

この添付文書をよく読んでから使用してください。
また、必要時に読めるように保管しておいてください。

体外診断用医薬品

** 2018 年 8 月改訂 (第 8 版)

* 2018 年 8 月改訂 (第 7 版)

製造販売承認番号: 22800EZ00011000

EGFR 遺伝子変異検出キット

コバス® EGFR 変異検出キット v2.0

【重要な基本的注意】

1. 血漿検査では、腫瘍由来 DNA が血漿中にじゅうぶんに漏出していないために、腫瘍組織には EGFR 遺伝子変異が存在しても EGFR 遺伝子変異が検出できない可能性が考えられます (性能 3. (1)、(2)、(3)、(6) 参照)。そのため血漿検査が先に実施され、EGFR 遺伝子変異陰性の結果が得られた場合には、可能な限り組織検査の実施を考慮してください。
2. 組織検査で EGFR 遺伝子 T790M 変異陰性かつ血漿検査で EGFR 遺伝子 T790M 変異陽性の集団が少なからず存在しますが、当該集団におけるオシメルチニブメシル酸塩の有効性は確認されていません (臨床的意義 3、4 及び性能 3. (6) 参照)。
3. 上記を踏まえ、血漿検査は組織検査と完全に置き換わる検査ではないことをじゅうぶんに理解したうえで検査を実施してください。

*【全般的な注意】

1. 本検査の被験者に対し、検査の目的・方法及び精度、特に不可避な偽陽性・偽陰性を含む診断限界などについて正確な情報を伝えてください。
2. 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
3. 添付文書に記載された使用目的及び用法・用量に従って使用してください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。
4. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。
5. 適用可能なタイプの変異陽性と判定された場合でも偽陽性の可能性を考慮し、EGFR-TKI 投与に際し、診断結果とその限界及び偽陽性だった場合に考えられる不利益についてじゅうぶんに説明してください。また、投与後はじゅうぶんな経過観察を行ってください。
6. 本品は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織 (FFPET) を試料として使用する場合、検査に用いられた DNA の 5% 以上に遺伝子変異が含まれる場合に陽性と判定されるように設計された診断薬であり、性能には限界があります。*本数値は、野生型と変異型の FFPET 検体より抽出した DNA を用いて検証された数値です。
7. FFPET を試料として使用する場合、HE 染色した標本を用い、腫瘍細胞が標本にじゅうぶんに含まれていることを確認してください。なお、FFPET 中の腫瘍の割合が 10% 未満の場合は、マクロダイセクションを行い、腫瘍の割合を高めた後 DNA 抽出を行ってください。
8. 本品をゲフィチニブ、エルロチニブ塩酸塩、アファチニブマレイン酸塩及びオシメルチニブメシル酸塩の適応を判定するための補助として用いる場合には、当該薬剤の本邦における最新の添付文書を参照のうえ使用してください。
9. 本品は体外診断用であり、癌組織又は血漿から抽出した DNA を用いた EGFR-TKI 投与前の非小細胞肺癌の検査以外の目的には使用しないでください。
10. 血漿検査の選択とその結果の解釈の際には、日本肺癌学会が発出している「肺癌患者における EGFR 遺伝子変異検査の手引き」等の最新の情報を参考にしてください。
11. 本品は血漿を試料として使用する場合、100 コピー/mL 以上の変異 DNA が含まれる場合に陽性と判定されるように設計された診断薬であり、性能には限界があります。*本数値は、EGFR 遺伝子変異を有する細胞株由来 DNA を断片化し、健康者血漿に添加した試料より抽出した DNA を用いて検証された数値です。

【形状・構造等(キットの構成)】

コバス EGFR 変異検出キット v2.0

1. コバス EGFR 変異検出キット v2.0 マスターミックス 1 [EGFR MMX-1] 2 × 0.48 mL
プライマー-EGFRD39_56FC1
プライマー-EGFRD39_47F1
プライマー-EGFRD33_47F3
プライマー-EGFRD35_52F1
プライマー-EGFRD39_58F1
プライマー-EGFRD36_53F2
プライマー-EGFRD38_52F2
プライマー-EGFRD35_49F3
プライマー-EGFRD40_54F5

プライマー-EGFRD52_76F15
プライマー-EGFRD40_51F8
プライマー-EGFRD36_50F4
プライマー-EGFRD37_55F3
プライマー-EGFRD40_57F4
プライマー-EGFR_EX20LF
プライマー-EGFRX19R1
プライマー-EGFR_S768IASR12
蛍光標識 DNA プローブ-EGFRX19SPS
蛍光標識 DNA プローブ-EGFR_EX20LP5
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸 (dATP)
2'-デオキシチジン-5'-三リン酸 (dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸 (dGTP)
2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸 (dUTP)
Z05-AS1 DNA ポリメラーゼ

2. コバス EGFR 変異検出キット v2.0 マスターミックス 2 [EGFR MMX-2] 2 × 0.48 mL
プライマー-EGFR_EX21F4
プライマー-EGFR_T790M_F2
プライマー-EGFR_E21_ASR29
プライマー-EGFR_T790MASR3
蛍光標識 DNA プローブ-EGFR_E21_P2
蛍光標識 DNA プローブ-EGFR_T790M_P3
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸 (dATP)
2'-デオキシチジン-5'-三リン酸 (dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸 (dGTP)
2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸 (dUTP)
Z05-AS1 DNA ポリメラーゼ
3. コバス EGFR 変異検出キット v2.0 マスターミックス 3 v2 [EGFR MMX-3 v2] 2 × 0.48 mL
プライマー-EGFR_G719X_F1
プライマー-EGFRG719CASR11
プライマー-EGFRG719SASR6B
プライマー-EGFR_EX20LF
プライマー-EGFR_G719AASR2
プライマー-EGFRX20I07ASR1
プライマー-EGFRX20I10ASR1
プライマー-EGFRX20I19ASR3
プライマー-EGFR_EX21_F5
プライマー-EGFR_L861QASR9B
蛍光標識 DNA プローブ-EGFR_G719X_P3
蛍光標識 DNA プローブ-EGFR_EX20LP5
蛍光標識 DNA プローブ-EGFR_E21_P5
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸 (dATP)
2'-デオキシチジン-5'-三リン酸 (dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸 (dGTP)
2'-デオキシウリジン-5'-三リン酸 (dUTP)
Z05-AS1 DNA ポリメラーゼ
4. コバス EGFR 変異検出キット v2.0 酢酸マグネシウム試薬 [MGAC] 6 × 0.2 mL
酢酸マグネシウム
5. コバス EGFR 変異検出キット v2.0 変異コントロール [EGFR MC] 6 × 0.1 mL
変異型 DNA 塩基配列含有プラスミド DNA
6. コバス EGFR 変異検出キット v2.0 希釈液 [DNA SD] 2 × 3.5 mL
トリスバッファー

*【使用目的】

癌組織又は血漿から抽出したゲノム DNA 中の EGFR 遺伝子変異の検出 (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及びオシメルチニブメシル酸塩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】

1. 本キットはリアルタイム PCR 法を用いて FFPET 又は血漿から抽出したゲノム DNA 中の上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子のエクソン 18, 19, 20 及び 21 中の変異を検出します。
EGFR 変異検出試験は次の 2 つの主なプロセスに基づきます。
(1) FFPET 又は血漿からゲノム DNA の抽出。
(2) プライマー及び蛍光標識したオリゴヌクレオチド・プローブを使用したターゲット DNA の PCR 増幅及び検出。

本品の検出対象変異一覧

エクソン	変異 ID	アミノ酸変化	COSMIC ID
18	2155 G>A	G719S	6252
18	2155 G>T	G719C	6253
18	2156 G>C	G719A	6239
19	2233_2247del15	K745_E749del	26038
19	2235_2248>AATTC	E746_A750>IP	13550
19	2235_2249del15	E746_A750del	6223
19	2235_2251>AATTC	E746_T751>IP	13552
19	2235_2252>AAT	E746_T751>I	13551
19	2235_2255>AAT	E746_S752>I	12385
19	2236_2250del15	E746_A750del	6225
19	2236_2253del18	E746_T751del	12728
19	2237_2251del15	E746_T751>A	12678
19	2237_2252>T	E746_T751>V	12386
19	2237_2253>TTGCT	E746_T751>VA	12416
19	2237_2254del18	E746_S752>A	12367
19	2237_2255>T	E746_S752>V	12384
19	2237_2257>TCT	E746_P753>VS	18427
19	2238_2248>GC	L747_A750>P	12422
19	2238_2252>GCA	L747_T751>Q	12419
19	2238_2252del15	L747_T751del	23571
19	2238_2255del18	E746_S752>D	6220
19	2239_2247del9	L747_E749del	6218
19	2239_2248TTAAGAGAAG>C	L747_A750>P	12382
19	2239_2251>C	L747_T751>P	12383
19	2239_2253del15	L747_T751del	6254
19	2239_2256>CAA	L747_S752>Q	12403
19	2239_2256del18	L747_S752del	6255
19	2239_2258>CA	L747_P753>Q	12387
19	2240_2251del12	L747_T751>S	6210
19	2240_2254del15	L747_T751del	12369
19	2240_2257del18	L747_P753>S	12370
19	2253_2276del24	S752_I759del	13556
20	2303 G>T	S768I	6241
20	2307_2308ins9GCCAGCGTG	V769_D770insASV	12376
20	2309_2310AC>CCAGCGTGGAT	V769_D770insASV	13558
20	2310_2311insGGT	D770_N771insG	12378
20	2311_2312ins9GCGTGGACA	D770_N771insSVD	13428
20	2319_2320insCAC	H773_V774insH	12377
20	2369 C>T	T790M	6240
21	2573 T>G	L858R	6224
21	2573_2574TG>GT	L858R	12429
21	2582 T>A	L861Q	6213

2. キャリーオーバーコンタミネーションの防止

本キットでは、以下の方法により増幅された DNA 産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる誤測定を最小限に抑制しています。
DNA 合成に必要な基質の一つである dTTP の代わりに dUTP を用いて増幅反応を行うため、増幅された DNA の塩基配列はチミン(T)がウラシル(U)に全て置き換わっています。また、この系で増幅された DNA が新たに試験する試料中へ混入した場合、マスターミックスに含まれているウラシル N-グリコシルラーゼ(UNG)が作用し DNA 中の U 塩基は除去されます。塩基を失った DNA は構造上極めて不安定な分子であり、増幅反応の最初の加熱によりリン酸結合が切断され、新たな増幅の鋳型とはなり得ません。UNG は高温で失活するため、それ以後に増幅されてくる U 塩基を含む増幅 DNA は影響を受けません。また、UNG は6塩基以上の DNA 上のウラシルのみに反応し、モノマーの dUTP や RNA 上のウラシルには作用しません¹⁾。

**【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法

- 本キットの測定検体には FFPET 又は血漿から抽出したゲノム DNA を用いてください。核酸の抽出にはコバス DNA プレパレーションキット(FFPE)又はコバス DNA サンプルプレパレーションキット(cfDNA)(別売品)ご使用ください。
- マスターミックスへの検体 DNA のコンタミネーションを防止するために、増幅と検出は DNA 抽出とは異なるエリアで行ってください。
- 増幅と検出するエリアは、マスターミックスの調製を行う前に清潔にしてください。清潔環境を保つには、操作デスク、ラックやピペットなどを 0.5%の次亜塩素酸ナトリウムで拭いたあと、70%エタノールで拭ってください。

2. 検体の調製法

(1) 組織検体から核酸を抽出する場合

コバス DNA プレパレーションキット(FFPE)を用いた核酸抽出

- キット内の各試薬は【用法・用量(操作方法)】の項、「2.別途必要な器具・器材・試料等」を参照してください。
- また、試薬及び操作の詳細はキット内の添付文書を参照してください。
- DNA 抽出操作は、キット内の添付文書に従ってください。
 - FFPET は、室温(15~30℃)で保存したとき FFPET 作成後 12 ヶ月以内、薄切後 60 日以内のものを使用してください。
 - 薄切切片はスライドグラスにマウントしてください。
 - 薄切した切片のうち1枚は、HE 染色を行ってください。染色標本は検鏡を行い、腫瘍細胞の範囲をマーキングすることにより、腫瘍細胞と正常細胞のおおまかな面積の割合を確認してください。この作業は、腫瘍の割合が 10%未満の場合、マクロダイセクションする際に重要になってきます。
 - DNA 抽出には、5 μm に薄切した FFPET で、少なくとも腫瘍の割合が 10%以上の切片を用いてください。腫瘍の割合が 10%未満の場合は、マクロダイセクションを行い、腫瘍の割合を高めた後 DNA 抽出を行う必要があります。
 - クロスコンタミネーションにじゅうぶん注意し、エアロゾルの飛散や手袋の汚染などを避ける特別の注意を払ってください。複数の検体を扱う場合でもスクリーキャップチューブのキャップ開閉は検体ごとに行ってください。また、検体ごとに新しいチップを使用してください。

① コバス DNA プレパレーションキット(FFPE)の各試薬調製

- 注意) 試薬の中に沈殿が認められる場合は、37℃のウォーターバスで溶けるまで温めてください。沈殿がすべて溶けるまで使用しないでください。
- PK: 4.5 mL のヌクレアーゼフリーの滅菌水に溶解して、5~10 回転倒混和をしてください。溶解後は、450 μL ずつ分注して-20℃で保管してください。凍結融解後は使い切って、再凍結はしないでください。PK は -20℃で 90 日間安定です。
- DNA Wash Buffer I (WB I): 15 mL の特級エタノールを加え、5~10 回、転倒混和することにより調製してください。
- DNA Wash Buffer II (WB II): 50 mL の特級エタノールを加え、5~10 回、転倒混和することにより調製してください。

② 脱パラフィン操作

- (a) 検体数に応じて、50 mL 遠沈管に 40 mL ずつキシレン、特級エタノールを分注しておきます。
- (b) キシレンが 40 mL 入った 50 mL 遠沈管にスライドグラスを入れ、5分間浸します。この 40 mL でスライド2枚まで処理可能です。2枚のスライドを遠沈管に入れる際は、背合わせに入れます。処理後のキシレンは廃棄します。
- (c) 特級エタノールが 40 mL 入った 50 mL 遠沈管にキシレン処理したスライドを入れ、5分間浸します。この 40 mL でスライド2枚まで処理可能です。2枚のスライドを遠沈管に入れる際は、背合わせに入れます。処理後の特級エタノールは廃棄します。
- (d) スライドグラスを取り出し、5~10 分完全に風乾します。この間に、1.5 mL チューブ^{*1}を検体分準備します。チューブに 180 μL の DNA TLB と 70 μL の PK (Proteinase K) を混和します (DNA TLB-PK mixture)。検体が複数の場合は、あらかじめ混合液を作成した後、分注してください。
- ※1 Safe-Lock microcentrifuge tube を使用してください。
- (e) 風乾した組織をカミソリで剥ぎ取ります。その組織を DNA TLB-PK 混合液で湿らせたチップでピックアップし、1.5 mL チューブに入れます。カミソリとチップは、検体ごとに新しいものを使用してください。HE 染色から確認された腫瘍組織の割合が 10%未満の場合、腫瘍部分をマクロダイセクションし、腫瘍の割合を高めてから以下の操作を続けてください。

③ DNA 抽出操作

- (a) DNA TLB-PK 混合液及び陰性コントロール(NEG CT)をボルテックスで 30 秒間攪拌してください(NEG CT は PK 70 μL と DNA TLB 180 μL を加えて作成します)。
- (b) 56℃ドライヒートブロックで 60 分間インキュベートします。
- (c) インキュベーション後、ボルテックスで 10 秒間攪拌してください。
- (d) 90℃ドライヒートブロックで 60 分間インキュベートします。インキュベーションの間に必要な FT(Filter tubes with caps)を準備します。1検体ごとに FT1本、CT(Collection tube)3本、溶出用の 1.5 mL チューブ1本を準備します(1.5 mL のチューブはキットに含まれていません)。
- (e) 反応後、チューブをブロックから取り出し、室温に戻します。
- (f) スピンダウン後、200 μL の DNA Paraffin Binding Buffer(DNA PBB)を加え3回のピペッティングで均一に混和し、室温で 10 分間放置します。
- (g) 100 μL のインプロパノールを加え、3回のピペッティングで混和します。
- (h) 全ての反応液(~550 μL)を FT に移します。
- (i) 8,000 g で1分間遠心します。
- (j) FT を新しい CT に移し、古い CT は廃棄します。
- (k) 500 μL の WB I を FT に加え、8,000 g で1分間遠心します。

- (l) CT の廃液を捨て、FT を再度装着し、500 μ L の WB II を FT に加え、8,000 g で1分間遠心します。
- (m) FT を新しい CT に移し、古い CT は廃棄します。
- (n) フィルターメンブレンを乾かすために16,000~20,000 g で1分間遠心します。
- (o) 100 μ L の DNA Elution Buffer(DNA EB)を FT の中心部に加えます。この時 FT の先端が触れないように注意します。
- (p) 室温で5分間インキュベート後、8,000 g で1分間遠心し、DNA 溶液を1.5 mL チューブに回収します(抽出 DNA)。

④ DNA 濃度測定と保存

抽出終了後、速やかに濃度測定を行ってください。

- (a) 抽出 DNA チューブを5秒間ボルテックス後スピンドアウンし、NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer (ND-1000 or ND-2000) と同等品を用いて DNA 濃度を二重測定します。Blank には EB を用います。
- (b) 二重測定の結果の平均値を計算します。NEG CT の抽出液は測定する必要はありません。

注意) 測定値の誤差範囲

測定値の誤差範囲は、平均値が 20 ng/ μ L 以上の場合、平均値の $\pm 10\%$ 、20 ng/ μ L 未満の場合は、平均値の ± 2 ng/ μ L です。この値から測定値が外れた場合は再度濃度測定を行い、いずれか2点の測定値を用いて、濃度を計算してください。

DNA 濃度が2 ng/ μ L 未満の場合はスライド枚数を増やして再抽出してください。

ただちに測定を行わない場合は、DNA を保管してください。組織検体からの抽出 DNA は、室温(15~30°C)で24時間、2~8°Cで14日間、-25~-15°Cで60日間安定です。凍結融解は-25~-15°Cで保存したとき3回まで可能です。

(2) 抽出 DNA の希釈計算

測定には、1 μ エルあたり、50 ng の DNA を使用します。抽出 DNA は2 ng/ μ L の濃度に希釈して使用します。

抽出 DNA 希釈液を調製するために以下の計算を行います。

① 抽出 DNA 濃度が2 ng/ μ L から36 ng/ μ L までのとき:

- (a) 測定に必要な抽出 DNA 量(μ L) =
$$\frac{90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}}{\text{抽出 DNA 濃度 (ng}/\mu\text{L})}$$
- (b) DNA SD (DNA 希釈液)の必要量(μ L) =
$$90 \mu\text{L} - \text{測定に必要な抽出 DNA 量}(\mu\text{L})$$

(例)抽出 DNA 濃度 = 6.5 ng/ μ L

DNA ストック検体(μ L) =
$$\frac{90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}}{6.5 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 27.7 \mu\text{L}$$

DNA SD (μ L) =
$$90 \mu\text{L} - 27.7 \mu\text{L} = 62.3 \mu\text{L}$$

② 抽出 DNA 濃度が36 ng/ μ L を超えるとき:

DNA 希釈液をすくなくとも90 μ L を準備するのに必要な DNA SD の量を計算します。抽出 DNA は、最低5 μ L を使用します。

- (a) 測定に必要な抽出 DNA 量(μ L) = 5 μ L
- (b) DNA SD の必要量(μ L) =
$$(5 \mu\text{L} \times \text{抽出 DNA 濃度 (ng}/\mu\text{L)}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L} - 5 \mu\text{L}$$
- (例)抽出 DNA 濃度 = 100 ng/ μ L
- DNA SD (μ L) =
$$(5 \mu\text{L} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L} - 5 \mu\text{L} = 245 \mu\text{L}$$

(3) 抽出 DNA の希釈

- 1.5 mL 用滅菌微小遠心管に希釈計算して得られた DNA SD の必要容量を分注します。また、陰性コントロールとして DNA SD を45 μ L 分注します。
- それぞれの DNA ストック検体及び陰性コントロールを5~10秒間撹拌します。
- チップを毎回取り替えながら計算した量の抽出 DNA を分注します。
- チューブにキャップをして5~10秒間撹拌します。

(4) 血漿検体から核酸を抽出する場合

コバス DNA サンプルプレパレーションキット(cfDNA)を用いた核酸抽出

- 試薬及び操作の詳細はキットの添付文書を参照してください。
- 採血管は EDTA-2K を使用し、採血後8時間以内に血漿分離してください。
 - 血漿分離を行う際の遠心条件などは、使用している採血管の添付文書等をご確認ください。
 - 血漿検体は、15~30°Cで1日間、2~8°Cで3日間、-25~-15°Cで12ヵ月間、-70°C以下で保存した場合12ヵ月間安定です。
 - 血漿検体の凍結融解は1回のみ可能です。融解後は、速やかに核酸抽出操作を行ってください。
 - クロスコンタミネーションにじゅうぶん注意し、エアロゾルの飛散や手袋の汚染などを避ける特別の注意を払ってください。複数の検体を扱う場合でもスクリーキャップチューブのキャップ開閉は検体ごとに行ってください。また、検体ごとに新しいチップを使用してください。

① コバス DNA サンプルプレパレーションキット(cfDNA)の各試薬調製

注意) 試薬の中に沈殿が認められる場合は、37°Cのウォーターバスで溶けるまで温めてください。沈殿がすべて溶けるまで使用しないでください。

PK: 4.5 mL のスクレアーゼフリーの滅菌水に溶解して、5~10回回転倒混和をしてください。1.1 mL ずつ、1.5 mL 用滅菌微小遠心管に分注し、必要量以外は冷凍保存してください。凍結融解後は使い切って、再凍結はしないでください。PK は-20°Cで90日間安定です。

DNA Wash Buffer I (WB I): ボトルに無水エタノールを15 mL 加え、ボトルを5~10回回転倒混和します。WB I は15~30°Cで90日間安定です。

DNA Wash Buffer II (WB II): ボトルに無水エタノールを50 mL 加え、ボトルを5~10回回転倒混和します。WB II は15~30°Cで90日間安定です。

② DNA 抽出操作

- (a) 血漿検体は、ボルテックスで撹拌してください。
- (b) 15 mL チューブに2 mL ずつ血漿検体又は陰性コントロール(NEG CT, スクレアーゼフリーの滅菌水)を分注します。

- (c) PK を250 μ L、DNA Paraffin Binding Buffer(DNA PBB)を2 mL ずつ加え、3~5回回転倒混和します。
- (d) 室温(15~30°C)で30分間インキュベートします。インキュベーションの間に必要なフィルターチューブ(HPEA FT)を準備します。1検体ごとにHPEA FT1本、コレクションチューブ(CT)3本、溶出用の1.5 mL チューブ1本を準備します(1.5 mL のチューブはキットに含まれていません)。

- (e) 500 μ L のイソプロパノールを加え、3~5回回転倒混和します。
- (f) 全ての反応液を HPEA FT に移します。
- (g) 4,000 g で5分間遠心します。
- (h) 遠心後、HPEA FT を50 mL コニカルチューブから取り出し、CT にセットします。大きい方の固定クリップを捻じり切り取りします。

- (i) HPEA FT のキャップ下部の小さい固定クリップを押し上げて取りします。この時、キャップの両側に割れたシールを剥がします。

- (j) HPEA FT から HPEA を除去し、廃液を捨てます。
- (k) 500 μ L の WB I をフィルターチューブ(FT)に加え、8,000 g で1分間遠心します。

- (l) CT の廃液を捨て、FT を再度装着し、500 μ L の WB II を FT に加え、8,000 g で1分間遠心します。

- (m) FT を新しい CT に移し、古い CT は廃棄します。
- (n) フィルターメンブレンを乾かすために16,000~20,000 g で1分間遠心します。

- (o) あらかじめサンプル名とオリエンテーションマーク(遠心時に外側に向いていることを表す目印)を記しておいた1.5 mL チューブに FT を装着します。CT は廃棄します。

- (p) 100 μ L の DNA Elution Buffer(DNA EB)を FT の中心部に加えます。この時フィルターにチップの先端が触れないように注意します。

- (q) 室温で5分間インキュベート後、遠心機にオリエンテーションマークが外側になるようにセットし、8,000 g で1分間遠心し、1.5 mL チューブに DNA 溶液を回収します(抽出 DNA)。

- (r) 沈殿物を懸濁させないようにしながら、オリエンテーションマークの反対側から慎重に抽出 DNA 80 μ L を吸引し、新しい1.5 mL チューブに分取します。

注意: 沈殿物が混入した場合はマークをつけた1.5 mL チューブを8,000 g で1分間再遠心し、抽出 DNA 80 μ L を分取します。

③ 抽出 DNA の保存

ただちに測定を行わない場合は、DNA を保管してください。血漿検体の抽出 DNA は、室温(15~30°C)で7日間、2~8°Cで21日間、-25~-15°Cで60日間安定です。凍結融解は-25~-15°Cで保存したとき2回可能です。

3. 妨害物質・妨害薬剤・交差反応性

- (1) 組織検体においては、トリグリセリド 37 mmol/L 以下及びヘモグロビン 2 mg/mL 以下での影響は認められませんでした。血漿検体においては、トリグリセリド 33 mg/mL 以下、ヘモグロビン 1.5 mg/mL 以下、非抱合ビリルビン及び抱合ビリルビン 0.2 mg/mL 以下、アルブミン 60 mg/mL 以下での影響は認められませんでした。
- (2) 組織検体においては、肺炎レンサ球菌及びインフルエンザ菌、血漿検体においては、表皮ブドウ球菌との交差反応は認められませんでした。
- (3) 組織検体においては、8種類の薬剤(サルブタモール、イプラトロピウム、フルチカゾン、セフトアジム、イミペネム/シラスタチン、タゾバクタム/ピペラシリン、ポビドンヨード(10%)、リドカイン)の本品への影響は認められませんでした。血漿検体においては、EDTA-2K 及び2種類の薬剤(フィルグラスチム、エロロチニブ)の本品への影響は認められませんでした。

4. その他の留意事項

試料中に PCR の妨害物質が存在すると正しい判定結果が得られないので注意してください。また、試料中に標的 DNA が存在しても最小検出感度以下である場合には陰性と判定されることがありますので注意してください。FFPET から抽出されたゲノム DNA は長時間のホルマリン固定などにより DNA が断片化されたり二本鎖 DNA がクロスリンクされたりすることで PCR の鑄型として機能しなくなることが報告されています。

【用法・用量(操作方法)】

1. 試薬の調製方法及び安定性

各試薬は、室温(15~30°C)に戻してから使用してください。これらの試薬は開封後使用期限内で4回までの繰り返し使用、又は90日間使用できます。なお、マスターミックスは光感受性であるため、長時間のライトへの暴露は避けてください。

試薬は粘性がありますので、ピペット操作はゆっくりと行ってください。マスターミックスは、薄い青色もしくは紫色に見えることがありますが、これは測定には影響はありません。

マスターミックスの調製

調製に必要なマスターミックス及び MGAC の量は、以下の「ワーキング試薬調製に必要な液量」を参考に調製してください。

必要 MMX 量=(検体数 + 2(NEG CT, EGFR MC) + 1) \times 20 μ L

必要 MGAC 量=(検体数 + 2(NEG CT, EGFR MC) + 1) \times 5 μ L

で計算可能です。

ワーキング試薬は調製後1時間以内に、抽出 DNA 希釈液を添加してください。

ワーキング試薬調製に必要な液量

		検体数 (NEG CT、EGFR MC + 1を含む)									
検体数		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 μL	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 μL	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
総量 (μL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

2. 別途必要な器具・器材・試料等

(1) DNA 抽出試薬

- ① コバス DNA プレパレーションキット (FPPE) (別売品)^{**2}
 - ・DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB)
 - ・Proteinase K (PK)
 - ・DNA Paraffin Binding Buffer (DNA PBB)
 - ・DNA Wash Buffer I (WB I)
 - ・DNA Wash Buffer II (WB II)
 - ・DNA Elution Buffer (DNA EB)
 - ・Filter tubes with caps (FT)
 - ・Collection Tubes (CT)
- ② コバス DNA サンプルプレパレーションキット (cfDNA) (別売品)^{**2}
 - ・Proteinase K (PK)
 - ・DNA Paraffin Binding Buffer (DNA PBB)
 - ・DNA Wash Buffer (WB I)
 - ・DNA Wash Buffer (WB II)
 - ・DNA Elution Buffer (DNA EB)
 - ・High Pure Extension Assembly Unit (HPEA FT)
- ③ キシレン
- ④ 特級エタノール
- ⑤ 特級2-プロパノール (イソプロパノール)
- ⑥ スクレアーズフリーの滅菌水
- ⑦ 5 mL 及び 25 mL 用のピペット
- ⑧ 滅菌済みマイクロ遠心チューブ 1.5 mL 用 (1.5 mL チューブ)
- ⑨ 37°C 恒温槽 (必要に応じて)
- ⑩ 20,000g の遠心力のあるマイクロ遠心機
- ⑪ ボルテックスミキサー
- ⑫ ドライヒートブロック 2台
- ⑬ ハルス遠心分離機

- (2) 遺伝子解析装置「コバス z 480」及び各専用の備品及び消耗品^{**3}
 - (3) 滅菌チューブ
 - (4) マイクロピペット及びチップ (チップは疎水性フィルター付きのもの)
 - (5) スクレアーズフリーの滅菌水
 - (6) 滅菌済みマイクロ遠心チューブ 1.5 mL 用 (1.5 mL チューブ)
 - (7) ボルテックスミキサー
- ※2 使用する検体種により、①②いずれかを使用してください。
 ※3 コバス z 480 用の消耗品を使用してください。

3. 操作方法 (コバス z 480)

【操作上の注意】の項、「2. 検体の調製法」を参考に検体を調製します。その際は、クロスコンタミネーションにじゅうぶん注意してください。

コバス z 480 における操作は機器の取扱説明書に従って操作してください。

- (1) コバス z 480 用 AD プレートの測定に必要な個所にワーキング試薬を 25 μL 分注します。
- (2) チップを取り替え EGFR MC を 25 μL 分注し、ピペットを使って最低2回混和してください。
- (3) チップを取り替え陰性コントロールを 25 μL 分注し、ピペットを使って最低2回混和してください。
- (4) チップを取り替え調製した DNA 検体を 25 μL 分注し、ピペットを使って最低2回混和してください。
- (5) コバス z 480 用 AD プレートにシールをした後、プレートを「コバス z 480」にセットして増幅・検出を開始します。マスターミックスと DNA 検体を混合後は1時間以内に測定を開始してください。
- (6) 増幅・検出が終了したら、コバス z 480 用 AD プレートを「コバス z 480」から取り出します。
- (7) 結果の Review 及び Accept は機器の取扱説明書に従って操作します。

*【測定結果の判定法】

1. 測定結果の判定

(1) 判定法

コバス z 480 では検体及びコントロールの結果の判定を自動で行います。各コントロールが正しく測定され、測定が有効な場合、コントロール及び検体の判定結果は次のように表示されます。

コントロールの判定結果

コントロール	結果表示
コバス EGFR 変異検出キット v2.0 変異コントロール	Valid
陰性コントロール	Valid

検体の判定結果

結果表示	変異検出結果	結果の解釈
Mutation Detected	Exon 19 Deletion S768I L858R T790M L861Q G719X (G719A, G719C, G719S) Exon 20 Insertion (変異が1つ以上の可能性あり)	変異の存在あり
Mutation Not Detected 又は No Mutation Detected	-	変異は検出されない ^{**4}
Invalid	-	測定無効 再検査が必要
Failed	-	測定中の機械的又はソフトに問題があった

※4 「Mutation Not Detected」又は「No Mutation Detected」の結果は、今回の測定では変異が検出されませんでした。変異遺伝子の割合や、検体の状態、阻害物質の存在又は DNA 量などに影響されるため、変異のなしを決定するものではありません。

(2) 測定の無効と再検

- ・どちらか片方のコントロールに「Invalid」の結果が得られた場合、その回の試験は無効となります。
- ・検体に「Failed」又は「Invalid」の結果が得られた場合、その検体測定は無効となります。その場合、フラグの確認方法や対処方法については機器の取扱説明書を参照してください。
- ・検体が「Invalid」の結果であった場合、抽出 DNA を用いて再測定を行ってください。その際、新しい測定用プレートと DNA SD、コントロールを使用してください。
- ・抽出 DNA を用いて再測定を行っても「Invalid」を示す場合は、試料より DNA を再抽出し、試験を繰り返してください。

2. 結果の判定にかかる注意

- (1) PCR 反応を阻害する物質が含まれている検体では、偽陰性となる可能性がありますので注意してください。
- (2) 臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
- (3) コントロールの結果が一貫して Invalid を示す場合は、弊社カスタマーソリューションセンターまでお問い合わせください。

*【臨床的意義】

本品はリアルタイム PCR 法を用いて EGFR 遺伝子変異を検出する体外診断用医薬品です。

本品の EGFR 遺伝子変異の検出はゲフィチニブ、エルロチニブ塩酸塩²⁾、アファチニブマレイン酸塩及びオシメルチニブメシル酸塩の非小細胞肺癌患者への適応を判定することを目的として用います。

オシメルチニブメシル酸塩の臨床成績概略

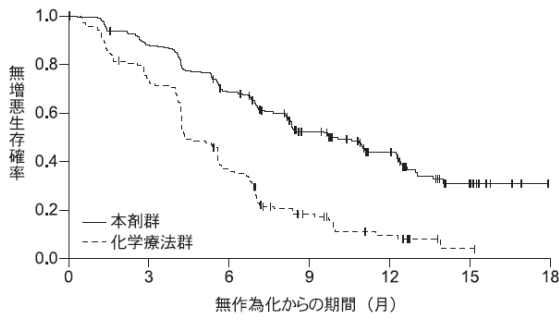
1. 国際共同第Ⅲ相試験 (AURA3 試験)

EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による治療後に病勢進行したEGFR T790M変異¹⁾陽性²⁾の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌患者³⁾ 419例 (本剤群279例、化学療法群140例) (日本人63例 [本剤群41例、化学療法群22例]) を対象として、本剤80mgと化学療法 (ベムレキセドナトリウム水和物及び白金系抗悪性腫瘍剤の併用投与) の有効性及び安全性を比較する国際共同第Ⅲ相非盲検無作為化試験が実施されました。主要評価項目である主治医判定による無増悪生存期間 (中央値 [95%信頼区間]) の結果は、本剤群で10.1 [8.3~12.3] 月、化学療法群で4.4 [4.2~5.6] 月であった (ハザード比 [95%信頼区間]: 0.30 [0.23~0.41]、p<0.001) (2016年4月15日カットオフデータに基づく集計)。

注1) EGFR遺伝子の活性型変異が腫瘍組織検体で確認され、かつ、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬による一次治療後に病勢進行が確認された後に、エグゾン20の変異 (T790M) が認められた患者が組み入れられました。

注2) 本品との同等性が確認されているコバスEGFR遺伝子変異検出キットが使用されました。

注3) 非小細胞肺癌のうち、扁平上皮癌が除外基準とされました。



Number at risk
 本剤群 279 240 162 88 50 13 0
 化学療法群 140 93 44 17 7 1 0
 図 AURA3試験における無増悪生存期間(主治医判定)のKaplan-Meier図

オフデータに基づく集計)

AURA第I相試験に登録された患者における用量及び血漿検査結果毎の奏効率

用量 ^{注3)}	N	奏効例数(奏効率) (95%信頼区間)		
		T790M 陽性	T790M 陰性	血漿検体なし/ 検査実施せず
20 mg	15	1/2 (50.0%) (算出せず)	3/5 (60.0%) (14.7%, 94.7%)	4/8 (50.0%) (15.7%, 84.3%)
40 mg	52	11/20 (55.0%) (31.5%, 76.9%)	11/25 (44.0%) (24.4%, 65.1%)	2/7 (28.6%) (算出せず)
80 mg	95	16/26 (61.5%) (40.6%, 79.8%)	9/22 (40.9%) (20.7%, 63.6%)	28/47 (59.6%) (44.3%, 73.6%)
160 mg	89	21/28 (75.0%) (55.1%, 89.3%)	13/24 (54.2%) (32.8%, 74.4%)	14/37 (37.8%) (22.5%, 55.2%)
240mg	13	4/8 (50.0%) (15.7%, 84.3%)	1/3 (33.3%) (算出せず)	2/2 (100.0%) (算出せず)
全体	264	53/84 (63.1%) (51.9%, 73.4%)	37/79 (46.8%) (35.5%, 58.4%)	50/101 (49.5%) (39.4%, 59.6%)

注1) 本品にて血漿検体を用い確認しました。

注2) 本品との同等性が確認されたコバス EGFR 変異検出キットにて FFPET 検体を用い確認しました。

注3) オシメルチニブメシル酸塩の承認用法・用量はオシメルチニブとして 80mg を 1日1回経口投与です。

【性能】

1. 性能

(1) 品質管理の方法

【用法・用量(操作方法)】に記載に従い、「コバス EGFR 変異検出キット v2.0 変異コントロール」及び「コバス EGFR 変異検出キット v2.0 希釈液」を8重測定するとき、測定は7回以上有効であり、以下の結果となります。なお、「コバス EGFR 変異検出キット v2.0 変異コントロール」は変異型 DNA 塩基配列含有プラスミド DNA などを含む液です。また、「コバス EGFR 変異検出キット v2.0 希釈液」は緩衝剤などを含む液です。

Channel	Target Mutation or 内部コントロール	コバス EGFR 変異検出キット v2.0 変異コントロール		コバス EGFR 変異検出キット v2.0 希釈液
		Ct値		Ct値
		下限	上限	
マスターミックス1	1 エクソン 19 欠失	30.30	38.10	検出せず又は ≥ 40
	3 S768I	27.20	34.70	検出せず又は ≥ 40
マスターミックス2	1 L858R	32.30	40.80	検出せず又は ≥ 40
	3 T790M	26.30	34.20	検出せず又は ≥ 40
マスターミックス3	1 L861Q	28.18	35.00	検出せず又は ≥ 40
	2 G719X	29.10	35.50	検出せず又は ≥ 40
	3 エクソン 20 挿入	25.00	31.60	検出せず又は ≥ 40
各マスターミックス	4 内部コントロール	22.00	28.00	検出せず又は ≥ 35

(2) 最小検出感度

FFPET 検体を用い7種類の EGFR 変異型について変異 DNA の割合がおおよそ 10%、5%、2.5%、1.25%となるよう調製した試料を本品3ロットを用いて8重測定し、Hit Rate が95%以上を示す変異 DNA の最小割合(%)を検討したところ下表のとおり結果が得られました。なお、測定には2 ng/μL の試料を25 μL 使用しました。

EGFR 変異型	検体 No.	最小検出濃度(検体中の変異の割合) (%)
G719X(G719A)	1	2.46
	2	4.69
	3	4.88
G719X(G719S)	4	3.15
G719X(G719C)	5	5.56
エクソン 19 欠失	6	1.39
	7	2.53
S768I	8	2.37
	9	2.42
	10	1.27
T790M	11	2.04
	12	2.43
	13	3.03
エクソン 20 挿入	14	1.26
	15	1.70
	16	6.81
L858R	17	4.19
	18	4.33
	19	3.96
	20	4.34
	21	5.32

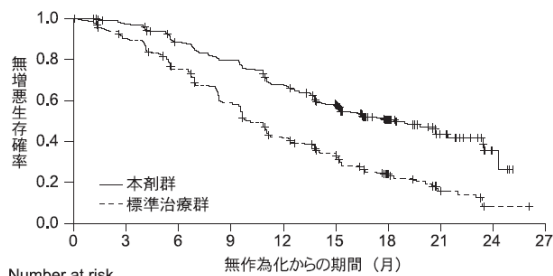
2. 国際共同第III相試験(FLAURA試験)

化学療法歴のないEGFR遺伝子の活性型変異^{注1)}陽性^{注2)}の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌患者^{注3)}556例(本剤群279例、標準的な治療群277例)(日本人120例[本剤群65例、標準的な治療群55例])を対象として、本剤80mgと標準的な治療(ゲフィチニブ又はエロロチニブメシル酸塩)の有効性及び安全性を比較する国際共同第III相二重盲検無作為化試験が実施されました。主要評価項目である主治医判定による無増悪生存期間(中央値[95%信頼区間])の結果は、本剤群で18.9[15.2~21.4]ヵ月、標準的な治療群で10.2[9.6~11.1]ヵ月でした(ハザード比[95%信頼区間]:0.46[0.37~0.57]、 $p < 0.0001$) (2017年6月12日カットオフデータに基づく集計)。

注1) EGFR遺伝子の活性型変異であるエクソン19の欠失(Ex19del)又はエクソン21の変異(L858R)が腫瘍組織検体で確認された患者が組み入れられました。

注2) 中央検査機関でのコバスEGFR変異検出キット又は各検査機関により実施された複数種のEGFR遺伝子変異検査(ローカル検査)を用いて検査されました。ローカル検査とコバスEGFR変異検出キットの陽性一致率が確認されています。コバスEGFR変異検出キットと本品は同等性が確認されています。

注3) 非小細胞肺癌のうち、腺癌又は腺癌が優勢の混合性の組織型の癌が確認された患者が組み入れられました。



Number at risk
 本剤群 279 262 233 210 178 139 71 26 4 0
 標準治療群 277 239 197 152 107 78 37 10 2 0
 図 FLAURA試験における無増悪生存期間(主治医判定)のKaplan-Meier曲線

オシメルチニブメシル酸塩の血漿検体に係る臨床成績概略

3. 国際共同第II相試験(AURA2試験)を基にしたレトロスペクティブ解析

2. に示したAURA2試験の最大解析対象集団210例中207例では血漿検体も採取されており、うち117例は血漿でもEGFR T790M変異陽性^{注1)}でした。この117例における奏効率は65.8%(77/117)であり、全体の奏効率67.6%とほぼ同等でした。また、FFPET・変異陽性かつ血漿・変異陰性89例における奏効率も69.7%(62/89)とほぼ同等でした。(2015年5月時点のカットオフデータに基づく集計)

AURA2試験に登録された患者における血漿検査結果毎の奏効率

対象集団	血漿検査結果	N	奏効例数 n(%)	奏効率 (95%信頼区間)
最大解析対象集団(組織検査 T790M 陽性)	T790M 陽性	117	77 (65.8%)	(56.5%, 74.3%)
	T790M 陰性	89	62 (69.7%)	(59.0%, 79.0%)
	無効	1	1 (100.0%)	(2.5%, 100.0%)
	血漿検体なし	3	2 (66.7%)	(9.4%, 99.2%)
	全体	210	142 (67.6%)	(60.8%, 73.9%)

注1) 本品にて血漿検体を用い確認しました。

4. 国際共同第I/II相試験(AURA試験)の第I相部分

AURA第I相試験の用量漸増コホートに登録された264例における奏効率を、オシメルチニブメシル酸塩の用量及び血漿検体でのEGFR T790M変異有無^{注1)}によってレトロスペクティブに解析しました。血漿・変異陽性の患者全体における奏効率63.1%は、第II相試験(AURA試験の第II相延長コホート及びAURA2試験の2試験併合)で確認されたFFPET・変異陽性^{注2)}の患者の奏効率66.1%と同程度でした。(2015年5月時点のカット

EGFR 変異型	検体 No.	最小検出濃度(検体中の変異の割合) (%)
L861Q	22	3.44
	23	2.16
	24	2.12

EGFR 遺伝子変異を有する細胞株由来 DNA を断片化し、健康者血漿に添加した試料を用い、7種類の EGFR 変異型について連続段階希釈した DNA 濃度の異なるパネルを本品3ロットを用いて24重測定し、Hit Rate が95%以上を示す最小 DNA 濃度を検討したところ下表のとおり結果が得られました。

EGFR 変異型	Sheared ^{30s} cell line DNA (コピー/mL)
G719X(G719A)	100
エクソン 19 欠失	75
S768I	25
T790M	100
エクソン 20 挿入	25
L858R	100
L861Q	30

※5 約 220 bp に断片化、バックグラウンドとして野生型 DNA を約 100,000 コピー/mL 含みます。

2. 相関性試験成績

- (1) 本法と既承認品(A 社 リアルタイム PCR 法)との一致率を検討したところ、臨床 FFPET 検体 118 例において良好な相関性を示しました³⁾。
全ての変異を対象とした場合の一致率

本法	既承認品 A		
	変異陽性	変異陰性	合計
変異陽性	59	1	60
変異陰性	0	58	58
合計	59	59	118
陽性一致率:100%(59/59) 陰性一致率:98%(58/59) 全体一致率:99%(117/118)			

変異毎の一致率

EGFR 変異型	陽性一致率	陰性一致率	全体一致率
G719X	78%(7/9)	100%(109/109)	98%(116/118)
エクソン 19 欠失	100%(26/26)	100%(92/92)	100%(118/118)
S768I	100%(2/2)	100%(116/116)	100%(118/118)
T790M	81%(13/16)	100%(102/102)	98%(115/118)
エクソン 20 挿入	100%(2/2)	99%(115/116)	99%(117/118)
L858R	96%(23/24)	100%(94/94)	99%(117/118)
L861Q	100%(1/1)	100%(117/117)	100%(118/118)

- (2) 本法と既承認品(B 社 リアルタイム PCR 法)との一致率を検討したところ、臨床 FFPET 検体 118 例において良好な相関性を示しました³⁾。
全ての変異を対象とした場合の一致率

本法	既承認品 B		
	変異陽性	変異陰性	合計
変異陽性	59	0	59
変異陰性	0	59	59
合計	59	59	118
陽性一致率:100%(59/59) 陰性一致率:100%(59/59) 全体一致率:100%(118/118)			

変異毎の一致率

EGFR 変異型	陽性一致率	陰性一致率	全体一致率
G719X	100%(7/7)	100%(111/111)	100%(118/118)
エクソン 19 欠失	100%(26/26)	100%(92/92)	100%(118/118)
S768I	100%(2/2)	100%(116/116)	100%(118/118)
T790M	93%(13/14)	99%(103/104)	98%(116/118)
エクソン 20 挿入	75%(3/4)	100%(114/114)	99%(117/118)
L858R	100%(23/23)	100%(95/95)	100%(118/118)
L861Q ^{30s}	-	-	-

※6 既承認品 B では L861Q 変異の検出が行えないため、算出できず。

3. 臨床性能試験成績

海外臨床性能試験

エルロチニブ塩酸塩の海外第 III 相試験 YO25121 (ENSURE 試験)にリクルートされた非小細胞肺癌(NSCLC)患者検体を用い、以下について検討しました。

- (1) 本法は血漿検体、既承認品(リアルタイム PCR 法)は FFPET 検体を用いたエクソン 19 欠失変異における一致率³⁾

本法(血漿)	リアルタイム PCR 法 ^{30t} (FFPET)		
	エクソン 19 欠失陽性	エクソン 19 欠失陰性	合計
エクソン 19 欠失陽性	97	4	101
エクソン 19 欠失陰性	23 ^{30s}	307	330

合計	120	311	431
陽性一致率:80.8%(97/120) 陰性一致率:98.7%(307/311) 全体一致率:93.7%(404/431)			

- (2) 本法は血漿検体、既承認品(リアルタイム PCR 法)は FFPET 検体を用いた L858R 変異における一致率³⁾

本法(血漿)	リアルタイム PCR 法 ^{30t} (FFPET)		
	L858R 陽性	L858R 陰性	合計
L858R 陽性	61	3	64
L858R 陰性	29 ^{30s}	338	367
合計	90	341	431
陽性一致率:67.8%(61/90) 陰性一致率:99.1%(338/341) 全体一致率:92.6%(399/431)			

- (3) 本法は血漿検体、既承認品(リアルタイム PCR 法)は FFPET 検体を用いたエクソン 19 欠失又は L858R 変異における一致率³⁾

本法(血漿)	リアルタイム PCR 法 ^{30t} (FFPET)		
	変異陽性	変異陰性	合計
変異陽性	161	4	165
変異陰性	49 ^{30s}	217	266
合計	210	221	431
陽性一致率:76.7%(161/210) 陰性一致率:98.2%(217/221) 全体一致率:87.7%(378/431)			

※7 コバス EGFR 変異検出キットを用いました。

※8 乖離の原因として、腫瘍由来 DNA が血漿中にじゅうぶんに漏出していなかったことが考えられました。

オシメルチニブ塩酸塩の国際共同第 II 相試験 D5160C00002 (AURA2 試験)にリクルートされた非小細胞肺癌(NSCLC)患者 383 検体を用い、解析可能な検体を対象として以下について検討しました。

- (4) FFPET 検体を用いた本法と既承認品(リアルタイム PCR 法)の T790M 変異における一致率³⁾

本法(FFPET)	リアルタイム PCR 法 ^{30t} (FFPET)		
	T790M 陽性	T790M 陰性	合計
T790M 陽性	225	5	230
T790M 陰性	8	131	139
合計	233	136	369
陽性一致率:96.6%(225/233) 陰性一致率:96.3%(131/136) 全体一致率:96.5%(356/369)			

※7 コバス EGFR 変異検出キットを用いました。

- (5) FFPET 検体を用いた本法と Next Generation Sequencing 法(以下、NGS 法)の T790M 変異における一致率³⁾

本法(FFPET)	NGS 法(FFPET)		
	T790M 陽性	T790M 陰性	合計
T790M 陽性	226	3	229
T790M 陰性	30 ^{30s}	109	139
合計	256	112	368
陽性一致率:88.3%(226/256) 陰性一致率:97.3%(109/112) 全体一致率:91.0%(335/368)			

※9 測定法間の検出感度の差が乖離の原因として考えられました。

- (6) 血漿検体(本法)、FFPET 検体(既承認品(リアルタイム PCR 法))を用いた T790M 変異における一致率³⁾

本法(血漿)	リアルタイム PCR 法 ^{30t} (FFPET)		
	T790M 陽性	T790M 陰性	合計
T790M 陽性	131	22 ^{30t11}	153
T790M 陰性	92 ^{30s10}	89	181
合計	223	111	334
陽性一致率:58.7%(131/223) 陰性一致率:80.2%(89/111) 全体一致率:65.9%(220/334)			

※7 コバス EGFR 変異検出キットを用いました。

※10 血漿・変異陰性、FFPET・変異陽性となった 92 例中 87 例は NGS 法(血漿)による測定を行い、79 例は NGS 法でも変異陰性であることが確認され、本法(血漿)の結果と一致しました。NGS 法と結果が乖離した 8 例中 6 例は、本法の最小検出感度未満でした。この結果より、腫瘍由来 DNA が血漿中にじゅうぶんに漏出していないことが乖離の原因として考えられました。

※11 血漿・変異陽性、FFPET・変異陰性となった 22 例中 21 例は NGS 法(血漿)による測定を行い、18 例は NGS 法でも変異陽性であることが確認され、本法(血漿)の結果と一致しました。NGS 法と結果が乖離した 3

例は、NGS 法のカットオフ値未満でしたが、血漿中にわずかに T790M 変異を有する cfDNA が存在していました。従って、腫瘍組織の不均一性により、測定に用いた標本組織に含まれる変異遺伝子の割合が低く検出感度未満であったことが乖離の原因として考えられました。なお、当該集団にオシメルチニブメシル酸塩は投与されており、有効性は確認されていません。

(7) 血漿検体を用いた本法と NGS 法の T790M 変異における一致率³⁰

本法 (血漿)	NGS 法 (血漿)		合計
	T790M 陽性	T790M 陰性	
T790M 陽性	129	16	145
T790M 陰性	12	163	175
合計	141	179	320
陽性一致率:91.5%(129/141)			
陰性一致率:91.1%(163/179)			
全体一致率:91.3%(292/320)			

本検討による乖離は、測定法間の検出感度の差に起因すると考えられました。

4. 交差反応性

海外臨床試験において、以下の EGFR 遺伝子変異を検出しました。これらの変異の検出については、性能評価されていないため、「本品の検出対象変異一覧」に記載されていません。

(1) EURTAC 試験^{※12} のコホート解析の結果、検出された変異^{※7}

変異 ID	エクソン	検体種
2234_2251>AAT	19	組織
2236_2244del9	19	組織
2236_2252>AT	19	組織
2236_2263>GAAGCAT	19	組織
2237_2251>AAC	19	組織
2239_2253>CAA	19	組織

※7 コバス EGFR 変異検出キットを用いました。

※12 EURTAC 試験:前向き無作為化比較第III相臨床試験で、EGFR 遺伝子変異を有する進行性 NSCLC 患者において、一次治療としてのエルロチニブとプラチナベース化学療法を比較した試験。

(2) AURA2 試験と AURA Extension 試験において検出された変異^{※13}

変異 ID	エクソン	検体種
2254_2277del24	19	血漿
2236_2256>ATC	19	血漿
2239_2247delTTAAGAGAA	19	血漿
2239_2256>CAG	19	血漿
2239_2264>GCCAA	19	血漿
2240_2264>CGAGAGA	19	血漿
2572_2573CT>AG	21	組織

※13 組織検体はコバス EGFR 変異検出キット、血漿検体は本品を用いました。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 検体及び本品の取扱いには、使い捨て手袋、実験着などの保護衣及び保護用眼鏡を着用するなど、人体に直接触れないように注意してください。また、測定終了後はよく手を洗ってください。
- ピペットは口で吸わないでください。
- 試薬が誤って目や口に入った場合には、直ちに水でじゅうぶんに洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
- 試薬が誤って皮膚及び粘膜に付着した場合には、直ちに多量の水で洗い流してください。
- 試薬をこぼした場合には水で希釈してから拭き取ってください。
- 抽出検体をこぼした場合は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)などの消毒液を使用してじゅうぶんに拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。
- 検体及び本品を取り扱う場所では飲食又は喫煙をしないでください。
- 検体は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って取り扱ってください。
- 検体を取り扱う際に使用した器具類は高圧蒸気滅菌器を用いて 121℃で 20 分以上加熱滅菌処理をするか、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に1時間以上浸すなどにより消毒してください。これらの作業中はじゅうぶんに換気を行ってください。
- キシレンは危険な化学薬品です。定められた安全基準に準じてご使用ください。

2. 使用上の注意

- 従来の測定方法から新しい測定方法に変更する場合は、変更前後の測定方法の相関性などを確認のうえ、ご使用ください。
- 試薬及び消耗品は専用のものであり、その容器・付属品などはほかの目的に転用しないでください。
- 試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、指定の条件以外で保存したものや使用期限を過ぎたものは使用しないでください。

- ロットの異なる試薬又は残った試薬を混ぜ合わせて使用しないでください。
- すべての構成試薬は使用前に室温(15~30℃)に戻してから使用してください。また、使用後は再び2~8℃で保存してください。
- すべての試薬は保存又は反応中に強い光を当てないでください。
- すべての試薬は開封又は分注時に微生物の汚染を避けてください。
- 増幅反応の準備は、紫外線照射装置の装備されたクリーンベンチ内で行ってください。ピペットなどは常にこのクリーンベンチ内に置いてください。増幅反応を準備するエリアには増幅後の DNA を持ち込まないでください。また、検体の分注には疎水性フィルター付き使い捨てチップを使用してください。
- キャリアオーバーコンタミネーション防止のため増幅後の反応チューブの蓋をあけないでください。
- 検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃などを徹底して行ってください。
- 本キットを取り扱う際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。汗や唾液に含まれる DNase が少量でも検体に混入しますと、DNA が分解され測定結果に誤りが生じる可能性があります。

3. 廃棄上の注意

- 測定により生じた廃液については、検体などと同様に滅菌又は消毒の処理を行ってください。また、これらを廃棄する場合には、各都道府県によって定められた規定に従ってください。
- 使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理してください。
- 遺伝子検査後の核酸試料及び増幅された DNA の廃棄は、次亜塩素酸剤を加えて有効塩素濃度が 5,000 ppm(0.5%)になるように混和後、一晚放置するなど、DNA を破壊してから廃棄してください。
- DNA を扱ったピペットチップ及びプラスチック容器などは、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)に一晚浸すなどにより DNA を破壊してから、焼却処理又は密閉できるビニール袋を2重に施し、医療廃棄物として処理してください。
- DNA を含む溶液は、次亜塩素酸剤を加えて有効塩素濃度が 5,000 ppm(0.5%)になるように混和後、一晚放置するなど、DNA を破壊してから、各都道府県によって定められた規定に従って廃液処理してください。
- 廃棄の際に、抽出検体及び試薬をこぼした場合は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)などの消毒液を使用してじゅうぶんに拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。
- 全ての試薬には 0.1%未満のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性のある金属アジドを生成することがあるため、廃棄の際には多量の水で洗い流してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

2~8℃で保存してください。

2. 有効期間

18 ヶ月

使用期限(Exp.)は外箱に記載してあります。

【包装単位】

コバス EGFR 変異検出キット v2.0 24テスト

(各構成試薬の詳細につきましては、【形状・構造等(キットの構成)】の項を参照してください)

【主要文献】

- Heid, C.A. et al. Real time quantitative PCR. Genome Research. 1996, 6, p.986~994.
- Malapelle, U. et al. Profile of the Roche cobas® EGFR mutation test v2 for non-small cell lung cancer. Expert Review of Molecular Diagnostics. 2017, 17(3), p.209~215.
- 自社データ

*【問い合わせ先】

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
カスタマーソリューションセンター
〒108-0075 東京都港区港南1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
〒108-0075 東京都港区港南1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

《特許に関連するお知らせ》

本製品をご購入頂きましたお客様は、これら製品をヒトの体外診断目的におけるPCRによる核酸配列の増幅、検出及びその関連工程に使用することが許諾されています。この特定された使用許諾権以外には、いかなる種類の特許権又はライセンスも許諾されていないものではありません。

COBAS is a trademark of Roche.
コバスは Roche の商標です。

