

体外診断用医薬品

**2021年3月作成（第5版）

*2020年4月作成（第4版）

製造販売承認番号22300AMX01256000

この添付文書をよく読んでから使用すること。

EGFR遺伝子変異検出キット
therascreen® EGFR 変異検出キット RGQ「キアゲン」

【一般的な注意】

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EGFR-TKI投与後は十分な経過観察を行なうこと。
4. HE染色した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*® EGFR 変異検出キット RGQ「キアゲン」のハンドブック及び、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) 600 µL ×2
Control Scorpion
Control リバースプライマー
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)
2. T790M Reaction Mix (T790M) (紫) 600 µL
T790M Scorpion
T790M ARMSプライマー
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)
3. Deletions Reaction Mix (Del) (橙) 600 µL
Deletions Scorpion
Deletions プライマー
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)
4. L858R Reaction Mix (L858R) (桃) 600 µL
L858R ARMS Scorpion
L858R リバースプライマー
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)

2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)

5. L861Q Reaction Mix (L861Q) (緑) 600 µL
L861Q Scorpion
L861Q ARMSプライマー
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)
6. G719X Reaction Mix (G719X) (黄) 600 µL
G719X Scorpion
G719X ARMSプライマー
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)
7. S768I Reaction Mix (S768I) (灰) 600 µL
S768I Scorpion
S768I ARMSプライマー
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)
8. Insertions Reaction Mix (Ins) (青) 600 µL
Insertions Scorpion
Insertions プライマー
2'-デオキシアデノシン-5'-三リン酸(dATP)
2'-デオキシシチジン-5'-三リン酸(dCTP)
2'-デオキシグアノシン-5'-三リン酸(dGTP)
2'-デオキシチミジン-5'-三リン酸(dTTP)
9. EGFR Positive Control (PC) (ベージュ) 300 µL
上記1～8の各オリゴヌクレオチドを含む
10. *Taq* DNA Polymerase (*Taq*) (ミント) 80 µL ×2
HotStar *Taq* DNA Polymerase
11. Nuclease-free Water for No Template Control (NTC) (白) 1.9 mL
12. Nuclease-free Water for Dilution (Dil) (白) 1.9 mL

【使用目的】

癌組織から抽出したDNA検体中のEGFR遺伝子変異の検出（ダコミチニブ水和物、ゲフィチニブ、エルロチニブ塩酸塩及びアファチニブマレイン酸塩の非小細胞肺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Scorpions®-ARMS法※を応用したリアルタイムPolymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて、EGFR遺伝子のエクソン18の3種類の変異（変異型は特定しない）、エクソン19の19種類のDeletion（変異型は特定しない）、エクソン20のT790M、S768I及び3種類のInsertion（変異型は特定しない）、エクソン21のL858R、L861Qの計29の変異型を検出する。

測定はコントロール試験とミューテーション試験の2ステップで行われ、まず増幅されたEGFRの全DNAが評価され、次に変異DNAの有無が検出される。

※ARMS (Amplification Refractory Mutation System)によって対立遺伝子または変異の増幅が選択的に行われScorpions®により蛍光として検出される。

本品の検出対象変異一覧

エクソン	変異	COSMIC ⁹⁾ ID	塩基変異
18	G719A	6239	2156G>C
	G719S	6252	2155G>A
	G719C	6253	2155G>T
19	Deletions	12384	2237 2255>T
		12387	2239 2258>CA
		12419	2238 2252>GCA
		12422	2238 2248>GC
		13551	2235 2252>AAT
		12678	2237 2251del15
		6218	2239 2247del9
		12728	2236 2253del18
		12367	2237 2254del18
		6210	2240 2251del12
		6220	2238 2255del18
		6223	2235 2249del15
		6225	2236 2250del15
		6254 ¹⁰⁾	2239 2253del15
		6255	2239 2256del18
20	S768I Insertions	12369 ¹⁰⁾	2240 2254del15
		12370	2240 2257del18
		12382	2239 2248TTAAGA GAAG>C
		12383	2239 2251>C
		6241	2303G>T
21	L858R L861Q	12376	2307_2308insGCCA GCGTG
		12378	2310 2311insGGT
		12377	2319 2320insCAC
		6240	2369C>T
22	L858R L861Q	6224	2573T>G
		6213	2582T>A

⁹⁾ COSMIC (Catalogue of somatic mutations in cancer) : <http://cancer.sanger.ac.uk/>

¹⁰⁾ COSMIC 6254 (2239_2253del15) および COSMIC12369 (2240_2254del15) の突然変異は、EGFR 配列から 15 塩基対の欠失をもたらす。同じ最終配列が両方の突然変異によって生成され、これらの突然変異は互いに区別がつかない。よって、突然変異 COSM6254 (2239_2253del15) は最新の COSMIC (v83) から削除され、両方の突然変異が COSM12369 (2240_2254del15) で表されるようになった。本品では、エクソン 19 の Deletions を区別せず全て「Deletions」とする。この変更は分類上の変更であり、キットや個々の突然変異を検出する能力には影響しない。

****【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、非小細胞肺癌 (NSCLC) 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 1 か月保存可能。

2. 検体の調製法

QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen 品番 56404、推奨品) のプロトコールに従って、FFPE組織よりDNA検体を抽出する。

- ・検体の抽出及び検体・陽性コントロールの保存は他の試薬と離して行い、別の場所で Reaction Mix に添加すること。

3. 妨害物質・妨害薬剤

測定検体の抽出工程において、本品の測定に影響する可能性のある下表の妨害物質について検討を行った結果、十倍濃度まで結果判定への影響は認められなかった。また、NSCLC のFFPE壊死組織の含量が最大50%まで陽性/陰性の判定に影響しなかった。

妨害物質
パラフィン
キシレン
エタノール (96-100%濃度)
Proteinase K

4. 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反応液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および陽性コントロールや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われなければならない。
- ・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。
 - ・正しい結果を得るため、操作方法に記載された各工程での攪拌操作を確実に実施すること。
 - ・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

全ての試薬を使用前に室温 (15~25℃) にて1時間~4.5時間静置して完全に融解したのち、穏やかに約10回回転混和し、遠心機でスピンドウンする。

- 1) 各 Reaction Mix (構成試薬1~8) 及び *Taq* DNA Polymerase を混和して、各マスターミックスを調製する。マスターミックスはDNA検体、Positive Control 及び Negative Control 用に加えピペッティングロスを見込み、余剰分として1反応分を加えた量を調製しておく。1 反応分のマスターミックスを調製する際の各 Reaction Mix 及び *Taq* DNA Polymerase の割合は表の通り。

マスターミックス

構成試薬	量
Reaction Mix	19.5 µL ×(n+1)
<i>Taq</i> DNA Polymerase (<i>Taq</i>)	0.5µL ×(n+1)
全量	20µL/ reaction

反応数 (n) は26を超えない (24 検体 + 2コントロール)

- ・各 Reaction Mix (構成試薬1~8) を初めにチューブにとり、次に *Taq* DNA Polymerase を加える。
- ・ *Taq* DNA Polymerase は使用前に室温 (15~25℃) でスピンドウンし、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。
- ・マスターミックスはゆっくり10回ピペッティングして混和する。
- ・ *Taq* DNA Polymerase、または、*Taq* DNA Polymerase を含む溶液(マスターミックス)のボルテックスでの混和は、*Taq* DNA Polymerase の酵素活性に影響するので避けること。
- ・各 Reaction Mix は、24 サンプルまで調製可能である。
- ・全サンプルを約10回回転混和し、スピンドウンする。
- ・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。試薬を放置する場合はPCRセットアップの時間を含めて室温で6時間、2~8℃で18時間までとする。
- ・各 Scorpions[®] は、適切な活性を維持するため光変性を避けて遮光する必要がある。
- ・測定は一度に実施するようにする。複数回に分けて測定すると測定可能な総検体数が少なくなる。

- 2) EGFR Positive Control
そのまま使用すること。

- 3) Nuclease-free Water for No template control (NTC)
そのまま使用すること。

- 4) Nuclease-free Water for Dilution (Dil)
そのまま使用すること。

2. 別途必要な器具・器材、試料等

- ゲノムDNA調製キット：QIAamp DNA FFPE Tissue Kit
(株キアゲン品番56404、推奨品)
- 遺伝子解析装置ロータージェンQ MDx 5plex HRM
(RGQ) (SW ver.2.3.5以降) 及び消耗品*
- 遠心分離機 (2 mLの反応チューブが使用できるもの)
- スピンドウン用マイクロ遠心機
- 専用のマイクロピペット及びチップ (チップはDNase、
RNaseおよびDNAフリー滅菌済の疎水性フィルター付きの
もの)
- 滅菌チューブとキャップ
- DNase、RNaseおよびDNAフリーのマイクロ遠心チューブ
(マスターミックスの調製に使用する)

*ロータージェンQ MDx 5plex HRM (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。DNA 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2~8℃で1週間、-15℃~-30℃なら8週間保存できる。検体は穏やかに約10回転倒混和し、遠心機でスピンドウンする。

本品は2ステップで試験を行う。最初のステップで検体中のDNAの質・量の評価を行い(コントロール試験)、次のステップにて変異の有無を検出する(ミュートーション試験)。

本品による各測定は、以下による。

・ Internal Control (反応評価)

本品の各 Reaction Mix にはそれぞれ Internal Control (IC) が含まれており、各反応においては標的 DNA の検出と同時に Internal Control の反応が行われる。これにより妨害物質によるPCRの阻害、キャリアオーバー及び測定のセットアップエラーを知ることができる。

・ Positive Control (チューブ1~8)

EGFR Positive Control (PC) を使用する。これにより本品の性能ならびに各 Reaction Mix が正しく調製されたかを知ることができる。

・ Negative Control (チューブ9~16)

Nuclease-free Water for No Template Control (NTC) を使用する。これにより各 Reaction Mix に DNA テンプレートや妨害物質の混入を知ることができる。

・ Control Reaction Mix (CTRL)

変異が報告されていないEGFR遺伝子エクソン2を増幅する反応で、この反応により検体中のDNA量を推定する。コントロール試験での使用が強く推奨される。

コントロール試験及びミュートーション試験の各 Scorpions®はFAM¹⁾で標識されており Internal Control 反応の HEX²⁾で標識された Scorpions®と識別されて測定される。

¹⁾ FAM : Carboxyfluorescein : 緑色蛍光色素

²⁾ HEX : Hexachlorofluorescein : 黄色蛍光色素

操作を開始する前に【全般的な注意】【使用上または取扱い上の注意】をよく読んでください。本品のハンドブックならびにロータージェンQ MDx 5plex HRM (RGQ) のユーザーマニュアルを参照し、取扱いを熟知した上で測定を開始してください。

1) 検体中のDNA評価試験(コントロール試験)

本品はあらかじめ定められた一定量のDNA検体を用いて反応を行った場合、その中に存在する変異型DNAを検出できるように設計されている。まず Control Reaction Mix (CTRL) を使用し、検体から抽出したDNA検体の Control Reaction のみで測定し、DNAの質と量を確認する。

- 「1. 試薬の調製方法」に従って、Control Reaction Mix (CTRL) を分注後に Taq DNA Polymerase を加えて混和し、マスターミックスを必要量調製する。
- 直ちに 0.1 mL strip tube (チューブ) にマスターミックスを 20 µL ずつ、必要な検体分を分注し、下表のようにレイアウトする。目視にて、全てのチューブにマスターミックスが分注されていることを確認する。

Reaction	Position							
Control	1[PC]	9	17	25	-	-	-	-
Control	2[NTC]	10	18	26	-	-	-	-
Control	3	11	19	-	-	-	-	-
Control	4	12	20	-	-	-	-	-
Control	5	13	21	-	-	-	-	-
Control	6	14	22	-	-	-	-	-
Control	7	15	23	-	-	-	-	-
Control	8	16	24	-	-	-	-	-

- 直ちにポジション2にNTC 5 µL を加え、キャップをする。ポジション3~26のチューブにDNA検体を5 µL ずつ加え、分注するごとにすぐにチューブにキャップをする。EGFR Positive Control (PC) 5 µL をポジション1のチューブに加えキャップをする。
- チューブをローターディスクにセットする。チューブのレイアウトが正しいこと、全チューブに溶液が均等に入っていることを目視確認し、全チューブを4回転倒混和する。その後RGQにセットする。ロータに空きがある場合は空チューブをセットして全てのポジションを埋める。
- ローターディスクにセットした各測定試料をすぐにRGQに搭載し、所定温度で所定時間インキュベーションしながら、470±10 nm の励起光から得られる510±5 nm における蛍光強度をそれぞれ測定する。操作の詳細については、本品ハンドブック、RGQ の添付文書及び取扱説明書を参照のこと。

2) 変異検出試験(ミュートーション試験)

1) のコントロール試験で適正なDNA量に調整された検体を用いて、EGFR 変異を検出する試験を行う。1検体につき、コントロール反応と7変異反応の計8反応を同時に行う。

- 「1. 試薬の調製方法」に従い、各 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。
- 直ちに 0.1 mL strip tube (チューブ) にマスターミックスを 20 µL ずつ必要な検体数分だけ分注し、下表のようにレイアウトする。目視にて、全てのチューブにサンプルが分注されていることを確認する。

Reaction	Position								
	Controls		Sample number						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
Control	1	9	17	25	33	41	49	57	65
T790M	2	10	18	26	34	42	50	58	66
Deletions	3	11	19	27	35	43	51	59	67
L858R	4	12	20	28	36	44	52	60	68
L861Q	5	13	21	29	37	45	53	61	69
G719X	6	14	22	30	38	46	54	62	70
S768I	7	15	23	31	39	47	55	63	71
Insertions	8	16	24	32	40	48	56	64	72

- 直ちにポジション9~16にNTC 5 µL を加え、キャップをする。マスターミックスを分注したポジション17~72のチューブにDNA検体を5 µL ずつ加える。分注するごとに、すぐにチューブにキャップをして混和する。続いて、EGFR Positive Control (PC) 5 µL を反応チューブのポジション1~8に分注する。
 - 各試薬を正しいチューブに間違えずに分注すること。
- チューブをローターディスクにセットする。全チューブにキャップをし、溶液が均等に入っていることを目視確認して4回転倒混和する。その後、遺伝子解析装置RGQにセットする。
 - 反応液の総量は25 µL となる。ポジションを間違えないこと。

・装置に入れる際は方向が分かるようにチューブの端をマークする。

- ⑤ ローターディスクにセットした各測定試料をすぐに RGQ に搭載し、所定温度で所定時間インキュベーションしながら、 470 ± 10 nm の励起光から得られる 510 ± 5 nm における蛍光強度をそれぞれ測定する。操作の詳細については、【操作方法の概略】の項、本品ハンドブック及び RGQ の添付文書及び取扱説明書を参照すること。結果については、【測定結果の判定法】を参照のこと。

** 【測定結果の判定法】

測定終了後、結果解析ならびに変異の判定が自動的に実施される。マニュアル解析を行う場合は本品ハンドブックの「結果解析（マニュアル）」のページを参照すること。

1. 結果の解析

本品は蛍光シグナルを測定し、PCR 反応による増幅で蛍光シグナルがバックグラウンドシグナル以上になるサイクル数を Ct (cycle threshold) 値とし、これを判定に利用する。Ct 値は 0~40 の実数で表され、検体中の DNA 量の指標となる。低い Ct 値は高濃度 DNA を示し、高い Ct 値は低濃度 DNA を示す。またそれぞれの蛍光シグナルの閾値は FAM (緑色) は 0.07、HEM (黄色) は 0.02 にセットされる。

本品のカットオフ値に使用される Δ Ct 値は、以下の計算式にて算出される。

Δ Ct = 各ミューテーション反応の Ct 値 (FAM) - コントロール反応の Ct 値 (エクソン 2, FAM)

本品の変異検出試験における各変異 Reaction の Ct 値の測定範囲およびカットオフ値 (Δ Ct 値) は、下表に記載のとおりとなる。

変異反応	Ct 値 (FAM)	カットオフ値レンジ* (Δ Ct 値)
T790M	0.00 - 40.00	-10.00 \geq , かつ, \leq 7.40
Deletions	0.00 - 40.00	-10.00 \geq , かつ, \leq 8.00
L858R	0.00 - 40.00	-10.00 \geq , かつ, \leq 8.90
L861Q	0.00 - 40.00	-10.00 \geq , かつ, \leq 8.90
G719X	0.00 - 40.00	-10.00 \geq , かつ, \leq 8.90
S768I	0.00 - 40.00	-10.00 \geq , かつ, \leq 8.90
Insertions	0.00 - 40.00	-10.00 \geq , かつ, \leq 8.00

* 本カットオフ値は NCCLS EP17-A(2004)に従い、合計 417 例の FFPE 検体の測定から得られた値である。

測定結果は Mutation Detected、No Mutation Detected、Invalid、Run Control Failed として報告される。複数の突然変異が含まれる場合は複数の Mutation が示される。

各アッセイの Δ Ct 値がカットオフの Δ Ct 値レンジ内の場合、その検体は突然変異陽性であり、このレンジ外の場合は陰性または本品の検出限界以下となり（本品の検出限界を下回る濃度では変異が存在する可能性がある）、No Mutation Detected と報告される。また、ミューテーション反応での増幅が行われなかった場合も No Mutation Detected と表示される。

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) DNA 評価試験の解析 (コントロール試験)
- | | | |
|------------------------|------------|---------------|
| Negative Control (NTC) | Ct 値 (FAM) | なし |
| Internal Control | Ct 値 (HEX) | 29.85 - 35.84 |

Positive Control (EGFR Positive Control)

	Ct 値 (FAM)
Control	28.13 - 34.59

Positive Control の Ct 値 (FAM) が 28.13 - 34.59、Internal Control (HEX) が 29.85 - 35.84 の範囲内の場合、解析は継続となる。

検体の Control Ct 値の範囲

	Ct 値 (FAM)
Control	23.70 - 31.10

Ct 値が 23.70 未満の場合は、DNA の濃度が高すぎるので Ct 値が規格の範囲内 (23.70~31.10) に収まるように同梱の水 (Dil) で検体の希釈を行うこと。一方、Ct 値が 31.10 より大きい場合、DNA 量が不足していることが考えられるので検体抽出を再度行うこと。

- 2) 変異検出試験の解析 (ミューテーション試験)

Negative Control (NTC)	Ct 値 (FAM)	なし
Internal Control	Ct 値 (HEX)	29.85 - 35.84

Positive Control (EGFR Positive Control)

	Positive Control の Ct 値 (FAM)
Control	28.13 - 34.59
T790M	30.22 - 34.98
Deletions	28.90 - 34.90
L858R	29.97 - 34.81
L861Q	28.49 - 34.02
G719X	29.42 - 34.19
S768I	28.98 - 35.19
Insertions	27.92 - 34.09

3) 結果解釈上の注意

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) 本品の測定は臨床検査ならびにRGQのトレーニングを受けた担当者が実施すること。
- (4) エクソン19の欠失測定では、エクソン19内の特定された19の欠失を検出するよう検証されているが、その他の追加的な変異（エクソン19の他の欠失や挿入、L747P変異を含む）も増幅される可能性があるため、これらの変異により「欠失検出」との結果が得られる可能性があることに注意すること。
- (5) L858Rの測定によりL858Q変異が検出される可能性があるため、L858Q変異が「L858R変異検出」という結果を引き起こす可能性があることに注意すること。

【臨床的意義】

EGFR遺伝子変異検出の臨床的意義としては、少なくとも NSCLCにおいて、EGFR遺伝子の変異検出によりEGFR-TKIの効果を予測できることが多くの臨床試験成績より示されている。「肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き（第3.05版）」等において、EGFR-TKI治療に先立ちEGFR遺伝子変異の測定を実施することが推奨されている。

- (1) アファチニブマレイン酸塩 臨床成績の概略
アファチニブと化学療法を一次治療とした国際共同多施設無作為化非盲検試験（第III相試験）がEGFR変異陽性の肺癌患者（ステージIIIBまたはIV）を対象として実施された。本臨床試験（CTA）の結果に基づき後方視的に無作為抽出された患者345人のうち264検体（アファチニブ投与178人、化学療法86人）が本品を用いて試験された。アファチニブ治療群は化学療法群に比較して無増悪生存期間（PFS）が有意に延長され（PFS中央値のアファチニブ治療群：化学療法群=11.2：6.9か月）、死亡や症状の進行が低下した（ハザード比[HR]=0.49, [95%信頼性区間(95%CI): 0.35, 0.69], $p < 0.0001$)。
- (2) ゲフィチニブ 臨床成績の概略
単一群非盲検のIFUM試験（Iressa follow up measures study：第VI相試験）によりEGFR変異陽性の局所進行または転移性NSCLCを有する白人患者（ステージIIIA/B/IV）の一次治療薬としてゲフィチニブの有効性および安全性が検討された。客観的な奏効率（ORR）はRECISTにて評価された。組入れ患者はEGFRエクソン19、L858R、L861Qに

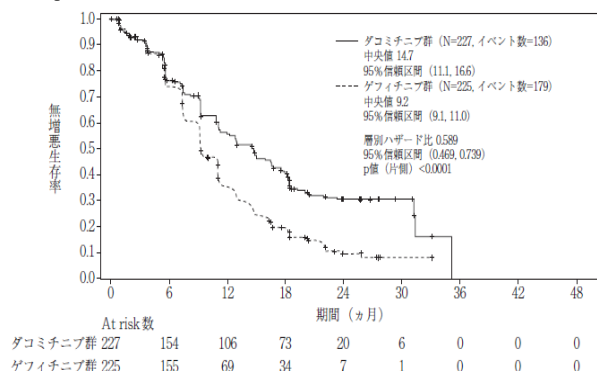
欠失があること、G719Xに置換があるか、T790MとS768Iに変異がないこと、エクソン20に挿入があることが後方視的にスクリーニングされた。この際の本品とCTAのエクソン19の欠損とL858R変異の検出における両アッセイの全体一致率は、98.2% (n = 700/713, [95% CI: 96.9%, 99.0%]) であり、陽性一致率 (PPA) は88.2% (n = 90/102, [95% CI: 80.4%, 93.8%]) で 陰性一致率 (NPA) は 99.8% (n = 610/611, [95% CI: 99.1%, 100.0%]) であった。スクリーニングした859検体の患者中106人が本剤による治療が有効で、うち765検体が後方視的に本品で測定された。主要評価項目であるORRは盲検下独立中央評価 (BICR) および治験担当医師により評価された。本品での試験群と全試験群で得られた結果は同等であり、本品のORR (95% CI) はBICRにおいて48.3% (38.1–58.6, n=42)、治験担当医師では71.3% (61.0–79.7, n=62) であった。本品はIFUM試験の組み入れに使用されなかったが追加の有効性解析が実施され、CTAで陰性の患者検体が本品で陽性となった患者ならびに本品で測定されずに組み入れられた患者も含めて評価され、全解析結果から本品は臨床試験の解析結果と同等であると評価された。

(3) ダコミチニブ水和物 臨床成績の概略

＜EGFR遺伝子変異を有する非小細胞肺癌患者を対象とした国際共同第Ⅲ相試験＞

化学療法歴のないEGFR遺伝子の活性型変異^{注1)} 陽性^{注2)} の切除不能な進行・再発の非小細胞肺癌^{注3)} 患者を対象に、ダコミチニブの有効性及び安全性をゲフィチニブと比較することを目的とした非盲検無作為化国際共同第Ⅲ相試験が実施された。452例 (日本人81例) を本剤群227例 (日本人40例) 及びゲフィチニブ群225例 (日本人41例) に無作為に割り付け、本剤45 mg又はゲフィチニブ250 mgを1日1回経口投与した。主要評価項目である独立画像中央判定委員会評価による無増悪生存期間の中央値は、本剤群で14.7ヵ月 (95% CI: 11.1, 16.6)、ゲフィチニブ群で9.2ヵ月 (95% CI: 9.1, 11.0) であり、ゲフィチニブ群に比べて本剤群で統計的に有意な無増悪生存期間の延長が認められた (HR=0.589, [95% CI: 0.469, 0.739], p<0.0001: 層別ログランク検定) (2016年7月29日データカットオフ)。

独立画像中央判定委員会評価による無増悪生存期間のKaplan-Meier曲線 (ITT集団)



注1) EGFR遺伝子の活性型変異であるエクソン19の欠失 (Ex19del) 又はエクソン21の変異 (L858R) が腫瘍組織検体で確認された患者が組み入れられた。

注2) *therascreen*[®] EGFR変異検出キットRGQ「キアゲン」等が使用された。

注3) 非小細胞肺癌のうち、腺癌又は腺癌の特殊型の組織型の癌が確認された患者が組み入れられた。また、脳転移のある患者は除外された。

本品による本剤の治療効果予測は、HR=0.54 (95% CI: 0.42, 0.68)、p<0.0001であり、この結果は第Ⅲ相試験の解析結果と同様であり、不一致データや得られなかったデータの影響を考慮した感度分析の結果からもPFSは一貫性のある結果を示し、有病群および悪性転化群の鑑別においても確実な結果を示した。

EGFR変異陽性患者のCTAと本品間での本品を基準とした一致率 (PPA, NPA, OPA) は両側Clopper-Pearson正確

95%信頼性区間 (95% CI) において、PPA: 99.7% (95% CI: 98.3%, 100.0%)、NPA: 84.2% (95% CI: 74.4%, 91.3%)、OPA: 96.5% (95% CI: 94.2%, 98.1%) であり、PPAが99%を超える非常に高い一致率を示した。また、CTAを基準として同様に分析した結果は、PPA: 96.1% (95% CI: 93.4%, 97.9%)、NPA: 98.6% (95% CI: 92.3%, 100.0%)、OPA: 96.5% (95% CI: 94.2%, 98.1%) であり、本品との一致率はPPAとNPAともに95%を超えた。CTAと本品間での不一致例は14例あり、うち13例はCTA陽性で試験に組み込まれた。1例はCTA陰性で本品陽性であった。

402例の臨床検体を用いた本品及びCTAによる全体一致率は、96.5% (388/402) であった。

		CTA		
		陽性	陰性	総数
本品	陽性 (変異あり)	319	1	320
	陰性 (変異なし)	13	69	82
	総数	332	70	402
全体一致率: 96.52% (388/402)				
陽性一致率: 96.08% (319/332)				
陰性一致率: 98.57% (69/70)				

【性能】

1. 性能試験

陽性コントロール (Positive Control) 及び陰性コントロール (Negative Control) を用い、各コントロール Ct 値を1重測定し、Ct 値がそれぞれ以下の規格の範囲内であることを確認する。

1) 陽性コントロール (Positive Control) の Ct 値 (FAM)

- ①Control 反応: 28.38–34.34
- ②T790M 変異反応: 30.47–34.73
- ③Deletions 変異反応: 29.15–34.65
- ④L858R 変異反応: 30.22–34.56
- ⑤L861Q 変異反応: 28.74–33.77
- ⑥G719X 変異反応: 29.67–33.94
- ⑦S768I 変異反応: 29.23–34.94
- ⑧Insertions 変異反応: 28.17–33.84

2) 陰性コントロール (Negative Control) の Ct 値 (HEX)

8つ全ての反応: 29.85–35.84

管理用物質

陰性コントロール (Negative Control) は「Nuclease-free water for No Template Control」 (精製水) である。陽性コントロール (Positive Control) は「EGFR Positive Control」であり、各変異を含む領域及びエクソン2の特定領域に対応する合成オリゴヌクレオチド等からなる。

- (1) 「EGFR Positive Control」の主要成分はEGFR遺伝子の各変異に関わる7種類の合成オリゴヌクレオチド及びコントロールとしてエクソン2に関わる合成オリゴヌクレオチドである。7種類の変異合成ヌクレオチドは、T790M、L858R、L861Q、S768Iにそれぞれ対応する変異を含む塩基配列である。G719Xについては3種類の変異からG719Aを代表させ、また、19種類のDeletion及び3種類のInsertionについてはそれを代表する1変異のみ(それぞれ6223及び12378)に対応する各塩基配列からなる。
- (2) 本品では全てのReaction Mixに既知量のInternal Control用合成オリゴヌクレオチド、Internal Control用リバープライマー及びInternal Control用Scorpions[®]が含まれている。各PCR反応では検体中の標的DNAと同時にこのInternal Control用合成オリゴヌクレオチドが増幅・検出され、反応阻害等をチェックしている。

2. 最小検出感度

最小検出感度試験

FFPE臨床検体、FFPE臨床検体にプラスミドDNAを添加した模擬検体を用いて、本品による測定を行い、95%の確率で陽性として検出される陽性検体の最小濃度%を用いて最小検出感度（LOD）を算出した。本品で測定可能な29変異についての結果は、次表に示すとおりである。各LODはロジスティック回帰により算出した。

エクソン	変異	COSMIC ID	塩基変異	LOD (% mutant)
18	G719A	6239	2156G>C	7.41 [†]
	G719S	6252	2155G>A	5.08 [‡]
	G719C	6253	2155G>T	10.30 [‡]
19	Deletions	12384	2237_2255>T	1.58 [§]
		12387	2239_2258>CA	4.91 [†]
		12419	2238_2252>GCA	16.87 [†]
		12422	2238_2248>GC	3.24 [†]
		13551	2235_2252>AAT	4.24 [†]
		12678	2237_2251del15	0.55 [§]
		6218	2239_2247del9	8.47 [†]
		12728	2236_2253del18	2.43 [†]
		12367	2237_2254del18	2.72 [†]
		6210	2240_2251del12	4.09 [†]
		6220	2238_2255del18	2.70 [†]
		6223	2235_2249del15	6.40 [†]
		6225	2236_2250del15	2.80 [†]
		6254	2239_2253del15	0.86 [§]
		6255	2239_2256del18	0.14 [§]
		12369	2240_2254del15	4.94 [§]
		12370	2240_2257del18	8.10 [§]
		12382	2239_2248TTAAGAGAAG>C	0.25 [§]
		12383	2239_2251>C	4.58 [§]
20	S768I	6241	2303G>T	7.66 [†]
	Insertions	12376	2307_2308insGCCAGC GTG	11.61 [†]
		12378	2310_2311insGGT	4.91 [†]
		12377	2319_2320insCAC	2.40 [†]
	T790M	6240	2369C>T	9.72 [†]
21	L858R	6224	2573T>G	5.94 [†]
	L861Q	6213	2582T>A	2.22 [†]

各LODの評価は、[†]細胞株、[‡]プラスミド、[§]臨床検体に実施された。

3. 交差反応性

潜在的な交差反応性を評価するため、DNA高濃度のFFPE細胞株を用いて全反応を試験した結果、変異反応間の交差反応性は認められなかった。最小 Δ Ct値は、各反応液およびDNA検体の全てにおいて各カットオフ値より高かった。

4. 正確性（参照法との比較）

本品とサンガー法を用いてFFPE360検体を試験し、変異の検出結果を比較した。両測定法間の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率は下表のとおりであった。28例の乖離については1例が本品陰性でサンガー法陽性であり、27例が本品陽性でサンガー法陰性であった。

	一致率 % (N)	95% CI
陽性一致率	99.4% (157/158)	96.5%–100.0%
陰性一致率	86.6% (175/202)	81.2%–91.0%

全体一致率	92.2% (332/360)	89.0%–94.8%
-------	-----------------	-------------

360例の臨床検体を用いた、本品及びサンガー法による全体一致率は、92.2%（332/360）であった。

5. 精度と再現性

NSCLCのFFPE組織およびFFPE細胞株、さらに野生型FFPE組織から抽出したDNAを用いて本品の精度と再現性を試験した。本試験は3施設にて各施設2台の機器を使用し、測定者2人によって本品3ロット用いて実施された。また、LODに近い濃度の各検体を16日にわたって非連続的に二重測定した。測定した全変異の総変動係数（CV）は14.11%以下であった。ロット間ならびに日差、測定間のCVは8.33%以下であり、同時再現性は5.99～13.49%であった。

6. 相関性試験

192例の臨床検体を用いた本品と既存品（前世代品）との全体一致率は、97.40%（187/192）であった。

		既存品		
		陽性	陰性	総数
本法	陽性（変異あり）	100	3	103
	陰性（変異なし）	2	87	89
	総数	102	90	192
全体一致率：97.40%（187/192）				
陽性一致率：97.09%（100/103）				
陰性一致率：97.75%（87/89）				

*【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

- 全ての試薬及び検体は感染の危険があるので感染性のあるものとして取り扱うこと。また検体は、HBV、HIV、HCV等の感染の恐れがあるものとして取り扱うこと。
- 検査にあたっては感染の危険を避けるため、白衣、使い捨て手袋、保護メガネを着用すること。
- ピペットは口で吸わないこと。
- 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。
- 試薬をこぼした場合は水で希釈してから拭きとること。
- 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。
- 検体及び本品を取り扱う場所では飲食または喫煙を避けること。
- 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をするか、次亜塩素酸剤（有効塩素濃度5000 ppm, 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。

2. 使用上の注意

- 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。
- 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。
- 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。
- 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。また、有効期間内でも、開封後は－30℃～－15℃で最長12ヶ月間まで保管可能であることに注意すること。
- 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または残った試薬を混ぜ合わせて使用しないこと。
- 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。
- 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入力が必要で反応数が減る可能性がある

- ある。
- 8) 全ての試薬は1～4.5時間常温（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) 本品は凍結融解を避けること。全ての試薬において8回を越えての凍結・融解を繰り返さないこと。
 - 10) 全ての試薬は保存また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) 全ての試薬は開封または分注時に微生物による汚染を避けること。
 - 12) Positive Control、検体は他の試薬とは離して保管および抽出し、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5000 ppm, 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、ロータージェン Q MDx 5plex HRM (RGQ) の添付文書及び取扱説明書を参照すること。

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また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、医療廃棄物また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、有効塩素濃度5000 ppm, 0.5%になるように混和後、一晚放置するなど、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5000 ppm, 0.5%）に一晚浸すなどによりDNAを破壊してから焼却処理また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：24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
874151	therascreen® EGFR 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) 肺癌患者におけるEGFR遺伝子変異検査の手引き第3.05版（2016年） 日本肺癌学会
- 2) Pao, W. and Miller, V.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. J. Clin. Oncol. 23, 2556.

- 3) Johnson, B.E. and Jaenne, P.A. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Res. 65, 7525.
- 4) Inoue, A., et al. (2006) Prospective Phase II study of gefitinib for chemotherapy-naïve patients with advanced non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor gene mutations. J. Clin. Oncol. 24, 3340.
- 5) Asahina, H., et al. (2006) A Phase II study of gefitinib as a first-line therapy for advanced non-small cell lung cancers with epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations. 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. J. Clin. Oncol. 24 (18S) (Suppl), Abstr 13014.
- 6) Paz-Ares, L. et al. A prospective phase II trial of erlotinib in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (p) with mutations in the tyrosine kinase (TK) domain of the epidermal growth factor receptor (EGFR). 42nd Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Atlanta 2 6 June 2006. J. Clin. Oncol. 24 (18S) (Suppl), Abstr 7020.
- 7) Kobayashi, K., et al. (2008) First-line gefitinib for poor PS patients with EGFR mutations. 44th Ann Mtg of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago 31 May 3 June 2008. J. Clin. Oncol. 26 (15S) (Suppl), Abstr 8070.
- 8) Sequist, L.V., et al. (2008) First-line gefitinib in patients with advanced non-small cell lung cancer harbouring somatic EGFR mutations. J. Clin. Oncol. 15, 2442.
- 9) Porta, R. et al. (2008) Erlotinib customization based on epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in stage IV non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients (p). J. Clin. Oncol. 26 (May 20 suppl), abstr 8038.
- 10) Jaene, P.A. and Johnson, B.E. (2006) Effect of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain mutations on the outcome of patients with non-small cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. Clin. Cancer Res. 12, 4416s.
- 11) Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nature Biotech. 17, 804.
- 12) Thelwell, N. et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. Nucleic Acids Res. 28, 3752.
- 13) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation: Approved Guideline, 1st ed. CLSI Document EP-17A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
- 14) ファイザー株式会社社内資料：国際共同第Ⅲ相試験（非小細胞肺癌）

【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及び住所】

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

