

この電子化された添付文書をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品

*2024年9月改訂(第2版)

2021年5月作成(第1版)

製造販売承認番号:30300EZ00042000

EZH2 遺伝子変異検出キット

コバス EZH2 変異検出キット

【一般的な注意】

- 本品は体外診断用であり、がん組織から抽出した DNA を用いたタゼトスタット臭化水素酸塩投与前の濾胞性リンパ腫の検査以外の目的には使用しないでください。
- 本品をタゼトスタット臭化水素酸塩の適応を判定するための補助として用いる場合には、当該薬剤の本邦における最新の電子化された添付文書を参照のうえ使用してください。
- 本検査の被験者に対し、検査の目的・方法及び精度、特に不可避な偽陽性・偽陰性を含む診断限界などについて正確な情報を伝えてください。
- 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状やほかの検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
- 電子化された添付文書に記載された使用目的及び用法・用量に従って使用してください。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねます。
- 使用する機器の電子化された添付文書及び取扱説明書をよく読み、記載に従って使用してください。
- 本品は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FPPE)組織を試料として使用する場合、検査に用いられた DNA の 5%以上に遺伝子変異が含まれる場合に陽性と判定されるように設計された診断薬であり、性能には限界があります。*本数値は、野生型と変異型の FPPE 組織検体より抽出した DNA を用いて検証された数値です。
- FPPE 組織を試料として使用する場合、HE 染色した標本を用い、腫瘍細胞が標本にじゅうぶんに含まれていることを確認してください。なお、FPPE 組織中の腫瘍の割合が 15%未満の場合は、ティッシュダイセクションを行い、腫瘍の割合を高めた後 DNA 抽出を行ってください。

【形状・構造等(キットの構成)】

コバス EZH2 変異検出キット

1. コバス EZH2 変異検出キット マスターミックス 1

*[EZH2 MMX-1]

プライマー EZH2_Y646N_R3

プライマー EZH2_EX16_cFWD

プライマー EZ_A692V_R1F2

プライマー EZ_A692V_CFWD

蛍光標識 DNA プローブ EZEX16_CPRB3

蛍光標識 DNA プローブ EZ_A692V_R1F1

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'-デオキシウリジン-5'-三リン酸(dUTP)

Z05-AS1 DNA ポリメラーゼ

2. コバス EZH2 変異検出キット マスターミックス 2

*[EZH2 MMX-2]

プライマー EZH2_Y646F_R6

プライマー EZH2_EX16_cFWD

プライマー EZH2_A682G_R7

プライマー EZ_A682G_CFWD

蛍光標識 DNA プローブ EZEX16_CPRB3

蛍光標識 DNA プローブ EZ_A682G_R1F9

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'-デオキシウリジン-5'-三リン酸(dUTP)

Z05-AS1 DNA ポリメラーゼ

3. コバス EZH2 変異検出キット マスターミックス 3

*[EZH2 MMX-3]

プライマー EZH2_Y646H_R8

プライマー EZH2_Y646S_R2

プライマー EZH2_Y646CR2_2

プライマー EZH2_EX16_cFWD

蛍光標識 DNA プローブ EZEX16_CPRB3

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'-デオキシウリジン-5'-三リン酸(dUTP)

Z05-AS1 DNA ポリメラーゼ

4. コバス EZH2 変異検出キット 酢酸マグネシウム試薬

*[MGAC]

酢酸マグネシウム

5. コバス EZH2 変異検出キット 変異コントロール

*[EZH2 MC]

変異型 DNA 塩基配列含有プラスミド DNA

6. コバス EZH2 変異検出キット 希釈液

*[DNA SD]

トリス緩衝液

【使用目的】

がん組織から抽出したゲノム DNA 中の EZH2 遺伝子変異の検出(タゼトスタット臭化水素酸塩の濾胞性リンパ腫患者への適応を判定するための補助に用いる)

【測定原理】

- 本キットはリアルタイム PCR 法を用いて生体由来のホルマリン固定パラフィン包埋(FPPE)組織から抽出したゲノム DNA 中の EZH2 遺伝子のエクソン 16 及び 18 中の変異を検出します。EZH2 変異検出試験は次の 2 つの主なプロセスに基づきます。
 - FPPE 組織からゲノム DNA の抽出。
 - プライマー及び蛍光標識したオリゴヌクレオチド・プローブを使用したターゲット DNA の PCR 増幅及び検出。
 本品の検出対象変異一覧

エクソン	変異 ID	アミノ酸変化	COSMIC ID
16	1936 T>A	Y646N	37031
16	1936 T>C	Y646H	37030
16	1937 A>T	Y646F	37028
16	1937 A>C	Y646S	37029
16	1937 A>G	Y646C	37032
18	2045 C>G	A682G	220386
18	2075 C>T	A692V	220529

2. キャリーオーバーコンタミネーションの防止

本キットでは、以下の方法により増幅された DNA 産物のキャリーオーバーコンタミネーションによる誤測定を最小限に抑制しています。

DNA 合成に必要な基質の一つである dTTP の代わりに dUTP を用いて増幅反応を行うため、増幅された DNA の塩基配列はチミン(T)がウラシル(U)に全て置き換わっています。また、この系で増幅された DNA が新たに試験する試料中へ混入した場合、マスターミックスに含まれているウラシル N-グリコシラーゼ(UNG)が作用し DNA 中の U 塩基は除去されます。塩基を失った DNA は構造上極めて不安定な分子であり、増幅反応の最初の加熱によりリン酸結合が切断され、新たな増幅の鋳型とはなり得ません。UNG は高温で失活するため、それ以後に増幅されてくる U 塩基を含

増幅 DNA は影響を受けません。また、UNG は 6 塩基以上の DNA 上のウラシルのみに反応し、モノマーの dUTP や RNA 上のウラシルには作用しません¹⁾。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法

- 本キットの測定検体には FFPE 組織を用いてください。核酸の抽出にはコバス DNA プレパレーションキット(FFPE)(別売品)をご使用ください。
- マスターミックスへの検体 DNA のコンタミネーションを防止するために、増幅と検出は DNA 抽出とは異なるエリアで行ってください。
- 増幅と検出するエリアは、マスターミックスの調製を行う前に清潔にしてください。清潔環境を保つには、操作デスク、ラックやピペットなどを 0.5%の次亜塩素酸ナトリウムで拭いた後、70%エタノールで拭いてください。

2. 検体の調製法

- * DNA 抽出操作は、電子化された添付文書に従ってください。
- FFPE 組織は、室温(15~30℃)で保存したとき FFPE 組織作成後 12 ヶ月以内、薄切後 60 日以内のものを使用してください。
- 薄切切片はスライドグラスにマウントしてください。
- 薄切した切片のうち 1 枚は、HE 染色を行ってください。染色標本は検鏡を行い、腫瘍細胞の範囲をマーキングすることにより、腫瘍細胞と正常細胞のおおまかな面積の割合を確認してください。この作業は、腫瘍の割合が 15%未満の場合、ティシューダイセクションする際に重要になってきます。
- DNA 抽出には、5 μm に薄切した FFPE 組織で、少なくとも腫瘍の割合が 15%以上の切片を用いてください。腫瘍の割合が 15%未満の場合は、ティシューダイセクションを行い、腫瘍の割合を高めた後 DNA 抽出を行う必要があります。
- クロスコンタミネーションにじゅうぶん注意し、エアロゾルの飛散や手袋の汚染などを避ける特別の注意を払ってください。複数の検体を扱う場合でもスクリュウキャップチューブのキャップ開閉は検体ごとに行ってください。また、検体ごとに新しいチップを使用してください。

(1) コバス DNA プレパレーションキット(FFPE)を用いた核酸抽出

キット内の各試薬は【用法・用量(操作方法)】の項、「2.別途必要な器具・器材・試薬等」を参照してください。

*また、試薬及び操作の詳細は電子化された添付文書を参照してください。

1) コバス DNA プレパレーションキットの各試薬調製

注意) 試薬の中に沈殿が認められる場合は、37℃のウォーターバスで溶けるまで温めてください。沈殿がすべて溶けるまで使用しないでください。

PK: 4.5 mL のヌクレアーゼフリーの滅菌水に溶解して、5~10 回転倒混和をしてください。溶解後は、450 μL ずつ分注して-20℃で保管してください。凍結融解後は使い切って、再凍結はしないでください。PK は-20℃で 90 日間安定です。

DNA Wash Buffer I (WB I): 15 mL の特級エタノールを加え、5~10 回、転倒混和することにより調製してください。

DNA Wash Buffer II (WB II): 50 mL の特級エタノールを加え、5~10 回、転倒混和することにより調製してください。

2) 脱パラフィン操作

- a. 検体数に応じて、50 mL 遠沈管に 40 mL ずつキシレン、特級エタノールを分注しておきます。
- b. キシレンが 40 mL 入った 50 mL 遠沈管にスライドグラスを入れ、5 分間浸します。この 40 mL でスライド 2 枚まで処理可能です。2 枚のスライドを遠沈管に入れる際は、背合わせに入れます。処理後のキシレンは廃棄します。
- c. 特級エタノールが 40 mL 入った 50 mL 遠沈管に

キシレン処理したスライドを入れ、5 分間浸します。この 40 mL でスライド 2 枚まで処理可能です。2 枚のスライドを遠沈管に入れる際は、背合わせに入れます。処理後の特級エタノールは廃棄します。

- d. スライドグラスを取り出し、5~10 分完全に風乾します。

この間に、1.5 mL チューブ※1 を検体分準備します。チューブに 180 μL の DNA TLB と 70 μL の PK(Proteinase K)を混和します(DNA TLB-PK mixture)。検体が複数の場合は、あらかじめ混合液を作成した後、分注してください。

※1 Safe-Lock microcentrifuge tube を使用してください。

- e. 風乾した組織をカミソリで剥ぎ取ります。その組織を DNA TLB-PK 混合液で湿らせたチップでピックアップし、1.5 mL チューブに入れます。カミソリとチップは、検体ごとに新しいものを使用してください。

HE 染色から確認された腫瘍組織の割合が 15%未満の場合、腫瘍部分をティシューダイセクションし、腫瘍の割合を高めてから以下の操作を続けてください。

3) DNA 抽出操作

- a. DNA TLB-PK 混合液及び陰性コントロール(NEG CT)をボルテックスで 30 秒間攪拌してください(NEG CT は PK 70 μL と DNA TLB 180 μL を加えて作成します)。

- b. 56℃ドライヒートブロックで 60 分間インキュベートします。

- c. インキュベーション後、ボルテックスで 10 秒間攪拌してください。

- d. 90℃ドライヒートブロックで 60 分間インキュベートします。

インキュベーションの間に必要な FT(Filter tubes with caps)を準備します。

1 検体ごとに FT1 本、CT(Collection tube)3 本、溶出用の 1.5 mL チューブ 1 本を準備します(1.5 mL のチューブはキットに含まれていません)。

- e. 反応後、チューブをブロックから取り出し、室温に戻します。

- f. スピンドウ後、200 μL の DNA Paraffin Binding Buffer(DNA PBB)を加え 3 回のピペッティングで均一に混和し、室温で 10 分間放置します。

- g. 100 μL のイソプロパノールを加え、3 回のピペッティングで混和します。

- h. 全ての反応液(~550 μL)を FT に移します。

- i. 8,000 g で 1 分間遠心します。

- j. FT を新しい CT に移し、古い CT は廃棄します。

- k. 500 μL の WB I を FT に加え、8,000 g で 1 分間遠心します。

- l. CT の廃液を捨て、FT を再度装着し、500 μL の WB II を FT に加え、8,000 g で 1 分間遠心します。

- m. FT を新しい CT に移し、古い CT は廃棄します。

- n. フィルターメンブレンを乾かすために 16,000~20,000 g で 1 分間遠心します。

- o. 100 μL の DNA Elution Buffer(DNA EB)を FT の中心部に加えます。この時 FT の先端が触れないように注意します。

- p. 室温で 5 分間インキュベート後、8,000 g で 1 分間遠心し、DNA 溶液を 1.5 mL チューブに回収します(抽出 DNA)。

4) DNA 濃度測定と保存

抽出終了後、速やかに濃度測定を行ってください。

- 抽出 DNA チューブを 5 秒間ボルテックス後スピンドウンし、NanoDrop UV-Vis Spectrophotometer(ND-1000 or ND-2000)と同等品を用いて DNA 濃度を二重測定します。Blank には EB を用います。
- 二重測定の結果の平均値を計算します。NEG CT の抽出液は測定する必要はありません。

注意) 測定値の誤差範囲

測定値の誤差範囲は、平均値が 20 ng/μL 以上の場合、平均値の±10%、20 ng/μL 未満の場合は、平均値の±2 ng/μL です。この値から測定値が外れた場合は再度濃度測定を行い、いずれか 2 点の測定値を用いて、濃度を計算してください。

DNA 濃度が 2 ng/μL 未満の場合はスライド枚数を増やして再抽出してください。

直ちに測定を行わない場合は、DNA を保管してください。抽出 DNA は、室温(15~30℃)で 24 時間、2~8℃で 14 日間、-25~-15℃で 60 日間安定です。凍結融解は-25~-15℃で保存したとき 3 回まで可能です。抽出された DNA は、推奨される安定性内、又は DNA の抽出に使用されたコバス DNA プレパレーションキット(FFPE)の使用期限のいずれか早い方で使用してください。

(2) 抽出 DNA の希釈計算

測定には、1 ウェルあたり、50 ng の DNA を使用します。抽出 DNA は 2 ng/μL の濃度に希釈して使用します。

抽出 DNA 希釈液を調製するために以下の計算を行います。

- 抽出 DNA 濃度が 2 ng/μL から 36 ng/μL までのとき:
 - 測定に必要な抽出 DNA 量(μL) = $(90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div \text{抽出 DNA 濃度}(\text{ng}/\mu\text{L})$
 - DNA SD(DNA 希釈液)の必要量(μL) = $90 \mu\text{L} - \text{測定に必要な抽出 DNA 量}(\mu\text{L})$

(例) 抽出 DNA 濃度 = 6.5 ng/μL
DNA ストック検体(μL) = $(90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 6.5 \text{ ng}/\mu\text{L} = 27.7 \mu\text{L}$
DNA SD(μL) = $(90 \mu\text{L} - 27.7 \mu\text{L}) = 62.3 \mu\text{L}$

- 抽出 DNA 濃度が 36 ng/μL を超えるとき:
DNA 希釈液をすくなくとも 90 μL を準備するのに必要な DNA SD の量を計算します。抽出 DNA は、最低 5 μL を使用します。

- 測定に必要な抽出 DNA 量(μL) = 5 μL
- DNA SD の必要量(μL) = $((5 \mu\text{L} \times \text{抽出 DNA 濃度}(\text{ng}/\mu\text{L})) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) - 5 \mu\text{L}$

(例) 抽出 DNA 濃度 = 100 ng/μL
DNA SD(μL) = $((5 \mu\text{L} \times 100 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) - 5 \mu\text{L} = 245 \mu\text{L}$

(3) 抽出 DNA の希釈

- 1.5 mL 用滅菌微小遠心管に希釈計算して得られた DNA SD の必要容量を分注します。また、陰性コントロールとして DNA SD を 45 μL 分注します。
- それぞれの DNA ストック検体及び陰性コントロールを 5~10 秒間攪拌します。
- チップを毎回取り替えながら計算した量の抽出 DNA を分注します。
- チューブにキャップをして 5~10 秒間攪拌します。

3. 妨害物質・妨害薬剤

- トリグリセライド 37 mmol/L 及びヘモグロビン 2 mg/mL の本品への影響は認められませんでした。

- リツキシマブ、ビンクリスチン及びブレドニゾロンは最高血清中濃度の 3 倍(3Cmax)に相当する量、シクロホスファミド、ドキシロピシンは 5 リットルの血液中に分布する 3 倍の治療用量に相当する濃度では本品への影響は認められませんでした。

4. その他の留意事項

試料中に 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してください。また、試料中に標的 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りますので注意してください。

FFPE 組織から抽出されたゲノム DNA は長時間のホルマリン固定などにより DNA が断片化されたり二本鎖 DNA がクロスリンクされたりすることで PCR の鋳型として機能しなくなることが報告されています。

【用法・用量(操作方法)】

1. 試薬の調製方法

- 各試薬は、室温(15~30℃)に戻してから使用してください。これらの試薬は開封後使用期限内で 4 回までの繰り返し使用、又は 90 日間使用できます。

なお、マスターミックスは光感受性であるため、長時間のライトへの暴露は避けてください。

- 試薬は粘性がありますので、ピペット操作はゆっくりと行ってください。

- マスターミックスは、薄い青色もしくは紫色に見えることがありますが、これは測定には影響はありません。

マスターミックスの調製

調製に必要なマスターミックス及び MGAC の量は、以下の「ワーキング試薬調製に必要な液量」を参考に調製してください。

必要 MMX 量=(検体数+ 2(NEG CT, EZH2 MC) +1)×20 μL
必要 MGAC 量=(検体数+ 2(NEG CT, EZH2 MC) +1)×5 μL
で計算可能です。

ワーキング試薬は調製後 1 時間以内に、抽出 DNA 希釈液を添加してください。

ワーキング試薬調製に必要な液量

		検体数(NEG CT, EZH2 MC+1を含む)									
検体数		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 μL	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 μL	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
総量(μL)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

2. 別途必要な器具・器材・試薬

(1) DNA 抽出試薬

- コバス DNA プレパレーションキット(FFPE) (別売品)
 - DNA Tissue Lysis Buffer (DNA TLB)
 - Proteinase K (PK)
 - DNA Paraffin Binding Buffer (DNA PBB)
 - DNA Wash Buffer I (WB I)
 - DNA Wash Buffer II (WB II)
 - DNA Elution Buffer (DNA EB)
 - Filter tubes with caps (FT)
 - Collection Tubes (CT)

2) キシレン

3) 特級エタノール

4) 特級 2-プロパノール(イソプロパノール)

5) スクレーパーゼフリーの滅菌水

6) 5 mL 及び 25 mL 用のピペット

7) 滅菌済みマイクロ遠心チューブ 1.5 mL 用(1.5 mL チューブ)

8) 37℃恒温槽(必要に応じて)

9) 20,000g の遠心力のあるマイクロ遠心機

10) ボルテックスミキサー

11) ドライヒートブロック 2 台

12) パルス遠心分離機

- (2) 遺伝子解析装置「コバス z480」及び各専用の備品及び消耗品^{※2}
 - (3) 滅菌チューブ
 - (4) マイクロピペット及びチップ(チップは疎水性フィルター付きのもの)
 - (5) スクレアーゼフリーの滅菌水
 - (6) 滅菌済みマイクロ遠心チューブ 1.5 mL用(1.5 mL チューブ)
 - (7) ボルテックスミキサー
- ※2 コバス z480 用の消耗品を使用してください。

3. 操作方法(コバス z480)

【操作上の注意】の項、「2.検体の調製法」を参考に検体を調製します。その際は、クロスコンタミネーションにじゅうぶん注意してください。

コバス z480 における操作は機器の取扱説明書に従って操作してください。

- (1) コバス z480 用 AD プレートの測定に必要な個所にワーキング試薬を 25 μ L 分注します。
- (2) チップを取り替え EZH2 MC を 25 μ L 分注し、ピペットを使って最低 2 回混和してください。
- (3) チップを取り替え陰性コントロールを 25 μ L 分注し、ピペットを使って最低 2 回混和してください。
- (4) チップを取り替え調製した DNA 検体を 25 μ L 分注し、ピペットを使って最低 2 回混和してください。
- (5) コバス z480 用 AD プレートにシールをした後、プレートを「コバス z480」にセットして増幅・検出を開始します。マスターミックスと DNA 検体を混合後は 1 時間以内に測定を開始してください。
- (6) 増幅・検出が終了したら、コバス z 480 用 AD プレートを「コバス z480」から取り出します。
- (7) 結果の Review 及び Accept は機器の取扱説明書に従って操作します。

【測定結果の判定法】

1. 測定結果の判定

(1) 判定法

コバス z480 では検体及びコントロールの結果の判定を自動で行います。各コントロールが正しく測定され、測定が有効な場合、コントロール及び検体の判定結果は次のように表示されます。

コントロールの判定結果

コントロール	結果表示
コバス EZH2 変異検出キット 変異コントロール	Valid
陰性コントロール	Valid

検体の判定結果

結果表示	変異検出結果	結果の解釈
Mutation Detected	Y646N A692V Y646F A682G Y646X (Y646H, Y646S 及び Y646C) (変異が 1 つ以上の可能性あり)	変異の存在あり
No Mutation Detected (NMD)	-	変異は検出されない ^{※3}
Invalid	-	測定無効 再検査が必要
Failed	-	測定中の機械的又はソフトに問題があった

※3 「No Mutation Detected」の結果は、今回の測定では変異が検出されませんでした。変異遺伝子の割合や、検体の状態、阻害物質の存在又は DNA 量などに影響されるため、変異のなしを決定するものではありません。

(2) 測定の無効と再検

- ・どちらか片方のコントロールに“Invalid”の結果が得られた

場合、その回の試験は無効となります。

- ・検体に“Failed”又は“Invalid”の結果が得られた場合、その検体測定は無効となります。その場合、フラグの確認方法や対処方法については機器の取扱説明書を参照してください。
- ・検体が“Invalid”の結果であった場合、抽出 DNA を用いて再測定を行ってください。その際、新しい測定用プレートと DNA SD、コントロールを使用してください。
- ・抽出 DNA を用いて再測定を行っても“Invalid”を示す場合は、試料より DNA を再抽出し、試験を繰り返してください。

2. 結果の判定にかかる注意

- (1) PCR 反応を阻害する物質が含まれている検体では、偽陰性となる可能性がありますので注意してください。
- (2) 臨床診断は、臨床症状や他の検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
- (3) コントロールの結果が一貫して Invalid を示す場合は、弊社カスタマーソリューションセンターまでお問い合わせください。

【臨床的意義】

本品はリアルタイム PCR 法を用いて EZH2 遺伝子変異を検出する体外診断用医薬品です。

本品の EZH2 遺伝子変異の検出はタゼメトスタット臭化水素酸塩の濾胞性リンパ腫への適応を判定することを目的として用います。

タゼメトスタット臭化水素酸塩の臨床成績概略

1. 国内第 II 相試験(コホート 1)

1 つ以上の化学療法又は抗体療法の治療歴を有し、かつ標準的な治療選択肢がない再発又は難治性の EZH2 遺伝子変異陽性^{注 1)}の濾胞性リンパ腫患者 17 例を対象に、本剤 800mg を 1 日 2 回経口投与しました。その結果、中央判定による奏効率(%)は 76.5(90%信頼区間:53.9、91.5)(13/17 例)でした。

2. 海外第 I / II 相試験(第 II 相パート コホート 4)

2 つ以上の前治療歴^{注 2)}を有する再発又は難治性の EZH2 遺伝子変異陽性注 1) の濾胞性リンパ腫患者 45 例を対象に、本剤 800mg を 1 日 2 回経口投与しました。その結果、中央判定による奏効率(%)は 68.9(95%信頼区間:53.4、81.8)(31/45 例)でした。

注 1) 本品コバス EZH2 変異検出キットが使用されました。

注 2) 少なくとも 1 つの抗 CD20 抗体を含む治療レジメン及びアルキル化剤(シクロホスファミド水和物、ベンダムスチン塩酸塩等)を含む治療レジメンを含む、2 つ以上の標準的な治療による治療歴を有し、治癒的治療の選択肢がない患者。

【性能】

1. 性能

(1) 品質管理の方法

【用法・用量(操作方法)】の記載に従い、

- 1) 「コバス EZH2 変異検出キット 変異コントロール」を 8 回同時に測定するとき、Hit Rate %(陽性数の割合)は 100%(8/8)です。ただし、本規格を満たさなかった場合でも、Hit Rate が 87.5%(7/8)であれば更に「コバス EZH2 変異検出キット 変異コントロール」を 1 ランにつき 16 回同時に測定し、2 ラン繰り返します。初回の結果と合わせた Hit Rate が 97.5%(39/40)であることを確認します。
なお、Ct 値が下表の範囲内にあるときを陽性、範囲外を陰性と判定します。
- 2) 「コバス EZH2 変異検出キット 希釈液」を 8 回同時に測定するとき、Hit Rate %(陽性数の割合)は 0%(0/8)です。ただし、本規格を満たさなかった場合でも、Hit Rate が 12.5%(1/8)であれば更に「コバス EZH2 変異検出キット 希釈液」を 1 ランにつき 16 回同時に測定し、2 ラン繰り返します。初回の結果と合わせた Hit Rate が 2.5%(1/40)であることを確認します。
なお、Ct 値が下表の定義を満たすときを陰性、満たさないときを陽性と判定します。

「コバス EZH2 変異検出キット 変異コントロール」は変異型 DNA 塩基配列含有プラスミド DNA などを含む液です。また、「コバス EZH2 変異検出キット希釈液」は緩衝剤などを含む液です。

	Target Mutation or 内部コントロール	コバス EZH2 変異検出キット 変異コントロール		コバス EZH2 変異検出キット 希釈液
		Ct値		Ct 値
		下限	上限	
マスターミックス 1	Y646N	28.4	33.3	検出せず又は ≥ 40
	A692V	26.4	31.1	検出せず又は ≥ 40
	内部コントロール	20.2	25.0	検出せず又は ≥ 35
マスターミックス 2	Y646F	26.5	31.0	検出せず又は ≥ 40
	A682G	25.8	30.8	検出せず又は ≥ 40
	内部コントロール	20.3	23.7	検出せず又は ≥ 35
マスターミックス 3	Y646X	28.2	32.7	検出せず又は ≥ 40
	内部コントロール	20.4	25.0	検出せず又は ≥ 35

(2) 最小検出感度

- EZH2 変異を有する 21 検体(7 種の変異 \times 3 検体)の FPPE 組織から抽出したゲノム DNA を野生型検体のゲノム DNA と混和し、変異 DNA の割合がおおよそ 10%、7.5%、5%、2.5%、1%かつ DNA 量は一定して 50 ng/PCR となるよう調製した試料を本品 3 ロットを用いて 21 重測定し、Hit Rate(変異陽性と判定された測定数/有効測定数 \times 100)が 95%以上を示す変異 DNA の最小割合(%)を検討したところ下表のとおり結果が得られました。

変異	検体 No.	最小検出感度 (検体中の変異の割合)(%)
Y646N	1	2.1
	2	2.6
	3	2.5
A692V	4	2.0
	5	1.6
	6	2.7
Y646F	7	1.6
	8	2.2
	9	1.3
A682G	10	1.1
	11	1.8
	12	2.0
Y646H	13	0.9
	14	1.9
	15	4.7
Y646S	16	2.3
	17	3.9
	18	2.5
Y646C	19	0.7
	20	2.4
	21	2.9

- EZH2 変異を有するリンパ腫細胞株から抽出したゲノム DNA(Y646N、Y646F、Y646S、Y646C 及び A682G)を、野生型細胞株のゲノムと混和することで 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 及び 1:64 の希釈系列を作製し、DNA 量は一定して 50 ng/PCR となるよう試料を調製しました。Y646C に対しては追加で 1:128 を作製しました。これらを本品 3 ロットを用いて 21 重測定し、Hit Rate(変異陽性と判定された測定数/有効測定数 \times 100)が 95%以上を示す変異 DNA の最小割合(%)を検討したところ下表のとおり結果が得られました。

変異	細胞株 ID	最小検出感度 (検体中の変異の割合)(%)
Y646N	RL	1.9
Y646F	WSU-DLCL2	1.1
A682G	Pfeiffer	2.0
Y646S	SUDHL-4	1.2
Y646C	SKM-1	1.7

2. 臨床性能試験成績

海外臨床性能試験

タゼメスタット臭化水素酸塩の外国 101 試験にリクルートされた非ホジキンリンパ腫患者検体 341 例を用いて、Next Generation Sequencing との一致率を検討したところ、以下の結果が得られました。

本品	Next Generation Sequencing			
	陽性	陰性	無効	合計
陽性	119	3	0	122
陰性	2	208	3	213
無効	0	3	3	6
合計	121	214	6	341

陽性一致率：(119/121) \times 100 = 98.3%
陰性一致率：(208/211) \times 100 = 98.6%

3. 交差反応性

本品のプライマー及びプローブの塩基配列をもとに、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)を用いてヒトゲノム DNA に存在し得る非標的 DNA 塩基配列から配列相同性検索を行いました。配列の類似性に基づき、EZH2 偽遺伝子及び EZH2 パラログ (EZH1)を潜在的交差反応性の評価対象としました。EZH2 変異型 5 検体と野生型 10 検体の FPPE 組織から抽出したゲノム DNA に EZH2 偽遺伝子及び EZH2 パラログ (EZH1)のプラスミド DNA を約 50%のプラスミド DNA、50%の増幅可能な検体 DNA の比率でスパイクすることにより評価した結果、本品は非標的変異 (EZH2 偽遺伝子及び EZH2 パラログ)との交差反応性を示しませんでした。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 検体及び本品の取扱いには、使い捨て手袋、実験着などの保護衣及び保護用眼鏡を着用するなど、人体に直接触れないように注意してください。また、測定終了後はよく手を洗ってください。
- ピペットは口で吸わないでください。
- 試薬が誤って目や口に入った場合には、直ちに水でじゅうぶんに洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。
- 試薬が誤って皮膚及び粘膜に付着した場合には、直ちに多量の水で洗い流してください。
- 試薬をこぼした場合には水で希釈してから拭き取ってください。
- 抽出検体をこぼした場合は、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)などの消毒液を使用してじゅうぶんに拭き取ってください。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護してください。
- 検体及び本品を取り扱う場所では飲食又は喫煙をしないでください。
- 検体は感染性を有するものとして、各施設の安全規定に従って取り扱ってください。
- 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°C 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 5,000 ppm、0.5%)に 1 時間以上浸すなどにより消毒してください。これらの作業中はじゅうぶんに換気を行ってください。
- キシレンは危険な化学薬品です。定められた安全基準に準じてご使用ください。

2. 使用上の注意

- (1) 従来の測定方法から新しい測定方法に変更する場合は、変更前後の測定方法の相関性などを確認のうえ、ご使用ください。
- (2) 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転用しないでください。
- (3) 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使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
- (4) ロット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でください。
- (5) すべての構成試薬は使用前に室温(15~30℃)に戻してから使用してください。また、使用後は再び2~8℃で保存してください。
- (6) すべての試薬は保存又は反応中に強い光を当てないでください。
- (7) すべての試薬は開封又は分注時に微生物の汚染を避けてください。
- (8) 増幅反応の準備は、紫外線照射装置の装備されたクリーンベンチ内で行ってください。ピペットなどは常にこのクリーンベンチ内に置いてください。増幅反応を準備するエリアには増幅後のDNAを持ち込まないでください。また、検体の分注には疎水性フィルター付き使い捨てチップを使用してください。
- (9) キャリーオーバーコンタミネーション防止のため増幅後の反応チューブの蓋をあけないでください。
- (10) 検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸剤(有効塩素濃度 5,000 ppm、0.5%)による器具、実験台の清掃などを徹底して行ってください。
- (11) 本キット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てください。汗や唾液に含まれるDNaseが少量でも検体に混入しますと、DNAが分解され測定結果に誤りが生じる可能性があります。

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又は消毒の処理を行ってください。また、これらを廃棄する場合には、各都道府県によって定められた規定に従ってください。
- (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って医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理してください。
- (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て有効塩素濃度が5,000 ppm(0.5%)になるように混和後、一晩放置するなど、DNAを破壊してから廃棄してください。
- (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 5,000 ppm、0.5%)に一晩浸すなどによりDNAを破壊してから、焼却処理又は密閉できるビニール袋を2重に施し、医療廃棄物として処理してください。
- (5) DNAを含む溶液は、次亜塩素酸剤を加えて有効塩素濃度

が5,000 ppm (0.5%)になるように混和後、一晩放置するなど、DNAを破壊してから、各都道府県によって定められた規定に従って廃液処理してください。

- (6) すべての試薬には0.1%未満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ある金属アジドを生成することがあるため、廃棄の際には多量の水で洗い流してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

2~8℃で保存してください。

2. 有効期間

*15 ヶ月

使用期限(Exp.)は外箱に記載してあります。

【包装単位】

*コバス EZH2 変異検出キット 24 テスト

1. [EZH2 MMX-1]	2×0.48 mL
2. [EZH2 MMX-2]	2×0.48 mL
3. [EZH2 MMX-3]	2×0.48 mL
4. [MGAC]	6×0.2 mL
5. [EZH2 MC]	6×0.1 mL
6. [DNA SD]	2×3.5 mL

【主要文献】

- 1) Heid, C.A. et al. Real time quantitative PCR. Genome Research. 1996, 6, p.986~994.
- 2) 自社データ

【問い合わせ先】

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
カスタマーソリューションセンター
〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所等】

ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社
〒108-0075 東京都港区港南 1-2-70
フリーダイヤル: 0120-600-152

《特許に関連するお知らせ》

本製品をご購入頂きましたお客様は、これら製品をヒトの体外診断目的におけるPCRによる核酸配列の増幅と検出、及びその関連工程に使用することが許諾されています。この特定された使用許諾権以外には、いかなる種類の特許権又はライセンスも許諾されているものではありません。

コバスはRocheの登録商標です。
その他の全ての製品名及び商標は、各所有者に帰属します。

《操作概略》

