

第2回

体細胞遺伝子検査の検査精度に関する調査研究：

肺癌 *EGFR* 遺伝子変異検査

研究報告書

日本病理学会 医療業務委員会

精度管理委員会

平成29年2月12日 報告

目 次

1. 背景および目的.....	3
2. 方法	3
3. 結果	5
4. 考察	7
5. 今後の対応	7
6. 参考文献.....	8
7. 研究組織.....	8
8. 謝辞	9

※ 本報告書に記載のある別添資料 3 および 4 は、参加医療機関および本調査研究関係者用の報告資料となっている。

1. 背景および目的

近年、病理組織・細胞検体を用いた悪性腫瘍の体細胞遺伝子検査は急増している。特に遺伝子変異検査については、年間約 10 万件が治療選択のためのコンパニオン診断として現在実施されており¹⁾、検査項目も肺癌における *EGFR* 変異検査²⁾、大腸癌における *KRAS* 遺伝子変異（現在は *RAS* 変異へ移行³⁾）、消化管間質腫瘍（GIST）における *KIT* 遺伝子変異検査に加え、2015 年からは悪性黒色腫における *BRAF* 遺伝子変異検査が新たに加わり、今後さらに増加する見込みとなっている。このうち肺癌 *EGFR* 変異検査は、その半数以上を占めており、多くは登録衛生検査所（いわゆる検査センター）によって実施されている。当該検査法については、登録衛生検査所において開発された薬事未承認検査法（LDT）法に加えて、近年 Scorpions-ARMS 法、Cobas 法が相次いで体外診断用医薬品（IVD）として承認され、医療機関における導入・実施がより容易となった。日本病理学会精度管理委員会による病理学会認定施設や登録施設を対象とした 2014 年のアンケート調査では、本検査の院内実施率は約 8%、また厚生労働科学研究費補助金研究班（桑田班）によるがん診療連携拠点病院を対象とした調査でも、ほぼ同様の結果が得られ、医療機関での実施が徐々に進んでいることが明らかとなった。

一方、これら遺伝子変異検査は分子標的治療のコンパニオン診断として治療選択に直結していることから、より厳密な精度保証体制が求められるが、医療機関で実施される検査精度の実態については、いまだ把握出来ていない。さらには今後、特に肺癌領域では、組織検体を使用したマルチプレックス遺伝子診断（いわゆるクリニカル・シーケンス）の臨床導入も検討されており、実施施設における検体取り扱いなど、質保証体制の把握が重要となっている。また将来的には外部精度評価（EQA）体制の構築が求められる。

本研究では、昨年度に引き続き、国内の医療機関における体細胞遺伝子検査（とくに遺伝子変異検査）の検査精度や検査実施体制を把握するため、① *EGFR* 変異検査を対象とした精度調査ならびに②本研究の参加医療機関を対象としたアンケート調査を行った。

2. 方法

1) 参加医療機関

本調査研究は、昨年度行った第一回調査の参加医療機関、日本病理学会認定施設のうちメールリಂಗリスト登録のある施設への電子メール案内、日本病理学会や日本臨床細胞学会ホームページ上およびニュースレターによる告知を行い、本研究への参加申込のあった自施設で *EGFR* 変異検査を実施している医療機関 29 施設を対象に行った。

2) リファレンス検査

協力企業によるリファレンス検査は、IVD 承認製品販売企業 2 社，登録衛生検査所 4 社，その他企業 1 社の計 7 社において行った。

3) FFPE 標準サンプルを用いた精度調査

精度調査には，遺伝子改変より作製された変異型の細胞株から作製され，米国 CAP サーベイにおいても利用実績のある Horizon Diagnostics 社製 FFPE 標準サンプル 3 種を用いた（下表）。研究事務局より，FFPE 標準サンプルの一斉発送（4℃）を行い，その到着後 2 週間以内に各医療機関において FFPE 標準サンプルからの *EGFR* 変異検査を実施した。各医療機関は，所定の記入フォーム（別添資料 1）へ結果を記入後，研究事務局へ返送した。

	サンプル#1	サンプル#2	サンプル#3
使用した FFPE 標準サンプル	5% EGFR L858R mutant type (HD129)	5% EGFR L861Q mutant type (HD132)	20% EGFR T790M mutant type (HD126)

4) 検査実施体制に関するアンケート調査

本研究では，検査実施体制に関するアンケート調査を実施した（別添資料 2）。

5) 調査研究のスケジュール

本研究は，概ね以下のスケジュールで実施された。

申込受付期間	2016 年 8 月下旬～10 月上旬
研究事務局からの送付期間	2016 年 10 月中旬～10 月下旬
各研究協力施設からの返送期間	2016 年 11 月上旬～11 月中旬
調査結果の解析期間	2016 年 12 月上旬～2017 年 1 月下旬
調査結果の開示時期	2017 年 2 月上旬

3. 結果

今回の参加医療機関（29 施設）の施設区分は、都道府県がん診療連携拠点病院が 8 施設（28%）、地域がん診療連携拠点病院が 18 施設（62%）、その他が 3 施設（10%）であった。また、参加医療機関において使用されている検出方法は、IVD 法が 9 施設、非 IVD 法が 20 施設であった。参加医療機関および協力企業における精度調査結果を図 1 に示す。

サンプル#1 の L858R 変異型では 28 施設（97%）で変異が検出できた。検出できなかった 1 施設については、解析方法としてダイレクトシーケンス法/ Fragment (length)解析法/ Cycleave 法（3 法を組み合わせ）を使用していた。サンプル#2 の L861Q 変異型は 21 施設（72%）で検出できた。検出されなかった 8 施設(28%)の施設では、当該変異型の測定が対象外となっていた。また、サンプル#3 の T790M 変異型では、28 施設（97%）で変異が検出できた。検出されなかった 1 施設においては当該変異型が測定対象外となっていた。IVD 法（Therascreen 法 [Scorpions-ARMS 法]および Cobas 法）を使用していた 9 施設では、サンプル#1、#2、#3 のいずれのサンプルにおいても、変異型が適切に検出できた。今回、サンプル#2 L861Q、サンプル#3 T790M の変異型が検索対象外となっていた施設では、Q-Probe 法（8 施設）や Fragment (length) 解析法（1 施設）が用いられていた。

協力企業（7 社）で実施された 9 検査（IVD 法：5 社、非 IVD 法：4 社 [PNA-LNA Clamp 法, PCR-Invader 法, ダイレクトシーケンス法, Q-probe 法]）において、8 検査（89%）では変異型が適切に検出できた。検出されなかった 1 検査は、ダイレクトシーケンス法であり、5%以下の低頻度の変異型であるサンプル#1、#2 にわずかなピークが検出されたものの、変異なしと判定された。同企業では、診療目的では IVD 法が使用され、ダイレクトシーケンス法は研究目的として使用されている（今回は参考データ）。詳細は別添資料 3 参照

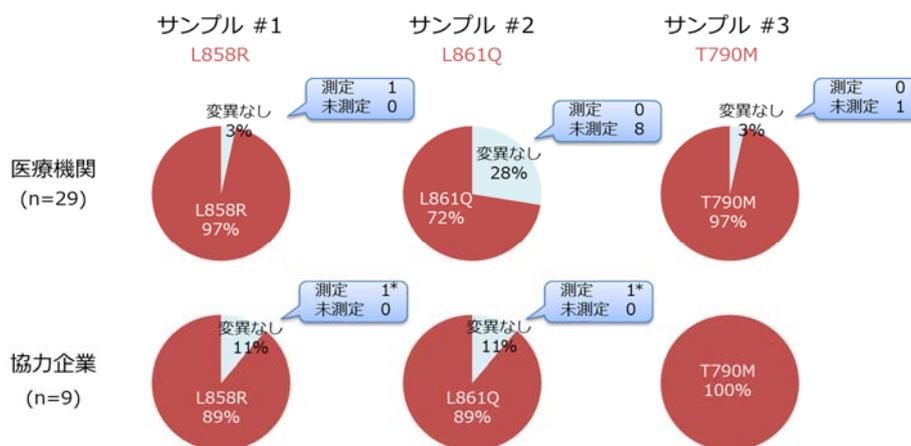
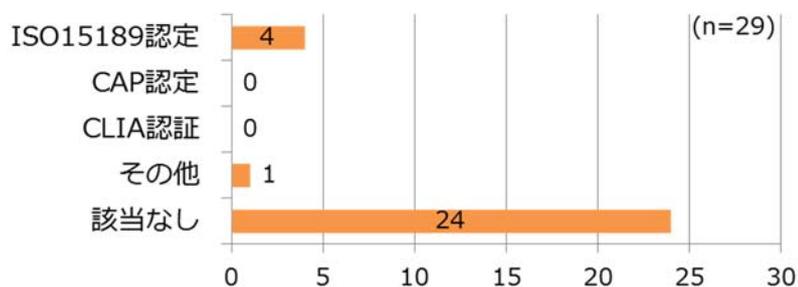


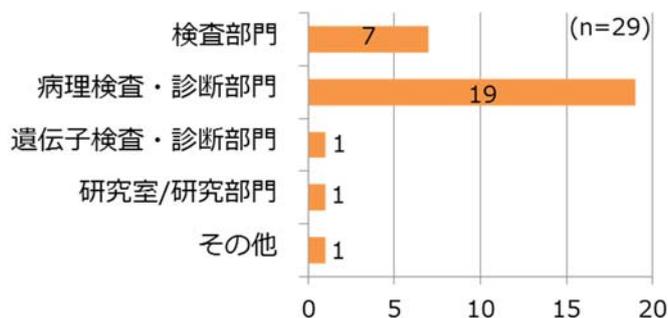
図 1 参加医療機関および協力企業における精度調査の結果

アンケート調査のうち、遺伝子変異検査の実施体制に関する調査結果を図2に示す。施設認定では、ISO15189認定施設は全体の14%（4/29施設）にとどまった（a）。遺伝子変異検査の実施部門としては、病理検査・診断部門が全体の半数以上を占めていた（b）。内部精度管理体制は70%近い数値で整っていた。また、EQAへの参加は53.6%と、前回の調査（28%）から倍増していた（c）。その他の結果は、別添資料4にまとめた。

(a) 検査室（実施区域）の認定等取得状況について



(b) 遺伝子変異検査の実施部門について



(c) SOP整備・内部精度管理・外部精度評価について

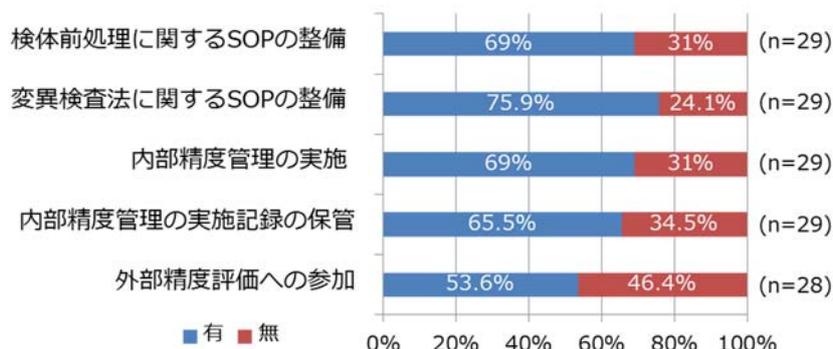


図2 遺伝子変異検査の実施体制に関するアンケート調査の結果

4. 考察

1) 非 IVD 法における検出対象変異型について

現在、EGFR 遺伝子では数多くの変異の種類が報告されているものの、治療効果予測上の意義が不明なものが多数含まれている²⁾。このうち IVD 法では、主要な感受性変異である ex21/L858R 変異や ex19/DEL 変異に加え、EGFR 阻害剤治療の効果予測上の意義が明らかとなっている低頻度の感受性変異 (ex18/G719X 変異, ex21/L861Q 変異) や抵抗性変異 (ex20/T790M 変異, ex20/INS 変異) の検出が可能となっており、保険点数は 2500 点での算定が可能となっている。一方、非 IVD 法でも保険診療が可能 (この場合は 2100 点) となっているが、どの範囲までの変異型を検出するかは、医療機関側に委ねられている。実際本調査においても、前回の調査同様に非 IVD 法実施施設間で変異検出項目数にばらつきが認められた。ex19/DEL 変異, ex20/T790M 変異, ex21/L858R 変異の検出はほぼ全ての施設で導入されていたが、ex20/INS 変異, ex20/S768I 変異はそれぞれ 25%, 15% の導入にとどまった。また、今回の調査対象の ex21/L861Q 変異検査の導入率は 60% (非 IVD 法使用の 20 施設中 12 施設) であり、実際に残りの 40% (8 施設) で変異は検索されていなかった。5% 以下の低頻度の変異型のうち、効果予測上の意義が明らかとなっている ex18/G719X 変異 (1.9%) , ex21/L861Q 変異 (1.6%) , ex20/INS 変異 (2.1%) の 3 変異型を併せると全体の 5% 以上を占める。これらの変異型の検出を行うことについて検討していく必要がある。

2) 検出精度について

本精度調査では、前回と比較し、変異割合の低い FFPE 標準サンプルを用いたが (サンプル #1 と #2 は 5%, #3 は 20%) , IVD 法を用いた参加医療機関においては、全サンプルで変異が検出された。また非 IVD 法においても、検出が行われなかった場合を除き、概ね全サンプルで変異が検出され (サンプル #1 : 95% [19/20 施設], #2 : 100% [12/12 施設], #3 : 100% [19/19 施設]) , 参加医療機関においては適切な検出感度で EGFR 変異検査が実施されていると考えられた。

5. 今後の対応

本調査研究の結果および課題を踏まえ、EGFR 変異検査を含め、組織や細胞検体を用いた体細胞遺伝子検査の外部精度評価の事業化について、日本病理学会・精度管理委員会において協議を行う。

6. 参考文献

- 1) 第7回 遺伝子・染色体アンケート調査報告書, 一般社団法人 日本衛生検査所協会, 2014
- 2) 肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き 第 3.05 版, 日本肺癌学会, 2016
- 3) 大腸がん診療における遺伝子関連検査のガイダンス 第 3 版, 日本臨床腫瘍学会, 2016

7. 研究組織

本研究は、日本病理学会・医療業務委員会 精度管理委員会の本研究の担当委員が、研究事務局運営を含め主体となって行い、また厚生労働科学研究費補助金「先端的がん医療実施のための地域完結型病理診断および臨床・病理連携ネットワークの構築」研究班との合同作業として進めた。

日本病理学会 医療業務委員会 委員長	森井 英一
日本病理学会 医療業務委員会 精度管理委員会 委員長	増田しのぶ
日本病理学会 医療業務委員会 精度管理委員会 委員・担当委員	畑中 豊 ^{*,***}
	桑田 健 ^{**}
	羽場 礼次
	銅島 一樹
	中西 陽子
	大林 千穂
日本病理学会 医療業務委員会 精度管理委員会 委員	鬼島 宏
	木佐貫 篤
	笹島 ゆう子
	滝野 寿
	津田 均
	和田 了
	吉田 正行

* : 研究事務局

** , *** : 厚生労働科学研究費補助金研究班 ** 研究代表者, *** 研究分担者

8. 謝辞

本研究実施にあたり、FFPE 標準サンプルをご提供頂いた株式会社理研ジェネシス、シスメックス株式会社に深謝致します。また IVD 承認製品販売企業でのリファレンス検査を実施頂いた株式会社キアゲン、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、登録衛生検査所でのリファレンス検査を実施頂いた株式

会社エスアールエル, 株式会社 LSI メディエンス, 株式会社ビーエムエル, 株式会社保健科学研究所, さらにリファレンス検査に参加協力頂きましたアークレイ株式会社に深謝致します.

日本病理学会・精度管理委員会 および 厚生労働科学研究費補助金「先端のがん医療実施のための地域完結型病理診断および臨床・病理連携ネットワークの構築」研究班 合同

第2回

肺癌 EGFR 遺伝子変異検査の検査精度に関する調査研究

別添資料 1

検査結果記入用紙

ご施設名 (_____)

お名前 (_____)

本調査研究で使用された測定・解析方法についてお教えてください -----

！ IVD 法をご使用の場合は、以下「①」にチェックを入れてください。

！ 非 IVD 法 (home-brew 法) をご使用の場合は、以下「②-1」「②-2」の両方にチェックを入れてください。

①ご使用の IVD 法 (キットと医療機器)

Scorpions-ARMS 法 (キアゲン社 : theascreen EGFR 変異検出キット RGQ)

コバス法 (ロシュ社 : コバス EGFR 変異検出キット)

②-1 ご使用の非 IVD 法 (home-brew 法) の検出原理

ダイレクトシーケンス法 PCR-SSCP 法 Fragment (length) 解析法

Q-Probe 法 PNA-LNA Clamp 法 PCR-Invader 法 Cycleave 法

NGS 法 PCR-RFLP 法 iPLEX 法 SMAP 法

その他 (_____)

②-2 上記方法を用いたルーチンにおいて検査 (検出) 対象にしている変異タイプ (種類)

エクソン 18 : G719A G719S G719C

エクソン 19 : 欠失変異

エクソン 20 : 挿入変異 S768I T790M

エクソン 21 : L858R L861Q

検査結果記入用紙

本調査研究での測定・解析結果についてお教えてください -----

	項目	EGFRmt #1	EGFRmt #2	EGFRmt #3
DNA の 収量と 品質	得られた DNA 抽出液の DNA 濃度 (ng/uL) [吸光度法での測定: 必須]			
	得られた DNA 抽出液の DNA 濃度 (ng/uL) [蛍光法での測定: 任意*]			
	得られた DNA 抽出液の 溶液量 (uL)			
	Abs260/280 (ratio)			
	コメント欄 (なにかあればご記入ください)			
変異の 検出	検出結果	<input type="checkbox"/> 変異なし <input type="checkbox"/> 変異あり <input type="checkbox"/> 測定不能	<input type="checkbox"/> 変異なし <input type="checkbox"/> 変異あり <input type="checkbox"/> 測定不能	<input type="checkbox"/> 変異なし <input type="checkbox"/> 変異あり <input type="checkbox"/> 測定不能
	「変異あり」の場合 変異タイプ			
	コメント欄 (なにかあればご記入ください)			

*: 測定していない場合は、記入不要です

日本病理学会・精度管理委員会 および 厚生労働科学研究費補助金「先端のがん医療実施のための地域完結型病理診断および臨床・病理連携ネットワークの構築」研究班 合同

第2回

肺癌 EGFR 遺伝子変異検査の検査精度に関する調査研究

別添資料 2

体細胞遺伝子検査に関するアンケート調査用紙

ご施設名 (_____)

お名前 (_____)

ご施設に関するご質問

ご施設の種別をお教えてください

- 都道府県がん診療連携拠点病院
- 地域がん診療連携拠点病院
- その他

EGFR 変異検査全般に関するご質問

(1) 当該検査で、使用する検体の頻度について検体種別にお教えてください。

！ 目安は、「よく使用」は全体の 30%以上、「たまに使用」は 5～30%未満、「ほとんど使用せず」は 5%未満です。

「FFPE」は「ホルマリン固定パラフィン包埋」の略です。

- | | | | |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| ① 新鮮凍結組織 | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |
| ② 手術・切除検体の FFPE 組織 | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |
| ③ 生検検体の FFPE 組織 | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |
| ④ 胸水の FFPE セルブロック | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |
| ⑤ 擦過細胞診検体 | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |
| ⑥ 気管支洗浄液（液状検体） | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |
| ⑦ 胸水（液状検体） | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |
| ⑧ 生検針先洗浄液（液状検体） | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |
| ⑨ その他（ _____ ） | <input type="checkbox"/> よく使用 | <input type="checkbox"/> たまに使用 | <input type="checkbox"/> ほとんど使用せず |

(2) 当該検査の年間実施件数および EGFR 変異陽性率についてお教えてください。

貴施設 年間 (_____) 件 EGFR 変異陽性率 (_____) %

！ 関連病院等、貴施設以外の検査も受託している場合は、別途以下もご記入ください。

貴施設以外 年間 (_____) 件 EGFR 変異陽性率 (_____) %

(3) 検体提出から結果返却までの時間（Turn Around Time; TAT）について、平均的な日数をお教えてください。

- 3 日以内 4-7 日 8-10 日 11-14 日 15 日以上

(2) 海外では EGFR 変異検査等の体細胞遺伝子検査の外部精度評価を行う実施機関がありますが、国内でもこうした機関は必要とお考えでしょうか。

- 必要である 不要である わからない

(3) 今回の調査研究では、調査サンプル数を 3 サンプルとしましたが、適当だったでしょうか。

- 適当な数だった
 減らすもしくは増やしたほうがよい ⇒ () サンプルくらいが適当

(4) 来年度、同様の内容の調査研究を行った場合、ご参加されますか。

- 参加したい 参加したくない 現時点ではわからない

(5) 今回の調査研究で、お気づきの点、改善が必要とお感じの点がございましたら、お教えてください。

アンケートは以上となります。
ご協力頂きありがとうございました。