

生殖細胞系列遺伝子変異解析セット (疾患原因遺伝子検査用)

PrismGuide™ IRD パネル システム



生殖細胞系列遺伝子変異解析セット (疾患原因遺伝子検査用)

PrismGuide™ IRDパネル システム

【使用目的又は効果】

本品は、遺伝性網膜ジストロフィと診断された患者又は疑われる患者の疾患原因遺伝子の情報を取得する。

【使用目的または効果に関連する使用上の注意】

本品による疾患原因遺伝子の情報に基づく診断や治療方針、ローピジョンケア等の決定においては、遺伝性網膜ジストロフィに精通した医師が、最新の医学知見に基づき、自覚症状、臨床症状及び他の関連する検査結果とあわせて、総合的に判断すること。

【承認条件】

遺伝性網膜ジストロフィに関連する十分な知識及び経験を有する医師が、関連学会の最新のガイドライン等に基づく検査の対象及び運用指針を遵守した上で、遺伝性網膜ジストロフィパネル検査に基づく診療体制が整った医療機関で本品を用いるよう、必要な措置を講ずること。

承認番号:30500BZX00129000

承認月日:令和5年5月31日

CONTENTS

PrismGuide™ IRDパネル システムによる ゲノムプロファイリング検査	4
PrismGuide™ IRDパネル システム 構成品 (コンビネーション医療機器)	5
PrismGuide™ IRDパネル システムと 組み合わせて使用する医療機器	5
PrismGuide™ IRDパネル システムの検出遺伝子	5
PrismGuide™ IRDパネル システムの対象疾患	6
PrismGuide™ IRDパネル システムの特徴	6
臨床研究試験	7
検査の流れ	8
提出検体情報	9
PrismGuide™ NET	10
解析結果レポート	11
添付文書	22

PrismGuide™ IRDパネル システムによる ゲノムプロファイリング検査

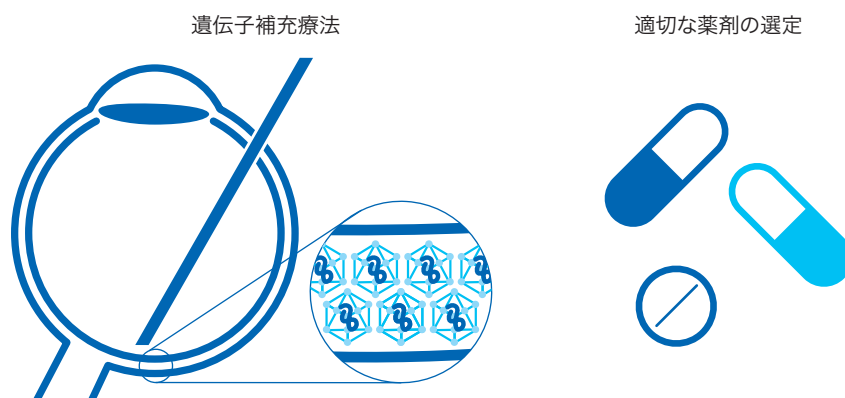
PrismGuide™ IRDパネル システムは遺伝性網膜ジストロフィ (Inherited Retinal Dystrophy, IRD) の診断を受けた患者もしくは疑いのある患者に対し、IRD関連遺伝子を網羅的に解析して原因遺伝子を特定することで、遺伝子補充療法や適切なロービジョンケアなど、早期の個別化治療と患者ケアへ繋げることを目的としています。

個人に合わせた的確な遺伝カウンセリング、治療計画、
ロービジョンケア計画のための情報提供

【個々に合った遺伝カウンセリング・ロービジョンケア計画】

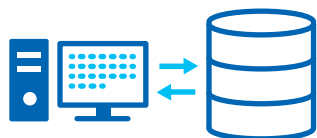


【個別化医療の実現】

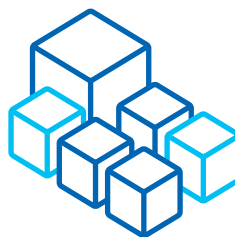


PrismGuide™ IRDパネル システム 構成品(コンビネーション医療機器)

PrismGuide™
IRDパネル 解析プログラム



PrismGuide™
IRDパネル キット



PrismGuide™ IRDパネル システムと組み合わせて使用する医療機器

MiSeq™Dx システム



* MiSeq™Dx システムは本品の構成には含まれません。
 一般的名称：遺伝子解析装置
 医療機器製造販売届出番号：13B1X10303000002
 製造販売元：イルミナ株式会社

PrismGuide™ IRDパネル システムの検出遺伝子

検出遺伝子(82遺伝子)					
ABCA4	CNGA1	GUCA1A	NRL	PRPH2	RPGR
ADGRV1	CNGA3	GUCY2D	NYX	RBP3	RPGRIP1
AIPL1	CNGB1	IDH3B	PCARE	RDH12	RS1
BEST1	CNGB3	IMPDH1	PDE6A	RDH5	SAG
C8orf37	CRB1	IMPG2	PDE6B	RGR	SEMA4A
CA4	CRX	IQCB1	PDE6C	RGS9BP	SNRNP200
CACNA1F	CYP4V2	KCNV2	PDE6G	RHO	SPATA7
CDH23	DHDDS	KLHL7	POC1B	RLBP1	TOPORS
CDHR1	DRAM2	LRAT	PRCD	ROM1	TTC8
CEP290	EYS	MAK	PROM1	RP1	TULP1
CERKL	FAM161A	MERTK	PRPF3	RP1L1	USH2A
CFAP410	FSCN2	MYO7A	PRPF31	RP2	ZNF513
CHM	GNAT2	NMNAT1	PRPF6	RP9	
CLRN1	GRK1	NR2E3	PRPF8	RPE65	

PrismGuide™ IRDパネル システムの対象疾患


本システムが対象とする疾患		
遺伝性網膜ジストロフィ (IRD)	網膜色素変性	網膜色素変性症 (指定難病 告示番号90) 1. 網膜色素変性症 2. 杆体ジストロフィ 3. 杆体錐体ジストロフィ 4. その他 パルデー・ビードル症候群 (小児慢性特定疾病 告示番号90)
		アッシャー症候群 (指定難病 告示番号303)
	黄斑ジストロフィ	黄斑ジストロフィ (指定難病 告示番号301) 1. 卵黄状黄斑ジストロフィ (ベスト病) 2. Stargardt病 3. オカルト黄斑ジストロフィ 4. 錐体ジストロフィ、錐体桿体ジストロフィ 5. X連鎖性若年網膜分離症
非遺伝的要因由来の疾患と想定されるものの遺伝学的検査を実施しなければ確定できない患者 (鑑別診断)		

PrismGuide™ IRDパネル システムの特徴


病的バリエーションの評価

① PrismGuide™ IRDパネル 解析プログラム

塩基配列情報のみで評価 (18基準)



HGMD等のDB




出力ファイル
・サマリーレポート
・シーケンシングレポート

ACMGに準拠した
生殖細胞系列病的バリエーション評価方法

② エキスパートパネル

家系情報や臨床情報を必要とする残りの10基準を含めたACMGガイドラインの全28基準を評価



学会ガイドライン:
「網膜ジストロフィにおける遺伝学的検査のガイドライン」に基づく

本製品の解析プログラムには病的バリエーションを評価する機能が含まれており、検出されたバリエーションは、本解析プログラムが参照するデータベースと照合され、ACMGガイドライン・基準に基づく病原性評価が行われます。病原性評価には検出された個々の変異に対し病原性に関する28の基準が使用されますが、そのうち病原性に関する10の基準、及び良性に関する8の基準に関する該当性の評価がなされた後、5つの分類 (Pathogenic, Likely Pathogenic, Benign, Likely Benign, Uncertain Significance) に基づき病原性を判定しています。本製品の解析プログラムは28基準のうち18基準を塩基配列情報のみで評価します。

病原性判定に際し、家系情報や臨床情報を必要とする残りの10基準を含めたACMGガイドラインの全28基準による病原性の評価は、複数の専門医等から構成される医療施設のエキスパートパネルで行います。

臨床研究試験

「遺伝子パネル検査による遺伝性網膜ジストロフィーの遺伝子診断」100症例の解析結果

本システムによる原因遺伝子同定、及び臨床所見に基づき診断された遺伝性網膜ジストロフィー患者由来の100例を対象に、本システムを用いて生殖細胞系列バリエーションの検出及び病的バリエーション情報を取得後、医療機関でのエキスパートパネルによる原因遺伝子同定率（主要評価項目）を確認しました。この臨床研究試験は先進医療B（遺伝子パネル検査による遺伝性網膜ジストロフィーの遺伝子診断）として神戸市立神戸アイセンター病院で実施されたものです。

主要評価項目	割合（内訳）
エキスパートパネルによる原因遺伝子同定割合	41.0% ^{※1} (41 / 100)
副次評価項目	割合（内訳）
シーケンス成功割合	100% (100 / 100)
候補原因遺伝子（バリエーション）同定割合	55.0% (55 / 100)
原因遺伝子同定患者のうち、本品で判定された病理性バリエーションを有する遺伝子が原因遺伝子であった患者	41.0% (41 / 100)
原因遺伝子同定患者のうち、本品で判定された病理性バリエーションを有する遺伝子とエキスパートパネルを経て確定された原因遺伝子が一致した患者	92.7% (38 / 41)
原因遺伝子同定患者のうち、本品で判定された非病理性バリエーション（VUS含む）を有する遺伝子が原因遺伝子であった患者 ^{※2}	7.3% (3 / 41)
アクションナブル率 ①全適格解析例を分母とし、遺伝形式情報に基づく遺伝カウンセリングができるようになった割合	41.0% (41 / 100)
②合併症精査を提案できた割合	4.0% (4 / 100)
解析前の遺伝カウンセリングの満足度	96.0% (97 / 101) ^{※3}
解析後の遺伝カウンセリングの満足度	97.0% (97 / 100)

※1 先行研究（エキスパートパネルを経た原因遺伝子同定率：約30%～50%）と同程度でした。Maeda A, et al. Development of a molecular diagnostic test for Retinitis Pigmentosa in the Japanese population. Jpn. J. Ophthalmol. 62, 451-457 (2018).

※2 シーケンシングレポート（全ての遺伝子変異の検出結果が記載）に、臨床的意義不明のバリエーション（Variant of uncertain significance: VUS）として報告されていました。

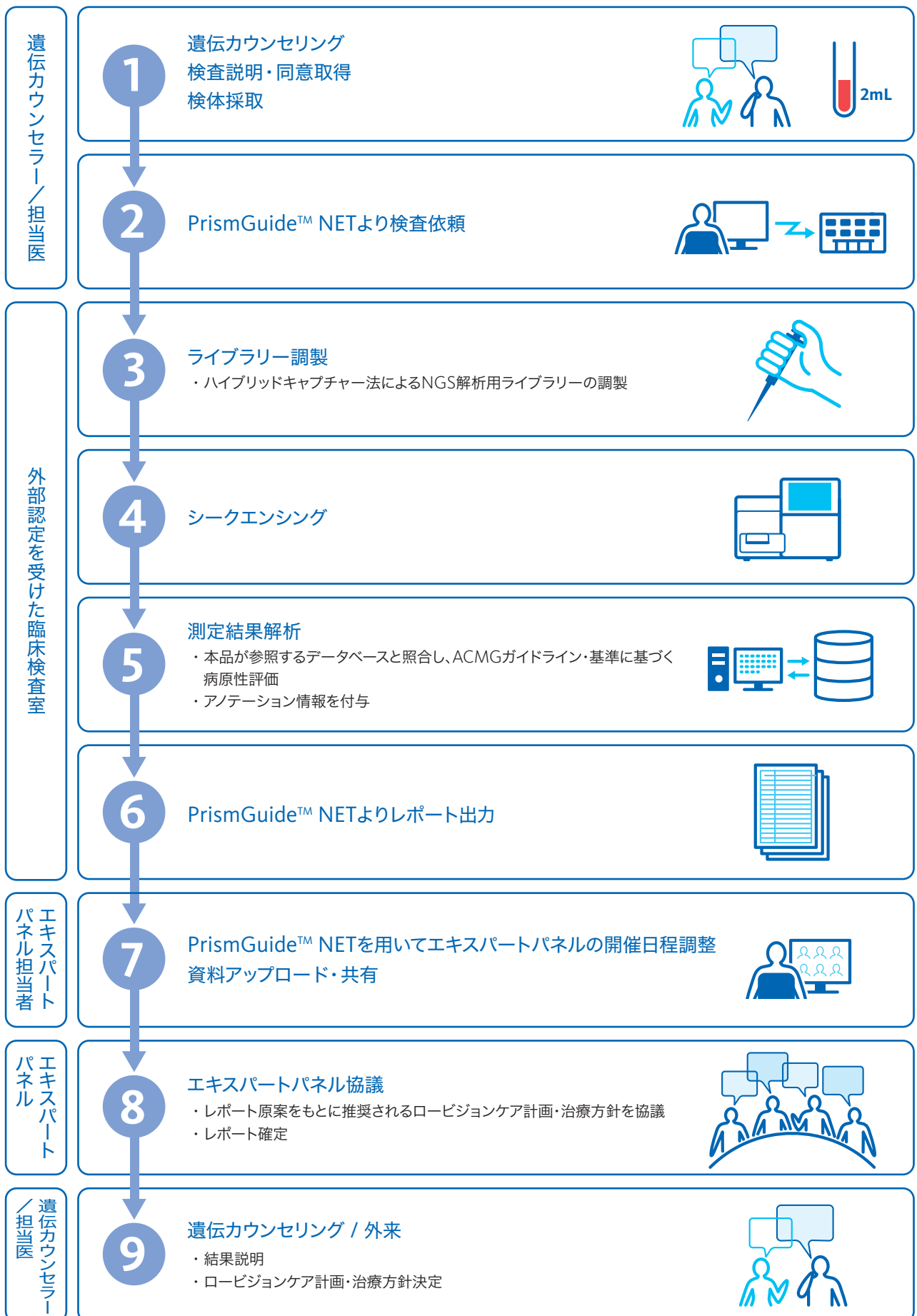
※3 遺伝カウンセリングを受けて解析に進まないという決断をされた方1名を含みます。

原因遺伝子が同定された41例中、38例（92.7%）は、本システムが判定した病的バリエーション（Pathogenic, 又は Likely pathogenic）を有する遺伝子でした。一方、3例（7.3%）は、本システムによりVUS（Variant of uncertain significance）として判定されたバリエーションを有する遺伝子であり、医療機関が保有する臨床情報や家系情報に基づくエキスパートパネルでの総合判定の結果、原因遺伝子として同定されました。

本結果より、本システムから得られた情報が、遺伝性網膜ジストロフィーの原因遺伝子同定の補助として寄与すること、ならびに医療機関のエキスパートパネルにおいて、本システムからの結果に加え、臨床情報や家系情報に基づき病理性有無に係る総合判定を行う運用が妥当であることが示されました。

なお、原因遺伝子が同定できた41名全員が、正確な遺伝形式に基づく遺伝カウンセリングの実施ができました。

検査の流れ



提出検体情報

本検査は血液(全血)を用います。

ご用意いただく血液について

EDTA*採血管を用いて、血液2mL以上を採取してください。

※成分の指定はありません(Na、Kどちらも使用可能)



採血後の取り扱い

採血後は直ちに十分な転倒混和を行い、各種の検体取扱いガイドライン(例:検体品質管理マニュアル:日本臨床検査標準協議会作成、等)に記載の条件に基づいて、適切に取り扱ってください。

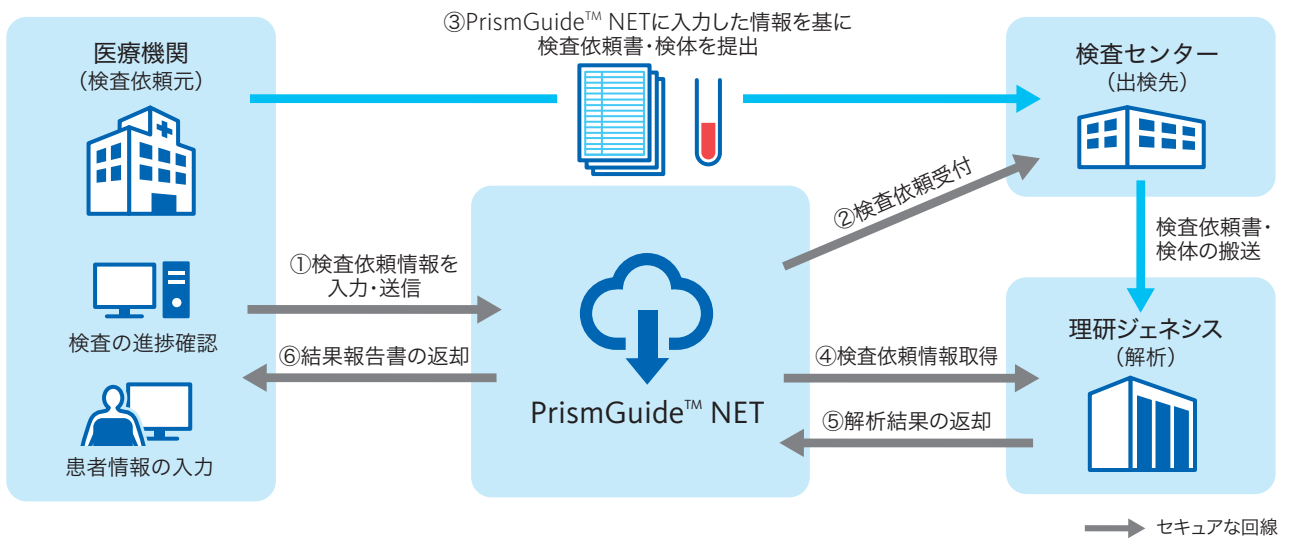
採血後4°Cで保管された全血検体は30日間、30°Cで保管された全血検体は7日間まで検査に使用できることを確認しています。

PrismGuide™ NET

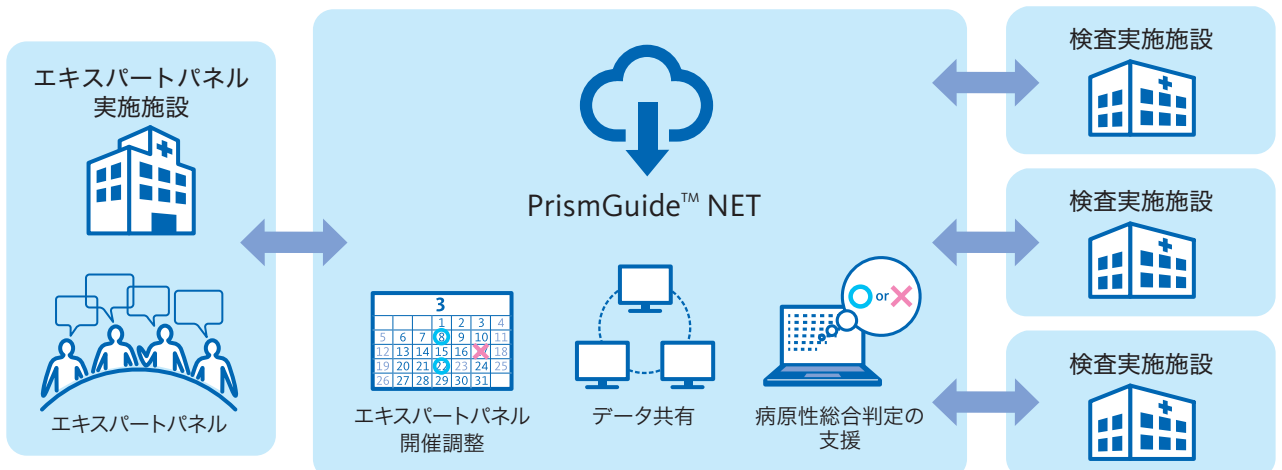
PrismGuide™ NETは検査依頼から結果返却、エキスパートパネル支援等を行うシステムです。

検査依頼情報の登録	エキスパートパネル支援
医療機関から検査センターへオーダー登録	<ul style="list-style-type: none"> ● エキスパートパネルの開催調整 <ul style="list-style-type: none"> ・ 開催日時、対象症例、参加施設の調整など ● データ共有 <ul style="list-style-type: none"> ・ エキスパートパネル参加施設間の共有 ・ エキスパートパネル結果登録 ● 病原性総合判定の支援 <ul style="list-style-type: none"> ・ 解析プログラムが出力した患者データに加え、患者情報やカテゴリー分類を考慮して、ACMGガイドラインに従った病原性判定の支援
患者情報の入力、保持、出力	
<ul style="list-style-type: none"> ● 臨床情報・表現型の入力 ● 家系図の入力 	
解析結果の返却	
<ul style="list-style-type: none"> ● PrismGuide™ IRDパネル システムの解析結果を返却 ● サマリーレポート原案 <ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子変異検出結果のサマリー ・ 患者データのみに基づくACMGカテゴリー分類を含む ● シークエンシングレポート <ul style="list-style-type: none"> ・ 遺伝子変異検出結果等の詳細情報 ・ 品質評価指標に関する付随・参考情報 	

【検査依頼情報の登録や患者情報入力、解析結果返却】



【エキスパートパネル支援機能】



解析結果レポート

No.	出力ファイル	内容
1	サマリーレポート	解析により得られた結果サマリー サマリーレポートには、解析プログラムで病的 (Pathogenic と Likely pathogenic) と判断されたバリエントが報告されます。
2	シーケンシングレポート	解析プログラムが検出した全てのバリエントと、解析により得られた付随・参考情報および品質評価指標に関する付随・参考情報

参照データベース

本システムは下記3種類のデータベースを参照します。

遺伝子変異データベース	①臨床的変異データベース
	②遺伝子定義データベース
	③SNPデータベース

①臨床的変異データベース

臨床的変異データベースはヒトの遺伝子変異について臨床的・生物学的意義が登録されているデータベースであり、検出された遺伝子変異が臨床的・生物学的に意味があり、サマリーレポートに出力すべきかを選択するために使用される。臨床的変異データベースとして、以下の4つのデータベースを使用する。

【使用データベース】

1. ClinVar
2. HGMD® Professional^{※1}
3. PublicP/PublicB^{※2}
4. カスタムバリエントリスト^{※2}

※1 HGMD® is a registered trademark of Cardiff University

※2 PublicP/PublicBおよびカスタムバリエントリスト(自社データベース)、その他は公開データベース

②遺伝子定義データベース

遺伝子定義データベースとはヒトゲノムリファレンス配列に存在する遺伝子の位置(転写領域・コーディング領域・転写方向)について定義しているデータベースとし、検出された遺伝子変異の遺伝子における機能部位(エクソン、イントロン、スプライシング)や変異種別(missense、nonsense、frame shift、in-frame、silent)、エクソン番号、HGVS表記によるアミノ酸変化・塩基変化を求めめるために使用する。遺伝子定義データベースとして、以下の3つのデータベースを使用している。

【使用データベース】

1. RefSeq
2. PFAM
3. Repeat Masker database

③SNPデータベース

SNPデータベースとはヒトの遺伝する変異の内容と集団における頻度(アレル頻度)について登録されているデータベースで、検出された遺伝子変異が集団内で一般的であるかを知るために使用する。遺伝性網膜ジストロフィに関連しない変異を特定するためのものであるため、最低でも1,000人以上の集団に対して体系的に調査された公開データベースを使用する必要がある。SNPデータベースとして、以下の4つのデータベースを使用している。

【使用データベース】

1. 1,000ゲノム
2. gnomAD
3. dbSNP
4. GEM-J WGA

サマリーレポート例

31 Jul 2023 v1

posi_con

PrismGuide IRD Panel Summary Report (Prioritized Variants)

① **QC Status: Pass**

② Order ID: posi_con

③ **Sample Information**

Clinical Sample ID	posi_con
--------------------	----------

④ **SNV/Indel Information**

#	Gene Name	Inheritance Pattern	Mutant Allele Frequency		Mutation Content		Consequence	
			Frequency (Read)	Zygoty	HGVSc	HGVSp	ACMG Classification	ACMG labels
1	ABCA4	Recessive	53.29% (721/1353)	Heterozygous	c.5318C>T	p.Ala1773Val	Pathogenic	PS1,PS3,PM2,PP2,PP3
2	ABCA4	Recessive	53.70% (610/1136)	Heterozygous	c.1760+2T>G	-	Pathogenic	PVS1,PS3,PM2,PP3,PP5
3	RPE65	Recessive, Dominant	53.73% (663/1234)	Heterozygous	c.1154C>T	p.Thr385Met	Pathogenic	PS1,PS3,PM2,PP2,PP3,BP4
4	RPGR	X-linked	98.68% (149/151)	Hemizygous	c.2838_2839del	p.Glu947GlyfsTer131	Pathogenic	PVS1,PS3,PM2
5	CEP290	Recessive	24.35% (158/649)	Heterozygous	c.2991+1655A>G	-	Likely pathogenic	PS3,PM2

⑤ **SNV/Indel Report:**

- ABCA4のAla1773Valはヘテロであり、潜性(劣性)の病的変異である。
- ABCA4のc.1760+2T>Gはヘテロであり、潜性(劣性)の病的変異である。
- RPE65のThr385Metはヘテロであり、潜性(劣性)または顕性(優性)の病的変異である。
- RPGRのGlu947GlyfsTer131はホモであり、X-linkedの病的変異である。
- CEP290のc.2991+1655A>Gはヘテロであり、潜性(劣性)の病的変異の可能性がある。

⑥ **SNV/Indel Notes:**

⑦ **Sample Notes:**

⑧ **Report Date:**

Confirmation Sign:

⑨ **Databases/Software Used**

Database/Software	Version Used
PFAM	2022-05-15
Ensembl VEP cache 1000 Genomes	phase3
Ensembl VEP cache SIFT	sift5.2.2
Benign Variants from PMID:31213501	v1.0.0
Ensembl VEP cache dbSNP	154
Ensembl VEP cache RefSeq	110
freebayes	1.3.2-38-g71a3e1c-dirty
Custom Variant List	v1.0.0
GEMJ	v1.0.0
multitqc	1.8
ClinVar	2023-01-09
Human gene annotation	2022-10-04
fastp	0.20.0
vep	108.2
dbscSNV	2015-04-13
Ensembl VEP cache assembly	GRCh38.p13
samtools	1.9
Ensembl VEP cache	2022-10-07
Repeat Masker database	2022-10-19
BLOSUM62	108
bwa	0.7.17-r1188
Pathogenic Variants from PMID:31213501	v1.0.0

⑩ **Appendix 1. Targeted Genes**

Gene Symbol	Transcript	Protein	HGNC ID
ABCA4	NM_000350.3	NP_000341.2	34
ADGRV1	NM_032119.4	NP_115495.3	17416
AIP1L1	NM_014336.5	NP_055151.3	359
BEST1	NM_004183.4	NP_004174.1	12703
C8orf37	NM_177965.4	NP_808880.1	27232
CA4	NM_000717.5	NP_000708.1	1375
CACNA1F	NM_005183.4	NP_005174.2	1393
CDH23	NM_022124.6	NP_071407.4	13733
CDHR1	NM_033100.4	NP_149091.1	14550
CEP290	NM_025114.4	NP_079390.3	29021
CERKL	NM_001030311.3	NP_001025482.1	21699
CFAP410	NM_004928.3	NP_004919.1	1260
		NP_000381.1	1940

サマリーレポートの概要

ファイル名: PrioritizedVariantsReport.pdf

内 容: 解析結果をまとめたレポートです。以下の項目が表示されます。

見出し	項目名	内 容
①QC判定結果	QC Status	QCの判定結果
②オーダー情報	Order ID	解析時のオーダーID
③サンプル情報	Clinical Sample ID	臨床サンプルID
④SNV/InDel情報	Gene Name	遺伝子名
	Inheritance Pattern	遺伝パターン
	Frequency (Read)	アレル頻度
	Zygoty	対象の遺伝子座における接合型です。同一の対立遺伝子の場合は"Homozygous"、異なる対立遺伝子の場合は"Heterozygous"と出力されます。
	HGVSc	CDS変化 ^{※1}
	HGVSp	アミノ酸変化 ^{※1}
	ACMG Classification	ACMG分類
ACMG labels	ACMG基準	
⑤SNV/InDel レポート	SNV/InDel Reports	④に記載された判定結果を変異毎にまとめた内容が、以下の形式で出力されます。(形式) [遺伝子名]の[アミノ酸変化]は[ホモ/ヘテロ]であり、[遺伝パターン]の[ACMG分類]です。
⑥SNV/InDel ノート	SNV/InDel Notes	バイオインフォマティクスが目視確認を行った結果として、GUI上で変異ごとにコメントを入力できます。入力したコメントがバリエーションごとに出力されます。
⑦サンプルノート	Sample Notes	GUI上のサンプル確認画面で、サンプルについてコメントすべき内容があった場合にコメントを入力できます。
⑧レポート日、署名記載欄	Report Date	レポート日を手書きで記載する欄です。
	Confirmation Sign	レポート作成者の署名を手書きで記載する欄です。

※1 CDS変化、アミノ酸変化、物理位置の記法はHuman Genome Variation Society (HGVS)に従う。

データベース/ソフトウェア

見出し	項目名	内 容
⑨データベース、ソフトウェア情報	Database/Software Used	使用しているデータベースの名前と、バージョンが記載されています。

遺伝子情報

見出し	項目名	内 容
⑩ 遺伝子情報	Target Genes	遺伝子名と、転写ID、タンパクID、HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) IDが記載されます。

シーケンシングレポート例 1/4

31 Jul 2023 v1	posi_con
PrismGuide IRD Panel Sequencing Report	
①	Order ID: posi_con
②	Sample Information
	Clinical Sample ID: posi_con
	Customer-provided Sample Sex: Male
③	Sequencing Analysis Information
	Panel: PrismGuide IRD Panel
	Reagent: PrismGuide IRD Panel reagent kit
	Analysis Execution Date: 31 Jul 2023 14:25:25
	On Target Reads (%): 73.86
	On And Near Target Reads (%): 82.55
	Off Target Reads (%): 17.45
	Mapped Reads (%): 99.37
	Duplicated Reads (%): 6.33
	Reads Mapping Quality 0 (%): 3.53
	Average Quality: 36.5
	Average Insert Size: 195.1
	Insert size std: 55.3
	Mean Target Coverage: 588.33
	Targets Not Covered: 4
	Evenness: 83.83
	Uniformity: 1.573
	Derivative Log Ratio Score for PrismGuide IRD Panel System: 0.133
	Pipeline-calculated Sample Sex: Male
	Low Coverage ($\geq 100\times$): 98.89
	Medium Coverage: 65.27
	High Coverage: 2.14
④	Data Analysis Information
	Analysis Protocol: IRD Protocol v1
	Pipeline Version: IRD Pipeline v2.4.3
	Enable CNV Calling: Yes
	Import SNV Results: Yes
	CNV Calling Mode: Yes
	Flanking Region (bp): 10
	Allele Balance Priors Off: Yes
	Minimum Alt Count: 5
	Minimum Base Quality: 20
	Minimum Total Read Count: 20
	Minimum Mapping Quality: 30
	Max Read Mismatch Fraction: 0.04
	Threshold for Targets Not Covered: 1
	Germline Minimum Alt Fraction: 0.2
	Germline Segmentation p-value Threshold: 0.01
	Genetic aberration selection criteria (SNV, InDel): Default SNV Filter
	Genetic aberration selection criteria (CNV): Default CNV Filter
	Analysis Program Version: 0.3.20

シーケンシングレポートの概要

ファイル名: SequencingReport.pdf

内 容: 解析プログラムが検出した全てのバリエーションと解析により得られた付随・参考情報および品質評価指標に関する付随・参考情報

見出し	項目名	内 容
①オーダー情報	Order ID	オーダー時に登録したオーダーID
②サンプル情報	Clinical Sample ID	オーダー時に登録した臨床サンプルID
	Customer-provided Sample Sex	オーダー時に登録した患者の性別
③解析データに関する情報	Panel	パネル名 (PrismGuide IRD Panel)
	Reagent	試薬名 (PrismGuide IRD Panel reagent kit)
	Analysis Execution Date	解析実行日 (日付 月 年 時間)
	On Target Reads (%)	パネルで定義されたすべての領域でオーバーラップしているフィルター処理されたリードの割合
	On And Near Target Reads (%)	パネルで定義されたすべての領域で両方向に250bp重複しているフィルター処理されたリードの割合
	Off Target Reads (%)	パネルで定義されたOn TargetまたはNear Target領域とオーバーラップしていないフィルター処理されたリードの割合
	Mapped Reads (%)	リファレンスゲノムにマッピングされたリード全体のパーセンテージ
	Duplicated Reads (%)	全体のリード数に対する重複リードの割合
	Reads Mapping Quality 0 (%)	マッピング品質が0に等しいリードの合計の割合
	Average Quality	全てのリードのPhredスコアの平均
	Average Insert Size	ペアおよびマップされた読み取りの平均絶対テンプレート長
	Insert size std	平均テンプレート長分布の標準偏差
	Mean Target Coverage	ターゲット領域内の塩基の合計をこれらの領域の全長で割ったもの
	Targets Not Covered	1を下回るカバレッジを持つパネルのターゲット領域の数
	Evenness	パネルのターゲット領域に正しく分散されているベースの割合
	Uniformity	ターゲットベースの80%が平均カバレッジを達成するために必要な倍数
	Derivative Log Ratio Score for PrismGuide IRD Panel System	Derivative Log Ratioのスコア スコアが高いサンプルで検出されたCNVは信頼性が低いことが示唆されます。
	Pipeline-calculated Sample Sex	性染色体の標的領域のカバレッジに基づいて予測された性別
	Low Coverage ($\geq 100x$)	カバレッジが100以上のベースの割合
	Medium Coverage	カバレッジが500以上のベースの割合
High Coverage	カバレッジが1,000以上のベースの割合	
④解析条件に関する情報	Analysis Protocol	解析プロトコル
	Pipeline Version	パイプラインバージョン
	Enable CNV Calling	CNV検出
	Import SNV Results	SNV結果のインポート
	Flanking Region (bp)	ターゲット領域に隣接した、変異検出可能な領域 (bp)
	Allele Balance Priors Off	アレルバランスによるフィルター
	Minimum Alt Count	最小検出変異リード
	Minimum Base Quality	最小検出塩基クオリティ
	Minimum Total Read Count	最小検出合計リード数
	Minimum Mapping Quality	最小検出マッピングクオリティ
	Max Read Mismatch Fraction	最大リードミスマッチ
	Threshold for Targets Not	Target Not Covered の閾値
	Germline Minimum Alt Fraction	変異をカバーする領域の最小割合
	Germline Segmentation p-value Threshold	p値の閾値
	Genetic aberration selection criteria (SNV, InDel)	遺伝子変異の選択基準
	Genetic aberration selection criteria (CNV)	CNVの選択基準
	Analysis Program Version	解析プログラムバージョン

シーケンシングレポート例 2/4

⑤ SNV/Indel Information

1	Variant (HGVS)	NM_000350.3:c.5318C>T
	Gene Symbol	ABCA4
	Variant Type	SNV
	Location	1:94014685-94014685
	Exon Numbers	38/50
	Ref	G
	Alt	A
	Frequency (Read)	0.53289 (721/1353)
	Zygosity	Heterozygous
	Amino Acid Change (HGVS)	NP_000341.2:p.Ala1773Val
	User Classification	Pathogenic
	ACMG Classification	Pathogenic
	ACMG Labels	PS1(ClinVar,HGMD,Custom Variant List),PS3(HGMD,ClinVar),PM2(gnomAD),PP2(ClinVar),PP3(SIFT)
	Inheritance Pattern	Recessive
	Variant Function	missense_variant
	Allele frequency in gnomAD - whole population	7.557E-5
	Allele frequency in gnomAD - East Asian	5.437E-5

⑥ CNV Information (as Reference)

1	Variant (ISCN)	seq[GRCh38] 1q31.3(195134497_197328497)x1
	Variant Type	Deletion
	Location	1:195134497-197328497
	Copy Number	1
	Log Ratio	-0.617
	Genes	CRB1 (exons 1-2/12)
	User Classification	Unclassified
2	Variant (ISCN)	seq[GRCh38] 2q13q13(111996876_111997026)x1
	Variant Type	Deletion
	Location	2:111996876-111997026
	Copy Number	1
	Log Ratio	-1.055
	Genes	MERTK (intronic)
	User Classification	Unclassified
3	Variant (ISCN)	seq[GRCh38] 4p15.32p15.32(15979817_15979967)x1
	Variant Type	Deletion
	Location	4:15979817-15979967
	Copy Number	1
	Log Ratio	-1.425
	Genes	PROM1 (exon 25/28)
	User Classification	Unclassified
4	Variant (ISCN)	seq[GRCh38] 5q14.3q14.3(90724940_90725233)x1
	Variant Type	Deletion
	Location	5:90724940-90725233

見出し	項目名	内 容	
⑤ 遺伝子変異 (SNV/InDel) に関する情報 検出された遺伝子変異ごとに、以下の情報が記載されます。	Variant (HGVS)	HGVS表記	
	Gene Symbol	遺伝子名	
	Variant Type	変異のタイプ	
	Location	変異の位置	
	Ref	リファレンス配列	
	Alt	検出された変異の配列	
	Frequency (Read)	頻度 (リード)	
	Zygoty	(対象の遺伝子座における) 接合型 同一の対立遺伝子の場合はHomozygous、異なる対立遺伝子の場合はHeterozygousが表示されます。	
	Amino Acid Change (HGVS)	アミノ酸変化	
	User Classification	ユーザー判定	
			GUI上で変異の分類を変更したい場合は、変異毎に手動で分類を変更できます。手動で変更した判定が出力されます。変更しない場合は、ACMG判定と同じ判定が表示されます。
	ACMG Classification	ACMG判定	
	ACMG Labels	ACMG基準	
	Inheritance Pattern	遺伝パターン	
	Variant Function	バリエーション機能	
	Allele frequency in gnomAD-whole population	gnomADのアレル頻度 (全体)	
	Allele frequency in gnomAD-East Asian	gnomADのアレル頻度 (東アジア)	
	1000 Genomes Minor Allele	1,000ゲノムのマイナーアレル	
	1000 Genomes Minor Allele Frequency	1,000ゲノムマイナーアレル頻度	
	SIFT Prediction	SIFTによる評価	
	dbSNP ID	dbSNP ID	
	ClinVar ID	ClinVar ID	
	ClinVar Pathogenicity	ClinVarの分類	
HGMD	HGMDのID		
GEM-J WGA Allele Frequency	GEM Japan Whole Genome Aggregation (GEM-J WGA) パネルの日本人コホートのアレル頻度		
Report Inclusion	サマリーレポート報告対象か否かの情報		
⑥ コピー数異常に関する情報 (参考)	Variant (ISCN)	ISCN表記法による変異詳細	
	Variant Type	変異形式	
	Location	バリエーション位置	
	Copy Number	コピー数	
	Log Ratio	ログ比	
	Genes	遺伝子名	
	User Classification	ユーザによる分類	

シーケンシングレポート例 3/4

⑦ Appendix 1: Disease Category Referred From RetNet

Gene	Associated Diseases
ABCA4	Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive; Macular degeneration, autosomal recessive; Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
ADGRV1	Usher syndrome, autosomal recessive
AIPL1	Cone or cone-rod dystrophy, autosomal dominant; Leber congenital amaurosis, autosomal recessive
BEST1	Macular degeneration, autosomal dominant; Retinitis pigmentosa, autosomal dominant; Retinitis pigmentosa, autosomal recessive; Other retinopathy, autosomal dominant; Other retinopathy, autosomal recessive
C8orf37	Bardet-Biedl syndrome, autosomal recessive; Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive; Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
CA4	Retinitis pigmentosa, autosomal dominant
CACNA1F	Cone or cone-rod dystrophy, X-linked; Congenital stationary night blindness, X-linked; Other retinopathy, X-linked
CDH23	Deafness alone or syndromic, autosomal recessive; Usher syndrome, autosomal recessive
CDHR1	Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive
CEP290	Bardet-Biedl syndrome, autosomal recessive; Leber congenital amaurosis, autosomal recessive; Syndromic/systemic diseases with retinopathy, autosomal recessive
CERKL	Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive; Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
CFAP410	Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive
CHM	Other retinopathy, X-linked
CLRN1	Retinitis pigmentosa, autosomal recessive; Usher syndrome, autosomal recessive
CNGA1	Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
CNGA3	Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive; Other retinopathy, autosomal recessive
CNGB1	Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
CNGB3	Cone or cone-rod dystrophy, autosomal recessive; Other retinopathy, autosomal recessive
CRB1	Leber congenital amaurosis, autosomal recessive; Retinitis pigmentosa, autosomal recessive; Other retinopathy, autosomal dominant
CRX	Cone or cone-rod dystrophy, autosomal dominant; Leber congenital amaurosis, autosomal dominant; Leber congenital amaurosis, autosomal recessive; Retinitis pigmentosa, autosomal dominant
CYP4V2	Retinitis pigmentosa, autosomal recessive; Other retinopathy, autosomal recessive
DHDDS	Retinitis pigmentosa, autosomal recessive
DRAM2	Macular degeneration, autosomal recessive

⑧ Appendix 2: Criteria for classifying pathogenic and benign variants based on ACMG guidelines

Very strong evidence of pathogenicity	
PVS1	Null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon) in a gene where loss of function (LOF) is a known mechanism of disease. SOURCE=VEP Impact
Strong evidence of pathogenicity	
PS1	Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change. SOURCE=ClinVar, HGMD, Custom Variant List
PS3	Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product. SOURCE= ClinVar, HGMD
Moderate evidence of pathogenicity	
PM1	Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain without benign variation. SOURCE=ClinVar, PFAM
PM2	Absent from controls if dominant or with a frequency $\leq 0.5\%$ if recessive in gnomAD database. SOURCE=gnomAD Allele Frequency
PM4	Protein length changes due to in-frame deletions/insertions in a non-repeat region or stop-loss variants. SOURCE=VEP consequence, Repeat Masker
PM5	Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic and has been seen before. SOURCE= ClinVar, HGMD, Custom Variant List
Supporting evidence of pathogenicity	
PP2	Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and where missense variants are a common mechanism of disease. SOURCE=ClinVar
PP3	Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.). SOURCE= SIFT, BLOSUM62, dbcsSNV, GERP
PP5	Reputable source recently reports variant as pathogenic but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation. SOURCE=ClinVar, HGMD, Pathogenic Variants from PMID:31213501
Stand-Alone evidence of benign impact	
BA1	Allele frequency is above 5% in gnomAD database. SOURCE=gnomAD Allele Frequency
Strong evidence of benign impact	
BS1	Allele frequency is greater than 0.5% for disorder. SOURCE=gnomAD Allele Frequency
BS3	Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing. SOURCE=ClinVar
Supporting evidence of benign impact	
BP1	Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease. SOURCE=ClinVar
BP3	In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function. SOURCE=VEP consequence, Repeat Masker, PFAM
BP4	Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.). SOURCE=SIFT, BLOSUM62, dbcsSNV, GERP
BP6	Reputable source recently reports variant as benign but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation. SOURCE=ClinVar, Custom Variant List, Benign Variants from PMID:31213501

⑨ Appendix 3: Rules for combining criteria to classify variants based on ACMG guidelines

- Pathogenic
 1. 1 Very Strong (PVS1) AND
 1. ≥ 1 Strong (PS1,PS3) OR
 2. ≥ 2 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) OR
 3. 1 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) and 1 Supporting (PP2,PP3,PP5) OR
 4. ≥ 2 Supporting (PP2,PP3,PP5)
 2. ≥ 2 Strong (PS1,PS3) OR
 3. 1 Strong (PS1,PS3) AND
 1. ≥ 3 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) OR
 2. 2 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) AND ≥ 2 Supporting (PP2,PP3,PP5) OR
 3. 1 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) AND ≥ 3 Supporting (PP2,PP3,PP5)
- Likely Pathogenic
 1. 1 Very Strong (PVS1) AND 1 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) OR
 2. 1 Strong (PS1,PS3) AND 1-2 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) OR
 3. 1 Strong (PS1,PS3) AND ≥ 2 (PP2,PP3,PP5) OR
 4. ≥ 3 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) OR
 5. 2 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) AND ≥ 2 Supporting (PP2,PP3,PP5) OR
 6. 1 Moderate (PM1,PM2,PM4,PM5) and ≥ 3 Supporting (PP2,PP3,PP5)
- Benign
 1. 1 Stand-Alone (BA1) OR
 2. ≥ 2 Strong (BS2,BS3)
- Likely Benign
 1. 1 Strong (BS1, BS3) AND 1 Supporting (BP1,BP3,BP4,BP6,BP7) OR
 2. ≥ 2 Supporting (BP1,BP3,BP4,BP6,BP7)
- Uncertain Significance
 1. Variants that do not meet the above criteria
 2. Conflicting classification labels (eg Likely Pathogenic, Likely Benign) which are listed

見出し	項目名	内 容
⑦各遺伝子と関連する眼関連疾患の情報	Gene/ Associated Diseases	本プログラムで対象とする遺伝子と関連する眼関連の疾患の一覧です。遺伝形式(劣性、優性)の情報も記載されます。
⑧ACMGガイドラインに基づく変異基準の分類基準の情報	Criteria	ACMGガイドラインの判定基準と、プログラム内で使用しているデータベースが記載されます。
⑨ACMGガイドラインに基づく分類を組み合わせた病原性判定基準の情報	rules	判定基準のルールが示されます。ルールの詳細は技術解説書内のシーケンシングレポートへの出力基準の欄に記載しています。

シーケンシングレポート例 4/4

⑩ Appendix 4: Databases/Software Used

Database/Software	Version Used
PFAM	2022-05-15
Ensembl VEP cache 1000 Genomes	phase3
Ensembl VEP cache SIFT	sift5.2.2
Benign Variants from PMID:31213501	v1.0.0
Ensembl VEP cache dbSNP	154
Ensembl VEP cache RefSeq	110
freebayes	1.3.2-38-g71a3e1c-dirty
Custom Variant List	v1.0.0
GEMJ	v1.0.0
multitqc	1.8
ClinVar	2023-01-09
Human gene annotation	2022-10-04
fastp	0.20.0
vep	108.2
dbscSNV	2015-04-13
Ensembl VEP cache assembly	GRCh38.p13
samtools	1.9
Ensembl VEP cache	2022-10-07
Repeat Masker database	2022-10-19
BLOSUM62	108
bwa	0.7.17-r1188
Pathogenic Variants from PMID:31213501	v1.0.0
ogkit	0.8.6
CNV references	v2.0.0
HGMD	v2022.3
sambamba	0.7.1
bedtools	2.29.2
Ensembl VEP cache gnomADe	r2.1.1
GERP	v1.0.0
Human genome reference	2014-01-11
vt	0.5
Ensembl VEP cache GENCODE	GENCODE_42

⑪ Appendix 5: Targeted Genes

Gene Symbol	Transcript	Protein	HGNC ID
ABCA4	NM_000350.3	NP_000341.2	34
ADGRV1	NM_032119.4	NP_115495.3	17416
AIP1L1	NM_014336.5	NP_055151.3	359
BEST1	NM_004183.4	NP_004174.1	12703
C8orf37	NM_177965.4	NP_808880.1	27232
CA4	NM_000717.5	NP_000708.1	1375
CACNA1F	NM_005183.4	NP_005174.2	1393
CDH23	NM_022124.6	NP_071407.4	13733
CDHR1	NM_033100.4	NP_149091.1	14550
CEP290	NM_025114.4	NP_079390.3	29021
CERKL	NM_001030311.3	NP_001025482.1	21699
CFAP410	NM_004928.3	NP_004919.1	1260
CHM	NM_000390.4	NP_000381.1	1940
CLRN1	NM_174878.3	NP_777367.1	12605
CNGA1	NM_000087.5	NP_000078.3	2148
CNGA3	NM_001298.3	NP_001289.1	2150
CNGB1	NM_001297.5	NP_001288.3	2151
CNGB3	NM_019098.5	NP_061971.3	2153
CRB1	NM_201253.3	NP_957705.1	2343

⑫ Appendix 6: QC Metrics

Name	Definition
Mapped Reads (%)	The percentage of total reads that are aligned to the reference genome
Duplicated Reads (%)	The percentage of total reads that are marked duplicated
Mean Target Coverage	The mean target coverage is defined as the sum of base counts (coverage) within the targeted regions of the panel divided by the total length of these regions. All base counts are calculated from filtered, mapped and de-duplicated reads
Low Coverage (>=100x)	The percentage of bases that have a coverage above or equal to 100
Medium Coverage	The percentage of bases that have a coverage above or equal to 500
High Coverage	The percentage of bases that have a coverage above or equal to 1000
Evenness	The evenness score represents the fraction of whole-sequencing throughput that is correctly distributed over the targeted regions of the panel
Average Quality	The average base Phred quality score of all reads
Average Insert Size	The average absolute template length for paired and mapped reads

QC情報の記載:詳しくは解析に関する情報※1を参照

⑬ Appendix 7: QC Thresholds

Name	Pass
Mapped Reads (%)*	>=95.0
Mean Target Coverage	>=240.0
Low Coverage (>=100x)	>=95.0
Evenness	>=75.0
Targets Not Covered*	<=30.0
On Target Reads (%)	>=60.0

見出し	項目名	内容
⑩使用しているデータベースとソフトウェアの情報	Database, Software/ Version Used	使用しているデータベース・ソフトウェアの名称とバージョン情報が記載されます。
⑪対象遺伝子の情報	Target Genes	対象遺伝子とその転写ID、タンパクID、HGNC IDが記載されます。
⑫QC 項目の定義	Name/Definition	QC項目とその定義が記載されます。*
⑬QC 閾値の情報	Name/Pass	QC項目名と合格基準の値が記載されます。

※QC項目の定義情報一覧

項目名	定義
Mapped Reads (%)	リファレンスゲノムにマッピングされたリード全体のパーセンテージ
Duplicated Reads (%)	全体のリード数に対する重複リードの割合
Mean Target Coverage	ターゲット領域内の塩基の合計をこれらの領域の全長で割ったもの
Low Coverage ($\geq 100x$)	カバレッジが100以上のベースの割合
Medium Coverage	カバレッジが500以上のベースの割合
High Coverage	カバレッジが1,000以上のベースの割合
Evenness	パネルのターゲット領域に正しく分散されているベースの割合
Average Quality	全てのリードのPhredスコアの平均
Average Insert Size	ペアおよびマップされた読み取りの平均絶対テンプレート長
Insert Size std	平均テンプレート長分布の標準偏差
Reads Mapping Quality 0 (%)	マッピング品質が0に等しいリードの合計の割合
Targets Not Covered	1を下回るカバレッジを持つパネルのターゲット領域の数
On Target Reads (%)	パネルで定義されたすべての領域でオーバーラップしているフィルター処理されたリードの割合
On And Near Target Reads (%)	パネルで定義されたすべての領域で両方向に250bp重複しているフィルター処理されたリードの割合
Off Target Reads (%)	パネルで定義されたOn TargetまたはNear Target領域とオーバーラップしていないフィルター処理されたリードの割合
Uniformity	ターゲットベースの80%が平均カバレッジを達成するために必要な倍数
Pipeline-Calculated Sample Sex	性染色体の標的領域のカバレッジに基づいて予測された性別
Customer-Provided Sex	顧客が提供した性別
Derivative Log Ratio Score for IRD System	Derivative Log Ratioのスコア スコアが高いサンプルで検出されたCNVは信頼性が低いことを示唆されます。

機械器具 17 血液検査用器具 その他の医用検体検査装置 高度管理医療機器
生殖細胞系列遺伝子変異解析セット(疾患原因遺伝子検査用) (71115003)

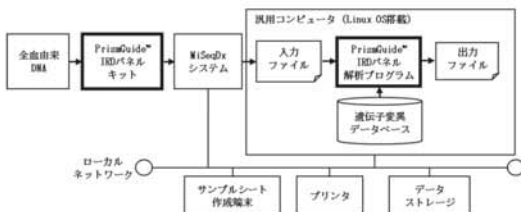
PrismGuide™ IRD パネル システム

【警告】

本品による検査を実施する際には、関連学会が作成した運用指針等に提示される施設要件を満たすことを確認するとともに、ガイドライン等の最新の情報を参考にすること。

【形状・構造及び原理等】

本品は、「PrismGuide IRD パネル 解析プログラム」及び「PrismGuide IRD パネル キット」より構成されるコンビネーション医療機器である。



<PrismGuide IRD パネル システムの構成品>

販売名
PrismGuide IRD パネル 解析プログラム
PrismGuide IRD パネル キット

1. 形状・構造等

1) PrismGuide IRD パネル 解析プログラム

本解析プログラムは独立した汎用コンピュータにインストールし、遺伝子変異解析のために使用する。遺伝子変異データベースは汎用コンピュータにインストールされており、本解析プログラムが参照する。

本解析プログラムの入力データ等は、オンライン(※)又はオフライン(HDD等の電子媒体を介してファイルの受け渡しを行う)でのデータ受け渡しが可能である。

※ローカルネットワークを介して、【使用方法等】に記載の次世代シーケンサー(MiSeqDx システム)やサンプルシート作成端末からのファイルの受け渡しを行う。

2) PrismGuide IRD パネル キット

本キットは次の試薬より構成され、次世代シーケンサー解析用のライブラリー調製のために使用する。

IRD NGS Library Preparation Kit
Nuclease-free Water
Step 1: ER Buffer
Step 1: ER Enzyme Mix
Step 2: Ligase Buffer
Step 2: Adaptor A
Step 2: Adaptor B
Step 2: Ligase
Step 3: PCR Buffer
Step 3: Primer
Step 3: PCR Polymerase
IRD NGS Hybridisation & Wash Kit
Nuclease-free Water
Cot Human DNA
Blockers
Hybridisation Buffer
Formamide
Wash Buffer
Bead Priming Buffer
Step 4: PCR Buffer
Step 4: Primers
Step 4: PCR Polymerase
IRD NGS Panel
IRD NGS Panel
IRD NGS Index Plate
Index PCR Primers Set 1
Index PCR Primers Set 2
IRD Pre-Capture NGS Bead Kit
Mag-Bind™ TotalPure NGS
IRD Post-Capture NGS Bead Kit
Dynabeads™ M-270 Streptavidin
Mag-Bind™ TotalPure NGS

2. 原理

本品は、臨床所見に基づき遺伝性網膜ジストロフィ(Inherited Retinal Dystrophies, 以下 IRD)と診断又は原因遺伝子情報による診断が必要と判断された患者由来の全血より抽出及び超音波により断片化された DNA を検体として用いる。「PrismGuide IRD パネル キット」により、断片化された DNA の末端修復及び dA 付加を行い、イルミナ株式会社の次世代シーケンサー(MiSeqDx システム)に対応したアダプター・インデックスを付加したライブラリーを構築後、IRD の原因となるポストキャプチャーDNAライブラリー(NGS 解析用ライブラリー)をハイブリッドキャプチャー法にて調製するため、IRD NGS Panel 試薬等を用いて回収・濃縮する。得られたポストキャプチャーDNAライブラリーを次世代シーケンサーに付し、塩基配列が決定される。その後、「PrismGuide IRD パネル 解析プログラム」により、塩基置換(SNV; Single Nucleotide Variants, MNV; Multiple Nucleotide Variants)、挿入欠失変異(InDel; Insertion and Deletion)の一括検出後、外部データベースと照合して得られたアノテーション情報(病的バリエーション情報を含む)が付与される。

本品の対象遺伝子は下記のとおりである。

<対象遺伝子:82 遺伝子>

No.	対象遺伝子	No.	対象遺伝子
1	ABCA4	42	NR2E3
2	ADGRV1	43	NRL
3	AIPL1	44	NYX
4	BEST1	45	PCARE
5	C8orf37	46	PDE6A
6	CA4	47	PDE6B
7	CACNA1F	48	PDE6C
8	CDH23	49	PDE6G
9	CDHR1	50	POC1B
10	CEP290	51	PRCD
11	CERKL	52	PROM1
12	CFAP410	53	PRPF3
13	CHM	54	PRPF31
14	CLRN1	55	PRPF6
15	CNGA1	56	PRPF8
16	CNGA3	57	PRPH2
17	CNGB1	58	RBP3
18	CNGB3	59	RDH12
19	CRB1	60	RDH5
20	CRX	61	RGR
21	CYP4V2	62	RGS9BP
22	DHDDS	63	RHO
23	DRAM2	64	RLBP1
24	EYS	65	ROM1
25	FAM161A	66	RP1
26	FSCN2	67	RP1L1
27	GNAT2	68	RP2
28	GRK1	69	RP9
29	GUCA1A	70	RPE65
30	GUCY2D	71	RPGR
31	IDH3B	72	RPGRIP1
32	IMPDH1	73	RS1
33	IMPG2	74	SAG
34	IQCB1	75	SEMA4A
35	KCNV2	76	SNRNP200
36	KLHL7	77	SPATA7
37	LRAT	78	TOPORS
38	MAK	79	TTC8
39	MERTK	80	TULP1
40	MYO7A	81	USH2A
41	NMNAT1	82	ZNF513

<遺伝子変異の検出方法>

対象となる遺伝子変異は、以下の条件を満たす。

・ 遺伝子変異 (SNV, InDel)

・ 遺伝子変異を示す位置の Depth が 20 以上かつ、遺伝子変異を示す配列のアレル頻度が 20 % 以上であること。

<遺伝子変異の病原性判定方法>

検出されたバリエーションは、本解析プログラムが参照するデータベースと照合され、ACMG ガイドライン・基準に基づく病原性評価が行われる。本品は、病原性に関する 10 の基準 (PVS1, PS1, PS3, PM1, PM2, PM4, PM5, PP2, PP3, PP5)、及び良性に関する 8 の基準 (BA1, BS1, BS3, BP1, BP3, BP4, BP6, BP7) に関する該当性の評価がなされた後、5 つの分類 (Pathogenic, Likely Pathogenic, Benign, Likely Benign, Uncertain Significance) に基づき病原性を判定する。

なお、アノテーション (病原性の判定を含む) 付与の際に参照する遺伝子変異データベースは下表のとおりである。詳細については PrismGuide IRD パネル 解析プログラムの取扱説明書を参照すること。

	参照データベース
臨床的変異データベース	ClinVar, HGMD, PublicP/PublicB (※)、カスタムバリエーションリスト
遺伝子定義データベース	RefSeq, Pfam, RepeatMasker
SNP データベース	1000 ゲノム, gnomAD, dbSNP, GEM-J WGA

※日本人コホートにおける網膜色素変性症を引き起こす遺伝子変異について、病的又は良性変異の情報が含まれる独自のデータベース

【使用目的又は効果】

本品は、遺伝性網膜ジストロフィと診断された患者又は疑われる患者の疾患原因遺伝子の情報を取得する。

【使用目的又は効果に関連する使用上の注意】

本品による疾患原因遺伝子の情報に基づく診断や治療方針、ロービジョンケア等の決定においては、遺伝性網膜ジストロフィに精通した医師が、最新の医学知見に基づき、自覚症状、臨床症状及び他の関連する検査結果とあわせて、総合的に判断すること。

【使用方法等】

1. 組み合わせて使用する医療機器

MiSeqDx システム

一般的名称: 遺伝子解析装置

医療機器製造販売届出番号: 13B1X10303000002

製造販売元: イルミナ株式会社

2. 使用方法の概略

1) PrismGuide IRD パネル 解析プログラム

<設置方法>

本解析プログラムは、下記の仕様を満たす汎用コンピュータに製造販売元が指定した方法でインストールして使用する。

〔汎用コンピュータの仕様 (Linux OS 搭載)〕

構成	仕様
CPU	i9-10980XE@3.00 GHz、2CPU 相当以上
メモリ	64 GB 以上
HDD	1 TB 以上
Linux OS	Ubuntu 20.04 以降
ネットワーク	次世代シークエンサーと汎用コンピュータ間でファイル転送可能なこと
ディスプレイ	SXGA 以上の解像度をもつこと

なお、本解析プログラムが動作する汎用コンピュータは常時起動した状態とし、シャットダウン・電源投入は都度行わないこと。アカウント管理は汎用コンピュータの OS が提供する機能を利用し、ユーザーは、汎用コンピュータに自身の OS アカウント及びパスワードでログイン後に本解析プログラムを起動する。

2) PrismGuide IRD パネル キット

<試薬の調製方法>

IRD NGS Library Preparation Kit:

Step 1: ER Enzyme Mix, Step 2: Ligase 及び Step 3: PCR

Polymerase:

各試薬を氷上で融解後、タッピングで撹拌し、氷上で保管する。

上記以外の各試薬:

各試薬を室温で融解後、ボルテックスで撹拌し、氷上で保管する。

IRD NGS Hybridisation & Wash Kit

Step 4: PCR Polymerase:

試薬を氷上で融解後、タッピングで撹拌し、氷上で保管する。

Wash Buffer 及び Bead Priming Buffer:

各試薬を室温で融解後、ボルテックスで撹拌する。

上記以外の各試薬:

各試薬を室温で融解後、ボルテックスで撹拌し、氷上で保管する。

IRD NGS Panel/ IRD NGS Index Plate:

各試薬を室温で融解後、ボルテックスで撹拌し、氷上で保管する。

IRD Pre-Capture NGS Bead Kit:

試薬を室温に戻し、ボルテックスで撹拌する。

IRD Post-Capture NGS Bead Kit:

各試薬を室温に戻し、ボルテックスで撹拌する。

<1 サンプル分の用量>

① 末端修復及び dA 付加

断片化された DNA	25 µL
マスターミックス	
Nuclease-free Water	9 µL
Step 1: ER Buffer	10 µL
Step 1: ER Enzyme Mix	6 µL

② ライゲーション

末端修復及び dA 付加した DNA マスターミックス	50 µL
Step 2: Ligase Buffer	3 µL
Step 2: Adaptor A	5 µL
Step 2: Adaptor B	5 µL
Step 2: Ligase	2 µL

③ ライブラリー増幅

アダプター付加した DNA	15 µL
Index PCR Primers Set 1 又は Set 2 の 各 Index Primer	5 µL
マスターミックス	
Nuclease-free Water	22 µL
Step 3: PCR Buffer	5 µL
Step 3: Primer	1 µL
Step 3: PCR Polymerase	2 µL

④ ハイブリダイゼーション 1

Cot Human DNA	5 µL
Blockers	7 µL

⑤ ハイブリダイゼーション 2

濃縮したプール DNA	2.5 µL
Hybridisation Buffer	7.5 µL
Formamide	3 µL
IRD NGS Panel	2 µL

⑥ ポストキャプチャーDNAライブラリー増幅

ポストキャプチャーDNAライブラリー マスターミックス	14 µL
Nuclease-free Water	26.5 µL
Step 4: PCR Buffer	5 µL
Step 4: Primers	2.5 µL
Step 4: PCR Polymerase	2 µL

<別途必要な器具・器材・試料等>

器具・器材

- マイクロピペット
- 遠沈管 (15 mL, 50 mL)
- マイクロチューブ (1.5 mL)
- 0.2 mL 8-strip PCR Tubes
- 1.5 mL 用 Magnetic rack, 96 well magnetic plate
- フィルター付きピペットチップ (スクレアーゼフリー)
- 96 ウェルプレート
- 全自動電気泳動システム (TapeStation 2200 又は相当品)
- DNA Shearing システム (Covaris M220 又は相当品)
- 遠心濃縮システム
- ヒートブロック
- 分光光度計 (NanoDrop)
- フルオロメーター (Qubit)
- サーマルサイクラー
- リアルタイム PCR 装置
- プレートミキサー

試薬

- QIAamp DNA Blood Mini Kit 又は相当品
- D1000 ScreenTape 又は相当品
- D1000 Reagents 又は相当品
- D1000 Ladder 又は相当品
- High Sensitivity D1000 ScreenTape 又は相当品
- High Sensitivity D1000 Reagents 又は相当品
- High Sensitivity D1000 Ladder 又は相当品
- Qubit dsDNA BR Assay Kit 又は相当品
- Qubit dsDNA HS Assay Kit 又は相当品
- 無水エタノール (100%)
- 5.0 M 水酸化ナトリウム
- Molecular Biology Grade water
- Nuclease-free Water
- TE Buffer
- PhiX Control
- Tween 20
- MiSeq Reagent Kit

<操作方法の概略>

① DNA 抽出及び断片化

検体 (全血) から、市販品 (QIAamp DNA Blood Mini Kit 等) を用いて DNA を抽出し、Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いて DNA 濃度を確認する。その後、1000 ng 以上の DNA 量を含む DNA 溶液を用いて、超音波処理により DNA を断片化し、IRD Pre-Capture NGS Bead Kit を用いて精製する。精製後、TapeStation を用いてフラグメントサイズを確認する。

② 末端修飾と dA 付加

IRD NGS Library Preparation Kit の構成試薬を用いて「1 サンプル分の用量」の①末端修復及び dA 付加に記載のマスターミックスを調製し、前工程で作製した断片化された DNA と混合し、下記プログラム 1 の条件で反応させる。

プログラム 1

ステップ	温度	時間
1	20 °C	30 分
2	72 °C	30 分
3	4 °C	Hold

③ ライゲーション

プログラム 1 の反応後、IRD NGS Library Preparation Kit の構成試薬を用いて「1 サンプル分の用量」の②ライゲーションに記載のマスターミックスを調製し、前工程で作製した末端修復及び dA 付加した DNA と混合し、20 °C で 15 分インキュベートする。その後、IRD Pre-Capture NGS Bead Kit を用いて精製し、ライブラリーを作製する。精製後、Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いて DNA 濃度を確認し、TapeStation を用いてフラグメントサイズを確認する。

④ ライブラリー増幅

IRD NGS Library Preparation Kit の構成試薬を用いて「1 サンプル分の用量」の③ライブラリー増幅に記載のマスターミックスを調製し、IRD NGS Index Plate の構成試薬 (Index PCR Primers Set 1 又は Set 2 の各 Index Primer) と前工程でアダプター付加した DNA を加え、下記プログラム 2 の条件で PCR により増幅する。その後、IRD Post-Capture NGS Bead Kit を用いて DNA 濃度を確認し、TapeStation を用いてフラグメントサイズを確認する。

プログラム 2

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	98 °C	3 分	1
2	98 °C	30 秒	6
	65 °C	30 秒	
	72 °C	60 秒	
3	72 °C	10 分	1
4	4 °C	Hold	1

⑤ ハイブリダイゼーション

前工程で作製した増幅精製後のサンプルをプールし、IRD NGS Hybridisation & Wash Kit の構成試薬と混合し (詳細は「1 サンプル分の用量」の④ハイブリダイゼーション 1 参照)、高温で乾燥させる。Nuclease-free Water を加えて溶解させ濃縮したプール DNA を調製し、IRD NGS Hybridisation & Wash Kit の構成試薬と IRD NGS Panel を加え (「1 サンプル分の用量」の⑤ハイブリダイゼーション 2 参照)、下記プログラム 3 の条件で反応させる。

プログラム 3

ステップ	温度	時間
1	95 °C	5 分
2	65 °C	Hold

⑥ DNA ライブラリーキャプチャー

前工程で作製したハイブリダイゼーション後のサンプルと洗浄した IRD Post-Capture NGS Bead Kit の Dynabeads™ M-270 Streptavidin を混合し、65 °C で 45 分反応させる。その後、IRD NGS Hybridisation & Wash Kit の構成試薬である Wash Buffer を用いて洗浄し、ポストキャプチャーDNAライブラリーを作製する。

⑦ ポストキャプチャーDNAライブラリーの増幅

IRD NGS Hybridisation & Wash Kit の構成試薬を用いて「1 サンプル分の用量」の⑥ポストキャプチャーDNAライブラリー増幅に記載のマスターミックスを調製し、前工程で作製したポストキャプチャーDNAライブラリーと混合し、下記プログラム 4 の条件で PCR により増幅する。その後、IRD Post-Capture NGS Bead Kit を用いて精製する。

プログラム 4

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	98 °C	3 分	1
2	98 °C	30 秒	12
	65 °C	30 秒	
	72 °C	60 秒	
3	72 °C	10 分	1
4	4 °C	Hold	1

- ⑧ 濃度確認
前工程で作製した増幅精製後のポストキャプチャーDNA ライブラリーを、Qubit dsDNA HS Assay Kit を用いて DNA 濃度が 0.9 ng/ μ L 以上であることを確認し、TapeStation (High Sensitivity D1000) を用いてフラグメントサイズを確認する。
- ⑨ シークエンシング
前工程で濃度を確認したポストキャプチャーDNA ライブラリー 12 pM と 1% の PhiX Control を混合し、MiSeqDx システムを用いてシークエンシングを行い、塩基配列を決定する。なお、1 回のシークエンシングには 12 サンプルから調製されたポストキャプチャーDNA ライブラリーを用いる。
- ⑩ 解析
本解析プログラムを用いて、次世代シークエンサーから出力された塩基配列情報より解析する。解析結果として遺伝子変異 (SNV、MNV、InDel)、アノテーション情報を含むレポートを出力する。
- 汎用コンピュータにログインする。
 - 本解析プログラムを起動しログインする。
 - 汎用コンピュータ内の入力用フォルダに入力ファイル一式 (サンプルシート、患者情報ファイル、FASTQ ファイル) をセットする。
 - 本解析プログラムのメイン画面でファイルスキャンを実行し、解析バッチ登録を行う。
 - Create and Start Batch ボタンから解析を開始する。
※解析処理中は汎用コンピュータからログアウトすることも可能である。
 - バッチ確認画面で解析が完了していることを確認する。
 - メイン画面の View Batch ボタンから解析結果を確認する。
解析が完了したオーダーを選択し、Finalize ボタンをクリックし、以下のレポートを確認する。
・サマリーレポート
・シークエンシングレポート
 - 本解析プログラムを終了し、汎用コンピュータからログアウトする。
※使用方法の詳細については、本解析プログラムの取扱説明書を参照すること。

【使用上の注意】

- 重要な基本的注意
 - 本品による検査を実施する際には、関連学会が提示する施設要件を満たした医療機関からの依頼であることを確認すること。また、遺伝子パネル検査の品質管理、精度管理に関して、関連するガイドライン等を参照すること。
 - 本品により得られる遺伝子変異結果を用いた診断や治療方針の決定は、関連学会が提示する要件を満たしたエキスパートパネルで行うこと。本品が搭載する遺伝子による診断が可能な RetNet (Retinal Information Network) に基づく IRD の疾患分類名は、Retinitis pigmentosa, Choroidal dystrophy, Cone or cone-rod dystrophy, Congenital stationary night blindness, Macular dystrophy, Syndromic/systemic diseases with retinopathy, Usher syndrome, Bardet-Biedl syndrome, Leber congenital amaurosis, Other retinopathy, Deafness alone or syndromic である。
 - 本品の結果を用いて遺伝カウンセリングを行う際には、必ず関連学会が提示する要件を満たしたエキスパートパネルで総合判断された結果を用いて実施すること。
 - 判定には必ず「PrismGuide IRD パネル 解析プログラム」を使用すること。なお、本解析プログラムは「遺伝子異常」が確認された遺伝子のみがサマリーレポート及びシークエンシングレポートに出力される。
- その他の注意
 - PrismGuide IRD パネル システム
 - 本品による検査は、遺伝カウンセリング実施体制及びエキスパートパネル実施体制を有する医療機関の体制下にあり品質保証において第三者認定を受けていること、もしくは外部委託した場合においては、第三者認定を受けた検査機関で必ず実施すること。
 - 検出されたバリエーションの病原性評価は、ACMG ガイドラインの分類プロセス・基準に基づき行われるが、一部の評価においては患者血縁者の変異情報等が必要となる場合がある。本品による病的

バリエーション情報は、＜遺伝子変異の病原性判定方法＞に記載の分類プロセス・基準により判定された結果であることをふまえ、関連学会が提示する要件を満たしたエキスパートパネルが血縁者解析や臨床所見も考慮し病原性総合判定を行うこと。

- 高い GC 含量 (例: High GC content 約 70% 以上) の場合の本品への影響は確認していない。GC 含量が高い場合、本品によるカバレッジの Depth (読み深度) や Evenness (均一性・網羅性) に影響する可能性がある。また、遺伝子領域 (繰り返し配列領域等) によっては、リファレンス配列へのミスマッピングが生じる可能性も否定できないため、関連学会が提示する要件を満たしたエキスパートパネルにより総合的に判断することを推奨する。
 - 他者の遺伝情報が混在する検体は、検査結果に影響を及ぼすことから検査に不適となる。他者の遺伝情報が混在する検体の例を以下に示す。
・同種造血幹細胞移植を受けた患者の全血等
 - 検査を検討している患者が白血病等の血液悪性腫瘍と診断された場合、生殖細胞系列の遺伝子変異状態が反映されず、結果が異なる可能性がある。
 - 本品で出力されたバリエーション病的分類及び解釈は、レポートが発行された時点での科学的知見に基づくものである。新たな科学的知見が得られるに従い、バリエーションの分類や解釈が変わる場合がある。
- (2) PrismGuide IRD パネル 解析プログラム
- 本解析プログラムは、次世代シークエンサーから得られる遺伝子データの解析や品質評価に必要なバイオインフォマティクスに関する十分な知識を有する専門家の責任のもとで使用すること。また、出力された結果に対して専門家が再確認を行うなど、結果の取り扱いには注意すること。
 - 本解析プログラムを海外に持ち出す場合は、外国為替及び外国貿易法 (安全保障貿易等) を確認して適切に取り扱うこと。
 - 本解析プログラムのインストールやアップデートは製造販売元のサービスマンが行う。
 - 本解析プログラムで使用しているデータベース情報等は、製造販売元が開示した最新の状態で使用すること。アップデートがある場合には、製造販売元より連絡する。
 - 本解析プログラムをインストールしたコンピュータならびに関連するシステムは、施設で定められたセキュリティポリシーに従い管理すること。
 - 本解析プログラムの管理者を 1 名設置し、管理者は、ユーザーごとに適切なアクセス権限を設定すること。アクセス権限が適切に設定されていない場合は、管理者の意図しない変更が行われる恐れがあることに注意すること。
 - 本解析プログラムをインストールしたコンピュータでは、以下の点に注意すること。
・ユーザーごとに OS アカウントを作成し、全ての OS アカウントでパスワードを設定すること。また OS アカウントのパスワードは十分な強度となるよう設定し、外部に漏えいしないよう適切に管理すること (推奨: 大小英数字混在の 8 文字以上)。管理者のパスワードは、本解析プログラムのアップデート等に必要であるため、記録・保管等予防の方法を検討すること。
・外部ネットワーク (インターネット等) に接続しないこと。
・ローカルネットワークに接続する場合は、接続先やフォルダを限定すること。
・リモートアクセスやファイル共有等のネットワークサービス機能を停止すること。運用上やむを得ない場合には、コンピュータシステムを設置した専門業者に相談するなど、セキュリティに十分な配慮を行うこと。
・USB ポートは使用しないこと。
 - 本解析プログラムの使用停止、置き換えや廃棄に際しては、解析時に使用したゲノム情報等のデータを確実に消去すること。お客様ご自身での実施が困難な場合には、コンピュータシステムを設置した専門業者に相談するなど、セキュリティに十分な配慮を行うこと。
- (3) PrismGuide IRD パネル キット
- 試薬には毒劇物や感染の恐れのあるものは含まれていない。
 - 試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けること。
 - 使用前に本添付文書をよく読んでから使用すること。詳細な使用方法は操作手順書を参照すること。
 - 使用期限を過ぎた試薬は使用しないこと。
 - 異なる製造番号の試薬又は残った試薬を注ぎ足して使用しないこと。
 - 本キットによる検査を行う際に、コンタミネーションを防ぐために、操作上の遺伝子増幅と検出は異なるエリアで行うこと。
 - 正確な結果を得るために、遺伝子検査の熟練者あるいはその指導のもとに試薬や試料の添加量、添加位置に十分に注意して測定を行うこと。

- 8)ヌクレアーゼフリーの実験器具(例えばピペット、ピペットチップ)を使用すること。
- 9)コンタミネーションに注意し、遺伝子検査に適した試験設備環境にて、保護衣・使い捨て手袋等(パウダーフリー)・マスク等の保護具を適切に着用して測定を行うこと。試薬や試料が手袋等に付着した場合は直ちに新しいものに取り替えること。
- 10)酵素は冷凍庫外で長時間放置を避け、素早く調製・使用すること。また、冷凍試薬の各構成試薬及びそれらを用いて調製した試薬類は、特に指定がない場合は氷上で取り扱うこと。
- 11)操作中に加熱状態で試薬を長時間放置しないこと。また、蓋を閉めた状態で加熱すること。
- 12)各構成試薬は十分に融解してから使用すること。
- 13)融解後のキットの各構成試薬及びそれらを用いて調製された試薬類は液が均一になるまで十分に攪拌し、蓋を開ける前にスピンドウンを行うこと。
- 14)本キットの冷凍保管試薬は、製造後 10 カ月までは 4 回まで融解できることを確認している。
- 15)IRD NGS Index Plate は必ず Index PCR Primers Set 1(Index Primer 1~12)又は Index PCR Primers Set 2(Index Primer 13~24)の組み合わせで使用すること。Index Primer 番号(1~24)とIRD NGS Index Plate の well 位置の関係は下表の通りである。

Index PCR Primers Set 1		Index PCR Primers Set 2	
Index Primer 番号	well 位置	Index Primer 番号	well 位置
Index Primer 1	A01	Index Primer 13	A04
Index Primer 2	B01	Index Primer 14	B04
Index Primer 3	C01	Index Primer 15	C04
Index Primer 4	D01	Index Primer 16	D04
Index Primer 5	E01	Index Primer 17	E04
Index Primer 6	F01	Index Primer 18	F04
Index Primer 7	A02	Index Primer 19	A05
Index Primer 8	B02	Index Primer 20	B05
Index Primer 9	C02	Index Primer 21	C05
Index Primer 10	D02	Index Primer 22	D05
Index Primer 11	E02	Index Primer 23	E05
Index Primer 12	F02	Index Primer 24	F05

- 16)測定装置及び使用備品は定期的な点検及び校正を行ない、使用すること。
- 17)測定装置の取扱説明書を参照し、適切な設定を行い、装置に適した動作環境で使用すること。
- 18)誤って試料をこぼした場合は、保護具を着用し試料が飛び散らないようにペーパータオル等で静かに拭き取ること。拭き取った後は、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 1.0 %以上)で浸すように拭き取り、その後水拭きすること。
- 19)PCR 反応生成物は、コンタミネーションを避けるため、ビニール袋で密閉し、各施設の規定に従って廃棄処理すること。
- 20)DNA 抽出前の検体を取り扱う際に使用した器具類は感染の可能性のあるものとし、オートクレーブ等で滅菌処理するか又は 1 %次亜塩素酸等の消毒液に浸して処理し、各都道府県の規定に従って廃棄処理すること。
- 21)廃液は水質汚濁防止法等の規制及び各都道府県の条例等に留意して廃液処理すること。
- 22)使用後の包装・容器等は、各都道府県の規定に従って適切に廃棄又はリサイクルを実施すること。

(4) 測定試料の性質、採取法

- 1) 測定検体は全血から抽出した DNA 以外は使用しないこと。
- 2) 全血は、抗凝固剤(EDTA)入りの採血管を用いることを推奨する。採血された全血は、有核細胞由来の DNA を用いる。全血(2 mL)を用いて、抽出試薬キットの推奨方法に従い DNA を準備すること。
- 3) 採血後は直ちに十分な転倒混和を行い、各種の検体取扱ガイドライン(例:検体品質管理マニュアル:日本臨床検査標準協議会作成、等)に記載の条件に基づいて、適切に取り扱うこと。採血後 4 °Cで保管された全血検体は 30 日間、30 °Cで保管された全血検体は 7 日間まで検査に使用できることを確認している。
- 4) 全血から DNA を抽出後、蛍光光度計等により、DNA 濃度を算出すること。検査には、DNA 量として 1,000 ng 以上の DNA 溶液を使用する。
- 5) 全血から DNA を抽出後、すぐに検査を行わない場合は、凍結保管すること。各種の検体取扱ガイドライン(例:検体品質管理マニュアル:日本臨床検査標準協議会作成、等)に記載の条件に基づいて、適切に取り扱うこと。抽出後 4 °Cで保管された DNA 検体は 30 日間、-20 °Cで保管された DNA 検体は 90 日間、凍結融解回数としては 4 回まで検査に使用できることを確認している。
- 6) 本品に付する全血検体に含まれる内因性妨害物質(ビリルビン(抱合型)、ヘモグロビン、コレステロール、トリグリセライド)、及び外因性妨害物質(EDTA)が本品へ与える影響を検証した結果、ビリルビン(抱合型)は 575 µg/mL、ヘモグロビンは 2.0 g/L、コレステロールは 5.0 g/L、トリグリセライドは 33.0 mg/mL、EDTA は 23.0

µmol/L の濃度まで、本品による測定及び解析には影響がないことを確認している。

(5) 性能

- 1) 実使用における工程管理に関する規格(システム適合性)
 - 本品の【使用方法等】に従い、12 検体を用いて検査を実施したとき、各工程(ライブラリー調製工程、シーケンシング工程、プログラム解析工程)で以下の結果が得られることを確認する。なお、ライブラリー調製工程を開始するにあたり必要な DNA 量は 1,000 ng 以上とする。

<ライブラリー調製工程の基準>

ポストキャプチャーライブラリーの収量(推奨値):0.9 ng/µL per pool 以上
 ※12 検体のプレキャプチャーライブラリーを混合後、反応させた場合

<シーケンシング工程の基準>

Cluster passing filter : 80 %以上
 Q30 score : 70 %以上

<プログラム解析工程の基準>

% On target reads : 60 %以上
 Evenness : 75 %以上
 Mean target coverage : 240 以上
 Low coverage (>=100x) : 95 %以上

2) 精密性(室内再現精度)

出荷判定時に使用される陽性管理用検体を用いて、本品によりライブラリー調製(n=72/オペレーター×2人で計 n=144)から解析を行い室内再現精度(日差、ロット間差、オペレーター間差を含む)を評価した場合、本品が対象とするバリエーション型(エクソン領域及びイントロン領域の SNV、ホモポリマー領域の SNV、InDel)を検出したサンプルの割合は 100 %であることを確認した。

3) 真度

特定の IRD 原因遺伝子領域のバリエーション部位を対象に、臨床検体 42 例を用いてサンガーシーケンス法による解析結果と本品による判定結果の一致率を算出した結果、SNV 及び InDel において陽性一致率(PPA)及び陰性一致率(NPA)はともに 100%であった(表 1)。

表 1 同源性評価結果

	サンガーシーケンス法による測定・解析結果	
	陽性バリエーション数 (SNV 35 個、InDel 8 個)	陰性バリエーション数
本品による測定・解析結果	43	0
合計	43	4281 ※
	PPA: 100 % [95 %信頼区間: 91.8 %-100 %]	NPA: 100 % [95 %信頼区間: 99.9 %-100 %]

※本品とサンガーシーケンス法の両方で検出されなかったバリエーション数は 4281 バリエーションであった。

また、参考試験として、本品の解析対象遺伝子のうちエビデンスレベルの高いRPE65遺伝子変異に係る本品の真度を評価した。両アレル性RPE65遺伝子変異によるIRD患者由来の4検体を用いて本品の真度を評価したところ、バリデーションされた対照法(サンガーシーケンス法、NGS法)と本品の変異検出に係る陽性一致率は100 %[95 %信頼区間:63.1 %-100 %]であった。また、医療機関で決定された当該変異の病原性判定に対する本品の判定一致率は100 %[95 %信頼区間:63.1 %-100 %]であった。

4) 特異性(バリエーション特異性)

臨床検体及び出荷判定時に使用される陽性/陰性管理用検体(※)を用いて、本品によりライブラリー調製(n=3)から解析を行い、IRD 原因遺伝子解析対象領域に対する 100 リード以上のカバレッジを有する塩基領域の割合を算出した結果、99.4 %以上の値を示すことを確認した。
 ※陽性管理用検体: NA24385(Coriell 社製)
 陰性管理用検体: NA18565(Coriell 社製)

5) 感度(最小検出感度)

インプットとなる DNA 量を規定量及び規定量以下にして本品による検査を実施した場合、代表的なバリエーション型を検出可能か確認

した。出荷判定時に使用される陽性管理用検体 1,000 ng(規定量)、500 ng を用いて、本品によりライブラリー調製(n=24)から解析を行い、本品が対象とする全バリエーション型(エクソン領域及びイントロン領域の SNV、ホモポリマー領域の SNV、InDel)に対する Hit Rate を算出した。その結果、1,000 ng では全バリエーション型を全て検出することができた(表 2)。

表 2 最小検出感度

バリエーション型	500 ng Hit Rate [%] (検出回数/ 解析回数)	1,000 ng Hit Rate [%] (検出回数/ 解析回数)
エクソン領域の SNV※1	100 (192/192)	100 (192/192)
ホモポリマー領域の SNV※2	100 (24/24)	100 (24/24)
イントロン領域の SNV※3	100 (48/48)	100 (48/48)
Insertion※4	100 (24/24)	100 (24/24)
Deletion※5	97.2 (70/72)	100 (72/72)

※1: USH2A、ABCA4、RPGRP1 遺伝子領域に存在する 8 SNVs

※2: RP1L1 遺伝子領域に存在する 1 SNV

※3: ABCA4、RHO 遺伝子領域に存在する 2 SNVs

※4: ADGRV1 遺伝子領域に存在する 1 Insertion

※5: EYS、MYO7A、POC1B 遺伝子領域に存在する 3 Deletion

- 6) 本品による原因遺伝子同定
臨床所見に基づき診断された IRD 患者由来の 80 例を対象に、本品を用いて生殖細胞系列遺伝子変異の検出及び病的バリエーション情報を取得後、医療機関でのエキスパートパネルによる原因遺伝子同定率を確認した。42.5 % (34 例/80 例) の患者において、本品及びエキスパートパネルで原因遺伝子が同定された。原因遺伝子が同定された 34 例中、31 例 (91.2 %) は、本品が判定した病的バリエーション (Pathogenic、又は Likely pathogenic) を有する遺伝子であった。一方、3 例 (8.8 %) は、本品により VUS (Variant of uncertain significance) として判定されたバリエーションを有する遺伝子であり、医療機関が保有する臨床情報や家系情報に基づくエキスパートパネルでの総合判定の結果、原因遺伝子として同定された。本結果より、本品から得られた情報が、IRD の原因遺伝子同定の補助として寄与すること、ならびに医療機関のエキスパートパネルにおいて、本品からの結果に加え、臨床情報や家系情報に基づき病原性有無に係る総合判定を行う運用が妥当であることが示された。

【保管方法及び有効期間等】

PrismGuide IRD パネル キット

- 保管方法

IRD NGS Library Preparation Kit	-25 ~ -15 °C
IRD NGS Hybridisation & Wash Kit	-25 ~ -15 °C
IRD NGS Panel	-25 ~ -15 °C
IRD NGS Index Plate	-25 ~ -15 °C
IRD Pre-Capture NGS Bead Kit	2 ~ 8 °C
IRD Post-Capture NGS Bead Kit	2 ~ 8 °C

 指定された温度で保存すること。

- 有効期間
19 カ月 (使用期限は外箱に表示)

【保守・点検に係る事項】

PrismGuide IRD パネル 解析プログラム

- 使用者による保守点検事項
本解析プログラム起動毎に、モニタに初期画面が正常に表示されることを確認すること。
- 業者による保守点検事項
特になし。

【承認条件】

遺伝性網膜ジストロフィに関連する十分な知識及び経験を有する医師が、関連学会の最新のガイドライン等に基づく検査の対象及び運用指針を遵守した上で、遺伝性網膜ジストロフィパネル検査に基づく診療体制が整った医療機関で本品を用いるよう、必要な措置を講ずること。

【主要文献】

- 「遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル」日本臨床検査標準協議会
- Richards S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 17, 405-24 (2015).
- Koyanagi Y, Akiyama M, Nishiguchi MK, Momozawa Y, Kamatani Y, Takata S, et al. Genetic characteristics of retinitis pigmentosa in 1204 Japanese patients. J Med Genet. 2019;56:662-670. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105691.
- 「網膜ジストロフィにおける遺伝学的検査のガイドライン」日本網膜硝子体学会
- 「遺伝性網膜ジストロフィーの原因となりうる主な遺伝子」リスト 日本網膜硝子体学会

【他社との契約による記載要求事項】

Dynabeads は Thermo Fisher Scientific Inc. の商標です。

Mag-Bind は Omega Bio-Tek, Inc. の商標です。

【製造販売業者及び製造業者の氏名又は名称等】

[製造販売元]

シスメックス株式会社

神戸市中央区脇浜海岸通 1-5-1 〒651-0073 Tel 078-265-0500

[製造元]

CytoCELL Limited

Oxford Gene Technology 418 Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge, United Kingdom, CB4 0PZ

[問合せ先]

シスメックス株式会社 CS センター

神戸市西区室谷 1-3-2 〒651-2241 Tel 0120-413-034

PrismGuide™ IRDパネル システムのお問合せは

シスメックス株式会社 PrismGuide™ IRDパネル システム 専用窓口



0120-056-034

受付時間：月曜日～金曜日 9:30～17:00(祝日・お盆・年末年始・その他休日は除く)

お問い合わせフォーム：https://www.sysmex.co.jp/contact/ivd_gene/index.html



製造販売元

シスメックス株式会社

本社 神戸市中央区脇浜海岸通1-5-1 〒651-0073

LS事業本部 LS市場開発部

(東京) Tel 03-5434-8569 Fax 03-5434-8557

(神戸) Tel 078-992-7221 Fax 078-992-7065

支店 仙台 022-722-1710 北関東 048-600-3888 東京 03-5434-8550 名古屋 052-957-3821

大阪 06-6337-8300 広島 082-248-9070 福岡 092-687-5380

営業所 札幌 011-700-1090 盛岡 019-654-3331 長野 0263-31-8180 新潟 025-243-6266

千葉 043-297-2701 横浜 045-640-5710 静岡 054-287-1707 金沢 076-221-9363

京都 075-255-1871 神戸 078-251-5331 高松 087-823-5801 岡山 086-224-2605

鹿児島 099-222-2788

日本・東アジア地域本部 03-5434-8565

カスタマーサポートセンター 0120-413-034

取扱店



注：活動及びサイトの適用範囲は規格により異なります。
詳細は www.tuv.com の ID 0910589004 を参照。
Note: Scopes of sites and activities vary depending on the standard.
For details, refer to the ID 0910589004 at www.tuv.com

*外観、仕様については改良のため予告なしに変更することがあります。