

この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

体外診断用医薬品

\*\*2020年12月改訂(第6版)  
\*2020年09月改訂(第5版)

製造販売承認番号:23000EZ00047000

マイクロサテライト不安定性検出キット

## MSI 検査キット(FALCO)

### 【全般的な注意】

1. 本製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で下さい。
2. 添付文書に記載された使用目的および用法・用量に従って使用して下さい。記載された使用目的および用法・用量以外での使用については、結果の信頼性を保証しかねます。
3. 判定結果に基づく診断、使用目的欄に記載の医薬品の適用については、本製品の結果、及び他の関連する検査結果や臨床症状と合わせて、担当医師が総合的に判断して下さい。
4. 本製品では判定が極めて困難なケースなど、検査法の限界で偽陰性もしくは偽陽性になることがあります。ペムプロリズマブ(遺伝子組換え)又はニボルマブ(遺伝子組換え)の投与に際して、判定結果とその限界及び偽陰性もしくは偽陽性だった場合に考えられる不利益についてじゅうぶんに説明して下さい。
5. 本製品をペムプロリズマブ(遺伝子組換え)又はニボルマブ(遺伝子組換え)の適応を判定するための補助として使用する際には、該当する薬剤の本邦における最新の添付文書を参照して下さい。
6. 使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読み、記載に従って使用して下さい。また使用する機器は取扱説明書に記載の保守点検を実施して下さい。
7. アフリカ系(特にピグミー族やサン族)等の人種では、遺伝子多型の頻度が高いと報告されているので<sup>1)</sup>、正常組織又は血液との比較をして判定をして下さい。

### 【形状・構造等(キットの構成)】

1. プライマー・ミックス 100  $\mu$ L  $\times$  1本  
マイクロサテライト領域マーカー(BAT-26、NR-21、BAT-25、MONO-27、NR-24)からなるマルチプレックス蛍光標識プライマー  
BAT-26: GenBank: U41210、標識: FL  
NR-21: GenBank: XM\_033393、標識: JOE  
BAT-25: GenBank: L04143、標識: JOE  
MONO-27: GenBank: AC007684、標識: JOE  
NR-24: GenBank: X60152、標識: TMR  
その他  
Penta-C: GenBank: AL138752、標識: TMR  
Penta-D: GenBank: AC000014、標識: FL
2. 増幅酵素・ミックス 200  $\mu$ L  $\times$  1本  
デオキシアデノシン三リン酸(dATP)  
デオキシングアノシン三リン酸(dGTP)  
デオキシチジン三リン酸(dCTP)  
デオキシチミジン三リン酸(dTTP)  
Taq ポリメラーゼ  
塩化マグネシウム緩衝液
3. レファレンスDNA 10  $\mu$ L  $\times$  1本
4. DNAサイズマーカー 75  $\mu$ L  $\times$  1本

### 【使用目的】\*\*

がん組織から抽出したゲノムDNA中の高頻度マイクロサテライト不安定性(MSI-High)の検出

- ペムプロリズマブ(遺伝子組換え)の固形癌患者への適応を判定するための補助
- ニボルマブ(遺伝子組換え)の結腸・直腸癌患者への適応を判定するための補助
- 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、切除可能な進行・再発の結腸・直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】

検体から抽出したDNAにマイクロサテライト領域BAT-26、NR-21、BAT-25、MONO-27、NR-24を挟むプライマーを加えてPCR増幅を行うと、それぞれのマイクロサテライト領域が増幅されます。PCR増幅産物をDNAシーケンサーにてキャピラリー電気泳動を行うと、DNAのサイズに応じて分離され、その増幅量に応じたピークが検出されます(マルチプレックスPCR-フラグメント解析法)。5種類のマーカーそれぞれに正常組織が示す繰り返し回数(QMVR幅)を設定し、目視にて腫瘍組織の極大ピークがQMVR幅以外の位置にもあればMSI+と識別してMSI-High(MSI-H)を判定します。

### 【操作上の注意】

1. コンタミネーションの防止  
試薬へのPCR増幅産物のコンタミネーションを防ぐために、試薬の調製とPCRの準備を行うエリアとPCR増幅と検出を行うエリアは厳密に区別して下さい。
2. プライマー・ミックスとDNAサイズマーカー試薬には、蛍光色素が含まれているので、遮光に注意して下さい。
3. 測定試料の性質、採取方法  
・本製品の検体には生体由来組織(FFPE組織または再検査陰性対照用の血液)から抽出したDNAを使用して下さい。  
・生体由来組織の取扱いは、日本病理学会「ゲノム診療用病理組織検体取り扱い規程」<sup>2)</sup>を参照して下さい。  
・組織のホルマリン固定を行う際には、DNAの断片化を最小限に留めるよう、10%中性緩衝ホルマリンを用いて固定し、固定時間は6~48時間を目安として下さい。  
・MSI検査用のFFPEスライド切片(5~10  $\mu$ m厚)の腫瘍細胞が占める割合が50%未満の場合は、腫瘍細胞の含有率を高める目的で腫瘍細胞部分を残して非腫瘍部分を除去(マクロダイセクション)する為、連続切片のスライド(3~5  $\mu$ m厚)を薄切してHE染色し、腫瘍部分をマーキングしてMSI検査用のFFPEスライドと共に提出して下さい。
4. 妨害物質・妨害薬剤  
FFPE検体のパラフィン、キシレン、血液検体のヘモグロビン中のヘム分子、抗凝固剤などの共存物質がPCRを阻害する事があります。DNA抽出キットの添付文書および取扱説明書をよく読んでDNAの抽出・精製を行って下さい。
5. 検査前工程(DNA抽出)  
(1) FFPE検体  
市販のDNA抽出キットと自動核酸抽出装置として一般的なプロメガ株式会社のDNA抽出キットのMaxwell RSC DNA FFPE Kit又はMaxwell RSC DNA FFPE Kit-PKK RSC(脱パラフィン不要)と自動核酸抽出装置Maxwell RSC、又は株式会社キアゲンのDNA抽出キットのQIAamp DNA FFPE Tissue Kitと自動DNA抽出装置QIAcubeを用いて、MSI検査に必要なDNA濃度とDNA純度が得られる事を確認済みです。

下記に操作手順の概略を示します。

- ① FFPEスライド切片の腫瘍細胞が占める割合が50%以上の場合は、組織切片をスライドから剥がして、各施設の標準作業書に従って脱パラフィンを行って下さい。

- ② 腫瘍細胞の割合が50%未満の場合は、HE染色スライドにFFPEスライドを重ねてHE染色スライドの腫瘍部マーキングを写し取り、FFPEスライドの腫瘍部マーキング以外の切片部分を除いた後に腫瘍部組織切片をスライドから剥がして脱パラフィンを行って下さい。
- ③ 脱パラフィン処理後の組織細胞が入ったマイクロチューブをDNA抽出キットの添付文書及び自動DNA抽出装置の取扱説明書に従ってDNA抽出を行って下さい。

(2) 新鮮凍結組織

検体としてホルマリン固定前の手術材料を用いる場合があります。使用する自動核酸抽出装置は上記のFFPE組織と同じで、DNA抽出キットとしてゲノムDNA抽出用を使用します。例示として、プロメガ株式会社のMaxwell RSC Tissue DNA Kitや株式会社キアゲンのQIAamp DNA Mini Kitを用いてDNA抽出キットの添付文書及び自動DNA抽出装置の取扱説明書に従ってDNA抽出を行って下さい。

以後の測定は、FFPEから抽出したDNAと同じ「操作方法」に準じて操作して下さい。

(3) 再検査用血液DNA

泳動波形からMSI+を識別する時に、判定に注意を要するパターンで識別が困難な場合の再検査の方法として正常組織の波形と比較します。この正常組織DNA対照として血液DNAを用いる場合があります。使用する自動核酸抽出装置は上記のFFPE組織と同じで、DNA抽出キットとして血液DNA抽出用を使用して下さい。例示として、プロメガ株式会社のMaxwell RSC Blood DNA Kitや株式会社キアゲンのQIAamp DNA Blood Mini Kitを用いてDNA抽出キットの添付文書及び自動DNA抽出装置の取扱説明書に従ってDNA抽出を行って下さい。

以後の測定は、FFPEから抽出したDNAと同じ「操作方法」に準じて操作して下さい。

6. その他

本製品の測定には、サーマルサイクラーとしてアプライドバイオシステムズVRTi Dxまたはその同等品、DNAシーケンサーとしてApplied Biosystems 3130xlジェネティックアナライザ、アプライドバイオシステムズ3500xl Dxまたはこれらの同等品を使用して下さい。また、DNAシーケンサーの使用前には必ずPowerPlex 5C Matrix Standardsを用いて、取扱説明書を参照の上、スペクトラルキャリブレーションを行って下さい。

【用法・用量（操作方法）】

1. 本製品以外に必要な試薬・器具・機器等

- (1) DNA抽出キット (Maxwell RSC DNA FFPE Kit, Maxwell RSC DNA FFPE Kit-PKK Custom, Reliaprep FFPE gDNA Miniprep System (プロメガ株式会社)、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (株式会社キアゲン) など)
- (2) サーマルサイクラー (アプライドバイオシステムズVRTi Dx (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) など)
- (3) DNAシーケンサー (Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザ、アプライドバイオシステムズ3500xl Dx (ライフテクノロジーズジャパン株式会社) など)
- (4) PowerPlex 5C Matrix Standard (製品番号 DG4850 (プロメガ株式会社))
- (5) マイクロ遠心機
- (6) プレート遠心機
- (7) 96ウェルプレート (RNase/DNaseフリー)
- (8) 1.5mLチューブ (RNase/DNaseフリー)
- (9) マイクロピペット及びチップ (チップはフィルター付き)
- (10) TEバッファ (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) (TE Buffer, 1X, Molecular Biology Grade (プロメガ株式会社) など)
- (11) 精製水 (ヌクレアーゼフリー)
- (12) Hi-Di Formamide (製品番号4311320 (ライフテクノロジーズジャパン株式会社))
- (13) MSI-Highを示すゲノムDNA (EpiScope Unmethylated HCT116 DKO gDNA、濃度 100ng/μL (タカラバイオ株式会社) など)

2. 試薬及び試液の調製方法

(1) 陰性コントロール

本製品に付属のレファレンスDNA (本製品による試験で、5種類のMSIマーカーすべてにおいてQMVR幅からシフトした位置に極大ピークを示さずMSI検査結果が陰性となるヒト由来のゲノムDNA、10ng/μL)をTEバッファで10倍に希釈したもの(1ng/μL)を陰性コントロールとします (冷蔵保存)。

(2) 陽性コントロール

本製品による試験で、5種類のMSIマーカーすべてにおいてQMVR幅からシフトした位置に極大ピークを示してMSI-Highとなる細胞株DNAをTEバッファで1ng/μLに調製した陽性DNAに陰性コントロールを等量加えたものを陽性コントロールとします (陽性DNA濃度:0.5ng/μL) (冷蔵保存)。

(3) ノーテンプレートコントロール

TEバッファを、鋳型DNAを含まないノーテンプレートコントロールとします。

(4) PCR反応液の調製

1反応あたりに、プライマー・ミックス、増幅酵素・ミックス及び精製水を下記の容量比率で混合したPCR反応液を調製して下さい。PCR反応液量は、検体数+3 (ノーテンプレートコントロール、陰性コントロール、陽性コントロール)+1~2 (ピペット分注ロス分)の反応分を調製して下さい。

表1. 反応液の調製

プライマー・ミックス	1.0μL
増幅酵素・ミックス	2.0μL
精製水	5.0μL
計	8.0μL

(5) ローディング・ミックス

1反応あたりに、本製品に付属のDNAサイズマーカーを0.5μLと変性剤のホルムアミドを9.5μLの容積比率で調製して、キャピラリー電気泳動で用いるローディング・ミックスを調製します。

3. 検体の調製

本製品は、【操作上の注意】3. 測定試料の性質、採取方法に留意して準備したFFPE組織から抽出したゲノムDNAを検体として用います。抽出DNAは、TEバッファで10ng/μLに調製して下さい。

4. 操作方法

4-1. PCR増幅

(1) PCR増幅は、自動サーマルサイクラー装置の取扱説明書に従い、下記のMSI検査用のPCR条件を設定して操作して下さい。

表2. PCRプログラム

温度	時間	サイクル数
96°C	2分00秒	1
94°C	30秒	30
59°C	2分00秒	
72°C	1分30秒	1
60°C	45分00秒	
4°C	∞	1

(2) DNA抽出後の検体DNA液の濃度を10ng/μLになるようにTEバッファで希釈して測定サンプルを用意して下さい。陰性コントロール、陽性コントロール及び再検査用血液DNAの濃度は1ng/μLとして下さい。

(3) PCRプレートにPCR反応液を8μLずつ分注しておいて、測定サンプル (ノーテンプレートコントロール、陰性コントロール、陽性コントロール及び検体DNA)を2μL加えて下さい。

(4) プレート穴をキャッピング又はプレートをシールしてボルテックスを行い、スピンドウンします。

(5) プレートをサーマルサイクラー装置にセットしてPCRを行って下さい。

#### 4-2. キャピラリー電気泳動

(1) キャピラリー電気泳動は、使用する自動電気泳動装置の取扱説明書に従い、下記のMSI検査用の電気泳動条件を設定して操作して下さい。ここでは、一般的なシーケンサーとしてライフテクノロジーズジャパン株式会社のApplied Biosystems 3130xlジェネティックアナライザとアプライドバイオシステムズ3500xL Dxの電気泳動条件を例示します。

表3. 電気泳動条件

項目	設定値	
	3130xl	3500xL Dx
キャピラリー長(cm)	36	50
ポリマータイプ	POP7	POP7
オープン温度(°C)	60	60
ラン電圧(kV)	15.0	19.5
プレ・ラン電圧(kV)	15.0	15.0
インジェクション電圧	1.2	1.6
ランタイム(秒)	1200	1330
プレ・ランタイム(秒)	180	180
インジェクションタイム	23	15
データディレイ(秒)	60	1

(2) PCR後の反応液を精製水で10倍希釈します。

(3) 電気泳動用プレートに必要な反応数分のローディング・ミックスを10μLずつ分注し、そこに希釈したPCR後の反応液を1μL加えます。

(4) プレートにプレートシーリングマット(セプタマット)を取り付けてボルテックスを行い、スピンドウンします。

(5) プレートを電気泳動装置にセットして電気泳動を行います。

#### 4-3. データ解析

(1) データ解析は、使用するDNAシーケンサーに付属のデータ解析ソフトの取扱説明書に従い実施して下さい。ここでは、ライフテクノロジーズジャパン株式会社のGeneMapperソフトウェアでの手順を例示します。

✓ GeneMapperに付属のマイクロサテライト解析用のデフォルト解析メソッドの条件をベースにして、Analysis Methodに本製品を用いるMSI解析メソッドを設定します。

✓ DNAサイズマーカー(標識:WEN、Dye:Orange)の設定をします。(60, 65, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 (bp))

✓ Panelに表4の各マーカーの極大ピークのQMVR幅の値をセットして、QMVR幅をマーク表示する様に設定します。

(2) 下記のQMVR幅を解析ソフトに設定する事により、泳動パターンのグラフ上にQMVR幅の背景が色で表示されます。目視にて各マーカーにおける極大ピークがQMVR幅の背景色以外の位置にも認められる場合にMSI+と識別します。

表4. QMVR幅(Applied Biosystems 3130xlジェネティックアナライザまたはアプライドバイオシステムズ3500xL Dx使用の場合)

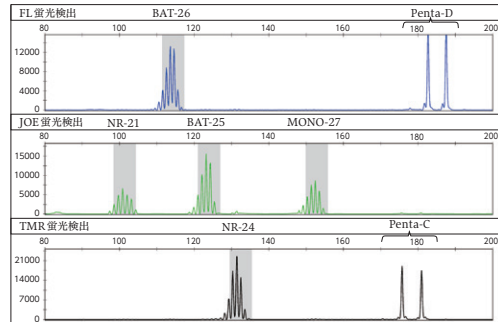
マーカー	QMVR幅(bp)	表示色/蛍光標識
BAT-26	111~117	青/FL
NR-21	98~104	緑/JOE
BAT-25	121~127	緑/JOE
MONO-27	150~156	緑/JOE
NR-24	129~135	黒/TMR

(泳動パターンの代表例)

#### ① 陰性のパターン

各マーカーにおいて、QMVRの範囲内だけに単一の左右対称形の極大ピークを認める場合はMSI-と識別します。

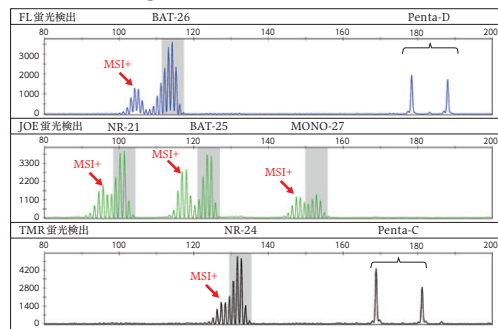
図1. 陰性の泳動パターン



#### ② MSI-Highのパターン

各マーカーにおける極大ピークがQMVRの範囲以外にも認める場合は、MSI+と識別します。

図2. MSI-Highの泳動パターン



#### ③ 判定に注意を要するパターン

③-1: 各MSIマーカーにおいてQMVRの範囲内に極大ピークを認めるが、山形のすそ野の片側に盛り上がり(図3-1の▲)を認めて、左右対称形の単一極大ピークと言い切れない場合

③-2: 各MSIマーカーにおいてQMVRの範囲内に複数の極大ピークを認める場合(図3-2の▲)

③-3: ヒトゲノムで癌種に関係ない陰性の波形(陰性コントロール)に比べて極大ピークが全体的にシフト(1~3リピート)している場合(図3-3の▲)

以上の場合については、正常組織由来の波形と繰り返し回数の変化が少ないMSI+由来の波形が重なっているケースが疑われますので、「2.再検査の基準と再検査の方法」の手順に従い再検査を行って下さい。

図3-1. 複数マーカーで盛り上がりを認める判定に注意を要する泳動パターン

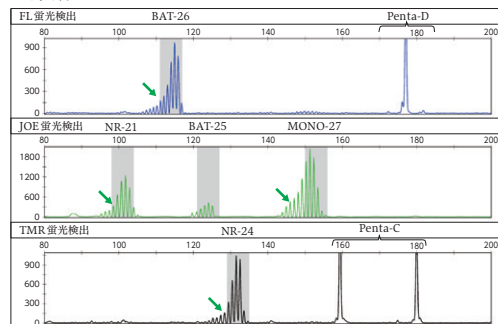


図3-2. QMVR範囲内に複数の極大ピークを認める判定に注意を要する泳動パターン

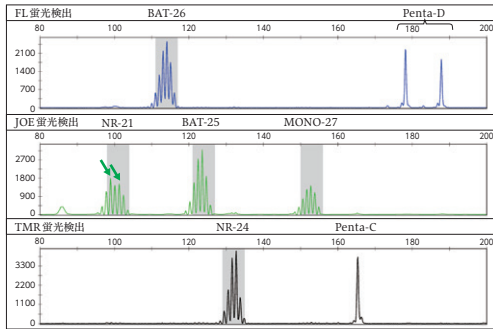
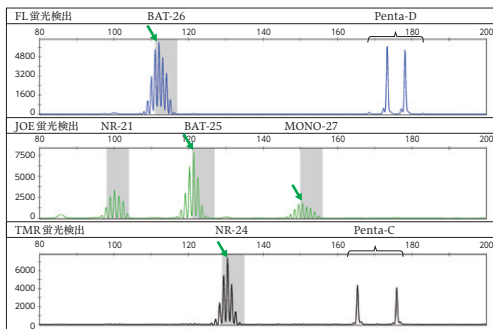


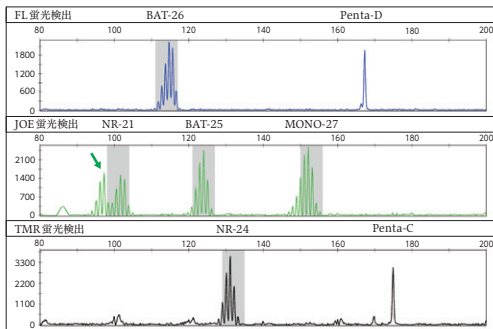
図3-3. QMVR範囲内の極大ピークが全体的にシフトしている判定に注意を要する泳動パターン



④ 遺伝子多型を疑うパターン

MSIマーカーの1マーカー又は2マーカーだけにQMVRの範囲以外にもピークを認める場合、そのMSIマーカーにおける遺伝子多型による繰り返し回数の変化が疑われます(図4の▲)。この現象が1マーカーのみに認められる場合の判定結果は「陰性」となります。この現象が2マーカー以上に認める場合の判定結果は「MSI-High」となります。本邦における遺伝子多型による偽陽性の発生率は、10万人に1人と極めて少ないので、ほとんど問題にならないと考えられますが、その可能性を無視出来ないため、「2.再検査の基準と再検査の方法」の手順に従い再検査を行って下さい。

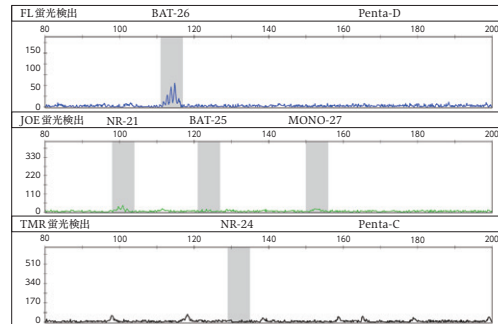
図4. 遺伝子多型を疑う泳動パターン



⑤ 極大ピークが低いパターン

検体の泳動波形の極大ピークの高さが陰性コントロールや陽性コントロールの高さに比べて極端に低く、MSIの識別が困難な場合、FFPE検体のDNAの分解が進んでいる事が想定されるので、「2.再検査の基準と再検査の方法」の手順に従い再検査を行って下さい。

図5. 極大ピークが低い泳動波形パターン



(MSI+識別上の注意)

- ① 波形ピークの蛍光強度が高い場合、他の蛍光波長にもわずかな波形が同じ泳動度で同じピーク比率で交差して認められる場合がありますので、MSI+と識別しないように注意下さい。
- ② JOE(緑)の波形においては、85-90 bp付近にアーティファクトのピーク(ゆるやかな山形)が認められる場合がありますので、MSI+と識別しないように注意下さい。

【測定結果の判定法】

1. 判定方法

- (1) ノーテンプレートコントロールの確認  
試薬のコンタミネーションがないことの確認として、増幅波形が検出されないことを確認します。
- (2) コントロールDNAの確認
  - ① 陰性コントロール  
各マーカーの極大ピークがQMVR範囲内にあることを確認します。
  - ② 陽性コントロール  
各マーカーの極大ピークがQMVR範囲外にもあることを確認します。

(1)(2)について、上記結果にならない場合、試薬の調製やPCR反応が正常に行われなかったと考えられるので、試薬及び試液の調製からやり直して下さい。

(3) 検体の判定

5種類のMSIマーカーのなかで、MSI+と識別されたMSIマーカーの数により、以下の判定基準に従ってMSI検査の結果を判定します。

- ① MSI+と識別されたMSIマーカーの数が、2個から5個(MSI-High)の場合は、「陽性(MSI-High)」
- ② MSI+と識別されたMSIマーカーの数が、0個(MSS)または1個(MSI-Low)の場合は、「陰性」

2. 再検査の基準と再検査の方法

「(3)検体の判定」で「明らかにMSI+と識別されたMSIマーカーの数が2個以上あった場合」は、陽性(MSI-High)と判定するが、明らかなMSI+を2マーカー以上で識別できない場合でも、下記の「(1)判定に注意を要するパターン」のマーカーと合わせて2マーカー以上になる場合は、下記の「再検査の方法」に従ってMSIを識別する。

再検査の基準

(1) 判定に注意を要するパターン

- ① 各MSIマーカーにおいてQMVRの範囲内に極大ピークを認めるが、山形のすそ野の片側に盛り上がり認めて、左右対称形の単一極大ピークと言い切れない場合
- ② 各MSIマーカーにおいてQMVRの範囲内に複数の極大ピークを認める場合

③ 陰性コントロールに比べて極大ピークが全体的にシフト(1~3リピート)している場合

再検査の方法: FFPEスライドからマクロダイセクションで正常組織を採取して抽出したDNA又は血液から抽出したDNAを用いて検査を行い、その泳動波形を正常組織対照として比較し、正常組織でも同様の波形を認める場合は、MSI-と識別し、腫瘍組織のみに変化を認める場合は、MSI+と識別して下さい。

(2) 遺伝子多型を疑うパターン

MSIマーカーの2マーカーだけにQMVRの範囲以外にもピークを認める場合は、そのMSIマーカーにおける遺伝子多型による繰り返し回数の変化による「偽陽性(MSI-High)」の可能性がります。

再検査の方法: 上記(1)の手順で得られる正常組織対照の泳動波形と比較し、正常組織でも同様にQMVRの範囲以外にもピークを認める場合は、遺伝子多型による泳動波形と識別し、結果を「陰性」として判定し、腫瘍組織のみに変化を認める場合は、「陽性(MSI-High)」と判定して下さい。

(3) 極大ピークが低いパターン

泳動波形の極大ピークの高さが陰性コントロールや陽性コントロールの高さに比べて極端に低く、MSIの識別が困難な場合、FFPE検体のDNAの分解が進んでいる事が想定されるので、「4-2.キャピラリー電気泳動(2)」でPCR産物の希釈を行わず、再度キャピラリー電気泳動を行なって下さい。それでも蛍光強度が弱い場合は、「4-1.PCR増幅(1)」のPCRサイクル回数だけを36回にしてPCR増幅操作を行い、増幅率を増やして再検査を行って下さい。

(正常組織と比較する再検査での注意)

Penta-CとPenta-Dは、繰り返し回数の個体差の大きい、5塩基繰り返しDNA領域で、個体ごとに異なるDNAサイズを示します。再検査において正常組織(又は血液)と腫瘍組織を比較する時に、Penta-CとPenta-Dの極大ピークが同じ位置に泳動されている事を確認して同じ患者の検体である事を確認する為に用いて下さい。この波形が異なる場合は、検体の取り間違えが考えられます。

3. 判定上の注意

(1) PCRサイクル数を36回に増やした再検査で判定が可能になった場合は、DNA分解により各マーカーのMSIの状況を正しく反映していない可能性もあるので、「検体のDNA分解が進んでいると考えられます」などの情報提供を臨床医にして、参考値として取り扱って下さい。

(2) PCRサイクル数を36回に増やした再検査でもMSIの識別が困難な場合は、DNAの分解がかなり進んでいると考えられるので、「検体のDNA分解がかなり進んでいると考えられます」などの情報提供を臨床医にして、結果値は「検査不能」として報告して下さい。

【臨床的意義】

1. ペムプロリズマブの局所進行性又は転移性のがん患者への適応を判定する為の補助

(1) 臨床検体を用いた同等性試験<sup>3)</sup>

MSI-High固形癌に対する臨床試験として、国際共同第II相試験(164試験および158試験)、海外第II相試験(016試験)、および海外第Ib相試験(028試験)が実施されました。これらの試験における患者選択には、各試験施設におけるMSI検査またはMMR免疫染色検査が用いられました。

本製品の臨床性能を評価するため、164試験、016試験、028試験に参加した患者の保存検体53症例について本製品を用いて測定しました。本製品と各試験施設での検査結果との一致率は下表の通り、感度(陽性一致率)は100%、特異度(陰性一致率)は100%となり、本製品と臨床試験における結果の同等性が示されました。

表5. 同等性試験の集計表

		164 試験, 016 試験, 028 試験		合計
		陰性	陽性*	
本製品	陰性	24	0	24
	陽性(MSI-High)	0	29	29
合計		24	29	53

\*: MSI-High又はdMMR

表6. 本製品と臨床試験の結果の一致率

	検体数	一致率
感度(陽性一致率)	29/29	100%
特異度(陰性一致率)	24/24	100%

(2) 臨床検体を用いた相関性試験<sup>3)</sup>

GI-SCREEN CRC-MSI研究において研究用キットでMSI検査が実施された切除不能進行再発大腸癌435症例の保存検体を、本製品を用いて測定しました。研究用キットでは腫瘍部と正常部を比較する方法で判定されました。本製品と研究用キットでの結果の一致率は、下表の通り、感度(陽性一致率)は100%、特異度(陰性一致率)は100%となり、腫瘍部のみで判定する本製品と、正常部と比較して判定する研究用キットの高い相関性が示されました。

表7. 相関性試験の集計表

		GI-SCREEN CRC-MSI 研究		合計
		陰性	陽性(MSI-High)	
本製品	陰性	424	0	424
	陽性(MSI-High)	0	11	11
合計		424	11	435

表8. 本製品とGI-SCREEN CRC-MSI 研究での結果の一致率

	検体数	一致率
感度(陽性一致率)	11/11	100%
特異度(陰性一致率)	424/424	100%

(3) 複数癌種における試験<sup>3)</sup>

大腸癌を除く固形癌の16癌種(子宮体癌、胃癌、卵巣癌、胆管癌、乳癌、膵臓癌、食道癌、脳腫瘍、肺癌、皮膚癌、肝癌、胆嚢癌、尿管癌、前立腺癌、膀胱癌、小腸癌)の計59検体について、本製品で測定した結果、40例が陰性で、19例がMSI-Highとなり、大腸癌と同様にMSI+の識別が可能でした。

(4) 臨床試験情報

国際共同第II相試験(164試験)

切除不能な局所進行又は転移性(Stage IV)の結腸・直腸癌で、MSI-HighまたはMMR欠損の患者を対象にペムプロリズマブを投与する多施設国際共同試験です。過去に標準治療を受けた患者群(コホートA)に組み入れられた61例のうち日本人症例は7例でした。コホートAのデータカットオフ日(2017年2月10日)時点での奏効率は27.9%、病勢コントロール値は50.8%でした。また、日本人患者の奏効率は28.6%、病勢コントロール値は57.1%でした。

海外第II相試験(016試験)

MSI-High結腸・直腸癌(コホートA:MSI-High CRC)、MSS結腸・直腸癌(コホートB:MSS CRC)、結腸・直腸癌以外のMSI-High癌(コホートC:MSI-High non-CRC)の進行性転移癌患者を対象にペムプロリズマブを単独投与した海外第II相試験(医師主導臨床試験)です。データカットオフ日(コホートA,C:2016年12月19日、コホートB:2015年5

月)時点で111例の患者(コホートA:40例、B:25例、C:46例)が組入れられました。本試験には、12の異なるがん腫の患者が登録されました。MSI-HighのコホートA(CRC患者、N=40)及びMSI-HighのコホートC(non-CRC患者、N=46)の奏効率は、それぞれ52%及び54%でしたが、MSS結腸・直腸癌患者(N=25)では奏効が認められませんでした。コホートA及びCを合わせたMSI-Highの固形癌での奏効率は53%、病勢コントロール率は77%でした。016試験では、MSI-Highの結腸・直腸癌及び結腸・直腸癌以外のMSI-Highのがん患者に対してペムプロリズマブが臨床効果を示したが、MSSの結腸・直腸癌では臨床効果を示さなかったことが観察されました。

海外第Ib相試験(028試験)

PD-L1発現陽性の進行性固形がん患者にペムプロリズマブを投与する多施設共同の結腸癌又は直腸癌を含む20種類の固形がんのマルチコホート試験です。結腸・直腸癌コホートは、2014年3月から組入れを開始して23例のPD-L1陽性の患者が組入れられました。奏効が得られたのは1例だけで、23例の奏効率は4.3%でした。この23例に対してMSI検査を行ったところ、奏効が得られた1例のみがMSI-Highでした。

2. ニボルマブのがん化学療法後に増悪した治療切除不能な進行・再発の結腸・直腸がん患者への適応を判定する為の補助

(1) 臨床検体を用いた同等性試験<sup>3)</sup>

次項で示す142試験と臨床背景が同等であるGI-SCREEN CRC-MSI研究において、研究用キットでMSI検査が実施された切除不能進行再発大腸癌435症例の保存検体を、本製品並びに142試験で用いられた中央測定法(Modifiedベセスダ法)を用いて測定しました。比較可能な389症例における本製品と中央測定法での結果の一致率は、表9-1の通り、感度(陽性一致率)は67%、特異度(陰性一致率)は100%となりました。また、TGFβRIIのサンガーシーケンス法を含む3種類の第三法による追加検討を行った結果、表9-2の通り、感度(陽性一致率)は91%、特異度(陰性一致率)は100%となりました。

表9-1. 同等性試験の集計表(主解析結果)

		中央測定法		合計
		陰性	陽性 (MSI-High)	
本製品	陰性	374	5	379
	陽性 (MSI-High)	0	10	10
合計		374	15	389

表9-2. 同等性試験の集計表(第三法による追加検討を含む結果)

		中央測定法		合計
		陰性	陽性 (MSI-High)	
本製品	陰性	378	1	379
	陽性 (MSI-High)	0	10	10
合計		378	11	389

(2) 臨床試験情報\*

国際共同第II相試験(142試験)

再発又は転移性のMSI-High又はdMMRを有する結腸・直腸がんを対象に、ニボルマブ単剤、ニボルマブとイピリムマブを併用投与する等の複数コホートからなる多施設共同試験です。ニボルマブ単剤治療では、74名にニボルマブが投与され、主要評価項目である医師判定による奏効率は31.1%でした。ニボルマブとイピリムマブの併用投与では、119名に併用投与され、主要評価項目である医師判定による奏効率は54.6%でした。

3. 大腸癌におけるリンチ症候群の診断の補助\*\*

「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイドライン第4版」<sup>4)</sup>及び「遺伝性大腸癌診療ガイドライン2020年版」<sup>5)</sup>にお

いて、リンチ症候群のスクリーニングを目的としてMSI検査を実施することが推奨されています。

4. 大腸癌における化学療法の選択の補助\*\*

「大腸がん診療における遺伝子関連検査等のガイドライン第4版」<sup>4)</sup>及び「大腸癌治療ガイドライン2019年度版」<sup>6)</sup>において、切除可能大腸がんの再発リスクに応じた治療選択の補助を目的としてMSI検査を実施することが推奨されています。

【性能】

1. 性能

性能試験は以下の管理検体を用いて行いました。

- 弱陽性コントロール (15%MSI陽性DNA)
- 陽性コントロール (50%MSI陽性DNA)
- 陰性コントロール (MSI陰性DNA)

(1) 感度

弱陽性コントロールを試験するとき、5マーカー全てにおいて、MSI+と識別され、MSI-Highを示します。

(2) 正確性

陽性コントロールを試験するとき、5マーカー全てにおいて、MSI+と識別されMSI-Highを示し、陰性コントロールを試験するとき、5マーカー全てにおいて、MSI+が識別されず陰性を示します。

(3) 同時再現性

陽性コントロールおよび陰性コントロールを同時に3回試験するとき、3回の判定が有効で同等です。

2. 最小検出感度

MSI陽性DNAをMSI陰性DNAで段階的に希釈し、MSI陽性DNAの濃度が、100%、50%、40%、30%、20%、10%、5%、2.5%となるサンプルを調製し試験したところ、5マーカー全てにおいてMSI+を識別できたMSI陽性DNA濃度は10%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

- (1) 検体はHIV、HBV、HCV等の感染の恐れがあるものとして取り扱って下さい。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して下さい。
- (2) 試薬や検体が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着したりした場合には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下さい。

2. 使用上の注意

- (1) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないで下さい。
- (2) ロットの異なる試薬を組み合わせ使用しないで下さい。

3. 廃棄上の注意

- (1) 検体は感染の可能性があるものとして注意して取り扱って下さい。検査に使用した器具は、次のいずれかの方法で処理して下さい。
  - ・ 2%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬させます。
  - ・ 0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸漬させます。
  - ・ 121°Cで20分間以上高圧蒸気滅菌します。
- (2) 試薬及び器具などを廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法などの規定に従って処理して下さい。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

- 20°C以下で保存して下さい。
- DNAサイズマーカーは、キット開封後、冷蔵保存して下さい。

2. 有効期間

24ヵ月、使用期限は外箱に表示してあります。

【包装単位】

MSI検査キット(FALCO) 100テスト

**【主要文献】\*\***

- 1) Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, et al. Multipopulation Analysis of Polymorphisms in Five Mononucleotide Repeats Used to Determine the Microsatellite Instability Status of Human Tumors. J Clin Oncol. 2006 Jan 10; 24(2): 241-51.
- 2) 日本病理学会「ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程」
- 3) 自社データ
- 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) 大腸癌研究会「遺伝性大腸癌診療ガイドライン2020年版」
- 6) 大腸癌研究会「大腸癌治療ガイドライン2019年度版」

**【問い合わせ先】**

株式会社ファルコバイオシステムズ  
〒613-0036 京都府久世郡久御山町田井西荒見17番地の1  
TEL:0774-46-2639  
FAX:0774-46-2655  
E-mail: idenshi-grp@falco.co.jp

**【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】**

株式会社ファルコバイオシステムズ  
〒613-0036 京都府久世郡久御山町田井西荒見17番地の1

