNA抽出を比較した結果について紹介</p>	<p>・乳房腫瘍3例、正常結腸3例、正常皮膚3例、腫瘍2例と正常腎臓1例、腫瘍1例と正常子宮2例について、15個のFFPE組織ブロック、15個のペーパーFFPE組織ブロック、および15個のペーパーRNA Later安定化サンプルを用意して使用。 ・6つの腫瘍組織サンプルについて、腫瘍面積は40-90%、正常組織面積は5-10%、壊死は最大20% ・FFPE切片は、20µmを2-3枚。</p>		<p>分析前 ・抽出:使用検体に合わせて4種類のキットを使用</p> <p>分析中 ・ライブラリー作製:TruSeq Amplicon Cancer Panel ・シーケンシング:illumina</p> <p>分析後 ・解析:MiSeq reporter</p>	<p>・DNA の濃度と純度 ・DNA Integrity Number(DIN値) ・全ゲノム増幅法 (WGA) によるDNA integrity評価 ・TruSeq NGSによるバリエーションの同定結果</p>	<p>・すべての重要な分析前段階の標準化と文書化とは別に、抽出方法が一貫して実行されることを保証するために、工程内QC材料を使用することが重要である。 ・固定された組織からの最も良質なDNAは、FFPEからのPAXgene Tissue DNAキットで、FFPE組織からはQIAamp DNA FFPEキットで抽出されたものであることがわかった。 ・multiplex PCRで評価した固定材料からの最も良質なDNAは、FFPEまたはFFPE組織からChemagic DNA Tissue Kitで抽出されたDNAであった。 ・whole genome amplification (WGA)によって評価された固定材料からの最高の品質のDNAは、FFPE組織からChemagic DNA Tissue kitを使用したものであった。 ・すべてのサンプルで総複製率が80%以上、カバレッジが1000倍である。</p>
10	<p>Richman SD, Fairley J, Hall JA, et al. Results of the UK NEQAS for Molecular Genetics reference sample analysis. J Clin Pathol. 2018;71(11):989-994. doi:10.1136/jclinpath-2018-205277</p>	<p>100以上の検査室が「教育用標準試料」を検査する機会を得て、検査プラットフォームの検証をさらに進めようとする意欲が示されたが、バリエーションの報告は解釈の余地があるため、臨床的関連性またはバリエーションのいずれかによって、検査施設がバリエーションを選択的に報告しているかどうかを明らかにすることが必要である。</p>	<p>ジェノタイプとバリエーション頻度の結果を101の検査室から収集し、最も多く検査に使用されたNGSにおいて、7遺伝子の5-27の有効なバリエーションのうち8施設がNRASの5つのバリエーションを、2施設が8つのBRAFのバリエーションをすべてを正しく報告した。</p>	<p>ホルムリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 細胞系材料の切片 (厚さ10µm) 1枚 ※Thermo Fisher Scientific社 AcroMatrix製品</p>	<p>101施設</p>	<p>分析前 ・抽出:任意の方法</p> <p>分析中 ・ライブラリー作製:アンプリコンまたはキャプチャー法 ・シーケンシング:illumina又はThermo Fisher Scientific</p> <p>分析後 ・解析:-</p>	<p>・バリエーションとバリエーション頻度 (最も一般的に検査される7つの遺伝子について) ・変異体の有無に関する検査の精度 ・ddPCRと比較</p>	<p>ここで報告した7つの遺伝子には、5~27の有効なバリエーションがあった。8施設が5つのNRASバリエーションすべてを正しく報告し、2施設が8つのBRAFバリエーションすべてを正しく報告した。検証された平均バリエーション頻度は、参加した検査室が決定した頻度よりも低く、単一遺伝子の検査方法は、NGSプラットフォームよりも推定頻度のばらつきが少ないことが示された。検査室は、臨床的に関連するバリエーションを正しく同定する可能性が高いであった。</p>
11	<p>Elsink K, Huibers MMH, Hollink IHM, et al. National external quality assessment for next-generation sequencing-based diagnostics of primary immunodeficiencies. Eur J Hum Genet. 2021;29(1):20-28. doi:10.1038/s41431-020-0702-0</p>	<p>次世代シーケンサーを用いた原発性免疫不全症診断の遺伝学的データから適切な結論を導き出すためには、専門医による臨床的・免疫学的データが必要である。</p>	<p>先天性免疫不全症のNGSベースの診断におけるバリエーションフィルタリング、解釈、報告の均一性を分析するために、外部品質評価をオランダ 4施設で評価し、遺伝学的データから適切な結論を導き出すためには、専門医による臨床的・免疫学的データが必要となることがわかった。</p>	<p>1施設あたり2件の先天性免疫不全症患者の解析の注釈なしバリエーションフォーマット (VCF) ファイルを4つのDutch genome diagnostic centers (GDC) に配布し、解析、解釈した。(計8件の解析)</p>	<p>オランダの4つの主要なゲノム診断センターが参加 すべての臨床検査室はISO15189の認証と認定を受けている</p>	<p>分析前 ・抽出</p> <p>分析中 ・ライブラリー作製 ・シーケンシング</p> <p>分析後 ・解析:独自の解析パイプラインと標準ワークフローで解析</p>	<p>・バリエーションの分類と報告 ・オランダの異なるGDC間でのその均一性 ・臨床検査技師の経験に関する調査。遺伝子解析の最終的な解釈と結論は、参加した4つの遺伝子センターで統一された</p>	<p>PathogenicまたはLikely pathogenicに分類されるバリエーションの大部分は、正しく同定され、記載されていた。 ・EQA実施時の臨床検査技師の経験の評価するため、本調査の参加者全員にアンケートを送付 ・アプローチと解析の多様性にもかかわらず、専門医に送られる診断報告書に含まれる変異は、8つの変異を除いて、4つのセンターで一貫していた。</p>
12	<p>Keppens C, Dequeker EMC, Patton SJ, et al. International pilot external quality assessment scheme for analysis and reporting of circulating tumour DNA. BMC Cancer. 2018;18(1):804. Published 2018 Aug 9. doi:10.1186/s12885-018-4694-x</p>	<p>ctDNA EQAスキームの実現可能性と、臨床的に重要な低頻度バリエーション検出での高いエラー率に起因するEQAスキームの必要性が実証された。</p>	<p>ctDNA中の臨床的に重要な変異の検出を評価するEQA実施可能性の調査と、報告様式を分析するために、32施設で評価し、EQAの結果の見直しとエラーが発生していないことの確認が必要であることがわかった。</p>	<p>Horizon Discovery社からの購入検体 ・ヒト血漿に変異を含む細胞由来ゲノムDNAを添加した検体を使用 ・血漿量は3ml ・4検体がEGFR変異有、4検体がRAS変異有、2検体が正常検体 ・MAFは1%又は5% ※検体は、5つのreference labにて、2つの異なるcfDNA抽出方法、及び6つの検出方法→Cobas, NGS (illumina, Ion Torrent), Therascreen, ddPCR, BEAMingによって検証された</p>	<p>16ヶ国から32施設参加 主にEU施設</p>	<p>分析前 ・QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) ・Cobas cfDNA Sample Preparation Kit (Roche) ・MagMAX Cell-Free DNA Isolation Kit(Thermo Fisher Scientific) ・Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega) ・Nucleospin Plasma XS (Macherey-Nagel) ・QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (Qiagen) version 2</p> <p>分析中 ・NGS-アンプリコン法:Ampliseq 50 gene hotspot panel, Ion Proton (LifeTechnologies) ・NGS-キャプチャー法:SureSelect (Agilent), MiSeq (illumina) ・OncoBEAM@RAS CRC IVD KIT (Sysmex-Inostics) ・Cobas® EGFR Mutation Test v2 (Roche) ・Therascreen®EGFR Plasma RGQ PCR Kit(Qiagen) ・QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-rad)</p> <p>分析後 ・解析</p>	<p>・変異検出性有無を評価。VAF返却は求められなかった ・Horizaon検体をreference labで測定した結果が真値</p>	<p>・全検体と全施設を総合した変異検出エラー率は20.1%。 ・RAS変異の方がEGFR変異よりも変異検出エラー率が高い。 ・1%MAF検体のほうが、5%MAF検体よりも変異検出エラー率が高い。 ・複数変異を含む検体のほうが、1つの変異を含む検体よりも、変異検出エラー率が高い。</p>
13	<p>Sunami K, Naito Y, Aiono E, et al. The initial assessment of expert panel performance in core hospitals for cancer genomic medicine in Japan [published correction appears in Int J Clin Oncol. 2021 May;26(5):1007]. Int J Clin Oncol. 2021;26(3):443-449. doi:10.1007/s10147-020-01844-1</p>	<p>日本のがんゲノム医療中核拠点病院におけるエキスパートパネルのパフォーマンスに関する初期評価は、臨床現場におけるプレシジョン・オンコロジーの応用のための参考データを提供する。臨床アノテーションの標準化に関しさらなる調査が必要である。</p>	<p>2つの模擬症例を用いてエキスパートパネルのパフォーマンスを11施設のがんゲノム医療中核拠点病院に対して評価し、各施設で推奨治療が異なるため、エキスパートのさらなる標準化が必要であることが確認された。</p>	<p>2症例 ・Case1 : 男性、進行性大腸癌、標準化学療法奏功無し、BRAF, ATM, NF1, TP53, APC, ARAF, NTRK2に体細胞変異有、BRCA2遺伝子生殖細胞系列変異有、NCCオンコパネルによる測定結果 ・Case2 : 女性、進行性乳がん、標準治療で増悪、PIK3CA, ERBB2, CCND1遺伝子増幅有、FoundationOneCDxによる測定結果 ※上記2症例の臨床所見、CGPテスト結果、C-CAT findingsが参加施設に送付され、エキスパートを実施した。</p>	<p>がんゲノム医療中核拠点病院(11施設: 2020年1月時点)</p>	<p>エキスパートパネル ・NCC Oncopanelで測定された結果 ・FoundationOne CDxで測定された結果</p>	<p>エキスパートパネルで推奨された治療法 (各施設での比較のみ)</p>	<p>[Case 1] ・9/11施設でBRAF V600Eを標的としたdabrafenib+trametinibを推奨。 ・2/11施設でencorafenib+binimetinib+cetuximabを推奨。 [Case 2] ・4/11施設でeverolimus+exemestaneを推奨。 ・3/11施設でAlpelisibを推奨。 ・2/11施設でTrastuzumab deruxtecanを推奨。 ・2/11施設で推奨薬剤無し。</p>