

機械器具 17 血液検査用器具

高度管理医療機器 一般的名称:体細胞遺伝子変異解析セット(抗悪性腫瘍薬適応判定用) (JMDN コード:71059023)

ArcherMET コンパニオン診断システム

再使用禁止(解析キット)

【形状・構造及び原理等】

本品は、Archer MET 解析キット及び Archer 解析用ソフトウェアからなる。

1. Archer MET 解析キット

(1) Archer MET ctDNA キット

| 構成部品 |
|--|
| GMSK0012: Reagents for Archer MET ctDNA |
| Complete end repair |
| Ligation Step 1 |
| Ligation Step 2 |
| First PCR |
| Second PCR Reactions, 1-8 |
| Cleanup Beads |
| Cleanup Buffer |
| ArcherPure™ Purification Beads |
| GMSK0026: ArcherMET Sample Indexing Adapters 1-24 |
| Sample Index Adapters 1-8 |
| Sample Index Adapters 9-16 |
| Sample Index Adapters 17-24 |
| GMSK0027: ArcherMET Library Quantification |
| Library Quant Standard Set |
| Library Quant qPCR Mastermix |
| GMSK0013: Universal ctDNA Assay Gene Specific Primers |
| Universal ctDNA Assay GSP1 |
| Universal ctDNA Assay GSP2 |

(2) Archer MET RNA キット

| 構成部品 |
|--|
| GMSK0014: Reagents for Archer MET RNA |
| Random Priming |
| First Strand cDNA Synthesis |
| Second Strand cDNA Synthesis |
| Complete End Repair |
| Ligation Step 1 |
| Ligation Step 2 |
| First PCR |
| Cleanup Beads |
| Second PCR Reactions 1 - 8 |
| RNA PreSeq® qPCR Mastermix |
| RNA PreSeq® Standard |
| Cleanup Buffer |
| ArcherPure™ Purification Beads |
| GMSK0026: ArcherMET Sample Indexing Adapters 1-24 |
| Sample Index Adapters 1-8 |
| Sample Index Adapters 9-16 |
| Sample Index Adapters 17-24 |
| GMSK0027: ArcherMET Library Quantification |
| Library Quant, Standard Set |
| Library Quant qPCR Mastermix |
| GMSK0015: Universal RNA Assay Gene Specific Primers |
| Universal RNA Assay, GSP1 |
| Universal RNA Assay, GSP2 |

(3) Archer 解析用ソフトウェア

Archer 解析用ソフトウェアはインターネット通信を介して使用者に提供される。使用者はウェブアプリケーション画面でサンプル情報の入力、解析指示、及び結果の受け渡し等を行う。シーケンシングにより作成された FASTQ ファイルは、シーケンサーから S3 bucket にアップロードされ、ウェブアプリケーションからの指示により Bioinformatics

pipeline で解析される。結果はウェブアプリケーションにレポートとして送られる。

【原理】

本品は(1)抽出および定量化された核酸による独自の Anchored Multiplex PCR (AMP™) テクノロジーを使用したライブラリ調製、(2) Illumina MiSeqDx プラットフォームを用いた合成によるシーケンシング (3) Archer 解析ソフトウェアによるシーケンシングデータの分析と最終レポートの発行の、主に 3 つのステップからなる。ライブラリ調整は RNA または ctDNA の入力から開始され、PCR ライブラリの定量で終了し、シーケンサーの手順へと進む。Archer 解析用ソフトウェアはシーケンシングの出力データ (FASTQ ファイル) を読み取り、MET 遺伝子エクソン 14 のスキッピング変異の有無について報告する。

【使用目的又は効果】

本品はホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 癌組織から抽出した RNA または血漿から抽出した循環腫瘍 DNA (ctDNA) 中の MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異の有無の検出を意図する。MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異の検出結果はテポチニブ塩酸水和物の適応判定の補助に用いる。

【使用方法等】

1. 使用方法

1) 検体調整

RNA を検体として用いる場合

① ランダムプライミング: ランダムヘキサマーを用い、検体 RNA のプライミングを行う。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間(分) |
|------|--------|-------|
| 1 | 65 | 5 |
| 2 | 4 | 15分未満 |

② 一本鎖 cDNA の合成: ランダムプライミングを行った RNA を鋳型とし、逆転写により一本鎖 cDNA を合成する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間(分) |
|------|--------|-------|
| 1 | 25 | 10 |
| 2 | 42 | 30 |
| 3 | 80 | 20 |
| 4 | 4 | 維持 |

③ 二本鎖 cDNA の合成: 調整した mRNA と cDNA により構成される二本鎖に RNaseH 及び DNA polymerase I を作用させ、nick translation により二本鎖 cDNA を合成する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間(分) |
|------|--------|-------|
| 1 | 16 | 60 |
| 2 | 75 | 20 |
| 3 | 4 | 維持 |

ctDNA を検体として用いる場合

ctDNA は事前の処理を行うことなく事項の解析ワークフローに用いることができる。

2) 解析ワークフロー

3) 前述の RNA 検体に対する事前処理に続き、RNA 及び ctDNA に共通のワークフローの手順に進む。

④ 末端修復: 検体である二本鎖 DNA (dsDNA) 断片を、T4 DNA ポリメラーゼを用いて末端を平滑化した後、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化を行う。反応液を ArcherPure により精製する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間(分) |
|------|--------|-------|
| 1 | 37 | 30 |
| 2 | 4 | 維持 |

- ⑤ 第1 Ligation: ビオチン化 dATP 及び Klenow fragment により、dsDNA の 3'末端のビオチン化及び A-tail 付加を行う。再度 ArcherPure により精製する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間(分) |
|------|--------|-------|
| 1 | 37 | 15 |
| 2 | 4 | 維持 |

- ⑥ 第2 Ligation: T4 DNA リガーゼを用いて、T overhang を有する sample index adaptors を、A-tail を付加した dsDNA に付加する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間(分) |
|------|--------|-------|
| 1 | 22 | 5 |
| 2 | 4 | 維持 |

この AMP テンプレートを、ストレプトアビジンコートされた常磁性ビーズ (Archer DX Cleanup beads) を用いて単離する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間(分) |
|------|--------|-------|
| 1 | 75 | 10 |
| 2 | 4 | 維持 |

- ⑦ 第1 PCR(PCR1): PCR1 では、遺伝子特異的プライマー (GSP1) 及びユニバーサルプライマー (P5) を用い、sample index によりラベルされた DNA 断片を増幅する。PCR1 の反応終了後、ArcherPure を用いて精製する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間 | サイクル |
|------|--------|-----|------|
| 1 | 95 | 3分 | 1 |
| 2 | 95 | 30秒 | 15 |
| 3 | 65 | 5分 | |
| 4 | 72 | 3分 | 1 |
| 5 | 4 | 維持 | 1 |

- ⑧ 第2 PCR(PCR2): PCR2 では、PCR1 による生成物を鋳型とし、遺伝子特異的プライマーセット (GSP2) を用いて増幅反応を行う。PCR1 及び PCR2 に用いる遺伝子特異的プライマー間の距離は、感度及び特異度を指標として最適化されている。これに加えて PCR2 では、Illumina 社製品に特異的であり、MiSeqDx を用いてサンプル (ライブラリ) を処理する際に必要となる、P7 flow cell binding site 及び 2 つ目の sample index tag を付加する。PCR2 反応後の生成物を ArcherPure により精製し、以降「ライブラリ」と呼称する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間 | サイクル |
|------|--------|-----|------|
| 1 | 95 | 3分 | 1 |
| 2 | 95 | 30秒 | 18 |
| 3 | 65 | 5分 | |
| 4 | 72 | 3分 | 1 |
| 5 | 4 | 維持 | 1 |

- ⑨ ライブラリの定量: DNA 鎖及び適切に希釈された検体、又はライブラリを、ライブラリ調整の際に付加された Illumina universal binding site を標的として、qPCR により増幅する。DNA 鎖の Best fit 線及び検体の線形回帰解析により平均 Cq 値データを絶対濃度に変換し、各ライブラリの濃度を算出する。各ライブラリの濃度を標準濃度調整し、プールする。最終的に得られたプールに対して増幅反応を繰り返した後、適切な濃度でシーケンサーに使用する。インキュベーション条件は以下のとおり。

| ステップ | 温度(°C) | 時間 | サイクル |
|-------------------------------|--------|-----|------|
| 初回変性 | 95 | 5分 | 1 |
| 変性 | 95 | 30秒 | |
| アニーリング/ エクステンション/ データ収集 | 60 | 45秒 | 35 |

- ⑩ シークエンシング: Illumina 社の MiSeqDx 及び Universal Sequencing 試薬を用い、Illumina 社により定められた手順に従ってシーケンシングを行う。

- ⑪ 解析及び報告: MiSeqDx により生成されたシーケンズデータファイル (FASTQ ファイル) に対し、Archer 解析ソフトウェアを用いた一連の事前処理ステップを解析前に実施する。ファイルの準備が終了した後、点変異、挿入又は欠失、コピー数変異、及び RNA スプライス変位を検出するための特異的な calling algorithm を実行する。検出された遺伝子変異が記載された臨床レポートが作成される。

2. 性能を担保する範囲のインプット量

ctDNA: 少なくとも 5 ng の精製 ctDNA 量、≤ 50 µL の検体量
RNA: 10~300 ng の精製 RNA 量、≤ 20 µL の検体量

3. 組み合わせて使用する医療機器

本品による解析には以下の医療機器をシーケンサーとして併用する。

販売名: MiSeqDx 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: 13B1X10303000002

製造販売業者: イルミナ株式会社

性能に関する仕様

| 項目 | 仕様 |
|------------|--------------------------------|
| 蛍光測定 | LED (530 nm, 660 nm) |
| 解析反応温度標準設定 | 65°C ~ 75°C |
| RFID | 周波数 : 13.56 MHz 電源 : 100 mW |

4. 解析用ソフトウェアの要件

本品の解析用ソフトウェアは、Firefox 又は Google Chrome のウェブブラウザが使用可能な汎用 IT 機器で使用できる。

(使用方法に関連する使用上の注意)

(1) 血漿検体の取扱いに関する注意

- 採血はセルフリーDNA の保存に適した採血管を用い、回収された血漿は使用するまで-80°Cで保管してください。

** (2) 凍結乾燥試薬の取扱いに関する注意

- パウチの開封後、凍結乾燥ペレットを目視で確認してください。
- 凍結乾燥ペレットがチューブの底から動いている場合は、内容物をチューブの底に戻すために約 3~5 秒間スピンドアウンしてください。
- 必要な数のチューブを取り出してください。パウチ開封後に残った未使用のチューブは、入っていたパウチに戻して密封して 2~8°C で保管してください。開封後は速やかにご使用ください。
- 1 つより多いペレットが入っているチューブは使用しないでください。
- ペレットが目視できない場合はチューブを使用しないでください。
- ピペットチップで凍結乾燥ペレットに触れないでください。
- 氷冷しながらチューブ中の凍結乾燥ペレットに検体/試薬を加えてください。
- 約 2~5 秒ボルテックスし、凍結乾燥ペレットを溶解および混合してください。過剰なボルテックスは、アッセイの最初のステップに悪影響を与える可能性があります。
- チューブの底に内容物を集める際は、約 2~5 秒遠心してください。
- 工程の間では、チューブは氷冷してください。

(3) ArcherMET Sample Indexing Adapters 使用時の注意

- サンプル間のクロスコンタミネーションを防ぐため、同じ Sample Indexing Adapter を含むライブラリや、同じ Sample Indexing Adapter を含むライブラリのシーケンズプールを同時に準備しないでください。
- ラン間のキャリーオーバーコンタミネーションを防ぐため、連続するシーケンズラン中で同じペアの Sample Index Adapter は使用しないでください。

取扱説明書を必ずご参照ください。

(4) ArcherPure™ Purification Beads 使用時の注意

- ArcherPure™ Purification Beads は使用前に 20~30 分間室温 (15~30℃) に置き、室温に戻し、各使用前に混和して均一化したことを確認してから使用してください。
- ArcherPure™ Purification Beads を洗浄する際は、溶出前に全ての洗浄液が除去されていることを目視してください。
- その他の使用方法に関する注意
 - 同一ロットの構成成分のみを使用し、構成成分を入れ替えないでください。
 - 検体を安全に凍結するための手順中のストップポイントに注意してください (-30℃~-10℃)。
 - 試薬のパウチは開封後、規定された期間使用可能です。(自己認証による。) 使用せずに残った試薬は、入っていたパウチに戻して密封し、2~8℃で保管してください。パウチの開封いかに依らず、キットの有効期間を過ぎた場合は、残っている試薬はすべて廃棄してください。
 - ライブラリの結果に影響を与えるため、指定されたインキュベーションの時間及び温度を守ってください。
 - 検体を加える順番及び各々の位置を管理してください。検体番号の割り付け及びテープにラベルすることが推奨されます。
 - バッチごとに少なくとも 2 つのライブラリを準備してください。バッチごとに最大 24 のライブラリを準備することが推奨されます。

【使用上の注意】

〈重要な基本的注意〉

- 本品は以下の最小検出感度を満たす場合に MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異を報告するよう設計されている。
 - 野生型のリードと比較して 2%以上の MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異を示すリードを含む組織検体
 - 3 リード以上の変異リードかつ 0.2%以上のアレル頻度の一塩基変異 (SNV)、3 リード以上の変異リードかつ 0.1%以上のアレル頻度の小型の挿入/欠失変異 (インデル)、または 5 リード以上の変異リードかつ 0.2%以上のアレル頻度の大きな構造的変異を含む血漿検体
- 本品は 10%以上の腫瘍割合の FFPE 検体から抽出した RNA の解析について検証されている。
- FFPE 検体から核酸を抽出する際は、日本病理学会が定める「ゲノム診療用病理組織検体採取規程」に則り、以下の点に留意してください。
 - 採取した組織は速やかに固定を行う
 - 10%中性緩衝ホルマリン溶液で 6~48 時間の固定を行う
 - 抽出した核酸は、純度や収量を確認する
 - FFPE 検体が過固定等による核酸の品質低下が懸念される場合核酸品質の確認を行う
 - その他詳細は本採取規程を参照する
- 妨害物質・交差反応性
 - 妨害物質

検証試験の結果、以下の物質は MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異の検出に影響を及ぼしませんでした。

 - ①ctDNA 解析: 3 つの内因性物質 (ヘモグロビン、ビリルビン、トリグリセリド)、4 つの外因性物質 (EDTA、エタノール、プロテイナーゼ K、血漿中 DNA 抽出キットの最終洗浄バッファー)
 - ②RNA 解析: 2 つの内因性物質 (壊死組織、ゲノム DNA)、4 つの外因性妨害物質 (パラフィンワックス、ミネラルオイル、エタノール、熱失活プロテイナーゼ K)
 - 交差反応性

遺伝子特異的プライマー (GSP2) の交差反応性を検証した結果、ctDNA 及び RNA 解析の METex14 の関心領域 (ROI) における交差反応性について、本品の規格を満たし、プライマー設計について検証されました。交差反応性は、ROI 外に結合したプライマーで複製されるが ROI の参照配列にアラインメントされるリードによる、誤ったプライミングにより測定されました。METex14 の ROI を標的とするプライマーのその他の遺伝子領域への交差反応性は 0.3%未満でした。誤ってプライミングされたリードは処理中に特定され、変異の判定には用いられません。

【臨床性能】

MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異を有する進行非小細胞性肺癌患者に対するテボチニブ塩酸水和物投与に関する Pivotal な第 II 相試験 (VISION 試験) の結果に基づき、治験で MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異の判定に用いられた対照試験 (CTA) と本品の

MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異解析の一致率を評価した。また、本品による MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異陽性患者における、治験担当医師が判定した奏効率のデータ検討により、臨床的有用性を評価した。

表 1: 血漿検体に対する本品と対照試験の一致率

| 一致率の基準 | 一致率(n/N) | 95% CI* |
|--------|-----------------|--------------|
| 総合一致率 | 91.48 (161/176) | 86.33, 95.15 |
| 陽性一致率 | 78.69 (48/61)* | 66.32, 88.14 |
| 陰性一致率 | 98.26 (113/115) | 93.86, 99.79 |

* Clopper-Pearson 法を用いた 95%正確信頼区間

表 2: 組織検体に対する本品と対照試験の一致率

| 一致率の基準 | 一致率(n/N) | 95% CI* |
|--------|-----------------|--------------|
| 総合一致率 | 97.04 (164/169) | 93.23, 99.03 |
| 陽性一致率 | 93.88 (46/49)* | 83.13, 98.72 |
| 陰性一致率 | 98.33 (118/120) | 94.11, 99.80 |

* Clopper-Pearson 法を用いた 95%正確信頼区間

表 3: 臨床的有用性

| 奏効率 (完全奏効 / 部分奏効) | CTA+ n/N % (95% CI) | CTA+ / CDx+ n/N % (95% CI) | CTA+ / CDx- n/N % (95% CI) |
|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 血漿検体 | 30/66 45.5 (33.1, 58.2) | 20/48 41.7 (27.6, 56.8) | 13/28 46.4 (27.5, 66.1) |
| 組織検体 | 26/60 43.3 (30.6, 56.8) | 20/47 42.6 (28.3, 57.8) | 1/4 25.0 (0.6, 80.6) |
| 血漿検体及び組織検体 | 42/99 42.4 (32.5, 52.8) | 34/78 43.6 (32.4, 55.3) | 5/11 45.5 (16.7, 76.6) |

CTA+: 対照試験陽性、CDx+/- : 本品陽性/陰性

* Clopper-Pearson 法を用いた 95%正確信頼区間

表 4: 血漿検体と組織検体の両方が試験された患者のサブセット

| | 組織検体+ | 組織検体- |
|-------|-------|-------|
| 血漿検体+ | 18 | 1 |
| 血漿検体- | 19 | 58 |

* 検体間の一致は後ろ向きに解析された。VISION 試験の患者は、いずれかの検体による独立した試験に基づき登録された。

VISION 試験に含まれた患者のうち、96 例の患者は組織検体と血漿検体の両方が本品により試験された。これらの患者の検体から、組織検体と血漿検体の総合一致率は 78.95%であった。NSCLC 患者が MET 遺伝子エクソン 14 スキッピング変異を有している頻度は約 3%であり、血漿検体による陰性的中率は 98.4%であった。いずれの検体で陽性と判定された患者も、臨床的結果の改善を示した。

【保管方法及び有効期間等】

〈保管方法〉

保管温度 2~8℃

〈有効期間〉

* 12 カ月

【承認条件】

送付された情報について、個人情報保護に対する適切な手続き及び管理を行うとともに、不正なアクセスを防止するため最良のセキュリティ及びプライバシー保護に係る対策を講ずること。

【製造業者及び製造販売業者の氏名等】

選任製造販売業者 : Invitae Japan 株式会社

外国製造業者 : ArcherDX, LLC. (アメリカ合衆国)

取扱説明書を必ずご参照ください。