

## 体外診断用医薬品

\*2021年6月改訂(第2版)  
2020年11月作成(第1版)

製造販売承認番号30200EZ00081000

この添付文書をよく読んでから使用すること。

BRAF遺伝子変異検出キット  
*therascreen* BRAF V600E 変異検出キット RGQ 「キアゲン」

## 【全般的な注意】

1. 遺伝子診断に際して、患者に遺伝子診断の目的・方法及び精度、特に不可避な診断限界などについて正確な情報を伝えること。
2. 検査の実施にあたっては、使用目的欄に記載される医薬品の最新の添付文書を参照すること。
3. 偽陽性の可能性を考え、本品にて適用可能なタイプの変異と判定された場合でも薬剤投与後は十分な経過観察を行なうこと。
4. ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色の標本で腫瘍細胞が存在していることを確認し、染色した標本はDNA抽出に用いないこと。
5. 本品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用しないこと。
6. 本品は資格を有する医療従事者のみが専門的な実験設備のある場所で使用すること。
7. 診断は、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。
8. 本添付文書に記載された使用方法及び使用目的以外の使用については、測定結果の信頼性を保証できない。記載内容に従って使用すること。
9. 腫瘍検体は不均一であり、同じ腫瘍であっても部位により結果が一致しないことがある。また非腫瘍部位が含まれることもあり、そのDNA検体には変異の検出が期待できない。
10. *therascreen* BRAF V600E 変異検出キット RGQ 「キアゲン」のハンドブック、ロータージーンQ MDx 5plex HRM (RGQ)の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用すること。

## 【形状・構造等(キットの構成)】

本品は全てが液剤からなる以下の構成試薬よりなる。

- |   |            |
|---|------------|
| 1. Control Reaction Mix (CTRL) (赤)<br>Control フォワードプライマー<br>Control リバースプライマー<br>2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)<br>2'-デオキシチジン-5'-三リン酸(dCTP)<br>2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)<br>2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)      | 720 µL × 2 |
| 2. V600E Reaction Mix (V600E) (紫)<br>BRAF V600E フォワードプライマー<br>BRAF V600E リバースプライマー<br>2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)<br>2'-デオキシチジン-5'-三リン酸(dCTP)<br>2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)<br>2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP) | 720 µL     |
| 3. BRAF Positive Control (PC) (ベージュ)  | 250 µL     |
| 4. <i>Taq</i> DNA Polymerase ( <i>Taq</i> ) (ミント)   | 80 µL      |
| 5. Water for NTC (NTC) (白)  | 1.9 mL     |
| 6. Water for Dilution (Dil) (白)   | 1.9 mL     |

## 【使用目的】

癌組織から抽出したゲノムDNA中のBRAF遺伝子変異(V600E)の検出[エンコラフェニブ及びセツキシマブ(遺伝子組換え)の併用療法、又はエンコラフェニブ、ビニメチニブ及びセツキシマブ(遺伝子組換え)の併用療法の結腸・直腸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】

本品は、Scorpion-ARMS法を応用したリアルタイムPolymerase Chain Reaction (PCR)法を用いて、生体由来の組織から抽出したゲノムDNA中のBRAF遺伝子のコドン600のV600Eの遺伝子変異を検出する。抽出したDNA中の変異型BRAF遺伝子は、Internal Control(内部コントロール:IC)用合成オリゴヌクレオチドと共にScorpion-ARMS法を応用したPCR法により増幅される。

本品の測定対象変異一覧

変異	エクソン	塩基変異	COSMIC ID
V600E	15	1799T>A	476

## \*【操作上の注意】

1. 測定検体の性質、採取法  
本品の測定検体には、結腸・直腸癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織から抽出したDNA検体を用いる。  
  - ・組織標本の輸送は標準的な病理学的手法で行い、品質を保持すること。
  - ・FFPEブロックとスライドは室温(15~25℃)で保存すること。スライドはDNA抽出まで最大8週間保存可能。
  - ・解析に十分なDNAを確保するために、FFPE切片は少なくとも4µmの厚さが必要となる。
  - ・抽出毎に4-5 µmの切片2枚を使用し、必要に応じて隣接する切片を使用すること。
2. 検体の調製法  
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit[(株)キアゲン:品番56404]のプロトコルに従って、FFPE組織よりDNA検体を抽出する。  
  - ・RNase ステップは行わない。
  - ・キシレン/エタノール法による脱パラフィン法のみ検証済みである。
  - ・プロテイナーゼKによる前処理を1時間行う必要がある。
  - ・デクロスリンク(90℃でインキュベート)は1時間を超えないようにする。
  - ・精製したゲノム DNA は、60 µl Buffer ATE (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit に同梱)で室温で2.5分間インキュベートして溶出後、最高速度で遠心する。その後さらに 60 µl Buffer ATE で溶出ステップを繰り返す。
  - ・精製したゲノム DNA は、-30~-15℃で保存すること。
3. 妨害物質  
本品の測定に影響する可能性のある妨害物質について検討を行った結果、結果判定への影響は認められなかった。また、壊死組織による測定への影響も認められなかった。

妨害物質
パラフィン
キシレン
エタノール
ATL 緩衝液
Proteinase K
AL 緩衝液
AW1 緩衝液
AW2 緩衝液
ヘモグロビン

4. 交差反応性  
本品のV600変異(V600K、V600R、V600G、V600M、V600D及びV600Ec)に対する交差反応性を確認した。V600K、V600R、V600G、V600Mにおいて、ゲノムDNAを用いて高濃度MAFで試験をしたところ交差反応は観察されなかった。V600DとV600Ecについては交差反応が確認されたが、V600DとV600Ec変異はいずれも結腸・直腸癌集団ではまれな変異である(COSMICデータベースより)。
5. その他の留意事項

- ・検体中に、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すること。
- ・PCR増幅産物が汚染しないよう細心の注意を払うこと。  
Reaction Mixをセットアップする際、及び、PCやDNA検体を添加する際には、それぞれ専用のピペットを使用することが推奨される。また、Reaction Mixの調製・分注はDNAテンプレートの添加とは異なる場所で行うこと。
- ・サンプリングや操作などのミスに注意し、正確な検査を実施すること。
- ・検体中に標的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るので注意すること。

## 【用法・用量(操作方法)】

### 1. 試薬の調製方法

- 1) 全ての試薬を使用前に常温(15~25℃)にて1時間以上かけて完全に融解したのち、穏やかに10回転倒混和し、遠心機でスピンドウンする。
- 2) マスターミックスの調製  
Control Reaction Mix又はV600E Reaction MixとTaq DNA Polymeraseを混和してマスターミックスを調製し、ゆっくり10回ピペッティングして混和する。マスターミックスを調製する際の必要量は表の通り。

構成試薬	量
Reaction Mix	19.5 $\mu\text{L}$ $\times$ (n+X)*
Taq DNA Polymerase [Taq]	0.5 $\mu\text{L}$ $\times$ (n+X)*
全量	20.0 $\mu\text{L}$ /1反応

\*n=反応数(検体+コントロール)。マスターミックスを準備する際には、PCRの設定に十分な処理ができるように、n+X(余分な検体)(ただし、4個以下の検体にコントロールを加えた場合はX=1個、5個以上の検体にコントロールを加えた場合はX=2個)を余分に用意する。

- ・各Reaction Mix (構成試薬1~2)を初めにチューブにとり、次にTaq DNA Polymeraseを加える。
- ・Taq DNA Polymeraseは毎回使用前に室温(15~25℃)に戻し、スピンドウンする。
- ・Taq DNA Polymeraseは、過剰な酵素がチップに付着しないよう、チップの先がちょうど液面の下に来る程度の位置で分取すること
- ・Taq DNA Polymerase、または、Taq DNA Polymeraseを含む溶液(マスターミックス)は、ボルテックスしないこと。酵素が不活性化する恐れがある。
- ・試薬を準備したらPCR反応の準備をし、すぐに測定を開始する。
- ・調製した試液は直ちに使用すること。試薬を直ちに使用しない場合はPCRセットアップの時間を含めて室温で4時間、2~8℃で12時間までとする。
- ・各Reaction Mixは、適切な活性を維持し、光変性を避けるため、遮光する必要がある。
- ・各Reaction Mixの容量は、24検体まで評価可能である。
- ・本品を効率的に使用するには6検体以上に測定をすること。

- 3) BRAF Positive Control  
そのまま使用すること。
- 4) Water for NTC  
そのまま使用すること。
- 5) Water for Dilution  
そのまま使用すること。

### 2. 別途必要な器具・器材、試料等

#### 1) 試薬

- ・ゲノムDNA調製キット: QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(櫛キアゲン、品番56404)

#### 2) 消耗品

- ・1.5 mL又は2 mLのマイクロチューブ(溶解用)
- ・1.5 mLのキャップ付きマイクロチューブ(溶出用)

(Eppendorf [Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1.5 ml, カタログ番号 0030 120.086] または Sarstedt [Safety Cap, カタログ番号 72.690を推奨)

- ・0.1 mL Strip tube 及びキャップ72ウェルローター用(RGQ専用品)
  - ・滅菌ピペットチップ(疎水性フィルター付きのもの)
  - ・スクレアーゼフリーの低DNA結合マイクロ遠心チューブ(マスターミックス調製用として推奨)
  - ・マイクロピペット
- 3) 機器
- ・遺伝子解析装置 ロータージーン Q MDx 5plex HRM(医療機器届出番号:13B2X10223000004)
- 及び消耗品\*
- ・サーモミキサー又はウォーターバス(56℃及び90℃でインキュベート可能なもの)
  - ・遠心機
  - ・ボルテックスミキサー
- ※RGQ用の消耗品を使用すること。

### 3. 操作法

「【操作上の注意】2. 検体の調製法」を参考に検体を調製する。その際は、クロスコンタミネーションに十分注意すること。検体の調製法に従って抽出したDNA検体は直ちに測定を開始すること。抽出後すぐに測定しない場合は、測定開始まで-15℃~-30℃で8週間保存できる。

操作を開始する前に【全般的な注意】【使用上又は取扱い上の注意】をよく読むこと。本品のハンドブックならびにRGQの添付文書及び取扱説明書を参照し、取扱いを熟知した上で測定を開始すること。試験は検体評価試験と変異検出試験の2段階からなる。

#### 1) 検体評価試験

- ① 「1. 試薬の調製方法」にしたがって、Control Reaction Mix と Taq DNA Polymerase を混和し、マスターミックスを必要量調製する。  
上下に10回ピペッティングを行い、マスターミックスを十分に混ぜ合わせる。表のレイアウトに従って、適切な数の Strip tube (チューブ)をローディングブロックに入れる。すぐに20 $\mu\text{L}$ のマスターミックスを各チューブに加える。

ローディングブロックにおける検体の配置

Reaction Mix									
Control	1( PC)	9	17	-	-	-	-	-	-
Control	2	10	18	-	-	-	-	-	-
	(NTC)								
Control	3	11	19	-	-	-	-	-	-
Control	4	12	20	-	-	-	-	-	-
Control	5	13	21	-	-	-	-	-	-
Control	6	14	22	-	-	-	-	-	-
Control	7	15	23	-	-	-	-	-	-
Control	8	16	24	-	-	-	-	-	-

- ② 直ちに以下の手順を実施する。
  - a) ポジション2にNTC 5  $\mu\text{L}$ を加え、キャップをする。
  - b) ポジション3~24に検体5  $\mu\text{L}$ ずつ加え、キャップをする。
  - c) ポジション1にPC 5  $\mu\text{L}$ を加え、キャップをする。
 注)チューブのキャップに印をつけ、RGQに装填する方向を表示する。
- ③ すべてのチューブをキャップした後、チューブの充填レベルを目視で確認し、全チューブに溶液が充填されていることを確認する。
- ④ すべてのチューブを4回転倒混和させ、ローターディスクにセットする。
- ⑤ ローターディスクに空の箇所がある場合、その位置にはキャップ付きの空のチューブを装填する。
- ⑥ ローターディスクをRGQに搭載し、Rotor-Gene Assay Managerの指示に従い測定を開始する。操作の詳細は本品のハンドブック及びRGQの添付文書、取扱説明書を参照すること。

2) 変異検出試験

- ① 「1. 試薬の調製方法」にしたがって、V600E reaction Mix 及び Control Reaction Mix と Taq DNA Polymerase を混和し、マスターミックスを必要量調製する。
- ② 上下に 10 回ピペッティングを行い、マスターミックスを十分に混ぜ合わせる。表のレイアウトに従って、適切な数の Strip tube (チューブ) をローディングブロックに入れる。すぐに 20  $\mu$  L のマスターミックスを各チューブに加える。

ローディングブロックにおける Reaction Mix の配置 (ローディングブロックの位置を示し、最終的なローターディスク上の位置を示す数字、太字は検体番号を示す)

Reaction Mix	PC	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>11</b>	<b>15</b>	<b>19</b>	<b>23</b>	-	-
Control	1	9	17	25	33	41	49	-	-
BRAF	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>26</b>	<b>34</b>	<b>42</b>	<b>50</b>	-	-
	<b>NTC</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>16</b>	<b>20</b>	<b>24</b>	-	-
Control	3	11	19	27	35	43	51	-	-
BRAF	4	12	20	28	36	44	52	-	-
	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>17</b>	<b>21</b>	-	-	-
Control	5	13	21	29	37	45	-	-	-
BRAF	6	14	22	30	38	46	-	-	-
	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>22</b>	-	-	-
Control	7	15	23	31	39	47	-	-	-
BRAF	8	16	24	32	40	48	-	-	-

- ③ 直ちに以下の手順を実施する。
  - a) ポジション 3-4 に NTC 5 $\mu$ L を加え、キャップをする。
  - b) ポジション 5-6、7-8、9-10 などに各検体 5 $\mu$ L ずつを必要数加え、キャップをする。
  - c) ポジション 1-2 に PC 5 $\mu$ L を加え、キャップをする。
 注: 各検体は Control Reaction Mix 及び V600E Reaction Mix の両方で測定をする必要がある。また、チューブのキャップに印をつけ、RGQ に装填する方向を表示する。
- ④ すべてのチューブをキャップした後、チューブの充填レベルを目視で確認し、全チューブに溶液が充填されていることを確認する。
- ⑤ すべてのチューブを 4 回転倒混和させ、ローターディスクにセットする。
- ⑥ ローターディスクに空の箇所がある場合、その位置にはキャップ付きの空のチューブを装填する。
- ⑦ ローターディスクを RGQ に搭載し、Rotor-Gene Assay Manager の指示に従い試験を開始する。操作の詳細は本品のハンドブック、RGQ の添付文書及び取扱説明書を参照すること。

3)再検査

試験が失敗した場合、もう 1 度検査をすることができる。

①検体評価試験

a) DNA インプット量が低い場合

DNA インプット量が低すぎたために、検体評価試験が失敗した場合、その検体は無効と判断され下表に示されるフラグを表示する。

DNA インプット量が低い検体の評価フラグ

フラグ	説明
NO_VALUE	得られると想定されていた値が得られていない。
ABOVE_ACCEPTED_RANGE	ターゲットの値が、定められた範囲よりも高い。Ct 値が CWR*を超えているか、IC もしくは PC の規定値を超えている可能性がある。

\*CWR・・・コントロールワーキングレンジ、CWR の範囲は Ct 値が 20.95-33.00 となる。

検体は検体評価試験から再検査をする。

DNA インプット量が 2 回目も低すぎ、検体評価試験が失敗した場合、同じ検体由来の 2 枚の切片から再抽出を実行する必要がある。その後、上記のように 2 回目まで検体評価試験を行う。

上記のすべての再検査を実施した後でも、検体が有効な結果を出さない場合、試験に不適切な検体であるとみなし、

無効として報告する。

注) 無効検体には、同じ患者から再度検体を用意し、検査することができる。

b) DNA インプット量が高い場合

DNA インプット量が高すぎたために、ある検体の検体評価試験が失敗した場合、検体は無効と判断され下図に示されるフラグを表示する。

DNA インプット量の高い検体の評価フラグ

フラグ	説明
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	DNA 濃度が高すぎるため、検体は無効である。コントロールの Ct 値を上げるため、検体を希釈すること。希釈については、キットに含まれている Water for Dilution で 1:2 に希釈すると Ct が 1.0 増加すると仮定して計算すること。検体が希釈されたら、検体評価試験を繰り返すため、新しくセットアップを行うこと。

検体は、Water for Dilution で CWR 内に入るよう希釈する。検体の 1:2 の希釈により、Ct 値が約 1.0 増加するとみす。希釈後の検体に対し検体評価試験を行い、希釈後もフラグが表示された場合、必要に応じて希釈を繰り返す。上記の検体評価試験の手順により、適切な希釈検体が得られた場合、希釈後の検体で変異評価検出試験を行う。

②変異検出試験

a) DNA インプット量が低い場合

検体が検体評価試験に合格して、変異検出試験に進んでも、DNA インプット量が低すぎで無効な結果を生む場合、検体評価試験と同じ 2 つのフラグのうちどちらかが表示される。検体は再度検査する必要がある。変異検出試験の再検査で再度同じフラグが表示された場合、同じ検体由来の 2 枚の切片から DNA 検体の再抽出を行う必要がある。新たに抽出した DNA 検体は、再度、検体評価試験から行う。再抽出された DNA 検体でも、変異検出試験が 2 回無効であった場合、追加検査は実行しない。

注) 無効検体には、同じ患者から再度検体を用意し、検査することができる。

③IC による無効

変異検出試験後に、IC により無効となった場合 (SAMPLE\_INT\_CTRL\_FAIL のフラグを表示する)、検体を Water for Dilution で下表を参照して希釈する必要がある。希釈した検体は、変異検出試験を初めから行う必要がある。

コントロール Ct 値	推奨希釈係数
<30.00	8
$\geq$ 30.00	4

1:8 の希釈の後に DNA インプット量が低すぎた場合、より薄い希釈係数 (1:4) を使用して、変異検出試験を再度実行する必要がある。

検体希釈後に 2 回目の変異検出試験でも、SAMPLE\_INT\_CTRL\_FAIL フラグが表示された場合、同じ検体由来の 2 枚の切片から DNA 検体の再抽出を実行する必要がある。新たに抽出した DNA 検体は、再度、検体評価試験から行う。

検体評価試験の再試験および変異検出試験の再試験の後、2 回目の評価を実行しても再抽出された DNA 検体が IC によって無効となった場合、結果は無効として報告され、追加検査は実行しない。

注) 無効検体には、同じ患者から再度検体を用意し、検査することができる。

**【測定結果の判定法】**

それぞれの検体について、各変異型をそれぞれ特異的に増幅・検出する反応と、野生型(エクソン 3)を検出するコントロール反応を同時併行して行い、各増幅産物をサイクル毎にリアルタイムにモニターしてそれぞれの増幅曲線を作成する。作成した増幅曲線より蛍光強度が一定以上となるサイクル数を求め、これを Ct 値 (Cycle threshold) とする。各反応において求められた Ct 値 (変異検出 Ct 値) とコントロール反応において求められた Ct 値 (コントロール Ct 値) の差 ( $\Delta$ Ct) を求める。RGQ を用いて測定した場合、Ct 値の算出は自動的に行われる。

$$\Delta Ct \text{ 値} = \text{変異検出 Ct 値} - \text{コントロール Ct 値}$$

本品の変異検出試験における、カットオフ値は下表に記載のとおりとなる。

変異	カットオフ値 ( $\Delta$ Ct 値)
V600E	$\leq 7.0$

測定結果は、"BRAF Mutation detected" (変異検出: 陽性)、"No Mutation Detected" (変異未検出: 陰性) 又は "Invalid" (無効) のいずれかである。

$\Delta$ Ct 値がカットオフ値を超えている場合は陰性、カットオフ値以下の場合には陽性と判定し、その他、検出基準を満たさない場合は無効と判定する。

閾値の決定ならびに結果の判定は、以下のコントロール (PC、NTC、IC) 規格値に基づき行われる。(規格値から外れた場合、測定は無効と判定される。)

1) 試験の解析

コントロールの測定結果が許容基準内であった場合、測定は有効となる。

コントロールの許容基準

Reaction Mix の種類	ウェル	チャンネル	Ct 値の許容基準(Ct)
Control Reaction Mix (Control)	PC	Green (FAM) *	27.82 – 33.85
V600E Reaction Mix	PC	Green (FAM) *	27.49 – 33.51
両 Reaction Mix	NTC	Green (FAM) *	NA
両 Reaction Mix	NTC	Yellow (HEX) **	32.53 – 38.16

IC の許容基準

Assay	Channel	許容基準 (Ct)
Internal Control	HEX*	32.53 – 38.16

\*FAM: Carboxyfluorescein、緑色蛍光色素

\*\*HEX: Hexachlorofluorescein、黄色蛍光色素

2) 結果解釈上の注意

- PCR反応を阻害する物質が含まれる検体では、偽陰性となる可能性があるため、注意すること。
- 診断は、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。
- 本品の測定は臨床検査ならびに使用する機器のトレーニングを受けた担当者が実施すること。

**【臨床的意義】**

国際共同第III相試験 (ARRAY-818-302試験)

一次治療又は二次治療後に増悪したBRAF V600E変異を有する治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌患者665例(日本人患者20例を含む)を対象に、FOLFIRI<sup>※1</sup>及びセツキシマブ<sup>※2</sup>の併用投与又はイリノテカン<sup>※3</sup>及びセツキシマブ<sup>※2</sup>の併用投与(対照群)を対照として①エンコラフェニブ<sup>※4</sup>、ピニメチニブ<sup>※5</sup>及びセツキシマブ<sup>※2</sup>の併用投与(3剤群)又は②エンコラフェニブ<sup>※4</sup>及びセツキシマブ<sup>※2</sup>の併用投与(2剤群)の有効性及び安全性を検討した。主要評価項目である全生存期間及び奏効率の結果<sup>※6</sup>を以下に示す。対照群に

対して3剤群及び2剤群は、全生存期間を統計学的に有意に延長し、奏効率は統計学的に有意に高値であった(2019年2月11日データカットオフ)。

※1: 2週間を1サイクルとして、第1日目に①イリノテカン180mg/m<sup>2</sup>を90分かけて静脈内投与、②ホリナート400mg/m<sup>2</sup>を120分かけて静脈内投与、③フルオロウラシル400mg/m<sup>2</sup>を急速静脈内投与した後、フルオロウラシル2,400mg/m<sup>2</sup>を46~48時間かけて静脈内投与

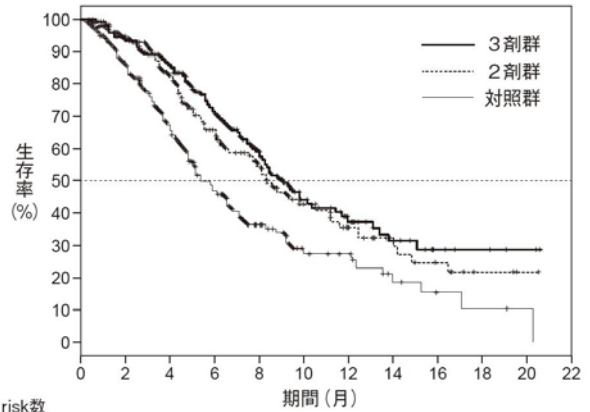
※2: 初回のみ400mg/m<sup>2</sup>を120分かけて、その後250mg/m<sup>2</sup>を60分かけて毎週静脈内投与

※3: 2週間を1サイクルとして、180mg/m<sup>2</sup>を90分かけて静脈内投与

※4: 300mgを1日1回投与

※5: 1回45mgを1日2回投与

※6: 本試験では、主要目的として、対照群に対する3剤群の奏効率及び全生存期間の優越性が検証された後、階層的な検定手順に従い、副次目的である対照群に対する2剤群の全生存期間及び奏効率の解析が実施された



at risk数	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
3剤群	224	186	141	103	69	37	24	14	6	4	2	0
2剤群	220	184	133	87	57	33	21	12	8	3	1	0
対照群	221	158	102	60	34	18	15	7	4	2	1	0

全生存期間	症例数	3剤群	2剤群	対照群
	中央値 (月)	224例	220例	221例
[95%信頼区間]	9.0	8.4	5.4	
	[8.0, 11.4]	[7.5, 11.0]	[4.8, 6.6]	
ハザード比 <sup>※7</sup>	0.52	0.60	-	
[95%信頼区間]	[0.39, 0.70]	[0.45, 0.79]	-	
p値 <sup>※8</sup>	<0.0001	0.0002	-	
奏効率 <sup>※9</sup>	111例	113例	107例	
奏効率 (%)	26.1	20.4	1.9	
[95%信頼区間]	[18.2, 35.3]	[13.4, 29.0]	[0.2, 6.6]	
p値 <sup>※11</sup>	<0.0001	<0.0001	-	

※7: 層別Cox比例ハザードモデル(対照群との比較)

※8: 層別log-rank検定(対照群との比較)

※9: RECISTガイドライン1.1版に基づく中央判定によるCR又はPR

※10: 本試験に最初に登録された331例が解析対象とされた

※11: Cochran-Mantel-Haenszel検定(対照群との比較)

**【性能】**

1. 性能試験

1) 感度試験

Control Reaction Mix 及び V600E Reaction Mix により陽性コントロールを測定するとき、各 Ct 値はそれぞれ 27.82-33.85 及び 27.49-33.51 である。

2) 正確性試験

Control Reaction Mix 及び V600E Reaction Mix により陽性コントロールを測定するとき、各 Ct 値はそれぞれ 27.82-33.85 及び 27.49-33.51 である。

Control Reaction Mix 及び V600E Reaction Mix により陰性コントロールを測定するとき、いずれも増幅無し (No Amplification) となる。

3) 同時再現性試験

Control Reaction Mix 及び V600E Reaction Mix により陽性コントロールをそれぞれ 2 回測定するとき、各 Ct 値はそれぞれ 27.82-33.85 及び 27.49-33.51 である。

Control Reaction Mix 及び V600E Reaction Mix により陰性コントロールをそれぞれ 2 回測定するとき、いずれも増幅無し (No Amplification) となる。

・管理用物質

陰性コントロールは、「Water for NTC」(精製水)である。

陽性コントロールは、「BRAF Positive Control」であり、ロングオリゴヌクレオチドである。

2. 最小検出感度

最小検出感度試験

FPPE臨床検体にDNA高濃度、中濃度、低濃度に調製した検体を用いて、本品による測定を行った。最小検出感度 (LoD値) は、probit解析により決定された95%信頼区間で検出される検体の最小値と定められた。結果は、下表に示すとおりである。

DNA 濃度	Ct 値の範囲	LoD 値 (MAF 濃度)
高	20.95 ≤ Ct ≤ 25.00	2%
中	25.00 < Ct ≤ 29.38	3.5%
低	29.38 < Ct ≤ 33.00	7.8%

3. 臨床試験

(1) BEACON CRC試験の検体を用いたCTAと本品との一致率検討(ブリッジング試験)

評価対象試験であるBEACON CRC試験で患者から得られた検体を活用し、本品の臨床的有効性ととも、BEACON CRC試験の検体における本品とCTA<sup>\*\*</sup> (Clinical Trial Assay)、及びLDT<sup>\*\*\*</sup> (Laboratory Developed Test)との全体比較による一致率の検証を行った。

※CTA: BEACON試験で使用され、中央検査機関で実施された検査。本品はCTAのパラメータを改良した製品となる。

※※LDT: BEACON試験で実施医療機関にて実施した検査

(2) CTAとの比較(ブリッジング試験)

1285例の臨床検体を用いた本品とCTAの全体一致率は99.84% (95% CI: 99.44%, 99.98%)であった。

本品とCTAの変異検出数の一致率			
CTA	本品		
検出の有無	検出	未検出	合計
検出	770	1	771
未検出	1	513	514
合計	771	514	1285

全体一致率: 99.84% (1283/1285)

陽性一致率: 99.87% (770/771)

陰性一致率: 99.81% (513/514)

(3) LDTとの比較(ブリッジング試験)

661例の臨床検体を用いた、本品とLDTの全体一致率は96.82% (95% CI: 95.18%, 98.02%)であった。

本品とLDTの変異検出数の一致率			
LDT	本品		
検出の有無	検出	未検出	合計
検出	520	15	535
未検出	6	120	126
合計	526	135	661

全体一致率: 96.82% (640/661)

陽性一致率: 98.86% (520/526)

陰性一致率: 88.89% (120/135)

※【使用上または取扱い上の注意】

1. 取り扱い上(危険防止)の注意

- 1) 検体は、HBV、HIV、HCV等の感染の恐れがあるものとして取り扱うこと。
- 2) 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋、白衣、保護メガネなど、必要な保護具を着用すること。
- 3) ピペットは口で吸わないこと。
- 4) 試薬が誤って皮膚及び粘膜に付着した場合は、直ちに大量の水で洗い流す等の処置をすること。
- 5) 試薬をこぼした場合は水で希釈してから拭きとること。
- 6) 抽出検体が床等にこぼれた場合、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度5000ppm, 0.5%)などの消毒液を使用して十分に拭き取ること。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護する措置を講ずること。
- 7) 検体及び本品を取り扱う場所では飲食又は喫煙を避けること。
- 8) 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するか、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度5000ppm, 0.5%)に1時間以上浸すなどの消毒を行う。これらの作業中は十分に換気すること。
- 9) 安全性情報(SDS)についてさらに情報が必要な場合は、[www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)にて検索可能である。

2. 使用上の注意

- 1) 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などはほかの目的に使用しないこと。本品に同梱されている全ての試薬が本品専用です。性能を維持するために他の試薬で代用しないこと。
- 2) 各試薬は最適濃度に希釈されている。反応が悪くなることがあるので、これ以上希釈はしないこと。
- 3) 偽陰性となるリスクを避けるため、反応液は25 µLを下回らないようにすること。
- 4) 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、有効期間(外箱に表示された使用期限)を過ぎたものは使用しないこと。
- 5) 性能に支障をきたす恐れがあるので、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こと。
- 6) 本キット内のTaq DNA Polymeraseのみを使用し、別キットや別会社のTaq DNA Polymeraseは使用しないこと。
- 7) 試薬はマニュアル用に検証されているため、自動測定の場合はdead volume入力が求められ反応数が減る可能性がある。
- 8) 全ての試薬は1時間以上常温(15℃~25℃)に置き、常温に戻してから使用すること。使用後は再び-30℃~-15℃で保存すること。
- 9) 本品は6回を超えての凍結・融解を繰り返さないこと。
- 10) 全ての試薬は保存又は反応中に強い光を当てないこと。全てのScorpionsは性能を維持し光変性を避けるため遮光が必要である。
- 11) 全ての試薬は開封又は分注時に微生物による汚染を避けること。
- 12) PC及び検体は他の試薬とは離して保管及び抽出し、他の試薬とは離れた場所でReaction Mixに追加すること。
- 13) Reaction Mixの調製・分注はDNAテンプレートとは離れた場所で行うこと。
- 14) PCR反応の準備は紫外線照射装置を完備したクリーンベンチ内で行うこと。ピペットなどは常にこのクリーンベンチ内に保管すること。PCR反応を準備するエリアには増幅後のDNAを持ち込まないこと。また、検体の分注には疎水性フィルター付きの使い捨てチップを使用すること。
- 15) コンタミネーション防止のため、検体を添加した際にチューブの蓋をすぐに閉めること。PCR反応後の反応チューブの蓋を開けないこと。
- 16) 検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸(有効塩素濃度5000ppm, 0.5%)による器具、実験台の清掃を徹底して行うこと。
- 17) 本品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る。汗や唾液に含まれるDNaseが少量でも検体に混入した場合、DNAが分解され測定結果に誤りが生じる可能性がある。
- 18) 操作の詳細については、ハンドブック、RGQの添付文書及び取扱説明書を参照すること。

- 19) ローディングブロックを使用する前に除染することまた、使用前に乾燥させること。
  - 20) 使用時には製品番号を確認すること。
  - 21) 本品の受領時にドライアイスが同封されており、凍結していることを確認すること。受領時に凍結していなかった場合または、ラベルが開封されていた場合、試薬が不足していた場合は弊社のカスタマーサポートに問い合わせること。
3. 廃棄上の注意
- 1) 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置を行うこと。また、これらを廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従い、廃棄すること。
  - 2) 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い、医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理すること。
  - 3) 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5000ppm、0.5%になるように混和後、一晩放置するなど、DNAを破壊してから、廃棄すること。
  - 4) 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5000ppm、0.5%)に一晩浸すなどによりDNAを破壊してから焼却処理又は医療廃棄物として処理すること。

**【保管方法及び有効期間】**

1. 貯蔵方法: 遮光、-30℃～-15℃
2. 有効期間: 12ヶ月 (使用期限は外箱に表示)

**【包装単位】**

製品番号	包装内容	包装単位
874854	therascreen BRAF V600E 変異検出キット RGQ「キアゲン」	24テスト

各構成試薬の詳細については**【形状・構造等(キットの構成)】**を参照。

**【主要文献】**

- 1) C.R.Newton, et al. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Research Volume 17 Number 7 1989: 2503-2516
- 2) David Whitcombe, et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotechnology Volume 17 August 1999: 804-807.
- 3) 小野薬品工業: 国際共同第Ⅲ相 (ARRAY-818-302) 試験成績 (社内資料; 2020年11月27日承認、CTD2.7.6.6)

**【お問い合わせ先】**

株式会社キアゲン  
〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1  
フォーフロント・タワーⅡ  
TEL 03-6890-7300  
FAX 03-5547-0818

**【製造販売業者の氏名又は名称および住所】**

株式会社キアゲン  
〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1  
フォーフロント・タワーⅡ