

RAS遺伝子変異検出キット
BRAF遺伝子変異検出キット

MEBGEN RASKET™-B キット

[全般的な注意]

1. 本品は体外診断用です。それ以外の目的で使用しないでください。
2. 本品は、生体由来組織中のRAS（KRAS及びNRAS）遺伝子及びBRAF遺伝子の変異を検出する試薬です。検出できる遺伝子変異は、KRAS遺伝子エクソン2（コドン12、13）、KRAS遺伝子エクソン3（コドン59、61）、KRAS遺伝子エクソン4（コドン117、146）、NRAS遺伝子エクソン2（コドン12、13）、NRAS遺伝子エクソン3（コドン59、61）、NRAS遺伝子エクソン4（コドン117、146）、及びBRAF遺伝子エクソン15（コドン600）です。本品の判定対象外の変異を有する場合、正しく判定されない可能性があります。また、結果に基づく治療方針の決定は医薬品の添付文書や適正使用ガイド等の最新の情報を参照し、他の関連する検査結果や臨床症状などと合わせて担当医師が総合的に判断してください。
3. PMS2遺伝子に変異があるリンチ症候群の大腸癌の一部では、BRAF遺伝子V600E変異が認められることが報告されており、注意が必要であることが、「遺伝性大腸癌診療ガイドライン」¹⁾に記載されています。そのため、BRAF遺伝子V600E変異検査のみでリンチ症候群の診断を行うのではなく、家族歴、臨床症状や他の関連する検査結果なども踏まえた上で、担当医師が総合的に判断してください。
4. 添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。また、使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。本品はLuminex® 100/200™システム（以下、Luminexシステム）の専用試薬ですので、測定にはLuminexシステムを使用してください。記載された方法及び目的以外での使用については、Index値の信頼性を保証致しません。
5. マスターミックス、ビーズミックス、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄用緩衝液（10倍濃縮品）、SA-PE希釈液及びSA-PEには、0.05%のアジ化ナトリウムが含まれています。目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
6. 試薬の使用時には、保護眼鏡と使い捨て手袋（パウダーフリー）を着用し、試薬が目、皮膚、粘膜に触れないように注意してください。もし、このようなことが起きた場合は、大量の水で十分に洗い流してください。また必要があれば医師の手当てなどを受けてください。こぼした場合は、水で希釈してから拭き取ってください。
7. 野生型コントロールDNA（10倍濃縮品）は、体外診断用医薬品を用いてHBs抗原、HCV抗体及びHIV抗体が陰性であることを確認した血液に由来するDNAですが、これらのウイルス及び他のウイルスの混入を完全に否定できる試験方法ではないため、検体同様、感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。

[形状・構造等（キットの構成）]

構成試薬	96回包装	
	容量	数量
①マスターミックス	1 mL	2
RB_KR12-13_F、RB_KR12-13_R、RB_KR59-61_F、RB_KR59-61_R、RB_KR117_F、RB_KR117_R、RB_KR146_F、RB_KR146_R、RB_NR12-13_F、RB_NR12-13_R、RB_NR59-61_F、RB_NR59-61_R、RB_NR117_F、RB_NR117_R、RB_NR146_F、RB_NR146_R、RB_BR600_F、RB_BR600_R、dATP、dCTP、dGTP、dUTP、dTTP		
②ビーズミックス	0.5 mL	1
K：G12S、K：G12C、K：G12R、K：G12D、K：G12V、K：G12A、K：G13S、K：G13C、K：G13R、K：G13D、K：G13V、K：G13A、K：A59T、K：A59G、K：Q61K、K：Q61E、K：Q61L、K：Q61P、K：Q61R、K：Q61Ht、K：Q61Hc、K：K117Nc、K：K117Nt、K：A146T、K：A146P、K：A146V、N：G12S、N：G12C、N：G12R、N：G12D、N：G12V、N：G12A、N：G13S、N：G13C、N：G13R、N：G13D、N：G13V、N：G13A、N：A59T、N：A59G、N：Q61K、N：Q61E、N：Q61L、N：Q61P、N：Q61R、N：Q61Ht、N：Q61Hc、N：K117Nc、N：K117Nt、N：A146T、N：A146P、N：A146V、B：V600E		
③ハイブリダイゼーション緩衝液	*5 mL	*1
④洗浄用緩衝液（10倍濃縮品）	25 mL	2
⑤SA-PE希釈液	5 mL	1
⑥SA-PE	50 µL	1
フィコエリスリン標識ストレプトアビジン		
⑦Taq DNAポリメラーゼ	13 µL	1
Taq DNAポリメラーゼ		
⑧ウラシルDNAグリコシラーゼ	13 µL	1
⑨野生型コントロールDNA（10倍濃縮品）	10 µL	2

②～⑥は2～8℃保存品。

①、⑦、⑧、⑨は-15～-35℃保存品。

②、⑥は遮光保存品。

[使用目的]

1. 癌組織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（セツキシマブ（遺伝子組換え）又はパニツムマブ（遺伝子組換え）の結腸・直腸癌患者への適応判定の補助、大腸癌における化学療法選択の補助）
2. 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（大腸癌におけるリンチ症候群の診断の補助、大腸癌における化学療法選択の補助）（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判定の補助）

「使用目的に関連する使用上の注意」

- ・RAS 遺伝子変異検査について、大腸癌における化学療法の選択の補助に用いる場合には、切除可能な結腸・直腸癌における術後補助化学療法の選択の補助に用いること。
- ・BRAF 遺伝子変異検査について、大腸癌における化学療法の選択の補助に用いる場合には、治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌における治療選択の補助又は結腸癌における術後補助化学療法の選択の補助に用いること。

【測定原理】

本品はPCR-rSSO (polymerase chain reaction-reverse sequence specific oligonucleotide) 法に基づいてRAS遺伝子及びBRAF遺伝子の変異を検出する試薬です。

測定試料から抽出したDNAを検体として、ビオチン標識プライマーを含むマスターミックスとTaq DNAポリメラーゼによって、RAS遺伝子及びBRAF遺伝子をPCR増幅させます。続いて、PCR増幅産物とビーズミックスを反応させ、ビーズミックスに含まれる蛍光ビーズ上のプローブとPCR増幅産物をハイブリダイズさせます。ビーズミックスには、各々のコドンに存在する遺伝子変異を検出するプローブを固相したビーズ（RAS遺伝子及びBRAF遺伝子変異検出ビーズ）が含まれています。ビーズを洗浄した後、蛍光標識タンパク質であるSA-PE（フィコエリスリン標識ストレプトアビジン）とビーズ・PCR増幅産物複合体を反応させ、PCR増幅産物を蛍光標識します。

Luminexシステムを用いてビーズとPEの蛍光を測定し、RAS遺伝子及びBRAF遺伝子における変異の有無を判定します。

判定対象の遺伝子変異と各増幅領域における陽性コントロールビーズ（PCビーズ）は、下表のとおりです。

遺伝子	エクソン	コドン	PCビーズ	変異検出ビーズ	塩基配列	アミノ酸
KRAS	2	12	K2PC	K : G12S	AGT	Ser (S)
				K : G12C	TGT	Cys (C)
				K : G12R	CGT	Arg (R)
				K : G12D	GAT	Asp (D)
				K : G12V	GTT	Val (V)
				K : G12A	GCT	Ala (A)
		13		K : G13S	AGC	Ser (S)
				K : G13C	TGC	Cys (C)
				K : G13R	CGC	Arg (R)
				K : G13D	GAC	Asp (D)
				K : G13V	GTC	Val (V)
				K : G13A	GCC	Ala (A)
	3	59	K3PC	K : A59T	ACA	Thr (T)
		K : A59G		GGA	Gly (G)	
		61		K : Q61K	AAA	Lys (K)
				K : Q61E	GAA	Glu (E)
				K : Q61L	CTA	Leu (L)
				K : Q61P	CCA	Pro (P)
				K : Q61R	CGA	Arg (R)
				K : Q61Ht	CAT	His (H)
K : Q61Hc	CAC	His (H)				

遺伝子	エクソン	コドン	PCビーズ	変異検出ビーズ	塩基配列	アミノ酸
KRAS	4	117	K117PC	K : K117Nc	AAC	Asn (N)
				K : K117Nt	AAT	Asn (N)
		146	K146PC	K : A146T	ACA	Thr (T)
				K : A146P	CCA	Pro (P)
				K : A146V	GTA	Val (V)
NRAS	2	12	N2PC	N : G12S	AGT	Ser (S)
				N : G12C	TGT	Cys (C)
				N : G12R	CGT	Arg (R)
				N : G12D	GAT	Asp (D)
				N : G12V	GTT	Val (V)
				N : G12A	GCT	Ala (A)
		13		N : G13S	AGT	Ser (S)
				N : G13C	TGT	Cys (C)
				N : G13R	CGT	Arg (R)
				N : G13D	GAT	Asp (D)
				N : G13V	GTT	Val (V)
				N : G13A	GCT	Ala (A)
	3	59	N3PC	N : A59T	ACT	Thr (T)
				N : A59G	GGT	Gly (G)
		61		N : Q61K	AAA	Lys (K)
				N : Q61E	GAA	Glu (E)
				N : Q61L	CTA	Leu (L)
				N : Q61P	CCA	Pro (P)
				N : Q61R	CGA	Arg (R)
				N : Q61Ht	CAT	His (H)
				N : Q61Hc	CAC	His (H)
4				117	N : K117Nc	AAC
	N : K117Nt	AAT	Asn (N)			
	146	N146PC	N : A146T	ACC	Thr (T)	
			N : A146P	CCC	Pro (P)	
N : A146V			GTC	Val (V)		
BRAF	15	600	B15PC	B : V600E	GAG	Glu (E)

【操作上の注意】

1. コンタミネーションの防止方法

本品はPCR増幅を伴うため、コンタミネーションに十分注意する必要があります。コンタミネーションは、主にエアロゾル、検体などで汚染されたピペットの使用が原因となりますので、検査区域の分割やピペットの専用化がコンタミネーションの防止に効果的です。更に、紫外線照射や0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度約1,000ppm）などを用いて作業環境を清浄化することで、コンタミネーションの危険を最小限にすることができます。

本品はPCR増幅反応前にウラシルDNAグリコシラーゼ（UDG）を用いてウラシルを含むDNAを分解し（UDG反応）、PCR増幅産物のキャリアオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止します。しかし、検体由来のコンタミネーションは防止することができませんので、十分な注意が必要です。したがって、次の事項に従うことを推奨します。

- (1) 操作を行う場所は、エリア1、エリア2及びエリア3の3区域に分けてください。各エリア専用のピペットとチップなどの器具を用意し、他のエリアとの共用はしないでください。
- (2) エリア1では、PCR増幅に用いる試薬の調製と分注を行います。紫外線照射可能なクリーンベンチなどをエリア1として利用すると便利です。

- (3) エリア2では、測定試料からのDNA抽出と調製を行います。検体を扱うチップはフィルター付きのものをういてください。
- (4) エリア3では、ハイブリダイゼーション反応及びSA-PE反応に用いる試薬の調製と分注、PCR増幅及び検出を行います。このエリアで使用する器具や保護衣及びPCR増幅産物は、他のエリアに持ち込まないでください。
- (5) 実験台、使用器具などが検体やPCR増幅産物で汚染された場合は、用時調製した0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液でよく拭き取ってください。ピペットなどの器具外部の汚染には、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液による拭き取り、あるいは紫外線照射を行ってください。ピペットなどの内部が汚染された場合は、直ちに使用を中止してください。
- (6) 使い捨ての手袋はパウダーフリーの製品を使用してください。
手袋のパウダーは酵素反応を阻害する物質を含むものがあり、反応溶液中に混在すると判定結果に影響を及ぼす可能性があります。

2. 測定試料

測定試料から抽出したDNAを検体として用います。下記の注意事項に留意して準備したホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織切片から抽出したDNAを用いることを推奨します。詳しくは日本臨床腫瘍学会の「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス」²⁾を参照してください。

- (1) 腫瘍組織を採取する際の注意
必ず、壊死していない腫瘍部分を含むように採取してください。壊死していない腫瘍組織が試料の大半を占めるように採取することを推奨します。
- (2) 測定試料を選択する際の注意
腫瘍細胞の比率を確認できるFFPE組織を第一選択肢としてください。
- (3) FFPE組織を測定試料とする場合の注意
DNA抽出に用いる組織切片の隣接切片を用いてHE（ヘマトキシリン・エオジン）染色を実施し、腫瘍細胞が含まれていることを確認した組織を使用してください。また、ホルマリン固定時間が長い組織は、DNAの断片化などが判定結果に影響を及ぼす可能性がありますので避けてください。
- (4) 新鮮凍結組織を測定試料とする場合の注意^{3), 4)}
新鮮凍結組織を用いる場合は、専門医がほぼ腫瘍組織からなると判断した組織を選択し、壊死などを起こしている組織及び正常組織をできる限り除いて1×0.5×0.3 cm（50～100 mg）程度を採取します。採取した組織を1辺2～3 mm角（10 mg）程度にまで細切し、これをDNA抽出に用います。保存する場合は、-20℃以下で凍結してください。また、凍結融解の繰り返しは避けてください。切片を作製し、HE染色を実施することなどによって、腫瘍細胞の比率を確認することができます。肉眼的に不均一性が認められる場合などは、特に、複数の場所から組織を採取し、各々からDNAを抽出して測定することを推奨します。

なお、新鮮凍結組織は、本品と同等の性能であるMEBGENTM RASKET キットにおいて、FFPE組織の判定結果と一致することを確認していますが、少数検体での検討結果であり、FFPE組織ほど十分に検討されていないことを理解した上で、上記の注意に従って使用してください。

(5) 検体（DNA）の抽出法

遺伝子検査に適したDNA抽出試薬を用いて行ってください。本品での測定にはDNA溶液を5 µL使用します。DNA濃度は、10～20 ng/µLを推奨します。

3. 検体の保管法

抽出したDNAは、DNaseなどのコンタミネーションを避け、-20℃以下で凍結して保管してください。

4. PCR増幅産物の取扱い

PCR増幅終了後にPCR増幅産物を一時保存する場合は、4℃で保存し、できるだけ速やかにハイブリダイゼーション反応に使用してください。4℃での保存は16時間以内としてください。室温で保管すると、わずかに残存しているUDG活性によってPCR増幅産物が分解される可能性があります。

PCR増幅産物を保存する場合は、必ず-20℃以下で凍結してください。凍結保存したPCR増幅産物を使用する場合は、できる限り短い時間で融解させ、よく混和してから使用してください。

5. 妨害物質

FFPE組織又は新鮮凍結組織を測定試料として用いたRAS及びBRAF遺伝子変異検査において、現在までに判定に影響を与える妨害物質や服用している薬剤の影響についての報告はありません。

6. 交差反応性

本品のマスターミックスに含まれるプライマーを用いてヒトゲノムDNAをPCR増幅した場合、目的の遺伝子配列以外の塩基配列は増幅されませんでした。

7. その他

ハイブリダイゼーション工程において、油性ペンを用いてプレート上面に着色すると、ウェル内にインク成分が混入して非特異蛍光が生じる場合があります。その結果、偽陽性が生じたり、ビーズアドレスが誤って認識されることがありますので、油性ペンによるプレートの着色は避けてください。やむを得ず使用する場合は、ウェルから十分離れた場所に着色し、ウェル内やウェル縁に着色しないようにしてください。

【用法・用量（操作方法）】

注意：本品は、Luminexシステムの専用試薬です。Luminexシステムの操作方法に従って測定してください。

また、本検査は熟練を要するため、検体の調製及び操作法を十分に修得するまでは2重測定することをお勧めします。なお、エリア1～3については「操作上の注意」を参照してください。

1. 本品以外に必要な器具・器材・試薬

(1) DNA抽出

- 1) DNA抽出用試薬
- 2) DNA抽出に必要な器具・器材
- 3) 滅菌水又はDNA溶解液 (1 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)、0.1 mmol/L EDTA)

(2) PCR

- 1) クリーンベンチ (溶液調製用)
- 2) マイクロピペット、フィルター付きチップ
- 3) 増幅反応用PCRプレート
- 4) プレートシール
- 5) サーマルサイクラー (Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700、アプライドバイオシステムズVRTi Dx (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) など)

(3) 検出

- 1) マイクロピペット (検体が多い場合、5 μ L、50 μ L を量り取れるマルチチャンネルピペットがあると便利です)
- 2) ディスペンサートレイ
- 3) プレートシール
- 4) プレートミキサー又はボルテックスミキサー
- 5) Luminexシステム (一般の名称: 遺伝子解析装置)
- 6) Luminexシステム測定用プレート
- 7) プレートカバー
- 8) サーマルサイクラー (Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700、アプライドバイオシステムズVRTi Dx (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) など)
- 9) プレート遠心機 (Plate Spin II (久保田商事株式会社) など)
- 10) 洗浄機 (405プレートウォッシャー (BioTek社) など)
※洗浄機を使用する場合、当社までお問い合わせください。

(4) その他

- 1) 消耗品等は使用する機器のメーカーが推奨するものを使用してください。
- 2) 必要な器材・試薬の詳細については【問い合わせ先】にお問い合わせください。
- 3) 紫外線照射箱 (コンタミネーション防止用)
- 4) 0.1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液 (コンタミネーション防止用)

2. 試薬の調製法

本品の構成試薬のうち、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄用緩衝液 (10倍濃縮品) 及びSA-PE希釈液は室温 (20~30℃) に戻してから使用してください。ハイブリダイゼーション緩衝液及び洗浄用緩衝液 (10倍濃縮品) は析出する場合がありますので、使用前に完全に溶解していることを確認してください。

マスターミックス及び野生型コントロールDNAは、使用前に完全に融解していることを確認してください。

ビーズミックス中のビーズは沈殿するため、使用前によく混和してください。ビーズミックス、SA-PE及びこれらを用いて調製した試薬は光によって退色するため、試薬調製時以外は遮光してください。

- (1) 野生型コントロールDNA溶液の調製 (エリア2で調製してください。)

野生型コントロールDNA (10倍濃縮品) を滅菌水等を用いて10倍に希釈します。チューブ1本あたり10 μ Lの溶液が入っていますので、90 μ Lの滅菌水等を加えて希釈してください。希釈後の溶液は冷蔵で保存し、6箇月以内に使用してください。

- (2) PCR溶液の調製 [用時調製] (エリア1で調製してください。)

1テストあたり、マスターミックス20 μ LにTaq DNAポリメラーゼ0.125 μ L及びウラシルDNAグリコシラーゼ0.125 μ Lを加えてよく混和します。調製後はすぐに使用してください。

- (3) ハイブリダイゼーション溶液の調製 [用時調製] (エリア3で調製してください。)

1テストあたり、ハイブリダイゼーション緩衝液40 μ Lにビーズミックス5 μ Lを加えてよく混和します。調製後はすぐに使用してください。

- (4) 洗浄液の調製 [用時調製] (エリア3で調製してください。)

洗浄用緩衝液を、精製水を用いて10倍に希釈します。

- (5) SA-PE溶液の調製 [用時調製] (エリア3で調製してください。)

1テストあたり、SA-PE希釈液50 μ LにSA-PE 0.5 μ Lを加えてよく混和します。調製後はすぐに使用してください。

- (6) その他の試薬は、そのまま使用します。

3. 検体の調製

本品は、[操作上の注意] 2. 測定試料の注意事項に留意して抽出したDNAを検体として用います。

DNAは遺伝子検査に適した方法で抽出してください。

抽出DNAは、滅菌水又はDNA溶解液で10~20 ng/ μ Lに調製します。コンタミネーション防止のため、検体の調製はエリア2で行ってください。

4. 操作法

注意: 本品はPCR増幅を伴うため、検体やPCR増幅産物のコンタミネーションに注意してください。

- (1) 増幅反応用PCRプレートの各ウェルにPCR溶液20 μ Lを分注します。この操作はエリア1で行います。
- (2) 各ウェルに野生型コントロールDNA溶液又は検体5 μ Lを加え、蓋をしてよく混和し、軽い遠心などで溶液をプレートの底に集めます。この操作はエリア2で行います。
- (3) 次の条件でPCR増幅を行います。以降の操作はエリア3で行います。

(例示: Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700[max mode]、アプライドバイオシステムズ VRTi Dx[9700 Max]の場合)

Hold 40℃ 5分

Hold 95℃ 2分

Cycle 94℃ 20秒、62℃ 30秒 (10サイクル)

Cycle 90℃ 20秒、59℃ 30秒、72℃ 30秒 (45サイクル)

Hold 72℃ 1分

Hold 95℃ 10分

増幅後は、次の操作まで4℃で冷蔵 (Hold 4℃ forever) します。16時間以内に次の操作を開始してください。

- (4) 新たに準備したLuminexシステム測定用プレートの各ウェルにハイブリダイゼーション溶液45 μLを分注します。
- (5) ハイブリダイゼーション溶液分注後の各ウェルにPCR増幅産物5 μLを加え、ピペッティングなどでよく混和し、プレートシールなどで蓋をします。
- (6) プレートカバーでプレートと蓋を密着させ、次の条件でハイブリダイゼーション反応を行います。
(例示:Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700[max mode]、アプライドバイオシステムズ VRTi Dx[9700 Max]の場合)
Hold 95℃ 2分
Hold 55℃ 30分
ハイブリダイゼーション反応終了後は、速やかに次の操作に移ってください。サーマルサイクラーのプログラムは、Hold 55℃ 30分の後に、Hold 20℃ forever^{*}を設定してください。^{*}foreverの段階は放置可能という意味ではありません。
- (7) 溶液が飛び散らないように注意して蓋を外し、洗浄操作を行います。

【洗浄機による洗浄】

ハイブリダイゼーション反応後のプレートを洗浄機にセットし、指定のプログラムによって洗浄操作を行います。

※洗浄機を使用する場合、当社までお問い合わせください。

【手法による洗浄】

各ウェルに洗浄液50 μLを加えます。プレート遠心機を用いて2,000×gで1分間又は1,000×gで5分間遠心後、各ウェルの上清を除去します。この一連の操作を2回行います。

- (8) 各ウェルにSA-PE溶液50 μLを加え、ピペッティングなどで混和し、プレートシールなどで蓋をします。プレートカバーでプレートと蓋を密着させ、次の条件でSA-PE反応を行います。
(例示:Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700[max mode]、アプライドバイオシステムズ VRTi Dx[9700 Max]の場合)
Hold 52℃ 15分
反応させた後は、速やかに次の操作に移ってください。サーマルサイクラーのプログラムは、Hold 52℃ 15分の後に、Hold 37℃ forever^{*}を設定してください。^{*}foreverの段階は放置可能という意味ではありません。
- (9) Luminexシステムにセットし、測定します。

【測定結果の判定法】

判定は、以下に行います。

1. NCビーズ測定値及びPCビーズ測定値の確認

陰性コントロールビーズ (NCビーズ) は、PCRの際に非特異的な増幅が起きていないことを確認するためのビーズです。陽性コントロールビーズ (PCビーズ) は各増幅領域の増幅を確認するためのビーズです。NCビーズの測定値がカットオフ値未満であること及び各増幅領域のPCビーズの測定値がそれぞれのカットオフ値以上であることを確認します。

NCビーズ 名称	カットオフ値	PCビーズ 名称	カットオフ値
NCビーズ	300	K2PC	1000
		K3PC	400
		K117PC	1400
		K146PC	400
		N2PC	2900
		N3PC	2000
		N117PC	2100
		N146PC	1200
		B15PC	500

2. Index値算出

1. が満たされている場合に、当該増幅領域について判定が可能となります。「測定検体」のRAS遺伝子及びBRAF遺伝子変異検出ビーズ (変異検出ビーズ) 測定値及び「野生型コントロールDNA溶液」の変異検出ビーズ測定値を用いて、次の計算式によりIndex値を算出します。

$$\text{Index値} = A - 0.6 \times B \times \left[\frac{C}{D} \right] - 0.5 \times B \times \left[\frac{C}{D} \right]^3$$

A：測定検体の変異検出ビーズ測定値

B：野生型コントロールDNA溶液の変異検出ビーズ測定値

C：測定検体のPCビーズ測定値

D：野生型コントロールDNA溶液のPCビーズ測定値

3. 各増幅領域の判定

2. で算出されたIndex値について、各変異検出ビーズに設定されたカットオフ値を用いて変異検出ビーズの陽陰性を判定し、当該増幅領域の陽陰性を判定します。

PCビーズがカットオフ値以上かつ当該増幅領域の変異検出ビーズが1つ以上陽性となった場合、当該増幅領域の遺伝子を変異陽性とします。

PCビーズがカットオフ値以上かつ当該増幅領域の変異検出ビーズが全て陰性の場合、当該増幅領域の遺伝子を変異陰性とします。

PCビーズがカットオフ値未満の場合、当該増幅領域を判定保留とします。

RAS遺伝子変異

RAS変異検出ビーズ (K：G12S、K：G12C、K：G12R、K：G12D、K：G12V、K：G12A、K：G13S、K：G13C、K：G13R、K：G13D、K：G13V、K：G13A、K：A59T、K：A59G、K：Q61K、K：Q61E、K：Q61L、K：Q61P、K：Q61R、K：Q61Ht、K：Q61Hc、K：K117Nc、K：K117Nt、K：A146T、K：A146P、K：A146V、N：G12S、N：G12C、N：G12R、N：G12D、N：G12V、N：G12A、N：G13S、N：G13C、N：G13R、N：G13D、N：G13V、N：G13A、N：A59T、N：A59G、N：Q61K、N：Q61E、N：Q61L、N：Q61P、N：Q61R、N：Q61Ht、N：Q61Hc、N：K117Nt、N：A146T、N：A146P) のカットオフ値は300です。

RAS変異検出ピーズ（N：K117Nc）のカットオフ値は960です。
RAS変異検出ピーズ（N：A146V）のカットオフ値は800です。

BRAF遺伝子変異

BRAF変異検出ピーズ（B：V600E）のカットオフ値は300です。

4. 遺伝子変異判定

(1) RAS遺伝子変異判定

3. で実施したRAS遺伝子の8増幅領域における判定結果をもとに、下表に従ってRAS遺伝子変異の陽陰性を判定します。

1つ以上の増幅領域で変異陽性となった場合、RAS変異陽性と判定します。

全ての増幅領域で変異陰性となった場合、RAS変異陰性と判定します。

1つ以上の増幅領域で判定保留となり、かつ判定が成立した全ての増幅領域で変異陰性となった場合、RAS変異判定保留とします。

RAS遺伝子変異判定	
8つある増幅領域のうち、 1つ以上で変異陽性	RAS変異陽性
8つある増幅領域全てが 変異陰性	RAS変異陰性
8つある増幅領域のうち、 1つ以上が判定保留となり、かつ判定が成立した全ての増幅領域で変異陰性	RAS変異判定保留

(2) BRAF遺伝子変異

3. で実施したBRAF遺伝子の1増幅領域における判定結果をもとに、次の表に従ってBRAF遺伝子変異の陽陰性を判定します。

当該増幅領域で変異陽性となった場合、BRAF変異陽性と判定します。

当該増幅領域で変異陰性となった場合、BRAF変異陰性と判定します。

当該増幅領域が判定保留となった場合、BRAF変異判定保留とします。

BRAF遺伝子変異判定	
増幅領域で変異陽性	BRAF変異陽性
増幅領域で変異陰性	BRAF変異陰性
増幅領域で判定保留	BRAF変異判定保留

判定の補助として解析ソフトウェア「Luminex[®]解析ソフトウェアUniMAGTM v2」を使用することで、迅速に判定結果を得ることも可能です。対応可能な解析ソフトウェアのバージョンについては、当社までお問い合わせください。

「判定上の注意」

1. 腫瘍細胞の割合が低い組織を用いると、RAS遺伝子もしくはBRAF遺伝子変異を有する腫瘍細胞が存在した場合でも変異陰性と判定されることがあります。
2. Luminexシステムでの測定が正常に終了していることを確認してから判定してください。Sample emptyなどのエラー表示がある場合、正しい判定結果を得られない可能性があります。
3. 本品の判定対象外の変異を有する場合、正しく判定されない可能性があります。
4. 野生型コントロールDNAが検体等により汚染した場合、判定に影響を及ぼす可能性があります。
5. 判定保留とは、当該試料を用いて測定した場合に判定結果が得られなかったことを示します。
本添付文書の「全般的な注意」及び「操作上の注意」を十分に確認し、必要に応じて再検査を行ってください。

「臨床的意義」

1. RAS遺伝子変異検査

切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌において、RAS（KRAS/NRAS）遺伝子エクソン2（コドン12、13）、エクソン3（コドン59、61）、エクソン4（コドン117、146）のいずれかに変異を有する場合、セツキシマブ（遺伝子組換え）及びパニツムマブ（遺伝子組換え）の治療効果が期待できないことが知られています。そのため、切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌の化学療法開始前にRAS遺伝子変異を確認し、RAS遺伝子変異の有無に応じて、セツキシマブ（遺伝子組換え）及びパニツムマブ（遺伝子組換え）の適応を判断することは、臨床的有用性が高いと考えられており、RAS遺伝子変異検査が広く行われています⁵⁾。

また、「大腸癌治療ガイドライン医師用」⁶⁾において、切除可能大腸癌における術後補助化学療法は、個々の患者で想定される再発リスクと期待される効果に基づいて治療選択を行うことが推奨されています。RAS遺伝子変異は、その再発リスクを予測する因子の候補と考えられており、「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス」²⁾の基本的要件にも、切除可能大腸癌において、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法の開始前にRAS遺伝子変異検査を実施することが記載されています。

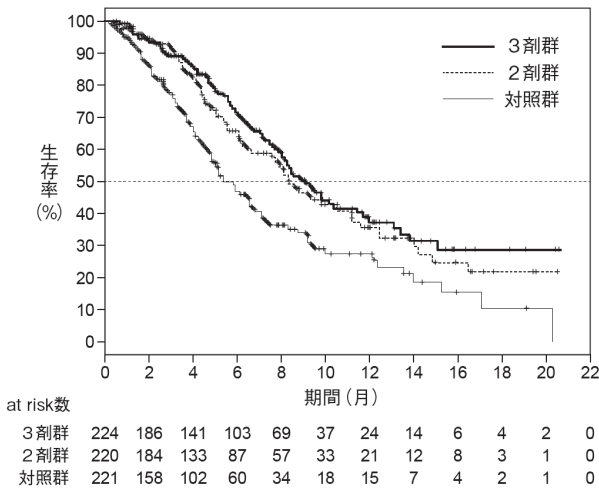
2. BRAF遺伝子変異（V600E）検査

結腸・直腸癌では、RASの下流にあるBRAFにも遺伝子変異が認められ、そのほとんどがエクソン15にあるコドン600のバリンがグルタミン酸へ変化するV600E変異であることが知られています。また、BRAF遺伝子変異（V600E）を持つ切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌は予後不良であり、病勢進行が早く、早急な化学療法開始を必要とする患者も少なくないものの、FOLFOXIRI+ベパシズマブ療法の有効性が示されています^{7), 8)}。本邦では、化学療法前におけるBRAF遺伝子検査の必要性が「大腸癌治療ガイドライン 医師用」⁶⁾に、切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌の化学療法の方針決定のため、治療前にBRAF遺伝子変異（V600E）を測定することが「大腸がん診療における

遺伝子関連検査等のガイダンス²⁾に記載されています。そして、FOLFOXIRI+ベバシズマブ療法は、臨床試験においてその有用性が示されたことから^{7), 8)}、「大腸癌治療ガイドライン 医師用」⁶⁾でも切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌に対する一次治療の一つとして推奨されています。

また、「大腸癌治療ガイドライン 医師用」⁶⁾では、切除可能大腸癌における術後補助化学療法は、個々の患者で想定される再発リスクと期待される効果に基づいて治療選択を行うことも推奨されています。BRAF遺伝子変異（V600E）は、その再発リスクを予測する因子であると考えられており、「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス」²⁾の基本的要件において、検査の実施が推奨されていることから、本検査の臨床的有用性は高いと考えられます。

さらに、国際共同第Ⅲ相試験（ARRAY-818-302試験）において、一次治療又は二次治療後に増悪したBRAF遺伝子変異（V600E）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^{*1}及びセツキシマブ^{*2}の併用投与又はイリノテカン^{*3}及びセツキシマブ^{*2}の併用投与（対照群）を対照として、①エンコラフェニブ^{*4}、ビニメチニブ^{*5}及びセツキシマブ^{*2}の併用投与（3剤群）、又は②エンコラフェニブ^{*4}及びセツキシマブ^{*2}の併用投与（2剤群）の有効性が検証されました。この試験における全生存期間及び奏効率の結果^{*6}を以下に示します。



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した。

		3剤群	2剤群	対照群
全生存期間	症例数	224例	220例	221例
	中央値（月）	9.0	8.4	5.4
	[95%信頼区間]	[8.0, 11.4]	[7.5, 11.0]	[4.8, 6.6]
	ハザード比 ^{*7}	0.52	0.60	-
	[95%信頼区間]	[0.39, 0.70]	[0.45, 0.79]	-
奏効率 ^{*9}	p値 ^{*8}	<0.0001	0.0002	-
	症例数 ^{*10}	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 ^{*11}	<0.0001	<0.0001	-

- ※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180 mg/m²を90分かけて静脈内投与、②ホリナート400 mg/m²を120分かけて静脈内投与、③フルオロウラシル400 mg/m²を急速静脈内投与した後、フルオロウラシル2,400 mg/m²を46～48時間かけて静脈内投与
- ※2 初回のみ400 mg/m²を120分かけて、その後250 mg/m²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、180 mg/m²を90分かけて静脈内投与
- ※4 300 mgを1日1回投与
- ※5 1回45 mg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。
- ※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）

以上のことから、BRAF遺伝子（V600E）変異の有無に応じて、エンコラフェニブ及びセツキシマブの併用療法、又はエンコラフェニブ、ビニメチニブ及びセツキシマブの併用療法の適応を判断することは、臨床的有用性が高いと考えられています。

なお、BRAF遺伝子変異（V600E）検査は、大腸癌におけるリンチ症候群の診断の補助にも有用であることが知られています。主にミスマッチ修復（MMR）遺伝子の生殖細胞系列変異を原因とする常染色体優性遺伝性疾患であるリンチ症候群は、患者及び家系内に大腸癌、子宮内膜癌をはじめ、さまざまな悪性腫瘍が若年発症することから、その診断は臨床的に重要であると考えられています。そのため、「遺伝性大腸癌診療ガイドライン」¹⁾では、リンチ症候群が疑われる大腸癌の診断の手順において、マイクロサテライト不安定性（MSI）検査により高頻度MSI（MSI-H）又は免疫染色でMMRタンパク質の消失が認められた症例に対して、腫瘍組織のBRAF遺伝子変異（V600E）検査を実施することが記載されています。リンチ症候群の大部分の大腸癌ではMSI-Hを示しても、BRAF遺伝子変異（V600E）はほとんど認められないことが報告されています。したがって、MSI検査にてMSI-Hが認められた場合に、BRAF遺伝子変異（V600E）検査を実施し、変異陽性であればリンチ症候群がほぼ否定できるため、確定診断に進まなくてよい患者を選択することが可能となります。

本品は、生体由来組織中のRAS遺伝子エクソン2（コドン12、13）、エクソン3（コドン59、61）、エクソン4（コドン117、146）変異及び、BRAF遺伝子変異（V600E）を簡便に検出する試薬です。切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌の化学療法開始前にRAS及びBRAF遺伝子変異を確認し、各遺伝子変異の有無に応じて治療法を層別化する検査方法として有用です。また、切除可能大腸癌において、補助化学療法の開始前にRAS遺伝子変異検査、BRAF遺伝子変異（V600E）検査を行うことは、再発リスクに応じた治療選択の補助として有用です。さらに、BRAF遺伝子変異（V600E）を検出することは、大腸癌におけるリンチ症候群の診断の補助としても有用です。

【性能】

1. 性能試験は以下の管理検体を用いて行いました。

RAS管理検体

名称	変異陽性となる遺伝子及びエクソン（コドン）	RAS遺伝子変異判定
管理検体1	KRAS遺伝子エクソン2（コドン12）	変異陽性
管理検体2	KRAS遺伝子エクソン2（コドン13）	変異陽性
管理検体3	KRAS遺伝子エクソン3（コドン61）	変異陽性
管理検体4	KRAS遺伝子エクソン3（コドン59）及びエクソン4（コドン117、146）	変異陽性
管理検体5	NRAS遺伝子エクソン2（コドン12）	変異陽性
管理検体6	NRAS遺伝子エクソン2（コドン13）	変異陽性
管理検体7	NRAS遺伝子エクソン3（コドン61）	変異陽性
管理検体8	NRAS遺伝子エクソン3（コドン59）及びエクソン4（コドン117、146）	変異陽性
管理検体9	なし	変異陰性

BRAF管理検体

名称	変異陽性となる遺伝子及びエクソン（コドン）	BRAF遺伝子変異判定
管理検体1	BRAF遺伝子エクソン15（コドン600）	変異陽性
管理検体9	なし	変異陰性

（1）感度試験

管理検体1から9を用いて試験するとき、それぞれの管理検体は、下表のIndex値を示します。

RAS遺伝子

検体	K：G12S	K：G12C	K：G12R	K：G12D	K：G12V	K：G12A	
管理検体1	≧300						
管理検体9	<300						
検体	K：G13S	K：G13C	K：G13R	K：G13D	K：G13V	K：G13A	
管理検体2	≧300						
管理検体9	<300						
検体	K：Q61K	K：Q61E	K：Q61L	K：Q61P	K：Q61R	K：Q61Ht	K：Q61Hc
管理検体3	≧300						
管理検体9	<300						
検体	K：A59T	K：A59G	K：K117Nc	K：K117Nt	K：A146T	K：A146P	K：A146V
管理検体4	≧300						
管理検体9	<300						

検体	N：G12S	N：G12C	N：G12R	N：G12D	N：G12V	N：G12A	
管理検体5	≧300						
管理検体9	<300						
検体	N：G13S	N：G13C	N：G13R	N：G13D	N：G13V	N：G13A	
管理検体6	≧300						
管理検体9	<300						
検体	N：Q61K	N：Q61E	N：Q61L	N：Q61P	N：Q61R	N：Q61Ht	N：Q61Hc
管理検体7	≧300						
管理検体9	<300						
検体	N：A59T	N：A59G	N：K117Nc	N：K117Nt	N：A146T	N：A146P	N：A146V
管理検体8	≧300	≧960	≧300	≧800			
管理検体9	<300	<960	<300	<800			

BRAF遺伝子

検体	B：V600E
管理検体1	≧300
管理検体9	<300

（2）正確性試験

RAS遺伝子変異

・管理検体1を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズ（K：G12S、K：G12C、K：G12R、K：G12D、K：G12V、K：G12A）は陽性を、その他のRAS変異検出

ピーズは陰性を示し、RAS変異陽性と判定されます。

- ・管理検体2を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズ（K：G13S、K：G13C、K：G13R、K：G13D、K：G13V、K：G13A）は陽性を、その他のRAS変異検出ピーズは陰性を示し、RAS変異陽性と判定されます。
- ・管理検体3を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズ（K：Q61K、K：Q61E、K：Q61L、K：Q61P、K：Q61R、K：Q61Ht、K：Q61Hc）は陽性を、その他のRAS変異検出ピーズは陰性を示し、RAS変異陽性と判定されます。
- ・管理検体4を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズ（K：A59T、K：A59G、K：K117Nc、K：K117Nt、K：A146T、K：A146P、K：A146V）は陽性を、その他のRAS変異検出ピーズは陰性を示し、RAS変異陽性と判定されます。
- ・管理検体5を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズ（N：G12S、N：G12C、N：G12R、N：G12D、N：G12V、N：G12A）は陽性を、その他のRAS変異検出ピーズは陰性を示し、RAS変異陽性と判定されます。
- ・管理検体6を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズ（N：G13S、N：G13C、N：G13R、N：G13D、N：G13V、N：G13A）は陽性を、その他のRAS変異検出ピーズは陰性を示し、RAS変異陽性と判定されます。
- ・管理検体7を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズ（N：Q61K、N：Q61E、N：Q61L、N：Q61P、N：Q61R、N：Q61Ht、N：Q61Hc）は陽性を、その他のRAS変異検出ピーズは陰性を示し、RAS変異陽性と判定されます。
- ・管理検体8を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズ（N：A59T、N：A59G、N：K117Nc、N：K117Nt、N：A146T、N：A146P、N：A146V）は陽性を、その他のRAS変異検出ピーズは陰性を示し、RAS変異陽性と判定されます。
- ・管理検体9を用いて試験するとき、RAS変異検出ピーズは全て陰性を示し、RAS変異陰性と判定されます。

BRAF遺伝子変異

- ・管理検体1を用いて試験するとき、BRAF変異検出ピーズ（B：V600E）は陽性を示し、BRAF変異陽性と判定されます。
- ・管理検体9を用いて試験するとき、BRAF変異検出ピーズ（B：V600E）は陰性を示し、BRAF変異陰性と判定されます。

検体	K : G12S	K : G12C	K : G12R	K : G12D	K : G12V	K : G12A	K : G13S	K : G13C	K : G13R	K : G13D	K : G13V	K : G13A	K : A39T	K : A59G	K : Q61K	K : Q61E	K : Q61L	K : Q61P	K : Q61R	K : Q61Ht	K : Q61He	K : K117Nc	K : K117Nt	K : A146T	K : A146P
管理検体1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
管理検体2	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
管理検体3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
管理検体4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	
管理検体5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
管理検体6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
管理検体7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
管理検体8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
管理検体9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

検体	N : G12S	N : G12C	N : G12R	N : G12D	N : G12V	N : G12A	N : G13S	N : G13C	N : G13R	N : G13D	N : G13V	N : G13A	N : A59T	N : A59G	N : Q61K	N : Q61E	N : Q61L	N : Q61P	N : Q61R	N : Q61H	N : Q61He	N : K177Nc	N : K177Nt	N : A146T	N : A146P	N : A146V	RAS 遺伝子 変異判定
管理検体1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	変異陽性
管理検体2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	変異陽性
管理検体3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	変異陽性
管理検体4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	変異陽性
管理検体5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	変異陽性
管理検体6	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	変異陽性
管理検体7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	変異陽性
管理検体8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	変異陽性
管理検体9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	変異陰性

検体	B : V600E	BRAF 遺伝子 変異判定
管理検体1	+	変異陽性
管理検体9	-	変異陰性

[+]はIndex値が陽性、[-]はIndex値が陰性であることを示します。

(3) 同時再現性試験

RAS遺伝子変異

- ・管理検体1から8をそれぞれ3回同時に測定するとき、全てRAS変異陽性を示します。
- ・管理検体9を3回同時に測定するとき、全てRAS変異陰性を示します。

BRAF遺伝子変異

- ・管理検体1を3回同時に測定するとき、全てBRAF変異陽性を示します。
- ・管理検体9を3回同時に測定するとき、全てBRAF変異陰性を示します。

2. 最小検出感度

150コピー/反応 (2本鎖DNAとして)

3. 校正用基準物質

自社調製品

4. 臨床性能試験結果¹⁾

(1) RAS遺伝子における対照法と本品の判定一致率

大腸癌302例において、FFPE組織切片から抽出したDNAを用いて、対照法 (MEBGEN RASKET キット⁵⁾ 又はダイレクトシーケンス法 (DS法)) と本品の判定一致率を検討したとき、以下のとおり、良好な一致率を示しました。

RAS遺伝子		RASKET キット		
		陽性	陰性	合計
本品	陽性	142	0	142
	陰性	0	160	160
	合計	142	160	302
全体一致率		100% (302例/302例)		
陽性一致率		100% (142例/142例)		
陰性一致率		100% (160例/160例)		

RAS遺伝子		DS法		
		陽性	陰性	合計
本品	陽性	136	6	142
	陰性	2	158	160
	合計	138	164	302
全体一致率		97.4% (294例/302例)		
陽性一致率		98.6% (136例/138例)		
陰性一致率		96.3% (158例/164例)		

(2) BRAF遺伝子における対照法と本品の判定一致率

大腸癌302例において、FFPE組織切片から抽出したDNAを用いて、対照法 (DS法あるいはパイロシーケンス法 (Pyro法)) と本品の判定一致率を検討したとき、以下のとおり、良好な一致率を示しました。

BRAF遺伝子		DS法		
		陽性	陰性	合計
本品	陽性	18	0	18
	陰性	0	284	284
	合計	18	284	302
全体一致率		100% (302例/302例)		
陽性一致率		100% (18例/18例)		
陰性一致率		100% (284例/284例)		

BRAF遺伝子		Pyro法		
		陽性	陰性	合計
本品	陽性	17	1	18
	陰性	0	284	284
	合計	17	285	302
全体一致率		99.7% (301例/302例)		
陽性一致率		100% (17例/17例)		
陰性一致率		99.6% (284例/285例)		

(3) 判定不一致例の解析

1) RAS遺伝子変異

本品で変異陽性、DS法で変異陰性と判定された6例は、別法 (TaqMan Mutation Detection Assays (サーモフィッシュャーサイエンティフィック社)) を用いて確認したところ変異陽性と判定され、本品の判定結果と一致しました。

本品で変異陰性、DS法で変異陽性と判定された2例は、本品の判定対象外の変異であったため、変異陰性と判定されていたことが判明しました。この2例の変異は下記のとおりです。

症例1:

KRAS p.A11A [c.33T>C]、KRAS p.G12C [c.34G>T]

症例2:

KRAS p.A59E [c.176C>A]

2) BRAF遺伝子変異

本品で変異陽性、Pyro法で変異陰性と判定された1例は、DS法を用いて確認したところ変異陽性と判定され、本品の判定結果と一致しました。

5. 臨床性能試験結果2

(1) BRAF遺伝子における対照法と本品の判定一致率

BEACON CRC試験において、分子プレスクリーニングの選択基準を全て満たし、いずれの除外基準にも該当しない患者から得られたDNAを用いて、対照法（中央測定又はローカル測定）と本品の判定一致率を検定したとき、以下のとおり、良好な一致率を示しました。

BRAF遺伝子		中央測定		
		陽性	陰性	合計
本品	陽性	471	0	471
	陰性	12	190	202
	合計	483	190	673
全体一致率		98.2% (661例/673例)		
陽性一致率		97.5% (471例/483例)		
陰性一致率		100% (190例/190例)		

BRAF遺伝子		ローカル測定		
		陽性	陰性	合計
本品	陽性	321	0	321
	陰性	23	3	26
	判定保留	6	0	6
	合計	350	3	353
全体一致率		91.8% (324例/353例)		
陽性一致率		91.7% (321例/350例)		
陰性一致率		100% (3例/3例)		

(2) 判定不一致例の解析

本品で変異陰性、対照法（中央測定）で変異陽性と判定された12例のうち、TaqMan Mutation Detection Assaysにて解析可能な検体があった4例について、追加解析を実施しました。この4例のうち、3例はTaqMan Mutation Detection Assaysにて変異陽性と判定されましたが、いずれもその変異率は1%前後と低いものでした。残りの1例は、TaqMan Mutation Detection Assaysでも変異未検出となり、本品の判定と一致しました。

また、本品で変異陰性、対照法（ローカル測定）で変異陽性と判定された23例のうち、TaqMan Mutation Detection Assaysにて解析可能な検体があった7例について、追加解析を実施しました。この7例のうち、2例はTaqMan Mutation Detection Assaysにて変異陽性と判定されましたが、いずれの検体も変異率は1%未満でした。残りの5例については、TaqMan Mutation Detection Assaysでも変異未検出となり、本品の判定と一致しました。

なお、本品で判定保留、対照法（ローカル測定）で変異陽性と判定された6例は検体の残量不足のため、TaqMan Mutation Detection Assaysの追加解析は実施しませんでした。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上の注意

- (1) コンタミネーションを防止するために紫外線を照射する場合は、紫外線ランプを直視したり、照射した

まま作業しないでください。

- (2) 試薬が目や口に入った場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
- (3) 試薬及び検体を調製する際に、口でピペットを扱わないでください。
- (4) ハイブリダイゼーション緩衝液には特異臭があります。強く吸い込まないように注意して使用してください。

2. 使用上の注意

- (1) 外箱記載の使用期限を過ぎた試薬は、Index値の信頼性を保証できませんので、使用しないでください。
- (2) 異なる製品ロットの試薬を混合したり、組み合わせたりして使用しないでください。また、同一の製品ロットであっても試薬を注ぎ足すことはしないでください。
- (3) 開封後はなるべく早く使用し、保存する場合は蓋を閉めて指定の方法で保存してください。マスターミックスは-15～-35℃で保存できますが、凍結融解回数は5回以内としてください。Taq DNAポリメラーゼ及びウラシルDNAグリコシラーゼは室温に放置すると失活する可能性がありますので、使用後は-15～-35℃で保存してください。
- (4) 試薬の調製に使用する容器や器具は、清浄なものを使用してください。
- (5) ヒトゲノムDNAを含まないサンプルの結果については、Index値の信頼性を保証致しません。

3. 廃棄上の注意

- (1) 検体は感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。検査に使用した器具は、次のいずれかの方法で処理してください。
 - ・2%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。
 - ・0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸漬する。
 試薬及び器具などを廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法などの規定に従って処理してください。
- (2) マスターミックス、ビーズミックス、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄用緩衝液（10倍濃縮品）、SA-PE希釈液及びSA-PEには、0.05%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金属アジドを生成することがありますので、これらの試薬を廃棄する際は大量の水と共に流してください。

【貯蔵方法】

構成試薬のうち

- ①マスターミックス
- ⑦Taq DNAポリメラーゼ
- ⑧ウラシルDNAグリコシラーゼ
- ⑨野生型コントロールDNA（10倍濃縮品）

は-15～-35℃で保存してください。

その他の試薬は凍結を避けて2～8℃で保存してください。

- ②ビーズミックス
- ⑥SA-PE

は遮光保存してください。

[有効期間]

製造後12箇月（使用期限は外箱に記載されています。）

[包装単位]

製品コード	製品名	包装
GS-D0471	MEBGEN RASKET-B キット（冷凍品）	96回包装
GS-D0472	MEBGEN RASKET-B キット（冷蔵品）	96回包装

[主要文献]

1. 「遺伝性大腸癌診療ガイドライン 2016年版」大腸癌研究会
2. 「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス 第4版 2019年12月（金原出版株式会社）」日本臨床腫瘍学会
3. 「遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル」日本臨床検査標準協議会
4. 「ゲノム研究用病理組織検体取扱い規定」日本病理学会
5. Yoshino, T. et al. EBioMedicine. 2015, vol. 2, p. 317-323.
6. 「大腸癌治療ガイドライン 医師用 2019年版」大腸癌研究会
7. Loupakis, F. et al. N Engl J Med. 2014, vol. 371, p. 1609-1618.
8. Cremolini, C. et al. Lancet Oncol. 2015, vol. 16, p. 1306-1315.
9. Taniguchi, H. et al. Neoplasia. 2018, vol. 20, p. 1219-1226.

[問い合わせ先]

株式会社医学生物学研究所 学術部
〒105-0012 東京都港区芝大門二丁目11番8号
住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL：03-6854-3613 E-mail：kensa@mbi.co.jp

**[製造販売元]

株式会社医学生物学研究所
〒105-0012 東京都港区芝大門二丁目11番8号
住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL：03-6684-6860 FAX：03-6854-3615

下記は株式会社医学生物学研究所の登録商標です。

「MEBGEN」（登録商標 第5350681号）

「RASKET」（登録商標 第5673539号）

「UniMAG」（登録商標 第5521789号）

測定フローチャート MEBGEN RASKET™-B キット

PCR 溶液調製☆

マスターミックス	20.0 μ L/reaction
Taq DNA ポリメラーゼ	0.125 μ L/reaction
ウラシル DNA グリコシラーゼ	0.125 μ L/reaction

PCR 溶液
20 μ L/well 分注

<エリア1>

PCR 増幅に用いる試薬の調製と分注
#紫外線照射可能なクリーンベンチなどをご利用ください。このエリア専用のピペットを用意し、フィルター付きチップを使用してください。

☆各数値は1反応あたりの必要量です。複数検体分の溶液を調製する際は、チップやチューブ等に残存する分を考慮して調製することをお薦めします。

検体

5 μ L/well 添加

検体 (抽出 DNA) 調製

10 ~ 20 ng/ μ L 推奨

wtDNA (野生型コントロール DNA 溶液) 調製	
野生型コントロール DNA (10 倍濃縮品)	10 μ L
滅菌水	90 μ L

wtDNA
(野生型コントロール DNA 溶液)
5 μ L/well 添加

<エリア2>

測定試料からの DNA 抽出と調製
#このエリア専用のピペットを用意し、フィルター付きチップを使用してください。

PCR 増幅

40°C, 5 min
95°C, 2 min
[94°C, 20 sec → 62°C, 30 sec] × 10 cycles
[90°C, 20 sec → *59°C, 30 sec → 72°C, 30 sec] × 45 cycles
72°C, 1 min
95°C, 10 min
4°C, forever (16 時間以内に次の操作を開始してください)

Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700
25 μ L/reaction, Max mode



<エリア3>

検出反応に用いる試薬の調製と分注、PCR 増幅及び検出操作
#このエリア専用のピペットをご用意ください。このエリアで使用する器具や保護衣及び PCR 増幅産物は他のエリアに持ち込まないでください (コンタミネーションの原因になります)。

ハイブリダイゼーション溶液

45 μ L/well 分注

ハイブリダイゼーション溶液調製☆

ハイブリダイゼーション緩衝液	40 μ L/reaction
ビーズミックス	5 μ L/reaction

成分が析出する場合がありますので、完全に溶解していることを確認し、室温 (20 ~ 30°C) に戻してから使用してください。

ビーズは沈殿するため、使用前によく混和してください。残りのビーズミックスは遮光して保存してください。

PCR 増幅産物
5 μ L/well 添加

ピペティング又はプレートミキサーで混和してください。

ハイブリダイゼーション反応

95°C, 2 min
55°C, 30 min
20°C, forever ※

Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700
50 μ L/reaction, Max mode



※forever の段階は、放置可能という意味ではありませんのでご注意ください。

ハイブリダイゼーション反応終了前に調製してください。

Luminex システム起動スタートアップ

起動後4時間以上放置するとレーザーが消えウォームアップに30分かかります。



ハイブリダイゼーション反応終了後、速やかに洗浄操作を行ってください。

用手法による洗浄操作の場合

遠心分離
2,000 × g, 1 min

又は
1,000 × g, 5 min

上清除去

洗浄液
50 μ L/well 添加

遠心分離
2,000 × g, 1 min

又は
1,000 × g, 5 min

上清除去

ピペティングなどで混和してください。

SA-PE 溶液
50 μ L/well 添加

SA-PE 溶液添加後、速やかに SA-PE 反応を行ってください。

SA-PE 反応

52°C, 15 min
37°C, forever ※

Gold 96-well GeneAmp PCR System 9700
50 μ L/reaction, Max mode



※forever の段階は、放置可能という意味ではありませんのでご注意ください。

スタートアップ終了確認！
Batch 作成

Luminex システムでの測定

結果の判定

Luminex 解析ソフトウェア UniMAG™ v2 によって迅速な判定が可能です。対応可能な解析ソフトウェアのバージョンについては、当社問い合わせ先までお問い合わせください。