

テーラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）

開発ガイドライン 2007

ー遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップに関してー

平成 1 9 年 5 月

経済産業省

目 次

1. 概要
 - 1.1 遺伝子型検定用 DNA チップとは
 - 1.2 本ガイドラインの目的と範囲
 - 1.3 検査対象と想定されるリスク
2. 測定装置(チップと装置)
 - 2.1 国内外の開発と普及の現状
 - 2.2 原理と構造
 - 2.3 方法
 - 2.4 特異性、感度、ダイナミックレンジ、再現性
 - 2.5 必要とするサンプル・検体、その前処理・保存等、試薬について
 - 2.6 ソフトウェア
 - 2.7 データ処理
 - 2.8 品質管理
3. 評価法
 - 3.1 評価項目
 - 3.2 塩基配列決定法との比較
 - 3.3 データ解析、解析ソフトについて
 - 3.4 有意性の検定
 - 3.5 比較試験・臨床評価試験
 - 3.6 臨床的実効性
 - 3.7 データの管理について
 - 3.8 安全性について
 - 3.9 その他
4. 標準物質
 - 4.1 目的
 - 4.2 外部参照物質に求められる要件
5. 参考文献
6. テーラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発WG委員名簿

テラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発ガイドライン 2007
ー遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップに関してー

1. 概要

1.1 遺伝子型検定用 DNA チップとは

DNA マイクロアレイチップとは、基板上に多数の DNA の部分配列を高密度に配置、固定したものである。これによってゲノムレベルの網羅的解析や特定のグループに属する多数の遺伝子を一度に解析することが可能となる。遺伝子型検定用 DNA チップとは、その中でも特にゲノム DNA を検討対象として遺伝子の多型や変異などを解析するものをいう。具体的には、各種素材の基板上に、ゲノム DNA 配列をコードする 20 塩基前後から 50～60 塩基ぐらいの短いオリゴプローブを重合、もしくは貼り付けたもの等がある。これらを微小なビーズ上に固定したものなどもあり得る。これらのプローブと検体標品とのハイブリダイゼーションあるいはさらに伸長反応させた結果をレーザー光や電気化学的手法などによって検出する。

1.2 本ガイドラインの目的と範囲

近年、技術的進歩の著しい、DNA マイクロアレイチップ及びその装置は、あらゆる疾患の検査や診断用、あるいは治療法開発用の次世代医療機器として大きく期待されている。一方現在、本法は研究用として急速に普及しつつあるものの、そのデータの信頼性、再現性、標準化など、臨床応用にはまだ問題が多い。そこで医療機器としての DNA チップの開発意欲の向上、機器開発の促進・活性化を目的として、その指標となるようにガイドラインを策定する。

また、DNA チップは最終的な診断装置（臨床試験のエビデンスも踏まえたもの）としてのガイドラインは早計と認識し、臨床検査装置としてガイドラインの策定を行う。

臨床検査や診断目的で遺伝子型判定 DNA マイクロアレイを用いるにはデータの再現性や高い精度が重要であり、判定ミスや曖昧さを極力排除しなければならない。また、臨床使用上の視点、患者の負担やリスクの軽減なども十分考慮しなければならない。高性能な測定装置の開発だけでなく、データの互換性や分解能、精度の向上のためには標準化が不可欠と考えられ、また評価方法についても指針が必要と思われる。そこで、本ガイドラインは、測定装置、評価法、標準化と大きく3つの項目に分けて策定した。

1.3 検査対象と想定されるリスク

検査対象は、遺伝子型検査を希望する一般健常人及び患者であり、疾患の罹患リスクの判定、疾患の診断、治療法の選択等の参考になるデータを供給するものである。

正しい遺伝子型検査が行われなければ、個々人に応じた的確な診断、治療が行われない可能性が高まり、誤診断や再発、副作用の増大等に繋がる。一方、遺伝子型検査のみに判断を頼るのは危険であり、他の既存の各種臨床検査結果と医師による観察、診察の情報とを併せて判断すべきである。現時点ではあくまで意思決定のための参考であり、補完資料と捉えるべきである。また、遺伝子型検査結果は重要な個人情報であり、その取り扱いには十分な注意を要する。

2. 測定装置(チップと装置)

2.1 国内外の開発と普及の現状

DNA チップでは、DNA の検出に、蛍光方式、電気化学検出方式、質量分析方式、表面プラズモン共鳴方式など様々な方式が用いられている。普及という意味で先行しているのは、蛍光検出方式である。Affymetrix 社や Agilent 社の DNA チップが、アメリカのみならず日本でも市場シェアの多くを占めている。蛍光方式の DNA チップは、従来主に研究用途で用いられてきたが、代謝酵素 (GYP2C19、2D6) の SNPs を判定する DNA チップが FDA で承認され、本格的に診断で用いられる可能性が高まりつつある。国内の DNA チップメーカーも、種々の方式のチップを開発し、様々な用途への展開を目指しているのが現状である。

2.2 原理と構造

(1) DNA の検出原理

DNA の検出方式、装置で検出する蛍光信号や電気化学信号などの出力信号を生み出す機構について技術的に検討する。

(2) チップと装置の構造

DNA チップについては、基板や DNA プローブなどチップを構成する主要素の仕様や形状・サイズなどについても検討する。

装置に関しては、装置本体の構成、装置を構成する各構成要素の仕様、機能の概略などについて検討する。

2.3 方法

(1) 検出の概要

プロトコール、即ち検体サンプルの準備から、検出・判定に至る全工程の流れ、特に、チップ・装置に導入する前の工程である、DNA 抽出、DNA 増幅、サンプル DNA のチップ・装置へのセッティング、装置での処理手順、信号から型判定を導く工程について技術的に検討することが必要である。装置での処理は、マニュアル操作と自動操作の区別も明記し、操作におけるリスクについても検討することが望ましい。

(2) 装置の機能

検出特性に影響を与える可能性の高い、温度制御機構、試薬送液機構、測定系、機械動作機構などは、各機構の動作、性能、役割を技術的に評価することが望まれる。

2.4 特異性、感度、ダイナミックレンジ、再現性

(1) 特異性

他の手法の解析により配列が既知の試料を用い、型判定を実施し一致率を表記する。検査するサンプルは、可能な限り、対象となる全ての対立遺伝子を含むこと。稀な遺伝子型のサンプルを取得できない場合は、ゲノム DNA の混合物、またクローン混合物を使用しても良いが、これらのサンプルの組成は、可能な限り実際の臨床サンプルのタンパク質及び DNA の質や量と類似となるよう設定

すべきである。また、交差反応を示す相同遺伝子配列に対する解析特異性に関しては、評価結果から遺伝子型判定に関する安定性について検討することが望ましい。

なお、対照となる実験として、「3. 評価法」に詳しく述べられているように、双方向の DNA シーケンシングの結果を利用することが望ましい。不一致があった場合、その結果を説明することが望ましい。なお対照実験は双方向の DNA シーケンシングに限定するものではなく、各変異に対して論文等で一般的に知られている適切な方法でもよい。

(2) 感度・ダイナミックレンジ

様々な濃度のゲノム DNA について試験を行い、検出限界濃度を判定することが望ましい。遺伝子型判定が所定の精度で行われるような、ゲノム DNA の濃度は明記することが望ましい。またこのゲノム DNA を確保するために必要な臨床サンプルの量を概算すべきである。

(3) 再現性

DNA チップ、及びその検査システムの再現性は十分に検証すべきである。再現性試験は、以下のような項目について行うことが望ましい。

- ・アッセイ内、アッセイ間、双方の再現性について検証すること
- ・適切なサンプルを使用し、複数の濃度のサンプルを使用すること
- ・検査するサンプルを用いて、有意義な再現性を統計学的に判断できるよう検査を実施すべき
- ・複数の作業員で、3 箇所以上の施設で実施されること。
- ・再現性試験で利用される手順が、添付文書に記載される予定の手順と同様であること
- ・複数の製品ロット、複数の器具を使用すること

(4) 検査の品質管理

適切な陽性コントロール、陰性コントロールを設け、各種コントロールの意義、それらの結果がもたらす管理項目について技術的に検討すべきである。また、検査機器の設定条件に対するモニタリング方法及びフィードバック方法を検討し、所定の条件で検査が実施されていることをどのように管理されているか説明すべきである。各コントロール、モニタリング、フィードバックにより得られる情報から、異常データとその管理方法を想定することが望まれる。

(5) その他、性能特性に影響する要因

DNA チップを含む検査機器に対する交差汚染には、別検体の混入・増幅産物の混入の二者があり得るが、それぞれの予防に対してとるべき操作環境・設備・手順について技術的に検討し、また、交差汚染を評価するための試験を実施しその結果を残すことが望ましい。

サンプルに含まれる潜在的な干渉物質は、必ずしもサンプル調製によって除去できるとは限らず、またサンプル調製、または DNA チップでの検出に干渉する場合もある。したがって干渉物質がアッセイの性能に及ぼす影響について特性評価をすることが望ましい。

検査中の各種条件について、その設定根拠、特に型判定に対する安定性について検討すべきである。

2.5 必要とするサンプル・検体、その前処理・保存等、試薬について

(1) 検体・サンプル

DNA を得る検体の種類（例えば血液、口腔粘膜）及びその採取方法、採取量について検討すること。

(2) サンプルの前処理

検体から DNA を抽出・精製する方法について検討すること。サンプル DNA をなんらかの増幅法で増幅した上で用いる場合には、その増幅法と使用する試薬について検討すること。増幅した DNA をさらに後処理（例えば一本鎖化や断片化）した上で、後段の反応に使用する場合には、その後処理法と使用する試薬について検討すること。

(3) サンプルの保存法

検体、精製 DNA、増幅 DNA、後処理後 DNA、といったすべての段階のサンプルについて、保管法及び輸送法を検討すること。すなわち、保管・輸送に適した温度と性能を維持できる期間について検討する必要がある。

(4) 試薬

DNA の抽出・検査など各工程で使用される試薬について、その種類・濃度などに関して検討することが望ましい。試薬を DNA チップと共に提供する場合、再現性、精度等に対する試薬の影響について、プロセスの各段階で検証した結果を残すことが望ましい。試薬を DNA チップと共に提供しない場合には、DNA チップ使用者が適切な試薬を選択できるよう、必要な試薬の仕様及び検査用 DNA の質を評価するための方法・仕様を技術的に検討する。

(5) 試薬の保存性・安全性

各工程の反応に使用される試薬の保管法・輸送法についても検討する必要がある。また各工程で使用される試薬の安全性、及び安全な取り扱いに必要な注意事項を検討することが望まれる。

2.6 ソフトウェア

(1) 装置を構成するソフトウェアの概要

装置のソフトウェア構成、その機能、関係性について技術的に検討する。その際、ユーザが直接操作する部分、機器を制御する部分、データの解析を行う部分、データの管理を行う部分等について、分けて記述すると分かりやすい。また、更には、ユーザが操作ミスをした場合の動作、機器に異常が発生した場合の動作、停電発生時・停電復帰時の動作等、正規の操作・動作以外の状況発生時の対応についても検討すべきである。

(2) ゲノム型判定アルゴリズムの原理と概要

ゲノム型判定アルゴリズムについて検討すること。その際、ゲノム型判定を行うに当たって設定している DNA プローブの種類、各プローブに割り当てているデータ数、型判定に用いる測定データの定義、各プローブの測定データから型判定を行うアルゴリズム、判定に必要な基準値の定義とその設定における統計学的根拠、最終的な判定結果とその信頼度を検討することが望ましい。

2.7 データ処理

本装置を用いて取得したデータは、トレーサビリティの観点から、検査日時、検体 ID、DNA チップ及び試薬ロット、検査プロトコル、測定装置の対応が付けられるよう、データ管理されている

ことが好ましい。

2.8 品質管理

(1) DNA チップ

保存方法、保存期間、安定性など、DNA チップの品質に関わる基本情報、チップに固定する DNA プローブの品質管理について検討すべきである。また、DNA チップの品質管理に関連し、GMP/QMS (ISO13485) などの製造管理/品質管理体制に関しても検討ことが望ましい。

(2) 検査装置

装置の校正方法、校正（検査）頻度、校正に用いる標準物質、合格規格、交換部品など、検査装置の品質に関わる基本情報、検査装置の品質管理に関連した GMP/QMS (ISO13485) などの製造管理/品質管理体制に関して、検討することが望ましい。

3. 評価法

3.1 評価項目

当該 DNA チップの評価法としては、以下の項目を含むべきであると考える。

- ①塩基配列決定法との比較
- ②データ解析、解析ソフトについて
- ③有意性の検定
- ④比較試験・臨床評価試験
- ⑤臨床的実効性
- ⑥データの管理について
- ⑦安全性について

3.2 塩基配列決定法との比較

- ・比較に用いた手法とその試験結果について検討することが望ましい。

塩基配列決定法との比較については、原則として目的遺伝子を PCR 法により増幅し、PCR 増幅産物から直接サイクルシーケンス法により塩基配列を決定する方法（ダイレクトシーケンス）により行う。

その他の方法として TaqMan 法 (ABI)、Invader 法 (Third Wave)、SnaPshot 法 (ABI)、MassARRAY 法 (Sequenom)、Pyrosequencing 法 (Biotage) 等を用いることができる。

- ・両者の一致率を遺伝子型毎に検討することが望ましい。
- ・比較に用いた試料に関して、以下の記録を残すことが望ましい。
試料の種類、試料の調整あるいは起源、試料数、試料の目的（特異性など）

3.3 データ解析、解析ソフトについて

- ・データの解析法、解析評価に用いたソフトウェア、及び統計分析に関して検討することが望ましい。

データ処理、解析ソフトについては、詳細を記したソフトウェア説明書を作成する。

- ・失敗事例（遺伝子型の判定不能、器具の故障、試薬の不具合などによるもの）に関しても分析することが望ましい。
- ・一致率の基準としては、他の診断薬での正答率を一応の目安とする。

3.4 有意性の検定

- ・分析内及び分析間の再現性を特徴付けられるような試験を設計し、その結果を検討することが望ましい。その際に、以下の点に留意することが望ましい。

－実用での濃度に近い、複数の DNA 濃度における適切な試料（注 1）を使用すること。

（注 1：アレル頻度が非常に小さく、対照試料として必要な量の確保が困難な場合は、の「5）比較試験・臨床評価試験」と同様に、合成試料を用いた検定試験を行っても良い。）

－検査現場で実際に用いられる試料（全血、口腔内採取等）から処理すること。

－複数の操作者いる、3 箇所以上の現場を含むこと。

－その他、一般的な臨床生化学検査での再現性試験に準じること。

－測定サンプル組成及び DNA 濃度に近い陽性対照及び陰性対照を用いて調べること。

3.5 比較試験・臨床評価試験

本項目については平成 18 年度「DNA チップを用いた遺伝子型判定装置に関する評価指標」を参照のこと（参考文献 7）。

3.6 臨床的実効性

本項目については平成 18 年度「DNA チップを用いた遺伝子型判定装置に関する評価指標」を参照のこと（参考文献 7）。

3.7 データの管理について

- ・測定の生データは、基本的にはイメージファイルで保存する。また、データベースとしては、リレーショナルデータベースを導入する。なお、信号の検出・分析、データ保存については、プライバシーとセキュリティを十分に確保する。

3.8 安全性について

- ・遺伝子型の同定に失敗した場合、あるいは遺伝子型同定結果の解釈に失敗した場合のリスクを評価し、その際に用いたリスク分析手法についても検討すべきである。

- ・この種の検査によってもたらされる情報は、医師による日常的な監視と併せて、診療上の意思決定を補完する目的においてのみ利用されるべきである。

- ・検体からの感染などの危険性に対する対策を講じる。

- ・検体からのコンタミネーションを回避するための対策を講じる。

3.9 その他

- ・本機器は使用目的が限定されている一方、臨床試験等での早期の利用が要望されていることな

どを鑑み、承認審査にあたっては、薬剤におけるオーファン・ドラッグの取扱いのように、優先的な取扱いが望まれる。

4. 標準物質

4.1 目的

遺伝子型決定用DNAアレイ開発の各フェーズに応じて外部参照物質に求められる要件を示し、該開発品を用いたSNP解析データの信頼性を向上させることを目的とする。

4.2 外部参照物質に求められる要件

DNAアレイ開発に用いられる外部参照物質には、特性の異なる様々なアレイ技術の精密性評価・正確性評価・結果表示のためのアルゴリズム検討や（一次標準品）、該開発品製造時のトレーサビリティの確認やルーチン検査における精度管理（二次標準物質）にも適用可能な性能が求められる。従って外部参照物質の選定に当たっては以下の方法論的課題を考慮すべきである。

4.2.1 外部参照物質の選定

(1) 一次標準品の選定

該開発品が検出対象とするSNPの両アレルのホモ型・ヘテロ型を網羅するサンプルによる評価が求められるため、一次標準品には対象SNPを含む複数のヒトゲノムサンプルを使用することを推奨する。但し、出現頻度が稀なアレルのホモ型については必ずしも準備しなくてもよい。

(2) 次標準物質の選定

解析対象のSNPを検出できることが一次標準品を用いた開発の過程で確かめられている該開発品を市販のために製造する場合、トレーサビリティを確認するために二次標準物質を使用する。二次標準物質には対象遺伝子のうち、ヒト染色体遺伝子よりも安定性に優れ、増産が可能であるプラスミドDNAや増幅産物が適用され、該開発品の性能評価が可能な部分の遺伝子配列が含まれていれば良い。全配列長などの仕様は被評価対象開発品の特性に合わせて開発者により決定されて差し支えないが、統一された測定条件（細胞溶解用緩衝液、プロテアーゼ、制限酵素など、抽出試薬に関する品質管理方法及びDNAの標準処理手順マニュアル）が設定されるべきである。

4.2.2 外部参照物質の管理

(1) 品質管理

一次標準品は選定時にDNAシーケンシングなどの方法により配列を確認する。一次標準品を細胞培養などにより複製する場合は、複製ロット毎に遺伝子配列の確認を行うことにより相同性を担保する。二次標準物質は大腸菌や遺伝子増幅法による複製を経て使用されるが、複製を行う場合には適切な頻度で遺伝子配列が確認されなければならない。

(2) 純度

DNAの合成については、ホスホロアミダイト法などの一般的な方法を行い、目的とした遺伝子配列が合成されていることを質量分析(TOF-MS)やHPLC、電気泳動法により確認する。

(3) 濃度単位

外部参照物質を感度試験に用いる場合には、核酸定量法により求められた既知濃度（理論値）の標準物質を用いて希釈検体を作製し、検出感度の検定を行う。尚、核酸定量は吸光度法（OD260）により実施する。

4.2.3 外部参照物質の入手

CDC の Genetic Testing Reference Material Coordination Program において reference material として確立された細胞株を、国内公的機関、例えば産業総合研究所が Coriell 医学研究所を通じて入手し、保存及び管理を行い、該開発品の機能評価を受託業務として実施する。尚、ヒトゲノムサンプルの保存中又は培養による後天的変異を監視するための定期的な検査も管理業務に含めるものとする。

（参考； Genetic Testing Reference Material Coordination Program (GeT-RM) は、遺伝子検査における QC、研究、検定試験や測定データの検証に適した参照物質を研究者が利用できるよう、CDC 主導の基に設立された綱領である。（文献 5））

5. 参考文献

- 1) Guidance for Industry and FDA Staff, Class II Special Controls Guidance Document: Drug Metabolizing Enzyme Genotyping System. U.S. Food and Drug Administration.
- 2) 血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査（NAT）の実施に関するガイドラインについて：平成 16 年 8 月 3 日 薬食発第 0803002.
- 3) The First Genetic Testing Quality Control Materials Program (GTQC) Expert Panel Meeting, November 29, 2005, Turnhout, Belgium.
- 4) PCR プライマーの合成と精製：1997 年 6 月 15 日, 共立出版.
- 5) Genetic Testing Quality Control Materials Program—Development of verified QC materials for genetic testing, April 5, 2005.
- 6) The Condensed Protocols, 467.
- 7) 平成 18 年度テラーメイド医療用診断機器審査ワーキンググループ検討報告書「DNA チップを用いた遺伝子型判定装置に関する評価指標」.

6. テーラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発WG委員名簿

（※は座長、五十音順、敬称略）

油谷 浩幸	東京大学 先端科学技術研究センター 教授
楠岡 英雄	独立行政法人 国立病院機構 大阪医療センター 副院長 （生体医工学会推薦）
桑 克彦	筑波大学大学院 人間総合科学研究科 助教授
源間 信弘	株式会社東芝 研究開発センター 技監
佐藤 宰	第一化学薬品(株) 研究開発統括部国際開発部 企画開発グループ長
※林 慎一	東北大学医学部 保健学科分子検査学分野 教授
山藤 清隆	財団法人かずさ DNA 研究所 新事業開発委員

開発WG事務局

木山 亮一 （独）産業技術総合研究所 シグナル分子研究ラボ 主任研究員