

平成 23 年度厚生労働省委託事業

平成 23 年度次世代医療機器評価指標作成事業

テーラーメイド医療用診断機器
(DNA チップ等を用いる遺伝子発現解析装置)
審査 WG 報告書

平成 24 年 3 月

座長 神田 忠仁
理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター
チームリーダー

目次

1. RNA プロファイリングにもとづく診断装置の評価指標（案）策定の経緯	2
2. テーラーメイド医療診断機器（DNA チップ等を用いる遺伝子発現解析装置）委員等名簿	3
3. 平成 23 年度会議議事概要	4
4. RNA プロファイリングにもとづく診断装置の評価指標（案）	14
5. RNA プロファイリングにもとづく診断装置の普及に関する提言	20
6. 参考資料	
(審査 WG 発表資料)	
(1) FDA 承認事例における臨床性能評価に関して	鈴木孝昌 23
(2) 21gene signature (Oncotype DX [®])の臨床性能	戸井雅和 43
7. 関連通知翻訳	
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	51
(平成 20 年 4 月 4 日付 薬食機発第 0404002 号	
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通知 別添 2)	

RNA プロファイリングにもとづく診断装置の評価指標（案）策定の経緯

理化学研究所・感染症研究ネットワーク推進センター
神田 忠仁

細胞に存在する複数の RNA（mRNA および noncoding RNA）の相対量比（プロファイル）と細胞形質の関係を明らかにする研究が進展し、RNA プロファイルを疾患の細分類や癌の悪性度判定、予後、治療薬への応答性の推定に応用する試みが進められている。平成 22 年度には DNA チップ等を用いた RNA プロファイル解析装置を体外診断装置として使う場合を想定し、特定の RNA を定量する装置の信頼性評価に必要な事項と RNA プロファイルから導く臨床情報の有用性を評価する際に考慮すべき事項とに分けて議論を進めた。論点を整理し、評価指標を策定する際に参考とすべき事項を網羅した報告書を作成した。しかし、RNA プロファイル装置の臨床現場への導入は、我々の予想よりはるかに早く、臨床現場では、海外で開発された装置による乳癌の予後や治療の有効性予測が治療方針の選定に役立つ可能性が議論されるに至っている。そこで、平成 23 年度は、RNA プロファイルに基づいて医療情報を導く体外診断装置の承認申請において、機構による審査に具体的に役立つことを念頭に、評価指標（案）を策定した。

RNA を識別・定量し、プロファイルを作製する装置の信頼性確保は、高品質の試料（RNA）を使えば困難な作業ではないと思われ、「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（平成 20 年）」にどのような修正を加えるべきかが主な論点となった。RNA プロファイルから導き出される医療情報の信頼性・有用性を臨床試験データで検証する方法については、希少疾患を対象とする場合は多くの患者が参加した臨床試験が難しいこと、癌の予後を推定する場合の前向き試験では、長期の追跡が必要で申請者の負担が大きいことなどが議論された。申請者へ不必要な負担を掛けずに、必要なデータは漏らさず提出を求める評価指標となるよう配慮したつもりである。

体外診断装置としての有用性・信頼性が確認され承認されても、臨床現場で十分活用されなければその後の発展は望めない。承認後、普及の促進に役立つ仕組みを議論し、評価指標とは別に提言としてまとめた。

テラーメイド医療用診断機器 (DNAチップ等を用いる遺伝子発現解析装置)
審査WG委員等名簿 (敬称略)

座長

神田 忠仁 理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター
チームリーダー

副座長

戸井 雅和 京都大学医学部附属病院 乳腺外科 教授

委員(五十音順)

油谷 浩幸 東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野 教授

佐々木 博己 国立がんセンター研究所 多層オミックス・バイオインフォーマティクス分野 ユニット長

高橋 隆 名古屋大学大学院医学系研究科 神経疾患・腫瘍分子医学研究センター 腫瘍病態統御部門・分子腫瘍学分野 教授

寺前 紀夫 東北大学理学部化学専攻分野 分析化学研究室 教授

登 勉 三重大学臨床検査医学分野 教授

古川 洋一 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 臨床ゲノム腫瘍学分野 教授

会計

柏 喜代美 JBCRG (Japan Breast Cancer Research Group) 事務局

厚生労働省

浅沼 一成 医薬食品局 審査管理課 医療機器審査管理室長

東 健太郎 医薬食品局 審査管理課 医療機器審査管理室 新医療材料専門官

間宮 弘晃 医薬食品局 審査管理課 医療機器審査管理室 技官

滝 久司 医薬食品局 審査管理課 医療機器審査管理室 審査調整官

関野 秀人 医薬食品局 審査管理課 前医療機器審査管理室長

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構 (PMDA)

鈴木 由香 医療機器審査第二部長

宮本 大誠 医療機器審査第二部 審査役代理

鹿野 真弓 規格基準部長

水上 良明 規格基準部 医療機器基準課 主任専門員

国立医薬品食品衛生研究所(事務局)

松岡 厚子 医療機器部 部長

鈴木 孝昌 遺伝子細胞医薬部 室長

宮島 敦子 医療機器部 室長

平成 23 年度 次世代医療機器評価指標作成事業
テーラーメイド医療用診断機器（DNA チップ等を用いる遺伝子発現解析装置）
審査 WG（第 1 回）議事概要

1. 開催日時 平成 23 年 9 月 5 日（月） 17 時～19 時
2. 開催場所 東京八重洲ホール 902 会議室
3. 出席者（敬称略・座長以下五十音順）
審査 WG 委員：神田 忠仁、戸井 雅和、油谷 浩幸、佐々木 博己、高橋 隆、
登 勉、古川 洋一、
厚生労働省：浅沼 一成、滝 久司、関野 秀人
医薬品医療機器総合機構：宮本 大誠、水上 良明
審査 WG 事務局：鈴木 孝昌、宮島 敦子
オブザーバー：木山 亮一、大塚 幸雄、片岡 正俊（産業技術総合研究所）

4. 配布資料

資料 1 Class II Special Controls Guidance Document: Gene Expression Profiling
Test System for Breast Cancer Prognosis (MammaPrint)

資料 2 Class II Special Controls Guidance Document: Cardiac Allograft Gene
Expression Profiling Test Systems (Allomap)

資料 3 510K 承認時の decision summary (MammaPrint)

資料 4 510K 承認時の decision summary (Pathwork)

資料 5 510K 承認時の decision summary (Allomap)

資料 6 利益相反関連の書類について

資料 7 <話題提供資料> 鈴木 孝昌 氏

資料 8 <話題提供資料> 戸井 雅和 委員

5. 議事概要

- (1) 開会挨拶（事務局） 配布資料確認
- (2) 厚生労働省挨拶（医療機器審査管理室長）
- (3) 座長挨拶（座長）
- (4) 話題提供
 - ・鈴木 孝昌 氏 「FDA 承認事例における臨床性能評価に関して」
（国立医薬品食品衛生研究所）（20 分）
 - ・戸井 雅和 委員 「Oncotype DX に関する臨床性能評価について」
（京都大学医学部附属病院）（20 分）

(5) 討議

「DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の製造販売承認申請における臨床性能評価に関する考慮すべき事項」について

座長より本年度の審査 WG の流れについて、昨年度作成した報告書の「II. DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の製造販売承認申請における臨床性能評価に関する考慮すべき事項」及び「III. 診断装置と診断方法を普及させる仕組みに

関する事項（提言）」について、本年度は時間をかけ十分に討議を行い、最終的に指標案としてまとめて行きたい旨説明があった。

鈴木氏（事務局）及び戸井委員より、話題提供に対して質疑応答がなされた後、今後の討議を行う項目について整理した。

- ・ 臨床試験情報としてどのような情報が必要か
- ・ 検体採取と治療の関係
- ・ 保存検体を用いる試験の可否
- ・ 海外データの利用
- ・ 統計解析に必要な検体数、統計処理の妥当性
- ・ 条件付き承認 等

医療情報の臨床的意義の評価について、昨年度、「II. DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の製造販売承認申請における臨床性能評価に関する考慮すべき事項」を担当した3委員の中から、佐々木委員がたたき台を作成し、それをもとに次回の審査 WG では討議を行うことになった。

(6) 次回の予定（第2回）

平成23年11月2日（水） 14時～16時

東京八重洲ホール 302 会議室

平成 23 年度 次世代医療機器評価指標作成事業
テーラーメイド医療用診断機器（DNA チップ等を用いる遺伝子発現解析装置）
審査 WG（第 2 回）議事概要

1. 開催日時 平成 23 年 11 月 2 日（水） 14 時～16 時
2. 開催場所 東京八重洲ホール 302 会議室
3. 出席者（敬称略・座長以下五十音順）
審査 WG 委員：神田 忠仁、戸井 雅和、佐々木 博己、高橋 隆、登 勉、古川 洋一
厚生労働省：浅沼 一成、東 健太郎、間宮 弘晃、滝 久司、関野 秀人
医薬品医療機器総合機構：宮本 大誠
審査 WG 事務局：松岡 厚子、鈴木 孝昌、宮島 敦子
オブザーバー：大塚 幸雄（産業技術総合研究所）

4. 配布資料

- 資料 1 2011 年 3 月 3 日 第 23 回高度医療評価会議 議事録（抜粋）
資料 2 第 23 回高度医療評価会議資料（資料 2-1～2-4）
資料 3 Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Biochem Biophys Res Commun. 2010;400(1):7-15.
資料 4 DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の製造販売承認申請における臨床性能評価指標（たたき台 A-4）
資料 5 DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の製造販売承認申請における臨床性能評価指標（検査目的、方法を含む FDA 型バージョンのたたき台 B-3）
資料 6 表 1 DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の診断目的別分類表（参考資料）
資料 7 図 1 がんの年間死亡数

5. 議事概要

- (1) 開会挨拶（事務局） 配布資料確認
- (2) 座長挨拶（座長）
- (3) 情報提供

第 23 回高度医療評価会議 新規申請技術の評価結果の紹介
「末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイル解析による消化器系癌罹患の判別診断」（金沢大学附属病院申請）の評価結果について

登委員より、金沢大学附属病院の新規申請技術についてと高度医療評価会議における評価結果について概略の説明。

- ・もとデータ（論文）における症例数 106 例、バリデーションスタディ 52 例
- ・新規申請における症例数 1700 症例の設定理由（必要性？）
- ・スクリーニング対象者について（対照群の取り方に問題があるのではないか）
- ・患者に対する費用負担の問題（臨床的有用性？）
- ・結論として、不適という判断がなされた。

(4) 「DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の製造販売承認申請における臨床性能評価に関する考慮すべき事項」について

昨年の報告書において臨床性の評価に関する考慮すべき事項を担当した戸井委員、古川委員、佐々木委員先生によりまとめられた臨床性能評価に関する部分の評価指標のたたき台について、佐々木委員より説明。

・たたき台案として A-4 および B-3 の 2 パターンが作成された。

A-4 は臨床性能試験とその性能の特徴の 2 項目に分けて整理したもの、B-3 は FDA の MammaPrint のガイダンスを参考に、A-4 に検査目的、検査方法の項目を追加したもの。

・表 1 DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の診断目的別分類表（参考資料）について

目的／用途／検査試料／例数／検査（診断）の種類／判定法／既存の検査（診断）について分類整理した。

たたき台 A-4 をもとに討議を進めた。

・第 1 項目 臨床性能試験

1. 臨床試験プロトコール
2. 臨床病事情報の整理
3. 後向き試験について
4. 検体数
5. モニタリングにおける測定回数
6. 判定アルゴリズムや判定基準の設定について
7. 診断結果

第 2 項目 性能の特徴

1. プローブやプライマー等の特異性について
2. 推奨する試料収集・保存・輸送法について
3. RNA 抽出について
4. RNA の品質管理について
5. 必要とする RNA の最低量
6. 工程の管理について
7. 治療介入評価、再現性について
8. 複数の施設で行った結果の再現性、同一施設内の独立した検査間の再現性について
9. 検査が限られた専門の解析施設（検査会社等）で行われる場合について
10. 既存法との比較について
11. 市販後調査について
12. 医療上の利益に関する説明
13. 医療政策上の利益に関する説明
14. その他、社会的利益等

議論された論点として、

症例数の考え方（トレーニングとバリデーションセットの区別、稀少疾患）

診断結果の提示の仕方について

アルゴリズムの部分をどう評価するか

アルゴリズムの変更について
海外データの取り扱いについて（日本人データの必要性）
具体的な必要検体数の記載について
試験実施施設の数と再現性について
市販後調査について（データ収集システム）
先進医療と保険収載（点数）の問題

- (5) 次回の予定（第3回）
平成23年12月20日（火） 14時～16時
東京八重洲ホール 302会議室

平成 23 年度 次世代医療機器評価指標作成事業
テーラーメイド医療用診断機器（DNA チップ等を用いる遺伝子発現解析装置）
審査 WG（第 3 回）議事概要

1. 開催日時 平成 23 年 12 月 20 日（火） 14 時～16 時
2. 開催場所 東京八重洲ホール 302 会議室
3. 出席者（敬称略・座長以下五十音順）
審査 WG 委員：神田 忠仁、戸井 雅和、油谷 浩幸、佐々木 博己、高橋 隆、
寺前 紀夫、古川 洋一
厚生労働省：浅沼 一成、東 健太郎、間宮 弘晃、滝 久司
医薬品医療機器総合機構：宮本 大誠、水上 良明
審査 WG 事務局：松岡 厚子、鈴木 孝昌、宮島 敦子
オブザーバー：木山 亮一、大塚 幸雄（産業技術総合研究所）
4. 配布資料
資料 1 「DNA チップ等を用いた RNA プロファイリング装置の評価指標案」
たたき台
資料 2 別紙「DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の製造販売承認申請
における臨床性能の評価において考慮すべき事項」たたき台
5. 議事概要
 - (1) 開会挨拶（事務局） 配布資料確認
 - (2) 座長挨拶（座長）
 - (3) 「DNA チップ等を用いた RNA プロファイリング装置の評価指標案」及び、
別紙「DNA チップ等の遺伝子発現解析装置の製造販売承認申請における臨
床性能の評価において考慮すべき事項」について

前回の議論を踏まえて事務局にて改訂した評価指標案の「たたき台」につい
て、事務局より説明。

まず、装置部分の評価に関して、資料 1 にもとづいて、RNA プロファイリング装
置の評価指標案について項目ごとに確認し、「4. 評価に当たって留意すべき事
項」以降の項目の内容について討議を行った。

1. はじめに
2. 本評価指標の対象
3. 評価指標の位置づけ
4. 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) 対象とする患者の範囲と添付文書への記載
 - 3) 測定装置及び原理
 - 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物質
- 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) 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
 - 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
 - 4) コンタミネーション対策、データ取り違い対策
 - 5) 試料の調製
 - 6) 測定装置
 - 7) 診断アルゴリズム
- (4) 臨床性能に関する事項（詳細は別紙）
- (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
- (7) 医療経済学的考察について
- (8) 保険収載
- (9) 高度医療
- (10) いわゆる LDT としての取り扱い

議論された論点として、

重複した部分の整理

2 施設 150 検体の必要性

市販後調査の取り扱い（必要検体数に関して考慮できるか）

臨床性能試験の計画の事前提出について

トレーニングセットとバリデーションセットおよび必要検体数の関係

アルゴリズムの修正（改良）の可能性

続いて、資料 2 にもとづいて臨床性能の評価についておいて考慮すべき事項の内容について討議を行った。

1. 臨床性能試験の成績

- 1) 被験者集団の妥当性
- 2) 後向き試験
- 3) 検体
- 4) 海外で行われた臨床性能試験成績の扱い
- 5) 医療情報の提示
- 6) 倫理面の配慮

2.その他の事項

- 1) アルゴリズムの変更
- 2) 解析対象外遺伝子の発現に関する情報

議論された論点として、

市販後も一機関のみで測定を行う場合があるか
アルゴリズムの変更と一部変更申請
補助的に使う試薬類の取り扱いについて
海外の臨床試験データの利用と日本人検体の必要性
解析対象外遺伝子の発現情報を同時に取ること（網羅的チップ）は可能か？

評価指標案の中で、別紙として運用上の配慮として記載することが適切な内容について（保険収載、点数の問題、第三者認証機関の設立、高度医療制度の利用、LDT、研究費による支援、市販後データ収集等）

開発企業側への情報提供と意見収集について

- (4) 次回の予定（第4回）
平成24年1月24日（火） 14時～16時
東京八重洲ホール 302会議室

平成 23 年度 次世代医療機器評価指標作成事業
テーラーメイド医療用診断機器（DNA チップ等を用いる遺伝子発現解析装置）
審査 WG（第 4 回）議事概要

1. 開催日時 平成 24 年 1 月 24 日（火） 14 時～16 時
2. 開催場所 東京八重洲ホール 302 会議室
3. 出席者（敬称略・座長以下五十音順）
審査 WG 委員：神田 忠仁、戸井 雅和、佐々木 博己、高橋 隆、登 勉、古川 洋一
厚生労働省：東 健太郎、滝 久司、関野 秀人
医薬品医療機器総合機構：水上 良明
審査 WG 事務局：松岡 厚子、鈴木 孝昌、宮島 敦子
オブザーバー：木山 亮一、千葉 靖典（産業技術総合研究所）
4. 配布資料
資料 1 「RNA プロファイリングにもとづく体外診断装置の評価指標案」たたき台
資料 2 「RNA プロファイリングにもとづく体外診断装置の普及に関する提言」たたき台
5. 議事次第
 - (1) 開会挨拶（事務局） 配布資料確認
 - (2) 座長挨拶（座長）
 - (3) 「RNA プロファイリングにもとづく体外診断装置の評価指標案」及び、「RNA プロファイリングにもとづく体外診断装置の普及に関する提言」について

事務局にて新たに作成（名称変更）した評価指標案、および診断装置の普及に関する提言の「たたき台」について、事務局より説明。
前回までは分けていた診断装置に関する評価指標案と臨床性能試験に関する部分を一緒にして、「RNA プロファイリングにもとづく体外診断装置の評価指標案」とし、これとは別に普及に関する部分を提言として別紙にする形でたたき台を作成した。資料 1 および資料 2 をもとに指標の最終案作成に向けて討議を行った。

資料 1 「RNA プロファイリングにもとづく体外診断装置の評価指標案」の中から、下記の項目について、意見交換を行った。

4. 評価に当たって留意すべき事項の
 - (1) 品目の概要に関する事項 1) 臨床的意義
 - (3) 性能に関する事項 7) 判定アルゴリズム
 - (4) 臨床性能に関する事項 2) 検体
5. その他の事項の
 - (1) アルゴリズムの変更
 - (2) 適応範囲の修正

議論された論点として、

検体数として 150 という数字は残すが、統計的有意性が示されることを原則として、場合によってはそれよりも少ない数での受け入れも可能
アルゴリズムの変更を含め、軽微な変更をしやすい仕組みについて
市販後データ登録システムの構築について
高度医療や研究費を使って保険収載前にデータを集める仕組み
医療費の低減とか医療経済学的効果は審査対象とはしづらい

続いて、資料2「RNA プロファイリングにもとづく体外診断装置の普及に関する提言」の下記の項目について意見交換を行った。

1. 市販後調査で取得するデータの利用
2. 厚生労働科研費等による臨床性能試験
3. 高度医療評価制度、先進医療制度の利用
4. 適切な保険点数の設定
5. Laboratory Developed Test (LDT) の取り扱い
6. 第三者機関を利用した新たな審査制度

議論された論点として、

「混合診療」という表現について
関連学会の役割について
第三者機関による評価と保険収載への反映
市販後データの蓄積による適応拡大と変更申請
目的外遺伝子プローブによる探索的データ取得の是非について
臨床データの有効利用と倫理問題
LDTの承認と制度管理
コンパニオン診断薬の取り扱いについて
「医療経済学的効果」が検査削減の方向に捉えられる危険性について

(4) 今後の予定について

「評価指標案」については、2月15日までメールにて意見募集する。

「提言」については、2月15日までに登先生&事務局で修正案を作成して送付、2月29日までメールにて意見募集、その後、それぞれの最終案を作成して、3月中旬を目処にまとめる。

RNA プロファイリングにもとづく診断装置の評価指標（案）

1. はじめに

RNA ないし相補 DNA とチップに固定された DNA プローブとの特異的結合を高感度に検出・定量する技術を使って、試料に含まれる複数種の mRNA や microRNA の相対量比（RNA プロファイル）を再現性良く示す装置が開発された。この装置を使って、がん細胞の悪性度や抗がん剤感受性、病態の推移、治療薬の効果や副作用などと相関性の高い RNA プロファイルが検討されてきた。現在では、患者の血液や組織片から調製した試料の RNA プロファイルを使って、予後や治療効果を推定することが可能になっている。この技術が臨床現場に導入されれば、個々の患者に最適な治療戦略を選択するのに役立つと期待されている。そこで RNA プロファイルの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臨床現場に導入するための承認審査の道しるべとすべく評価指標（案）を作成した。本評価指標（案）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（平成 20 年 4 月 4 日付 薬食機発第 0404002 号 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通知 別添 2）の考え方を踏襲しつつ、RNA プロファイル解析に固有の事項を加えた。

2. 本評価指標の対象

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評価の対象とする。従って、本評価指標の対象となる診断装置は、DNA チップ（体外診断用医薬品）等と分析装置を組み合わせたものとなる。承認申請の枠組みについては、必要に応じ、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室に相談すること。診断装置から得られる情報の臨床的意義については、個別の事例ごとに臨床データをもとに検証することになる。

3. 評価指標の位置づけ

本評価指標は、現時点で重要と考えられる事項を示したものである。今後の技術革新や知見の集積等を踏まえて改訂されるものであり、申請内容に対して拘束力を持つものではない。本評価指標が対象とする製品の評価に当たっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性を背景にして、柔軟に対応する必要がある。

4. 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

判定に用いる RNA が由来する遺伝子の名称及びコードするタンパク質や RNA の機能について明らかとなっている情報を記載すること。

1) 臨床的意義

プロファイル解析から得られる医療情報の有用性が、既に論文等により科学的に実証されている場合は、文献等を引用して説明すること。解析対象とする個々の RNA についても、プロファイル解析における寄与度や個別の臨床的意義などについて説明すること。また海外での臨床性能試験を使って有用性を説明する場合は、日本人や本邦の医療環境等を踏まえて、日本人集団でも同一の有用性があることを考察すること。

予後や QOL の改善などの患者の利益があれば記載すること。

2) 対象とする被験者の範囲と添付文書への記載

対象とする被験者を添付文書において明確に規定すること。プロファイル解析によって得られる医療情報の意義と治療への利用法について、添付文書の中で具体的に記載・説明すること。

3) RNA 測定装置及び測定原理

RNA を定量する手法の原理を詳細に示すこと。RNA を増幅する場合は、増幅手法を説明し、増幅によってプロファイルが歪む可能性について記載すること。測定に用いる専用装置がある場合は、その測定原理を示すとともに測定原理が記載された論文、特許等の文献があれば引用し、必要な実側データと仕様に関する資料を添付すること。既存の測定機器を用いる場合には、使用可能な機種を特定するとともに、その資料を添付すること。いずれの場合も、測定装置の信頼性を示すデータを提出すること。

4) 遺伝子の選択

遺伝子の選択及びアルゴリズムの作成に使用したデータセットが存在する場合には、その詳細な資料とともに、測定する RNA を選択した根拠を示すこと。

5) プライマー、プローブ等の塩基配列

逆転写反応に用いるプライマー配列及び各 RNA 定量のための特異的プライマー及びプローブ等の塩基配列を示すこと。偽遺伝子や類似配列を持つ他の遺伝子由来 RNA の存在を含めて、プライマーやプローブの配列を選択した理由と妥当性を説明すること。ミスマッチプローブ等を判定に利用する場合には、その配列を選択した根拠を説明すること。

6) DNA チップ構成

DNA チップを用いる場合には、プローブの配置と固定方法を詳細に説明すること。リアルタイム PCR 法による検出をマイクロプレート等で行う場合には、測定する遺伝子の位置を明記すること。

7) DNA チップに搭載される対照遺伝子の配列

陰性対照と陽性対照の遺伝子配列を示し、設定の妥当性を説明すること。陰性対照はシグナルのバックグラウンド算定の根拠となるので、複数の配列を搭載することが望ましい。バックグラウンドシグナル値、陽性対照による内部標準等を用いて測定データの補正を行う場合には、その原理、手法について実測データを用いて詳細に説明すること。

8) アッセイ条件

ハイブリダイゼーション、洗浄、乾燥等の反応条件（温度、時間、緩衝液の組成等）の概略（アッセイのプロトコル及び標準手順を含む）を記載し、非特異反応が生じる可能性等も説明すること。

9) ソフトウェア

蛍光や電流値などのシグナル強度から解析機器に組み込まれたソフトウェア等によってプロファイルを得る場合は、測定アルゴリズムの妥当性に関して説明すること。ソフトウェアの動作に関するバリデーションの方法を示すこと。

10) 判定アルゴリズム

プロファイ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について、用いたデータセットを含めて説明すること。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、その内容を変更するべきではなく、変更の必要が生じた場合には改めてバリデーションを行うこと。

(2) 仕様及び安定性に関する事項

1) 品質管理の方法

DNA チップ等を用いる場合は、デザインした塩基配列と固定されたプローブの塩基配列が同一であることを、実測データを用いて説明すること。核酸増幅反応（PCR など）を用いる場合は、使用するプライマーの純度、配列を確認すること。用いる手法が、対象 RNA のレベルを測定する感度、特異性及び再現性を保証する標準試験を設定し、標準試験の成績からこれらの項目を検証する具体的な方法を、実測データを用いて説明すること。

2) 分析的妥当性（感度、特異性）、測定範囲

一定の RNA（または相補 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こと。また、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とともに、補正が必要な場合にはその方法と根拠を説明すること。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 を標準試料として使う場合は、臨床検体由来試料の濃度や純度等との同一性に留意すること。

非特異的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こと。試料中の RNA を測定できる最少検体量（RNA の最少必要量）を示すこと。必要に応じ、許容される最大検体量について検討すること。RNA レベルの異なる二つの試料を一定の割合にて混合した試料を測定し、プロファイルが RNA レベルに依存しないことを検証すること。また、データの精度を保証するための、データ受け入れ基準について明確にすること。

3) データの標準化

試料間でのレベル変動が無い RNA を複数種用いてデータを標準化することが望ましいが、それらの選択根拠と標準化の手法を説明すること。標準化のための RNA の選択が難しい場合は、全 RNA 量の総和等により標準化（グローバルノーマライゼーション）を行うことになるが、その方法の詳細と妥当性に関して説明すること。標準化の際のバックグラウンド値の測定方法とシグナル強度の補正方法を説明すること。

4) 測定装置の較正

一定のシグナルを安定して発生する較正用 DNA チップもしくはそれに準ずる標準試料を装置の較正に用い、作動バリデーションを定期的に行うことができる場合は、較正用チップ、標準試料の妥当性を説明すること。これらが利用できない場合には、陽性及び陰性較正用試料を用いた測定値の評価等によって作動確認をとる方法を示すこと。較正用試料の妥当性を説明すること。測定・解析装置を一体として評価する際に、これらの情報が必要になることに留意すること。

5) 安定性に関する資料

DNA チップや測定用キットの保存条件、有効期限を設定し、その妥当性を説明すること。提供される試薬を用いて使用者が反応液等を調製する場合は、調製方法や品質管理の方法を示すこと。

6) 試薬

キットとして提供されない試薬類がある場合には、適切な試薬を選択できるように、その品質に関して情報を提供すること。

(3) 性能に関する事項

1) プロファイル取得の精度

個々の RNA の定量精度は、信頼性の確立されたリアルタイム PCR 法などや、精度がリアルタイム PCR 法によって確実に担保されている DNA チップ等を用いて検

証する。同等の既存品がある場合には、それとの比較によって検証する。標準試料または異なる試料間での RNA 量比が一定となることで、精度は担保される。

2) 検体と共に測定する対照試料

陽性対照試料、陰性対照試料を選定し、選定した理由を説明すること。公的機関より適切な標準試料が供給されている場合には、これを用いること。そして、それらを用いた精度管理の方法を、実測データを用いて説明すること。

3) 再現性、頑健性

標準試料を用いた 3 回以上の繰り返し測定によるシグナル検出及び RNA プロファイルの再現性に関する検討を行うこと。同一施設内で測定日や作業者を替えた測定や、複数施設における測定によって、再現性を確認すること。必要に応じて頑健性に関する情報、外部精度管理の方法に関する情報を提供すること。複数の製品ロットを使用すること。

4) コンタミネーション防止対策、データ取り違い対策

検体の前処理や測定に 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、必要に応じて実測データを用いて説明すること。また、キャリーオーバー対策を講じ、キャリーオーバーを否定する試験を説明すること。バーコード等を使ったデータ管理システム等により、検体情報と解析結果の対応等における誤りを防止する方策を説明すること。検体や試薬類の入れ間違いなどの人為的ミスを防ぐ方策と、それを確認する方法に関して検討を行うこと。また、測定値の生データを保存し、データ処理各ステップの追跡、検証を可能にすること。

5) RNA 試料の調製

検体の質が RNA プロファイルに大きな影響を与えるため、検体の取り扱いには細心の注意が必要である。高品質な RNA 試料を得るために、採取する検体の種類に応じて、採取、保管、運搬等に関する適切な取扱い方法を設定し、その妥当性を説明すること。特に RNA の分解を防ぐ方策を講じることが望ましい。測定に使用できる RNA 量と濃度の範囲を示すこと。

検体の種類（血液、組織等）に留意しながら、検体の受け入れ条件を示すとともに、検体から RNA を抽出する方法と得られた試料の品質を評価するための方法または参考値（量、純度、分解度等）を示すなど、試料の評価基準を明確にすること。また、調製した試料の安定性について説明し、保存方法、輸送法、保存可能期間を示すこと。必要に応じて反応を妨害する物質（血清中のトリグリセリド、ヘモグロビン、ビリルビン、脂質などや投薬された薬物、検体採取に用いた抗凝固剤等）について予め評価しておくこと。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）を参照のこと。

6) 測定装置

基本的に、DNA チップ等と測定装置は一体として評価される。専用の測定装置を使用する場合には、その測定装置が一般的な医療機器として満たすべき基本要件に適合し、医療機器としての承認若しくは認証を取得し、又は届出する必要がある。汎用性のある測定機器を用いる場合で、その装置が医療機器としての認可を得ていない場合には、使用できる機器の特定と性能を担保する方法に関して、説明すること。

7) 判定アルゴリズム

判定アルゴリズムを導くために用いた全ての試験データを提出すること。アルゴリズムの妥当性は、適切に計画された臨床性能試験の成績をもとに評価する。アル

ゴリズムは、臨床性能試験開始前に詳細を確定するものとし、変更を加えることは認めない。

(4) 臨床性能に関する事項

診断装置を使用して得られる情報の臨床的有用性を示す臨床性能試験の成績をデータと共に明確に記載する。被験者に関する情報（年齢、性別、人種など）と被験者の疾患に関する情報（重篤度、発症率、治療法など）、検体に関する情報を詳細に記載する。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）を具体的に記載し、その情報と臨床病理所見や患者の追跡情報の相関を明確に記載する。

類似の医療情報を提供する承認済み診断装置がある場合には、それとの同等性、相関性を示すデータを添付すること。記載にあたっては、特に以下の事項に留意すること。

1) 被験者集団の妥当性

臨床性能試験で対象とした患者集団の臨床病情報は、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情報と同等（偏りが無い）であることを検証すること。偏りのある患者集団を用いた場合は、臨床性能試験の評価に与える影響を説明する。アルゴリズム作成に用いた患者集団と臨床性能試験に用いた集団の同等性、独立性に関して明記すること。また、解析対象として添付文書に規定された集団であることを明記すること。

2) 検体

原則として2施設以上で150以上の検体（正常範囲の検体も含む）を用いた臨床試験成績を提示すること。ただし、検体数の確保が難しい希少疾患を対象とする場合や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において、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できる場合がある。予備試験の成績などを用いて、診断装置が導き出す医療情報において区分される集団間の有意差を生物統計学的に示すことができる検体数をあらかじめ求めることができる場合は、臨床性能試験を開始する前に統計学的解析手法を確定し、その妥当性について（独）医薬品医療機器総合機構の対面助言を利用することが望ましい。

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また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。前向きに集めた後向き試験も同様に扱う。ただし、それら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すこと。検体は複数の医療機関からの収集を原則とするが、一機関のみで測定を行う場合には、その理由と妥当性を説明すること。

一人の被験者から複数回にわたって採取した検体を解析する場合は、信頼性、再現性を確保するのに必要な検体の採取回数、間隔などを明記する。

3) 海外で行われた臨床性能試験成績の扱い

適切に計画された海外での臨床性能試験の成績を評価に使ってもよい。ただし、日本人でのデータと差が無いことを示すことが必要である。

4) 医療情報の提示

診断装置が導き出す医療情報（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）は具体的に提示すること。例えば、疾患のスクリーニング（癌細胞の検出など）の場合は病変の存在確率（%）を、予後や治療効果を予測する場合は2年以内の再発確率（%）や5年生存率（%）などを示す。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または新たな重症度分類の導入などが必要である。判定に用いた個々の遺伝子の発現情報は、必要があれば提供できることが望ましい。

5) 倫理面の配慮

各施設の治験審査委員会で承認されていることを示し、インフォームドコンセントについて記載する。同一または一部の試料を用いた研究が論文として発表されていれば、参考資料として添付する。

(5) リスク分析に関する事項

操作過程において、人為的及び機械的ミス、非特異反応等が発生する要因を分析し、必要に応じて添付文書にて注意喚起を行うなどの対策を講じること。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、文献等を使って評価すること。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、積極的に提示すること。診断結果は直接ゲノム情報を含むものではないが、それに準ずる情報を含むと考えられるため、個人情報としての取り扱いに留意し、倫理面で配慮すること。

(6) データの保存と医療情報の表示方法に関する事項

得られた医療情報に加え、測定した各 RNA の補正、標準化前後のシグナル値を保存し、検証を可能とすることが望ましい。医療情報の開示方法については、あらかじめ添付文書等でその形式と臨床的意義に関する説明を明記することが望ましい。また、全工程が良好に進んだかどうかの判定項目を示すとともに、医療情報の根拠となるデータ（指標とした RNA の発現レベル等）を可能な限り開示する。

5. その他の事項

(1) アルゴリズムの変更

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、その妥当性を再評価する必要がある。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、その妥当性が認められれば、この限りではないが、厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室に相談すること。

(2) 適応範囲の変更

市販後蓄積されたデータを基に、被験者の範囲、対象疾患、判定内容等の適応範囲を修正する場合には、（独）医薬品医療機器総合機構と相談の上、必要とされるデータを添付して変更を申請する。

RNA プロファイリングにもとづく診断装置の普及に関する提言

RNA プロファイリングにもとづく診断装置を支える技術は急速に進歩しており、また生命科学の発展によって解析対象となる RNA 分子種の選定も最適化が進んでいる。患者の個性や疾患の特徴を正確に知ることは、個々の患者に最適な治療を選択する基盤であり、限られた医療資源を有効に使うことにつながる。従って、今後、当該診断装置の重要性は飛躍的に増すであろう。一方、いわゆるハイテク機器の側面もあり、先進国の主要な産業のひとつとして発展する可能性がある。このような装置の開発を促進し、円滑に市場導入するには、新たな承認と保険収載の枠組みが必要となる。以下は、ワーキンググループでの議論を踏まえた提言である。

1. 市販後調査で取得するデータの利用

臨床性能試験のデータにもとづく予後や治療薬への応答性などの推定精度は、臨床性能試験に用いた検体数に依存する。しかし、長期間経過後の病態の推定や希少疾患を対象とする場合などは、承認申請前に多数の検体を集めることは難しい。そこで、少数の検体を用いた臨床性能試験成績にもとづく申請でも、装置によって導き出される情報の統計的学有意性が確認できれば承認する。承認後の前向き調査による検体数の増加に伴い、推定精度の向上や適応範囲の拡大が科学的に示される場合、追加的な申請で臨床性能の記載を修正したり、適応範囲を拡大できる仕組みを作る。また、市販後調査を確実にを行うために、「市販後データ登録システム」を構築する。

2. 厚生労働科学研究費等による臨床性能試験

希少疾患のデータ取得には、研究班組織で患者情報を集める方法が役立つ。厚生労働科学研究費の中に、承認申請が近い製品を使った臨床性能試験を支援する枠を設定する。あるいは、「次世代体外診断薬開発基金（仮称）」を設立し、NPO や業界団体が主体となって、製品化された場合の利益を還元する方法による運営も考えられる。

3. 特定機関での使用に限定した承認

RNA プロファイリングにもとづく診断装置は、一般に普及する診断機器とは異なり、特定の検査機関でのみ使用可能な高度機器となる可能性がある。特定機関での使用に限定した使用は、従来の薬事承認の枠組みから外れてしまうが、安全で有効な医療情報の提供が確実に期待できる場合には、米国で実施されている CLIA 認証制度* のような評価を経て、保険収載することが望まれる。

4. 高度先進医療としての承認

RNA プロファイリングにもとづく診断装置を用いた医療では、開発者から提供された home-brew assay や Laboratory-developed test (LDT) 等が薬事法にもとづく承認を受けていない場合があるが、これらの診断技術の妥当性、信頼性を検証する仕組みをつくったうえで、積極的に高度先進医療として承認する。例えば、Japan Molecular Diagnostic Standards (JMDS) (仮称、NPO 法人) が技術的な検証を受け持つ方法が考えられる。現在、高度先進医療で使われている遺伝子検査や、PCR 法、DNA シーケンス法、FISH 法またはサザンブロット法では、薬事法未承認で精度管理が不明確な自家調製品の診断薬や診断キットを使用しているものもあるが、JMDS による審査の導入で、診断薬や診断キットの信頼性を確保し、保険収載に至る過程も明確になる。home-brew assay や LDT が多いコンパニオン診断薬の信頼性・有効性の評価にも活用できる。

5. 適切な保険点数の設定

現在の遺伝子検査の大半は、診療報酬点数が 2,000 点であり、開発コストや検査実施コストを回収できない。平成 24 年度診療報酬改定で、遺伝子検査の点数は 100~520 点増となるが、いまだコストを反映した点数とは言い難い。DNA チップ等を用いた検査に対して「多項目一括測定遺伝子検査」という新たな項目を設定し、より高い診療報酬点数を与えることが妥当である。

* Clinical Laboratory Improvement Amendments (臨床検査施設改善法) にもとづく米国の認証制度。定められた品質基準にもとづいて全ての臨床検査施設の質を保証し、認証を与える制度で、1988 年に施行された。

FDA承認事例における 臨床性能評価に関して

国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
(審査WG事務局)

鈴木 孝昌

FDAに認可されたIVDMIA

- **MammaPrint[®]** (2007年2月)
 - Agilent microarray (70遺伝子)
 - 乳癌の遠隔転移(予後) 予測
- **Pathwork[®] Tissue of Origin** (2008年7月)
 - Affymetrix PathChip(1550遺伝子)
 - 15種類の典型的な癌のタイプを分類
- **AlloMap[®] Molecular Expression Testing** (2008年8月)
 - リアルタイムPCR(11+9 control遺伝子)
 - 心臓移植の拒絶の予測
- **OVA-1** (2009年9月)

Case-1 MammaPrint



- 70遺伝子の発現解析をもとに、乳がんの予後予測を行う。
- アルゴリズムから得られるスコアをもとに、高リスク群と低リスク群に分ける。
- 大規模な臨床試験 (TRANSBIG) 結果あり。

文献情報

Study	Purpose	Time Frame	Comments
Nature Paper (1)	Development of breast cancer prognosis 70-gene profile (LNO, <55y)	2002, 78 patients, 6.4% adjuvant treatment	Within 5 year metastasis risk by profile multivariate OR 18
NEJM Paper (2)	Validation of the 70-gene profile in consecutive series of breast cancer patients (LNO, <53y)	2002, 151 patients, 5.2% adjuvant treatment	Metastasis-free survival by profile at 10 yrs: low risk profile 87%, high risk profile 44% (at 5 yrs: 93% and 56% respectively)
MammaPrint Paper (3)	Development of MammaPrint	2006, reproducibility of (1) and (2) on MammaPrint	Highly reproducible MammaPrint as diagnostic tool
Transbig Paper (4)	Independent European validation of 70-gene signature (LN0, <61y)	2006, 302 patients, no adjuvant treatment	Metastasis-free survival by profile at 10 yrs: low risk profile 88%, high risk profile 71% (at 5 yrs: 96% and 83% respectively)

開発段階

製品化

臨床評価

*

References:

- (1) 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 RN, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
- (2) van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
- (3) 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*. 2006 Oct 30;7:278.
- (4) Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J, Therasse P, Floore A, Amakrane M, Piette F, Rutgers E, Sotiriou C, Cardoso F, Piccart MJ. TRANSBIG Consortium. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Sep 6;98(17):1183-92.

(対象患者)

- 60歳以下
- Stage I & II
- 腫瘍サイズ5cm以下
- リンパ節転移陰性

(サンプル条件)

- 病理組織検査で、癌の割合が30%以上。
- 凍結組織切片(後に適応をFFPEに拡大)
- 補助療法を受けていない
- RNAを抽出して、Agilent社製マイクロアレイおよびスキャナーで解析

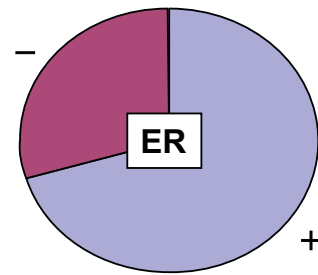
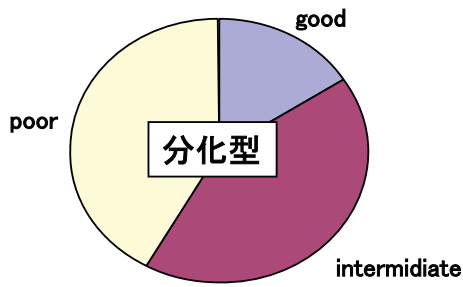
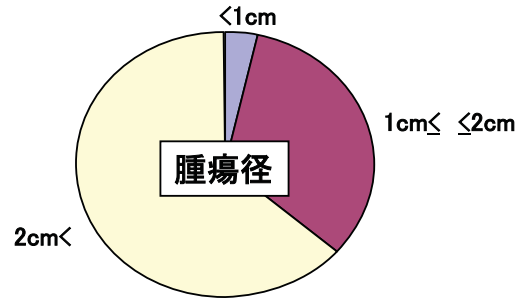
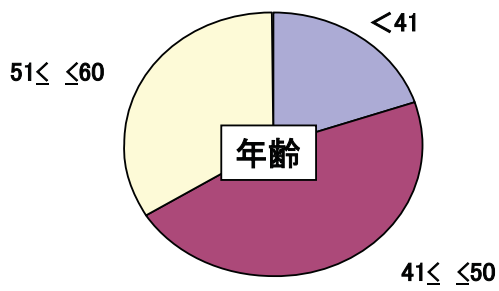
(患者(サンプル)数)

- 403患者サンプルを5つの欧州機関が収集
- 326サンプルについてRNA を得る
- ER情報のある302サンプルについて解析

(患者情報)

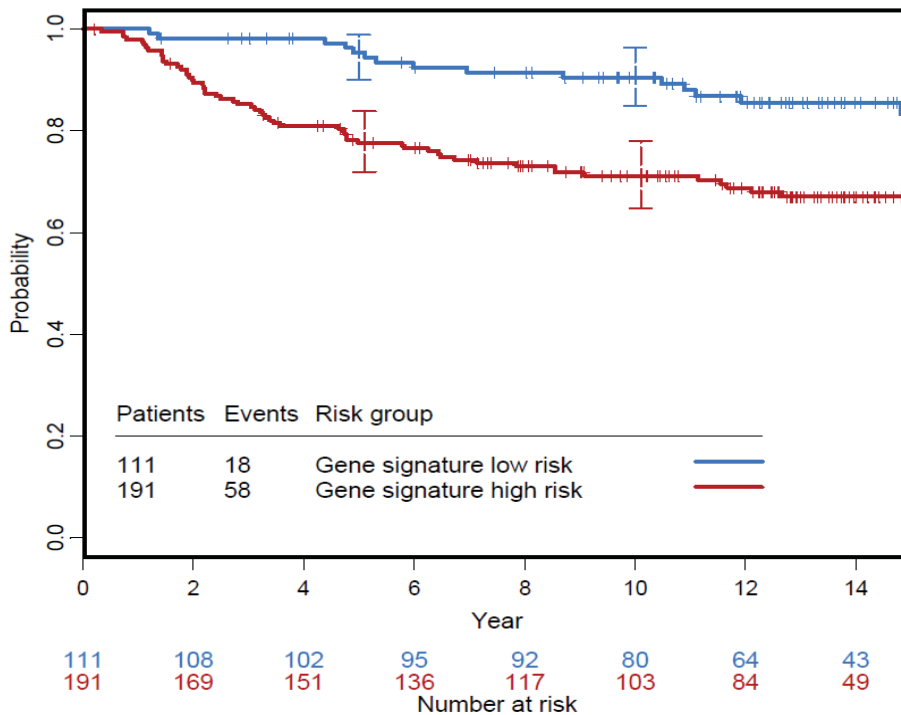
- 年齢 (60 以下)
- 326サンプルについてRNA を得る
- ER情報のある302サンプルについて解析

サンプルの内訳



(結果)

Time to distant metastases



5年間転移無し

Low Risk群 0.95
High Risk群 0.78

10年間転移無し

Low Risk群 0.90
High Risk群 0.71

(結果のまとめ)

High Risk; 191 Low Risk; 111

- 5年以内の転移

- 陽性予測率 0.22 (0.16-0.28)
- 陰性予測率 0.95 (0.91-0.99)

ハイリスクと判断されて
イベントが起きる確率

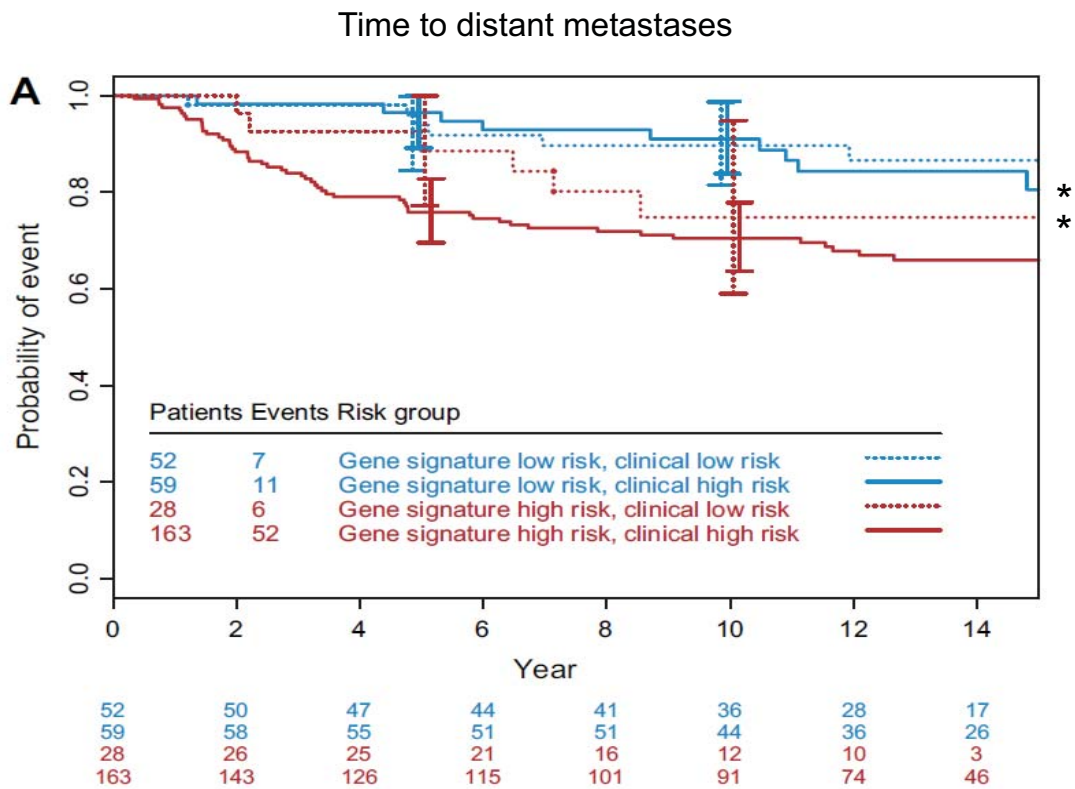
ローリスクと判断されて
イベントが起きない確率

- 10年以内の転移

- 陽性予測率 0.29 (0.22-0.35)
- 陰性予測率 0.90 (0.85-0.96)

Low Riskと予測した場合に無駄な治療を避けられる!

既存の手法 (Aduvant! Software)でのclinical評価との比較



Number at risk
28

Buyse et al., JNCI 98, 1183-92 (2006)

(参考データ)国内の臨床試験

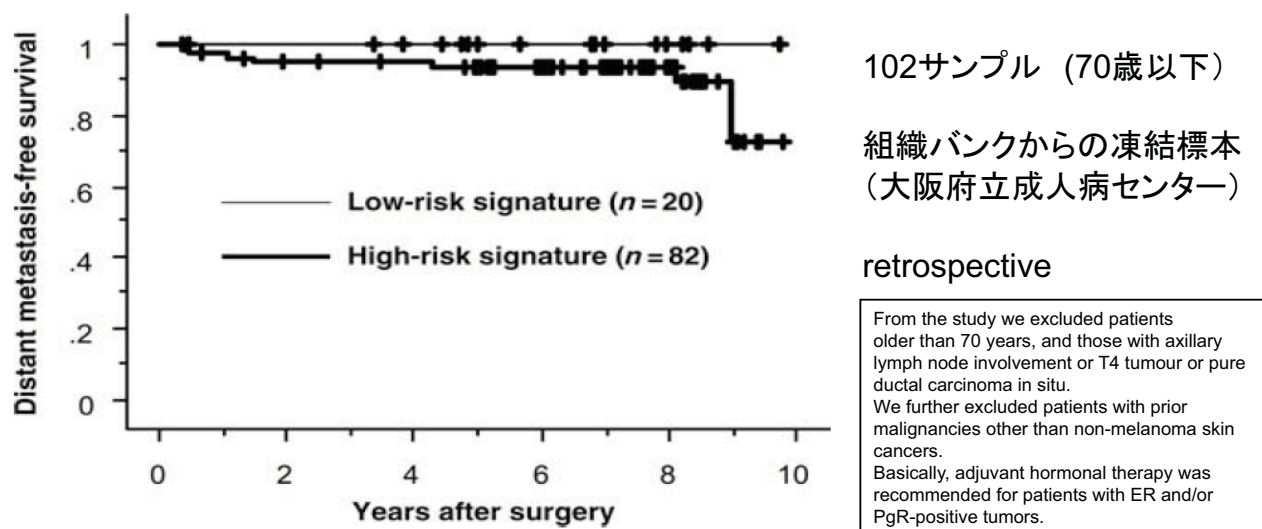


Figure 1. Distant metastasis-free survival curves according to risk signature.

Ishitobi et al., *Jpn J Clin Oncol* 40, 508-512 (2010)

MammaPrint まとめ

- 大規模な臨床試験(前向き)により、予後予測に有用であることが確認された。
- 無駄な投薬を減らすという医療経済学的メリットがある。
- 米国における臨床データは無いが、FDAは承認。
- 国内データは、ケーススタディとして有用

Case-2 Pathwork Tissue of Origin

- 1550遺伝子を使って、癌の原発臓器を予測。
- Affymetrix製PathChipを使用。
- データベース化した2039サンプルのデータとの比較により癌種(15)ごとにSimilarity Score (0-100)を算出し、30以上で陽性。

(サンプル条件)

- 病理組織検査で、癌の割合が60%以上、壊死20%以下。
- 組織100mg、RNA 1 μ g
- 病理診断結果のあるサンプル
- スキャンまでを各機関で行い、イメージデータをPathwork社に送付。

(患者(サンプル)数)

- 622患者サンプルを入手
- 331凍結サンプルは、公的機関(2)と営利企業(2)より入手
- 癌種ごとに25以上、合計545サンプルについて、データを得る。

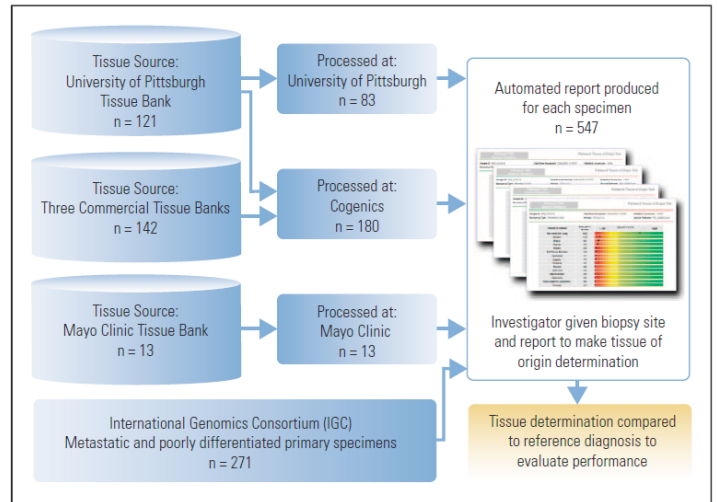


Fig 1. Validation study design. Gene expression data from 547 tumor samples generated by multiple laboratories were processed by the Pathwork Tissue of Origin test (Pathwork Diagnostics, Sunnyvale, CA) software. The test software transformed data into gene expression values, performed data verification and standardization, and generated reports that were evaluated in a blinded fashion by the investigators.

(結果)

Available Diagnosis	Positive Percent Agreement (% , ratio, 95% CI)	Negative Percent Agreement (% , ratio, 95% CI)	Non-Agreement (% , ratio, 95% CI)	Indeterminate (% , ratio, 95% CI)	Area Under ROC Curve
Bladder	78.6% (22/28) [59.0, 91.7]	100.0% (517/517) [99.3, 100.0]	14.3% (4/28) [4.0, 32.7]	7.1% (2/28) [0.9, 23.5]	0.996
Breast	94.1% (64/68) [85.6, 98.4]	98.5% (470/477) [97.0, 99.4]	5.9% (4/68) [1.6, 14.4]	< 0.1% (0/68) [0.0, 4.3]	0.979
Colorectal	94.6% (53/56) [85.1, 98.9]	99.2% (485/489) [97.9, 99.8]	5.4% (3/56) [1.1, 14.9]	< 0.1% (0/56) [0.0, 5.2]	0.980
Gastric	76.0% (19/25) [54.9, 90.6]	99.8% (519/520) [98.9, 100.0]	16.0% (4/25) [4.5, 36.1]	8.0% (2/25) [1.0, 26.0]	0.970
Hepatocellular	92.0% (23/25) [74.0, 99.0]	99.8% (519/520) [98.9, 100.0]	<0.1% (0/25) [0.0, 11.3]	8.0% (2/25) [1.0, 26.0]	0.999
Kidney	94.9% (37/39) [82.7, 99.4]	99.8% (505/506) [98.9, 100.0]	2.6% (1/39) [0.1, 13.5]	2.6% (1/39) [0.1, 13.5]	0.975
Melanoma	84.6% (22/26) [65.1, 95.6]	99.8% (518/519) [98.9, 100.0]	7.7% (2/26) [0.9, 25.1]	7.7% (2/26) [0.9, 25.1]	0.999
Non-Hodgkin's Lymphoma	93.9% (31/33) [79.8, 99.3]	99.4% (509/512) [98.3, 99.9]	3.0% (1/33) [0.1, 15.8]	3.0% (1/33) [0.1, 15.8]	0.999
Non-small Cell Lung	90.3% (28/31) [74.2, 98.0]	98.6% (507/514) [97.2, 99.5]	6.5% (2/31) [0.8, 21.4]	3.2% (1/31) [0.1, 16.7]	0.991
Ovarian	94.2% (65/69) [85.8, 98.4]	99.4% (473/476) [98.2, 99.9]	2.9% (2/69) [0.4, 10.1]	2.9% (2/69) [0.4, 10.1]	0.996
Pancreas	76.0% (19/25) [54.9, 90.6]	99.8% (519/520) [98.9, 100.0]	16.0% (4/25) [4.5, 36.1]	8.0% (2/25) [1.0, 26.0]	0.953
Prostate	88.5% (23/26) [69.8, 97.6]	100.0% (519/519) [99.3, 100.0]	3.8% (1/26) [0.1, 19.6]	7.7% (2/26) [0.9, 25.1]	0.998
Soft-tissue Sarcoma	83.9% (26/31) [66.3, 94.5]	99.4% (511/514) [98.3, 99.9]	9.7% (3/31) [2.0, 25.8]	6.5% (2/31) [0.8, 21.4]	0.972
Testicular Germ Cell	82.1% (23/28) [63.1, 93.9]	100.0% (517/517) [99.3, 100.0]	3.6% (1/28) [0.1, 18.3]	14.3% (4/28) [4.0, 32.7]	0.999
Thyroid	91.4% (32/35) [76.9, 98.2]	99.6% (508/510) [98.6, 100.0]	5.7% (2/35) [0.7, 19.2]	2.9% (1/35) [0.1, 14.9]	0.976
Overall	89.4% (487/545) [86.5, 91.8]	99.6% (507/509) [98.6, 100.0]	6.2% (34/545) [4.4, 8.6]	4.4% (24/545) [2.8, 6.5]	

*As described in the Guide to Report Interpretation, if two or three SS are greater than or equal to 30, then one of those results indicates the likely tissue of origin. In the clinical validation study, this occurred in 11 of 545 specimens or 2%.

Results of Off-panel Tumor Types

Specimen	TOO Result	Total Specimens (n = 143)	TOO Reports with 2 SS ≥ 30	Total Indeterminates		Total False Positives	
				n	%I	n	%
Endometrium		49	2	1	2.0	48	98.0
Esophagus		28	1	6	21.4	22	78.6
Small Cell Lung		4	0	0	0.0	4	100.0
Ovarian Germ Cell		2	0	1	50.0	1	50.0
Sq. Head & Neck		18	0	7	38.9	11	61.1
Uterine cervix		42	2	6	14.3	36	85.7

15種以外の癌は間違っって分類される

Specimen	Total False Positives	Distribution of Similarity Scores ≥ 30 across the 15 tissues on the TISSUE OF ORIGIN panel															
		N	BL	BR	CO	GA	GC	LI	KI	LY	LU	ME	OV	PA	PR	SC	TH
Endometrium	48		1	2							2		43			2	
Esophagus	22		1	1	4	14					2			1			
Small Cell Lung	4										4						
Ovarian Germ Cell	1						1										
Sq. Head & Neck	11		2	2							6						1
Uterine cervix	36		6	9	10				1	6		5				1	

(参考データ) FFPEサンプルでの成績

Table 2. Tissue of Origin Test Clinical Validation Results

Reference cancer diagnosis	Agreement % (ratio)	95% CI	Nonagreement % (ratio)	95% CI
Bladder	79.3 (23/29)	60.3–92.0	20.7 (6/29)	8.0–39.7
Breast	96.5 (55/57)	87.9–99.6	3.5 (2/57)	0.4–12.1
Colorectal	91.7 (33/36)	77.5–98.2	8.3 (3/36)	1.8–22.5
Gastric	72.0 (18/25)	50.6–87.9	28.0 (7/25)	12.1–49.4
Hepatocellular	96.0 (24/25)	79.6–99.9	4.0 (1/25)	0.1–20.4
Kidney	89.3 (25/28)	71.8–97.7	10.7 (3/28)	0.3–28.2
Melanoma	84.0 (21/25)	63.9–95.5	16.0 (4/25)	0.5–36.1
Non-Hodgkin's lymphoma	89.7 (26/29)	72.6–97.8	10.3 (3/29)	2.2–27.4
Non-small cell lung	85.2 (23/27)	66.3–95.8	14.8 (4/27)	4.2–33.7
Ovarian	88.9 (40/45)	75.9–96.3	11.1 (5/45)	3.7–24.1
Pancreas	85.7 (24/28)	67.3–96.0	14.3 (4/28)	4.0–32.7
Prostate	96.0 (24/25)	79.6–99.9	4.0 (1/25)	0.1–20.4
Sarcoma	88.9 (24/27)	70.8–97.6	11.1 (3/27)	2.4–29.2
Testicular germ cell	84.0 (21/25)	63.9–95.5	16.0 (4/25)	4.5–36.1
Thyroid	90.3 (28/31)	74.2–98.0	9.7 (3/31)	2.0–25.8
Overall	88.5 (409/462)	85.3–91.3	11.5 (53/462)	8.7–14.7

ほぼ同等の成績が得られる。 → FDA承認(2010)

Pathwork まとめ

- タイプ分けなので、個々の事例は少ないが、全体としては十分な症例数を検討している。
- 病理診断結果を答えとして比較する
- 設定外のタイプは性格に診断できない

Case-3 AlloMap



- 血液(単核球)を使って、心臓移植後の拒絶反応を予測
- RT-PCR法にて、20遺伝子の発現解析
- データベース化した2039サンプルのデータとの比較により癌種(15)ごとにSimilarity Score (0-100)を算出し、30以上で陽性。

(患者およびサンプル条件)

- 15歳以上。
- 移植後、55日以上
- 同時に患者からバイオプシーサンプルを得て、病理診断による予測を行う(従来法)
- キットを用いて各機関で血液を処理し、凍結状態で単一ラボ(XDx社)に送付

(スタディ デザイン)

Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational (CARGO) study

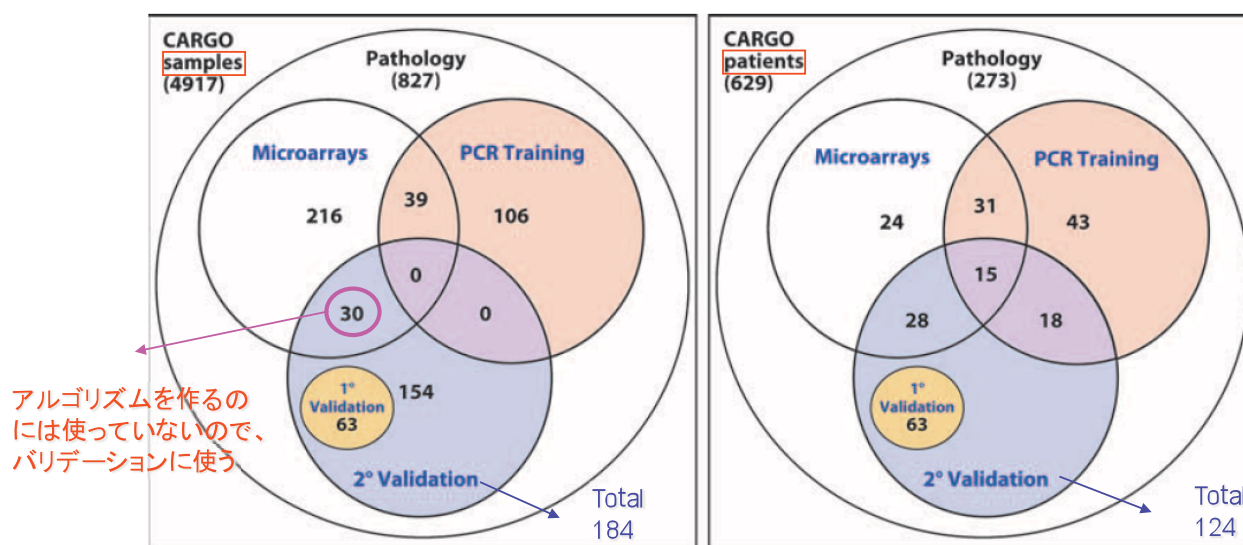


Figure 1: (B) Venn diagrams of samples and patients used for CARGO studies. A total of 827 samples were examined by centralized pathology. A set of samples and patients independent from both the microarray and PCR training studies are reported in the primary validation study, whereas an independent set of samples from the PCR training was used in the secondary validation study.

(結果)

Table 3: Classifier performance in training, primary and secondary validation studies

Sample set	Months post-Tx	Threshold	Biopsy grade 3A rejection				Biopsy grade 0 quiescence			
			#Patients	#Samples	#Agree	%Agree	#Patients	#Samples	#Agree	%Agree
Training	All	20	29	36	29*	80.0%*	99	109	64*	59.0%*
1° Validation	All	20	31	31	26	83.9%	32	32	12	37.5%
2° Validation	All	20	50	62	47	75.8%	83	122	51	41.8%
1° Validation	>6	28	12	12	10	83.3%	14	14	10	71.4%
2° Validation	>6	28	19	21	15	71.4%	38	47	37	78.7%
1° Validation	>12	30	6	6	6	100%	7	7	4	57.1%
2° Validation	>12	30	10	10	8	80.0%	15	18	14	77.8%

*Bootstrap estimates.

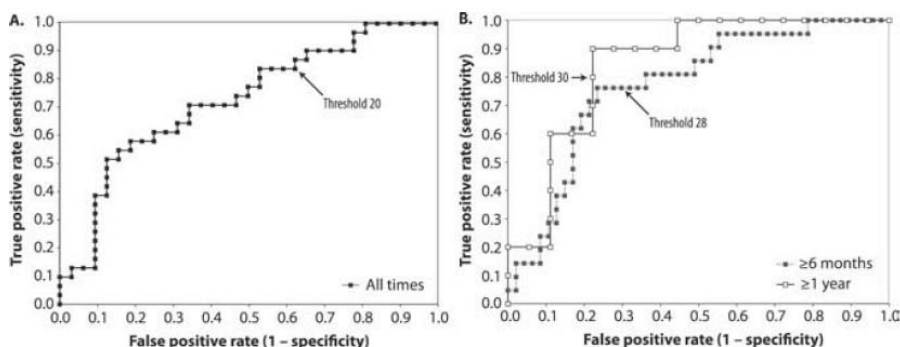


Figure 3: (A) Receiver operator characteristic (ROC) curve for primary validation cohort of 63 unique patient samples (31 rejection, 32 quiescent). Area under the ROC curve is 0.72 ± 0.06 . (B) ROC curves for secondary validation set of 184 patient samples (62 rejection, 122 quiescent) for the ≥ 6 months and ≥ 1 year periods. Areas under the ROC curves are: 0.80 ± 0.114 for ≥ 6 months and 0.86 ± 0.09 for ≥ 1 year.

FDA申請資料での臨床データ

- 300 samples from 154 patients
- AUC 0.67 (0.56-0.78) for all samples
- 0.71 (0.56-0.84) for 55-182 days samples
- 0.67 (0.50-0.88) for ≥ 183 days samples

Table 2: AlloMap Testing Clinical Performance Characteristics**

Post-Transplant Period >2 - 6 months (n=166 samples)			AlloMap Score**	Post-Transplant Period >6 months (n=134 samples)		
NPV <3A(2R) ± SE	% Pts Below	PPV ≥3A(2R) ± SE		NPV <3A(2R) ± SE	% Pts Below	PPV ≥3A(2R) ± SE
97.9% ± 0.0%	100.0%	—	39	98.3% ± 0.0%	97.7%	—
97.9% ± 0.0%	100.0%	—	38	98.2% ± 0.0%	96.5%	—
98.1% ± 0.2%	97.8%	9.5% ± 21.1%	37	98.4% ± 0.2%	91.7%	—
98.1% ± 0.2%	97.3%	7.6% ± 13.8%	36	98.7% ± 0.3%	90.2%	5.4% ± 3.2%
98.1% ± 0.2%	94.5%	5.7% ± 4.8%	35	98.7% ± 0.4%	84.1%	4.0% ± 2.2%
98.2% ± 0.3%	91.7%	5.0% ± 3.5%	34	98.9% ± 0.4%	79.1%	4.1% ± 1.7%
98.1% ± 0.3%	89.4%	4.0% ± 2.7%	33	99.1% ± 0.4%	72.4%	3.8% ± 1.3%
98.0% ± 0.3%	85.6%	2.9% ± 2.0%	32	99.0% ± 0.5%	63.1%	2.9% ± 0.9%
98.2% ± 0.4%	81.0%	3.3% ± 1.6%	31	98.8% ± 0.6%	54.1%	2.3% ± 0.7%
98.6% ± 0.4%	77.2%	4.6% ± 1.6%	30	98.7% ± 0.6%	50.6%	2.1% ± 0.6%
98.6% ± 0.4%	73.7%	4.0% ± 1.3%	29	99.0% ± 0.7%	40.8%	2.1% ± 0.5%
98.5% ± 0.5%	68.3%	3.3% ± 1.1%	28	98.9% ± 0.7%	39.1%	2.1% ± 0.5%
98.7% ± 0.5%	63.6%	3.4% ± 1.0%	27	98.7% ± 0.9%	31.6%	1.9% ± 0.4%
99.0% ± 0.5%	61.4%	3.8% ± 0.9%	26	100.0% ± 0.0%	26.8%	2.3% ± 0.1%
99.3% ± 0.5%	56.0%	3.8% ± 0.7%	25	100.0% ± 0.0%	22.1%	2.2% ± 0.1%
99.1% ± 0.6%	47.5%	3.2% ± 0.6%	24	100.0% ± 0.0%	18.4%	2.1% ± 0.1%
99.0% ± 0.6%	41.8%	2.9% ± 0.5%	23	100.0% ± 0.0%	14.1%	2.0% ± 0.1%
98.9% ± 0.7%	38.8%	2.7% ± 0.5%	22	100.0% ± 0.0%	11.0%	1.9% ± 0.1%
98.8% ± 0.8%	33.6%	2.5% ± 0.4%	21	100.0% ± 0.0%	9.8%	1.9% ± 0.1%
100.0% ± 0.0%	24.3%	2.8% ± 0.2%	20	100.0% ± 0.0%	8.1%	1.8% ± 0.1%
100.0% ± 0.0%	<22.4%	≤2.7% ± 0.1%	≤19	100.0% ± 0.0%	≤5.4%	≤1.8% ± 0.0%

* (XDx Laboratory Services Guide, 2008)

判定はスコアで提供され、この表を元に拒絶反応を予測する

Lower probability of ACR

Gene-Expression Profiling for Rejection Surveillance after Cardiac Transplantation

Michael X. Pham, M.D., M.P.H., Jeffrey J. Teuteberg, M.D., Abdallah G. Kfoury, M.D., Randall C. Starling, M.D., M.P.H., Mario C. Deng, M.D., Thomas P. Cappola, M.D., Andrew Kao, M.D., Allen S. Anderson, M.D., William G. Cotts, M.D., Gregory A. Ewald, M.D., David A. Baran, M.D., Roberta C. Bogaev, M.D., Barbara Elashoff, M.S., Helen Baron, M.D., James Yee, M.D., Ph.D., and Hannah A. Valantine, M.D., for the IMAGE Study Group*

ABSTRACT

BACKGROUND

Endomyocardial biopsy is the standard method of monitoring for rejection in recipients of a cardiac transplant. However, this procedure is uncomfortable, and there are risks associated with it. Gene-expression profiling of peripheral-blood specimens has been shown to correlate with the results of an endomyocardial biopsy.

METHODS

We randomly assigned 602 patients who had undergone cardiac transplantation 6 months to 5 years previously to be monitored for rejection with the use of gene-expression profiling or with the use of routine endomyocardial biopsies, in addition to clinical and echocardiographic assessment of graft function. We performed a noninferiority comparison of the two approaches with respect to the composite primary outcome of rejection with hemodynamic compromise, graft dysfunction due to other causes, death, or retransplantation.

最新のバリデーション結果

Invasive Monitoring Attenuation through Gene Expression (IMAGE) Study

•12機関が参加した共同研究

•AllomapとBiopsyの予測性を評価

•602人の患者を前向きに評価

•Acute Rejectionの予測率は同等

AlloMap[®]

From Stanford University Medical Center, Stanford (M.X.P., H.A.V.), and VA Palo Alto Health Care System, Palo Alto (M.X.P.) — both in California; the University of Pittsburgh Medical Center, Pittsburgh (J.J.T.); Intermountain Medical Center and Intermountain Healthcare, Salt Lake City (A.G.K.); Cleveland Clinic, Cleveland (R.C.S.); Columbia University Medical Center, New York (M.C.D.); Hospital of the University of Pennsylvania, Philadelphia (T.P.C.); Mid-America Heart Institute, Saint Luke's Hospital, Kansas City, MO (A.K.); University of Chicago Medical Center (A.S.A.) and Northwestern University (W.G.C.) — both in Chicago; Washington University School of Medicine, St. Louis (G.A.E.); Newark Beth Israel Medical Center, Newark, NJ (D.A.B.); Texas Heart Institute, Houston (R.C.B.); and XDX, Brisbane, CA (B.E., H.B., J.Y.). Address reprint requests to Dr. Valantine at the Division of Cardiovascular Medicine, Stanford University School of Medicine, Falk CVRB, 300 Pasteur Dr., Stanford, CA 94305, or at hvalantine@stanford.edu.

RESULTS

During a median follow-up period of 19 months, patients who were monitored with gene-expression profiling and those who underwent routine biopsies had similar 2-year cumulative rates of the composite primary outcome (14.5% and 15.3%, respectively; hazard ratio with gene-expression profiling, 1.04; 95% confidence interval, 0.67 to 1.68). The 2-year rates of death from any cause were also similar in the two groups (6.3% and 5.5%, respectively; $P=0.82$). Patients who were monitored with the use of gene-expression profiling underwent fewer biopsies per person-year of follow-up than did patients who were monitored with the use of endomyocardial biopsies (0.5 vs. 3.0, $P<0.001$).

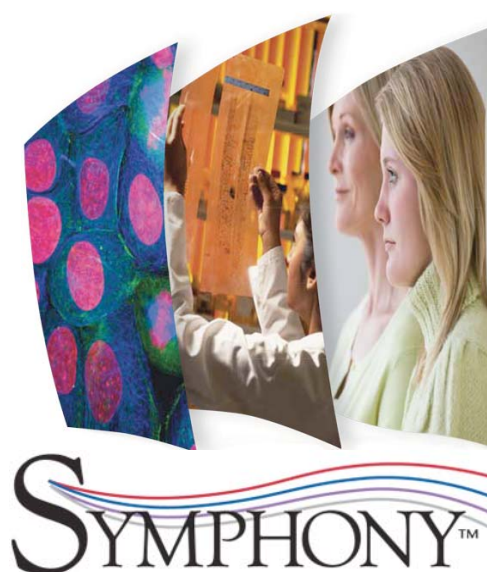
CONCLUSIONS

Among selected patients who had received a cardiac transplant more than 6 months previously and who were at a low risk for rejection, a strategy of monitoring for rejection that involved gene-expression profiling, as compared with routine biopsies, was not associated with an increased risk of serious adverse outcomes and resulted in the performance of significantly fewer biopsies. (ClinicalTrials.gov number, NCT00351559.)

AlloMap まとめ

- 性能を比較できる既存の診断法有り。
- 既存法と同等であれば、低侵襲性であるので、十分な有用性がある。
- 結果はスコアとして提供される。
- 最新の国際バリデーションスタディーで有用性が確認された。

その後も開発は続いている...



mammaprint®
Breast Cancer Recurrence Assay
70-gene signature
Prognostic and predictive tumor analysis

blueprint®
Molecular Subtyping Assay
80-gene signature
Profiles Basal, Luminal and HER2 subtypes

targetprint®
ER/PR/HER2 Expression Assay
Centralized lab confirmation of quantitative receptor status

theraprint®
Therapy Selection Assay
56-gene measurement
Gene expression analysis for targeted drug therapy

Gene Expression Profiling Identifies High-Risk Colon Cancer Patients

ColoPrint® Development and Validation

For more information about participation in the PARSC trial, please visit the [PARSC Clinical Trial for Colon Cancer](#) page.



...しかし、FDAの承認例は増えていない

FDAにおける510(k)関連資料

- **MammaPrint®** *Class II Special Controls Guidance Document: Gene Expression Profiling Test System for Breast Cancer Prognosis (May, 2007)*
 - K062694 Original (凍結組織を使用) (Jan, 2007)
 - K070675 Modification (新鮮組織を使用) (Jun, 2007)
 - K080252 Modification (アレイHD化とスキャナー追加) (Jul, 2008)
 - K081092 Modification (適応年齢を60歳から87歳へ) (Dec, 2009)
- **Pathwork® Tissue of Origin**
 - K080896 Original (凍結組織を使用) [vs BioPlex 2200] (Jul, 2008)
 - K092967 Modification (FFPE用Kitを使用) (Jun, 2010)
- **AlloMap®** *Class II Special Controls Guidance Document: Cardiac Allograft Gene Expression Profiling Test Systems (October, 2009)*
 - K073482 Original (血液を使用) (Aug, 2008)

Class II Special Controls Guidance Document: **Gene Expression Profiling Test System for Breast Cancer Prognosis**

Clinical Validation

対象患者(サンプル)を正しく選択。
アルゴリズム作成に未使用のもの

You should provide data from clinical studies to support the indications for use and claims for your device. The clinical validation study should use patient samples that are derived from the intended use population and that are independent of the specimens you used to develop the signature (pattern or classifier or index). You should describe the protocol of each clinical study (including the inclusion and exclusion criteria, study endpoints, acceptance criteria), and a description of how the studies support the proposed intended use. You should submit the raw data along with the processed data (i.e., prognostic results) from your clinical validation studies.

異なる地域の少なくとも3機関からのデータ

For the clinical validation study, the validation dataset should consist of clinical samples collected from at least three different clinical sites in different geographical locations. Preferably, studies would be conducted within the U.S. population. If the studies are conducted outside the U.S, you will need to document the relevance of your studies to U.S. clinical practice and demographics.

Clinical Validation (continued)

参考論文を提出可

If the clinical validity and utility of your specific device is supported by an established scientific framework and a sufficient body of evidence, then you may submit peer-reviewed references to support your claim. These should include multiple studies that test appropriate populations. In cases where the literature does not sufficiently support your indications for use, you should conduct studies to support claims for your device. Retrospective analysis of prospectively collected banked samples may be acceptable if appropriate measures are taken to identify and either remove or mitigate any biases in the study set. We recommend that you discuss with FDA your specific proposed study to determine whether it is adequate.

前向きに収集されバンク化されたサンプルを
使った後ろ向き試験も受け入れる

試験計画の妥当性を事前に相談することを推奨

Accuracy using comparison to clinical outcome:

診断する内容と手法を明確にする

Clinical truth: In order to allow FDA to judge the performance of your device, you should define the measure of clinical outcome used for all patients in the clinical validation study, and the method by which the measure was obtained.

End points: You should describe the appropriate prognostic endpoints for your device. Examples include 1) time from surgery to distant metastases, 2) overall survival (defined as the time from surgery to death from any cause), and 3) disease-free survival (defined as time from surgery to any recurrence - local or regional, second breast primary, distant metastasis, or death from any cause). For example, a Kaplan-Meier, product-limit estimator can be used to display time-to-event curves for one or more of these three endpoints. Ninety-five percent, two-sided confidence intervals for fixed time intervals may also be included, but the actual times may differ with the intended use population (e.g., events at 5 years may be relevant for some patient groups but less relevant for others). Alternatively, continuous-valued risk descriptors (e.g., hazard ratios) may be used if model assumptions are met.

評価のための統計手法を提出

Validation Strategy: You should provide the method used to validate the gene signature. This should include a clinical protocol and statistical analysis plan. The clinical data should be a new data set not used in the development of the gene signature and the patients should be representative of the intended use population for the device. For the statistical approach, one can consider the estimation of "hazard ratios" (an estimate calculated using statistical methods for time to event data) to quantify the relative risk of an event in the high-risk group compared with the low-risk group. The statistical analysis plan for validation should include a hypothesis about the relative risk that is of interest in the clinical study, e.g., the risk of developing metastatic cancer within 5 years can be estimated by the gene expression profile x. The hypothesized relative risk should be a clinically relevant difference that validates the gene signature as a prognostic marker.

新しい
データ
での評価

The clinical study should be sized to obtain sufficient statistical power to demonstrate this hypothesis. Note that in a longitudinal study some patients will be censored, e.g., if a woman dies of unrelated causes, such as heart disease before the end of the study; however, we would expect all such cases to be included in the analysis. Many statistical methods rely on assumptions that you should check prior to submission of your 510(k) (e.g., proportional hazards in a Cox regression model). You should provide summaries of this clinical validation study, including descriptive statistics for patients within the study as well as either survival curves for specific groups of patients or estimates of risk associated with your endpoint (e.g., estimated proportion of patients that develop metastatic disease within 5 years.⁴)

患者数は統計的に必要な数

While prospective samples are preferred, well-characterized samples from banks can be used in your clinical validation study, provided that there is no collection or selection bias, and patient history and appropriate outcome information are available.⁵ You should fully describe selection (inclusion/exclusion) criteria and characterize any relevant features or limitations of the samples (whether prospective or from banks). You should describe patient demographics and disease characteristics and the prevalence of relevant outcomes in the intended use and study populations. You should select samples in a way that minimizes the sources of bias such as sample integrity, storage duration, and tumor size. We recommend you consult with FDA prior to performing pivotal studies using banked samples.

サンプル数の妥当性を統計的に示せ

You should use clinical samples from all matrices you claim in your intended use (e.g., frozen, or formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE), or collected in any nucleic acid preservative) to demonstrate that correct results can be obtained from clinical material. Appropriate sample size depends on factors such as precision/reproducibility, interference, and other performance characteristics of the test. We recommend that you provide a justification using statistical methods to support your study sample size. For samples you use in your clinical studies, you should provide data demonstrating that storage and transport of retrospectively examined samples have not affected assay results.

診断内容による多様性

- 新規(ex予後予測)or 既存法が存在
- 定性的 or 定量的
- 前向き試験の容易さ
- 症例数確保の容易さ
- 単一ラボ or 複数機関

新しい診断法をより迅速に臨床応用するために

高いハードルをクリアするためには

市販後調査

保険収載

追加データ

承認条件

承認申請

ハードルを下げる



臨床応用

開発

事前相談

補助金

先進医療

踏み台をおく

民間保険

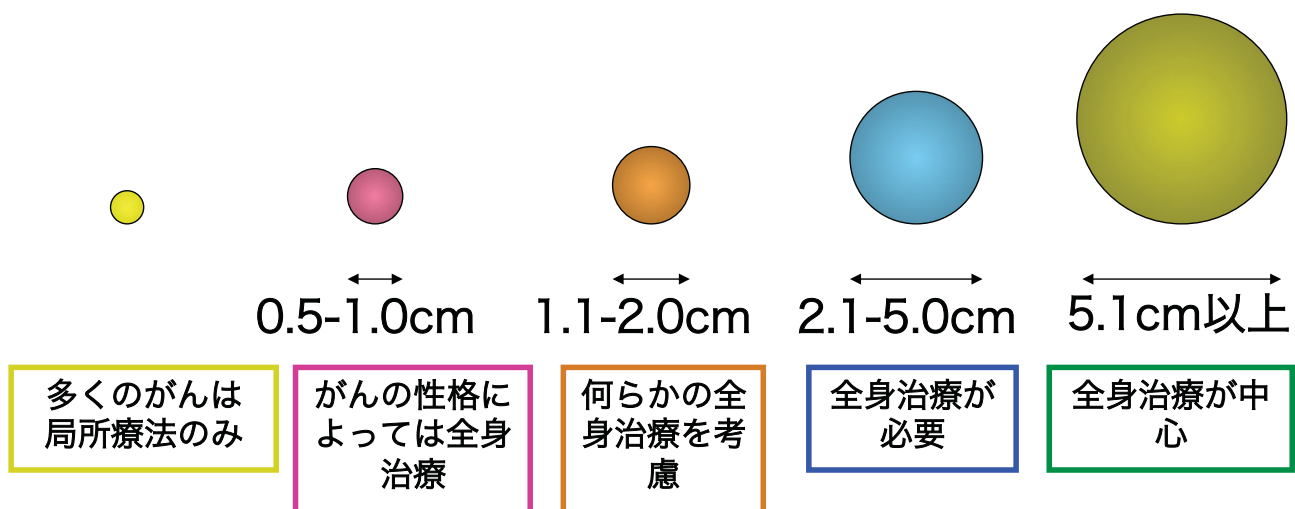
評価指標

別ルートを通る

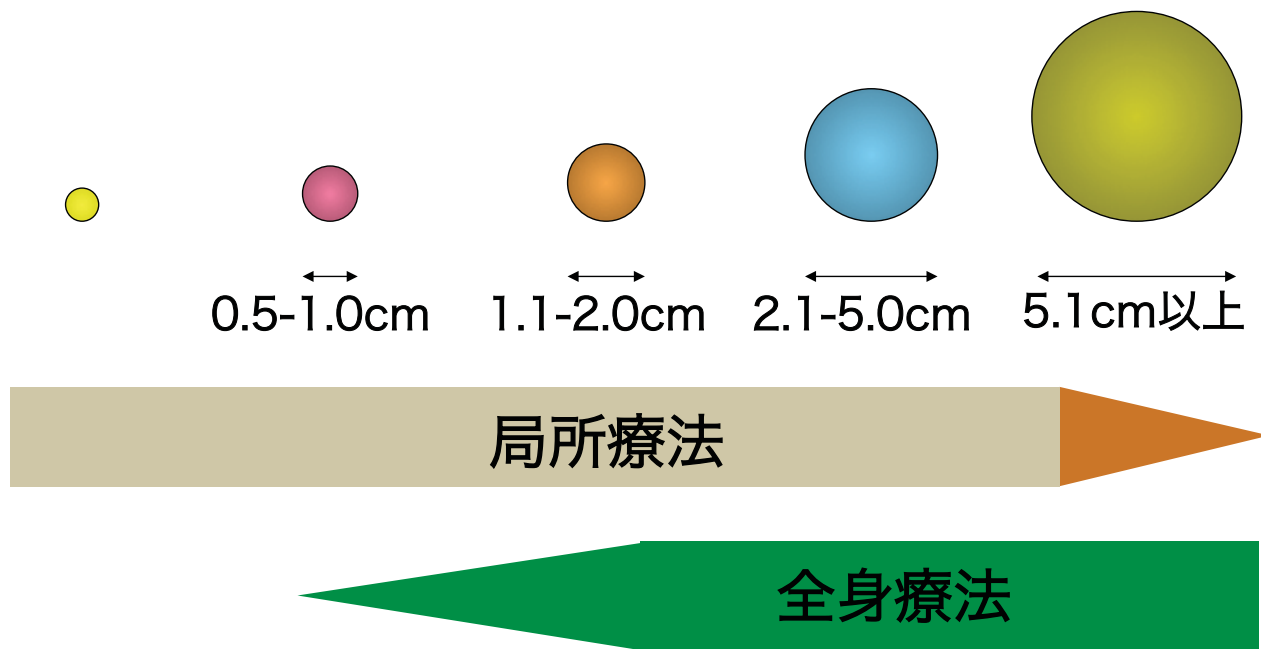
21 gene signature (Oncotype DX®)の 臨床性能

京都大学大学院医学研究科
外科学講座乳腺外科学
戸井雅和

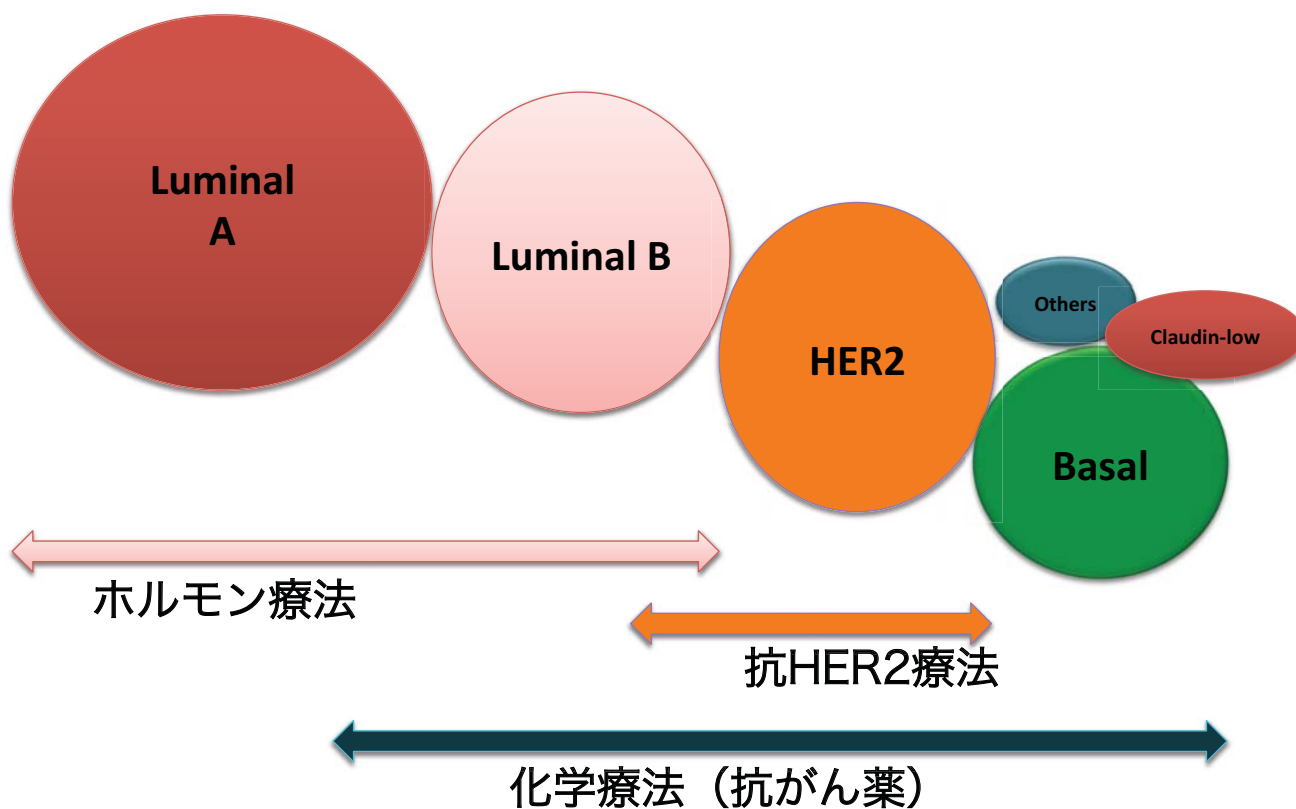
乳がんの大きさと治療の目安



乳がんの大きさと 局所療法、全身療法

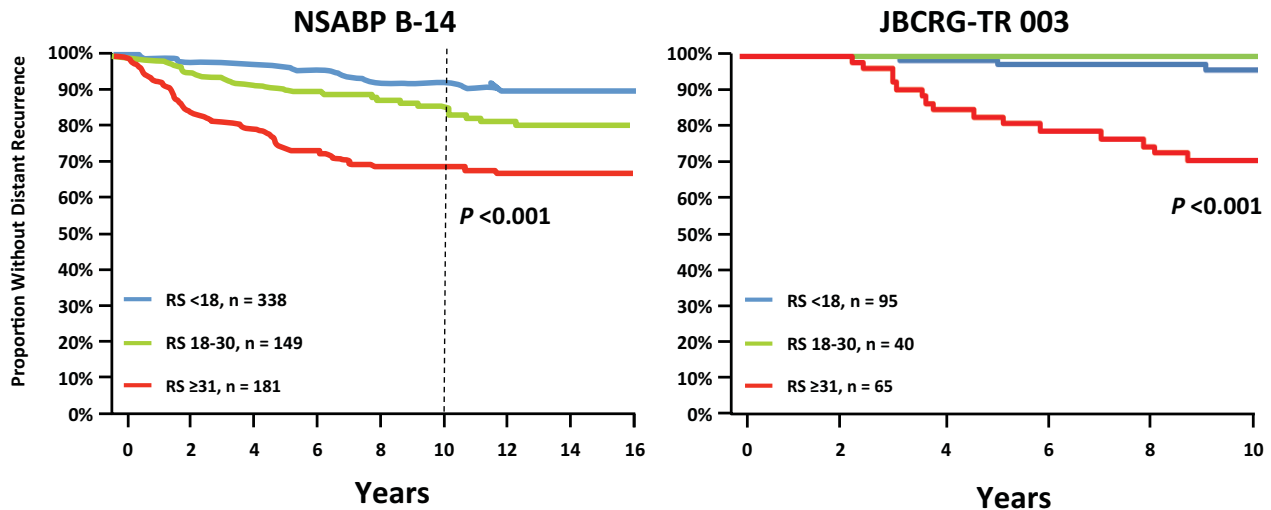


サブタイプと全身療法の選択



21 gene signatureと長期予後

ホルモン療法(化学療法なし)



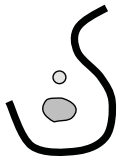
		Low (RS<18)	IM (RS 18-30)	High (RS≥31)
JBCRG-TR03	No. of Pts	95 (48%)	40 (20%)	65 (33%)
NSABP-B14	No. of Pts	338 (51%)	149 (22%)	181 (27%)

Paik et al. N Engl J Med. 2004;351:2817-2826, Toi M et al. Cancer. 116(13):3112-3118, 2010

術前ホルモン療法の利点

1. 腫瘍縮小による乳房温存
2. 治療感受性の把握
3. バイオマーカーの変化、安定性を確認
4. 治療の個別化
5. 長期予後との関連性を検索

JFMC34: 術前ホルモン療法



2006-2007

臨床効果
毒性

組織学的効果
手術(乳房温存、腋窩)
バイオマーカー変化
予後

Stage II, IIIA Postmenopausal
ER+ and/or PgR +
n=110

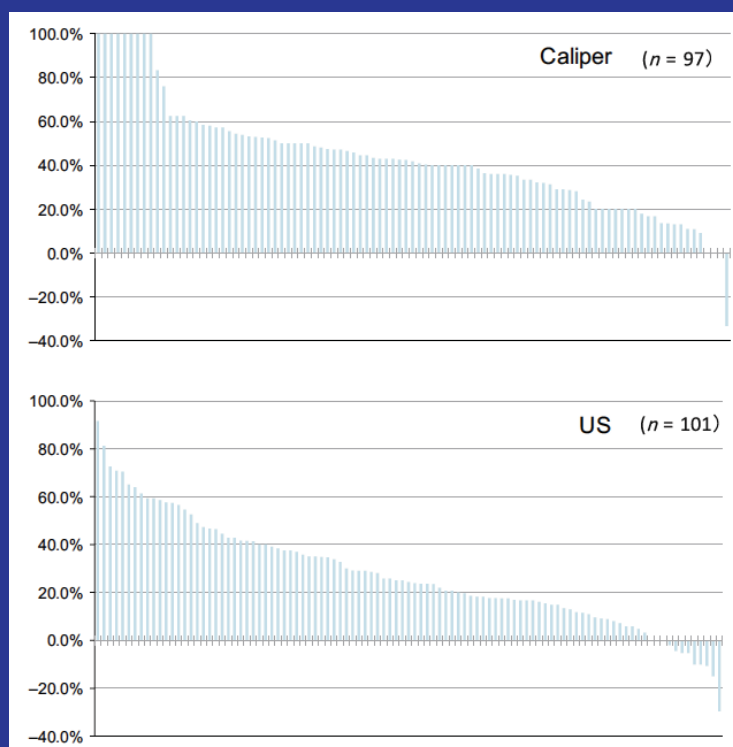
Exemestane 25mg 16 wks

CR, PR, SD

Exemestane 25mg 24 wks

Surgery

Size reduction by neoadjuvant hormone therapy (Exemestane 6M)



Neoadjuvant hormone therapy

JFMC34 (Exemestane)

		Actual surgery (underwent)			Total n (%)
		Total	Partial	No surgery	
Pre-treatment evaluation	Total mastectomy	14	40	5	59 (50.9)
	Partial mastectomy	5	49	3	57 (49.1)
Total n (%)		19 (16.4)	89 (76.7)	8 (6.9)	116

Toi M et al. Cancer Science 2011

A Study of the Recurrence Score by the 21-Gene Signature Assay as a Predictor of Clinical Response to Neoadjuvant Exemestane for 24 Weeks in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer

N. Masuda, M. Toi, T. Ueno, T. Yamanaka, S. Saji, K. Kuroi, N. Sato, H. Takei, Y. Yamamoto, S. Ohno, H. Yamashita, K. Hisamatsu, K. Aogi, H. Iwata, S. Saji, H. Sasano; National Hospital Organization Osaka National Hospital, Osaka, Japan; Breast Surgery, Kyoto University, Kyoto, Japan; Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan; National Kyushu Cancer Center, Fukuoka, Japan; Saitama Medical University, International Medical Center, Saitama, Japan; Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Diseases Center, Komagome Hospital, Tokyo, Japan; Niigata Cancer Center Hospital, Niigata, Japan; Saitama Cancer Center, Saitama, Japan; Department of Breast and Endocrine Surgery, Kumamoto University, Kumamoto, Japan; Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan; Hiroshima City Asa Hospital, Hiroshima, Japan; National Hospital Organization Shikoku Cancer Center, Ehime, Japan; Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya, Japan; Japanese Foundation for Multidisciplinary Treatment of Cancer, Tokyo, Japan; Tohoku University Hospital, Sendai, Japan

ASCO 2011 (Chicago)

21-Gene expression profile assay on core needle biopsies predicts responses to neoadjuvant endocrine therapy in breast cancer patients.

Akashi-Tanaka S, et al. Breast. 2009 Jun;18(3):171-4.

術前ホルモン療法 : Tamoxifen or Anastrozole

奏効率 : Low RS > Intermediate or High RS (n=43)

Clinical Outcomes (n=64)

Outcome	n (%)
Clinical Response	
CR	0
PR	32 (50.0%)
SD	24 (37.5%)
PD	5 (7.8%)
NE	3 (4.7%)
Surgery Type	
Breast-Conserving	49 (76.6%)
Mastectomy	11 (17.2%)
No surgery	4 (6.3%)

Baseline Features (n=64)

Feature	Median	Range
Age	64	(56-77)
Tumor Size (mm)	27	(15-58)
Ki67 by IHC (%)	12.5	(1-58)

Feature	n (%)
HER2 by IHC/FISH	
Negative	50 (78.1%)
Equivocal	12 (18.8%)
Positive	2 (3.1%)
Stage	
IIA	47 (73.4%)
IIB	15 (23.4%)
IIIA	2 (3.1%)
RS Risk Group	
Low (< 18)	32 (50.0%)
Intermediate (18 - 30)	17 (26.6%)
High (≥ 31)	15 (23.4%)

Masuda N. et al. ASCO 2011

Core Biopsy RS and Clinical Response

RS Group	Clinical Response
Low (< 18)	19/32 = 59.4%
Intermediate (18 - 30)	10/17 = 58.8%
High (≥ 31)	3/15 = 20.0%

p=0.015 for Comparison Between Low and High RS Groups (2-sided Fisher's exact test)

Masuda N. et al. ASCO 2011

Core Biopsy RS and Breast Conserving Surgery

RS Group	BCS
Low (< 18)	29/32 = 90.6%
Intermediate (18 - 30)	13/17 = 76.5%
High (≥ 31)	7/15 = 46.7%

Logistic Regression of Baseline Core Biopsy Markers in Predicting BCS

Marker	Unadjusted		Adjusted for Tumor Size and PgR Allred Score	
	Odds Ratio (95% CI)	p-value	Odds Ratio (95% CI)	p-value
RS/50	0.055 (0.009, 0.323)	0.001	0.016 (<0.001, 0.259)	0.004
ER by RT-PCR	1.786 (1.150, 2.774)	0.001	1.881 (1.090, 3.245)	0.023
Ki-67 by IHC	0.957 (0.921, 0.994)	0.024	0.953 (0.907, 1.002)	0.060

Masuda N. et al. ASCO 2011

RS：術前ホルモン療法

1. 臨床効果と有意の相関性が認められた
2. 乳房温存手術との関連性が認められた。
3. ルミナルタイプの乳がん患者における全身療法の適応決定において、有用性が示唆される。

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

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協議会体外診断用医薬品委員会委員長あて送付することとしている。

記

1. 評価指標とは、承認申請資料の収集やその審査の迅速化等の観点から、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。評価指標は、法的な基準という位置付けではなく、技術開発の著しい次世代医療機器を対象として現時点で考えられる評価項目を示したものであり、製品の特性に応じて、評価指標に示すもの以外の評価が必要である場合や評価指標に示す評価項目のうち適用しなくてもよい項目があり得ることに留意すること。
2. 個々の製品の承認申請に当たって必要な資料・データを収集する際は、評価指標に示す事項について予め検討するほか、可能な限り早期に（独）医薬品医療機器総合機構の対面助言を活用することが望ましい。

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

1. はじめに

ファーマコゲノミクスの進歩を反映し、試料中の複数の核酸断片の塩基配列や量を調べる DNA チップの開発が進められている。DNA チップは専用の測定・解析装置とともに使用され、物理的ないし生化学的な測定値を直接提供する従来の体外診断装置と異なり、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。従って、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等が評価の対象となる。DNA チップはクラスⅢの体外診断用医薬品、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ている。

DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬としては、ヒトの遺伝子多型や変異を解析して遺伝子型を判定するもの又は病原微生物の遺伝子型を判定するものが近い将来、市場に導入されると思われる。これらの基本的な原理としては、ゲノムの特定領域を対象として、プローブとのハイブリダイゼーションの程度を測定し、塩基配列を推定するが多い。この方法では、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。本評価指標は、DNA チップ及びその専用測定・解析装置によって正確に遺伝子型が判定されることを確認するために必要な事項をまとめ、製造販売業者による申請の準備と（独）医薬品医療機器総合機構（以下、「総合機構」という。）による審査の迅速化に役立てることを目的とする。なお、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おいても参考となるものとする。ヒトの遺伝子型情報に基づいて個別の薬物に対する応答性を推定する妥当性については、データの蓄積とともに、対象とする薬物毎に学会等の場において専門家による個別の議論が必要である。

2. 本評価指標の対象

DNA チップを用いヒト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 チップと専用の測定・解析装置から成る測定系の評価を行うためのものである。

3. 評価指標の位置づけ

本評価指標は、DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬に求められる性能等において、現時点で重要と考えられる事項を示したものである。今後の技術革新や知見の集積等を踏まえて改訂されるものであり、申請内容に関して拘束力を持つものではない。本評価指標が対象とする製品の評価にあたっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な

合理性をもって柔軟に対応することが必要である。

4. 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

判定対象とするヒト遺伝子型または病原微生物の遺伝子型を説明すること。

1) 臨床的意義

対象とするヒト遺伝子型や病原体遺伝子型の判定が、診断や治療に与える有用性等について、文献等を引用して説明すること。この際、日本人における遺伝子多型、日本国内における病原微生物株の分布等を考慮すること。

2) 測定原理

DNA チップと測定・解析装置を使った遺伝子型判定の原理を詳細に示すこと。従来用いられたヒトまたは病原体遺伝子型の判定方法との原理的な相違について記載し、同一の結果が得られることを説明する。なお、測定原理が記載された論文、特許等の文献があれば引用し、必要な実測データを添付すること。測定・解析装置に類似の機器があれば、その資料を示すこと。海外のデータを用いる場合には、人種差、病原微生物株の分布等を踏まえた上で、その妥当性を説明すること。

3) プライマー、プローブ等の塩基配列

検体の遺伝子を増幅するプライマー、プローブ等の塩基配列を示し、偽遺伝子や類似配列を持つ他の遺伝子の存在を含めて、それらの配列を選択した妥当性を説明すること。ミスマッチプローブ等を判定に利用する場合には、その配列を設定した根拠を説明すること。病原体には多くの変異体が存在することから、ゲノムの多様性への対応について説明すること。必要に応じ、実測データの添付または文献の引用によって詳細に説明すること。

なお、プローブの数が非常に多い場合は、資料の提出方法等に関して事前に総合機構の相談制度を利用することが望ましい。

4) DNA チップ構成

DNA チップにおけるプローブの空間的配置と固定方法の特徴を詳細に説明すること。

5) DNA チップに搭載される対照物質

陰性対照と陽性対照の設定と妥当性を説明すること。陰性対照としては、検出するDNA 配列と類似の配列を複数搭載することが望ましい。陰性対照は、シグナルのバックグラウンド算定の根拠となる。バックグラウンドシグナル値、陽性対照物質による内部標準等を用いて測定データの補正を行う場合には、その原理、手法を実測データを用いて詳細に説明すること。

6) アッセイ条件

ハイブリダイゼーション、洗浄、乾燥等の反応条件（温度、時間、緩衝液の組成等）

の概略（アッセイのプロトコル及び標準手順を含む。）を記し、非特異反応が生じる可能性等も説明すること。

7) ソフトウェア

蛍光や電流値などから得られるシグナル強度に基づき、解析機器に組み込まれたソフトウェア等により最終的な遺伝子型の判断を下す場合は、解析アルゴリズムの妥当性に関して説明すること。ソフトウェアの動作に関するバリデーションの方法を示すこと。

(2) 仕様及び安定性に関する事項

1) 品質管理の方法

DNA チップに固定化されたプローブの塩基配列とデザインした塩基配列の同一性に関して、実測データを用いて説明すること。

DNA チップが対象遺伝子を検出する感度、正確性及び同時再現性を保証する標準試験を設定し、標準試験の成績からこれらの項目を検証する具体的な方法を、実測データを用いて説明すること。

2) 感度、特異性、測定範囲

一定のゲノムコピー数を含む試料を希釈して測定し、検出限界を示すこと。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しておくこと。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。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こと。

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こと。シークエ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）を示すこと。定量する場合は直線性を保つ範囲について示すこと。必要に応じ、最大検体量について検討すること。

3) 測定装置の較正

一定のシグナルを安定して発生する較正用 DNA チップを装置の較正に用い、動作バリデーションを定期的に行うことができる場合は、較正用チップの妥当性を検討すること。較正用チップが利用できない場合には、DNA チップのバリデーションとあわせ、陽性及び陰性較正用試料を用いた測定値の評価等によって動作確認をとる方法を示すこと。較正用試料の妥当性を検討すること。DNA チップと測定・解析装置を一体として評価する際に、これらの情報が必要になることがあるので留意すること。

4) 安定性に関する資料

DNA チップの保存条件、有効期限を設定し、その妥当性を説明すること。使用者が

調製する試薬類がある場合は、調製方法や品質管理の方法を示すこと。

(3) 性能に関する事項

1) 遺伝子型判定の精度

①ヒト遺伝子型判定

- ・ ヒト遺伝子型判定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を示すこと。
- ・ 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すこと。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 シークエンサーを用いた双方向の塩基配列解析結果を比較すること。
- ・ 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こと。

②病原体の遺伝子型判定

- ・ 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、既承認の体外診断用医薬品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こと。
- ・ 複合感染の場合についても、定量性を含めて検討すること。病原体ゲノムに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こと。
- ・ 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。

2) 検体と共に測定する対照試料

陽性対照試料、陰性対照試料を選定し、選定した理由を説明すること。それらを用いた精度管理の方法を、実測データを用いて説明すること。

3) 再現性、頑健性

標準試料を用いた繰り返し測定によるシグナルおよび遺伝子型判定結果の再現性に関する検討を行うこと。複数施設における測定を行い、再現性を確認すること。必要に応じて頑健性に関する情報、外部精度管理の方法に関する情報を提供すること。

4) コンタミネーション対策、データの取り違え対策

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、必要に応じて実測データを用いて説明すること。また、キャリー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対策の妥当性を示すこと。

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。

5) 検体の調製

検体の質が遺伝子型判定結果の精度に大きな影響を与える。高品質な DNA ないし RNA 試料を得るために、採取する検体の種類や対象となる病原体に応じて、採取、保管、運搬等に関する適切な取扱い方法を設定し、その妥当性を説明すること。特に RNA 試料の場合は、分解を防ぐ方策を講じることが望ましい。

検体の種類（血液、口腔内採取物等）に留意しながら、検体から試料 DNA ないし RNA を抽出する方法と得られた試料の品質を評価するための方法及び参考値（量、純度、分解度等）を示すこと。

調製した試料の安定性について説明すること。反応を妨害する物質（血清中のトリグリセリド、ヘモグロビン、ビリルビン、脂質などや投薬された薬物、検体採取に用いた抗凝固剤等）について予め評価しておくこと。

病原体ゲノムの場合は、患者や常在菌の DNA ないし RNA が混入し得るので、混入による妨害の有無を説明し、必要に応じて検体や試料の品質評価基準を示すこと。

(4) リスク分析に関する事項

操作過程において、人為的及び機械的ミス、非特異反応等が発生する要因に関して分析し、必要に応じて添付文書にて注意喚起を行うなどの対策を講じること。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。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、積極的に提示すること。

Attachment 2

Guidance on evaluation of diagnostic agents for genotyping using DNA microarrays

1. Introduction

With an advancement of pharmacogenomics, DNA microarrays are being developed for investigating the nucleotide sequence and the amount of multiple nucleic acid fragments in a sample. A DNA microarray is used with a dedicated device for measurement and analysis, and unlike traditional IVD that directly takes physical or biochemical measurements, DNA microarrays provide medical information from the analysis of multiple measurement values in multiple criteria using an algorithm. Therefore, the precision and reliability of measurement are not the only evaluation items, but also the algorithm used in the analysis as well as the adequacy of the statistical analysis are evaluated. The DNA microarray is treated as a Class III IVD, and the dedicated measurement and analytical devices are handled as Class I medical devices.

Genotyping diagnostic agents using DNA microarrays will be introduced to the market in the near future to determine human genotypes from the analysis of genetic polymorphisms and mutations, as well as genotypes of pathogenic microbes. In most cases, the degree of hybridization to the probe, which is targeted at a specific region of the genome, is measured, and the nucleotide sequence is determined from this measurement. This method provides more information more quickly and at lower cost compared to traditional sequencing techniques, but it is important to determine the nucleotide sequence accurately. In this guidance for evaluation, check points have been summarized for confirming that the genotype was accurately determined by the DNA microarray and its measurement/analytical device. The guidance also aims to help manufacturing firms to prepare their approval application, and to accelerate the examination process conducted by the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). In addition, this guidance will be a reference for related products such as diagnostic agents for gene expression analysis using DNA microarrays. In terms of adequacy in determining responsiveness to drugs based on human genotype, data should be accumulated and each drug must be independently discussed by experts at academic conferences, etc.

2. Scope

This guidance for evaluation covers diagnostic agents that utilize DNA microarrays to determine the genotypes of humans and pathogenic microbes. The guidance aims to evaluate the measurement system consisting of the DNA microarray and its measurement/analytical device.

3. Role of this guidance

The guidance for evaluation of a genotyping diagnostic agent using DNA microarrays specifies points that are currently considered important in the expected performance, etc... This guidance is subjected to revision based on technical innovations and accumulation of findings in the future, and is not intended to restrict the content of applications. When evaluating products, it is important to fully understand the properties of each product, and to conduct the evaluation flexibly with scientific rationality.

4. Points to consider during evaluation

(1) Overview

The human or pathogenic genotype to be determined should be explained..

1) Clinical significance

The clinical significance of determining the human or pathogenic microbial genotype for diagnosis and treatment should be explained with citations. In this process, polymorphisms within the Japanese population, or the distribution of pathogenic strains in Japan, should be considered.

2) Principle of measurement

Details of the principle behind genotyping using DNA microarrays and the dedicated measurement/analytical device should be provided. An explanation of the difference in principle from other traditional genotyping methods in humans and pathogens should be given, and it should be shown that both methods give identical results. If there are other published articles or patent literature, those publications can be cited, and any necessary measured data should be attached. If instruments similar to the measurement/analytical device are used, then documents for those instruments should be indicated as well. If foreign data is used, then the adequacy of the data in terms of difference in race or distribution of pathogenic strains should be explained.

3) Nucleotide sequence of primers and probes

The nucleotide sequence of the primers and probes used for gene amplification of the sample should be provided, and the adequacy in selecting those sequences should be explained, including the existence of pseudogenes or genes with similar sequences. If mismatch probes were used in genotyping, the basis of selecting those sequences should be explained. Since there are many mutants in pathogens, methods for dealing with genomic diversity should be presented as well. Details with attached measured data or citations should be provided as needed.

If a high number of probes are being used, PMDA consulting system should be utilized regarding the submission of documents.

4) DNA microarray construction

The spatial position and method of fixing each probe in the DNA microarray should be explained in detail.

5) Reference material in the DNA microarray

The selection of positive and negative controls, as well as their adequacy, should be explained. In terms of negative controls, several DNA sequences similar to that of the detected

DNA should be used. The negative control will be the basis for calculating the background signal. If the measured data is calibrated using background signals and internal standards with positive controls, the principle and method should be explained in detail using the measured data.

6) Assay conditions

An overview of the reaction conditions of hybridization, washing, and drying (including the assay protocol and standard procedure) should be provided. Any possible nonspecific reactions should be explained as well.

7) Software

If the final genotype is determined using software installed in the analytical device, based on signal intensity obtained from fluorescence or current, the adequacy of the algorithm should be explained. The method of validation concerning the performance of the software should be provided as well.

(2) Specifications and stability of the DNA microarray

1) Quality control method

The identity in the nucleotide sequence between the probe bound to the DNA microarray and the designed sequence should be explained using measured data.

A standard test should be established to assure the sensitivity, precision and within-run reproducibility of the detection of the target gene by the DNA microarray. A detailed method of verifying these criteria from the results of this test should be explained using measured data.

2) Sensitivity, specificity and measurement range

A sample including a certain number of genomic copies should be diluted and measured to determine the detection limit. If possible, the qualitative and quantitative detection limit should be determined as well. It is permissible to set an entire measurement range based on the investigation of typical genotypes. If nucleic acids manipulated through genetic engineering or pathogenic genomes obtained from cell culturing are used as reference materials, the concentration and purity of the samples derived from clinical specimens should be concerned..

The nonspecific reactions and the stability and uniformity of background signals should be examined, and the possibility of misjudgment should be explained. Attachment of information on appropriate primer sequences, reaction conditions, repeated sequences and CG content is recommended, for the assumed DNA sequencing..

The minimal amount of specimen and the corresponding minimal amount of DNA needed for genotyping, should be presented. When a quantitative measurement is done, the range in which linearity is retained should be presented. The maximum amount of specimen should also be determined when needed.

3) Calibration of measurement device

If the performance validation can be done regularly by using a calibration DNA microarray which produces a constant signal in a stable manner for the calibration of the device., the

adequacy of the calibration microarray should be examined. If the calibration microarray is not available, measurements should be evaluated using positive and negative calibrating samples to confirm the performance, and this should be noted together with the validation of the DNA microarray. In addition, the adequacy of the calibrating samples should be examined. Note that the information discussed so far will be necessary for evaluating the DNA microarray and its measurement/analytical device as a whole.

4) Documents about stability

The storage conditions and expiration date of the DNA microarray should be set, and the adequacy of that information should be explained. If any reagents are prepared by the experimenter, the method of preparation and quality control should be presented.

(3) Performance

1) Precision of genotyping

I. Human genotyping

- Tests using human specimens should be conducted, and data for both heterozygous and homozygous specimens should be presented.
- If there is a stored specimen with a known genotype, measured data for that specimen should be presented. If measurements are taken from a human specimen with an unknown genotype, the measured values should be compared with the results from a bidirectional sequence analysis using a DNA sequencer.
- Although it is preferable to measure all genotypes in question using human specimens, it is permissible, in cases of low-frequency mutations, to use specimens mixed with the mutant DNA or genetically engineered DNA. However, the composition of the mixed specimen should be as similar as possible to that of a human specimen.

II. Pathogen genotyping

- For instruments that determine the genotype of pathogens, detection data of all the genotypes in question should be presented. However, in cases of low-frequency genotypes, a pseudospecimen in which a genetically engineered standard preparation is mixed with a specimen derived from an uninfected individual could be used as a substitute.
- The precision of genotyping should be confirmed through comparison of the measured data with the results from an already-approved IVD or other sequencing method. If there are multiple genotypes existing for the pathogen in question, it should be shown that specific detection and quantification is possible.
- Cases of complex infections should be examined, including quantitative measurements. Since mutations occur frequently in pathogenic genomes, the effect of these mutations on detection sensitivity and genotyping results should be presented, as well as methods for dealing with the effects.

- The existence of mutations should be considered when setting the signal-to-cutoff ratio and the algorithm.

2) Control material measured with the sample

Positive and negative controls should be set, and reasons for the selection should be explained. Methods of controlling accuracy by means of these controls should be explained using the measured data.

3) Reproducibility and robustness

Reproducibility of the signals and the genotyping results should be examined by repeated measurements using reference materials. Measurements should be conducted at multiple facilities to confirm reproducibility. Information on robustness and external quality control should be presented when needed.

4) Countermeasures against contamination and data mix-up

If the amplification of nucleic acids, such as by PCR, was part of the sample preparation, the possibility of misjudgment due to contamination and countermeasures to prevent it should be explained using measured data when needed. In addition, tests to rule out sample carry-over should be conducted to ensure the adequacy of the countermeasure against contamination.

Countermeasures to prevent errors in the correspondence of sample information and analysis results are needed through data management systems using barcodes or other measures.

5) Sample preparation

The quality of the sample can have a great effect on the accuracy of genotyping. In order to obtain high-quality DNA and RNA samples, an appropriate method for collecting, storing and transporting samples should be set according to the types of samples to be collected and the pathogens in question, and the adequacy of each method should be explained. Countermeasures to prevent degradation should especially be taken for RNA samples.

With consideration of the type of sample (blood, saliva, etc.), methods to extract DNA or RNA from the sample and to assess the quality of the sample should be presented, along with any reference values (amount, purity, level of degradation, etc.).

The stability of the prepared sample should be explained. Substances that disturb reactions (such as triglycerides, hemoglobin, bilirubin in serum, lipids, administered drugs, anticoagulants used for sample collection, etc.) should be evaluated beforehand.

For pathogenic genomes, there is a possibility of contamination by patient DNA and RNA or that of the normal flora. Therefore, the possibility of such contamination disturbing the reaction should be explained, and a standard for quality assessment of the specimen and sample should be provided when needed.

(4) Risk analysis

Factors leading to human or mechanical errors and nonspecific reactions during operation should be analyzed, and methods for dealing with these factors should be presented when needed,

by attaching a caution note, for example. The possible risk of misjudgment in diagnosis and treatment should be evaluated using literature references. Methods for independently confirming genotyping results using different techniques should be actively presented.