

# ファーマコゲノミクスの サンプル，試験およびデータ処理に関する考察書\*

Reflection Paper on Pharmacogenomic Samples,  
Testing and Data Handling

欧州医薬品審査庁 (EMA)  
欧州医薬品委員会 (CHMP)

2007年11月15日

European Medicines Agency (EMA)  
Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)  
Doc. Ref. EMA/CHMP/PGxWP/201914/2006  
[www.ema.europa.eu/pdfs/human/pharmacogenetics/20191406en.pdf](http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/pharmacogenetics/20191406en.pdf)

15 November 2007

訳 西川 昭子<sup>1)</sup> 村山 敏典<sup>2)</sup>

---

1) 財団法人先端医療振興財団臨床研究情報センター研究事業 2) 京都大学医学部附属病院探索医療臨床部

\* 本翻訳は、EMAのウェブページに公開された全文を訳出したものであり、翻訳掲載についてEMAの許諾を必要としないものである。

## 目 次

1. 序 .....	215
2. 範囲 .....	215
3. 解析前の側面 .....	215
3.1 標本抽出 .....	215
3.2 保存 .....	216
3.3 固定 .....	216
3.4 核酸抽出と定量化 .....	216
4. 分析的側面 .....	217
4.1 試験性能 .....	217
4.2 品質保証 .....	218
5. 他の側面 .....	218
5.1 サンプル処理システム .....	218
5.2 保存期間および関連データ処理 .....	219
6. 用語集 .....	219
7. 参考文献 .....	220

## 1. 序

ファーマコゲノミクス (PGx)<sup>1</sup>は、疾患の機構をより良く理解し、医薬品の開発と使用を最適化することに対する可能性を提供する。PGx情報により規制者は、損／益バランス評価を最適化し、処方者と患者に対するガイダンスとして焦点の合った情報を提供することができるようになる。さらに、PGx評価は危機管理および医薬品安全性監視戦略で貴重なツールとなるかもしれない。

したがって、臨床試験および大規模な疫学的試験におけるPGx試験が将来、医薬品の承認前および承認後の開発と評価でますます考慮されることが予想される。

この考察書の目的は、規制当局への提出を意図する臨床試験におけるPGx標本抽出のために、製薬企業と評価者の両方によって考慮されるべきいくつかの主要な原則を強調することである。これらの原則は、急速に科学と技術を進化させることによって実証されるため、この考察書は徹底的な技術的詳細を含まない。

## 2. 範囲

PGx解析の可能性は、PGx情報の信頼性に強く依存している。PGx情報の信頼性はさらに、試験サンプルの全体的な品質、検定および方法の検証、データの再現性や、例えば、治療反応のような関心のある臨床表現型との関連に強く依存するであろう。

この考察書は、解析前、解析および解析後の段階周辺のいくつかの側面、PGxサンプル、試験およびデータ処理、規制的な評価に対して提出されるPGxデータの、科学的信頼性のための手掛かりに関する考察を記述している。

## 3. 解析前の側面

### 3.1 標本抽出

適切な品質の核酸 (DNA, RNA) の利用可能性は、個人の遺伝的背景または発現プロファイルを調査するPGx研究には不可欠である。異なる問題に対処するために、異なる組織または他の生体由来の核酸が使用される。PGx研究、サンプル保存、固定および核酸抽出手順のためのサンプルを採取する場合、核酸の品質は適切な処理の組み合わせによって保証される。

### RNA

RNA分解酵素 (RNase) が広範に存在しているため、DNAと比較するとRNAははるかに不安定である。他方、しばしば微量なRNA分子が分析される必要がある。したがって、RNaseが存在しない収集設備や、効率的なRNA抽出およびRNAの完全性を保証するのに、特別な注意が必要である。発現プロファイルに関しては、核酸の急速な分解が起こる場合があるので、発現パターンは、細胞または有機体を新しい環境に持ち込んだ直後に顕著に変化する可能性があり、生物学的物質の迅速な処理 (例えば、液体窒素における即座の急速冷凍保存、固定、核酸抽出、または特別な血液RNAチューブにおける血液の保存、または各々デザインされたRNA保存液における組織サンプルの保存のような、他の適切な解析前保存法) を推奨する。

発現パターンに関する温度の潜在的な効果は評価される必要がある場合があり、その処理過程は検証される必要があるかもしれない。

### DNA

ゲノムDNAは、末梢血のような容易に入手可

<sup>1</sup> ICH-E15専門家ワーキンググループの定義：薬物反応に関連するものとしてのDNAおよびRNA特性の変動に関する調査。

能な組織からしばしば採取される。遺伝子型決定に使用するDNAターゲット構造は、RNAと比べてはるかに安定しているが、DNAの連続的な分解は不適切な採取（例えば、DNAseの存在）および保存（例えば、長時間の室温）条件の下で起こるかもしれない。

### 3.2 保存

生体サンプルは、一般にDNAと比較するとはるかに不安定なRNAを伴う場合、異なる条件下で異なる活性を持つ様々な量のヌクレアーゼを含むかもしれない。凍結融解サイクルは、核酸のサンプルを複数のアリクオットに分けることによって最小となるかもしれない。適温（4℃および-20℃）下での長期保存を支援するために、生体サンプルの凍結乾燥が示されている（Vaughanら、2006）。使用方法によって、核酸の完全性の異なるレベルは許容可能であるかもしれない。適切な同意がある場合、PGxのサンプルは臨床試験の期間後、潜在的には臨床開発プログラム期間およびその後の期間も保存されるかもしれない。したがって、選択された保存条件下での核酸の適切な完全性は少なくとも、第一標的領域および潜在的な対照標的領域に対して確認され、検証される必要がある。さらに、増幅されたDNAの配列同一性および分析されたmRNAの同一性に対して、適切な管理を実行するものとする。

### RNA

核酸の安定性に関して、-65℃から-80℃の温度で、生体サンプルを含むRNAを保存すれば、長期間でも何ら顕著な影響は考えられないと、多くのプロトコルが予見している。-20℃で保存すると、反応速度が遅くともRNAの連続的な分解に関連する、と記述されている（Kasaharaら、2006）。また、抽出された核酸のサンプルとして、PGx解析のための生物試料を保存する場合がある。通常は、抽出されたRNAのサンプルを、-65℃から-80℃のRNAseの存在しない水で保存する。

### DNA

DNA保存は、通常、RNA保存のような厳格な条件を必要とすることはない。DNAを含む原料生体サンプルは、-20℃または-80℃で保存すればよい。抽出されたDNAは、水または、例えばTE緩衝液（Tris/HCl, EDTA）のような適切な緩衝液で、-20℃で保存すればよい。しばしば乾燥DNAは非常に溶解が困難なため、-20℃でさえDNAサンプルが蒸発しないよう注意を払う必要がある。

### 3.3 固定

組織とその他の原料の固定に関しては、異なるプロトコルが存在しているが、計画された試験の目的に対して適切性の適切な検証後にその対処を行う可能性がある。

固定後の核酸検出、特定法または定量法を用いて、固定に関する干渉可能性を調査すべきである。干渉可能性は、以下の異なる段階で起こる場合がある。すなわち、その後の反応の抑制（例えば、RNAの逆転写、核酸標的部位の増幅、核酸のラベル、プローブに対する特異的ハイブリダイゼーション）によって、固定試薬によって、または固定過程による核酸の分解可能性または化学修飾によって起こる可能性がある。

固定過程の核酸の存在、安定性および固定組織からの抽出性に対する影響は問題であり、本件を考慮に入れるべきである。

核酸の質的分析に関しては、簡単な固定プロトコル、例えば、DNA用のろ紙上の乾燥血液またはRNA用の適切な保存試薬は十分である可能性がある。

さらに、結果の信頼性は異なる基盤における確認で強化されるが、その固定過程の同等性検証が実行される必要がある。

### 3.4 核酸抽出と定量

いくつかの異なるDNAおよびRNA抽出試薬お

よび方法が利用可能である。

核酸以外の生物学的物質の化合物が核酸と共に精製される可能性があり、抽出試薬の残量が精製された核酸に残存している場合がある。試料マトリクス、選択された抽出プロトコルおよびPGx解析法の組み合わせに対して、PGx解析のその後の段階に関する干渉可能性を検証する必要がある。

核酸の絶対定量がPGx解析の不可欠な部分である場合、一貫した抽出効率性の検証が問題になる可能性がある。

## RNA

核酸抽出後でさえ、RNaseの残量が、まだその後の解析を妨げになるくらい十分存在している場合がある。さまざまな方法、例えば、OD260/280吸光度比や、28Sおよび18SリボソームRNAのゲルの解析によって、全体的なRNA含有量、品質（純度）および完全性が示されるかもしれない。

## DNA

DNA濃度の推計値の精度および正確性は、高処理能力遺伝子型および配列分析におけるDNAサンプルの効率的な使用のための重要な要素であるため、抽出されたDNAが完全に溶解していることが不可欠となる。特定の分子遺伝研究室に対する特異的なDNA定量法の申請に際しては、サンプル量と処理能力に関して、プロトコルは、実験的な作業フローの要求事項と同様に、特定の方法的精度および正確性をも考慮に入れなければならない。

## 4. 分析的側面

### 4.1 試験性能

PGx解析のための異なる基盤が、異なる技法によって特徴付けられる。プローブは、有機化学によって製造された異なる長さのオリゴヌクレオ

チド、または*in vitro*で合成されたcDNAプローブからできている。

適切なソフトウェアを使用して、使用されるべきオリゴヌクレオチドプローブの妥当性を確認する必要がある。ゲノムDNA由来のPCR反応産物の同一性を確認することが非常に重要である。DNA調製における不純物は、特定のサンプルにおける不適切なアニーリングまたは不適切なハイブリダイゼーションにつながるかもしれない。

SNP検出に使用される方法の検証に関しては、ポジティブおよびネガティブのコントロールDNAサンプルを使用する必要がある。これは、水が入ったチューブ、および、例えば、解析される多型の異なる遺伝子型を持っていることが既知である被験者のゲノムDNA（各対立遺伝子にとっては同型接合で、両方の対立遺伝子にとってはヘテロ接合）を含んでいる。（ほとんどゲノムの）適切な標準DNAが入手できない稀な対立遺伝子の場合、SNP検出方法を検証するために、両方向からの適切なDNA配列分析を行わなければならない。あらゆる実験の際に、これらの対照サンプルを分析する必要がある。

検証を行っていないSNP（探索的ゲノムバイオマーカー）については、それらの信頼性（例えば、種特異性、集団内頻度、SNPが位置するセグメントのコピー数の変化の欠如、連鎖不均衡の有無）を示すために、*in silico*と*in vitro*で試験を行う必要がある。

異なる基盤間の再現性の不足が問題であり、この問題はPGx試験結果の信頼性を減少させる場合がある。ある配列相同性を伴う標的のクロスハイブリダイゼーションのような異なる方法によって、または配列相同性が存在しない場合は背景信号によって、または特異的結合を妨げている標的および/またはプローブ配列の二次構造（折り畳み）によって、試験結果が不正確となる場合がある。

異なる基盤またはフォーマットのいずれかにおける決定的な結果の交差検証は、データを確認する上での主要な側面である。

## 4.2 品質保証

### 内部の品質保証

試験標準化 PGxに対して国際的に受け入れられている標準または基準試料は、現在、利用可能ではない。現在のところ、試験標準化および校正のための適切な基盤特異的基準試料の使用を推奨する。個別に特定している試験結果の独立した確認には、検証されたリアルタイム (RT) のPCR法のような、非常に特異的で感受性が高く正確な試験系が含まれるかもしれない。

試験対照 適切な試験対照は重要な品質管理尺度である。管理には、試験系の正確性を評価するために特徴付けられた核酸の既知量を、抽出された核酸にスパイクすることによってハイブリダイゼーションと検出過程が管理される spike-in 管理が含まれる場合がある。遺伝子発現研究に関しては、遺伝子発現の絶対測定は、相対測定に比べて変動がより大きくなっている。例えば、constitutiveに発現される遺伝子由来の既知のコンパレータ・RNAが、正規化に対して選択される可能性がある。

### 外部の品質保証

いくつかの遺伝子マーカーの分子診断に対して、上手く特徴付けられた試験サンプルを使用した外部の熟達度試験プログラムが既に導入されている。これらのプログラムは、各々の試験結果の研究室間および研究室の変動の程度を明らかにし、是正措置の潜在的必要性を明らかにする可能性がある。

発現プロファイル研究のための熟達度試験プログラムの導入が、現在進行中である。一度、そのようなシステムがPGxに対して導入されると、適切な試験プログラムへの定期的な参加が重要な品質管理措置と考えられる。RNA発現解析システムに対して、潜在的基準試料の特性化のためのシステムが、ちょうど今現在構築されつつある (Shiら (2006))。分析的および臨床的妥当性を確

立するために、国際協力への取り組みが奨励されるべきである。

## 5. 他の側面

### 5.1 サンプル処理システム

適切な物理的保存、および効率的なラベル貼り付け、および在庫管理システムが不可欠である。検証された電子データ管理プログラムで、効率的に追跡され検索されるようなサンプルのラベル貼り付けが行われる可能性がある。

生物試料のバーコード付けまたは他のラベル貼り付けにより、バンキングシステムやエラー防止操作の自動化が可能となる。固有のバーコードIDを各サンプルに付与することで、検体を容易に追跡するシステムが誕生する。各サンプルおよび関連のある疫学および臨床的情報の特徴が、データベースシステムのバーコードIDにリンクされる。

公文書上の品質のDNAを生産することが証明されている精製工程、独自の研究室情報管理システム (LIMS) を通しての一連の保管文書、サンプルの安全性と検索の効率性を組み合わせたDNAの長期保存のための革新的なプログラムが、開発され利用可能である。

適切な品質規格を満たす設備は、以下のものを含んでいる (完全に限定的なリスト)。すなわち、

- 検証的試験に対してGCPに準拠した設備、または探索的試験に対して確立されたSOP
- オーダーメイドの記録プログラムの双方向的で協力的な開発
- LIMS支援の文書化された一連の保管およびサンプル管理過程
- 安全な保存システム
- 効率的で順応性のある検索および出荷
- 文書化された品質管理

## 5.2 保存期間および関連データ処理

医薬品の十分な開発には何年もの年月がかかり、PGxの領域における知識が増加し続けている。したがって、PGxおよび医薬品開発のために、サンプルの長期保存および適切な識別コードの使用が考慮されなければならない。<sup>2</sup>

PGxサンプルの固有の値は、医薬品の開発およびライフサイクル管理期間中のどの時期においても、治療薬の反応および有害事象に関するゲノム因子についての調査にとっては好機となる。これは、臨床情報を遺伝子解析の結果にリンクさせることを通してのみ可能である。ケースバイケースの原則が基本となる場合、これらの縦断的研究は、医薬品の規制当局の承認および／または承認後の追跡調査またはモニタリング調査にとっては適切であるかもしれない。

GCPのガイドラインおよび関連のある欧州の法律により、データ収集および処理における基本的な構成要素は、被験者にとって重要なすべての関連問題を扱う必要があるインフォームド・コンセントとなっている。

この同意は、試験の目的を扱うのに、および／または、追加サンプル、データ収集、および調査のための新しいインフォームド・コンセントに対して、被験者と再度連絡を取り合う機会を十分与えるものである必要がある。その同意過程は、新しい科学知識と技術の見地において、データおよびサンプルの使用制限が設けられるように、十分に研究目的について説明することと過度に制限しないこと、という妥当なバランスで動き出さなければならない。特別な状況では、提案された研究の範囲が獲得された元々の同意を超えている場合、被験者の再同意を考慮する可能性がある。大部分の試験およびサンプル収集は未だ狭義のインフォームド・コンセント・モデルを使用しているが、現在の国際的な傾向は、同意の範囲を広げる

方向にシフトしている。これは、大規模試験や、ほとんどの現在の試験が探索的な性質のものであるという事実を考えると、特に重要であり、その結果は将来的に検証を必要とするかもしれない。

被験者には、いずれの時点でも、PGx試験も含めて、試験への参加およびサンプルの規定に関する彼／彼女の同意を撤回する、取り消し不能の権利がある。しかしながら、インフォームド・コンセントを撤回する被験者の個人的意思決定の自律性は、サンプル／データ識別コードの存在がある場合にのみ実用的価値を持ちうる。

同意撤回前に得られた／発生したデータは、使用され続ける場合がある。同意撤回後のデータの使用および発生は、得られたインフォームド・コンセントに基づいて導かれるであろう。一般的なデータ安全対策は、指令95/46/ECに相当するものである必要がある。

## 6. 用語集

以下の定義は、PGx検定およびPGxデータの変動に関連した特徴について説明したものである。

**精度 (accuracy)** とは、1つの試験系での真 (実際) の値と測定結果の適合の度合いのことを指す。

**正確性 (precision)** とは、規定された条件下での、同質の資料の複数回の標本抽出から得られる一連の測定結果間の一致の精密さのことを指す。正確性は、反復可能性、中間的な正確性および再現性という3つの異なる段階で考えられる可能性がある。

**反復可能性 (repeatability)** とは、短い時間間隔上の同じ操作条件下での正確性のことを指している (試験内の正確性)。

**中間的な正確性 (intermediate precision)** とは、1つの試験系 (異なる日、異なる解析者、異なる設備) での反復試験結果の研究室内での変動について説明したものである。

<sup>2</sup> ICH E15

**再現性 (reproducibility)** とは、研究室間の正確性のことで、異なる研究室 (基盤内の変動) における1つの試験系、または異なる試験系 (基盤間の正確性) に対する反復試験結果の変動として決定される可能性がある。

**分析特性 (analytical specificity)** とは、他の核酸または他の成分材料が存在している場合、あるいは存在が予測される場合に、標的の核酸を明確に評価する能力のことを指す。

**定量試験の線形範囲 (linear range)** とは、目標の濃度範囲について説明したものであるが、それは正確な結果と一致したものである。

**分析感度 (analytical sensitivity)** とは、検出の限界を定義したものであるが、それはPGx検定によって明確に検出することができる核酸の最低量のことを指す。

**臨床感度 (clinical sensitivity)** とは、その試験値が疾患または臨床効果が存在している (例えば、疾患に関連している突然変異が特定される) ことを示す、特定された臨床疾患または臨床効果をもつ個人の割合のことを指す。

**臨床特異性 (clinical specificity)** とは、特定された臨床疾患または臨床効果がなく、その試験結果が疾患または臨床効果の存在を示さない個人の割合のことを指す。

## 7. 参考文献

- CHMP position paper on terminology in Pharmacogenetics (EMA/CPMP/3070/01)
- ICH guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology
- OECD Guidelines for Quality Assurance in Molecular Genetic Testing. <http://www.oecd.org/dataoecd/43/6/38839788.pdf>
- CAMDA Critical Assessment of Microarray Data Analysis [www.camda.duke.edu](http://www.camda.duke.edu)
- Directive 2001/20/EC of the European Parliament and of the Council of 4 April 2001 on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to the implementation of good clinical practice in the conduct of clinical trials on medicinal products for human use (*Official Journal L 121, 15.2001 p. 34*) Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 lays down standards of the quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissue and cells (*Official Journal L 102, 7.4.2004 p. 48*)
- Commission Directive 2006/86/EC of 24 October 2006 implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council as regards traceability requirements, notification of serious adverse reactions and events and certain technical requirements for the coding, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells was published in the official journal (*Official Journal, L 294, 25.10.2006 p. 32*)
- Directive 95/46/EC of the European Parliament and of the Council of 24 October 1995 on the protection of individuals with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data (*Official Journal L 281, 23.11.1995 p. 31*)
- Kasahara,T.; Miyazaki,T.; Nitta,H.; Ono,A.; Miyagishima,T.; Nagao,T.; Urushidani,T. (2006) Evaluation of methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. *J.Toxicol.Sci.* 31: 509-519.
- Vaughan,H.; Chalker,V.J.; Mee,Z.; Rossouw,A.; James,V. (2006). Stability of lyophilised specimens for the molecular detection of viral DNA/RNA. *J. Clin. Virol.* 35: 135-140.
- Shi et al. (2006). The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnology* 24: 1151-1161.