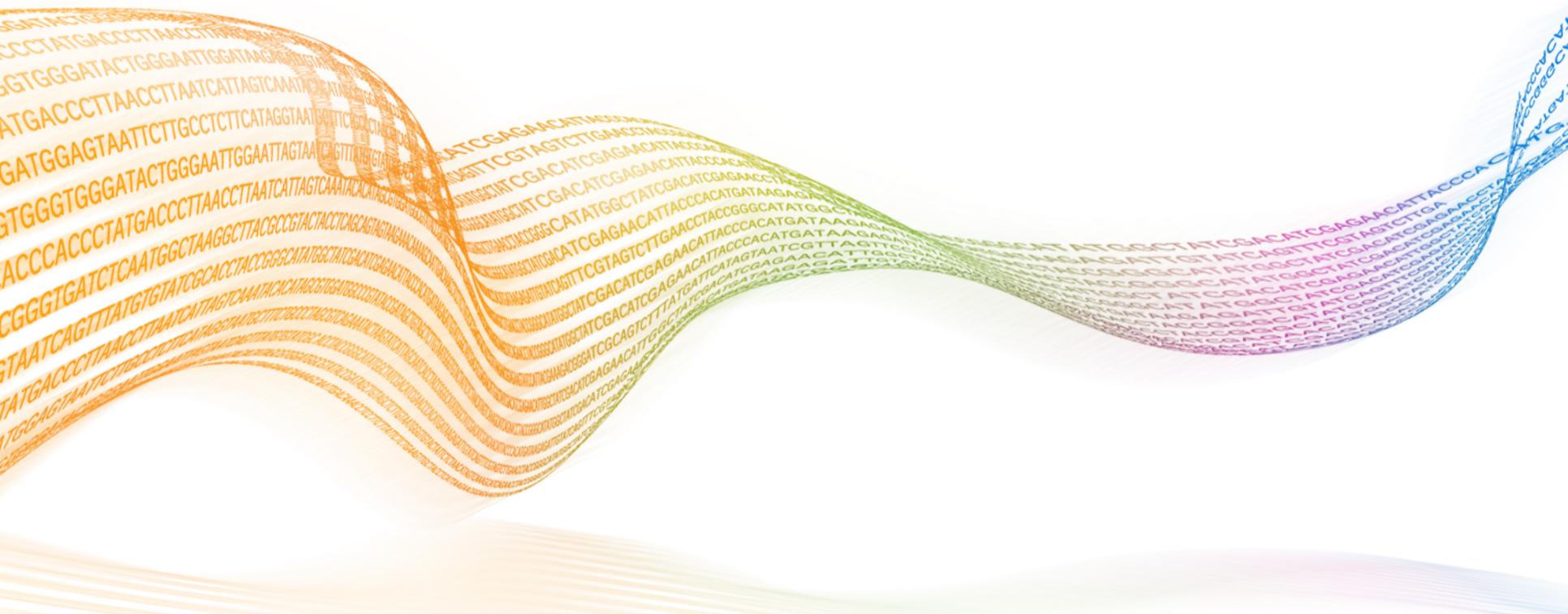


2015年10月8日
日本臨床検査自動化学会 第47回大会
第16回遺伝子・プロテオミクス技術セミナー

次世代シーケンサーの
データ解析の実際
VariantStudioソフトウェアによる
疾患原因変異の絞り込み

イルミナ株式会社
シーケンシングスペシャリスト
鈴木 健介

エクソーム解析原理

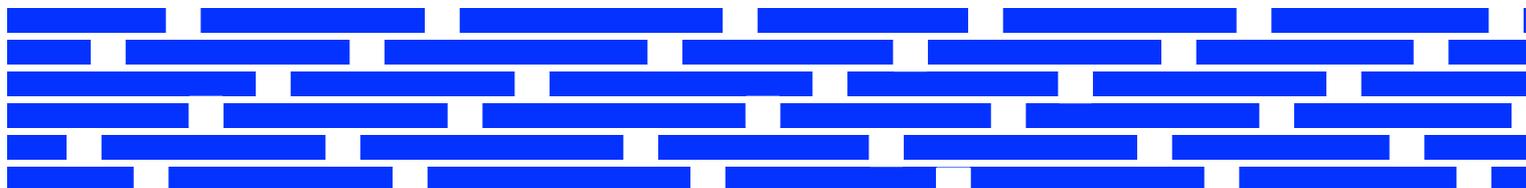


シーケンスによるバリエーション解析

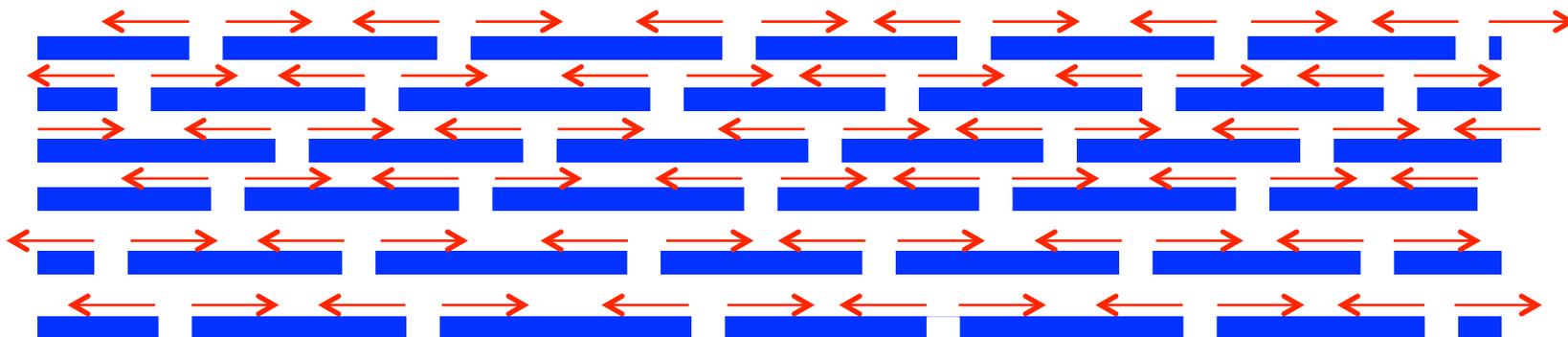
ゲノムDNA



断片化



シーケンス



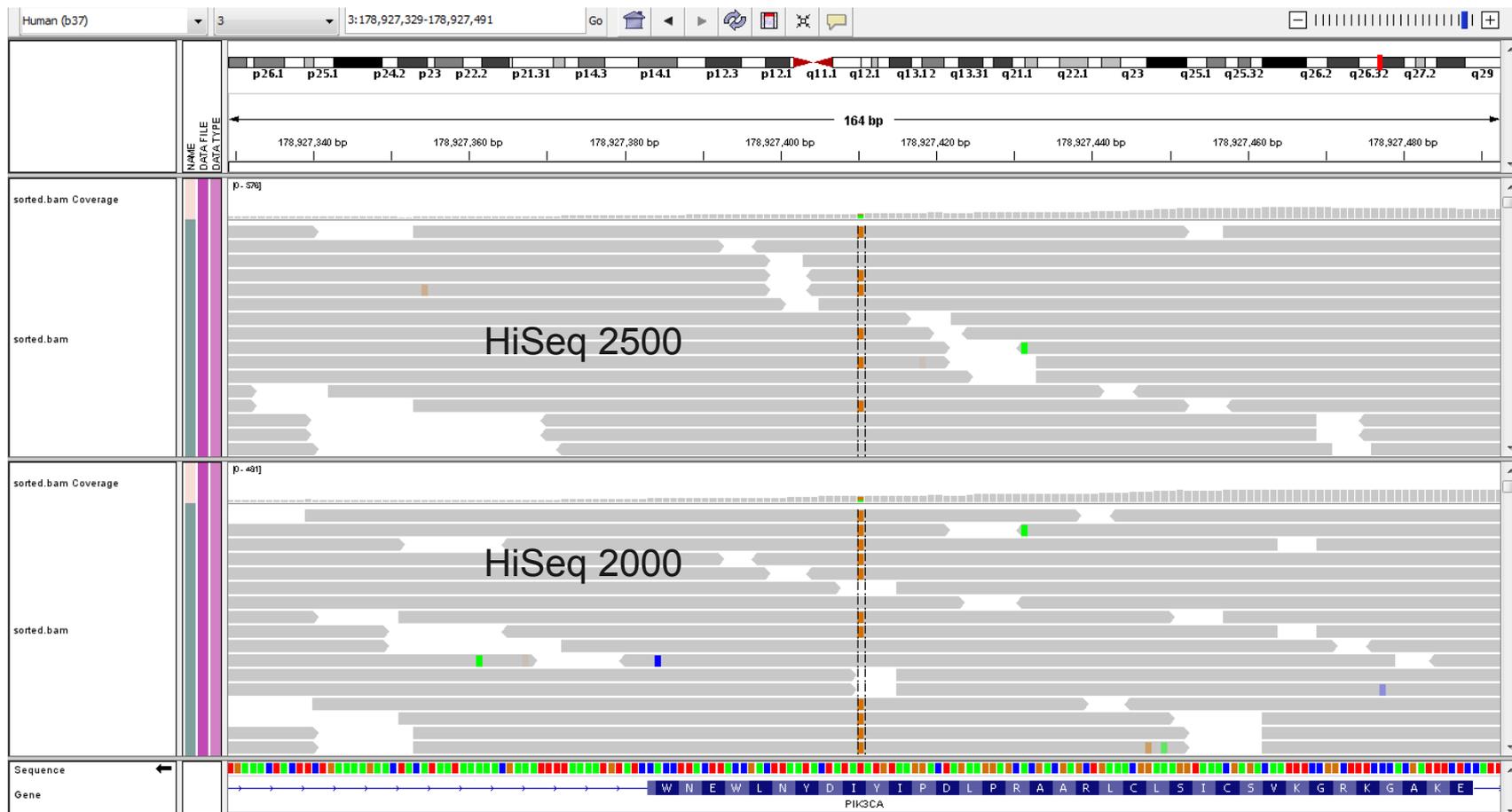
イルミナシーケンサーを用いたバリエーション解析

- ▶ TP53遺伝子の1塩基置換 (7,579,472 G→C)

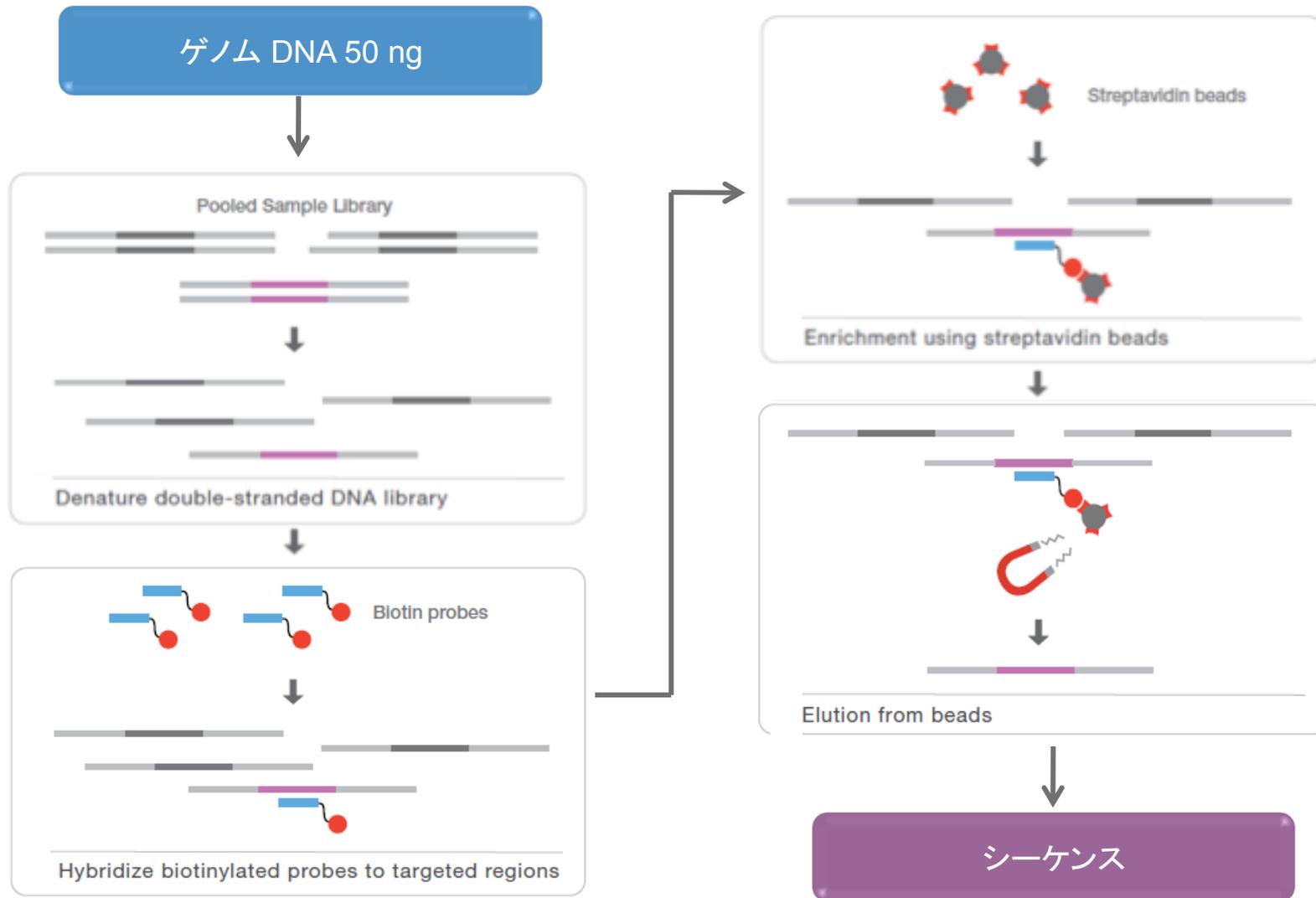


イルミナシーケンサーを用いたバリエーション解析

- ▶ PIK3CA遺伝子の1塩基置換 (178,927,410 A→AG)

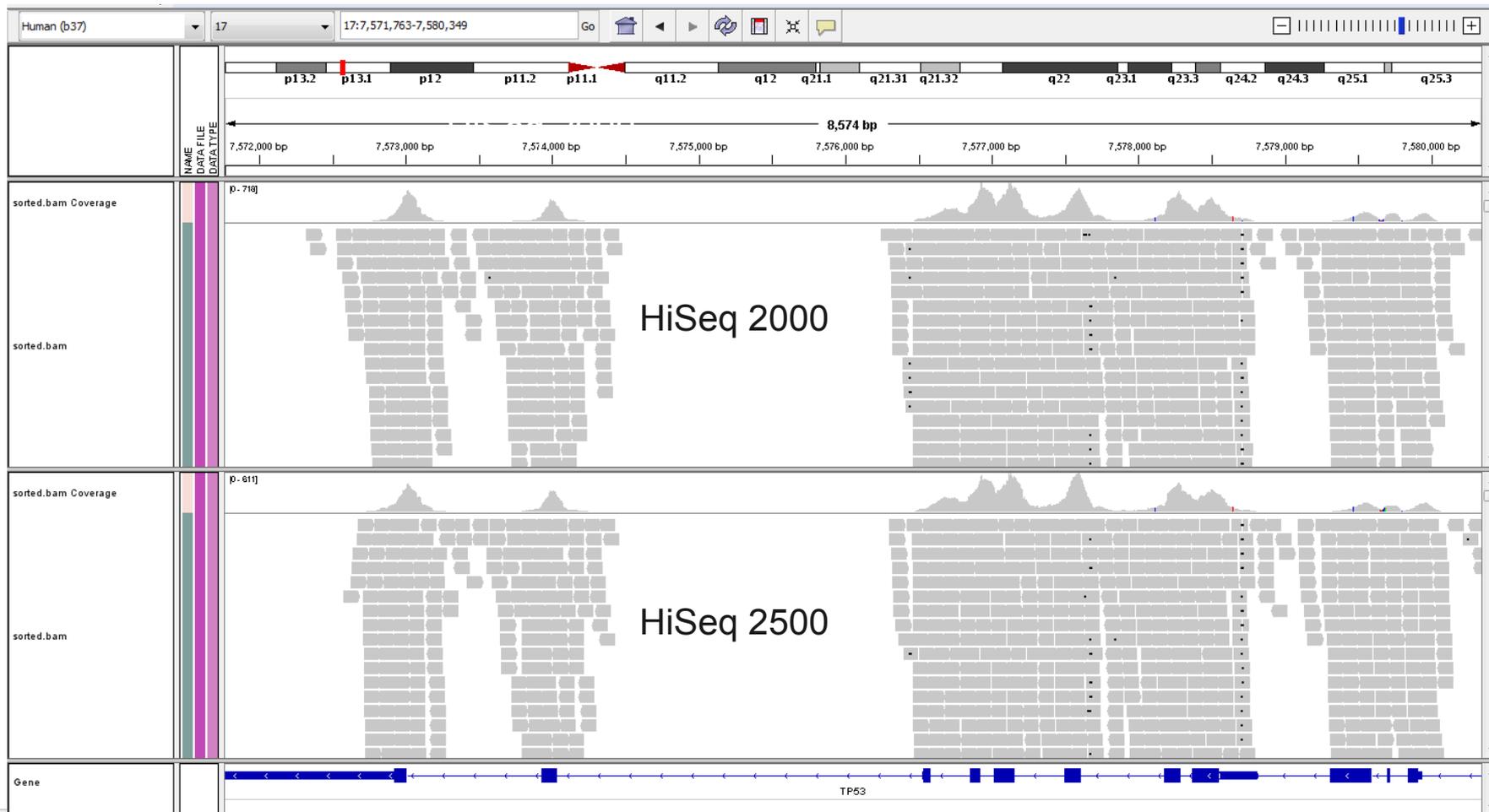


エクソーム濃縮ワークフロー



エクソーム解析結果

▶ TP53遺伝子のカバレッジ



全ゲノム解析例：初めての日本人ゲノム解析

- ▶ 3,132,608 箇所の1塩基の置換
- ▶ 5,319箇所の 10kb 以下の欠損
- ▶ 3 Mb の参照配列には無い配列
- ▶ ヒトゲノムには未発掘の多様性に富んだ配列が数多く存在
- ▶ 全ゲノム解析は、これらを理解するために極めて重要なアプローチ

The image shows the front cover of a Nature Genetics article. At the top left is the 'nature genetics' logo. At the top right, the word 'ARTICLES' is written in a bold, sans-serif font. The title of the article, 'Whole-genome sequencing and comprehensive variant analysis of a Japanese individual using massively parallel sequencing', is centered in a large, black, serif font. Below the title, the authors' names are listed: Akihiro Fujimoto^{1,2}, Hidewaki Nakagawa¹, Naoya Hosono¹, Kaoru Nakano¹, Tetsuo Abe¹, Keith A Boroevich¹, Masao Nagasaki³, Rui Yamaguchi³, Tetsuo Shibuya³, Michiaki Kubo¹, Satoru Miyano^{2,3}, Yusuke Nakamura^{1,2} & Tatsuhiko Tsunoda^{1,2}. A vertical copyright notice on the left edge reads '© 2010 Nature America, Inc. All rights reserved.' The main body of the cover contains a short abstract and a longer introductory paragraph. The abstract states: 'We report the analysis of a Japanese male using high-throughput sequencing to ×40 coverage. More than 99% of the sequence reads were mapped to the reference human genome. Using a Bayesian decision method, we identified 3,132,608 single nucleotide variations (SNVs). Comparison with six previously reported genomes revealed an excess of singleton nomenclature and non-synonymous SNVs, as well as singleton SNVs in conserved non-coding regions. We also identified 5,319 deletions smaller than 10 kb with high accuracy, in addition to copy number variations and rearrangements. De novo assembly of the unmapped sequence reads generated around 3 Mb of novel sequence, which showed high similarity to non-reference human genomes and the human herpesvirus 4 genome. Our analysis suggests that considerable variation remains undiscovered in the human genome and that whole-genome sequencing is an invaluable tool for obtaining a complete understanding of human genetic variation.' The introductory paragraph begins: 'Genome-wide scans for genetic variation have been conducted with the aim of clarifying the genetic basis of disease, and recent advancements in DNA genotyping technologies have revealed many susceptibility genes and variants for common diseases^{1,2}. Genome-wide association studies indicate that common genetic variants can explain only a modest-to-low heritable risk for common diseases, raising the question of how rare variants could contribute to a substantial fraction of disease susceptibility³⁻⁶. However, current DNA genotyping technologies specifically target common, known SNPs, not rare, unknown variants. The only way to identify and evaluate these rare or previously unidentified variants comprehensively is through whole-genome sequencing⁷. At present, massively parallel sequencing technology is one of the most powerful and promising tools for whole-genome sequencing and genome-wide variation discovery, in particular as it has less bias for common variants than other techniques, and it is expected to be used for personalized medicine in the future⁸. Previous studies of whole-genome sequencing using this technology has provided us with much information on DNA variations such as single nucleotide variations (SNVs), copy number variations (CNVs), insertions and deletions (indels), inversions and translocations⁹⁻¹⁶. However, standardized methods for variation calling have yet to be established on these platforms, and a variety of factors, such as platform-specific sequencing errors, mapping errors, ethnic differences from reference genome sequences¹⁷ and variant calling algorithms can affect the result of variant calling for whole-genome sequencing. Therefore, further refinement of the sequencing technology and more sophisticated informatic approaches are required to overcome these limitations and to detect undiscovered genetic variations. Here we report the whole-genome sequencing of a Japanese male individual (NA18943), who had been previously genotyped by the International HapMap project¹⁸. To our knowledge, this is the first report of whole-genome sequencing of a Japanese individual. The Japanese population is considered to be constructed by two migration events, a so-called 'dual structure' population¹⁹. Notable genetic differentiation from Korean and Chinese populations has been found^{19,20} and therefore whole-genome variation discovery of a Japanese individual provides us with useful information for understanding genetic variation in Asian populations. Our study revealed a large amount of variation, including SNVs, CNVs, medium-sized deletions, inversions and non-reference insertions. These results suggest that much variation remains unidentified in the human genome and that whole-genome sequencing provides us with the opportunity to detect undiscovered human polymorphisms that will be required for the advancement of personalized medicine.' At the bottom, there is a list of footnotes: ¹Center for Genetic Medicine, RIKEN, Tsukuba, Japan. ²Data Analysis Fusion Team, Computational Science Research Program, RIKEN, Tokyo, Japan. ³Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo, Japan. Correspondence should be addressed to T.T. (tsunoda@src.riken.jp) or H.N. (hideo@src.riken.jp). Received 18 February; accepted 10 September; published online 24 October 2010; doi:10.1038/ng.691. The bottom of the cover features the 'NATURE GENETICS' logo, the volume and issue information 'VOLUME 42 | NUMBER 11 | NOVEMBER 2010', and the page number '931'.

Fujimoto A, et al., (2010) Whole-genome sequencing and comprehensive variant analysis of a Japanese individual using massively parallel sequencing. *Nat Genet.* 2010 Nov;42(11):931-6.

エクソーム解析のレビュー: Nature Reviews Genetics

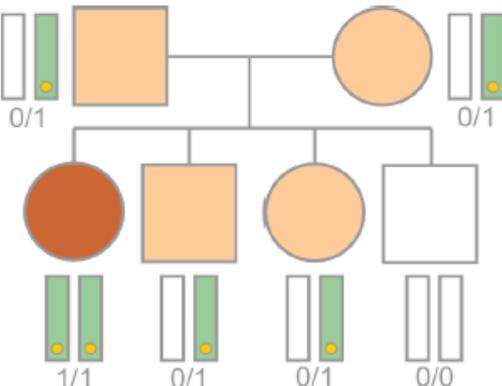
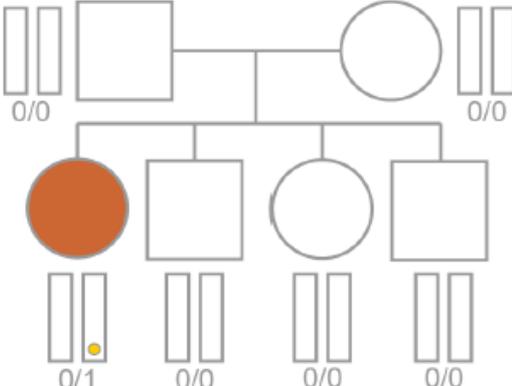
- ▶ これまでエクソーム解析で原因遺伝子を特定できた29文献の一覧表
- ▶ ほとんどの解析が、1-4家系、1-4症例で実施されている
- ▶ 遺伝性疾患の解析に威力を発揮
- ▶ 全エクソーム解析で見つかるバリエーション数 20,000~30,000
- ▶ *de novo* バリエーションは約70

Supplementary Table 1 | Diseases identified to date via exome sequencing

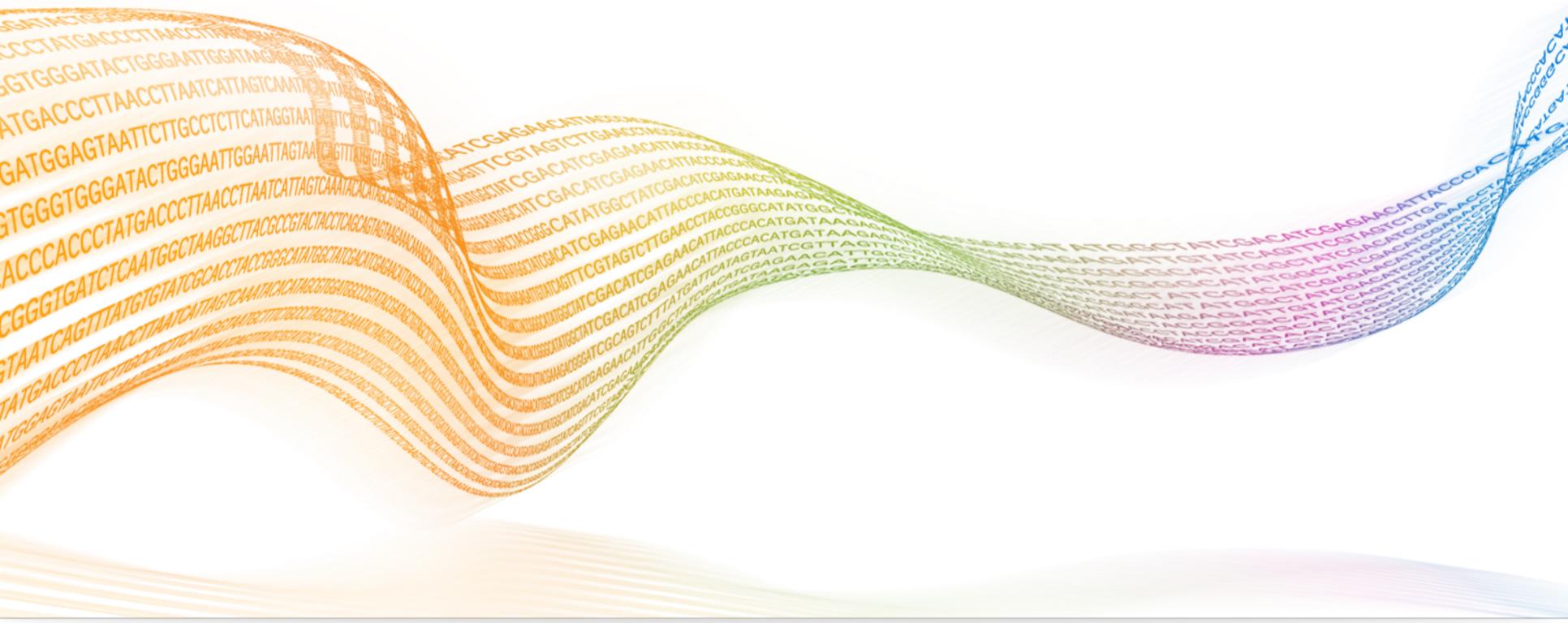
Disorder	PMID**	Mode of inheritance	N*	Strategy	Gene(s)
Comparison of unrelated cases					
Kabuki	20711175	AD	10	10 cases / 10 kindreds	MLL2
Schinzel-Giedion	20436468	AD	4	4 cases / 4 kindreds	SETBP1
Hadju-Cheney	21378985	AD	3	3 cases / 3 kindreds	NOTCH2
Fowler	20518025	AR	2	2 cases / 2 kindreds	FLVCR2
Sensenbrenner	20817137	AR	2	2 cases / 2 kindreds	WDR35
Comparison of related cases					
Miller	19915526	AR	4	4 cases / 3 kindreds	DHODH
hyperphosphatasia-MR	20802478	AR	3	3 cases / 1 kindred	PIGV
hypolipidemia	20942659	AR	2	2 cases / 1 kindred	ANGPTL3
retinitis pigmentosa	21295283	AR	3	3 cases / 1 kindred	DHDDS
novel skeletal dysplasia	21455487	AR	4	2 cases + parents / 1 kindred	POP1
spinocerebellar ataxia	21106500	AD	4	linkage + 4 cases / 1 kindred	TGM6
familial ALS	21145000	AD	2	linkage + 2 cases / 1 kindred	VCP
dilated cardiomyopathy	21353195	AD		linkage + 4 cases / 1 kindred	BAG3
hidradenitis suppurativa	21430701	AD	3	linkage + 2 cases ³ / 1 kindred	NCSTN
spinocerebellar ataxia	21106500	AD	4	linkage + 4 cases / 1 kindred	TGM6
primary failure tooth eruption	21404329	AD	4	linkage + 4 cases ¹ / 1 kindred	PTH1R
TARP ¹	20451169	XLR	2	linkage + 2 cases / 2 kindreds	RBM10
X-linked leukoencephalopathy	21415082	XLR	2	linkage + 1 case ³ / 1 kindred	MCT8
Homozygosity mapping					
DFNB82 (hearing loss)	20602914	AR	1	1 case / 1 kindred	GPSM2
CNS malformations	20729831	AR	2	2 cases / 1 kindred	WDR62
Seckel	21131973	AR	1	1 case / 1 kindred	CEP152
NPHP-related ciliopathy ²	20835237	AR	1	1 case / 1 kindred	SDCCAG8
autoimmune LPS	21109225	AR	1	1 case / 1 kindred	FADD
3MC	21035106	AR	1	1 case / 1 kindred	MASP1
complex I deficiency	21057504	AR	1	1 case / 1 kindred	ACAD9
non-syndromic MR	21212097	AR	2	2 obligate carrier parents	TECR
Ochoa	21450525	AR	1	1 case / 1 kindred	HPSE2
Identification of <i>de novo</i> mutations					
sporadic MR	21076407	complex	30	10 parent-child trios	multiple
autism		complex	60	20 parent-child trios	multiple

Bamshad MJ, et al., Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet.* 2011 Sep 27;12(11):745-55.

疾患原因遺伝子を絞り込むための研究デザイン

<p>家系情報</p>	 <p>家族内集積あり</p>	 <p>家族内集積なし</p>
<p>仮説</p>	<p>常染色体劣性遺伝</p>	<p><i>de novo</i></p>
<p>研究デザイン</p>	<p>スクリーニング: 家族サンプル 検証: 独立した別家族 裏付け: 生化学的特徴</p>	<p>スクリーニング: 家族サンプル 検証: 独立した別発症者 裏付け: 生化学的特徴</p>

エクソーム解析ワークフロー



イルミナシーケンスシステムの紹介

デスクトップ型

フォーカス

柔軟



MiSeq



NextSeq

大型

生産性

集団規模



HiSeq 2500



HiSeq X Ten

ランあたりの
最大データ量

15 Gb

120 Gb

1,000 Gb

1,800 Gb

最大リード長

300 x2

150 x2

250 x2

150 x2

ランあたり
エクソーム
解析サンプル数

1

9

96

-
(全ゲノムのみ)

エクソーム解析ワークフロー

ゲノム
DNA



ライブラリ作製
エクソン濃縮



エクソーム
濃縮キット

シーケンス



NextSeq

アライメント
バリエーションコール

アノテーション



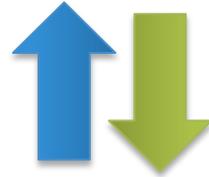
Variant
Studio

BaseSpace®

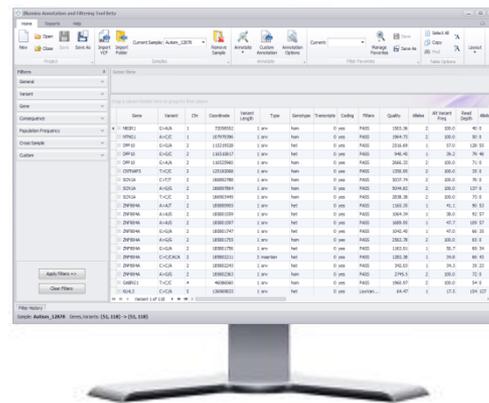
レポート



イルミナ VariantStudioの解析フロー



VCF または gVCF ファイルの入力

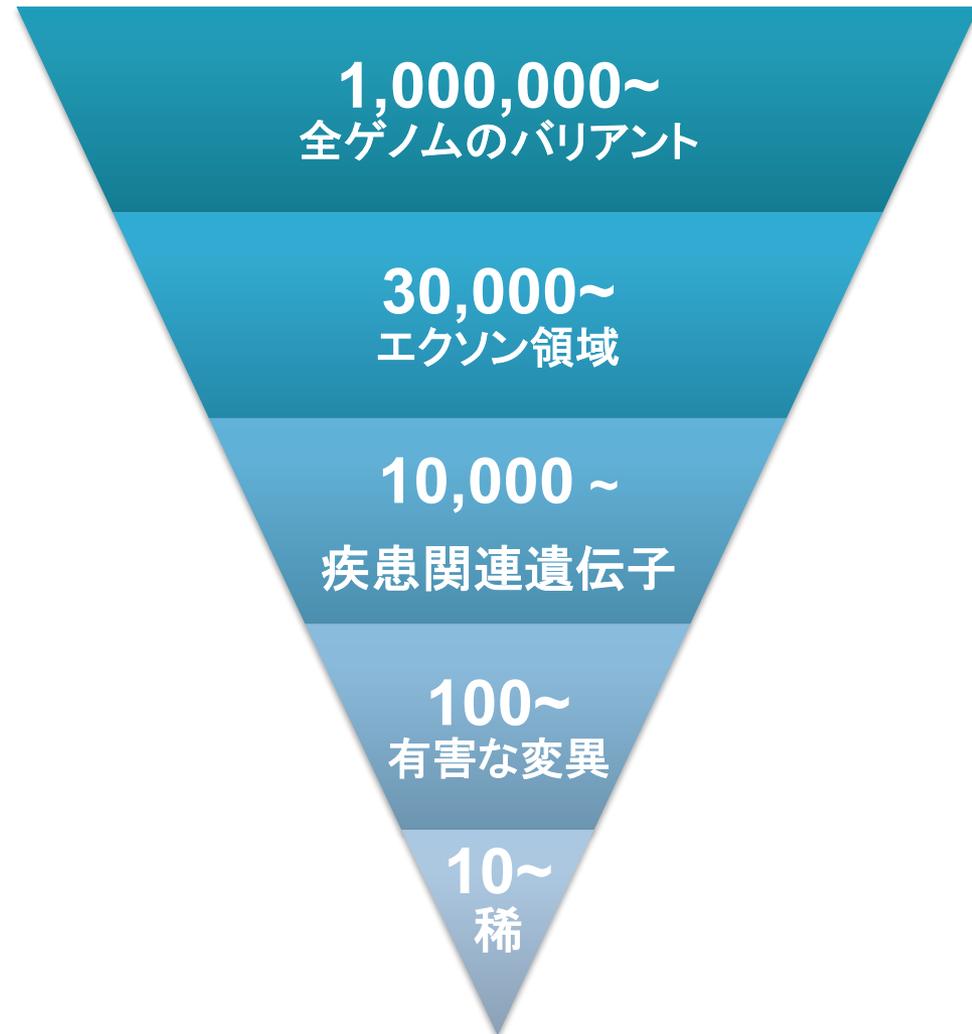


解釈した結果をレポートとして出力

イルミナ VariantStudio デスクトップ版

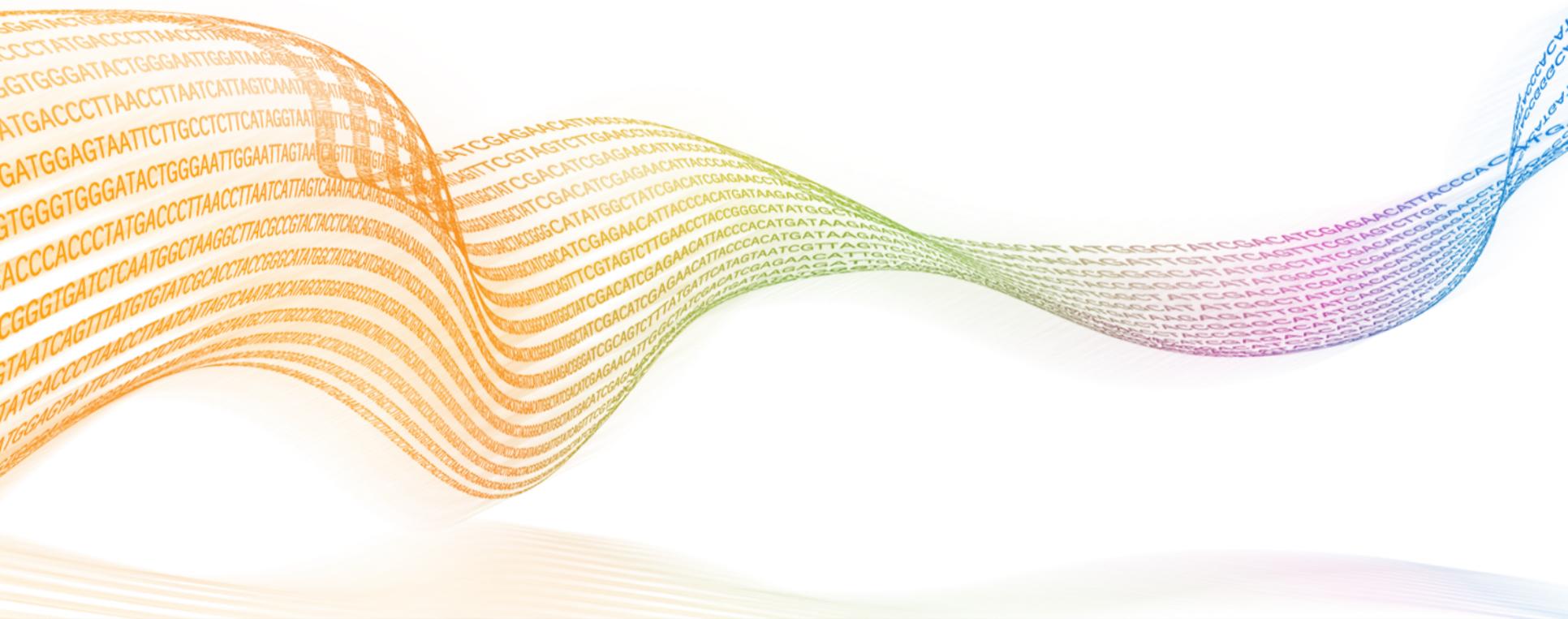
VariantStudioによるバリエーションの絞り込み

- ▶ 家系情報を利用した絞り込み
 - トリオ解析のデータを利用可能
 - 劣性モデルでの遺伝子抽出
 - *de novo* モデルでの遺伝子抽出
- ▶ データベースを使用した絞り込み
 - OMIM
 - ClinVar
 - 1000人
 - COSMIC
 - 他
- ▶ アノテーション機能
 - SIFT : タンパク質の立体構造への影響を予測
 - PolyPhen : 生物種を超えて保存されている配列情報を利用



VariantStudioを使ってみよう

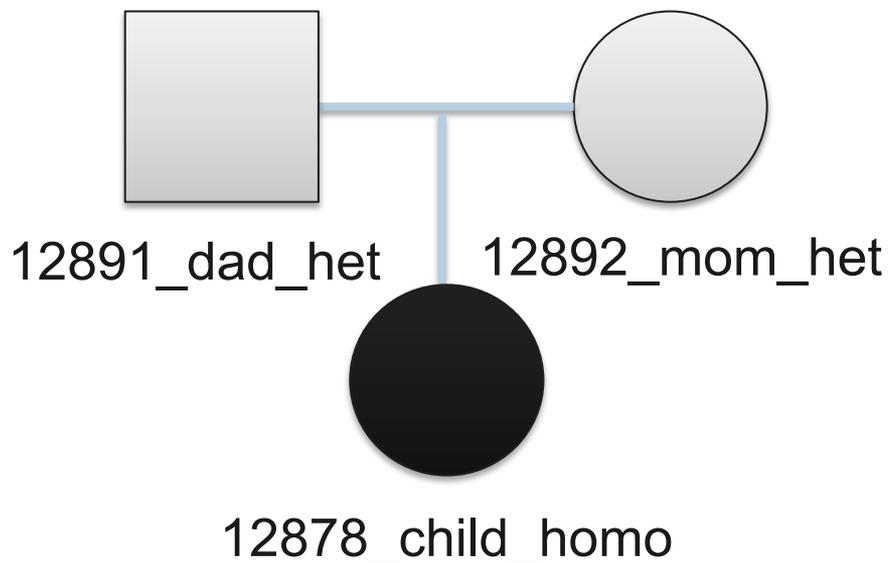
- エクソーム解析編 -



親子トリオのデモデータについて

デモデータ

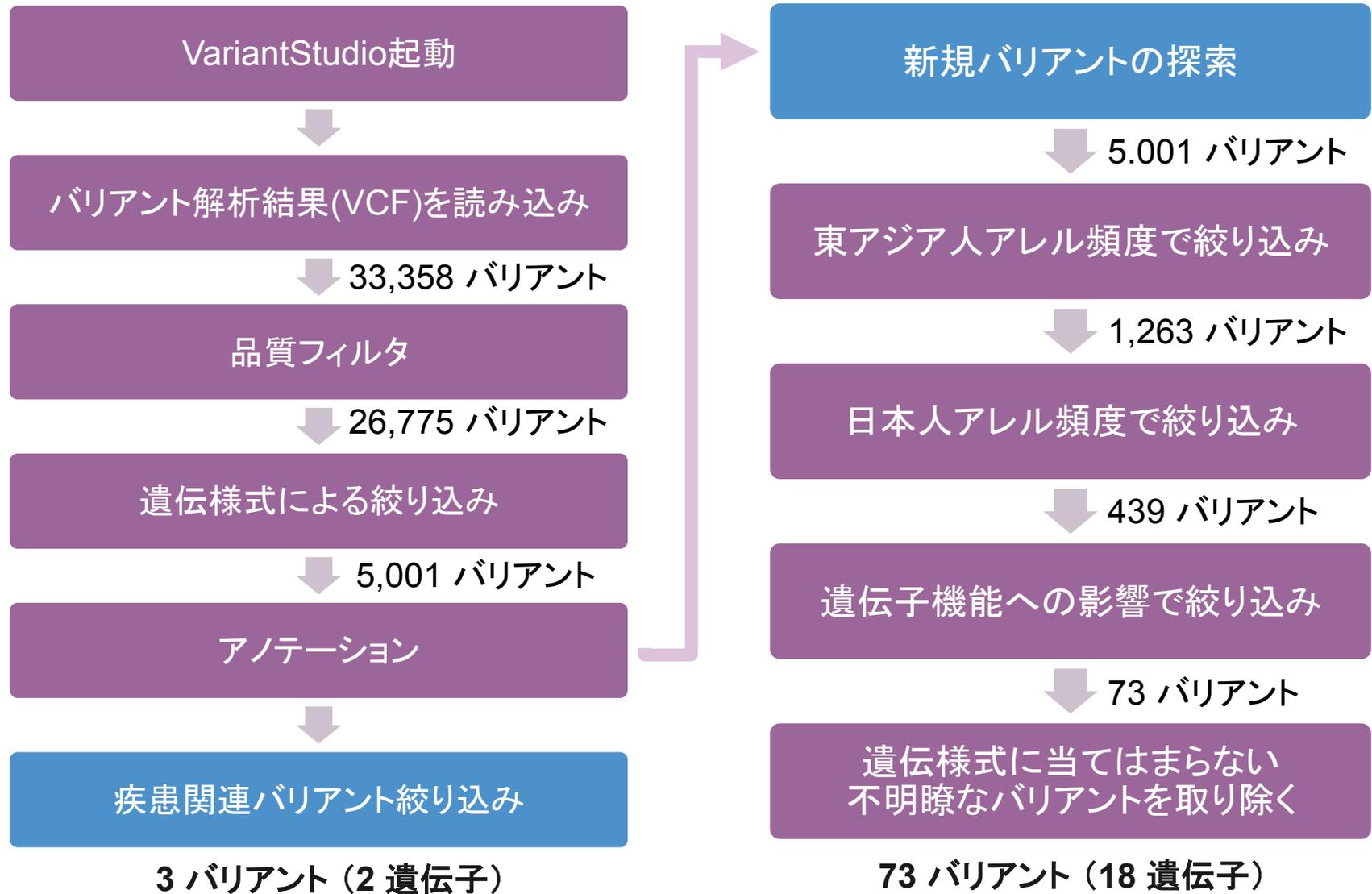
先天性疾患原因変異を
両親にヘテロ、子にホモと
なるようにデータ上で挿入



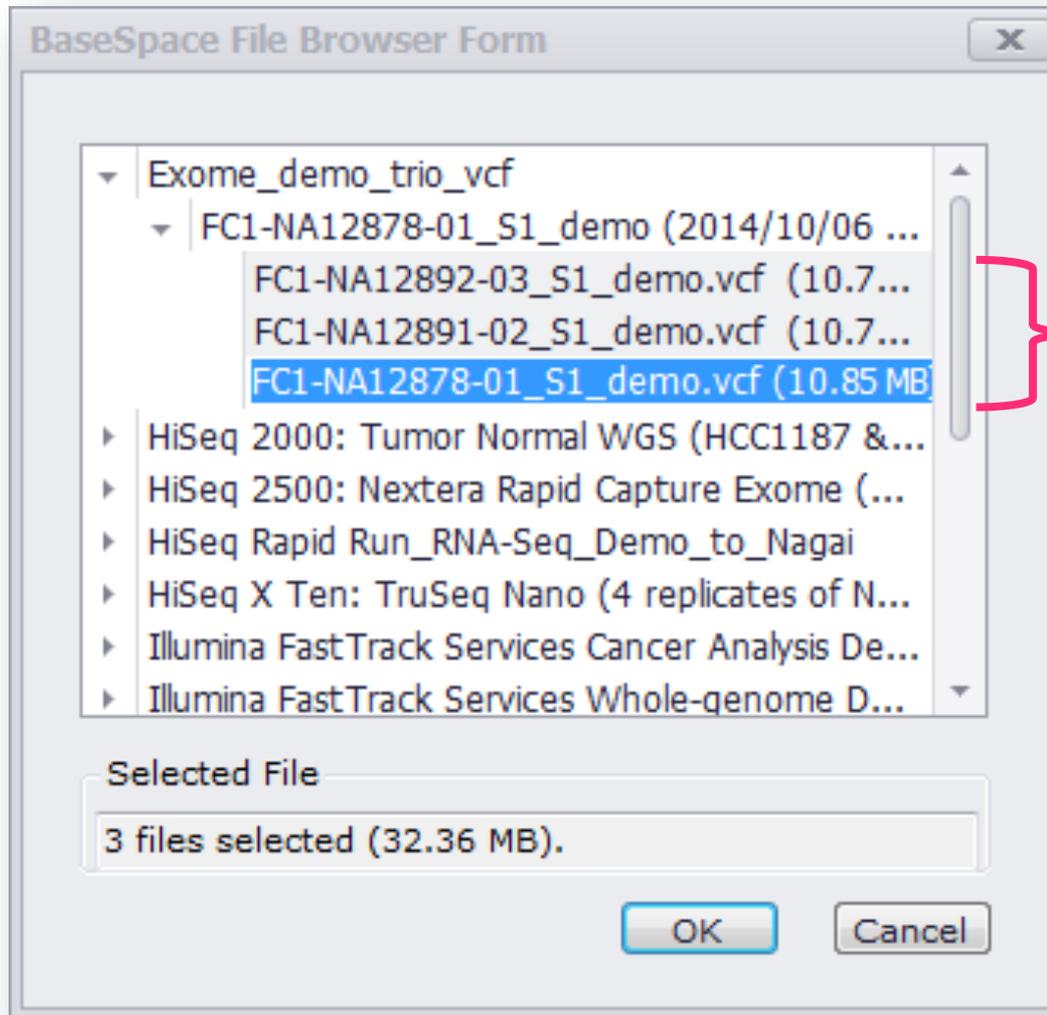
トリオ解析の前提

1. 疾患は常染色体劣性遺伝と仮定
2. 希少疾患で、原因変異はアレル頻度が低いと仮定
3. 遺伝子上の変異で遺伝子機能に影響を与えると仮定

VariantStudioによるエクソーム解析例



VariantStudioを起動し VCFファイルを読み込む



Shiftキーで
複数選択可

サンプルごとのバリエント一覧を表示

Consequence
Population Frequency
Cross Sample Subtraction
Family Based
Custom
Classification

Apply Filters =>
Clear Filters

Filter History

Sample: FC1-NA12892-03_S1_demo Genes, Variants: (C...)

Variant ID	Variant	Gene	Count	Category
N/A	A>G/G	M	4746	sr
N/A	A>A/G	M	6267	sr
N/A	T>C/C	M	7029	sr
N/A	G>A/A	M	7338	sr
N/A	G>A/A	M	8702	sr
N/A	G>A/A	M	9378	sr
N/A	C>T/T	M	9541	sr
N/A	G>A/A	M	10399	sr
N/A	G>A/A	M	10820	sr
N/A	C>T/T	M	10874	sr
N/A	C>T/T	M	11018	sr
N/A	A>G/G	M	11720	sr
N/A	C>T/T	M	11723	sr
N/A	T>C/C	M	12706	sr
N/A	G>A/A	M	12851	sr

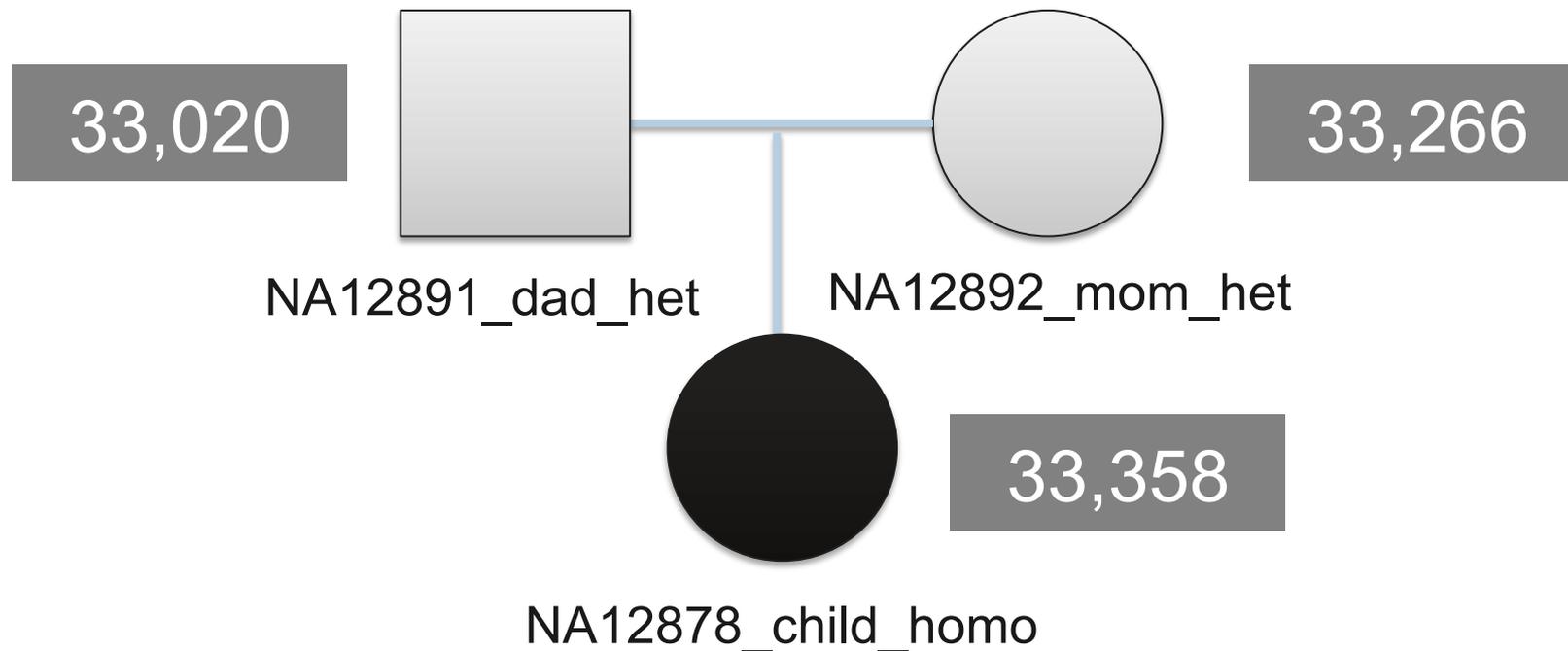
Variant 1 of 33266

Show Population Frequencies Show Transcript Info Show Custom

Variants Genes No Regions

読み込まれたバリエント数
33266

トリオ解析



NA12878が有する33,358個のバリエーションから
疾患原因候補遺伝子の絞り込みを行う

シーケンス品質が良いバリエーションの絞り込み

フィルタをパスしているバリエーションを絞り込む

Gene	Variant	Coordinate	Classification	Type	Genot...	Exonic	Filters	Quality	GQX
WIF1	C>C/T	12 65477601	...	snv	het	no	Low...	3.93	9%
WIF1	C>C/T	12 65477602	...	snv	het	no	PASS	147.97	9%
WIF1	C>C/T	12 65477606	...	snv	het	no	SB	91.17	9%
WIF1	C>CTCT	12 65477609	...	insertion	hom	no	PASS	3979.44	6%
LEMD3	C>C/T	12 65514266	...	snv	het	yes	PASS	6.05	9%
LEMD3	C>C/T	12 65563654	...	snv	het	yes	Low...	0.52	4%
LEMD3	C>C/T	12 65563712	...	snv	het	yes	PASS	689.73	5%
MYRF1	A>G/G	12 70274066	...	snv	hom	yes	PASS	215.5	9%
PTPRB	G>G/A	12 70928616	...	snv	het	yes	PASS	507.48	9%
PTPRB	A>A/C	12 70983895	...	snv	het	yes	PASS	999.06	9%
PTPRB	A>A/G	12 70988287	...	snv	het	yes	PASS	2851.82	9%
PTPRB	T>C/C	12 70990054	...	snv	hom	yes	PASS	2144.16	9%
NAP1L1	G>A/A	12 76453966	...	snv	hom	yes	PASS	213.37	9%
NAV3	A>A/G	12 78334194	...	snv	het	yes	PASS		

33,358 > 26,775 バリエーション

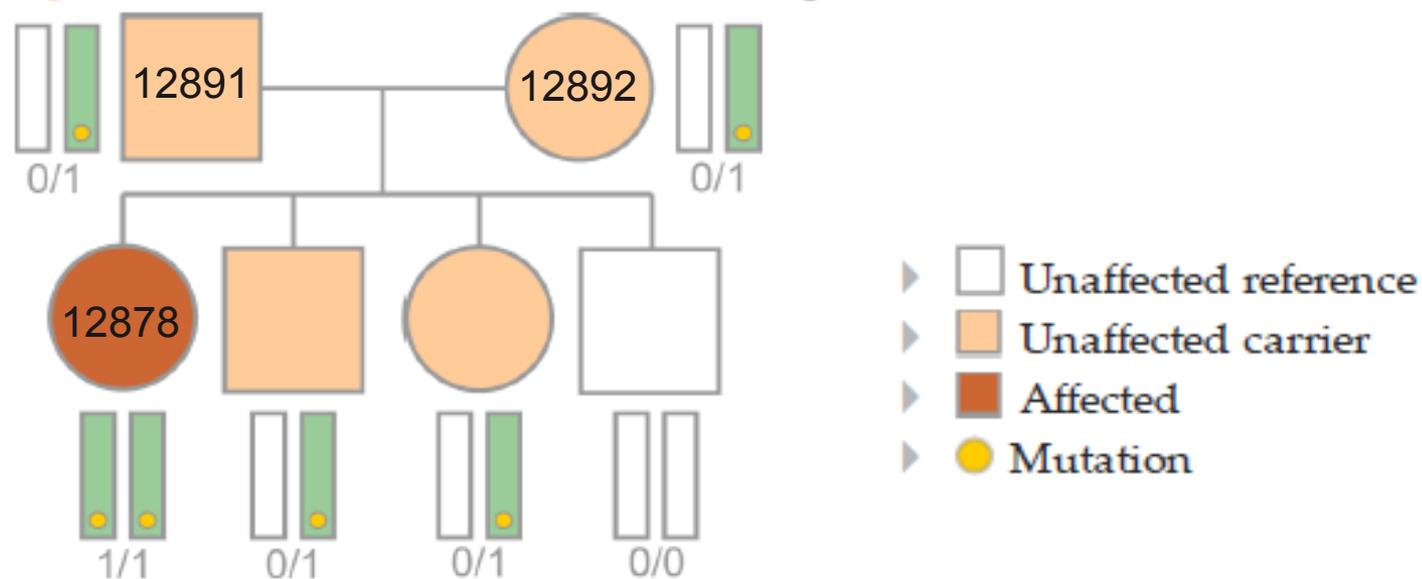
遺伝様式での絞り込み(常染色体劣性遺伝)

Autosomal Recessive Transmission Workflow

There are two possibilities for recessive transmission.

- 1 A single gene contains a variant that is:
 - Heterozygous (0/1) in the mother
 - Heterozygous (0/1) in the father
 - Homozygous (1/1) in the affected children

Figure 27 Autosomal Recessive Transmission Logic #1



遺伝様式での絞り込み(常染色体劣性遺伝)

Family Based

Use Family Based Filtering

Type: Autosomal Recessive

Mother: FC1-NA12892-03_S1 Affected

Father: FC1-NA12891-02_S1 Affected

Child: FC1-NA12878-01_S1 Affected

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Classification
MUC4	C>G/G	3	195506354	...
MUC4	G>G/T	3	195506398	...
MUC4	G>G/A	3	195506410	...
MUC4	C>C/T	3	195506411	...
MUC4	G>G/C	3	195506414	...
MUC4	A>A/G	3	195506421	...
MUC4	G>G/A	3	195506434	...
MUC4	T>T/A	3	195506435	...

“Autosomal Recessive”
父・母のサンプルIDを指定

26,775 > 5,001 バリエーション

バリエーションへのアノテーション(注釈)

Annotation & Classification

Annotate

Custom Annotation

Custom Gene Annotation

Annotation Options

Set Default Transcripts

Apply Classifications from Database

View C Da

Classificat

Filter

General

Variant

Gene

Consequence

Population Frequency

Cross Sample Subtraction

	Gene	Variant	Chr	Coordinate
▼				
▶	N/A	A>G/G	M	4782
	N/A	G>A/A	M	5461
	N/A	T>C/C	M	7029
	N/A	A>G/G	M	8513

アノテーションデータベースの情報を取得

バリエーションへのアノテーション(注釈)

Current Sample: One_12880

Remove Sample

Filter Favorites

Select All

Copy

Column Order

Layout

Samples

Table Options

KIF1B

10,441,661

表示されているバリエーションを全て選択する

Variant	Chr	Coordinate	Classification	Type	Genot...	Exonic	Filters	Quality	GQX
T	1	976580	...	snv	het	yes	PASS	345.29	99
C	1	977330	...	snv	hom	yes	PASS	2880.59	99
G	1	981931	...	snv	hom	yes	PASS	6800.75	99
C	1	982994	...	snv	hom	yes	PASS	3549.67	99
C	1	984302	...	snv	hom	yes	PASS	1659.51	95
A	1	986732	...	snv	het	yes	PASS	1788.53	99
T	1	987200	...	snv	hom	yes	PASS	3474.23	99
T	1	990780	...	snv	hom	yes	PASS	3358.84	99

バリエーションへのアノテーション(注釈)

“Selected variants of Current Sample”
選択されたバリエーションのみに
アノテーション

Gene	Variant	Chr	Coordinate
AGRN	C>C/T	1	976580
AGRN	T>C/C	1	977330
AGRN	A>G/G	1	981931
AGRN	T>C/C	1	982994

既知の疾患関連バリエーションの絞り込み

The screenshot shows the Illumina VariantStudio interface. The 'Filters' panel on the left has the 'Variant' filter selected. The 'Pass Filter' section includes 'Quality > 0', 'Read Depth > 0', and 'Alt Variant Freq > 0'. The 'Show only variants' section has 'Only variants with ClinVar annotation' checked. The main table displays a list of variants with columns for Gene, Variant, Chr, Coordinate, Classification, Type, Genot..., Exonic, Filters, Quality, GQX, Inherited From, and Alt Var Freq. A red arrow points to the 'Only variants with ClinVar annotation' checkbox. A red text overlay reads 'ClinVarに登録されている疾患関連バリエーションを抽出'. A white text overlay at the bottom reads '5,001 > 26 バリエーション (13 遺伝子)'. The status bar at the bottom shows 'Variant 1 of 5606'.

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Classification	Type	Genot...	Exonic	Filters	Quality	GQX	Inherited From	Alt Var Freq
N/A	A>T/T	1	324822	...	snv	hom	no	PASS	2757.34	99	father	ε
N/A	A>T/T	1	187610852	...	snv	hom	no	PASS	3138.56	99	both	
N/A	A>G/G	1	187611003	...	snv	hom	no	PASS	2335.34	99	both	
N/A	T>G/G	1	202956340	...	snv	hom	no	PASS	2735.14	99	both	
N/A	T>C/C	1	219706428	...	snv	hom	no	PASS	1436.15	99	both	
N/A	A>G/G	2	3488502	...	snv	hom	no	PASS	1097.04	81	both	
N/A	G>C/C	2	10959475	...	snv	hom	no	PASS	1067.83	81	both	
N/A	A>G/G	2	131672950	...	snv	hom	no	PASS	2419.38	99	both	
N/A	C>T/T	2	131673316	...	snv	hom	no	PASS	431.14	36	both	
N/A	T>C/C	2	132229720	...	snv	hom	no	PASS	984.72	84	both	
N/A	C>G/G	3	136739406	...	snv	hom	no	PASS	588.87	45	both	
N/A	C>T/T	3	195467853	...	snv	hom	no	PASS	856.13	66	both	
N/A	G>A/A	4	5990339	...	snv	hom	no	PASS	1481.95	99	both	
N/A	G>A/A	4	5991476	...	snv	hom	no	PASS	649.09	51	both	
N/A	G>A/A	6	32223632	...	snv	hom	no	PASS	1407.03	99	both	

ClinVar で Pathogenic に分類されるバリエントを抽出

ASN.1 terms	ClinVar and VCF
0 – unknown	Uncertain significance
1 – untested	not provided (includes the cases where data are not available or unknown)
2 - non-pathogenic	Benign
3 - probable-non-pathogenic	Likely benign
4 - probable-pathogenic	Likely pathogenic
5 – pathogenic	Pathogenic
6 - drug-response	drug response
7 – histocompatibility	histocompatibility
255 - other	other
	confers sensitivity
	risk factor
	association
	protective

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/clinsig/>

ClinVar で Pathogenic に分類されるバリエントを抽出

Gene View

Gene	Variant	Chr	Coordinate	ClinVar Allele Type	ClinVar Significance	ClinVar Disease Name
					pathogenic	
A2M	T>C/C	12	9232268	germline	other non-patho...	ALPHA-2-MACROGLOBULIN_POLYMORPHI.
ASPM	G>G/T	1	197070442		non-pathogenic	Primary_autosomal_recessive_microcephal.
ASPM	T>T/C	1	197070697		non-pathogenic	Primary_autosomal_recessive_microcephal.
ASPM	G>G/A	1	197070707		non-pathogenic	Primary_autosomal_recessive_microcephal.
ASPM	C>C/T	1	197072420		non-pathogenic	Primary_autosomal_recessive_microcephal.
ASPM	T>T/C	1	197073420		non-pathogenic	Primary_autosomal_recessive_microcephal.
ASPM	T>T/C	1	197073531		non-pathogenic	Primary_autosomal_recessive_microcephal.
ASPM	A>A/G	1	197097751		non-pathogenic	Primary_autosomal_recessive_microcephal.
ATP7B	C>C/T	13	52508979	germline	non-pathogenic	Wilson's_disease
ATP7B	G>G/A	13	52511606	germline	non-pathogenic	Wilson's_disease
ATP7B	A>A/G	13	52515354	germline	probable-non-pat...	Wilson's_disease
ATP7B	C>C/T	13	52520507	germline	non-pathogenic	Wilson's_disease

Contains([ClinVar Significance], 'pathogenic')

Variant 0 of 24

フィルターを編集

ClinVar Significantカラム下に
"Pathogenic"と入力

ClinVar で Pathogenic に分類されるバリエントを抽出

The image displays two overlapping windows of a "フィルター エディタ" (Filter Editor). The top window shows a filter rule: "And" with a sub-rule "[ClinVar Significance] Contains pathogenic". A red arrow points to the word "Contains". The bottom window shows the same rule but with "Equals" selected instead of "Contains". A red text box with white background contains the instruction: "“Contains”をクリックして “Equals”に変更". At the bottom of the bottom window, the "適用(A)" (Apply) button is highlighted with a red box.

フィルター エディタ

And

[ClinVar Significance] Contains pathogenic

フィルター エディタ

And

[ClinVar Significance] Equals pathogenic

OK(O) キャンセル(C) 適用(A)

“Contains”をクリックして
“Equals”に変更

ClinVar で Pathogenic に分類されるバリエントを抽出

Gene View

COSMIC Gene	COSMIC Primary	COSMIC Histology	ClinVar RS	ClinVar Ref	ClinVar Alleles	ClinVar Allele Type	ClinVar Significa...	ClinVar Disease Name	ClinVar Accessio
			rs267606...	G	A		pathogenic	Miller_syndrome	RCV0000
DHODH	large_inte...	carcinoma	rs201947...	C	T		pathogenic	Miller_syndrome	RCV0000
ITGA2B	breast	carcinoma	rs5911	A	C	germline	pathogenic	Bak_platelet-specific_antigen	RCV0000

Filters

- Alt Variant Freq > U
- Show only variants:
 - Inside genes
 - In conserved regions
- Only variants without dbSNP ID
- Only variants with Cosmic annotatio
 - where matches mutant allele
 - where not matches mutant ;
- Only variants with ClinVar annotatio
 - where matches mutant allele
 - where not matches mutant ;

Gene: [Dropdown]

Apply Filters =>

Clear Filters

Filter History

Sample: FC1-NA12878-01_S1_demo Genes Variants: (10951, 33358) (13, 26)

Filter: [x] [ClinVar Significance] = 'Pathogenic' フィルターを編集

Variant 0 of 3

Show Population Frequencies Show Transcript Info Show Custom Annotations Show ClinVar Show Cosmic

Variants Genes No-Call Regions

26 > 3 バリエント (2 遺伝子)

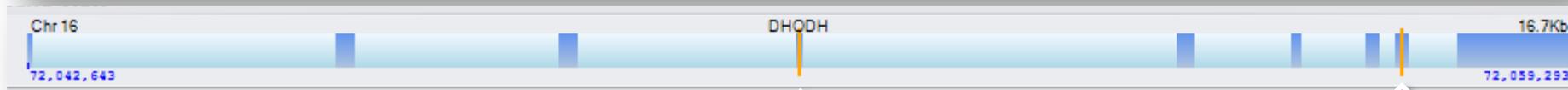
ClinVar で Pathogenic に分類されるバリエントを抽出

COSMIC Gene	COSMIC Primary	COSMIC Histology	ClinVar RS	ClinVar Ref	ClinVar Alleles	ClinVar Allele Type	ClinVar Significa...	ClinVar Disease Name
			rs267606...	G	A		pathogenic	Miller_syndrome
DHODH	large_inte...	carcinoma	rs201947...	C	T		pathogenic	Miller_syndrome
ITGA2B	breast	carcinoma	rs5911	A	C	germline	pathogenic	Bak_platelet-specific_antigen

既知の疾患関連バリエントで説明できれば完了
説明できない場合、更に追加で解析を実施

遺伝性疾患の原因と考えられるバリエントの確認

PubMed	GeneReviews	Disease	
ARHGAP8			Rho GTPase activating protein 8
CD177			CD177 molecule
DHODH	Miller syndrome		▼ dihydroorotate dehydrogenase (quinone)

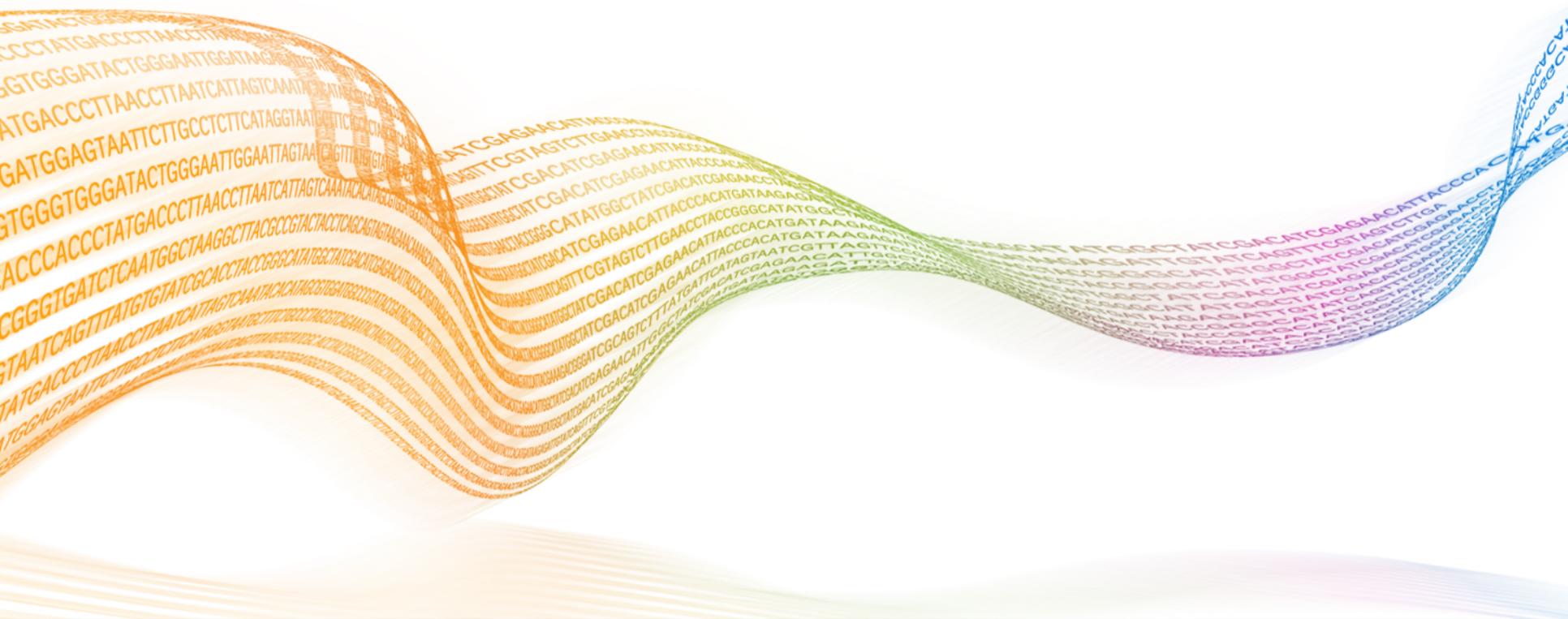


父方由来
NA12891

母方由来
NA12892

同一遺伝子の異なる箇所に変異を検出

レポート作成



バリエントに独自の分類を指定

Gene View

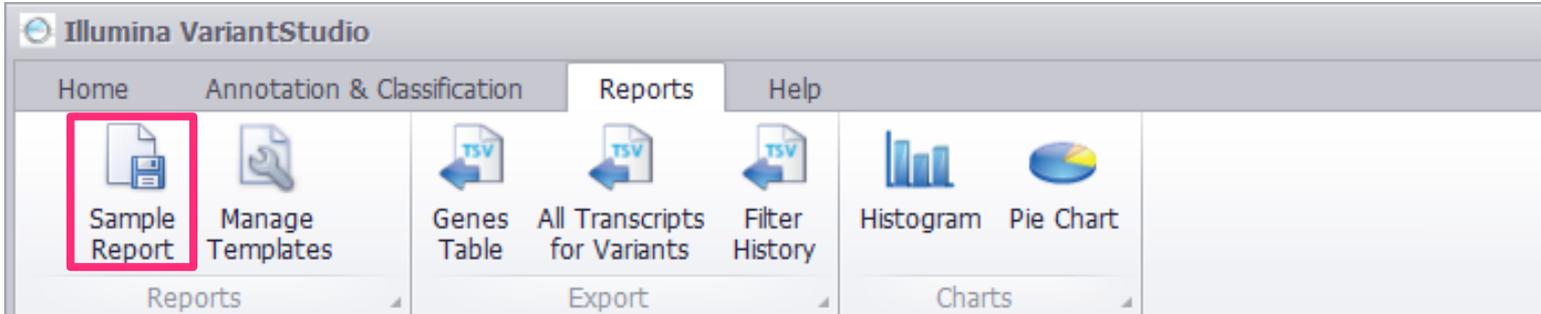
Chr11 TYR 117.9Kb
88,911,040 89,028,927

Custom Annotation	Custom Annotation	Custom Gene	Custom Gene	Classification	Google Scholar	PubMed	UCSC Browser	Num Transcripts	
				Presumed Pathogenic	...	google	pubmed	ucsc	1
				Pathogenic	...	google	pubmed	ucsc	1
				Pathogenic	...	google	pubmed	ucsc	1



Variant 1 of 3

レポートを作成



The screenshot shows the Illumina VariantStudio interface. The 'Reports' tab is selected in the top navigation bar. The 'Reports' menu is open, showing options: 'Sample Report' (highlighted with a red box), 'Manage Templates', 'Genes Table', 'All Transcripts for Variants', 'Filter History', 'Histogram', and 'Pie Chart'. Below the menu, the 'Filters' panel is visible on the left, and the 'Gene View' table is on the right.

Filters

Family Based

Custom

Do not filter on custom annotation

Show variants with annotation

Show variants without annotation

Show variants that contain

in Custom

in Custom2

in Custom3

Gene View

Name	Gene ID	Chr	Start	Stop	Length
ARHGAP8	23779	22	45148438	45258664	1102
CD177	57126	19	43857825	43867480	96
DHODH	1723	16	72042643	72059316	166
MAGEC1	9947	X	140991642	140997187	55
MYRFL	196446	12	70272787	70352504	797
OR10A4	283297	11	6897856	6898850	9
PCDHA1	56147	5	140165876	140391929	2260
PCDHA2	56146	5	140174444	140391929	2174
PCDHA3	56145	5	140180783	140391929	2111
PCDHA4	56144	5	140186672	140391929	2052

レポートを作成：サンプル情報

Sample Report

Report Template

Restore From Template

Sample Info | Lab Information | Test Summary | Methodology | References | Page Footer

Enter data manually (based on fields specified in report template):

John Doe and Jan 1st 1990 : FC1-NA12898

or

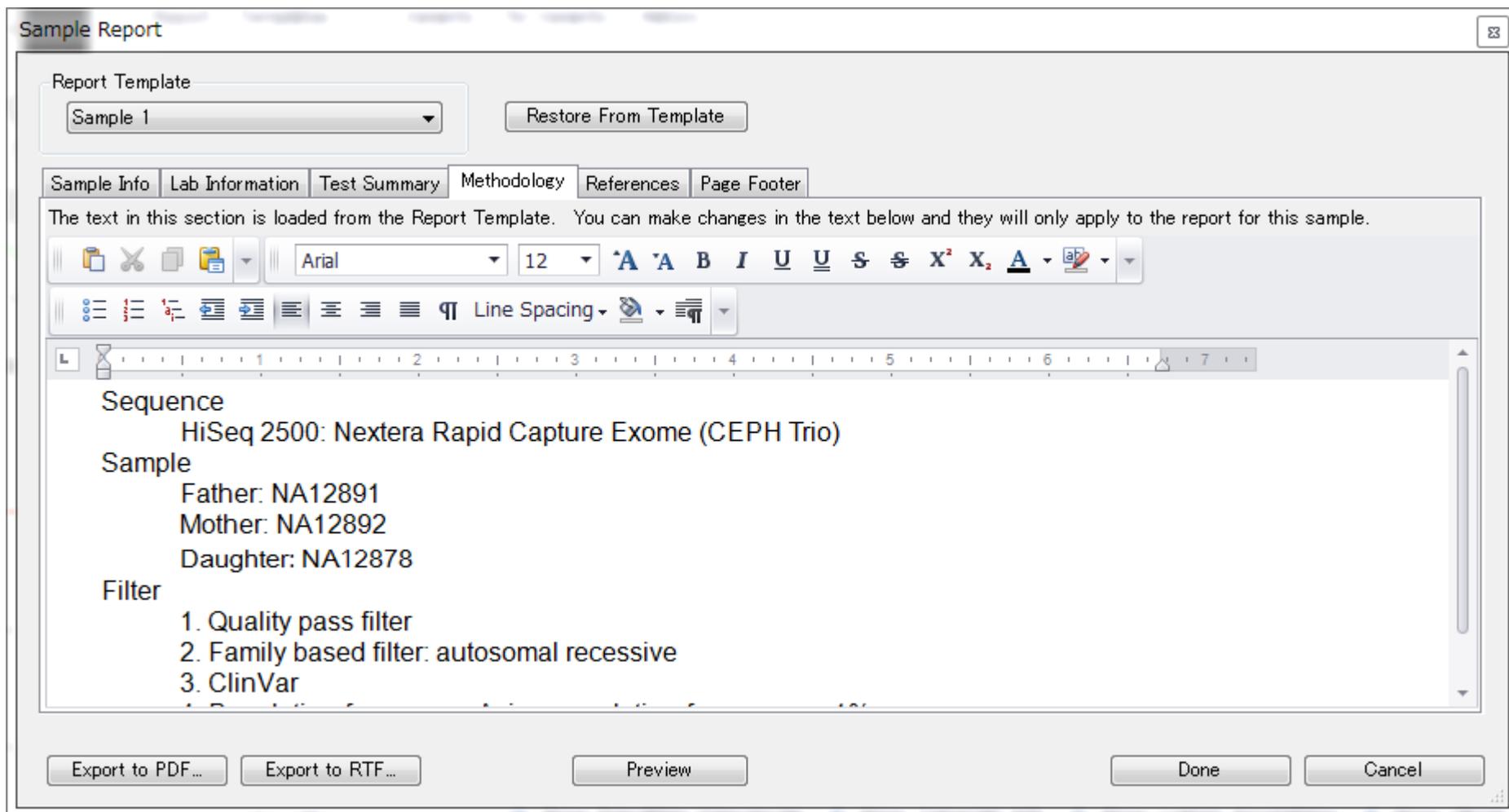
Import Sample Information

Click Import to import sample information from a text file. The text file must have two columns separated by either a comma or a tab. The first column contains the field, such as Sample Name and Date of Birth, and the second column contains the value for the field, such as John Doe and Jan 1, 1990.

Import...

Export to PDF... | Export to RTF... | Preview | Done | Cancel

レポートを作成：解析方法



PDFレポートの出力

Sample Information

John Doe and Jan 1st 1990 FC1-NA12898

Test Summary

Signature:

Results

Gene	Variant	Classification
TYR	NM_000372.4:c.1205G>A	Presumed Pathogenic
DHODH	NM_001361.4:c.454G>A	Pathogenic
DHODH	NM_001361.4:c.1036C>T	Pathogenic

Methodology

Sequence

HiSeq 2500: Nextera Rapid Capture Exome (CEPH Trio)

Sample

Father: NA12891
Mother: NA12892
Daughter: NA12878

Filter

1. Quality pass filter
2. Family based filter: autosomal recessive
3. ClinVar
4. Population frequency: Asian population frequency < 1%

References

Results

Gene	Variant	Classification	Details
TYR	NM_000372.4:c.1205G>A	Presumed Pathogenic	
DHODH	NM_001361.4:c.454G>A	Pathogenic	
DHODH	NM_001361.4:c.1036C>T	Pathogenic	

Methodology

Sequence

HiSeq 2500: Nextera Rapid Capture Exome (CEPH Trio)

Sample

Father: NA12891
Mother: NA12892
Daughter: NA12878

Filter

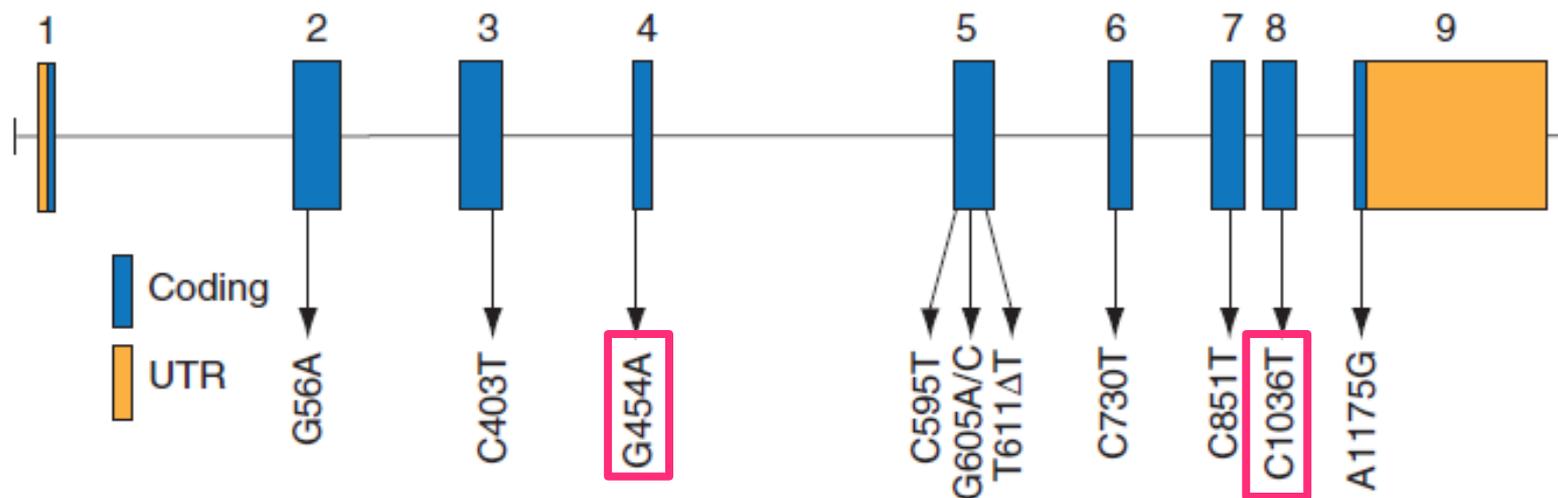
1. Quality pass filter
2. Family based filter: autosomal recessive
3. ClinVar
4. Population frequency: Asian population frequency < 1%

QUESTIONS ?

補足: Miller 症候群の原因変異

原因候補遺伝子: DHODH

- ▶ 同様の症状を持つ11人を6家系から集め、同遺伝子のバリエントを調べた結果、全ての被検者において、この遺伝子にバリエントが発見された



Ng SB, et al., Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat Genet.* 2010 Jan;42(1):30–5. Epub 2009 Nov 13.

2015年10月8日
日本臨床検査自動化学会 第47回大会
第16回遺伝子・プロテオミクス技術セミナー

次世代シーケンサーの 臨床研究への応用と今後

イルミナ株式会社
シーケンシングスペシャリスト
鈴木 健介

illumina 沿革

- ▶ 1998 米国サンディエゴにて設立
- ▶ 2000 株式公開
- ▶ 2003 日本法人イルミナ株式会社設立
- ▶ 2007 Solexa社買収(次世代シーケンサー)
- ▶ 2008 NASDAQ-100に選出
- ▶ 2009 フォーブス誌 Fastest Growing Technology Company にて1位に選出
- ▶ 2013 「MIT Technology Review」50 Disruptive Companies (世界の革新的な50の企業)に選出



本社
従業員数 米国カリフォルニア州サンディエゴ
3,000名以上

日本法人
事務所 イルミナ株式会社
東京オフィス / 大阪オフィス
従業員数 83名(サポート部 39名)



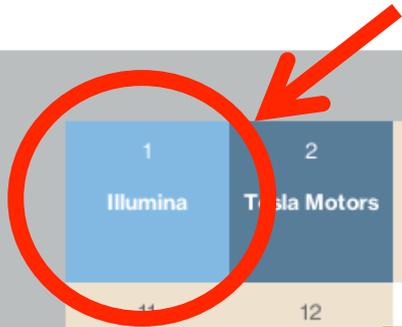


50 SMARTEST COMPANIES

Introduction
The 50 Companies
FAQ

Illumina on Top
Tesla's Tech Advantage
Google's Next Act
Third Rock is Biotech's Top VC
Cree: Reinventing the Lightbulb

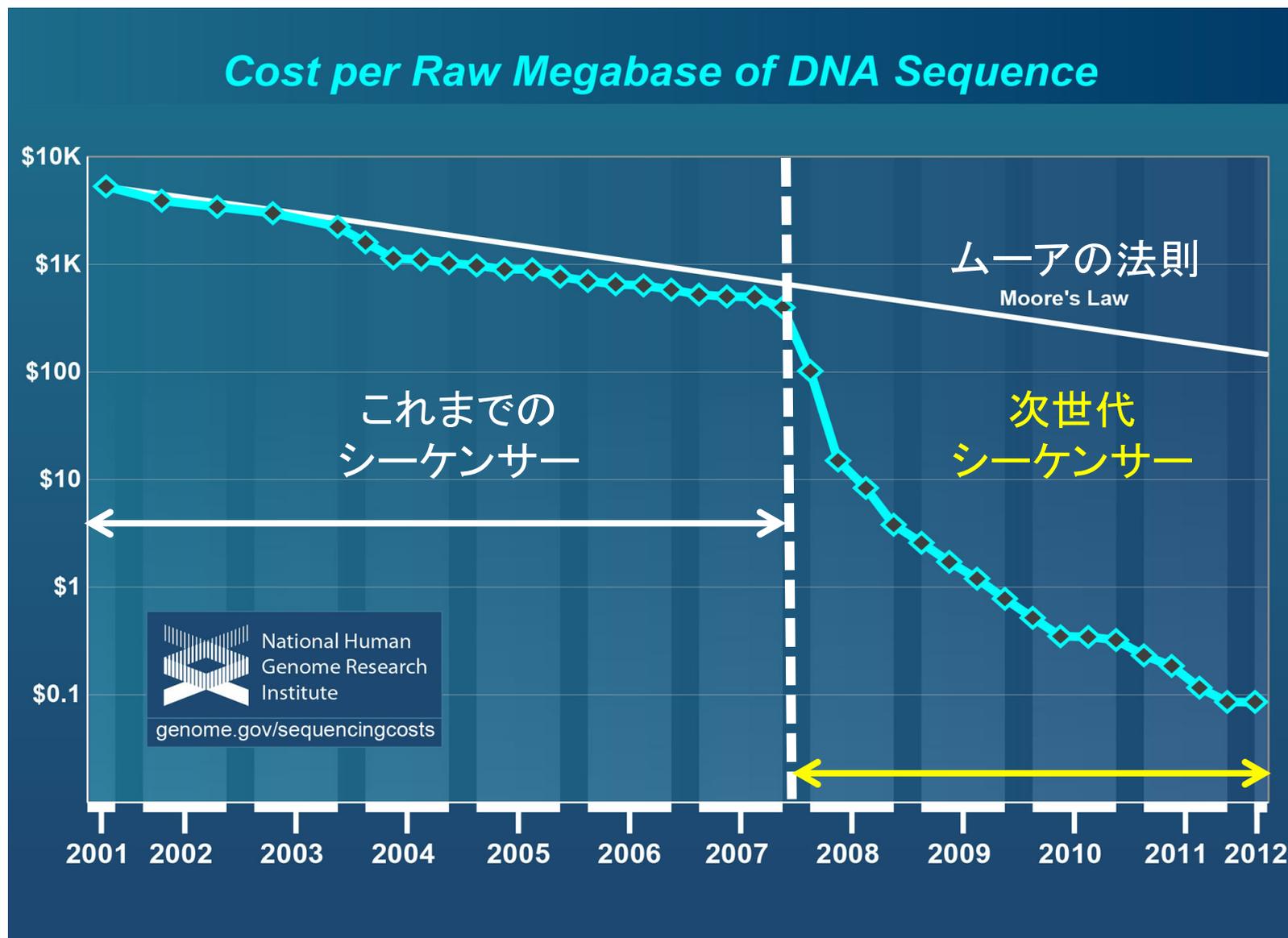
1366: Solar Survivor
Xiaomi's Smartphone Success
Cheap Gas from Siluria
Upworthy: Going Viral
Ripple Labs: New Money



1 Illumina	2 Tesla Motors	3 Google	4 Samsung	5 Salesforce.com	6 Dropbox	7 BMW	8 Third Rock Ventures	9 Square	10 Amazon
11 Tencent	12 Snapchat	13	14	15	16	17	18	19	20
21 SpaceX	22 Kickstarter								
31 Oculus VR	32 Qihoo 360 Technology								
41 Siluria Technologies	42 Kailima Bio-Agritech								

2014年
MIT Technology Review
SMARTEST COMPANIES
第1位

DNAシーケンサーの100万塩基あたりの解読コスト



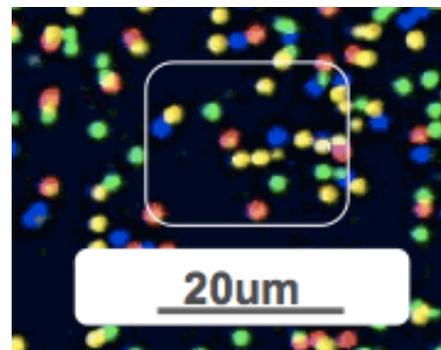
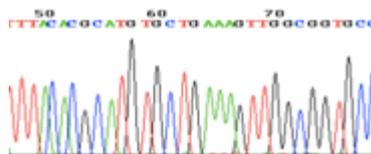
次世代シーケンサー開発におけるブレイクスルー

鋳型調製
スループット
向上



フローセル1枚で
96穴プレート
3000万枚分
の鋳型を増幅

検出感度
向上



数umの
千分子の
程度の
DNAを解析

データ
処理能力
向上



小型の
ワーク
ステーション
で大量の
データ処理

イルミナ次世代シーケンサー一覽

\$1000ゲノム
達成!

デスクトップ型

大型

MiSeq

NextSeq 500

HiSeq 2500

HiSeq 4000

HiSeq X Ten



データ量

15 Gb

120 Gb

1,000 Gb

1,500 Gb

1,800 Gb

最大リード長

300x2

150x2

250x2

150x2

150x2

Gbあたりの
コスト

約 1.7 万円

約 0.6 万円

HO 約 0.6 万円
RR 約 0.8 万円

約 0.5 万円

約 0.1 万円

アプリ
ケーション

ターゲット

ターゲット

RNA-Seq

RNA-Seq

RNA-Seq

エクソーム

エクソーム

エクソーム

全ゲノム

全ゲノム

全ゲノム

全ゲノム

MiSeq Dx システム*

世界で初めて体外診断目的で
FDA認可およびCEマーク

嚢胞性繊維症アッセイ & ユニバーサル試薬

“個別化医療の約束を
理解する手助けとなる画期的な出来事”
Francis Collins – NIHディレクター



*日本国内での発売開始時期未定

等量のデータを得るためには



8,000

1



1日あたり3730XL 1Mbの場合

大量データの効果：アナログからデジタルへ

蛍光強度 から リード数カウント へ

キャピラリーシーケンサー

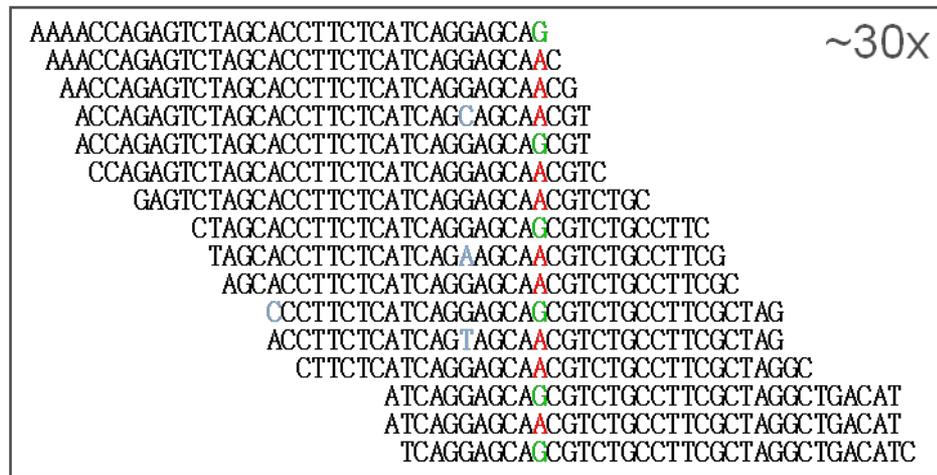
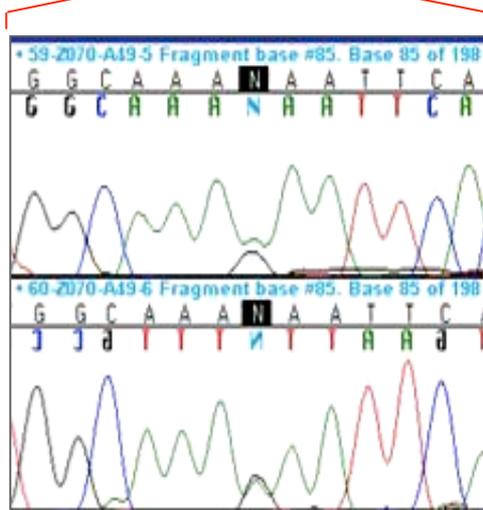
次世代シーケンサー



遺伝子

アンプリコン \rightleftharpoons

アンプリコン \rightleftharpoons



シーケンス

A
G

多型

A 9リード
G 7リード

大量データの効果：癌関連の複数遺伝子を一気に解析 TruSight Tumor (26 genes)

業界ガイドライン

新規または臨床試験

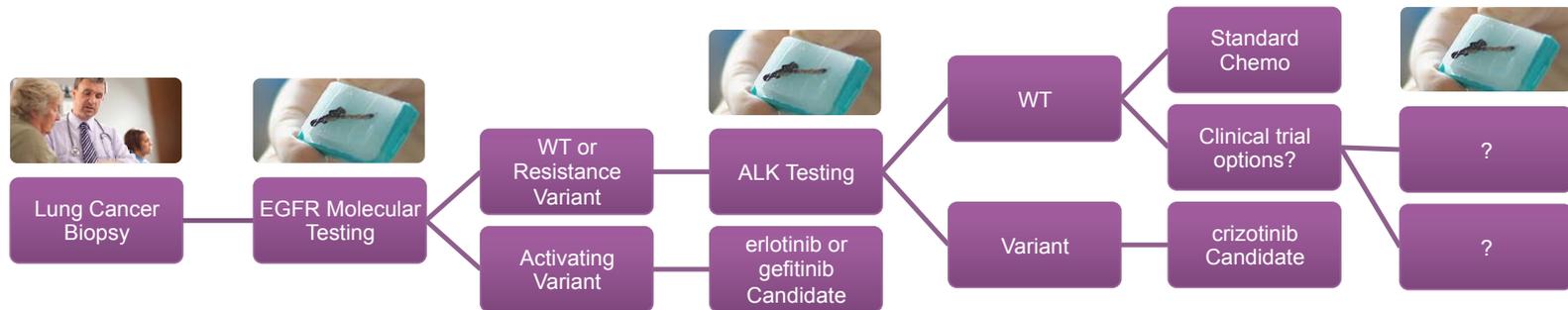
肺癌		大腸癌		メラノーマ		胃癌		卵巣癌	
EGFR	KRAS	KRAS	BRAF	BRAF	KIT	KIT	PDGFRA		
AKT1	PIK3CA	AKT1	PIK3CA	GNAQ	KRAS	AKT1	FGFR2	AKT1	ERBB2
ALK	PTEN	APC	PTEN	MAP2K1	NRAS	PIK3CA	p53	PTEN	p53
BRAF	p53	CTNNB1	SRC	PIK3CA	PTEN				
CTNNB1	MAP2K1	EGFR	p53						
MET	NRAS	FBXW7	MET						
		NRAS							

A Shared Vision: A Universal Oncology Test

Revolutionizing the clinical paradigm for Oncology Rx

Today

Iterative testing increases demands for tissue, time to action, and costs



Future

Universal Oncology testing informs approved therapies and guides access to experimental therapies; minimizes tissue burden; potentially reduces time to action; and improves outcomes

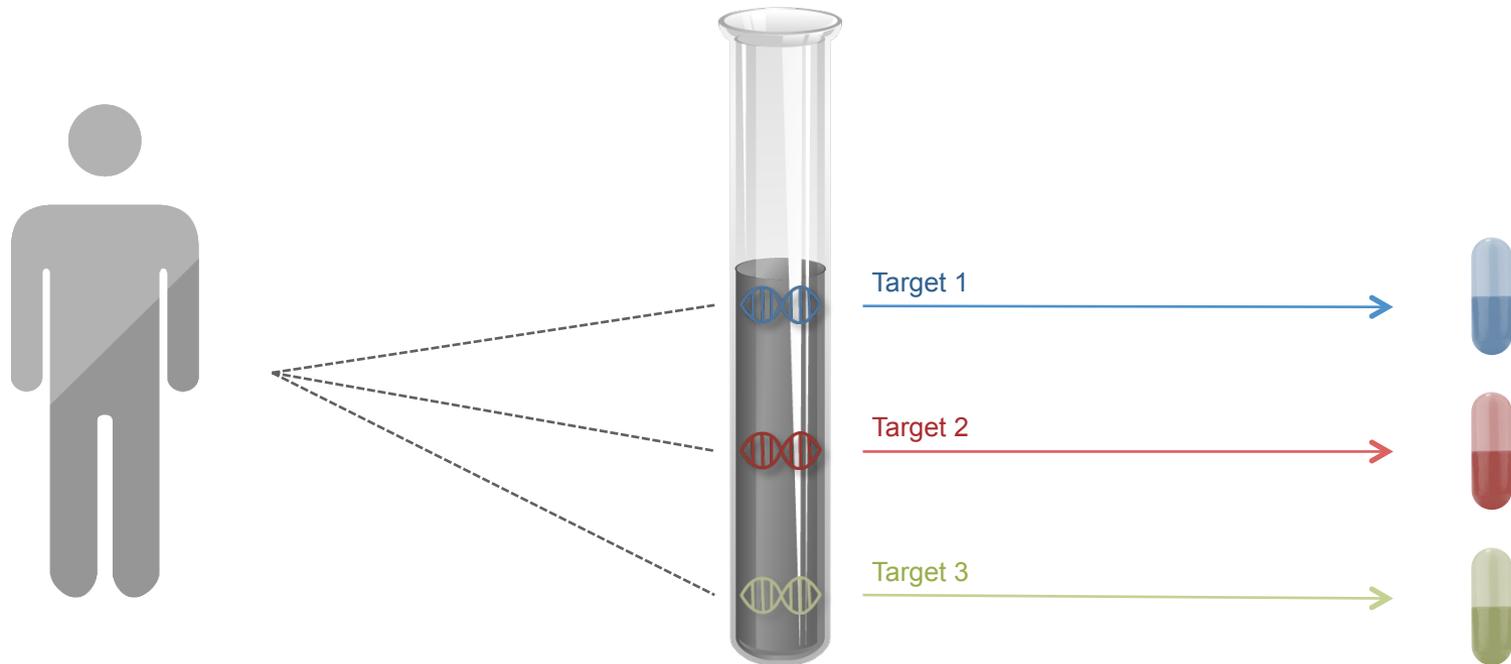


Companion Therapeutic

患者

The (One) Test
(複数の遺伝子ターゲット)

治療薬



大量データの効果：複数遺伝子の塩基配列を一気に解析 TruSight One (4,813 genes)

4,813

遺伝子をターゲット

HGMD + OMIM
(1,966 遺伝子)

GeneTests.org
(69 遺伝子)

TruSight
(2,778 遺伝子)

12Mb

のコーディング領域

神経発達疾患

発作性疾患

神経変性疾患

心疾患

腫瘍

代謝疾患

感覚器疾患

全ゲノムシーケンスを用いた乳児疾患の同定

5ヶ月の乳児
発達遅延、
低血圧症、発作の
症状あり

HiSeq で全ゲノム
解析

銅代謝に関与する
遺伝子に変異を
確認

メンケス症と診断



2012年
解析から結論に
要したのはわずか50
時間

大量データの効果：解析サンプル数が多い場合、作業が効率的

例えば192ターゲット領域を96サンプル解析するには

キャピラリーシーケンス

鋳型調製, PCR, 精製



- 96穴プレートを192枚



テンプレート定量



- 96穴プレートを192枚



シーケンス



- 96穴プレートを192枚

2-3週



NGS



- 1ウェルで96箇所同時増幅



- 96サンプルを混合

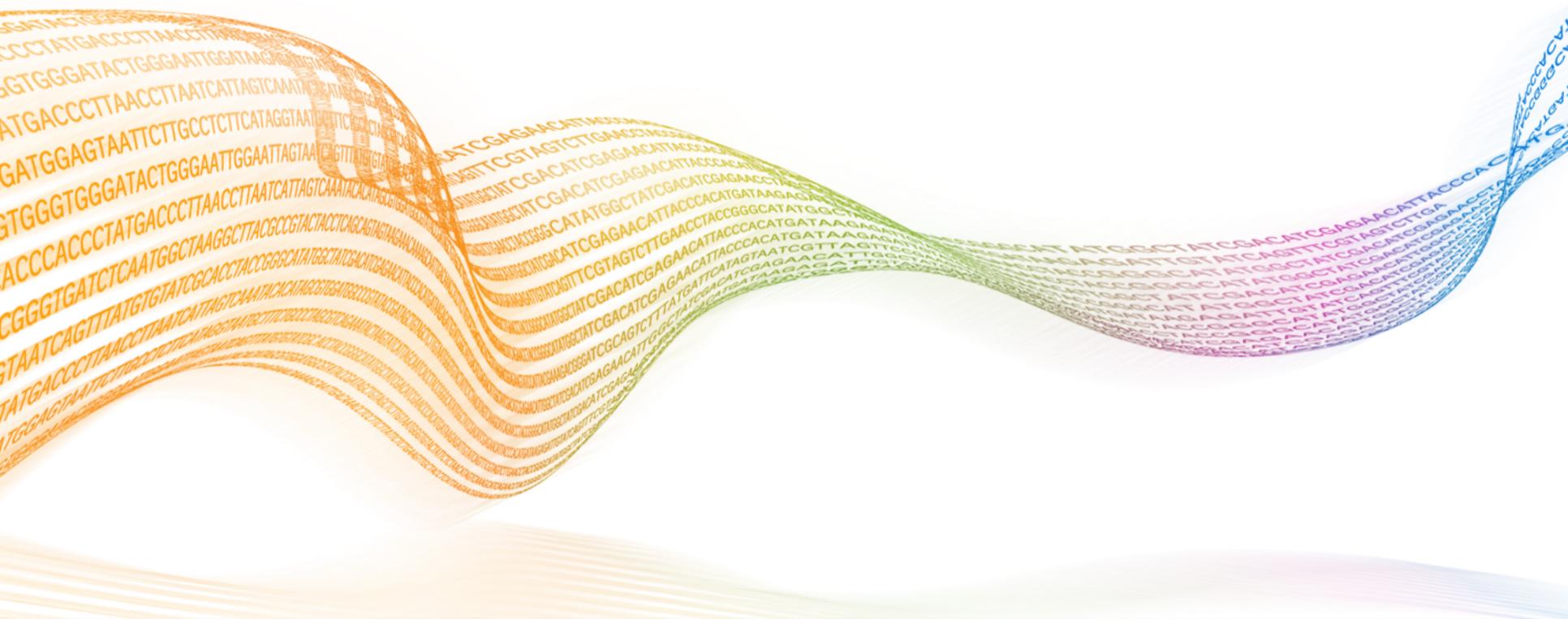


- 1ランで同時解析

2日

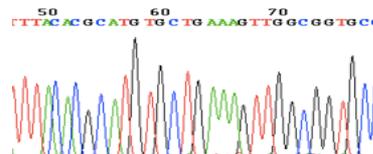
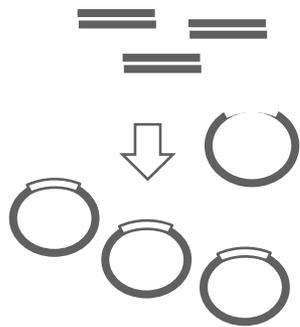


次世代シーケンサーのワークフロー



イルミナシーケンスワークフロー

サンガー法



ライブラリー作製

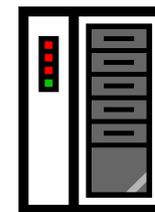
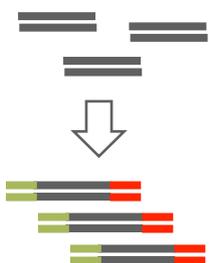
DNA増幅

シーケンス

データ解析

ライブラリー作製

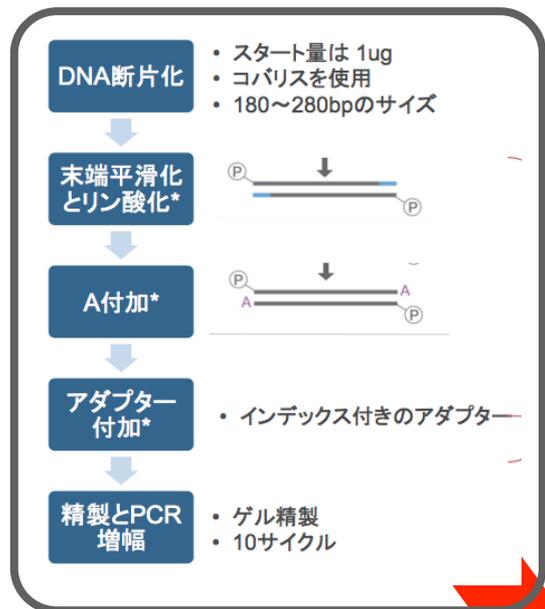
クラスター形成



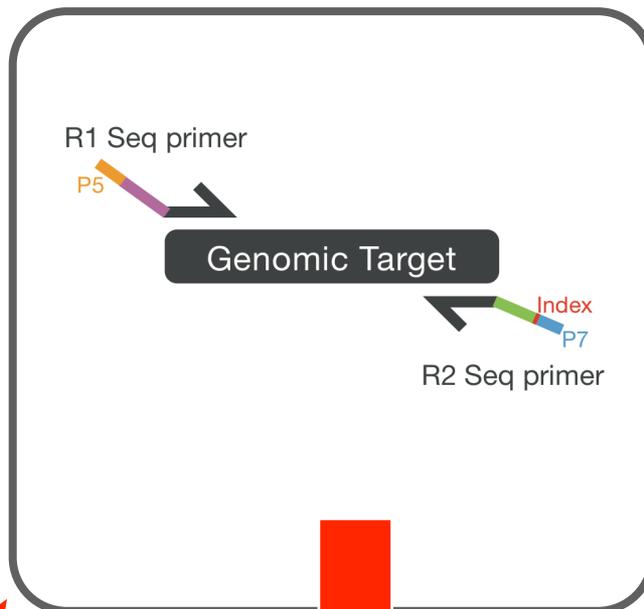
イルミナ次世代

サンプル調製

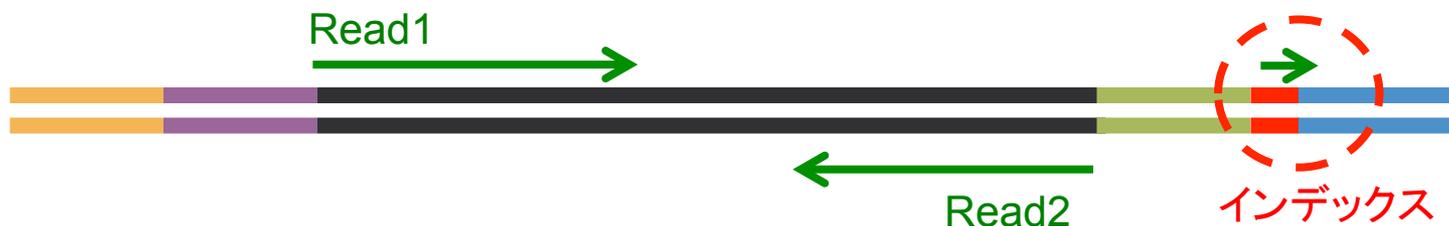
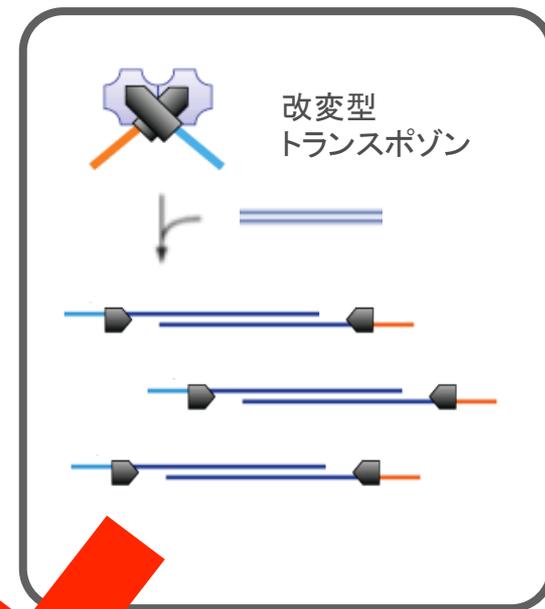
TruSeq DNA サンプル調整キット
(物理的断片化装置必要)



Tailed PCR



Nextera
酵素を使った断片化と
アダプターライゲーション



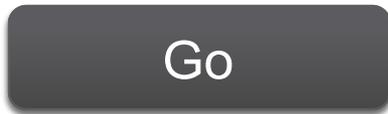
シンプルで使いやすいワークフロー

- ▶ カートリッジ式の試薬キット
 - DNA増幅(クラスター形成)、SBSおよびペアエンド用試薬
 - ペアエンド用の流路はMiSeqに内蔵
- ▶ RFIDを採用した試薬とフローセルのトラッキング
- ▶ 簡潔で自動化されたワークフロー



シンプルで使いやすいワークフロー

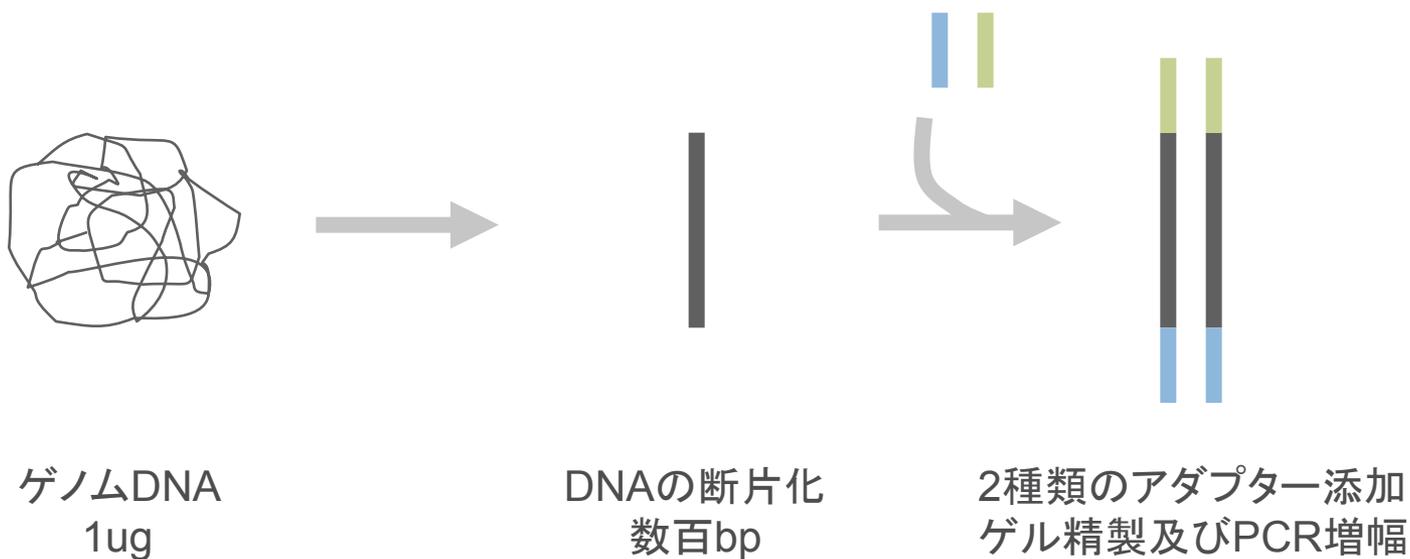
- ▶ カートリッジ式の試薬キット
 - DNA増幅(クラスター形成)、SBSおよびペアエンド用試薬
 - ペアエンド用の流路はMiSeqに内蔵
- ▶ RFIDを採用した試薬とフローセルのトラッキング
- ▶ 簡潔で自動化されたワークフロー



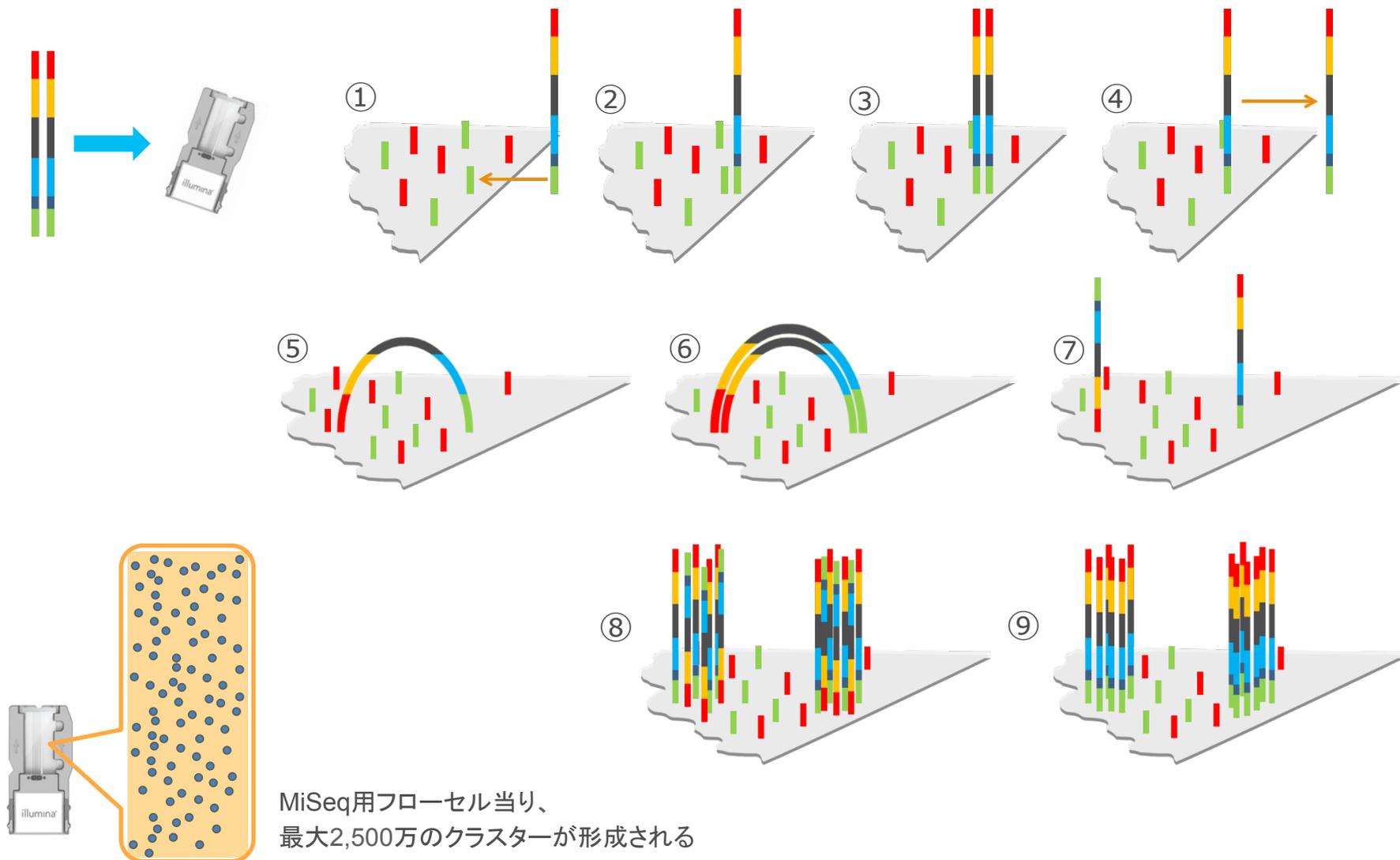
イルミナシーケンサー原理

サンプル調製

- ▶ 微量のDNAからスタート
- ▶ アプリケーションごとに最適化された試薬キットの提供

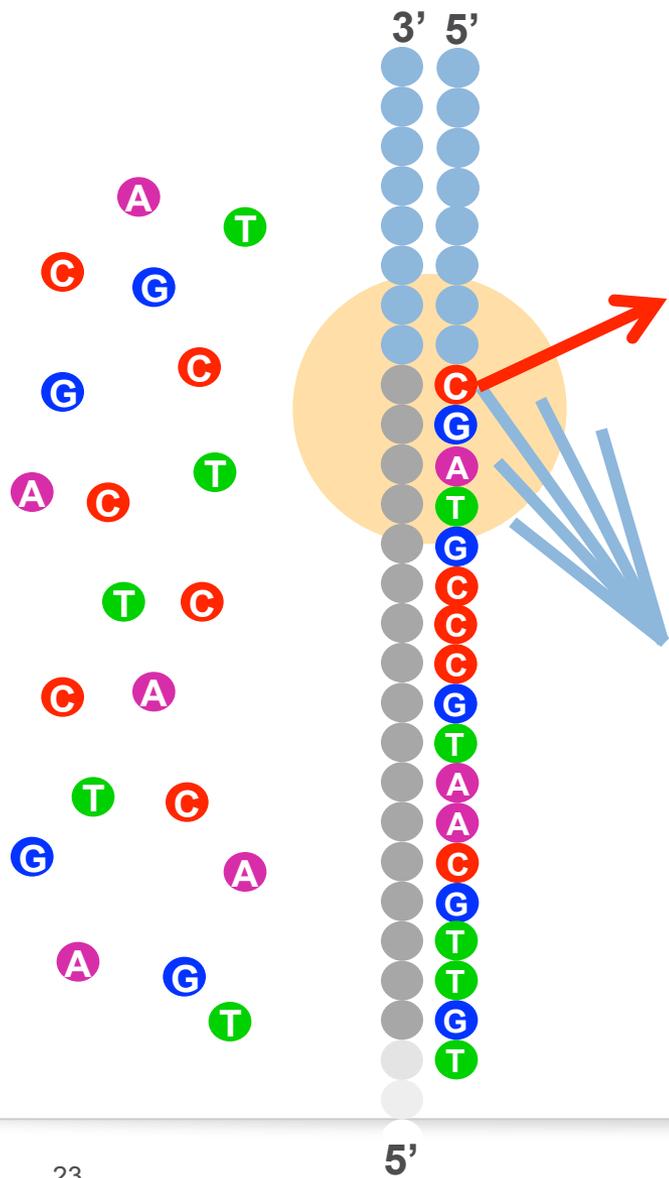


クラスター形成工程



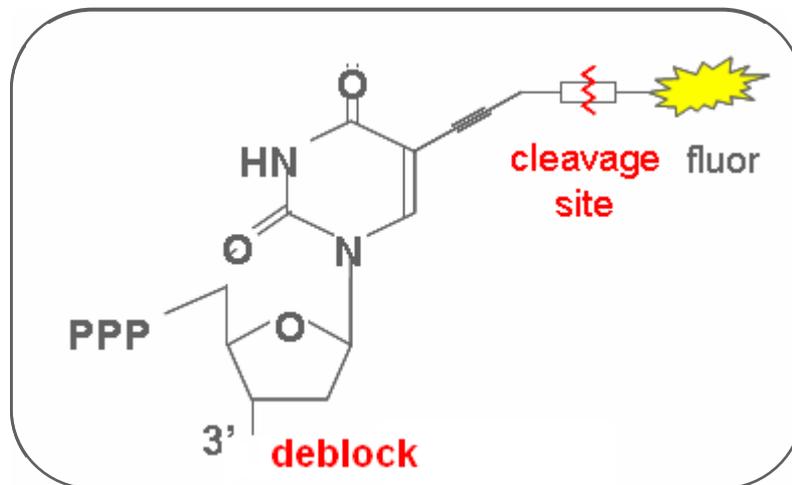
イルミナシーケンサー原理

シーケンス (Sequence-by-Synthesis: SBS法)



Cycle 1

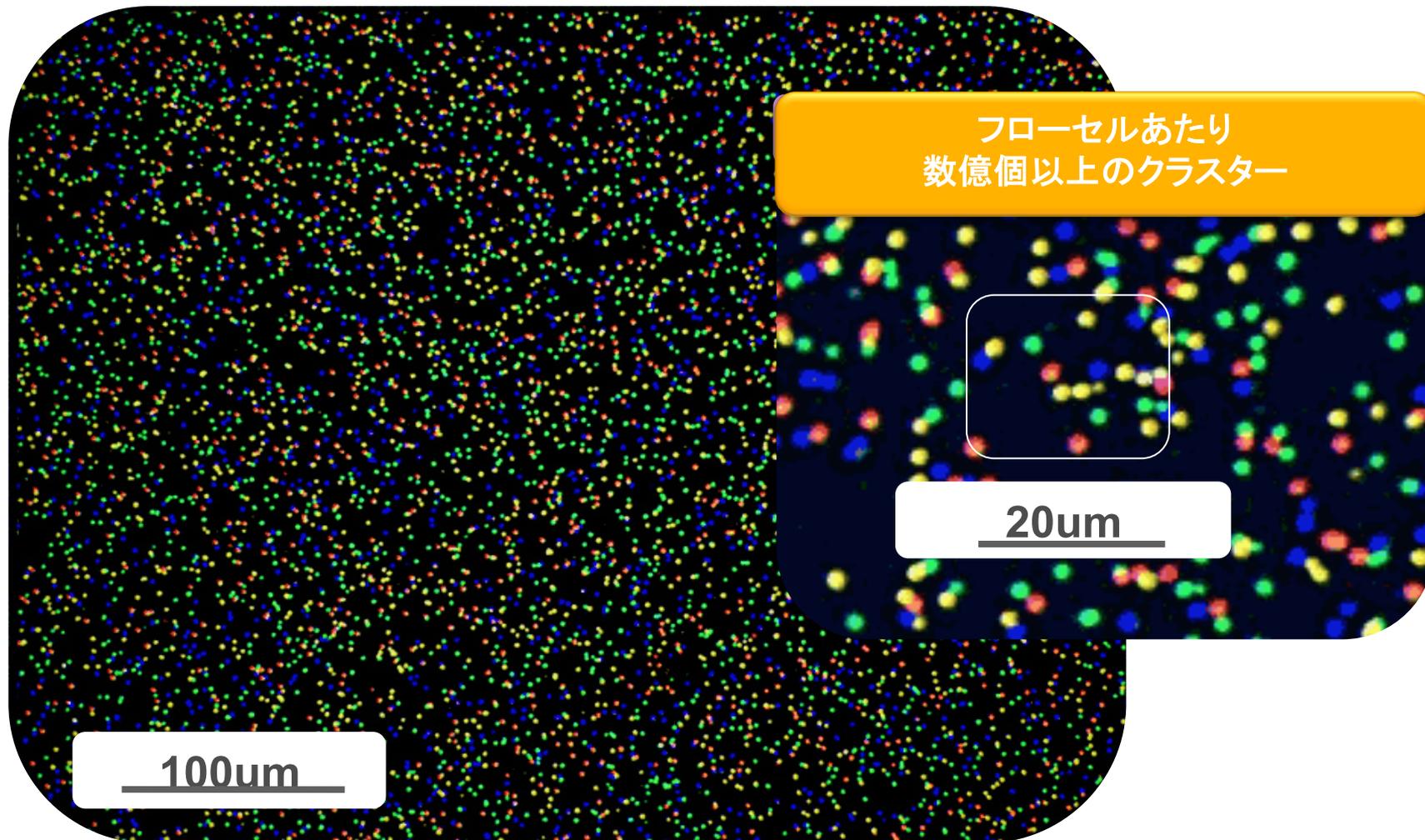
- ▶ シーケンス試薬の添加
- ▶ 1塩基伸長反応
- ▶ 未反応試薬の除去
- ▶ 蛍光シグナルの取り込み
- ▶ 保護基と蛍光の除去



イルミナシーケンサー原理

イメージ処理から塩基配列情報へ

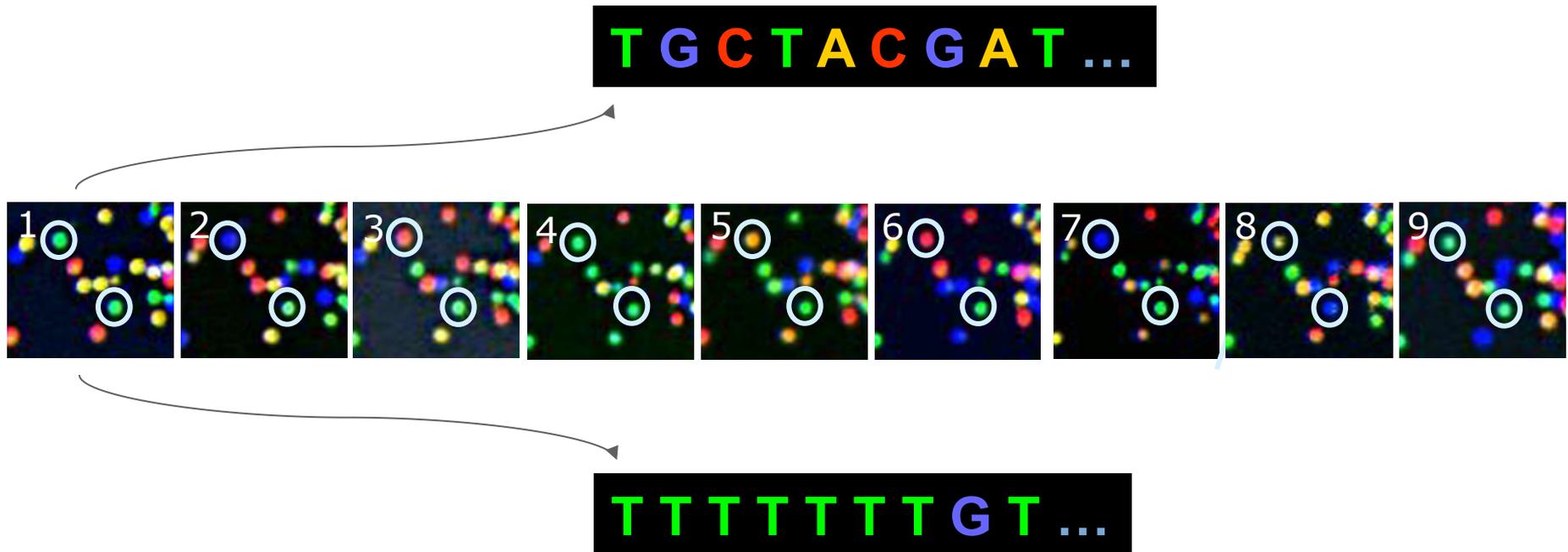
- ▶ 1回のサイクル終了後のイメージ



イルミナシーケンサー原理

イメージ処理から塩基配列情報へ

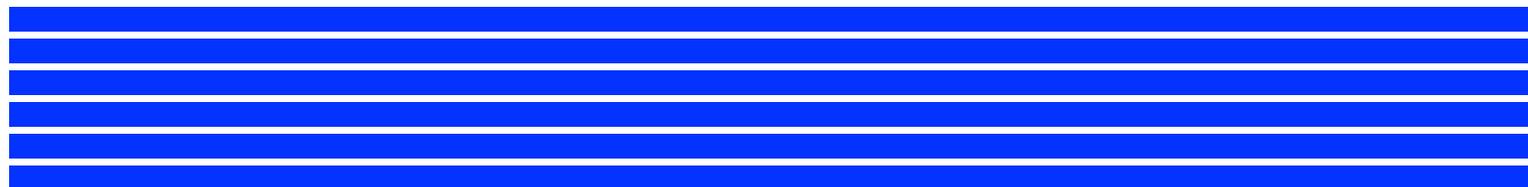
- ▶ 色の情報を塩基配列に変換



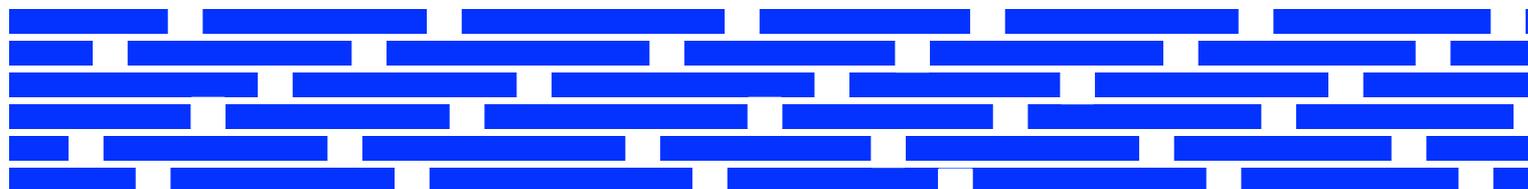
1塩基伸長反応ごとに蛍光イメージをとる
→ 蛍光の色から各塩基を決定する

シーケンスによるバリエーションの検出

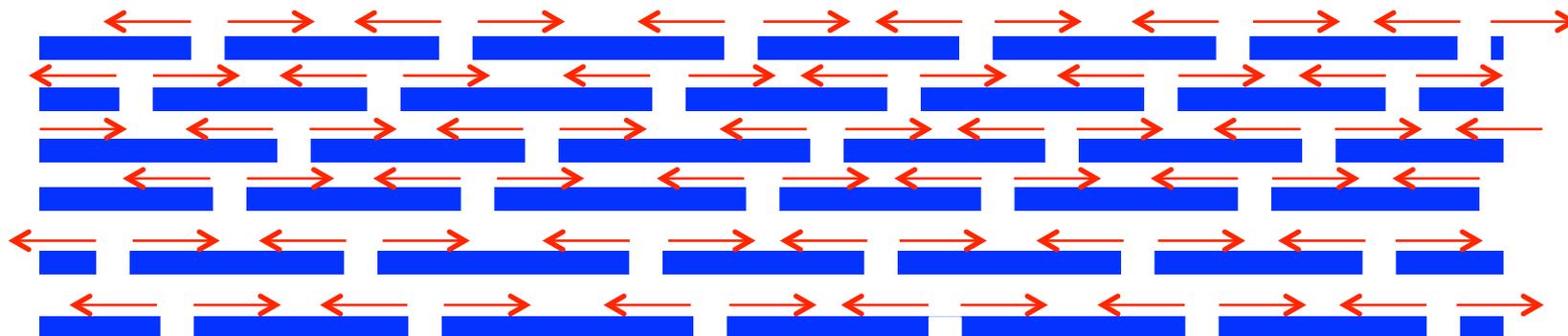
Genome DNA



断片化



シーケンス



レポート作成機能

Lab Logo

イルミナ株式会社
〒108-0014 東京都港区芝5-35-7 三田ヘルジュビル22階
03-4578-2600
http://www.illumina.co.jp/

Sample Information

Sample ID	P3049534
Sample Type	Blood
Sample Collection Date	2014/01/16
Date Reported	2014/03/23

Test Summary

概要

既知の臨床表現型に関連した4,813の遺伝子をターゲットとしたエクソームシーケンシングを実施し、常染色体劣性遺伝形式に従う遺伝子上に存在するバリエントを検出後、生物学的意味付けと医学的分類を行った。

推奨

Pathogenic - 病原性変異: CLIA認定機関において同定された臨床的に関連する変異
Presumed Pathogenic 病原性様変異: 疾患関連遺伝子上の変異で遺伝子機能への影響が危惧される変異
Unknown Significance 意義不明: 疾患関連遺伝子上の変異

Signature:

Results

Gene	Variant	Classification	Details
AGRN	NM_198576.3:c.755C>T	Pathogenic	
AGRN	NM_198576.3:c.6057C>T	Presumed Pathogenic	
CDK11A	NM_024011.2:c.380G>A	Presumed Pathogenic	

For research use only

1/2

概要

既知の臨床表現型に関連した4,813の遺伝子をターゲットとしたエクソームシーケンシングを実施し、常染色体劣性遺伝形式に従う遺伝子上に存在するバリエントを検出後、生物学的意味付けと医学的分類を行った。

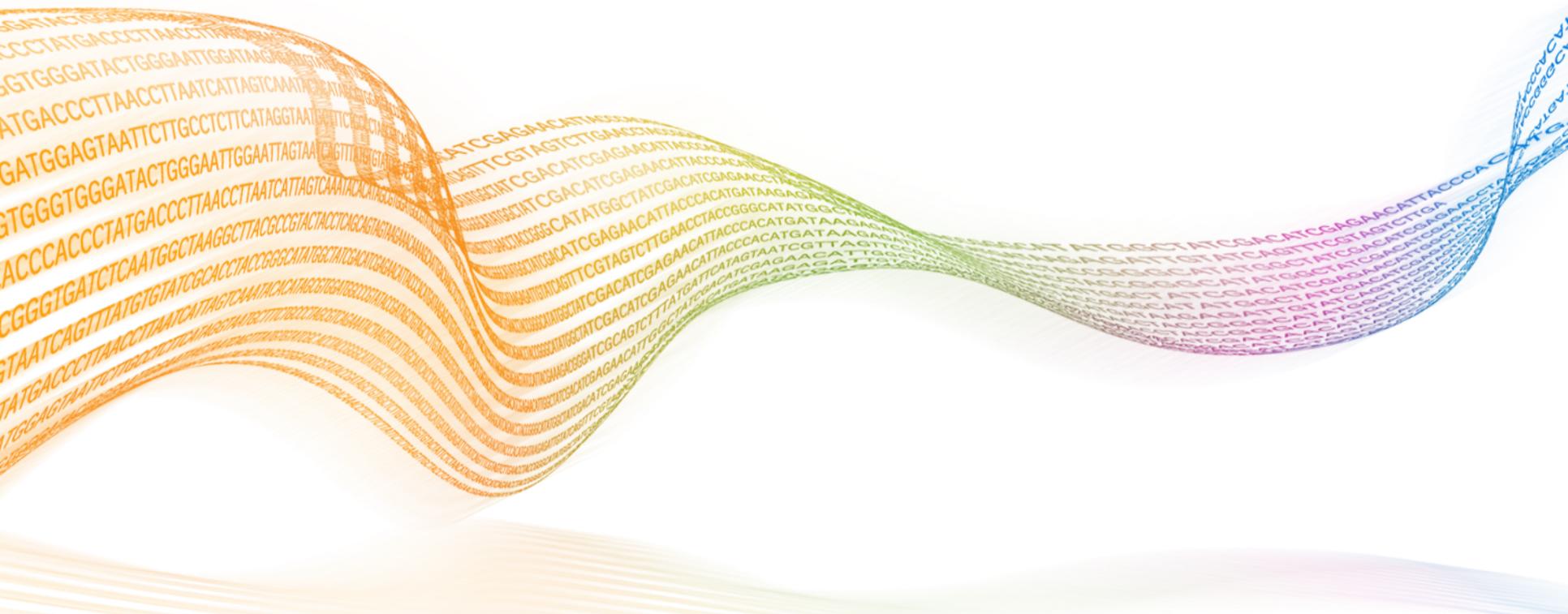
推奨

Pathogenic - 病原性変異: CLIA認定機関において同定された臨床的に関連する変異
Presumed Pathogenic 病原性様変異: 疾患関連遺伝子上の変異で遺伝子機能への影響が危惧される変異
Unknown Significance 意義不明: 疾患関連遺伝子上の変異

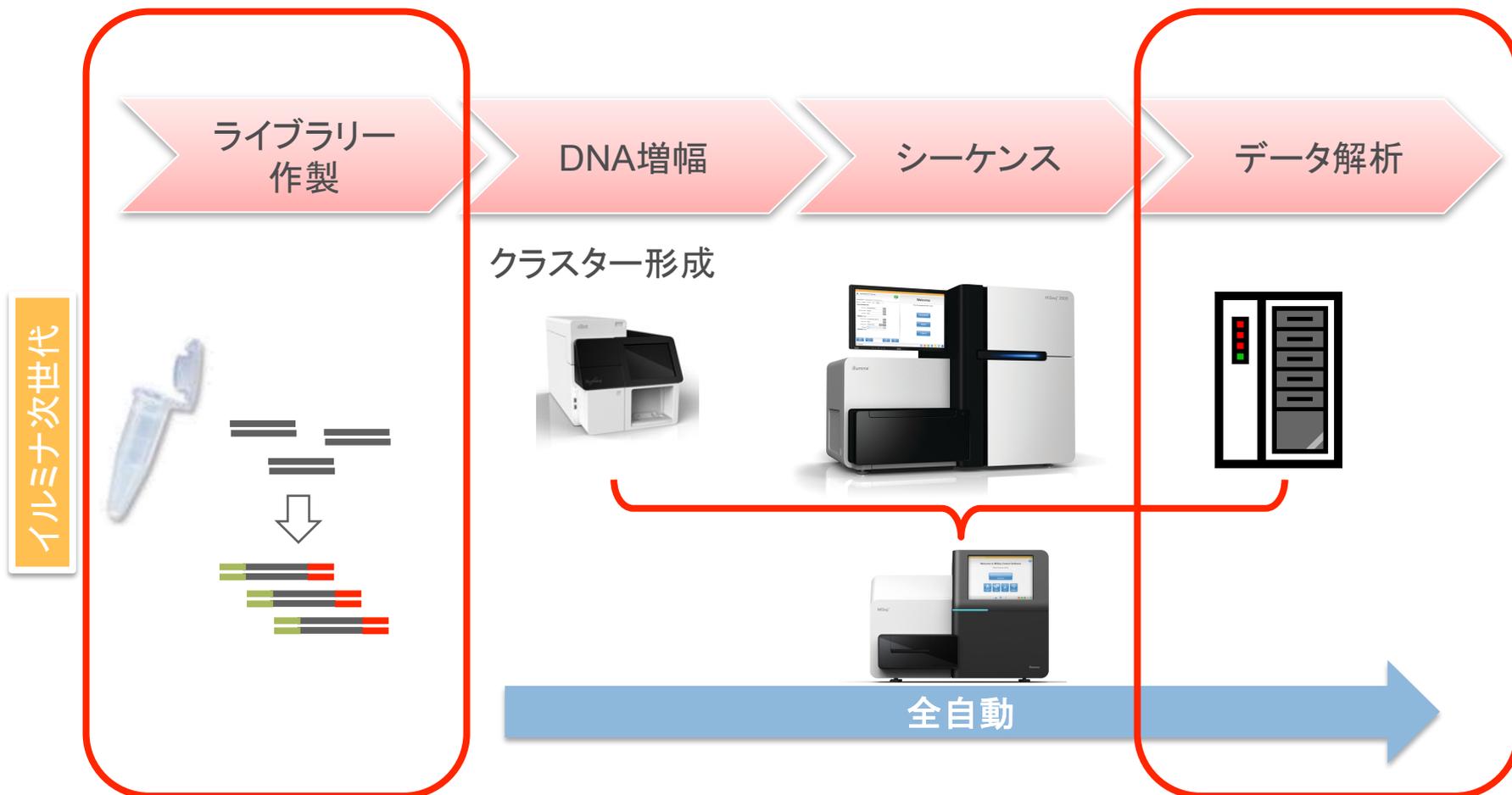
Results

Gene	Variant	Classification	Details
AGRN	NM_198576.3:c.755C>T	Pathogenic	
AGRN	NM_198576.3:c.6057C>T	Presumed Pathogenic	
CDK11A	NM_024011.2:c.380G>A	Presumed Pathogenic	

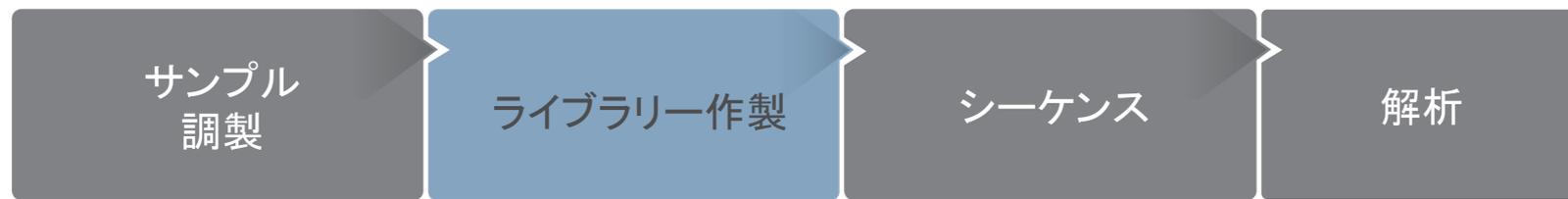
次世代シーケンサーの課題



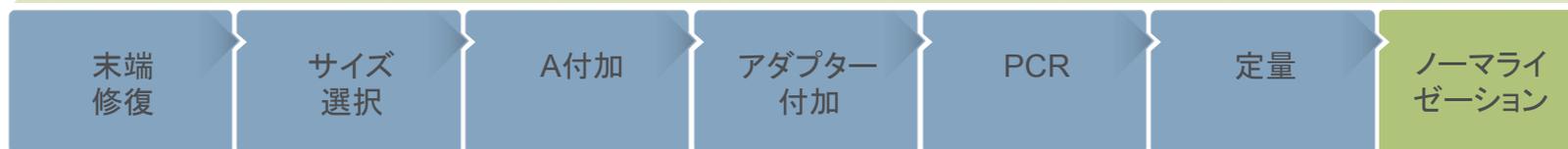
イルミナシーケンスワークフロー



チャレンジングなライブラリー作製



- 時間がかかる
- マニュアルエラーのリスク
- トレーニング、スキル、経験が必要
- 消耗品の山
- 日差間、ユーザー間での変動



次世代のライブラリー調製



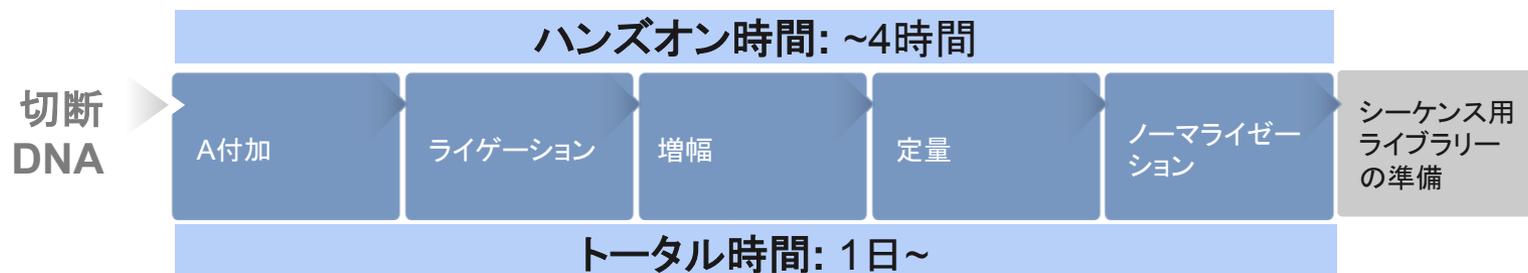
簡便性と効率性

NeoPrep DNA ワークフロー

NeoPrep Nano DNA



マニュアルDNA



データ解析の課題：小児疾患におけるWGSの分子診断の実績

- ▶ 小児疾患21例中
 - ▶ 5例が診断成功(24%)
 - ▶ 7例が診断可能(34%)
 - ▶ 9例が失敗(39%)

- ▶ 数多くのVariant of Unknown Significance (VUS)を発見

Table 1. Results of WGS at the MCW Genomics Medicine Clinic for 23 Pediatric (CHW) and 2 Adult (FH) Cases.

Pediatric case #	Clinical indication	Variants	Diagnosis
1	T cell immune deficiency	4 pathogenic, 1 VUS	No
2	Multiple congenital anomalies, lactic acidosis, leukodystrophy and seizure disorder	3 pathogenic, 11 VUS	Maybe
3	Immune deficiency	1 pathogenic, 1 VUS	No
4	Leukodystrophy	3 pathogenic, 4 VUS	Maybe
5	Intrauterine growth retardation, hair abnormalities, vomiting, chronic diarrhea, developmental delay, facial dysmorphism	2 pathogenic, 5 VUS	Yes
6	Recurrent stroke, polymyositis, chronic inflammation, recurrent unexplained fever	5 pathogenic, 5 VUS	No
7	Infantile spasms, dystonia, sensorineural hearing loss, optic nerve abnormalities	5 pathogenic, 10 VUS	No
8	Ataxia, seizures, regression	1 pathogenic, 4 VUS	No
9	Malignant nerve sheath tumor, plexiform neurofibroma	1 VUS	No
10	Dilated cardiomyopathy with recurrent hypoglycemic events	2 VUS	Maybe
11	Atypical hemolytic uremic syndrome	1 VUS	No
12	Dystonia, chorea, mental retardation, retinal and neurotransmitter abnormalities	2 pathogenic, 14 VUS	Maybe
13	Recurrent rhabdomyolysis	1 pathogenic, 6 VUS	Yes
14	Long QT syndrome, arrhythmia, neurogenic myopathy	2 pathogenic, 5 VUS	Yes
15	Seizures with combined white and grey matter degeneration	3 pathogenic, 1 VUS	No
16	Methyl malonic acidemia and spherocytosis	1 pathogenic	Yes
17	Congenital myofibromatosis	1 pathogenic, 5 VUS	No
18	Poor growth, vomiting, mental retardation, facial dysmorphism, seizure disorder	2 pathogenic, 2 VUS	Yes
19	Connective tissue disorder, aortic root dilatation, short stature, developmental delay, hypermobility	analysis in process	N/A
20	Neurological condition (microcephaly, epilepsy, mental retardation, autism) and endocrine syndrome (primary ovarian failure)	4 pathogenic, 1 VUS	Maybe
21	Neurological condition (microcephaly, epilepsy, mental retardation, autism) and endocrine syndrome (primary ovarian failure)	9 pathogenic, 2 VUS	Maybe
22	Metabolic condition, liver and renal failure, bilateral cataracts, short stature	3 pathogenic, 2 VUS	Maybe
23	Neurological condition, neurodegeneration	analysis in process	N/A
Adult case #			
24	Hypertension of unclear etiology (Executive Medicine Program)	2 pathogenic, 3 VUS	Yes
25	Colon cancer, secondary finding of Marfan syndrome	1 pathogenic, 8 VUS	Yes for Marfan syndrome; Maybe for cancer

データ解析の課題: 神経発達障害の100家系に対するゲノムシーケンス

GENOMICS

Effectiveness of exome and genome sequencing guided by acuity of illness for diagnosis of neurodevelopmental disorders

Sarah E. Soden,^{1,2,3*} Carol J. Saunders,^{1,2,3,4} Laurel K. Willig,^{1,2,3} Emily G. Farrow,^{1,2,3,4} Laurie D. Smith,^{1,2,3} Josh E. Petrikin,^{1,2,3} Jean-Baptiste LePichon,^{1,2,3} Neil A. Miller,^{1,2} Isabelle Thiffault,^{1,3,4} Darrell L. Dinwiddie,^{5,6} Greyson Twist,¹ Aaron Noll,¹ Bryce A. Heese,^{2,3} Lee Zellmer,^{1,4} Andrea M. Atherton,^{1,2,3} Ahmed T. Abdelmoity,^{2,3} Nicole Safina,^{2,3} Sarah S. Nyp,² Britton Zuccarelli,² Ingrid A. Larson,^{1,2} Ann Modrcin,^{2,3} Suzanne Herd,^{1,2} Mitchell Creed,¹ Zhaohui Ye,⁷ Xuan Yuan,⁷ Robert A. Brodsky,⁷ Stephen F. Kingsmore^{1,2,3,4}

- ▶ 米国マーシー子供病院
- ▶ 神経発達障害の100家系を対象(子供119人と両親のトリオ解析)
- ▶ 疾患の重症度によってWGS / エクソームのシーケンスアプローチを選択
- ▶ WGSにより重症な15症例のうち11症例の分子診断に成功(73%)
- ▶ 従来の効果のない検査のコストは1家族あたり\$19,100、シーケンスコストは\$7,940となり費用対効果が上がった

Soden SE, et al., Sci Transl Med. 2014 Dec 3;6(265):265ra168.

データ解析の課題：分子診断のインパクト

- ▶ エクソームとWGSの両方にて、100家系のうち45家系において遺伝性疾患の診断に成功
- ▶ 臨床医へのインタビューにより、新規に診断された家族の49%において、病態生理学の印象と患者の管理が改善
- ▶ 12症例において新規投薬をスタート
- ▶ 50時間 WGSプロコールを採用し、従来のエクソームやWGSより早い診断が可能(最短6日)

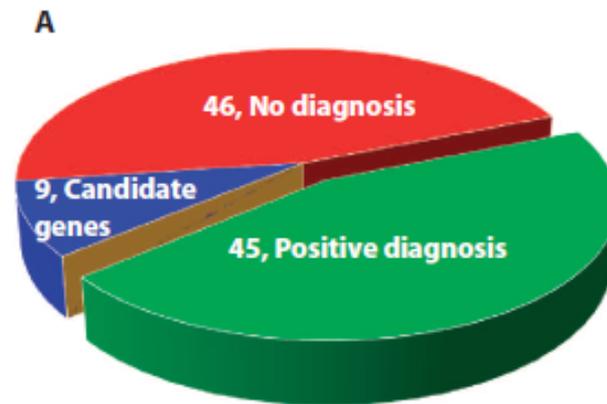


Table 2. Time to diagnosis. Average age at symptom onset, enrollment, and molecular diagnosis for children diagnosed by exome or rapid genome sequencing.

	Exome sequencing (months)		Rapid genome sequencing (days)*		
	Mean	Range	Mean	Median	Range
Symptom onset	6.6	0-90	8.2	0	0-90
Enrollment	83.8	1-252	43.2	38	2-154
Molecular diagnosis	95.3	16-262	107.5	50	8-521

*Four postmortem enrollments were excluded from time-to-diagnosis calculations.

Soden SE, et al., Sci Transl Med. 2014 Dec 3;6(265):265ra168.

課題のまとめ

▶ 全般

- NGSの自動化が進んでいる。しかし、ライブラリー作製からデータ解析までの、「サンプルからレポートまで」の、全自動化は今後の課題である。
- 現時点で、機器・試薬共に使用目的が研究に限定される。NGSを現薬機法でどのように解釈するのが薬事上の課題にもなっている。
- 臨床検査としての「品の保障」をどうするか、コミュニティ内での議論が必要である。

▶ ライブラリー作製

- 対応しているキットが少い。現在のところ、DNAの全ゲノム解析とRNAシーケンス解析のみの2種類のみの対応。エクソーム等には未対応
- 投入するDNAやRNAの品質に大きな影響を受ける。DNAやRNAの品質管理にノウハウが必要。
- より多くの遺伝子を対象とした「パネル」キットが各社で開発されつつある。今後、国内での臨床のニーズとのマッチングが必要である。

▶ データ解析

- データの解釈には遺伝学の専門知識が必要である
- 疾患の原因候補遺伝子を絞り込むことが難しい場合がまだまだ高い割合で存在する。アノテーションのデータベースを充実させ維持することが必要

イルミナサポートプログラム : iSchool

www.illumina.co.jp/ilmn-ischool

illumina iSchool で検索!

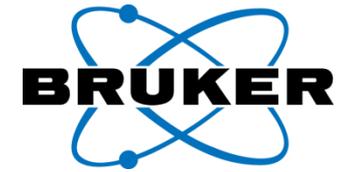


製品、技術、サイエンスの知識を強化する技術教育コース

イルミナiSchool

	ウェビナー	講習会	トレーニング
初級	製品概要	ベーシック講習会 NGSの原理など	システム操作
中級	製品の詳細紹介 使用時のポイント	イルミナ提供の Sample to Answer	ライブラリー調製
上級	トラブルシュート	3rd パーティを用いた アプリケーション	
プロフェッショナル	ユーザーによるご講演	ユーザーによるご講演	

ご清聴ありがとうございました。



MALDIバイオタイパー

Microbial identification for
the 21st century

松山 由美子

ブルカー・ダルトニクス株式会社

<http://www.bruker.jp/daltonics/index.html>

info.bdal.jp@bruker.com

MALDI バイオタイパーの歴史

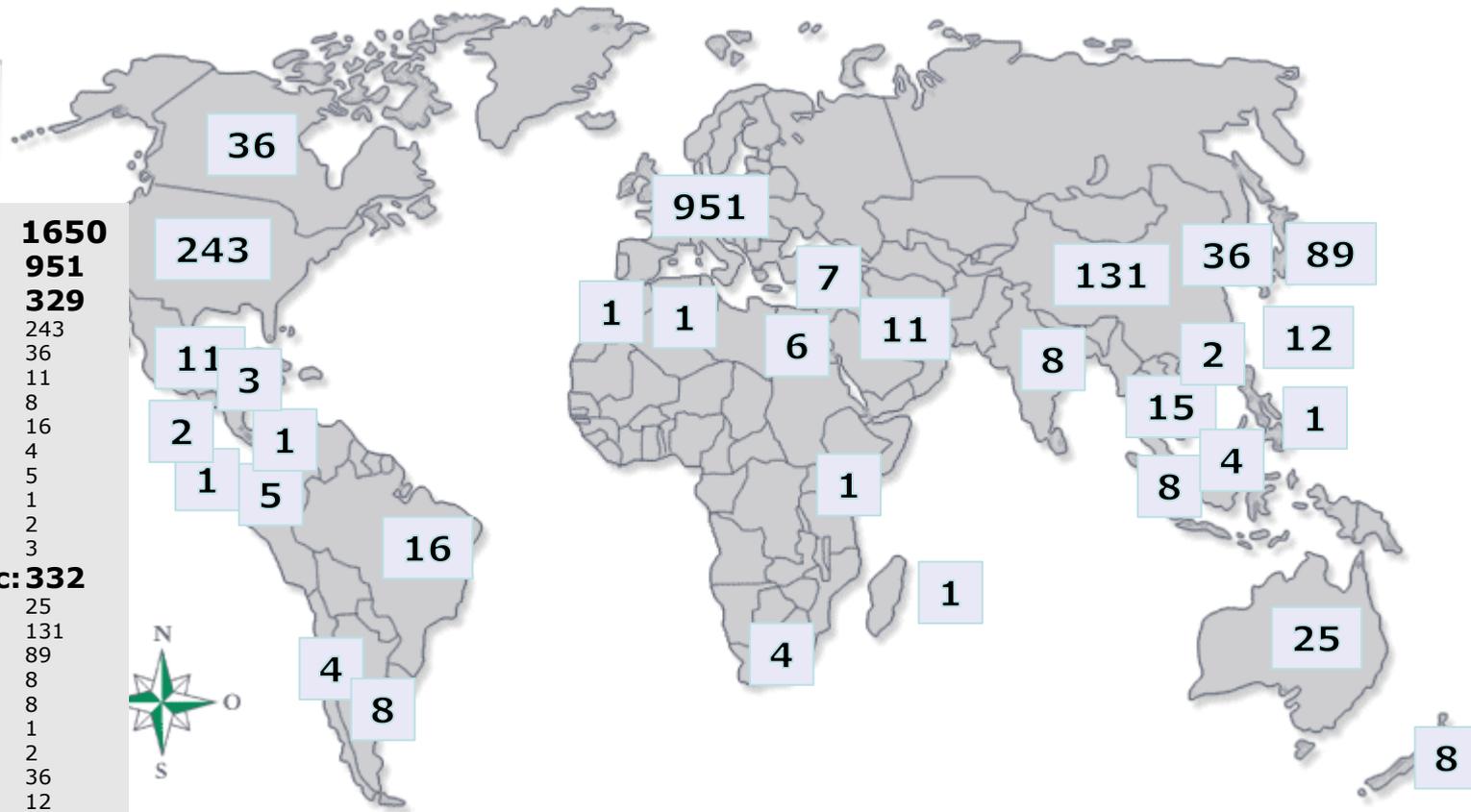
長い期間で得られた経験をもとにしたサクセスストーリー



- **1991** 最初のMALDI-TOF MSを市場へ導入したパイオニア
- **1996** MALDI-TOFを用いた微生物同定の論文発表
- **1998** 微生物 R&D グループがオペレーションを開始
- **2004** 研究用としてMALDI タイパーを発売
- **2009** EUでIVD CEマークを取得
- **2011** 日本で医療機器登録(14B3X90013MBT001)
- **2013** FDA の認可を取得
- **2015** 世界で1500台以上のMALDIバイオタイパーシステムが稼働中

World Wideでの導入実績

Global MBT Sites



Globally:	1650
Europe:	951
Americas:	329
US:	243
Canada:	36
Mexico:	11
Argentina:	8
Brazil:	16
Chile:	4
Colombia:	5
Ecuador:	1
Peru:	2
Puerto Rico:	3
Asia/Pacific:	332
Australia:	25
China/HongKong:	131
Japan:	89
New Zealand:	8
Singapore:	8
Philippines:	1
Vietnam:	2
South Korea:	36
Taiwan:	12
Thailand:	15
Malaysia:	4
IMEA:	38
India:	8
Israel:	7
Middle East:	11
Egypt:	6
Algeria:	1
Africa:	7

MALDIバイオタイパーの特長



迅速

✓ コロニー釣菌から同定まで10分以内



正確

✓ 16S rRNAシーケンス解析と高い一致率
✓ 約5,000菌株のライブラリ(データベース)



経済的

✓ 複雑な前処理もなく、専用の消耗品も不要

MALDIの基本原理

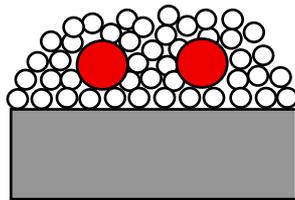
MALDI

Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization

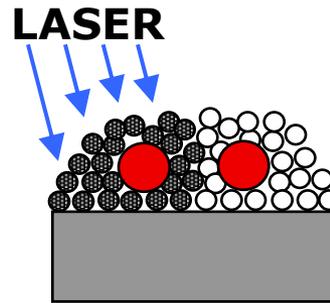
マトリックス支援レーザー脱離イオン化



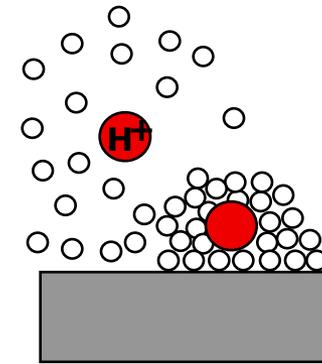
MatrixとSampleの
混合結晶



LASERによる
Matrixの励起



脱離および
イオン化(プロトン化)



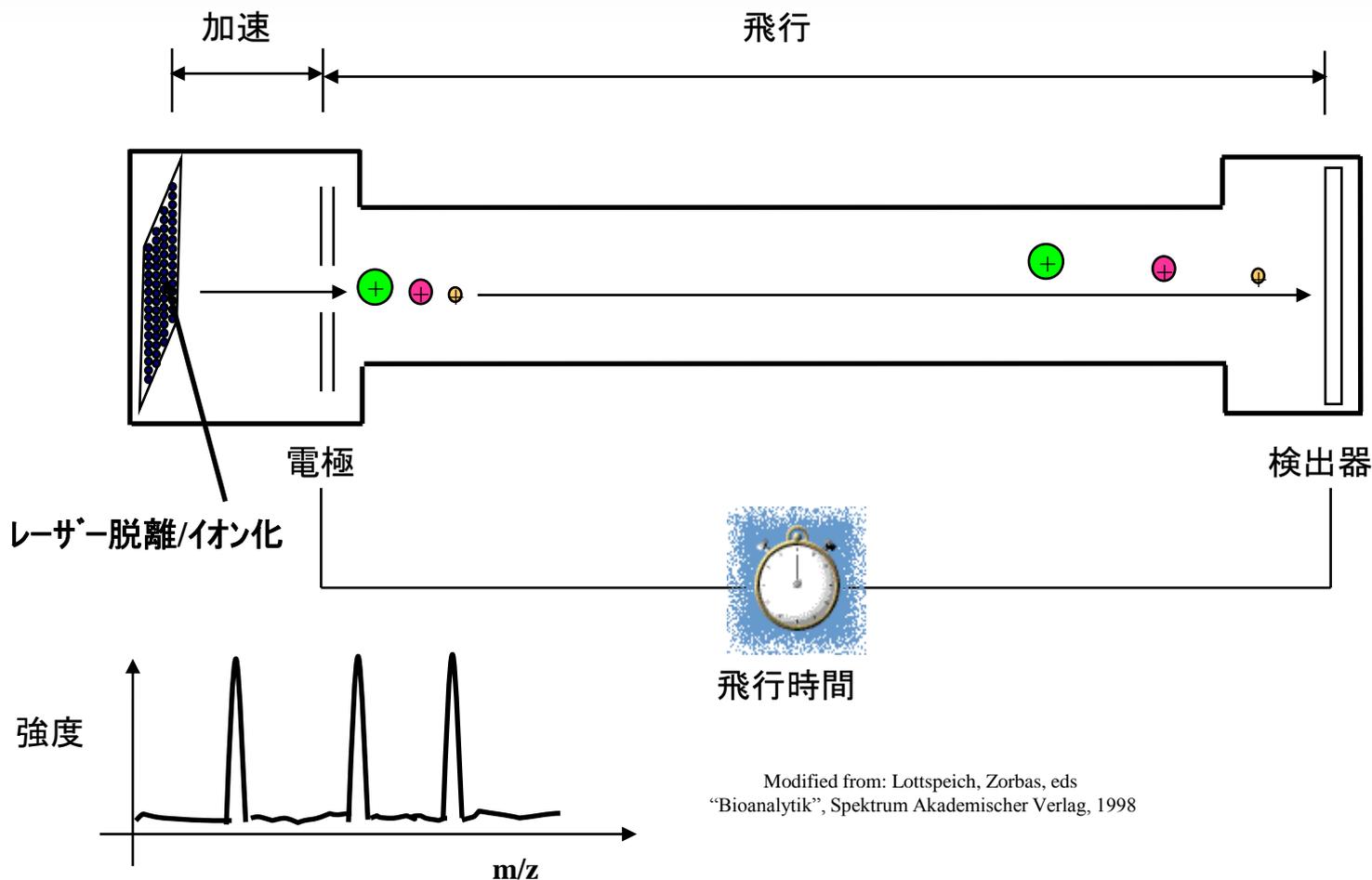
ソフトなイオン化
多価イオンを生成しづらい

全ての質量分析計は試料をイオン化するイオン化部とイオンを分離する質量分析部からなる。
MALDIはタンパク質のイオン化に適したイオン化法の一つ。

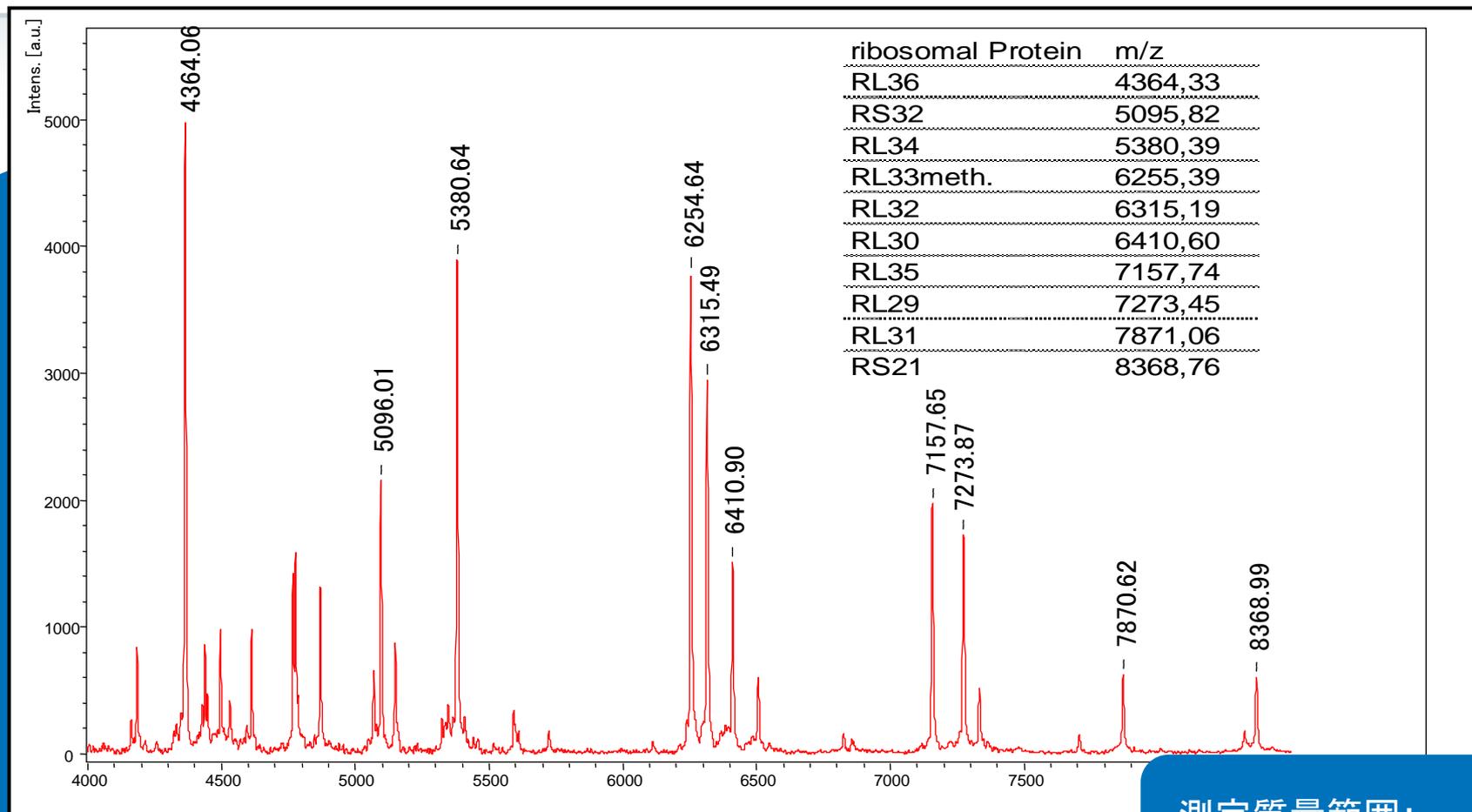
MALDI-TOF 質量分析計 原理



同じ加速度を与えられた(タンパク質)分子は質量の小さいものから早く検出器に到達。
その飛行時間を測定し質量に換算して求めるのがTOF(Time Of Flight)型質量分析計。



バクテリアのRibosomal Proteinなどのメジャーなタンパク質のスペクトルを用いて同定するため、再現性が高い



E.coli

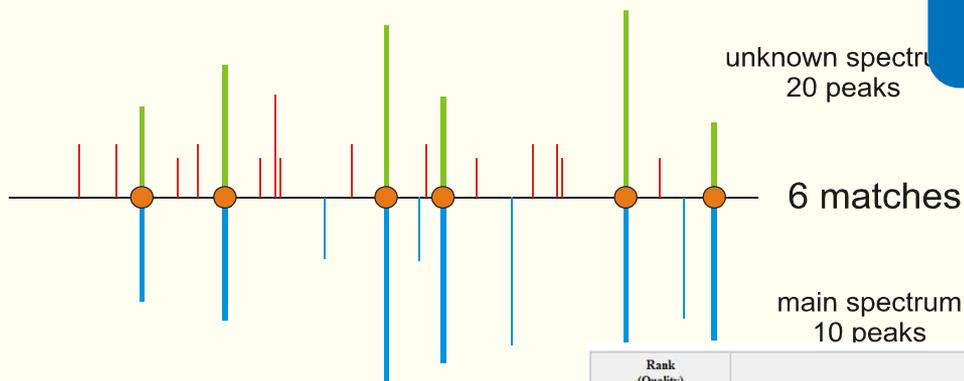
測定質量範囲:
2,000-20,000 Da

パターンマッチングで同定



2150 種以上のライブラリに対し、未知微生物のスペクトルをマッチング

独自のアルゴリズムでスコアを評価
近似性の高い菌株から順に表示



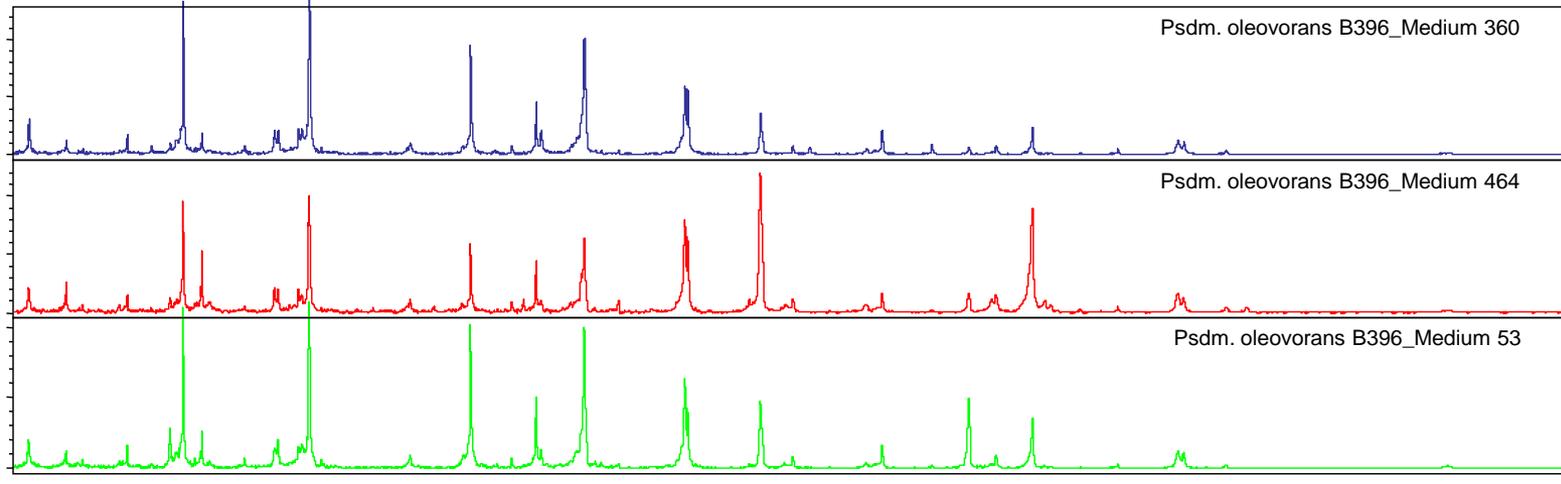
- スコア 2.0 – 3.0
- スコア 1.70 – 1.99
- スコア 0 – 1.69

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	<i>Mycobacterium intracellulare</i> DSM 44365 DSM b	2.132	122040932
2 (++)	<i>Mycobacterium intracellulare</i> DSM 44655 DSM b	2.028	122040932
3 (++)	<i>Mycobacterium intracellulare</i> DSM 44161 DSM b	2.009	122040932
4 (++)	<i>Mycobacterium intracellulare</i> DSM 43223T DSM b	2.005	122040932
5 (+)	<i>Mycobacterium chimera</i> DSM 44623T DSM b	1.87	122040932
6 (-)	<i>Enterococcus faecium</i> VRE_PX_16086218 MLD	1.433	1352
7 (-)	<i>Mycobacterium avium</i> ssp. <i>paratuberculosis</i> ATCC 19698T VAR	1.333	1770
8 (-)	<i>Arthrobacter ramosus</i> IMET 10685T HKJ	1.306	1672
9 (-)	<i>Mycobacterium malmoeense</i> 0205 BSI	1.296	1780
10 (-)	<i>Aromatoleum aromaticum</i> EbN1 MPB	1.275	12960

高再現性： 培養条件選択の自由度が高い



異なる培地で培養した*Pseudomonas oleovorans* のスペクトル



種の同定は培養時間、培養条件、培地の種類などに影響しない

Mellmann et al. *JCM* **2008**

Veloo et al. *Clinical Microbiology and Infection* **2011**

Lartigue et al. *JCM* **2009**

Valentine et al. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**

一般細菌の同定



For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

MBTサンプル調整： セルスメア法



グラム陽性菌はほとんどこれだけで有効



- 釣菌
- ターゲットプレートに塗布
- マトリックスを1 μ l添加、乾燥
- MALDI Biotyper に装填

消耗品はほぼマトリックス試薬とスタンダード試薬のみ！

正確なMALDIバイオタイパー:臨床株のテスト

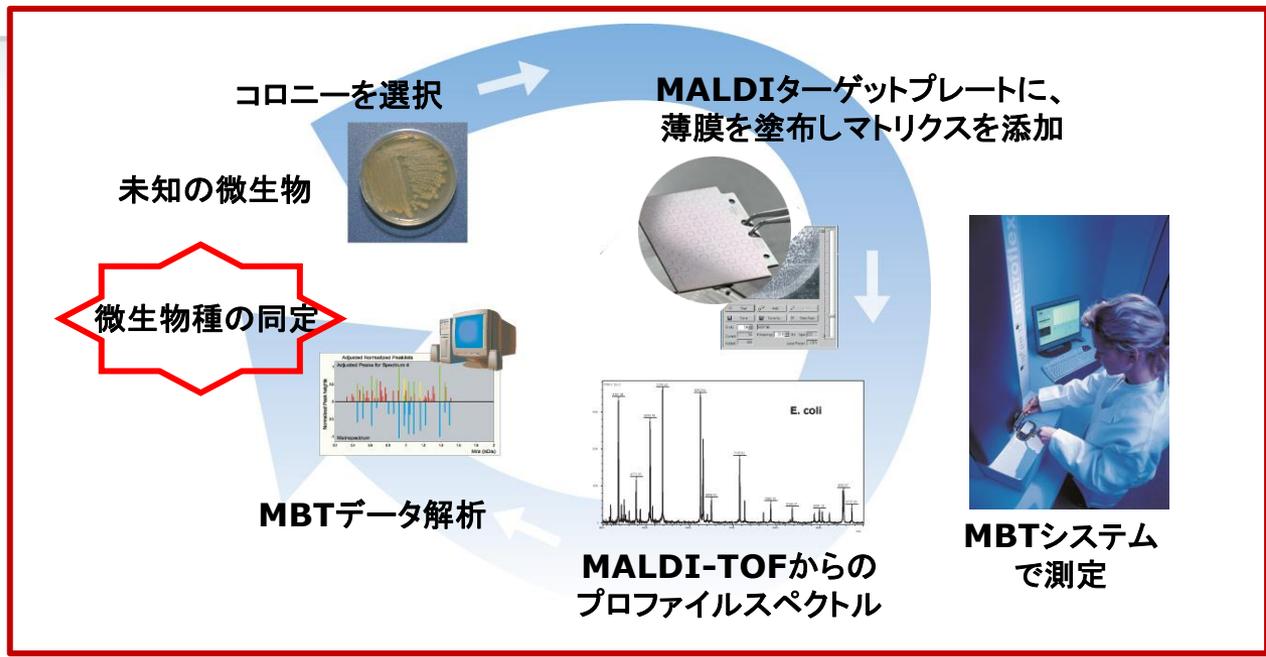
Bizzini et al. J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1549-54.



Results	N	Genera	Species	Species	Genus
Enterobacteriaceae	543	14	21	93.37%	98.70%
Non-Fermenters	142	4	6	86.62%	89.44%
GPC (clusters)	333	1	9	99.70%	100.00%
GPC (chains)	179	2	10	98.32%	100.00%
Misc Bacteria	57	9	10	92.98%	96.49%
Yeast	24	1	4	100.00%	100.00%
Total	1278	42	92	95.07%	98.12%

偽陽性率 < 1%

21世紀の微生物同定法: MALDIバイオタイパー 従来法に比較し、圧倒的な迅速同定



コロニーから釣菌後
10分以内に菌種同定

血液培養陽性ボトルから
30分程度で菌種同定

血液培養陽性ボトル

菌体分離

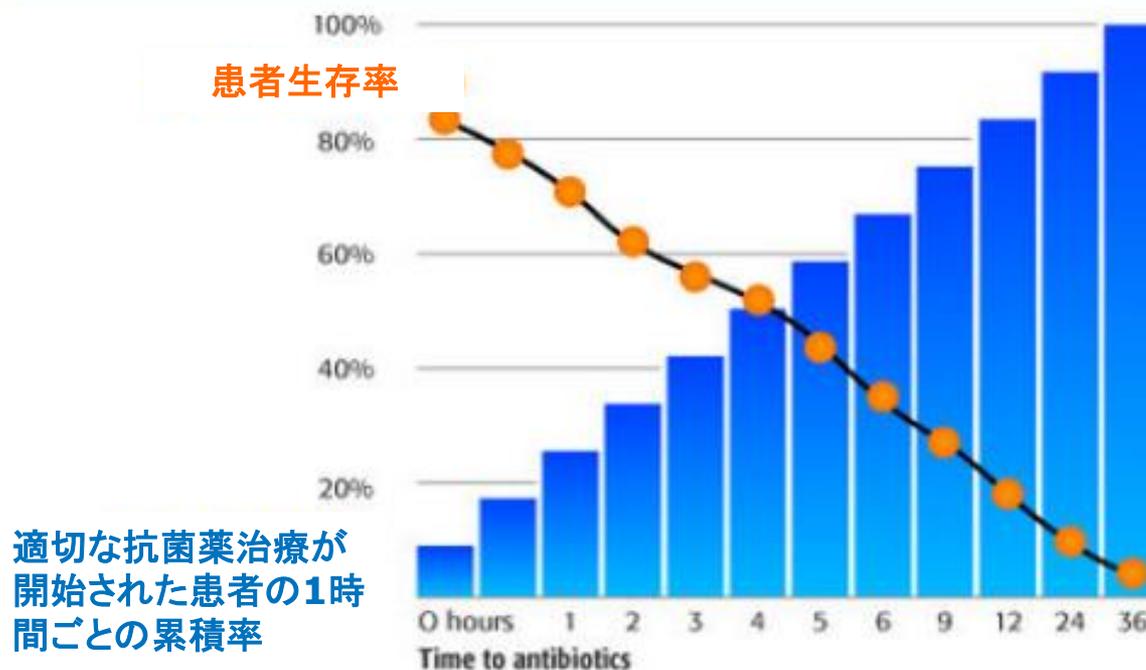
MALDIバイオタイパー

血液培養陽性後**30分以内**に同定可能！

適切な抗菌薬の投与開始時間が生存率に影響



敗血症



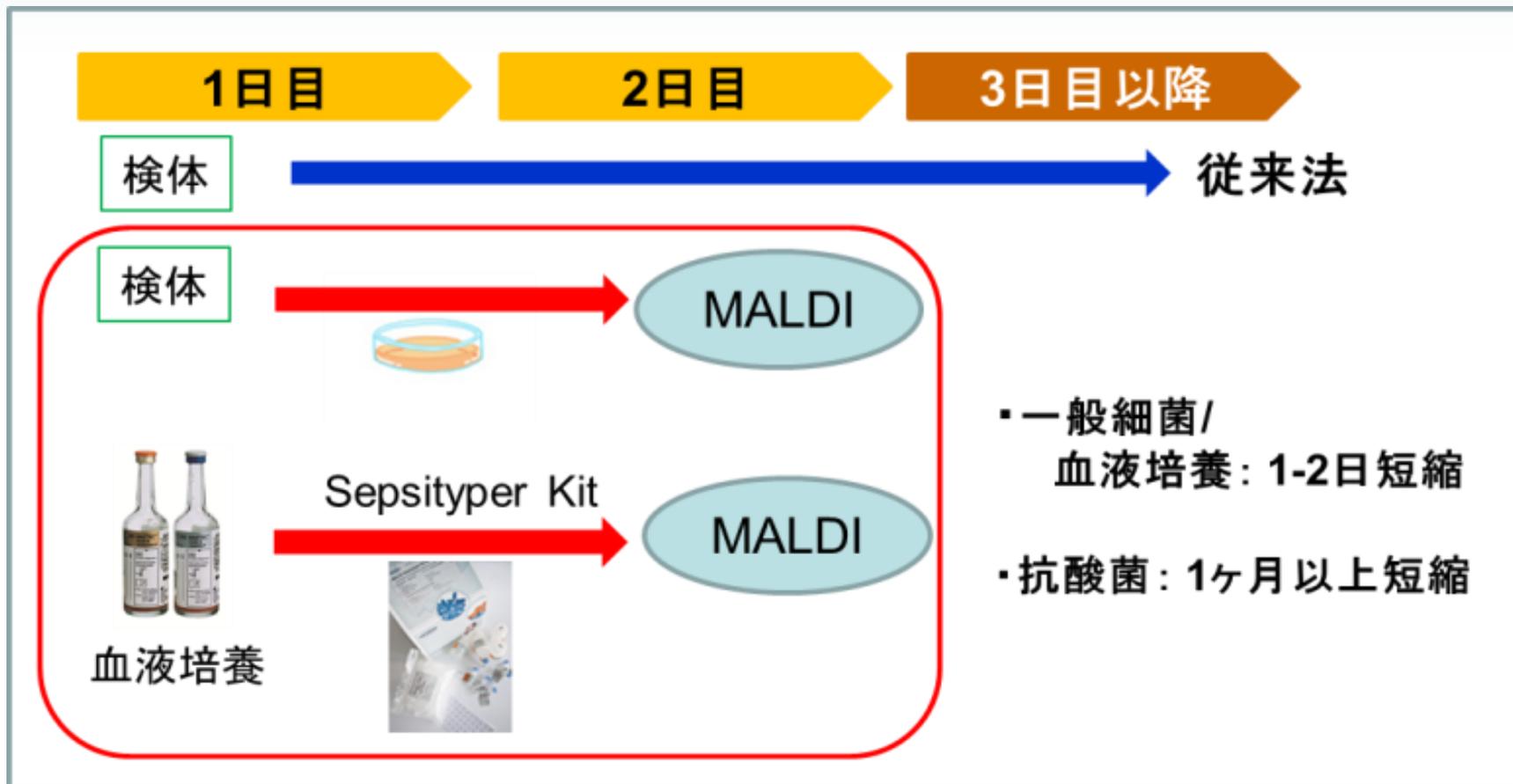
適切な抗菌薬治療が開始された患者の1時間ごとの累積率

Kumar et al.
Crit Care Med 2006 Vol. 34, No. 6

Made for World Sepsis Day by lingruen-gmbh.com

- いかに早い段階で適切な抗菌薬の投与ができるのかが重要

血液培養陽性から1-2日短く同定結果報告



感染症治療の革命と病院経営の利益

MBTによる早期適切抗菌薬選択をAMSに利用



1. 感染症治癒までの時間短縮が期待
2. 生存率の向上
3. 経験的抗菌薬投与期間短縮による薬剤費節減
4. 入院期間の短縮による医療費節減
5. 耐性菌検出率減少
6. 感染防止対策加算への利用

MBTによる迅速同定は病院全体に大きな利益をもたらします。

特殊な微生物グループの同定

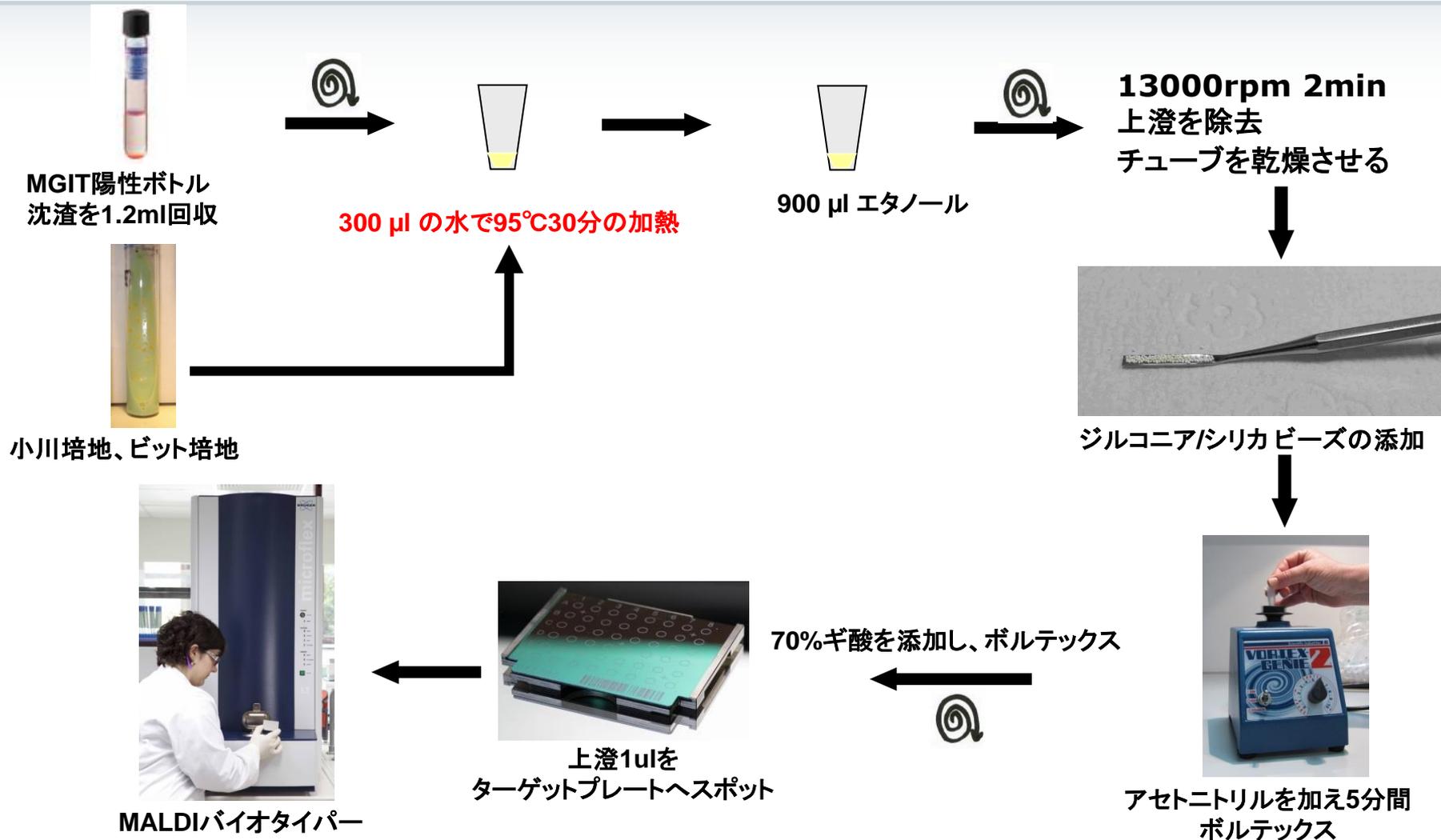
抗酸菌の同定



For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

抗酸菌 - 抽出法 (v2.0)

ジルコニア・シリカビーズを用いた抽出法で最適化



マイコバクテリア ライブラリ 2.0

131菌種、313株



M. abscessus ssp abscessus	M. conspicuum	M. kyorinense	M. pulveris
M. abscessus ssp bolletii	M. cookii	M. lacus	M. pyrenivorans
M. agri	M. cosmeticum	M. lentiflavum	M. rhodesiae
M. aichiense	M. crocinum	M. llutzerense	M. riyadhense
M. aigericum	M. diernhoferi	M. mageritense	M. rufum
M. alvei	M. dricum	M. malmoense	M. rutilum
M. aromaticivorans	M. duvalii	M. mantenii	M. saskatchewanense
M. arosiense	M. elephantis	M. marinum	M. scrofulaceum
M. arupense	M. europaeum	M. marseillense	M. Senegalense
M. asiaticum	M. farcinogenes	M. monacense	M. Senuense
M. aubagnense	M. flavescens	M. montefiorensis	M. seoulense
M. aurum	M. florentinum	M. moriokaense	M. septicum
M. austroafricanum	M. fluoranthenvivorans	M. mucogenicum	M. setense
M. avium	M. fortuitum subsp. acetamidolyticum	M. murale	M. sherrisii
M. avium subsp. avium	M. fortuitum subsp. fortuitum	M. nebraskense	M. shimoidei
M. avium subsp. paratuberculosis	M. frederiksbergense	M. neoaurum	M. shinfukuense
M. avium subsp. silvaticum	M. gastri	M. neworleansense	M. shottsii
M. boenickei	M. gilvum	M. nonchromogenicum	M. simiae
M. bohemicum	M. goodii	M. noviomagense	M. smegmatis
M. botniense	M. gordonae	M. novocastrense	M. sp.
M. bovis	M. haemophilum	M. obuense	M. stomatepieae
M. branderi	M. hassiacum	M. pallens	M. szulgai
M. brumae	M. heckeshornense	M. palustre	M. terrae
M. brisbanense	M. heidelbergense	M. paraffinicum	M. thermoresistibile
M. canariense	M. hiberniae	M. parafortuitum	M. tokaiense
M. celatum	M. hodleri	M. parascrofulaceum	M. triplex
M. cheronae	M. holsaticum	M. parseoulense	M. triviale
M. chelonae subsp. chelonae	M. houstonense	M. parmense	M. tuberculosis
M. chimaera	M. immunogenum	M. peregrinum	M. vaccae
M. chitae	M. insubricum	M. phlei	M. vanbaalenii
M. chlorophenolicum	M. interjectum	M. phocaicum	M. vulnerans
M. chubuense	M. intermedium	M. porcinum	M. wolinskyi
M. colombiense	M. intracellulare	M. poriferae	M. xenopi
M. conceptionense	M. kansasii	M. pseudoshottsii	
M. confluentis	M. kumamotonense	M. psychrotolerans	

培地によりスペクトルパターンが異なる種 (e.g. M. aichienseやM. chubuenseなど) は、MGITとLJでそれぞれのMSPを登録

糸状菌の同定



抗酸菌

糸状菌

血液培養

一般細菌

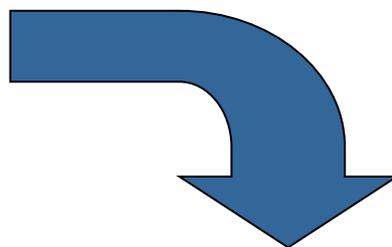
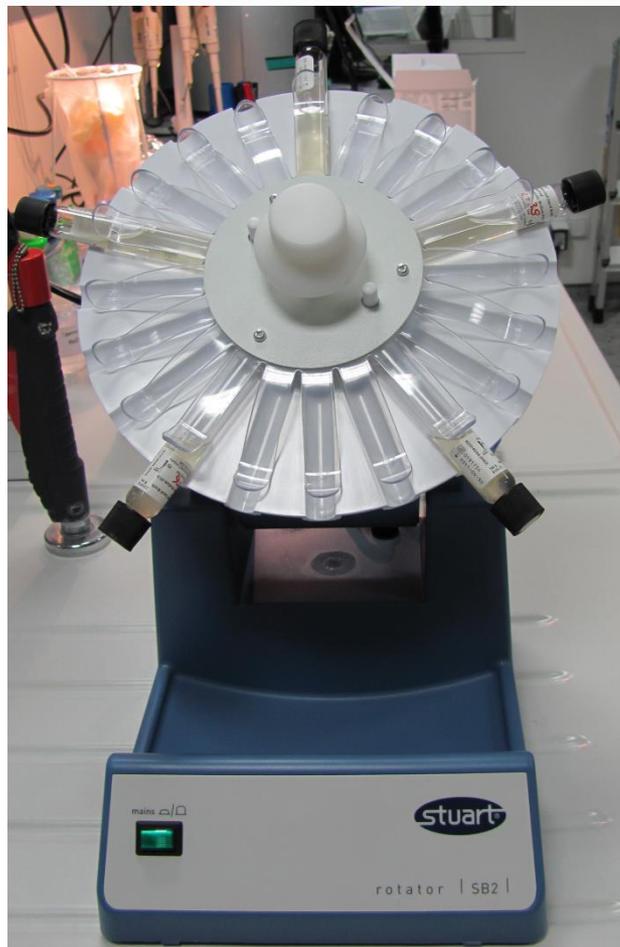
特殊な細菌

尿検体

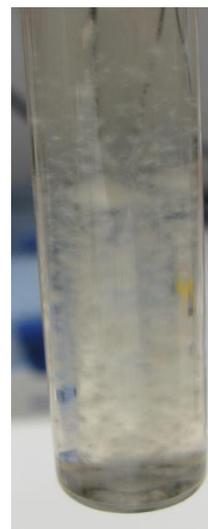
MALDIバイオタイパー

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

MBTのための糸状菌の培養



糸状菌を液体のサブローブロスで培養後、直接分析を行うことも可能。
※ただし、回転培養することが重要



糸状菌データベース

45 属, 129 種 - 366 株



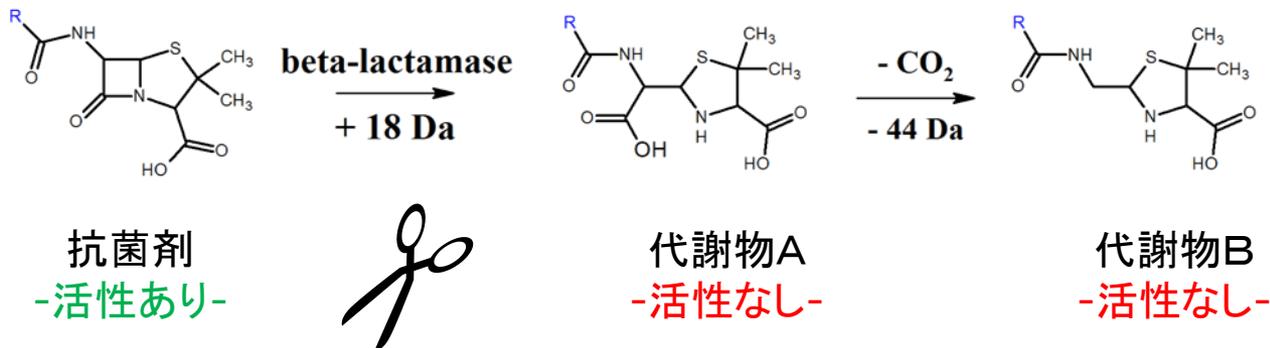
Genera	
Absidia coerulea	Absidia
Acremonium strictum	Epidermophyton
Alternaria alternata	Phialophora
Arthrinium phaeospermum	Fennellia
Arthrographis_kalrae[ana] (Eremomyces_langeronii[teleo])	Fusarium
Aspergillus candidus	Geomyces
Aspergillus clavatus	Geosmithia
Aspergillus flavus	Kerstersia
Aspergillus fumigatus	Lecythophora
Aspergillus glaucus	Monilinia
Aspergillus niger	Mucor
Aspergillus nomius	Paecilomyces
Aspergillus ochraceus	Penicillium
Aspergillus oryzae	Phaeoacremonium
Aspergillus parasiticus	Phialemonium
Aspergillus sclerotiorum	Trichoderma
Aspergillus sydowi	Trichophyton
Aspergillus tamarii	Trichurus
Aspergillus terreus	
Aspergillus unguis	
Aspergillus ustus	
Aspergillus versicolor	
Aspergillus_amstelodami[ana] Eurotium_amstelodami[teleo]	
Aspergillus_nidulans[ana] Emericella_nidulans[teleo]	
Aureobasidium pullulans	
Beauveria bassiana	

薬剤耐性株の検出: MBT STAR-BL

基本原理



- MBT STAR-BL は抗菌剤感受性をテストするアッセイ
- β -lactam系抗菌剤: バクテリアの細胞壁の合成を阻害
 - バクテリアは抗菌剤に対して特別な戦略を進化
 - 重要な戦略が加水分解反応



STAR BLは” 薬剤耐性の選択テスト”このテストは加水分解するバクテリアを検出するが、” 加水分解しない”という結果は全て”耐性なし”ということではないため、注意が必要。

MBT STAR-BL: 基本原理

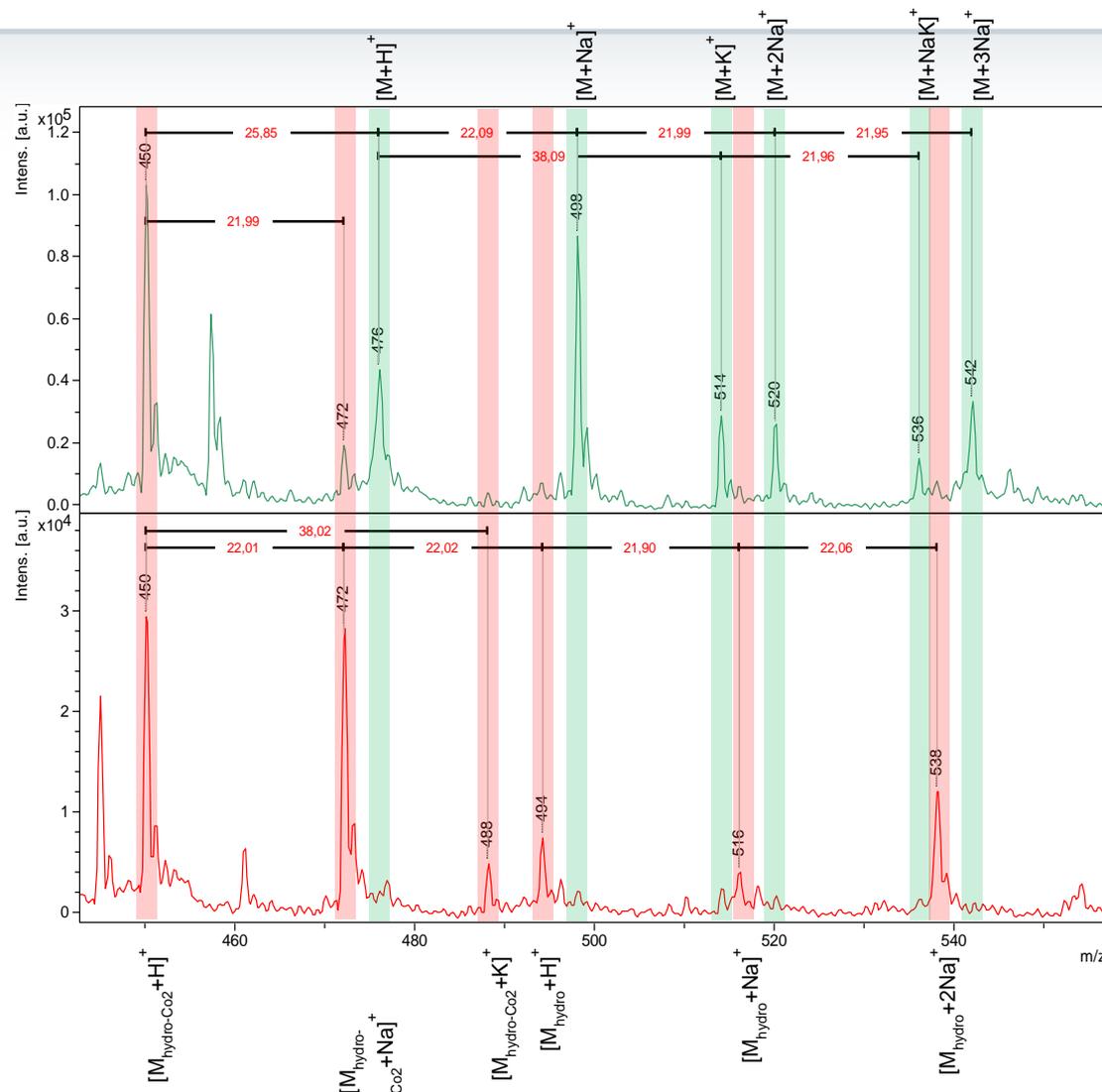
MS スペクトル: パターンの変化



β-lactam 系抗菌剤:
Ertapenem (ETP)

加水分解できないバクテリア(感受性菌)によるETPの質量スペクトル(カルバペネム陰性)

加水分解するバクテリア(耐性菌)によるETPの質量スペクトル(カルバペネム陽性)



MBT STAR-BLを利用した血培陽性検体の解析例



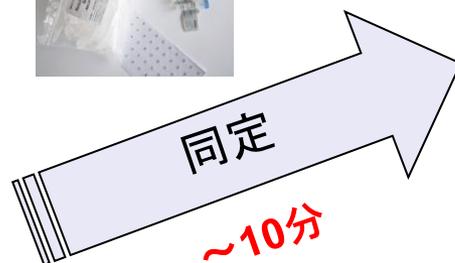
MALDIセプシタイパー



MALDIバイオタイパーによる菌種同定

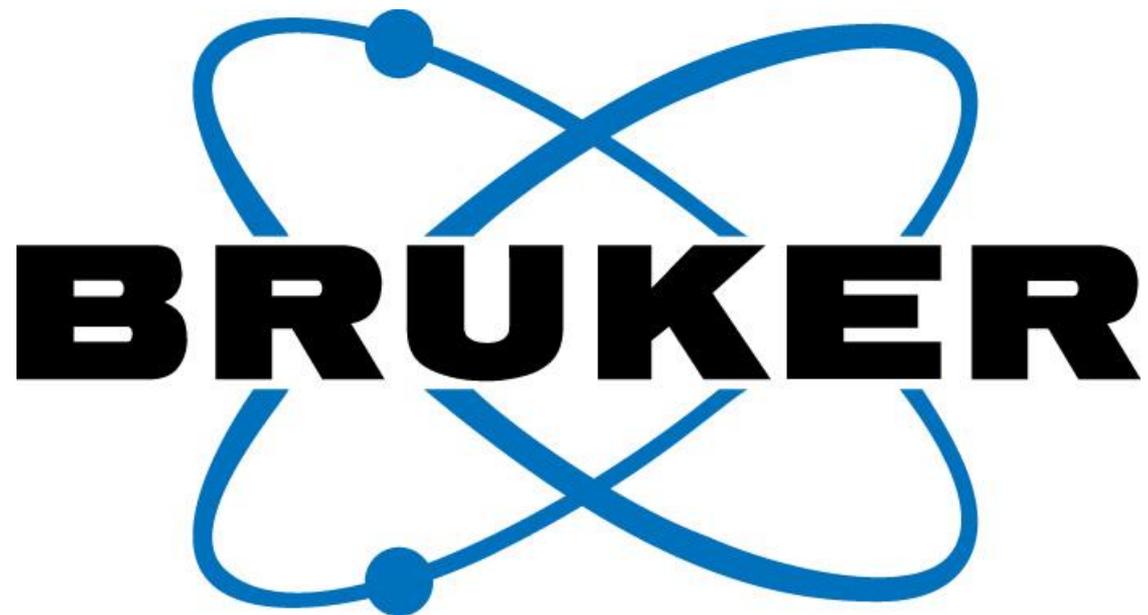


血液培養陽性



MALDIバイオタイパーによるAST選択

同定と抗菌剤の選択が同日に可能！



www.bdal.com

Xpert® Cartridge Preparation - Carba-R

Refer to the package insert for detailed instructions, precautions, and warnings.

For a copy of the SDS, visit www.cepheid.com or www.cepheidinternational.com

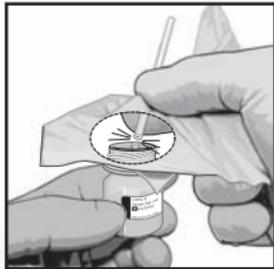
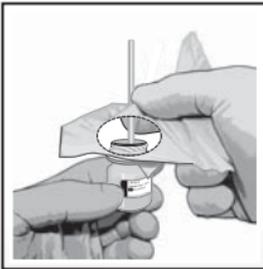
Cepheid Technical Support

US office
(888) 838-3222
techsupport@cepheid.com

European office
+33 563 82 53 19
support@cepheideurope.com



- 1 Obtain one Xpert cartridge and one Sample Reagent vial for each sample.
- 2 Insert the swab into the Sample Reagent vial.
- 3 Break the swab at the score mark near the opening of the vial.
- 4 Recap the Sample Reagent vial and vortex for 10 seconds.
- 5 Open the Xpert cartridge lid.
- 6 Aspirate the Sample Reagent up to the line on the supplied pipette.
- 7 Empty the pipette into the sample chamber.
- 8 Close the Xpert cartridge lid.
- 9 Start the test within the timeframe specified in the package insert.

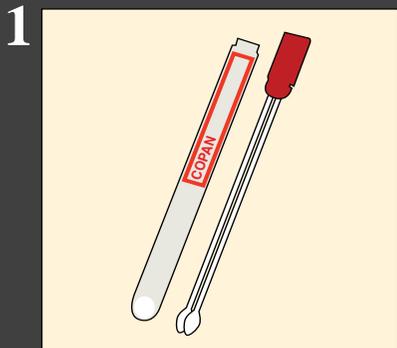


Note: Do not hold the swab below the score mark. Use gauze or its equivalent to minimize the risk of contamination.

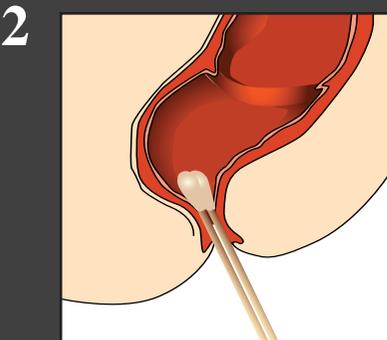
Rectal Specimen Collection Protocol

for use with Xpert® assays:

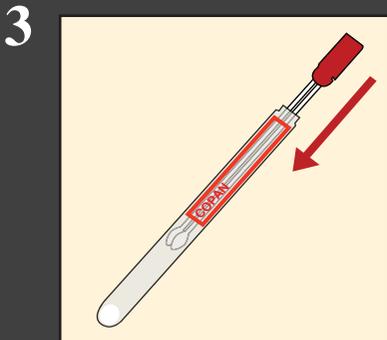
- Xpert Carba-R



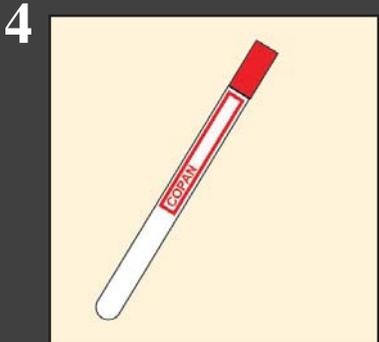
A Copan Venturi Transystem double swab must be used to collect the specimen. *Cepheid Collection Device #900-0370*



Carefully insert both swab tips approximately 1 cm beyond the anal sphincter and rotate gently.



Place the swabs back in the tube.



Specimens that can be tested within 6 hours can be stored at 15-28 °C. Specimens stored at 2-28 °C are stable for up to 7 days.

defining *on-demand* molecular diagnostics

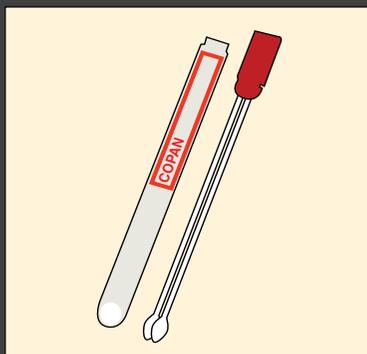


Rectal Specimen Collection Protocol

for use with Xpert® assays:

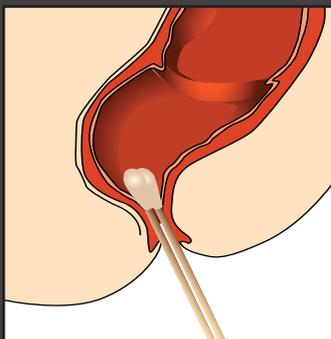
- Xpert Carba-R

1



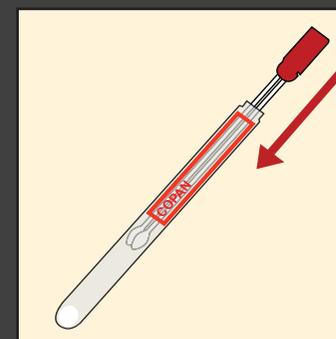
A Copan Venturi Transystem double swab must be used to collect the specimen.
Cepheid Collection Device #900-0370

2



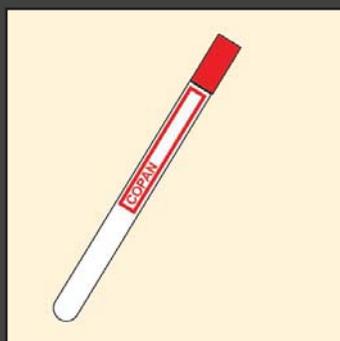
Carefully insert both swab tips approximately 1 cm beyond the anal sphincter and rotate gently.

3



Place the swabs back in the tube.

4



Specimens that can be tested within 6 hours can be stored at 15-28 °C. Specimens stored at 2-28 °C are stable for up to 7 days.

defining *on-demand* molecular diagnostics

質量分析器導入による投資対 効果の検証

淀川キリスト教病院 臨床検査科部長

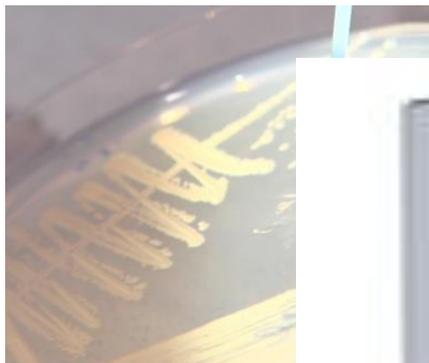
中川俊正

背景

- 2012年7月に当院は新設移転し、同時に一部機器の入れ替えと新規導入が行われたが、同年11月に細菌検査に質量分析器が新規に導入された
- 質量分析器の投資対効果を検証する
 - 血液培養陽性入院患者を対象に行った結果
 - 質量分析器を導入したメリット
 - 敗血症以外の疾患での在院短縮効果を検証した

10分で細菌の同定ができる機器を導入

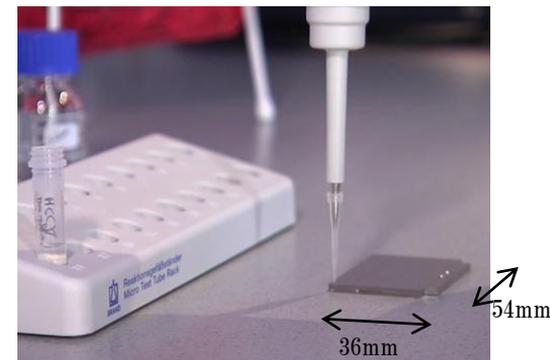
コロニーをピックアップ



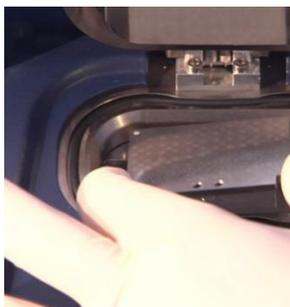
ターゲットプレートに薄く塗布



マトリックスを添加



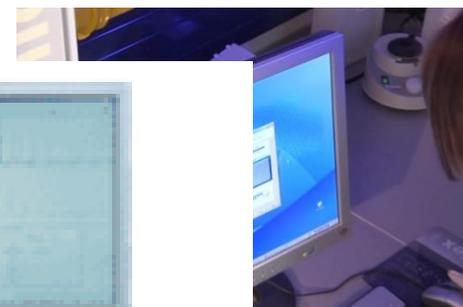
乾燥後、装置に装填



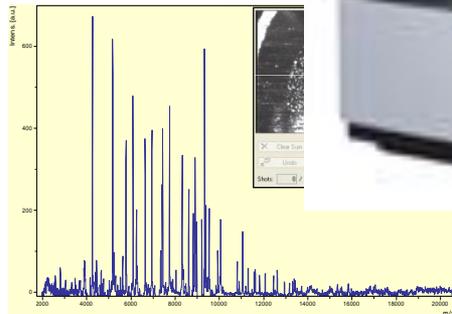
引き(3分以内)



クリック5回で測定開始



マススペクトルを取得



Strain	Log ₁₀ CFU
ATCC 35218 CHB	2.308
Escherichia coli MB11464.1 CHB	2.227
Escherichia coli ESB1_EA_PSS_1528T CHB	2.034
Escherichia coli ATCC 25922 CHB	2.016
Escherichia coli Nissl VML	1.982
Escherichia coli ATCC 25922 THL	1.969
Escherichia coli DSM 30063T HAM	1.853
Escherichia fergusonii DSM 13698 HAM	1.735
Enterobacter cloacae DSM 46349 DSM	1.675
Escherichia coli B421 UFL	1.652

ツ



Strain	Log ₁₀ CFU	CFU
Escherichia coli ATCC 35218 CHB	2.308	573
Escherichia coli ATCC 25922 CHB	2.016	573
Escherichia coli ATCC 25922 THL	1.969	573
Escherichia coli ATCC 25922 HAM	1.957	573
Escherichia coli ATCC 25922 HAM	1.938	72407
Escherichia coli ATCC 25922 HAM	1.837	573

検査課での投資対効果

○導入コスト(年間)

減価償却費・保守費用	¥ 6,720,000
------------	-------------

○導入効果(年間)

材料費削減効果	¥ 1,675,884
---------	-------------

導入前材料費	¥ 542,355
--------	-----------

導入後材料費	¥ 402,698
--------	-----------

差額	¥ 139,657
----	-----------

¥ 5,044,116のマイナスになる

導入により検査結果返却時間の短縮

	導入前	導入後
一般細菌検査	2.5日	1.5日
血液培養	4日	2日

血液培養陽性の入院患者で効果検証

調査期間

導入前：2012年8月～10月

導入後：2012年11月～2013年1月

調査日

2012年11月20日

2013年2月20日

対象

- ・調査日に退院している患者(死亡退院・入院中の患者は除く)

血液培養陽性患者の導入前後の比較

○導入前

期間: 2012年8月～10月

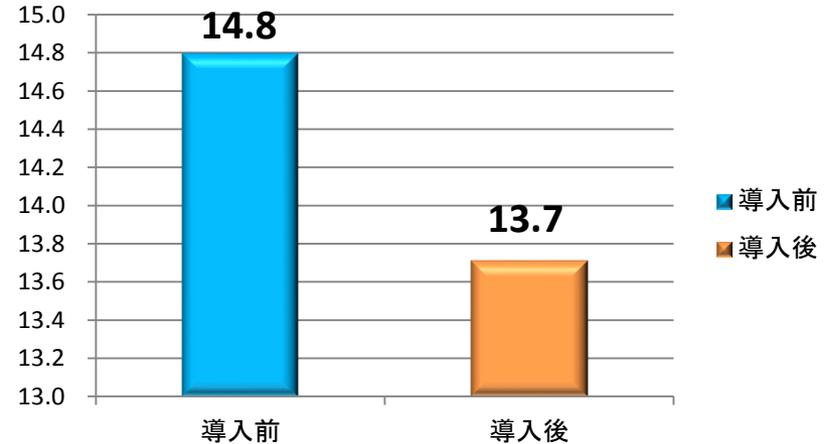
対象: 98症例

○導入後

期間: 2012年11月～2013年1月

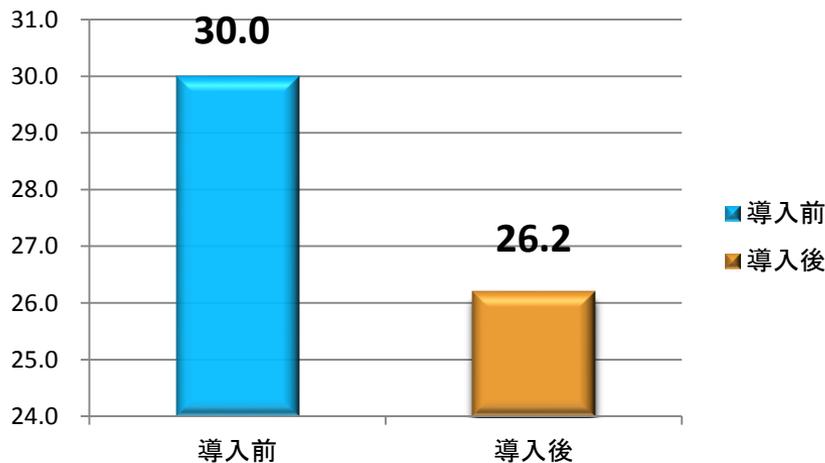
対象: 74症例

投与期間



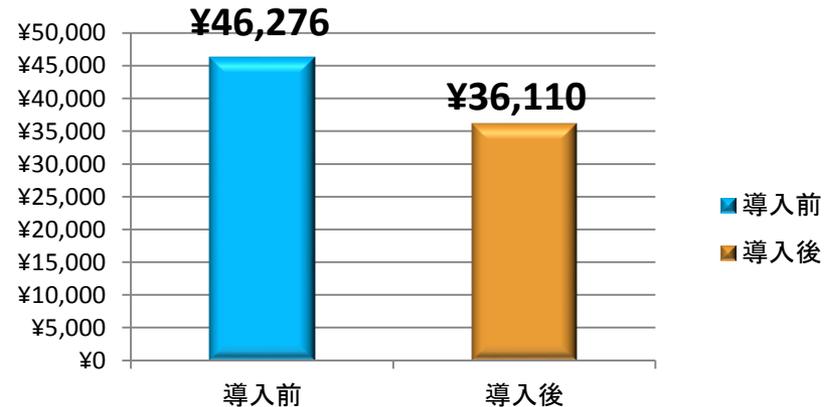
1.1日の短縮

在院日数



3.8日の短縮

点滴抗生物質

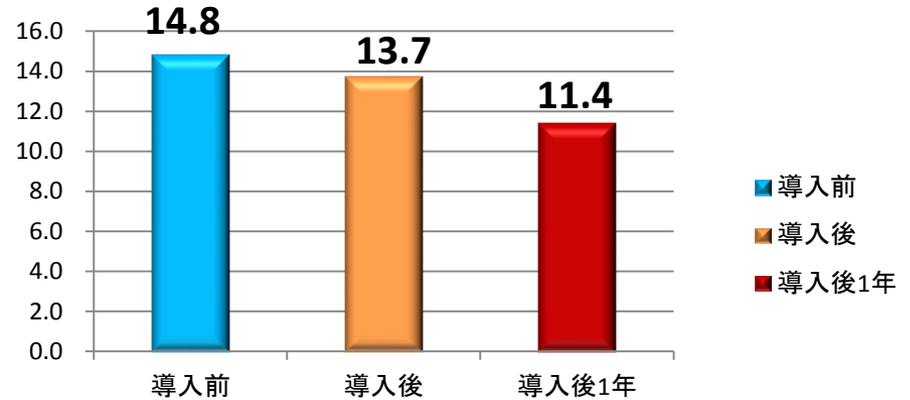


¥10,166の減少

血液培養陽性患者の導入前後の比較

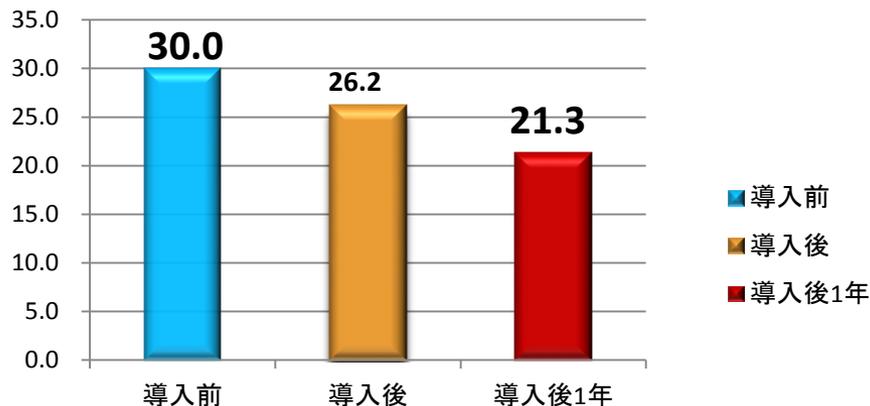
○導入後1年
期間:2013年11月~2014年1月
対象:82症例
調査日:2014年2月20日

投与期間



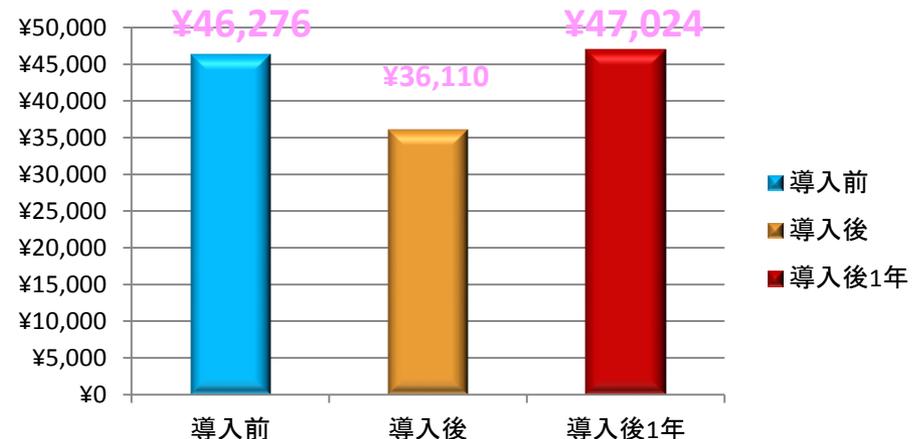
3.4日の短縮

在院日数



8.7日の短縮

点滴抗生物質



¥748増加

病院全体での効果

	病床稼働率	在院日数	入院日当点	平均年齢(陽性者)
導入前	94.6%	13.9日	5,895	72.2歳
導入後	93.4%	13.6日	6,042	68.4歳
導入後1年	93.0%	13.1日		69.0歳

在院日数のみ

85,782,744円／年間

(3.8日 × 60,424円 × 400人 × 0.934)

ま と め

- ①質量分析装置は検査課にとって二重投資であり、また高価な機器のため細菌検査室のみならず検査課での投資対効果をプラスにするのは難しい。
- ②病院への貢献という観点から効果検証すると、大きなプラス効果がでていることがわかった。
- ③ICTラウンドの充実に役立った。
- ④感染症に興味のある医師に研究の場を提供できた。

アウトカムを求められることが多いが、検査課の中だけで考えるのではなく病院全体にどのような影響を与えたかという観点から検証することが今後重要と考える。

質量分析機導入による利点

- 細菌名が短期間で判明する
- 特殊な菌
 - 薬剤耐性の結果が一日早まる
 - 髄膜炎菌 飛沫感染
 - 検出頻度が極端に低い菌
- 細菌検査技師による同定技術が不要となる
 - 特殊な菌

髄膜炎菌感染症

- ヒトからヒトへ飛沫感染する
- 家族、同居者、医療従事者など
- 2次感染による感染拡大のリスクが大きい
- 3から4%に髄膜炎、菌血症、呼吸器感染をおこす
- 国内では年間10から20例の報告（5類全数）
- 2011年の国内事例129人が濃厚接触
 - 4名2次感染、1名死亡

当院での事例

- 救急受診患者（発熱、頸部痛、腰痛）
- 入院翌日に血液培養から菌が検出された
- 受診時から結果が判明するまでの1日半で21名の職員が濃厚接触しており予防投薬が行われた
- もし、質量分析器がなければ、菌名が判明するまで、さらに3日程度かかるため、予防投薬者数が数倍増えていた可能性がある

薬剤耐性菌治療 の影響

背景

- 質量分析器の同定後、これまで通り薬剤感受性検査が実施される
- 感染症治療はエンピリックに行われるため、遅れて耐性菌が判明することは治療効果に影響をあたえる可能性がある
- 質量分析器導入は薬剤耐性検査菌治療にメリットになるだろうか

方法

- 血液培養陽性患者は、緊急対応を必要である
- 外来で依頼された血培が入院後に陽性となり菌名が報告される
- 遅れて薬剤耐性が判明したケースの出現頻度や症例を抽出して個別に解析する

血液培養陽性データ

- 2013年1月から2014年9月まで
- 陽性検体総数 1673件(重複あり)
- 患者数 869人 1064件
 - 以下、数値の単位は人数とする
- 検出数上位
 - 大腸菌、CNS、MRS表皮ブドウ球菌、MRS CNS
 - 肺炎桿菌、ブドウ球菌、MRSA、バチルス、緑膿菌
 - 大腸菌ESBL

菌名	件数
Escherichia coli	168
Coagulase-negative Staphylococcus species	94
Staphylococcus epidermidis MRS	94
Coagulase-negative Staphylococcus species MRS	76
Klebsiella pneumoniae	60
Staphylococcus epidermidis	58
Staphylococcus aureus	49
Staphylococcus aureus MRSA	36
Bacillus species	30
Escherichia coli ESBL	26
Pseudomonas aeruginosa	24
Enterococcus faecalis	19
Propionibacterium acnes	19
Streptococcus agalactiae (Group B)	17
Corynebacterium sp	16
Enterococcus faecium	16
Streptococcus pneumoniae	14
Clostridium perfringens	12
Enterobacter aerogenes	10

単位	人数
大腸菌	168人
CNS	94人
SE-MRS	94人
CNS-MRS	76人
肺炎桿菌	60人
SA	49人
MRSA	36人

菌種別耐性菌比率

菌名	耐性菌	頻度(%)
大腸菌 168	大腸菌ESBL 26	13.4
CNS 94	CNS-MRS 76	44.7
表皮ブドウ球菌 58	表皮ブドウ球菌-MRS 94	61.8
肺炎桿菌 60	肺炎桿菌ESBL 3	4.7
ブドウ球菌 49	MRSA 36	42.3

出現比率のまとめ

- 大腸菌の耐性化率 (ESBL) は、13.4%
- MRSAの比率は42.3%

- 大腸菌の院内発生は8.6%に対して外来発生は26.0%
- MRSAの院内発生は52.9%に対して外来発生は22.5%
 - 大腸菌の場合、無症候性キャリアを反映している可能性がある

外来でMRSA菌血症であった8例

#	転帰	在院日数	抗菌薬治療	感染症名、基礎疾患
1	軽快	45	CEZ(3)→VCM	CVポート感染、大腸癌治療中
2	軽快	47	MEPM→LZD	腓周囲膿瘍
3	死亡	3		肺炎
4	死亡	2		肺炎
5	死亡	37	CTR(7日)→VCM	腎盂腎炎、腸腰筋膿瘍
6	軽快	16	FMOX→ST	縦隔膿瘍
7	軽快	52	MEPM	汎発性腹膜炎手術
8	死亡	15	SBT/ABPC(5)→VCM	肺炎、褥瘡

外来でESBL菌血症であった12例

#	転帰	在院日数	抗菌薬	感染症、基礎疾患名
1	軽快	12	CMZ(7)	胆石性胆管炎 ドレナージ
2	軽快	18	FOM(9)→CMZ	尿路感染
3	死亡	20	SBT/ABPC→打ち切り	肺癌末期
4	軽快	18	SBT/ABPC→MEPM	熱源不明 (尿路感染疑い)
5	死亡	2		尿路感染
6	軽快	14	ゾシン(15)	腎盂腎炎
7	軽快	30	MEPM(15)	膵臓癌
8	軽快	14	CTRX(5)→CMZ(5)	尿路感染
9	軽快	9	ゾシン(9)	急性前立腺炎
10	軽快	24	SBT/ABPC(14)	胆管炎 ドレナージ
11	軽快	13	CMZ(5)	急性胆のう炎 切除術
12	死亡	27	MEPM(14)	大腸がん 末期

症例のまとめ

- MRSAでは死亡例が多く、ESBL症例では軽快退院例が多い
- MRSAでは入院時かなり重篤であるケースが多く、迅速に有効な抗菌薬に変更されている
- ESBLの場合、エンピリック治療で耐性菌を考慮に入れて治療しているケースが多く、抗菌薬の変更を要するケースは少なかった

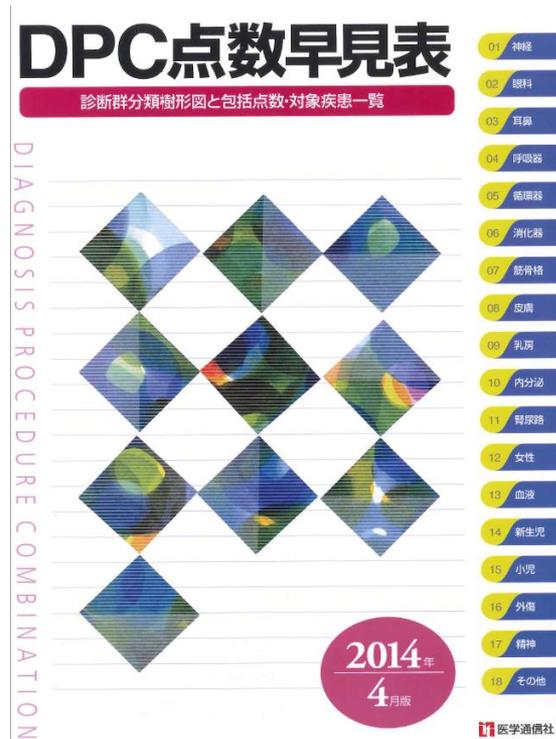
重要な点

- 当院の医師は、血培依頼後、菌名および感染源（熱源）を4日程度で把握するが、質量分析器がなければ6日以上かかる。
- エンピリック治療が奏功すれば3日から5日で症状が改善していることが多い
- 従って、質量分析器がなければ、耐性菌でエンピリック治療が無効であるという情報が遅れて、治療方針の決定に不利となる可能性がある

病名による在院日数 短縮効果の解析

- 解析データ
 - 最も医療資源を投入した疾患名ごとの患者一人あたりの在院日数データ
- グラフ化
 - 病名ごとに在院日数をプロットし、同時に診療報酬請求の基準となる在院日数と比較した
- 目的
 - 感染症関連の病名ごとに、質量分析導入時前後での在院日数の短縮効果を検証する

包括医療制度について

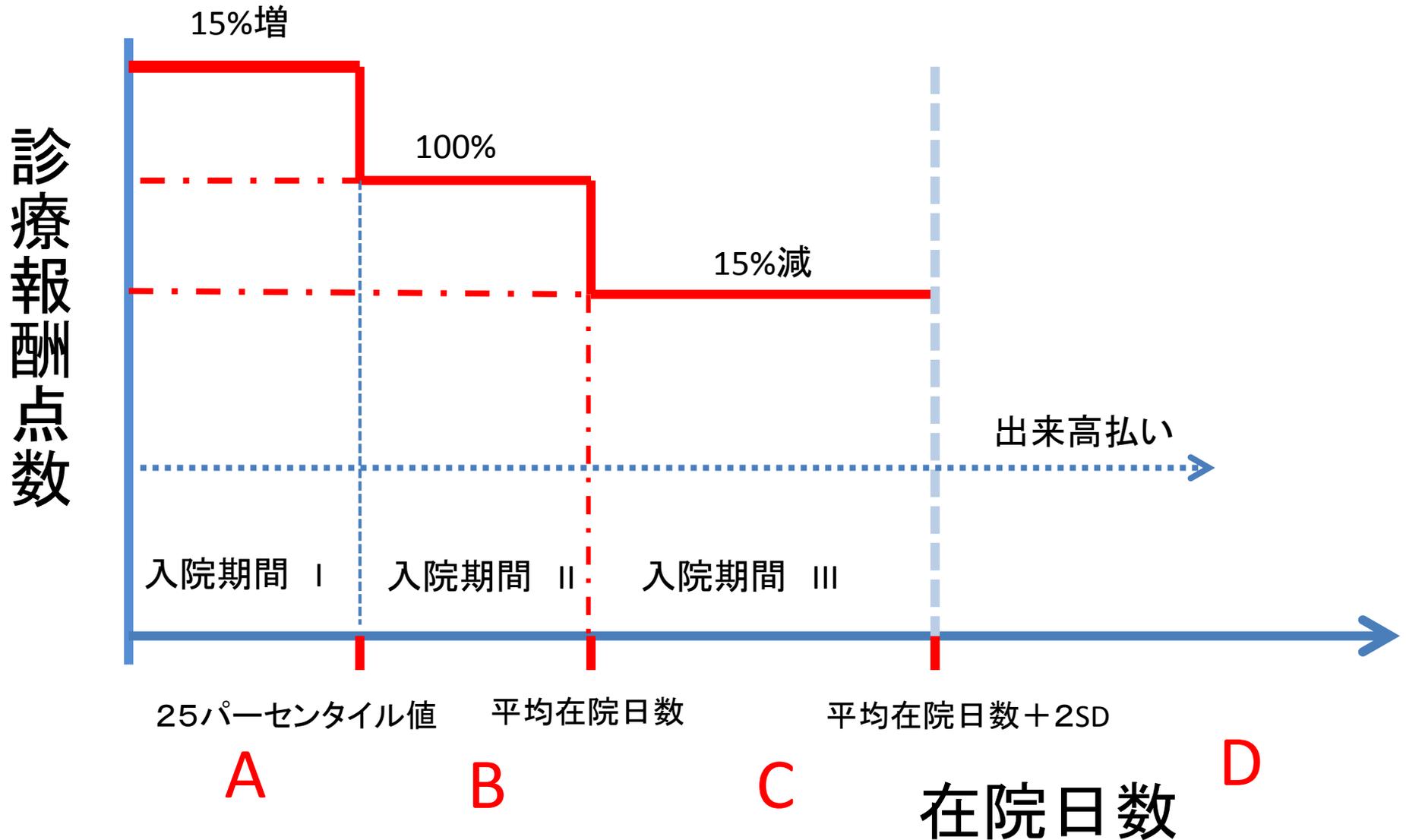


この本で勉強しました

包括医療制度（DPC）とは

- 診断群ごとに医療費を算定する制度
- 各疾患ごとの医療費に在院日数と病院の機能評価の要素を加味している
- DPCで支払われる金額には包括評価部分と出来高算定部分があり、この両者を足したものが請求金額となる

在院日数が長くなると点数が減額される



包括部分について

- 1人の入院患者に対して、1入院に対して1つの診断群病名(DPC)を割り当てる
- 1日あたりの保険点数が、在院日数により3段階に逓減されている
- 3段階は、参加医療機関のデータを集めて決められている

全国平均の在院日数による 3段階の区分

- その診断群における全国平均在院日数をもとに、25%タイル(入院期間I,II,IIIおよびそれ以上に分ける
- IIの場合を100%とすると、Iの場合は医療費の請求金額が15%増、IIIの場合は15%減となる
- IIIを越えると出来高払いとなり病院収入に影響する

誤嚥性肺炎

- 誤嚥性肺炎とは唾液や食物が食道に流れず、肺などの気管内に入ってしまう引き起こされる肺炎。高齢者に多い。

入院期間	日数	1日あたりの点数
A (入院期間 I)	10	2757
B (入院期間 II)	20	2038
C (入院期間 III)	45	1732

D (仮称)

最も単純なケース

誤嚥性肺炎



樹形図 番号	入院期間			A日以下		A日超B日以下		B日超C日以下	
	A	B	C	入院期間①	点数/日	入院期間②	点数/日	入院期間③	点数/日
①441	10	20	45	1～10日	2,757	11～20日	2,038	21～45日	1,732
②442	20	40	83	1～20日	2,635	21～40日	1,947	41～83日	1,655
③443	9	23	57	1～9日	3,321	10～23日	2,602	24～57日	2,212
④444	22	44	96	1～22日	2,608	23～44日	1,928	45～96日	1,639
⑤445	28	57	128	1～28日	3,347	29～57日	2,474	58～128日	2,102

ICD名称 (040081 に対応する傷病名)

J69 S 固形物および液状物による肺臓炎

手術

- K386 気管切開術
- K403-23 嚥下機能手術 喉頭気管分離術
- K6182 中心静脈注射用植込型カテーテル設置 頭頸部その他に設置した場合
- K664 胃瘻造設術 (経皮的内視鏡下胃瘻造設術、腹腔鏡下胃瘻造設術を含む)
- K664-2 経皮経食道胃管挿入術 (PTEG)

その他のKコード

手術・処置等 2

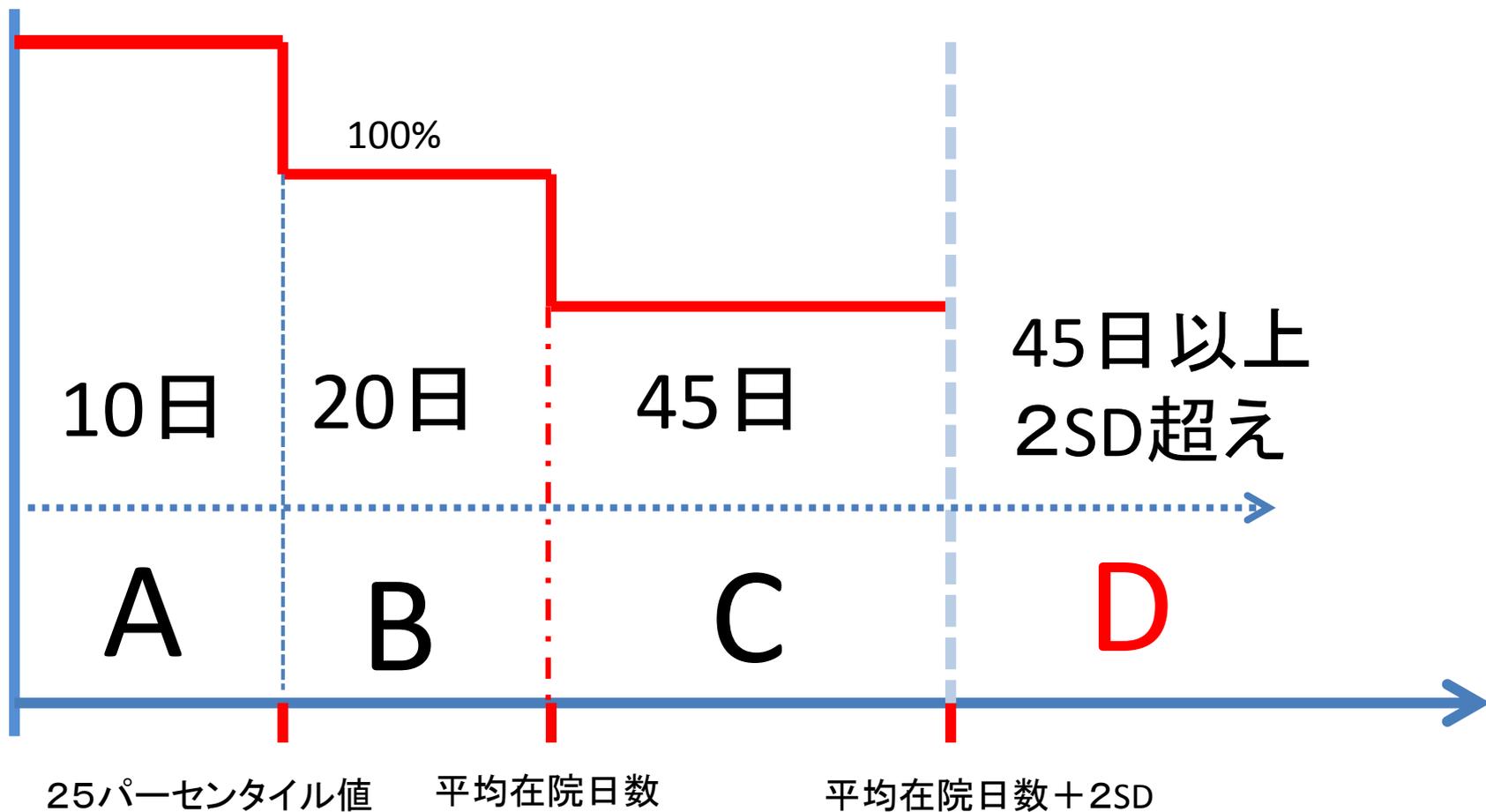
J045 S 人工呼吸

定義副傷病

手術なし

150021 偽膜性腸炎

(編注) 誤嚥性肺炎とは、唾液や食物などが食道に流れず、肺などの気管内に入ってしまう引き起こされる肺炎。喉頭の筋肉や嚥下反射が衰えた高齢者や麻痺者に多い。



在院日数

最も資源を投入した疾患

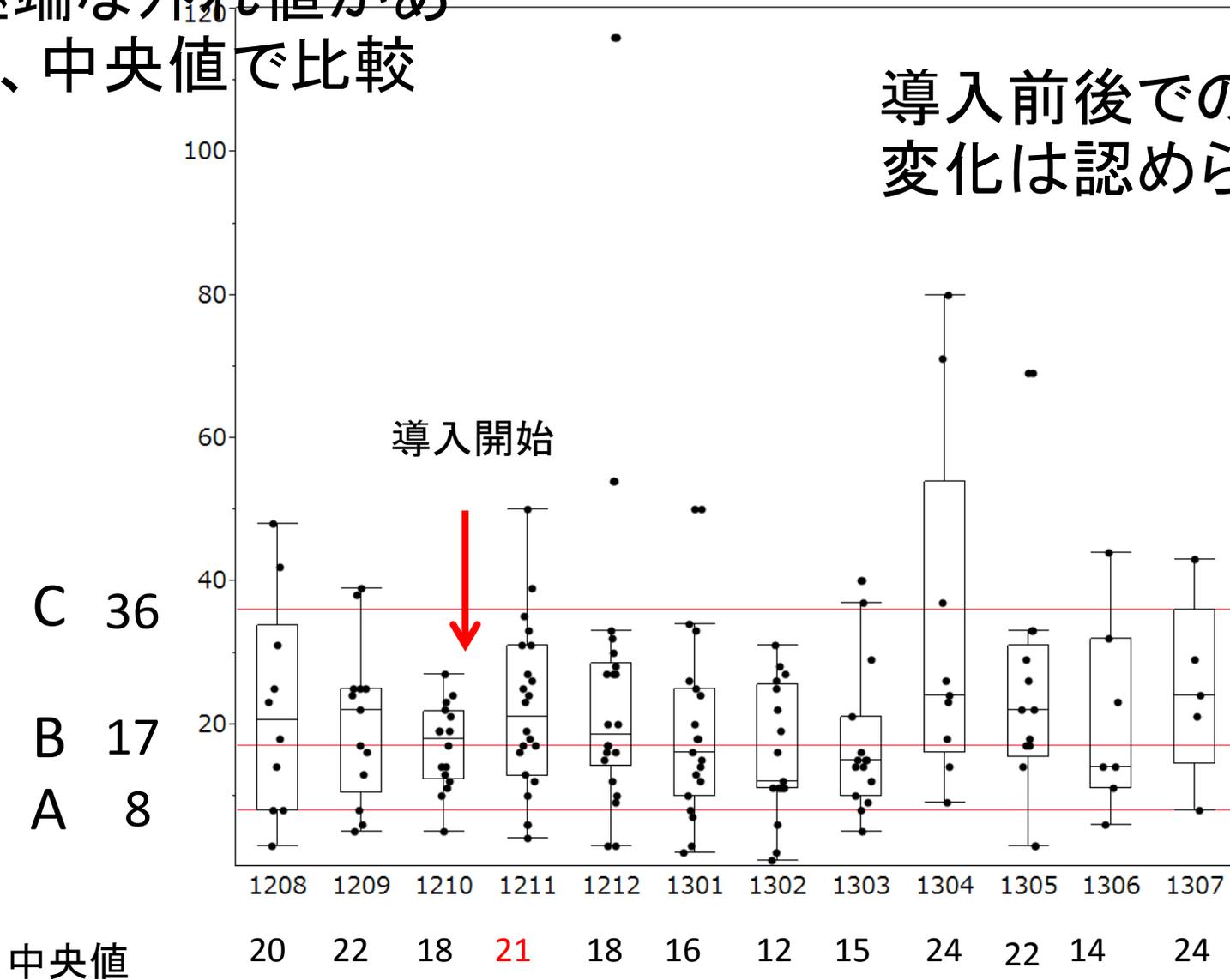
最も資源を投入した疾患	人数
大腸ポリープ	679
誤嚥性肺炎	245
妊娠39週自然頭位分娩	236
妊娠40週自然頭位分娩	214
胃体部癌	196
末期腎不全	186
肝細胞癌	178
労作性狭心症	178
うっ血性心不全	168
両層状白内障	155

- 1208(2012年8月)から1307(13年7月)までのデータ
- 入院患者数15170人、診断群分類した疾患名3087件
- 上位10疾患の表
- 誤嚥性肺炎とうっ血性心不全の在院日数を比較した
- 2012年11月1日に使用開始したので、導入前の3ヵ月と導入後の3ヵ月のデータを解析した

心不全

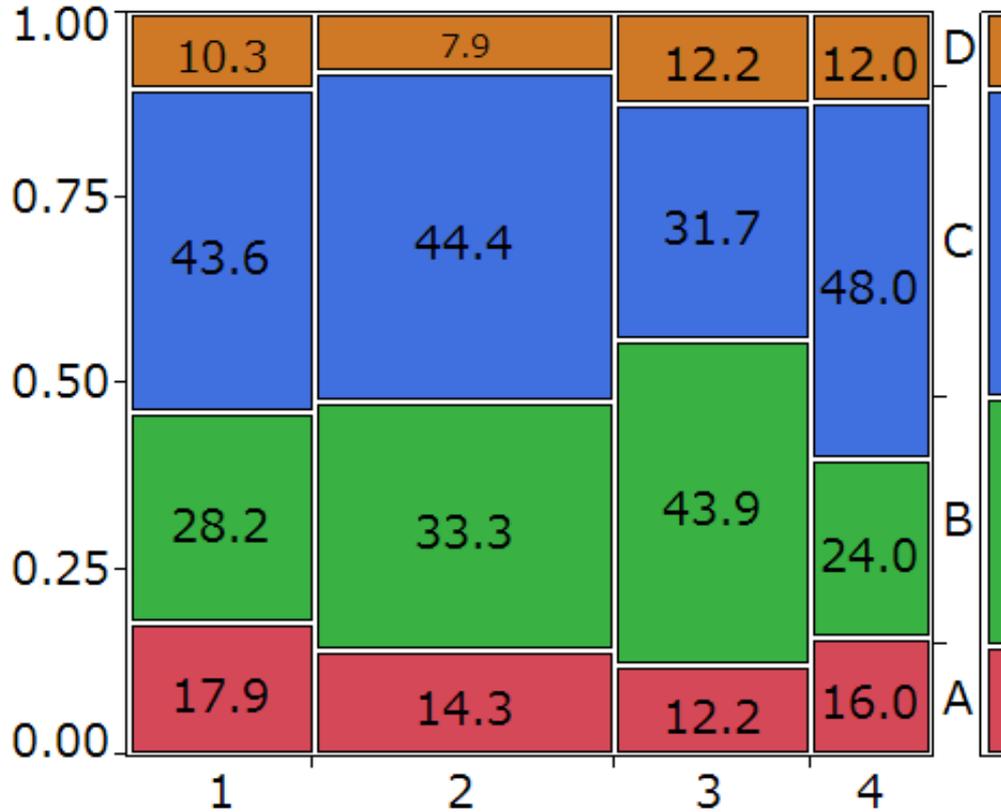
極端な外れ値があり、中央値で比較

導入前後での大きな変化は認められない



心不全 モザイク図

在院日数
(比率)



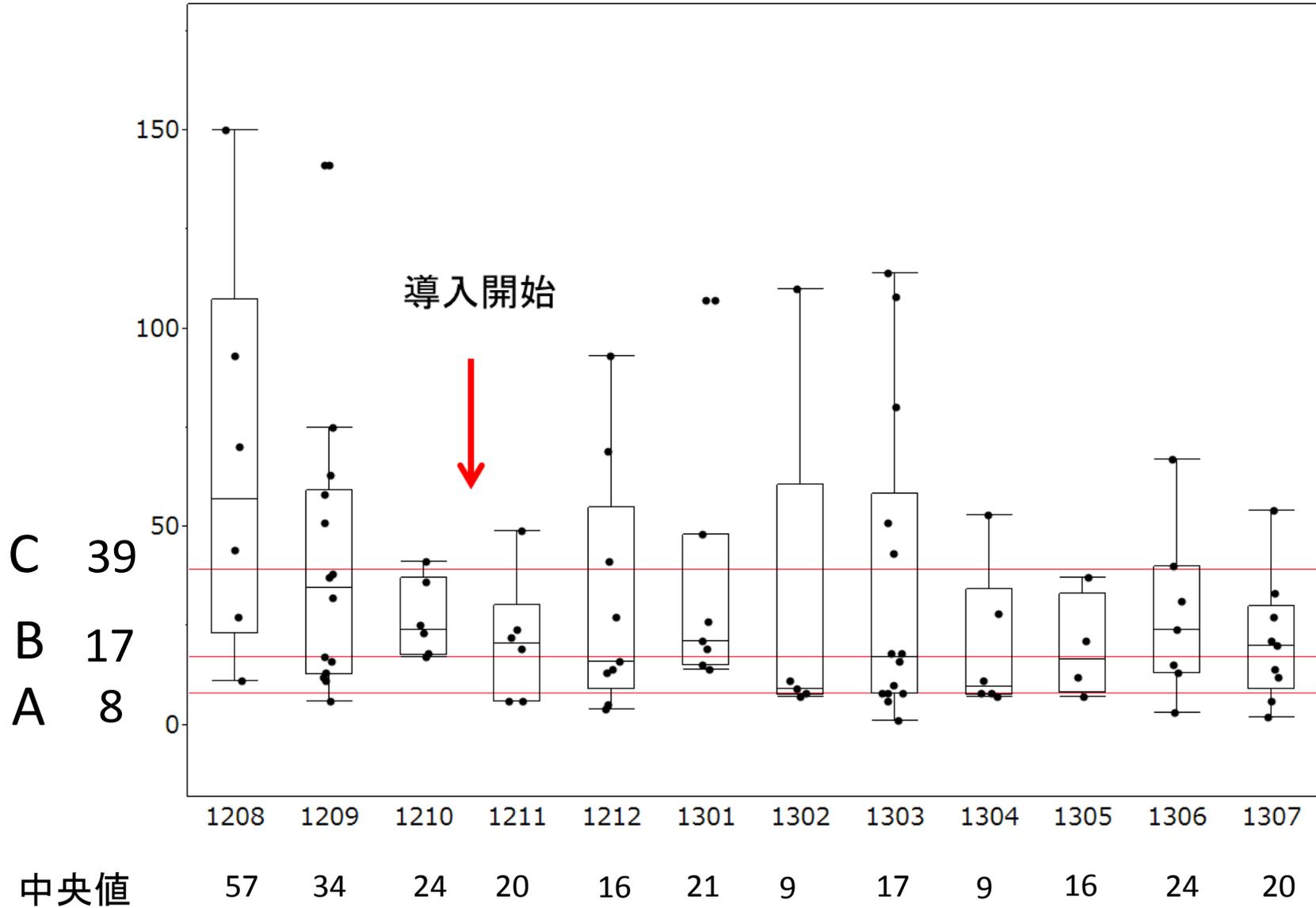
全国平均
B
0.5(50%)

1208-10 ↑ 1211-1301 1302-1304 1304-1307

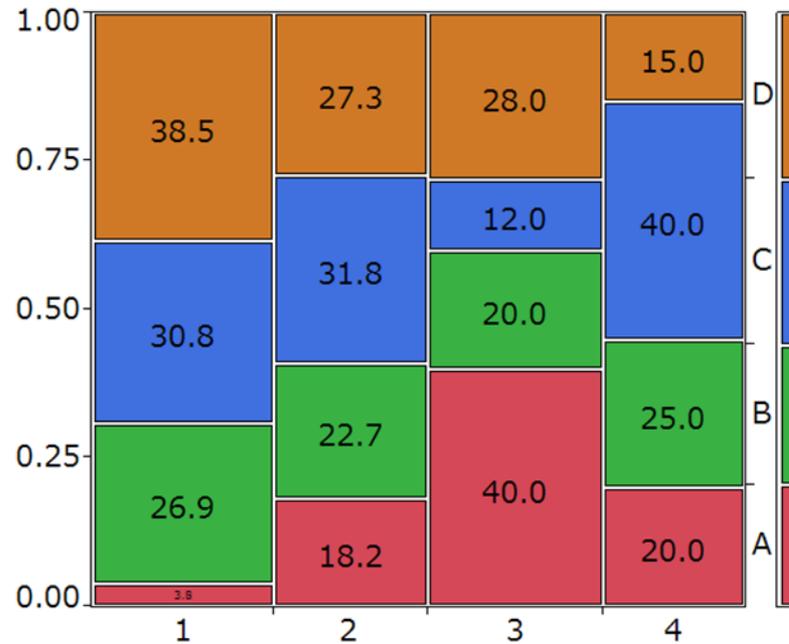
導入

3カ月ごとの分画の比率

敗血症



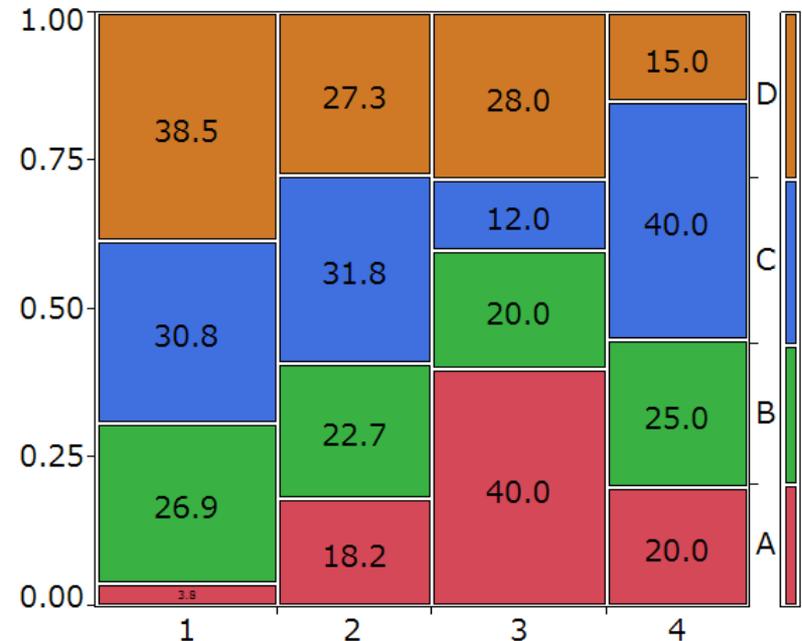
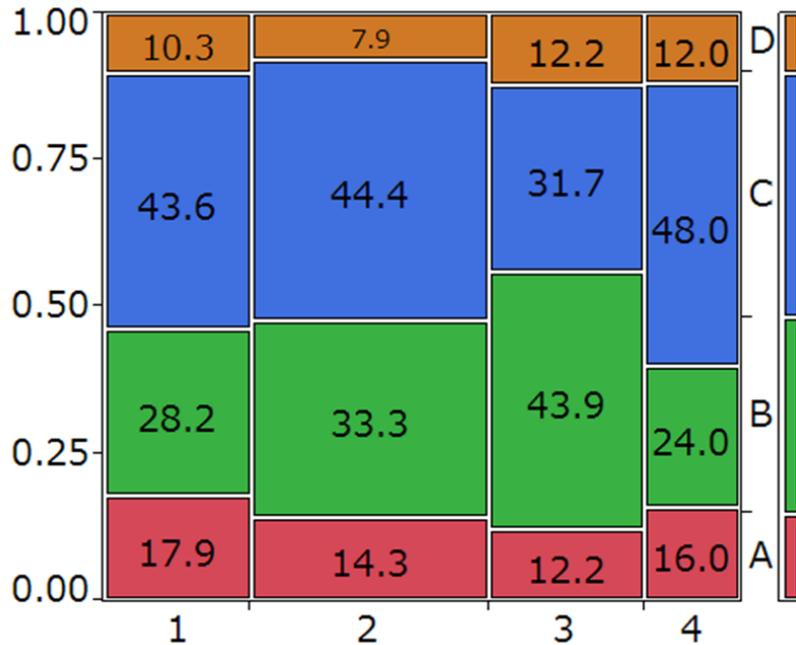
敗血症 モザイク図



期間1 (201208-201210)と期間2(201211-201301)の間で大きな変化が認められる

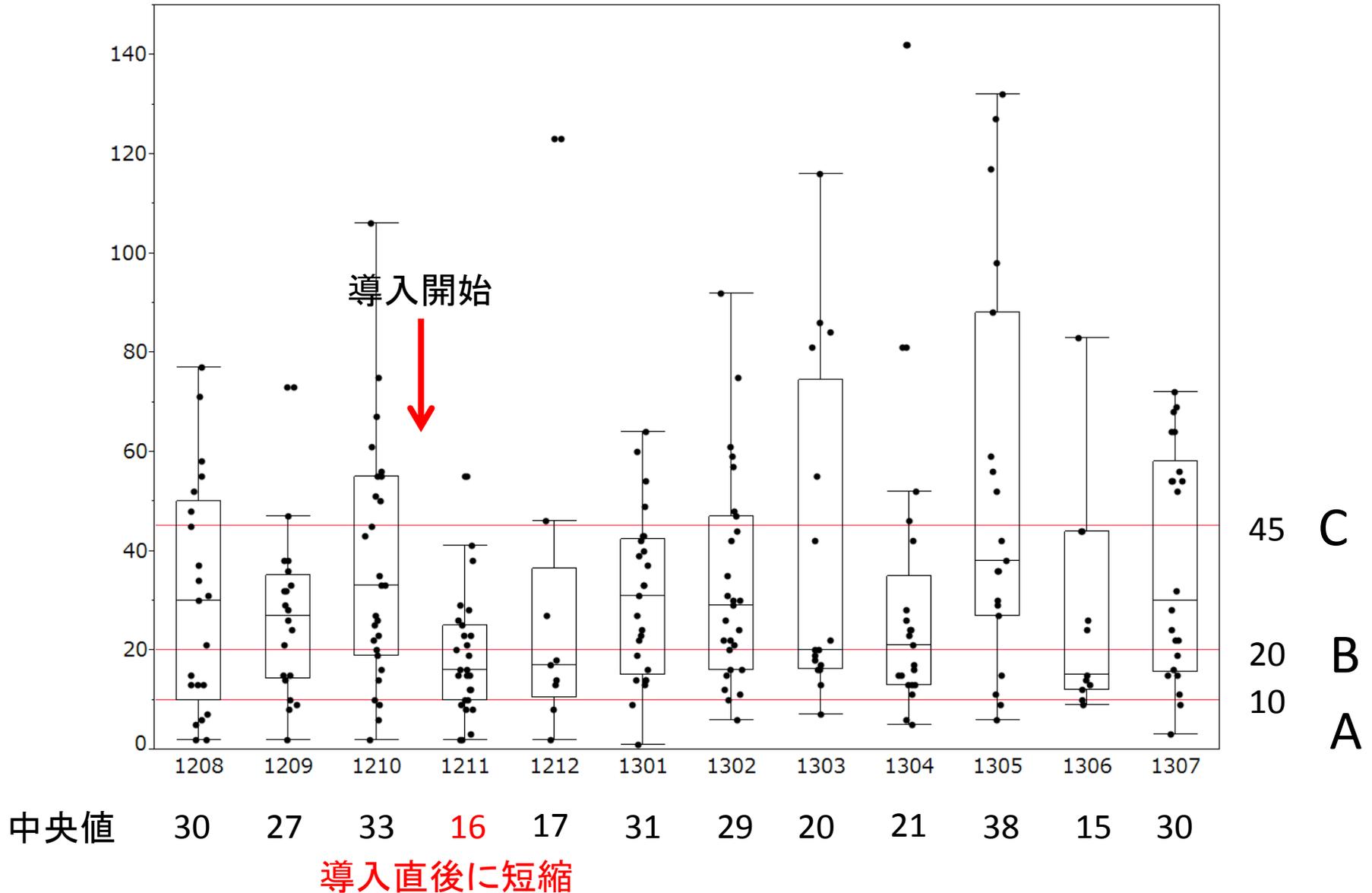
期間3ではさらに改善しているが、期間4ではAの割合が減少している

心不全と敗血症の比較



心不全 導入による変化が認められず
 期間により大きな変動があるが、AとBの割合は50%前後であり、Dは10%前後である

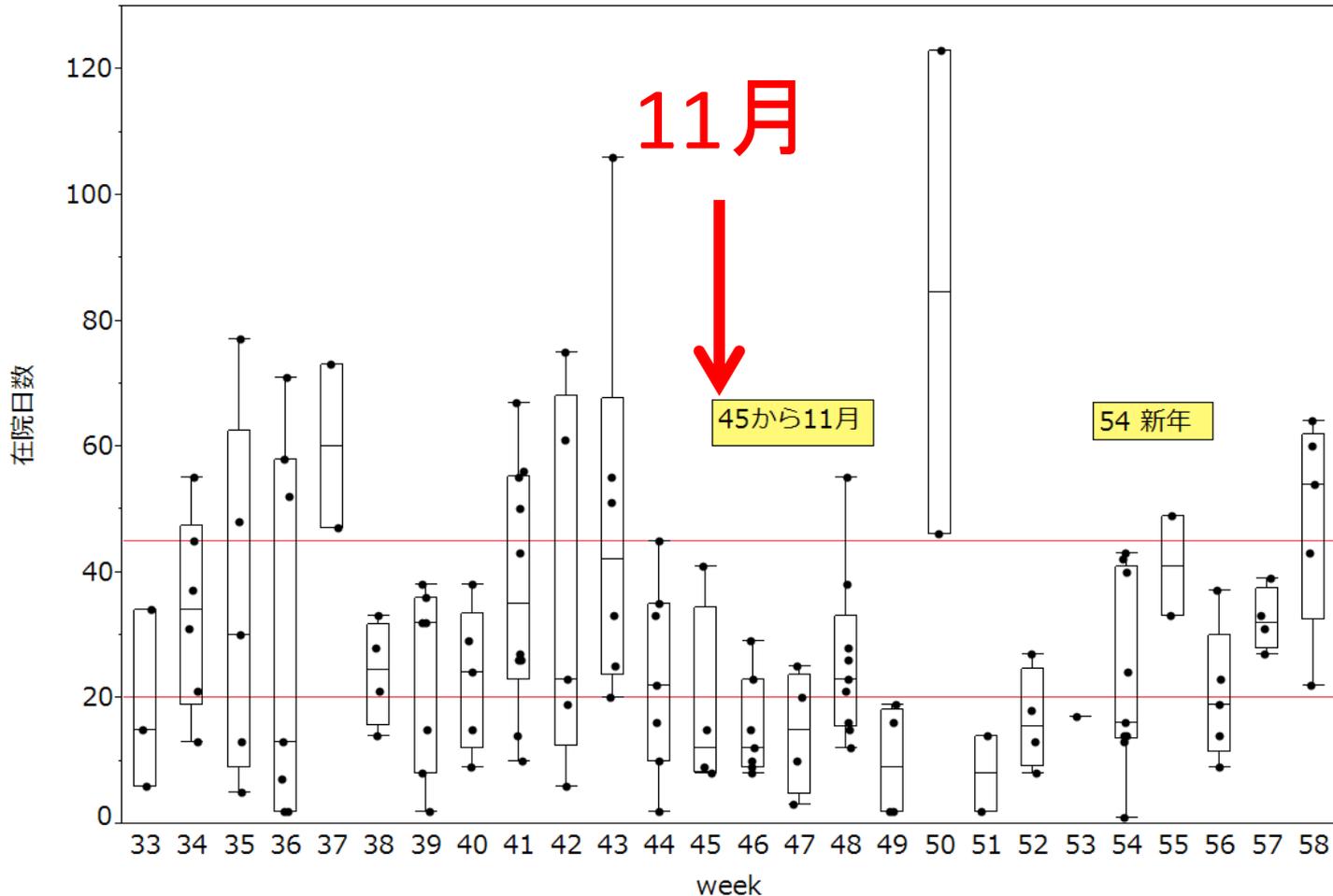
誤嚥性肺炎



誤嚥性肺炎 週ごとの変化

201208から201301

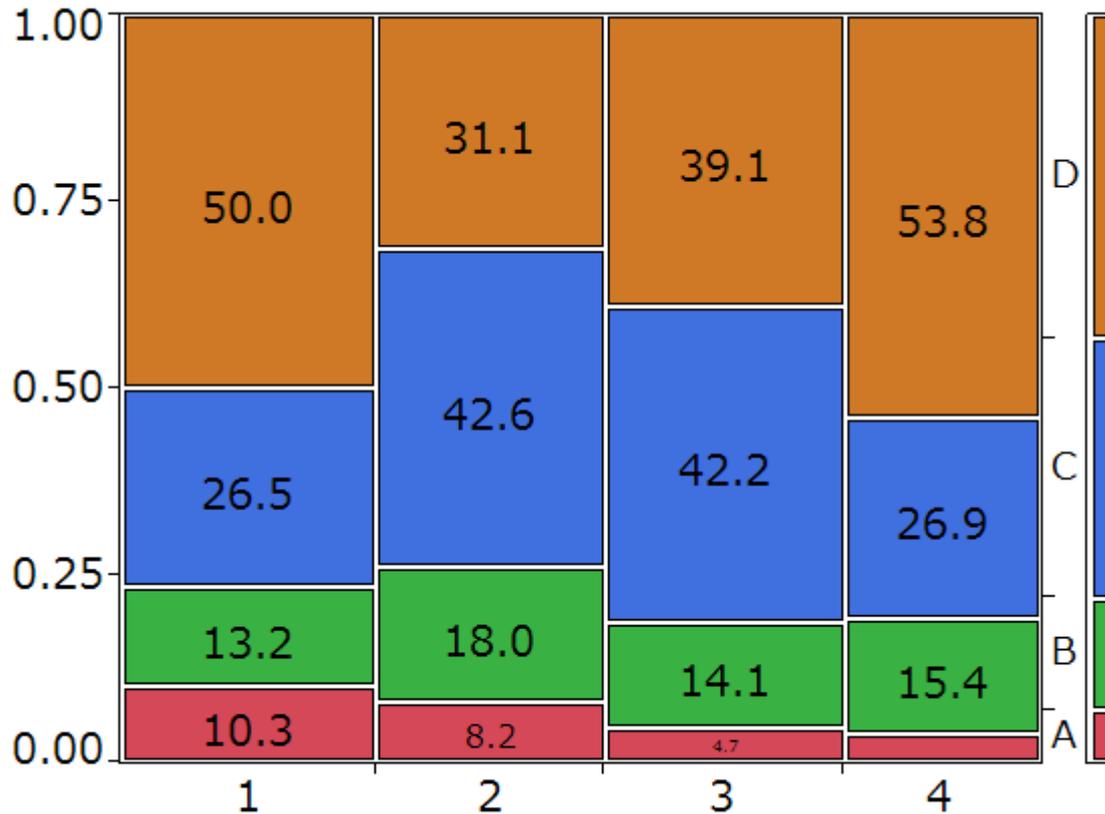
週	日数
41	35
42	23
43	42
44	22
45	12
46	12
47	15
48	23
49	9



なぜ導入直後に短縮したのか？

- 理由は分からない
 - 誤嚥防止のリハビリが強化された
 - 退院調整
- 誤嚥性肺炎の特性
 - 高齢者に多い
 - 他に多くの疾患を合併している
 - 在院日数の変動幅が大きい
- 推測
 - 誤嚥エピソードがあったので誤嚥性肺炎疑いで入院
 - 喀痰培養で菌が生えない
 - 陰性結果の報告が1日早くなった事が関係しているのか

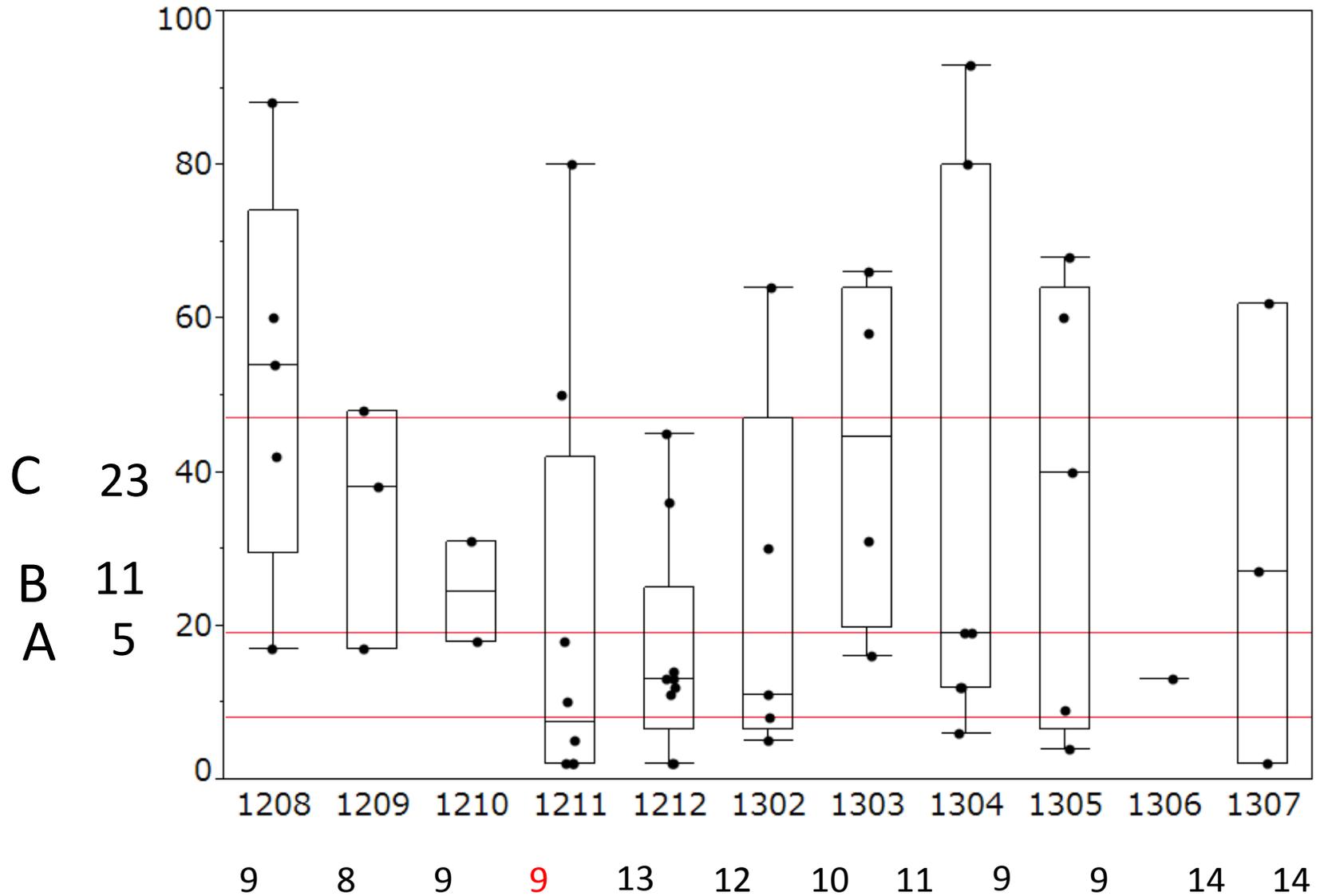
誤嚥性肺炎



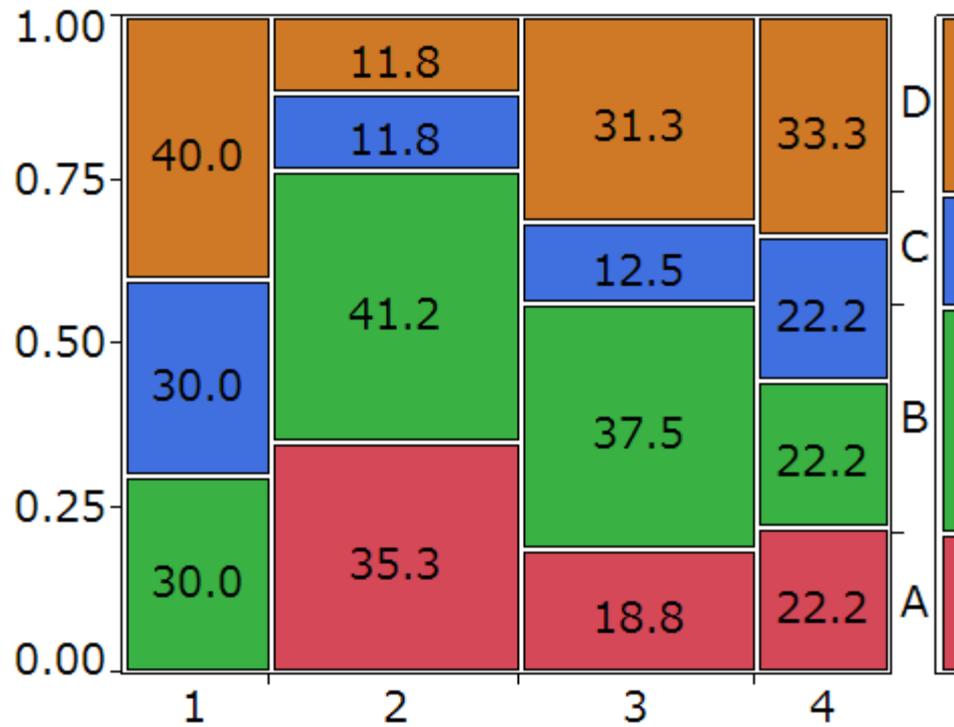
導入直後の3カ月は著しく短縮されているが、その後、元に戻っている

3カ月ごとの変化

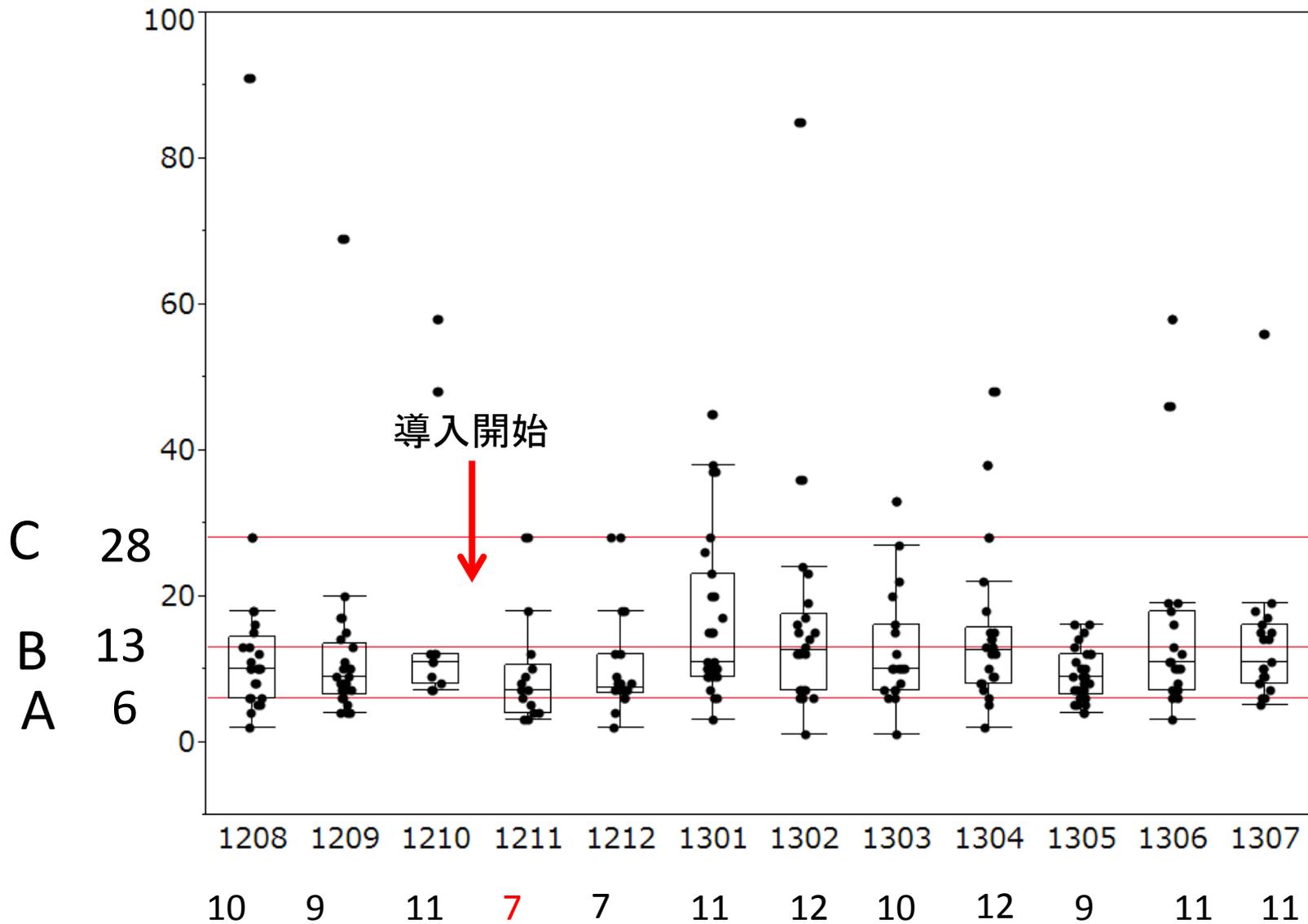
間質性肺炎



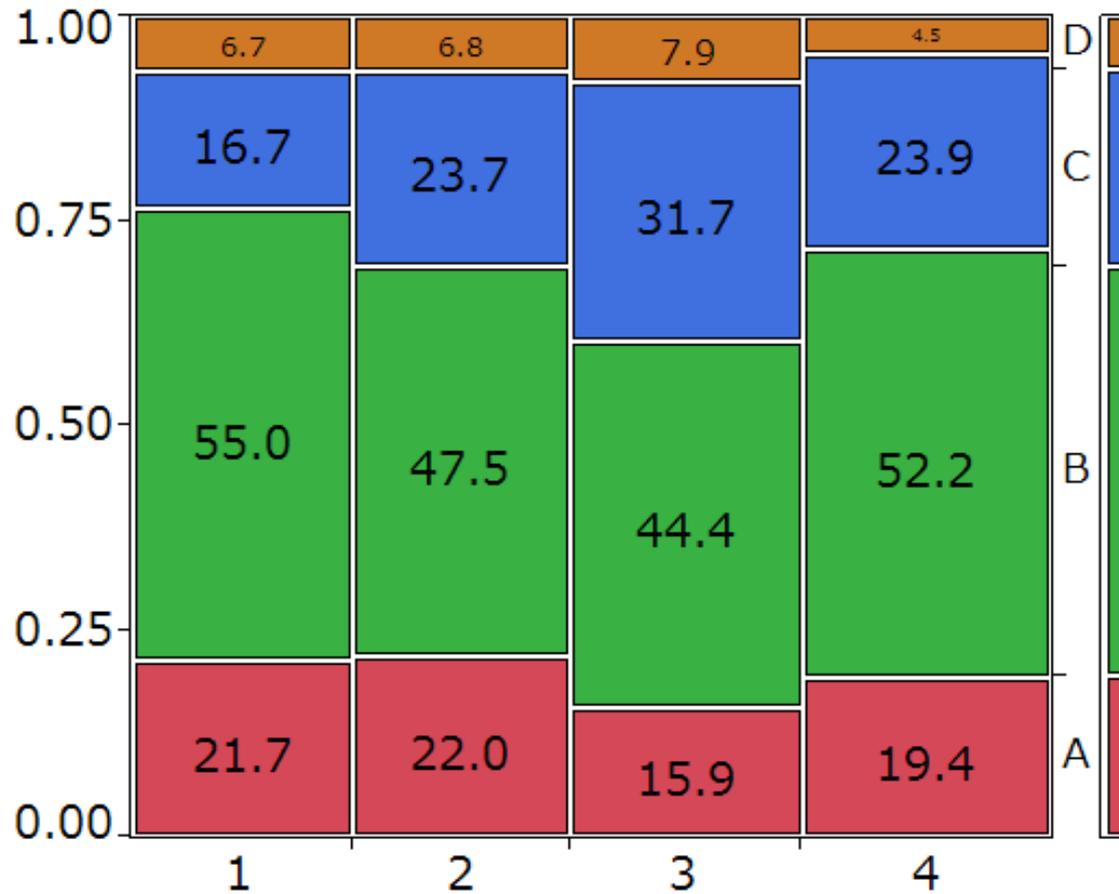
間質性肺炎



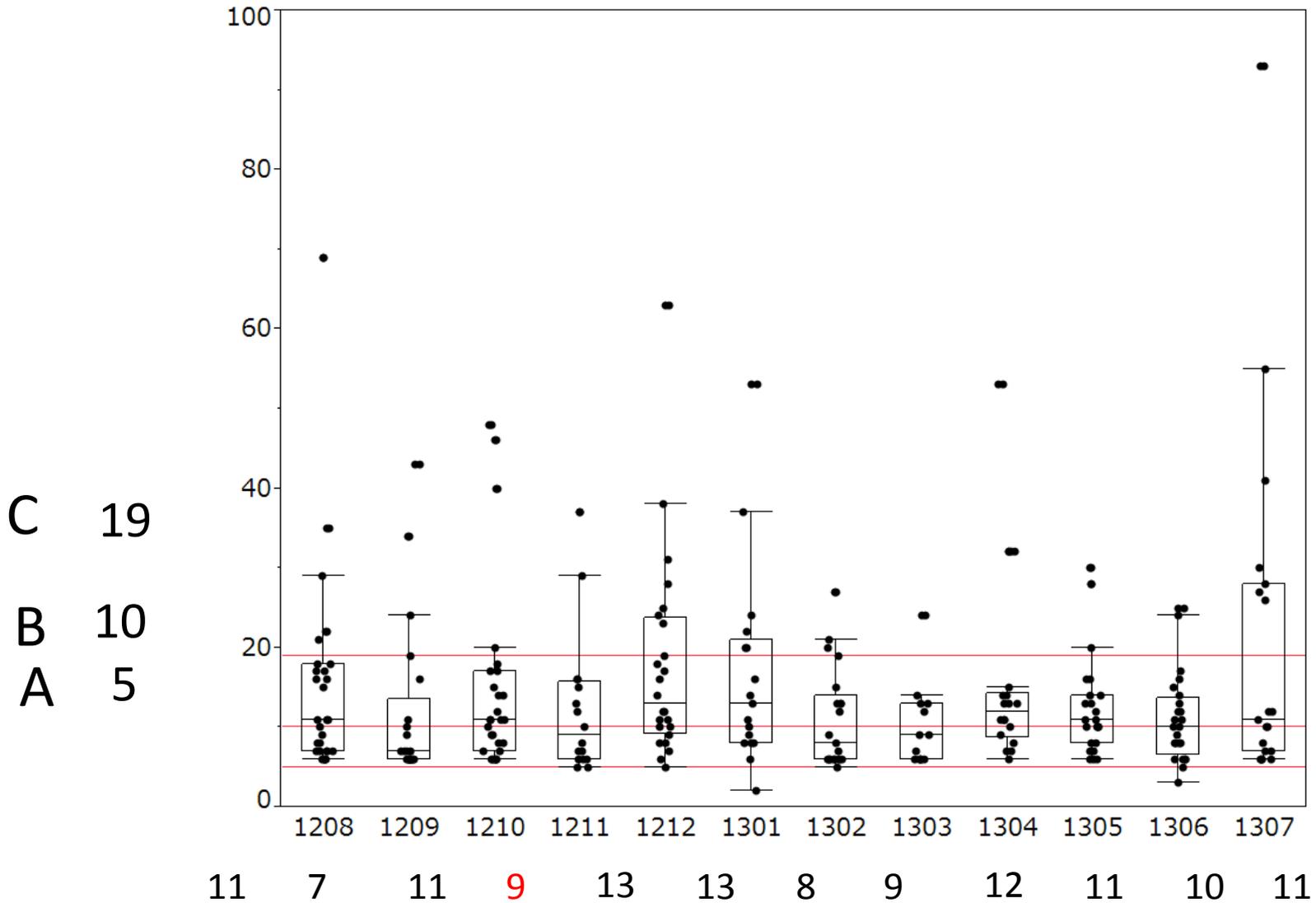
細菌性肺炎



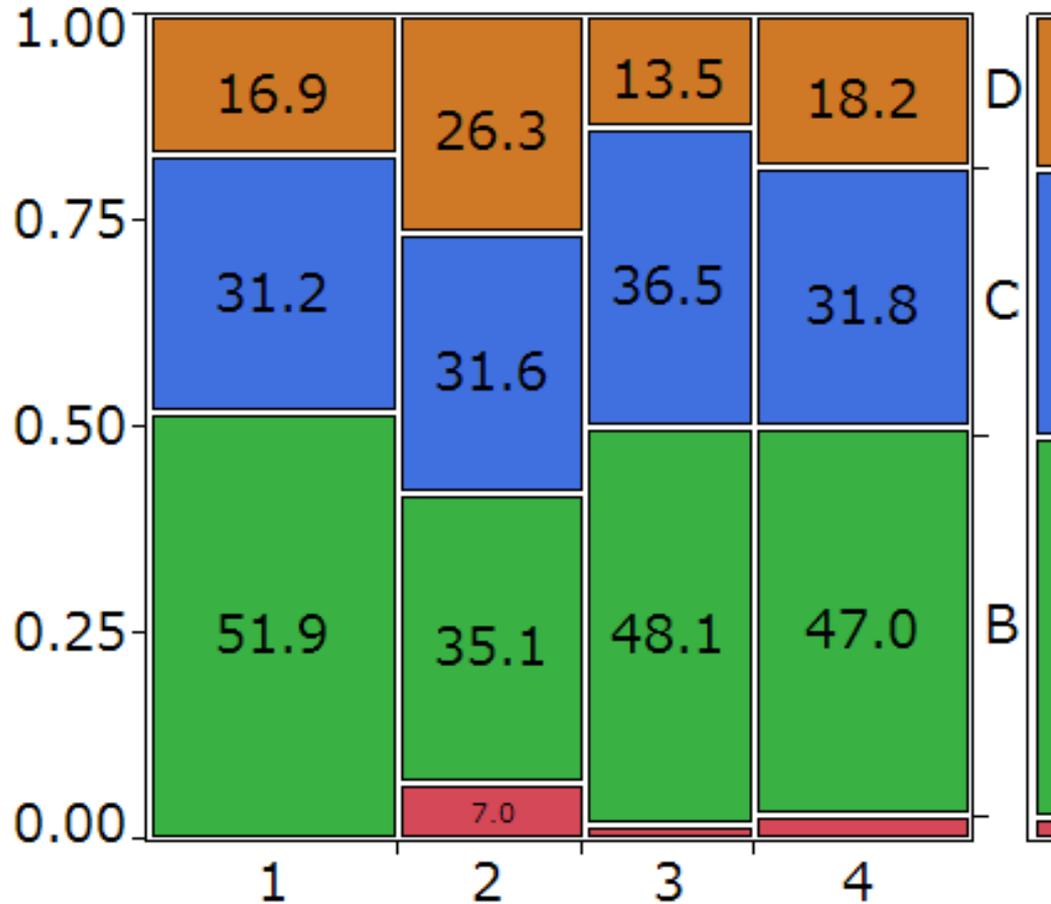
細菌性肺炎



胆石性胆のう炎

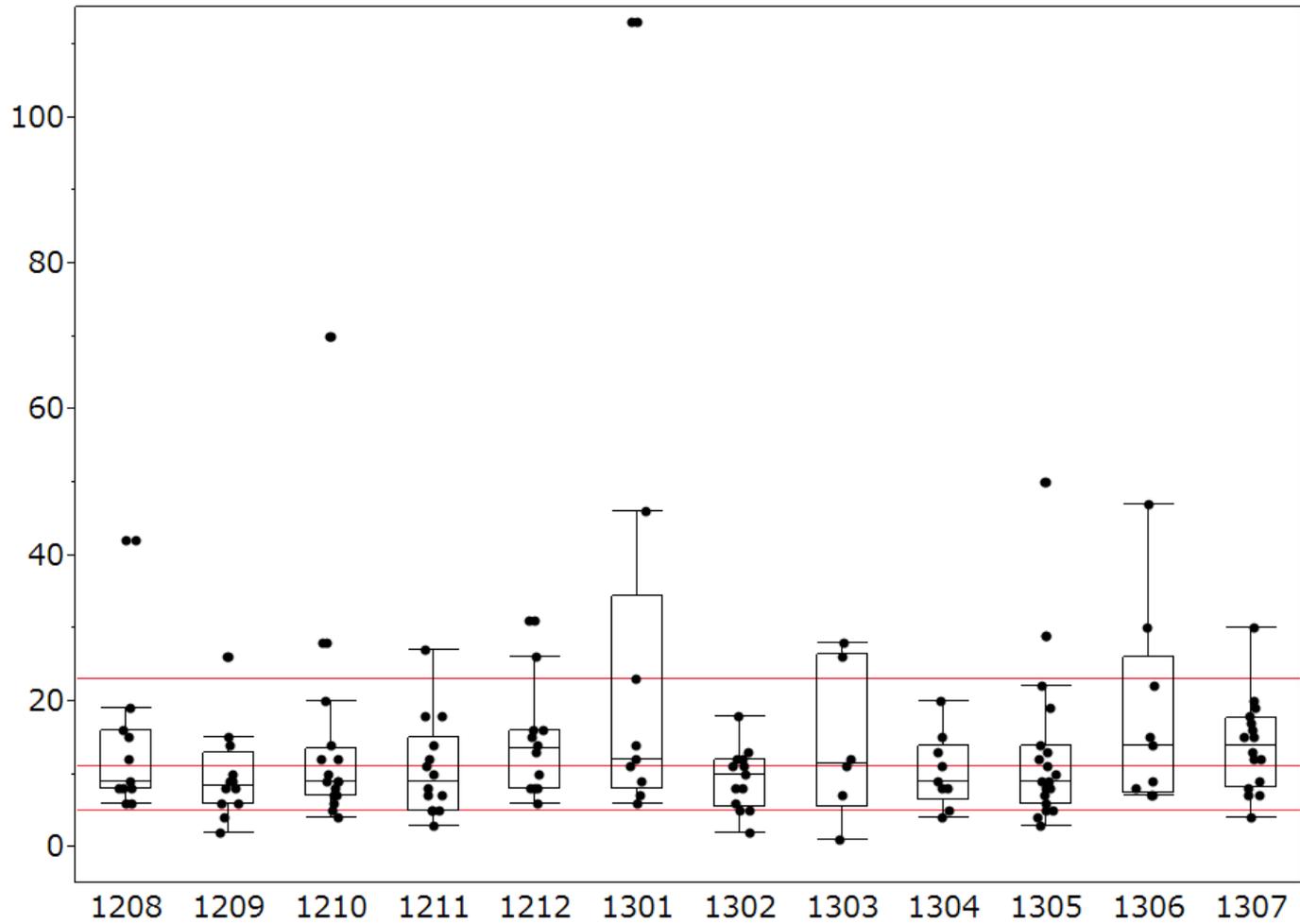


胆石性胆のう炎



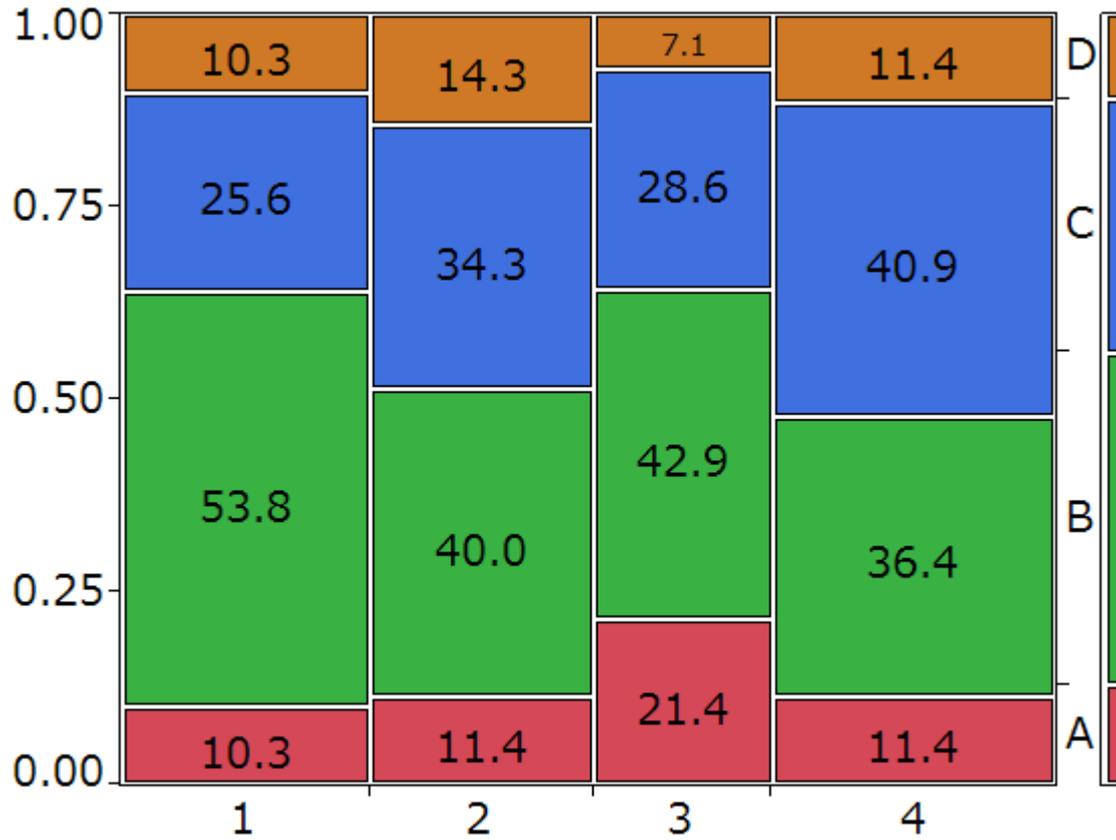
急性腎盂腎炎、尿路系感染症

C 23
B 11
A 5



9 8 9 9 13 12 10 11 9 9 14 14

腎・尿路感染

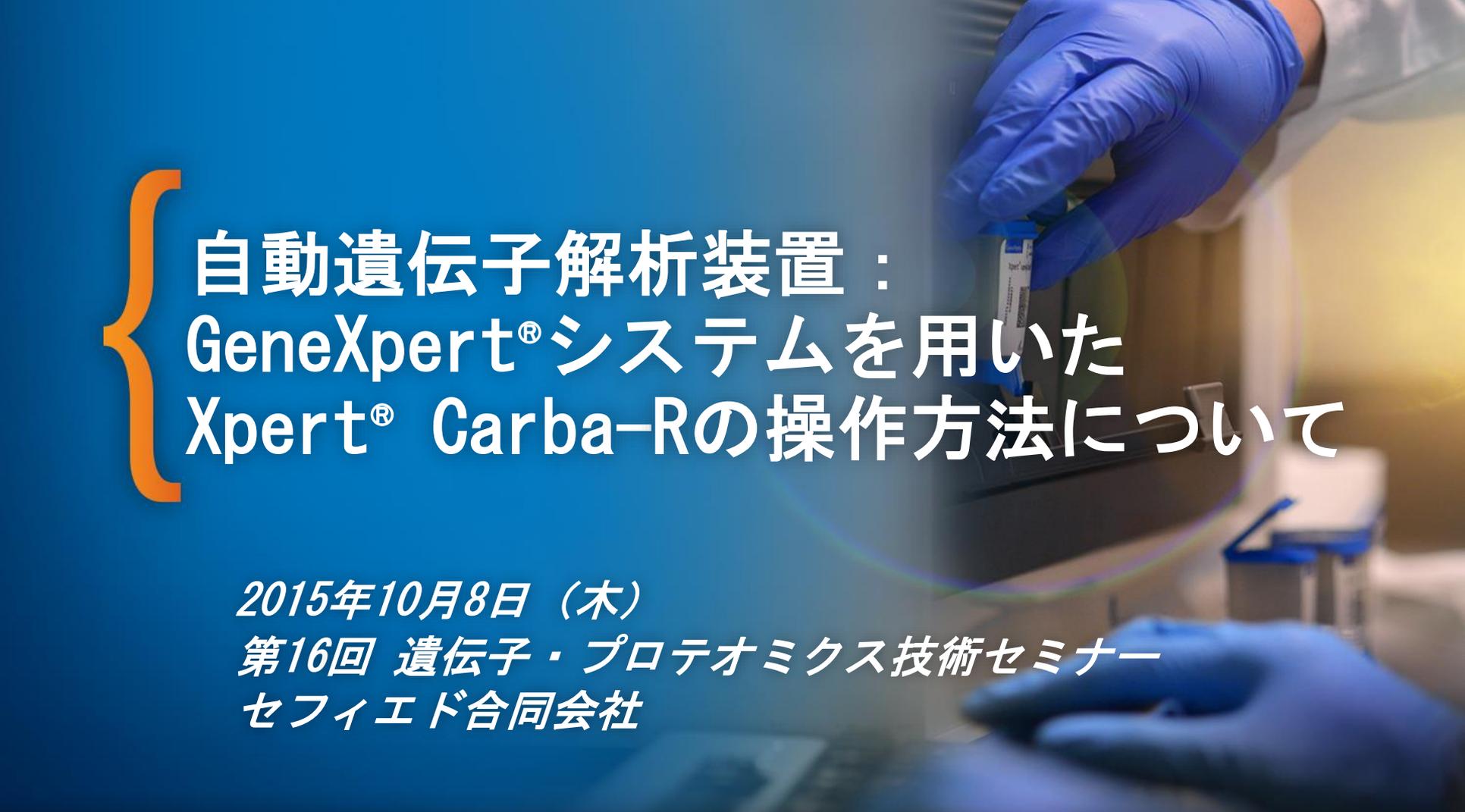


病名による解析のまとめ

- 分割表分析で3ヵ月ごとの推移をグラフ化することで在院日数の変化が観察できた
- Bが50%前後の疾患（胆石性胆のう炎、細菌性肺炎や腎尿路疾患）は導入による大きな変化は認めにくい
- 一方、Bが20から30%前後の疾患（敗血症、誤嚥性肺炎、間質性肺炎）では導入直後に在院日数短縮効果が認められた
- 特に敗血症では導入前後の3ヵ月で統計学的有意差を確認できた

まとめ

- 質量分析器の導入は、一部の疾患で導入直後に在院日数の大幅な短縮効果が認められる
- ただ、効果は数ヵ月単位で変化する
- 質量分析による迅速な菌名報告は医師の判断に大きな影響がある
- 導入をきっかけに効果を適切に評価することで病院全体への波及効果があると考えられる



自動遺伝子解析装置：
GeneXpert®システムを用いた
Xpert® Carba-Rの操作方法について

2015年10月8日（木）

第16回 遺伝子・プロテオミクス技術セミナー
セフィエド合同会社

GeneXpertシステムのコンセプト



遺伝子診断の本来の価値を最大限に発揮させるために



正確

検査結果



迅速

結果報告



簡便

操作性

GeneXpert® システムの特徴



- ① 核酸抽出からリアルタイムPCRによる遺伝子増幅・検出を完全自動化したシステム
- ② 独立したモジュールを採用
(モジュール: 核酸抽出からリアルタイムPCRを実施するユニット)
- ③ 全項目同一形状の密閉型の試薬カートリッジを採用し、試薬カートリッジ内で核酸抽出からリアルタイムPCRを実施
- ④ 1検体につき1試薬カートリッジを使用したオンデマンド検査が可能
- ⑤ 1台の装置で多項目検体にも対応
- ⑥ ランダムアクセス可能
- ⑦ すべての試薬カートリッジにSPC、PCCを採用し品質管理を実施
- ⑧ 試薬カートリッジ内で検体と装置が接触しない設計されており、コンタミネーションのリスクを最小限に抑制



Xpert® Carba-R: On-Demand Molecular Diagnostics

On the GeneXpert® and Infinity Systems



**Carba-R
Determination**

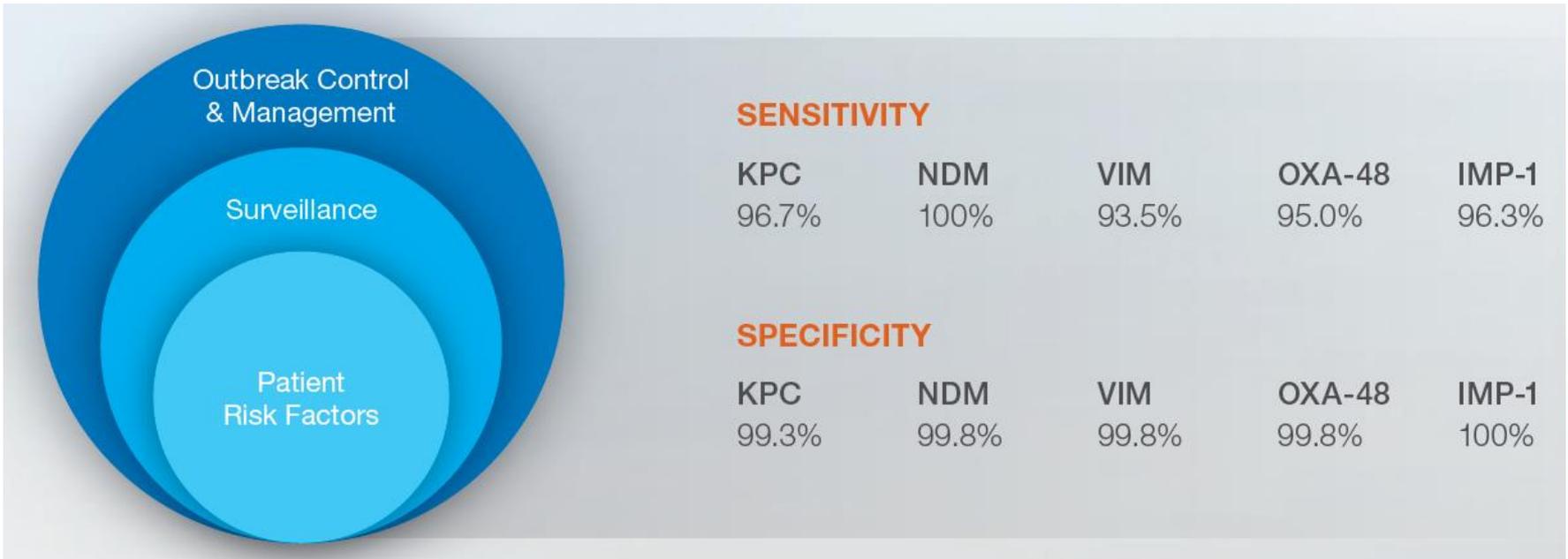
**Unprecedented
Ease-of-Use**

**Results in About 48
minutes**

Xpert® Carba-R

Catalog Number	GXCARBAR-CE-10
GeneXpert Systems	<ul style="list-style-type: none"> • 6 color modules • GX, DX or Xpertise Software version 4.3 or higher
Tests per kit	10
On-Board Contents (per test cartridge)	<ul style="list-style-type: none"> • Cartridge (10) • Sample Reagent (10) • Disposable (1.7 mL) Transfer Pipettes
Kit CD	<ul style="list-style-type: none"> • Assay Definition File (ADF) • Instruction to import ADF • Multi-language Package insert
Transfer pipettes	10
Storage	2-28° C
Target genes	<i>bla_{KPC}</i> <i>bla_{IMP-1}</i> <i>bla_{VIM}</i> <i>bla_{NDM-1}</i> <i>bla_{OXA-48}</i> (Control: SPC PCC)
Specimen	Rectal swab
Transport and Storage	Swabs in transport tube : 7 days at 2-28°C Swabs in sample reagent : 4 days at 2-28°C

Xpert[®] Carba-R Test: 性能



Limit of Detection (LoD)

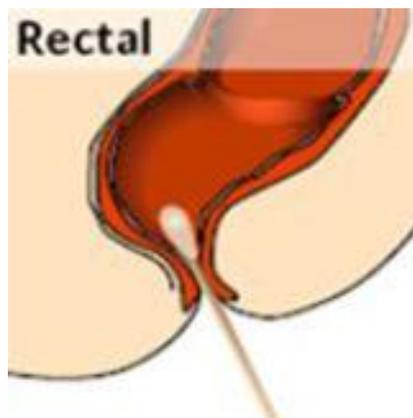
KPC	NDM	VIM	OXA-48	IMP1
~20 cfu/mL	~20 cfu/mL	~20 cfu/mL	~50 cfu/mL	~50 cfu/mL

検体採取から前処理



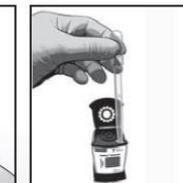
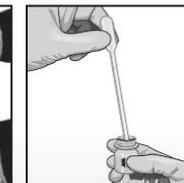
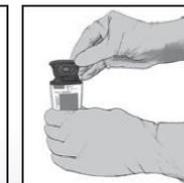
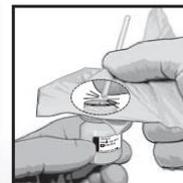
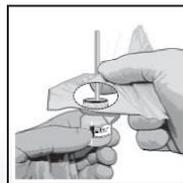
Sample Collection Device

← Score Mark



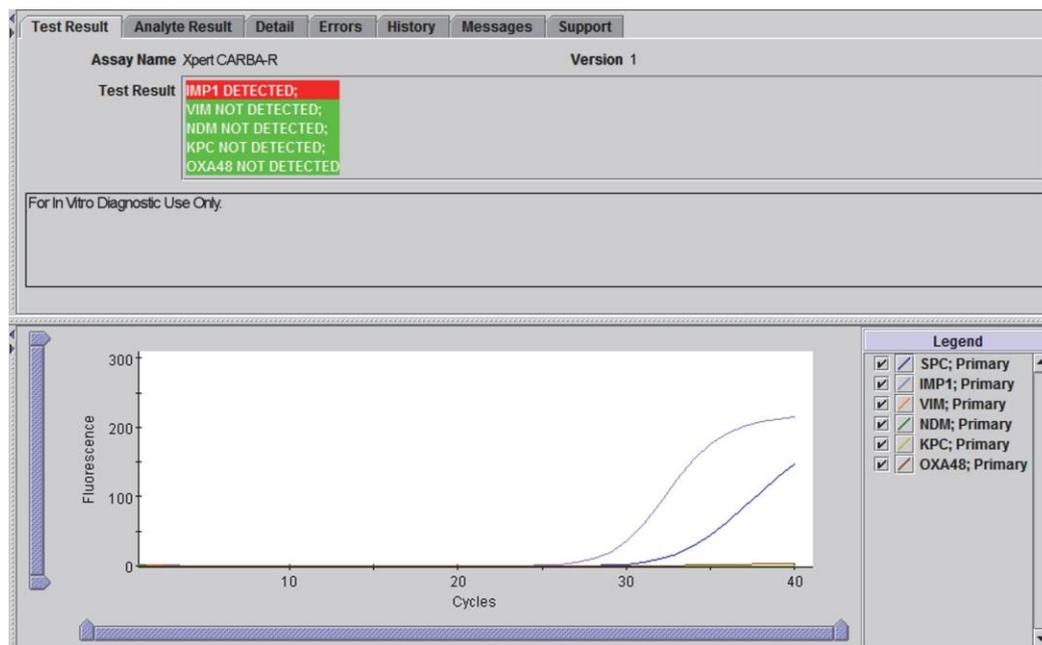
肛門に約1cm入れて優しく掻き回し、ケースに入れます

- 1 Obtain one Xpert cartridge and one Sample Reagent vial for each sample.
- 2 Insert the swab into the Sample Reagent vial.
- 3 Break the swab at the score mark near the opening of the vial.
- 4 Recap the Sample Reagent vial and vortex for 10 seconds.
- 5 Open the Xpert cartridge lid.
- 6 Aspirate the Sample Reagent up to the line on the supplied pipette.
- 7 Empty the pipette into the sample chamber.
- 8 Close the Xpert cartridge lid.
- 9 Start the test within the timeframe specified in the package insert.



Note: Do not hold the swab below the score mark. Use gauze or its equivalent to minimize the risk of contamination.

判定と結果



	IMP-1	VIM	NDM	KPC	OXA48	SPC	PCC
POS			いずれか陽性			NA	PASS
NEG	—	—	—	—	—	PASS	PASS
INVALID	—	—	—	—	—	FAIL	PASS
ERROR	—	—	—	—	—	No Result	FAIL*
NO RESULT							NA

GeneXpert PC 15/08/17 16:00:36

テストレポート

患者ID: 20150718058
 サンプルID: 058
 テストタイプ: 検体
 サンプルタイプ:

アッセイ情報

アッセイ	アッセイ Ver.	アッセイタイプ
Xpert Carba-R	1	In Vitro Diagnostic

テスト結果:

IMP1 DETECTED;
 VIM NOT DETECTED;
 NDM NOT DETECTED;
 KPC NOT DETECTED;
 OXA48 NOT DETECTED

テストおよび分析結果

分析名	Ct	エンドポイント	分析結果	プローブチェック結果
SPC	32.5	168	該当せず	PASS
IMP1	27.1	206	POS	PASS
VIM	0.0	0	NEG	PASS
NDM	0.0	0	NEG	PASS
KPC	0.0	0	NEG	PASS
OXA48	0.0	2	NEG	PASS

ユーザー: genexpert
 状況: 完了
 使用期限*: 15/10/11
 SW/バージョン: 4.6
 カートリッジ S/N*: 341509970
 試薬ロットID*: 02501

開始時間: 15/07/21 15:03:44
 終了時刻: 15/07/21 15:51:56
 機器シリアル番号: 805849
 モジュール S/N: 651454
 モジュール名: A1

注記:

For In Vitro Diagnostic Use Only.

GeneXpert® Dx System /バージョン 4.6 1 / 2 ページ

* If the probe check passed, the error is caused by a system component failure.



Thank You.

Visit us at www.cepheid.com



We are **a better way.**

 **Cepheid**[®]
A better way.

リキッド・バイオプシー 臨床検査への応用上の問題点

佐賀大学医学部臨床検査医学講座 末岡榮三朗

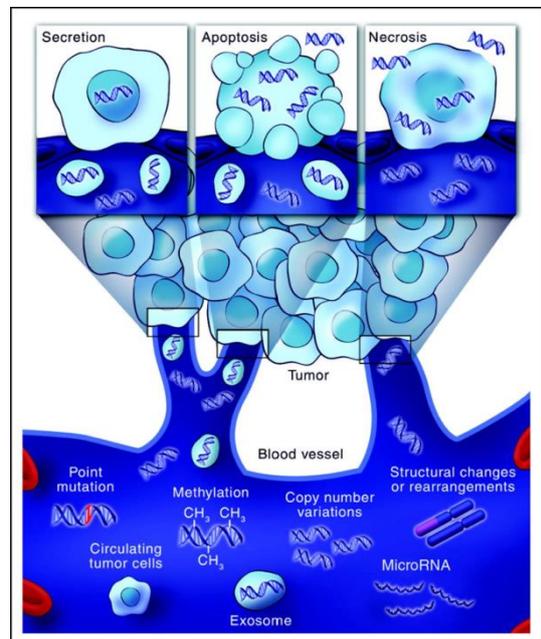
リキッド・バイオプシーは、腫瘍など組織の一部を採取して行っていた生体検査 (Biopsy) と同等の性能でかつ患者さんに負担の少ない検査を血液検査で実現しようとする検査手法である。その対象となる検体は循環血液中の腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell)、エキソソーム、オンコソームなどの構造体から、血中遊離核酸など幅広い材料から腫瘍特異性の高いマーカーを用いて診断に応用することを目的として研究が進んできた。最近ではがん領域のみならず、遺伝性疾患の出生前診断にまでその応用範囲は広がろうとしている。

がん診療におけるリキッド・バイオプシーの適応は、診断、病型の決定、治療反応性の予測、残存病変の評価、再発の早期診断、副作用の危険因子の同定など広い範囲での有用性が期待されている。

しかしながら、リキッド・バイオプシーを臨床検査に導入する際にはそれぞれの目的によって検討すべき内容も異なってくる。たとえば、診断や病型の判定、治療反応性の予測においては、より特異性が重視され、残存病変の評価や再発の早期発見については感度がより重要な因子となってくる。

今回のセミナーでは、がん研究におけるリキッド・バイオプシーの現状と問題点をレビューし、臨床応用の方向性について考察する。

次に、我々が行ってきた、血漿 DNA を用いた肺癌における EGFR の変異およびチロシンキナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)による治療後の耐性化に関与する EGFR T790M 変異高感度測定法の臨床効用について紹介する。また、臨床検査に導入するために避けられない、検体の質とサンプリング、検査精度および感度、臨床情報との連携のためのバイオバンクの問題についても簡単に触れてみたい。以上、「一般臨床に応用可能な遺伝子検査としてのリキッド・バイオプシー」をテーマに、リキッド・バイオプシーの世界的な現状、また臨床応用上の問題点について紹介したい。



Diaz L A , and Bardelli A JCO 2014;32:579-586