

「がんゲノム検査全般に関する指針」 参考資料

本編は、「がんゲノム検査全般に関する指針」発刊に際して、核酸抽出やシーケンスに関する、より具体的な手順等について参考となる情報をまとめたものである。

参考資料は、あくまでも特定の施設における基準や手順を紹介するものであり、すべての施設における基準や手順を規定するものではないが、各検査室等の参考資料として活用していただきたい。

なお、基本的には、各施設で定められた基準や手順、試薬等のマニュアルを遵守して、がんゲノム検査を実施されたい。

目次

I. 核酸抽出プロセス.....	1
慶應義塾大学医学部 腫瘍センターゲノム医療ユニット	西原広史
同	柳田絵美衣
II. 核酸解析プロセス(ライブラリ調製からシーケンシングまで).....	7
慶應義塾大学医学部 腫瘍センターゲノム医療ユニット	西原広史
同	柳田絵美衣
III. 病理検体を用いた遺伝子パネル検査 標準作業手順書.....	10
鹿児島大学 医歯学域医学系 医歯学総合研究科 先進治療科学専攻 腫瘍学講座	
同	谷本昭英
	赤羽俊章
IV. 病理検体を用いた EGFR 検査 標準作業手順書.....	38
埼玉県立がんセンター 腫瘍診断・予防科	赤木 究
V. NGS データのバイオインフォマティクス解析.....	56
国立がん研究センター バイオインフォマティクス部門	加藤 護

I. 核酸抽出プロセス

I-1 DNA および RNA の取り扱いにおける一般的注意事項

NGS 解析用の DNA あるいは RNA の取り扱いに際しては、一般的に以下の点に注意すべきである。

- スクレアゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、ピペット、スクレアゼフリーでエアロゾル防止フィルター付きピペットチップを使用する。
- 実験スペースは常にクリーンな状態にし、Biosafety Level 1(BSL1)のルールに基づき、実験を行う。

I-2 病理検体からの核酸抽出※

1) 検体選択

検査対象となる FFPE から、HE 染色標本を作製し、過去に診断された病理診断内容を病理医が再度確認し、組織切片上における有核細胞数中の腫瘍含有率を確認する。腫瘍細胞の含有率が少ない場合は、正確なゲノム解析が困難となる場合があるため、未染色標本を作製したのち目的の腫瘍部位のみを削ぎ取り、腫瘍含有率を高める操作が必要となる。病理医は、核酸抽出をおこなう細胞域にマッピングし、ダイゼクションをする場所を指定する。未染色標本の裏面（切片が載っていない面）に油性マジックでマーキング通りに写す。

2) 薄切

マイクローム替刃や剃刀替刃を、スライドガラスと切片の間に這わせるようにスライドさせ、未染色切片を削りとりマイクロチューブに回収する。検体ごとに手袋、マイクローム替刃を新しいものに交換する。

腫瘍部を含む病理組織検体のパラフィンブロックやセルブロックからの DNA 抽出は、①カーリング状に薄切した切片から DNA 抽出する方法と、②未染色標本を作製して目的部位のみを剃刀刃で削り取り DNA を抽出する方法がある。

①カーリング状の切片からの細胞回収:生検材料の場合

1. FFPEの余分なパラフィンをメスで削り取る。
2. 10 μ m厚で、カーリングの状態のまま薄切をおこなう。
3. マイクロチューブにカーリングの状態の数本入れる（腫瘍細胞含有量によって枚数は変動する）。

②未染色標本からの細胞回収:手術材料の場合

1. HE標本上で目的の腫瘍細胞範囲を病理医がマーキングする。
2. 10 μ m厚の未染色標本を作製する（腫瘍細胞含有量によって枚数は変動する）。
3. HE標本のマーキングを参考にして、未染色標本の切片を剃刀刃で目的の部位を削りマイクロチューブへ回収する。

*コンタミネーション防止

可能な限り、薄切はゲノム検査用に専用のマイクロトームを設置し、マイクロトームの替え刃や切片を浮かべる水槽の水なども、1ブロックごとに交換するなど、病理検査での薄切作業とはエリアや道具を区別してゲノム検査用に作業を実施する。

3) 【脱パラフィン（キシレンを用いた方法）】

1. 1 mLのキシレンを添加し、10秒間激しくボルテックスした後、最高速度で遠心する。
2. 上清を取り除く。
3. 残ったペレットにエタノールを添加し、ボルテックスで混和後、最高速度で遠心する。
4. 上清を取り除く。
5. 蓋を開け、室温（15~25°C）または37°Cでエタノールが蒸発するまでインキュベートする。乾燥しすぎると沈殿が不溶になるので注意。

*包埋前の不完全な脱水により、核酸の断片化や proteinase K の阻害が生じる。再利用したエタノールやキシレンには水分が蓄積されるため、未使用なエタノールやキシレンを使用して十分に脱水する。

*脱パラフィンにおいてもキシレンやエタノールは未使用品使用する。

*有機溶剤を使用せず、ミネラルオイルを用いて脱パラフィンをおこなう方法もある。

*＜脱パラフィン＞は、各メーカーの核酸抽出キットを使用することで省略できる。

Point: RNA の抽出を目的とする場合、FFPE 作製は低融点のパラフィンを用い、FFPE 作製後はできるだけ低温(4°C以下)で保存する。-20°C以下で保存すべきだとする報告もある(PMID: 30606660)。

4) 核酸抽出

基本的には使用する DNA 抽出キットのプロトコルに従って操作を行うが、以下、代表的な手順を記載する。

<DNA>

1. 脱パラフィン後のサンプルに Lysis buffer と proteinase K を加えて、ヒートブロックにてインキュベートする。
2. ヒートブロック（高温）にマイクロチューブを移し、インキュベート後、室温に戻す。
3. RNase を加えてピペッティングする。RNase は安定しているため、操作 1 の際に加えることも可能。
4. 室温でインキュベートする。

<RNA>

1. 脱パラフィン後のサンプルに Lysis buffer と proteinase K を加えて、ヒートブロックにてインキュベートする。
2. ヒートブロック（高温）にマイクロチューブを移し、インキュベートする。
3. 高温のヒートブロックからマイクロチューブを取り出し、氷上に置いて冷やし、その後は室温で放置。（DNase は高温下で失活するため、確実に溶液を室温に戻してから DNase を加える。）
4. DNA の混入を避けるために DNase を加えてピペッティングする。
5. 室温でインキュベートする。

5) 混在する他の細胞構成成分の除去 / 核酸回収の基本的な原理**➤ DNA 【フェノール/クロロホルム/エタノール法】**

細胞あるいは組織破砕液にフェノールを加え、蛋白を不溶化する。

上清の水層分離し、クロロホルム添加によりフェノールを除去する。

➤ DNA 【シリカカラム法】

カオトロピック物質（グアニジン塩）の存在下で、核酸がシリカに binding する。カオトロピックの陰イオンは、水素結合・ファンデルワールス力など非共有結合を阻害する効果を持つ。この作用により水和水は放出され、シリカと核酸の間に疎水結合が形成される。この原理を利用して、DNA を選択的にシリカメンブレンに結合させ、遠心することで夾雑物や DNA 合成阻害物を除去する。

➤ RNA 【AGPC (acid guanidinium thiocyanate - phenol - chloroform extraction)法】

RNA はリボースに OH 基を持つため、DNA に比べて親水性を持つ。

細胞や組織の破砕液に酸を加えて酸性にすることで親和性を低下させる。

フェノールやクロロホルムなどを加えると DNA やタンパク質は有機層、RNA は水層へ分配される。

水層を単離してアルコール沈殿することで RNA を抽出する。

I-3 血液検体(白血球)からの DNA 抽出

1) 検体の準備

EDTA などの抗凝固剤で処理した新鮮な全血を 200 μ L~300 μ L 程度用意する。凍結されている検体の場合には事前に溶解し、室温に戻す。全血には一般的に白血球が 4×10^6 to 1.1×10^7 cells/mL 程度含まれる。一般的な DNA 抽出キットを用いる場合、各キットが想定している白血球数と予定 DNA 収量を確認し、用意する血液量を決める。

2) DNA 抽出

基本的には使用する DNA 抽出キットのプロトコルに従って操作を行うが、以下、代表的な手順を記載する。

1. Proteinase K 20-30 mL 30 mL に対して全血 200 μ L~300 μ L を添加し、56°C で 10-20 分間インキュベートする。その間に使用するキットのカラムなどの準備を行う。
2. 使用するキットのプロトコルに従い、インキュベートしたライセートに対して RNase やエタノールなどを添加し、キットのカラムに載せる。
3. I-2 病理検体からの核酸抽出の手順と同様に、キットのプロトコルに従い、混在する他の細胞構成成分の除去と核酸の回収を行う。

I-4 DNA の品質管理※

DNA の品質管理の指標には、長さ、量、化学的純度、構造的完全性を指標とすることができる。

1) 定性 ※

DNA の長さ(分解度)の確認には、一般的に電気泳動法が用いられる。分解度の低い良好なゲノム DNA は、高分子の DNA がはっきりと確認でき、低分子のスミア、バンドやピークは認められない。

全血や凍結組織から抽出された DNA の場合には、1000 bp~1000bp 以上の高分子 DNA が主体を占めるのに対し、FFPE 組織から抽出された DNA は、ホルマリンによる架橋形成によって DNA が切断され、200 bp 以下の低分子 DNA が主体となる。血漿または血清から抽出した cfDNA の場合には、その多くは 140~200 bp の長さである。高分子の DNA が認められる場合には、有核細胞由来のゲノム DNA が混入している可能性が疑われるため、cfDNA の解析にはふさわしくない。高分子 DNA は、物理的衝撃で断片化する可能性があることから、溶液を混合する際には指でそっとタッピングするなどの注意が必要である。また、可能な限り凍結融解の繰り返しを避ける。

2) 定量 ※

DNA の濃度はライブラリ調製効率に影響を及ぼすことから、適切な長さの dsDNA(二本鎖 DNA)のみを正確に定量することが必要である。一本鎖 DNA や RNA、ヌクレオチドの混入は正確な定量を妨げる恐れがある。紫外可視分光光度計では 260 nm 付近に吸収をもつ物質があわせて定量されてしまうため、定量値を過大に見積もる傾向がある。このため、dsDNA に選択性を示す蛍光アッセイ法などを用いて定量することが望ましい。この際、適切な頻度で検量線作成を行うことや、濃度既知の DNA を毎回測定することなどにより、できるだけ正確な測定値を得るようにする。血漿または血清から cfDNA を抽出する場合、一般的に 1 mL の血漿からは 1 ~ 50 ng の cfDNA が回収できる。病態の進行などにより幅はあるが、収量が過大である場合には有核細胞由来のゲノム DNA が混入している可能性が疑われるため、cfDNA の解析にはふさわしくない。凍結している DNA ストック溶液を NGS 用ライブラリ調製に使用する際には、使用する直前に定量することが望ましい。

3) 化学的純度

良好な DNA の化学的純度の指標は、A260/A280 の値が 1.8 ~ 2.0、A260/A230 の値が 1.0 より大きいことである。また、DNA を溶かしている溶媒に EDTA、エタノール、フェノール等が含まれる場合、ライブラリ調製試薬の反応を阻害する可能性がある。製造販売業者の使用説明書を参照し、混入を避けるように提示された物質に関しては溶媒に含まれないように配慮する。

4) 構造的完全性

構造的完全性の指標としてリアルタイム PCR 法により得られる Ct 値（もしくは Cq 値）を用いて核酸品質を評価する方法である。DNA 品質評価では、異なる長さの 2 種のアンプリコンサイズ（例：50~100 bp 程度の短鎖アンプリコンと、100~300 bp 程度の長鎖アンプリコンなど）から得られる Ct 値の差（ Δ Ct 値もしくは Δ Cq 値）を指標とする方法などが用いられている。

また電気泳動法を用いた方法として、DIN (DNA Integrity Number) 値がある。この指標はアジレント社の Agilent 2200/4200 TapeStation システムを用いた Genomic DNA ScreenTape assay で測定したデータを gDNA の分解度に応じて 1~10 にスコア化された値であり、FFPE 検体の DNA 品質評価が可能である。

このほか dsDNA の割合を算定する方法がある。蛍光分光光度計を用いて dsDNA を定量し、吸光光度計で測定した DNA 濃度と比較する。

$$\text{dsDNA の割合(\%)} = \text{dsDNA 濃度} / \text{DNA 濃度} \times 100$$

分解度の高い DNA を使用する場合は、dsDNA 濃度をもとに必要な DNA の液量を算定し、ライブラリを作製することが有効な場合もある。

I-5 RNA の品質管理※

RNA の品質は、長さ、量、化学的純度、構造的完全性を指標とすることができる。

1) 定性※

RNA の長さ(大きさ)の確認には一般的に電気泳動法が用いられる。NGS 解析用の RNA の品質確認には微量で解析できる機種システムを使用することが望ましい。分解度の低い良好な RNA は、28S、18S のバンドがはっきりと確認でき、低分子のスミアなバンドやピークは認められない。

2) 定量 ※

RNA の濃度が DNA やヌクレオチドなどの混入により正確に定量されていない場合、ライブラリ調製効率に影響を及ぼす可能性がある。

3) 化学的純度

良好な RNA の化学的純度の指標は、A260/A280 の値が 1.8 ~ 2.0、A260/A230 の値が 1.0 より大きいことである。また、RNA を溶かしている溶媒に EDTA、エタノール、フェノール等が含まれる場合や検体に DNA が混入している場合、ライブラリ調製試薬の反応を阻害する場合がある。製造販売業者の使用説明書を参照し、混入を避けるように提示された物質に関しては溶媒に含まれないように配慮する。

4) 構造的完全性

構造的完全性の指標として電気泳動法(バイオアナライザ等)を用いた RIN(RNA Integrity Number)値を測定する。RIN 値が 10 に近いほど RNA の品質が高い。また RIN 値と同様に、電気泳動法を用いた指標として、イルミナ社が開発した DV200 値があり、200 ヌクレオチド以上の RNA 断片の全 RNA 断片に占める割合を算出する。DV200 による品質区分は、>70%の場合は High、50~70%の場合は Medium、30~50%の場合は Low、<30%は Too degraded としており、<30%の FFPE 検体では、RNA シークエンスのライブラリ調製への使用を推奨していない。その他、RIS (RNA Integrity Score)などの指標がある。

II.核酸解析プロセス (ライブラリ調製からシーケンシングまで)※

II-1 ライブラリ作成

ターゲットとなる遺伝子を解析するためのライブラリ作製方法は、裁断された核酸断片に対して相補的な配列をもつキャプチャープローブを用いて捕獲し、PCR で増幅させて解析するキャプチャーシーケンス法と、核酸断片に対して PCR プローブを用いてマルチプレックス PCR を施行して核酸配列を解析するアンプリコンシーケンス法に大別される。この両者にはそれぞれ利点・欠点があり、例えばキャプチャーシーケンス法は、融合遺伝子や比較的長い領域の欠失のような DNA の大きな構造変化を捉え、かつ DNA コピー数を算出する能力が高い。一方で、アンプリコンシーケンス法では、必要 DNA 量が少なく作業時間も短く、また安価なコストで実施できるが、標的領域の GC 比など核酸配列による PCR 増幅効率の差異が大きくなるために、増幅不良領域での解析精度の低下や DNA コピー数計算が困難になる、という特徴を有する。パネルに搭載する遺伝子は、ライブラリ作製時に反応させる target gene sequence primer (probe) のデザインによって選定することになるが、その方法論や種類は様々で、それぞれのキットによる特徴があるため、使用する検体の種類、品質、並びに標的となる遺伝子数等に合わせて選定すべきである。

【アンプリコンシーケンス法】

1. ターゲット領域をPCR増幅する。
2. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。
3. 回収したDNA片の品質（濃度、サイズ）を確認する。
4. T4 DNAポリメラーゼを用いて末端修復を行う。断片化によって生じた突出末端を平滑化する。
5. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。
6. 3'末端へのA付加。平滑化したDNAの3'末端にアデニンを付加する。
7. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。
8. アダプター、インデックス付加。鋳型増幅に必要なアダプター、インデックスを、DNAの両末端に付加する。
9. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。
10. アダプター、インデックスを付加したライブラリをPCR増幅させる。
11. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。

【キャプチャーシーケンス法】

1. 二本鎖DNAを酵素または超音波によって断片化させる。

2. 変性させる。
3. 磁気ビーズを用いて精製し、目的の長さのDNA片を回収する。
4. 回収したDNA片の品質（濃度、サイズ）を確認する。
5. T4DNAポリメラーゼを用いて末端修復を行う。断片化によって生じた突出末端を平滑化する。
6. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。
7. 3'末端へのA付加。平滑化したDNAの3'末端にアデニンを付加する。
8. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。
9. アダプター付加。鋳型増幅に必要なアダプターを、DNAの両末端に付加する。
10. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。
11. アダプターを付加したライブラリをPCR増幅させる。
12. 磁気ビーズを用いて精製し、目的の長さのDNA片を回収する。
13. 精製後のDNA片とビオチン結合されたキャプチャーライブラリをハイブリダイズする。
14. ストレプトアビジンコートされた磁気ビーズを用いてビオチン-アビジン結合させる
15. 磁気ビーズを回収する。
16. ビーズからDNAを遊離する。
17. 回収したDNAとインデックスプライマーを結合させ、増幅させる。
18. 磁気ビーズを用いて精製し、夾雑物を除去する。
19. 回収したライブラリの品質（濃度、サイズ）を確認する。

II-2 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer:NGS) のオペレーション

各ライブラリ断片はライブラリアダプターとハイブリダイズする共有結合済 DNA リンカーと共に固体表面（ビーズまたは基盤表面）上で増幅されるが、この増幅により単一ライブラリ断片に由来する DNA のクラスター群が形成され、各クラスターが個々のシーケンシング反応で作用する。

各クラスター配列は核酸取り込みの繰返しサイクルにおいて、光または蛍光シグナルの産生を介して視覚的に読み取られる。

(例) Next Seq 550 System (illumina)

【ラン開始】

1. 全ライブラリを希釈した後、混和する。混和したものを、NaOHで一本鎖DNAに変性した後、中和させて、Bufferで最終濃度まで希釈する。

2. 解析する (NGSにアプライする) 検体の情報を入力し、リストを作成する。
* 検体入れ違いが発生しないように、検体番号とindex番号を正しく入力する。
3. 試薬カートリッジの準備
ミリQ水 (超純水) を満たした水浴に試薬カートリッジを浸し、試薬を解凍する。
* コンタミ防止のためカートリッジの表面に水が付着しないようにする。
4. フローセルの準備
フローセルを室温に戻す。フローセルの表面に汚れや埃が付着していないか確認。
* 汚れはエタノールまたはイソプロパノールを染み込ませたレンズ紙でふき取る。
5. 最終濃度まで希釈しておいたライブラリを試薬カートリッジに分注。
* コンタミを防ぐために、カートリッジのホイルシールに穴を開けるチップと分注するチップは新しいものにする。
6. NGS画面上で作成しておいたリストを選択し、機器の指示に従って試薬カートリッジ、フローセル、廃液ボトル、Bufferをセットする。
7. ソフトウェアがシステムの自動チェックを行う。問題がなければランをスタートさせる。

【ラン終了】

1. シーケンスした塩基のクオリティ値「Q-Score」、得られたシグナル値「Intensity」、クラスター密度「Cluster Density」、純度の高いクラスター割合Cluster Passing Filter」、取得できる見込みの総塩基数「Estimated Yield」を記録する。
2. ラン開始前、ラン終了後に装置の洗浄を実施する。
* 前ランの持ち越し (コンタミ) を防止するため、洗浄は忘れずに実施する。

【データ出力】

それぞれの機器はシーケンシング実行終了時に生データを出力する。この生データは各クラスターより産生された DNA 配列を集めたものである。

1. ランをした検体分のFASTQ形式ファイルをNGSから取り出す。

Ⅲ. 病理検体を用いた遺伝子パネル検査 標準作業手順書

Ⅲ-1 検体受付及び仕分標準作業書・標準操作手順書

検体搬送および受領・受付

【Part A 概要】

1 試料(組織)

1) 院内症例：

組織採取日が最新の組織について、該当する病理組織標本を病理専門医が再確認し、最適なホルマリン固定パラフィン包埋ブロック (formalin-fixed paraffin embedded: FFPE) を選択する。組織採取から5年以上を経過したものや、FFPEの組織量が十分ではない場合は、再度患者に説明したのち、新たに組織を採取することを考慮する。新しく採取する腫瘍組織については、病理部の臨床検査技師が直接組織を受取、ホルマリン固定から管理をおこない、病理診断にて悪性所見を確認後速やかに核酸抽出をおこなう。細胞診検体はPap染色標本で腫瘍細胞を確認し、腫瘍細胞が分量ある場合はセルブロックを作製し、セルブロックFFPEから核酸抽出をおこなう。通常細胞診の場合、BD Cytorig RED LBC保存液に入れ、4°Cで保管しているものから核酸抽出をおこなう。

2) 院外症例：

当院へは、既定の方法で作成された病理検体とともに、院外用検査依頼書、病理診断書、切り出し図、診療情報提供書の添付を義務付ける。

検査に用いる組織の取り扱いについては、日本病理学会による「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規定」にしたがう。

2 試料(血液)

院内症例・院外症例：

ゲノム外来受診・同意取得後、外来採血室にて2mL EDTA採血管1本採血をおこなう。

【Part B 手順】

1 搬送・受領・受付

使用機器および試薬

●なし

1. 担当看護師が、院内・院外用検査依頼書、病理診断書、EDTA採血管(2mL)1本、組織検体を既定のA4サイズの袋に入れ病理診断科まで持参する。
2. 依頼書患者名と採血管記載の患者名、病理診断書記載の患者名を受領スタッフとダブルチェックで確認。
3. 血液は抽出時まで、専用の4°C冷蔵庫で保管。

4. パネル検査用 ID を発番し依頼書に記載。
5. 腫瘍センターカルテ上から、サンプルシートをダウンロードしサンプルシートにもパネル検査用 ID を入力。
6. 当日中に組織検体の DNA 抽出工程に進めない場合、専用の保管庫にて保管。
7. 当日中に組織検体の DNA 抽出工程に進む場合、既定の方法に従い作業を進行する。

Ⅲ-2 検体処理・測定標準作業書

病理検体を用いた遺伝子解析

【Part A 検査の概要】

1 検査の目的

ヒトのがんの発生、進展、転移、悪性度などに関与する遺伝子変異を、腫瘍組織から抽出したゲノム DNA から解析し、遺伝子変異に対応する抗がん剤の情報を得ることで、がん治療の個別化に貢献する。

2 検査の対象

がんを扱う各外来において、検査内容について十分に文章を提示しながら説明し、所定の同意書をもって同意が得られた患者を検査の対象とする。

3 検査の流れ

生検あるいは手術で得られた腫瘍組織（または細胞）あるいは血液から、それぞれゲノム DNA を抽出し、Human Comprehensive Cancer Panel (QIAGEN 社)と次世代シーケンサーMiSeq (illumina 社)を用いて、アンプリコンシーケンス法で160のがん関連遺伝子について遺伝子配列を解析する。シーケンス結果は三菱スペースソフトウェア社に専用ネット回線を介して転送、解析され、結果をもとに Web で Cancer Genomic Board を開催し、actionable 遺伝子変異、druggable 遺伝子変異の検討、注釈をおこなう。Cancer Board においてオンコロジスト、主治医、病理専門医や関係する医療従事者を交えて推奨される治療について検討し、結果を患者に報告する。

4 試料の種類

血液：本検査のために新たに採取する（約 2mL）。

組織：腫瘍組織あるいは正常組織については、病理診断後の残余組織（細胞）を用いる。あるいは本検査のために新たに腫瘍組織を採取する。

5 試料の選択と取り扱い

1) 院内症例：

組織採取日が最新の組織について、該当する病理組織標本を病理専門医が再確認し、最適なホルマリン固定パラフィン包埋ブロック（formalin-fixed paraffin embedded:

FFPE) を選択する。組織採取から 5 年以上を経過したものや、FFPE の組織量が十分ではない場合は、再度患者に説明したのち、新たに組織を採取することを考慮する。新しく採取する腫瘍組織については、病理部の臨床検査技師が直接組織を受取、ホルマリン固定から管理をおこない、病理診断にて悪性所見を確認後速やかに核酸抽出をおこなう。細胞診検体は Pap 染色標本で腫瘍細胞を確認し、腫瘍細胞が分量ある場合はセルブロックを作製し、セルブロック FFPE から核酸抽出をおこなう。通常細胞診の場合、BD Cytocig RED LBC 保存液に入れ、4℃で保管しているものから核酸抽出をおこなう。

2) 院外症例：

当院へ送付される病理診断書、切り出し図、診療情報提供書を参考に、適切な FFPE から HE 染色標本と未染色標本を作製する。FFPE の貸し出しが出来ない施設では、HE 染色標本とパラフィンロールの作製を主治医に依頼する。

病理組織は外来受診日までに準備し、外来受診時に採血した血液と同時に検査を開始する。

検査に用いる組織の取り扱いについては、日本病理学会による「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規定」にしたがう。

6 検査環境および安全性

- 1) 検査室では清潔な白衣を着用し、検体を取り扱う際には手袋とマスクを着用する。
- 2) シークエンサーは、室温 20～25℃、湿度 40%前後、振動および騒音の少ない場所に設置する。
- 3) 廃液は感染性産業廃棄物として扱う。

7 個人情報に対する配慮

ゲノムシークエンスで得られる情報は、高度な個人情報であることを理解し、その取り扱いについては十分に注意する。当該検査にかかわる医療従事者は、医療安全講習会や個人情報保護に関する講習会などを定期的に受講し、知識の更新につとめる。

【Part B 検査の手順】

1 ゲノム DNA の抽出

使用機器および試薬

- Promega社 MaxWell® RSC system 自動核酸抽出装置を使用 (製品番号 AS4500)
- Promega社 DNA FFPE kit-PKK-Custom (製品番号 AX2500)室温保存
- Vortex mixer
- Heat block (70℃、90℃)
- 1.5mL tube
- Paraffin Dissolver cat# 740968.25 (タカラバイオ)
- 滑走式マイクローム リトラームREM-710 (YAMATO)

FFPEブロックの選択と薄切およびHE染色標本へのマーキング

1. 病理診断時のHE染色標本と病理診断報告書の記載に基づき、必要な腫瘍量を有するFFPEブロックを病理医が選択する。出血や壊死、炎症細胞などの非腫瘍細胞が多いブロックの使用は避ける。
2. 作成後、5年以内のブロックを用いる。
3. 同一患者において、切除・採取時期が異なる検体が複数存在する場合は、作製時期が最新の検体を第一選択とする。
4. FFPEブロックの薄切時は、専用のマイクロトームを用いる。
5. ブロックごとにマイクロトーム刃を交換し、コンタミネーションに十分注意する。
6. 薄切作業にはグローブを着用し、核酸分解防止に留意する。
7. ゲノム診断用に作製した未染色FFPE標本から、再度HE染色標本を作製し、病理医が標本上にマーキングし、腫瘍割合（標本中の全細胞に占める腫瘍細胞の%）を判定する。

FFPE検体からの核酸抽出

前処理

●Promega社 DNA FFPE kit-PKK をもちいる。

1. 500 μ L の Nuclease-Free Water を凍結乾燥品の Proteinase K に加え、20 μ g/ μ L のProteinase K溶液を作製する（溶解後は、小分けして-20°C保存で1年程度は安定して保存可能）。
2. 手術検体 FFPE 切片の場合10 μ M 厚 4枚を 1.5mL tube に入れる。CF、GTF生検検体はFFPE切片の場合10 μ M 厚 6枚を 1.5mL tube に入れる。
3. Proteinase K溶液 20 μ L と incubation buffer 180 μ L をくわえる。
4. 70°Cで10分 incubationする。
5. ボルテックスで攪拌後、遠心する。
6. 70°Cのヒートブロックで overnight incubation する。
7. 450 μ L の Lysis buffer をくわえる。
8. 98°Cのヒートブロックで 1-3時間 incubation後、ボルテックスで攪拌する。
9. 14,000rpmで遠心、パラフィン層を分離する。

未染プレパラートからの核酸抽出

前処理

●Promega社 DNA FFPE kit-PKKをもちいる。

1. 500 μ L の Nuclease-Free Water を凍結乾燥品の Proteinase K に加え、20 μ g/ μ L の Proteinase K 溶液を作製する（溶解後は、小分けして-20°C保存で1年程度は安定して保存可能）。
2. 未染プレパラートの組織部分に paraffin dissolver 150 μ L を添加、なじませた後、メ

ス、病理用ナイフなどを用いて組織片を採取し1.5mL tube に入れる。150 μ Lで採取しきれない場合、本操作を繰り返し、最大1mLまで増やすことができる。

3. 14,000rpmで遠心、上清を廃棄する。
4. 80~98% EtOH 1mL加えvortex後 14,000rpmで遠心、上清を廃棄する。本操作を2回繰り返す。
5. 70°C 3-5分加温し EtOHを揮発させる。
6. 沈殿に Proteinase K 溶液 20 μ L と incubation buffer 180 μ L をくわえる。
7. 70°Cで10分 incubation する。
8. ボルテックスで攪拌後、遠心する。
9. 70°Cのヒートブロックで overnight incubation する。
10. 450 μ L の Lysis buffer をくわえる。
11. 98°Cのヒートブロックで 1-3時間 incubation後、ボルテックスで攪拌する。
12. 14,000rpmで遠心、パラフィン層を分離する。

DNAの抽出操作

1. カートリッジをMaxWell RSC Deck Tray にセットする。
2. Elution tube をセットし、50 μ L の elution buffer をくわえる。
3. カートリッジのウェル8に、プランジャーをおく。
4. サンプル (約600 μ L) をカートリッジのウェルに添加する。
5. MaxWell を起動し、Start から FFPE DNA-PKK/AX2500 を選択する。
6. Deck Tray を本体にセットし、精製をスタートする。

2 抽出 DNA の濃度測定

使用機器及び試薬

- Qubit™ 4 蛍光光度計 DNA/RNA 測定装置を使用



- Qubit® dsDNA BR or HS Assay Kit, for use with the Qubit® 2.0 Fluorometer (100 assays)



❖ 製品番号: Q32850 or Q32851

- Qubit® dsDNA BR or HS Reagent (component A) 200x concentrate in DMSO RT
- Qubit® dsDNA BR or HS Reagent (component B) RT (白いボトル)
- Qubit® dsDNA BR or HS Standard #1 (component C) 4°C
- Qubit® dsDNA BR or HS Standard #2 (component D) 4°C
- Plastic container (disposable) for mixing the Qubit working solution
- Qubit® assay tubes (500 tubes, Life Technologies, ♦ Cat. no. Q32856)

＝Sample 準備＝

Sample は 2 μLを使用する。

1. 0.5 mL qubit tube (Q32856) を必要数 (standard用に2本、sampleの本数) 準備する。
2. Tube のふたにラベリングする。
3. Qubit working solutionを1.5 or 5 mL エッペンチューブに、必要数+1本分、作製する。
1本分
Qubit dsDNA BR or HS Reagent 1 μL
Qubit dsDNA BR or HS Buffer 199 μL
4. Standard 用の qubit tube 2本に 190 μL ずつ Qubit working solutionを入れる。
5. 10 μLの standard (#1 & 2) をそれぞれ入れ、2-3 sec vortexする。
6. サンプル用の qubit tube に 198 μL の Qubit working solutionを入れる。
7. 2 μLの sample DNA を入れ、2-3 sec vortex する。
8. RT 2 min インキュベートする。

Qubit 4 Fluorometer 測定

1. Qubit 4 Fluorometer のHome screen 画面で、[DNA] を押し、[dsDNA BR or HS] を選択するとstandard screenが表示される。
2. Standard screenでstandardを読むために「Yes」を押し。
3. Standard #1 の tube をセットし、ふたを閉めて [Read] を押し、読み取りが終わったら取り出す。
4. Standard #2 の tube をセットし、ふたを閉めて [Read] を押し、読み取りが終わったら取り出す。読み取りが終了したら、sample screen になっている。
5. Sample の tube をセットし、ふたを閉めて、[Read] を押し、読み取りが終わったら取り出す。
6. 上記Stepsを繰り返し、すべてのSampleを測定する。

➤この測定値は、希釈後の濃度が表示されているので下記操作で希釈前の濃度を算出する。

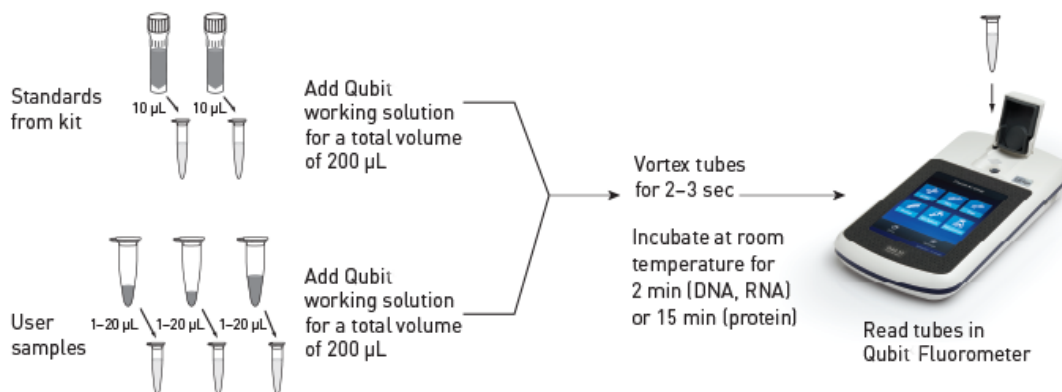
7. サンプル測定後、[Calculate Stock Conc.] を押し、希釈計算 screen を表示させる。

8. volume roller を使って、original sample 量 ($2\mu\text{L}$) を選択すると希釈前の original sample 濃度が計算される。
9. 単位を変更するために、
 - a. [ng/mL] を押す。
 - b. スクロールで [ng/ μL] を選択する。
 - c. 画面を適当にタッチする。
10. [save] を押すと単位などが記憶される。
11. [Read Next Sample] を押す。

= Sample 準備 =

下記の図のようにして standard 1&2、sample を準備し、Qubit 2.0 で測定する。

1. Standard 2本 + sampleに必要な量のworking solutionを作成する。
2. Standard (#1) $10\mu\text{L}$ + working solution $190\mu\text{L}$ をそれぞれqubit tubeに作成する。
3. Sample 各 $2\mu\text{L}$ + working solution $198\mu\text{L}$ をそれぞれqubit tubeに作成する。
4. VortexしてRTで2 minインキュベートする。
5. Qubit 2.0 Fluorometerにて定量する。



Qubit 2.0 の操作方法



1. 初期メニューで目的のアッセイを選択 DNA → dsDNA → BR or HS
2. 画面の指示に従い、各スタンダード チューブを順番通りセットし、サンプルを測定する。
3. 使用するサンプルの量(2 μ L)と必要な濃度単位(ng/ μ L)を入力する。

3 抽出 DNA の品質チェック

使用機器及び試薬

- Rightcycler 96 (Roche)
- GeneRead TM DNA QuantiMIZE Assay Kit
- 96 well plate (メーカー指定のもの)
- Plate シール (メーカー指定のもの)

PCR Mixture の準備

1. PCR component mix 1 (primer Assay 100) & mix 2 (primer Assay 200) をそれぞれ sample数+control 1本分 作製する。エッペンチューブに Assay 100、Assay 200 をそれぞれ作製する。Mastermix は析出しているものが無いようによく溶解し、ピペッティングの際はドロットとしているので注意する。

	1本分	3本	9本	16本
RNase/DNase-free water	10.73	32.19	96.57	171.68
GeneRead qPCR SYBR Green Mastermix	20.63	61.89	185.67	330.08
Primer assay (100 or 200)	1.65	4.95	14.85	26.4
Final volume	33	99	297	528

(単位はいずれも μ L)

2. Mixture 10 μ Lをplate に入れていく。(Step 3.をしてから入れる。)
3. sample+ control gDNAを希釈する。
 - * まず10-15ng/ μ L になるようにgDNA を希釈する。エッペンチューブに 20 μ L 程度作製する。
 - * control と 10-15ng/ μ L に希釈した sample を下記のように希釈する。

Genomic DNA (control or sample)	3 μ L
RNase/DNase-free water	21 μ L
4. 希釈したGenomic DNA 2.5 μ Lを plate に入れていく。
5. Plate にシールする。
6. 1,000 gで1 min RT 遠心して泡を抜く。
7. Real Time PCR をおこなう。

Real time PCR 手順

1. LightCycler 電源オン
----- sample準備前につけて機械を安定化させる-----
2. Readyの画面で eject を押しトレイを出しplateをのせ、手動で閉める。
3. NGS QC check を選びNewを押す。PCR の条件はTable.5参照。
4. Rename画面で、NGS QC checkを選び、file名の後ろに日付を入力し create を押す。
5. Reaction volumeを任意に設定。
6. Start
7. 終了したら、LightCycler96 soft から Instrument manager を選び、send receive experimentsのタブを選ぶ。
8. 解析している項目を選び⇐でサーバー内に移動。Checkマークをつけopenを押す。
9. 解析結果からanalyzeを選択、右上の解析を押す。Abs QuantにcheckでOKを押す。
10. 一覧からすべて選択し、コピーし、下記QIAGENの解析sheet excel fileに張り付けする。

Data Analysis

QuantiMIZE_96_DataAnalysis_sheet.xlsx を使用

1. Raw data & Analysis Setup sheet のsample ID (column I) を各sample名に変更可能
2. Raw data & Analysis Setup sheet のcolumn Bにexportしたdataの値を入れる。
3. Raw data & Analysis Setup sheet のcolumn KのCataloged DNaseq Panel のところへ Calculation sheetのCataloged panels を参考に使用したPanel名を入れる。
*customの場合は、空欄にして、Custom DNaseq Panel;#primers per pool と#poolに数値をそれぞれ入れる。
4. calculation sheetの #cycle を確認し、数値が入ってなければ、数値を入れ Results sheetで、希釈と cycle を確認し、次のステップで使用する。得られた数値の QC score および、amplifiable 値は、最終的な解析結果を参照するうえで非常に重要であるため必ず保存する。

4 ターゲット領域遺伝子の増幅とライブラリの作製

使用機器及び試薬

● GeneRead DNaseq Panel PCR Reagent V2

For 96 samples of a 4-tube panel

QIAGEN #181942

● AXYGEN 309060 PCR-96-FS-C

96 well PCR Plate 0.2mL Full-Skirt

* 96 well plate (蒸発するので端の well の使用は避ける)

● シール Applied Biosystems 4311971

Table 5. Cycling conditions for 96-well or 384-well plates

Cycles	Duration	Temperature	Comments
1	10 min	95°C	HotStarTaq® DNA Polymerase is activated by this heating step
40	15 s	95°C	
	2 min	60°C	Perform fluorescence data collection

MicroAmp Optical Adhesive Film PCR compatible, DNA/RNA/RNase Free

●がん関連遺伝子検査 160

GeneRead DNA Seq Targeted HC Panel V2

Human Comprehensive Cancer Panel NGHS-501X-96 #181901

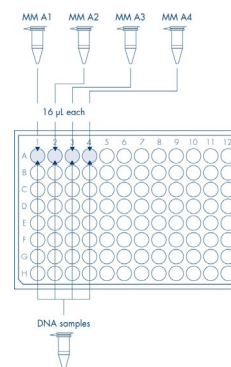
1. DNA の希釈をおこなう。品質は QuantiMIZE の QC score の結果から参考にする。
QuantiMIZEで使用した10-15ng sample を使用しPanel PCRをおこなう
2. PCRに必要な反応数、反応時間を決定する（上記参照）。

通常反応数=18cycles、反応時間=8min 固定

Table 3. PCR program

Cycle	Temperature	Time
1	95°C	15 min
Number of cycles according to tables 4A or 4B	95°C 60°C	15 s 4/8 min*
1	72°C	10 min
1	4°C	∞

* If number of primer pairs is <1200 in each pool, 4 min; if number of primer pairs is 1201–2500 per pool, 8 min. To determine number of primer pairs per pool, refer to tables 4A or 4B.



3. PCR反应用96 well plateに、希釈したDNAを4 µLずつ4 well (4 pools)に分注する。
4. PCR mix を作製する。

*A1, A2, A3, A4の4本をそれぞれエッペンチューブに作製

*下表参照

	検体数	1本分	2本	4本	6本
GeneRead DNA seq Panel PCR Buffer(5x)		4.4	8.8	17.6	26.4
Primer mix pool A1 or A2 or A3 or A4		11	22	44	66
GeneRead HotStarTaq DNA Polymerase(6U/µL)		1.5	3	6	9
DNase-free water		0.7	1.4	2.8	4.2
Total volume		17.6	35.2	70.4	105.6

(単位はいずれも µL)

5. PCR mix を No.3に 16 µLずつ4 well (4 pools) に加える。
6. Plate にシールをし、1,000 x g, 1min RT で遠心して、p.19の Table 3 PCR program (前頁) に従いPCRをおこなう。

Sample Pooling and Purification

使用機器及び試薬

● AMPure XP beads: Bechman coulter A63880 AGENCOURT AMPURE XP

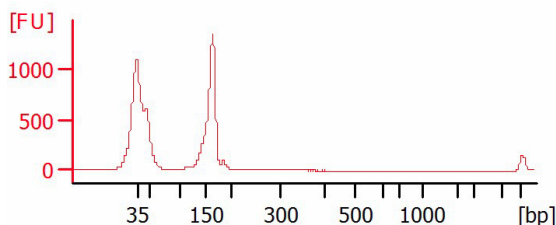
5 mL A63880

60 mL A63881...5mL の容器に分注して使用

Protocol

1. A1~A4の 4 well のサンプルを1 wellに集める。80 μ L
2. 40 μ L ずつ 2 well に分ける。
3. 36 μ L (0.9x volume) の AMPure XP beads を No.2 に加え、pipetting する。
4. 5 min RT インキュベートする。
5. Magnetic rack に約 5min 置いて、上清約 70 μ L を新しい well に入れる。(残り6 μ L)
6. 64 μ L (1.6x original volume) AMPure XP beads を加え、pipetting する。
5min RT インキュベートする。
7. Magnetic rack に約 5min 置いて、上清を除去する。
8. AMPure XP beadsにfresh 80% エタノールを 200 μ L 加え、beadsを2回動かして洗浄する。
9. 8をおこなう。
10. Magnetic rack に 10min 置いたまま、完全にエタノールを除去する。
11. 一方の well に nuclease-free water を加えて、pipetting して、もう一方の well に移しpipetting して、Magnetic rack に約 5min 置いて、上清 (Target DNA) を抽出する。続けて Ligationに行く場合 28 μ L で溶出し 25 μ L をligationに使用、1 μ L をBioanalyzerに使用する。翌日からLigationを行う場合 30 μ L で溶出し 27 μ L をマイクロチューブに回収する。
12. Conc. Check Agilent 2100 Bioanalyzer の the High Sensitivity DNA Kit を使用。

*160 bp のピークが見られ、15-60ng PCR product が得られる



Library Construction Using GeneRead Library Prep Kits for illumine

使用機器及び試薬

● QIAseq 1 step Amplicon Library Kit (96) QIAGEN #180415

● GeneRead DNA Library I Amp Kit (100) QIQGEN Cat no.180455

Library Construction Using the QIAseq 1-Step Amplicon Library Kit for Illumina Sequencing

* QIAseq 1-Step Amplicon Library Kit(96) # 180415 を使用

PCR 産物濃度が High Sensitivity DNA Kit で測定可能な濃度を ligation に使用する。High Sensitivity DNA Kit に使用する量は PCR 産物を 1/3 dilution したものを使用する。

Ex) 1/3 dil 濃度が 4ng そのまま 1/3 量を ligation に使用、1/3 dil 濃度が 8ng 更に 1/2 dil し ligation に使用。

1. Adapter ligation用の反応mixをTable 1に従って作製する。

1 本分		
Purified PCR amplicons from gene panel	25 μ L	濃度により使用量減らす
4x 1-Step Amplicon Library Buffer	12.5 μ L	
Adapter Plate 96-plex illumine	4 μ L	
1-Step Amplicon Enzyme Mix	2 μ L	
DNase-free water	6.5 μ L	濃度により増やす
Total	50 μ L	

2. よくmixする
3. 室温で30 min放置
4. On ice

● Cleanup of adapter-ligated DNA with Agencourt AMPure XP beads ●

1. 50 μ L nuclease-free waterを加えて、40 μ L (0.4x volume) Agencourt AMPure XP beads を加え、pipettingする。
2. 5min RT インキュベートして、Magnetic rackに約5min置く。
3. 133 μ Lの上清を新しいwellに移す。
4. 40 μ L Agencourt AMPure XP beads を加え、pipettingする。
5. 5min RT インキュベートする。
6. Magnetic rackに約5min置き、上清を捨てる。
7. AMPure XP beads に200 μ L 80%エタノールを加え、beadsを2回動かして洗浄して、上清を捨てる。Total 2回繰り返す。
8. できる限り、エタノールを除去して、5-10min beadsが乾くまで待つ。
乾かし過ぎは回収率を悪くするのでよくない。
9. 26 μ L nuclease-free waterを加えて、pipettingして、Magnetic rackに約2min置く。
10. Magnetic rackに置いて、透明な液体になるまで待つ。
11. 上清23.5 μ Lを次のPCRに使用する。

●PCR amplification of purified library●

1. PCR機を立ち上げ、下記のTable 2の温度サイクル (Library amplification) を確認する。

Table 2. Cycling conditions for the amplification of the DNA library

Time	Temperature	Number of cycles
Initial denaturation		
2 min	98°C	1
Annealing		
20 s	98°C	4-10*
30 s	60°C	
30 s	72°C	
Final extension		
1 min	72°C	1
∞	4°C	Hold

基本的に4 cycleで固定

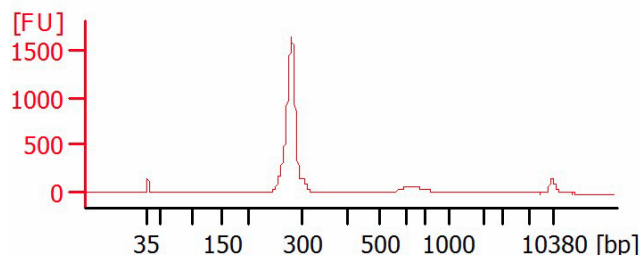
2. 下表に従って、mixを準備する。

1 本分

HiFi PCR Master Mix, 2x	25	μ L
Primer Mix (10 uM each)	1.5	μ L
<u>Library DNA (from 15.)</u>	<u>23.5</u>	<u>μ L</u>
Total	50	μ L

- PCRを行う。
- 50 μ L nuclease-free water を加え、100 μ L Agencourt AMPure XP beads を加え、pipettingする。
- 5min RT インキュベートして、Magnetic rackに置いて、上清を除去する。
- AMPure XP beads に200 μ L 80%エタノールを加え、beadsを2回動かして洗浄して、上清を捨てる。Total 2回繰り返す。
- できる限り、エタノールを除去して、5-10min beadsが乾くまで待つ。
乾かし過ぎは回収率を悪くするのでよくない。
- 30 μ L nuclease-free waterを加えて、pipettingして、Magnetic rackに置く。
上清28 μ Lを回収する。
- Conc. Check Agilent 2100 Bioanalyzerのthe High Sensitivity DNA Kitを使用。
- GeneRead Library Kitでqualitycheck
- 精製したLibraryは、-20°Cで保存。
- Conc. Check Agilent 2100 Bioanalyzerのthe High Sensitivity DNA Kitを使用。

*280 bp のピークが得られる



5 ライブラリの品質チェック

使用機器及び試薬

- Agilent 2100 バイオアナライザ
- High Sensitivity DNA キット dsDNA 50–7000bp 用 (Agilent Technologies 5067–4626)

キット内容

- ・DNA 用ラボチップ 10 枚
- ・電極洗浄用チップ1枚
- ・シリンジ
- ・マニュアル
- ・専用試薬 Box 4°C保存 ピペッティングする時以外は遮光
 - (黄) High Sensitivity DNA Ladder 1 本
 - (緑) High Sensitivity DNA Marker 35/10380 bp 4 本
 - (青) High Sensitivity DNA Dye Concentrate 1 本
 - (赤) High Sensitivity DNA Gel Matrix 2 本
 - スピンフィルター

Gel-Dye Mix の準備

1. High Sensitivity DNA Kit (4°C) からHigh Sensitivity DNA dye concentrate (青)と High Sensitivity DNA gel matrix (赤) のチューブを取り出し、室温暗所で30分 以上 平衡化させる。
2. High Sensitivity DNA dye concentrate (青) 15 μ L をHigh Sensitivity DNA gel matrix (赤) のチューブに加える。
3. ボルテックスでよく攪拌してスピンドウンし、全量をスピンフィルターに移す。
* Gel matrixは、粘性が高いため、ピペット操作はゆっくり行い、ピペットに残らないように注意。
4. 2,600g、10 分 RT で遠心して濾過液を回収し、エッペンチューブ3本 (約80 μ L ずつ) に分注して4°Cで遮光保存。
* 完全に濾過されていない場合は、もう数分遠心する。

* エッペンチューブには「gel」と記載する=gel-dye mix。

DNA library 品質チェックの手順

1. High Sensitivity DNA Kit (4°C) をBoxごとに室温に30分以上置き、使用前に手で軽く攪拌し、スピンドウンする。
2. 室温にしたgel-dye mix=gel をHigh Sensitivity DNA チップのGマーク (黒丸白文字) のウェル(1番右の上から3番目)に9 μ L添加する。



3. シリンジを1mLまで引き、DNAチップをChip Priming Stationにセットして閉じる。
4. タイマーを60秒にセットし、シリンジを押し込んでクリップで止める。
* Syringe clipのレバーは最下段にセットしておく。



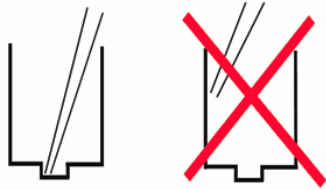
position C

5. 60秒後クリップをはずしてシリンジを戻し、5秒間待ったら、ゆっくりとシリンジを1mLの位置まで戻す。
6. 残り3カ所のGマークウェルに9 μ Lずつgelを添加する。
7. High Sensitivity DNA Marker(緑)を11個のサンプルウェル及びラダーシンボルすべてに5 μ Lずつ添加する。
* サンプルが11個なくても、全てのサンプルウェルに添加する。
8. High Sensitivity DNA ladder(黄)をラダーシンボルのウェルに1 μ L添加する。
9. サンプルウェルに、DNAサンプルを1 μ L添加する。
* サンプルが11個ない場合は、サンプル以外のところはH₂Oを1 μ L添加する。

10. DNA チップを、手で押さえながら、下記の機械で60 秒攪拌する。



11. 5 min 以内にDNA チップをAgilent 2100 Bioanalyzer にセットし、電気泳動を行う。



* gel と High Sensitivity DNA Marker(緑)は、
ピペットの先端をウェルの中央底までつけ、
気泡が入らないよう注意

Agilent 2100 Bioanalyzer の使い方



1. Sampleを準備する前に、機械（電源は後ろ側）とパソコンを立ち上げる。
2. デスクトップのショートカット「2100 Expert」から、ソフトを立ち上げる。
3. InstrumentのChip Summaryのsample Nameを入れる。
4. サンプルが11個フルに無い時は、Run sample を1 to 11から、1 toサンプル数に変更する。
5. DNA Chipを準備し、機械にセットする。

*Chipにセンサーが付いているので、勝手にAssayがhigh sensitivityに設定される。



6. Start を押す。

7. 全ての泳動が終わったら、DNA chipを 600 μ L のH₂Oをウェルに入れた電極洗浄用チップに置き換える。
8. 5 minほどして電極洗浄用チップのH₂Oを捨て、新しい 600 μ L のH₂Oを入れ機械にセットして電源を切る。

ライブラリの定量

使用機器及び試薬

- Qubit™ 4 蛍光光度計 DNA/RNA 測定装置を使用



- Qubit® dsDNA BR or HS Assay Kit, for use with the Qubit® 2.0 Fluorometer (100 assays)



❖ 製品番号: Q32851

- ・ Qubit® dsDNA HS Reagent (component A) 200x concentrate in DMSO RT
- ・ Qubit® dsDNA HS Reagent (component B) RT (白いボトル)
- ・ Qubit® dsDNA HS Standard #1,2 (component C) 4°C
- Plastic container (disposable) for mixing the Qubit working solution
- Qubit® assay tubes (500 tubes, Life Technologies, ❖ Cat. no. Q32856)

= Sample 準備 =

Sample は 2 μ L を使用する。

1. 0.5mL qubit tube (Q32856)を必要数 (standard用に2本、sampleの本数) 準備する。
2. Tube のふたにラベリングする。
3. Qubit working solutionを1.5 or 5 mL エッペンチューブに、必要数 + 1 本分、作製する。

1 本分

Qubit dsDNA BR or HS Reagent 1 μ L

Qubit dsDNA BR or HS Buffer 199 μ L

4. Standard 用の qubit tube 2本に190 μ L ずつ Qubit working solutionを入れる。
5. 10 μ Lの standard (#1 & 2) をそれぞれ入れ、2-3 sec vortexする。
6. サンプル用の qubit tube に 198 μ L の Qubit working solutionを入れる。
7. 2 μ Lの sample DNA を入れ、2-3 sec vortex する。
8. RT 2 min インキュベートする。
9. 算出された濃度に対し、係数をかけ、final concentrationを算出する。
10. すべてのLibrary を混和し40nM Pool を作成したら、改めてQubit dsDNA HS kitにて測定。40nM poolの濃度が3.5-4.5 ng/ μ Lになるように40nM poolを作成する。

6 シークエンス

使用機器及び試薬

- Illumina MiSeq
- MS-102-2002 MiSeq Reagent kit v2 (300 cycles)
- MS-103-1002 MiSeq Reagent kit v2 micro (300 cycles)

* Buffer (PR2 試薬) & フローセル: 4 $^{\circ}$ C保存

* カートリッジ&HT-1: -20 $^{\circ}$ C保存 (1,2kit共通)

* V2試薬キット (MS-102-2002)は3症例 6サンプル分、V2試薬キット Micro (MS-103-1002) は1症例 2サンプル分流す場合にそれぞれ使用する



カートリッジの準備

1. カートリッジを使用1時間前に-20 $^{\circ}$ Cから取り出し解凍を始める。
 - 白いトレイに蒸留水をはり、その中にカートリッジをつけて解凍する。
 - その際、カートリッジ横のMaximum Water Lineを超えないように注意する。
 - 解凍後、4 $^{\circ}$ Cで最長1週間保存できる (4 $^{\circ}$ Cで解凍してもよい)。
 - 解凍後は、ペーパータオルで水分を拭き取り、カートリッジを10回上下反転させ、すべての試薬が溶けていることを確認する。
 - カートリッジを実験台に軽く叩きつけ、試薬チューブから気泡を取り除く。
 - 解凍後はなるべく早くランを開始する。
2. カートリッジに付属しているHT-1(Hybridization Buffer)は、室温で溶解させサンプル希釈に使用するまでon ice に置く。

サンプルシートの作成 (index 確認の際に作製している場合は不要)

Illumina Experiment Manager (IEM) 簡易マニュアル.pdf を参考に作成する。

1. Miseq 電源 ON → IEMのショートカットアイコンで立ち上げる。
2. Create Sample Sheet

3. MiSeq ▶▶Next
4. Categoryで”Other”を選択し、Applicationで”FASTQ Only”を選択し、▶▶Next
5. 情報を入力する。
 - 左) Reagent Cartridge Barcode : MSxxxxxxxx-300V2
 - Sample Prep Kit :
(GeneRead Panel-Adaptor 2種類の場合)
TruSeqHT, Index Reads 2, Cycle Reads 151のPair End
 - Experimental Name : 本検査でのみ使用される連番 (ex PS_01)など
 - Investigator Name : ライブラリ作成者名
 - Description : 記載なし
 - Date : 自動記載
 - 右) 下二つ : Use Adapter Trimming と Use Adapter Trimming Read 2 にチェック
▶▶Next
6. Sample数だけAdd Blank Row で空白行を増やす。(Maximizeチェックで画面を広げる)
7. Sample ID*: 1, 2, 3,...数字を入れる。
8. Sample Name :病理ID(遺伝子外来sample)やNGSIDを入れる。
(これが、fastq file nameになる)
9. Index を選択する。
10. 入力終了したら、Statusが ”Valid“ になっていることを確認する。
11. Invalidの際は、空白などがいないか確認する。
Indexの組合せが理想的でない場合は、”Warning” が表示される ▶▶Finish
12. ファイルの保存先を指定して → save
ファイル名は、自動的に『カートリッジナンバー.csv』
(保存先は、D:\Illumina\Miseq Control Software\Sample Sheets=初期設定)
13. Would you like to view your sample sheet in Excel? → No

MiSeq Control Software (MCS) のセットアップ

1. Miseq Control Software (MCS)の Sequenceを選ぶ。
2. BaseSpaceは使用しないので、
“Use BaseSpace for storage and analysis”のボックスは空欄で ▶▶Next
3. 定期的にwashの指示が出るので、出た場合、Miseq を洗浄する。

Maintenance Wash

20分×3回のwash (2回のwash溶液交換をはさむ)
月に一回実施する。

Stanby Wash

60分×2回のwash (1回のwash溶液交換をはさむ)

7日間以上装置を使用しない場合に実施する。

Stanby Washを行うと、装置はStanby modeになり、次のラン前に必ずMaintenance Washを実施する必要がある。

- wash液は、0.5% Tween 20 in Distilled water (冷蔵保存)
無くなったら、下記の試薬を容器に継ぎ足して作製する。

5mL Tween 20

995mL ddH₂O

- Wash bottleには、350mL程度、wash trayには9.5割程度 0.5% Tween 20を入れる。

希釈・変性したライブラリをザーバーにロードする

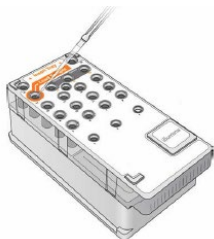
- library pool をエッペンチューブに作製する。
- 4 nM poolになるようにH₂Oで希釈する。
- 0.2N NaOHでdenatureする。
4 nM sample DNA pool (5 μL)
0.2N NaOH (5 μL) ← 用事調整1N NaOH 10 μL H₂O 40 μL
Vortex and stay at RT for 5min.
- pre-chilled HT1を加える。(=20 pM denatured library)
Denature DNA (10 μL)
Pre-chilled HT1 (990 μL)

- クラスター形成数 800K/mm² 付近が理想、少なすぎたり多すぎたりしたら、最終濃度を変える。

Final Concentration	6 pM	8 pM	10 pM	12 pM	15 pM	20 pM
20 pM denatured DNA	180 μl	240 μl	300 μl	360 μl	450 μl	600 μl
Pre-chilled HT1	420 μl	360 μl	300 μl	240 μl	150 μl	0 μl

- サンプルロードと primer ロードは、カートリッジを入れる直前に行うので、それまでサンプルは、on ice に置いておく。

5. カートリッジのLoad sampleのところをチップで穴開けして、サンプル600 μ Lを入れる。

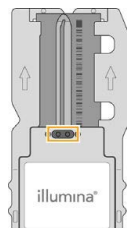


6. QIAseq Targeted DNA Panelのときは、カートリッジposition 18のところをチップで穴開けして、QIAseq A Read1 Primer (Final 0.5 μ M) 600 μ Lを入れる。

フローセルの洗浄、乾燥および設置

❖ フローセルは、バッファーに浸された状態で届く:V2 (白キャップ) Micro(緑キャップ)

1. バッファーを蒸留水に置換したら、プラスチック製のピンセットでプラスチックカートリッジの端部分をつまみ取り出した後、さらに蒸留水で余分な塩を洗い流し、専用のpaper*で水分を拭いて乾かす。
 - グレーの部分の水分は、キムワイプで吸い取ると早い
 - フローセルポートのガスケットは触らない！（図右の□部分）

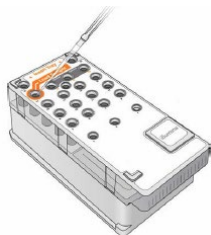


➢ LENS CLEANING TISSUE

Whatman 105 cat no. 2105 841 100x150mm 25 SHEETS

2. フローセル区画のドアを開け、フローセルラッチの右側の白いボタンを押し、ラッチを開け、フローセルをセットする。
 - フローセルをのせる台を蒸留水で湿らせたキムワイプでふいて、析出物などが無いようにする。
 - フローセル右側にガイドピン用の穴が来るようにフローセルを持ちセットする。
3. フローセルラッチを静かに閉め、画面左下で、RFIDの読み取りに成功している事を確認し、フローセル区画のドアを閉め、読み取っていないければ、タッチパネルキーボードでバーコードナンバーを入力し、doneを選ぶ。
4. PR2ボトルを設置し、廃液ボトルを空にして設置、カートリッジをセットする。
5. PR2試薬を穏やかに転倒攪拌して中身を軽く混ぜ蓋をあける。
6. 試薬区画のドアを開け、ノズルのハンドルをロックされるまであげてPR2試薬に置き換える。

7. 廃液ボトルを空にする（wash bufferは、流しに流してよい）。
8. ノズルを下げる。
9. 画面左下のPR2のRFIDが読み取られていることを確認して ▶▶Next
10. 読み取っていない場合は、タッチパネルキーボードでバーコードナンバーを入力し、doneを選ぶ。
11. チラーのドアを開け、wash トレイを引き出し、サンプルをロードし（→ 参考No.4-6.）、カートリッジをセットする。



12. カートリッジのLoad sampleのところをチップで穴開けして、サンプル600 μ Lを入れる。
13. QIAseq Targeted DNA Panelのときは、カートリッジposition 18のところをチップで穴開けして、QIAseq A Read1 Primer (Final 0.5 μ M) 600 μ Lを入れる。
*wash用のトレイが引っ掛かって取り出せない時は、
◀◀Back で戻り、一番左のWashの画面に行く
Raise Slippersを押すと、引き出せるようになるので、
◀◀Back で戻り、再開する
14. 画面左下のカートリッジのRFIDが読み取られていることを確認して ▶▶Next
15. 読み取っていない場合は、タッチパネルキーボードでバーコードナンバーを入力し、doneを選ぶ。

ランパラメーターとプレランチェックの結果再確認と「Start Run」の選択

1. Review screenが開くので確認して ▶▶Next
2. ラン開始前に、プレランチェックで、全てのラン要素、ディスクの空き容量、ネットワーク接続状態をチェックするので、これらのチェックをパスすると、Start Runボタンを押し、ランスタート。
3. Miseqモニタでシークエンスランをモニタリングする。
density値はその後の解析結果のread残存率に非常に影響することからdensity値が800-1000付近になるよう、最終産物濃度を調整する。
4. エラー無く解析終了表示がでたら、MSS解析サーバーにデータを転送する。

Post Run Wash の実施

ランが終了すると、画面上に Next ボタンが表示されるので、Next ボタンを押して、Post Run Wash を始める。

* wash 液は、0.5% Tween 20 in Distilled water（冷蔵保存）

無くなったら、下記の試薬を容器に継ぎ足して作製する。

5mL Tween 20

995mL ddH₂O

1. Run completed without errors画面で 右下の Start Washボタンを押す。
2. Sampleトレイを出し、感染性廃boxにそのまま破棄する。
 (● ごく稀に引き出せない時があるので、強く引き出さない)
 対処法：◀◀Back で戻り、一番左のWashの画面に行く
 Raise Slippersを押すと、引き出せるようになるので、
 Perform Post-Run Washを押して ▶▶Next で続きを行う
3. 廃液（白い容器のピンクの液体）を、残ったPR2試薬のボトルに入れてふたをして、感染性boxに捨てる。
4. グレーのwashトレイにwash液を満たし、セットする。
5. Wash ボトルにwash液を350mL~400mL入れてセットする。
6. Step 3.で空にした廃液ボトルをセットする。
7. Wash start
 *Boxにはチェックを入れなくてよい。
 *約20minでwash終了
8. Done→Home画面の management instrument を選択→shut down→画面が消えるのをまち本体後ろの電源off にする。
 *電源をOFFする前に、Dataが保存されているか確認する。

III-3 検査機器保守管理標準作業書

精度管理標準作業書

標準操作手順書

検査機器保守管理

1 ゲノム DNA の抽出

使用機器および試薬

●Promega 社 MaxWell® RSC system 自動核酸抽出装置（製品番号 AS4500）

1. MAXwell本体電源を入れる。
2. PCの電源を入れる。
3. MAXwell アプリケーションを開き、ホーム画面settingを選ぶ。
4. Selftestを選び動作確認をおこなう。

5. プレートは使用前後に、70%エタノールおよびDNaseRNase除去剤にて清掃をおこなう。

2 抽出 DNA の品質チェック

使用機器及び試薬

●Qubit™ 4 蛍光光度計

1. Qubit本体の電源入れる。
2. HSキットまたはBRキット付属のSTDサンプルを準備する。
3. ホーム画面で測定項目を選択しStandardを選択する。
4. 規定量のStandardサンプルを測定する。
5. HSキットならば下限のRf値は50、上限はおよそ30000前後であること、BRキットならば下限は300、上限は20000前後であることを確認する。

●Rightcycler 96 (Roche)

●GeneRead™ DNA QuantiMIZE Assay Kit

1. Rightcycler96本体の電源入れる。
2. Quantimize kit付属の5ng/ μ L コントロールサンプルを準備する。
3. コントロールサンプルを1:7で希釈する。
4. 100bp、200bp primerと反応させ、qPCR 40cycleおこなう。
5. 100bpのCt値が18, 200bpのCt値が19であることを確認する。

3 ライブラリの品質チェック

使用機器及び試薬

●Agilent 2100 バイオアナライザ

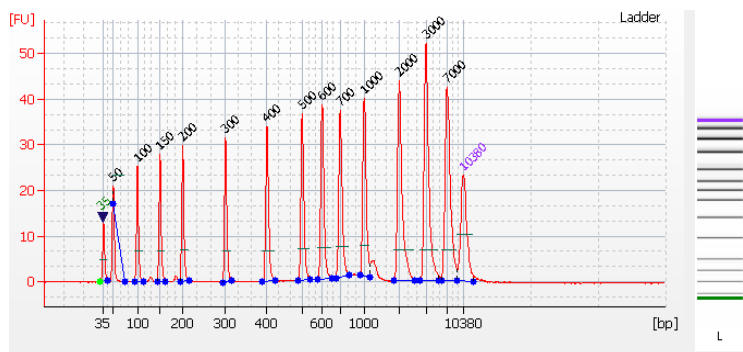
●High Sensitivity DNA キット dsDNA 50–7000bp 用 (Agilent Technologies 5067–4626)

1. 泳動が終わったら、DNA chipを600 μ LのH₂Oをウェルに入れた電極洗浄用チップに置き換える。
2. 5 minほどして電極洗浄用チップのH₂Oを捨て、新しい600 μ LのH₂Oを入れ機械にセットして電源を切る。



3. サンプルが、正しいサイズかどうか、極端に濃度が薄くない、濃すぎないか確認する。

Ladder のイメージ



サンプルのイメージ

マーカー lower 35 と upper 10380 のピークの上にサンプルのピークがくる

シーケンス

使用機器及び試薬

●Illumina MiSeq 定期1

1. 月に1度、精度管理コントロールのシーケンスをおこなう (AcroMetrix Oncology Hotspot Control #969056)
2. Library作成手順は標準作業手順書を遵守しおこなう。
3. シーケンス後のFASRQをMSSサーバーに転送しVAFの確認をおこなう。

●Illumina MiSeq 定期2

1. MiSeqホーム画面から、Washを選び、メンテナンスウォッシュを選択する。
2. 20分3回の洗浄をおこなう。洗浄方法は測定手順書を遵守する。

●Illumina MiSeq

別途 illumina 社と保守点検契約を結ぶ

精度管理

内部精度管理

- 1) DNA抽出のためのFFPE切片は、専用の場所に設置された専用のマイクロームをもちいて作製する。
- 2) プレアナリシスのPCRとライブラリ構築のためのPCRは別の場所で、別のPCR装置をもちいる。PCR産物の保管場所は同じ冷蔵庫などをもちいない。
- 3) ピペティング操作には誤差が生じやすいことを理解し、熟練した臨床検査技師

が核酸などを取り扱う。本検査専用のマイクロピペットをもちい、定期的に校正に
 だす。

- 4) 全行程のチェックリストを作成し、各工程を確実にこなす。
- 5) チェックリストは作業日誌とともに保管する。
- 6) 試薬と検体の分注は原則、同じ日、同じ場所でおこなわない。あるいは検体は最後
 に取り扱う。
- 7) 試薬、機器の管理を徹底し、使用期限、保管条件を厳守する。
- 8) 試薬の品質管理のため、冷蔵庫・冷凍庫の温度を定期的にチェックし記録する。
- 9) 作製されるライブラリの品質に影響が大きい磁気ビーズの操作には、十分な訓練
 をおこなう。
- 10) DNA 識別のための index を付加する操作では、異なる index をピペッティング
 するたびに、手袋を交換する。
- 11) シークエンサーによる解析では、前の Run と次の Run では異なる index をもちい
 る。
- 12) シークエンサーの洗浄操作を各 Run 終了時に毎回おこなう。
- 13) 抽出された核酸、PCR 産物、ライブラリの品質は、Qubit 3.0 Fluorometer、QIAseq
 Library Quant Assay Kit (QIAGEN)、Agilent 2100 バイオアナライザを使用し作業
 の都度確認をおこなう。
- 14) 抽出された核酸分解度については DNA QuantMIZE kit (QIAGEN) で測定する
 ことで検定する。核酸品質が低いものの場合、再生検可能な場合には生検を第一選
 択とし低品質核酸検体の DNA 量を増やして PCR をおこなうといったことは、最
 終的な解析結果において擬陽性が発生し結果の解釈を困難にすることから、おこ
 なってはならない。
- 15) 各工程での品質最低ラインを定め、シーケンス品質が不良の際には、原因が組織
 検体にあるのか PCR の増幅不良あるいはライブラリの不良なのかを特定し、不良
 である工程から再度やり直す。
- 16) PDCA サイクル (Plan・Do・Check・Act) を実施する。

外部精度管理

慶應義塾大学病院腫瘍センターゲノム医療ユニットに適宜、すべての作業工程につい
 ての指導をうける。また、ゲノムシーケンスやゲノム医療に関連した講習会、講演会など
 に積極的に参加し、最新の知識と技術の習得につとめる。

Ⅲ-4 外部委託解析標準作業書

標準操作手順書

パネル検査アノテーションの外部委託

【Part A 概要】

1 アノテーション

変異コールされた配列の意味を知るためにおこなうデータ処理をアノテーションという。鹿児島大学病院ではがんゲノム専属のバイオインフォマティクソンまたはそれに類する常勤担当がないため、アノテーション作業を（株）三菱スペースソフトウェア（以下 MSS）へ委託する。

2 VPN 回線

シークエンス終了後の FASTQ file を転送するために、専用の閉鎖系回線を委託先会社である MSS と結ぶことによって大容量ファイルを安定的にかつ、安全に転送する環境を配備している。

【Part B 手順】

1 データ転送

使用機器および試薬

●解析データ転送用サーバー DEL PowerEdgeT130

1. サンプルシート（Sampleinfo.xlsx）の解析結果項目に FASTQ file 名、QCscore、Amplifiable DNA濃度を記載する。
2. 各サンプル毎に行を変えて記載（1行にはCONTROLとTUMOR両方記載）
3. PANEL カラム： panelの種類を選択
4. 送信ID: 20160923.1（西暦月日.1 同じ日に2個目を送る場合は、西暦月日.2）
5. NAME：病理IDを記載（fastq file nameと一致させる。）
6. TISSUE：FFPE と記載する。
7. RATE: 腫瘍含有率を記載する。
8. Conc: library作製に使用したDNAの濃度を記載（通常は2.5 ng/ μ L）する。
9. Miseqのwindows 画面を出し、clinical short cut をクリックし、New folderを作成して送信IDと同じfolderを作成する。
10. 送信ID folder内に、fastq folderを作成して、下記のファイルを転送する。
 - ・FASTQファイル R1, R2
 - ・Undetermined_indices
11. * FASTQファイルは、D:→Miseq→Data→Intensities→Basecallsにあるものを用いる。
12. 送信ID folder内にStep 1.で作成したSampleinfo.xlsxを入れる。

13. DNA抽出をおこなった検体のHE標本画像を添付する（40倍、100倍、200倍）。

2 データ受領・結果報告

使用機器および試薬

●解析データ転送用サーバー DEL PowerEdgeT130

●ハードウェアキー

1. MSS担当者からアノテーション終了連絡を受けたら、ハードウェアキーにてワンタイムパスワードを確認し、VPN回線にログインする。
2. カンファレンスシートとアノテーションファイル、キュレーションシートをダウンロードしMolecular tumor board (MTB)用資料を作成する。
3. 作製したMTBデータを、VPN回線経由でMSSサーバーにアップロードする。
4. 担当医は、MTB用資料を用いてClinical tumor board (CTB)をおこないエキスパートパネルまでに資料を作成する。
5. 作製したCTBデータをVPN回線経由でMSSサーバーにアップロードする。
6. エクスパートパネル開催後、修正した結果をVPN回線経由でMSSサーバーにアップロードする。

IV. 病理検体を用いた EGFR 検査 標準作業手順書

② EGFR 検査 (NGS 法) 標準作業手順書

第 1 版

使用開始日 2019 年 4 月 1 日

作成	確認	承認
山本	新井	新井
/ /	/ /	/ /

目次

1. 検査の目的（臨床的意義）	41
2. 検査に用いられる手順の原理および測定法	41
3. 性能特性	42
4. サンプルの種類	42
5. 患者の準備	43
6. 容器および添加剤の種類	43
7. 必要な機材および試薬	44
8. 環境および安全管理	47
9. 校正手順（計量測定トレーサビリティ）	48
10. 操作ステップ	48
11. 精度管理手順	50
12. 干渉および交差反応	52
13. 結果計算法の原理、測定不確かさを含む	52
14. 生物学的基準範囲または臨床判断値	53
15. 検査結果の報告可能範囲	53
16. 再検査基準および結果が定量範囲外であった場合の処置	54
17. 警戒値/緊急異常値	54
18. 検査室の臨床的解釈	54
19. 可能性のある変動要因	54
20. 参考資料	54

工程	工程内容	その他/備考
1. 検査の目的（臨床的意義）	<p>上皮成長因子受容体（EGFR：Epidermal Growth Factor Receptor）は膜貫通型受容体チロシンキナーゼである。</p> <p>一般に EGFR に変異が起これば EGFR チロシンキナーゼの ATP 結合部位に構造変化を起こすため、リガンドの刺激がなくても恒常的に活性化するようになり、癌細胞はその増殖や生存がこの経路に依存した状態となる。</p> <p>EGFR チロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI）は、EGFR チロシンキナーゼ領域において ATP の結合を競合的に阻害する。その結果、下流へのシグナル伝達を遮断し、抗腫瘍効果を示す。また、EGFR-TKI は EGFR 遺伝子変異陽性の非小細胞性肺癌に優れた抗腫瘍効果を示す。</p> <p>このことから、薬物療法を考慮している肺癌患者の、科学的な効果予測因子として EGFR 遺伝子変異が最も重要な因子であると認識されている。</p>	<p>EGFR 遺伝子変異検査の手引き 第3.05版、2016</p> <p>臨床検査データブック 2017-2018 669頁、2017</p>
2. 検査に用いられる手順の原理および測定法		
2.1 測定法	Sequence By Synthesis (SBS) 法	
2.2 測定原理	<p>SBS 法とは核酸配列を読み取る方法である。可逆的ターミネーターを用いて、蛍光ラベルされた4ヌクレオチドを用いて DNA 合成を1塩基ずつストップしながら行うことにより、蛍光の種類で1反応ごとに塩基を特定していく。</p>	<p>Nature, 456:53-59, 2008</p>
2.3 パラメーター	下記「10. 操作ステップ」を参照	

3.性能特性	PCR 法、PCR-RFLP 法を用いた EGFR 検査との一致率 「Routine genetic testing of lung cancer specimens derived from surgery, bronchoscopy and fluid aspiration by next generation sequencing.」	Int J Oncol. 2017 May;50(5):1 579-1589.
4. サンプルの種類		
4.1 検体の種類	以下の各種検体から RNA を抽出し、使用する。 1) 腫瘍組織（生検、手術材料） 2) 液状検体（気管支洗浄液、胸水、喀痰、腹水、心嚢液、髄液）	
4.2 検体量	1) RNA 量 RNA を滅菌 Milli-Q 水で 20 ng/ μ L に調整 濃度が 20 ng/ μ L より低い場合は、抽出されたものを濃度変更なしに使用する。 2) 検体採取量 ①腫瘍組織（生検、手術材料） 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 以上 ②気管支洗浄液、胸水、喀痰、腹水、心嚢液、髄液 15 mL スピッツに採取できた量	
4.3 検体の貯蔵及び安定性	1) 腫瘍組織、リンパ節（生検、手術材料） 組織の自己融解による核酸の分解を防ぐために、RNAlater に入れて 2 $^{\circ}$ C \sim 10 $^{\circ}$ C で保存する。核酸抽出が終了した検体は-85 $^{\circ}$ C \sim -75 $^{\circ}$ C で保存する。 2) 気管支洗浄液、胸水、喀痰、腹水、心嚢液 遠心後、沈査を 1 \times PBS にて洗浄する。再度遠心分離した	RNAlater 添付文書 遺伝子関連検査検体品質管理マニ

<p>4.4 測定できない検体</p>	<p>後、上清を捨て、沈査を$-85^{\circ}\text{C}\sim-75^{\circ}\text{C}$で保存する。</p> <p>3) 抽出した RNA は$-85^{\circ}\text{C}\sim-75^{\circ}\text{C}$の超低温で保存する。抽出した RNA の凍結融解は RNA 劣化の原因となり、偽陽性の結果を生じさせる可能性があるため、繰り返さないように注意する。</p> <p>1) 記名の無い検体</p> <p>2) ホルマリンに浸けられたまま提出された検体</p> <p>3) ライブラリ作製後、Agilent 2200 TapeStation でピークの見られない検体</p>	<p>ユアル</p> <p>1) 36 頁</p> <p>2) 41 頁</p> <p>3) 37 頁</p> <p>4) 43 頁、2009</p>
<p>5. 患者の準備</p>	<p>患者の準備を行う必要はない。</p>	
<p>6. 容器および添加剤の種類</p>	<p>1) 2 mL チューブ CryoTube™ Vials (Thermo SCIENTIFIC、CAT NO. 377267 1.8 mL) 添加剤：RNAlater (QIAGEN 社、Cat.No. 76163 20×5 mL) 1 mL 添加</p> <p>2) 15 mL チューブ 15 mL 滅菌 V 底遠心チューブ 赤キャップ (ザルスタット、62.554.001S 500 本入)</p>	

<p>7. 必要な機材および試薬</p> <p>7.1 装置</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="424 456 564 506">装置名</th> <th data-bbox="571 456 922 506">メーカー</th> <th data-bbox="928 456 1121 506">型</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="424 510 564 698">ボルテック ス・ミキサー</td> <td data-bbox="571 510 922 698">Scientific Industries</td> <td data-bbox="928 510 1121 698">VORTEX GENIE 2</td> </tr> <tr> <td data-bbox="424 703 564 842">サーマルサイクラー</td> <td data-bbox="571 703 922 842">Thermo Fisher Scientific</td> <td data-bbox="928 703 1121 842">ProFlex PCR System</td> </tr> <tr> <td data-bbox="424 846 564 940">核酸定量装置</td> <td data-bbox="571 846 922 940">Thermo Fisher Scientific</td> <td data-bbox="928 846 1121 940">Qubit 2.0 Fluorometer</td> </tr> <tr> <td data-bbox="424 945 564 1084">自動電気泳動装置</td> <td data-bbox="571 945 922 1084">Agilent Technologies</td> <td data-bbox="928 945 1121 1084">Agilent 2200 TapeStation</td> </tr> <tr> <td data-bbox="424 1088 564 1227">サーマルサイクラー</td> <td data-bbox="571 1088 922 1227">Thermo Fisher Scientific</td> <td data-bbox="928 1088 1121 1227">Applied Biosystems 2720</td> </tr> <tr> <td data-bbox="424 1232 564 1281">遠心機</td> <td data-bbox="571 1232 922 1281">エッペンドルフ</td> <td data-bbox="928 1232 1121 1281">5415R</td> </tr> <tr> <td data-bbox="424 1285 564 1473">次世代シーケンサー</td> <td data-bbox="571 1285 922 1473">Illumina</td> <td data-bbox="928 1285 1121 1473">MiSeq</td> </tr> <tr> <td data-bbox="424 1478 564 1711">ゲノム解析用サーバーシステム</td> <td data-bbox="571 1478 922 1711">NABE international</td> <td data-bbox="928 1478 1121 1711">TAKERU workstation</td> </tr> </tbody> </table>	装置名	メーカー	型	ボルテック ス・ミキサー	Scientific Industries	VORTEX GENIE 2	サーマルサイクラー	Thermo Fisher Scientific	ProFlex PCR System	核酸定量装置	Thermo Fisher Scientific	Qubit 2.0 Fluorometer	自動電気泳動装置	Agilent Technologies	Agilent 2200 TapeStation	サーマルサイクラー	Thermo Fisher Scientific	Applied Biosystems 2720	遠心機	エッペンドルフ	5415R	次世代シーケンサー	Illumina	MiSeq	ゲノム解析用サーバーシステム	NABE international	TAKERU workstation	
装置名	メーカー	型																											
ボルテック ス・ミキサー	Scientific Industries	VORTEX GENIE 2																											
サーマルサイクラー	Thermo Fisher Scientific	ProFlex PCR System																											
核酸定量装置	Thermo Fisher Scientific	Qubit 2.0 Fluorometer																											
自動電気泳動装置	Agilent Technologies	Agilent 2200 TapeStation																											
サーマルサイクラー	Thermo Fisher Scientific	Applied Biosystems 2720																											
遠心機	エッペンドルフ	5415R																											
次世代シーケンサー	Illumina	MiSeq																											
ゲノム解析用サーバーシステム	NABE international	TAKERU workstation																											

7.2 器具	器具名	メーカー	規格
	0.2 mL チューブ	Thermo Fisher Scientific	
	0.6 mL チューブ	QSP	
	1.5 mL チューブ	エッペンドルフ	
	2.0 mL チューブ	エッペンドルフ	
	30 mL チューブ	Labcon	
	Qubit assay tubes	Thermo Fisher Scientific	
	フィルターチップ	ザルスタット	10 μ L
	フィルターチップ	ザルスタット	100 μ L
	フィルターチップ	ザルスタット	200 μ L
	フィルターチップ	ザルスタット	1000 μ L
	Loading Tip	Agilent	
	チップ	QSP	5000 μ L
	デイスポーザブルピペット	コーニング	5 mL
	デイスポーザブルピペット	コーニング	25 mL
	ピペット	エッペンドルフ	0.5 μ L~10 μ L
	ピペット	エッペンドルフ	2 μ L~20 μ L
	ピペット	エッペンドルフ	10 μ L~100 μ L
	ピペット	エッペンドルフ	20 μ L~200 μ L
	ピペット	エッペンドルフ	100 μ L~1000 μ L
ピペット	エッペンドルフ	500 μ L~5000 μ L	

7.3 試薬	電動ピペッター	FALCON		
	Thermowell 96well Plate	コーニング	96 穴	
	Dyna-Mag 96well Side	Thermo Fisher Scientific	96 穴	
	0.2 mL Skirted 96well PCR Plate	Thermo Fisher Scientific	96 穴	
	96well Plate Foil seal	Agilent	96 穴	
	LENS CLEANING TISSUE	Whatman		
	試薬名	メーカー	保存条件 (°C)	有効期限
	滅菌ミリQ水	自家調製	2~8	滅菌後 3 ヵ月
	99.5%エタノール	WAKO	15~25	記載無
	1N 水酸化ナトリウム溶液	WAKO	記載無	ボトルに 記載
	プライマー (EGFR-1947F)	FASMAC	-30~-10	記載無
	プライマー (EGFR-3095R)	FASMAC	-30~-10	記載無
	QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN	15~25	記載無
	Qubit ds DNA HS Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	Standard 2 ~8、その 他-25~30	記載無
	NEXTERA XT DNA Library Prep Kit	Illumina	4、-20	箱に記載

	Agencourt AMPure XP	BECKMAN COULTER	2~8	箱に記載		
	D1000 Screen Tape	Agilent	2~8	箱に記載		
	D1000 Reagent	Agilent	2~8	箱に記載		
	PhiX Control v3	Illumina	-15~-25	箱に記載		
	MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300 Cycles)	Illumina	Box1:-15 ~-25 Box2:2~8	箱に記載		
	Tween 20, Molecular Biology Grade, 100mL	PROMEGA	15~30	ボトルに 記載		
8.環境および安全管理						
8.1.1 環境 (シーケンシング以外)	1)室温 15°C~25°C 2)湿度 20%~60% 3)Pre-PCR、Post-PCR でエリアを分離する。					
8.1.2 環境 (シーケンシング)	1)室温 22°C±3°C 2)湿度 20%~60%					
8.2 安全管理	検体は、肝炎ウイルス等の感染の危険性を考慮して取り扱う。					

9.校正手順 (計量測定 トレーサビ リティー)	該当なし	
10.操作ステ ップ		
10.1 事前準 備	作業机上とピペットを 70%エタノールで拭く。	
10.2 フロー チャート	<p>EGFR 検査後に追加解析が必要な検体の抽出 (EGFR 検査標準作業手順)</p> <p>↓</p> <p>逆転写 (逆転写反応手順書)</p> <p>↓</p> <p>PCR (本書に記載: 10.3) ProflexNo.1 を使用する。故障等によりやむを得ず変更する場 合には「NGS 用 EGFRPCR ワークシート」に記録する。</p> <p>↓</p> <p>PCR 産物の精製 (QIAquick PCR Purification 手順書)</p> <p>↓</p> <p>PCR 産物の定量・濃度測定 (Qubit 機器操作手順書)</p> <p>↓</p> <p>ライブラリ作製 (NEXTERA XT ライブラリ作製手順書) ABI2720No.9 を使用する。故障等によりやむを得ず変更する場 合には「ライブラリ作製ワークシート」に記録する。</p> <p>↓</p> <p>ライブラリの定性・定量 (Qubit 機器操作手順書、TapeStation 機器操作手順書) *ワークシートは「シングルサイト検証検査標準作業手順書 様 式2 ライブラリ作製ワークシート」を用いる。</p> <p>↓</p> <p>シーケンシング (MiSeq 機器操作手順書)</p>	

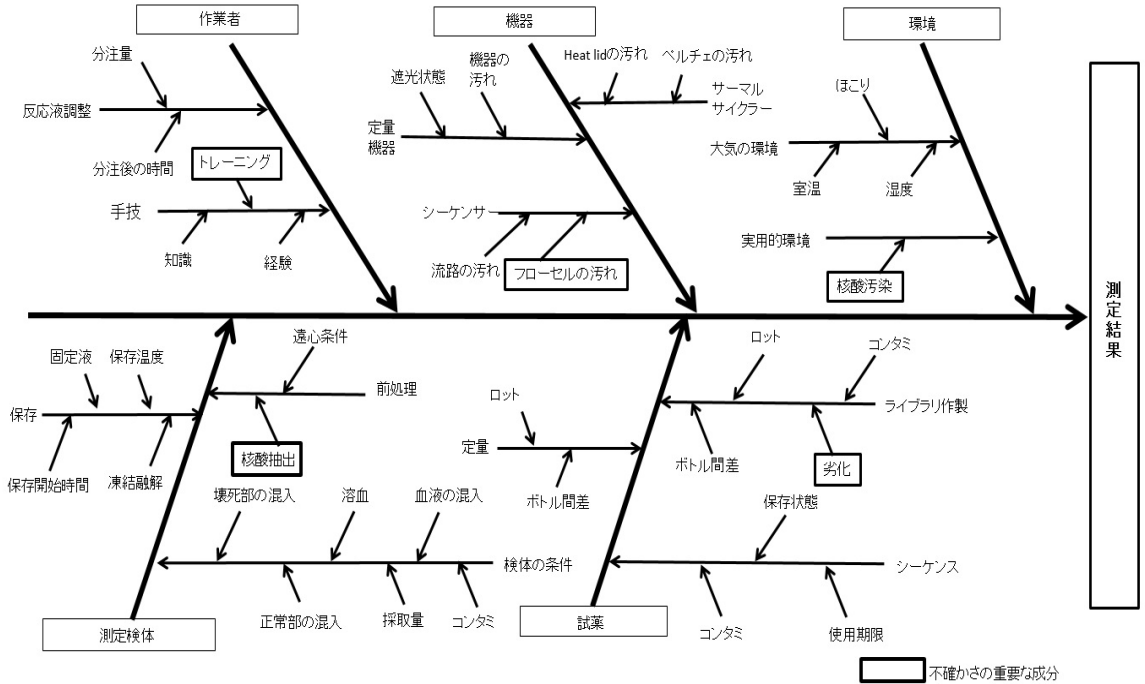
10.3 PCR	<p>*シーケンシングはシングルサイト検証検査の検体と合わせて行う。</p> <p>↓</p> <p>解析（シーケンスデータ解析手順書）</p> <p>↓</p> <p>結果入力・報告（本書 10.4）</p> <p>NGS 用 EGFRPCR ワークシート（様式 1）を作成する。</p> <p>1) プライマー配列</p> <p>EGFR-1947F GAACATCACCTGCACAGGACG</p> <p>EGFR-3095R ATCTGCGTCTATCATCCAGC</p> <p>2) チューブの準備</p> <p>解析を行う逆転写済みの cDNA サンプルを冷凍庫から出す。</p> <p>0.2mL チューブをサンプル数分出し、壁面にサンプル番号と「EGFR」と記載する。</p> <p>PCR ミックスを調製する 0.6 あるいは 1.5mL チューブを 1 本出す。</p> <p>3) PCR ミックスの作製</p> <p>氷上に滅菌ミリ Q 水、10xbuffer、dNTP、F と R のプライマー、Taq HS を出し、10xbuffer と dNTP は溶解後ボルテックスして、卓上遠心機で壁面の液体を落とす。</p> <p>1 サンプルあたり、</p> <p>滅菌ミリ Q 水 30.75 μL</p> <p>10xbuffer 5 μL</p> <p>EGFR-1947F 2 μL</p> <p>EGFR-3095R 2 μL</p> <p>Taq HS 0.25 μL</p> <p>のミックスをサンプル数プラス 1 本の計算で作製する。作製の際にはワークシート上での計算を参考にする。</p> <p>ピペティングでよく混和し、卓上遠心機で壁面の液体を落とす。</p> <p>4) PCR の準備</p> <p>準備した 0.2mL チューブに 44 μL の PCR ミックスを分注し、</p>	
----------	---	--

	<p>それぞれに 6 μL の cDNA を添加する。</p> <p>5) ProFlex PCR System1 を用いて、以下の条件で PCR を行う。 （やむを得ず機器を変更する場合には「NGS 用 EGFRPCR ワークシート」に記録する。）</p> <p>95°C 3分 95°C 30 秒-57°C 30 秒-72°C 90 秒を 40 サイクル 72°C 5分 4°Cでホールド</p> <p>ProFlex PCR System ユーザーガイド参照。</p> <p>6) PCR 後は装置内で 1 晩保存可能、もしくは 4°Cで 1 週間、-20°Cで 1 か月保存可能である。</p>	
10.4 結果入力と報告	<p>結果は「LgNGS 解析結果一覧（様式自由）」と Filemaker（EGFR 手順書 13.1 参照）に入力する。</p> <p>「LgNGS 解析結果一覧」にはサンプル名、検出標的変異、検出された頻度、備考を記載する。</p> <p>Filemaker には「報告経過」に追加解析中か解析済みかを記載し、「進捗 NGS」に結果と報告状況を記載する。</p> <p>追加報告が必要な場合は、報告書を再度発行するか担当医に電カルメールで連絡する。</p>	
11.精度管理手順		
11.1 内部精度管理	<p>1) ライブラリのサイズ、濃度を測定する。</p> <p>2) シークエンス時の Cluster Density、Clusters Pass Filter、Q30 を測定する。</p> <p>3) EGFR 遺伝子領域の最大カバレッジを測定する。</p> <p>4) リードの On target 率（Mapped reads の比率で代用）を測定する。</p>	

	<p>5) PhiX の Align 率を測定する。</p> <p>測定結果は「ライブラリ作製ワークシート」、「精度管理記録」に記載する。</p>	
11.1.1 測定頻度	<p>1) ライブラリのサイズ、濃度はサンプルごと。</p> <p>2) シークエンス時の Cluster Density、Clusters Pass Filter、Q30 はシークエンスラン実施ごと。</p> <p>3) EGFR 遺伝子領域の最大カバレッジは各サンプルごと。</p> <p>4) リードの On target 率はサンプルごと。</p> <p>5) PhiX の Align 率はシークエンスラン実施ごと。</p>	
11.1.2 精度管理基準と外れた場合の対応	<p>1) ライブラリのサイズ：ピーク 200bp 以上 上記のサイズで 4nM ライブラリを作成できる濃度。 精度管理基準を外れた場合には再度ライブラリ作製を行う。</p> <p>2) Cluster Density：700k/mm² 以上 Clusters Pass Filter：75% 以上 Q30：75% 以上 精度管理基準を外れた場合には同じライブラリで再度シークエンスを行う。他の項目が基準を満たしている場合にはサンプル単位で結果を採用する場合がある。また、シークエンサーのメーカーに報告を行い原因を検討する。</p> <p>3) EGFR 遺伝子領域の最大カバレッジ 1000 以上。 精度管理基準を外れた場合には、PCR からやり直す。</p> <p>4) On target 率：70% 以上 精度管理基準を外れた場合には、PCR からやり直す。</p>	

	<p>5)PhiX の Align 率は 2.5%以上。 精度管理基準を外れた場合には同じライブラリで再度シーケンスを行う。また、シーケンサーのメーカーに報告を行い原因を検討する。</p>	
11.2 機器間差の確認	<p>過去に測定した検体（少なくとも 1 検体）を異なる機器 (MiSeq) を用いて測定する。同じ変異が検出されることを確認する。結果は「精度管理実施手順書」に準ずる。</p>	
11.3 外部精度管理	<p>過去に測定した検体、あるいは他の検査方法で変異陽性の検体（少なくとも 1 検体）を測定し、同じ変異が検出されることを確認する。結果は「精度管理実施手順書」に準ずる。</p>	
12.干渉および交差反応	<p>1)腫瘍細胞の少ない検体の場合、偽陰性となる場合がある。 2)RNA の量や状態によって、低頻度で偽陽性が出る場合や測定不能となる場合がある。</p>	
13.結果計算法の原理、測定不確かさを含む		
13.1 結果計算法の原理	該当なし	
13.2 測定不確かさ	該当なし	

13.3 特性要因図



14. 生物学的基準範囲または臨床判断値

14.1 生物学的基準範囲

EGFR 遺伝子変異を認めない。

15. 検査結果の報告可能範囲

解析結果ファイル（アノテーションの付いた vcf ファイル）に検出されている EGFR エクソン 18 から 21 に検出されたアミノ酸置換を伴う頻度 1% 以上の変異。「肺がん患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き」を参照し、他の検査結果（排他的な関係にある変異が検出されているか、がん細胞の含有はどの程度か）を合わせて報告する。

16.再検査基準および結果が定量範囲外であった場合の処置		
16.1 再検査基準と再検査時の対処	精度管理基準を外れた場合の対応に準ずる。	
16.2 再検査時のデータ採択基準	再検査後、カバレッジと On target 率が精度管理基準を満たさない場合には、結果を解析不能とする。	
17.警戒値/緊急異常値	該当なし	
18.検査室の臨床的解釈	EGFR-TKI に対する感受性、耐性の予測 「肺癌患者における EGFR 遺伝子検査の手引き」に従う。 必要な場合は論文やデータベースを参照する。	
19.可能性のある変動要因	1) 定量時の測定誤差 2) RNA の純度	
20.参考資料	1) EX 遺伝 023：肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き 2) EX 遺伝 024：臨床検査データブック 3) PM 共通 001 検査のご案内 4) QS 共通 027：精度管理実施手順書	

	<p>5) SO 遺伝 117: 逆転写反応手順書</p> <p>6) SO 遺伝 108: 核酸抽出 (カラム法) 手順書</p> <p>7) SO 遺伝 109: 核酸抽出 (フェノールクロロホルム法) 手順書</p> <p>8) SO 遺伝 110: 核酸抽出 (FFPE) 手順書</p> <p>9) SO 遺伝 130: QIAquick PCR Purification Kit 手順書</p> <p>10) SO 遺伝 121: NEXTERA XT ライブラリ作製手順書 SO 遺伝 207: MiSeq 機器操作手順書</p> <p>11) SO 遺伝 208: TapeStation 2200 機器操作手順書</p> <p>12) SO 遺伝 209: Qubit 機器操作手順書</p> <p>13) SO 遺伝 129: シークエンスデータ解析手順書</p> <p>14) SO 遺伝 408: 遺伝子検査室業務マニュアル</p> <p>15) EX 共通 506: 遺伝子検査業務支援システム 操作説明書</p> <p>16) EX 遺伝 054: Qubit2.0 Fluorometer User Manual</p> <p>17) EX 遺伝 055: TapeStation 2200 User Manual</p> <p>18) EX 遺伝 056: Agencourt Ampure XP Instruction for Use EX 遺伝 058: Qubit ds DNA HS Assay Kits</p> <p>19) EX 遺伝 061: QIAquick Spin プロトコールとトラブルシューティング</p> <p>20) EX 遺伝 062: QIAquick PCR purification Kit Quick-Start Protocol EX 遺伝 064: NEBNext Multiplex Oligos for Illumina Instruction Manual</p> <p>21) EX 遺伝 065: Dynamag Product description EX 遺伝 067: NEBNext High-Fidelity 2X PCR Master Mix Data sheet</p> <p>22) EX 遺伝 068: Agilent D1000 ScreenTape System Quick Guide</p> <p>23) EX 遺伝 069: MiSeq Specification Sheet</p> <p>24) EX 遺伝 070: Illumina Experiment Manager, v1.7: 簡易マニュアル</p> <p>25) EX 遺伝 071: MiSeq System Denature and Dilute Libraries Guide EX 遺伝 076: Nature, 456:53-59, 2008</p> <p>26) EX 遺伝 079: Applied Biosystems 2720 サーマルサイクラー User Guide</p> <p>27) EX 遺伝 080: ProFlex PCR System ユーザーガイド</p> <p>28) EX 遺伝 081: 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</p> <p>29) EX 遺伝 170: MiSeq System Quick Reference Guide for Miseq Control Software 2.6</p>	
--	---	--

V. NGS データのバイオインフォマティクス解析

V-1 バイオインフォマティクス解析の範囲

本指針が対象とするバイオインフォマティクス解析の範囲は、計算機によって、1) 得られた NGS データをヒトゲノム参照配列にアライメントし、2) 変異を同定し、3) 変異に注釈付けを行ってレポートを作成するまで、とする。変異は、DNA の SNV/indel, CNA, SV (fusion、および、その他の rearrangement) とする。現時点での普及状況を鑑み RNA については触れないが、今後の普及状況によっては指針が更新されるときに含まれるであろう。腫瘍組織を用いた遺伝子パネル検査を主体にしているが、エキソームや全ゲノム、ctDNA などにも将来拡張可能なよう記述している。バイオインフォマティクス解析ツールやデータベースの開発は含まない。既存のツールやデータベースを組み合わせるパイプラインを組み、運用する状況を想定する。

V-2 解析前の準備と留意点

1) 計算機

シーケンスの対象範囲に応じて、データ解析に十分な計算機資源を用意する。特にストレージはデータが蓄積されるにつれ不足しがちになるので、追加および代替ストレージの確保など、計画的に準備する。

2) ファイル転送

ファイル転送の際には md5sum などによって、正常な転送を確認しておくことが望ましい。

3) 個人情報に配慮したデータの取り扱い

配列データは個人情報を含む可能性があるため(日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会合同 2017)、その点に配慮したコンピュータ・システムの構築を行う。たとえば、暗号化ストレージや閉鎖系ネットワークを検討する。インターネットへの接続は、VPN のようなセキュアな経路を確保して行う。クラウドを利用する場合には、3省3ガイドラインを満たすこと。関連して注意すべき点は以下である：1) 通信経路が暗号化されていること、2) データの所有権は利用者に帰属し、利用者以外への譲渡・無断使用が禁止されていること、3) データ返却・削除の権利が利用者に帰属していること、4) 国内法の及ぶ国内にデータセンターがあること。

4) データ保存と中間ファイル

シーケンス結果 (FASTQ など)、アライメント結果 (BAM/CRAM)、変異コール結果 (VCF など)、結果レポート (XML/JSON/YAML など) のデータを、SOP で定めら

れた期間保存する。バイオインフォマティクス解析の計算途中で中間ファイルが発生するが、膨大なデータサイズになるため、ソフトウェアとデータセットから中間ファイルを再生成できる場合は必ずしもそれらすべてを保存する必要はない。しかしながら、不具合が発生した場合に、不具合箇所を効率的に絞り込める程度の中間ファイル、およびログファイルを保存することを推奨する。実行時に使用されたソフトウェアのバージョン情報及び OS などの環境情報についてはログファイルに記録し、データと共に保存する。

5) バージョン管理

ソフトウェア、データベースについてはバージョン管理を行い、使用した版のソフトウェアとデータベースを SOP で定められた期間、保存する。このようにして、その期間ならばいつでも、保存されたシーケンス結果データから、保存された主要段階の結果ファイルおよび結果レポートが再現できるようにしておく。ソフトウェア、データベースを組み合わせたパイプライン全体に対しても、バージョン管理を行う。バージョンが更新された時は、その変更の内容と程度に応じて再検証の範囲を定め、再現性や変更点の確認を実施する。

V-3 品質基準と運用

1) 標準試料

①概要

バイオインフォマティクス解析、特にアライメントや変異コールにおいて、品質や性能を確認したり、その基準を決めたりするため、品質管理された試料である標準試料を用意する。標準試料は、検査系確立のため便宜上用いられる試料であって、いわゆる“ゴールドen・スタンダード”な試料を必ずしも意味しない。標準試料から DNA を抽出し、NGS シーケンスして較正用データとして用いる。

②アライメント

アライメントに対しては、実験手順で品質が保証された標準試料を用いる。がんゲノム検査においては多くの場合、品質が保証された患者由来 FFPE 試料を用いる。この段階では必ずしも変異の有無は問われない。

③変異コール

変異コールに対しては、品質保証に加え、さらに、変異の有無が問われる。感度や特異度を正確に算出するには十分 n が必要であり、そのためには複数の試料に対し変異の有無が広範な染色体領域において明らかにされていなければならないが、実際の検査に近い、そのような FFPE 標準試料は確立されていない。したがって現実には、変異の有無に関しては便宜上の試料が用いられる。

具体的には、1) 広範な染色体領域において変異の有無が分かっている細胞株由来の DNA 試料がある (たとえば、HapMap NA12878)。欠点としては以下が挙げられる：変異は生殖細胞変異 (多型) であってがんの体細胞変異ではないこと、また、細胞株試料であって FFPE 試料ではないこと。

他に、2) がん変異を持つ DNA が人工的に挿入された FFPE 試料がある (たとえば、horizon 社販売の試料)。欠点としては以下が挙げられる：人工的に作製された試料であること、挿入されているがん変異が少ないこと、挿入された変異位置以外の位置に変異無しの保証がされていないこと。

また、3) 他の何らかの方法で変異が確認された、患者 FFPE 試料を用いることもできる。欠点としては以下が挙げられる：入手が比較的困難なため異なる検査系間での普遍性が無いこと、確認された変異位置以外の位置に変異無しの保証がされていないこと。

がん変異を想定した場合、上の 2) と 3) が対象となるが、いずれも変異無しの保証がされていない、つまりネガティブ・コントロールとしての役割が果たせていない。これを補うため、4) 正常組織、または、がん組織周辺の非がん部分の FFPE 試料を、ネガティブ・コントロールとして用いることがある。

具体的な使用としては、たとえば 1) や 2) でコンピュータ・システムの基本的な作動品質、および、理想的な環境下でのデータ品質と解析性能を確認し、3) とさらに 4) で、実際の検査に近い環境下での品質と性能を確認する。3) と 4) で試料数が多ければ多いほど、実際の検査により近い環境を想定したことになる。

2) 品質指標の基準値

品質指標の基準値は検査の目的、シーケンスの対象範囲、使用する化学的処理 (キャプチャーや PCR など)、シーケンサーの種類などによって異なる。標準試料を複数用いて解析し、技術習熟が増すと共に値に収束が見られたら、その安定的な値から平均とばらつき (標準偏差) を出し、それらに基づいて値の基準を決める。その後は、その基準値を参照して品質指標値を毎回監視し、QA/QC を実施する。FFPE 試料はそれが持つ品質のばらつきが大きいため、可能な限り多くの試料を解析し、変動の大きさに習熟しておくことが望ましい。

3) 性能指標値

標準試料を用いて、変異コールの解析性能指標値を算出する。性能指標には、検出限界、感度、特異度、正確度など (他にはたとえば、陽性的中率、陰性的中率、F-measure) がある。調整プロセスで使用した標準試料を用いて性能指標値を算出した場合、オーバー

フィッティングしていることを認識する。標準試料数が十分にある理想的な場合、調整プロセスで使用した試料とは別の標準試料で、性能指標値を算出する。この性能指標値は、オーバーフィッティングしていない。現実的には、入手可能な限りの多くの試料を用いて調整プロセスを実行し、オーバーフィッティングの程度を減らす。指標値を算出した手続きは記録しておく。

4) SOP に基づく運用

運用に当たっては SOP を定義し、トレーサビリティを確保できるよう、SOP に準拠して運用した旨の記録を残す。SOP には品質指標基準値を記載し、検査ごとに品質を監視する。検査ごと、または一定期間ごとに標準試料を用いた監視を行うことが望ましい。

V-4 アライメント

1) 概要

NGS から得られた塩基配列データは、シークエンス・リードまたは略してリードと呼ばれ、FASTQ 形式で与えられる。FASTQ データにアダプター配列が含まれている場合は、アダプター配列除去ツールを用いて、その配列を取り除く。得られた FASTQ データを、アライメント・ツールを用いて、ヒトゲノム参照配列にアライメントし、BAM 形式のデータを得る。その後、必要に応じて PCR 重複除去、base quality score recalibration、local realignment を実行し、加工された BAM データを得る。

2) 補足および留意事項

- アダプター配列除去ツールとして、たとえば、Cutadapt がある。
- ヒトゲノム参照配列は、NCBI (<https://www.nih.gov/>) や USCS genome browser (<https://genome.ucsc.edu/>) から取得する。ターゲット・シークエンスでも、(当て先の配列を絞らないう) 全ゲノム配列を用いてアライメントする方が一般的に望ましい。
- ミスアライメントを防ぐため、アライメントの当て先に、ヒトゲノム参照配列に加えてデコイ配列 (染色体位置が不確定なコンティグなど) を含めることがある。
- アライメント・ツールとして、たとえば bwa、TMAP (ION Torrent シークエンサー用) がある。
- キャプチャー法でターゲット・エンリッチメントした場合、PCR 重複除去を行う。
- アライメント後に得られる形式には、BAM の他に、より新しい CRAM がある。
- Recalibration は、各リードの base (Phred) quality score を積極的に使うベイズ統計に基づいた変異コールにおいて、重要である。Realignment は計算時間を要するが、変異コーラー側で indel の位置ずれを考慮していない場合、重要である。

3) 調整プロセス

この工程では、後述する変異検出の工程と比べてツールの最適化調整を行うことは少

ない。ただし、アライメント・ツールには、ソフトクリップ部分が少なくてもリードを出力できるパラメーターがあり (bwa mem では-T)、ソフトクリップを利用して SV を検出するツールで感度を向上させたい場合には、調整を行う。

4) QA/QC

標準試料を用いて品質指標の基準値を確立し、SOP に記載する。検査ごとに品質指標値を監視し、SOP の基準値を基に警告または解析不良のフラグを立てる。たとえば表 1 のような品質指標がある。

表 1 アライメント段階における QA/QC 指標の例

指標	補足説明
平均深度 (デプス)	対象領域に渡る深度の平均。平均 (average) としては、算術平均 (mean) と中央値 (median) 両方出しておくといよい。
マッピング率	アライメントによって、(ゲノム上のどこかに) マッピングされたリードの割合。
オンターゲット・マッピング率	対象領域にマッピングされたリードの割合。
デプス均一性	対象領域にリードが均一にマッピングされているかの指標。
リード重複率	同じ分子由来の PCR 産物がシーケンスされたと考えられる冗長率。
不一致率	下記の mismatches 率 + indel 率。
mismatches 率	アライメントにおける塩基の不一致の率。
indel (ギャップ) 率	アライメントにおけるギャップの率。

V-5 変異コール

1) 概要

変異コールにおいては、アライメントされた配列データを用い、変異を同定する。変異のタイプには、SNV/indel、CNA、SV があり、それぞれに適したツールを用いて検出を行う。疑わしい変異を除くためのフィルター処理はツールの中に含まれている場合もあり、それとは別にコマンドの実行を要する場合もある。いずれにせよ一般に、フィルター処理がなされて検出が行われる。この計算機によるフィルター処理だけでは精度が不十分な場合があり、これを補うため個別解析や目視確認を行うことがある。

2) 補足および留意事項

① FFPE 試料

- がんゲノム検査で用いられる試料は多くが FFPE 試料であり、学術研究で用いられる凍結試料とは異なる。凍結試料の場合、抽出される DNA は比較的品质が一定で良質である。しかし FFPE 試料の場合、その化学的処理の影響を受けて DNA は変性し、塩基に置換が起きたり断片化が進んだりする。一部のツール（たとえば cisCall(Kato, Nakamura et al. 2018)) を除き、多くの変異検出ツールは FFPE 試料を想定していないため、そのようなツールを使用する場合は調整プロセスが一般に必要となる。

②検出ツール

- SNV/indel の検出ツールとしては、たとえば、cisCall (cisMuton)(Kato, Nakamura et al. 2018), Mutect2, Strelka2(Kim, Scheffler et al. 2018), Pindel(Ye, Schulz et al. 2009), GATK Haplotype Caller, Ion Reporter (Ion Torrent Variant Caller) がある。
- CNA の検出ツールとしては、たとえば、cisCall (cisCton) (Kato, Nakamura et al. 2018), Ion Reporter がある。
- SV の検出ツールとしては、たとえば、cisCall (cisFusion) (Kato, Nakamura et al. 2018), Delly(Rausch, Zichner et al. 2012) がある。

③フィルター処理と目視確認

- フィルターには、リードを除去するフィルター、コール過程でリードの特定箇所を除去するフィルター、変異自体を除去するフィルター（変異フィルター）がある。前二者では、mapping quality score や base (Phred) quality score が頻繁に用いられる。
- 変異フィルター処理を行う場合、どの変異がフィルターによって除かれたのか、フラグを立てて記録を残すことが望ましい。さらに言えば、どの変異フィルターによって除かれたのかも記録することが望ましい。
- フィルターが効き過ぎて変異を取り除きすぎているかも知れない。そのような疑義が発生した場合、ツールやフィルターなどが記録した指標値やデータに基づき、基準を満たせば変異を復元する。ただし、どのような基準を満たせば復元するかは予め決め、SOP に記載しておく。
- フィルター処理後でもなお疑わしい変異や、フィルターで変異を除去しすぎている疑義が発生した場合、マッピングされたリード周りを視覚化するツール（たとえば IGV(Thorvaldsdottir, Robinson et al. 2013)) を用いて目視確認し、変異を除去・復元することがある。
- 目視確認による変異の除去・復元は、人間のパターン認識に基づくためその判断の根拠を記述しづらいが、少なくとも目視確認によって除去・復元された変異にフラグを立てて記録を残す。ただし、目視確認による除去・復元は検出終盤行程での微調整としての位置づけであり、最小限に止めるべきである。

④ 変異検出で注意を要すべき事項

- 誤検出を発生させる要因として、1) ミスアライメント、2) マップされたリードの端、3) 繰り返し配列領域、4) 高 GC-content 領域、が挙げられる。特に FFPE 試料由来 NGS データの場合、これらの要因効果が増すことがある。調整プロセス、および、フィルター処理、目視確認において、注意が必要である。

3) 調整プロセス

- FFPE 試料由来 NGS データに既存の変異検出ツールやフィルターをそのまま適用すると、一般にエラーが多い。なぜなら既存のプログラムは、凍結試料や特定の実験プラットフォームに由来する NGS データに対して最適化調整されているからである。
- 既存ツールにおける調整の対象としては、SNV/indel、CNA、SV それぞれに関し、たとえば、変異リード数、logR/マップリード数、サポートリード数に関わる統計的指標（その値自体、割合、分子、分母、P 値、尤度、事後確率、など）、が挙げられる。ただしこれらだけに限定されるわけではない。
- 上記調整だけでは、特に FFPE 試料の場合限界があり、フィルターの調整も必要となる。フィルターの調整は、フィルターごとの個別調整になる。
- これらのバイオインフォマティクス解析プログラムは複雑なアルゴリズムから構成されるため、調整のための理論的な指針は存在せず、事実上経験則から調整を行う。
- できる限り多くの異なる標準試料を用いて、調整を行う。標準試料の限界やオーバーフィッティングの可能性を認識しつつ、性能指標（検出限界、感度、特異度、正確度など）の値を算出する。
- 調整によっては計算時間が増すことがある。検査の目的に応じた turn around time を念頭に置いて制限時間を定義し、その時間内に計算が収まるよう調整する。

4) QA/QC

標準試料を用いて品質指標の基準値を確立し、SOP に記載する。検査ごとに品質指標値を監視し、SOP の基準値を基に警告または解析不良のフラグを立てる。たとえば表 2 のような品質指標がある。

表 2 変異コール段階における QA/QC 指標の例

対象変異	指標	補足説明
SNV/indel	変異箇所での深度	少ない場合注意。
	変異箇所に変異を持つリード数	少ない場合注意。
	VAF (変異アレル頻度)	低い場合注意。
	ストランド・バイアス	偏っている場合注意。
	C>T, G>A 変異の数	FFPE 処理による化学反応 (脱アミノ化) で生じやすい擬陽性変化。多過ぎる場合注意。

CAN	LogR	0 付近は注意。
	CNA 領域 (segment) にマッピングしたリードの数	正常組織がある場合には、正常組織のデータに対しても。少ない場合注意。
	該当遺伝子における CNA 領域 (segment) の被覆率	小さい場合注意。
SV	サポートリードの数	少ない場合注意。
	サポートリードの割合	分母は breakpoint における総リード数。小さい場合注意。分母に関しても。
	サポートリード内部における soft clipping 塩基部分の割合	小さい場合注意。
	breakpoint 候補の数	アライメントによっては breakpoint がずれる。多過ぎる場合注意。
General	検出変異数	多過ぎる場合注意。ただし SNV/indel に関しては、単に TMB high の可能性もある。
	計算時間	長過ぎる場合注意。制限時間を予め決めて、強制終了させる。原因を調べる。

V-6 アノテーションとレポート作成

1) 概要

コールされた変異に、データベースとアノテーション・プログラムを使用して、アミノ酸変化、多型 (たとえば SNP)、TMB、コンタミネーションの可能性、候補薬剤などの注釈付けを行う。その情報を整形し、患者臨床情報を付与して直感的に把握しやすいレポートを作成する。より詳細な情報は別紙添付の形で行う。

2) 補足および留意事項

①アノテーション

- アノテーションには、アミノ酸変化や多型の注釈を行う生物学的アノテーションと、薬剤や臨床試験の注釈を行う医学的アノテーションがある。
- 生物学的アノテーションを行うプログラムには、たとえば、Annovar(Wang, Li et al. 2010)、snpEff(Cingolani, Platts et al. 2012)がある。使用するデータベースも定義されている。
- がん生物学的なアノテーションを行うプログラムには、たとえば、Oncotator(Ramos, Lichtenstein et al. 2015)があり、そのためのデータベースとしては、たとえば COSMIC(Tate, Bamford et al. 2019) がある。
- 医学的アノテーションを行うに必要なデータベース (医学的データベース) には、たとえば、OncoKB(Chakravarty, Gao et al. 2017)、Cancer Genome Interpreter(Tamborero,

Rubio-Perez et al. 2018)がある。

- 使用するデータベースには一定の基準が求められる(FDA 2018)。使用するデータベース(特に医学的データベース)には、専門家によって十分にキュレーションされたデータベースを推奨する。
- コールされる変異表記と医学的データベースで使用される変異表記とは、表記上および概念上のギャップがある場合があり、その場合うまく結合できない。たとえば、医学的データベースにおいて *PIK3CA* の変異表記が"oncogenic mutation" である場合、コールされる変異表記と直に紐付けることができない。公開されている医学的データベースをそのまま用いるのではなく、知識によって変異表記を調整する必要がある。
- 腫瘍組織しか用いない検査系の場合、体細胞変異/生殖細胞変異の区別を注釈すべきではない。その判断は、エキスパート・パネルに委ねる。
- コンタミネーション検出プログラムには、たとえば、ContEst (Cibulskis, McKenna et al. 2011) がある。

②表記

- アミノ酸変化を注釈するために必要な transcript ID に関しては、accession と version 両方を含めた完全な ID を記録しておく。
- 遺伝子名の表記は、HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) が定めた表記の使用を推奨する。版管理に注意。
- 遺伝子変異の表記は、Human Genome Variation Society (HGVS) が定めた表記の使用を推奨する。版管理に注意。HGVS 表記だけだと意味が取れない場合があるので、より説明的な表記を付属させてもよい(たとえば、プロモータ上の変異の場合(Li, Datto et al. 2017))。

③レポート

- レポートに載せる変異の基準を予め決めておく。たとえば、VUS はレポートに載せる必要が無いかもしれない。
- レポートは XML や JSON のような形式で作成し、それを PDF のような形式に変換して可読化するのが望ましい。
- レポートの内容については、文献(日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会合同 2017)を参照。

3) 調整プロセス

TMB 算出やコンタミネーション検出には、調整が必要である。ポジティブ・コントロール、ネガティブ・コントロールのための標準試料を用意し、調整を行う。TMB の場合、TMB 算出のための染色体領域を調整するほか、変異コールまで戻って調整を行う可能性がある。

コンタミネーション検出の場合、対象 SNP の調整などを行う。

V-7 がんゲノム情報管理センター(C-CAT)へのデータ送付

1) 概要

日本における良質ながんゲノム医療を実現するために、がんゲノム情報センター (C-CAT) が設立された。その主な機能は以下である。1) 保険診療下のがんゲノム検査データを受領し、候補薬剤とそれに紐付く臨床試験情報が記載された「C-CAT 調査結果」というレポートを患者ごとに作成し、医療機関へ提供する。2) 保険診療および先進医療下のがんゲノム検査データを受けて情報を集約し、整理された情報を研究開発のため利用者に提供する。ここで研究開発の有用性をさらに高めるため、検査時のデータだけでなく、薬剤応答などのフォローアップ情報も受領する。

また、上記の機能を効率的に果たすため、全国の臨床試験情報を集積した医学的データベースである「がんゲノム知識データベース」を作成する。他にも、異なる遺伝子パネル検査システムに由来するゲノムデータを統一的に扱って、C-CAT 調査結果やデータベースを効率的に作成できる標準化フォーマット、「がんゲノムデータ標準化フォーマット (仮)」を現在 (2020 年 3 月) 策定中である。

2) ゲノムデータの送付

2019 年 6 月に保険収載された「がんゲノムプロファイリング検査」において、がんゲノム医療中核拠点病院等の医療機関は、C-CAT 調査結果を用いてエキスパート・パネルを開催することが求められており、そのため医療機関は C-CAT へ保険診療下のがんゲノム検査データを送付する必要がある。

バイオインフォマティクス解析に関連した要請としては、検査データの中のゲノムデータの送付である。C-CAT は、検査時のシークエンス・データ (いわゆる"生"データ) と、検査結果報告書に記載された変異データを求めている。その具体的形式は、現在、1) 検査時のシークエンスデータとしては、FASTQ、BAM、または両方、2) 検査結果報告書記載の変異データとしては、VCF、XML 等で表現されたレポート、または両方、を求めている。

今後、1) に関しては、CRAM も選択肢に入れることが検討されている。2) に関しては、様々な遺伝子パネル検査に由来するゲノムデータを効率的に処理するため、現行の形式ではなく、上記がんゲノムデータ標準化フォーマット (仮) で提出することが求められる予定である。

参考資料

がんゲノム医療検査指針の参考となる資料を挙げる。

- (臨床検査振興協議会 2019)
- (日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会合同 2017)
- (Sboner and Elemento 2016)
- (Kim, Park et al. 2017)
- (Roy, Coldren et al. 2018)

引用文献

Chakravarty, D., J. Gao, S. M. Phillips, R. Kundra, H. Zhang, J. Wang, J. E. Rudolph, R. Yaeger, T. Soumerai, M. H. Nissan, M. T. Chang, S. Chandarlapaty, T. A. Traina, P. K. Paik, A. L. Ho, F. M. Hantash, A. Grupe, S. S. Baxi, M. K. Callahan, A. Snyder, P. Chi, D. Danila, M. Gounder, J. J. Harding, M. D. Hellmann, G. Iyer, Y. Janjigian, T. Kaley, D. A. Levine, M. Lowery, A. Omuro, M. A. Postow, D. Rathkopf, A. N. Shoushtari, N. Shukla, M. Voss, E. Paraiso, A. Zehir, M. F. Berger, B. S. Taylor, L. B. Saltz, G. J. Riely, M. Ladanyi, D. M. Hyman, J. Baselga, P. Sabbatini, D. B. Solit and N. Schultz (2017). "OncoKB: A Precision Oncology Knowledge Base." JCO Precis Oncol **2017**.

Cibulskis, K., A. McKenna, T. Fennell, E. Banks, M. DePristo and G. Getz (2011). "ContEst: estimating cross-contamination of human samples in next-generation sequencing data." Bioinformatics **27**(18): 2601-2602.

Cingolani, P., A. Platts, L. Wang le, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, S. J. Land, X. Lu and D. M. Ruden (2012). "A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3." Fly (Austin) **6**(2): 80-92.

FDA (2018). Use of Public Human Genetic Variant Databases to Support Clinical Validity for Genetic and Genomic-Based In Vitro Diagnostics, Guidance for Stakeholders and Food and Drug Administration Staff.

Kato, M., H. Nakamura, M. Nagai, T. Kubo, A. Elzawahry, Y. Totoki, Y. Tanabe, E. Furukawa, J. Miyamoto, H. Sakamoto, S. Matsumoto, K. Sunami, Y. Arai, Y. Suzuki, T. Yoshida, K. Tsuchihara, K. Tamura, N. Yamamoto, H. Ichikawa, T. Kohno and T. Shibata (2018). "A computational tool to detect DNA alterations tailored to formalin-fixed paraffin-embedded samples in cancer clinical sequencing." Genome Med **10**(1): 44.

Kim, J., W. Y. Park, N. K. D. Kim, S. J. Jang, S. M. Chun, C. O. Sung, J. Choi, Y. H. Ko, Y. L. Choi, H. S. Shim, J. K. Won and P. Molecular Pathology Study Group of Korean Society of (2017). "Good Laboratory Standards for Clinical Next-Generation Sequencing Cancer Panel Tests." J Pathol Transl Med **51**(3): 191-204.

Kim, S., K. Scheffler, A. L. Halpern, M. A. Bekritsky, E. Noh, M. Kallberg, X. Chen, Y. Kim, D. Beyter, P. Krusche and C. T. Saunders (2018). "Strelka2: fast and accurate calling of germline and somatic variants."

Nat Methods **15**(8): 591-594.

Li, M. M., M. Datto, E. J. Duncavage, S. Kulkarni, N. I. Lindeman, S. Roy, A. M. Tsimberidou, C. L. Vnencak-Jones, D. J. Wolff, A. Younes and M. N. Nikiforova (2017). "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**(1): 4-23.

Ramos, A. H., L. Lichtenstein, M. Gupta, M. S. Lawrence, T. J. Pugh, G. Saksena, M. Meyerson and G. Getz (2015). "Oncotator: cancer variant annotation tool." Hum Mutat **36**(4): E2423-2429.

Rausch, T., T. Zichner, A. Schlattl, A. M. Stutz, V. Benes and J. O. Korbel (2012). "DELLY: structural variant discovery by integrated paired-end and split-read analysis." Bioinformatics **28**(18): i333-i339.

Roy, S., C. Coldren, A. Karunamurthy, N. S. Kip, E. W. Klee, S. E. Lincoln, A. Leon, M. Pullambhatla, R. L. Temple-Smolkin, K. V. Voelkerding, C. Wang and A. B. Carter (2018). "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**(1): 4-27.

Sboner, A. and O. Elemento (2016). "A primer on precision medicine informatics." Brief Bioinform **17**(1): 145-153.

Tamborero, D., C. Rubio-Perez, J. Deu-Pons, M. P. Schroeder, A. Vivancos, A. Rovira, I. Tusquets, J. Albanell, J. Rodon, J. Taberner, C. de Torres, R. Dienstmann, A. Gonzalez-Perez and N. Lopez-Bigas (2018). "Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations." Genome Med **10**(1): 25.

Tate, J. G., S. Bamford, H. C. Jubb, Z. Sondka, D. M. Beare, N. Bindal, H. Boutselakis, C. G. Cole, C. Creatore, E. Dawson, P. Fish, B. Harsha, C. Hathaway, S. C. Jupe, C. Y. Kok, K. Noble, L. Ponting, C. C. Ramshaw, C. E. Rye, H. E. Speedy, R. Stefancsik, S. L. Thompson, S. Wang, S. Ward, P. J. Campbell and S. A. Forbes (2019). "COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer." Nucleic Acids Res **47**(D1): D941-D947.

Thorvaldsdottir, H., J. T. Robinson and J. P. Mesirov (2013). "Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration." Brief Bioinform **14**(2): 178-192.

Wang, K., M. Li and H. Hakonarson (2010). "ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data." Nucleic Acids Res **38**(16): e164.

Ye, K., M. H. Schulz, Q. Long, R. Apweiler and Z. Ning (2009). "Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads." Bioinformatics **25**(21): 2865-2871.

日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会合同 (2017). 次世代シーケ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ドライン第 1.0 版.

臨床検査振興協議会 (2019). 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 2.0 版.

デザイン・構成 田中理佳
(一般社団法人日本病理学会 事務局)