

体外診断用医薬品

製造販売承認番号 30100EZK00010000

\* この電子添文をよく読んでから使用してください。

RAS 遺伝子変異検出キット

# OncoBEAM™ RAS CRC キット

**【重要な基本的注意】**

- 腫瘍由来DNAが血漿中にじゅうぶんに漏出していない患者では、腫瘍組織に RAS 遺伝子変異が存在しても、本検査で野生型と判定される可能性があります (性能参照)。特に肺転移のみを有する患者では、可能な限り腫瘍組織を用いた検査の実施を考慮してください (臨床性能試験成績参照)。
- 本検査でカットオフ値近傍において変異型と判定された患者では、腫瘍組織に RAS 遺伝子変異が存在しない可能性を否定できません。このような患者では、腫瘍組織を用いた検査の実施についても考慮してください (臨床性能試験成績参照)。
- 上記を踏まえ、本検査は腫瘍組織を用いる検査と完全に置き換わらないことをじゅうぶんに理解した上で、本検査を実施してください。

**【全般的な注意】**

- 本キットは体外診断用医薬品です。これ以外の目的には使用しないでください。
- 本キットの検査の対象患者に対し、検査の目的・方法及び精度、特に不可避な偽陽性・偽陰性を含む性能限界などについて正確な情報を伝えてください。
- 診断の際には、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
- \* 本キットをセツキシマブ (遺伝子組換え) 又はパニツムマブ (遺伝子組換え) 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電子添文を参照のうえ使用してください。
- 野生型と判定された場合でも、偽陰性の可能性を考慮し、セツキシマブ (遺伝子組換え) 又はパニツムマブ (遺伝子組換え) 投与に際し、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。
- 本検査の選択とその結果の解釈の際には、日本臨床腫瘍学会が発出している大腸がん患者における RAS 遺伝子変異の測定に関するガイダンス等の最新の情報を参考にしてください。
- \* 電子添文以外の使用方法については保証をいたしかねます。
- \* 測定に使用する機器の電子添文及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

**【形状・構造等 (キットの構成)】**

本キットは次の試薬より構成されています。

	構成試薬 (略号)
	反応に関わる成分
Box1	Positive Control Amplicon KRAS Exon 2 (PC1)
	Positive Control Amplicon KRAS Exon 3 (PC2)
	Positive Control Amplicon KRAS Exon 4A (PC3)
	Positive Control Amplicon KRAS Exon 4B (PC4)
	Positive Control Amplicon NRAS Exon 2 (PC5)
	Positive Control Amplicon NRAS Exon 3 (PC6)
	Positive Control Amplicon NRAS Exon 4 (PC7)
	No Template Control (NTC)
	Multiplex PCR Master Mix dNTPs 1
	Multiplex PCR Primer Mix MPx Primer 1, MPx Primer 2 MPx Primer 3, MPx Primer 4 MPx Primer 5, MPx Primer 6 MPx Primer 7, MPx Primer 8 MPx Primer 9, MPx Primer 10 MPx Primer 11, MPx Primer 12 MPx Primer 13, MPx Primer 14
	Multiplex PCR DNA Polymerase Phusion Hot Start DNA Polymerase
	Emulsion PCR Master Mix KRAS Exon 2 dNTPs 2, EM Primer 1, EM Primer 2

Box1	Emulsion PCR Master Mix KRAS Exon 3 dNTPs 2, EM Primer 3, EM Primer 4
	Emulsion PCR Master Mix KRAS Exon 4A dNTPs 2, EM Primer 5, EM Primer 6
	Emulsion PCR Master Mix KRAS Exon 4B dNTPs 2, EM Primer 7, EM Primer 8
	Emulsion PCR Master Mix NRAS Exon 2 dNTPs 2, EM Primer 9, EM Primer 10
	Emulsion PCR Master Mix NRAS Exon 3 dNTPs 2, EM Primer 11, EM Primer 12
	Emulsion PCR Master Mix NRAS Exon 4 dNTPs 2, EM Primer 13, EM Primer 14
	Emulsion PCR DNA Polymerase peqGOLD Taq DNA Polymerase
Box2	Hybridization Probe Mix 1 蛍光標識プローブ 1 蛍光標識プローブ 2 蛍光標識プローブ 3 蛍光標識プローブ 4 蛍光標識プローブ 5 蛍光標識プローブ 6 蛍光標識プローブ 7 蛍光標識プローブ 8
	Hybridization Probe Mix 2 蛍光標識プローブ 9 蛍光標識プローブ 10
	Hybridization Probe Mix 3 蛍光標識プローブ 11 蛍光標識プローブ 12 蛍光標識プローブ 13
	Hybridization Probe Mix 4 蛍光標識プローブ 14 蛍光標識プローブ 15 蛍光標識プローブ 16 蛍光標識プローブ 17 蛍光標識プローブ 18
	Hybridization Probe Mix 5 蛍光標識プローブ 19 蛍光標識プローブ 20 蛍光標識プローブ 21 蛍光標識プローブ 22
	Hybridization Probe Mix 6 蛍光標識プローブ 23 蛍光標識プローブ 24 蛍光標識プローブ 25 蛍光標識プローブ 26
	Hybridization Probe Mix 7 蛍光標識プローブ 27 蛍光標識プローブ 28 蛍光標識プローブ 29 蛍光標識プローブ 30 蛍光標識プローブ 31 蛍光標識プローブ 32 蛍光標識プローブ 33 蛍光標識プローブ 34
	Hybridization Probe Mix 8 蛍光標識プローブ 35 蛍光標識プローブ 36 蛍光標識プローブ 37 蛍光標識プローブ 38

Box2	Hybridization Probe Mix 9 蛍光標識プローブ 39 蛍光標識プローブ 40 蛍光標識プローブ 41
	Hybridization Probe Mix 10 蛍光標識プローブ 39 蛍光標識プローブ 42 蛍光標識プローブ 43 蛍光標識プローブ 44 蛍光標識プローブ 45 蛍光標識プローブ 46 蛍光標識プローブ 47
	Hybridization Probe Mix 11 蛍光標識プローブ 48 蛍光標識プローブ 49 蛍光標識プローブ 50 蛍光標識プローブ 51
	Hybridization Probe Mix 12 蛍光標識プローブ 48 蛍光標識プローブ 52 蛍光標識プローブ 53
	Emulsion PCR Beads 固相化用プライマー
	Box3
Breaking Buffer 1 without Alcohols	
Breaking Buffer 2 without Alcohols	
Hybridization Buffer	
EmulsiFIRE	

### 【使用目的】

血漿から抽出したゲノム DNA 中の RAS (KRAS 及び NRAS) 遺伝子変異の検出 (セツキシマップ (遺伝子組換え) 又はパニツムマップ (遺伝子組換え) 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、BEAMing (Beads, Emulsions, Amplification and Magnetics) 法を測定原理とする高感度デジタル PCR により、血漿から抽出した cfDNA (血中循環 DNA: cell free DNA) 中の RAS 遺伝子変異 (KRAS 及び NRAS 遺伝子のエクソン 2、3、4 領域の変異) を検出するキットです。

RAS 遺伝子変異の検出は、血漿から抽出した DNA を検体として、全てのターゲット領域を正確性の高い DNA 合成酵素でプレ増幅し、油中水滴型エマルジョン中の磁性ビーズ上で検出対象領域を増幅させます。油中水滴型エマルジョンを破壊して (プレーキング) 磁性ビーズ上で増幅された DNA と野生型検出用、変異型検出用、及びエマルジョン PCR によるビーズ上での増幅確認用 (共通領域) に、それぞれ異なる蛍光色素で標識されたコドン毎の蛍光プローブとハイブリダイゼーションさせます。蛍光標識されたビーズをフローサイトメトリー法で測定します。

本品の検出対象変異は下表のとおりです。

遺伝子	エクソン	コドン	遺伝子変異箇所 アミノ酸 (塩基)
KRAS	2	12	G12S (g34a)
			G12R (g34c)
			G12C (g34t)
			G12D (g35a)
			G12A (g35c)
	3	61	G12V (g35t)
			G13D (g38a)
	4A	117	G13D (g38a)
			A59T (g175a)
			K117N (a351c)
4B	146	K117N (a351t)	
		A146T (c437t)	
NRAS	2	12	G12S (g34a)
			G12R (g34c)
			G12C (g34t)
			G12D (g35a)
			G12A (g35c)
	3	61	G12V (g35t)
			G13R (g37c)
	4	117	G13D (g38a)
			G13V (g38t)
			A59T (g175a)
3	61	A59T (g175a)	
		Q61K (c181a)	
4	146	Q61R (a182g)	
		Q61L (a182t)	
4	146	Q61H (a183c)	
		Q61H (a183t)	
4	146	K117N (g351c)	
		K117N (g351t)	
4	146	A146T (g436a)	
		A146T (g436a)	

### 【操作上の注意】

#### 測定試料の性質、採取法

- 測定検体は血漿から抽出した DNA 以外は使用しないでください。
- \*\* 2. 指定された採血管 ( Streck 採血管もしくは BD Vacutainer K2 EDTA tubes ) で採血後、15~25 °C で保存し、指定時間内 ( Streck 採血管; 採血後 3 日以内、BD Vacutainer K2 EDTA tubes; 採血後 4 時間以内 ) に血漿分離してください。
3. 血漿分離の遠心条件は 15~25 °C、1600 ± 150 × g、10 分間遠心を行い、上清を回収後、15~25 °C、3000 ± 150 × g 又は 6000 ± 150 × g、10 分間遠心を行ってください。
- \*\* 4. 血漿検体は -30~-15 °C もしくは -70 °C 以下で保存した場合 6 か月間安定です。
5. 血漿 (推奨の血漿量; 3 mL) から市販キット (QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit 等) のプロトコルに従って DNA 抽出を行った DNA は、2~8 °C で 24 時間、-30~-15 °C で 30 日間安定です。

#### 妨害物質・妨害薬剤

1. 本品は抽出された DNA を試料として測定することから、ヘモグロビン、ビリルビン及び乳びの混入はないと考えられます。従って、妨害物質の測定への影響はないものと考えられます。
2. 溶血した血液から血漿を調製した場合、測定結果に影響を与えることがあります。

#### その他

1. コントロールは測定毎にキットに添付のコントロール (NTC 及び PC1~7) を使用し、検体と同時に測定し正しく判定されることを確認してください。
2. 本品の測定にはフローサイトメータ (CyFlow Cube 6i システム 又は同等品) を使用し、消耗品は指定のものを必ずご使用ください。
3. コンタミネーションを防ぐために、増幅と検出するエリアは、プレ増幅のためのマスターミックス調製を行うエリアとは異なるエリアで行ってください。

**【用法・用量（操作方法）】**

**試薬の調製方法**

酵素以外の各試薬は、常温（15～25℃）に戻してからボルテックスで混合してから使用してください。  
プローブミックスは光感受性のため、長時間の光への曝露は避けてください。

1. マスターミックスの調製

- (1) Multiplex PCR Master Mix の調製  
1 検体分（PC 7 種類、NTC 1 種類を含む）  
Multiplex PCR Master Mix 1871 μL  
Multiplex PCR Primer Mix 772.2 μL  
Multiplex PCR DNA Polymerase 59.4 μL

- (2) Emulsion working Mix の調製  
1 反応分  
Emulsion PCR Master Mix 13.2 μL  
Emulsion PCR Beads 0.8 μL  
Emulsion PCR DNA polymerase 1 μL

- (3) Hybridization Buffer probe Mix の調製  
1 検体分  
Hybridization buffer 328 μL  
Hybridization probe 5 μL

**必要な器具・器材・試料等**

＜器具・器材＞

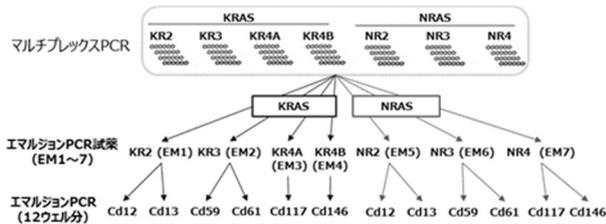
1. マルチチャンネル電子ピペット（E12-200XLS+又は同等品）
2. マイクロピペット
3. フィルター付きピペットチップ（ヌクレアーゼフリー）
4. マイクロチューブ、96 ウェルプレート、8 連チューブ
5. 96 ウェルプレート用シール
6. リザーバー
7. QIAvac Connecting System 又は同等品
8. QIAvac 24 Plus System 又は同等品
9. 吸引ポンプ
10. サーマルサイクラー（Veriti Dx 又は同等品）
11. マグネットプレート（Alpaqua 96S Super Magnet Plate 又は同等品）
12. フローサイトメータ（CyFlow Cube 6i システム又は同等品）

＜試薬＞

1. エタノール ≥ 99.8 %
2. 1-プロパノール ≥ 99.8 %
3. 2-プロパノール ≥ 99.8 %
4. ミネラルオイル
5. 2-ブタノール ≥ 99 %
6. Dulbecco's 1X リン酸緩衝生理食塩水（PBS）（Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 非含有 pH 7.4）
7. 1X TE Buffer, low EDTA（pH 8.0）
8. cfDNA 抽出試薬（QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit）

**測定（操作）法**

＜測定方法の概略＞



1. プレ増幅（マルチプレックス PCR）
  - (1) Multiplex PCR Master Mix を必要検体数分調製し、287 μL ずつ分注します。
  - (2) (1)に血漿から精製した cfDNA（以下、検体）とコントロール（NTC 及び PC1～7）を 123 μL ずつ添加して混合します。混合した検体を 6 ウェルに 65 μL ずつ PCR 用プレートに分注し、ミネラルオイルを重層し、アルミシートで蓋をします。
  - (3) サーマルサイクラー（Veriti Dx 又は同等品）でマルチプレックス PCR によりプレ増幅を行います。
  - (4) マルチプレックス PCR の増幅産物を各ウェルから 15 μL ずつ回収し一つにまとめます。
  - (5) 増幅領域毎に low EDTA TE バッファーで希釈します。1 段階目の希釈は検体及びコントロール（NCT と PC）を low EDTA TE バッファーで 1:20 希釈します。その後、下表の希釈倍率に従って low EDTA TE バッファーで希釈します。  
※low EDTA TE バッファーは本品には含まれていません

＜希釈倍率＞

増副産物	コドン	希釈倍率	TE	1 段階目の希釈液
KR2	12/13	1:100	80 μL	20 μL
KR3	59/61	1:100	80 μL	20 μL
KR4A	117	1:350	330 μL	20 μL
KR4B	146	1:300	280 μL	20 μL
NR2	12/13	1:100	80 μL	20 μL
NR3	59/61	1:150	130 μL	20 μL
NR4	117	1:50	30 μL	20 μL
NR4	146	1:100	80 μL	20 μL

2. エマルジョン PCR

- (1) 96 ウェルプレートに検出するコドン分（12 種類）となるように各 Emulsion PCR working Mix を 1 検体もしくは 1 コントロール（PC、NTC）に対して 2 ウェルずつ各 15 μL 分注し（KRAS エクソン 4A 及び 4B は 1 ウェルずつ）、各コドンに対応した希釈倍率のマルチプレックス PCR 産物（5 μL）と混合します。
- (2) 以下の設定を行ったマルチチャンネル電子ピペット（メトラート社製又は同等品）を用いて EmulsiFIRE（70 μL）を添加し、油中水滴型エマルジョンを作製します。

＜電子ピペットの設定（例示）＞

項目	設定値
Aspirate volume (μL)	70
Aspiration speed	6
Dispense Volume (μL)	70
Dispense Speed	6
Mixing Volume (μL)	80
Mixing Cycles	30
Mixing Speed	6

- (3) サーマルサイクラーでエマルジョン PCR を行います。

3. プレーキング及びハイブリダイゼーション

- (1) エマルジョン PCR 終了後、以下の設定値（B）でマルチチャンネル電子ピペット（メトラート社製又は同等品）を用いて Breaking buffer 1 100 μL で懸濁することにより油中水滴型エマルジョンを破壊し、マグネットプレートを用いて磁性ビーズを集磁します。上清を除去し、もう一度、Breaking buffer 1 100 μL を添加して同様の操作を繰り返すことで洗浄します。

＜電子ピペットの設定（例示）＞

項目	設定値 (B)	設定値 (H)	設定値 (P)
Aspirate volume (μL)	100	70	80
Aspiration speed	4	4	4
Dispense Volume (μL)	100	70	80
Dispense Speed	4	4	4
Mixing Cycles	20	20	15
Mixing Speed	8	8	8

- (2) 設定値（B）の設定をしたマルチチャンネル電子ピペットを用いて Breaking Buffer 2 100 μL を添加して懸濁し、2 分間変性させた後、マグネットプレートで磁性ビーズを集磁して上清を除去します。
- (3) 検出対象コドン毎のプローブ混合溶液（12 種類の Hybridization Probe Mix）を対応するウェルに設定値（H）のマルチチャンネル電子ピペットを用いて 70 μL ずつ添加します。
- (4) サーマルサイクラーでハイブリダイゼーション反応を行います。
- (5) ハイブリダイゼーション反応後、マグネットプレートで集磁し、上清を 50 μL 除きます。設定値（P）のマルチチャンネル電子ピペットでリン酸緩衝生理食塩水（PBS）80 μL を添加して 2 回洗浄します。最後に 80 μL × 2 の PBS を添加して、添加の都度、懸濁します。  
※PBS は本品には含まれていません

4. 検出

CyFlow Cube 6i システム又は同等のフローサイトメータを用いて、洗浄した磁性ビーズの粒子径（前方散乱光と側方散乱光）と各プローブ（野生型、変異型、共通配列）の蛍光強度を測定します。

※フローサイトメータ用試薬は本品には含まれていません

## 5. 解析

フローサイトメータによる測定結果の解析方法の概要は、以下の通りです。

- (1) 磁性ビーズの粒子径によりシングルビーズの集団を選択します。
- (2) シングルビーズの中から、共通領域に結合したプローブの蛍光強度を指標として、磁性ビーズ上で増幅反応が起こっていた磁性ビーズの集団を選択して、最終的な解析対象とします。
- (3) 最終的な解析対象となった磁性ビーズの集団の中から、野生型用検出プローブの蛍光強度を持つ集団と変異型用の検出プローブの蛍光強度を持つ集団に分離し、変異型の出現するエリア内に存在する磁性ビーズ数を計測します。

### 【測定結果の判定法】

#### 判定法

変異型として検出された磁性ビーズ数をあらかじめ設定したカットオフ値と比較することにより、変異陽性又は変異陰性の判定を行います。

コドン	カットオフ値
KR2 Cd12	40
KR2 Cd13	48
KR3 Cd59	36
KR3 Cd61	32
KR4 Cd117	36
KR4 Cd146	54
NR2 Cd12	34
NR2 Cd13	30
NR3 Cd59	30
NR3 Cd61	20
NR4 Cd117	22
NR4 Cd146	24

#### 判定上の注意

コントロール; NTC と PC が正しく判定されていることを確認します。

検体; コントロールが正しく判定されていた場合に、変異型の出現するエリアに存在する磁性ビーズ数が、カットオフ値を上回るコドンを Mutation Detected (変異陽性)、カットオフ値未満の結果となったコドンを No Mutation Detected (変異陰性) として、KRAS 及び NRAS 遺伝子のエクソン 2 (コドン 12、13)、エクソン 3 (コドン 59、コドン 61)、エクソン 4 (コドン 117、146) のコドン毎に変異の有無を判定します。

コントロールが正しく判定されなかった場合は再測定を実施してください。

#### \* 【臨床的意義】

進行・再発大腸癌の薬物療法におけるセツキシマブ（遺伝子組換え）又はパニツムマブ（遺伝子組換え）は、多くの大腸癌患者の腫瘍組織で高発現が認められる EGFR に高い親和性で結合し、リガンドの結合を阻害すること及び EGFR の内在化作用により抗腫瘍効果を発揮するとされています<sup>(1)~(3)</sup>。

なお、セツキシマブ（遺伝子組換え）又はパニツムマブ（遺伝子組換え）は RAS (KRAS 及び NRAS) 遺伝子変異がある場合には、治療効果が期待されないことが報告されており、セツキシマブ（遺伝子組換え）又はパニツムマブ（遺伝子組換え）の電子添文の効能・効果に関連する使用上の注意には、「RAS (KRAS 及び NRAS) 遺伝子変異の有無を考慮した上で、適応患者の選択を行うこと」が記載されています<sup>(4)(5)</sup>。また、日本臨床腫瘍学会は、大腸がん患者における RAS 遺伝子変異の測定に関するガイドランスを出して、適切な治療の提供のための情報提供を行っています<sup>(6)</sup>。本キットは、血漿から抽出したゲノム DNA 中の RAS (KRAS 及び NRAS) 遺伝子変異の検出する体外診断用医薬品です。本品の血漿から抽出したゲノム DNA 中の RAS (KRAS 及び NRAS) 遺伝子変異の検出は、セツキシマブ（遺伝子組換え）又はパニツムマブ（遺伝子組換え）による治療の適用の判断を補助することを目的として用います。

## 【性能】

### 性能

#### 1. 感度

- (1) 管理用検体 1 は変異型検出ビーズ (KRAS Codon 12, NRAS Codon 12, 59, 117) の数が各カットオフ値以上を示します。
- (2) 管理用検体 2 は変異型検出ビーズ (KRAS Codon 13, 59, 146, NRAS Codon 13) の数が各カットオフ値以上を示します。
- (3) 管理用検体 3 は変異型検出ビーズ (KRAS Codon 61, NRAS Codon 146) の数が各カットオフ値以上を示します。
- (4) 管理用検体 4 は変異型検出ビーズ (KRAS Codon 117, NRAS Codon 61) の数が各カットオフ値以上を示します。
- (5) 管理用検体 5 は変異型検出ビーズ (KRAS Codon 12, 13, 59, 61, 117, 146, NRAS Codon 12, 13, 59, 61, 117, 146) の数が各カットオフ値未満の値を示します。

#### 2. 正確性

- (1) 管理用検体 1 を用いて試験するとき、KRAS 12, NRAS 12, 59, 117 は陽性を示し、変異陽性と判定されます。
- (2) 管理用検体 2 を用いて試験するとき、KRAS 13, 59, 146, NRAS 13 は陽性を示し、変異陽性と判定されます。
- (3) 管理用検体 3 を用いて試験するとき、KRAS 61, NRAS 146 は陽性を示し、変異陽性と判定されます。
- (4) 管理用検体 4 を用いて試験するとき、KRAS 117, NRAS 61 は陽性を示し、変異陽性と判定されます。
- (5) 管理用検体 5 を用いて試験するとき、KRAS 12, 13, 59, 61, 117, 146, NRAS 12, 13, 59, 61, 117, 146 は全て陰性を示し、変異陰性と判定されます。

#### 3. 同時再現性

- (1) 管理用検体 1 を 3 回同時に測定するとき、KRAS 12, NRAS 12, 59, 117 が 3 回とも変異陽性と判定されます。
- (2) 管理用検体 2 を 3 回同時に測定するとき、KRAS 13, 59, 146, NRAS 13 が 3 回とも変異陽性と判定されます。
- (3) 管理用検体 3 を 3 回同時に測定するとき、KRAS 61, NRAS 146 が 3 回とも変異陽性と判定されます。
- (4) 管理用検体 4 を 3 回同時に測定するとき、KRAS 117, NRAS 61 が 3 回とも変異陽性と判定されます。
- (5) 管理用検体 5 を 3 回同時に測定するとき、KRAS 12, 13, 59, 61, 117, 146, NRAS 12, 13, 59, 61, 117, 146 が 3 回とも変異陰性と判定されます。

#### 4. 最小検出感度

健常人血漿から抽出した DNA に野生型ゲノム DNA を添加して、低濃度 DNA (5,000 GE/検体)、中濃度 DNA (23,000 GE/検体)、及び高濃度 DNA 量 (116,000 GE/検体) の 3 つの濃度のバックグラウンド DNA を調製後、検出対象物である変異型 KRAS 遺伝子及び NRAS 遺伝子を段階希釈して添加し、測定試料を調製しました。各測定試料を 8 重測定し、各変異について、プロビット回帰モデルを使用して LoD を計算した結果を下表に示しました。(GE: ゲノム当量)

変異型	DNA 濃度 [コピー数/検体]		
	低濃度 5,000GE	中濃度 23,000GE	高濃度 116,000GE
KR2 Cd12 g35a	7	11	43
KR3 Cd61 a183c	7	11	44
KR4A Cd117 a351c	6	15	43
KR4B Cd146 g436a	6	12	37
NR2 Cd12 g35a	6	10	39
NR3 Cd61 c181a	7	13	45
NR4A Cd117 g351t	7	12	43

各コドンで決定した中濃度 DNA の LoD の 3x LoD 検体を調製し、全変異型で検証を行った結果を下表に示しました。

遺伝子	コドン	変異型	Hit Rate	
KR2	12	g34a	100 %	
		g34c	100 %	
		g34t	100 %	
		g35a	100 %	
		g35c	100 %	
		g35t	100 %	
KR3	13	g38a	100 %	
	59	g175a	100 %	
		61	a182t	100 %
			a182g	100 %
KR4A	117	a351c	100 %	
		a351t	100 %	
KR4B	146	g436a	100 %	
		c437t	100 %	
NR2	12	g34a	100 %	
		g34c	100 %	
		g34t	100 %	
		g35a	100 %	
		g35c	100 %	
		g35t	100 %	
	13	g37c	100 %	
		g38a	100 %	
		g38t	100 %	
		NR 3	59	g175a
61	c181a	100 %		
	a182g	100 %		
	a182t	100 %		
	a183c	100 %		
	a183t	100 %		
NR 4	117	g351c	100 %	
		g351t	100 %	
	146	g436a	100 %	

#### 5. 臨床性能試験成績<sup>(7)</sup>

進行・再発大腸癌の患者を対象として臨床性能試験を実施し、国内 8 施設において 352 例の同意を取得しました。

##### (1) 本品の検査成功率

有効性解析対象の 288 例について、測定対象コドンの何れかで結果が得られなかった「RAS 不明」は 8 例(2.8%:8/288)でした。

##### (2) 本品と比較対照法の判定一致率

有効性解析対象の 288 例のうち「RAS 不明」の 8 例を除いた 280 例において、本品（血漿から得られたゲノム DNA を用いる本キット）と比較対照法（腫瘍組織から得られた DNA を用いる BEAMing 法を用いた RAS 遺伝子変異検出法）との判定一致率は 86.4%でした。

	比較対照法（組織検体）		計	
	RAS 変異型	RAS 野生型		
本品 (血漿検体)	RAS 変異型	110	14 <sup>*1</sup>	124
	RAS 野生型	24 <sup>*2</sup>	132	156
計		134	146	280

	症例数	推定値	95%信頼区間	
			下限	上限
判定一致率	242/280	86.4 %	81.9 %	90.2 %
陽性一致率	110/134	82.1 %	74.5 %	88.2 %
陰性一致率	132/146	90.4 %	84.4 %	94.7 %
陽性的中率	110/124	88.7 %	81.8 %	93.7 %
陰性的中率	132/156	84.6 %	78.0 %	89.9 %

※1 本品で変異型であり比較対照法で野生型であった 14 例について、血漿を用いて別法（次世代シーケンス法）による測定結果及び患者背景から考察を行いました。その結果、6 例については、別法の結果でも変異型と判定されており、血漿検体と組織検体の検体種間の乖離と考えられました。残りの 8 例については、いずれも試験法のカットオフ値付近の検体でしたが、不一致の原因は特定できませんでした。

※2 本品で野生型であり比較対照法で変異型となった 24 例のうち、血漿が利用可能な 18 例について、別法（次世代シーケンス法）による測定結果及び患者背景から考察を行いました。その結果、15 例については、別法においても野生型と判定され、試験法の結果と一致しました。なお、別法で変異型と判定されたものが 3 例あり、この 3 例を除いた 21 例では、血漿検体と組織検体の検体種間の乖離又は腫瘍由来 DNA が血漿中にじゅうぶんに漏出していない可能性が考えられました。

##### (3) 本品と既承認品検査との判定一致率

同意取得された 352 例のうち本品と既承認品検査（腫瘍組織から得られた DNA を用いる MEBGEN™ RASKET キット）で結果が得られた 266 例における判定一致率は 84.6%でした。

	既承認品検査 (組織検体)		計	
	RAS 変異型	RAS 野生型		
本品 (血漿検体)	RAS 変異型	109	15	124
	RAS 野生型	26	116	142
計	135	131	266	

	症例数	推定値	95%信頼区間	
			下限	上限
判定一致率	225/266	84.6 %	79.7 %	88.7 %
陽性一致率	109/135	80.7 %	73.1 %	87.0 %
陰性一致率	116/131	88.5 %	81.8 %	93.4 %
陽性的中率	109/124	87.9 %	80.8 %	93.1 %
陰性的中率	116/142	81.7 %	74.3 %	87.7 %

(4) 肺のみ転移の症例における本品と比較対照法の判定一致率  
有効性解析対象の 288 例から「RAS 不明」の 8 例を除いた 280 例のうち、肺のみに転移を有していた 31 例における、本品と比較対照法（腫瘍組織から得られた DNA を用いる BEAMing 法を用いた RAS 遺伝子変異検出法）との判定一致率は 64.5%でした。

	比較対照法（組織検体）		計	
	RAS 変異型	RAS 野生型		
本品 (血漿検体)	RAS 変異型	7	1	8
	RAS 野生型	10	13	23
計	17	14	31	

	症例数	推定値	95%信頼区間	
			下限	上限
判定一致率	20/31	64.5 %	45.4 %	80.8 %
陽性一致率	7/17	41.2 %	18.4 %	67.1 %
陰性一致率	13/14	92.9 %	66.1 %	99.8 %
陽性的中率	7/8	87.5 %	47.3 %	99.7 %
陰性的中率	13/23	56.5 %	34.5 %	76.8 %

#### 【使用上又は取扱い上の注意】

##### 取扱い上（危険防止）の注意

1. 試薬には、毒劇物や感染の恐れのあるものは含まれていません。
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等（パウダフリー）及びマスクを着用してください。
3. 感染を避けるために口によるピペティングを行わないでください。
4. 試薬が誤って目や口に入った場合は、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などを受けてください。

##### 使用上の注意

1. 正確な結果を得るために、遺伝子検査の熟練者あるいはその指導のもとに試薬やサンプルの添加量、添加位置にじゅうぶんに注意して測定を行ってください。
2. ヌクレアーゼフリーの実験器具（例えばピペット、ピペットチップ）を使用してください。
3. コンタミネーションに注意し、遺伝子検査に適した試験設備環境にて、使い捨て手袋等（パウダフリー）及びマスクを着用して測定を行ってください。試薬やサンプルが手袋等に付着した場合はただちに新しいものに取りかえてください。
4. 使用期限を過ぎた試薬やコントロールは使用しないでください。
5. 指定外のコントロールは使用しないでください。
6. 試薬及び消耗品は使用する装置に適したものを使用してください。

7. Box1の構成試薬の酵素(Multiplex PCR DNA Polymerase、Emulsion PCR DNA Polymerase)は冷凍庫外で長時間放置されないように素早く調製・使用してください。また、冷凍試薬(Box1)の各構成試薬及びそれらを用いて調製された試薬類は氷上で取り扱ってください。Breaking buffer 1、2は長時間開封状態で放置しないでください。
8. プローブミックス(Hybridization Probe Mix 1~12)の強い光への曝露は最小限にとどめてください。
9. 融解後のキットの各構成試薬及びそれらを用いて調製された試薬類は液が均一になるまで十分に攪拌し、蓋を開ける前にスピンドアウンを行ってください。
10. 異なる製造番号の試薬又は残った試薬を注ぎ足して使用しないでください。
11. 測定装置については定期的に校正されたものを使用してください。また、測定装置は適切な設定を行い、装置に適した動作環境で使用してください。
12. 誤って試料をこぼした場合は、保護具を着用し試料が飛び散らないようにペーパータオルなどで静かに拭き取ってください。拭き取った後は、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度1.0%以上)で浸すように拭き取り、その後水拭きしてください。

#### 廃棄上の注意

1. PCR反応生成物は、コンタミネーションを避けるため、密閉できるビニール袋を2重に施し、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物として処理してください。
2. 検体及び本品を取り扱う際に使用した器具類は感染の可能性のあるものとし、オートクレーブ等で滅菌処理するか又は1%次亜塩素酸等の消毒液に浸して処理し、各都道府県によって定められた規定に従って処理してください。
3. 廃液は水質汚濁防止法等の規制及び各都道府県の条例等に留意して廃液処理してください。

#### 【保管方法・有効期間】

1. 保管方法
  - Box1 -30~-15 °C
  - Box2 2~8 °C
  - Box3 15~25 °C
 指定された温度で保存してください。
2. キットの有効期間
  - 20 カ月 (使用期限は外箱の天面に表示しています。)
3. 下記構成試薬の有効期間
  - 20 カ月: EmulsiFIRE
  - 21 カ月: Multiplex PCR Master Mix、Breaking Buffer 1 without Alcohols、Breaking Buffer 2 without Alcohols、Hybridization Buffer

#### 【包装単位】

30 テスト用

#### 【主要文献】

- (1) Fan Z et al. Antibody-induced epidermal growth factor receptor dimerization mediates inhibition of autocrine proliferation of A431 squamous carcinoma cells. J Biol Chem. 1994; **269**:27595-602.
- (2) Goldstein NI et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. Clin Cancer Res. 1995; **1**:1311-8.
- (3) Yang XD et al. Eradication of established tumors by a fully human monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor without concomitant chemotherapy. Cancer Res. 1999; **59**:1236-43.
- \* (4) セツキシマブ(遺伝子組換え)製剤 電子添文
- \* (5) パニツムマブ(遺伝子組換え)電子添文
- (6) 日本臨床腫瘍学会, 大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイドランス
- (7) Bando H et al. A multicentre, prospective study of plasma circulating tumour DNA test for detecting RAS mutation in patients with metastatic colorectal cancer. Br J Cancer. 2019; **120**:982-6

#### 【問合せ先】

シスメックス株式会社 カスタマーサポートセンター  
 神戸市西区室谷1丁目3番地の2 〒651-2241  
 Tel 0120-413-034



カタログ番号



使用期限



添付の文書参照



ロット番号



直射日光遮へい

製造販売元

シスメックス株式会社

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 〒651-0073

Tel 078-265-0500