使用の前に本電子化された添付文書をよく読んでください。

2026年3月作成（第1版）
承認番号：30800EZX00012000

体外診断用医薬品

PIK3CA遺伝子変異検出キット

AmoyDx® PIK3CA 変異検出キット

［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、がん組織から抽出したDNA中のPIK3CA遺伝子エクソン9（E542K、E545K、E545D、E545A、E545G、Q546R、Q546E）及びエクソン20（H1047L、H1047R、H1047Y）における変異を検出する試薬です。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. 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。測定に使用するための器具・装置は適正に整備されたもの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、判定結果の信頼性を保証いたしません。
4. 本品をリソバリシブメシル酸塩水和物の卵巣明細胞癌患者への適応を判定するための補助として用いる場合には、当該医薬品の本邦における最新の電子化された添付文書を参照の上使用してください。

［形状・構造等（キットの構成）］

	構成試薬
①	H1047R反応ミックス PI-M1-F10プライマー、PI-M1-R11プライマー、PI-M1-P5プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
②	H1047L反応ミックス PI-M1-F10プライマー、PI-M2-R17プライマー、PI-M1-P5プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
③	E542K反応ミックス PI-M3-F17プライマー、PI-M3-R14プライマー、PI-M3-P5プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
④	E545K反応ミックス PI-M4-F12プライマー、PI-M3-R32プライマー、PI-M3-P5プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
⑤	E545D反応ミックス PI-M5-F10プライマー、PI-M5-R15プライマー、PI-M3-P6プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
⑥	H1047Y反応ミックス PI-M1-F10プライマー、PI-M6-R8プライマー、PI-M1-P5プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
⑦	E545A反応ミックス PI-M11-F13プライマー、PI-M3-R14プライマー、PI-M3-P4プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
⑧	E545G反応ミックス PI-M5-F10プライマー、PI-M12-R3プライマー、PI-M3-P6プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
⑨	Q546R反応ミックス PI-M5-F10プライマー、PI-M15-R10プライマー、PI-M3-P6プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
⑩	Q546E反応ミックス PI-M17-F1プライマー、PI-M3-R26プライマー、PI-M3-P5プローブ、dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP
⑪	外部コントロール反応ミックス
⑫	酵素ミックス Taq DNAポリメラーゼ
⑬	陽性コントロール

①～⑪は遮光保存品。

［使用目的］

がん組織から抽出したDNA中のPIK3CA遺伝子変異の検出（リソバリシブメシル酸塩水和物の卵巣明細胞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］

本品はリアルタイムPCR法により、PIK3CA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、検体、反応ミックス、酵素ミックスを混合し、リアルタイムPCR装置を用いてPCRを行います。PCRは、検体に含まれるDNAを鋳型として、反応ミックスに含まれるdNTPs（dATP、dCTP、dGTP、dTTP、dUTP）、増幅プライマー、プローブ、酵素ミックスに含まれるTaq DNAポリメラーゼによって、PIK3CAのエクソン9領域または20領域を増幅させます。

本品の①～⑩の反応ミックスにはPIK3CA変異領域を増幅するプライマー及びプローブとインターナルコントロール（IC）を増幅するプライマー及びプローブが含まれています。⑪外部コントロール反応ミックスには外部コントロールを増幅するプライマー及びプローブが含まれています。

測定には、蛍光色素及び消光物質（クエンチャー）で標識したプローブを用います。プローブは、PIK3CA及びICの各配列に対応しており、それぞれ異なる波長の蛍光色素で標識されています。蛍光色素は、クエンチャーが近傍に存在すると消光されるため強い蛍光を発しませんが、プローブが検出対象となる塩基配列にハイブリダイズし、PCRにおける伸長反応の際にTaq DNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性によって分解されると、蛍光を発します。

PCRの各サイクルにおける蛍光強度をリアルタイムPCR装置で測定しPIK3CA及びICを検出するプローブの蛍光色素のCt値と、外部コントロールを検出するプローブの蛍光色素のCt値から、検体中のPIK3CA遺伝子における変異の有無を判定します。

［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1,000 ppm）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。したがって、次の事項に従うことを推奨しますが、以下の事項に従ってもコンタミネーションが起こる可能性がありますので、十分注意してください。

（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用いてください。

（4）エリア3では、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。PCR増幅後のプレートは、キャリーオーバーコンタミネーションの原因となるため、蓋を開けずにそのまま廃棄してください。

（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. 試料及び検体

がん組織のFFPE組織切片を測定試料とし、測定試料から抽出したDNAを検体として用います。DNA抽出には、遺伝子検査に適したDNA抽出試薬を用いてください。本品での測定にはDNA溶液を5 μL使用します。DNA濃度は、2～3 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、－15～－25℃で凍結して保管してください。凍結保管した検体は抽出から6箇月以内に使用してください。

4. 妨害物質

FFPE臨床検体からDNAを抽出する過程で以下が含まれていた場合にも本品の判定結果に影響がないことを確認しました。ヘモグロビン2 g/L、トリグリセリド37 mmol/L、エタノール21.7 mmol/L、キシレン37 mmol/L、プロテイナーゼK0.2 mg/L、流動パラフィン1%、大腸菌10^6 CFU/mL、酵母菌10^6 CFU/mL、ホルマリン0.1%。

5. 交差反応性

本品に含まれるプライマー及びプローブを用いてBLAST検索を行い、交差反応性の可能性を検討しました。その結果、プライマーが測定対象以外の配列を増幅する可能性は極めて低いと判断しました。

6. その他

（1）①～⑪の反応ミックスには、蛍光色素が含まれています。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。

（2）全ての構成試薬は、使用時以外は、貯蔵方法に従って保管してください。

［用法・用量（操作方法）］

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薦めします。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）1×TE緩衝液（pH 8.0）

（2）リアルタイムPCR

1）クリーンベンチ（溶液調製用）
2）マイクロピペット
3）フィルター付きチップ
4）マイクロチューブ
5）PCRプレート（※）
6）プレートシール（※）
7）アプライドバイオシステムズQuantStudio 5 Dxリアルタイム PCR装置（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）
8）プレートミキサー又はボルテックスミキサー
9）遠心機

(3) 滅菌精製水（RNA、RNase、DNA及びDNase Free）
(4) その他
1) 紫外線照射箱（コンタミネーション防止用）
2) 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）

※使用するリアルタイムPCR装置のメーカーが推奨するものを使用してください。
※必要な機材・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。

2. リアルタイムPCR装置の設定
(1) 反応設定
(Stage1)
95℃ 5分
(Stage2)
95℃ 25秒、64℃ 20秒、72℃ 20秒（15サイクル）
(Stage3)
93℃ 25秒、**60℃ 35秒**、72℃ 20秒（31サイクル）
太字：Data collection

(2) 検出設定
PCR Cycleステージの60℃のアニーリング反応時に次の蛍光を検出できるように設定してください。変異検出プローブに結合しているFAMの蛍光波長は505～535 nm、内部コントロール検出プローブに結合しているVICの蛍光波長は546～570 nmです。

（例）アプライドバイオシステムズQuantStudio 5 Dx リアルタイムPCR装置の場合
＜Properties/Experiment Properties＞
Experiment type ：Standard Curve
Chemistry ：TaqMan® Reagents
Run mode ：Standard

＜Plate/Assign Targets and Samples＞
［Quick Setup］
Passive Reference：None

［Advanced Setup］
各Targetsについて、以下の通り設定する。

	Name	Reporter	Quencher	Task
1	H1047R	FAM	None	Unknown
2	H1047R-IC	VIC	None	Unknown
3	H1047L	FAM	None	Unknown
4	H1047L-IC	VIC	None	Unknown
5	E542K	FAM	None	Unknown
6	E542K-IC	VIC	None	Unknown
7	E545K	FAM	None	Unknown
8	E545K-IC	VIC	None	Unknown
9	E545D	FAM	None	Unknown
10	E545D-IC	VIC	None	Unknown
11	H1047Y	FAM	None	Unknown
12	H1047Y-IC	VIC	None	Unknown
13	E545A	FAM	None	Unknown
14	E545A-IC	VIC	None	Unknown
15	E545G	FAM	None	Unknown
16	E545G-IC	VIC	None	Unknown
17	Q546R	FAM	None	Unknown
18	Q546R-IC	VIC	None	Unknown
19	Q546E	FAM	None	Unknown
20	Q546E-IC	VIC	None	Unknown
21	External	FAM	None	Unknown

［Plate layout］
附表1を参考にPlate layout、Targetsを設定してください。Targetsは列ごとに設定してください。

注意：リアルタイムPCR装置によって蛍光検出の設定が異なる場合があるため、使用する装置の取り扱い説明書等を確認してください。

3. 試薬の調製法
本品の①～⑪の反応ミックスと陽性コントロールは室温（20～30℃）に戻した後、ボルテックスミキサーで混和してからスピンダウンし、使用してください。酵素ミックスは、スピンダウンし、使用してください。この操作はエリア1で行ってください。
なお、スピンダウンとは、チューブ又はプレート内の少量の溶液をチューブの底に集めるための操作であり、遠心機で約5秒間遠心することを指します。また、①～⑪の反応ミックスは蛍光物質を含みますので、試薬調製時以外は遮光してください。

4. 検体の調製
本品は、［操作上の注意］2. 試料及び検体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。
抽出したDNAは、1×TE緩衝液（pH 8.0）で2～3 ng/μLに調製することを推奨します。
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。

5. 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) PCR溶液の調製［用時調製］
1テストあたり、反応ミックスと酵素ミックスを以下の容量でよく混和します。試薬の調製後はすぐに使用してください。

		1テストあたりのPCR溶液	
	検出対象	反応ミックス（μL）	酵素ミックス（μL）
1	H1047R	20	0.16
2	H1047L	20	0.16
3	E542K	20	0.2
4	E545K	20	0.2
5	E545D	20	0.16
6	H1047Y	20	0.16
7	E545A	20	0.16
8	E545G	20	0.16

		1テストあたりのPCR溶液	
	検出対象	反応ミックス（μL）	酵素ミックス（μL）
9	Q546R	20	0.16
10	Q546E	20	0.16
11	外部コントロール	20	0.16

（2）PCR溶液の分注
PCRプレートに、Plate layoutで設定したとおりに(1)で調製したPCR溶液を1ウェルあたり20 μL分注します。

（3）検体の添加（エリア2で行ってください）
PCR溶液を分注した増幅反応用PCRプレートの各ウェルに、検体又は陽性コントロール又は滅菌精製水（NTC）を5 μL加え、蓋をして十分に混和し、軽い遠心などで溶液をプレートの底に集めます。この時、ウェルの底に空気が入らないようにしてください。
※陽性コントロールおよびNTCは各検体、各変異において必ず測定してください。

（4）測定
「2. リアルタイムPCR装置の設定」で設定した条件で測定します。

［測定結果の判定法］

判定は、以下のように行います。

1. Threshold LineおよびCt値の算出
測定結果から各反応ミックスで測定した陽性コントロールの31サイクル目のDelta Rn値を確認してください。反応ミックスごとにThreshold Line値を“Delta Rn値(31)”×0.05として設定し、Ct値を算出してください。

2. 測定の妥当性確認
（1）各測定に含まれるIC、NTC、外部コントロールおよび陽性コントロールのCt値を下表の基準Ct値と比較します。

コントロールの種類	基準Ct値
NTC	FAM31以上
陽性コントロール	FAM20未満かつVIC20未満
IC	「VIC31未満」又は「VIC31以上かつFAM31未満」
外部コントロール	FAM15以上21以下

（2）上記基準をすべて満たす場合は検査成立として検体の判定を行います。ひとつでも満たさない場合は判定不成立となります。

3. 検体の判定
次の手順で各検体の判定を行います。判定にはCt値を用いる場合とΔCt値を用いる場合があります。検体の陽性、陰性の判定は附表2のCt値、附表3のΔCt値に従ってください。

（1）Ct値を用いた検体の判定
1）各変異のCt値が「陽性Ct値」より小さい場合は陽性と判定します。
2）各変異のCt値が「陰性Ct値」以上である場合は陰性と判定します。

（2）ΔCt値を用いた検体の判定
1）各変異のCt値が附表2の「許容Ct値」の範囲の場合は、ΔCt値を用いて判定を行います。ΔCt値は各変異のFAMのCt値から外部コントロールのFAMのCt値を引いて算出した値です。
2）ΔCt値がカットオフΔCt値より小さい場合は陽性と判定します。
3）ΔCt値がカットオフΔCt値以上の場合は陰性と判定します。

（3）判定結果
検体の判定は附表2、3を参照してください。

「判定上の注意」

1. 腫瘍細胞の割合が低い組織を用いると、PIK3CA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. リアルタイムPCR装置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。エラー表示がある場合には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。

［臨床的意義］

1. 臨床性能試験結果
（1）本品と臨床試験測定法との判定一致率
リソバリシブメシル酸塩水和物の臨床試験（CYH-G201試験）にて卵巣明細胞癌患者から収集された検体のうち、PIK3CA遺伝子変異の有無が確認された197例の検体を用い、本試験の臨床試験測定法（CTA）を対照として判定一致率を検討した結果は次の通りです。

*PIK3CA*変異		CTA1/CTA2※		合計
		陽性	陰性	
本品	陽性	81	0	81
	陰性	3	113	116
合計		84	113	197

※CTA1：NGS法、CTA2：リアルタイムPCR法

陽性一致率：96.43%（81例/84例）
陰性一致率：100%　（113例/113例）
全体一致率：98.48%（194/197例）

［性能］

1. 性能試験には以下の管理検体を用いました。

管理検体	変異	判定
管理検体1、管理検体13	H1047R	陽性
管理検体2、管理検体14	H1047L	陽性
管理検体3、管理検体15	E542K	陽性
管理検体4、管理検体16	E545K	陽性
管理検体5、管理検体17	E545D	陽性
管理検体6、管理検体18	H1047Y	陽性
管理検体7、管理検体19	E545A	陽性
管理検体8、管理検体20	E545G	陽性
管理検体9、管理検体21	Q546R	陽性

管理検体	変異	判定
管理検体10、管理検体22	Q546E	陽性
管理検体11、管理検体12、管理検体23	野生型	陰性
管理検体24	10変異	陽性

(1) 感度試験
感度試験用の管理検体を測定したとき、対応する変異が陽性を示します。
(2) 正確性試験
正確性試験用の陽性管理検体を測定したとき、対応する変異の陽性を示します。正確性試験用の陰性管理検体を測定したとき、陰性を示します。
(3) 同時再現性試験
同時再現性試験用の管理検体を同時に10回測定したとき、いずれも同一の判定となります。

2. 最小検出感度

変異	変異頻度
H1047R、H1047L、E545D、H1047Y、Q546E	1.0%
E542K、E545K、E545A、E545G、Q546R	2.0%

[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ないでください。また、紫外線を照射したまま作業しないでください。
(2) 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には、大量の水で十分に洗い流し、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。
(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) 検体を取り扱う際は、感染の危険性がありますので、必要なバイオハザード対策をとってください。

2. 使用上の注意
(1) 外箱記載の使用期限を過ぎた試薬は、結果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。凍結融解回数は6回以内としてください。酵素ミックス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～－25℃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。

3. 廃棄上の注意
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。

[貯蔵方法]

全ての構成試薬は－15～－25℃で保存してください。

[有効期間]

12箇月

[包装単位]

AY8010297　AmoyDx® PIK3CA 変異検出キット　24テスト

	キット構成	容量	数量
①	H1047R反応ミックス	650 μL	1本
②	H1047L反応ミックス	650 μL	1本
③	E542K反応ミックス	650 μL	1本
④	E545K反応ミックス	650 μL	1本
⑤	E545D反応ミックス	650 μL	1本
⑥	H1047Y反応ミックス	650 μL	1本
⑦	E545A反応ミックス	650 μL	1本
⑧	E545G反応ミックス	650 μL	1本
⑨	Q546R反応ミックス	650 μL	1本
⑩	Q546E反応ミックス	650 μL	1本
⑪	外部コントロール反応ミックス	650 μL	1本
⑫	酵素ミックス	100 μL	1本
⑬	陽性コントロール	500 μL	2本

[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@mbl.co.jp

[製造販売業者の氏名又は名称及び住所]

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

（附表1）リアルタイムPCRのプレート配置図

変異	H1047R	H1047L	E542K	E545K	E545D	H1047Y	E545A	E545G	Q546R	Q546E	外部コントロール	空き
ウェル	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	⑪	⑫
A	検体1	検体1	検体1	検体1	検体1	検体1	検体1	検体1	検体1	検体1	検体1	
B	検体2	検体2	検体2	検体2	検体2	検体2	検体2	検体2	検体2	検体2	検体2	
C	検体3	検体3	検体3	検体3	検体3	検体3	検体3	検体3	検体3	検体3	検体3	
D	検体4	検体4	検体4	検体4	検体4	検体4	検体4	検体4	検体4	検体4	検体4	
E	検体5	検体5	検体5	検体5	検体5	検体5	検体5	検体5	検体5	検体5	検体5	
F	検体6	検体6	検体6	検体6	検体6	検体6	検体6	検体6	検体6	検体6	検体6	
G	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	陽性コントロール	
H	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	

（附表2）Ct値を用いた検体の判定

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	判定結果
	H1047R	H1047L	E542K	E545K	E545D	H1047Y	E545A	E545G	Q546R	Q546E	
陽性Ct値	＜25	＜26	＜25	＜26	＜26	＜26	＜25	＜25	＜25	＜26	陽性
陰性Ct値	≧28	≧29	≧29	≧29	≧29	≧28	≧27	≧27	≧27	≧28	陰性
許容Ct値	25≦Ct値＜28	26≦Ct値＜29	25≦Ct値＜29	26≦Ct値＜29	26≦Ct値＜29	26≦Ct値＜28	25≦Ct値＜27	25≦Ct値＜27	25≦Ct値＜27	26≦Ct値＜28	ΔCt値を用いて判定する

＊許容Ct値は附表3のΔCt値を用いて判定する

（附表3）ΔCt値を用いた検体の判定

	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	判定結果
	H1047R	H1047L	E542K	E545K	E545D	H1047Y	E545A	E545G	Q546R	Q546E	
陽性ΔCt値	＜11	＜12	＜12	＜12	＜12	＜9	＜8	＜8	＜8	＜9	陽性