

平成25年度戦略的技術開発委託費  
医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業  
(医療機器に関する技術ガイドライン作成のための支援事業)

テーラーメイド医療用診断機器分野  
開発ガイドライン  
普及活動WG報告書

平成26年3月

独立行政法人 産業技術総合研究所



平成25年度 テーラーメイド医療用診断機器分野 開発ガイドライン 普及活動WG 委員名簿  
(敬称略、五十音順、※座長)

|        |   |
|--------|---|
| 秋山 英雄  | 東レ株式会社 新事業開発部門 主席   |
| 油谷 浩幸  | 東京大学 先端科学技術研究センター 教授                                      |
| 磯部 信一郎 | 九州産業大学 工学部 物質生命化学科 教授                                     |
| 岡村 浩   | 東洋鋼鈹株式会社 技術企画部 技術企画グループ<br>グループリーダー                       |
| 楠岡 英雄  | 国立病院機構 大阪医療センター 院長  |
| ※久原 哲  | 九州大学大学院 農学研究院 教授  |
| 桑 克彦   | 一般社団法人 臨床検査基準測定機構 会長                                      |
| 田谷 敏貴  | アジレント・テクノロジー株式会社ゲノミクス部門バイオアプリケーショングループ シニアアプリケーションコンサルタント |
| 中江 裕樹  | 特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム 事務局長                               |
| 橋本 幸二  | 株式会社東芝 部品材料事業統括部 DNAチップ事業推進統括部<br>DNAチップ技術・開発担当 グループ長     |
| 的場 亮   | 株式会社DNAチップ研究所 代表取締役社長                                     |
| 森 康晃   | 早稲田大学大学院 創造理工学研究科 経営デザイン専攻 教授                             |
| 若本 明子  | アフィメトリクス・ジャパン株式会社 マーケティング部<br>マーケティング スペシャリスト             |

開発WG事務局

木山 亮一 (独) 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 上級主任研究員

テーラーメイド医療用診断機器分野 開発ガイドライン 普及活動WG委員会 開催日

第1回普及活動WG委員会

開催日時 平成25年11月13日(水)

第2回普及活動WG委員会

開催日時 平成26年2月26日(水)



## 目次

|  |     |
|--|-----|
| 1. 「テーラーメイド医療用診断機器分野」の概要 .....               | 1   |
| 2. 「テーラーメイド医療用診断機器分野」における開発ガイドライン普及活動の意義 ... | 2   |
| 2.1 診断用DNAチップ.....                           | 2   |
| 2.2 本開発ガイドライン事業について.....                     | 3   |
| 2.3 診断用DNAチップの開発と国際標準化動向.....                | 5   |
| 3. 開発ガイドライン普及活動の検討過程 .....                   | 8   |
| 3.1 開発ガイドライン解説書の検討.....                      | 8   |
| 3.1.1 第1回普及活動WG委員会 .....                     | 8   |
| 3.1.2 第2回普及活動WG委員会 .....                     | 12  |
| 3.2 話題提供 .....                               | 20  |
| 3.2.1 話題提供（1） .....                          | 20  |
| 3.2.2 話題提供（2） .....                          | 21  |
| 3.2.3 話題提供（3） .....                          | 23  |
| 3.3 欧米におけるDNAチップ関係の資料.....                   | 26  |
| 3.3.1 FDAによる次世代シーケンサー販売認可に関する資料（翻訳文）.....    | 26  |
| 3.4 DNAチップに関するインターネット検索.....                 | 30  |
| 3.4.1 調査目的及び方法.....                          | 30  |
| 3.4.2 調査結果.....                              | 31  |
| 3.4.3 まとめと考察.....                            | 46  |
| 4. 開発ガイドライン普及活動の結果 .....                     | 47  |
| 4.1 開発ガイドライン解説書の作成過程.....                    | 47  |
| 4.2 開発ガイドライン解説書原稿.....                       | 48  |
| 5. 平成25年度の総括と今後の展望 .....                     | 129 |
| 5.1 平成25年度の総括.....                           | 129 |
| 5.2 今後の展望.....                               | 131 |

|   |     |
|---|-----|
| 参考資料 .....  | 133 |
| 1. 「テーラーメイド医療用診断機器分野遺伝子発現解析用DNAチップ〔改訂版〕開発ガイドライン2012」経済産業省（平成25年3月） .....                  | 134 |
| 2. 「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－遺伝子型（ジェノタイピング）検定用DNAチップに関して－」経済産業省（平成19年5月） ..... | 143 |
| 3. 本年度ガイドライン事業の説明資料：「医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業（経済産業省）」 .....                           | 151 |
| 4. 本年度DNAチップ開発ガイドライン事業の説明資料：「DNAチップ開発ガイドライン事業の説明」 .....                                   | 162 |

## 1. 「テーラーメイド医療用診断機器分野」の概要

テーラーメイド医療用診断機器とは、それぞれの患者の疾病の状態に応じて最適の治療（テーラーメイド医療、あるいは個別化医療）を行うために、形質・体質や疾病の状態に関するデータを科学的手法を用いて取得・分析するための診断機器である。2003年にヒトゲノム計画が終了するとともに「ポストゲノム」時代の医療機器として開発が進んでおり、急速な発展のために、医療機器として必要とされる装置の性能や信頼性に関する基準や判定法などが十分に整備されていないことから、様々な検証や検討が求められている。特に遺伝子情報を用いるテーラーメイド医療用診断機器は、装置の先進性とデータ処理の複雑さや判定の特異性など、様々な点から検討が必要であり、政府や企業単独では十分な検証ができないことから、政府が主導して企業や公的研究機関がコンソーシアムを作って検証を行い、ガイドラインなどの文章化と国際的な標準化を進めている。DNAチップは、遺伝子の形質や発現など様々な重要な情報が得られることから、ヒトゲノム計画とともに開発が進み、診断利用に対して大きな期待がもたれている装置であり、次世代の体外診断薬として開発が精力的に進められている。また、DNAチップに関しても、国際的にはコンソーシアムを作って臨床応用や標準化が進められており、我が国でも薬事申請の動きが見られた平成18年に、経済産業省及び厚生労働省の両省においてそれぞれガイドライン策定事業を開始し、コンソーシアムの設立を視野に入れて、初めて関係企業や研究者を集めたガイドラインの策定のための委員会を設立した。ガイドライン策定事業では、それぞれの省から委託を受けた研究所（経済産業省は産業技術総合研究所、厚生労働省は国立医薬品食品衛生研究所）が、それぞれ開発ガイドライン案、評価指標案という形で提言を出し、それぞれの省で修正・承認を得た後に、経済産業省から開発ガイドライン、厚生労働省から通知という形で公表される。

本「テーラーメイド医療用診断機器分野」は、医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業の一つとして、診断用DNAチップを主体にしたテーラーメイド医療用診断機器を対象に開発ガイドラインを策定する事業である。本分野は、第4回次世代医療機器開発ガイドライン検討委員会（経済産業省）と次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省）の合同による検討会（合同検討会）の議論に基づき、平成18年度より事業を開始した。これまでに平成18～19年度及び平成21～25年度に事業を行い、診断用DNAチップに関するガイドライン（DNAチップ開発ガイドライン）を平成19年5月、平成24年8月、および、平成25年3月に公表した。

本年度は、過去に公表した3つのガイドラインの普及を進めるための活動を目標としてワーキンググループを構成し、委員会を開催して議論を進め、その結果、ガイドラインの解説書案を作成した。

本報告書では、その解説書案（原稿）を掲載するが、十分な検討や必要な情報を付加することで、さらに有用な資料になると考えられる。最終的には、診断用DNAチップ開発企業をはじめとする医薬関連企業や、大学・公的研究機関の技術者・研究者、さらには、薬事審査や標準化の関係者に役立つ資料となることを期待したい。

## 2. 「テーラーメイド医療用診断機器分野」における開発ガイドライン普及活動の意義

### 2.1 診断用DNAチップ

医療機器とは、「人若しくは動物の疾病の診断、治療若しくは予防に使用されること、又は人若しくは動物の身体の構造若しくは機能に影響を及ぼすことが目的とされている機械器具等であって、政令で定めるもの」（薬事法第2条）と定義される。これらの機器はリスク等に応じて、高度管理医療機器（クラスIII、IV）、管理医療機器（クラスII）、一般医療機器（クラスI）の4つのクラスに分類されている。新しく開発した医療機器を患者に適用する場合には薬事審査を経なければ「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（以下、医薬品医療機器等法）」に抵触することになる。薬事の承認審査は、クラスに応じて、第三者認証機関と（独）医薬品医療機器総合機構によって実施されており、機器の形状構造、目的を満たす性能、安全性、臨床データの信頼性やGCP（医薬品の臨床試験の実施の基準）への適合などに関して審査される。

体外診断薬（医薬品医療機器等法では「体外診断用医薬品」）は、医薬品医療機器等法では「専ら疾病の診断に使用されることが目的とされている医薬品のうち、人又は動物の身体に直接使用されることのないものをいう」と定義されており、医療機器規制国際整合化会議（GHTF）の定義では医療機器になるが、日本の医薬品医療機器等法では医薬品扱いになる。ただし、体外診断薬は、医療機器同様の認証制度が導入されているほか、規制はGHTFの定義にあわせて医療機器同様に扱われている。

DNAチップ（DNAマイクロアレイとも呼ばれる）は、検出したい塩基配列のDNAをプローブとして数センチ角の基板の上に数十から数万個のスポットとして格子状に整列させた一種のセンサーで、基板上のDNAと特異的に結合する生物由来のDNAあるいはcDNAを高感度かつハイスループットに検出するためのツールである。検出する対象がゲノム由来DNAの場合、遺伝子型検定（ジェノタイピング）用であり、メッセンジャーRNA由来のcDNAの場合、遺伝子発現解析（プロファイリング）用に大別される。DNAチップは1990年代に米国で開発され、ヒトゲノム計画（1990～2003年）の進行とともに、多くの遺伝子情報を一度に取得できるDNAチップ技術は大きな期待がかけられ、需要が加速度的に膨らんだ。そのため、Affymetrix社など多くのベンチャー企業が設立され、GEヘルスケア社など大手も参入することで、競争的に技術開発と製品化がすすんだ。ヒトゲノム計画終了後のポストゲノム時代には、ゲノム情報を利用した診断や食品や環境などのリスク評価など応用に関する研究開発がすすめられた。開発の対象は、プラットフォーム（DNAチップ基板）及びその作成技術だけでなく、DNA/RNA調製法、検出器などの周辺機器などのアプリケーション開発に至るまで幅広く、プラットフォームにおいてもビーズや繊維など様々なタイプが開発されている。

診断用DNAチップは体外診断薬の一つであり、Roche Diagnostics社（米国）が2003年6月から製造販売を始めた、薬物代謝をコントロールする2つの遺伝子に関する遺伝型を決定するDNAチップが最初の例である。米国FDA（食品医薬品局）によると、診断用DNAチップは、低リスクのクラス1の医療機器（medical device）か臨床試験の必要なクラス2の医療機器として取り扱われている。一方、我が国では、「DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標」（厚生労働省薬食機発第04040002、平成20年4月4日）によると、DNAチップはクラスIIIの体外診断用医薬品として扱われることになっている（専用の測定・解析装置

はクラス I の医療機器として扱われるとされるが、両者は一体として審査を受けることになると考えられる）。

## 2.2 本開発ガイドライン事業について

平成 25 年度「医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業」は、経済産業省と厚生労働省が連携して進める「次世代医療機器ガイドライン策定事業」のうちの経済産業省の事業として、経済産業省の委託により独立行政法人産業技術総合研究所が実施した。本事業は平成 17 年度に開始し、これまでに手術ロボット、体外埋め込み型能動型機器（人工心臓）、体内埋め込み型材料（人工関節）、再生医療（細胞シート）、テーラーメイド医療用診断機器（DNA チップ）など 7 つの分野において開発ガイドラインを策定してきた（第 13 回合同検討会参考資料 1）。経済産業省と厚生労働省が連携して「次世代医療機器ガイドライン策定事業」を支援することで、医療機器の開発から臨床導入までを時系列で、企業に対しては円滑な開発を進めるための情報を発信し、審査機関に対しては迅速な審査を進めるための情報を発信することを目標にしている。

本開発ガイドライン策定事業の目的は以下のように要約できる。

- (1) 迅速な審査を可能とする審査ガイドライン（ガイダンスなども含む）に対して、技術情報、評価方法、評価物質などを提供する。
- (2) 円滑な開発や承認申請を可能とする手引き（手引き書、解説書）を提示し、必要に応じて JIS 提案、基準物質や試験方法を提案して手引き書に加味する。
- (3) 企業における開発の指針になるような開発ガイドラインを策定する。

それぞれの省から委託を受けた研究所（経済産業省は産業技術総合研究所、厚生労働省は国立医薬品食品衛生研究所）は、それぞれ開発ガイドライン案、評価指標案という形で提言を出し、最終的には、経済産業省から開発ガイドライン、厚生労働省から評価指標として公表される。

本テーラーメイド医療用診断機器分野は、第 4 回次世代医療機器開発ガイドライン検討委員会（経済産業省）と次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省）の合同による検討会（合同検討会）において新たな検討分野として追加され、平成 18 年度より事業を開始した。平成 19 年 5 月に公表された診断用 DNA チップに関するガイドライン（DNA チップ開発ガイドライン 2007）は最初に公表されたガイドラインのひとつである。さらに、DNA チップ開発ガイドライン 2012 が平成 24 年 8 月に公表され、また、その改訂版が平成 25 年 3 月に公表され、合計 3 つのガイドラインが公表された。一方で、厚生労働省からは、平成 20 年 4 月と平成 24 年 11 月に、診断用 DNA チップに関する評価指標が医療機器審査管理室長から通達された。これまでに公表されたガイドライン・評価指標、並びに標準仕様書（TS）（案）を表 1 にまとめた。

### 表1. 「次世代医療機器ガイドライン策定事業」(テラーメイド医療用診断機器分野)の成果

(1~3は経産省開発ガイドライン、4~5は厚生省評価指標、6~7は標準仕様書原案)

1. 「テラーメイド医療用診断機器分野遺伝子発現解析用DNAチップ[改訂版]開発ガイドライン2012」経済産業省(平成25年3月)
2. 「ガイドライン2011テラーメイド医療用診断機器分野 遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン2012」経済産業省(平成24年8月)
3. 「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(ジェノタイプ)検定用DNAチップに関してー」経済産業省(平成19年5月)
4. 「RNAプロファイリングに基づく診断装置の評価指標(薬食機発1120第5号)」(厚生労働省、平成24年11月)
5. 「DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標(薬食機発第0404002号)」(厚生労働省、平成20年4月)
6. 標準仕様書(TS)(案)「DNAチップを用いた医療用診断装置の評価法に関する指針」(2012年度作成)
7. 標準仕様書(TS)(案)「DNAチップを用いた医療用診断装置の評価法に関する指針」(2008年度作成)

本開発ガイドラインで対象とする診断用DNAチップは、「遺伝子多型検定用DNAチップ」と「遺伝子発現解析用DNAチップ」に大きく分けることが出来る(表2.「診断用DNAチップ」参照)。前者は、薬剤代謝能に係る多型を判定することで患者に投与する薬剤の代謝速度を診断するために2004年(平成16年)にRoche Diagnostics(ロッシュ)社が製品化した、薬剤代謝能判定用DNAチップ(商品名:AmpliChip CYP450)があり、これは診断用DNAチップとして初めて米国FDAの承認を得た。一方、後者は、例えばがん細胞における遺伝子発現を解析することで原発がんや悪性度・進行度の判定や薬剤抵抗性の判定などをもとに診断を行うタイプのDNAチップのことであり、Agendia社の乳がん転移リスク評価のためのDNAチップ(商品名:MammaPrint)があり、2007年(平成19年)2月に米国FDAによりIVDMI A(In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay:体外診断用複数指標測定法)として承認された。

### 表2. 診断用DNAチップ

#### 遺伝子型判定用DNAチップ

- ・ 遺伝子型判定を行うDNAチップ
- ・ 多くの場合、一度判定すると再検は不必要
- ・ 他の方法で代用できる場合が多い(PCR法など)
- ・ がんの遺伝子型判定などに利用

(例) **AmpliChip CYP450** (Roche Diagnostics社)

- ・ 薬物代謝酵素シトクロムP450の遺伝子型を調べるDNAチップ、2009年5月12日に承認
- クリニチップHPV** (第一化学薬品、東芝、東芝ホクト電子)
- ・ ヒトパピローマウイルス型判別用DNAチップ、2009年7月に承認

#### 遺伝子発現解析用DNAチップ

- ・ 遺伝子の発現解析を行うDNAチップ
- ・ 経過判定など何度も使用する
- ・ IVDMI A(体外診断多変指標測定)として有効
- ・ がんの遺伝子発現解析に有効

(例) **MammaPrint** (オランダ、Agendia社)

- ・ 70遺伝子の発現解析により乳がんの転移・再発リスクを判定、FDA承認(2007年2月)
- Tissue of Origin Test** (米、Pathwork社)
- ・ 15の悪性腫瘍の結果と比較して、癌の原発組織を決定、FDA承認(2008年7月31日)

我が国においても薬事申請の動きがみられたことから、平成18年度に本事業を開始し、各学会、企業、大学・公的研究機関を代表する合計7名の委員による検討の成果として開発ガイドラ

イン案を策定し、合同検討会と経済産業省の承認を経て、平成19年5月に「DNAチップ開発ガイドライン2007-遺伝子型（ジェノタイピング）検定用DNAチップに関して-」の公表に至った。

平成19年度は、開発ガイドライン普及活動として、内容に対する企業の理解を深め、また開発への利用を促すために、標準化の活動を進めた。具体的には、大学、国立研究機関、企業並びに経済産業省関連部署及び標準関連団体から診断用DNAチップの開発、研究、知財、規格、あるいは、行政にかかわる専門家が参加する委員会を開いて標準仕様書（TS）原案の検討と作成を行った。

さらに、もう一つのタイプの遺伝子発現解析用DNAチップに関しても薬事申請の動きがあり、また、それ以外のIVDMI Aの薬事申請も今後進められると考えられることから、平成21年度に、新たに遺伝子発現解析用DNAチップに関するガイドライン策定事業を開始した。平成22年度は、平成21年度から継続してガイドライン策定事業を行ない、「遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン2012」を策定し、平成24年8月に公表した。その間、次項で示すような新しい動きがいくつか見られたため、平成23年度も事業を継続し、修正が必要な項目に関して議論を行い、「遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン2012[改訂版]」を策定した。

平成24年度は、平成22年度に作成し、平成24年8月に公表に至った「開発ガイドライン2012」を改訂した「開発ガイドライン2012[改訂版]」を作成し平成25年3月に公表した。また、以下に説明するような国際標準化動向を受けて、そのガイドラインをもとにした標準仕様書（TS）原案を作成した。

本年度（平成25年度）は、さらに新しい普及活動を検討すべく、普及活動ワーキンググループを構成し、2回の委員会を開催することで、上記の「開発ガイドライン策定事業の目的」の(2)項に記したように、「円滑な開発や承認申請を可能とする手引き（手引き書、解説書）を提示」するために手引書・解説書の作成を行った。

### 2.3 診断用DNAチップの開発と国際標準化動向

診断用DNAチップは、表2にまとめたとおり遺伝子型判定用DNAチップと遺伝子発現解析用DNAチップに分けられる。遺伝子型判定用DNAチップは、日本でも「クリニチップHPV」など薬事承認例があるが、一方、遺伝子発現解析用DNAチップは米国ではMammaPrintなど数例のFDA承認例があるが、我が国ではまだ申請例はない。しかし、委託調査で明らかになったように、現在、遺伝子発現解析用DNAチップを開発している企業は複数あり、多くは診断利用を進めている（図1。「DNAチップ開発状況の一例」）。したがって、遺伝子発現解析用DNAチップに関する開発ガイドラインは役立つものと期待できる。

図1. 「DNAチップ開発状況の一例」（バイオチップコンソーシアム委託調査2012）



## DNAチップ開発状況の一例(2012年10月現在)



| 企業     | 区分   | 用途  | 備考                                   |
|--------|------|---|--------------------------------------|
| 東芝     | 医療用  | 感染症診断用、薬効・副作用判定用、疾病早期・予後診断用                         | ジェネライザー電流検出型                         |
|        | 産業向け | バイオテロ対策用、食品検査用、個人認証用チップ                             | ジェネライザー電流検出型                         |
| 東洋製罐   | 産業向け | 人体および食品に悪影響を及ぼす施設環境中の主要なカビや菌の検出用途<br>食品の食中毒菌検査用途    | GENOGATE(ジェノゲート)<br>ジーンシリコン<br>蛍光検出型 |
| 東洋鋼鈑   | 医療用  | 診断用チップ開発中   |                                      |
| 東レ     | 研究用  | ヒト全遺伝子型DNAチップ<br>消化器がん研究用チップ<br>microRNA研究用DNAチップ 等 | 3D-Gene®<br>蛍光検出型                    |
| 三菱レイヨン | 研究用  | 皮膚、美白、食品感受性評価、酸化ストレス、免疫、メタボリック、アレルギー、マイクロRNA 等      | GenoPal®<br>繊維型DNAチップ<br>蛍光検出型       |

一方で、診断用DNAチップの国際標準化の動きは、開発にも影響することから注目する必要がある。以下に、委員による情報提供や委託調査などで明らかになった動向をまとめる。

### 【DNA チップ開発動向】

研究用DNAチップの国際市場は、Affymetrix社、アジレント・テクノロジー社、Illumina社の3つの米国企業によって、それぞれ43.3%、27.3%、25.1%、合計95.7%が占められている（富士経済、2011 バイオビジネス市場より引用）。米Affymetrix社の「Axiome エキソーム・ジェノタイピング・アレイ」、Roche Diagnostics社の「ニンブルジェンHD4 CGH アレイ」、Illumina社の「Infinium HDHumanOmni1-Quad BeadChip」、米23andMe社の「SNP ジェノタイピングアレイ」等の例がある。一方で、カスタムアレイやフォーカスアレイなどの診断用DNAチップの例はまだ少なく、今後、競争が激化することは必至である。

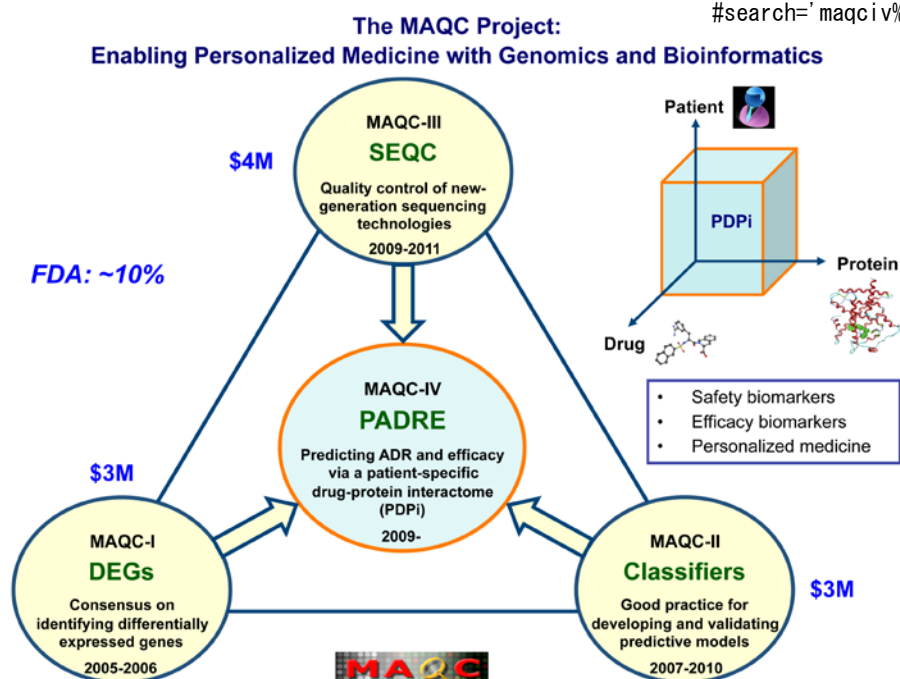
### 【FDA /MAQC-IIIの動向】

FDAが主導しているMAQC-IIIは、SEQC (sequencing quality control) として次世代シーケンサーの技術性能を評価するために実施している。具体的には、シーケンサー同士のデータ互換性及びRNA-seqデータ（遺伝子発現のシーケンス解析）とマイクロアレイのデータ比較を行っている。これらの成果をもとに、FDAが薬事承認を与えるときのガイドラインをまとめる予定である。個人化医療のためのトランスレーショナル・レギュラトリーサイエンス促進に向けて、マイクロアレイに続き、次世代シーケンサーの互換性、性能評価を行っている。今後開始されるMAQC-IVでは、副作用の予測と患者個別の薬物／タンパク質のインタラクトーム（相互作用）の解析（「PADRE: Predicting ADR and efficacy via a patient-specific drug-protein interactome」と呼称：図2）を進める計画である。



図2. MAQC プロジェクトの概要

[https://conference.stat.osu.edu/nss12010/slides/Shi\\_thur\\_245.pdf#search='maqci%'2Fpadre](https://conference.stat.osu.edu/nss12010/slides/Shi_thur_245.pdf#search='maqci%'2Fpadre)



### 【EU/SPIDIAの動向】

SPIDIA (Standardization and improvement of Pre-analytical procedures for In vitro Diagnostic) は、欧州共同体 (EU) において、ヨーロッパの7公的研究機関、8企業及び標準化委員会 (欧州規格委員会: European Committee for Standardization, CEN) がコンソーシアムを結成し、ヨーロッパ域内で共通の臨床サンプルの採取、取扱い、輸送、処理、保管など前処理 (プレアナリシス) 段階での品質保証のためのガイドラインを作成することを目標として2007年にスタートした (2013年3月まで)。キアゲン社がコーディネーター役を務めている。主な取組内容は、(1) 体外診断用前処理の品質保証スキーム・ガイドラインの確立、(2) 組織、血液サンプルの安定化をはじめとする技術革新、(3) 管理面、倫理面における情報の流通、コンプライアンス確立、の3点である。2012年の主な成果は、ヨーロッパ各国のラボが参加し、血液からRNAを抽出した際の品質を相互に比較し、キアゲン社の採血管 PAXgene を用いて調製したRNAの品質が上回っていることを示した。この結果は、欧州規格委員会 (CEN) のTC140において、NWIP (New Work Item Proposal) として承認され、今後、同委員会の中で、文書化を行う予定である。また、血液RNAリングトライアルではRNA品質管理のパラメーターを探索した。ヨーロッパ全域の多施設ラボで血液採取、運搬によるRNA品質への影響をIL1B、IL8、FOS、GAPDHの遺伝子発現をもとに検証した。

### 【ISO/TC276】

ISO/TC276は、ドイツ規格協会 (DIN) が中心となって、バイオテクノロジー分野を横断的に扱うTCとして2013年12月 (設立総会開催) に設立された。本TCでは、用語の定義、オミックス技術の測定法・分析法、コンピューターツール (バイオインフォマティクス)、バイオリソース・バイオバンク、バイオリアクターを対象とし、臨床試験・体外診断薬、農業・食品・医療産業、法医学は除外されると規定されている。

### 3. 開発ガイドライン普及活動の検討過程

#### 3.1 開発ガイドライン解説書の検討

##### 3.1.1 第1回普及活動WG委員会

(1) 開催日時：平成25年11月13日（水）15:00～17:00

(2) 開催場所：スタンダード会議室 4階B会議室

(3) 出席者

委員：久原哲、秋山英雄、岡村浩、桑克彦、田谷敏貴、橋本幸二、的場亮、若本明子

経済産業省：中川琢磨

事務局：木山 亮一

(4) 配布資料

資料1：医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業（経済産業省）

資料2：「DNAチップ開発ガイドライン事業の説明」産総研木山

資料3：話題提供1資料：「遺伝子発現解析用DNAチップ開発の最新動向」特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム 中江裕樹委員

資料4：話題提供2資料：「Affymetrix 会社紹介」アフィメトリクス・ジャパン株式会社 若本明子委員

資料5：ガイドライン資料（過去の資料：5-1～3は経産省開発ガイドライン、5-4～5は厚労省評価指標、5-6～7は標準仕様書案）

5-1：「テーラーメイド医療用診断機器分野遺伝子発現解析用DNAチップ [改訂版] 開発ガイドライン2012」経済産業省（平成25年3月）

5-2：「ガイドライン2011 テーラーメイド医療用診断機器分野 遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン2012」経済産業省（平成24年8月）

5-3：「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」経済産業省（平成19年5月）

5-4：「RNAプロファイリングに基づく診断装置の評価指標（薬食機発1120第5号）」（厚生労働省、平成24年11月）

5-5：「DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標（薬食機発第0404002号）」（厚生労働省、平成20年4月）

5-6：標準仕様書（TS）（案）「DNAチップを用いた医療用診断装置の評価法に関する指針」（2012年度作成）

5-7：標準仕様書（TS）（案）「DNAチップを用いた医療用診断装置の評価法に関する指針」（2008年度作成）

資料6：開発ガイドライン解説書案

(5) 議事概要

#### 【挨拶・説明】

・資料の確認と説明、関係者挨拶。

#### 【ガイドライン事業の説明】

- ・「ガイドライン事業の説明」。

- ・高齢化社会における質の高い生活には、新しい医療機器の開発と、それを臨床現場に円滑に導入することが重要。医療機器産業の育成、国際競争力、迅速な開発、医療機器としての認可及び審査が重要。本事業は平成 17 年度に開始した。次世代医療機器には、臨床導入の経験、評価の経験がないことから、道標が必要。企業側に対しては開発の迅速化、審査側に対しては審査の円滑化を目標にして、経済産業省と厚生労働省との間で連携。「合同検討会」で省庁間の連携。経済産業省は開発ガイドライン、厚生労働省は評価指標を作成する。

- ・開発ガイドラインをまとめた。素案をワーキンググループで作成し、合同検討会に提出。検討後にガイドライン案として省庁の担当部署がさらに検討。評価指標の場合、パブコメを参考にする。

- ・経済産業省のホームページの「医療機器開発ガイドライン策定事業」で開発ガイドラインを公表。平成 19 年 5 月に最初に公表された開発ガイドラインが DNA チップと人工心臓の 2 件。厚生労働省でも、医療機器審査管理室長が関連する都道府県や関連する団体などに通知。経済産業省から 26 件の開発ガイドラインなどが、厚生労働省から 17 件の評価指標が公表されている。

- ・最近の開発ガイドラインは今年の 3 月に出したものの。今年度は普及活動に徹したい。普及活動として、技術セミナーを開くという案もあったが、DNA チップについては分野が広いので、解説書作成を行う。2012 年のセミナーでは「もうちょっと踏み込んだ説明がほしい」という要望があった。

- ・DNA チップ開発ガイドライン事業の説明。本ガイドライン事業で扱う DNA チップは体外診断薬の 1 つ。体外診断薬は、薬事法では「体外診断用医薬品」で、日本では医薬品扱い。諸外国では医療機器で、薬とは違う所が多い。例えばインフルエンザの検出キット（イムノアッセイ）などたくさん出ている。これは単一の遺伝子の状態を検査するが、次世代医療機器としては、複数の遺伝子の状態を検査して、1 つの診断を行う DNA チップがある。

- ・DNA チップは塩基配列の異なる短い DNA を数センチ角の基盤の上に、何千、何万種と格子状に配置させた一種のセンサーで、一度に数千から数万種の DNA を解析できる。アフィメトリクス社のタイプと Stanford 型の大きく 2 つのタイプが知られているが、これ以外にも東芝の電気方式、三菱レイヨンの中空繊維など、いろいろなタイプが出ている。

- ・遺伝子診断用 DNA チップの例。遺伝子型判定用、遺伝子発現解析用の大きく 2 つに分けられる。FDA 承認例は、AmpliChip、MammaPrint、Tissue of Origin Test。日本では、遺伝子型検定用 DNA チップとしては AmpliChip、東芝のクリニチップが薬事承認を得ている。一方、遺伝子発現解析用 DNA チップでは、日本では審査例がない。

- ・開発ガイドラインの必要性。技術的に単一の遺伝子情報を得るイムノアッセイなどに比べて複雑なために開発が難しい。コンテンツの開発が重要。一企業で行うには非常に負担が大きい。確立したアルゴリズムなどを利用する必要がある。いろいろなタイプのプラットフォームに利用できるような前処理の必要性、その管理が重要。

- ・ガイドラインに関する活動。欧州では SPIDIA プロジェクト、米国では MAQC I から IV。I V D M I A のガイドラインが 2007 年に FDA から出ている。さらに OECD、ISO の活動もある。

- ・標準化動向。アメリカでは MAQC (MicroArray Quality Control) プロジェクトは 2005 年開始、フェーズ I から IV。MAQC-III が終了した。

- ・国際標準化は ISO が担当するが、臨床検査の標準化に関する委員会 TC212 では DNA チップの標準化をするのではなく、DNA チップなど、遺伝子診断に使う検体の前処理のところの標準化 (SPIDIA) を、ヨーロッパ主体で進められている。
- ・SPIDIA は、2009 年から 4.5 年で 10 何億円の予算を使って進められたプロジェクト。7 つの公的機関、8 つの企業、ヨーロッパの標準機関がコンソーシアムを設立して進めた。SPIDIA では、体外診断薬に関するプレアナリシスの部分の標準化を進めており、DNA チップの精度にも関係。
- ・国内企業。東芝、東洋製罐、東レ、三菱レイヨン、各社が DNA チップを開発。
- ・本事業ではガイドラインを合計 3 件出した。平成 19 年 5 月にジェノタイピングに関する DNA チップのガイドライン。遺伝子発現解析用 DNA チップに関するガイドラインを平成 24 年 3 月、改訂版を平成 25 年 3 月に出した。
- ・評価指標は、ジェノタイピングに関するものは、平成 20 年 4 月 4 日。DNA チップはクラスⅢの体外用医薬品として取り扱い、専用の測定・解析装置はクラスⅠの医療機器として扱われると記載。アメリカなどではクラスⅡに相当する対応。遺伝子発現解析用 DNA チップに関する評価指標 (RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標) は、平成 24 年 11 月 20 日に通知が出された。ポイントは、統計的な信頼性をきちんと確保しなさいということ。標準試料を用いて 3 回以上の測定を行う。データ自体に独立性がないといけないなど。チップと装置は一体として評価する。検体は、2 施設以上で 150 以上の検体を用いた臨床成績を示しなさい、それができない場合には、その理由を示しなさいということ。海外での実績についても記載するように、など。
- ・昨年度は久原先生を座長として 3 回の委員会を行い、標準仕様書案を作成。今年度はもう少し緩やかな普及活動を考えている。解説書作成は本事業では初めての試み。

## 【討議】

(本年度事業計画に関する説明)

○本年度の事業の説明。解説書案を作った。ガイドラインの普及活動を行うので、ガイドラインに関係する内容を記載することがポイントだが、ガイドラインに直接関係するものだけでなく周辺の情報についても記載。1 番は概論。2 番は遺伝子検査技術の動向。DNA チップだけでなく遺伝子検査技術はいろいろある。3 番目に DNA チップに関する技術で、ガイドラインと直接関係するような内容。3.1、2、3 と 3 つに分けて、測定装置、評価法、標準物質という項目を立てた。新規委員は、DNA チップの技術に関するどれに相当するか分からないので、全てについて書いた。4 番目は周辺技術で検体前処理、蛍光色素、遺伝子関連データ標準化技術。

(解説書内容に関する討議)

○事務局案の解説書で書く内容をどうするか。ガイドラインを膨らませて書くという話。開発用の解説書、開発ガイドラインの解説書というスタイルになる。

○事務局案について、コメント、あるいは御意見、御質問等がありましたらどうぞ。

○ガイドラインの解説書は項目としては一応ガイドラインに沿った項目、それと一応ガイドラインの執筆担当で分担を決めた。最終的に出版を考えている。

○公表について。本事業の成果物は経済産業省に報告書として提出、内容は経済産業省の成果物になる。経済産業省の規定では、きちんと申請して許可を得れば一般の出版社が出版することには問題ない。実費の何倍以内の価格で出しなさいということはあるが、厳しい制限があるという

ことではない。産総研の広報で出すか、あるいは出版社にお願いするか検討中。経済産業省と協議しながら進める。著作権については、成果物なので、経済産業省が持つことになると思うが、出版の場合にどういう問題点があるかは、今後考えるポイント。

○御意見をお伺いしたい。事務局案は 1、2、3、4、5 とガイドラインに沿った形で作られている。ガイドラインは端的に書いてあり、これをもう少し分かりやすく解説することになる。

○書籍といって厚いものをイメージするのですか。

○そこまではというのではなくて、冊子くらい。

○細胞工学などの別冊みたいなもの。

○200 ページぐらいありますか、100 ページぐらいですかね。

○仕上がりが 1 人当たり 2、3 ページ分で、プラス図表 1 点を付ければ、10 人いれば数 10 ページ。

○読まれる方はどういう方をターゲットにされていますか。

○出版社が出すことを想定すると、一般の人にも、例えば大学生や大学院生にも読めるぐらいの内容がいいと思う。

○想定するのは、雑誌の特集号とか。項目もガイドラインのどれについて解説するというよりは、項目を決めて、自分が一番書きやすい内容を書く。例えば、測定装置でいうと、原理と構造、方法とか特異性、感度・ダイナミックレンジ、再現性などに結び付くような内容であれば、特に全てを網羅する必要もないし、むしろ読みやすさが重要。企業は、成果は製品になっているので、そこでどのように精度をカバーしたとか、そういった説明ができる。

○測定の対象となる核酸は RNA と DNA の両方と考えられますか。

○資料としてはジェノタイピングとエクスペッションタイプの両方の資料を付けたが、どちらにするかは限定しなくてもいい。一応ガイドラインとしては両方出ている。

○この事業はそもそも医療機器の開発促進のためなので学生ばかりにフォーカスするのではない。

○そこぐらいのレベルまで落とすが、もちろん高いほうは企業の開発者が読んでも満足する内容も入れないといけない。開発動向の最新情報や技術的な問題点として入れていただく。

○例えば陽性コントロール、陰性コントロール、タームについても説明があったほうがいい。

○1 人がある項目について書く。それをみんな集めて全体の内容に従って配列させる。

○基本はこのガイドラインが下敷になる。この解説書を読めば、大体理解できる。

○イメージとしては今まで開発してきた人でなくて、今から、あるいは新規に参入したいという人が解説書とガイドラインを読めば、そのガイドラインの中身が 100%ではないが、かなりの部分に分かるというような解説書。具体例を多少入れたほうが分かりやすい。

○読み手の対象は理系の大学院生という話があったのですが。

○そういう人たちが読んでもオーケーだという話。

○高度のレベルの人もちろん参考にしてほしいわけですから、そういうレベルも対象になるような内容が必要。語句の説明も重要。

○私たちは製品を出しているのだから、それを中心に書き、皆さんも得意なところを選ぶ。

○もし、どうしても大きな穴があるようならそれを担当できるような方を探す。

○弊社はチップそのものがメイン。測定装置に近いところ。評価法ではなくて、3.1 がいい。

○評価法は難しい。特にメディカルのほうでは例としてもかなり難しいかなという気がする。

○評価法というのは、例えば精度管理をどうするか、どういう測定をするためのどういう装置を使うとか。

○精度の管理ということになるとかなり企業秘密のところもあるし、難しい。

○今年度の3.1と3.2が昨年度と逆転しているのではないか。

○では、測定装置のほうが橋本委員と岡村委員。

○秋山委員、油谷委員、楠岡委員、森委員が評価方法。

○評価方法の3.5と3.6は、いわゆる厚生労働省の評価指標を参照のことということです。

○参考資料として付けた。これを使ってくださいということではない。

○臨床に関係するところを参考になるかもしれないので付けた。あくまでも技術的なところで、診断は入れない。、実際の例として紹介するのは全然かまわない。

#### (分担に関する討議)

○3.1が橋本委員と岡村委員と若本委員と田谷委員が担当。評価方法は秋山委員、油谷委員、楠岡委員、森委員が担当。

○取りまとめの中心は3.1が橋本委員で3.2が秋山委員でいいですか。

○3.3が桑委員。

○執筆項目の案を出していただく締め切りを設定したい。タイトルを今月中に出していただく。

○2番目は、中江委員と的場委員で、どちらか担当していただく。取りまとめは的場委員。

○4番は事務局(木山)。4.1が事務局(木山)で、4.2が磯部委員で、4.3が中江委員で進めたい。

#### (解説書作成のスケジュール他)

○項目と分担を11月中に、最終的な原稿は2月10日(月)までに事務局にお送りいただく。次回2月26日までには最終稿に近いものを作りたい。

○弊社はどちらかというとRNAに強く、ジェノタイピングの評価法に関してはそんなに強くないので、例えば橋本委員に協力をいただいてよろしいでしょうか。

○全然問題はない。

○情報公開しながら、全員で進めていく。

#### 【次回予定、その他】

次回は2月26日(水)。

#### 3.1.2 第2回普及活動WG委員会

(1) 開催日時：平成26年2月26日(水) 15:00~17:00

(2) 開催場所：オフィス東京 2階 L会議室

(3) 出席者

委員：久原哲、秋山英雄、磯貝健次(岡村浩代理)、油谷浩幸、田谷敏貴、橋本幸二、的場亮、若本明子、中江裕樹、森康晃

経済産業省：山田裕介

国立医薬品食品衛生研究所：宮島敦子

事務局：木山亮一、鎮西清行

#### (4) 配布資料

資料 1 : 第 1 回委員会の議事録(詳細版)

資料 2 : 次世代シーケンサーに関する資料

2-1 : 「First FDA authorization for next-generation sequencer.」 Collins FS, Hamburg MA. N Engl J Med. 2013 Dec 19;369(25):2369-71.

2-2 : 「FDA 初の次世代シーケンサー販売認可」 フランシス・S. コリンズ, マーガレット・A. ハンバーグ. ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン誌

資料 3 : 話題提供資料 :

「アジレントが提供するゲノミクスツールのご紹介～マイクロアレイ技術の最新活用例、医療へ向けた応用事例～」アジレント・テクノロジー株式会社 田谷敏貴委員

資料 4 : 開発ガイドライン解説書原稿

4-1 : 「開発ガイドライン解説書目次」

DNAチップ開発ガイドライン解説書案 4 (12月26日)

4-2 : 「1. DNAチップとは」(分担: 木山)

4-3 : 「2. 遺伝子検査技術動向」(分担: 的場(取りまとめ)、中江)

4-4 : 「3. 1. 測定装置(チップと装置)」(分担: 橋本(取りまとめ)、岡村、若本、田谷)

4-5 : 「3. 2. 評価法」(分担: 秋山(取りまとめ)、油谷、楠岡、森)

4-6 : 「3. 3. 標準物質」(分担: 久原(取りまとめ)、桑)

4-7 : 「4. DNAチップの周辺技術」(分担: 磯部、中江、久原、木山(取りまとめ))

4-8 : 「5. まとめ」(分担: 木山)

#### (5) 議事概要

##### 【挨拶・説明】

・資料の確認と説明、関係者挨拶。

##### 【開発ガイドライン解説書の説明】

・「開発ガイドライン解説書の出版について」。

・この開発ガイドライン普及活動WG委員会の性格は、開発ガイドラインをどうやって普及させようかということ。初めてやっていることで、試行錯誤の面もある。どういう点が課題になるか調べた。

・書いていただいたものが最終的にどうなるか。この事業は経産省の委託事業なので、報告書等は基本的に経産省に対する納入物。報告書は基本的に経産省の著作物で、発行するのは経産省。報告書を更に印刷して出版配布する場合に、経産省の「私費出版手続」に沿った形で行う必要がある。基本的には出版はできる。ただし、経産省が第三者の出版社が出版したものを全部買い上げることはできない。半分までならできる。出版社が儲かるような価格の設定はできない。

・どこが出版社になるのか。産総研で出せないか検討した。産総研の広報部では、産総研の研究成果等を普及させる目的でいろいろな書籍を出していて、『産総研ボックス』がある。想定する

読者は一般で、専門書は余り出してない。過去の例では、2,000部を初版で刷って、そのうち1,000部を産総研が買い上げて、残り1,000部を出版社が普通の販路で出した。初版が全部売れた場合、第2版以降は全部出版社が販路に乗せて売る。そうすると、印税もでてる。DNAチップの解説書を産総研から出そうと思うと、まず想定する読者は誰か。あとは、想定する読者が大体どれぐらいの人数いて、どれぐらい売れそうかといったことが議論になる。

#### 【補足翻訳資料の説明】

・「FDA初の次世代シーケンサー販売認可」フランシス・S.コリンズ、マーガレット・A.ハンバーグ、ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン誌（資料2）の説明。

・前回の委員会の後に、『The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE』という雑誌にNext-Generation SequencerがFDAの認可が下りた。シーケンサーがかなり早く体外診断装置として認可された。アプリケーションが何かは特に書いていない。DNAチップの場合に比べると非常に早く、これから新しいトレンドを作るのではないか。

#### （コメント）

○もう医療現場でも使っているが住み分けの要素もある。次世代シーケンサーが得意な対象疾患やがんなどでは体細胞が変異している過程の追跡にも使われるが、ルーチンでやるようなものに関しては単価が安くて余計な個人情報データとして出てこないマイクロアレイもまだある。

○例えば日本でサンプルを採ってアメリカに送って検査してもらう形が進むのか。それとも、日本で検査する所が作られるのか。

○がんに関わる解析というのは日本でも動きがある。

○厚労省の認可や承認が必要になってくる場合があるということですね。

○一定の安定した結果が出るとなれば、先進医療に進んで保険を受けることになると思う。

○LDT (laboratory-developed tests) の形で進めるのではないかという話が厚労省の審査ワーキンググループでも出ていた。

○今出ている検出キットとしてはシスティック・ファイブローシス (cystic fibrosis)。そのほかに、ユニバーサルキット (Universal Kit) といって、Develop your own diagnostic tests、要するに自分でキットを作るというもの。

○Your own diagnostic tests は、LDT だと思う。

○クリアラボでそれが行われて、それに対してお金を払うのが保険会社。日本より大分制度が違う。Affymetrix の遺伝子型を決めるマイクロアレイの装置も、そういう承認は取れている。

○クリアラボも日本にないシステム。日本にないシステムでアメリカは進めている。集中的な検査場所で検査する形。日本の場合、キットを売って自由にやったださいと言っても、どこでやるのが問題。ただ、アメリカに送って検査してもらって検査結果をもらう形であれば、今でもそういう例はあるわけだし、大きな問題が起こらない限り、それで進んでいくのかもしれない。

○個人の責任でやるということ。トラブルが起こる可能性はある。その議論は、DNAチップも含めて遺伝子検査の今後ということになる。非常に注目しておかなければいけないところ。

○去年の春頃に問題になった出生前診断も、今はシーケンサーで診断している。全ての病気をデープに読んでいけば、親が持っている遺伝子異常も分かってしまう。そういう議論も何かの場でやっていかなければいけない。今は海外の会社が日本で集めてそちらに送る形がほとんど。そ



れを正確にやろうとすると、結果の解釈をするところが極めてデリケートな問題で、きちんとした procedure に従ってやってもらわなければいけない。

## 【討議】

### （解説書内容に関する討議）

○資料 4-1 の解説書案の説明。前回の委員会で大まかな分担を決めて、実際の執筆の項目を去年の年末（12月26日）に集めた。

○資料 4-2（第1章）の説明。専門でない人でも分かるような内容。DNAチップの説明と診断用DNAチップについてのまとめと問題点について説明。国際標準化についてまとめた。参考文献としては経済産業省が出したガイドラインなど。

○資料 4-3（遺伝子検査技術動向）の説明。遺伝子検査技術の例、DNAチップのこれまでの歴史と開発動向を書いた。遺伝子検査技術全体の動向は3つの検査について書いた。1つは核酸検査、配列検出で、主にはパピローマウイルスや食中毒菌の核酸検査等。次に発現解析。具体例として白血病のRNAの検査、大腸がん、肺がんなどのミューテーションの検査、Mamma-Print等々の発現による予後予測、あるいは薬剤効果予測など。最後がゲノム解析、遺伝学的検査。歴史的にはチトクローム P450、最近は出生前診断。DNAチップの技術的な動向。基本的構造、自動化、 $\mu$ TAS、自動化、Lab-on-a-Chip など。最後に標準物質の開発。

○第3章の説明。チップと装置を含めた内容についてガイドラインに沿った項目をそのまま細分化した。測定装置に関しては、担当の委員がメーカー出身ということもあり、具体的。一方で、企業色をどこまで出していいかという点は検討が必要。解説書として適当な形かどうかは見ていただきたい。最後に応用例を1項目入れた。

○3.2（評価方法）の説明。資料 4-1 では 3.2.1 が技術評価、3.2.2 が臨床評価というように切り分けようということで提案。資料 4-5 では 3.2.1 がジェノタイピングの検定用DNAチップ、3.2.2 が遺伝子発現用DNAチップについて記載。3.2.1 のジェノタイピング検定用DNAチップについては、最初に技術評価、後半に臨床評価。技術評価については塩基配列決定法との比較、注意事項などを記載。(2) データ解析及び解析ソフト。ポイントを記載。MAQC を参照するように。臨床評価についてはRNAプロファイリングに基づく診断装置の評価指標がある。ガイドライン 2007 に従って項目立てをした。データの管理、安全性（4 ページ）については、ポイント、注意事項を記載。例えば生データを保存すること、データベースについてはリレーショナルデータベースを導入、プライバシーとセキュリティを十分確保するなど。遺伝子発現用DNAチップ（5 ページ）は、具体的に技術評価と臨床評価という形。3.2.3.（9 ページ）DNAチップの知財管理、疾患別の特許出願傾向を調査しまとめた。

○資料 4-6（標準物質）の説明。目的で信頼性の向上のために必要であるということ述べた。遺伝子型検定と遺伝子発現解析用の両方に必要で、標準物質に求められる要件を項目立て。測定対象標品の標準物質と精度管理用の標準物質という2つに分けないといけない。SI トレーサビリティの基本概念をまず書いた。測定対象標品の選定、精度管理用の標準物質の選定、内在性の標準物質、人工の標準物質等を記載。標準物質の管理、品質管理、純度、濃度の単位等々について解説。最後は標準物質の入手。

○資料 4-7 (DNAチップの周辺技術)の説明。周辺技術も知っておく必要がある。1つはDNAチップ用検体の前処理技術。SPIDIA や JCCLS がマニュアル作成、調査、様々なガイドラインを作成している。検体前処理技術における精度管理は『遺伝子分析科学』を参考にまとめた。国内外の開発動向については、SPIDIA と MAQC と ISO の新 TC についてまとめた。蛍光色素がDNAチップの技術の中でも重要なポイント。遺伝子関連データ標準化技術は 4.3 にまとめた。

○資料 4-8 (全体のまとめ)の説明。診断用DNAチップ、遺伝子診断の将来と医療機器について全体のまとめをした。DNAチップは様々なシグナル伝達経路の研究に使われており、実際どのようなシグナル伝達経路に使われているかという具体的な例を、参考文献も付けて表にまとめた。

(解説書の修正について)

・資料 4-2 のDNAチップについて議論。

○ざっと見た感じではフォーマットがかなり違う。参考文献をどのぐらい扱うか余り整合性がとれていない。文献を多くするのか、それとも解説書として少なくするのか。かぶっているところが少しある。

○引用文献が多い人が多かった。評価法の引用文献が多い。

○後で最終的に決めればいい。

○最初は、章立てがいいかどうかということ。それに付け加えるものがあるのかどうか。

○対象となるのは高校生以上と考えるのでしょうか。「開発ガイドライン解説書の出版について」では想定読者は一般向け、高校生以上となっている。

○それは産総研が出版する場合に、今まで出版した例。前回の議論では大学生とか大学院生ぐらい以上。せいぜい大学院生ぐらいが一番下。

・第 2 章、遺伝子検査技術と方向について議論。

○図のタイトルは「遺伝子解析に応用される検査手法」ですか。それと図の引用場所。

○2.2 (DNAチップ技術の動向)について議論。

○2.2.1 と 1.1 のDNAチップとが、内容的に一部がかぶっている。

○今回、初めて全部まとめたので、これを見て例えば内容の齟齬、間違いについては、自分の分担部分とほかの方の分担部分で比べて、調整し、書き替えていただきたい。重複している部分でも、全体の説明で必要な部分もあるし、個々の説明で、もう 1 回、念を押す必要もある。今回、もともと重複がかなりあるような形にしているので、この後に修正していただく。

○2.2.3 のDNAチップ用標準物質の開発、標準物質の利用について議論。

○題名がちょっとまずいような気がする。

・資料 4-4、DNAチップに関する技術について議論。

○第 3 章はガイドラインと密接に結び付いている部分。同じことを書いても仕方ない。「検討する必要がある」とか、最後に「望ましい」とか書くとガイドラインと似たような形になる。ガイドラインでなぜ「望ましい」と書いたのかを説明するとか、あるいは具体的な実施例、実際の基準とか、そういうのを説明するのがよい。もう 1 回検討していただきたい。本として読みやすいのがよく、ガイドライン的な文書だと読みづらくなってしまふ。

○資料 4-4、3 章は、何か少し異質な感じがする。余りにも企業色が出すぎている。例えばこれを見ている人がアジレントでないチップを使っていたらどうすればいいのか。

○企業色が出てもいいと思う。ただ、ガイドラインと結び付けて出るとまずいので、実施例か何かでまとめていただくのはいい。項目ごとに何か説明があって、それが企業の実施例と結び付けて書いてあるから、ガイドラインと結び付きが強く見えてしまう。そうではなくて、1つは企業の実施例にしてまとめてしまう。そこで、こういうところは関係していますよと書けば、それほど強くはならない。

○あくまでも解説書。「望ましい」というように書くと、どうしてもそれをやらないといけないのかなと思う。そうではなくて、実際このようにやりましたよとか、これはこういう基準があるのだけれども、こういう理由でこういう基準になっているとか、情報提供の形になっているほうが参考になる。

○ニュートラルに各社のデータがあって、押さえるべきポイントがあって、データの読み方はどうだとか、エラーの修正方法はどうか、そのような内容を盛り込めば、余り企業色が出ない。余りにもうまくいった例ばかりだと、どうなのかなというのがある。

○逆に企業色を出すなら、全部の企業を入れてもいい。

○ガイドラインの解説書というように考えると、ガイドラインを具体的にどうすればいいかを書く。ガイドラインの解説書なので、例えば東芝はクリニチップの実体験をコメントするというのには意味がある。国から認められているから。ところが、まだそうでないと、ちょっと難しい。

○基本的に開発だから、各社、開発過程のデータを出すのがいいのではないかな。

○確かに許可の過程を書くと、それはいろいろ書けないこともある。技術に関していえば、例えば学会発表とか論文発表の内容を、簡単に分かりやすくまとめて示せば、それは秘密事項でもなく、公開情報として提供できるし、見る側は参考になる。ガイドラインと同じことは書かなくていいと思う。全部網羅しなくてもいい。むしろ全ての企業に書いてもらうぐらいのつもりで。

○ガイドラインで一般的なことを書いてあるから、実例がいっぱいあったほうがいい。あと2つぐらい入れると体裁としては良い感じになる。

○今回メンバーが限られてしまったので、偏りが出てしまっている。

○東芝と東レを入れて、もう1回構成し直したらいいのではないかな。

○一般的な診断用のチップ開発は余りプラットホームにこだわらない。チップの技術のところは各社によって違う。やはりチップの開発メーカーは個々の開発の過程を知りたいという人も多い。診断チップを開発している方々も読むし、チップ自体の開発をこれからする方も読む。

○個人的に言えば、Mamma-Print について、詳しい話を聞きたい。あと三菱レイヨンなども参加していただいてもいい。別に限定しているつもりはないので、来年度、もし参加していただけるようだったら、書くことを前提にして参加していただくとか。

○最初の例なので、試行錯誤でどこへ行くか分からない。出版という目標がある。最初の例として後に続く分野に対しても参考になるような議論をきちんとして、まとめたい。

○特異性についてコメントがあるが、ISO で特異性というのはどのように定義されているか書いている。それと合っているかは1つ1つ一応確認したほうがいい。

○それはごもっとも。書いた方が一番よく御存じなので、御指摘をいただければと。

○ここで例えば国際標準の定義を必ず使わなければいけないということでもない。

○ただ、言葉の定義はある程度きちんとまとめておかないといけない。

○企業色というか、企業の実例を出すという形で、もう 1 回検討していただく。各項目について分担の取りまとめの方が検討していただくということをお願いします。

○資料 4-4 で気が付いた点。13 ページの表 1 の引用場所を、括弧で表 1 というのをどこかに入れていただきたい。

・ 3.2 (評価法) について議論。

○ジェノタイピング検査用 DNA チップに関して、技術評価、比較、解析ソフトが書いてあって、臨床評価、有意性の検定、比較試験、臨床実効性、その他でデータの管理、安全性その他ということ。次が 3.2.2.2、遺伝子発現解析用 DNA チップに関する臨床評価。臨床評価の部分が妥当性の確認から臨床性能試験、施設数、検体数、後向き試験、海外で行われた臨床性能試験、医療情報、リスク分析という形。最後は判定のアルゴリズム、データ管理、安全性、知財管理、疾患別特許出願傾向、技術分野と出願動向、知財管理における特許と国際標準化との関係。

○10 ページの (3) を (4) に訂正する。

○分担者の名前を入れてください。

○2 ページの文献 XX と YY というのが入っていないので、これを加えてください。

○「望ましい」という文言は、変えていただくようにお願いします。

・ 4-6 (標準物質) について議論。

○標準物質に求められる要件、標準物質の選定で、測定用対象の選定と精度管理用標準ベストの選定。標準物質の管理で、品質管理、純度、濃度管理。次の項目として標準物質の入手。

○ガイドラインの解説書なので、ガイドラインの引用をして、引用文献の所にガイドラインを。ガイドラインの引用で、例えばガイドラインのどこの項目を引用したか、具体的に明記していただく解説書として良い形になる。

○章立てはもう 1 回考えさせてください。

・ 資料 4-7 (DNA チップの周辺技術) について議論。

○4.1. DNA チップ用検体の前処理、遺伝子検査のための検体の前処理技術。4.1.2 が検体前処理技術における精度管理で、4.1.3 が国内外の開発動向。4.2 の蛍光色素は 4.2.1 の蛍光の原理と蛍光色素の利用法、4.2.2 が DNA チップに利用される蛍光色素、4.2.3 の Cy 色素の特徴と開発の経緯、4.2.4 が蛍光色素の技術的問題点、4.2.5 の新規蛍光色素 Fluolid、4.2.6 の今後の展開。

○全体の分量との問題もありますが、ちょっと長い。

○最近イェール大学が核酸の色素ラベルの特許でライフテクノロジーからお金を取ったという訴訟の論文が出ていた。色素は海外のメーカーが特許を持っていて、それにまつわるいろいろなことがある。色素を使われる方は、どの色素を選べばいいのかなと思って見るではないですか。技術的な面は書いてあるが、特許上困らないかなと思う。

○それをちょっと書いていただくとか。

○記事 1 個の解説なら書ける。それでよろしければ。

○4.3 は、項目を変更したのですか。

○調べたのですが、データ標準化というのはほとんどなくて、一番最後の 4.3.3 の第 2 パラグラフだけだった。国際標準化のほうを 3 つ書いた。

○語句の説明、例えば GMO とか NWIP とか説明を加えてください。括弧で日本語を書くとか。

・ 第 5 章 (診断用 DNA チップに関するまとめ) について議論。

○診断用DNAチップに関するまとめ、遺伝子診断の将来と医療機器について。

○今回お願いしたいこと。1つは著者名のリストの提出をお願いします。ほかの項目との整合性について検討して、修正していただく。今回書き直すのは時間的に無理があるので、修正する形で今年度は一応終了する。来年度、多分継続するので、そのときにはまた皆さんにお願いするとして、書替えも含めて修正を考えたい。ガイドラインの引用をはっきりと書いていただく。できれば何項目のどこという形で、きちんと指定していただく。締切りは3月15日。報告書は年度内に出さないといけない。以上が私のほうからお願いすること。

○3月15日締切りということですね。

○ポイントをまとめたものをメールで皆さんに御連絡します。

#### 【閉会の挨拶】

○本年度2回しか委員会を開けませんでした。慌ただしい中、皆さん執筆していただいて、どうもありがとうございました。何とか形にすることができ、また、非常に良い内容になったと思う。以上で今年度のガイドライン普及活動WGを終了する。皆さん、ありがとうございました。

### 3. 2 話題提供

#### 3.2.1 話題提供（1）

中江裕樹委員（特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム）による話題提供（第1回普及活動ワーキンググループ委員会：平成25年11月13日）（代理発表：木山）。演題「遺伝子発現解析用DNAチップ開発の最新動向」。

・バイオチップコンソーシアムでは、例年委託調査で、マイクロアレイに関する最新動向をまとめている。バイオチップコンソーシアムが作成したマイクロアレイの規格案が、世界初の国際標準として承認された。ISO16578、「DNAマイクロアレイを用いた特定核酸配列の検出に関する一般的定義と要求事項」。シグナル強度とサンプル濃度のグラフで、有効性、信頼性のある領域を決めることができ、シグナル強度が分かれば、そのDNAの濃度が分かる。また、そういったものを調べる方法とかプロトコールとかを、この規格で指定している。

・この規格は食品の検査に関する規格。食品から核酸を抽出し、チップ解析し、スキャナーでスキャンして、解析ソフトにより解析。抽出やソフトによる解析は入らない。

・標準化のプロセス。新たな規格の提案があり、ISOの中で新規プロジェクトとして承認登録し、ワーキンググループで議論し、最終的には規格として承認・発行。全体を3年以内に行う。

・標準化のプロセスのまとめ。食品専門委員会（TC34）の分子生物指標の分析に係る横断的手法に係る分科委員会（SC16）で、規格名「DNAマイクロアレイを用いた特定核酸配列の検出に関する一般的定義と要求事項」としてまとめられた。国内の審議団体は、農林水産消費安全技術センター。

・バイオチップコンソーシアムでは食品関係の規格を医療機器へ持っていくことを検討。

OTC34で作ったものはTC212において共通に使われると考えている。TC212で承認を得なくてもよい。

・SPIDIAプロジェクトは2013年3月に終了。ヨーロッパ標準機関でNew Work Item Proposalとして標準化が進んでいこう。MAQCプロジェクトはフェーズⅢが終了して、論文投稿の段階。次世代シーケンサーを用いたRNA-seqの利用が今後はポイント。

・標準物質。アメリカの標準研究機関（NIST）の認証標準物質として販売。ERCCのRNA Spike-Inコントロールミックスが既に販売されている。日本でも産総研がRNA Spike-Inコントロールを開発。

・2013年6月に新しいTCが作られた。バイオテクノロジー専門委員会（TC276）、12月に総会がある。議論する内容はほかの委員会と重複しない。

#### （質疑応答）

○産総研で準備した核酸物質が2種類ある。RNAのほうが最初。

○販売されているのか。

○頒布は一応できる。世界で初めて絶対定量された核酸RNA。アメリカのは配列を担保して認証されている。

○ERCCはプラスミドで転写させて作るのか。

○プラスミドの配列で、大腸菌に入れるなりして作る。重さは自分たちで測る。ただ希釈して使えばいい。これまで絶対定量ができなかったが、産総研が定量できるような技術を開発した。

### 3.2.2 話題提供（2）

若本明子委員（アフィメトリクス・ジャパン株式会社）による話題提供（第1回普及活動ワーキンググループ委員会：平成25年11月13日）。演題「Affymetrix 会社紹介」。

- ・アフィメトリクスは1992年に設立され、本社はカリフォルニア州サンタクララにある研究用試薬・研究用機器の製造販売と技術サービスを行っている会社。アフィメトリクスのメインの製品はGeneChip。1980年代にDr. Fodorのチームによって開発された。

- ・アフィメトリクスのビジネス。黎明期には、ゲノム構造の解析やゲノムバイオロジーの解明、疾患のバイオロジーの解明にDNAチップを使った。これからは、基礎的なところから現実の医療の現場で使っていただくことを目的とする。トランスレーショナル・メディシン、臨床診断など。

- ・アフィメトリクスはいろいろな会社を買収した。QuantiGene、eBioscience、抗体やELISAキットを取り扱う会社、それから、USBという分子生物学用試薬を取り扱う会社など。

- ・アフィメトリクスのDNAチップはフォトリソグラフ(photolithograph)で製造。半導体製造で用いられている技術。マスクを掛けて光の当たる所だけにDNAが合成、probeを伸ばす。「wefer」から作ったものが「チップ」。その小さい単位が「feature」、その中が「probe」。weferは通常5in×5inのガラス基板。900ぐらいまで小さく作ることができるが、通常は7×7で49のチップ。

- ・出来上がったチップを製品に載せる。拡大したチップの中に、 $5\mu \times 5\mu$ の「feature」がびっしりと載っている。この $5\mu \times 5\mu$ のfeatureの中にprobeが約100万個載っている。1つのチップのサイズは通常1.28cm×1.28cm。featureのサイズが $5\mu \times 5\mu$ であれば、計算上は650万以上のfeatureがここにびっしりと載っていることになる。GeneChipでは、probeの長さは25mer。

- ・featureのサイズを小さくすることで高密度化が可能。featureのサイズが2分の1になると、コンテンツは4倍。2002年では、featureのサイズは $18\mu \times 18\mu$ だったが、2005年では $5\mu \times 5\mu$ を実現。18 $\mu$ から5 $\mu$ になることによってコンテンツの量が約13倍増えた。昔のGeneChipには、パーフェクト・マッチと、パーフェクト・マッチのprobeの中心の塩基を違うものに変えた mismatchesを必ず対で付けていたが、最近のアレイでは mismatchesのfeatureを載せていない。

- ・GeneChipはカートリッジタイプのものが有名。ArrayタイプとArray Stripを用意。

- ・DNAチップに合わせた装置。カートリッジタイプのもは、最新の「GeneChip System 3000」のシステム。ハイブリダイゼーション溶液をGeneChipに注入。自動で行い、終わったらポストハイブリダイゼーションから染色、洗浄、全て自動。終わったら、スキャンを行って解析、数値化。

- ・プレートのタイプでは、「GeneTitan」というシステム。引き出しにプレートを載せると、あとは自動でハイブリダイゼーション、染色などを行う。少し安価な「Gene Atlas」もある。

- ・ソフトウェアも用意。遺伝子発現解析では、Expression Console(EC)、Transcriptome Analysis Console(TAC)。ECは、アレイのprobe set summaryや主成分分析などができる。TACでは、簡単な発現変動の統計的検定や、選択的スプライシングの検出ソフトウェア。

- ・ゲノムの構造解析。Chromosome Analysis Suite(CHAS)と、OncoScan Nexus Express。CHASは、ゲノムを対象とした染色体異常の把握に使われ、Nexusは全コピー数表示で増幅等を検出。解析のソフトウェアは全て無料で提供。ホームページから無料でダウンロードできる。

・ 遺伝子発現解析用のアレイの probe の設計。3' 側に probe を設計している「3' IVT Array」と、その他「Whole Transcriptome Array」の 2 種類。3' IVT Array は、3'、末端側にのみ probe を設計。まず「Exon Array」を開発。その次に、ノンコーディング exon も搭載したアレイを開発。選択的スプライシングの場合は「Human Transcriptome Array (HTA)」。exon-exon のジャンクション部分にも probe をタイリング。スプライシングのイベントも検出できる。

・ 試薬を開発。WT (Whole-Transcriptome) Array のタイプには「GeneChip WT PLUS Assay」という試薬を用意。血液、フレッシュサンプル、普通の培養細胞やソートしてきた細胞から採ってきたものを対象に使える。「Sensation PLUS」を IVT 用にも WT 用にも用意。FFPE のサンプルがターゲット。FFPE から採ってきた DNA も RNA も壊れている場合が多いので、プライマーを工夫した。

・ 「Human Transcriptome Array」。exon 領域、スプライシング部分にも probe を設計。ノンコーディングの転写産物なども網羅的にカバー。実績として全世界で 1 万 5,000 枚ほどを出荷。

・ Human Transcriptome Array を開発に参照したデータベース。Refseq、Ensembl、UCSC、VEGA や Mammalian Gene Collection、Link RNA Database、Broad Institute、Human Body Map など。本当のトランスクリプトームの姿は、これらを合算する形になる。1 つの遺伝子当たりの平均の probe のカバレッジとして 140 種類の probe。合計 28 万 5,000 以上のフルレングスのトランスクリプトームをカバー、そのうちコーディングが 24 万 5,000 以上、ノンコーディングが 4 万以上。

・ DNA の検出。染色体のコピー数異常を検出するための CytoScan。主に血液腫瘍などのコピー数解析に用意。全遺伝子を高密度にマーカーで網羅。参照データベースは、ISCA や OMIM から X 染色体とがん遺伝子をほぼ 100%カバー。高密度の SNP マーカーを検出することの利点は、モザイクや LOH、転座ブレイクポイントの検出ができる。また、全遺伝子の微細検出、増幅の検出、コピー数の検出も検証できる。血液、骨髄、FFPE サンプル、羊水検体、口腔粘膜検体、唾液など。羊水検体が使えるので、出生後診断用アプリケーションとして FDA に申請を完了。

・ 「OncoScan FFPE Kit」。アメリカのサービスラボでデータを解析してデータを返すサービスをしていたが、一般用に作り直して、FFPE Kit として出した。固形腫瘍の解析に重要。多数の固形腫瘍においてコピー数の異常は予後の指標となる。

・ 「OncoScan」。がんの遺伝子 900 以上に特化。10 年以上経過した FFPE サンプル 7,000 サンプル以上を使って実証済み。

#### (質疑応答)

○ Human Transcriptome Array で遺伝子の何%ぐらいがカバーされていますか。

○ カバーで言うと、90 数%。

○ 28 万 5,000 というのは、ヒトの遺伝子の 2 万とか 3 万からすると、コーディングトランスクリプトからするとかなり多い。遺伝子 1 個当たり probe が重複しているということですね。

○ 一般的に、25mer でゲノムの中は重複するように思うが、設計はそれほど難しくはないのですか。

○ 重複するものを省いていく。クロスハイブリッドがあるものは排除している。

○ 1 つを検出するために何種類ぐらいの probe を実際に使っているのですか。

○ アレイのコンセプトによってちがうが、例えば HTA Array では、平均して exon 当たり 10。



○クロスするというのは、どうやって情報として得られるのですか。ミスマッチを使うのであれば似た配列の検出から計算できるが、probeが1個しかなければ情報は得られないように思う。

○ミスマッチをなくしてもクロスしていないので、ミスマッチ probe はやめようという流れになった。

○FFPE から採取したDNAで、80ng のDNAがあればいいということでしたが、80ng のDNAを採るためのFFPEの面積は？

○1 スライス当たり大体 20ng ぐらい採れる。計算上は 4 枚あれば 80ng のDNA。QC 検定を行うので、4 プラス $\alpha$ のスライスが必要。

○FFPE の関連ですが、QC はどういう基準でやっているのでしょうか。

○RNA と DNA とで少し違う。RNA では、アジレント社のバイオアナライザーを使う。RIN 値を見て、その値をアレイの実験に進めるときの指標にする。FFPE から採ってきたRNA では、通常 2 以下。18S リボゾームRNA を QPCR で見て確実に良いものをマイクロアレイに使う。

### 3.2.3 話題提供 (3)

田谷敏貴委員 (アジレント・テクノロジー株式会社) による話題提供 (第 2 回普及活動ワーキンググループ委員会 : 平成 26 年 2 月 26 日)。演題 : 「アジレントが提供するゲノミクスツールのご紹介~マイクロアレイ技術の最新活用例、医療へ向けた応用事例~」

○会社案内。大きく分けて 3 つ。一番が電子計測。非常に古く、会社の立上げの部門。2 番目は化学分析。食の安全、エネルギー、法医学、低分子化合物を分析。3 番目がライフサイエンス。2012 年に診断会社のダコを買収して、新たに診断グループを設立。これまでは測定技術をコアとする会社だが、現在ではライフサイエンスと診断の入口から出口までカバー。

○アジレントはライフサイエンスと診断グループの会社になり、今秋から電子計測はキーサイト・テクノロジーに分離。

○代謝物も含めた低分子化合物の質量分析計や、ガスクロ、液クロを販売。もともとマイクロアレイはトランスクリプトーム解析のツールとして提供していた。CGH+SNP によるゲノム解析をマイクロアレイで行う事業を展開。

○次世代シーケンサーに対するアプローチ。1 つは前処理試薬の提供。一方で、多検体、コホートなどのラージスケールの臨床検体の解析向けに、オートメーションの装置を出している。

○これまではゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム。今、ゲノムはマイクロアレイと次世代シーケンサー、トランスクリプトームマイクロアレイと RNA シーケンスで、やはり次世代シーケンサー。プロテオームとメタボロームは機械を使う。これらのマルチオミックスを解析するための統合解析プラットフォームとして、マイクロアレイの解析用に GeneSpring というソフトウェアを出している。次世代シーケンサー向けには AvadisNGS というソフトウェア、質量分析用には Mass Profiler Professional というソフトウェアを提供、これらを統合する GeneSpring Workgroup という Integrated Biology のソリューションを進めている。

○クリニカル・ゲノミクス戦略。マイクロアレイあるいは次世代シーケンサーを使って、ミュレーションやコピー数を解析。マイクロアレイを使う CGH+SNP という流れと次世代シーケンサーの流れを展開。新たに臨床解析向けに、ミュレーション解析用の SNP call、コピー数解析用のサイトゲノミクスというソフトウェアを出し、分子診断ゲノミクスの方向に向かう。

○マイクロアレイ技術。マイクロアレイの Inkjet 技術は、元はヒューレットパッカートのプリンター。汎用スライドガラスに長鎖オリゴヌクレオチド DNA を酵素合成。非常に高い合成効率を達成。

○10 数年前からこの事業を展開。1 つは高密度化の流れ。もう 1 つは「マルチパックフォーマット」、1 つのスライド上を何分割かして多検体を分析。この 2 方向でアレイを改良。1 番大きな変化は 2006 年。1 枚のスライドで、4 万 4,000 のスポットで発現解析をしていたが、1 枚のスライドで 4 つの 4 万 4,000 スポットの解析ができるようになった。コストを 4 分の 1 に下げた。

○密度を上げるとマイクロアレイの再現性や感度が悪くなる可能性がある。通常は密度を上げることで感度が低下する。2006 年に高密度化してマルチパック化した上に、感度も精度も上げた。発現量の非常に少ない遺伝子から発現量の極めて高い遺伝子は、大体 22 から 218 になるので 216、105 ぐらい、5 桁のレンジで発現解析、トランスクリプトの解析ができる。シグナル伝達系あるいは転写因子系など、発現量の低い遺伝子についても、それを含めてネットワーク解析できる。

○医療の応用事例。ゲノムのコピー数解析。最初に laughter (笑い)。2 型糖尿病の患者を、笑いによって病気を治す。どういった遺伝子の発現が起きるのか。例えば落語を 40 分聞かせたグループと、講義を 40 分聞かせたグループとで発現差解析、ラットなどのモデル動物を使って、laughter にスペシフィックな遺伝子発現を見ていく。免疫応答系とか、シグナル伝達系の遺伝子が動いたという報告がある。

○「Mamma-Print」。70 の遺伝子で乳がんの外科手術後の予後予測。アジレントの技術。

○2006 年、2007 年に iPS 細胞が発表された。iPS 細胞を樹立するのに必要な 24 因子を決めるときにマイクロアレイを使った。iPS 細胞ができた後は、マイクロアレイを使ってキャラクターゼーションをした。2007 年のヒトの iPS 細胞の発表では、マルチパックフォーマットを使ってキャラクターゼーションがなされた。ファイブロブラストと 4 因子の iPS 細胞をマイクロアレイで解析。樹立した iPS 細胞が、ヒトの ES 細胞とプロファイルが非常に似ているという発表があった。

○クロマチン構造の解析やゲノムの解析にタイリングアレイを使うことでアプリケーションを広げた。iPS 細胞を樹立するときに、一部の染色体の trisomy などが起きることを CGH アレイで確認。このマイクロアレイは SNP ではなくて、コピー数を解析。

○アレイを使った微細なゲノム構造の変化の検出。疾患 iPS、病気の患者から iPS を樹立するということが盛んに発表されている。昨年、Trisomy21 のモデルの疾患 iPS が樹立。Chr21 以外にはコピー数に変化が起きていないとことを CGH マイクロアレイで確認。

○パーソナライズドメディシンの取組。1 つは、スキャナ。感度を上げて性能も上げて小型化。ダイナミックオートフォーカスで、ピクセルごとに焦点を合わせてスキャンして、ノイズをなくす。

○従来の自動でスライドを連続スキャンする機能以外に、スキャン中でもスライドを任意に追加していく性能を加えた。最後は小型化。ISO13485 の認証の製造プロセスで造る。

○マイクロアレイのクオリティー。原子間力顕微鏡のプロセス。マイクロアレイの製造は In Situ の合成で、PCR のプライマーを合成するホスホロアミダイト法。カップリングを 99.5%以上まで上げ、デプリヴェーションを抑えることで、大体 200 ヌクレオチドぐらいまで合成できる。

○シーケンサーの前処理試薬に使う新しい発想。200 ベースの様々な種類のオリゴを切り離して、オリゴのライブラリーを調製。T7RNA ポリメラーゼで RNA にすることで、Exome 領域だけを濃縮

できる Exome アレイを作る。その Exome のプローブ部分だけを集めた試薬を提供し、シーケンサーの解析に使う、SNP、ミューテーション解析をする。オリゴライブラリーを使って濃縮し、直接シーケンスで読んでしまっ、ミューテーション解析をする。

○アジレントの今のビジネス戦略。マイクロアレイを使って染色体の特定の領域のコピー数の解析をする。一方で次世代シーケンサーを使った、Exome-seq 解析でポイントミューテーションとか、比較的短い 10 ベース、20 ベースでのインサージョン・ディレイション、あるいは逆位の解析をする。

**(質疑応答)**

○コピー数の変化を検出するという話だが、実際にダウンの診断に使っているのか。

○海外で今使われているのは、ほとんど出生後の遺伝学的検査。

○コピー数解析に関しては、実際にシーケンサーを使っていこうという動きがある。より精度の高いデータ、再現性の高いデータを診断に利用するためには、コピー数解析では、マイクロアレイに分がある。

### 3.3 欧米におけるDNAチップ関係の資料

#### 3.3.1 FDAによる次世代シーケンサー販売認可に関する資料（翻訳文）

第2回普及活動ワーキンググループ委員会の資料（平成26年2月26日）として、ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン誌「FDA初の次世代シーケンサー販売認可」を翻訳して配付した。

原資料：「First FDA authorization for next-generation sequencer.」 Collins FS, Hamburg MA. N Engl J Med. 2013 Dec 19;369(25):2369-71.

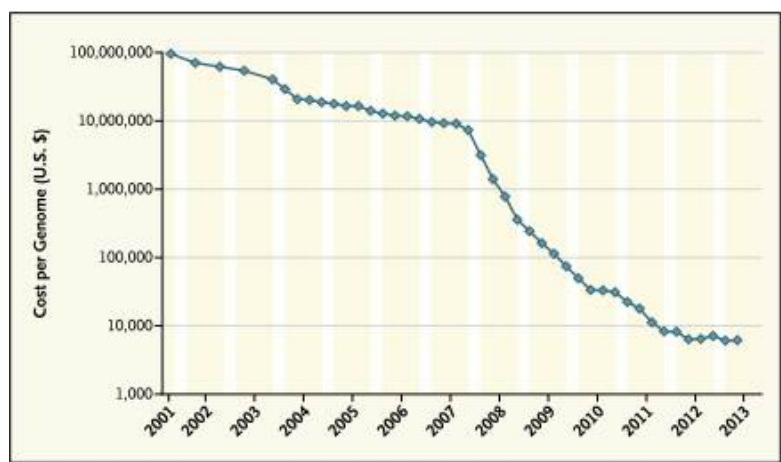
ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン

展望

「FDA初の次世代シーケンサー販売認可」

フランシス・S. コリンズ, M.D., Ph.D., マーガレット・A. ハンバーグ, M.D.

今年ジェームズ・ワトソンとフランシス・クリックがDNAの構造を解明してから60年であり、ヒトゲノムの完全シーケンスから10年である。折しも今日、食品医薬品局（Food and Drug Administration: FDA）は、初めて高スループット（次世代）ゲノム・シーケンサーの販売を認可した。認可を受けたイルミナ社のMiSeqDxは、無数の新しいゲノムに基づく検査の開発と利用が可能となる。国際的な研究者チームが最初のヒトゲノムをシーケンスしたとき、10年を超える年月と数億ドルの費用を要した。今日、連邦政府及び民間の投資により、シーケンス技術は劇的に進歩し、ヒトのゲノムは約24時間以内に5000ドルもかからずシーケンスできるようになった（グラフ参照）。これは、同時により速く、より安く、より良い技術が進歩した稀少な事例である。すなわち、コストは急速に下がりながら能力は向上し、シーケンスの正確性は大きく改善された。FDAの声明により、国立衛生研究所の資金提供で最初の研究プロジェクトから10年近くかけて開発されたプラットフォームは、臨床治療に用いることが可能になった。臨床医は、ほとんど無限の、医学的に意味のある遺伝的変異を選択して調べることができる。これらのデータへのアクセスは、研究、臨床治療、及び患者の主体的関与を変質させる扉を開くものだ。



図：ゲノム解読コスト

国立ヒトゲノム研究所資料より作成

この技術がどのように利用され得るか知るために、がんについて考えてみる。個別のがんのゲノムシーケンスについての総合的な解析は、悪性の表現型の原因となる特異的変異を明らかにし、治療の新しい標的を割り出し、それぞれの患者のために最適な治療を選択する機会を増加させてきた。例えば、肺腺がんは現在、特定の治療法についての異なる結果、異なる反応と関連するユニークなゲノム上の特徴によって、サブタイプに分けることができる。より一般的には、がんゲノムアトラスの最近の研究は、特定のがんに由来する組織は、原因となる変異データの集積に比べて、治療への反応や予後との関連が弱いかもしれないことを示す(1)。結果として、ほとんど治療の選択肢がないとされるがんと診断された患者が、もともとは共通のドライバー変異を共有する別のがんを標的とする薬物治療の恩恵を受けられるようになるだろう。新しい技術により我々は、個々のがんの特異的な変異を標的とする現在のアプローチから、全ゲノムを探索して広範囲に利用するアプローチへと移行できる。

このプラットフォームが十分に活用できる主な分野は、ゲノム薬理学、すなわちそれぞれの患者に対して適切な薬剤と容量を決定するためのゲノム情報の利用である。120を超えるFDA認可薬剤のラベルには、ゲノム薬理学的情報が記載され、薬剤に対する反応の違いについての重要な詳細情報が提供し、時には処方前の遺伝子検査が推奨している(2)。

しかし、ゲノム薬理学の潜在的な可能性は、まだまだ実現されていない。処方に役立てることのできるタイミングで適切なゲノム情報を獲得することが論理的に困難なためである。ゲノム情報が電子医療記録に入れば、オーダーメイド医療に役立つだろう。患者の全ゲノムが患者の医療記録の一部となれば、DNAサンプルの取得や輸送、実験室での作業に伴う複雑さは、短い電子的な質問に取って代わられるだろう。

このシナリオは非常に有望だが、薬剤処方におけるゲノム情報の有用性は、厳格な証拠によって示されなければならない。例えば、最近公表された三つの臨床試験では、ビタミンK拮抗薬初期投与における薬理遺伝学的情報利用の臨床的有用性に疑問が投げかけられた(3)。

FDAは、イルミナ社の機器プラットフォーム及び試薬の販売認可を、示された19のヒト染色体に渡る多数のゲノム断片における正確性に基づいて決定した。また、異なる機器、使用者、使用日、試薬ロットにおける精度と再現性も示されている。

臨床利用のためのシーケンス・プラットフォームの販売認可は、おそらく、健康管理への遺伝情報の取り込みを拡大するだろう。しかし、もっとも有望な技術でさえも、関連する政策、法律、そして規制事項が十分に整わなければ、可能性を完全に実現することはできない。すでに鍵となる政策は前進しており、遺伝情報の誤用に関する公衆の懸念の多くに配慮し、道行きを滑らかにしている(4)。例えば、医療保険の携行性と責任に関する法律(Health Insurance Portability and Accountability Act of 1996: HIPAA)と遺伝情報差別禁止法(Genetic Information Nondiscrimination Act: GINA)は、保険者に契約前状態、査定事項、あるいは補償拒否の根拠として遺伝情報を考慮することを禁じている。GINAはまた、遺伝情報を雇用者による利用からも保護する。しかし、これらの保護は、遺伝的リスクによる病気の症状には及ばない。GINAによって、がんの素因を示すゲノム情報は保護されるが、がんを示唆する他の臨床兆候または症状は保護されない。医療費軽減法の規定は2014年にさらに踏み込み、ゲノム情報であろうとなかろうと、保険料の決定において、全ての契約前状態を考慮することを禁止する。しかし現在

の連邦法は、生命保険、介護保険、あるいは傷害保険におけるゲノム情報の利用を制限していない。

今年6月、最高裁判所が単離された自然由来のDNAには特許は生じないという判決（分子病理学協会対ミリアッド・ジェネティクス）を出して以来、オーダーメイド医療におけるゲノム利用のための法的な展望は明るくなって来た。この判決は個人遺伝子検査へのアクセスにおけるブレイクスルーであるが、さらに重要なことは、ゲノムシーケンシングの臨床治療への統合のためのブレイクスルーでもあるということである。ミリアッド判決以前、全ゲノムシーケンシングを提供するためには、臨床研究室は長いリストに記載された遺伝子特許保持者に使用料を支払わなければならないのではないかという大きな憂慮があった。この判決が、公衆衛生に利益をもたらすであろう未だ想像すらできない製品を創り出すための扉を開いたのだ。

FDAはまた、オーダーメイド医療に関連する他の規制事項に配慮することにも積極的である

(5)。イルミナ社の技術の販売認可に伴い、FDAは、性能評価を可能にする参照材料と方法の必要性を認めた。その結果、FDAは国立標準技術研究所（National Institute for Standards and Technology: NIST）と共同して全ヒトゲノムDNAとその配列のもっとも確からしい解釈からなる参照材料を開発した。ヒトゲノムの最初の参照材料は、12ヶ月以内に公開され、利用可能となると期待される。

病気に特化しないプラットフォームが販売認可されたことにより、すべての研究室が、すべての目的のために、すべての配列を検査することが可能になる。従って、臨床研究室内で開発される検査（研究室開発検査、laboratory-developed tests: LDTと呼ばれる）の妥当性評価や品質を保証するため、リスクに基づく適切な規制のフレームワークが今や不可欠である。

次世代ゲノム・シーケンサーに対する初めての販売認可は、患者の治療を究極的に改善するゲノム情報を生み出し得る大きな一歩を意味する。しかし、ただの一歩に過ぎない。オーダーメイド医療が本当に健康管理に取り入れられるまでにはいくつもの困難がある。我々は疾病の発生を予測でき、進行に影響を与え、薬剤に対する反応を調節するようなゲノム中の変異を明らかにする必要がある。新しいゲノムに関する知見については、医学的な意思決定に用いられる前に妥当性を評価する必要がある。医師や他の医療専門職は、ゲノムデータとそれが個々の患者において意味することを解釈するためのサポートを必要とするだろう。患者は自分の遺伝情報について医師と相談したいと思うだろう。適切な情報とサポートによって、患者は医師とともに、より豊富な情報に基づく決断を行なうことが可能になるだろう。患者が最良の検査にアクセスできること、また製造企業が開発のインセンティブを保てるようにするため、経費の問題も解決される必要がある。

この規制方針への次世代シーケンシングの登場はまだ始まったばかりである。我々は、研究が進展し、規制政策が発達し、患者の権利とニーズに注意が払われ、そしてゲノム情報の臨床利用が確固たる証拠に基づいていることを確かにするため、協働しなければならない。

著者らの利益相反開示はこの記事の全文とともに NEJM.org で閲覧可能である。

所属：国立衛生研究所所長室、ベセスダ、MD (F. S. C.) 保健福祉省食品医薬品局長官室、シルバーク・スプリング、MD (M. A. H.)

この記事は 2013 年 11 月 19 日、NEJM.org にて発表された。

1. C. カンドス、M. D. マクレラン、F. ヴァンディン 他「がんの主要 12 タイプに渡る変異の展望と重要性」ネイチャー 2013 年 502 号 333-9
2. 薬剤ラベリングにおけるゲノム薬理的バイオマーカー表. シルバー・スプリング、MD: 食品医薬品局、2013 年  
(<http://www.fda.gov/%20drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm>) .
3. B. フリー. ゲノム薬理学 - ビタミン K 拮抗投与の役割。ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン 2013 年. DOI: 10/1056/NEJMe1313682.
4. K. L. ハドソン「ゲノミクスと健康管理そして社会」ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン 2011 年; 365 号 1033-41.
5. 「オーダーメイド医療への道を整える: 医療製品開発の新時代における FDA の役割」シルバー・スプリング、MD: 食品医薬品局、2013 年 10 月  
(<http://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/SpecialTopics/PersonalizedMedicine/UCM372421.pdf> )

### 3.4 DNAチップに関するインターネット検索

#### 3.4.1 調査目的及び方法

##### 3.4.1.1 調査目的

DNAチップ技術は日々進歩しており、世界的にも標準化が進んでいる。DNAチップの精度管理は多くの企業の技術的課題であり、米国では51の企業や公的な研究機関がMAQCコンソーシアムを設立するほど多くの研究者・技術者、企業関係者が興味を持っている。我が国でも、2007年に11の法人（企業、公的研究機関）が中心となってバイオチップコンソーシアムが設立された。このように、多くの企業がDNAチップ技術や製品を開発・販売しており、インターネット検索により網羅的に調査することができる。このような調査は最新の技術・製品化の動向や、新規参入企業等の情報を得るために有効と考えられる。

本調査では、インターネット検索により、DNAチップ技術や製品を開発・販売している企業や公的な研究機関を検索し、その技術・製品を網羅的に調査することを目的にしている。

##### 3.4.1.2 調査方法

###### (1) ウェブ検索条件

以下の条件でDNAチップに関するインターネット検索を行い、DNAチップの技術や製品を公開している企業や公的研究機関のリストを作成する。

###### 【キーワード】

「DNAマイクロアレイ」OR「DNAチップ」

###### 【検索条件】

- ・ 検索の条件指定で対象とする国は「日本」
- ・ 2010年以降の情報：ウェブページの内容から確認する。
- ・ 企業か大学等の研究機関の情報：ウェブページの内容から確認する。

###### (2) まとめ方

- ・ 1項目、1団体（企業・大学等）。
- ・ 以下の内容を順番に記載する。
  1. 【企業・大学等の名称】（注：正式名称を記載）
  2. 【ウェブアドレス（URL）】
  3. 【概要】（注：技術名・製品名、技術内容を抜粋）
  4. 【参考資料】（注：図を記載）



### 3.4.2 調査結果

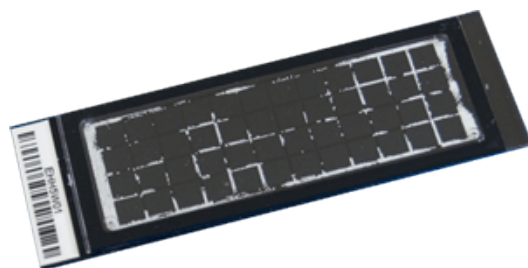
以下に、調査結果を団体ごとにまとめて記載する。

#### (1) 東レ株式会社

<http://www.toray.co.jp/>

[製品・サービス]

- ・「Human Oligo chip 25k」 ヒト全遺伝子型DNAチップ



3D-Gene® (DNA チップ)

3D-Gene® Human 25k は、オペロンバイオテクノロジー株式会社の定評のあるマイクロアレイ用オリゴDNAセット AROSTM v3.0 および v4.0 から選択。アノテーション情報が充実している遺伝子を中心に選択しているため、あいまいな情報に迷わされることなく解析を行うことが可能

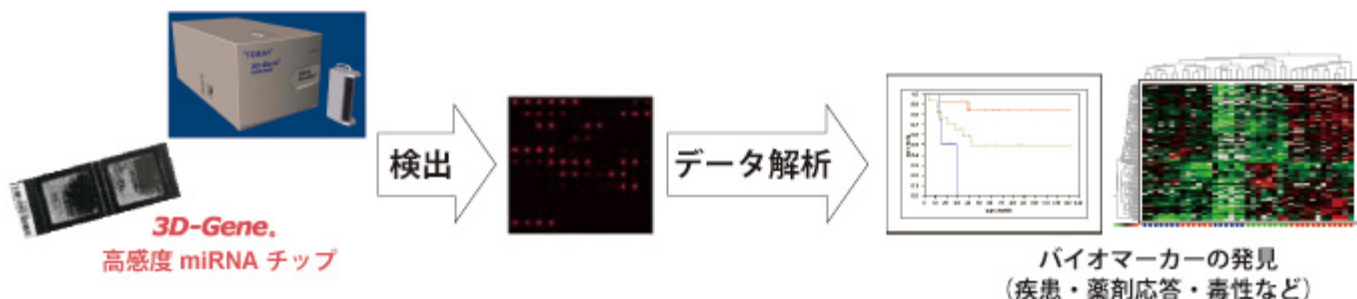
#### (その他の製品)

- ・「Mouse Oligo chip 24k」 マウス全遺伝子型DNAチップ
- ・「Rat Oligo chip 20k」 ラット全遺伝子型DNAチップ
- ・「Yeast Oligo chip S.cerevisiae 6k」 酵母全遺伝子型DNAチップ
- ・「miRNA Oligo chip」 miRNA 研究用DNAチップ
- ・「3D-Gene® Scanner」 DNAチップ読み取り装置
- ・カスタムチップ作製
- ・RNA/FFPE/血液からの受託解析
- ・miRNA と mRNA の関係と統合解析

#### [技術]

(ホームページ掲載の技術事例)

- ・新規RNA抽出試薬と高感度DNAチップの組み合わせで革新的なバイオマーカー探索



- ・3D-Gene®のmiRNA配列に対する検出特異性
- ・血液由来サンプルからのmiRNAを使用した解析
- ・ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)標本からの遺伝子発現解析
- ・DNAチップと定量PCRの検出相関性
- ・酵母全遺伝子型DNAチップを用いた遺伝子発現解析
- ・酵母全遺伝子型DNAチップの感度比較
- ・ヒト培養脂肪細胞の分化に伴う遺伝子発現変動の検出

(2) 株式会社DNAチップ研究所

<http://www.dna-chip.co.jp/index.html>

[製品・サービス]

- ・「ハイブリ先生」 教育用DNAチップ教材
- ・「iRIS (アイリス)」 関節リウマチ問診システム
- ・「Tbone EX Kit」 硬組織 (歯牙・骨) 用DNA抽出キット
- ・「リウマチチェック」 関節リウマチ生物学的製剤インフリキシマブの効果予測検査サービス
- ・「MammaPrint (マンマプリント)」 乳癌の再発リスクを予測する新しい検査サービス

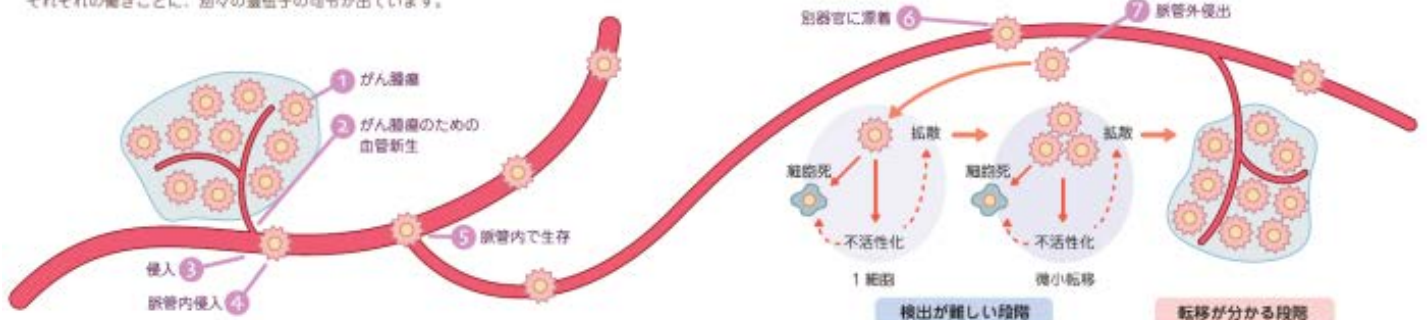
乳癌を2群に分類する予後予測検査法。

70 遺伝子シグニチャーによるマンマプリントは早期乳癌患者様の術後再発リスクを測定するもので、従来法とは違う新しい方法であり、エストロゲン受容体ステータスとは無関係に実施することができる。

従来型の遺伝子検査とは違い、マンマプリントは乳癌の転移流路に関連する重要な分子パスウェイ全体を調べ、重要な 70 遺伝子の発現を分析し、患者を2つのローリスクあるいはハイリスクグループに分類。マンマプリントを用いて、患者様の腫瘍の攻撃性についてより深く観察することができ、患者様への個人別の治療プロトコルを組み立てることができる。

がん細胞の転移・再発のしくみ

それぞれの働きごとに、別々の遺伝子の司令が出ています。



[技術]

(ホームページ掲載の受託サービス事例)

- ・マイクロアレイ受託

アジレント社製マイクロアレイ作製/カスタムアレイ作製→RNA・DNA抽出/品質検査(QC)→遺伝子発現解析/miRNA発現解析/メチレーション解析/ゲノム構造解析 CGH/CNV→3D-Gene→アレイのスキャン→統計解析/統合解析

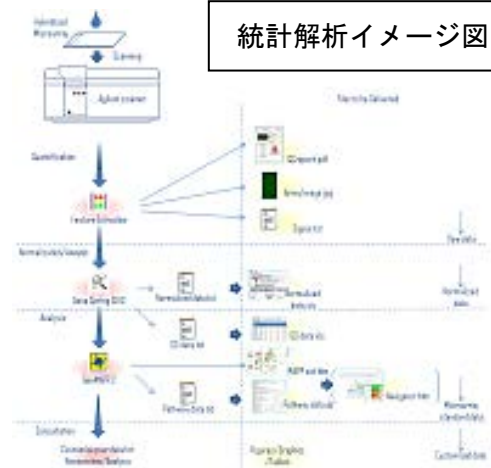
- ・次世代シーケンス解析

エクソーム解析/エピジェネティクス解析/ターゲットリシーケンス/RNA-Seq/Small RNA-Seq/シーケンスデータ登録サービス(DDBJ/DRA)/その他

- ・バイオマーカー探索

がん細胞の転移・再発のしくみの図

統計解析イメージ図



(3) 株式会社東芝

<http://www3.toshiba.co.jp/ddc/dnachip/>

[製品・サービス]

- ・電流検出型DNAチップ（2010年超モノづくり部品大賞）

電気信号で遺伝子を検出するという全く新しい原理を採用。高い感度と精度を持つ一方、従来型の1/3～1/10の費用で、簡便に検査ができるなどの特長を持っている。日本発の数少ないバイオ技術であり、東芝方式として国内外から高い評価を得ている。既に、子宮頸がんの原因であるヒトパピローマウイルスをタイピングする国産初のシステムをはじめ、国産初の生物剤検知システム、実験動物用微生物感染モニタリングシステムなどを製品化。

DNAチップを癌・生活習慣病の疾病リスクの遺伝子診断、薬剤の効用や副作用の遺伝子診断に展開するとともに、食品検査や家畜防疫分野での開発、製品化も進め、DNAチップを通して、安心安全社会の実現に貢献。

(その他の製品)

- ・遺伝子検査装置

[技術]

(ホームページ掲載応用技術事例)

・薬物代謝酵素 CYP2D6 の欠損/重複 を LAMP-DNA チップ系で検出する方法の確立

・HPV タイピング用DNAチップを用いたタイ国内の疫学研究

- ・HPV タイピング用DNAチップの開発

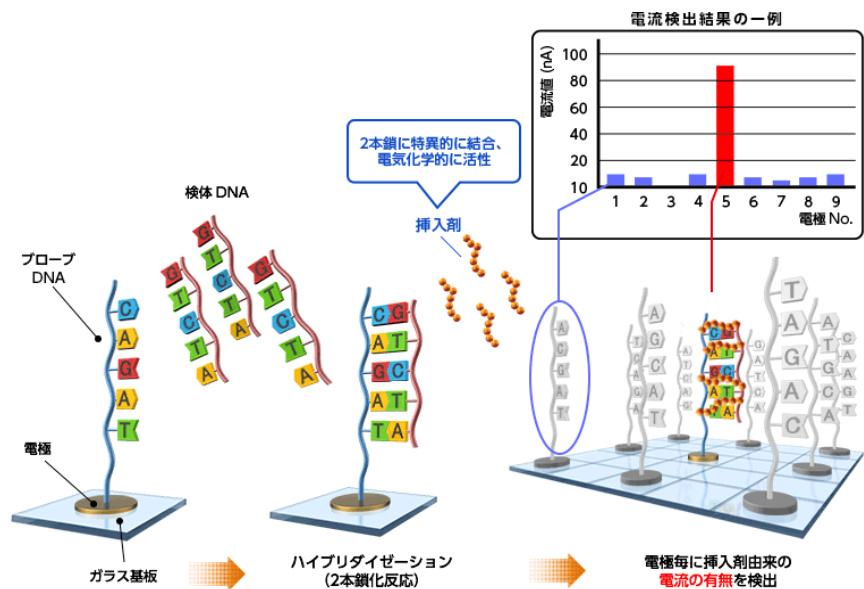
・プライマーに検体識別用のタグを挿入することにより、1チップ上で複数検体を検出する方法の確立（モニジーンヘリコマルチ）

- ・自動DNA検査装置 Genelyzer™の開発

- ・モバイル型生物剤検知システム BioBulwark™の開発

- ・モバイル型生物剤検知システム BioBulwark™

・実験動物微生物モニタリング用DNAチップの開発、及びDNA自動検査装置のラインアップ拡充



(4) 三菱レイヨン株式会社

<http://www.mrc.co.jp/>

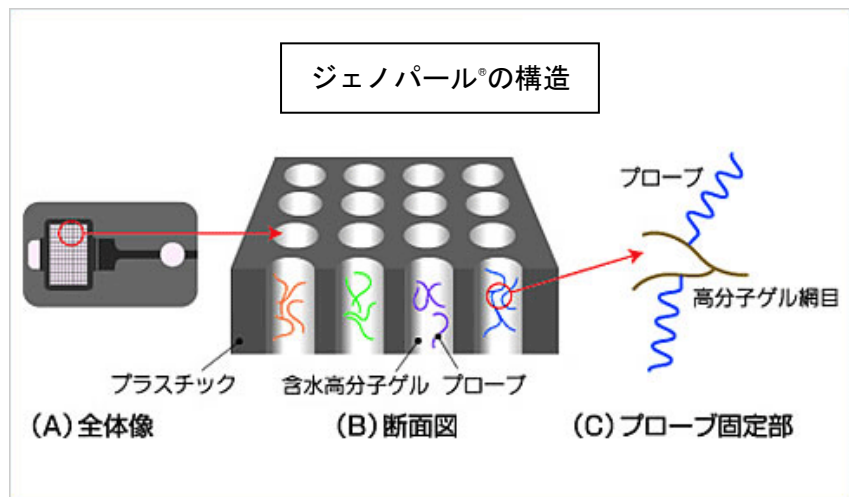
[製品・サービス]

- ・繊維型DNAチップ「ジェノパール®」

繊維・樹脂・バイオの独自技術を融合することにより開発した全く新しいタイプのDNAチップであり、高い再現性、信頼性、操作性を兼ね備えた、検査・診断など精密解析用途に最適のフォーカストアレイ。

(その他の製品)

- ・皮膚チップ
- ・美白チップ
- ・食品感受性評価チップ
- ・酸化ストレス・アンチエイジングチップ
- ・自然免疫チップ
- ・メタボリックチップ
- ・アレルギーチップ
- ・マイクロRNAチップ
- ・カスタムチップ受託製造
- ・遺伝子受託サービス



[技術]

(ホームページ掲載技術解析事例)

- ・食品や医薬品の機能成分がターゲットとする分子にフォーカスした「食品感受性評価チップ (マウス・ヒト)」を開発
- ・食品の抗酸化機能解析
- ・‘自然免疫’に関連する遺伝子にフォーカスした「自然免疫チップ」を開発
- ・メタボリックチップを用いた解析高脂肪食が概日リズムに与える影響
- ・臓器間におけるメタボ関連遺伝子の発現差を「メタボリックチップ」を用いてクラスタリング解析
- ・ヒト培養細胞・組織のマイクロRNAプロファイリング
- ・食品成分のアレルギー改善効果の解析
- ・マウス臓器のマイクロRNAプロファイリング



(5) アレジレント・テクノロジー株式会社

<http://www.chem-agilent.com/index.php>

[製品・サービス]

・「DNA マイクロアレイシステム」  
遺伝子発現解析用マイクロアレイ/CGH  
用マイクロアレイ/ChIP-on-chip 用マイ  
クロアレイ/microRNA 用マイクロアレイ  
/カスタム マイクロアレイ/DNA マ  
イクロアレイ用試薬キット/DNA マ  
イクロアレイ 実験用機器/データ解析  
ソフト/ソリューション



Human Exon マイクロアレイ

[技術]

(ホームページ掲載技術例)

・ SurePrint 技術

最大 8 つのアレイを単一のスライドにプリントすることができ、これにより、ゲノム全体の解析からの絞った詳細な解析まで、幅広い研究に対応できるようになった。従来よりも大規模でパワフルなマイクロアレイ実験を、きわめて低いコストで実施できる。

・ SureScan 技術

さらに高密度なマイクロアレイの出現に備えて、高分解能スキャン能力の導入を行い、マイクロアレイスキャナを進化させた。

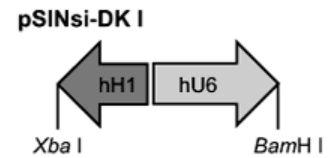
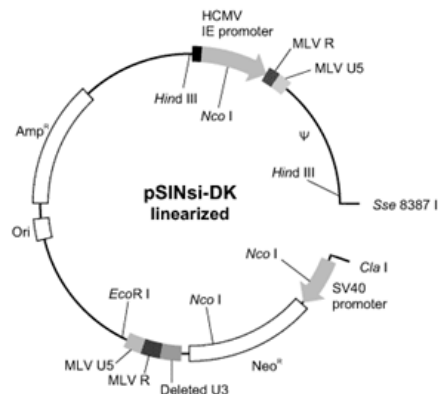


(6) タカラバイオ株式会社

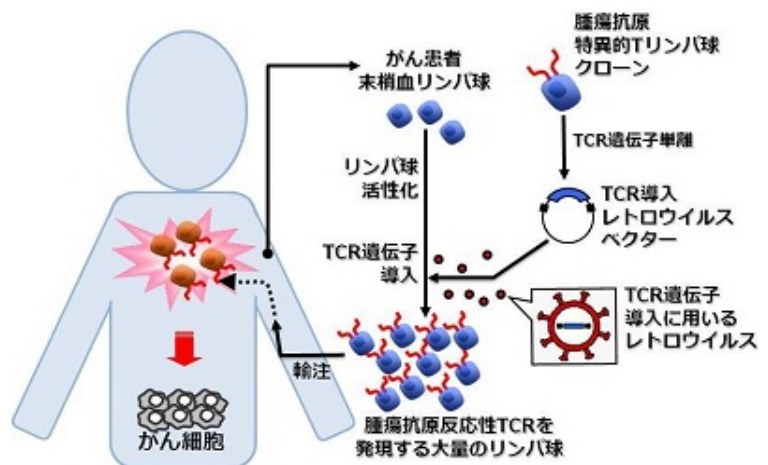
<http://www.takara-bio.co.jp/>

[製品・サービス]

- ・ PCR
  - ・ リアルタイム PCR (定量 PCR、qPCR)
  - ・ 遺伝子検出・検査
  - ・ cDNA 合成・クローニング
  - ・ ライブラリー・cDNA・RNA
  - ・ 次世代シーケンス解析 (NGS)
  - ・ 核酸抽出・精製
  - ・ 核酸増幅・標識
  - ・ 遺伝子導入 (試薬)
  - ・ 遺伝子導入 (ウイルス、ベクター)
  - ・ 発現調節・タンパク質相互作用解析
  - ・ miRNA・RNAi 関連
- ダブルノックダウンタイプの shRNA 発現用レトロウイルスベクター



pSINsi-DK ベクターシリーズ



TCR 遺伝子治療プロジェクト

[技術]

- ・ 最新鋭 DNA シーケンサー導入により受託解析事業を拡充 (2013/10/29)
- ・ 次世代シーケンサー向け遺伝子発現解析キットを発売 (2013/10/22)
- ・ iPS 細胞等の多能性幹細胞から肝臓細胞への分化状態評価関連試薬を拡充 (2013/10/02)
- ・ 新たな iPS 細胞作製方法に関する特許の全世界商用ライセンスを iPS アカデミアジャパン社より取得 (2013/09/30)
- ・ 日本癌学会学術総会にて遺伝子治療および細胞医療の臨床研究/前臨床試験の成果を発表 (2013/09/04)
- ・ HSV-TK 遺伝子治療プロジェクト
- ・ TCR 遺伝子治療プロジェクト
- ・ MazF 遺伝子治療プロジェクト
- ・ HF10 プロジェクト

(7) 株式会社バイオマトリックス研究所

<http://www.biomatrix.co.jp/index.html>

[製品・サービス]

・モノクローナル抗体

BMR モノクローナル抗体

BMR では、当社独自の技術により高い抗原特異性・親和性を持つモノクローナル抗体を提供。

特に、抗体の作製が困難でありながら研究価値の高いタンパク質に対するモノクローナル抗体の開発を推し進めている。

・抗体受託作製サービス

・マイクロアレイ受託解析

Affymetrix® - GeneChip® Array/Agilent DNA microarray/NuGEN™ 試薬を用いた DNA マイクロアレイ解析/RNA 抽出からのマイクロアレイ解析/BMR フィードバックシステム

・リアルタイム定量 PCR 受託解析

・DNA シーケンス受託解析

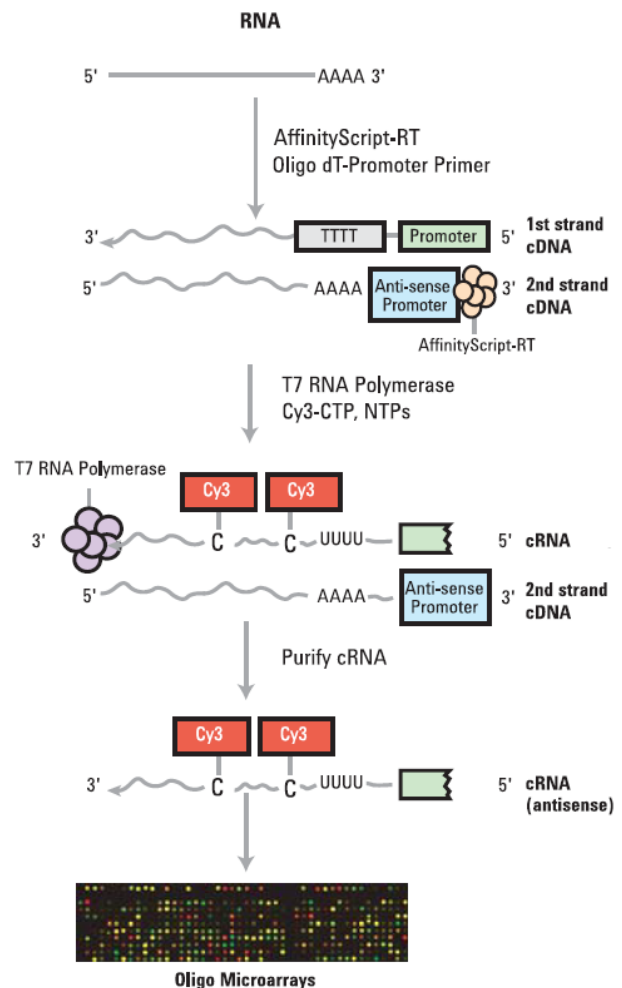
(その他ホームページ掲載情報)

・国立がん研究センターとの共同研究契約締結  
600 種の核内因子モノクローナル抗体と臨床サンプルを用いた解析を国立がん研究センター研究所、中国の復旦大学と行い、肝細胞がんの発見・診断マーカー候補を取得。当該プロジェクトが 22 年度の経産省の地域イノベーション創出研究開発事業に採択され、開発の加速が期待される。

・診断用の抗体として開発した抗インフルエンザ抗体ではいくつかの診断薬メーカーに評価、採用される。



BMR モノクローナル抗体



Low Input Quick Amp Labeling Kit を用いた解析  
Agilent 社のプロトコルを BMR が編集したもの

(8) 東洋製罐グループホールディングス株式会社

<http://www.tskg-hd.com/>

[製品・サービス・技術]

- ・「ジェノゲート」 DNAチップ検査技術を用いた食品・環境検査

DNAチップによるカビ検査法

新たに開発した高性能DNAチップと、当社が保有する独自技術を活用した新しい検査技術。食品工場や病院、農業現場、文化財施設などにおいて、人体および食品に悪影響を及ぼす施設環境中の主要なカビや菌の検出に効果がある。

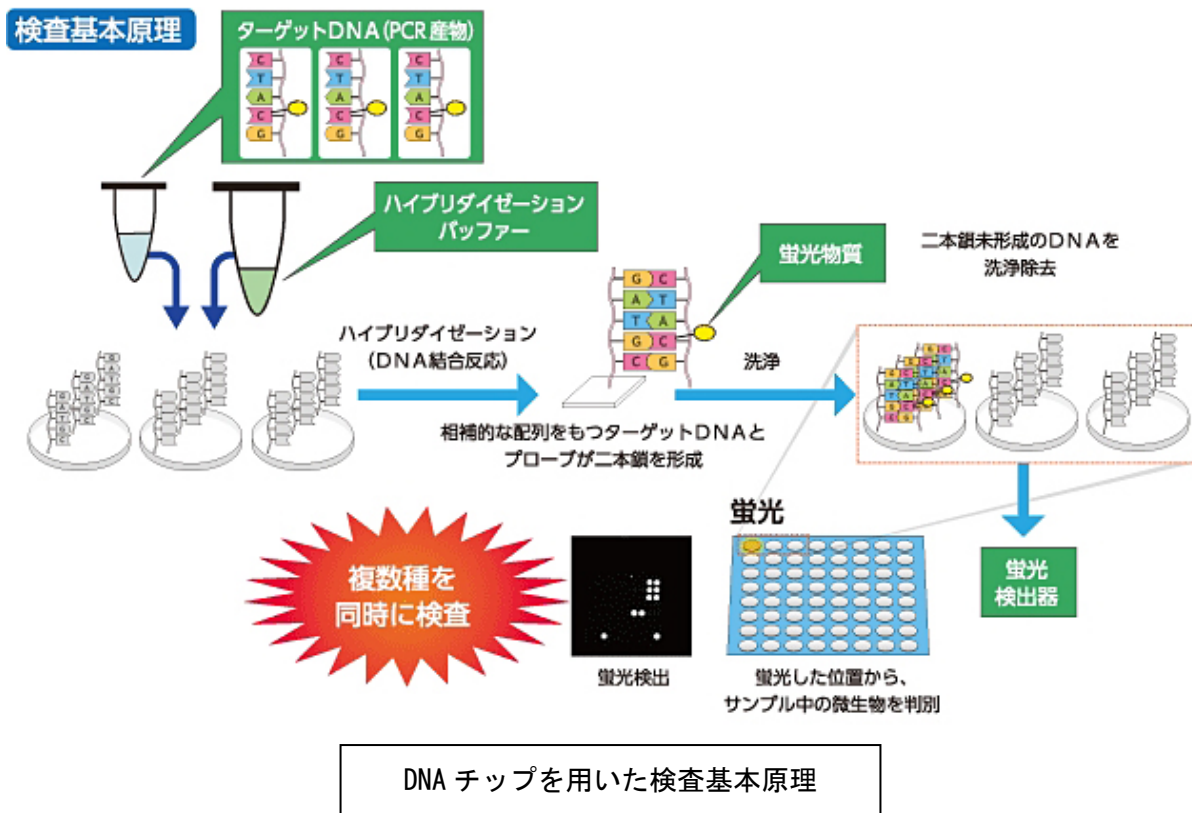
(その他ホームページ掲載情報)

- ・新分野 - 高効率自動細胞培養システム (開発中)

細胞培養バッグ CCB-st (Cell Culture Bag-st)

自動細胞培養システム ACCS (Automatic Cell Culture System)

- ・新分野 - 屈折率分布型マイクロレンズ「シリカグリン®」





(9) フィルジェン株式会社

<http://www.filgen.jp/index.htm>

[製品・サービス]

・ 受託サービス

DNA マイクロアレイ / アレイ CGH / m i c r o RNA アレイ

ProtoArray® / 抗体アレイ・ペプチドアレイ  
質量分析 / リアルタイム PCR / リアルタイム

PCR アレイ / 次世代シーケンシング / DNA シーケンシング / MultiPlex Suspension

Array / ELISA・EIA / カスタムペプチド合成 / 電子顕微鏡撮影 / DNA・RNA 抽出 / データ  
マイニングサービス / アレイスキャンニング

(その他機器)

LED イルミネーター / ピペッティングナビゲーションシステム / 微量サンプル採取システム / 自  
動核酸抽出精製装置 / タンパク質分離システム / 電気泳動関連機器 / バイオ実験関連機器 / バイ  
オチップスキャナー / グルコース濃度測定装置

・ 試薬・キット・消耗品

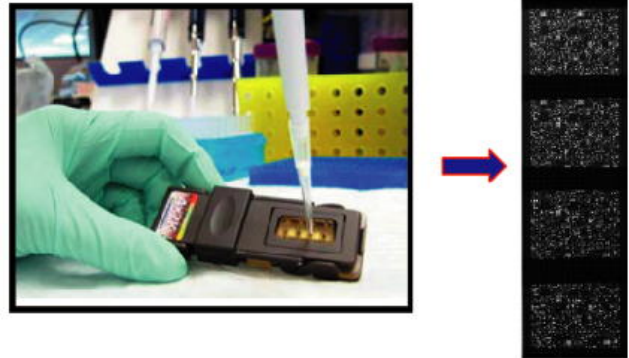
・ バイオインフォマティクス ソフトウェア

遺伝子発現統計解析モジュール (BioFormatix 社製)

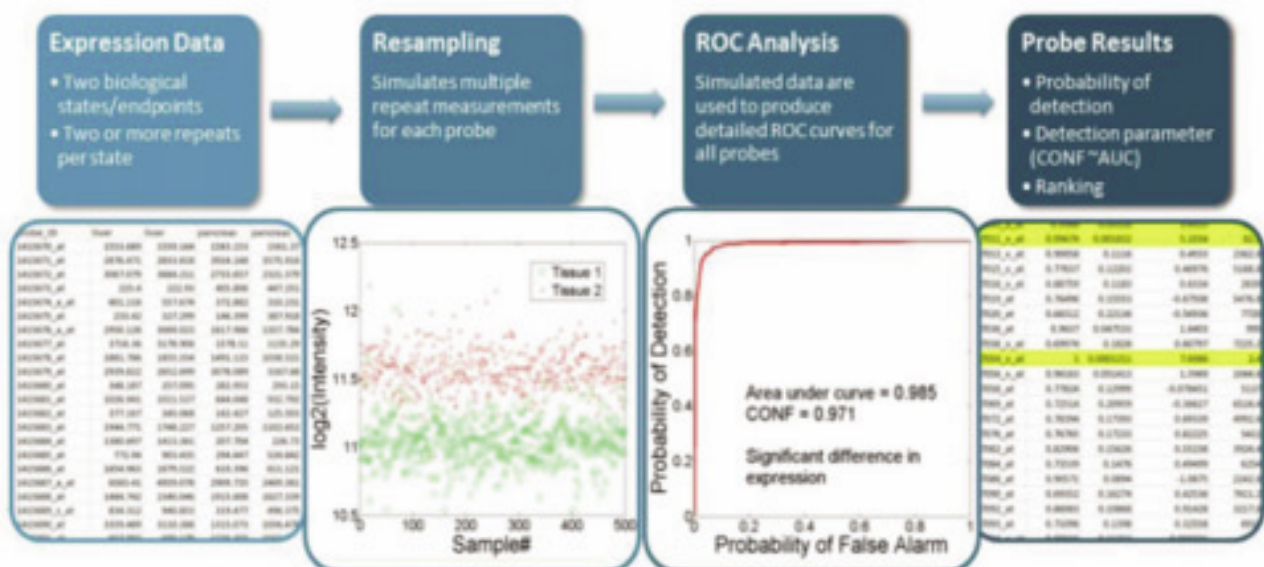
Bootstrapped ROC (bROC) では、マイクロアレイや RNA-Seq 解析のデータから、発現変動した  
プローブや遺伝子を検出。他の手法とは異なり、bROC は反復の少ない実験でも解析。ユーザーが  
パラメーターを選択せずに、簡単に使うことのできるアルゴリズム。

・ Applera Corporation 社 (applied biosystems Group) とのライセンス契約

・ CLC Bio 社との CLC Genomics Workbench のサービスライセンス契約



## ANALYSIS FLOW



(10) 住友ベークライト株式会社

<http://www.sumibe.co.jp/index.html>

[製品・サービス]

- ・回路基板・半導体封止材ほか樹脂材料の製造
- ・フェノール樹脂をはじめとする自動車製品
- ・フィルム・シート
- ・プレート
- ・医療機器
- ・半導体パッケージ基板用材料
- ・バイオ関係

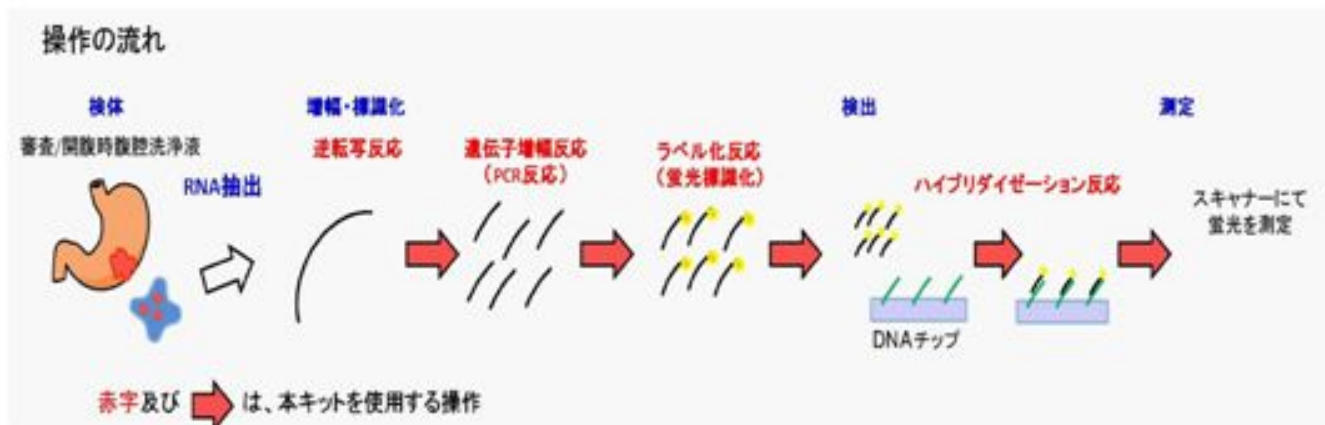
糖鎖関連／低吸着関連／細胞培養関連／凍結保存関連／神経細胞培養関連／遠沈管／コニカルチューブ関連／ピペット関連製品／免疫測定関連／その他理化学製品

(ホームページ掲載情報)

2013/07/08 日本初 がん診断用DNAチップの開発

胃がんの腹腔洗浄細胞診断用キットの開発・体外診断薬事申請

このがん診断用DNAチップは、独立行政法人国立がん研究センター（理事長：堀田知光、東京都）の研究所 バイオマーカー探索支援部門と共同で開発。日本をはじめ東アジアに多い胃がん患者を対象に、常時行われている「細胞診」の際に回収される腹腔洗浄液の中に存在する種々の細胞から胃がん細胞を検出するもの。



胃がんの腹腔洗浄細胞診断用キット操作の流れ

(11) 積水メディカル株式会社

<http://www.sekisui-medical.jp/index.html>

[製品・サービス]

・「クリニチップ® HPV」 ヒトパピローマウイルス核酸タイピングキット

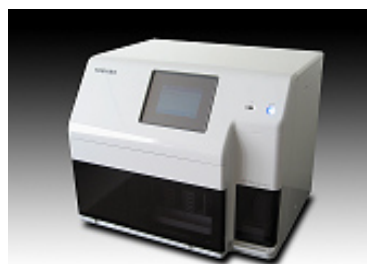
遺伝子解析装置ジェネライザーで測定を実施することで、子宮頸癌の原因ウイルスである13種の高リスクヒトパピローマウイルス（HPV）ゲノムを型別に検出できる HPV タイピング試薬。



・ジェネライザー601/ジェネライザー701 電流検出型DNAチップの専用解析装置



ジェネライザー



ジェネライザー701

(その他機器)

血液凝固・糖尿病・脂質・リウマチ・感染症などの各種臨床検査薬

プラスチック製真空採血管の開発・製造・販売

臨床化学自動分析装置・全自動血液凝固分析装置をはじめとする各種分析装置

各種アミノ酸・医薬バルク・医薬中間体などの受託製造

貼付型医薬品の開発・製造・販売

標識化合物の特別合成、薬物動態関連試験の各種評価試験など

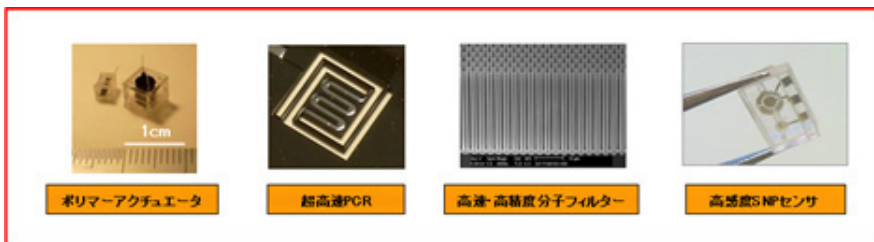
(12) パナソニック株式会社

<http://panasonic.co.jp/index3.html>

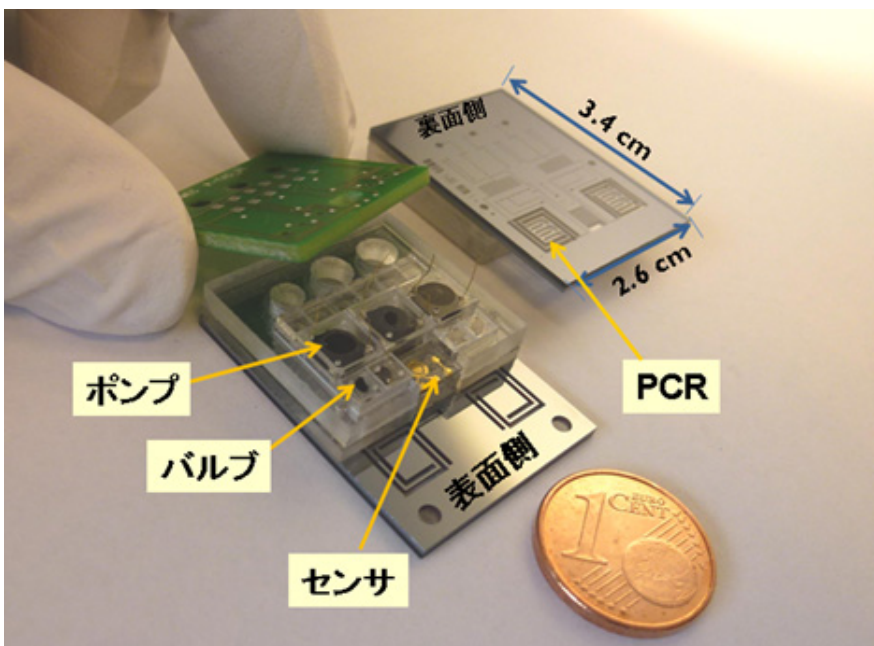
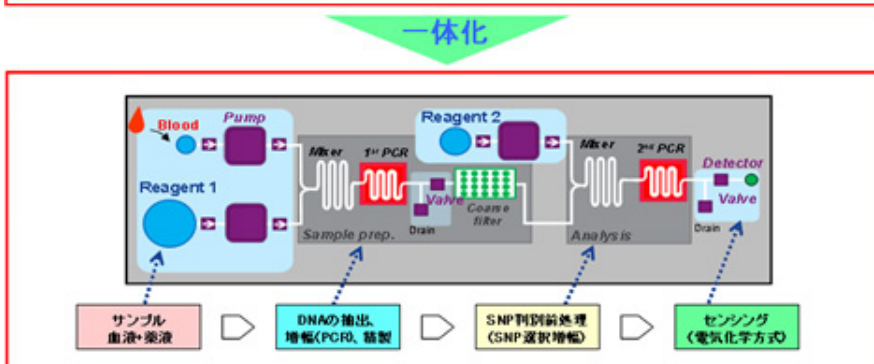
[製品・サービス]

・全自動の小型体質診断用遺伝子検査チップを開発 (2013/02/14)

imec と共同で、数マイクロリットルの血液から、SNP などの遺伝子情報の検査を、前処理工程も含め、全自動で行なえる小型の遺伝子検査チップを開発。このチップは微量の血液からDNA抽出・増幅し、目的のSNP判定を行う機能を一体化したもの。これにより、わずか1時間で、遺伝子検査を行うことが可能となった。



遺伝子検査チップの構成図



開発した遺伝子検査チップの外観

(13) 株式会社日本ローパー

<http://www.roper.co.jp/>

[製品・サービス]

- ・「Image-Pro Plus」

米国 Media Cybernetics 社が生んだ 最先端の画像解析・画像計測・画像処理ソフト。

- ・「Image-Pro Premier」

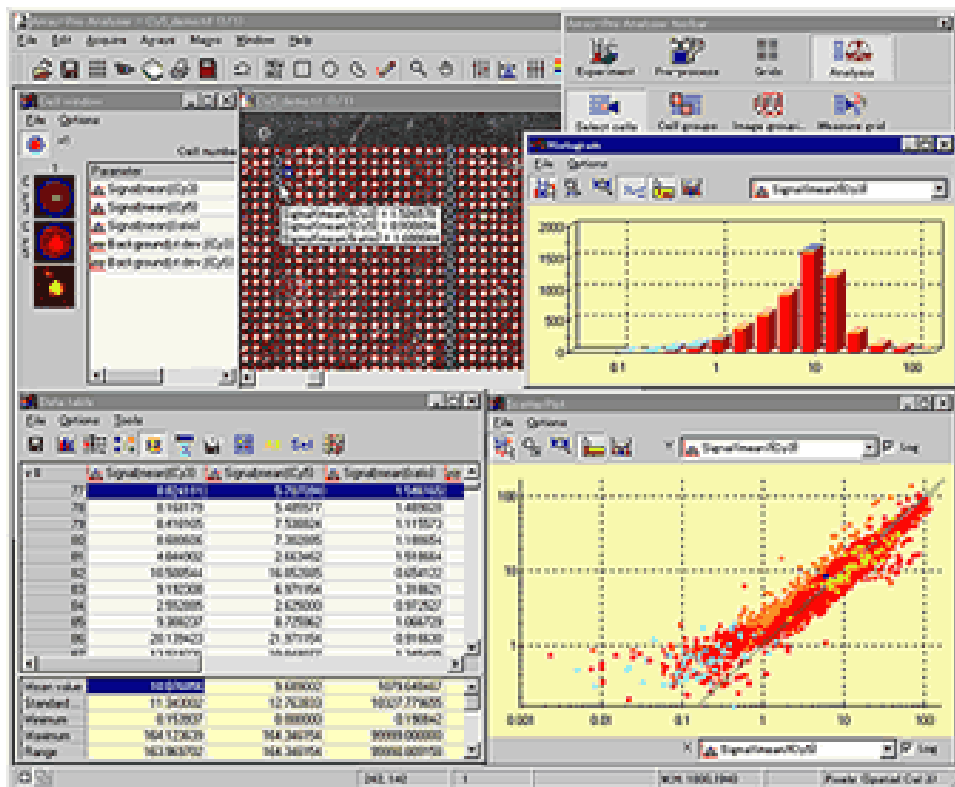
25年以上にも亘るユーザーの皆様からの要望を反映し、64bit ネイティブのサポートによる大きな画像のハンドリングや強化された画像取り込み機能、スマート対象抽出ツールやグラフィカルなマクロエディター、リボンインターフェースを採用したUIなど、革新的な機能を搭載して新開発。

- ・「Image-Pro Insight」

特別なトレーニングを必要としない使いやすさを追求した画像解析・計測ソフト。

- ・「Array-Pro Analyzer」

Image-Pro Plus で有名な米 Media Cybernetics 社が開発したDNAチップやDNAマイクロアレイなど、高密度のアレイ構造を持った画像を解析するソフト。



応用例および統計解析・クラスター解析オプション



(14) シスメックス株式会社

<http://www.sysmex.co.jp/index.html>

[製品・サービス]

- ・「GCS 3000Dx」

GeneChip®マイクロアレイ解析システム

- ・「Fluidics Station 450 Dx v.2」

マイクロアレイ洗浄・蛍光染色処理専用装置

- ・「Workstation with Affymetrix Molecular Diagnostics Software [AMDS]」

AMDS 搭載ワークステーション

- ・「GeneChip® Scanner 3000Dx v.2 with AutoLoaderDX」

オートローダー付きスキャナ

- ・「GeneChip®Hybridization Oven 645 (オプション) 」

ハイブリダイゼーションオープン

- ・「Data Transfer Server with AGCC」

AGCC 搭載臨床研究用アレイデータ管理サーバー

DNA 解析用マイクロアレイ

- ・「Genome-Wide Human SNP Array 6.0」
- ・「DMETTM Plus」

遺伝子発現解析用マイクロアレイ

- ・「GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array」

ヒト遺伝子発現解析用マイクロアレイ

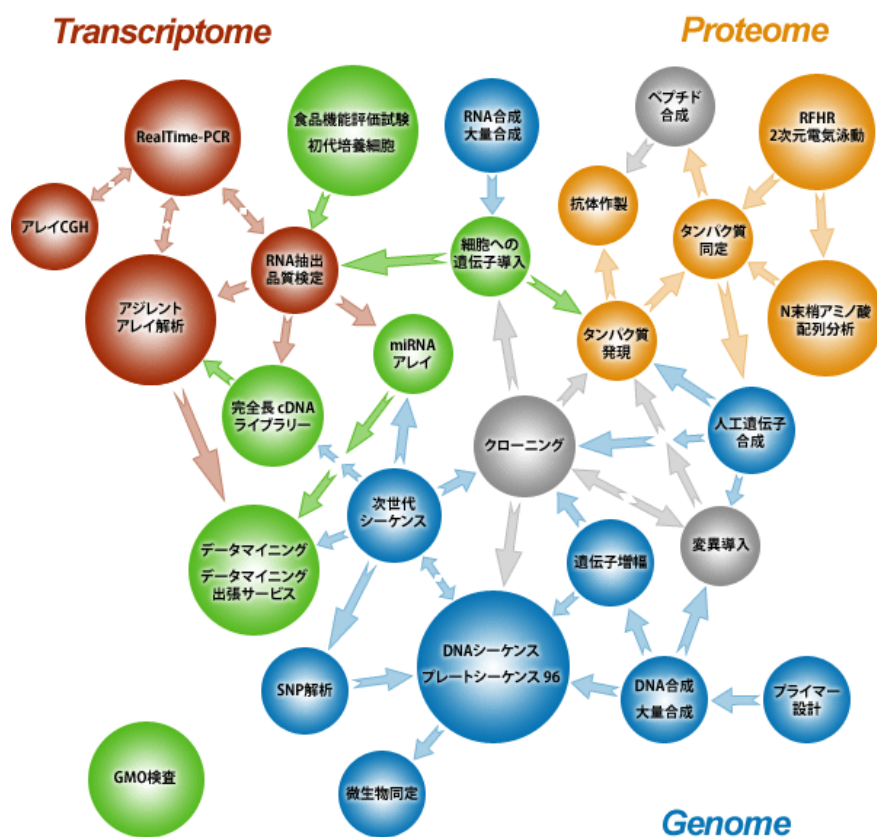
[技術]

- ・細胞計測・分析／タンパク質測定・分析／遺伝子測定・分析／原材料・試料作製



[製品・サービス]

- 受託DNA・RNA合成
- 次世代シーケンス
- 受託DNAシーケンス
- 受託DNAマイクロアレイ
- タンパク質関連事業
- 研究支援事業
- 関連製品
  - ・サーマルサイクラーPCRくん
  - ・遺伝子/核酸導入試薬
- LipoTrust™ シリーズ
  - ・LaboPass™ Products シリーズ(精製キット、Taqポリメラーゼ)
  - ・精製キットバルクシリーズ
- ・ストックシリーズ(サンプル保存用ボックス)
  - ・システムラック (アクリル製チューブホルダー)
  - ・浮っきー(ウォーターバス用チューブホルダー&アイスボックス)
  - ・冷蔵(ひえぞう)くん(実験サンプル用アイスバケツ)
  - ・冷(れい)ちゃん(アルミ製サンプルクーラー)
  - ・楽(らく)ラック(サンプル保管用ラック)
  - ・ミニミニ実験試薬セット(実験用試薬パッケージ)
  - ・各種プライマー
  - ・X線照射ユニットシステム
  - ・EVA(エヴァ)
  - ・MAXY SEALER(マイクロプレート用ヒートシーラー)



(16) 株式会社 カケンジェネクス

<http://www.kakengenqs.co.jp/index.html>

[製品・サービス]

- ・ DNAチップ
- ・ DNAマイクロレイ受託サービス
- ・ タンパク質アレイ
- ・ タンパク質アレイ-moist!-受
- ・ タンパク質アレイ-1spot 独立反応システム
- ・ DNA/抗体/蛋白質マイクロレイヤー



受託サービス

マイクロレイヤー外観図・内部

第一回ものづくり日本大賞優秀賞受賞

従来技術では困難とされてきた抗体、蛋白質、ペプチド、低分子化合物などにも幅広く適用が可能

- ・ DNAマイクロレイヤー
- ・ 微量溶液分注器 GeneX Spotter
- ・ ガラス標本（パラフィン固定薄切標本）包埋器 パラメイト
- ・ コロニーピッカー
- ・ ブロックインキュベーター
- ・ レプリケーター
- ・ PCR プレート
- ・ 冷え MAX
- ・ ハイブリチャンバー
- ・ マクロレイヤー等のピン保管用ラック - ピン楽（ぴんらっく）
- ・ タンパク質アレイ（プロテインチップ）検出用チャンバー（化学発光検出）

### 3.4.3 まとめと考察

本調査では合計16の企業についてインターネット情報をまとめた。本ガイドライン事業に関わる企業も多く検索対象になったが、それ以外の企業も多くリストアップされた。今後は、「診断」や「創薬」などの検索キーワードを足すことにより、さらに詳細な情報を得ることが重要と考えられる。また、海外の企業についても同様の検索をすることで、国外の開発・製品化動向についても情報を得ることが必要であると考えられる。



#### 4. 開発ガイドライン普及活動の結果

##### 4.1 開発ガイドライン解説書の作成過程

本年度は開発ガイドライン普及活動として、2回の普及活動WG委員会を開催して、解説書の作成を行った。以下に、それぞれの委員会で議論した内容をまとめる。

###### 【第1回普及活動WG委員会検討事項】（平成25年11月13日）

○開発ガイドラインの普及活動として開発ガイドラインの解説内容をまとめる。概論、遺伝子検査技術の動向、開発ガイドラインと関係する測定装置、評価法、標準物質などのDNAチップに関する技術、周辺技術（検体前処理、蛍光色素、遺伝子関連データ標準化技術）に分けて記載する。

○開発ガイドラインの解説書は経済産業省に報告書として提出、内容は経済産業省の成果物になる。条件はあるが、一般の出版社が出版することには問題はない。

○100～200 ページ程度の分量で、一般の人にも、例えば大学生や大学院生にも読めるぐらいの内容を目標にする。企業の開発者が読んでも満足する内容も入れる。

○解説書の記載内容は、ジェノタイピングとエクスペリションタイプと両方のDNAチップを対象とする。

○委員の中で分担を決めて執筆する。

###### 【第2回普及活動WG委員会検討事項】（平成26年2月26日）

○各分担部分の内容の説明を行い、様式・用語や内容について修正点を明らかにした。

○メンバーが限られているので、内容に偏りがある点が今後の課題である。

○ガイドラインの引用（項目など）を明確にする。

○色素の特許などの項目を加える。

○それぞれの分担項目について、ほかの項目との整合性について検討し、修正する。

これらの議論に従って、第1回普及活動WG委員会（平成25年11月13日）で示した事務局案を改訂し、平成25年12月26日に執筆項目と分担者を決めて、第2回普及活動WG委員会（平成26年2月26日）でまとめた原稿に修正を加えて、最終原稿（平成26年3月17日現在）を作成した。

## 4.2 開発ガイドライン解説書原稿

以下に、平成26年3月17日までにまとめたガイドライン解説書の原稿を示す。

### テーラーメイド医療用診断機器分野DNAチップ開発ガイドライン解説書案（3月17日）

#### 【目次】

1. DNAチップとは
  1. 1. DNAチップとは
  1. 2. 診断用DNAチップの開発と問題点
  1. 3. DNAチップに関わるガイドラインと国際標準
  
2. 遺伝子検査技術動向
  2. 1. 遺伝子検査技術全体の動向
    2. 1. 1. 核酸検査（配列検出）
    2. 1. 2. 遺伝子検査（発現解析）
    2. 1. 3. 遺伝学的検査（ゲノム解析）
  2. 2. DNAチップ技術の動向
    2. 2. 1. DNAマイクロアレイ（DNAチップ）
    2. 2. 2. 自動化、チップ化の動向（ $\mu$ TAS、Lab-on-a-Chip）
    2. 2. 3. DNAチップ用標準物質の利用
  
3. DNAチップに関する技術
  3. 1. 測定装置（チップと装置）
    3. 1. 1. 遺伝子型（ジェノタイピング）検定用DNAチップ
    3. 1. 2. 遺伝子発現（RNA）解析用DNAチップ
    3. 1. 3. 遺伝子型検定用及び遺伝子発現解析用DNAチップに関する応用例
  3. 2. 評価法
    3. 2. 1. 遺伝子型（ジェノタイピング）検定用DNAチップ
    3. 2. 2. 遺伝子発現（RNA）解析用DNAチップ
    3. 2. 3. DNAチップの知財管理
  3. 3. 標準物質
    3. 3. 1. 目的
    3. 3. 2. 標準物質に求められる要件
  
4. DNAチップの周辺技術
  4. 1. DNAチップ用検体の前処理技術
    4. 1. 1. 遺伝子検査のための検体前処理技術
    4. 1. 2. 検体前処理技術における精度管理
    4. 1. 3. 国内外の開発動向

- 4. 2. 蛍光色素
    - 4. 2. 1. 蛍光の原理と蛍光色素の利用法
    - 4. 2. 2. DNAチップに利用される蛍光色素
    - 4. 2. 3. Cy色素の特徴と開発の経緯
    - 4. 2. 4. 蛍光色素の技術的問題点
    - 4. 2. 5. 新規蛍光色素 Fluolid
    - 4. 2. 6. 光色素の今後の展開
    - 4. 2. 7. 蛍光に関する訴訟について
  - 4. 3. 遺伝子検査関連の国際標準化
    - 4. 3. 1. ISO/TC 212 臨床検査及び体外診断検査システムの動向
    - 4. 3. 2. ISO/TC 276 バイオテクノロジーの動向
    - 4. 3. 3. その他の標準化動向
5. まとめ
- 5. 1. 診断用DNAチップに関するまとめ
  - 5. 2. 遺伝子診断の将来と医療機器について

【執筆者一覧】

秋山 英雄 東レ株式会社 新事業開発部門  
油谷 浩幸 東京大学 先端科学技術研究センター  
荒木 啓充 九州大学大学院 農学研究院  
磯部 信一郎 九州産業大学 工学部物質生命化学科  
岡村 浩 東洋鋼鉄株式会社 技術企画部技術企画グループ  
柏 裕樹 九州産業大学 工学部物質生命化学科  
木山 亮一 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門  
楠岡 英雄 国立病院機構 大阪医療センター  
久原 哲 九州大学大学院 農学研究院  
桑 克彦 (社)臨床検査基準測定機構  
澤田 裕子 アジレント・テクノロジー株式会社 ゲノミクス部門  
田谷 敏貴 アジレント・テクノロジー株式会社 ゲノミクス部門  
張 博文 アフィメトリクス・ジャパン株式会社 技術サポート部  
中江 裕樹 特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム  
西 健太郎 九州産業大学 工学部物質生命化学科  
橋本 幸二 (株)東芝 部品材料事業統括部DNAチップ事業推進統括部  
福岡 弥生 アジレント・テクノロジー株式会社 ゲノミクス部門  
的場 亮 (株)DNAチップ研究所  
森 康晃 早稲田大学大学院 創造理工学研究科経営デザイン専攻  
森谷 哲浩 アフィメトリクス・ジャパン株式会社 技術サポート部  
山崎 久人 アフィメトリクス・ジャパン株式会社 技術サポート部  
若本 明子 アフィメトリクス・ジャパン株式会社 マーケティング部

## 1. DNA チップとは (木山亮一)

### 1. 1. DNA チップとは

DNA チップ (あるいは DNA マイクロアレイとも呼ばれる) は、塩基配列の異なる短い DNA を数センチ角の基板の上に何千何万種と格子状に整列させた一種のセンサーで、基板上の DNA と特異的に結合するゲノム由来 DNA やメッセンジャーRNA 由来の cDNA を高感度で検出することができる。遺伝子発現プロファイリング用の DNA チップの小型化およびハイスループット化が初めて報告されて以来約 20 年が過ぎており [1]、診断用途をはじめとして、数多くの DNA チップの利用法が開発されてきた [2-4]。DNA チップとは、特定の配列をした DNA を数ピコモル含んだ DNA スポットを固体表面に多数付加したものであり、大量の遺伝子についてそれらの発現レベルを同時に解析すること (遺伝子発現プロファイリング) や、ゲノム DNA の複数の領域について遺伝子型判定 (ジェノタイピング) を行うことができる。遺伝子発現解析に対する DNA チップの利用法は大きく次の 2 つに分けられる。ひとつは、後に使用するために 1 つの遺伝子あるいは 1 セットの遺伝子をストックすることと、もうひとつは、例えば遺伝的表現型や病気、化学物質に対する反応、臨床的アノテーションなどいわゆるフェノーム (phenome) に対して、遺伝子発現によるプロファイリングを行うことである [5]。後者の用途の場合、フォーカスアレイという、特定の目的のための限られた組の遺伝子を載せた DNA チップが適している。なぜならば、信頼できる遺伝子について、機能的重要性によってではなく、統計的有意性を確立するためには、たいていは 100 個程度の遺伝子があれば良いからである。このような遺伝子の集まりはシグニチャーあるいはモジュールと総称され、がんの診断や化学物質のリスク評価など、様々な用途のために利用されてきた。例えば、アメリカ合衆国食品医薬局 (FDA) では、乳がんのリスク予測用体外診断装置 [6] および原因不明のがんのタイピングのための体外診断装置 [7] として、DNA チップを承認している。その一方で、化学物質の危険性評価のためのインビトロ測定システムの開発が緊急の課題となっている。というのも、欧州共同体 (EU) による規制である REACH で掲げられているように、商用の化学物質やその製品の安全管理に関して注目が集まっており [8]、また動物実験による毒性検査をやめていわゆるパスウェイ解析に基づくインビトロアッセイに切り替えることを求める声が高まっている [9] からである。

### 1. 2. 診断用 DNA チップの開発と問題点

DNA チップは 1990 年代に米国で開発され、ヒトゲノム計画 (1990~2003 年) の進行とともにその価値が急速に高まった。その技術開発と製品化及び販売のために Affymetrix 社をはじめとしてベンチャー企業が多数作られ、その後、GE Healthcare 社などの大手企業も参入して技術開発がすすめられた。ヒトゲノム計画終了後はポストゲノム時代として、ゲノム情報を利用するための研究開発がすすめられ、中でも、多くの遺伝子情報を一度に取得できる DNA チップ技術は大きな期待がかけられ、多くの企業がプラットフォーム (DNA チップ基板) 及びその作製技術、DNA/RNA 調製法、検出器などの周辺機器などからアプリケーション開発に至るまで幅広い研究開発がすすめられた。現在では、プラットフォームとしてビーズや繊維など様々なタイプが開発され、DNA スポットの集積度やシグナルの検出法・感度などについても技術開発が進んでいる。

DNA チップの臨床用途 (診断用 DNA チップ) は早い段階から各企業が開発を進め、Roche Molecular Diagnostics 社 (米国) は、2003 年 6 月から、薬物代謝をコントロールする 2 つの遺

伝子に関する遺伝型を決定する DNA チップ（臨床検査用）を遺伝学的検査に使用する試薬（analyte-specific reagent、ASR）として製造販売を始めた。ASR は、自家試験の一部として認められるものであり、低リスクのクラス 1 の医療機器（medical device）として分類される。ASR の製造は cGMP（current Good Manufacturing Practice：健康食品などに適用される）が適用されるが、臨床試験は免除されている。これに対して、米国 FDA（食品医薬品局）は、診断結果が患者にとって重要なことから ASR ではないという通達を出した。このように FDA は診断用 DNA チップに関するガイドラインや通達を出し、臨床試験の必要なクラス 2 の医療機器として規制を強めている。

世界のバイオチップ（DNA/RNA バイオチップ）市場は 2006 年には約 2.5 億ドルで、2010 年には 40 億ドルになると予想されていた [10] が、リーマン・ショックなどの世界的な不況により、実際は約 15 億ドル程度（80 円換算で 1217 億円、2011 年：BBC リサーチ報告書）であった。一方で、我が国の DNA チップのみの市場としては、42 億 8000 万円（2012 年） [11] であり、診断用 DNA チップに限定すればまだほとんど市場は無い。

### 遺伝子型判定用 DNA チップ

- ・ 遺伝子型判定を行う DNA チップ
- ・ 薬剤耐性遺伝子の多型判定（薬事承認）
- ・ ウイルスの遺伝子型判定（薬事承認）
- ・ 多くの場合、一度判定すると再検は不必要
- ・ 他の方法で代用できる場合が多い（PCR法など）
- ・ がんの遺伝子型判定にも利用可（開発段階）

#### AmpliChip CYP450(ロシュ・ダイアグノスティクス)



- ・ 薬物代謝酵素シトクロム P450 の遺伝子型を調べる DNA チップ
- ・ 体外診断薬としての申請 (2007年2月5日)
- ・ シトクロム P450 の 2D6 の 32 種類の多型と 2C19 の 2 種類の多型を判別
- ・ 製造販売承認を取得 (2009年5月12日)

#### クリニチップ HPV(東芝など)



DNA チップカセット



医療用 DNA 検査装置

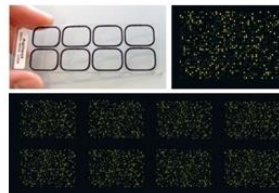
- ・ 2007年5月「ヒトパピローマウイルス型判別用 DNA チップ」の薬事申請（第一化学薬品株式会社、株式会社東芝、東芝ホクト電子株式会社）
- ・ 2009年7月に承認（クリニチップ HPV として販売）
- ・ 本ガイドライン事業が申請に貢献

### 遺伝子発現解析用 DNA チップ

- ・ 遺伝子の発現解析を行う DNA チップ
- ・ 乳がんの転移リスク判定など（FDA 承認）
- ・ 経過判定など何度も使用する
- ・ IVDMIA（体外診断多変指標測定）として有効
- ・ がんの遺伝子発現解析に特に有効

#### 特徴

#### MammaPrint(オランダ、Agendia 社)



- ・ 70 遺伝子の発現解析により乳がんの転移・再発リスクを判定。
- ・ DNA チップによる遺伝子発現解析データを利用。
- ・ FDA 承認 (2007年2月)。
- ・ 価格：¥380,000 (税別：健康保険適用外)。

#### 技術・製品例

#### Tissue of Origin Test(米、Pathwork 社)



- ・ 15 の悪性腫瘍の結果と比較して、癌の原発組織を決定。
- ・ DNA チップによる遺伝子発現解析データを利用。
- ・ FDA 承認 (2008年7月31日)。

図 1-1. 遺伝子診断用 DNA チップ

### 1. 3. DNA チップに関わるガイドラインと国際標準

遺伝子診断用 DNA チップは、「遺伝子多型検定用 DNA チップ」と「遺伝子発現解析用 DNA チップ」に大きく分けることが出来る（図 1-1）。前者は、薬剤代謝能に関係する多型を判定することで患者に投与する薬剤の代謝速度を診断するために 2004 年（平成 16 年）にロッシュモレキ

ユラーダイアグノスティックス（ロッシュ）社が製品化した、薬剤代謝能判定用 DNA チップ（商品名：AmpliChip CYP450）があり、これは診断用 DNA チップとして初めて米国 FDA の承認を得た。一方、後者は、例えばがん細胞における遺伝子発現を解析することで原発がんや悪性度・進行度の判定や薬剤抵抗性の判定などをもとに診断を行うタイプの DNA チップのことであり、Agendia 社の乳がん転移リスク評価のための DNA チップ（商品名：MammaPrint）があり、2007 年（平成 19 年）2 月に米国 FDA により IVDMA（In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay：体外診断用複数指標測定法[12]）として承認された。

このような背景のもと、我が国においても薬事申請の動きがみられたことから、独立行政法人産業技術総合研究所では、平成 18 年度に経済産業省の委託事業である医療機器開発ガイドライン策定事業（「医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業」）を開始し、各学会、企業、大学・公的研究機関を代表する合計 7 名の委員による検討の成果として開発ガイドライン案を策定し、合同検討会と経済産業省の承認を経て、平成 19 年 5 月に「DNA チップ開発ガイドライン 2007-遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップに関して-」の公表に至った[13]。

その間、我が国においても国内外の企業から遺伝子型検定用 DNA チップの薬事承認申請及び厚生労働省による承認が続いたことから、ガイドラインの策定は現実的に薬事申請と歩調を合わせて進んだ（図 1-2）。

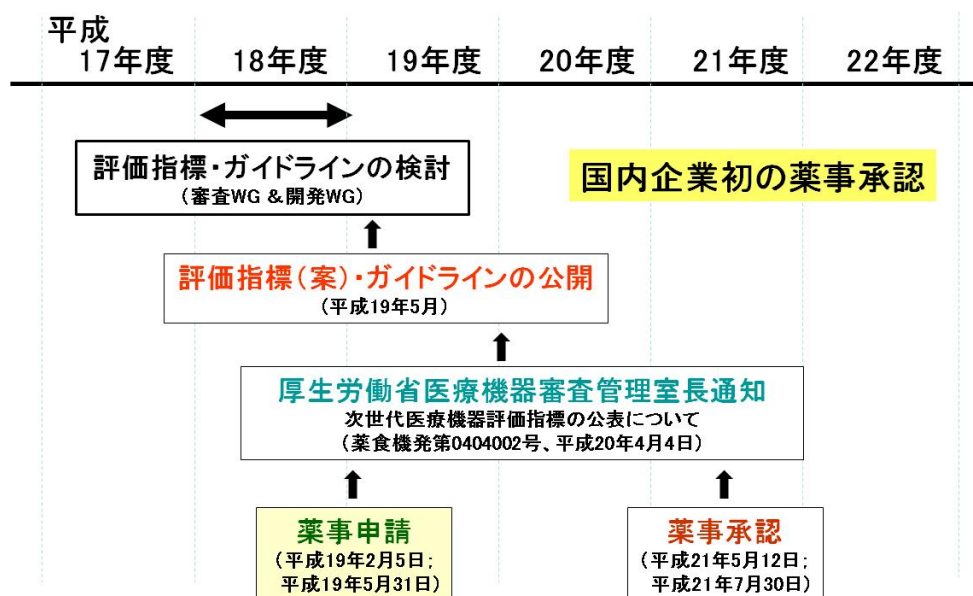


図 1-2. 開発ガイドライン及び評価指標の成果

さらに、もう一つのタイプの遺伝子発現解析用 DNA チップに関しても薬事申請の動きがあり、また、それ以外の IVDMA の薬事申請も今後進められると考えられることから、平成 21 年度に、新たに遺伝子発現解析用 DNA チップに関するガイドライン策定事業を開始した。平成 22 年度は、平成 21 年度から継続してガイドライン策定事業を行ない、「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2012」を策定し、平成 24 年 8 月に公表した[14]。その間、次項で示すような新しい動きがいくつか見られたため、平成 23 年度も事業を継続し、修正が必要な項目に関して議論を行い、「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2012[改訂版]」を策定した[15]。



診断用 DNA チップは、すでに説明したように遺伝子型判定用 DNA チップと遺伝子発現解析用 DNA チップに分けられる。遺伝子型判定用 DNA チップは、日本でも既に薬事承認例が出ている。一方、遺伝子発現解析用 DNA チップは米国では MammaPrint をはじめ数例の FDA 承認例が出ているが、我が国ではまだ申請されていないことから、本事業においては、遺伝子発現解析用 DNA チップの開発と薬事申請に役立つ資料の作成を目標にしている。それらの開発ガイドラインの作成には、FDA のガイダンスなどの資料のほか以下のような国際的な標準化の動向を参考にしている。

【MAQC 動向】 MAQC-I では個々の最初の DNA チップの信頼性を確保することを目標とした。MAQC-II ではさらに先の Classifier (分類予測) について検討を行った。結果は Nature Biotechnology 誌などに報告している。現在は MAQC-III (次世代シーケンサー性能評価) がほぼ終了しており、現在は、MAQC-IV (患者特異的ゲノム情報の精度) が進んでいる。

【SPIDIA 動向】 SPIDIA はプリアナリシスの標準化を目指すプロジェクトで、2008 年から 2012 年の 4 年間で、1,300 万ユーロを使って 7 つの公的研究機関、8 つの企業・標準化機関がコンソーシアムをつくって標準化を進めている。体外診断薬に利用するプリアナリシスの標準化と改善が目標である。

【ISO 新 TC の設立動向】 ISO 内にバイオテクノロジー分野を横断的に扱う TC (Technical Committee) を起ち上げる動きがあり、実際にドイツ規格委員会 (DIN) が設立提案書を ISO 事務局へ提出するにいたった (2013 年春設立)。本新 TC では、遺伝子発現解析に関係する技術・方法や装置が対象になっており、本ガイドライン及び標準化資料が最も関係の深い ISO/TC になることは疑いもない。

#### 【参考文献】

- [1] Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270(5235):467-470.
- [2] Churchill GA. (2002) Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. *Nat Genet* 32 Suppl:490-495.
- [3] Leung YF, Cavalieri D. (2003) Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet* 19(11):649-659.
- [4] Reis-Filho JS, Pusztai L. (2011) Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 378(9805):1812-23.
- [5] Inoue A, Tanji M, Kiyama R. (2006) Focused Microarray Analysis: Characterization of Phenomes by Gene Expression Profiling. *Current Pharmacogenomics* 4:245-260.
- [6] Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteveen AT, Pover RC, Bakx N, Lahti-Domenici JS, Bruinsma TJ, Warmoes MO, Bernards R, Wessels LF, Van't Veer LJ. (2006) Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics* 7:278.
- [7] Monzon FA, Dumur CI. (2010) Diagnosis of uncertain primary tumors with the Pathwork tissue-of-origin test. *Expert Rev Mol Diagn* 10(1):17-25.
- [8] European Community. (2006) Regulation (EC) No 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH). EC Regulation, retrieved from [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach\\_intro.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/reach/reach_intro.htm).
- [9] National Research Council. (2007) Toxicity Testing in the 21st Century: A Vision and a Strategy. Washington D.C.: National Academies Press.



- [10] 「2007年版ワールドワイド・バイオチップ&装置市場の動向と展望」、Fuji-Keizai USA、2006年8月
- [11] 「オーダーメイド医療に関する市場動向調査2013年版」、矢野経済研究所、2013年5月
- [12] Food and Drug Administration. (2007) Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories, and FDA Staff: In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays (DRAFT GUIDANCE).
- [13] 「DNAチップ開発ガイドライン2007-遺伝子型(ジェノタイピング)検定用DNAチップに関して-」、経済産業省、平成19年5月
- [14] 「遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン2012」、経済産業省、平成24年8月
- [15] 「遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン2012[改訂版]」、経済産業省、平成25年3月

## 2. 遺伝子検査技術動向（中江裕樹）

### 2. 1. 遺伝子検査技術全体の動向

遺伝子検査技術は、特にここ数年の間に、技術的な広がりを見せている。まず検査項目では、単項目解析から多項目解析へとその応用が広がっていく傾向にある。単一項目の検査は、主にPCR法のような遺伝子増幅手法を用いた検査である。この検査では項目数が増えると、使用する酵素量が増加することや、multiplex PCRを使っても、一度に検出できる対象の数は限られているため、結果として検出反応の本数が増えることから作業が煩雑になっていくといったデメリットがある。臨床検査では、感染症の検査であれば同時に多数の病原体の検査が求められ、また個別化医療でも、多数の測定項目から検査結果を求めるタイプの検査が広がり、多項目解析への需要が高まっているため、多項目解析に適したマイクロアレイが注目されている。また大きな病院では、次世代シーケンサーなどの多項目解析技術を臨床検査に応用しようという動きも出ている。このような広がりの中で、対象となる遺伝子数に応じ、検査技術が選択される(図2-1)。

また項目数ではなく、検出対象も広がりを見せ、遺伝子配列以外のエピジェネティックマーカーや、miRNAも検査

対象のマーカーとして注目されている。エピジェネティックマーカーの代表例は、メチル化である。がんに特異的にDNAメチル化する遺伝子が見出されており、メチル化自体

が安定した修飾であること、メチル化のターゲットであるDNAが安定していること、利用可能なメチル化のアッセイ法があることなどから、メチル化は特にがん診断に利用できる可能性がある[1]他、精神疾患、生活習慣病の診断への応用が期待されている[2]。一方でmiRNAは、血液中、あるいは血液中のエクソソームに含まれる分泌型と呼ばれるmiRNAが、侵襲性の低い検査方法として有望視されている。例えば、がん患者と健常者とでは分泌型miRNAのプロファイリングに大きな違いがみられることから、これを新しいがんのマーカーとして診断に応用することができる。ヒトでは、最大で約3,000種類のmiRNAが存在すると考えられており、複数のmiRNAのプロファイルを測定し、診断のためのデータとすることができる。日本でも東レ株式会社が、最新のmiRNAデータベースの全種類に対応するマイクロアレイを製品化しており、我が国の技術が将来的ながん診断をリードできる可能性を持っている[3]。

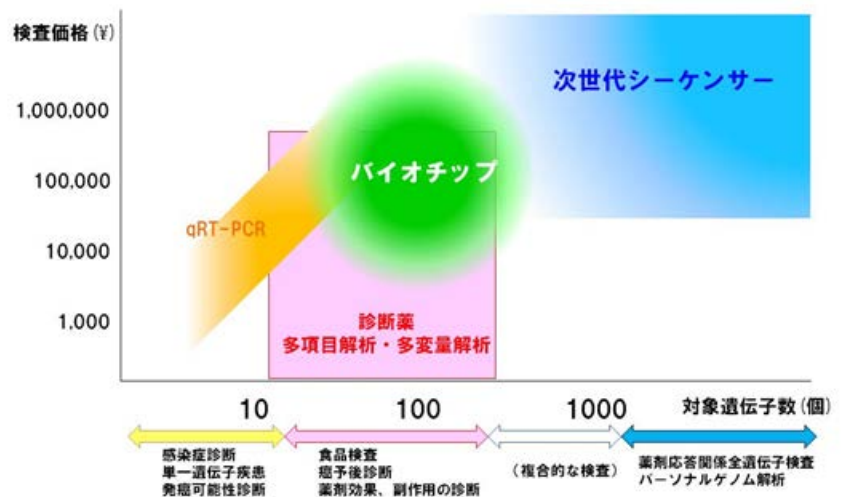


図2-1. 遺伝子検査のターゲット数と選択される検査技術の関係  
検査の費用および検査技術のパフォーマンスの制限により、検査のターゲットとなる遺伝子の個数に応じて、検査技術が選択される。研究用と異なり、新しい技術が開発されても様々な要因から棲み分けが起こると考えられる。

以上のように、使われる技術や検出対象が広がっている遺伝子検査だが、特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会に設置された「遺伝子関連検査標準化専門委員会」で、概ね3つに分類[4]されており、基本的にはこの分類に従って、臨床検査以外の検査に拡大しながら説明したい。

## 2. 1. 1. 核酸検査（配列検出）

臨床検査では、病原体遺伝子検査がここに含まれる。ヒトに感染症を引き起こすウイルス、細菌等微生物など外来性の病原体の核酸すなわち DNA、RNA を検出・解析する検査である。核酸検査では、主に PCR など核酸増幅手法が用いられ、最近になって、マイクロアレイの利用が拡大している。

検査における検出対象として注目されている病原体には、ヒューマンパピローマウイルス (HPV)、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルスなどがある。HPV 検査においては、各社から多数の検査システムが発売されている。例えば、ロシュダイアグノスティクス社のコバス 4800 システム HPV は、リアルタイム PCR 法による検出システムであり、子宮頸部細胞中のヒトパピローマウイルス (HPV) 16 型、18 型およびその他 12 種類のハイリスク型 DNA を検出する。キアゲンのヒトパピローマウイルス (HPV) 検出キット “HPV DNA「キアゲン」HC II” は、ハイブリッドキャプチャー (HC2) 法と呼ばれる独自の検出方法を利用しており、13 種類のハイリスク型 HPV と呼ばれる HPV 型の感染の有無を判定する。積水メディカルのクリニチップ (R) HPV は、東芝の開発した遺伝子解析装置ジェネライザーを利用し、子宮頸癌の原因ウイルスである 13 種のハイリスクヒトパピローマウイルス (HPV) ゲノムを型別に検出できる HPV タイピング試薬であり、2000 点がつく唯一の IVD となっている。C 型肝炎ウイルスや、B 型肝炎ウイルスの定性・検査については PCR 法、TMA 法などの核酸増幅手法が用いられている。

このように臨床検査のための核酸検査では、PCR 法など特定遺伝子を増幅する技術の利用が中心であるが、同時に多数の遺伝子を検出する必要も生じていることから、今後、マイクロアレイなど、多項目解析手法の利用が広がると考えられる。

臨床検査ではないが、同様に核酸を検出する核酸検査は、他の領域でも利用が広がっている。例えば、カビや食中毒菌の核酸検査は PCR 法が主に用いられているが、最近ではカビ検査において、東洋製罐グループホールディングスが開発したマイクロアレイシステム、「GENOGATE」（ジェノゲート）の利用が始まっている。また、積水メディカルのクリニチップに用いられている技術と同様の、東芝製・ジェネライザーは、バイオテロ防止用の生物剤センシングシステムに利用されている。このように、診断・医療用途以外の核酸検査についても、遺伝子増幅手法を中心として、同時に検出したいターゲット数に応じてマイクロアレイの利用が広がっていると考えられる。

## 2. 1. 2. 遺伝子検査（発現解析）

臨床検査において、体細胞遺伝子検査がここに該当する。癌細胞特有の遺伝子の構造異常等を検出する遺伝子検査および遺伝子発現解析等、疾患病変部・組織に限局し、病状とともに変化し得る一時的な遺伝子情報を明らかにする検査である。遺伝子検査では、PCR、マイクロアレイが積極的に利用され、特に予後予測などこれまでの検査ではカバーできなかった臨床上有用な検査情

報を提供している。対象となるがんは幅広く、白血病、肺がん、大腸がん、乳がんをはじめ多くのがんに対応する検査が開発されている。

白血病の検査では、慢性骨髄性白血病(CML)の90%以上、急性リンパ性白血病(ALL)の約20%の症例で認められる、第9染色体と第22染色体の相互転座による異常な第22染色体、フィラデルフィア染色体(ph染色体)のRT-PCRによる検査が用いられている[5-6]。分子生物学的には、ph転座は、bcr遺伝子でおこり、その切断点はmajor-bcr(M-bcr)とminor-bcr(m-bcr)の2カ所に集中していることが知られており、RT-PCR法で両方を解析して、治療選択、治療経過のモニタに使われている。また、major BCR-ABLの発現量と、内部標準となるGAPDHの発現量を測定し、BCR-ABL/GAPDH比(%)を定量値として報告する検査である。この検査では、国際的な数値のばらつきが課題とされた。本来であれば検査の手法や精度の管理自体を標準化し、国際的に一定範囲のデータがでるように標準化すべきであるところ、国際標準となるIS(International Scale)を、レファレンスラボより取得したLaboratory Specific Conversion Factor(CF)を乗ずることで換算し、報告するようになっている。

肺がん、大腸がん患者の治療に用いられる、EGFRチロシナーゼ阻害薬では、投与に先立って、ターゲットであるEGFR遺伝子および、EGFRが出す細胞増殖のシグナルを核に伝達し細胞増殖を進めるパスウェイ上のタンパク質をコードするKRAS遺伝子の変異検査が使われる。EGFR遺伝子の変異解析では、腫瘍のパラフィン包埋組織などのサンプルを用い、主にエクソン19の欠失変異や、L858Rと呼ばれる、エクソン21の変異を含む、複数の遺伝子変異を、KRAS遺伝子では、コドン12と13領域における点突然変異の有無を解析対象としている。これらの遺伝子の既定の変異を検出する方法として、数多くの手法が提唱されており、直接シーケンス解析を行うダイレクトシーケンス法、PCR-RFLP(Restriction fragment length polymorphism)法、アレル特異的PCR法(=ARMS amplification refractory mutation system)、PCR-Invader法、Scorpion ARMS法など、感度、精度、価格に違いがある様々な手法が使われている。

乳癌治療薬のハーセプチン(Trastuzumab、中外製薬株式会社)は、HER2/neu癌遺伝子産物(HER2タンパク質)をターゲットとした分子標的薬であり、HER2タンパク質を過剰発現している腫瘍細胞に特異的に結合することにより腫瘍細胞の増殖を阻害する。HER2タンパク質はさまざまなヒトの腫瘍において過剰発現しており、特に乳癌においては転移性乳癌患者の25~30%で過剰発現が認められ、ハーセプチンはHER2タンパク質過剰発現乳癌患者に対して選択的な効果を発揮する。この薬剤の適切な投与の判断のために使われるダコHercepTest IIは、乳癌組織でのHER2タンパク質の過剰発現を免疫組織化学的手法にて半定量的に評価する検査キットである。すでに広く使われており、現在最も成功しているコンパニオン診断薬といえることができる。

発現解析を用いた遺伝子検査による予後の予測も利用が拡大している。米国Genomic Health Inc.(以下「GHI」)のオンコタイプDX(Oncotype DX(TM))は、米国において、エストロゲン・レセプター(+)、リンパ節転移(-)のStage I または II の早期浸潤性乳がん患者を対象に実施されている遺伝子発現解析を用いた乳がんの予後予測検査である。乳がん手術組織を検体とし、21種類の遺伝子の発現量をRT-PCR(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)法を用いて測定し、GHI独自のアルゴリズムにより再発スコア(Recurrence Score)を計算する。オランダAgendiaのマンマプリントも同様に、乳がん患者の術後再発リスクを予測する検査である。マンマプリントは2007年、最初にFDA米国医薬品食品局に承認されたIDVMIA(体外診断多変指標測



定)である。70 遺伝子の発現解析により、早期乳癌患者の術後再発リスクを測定する。エストロゲン受容体の状態とは独立に実施できることが特徴となっている。マンマプリントは、検査結果として患者をローリスクあるいはハイリスクの2つのグループに分類する。さらに、米国 BioTheranostics(以下「BT」)のBCI(Breast Cancer Index)は、5年後の再発や内分泌療法の奏功についての予測を行う免疫染色(ER、プロゲステロン受容体(PgR)、HER2、Ki-67)によるIHC4スコアに加えて、21 遺伝子のPCR法による発現解析を行うサービスである[7]。これらの遺伝子検査は、それぞれに特徴があるが、いずれも早期浸潤性乳がん患者の術後再発リスクの予測により、必要以上の化学療法を回避することに役立つ検査である。

遺伝子検査は、原発不明がんの原発予測にも使われている例がある。BCIを提供している米国 BioTheranostics社が提供する“CancerTYPE ID”は、原発が通常の検査では明らかにならない転移性のがんの原発を予測するサービスである[8]。多数の遺伝子(開発段階では92 遺伝子)のRT-PCRによる発現解析により、原発の可能性を評価している。また、すでにサービス提供を停止しているが、過去には米国Pathworkの“Tissue of Origin”というテストは、Affymetrixプラットフォームを用いて、2000 遺伝子の発現を比較し、全がん種の90%を構成する15の既知がんのタイプに分類するテストであった[9]。

BioTheranosticsは、上述した乳がん予後予測や、原発不明がんの原発予測サービスの他にもPCR法、FISH法、IHC法など複数の方法での検査をパッケージ化した“CancerTARGET ID”や、次世代シーケンサー解析も取り込んだ“CancerTREATMENT ID”などを、積極的に製品化しており、今後が注目される。

### 2. 1. 3. 遺伝学的検査(ゲノム解析)

ここでの検査は、臨床検査を目的とした遺伝学的検査を意味する。単一遺伝子疾患、多因子疾患、薬物等の効果・副作用・代謝、個人識別に関わる遺伝学的検査等、ゲノムおよびミトコンドリア内の原則的に生涯変化しない、その個体が生来的に保有する遺伝学的情報(生殖細胞系列の遺伝子解析より明らかにされる情報)を明らかにする検査である。言い換えれば、遺伝学的検査は、がんなど体細胞の変異ではなく、生殖細胞系列の遺伝子に関する検査であるといえることができる。

様々な遺伝学的検査の中で、個別化医療の広がりとともに注目されてきたのが、薬物代謝酵素の変異に関する検査である。肝臓にあるCYP450(チトクロームP450)という酵素は、直接排出される薬剤を除くほぼ90%以上の薬剤が代謝される代表的な薬物代謝酵素である。この酵素の変異が、活性を上げる変異であれば、血中の濃度がすぐに落ちてしまい、薬の効果が得られず、活性を下げる変異の場合は、いつまでも血中の濃度が下がらず、むしろ副作用が出る危険性が高まるというように、薬剤の効果・副作用に重大な影響を生ずる。薬の投与前に、これら変異が明らかになれば、投与量などの調整により、適正な利用をデザインすることができるようになるため、この酵素の変異に関する検査が重要視されている。また、この他、薬物が作用するターゲットタンパク質をコードする遺伝子の変異も薬効に影響がある場合がある。例として、ワーファリンは、薬物代謝酵素であるCYP450の1つのタイプであるCYP2C9と、ターゲットタンパク質をコードするVKORC1(VitaminKEpoxideReductaseComplexSubunit1)遺伝子の変異により、薬効と副作用のほぼ50%が説明できると言われている[10]。

薬物耐性にかかわる遺伝子には多くのタイプがあり、その変異も様々であることからこれまでマイクロアレイによりその変異を検出する検査が開発されてきた。日本でも、2009年5月12日に国内製造販売承認を取得したRoche(Affymetrix) AmpliChip450や、さらに、国内製造販売承認は取得していないが、その後Affymetrixによって開発された、薬物代謝酵素やトランスポーターを含む薬効や、薬物代謝にかかわる変異を網羅したDMETというマイクロアレイなどがその例である。現在のところ、価格面や遺伝学的検査の取り扱いに関する難しさなどから、臨床的な利用は広がっていない。

注目されているシーケノム社が開発した新型出生前診断も遺伝学的検査の1種である。これは、無侵襲的出生前遺伝学的検査(NIPT)の一種であり、MPS法(massively parallel genomic sequencing method)を利用した出生前診断である。この検査は、母体の血液の血漿に含まれている胎児のDNAを採取することによって、胎児の13、18、21トリソミーの3つの染色体異常を検出する検査である。特徴の1つは、母体の血液を用いた遺伝学的検査であり、子宮の近くの血液を採血する必要もなく、高度に専門的な施設のない医療施設でも検査が利用できること、もう1つは、無侵襲的遺伝学検査であり、羊水検査や絨毛検査など、子宮内に異物を侵入させる必要のある検査と異なって、母体の採血以外、母体も胎児も傷つける必要がないということである。一方で、判断確度は約99%と、100%ではないことが倫理的な議論につながっている[11]。

最後に、消費者が直接依頼する遺伝学的検査が、DTC(Direct to Consumer)検査である。23andMeの次世代シーケンサーによる遺伝子解析サービス[12]のように、米国のベンチャーが主導してきたこの検査は、日本でも予期された以上の広がりを見せているものの、同社がFDAからサービス停止を求められているように、主に精度管理と、医学的な判断の妥当性が問題となっている。おそらくDTC検査を求め、提供する流れは広がっていき、このような問題は適切な施策により解決の方向に進むのではないかと期待される。

#### 【参考文献】

- [1] 「がん細胞を制御するエピジェネティクス (Implications of Epigenetic Alterations in Human Neoplasia)」, <http://www.dojindo.co.jp/letterj/140/review/01.html>
- [2] 豊田実, 鈴木拓, 甲斐正広, 「疾患とエピゲノム解析」, 2010, 生化学第82巻第8号, pp. 693—701.
- [3] 東レ株式会社・アプリケーションノート, Vol. 8 「新規RNA抽出試薬と高感度DNAチップの組み合わせで革新的なバイオマーカー探索」, [http://www.3d-gene.com/case/application/app\\_008.html](http://www.3d-gene.com/case/application/app_008.html)
- [4] JCCLS, 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, [http://www.jccls.org/techreport/bestpractice\\_guideline.pdf](http://www.jccls.org/techreport/bestpractice_guideline.pdf)
- [5] [http://www.srl.info/srlinfo/kensa\\_ref\\_CD/KENSA/SRL6324.htm](http://www.srl.info/srlinfo/kensa_ref_CD/KENSA/SRL6324.htm)
- [6] [http://www.srl.info/srlinfo/kensa\\_ref\\_CD/KENSA/SRL6392.htm](http://www.srl.info/srlinfo/kensa_ref_CD/KENSA/SRL6392.htm)
- [7] Sgroi, DC et. al., “Prediction of late distant recurrence in patients with oestrogen-receptor-positive breast cancer: a prospective comparison of the breast-cancer index (BCI) assay, 21-gene recurrence score, and IHC4 in the TransATAC study population”, *Lancet Oncol* 2013; 14: 1067-76.

[8] <http://www.biotheranostics.com/>

[9] <http://www.pathworkdx.com/>

[10] Johnson, JA et. al., “Clinical Pharmacogenetics Implementation consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 Genotypes and Warfarin Dosing”, *Clinical pharmacology & Therapeutics*, 2011, Vol.90, #4, 625–629.

[11] 島先 京一, “新型出生前診断と 21 トリソミーをめぐる誤解 The New Prenatal Testing and Misunderstandings regarding Trisomy 21”, *成安造形大学紀要* 第 4 号, [http://seian-geibun.org/wp-content/uploads/reports/vol4/02\\_%E5%B3%B6%E5%85%88%E4%BA%AC%E4%B8%80.pdf](http://seian-geibun.org/wp-content/uploads/reports/vol4/02_%E5%B3%B6%E5%85%88%E4%BA%AC%E4%B8%80.pdf)

[12] <https://www.23andme.com/>

## 2. 2. DNAチップ技術の動向 (的場亮)

### 2. 2. 1. DNA マイクロアレイ (DNA チップ)

現在の DNA チップは合成されたオリゴ DNA を基板上へスポットするタイプと、基板上でオリゴ DNA を合成して作製するタイプの 2 種類がある。国産メーカーは前者のタイプが多く、海外メーカーは後者のタイプが多い。前者のタイプ (後からスポットするタイプ) は当初、cDNA クローン 或いは PCR 産物を基板上へスポットするタイプのものもあったが、現在ではほとんど合成オリゴ DNA をスポットしている。これは、cDNA や PCR 産物を使うと、DNA チップのクオリティコントロールが難しく、また生産コストが高い、などの理由であると思われる。

近年、オリゴ DNA 合成技術はその品質とコストパフォーマンスが非常に向上している。以前は困難であった 100base を超えるオリゴヌクレオチドも非常に精度よく、収量よく、コストも安く、得ることができるようになってきている。従って、DNA チップの原価も低く抑えられるようになってきた。一部のメーカーでは、DNA チップの部分より、その周りのプラスチック部分の方がコスト高になっているようである。今後開発される DNA チップもオリゴ DNA タイプが主流となるであろう。

DNA チップに使われるオリゴ DNA の長さは 20mer から 70mer 程度といろいろな長さのタイプがある。これは各メーカー別に、特異度と感度を確保するために、ハイブリダイゼーション条件等と共に最適化された長さに設定されている。検出する分子によって、チップ上のオリゴ DNA の長さは若干異なると考えられるが、今後、新しい DNA チップが開発されていく際にも、おおよそ、これまでと同程度の長さのオリゴ DNA が使われると考えられる。

チップ上のオリゴ DNA は遺伝子配列部分と相補的な配列を搭載しているが、発現解析の場合、どの部分を検出するか (オリゴ DNA の配列デザイン) は、各社によって異なり、それ故に、メーカーが異なるとデータの互換性が保証されない。また同じメーカーの DNA チップでもバージョンが異なると同じ理由で互換性が保証されない。さらに、同じバージョンのチップを用いてもロット間差 (デイクラスター) が見られる場合がある。これらの問題を解決するため、正規化処理による検討や、内部コントロール等を用いることによる互換性の検討などが行われている [1-3]。

DNA チップの部材は、現在、スライドガラス、プラスチックなどのものが主流である。その他、ダイヤモンドコーティングやアモルファスシリコンコーティング、ペーパー素材のものなどが開発されつつある。蛍光バックグラウンドをいかに少なくするか、或いは、効率良い遺伝子検出、操作の利便性を求めて、開発が進んでいる。また、製造メーカーの多くはその製造ラインにおい

てかなりシステマチックに自動化されており、非常に安く DNA チップを作製できるようなシステムを構築している。今後、臨床応用のための DNA チップの開発をする際には、原価が一枚あたり数百円程度以下でないと広く使われるようにならないと思われる。

DNA チップを用いた解析の基本的なカインेटクスは相補的な DNA (或いは RNA) 分子のハイブリダイゼーションである。これは、DNA チップが開発されて以来、変わっていない。もっと歴史を遡れば、DNA チップが開発される 20 年程前の Southern ハイブリダイゼーションと基本的反応は同じである [4]。只、現在では、高密度化や効率的なハイブリダイゼーション反応の開発が進み、より多数の遺伝子について、高感度にかつ、短時間で検出が可能となっている。

一度の反応 (ハイブリダイゼーション) で検出できるプローブ数は、現在のところ、1 枚の DNA チップあたり最大 500 万プローブ (オリゴ DNA) 程度である。しかし、臨床応用のためには、それほど多くの遺伝子を一度に解析する必要はなく、疾患毎に目的遺伝子を絞ったフォーカスチップの開発が重要である。この場合、数十から数百程度の遺伝子を解析すれば、薬剤応答や病態やリスク評価データが得られると考えられる。

DNA チップは相補的ハイブリダイゼーションのカインेटクス原理を用いて目的の遺伝子を検出するが、その検出方法は、蛍光色素によるもの、電気的信号によるものなどがある。蛍光色素によるものは特殊なスキャナと呼ばれる機器が必要となる。最近では、特殊な波長の光を当てることにより蛍光色素なしで検出する機器の開発も行われている [5]。検出系の感度や特異度を上げる開発も重要であり、DNA チップの部材の開発とともに、新しい蛍光色素や検出機器の開発も盛んに行われている。

これまで研究用途として使われてきた DNA チップであるが、今後は診断用途に使われることが期待されている。また、DNA チップの問題点として、感度、再現性、操作の自動化、価格、などが挙げられるが、これらの問題を解決するために、各メーカーは様々な開発を進めている。しかし、重要なことは、どんな遺伝子を測定するかということであり、コンテンツがあって初めて有用なツールとなる。特に DNA チップの得意とするのは多項目、多変量測定系であり、そのようなデータを必要とする診断コンテンツの開発が望まれる。

## 2. 2. 2. 自動化、チップ化の動向 ( $\mu$ TAS、Lab-on-a-Chip)

例えば、DNA チップによる遺伝子発現解析の場合、図 2-2 のような流れでデータを取得する。各工程の一部分を自動で行う機器もいくつか開発されている。最も古くから自動化が進んでいるのは、細胞や組織などからの核酸調整の自動化である。例えば、血液からの核酸抽出については、すでに複数の企業から自動抽出装置が製品化されている。手動による方法と比較すると若干異なる結果が得られることもあるが、安定性はよく、同じクオリティの核酸抽出が可能である。自動化装置は遠心操作を含むものと、遠心操作を行わず

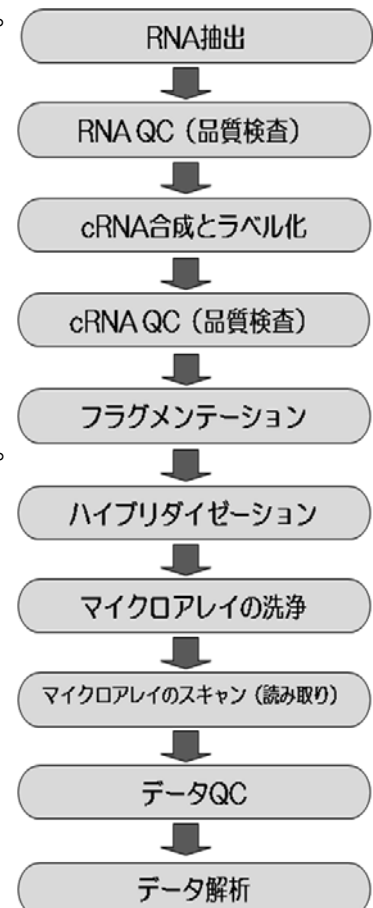


図 2-2. DNA チップによる発現解析の工程



ビーズ等を用いて精製する方法があるが、最近ではビーズ等を用いる方法が主流となりつつある。

ハイブリダイゼーション及び洗浄の自動化は、カセットタイプの DNA チッププラットフォームで実用化されている。一方、スライドガラスタイプの DNA チップではこの工程の自動化が難しく、過去に自動化装置が販売されていた時期もあったが、洗浄の際のムラなどの問題があり、現在ではほとんど使われていない。また、蛍光色素量を測定する際に使われるスキャナについては、装置毎にその特性が異なり、さらに、使用しているうちにレーザーパワーの減少がしばしば見られる。この点を自動的に補正する装置はまだ開発されていないが、標準物質等を用いた自動補正などの手法の開発が今後の課題であろう。

このように部分的に自動化装置は多数存在するが、全行程を完全自動に行う装置はまだ存在しない。今後、DNA チップが診断用途に使われるためには、より安定した測定系のための完全自動化装置の開発が望まれる。また、診断用途を考えた場合、現在主流の網羅型の DNA チップではなく、フォーカスチップが主流となると考えられる。その際、フォーカスチップに適合した自動化システムが必要となる。逆に言えば、自動化に適合した、既存の DNA チップではない形態の DNA チップ（バイオチップ）を開発することが重要であろう。

一方で、 $\mu$ TAS（マイクロタス：Micro-Total Analysis Systems）と呼ばれる、半導体集積回路の製造に用いられる微細加工技術を応用して作られる微細流路や微細反応空間を持つ分析システムの開発が進んでいる（Lab-on-a-Chip とも呼ばれる）[6]。ナノオーダースケールからマイクロオーダースケールのもので様々なタイプが開発されている。特に核酸電気泳動の分野では開発が進んでおり、アクリル（PMMA：Poly Methyl Methacrylate）樹脂やシクロオレフィンポリマー（COP）樹脂などの材質を用いてマイクロオーダーの溝（流路）を作製し、電気を通すことにより DNA を分離させるデバイスとなる[7-8]。流路内面への核酸吸着などが問題となるが、内部に特殊なコーティングをするなどの工夫や、材質そのものの工夫により、低吸着の材質の開発が進んでいる。また、微細加工の精度を高くし、さらに大量生産によりコストを大幅に安く抑えることにより、安価で性能の良いデバイスとなり、市場を広げつつある。これらの開発は、技術的には、既存のバイオ関連企業ではなく、プラスチック加工メーカーや電子機器開発メーカーなど異分野の企業が参入しやすい。今後、自動化システムと一体となった開発が望まれる。

さらに小さいオーダー（ナノオーダー）の微細流路の開発も進んでいる。例えば、ある半導体開発メーカーでは、核酸反応を想定し、CMOS(Complementary Metal Oxide Semiconductor)を用いたナノチャンネルの開発が進められている[9]。まだ研究段階であるが、1分子操作ができる反応流路を目指しており、DNA チップだけではなく DNA シーケンサーなどへの応用が期待されている。

### 2. 2. 3. DNA チップ用標準物質の利用

前述のように、様々な企業が DNA チップを開発、商品化を行っているが、プラットフォームが異なると、それらから得られるデータに関して互換性はない。それらを相互比較するための標準物質が必要である。また今後、自動化システムが発達することを考えると、測定系が機能しているかどうか、モニタリングする必要があり、そのための標準物質も求められている。逆に言えば、未だ DNA チップの医療応用（産業応用）の広がりが見えないのは、精度管理のための手法（標準物質）開発が進んでいないことが原因ではないかと考えられる。このようなニーズに応えるために、アメリカでは、NIST(National Institute of Standards and Technology)が主導し、

ERCC(External RNA Controls Consortium)が「RNA Spike-In Mix」を開発し、250 から 2,000base の長さの 92 種類の RNA の混合液として市販されている[10]。またヨーロッパでは、SPIDIA(Standardisation and improvement of pre-analytical procedures for in vitro diagnostics)コンソーシアムが臨床検体についての管理方法と核酸クオリティの関連についてガイドライン作成を進めている。我が国においては、産業技術総合研究所が SI(International System of Unit)へのトレーサビリティを確保された核酸標準物質 2 種類(DNA 標準物質と RNA 標準物質)を開発し、販売を開始している。また JMAC (Japan MicroArray Consortium: 日本マイクロチップコンソーシアム) が主導し、DNA チップ分野の国際標準化機構(ISO: International Organization for Standardization)における規格化を進めており、さらに、JCCLS(Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards: 日本臨床検査標準協議会)が「検体品質管理マニュアル」を作成し、「臨床検査と体外診断用検査システム」に関する国際標準化活動を推進している。

これまで主として研究用途として使われてきた DNA チップが、臨床用途として使われるためには、再現性、精度保証など乗り越えなければならないハードルがあるが、標準物質を取り入れることによって客観的な数値として、データを安定して出力できるようになることが期待されている。

DNA チップを使った多項目、多変量測定系の診断キットとしてすでに実用化されている MammaPrint (乳がん再発予測キット) は、常にコントロールサンプルを準備し、対象検体との競合ハイブリダイゼーション (2 色法) による解析によってデータを取得している[11-12]。ただし、コントロール DNA をどのように安定的に入手するかが問題である。コントロール DNA のロットが変わるごとに微妙にデータが変わることが予想されるので、その度に、測定系の確認が必要となる。

今後は、どのような標準物質を開発し、どのように有効利用し、DNA チップの精度管理に活かしていくかが問題となると思われる。例えば、発現解析の場合、DNA チップの種類によってダイナミックレンジや検出感度が異なるが、どの範囲で発現量比較が可能なのか (ダイナミックレンジ)、微量の検出が何モルまで可能なのか (LODP: limit of detection for microarray platform)、といった精度保証のために、標準物質を使うことが検討されている。また、細胞や組織からの核酸抽出の際に標準物質をスパイクインすることによって、プロセス管理や収量の確認をすることができると考えられる。既存のプロトコルの中でどのように利用するのか、或いは今後開発される自動化システムにどのように利用されるのかを想定した標準物質の開発が望まれる。

さらに、診断用途を考えた場合、より具体的な標準物質の開発が望まれる。例えば、すでに保険適応されている KRAS や EGFR などの遺伝子変異 (SNPs) の解析などは、その精度管理、検出感度などが検査施設ごとに異なっており、それらの互換性を保証するための標準物質が必要とされている。現場のニーズに合わせた標準物質の開発が望まれている。

#### 【参考文献】

[1] Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. Nat Genet. 32: 496-501, (2002).

- [2] Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 19: 185–193, (2003).
- [3] Lovén J, Orlando DA, Sigova AA, Lin CY, Rahl PB, Burge CB, Levens DL, Lee TI, Young RA. Revisiting global gene expression analysis. *Cell*. 151: 476–482, (2012).
- [4] Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 98: 503–517, (1975).
- [5] Arora A, Luong TQ, Krüger M, Kim YJ, Nam CH, Manz A, Havenith M. Terahertz-time domain spectroscopy for the detection of PCR amplified DNA in aqueous solution. *Analyst*. 137: 575–579, (2012).
- [6] Reinholt SJ, Behrent A, Greene C, Kalfe A, Baeumner AJ. Isolation and Amplification of mRNA within a Simple Microfluidic Lab on a Chip. *Anal Chem*. 86: 849–856, (2014).
- [7] Kitagawa F, Shinohara H, Mizuno J, Otsuka K. Application of cycloolefin polymer chip directly integrated with an electronanospray tip to electrophoretic separation and mass spectrometric detection. 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (uTAS 2007). 1405–1407, (2007).
- [8] Electrophoretic Separation–Mass Spectrometric Detection on Polymer Microchip Directly Integrated with a Nanospray Tip. Kitagawa F, Shinohara H, Mizuno J, Otsuka K, Shoji S. *IEEE Transactions on Sensors and Micromachines*. 130: 351–355, (2010).
- [9] Wang D, Harrer S, Luan B, Stolovitzky G, Peng H, Afzali–Ardakani A. Regulating the Transport of DNA through Biofriendly Nanochannels in a Thin Solid Membrane. *Sci Rep*. 4: srep3985, (2014).
- [10] Jiang L, Schlesinger F, Davis CA, Zhang Y, Li R, Salit M, Gingeras TR, Oliver B. Synthetic spike-in standards for RNA-seq experiments. *Genome Res*. 21: 1543–1551, (2011).
- [11] van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 415: 530–536, (2002).
- [12] Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteveen AT, Pover RC, Bakx N, Lahti–Domenici JS, Bruinsma TJ, Warmoes MO, Bernards R, Wessels LF, Van't Veer LJ. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics*. 7: 278, (2006).

### 3. DNAチップに関する技術

#### 3. 1. 測定装置(チップと装置)

##### 3. 1. 1. 遺伝子型(ジェノタイピング)検定用DNAチップ

###### 3. 1. 1. 1. 原理、構造および検出方法(岡村浩、田谷敏貴)

###### (1) 検出原理

DNAチップは、ターゲットとなるDNAをチップ基板上で選択的に捕捉することによって、その配列を検出することを目的としている(図3-1)。検出にあたっては、蛍光物質を利用した系の場合は、チップ上での反応を蛍光検出装置で読み取る。電気化学を利用した系の場合には、チップ基板上での反応を、インターカレーター等を介して得られる電気信号を読み取る。上記のように、検出方式が異なると出力信号が異なるため、どのような検出方式を採用し、どのような出力信号として取り扱うか、検出対象や目的に応じて事前に十分に検討する必要がある。

###### DNAチップ基板の設計

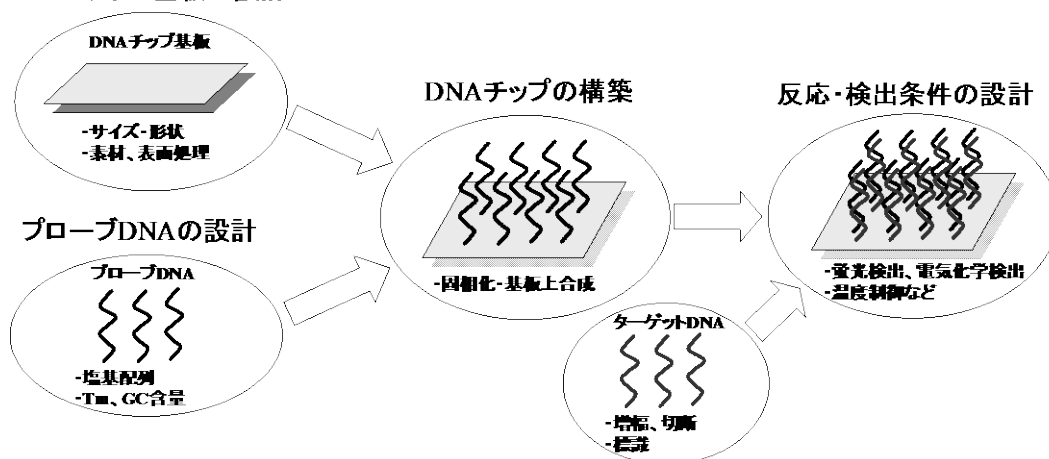


図3-1. DNAチップの検出原理

チップ基板上で選択的に捕捉するには、チップ基板上のプローブDNAと、ターゲットDNAを増幅するためのプライマーセットや、制限酵素による断片化処理工程が重要となる。また、ターゲットDNAをユニークな配列を有するDNA断片として、確実に増幅し、その増幅DNAを、確実に捕捉できるプローブDNA設計が重要であると言える。この設計が不十分である場合、ハイブリダイゼーションによる検出時に、相補的でありながら反応しないという偽陰性や、逆に相補的でないのに反応するという偽陽性を示す結果となる。チップの製品設計においては、特に注意すべき点であると言える。

チップ基板上のプローブDNAの固定化方法としては、基板上で合成する方法と、合成オリゴを固定化する方法がある。合成オリゴを固定化する場合、チップ基板上の合成オリゴの固定化方法が重要になる。チップ基板上での固定化密度と、固定化の強度により、最終的な捕捉性能が異なる。理想的には、チップ基板上に合成オリゴが高密度に固定化し、かつ剥離等の品質問題を起こさないような結合方式で固定化する。また、高密度で固定化していたとしても、ハイブリダイゼーションを阻害するような固定形態は望ましくないため、プローブDNAの活性を阻害しないような固定化方法、例えばプローブDNAの末端に修飾した官能基を介した固定化が使われる。

例えば、Agilent Technologies（以下、Agilent 社）が提供する「CGH+SNP」\*マイクロアレイ（CGH：Comparative Genomic Hybridization、SNP：Single Nucleotide Polymorphisms）では、特定の制限酵素の認識配列と重なる大多数の SNP に対する SNP 領域プローブを搭載したオリゴ DNA チップを用いてジェノタイプが行われる。この DNA チップに対し、制限酵素処理後に蛍光物質（通常は Cy3 または Cy5 を使用）で標識された被検査ゲノム DNA またはジェノタイプ既知のリファレンスゲノム DNA 由来のターゲットをハイブリダイゼーションさせ、各 SNP 領域プローブに対応するハイブリダイゼーション量を蛍光強度により測定する。この時、制限酵素で切断されたターゲットの SNP 領域では、DNA チップ上の対応する SNP 領域プローブの蛍光強度が大きく低下する。被検査ゲノムの蛍光強度をジェノタイプ既知のリファレンスゲノムの蛍光強度と比較することにより、各 SNP 領域について被検査ゲノムの遺伝子型を一度に決定する。

## (2) チップと装置の構造

DNA チップの仕様については、解析対象に合わせて決定する。DNA の網羅的な解析を目的とするならば、比較的大きなサイズの基板に、何万～百万種類ものプローブ DNA を高密度に固定化する。一方で、解析対象が絞られている場合には、少ない数のプローブ DNA で済むため、比較的小さいサイズの基板に、100 程度のプローブ DNA を固定化することになる。このように、解析の対象と目的によって、DNA チップの主要素の仕様や形状・サイズを適したものにすることが必要である。また、これらに伴って装置本体の仕様や機能も異なってくるので、事前に最適な構成を十分検証する必要がある。

DNA の網羅的な解析に用いる DNA チップとしては、例えば Agilent 社の CGH+SNP マイクロアレイや、Affymetrix 社の「GeneChip」が挙げられる。Agilent 社では、インクジェット技術をベースにオリゴ DNA を標準サイズのスライドガラス上に直接 in situ 合成したオリゴ DNA チップを提供している。ヌクレオチド合成試薬をスライドガラス上の正確な位置にマスクなしで高い合成効率（99.5%以上）で順次スポットすることにより、1 枚のスライドガラス上に何万～百万種類もの異なる 45～60mer の DNA 配列を網羅している。2014 年 2 月現在、制限酵素 AluI/RsaI の認識部位に配置して SNP 領域プローブが設計され、さらに HapMap SNP データベースとの重なりやマイナーアレル頻度を考慮して約 65,000 種類の SNP 領域プローブセットとしている。

解析対象を絞った場合に用いる DNA チップとしては、例えば東洋鋼鈑㈱の「ジーンシリコン」が挙げられる。このチップは、3mm 角のシリコン基板上にダイヤモンドライクカーボン（DLC）を製膜し、その後に表面処理を施したチップであり、100 程度のプローブ DNA を固定化することができる。解析対象を絞った分析に対しては、臨床応用を見据えたコストの実現性を含めて有効な手段と言える。

## (3) 検出の方法

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 DNA 抽出、DNA 増幅、サンプル DNA のセッティング、装置の処理手順、信号から型判定を導く工程を技術的に検討することが重要である。チップ装置に導入する前の工程について検討が不十分な場合、必要な量の DNA が確保できない、または断片化や分解によって試験に供することができない、蛍光物質などの修飾が不十分であり、その後の分析に不適な状態になる、などの不具合が生

じることがある。装置の処理手順については、マニュアル操作と自動操作の違いによってもリスクが異なる。マニュアル操作においては、試験実施者による操作のばらつきが生じるため、それぞれの工程のばらつきになり得る項目を抽出し、その項目が結果に及ぼす効果について検証する必要がある。自動操作の場合においては、操作自体のばらつきは低減されるものの、装置や部品の不具合や劣化等の影響を受けることもあるので、装置が正常に動作していることを操作前及び操作後に確認するなど、必要な措置を施す必要がある。

検出装置において、検出特性に影響を与える可能性の高いのは、温度制御機構、試薬送液機構、測定系、機械動作機構などである。DNA チップの反応は温度の影響を大きく受けるため、温度制御を精密に行わないと、誤判定の原因となる。また、試薬送液も反応に影響を及ぼす。例えば、試薬溶液が十分に攪拌された状態で、チップ表面に接触し、チップ表面のプローブ DNA と適切に接触し反応できる状態に保つ必要がある。

DNA チップでは、チップ上に固定化したプローブ DNA と相補的な配列を有する DNA の有無を検出するが、その方法としては、蛍光物質を使用した検出系が一般的である。ターゲット DNA は、サンプルとなる DNA を制限酵素で切断した後に蛍光物質を修飾する方法や、PCR 法により増幅して使用することが一般的である。PCR 法で増幅する際には、蛍光物質が結合したプライマーを使用して蛍光物質が結合した PCR 産物とするか、蛍光物質を結合した塩基を PCR 反応に用いることによって、蛍光物質を取り込んだ PCR 産物とするのが一般的である。

Agilent 社が提供するプロトコルでは、まず、血液などの被検査サンプルから RNA およびタンパク質が混入しない高品質のゲノム DNA を抽出する。高品質なゲノム DNA の濃度は二本鎖 DNA 特異的な蛍光光度計（例：Qubit）で定量する。リファレンスサンプルはジェノタイプ既知の個体サンプルからあらかじめ抽出されたゲノム DNA を準備する（Agilent 社から入手可能）。これらのゲノム DNA（200～500ng：DNA チップのフォーマットにより異なる）を制限酵素で消化した後、Exo(-)Klenow polymerase(3'→5' と 5'→3' のヌクレアーゼ活性を欠いた DNA ポリメラーゼ)を用いて Cy3 または Cy5-dUTP による蛍光標識を行い所定のミニカラムを用いて精製・濃縮する。

蛍光物質を利用する系では、相補鎖の形成を検出するために、蛍光画像検出装置が必要になる。これは、蛍光物質の励起波長と合致したレーザーをチップに照射し、フィルターを通して蛍光のみを CCD (Charge Coupled Device) や PMT (Photomultiplier Tube) により読み取る装置である。複数の蛍光物質を使用して、標準サンプルとの競合により検出する場合もある。蛍光検出装置としては、共焦点レーザーを用いて、チップ前面をスキニングするタイプの装置等が市販されているが、CCD でスキャンすることなく検出する簡便な装置も開発されている。

蛍光検出以外では、チップ上において相補鎖を形成した後に、インターカレーター等を取り込むことによって、電気化学的に検出する方法もある。この方法では、上記に示した蛍光物質を利用する系とは異なり、電気化学信号を検出する装置が必要となる。

Agilent 社が提供する SureScan スキャナは、最少ピクセルサイズ  $2\mu\text{m}$  の高分解能スキャン、スキャン中も全てのスポットに焦点を合わせ続けるダイナミックオートフォーカス機能による高感度スキャン、および、蛍光色素の分解を防ぐためのオゾン防御システムを備えた 2 色 (Cy3 および Cy5) 同時スキャンが可能である。複数の DNA チップを連続してスキャンするためのカセットを備えており (最大 24 枚)、運転中でも DNA チップの追加や抜き取りが可能であり、急に分析が必要になった時にも柔軟に対応できる。



### 3. 1. 1. 2. サンプルおよび検体（橋本幸二）

ヒトの遺伝子型の検査には、血液（白血球）、生体組織（細胞）、手術採取標品、病理検査用パラフィン包埋標品、口腔粘膜、毛根、爪などが用いられる（表1）。使用する検体の種類およびその採取方法、採取量、保管・輸送方法については、検査の目的に応じ十分検討することが重要である[1]。口腔粘膜は採取が容易で、簡易な採取キットなども販売されていることから、DTC（Direct To Consumer）検査などでは普及が進んでいる。しかしながら、受診者自らあるいは検査知識が不十分な人間が採取する場合は、コンタミネーションや採取後の検体保存などに対する管理が不十分となる場合があり注意が必要である。血液（白血球）は医師による採取が必要ではあるが、採取できる検体量が比較的多く、検体の保存や検体からの核酸抽出に関しても、専門家による管理された環境で行うことができるため、遺伝子型検査用の検体としては最も適している。ホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin-Fixed Paraffin-Embedded: FFPE）された組織を用いて検査を行う場合は、DNAが断片化されており、正常な検査結果が得られない可能性のある事を認識して検査を行う必要がある。微生物やウイルスの遺伝子型検査の場合、検体はそれらを含む血液、血清、喀痰、骨髓液、擦過細胞、便、培養液など非常に幅広い。検体が異なると、採取方法や保存方法なども異なることから、それぞれに適した方法を選択する必要がある。なお、国内では日本臨床検査標準協議会（JCCLS）から、標準採血法ガイドライン[2]および遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル[3]が発行されているので参考になる。

表3-1. DNAの回収量（Butlerより引用）

| 検体   | 回収量                |
|------|--------------------|
| 血液   | 20,000~40,000ng/mL |
| 組織   | 50~500ng/mg        |
| 口腔粘膜 | 100~1,500ng/綿棒     |
| 毛根   | 1~750ng/毛根         |

#### 【参考文献】

- [1] Butler JM 「Advanced Topics in Forensic DNA Typing Methodology」 Academic Press, p30, 2011
- [2] 「標準採血法ガイドライン改訂版(GP4-A2)」特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会（JCCLS）（平成23年1月）
- [3] 「遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル Approved Guideline（承認文書）」特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会（JCCLS）（平成23年12月）

### 3. 1. 1. 3. 試薬およびサンプルの前処理・保存方法（岡村浩、田谷敏貴）

#### (1) サンプルの前処理

サンプルは検出に用いるシステムに適合した前処理を施す必要がある。最終的な検出に必要な採取量のサンプルからDNAを抽出し、制限酵素による断片化やPCR等による増幅を行う。増幅にあたっては、使用する酵素試薬などによっては、最終的な増幅量が異なるため、試薬の選定や増幅条件については慎重に検討する必要がある。使用するDNAの品質の評価法と品質基準を設定す



ることによって検査の信頼性が向上する。また、前処理したサンプルについては、その後さらに蛍光修飾や一本鎖化といった処理を行うことがある。これらの処理は、検出感度等に大きな影響を与えるので、試薬の選択や条件設定を十分に注意して行う。

Agilent 社の CGH マイクロアレイでは、UV 分光光度計の A260/A280 と A260/A230 を測定し、高濃度の塩や有機溶媒などの混入物がないことを確認する（推奨値 A260/A280 : 1.8–2.0、A260/A230 : >1）。さらに電気泳動（アガロース電気泳動や TapeStation）にて DNA の分解が生じていないことを確認する。実験に用いる DNA の濃度測定は、混入 RNA による影響を防ぐために二本鎖 DNA 特異的な蛍光法（例：Qubit）を用いて実施する。さらに UV 分光光度計の A260 から算出される濃度との大きな乖離がないこともあわせて確認する。

## (2) サンプルの保存方法

サンプルについては、それぞれの段階や状態に適した保存条件を選択する。上記に述べたように、検体サンプル、それから抽出した DNA サンプル、検出のために前処理を行ったサンプル、更に後処理を施したサンプルが、性能を保った状態で保存できる条件を見出す必要がある。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を十分に検討して基準を設定する。サンプルの保存が不十分であると、DNA 分解酵素によるサンプルの分解など、測定に致命的な影響を与える。使用する試薬や精製度によっても、保管条件や保管期間は変化するので、それぞれのサンプルについて保管試験を行い、保存の影響を確認する必要がある。

## (3) 試薬・保存性・安定性

測定に用いる試薬類についても、最終的な結果に大きな影響を与える要素である。使用するそれぞれの試薬について、どのような品質のものを使用するか、十分に検討する必要がある。また、各試薬については、その品質を担保するために必要な試験を行う必要がある。各試薬を保存するための条件と、安定性についても確認する必要がある。DNA のラベル化からハイブリダイゼーションまでの各行程で使用される試薬・消耗品について、各ロットの QC (Quality Control) 結果が提供されている場合もある。

### 3. 1. 1. 4. 特異性、感度、ダイナミックレンジおよび再現性（若本明子、張博文、森谷哲浩、田谷敏貴、澤田裕子）

#### (1) 特異性

特異性は検査の性能を決める指標の一つである。ジェノタイピング検定用 DNA チップでは、検査する塩基座の塩基を正しく判定する確率として定義される。機器の特異性を示しておくことは検査結果の信頼性を担保するうえで必要である。DNA チップを用いて行ったジェノタイピング解析結果について、その特異性を検証するためには、別の手法（プラットフォーム）で遺伝子型判定を行うことが必要とされる。その際、標的となる遺伝子に対して DNA シークエンシングを実施する場合が多い[1]。対照実験となる DNA シークエンシングは双方向を行うことで信頼性を向上させることができる。なお、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良い。TaqMan 法[2, 3]、Invader 法、MassARRAY 法等がある。また、他の手法の解析によりジェノタイピングが既知である試料を用いて、実験的に DNA チップの特異性を検討する。例えば、Agilent 社

が提供する CGH+SNP マイクロアレイや Affymetrix 社が提供する SNP アレイでは、解析終了時、各検出 SNP Call の信頼度 (Confidence) が同時に出力され、信頼度 95%以上の SNP call の割合 (Call rate) が表示される (図 3-2 左: 各種 HapMap 試料解析結果、図 3-3 上: HapMap 試料解析結果, QC Call Rate グラフ)。さらに、解析ソフトウェアに測定試料のジェノタイプファイルがあらかじめインポートされていると、その一致率 (Call accuracy) も自動的に算出表示される (図 3-2 右: 3 種 HapMap 試料解析結果、図 3-3 下: HapMap 試料解析結果, Concordance Report Table)。これらの製品は以上のような方式で特異性の規定を満足している。

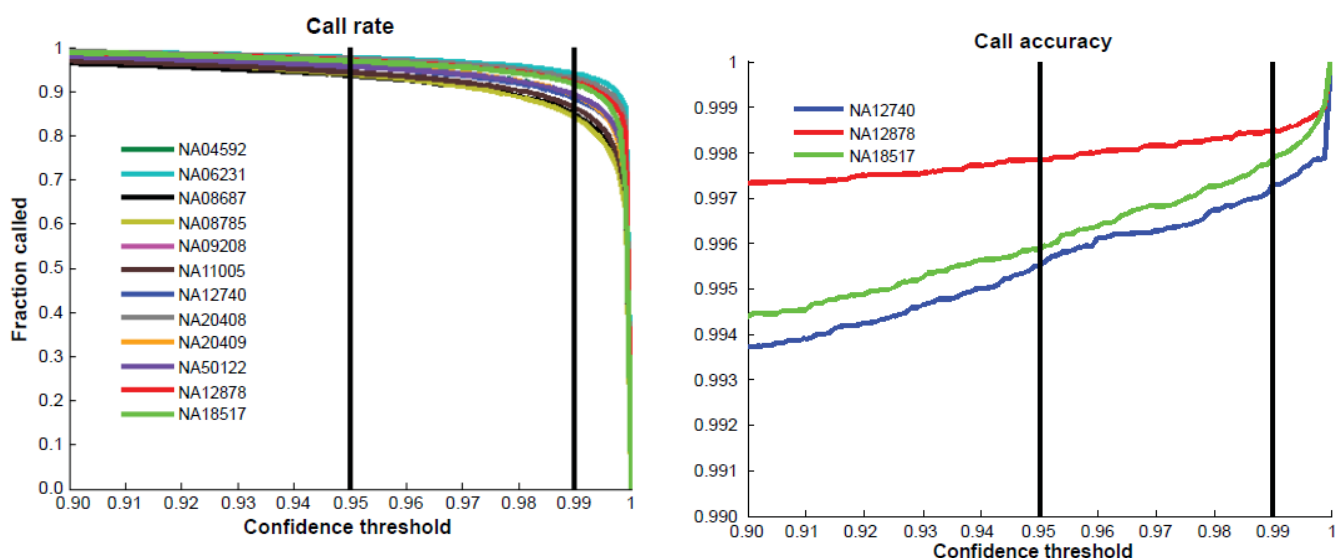
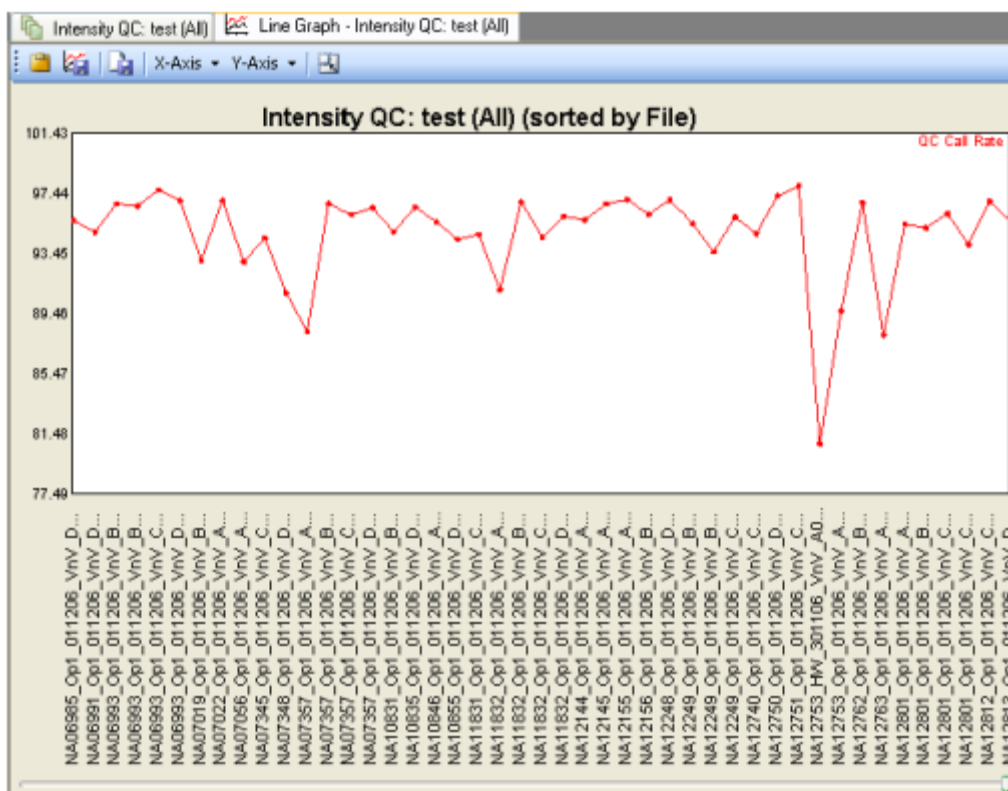


図 3-2. Agilent 社 Application Note 5990-6274EN



|     | File                         | Reference                    | # SNP's Called | # Concordant SNP's | % Concordance |
|-----|------------------------------|------------------------------|----------------|--------------------|---------------|
| ▶ 1 | NA06985_NSP_TC_B1.brilm.chp  | NA07055_NSP_TC_B4.brilm.chp  | 257048         | 158546             | 84.68         |
| 2   | NA07000_NSP_TC_A10.brilm.chp | NA07345_NSP_TC_B10.brilm.chp | 258373         | 158731             | 88.43         |

図 3-3. Affymetrix 社 Genotyping Console

## (2) 感度・ダイナミックレンジ

感度・ダイナミックレンジも検査の性能を決める重要な指標の一つである。検査機器の感度やダイナミックレンジを検討するためには、濃度既知のゲノム DNA 検体や、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ような標準検体などを用いて測定する必要がある。このような試料の希釈系列を使うことで、使用する機器の感度と検出精度を把握することができる。そのことから適切な検査方法が決定されて、精度の高いデータ品質管理も可能となる。例えば、ジェノタイプが既知の標準検体などを用いて、モザイク性や不均一性に起因する試料の希釈を想定した検出能を検討することができる。Agilent 社が提供する CGH + SNP マイクロアレイの例では、モザイク性のある多発性骨髄腫検体において 13 番染色体の LOH (Loss of Heterozygosity) を検出した (図 3-4)。この試料は FISH (Fluorescence in situ Hybridization) 法により 222 細胞中 69 細胞 (31%) で本 LOH を確認した。また Affymetrix 社が提供する Copy Number + SNP マイクロアレイの例では、骨髄異型性症候群検体においてトリソミー、LOH 等を検出した (図 3-5)。これらの製品は、別の手法で判定を行うことにより感度の

規定を満足している。なお、検出するに適切なゲノム DNA 濃度と量を確保するために必要な臨床サンプルの量を概算しておくことは、臨床現場での利用に有用である。

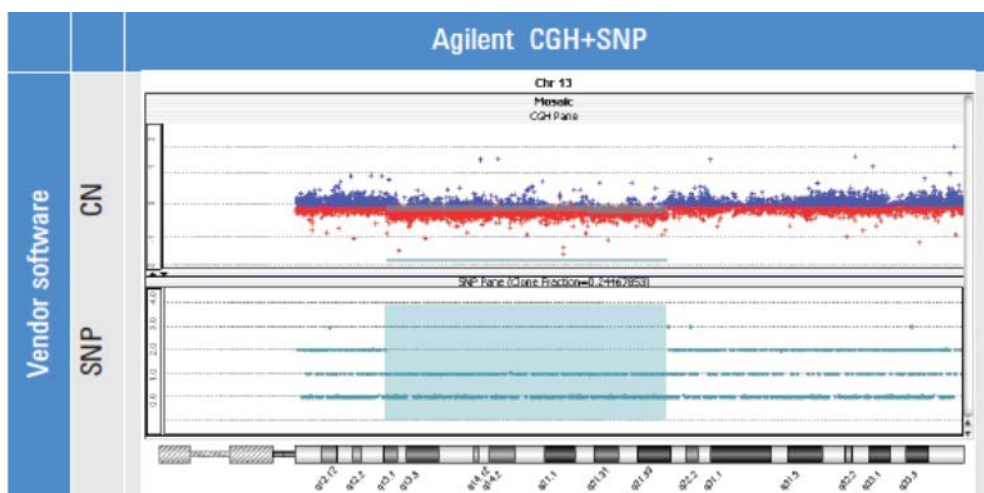


図 3-4. Agilent 社 Application Note 5991-0409EN Agilent 社 CytoGenomics ソフトウェア デフォルト設定により解析

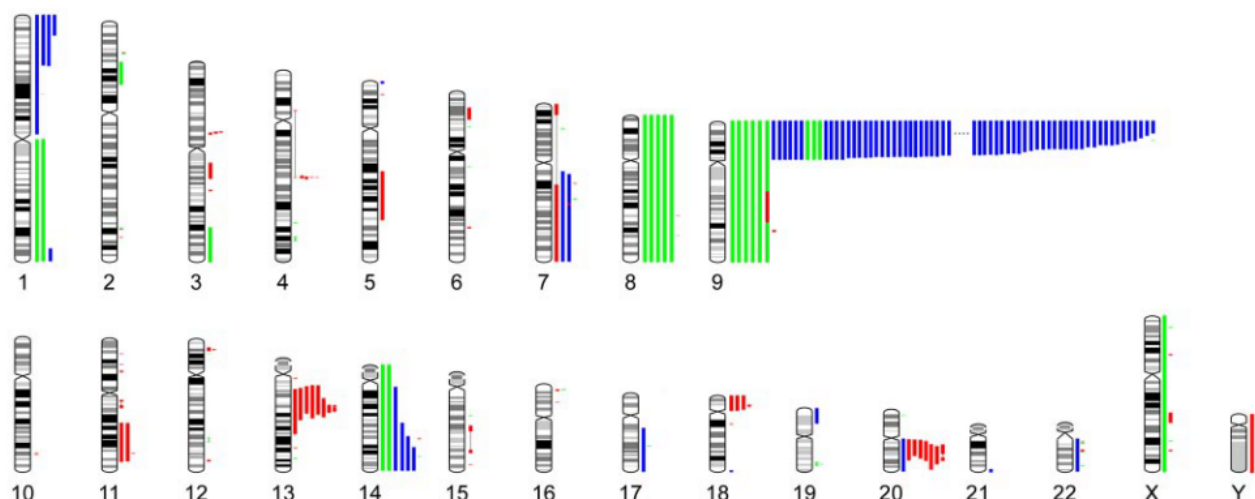


Figure 2. Karyoview of all chromosomal aberrations detected by Affymetrix SNP array analysis in 321 chronic-phase MPN patients. Bars depict the physical position and the size of the aberration; green indicates gains; red, deletions; and blue, UPDs. Thin black lines that connect 2 bars indicate multiple aberrations in the same patient.

図 3-5. Hong, H. *et al.* (2012) [5] より Affymetrix 社マイクロアレイによる骨髓異型性症候群検体の解析結果

### (3) 再現性

再現性とは、検体や検査の条件を等しく整えた時に、別の人が別の施設で実験しても再びまったく同じ検査結果が得られる性質をそなえていることである。これを備えている時は、検査結果は妥当なものとされ、その検査内容の正当性が認められる。DNA チップ、および検査システムによって得られるデータの再現性を検証するためには、同じ手順で複数の製品ロット、複数の器具を使用して繰り返し実験を行う必要がある[4]。また、施設間での再現性を確認するために、3箇所以上の施設で再現性試験が行われ一か所の施設では二人以上の作業者がいるようにすることが必要である。その際、生物学的に同一と見なされる検体を使った繰り返し実験（バイオロジカルレプリケート）、及び1つの検体に対してアッセイを繰り返し行ってサンプル調整実験（テクニ

カルレプリケート)をそれぞれ少なくとも3つ以上行って測定データを得ることで有意な再現性を統計学的に判断することができ、また、得られたデータの品質も判断できる。例えば、[図3-6](#)に示すように Affymetrix 社の SNP アレイは3つの施設で再現性試験を行うことで、この規定を満足している。

|                    | Site 1 | Site 2 | Site 3 |
|--------------------|--------|--------|--------|
| Call rate          | 99.4   | 99.6   | 99.2   |
| HapMap concordance | 99.6   | 99.7   | 99.3   |
| Reproducibility    | 99.9   | 99.9   | 99.6   |

[図3-6](#). Affymetrix 社 SNP 6.0 アレイ DataSheet より、アレイの再現性の評価結果

【参考文献】

[1] Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 447:661-78. (2007)

[2] Livak, K.J. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal.* 14:143-9. (1999)

[3] Morris, T. *et al.* Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TaqMan fluorogenic detection system. *J Clin Microbiol.* 34:2933-6. (1996)

[4] Hong, H. *et al.* Technical reproducibility of genotyping SNP arrays used in genome-wide association studies. *PLoS One*. 7:e44483. (2012)

[5] Klampfl T. *et al.* Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. *Blood*. 118:167-76. (2011)

3. 1. 1. 5. データ解析用ソフトウェアおよびデータ処理方法 (田谷敏貴、澤田裕子)

(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、客観性・簡便性の観点から技術的に検討すること。その際、ユーザにより直接装置を操作する部分、機器を制御する部分、データに付加する情報を含めた管理を行う部分、解析を実施し判定アルゴリズムにより判定を行う部分、判定後のデータの解釈を行う部分など一連の操作内容について、項目に分けて施設において文書化すること。項目に分けて文書化することにより間違いを軽減し、明確化することができる。例えば、検出装置を操作するソフトウェアに、推奨検出条件やデータへの情報自動付加機能が搭載されていると、検出ミスや出力データの取り違いなどの事象を避けることができる。あるいは、①



出力されたデータの既定条件による自動的な解析の実施、②解析ソフトウェアへの推奨解析・判定条件のデフォルトの搭載、③解析条件の解析結果への記録も非常に有用である。

Agilent 社が提供する CGH+SNP マイクロアレイをスキャンする装置の操作ソフトウェアには推奨されるスキャン条件が搭載されており、スキャン開始時にユーザにより、出力データへの検体名などの情報付加および出力先を設定することができる。また、スキャナ操作ソフトウェアと、推奨条件を搭載した解析ソフトウェアによる解析を自動連携させることができる。詳細情報（実験者、検体詳細など）を解析ソフトウェア上で追加することもできる。

また、更には正規の操作・動作以外の状況発生時の対応についての検討と、ソフトウェアの開発・設計に関する国際規格の参照は、開発ガイドライン[1]を参照すること。

## (2) 判定アルゴリズム

判定アルゴリズムの文書化については開発ガイドライン[1]を参照すること。ジェノタイプ判定の精度を上げるために、データの良否判断(QC)を含めることにより、得られたデータの信頼度を確認し、追試の必要性や工程上の問題点の可能性を判断することが可能となる。また、解析上で精度の低いプローブデータを排除して解析を行うことが可能となる。

Agilent 社が提供する CGH+SNP マイクロアレイでは、解析結果に、各 QC 項目の結果が示されており、それぞれに判断基準値も設定されている。データを構成する各プローブデータには、個々に各種フラグが付加され、解析時に精度の低いプローブデータが自動的に排除される。

### 【参考文献】

[1] 「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2012[改訂版]」（経済産業省、平成 25 年 3 月）

## 3. 1. 1. 6. 品質管理方法（田谷敏貴、福岡弥生、澤田裕子、若本明子）

### (1) DNA チップ

DNA チップが劣化していると検出シグナルが低くなる、データのノイズが高くなる、再現性が低下するなどの問題が生じるため、DNA チップの質や安定性、保管方法を把握する必要がある。高湿・温度変化・外気に触れないようにするなど、必ず使用する DNA チップに適した環境で保存すること。また使用期間内のものを使用すること。DNA チップの質について Agilent 社では IS013485 に則りマイクロアレイスライドを製造しており、出荷用マイクロアレイと同時に作製された品質確認用マイクロアレイスライドにラベル化サンプルをハイブリダイズすることで、マイクロアレイの品質を確認している。

### (2) 検査装置

検査装置の品質に関わる基本情報や、製造管理/品質管理体制については開発ガイドライン[1]を参照すること。校正方法の推奨条件や、保守点検サービスは通常製造元から提供される。例えば、Agilent 社が提供する SureScan スキャナは IS013485 に則り製造され、幾つかの国で CE-IVD 認証を取得している。保守点検サービスの利用も可能である。

## 【参考文献】

[1] 「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2012[改訂版]」（経済産業省、平成 25 年 3 月）

### (3) 検査の品質管理

検査が適切に実施されているかは、サンプル調整のためのアッセイや検査機器を使用した一連の操作においてモニタリングして確認する必要がある。アッセイにおいては、陽性コントロール（標準検体など）と陰性コントロール（ゲノム DNA 溶解 buffer など）を用い、検査機器での測定で適切に検出されているかどうかをモニタリングすることで、アッセイが適切に行われたかどうかを検証する。一方、得られたデータをソフトウェアで解析し、品質メトリクスを用いて、検査機器で適切に測定できたかの確認が推奨される。例えば Affymetrix 社の Copy Number + SNP アレイは、得られたデータをソフトウェアで解析し、Marioni J.C. et al. (2007) [1] が指摘した”Waviness”（図 3-7）等の品質メトリクスを求めることで、品質管理の規定を満足している。

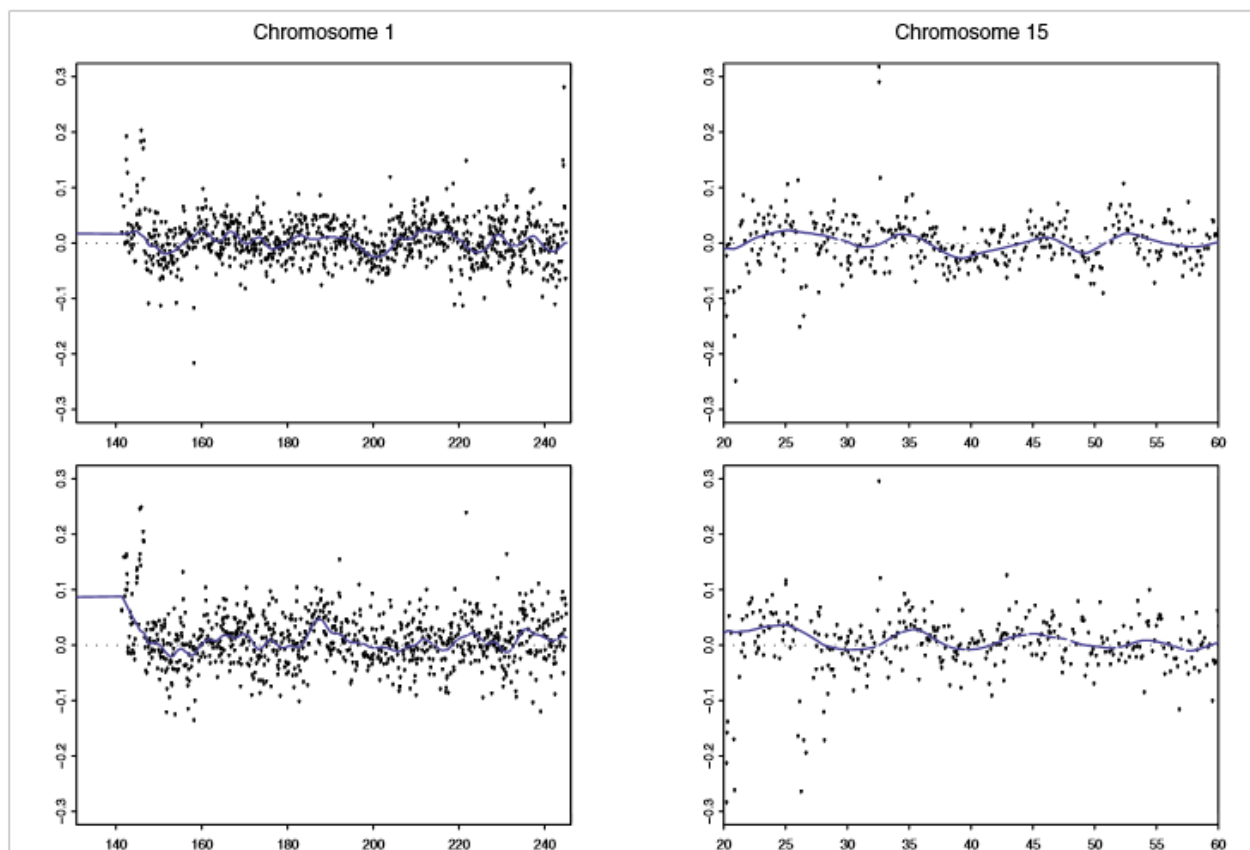


Figure 1

Examples of the wave artifact and the fitted loess curve. In the two left hand plots we display the  $\log_2$  ratios for clones on the long arm of chromosome 1 plotted against their genomic location for two HapMap samples, NA06993 (top) and NA11832 (bottom). On the right we plot the  $\log_2$  ratios for clones on a section of the long arm of chromosome 15 against their genomic location for samples NA06993 (top) and NA11832 (bottom). The wave effect can be observed by scanning across each of the plots from left to right. The fitted loess curves for each of these samples/genomic regions have been overlaid in blue.

図 3-7. Marioni J.C. et al. (2007) [1] より Affymetrix 社 Copy Number + SNP アレイの品質メトリクスの一つ”Waviness”の概念図



#### (4) その他、性能特性に影響する要因

測定における交差汚染に対する予防として、検体・試料を取り扱う環境の整備と管理が必要となる。RNA を含む検体・試料を扱う場合においては、RNase の混入による分解等を予防するために除去剤を使用して環境整備を行う。同様に DNA を含む検体・試料を扱う場合においても、DNase の混入による分解等を予防するために除去剤を使用して環境整備を行う。DNA を増幅する必要がある場合は、PCR を行う前と行った後の作業場所を別々にし、増幅前に他検体・試料の混入の可能性を最低限に抑える。また、検体・試料に試薬を混合させる際には、フィルター付のピペットチップのような、汚染を予防するための備品を使用することが推奨される。検体に含まれる潜在的な干渉物質においては、検体から DNA を抽出・精製する場合に適切な方法に従って処理することで、混入を抑えるように行う。そして、調整後の品質チェックは、分光光度計や電気泳動等で確認する。

#### 【参考文献】

[1] Marioni J.C. *et al.* Breaking the waves: improved detection of copy number variation from microarray-based comparative genomic hybridization. *Genome Biology* 8:R228. (2007)

### 3. 1. 2. 遺伝子発現 (RNA) 解析用 DNA チップ

#### 3. 1. 2. 1. 原理、構造および検出方法 (岡村浩、田谷敏貴)

##### (1) 検出原理

遺伝子発現解析用 DNA チップは、遺伝子型検定用 DNA チップと同様に、ターゲットとなる RNA/DNA をチップ基板上で選択的に捕捉することによって、その配列を検出する。表 3-2 に DNA と RNA の違いを示す。

遺伝子発現では、検体からの RNA 抽出方法と、ターゲットサンプルの調製方法が重要になる。一般的には、検体から RNA を抽出し蛍光標識を施して試験に供する方法と、逆転写酵素を用いて相補的な DNA に転写し、そのまま試験に供する方法がとられる。

チップ基板上には、ターゲットとする RNA/DNA を捕捉することができるように設計したプローブ DNA を固定化する。このプローブ DNA は、正確な検出を行うことができるために、ターゲットに対してユニークな配列にするとともに、反応条件に適合した配列にする必要がある。チップ上には複数のプローブ DNA が固定化されるので、複数のプローブと同条件で特異的に反応するには、 $T_m$  (Melting Temperature) を揃える必要がある。具体的には、GC 含有量が同等になるようにプローブ DNA を設計する。

Agilent 社では、各転写産物の一部の配列 (またはその相補鎖配列) をプローブとして搭載したオリゴ DNA チップを用いる。この DNA チップに対し、蛍光物質 (Cy3 または Cy5) で標識された全 RNA 由来のターゲット (mRNA (messenger RNA) や ncRNA (non-coding RNA) 等) をハイブリダイゼーションさせ、各プローブに対応するハイブリダイゼーションの量を蛍光強度により測定する。正規化処理後、各遺伝子の発現量をサンプル間で比較することにより発現差解析を行う。2 種類のサンプルのペアを一枚の DNA チップに同時にハイブリダイゼーションさせ異なる検出波長で得られたハイブリダイゼーション強度から比較を行う二色法と、1 種類の色素で標識した検体を 1

枚の DNA チップにハイブリダイゼーションさせ、シグナルの比較を常に DNA チップ間で行う一色法がある。

表 3-2. DNA と RNA の比較

| 項目                  | DNA        | RNA        |
|---------------------|------------|------------|
| 構造の違い<br>※ヌクレオチド中の糖 | デオキシリボース   | リボース       |
| 形態                  | 二本鎖        | 一本鎖        |
| 塩基                  | A, G, C, T | A, G, C, U |
| 転写の影響               | 無し         | 有り         |
| 安定性                 | 安定         | 不安定        |

## (2) チップと装置の構造

チップの構造は、解析対象によって異なる。例えば、遺伝子発現を網羅的に解析するには、チップ上に解析したい多数のプローブが固定化されたチップを用いる。

検出装置に関しては、チップの検出方法によって異なる構造を持つ。一般的には、蛍光物質を用いた系が多く用いられるが、その場合には蛍光を読み込むための蛍光検出装置が必要となる。また、電気化学的な検出を行う系においては、電気信号を読み込むための装置が必要となる。それぞれの装置については、適切な機構を有する必要がある。チップの蛍光読み取りについては、チップ表面をレーザーでスキャンして、蛍光強度を PMT や CCD で検出する。蛍光検出の感度やダイナミックレンジによって、判定結果が影響されないように、装置の各種条件を設定する必要がある。

電気化学的な検出においては、電気信号を読み取る機構が蛍光検出とは異なる。蛍光検出装置と同様に、温度制御や駆動系などについて検討する必要がある。また、装置全体の機能は標準物質を用いて確認を行うことができる。

Agilent 社の DNA チップは、遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップと同様、インクジェット技術をベースに製造されたオリゴ DNA チップであり、25~60mer の DNA 配列を網羅させている。プローブ設計は各転写産物に対して特異性を持つ 3' 側にバイアスをかけるか、各エクソン部位に配置して設計される。プローブ配列の決定においては GC 比が考慮される。1 遺伝子または 1 エクソンを概ね 1 つの長鎖（主に 60mer）プローブで検出する。3' 側にバイアスをかける場合、あらかじめターゲット配列のクラスタリングを行い、定義されたトランスクリプトームに対して遺伝子毎に設計された 60mer プローブの相同性チェックを行うことでクロスハイブリの可能性を確認している。

## (3) 検出の方法

検体をサンプルとして、RNA を抽出した後、標識や増幅を行う前処理と、チップシステムで測定を行った後、検出した信号を処理することによって、判定を行う。

得られた信号から判定を行うプロセスについては、遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップの場合と同様に、十分な技術的な検討結果を反映させて、システムを構築する必要がある。装置での処理においては、マニュアル操作と自動操作の区別を明記して、各操作のリスクを評価する必要がある。

Agilent 社では、スライドガラス上の蛍光ハイブリダイゼーションシグナルを測定するためスキャナは、遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップと同一のもの（SureScan スキャナ）を用いる。20 ビットデータ処理を行うことにより、1 回のスキャンで 6 桁のシグナルダイナミックレンジを得ることが出来る。

#### 【参考文献】

- [1] 久原哲 「DNA チップ活用テクノロジーと応用」 シーエムシー出版、2006 年
- [2] 金子周一、堀池靖浩 「バイオチップ実用化ハンドブック」 エヌ・ティー・エス出版、2010 年
- [3] Mark Schena 「DNA Microarray」 Oxford University Press, 2000

### 3. 1. 2. 2. サンプルおよび検体（橋本幸二）

遺伝子発現の検査には 血液、生体組織、手術採取標品、病理検査用パラフィン包埋標品などが用いられる。RNA は DNA と比較して分解され易く、検体中の RNA は検体採取直後から分解が始まることを十分認識した対応が必要である。検体の品質が RNA の品質や RNA 増幅・標識に大きく影響するため、使用する検体の種類およびその採取方法、採取量、保管・輸送方法などについては、検査の目的に応じ十分な検討が必要である。また検体を取り違えないよう、バーコードや ID などで管理し、採取日など検体情報を記録すること。欧州の CORDIS FP7 プログラムで進められている SPIDIA プロジェクトでは、遺伝子発現解析に用いる検体取扱いについての標準化活動を行っているので参考になる [1-5]。

#### 【参考文献】

- [1] <http://www.spidia.eu/>
- [2] Pazzagli M et al, SPIDIA-RNA: First external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *Methods* 59, 20 (2013)
- [3] Groelz D et al, Non-formalin fixative versus formalin-fixed tissue: A comparison of histology and RNA quality. *Exp Mol Pathol* 94, 188 (2013)
- [4] Viertler C et al, A New Technology for Stabilization of Biomolecules in Tissues for Combined Histological and Molecular Analyses. *J Mol Diagn* 14, 458 (2012)
- [5] Günther K et al, Implementation of a proficiency testing for the assessment of the preanalytical phase of blood samples used for RNA based analysis. *Clin Chim Acta* 413, 779 (2012)

### 3. 1. 2. 3. 試薬およびサンプルの前処理・保存方法（田谷敏貴、福岡弥生）

#### (1) 検体の前処理

検体から RNA を抽出・精製する際は極力分解が起こらないよう、また抽出時の溶媒を残さないよう精製すること。RNA を分解する RNase は非常に安定した酵素なので、すべての工程で RNase による分解に注意を払うこと。実験台や操作に用いる実験設備は RNase 阻害剤で拭くなど極力 RNase free にすること。RNase を失活するためによく使用される DEPC（ジエチルピロカーボネー

ト)はオートクレーブ処理しても完全に分解されず、逆転写酵素や増幅酵素などの酵素反応を阻害するため使用を避けること。実験に用いる Nuclease Free Water は DEPC 処理水ではなく膜透過で Nuclease を除去している市販品を用いること。またピペットマンは RNA 専用とし、フィルター付きピペットチップはパッケージ化したものを使い捨てで用い、チューブは RNase フリーのものを使用すること。作業中は白衣、手袋およびマスクを着用し RNase の混入を防ぐこと。

RNA 抽出方法は使用する DNA チップのメーカーの推奨プロトコルに従う。プロトコルに依存して、抽出物は Total RNA、mRNA あるいは small RNA を含んだ RNA など異なる。また RNA の品質は前述のように DNA チップのデータに大きな影響を与えるため、必ず UV 分光光度計および電気泳動での確認を行う必要がある。まず UV 分光光度計では 260 nm の吸光度で RNA を定量する他、スペクトルから塩や抽出時の溶媒が混入している可能性を確認できる。特に A260/A280 および A260/A230 がともに 2 に近いサンプルを用いることが必要である。具体的な判定基準を設け、判定基準に満たない質の悪い RNA は再精製を行う。また分光光度計では RNA の分解具合を判定できないため、合わせて必ず電気泳動を行う。ゲル電気泳動の他、例えば電気泳動装置 Agilent 2100 バイオアナライザあるいは Agilent 2200 TapeStation などを用いると、少量で泳動することができ、サンプルの損失を最小限に抑えることができる。またバイオアナライザや TapeStation に備わっている RIN (RNA Integrity Number) [1] あるいは RINe 機能で客観的な分解度の判定が可能である。

ハイブリダイズするラベル化サンプルは定量と色素取り込み率の評価を行う。Agilent 社が提供する標準プロトコルでは、ラベル化サンプルは NanoDrop を用い 260nm の吸光度を元に cRNA の定量を行い、550nm (Cy3) と 650nm (Cy5) の吸光度を測定することで、蛍光色素が適切に取り込まれたかを確認する。また上述の電気泳動装置など少量で電気泳動できるツールを用いることで、目的断片長のラベル化サンプルが合成できているか評価することができる。プロトコル記載の基準値に満たない場合は抽出 RNA の質を確認するとともに再度ラベル化を行う。

## (2) サンプルの保存法

前述のように遺伝子発現を解析するにあたって、その試料となる RNA の品質はとても重要であるため、全ての段階の検体について分解には十分注意する。保管方法や輸送方法はそれぞれの検体に最適な方法を採用する。保管の際は検体の情報や保存温度、保存日時などを明記する。

検体の保管にはいろいろな方法があるが、RNA の分解の大きな要因となる RNase が活性を持たないよう、また熱をかけないように検体を採取後すぐに凍結する、RNA later を用いる等それぞれの検体に最適な方法で処理・保管する。

精製 RNA は $-80^{\circ}\text{C}$ で長期保管が可能である。ラベル化サンプルは、標識した蛍光色素が退色しないよう、チューブや箱をアルミ箔で遮光するなど、メーカー提供のプロトコルに従い保管する。精製 RNA およびラベル化サンプルは凍結融解を繰り返すと分解するため、極力避け必要があれば分注する。また融解した後は、前述の分光光度計および電気泳動により保管による劣化 (RNA の分解あるいは蛍光色素の退色) を検証する。保管の際 RNA 濃度が薄いとチューブ内に吸着するため、吸着しないチューブを用いるかある程度の濃度 (例:  $100\text{ng}/\mu\text{L}$  以上) で保管する。また輸送の際は、ドライアイスおよび保冷剤とともに発泡スチロール箱に入れ冷凍便で送り、受け取った後すぐに $-80^{\circ}\text{C}$ で保管する。

### (3) 試薬

RNA の抽出やラベル化・増幅などの各工程で使用する試薬は、予めその安定性や濃度などを検証する。基本的に使用する DNA チップを提供しているメーカーが提供しているプロトコルに記載の試薬を用いる。例えば Agilent 社ではアジレント遺伝子発現マイクロアレイに最適化したプロトコルおよび各試薬や消耗品を提供している。一方、各実験施設における実験操作の再現性や精度は施設ごとに検証する。例えば文献 [2] では 1 年間にわたり同一サンプルを用いて定期的にデータを取得し、データの安定性を確認している。

### (4) 試薬の保存性・安全性

各工程で使用する試薬の保管方法などを予め検証する。キット化されている試薬の場合、提供メーカーの指示に従って保管する。例えば、Agilent 社の試薬はプロトコルに従い常温、4°C、-20°C あるいは -80°C で保管する。また塩化リチウムやラウリル硫酸リチウムなどを含む試薬があるが、一般的な実験室で白衣、マスク、手袋および防護メガネを着用することで安全性を確保できる。いずれも使用期限内の試薬を使用する。

### 【参考文献】

[1] A. Schrepfer et al., “The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements” *BMC Molecular Biology* 2006, 7:3

[2] A. M. Glas et al., “Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test” *BMC Molecular Biology* 2006, 7:278

## 3. 1. 2. 4. 特異性、感度、ダイナミックレンジおよび再現性 (若本明子、山崎久人)

### (1) 特異性

DNA チップを用いて行った遺伝子発現解析結果について、その特異性を検証するためには別の手法（プラットフォーム）で遺伝子発現解析を行い、結果の妥当性を確認することが推奨される。これは DNA チップを用いた実験に限らず、どのような実験においても、異なった手法を用いて得られた結果の裏付けを取ることはデータの信頼性を確認する上で必要なことである。その際、別の手法としては DNA チップとは異なった測定原理に基づいた測定方法を使って、結果の妥当性を検証することが望まれる。その場合、DNA チップによる網羅的な手法で検出された絞り込まれた標的遺伝子に対して、精度の高い定量性を持ったリアルタイム定量 PCR [1] を実施するケースが一般的である。実際、FDA が主導で行った MicroArray Quality Control (MAQC) プロジェクトでは、様々な DNA チップのプラットフォームで解析した 2 種類のサンプルについての遺伝子発現変動の結果をリアルタイム定量 PCR の 1 つのプラットフォームからの結果と比較し、それらの結果の同等性が示されている (図 3-8) [2, 3]。



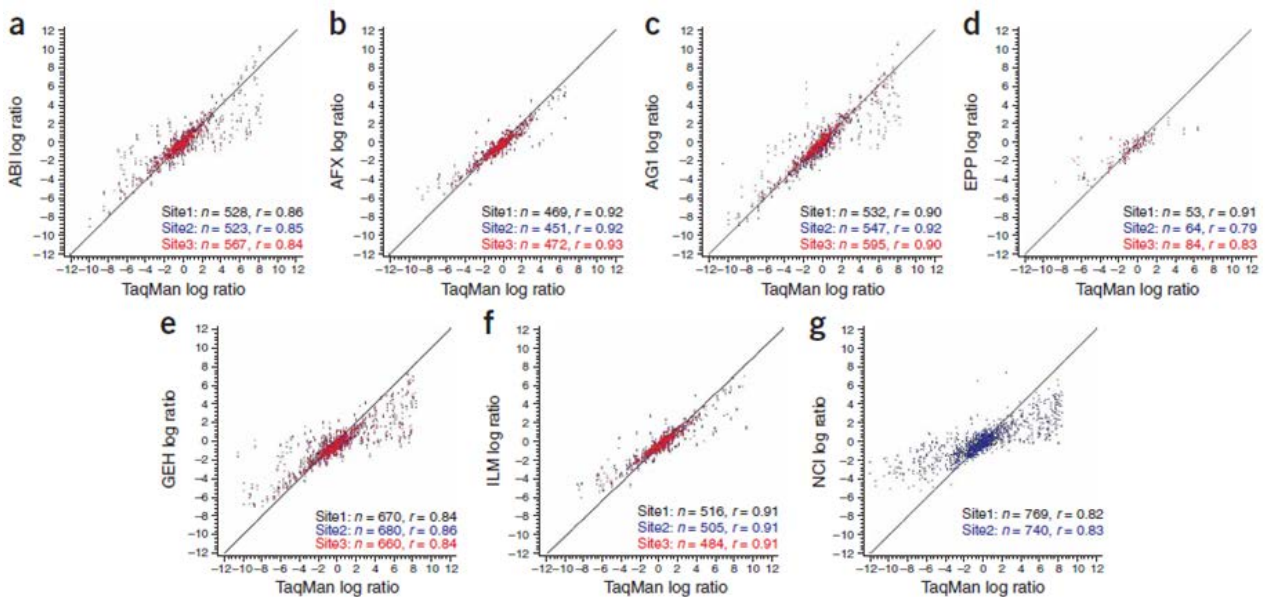


図 3-8. 様々な DNA チップのプラットフォームとリアルタイム定量 PCR の結果の相関性 [3]

## (2) 感度・ダイナミックレンジ

検査機器の感度やダイナミックレンジを検討するためには、濃度既知の試料が含まれた標準検体や標準物質などを用いて測定することで確認できる。これは、様々な濃度からなる複数の試料を使って測定することで各濃度に対してどの程度のシグナルが得られるかがわかるため、使用する検査機器の感度やダイナミックレンジを把握することができる。そして、それらのデータは実検体から得られる結果から信頼できるレンジを判断するための指標になり、精度の高いデータ品質管理につながると考えられる。このような試料を使った検証については、The External RNA Controls Consortium (ERCC) からの論文に記載されており [4, 5]、MAQC プロジェクトでも評価している [6]。また、これらの標準検体は DNA チップを取り扱っているメーカーでそれぞれに適合した製品として販売されており、その使用方法に従った手順で操作することで容易に検証することができる [7-10]。

## (3) 再現性

DNA チップ、および検査システムを使って得られるデータ量は膨大なものになるため、その再現性を検証するには統計学的手法を使って判断することができる。その際、有意な再現性を判断するためには繰り返し実験を行う必要があり、生物学的に同一と見なされる検体を使った繰り返し実験（バイオロジカルレプリケート）、及び同一検体を使ってアッセイを繰り返し行ってサンプル調製する実験（テクニカルレプリケート）をそれぞれ少なくとも 3 つ以上行って測定データを得ることが推奨される。また、併せて複数の製品ロットを使用して検証することで、より品質の高いデータを得ることができる。いずれの場合においても、再現性の検証を行う際は必ず製品の使用方法が記載された手順に忠実に従って操作することが重要であり、そうすることで実験施設内のみならず実験施設間でも相関性の高いデータが得られる（図 3-9） [11]。

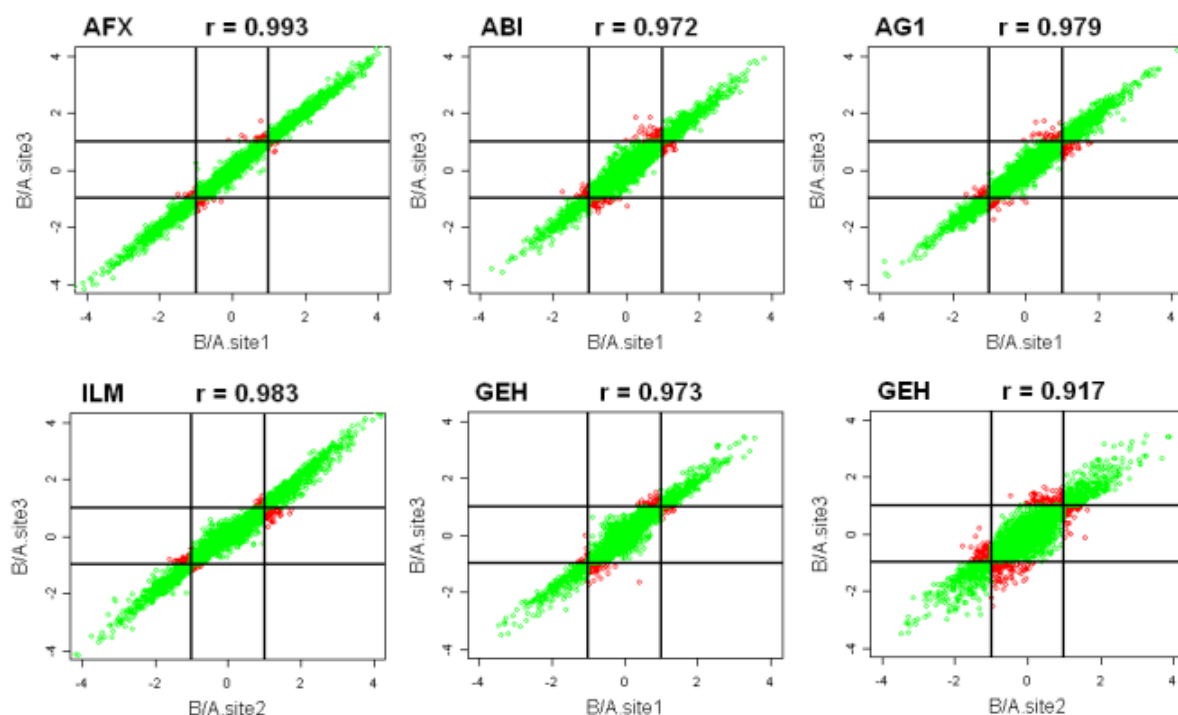


図3-9. 同一サンプルを使って2実験施設間で行った実験データの相関性[11]  
MAQCプロジェクトで得られた様々なDNAチップデータを使用

【参考文献】

- [1] Freeman, W.D. et al., Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential, *BioTechniques*, 26:112, 1999.
- [2] Canales, R.D. et al., Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms, *Nat. Biotechnol.*, 24, 1115, 2006.
- [3] MAQC Consortium, The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intramolecular reproducibility of gene expression measurements, *Nat. Biotechnol.*, 24, 1151, 2006.
- [4] ERCC, Proposed methods for testing and selecting the ERCC external RNA controls, *BMC Genomics*, 6, 150, 2005.
- [5] ERCC, The External RNA Controls Consortium: a progress report., *Nat. Methods*, 2, 731, 2005.
- [6] Tong, W. et al., Evaluation of external RNA controls for the assessment of microarray performance. *Nat. Biotechnol.*, 24, 1132, 2006.
- [7] [http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131486/AFFY/Poly-A-RNA-Control-Kit#1\\_1](http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131486/AFFY/Poly-A-RNA-Control-Kit#1_1).
- [8] [http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131465/AFFY/Hybridization-Control-Kit#1\\_1](http://www.affymetrix.com/estore/catalog/131465/AFFY/Hybridization-Control-Kit#1_1).
- [9] <http://www.genomics.agilent.com/en/Gene-Expression-Amplification-Labeling-Reagents/RNA-Spike-In-Kits/?cid=AG-PT-102&tabId=AG-PR-1176>.
- [10] <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/4456740>.



[11] Chen, J. J. et al., Reproducibility of microarray data: a further analysis of microarray quality control (MAQC) data, BMC Bioinformatics, 8, 412, 2007.

### 3. 1. 2. 5. データ解析用ソフトウェアおよびデータ処理方法 (橋本幸二)

データ解析用ソフトウェアおよびデータ処理方法 (アルゴリズム) の開発については、遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2012[改訂版]が参考になる[1]。遺伝子発現解析の場合、複数遺伝子の発現パターンから、統計的な根拠に基づき作成したアルゴリズムを用いて結果を判定するケースが多い。判定アルゴリズム作成に必要な検体数について規定はないが、一般的な体外診断薬の基準に基づき、複数施設から収集したサンプルを用いた試験を行う。患者数が限られているなど、少ない症例を基に開発を行う場合であっても、統計的な有意性や妥当性を説明できることが必要である。

#### 【参考文献】

[1] 「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2012[改訂版]」 (経済産業省、平成 25 年 3 月)

### 3. 1. 2. 6. 品質管理方法

「3. 1. 1. 6. 品質管理方法」の項目を参照

### 3. 1. 3. 遺伝子型検定用及び遺伝子発現解析用 DNA チップに関する応用例 (久原哲、荒木啓充)

DNA チップを用いた研究は関連する実験試薬等の簡便化、低コスト化に伴い広い範囲で利用されるようになった。米国 NCBI が運営する遺伝子発現データベース、Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) には DNA チップによる発現データ、遺伝子型データ (CGH, SNP) が登録されており、そのデータ数は年々増加している (図 3-10)。2014 年 3 月 12 日現在、1,100,131 個のデータが登録されている。

このうち最も多いのはヒトの遺伝子発現データであり、616,766 個のデータが登録されている (図 3-11)。ヒトのデータが最も多い理由の一つとして、ヒトの臨床研究では大規模なデータ (サンプル数) が必要であること

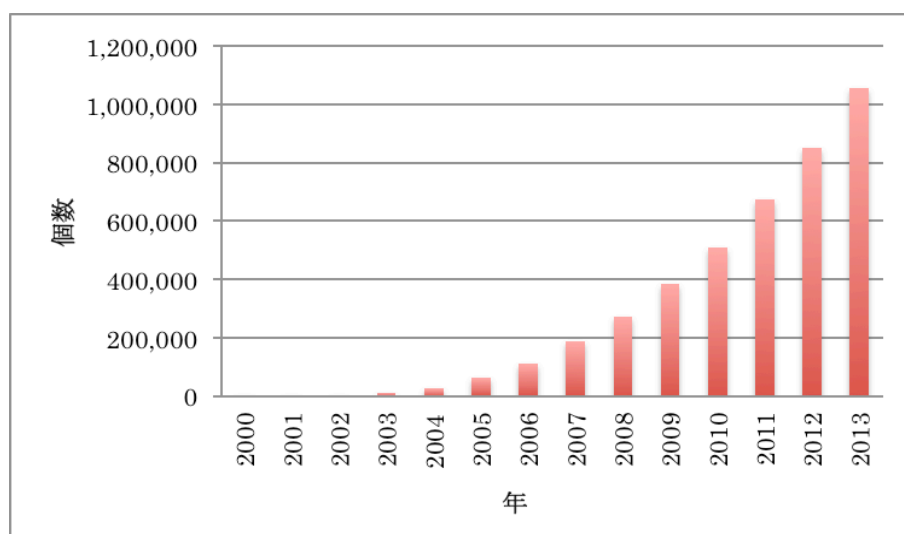


図 3-10. GEO に登録されている遺伝子発現データ数の分布 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/summary/?type=history> より)

とが挙げられる。ヒト以外にも様々な生物種のデータが登録されており、GEO 全体では 2,106 生物種のデータがある。このように DNA チップは様々な生物種の様々な研究目的で使用されており、また、GEO 等の公的遺伝子発現データベースに登録されているデータを再利用して、研究に取り入れる動きもある [1]。

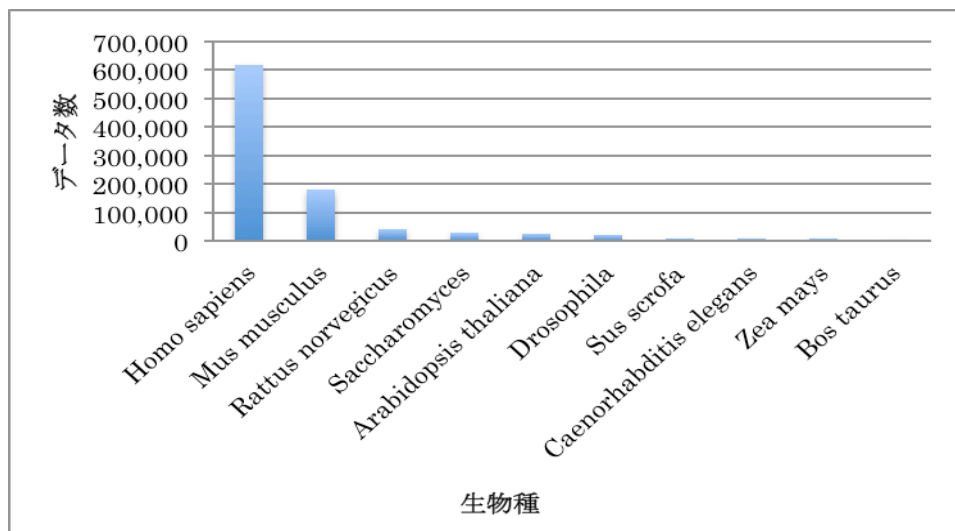


図 3-1.1. GEO に登録されている生物種毎の遺伝子発現データ数 (上位 10 生物種) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/summary/?type=tax> より)

以下に我々が実施した発現解析の応用例と、他のグループが実施した大規模遺伝子型解析の応用例を 1 つずつ示す。

我々はがんペプチドワクチンの予後予測マーカー同定を目的とする遺伝子発現解析を実施した [2]。がんペプチドワクチンは久留米大学免疫学教室で行われている免疫療法で、合計 31 種類のペプチドから患者の血液型にあったペプチドのうち、免疫活性の高い順に 4 種類選り投与する治療方法である。しかしながら、他の治療法と同様に、投与したペプチドに免疫応答を示す (効く) 患者と示さない (効かない) 患者が存在する。それらを投与前に見分けることは、患者への身体的、経済的負担を軽減し、他の治療への選択など、患者の QOL の向上につながる。本研究では、ペプチドワクチンの予後予測するバイオマーカーの同定を目的とし、前立腺がん患者で同ワクチンに対して予後良好の患者 (投与後 900 日以上生存)、予後不良の患者 (投与後 300 日以内で死亡)、それぞれ n=20 ずつのワクチン投与前の末梢血単核細胞 (PBMC, Peripheral blood mononuclear cell) の遺伝子発現データを Illumina 社の HumanWG-6 v3.0 Expression BeadChip を用いて測定した。発現していない、もしくは発現の低い遺伝子は解析を行う上でノイズになる可能性があるため、これらの低発現遺伝子は以下の基準で除去した。

Illumina 社の発現解析ソフトウェアの BeadStudio v3.0 で detection level の P 値が全サンプル (40 例) 中で 70% 以上で 0.05 を満たすプローブを解析対象とした。この条件では 48,803 プローブ中 16,449 個

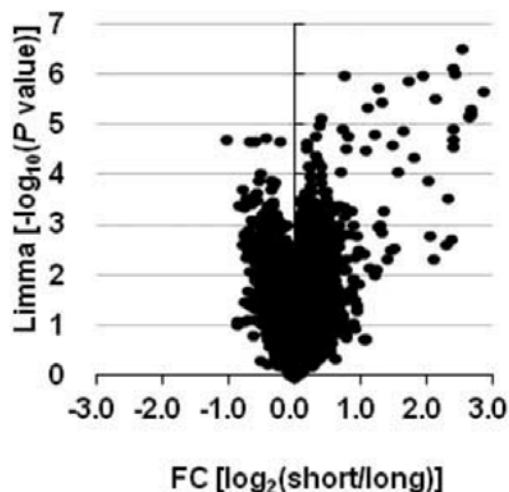


図 3-1.2. 予後良好、予後不良前立腺がん患者の PBMC 遺伝子発現データの Volcano plot. X 軸は各遺伝子の log2 Fold Change (予後不良/予後良好)。Y 軸は log10 P 値。右上、または左上に分布する遺伝子群は予後良好患者で発現が顕著に低い、または高い ([2] より引用)。

が残った。データの正規化は a variance-stabilizing transformation と robust spline 法を用いて行った [3]。また発現変動遺伝子の同定は、改良版 t 統計量を用いた Limma (Linear Models for Microarray Data) によって行った。Limma による発現変動の P 値が 0.01 より小さく、且つ  $|\log_2(\text{予後不良}/\text{予後良好})|$  の値が 1 以上を示す遺伝子 (プローブ) を発現変動ありと定義した。その結果、予後と関連のある 38 遺伝子 (42 プローブ) を同定した (図 3-12)。

これらを基にステップワイズ変数選択法を用いて予測システムを開発した。評価用データ (n=13) を用いて、開発した予測システムの精度を検証したところ、92%の正答率を得た (表 3-3)。

表 3-3. 遺伝子発現データを基に構築した予測システムの正答率 ([2] より引用)

| Training/Test | Sensitivity (%) | Specificity (%) | Positive Predictive Value (%) | Negative Predictive Value (%) | Accuracy (%) |
|---------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------|
| Training n=40 | 17/20 (85)      | 15/20 (75)      | 17/22 (77)                    | 15/18 (83)                    | 32/40 (80)   |
| Training n=13 | 7/7 (100)       | 5/6 (83)        | 7/8 (88)                      | 5/5 (100)                     | 12/13 (92)   |

ウエスト-ヒップ比 (WHR) は、肥満者の体型を示す体脂肪分布の測定値であり、全身肥満とは別の代謝系の予測変数である。WHR は遺伝するが、この特性に影響する遺伝子多型はほとんど知られていない。Heidらは、DNA チップ等で判定された遺伝子型データを用いてボディマス指数で補正した WHR に関する全ゲノムワイド関連解析のメタ解析を行った [5]。はじめに、32 のゲノムワイド関連解析研究 (77, 167 人の参加者) に対して解析を行ったところ、WHR に関する 16 の座位を同定した (図 3-13)。さらに追加の 29 の研究 (113, 636 人の対象者) で検証したところ、13 の新規座位ならびに既に報告されている LYPLAL1 を同定した。これらのうち 7 つは、顕著に男女の差を示しており、WHR に対するより強い影響は男性より女性において見られた。また、全身肥満とは独立して体脂肪分布を調節する複数の座位がある証拠を示すとともに、性差と遺伝子の強い相互作用を示す結果が得られた。

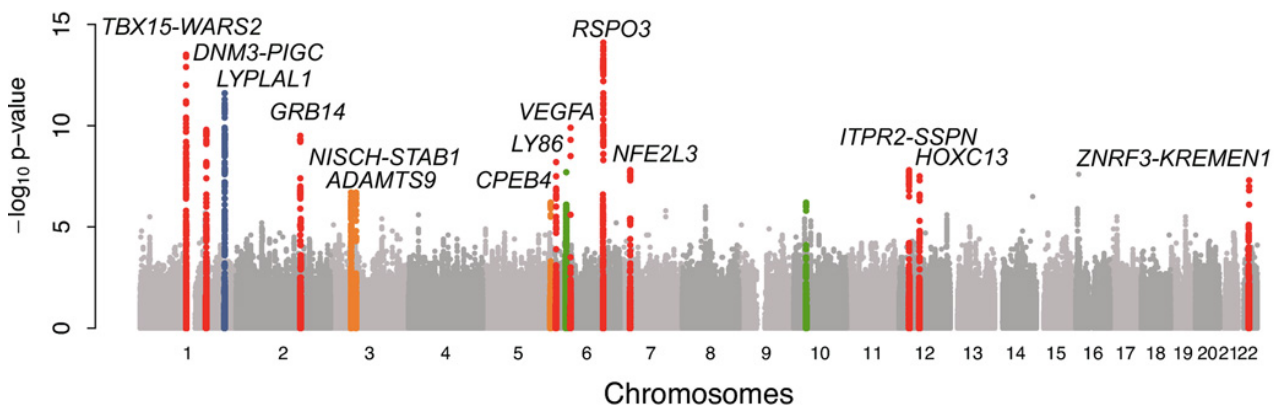


図 3-13. WHR に関するゲノムワイド関連解析で得られた Manhattan plot. X 軸は染色体状の位置、Y 軸は各 SNP の  $\log_{10}$  P 値 ([5] より引用)

【参考文献】

- [1] Rung J and Brazma A., Reuse of public genome-wide gene expression data. Nat Rev Genet. 14(2):89-99, 2013
- [2] Komatsu N et al., Gene expression profiles in peripheral blood as a biomarker in cancer patients receiving peptide vaccination. Cancer. 118(12):3208-3221, 2012
- [3] Du et al., lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. Bioinformatics. 24(13):1547-1548, 2008
- [4] D Smyth GK, Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol. 3:Article3, 2004
- [5] Heid et al., Meta-analysis identifies 13 new loci associated with waist-hip ratio and reveals sexual dimorphism in the genetic basis of fat distribution. Nat Genet. 42(11):949-960, 2010

3. 2. 評価法

3. 2. 1. 遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップ

3. 2. 1. 1. 遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップに関する技術評価（橋本幸二）

(1) 塩基配列決定法との比較

DNA チップの評価にあたっては、測定結果の確度、精度を確認する目的で、同一サンプルを用いて他の遺伝子型検定方法との比較検討が必要である。現在はキャピラリーシーケンサーを用いたダイレクトシーケンスがゴールドスタンダードとして使用されている。ダイレクトシーケンスを行う場合、多型部位を含む領域を予め PCR で増幅しその増幅産物の塩基配列を解析することになるが、PCR 反応に用いる鋳型量が少ない場合に遺伝子座によっては増幅に偏りが生じ (allele drop-out)、ヘテロ接合体がホモ接合体と誤判定される場合もあるので注意が必要である [1]。また、キャピラリーシーケンサーでは、マイナーな遺伝子型の存在比率が 20%以下になると検出できなくなる事が報告されている (図 3-14) [2, 3]。例えば組織中に存在する癌遺伝子の変異や、血清中に存在するウイルスの薬剤耐

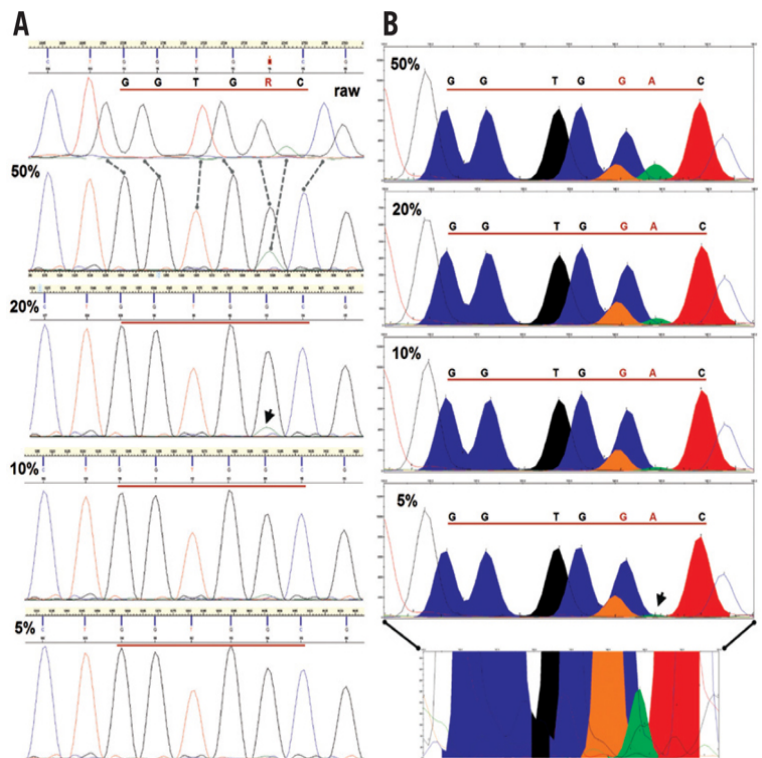


図 3-14. *K-RAS* 遺伝子変異の解析結果。変異タイプの存在率が 20%以下になると、波形の読み取りが困難になる (Davidson et al. [3]より引用)。

性遺伝子の変異などを検出する場合に検出下限以下となる可能性もあるので、検査対象や用途によって注意が必要である。なお、シーケンサーは次世代型の装置も急速に普及しており、キャピラリーシーケンサーと同じように使用可能である。次世代やキャピラリーシーケンサー等を使用する場合は信頼性を高める為に両鎖解析を行う事が望ましい[4]。なお DNA 中の修飾塩基の有無により配列が変化することがあるため、ストランド毎に解析することもある[5]。また、遺伝子多型を解析可能な技術として PCR-RFLP 法、TaqMan-PCR 法、SNaPshot 法、Pyrosequence 法、Invader 法、MassArray 法なども、事前にシーケンス法との比較でバリデーションしてあれば対照法として利用可能である。

#### 【参考文献】

- [1] Hahn S, et al, Allele drop-out can occur in alleles differing by a single nucleotide and is not alleviated by preamplification or minor template increments. Genet Test 2, 351 (1998)
- [2] Aberle SW, et al, Comparison of Sequence Analysis and the INNO-LiPA HBV DR Line Probe Assay for Detection of Lamivudine-Resistant Hepatitis B Virus Strains in Patients under Various Clinical Conditions. J Clin Microbiol 39, 1972 (2001)
- [3] Davidson CJ, et al, Improving the limit of detection for Sanger sequencing: A comparison of methodologies for KRAS variant detection. Biotechniques. 53, 182 (2012).
- [4] Morrison SL. Double-stranded DNA sequence analysis. Curr Protoc Immunol. 2001 May;Chapter 10:Unit 10.25. doi: 10.1002/0471142735.im1025s14.
- [5] Taqi MM, et al, Conformation effects of CpG methylation on single-stranded DNA oligonucleotides: analysis of the opioid peptide dynorphin-coding sequences. PLoS One. 2012;7(6):e39605. doi: 10.1371/journal.pone.0039605. Epub 2012 Jun 29.

#### (2) データ解析及び解析ソフト

DNA チップから出力される蛍光や電流などのシグナルは、専用あるいは汎用の計測装置で測定されるが、使用する装置によって、ノイズレベル、検出感度、ダイナミックレンジ、バラツキなどが異なることから、校正された同一型の装置を用いて測定を行うことが望ましい。もし、異なる型の装置を用いる場合は、同等性を保証するデータを取得することが必要である。また、取得したシグナルは通常ソフトウェアで数値化後解析に使用するが、使用するソフトウェアによって信号の処理方法が異なることから、同一のソフトウェアを用いて数値化および解析することが望ましい。もし、異なるソフトウェアを用いる場合は、同等性を保証するデータを取得することが必要である。米国の FDA が実施した MicroArray Quality Control (MAQC) II プロジェクトで、マイクロアレイのデータ解析や解析ソフトに関する研究成果を報告しているので参考となる [1-6]。

#### 【参考文献】

[1]

<http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/MicroarrayQualityControlProject/>



- [2] Miclaus K, et al, Variability in GWAS analysis: the impact of genotype calling algorithm inconsistencies. *Pharmacogenomics J* 10, 324 (2010)
- [3] Miclaus K, et al, Batch effects in the BRLMM genotype calling algorithm influence GWAS results for the Affymetrix 500K array. *Pharmacogenomics J* 10, 336 (2010)
- [4] Zhang L, et al, Assessment of variability in GWAS with CRLMM genotyping algorithm on WTCCC coronary artery disease. *Pharmacogenomics J* 10, 347 (2010)
- [5] Chierici M, et al, An interactive effect of batch size and composition contributes to discordant results in GWAS with the CHIAMO genotyping algorithm. *Pharmacogenomics J* 10, 355 (2010)
- [6] Hong H, et al, Assessing sources of inconsistencies in genotypes and their effects on genome-wide association studies with HapMap samples. *Pharmacogenomics J* 10, 364 (2010)

### 3. 2. 1. 2. 遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップに関する臨床評価（楠岡英雄）

臨床的有用性を示すための臨床性能試験において、ヒトに由来する試料を用いる場合とヒトから分離した病原微生物を試料とする場合とでは、治験として実施する場合はいずれの場合も「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令」（医療機器 GCP 省令）[1, 2]によるが、臨床試験として実施する場合は適用される倫理指針が異なるので注意が必要である。ヒトに由来する試料を用いる場合は、「臨床研究に関する倫理指針」[3]、「ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針」[4]の双方を遵守する必要があるが、分離された病原微生物を試料とする場合は「ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針」の適用外となる。

#### (1) 有意性の検定

上記の規制に従って収集した検体を用い、有意性、再現性の確認を行う[5]。有意性の確認においては、感度、特異度、測定範囲の決定などを行うことになる。具体的には、

- ・一定のゲノムコピー数を含む試料を希釈して測定し、検出限界を示す。
- ・可能な場合は、定性的検出限界と定量的検出限界を明らかにする。
- ・代表的な遺伝子型についての検討で、全体の測定範囲を設定することも差し支えない。
- ・非特異的反応やバックグラウンドシグナルの安定性や均一性を検討し、誤判定の可能性を説明する。
- ・シーケンシングを行う場合を想定し、適切なプライマーの配列や反応条件、繰り返し配列や GC 含量等の情報を添付することが望ましい。
- ・検体の遺伝子型を判定できる最小検体量（相当する DNA の最小必要量）を示す。
- ・定量する場合は直線性が保たれる範囲について示す。

再現性に関しては、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。

- ・実用での濃度に近い、複数の DNA 濃度における適切な試料を使用する。
- ・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。

- ・複数の操作者のいる、3 箇所以上の現場を含む。
- ・一般的な臨床生化学検査での再現性試験に準じる。
- ・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。

遺伝子工学技術によって作製した核酸や培養等により得られた病原体ゲノムを標準試料として使う場合は、臨床検体由来試料の濃度や純度等に留意する。

## (2) 比較試験・臨床評価試験

ヒト遺伝子型判定においては、ヒト検体を用いた試験を実施し、ヘテロ接合性及びホモ接合性の両検体を調べたデータが求められる。測定対象となる遺伝子型がすでに明らかにされている保管検体がある場合は、それらを測定したデータを示せばよい。測定対象となる遺伝子型が明らかにされていないヒト検体を測定した場合は、測定データと DNA シーケンサーを用いた両鎖解析結果との比較が求められる。判定対象とする遺伝子型をすべてヒト検体で測定するのが望ましいが、低頻度の遺伝子変異の場合、当該変異を持つ DNA あるいは遺伝子工学で作製した DNA を添加した検体を使用することができる。ただし、添加検体の組成は、ヒトから採取した検体の組成に可能な限り近づける必要がある。

病原体の遺伝子型判定を目的とする機器では、検出対象となるすべての遺伝子型の検出データを示すことが望ましいが、出現頻度の低い遺伝子型には、遺伝子工学技術を使って作製した標準品を非感染者由来検体に混入させた疑似検体を用いて代用できる。遺伝子型判定の正確性は、既承認体外診断薬が存在すればそれを用いた結果、あるいは、シーケンシングにより得られた結果との一致をもって確認する。病原体に複数の遺伝子型が存在する時には、それらの特異的な検出、定量ができることを示す必要がある。複合感染の場合についても、定量性を含めて検討しなければならない。病原体ゲノムでは頻繁に変異が起こることが多いので、それらの変異が検出感度や判定へ及ぼす影響、対応について説明する必要がある。シグナルカットオフ値の設定やアルゴリズムの設定において、変異の存在も考慮されなければならない。

## (3) 臨床的実効性

コンタミネーションやデータの取り違えに対する対策が必要である。検体の前処理に PCR 等による核酸の増幅過程が含まれる場合、コンタミネーションによる誤判定の可能性とそれらを排除するための方策を示す必要がある。必要に応じて実測データを示す。また、キャリアオーバーを否定する試験を実施して、コンタミネーション防止対策の妥当性を示さねばならない。

バーコード等を使ったデータ管理システムにより、検体情報および解析結果の対応に誤りが起こらないような方策が求められる。

リスク分析も必要である。操作過程において、人為的および機械的ミスが発生する要因に関して分析しておかねばならない。また、誤った判定結果が得られた場合に起こりうる、診断、治療上のリスクについて、文献等を使って評価することも求められる。

## 【参考文献】

- [1] 医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 17 年厚生労働省令第 36 号）



[2] 「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令」のガイダンス（薬食機発 0208 第 1 号、平成 25 年 2 月 8 日）

[3] 臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省 平成 20 年 7 月 31 日全部改正）

[4] ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針（文部科学省・厚生労働省・経済産業省 平成 25 年 2 月 8 日全部改正）

[5] DNA チップを用いた遺伝子型判定装置に関する評価指標（薬食機発第 040402 号 平成 20 年 4 月 4 日）

### 3. 2. 1. 3. その他（データの管理、安全性、その他）（油谷 浩幸）

#### (1) データの管理

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。

#### (2) 安全性

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、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) 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、薬剤におけるオフアン・ドラッグの取扱いのように、優先的な取扱いが望まれる。

### 3. 2. 2. 遺伝子発現（RNA）解析用 DNA チップ

#### 3. 2. 2. 1. 遺伝子発現解析用 DNA チップに関する技術評価（秋山英雄）

##### (1) 他の発現解析手法との比較

DNA チップの評価にあたっては、測定結果の確度、精度を確認する目的で、同一サンプルを用いて他の遺伝子発現の解析法と比較検討することが必要である。遺伝子定量法としては、当該プラットフォーム以外の一般的な手法、例えばリアルタイム PCR 法、もしくは性能が確認されている既承認の他 DNA チップ等、ハイブリダイゼーション法に基づく検出技術を用いることができる。比較には、診断上重要な遺伝子について重要性を言及した後、当該遺伝子を対象に、標準試料等の、少なくとも 1 種類の同一と見なされる RNA を鋳型に測定を行う。リアルタイム PCR 法を行う場合、目的とする RNA に加え、内在性 RNA、例えばハウスキーピング RNA の遺伝子発現量を測定して補正する、相対定量法が用いられることが多い。内在性 RNA 等の発現量がサンプル状態に依存せず安定であることが前提であるが、例えば薬剤投与やストレス等の環境要因で変動すること

があるので、注意が必要である [1-6]。そのため、10 種類以上の内在性 RNA の遺伝子発現量を測定し、変動のない RNA を複数種類用いて補正することが必要である。

また他の発現解析手法との比較には、サンプルに含まれるコンタミネーションによる誤判定の可能性とそれらを排除するため、標準物質等の外部標準 RNA を添加希釈して測定し、データの直線性を確認する等、バリデーションデータが求められることが多い。

#### 【参考文献】

- [1] Vandecasteele SJ, et al: Quantification of expression of Staphylococcus epidermidis housekeeping genes with Taqman quantitative PCR during in vitro growth and under different conditions. J Bacteriol 2001, 183:7094-7101.
- [2] Radonic A, et al: Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun 2004, 313:856-862.
- [3] Janssens N, et al: Housekeeping genes as internal standards in cancer research. Mol Diagn 2004, 8:107-113.
- [4] Jeong YJ, et al: Optimization of real time RT-PCR methods for the analysis of gene expression in mouse eggs and preimplantation embryos. Mol Reprod Dev 2005, 71:284-9.
- [5] Lee PD, et al: Control genes and variability: absence of ubiquitous reference transcripts in diverse mammalian expression studies. Genome Research 2002, 12:292-297.
- [6] van de Peppel et al: Monitoring global messenger RNA changes in externally controlled microarray experiments. EMBO Reports 2003, 4:387-393.

#### (2) データ解析及び解析ソフト

DNA チップから出力される蛍光や電流などのシグナルは、専用あるいは汎用の計測装置で測定されるが、使用する装置によって、ノイズレベル、検出感度、ダイナミックレンジ、バラツキなどが異なることから、同一型の装置を用いて測定を行うことが望ましい。もし、異なる型の装置を用いる場合は、同等性を保証するデータを取得する必要がある。また、取得したシグナルは通常ソフトウェアで数値化後、解析に使用するが、使用するソフトウェアによって信号の処理方法が異なることから、同一のソフトウェアを用いて数値化および解析することが望ましい。もし、異なるソフトウェアを用いる場合は、同等性を保証するデータを取得する必要がある。米国の FDA が実施した MicroArray Quality Control (MAQC) II プロジェクトで、マイクロアレイのデータ解析や解析ソフトに関する研究成果を報告しているので参考となる [1-6]。

#### 【参考文献】

- [1] <http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/MicroarrayQualityControlProject/>
- [2] Miclaus K et al, Variability in GWAS analysis: the impact of genotype calling algorithm inconsistencies. Pharmacogenomics J 10, 324 (2010)
- [3] Miclaus K et al, Batch effects in the BRLMM genotype calling algorithm influence GWAS results for the Affymetrix 500K array. Pharmacogenomics J 10, 336 (2010)

[4] Zhang L et al, Assessment of variability in GWAS with CRLMM genotyping algorithm on WTCCC coronary artery disease. *Pharmacogenomics J* 10, 347 (2010)

[5] Chierici M et al, An interactive effect of batch size and composition contributes to discordant results in GWAS with the CHIAMO genotyping algorithm. *Pharmacogenomics J* 10, 355 (2010)

[6] Hong H et al, Assessing sources of inconsistencies in genotypes and their effects on genome-wide association studies with HapMap samples. *Pharmacogenomics J* 10, 364 (2010)

### 3. 2. 2. 2. 遺伝子発現解析用DNAチップに関する臨床評価（楠岡英雄、秋山英雄）

臨床的有用性を示すための臨床性能試験の成績に関しては、判別の結果のみならず、当該試料を提供した被験者の年齢、性別、人種などの情報、ならびに、被験者の疾患に関する情報（重篤度、発症率、治療法など）、さらに、検体に関する情報が求められる。また、当該装置が導き出す医療情報（疾患の予後、治療への応答性など）については、臨床病理所見や患者の追跡情報との相関も求められる。したがって、治験として実施するならば「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令」（医療機器 GCP 省令）[1, 2]、臨床試験として実施する場合は「臨床研究に関する倫理指針」[3]、「ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針」[4]を遵守する必要がある。

#### (1) 妥当性の確認

上記の規制に従って収集した検体を用いての妥当性の確認においては、感度、特異度、測定範囲の決定を行うことになる。具体的には、以下の事項を行う。

- ・一定の RNA（又は相補 DNA）のコピー数を含む試料を希釈して測定し、定量的検出限界を示す。
- ・段階希釈試料を用いて、データが直線性を示す範囲を検討し、測定濃度範囲を規定する。補正が必要な場合にはその方法と根拠を説明する。
- ・非特異反応やバックグラウンドシグナルの安定性、均一性を検討し、誤判定の可能性を説明する。
- ・試料中の RNA を測定できる最少検体量（RNA の最少必要量）を示す。
- ・必要に応じ、許容される最大検体量について検討する。
- ・異なる二つの試料から調整した RNA を一定の割合にて混合した試料を測定し、判定が RNA レベルに依存しないことを検証する。

また、遺伝子工学技術によって作製した核酸、組織や培養細胞等から得られた RNA を標準試料として用いる場合は、臨床検体由来試料の濃度や純度等との同一性への留意が求められる。

#### (2) 臨床性能試験

臨床性能試験に関しては、以下の事項が求められる[5]。

##### 1) 被験者集団の妥当性の保証

臨床性能試験で対象とした患者集団の臨床病理情報は、解析の対象とする疾患に関わる情報を除けば、一般的な患者集団の臨床病理情報と同等であることの検証が求められている。試験計画における選択基準・除外基準の設定において、バイアスが生じないように注意する必要がある。

もし選択基準に特定の条件の付与が必要であり、結果として偏りのある患者集団を用いることになる場合は、そのバイアスが臨床性能試験の結果に及ぼす影響を評価し、説明する必要がある。また、臨床性能試験に用いた集団に関し、アルゴリズム作成に用いた患者集団との同等性、独立性についても検討する必要がある。

## 2) 施設数、検体数

原則として、2施設以上、150以上の検体（正常範囲の検体も含む）を用いることが望ましい。しかし、検体数の確保が難しい希少疾患を対象とする場合、予後予測などで臨床試験の最終結果を得るのに長時間を要する場合等では、統計学的に有意性を示すことができれば、より少数であっても許容される。

## 3) 後向き試験

過去に集めた検体、バンクに保存されていた検体、市販の検体を用いた後向きの臨床性能試験であっても、診断装置が導き出す情報を現在又は将来に適用できる場合には、評価資料として使用できる。しかし、後ろ向き試験での検体の臨床病理評価が、現行の医療における評価と同等であることを示さねばならない。

## 4) 海外で行われた臨床性能試験

適切に計画された海外での臨床性能試験の成績は、日本人でのデータと差が無いことを示すことができれば、評価に活用してもよい。

## 5) 医療情報

診断装置が導き出す医療情報とは、発症予測・リスク診断におけるリスク率やオッズ比、存在診断における疾患診断の的中率、病態分類における再発リスクや治療応答性などであり、具体的に提示することが求められる。

### 【例】

- ・疾患のスクリーニング（癌細胞の検出など）：病変の存在確率（%）
- ・予後や治療効果の予測：2年以内の再発確率（%）、5年生存率（%）

治療介入評価における種々のモニタリングや治療応答性の判定では、既存の重症度との対応又は新たな重症度分類の導入などが必要とされる。

## 6) リスク分析

操作過程において発生し得る、人為的及び機械的ミス、非特異反応等について、その要因の分析が求められる。誤った医療情報が得られた場合に起こりうる診断と治療におけるリスクについて、文献等を用いた評価が求められる。判定結果を別の手法を用いて個別に確認するための方法についても、積極的に提示することが求められている。

## (3) 判定アルゴリズム

DNA チップを用いた診断においては、複数遺伝子の発現パターンよりアルゴリズムで判定が行われる。アルゴリズム作成に必要な検体数について規定はないが、アルゴリズムの検証のための臨床性能試験は、一般の既存の体外診断薬に関する基準に基づき、複数施設から収集したサンプルを用いた統計的有意差を示すデータの提出が要求される。すなわち、プロフィールから医療情報を導くためのアルゴリズムとその構築方法の詳細を、用いたデータセットを含めて説明しなければならない。ただし、患者数が限られている場合や、より少ない症例数で有効性が十分に示される場合は、その科学的根拠に基づいて説明することとなる。

また、いったんアルゴリズムを確定した後は、その後の評価の過程において、その内容を変更してはならない。もし変更の必要が生じた場合には改めてバリデーションが求められる。

さらに、承認後にアルゴリズムを変更する場合は、新たな臨床性能試験を追加して、独立したデータセットにより、その妥当性が再評価される。ただし、カットオフ値の修正など、医療情報の精度を向上させる変更については、この限りではない場合もある。

#### 【参考文献】

- [1] 医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 17 年厚生労働省令第 36 号）
- [2] 「医療機器の臨床試験の実施の基準に関する省令」のガイダンス（薬食機発 0208 第 1 号、平成 25 年 2 月 8 日）
- [3] 臨床研究に関する倫理指針（厚生労働省 平成 20 年 7 月 31 日全部改正）
- [4] ヒトゲノム遺伝子解析に関する倫理指針（文部科学省・厚生労働省・経済産業省 平成 25 年 2 月 8 日全部改正）
- [5] RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標（薬食機発 1120 第 5 号 平成 24 年 11 月 20 日 別添 2）

### 3. 2. 2. 3. その他（データの管理、安全性、その他）（油谷浩幸、秋山英雄）

#### (1) データの管理

原則として試料の種類、試料数、試料の調製法あるいは起源、試料の使用目的（特異性など）の記録を残すこと。最終的な結果の出力だけではなく、結果出力前の画像ファイルや数値データ等を保存すること。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こと。また結果に疑問が生じた場合には、データ処理段階毎に確認が可能となることが求められる。

#### (2) 安全性

交差汚染を評価するための試験を実施して結果を残すとともに、判定に失敗した場合、あるいは判定結果の解釈に失敗した場合のリスクも評価し、その際に用いたリスク分析手法についても検討することが望ましい。

### 3. 2. 3. DNA チップの知財管理（森康晃）

#### (1) はじめに

知財管理とは、自社の特許技術、意匠（産業用デザイン）及び商標（トレードマーク、サービスマーク）並びに著作物などの知的財産[1]を如何に他社の侵害から「保護」し、自社生産又は他社へのライセンス供与といった「活用」についてのマネジメントを行うことである。

近年、技術の高度化、製品ライフサイクルの短縮化が急速に進み、自社独自で研究開発・生産・販売を行うことは実態に合わなくなりつつある。むしろ自社の特許技術は、積極的にオープンにして国際標準化を目指す、或いは特許技術などの知的財産を含め、必要なものは他社から購入する、自社の特許技術を連携する企業グループと連携しパテント・プールを形成して戦略的にデファクト・スタンダード化を図ることが盛んに行われている。

## (2) 疾患別特許出願傾向

日本特許庁 DB の特許出願の検索は、CKS WEB[2]及びX lus[3]を使用し、検索式（要約・クレーム）として DNA チップ or DNA マイクロアレイを用いて DNA チップ関連特許を調査した結果、1,077 件が該当した（調査実施時点：2014 年 1 月 24 日）。さらに疾患別に明細書の要約や権利範囲を分類した結果、がん、ウイルス、アルツハイマー関連の出願が多く（表 3-4）、特にがん関連専門の DNA チップの特許出願が最も多かった。

表 3-4. DNA チップの疾患別特許出願件数（明細書の要約や権利範囲で検索）

| 疾患名       | 公開件数 |
|-----------|------|
| ガン, 癌, がん | 819  |
| ウイルス      | 760  |
| アルツハイマー   | 738  |

## (3) 技術分野による出願動向

(2)で検索した 1,077 件に関し、特許解析ソフト X lus を使用して出願特許を分析した結果、新規遺伝子及びそれにコードされる蛋白質、遺伝子発現変動解析による化学物質のリスク評価方法、核酸の塩基配列解析方法、遺伝子検出用プローブと電気化学的遺伝子検出方法に関する特許出願の群に大別できた（図 3-15）。さらにインクジェット技術の応用を含む固相担体表面への DNA 断片の固定方法及び DNA チップの群が独立に存在し、半導体や材料などの電子技術がバイオ分野に応用されていることがわかる。



## DNAチップ特許の詳細分析

検索式(要約・クレーム):DNAチップorDNAマイクロアレイ  
特許件数:1077

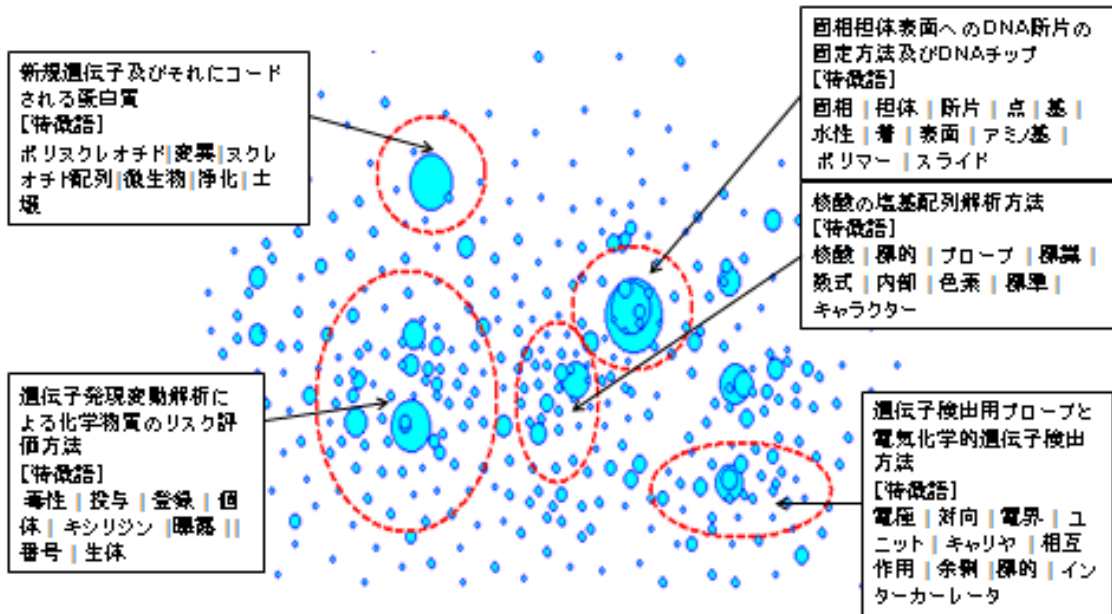


図3-15. DNAチップ特許の詳細分析

DNAチップ特許出願（日本特許庁）をXlus[3]を使用して件数ベースに比例して円を描き、類似の特許出願技術を表示して、特許群を示した。

### (4) 知財管理における特許と国際標準化との関係

顧客志向のモノづくりやサービスを提供する上で、新しい製品やサービスの信頼性などを確保し新市場の拡大を目指すためには、国際標準の策定は極めて重要である。我が国においては2006年に経済産業省が「国際標準化総合戦略目標」[4]を策定し、10年後の目標を掲げて戦略分野における国際標準化を推進している。米国はマイクロソフトやグーグルなど自由競争で勝ち残った企業がデファクト（事実上の）標準を握ることを重視する社会であるが、その米国も2004年末に米大統領の諮問に対して答申された「イノベート アメリカー全米競争力評議会提起書」（いわゆるパルミサーノ・レポート）[5]の中で国際標準化の重要性を従来に比べて強調している。

一方で、欧州は国際標準化機構（ISO）や国際電気標準会議（IEC）などが策定するデジュール（公的）標準を重視する。日本も2002年末に制定された「知的財産基本法」など一連のプロパテント（特許重視）戦略によって特許などの知財権やノウハウの保護、活用のマネジメントを図っているが、国際標準化に消極的な受け身の姿勢では技術のフロンティアが拡大する時代においてイノベーション競争に生き残ることは困難である。DNAチップにおいては、今後基礎研究用のみならずあらゆる疾患の検査・診断などに利用されることが期待されるため、各企業の自主的な研究開発の成果を特許などの知財として管理することが必要である。その上で、よりオープンにして新市場の拡大と顧客志向の医療サービスの実現を目指すためには、国際標準化が極めて重要な段階になる。



## 【参考文献】

- [1] 「知的財産基本法」第2条  
(<http://www.kantei.go.jp/jp/singi/titeki/hourei/021204kihon.html>)
- [2] CKS WEB (中央光学出版の情報検索システム) (<http://www.cks.co.jp/html/i-1.htm>)
- [3] Xlus (VALUENEX コンサルティング株式会社(旧社名:株式会社創知)の特許検索システム  
(<http://so-ti.com/service/xlus/about.html>)
- [4] 経済産業省「国際標準化総合戦略目標」  
(<http://www.meti.go.jp/policy/economy/hyojun/kokusaihyojunka.html>)
- [5] 「イノベート アメリカー全米競争力評議会提起書」  
([http://www.smeal.psu.edu/fcfe/more/white/nii04.pdf/at\\_download/file](http://www.smeal.psu.edu/fcfe/more/white/nii04.pdf/at_download/file))

### 3. 3. 標準物質 (桑克彦)

#### 3. 3. 1. 目的

本項では、「DNA チップ開発ガイドライン 2007」および「DNA チップ開発ガイドライン 2012」  
[1]において規定された、遺伝子型 (ジェノタイピング) 検定用 DNA チップおよび遺伝子発現解析  
用 DNA チップに用いる標準物質について解説する。

両ガイドラインにおいて、いずれも標準物質としての章でその目的と要件を示しているが、本  
解説書では、「DNA チップ開発ガイドライン 2012」に示す標準物質の目的および要件に準拠した  
上で、遺伝子型検定用 DNA チップおよび遺伝子発現解析用 DNA チップの両 DNA チップの標準物質  
の仕様に適用して解説する。

DNA チップの開発には、測定対象を正確に測定するための原理や解析アルゴリズムの検討など  
から、日常検査における精度管理まで多段階のフェーズがあるが、本項では、そのフェーズに応  
じた標準物質に対して求められる要件を示し、該開発品を用いた遺伝子型検定や遺伝子発現解析  
データの信頼性を向上させることを目的とする。

#### 3. 3. 2. 標準物質に求められる要件

標準物質はその性質上、大別して二種類のもが存在する。一つは主として純物質系標準物質  
から成る校正用標準物質である。例として計量法に基づく計量法トレーサビリティ制度である  
JCSS (Japan Calibration Service System) 制度における無機標準液や、医薬品医療機器レギュラ  
トリーサイエンス財団などが頒布する医薬品における日本薬局方標準品などがある。もう一つは  
測定方法や装置の評価および精度管理などを目的とする組成標準物質である。例として産業技術  
総合研究所計量標準総合センター (National Metrology Institute of Japan, NMIJ) などが頒布す  
る環境計測用組成標準物質や検査医学標準物質機構 (Reference Material Institute for  
Clinical Chemistry Standards, ReCCS) が頒布する臨床検査用血清標準物質などがある。

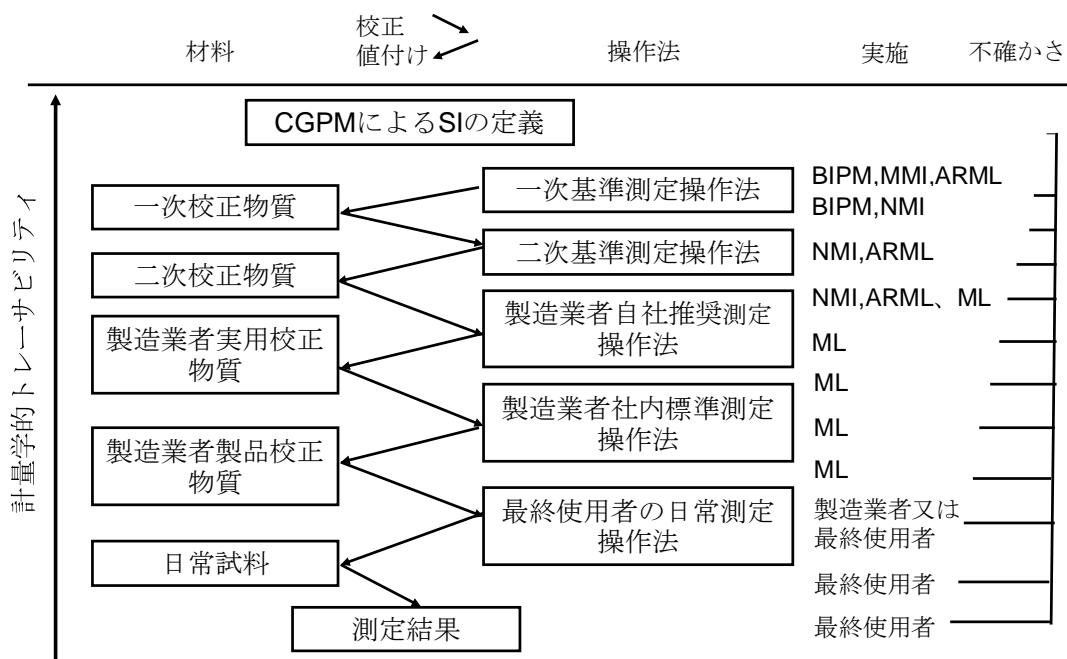
DNA チップの臨床性能試験などで示される再現性や有意性を評価するものとしては、主に後者  
の組成標準物質が該当する。しかし、一方で、構成要件の異なるアレイ技術の正確性評価や測定  
結果の互換性を評価する上では、測定対象標品からなる校正用標準物質の要件も必要である。

DNAチップの測定対象としては、遺伝子型として主にDNA分子、また、遺伝子発現用としてRNA分子が選定されるが、それぞれ4つの塩基種を有するヌクレオチドの並び方となる塩基配列によって識別される。この塩基配列は測定対象ごとに異なるため、DNAチップに用いる標準物質においても、個々の測定対象ごとにその塩基配列を定める必要がある。

測定対象およびその塩基配列については、DNAチップの開発フェーズや評価検討を行う内容によって異なる。遺伝子型検定および遺伝子発現解析の両DNAチップに共通であるが、測定対象を正確に測定するための原理や解析アルゴリズムの検討に用いる標準物質（測定対象標品）および日常検査における精度管理に用いる標準物質（精度管理用標準物質）がある。また、これらには測定結果のトレーサビリティの確認にも適用可能な性能が求められる。

このトレーサビリティとは、ISO Guide 30（標準物質に関連して用いられる用語および定義）に示される計量計測トレーサビリティを示し、例えば国際単位系（SI）を頂点とし、一次、二次標準物質などを介して常用試験方法を校正することで、得られる測定結果について切れ目のない比較の連鎖によって国際標準に関連づけられ得る測定結果を示すような体系である。図3-16に体外診断用医薬品・医療機器の生物試料の定量測定における校正物質と管理物質の表示値の計量学的トレーサビリティの概念図[2]を示した。このようにすることで、特定の測定系でのみ精度管理が行われるものでなく、構成要件の異なるDNAチップにおいても、得られる結果の互換性や測定結果の信頼性確保に貢献するものと考えられる。

なお、該開発品製造における標準物質の選定に当たっては、次項以下の方法論的課題を考慮する必要がある。



ARML：認定基準検査室、BIPM：国際度量衡局、CGPM：度量衡委員会、ML：製造業者の検査室、NMI：国内計量研究所

図3-16. 校正の階層段階全体とSIへの計量学的トレーサビリティ

### 3. 3. 2. 1. 標準物質の選定

#### a) 測定対象標品の選定

測定対象標品としては、遺伝子型検定用 DNA チップおよび遺伝子発現解析用 DNA チップの測定対象となる遺伝子や、遺伝子発現量の相対比較に使用される塩基配列を含むサンプルを選定する必要がある。

測定対象標品は、測定対象の定量値を校正するためのキャリブレーターとなるため、精度管理用標準物質とは性質を異にすることから、標品として記載している。このため、標準物質の管理の項にも示すように、測定対象である遺伝子および遺伝子発現量の相対比較に使用される塩基配列を含むことについて、DNA シークエンシング法などを用いて確認する必要がある。

検出対象としては、対象遺伝子を含む複数のヒトゲノムや遺伝子発現量の相対比較に使用される内在遺伝子が推奨される。また、内在遺伝子の発現量に差が見られるなど、不安定性の要因となる場合には、人工的なコントロール塩基配列を含むサンプルを使用することもできる。測定対象標品を用いて被検対象への値付けや該開発品の校正を行うため、測定対象標品の値付けに測定対象と同じ塩基配列を有する上位の認証標準物質（certified reference material, CRM）などを用いることは、測定結果のトレーサビリティを確認することにおいて重要である。

認証標準物質とは、JIS Q 0030（標準物質に関連して用いられる用語および定義）に示されるように、認証書の付いた標準物質で、一つ以上の特性値が、その特性値を表す単位を正確な現示へのトレーサビリティが確立された手順によって認証され、各認証値にはある表記された信頼水準での不確かさが付いているものである。認証標準物質を校正に用いることで、測定結果の比較、同等性の向上に貢献するものと期待されるが、頒布されている核酸を対象とした認証標準物質は少なく、今後の開発が待たれる。

#### b) 精度管理用標準物質の選定

精度管理用標準物質は、測定方法の妥当性を評価するため、また、該開発品が正確な指示値を示すよう調整するために使用する。精度管理用標準物質としては、測定対象標品に示される対象遺伝子や人工的な非遺伝子塩基配列を含むが、測定の再現性や有意性を評価する上で、測定試料としての標準物質自体の安定性が求められることから、ヒト染色体遺伝子よりも安定性に優れ、増産が可能である合成 DNA、RNA、cDNA あるいはその鋳型となるプラスミド DNA が適用される。

また、精度管理を目的とするため、該開発品の性能評価が可能な部分の遺伝子配列あるいは任意の非遺伝子塩基配列が含まれていれば良い。このため、全塩基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、開発者により決定して差し支えないが、測定試料の由来などによる試料組成などに注意する必要がある。さらに、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および DNA、RNA の標準処理手順マニュアル）が設定されるべきである。

### 3. 3. 2. 2. 標準物質の管理

#### a) 品質管理

測定対象標品および精度管理用標準物質において、以下のような品質管理が必要である。遺伝子型検定用 DNA チップにおいては DNA 分子、遺伝子発現解析用 DNA チップにおいては RNA が対象分子となるが、標準物質として RNA を合成する上で、鋳型として DNA 分子を用いる。従って、両

DNA チップにおいて標準物質の選定時に鋳型となる DNA の塩基配列を DNA シークエンシングなどの方法によって確認することが望ましい。

また、必要に応じて、合成された RNA 分子について逆転写後の塩基配列を確認することも望ましい。また、標準物質を酵素合成などによって複製する場合は、複製ロット毎に遺伝子配列の確認を行うことによって対象塩基配列との相同性を担保する。加えて、塩基鎖長の評価を行うことで、宿主由来塩基配列や制限酵素処理による塩基配列断片混入の評価や目的とする塩基配列の純度を確認する。

塩基鎖長の評価には、ゲル電気泳動法や高速液体クロマトグラフィ (HPLC) などを用いて、試料中核酸の分子量に応じた測定結果を基に非意図的塩基配列の混入を確認する。また、宿主由来の特異的な塩基配列などの混入評価には、定量的 PCR 法やデジタル PCR 法といった核酸定量評価技術を用いることも可能である。これらの核酸測定技術による測定結果の総合的な評価によって、核酸標準物質の品質管理を行う。

#### b) 純度

測定対象標品および精度管理用標準物質の複製の鋳型などに用いる DNA の合成については、ホスホ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 DNA シークエンシング法、質量分析 (TOF-MS)、HPLC やゲル電気泳動法などによって確認する。これらの測定手法においては、主に塩基配列情報と塩基鎖長に関する情報が得られるが、純度評価を行う際には、測定対象と測定上交叉する可能性のある塩基配列に対してその混入率を評価する必要がある。品質管理の項で示した、特異的塩基配列に対して定量評価可能な定量的 PCR 法やデジタル PCR 法といった核酸定量評価技術を用いて純度評価を行うことも可能である。

#### c) 濃度単位

標準物質を感度試験に用いる場合には、核酸定量法によって求められた既知濃度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。なお、核酸定量は吸光度法 (OD260) によって実施する場合、260 nm に吸収を持つ不純物が含まれていないことを確認する必要がある。特に、核酸合成時に基質として用いるヌクレオチドや希釈溶液に緩衝液を用いる場合に混入する可能性のある EDTA などは 260 nm 付近に吸収を示すため、試料溶液そのものを吸光度分析する際には注意が必要である。この場合、HPLC 法や電気泳動法を用いることで、高分子核酸とヌクレオチドや EDTA などの低分子を分離して評価することも可能である。また、可能な場合、濃度値が付与された認証標準物質によって値付けした標準物質を用いることで、トレーサビリティの確認を行うこともできる。

### 3. 3. 2. 3. 標準物質の入手

測定対象となる塩基配列については、「DNA チップ開発ガイドライン 2007」および「DNA チップ開発ガイドライン 2012」において、米国疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention: CDC) の Genetic Testing Reference Material Coordination Program (注: 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)で reference material として確立された細胞株を、国内公的機関、例えば独立行政法人 産業技術総合研究所などが Coriell 医学研究所を通じて入手し、保存および管理を行い、該開発品の機能評価を受託業務として実施するとしている。

その他にも、国内外の研究機関やオンラインデータベースなどで対象遺伝子の塩基配列情報が公開されている、或いはライブラリとして公開されているものもある。入手した情報を元に人工合成遺伝子などを利用して鋳型 DNA を作製し、測定対象遺伝子或いは遺伝子発現量の相対比較に使用される塩基配列を調製することも可能である。

なお、ヒトゲノム DNA サンプルの保存中また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。このことは、標準物質の品質管理にも関わることであり、目的とする対象遺伝子であるかどうかについて精査する必要がある。

また、精度管理用標準物質としては、NMIJ が頒布するトレーサビリティが確立された認証標準物質を利用することができる。

#### 【参考文献】

- [1] 遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2012[改訂版] (経済産業省、平成 25 年 3 月)
- [2] ISO 17511:2003. In vitro diagnostic medical devices—Measurement of quantities in biological samples—Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials

## 4. DNA チップの周辺技術

### 4. 1. DNA チップ用検体の前処理技術 (木山亮一)

#### 4. 1. 1. 遺伝子検査のための検体前処理技術

ヒトゲノム DNA 全塩基配列の解読、及び、それに伴って進歩した様々な DNA 解析技術により、遺伝的要因だけでなく、生活習慣等の環境要因が複雑に関係する、例えば薬物に対する反応やメタボリックシンドロームなどの体質や病気のなりやすさ（疾患感受性）など、疾患の早期診断やその予防のための検査が可能になってきた。経済協力開発機構（OECD）では、遺伝子検査における標準化や精度確保の課題を解決するため、国際基準の必要性を提起し、各国が行うべき政策等を明らかにする「分子遺伝学的検査における質保証に関する OECD ガイドライン」（2007 年 5 月）を公開した。

遺伝子検査では、検体、方法やデータの解析法については検査によって違いがあるが、検体の取扱いについては共通する部分が多く、遺伝子検査の結果は検体の品質に大きく左右されることから、検体の取扱いは測定精度を保証する上で極めて重要である。したがって、測定精度を保証するためには、検査機器・試薬・測定者による施設間のばらつきの解消と検体前処理のプロセス（プレアナリシス）における作業工程の標準化を進め、検体の品質管理の優先的な取り組みが必要になる。

遺伝子・染色体検査業務に関わるガイドラインや指針は「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」、「ヒトゲノム研究に関する基本原則」、及び、「個人情報保護に関する法律」をもとに、それぞれが対象とする従事者・研究者あるいは事業分野・研究分野に対して関連省庁や団体が策定している（表 4-1）。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」[1]は3省（文部科学省、厚生労働省、経済産業省）が策定したヒトゲノム・遺伝子解析研究の進め方に関する指針であり、資料提供者の自己決定による研究協力への参加の可否判断と連結不可能匿名化を前提としている。厚生労働省は「個人情報保護に関する法律」に基づき、診療

#### 表 4-1. 遺伝子検査に関係する主なガイドライン

- ・「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」文部科学省、厚生労働省、経済産業省（平成 13 年 3 月 29 日策定）[1]
- ・「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」厚生労働省（平成 16 年 12 月 24 日）[2]
- ・「遺伝学的検査に関するガイドライン」（平成 15 年 8 月）遺伝医学関連学会（日本遺伝カウンセリング学会、日本遺伝子診療学会、日本産科婦人科学会、日本小児遺伝学会、日本人類遺伝学会、日本先天異常学会、日本先天代謝異常学会、日本マススクリーニング学会、日本臨床検査医学会、家族性腫瘍研究会）[3]
- ・「遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル Approved Guideline（承認文書）」特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会（JCCLS）（平成 23 年 12 月）[4]
- ・「検査前工程の標準化ガイドラインー 生化学、血液学、血清学的検査 ー」一般社団法人日本衛生検査所協会（JRCLA）（平成 25 年 4 月）[5]
- ・「染色体検査・FISH検査勧告法 2010」日本染色体遺伝子検査学会標準化精度管理委員会（平成 22 年 1 月 1 日施行）[6]



情報の取扱いや診療情報の研究利用などに関するガイドライン「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」[2]を策定した。一方で、生殖細胞系列の遺伝情報を取扱う遺伝学的検査（染色体検査・遺伝生化学的検査・DNA検査）を対象として10の遺伝医学関連学会が「遺伝学的検査に関するガイドライン」（平成15年8月）[3]を策定した。

特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会（Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards: JCCLS）では、病原体遺伝子検査、体細胞遺伝子検査、及び、遺伝学的検査をまとめて遺伝子関連検査と定義し、実態調査の結果をもとに、検体採取、運搬および保存における標準化マニュアルとして、「遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアル」[4]を策定した。本マニュアルの対象者は、病院検査室や登録衛生検査所等の検査実施者、検査利用者または検体提出に関与する者（検体採取者、運搬者等）全てとしており、医療機関においては、医師、看護師ときに患者本人が対象になる。一方、JCCLSの提案により、国際標準化機構（ISO）の第212技術委員会（TC212）でも遺伝子検査の標準化が議論され、新規作業項目提案として臨床検査分野の遺伝子関連検査の質保証と能力要求に関する標準化の検討を開始した。

一方、一般社団法人日本衛生検査所協会（JRCLA）では、このガイドラインは、医療機関などから受託している検査所業務の際の生化学、血液学、血清学的検査の前工程の精度保証のためのガイドラインを策定した[5]。本ガイドラインでは、臨床検査室のサービスを、検査依頼、患者の準備、検体の採取、検体の受領・搬送、検体の仕分などの検査前工程（pre-examination process）と検査材料の前処置、検査、検査結果の妥当性確認、検査結果の解釈などの検査工程（examination process）、結果報告、検体の保管などの検査後工程（post-examination process）に分け、検査前工程における管理（検査の受託、検体の受領・搬送、受付・仕分、検査所における血清分離、検査の外部委託）、安全衛生（感染対策、作業場所の安全性確保、感染性廃棄物の処理）、個人情報保護（守秘義務と安全管理措置など）、教育・訓練などについてガイドラインを示している。

また、日本染色体遺伝子検査学会標準化精度管理委員会では、染色体検査及びFISH検査について標準化と精度管理のためのガイドラインを公表している[6]。本ガイドラインの中で、DNAチップに関連する記述としては、がんや遺伝疾患などで染色体コピー数異常をゲノムワイドに迅速スクリーニングするために用いられるアレイCGH（Comparative Genomic Hybridization）に関する注意点として、以下の点を記載している。（1）定量的解析精度の有効性を実証した上で解析を行う。（2）染色体部分の増加や損失によるゲノム・アンバランスを検出でき、ダイソミーや突然変異を除外するものではない。（3）バランスのとれた再構成を除外できないが、染色体検査上均衡型であっても小さなゲノム・アンバランスがある場合は検出される可能性がある。（4）アレイCGHの分析結果を確認するために、染色体分析、FISHまたは両親のアレイCGH分析などの方法を決定しなければならない。（5）前後の遺伝カウンセリングが必要である。

また、臨床検査全般について、検査結果の質、臨床的妥当性、有用性を保証するためには臨床検査専門医の教育が必要と考えて、日本臨床検査医学会教育委員会では「臨床検査専門医卒後研修カリキュラム」[7]に基づいて臨床検査専門医の教育を行っている。

#### 4. 1. 2. 検体前処理技術における精度管理

遺伝子・染色体検査業務における精度管理は一般的に以下の様に行われている[8]。内部精度管理として、内部コントロールを用いた管理と外部コントロールを用いた管理に分けて、目的遺伝

子の発現量の補正、各操作工程の管理、検出感度・特異性の確認、コンタミネーションの影響評価を行っている。内部コントロールとしては、標的遺伝子と共存する別の遺伝子（核酸）、例えばハウスキーピング遺伝子、を使う場合や、標的遺伝子と同じ挙動を示す別の核酸を検体に添加して同時に測定する。外部コントロールの場合は、濃度に応じて異なるコントロールを用意し、場合によっては、陽性試料由来のゲノム DNA/RNA やプラスミド DNA、あるいは、合成 DNA/RNA を用いる。ゲノム DNA の変異解析には、野生型と変異型を用意して同時に測定することで精度管理を行っている。

一方で、外部精度管理はプロトコールの標準化（キット化や自動化）、標準物質の利用、外部精度管理によって行われている。例えば、定量 PCR では、白血病細胞検出用の標準物質が NIBSC（英国）から入手できる。また、外部精度管理としては、同一試料を複数施設に配布して測定し、その結果から精度（検出感度、特異度、再現性）や正確性を判定する方法である。また、精度管理には、検査マニュアルを作成し、検査項目に関して記録し、保管することが重要であり、検査を行う者の知識や技術の向上のために研修や教育が重要である。

#### 4. 1. 3. 国内外の開発動向

EU/SPIDIA の動向、FDA /MAQC-III の動向及び ISO 新 TC の設立動向は、今後の DNA チップに関する標準化に重要に関わるので、それぞれについて以下にまとめる。

##### 【EU/SPIDIA の動向】

SPIDIA (Standardization and improvement of Pre-analytical procedures for In vitro Diagnostic) は、欧州共同体 (EU) において、ヨーロッパ域内で共通の臨床サンプルの採取、取扱い、輸送、処理、保管など前処理（プレアナリシス）段階での品質保証のためのガイドラインを作成することを目標として 2007 年にスタートした。臨床検査の現場で起こる問題の 60-70%がプレアナリシス段階にあるとされている。このため、プレアナリシスの標準化を進めるために、ヨーロッパの 7 公的研究機関、8 企業及び標準会委員会 (European Committee for Standardization : GEN) がコンソーシアムを結成し、SPIDIA プロジェクトが発足した。コーディネーター役は大手試薬メーカーのキアゲン社が務めている。プロジェクト期間は、2008 年 10 月から 4 年間とされていたが、2013 年 3 月まで延長された。主な取組内容は、(1) 体外診断用前処理の品質保証スキーム・ガイドラインの確立、(2) 組織、血液サンプルの安定化をはじめとする技術革新、(3) 管理面、倫理面における情報の流通、コンプライアンス確立、の 3 点である [9]。

また、本事業において、SPIDIA 事務局に対して行ったヒアリングにより、以下の点が明らかになった（バイオチップコンソーシアム報告書による）。まず、2012 年の主な成果として、ヨーロッパ各国のラボが参加し、血液から RNA を抽出した際の品質を相互に比較し、キアゲン社の採血管 PAXgene を用いて調製した RNA の品質が上回っていることを示した。この結果は、欧州規格委員会 (GEN) の TC140 において、NWIP (New Work Item Proposal) として承認され、今後、同委員会の中で、文書化を行う予定である。当初は、Technical Report として 2013 年 4~6 月頃を目処に原案が作成されるが、GEN 承認には、3~5 年掛かる。

また、血液 RNA リングトライアルでは RNA 品質管理のパラメーターを探索した。ヨーロッパ全域の多施設ラボで血液採取、運搬による RNA 品質への影響を IL1B、IL8、FOS、GAPDH の遺伝子発現をもとに検証した[9]。

#### 【FDA /MAQC-III の動向】

FDA が主導している MAQC-III は、SEQC (sequencing quality control) として次世代シーケンサーの技術性能を評価するために実施している[10]。具体的には、シーケンサー同士のデータ互換性及び RNA-seq データ (遺伝子発現のシーケンス解析) と DNA チップのデータ比較を行っている。これらの成果をもとに、FDA が薬事承認を与えるときのガイドラインをまとめる。個人化医療のためのトランスレーショナル・レギュラトリーサイエンス促進に向けて、DNA チップに続き、次世代シーケンサーの互換性、性能評価を行っている。今後開始される MAQC-IV では、副作用の予測と患者個別の薬物/タンパク質のインタラクトーム (相互作用) の解析を進める予定である。

#### 【ISO 新 TC の設立】

ISO においてバイオテクノロジー分野を横断的に扱う TC を起ち上げる動きがあり、ドイツ規格委員会 (DIN: Deutsches Institut für Normung) が設立提案書を ISO 事務局へ提出した (2012 年 7 月)。全 29 国の投票結果は賛成 23 国、反対 2 国、棄権 4 国であったが、2013 年に TC276 (バイオテクノロジー専門委員会) として設立した[11]。事務局は DIN が務める。日本は、日本工業標準調査会 (JISC) を通じて、賛成票を投じた。これに対し、米国国家規格協会 (ANSI) は反対の立場を表明しており、米国対各国の構図になっている。本 TC では、用語の定義・測定法・分析、診断法・コンピューターツール (バイオインフォマティクス)・バイオサンプル、バイオバンク・バイオリアクターを対象とし、バイオセーフティ・マネジメントシステム、生物学的製剤のリスクマネジメント、法医科学は除外される。

#### 【参考文献】

- [1] 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」文部科学省, 厚生労働省, 経済産業省 (平成 13 年 3 月 29 日策定) [http://www.mext.go.jp/a\\_menu/shinkou/seimei/genome/04122801.htm](http://www.mext.go.jp/a_menu/shinkou/seimei/genome/04122801.htm)
- [2] 「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取扱いのためのガイドライン」厚生労働省 (平成 16 年 12 月 24 日) <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/seisaku/kojin/dl/170805-11a.pdf>
- [3] 「遺伝学的検査に関するガイドライン」 (平成 15 年 8 月) 遺伝医学関連学会 (日本遺伝カウンセリング学会、日本遺伝子診療学会、日本産科婦人科学会、日本小児遺伝学会、日本人類遺伝学会、日本先天異常学会、日本先天代謝異常学会、日本マススクリーニング学会、日本臨床検査医学会、家族性腫瘍研究会) <http://jshg.jp/resources/data/10academies.pdf>
- [4] 「遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル Approved Guideline (承認文書)」特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会 (JCCLS) (平成 23 年 12 月)
- [5] 「検査前工程の標準化ガイドラインー 生化学, 血液学, 血清学的検査 ー」一般社団法人日本衛生検査所協会 (JRCLA) (平成 25 年 4 月)

- [6] 「染色体検査・FISH検査報告法 2010」日本染色体遺伝子検査学会標準化精度管理委員会（平成 22 年 1 月 1 日施行）
- [7] 「日本臨床検査医学会臨床検査専門医卒後研修カリキュラム」日本臨床検査医学会教育委員会（平成 20 年 1 月 1 日）
- [8] 「遺伝子分析科学」日本臨床検査同学院遺伝子分析科学認定士制度委員会（平成 23 年）
- [9] 「SPIDIA ニュースレター2012 年 11 月号（SPIDIA Newsletter 11/2012）」（2012 年 11 月）
- [10] 「MicroArray Quality Control (MAQC)」U.S. Food and Drug Administration、  
<http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/MicroarrayQualityControlProject/>
- [11] 「ISO/TC 276 Biotechnology」International Organization for Standardization (ISO)、  
[http://www.iso.org/iso/home/standards\\_development/list\\_of\\_iso\\_technical\\_committees/iso\\_technical\\_committee.htm?commid=4514241](http://www.iso.org/iso/home/standards_development/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=4514241)

## 4. 2. 蛍光色素

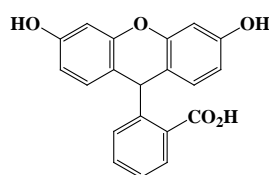
### 4. 2. 1. 蛍光の原理と蛍光色素の利用法（西健太郎、柏裕樹、磯部信一郎）

分子生物学分野では、特定遺伝子の解析、遺伝子治療やテーラーメイド医療[1]などを目的とした研究が北米を中心に世界中で盛んに行われている。その中でも、DNA マイクロアレイ[2]とよばれる DNA の検出技術は良く知られている。また、抗体を含むタンパク質の検出技術[3-5]においても同様であり、正確な疾病診断方法の開発に応用されつつある。このように、これらの検出技術に用いられる色素は、機能性色素と分類されている。機能性色素とは、光、電気および化学反応などの外部からのエネルギーによって、その分子自身が発色や色調の変換をする性質を持つもので、蛍光色素として幅広い分野で馴染み深いものである。機能性色素という言葉は、1970年代後半、日本で誕生した[6]。それまで、色素は染色剤や塗料の顔料などの原料に用いられていたが、電子情報分野や生化学分野の発展に伴い、その分野へ応用するための研究が盛んになったことに起因している。生化学分野では DNA の検出、タンパク質および抗体の標識試薬への実用化が図られている。マイクロアレイ分野では、電磁波の中でも可視光と呼ばれるとても狭い領域（400 nm~800 nm）で、光をエネルギー源とするフォトルミネッセンス（photo luminescence）化合物がその殆どを占めている。

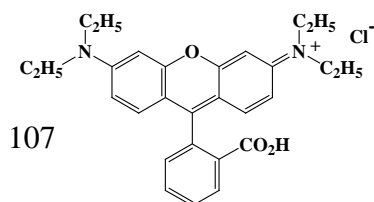
本章では、マイクロアレイ分野で用いられている蛍光色素について、発光の原理、その歴史およびデメリットなどについて解説し、新しい蛍光色素などの紹介を行う。

#### (1) 機能性色素の歴史

機能性色素の歴史は古く、1845 年イギリスのジョン・フレデリック (Sir John Frederick) により、始めて 450 nm（青色）の蛍光が観測されたことをきっかけに、1871 年にフルオレセイン (Fluorescein)、1887 年にはローダミン (Rhodamine) など、発光現象を示す有機化合物が発明された（図 4-1）。



(1)



(2)



図4-1. Fluorescein と Rhodamine の化学構造式

フルオレセイン (1) やローダミン (2) は、大変古い蛍光色素であるが、現在でもタンパク質などの標識剤として細胞の組織染色などに多く用いられている。また、この他にも多くの蛍光色素が開発されており、私たちの身の回りでも多く用いられている。

## (2) 発光のメカニズム

分子生物学分野で多用されている蛍光色素は、フォトルミネッセンスによる発光が殆どである。ここでは、その発光メカニズムを解説する (図4-2)。

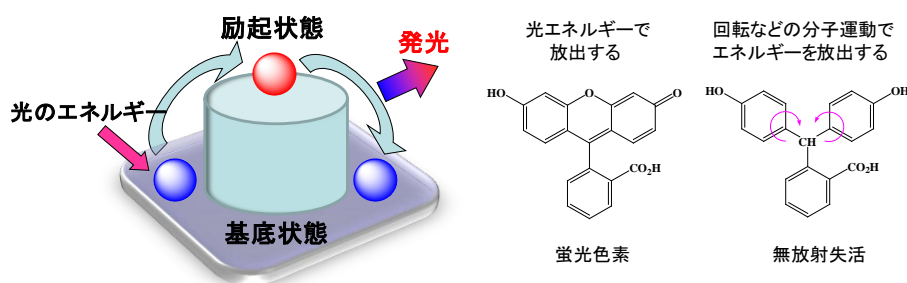


図4-2. 発光のメカニズムと蛍光色素の化学構造

分子がエネルギーを吸収していない状態、つまり、エネルギーを持たない状態が基底状態と呼ばれている。基底状態にある化合物に光を当てるとその化合物の分子が光のエネルギーを吸収し、エネルギーの高い状態になる。この分子状態を励起状態と呼ぶ。励起状態となった分子は、エネルギーを放出して基底状態に戻ろうとする。そこで、励起状態にある物質は、吸収したエネルギーを光のエネルギーとして放出し、基底状態へ戻る。ここで放出された光のエネルギーが蛍光発光と呼ばれる。一方、分子の骨格が共役系で固定されていない化合物の多くは、吸収したエネルギーを放出する際、分子の回転や振動などの運動により、無放射失活となり蛍光は生じない。また、化学構造が固定されており、回転運動などが少ない場合は、ストークスシフトは小さくなるが、化学構造中に回転運動などが可能な部位のあるものはストークスシフトが大きくなる。

## (3) 吸収波長と蛍光波長

蛍光色素は、全ての波長の光を吸収するわけではなく、効率よく光エネルギーを吸収する特有の波長が存在する。例えば、フルオレセインを分光光度計で測定すると、488 nmに波長のピークが得られる。この波長を最大吸収波長 (excitation wavelength) という。つまり、フルオレセインは 488 nm の電磁波を効率よく吸収して励起されることになる。次に、蛍光分光光度計で 488 nm の光を照射して励起させると、520 nmに蛍光を示す。従って、フルオレセインの蛍光波長 (emission wavelength) は 520 nmとなる。また、最大励起波長 (a) と最大蛍光波長 (b) の波

長間の差 (c) はストークスシフト (stokes' shift) と呼ばれ、蛍光色素が発光前の励起状態で放出されたエネルギーが熱エネルギーに変換されるために生じる (図4-3)。

励起波長と蛍光波長は、その分子骨格に広がる共役系の電子状態によって変化する。言い換えれば、同じ基本構造を持つ蛍光色素であっても、置換基の位置および種類によって大きく変化する。

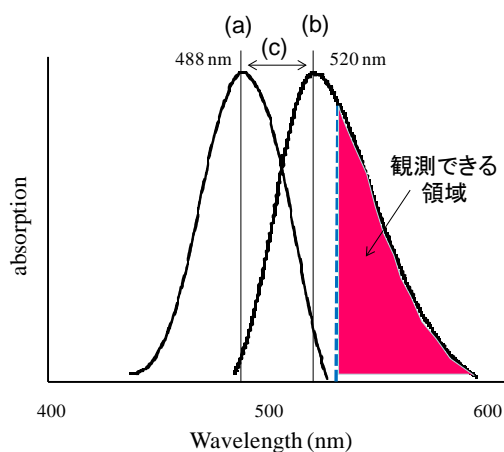


図4-3. 蛍光色素の光学的性質

DNA マイクロアレイなど、分子生物学分野で用いられている蛍光色素のストークスシフトは20-40 nm程度である。スキャナなどを用いてDNA マイクロアレイ基板上の蛍光を観測する際、フィルターを用いて励起光を遮断すると、図に示したように測定しなければならない蛍光の半分以上がフィルターによってカットされることになる。これより、ストークスシフトが大きな蛍光色素を用いることができれば効率よく観測が行えることになる。

#### (4) 従来から用いられている蛍光色素

蛍光色素は、数多く存在しているが、バイオケミストリー分野で主に用いられているものをいくつか挙げている。まず、DNA マイクロアレイに用いられているもので、シアニン構造を持つCy™色素がある。20年ほど前に米国カーネギーメロン大学で開発されたものである。この蛍光色素は、DNA 解析分野で当初より用いられてきた蛍光色素で、DNA 解析分野ではこの蛍光色素以外のものはほとんど使われていない。

フルオレセインは先述したように、19世紀後半に発明されたとても古い蛍光色素である。タンパク質の標識に用いられることが多く、現在でも新しい疾病診断手法にも用いられるほど、息の長い物質である。Alexa Fluor®は、フルオレセインの基本構造を応用して開発された蛍光色素である。これもフルオレセインと同様にタンパク質の検出や細胞などの染色に用いられることが多い (図4-4)。分子生物学分野で用いられている蛍光色素については、次節で、その化学構造や問題点などを詳細に述べる。



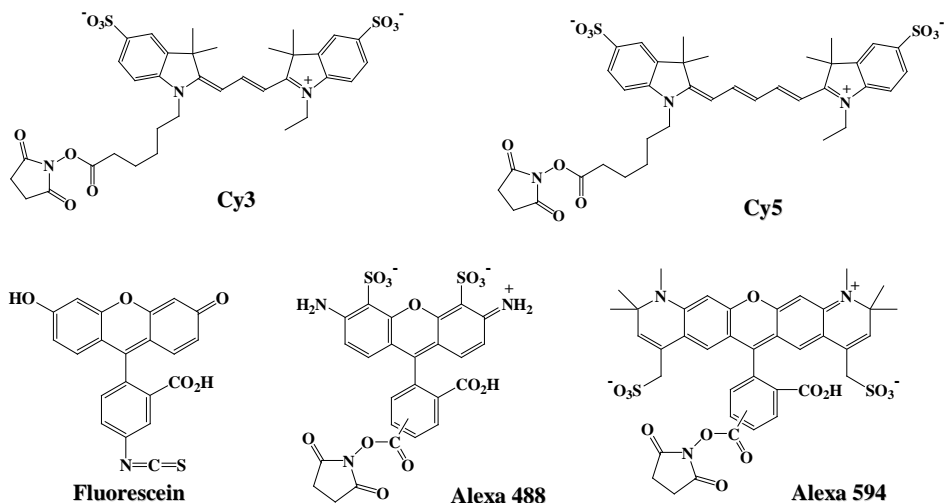


図 4-4. バイオケミストリー分野で主に用いられている蛍光色素

蛍光色素を生体分子への標識試薬として用いるには、生体分子のアミノ基などと共有結合をさせる必要がある。このため、蛍光色素にはイソチオシアネート基、スクシンイミジル活性エステルやマレイミドなどの官能基が取り付けられており、生体分子中にあるアミノ基と求核置換反応をさせることで化学結合させている。

蛍光色素は、DNA や抗体を含むタンパク質を可視化する目的で用いられ、様々なアプリケーション開発が行われている。しかし、この分野で用いられている蛍光色素は、熱や pH などの物理的条件に対する安定性が悪く、アプリケーションによっては深刻な問題となっている。中には、空気中のオゾンで分解する蛍光色素もあり、定量分析においては安定した結果を得ることが困難な場合もある。

#### (5) DNA チップへの応用

DNA チップとは、小さなガラス基板もしくは樹脂基板に疾病など特有の配列をもつ、合成 DNA が固定してある (図 4-5)。

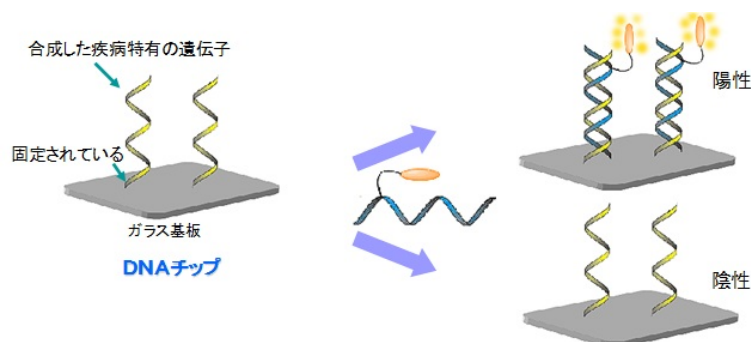


図 4-5. DNA チップの原理

一方、ヒトの細胞から mRNA を取り出し、これを鋳型として相補的な DNA (cDNA) を逆転写し、複製したものに蛍光色素を組み込んだものをつくる。これを DNA チップ上に流し込むことで基盤に固定してある DNA と会合する。お互いに水素結合をつくる塩基配列であれば二重螺旋を組むが、

塩基の配列が一致しなければ二重螺旋にはならない。これを蛍光イメージスキャナで観察すると、二重螺旋を形成したものは蛍光発光によって塩基の配列が一致したことが容易に判断可能である。つまり、いろいろな疾病の遺伝子配列を DNA チップに固定し、人から取りだした遺伝子がどの疾病の DNA と二重螺旋を組んでいるかを知ることで診断が可能になるのである。この検出方法を用いて多くの疾病診断技術や環境ホルモンによるアレルゲン物質の特定に用いられる[7]など、様々なアプリケーションが出現している。

#### 【参考文献】

- [1] 山本重夫 監修：「バイオ検査薬と機器・装置」 CMC 2 (2001).
- [2] C. C. Xiang, O. A. Kozhich, M. J. Brownstein, *Nature biotechnology* Vol. 20, July, 738 (2002).
- [3] M. F. Templin, D. Stoll, T. O. Joos, *TREND in Biotechnology*, Vol. 20, No.4, April, 160 (2002).
- [4] Y. M. Bae, B. Oh, W. Lee, W. H. Lee, J. W. Choi, *Anal. Chem.*, 76, 1799–1803 (2004).
- [5] M. Lesaicherre, M. Uttamchandani, G. Y. J. Chen, *Bioorganic & Chemistry Letters*, 12, 2085–2088 (2002).
- [6] 高橋洋之助, 門脇雅美, 又賀俊太郎, 張学龍, Thies Thiemann 他：「最新機能性色素大全集」, 技術情報協会 3 (2007).
- [7] A. Inoue, M. Tanji, R. Kiyama, *Current Pharmacogenomics*, 4, 245 (2006).

#### 4. 2. 2. DNA チップに利用される蛍光色素 (西健太郎、柏裕樹、磯部信一郎)

オリゴヌクレオチドを蛍光色素で標識して DNA チップに利用する場合、その検出法として1色法と2色法がある。この内、2色法においては、使用される色素の蛍光がはっきり区別されなければならない。そして、どちらの方法にも共通していることは、色素の蛍光強度が維持されることが必要不可欠である。また、オリゴヌクレオチドに標識する際は、緩衝液中で反応が行われる為、化合物自体の水溶性が問われる。この項では、このような問題点を解決した、DNA チップで主に用いられている色素の紹介と使用の拡大が予想される蛍光色素について紹介する。

##### (1) DNA チップで使われる主な色素

近年、DNA チップで主に使われている色素に Cy™ 色素があげられる。発色の強さ、化合物の安定性において優れており、2色法で DNA チップに用いる際には蛍光のスキャンにも利用しやすいという特徴がある。特に、多用されている色素は Cy3™ (緑), Cy5™ (赤) である[1, 2]。Cy™ 色素が使われる以前は、蛍光色素の中でも代表的なフルオレセインやリサミンローダミン B が使用されていた[3, 4]。これらの蛍光色素は多くの研究がなされており、その使い方は確立されていた。その一方で、発色の弱さ、化合物の安定性の低さ、水溶性が不十分である等があり、それらに優れている Cy™ 色素が多用されているのが現状である (図 4-6)。

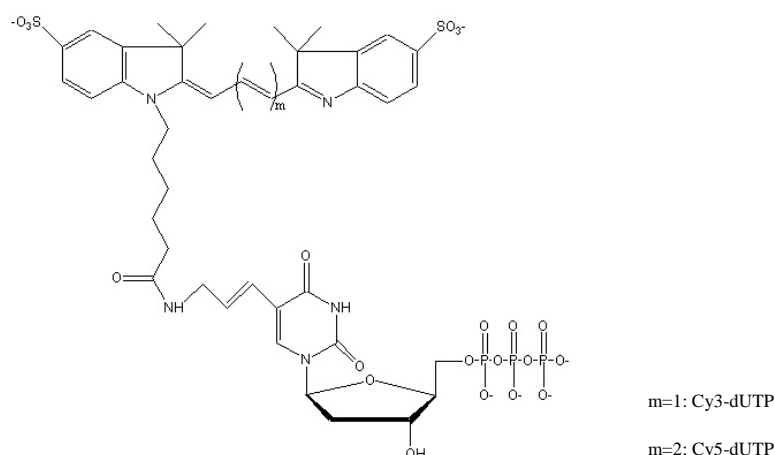


図4-6. DNAチップに使用されている Amersham Cy<sup>TM</sup>-dUTP [5]

Cy<sup>TM</sup>色素の他に使用されている色素には、Alexa Fluor<sup>®</sup>dyeがある[6]。Alexa Fluor<sup>®</sup> dyeは、Fluoreceine様の骨格を基本とした蛍光色素で、多数の種類が販売されている(図4-7)。例えば、Alexa Fluor<sup>®</sup>555やAlexa Fluor<sup>®</sup> 647のスペクトルは、Cy3<sup>TM</sup>とCy5<sup>TM</sup>と同様のスペクトルを示し、Alexa Fluor<sup>®</sup>680とAlexa Fluor<sup>®</sup>750はCy<sup>TM</sup>5.5とCy<sup>TM</sup>7と同じスペクトルを示すことがMolecular Probes社より公表されている[7]。そして、DNAチップ上での遺伝子発現パターンの解析において、Alexa Fluor<sup>®</sup>はCy<sup>TM</sup>で標識するよりも、優れたデータを得ることができると論文で示唆されている[8]。

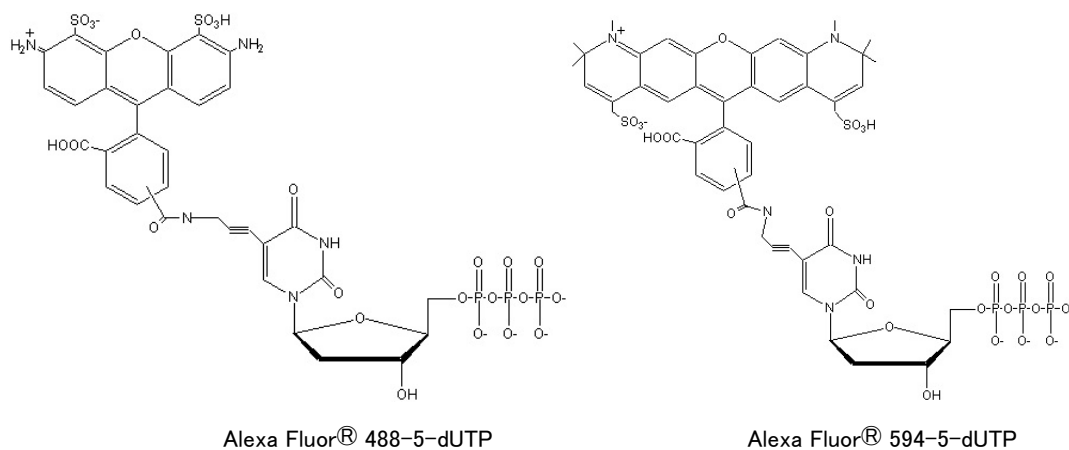


図4-7. Molecular Probes社製 Alexa Fluor<sup>®</sup> dUTPの構造

## (2) DNAチップで使用されるその他の蛍光色素

DNAチップに使用される主な蛍光色素は上述したとおりだが、より良いデータを検出するために汎用性が高い蛍光色素が求められているのは言うまでもない。他の新規蛍光色素としては、Dylight<sup>TM</sup>がThermo Fisher Scientificより発売されている。この色素は、Alexa Fluor<sup>®</sup>よりもさらに水溶性が高く、pH安定性も高い。この色素は、Cy<sup>TM</sup>色素と比較してもDNAチップに使用した場合は、十分に優れたアレイデータを検出できるということが論文で報告されている[9]。また、インターカレーターとして働くSYBR<sup>®</sup> Green IIは、目的のDNAがマイクロアレイ上にスポットさ

れた後、その検出のための染色剤として応用することが報告されている[10]。さらに蛍光色素には、Megastokes™ dye (dyomics) , Oyster® (Denovo biolabels) , Hilyte Fluor™ (AnaSpec) (構造非公開) や ATTO™ (ATTO-TEC) (構造非公開) などがあり、DNA チップに用いる蛍光色素として販売されている

(図4-8)。

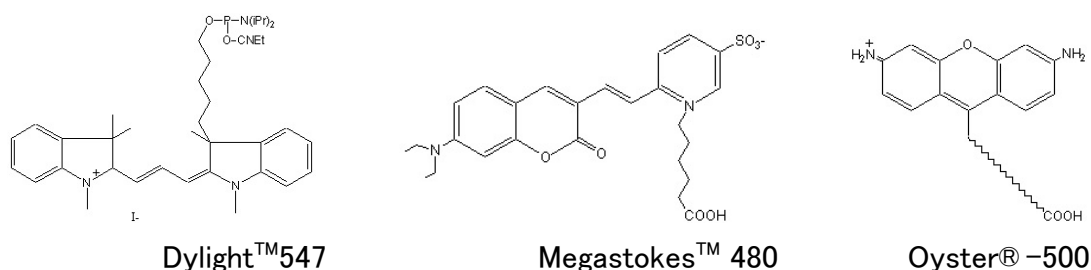


図4-8. 様々な蛍光色素の構造

#### 【参考文献】

- [1] Schena, M. et al. : Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1000 genes. : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 93 : 10614-10619, 1996.
- [2] DeRisi, L. J. et al. : Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. : Science., 278 : 680-686, 1997.
- [3] Schena, M. et al. : Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. : Science., 270 : 467-470, 1995.
- [4] Shalon, D. et al. : A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. : Tenome Res., 6 : 639-645, 1996.
- [5] Yu, H. et al. : Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. : Nucleic Acids Research., 22 : 3226-3232, 1994.
- [6] Voloshina, P. N. et al. : Alexa Dyes, a Series of New Fluorescent Dyes that Yield Exceptionally Bright, Photostable Conjugates. : J. Histochemistry & Cytochemistry., 47 : 1179-1188, 1999.
- [7] The Molecular Probes® Handbook, 11th edition. : Part I-Choosing a Fluorescent Label: Their Properties and Labeling Chemistries. : Chapter 1 - Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives.
- [8] Cox, W. G. et al. : Possible sources of dye-related signal correlation bias in two-color DNA microarray assays. : Anal Biochem., 331 : 243-254, 2004.
- [9] Kretschy, N. et al. : Comparison of the Sequence-Dependent Fluorescence of the Cyanine Dyes Cy3, Cy5, DyLight DY547 and DyLight DY647 on Single-Stranded DNA. : PLoS One., 9 : e85605, 2014.
- [10] Battaglia, C. et al. : Analysis of DNA Microarrays by Non-Destructive Fluorescent Staining Using SYBR® Green II. : Bio Techniques., 29 : 78-81, 2000.

#### 4. 2. 3. Cy 色素の特徴と開発の経緯 (西健太郎、柏裕樹、磯部信一郎)

DNA チップにおいて、最も多用されている色素は Cy<sup>TM</sup> 色素である。Cy<sup>TM</sup> 色素は、1) スルホ基を導入したことで水溶性が高い。2) 元々シアニン系色素を改良したもので蛍光強度が強い。3) 両端のインドール環の間のポリメチンの長さを変えることで異なる色調にできる、という特徴がある。現在、販売されている Cy<sup>TM</sup> 色素は、短波長から長波長までの幅広い蛍光スペクトル領域をカバーしている。ここでは、Cy<sup>TM</sup> 色素の歴史的経緯を踏襲しながらその特徴を紹介する。

##### (1) Cy 色素の構造の歴史

DNA チップに用いられる前の Cy<sup>TM</sup> 色素は、細胞内オルガネラの染色と検出を目的として用いられていた[1]。その後、ジャーナル Cytometry 誌で、Cy<sup>TM</sup> 色素の開発者の Waggoner らにより、2報の論文が発表された。当時の Cy<sup>TM</sup> 色素は、他の分子と結合させるための官能基の検討や抗体などのタンパク質に標識することを目的とし、さらに水溶性を向上させるための検討も行っていた[2, 3] (図4-9)。

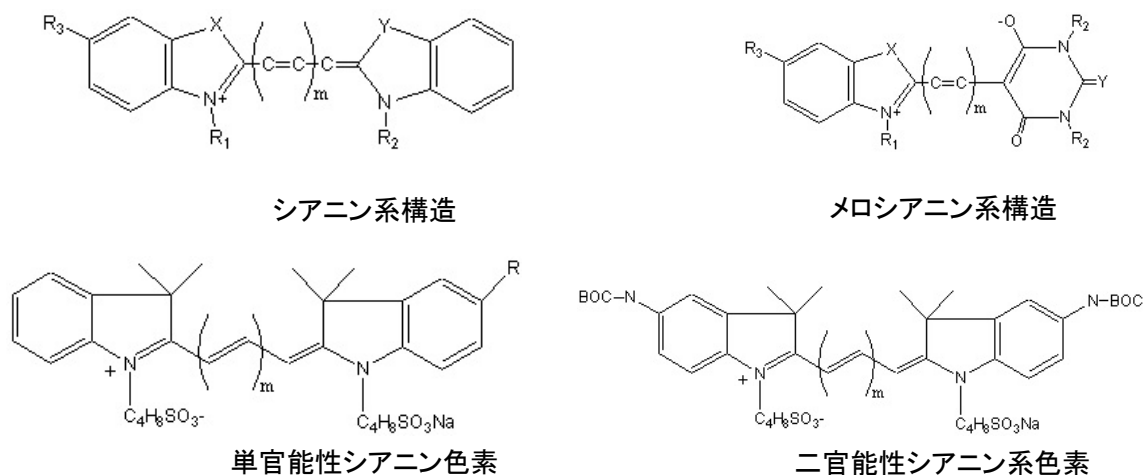
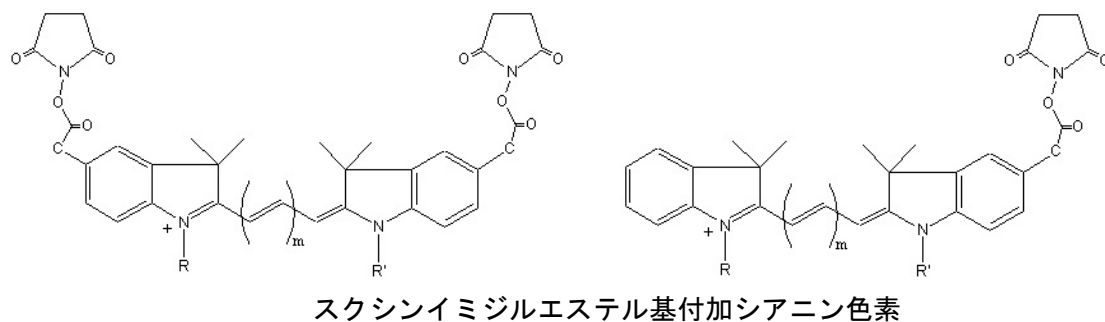


図4-9. 1989年に合成された Cy<sup>TM</sup> 色素の構造

Waggoner らは、1989年以降、Cy<sup>TM</sup> 色素の合成法の確立と Cy<sup>TM</sup> 色素で標識された抗体を用いた、細胞の二重染色のための実験を行っていた[4]。1993年には、ジャーナル誌 Bioconjugate Chemistry に、これまでの Cy<sup>TM</sup> 色素にスクシンイミジルエステル基を導入することで、多くの生体試料に修飾できるようになったことを論文で発表している (図4-10)。この論文の中でも、水溶性の向上に関しては触れられているが、以前と異なる点は、スルホン酸だけを用いて水溶性の向上を図った所である[5] (以前はアリルスルホン酸だった)。



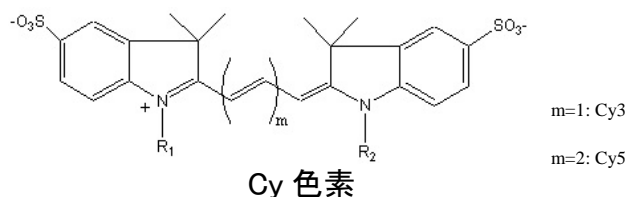


図 4-10. Cy 色素の構造

## (2) Cy 色素と DNA マイクロアレイ

上記の論文の一年後には、Waggoner らは、dUTP に Cy3 と Cy5 をラベリングし、PCR 法によって DNA の合成に成功している [6] (図は前項を参考)。その翌年に、Brown らが初めての DNA マイクロアレイの開発を論文で報告している [7] (1995 年)。さらに一年後、Brown らは蛍光色素を使用した 2 色法による DNA マイクロアレイの開発について報告した [8]。この論文で Brown が使用した色素は、フルオレセインとリサミンローダミン B であった。この時点でも、2 色法によるマイクロアレイでの解析について、データの有用性は示されているが、おそらく蛍光強度と化合物自体の安定性の問題から、DNA マイクロアレイに最適な色素について調査していたのではないかと推測される。実際に、1996 年の DNA マイクロアレイに関する論文では、上記で述べた Cy3 dUTP を使用して論文を発表している [9]。そして、1997 年の 10 月に Brown らは Cy<sup>TM</sup> 色素だけを使用した DNA マイクロアレイの開発に成功している [10]。この後、Brown らは、Cy<sup>TM</sup> 色素を利用して DNA マイクロアレイの開発を行っている。これ以降、他の DNA マイクロアレイの論文においても、ほとんどが Cy 色素を使用しており、これらの研究によって Cy<sup>TM</sup> 色素の有用性が世界中に認められたものと考えられる。

### 【参考文献】

- [1] DeBiasio, R. et al. : Five-Parameter Fluorescence Imaging: Wound Healing of Living Swiss 3T3 cells. : J. Cell Biology., 105 : 1613-1622, 1987.
- [2] Ernst, A L. et al. : Cyanine Dye Labeling Reagents for Sulfhydryl Groups. : Cytometry., 10: 3-10, 1989.
- [3] Mujumdar, B R. et al. : Cyanine Dye Labeling Reagents Containing Isothiocyanate Groups. :Cytometry., 10 : 11-19, 1989.
- [4] Southwick, L P. et al. : Cyanine Dye Labeling Reagents-Carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters. : Cytometry., 11 : 418-430, 1990.
- [5] Mujumdar, B R. et al. : Cyanine Dye Labeling Reagents: Sulfoindocyanine Succinimidyl Esters. : Bioconjugate Chemistry., 4 : 105-111, 1993.
- [6] Yu, H. et al. : Cyanine dye dUTP analogs for enzymatic labeling of DNA probes. : Nucleic Acids Research., 22 : 3226-3232, 1994.
- [7] Schena, M. et al. : Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. : Science., 270 : 467-470, 1995.
- [8] Shalon, D. et al. : A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. : Tenome Res., 6 : 639-645, 1996.



[9] DeRisi, J. et al. : Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. : Nature Genetics., 14 : 457-460, 1996.

[10] DeRisi, L J. et al. : Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. : Science., 278 : 680-686, 1997.

#### 4. 2. 4. 蛍光色素の技術的問題点 (西健太郎、柏裕樹、磯部信一郎)

蛍光色素の最大の問題点は、発光の退色である。例えば、フルオレセインは古くから使われているので色素自体利用しやすい現状があるが、その退色は早い。また DNA チップ上の情報をスキャンする場合、種々のレーザーを照射して色素を発光させて検出するが、レーザー照射により色素化合物が壊れて退色してしまう。

##### (1) Cy 色素と大気中のオゾンの影響

色素自体の発光の弱さや化合物の崩壊による退色以外に、別の要因でも退色する例がある。2003年、Fareらによれば、Cy™色素を使用したDNAチップを作製する場合、チップの2回目の洗浄後、大気中のオゾンに晒されることによって色素は分解が起こり、発色が著しく失われるということを示唆した[1]。この報告の中で重要な点は、DNAチップが20ppbのオゾン濃度に晒されると、1分で色素の退色が始まることである。そしてCy3™とCy5™では、後者の方が著しい退色を引き起こしたと述べている。(論文中にデータはないが、Alexa Flour™647でも同様に退色がみられたと述べている)オゾンを要因としたDNAチップ上のCy™色素の退色に関しては、次のような内容も報告されている。Branhamらは、研究所内のオゾン濃度を軽減するフィルターを使い、DNAチップ上のCy™色素の退色について研究を行った[2]。この論文中でも、大気中に含まれるオゾン濃度が25ppb以下に抑えられなければ、13分でCy5™色素のシグナルは半分以下に退色するという詳細な報告をしている。前述の論文との大きな違いは、Fareらは窒素を封入したボックスにDNAチップを入れ、オゾンに晒されるのを防ぎ退色を遅らせたのに対して、Branhamらは、カーボンフィルターで大気中のオゾンを取り除いて退色を防いだという点である(図4-11)。

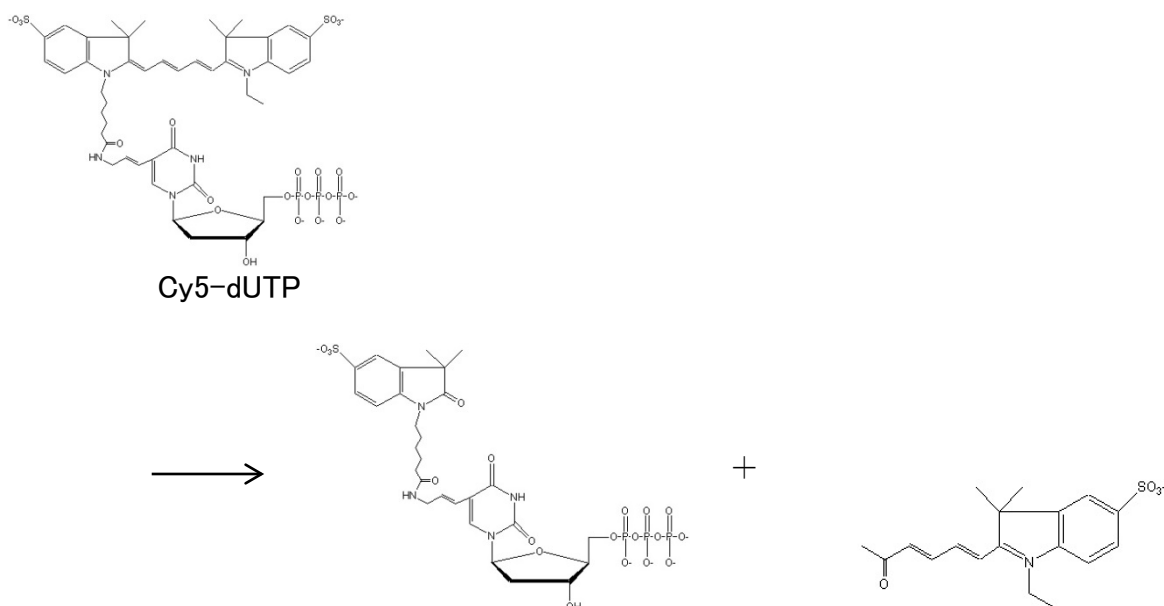


図4-11. 酸化されたCy5-dUTP色素[3]

## (2) 退色防止剤について

大気中のオゾンによる退色に関して、2つの事柄を紹介したが、色素の退色を防ぐにはやはり簡易な方法が望まれる。例えば、退色防止剤を用いる方法がある。退色防止剤には、フェノール系、アミン系、リン系、硫黄系および不飽和炭化水素系があり、これらは封入剤に混ぜて使われることが多い[4]。また退色防止剤の性質としては、主に光によって色素が酸化されるのを防ぐ効果を有する。その使用方法としては、蛍光標識された試料やDNAチップのスライド上に、直接振り掛けるというものが多い。現在、市販されている退色防止剤には、例えば1,4-フェニレンジアミンやプロピルガレートなどがよく使用されている。また、Cy<sup>TM</sup>色素の退色防止剤としてEverBrite<sup>TM</sup>が、Alexa fluor<sup>®</sup>にはProLong<sup>®</sup> Gold antifade reagentなどが販売されている。

今日、蛍光顕微鏡などで試料を観察する際に、退色防止剤は多用されている。ただし、退色防止剤のほとんどは、細胞に対して毒性があるものや、使用者に対して発がん性などの悪影響を及ぼすものがあり、使用の際には十分に注意しなければならない。

ここまでで述べたことからやはり、発色が良く、耐久性にすぐれた新規蛍光色素を開発することが望まれる。

### 【参考文献】

- [1] Fare, L T. et al. : Effects of Atmospheric Ozone on Microarray Data Quality. : Analytical Chemistry., 75: 4672-4675, 2003.
- [2] Branham, S W. et al. : Elimination of laboratory ozone leads to a dramatic improvement in the reproducibility of microarray gene expression measurements. : BMC Biotechnology., 7: 8, 2007.
- [3] Campion, M. et al. : Stability of Cy5 Dye-labelled Nucleotides and Decreasing CyDye Signal Loss in Microarray Experiments. : The 10 Year Anniversary of CHIPS to HITS., Poster.
- [4] Kensaku, T. et al. : Method for detecting biological material. : PATENTS., WO 2013147081 A1, 2013.

## 4. 2. 5. 新規蛍光色素 Fluolid (西健太郎、柏裕樹、磯部信一郎)

蛍光物質を用いる生体イメージング技術は、病理および臨床分野へ応用され、疾患の早期発見および診断を可能とするマーカーを用いた新しい医療技術の開発が進展している。これらの研究開発においては、DNA、タンパク質および抗体などの生体分子を蛍光色素で標識し、基板上で目的分子を染色して画像化する手法が一般化している。標識に用いられる蛍光色素の中でも代表的なものは、前項で説明したように、米国で開発されたCy<sup>TM</sup>色素やAlexa Fluor<sup>TM</sup>などで、大変高価なものである。しかしながら、これらの蛍光試薬は物理的安定性が低いなどの大きなデメリットを抱えているが、安定性の高い蛍光試薬は存在しないため、リスクを抱えながら用いられている。このように、バイオケミストリー分野で用いられている全てのイメージングなどの技術は、欧米が支配しており、日本独自の技術は少ない。

このような背景から、従来の蛍光色素のデメリットを解消した国産初の新規蛍光色素の開発が大学発ベンチャー企業によって行われており、Fluolid という製品名で一部の分野で実用化を果たしている。蛍光色素は、広範なバイオケミストリー分野で多用されることから、多機能的な純国産の蛍光色素開発は極めて有用である。

従来の蛍光試薬は、FITC に類似した骨格やポリオレフィン を有するシアニン骨格のため、酸化などの化学反応を受けやすく、物理的安定性が非常に低い。このため、DNA マイクロアレイや病理検体など、従来の蛍光色素を用いて作製した観察基板を長時間に渡り観察したり、それを保存したりすることは不可能である。一方、Fluolid は、デバイス分野で開発された物理的安定性の非常に高いアゾール系の化学構造を有しており、太陽光発電パネルの波長変換フィルターとして用いることが可能など、物理的安定性が非常に高い。また、結晶の状態でも強く蛍光を示すことや電子線照射においても安定である。また、120-150 nm 程のストークスシフトを有しているなど、これまでの蛍光試薬には見られない物理的性質を有している (図 4-12)。

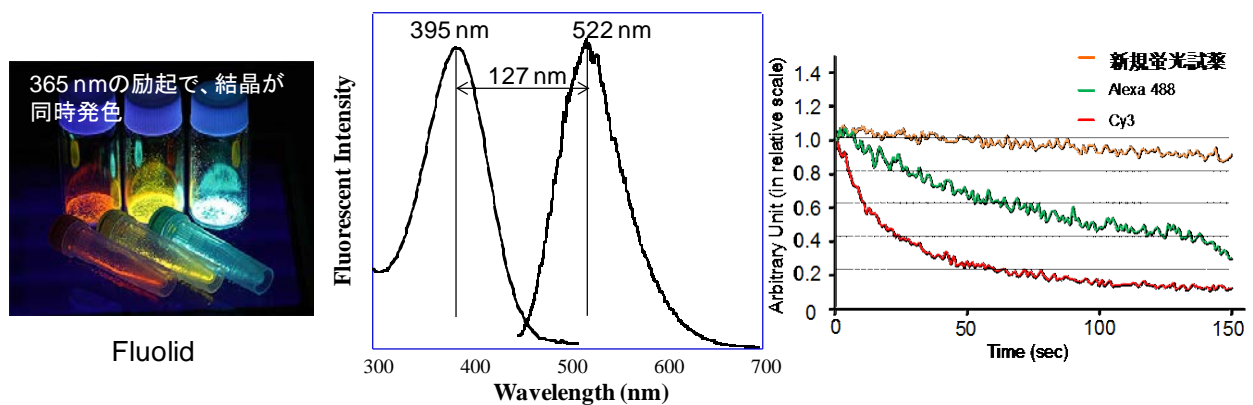


図 4-12. 新規蛍光色素 Fluolid の物理的性質

現在、免疫組織化学染色分野での開発が進んでおり、実用化の領域に達している。このように、高い物理的安定性から、不可能とされていた観察基板のカラーでの標本化が期待される。現在、DNA マイクロアレイ分野での実用化を図るための研究も同時に行われている。参考までに、免疫組織化学分野でのアプリケーション例を紹介する。

これまでに、Fluolid を用いた免疫組織化学染色が検討され、四重染色が可能であることおよび腎がんのステージ診断が可能であることなども確認されている [1] (図 4-13)。

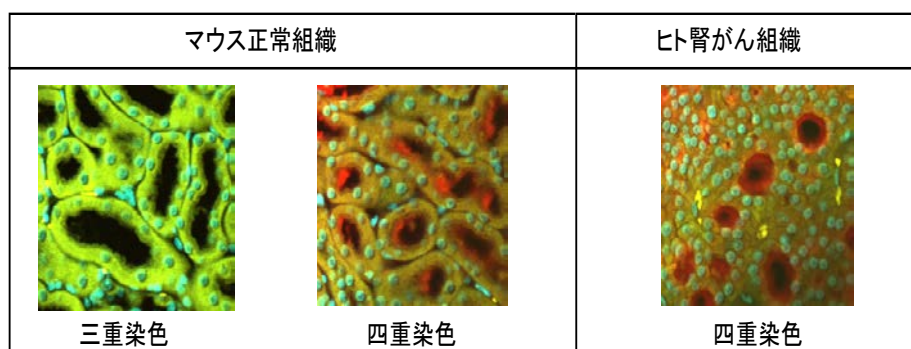


図 4-13. 新規蛍光試薬 Fluolid を用いた四重染色の例

更に、ドラッグデリバリー研究においては、Fluolidで標識された人工リポソームをマウスの腹腔内へ導入し、24時間後に腫瘍の目的部位へ安定に到達したことも確認されるなど、バイオケミストリー分野での実用化が可能となった[2]。画像は、まだ世界で実用化されていない新規蛍光電子顕微鏡プロトタイプ機[3, 4]を用いてFluolidで標識した人工リポソームが、24時間後にマウス腹腔内のガン細胞へ到達したことが確認されている。一方、マイクロアレイ分野においても検討が続いており、逆転写されたcDNAを用いたマイクロアレイの検討が行われている(図4-14)。

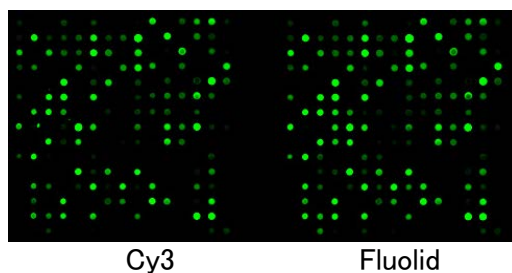


図4-14. Fluolidを用いたマイクロアレイ

スキャナで確認された画像は、Cy3<sup>TM</sup>と同等に用いることが可能なように見えるが、相関係数によると、Fluolidの蛍光強度がCy3<sup>TM</sup>に比べて低いことからバックグラウンドが向上することが判明している[1]。現在、Fluolidを用いたマイクロアレイ分野に適応可能なよう、水溶性および蛍光強度の向上を図るための実用化研究が行われている。

#### 【参考文献】

- [1] Application of Fluolid-Orange-labeled probes for DNA microarray and immunological assays., *Biotechnol Lett*, 33, 1759-1766, (2011).
- [2] Effective transgene expression without toxicity by intraperitoneal administration of PEG-detachable polyplex micelles in mice with peritoneal dissemination., *Journal of Controlled Release*, Vol. 160, Issue 3, 542-551, (2012).
- [3] A fluorescence scanning electron microscope, *Ultramicroscopy*, 109, 344-349, (2009).
- [4] ELECTORON MICROSCOPY SPECIAL ISSUE, *Material Today Supplement 1*, Vol. 12, 41-48, (2010).

#### 4. 2. 6. 蛍光色素の今後の展開 (西健太郎、柏裕樹、磯部信一郎)

DNA および抗体を含むタンパク質などの分析技術においては、蛍光試薬を用いた手法が殆どである。先にも述べたように、これらは全て海外の技術であり、日本独自の技術は殆ど存在しない。欧米を中心に開発された従来の蛍光試薬は、物理的安定性が低く、乾燥することで蛍光を失うなどのデメリットが多い。しかしながら、これらのデメリットを解決した蛍光試薬が存在しないことから、多くの研究者は制限された環境下で研究開発を行っている。また、蛍光色素の安定性が低いことから、実現不可能な技術も多く存在している。それにもかかわらず、蛍光色素の市場は

莫大なもので、日本国内で数百億円とも言われている。また、米国では日本市場の 50 倍程度の規模を抱えている。

今後、医療バイオケミストリー分野は、更に大きく発展することが予想されている。この分野が大きく発展することは、蛍光色素市場も大きく発展することになる。近い将来、従来の蛍光色素のデメリットを解消した蛍光色素の実用化が進み、これまで実現不可能であったアプリケーションの確立などに期待したい。

#### 4. 2. 7. 蛍光に関する訴訟について（中江裕樹）

蛍光色素、およびラベルの方法については、開発各企業の利益確保を目的とした各社の特許が複雑に関係し、マイクロアレイ開発や原価低減に対する制限事項となっている。2014 年 1 月にも、米国の連邦裁判所が、ライフテクノロジーに対する特許訴訟において、Enzo という会社に対して 12.4 ミリオンドルの追加賠償金の支払いを命じる裁定を下したことを、genomeweb が伝えている [1]。最終的には 2012 年に支払いが命じられている 49 ミリオンドルと合わせ、61 ミリオンドルに利子等を加えた金額に上るとみられている。この訴訟では、Enzo が関係する 6 つの特許について争われ、最終的に Yale 大学の色素ラベルされたオリゴ核酸に関する特許 5,449,767 が対象となっている。このように、色素に関しては、ライセンスまたその費用についての懸念があり、マイクロアレイによる産業化を推進するためには、国内での相互ライセンスなどを意識した、開発やビジネスマッチングが重要であると考えられる。

#### 【参考文献】

[1] genomeweb January 06, 2014, “Federal Court Awards Enzo Additional \$124M Related to IP suit Against Life Tech” .

#### 4. 3. 遺伝子検査関連の国際標準化（中江裕樹）

遺伝子関連の標準化について、ここ数年で、我が国がリードするケースが出てきた。遺伝子検査が関連する診断、検査だけでなく、マイクロアレイによる解析に関する基本的な規格提案が、日本から提案され国際標準として発行され、さらにバイオテクノロジー全般の標準化に対するチャネルが構築されており、今後標準化活動はますます活性化すると考えられる。

ISO では、多くの産業分野に対応するため、多くの TC（専門委員会）およびその下部組織である SC（分科委員会）に分かれて規格を作成している。ここでは遺伝子検査に係る 3 つの TC および SC（図 4-15）、すなわち、TC34/SC16（分子生物指標の分析に係る横断的手法）、TC212（臨床検査及び体外診断検査システム）、TC276（バイオテクノロジー）について、動向を紹介する。

##### 4. 3. 1. ISO/TC 212 臨床検査及び体外診断検査システムの動向

ISO/TC 212 では、ライフサイエンス分野における重要課題である医薬の安全や、医療の質の向上に係る規格が作られている。TC 212 は、臨床検査と体外診断検査システム及び関連試薬装置の分野、特に用語、試験、保守・操作、性能及び設計原則における規格を制定する技術委員会



であり、この下に4つWGすなわち、WG1（臨床検査室における品質と能力）、WG2（基準測定システム）、WG3（体外診断用製品）及びWG4（抗菌薬感受性検査）が設置され運営されてきた。規格制定に係る実質審議は、それぞれのWGで対応し、TC 212の国際会議は、毎年1回の頻度で開催されている。

|  |
|--|
| <p><b>ISO/TC34/SC16</b><br/> <b>食品専門委員会</b> 分子生物指標の分析に係る横断的手法に係る分科委員会<br/> <b>国内審議団体：</b> 農林水産消費安全技術センター (FAMIC)<br/> <b>キーワード：</b> 食品検査、GMO（遺伝子組換え食品）、マイクロアレイ、プラットフォーム検出限界 (LODP)、信頼性区間</p> |
| <p><b>ISO/TC212</b><br/> <b>臨床検査と体外診断用検査システム専門委員会</b><br/> <b>国内審議団体：</b> 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS)<br/> <b>キーワード：</b> 臨床検査、多項目解析、マイクロアレイ、核酸品質、精度管理 ほか</p>   |
| <p><b>ISO/TC276</b><br/> <b>バイオテクノロジー専門委員会</b><br/> <b>国内審議団体：</b> 再生医療イノベーションフォーラム (FIRM)<br/> <b>キーワード：</b> 用語の定義、オリゴ品質 ほか</p>   |

図4-15. 遺伝子検査に係るISO 専門委員会

遺伝子検査の国際標準化が行われている主な専門委員会。食品を対象としたバイオマーカー検査についてはISO/TC 34/SC 16、検査室と臨床検査薬に関する企画はTC 212で、それぞれ分担して規格開発が行われている。また2013年には、バイオテクノロジーの専門委員会TC 276が新設された。

昨年11月にシンガポールで開催されたTC 212の国際会議において、WG4が臨床検査室における測定方法 (Medical laboratory measurement procedures) をスコープとして、これまでの抗菌薬感受性検査の他、核酸検査や、欧州で行われたSPIDIAプロジェクトから提案される規格案の審議を含め、広いスコープで新たに進められることとなった。これには、TC212で測定前プロセスに関する規格作成が活発化しているという背景がある。これまでもWG1において、測定前プロセスの基本的なTRについての議論が進められてきたが、最近になってこれに加えて、韓国が病原体の検出に関わり一部測定前プロセスにかかわる提案を行ってきたこと、またSPIDIAが、プロジェクトの成果を踏まえて開発している規格案の議論を提案してきことが顕著な例である。また、我が国も、同じシンガポールの総会で、多項目解析にかかわる核酸の品質評価に関わる国際標準の開発提案をPWIとして提案し、全会一致で承認されている。このTCの特徴として、各国のレギュレーションが関わっていることから、多くの議論が、直接NWIPとして提案されるのではなく、その前のPWIで十分な議論を積んでから、実際の規格開発プロセスに移行するのが通例である。日本提案の可決は、まさに国際標準への一歩となったと考えられる。

#### 4. 3. 2. ISO/TC 276 バイオテクノロジーの動向

TC276は、2013年に設立された新しいTCである。これまで、バイオテクノロジーの標準は、様々なTCに分散して議論、作成されてきた。しかし、それぞれのTCには、決められたScopeが



あり、バイオテクノロジーの製品・技術によっては議論できる TC がなく、国際標準を開発できないという不満がこの分野に広がっていた。TC276 は、このような行き場のない国際標準の受け皿となる TC である。産業分野というより、技術分野でくられたこの TC の設立には、当初 Scope が広すぎるなど様々な批判があったが、2013 年 12 月に第一回の会議が開催され、そこで Scope が決まり、TC として正式に活動する道のりを歩み始めたところである。

現在は、ドイツを議長国とし、用語と定義(ドイツ)、バイオバンクとバイオリソース(フランス)、解析手法(アメリカ)、バイオプロセッシング(日本)の 4 つのタスクグループが作られ、ビジネスプランの検討が始まっているところである。

日本は、特に再生医療の国際標準を議論する場にしたいという思いで活動を継続し、この思いは、これまでの活動の中で、参加各国に認識されつつある。この TC において、特定分野で日本がイニシアチブをとることで、バイオテクノロジー全般の国際標準化についても、そのチャンネルがしっかりと確保されていくと考えられる。

#### 4. 3. 3. その他の標準化動向

食品検査の分科委員会である ISO/TC34/SC16(分子生物指標の分析に係る横断的手法分科委員会)では、GMO の検出を含む、様々なバイオマーカーの分析手法に関する議論および規格開発が行われている。この SC において、バイオチップコンソーシアムが中心となって、日本発のマイクロアレイに関する国際規格の開発が行われた。2010 年に東京で開催された同 SC の国際会議により、規格開発のプレゼンテーションを実施、その後マイクロアレイの測定に関する一般的要求事項と定義についての規格案を作成する NWIP を提出、ISO の手続きに従って議論、修正、投票を繰り返し、ISO16578 と付番された国際標準が、2013 年 10 月に各国投票により可決され、同年に発行された。この国際標準は、マイクロアレイという、ゲノム時代以降の最先端の測定手法が国際標準となった最初の例と考えられ、日本にとっても医療・バイオの分野で国際標準をリードできることを実証した重要な例であり、今後の礎となった成果であると考えられる。

国際標準化は ISO だけに限らない。上述の国際標準開発の過程で、ISO/TC34/SC16 と、FGED という団体とのリエゾンを構築した。FGED は、The Functional Genomics Data (FGED) Society の略で、1999 年に、MGED (Microarray Gene Expression Data Society)として設立された。マイクロアレイデータの標準形式である MIAME フォーマットをはじめ、ファンクショナルゲノミクスにかかわる様々なデータの標準化に取り組んでいる団体である。ISO16578 が測定内容に特化した規格であったため、積極的にこのリエゾンが利用されることはなかったが、ISO 以外にも標準化が進められているケースがあるため、標準の開発には、重複した作業の排除や、標準の整合性確保のため、調査を継続しながら、進めていく必要がある。遺伝子検査は、今後、検査データだけでなく、臨床情報などのデータベースと接続されるようになっていくと考えられる。このような基盤を構築する際には、インタフェースを国際標準として定義するなど標準化を意識した開発が不可欠となってくるであろう。

## 5. まとめ（木山亮一）

### 5. 1. 診断用 DNA チップに関するまとめ

DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイリング技術の応用については、医薬品や食品、診断および予後予測の試験、そして環境工学といった、いくつかの産業分野に広げられている。まず、DNA チップを用いた遺伝子発現プロファイリングは、炎症や心不全、がんの治療薬の開発に用いられている[1-3]。この分野における DNA チップ技術の有用性は、試料のサイズと試験にかかる時間を減少させるとともに、その有効性および毒性について予測するのに用いるマーカー遺伝子の数を増やすことを可能にすると考えられる。例えば、発現プロファイリングを用いることで遺伝毒性効果と非遺伝毒性効果が区別でき、またその作用のメカニズムに関する情報が得られる。次に、この技術は機能性食品の開発や食品の安全評価に使われてきた。DNA チップは、遺伝子組換え体（GMOs）の遺伝子発現の変化を検出して安全性を評価するための重要な技術の一つに掲げられている[4]。第三に、応用されている分野として重要なものに、診断および予後予測の試験などの医療機器の技術があげられる。しかしながら、多くの研究者によって、これまでに発表された報告書の多くは適切なパラメーターやアルゴリズムに基づいて適切な統計的評価を行うことが必要であるということが指摘されている[5]。最後に、別の重要な分野として毒性学の研究（トキシコゲノミクス）および環境リスクアセスメントがあげられる。トキシコゲノミクスの研究では、毒物やその作用様式に関する遺伝子発現について、偏りがなく包括的な、時として新規性のある情報を DNA チップのデータから得ることができるとしているが、コストパフォーマンスやデータの質、プロトコルの標準化、生理学のデータとの整合性に関していくつかの技術的な困難や問題が存在することも明らかにされている[6]。

DNA チップの診断利用については、DNA チップアッセイを行う前の段階、すなわち、手術中に試料を採取するステップ（組織の処理および短期間の保存）、取り扱いのステップ（輸送および長期間の保存）、試料調製のステップ（抽出および精製、保存）、そして品質評価のステップ（ブレアナリシスステップ）などが重要である。試料の準備は遺伝子発現のデータの質に影響するため、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料の取り扱いには細心の注意が払われてきた[7]。しかしながら、FFPE 試料の収集と保管については病理学の研究室において日常的な作業として行われてきたにもかかわらず、たいてい RNA の品質は良くなく、また基準値に基づく適切な品質管理プロトコルに基づいて実施されなければ、DNA チップアッセイに適する品質は得られない。しばしば DNA チップのデータの信頼性について議論がなされているように、生物学上の違いや実験上の違い、そして技術的な違いから生じるバラつきについても検討が必要である。偽陽性率および予測可能性などの性能や、コストや自動化といった商業化の際のメリットについては、免疫組織化学や蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法（FISH）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、そして DNA チップ技術について検証が行われたほか、RT-PCR に基づいた Oncotype DX および DNA チップを利用した MammaPrint という 2 つの製品についても比較検証が行われている[8]。

DNA チップ技術には様々なメリットとともにデメリットもまた存在しているが、これらの技術を区別する重要なポイントの一つは使用されるマーカーの数である。例えば、Oncotype DX では 21 個の遺伝子が使用され、MammaPrint では 70 個の遺伝子が使用されている。一般的に、マーカーの数は免疫組織化学および FISH の場合には一つから数個、RT-PCR の場合には数個から数十個、

そして DNA チップ技術では数十から数百個以上となっている。従って、これらの技術はその内のどれが最も優れているというのではなく、必要性和状況に応じて共存できるものである。

## 5. 2. 遺伝子診断の将来と医療機器について

最近では、特定のシグナル伝達経路に関する研究を進めるうえで、様々なメジャーあるいはマイナー経路から成る、より高次かつ複雑なネットワークについて包括的な分析を行う必要がある。このため、DNA チップによる遺伝子発現プロファイリングは伝達経路の解析に用いられてきた。これらのネットワークは、リガンド-受容体相互作用や、受容体間クロストーク、バイパスカスケード、阻害活性/促進活性、そしてアゴニスト/アンタゴニスト作用に関する分析から明らかとなったものである。そして現在、DNA チップアッセイによって非常に多くの数の高次ネットワークが同定されている。DNA チップは例えば、MAPK や血管新生、核内受容体、ErbB/HER、ユビキチンあるいはプロテアソームのシグナル伝達などをはじめとする、様々なシグナル伝達経路に対して用いられてきたほか、クロマチン制御やエピジェネティック制御、アポトーシス、自食作用、細胞代謝、翻訳調節、細胞周期および DNA 損傷、細胞骨格の制御や細胞接着といった種々の細胞機能に対して、また免疫学や炎症、神経科学、発生、分化などの様々な高次の機能に対しても用いられてきた (表 5-1)。

**表 5-1. マイクロアレイおよびシグナル伝達経路**

| 経路/カスケード/機能              | 同定された遺伝子 <sup>a</sup>                 | 参考文献                     |
|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| <b>MAPKシグナル伝達</b>        |                                       |                          |
| GPCR/MAPK                | 低分子量GTPアーゼ/アポトーシスシグナル伝達               | Chang et al., 2009       |
| NF- $\kappa$ B/MAPK/ERK  | PI3K/Akt/mTOR                         | Mendes et al., 2009      |
| MAPK/JNK                 | ミトコンドリア機能関連遺伝子                        | Cizková et al., 2008     |
| <b>その他のシグナル伝達</b>        |                                       |                          |
| 血管新生シグナル伝達               | HIF-1 $\alpha$ -依存遺伝子                 | Copple et al., 2011      |
| 核内受容体シグナル伝達              | PPAR $\gamma$ -随伴遺伝子                  | Lee et al., 2012         |
| ErbB/HERシグナル伝達           | 足場受容体                                 | Nakaoka et al., 2007     |
| ユビキチン/プロテアソームシグナル伝達      | NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B シグナル伝達遺伝子 | Granese et al., 2013     |
| <b>クロマチン/エピジェネティック制御</b> |                                       |                          |
| ヒストン修飾                   | Hdac1 (ヒストンデアセチラーゼ)                   | Reichmann et al., 2012   |
| ヘテロクロマチン                 | HP1-制御遺伝子                             | Lee et al., 2013         |
| DNAメチル化                  | SCARA5 (スカベンジャー受容体)                   | Khamas et al., 2012      |
| <b>アポトーシス</b>            |                                       |                          |
| 感染応答                     | NF- $\kappa$ B/p53/RB/JUN/アポトーシス遺伝子   | Faherty et al., 2010     |
| ウイルス誘発アポトーシス             | p53/caspase-1                         | Nasirudeen and Liu, 2010 |
| 細胞死受容体シグナル伝達             | FAS誘発アポトーシス遺伝子                        | Wang et al., 2007        |
| <b>自食作用</b>              |                                       |                          |
| 飢餓ストレス                   | 自食作用関連遺伝子                             | Burgess et al., 2012     |
| PI3K/Akt/FOXO/mTOR       | グルタミン合成酵素                             | van der Vos et al., 2012 |

---

## 細胞代謝

|                 |             |                        |
|-----------------|-------------|------------------------|
| インシュリン受容体シグナル伝達 | 代謝プロセス関連遺伝子 | Bolukbasi et al., 2012 |
| AMPKシグナル伝達      | AMPK活性化因子   | Solskov et al., 2012   |

## 翻訳調節

|                   |                           |                          |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| eIF2シグナル伝達        | tRNAプロセッシング遺伝子            | Saikia et al., 2012      |
| eIF4/p70S6Kシグナル伝達 | eIF4因子                    | Villas-Bôas et al., 2011 |
| mTORシグナル伝達        | TGF- $\beta$ /MINK1/SMAD2 | Grzmil et al., 2011      |

## 細胞周期/DNA損傷

|                    |             |                        |
|--------------------|-------------|------------------------|
| G1/Sチェックポイント       | EIF2活性化因子   | Stockwell et al., 2012 |
| G2/M DNA損傷チェックポイント | RB/E2F/ECT2 | Eguchi et al., 2007    |

## 細胞骨格の制御および癒着

|            |                     |                           |
|------------|---------------------|---------------------------|
| アクチンダイナミクス | PKC $\delta$ /コフィリン | Wada-Kiyama et al., 2012  |
| 微小管動態      | Formin1             | Simon-Areces et al., 2012 |
| 接着結合ダイナミクス | 糖尿病関連遺伝子            | Caramori et al., 2012     |

## 免疫学および炎症

|                 |                    |                     |
|-----------------|--------------------|---------------------|
| 炎症反応            | miR-155/Jak/ STAT  | Kutty et al., 2010  |
| サイトカイン受容体シグナル伝達 | TLR/IL-1R          | Abend et al., 2012  |
| T細胞活性化          | NF- $\kappa$ B/Rel | Chang et al., 2012  |
| TLRs誘導炎症        | TLR4応答性遺伝子         | Yang et al., 2012   |
| B細胞受容体シグナル伝達    | サイトカイン             | Franke et al., 2011 |
| リウマチ性関節炎        | T細胞受容体             | Kim et al., 2011    |

## 神経科学

|          |            |                       |
|----------|------------|-----------------------|
| アルツハイマー病 | 神経性疾患関連遺伝子 | Walker et al., 2004   |
| パーキンソン病  | FOXO1      | Dumitriu et al., 2012 |

## 発生および分化

|                          |                |                      |
|--------------------------|----------------|----------------------|
| Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達 | Wnt随伴遺伝子       | Nguyen et al., 2012  |
| Notchシグナル伝達              | RBファミリー遺伝子     | Viatour et al., 2011 |
| ヘッジホッグシグナル伝達             | 盲目/ヘッジホッグ制御遺伝子 | Nfonsam et al., 2012 |
| TGF- $\beta$ シグナル伝達      | 角膜ジストロフィー随伴遺伝子 | Choi et al., 2009    |

---

詳細は文献[16]参照。経路およびカスケード、機能の分類は、Cell Signaling Technology社 (<http://www.cellsignal.com/>) のものに基づいている。aマイクロアレイアッセイ、およびその後のRT-PCRやウエスタンブロット法などの性質決定によって同定されたタンパク質あるいは細胞因子。AMPK=AMP活性化タンパク質キナーゼ、eIF=真核生物翻訳開始因子、FOXO=フォークヘッドボックスO、GPCR=Gタンパク質共役型受容体、IGF-1=インシュリン様増殖因子1、IL-1R=インターロイキン1受容体、JNK=c-Jun N末端キナーゼ、MAPK=分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ、mTOR=哺乳類ラパマイシン標的タンパク質、PI3K=フォスファチジルイノシトール3キナーゼ、PPAR $\gamma$ =ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 $\gamma$ 、RB=網膜芽細胞腫、TLR=Toll様受容体。

同時に、シグナルメディエーターやホルモン、成長因子、がん遺伝子あるいは腫瘍抑制因子についての経路を表す遺伝子を含む特定のシグニチャーは、乳がんの診断などといった応用例で役に立っている[9]。しかしながらこうしたアプローチでは、目的に最も適したシグニチャーを見出すために経路に基づいた遺伝子発現プロファイルの解析がより多く行われる必要があり、これまでに商業化できたものはごくわずかしかない。トランスクリプトミクスだけがこれらの応用

例に関係のある経路を理解するために用いられている技術というわけではないことには留意しておくべきであり、将来はプロテオミクスやメタボロミクスといった他の「omics」と総称される技術もトランスクリプトームのデータとは別に用いられるか、それらと組み合わせられて使用されると考えられる。同様に、DNA メチル化やヒストン修飾、非翻訳 RNA などで観測されるようなエピジェネティックな変異についても、その利用が現実のものになってきた[10]。

イノベーションの後に、いつでも即座に商業化がなされたり市場での成功を納めたりするわけではない。技術の開発から商業化における成功に至るまでの難しさは、死の谷という言葉で表わされている。このような困難は、部分的には 1990 年代後半に DNA チップ技術によってみごとに打破されたものの、これは様々なゲノムプロジェクトにおいてハイスループット技術を求める声が高まったことによるところが大きい。彼らはこの技術を用いて特定の機能を持った遺伝子のスクリーニングや、新たに同定された発現遺伝子配列断片 (ESTs) や出自不明の cDNA の断片の分析を行い、それらの潜在的な機能を見つけ出そうとしていたのである。このような目的に対して包括的 DNA チップは有用であり、Affymetrix 社や Agilent Technologies 社、Illumina 社をはじめとするいくつかの会社がこの種の DNA チップを作製した。しかしながら多くの研究者の努力は、各々の用途で用いることができる専用の遺伝子あるいはシグニチャーのセットを見つけ出すことに向けられてきた。個別化医療の流れがあるため、専用のシグニチャーはその重要性を増していこう。また、種々の「omics」技術によって得られるような分子レベルでの情報により、新たな健康管理の規範が形成されるだろう。このような特異化は、技術が死の谷を越えて一般化という次のステージに進むための重要なステップである。一般化とは、例えば医療機器あるいはリスク評価用ツールを政府が承認し、便利なツールであることが広く浸透するとともに市場において安定性と競争性を得ることで、成し遂げられるものである。ELISA やその派生系などをはじめとするイムノアッセイはこのプロセスを経て成長した。

技術が公共の場あるいは産業において安定して認められるようになるための重要なステップが、その標準化である。標準化とは技術標準を開発し利用することで、(一つの供給先に頼ることのない) コモディティ化や互換性、相互運用性、安全性、再現性、品質を得るプロセスのことである。DNA チップデータの信頼性に対する批判を受けて、アメリカ合衆国食品医薬局が 2006 年に組織した学術、政府および商業の 51 の機関からなるマイクロアレイ品質管理 (MAQC) コンソーシアムによって、DNA チップの規格化が開始された[11]。2つの活動時期 (MAQC-I および MAQC-II) を経て、MAQC によって DNA チップの国際コミュニティに品質管理ツールとプロトコルのガイドライン、パフォーマンスの評価に対する閾値と限界値、そして薬理ゲノミクスとトキシコゲノミクスにおけるベストプラクティスモデルをもたらした。MAQC コンソーシアムは、臨床および規制において利用するために DNA チップ技術が信頼できるツールであると評価するための枠組みを報告した。この枠組みは、例えば試験されたプラットフォームにおける変動係数 (CV) のメジアンは 5~15% であり一致率は 80~95% であることなどとしている (MAQC-I [12])。またデータの前処理および標準化の方法や、臨床データや毒性学のデータを用いてパターンを識別しかつシグニチャーを同定するアルゴリズムおよびプロトコルについての検査を行い、ゲノムの分類指標、すなわち特定の病的状況を表す遺伝子シグニチャーの模範例も報告した (MAQC-II [13])。

MAQC の活動のすぐ後に、ヨーロッパ諸国や日本などの他の国によって、遺伝子に基づいた診断試験に用いる臨床試料の品質を管理するための分析時および分析前のステップの標準化が進めら



れた。SPIDIA（体外診断用医薬品のための遺伝子を用いた分析前のツールおよび手法の標準化と改良）は、ヨーロッパ連合が出資する4年半にわたるプロジェクトであり、体外診断用医薬品のための測定前手法を標準化し、改良することを目的としている。SPIDIAの活動は、分析前の検査に関するガイドラインおよびツール、プロトコルを証拠に基づいて作成すること、および品質管理用のバイオマーカーを開発することに向けられている[14]。最近の報告では、ヨーロッパの102の研究所における血液試料の分析前の段階について、異なる条件下において様々な採血管を用いて抽出を行った後のRNAの安定性および質に関する評価を行っている[15]。一方で、日本政府もまた企業や学術施設、官公庁に対して産業開発目的の場合

([http://www.meti.go.jp/policy/mono\\_info\\_service/service/iryoku\\_fukushi/](http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryoku_fukushi/)) と、医療品承認目的の場合のガイドラインおよび手引き

(<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/iryokiki/iryokiki-list.html>) を提供している。同時に、DNAチップおよび遺伝子発現に基づく体外診断用機器についての標準化が、国際標準化機構の212専門委員会（ISO/TC 212）によって進められてきた。この委員会は臨床検査および体外診断検査システムに主眼をおいており、品質管理をはじめ、分析前および分析後の手順や、分析時のパフォーマンス、研究室における安全性、参照方式、そして品質保証を対象としている。一方で新たに組織されたISO/TC 276では、「omics」技術に基づいた分析手法に主眼が置かれている。

しかしながら標準化のプロセスにおいて、企業間での激しい競争というのは起こるものであり、また商品の品質やパフォーマンス、コストあるいは特許の強さが他社に比べて低いという理由ではなく、その商品に標準化に適合したツールおよびプロトコルが含まれていないがために、商業化が中断されうることもある。こうした意味で、政府や、MAQCおよびSPIDAをはじめとする地域のコンソーシアムが担う役割というのはこれまで以上に大きなものとなるだろう。

#### 【参考文献】

- [1] Palayoor ST, J-Aryankalayil M, Makinde AY, Cerna D, Falduto MT, Magnuson SR, Coleman CN. (2012) Gene expression profile of coronary artery cells treated with nonsteroidal anti-inflammatory drugs reveals off-target effects. *J Cardiovasc Pharmacol* 59(6):487-499.
- [2] Lara-Pezzi E, Terracciano CM, Soppa GK, Smolenski RT, Felkin LE, Yacoub MH, Barton PJ. (2009) A gene expression profile of the myocardial response to clenbuterol. *J Cardiovasc Transl Res* 2(2):191-197.
- [3] Le Fevre AC, Boitier E, Marchandeu JP, Sarasin A, Thybaud V. (2007) Characterization of DNA reactive and non-DNA reactive anticancer drugs by gene expression profiling. *Mutat Res* 619(1-2):16-29.
- [4] Kuiper HA, Kok EJ, Engel KH. (2003) Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Curr Opin Biotechnol* 14(2):238-243.
- [5] Michiels S, Koscielny S, Hill C. (2005) Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. *Lancet* 365(9458):488-492.



- [6] Fent K, Sumpter JP. (2011) Progress and promises in toxicogenomics in aquatic toxicology: is technical innovation driving scientific innovation? *Aquat Toxicol* 105(3-4 Suppl):25-39.
- [7] Fan JB, Hu SX, Craumer WC, Barker DL. (2005) BeadArray-based solutions for enabling the promise of pharmacogenomics. *Biotechniques* 39(4):583-588.
- [8] Ross JS, Hatzis C, Symmans WF, Pusztai L, Hortobágyi GN. (2008) Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *Oncologist* 13(5):477-493.
- [9] Fu J, Jeffrey SS. (2007) Transcriptomic signatures in breast cancer. *Mol Biosyst* 3(7):466-472.
- [10] Reamon-Buettner SM, Mutschler V, Borlak J. (2008) The next innovation cycle in toxicogenomics: environmental epigenetics. *Mutat Res* 659(1-2):158-165.
- [11] Nat. Biotechnol. (2006) Making the most of microarrays (Editorial). *Nat Biotechnol* 24(9):1039.
- [12] MAQC Consortium. (2006) The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol* 24(9):1151-1161.
- [13] MAQC Consortium. (2010) The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models. *Nat Biotechnol* 28(8):827-838.
- [14] SPIDIA, EU. (2013) SPIDIA Newsletter, 03/2013.
- [15] Pazzagli M, Malentacchi F, Simi L, Orlando C, Wyrich R, Günther K, Hartmann CC, Verderio P, Pizzamiglio S, Ciniselli CM, Tichopad A, Kubista M, Gelmini S. (2013) SPIDIA-RNA: first external quality assessment for the pre-analytical phase of blood samples used for RNA based analyses. *Methods* 59(1):20-31.
- [16] Kiyama R, Zhu Y. (2014) DNA microarray-based gene expression profiling of estrogenic chemicals. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Jan 8. [Epub ahead of print]

## 5. 平成25度の総括と今後の展望

### 5.1. 平成25度の総括

本事業ではすでに合計3報の開発ガイドラインを策定し、経済産業省から公表された。もっとも新しい開発ガイドラインは平成25年3月に公表した「テーラーメイド医療用診断機器分野遺伝子発現解析用DNAチップ〔改訂版〕開発ガイドライン2012」であり、開発の現場や薬事審査における成果を検討するには時期尚早と考えられる。一方で、DNAチップに関わる技術の発展も著しく、開発ガイドラインだけでは開発や研究の現場に必要とされる具体的なポイントを示すことは難しくなってきた。また、新しい技術や研究成果を一般に普及する機会の重要性は以前にまして大きくなってきている。そこで、本事業では、本年度はこれまでに公表したガイドラインの普及活動をどう行うかを検討した。

本年度は合計2回の普及活動ワーキンググループ委員会を開催し、まず第1回委員会では普及活動としてガイドラインの解説書を作成することを決め、委員による分担執筆を行った後に、第2回委員会ではその原稿の修正を行った。また、特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアムの中江裕樹委員による国内外の開発動向に関する話題提供（「遺伝子発現解析用DNAチップ開発の最新動向」：「3.2.1 話題提供（1）」項参照）と、DNAチップシェア世界第1位のアフィメトリクス社の日本法人アフィメトリクス・ジャパン株式会社の若本明子委員による話題提供（「Affymetrix 会社紹介」：「3.2.2 話題提供（2）」項参照）、及び、同2位のアジレント・テクノロジー株式会社の田谷敏貴委員による話題提供（「アジレントが提供するゲノミクスツールのご紹介～マイクロアレイ技術の最新活用例、医療へ向けた応用事例～」：「3.2.3 話題提供（3）」項参照）により、DNAチップ及びその周辺機器・技術の開発・研究動向について最新の情報を得た。また、本事業に関しては、第1回委員会において、事務局より、本年度のDNAチップ開発ガイドライン事業の説明を行なった（第1回普及活動ワーキンググループ委員会参考資料1「医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業（経済産業省）」及び参考資料2「DNAチップ開発ガイドライン事業の説明」）。さらに、本委員会や関連するバイオチップコンソーシアム（JMAC）や特定非営利活動法人 日本臨床検査標準協議会（JCCLS）などに参加していない企業についても、製品開発や研究の動向を調査するためにインターネット検索を行った（「3.4 DNAチップに関するインターネット検索」項参照）。また、第1回委員会の後に、次世代シーケンサーがFDAから医療機器として販売認可を受けたという発表があり、ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディシン誌にその解説（「FDA初の次世代シーケンサー販売認可」フランシス・S.コリンズ、マーガレット・A.ハンバーグ著）が掲載されたので、その日本語訳を行い、委員と情報を共有した（資料2：次世代シーケンサーに関する資料）。

作成したガイドライン解説書（テーラーメイド医療用診断機器分野DNAチップ開発ガイドライン解説書）は、5つの章から構成されており、それぞれ、第1章「DNAチップとは」、第2章「遺伝子検査技術動向」、第3章「DNAチップに関する技術」、第4章「DNAチップの周辺技術」、及び、第5章「まとめ」である。また、第3章は、開発ガイドラインに直接関係する技術内容をまとめたものであり、開発ガイドラインの該当する項目に対応するように、「3.1. 測定装置(チップと装置)」、「3.2. 評価法」、及び、「3.3. 標準物質」の3つに分けて記載されている。また、第1章「DNAチップとは」では、診断用DNAチップの開発と問題点

とDNAチップに関わるガイドラインと国際標準についてまとめ、第4章では、DNAチップ用検体の前処理技術、蛍光色素、及び、遺伝子関連データ標準化技術を説明し、第5章「まとめ」では遺伝子診断の将来と医療機器についてまとめた（図1. 「DNAチップガイドラインの普及活動」（1）参照：第13回合同検討会資料）。

図1. 「DNAチップガイドラインの普及活動」（1）

## DNAチップガイドラインの普及活動

「テラーメイド医療用診断機器分野DNAチップ開発ガイドライン解説書」

本年度成果

|  |  |
|--|--|
| <p><b>1. DNAチップとは</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1. DNAチップとは</li> <li>1. 2. 診断用DNAチップの開発と問題点</li> <li>1. 3. DNAチップに関わるガイドラインと国際標準</li> </ol> <p><b>2. 遺伝子検査技術動向</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. 1. 遺伝子検査技術全体の動向(分担:中江)</li> <li>2. 2. DNAチップ技術の動向(分担:的場)</li> </ol> <p><b>3. DNAチップに関する技術</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. 1. 測定装置(チップと装置) <ul style="list-style-type: none"> <li>・遺伝子型(ジェノタイピング)検定用DNAチップ<br/>(項目)原理、構造および検出方法/サンプルおよび検体/試薬およびサンプルの前処理・保存方法/特異性、感度、ダイナミックレンジおよび再現性/データ解析用ソフトウェアおよびデータ処理方法/品質管理方法</li> <li>・遺伝子発現(RNA)用DNAチップ<br/>(項目)原理、構造および検出方法/サンプルおよび検体/試薬およびサンプルの前処理・保存方法/特異性、感度、ダイナミックレンジおよび再現性/データ解析用ソフトウェアおよびデータ処理方法/品質管理方法</li> <li>・遺伝子型検定用及び遺伝子発現解析用DNAチップに関する応用例</li> </ul> </li> <li>3. 2. 評価法 <ul style="list-style-type: none"> <li>・遺伝子型(ジェノタイピング)検定用DNAチップ<br/>(項目)遺伝子型(ジェノタイピング)検定用DNA チップに関する技術評価(塩基配列決定法との比較、データ</li> </ul> </li> </ol> | <p>解析、解析ソフト)/遺伝子型(ジェノタイピング)検定用DNAチップに関する臨床評価(有意性の検定、比較試験・臨床評価試験、臨床的実効性)/その他(データの管理、安全性、その他)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・遺伝子発現(RNA)用DNAチップ<br/>(項目)伝子発現解析用DNAチップに関する技術評価(塩基配列決定法との比較、データ解析、解析ソフト)/遺伝子発現解析用DNAチップに関する臨床評価(妥当性の確認、臨床性能試験、判定アルゴリズム)/その他(データの管理、安全性、その他)</li> <li>・DNAチップの知財管理</li> </ul> <p>3. 3. 標準物質<br/>(内容)目的、標準物質に求められる要件</p> <p><b>4. DNAチップの周辺技術</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. 1. DNAチップ用検体の前処理技術<br/>遺伝子検査のための検体前処理技術/検体前処理技術における精度管理/国内外の開発動向</li> <li>4. 2. 蛍光色素<br/>蛍光の原理と蛍光色素の利用法/DNAチップに利用される蛍光色素/Cy色素の特徴と開発の経緯/蛍光色素の技術的問題点/新規蛍光色素Fluolid/光色素の今後の展開</li> <li>4. 3. 遺伝子関連データ標準化技術</li> </ol> <p><b>5. まとめ</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. 1. 診断用DNAチップに関するまとめ/5. 2. 遺伝子診断の将来と医療機器について</li> </ol> |
|--|--|

## 5.2. 今後の展望

本年度に本事業で得られた成果は、経済産業省と厚生労働省の合同検討会（経済産業省の「医療機器開発ガイドライン評価検討委員会」と厚生労働省の「次世代医療機器評価指標検討会」の合同検討会）にて報告し、了承を得た（平成26年3月10日、第13回合同検討会）（[図2](#)。「DNAチップガイドラインの普及活動」（2）参照：第13回合同検討会資料）。

**図2. 「DNAチップガイドラインの普及活動」（2）**

次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省）/医療機器開発ガイドライン評価検討委員会（経済産業省）合同検討会  
テラメイト\*医療用診断機器分野・遺伝子発現解析用DNAチップ開発WG 平成25年度報告

| WGメンバー:13名 ※座長 |   |
|----------------|---|
| ※ 久原 哲         | 九州大学大学院 農学研究院 教授  |
| 秋山 英雄          | 東レ株式会社 新事業開発部門 主席部員   |
| 油谷 浩幸          | 東京大学 先端科学技術研究センター 教授  |
| 磯部 信一郎         | 九州産業大学工学部物質生命化学科 教授   |
| 岡村 浩           | 東洋鋼鈑株式会社 技術企画部技術企画グループ グループリーダー                               |
| 楠岡 英雄          | 国立病院機構 大阪医療センター 院長  |
| 桑 克彦           | (社)臨床検査基準測定機構 会長  |
| 田谷 敏貴          | アジレント・テクノロジー株式会社 ゲノミクス部門バイオアプリケーショングループ<br>シニアアプリケーションコンサルタント |
| 中江 裕樹          | 特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム 事務局長                                   |
| 橋本 幸二          | (株)東芝 部品材料事業統括部DNAチップ事業推進統括部 グループ長                            |
| 的場 亮           | (株)DNAチップ研究所 代表取締役社長  |
| 森 康晃           | 早稲田大学大学院 創造理工学研究科経営デザイン専攻 教授                                  |
| 若本 明子          | アフィメトリクス・ジャパン株式会社 マーケティング部 マーケティング スペシャリスト                    |

### 1.平成25年度の活動

- 普及活動WG委員会:2回開催(平成25年11月13日、平成26年2月26日)
- ガイドライン(「遺伝子型検定用DNAチップ開発ガイドライン(平成19年5月)」及び「遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン2012(平成24年8月及び平成25年3月)」の普及活動としてセミナー開催と解説書作成を検討
- 話題提供:「遺伝子発現解析用DNAチップ開発の最新動向」特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム、「Affymetrix会社紹介」アフィメトリクス・ジャパン株式会社、「アジレントが提供するゲノミクスツールのご紹介～マイクロアレイ技術の最新活用例、医療へ向けた応用事例～」アジレント・テクノロジー株式会社

### 2.解説書作成

- 遺伝子検査技術動向、DNAチップに関する技術(測定装置、評価方法、標準物質)、DNAチップ周辺技術に分けて検討事項を議論、国際標準資料(MAQC報告、SPIDIA中間報告など)をもとに内容を検討

### 3.次年度における検討内容(案)

- 解説書の作成・完成とそれを用いたセミナーの開催など

本事業の成果であるガイドラインは、経済産業省では次世代医療機器の開発ガイドラインとして、開発の際に考慮すべき工学的評価基準などを作成することで、薬事申請のプロセスにおける設計・開発及び安全性試験・非臨床試験の際に活用されることを期待しており、厚生労働省では次世代医療機器評価指標として審査時に活用されることを期待している。特に、経済産業省では、それぞれの分野の開発ワーキンググループにおいて作成した開発ガイドライン素案を合同検討会で承認を受け、さらに経済産業省において関係機関等の承認などを得て修正したものが経済産業省から公表される（[図3](#)。「医療機器開発ガイドライン/評価検討委員会事業の流れ」参照：第1回普及活動ワーキンググループ委員会資料1）。

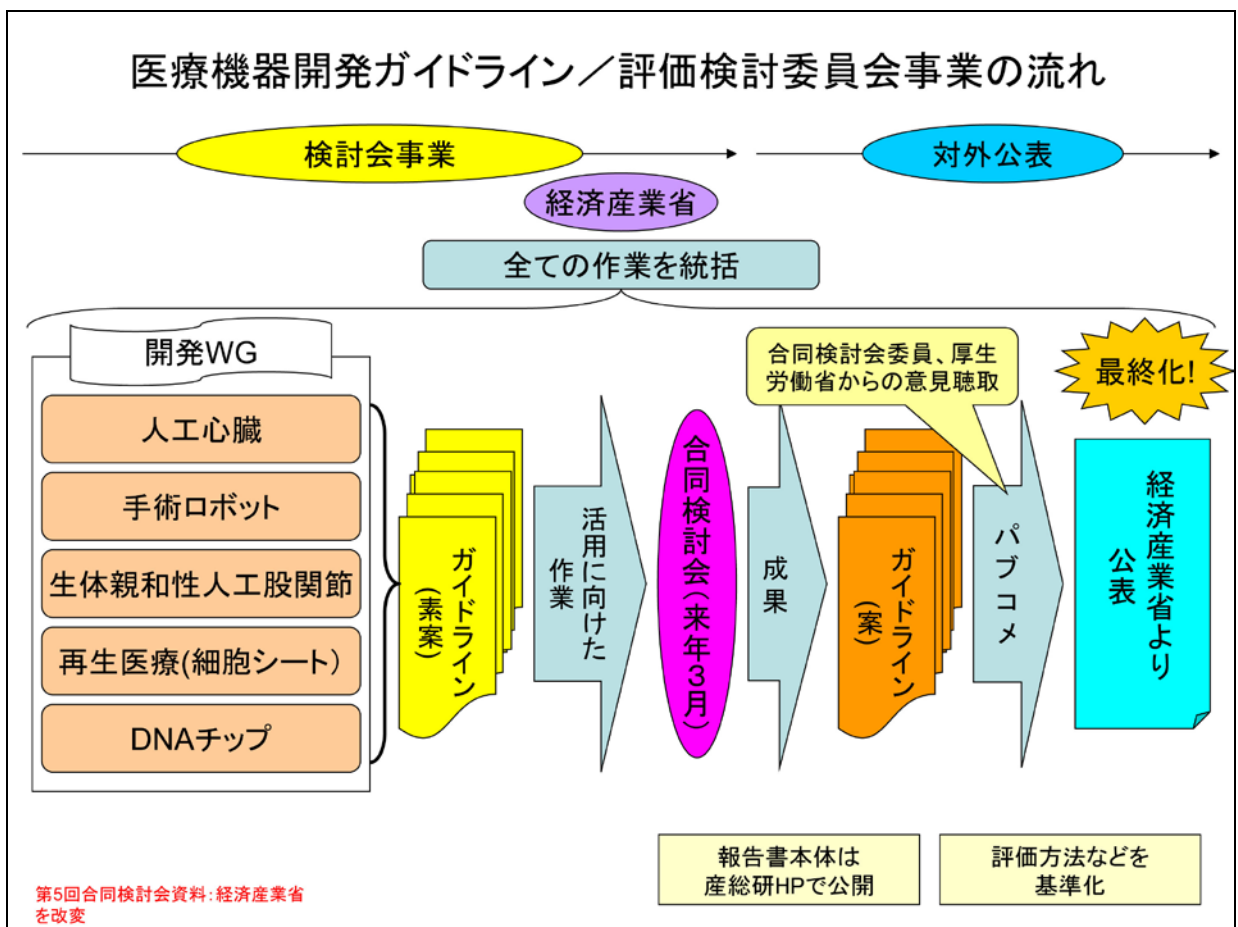
これらのガイドライン・評価指標などが、工業会・企業における効率的な機器開発に貢献し、審査機関においては迅速な承認審査に寄与し、学会においても研究開発などに有用な情報源となることを真に期待したい。

本年度は、本事業全体でも初めての試みとして、開発ガイドラインの普及活動を中心にワーキンググループを構成し、委員会を開催して事業の方向性を決め、解説書の作成という新しい試み

を行った。また、DNAチップの開発には多くの分子生物学、細胞生物学、分子遺伝学、生化学などの研究・技術要素が関わっていることから、関連する分野についても議論を進め、遺伝子検査や特許動向、臨床検体前処理技術や蛍光色素など幅広い分野とのかかわりについても検討を行った。これらを解説書に含めることで、関連する分野における技術者・研究者にとっても本事業の活動が役立つことを期待したい。

最後に、本事業の成果は普及活動ワーキンググループ委員の活動のおかげである。加えて、本事業の事務局スタッフの支援も大きな貢献をしたことを記して、ここに感謝を表したい。

図3. 「医療機器開発ガイドライン/評価検討委員会事業の流れ」



## 参考資料

1. 「テーラーメイド医療用診断機器分野遺伝子発現解析用DNAチップ [改訂版] 開発ガイドライン2012」経済産業省（平成25年3月）（第1回普及活動WG委員会資料5-1）
2. 「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（ジェノタイプング）検定用DNAチップに関してー」経済産業省（平成19年5月）（第1回普及活動WG委員会資料5-3）
3. 本年度ガイドライン事業の説明資料：「医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業（経済産業省）」（第1回普及活動WG委員会資料1）
4. 本年度DNAチップ開発ガイドライン事業の説明資料：「DNAチップ開発ガイドライン事業の説明」（第1回普及活動WG委員会資料2）



## 1. 本年度ガイドライン事業の説明資料

「テーラーメイド医療用診断機器分野遺伝子発現解析用DNAチップ [改訂版] 開発ガイドライン2012」経済産業省（平成25年3月）（第1回普及活動WG委員会資料5-1）

### テーラーメイド医療用診断機器分野遺伝子発現解析用DNAチップ [改訂版] 開発ガイドライン2012

平成25年3月

経済産業省

#### 目次

##### 1. 概要

###### 1.1 遺伝子発現解析用 DNA チップ

###### 1.2 本ガイドラインの目的と範囲

###### 1.3 検査対象とリスク

###### 1.4 先行事例

###### 1.5 測定システム

##### 2. 測定装置(チップと装置)

###### 2.1 原理と構造

###### 2.2 方法

###### 2.3 特異性、感度・ダイナミックレンジ、再現性等について

###### 2.4 必要とするサンプル・検体、その前処理・保存法、試薬等について

###### 2.5 ソフトウェア

###### 2.6 データ処理

###### 2.7 品質管理

##### 3. 評価法

###### 3.1 評価項目

###### 3.2 他の発現解析手法との比較

###### 3.3 データ解析、解析ソフト

###### 3.4 妥当性の確認

###### 3.5 臨床性能試験

###### 3.6 判定アルゴリズム

###### 3.7 データの管理

###### 3.8 安全性

##### 4. 標準物質

###### 4.1 目的

###### 4.2 標準物質に求められる要件

## 1. 概要

### 1.1 遺伝子発現解析用 DNA チップ

DNA チップは、基板の上に特定の塩基配列を持った DNA を高密度に配置し、固定したものである。この DNA をプローブとして、検体標品を精製・標識など前処理したものに対して反応させ、その反応物をレーザー光や電気的・化学的検出法によって高感度に検出する。これによって多数の遺伝子や多型 DNA について網羅的な解析を可能にするものである。遺伝子発現解析用 DNA チップは遺伝子発現をもとに遺伝子の機能状態についての網羅的な解析を目的としたものであり、その解析対象は遺伝子型解析の対象であるゲノム DNA などとは異なり、主に RNA、もしくは、それを調製した試料である。

### 1.2 本ガイドラインの目的と範囲

DNA チップは、近年の技術的進歩によって、基礎研究用のみならず、あらゆる疾患の検査・診断や各種薬剤感受性の検査などに利用されるようになってきており、新たなジャンルの次世代医療機器として期待されている。一方で、DNA チップは信頼性や再現性、標準化など臨床現場に広く導入するにはまだ問題も多い。これらの問題点を解決し、医療機器として DNA チップの開発意欲を向上させ、DNA チップ及び関連機器の開発を促進し活性化することを目的に、まず遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップについて「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」を策定し、公表した（平成 19 年 5 月、経済産業省）。今回は、遺伝子発現解析用 DNA チップに焦点をあて、医療機器としての遺伝子発現解析用 DNA チップ及び関連機器の開発の促進・活性化を目的に、その指標となるためのガイドラインを策定する。

遺伝子発現解析用 DNA チップによる検査・診断への応用としては、疾患の早期発見・早期診断、客観的疾患分類・確定診断、治療法選択、病状変化把握や治療効果モニタリングなどが考えられる。臨床検査や診断などの実臨床で DNA チップを用いる場合、得られるデータの高い信頼性や再現性が重要であり、判定ミスや判定の曖昧さを極力排除しなければならない。特に遺伝子発現解析用 DNA チップの解析対象である RNA は不安定な物質であるため、検体の保管・運搬及び前処理を含めた取り扱いにおける質保証、さらに再現性や信頼性の確保など様々な問題点がある。この点については後に項目別に述べる。

DNA チップは専用の測定装置とともに使用され、複数遺伝子の測定値をアルゴリズムに基づいて解析し、医療情報として提供する。DNA チップおよび関連装置の開発の促進には、高性能な測定装置の開発だけでなく、データの互換性や精度や再現性の向上のための標準化も必要であり、またチップや装置の評価法についても指針が必要と思われる。そこで、本ガイドラインではチップを含めた測定装置、その評価方法、標準化と大きく 3 つの項目にわけて記述する。

なお、本ガイドラインは、DNA チップの研究・開発を円滑に進めるうえで有用と考えられる事項を掲げたものであり、製品化に当たって、これらの事項のすべてが必要となるとは限らず、また、これら以外の事項が必要となる可能性があることに留意すること。

### 1.3 検査対象とリスク

検査対象は、血液、生検組織、手術採取標品、病理検査用パラフィン包埋標品などが考えられる。特に生材料の採取にはその迅速性、適切な保存処理がその後の解析に決定的な影響を与えられ、そのプロトコルの標準化が重要な問題である。得られた測定結果は疾患の診断、治療法選択、病状経過や薬剤効果のモニターなどの参考

となる。また、検体の採取には侵襲を伴うため、その負担とリスクを軽減する工夫や事故の補償に配慮すべきである。RNAが解析対象であってもそこから一部のゲノム情報も得ることができるため、遺伝子型解析と同様に個人情報保護に注意する必要がある。

#### 1.4 先行事例

遺伝子発現解析用 DNA チップの臨床応用がすでに始まっている例として、国外で開発された乳がんの治療法選択に用いられる MammaPrint があり、本邦でも保険適用外ではあるが一部医療機関で用いられつつある。また、DNA チップとは異なるが、同様に乳がんの治療法の選択の際の指標として、RNA を対象とした複数遺伝子の発現解析診断キットとして RT-PCR 法を基礎とした製品 Oncotype DX が実用化されている。

#### 1.5 測定システム

遺伝子発現解析用 DNA チップと装置は、開発メーカーが意図した性能を確保するために、遺伝子発現解析用測定システムとして一体化したものと扱うことが必要であろう。DNA チップの性能は、これを解析する装置と組み合わせられて規定される必要があることから、DNA チップとこれを解析する装置は、一体化した状態での性能を規定し、その信頼性を評価するかたちが求められる。

### 2. 測定装置(チップと装置)

#### 2.1 原理と構造

##### (1) 遺伝子発現解析用 DNA チップの検出原理

RNA の検出方式、装置で検出する出力信号を生み出す機構について詳細に検討する。

##### (2) チップと装置の構造

基板やプローブ DNA などチップを構成する主要素の仕様や形状・サイズ・構造などについて検討すること。特にプローブ DNA に関しては、 $T_m$  (melting temperature) 値、GC (グアニン・シトシン) 比、配列の特異性や長さなど、プローブ設計の要件について検討すること。また、PNA や LNA などの人工核酸を用いる場合はその化学的性質についても検討すること。また装置に関しては、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こと。

#### 2.2 方法

##### (1) 検出の概要

プロトコル、即ち検体の準備から、検出・判定に至る全工程の流れ、特に RNA 抽出・RNA 増幅・標識等のチップ・装置に導入する前工程、チップ・装置へのセッティング、装置での処理手順 (処理条件)、信号から判定を導く工程等について技術的に詳細に検討すること。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評価すること。

##### (2) 装置の機能

信号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。また標準物質を用いて測定装置の評価や基準光源などの基準信号源による測定装置自体の校正を行うことが望ましい。

### 2.3 特異性、感度・ダイナミックレンジ、再現性等について

#### (1) 特異性

他の手法の解析により配列や濃度が既知である試料を用いて、実験的に DNA チップの特異性を検討すること。実験での評価が困難な場合は、DNA プローブの選定プロセスを詳細に説明すること。また、目的遺伝子以外と交差反応する可能性がある場合は、そのリスクについても検討すること。

#### (2) 感度・ダイナミックレンジ

標準検体、標準物質などを用いて、検出系の検出限界濃度やダイナミックレンジを検討すること。この際、使用した DNA チップと検出装置、反応プロトコル、検出条件などを明記すること。

#### (3) 再現性

DNA チップ、および検査システムによって得られるデータの再現性は十分に検証すること。再現性試験は、以下の項目について行うこと。

- ・有意な再現性を統計学的に判断するため、同一と見なされる試料に対し、少なくとも3つ以上の測定データを得ること
- ・検体は、複数の施設から収集すること
- ・再現性試験で使用される手順が、製品化時に示される手順と同様であること
- ・複数の製品ロットを使用すること

#### (4) 検査の品質管理

適切な陽性対照、陰性対照を設け、各種対照の意義、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ること。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ること。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。

#### (5) その他、性能特性に影響する要因

DNA チップを含めた測定における交差汚染には、別検体・別試料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。

検体に含まれる潜在的な干渉物質は、必ずしも試料の調製によって除去できるとは限らず、試料の調製、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、干渉物質が検出性能に及ぼす影響について特性評価をすること。なお検査中の各種条件について、その設定根拠、特に RNA の定量に対する安定性について検討すること。

## 2.4 必要とするサンプル・検体、その前処理・保存法、試薬等について

### (1) 検体

検体の品質が RNA の品質や RNA 増幅・標識に大きく影響するため、RNA を得る検体の種類（例えば血液、組織）およびその採取方法、採取量について検討すること。また検体の管理・保管方法については検討すること。

### (2) 検体の前処理

検体から RNA を抽出・精製する方法について検討すること。また RNA の分解を防ぐための留意点を記すとともに、使用する RNA の品質の評価法について明記して、測定結果を保証できる RNA の品質基準を設定すること。なお RNA 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 RNA を標識した上で後段の反応に使用する場合には、その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 RNA、増幅 RNA、標識 RNA、といったすべての段階のサンプルについて、保管法及び輸送法について検討すること。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明記すること。

### (4) 試薬

RNA 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。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。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、必要な試薬の仕様および RNA の品質と量を評価するための方法・仕様を技術的に検討すること。

### (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こと。また各工程で使用される試薬の安全性、および安全な取り扱いに必要な注意事項を検討すること。

### (6) 自動操作

サンプル調製に関して人為的要因による差異、施設間の差異を回避するために、自動化の導入が考えられる。自動化する際は、分注精度、温度制御精度を明記すること、試料間の交差汚染を防御できる構造、機構であること、環境からの汚染、例えば、空気中に浮遊している反応阻害物質、RNA 分解酵素等の汚染物質の混入を防止できる構造であること、トレーサビリティを確保可能な機構であること、人的過誤を回避するための工夫が施され、作業への安全性が確保できること等を考慮すること。また、自動化が導入された場合も、その結果の再現性等、妥当性を確認すること。

## 2.5 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こと。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、項目に分けて文書化されていること。特にデータの処理、解析ソフトウェアについては、詳細を記した説明書を作成すること。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ること。ソフトウェアの開発・設計に関しては国際規格（例えば IEC 62304:2006）などを参照すること。

## (2) 判定アルゴリズム

判定アルゴリズムについて、少なくとも判定に用いるプローブ DNA の種類、各プローブの重複数、判定に用いる測定値の定義、各プローブの測定値から判定を行うためのアルゴリズム、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な根拠、最終的な判定結果とその信頼度が十分な詳しさと文書化されていること。

## 2.6 データ処理

本装置を用いて取得したデータについてデータを保護するための手順が確立され、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にデータ管理されていること。

## 2.7 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、チップに固定するプローブ DNA の品質管理について検討すること。特に DNA チップの品質管理に関連しては、ISO/DIS16578 規格名称「マイクロアレイを用いた特定核酸配列の検出に関する一般的定義と要求事項」や GMP/QMS（ISO13485）などの製造管理/品質管理体制を検討すること。

### (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。

## 3. 評価法

### 3.1 評価項目

当該 DNA チップの評価法としては、以下の項目を含むこと。

- (1) 他の発現解析手法との比較
- (2) データ解析、解析ソフト
- (3) 妥当性の確認
- (4) 臨床性能試験
- (5) 判定アルゴリズム
- (6) データ管理
- (7) 安全性

### 3.2 他の発現解析手法との比較



DNA チップの評価にあたっては、他の遺伝子発現の解析法と比較検討すること。比較は診断上重要な遺伝子について重要性を言及した後、当該遺伝子を対象に、少なくとも1種類の同一と見なされるRNAを鋳型にして定量する方法により行い、両者の一致率を遺伝子ごとに検討すること。遺伝子定量法としては、当該プラットフォーム以外の一般的な手法、もしくは性能が確認されている既承認の他のDNAチップ等を用いることができる。

### 3.3 データ解析、解析ソフト

解析ソフトについては、用途に対して十分であることを適切に妥当性が検討され、同一データから同一の結果が得られること。その再現性を保証するためには、アルゴリズムを明確に表現すること。具体的には正規化の手法、データ補正の方法、マーカー遺伝子の抽出方法、判定の方法などを数式等で表し、数値化したデータに基づき判定されること。

### 3.4 妥当性の確認

妥当性の検討にあたっては、各方法の良否の確定に用いる手法は、コスト、リスクおよび技術的可能性のバランスを十分に検討し、次の事項のうちの一つ、またはそれらの組合せであり、客観的な結果を残すこと。

- ・他の解析法で得られた結果との比較
- ・試験所間比較
- ・結果に影響する要因の系統的な評価
- ・方法の原理の科学的理解および実際の経験に基づいた有意性の評価

また失敗事例（判定不能、器具の故障、試薬の不具合等に起因するもの）に関しても分析すること。

### 3.5 臨床性能試験

本項目については、平成24年11月20日付薬食機発1120第5号通知別添2「RNAプロファイリングに基づく診断装置の評価指標」を参照のこと。

### 3.6 判定アルゴリズム

本項目については、平成24年11月20日付薬食機発1120第5号通知別添2「RNAプロファイリングに基づく診断装置の評価指標」を参照のこと。

### 3.7 データの管理

原則として試料の種類、試料数、試料の調製法あるいは起源、試料の使用目的（特異性など）の記録を残すこと。最終的な結果の出力だけではなく、結果出力前の画像ファイルや数値データ等を保存すること。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こと。また結果に疑問が生じた場合には、データ処理段階毎に確認が可能となること。

### 3.8 安全性

交差汚染を評価するための試験を実施して結果を残すとともに、判定に失敗した場合、あるいは判定結果の解釈に失敗した場合のリスクも評価し、その際に用いたリスク分析手法についても検討すること。

## 4. 標準物質

### 4.1 目的

遺伝子発現解析用DNAチップ開発の各フェーズに応じて標準物質に求められる要件を示し、当該開発品を用いた遺伝子発現解析データなどの信頼性を向上させることを目的とする。

### 4.2 標準物質に求められる要件

DNAチップ開発に用いられる標準物質には、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に用いるもの（測定対象標品）や、当該開発品製造時の品質管理やルーチン検査における精度管理に用いるもの（精度管理用標準物質）がある。また、これらには測定結果のトレーサビリティの確認にも適用可能な性能が求められる。従って当該開発品製造における標準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 標準物質の選定

##### (1) 測定対象標品の選定

当該開発品が検出対象とする遺伝子と遺伝子発現量の相対比較に使用される塩基配列を含むサンプルによる評価が求められる。これらの被検対象への値付けや当該開発品の校正を行うため、測定対象標品には対象遺伝子を含む複数のヒトRNAサンプルや遺伝子発現量の相対比較に使用される内在遺伝子や人工的な対照塩基配列を含むサンプルを使用することを推奨する。また、測定対象と同じ塩基配列を有する上位の標準物質（認証標準物質など）を用いて被検対象の値付けをすることによって、測定結果のトレーサビリティを確認することもできる。

##### (2) 精度管理用標準物質の選定

解析対象の特定遺伝子を検出できることが開発の過程で確かめられている当該開発品を市販のために製造する場合、当該開発品が正確な指示値を示すよう調整するために精度管理用標準物質を使用する。精度管理用標準物質には対象遺伝子や人工的な非遺伝子塩基配列のうち、ヒト染色体遺伝子よりも安定性に優れ、増産が可能である合成RNAやcDNA或いはその鋳型となるプラスミドDNAが適用され、当該開発品の性能評価が可能な部分の遺伝子配列或いは任意の非遺伝子塩基配列が含まれていれば良い。全塩基配列長等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、制限酵素等、抽出試薬に関する品質管理方法及びRNA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 標準物質の管理

##### (1) 品質管理

標準物質は選定時にDNAシーケンシング等の方法によって配列を確認すること。標準物質を酵素合成等によって複製する場合は、複製ロット毎に遺伝子配列の確認を行うことによって相同性を担保する。また、電気泳動やHPLCなどを用いた塩基鎖長評価を行うことで、宿主由来塩基配列の混入や目的とする塩基配列の純度を確認する。精度管理用標準物質は酵素合成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

複製の鋳型などに用いるDNAの合成については、ホスホロアミダイト法等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DNAシーケンシング法、質量分析（TOF-MS）、HPLCや電気泳動法によって確認する。

### (3) 濃度単位

標準物質を感度試験に用いる場合には、核酸定量法によって求められた既知濃度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。なお、核酸定量は吸光度法（OD260）によって実施する場合、260 nmに吸収を持つ不純物が含まれていないことを確認する必要がある。また、可能な場合、濃度値が付与された認証標準物質によって値付けした標準物質を用いることで、トレーサビリティの確認を行うこともできる。

#### 4.2.3 標準物質の入手

測定対象となる塩基配列については、CDCの Genetic Testing Reference Material Coordination Program 1) において reference material として確立された細胞株を、国内公的機関、例えば独立行政法人 産業技術総合研究所などが Coriell 医学研究所を通じて入手し、保存及び管理を行い、当該開発品の機能評価を受託業務として実施するので、それらを利用することができる。なお、ヒトゲノムCDC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可能である。精度管理用標準物質としては、産業技術総合研究所が頒布するトレーサビリティが確立された認証標準物質を利用することができる。

注1) 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。）

平成23年度 テーラーメイド医療用診断機器分野

遺伝子発現解析用DNAチップ開発WG委員

|    |       |                       |                                      |
|----|-------|-----------------------|--------------------------------------|
| 座長 | 林 慎一  | 東北大学大学院 医学系研究科        | 教授                                   |
|    | 秋山 英雄 | 東レ株式会社 新事業開発部門        | 主席                                   |
|    | 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 | 国立病院機構 大阪医療センター       | 院長                                   |
|    | 久原 哲  | 九州大学大学院 農学研究院         | 教授                                   |
|    | 桑 克彦  | 日本臨床検査標準協議会 (JCCLS)   | 理事                                   |
|    | 住谷 知明 | プレジジョン・システム・サイエンス株式会社 | 事業開発担当 部長                            |
|    | 橋本 幸二 | 株式会社東芝 部品材料事業統括部      | DNAチップ事業推進統括部<br>DNAチップ技術・開発担当 グループ長 |

## 2. 本年度DNAチップ開発ガイドライン事業の説明資料

「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（ジェノタイプング）検定用DNAチップに関してー」経済産業省（平成19年5月）（第1回普及活動WG委員会資料5-3）

### 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（ジェノタイプング）検定用DNAチップに関してー

平成19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—遺伝子型（ジェノタイプング）検定用 DNA チップに関して—

## 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、治療法を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(CYP2C19、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るべきである。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
- ・複数の作業者で、3箇所以上の施設で実施されること。
- ・再現性試験で使用される手順が、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、検査プロトコール、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られる。

- 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年度テー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

3. 本年度ガイドライン事業の説明資料

「医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業（経済産業省）」

（第1回普及活動WG委員会資料1）

**医療機器等の開発・実用化促進  
のための  
ガイドライン策定事業  
（経済産業省）**

The Guideline Program  
for  
Medical Device Development

必要性・体制・合同検討会

**医療機器ガイドラインとは**





「国民の長寿」と「質の高い生活」を実現  
 => 新しい医療機器の開発と円滑な臨床導入が不可欠

医療機器産業の育成・産業創出、国際競争力の強化、  
 迅速な開発と審査が求められている



### 医療機器ガイドラインの策定

次世代医療機器ガイドライン策定事業(経済産業省と厚生労働省の連携)  
 において、行政、学会、産業界などが連携

## ガイドラインの必要性

革新的な技術 = 誰も臨床導入経験, 評価の経験がない

臨床研究が進まない, IRBも迷う...

コンサルも新しい技術のことは判らない

PMDA審査員も知らない, 承認審査の判断基準が判らず遅い.

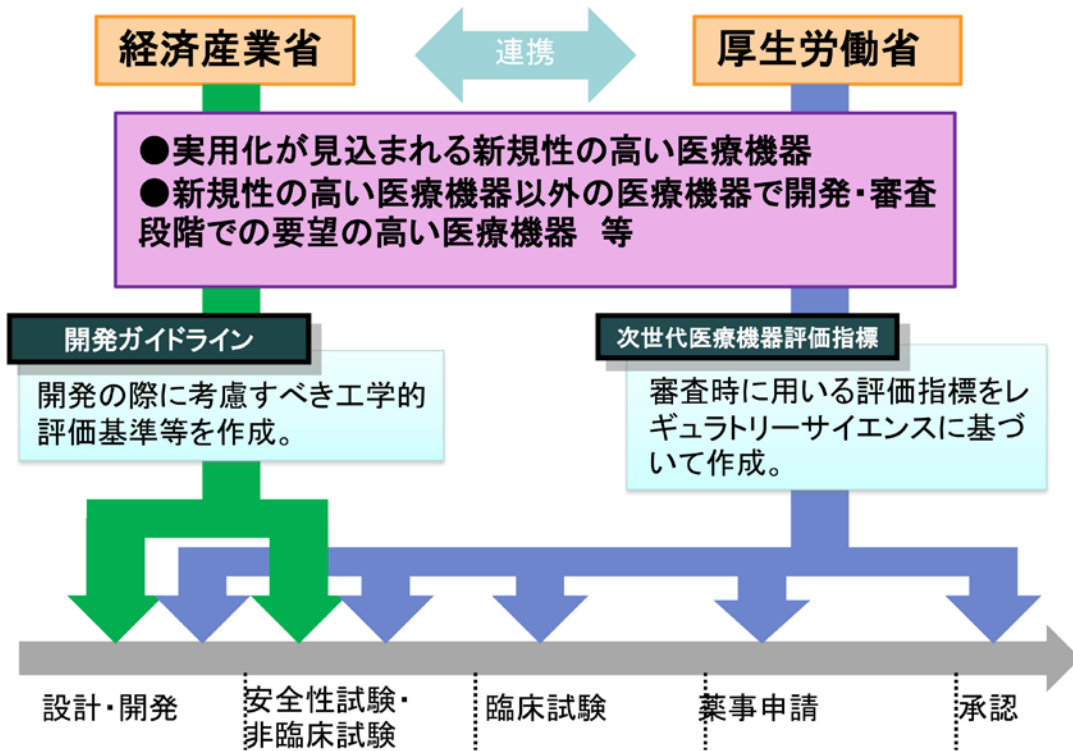
定着していない技術の工業標準, 国際規格は作れない...

ビジネス見込みが立たない...

ガイドライン=みちしるべ

開発の迅速化, 審査の円滑化

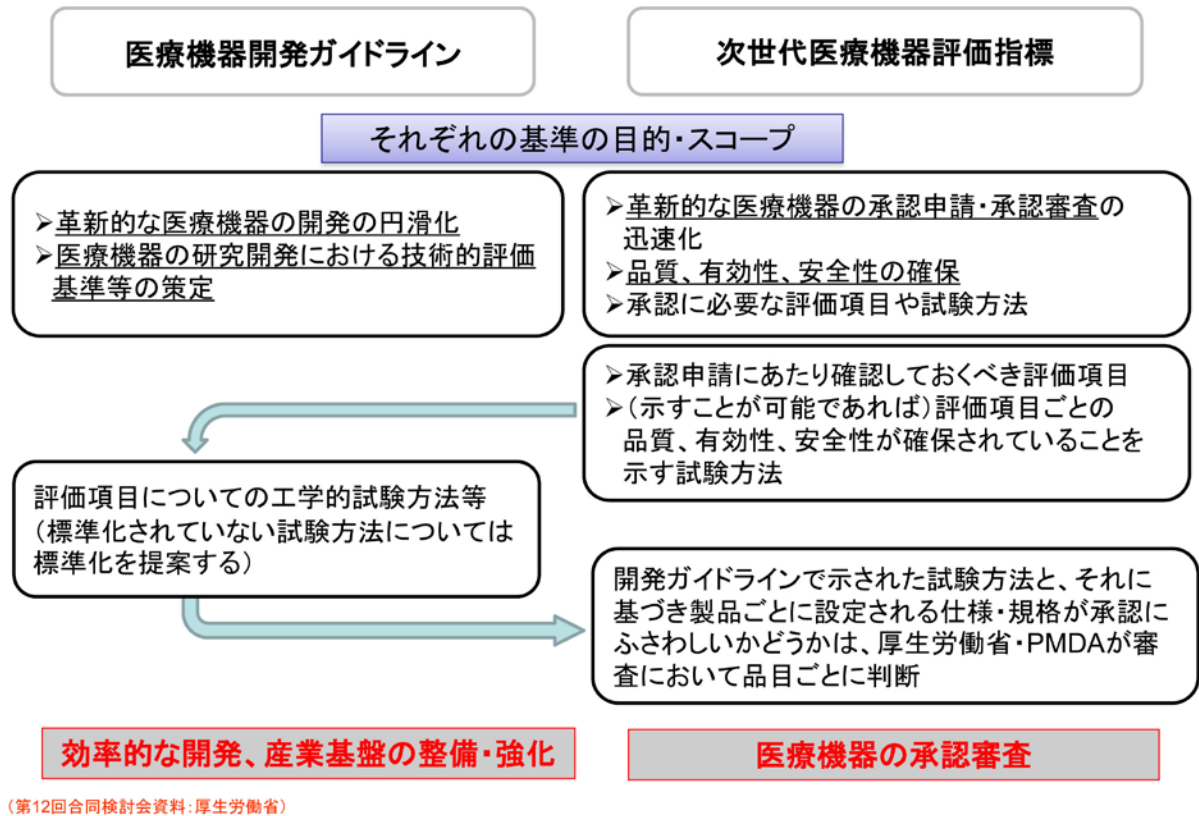
# 次世代医療機器評価指標と開発ガイドラインの連携



(第12回合同検討会資料:厚生労働省)

5

# 次世代医療機器評価指標と開発ガイドラインの連携



(第12回合同検討会資料:厚生労働省)

## 次世代医療機器評価指標検討会委員

|       |                                  |
|-------|----------------------------------|
| 澤 芳樹  | 大阪大学大学院医学系研究科教授                  |
| 妙中 義之 | 国立循環器病研究センター研究所副所長               |
| 橋爪 誠  | 九州大学大学院医学研究院教授                   |
| 平岡 真寛 | 京都大学大学院医学研究科教授                   |
| 松岡 厚子 | 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部長               |
| 山口 照英 | 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部抗体医薬開発プロジェクト研究員 |
| ○吉田 純 | 名古屋大学名誉教授                        |

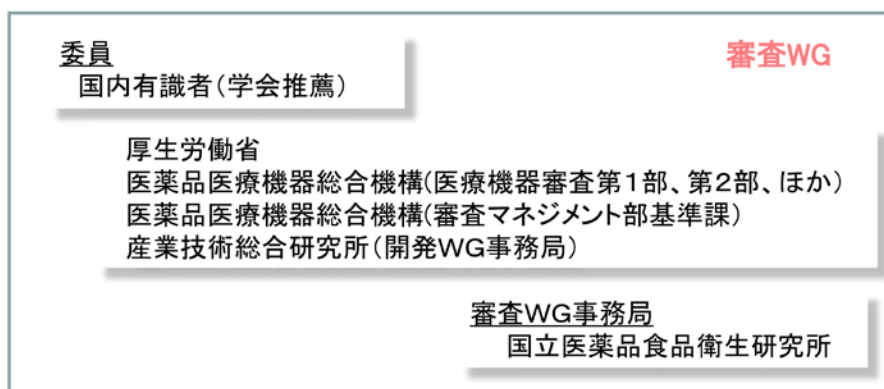
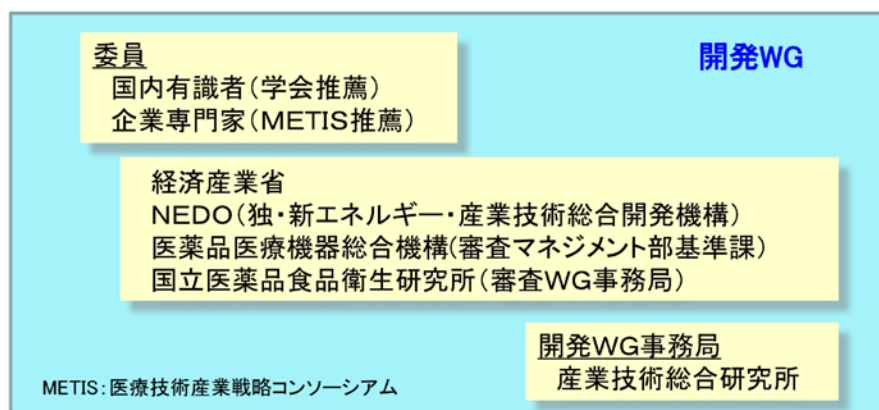
## 医療機器開発ガイドライン評価検討委員会委員

|        |                              |
|--------|------------------------------|
| 赤松 幹之  | 産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門長 |
| 菊地 眞   | 防衛医科大学校名誉教授                  |
| 佐久間 一郎 | 東京大学大学院工学系研究科教授              |
| 橋爪 誠   | 九州大学大学院医学研究院教授               |
| 平岡 真寛  | 京都大学大学院医学研究科教授               |
| 村垣 善浩  | 東京女子医科大学先端生命医科学研究科教授         |
| ○吉田 純  | 名古屋大学名誉教授                    |

○…座長

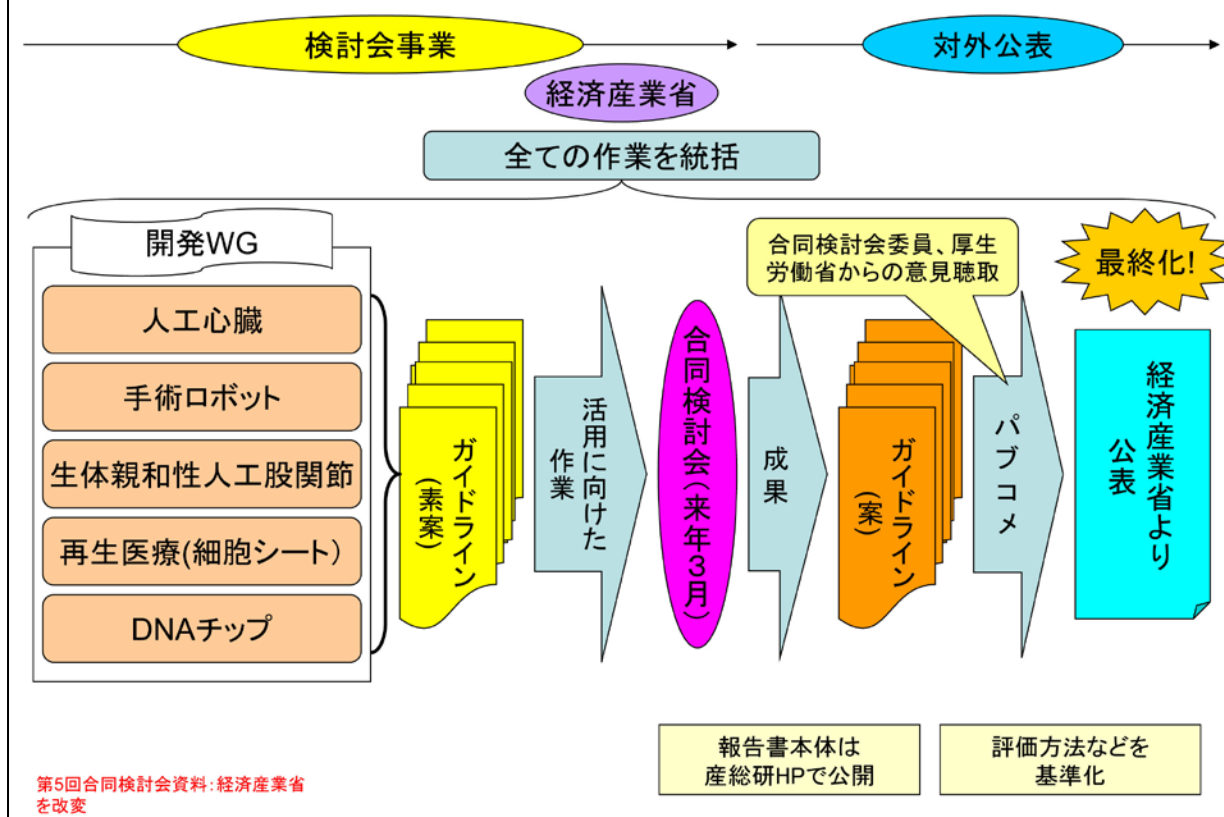
(五十音順)

## ワーキンググループのメンバー構成



WG:ワーキンググループ

## 医療機器開発ガイドライン／評価検討委員会事業の流れ



### 医療・福祉機器

開発ガイドライン  
経済産業省のHPにて公開

#### 医療機器開発ガイドライン策定事業

[http://www.meti.go.jp/policy/mono\\_info\\_service/service/iryuu\\_fukushi/index.html](http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryuu_fukushi/index.html)

【平成19年5月公表】

- 1.DNAチップ(PDF形式:180KB)
- 2.高性能人工心臓システム(PDF形式:202KB)

【平成20年6月公表】

- 3.ナビゲーション医療分野共通部分(PDF形式:974KB)
- 4.骨折修復支援システム(PDF形式:236KB)
- 5.脳腫瘍焼灼レーザスキャンシステム(PDF形式:232KB)
- 6.次世代(高性能)人工股関節(PDF形式:198KB)
- 7.ハイブリッド型人工骨・骨補填材(PDF形式:183KB)
- 8.ヒト細胞培養加工装置の設計ガイドライン(PDF形式:1664KB)



## 医療機器審査管理室長通知

厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長

### 次世代医療機器評価指標の公表について

厚生労働省では、医療ニーズが高く実用可能性のある次世代医療機器について、審査時に用いる技術評価指標等をあらかじめ作成し、公表することにより、製品開発の効率化及び承認審査の迅速化を図る目的で、検討分野を選定して評価指標を検討してきたところである。

今般、次世代型人工心臓及び DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬の評価を行うに当たって必要と考えられる資料、評価のポイント等を評価指標としてとりまとめたので、下記に留意の上、販売承認申請に当たって参考とするよう、貴管下関係業者に対し指導方御配慮願いたい。

なお、本通知の写しを独立行政法人医薬品医療機器総合機構理事長、日本製薬団体連合会会長、社団法人日本臨床検査薬協会会長、在日米国商工会議所医療機器・IVD小委員会委員長及び欧州ビジネス協会

- (1) 薬食機発第0404002号、平成20年4月4日  
2品目：次世代高機能人工心臓、DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬
- (2) 薬食機発第0118第1号、平成22年1月18日  
4品目：骨折修復支援装置、関節手術支援装置、重症心不全細胞治療用細胞シート、角膜上皮細胞シート
- (3) 薬食機発0528 第1号、平成22年5月28日  
2品目：角膜内皮細胞シート、軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置
- (4) 薬食機発1215第1号、平成22年12月15日  
3品目：関節軟骨再生、神経機能修復装置、整形外科用骨接合材料カスタムメイドインプラント
- (5) 薬食機発1207第1号、平成23年12月7日  
3品目：歯周組織治療用細胞シート、整形外科用カスタムメイド人工股関節、コンピュータ診断支援装置
- (6) 薬食機発1120第5号、平成24年11月20日  
3品目：RNAプロファイリングに基づく診断装置、整形外科用カスタムメイド人工膝関節

## ガイドラインの構成

## 策定した開発ガイドラインおよび評価指標 (平成17年度～平成24年度)

| 医療機器開発ガイドライン(標準仕様書含)<br>(開発のための)  | 医療機器評価指標<br>(審査のための)   |
|---|--|
| <p style="text-align: right; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">26件</p> <p>高機能人工心臓システム(和文・英文)/ DNAチップ(和文・英文)<br/>                     遺伝子発現解析用DNAチップに関する開発ガイドライン(改訂)(和文)<br/>                     遺伝子発現解析用DNAチップに関する標準仕様書(TS)素案<br/>                     ナビゲーション医療分野共通部分(和文・英文)/ 骨折修復支援システム(和文)/<br/>                     脳腫瘍焼灼レーザシステム(和文)/ナビゲーション医療機器の位置的性能<br/>                     の品質担保(和文)/ナビゲーション医療分野共通部分の改定(案)<br/>                     トレーニングシステム開発ガイドライン(案)(和文・英文)<br/>                     次世代(高機能)人工股関節(和文・英文)/ハイブリッド型人工骨・骨補填材(和文・<br/>                     英文)/カスタムメイド骨接合材料(和文・英文)<br/>                     カスタムメイド人工股関節に関する開発ガイドライン(和文・英文)<br/>                     カスタムメイド人工膝関節に関する開発ガイドライン(和文)<br/>                     ヒト細胞培養加工装置についての設計ガイドライン(改訂版を含む)(和文・英文)<br/>                     除染/バスボックス設計ガイドライン(和文・英文)<br/>                     無菌接続インターフェース設計ガイドライン(和文・英文)<br/>                     ヒト細胞・組織の搬送に関するガイドライン(和文・英文)<br/>                     ヒト細胞自動培養加工装置についての設計ガイドライン(案)<br/>                     軟骨再生における性能評価技術(案)(和文)<br/>                     挿込み型神経刺激装置(和文・英文)<br/>                     コンピュータ検出支援装置の性能評価項目(案)(和文)<br/>                     コンピュータ診断支援装置におけるソフトウェア設計・開発管理(改訂)(和文・英文)<br/>                     CAD×(コンピュータ診断支援装置)の性能評価(案)<br/>                     ロボット技術を用いた活動機能回復装置(案)</p> | <p style="text-align: right; font-weight: bold; font-size: 1.2em;">17件</p> <p>次世代型高機能人工心臓の臨床評価のための評価指標<br/>                     DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標<br/>                     DNAチップ等を用いる遺伝子発現解析装置に関する評価指標(案)<br/>                     骨折修復支援装置に関する評価指標<br/>                     関節手術支援装置に関する評価指標<br/>                     軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置に関する評価指標<br/>                     骨形成因子(BMP)含有人工骨に関する評価指標(案)<br/>                     整形外科用骨接合材料カスタムメイドインプラントに関する評価指標<br/>                     カスタムメイド人工股関節に関する評価指標<br/>                     カスタムメイド人工膝関節に関する評価指標(案)<br/>                     重症心不全細胞治療用細胞シートに関する評価指標<br/>                     角膜上皮細胞シートに関する評価指標<br/>                     角膜内皮細胞シートに関する評価指標<br/>                     関節軟骨再生評価指標<br/>                     神経機能修飾装置に関する評価指標<br/>                     歯周組織治療用細胞シートに関する評価指標<br/>                     コンピュータ診断支援装置に関する評価指標</p> |

### 医療機器開発ガイドラインの公開

[http://www.meti.go.jp/policy/mono\\_info\\_service/  
service/iryou\\_fukushi/index.html](http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryou_fukushi/index.html)

**コンソーシアムの設立**(平成19年10月)  
「バイオチップコンソーシアム、JMARC(企業68社)」

### 承認に寄与したガイドライン

埋込み型補助人工心臓 2品目  
DNAチップ 2品目  
カスタムメイドインプラント 1品目

### 厚生労働省・通知「次世代医療機器評価指標の公表について」

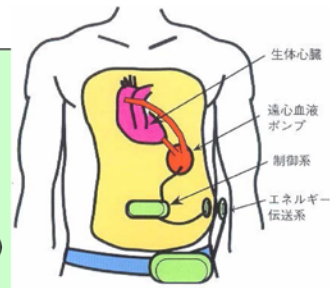
- (1) 薬食機発第0404002号、平成20年4月4日  
2品目: 次世代高機能人工心臓、DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬
- (2) 薬食機発第0118第1号、平成22年1月18日  
4品目: 骨折修復支援装置、関節手術支援装置、重症心不全細胞治療用細胞シート、角膜上皮細胞シート
- (3) 薬食機発0528第1号、平成22年5月28日  
2品目: 角膜内皮細胞シート、軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置
- (4) 薬食機発1215第1号、平成22年12月15日  
3品目: 関節軟骨再生、神経機能修飾装置、整形外科用骨接合材料カスタムメイドインプラント
- (5) 薬食機発1207第1号、平成23年12月7日  
3品目: 歯周組織治療用細胞シート、整形外科用カスタムメイド人工股関節、コンピュータ診断支援装置
- (6) 薬食機発1120第5号、平成24年11月20日  
3品目: RNAプロファイリングに基づく診断装置、整形外科用カスタムメイド人工膝関節

## 開発ガイドラインに規定される評価項目

—人工心臓の例—

### 【評価項目】

- |   |   |
|---|---|
| (1) 意図する使用目的<br>(2) 想定する使用環境及び人的要因<br>(3) ポンプ流体性能<br>(4) 発熱特性<br>(5) 電気的安全性<br>(6) 電磁環境両立性(EMC)<br>(7) 機器制御・モニタ<br>(8) 流入出コンデュイット・人工血管・人工心臓弁・心房カフ | (9) 素材安全性<br>(10) 生体適合性<br>(11) 動物実験<br>(12) 信頼性(耐久性試験) |
|---|---|



科学的根拠に基づく  
妥当な評価項目と定量的評価

- **評価科学**  
(レギュラトサイエンス)
- **評価工学**  
(レギュラトエンジニアリング)

- ・ 臨床試験に関する規定: 「次世代型高機能人工心臓の臨床評価のための評価指標」  
(厚生労働省 薬食機発第0404002号 H20.4.4)
- ・ 関連する国際標準: ISO 14708-5 Implants for surgery-circulatory support devices, 2010



## 評価指標・ガイドラインの活用事例 植込み型補助人工心臓2機種について

(DuraHeart 及び EVAHEARTが昨年12月8日薬事承認)

人工心臓評価指標では、

- ・非臨床試験の必要項目(耐久試験、動物試験など)
- ・臨床試験として**20例**(パイロット試験5例、ピポタル試験15例;従来は60例)を明示

テルモ  
DuraHeart



欧州臨床試験 33例  
国内臨床試験 6例  
で承認

サンメディカル  
技術研究所  
EVAHEART



国内パイロット試験 3例  
国内ピポタル試験 15例  
で承認

### 開発ガイドラインの策定の経緯

| 分野名                  | 平成17年度   | 平成18年度 | 平成19年度 | 平成20年度                               | 平成21年度               | 平成22年度                                | 平成23年度                               | 平成24年度   |
|----------------------|--|--------|--------|--------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--|
| ナビゲーション医療            | 骨折修復支援システム<br>脳腫瘍焼灼レーザーシステム<br>ナビゲーション医療分野共通部分                     |        |        | ナビゲーション医療機器の位置的性能の品質担保<br>トレーニングシステム |                      | ナビゲーション医療分野共通部分<br>(改定案)              |                                      |  |
| 体内埋め込み型材料            | 次世代(高機能)人工股関節<br>ハイブリッド型人工骨・骨補填材                                   |        |        | カスタムメイド骨接合材料                         |                      | カスタムメイド人工<br>股関節                      | カスタムメイド人工<br>膝関節                     | カスタムメイド脊椎<br>(検討中)<br>カスタムメイド股<br>関節以外の関節<br>(検討中) |
| 体内埋め込み型能<br>動型機器     | 高機能人工心臓システム  |        |        |                                      |                      |                                       |                                      |  |
| 再生医療                 | ヒト細胞培養加工装置の設計ガイド<br>ライン  |        |        | ヒト細胞培養加工<br>装置の設計ガイド<br>ライン(改訂)      | 除染バスボックス<br>設計ガイドライン | 無菌接続インター<br>フェイス設計                    | 細胞・組織加工品の研<br>究・開発におけるヒト細<br>胞・組織の搬送 | ヒト細胞自動培<br>養加工装置につ<br>いての設計(案)                     |
| リポソーム等のデリ<br>バリーシステム | リポソーム等のデリバリーシステム(調査<br>分析)   |        |        |                                      |                      |                                       |                                      |  |
| テーラーメイド医療<br>用診断機器   | DNAチップ   |        |        | 遺伝子発現解析用DNAチ<br>ップ                   |                      | 遺伝子発現解析<br>用DNAチップ(改<br>訂)            |                                      | 遺伝子発現解<br>析用DNAチップ<br>(標準仕様<br>案)                  |
| バイオニック医療機<br>器       | 植込み型神経刺激装置   |        |        |                                      |                      |                                       |                                      |  |
| 画像診断                 | コンピュータ検出支援装置の性能評価項目<br>(案)<br>コンピュータ検出支援装置におけるソフトウ<br>ェア設計・開発管理(案) |        |        |                                      |                      | コンピュータ診断支<br>援装置におけるソフト<br>ウェア設計・開発管理 |                                      | コンピュータ診<br>断支援装置の<br>性能評価(案)                       |
| 運動機能回復訓練機<br>器       |  |        |        |                                      |                      | ロボット技術を用いた活動機能回復装置<br>(案)             |                                      |  |
| プラズマ応用技術             |  |        |        |                                      |                      | 開腹外科手術用プラズマ止血<br>装置(検討中)              |                                      |  |

### 次世代医療機器評価指標の策定の経緯

| 分野名               | 平成17年度               | 平成18年度 | 平成19年度   | 平成20年度    | 平成21年度                      | 平成22年度              | 平成23年度                  | 平成24年度           |
|-------------------|----------------------|--------|--|-----------|-----------------------------|---------------------|-------------------------|------------------|
| ナビゲーション医療         | 骨折整復支援装置<br>関節手術支援装置 |        | 軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置   |           |                             |                     |                         |                  |
| 体内埋め込み型材料         | 主体親和性インプラント          |        |  |           | 整形外科用骨接合材料<br>カスタムメイドインプラント | 整形外科用カスタムメイド人工股関節   | 整形外科用カスタムメイド人工膝関節       |                  |
| 体内埋め込み型電動機器       | 次世代型高性能人工心臓の臨床評価     |        |  |           |                             |                     |                         |                  |
| 再生医療              | 重症心不全細胞治療用細胞シート      |        |  | 角膜上皮細胞シート | 関節軟骨再生                      | 歯周組織治療用細胞シート        |                         | 網膜色素上皮細胞(案)      |
| リボソーム等のデリバリーシステム  | リボソーム等のデリバリーシステム(検討) |        |  |           |                             |                     |                         |                  |
| テーラーメイド医療用診断機器    | DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬 |        |  |           |                             | RNAプロファイリングに基づく診断装置 |                         |                  |
| 神経機能修飾装置／活動機能回復装置 |                      |        | 神経機能修飾装置   |           |                             |                     | 活動機能回復装置(案)             |                  |
| 画像診断              |                      |        | <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) 反復経頭蓋磁気刺激(rTMS)装置</li> <li>(2) 運動機能回復のための大脳皮質刺激装置</li> <li>(3) 人工視覚装置</li> <li>(4) カテーテル型硬膜外電極を用いた脊髄電気刺激による術中血圧制御装置</li> <li>(5) 迷走神経刺激による心不全治療</li> <li>(6) ブレインマシンインターフェース</li> </ul> |           |                             | コンピュータ診断支援装置        |                         |                  |
| 重症下肢虚血            |                      |        |  |           |                             |                     | 重症下肢虚血疾患治療用医療機器の臨床評価(案) |                  |
| ナノ材料応用医療機器        |                      |        |  |           |                             |                     |                         | ナノ材料を応用した医療機器(案) |

## 平成25年度の計画

## 開発WGの計画(案) (平成25年度)

| 対象分野           | 課題名                             | 検討予定課題  |
|----------------|---------------------------------|---|
| 再生医療           | ヒト細胞製造システム                      | ヒト細胞培養の自動化導入に関する開発ガイドラインを検討する。                  |
|                | 組織(軟骨)再生性能評価技術                  | 設置せず  |
| 画像診断           | コンピュータ診断支援装置                    | 設置せず  |
| 運動機能回復訓練機器     | 運動機能訓練用医療機器                     | ロボット技術を用いた活動機能回復装置開発ガイドラインの改訂(ISO検討内容の導入)を検討する。 |
| ナビゲーション医療      | 手術ロボット                          | 設置せず  |
| テーラーメイド医療用診断機器 | 遺伝子発現解析用DNAチップ                  | 設置せず  |
| 体内埋め込み型材料      | 高生体適合性(カスタムメイド)股・膝関節以外の関節インプラント | 股・膝関節以外の関節に対するカスタムメイドインプラントに関する開発ガイドラインを検討する。   |
|                | 高生体適合性(カスタムメイド)脊椎インプラント         | 脊椎に対するカスタムメイドインプラントに関する開発ガイドラインを検討する。           |
| プラズマ応用技術       | プラズマ処置機器                        | プラズマを原理とする止血装置に関する開発ガイドラインを検討する。                |
| 新規分野           | 新規課題                            |   |

○産業の活性化：医療機器開発のための支援(開発ガイドライン等を引用したセミナー)

○標準化戦略(試験法の策定など)への寄与

(第12回合同検討会資料:経済産業省)

5課題+複数の新規課題

## 平成25年度の取組 (開発WG)

### 来年度新規検討テーマ

- 1) METIS等と相談
  - 2) 医療用ソフトウェア研究会での検討結果
  - 3) 課題解決型医療機器等開発事業採択案件の中から
- 例: 医療用ソフトウェア、3D造形によるインプラント

### 検討テーマ調査について

- 1) 再来年度以降のガイドライン検討テーマを決めるに当たり、医療機器技術動向、学会からのニーズ、産業界からのニーズを幅広く調査する
- 2) 調査結果を来年度合同検討会に報告し、再来年度のガイドライン新規検討テーマを決める参考とする。

### セミナーの開催について

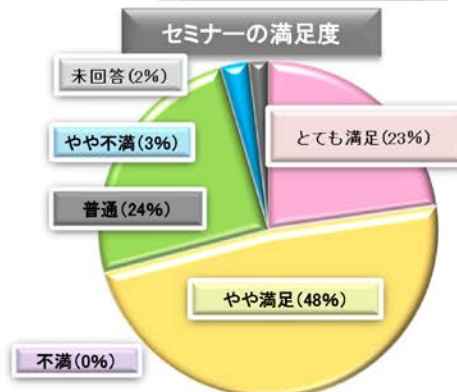
- 1) 平成23年度に開催したセミナーは、非常に好評であったが、各テーマの説明時間が短く詳細な内容を説明できなかったため、各テーマについてより詳細に説明してほしいという意見が多かった
- 2) そこで、より詳しいセミナーを開催し、再生医療、画像診断支援システム等の個別のテーマについて、ガイドラインをかみ砕いた解説書を作成し、医療機器の開発・薬事申請に不慣れな企業でも開発プロセスが理解できるように説明

(第12回合同検討会資料:経済産業省)

## 次世代医療機器 開発ガイドライン・評価指標セミナー

日時：2012年1月20日(金)  
13:00～17:30

会場：日本教育会館  
参加者：250名  
(講演者・関係者を含む)



<参加者からの自由コメント(回答数33)>

- ・内容が濃厚なので、講演時間を長くするか演題を少なくする等、時間的余裕が欲しい(11)。
- ・さらに具体的で詳細な講演を聞きたい(10)。




4. 本年度DNAチップ開発ガイドライン事業の説明資料

「DNAチップ開発ガイドライン事業の説明」（第1回普及活動WG委員会資料2）

経済産業省委託

テラーメイド医療用診断機器分野  
遺伝子発現解析用DNAチップ  
開発ガイドライン事業

DNAチップ開発ガイドライン事業の説明

 産業技術総合研究所  
バイオメディカル研究部門  
木山亮一

2013年11月13日

1

体外診断薬

- ・体外診断薬（薬事法では「体外診断用医薬品」）は、「専ら疾病の診断に使用されることが目的とされている医薬品のうち、人又は動物の身体に直接使用されることのないものをいう」。
- ・体外診断薬は、医療機器規制国際整合化会議（GHTF。日本、EU、アメリカ合衆国、カナダ、オーストラリアによって構成。）の定義では医療機器になるが、日本の薬事法では医薬品扱い。
- ・ただし、体外診断薬は、医療機器同様の認証制度が導入されているほか、規制はGHTFの定義にあわせて医療機器同様に扱われている。

単一の遺伝子の状態を検査する



インフルエンザウイルスの迅速測定キット「クイックナビ™-Flu」

大塚製薬株式会社が販売する、感染症分野の体外診断用医薬品。イムノクロマト法を用いて、鼻腔拭い液又は鼻腔吸引液中のインフルエンザウイルス抗原を、迅速かつ特異的に検出することが可能な測定キット。ウイルスの検出を8分以内で最終判定することが可能。「クイックナビシリーズ」では、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ノロウイルス、及び、RSVを対象とした測定キットを販売。

複数の遺伝子の状態を検査する



MammaPrint（蘭国Agendia社）：乳癌診断用DNAチップ。

- ・細胞周期、浸潤、転移、血管新生などに関わる遺伝子70個を同時に測定し、特別のアルゴリズムを用いて、遠隔転移リスクをスコアで示す。
- ・FDA承認（2007年2月6日）。

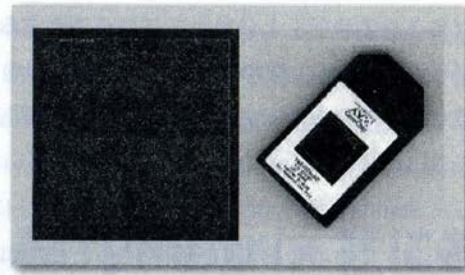
# DNAチップとは？

## 【DNAチップの特徴】

- ・塩基配列の異なる短いDNAを数センチ角の基盤の上に何千万種と格子状に整列させた一種のセンサー。
- ・基板上のDNAと特異的に結合するものを高感度で検出。
- ・一度に数千～数万種のDNAを解析できることから多数の遺伝子に発現解析、個人により異なる多型 (SNPs) の同時解析が可能。

## 【DNAチップの種類】

- ・「DNAマイクロアレイ」とも呼ぶ。
- ・アレイヤーを使ってcDNAやオリゴヌクレオチドを基板上にのせて作成するStanford型。
- ・光リソグラフィで核酸のカップリング反応を制御して作成したAffymetrix社のGeneChip。
- ・その他、電気式の検出方を利用したもの、中空線維を利用したものなどがある。



(a) Affymetrix社製 GeneChip® (数万～数十万プローブ/cm<sup>2</sup>)



(b) Stanford型のDNAチップ (～数千プローブ/cm<sup>2</sup>)

図1 2種類のDNAチップ

「注目先端技術成功の理由」(武田計測先端知財団編)より

ScienceDirect  
Food and Chemical Toxicology 43 (2007) 2470–2478

**漢方生薬の解析**

Activation of rapid signaling pathways and the subsequent transcriptional regulation for the proliferation of breast cancer MCF-7 cells by the treatment with an extract of *Glycyrrhiza glabra* root

Sijun Dong<sup>a</sup>, Akio Inoue<sup>b</sup>, Yun Zhu<sup>a</sup>, Masao Tanji<sup>b</sup>, Ryoiti Kiyama<sup>a,b\*</sup>

---

ELSEVIER  
journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodtox

**カビ毒の解析**

Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes

Meher Parveen, Yun Zhu, Ryoiti Kiyama<sup>\*</sup>

---

ELSEVIER  
journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfcs

**新エストロゲンの発見**

Brefeldin A Is an Estrogenic, Erk1/2-Activating Component in the Extract of *Agaricus blazei* Mycelia

Sijun Dong<sup>1,2,3</sup>, Yoshiyuki Furutani<sup>1,2,3</sup>, Sadao Kimura<sup>1</sup>, Yun Zhu<sup>1</sup>, Kazutaka Kawabata<sup>4</sup>, Michiko Furutani<sup>1,2,3</sup>, Toshio Nishikawa<sup>1</sup>, Takeshi Tanaka<sup>1</sup>, Tomoh Masaki<sup>1</sup>, Rumiko Matsuoka<sup>1,2,3,5,6</sup> and Ryoiti Kiyama<sup>a,b\*</sup>

---

ELSEVIER  
journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfcs

**蛍光色素の利用**

Application of Fluolid-Orange-labeled probes for DNA microarray and immunological assays

Yun Zhu<sup>1</sup>, Takumori Ogaeri<sup>1</sup>, Jun-ichiro Suzuki<sup>1</sup>, Sijun Dong<sup>1</sup>, Taisihiro Aoyagi<sup>1</sup>, Keiji Mizuki<sup>1</sup>, Mikako Takasugi<sup>1</sup>, Shin-ichiro Inoue<sup>1</sup>, Ryoiti Kiyama<sup>1</sup>

ScienceDirect  
Molecular and Cellular Endocrinology 272 (2007) 38–49

**ダイオキシンの解析**

Estrogen-responsive genes newly found to be modified by TCDD exposure in human cell lines and mouse systems

Junko Tanaka<sup>a,b</sup>, Junzo Yonemoto<sup>a,b</sup>, Hiroko Zaha<sup>a,b</sup>, Ryoiti Kiyama<sup>c</sup>, Hideko Sone<sup>a,b,\*</sup>

---

ELSEVIER  
Toxicology Letters 163 (2006) 130–141

**フェノール類の解析**

Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity

Shunichi Terasaka<sup>a,b</sup>, Akio Inoue<sup>a</sup>, Masao Tanji<sup>a</sup>, Ryoiti Kiyama<sup>a,b,c,\*</sup>

---

ScienceDirect  
Toxicology in Vitro 21 (2007) 741–752

**乳癌細胞の解析**

Comparative profiling of the gene expression for estrogen responsiveness in cultured human cell lines

Akio Inoue<sup>a</sup>, Yuko Seino<sup>b,c</sup>, Shunichi Terasaka<sup>a</sup>, Shin-ichi Hayashi<sup>c,d</sup>, Takao Yamori<sup>e</sup>, Masao Tanji<sup>a</sup>, Ryoiti Kiyama<sup>a,b,\*</sup>

---

ELSEVIER  
Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes

A Inoue<sup>1,2</sup>, N Yoshida<sup>1,3</sup>, Y Omoto<sup>1</sup>, S Oguchi<sup>4</sup>, T Yamori<sup>5</sup>, R Kiyama<sup>2,4</sup> and S Hayashi<sup>1</sup>

**カスタムDNAチップ最初の論文**

---

ELSEVIER  
Environmental Pollution

Estrogenic activity of bio-degradation products of C-heavy oil revealed by gene-expression profiling using an oligo-DNA microarray system

Yun Zhu<sup>1</sup>, Keiko Kitamura<sup>2</sup>, Akihiko Maruyama<sup>3</sup>, Takanori Higashihara<sup>4</sup>, Ryoiti Kiyama<sup>a,b,\*</sup>

**重油の解析**



## 遺伝子診断用DNAチップの例

### 遺伝子型判定用DNAチップ

- ・ 遺伝子型判定を行うDNAチップ
- ・ 薬剤耐性遺伝子の多型判定（薬事承認）
- ・ ウイルスの遺伝子型判定（薬事承認）
- ・ 多くの場合、一度判定すると再検は不必要
- ・ 他の方法で代用できる場合が多い（PCR法など）
- ・ がんの遺伝子型判定にも利用可（開発段階）

### 遺伝子発現解析用DNAチップ

- ・ 遺伝子の発現解析を行うDNAチップ
- ・ 乳がんの転移リスク判定など（FDA承認）
- ・ 経過判定など何度も使用する
- ・ IVDMA（体外診断多変指標測定）として有効
- ・ がんの遺伝子発現解析に特に有効

### 特徴

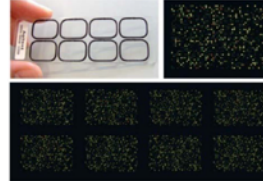
#### AmpliChip CYP450（ロシュ・ダイアグノスティクス）



- ・ 薬物代謝酵素シトクロムP450の遺伝子型を調べるDNAチップ
- ・ 体外診断薬としての申請（2007年2月5日）
- ・ シトクロムP450の2D6の32種類の多型と2C19の2種類の多型を判別
- ・ 製造販売承認を取得（2009年5月12日）

### 技術・製品例

#### MammaPrint（オランダ、Agendia社）



- ・ 70 遺伝子の発現解析により乳がんの転移・再発リスクを判定。
- ・ DNAチップによる遺伝子発現解析データを利用。
- ・ FDA承認（2007年2月）。
- ・ 価格：¥380,000（税別：健康保険適用外）。

#### クリニチップHPV（東芝など）



DNAチップカセット



医療用DNA検査装置

- ・ 2007年5月「ヒトパピローマウイルス型判別用DNAチップ」の薬事申請（第一化学薬品株式会社、株式会社東芝、東芝ホクト電子株式会社）
- ・ 2009年7月に承認（クリニチップHPVとして販売）
- ・ 本ガイドライン事業が申請に貢献

#### Tissue of Origin Test（米、Pathwork社）



- ・ 15の悪性腫瘍の結果と比較して、癌の原発組織を決定。
- ・ DNAチップによる遺伝子発現解析データを利用。
- ・ FDA承認（2008年7月31日）。

## ガイドラインの必要性

### DNAチップ開発の問題点

- ・ 単一の遺伝子の情報を得る方法に比べて複雑なため開発が難しい。
- ・ 検査開発メーカーは、検査コンテンツの申請毎にDNAチップ・試薬安定性や再現性、および性能に関する試験が必要であり、負担が大きい。
- ・ 臨床検体の調製法が多様なため、信頼ある測定が難しい。検体調製法や判定アルゴリズムなども考慮する必要がある。
- ・ 検査開発用のプラットフォームが確立しないため、前処理にあたる「検体品質管理」の技術課題を定義できず、関連技術開発が進まない。

### 必要なガイドラインの内容

- ・ GMP製造され、安定性・再現性・性能が認められたDNAチップ・試薬を検査開発用のプラットフォームとして承認するための開発ガイドライン。
- ・ 各検査メーカーは、体外診断薬の承認申請毎にDNAチップ・試薬の基本性能試験を行う必要がなくなり、診断に応じたシグネチャー（遺伝子の組み合わせ）を開発し薬事申請する。

## ガイドラインに関連する活動

| 地域   | ガイドライン                    | 時期      | 内容等   |
|------|---------------------------|---------|---|
| 欧州   | SPIDIAプロジェクト              | 2008-   | 前処理過程の標準化   |
| 米国   | MAQC I-IV                 | 2005-   | マイクロアレイ測定 of 標準化  |
|      | IVDMIAガイドライン              | 2007    | Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories, and FDA In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays (IVDMIA)  |
|      | 乳がん予後予測ガイドライン             | 2007    | Class II Special Controls Guidance Document; Gene Expression Profiling Test System for Breast Cancer Prognosis 2007 |
|      | PGxデータ提出ガイドライン            | 2007    |   |
| 日本   | 遺伝子型検定用DNAチップ (経済産業省)     | 2007.5  | 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-遺伝子型 (ジェノタイプ) 検定用DNAチップに関して-   |
|      | 遺伝子型判定用DNAチップ (厚生労働省)     | 2008.4  | 次世代医療機器評価指標の公表について-DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標-  |
|      | 遺伝子発現解析用DNAチップ (経済産業省)    | 2012.8  | テーラーメイド医療用診断機器分野 遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン2012   |
|      | 遺伝子型判定用DNAチップ (厚生労働省)     | 2012.11 | RNAプロファイリングに基づく診断装置の評価指標  |
| OECD | 分子遺伝学的検査における質保証に関するガイドライン | 2007    | OECD GUIDELINES FOR QUALITY ASSURANCE IN MOLECULAR GENETIC TESTING  |
| ISO  | GMO検出                     | -       | Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products                        |
|      | マイクロアレイ解析                 | 2010-   | NWIP - CD : General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences        |

バイオチップコンソーシアム調査

海外技術動向

## MAQCプロジェクトの概要 (MAQC-I~IV)

MAQCプロジェクト (2005~) ホームページ : <http://www.fda.gov/>

DNAチップの標準化を進めるために、2005年に設立された、米FDA主導で51の大学・企業などからなるマイクロアレイ品質管理 (MAQC) コンソーシアムが進めるプロジェクト。

|                       | プロジェクトテーマ  | 成果   |
|-----------------------|--|--|
| MAQC-I<br>2005~2006   | <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ プラットフォーム間差・互換性</li> <li>◆ 各種統計解析法で同定された発現遺伝子の差を評価</li> <li>◆ FDAのファーマコジェノミクス承認用ガイドライン向けのデータを更新</li> </ul> | Nature Biotechnology (2006)                                    |
| MAQC-II<br>2007~2010  | <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 臨床エンドポイント、トキシコロジカルエンドポイントを予測する分類モデルの開発方法、検証方法の評価</li> <li>◆ ゲノム研究の再現性→新規FDAガイドラインの開発に貢献</li> </ul>        | Nature Biotechnology (2010)<br>Pharmacogenomics Journal (2010) |
| MAQC-III<br>2009~2012 | <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ SEQC (sequencing quality control) 次世代シーケンサーの技術性能評価</li> <li>◆ RNA・DNA解析の情報解析法の特長と限界を評価</li> </ul>         | 2013年2月?<br>Nature Biotechnologyへ投稿予定                          |
| MAQC-IV<br>2013~      | <ul style="list-style-type: none"> <li>◆ 患者特異的ゲノム情報の精度</li> <li>◆ 深刻な薬物副作用を及ぼす特異的状況回避</li> </ul>   |  |

8

バイオチップコンソーシアム調査



## 国際標準化の動向

### TC212 (Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems)

Scope: **Standardization and guidance in the field of laboratory medicine and in vitro diagnostic test systems.** This includes, for example, quality management, pre- and post-analytical procedures, analytical performance, laboratory safety, reference systems and quality assurance.

### TS/P231【新しいTCの提案】

Scope: **Standardization in the field of Biotechnology seeks internationally recognized and accepted terms and definitions, analytical and diagnostic methods, computing tools and metrology for international comparability and integratability of data.** The new committee would not seek to standardize academic or SME research, but would instead encourage experts of these groups to actively participate in the standardization of biotechnological products, techniques and processes. The proposed Technical Committee would hence also be responsible for the timely incorporation of innovative ideas into the standardization works of this field.

関連する国際標準化委員会：ISO/TC212 (Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems), ISO/TC229 (Nanotechnology), ISO/IEC/JTC1/SC37 (Biometrics), CEN/TC140 (In-vitro diagnostic medical devices), CEN/TC233 (Biotechnology), CEN/TC316 (Medical products utilizing cells, tissues and/or their derivatives), CEN/TC411 (Bio-based products), CEN/TC419 (Project Committee- Forensic Science Services)

参加予定国：オーストラリア、ベルギー、ブラジル、カナダ、中国、デンマーク、フィンランド、フランス、ドイツ、アイスランド、インド、イスラエル、日本、オランダ、ニュージーランド、シンガポール、韓国、スペイン、スイス、イギリス、アメリカ

9

## SPIDIA動向について

### SPIDIAとは

- ・「**Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics**」の略
- ・4.5年間（2009～2013年）で1300万ユーロの予算（ECは900万ユーロ支出）
- ・7つの公的研究機関、8つの企業、ヨーロッパの標準化機関がコンソーシアムを設立
- ・**体外診断薬に利用するプレアナリシスの標準化と改善を目標（診断用DNAチップの精度に影響）**
- ・新規のアッセイ法や標準化バイオマーカーの探索により得られる科学的根拠をもとにプレアナリシスツールの最適化のためのガイドラインを策定

### なぜSPIDIAが始まったのか

- ・核酸、タンパク質、代謝産物のプロファイルをもとにした体外診断薬の開発の進展
- ・これらの分子のプロファイルは輸送や保管などの影響を受けて変化するため正確な評価が困難
- ・検体の調製、取扱い、標準化、保管にはガイドラインが必要
- ・SPIDIAではガイドライン、標準化プロトコル、プレアナリシスツールの提供が目標

### SPIDIAの活動

- (1) 体外診断薬による診断のプレアナリシスに関する全ヨーロッパの品質管理プロトコルとガイドラインの策定
  - ・組織/がん/血液/血清/血漿から採取されるDNA/RNA、タンパク質、及び、代謝産物にフォーカス
  - ・検体の品質管理に必要なバイオマーカーを探索
- (2) 体外診断薬による診断のプレアナリシスの弱点を克服する技術の開発と統合
  - ・スワブによって採取した検体の自動化処理など、組織、血液、非侵襲調製検体の標準化に関する新しい技術開発
- (3) 新発見やガイドラインに関する情報を医療、研究、バイオバンクなどのコミュニティーに発信し、倫理的問題への関心を高めコンプライアンスを求める
- (4) ニュースレターによりプロジェクトの進展を公表（最新版：2013年3月号）

## 国内企業によるDNAチップ開発動向

| 企業     | 区分   | 用途  | 備考                                   |
|--------|------|---|--------------------------------------|
| 東芝     | 医療用  | 感染症診断用、薬効・副作用判定用、疾病早期・予後診断用                         | ジェネライザー電流検出型                         |
|        | 産業向け | バイオテロ対策用、食品検査用、個人認証用チップ                             | ジェネライザー電流検出型                         |
| 東洋製罐   | 産業向け | 人体および食品に悪影響を及ぼす施設環境中の主要なカビや菌の検出用途<br>食品の食中毒菌検査用途    | GENOGATE(ジェノゲート)<br>ジーンシリコン<br>蛍光検出型 |
| 東洋鋼鈑   | 医療用  | 診断用チップ開発中   |                                      |
| 東レ     | 研究用  | ヒト全遺伝子型DNAチップ<br>消化器がん研究用チップ<br>microRNA研究用DNAチップ 等 | 3D-Gene®<br>蛍光検出型                    |
| 三菱レイヨン | 研究用  | 皮膚、美白、食品感受性評価、酸化ストレス、免疫、メタボリック、アレルギー、マイクロRNA 等      | GenoPal®<br>繊維型DNAチップ<br>蛍光検出型       |

バイオチップコンソーシアム調査

11

### 平成18年度開発WG成果（平成19年5月）

「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-遺伝子型（ジェノタイプ  
ング）検定用DNAチップに関して-」

経済産業省ホームページにて公開：

[http://www.meti.go.jp/policy/mono\\_info\\_service/service/iryuu\\_fukushi/index.html](http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryuu_fukushi/index.html)

#### (A) 測定装置(DNAチップと解析装置)の諸特性

- A-1 測定装置の特異性など
1. 特異性
  2. 感度・ダイナミックレンジ
  3. 再現性
  4. 検査の品質管理
  5. その他、性能特性に影響する要因に関する記載
- A-2 サンプル・検体、その前処理・保存等、試薬
- A-3 ソフトウェア（解析、判別）
- A-4 データ処理
- A-5 品質管理

#### (B) 評価法

- B-1 評価項目
- 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
- B-2 塩基配列決定法との比較
- B-3 データ解析、解析ソフトについて
- B-4 有意性の検定
- B-5 データの管理について
- B-6 安全性について

#### (C) 標準物質

- C-1 外部参照物質に求められる要件
- C-2 外部参照物質の選定、管理、入手

### 平成23年度開発WG成果（平成25年3月）

「テラーメイド医療用診断機器分野 遺伝子発現解析用DNAチップ[改訂版]開発ガイドライン2012」

#### 1. 概要

- 1.1 遺伝子発現解析用DNAチップ
- 1.2 本ガイドラインの目的と範囲
- 1.3 検査対象とリスク
- 1.4 先行事例
- 1.5 測定システム

#### 2. 測定装置(チップと装置)

- 2.1 原理と構造
- 2.2 方法
- 2.3 特異性、感度・ダイナミックレンジ、再現性等について
- 2.4 必要とするサンプル・検体、その前処理・保存法、試薬等について
- 2.5 ソフトウェア
- 2.6 データ処理
- 2.7 品質管理

#### 3. 評価法

- 3.1 評価項目
- 3.2 他の発現解析手法との比較
- 3.3 データ解析、解析ソフト
- 3.4 妥当性の確認
- 3.5 臨床性能試験
- 3.6 判定アルゴリズム
- 3.7 データの管理
- 3.8 安全性

#### 4. 標準物質

- 4.1 目的
- 4.2 標準物質に求められる要件



## DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標

薬食機発第0404002号：平成20年4月4日公表（厚労省医薬品食品局審査官理課医療機器審査管理室長）

- ・評価指標は承認申請資料の収集やその審査の迅速化などの観点から、製品の評価において着目すべき事項（評価項目）を示すものである。
- ・DNAチップは専用の測定・解析装置とともに使用され、多項目にわたる複数の測定値をアルゴリズムに基づいて解析し、医療情報として提供する。したがって、測定の精度や信頼性だけでなく、解析に使われるアルゴリズムや統計処理の妥当性などが評価の対象になる。
- ・本評価指標は、DNAチップを用いた遺伝子発現解析用診断薬など関連する製品にも参考になる。
- ・ヒトの遺伝子多型や病原微生物の遺伝子型を判定する診断薬を対象とする。
- ・DNAチップ法は、シーケンシングに比べて大量、迅速かつ、低コストで必要な情報が得られるが、塩基配列を正確に判定できることが重要である。
- ・DNAチップはクラスⅢ体外診断用医薬品、専用の測定・解析装置はクラスⅠ医療機器として扱われる。

### 評価指標の主な事項

1. 品目の概要に関する事項  
臨床的意義（有用性）、測定原理、プライマー／プローブ等の塩基配列、DNAチップ構成、対照物質、アッセイ条件、ソフトウェア
2. 仕様及び安定性に関する事項  
品質管理の方法、感度／特異性／測定範囲、測定装置の較正、安定性に関する資料（保存条件や有効期限）
3. 性能に関する事項  
遺伝子型判定の精度（DNAシーケンサーの結果と比較・確認）、対照試料、操作上のコンタミネーション対策、検体の調製（高品質なDNA・RNA試料採取のための採取・保管・運搬の方法）
4. リスク分析に関する事項（誤診のリスクなど）

## RNAプロファイリングに基づく診断装置の評価指標

薬食機発1120第5号：平成24年11月20日公表（厚労省医薬品食品局審査官理課医療機器審査管理室長）

### 【概要、対象、位置づけ】

- ・解析装置が導き出す医療情報の有用性と信頼性を確認し、診断装置としての承認審査の道しるべ。
- ・DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標（薬食機発第0404002号）の考え方を踏襲。
- ・血液や病変部等のRNAプロファイルから医療情報を導き出す診断装置を対象。
- ・診断装置から得られる情報の臨床的意義については、個別の事例ごとに検証。
- ・本評価指標が対象とする製品の評価に当たっては、柔軟に対応する必要がある。

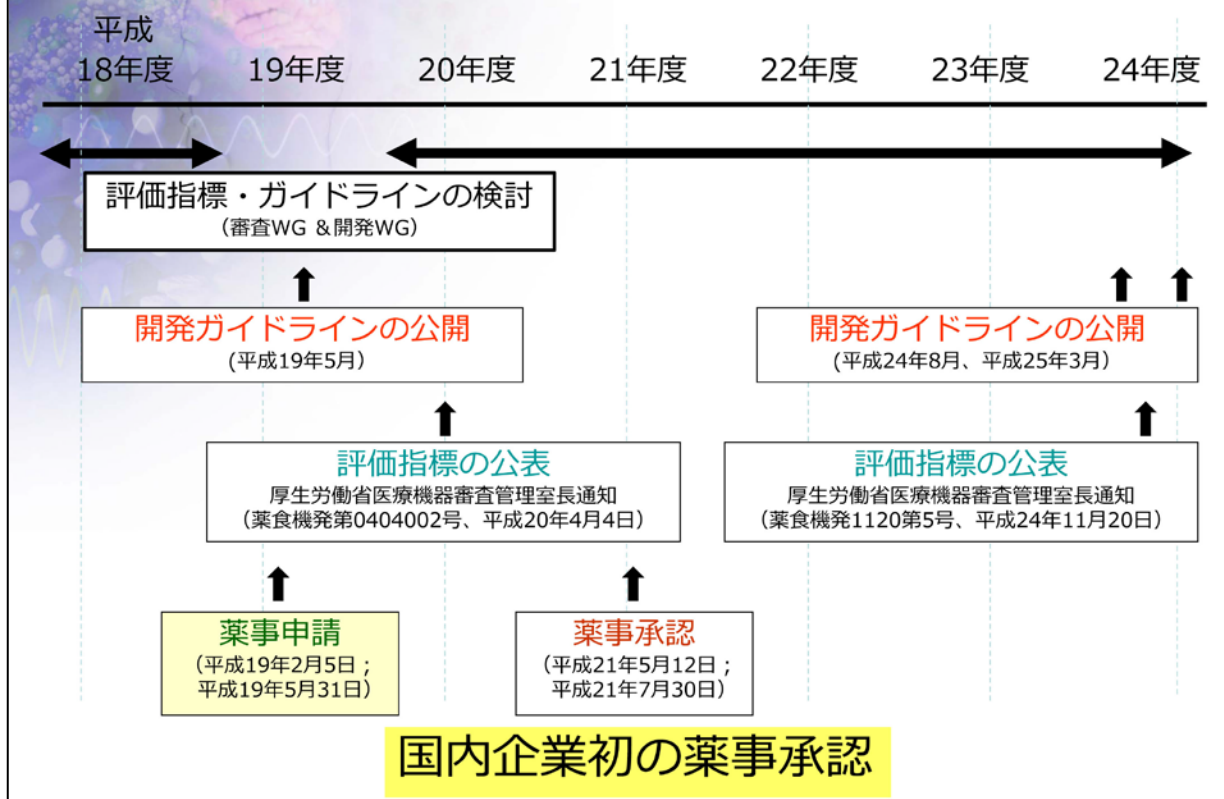
### 【評価に当たって留意すべき事項】

- (1) 品目の概要に関する事項：1) 臨床的意義、2) 対象とする被験者の範囲と添付文書への記載、3) RNA測定装置及び測定原理、4) 遺伝子の選択、5) プライマー、プローブ等の塩基配列、6) DNAチップ構成、7) DNAチップに搭載される対照遺伝子の配列、8) アッセイ条件、9) ソフトウェア、10) 判定アルゴリズム
- (2) 仕様及び安定性に関する事項：1) 品質管理の方法、2) 分析の妥当性（感度、特異性）、測定範囲、3) データの標準化、4) 測定装置の較正（較正用チップ、標準試料）、5) 安定性に関する資料、6) 試薬
- (3) 性能に関する事項：1) プロファイル取得の精度、2) 検体と共に測定する対照試料、3) 再現性、頑健性（標準試料を用いた3回以上の測定による再現性。測定日や作業者を替えた測定や、複数施設における測定）、4) コンタミネーション防止対策、データ取り直し対策、5) RNA試料の調製（遺伝子関連検査検体管理マニュアル（日本臨床検査標準協議会JCCLS）を参照）、6) 測定装置（DNAチップ等と測定装置は一体として評価）、7) 判定アルゴリズム
- (4) 臨床性能に関する事項：1) 被験者集団の妥当性、2) 検体（2施設以上で150以上の検体を用いた臨床試験成績。統計学的に有意性を示すことができれば、150以上の検体数でなくとも許容。過去に集めた検体、市販の検体も評価資料として使用できる）、3) 海外で行われた臨床性能試験成績の扱い（海外での臨床性能試験の成績）、4) 医療情報の提示（病変の存在確率%、2年以内の再発確率%や5年生存率%など）、5) 倫理面の配慮
- (5) リスク分析に関する事項、(6) データの保存と医療情報の表示方法に関する事項

【その他の事項】(1) アルゴリズムの変更、(2) 適応範囲の変更

14

## ガイドライン・評価指標の活用（DNAチップ）



## テーラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発WG 平成24年度活動内容

### 開発WGメンバー構成

|       |                                 |
|-------|---------------------------------|
| 久原 哲  | 九州大学大学院農学研究院 教授（座長）             |
| 秋山 英雄 | 東レ株式会社先端融合研究所 主任研究員             |
| 油谷 浩幸 | 東京大学先端科学技術研究センター 教授             |
| 岡村 浩  | 東洋鋼鈑株式会社 技術企画部技術企画グループ グループリーダー |
| 楠岡 英雄 | 国立病院機構大阪医療センター 院長               |
| 桑 克彦  | 日本臨床検査標準協議会（JCCLS） 理事           |
| 住谷 知明 | プレジジョンシステムサイエンス株式会社 執行役員・事業開発部長 |
| 橋本 幸二 | 東芝ディスプレイ・部品材料統括 新デバイス開発センター 参事  |
| 森 康晃  | 早稲田大学大学院 創造理工学研究科経営デザイン専攻 教授    |

### 平成24年度の活動

- ・開発WG委員会：3回開催（平成24年11月12日、平成25年1月30日、平成25年2月21日）
- ・委託調査：国内企業開発動向（ヒアリング）、薬事申請に関する国内外の動き（申請状況、ガイドラインなど）、標準化動向などの調査（ドイツ、キアゲン社）
- ・話題提供：「今後のJIS化の対処方針」、開発動向、バイオチップ開発状況、診断用DNAチップ開発例
- ・「遺伝子発現解析用DNAチップ」に関する標準化資料作成（評価方法、測定装置、標準物質に分けて検討事項を議論、JIS標準仕様書フォーマットに準拠）



# 遺伝子発現解析用DNAチップに関する標準化資料

標準化資料

「DNAチップを用いた医療用診断装置の評価法に関する指針」

1. 適用範囲

2. 引用規格

3. 用語及び定義

4. 評価方法

- 4.1 他の発現解析手法との比較による評価
- 4.2 データ解析及び解析ソフトに関する評価
- 4.3 妥当性の確認
- 4.4 臨床性能試験
- 4.5 判定アルゴリズム
- 4.6 データの管理に関する評価
- 4.7 判定に関するリスク評価
- 4.8 安全性に関する評価

附属書A DNAチップを用いた医療診断装置の原理、構造等

- A.1 一般
- A.2 原理と構造
  - A.2.1 RNAの検出原理
    - A.2.1.1 サンプル調製方法
    - A.2.1.2 標識方法
    - A.2.1.3 検出方法
  - A.2.2 チップと装置の構造
- A.3 方法
  - A.3.1 検出の概要
  - A.3.2 装置の機能

- A.4 特異性、感度、ダイナミックレンジ及び再現性
  - A.4.1 特異性
  - A.4.2 感度・ダイナミックレンジ
  - A.4.3 再現性
  - A.4.4 検査の品質管理
  - A.4.5 その他、性能特性に影響する要因
- A.5 必要とする検体・サンプル、サンプルの前処理・保存、試薬等
  - A.5.1 検体・サンプル
  - A.5.2 サンプルの前処理
  - A.5.3 サンプルの保存
  - A.5.4 試薬
  - A.5.5 試薬の保存性・安全性
  - A.5.6 自動化
- A.6 ソフトウェア
  - A.6.1 装置を構成するソフトウェアの概要
  - A.6.2 判定アルゴリズムの原理と概要
- A.7 データ処理
- A.8 品質管理
  - A.8.1 DNAチップ
  - A.8.2 検査装置

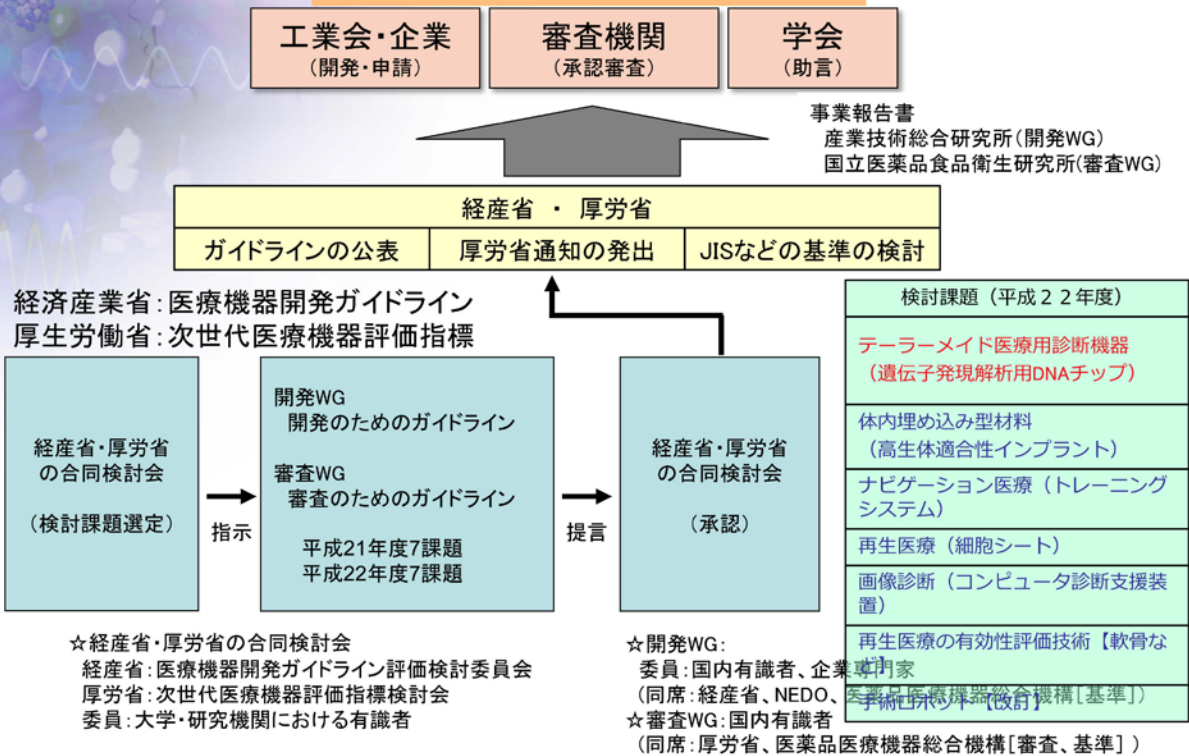
- ・評価法を中心にまとめた
- ・国際規格への提案を視野に入れた修正
- ・引用規格など前例を記載

附属書B 標準物質

- B.1 目的
- B.2 標準物質に求められる要件
  - B.2.1 標準物質の選定
  - B.2.2 標準物質の管理
  - B.2.3 標準物質の入手

## ガイドライン作成及び公表のプロセス

### 効率的な機器開発・迅速な承認審査



この報告書は、平成25年度に独立行政法人 産業技術総合研究所が、経済産業省からの委託を受けて実施した成果を取りまとめたものです。

— 禁無断転載 —

平成25年度 戦略的技術開発委託費  
医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業  
(医療機器に関する開発ガイドライン作成のための支援事業)  
テーラーメイド医療用診断機器分野  
開発ガイドライン  
普及活動WG報告書

連絡先

〒100-8901  
東京都千代田区霞が関1-3-1  
経済産業省商務情報政策局 ヘルスケア産業課  
医療・福祉機器産業室  
TEL : 03-3501-1562  
FAX : 03-3501-0315  
URL : <http://www.meti.go.jp/>

発行

〒305-8564  
茨城県つくば市東1-1-1  
独立行政法人 産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門  
医療機器開発ガイドライン事業実務委員会  
TEL/FAX : 029-861-7840  
E-Mail : [human-ws-ml@aist.go.jp](mailto:human-ws-ml@aist.go.jp)