体外診断用医薬品

この電子添文をよく読んでから使用してください。

＊＊2026 年 10 月改訂 (第 3 版)
＊2025 年 11 月改訂 (第 2 版)

製造販売承認番号：30600EZX00019000

DNA メチル化検出キット 87010000

OncoGuide EpiLightメチル化検出キット

【重要な基本的注意】

1. *RAS* 遺伝子野生型の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸癌における治療選択の補助に用いること。
2. 臨床性能試験成績を熟知し、本品の有用性を理解した上で使用すること。

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品である。DNA 中のメチル化状態の検出以外の目的には使用しないこと。
2. 本品の検体には必ずバイサルファイト変換処理をした DNA を用いること。
3. 検査結果に基づく臨床診断は、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。
4. 本電子添文に記載された使用目的、用法・用量（操作方法）に従って使用すること。記載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。
5. 本品の測定は、臨床検査並びに使用する機器のトレーニングを受けた担当者が実施すること。本品及び測定装置の取扱説明書をよく読んでから使用すること。本品の取扱説明書については、製造販売元である株式会社理研ジェネシスのウェブサイトを参照すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

試薬の構成

(1) オリゴミックス溶液（①～⑧：8 連チューブ）

表 1.オリゴミックス溶液のプライマー及びプローブ一覧

オリゴミックス溶液	プライマー及びプローブ
①	1R-F-Primer 1、1R-R-Primer 1、1R-Probe 20 (FAM-TAMRA)、9R-F-Primer 7、9R-R-Primer 2、9R-probe 8 (HEX-BHQ1)
②	2F-F-Primer 1、2F-R-Primer 6、2F-Probe8 (FAM-TAMRA)、13F-F-Primer 7、13F-R-Primer 2、13F-probe 1 (HEX-BHQ1)
③	3F-F-Primer 2、3F-R-Primer 1、3F-Probe 10 (FAM-TAMRA)、18R-F-Primer 3、18R-R-Primer 8、18R-probe 5 (HEX-BHQ1)
④	5R-F-Primer 5、5R-R-Primer 10、5R-probe 19 (FAM-TAMRA)、12R-F-Primer 2、12R-R-Primer 1、12R-probe 1 (HEX-BHQ1)、12R-probe 1-2 (HEX-BHQ1)
⑤	6F-F-Primer 8、6F-R-Primer 1、6F-Probe 1 (FAM-TAMRA)、11F-F-Primer 7、11F-R-Primer 6、11F-probe 15 (HEX-BHQ1)
⑥	8R-F-Primer 4、8R-R-Primer 7、8R-probe 22 (FAM-TAMRA)、8R-probe 22-2 (FAM-TAMRA)、16R-F-Primer 1、16R-R-Primer 1、16R-probe 3 (HEX-BHQ1)
⑦	17R-F-Primer 5、17R-R-Primer 4、17R-probe 11 (FAM-TAMRA)、15F-F-Primer 6、15F-R-Primer 1、15F-probe 1 (HEX-BHQ1)
⑧	19R-F-Primer 4、19R-R-Primer 6、19R-probe 13 (FAM-TAMRA)、4R-F-Primer 3、4R-R-Primer 3、4R-Probe 15 (HEX-BHQ1)

(2) マスターミックス溶液
DNA ポリメラーゼ、dNTPs（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）

(3) コントロール①

(4) コントロール②

【使用目的】

がん組織から抽出した DNA をバイサルファイト変換処理した検体中のメチル化状態の検出（結腸・直腸癌における治療薬の選択の補助）

【測定原理】

本品は、検体から抽出した DNA をバイサルファイト変換試薬で処理し非メチル化シトシンをウラシルに変換後、変換した DNA に対してメチル化特異的リアルタイム PCR 反応を行い、16 領域のメチル化状態を検出する。得られた 16 領域のメチル化状態から高メチル（HMCC: high methylated colorectal cancer）又は低メチル（LMCC: low methylated colorectal cancer）を判定する。

PCR 反応

メチル化 DNA 配列に特異的なフォワードプライマー、リバースプライマー、及び蛍光標識プローブを用いてリアルタイム PCR 反応を行う。
バイサルファイト処理により非メチル化 DNA ではシトシンがウラシルに変換されており、メチル化配列と相補的なプライマーはウラシルを含む非メチル化配列とは完全には相補的ではなく増幅が起こらず、メチル化 DNA のみが増幅される。
本品は 2 種類のターゲット領域を 1 種類の反応ウェルで同時に PCR を行う。2 種類の領域の PCR 増幅を区別するために、一方のターゲットに対するプローブは FAM で標識し、他方のターゲットに対するプローブは HEX で標識を行っている。16 ターゲット領域を 8 ウェルで反応させるため、プライマー・プローブの混合溶液であるオリゴミックス溶液は 8 種類がキットに準備されている（オリゴミックス溶液 ①~⑧）。
内部コントロールとして DNA 全体のメチル化状態の影響を受けない配列が選択されており、メチル化検出のための 2 種類の蛍光色素と区別するため Cy5 で標識したプローブで検出される。

【操作上の注意】

1. 検体について
   - 本品での検出には、大腸がん患者の FFPE 組織から抽出した DNA 検体をバイサルファイト変換処理し用いること。組織検体の扱いについては日本臨床腫瘍学会の「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイダンス」等本邦の最新のガイダンスを参照することを推奨する。
   - 組織からの DNA 抽出については DNA 抽出試薬の取扱説明書を、また、抽出した DNA のバイサルファイト変換処理についてはバイサルファイト変換処理試薬の取扱説明書をよく読んでから使用すること。
   - DNA 量は吸光度測定法以外の手法（Qubit 法、PicoGreen 法などの 2 本鎖 DNA 選択的測定法）で測定した濃度を基に算出することを推奨する。

2. PCR 反応・操作
   - 本製品はリアルタイム PCR システムでの解析によって結果判定を行うため、リアルタイム PCR システムの機能が正確に動作しなかった場合は、誤判定の原因になり得る。リアルタイム PCR システムは校正したものを使用し、装置の取扱い説明書に従って正しく操作すること。
   - PCR 反応液を調製する前に予めリアルタイム PCR システムのセットアップと反応条件等を設定することを推奨する。
   - オリゴミックス溶液には蛍光標識が含まれるため、保管中、使用中ともに出来るだけ遮光すること。

3. その他
   - 検体及び本製品の取扱いや検査に際しては、人体に直接触れないように、適切な実験着、使い捨て手袋を着用すること。
   - 本品の測定に影響する可能性のある妨害物質について検討を行った結果、ヘモグロビン 2 μg/μL、トリグリセリド 37 mmol/L、パラフィン 1%、キシレン 1%、プロテナーゼ K 1%、エタノール 10%、Deparaffinization Solution 10%（QIAGEN 社）において結果判定への影響は認められなかった。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法
   各試薬は解凍後、十分に混和してから、そのまま用いる。

2. 別途必要な試薬・器具・機器・ソフトウェア等

＜試薬＞
- Nuclease Free Water

＜機器・装置・ソフトウェア＞
- リアルタイム PCR 装置及びソフトウェア
- マイクロピペット
- ボルテックスミキサー
- 1.5 mL チューブ用卓上遠心機

■ 8 連チューブ用卓上遠心機
■ プレート用遠心機

＜消耗品等＞
■ フィルター付きマイクロピペット用チップ（低吸着・低残液タイプ推奨）
■ 96 ウェルプレート及びプレートシール
■ 1.5 mL チューブ（低吸着タイプ推奨）

3. 操作法
(1) 1 ウェルあたりマスターミックス溶液 10 μL、バイサルファイト変換処理済 DNA 2 μL（推奨濃度はバイサルファイト変換処理前に測定した DNA 濃度で 10 ng/μL 以上）、精製水 5.5 μL を 8 ウェルに添加する。
(2) 1 ウェルあたりマスターミックス溶液 10 μL、コントロール①あるいは②を 1 μL、精製水 6.5 μL を上記(1)とは別の 8 ウェルに添加する。
(3) (1)~(2)のウェルにオリゴミックス溶液 ①～⑧をそれぞれ 2.5 μL ずつ添加する。
＊＊(4) 次の条件下でリアルタイム PCR を行う。

表 4. PCR 反応条件 1（装置 1、装置 2）

工程	温度、蛍光測定	保持時間	サイクル
1	95℃	2 分間	-
2	95℃	15 秒間	10 サイクル
3	55℃	30 秒間	
4	72℃	1 分間	
5	95℃	15 秒間	35 サイクル
6	55℃	30 秒間	
7	72℃＋蛍光測定	1 分間	

表 5. PCR 反応条件 2（装置 3）

工程	温度、蛍光測定	保持時間	サイクル
1	95℃	2 分間	-
2	95℃	15 秒間	10 サイクル
3	55℃	30 秒間	
4	72℃	1 分間	
5	95℃	15 秒間	35 サイクル
6	55℃	30 秒間	
7	72℃＋蛍光測定	75 秒間	

蛍光測定:
1) 条件 1（装置 1）
465 nm の励起光から得られる 510 nm における蛍光強度（メチル化検出反応/FAM）、
533 nm の励起光から得られる 580 nm における蛍光強度（メチル化検出反応/HEX）、
618 nm の励起光から得られる 660 nm における蛍光強度（内部コントロール反応/Cy5）を測定する。
2) 条件 2（装置 2）
494 nm の励起光から得られる 523 nm における蛍光強度（メチル化検出反応/FAM）、
541 nm の励起光から得られる 565 nm における蛍光強度（メチル化検出反応/HEX）、
657 nm の励起光から得られる 675 nm における蛍光強度（内部コントロール/Cy5）を測定する。
3) 条件 3（装置 3）
470±15 nm の励起光から得られる 520±15 nm における蛍光強度（メチル化検出反応/FAM）、
520±10 nm の励起光から得られる 558±12 nm における蛍光強度（メチル化検出反応/VIC（HEX））、
640±10 nm の励起光から得られる 682±14 nm における蛍光強度（内部コントロール/Cy5）を測定する。

4. 判定法
(1) サイクルごとに測定した蛍光強度から増幅曲線を作成する。増幅曲線より蛍光強度が予め規定された値以上となるサイクル数を求めこれを Ct 値とする。
(2) コントロール①、コントロール②の 8 ウェルのそれぞれの Ct 値が次の基準を満たすことを確認する。
● コントロール①の Ct 値は FAM/HEX の Ct 値が全てのウェルで 18 以下かつ、Cy5 の増幅が全てのウェルで認められないか、または Ct 値が 29 以上であること。
● コントロール②の Ct 値は全てのウェルで Cy5 の Ct 値が 16 以下かつ、FAM/HEX の増幅が全てのウェルで認められないか、または Ct 値が 29 以上であること。
基準を満たさない場合は測定無効とする。
(3) 検体 DNA の 8 ウェルのそれぞれのメチル化検出反応（FAM 及び HEX それぞれ）の Ct 値と内部コントロール（Cy5）の Ct 値との差を求めて⊿Ct 値とする。
(4) メチル化陽性・メチル化陰性判定
● ⊿Ct 値が算出できる場合
1） ⊿Ct 値が 6 未満（マイナスも含む）の場合はメチル化陽性と判定する。
2） ⊿Ct 値が 6 以上の場合はメチル化陰性と判定する。
● ⊿Ct 値が算出できない場合（いずれかの Ct 値が算出されず、N/A である場合）
1） FAM または HEX の Ct 値が N/A の場合、Cy5 の Ct 値が 29 未満であればメチル化陰性と判定する。Cy5 の Ct 値が N/A または 29 以上であれば判定不能とする。
2） FAM または HEX の Ct 値が算出されているが Cy5 の Ct 値が N/A の場合はメチル化陽性と判定する。
(5) メチル化ステータスの判定
メチル化陽性数・メチル化陰性数によってメチル化ステータスを判定する。

表 6. メチル化ステータスの判定

判定基準	メチル化ステータス
メチル化陽性数:8 以上	高メチル（HMCC）
メチル化陰性数:9 以上	低メチル（LMCC）
メチル化陽性数:8 未満 かつ、メチル化陰性数:9 未満	判定不能

16 領域のうち、メチル化陽性・陰性判定の判定不能の領域がある場合、メチル化陽性数 8 未満かつメチル化陰性数 9 未満の場合、そのサンプルはメチル化ステータス判定不能とする。

メチル化ステータス判定不能となった場合、検体量を増やすか、バイサルファイト処理からの再試験を推奨する。

【臨床的意義】
大腸がん診療ではバイオマーカー等により分子標的治療薬が選択されており、*RAS* 遺伝子変異は分子標的治療薬の抗 EGFR 抗体薬を選択するためのバイオマーカーである。*RAS* 遺伝子変異を有する症例は抗 EGFR 抗体薬に抵抗性を示すため、抗 EGFR 抗体薬は *RAS* 遺伝子野生型の症例への使用が推奨されている[1]。一方で *RAS* 遺伝子野生型の症例群でも抗 EGFR 抗体薬による奏効率の上乗せは 30%程度であり、一部の症例にだけ有効である[2]。
近年 DNA メチル化状態が大腸がん治療における抗 EGFR 抗体薬の治療効果と関連することが報告されている。Ouchi らは進行・再発大腸がんの *RAS* 遺伝子野生型の症例について網羅的な解析によりゲノムワイドの DNA メチル化解析を行い、低メチル化群（LMCC）では高メチル化群（HMCC）と比較して抗 EGFR 抗体薬の治療効果が優位に良好であることを明らかにした[3]。また Okita らは切除不能 *RAS* 野生型大腸がんの後方視的検討で、原発巣占居部位や DNA メチル化状態を含む多変量解析を行い、DNA 高メチル化状態が抗 EGFR 抗体薬投与後の唯一の独立予後不良因子であることを示した[4]。「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 5 版）」においても、ゲノムワイドな DNA メチル化状態が抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測因子として新たに記載され、進行・再発の結腸・直腸がんの一次治療および既治療例における抗 EGFR 抗体薬の選択補助に DNA メチル化状態を検査することが有用であることが示唆されている[5] [6]。また、同ガイダンスにて DNA メチル化アッセイ実施のタイミングについては、一次治療における治療選択及び検体組織節約の観点から一次治療前とするのが合理的とされている[5]。

本品はゲノムワイドな DNA メチル化状態を反映する 16 カ所の CpG 領域を検出が可能で、HMCC と LMCC を簡便に判別することができるキットである。

臨床性能試験（臨床試験登録番号:UMIN000041205）
進行再発大腸癌の DNA メチル化状態に基づく抗 EGFR 抗体薬感受性予測能を検証する後ろ向き試験において、*RAS* 遺伝子野生型と診断された大腸がん症例 145 例を対象に、原発巣 FFPE から抽出した DNA を材料として本品を用いて DNA メチル化状態の測定を行った。なお、評価対象の患者背景はオキサリプラチン及びイリノテカンを含む治療レジメンが不応・不耐となった後、三次治療以降で、抗 EGFR 抗体薬とイリノテカンとの併用による治療が実施された症例であった。
この試験における症例内訳及び主要評価項目である無増悪生存期間（PFS）の結果を以下に示す。

表 7 高メチル化群及び低メチル化群の症例数

	全体	LMCC 群	HMCC 群
症例数	145	114	31

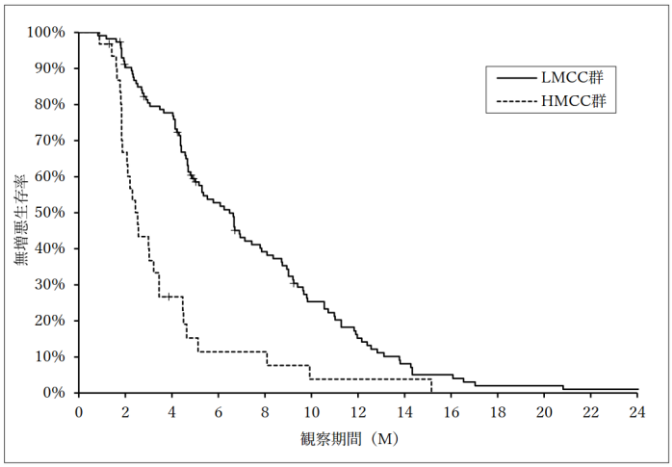

図. メチル化状態別の PFS の Kaplan-Meier プロット

表 8 メチル化状態別の PFS の Kaplan-Meier プロットにおける各時点での無増悪生存率及び 95%CI

経過月	LMCC 群 (n=114)		HMCC 群 (n=31)	
	無増悪生存率	95%CI	無増悪生存率	95%CI
6	52.8%	43.0 – 61.6%	11.4%	3.0 – 26.2%
12	15.2%	9.1 – 22.9%	3.8%	0.3 – 16.2%
18	2.0%	0.4-6.4%	3.8%	0.3 – 16.2%

ログランク検定及び一般化 Wilcoxon 検定のいずれにおいても p 値は $p<0.001$ となり、LMCC 群では HMCC 群と比較して PFS が統計学的に有意に良好であった。PFS 中央値は、LMCC 群で 6.5 ヶ月（95%CI：4.9～7.8 ヶ月）、HMCC 群で 2.5 ヶ月（95% CI：1.9～3.5 ヶ月）であった。

以上より、*RAS* 遺伝子野生型症例では LMCC 群の方が HMCC 群と比較して抗 EGFR 抗体薬による治療成績が良好であったことから、本品による DNA メチル化状態測定に基づく分類が進行・再発大腸癌の治療効果の予測に有用である。

【性能】

1. 性能

(1) 感度試験

バイサルファイト変換処理したメチル化陽性管理検体を測定したとき 16 領域全て ΔCt 値 6 未満、バイサルファイト変換処理したメチル化陰性管理検体を測定したとき 16 領域全て ΔCt 値が算出されないか、算出された場合 ΔCt 値 6 以上である。

(2) 正確性試験

バイサルファイト変換処理したメチル化陽性管理検体を測定したとき、16 領域全てメチル陽性、バイサルファイト変換処理したメチル化陰性管理検体を測定したとき 16 領域全てメチル陰性の判定である。

(3) 同時再現性試験

バイサルファイト変換処理したメチル化陽性管理検体を用いて 3 回繰り返し測定したとき、3 回ともに 16 領域全てメチル陽性、バイサルファイト変換処理したメチル化陰性管理検体を用いて 3 回繰り返し測定したとき、16 領域全てメチル陰性の判定である。

2. 最小検出感度（例示）

0.5 ng/μL

【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) 検体は HIV、HBV、HCV 等の感染のおそれがあるものとして取扱うこと。
(2) 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用すること。
(3) 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。
(4) 試薬をこぼした場合は水で希釈してから拭きとること。
(5) 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 5000 ppm, 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。

2. 使用上の注意

(1) 試薬及び消耗品は専用のものを使用し、その容器・付属品などは他の目的に転用しないこと。
(2) 試薬は必ず保管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こと。
(3) 本品は低温にて輸送し到着後は直ちに温度管理された冷凍庫に入れ、遮光して－20 ± 5℃で保管すること。
(4) 本品の不必要な凍結融解の繰り返しは避け、8 回を超えて凍結融解を行った試薬は使用しないこと。
(5) 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こと。
(6) 全ての試薬は、開封又は分注時にコンタミネーションしないよう注意すること。
(7) 増幅反応を準備するエリアには増幅後の DNA を持ち込まないこと。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すること。
(8) 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開けないこと。
(9) 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。

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) PCR 反応後のチューブは決して開閉しないこと。また、オートクレーブもしないこと。PCR キャリーオーバーコンタミネーションの原因となるおそれがある。反応後のチューブはそのままビニール袋を二重に施し、医療廃棄物として廃棄すること。
(3) 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、医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理すること。
(4) 残余の試薬等の廃棄の際は、水質汚濁防止法等の規制に留意して処理すること。
(5) 遺伝子検査後の核酸試料などは、次亜塩素酸剤を加えて、有効塩素濃度 5000 ppm, 0.5%になるように混和後、一晩放置するなど、核酸を破壊してから、廃棄すること。
(6) 核酸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%）に一晩浸すなどにより核酸を破壊してから焼却処理又は医療廃棄物として処理すること。これらの作業中は十分に換気すること。

【保管方法及び有効期間】

1. 保管方法

・遮光して－20 ± 5℃

＊2. 有効期間

・オリゴミックス溶液：25 ヶ月
・マスターミックス溶液：25 ヶ月
・コントロール①：25 ヶ月
・コントロール②：25 ヶ月

※キットの使用期限は外箱に記載がある。

【包装単位】

24 テスト用

【主要文献】

(1) Sorich MJ. et al. Ann. Oncol. 2015; 26: 13-21.
(2) Karapetis CS. et al. N. Engl. J. Med. 2008; 359: 1757-65.
(3) Ouchi K. et al. Cancer Sci. 2015; 106: 1722-1729.
(4) Okita A. et al. Oncotarget. 2018; 9: 18698-18711.
(5) 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 5 版（2023 年 3 月 20 日）日本臨床腫瘍学会
(6) Osumi et al. Int J Colorectal Dis. 2022 Jun;37(6):1439-1447

【問い合わせ先】

株式会社理研ジェネシス
〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目 2 番 2 号
アートヴィレッジ大崎セントラルタワー
電話番号： 03-5759-6041
FAX 番号： 03-5759-6043

【製造販売元】

株式会社理研ジェネシス
〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目 2 番 2 号
電話番号： 03-5759-6041
FAX 番号： 03-5759-6043