

# AMED 医薬品等規制調和・評価研究事業

## 「遺伝子パネル検査によるコンパニオン診断システムの

### 標準化に向けた検討」(永井班) 提言

#### 「遺伝子パネル検査の分析学的同等性評価に係る留意点について」

##### 背景

FoundationOne CDx がんゲノムプロファイル及び OncoGuide NCC オンコパネルシステムが 2018 年 12 月に承認、2019 年 6 月に保険適用されて以降、遺伝子パネル検査によるコンパニオン診断システム (companion diagnostics system: CDx) 及びがんゲノムプロファイリング検査 (comprehensive genomic profiling: CGP) を用いたがんゲノム医療は着実に進展してきた。さらにこれらの組織検体を用いた検査に加え、血漿検体を用いた検査として、FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイルが 2021 年 3 月に承認、2021 年 8 月に保険適用された。

本邦における既承認 CDx が存在するバイオマーカーに対して新たに CDx を開発する場合には、同等性試験又は真度試験として、臨床検体又は人工構築検体を用いて、既承認 CDx 又は標準的な方法として確立した検査法との分析学的同等性を評価する必要がある(「コンパニオン診断システムに対する新たな規制上の取扱い案」令和元年8月9日 PMDA(医薬品医療機器総合機構)コンパニオン診断薬 WG、「コンパニオン診断薬等及び関連する医薬品に関する技術的ガイダンス等について」(平成 25 年 12 月 26 日付け薬食審査発事務連絡))。ただし、実際には、臨床検体が貴重であること、人工構築検体の活用方法に関するコンセンサスが確立していないこと、対照法としての既承認 CDx による測定結果の入手が困難である場合があること、から分析学的同等性の評価に際して実現可能性の観点でハードルが存在する場合がある。

また、CGP により CDx が存在する遺伝子変異等が確認された場合、エキスパートパネルが当該遺伝子変異等に係る医薬品投与が適切であると推奨すれば、改めて CDx による検査を行うことなく当該医薬品を投与しても差し支えないとされている(「遺伝子パネル検査の保険適用に係る留意点について」令和元年 5 月 31 日付事務連絡)。しかし、現状では、既承認 CGP 同士又は既承認 CGP と CDx との分析学的同等性を評価した公表文献等、エキスパートパネルでの議論に資する公開情報は限定的である。

以上を踏まえ、AMED 医薬品等規制調和・評価研究事業「遺伝子パネル検査によるコンパニオン診断システムの標準化に向けた検討」(研究代表者:永井純正)において、遺伝子パネル検査の分析性能評価手法の標準化を検討してきた。同等性評価及び分析性能評価における真度試験、最小検出感度(limit of detection: LOD)の評価は特に臨床検体利用の有無が論点となるとともに CGP ではエキスパートパネルでの議論にとって特に重要となることから、これらの評価において、臨床検体を用いた評価を極力省略可能とするために考慮すべき留意点を本提言でとりまとめた。同一の標準物質を利用して分析性能評価を行うことで、パネル同士の外部比較が可能となる利点がある。これらは、CDx としての評価に限らず、CGP としての分析性能評価においても実施されるものと考えられるが、その中で特に重要性の高い評価項目として、本班会議での議論の結果とりあげられたものである。ただし、臨床検体での測定が可能であることを担保するため、CGP であっても、標準物質で全ての分析性能評価を完結させて遺伝子パネルの承認申請を行うことは適切ではなく、複数組織由来の臨床検体での測定が可能であることを評価するための臨床検体適合性試験も実施すべきだと考えられる。それに加え、現状では、臨床検体(臨床試験由来の検体に限定されない)を用いた検査の validation(何らかの対照法との一致率評価)も承認申請に際して必要とされているが、科学的な観点からこのような臨床検体での validation が今後も必要とされるべきか否かについて本提言に記載した。また、本提言では議論の対象外としているが、市販後の外部精度評価により、継続的に精度管理に努めていくことも望まれる。

さらに、本提言では、エキスパートパネルでの遺伝子パネル検査の分析性能に関する議論を実施しやすくすることを目的として、議論の判断材料として資するように今後企業が添付文書やレポート等で情報提供することが望まれる事項やエキスパートパネルで議論することが望まれる事項についても記載した。

#### 適用範囲

本提言は、組織検体又は血漿検体を用いて、塩基置換 (single or multiple nucleotide variant: SNV/MNV)、挿入・欠失 (insertion/deletion: Ins/Del) の遺伝子変異、コピー数異常 (copy number variation: CNV)、融合遺伝子 (Fusion) 等を検出対象とする遺伝子パネル検査に関して、CGP として承認申請する場合を対象とするものである。ただし、血漿検体から抽出した遊離 DNA を用いた遺伝子パネル検査に関しては、本文中に言及されている箇所のみが該当する。

現時点では、固形がん患者の検体を用いた遺伝子パネル検査を中心に記載しているが、造血器腫瘍を対象とした遺伝子パネル検査についても、本提言を参考とすることは可能である。

本提言は、これまでに得られている知見等に基づいて検討し作成したものであるが、今後得られる新たな科学的知見や開発状況等により変わり得るものであることに留意されたい。また、本提言で記載されている考え方に基づく具体的な開発については、必要に応じ PMDA に個別に相談されたい。

#### SNV/MNV、Ins/Del <全般的な留意事項>

・入手可能な標準物質については、Horizon 社、AcroMetrix 社のもの等があり、臨床検査振興協議会「がん遺伝子パネル検査の品質・精度の確保に関する基本的考え方 (第 2.0 版) (2019 年 5 月 31 日)」又は Medical Device Innovation Consortium SRS Report: Somatic Variant Reference Samples for NGS (<https://mdic.org/resource/srs-landscape-analysis-report/>)に記載されている内容が参考になる。このうち、班会議では、Horizon 社の HD701、HD827、HD Tru-Q での検討を行った結果、販売会社が公開している変異アレル頻度 (variant allele frequency: VAF) に概ね問題がないこと及びホモポリマー領域の変異や GC 含量が高い領域の変異等が標準物質の販売会社が公表している測定可能変異のリストに含まれており公表どおりに検出可能であることが確認でき、利用可能であることを確認した。標準物質の販売会社が公開しているデータや論文で公表されているデータを活用することは、エキスパートパネルでの議論にも資する内容であり、可能と考えられる。なお、HD827 のように、多数の変異が含まれる (同じリードに複数の変異が存在する) 標準物質では、がん遺伝子パネルのソフトウェアフィルタにて多数の変異が除去される可能性がある (近い位置に多くの変異が存在する場合にアラインメントのミスとソフトウェアフィルタが判定して除去してしまう) ことに留意する必要がある。

・LOD については VAF と hit rate (複数回測定し、変異を検出した回数を有効測定回数で割った値) で表記し、添付文書等に記載することで差し支えない。LOD を hit rate のみで評価しようとする場合、カットオフ値を下げれば、良い hit rate の結果が得られるがその分エラー率も上がることになるため、分析特異度・エラー率に加え、バックグラウンドノイズについて測定した結果も考慮して決定することが重要である。添付文書における使用上の注意の項で、「〇%以上の VAF で存在した SNV を検出する」というような記載をする際には、LOD の評価方法についても併せて情報提供することが望ましい。バックグラウンドノイズの測定に際しては正常サンプルでの測定の他に、市販の標準物質において陽性でない遺伝子変異を対象とした測定も考慮される。さらに、LOD を評価する際には、比較的大きな Ins/Del についてはデジタル PCR と比較して、NGS (キャプチャー法) を用いたがん遺伝子パネルでは VAF が低く出る傾向にあるなど、遺伝子変異検出測定手法による得手・不得手を事前に理解しておくことが重要である。

・SNV/MNV (multiple nucleotide variant), Ins/Del の検出対象変異の範囲に関しては、「コンパニオン診断システムに対する新たな規制上の取扱い案」(令和元年8月9日 PMDA コンパニオン診断薬 WG)において、対象変異にバリエーションがある場合には、原則として対象患者集団において報告されている変異の 90%以上(検出頻度ベースで)を陽性検体がカバーすることが推奨されている。分析性能の観点からは、比較的大きな Ins/Del (EGFR V769\_D770insASV, EGFR ΔE746 – A750 など)、ホモポリマー領域の Ins/Del、GC 含量が高い領域の変異 (GNA11 Q209L, AKT1 E17K など)、pseudogene が存在する遺伝子の変異については、より慎重な分析性能評価が求められる(表1参照)。以上を踏まえ、ベイト、プライマー等の設計において対象患者集団において報告されている変異を概ねカバーしていることを前提に、より慎重な分析性能評価が求められる変異に該当するか否かでグループ分けすることにより、標準物質で測定できる変異から外挿して遺伝子パネルの検出対象を評価することは可能である。

・MNV については、稀な変異であるが、ソフトウェアでの対応が困難である場合や対応する標準物質が存在しない場合があることに留意する必要がある。

・エキソンスキッピング変異については、DNA パネルでは SNV/MNV、Ins/Del の範疇で取り扱うことで差し支えない。RNA パネルでは fusion 用の標準物質に含まれている場合があるため、fusion の範疇で取り扱うことが適切と考えられる。

・標準物質については、前述の Medical Device Innovation Consortium が腫瘍細胞と正常細胞がペアとなった細胞株による新たな標準物質の作成を大規模に開始しようとしており、また、FDA による Sequencing and Quality Control (SEQC)が低い VAF までカバーした標準物質を作成しようとしている(Jones W, et al. A verified genomic reference sample for assessing performance of cancer panels detecting small variants of low allele frequency. Genome Biol. 2021;22:111)など、今後も新たな標準物質が利用可能となっていく可能性がある。

## <まとめ>

### ・CGP としての承認を目指す場合

市販されている標準物質を用いて LOD を算出することで差し支えない。標準物質を利用した LOD の表記については、既承認品の添付文書と同様に、VAF と hit rate による表記が想定される。また、真度試験についても、標準物質の参照値(販売会社が quality control の検証の一環として公開している、デジタル PCR 等により測定された VAF 等)との比較により評価することで差し支えない。

### ・エキスパートパネルで議論した上で CDx での確認を行わずに CGP の結果を基に医薬品投与を行う場合

CGP としての薬事承認取得時に評価された真度試験及び LOD の結果に基づき、既承認 CDx との同等性についてエキスパートパネルで考察することが望まれる。真度試験及び LOD 評価で利用された標準物質でカバーされない遺伝子変異については、対象となる遺伝子変異を、比較的大きな Ins/Del 等、より慎重な分析性能評価が求められる変異か否かでグループ分けし、グループ毎に検討を行う。その上で、標準物質でカバーされる遺伝子変異に対する分析性能結果に基づき、標準物質でカバーされない遺伝子変異に対する分析性能について考察することが望まれる。

### ・今後の展望・期待

科学的な観点からは、標準物質でカバーされる遺伝子変異については、既承認 CDx との同等性を評価する同等性試験の代替として、標準物質の参照値との比較による標準物質を利用した真度試験を実施することで、CDx としての承認申請に活用可能となることが望まれる。

また、標準物質でカバーされない遺伝子変異については、比較的大きな Ins/Del 等、より慎重な分析性能評価が求められる変異か否かでグループ分けし、グループ毎に検討を行う。標準物質でカバーされる遺伝子変異に対する分析性能結果に基づき、標準物質でカバーされない遺伝子変異に対する分析性能について考察可能である場合には、CDx としての承認申請に際して、標準物質の参照値との比較による標準物質を利用した真度試験をもって、既承認 CDx との同等性を評価する同等性試験を省略することが可能となることが望まれる。

## CNV

### <全般的な留意事項>

・Horizon 社の HD753 による *MYC-N* と *MET* のコピー数解析 (Droplet Digital PCR による精度管理がされている) 及び NIST Reference Material 8366 (He HJ, et al. Development and interlaboratory evaluation of a NIST Reference Material RM 8366 for EGFR and MET gene copy number measurements. Clin Chem Lab Med. 2019;57:1142-1152) による *EGFR* と *MET* のコピー数解析 (デジタル PCR の結果がコントロールとして利用可能である) について、本班会議で検討した結果、販売会社が公開しているコピー数に概ね問題がないことが確認でき、がん遺伝子パネルの分析性能評価に利用可能であることを確認した。なお、NIST Reference Material 8366 は 6 種類のヒト細胞株から作製され、デジタル PCR で測定されたりファレンス遺伝子との比が提供されている。6 種類のヒト細胞株のうち、デジタル PCR で *MET* のコピー数 33.4 となっている Hs746T については、NGS (キャプチャー法) を用いたがん遺伝子パネルでの *MET* のコピー数予測値はデジタル PCR での値よりも低くなっており、このような高いコピー数の標準物質では、プローブの枯渇により、キャプチャー法を用いたがん遺伝子パネルでのコピー数予測上限値は一般に PCR 法と比較して低くなることが想定されることに留意する必要がある。また、*ERBB2* のコピー数解析用の標準物質としては、NIST Reference Material 2373 (Lih CJ, et al. Certified DNA Reference Materials to Compare HER2 Gene Amplification Measurements Using Next-Generation Sequencing Methods. J Mol Diagn. 2016;18:753-761) のゲノム DNA (デジタル PCR 及び定量 PCR の結果がコントロールとして利用可能である) を輸入して利用することが可能となっている。本班会議で検討した結果、販売会社が公開しているコピー数に概ね問題がないことが確認でき、がん遺伝子パネルの分析性能評価に利用可能であることを確認した。

・CNV の LOD としては、コピー数又は腫瘍割合と hit rate で表記することで差し支えない。その際の腫瘍割合が病理検体におけるカウントによるものか、VAF 等から算出されたものかが既承認品では不明瞭であるが、腫瘍割合を validate された値として記載することは難しいため、やむを得ないものと考えられる。また、既承認品の添付文書又は審査報告書と同様に、CNV においても検出判定基準は明記すべきである。

・コピー数は相対的な数値であり、何かとの比をとって算出された値である。パイプラインでどのような計算をしているかは企業の機密事項として開示が困難である場合が多いと考えられる。しかし、少なくともレポートに表示されているコピー数が ploidy や腫瘍割合で補正された値であるか否かの情報提供がないとエキスパートパネルでの議論が困難であることから、表示されるコピー数が ploidy や腫瘍割合で補正された値であるか否かについて、添付文書やレポート等で情報提供されることが望ましい。CNV の解析結果について、異常あり or なしという結果のみを出力するようながん遺伝子パネルは適切とは言えない。特に、染色体本数異常や高度な核型異常が存在する場合には、このような補正にも限界があり、エキスパートパネルでの議論が必要となる。

・ATCC (American Type Culture Collection) の細胞株を利用して CNV についての LOD を設定することは技術的に可能であるが、DNA の形態で流通していない ATCC 細胞株については、継代培養した後で DNA を抽出すること、測定法により参照値が異なること等の留意事項がある。実際、ATCC で公開している QIAGEN 社のリアルタイム PCR 法によるコピー数と本

班会議でデジタル PCR で測定したコピー数には差が見られ、特に過剰なコピー数となっている細胞株ではその差が大きく出ていた。したがって、ATCC で公開しているコピー数ではなく、継代培養した後でリアルタイム PCR 法又はデジタル PCR 法で測定した結果を参照値として遺伝子パネルの CNV の分析性能を評価することは可能と考えられる。ただし、パネル同士の外部比較をする際にはコピー数の測定値同士の直接比較はできないため注意が必要である。また、DNA の形態で流通していない ATCC 細胞株でコピー数異常無しとされている遺伝子については本当にコピー数 2 であるかどうかを PCR 等で確認する必要がある。以上を踏まえ、特定のロットを第三者機関で保管することなども検討の余地がある。

・*ERBB2*については既承認の CDx が存在するが、そのような利用可能な診断薬が存在しない新たな遺伝子の CNV であり、標準物質の参照値も存在しないものについては、真度試験で対照法として用いるものとしては、デジタル PCR、FISH(タンパク発現では IHC)が想定される。FISH プローブの最適化には時間と労力を要することから、多くの遺伝子への汎用性という観点からはデジタル PCR の使用が現実的である。デジタル PCR の基準値策定にあたっては ATCC の正常細胞 (euploidy) 株のセットなどの利用が想定される。

・病理標本で IHC や FISH で陽性であっても、腫瘍の heterogeneity により希釈され、パネル検査で CNV を検出できないケースが存在することから、IHC や FISH とパネル検査とでの結果の乖離については避けられない。また、コンパニオン診断としては検証的試験の組み入れ基準や医薬品の添付文書の効能・効果等に記載されているコピー数の閾値が重要となる。

・CNV では、SNV/MNV, Ins/Del のように、より慎重な分析性能評価が求められるものに該当するか否かのグループ分けを行うことは現状の知識では困難である。

## <まとめ>

### ・CGP としての承認を目指す場合

*MET*, *EGFR*, *MYC-N*, *ERBB2*については、市販の標準物質を利用して LOD を評価することが可能である。標準物質を利用した LOD の表記については、既承認品の添付文書と同様に、コピー数又は腫瘍割合と hit rate による表記が想定される。また、真度試験についても、Hs746T 等の高コピー数の標準物質以外は標準物質の参照値との比較により評価することで差し支えない。

### ・エキスパートパネルで議論した上で CDx での確認を行わずに CGP の結果を基に医薬品投与を行う場合

CGP としての薬事承認取得時に評価された真度試験及び LOD の結果に基づき、既承認 CDx との同等性についてエキスパートパネルで考察することが望まれる。

### ・今後の展望・期待

科学的には、標準物質でカバーされる遺伝子の CDx としての承認申請の際にも、「CGP としての承認を目指す場合」と同様の留意点を踏まえた市販の標準物質を利用した LOD 評価が活用可能となることが望まれる。*ERBB2*のように、既承認 CDx が IHC であるなど、パネル検査の CNV と検出対象が異なる場合に CDx としての承認を目指す際には、真度試験又は同等性試験としての同等性評価として、既承認 CDx との一致率の評価が不可欠であると考えられる。したがって、CDx としての承認申請の際には、真度試験(同等性試験としての同等性評価を兼ねる)としては、対照法との一致率を臨床検体で評価する必要がある。真度試験の対照法としては既承認 CDx が利用可能である場合は既承認 CDx、利用不可能である(すなわち既承認 CDx での測定結果を有する臨床検体が入手できない)又は存在しない場合は精度管理されたデジタル PCR の使用が現実的である。既承認 CDx については、後発でないオリジナルの CDx を対照法とすることが原則である。但し今後、既承認 CDx としてパネル検査又はデジタル PCR のみが存在する CNV が登場した場合には、標準物質でカバーされる遺

伝子の CDx としての承認申請の際には、その CNV における既承認 CDx との同等性を評価する同等性試験の代替として、標準物質の参照値との比較による標準物質を利用した真度試験の実施が可能となることが望まれる。

但し、標準物質でカバーされない遺伝子の CDx としての承認申請の際には、臨床検体を用いた LOD 評価及び真度試験(同等性試験としての同等性評価を兼ねる)が必要であると考えられる。

## Fusion

### <全般的な留意事項>

・Fusion の LOD としては、既承認品の添付文書に記載されているとおり、VAF 又は腫瘍割合、リード数と hit rate で表記することで差し支えない。Fusion の分析性能評価にあたっては、SNV/MNV, Ins/Del のようにある閾値以上での陽性陰性の判定が重要であること、どれだけ多くの転座相手を検出できるのかという範囲が重要である。

・RNA パネルでは、理論上は(核酸からの合成又は強制発現させた細胞からの精製等により得られる)人工合成 RNA として色々な転座相手との fusion RNA を作成することで評価することは可能である。DNA パネルでは、利用可能な標準物質や臨床検体により様々な転座相手との fusion を網羅することができないことから、様々な転座相手との fusion が検出可能かを評価することは事実上不可能である。

・DNA パネル用の fusion に関する標準物質として現時点で利用可能なものは Horizon 社の HD753 による *SLC34A2/ROS1*, *CCDC6/RET* の fusion のみであり、既承認品の分析性能評価にも利用されている。本班会議でも検出可能であることを確認した。

・SeraSeq FFPE Fusion RNA v4 Reference Material は、fusion がゲノムレベルでは存在しないため、RNA パネルで使用可能であり、DNA パネルでは使用できない。本標準物質はデジタル PCR で測定したコピー数と次世代シーケンサーを用いた検査(Archer FusionPlex)で測定したユニークリード数を参照値として公表しているが、これらは互いに相関せず、本班会議での検討では、がん遺伝子パネルでの測定結果は次世代シーケンサーを用いた検査(Archer FusionPlex)で測定したユニークリード数とより良く相関する。*MET* のエクソン 14 スキッピングも含まれている。本標準物質の希釈系列は市販されておらず、LOD の算出のためには測定者自身で希釈系列を作成する必要がある。

・Fusion について特に DNA パネルでは利用可能な標準物質が限られていることは分析性能評価を行う上での障壁となっており、今後国際的に標準物質を整備していくことが望ましい。

・Fusion についてもキャプチャー法とアンプリコン法で異なる点があり、アンプリコン法では PCR で挟んで検出することになるので転座相手の限定が必要となる。キャプチャー法では転座相手を限定せずに同定することも可能だが、転座相手のイントロンをキャプチャーすることで検出を強化している場合もある(FOUNDATION ONE では *NTRK3* のイントロンを検出対象としていないが、転座相手のイントロンを検出対象とすることで *ETV6/NTRK3* は検出できる等)。したがって、各遺伝子パネルの検査法を考慮して考察する必要がある。

・繰り返し配列や類似配列のある遺伝子(*ROS1* 等)では、DNA パネルによる fusion の検出は困難であり、同等性評価には限界がある

・COSMIC に報告のある fusion 情報を収集したリスト(表 2 参照)を本班会議の成果として公開することは、現状でそのようなリストが存在しないことから、有用である。このリストは in frame のみならず out of frame の fusion も掲載されている。検出頻度についても公開情報を基に記載している。

・上記リストに掲載されている fusion を実際に各パネルで検出可能かどうかは、臨床検体や標準物質に限りがあり網羅的に検証することはできないが、プローブの位置等により推定は可能である。プローブ設計位置を基に、理論上検出可能な fusion と検出できない fusion を情報提供することがエキスパートパネルでの議論の上で重要であり、販売会社による資材等での情報提供が推奨される。パネル設計や原理・手法に応じた限界について明示することが望まれる。

・以上より、対象となる fusion を臨床検体、人工構築検体、標準物質で網羅することは現実的でないこと、既承認 CDx が DNA パネルのみである fusion も存在し、fusion に関する DNA パネルの分析性能について限界があることから、fusion に関して同等性試験として既承認 CDx との同等性を評価することにも一定の限界があることに留意すべきである。

## <まとめ>

### ・CGP としての承認を目指す場合

市販されている標準物質を用いて LOD を算出することで差支えない。標準物質を利用した LOD の表記については、既承認品の添付文書と同様に、VAF 又は腫瘍割合、リード数と hit rate による表記が想定される。また、真度試験についても、標準物質の参照値との比較により評価することで差し支えない。

### ・エキスパートパネルで議論した上で CDx での確認を行わずに CGP の結果を基に医薬品投与を行う場合

CGP としての薬事承認取得時に評価された真度試験及び LOD の結果に基づき、既承認 CDx との同等性についてエキスパートパネルで考察することが望まれる。その際には、真度試験及び LOD 評価で利用された標準物質でカバーされない fusion については、プローブの設計等を基に、理論上検出可能な fusion であるか否かを議論することが望ましい。

### ・今後の展望・期待

科学的には、標準物質でカバーされる遺伝子の CDx としての承認申請の際にも、既承認 CDx との同等性を評価する同等性試験の代替として、標準物質の参照値との比較による標準物質を利用した真度試験結果を活用することが可能となることが望まれる。その際の真度試験の留意点としては「CGP としての承認を目指す場合」と同様であり、さらに、プローブの設計等を基に、理論上検出可能な fusion であるか否かについても考察する必要があると考えられる。

標準物質でカバーされない遺伝子の CDx としての承認申請の際には、IHC や FISH 等、DNA パネル以外の既承認 CDx が存在し、利用可能である場合には、臨床検体を用いた既承認 CDx との同等性を評価することには一定の意義があり、実施することが望ましい。

## TMB (tumor mutation burden)

### <全般的な留意事項>

・Friends of Cancer Research による TMB に関する JITC 誌の論文 (Merino DM, et al. Establishing guidelines to harmonize tumor mutational burden (TMB): in silico assessment of variation in TMB quantification across diagnostic platforms: phase I of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. J Immunother Cancer 2020;8:e000147) において Table 2 に記載されている分析性能評価の留意点は参考になる。特に、SNV/MNV, Ins/Del の個々の変異の分析性能については別途評価されることを踏まえると、TCGA や公表論文で公開されているデータによる in silico 解析にて whole exome sequence (WES) との一致率から検索領域の妥当性を評価することで、TMB の分析性能を評価することは理にかなっていると考えられる。ただし、これらのデータは validation 用としての位置づけであるため、遺伝子パ

ネルの設計の際に使用したデータは除外すべきである。なお、in silico 解析については、Friends of Cancer Research の project が論文公表している software tool も参考になる (Vega DM, et al. Aligning Tumor Mutational Burden (TMB) quantification across diagnostic platforms: Phase 2 of the Friends of Cancer Research TMB Harmonization Project. Annals of Oncology 2021)。

・臨床検体を用いた解析、in silico 解析いずれにおいても、WES を比較対照とすることについては、WES 自体が診断機器として薬事承認されているわけではなく、公表論文などで質を担保する必要があること等の課題がある。したがって、TCGA や公表論文で公開されているデータの中から共通したデータセットで各遺伝子パネルで in silico 解析を行えば、その結果を横並びで対比させることが可能であり、意義があると考えられる。

・市販されている標準物質としては、Friends of Cancer Research の project でも使用されている SeraCare 社のもの (SeraSeq TMB Genomic DNA Mix/FFPE Reference Material) が入手でき、利用可能である。

・Friends of Cancer Research による JTO 誌の論文にあるとおり、各遺伝子パネルで算出する TMB 値は同一症例でも異なっており、既承認である pembrolizumab の投与対象としての Foundation One CDx での TMB 10 Mut/Mb 以上という閾値は各遺伝子パネルで異なる可能性がある。それを明らかにするためには、同一検体で Foundation One CDx と TMB 値を比較するか、新たな臨床試験を行って pembrolizumab の有効性と相関する TMB の閾値を各遺伝子パネルで検証することになるが、その実現可能性は高くない。CDx としては特に閾値及びその近傍での分析性能が重要であるが、临床上は、Friends of Cancer Research が HP で公開している文書 (Tissue Agnostic TMB Clinical Cut-off Harmonization Initiative [https://www.focr.org/sites/default/files/Tissue-Agnostic-TMB\\_Summary.pdf](https://www.focr.org/sites/default/files/Tissue-Agnostic-TMB_Summary.pdf)) にあるとおり、TMB 10 Mut/Mb を閾値の最小値として定義することで抗 PD-1/PD-L1 抗体薬の奏効率に TMB high 集団と low 集団との間で明らかな差が認められている。従って、現時点では 10 mut/Mb が閾値として一応のコンセンサスが得られているが、遺伝子パネル間の同等性を特定の TMB の閾値を用いて厳密に評価することの臨床的意義は必ずしも高いとは言えない。

・エキスパートパネルでの議論に資することから、TMB の算出方法 (actionable な変異や生殖細胞系列変異を含むか否か等) については情報提供が望ましい。

## <まとめ>

### ・CGP としての承認を目指す場合

真度試験としては、TCGA や公表論文で公開されているデータによる in silico 解析にて WES との一致率を評価することで差し支えない。その際には、0-40 Mut/Mb の範囲にある様々な TMB 値のサンプル及び様々な癌種のサンプルを含めることが望ましい。WES での TMB 算出においては、計算対象に用いた変異種類、シーケンス QC、変異検出の閾値、計算領域等について科学的に妥当な方法で計算される必要がある。市販されている標準物質の利用も可能である。

### ・エキスパートパネルで議論した上で CDx での確認を行わずに CGP の結果を基に医薬品投与を行う場合

CGP としての薬事承認取得時に評価された真度試験の結果に基づき、既承認 CDx との同等性についてエキスパートパネルで考察することが望まれる。その際には、既承認 CDx でカットオフ値となっている Mut/Mb 近傍での分析性能に着目する必要がある。

### ・今後の展望・期待

「CGP としての承認を目指す場合」と同様に実施した分析性能評価結果に基づき、既承認

CDx でカットオフ値となっている Mut/Mb 近傍での分析性能が担保される旨の考察が可能である場合には、既承認 CDx との同等性を評価する同等性試験の代替として、「CGP としての承認を目指す場合」に記載されている真度試験の結果を CDx としての承認申請にも活用可能となることが科学的には望まれる。カットオフ値以上の値を検出するための LOD の評価を行う場合には、既承認品の添付文書に記載されているとおり、腫瘍割合と hit rate で表記することで差し支えないと考えられる。

## **MSI(microsatellite instability)**

### **<全般的な留意事項>**

・Horizon 社の MSI FFPE DNA Reference Standard (MSI-high: HD830、MSS: HD831) は、プロメガパネルと同一の 5 か所を含む複数のバイオマーカーについて販売会社による検証が行われており、これらを検出対象とする遺伝子パネルにおいては、標準物質として利用可能である。一方で、この標準物質で検証されていない領域での繰り返し配列を検出する遺伝子パネルにおいては、この標準物質を利用した分析性能評価は困難である。

・エキスパートパネルでの議論に資することから、MSI の算出方法については情報提供が望ましい。

### **<まとめ>**

#### **・CGP としての承認を目指す場合**

販売会社による検証が行われているバイオマーカーを検出対象とする遺伝子パネルにおいては、市販されている標準物質の希釈系列を用いて LOD を算出することで差し支えない。標準物質を利用した LOD の表記については、hit rate による表記が想定される。真度試験については、標準物質の参照値との比較により評価することで差し支えない。販売会社による検証が行われているバイオマーカーを検出対象としていない場合には、臨床検体を用いた既承認 CDx 又は標準的な方法との同等性を評価する必要がある。

#### **・エキスパートパネルで議論した上で CDx での確認を行わずに CGP の結果を基に医薬品投与を行う場合**

CGP としての薬事承認取得時に評価された真度試験及び LOD の結果に基づき、既承認 CDx との同等性についてエキスパートパネルで考察することが望まれる。

#### **・今後の展望・期待**

CDx としての承認申請に際しては、販売会社による検証が行われているバイオマーカーを検出対象とする遺伝子パネルにおいても、臨床検体を用いた既承認 CDx 又は標準的な方法との同等性を評価することには一定の意義があり、実施することが望ましい。その際には、既承認 CDx については、後発でないオリジナルの CDx を対照法とすることが原則であると考えられる。

## **血漿検体**

### **<全般的な留意事項>**

・組織検体に対する遺伝子パネルではなるべく偽陽性を出さないように設計することがこれまで求められてきた一方で、liquid biopsy については感度を上げる工夫がされる等の違いがあり、標準物質及びその希釈系列の測定による LOD、limit of blank 及びエラー率の評価が特に重要となる。ただし、分析性能評価に対する科学的な留意点としては、liquid biopsy と組織検体に対する遺伝子パネルとで大差はないと考えられる。Liquid biopsy では、組織検体と血漿検体での一致率を評価するという点で、組織検体を対象とした遺伝子パネル検査での議論とは異なることに留意が必要である。

・日本臨床腫瘍学会・日本癌治療学会・日本癌学会3学会合同ゲノム医療推進タスクフォース「血中循環腫瘍DNAを用いたがんゲノムプロファイリング検査の適正使用に関する政策提言」(2021年1月20日)にも記載があるとおり、liquid biopsy では、CHIP (clonal hematopoiesis of indeterminate potential) との鑑別を要すること、CNV及びfusionについて評価が困難な場合があることに留意する必要がある。

・Liquid biopsy については、例えば、Foundation for the National Institutes of Health (FNIH) Biomarkers Consortium により、Horizon 社、Thermo Fisher Scientific 社、SeraCare 社から入手した標準物質が利用可能であることが JCO Precision Oncology 誌に掲載されている (Williams PM, et al. Validation of ctDNA Quality Control Materials Through a Precompetitive Collaboration of the Foundation for the National Institutes of Health. JCO Prec Oncol. 2021;5:910–920)。これらの標準物質の一部は Medical Device Innovation Consortium SRS Report: Somatic Variant Reference Samples for NGS に掲載されている。

・Liquid biopsy について既承認の CDx が存在するバイオマーカーは限定的であり、かつ、真度試験としてペアとなる組織検体の測定結果との一致率を評価することについては、tumor heterogeneity などの biology の観点から限界があること及びペアとなる組織検体を手に入れるのは臨床試験に組み入れられた症例に限定される場合が多いことから、むしろ標準物質を用いた LOD 及び真度試験の方が有用であると考えられる。

・Liquid biopsy における分析性能評価については、米国の Blood Profiling Atlas Consortium による公表論文 (Godsey JH, et al. Generic Protocols for the Analytical Validation of Next-Generation Sequencing-Based ctDNA Assays: A Joint Consensus Recommendation of the BloodPAC's Analytical Variables Working Group Clin Chem. 2020;66(9):1156–1166) が参考になり、supplemental material としてプロトコルの雛形が公開されている。

## <まとめ>

### ・CGP としての承認を目指す場合

組織検体に対する遺伝子パネル検査と同様に、標準物質を利用した分析性能評価を行うことで差し支えない。

### ・エキスパートパネルで議論した上で CDx での確認を行わずに CGP の結果を基に医薬品投与を行う場合

CGP としての薬事承認取得時に評価された真度試験及び LOD の結果、さらに、対応する医薬品の臨床試験成績が組織検体を用いた検査又は liquid biopsy のいずれで測定された結果に基づくものであるか、を踏まえてエキスパートパネルで考察することが望まれる。

### ・今後の展望・期待

組織検体を対象とした既承認 CDx のみが存在する状況下では、既承認 CDx を対照法とした真度試験が実施可能な場合であっても、標準物質でカバーされる遺伝子変異の CDx としての承認申請に際しては、標準物質を利用した分析性能評価結果を重視することが科学的には望ましい。標準物質でカバーされない遺伝子変異の CDx としての承認申請に際しても、組織検体に対する遺伝子パネル検査における今後の展望・期待の項と同様の内容が期待される。

## Table legend

### 表 1 標準品で測定される変異情報

Horizon 社標準品 HD701, HD827 で測定される変異情報について、Variant type、Ins/Del size、変異周囲の GC 含有率、ホモポリマー繰り返し数などを示した。

### 表 2 既知の fusion リスト

データベース登録や論文報告のある fusion の情報をまとめた。fusion を構成する遺伝子名、各構成遺伝子の切断点のゲノム位置情報、fusion 転写産物における切断点近傍のエクソン番号、データベースでの登録症例数などを示した。