

体外診断用医薬品

承認番号 | 30600EZX00033000

テンプレート DNA 調製キット

MINtS® 肺癌マルチ CDx ライブラリー調製試薬キット

【全般的な注意】

- 本製品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用できない。
- 本製品の判定結果に基づく臨床診断、使用目的欄に記載した医薬品の適用は、医師が臨床症状や他の検査結果を含めて総合的に判断すること。
- 添付文書に記載された内容に従い使用すること。本製品の性能に由来しない事由(操作方法を誤った場合等)による誤った判定、またその判定に由来して発生した事項に対して、弊社は一切の責任を負わない。
- 遺伝子検査の知識や経験を持たない場合、検査結果の判定を誤る危険性があるため、本製品の使用にあたっては遺伝子検査の知識、経験を有した技術者の指導のもとで検査を実施すること。
- 複数検体を同時に取り扱う場合、検体の取り違いが起きないように十分に注意すること。
- 本製品を医薬品適応判定の補助として用いる際には、当該医薬品の本邦における最新の添付文書を参照すること。
- 使用する試薬及び装置の添付文書、取扱説明書又は使用説明書をよく読んでから使用すること。
- 本製品の構成試薬である Negative Control DNA 及び Negative Control RNA はヒト由来成分を含むため、感染のおそれがあるものとして検体と同様に取り扱うこと。
- 本製品で得られるアレル頻度値はライブラリー調製時のパイアスを含むため、実際の検体中におけるアレル頻度値とは異なる可能性があることに注意すること。

【形状・構造等(キットの構成)】

1. 構成試薬

2x RT Master Mix MINtS	960 µL × 1
20 mM Dithiothreitol	480 µL × 1
2x PCR Reaction Mix MINtS	1200 µL × 7
1st DNAP1 Primer Mix	192 µL × 1
2nd DNAP1 Primer Mix	192 µL × 1
1st RNAP1 Primer Mix	192 µL × 1
2nd RNAP1 Primer Mix	192 µL × 1
1st RNAP2 Primer Mix	192 µL × 1
2nd RNAP2 Primer Mix	192 µL × 1
Negative Control DNA	60 µL × 1
Negative Control RNA	60 µL × 1
Distilled Water	1000 µL × 6

下記構成試薬には、次の略名とロット番号、製造販売業者の略号(EKN)が記載されている。

構成試薬	チューブ記載事項	キャップ記載略号
2x RT Master Mix MINtS	RT MM ロット番号, EKN	RT MM
20 mM Dithiothreitol	DTT ロット番号, EKN	DTT
2x PCR Reaction Mix MINtS	PCR RM ロット番号, EKN	PCR RM
1st DNAP1 Primer Mix	1st D1 ロット番号, EKN	1st D1
2nd DNAP1 Primer Mix	2nd D1 ロット番号, EKN	2nd D1
1st RNAP1 Primer Mix	1st R1 ロット番号, EKN	1st R1
2nd RNAP1 Primer Mix	2nd R1 ロット番号, EKN	2nd R1
1st RNAP2 Primer Mix	1st R2 ロット番号, EKN	1st R2

2nd RNAP2 Primer Mix	2nd R2 ロット番号, EKN	2nd R2
Negative Control DNA	NC DNA ロット番号, EKN	NC DNA
Negative Control RNA	NC RNA ロット番号, EKN	NC RNA
Distilled Water	DW ロット番号, EKN	DW

2. 反応系に関する成分

2x RT Master Mix MINtS 中に以下、含有。

レトロウイルス由来逆転写酵素(RT), Random Hexamer, Oligo(dT)18, デオキシアデノシン 5' -3 リン酸(dATP), デオキシシチジン 5' -3 リン酸(dCTP), デオキシグアノシン 5' -3 リン酸(dGTP), デオキシチミジン 5' -3 リン酸(dTTP)

2x PCR Reaction Mix MINtS 中に以下、含有。

3' -5' エクソヌクレアーゼ活性(+)耐熱性 DNA 合成酵素(DNA pol), デオキシアデノシン 5' -3 リン酸(dATP), デオキシシチジン 5' -3 リン酸(dCTP), デオキシグアノシン 5' -3 リン酸(dGTP), デオキシチミジン 5' -3 リン酸(dTTP)

1st DNAP1 Primer Mix 中に以下、含有。記載はプライマー名称。

EGFR-ex18-1F, EGFR-ex18-1B, EGFR-ex19-1F, EGFR-ex19-1BRev1, EGFR-ex20-1F, EGFR-ex20-1B, EGFR-ex21-1F, EGFR-ex21-1B, BRAF-ex15-1F, BRAF-ex15-1B

2nd DNAP1 Primer Mix 中に以下、含有。記載はプライマー名称。

EGFR-ex18-2F, EGFR-ex18-2B, EGFR-ex19-2F, EGFR-ex19-2BRev1, EGFR-ex20-2F, EGFR-ex20-2B, EGFR-ex21-2F, EGFR-ex21-2B, BRAF-ex15-2F, BRAF-ex15-2B

1st RNAP1 Primer Mix 中に以下、含有。記載はプライマー名称。

EML4-ex2-1F2, EML4-ex4-1F, EML4-ex12-1F, EML4-ex16-1F, KIF5B-ex1-1F, KIF5B-ex4-1F, KIF5B-ex7-1F2, KIF5B-ex11-1F, KIF5B-ex14-1F, KIF5B-ex16-1F, KIF5B-ex20-1F, KIF5B-ex23-1F, TFG-ex4-1F2, KLC1-ex8-1F, ALK-ex20-1-1B, ALK-ex20-2-1B, OAZ1_1-1F, OAZ1_1-1B

2nd RNAP1 Primer Mix 中に以下、含有。記載はプライマー名称。

EML4-ex2-2F2, EML4-ex4-2F, EML4-ex12-2F, EML4-ex16-2F, KIF5B-ex1-2F, KIF5B-ex4-2F, KIF5B-ex7-2F2, KIF5B-ex11-2F, KIF5B-ex14-2F, KIF5B-ex16-2F, KIF5B-ex20-2F, KIF5B-ex23-2F, TFG-ex4-2F2, KLC1-ex8-2F, ALK-ex20-1-2B, ALK-ex20-2-2B, OAZ1_1-2F, OAZ1_1-2B

1st RNAP2 Primer Mix 中に以下、含有。記載はプライマー名称。

OAZ1_2-1F, OAZ1_2-1B

2nd RNAP2 Primer Mix 中に以下、含有。記載はプライマー名称。

OAZ1_2-2F, OAZ1_2-2B

【使用目的】

がん組織から抽出した DNA 中の遺伝子変異 (EGFR 遺伝子変異及び BRAF 遺伝子変異 (V600E)) 並びに RNA 中の融合遺伝子 (ALK 融合遺伝子) の検出のための塩基配列情報の取得

- EGFR 遺伝子変異：ゲフィチニブ、エルロチニブ塩酸塩、アファチニブマレイン酸塩、オシメルチニブメシル酸塩、ダコミチニブ水和物の非小細胞肺癌患者への適応を判定するための補助に用いる。
- BRAF 遺伝子変異 (V600E)：ダブラフェニブメシル酸塩及びトラメチニブ ジメチルスルホキシド付加物の非小細胞肺癌患者への適応を判定するための補助に用いる。
- ALK 融合遺伝子：アレクチニブ塩酸塩、クリゾチニブ、ブリグチニブ、セリチニブ、ロルラチニブの非小細胞肺癌患者への適応を判定するための補助に用いる。

【測定原理】

本製品は、次世代シーケンサー (MiSeqDx システム) を用いて腫瘍組織から抽出した核酸中の体細胞遺伝子変異を検出するためのライブラリー調製試薬である。

本製品の構成試薬のうち 2x RT Master Mix MINtS は逆転写酵素、逆転写プライマー、基質を含んでおり、トータル RNA を逆転写して相補的 DNA (cDNA) を得るために用いる。2x PCR Reaction Mix MINtS は DNA 合成酵素、基質を含んでおり、Primer Mix と組み合わせて用いることでゲノム DNA、cDNA、PCR 増幅産物を鋳型とする PCR による核酸増幅反応を行う。

ライブラリー調製の概要として、まず遺伝子配列特異的なプライマーを用いた遺伝子増幅 (1st PCR) を行う。つづいて遺伝子配列特異的な配列及びアダプター配列を有するプライマーを用いた遺伝子増幅 (2nd PCR) を行い、ユニバーサルなアダプター配列を有する増幅産物 (アンプリコン) を作製する。ユニバーサルなアダプター配列に相補的なプライマーで構成される MINtS インデックスキット for 384 samples (別売) を用いて検体識別配列 (インデックス配列) を付与する (3rd PCR)。本製品の構成試薬のプライマーのうち 1st DNAP1 Primer Mix, 2nd DNAP1 Primer Mix はゲノム DNA を対象に遺伝子増幅するためのプライマーで構成されており、EGFR 遺伝子変異検出プライマー、BRAF 遺伝子変異検出プライマーを含む。1st RNAP1 Primer Mix, 1st RNAP2 Primer Mix, 2nd RNAP1 Primer Mix, 2nd RNAP2 Primer Mix は cDNA を対象に融合遺伝子配列を増幅するためのプライマーで構成されており、ALK 融合遺伝子検出プライマー、内部標準遺伝子検出プライマーを含む。シーケンシング反応ののち得られた塩基配列データ (FASTQ ファイル) を、専用プログラム (遺伝子解析プログラム MINtS Analyzer) により解析し、遺伝子変異を検出する。本製品が解析する遺伝子変異を以下に示す。

	遺伝子	遺伝子変異
DNA	EGFR	EGFR_G719S
		EGFR_G719C
		EGFR_G719A
		EGFR_G719D
		EGFR_K745_E749delKELRE (Exon 19 deletion)
		EGFR_K745_A750>T (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_E749delELRE (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_A750delELREA (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_T751>I (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_A750delELREA (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_T751delELREAT (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_T751>A (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_T751>VA (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_S752>V (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_A750>P (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_T751>Q (Exon 19 deletion)
		EGFR_E746_S752>D (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_E749delLRE (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_A750>P (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_T751>P (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_S752delLREATS (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_P753>Q (Exon 19 deletion)

		EGFR_L747_T751>S (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_T751delLREAT (Exon 19 deletion)
		EGFR_L747_P753>S (Exon 19 deletion)
		EGFR_S768I
		EGFR_V769_D770insASV (Exon 20 insertion)
		EGFR_V769_D770insASV (Exon 20 insertion)
		EGFR_D770_N771insSVD (Exon 20 insertion)
		EGFR_H773_V774insNPH (Exon 20 insertion)
		EGFR_H773_V774insH (Exon 20 insertion)
		EGFR_L858R (2573T>G)
		EGFR_L858R (2573T>G_2574G>T)
		EGFR_L861Q (2582T>A)
		EGFR_L861R (2582T>G)
		EGFR_T790M
		BRAF
RNA	ALK	EML4_ALK_v1 (EML4_ALK_E13_A20)
		EML4_ALK_v2 (EML4_ALK_E20_A20)
		EML4_ALK_v3a (EML4_ALK_E6_A20)
		EML4_ALK_v3b
		EML4_ALK_v4
		EML4_ALK_v5a (EML4_ALK_E2_A20)
		EML4_ALK_v5b
		EML4_ALK_v6
		EML4_ALK_v8a
		EML4_ALK_v8b
		EML4_ALK_E6_A18
		EML4_ALK_E18_A20
		KIF5B_ALK_K2_A20
		KIF5B_ALK_K5_A20
		KIF5B_ALK_K7_A20
		KIF5B_ALK_K11_A20
		KIF5B_ALK_K17_A20
		KIF5B_ALK_K24_A20
		TFG_ALK_T4_A20
		KLC1_ALK_K9_A20

なお、本製品は定性検出キットであり、定量測定目的に開発されたものではない。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質・採取法

- 対象検体
 - 非小細胞肺癌由来の新鮮組織又は FFPE 組織
- 検体の採取方法 (新鮮組織)
 - 気管支鏡などの検体採取時に採取された組織診検体と細胞診検体を同一のチューブにいれ、良く振って懸濁し、細胞診検体を取得する。得られた細胞診検体の一部を 30 分以内に遠心し、上清を除いた沈査に核酸保存溶液 (RNAlater 等) を 1 mL 以上添加し、よく懸濁した後、冷蔵保管する。
- 検体の採取方法 (FFPE 組織)
 - FFPE 検体は最新のゲノム診療用病理組織検体取扱い規程に従い、作製された検体を用いる¹⁾。

2. 妨害物質

検体に由来する成分としてヘモグロビン、断片化ゲノム DNA、パラフィンによる本製品への影響を評価したところ、それぞれ最大 4 mg/mL, 6 µg/mL, 165 mg において測定への影響は、社内で検討した結果認められなかった。

核酸抽出過程 (Maxwell RSC Whole Blood DNA Kit 及び Maxwell RSC simplyRNA Cells Kit を使用時) に由来する成分としてキシレン、ミネラルオイル、RNAlater、Proteinase K、1-チオグリセロール、Wash buffer による本製品への影響を評価したところ、それぞれ最大 80 µL, 75 µL, 140 µL, 45 µL, 300 µL, 6 µL において測定への影響は、社内で検討した結果認められなかった。

3. その他

本製品は、MiSeqDx システム及び遺伝子解析プログラム MINtS Analyzer と組み合わせて用いる専用試薬である。

【用法・用量(操作方法)】

1. 必要な器具・器材・試薬等

- 1) MINtS インデックスキット for 384 samples (栄研化学株式会社)
 - 2) 検体保管用試薬: RNAlater™ Stabilization Solution(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)
 - 3) DNA 分離用試薬: Maxwell RSC Whole Blood DNA Kit(プロメガ株式会社)
 - 4) RNA 分離用試薬: Maxwell RSC simplyRNA Cells Kit(プロメガ株式会社)
 - 5) 自動核酸抽出装置: Maxwell RSC Instrument(プロメガ株式会社)
 - 6) 核酸精製試薬: AMPure XP(ベックマン・コールター株式会社)
 - 7) 自動核酸精製装置: Biomek Genomic Workstation(ベックマン・コールター株式会社)
 - 8) 核酸定量用試薬: Quant-iT 1X dsDNA HS Assay Kit(サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社)、Quant-iT RNA Assay Kit(同左)
 - 9) 核酸定量用蛍光プレートリーダー
 - 10) マイクロ遠心機(2 mL ローター付, 20,000×g)
 - 11) ヒートリッド機能付きサーマルサイクラー
 - 12) 96 ウェル PCR プレート遠心機(480×g 以上)
 - 13) ボルテックスミキサー
 - 14) マイクロピペット(0.5~10 µL, 10~100 µL, 100~1,000 µL) 及びフィルター付きチップ
 - 15) 電動ピペッター及びディスプレイザブルピペット
 - 16) 0.2 mL PCR チューブ, 8 連 PCR チューブ, もしくは 96 ウェル PCR プレート
 - 17) 96 ウェル PCR プレートシール※1
 - 18) 加熱式 96 ウェル PCR プレートシーラー※2
 - 19) 冷却用アルミ製ラック及び氷(クラッシュアイス)又はそれに相当するもの
 - 20) MiSeqDx システム(イルミナ株式会社)※3
 - 21) 遺伝子解析プログラム MINtS Analyzer
 - 22) マグネットスタンド
 - 23) 80%エタノール
 - 24) DNase-free 超純水
 - 25) ライブラリー希釈バッファー(10 mM Tris-HCl pH8.0 with 0.1% tween20)
 - 26) 1M NaOH
- ※1: 96 ウェル PCR プレートをを用いる場合に必要。
 ※2: 熱式シールを用いる場合に必要。
 ※3: 本製品に対応した専用モジュールのインストールが必要。

2. サンプルの調製(DNA・RNA 抽出液の調製)

検体から DNA 分離用試薬を用いて得られた抽出液を DNA 抽出液、RNA 分離用試薬を用いて得られた抽出液を RNA 抽出液とする。DNA 抽出液及び RNA 抽出液は精製水等を用いて 2 ng/µL に調整しておくこと。なお、陰性コントロール反応として DNA 抽出液の代わりに Negative Control DNA を、RNA 抽出液の代わりに Negative Control RNA をそれぞれ用いることができる。

3. 試薬の調製方法

- 1) 2x RT Master Mix MINtS (RT MM)
2x PCR Reaction Mix MINtS (PCR RM)
(1) 15~30°Cで融解後、よく転倒混和し、氷上におく。
(2) スピンドアウンしてから使用する。
- 2) 1st DNAP1 Primer Mix (1st D1)
2nd DNAP1 Primer Mix (2nd D1)
1st RNAP1 Primer Mix (1st R1)
2nd RNAP1 Primer Mix (2nd R1)
1st RNAP2 Primer Mix (1st R2)
2nd RNAP2 Primer Mix (2nd R2)
20 mM Dithiothreitol (DTT)
(1) 15~30°Cで融解後、ボルテックスし、氷上におく。
(2) スピンドアウンしてから使用する。
- 3) Negative Control DNA (NC DNA)
Negative Control RNA (NC RNA)
(1) 15~30°Cで融解後、ボルテックスし、氷上におく。
(2) スピンドアウンしてから使用する。
(3) 毎回測定を推奨する。
- 4) Distilled Water (DW)
(1) スピンドアウンしてから使用する。

4. 操作方法

本製品は 3 種類のマルチプレックス PCR を並行して行う事でライブラリーを調製する。DNA 抽出液、RNA 抽出液はあらかじめ 2 ng/µL に調整して用いる。各 PCR 反応のフローを下表に示す。

	DNAP1	RNAP1	RNAP2
逆転写反応	-	RNA抽出液 or NC RNA	
1st PCR	DNA抽出液 or NC DNA	cDNA	cDNA
2nd PCR	1st PCR精製液	1st PCR精製液	1st PCR精製液
3rd PCR	2nd PCR反応液		

1) 逆転写反応(RNA)

- (1) 1 反応あたり以下の用量を氷上にて調製する。

逆転写反応	
20 mM Dithiothreitol (DTT)	5 µL
2x RT Master Mix MINtS (RT MM)	10 µL
RNA 抽出液	5 µL
Total	20 µL

- (2) 転倒混和後、スピンドアウンする。
- (3) サーマルサイクラーを以下の温度サイクルに設定し、逆転写反応を行う。
25°C 10分
50°C 10分
85°C 5分
- (4) 反応後溶液を cDNA とする。

2) 1st PCR 反応 (DNaP1/ RNAP1/ RNAP2)

- (1) 1 反応あたり以下の用量を氷上にて調製する。

	1st PCR 反応		
	DNaP1	RNAP1	RNAP2
Distilled Water (DW)	5.5 μ L	5.5 μ L	5.5 μ L
2x PCR Reaction Mix MINtS (PCR RM)	12.5 μ L	12.5 μ L	12.5 μ L
1st DNaP1 Primer Mix (1st D1)	2 μ L		
1st RNAP1 Primer Mix (1st R1)		2 μ L	
1st RNAP2 Primer Mix (1st R2)			2 μ L
DNA 抽出液	5 μ L		
cDNA		5 μ L	5 μ L
Total	25 μ L	25 μ L	25 μ L

- (2) 転倒混和後、スピンドウンする。
 (3) サーマルサイクラーを以下の温度サイクルに設定し、PCR 反応を行う。
 98°C 30 秒
 98°C 15 秒 \downarrow
 62°C 30 秒 | 34 サイクル
 72°C 30 秒 \downarrow
 72°C 2 分
 4°C 停止
 (4) 以降の作業は 15~30°Cにて行う。
 (5) PCR 反応後反応液 20 μ L と AMPure XP 36 μ L を混合する。
 (6) 5 分間静置後、マグネットスタンドにて 2 分間集磁する。
 (7) 上清を除去する。
 (8) 80%エタノール 150 μ L を添加する。
 (9) 上清が透明であることを確認して上清を除去する。
 (10) 再度 80%エタノール 150 μ L を添加する。
 (11) 上清が透明であることを確認して上清を除去する。
 (12) 5 分間チューブの蓋を開けて乾燥させる。
 (13) DNase-free 超純水 25 μ L を加えて良く懸濁する。
 (14) マグネットスタンドに設置し 5 分間静置する。
 (15) 上清を回収して、新しい容器に保管する。これを 1st PCR DNaP1/ RNAP1/ RNAP2 反応後精製液とする。

3) 2nd PCR 反応 (DNaP1/ RNAP1/ RNAP2)

- (1) 1 反応あたり以下の用量を氷上にて調製する。

	2nd PCR 反応		
	DNaP1	RNAP1	RNAP1
Distilled Water (DW)	5.5 μ L	5.5 μ L	5.5 μ L
2x PCR Reaction Mix MINtS (PCR RM)	12.5 μ L	12.5 μ L	12.5 μ L
2nd DNaP1 Primer Mix (2nd D1)	2 μ L		
2nd RNAP1 Primer Mix (2nd R1)		2 μ L	
2nd RNAP2 Primer Mix (2nd R2)			2 μ L
1st PCR DNaP1 反応後精製液	5 μ L		
1st PCR RNAP1 反応後精製液		5 μ L	
1st PCR RNAP2 反応後精製液			5 μ L
Total	25 μ L	25 μ L	25 μ L

- (2) 転倒混和後、スピンドウンする。
 (3) サーマルサイクラーを以下の温度サイクルに設定し、PCR 反応を行う。
 98°C 30 秒
 98°C 15 秒 \downarrow
 62°C 30 秒 | 6 サイクル
 72°C 30 秒 \downarrow

72°C 2 分

4°C 停止

- (4) 反応後溶液を 2nd PCR DNaP1/ RNAP1/ RNAP2 反応液とする。

4) 3rd PCR 反応 (DNaP1 + RNAP1 + RNAP2)

- (1) 1 反応あたり以下の用量を氷上にて調製する。

3rd PCR 反応	
Distilled Water (DW)	2.5 μ L
2x PCR Reaction Mix MINtS (PCR RM)	12.5 μ L
MINtS インデックスキット for 384 samples	2.5 μ L
2nd PCR DNaP1 反応液	2.5 μ L
2nd PCR RNAP1 反応液	2.5 μ L
2nd PCR RNAP2 反応液	2.5 μ L
Total	25 μ L

- (2) 転倒混和後、スピンドウンする。
 (3) サーマルサイクラーを以下の温度サイクルに設定し、PCR 反応を行う。
 98°C 30 秒
 98°C 15 秒 \downarrow
 62°C 30 秒 | 6 サイクル
 72°C 30 秒 \downarrow
 72°C 2 分
 4°C 停止
 (4) 以降の作業は室温にて行う。
 (5) PCR 反応後反応液 20 μ L と AMPure XP 28 μ L を混合する。
 (6) 5 分間静置後、マグネットスタンドにて 2 分間集磁する。
 (7) 上清を除去する。
 (8) 80%エタノール 150 μ L を添加する。
 (9) 上清が透明であることを確認して上清を除去する。
 (10) 再度 80%エタノール 150 μ L を添加する。
 (11) 上清が透明であることを確認して上清を除去する。
 (12) 5 分間チューブの蓋を開けて乾燥させる。
 (13) DNase-free 超純水 25 μ L を加えて良く懸濁する。
 (14) マグネットスタンドに設置し 5 分間静置する。
 (15) 上清を回収して、新しい容器に保管する。これを 3rd PCR 反応後精製液とする。

5) サンプルプーリング及び濃度調整

- (1) 3rd PCR 反応後精製液を Quant-iT™ 1X dsDNA Assay Kit 等を用いて核酸定量を行う。
 (2) 3rd PCR 反応後精製液を濃度が均等となるよう全てプーリングする。プーリング後、再度定量する。
 (3) プーリングしたサンプルはアガロースゲル等を用いて電気泳動し、100 - 700 bps の区間に産物が得られていることを確認する(推奨)。
 (4) 平均鎖長と定量値を用いてモル濃度に換算する。これをシークエンシングライブラリーとする。

6) MiSeqDx システムによるシークエンシング

- (1) シークエンシングライブラリーをライブラリー希釈バッファーにて 4 nM に希釈する。
 (2) 4 nM シークエンシングライブラリーと 0.2 M NaOH を等量混合し、室温で 5 分間静置する。
 (3) 静置後ただちに MiSeqDx システムの構成品である MiSeqDx 試薬キットに添付されている HT1 にてシークエンシングライブラリーを最終濃度 12 pM に調製し、氷上に置く。
 (4) 12 pM シークエンシングライブラリー 600 μ L を MiSeqDx 試薬カートリッジに添加し、MiSeqDx 本体の操作指示に従って、ランを開始する。

7) 遺伝子解析プログラム MINtS Analyzer による解析

- (1) シークエンシングより得られた FASTQ ファイルを遺伝子解析プログラム MINtS Analyzer を使用して解析する。詳細は本プログラムの添付文書及び取扱説明書を参照す

ること。

<操作にあたっての注意>

- 凍結試薬は融解後、成分が均一でない可能性があるため、良く混合して用いること。
- コンタミネーションを回避するために、検体採取は本製品を使用する部屋とは別の部屋で実施するか、あるいは検査区域を分割して別のエリアで行うこと。必要に応じて、クリーンベンチの使用又は手袋やアイソレーションガウンの着用等でコンタミネーションを防ぐ措置を取ること。
- PCR 反応産物を開封する際は、1,500×g 以上で1分間遠心した後、コンタミネーションに十分注意して開封すること。
- RNA 分子は非常に不安定なため、取扱いには注意が必要である。特に RNA 分解酵素 (RNase) により容易に分解されてしまう。RNase は材料である検体、検査器具、試薬、更には検査従事者自身の唾液や汗からも混入するおそれがある上、熱に強くオートクレーブ処理でも完全に失活させることができない。また、DNA 分解酵素 (DNase) も増幅反応に悪影響を及ぼすことがわかっている。このため、極力 RNase 及び DNase の混入を防ぐことが重要であり、そのために以下の注意が必要となる。
 - RNA 検査を行う検査台や検査器具を他と区別する。
 - 検査従事者は、必ず手袋、マスクを着用し、検査従事者自身の唾液や汗からの RNase, DNase の混入を防ぐ。
- 80%エタノールは揮発により濃度が変化するため、開封状態で放置しないこと。
- 操作方法に記載のピペッティング操作は精度が同等であれば自動分注機等に置き換えられる。

【測定結果の判定法】

本製品を用いて調製したライブラリーをシークエンシングすることにより得られる FASTQ ファイルを、遺伝子解析プログラム MINtS Analyzer によって解析する。判定結果は陽性、陰性、判定不可のいずれかに自動的に判定され、レポート出力される。陽性の場合には変異型が併せてレポート出力される。詳細は本プログラムの添付文書及び取扱説明書を参照すること。

【性能】

1. 解析能力試験

本製品の性能の規格を以下に示す。

- 全ての遺伝子項目について判定可否基準を満たした反応が全体の反応数のうち 96%以上であること。
- 判定可否基準を満たした反応において、高濃度陽性管理検体を 3 回以上、低濃度陽性管理検体を 6 回以上、陰性管理検体を 6 回以上、同時に測定したとき、陽性管理検体については対象の遺伝子変異を陽性と判定し、陰性管理検体については陰性と判定すること。

2. 最小検出感度

本製品の最小検出感度を以下の表に示す。

遺伝子	変異型	最小検出感度
EGFR	G719X	1.50%
	S768I	1.50%
	Exon 19 deletion	1.48%
	L858R	1.48%
	Exon 20 insertion	1.49%
	L861X	1.55%
	T790M	1.41%
BRAF	V600E	1.41%
ALK	EML4-ALK Fusion	186 コピー/テスト

3. 関連性試験

先進医療 (NEJ021C 試験) から供された検体および臨床研究 (NEJ021D 試験) の試験データより、薬事承認された既存の体外診断用医薬品を対照品とする本製品の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率を評価した。

1) EGFR 遺伝子変異検出に係る同等性評価

非小細胞肺癌由来の 126 検体 (陽性検体 76 例、陰性検体 50

例) を用いて、既承認対照品 (A 社リアルタイム PCR 法) と同等性評価を実施した。

表 1. A 社リアルタイム PCR 法を対照品とした測定結果の一致率

		対照品		
		陽性	陰性	計
本製品	陽性	75	1	76
	陰性	1	49	50
	計	76	50	126

陽性一致率 : 98.7% (75/76, 95%CI: 96.1 - 100)

陰性一致率 : 98% (49/50, 95%CI: 94.1 - 100)

全体一致率 : 98.4% (124/126, 95%CI: 96.2 - 100)

本製品で陽性と判定された 1 例は、EGFR L858R が変異頻度 1.7% で検出されたが、対照品 A では陰性と判定された。これは、2 法間の感度の違いによる結果の乖離と考察される。

本製品で陰性と判定された 1 例は、対照品 A では EGFR Exon 19 deletion 陽性と判定された。これは、本製品未登録の変異型であったと考察される。

表 2. A 社リアルタイム PCR 法を対照品とした変異毎の一致率

	陽性一致率	陰性一致率	全体一致率
Exon 19 del	95.5% (21/22)	100% (78/78)	99% (99/100)
T790M	100% (27/27)	100% (99/99)	100% (126/126)
L858R	100% (24/24)	98.7% (75/76)	99% (99/100)

また、その他の既承認対照品 (B 社リアルタイム PCR 法) についても同様に非小細胞肺癌由来の 100 検体 (陽性検体 50 例、陰性検体 50 例) を用いて、同等性評価を実施した。

表 3. B 社リアルタイム PCR 法を対照品とした測定結果の一致率

		対照品		
		陽性	陰性	計
本製品	陽性	49	0	49
	陰性	1	50	51
	計	50	50	100

陽性一致率 : 98% (49/50, 95%CI: 94.1 - 100)

陰性一致率 : 100% (50/50, 95%CI: 100 - 100)

全体一致率 : 99% (99/100, 95%CI: 97 - 100)

本製品で陰性と判定された 1 例は、対照品 B では EGFR G719X 陽性と判定された。本製品が出力した参考情報には EGFR E709K が検出されていた。対照品 B は E709K を検出対象としないが、リアルタイム PCR 法であるため、近傍に生じた変異を対象変異である G719X として検出した可能性が考察される。

表 4. B 社リアルタイム PCR 法を対照品とした変異毎の一致率

	陽性一致率	陰性一致率	全体一致率
Exon 19 del	100% (24/24)	100% (76/76)	100% (100/100)
T790M	100% (3/3)	100% (97/97)	100% (100/100)
L858R	100% (23/23)	100% (77/77)	100% (100/100)

2) BRAF 遺伝子変異 (V600E) 検出に係る同等性評価

非小細胞肺癌由来の 72 検体 (陽性検体 22 例、陰性検体 50 例) を用いて、既承認対照品 (C 社 NGS 法) と同等性評価を実施した。

表 5. C 社 NGS 法を対照品とした測定結果の一致率

		対照品		
		陽性	陰性	計
本製品	陽性	22	0	22
	陰性	0	50	50
	計	22	50	72

陽性一致率 : 100% (22/22, 95%CI: 100 - 100)

陰性一致率 : 100% (50/50, 95%CI: 100 - 100)

全体一致率 : 100% (72/72, 95%CI: 100 - 100)

3) ALK 融合遺伝子検出に係る同等性評価

非小細胞肺癌由来 69 検体(陽性検体 19 例, 陰性検体 50 例)を用いて、既承認対照品(D 社 IHC 法)と同等性評価を実施した。

表 6. D 社 IHC 法を対照品とした測定結果の一致率

		対照品		
		陽性	陰性	計
本製品	陽性	18	0	18
	陰性	1	50	51
	計	19	50	69

陽性一致率 : 94.7% (18/19, 95%CI: 84.7 - 100)

陰性一致率 : 100% (50/50, 95%CI: 100 - 100)

全体一致率 : 98.6% (68/69, 95%CI: 95.7 - 100)

本製品で陰性と判定された 1 例は、対照品 D では ALK 融合遺伝子陽性と判定された。当該症例について本製品のシーケンシングリード数を確認したところ EML4-ALK 融合遺伝子が 270 リードとなっており低い測定値であったことから感度付近による結果の乖離と考察される。

また、その他の既承認対照品 (E 社 FISH 法) についても同様に非小細胞肺癌由来の 70 検体(陽性検体 20 例, 陰性検体 50 例)を用いて、同等性評価を実施した。

表 7. E 社 FISH 法を対照品とした測定結果の一致率

		対照品		
		陽性	陰性	計
本製品	陽性	18	1	19
	陰性	2	49	51
	計	20	50	70

陽性一致率 : 90% (18/20, 95%CI: 76.9 - 100)

陰性一致率 : 98% (49/50, 95%CI: 94.1 - 100)

全体一致率 : 95.7% (67/70, 95%CI: 91 - 100)

本製品で陽性となった 1 例は、対照品 E では ALK 融合遺伝子陰性と判定された。当該症例について、既承認の体外診断用医薬品 (IHC 法) の検査結果を確認したところ、ALK 融合遺伝子陽性と判定されており本製品の結果と一致していた。

本製品で陰性と判定された 2 例は、対照品 E では ALK 融合遺伝子陽性と判定された。当該症例について、1 例は本製品のシーケンシングリード数を確認したところ EML4-ALK 融合遺伝子が 270 リードとなっており低い測定値であったことから感度付近による結果の乖離と考察される。また、1 例は本製品参考情報陽性 (TGGCCATGCTGGACCTAAAG-ALK Exon 20) が得られており、本製品の未登録変異配列であったと考察される。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 1) 検体は感染の危険があるものとして注意して取り扱い、必要なバイオハザード対策を実施すること。
- 2) 凍結試薬を取り扱う際は、凍傷のおそれがあるため手袋を着用すること。
- 3) 試薬が誤って目や口、皮膚に付着したときは、直ちに大量の水で十分に洗い流し、必要があれば医師の手当てを受けること。

2. 使用上の注意

- 1) 試薬は指定の貯蔵方法で保存すること。
- 2) 試薬の劣化を防止するために、使用時は必要な試薬だけをキットケースから取り出して使用すること。
- 3) 使用期限を過ぎた試薬は使わないこと。
- 4) 本製品で調製したシーケンシングライブラリーを一時保管する場合、-20℃以下で保管し、一週間以内にシーケンシングを実施すること。
- 5) 他社が市販するインデックスキットと組み合わせて使用しないこと。
- 6) 他のロットと組み合わせて使用しないこと。また、試薬の注

ぎ足しは行わないこと。

- 7) PCR 増幅産物、Negative Control DNA, Negative Control RNA をこぼすなどの漏出が起きた場合、ただちに 0.5%次亜塩素酸にて洗浄すること。
- 8) 本製品で調製したシーケンシングライブラリーを MiSeqDx システムにて解析する際は専用モジュールが必要となるため、必ず本製品使用前にインストールしておくこと。
- 9) DNA 分離用試薬及び RNA 分離用試薬は、抽出後核酸の純度が吸光度 A260/A280 \geq 1.7 を得る性能が担保された試薬を用いること。

3. 廃棄上の注意

- 1) 反応後のチューブは使用後、焼却処理又は密閉できるビニールの袋を二重に施し医療廃棄物として処理する。増幅産物の飛散防止のため、廃棄の際にオートクレーブ処理は行わないこと。
- 2) 反応チューブ及び構成試薬チューブはポリプロピレン (PP)、チューブ用トレイは PET、アルミパックはアルミ、キットケースは紙を主な材質としている。
- 3) 使用後の試薬や容器及び器具類は、医療廃棄物等に関する規定及び、水質汚濁防止法等の各種規制に従い、各施設の責任において処理すること。
- 4) 未使用の試薬は、使用後の試薬と同様に廃棄処理を行うこと。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法 : -20℃以下

有効期間 : 12 ヶ月間

【包装単位】

製品名	包装単位	製品コード
MINtS 肺癌マルチ CDx ライブラリー調製試薬キット	96 テスト分	E-LM10

【主要文献】

- 1) 日本病理学会:ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程

MINtS は栄研化学株式会社の登録商標です。

Maxwell はプロメガ株式会社の登録商標です。

MiSeqDx は Illumina, Inc. の登録商標です。

【問い合わせ先】

栄研化学株式会社 お客様相談窓口

フリーダイヤル ☎ 0120-560-198

【製造販売業者の名称及び住所】

栄研化学株式会社

〒329-0114 栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地

製造販売元  **栄研化学株式会社 (EKN)**
栃木県下都賀郡野木町野木 143 番地