

体外診断用医薬品	
日本標準商品分類番号	87 7449
承認番号	30600EZK00028000

*2026年 1月改訂（第3版）
2024年 9月作成（第2版）

ご使用の際はこの電子添文をよく読んでからご使用ください。

テンプレートDNA調製キット

ヘムサイト診断薬

TI25380102

【重要な基本的注意】

本品による検査を実施する際には、関連する指針等に提示される施設要件を満たすことを確認するとともに、関連学会が作成したガイドライン等の最新の情報を参考に、検査の実施の適否及び介入方針の検討を行うこと。

【一般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
2. 診断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すること。
3. 電子添文以外での使用方法については保証外であること。
4. 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すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

D1) DNA Capture Library

No.	構成試薬名	成分
D1-01	Capture Library for DNA	オリゴRNA

D2) Library Prep Kit (Pre PCR)

No.	構成試薬名	成分
D2-01	End-Repair-A Tailing Enzyme Mix	酵素
D2-02	End-Repair-A Tailing Buffer	緩衝剤
D2-03	T4 DNA Ligase	酵素
D2-04	Ligation Buffer	緩衝剤
D2-05	Adaptor Oligo Mix	オリゴDNA
D2-06	Forward Primer	オリゴDNA
D2-07	100mM dNTP Mix	dNTP
D2-08	Herculase II Fusion DNA Polymerase	酵素
D2-09	5X Herculase II Reaction Buffer	緩衝剤

D3) Index Primers 1-32 (Pre PCR)

No.	構成試薬名	成分
D3-01	SureSelect XT HS Index Primer A01	オリゴDNA
D3-02	SureSelect XT HS Index Primer B01	オリゴDNA
D3-03	SureSelect XT HS Index Primer C01	オリゴDNA
D3-04	SureSelect XT HS Index Primer D01	オリゴDNA
D3-05	SureSelect XT HS Index Primer E01	オリゴDNA
D3-06	SureSelect XT HS Index Primer F01	オリゴDNA
D3-07	SureSelect XT HS Index Primer G01	オリゴDNA
D3-08	SureSelect XT HS Index Primer H01	オリゴDNA
D3-09	SureSelect XT HS Index Primer A02	オリゴDNA
D3-10	SureSelect XT HS Index Primer B02	オリゴDNA
D3-11	SureSelect XT HS Index Primer C02	オリゴDNA
D3-12	SureSelect XT HS Index Primer D02	オリゴDNA
D3-13	SureSelect XT HS Index Primer E02	オリゴDNA
D3-14	SureSelect XT HS Index Primer F02	オリゴDNA
D3-15	SureSelect XT HS Index Primer G02	オリゴDNA
D3-16	SureSelect XT HS Index Primer H02	オリゴDNA
D3-17	SureSelect XT HS Index Primer A03	オリゴDNA
D3-18	SureSelect XT HS Index Primer B03	オリゴDNA
D3-19	SureSelect XT HS Index Primer C03	オリゴDNA

No.	構成試薬名	成分
D3-20	SureSelect XT HS Index Primer D03	オリゴDNA
D3-21	SureSelect XT HS Index Primer E03	オリゴDNA
D3-22	SureSelect XT HS Index Primer F03	オリゴDNA
D3-23	SureSelect XT HS Index Primer G03	オリゴDNA
D3-24	SureSelect XT HS Index Primer H03	オリゴDNA
D3-25	SureSelect XT HS Index Primer A04	オリゴDNA
D3-26	SureSelect XT HS Index Primer B04	オリゴDNA
D3-27	SureSelect XT HS Index Primer C04	オリゴDNA
D3-28	SureSelect XT HS Index Primer D04	オリゴDNA
D3-29	SureSelect XT HS Index Primer E04	オリゴDNA
D3-30	SureSelect XT HS Index Primer F04	オリゴDNA
D3-31	SureSelect XT HS Index Primer G04	オリゴDNA
D3-32	SureSelect XT HS Index Primer H04	オリゴDNA

D4) Hyb Module Box 1 (Post PCR)

No.	構成試薬名	成分
D4-01	SureSelect Binding Buffer	緩衝剤
D4-02	SureSelect Wash Buffer 1	緩衝剤
D4-03	SureSelect Wash Buffer 2	緩衝剤

D5) Hyb Module Box 2 (Post PCR)

No.	構成試薬名	成分
D5-01	SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix	緩衝剤
D5-02	SureSelect Fast Hybridization Buffer	緩衝剤
D5-03	SureSelect RNase Block	RNase阻害剤
D5-04	SureSelect Post-Capture Primer Mix	オリゴDNA
D5-05	100mM dNTP Mix	dNTP
D5-06	Herculase II Fusion DNA Polymerase	酵素
D5-07	5X Herculase II Reaction Buffer	緩衝剤

R1) RNA Capture Library

No.	構成試薬名	成分
R1-01	Capture Library for RNA	オリゴRNA

R2) RNA Library Prep Box1

No.	構成試薬名	成分
R2-01	Fragmentation Mix	緩衝剤
R2-02	First Strand Master Mix	酵素
R2-03	Second Strand Enzyme Mix	酵素
R2-04	Second Strand Oligo Mix	オリゴDNA
R2-05	dA Tailing Master Mix	酵素
R2-06	SureSelect Ligation Master Mix	酵素
R2-07	SureSelect Oligo Adaptor Mix	オリゴDNA
R2-08	PCR Master Mix	酵素
R2-09	Uracil DNA Glycosylase (UDG)	酵素
R2-10	ILM Reverse PCR Primer	オリゴDNA
R2-11	SureSelect Primer	オリゴDNA
R2-12	ILM Post-capture PCR Primer	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp A01	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp B01	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp C01	オリゴDNA

取扱説明書を必ず参照すること

No.	構成試薬名	成分
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp D01	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp E01	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp F01	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp G01	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp H01	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp A02	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp B02	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp C02	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp D02	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp E02	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp F02	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp G02	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp H02	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp A03	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp B03	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp C03	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp D03	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp E03	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp F03	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp G03	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp H03	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp A04	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp B04	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp C04	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp D04	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp E04	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp F04	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp G04	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp H04	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp A05	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp B05	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp C05	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp D05	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp E05	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp F05	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp G05	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp H05	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp A06	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp B06	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp C06	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp D06	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp E06	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp F06	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp G06	オリゴDNA
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp H06	オリゴDNA

R2-13は48種類のインデックスを96-well plateに分注したものである。

R3) Target Enrichment Box 1 for RNA

No.	構成試薬名	成分
R3-01	SureSelect Hyb 1	緩衝剤
R3-02	SureSelect Hyb 2	緩衝剤
R3-03	SureSelect Hyb 4	緩衝剤
R3-04	SureSelect Binding Buffer	緩衝剤
R3-05	SureSelect Wash Buffer 1	緩衝剤
R3-06	SureSelect Wash Buffer 2	緩衝剤

R4) Target Enrichment Box 2 for RNA

No.	構成試薬名	成分
R4-01	SureSelect RNase Block	RNase阻害剤

No.	構成試薬名	成分
R4-02	SureSelect Indexing Block #1	オリゴDNA
R4-03	SureSelect Block #2	緩衝剤
R4-04	SureSelect Indexing Block #3	オリゴDNA
R4-05	SureSelect Hyb #3	緩衝剤

【使用目的】

末梢血、骨髄液、組織又は体腔液より抽出したDNA及びRNA中の造血器腫瘍関連遺伝子変異の検出のための塩基配列情報の取得(造血器腫瘍又は類縁疾患の包括的なゲノムプロファイリング)

【測定原理】

本品は、次世代シーケンサー (NextSeq 550Dxシステム)、及び解析ソフトウェア (ヘムサイト解析プログラム) と組み合わせて使用する。

本品を用い、腫瘍部 (新鮮検体 (末梢血、骨髄液、組織、体腔液) 又はホルマリン固定パラフィン包埋 (以下、FFPE) (切片又はブロック)) より抽出したDNA及びRNA、及び正常部 (新鮮検体 (口腔粘膜又は爪)) より抽出したDNAを検体として、DNAライブラリの調製を行う。

その後、次世代シーケンサーを用い、調製されたDNAライブラリの塩基配列決定を行う。

解析ソフトウェアは、DNAライブラリの塩基配列決定により取得したFASTQファイルを解析し、造血器腫瘍遺伝子異常を検出する。

1. DNAからのDNAライブラリ調製

抽出したDNAを超音波処理により、ランダムに断片化する。断片化したDNAの末端修復及びデオキシリボアデノシン (dA) 付加を行った後に、アダプター・インデックスを付加し、PCRでプレ増幅を行う。プレ増幅した増幅DNAライブラリにCapture Library for DNAをハイブリダイゼーションさせ、ストレプトアビジン磁気ビーズを使用し、標的領域として捕捉されたDNAを回収・濃縮し、PCRを行う。PCR後のDNAライブラリを精製することで、次世代シーケンサー解析用DNAライブラリを調製する。概略を図1に示す。

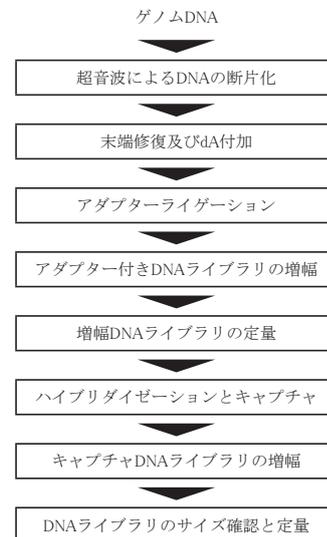


図1 DNAからのDNAライブラリ調製の操作方法の概略

取扱説明書を必ず参照すること

2. RNAからのDNAライブラリ調製

抽出したRNAをアルカリ溶液の添加と加熱による化学的処理により、ランダムに断片化する。断片化したRNAを鋳型として、一本鎖cDNAを合成後、二本鎖cDNAを合成する。二本鎖cDNAの末端修復及びdA付加を行った後に、アダプターを付加し、PCRでプレ増幅を行う。増幅したプレ増幅DNAライブラリにCapture Library for RNAをハイブリダイゼーションさせ、ストレプトアビジン磁気ビーズを使用して、捕捉されたDNAのみを回収・濃縮し、インデックスプライマーによるPCRを行う。PCR後のDNAライブラリを精製することで、次世代シーケンサー解析用DNAライブラリを調製する。概略を図2に示す。



図2 RNAからのDNAライブラリ調製の操作方法の概略

3. シークエンシング

必要に応じて複数の次世代シーケンサー解析用DNAライブラリを等モルとなるように混合し、プールを作製する。NextSeq 550Dx High Output Reagent Kitを用いて、次世代シーケンサー (NextSeq 550Dxシステム) でシーケンシングを行い、出力されたFASTQファイルを取得する。

*4. 造血器腫瘍遺伝子異常の報告

DNAライブラリの塩基配列決定により取得したFASTQファイルを解析ソフトウェア (ヘムサイト解析プログラム) にて解析し、遺伝子異常を報告する。

報告対象となる遺伝子異常は、DNA解析による体細胞における一塩基置換、及び短い挿入・欠失 (以下、SNV/Indelと示す)、構造異常、RNA解析による体細胞における融合遺伝子、構造異常の報告基準を満たしたすべての遺伝子異常である。なお、一般人口頻度が高いものを除く全ての遺伝子異常 (意義不明変異 (VUS: variant of unknown significance) を含む) を区別なく報告する。

【操作上の注意】

使用者は本品の取扱説明書に従い、操作を行うこと。また、使用者は初めて使用する前にトレーニング等を受講すること。

1. 検体に関する事項

- (1) 口腔粘膜採取時は、血液及び唾液中の白血球の混入に注意すること。
- (2) 腫瘍部RNA中にDNAが混入している場合、測定結果に影響を及ぼすため、RNA抽出時に核酸抽出キットの取扱説明書に従い、DNase処理を行うこと。ただし、核酸抽出キットの仕様でDNAの混入が低減されている場合はこの限りではない。

- (3) 腫瘍部及び正常部からの検体採取及び保管は、各種の検体取り扱いガイドライン等 (例: ゲノム診療用病理組織検体採取規程: 日本病理学会作成, 検体品質管理マニュアル: 日本臨床検査標準協議会作成, 等) に従い実施することを推奨する。
- (4) 核酸抽出キットの成分が残留していると、DNAライブラリ調製に必要な反応が阻害される恐れがある。核酸抽出キットの取扱説明書を参照し、適切に核酸抽出を実施すること。
- (5) 本品によるDNAライブラリ調製は、腫瘍割合が20%以上である検体で実施すること。また、FFPEにおいては、十分な核酸量を得るため、組織部体積が合計2mm³以上となるよう、複数枚のFFPE切片から核酸抽出を行うことが望ましい。
- (6) FFPEからDNAを抽出する場合、測定結果に影響を及ぼすため、核酸抽出キットの取扱説明書に従いUDG処理を行うこと。
- (7) DNAライブラリ調製に供するFFPE由来核酸の品質について、DNAはDIN値が2以上であること、RNAはDV₂₀₀が30%以上であることを推奨する。
- (8) 正常部及び腫瘍部の成分が影響を与える可能性があるため、核酸抽出キットの取扱説明書に従い核酸抽出を行うこと。
- (9) 他検体等により汚染された核酸を使用すると測定結果に影響を及ぼすため、汚染されていない核酸を使用して検査を実施すること。
- (10) 腫瘍部DNAからのDNAライブラリ及び正常部DNAからのDNAライブラリがいずれも調製工程の適格性 (【性能】(1) 参照) を満たした場合は、RNAからのDNAライブラリが調製工程の適格性を満たさずDNAライブラリを調製できなかった場合でも次世代シーケンサー及び解析ソフトウェアでの検査を実施可能だが、腫瘍部DNAからのDNAライブラリ及び正常部DNAからのDNAライブラリのいずれか又は両方が調製工程の適格性を満たさなかった場合は次世代シーケンサー及び解析ソフトウェアでの検査を実施しない。

2. 操作に関する事項

- (1) 本品の保管温度は、構成試薬ごとに異なる (15~30℃, -20℃以下, -70℃以下の3種類)。規定の温度以外にて放置しないこと。
- (2) プレートシール又はキャップによる密閉が不十分の場合、反応中に反応液が蒸発するため注意すること。
- (3) PCRプレート又は8連チューブのキャップを外す必要のある工程で取り外し可能なキャップを使用している場合は、再びキャップをするときに、常に新しいキャップを使用すること。
- (4) 操作中は、検体間及び構成試薬間のコンタミネーションに注意すること。
- (5) 各凍結試薬は、特に指定がない場合は、使用前に液が均一になるまでよく混合してから使用すること。
- (6) 凍結の各構成試薬及びそれらを用いて調製した試薬類は、特に指定のない場合は氷上で取り扱うこと。
- (7) 機器を使用する際は、各機器の取扱説明書を参照し、適切な設定を行い、各機器に適した環境で使用すること。
- (8) 妨害物質の影響

以下の妨害物質を添加した試料を用い、本品による測定をそれぞれ4回実施したところ、下表に示す濃度の妨害物質が混入しても結果に影響を与えないことが示された。

妨害物質	濃度
遊離型ビリルビン	199 μg/mL
抱合型ビリルビン	201 μg/mL
溶血ヘモグロビン	4.7mg/mL
乳び	1630FTU
ヘパリンナトリウム	30U/mL
エタノール	10%
Proteinase K	80 μg/mL

ヒト血清由来アルブミンを添加したDNA及びRNAについて核酸抽出キットによるタンパク質除去性能の確認を3回ずつ実施したところ、ヒトの血液に含まれる程度のアルブミンが検体に混入しても核酸の単離工程で除去され、測定結果に影響を与えないことが示された。

取扱説明書を必ず参照すること

【用法・用量（操作方法）】

1. 必要な試薬（本品以外に必要な試薬）

- (1) Agencourt AMPure XP
- (2) Dynabeads MyOne Streptavidin T1
- * (3) Dynabeads M-270 Streptavidin
- (4) TE Buffer (10mM Tris HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0)
- (5) 99.5% Ethanol molecular biology grade
- (6) Actinomycin D
- (7) DMSO
- (8) スクレアーゼフリー水
- (9) Agilent TapeStation D1000 ScreenTape (同等品可)
- (10) Agilent TapeStation D1000 試薬キット
- (11) Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 ScreenTape (同等品可)
- (12) Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット
- (13) Qubit dsDNA BR Assay Kit (同等品可)
※ FFPE由来DNAの品質確認で、(14) 及び (15), 又は (16) を使用
- (14) Genomic DNA ScreenTape
- (15) Genomic DNA試薬キット
- (16) Agilent NGS FFPE QC Kit
※ RNA濃度により、(17) ~ (19), (20) ~ (22) のいずれかを使用
- (17) RNA ScreenTape
- (18) RNA ScreenTape Sample Buffer
- * (19) RNA ScreenTape Ladder
- (20) High Sensitivity RNA ScreenTape
- (21) High Sensitivity RNA ScreenTape Sample Buffer
- (22) High Sensitivity RNA ScreenTape Ladder

2. その他必要な器具、機器等

- (1) Covaris Sample Preparation System (同等品可)
- (2) Agilent 4200 TapeStation (同等品可)
- (3) サーマルサイクラー
- (4) 遠心分離機
- (5) 96ウェルプレート又は8連チューブ遠心機
- (6) MS3デジタル (96ウェル対応ミキサー) (同等品可)
- (7) MS3.5 96ウェルプレート用アタッチメント (同等品可)
- (8) 遠心濃縮装置
- (9) Qubit 4 Fluorometer (同等品可)
- (10) リアルタイムPCR装置 (※ Agilent NGS FFPE QC Kitを使用する場合のみ必要)
- (11) マルチチャンネルピペット
- (12) マイクロピペット (0.5~1,000 µLを採取することのできる、各容量に対応したマイクロピペット)
- (13) ビーズ分離用マグネット
- (14) アイスバケツ
- (15) タイマー
- (16) microTUBE AFA Fiber Crimp-Cap 6x 16mm (同等品可)
- (17) Optical strip tube (同等品可)
- (18) Tube cap strips, domed (同等品可)
- (19) DNA LoBind チューブ 1.5mL PCR clean, 250pieces (同等品可)
- (20) 96-well sample plate (同等品可)
- (21) 96-well plate foil seals (同等品可)
- (22) 0.2mLリアルタイムPCR用8連チューブ (同等品可)
- (23) ピペットチップ (滅菌 Nuclease-Free, エアロゾルブロックフィルター付き) (同等品可)
- (24) 滅菌済みコンカルチューブ (ポリプロピレン製, 15mL)
- (25) パウダーフリー手袋
- (26) クリーンベンチ

3. 組み合わせて使用する医療機器

- (1) NextSeq 550Dxシステム
一般的名称：遺伝子解析装置
医療機器製造販売届出番号：13B1X10303000001
製造販売元：イルミナ株式会社
- (2) ヘムサイト解析プログラム
一般的名称：遺伝子変異解析プログラム (がんゲノムプロ

ファイリング検査用)

医療機器製造販売承認番号：30600BZX00190000

製造販売元：大塚製薬株式会社

4. 検体及び試薬の調製方法

- (1) DNAの抽出
DNAの抽出は、それぞれの由来検体に適した市販のDNA抽出キットを用いて行うこと。操作方法については、DNA抽出キットの取扱説明書をよく読んでから使用すること。
- (2) DNAの品質確認及び濃度調整
1) Qubit 4 Fluorometer 及びQubit dsDNA BR Assay Kitの取扱説明書に従い、DNA濃度を算出すること。
2) FFPE由来DNAの場合、Agilent 4200 TapeStation, 又は同等品の取扱説明書に従い、DIN値を算出する。又はAgilent NGS FFPE QC Kitを用いる場合、キットの取扱説明書に従い、 $\Delta \Delta Cq$ を算出すること。
3) TE Buffer (10mM Tris HCl, 0.1mM EDTA, pH8.0) を用い、DNAライブラリ調製に用いるDNAを希釈すること。
- (3) DNAからのDNAライブラリ調製時の試薬の調製
凍結試薬は、氷上で融解後、混合してから使用すること。また、1) ~6) は、サンプル数に応じ、比例計算で試薬量を変更すること。

1) Ligation Master Mix

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
D2-04	Ligation Buffer	23 µL
D2-03	T4 DNA Ligase	2 µL
	合計	25 µL

2) End-Repair-A Tailing Master Mix

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
D2-02	End-Repair-A Tailing Buffer	16 µL
D2-01	End-Repair-A Tailing Enzyme Mix	4 µL
	合計	20 µL

3) プレキャプチャPCR反応液

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
D2-09	5X Herculase II Reaction Buffer	10 µL
D2-07	100mM dNTP Mix	0.5 µL
D2-06	Forward Primer	2 µL
D2-08	Herculase II Fusion DNA Polymerase	1 µL
	合計	13.5 µL

4) SureSelect RNase Block 25%溶液

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
D5-03	SureSelect RNase Block	0.5 µL
-	スクレアーゼフリー水	1.5 µL
	合計	2 µL

5) Capture Hybridization Mix

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
4)	SureSelect RNase Block 25%溶液	2 µL
D1-01	Capture Library for DNA	2 µL
D5-02	SureSelect Fast Hybridization Buffer	6 µL
-	スクレアーゼフリー水	3 µL
	合計	13 µL

6) ポストキャプチャPCR反応液

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
D5-07	5X Herculase II Reaction Buffer	10 µL
D5-06	Herculase II Fusion DNA Polymerase	1 µL
D5-05	100mM dNTP Mix	0.5 µL
D5-04	SureSelect Post-Capture Primer Mix	1 µL
-	スクレアーゼフリー水	12.5 µL
	合計	25 µL

下記の試薬はそのまま用いること。

No.	構成試薬名
D2-05	Adaptor Oligo Mix
D3-01~D3-32	SureSelect XT HS Index Primer
D4-01	SureSelect Binding Buffer
D4-02	SureSelect Wash Buffer 1
D4-03	SureSelect Wash Buffer 2
D5-01	SureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mix

(4) RNAの抽出

RNAの抽出は、それぞれの腫瘍部に適した市販のRNA抽出キットを用いて行い、RNAは最終的にスクレアーゼフリー

取扱説明書を必ず参照すること

水へ溶解すること。操作方法については、RNA抽出キットの取扱説明書をよく読んでから使用すること。

- (5) RNAの品質確認及び濃度調整
Agilent 4200 TapeStation, 又は同等品の取扱説明書に従い、RNA濃度とDV₂₀₀を算出すること。
- (6) RNAからのDNAライブラリ調製時の試薬の調製
凍結試薬は、氷上で融解後、混合してから使用すること。また、1) ~8) はサンプル数に応じ、比例計算で試薬量を変更すること。

1) 120ng/μL Actinomycin D溶液

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
-	Actinomycin D (4 μg/μL in DMSO)	3 μL
-	ヌクレアーゼフリー水	97 μL
	合計	100 μL

2) First Strand Master Mix/Actinomycin D混合液

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
1)	120ng/μL Actinomycin D溶液	0.5 μL
R2-02	First Strand Master Mix	8.0 μL
	合計	8.5 μL

3) プレキャプチャPCR反応液

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
R2-08	PCR Master Mix	25 μL
R2-09	Uracil DNA Glycosylase (UDG)	1 μL
R2-11	SureSelect Primer	1 μL
R2-10	ILM Reverse PCR Primer	1 μL
	合計	28 μL

4) SureSelect Block Mix

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
R4-02	SureSelect Indexing Block #1	2.5 μL
R4-03	SureSelect Block #2	2.5 μL
R4-04	SureSelect Indexing Block #3	0.6 μL
	合計	5.6 μL

5) 10% RNase Block solution

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
R4-01	SureSelect RNase Block	0.5 μL
-	ヌクレアーゼフリー水	4.5 μL
	合計	5 μL

6) ハイブリダイゼーションバッファー

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
R3-01	SureSelect Hyb 1	6.63 μL
R3-02	SureSelect Hyb 2	0.27 μL
R4-05	SureSelect Hyb #3	2.65 μL
R3-03	SureSelect Hyb 4	3.45 μL
	合計	13 μL

7) Capture Library Hybridization Mix

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
6)	ハイブリダイゼーションバッファー	13 μL
5)	10% RNase Block solution	5 μL
R1-01	Capture Library for RNA	2 μL
	合計	20 μL

8) ポストキャプチャPCR反応液

No.	構成試薬名	試薬量/サンプル
R2-08	PCR Master Mix	25 μL
R2-12	ILM Post-capture PCR primer	1 μL
	合計	26 μL

下記の試薬はそのまま用いること。

No.	構成試薬名
R2-01	Fragmentation Mix
R2-03	Second Strand Enzyme Mix
R2-04	Second Strand Oligo Mix
R2-05	dA Tailing Master Mix
R2-06	SureSelect Ligation Master Mix
R2-07	SureSelect Oligo Adaptor Mix
R3-04	SureSelect Binding Buffer
R3-05	SureSelect Wash Buffer 1
R3-06	SureSelect Wash Buffer 2
R2-13	SureSelect XT Indexes, 8bp A01~H06

5. 測定操作

5.1 DNAからのDNAライブラリの調製

- (1) DNAからのDNAライブラリ調製に用いるDNA量
DNAライブラリ調製に供するDNA量は200ngとする。

(2) DNAの断片化

例示として、DNA ShearingシステムME220を用いたDNAの断片化方法を示す。DNAの断片化条件は、使用する機種ごとに設定する必要がある。

- 1) 50 μLのDNAをmicroTUBE AFA Fiber Crimp-Capに移し替える。
2) DNA ShearingシステムME220を用いて、DNAを下記条件で断片化する。

項目	設定
Duration (s)	285
Peak Power	75
Duty% Factor	25
Cycles/Burst	1000
Avg Power	18.75

- 3) microTUBE AFA Fiber Crimp-Cap内に残ったサンプルを可能な限り回収する。

- 4) Agilent 4200 TapeStation, 又は同等品を用い、断片化の確認を行う。

(3) 末端修復及びdA付加

- 1) 断片化DNAに20 μLのEnd Repair-A Tailing Master Mixを加え、混合する。
2) 末端修復とdA付加反応を下記の条件で行う。

ステップ	温度	時間
1	20°C	15分間
2	72°C	15分間
3	4°C	Hold

(4) アダプターライゲーション

- 1) 末端修復・dA付加反応後の各断片化DNA (約70 μL) に、Ligation Master Mixを25 μLずつ加え、混合する。
2) Adaptor Oligo Mixを5 μLずつ加え、混合する。
3) 下記の条件でライゲーション反応を行う。

ステップ	温度	時間
1	20°C	30分間
2	4°C	Hold

(5) Agencourt AMPure XPを用いたアダプター付きDNAライブラリの精製

Agencourt AMPure XPにより、アダプター付きDNAライブラリを精製する。

(6) アダプター付きDNAライブラリの増幅

- 1) 13.5 μLのプレキャプチャPCR反応液を、34.5 μLの精製DNAライブラリにそれぞれ加える。
2) 各反応液に、それぞれSureSelect XT HS Index Primerを2 μL加え、混合する。
3) 下記の条件でPCRを行い、増幅DNAライブラリを調製する。

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	98°C	2分間	1
2	98°C	30秒間	※
	60°C	30秒間	
	72°C	1分間	
3	72°C	5分間	1
4	4°C	Hold	1

※PCRサイクル数は、下記の表を基に決定すること

インプットDNAの品質	サイクル数
新鮮検体由来DNA	8
FFPE由来DNA	11

(7) Agencourt AMPure XPを用いた増幅DNAライブラリの精製
Agencourt AMPure XPにより、増幅DNAライブラリを精製する。

(8) 電気泳動による増幅DNAライブラリのサイズ確認
Agilent 4200 TapeStation, 又は同等品を用い、増幅DNAライブラリのサイズ確認と定量を行う。

(9) ハイブリダイゼーションとキャプチャ

- 500~1000ngの各増幅DNAライブラリを、最終容量12μLになるようにスクレアーゼフリー水を加える。各増幅DNAライブラリは500~1000ngの範囲内で、可能な限り多く量を使用すること。
- 各増幅DNAライブラリに、5μLのSureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mixを加える。
- 下記の条件で反応させる。

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	95°C	5分間	1
2	65°C	10分間	1
3	65°C	1分間	1
4	65°C	Hold	1
5	65°C	1分間	60
	37°C	3秒間	
6	65°C	Hold	1

- ステップ4のまま、65°Cに保温する。
 - 13μLのCapture Library Hybridization Mixを、増幅DNAライブラリとSureSelect XT HS and XT Low Input Blocker Mixの混合液にサーマルサイクラーにセットした状態のままに加え、混合する。
 - ステップ5でハイブリダイゼーション反応を行う。
- (10) ストレプトアビジン磁気ビーズの洗浄
SureSelect Binding Bufferを用いて、Dynabeads MyOne Streptavidin T1ビーズを洗浄する。
- (11) ストレプトアビジン磁気ビーズによるハイブリダイゼーションDNAのキャプチャ

- 洗浄済みDynabeads MyOne Streptavidin T1ビーズ200μLとハイブリダイゼーションDNAを混合し、室温にてプレートミキサーを用いて攪拌しながら30分間インキュベーションする。
- SureSelect Wash Buffer 1でハイブリダイゼーションDNAがキャプチャされたDynabeads MyOne Streptavidin T1ビーズを洗浄する。
- 70°Cに温めたSureSelect Wash Buffer 2でハイブリダイゼーションDNAがキャプチャされたDynabeads MyOne Streptavidin T1ビーズを6回洗浄する。
- 洗浄後のDynabeads MyOne Streptavidin T1ビーズを25μLのスクレアーゼフリー水で懸濁する。

(12) キャプチャDNAライブラリの増幅

- ポストキャプチャPCR反応液25μLを、Dynabeads MyOne Streptavidin T1ビーズに吸着したキャプチャDNAライブラリ25μLに加え、混合する。
- PCRを行う。条件は下記のとおりとする。

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	98°C	2分間	1
2	98°C	30秒間	12
	60°C	30秒間	
	72°C	1分間	
	72°C	5分間	
3	72°C	5分間	1
4	4°C	Hold	1

- PCRが完了し、サーマルサイクラーが4°Cのホールドステップに到達したら、サンプルを室温に移す。
 - 磁気スタンドにセットし、2分間静置する。
 - 上澄み液（約50μL）を回収する。
- (13) Agencourt AMPure XPを用いた増幅キャプチャDNAライブラリの精製
Agencourt AMPure XPにより、増幅キャプチャDNAライブラリを精製する。
- (14) 品質管理方法
Agilent 4200 TapeStation、又は同等品を用い、DNAライブラリのサイズ確認と定量を行う。

5.2 RNAからのDNAライブラリ調製

- (1) RNAからのDNAライブラリ調製に用いるRNA量
DNAライブラリ調製に供するRNA量は、新鮮検体由来RNAで100ng、FFPE由来RNAで200ngとする。また、新鮮検体由来RNAでDV₂₀₀が70%以上のもの、及びFFPE由来RNAでDV₂₀₀が20%以上のものをDNAライブラリ調製に供する。

(2) RNAの断片化

- 遠心濃縮装置を用い、RNAを45°C以下で完全に乾燥させる。
- 19μLのFragmentation Mixを加え、混合する。
- RNAの断片化を実施する。断片化条件は、下記の表に基づき決定する。

グレード	DV ₂₀₀
新鮮検体由来RNA	≥70%
FFPE由来RNA（高品質）	≥50%
FFPE由来RNA（低品質）	20%以上50%未満

a) 新鮮検体由来RNA

ステップ	温度	時間
1	94°C	8分間
2	4°C	1分間
3	4°C	Hold

b) FFPE由来RNA（高品質）

ステップ	温度	時間
1	94°C	3分間
2	65°C	2分間
3	4°C	1分間
4	4°C	Hold

c) FFPE由来RNA（低品質）

ステップ	温度	時間
1	65°C	5分間
2	4°C	1分間
3	4°C	Hold

(3) RNAからのDNAライブラリの調製

- 「(2) RNAの断片化」で行ったサーマルサイクログラムが4°Cホールドステップに到達後、サンプルを氷上に移す。
- First Strand Master Mix/Actinomycin D混合液8.5μLを断片化RNAに添加し、混合する。
- 下記の条件で反応させ一本鎖cDNA合成を行う。

ステップ	温度	時間
1	25°C	10分間
2	37°C	40分間
3	4°C	Hold

(4) Agencourt AMPure XPを用いた一本鎖cDNAの精製
Agencourt AMPure XPにより、一本鎖cDNAを精製する。

(5) 二本鎖cDNAの合成

- 25μLのSecond Strand Enzyme Mixを精製一本鎖cDNAに添加する。
- 5μLのSecond Strand Oligo Mixを加え、混合する。
- 下記の条件で二本鎖cDNA合成を行う。（リッドの加熱設定をOFFにする）

ステップ	温度	時間
1	16°C	1時間
2	4°C	Hold

(6) Agencourt AMPure XPを用いた二本鎖cDNAの精製
Agencourt AMPure XPにより、二本鎖cDNAを精製する。

(7) dA付加

- 20μLのdA Tailing Master Mixを各20μLの精製二本鎖cDNAに添加し、混合する。
- 下記の条件でdA付加反応を行う。（リッドの加熱設定をOFFにする）

ステップ	温度	時間
1	37°C	30分間
2	4°C	Hold

(8) アダプターライゲーション

- 5μLのSureSelect Ligation Master Mixを(7)で調製したdA付加済みcDNAに加え、混合する。
- 5μLのSureSelect Oligo Adapter Mixを加え、混合する。
- アダプターライゲーションを実施する。（リッドの加熱設定をOFFにする）

ステップ	温度	時間
1	20°C	15分間
2	4°C	Hold

取扱説明書を必ず参照すること

- (9) Agencourt AMPure XPを用いたアダプター付きDNAライブラリの精製
Agencourt AMPure XPにより、(8) で調製したアダプター付きDNAを精製する。

(10) アダプター付きDNAライブラリの増幅

- 1) 28 μ LのプレキャプチャPCR反応液を、22 μ Lのアダプター付きDNAライブラリに添加する。
2) 下記の条件でPCRを実施する。

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	37°C	15分間	1
2	95°C	2分間	1
3	95°C	30秒間	14
	65°C	30秒間	
	72°C	1分間	
4	72°C	5分間	1
5	4°C	Hold	1

- (11) Agencourt AMPure XPを用いた増幅DNAライブラリの精製
Agencourt AMPure XPにより、増幅DNAライブラリを精製する。
(12) 電気泳動による増幅DNAライブラリのサイズ確認と定量
Agilent 4200 TapeStation, 又は同等品を用い、増幅DNAライブラリのサイズ確認と定量を行う。
(13) ハイブリダイゼーションとキャプチャ

(a) ライブラリへのハイブリダイゼーション

- 1) 増幅DNAライブラリ濃度が58.8ng/ μ Lを超える場合は、増幅DNAライブラリ濃度を58.8ng/ μ Lとなるようにヌクレアーゼフリー水で希釈する。増幅DNAライブラリ濃度が58.8ng/ μ L未満の場合は、遠心濃縮装置を用いて45°C未満の条件で濃縮をする。
2) 3.4 μ Lのヌクレアーゼフリー水に溶解した増幅DNAライブラリに、5.6 μ LのSureSelect Block Mixを加え、ピペティングで混合する。
3) 95°Cにて5分間反応した後に、65°Cで5分間反応させる。
4) 反応後の増幅DNAライブラリを65°Cに保つ。
5) 20 μ LのCapture Library Hybridization Mixを添加し、混合する。
6) 65°Cにて、24時間加温する。

(b) ストレプトアビジン磁気ビーズの洗浄

SureSelect Binding Bufferを用いて、Dynabeads M-270 Streptavidinビーズを洗浄する。

(c) ストレプトアビジン磁気ビーズによるハイブリダイゼーションDNAのキャプチャ

- 1) 全量のハイブリダイゼーションDNAと200 μ Lの洗浄済みDynabeads M-270 Streptavidinビーズを混合する。
2) 室温にてプレートミキサーを用いて攪拌しながら、30分間インキュベーションする。
3) Dynabeads M-270 StreptavidinビーズをSureSelect Wash Buffer 1で洗浄する。
4) Dynabeads M-270 Streptavidinビーズを65°CのSureSelect Wash Buffer 2で3回洗浄する。
5) 洗浄後のDynabeads M-270 Streptavidinビーズを40 μ Lのヌクレアーゼフリー水で懸濁する。

(14) マルチプレックスシーケンエンスのためのキャプチャ後サンプル調製

(a) キャプチャライブラリの増幅とインデックスタグの付加

- 1) 26 μ LのポストキャプチャPCR反応液と5 μ Lのindexing primerを混合する。
2) 19 μ Lのキャプチャ後ストレプトアビジン磁気ビーズを上記の混合液へ添加し、混合する。
3) PCRを実施し増幅キャプチャDNAライブラリを作製する。

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	95°C	2分間	1
2	95°C	30秒間	12
	57°C	30秒間	
	72°C	1分間	
3	72°C	5分間	1
4	4°C	Hold	1

- (b) Agencourt AMPure XPを用いた増幅キャプチャDNAライブラリの精製

Agencourt AMPure XPにより、増幅キャプチャDNAライブラリを精製する。

(15) 品質管理方法

Agilent 4200 TapeStation, 又は同等品を用い、DNAライブラリのサイズ確認と定量を行う。

5.3 シークエンシング

1) DNAライブラリの濃度調整及びプール

各DNAライブラリの算出モル濃度に従い、同じモル数になるようプールを作製する。プールしたDNAライブラリはTE Buffer (10mM Tris, 0.1mM EDTA, pH8.0) を用いて1nMに希釈する。

2) DNAライブラリの変性及び中和

プールしたDNAライブラリを希釈し、変性を行う。その後Tris-HClを用いて中和を行う。

3) 変性DNAライブラリの希釈

変性済みのDNAライブラリをHT1 Bufferを用いて1.7pMに希釈する。

4) NextSeq 550Dxのセットアップ及びシーケンシング

NextSeq 550Dxの取扱説明書に従い、次世代シーケンサーのセットアップを行う。NextSeq 550DxはDXモードにて起動し、本品専用のローカルランマネージャーを選択してシーケンシングを実行し、FASTQファイルを取得する。

【測定結果の判定法】

本検査の測定結果は、本品を用いて調製したDNAライブラリを次世代シーケンサーにより測定後、得られたFASTQファイルを専用解析ソフトウェア（ヘムサイト解析プログラム）にて解析し得られる。遺伝子データの解析や品質評価に必要なバイオインフォマティクスに関する十分な知識を有する専門家の責任のもとで使用すること。また、出力された結果に対して専門家が再確認を行うなど、結果の取り扱いには注意すること。

【臨床的意義】

本遺伝子パネル検査システムにより検出されたSNV/Indel、構造異常、融合遺伝子の各遺伝子異常に対し、造血器腫瘍又は類縁疾患の包括的なゲノムプロファイリングを行う。

【性能】

本品の【用法・用量（操作方法）】に従い、管理試料DNA1、管理試料DNA2、管理試料DNA3及び管理試料RNAを用いてDNAライブラリ調製を行い、次世代シーケンサー及び専用解析ソフトウェアを用いて解析を実施したとき、以下の結果が得られることを確認した。

以下4種類の管理試料（人工構築検体）から、「5.測定操作」に従い、DNAライブラリ調製及びFASTQファイルの解析を行った。各管理試料は、以下の遺伝子異常を含む。

管理試料DNA1

遺伝子	遺伝子異常	Refseq No.
<i>ASXL1</i>	G646fsTer12	NM_015338
<i>BCOR</i>	Q1174fsTer8	NM_001123383
<i>GATA1</i>	Q119Ter	NM_002049
<i>GATA2</i>	G200fsTer18	NM_001145662
<i>KRAS</i>	G13D	NM_033360
<i>NRAS</i>	Q61L	NM_002524
<i>RUNX1</i>	M267I	NM_001754

管理試料DNA2は、管理試料DNA1上の対象とする遺伝子領域に各遺伝子異常が存在しないこと、及びIGH::MYC再構成が存在しないことが事前に確認されている試料である。

管理試料DNA3

遺伝子異常	位置（サイトバンド）
IGH::MYC再構成	14番染色体（14q32）及び8番染色体（8q24）

管理試料RNA

融合遺伝子
<i>BCR::ABL1</i>
<i>ETV6::ABL1</i>
<i>FIPL1::PDGFRA</i>
<i>MYST3 (KAT6A) ::CREBBP</i>
<i>PCMI::JAK2</i>
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>
<i>TCF3::PBX1</i>

各管理試料から調製したDNAライブラリが、下記 (1) に示す基準を満たすことを確認した。各管理試料から調製したDNAライブラリ及びそこから作成されたFASTQファイルを解析した結果が、下記 (2), (3), (4) に示す基準を満たすことを確認した。

(1) DNAライブラリ調製工程の適格性

管理試料DNA1, 管理試料DNA2, 管理試料DNA3 :

- ・プレキャプチャPCR後の増幅DNAライブラリ量 : 500ng以上
- ・DNAライブラリのフラグメント断片のピーク長 : 200~400bp

管理試料RNA :

- ・プレキャプチャPCR後の増幅DNAライブラリ量 : 200ng以上
- ・DNAライブラリのフラグメント断片のピーク長 : 200~350bp

(2) DNAライブラリの適格性

管理試料DNA1, 管理試料DNA2, 管理試料DNA3 :

- ・マップドリード数 : 1500万以上
- ・平均深度 : 400以上
- ・100×カバレッジ以上が読まれている塩基の割合 (100×カバレッジ比率) : 0.85以上
- ・PCR重複率 : 60%以下

管理試料RNA :

- ・マップドリード数 : 300万以上

(3) 正確性

管理試料DNA1, 管理試料DNA2, 管理試料DNA3 :

- ・管理試料DNA2から調製したDNAライブラリをマッチドコントロールに用いて、管理試料DNA1及び管理試料DNA3から調製したDNAライブラリを解析するとき、あらかじめ定めた遺伝子異常がすべて検出されること

管理試料RNA :

- ・管理試料RNAから調製したDNAライブラリを解析するとき、あらかじめ定めた7種類の遺伝子異常が6種類以上検出されること

(4) 同時再現性

管理試料DNA1, 管理試料DNA2, 管理試料DNA3 :

- ・同時に4回DNAライブラリ調製を行った際に、(3) 正確性の基準にすべて適合すること

管理試料RNA :

- ・同時に4回DNAライブラリ調製を行い、あらかじめ定めた7種類の遺伝子異常がそれぞれ3回以上検出されること。また、全評価対象ポイントのうち90%以上のポイントにおいて、あらかじめ定めた遺伝子異常が検出されること

(5) 最小検出感度

それぞれの遺伝子異常について、本品による測定を22回ずつ行い、Hit rateを確認した。Hit rateが95%以上となるVAFを最小検出感度 (LoD) とした。

- ・SNV/Indel : 管理試料DNA1に含まれるSNV/Indelから、VAF5%に設定されている14種類を評価対象とし、22回ずつ測定を行ったときのHit rateを算出した。Hit rateが95%に満たなかったものについては、VAFを上げた試料でHit rate 95%以上となる点を確認した。

最小検出感度 (SNV)

遺伝子	遺伝子異常	VAF	Hit rate % (検出数/試行数)
<i>ABL1</i>	T315I	5%	100% (22/22)
<i>ASXL1</i>	W796C	5%	100% (22/22)
<i>CBL</i>	S403F	5%	100% (22/22)
<i>DNMT3A</i>	R882C	5%	100% (22/22)

遺伝子	遺伝子異常	VAF	Hit rate % (検出数/試行数)
<i>EZH2</i>	R418Q	5%	95.5% (21/22)
<i>FLT3</i>	D835Y	5%	100% (22/22)
<i>IDH1</i>	R132C	5%	100% (22/22)
<i>IDH2</i>	R172K	5%	100% (22/22)
<i>JAK2</i>	V617F	7.5%	100% (22/22)
<i>SF3B1</i>	G740E	5%	100% (22/22)
<i>TET2</i>	R1261H	5%	100% (22/22)
<i>TP53</i>	S241F	5%	100% (22/22)

最小検出感度 (Indel)

遺伝子	遺伝子異常	VAF	Hit rate % (検出数/試行数)
<i>JAK2</i>	F537-K539>L	7.5%	100% (22/22)
<i>NPM1</i>	W288CfsTer12	10%	100% (22/22)

- ・構造異常 : 管理試料DNA3に含まれる構造異常を対象とし、理論値VAF5%に調製した試料から、22回ずつ測定を行ったときのHit rateを算出した。

再構成	VAF	Hit rate % (検出数/試行数)
<i>IGH::MYC</i>	5%	100% (22/22)

- ・融合遺伝子 : 管理試料RNAに含まれる7種類の融合遺伝子を対象とし、22回測定を行ったときのHit rateを算出した。

融合遺伝子	濃度 (copies/ μ L)	Hit rate % (検出数/試行数)
<i>BCR::ABL1</i>	1742	100% (22/22)
<i>ETV6::ABL1</i>	2533	100% (22/22)
<i>FIPL1::PDGFRA</i>	1645	100% (22/22)
<i>MYST3 (KAT6A) ::CREBBP</i>	1507	100% (22/22)
<i>PCMI::JAK2</i>	1960	100% (22/22)
<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	2373	100% (22/22)
<i>TCF3::PBX1</i>	1329	100% (22/22)

・Fast-track対象遺伝子異常

それぞれの遺伝子異常について、本品による測定を22回ずつ行い、Hit rateを確認した。Hit rateが95%に満たなかったものについては、VAFを上げた試料でHit rate 95%以上となる点を確認した。

遺伝子	遺伝子異常	VAF	Hit rate % (検出数/試行数)
<i>ABL1</i>	G250E	5%	100% (22/22)
<i>ABL1</i>	Y253H	5%	100% (22/22)
<i>ABL1</i>	E255K	5%	100% (22/22)
<i>ABL1</i>	V299L	5%	100% (22/22)
<i>ABL1</i>	T315I	5%	100% (22/22)
<i>ABL1</i>	F317L	5%	100% (22/22)
<i>ABL1</i>	F359V	5%	100% (22/22)
<i>BRAF</i>	V600E	5%	100% (22/22)
<i>CALR</i>	L367TfsTer46	5%	100% (22/22)
<i>CALR</i>	K385NfsTer47	5%	100% (22/22)
<i>CD79B</i>	Y196H	5%	100% (22/22)
<i>CSF3R</i>	T618I	5%	100% (22/22)
<i>EZH2</i>	Y646C	7.5%	100% (22/22)
<i>FLT3</i>	N676K	5%	100% (22/22)
<i>FLT3</i>	D835Y	5%	100% (22/22)
<i>IDH1</i>	R132C	5%	100% (22/22)
<i>IDH1</i>	R132H	5%	100% (22/22)
<i>IDH2</i>	R140Q	5%	100% (22/22)
<i>IDH2</i>	R172K	5%	100% (22/22)
<i>JAK2</i>	V617F	7.5%	100% (22/22)
<i>KIT</i>	D816V	7.5%	100% (22/22)
<i>KRAS</i>	G12A	5%	95.5% (21/22)
<i>KRAS</i>	G12C	5%	100% (22/22)
<i>KRAS</i>	G12D	5%	100% (22/22)
<i>KRAS</i>	G12R	5%	95.5% (21/22)
<i>KRAS</i>	G12S	5%	95.5% (21/22)
<i>KRAS</i>	G12V	5%	100% (22/22)
<i>KRAS</i>	G13C	5%	95.5% (21/22)
<i>KRAS</i>	G13D	5%	100% (22/22)
<i>KRAS</i>	Q61H	5%	100% (22/22)
<i>KRAS</i>	Q61L	5%	100% (22/22)
<i>KRAS</i>	Q61R	5%	100% (22/22)
<i>MPL</i>	W515L	5%	100% (22/22)
<i>MYD88</i>	L252P	5%	100% (22/22)

取扱説明書を必ず参照すること

遺伝子	遺伝子異常	VAF	Hit rate % (検出数/試行数)
<i>NPM1</i>	W288CfsTer12	10%	100% (22/22)
<i>NPM1</i>	W288LfsTer12	7.5%	95.5% (21/22)
<i>NRAS</i>	G12D	5%	100% (22/22)
<i>NRAS</i>	G12V	5%	100% (22/22)
<i>NRAS</i>	G13D	5%	100% (22/22)
<i>NRAS</i>	Q61H	5%	100% (22/22)
<i>NRAS</i>	Q61K	5%	100% (22/22)
<i>NRAS</i>	Q61L	5%	100% (22/22)
<i>NRAS</i>	Q61R	5%	100% (22/22)
<i>RHOA</i>	G17V	5%	100% (22/22)
<i>SF3B1</i>	R625C	7.5%	100% (22/22)
<i>SF3B1</i>	N626Y	5%	100% (22/22)
<i>SF3B1</i>	K666N	7.5%	100% (22/22)
<i>SF3B1</i>	K700E	5%	100% (22/22)
<i>STAT3</i>	Y640F	5%	100% (22/22)
<i>STAT3</i>	D661Y	5%	100% (22/22)

(6) 室内再現精度

- 3ロットの本品を用い、管理試料DNA1、管理試料DNA2、管理試料DNA3及び管理試料RNAそれぞれ4サンプルを用いて測定を実施したところ、いずれのロットでも(1)～(4)の基準を満たす結果が得られたことから、本検査は良好なロット間再現性を有することが示された。
- 3人の測定者により、管理試料DNA1、管理試料DNA2、管理試料DNA3及び管理試料RNAそれぞれ4サンプルを用いて測定を実施したところ、いずれの測定者でも(1)～(4)の基準を満たす結果が得られたことから、本検査は良好な測定者間再現性を有することが示された。
- 異なる3測定日において、管理試料DNA1、管理試料DNA2、管理試料DNA3及び管理試料RNAそれぞれ4サンプルを用いて測定を実施したところ、いずれの測定日においても(1)～(4)の基準を満たす結果が得られたことから、本検査は良好な測定日間再現性を有することが示された。

(7) 室間再現精度

- 本品を用いた測定を異なる2つの施設にて実施したところ、いずれの施設でも(1)～(4)の基準を満たす結果が得られたことから、本検査は良好な室間再現性を有することが示された。
- 本品を用いた測定を異なる3台の次世代シーケンサーで実施したところ、いずれの次世代シーケンサーを使用しても(1)～(4)の基準を満たす結果が得られたことから、本検査は良好な号機間再現性を有することが示された。

(8) 特異性

Capture Library for DNA :

- 管理試料DNA1、管理試料DNA2、及び管理試料DNA3を測定したデータのオンターゲット率を計算したとき、すべてのオンターゲット率が40%以上であることを確認した。
- 管理試料DNA1、管理試料DNA2、及び管理試料DNA3を測定したデータのカバレッジ均一性を計算したとき、すべてのカバレッジ均一性が80%以上であることを確認した。
- 管理試料DNA2を測定したデータの100×カバレッジ以上が読まれている塩基の割合を算出したとき、その値は0.93～0.94であった。

Capture Library for RNA :

- 評価対象とした279融合遺伝子のリードを含むFASTQファイルを解析したとき、すべての融合遺伝子が検出されることを確認した。
- Capture Library for RNAに含まれる各プローブの配列について、それぞれリファレンスゲノム配列に対して配列検索を行った結果、全体として91.39%のプローブで配列が同定された。

(9) 真度

造血器腫瘍患者の既存検体を用いた後方視的試験を実施した。3つの遺伝子異常タイプ (SNV/Indel, 融合遺伝子及び構造異常のうち再構成に対して、対照法を真値とした本検査

の陽性一致率、陰性一致率 (既承認品 (*FLT3*変異検査試薬, *JAK2* V617F変異検査試薬) との比較においては陽性一致率、陰性一致率、全体一致率) を算出した。登録症例数は臨床検体188例であった。

対照法を真値とした本検査の一致率 (陽性一致率, 陰性一致率)

	陽性一致率		陰性一致率	
	一致数/ 陽性数	一致率 [95%CI] ^{a)}	一致数/ 陰性数	一致率 [95%CI]
SNV/Indel				
全体	251/266	94.4% [90.9-96.8]	2,060/ 2,062	99.9% [99.6-100]
アンブリコンシーク エンス解析	231/246	93.9% [90.1-96.5]	2,001/ 2,003	99.9% [99.6-100]
<i>FLT3</i> 変異検査試薬 (計) ^{b)}	12/12	100% [73.5-100]	58/58	100% [93.8-100]
<i>FLT3</i> -ITD	8/8	100% [63.1-100]	27/27	100% [87.2-100]
<i>FLT3</i> -TKD	4/4	100% [39.8-100]	31/31	100% [88.8-100]
<i>JAK2</i> V617F 変異検査試薬	8/8	100% [63.1-100]	1/1	100% [2.5-100]
融合遺伝子				
白血病キメラ遺伝子 スクリーニング検査	52/52	100% [93.2-100]	1,508/ 1,508	100% [99.8-100]
構造異常				
全体	36/38	94.7% [82.3-99.4]	158/162	97.5% [93.8-99.3]
WGS解析 ^{c)}	32/34	94.1% [80.3-99.3]	158/161	98.1% [94.7-99.6]
FFPE-FISH検査	4/4	100% [39.8-100]	0/1	0.0% [0.0-97.5]

^{a)} 95%CI : 95%信頼区間

^{b)} *FLT3*変異検査試薬 (既承認品) が検出可能な変異を対象として評価した。

^{c)} WGS : Whole genome sequence 全ゲノムシーケンセス

対照法を真値とした本検査の一致率 (全体一致率)

	全体一致率	
	一致数/全体数	一致率 [95%CI]
<i>FLT3</i> 変異検査試薬 (計)	70/70	100% [94.9-100]
<i>FLT3</i> -ITD	35/35	100% [90.0-100]
<i>FLT3</i> -TKD	35/35	100% [90.0-100]
<i>JAK2</i> V617F変異検査試薬	9/9	100% [66.4-100]

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 検体及び試薬を取り扱うときには、ディスポーザブルのパウダーフリー手袋、マスク、実験着及び保護眼鏡を着けて操作し、試薬が皮膚、目及び粘膜等に触れないように注意すること。また、取扱い後は手をよく洗うこと。
- 検体は常に感染の危険性を伴うものとして取扱いには十分注意すること。また、検体に接触したチップ等の器具やそれらの残液及びその容器等も同様に扱うこと。
- 誤って試薬や反応液をこぼした場合は、保護具を着用し試薬や反応液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る。また、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、その後水拭きすること。

2. 使用上の注意

- 微生物や核酸分解酵素が混入しないよう操作すること。
- 汗や唾液に含まれる核酸分解酵素が少量でも検体や本品に混入すると、核酸が分解される可能性があるため、ディスポーザブルのパウダーフリー手袋及びマスクを着用すること。
- PCR前のサンプルを扱う場所とPCR後のサンプルを扱うエリアを分け、それぞれのエリアで専用の機器、消耗品、試薬を使用すること。特に、PCR増幅産物によるコンタミネーションを避けるため、PCR後のエリアで使用するものをPCR前の過程で使用することは避けること。
- 検体や試薬間のコンタミネーションを避けるため、検体や試薬類の分注にはフィルターチップを使用すること。

取扱説明書を必ず参照すること

- (5) コンタミネーションを避けるため、操作はコンタミネーション防止措置がとられた部屋又は紫外線照射装置の装備されたクリーンベンチ等で実施すること。また器具、クリーンベンチ内は次亜塩素酸ナトリウム溶液等の核酸のクロスコンタミネーションを防止する溶液による清掃を行うこと。
- (6) 定められた使用目的以外の用途に使用しないこと。
- (7) 使用期限切れの試薬は使用しないこと。
- (8) 製造番号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。

3. 廃棄上の注意

- (1) 検体及び試薬を取り扱う際に使用した器具類や残液は感染の危険があるものとし、オートクレーブで滅菌処理（121℃、20分）するか、又は次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1.0%以上）に1時間以上浸してから処理し、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等を区別して処理すること。
- (2) 試薬及び器具を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理すること。

4. その他の注意

- (1) 必ず、次世代シーケンサーはNextSeq 550Dxシステムを使用し、解析ソフトウェアはホームサイト解析プログラムを使用すること。
- (2) 本検査による包括的ゲノムプロファイリング検査の出力結果に基づく介入方針の決定においては、がんゲノム医療に精通した医師が、最新の医学知見に基づき、治療歴、他の関連する検査結果、臨床症状とあわせて、総合的に判断すること。
- (3) 本品で得られた結果は特定の医薬品に対する適応判定を目的としたものではない。
- (4) 本検査は、次世代シーケンサーから得られる遺伝子データの解析や品質評価に必要なバイオインフォマティクスに関する十分な知識を有する専門家の責任のもとで使用すること。また、出力された結果に対して専門家が再確認を行うなど、結果の取り扱いには注意すること。
- (5) 本検査を包括的ゲノムプロファイリング検査に使用する際は、本品の使用により、必ずしも治療選択肢が提示できるとは限らず、解析結果に基づく治療選択に限界があること、生殖細胞系列におけるバリエーションの二次的所見が見出される可能性等について、事前に患者又は代諾者に説明し、適切に文書で同意を取得すること。
- (6) 本検査はターゲットシーケンスの解析に基づき遺伝子異常を判定するため、その他の遺伝子学的検査と比較して、異なる結果を生じる可能性があることから、その特性を十分に理解したうえで使用すること。
- (7) 本検査の使用に際しては、個人情報保護に関する法令等に準い取り扱うべき情報があることに留意すること。
- (8) 解析ソフトウェアから出力された結果から、コンタミネーションの有無や検体の同一性の確認を行うことを推奨する。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

- (D1) DNA Capture Library : -70℃以下
- (D2) Library Prep Kit (Pre PCR) : -20℃以下
- (D3) Index Primers 1-32 (Pre PCR) : -20℃以下
- (D4) Hyb Module Box 1 (Post PCR) : 15~30℃
- (D5) Hyb Module Box 2 (Post PCR) : -20℃以下
- (R1) RNA Capture Library : -70℃以下
- (R2) RNA Library Prep Box1 : -20℃以下
- (R3) Target Enrichment Box 1 for RNA : 15~30℃
- (R4) Target Enrichment Box 2 for RNA : -20℃以下

2. 有効期間

製造日より24ヵ月

【包装単位】

- **D1** DNA Capture Library : 96テスト用
- **D4** Hyb Module Box 1 (Post PCR) : 96テスト用
- **D6** HemeSight DNA -20℃ set : 96テスト用
 - D2** Library Prep Kit (Pre PCR)
 - D3** Index Primers 1-32 (Pre PCR)
 - D5** Hyb Module Box 2 (Post PCR)
- **R1** RNA Capture Library : 96テスト用
- **R3** Target Enrichment Box 1 for RNA : 96テスト用
- **R5** HemeSight RNA -20℃ set : 96テスト用
 - R2** RNA Library Prep Box1
 - R4** Target Enrichment Box 2 for RNA

【問い合わせ先】

大塚製薬株式会社 医薬情報センター
〒108-8242 東京都港区港南2-16-4
品川グランドセントラルタワー
電話 0120-189-840 FAX 03-6717-1414

【製造販売元】

 **大塚製薬株式会社**
Otsuka 東京都千代田区神田司町2-9

【製造業者】

アジレント・テクノロジー株式会社（米国）
Agilent Technologies, Inc. (USA)