この添付文書をよく読んでから使用してください。
また、必要時に読めるように保管しておいてください。

体外診断用医薬品　　*2022 年 10 月作成（第 2 版）
2021 年 12 月作成（第 1 版）

製造販売承認番号:30300EZX00097000

BRAF 変異タンパクキット

ベンタナ OptiView BRAF V600E(VE1)

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 染色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。
3. 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。
4. 組合せて使用する試薬の添付文書、使用する機器の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。

【形状・構造等（キットの構成）】

構成試薬	成分	分量
一次抗体	抗BRAF V600Eマウス モノクローナル抗体（VE1）	5 mL（50 テスト）
ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキット（別売）※		250 テスト
インヒビター	過酸化水素	25 mL
リンカー-HQ	ヒドロキシキノキサリン標識 抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体	25 mL
マルチマー -HRP	ペルオキシダーゼ標識 抗ヒドロキシキノキサリン マウスモノクローナル抗体	25 mL
DAB 試薬	3,3'-ジアミノベンジジン	25 mL
H2O2 試薬	過酸化水素	25 mL
COPPER 試薬	硫酸銅	25 mL

※別売のベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキット（商品コード 111427）と一緒にご使用ください。

【使用目的】

がん組織中の BRAF V600E 変異タンパクの検出

- 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の選択の補助

「使用目的に関連する使用上の注意」

大腸癌における化学療法の選択の補助に用いる場合は、治癒切除不能な進行・再発の直腸・結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、リンカーHQ（ブリッジ試薬）を使用した免疫組織化学染色法により、がん組織中の BRAF V600E 変異タンパクを検出します。スライド標本上の抗原に一次抗体を反応させると、切片に存在する対象抗原と結合します。次にベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットのヒドロキシキノキサリンで標識したリンカー-HQ 及びペルオキシダーゼで標識したマルチマー-HRP を反応させると、スライドガラス上に対象抗原－一次抗体－リンカー-HQ－マルチマー- HRP 結合物が形成されます。この結合物に対して、ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキットの DAB 試薬、H2O2 試薬及び COPPER 試薬を添加すると、酵素反応により、検体中に存在する対象抗原が茶褐色に染色されます [1]。茶褐色に可視化された抗原部位を光学顕微鏡で観察し、BRAF V600E 変異タンパクの陽性・陰性を判定します。

【操作上の注意】

1. 検体にはホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを使用してください。
2. 検体は採取後速やかに固定してください。固定条件は 10%中性緩衝ホルマリンの使用を推奨します [2]。検体の 15～20 倍量の固定液を用いて、15～25℃[3]で 12～72 時間固定してください。
3. 固定不良等の病理標本作成過程における不適切な操作が染色不良の原因となりうることから、ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程等を遵守してください。
4. 検体となる切片は 4 μm に薄切し、シラン等がコートされたスライドガラスに貼り付け、薄切後は速やかに染色を実施してください。また、使用するスライドガラスは、製造後なるべく新しいものを使用してください。未染色の大腸癌組織スライドを 2～8℃または 25～35℃で保存した場合、薄切後 8 週間まで速やかに染色した場合と同等の染色が得られました。
5. 本品は、既に適切な濃度に希釈されているので、希釈せずにそのまま使用してください。希釈して使用するとじゅうぶんな染色結果が得られないことがあります。
6. 染色を行う場合には、必ず同時に精度管理用コントロールスライドの染色を行い、染色操作が適切に行われていることを確認してください。

*7. 本品の適用機器はベンタナ ベンチマーク ULTRA、ベンタナ XT システム ベンチマークモジュール XT、ベンタナ ベンチマーク GX 及びベンチマーク ULTRA PLUS です。その他の機器については弊社までお問い合わせください。

【用法・用量（操作方法）】

1. 別途必要な器具・器材・試薬等

- スライドバーコードラベル
- リアクションバッファー
  （精製水又は脱イオン水で 10 倍に希釈しておく）
- 液体カバースリップ HI 又は液体カバースリップ ULTRA
- EZ バッファー
  （精製水又は脱イオン水で 10 倍に希釈しておく）
- CC1 バッファー又は CC1 バッファー ULTRA
- ヘマトキシリン核染色試薬 II
- 炭酸リチウム試薬
- 精製水又は脱イオン水
- 染色用バット、染色かご
- キシレン、アルコール（透徹用）
- カバーガラス、封入剤
- イムノブロック等、検体の前処理に必要な試薬
- 光学顕微鏡
- 陰性コントロール マウスモノクローナル抗体用
- 精度管理用コントロールスライド

2. 試薬の使用方法

(1) 本品はそのままご使用ください。

(2) 初回使用時の試薬本品の外箱、又はラベルに付いている登録ボタン又は二次元バーコードを機器付属の専用ツールで読み取り、装置に登録します。

(3) 必要に応じて調製したバッファー類、液体カバースリップをバッファーモジュールの各ボトルに充填します。

3. スライド標本の準備

(1) 適切な方法により固定、包埋した検体を薄切し、シラン等がコートされたスライドガラスに貼り付けます。

(2) 1 検体につき、スライド標本を 2 枚準備します。1 枚は一次抗体、もう 1 枚は試薬対照スライドとして一次抗体の代わりに別売の陰性コントロール試薬(陰性コントロール マウスモノクローナル抗体用)を用いて染色を行います。

(3) 精度管理用コントロールスライドをスライド標本と同様の手順で作製します。その際、あらかじめ BRAF V600E 変異タンパク陽性及び陰性が確認されている検体を用いてください。

*4. 染色プロトコールの設定

本品は「ベンタナ ベンチマーク ULTRA」、「ベンチマーク ULTRA PLUS」、「ベンタナ XT システム ベンチマークモジュール XT」又は「ベンタナ ベンチマーク GX」を用いて操作をします。それぞれ以下のプロシージャ及び推奨染色条件で染色を行ってください。添付文書に記載された染色条件を逸脱した場合、適切な判定結果が得られない可能性があります。

*表 1 各機種におけるプロシージャ名

機種名	プロシージャ名
ベンタナ ベンチマーク ULTRA ベンチマーク ULTRA PLUS	U OptiView DAB IHC
ベンタナ XT システム ベンチマークモジュール XT	XT OptiView DAB IHC
ベンタナ ベンチマーク GX	BMK OptiView DAB IHC

*表 2 染色条件

染色工程	設定内容		
	ULTRA/ ULTRA PLUS	XT	GX
Deparaffinization (脱パラフィン)	Selected	Selected	Selected
Cell Conditioning (熱処理)	ULTRA CC1 64 min,100℃	CC1 64 min	CC1 64 min
Pre-Primary Peroxidase Inhibitor (ペルオキシダーゼインヒビター前処理)	Selected	Selected	Selected
Antibody (一次抗体)	16 min,36℃	16 min,37℃	28 min,37℃
HQ Linker (リンカー-HQ)	8 min		
HRP Multimer (マルチマー-HRP)	8 min		
Counterstain (核染色)	Hematoxylin Ⅱ −4 min		
Post Counterstain (色出し)	Bluing−4 min		

5. 測定(操作)方法

本品は自動免疫染色装置を用いて操作を行います。代表的な自動免疫染色装置である「ベンタナ ベンチマーク ULTRA」を使用した場合の全自動の操作方法は、以下のとおりです。

(詳しくは自動免疫染色装置の取扱説明書を参照してください。)

(1) 染色モジュール、PC、E-bar システムの順に電源を入れます。

(2) Windows 画面から VSS ソフトウエアを立ち上げます。

(3) Instrument View を表示し、画面右下の Ready モードボタンをクリックします。

(4) 装置の取扱説明書に従ってプロトコールを作成し、ソフトウエアに保存します。

(5) バーコードラベルを印字し、検体スライドに貼り付けます。

(6) 必要な試薬を染色モジュールにセットします。

(7) 検体スライドを染色モジュールにセットし、スライドドローワーと試薬フードを閉めます。

(8) 染色モジュールにあらかじめセットされているバッファー類の量がじゅうぶんにあることを確認し、Running モードボタンをクリックし、染色開始確認のホップアップ画面の Yes をクリックします。試薬と検体スライドのバーコードを読み取り後、染色処理が開始されます。

① 検体スライドを加熱してパラフィンを溶解し、その後 EZ バッファーで洗浄することにより脱パラフィンが行われます。

② 検体スライドは CC1 バッファーULTRA により設定された条件で熱処理が行われます。

③ スライド上の検体にインヒビターを 1 滴(約 100μL)加え、36℃で 4 分間反応します。

④ スライド上のインヒビターを洗浄後、試薬対照以外の全てのスライドには一次抗体、試薬対照スライドには別売の陰性コントロール試薬を 1 滴(約 100μL)加え、36℃で 16 分間反応します。

⑤ スライド上の一次抗体を洗浄後、リンカー-HQ を 1 滴(約 100μL)加え、36℃で 8 分間反応します。

⑥ スライド上のリンカー-HQ を洗浄後、マルチマー-HRP を 1 滴(約 100μL)加え、36℃で 8 分間反応します。

⑦ スライド上のマルチマー-HRP を洗浄後、DAB 試薬と H2O2 試薬を 1 滴ずつ(約 100μL)加え、36℃で 8 分間反応します。

⑧ スライド上の DAB 試薬と H2O2 試薬を洗浄後、COPPER 試薬を 1 滴(約 100μL)加え、36℃で 4 分間反応します。

⑨ スライド上の COPPER 試薬を洗浄します。

対比染色

検出終了後、対比染色として核染色及び色出しを実施します。

(9) 染色が終了したら、装置からスライド標本を取り外します。

(10) スライド標本を水洗、脱水、透徹後、封入します。

【測定結果の判定法】

1. 判定方法

光学顕微鏡により鏡検を行います。組織形態及び背景染色に問題がないことを確認した後、精度管理用コントロールスライド及び試薬対照スライドの染色に問題がないことを確認します。いずれも問題がない場合は、BRAF V600E 変異タンパクの陽性・陰性を判定します。

なお、精度管理用コントロールスライド及び試薬対照スライドとしてそれぞれ以下のスライドを準備します。

精度管理用コントロールスライド

陽性コントロール

陽性コントロールは、検体スライドと同じ手順で染色を行います。検体と同じスライドに陽性コントロール切片をのせて染色を行う方法が最適であり、一次抗体または他の重要な試薬に問題があったことを特定することが可能です。

陽性染色を有する組織は、抗体が検出対象に結合し、装置が適切に機能したことを確認するのに適しています。陽性染色を有する組織は、陽性および陰性の両方の染色細胞または組織成分を含み、陽性コントロール及び陰性コントロールの両方として機能することができます。剖検、生検または手術で得られた組織を、検体スライドと同一の方法でできるだけ早く固定したものを使用してください。また検体スライドとは異なる方法で固定した組織切片を使用する場合は、固定以降の操作の適切性を確認することができます。

陽性コントロールは、その測定が正しく実施されたことを確認する目的にのみ使用し、患者検体の判定の補助には使用しないでください。陽性コントロールが陽性染色を示すことができなかった場合、その検体での結果は無効となります。

あらかじめ本品で BRAF V600E 変異タンパクが陽性であることを確認済みの大腸癌組織を用いてください。陽性コントロールは、腫瘍細胞の細胞質に背景染色を超える染色強度の明瞭な染色が認められますが、正常な大腸上皮の近傍に存在するリンパ球や線維芽細胞の細胞質には明瞭な染色が認められない、あるい

は染色が全く認められません。

陰性コントロール

本品を用いて事前に BRAF V600E 変異タンパクが陰性であることを確認済みの大腸癌組織を用いてください。陰性コントロールは、操作が適切に行われたことを確認する目的のみに使用し、患者検体の判定の補助には使用しないでください。

試薬対照スライド

検体スライドを一次抗体の代わりに別売の陰性コントロール試薬で染色したスライド標本です。いずれの細胞にも陽性所見が認められないことを確認します。陽性所見がある場合、非特異反応が生じていると考えられます。

2. **判定基準**

以下の判定基準に従い、BRAF V600E 変異タンパクの陽性・陰性を判定します。なお、腫瘍細胞あるいは小さな腫瘍細胞クラスターの核に染色がみられる場合、いかなる染色強度でも陰性と判定してください。なお、陽性の所見がみられたときは他の免疫染色結果や組織診断等も踏まえ、病理医が総合的に判断してください。

表 3 BRAF V600E 変異タンパクに対する判定基準

判定	染色結果
陽性	腫瘍細胞の細胞質に染色強度にかかわらず、背景染色をこえる明瞭な染色が認められる。
陰性	腫瘍細胞の細胞質に明瞭な染色が認められない。あるいは染色が全く認められない。

3. **判定上の注意**

腫瘍領域全体の染色の有無により陽性・陰性に分類されます。染色強度は腫瘍全体にわたって様々であるものの、BRAF V600E 変異タンパクの判定には影響しません。

以下の染色がみられる場合は判定にご注意ください。

(1) 平滑筋、小脳プルキンエ細胞、正常結腸上皮細胞、腸細胞、精巣間質細胞、副腎、下垂体、膵臓腺房構造、腸腺細胞及び一部の腫瘍細胞において、弱い細胞質及び核の特異的染色を示すことがありますが、このような症例は陽性と判定されるべきではありません。さらに、下垂体の神経内分泌細胞において中等度の染色、肺の線毛も染色されます。

(2) 非特異的背景染色:
一部の標本では、理由はじゅうぶんに解明されていませんが、非特異的背景染色がみられることがあります。よって、スライド標本を染色するときは、陰性コントロール試薬で染色したスライド標本と比較し、非特異的背景染色を確認してください。また、腫瘍細胞の核における染色が観察されることがありますが、その意義は不明です。

(3) 組織または染色アーチファクト:
検体処理およびスライド標本の作製工程から生じる組織学的アーチファクトも、本品の判定に影響する可能性があります。これらのアーチファクトには、固定液、エッジ効果、DAB トラッピング、核バブリング、組織の一部の領域における染色の欠如、組織の引き裂きまたは折り畳み、および組織切片の喪失等が含まれます。場合によっては、新たなスライド標本の再染色や新たな標本の採取が必要となることがあります。

【臨床的意義】

「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)[4]」では BRAF 変異検査について以下のとおり記載されており、本邦における BRAF 変異検査の臨床的意義が確立されています。

1. 切除不能進行再発大腸がん患者に対し、予後予測に応じた治療選択を目的として、一次治療開始前に BRAF V600E 変異検査を強く推奨する
2. 切除可能進行再発大腸がん患者に対し、再発リスクに応じた治療選択を目的として、補助化学療法開始前に BRAF V600E 変異検査を推奨する
3. 大腸がん患者に対し、リンチ症候群の診断の補助を目的として、BRAF V600E 変異検査を推奨する

本品はがん組織中の BRAF V600E 変異タンパクの陽性・陰性を判定するキットです。遺伝子検査(NGS 法)と本品の相関性試験の結果は非常に良好であったことから、本品の BRAF V600E 変異タンパク検出に対する臨床的有用性が示されております[5]。よって、本品はガイダンスで示されている切除不能進行再発大腸がん患者に対する予後予測に応じた治療選択や切除可能進行再発大腸がん患者に対する再発リスクに応じた治療選択、大腸がん患者に対するリンチ症候群の診断の補助に寄与するので、本品は大腸がんにおける化学療法の選択の補助及び大腸がんにおけるリンチ症候群の診断の補助に対する臨床的意義を有しています。

遺伝子検査と本品の相関性[5]

BRAF V600E 変異検査における遺伝子検査(NGS 法)と本品(IHC 法)の相関性を評価しました。本試験では BRAF V600E 変異ありを陽性、変異なしを陰性として、BRAF V600E 変異検出における遺伝子検査と本品の全体一致率(OPA)、陽性一致率(PPA)、陰性一致率(NPA)を算出しました。

その結果、大腸癌検体 118 例での BRAF V600E 変異検出における遺伝子検査と本品の OPA、PPA 及び NPA は、いずれも 100%と算出され、非常に良好な相関性が確認されました(表 4)。

表 4 BRAF V600E 変異検出における遺伝子検査と本品の相関性

大腸癌		遺伝子検査		計
		変異あり	変異なし	
本品 (IHC 法)	陽性	23 例	0 例	23 例
	陰性	0 例	95 例	95 例
計		23 例	95 例	118 例

OPA : 100% (118/118, 95%CI:96.8-100%)
PPA : 100% (23/23, 95%CI:85.7-100%)
NPA : 100% (95/95, 95%CI:96.1-100%)

【性能】

1. **性能**

【用法・用量(操作方法)】の記載に従い試験を行った場合、下記の規格に適合します。

規格

出荷試験用コントロールスライドとして、BRAF V600E 変異タンパク陽性大腸癌組織及び BRAF V600E 変異タンパク陰性大腸癌組織から作製したスライド標本を染色し、特異的染色及び背景染色の染色強度を 0～3 に便宜的にスコア化するとき、以下の結果が得られます。

BRAF V600E 変異タンパク陽性大腸癌組織

1) 試験対象ロットと品質を確認済みのロットで染色したスライド標本の特異的染色の染色強度が 1.0 以上であること。また、試験対象ロットと品質を確認済みのロットでの染色強度の差は 0.5 以内であること。
2) 試験対象ロット、品質を確認済みのロット及び陰性コントロール試薬で染色したスライド標本の背景染色が適切であり、その染色強度は 0.5 以下であること。

BRAF V600E 変異タンパク陰性大腸癌組織

1) 試験対象ロットと品質を確認済みのロットで染色したスライド標本の特異的染色の染色強度が 0.0 であること。
2) 試験対象ロット、品質を確認済みのロット及び陰性コントロール試薬で染色したスライド標本の背景染色が適切であり、その染色強度は 0.5 以下であること。

2. **最小検出感度**

本品はスライド上の組織を検体として免疫組織染色を行うものであり、検体中の抗原量を正確に測定することができないため、本品の最小検出感度を定量的に示すことはできない。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上（危険防止）の注意
   (1) スライド標本や試薬を取り扱っている間は、使い捨ての手袋の着用を推奨します。
   (2) スライド標本や試薬を取り扱っている場所での喫煙・飲食は避けてください。
   (3) スライド標本は、感染性のあるものとして取り扱い、適切な予防措置をとってください。
   (4) 試薬、スライド標本が皮膚や粘膜に直接接触しないようにしてください。
   (5) 試薬がこぼれたり、漏れたりした場合は、消毒剤及び洗浄剤できれいに拭き取ってください。
   (6) 試薬が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合、水でじゅうぶん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。
2. 使用上の注意
   (1) 試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、凍結など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。
   (2) 試薬を装置にセットする場合は、必ずキャップとストッパーを外してからセットしてください。
   (3) 使用後の試薬は、できるだけ速やかにキャップをはめて冷蔵庫に保管してください。
   (4) 試薬の注ぎ足しは行わないでください。
3. 廃棄上の注意
   廃棄にあたっては、各施設の内部規則及び各地域により規定されている水質汚濁防止法などの規則に留意して処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法
   2～8℃で保存してください。凍結は避けてください。
2. 有効期間
   一次抗体: 24 ヵ月
   ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキット:12 ヵ月

【包装単位】

ベンタナ OptiView BRAF V600E(VE1)

1. 一次抗体 50 テスト　5 mL×1 ディスペンサー
   （商品コード 115142）
2. ベンタナ OptiView DAB ユニバーサルキット　250 テスト
   （商品コード 111427）

インヒビター	25 mL×1 ディスペンサー
リンカー-HQ	25 mL×1 ディスペンサー
マルチマー-HRP	25 mL×1 ディスペンサー
DAB 試薬	25 mL×1 ディスペンサー
H2O2 試薬	25 mL×1 ディスペンサー
COPPER 試薬	25 mL×1 ディスペンサー

【主要文献】

1) Dvorak K, Higgins A, Palting J, et al (2019) Immunohistochemistry with anti-BRAF V600E (VE1) mouse monoclonal antibody is a sensitive method for detection of the BRAF V600E mutation in colon cancer: evaluation of 120 cases with and without KRAS mutation and literature review. Pathol Oncol Res 25:349-359.
2) Sheehan, D.C. et al. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd edition. St. Louis, MO: The C.V. Mosby Company. 1980.
3) Carson F, Hladik C. Histotechnology: A Self Instructional Text, 3rd edition. Hong Kong: American Society for Clinical Pathology Press; 2009.
4) 日本臨床腫瘍学会「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）」
5) 自社データ

【問い合わせ先】

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
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】

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

Ventana is a trademark of Roche.
Ventana は Roche の商標です。

09564845001-B