

TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム

illumina®

Assay Workflow Guide

本製品は医療機器です。

使用目的

TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム™は、ターゲット次世代シーケンスを用いたがんゲノムプロファイリング検査で、固形悪性新生物を有するがん患者のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織サンプルから抽出した核酸と NextSeq™ 550Dx システムを使用して 517 個の遺伝子のバリエーションを検出することができます。本テストにより、DNA からは一塩基変異、多塩基変異、挿入、欠失、および遺伝子増幅を、また RNA からは遺伝子融合およびスプライスバリエーションを検出することができます。

アッセイの概要と説明

注意 MSIおよびTMBの三次解析は、日本で認可された適用の範囲外であり、参考情報として提供されます。

臨床説明

がんは世界各国で死因のトップとなっている疾病であり、あらゆる組織で発症する可能性があります^{1, 2}。がんの遺伝学的根拠の解析は、標的療法の効果が期待できる患者を特定する場合、および新たな治療法を開発する場合に重要な役割を果たします。がんの発症や進行には多くの遺伝子が関与しており、多くのがんはそのような遺伝子とその機能に影響を及ぼすさまざまなバリエーションを持っています。このようなバリエーションとしては、一塩基変異（SNV）、多塩基変異（MNV）、挿入または欠失、遺伝子増幅、遺伝子融合、スプライスバリエーションなどの遺伝子変異が挙げられます。また、がん遺伝子変異によってもたらされるその他の結果としては、がん特異的免疫反応を誘発する新抗原（ネオアンチゲン）の産生が挙げられます。

TruSight Oncology Comprehensive パネルシステムは、表 1に示すがん関連遺伝子の大規模なパネル検査で遺伝子のバリエーションを広範に評価する、定性的な次世代シーケンサー（NGS）を用いた包括的なゲノムプロファイリング検査です。アッセイでは、表 1に示すように、517個の遺伝子におけるスモールDNAバリエーションに加え、遺伝子増幅、融合遺伝子、スプライスバリエーションを検出します。また、TERT遺伝子を除くすべての遺伝子のコーディング配列をカバーし（TERT遺伝子はプロモーター領域のみ）、TMBスコアとMSIステータスを参考情報として評価します。アッセイの対象には、専門機関やその他の主要な米国ガイドラインで引用されている内容が含まれています。また、独立系コンソーシアムの発表論文や後期段階の製薬研究も、TSO Comprehensiveアッセイの設計に影響を与えています。

バリエーションコールから除外される領域のリストについては、イルミナの[サポートサイト](#)から入手できる『TruSight Oncology Comprehensive Block List』（文書番号：200009524）を参照してください。

表 1は、スモールDNAバリエント（S）、遺伝子増幅（A）、融合遺伝子（F）、スプライスバリエント（Sp）の各バリエントタイプのカテゴリを示したものです。スモールDNAバリエントには、SNV、MNV、挿入および欠失が含まれます。

表 1 TSO Comprehensive パネルシステムアッセイ遺伝子パネル

番号	Entrez ID	遺伝子	バリエントタイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエントタイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエントタイプ
1	25	ABL1	S	176	2261	FGFR3	S, F	351	7849	PAX8	S
2	27	ABL2	S	177	2264	FGFR4	S	352	55193	PBRM1	S
3	84142	ABRAXAS1	S	178	2271	FH	S	353	5133	PDCD1	S
4	90	ACVR1	S	179	201163	FLCH	S	354	80380	PDCD1LG2	S
5	91	ACVR1B	S	180	2313	FLI1	S	355	5156	PDGFRA	S
6	25960	ADGRA2	S	181	2321	FLT1	S	356	5159	PDGFRB	S
7	207	AKT1	S	182	2322	FLT3	S	357	5163	PKD1	S
8	208	AKT2	S	183	2324	FLT4	S	358	5170	PDPK1	S
9	10000	AKT3	S	184	3169	FOXA1	S	359	5241	PGR	S
10	238	ALK	S, F	185	668	FOXL2	S	360	84295	PHF6	S
11	242	ALOX12B	S	186	2308	FOXO1	S	361	8929	PHOX2B	S
12	139285	AMER1	S	187	27086	FOXP1	S	362	5287	PIK3C2B	S
13	29123	ANKRD11	S	188	10818	FRS2	S	363	5288	PIK3C2G	S
14	22852	ANKRD26	S	189	8880	FUBP1	S	364	5289	PIK3C3	S
15	324	APC	S	190	2534	FYN	S	365	5290	PIK3CA	S
16	367	AR	S	191	2559	GABRA6	S	366	5291	PIK3CB	S
17	369	ARAF	S	192	2623	GATA1	S	367	5293	PIK3CD	S
18	10139	ARFRP1	S	193	2624	GATA2	S	368	5294	PIK3CG	S
19	8289	ARID1A	S	194	2625	GATA3	S	369	5295	PIK3R1	S
20	57492	ARID1B	S	195	2626	GATA4	S	370	5296	PIK3R2	S
21	196528	ARID2	S	196	2627	GATA6	S	371	8503	PIK3R3	S
22	84159	ARID5B	S	197	348654	GEN1	S	372	5292	PIM1	S
23	171023	ASXL1	S	198	79018	GID4	S	373	5336	PLCG2	S
24	55252	ASXL2	S	199	2735	GLI1	S	374	10769	PLK2	S
25	472	ATM	S	200	2767	GNA11	S	375	5366	PMAIP1	S
26	545	ATR	S	201	10672	GNA13	S	376	5378	PMS1	S
27	546	ATRX	S	202	2776	GNAQ	S	377	5395	PMS2	S
28	6790	AURKA	S	203	2778	GNAS	S	378	10957	PNRC1	S
29	9212	AURKB	S	204	2874	GPS2	S	379	5424	POLD1	S
30	8312	AXIN1	S	205	26585	GREM1	S	380	5426	POLE	S
31	8313	AXIN2	S	206	2903	GRIN2A	S	381	5468	PPARG	S
32	558	AXL	S, F	207	2913	GRM3	S	382	8493	PPM1D	S
33	567	B2M	S	208	2932	GSK3B	S	383	5518	PPP2R1A	S
34	8314	BAP1	S	209	3020	H3F3A	S	384	5520	PPP2R2A	S

番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーションタイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーションタイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーションタイプ
35	580	BARD1	S	210	3021	H3F3B	S	385	5537	PPP6C	S
36	27113	BBC3	S	211	440093	H3F3C	S	386	639	PRDM1	S
37	8915	BCL10	S	212	3082	HGF	S	387	80243	PREX2	S
38	596	BCL2	S, F	213	3006	HIST1H1C	S	388	5573	PRKAR1A	S
39	598	BCL2L1	S	214	3017	HIST1H2BD	S	389	5584	PRKCI	S
40	10018	BCL2L11	S	215	8350	HIST1H3A	S	390	5591	PRKDC	S
41	599	BCL2L2	S	216	8358	HIST1H3B	S	391	5071	PRKN	S
42	604	BCL6	S	217	8352	HIST1H3C	S	392	5652	PRSS8	S
43	54880	BCOR	S	218	8351	HIST1H3D	S	393	5727	PTCH1	S
44	63035	BCORL1	S	219	8353	HIST1H3E	S	394	5728	PTEN	S
45	613	BCR	S	220	8968	HIST1H3F	S	395	5781	PTPN11	S
46	330	BIRC3	S	221	8355	HIST1H3G	S	396	5789	PTPRD	S
47	641	BLM	S	222	8357	HIST1H3H	S	397	5802	PTPRS	S
48	657	BMPR1A	S	223	8354	HIST1H3I	S	398	11122	PTPRT	S
49	673	BRAF	S, F	224	8356	HIST1H3J	S	399	9444	QKI	S
50	672	BRCA1	S	225	333932	HIST2H3A	S	400	11021	RAB35	S
51	675	BRCA2	S	226	126961	HIST2H3C	S	401	5879	RAC1	S
52	23476	BRD4	S	227	653604	HIST2H3D	S	402	5885	RAD21	S
53	83990	BRIP1	S	228	8290	HIST3H3	S	403	10111	RAD50	S
54	694	BTG1	S	229	6927	HNF1A	S	404	5888	RAD51	S
55	695	BTK	S	230	3190	HNRNPK	S	405	5890	RAD51B	S
56	811	CALR	S	231	10481	HOXB13	S	406	5889	RAD51C	S
57	84433	CARD11	S	232	3265	HRAS	S	407	5892	RAD51D	S
58	841	CASP8	S	233	3283	HSD3B1	S	408	5893	RAD52	S
59	865	CBFB	S	234	3320	HSP90AA1	S	409	8438	RAD54L	S
60	867	CBL	S	235	23308	ICOSLG	S	410	5894	RAF1	S, F
61	595	CCND1	S	236	3399	ID3	S	411	5903	RANBP2	S
62	894	CCND2	S	237	3417	IDH1	S	412	5914	RARA	S
63	896	CCND3	S	238	3418	IDH2	S	413	5921	RASA1	S
64	898	CCNE1	S	239	3459	IFNGR1	S	414	5925	RB1	S
65	29126	CD274	S	240	3479	IGF1	S	415	8241	RBM10	S
66	80381	CD276	S	241	3480	IGF1R	S	416	9401	RECQL4	S
67	972	CD74	S	242	3481	IGF2	S	417	5966	REL	S
68	973	CD79A	S	243	9641	IKBKE	S	418	5979	RET	S, F
69	974	CD79B	S	244	10320	IKZF1	S	419	6009	RHEB	S
70	79577	CDC73	S	245	3586	IL10	S	420	387	RHOA	S
71	999	CDH1	S	246	3575	IL7R	S	421	253260	RICTOR	S
72	51755	CDK12	S	247	3623	INHHA	S	422	6016	RIT1	S
73	1019	CDK4	S	248	3624	INHBA	S	423	54894	RNF43	S

番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーション タイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーション タイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーション タイプ
74	1021	CDK6	S	249	3631	INPP4A	S	424	6098	ROS1	S, F
75	1024	CDK8	S	250	8821	INPP4B	S	425	8986	RPS6KA4	S
76	1026	CDKN1A	S	251	3643	INSR	S	426	6198	RPS6KB1	S
77	1027	CDKN1B	S	252	3660	IRF2	S	427	6199	RPS6KB2	S
78	1029	CDKN2A	S	253	3662	IRF4	S	428	57521	RPTOR	S
79	1030	CDKN2B	S	254	3667	IRS1	S	429	861	RUNX1	S
80	1031	CDKN2C	S	255	8660	IRS2	S	430	862	RUNX1T1	S
81	1050	CEBPA	S	256	3716	JAK1	S	431	23429	RYBP	S
82	1058	CENPA	S	257	3717	JAK2	S	432	6389	SDHA	S
83	1106	CHD2	S	258	3718	JAK3	S	433	54949	SDHAF2	S
84	1108	CHD4	S	259	3725	JUN	S	434	6390	SDHB	S
85	1111	CHEK1	S	260	7994	KAT6A	S	435	6391	SDHC	S
86	11200	CHEK2	S	261	5927	KDM5A	S	436	6392	SDHD	S
87	23152	CIC	S	262	8242	KDM5C	S	437	26040	SETBP1	S
88	64326	COP1	S	263	7403	KDM6A	S	438	29072	SETD2	S
89	1387	CREBBP	S	264	3791	KDR	S	439	23451	SF3B1	S
90	1399	CRKL	S	265	9817	KEAP1	S	440	10019	SH2B3	S
91	64109	CRLF2	S	266	3792	KEL	S	441	4068	SH2D1A	S
92	1436	CSF1R	S	267	3799	KIF5B	S, F	442	55164	SHQ1	S
93	1441	CSF3R	S	268	3815	KIT	S	443	9353	SLIT2	S
94	1452	CSNK1A1	S	269	9314	KLF4	S	444	84464	SLX4	S
95	10664	CTCF	S	270	89857	KLHL6	S	445	4087	SMAD2	S
96	1493	CTLA4	S	271	4297	KMT2A	S	446	4088	SMAD3	S
97	1495	CTNNA1	S	272	3845	KRAS	S	447	4089	SMAD4	S
98	1499	CTNNB1	S	273	3916	LAMP1	S	448	6597	SMARCA4	S
99	8452	CUL3	S	274	9113	LATS1	S	449	6598	SMARCB1	S
100	1523	CUX1	S	275	26524	LATS2	S	450	6602	SMARCD1	S
101	7852	CXCR4	S	276	4004	LMO1	S	451	8243	SMC1A	S
102	1540	CYLD	S	277	53353	LRP1B	S	452	9126	SMC3	S
103	1616	DAXX	S	278	4067	LYN	S	453	6608	SMO	S
104	54165	DCUN1D1	S	279	8216	LZTR1	S	454	9627	SNCAIP	S
105	4921	DDR2	S	280	9863	MAGI2	S	455	8651	SOCS1	S
106	51428	DDX41	S	281	10892	MALT1	S	456	6663	SOX10	S
107	1665	DHX15	S	282	5604	MAP2K1	S	457	64321	SOX17	S
108	23405	DICER1	S	283	5605	MAP2K2	S	458	6657	SOX2	S
109	22894	DIS3	S	284	6416	MAP2K4	S	459	6662	SOX9	S
110	3337	DNAJB1	S	285	4214	MAP3K1	S	460	23013	SPEN	S
111	1786	DNMT1	S	286	9175	MAP3K13	S	461	8405	SPOP	S
112	1788	DNMT3A	S	287	9020	MAP3K14	S	462	6708	SPTA1	S

番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーションタイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーションタイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーションタイプ
113	1789	DNMT3B	S	288	4216	MAP3K4	S	463	6714	SRC	S
114	84444	DOT1L	S	289	5594	MAPK1	S	464	6427	SRSF2	S
115	1871	E2F3	S	290	5595	MAPK3	S	465	10274	STAG1	S
116	8726	EED	S	291	4149	MAX	S	466	10735	STAG2	S
117	51162	EGFL7	S	292	4170	MCL1	S	467	6774	STAT3	S
118	1956	EGFR	S, F, Sp	293	9656	MDC1	S	468	6775	STAT4	S
119	1964	EIF1AX	S	294	4193	MDM2	S	469	6776	STAT5A	S
120	1974	EIF4A2	S	295	4194	MDM4	S	470	6777	STAT5B	S
121	1977	EIF4E	S	296	9968	MED12	S	471	6794	STK11	S
122	6921	ELOC	S	297	100271849	MEF2B	S	472	83931	STK40	S
123	27436	EML4	S, F	298	4221	MEN1	S	473	51684	SUFU	S
124	56946	EMSY	S	299	4233	MET	S, A, Sp	474	23512	SUZ12	S
125	2033	EP300	S	300	23269	MGA	S	475	6850	SYK	S
126	4072	EPCAM	S	301	4286	MITF	S	476	6872	TAF1	S
127	2042	EPHA3	S	302	4292	MLH1	S	477	6926	TBX3	S
128	2044	EPHA5	S	303	4300	MLL3	S	478	6929	TCF3	S
129	2045	EPHA7	S	304	4352	MPL	S	479	6934	TCF7L2	S
130	2047	EPHB1	S	305	4361	MRE11	S	480	7012	TERC	S
131	2064	ERBB2	S, A	306	4436	MSH2	S	481	7015	TERT	S
132	2065	ERBB3	S	307	4437	MSH3	S	482	80312	TET1	S
133	2066	ERBB4	S	308	2956	MSH6	S	483	54790	TET2	S
134	2067	ERCC1	S	309	4485	MST1	S	484	7030	TFE3	S
135	2068	ERCC2	S	310	4486	MST1R	S	485	7037	TFRC	S
136	2071	ERCC3	S	311	2475	MTOR	S	486	7046	TGFBR1	S
137	2072	ERCC4	S	312	4595	MUTYH	S	487	7048	TGFBR2	S
138	2073	ERCC5	S	313	4602	MYB	S	488	55654	TMEM127	S
139	2078	ERG	S, F	314	4609	MYC	S	489	7113	TMPRSS2	S, F
140	54206	ERRFI1	S	315	4610	MYCL	S	490	7128	TNFAIP3	S
141	2099	ESR1	S, F	316	4613	MYCN	S	491	8764	TNFRSF14	S
142	2113	ETS1	S	317	4615	MYD88	S	492	7150	TOP1	S
143	2115	ETV1	S, F	318	4654	MYOD1	S	493	7153	TOP2A	S
144	2118	ETV4	S, F	319	4665	NAB2	S	494	7157	TP53	S
145	2119	ETV5	S	320	4683	NBN	S	495	8626	TP63	S
146	2120	ETV6	S	321	8202	NCOA3	S	496	7186	TRAF2	S
147	2130	EWSR1	S	322	9611	NCOR1	S	497	84231	TRAF7	S
148	2146	EZH2	S	323	257194	NEGR1	S	498	7248	TSC1	S
149	54855	FAM46C	S	324	4763	NF1	S	499	7249	TSC2	S
150	2175	FANCA	S	325	4771	NF2	S	500	7253	TSHR	S
151	2176	FANCC	S	326	4780	NFE2L2	S	501	7307	U2AF1	S

番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーション タイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーション タイプ	番号	Entrez ID	遺伝子	バリエーション タイプ
152	2177	FANCD2	S	327	4792	NFKBIA	S	502	7422	VEGFA	S
153	2178	FANCE	S	328	7080	NKX2-1	S	503	7428	VHL	S
154	2188	FANCF	S	329	4824	NKX3-1	S	504	79679	VTCN1	S
155	2189	FANCG	S	330	4851	NOTCH1	S	505	8838	WISP3	S
156	55215	FANCI	S	331	4853	NOTCH2	S	506	7490	WT1	S
157	55120	FANCL	S	332	4854	NOTCH3	S	507	331	XIAP	S
158	355	FAS	S	333	4855	NOTCH4	S	508	7514	XPO1	S
159	2195	FAT1	S	334	4869	NPM1	S	509	7516	XRCC2	S
160	55294	FBXW7	S	335	4893	NRAS	S	510	10413	YAP1	S
161	2246	FGF1	S	336	3084	NRG1	S, F	511	7525	YES1	S
162	2255	FGF10	S	337	64324	NSD1	S	512	57621	ZBTB2	S
163	2259	FGF14	S	338	4914	NTRK1	S, F	513	51341	ZBTB7A	S
164	9965	FGF19	S	339	4915	NTRK2	S, F	514	463	ZFH3	S
165	2247	FGF2	S	340	4916	NTRK3	S, F	515	7764	ZNF217	S
166	8074	FGF23	S	341	9688	NUP93	S	516	80139	ZNF703	S
167	2248	FGF3	S	342	256646	NUTM1	S	517	8233	ZRSR2	S
168	2249	FGF4	S	343	5058	PAK1	S	N/A	N/A	N/A	N/A
169	2250	FGF5	S	344	5063	PAK3	S	N/A	N/A	N/A	N/A
170	2251	FGF6	S	345	57144	PAK5	S	N/A	N/A	N/A	N/A
171	2252	FGF7	S	346	79728	PALB2	S	N/A	N/A	N/A	N/A
172	2253	FGF8	S	347	142	PARP1	S	N/A	N/A	N/A	N/A
173	2254	FGF9	S	348	5077	PAX3	S, F	N/A	N/A	N/A	N/A
174	2260	FGFR1	S, F	349	5079	PAX5	S	N/A	N/A	N/A	N/A
175	2263	FGFR2	S, F	350	5081	PAX7	S	N/A	N/A	N/A	N/A

手順の原理

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイは、抽出した核酸をインプット物質として各施設で手動で実施される検査です。FFPE 組織から抽出した DNA または RNA (あるいはその両方) を使用してライブラリーを調製した後、がん関連遺伝子に対してライブラリーを濃縮し、NextSeq 550Dx システムでシーケンスします。

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイには以下のプロセスが含まれます。

- ライブラリー調製と濃縮: RNA の場合は、計 40 ng の RNA を二本鎖相補的 DNA (cDNA) に変換します。ゲノム DNA (gDNA) の場合は、40 ng の gDNA を小さなフラグメントに断片化します。シーケンス用のユニバーサルアダプターを cDNA および gDNA 断片にライゲーションします。シーケンス中にフローセルの表面にライブラリーが結合できるように、P5 および P7 アダプター配列を各ライブラリーに取り込みます。これらのアダプターには i5 および i7 インデックス配列が含まれており、これによって個々のサンプルを同定します。gDNA サンプルのライブラリーの場合は、分子バーコード (UMI) を使用して個々の分子も同定されます。ライブラリーは次に、キャプチャーベースの方法を用いて、目的の特定の遺伝子に対して濃縮されます。本アッセイのターゲットとなる遺伝子領域にまたがるビオチン化プローブ配列をライブラリーにハイブリダイズします。ストレプトアビジン磁気ビーズでキャプチャーすることにより、プローブとハイブリダイズされたターゲットライブラリーを非ターゲットライブラリーから分離します。ターゲット濃縮ライブラリーを洗浄し、増幅します。さらに、シーケンス用にプールされたライブラリーに均等に含まれるように、ビーズベースの方法を使用して各濃縮ライブラリーの量をノーマライズします。
- シーケンスと一次解析: ノーマライズした濃縮ライブラリーをプールしてフローセル上でクラスター形成させた後、NextSeq 550Dx システムで Sequence by Synthesis (SBS) ケミストリーを使用してシーケンスします。SBS ケミストリーは、可逆的ターミネーター法を使用して、伸長する DNA 鎖に取り込まれた単一の蛍光標識デオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) 塩基を検出します。各シーケンスサイクル中に、単一の dNTP が核酸鎖に付加されます。この dNTP 標識が、重合化のターミネーターとして働きます。dNTP が取り込まれるたびに、塩基同定のために蛍光色素がイメージングされ、その後次のヌクレオチドを取り込めるように切断されます。可逆的ターミネーターに結合した 4 種類の dNTP (A、G、T、C) が別々の単一分子として存在するため、自然競合によって取り込みバイアスが最小限に抑えられます。一次解析中に、シーケンスサイクルごとにシグナル強度測定から直接ベースコールが行われ、塩基ごとに配列が決定されます。各ベースコールにクオリティスコアが割り当てられます。
- 二次解析: TSO Comprehensive パネルシステムのランセットアップを容易にし、シーケンス結果の二次解析を実行するために、NextSeq 550Dx システム上に Local Run Manager ソフトウェアの一部として Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールが搭載されています。二次解析では、ラン処理と品質管理が検証された後、デマルチプレックス、FASTQ ファイルの生成、アライメント、バリエーションコールが行われます。デマルチプレックスでは、ライブラリー調製手順中に付加された固有のインデックス配列に基づいて、プールされたライブラリーからデータが振り分けられます。続いて、FASTQ 中間ファイルが生成されます。このファイルには、各サンプルのシーケンスリードとクオリティスコアが含まれます。ただし、フィルターをパスしなかったクラスターのリードは除外されます。次に、配列間の関係を同定するためにシーケンスリードがリファレンスゲノムに対してアライメントされ、類似領域に基づいてスコアが割り当てられます。アライメントされたリードは BAM 形式でファイルに書き込まれます。TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールは、DNA または RNA サンプル (あるいはその両方) から生成されたライブラリーに対して異なるアルゴリズムを使用し、DNA サンプルの

場合はスモール DNA バリエント、遺伝子増幅、TMB、および MSI を、RNA サンプルの場合は融合遺伝子とスプライスバリエントを、それぞれコールします。TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールにより、シーケンスメトリクスやバリエントコール形式 (VCF) ファイルを含む複数の出力ファイルが生成されます。VCF ファイルには、リファレンスゲノムの特定の位置で見つかったバリエントに関する情報が含まれます。シーケンスメトリクスと個々の出力ファイルはサンプルごとに生成されます。二次解析と三次解析の詳細については、『Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module Workflow Guide』（文書番号：200049183）を参照してください。

- 三次解析：Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールにより実行される三次解析は、TMB と MSI の計算、KB と組織タイプを使用した 2 種類の臨床的有意性レベルへのバリエントの腫瘍プロファイリング、および結果レポートの生成で構成されています。腫瘍プロファイリングは、包括的ゲノムプロファイリングと呼ばれることもあります。バリエントの解釈結果と TMB および MSI バイオマーカーの結果は、結果レポートにまとめられます。

注意： MSI および TMB の三次解析は、日本で認可された適用の範囲外であり、参考情報として提供されます。

手順の制限

体外診断専用。

- 処方使用専用。本テストは臨床検査規制に従って使用する必要があります。
- TSO Comprehensive パネルシステム結果レポートで Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance（臨床的に有意なエビデンスがあるゲノムの所見、レベル 2）および Genomic Findings with Potential Clinical Significance（臨床的に有意な可能性があるゲノムの所見、レベル 3）に分類されたバリエントについて、臨床的検証は行われていません。
- 患者のケアや治療に関する決定は、特定の地域社会で確立されている標準治療に従い、患者の既往歴と家族歴、身体診察、他の診断検査からの情報、患者の希望など、患者の状態に関する該当するすべての情報を考慮したうえで、治療担当医師が独立した医学的判断に基づいて下す必要があります。
- FFPE サンプルの品質には大きなばらつきがあります。標準固定手順以外の方法で固定された検体から抽出した核酸は、本アッセイの品質管理要件（80 ページの「品質管理」）を満たさない可能性があります。保管期間が 5 年を超える FFPE ブロックは有効性が低いことが実証されています。
- 臓器または組織移植を受けた患者から採取したサンプルを用いた TSO Comprehensive パネルシステムの性能は、評価されていません。
- 壊死組織の量が多いと（23% 以上）、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイによる遺伝子増幅および RNA 融合遺伝子の検出能力が阻害される可能性があります。
- 腫瘍含有量（面積比）が 20% 未満の場合、体細胞ドライバー変異の検出結果は信頼できない可能性があります。
- 組織に関連するヘモグロビンは、MET スプライスバリエントのサポートリード数を減少させます。
- コンタミネーション検出は以下の影響を受ける可能性があります。
 - 欠失やヘテロ接合性の喪失を伴う高度に再編成されたゲノムでは、TSO Comprehensive 解析モジュールが DNA サンプルをコンタミネーションとして誤分類してしまう可能性があります（CONTAMINATION_SCORE > 3106 および p 値 > 0.049）。

- 手順中のコンタミネーションは、前のサンプル処理工程で生じた核酸によって引き起こされる可能性があります。優良試験所基準や本ユーザーガイドに記載されているすべての注意事項とガイドラインに従うことで、サンプル間のクロスコンタミネーションを回避できます。
- TSO Comprehensive パネルシステムには、RNAライブラリーのコンタミネーションを検出するメトリクスが用意されていません。同一のランで複数のサンプルに同じ融合遺伝子が検出された場合は、TSO Comprehensive パネルシステムのテストを再度実施することをお勧めします。
- 検査結果で変異が陰性だとしても、本アッセイの検出下限（LoD）を下回るレベルの変異が存在した可能性は否定しきれません。
- スモール DNA バリエントの検出感度は以下の影響を受ける可能性があります。
 - 低複雑度のゲノムコンテキスト。
 - バリエント長の増加。
- 遺伝子増幅は、TSO Comprehensive パネルシステムによって報告される唯一のコピー数バリエントです。遺伝子欠失は、本アッセイでは報告されません。
- TSO Comprehensive 解析モジュールの融合遺伝子コールアルゴリズムでは、アノテーション付き遺伝子の境界外に広がる読み取り値からのエビデンスが考慮されない可能性があります。
- 融合遺伝子の検出感度は以下の影響を受ける可能性があります。
 - 低いライブラリー複雑度。アッセイのワークフローに逸脱があると、サポートリード数の減少につながります（例：45 ページの「RNA の変性とアニーリング」の混合ステップを参照してください）。
 - 単一遺伝子が両方のブレイクポイントにまたがる場合。
 - いくつかの融合遺伝子のブレイクポイントが1つまたは複数のパートナーと互いに近接している場合、複数のブレイクポイントおよびパートナーが単一のブレイクポイントおよびパートナーとして報告される可能性があります。
 - インサートサイズの中央値の低さ。最低限必要なインサートサイズの中央値は 80 bp ですが、80 ~ 100 bp の範囲では感度は低下します。
 - 融合遺伝子ブレイクポイントの周辺での低い配列複雑性または相同ゲノムコンテキスト。
- 融合遺伝子ブレイクポイントが、重複遺伝子を含むゲノム領域で発生した場合、融合遺伝子に関する遺伝子の検出に影響が出る可能性があります。複数の遺伝子でブレイクポイントが重なっている場合は、すべての遺伝子がセミコロン区切りで報告されます。
- TERT プロモーター領域でのカバレッジが一貫していないと、低カバレッジ深度の理由で「結果なし」になる可能性があります。
- バリエントがレベル 2（Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance：臨床的に有意なエビデンスがあるゲノムの所見）とレベル 3（Genomic Findings with Potential Clinical Significance：臨床的に有意な可能性があるゲノムの所見）の間で間違ったレベルに分類されている、レポートのアノテーション情報が正しくない、といったアノテーションまたは KB のエラーが原因で、偽陽性または偽陰性の結果になる可能性があります。エラーの原因には次の 3 つが考えられます。
 - TSO Comprehensive パネルシステムによるバリエントのアノテーション。COSMIC v92 に登録されている 2,448,350 種類のバリエントの解析に基づくエラー率は約 0.0027% です。したがって、エラーの可能性は低いと言えます。

- キュレーションプロセスによる KB エラー。
- KB コンテンツの関連性の経時的な変化。レポートに反映されている知識は、KBバージョンがキュレーションされた時点のものです。
- TSO Comprehensive パネルシステムは、臨床的に有意なエビデンスがあるバリエーションまたは臨床的に有意な可能性があるバリエーションを報告するときに体細胞バリエーションを報告するように設計されています。Tumor-only テストとして、生殖細胞系列（遺伝的）バリエーションが報告される可能性はありますが、これは意図的ではありません。TSO Comprehensive パネルシステムは KB を使用して、そのバリエーションが生殖細胞系列と体細胞系列のどちらを起源とするかを明示的にアノテーションせずにバリエーションを報告します。
- KB に含まれる関連性は、確立された固形悪性新生物中に存在するバリエーションに対する治療的、診断的、および予後的関連性のみです。癌を発症しやすいか、またはがんリスクの関連性は、KB に含まれていません。
- 次の表に、本アッセイでは検出できない 3 つの RET バリエーションのヌクレオチド変化を示します。同じアミノ酸変化の他のヌクレオチド変化は検出できます。

表 2 3 つの RET バリエーションのヌクレオチド変化

アミノ酸変化	Chr*	位置	リファレンスアリル	代替アリル
p.E632_ A640delinsVRP	chr10	43609943	AGCTGTGCCGCACGGTGATCGCAGCC	TAAGGCCG
				TGCGGCCG
p.E632_ C634delinsDVR	chr10	43609944	GCTGTGC	TGTCAGG
p.C634_ R635insPK	chr10	43609952	GC	CTAAAAGA
				CAAAGAGA
				CAAAAAGG
				CCAAAAGG
				CTAAGAGG

*Chr = 染色体

製品のコンポーネント

TSO Comprehensive パネルシステムテストは以下のもので構成されています。

- TruSight Oncology Comprehensive Kit (イルミナ カタログ番号 : 20032573) : このキットには、24 個の DNA ライブラリーと 24 個の RNA ライブラリーを生成するのに十分な量の試薬が含まれています。これは患者サンプルとコントロールを含めた量です。コントロールは別売りです (17 ページの「[TruSight Oncology Controls](#)」を参照してください)。
- Knowledge Base (KB) : 定期的に更新されています。今後 KB が更新された場合は、フィールドアプリケーションサイエンティスト (FAS) がデータ共有フォルダーを使用して KB と関連ファイルをユーザーに提供します。ユーザーは KB をダウンロードして、シーケンサーにインストールします。
- Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module (イルミナ カタログ番号 20067230) は、がんプロファイリングクレームをサポートしています (1 ページの「[使用目的](#)」を参照してください)。このソフトウェアは、以下のコンポーネントで構成されています。
 - TSO Comprehensive Claims Packages
 - TSO Comprehensive Software Suite
 - TSO Comprehensive USB Kit

イルミナのサービス担当者が、TSO Comprehensive 解析モジュールの適切なバージョンを NextSeq 550Dx システム上の Local Run Manager にインストールします。解析モジュールの詳細については、『Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module Workflow Guide』(文書番号 : 200049183) を参照してください。

試薬

提供される試薬

TSO Comprehensive kit では、以下の試薬が提供されます。

TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (1/8)、REF : 20031127

試薬	REF	数量	液量	活性成分	保管温度
First Strand Synthesis Mix (FSM)	20031431	1	260 µL	塩類とヌクレオチドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Second Strand Mix (SSM)	20031432	1	720 µL	塩類、DNA ポリメラーゼ、RNase H、およびヌクレオチドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Elution Primer Frag Mix (EPH3)	20031433	1	250 µL	塩類とランダムヘキサマーを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Reverse Transcriptase (RVT)	20031434	1	70 µL	逆転写酵素を含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (2/8) (凍結)、REF : 20031118

試薬	REF	数量	液量	活性成分	保管温度
End Repair A-tailing A (ERA1-A)	20031435	2	85 µL	T4 DNA ポリメラーゼとポリヌクレオチドキナーゼを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
End Repair A-tailing B (ERA1-B)	20031436	2	210 µL	塩類とヌクレオチドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Adapter Ligation Buffer 1 (ALB1)	20031437	2	1.73 mL	塩類を含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
DNA Ligase 3 (LIG3)	20031438	2	190 µL	リガーゼを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Short Universal Adapters 1 (SUA1)	20031439	1	290 µL	汎用シーケンスオリゴヌクレオチドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
UMI Adapters v1 (UMI)	20031496	1	290 µL	汎用シーケンスオリゴヌクレオチドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Stop Ligation Buffer (STL)	20031440	2	480 µL	塩類を含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µL	DNA ポリメラーゼとヌクレオチドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C

TruSight Oncology Comp Library Prep (3/8) (冷蔵)、REF : 20031119

試薬	REF	数量	液量	活性成分	保管温度
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12.4 mL	塩類を含む緩衝水溶液	2°C ~ 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6.11 mL	磁気ビーズを含む水溶液	2°C ~ 8°C
TE Buffer (TEB)	20013443	1	10 mL	Tris EDTA 溶液	2°C ~ 8°C

TruSight Oncology Comp UP Index Primers (4/8)、REF : 20031120

活性成分：個別にバーコードが付けられたオリゴヌクレオチドプライマーを含む緩衝水溶液。



警告

Unique Index Primer (UPxx) は RNA または DNA サンプルに使用してください。同じライブラリーで CPxx と UPxx のインデックスプライマーを組み合わせ使用しないでください。

インデックス プライマー	REF	数量	液量	i7 インデックス	i7 配列	i5 インデックス	i5 配列	保管温度
UP01	20031445	1	24 µL	D702	TCCGGAGA	D503	AGGATAGG	-25℃～-15℃
UP02	20031446	1	24 µL	D707	CTGAAGCT	D504	TCAGAGCC	-25℃～-15℃
UP03	20031447	1	24 µL	D717	CGTAGCTC	D509	CATCCGAA	-25℃～-15℃
UP04	20031448	1	24 µL	D706	GAATTCGT	D510	TTATGAGT	-25℃～-15℃
UP05	20031449	1	24 µL	D712	AGCGATAG	D513	ACGAATAA	-25℃～-15℃
UP06	20031450	1	24 µL	D724	GCGATTAA	D515	GATCTGCT	-25℃～-15℃
UP07	20031451	1	24 µL	D705	ATTCAGAA	D501	AGGCTATA	-25℃～-15℃
UP08	20031452	1	24 µL	D713	GAATAATC	D502	GCCTCTAT	-25℃～-15℃
UP09	20031453	1	24 µL	D715	TTAATCAG	D505	CTTCGCCT	-25℃～-15℃
UP10	20031454	1	24 µL	D703	CGCTCATT	D506	TAAGATTA	-25℃～-15℃
UP11	20031455	1	24 µL	D710	TCCGCGAA	D517	AGTAAGTA	-25℃～-15℃
UP12	20031456	1	24 µL	D701	ATTACTCG	D518	GACTTCCT	-25℃～-15℃
UP13	20031457	1	24 µL	D716	ACTGCTTA	D511	AGAGGCGC	-25℃～-15℃
UP14	20031458	1	24 µL	D714	ATGCGGCT	D512	TAGCCGCG	-25℃～-15℃
UP15	20031459	1	24 µL	D718	GCCTCTCT	D514	TTCGTAGG	-25℃～-15℃
UP16	20031460	1	24 µL	D719	GCCGTAGG	D516	CGCTCCGC	-25℃～-15℃

TruSight Oncology Comp CP Index Primers (5/8)、REF : 20031126

活性成分：個別にバーコードが付けられたオリゴヌクレオチドプライマーを含む緩衝水溶液。

**警告**

Combinatorial Index Primer (CPxx) は DNA サンプルのみに使用してください。同じライブラリーで CPxx と UPxx のインデックスプライマーを組み合わせ使用しないでください。

インデックス プライマー	REF	数量	液量	i7 インデックス	配列	i5 インデックス	配列	保管温度
CP01	20031461	1	20 µL	D721	CATCGAGG	D507	ACGTCCTG	-25℃～-15℃
CP02	20031462	1	20 µL	D723	CTCGACTG	D508	GTCAGTAC	-25℃～-15℃
CP03	20031463	1	20 µL	D709	CGGCTATG	D519	CCGTCGCC	-25℃～-15℃
CP04	20031464	1	20 µL	D711	TCTCGCGC	D520	GTCCGAGG	-25℃～-15℃
CP05	20031465	1	20 µL	D723	CTCGACTG	D507	ACGTCCTG	-25℃～-15℃
CP06	20031466	1	20 µL	D709	CGGCTATG	D507	ACGTCCTG	-25℃～-15℃
CP07	20031467	1	20 µL	D711	TCTCGCGC	D507	ACGTCCTG	-25℃～-15℃
CP08	20031468	1	20 µL	D721	CATCGAGG	D508	GTCAGTAC	-25℃～-15℃
CP09	20031469	1	20 µL	D709	CGGCTATG	D508	GTCAGTAC	-25℃～-15℃
CP10	20031470	1	20 µL	D711	TCTCGCGC	D508	GTCAGTAC	-25℃～-15℃
CP11	20031471	1	20 µL	D721	CATCGAGG	D519	CCGTCGCC	-25℃～-15℃
CP12	20031472	1	20 µL	D723	CTCGACTG	D519	CCGTCGCC	-25℃～-15℃
CP13	20031473	1	20 µL	D711	TCTCGCGC	D519	CCGTCGCC	-25℃～-15℃
CP14	20031474	1	20 µL	D721	CATCGAGG	D520	GTCCGAGG	-25℃～-15℃
CP15	20031475	1	20 µL	D723	CTCGACTG	D520	GTCCGAGG	-25℃～-15℃
CP16	20031476	1	20 µL	D709	CGGCTATG	D520	GTCCGAGG	-25℃～-15℃

TruSight Oncology Comp Enrichment (6/8) (冷蔵)、 REF : 20031123

試薬	REF	数量	液量	活性成分	保管温度
Target Capture Buffer 1 (TCB1)	20031477	2	870 µL	ホルムアミドと塩類を含む緩衝水溶液	2°C ~ 8°C
Streptavidin Mag Beads (SMB)	20031478	2	7.78 mL	塩類と、ストレプトアビジンで共有結合的にコーティングされた固相常磁性ビーズを含む緩衝水溶液	2°C ~ 8°C
2N NaOH (HP3)	20031479	2	400 µL	水酸化ナトリウム溶液	2°C ~ 8°C
Elute Target Buffer 2 (ET2)	20031480	2	290 µL	緩衝水溶液	2°C ~ 8°C
Library Normalization Beads 1 (LNB1)	20031481	1	1.04 mL	固相常磁性ビーズを含む緩衝水溶液	2°C ~ 8°C
Library Normalization Wash 1 (LNW1)	20031482	2	4.8 mL	塩類、2-メルカプトエタノール、ホルムアミドを含む緩衝水溶液	2°C ~ 8°C
Library Normalization Storage Buffer 1 (LNS1)	20031483	2	3.5 mL	塩類を含む緩衝水溶液	2°C ~ 8°C
Resuspension Buffer (RSB)	20031444	1	12.4 mL	塩類を含む緩衝水溶液	2°C ~ 8°C
Sample Purification Beads (SPB)	20031442	2	6.11 mL	磁気ビーズを含む水溶液	2°C ~ 8°C

TruSight Oncology Comp Enrichment (7/8) (凍結)、REF : 20031121

試薬	REF	数量	液量	活性成分	保管温度
Target Capture Additives 1 (TCA1)	20031486	2	521 µL	オリゴヌクレオチドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Enhanced Enrichment Wash (EEW)	20031487	1	50.4 mL	塩類を含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Enrichment Elution 2 (EE2)	20031488	3	1.65 mL	洗浄剤を含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Enhanced PCR Mix (EPM)	20031441	2	550 µL	DNA ポリメラーゼとヌクレオチドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
PCR Primer Cocktail 3 (PPC3)	20031490	2	150 µL	P5 および P7 プライマーを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
Library Normalization Additives 1 (LNA1)	20031491	1	4.6 mL	塩類、2-メルカプトエタノール、およびホルムアミドを含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C
PhiX Internal Control (PX3 または PhiX)	20031492	1	10 µL	PhiX ゲノム DNA を含む緩衝水溶液	-25°C ~ -15°C

TruSight Oncology Comp Content Set (8/8)、REF : 20031122

試薬	REF	数量	液量	活性成分	保管温度
Oncology RNA Probe Pool (OPR1)	20031494	1	290 µL	オリゴヌクレオチドプローブプール	-25°C ~ -15°C
Oncology DNA Probe Pool 2 (OPD2)	20031495	1	290 µL	オリゴヌクレオチドプローブプール	-25°C ~ -15°C

TruSight Oncology Controls

製品	REF	数量	液量	濃度 *	活性成分	保管温度
TruSight Oncology DNA Control	20065041	1	25 µL	20 ng/µL	合成 DNA プール	-25°C ~ -15°C
TruSight Oncology RNA Control	20065042	1	25 µL	25 ng/µL	合成 RNA プール	-85°C ~ -65°C

* 最低濃度が示されています。実際の濃度はロットによって異なり、チューブラベルに記載されています。

ユーザーが用意する必要な試薬

増幅前試薬

- DNA および RNA 抽出および精製用試薬：試薬の要件については、[26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」](#)を参照してください。
- DNA および RNA 定量用試薬：試薬の要件については、[26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」](#)を参照してください。
- エタノール (EtOH) 100% (純粋エタノール)、分子生物学グレード
- RNase/DNase フリー水

増幅後試薬

- NextSeq 550Dx High-Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (イルミナ カタログ番号 : 20028871)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
- EtOH 100% (純粋エタノール)、分子生物学グレード
- RNase/DNase フリー水

試薬の保管および取り扱い

以下の試薬ボックスは凍結された状態で出荷されます。- 25°C ~ - 15°C で保管してください。

ボックス	REF	ラボエリア
TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (1/8)	20031127	増幅前
TruSight Oncology Comp Library Prep (2/8) (凍結)	20031118	増幅前
TruSight Oncology Comp UP Index Primers (4/8)	20031120	増幅前
TruSight Oncology Comp CP Index Primers (5/8)	20031126	増幅前
TruSight Oncology Comp Enrichment (7/8) (凍結)	20031121	増幅後
TruSight Oncology Comp Content Set (8/8)	20031122	増幅後



警告

霜取り不要の保管庫または冷蔵庫のドアポケットに、試薬を保管しないでください。

以下の試薬ボックスは、0°C ~ 10°C に維持するためにゲルパックで出荷されます。2°C ~ 8°C で保管してください。

ボックス	REF	ラボエリア
TruSight Oncology Comp Library Prep (3/8) (冷蔵)	20031119	増幅前
TruSight Oncology Comp Enrichment (6/8) (冷蔵)	20031123	増幅後



警告

ビーズを含む試薬 (LNB1、SPB、SMB) を凍結させないでください。

- 試薬の外見の変化は内容物の劣化を示す可能性があります。外見が変化した試薬は使用しないでください (例: 試薬の色が変わった、濁りがある)。
- FSM、SSM、ERA1-B、および TCB1 には、製品関連微粒子が含まれている場合があります。各試薬に固有の取り扱いガイドラインに従ってください。FSM および SSM 混合ステップの後に残った白い製品関連微粒子は、性能に影響しません。
- TSO Comprehensive パネルシステムアッセイの安定性は評価済みで、同一キットの最大 4 回の使用について性能が実証されています。指定の温度で保管した試薬は、ボックスのラベルに記載されている指定の有効期限まで安定しています。

機器および消耗品

ユーザーが用意する必要な機器および消耗品

増幅前の機器および消耗品

機器	サプライヤー
DNA 断片化用超音波発生装置 23 ページの「DNA 断片化用超音波発生装置の構成」を参照してください。	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の仕様を満たしたサーマルサイクラー： <ul style="list-style-type: none"> 30°C および 100°C に設定できる（または 30°C に設定できない場合はオフにすることができる）ヒートリッド 4°C ~ 99°C の温度範囲に対応 温度精度：± 0.25°C 96 ウェル PCR プレート、0.2 mL と互換性がある 25 ページの「サーマルサイクラーのランプ速度」を参照してください。 	一般的なラボ用品サプライヤー
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
96 ウェル MIDI プレート用のインサート付きのマイクロサンプルインキュベーター（2 セット）	一般的なラボ用品サプライヤー
微量遠心機	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の仕様を持つプレート遠心機： <ul style="list-style-type: none"> 96 ウェルマイクロプレートと互換性がある 280 × g (+/- 10%) に対応 	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の仕様を持つプレートシェイカー： <ul style="list-style-type: none"> 軌道：2 mm 1200 rpm および 1800 rpm で攪拌可能 	一般的なラボ用品サプライヤー
シーリングウェッジまたはローラー	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の仕様を満たした磁気スタンド： <ul style="list-style-type: none"> 常磁性の磁気ビーズの沈殿または分離用 スタンドの底面ではなく側面に磁石が付いている 96 ウェル MIDI プレートと互換性がある 	一般的なラボ用品サプライヤー

機器	サプライヤー
2 μ L ~ 1000 μ L の分量を正確に分注できる、以下の仕様を満たした高精度ピペット： ・ 0.02 μ L 刻みのシングルまたはマルチチャンネルピペット ・ 0.1 μ L、0.2 μ L、または 0.5 μ L 刻みのシングルまたはマルチチャンネルピペット ・ 1 μ L または 2 μ L 刻みのシングルまたはマルチチャンネルピペット ピペットは定期的に較正し、規定量の 5% 以内の精度を維持する必要があります。	一般的なラボ用品サプライヤー
ピペットエイド	一般的なラボ用品サプライヤー
氷またはコールドブロック	一般的なラボ用品サプライヤー
10 mL セロロジカルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の仕様を満たした 96 ウェルプレート用の粘着シール： ・ 剥離可能 ・ スカートまたはセミスカート付きの PCR プレートに適合 ・ -20°C ~ 100°C の複数回にわたる温度変化に耐えられる強力な粘着力 ・ DNase/RNase フリー	一般的なラボ用品サプライヤー
容量 1.7 mL のマイクロチューブ、ヌクレアーゼフリー	一般的なラボ用品サプライヤー
ヌクレアーゼフリーの試薬リザーバー（ディスポーザブルトラフ、50 mL）（または同等品）	一般的なラボ用品サプライヤー
15 mL のコニカルチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
50 mL のコニカルチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
互換性のあるエアゾール防止フィルター付きピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
96-well storage plates, 0.8 mL (MIDI プレート)	Fisher Scientific、REF : AB-0859 または同等品
サーマルサイクラーと互換性のある 96 ウェル PCR プレート、0.2 mL（ポリプロピレン製ウェル）	一般的なラボ用品サプライヤー

増幅後の機器および消耗品

機器	サプライヤー
NextSeq 550Dx システム	イルミナ、カタログ番号：20005715
以下の仕様を持つプレート遠心機： ・ 96 ウェルマイクロプレートと互換性がある ・ 280 \times g (+/- 10%) に対応	一般的なラボ用品サプライヤー

機器	サプライヤー
以下の仕様を満たしたサーマルサイクラー： <ul style="list-style-type: none"> ヒートリッド (100°C) 4°C～99°Cの温度範囲に対応 温度精度：±0.25°C 96 ウェル PCR プレート、0.2 mL と互換性がある 25 ページの「サーマルサイクラーのランブ速度」を参照してください。 	一般的なラボ用品サプライヤー
ボルテックスミキサー	一般的なラボ用品サプライヤー
96 ウェル MIDI プレート用のインサート付きのマイクロサンプルインキュベーター	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の仕様を満たしたドライヒートブロック： <ul style="list-style-type: none"> 温度範囲：25°C～99°C 温度精度：±5°C マイクロチューブがヒートブロックに適合していることを確認すること 	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の仕様を持つプレートシェイカー： <ul style="list-style-type: none"> 軌道：2 mm 1200 rpm および 1800 rpm で攪拌可能 	一般的なラボ用品サプライヤー
微量遠心機	一般的なラボ用品サプライヤー
シーリングウェッジまたはローラー	一般的なラボ用品サプライヤー
以下の仕様を満たした磁気スタンド： <ul style="list-style-type: none"> 常磁性の磁気ビーズの沈殿または分離用 スタンドの底面ではなく側面に磁石が付いている 96 ウェル MIDI プレートと互換性がある 	一般的なラボ用品サプライヤー
2 µL ～ 1000 µL の分量を正確に分注できる、以下の仕様を満たした高精度ピペット： <ul style="list-style-type: none"> 0.02 µL 刻みのシングルまたはマルチチャンネルピペット 0.1 µL、0.2 µL、または 0.5 µL 刻みのシングルまたはマルチチャンネルピペット 1 µL または 2 µL 刻みのシングルまたはマルチチャンネルピペット ピペットは定期的に較正し、規定量の 5% 以内の精度を維持する必要があります。	一般的なラボ用品サプライヤー
ピペットエイド	一般的なラボ用品サプライヤー
10 mL セロロジカルピペット	一般的なラボ用品サプライヤー

機器	サプライヤー
以下の仕様を満たした 96 ウェルプレート用の粘着シール： <ul style="list-style-type: none"> 剥離可能 スカートまたはセミスカート付きの PCR プレートに適合 -20°C～100°Cの複数回にわたる温度変化に耐えられる強力な粘着力 DNase/RNase フリー 	一般的なラボ用品サプライヤー
容量 2 mL のマイクロチューブ、ヌクレアーゼフリー	一般的なラボ用品サプライヤー
容量 1.7 mL のマイクロチューブ、ヌクレアーゼフリー	一般的なラボ用品サプライヤー
ヌクレアーゼフリーの試薬リザーバー（ディスパーザブルトラフ、50 mL）（または同等品）	一般的なラボ用品サプライヤー
15 mL のコニカルチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
50 mL のコニカルチューブ	一般的なラボ用品サプライヤー
互換性のあるエアゾール防止フィルター付きピペットチップ	一般的なラボ用品サプライヤー
96-well storage plates, 0.8 mL (MIDI プレート)	Fisher Scientific、REF : AB-0859 または同等品
サーマルサイクラーと互換性のある 96 ウェル PCR プレート、0.2 mL（ポリプロピレン製ウェル）	一般的なラボ用品サプライヤー
氷またはコールドブロック	一般的なラボ用品サプライヤー

DNA 断片化用超音波発生装置の構成

断片サイズの分布を決定する DNA 断片化（または DNA せん断）は、アッセイの性能に影響し、ひいてはシーケンスカバレッジにも影響を与えます。いくつかの集中型超音波発生装置の構成を評価し、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイ用に最適化しました（表 3）。

- 80ページの「品質管理」に示すMEDIAN_EXON_COVERAGEメトリクスが最大になるように、断片化時間を調整しました。断片化時間（表 3を参照）とMEDIAN_INSERT_SIZEの結果は構成によって変わりました。
- 構成1～4および6は、8ストリップガラスチューブでテストしました。構成5では単一ガラスチューブを使用しました。チューブ容量を表 3に示します。
- 構成3～6（ウォーターバス水量が少ない）の最適化では、パルシングを使用しました。
- 構成3～5は、容量の小さいチューブで断片化しました。チューブ容量は断片化パラメーターに影響を与えます。
- 構成4（ライントランスデューサー、中程度のウォーターバス水量、脱気水）では、40 ngの公称インプットで構成1および2と同等のMEDIAN_EXON_COVERAGEを達成するにはパルス遅延時間を長くする必要がありました（40秒）。
- 構成3では、設定を最適化した結果、他の構成と比較して断片サイズの分布が若干大きくなりました（MEDIAN_INSERT_SIZEは約5～10塩基対長くなりました）。

- 構成3と5では、非脱気水と最小のウォーターバス水量を使用しました。
- 構成3と5では、他の4つの構成（40 ngの公称インプットを使用）と同等のMEDIAN_EXON_COVERAGEを達成するにはDNAインプットを増やす必要がありました（構成3では50 ng、構成5では60 ng）。
- 構成3と5は他の構成よりも損傷や変性が多く、その結果ライブラリー調製に使用可能なdsDNA分子の有効質量が少なくなりました。

DNA サンプルの損失は性能に悪影響を及ぼす可能性があるため、指定の量が確実に得られるように、回収プロセス中にシェアリングチューブを遠心分離してください。

表 3 評価した集中超音波発生装置の構成

パラメーター	構成					
	1	2	3	4	5	6
トランスデューサー	ライン	ポイント	ポイント	ライン	ポイント	ライン
ウォーターバス水量	5 L	5 L	85 mL	500 mL	16 mL	1.7 L
脱気水	あり	あり	なし	あり	なし	あり
ウォーターチラー	あり	あり	あり	あり	あり	あり
ウォーターバス温度	7°C	7°C	12°C	12°C	20°C	10°C
ピーク入射電力 (PIP)	450 W	175 W	50 W	350 W	50 W	450 W
% デューティファクター	30	10	30	25	20	25
バーストあたりのサイクル数	200	200	1000	1000	1000	600
パルシング (10 秒バースト)	なし	なし	あり	あり	あり	あり
パルシング遅延時間	該当なし	該当なし	10 秒	40 秒	10 秒	10 秒
断片化時間	250 秒	280 秒	200 秒 ¹	320 秒 ²	200 秒 ¹	320 秒 ²
サンプル処理	1~8	1	1	1~8	1	1~8
バッチサイズ	1~96	1~96	1~8	1~8	1	1~96
ガラス製 8 ストリップチューブ サンプルサイズ	130 µL	130 µL	50 µL	50 µL	単一 チューブ (50 µL)	130 µL (または 96マイクロ チューブプレ ート)
ディザリング	該当なし	該当なし	該当なし	3 mm Y @ 20 mm/s	該当なし	1.5 mm Y @ 10 mm/s
DNA インプット当量 (エクソン カバレッジの中央値の量)	40 ng	40 ng	50 ng	40 ng	60 ng	40 ng

¹ 200 秒の断片化時間は、10 秒バーストの 20 回の繰り返しで構成されています。

² 320 秒の断片化時間は、10 秒バーストの 32 回の繰り返しで構成されています。

サーマルサイクラーのランプ速度

サーマルサイクリングのランプ速度は、アッセイの QC メトリクス (Median Bin Count CNV Target、Median Insert Size (RNA)) とスプライスバリエーションおよび融合遺伝子のサポートリードに影響を与えます。サーマルサイクラーのランプ速度を最適化することが推奨されます。例えば、テストしたモデルでランプ速度をデフォルト (かつ最大値) の 5°C / 秒から 3°C / 秒に調整したところ、デフォルトランプ速度が低い他のモデルと同等の結果が得られました。

検体の収集、輸送、および保管

検体を収集、輸送、保管、処理する際は、標準手順に従います。

サンプルの要件

FFPE 組織

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイには、FFPE 組織から抽出した 40 ng の RNA または 40 ng の DNA（あるいはその両方）が必要です。RNA と DNA の両方を使用すると、クレームされたすべてのバリエーションタイプを解析できます。組織の固定には、分子解析に適したホルマリン固定液（例：10% 中性緩衝ホルマリン）を使用する必要があります。* 組織を脱灰してはなりません。TSO Comprehensive パネルシステムアッセイを実施する前に、病理学者が組織サンプルを調べてこのテストに適していることを確認します。体細胞ドライバ変異を検出するには、（面積比で）少なくとも 20% の腫瘍含有量が必要です。

遺伝子増幅および RNA バリエーションに必要な腫瘍含有量は、増幅または融合発現の程度によって異なります（98 ページの「腫瘍含有量」を参照してください）。

各種固形組織タイプから 40 ng の RNA と 40 ng の DNA を高い確度で抽出するための推奨される組織量は、1.0 mm³ 以上です。この量は、5 μm 厚の切片を使用する場合は 200 mm² 以上、10 μm 厚の切片を使用する場合は 100 mm² 以上の累積的な生存組織面積に相当します。累積的組織面積とは、抽出用に提出されたすべての切片の生存組織面積を合計したものです。例えば、200 mm² の累積的組織面積を得るには、それぞれ 50 mm² の組織面積を持つ 4 枚の 5 μm 切片、またはそれぞれ 20 mm² の組織面積を持つ 5 枚の 10 μm 切片を採取します。組織壊死は核酸収量を減少させる場合があります。結果が偽陰性になる可能性を最小限に抑えるため、マクロダイセクションによって目的の生存腫瘍含有量を得ることもできます。

壊死組織の量が多いと（面積比で 23% 以上）、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイによる遺伝子増幅および RNA 融合遺伝子の検出能力が阻害される可能性があります。サンプル切片の壊死の割合が総組織面積の 23% を超えている場合は、壊死組織のマクロダイセクションを行う必要があります。本アッセイで RNA を使用する場合は、組織ブロックをスライスする際にヘモグロビンを含む組織を避けるか、できるだけ少なくしてください。90 ページの「干渉物質」を参照してください。

スライドに載せた FFPE 組織を室温で最長 28 日間保管できます。

核酸抽出、定量、および保管

- 市販の抽出キットを使用して、FFPE 組織サンプルから RNA と DNA を抽出します。抽出キットの違いが性能に影響を与える可能性があります。88 ページの「核酸抽出キットの評価」を参照してください。
- 抽出時に、Proteinase K または同等の酵素の濃度を抽出キットで提供されている標準濃度より高くしないでください。90 ページの「干渉物質」を参照してください。
- 抽出したストック核酸は、抽出キット製造元の指示に従って保管します。
- 抽出した DNA は -25°C ~ -15°C で保管します（最長 28 日間）。
- 抽出した RNA は -85°C ~ -65°C で保管します（最長 28 日間）。

*FFPE組織標本は、「ゲノム研究用・診療用病理組織検体取扱い規定」（日本病理学会）に記載のホルマリン固定条件等を遵守された検体を用いること。

- 濃度の経時的な変化を避けるため、ライブラリー調製開始前の 28 日以内に DNA と RNA を測定します。核酸結合色素を使用した蛍光定量法で RNA と DNA を定量します。少なくとも 3 回の測定の平均値を核酸濃度とします。
- 本アッセイには 40 ng の各 RNA サンプルが必要であり、これを RNase/DNase フリー水（ユーザーが用意）で調製して 8.5 μL (4.7 ng/ μL) の最終液量を用意します。
- 本アッセイには、抽出濃度が 3.33 ng/ μL 以上の各 gDNA サンプルが 40 ng 必要です。断片化には 52 μL (0.77 ng/ μL) の最終液量が必要であり、40 μL 以上の TEB（キットに含まれる）を希釈溶液として使用します。

ライブラリーの保管

低結合 PCR プレートに入れたライブラリーを、ライブラリーのタイプに応じて 7～32 日間保管します（表 4 を参照）。

表 4 ライブラリー保管期間

ライブラリータイプ	プレート	日数	保管温度
cDNA	PCF PCR	≤ 7	-25°C～-15°C
断片化 gDNA	LP PCR	≤ 7	-25°C～-15°C
濃縮前	ALS PCR	≤ 30	-25°C～-15°C
濃縮後	ELU2 PCR	≤ 7	-25°C～-15°C
濃縮後 PCR	PL PCR	≤ 30	-25°C～-15°C
ノーマライズ済み	NL PCR	≤ 32	-25°C～-15°C

警告および注意

安全性

警告

この試薬一式には有害な可能性のある化学物質が含まれます。吸引、嚥下、皮膚への接触、目への接触により身体傷害を生じる危険があります。試薬中の有害物質に対処するため、適切に換気する必要があります。曝露リスクに適したゴーグル、手袋、実験着などの保護具を着用してください。使用済み試薬は化学廃棄物として取り扱い、各地域、国、および現地の適用法に従って廃棄してください。環境、健康、および安全の情報については、jp.support.illumina.com/sds.htmlに掲載のSDSを参照してください。

- すべての検体を感染性のあるものとして取り扱ってください。
- ラボで日常的に実践している予防策をとってください。口でピペティングしないでください。指定された作業エリアでの飲食や喫煙は避けてください。検体やアッセイ試薬を取り扱う際は使い捨て手袋と実験着を着用してください。検体やアッセイ試薬を取り扱った後は手をよく洗ってください。

ラボ

- コンタミネーションを防止するため、ラボのエリアを区切り、一方向のワークフローに沿って各エリアを配置してください。増幅前および増幅後エリアには、専用の機器と消耗品（例：ピペット、ピペットチップ、ボルテックスミキサー、遠心機）を置く必要があります。増幅産物またはプローブのキャリーオーバーを防ぐため、増幅後エリアに入った後に増幅前エリアに戻らないでください。
- 増幅産物のキャリーオーバーを防ぐため、インデックスPCRおよび濃縮ステップは増幅後エリアで実施してください。
- ライブラリー調製手順にはRNase/DNaseフリー環境が必要です。作業エリアをRNase/DNase抑制洗浄剤でしっかりと消毒してください。DNase、RNase、およびヒトゲノムDNAフリーの認定を受けたプラスチックを使用してください。
- 毎回の増幅後手順の前後に、用時調製した0.5%次亜塩素酸ナトリウム（NaOCl）溶液で作業面と機器をしっかりと清掃してください。溶液を表面に付けたまま10分間放置し、その後70%エチルアルコールまたはイソプロピルアルコールでしっかりと拭きます。
- マイクロチューブ、プレート、ピペットチップ、リザーバーはヌクレアーゼフリーのものを使用してください。
- アッセイ全体を通して、校正済みの機器を使用してください。本プロトコールで指定された速度、温度、および量に合わせて必ず機器を校正してください。
- 試薬とサンプルを正確に分注するために、高精度ピペットを使用してください。製造元の仕様に従って定期的に校正してください。

- マルチチャンネルピペットを使用する際は、以下のガイドラインに従ってください。
 - 少なくとも2 µL以上をピペティングします。
 - バリアチップが良好にフィットしていて、マルチチャンネルピペットのブランドおよびモデルに適していることを確認します。
 - すべてのチップを均一に装着するため、回転させながらチップを取り付けます。
 - 90° の角度で吸引し、吸引された液体の量がすべてのチップで均一になるようにします。
 - 分注後にすべての成分を混合するため、反応混合物を上下にピペティングします。
 - 分注後、すべてのチップから液体が排出されたことを確認します。
- 必ず本アッセイで指定された機器を使用し、プログラムを指示どおりに設定してください。
- サーマルサイクラーとマイクロサンプルインキュベーターの規定温度は反応温度を示します。これは必ずしも機器の設定温度ではありません。

アッセイ

- クロスコンタミネーションを防止してください。
 - サンプルおよび試薬を取り扱う際は、適切なラボ慣行に従ってください。
 - 別のサンプルまたは別の試薬の分注に移るときは、新しい使い捨てラボウェアと新しいピペットチップを使用してください。
 - クロスコンタミネーションのリスクを軽減するため、エアゾール防止フィルター付きピペットを使用してください。
 - 増幅前エリアから増幅後エリアに移動するときは、一方向の作業動線を守ってください。
 - 同時に複数のインデックスプライマーを扱うこと、および開栓することは避けてください。使用後すぐに各インデックスチューブにキャップを付けてください。予備のキャップがキットに付属しています。
 - 手袋を頻繁に交換してください。手袋がインデックスプライマーまたはサンプルに接触した場合は必ず交換してください。
 - 使用しないインデックスプライマーチューブは作業台から取り除いてください。
 - チューブストリップ、トラフ、またはリザーバーで使用した試薬をストックチューブに戻さないでください。
 - サンプルをピペットで混合し、指示されたときにプレートを遠心してください。
 - マイクロプレートシェイカーを使用してください。プレートをボルテックスしないでください。
- アッセイのコンポーネントを、別ロットの試薬キットのものと交換しないでください。試薬キットのロットは、試薬キットの箱のラベルとマスターロットシートに記載されています。
- ヌクレアーゼやPCR産物による試薬、装置、サンプル、ライブラリーのコンタミネーションを防止するため、適切なラボ慣行に従う必要があります。ヌクレアーゼやPCR産物のコンタミネーションは、不正確で信頼できない結果を招く可能性があります。
- 最適なアッセイ性能を確保し、保管を最適に行うため、適切なタイプのプレートを使用する必要があります。40ページの「[使用説明](#)」に記載されたプレート間の移動に関する指示に必ず従ってください。

- 概説された手順に従わないと、誤った結果になる、またはライブラリーの質が著しく低下する可能性があります。
- [40ページの「使用説明」](#)にセーフストップポイントが指定されていない限り、直ちに次のステップに進んでください。
- アッセイの試薬またはコンポーネントは、指定された増幅前および増幅後エリアに指定の温度で保管してください。
- 霜取り不要の保管庫または冷蔵庫のドアポケットに、試薬を保管しないでください。
- ビーズを含む試薬（LNB1、SPB、SMB）を凍結させないでください。
- 不適切に保管されていた試薬を使用しないでください。
- 各試薬の指定された混合手順や取り扱い手順から逸脱しないでください。試薬の混合が不十分であるか、試薬を過剰にボルテックスすると、正しい結果が得られない可能性があります。
- FSM、SSM、ERA1-B、およびTCB1には、製品関連微粒子が含まれている場合があります。個々の特定の試薬の取り扱いガイドラインに従ってください。FSMおよびSSM混合ステップの後に残った白い製品関連微粒子は、性能に影響しません。
- マスターミックスは用時調製し、残った分は使用後に廃棄してください。
- 洗浄ステップに使用する80%エタノール溶液はRNase/DNaseフリー水を使用して常に用時調製してください。エタノールは空気中の水分を吸収する可能性があり、これによって結果が影響を受ける場合があります。使用後の80%エタノールは、国や地域の規制に従って廃棄してください。
- 指定の量の溶出液を移します。溶出ステップ中に移す溶出液の量が指定の量より少ないと、結果に影響する場合があります。
- 超音波発生装置については以下のガイドラインに従ってください。製造元の指示に必ず従ってください。
 - gDNAを、気泡が生じないようにゆっくりと超音波発生装置用チューブにロードします。シェアリングチューブに過剰な気泡またはエアギャップが存在すると、不完全な断片化につながる場合があります。
 - 超音波発生装置用チューブにゆっくりと分注し、液はねが起こらないようにします。
 - 流体置換やサンプルの損失を避けるため、断片化DNAを移す際にピペットチップを超音波発生装置用チューブの底まで挿入しないでください。
- 2 µL未満のサンプルインプットをピペティングしないでください。
- 10 µL未満の溶液を各サンプルウェルに追加するステップにおいて、トラフを使用して試薬を分注しないでください。
- 断片化されたgDNAサンプルを超音波発生装置用チューブからライブラリー調製（LP）プレートに移すときは、先の細いピペットを使用してください。
- SUA1アダプターとUMIアダプターを組み合わせ使用しないでください。
- SUA1アダプターはRNAサンプルで使用してください。
- UMIアダプターはDNAサンプルで使用してください。
- 単一のフローセルでのシーケンス用にプールされたライブラリーにおいて各ライブラリーを一意に同定するため、各ライブラリーサンプルに異なるインデックスプライマーを割り当ててください。

- 同じライブラリーでCPxxとUPxxのインデックスプライマーを組み合わせず使用しないでください。
- サンプルとインデックスプライマーが一致していないと、サンプルが確実に同定されないため、結果報告が誤ったものになります。ライブラリー調製を開始する前に、Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールでサンプルIDを入力し、インデックスを割り当てます。ライブラリー調製中に参照するため、サンプルID、インデックス、およびプレートウェルの位置を記録してください。
- RNAサンプルに由来するライブラリーについては、UPxxインデックスのみを使用してください。
- DNAサンプルに由来するライブラリーについては、UPxxインデックスまたはCPxxインデックスを使用してください。
- 1つのフローセルでシーケンスする最大のライブラリー数は、RNAライブラリー8個およびDNAライブラリー8個までにしてください。少なくとも3つのライブラリーをシーケンスしてください。36ページの「ライブラリーの数とインデックスの選択」に示すガイドラインに従ってください。
- 60ページの「ターゲットキャプチャー1」および64ページの「ターゲットキャプチャー2」の結合ステップの後、ビーズペレットが乾かないように直ちに洗浄ステップに進んでください。
- 洗浄ステップ中に、ウェルの底から80%エタノールをすべて除去してください。エタノールが残留していると、結果に影響する可能性があります。
- 最適なアッセイ性能を確保するため、40ページの「使用説明」に示された指定の洗浄回数に従ってください。
- フローセル上で一貫したクラスター密度を達成するため、70ページの「ライブラリーのノーマライズ」の手順中にライブラリービーズペレットをしっかりと懸濁してください。

手順に関する注意事項

- TSO Comprehensive パネルシステムワークフローは、次のスケジュールに従って実施できます。
 - 1日目: RNA サンプルからの cDNA 合成、gDNA サンプルの DNA 断片化、ライブラリー調製、一晚 (1回目) のハイブリダイゼーションの開始。
 - 2日目: 濃縮、濃縮したライブラリーのノーマライゼーション、NextSeq 550Dx システムへのライブラリーのロード。

このスケジュールに従って TSO Comprehensive パネルシステムワークフローを実施できない場合のために、プロトコル全体を通していくつかのセーフストップポイントが指定されています。プロトコルにセーフストップポイントが指定されていない限り、直ちに次のステップに進んでください。

- RNA サンプル由来のライブラリーと DNA サンプル由来のライブラリーを別々のウェルで同時に調製できます。
- 処理するサンプルの数に対して十分な液量を準備するため、マスターミックス調製表に記載されている量は若干多めになっています。
- ヌクレアーゼフリーの分子生物学用グレード水を使用してください。
- 手順で特に指定されていない限り、試薬を追加した後、チップをすすぎ洗うためにプレート内の適切なウェルで吸引と分注を 1 回行います。
- 室温は 15°C ~ 30°C と定義されています。
- 試薬、サンプル、ライブラリーは、「使用説明」に記載された特定のステップにおいて低温に維持する必要があります。これは氷または同等品の上に静置することと定義されています。

サーマルサイクラーのプログラム

- プロトコルを開始する前に、増幅前および増幅後の機器でサーマルサイクラーのプログラムを設定します。
- PCR プレートがサーマルサイクラーにぴったりと収まることを確認します。
- サーマルサイクラーの製造元が推奨しているプレートを使用します。

プレートへのシールの貼付と剥離

- 新しい粘着プレートシールでプレートを常に密閉します。シールは再使用しないでください。
- プレートを密閉するため、シーリングウェッジまたはローラーを使用して粘着カバーをプレートにしっかりと貼り付けます。
- プロトコルの以下のステップを実行する前に必ず、新しい粘着プレートシールで 96 ウェルプレートを密閉します。
 - プレート攪拌ステップ
 - 遠心分離ステップ
 - サーマルサイクリングステップ
 - ハイブリダイゼーション
 - 長期保管

- クロスコンタミネーションや蒸発のリスクを軽減するため、縁端部とウェルがシールで覆われていることを確認します。
- プレートを平らな面に置き、シールをゆっくりと剥がします。
- シールを剥がす前にプレートのシールまたは側壁に液体や結露が認められる場合は、280 × g で1分間遠心します。
- 有効温度が -20°C ~ 100°C で、スカート付きまたはセミスカート付きのPCRプレートに適した粘着プレートシールを使用します。

機器

- アッセイを開始する前に、ラボスタッフがすべての機器の操作とメンテナンスに関する製造元の指示を理解していることを確認します。

プレートタイプとプレート間の移動

- 最適なアッセイ性能を確保し、保管を最適に行うため、適切なタイプのプレートを使用する必要があります。
- プレート間で液体を移動するときは、プレートの各ウェルから指定の量を移動先プレートの対応するウェルに移します。
- チューブストリップ間またはプレート間でサンプルを移すときはマルチチャンネルピペットを使用できます。
- プレートを攪拌するときは以下のガイドラインに従ってください。
 - プレートシェイカーを使用してプレートを攪拌します。プレートをボルテックスしないでください。
 - PCR プレートは 1200 rpm で攪拌します。
 - MIDI プレートは 1800 rpm で攪拌します。
 - 製造元の指示に従い、プレートシェイカー上でプレートがしっかりと保持されていることを確認します。

遠心分離

- プロトコールで短時間遠心するよう指示されているときは、280 × g で1分間遠心します。
- シール上またはウェルの側面に液体が認められる場合は、プレートを 280 × g で1分間遠心します。

試薬の取り扱い

- 蒸発を抑えてコンタミネーションを防止するため、試薬チューブはすべて使用後すぐにしっかりとキャップを閉めます。
- 手順に必要なでなくなった試薬は、指定の保管温度に戻します。
- [40 ページの「使用説明」](#)の各手順セクションの前にある試薬調製の指示に従ってください。
- 処理するサンプルの数に必要な量のマスターミックス、溶出ミックス、および 80% エタノールを調製します。

- マスターミックスおよび溶液の表に記載されている量は若干多めになっています。多めの量の計算式は次のとおりです。
 - 表 13
 - FSMの量 = $(7.2 \mu\text{L}) \times (\text{サンプル} + \text{コントロールの数}) \times (1.25)$
 - RVTの量 = $(0.8 \mu\text{L}) \times (\text{サンプル} + \text{コントロールの数}) \times (1.25)$
 - 表 20
 - ERA1-Bの量 = $(7.2 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (1.20)$
 - ERA1-Aの量 = $(2.8 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (1.20)$
 - 表 28
 - EE2の量 = $(20.9 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (1.364)$
 - HP3の量 = $(1.1 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (1.364)$
 - 表 29
 - EE2の量 = $(20.9 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (1.364)$
 - HP3の量 = $(1.1 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (1.364)$
 - 表 35
 - LNA1の量 = $(38.1 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (2.0)$
 - LNB1の量 = $(6.9 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (2.0)$
 - 表 36
 - EE2の量 = $(30.4 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (1.25)$
 - HP3の量 = $(1.6 \mu\text{L}) \times (\text{ライブラリーの数}) \times (1.25)$

アダプターセット

- TSO Comprehensive パネルシステムアッセイには、SUA1 アダプターと UMI アダプターが含まれています。
- SUA1 アダプターは RNA サンプル用です。DNA サンプルでは使用しないでください。
- UMI アダプターは DNA サンプル用です。RNA サンプルでは使用しないでください。

ビーズの取り扱い

- TSO Comprehensive パネルシステムアッセイには、SPB、SMB、LNB1 の 3 種類のビーズが含まれています。手順中に正しいビーズタイプが使用されていることを確認してください。
- 洗浄は、ビーズタイプごとに決められた正しい回数実施します。
- 使用前にビーズが室温にあることを確認します。
- 均質性を確保するため、使用前にビーズを 1 分間混合します。
- ビーズをピペットで混合する際は、以下のガイドラインに従ってください。

- 混合する量に適したピペットとチップサイズを使用します。
- 量設定をサンプル量の約 50 ~ 75% に調整します。
- プランジャーを放さずにゆっくりとピペッティングします。
- 液はねを避け、気泡が生じないようにします。
- ピペットチップをペレットの上に位置付け、ウェルまたはチューブからのビーズをペレットに直接分注します。
- ビーズペレットが完全に溶解したことを確認します。溶液は見た目が暗褐色で、濃度が均一である必要があります。
- ビーズペレットが存在するかどうかを評価します。ウェルのビーズ溶液全体を慎重にチップに吸引し、ウェルの底を確認します。
- 磁気分離ステップ中にビーズがピペットチップに吸引された場合は、ビーズを磁気スタンド上のプレートウェルに戻します。液体が透明になるまで（約 2 分間）待ってから、手順の次のステップに進みます。
- ビーズを洗浄するとき：
 - プレートに対して推奨される磁気スタンドを使用します。
 - ウェルの側面にあるビーズが濡れるように、液体をビーズペレットに直接分注します。
 - 取り外すよう指示があるまで、プレートを磁気スタンドに載せたままにします。
 - 磁気スタンドに載せている間、プレートを激しく攪拌しないでください。
 - 磁気スタンドに載せている間、ビーズペレットを乱さないでください。
- ビーズを洗浄または上清を除去するときは、ウェルの底でピペットチップを傾けます。これにより、真空が生じてピペットチップフィルターへの溶液の吸引を防ぐことができます。

ライブラリーの数とインデックスの選択

ランセットアップの前に、シーケンスランに使用するサンプルライブラリーの数とサンプルインデックスを計画します。以下のサンプル数ガイドラインには、陽性コントロールは含まれていますが、陰性 / テンプレートなしのコントロール（NTC）は含まれていません。NTC は、計画したランに追加サンプルとして追加する必要があります。

TSO Comprehensive パネルシステムでは、表 5 および表 6 のガイドラインに従って、1つのフローセルでシーケンスする RNA および DNA ライブラリーの数を決定します。RNA または DNA ライブラリーを別々にシーケンスする場合は、表 5 を参照してください。RNA ライブラリーと DNA ライブラリーを同じフローセルでシーケンスする場合は、表 6 を参照してください。

表 5 RNA または DNA ライブラリーのシーケンス

ライブラリータイプ	最小 *	最大 *
RNA のみ	3	16
DNA のみ	3	8

* NTC は、ライブラリー数に含めません。

表 6 RNA ライブラリーと DNA ライブラリーの同じフローセルでのシーケンス

ライブラリータイプ	最小 *	最大 *
RNA	3	8
DNA	3	8

* NTC は、ライブラリー数に含めません。

NextSeq 550Dx システムで TSO Comprehensive パネルシステムを使用して DNA ライブラリーと RNA ライブラリーを同時にシーケンスする場合、試薬を最適に使用するには、フローセルあたり 8 個の RNA ライブラリーと 8 個の DNA ライブラリーをシーケンスします。

インデックスプライマーによって各サンプルが一意に同定されます。これにより、複数のライブラリーをプールして 1つのフローセルでシーケンスできます。Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールでのランセットアップ中に、適合するインデックスの組み合わせが [Create Run] 画面に表示されます。ライブラリー調製中に、インデックスプライマーを各サンプルライブラリーに追加します。サンプルライブラリーごとに異なるインデックスプライマーミックスを使用してください。

サンプルに対して使用するインデックスプライマーが、Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールで解析用に選択したインデックスと一致していることを確認します。両者が一致していないと、サンプルが確実に同定されないため、結果報告が誤ったものになります。

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイには 2 種類のインデックスがあります。

- **UPxx インデックス**：UPxx インデックスは、RNA または DNA サンプルに由来するライブラリーに使用します。
- **CPxx インデックス**：CPxx インデックスは、DNA サンプルに由来するライブラリーに使用します。RNA サンプルに由来するライブラリーに CPxx インデックスを使用しないでください。また、計 3 つの DNA ライブラリーをシーケンスする場合も、CPxx インデックスは使用しないでください。

3 つのライブラリーのみをシーケンスする場合の要件は以下のとおりです。

- ライブラリーはすべて DNA であるか、すべて RNA である必要があります。
- CPxx インデックスセットを使用しないでください。
- 十分な多様性を得るために、以下のいずれかの UPxx インデックスの組み合わせを使用する必要があります。
 - UP01、UP02、UP03
 - UP04、UP05、UP06
 - UP07、UP08、UP09
 - UP10、UP11、UP12

例えば、1 つ目のライブラリーに UP01、2 つ目のライブラリーに UP02、3 つ目のライブラリーに UP03 をそれぞれ割り当てます。

TruSight Oncology Controls

TSO Comprehensive パネルシステムには TruSight Oncology Controls が必要です。これは TruSight Oncology DNA Control と TruSight Oncology RNA Control で構成されており、どちらも陽性コントロールとして使用します。特定のライブラリー調製イベントで、各 DNA シーケンスランには TruSight Oncology DNA Control を含め、各 RNA シーケンスランには TruSight Oncology RNA Control を含めます (DNA と RNA の混在ランにも、これらのコントロールを含めます)。計画したシーケンスランごとに、そのランに固有の陽性コントロールを調製します。

各 RNA および各 DNA ライブラリー調製イベントに適切な NTC を含めます。NTC は、1 回のライブラリー調製イベント内で繰り返しシーケンスされます。TruSight Oncology Controls については以下のガイドラインに従ってください。

- 陽性コントロールとテンプレートなしのコントロールから、サンプルとまったく同じようにライブラリーを調製します。
- DNA NTC には TEB を使用します。
- RNA NTC には DNase/RNase フリー水を使用します。
- 陽性コントロールは最大必要ライブラリー数に含まれています。
- NTC は最小必要ライブラリー数に含まれていません。
- 3 つのライブラリーをシーケンスする場合は、NTC に対して UP インデックスを使用します。
- NTC は繰り返しシーケンスされるため、このコントロール用に選択したインデックスを同じライブラリー調製イベントで再び使用することはできません。

以下の表に、ライブラリー調製用のプレートレイアウトの例を示します。番号の振られた各列が単一のシーケンスランを表します。DNA ライブラリーと RNA ライブラリーを一緒にシーケンスするときは、それぞれの対応する列の組み合わせが単一のシーケンスランを表します (例: 列 1 と列 7)。NTC は、列ごと、または列の組み合わせごとにシーケンスされます。

表 7 6 個の患者サンプルを含む単一ランのライブラリー調製イベント

	1	2	3	4	5	6	7
A	陽性 DNA コントロール	空	空	空	空	空	陽性 RNA コントロール
B	DNA 1	空	空	空	空	空	RNA 1
C	DNA 2	空	空	空	空	空	RNA 2
D	DNA 3	空	空	空	空	空	RNA 3
E	DNA 4	空	空	空	空	空	RNA 4
F	DNA 5	空	空	空	空	空	RNA 5
G	DNA 6	空	空	空	空	空	RNA 6
H	DNA NTC	空	空	空	空	空	RNA NTC

表 8 20 個の患者サンプルを含む 3 つのランのライブラリー調製イベント

	1	2	3	4	5	6	7
A	陽性 DNA コント ロール	陽性 DNA コント ロール	陽性 DNA コント ロール	空	陽性 RNA コント ロール	陽性 RNA コント ロール	陽性 RNA コント ロール
B	DNA 1	DNA 7	DNA 14	空	RNA 1	RNA 7	RNA 14
C	DNA 2	DNA 8	DNA 15	空	RNA 2	RNA 8	RNA 15
D	DNA 3	DNA 9	DNA 16	空	RNA 3	RNA 9	RNA 16
E	DNA 4	DNA 10	DNA 17	空	RNA 4	RNA 10	RNA 17
F	DNA 5	DNA 11	DNA 18	空	RNA 5	RNA 11	RNA 18
G	DNA 6	DNA 12	DNA 19	空	RNA 6	RNA 12	RNA 19
H	DNA NTC	DNA 13	DNA 20	空	RNA NTC	RNA 13	RNA 20

使用説明

TSO Comprehensive パネルシステムワークフローの概要を図 1 および図 2 に示します。

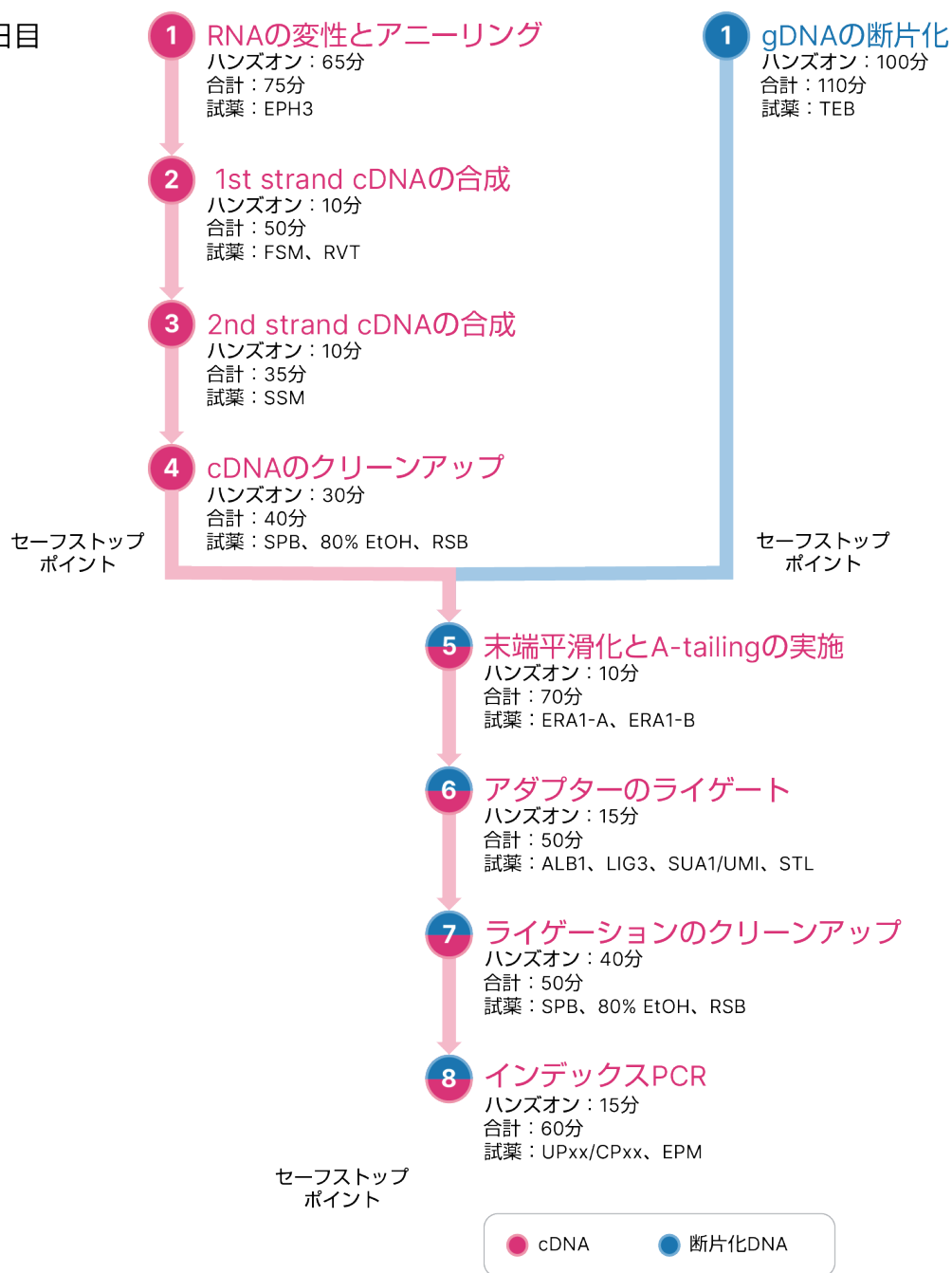
ライブラリー調製ワークフロー

図 1 は、TSO Comprehensive パネルシステムのライブラリー調製ワークフローを示しています。RNA サンプル由来のライブラリーと DNA サンプル由来のライブラリーを別々のウェルで同時に調製できます。陽性コントロールとテンプレートなしのコントロールは、サンプルとまったく同じように処理されます。ステップ間にセーフストップポイントが示されています。

プロトコールを開始する前に、Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールにラン情報とサンプル情報を入力します。『Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module Workflow Guide』（文書番号：200049183）を参照してください。

図 1 TSO Comprehensive パネルシステムワークフロー (パート1)

1日目

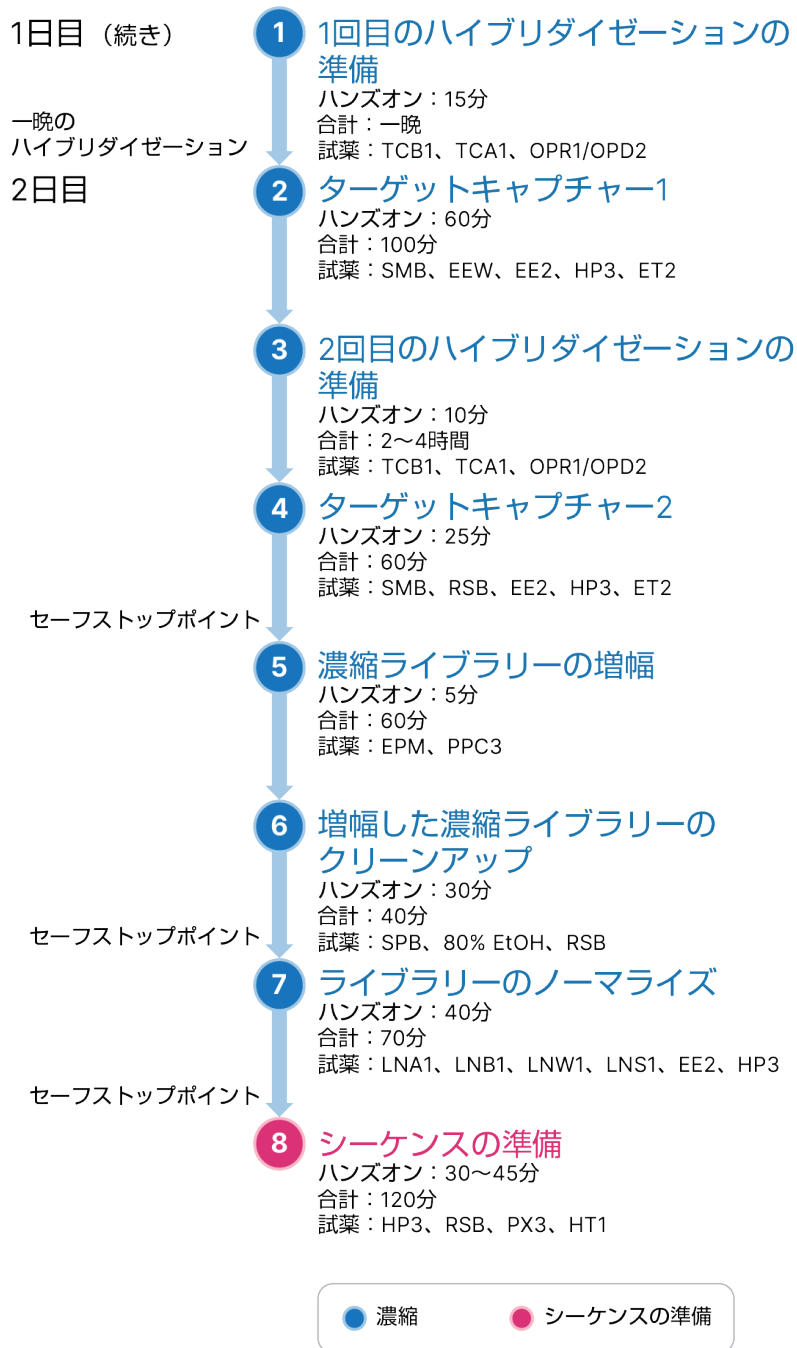


* ハンズオン時間と合計時間は概算

濃縮ワークフロー

図 2 は、TSO Comprehensive パネルシステムの濃縮ワークフローを示しています。ステップ間にセーフストップポイントが示されています。

図 2 TSO Comprehensive パネルシステムワークフロー（パート 2）



サーマルサイクラーのプログラミング

アッセイを開始する前に、増幅前および増幅後サーマルサイクラーに以下のプログラムを保存します。

表 9 増幅前サーマルサイクラーのプログラム

手順ステップ	プログラム名	リッド温度	反応量	サーマルサイクラーのパラメーター
RNA の変性とアニーリング	LQ-RNA	100°C	17 µL	<ul style="list-style-type: none"> • 65°C 5 分 • 4°C 1 分 • 4°C で保持
1st strand cDNA の合成	1stSS	100°C	25 µL	<ul style="list-style-type: none"> • 25°C 10 分 • 42°C 15 分 • 70°C 15 分 • 4°C 1 分 • 4°C で保持
2nd strand cDNA の合成	2ndSS	30°C	50 µL	<ul style="list-style-type: none"> • 16°C 25 分 • 4°C 1 分 • 4°C で保持

注意 2ndSS のリッド温度を 30°C に設定できない場合は、予熱リッド加熱オプションをオフにしてください。

表 10 増幅後サーマルサイクラーのプログラム

手順ステップ	プログラム名	リッド温度	反応量	サーマルサイクラーのパラメーター
インデックス PCR	I-PCR	100°C	50 µL	<ul style="list-style-type: none"> • 98°C 30 秒 • 以下を 15 サイクル： <ul style="list-style-type: none"> • 98°C 10 秒 • 60°C 30 秒 • 72°C 30 秒 • 72°C 5 分 • 10°C で保持
1 回目のハイブリダイゼーションの実施	HYB1	100°C	50 µL	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C 10 分 • 85°C 2 分 30 秒 • 75°C 2 分 30 秒 • 65°C 2 分 30 秒 • 57°C で 8 ~ 24 時間保持
2 回目のハイブリダイゼーションの実施	HYB2	100°C	50 µL	<ul style="list-style-type: none"> • 95°C 10 分 • 85°C 2 分 30 秒 • 75°C 2 分 30 秒 • 65°C 2 分 30 秒 • 57°C で 1.5 ~ 4 時間保持

手順ステップ	プログラム名	リッド温度	反応量	サーマルサイクラーのパラメーター
濃縮ライブラリーの増幅	EL-PCR	100°C	50 µL	<ul style="list-style-type: none"> 98°C 30 秒 以下を 18 サイクル： <ul style="list-style-type: none"> 98°C 10 秒 60°C 30 秒 72°C 30 秒 72°C 5 分 10°C で保持

プロトコルの準備

この準備は、次のセーフストップポイントに至るまでのプロトコルステップを実行するために必要です。



警告

このワークフローでは、すべての手順に RNase/DNase フリー環境が必要です。

- 作業エリアを RNase/DNase 抑制洗浄剤でしっかりと消毒します。
- 増幅前サーマルサイクラーのプログラムが設定されていることを確認します。[43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」](#)を参照してください。
- 製造元の指示に従い、超音波発生装置を準備します。
- DNA サンプルのみを処理する場合は、直接 [49 ページの「gDNA の断片化」](#)に進みます。
- 保管庫から RNA コントロールを取り出します。
- 試薬チューブを箱から取り出し、指示に従って融解します。

表 11 TruSight Oncology Comp RNA Library Prep (1/8) (REF : 20031127)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコルステップ
EPH3	-25°C ~ -15°C	室温で融解。	RNA の変性とアニーリング
FSM	-25°C ~ -15°C	室温で融解。	1st strand cDNA の合成
RVT	-25°C ~ -15°C	低温に維持。	1st strand cDNA の合成
SSM	-25°C ~ -15°C	室温で融解。	2nd strand cDNA の合成

表 12 TruSight Oncology Comp Library Prep (3/8) (冷蔵) (REF : 20031119)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコルステップ
SPB (薄緑色のラベル)	2°C ~ 8°C	30 分間かけて室温に戻します。	cDNA のクリーンアップ
RSB	2°C ~ 8°C	室温に戻します。	cDNA のクリーンアップ

RNA の変性とアニーリング

このプロセスでは、精製された RNA を変性させ、cDNA 合成の準備としてランダムヘキサマーでプライミングします。

事前準備

- 次の試薬を準備します。
 - EPH3：脇に置いておきます。
 - FSM：ボルテックスして混合します。短時間遠心してから、ピペティングして混合します。この試薬には、白い製品関連微粒子が含まれている場合があります。ユーザーによる対処は必要ありません。製品の性能には影響しません。
 - RVT：短時間遠心してから、ピペティングして混合します。低温に維持します。

注意 RVT は粘性の高い溶液です。ピペティング中にできるだけ気泡が生じないようにしてください。

- マイクロチューブに以下の分量を入れて、FSM + RVT マスターミックスを調製します。

表 13 FSM + RVT マスターミックス *

マスターミックスの成分	4 ライブラリー (μL)	8 ライブラリー (μL)	16 ライブラリー (μL)	24 ライブラリー (μL)
FSM	36	72	144	216
RVT	4	8	16	24

* この表に記載されている量は若干多めになっています。計算式については、[33 ページの「試薬の取り扱い」](#)を参照してください。

- 10 回ピペティングして混合します。
- [46 ページの「1st strand cDNA の合成」](#)まで、FSM + RVT マスターミックスを低温に維持します。

手順

- 融解している間、抽出した RNA サンプルと RNA コントロールを低温に維持します。プロトコルの残りのステップでは、RNA コントロールをサンプルとして処理します。
- 使用していない RNA は低温に維持します。[26 ページの「サンプルの要件」](#)を参照してサンプルを定量します。
- 各 RNA サンプルを 10 回ピペティングして混合します。
- RNase/DNase フリー水を使用して 40 ng の各 RNA サンプルを調製し、8.5 μL (4.7 ng/μL) の最終液量を用意します。RNA コントロールについては、チューブラベルに記載されている濃度を使用します。
- 新しい 96 ウェル PCR プレートに「CF」(cDNA Fragments) というラベルを付けます。
- 8.5 μL の各 RNA サンプルを CF PCR プレートの別々のウェルに加えます。
- サンプルプレートのレイアウトと各サンプルのインデックスが、ランセットアップ中に TSO Comprehensive 解析モジュールで計画したランと一致していることを確認します。

8. EPH3 をボルテックスして混合し、短時間遠心します。
9. 8.5 μL の EPH3 を各サンプルウェルに添加します。
10. 粘着プレートシールを CF PCR プレートに貼付します。



警告

蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。

11. 1200 rpm で1分間攪拌します。
12. 280 \times g で1分間遠心します。
13. サーマルサイクラーの上に置き、LQ-RNA プログラムを実行します。
[43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」](#)を参照してください。
14. サンプルが 4°C に達したら、1分間保持します。直ちに次のステップに進んでください。

1st strand cDNA の合成

このプロセスでは、逆転写酵素を使用して、ランダムヘキサマーでプライミングした RNA 断片を 1st strand cDNA に逆転写します。

手順

1. CF PCR プレートをサーマルサイクラーから取り出します。
2. FSM + RVT マスターミックスを 10 回ピペティングして混合します。FSM + RVT ミックスが完全に均質であることを確認します。
3. 8 μL の FSM + RVT マスターミックスを各サンプルウェルに添加します。
4. 10 回ピペティングして混合します。
5. 残りの FSM + RVT マスターミックスを廃棄します。
6. 粘着プレートシールを CF PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
7. 1200 rpm で1分間攪拌します。
8. 280 \times g で1分間遠心します。
9. サーマルサイクラーの上に置き、1stSS プログラムを実行します。
[43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」](#)を参照してください。
10. サンプルが 4°C に達したら、すぐに次のステップに進みます。
1st strand サンプルは、4°C で最長 5 分間保持できます。

2nd strand cDNA の合成

このプロセスでは、RNA テンプレートを除去し、二本鎖 cDNA を合成します。

事前準備

1. SSM を調製します。
 - a. 10 回転倒混和して混合します。
 - b. 短時間遠心します。この試薬には、白い製品関連微粒子が含まれている場合があります。ユーザーによる対処は必要ありません。また、製品の性能には影響しません。

手順

1. CF PCR プレートをサーマルサイクラーから取り出します。
2. 25 μ L の SSM を各サンプルウェルに添加します。
3. 粘着プレートシールを CF PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
4. 1200 rpm で1分間攪拌します。
5. 280 \times g で1分間遠心します。
6. サーマルサイクラーの上に置き、2ndSS プログラムを実行します。
[43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」](#)を参照してください。
7. サンプルが 4°C に達したら、1分間保持した後、すぐに次のステップに進みます。

cDNA のクリーンアップ

このプロセスでは、SPB を使用して不要な反応成分を除去することにより、cDNA を精製します。用時調製した 80% EtOH でビーズを 2 回洗浄します。RSB で cDNA を溶出します。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。
 - SPB：30 分間かけてビーズを室温に戻します。
 - RSB：手順で使用するまで脇に置いておきます。
2. 15 mL または 50 mL のコニカルチューブで 80% EtOH を次のように用時調製します。

表 14 80% EtOH の用時調製

試薬	4 ライブラリー	8 ライブラリー	16 ライブラリー	24 ライブラリー
100% EtOH、純正	2 mL	4 mL	8 mL	12 mL
RNase/DNase フリー水	500 μ L	1 mL	2 mL	3 mL

3. 用時調製した 80% EtOH をボルテックスして混合します。

4. 新しい 96 ウェル MIDI プレートに「BIND1」(cDNA Binding) というラベルを付けます。
5. カバーを付けて脇に置いておきます。
6. 磁気スタンドを用意します。

手順

結合

1. CF PCR プレートをサーマルサイクラーから取り出します。
2. SPB を 1 分間ボルテックスしてビーズを懸濁します。
3. すぐに 90 μ L の SPB を BIND1 MIDI プレートの各サンプルウェルに加えます。
トラフを使用して SPB を分注する場合は、サンプルあたりの溶液の量が十分になるように、1.15 の余裕係数を掛けて分量を計算します。SPB を各サンプルウェルに加えた後、残りの溶液を廃棄します。
4. CF PCR プレートから各サンプルの全量 (50 μ L) を BIND1 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
5. 空になった CF PCR プレートを廃棄します。
6. 粘着プレートシールを BIND1 MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
7. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
8. 室温で 5 分間インキュベートします。
9. BIND1 MIDI プレートを磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
10. プレートを磁気スタンドに保持します。ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各サンプルウェルからすべての上清を除去して廃棄します。

洗浄

1. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. BIND1 MIDI プレートを磁気スタンドに載せたまま、200 μ L の用時調製した 80% EtOH を各ウェルに添加します。
 - b. 30 秒間待ちます。
 - c. ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各サンプルウェルからすべての上清を除去して廃棄します。
2. 2 回目のビーズの洗浄を行います。
3. 先の細いピペットを使用して、各ウェルに残っている EtOH を除去します。
4. 使用しなかった 80% EtOH を廃棄します。

溶出

1. BIND1 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
2. RSB を転倒混和またはボルテックスして混合します。
3. 22 μ L の RSB を各サンプルウェルに添加します。

4. 粘着プレートシールを BIND1 MIDI プレートに貼付します。縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
5. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
6. 室温で 2 分間インキュベートします。
7. 磁気スタンドに載せて 2 分間待ちます。
8. 新しい 96 ウェル MIDI プレートに「PCF」(Purified cDNA Fragments) というラベルを付けます。[49 ページの「セーフストップポイント」](#)で中断する場合は、PCR プレートを使用します。
9. BIND1 MIDI プレートの各サンプルウェルから 20 μ L の溶出液を PCF プレートの対応するウェルに移します。
10. 空になった BIND1 MIDI プレートを廃棄します。
11. 30 μ L の RSB を PCF プレートの各サンプルウェルに添加します。
12. 10 回ピペティングして混合します。
13. 粘着プレートシールを PCF プレートに貼付し、低温に維持します。
14. EPH3、FSM、RVT、SSM を保管庫に戻します。
15. RNA (cDNA) のみに由来するサンプルを処理していて、セーフストップポイントで中断しない場合は、[52 ページの「末端平滑化と A-tailing の実施」](#)に進みます。

セーフストップポイント

中断する場合は、PCF PCR プレートを 280 × g で 1 分間遠心し、-25°C ~ -15°C で保管します (最長 7 日間)。

プロトコールの準備

この準備は、次のセーフストップポイントに至るまでのプロトコールステップを実行するために必要です。

1. 保管庫から DNA コントロールを取り出します。
2. 試薬チューブを箱から取り出し、指示に従って融解します。

表 15 TruSight Oncology Comp Library Prep (3/8) (冷蔵) (REF : 20031119)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
TEB	2°C ~ 8°C	室温に戻します。	gDNA の断片化

gDNA の断片化

このプロセスでは、gDNA を断片化し、3' または 5' オーバーハングを有する dsDNA 断片を生成します。

事前準備

1. [26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」](#)の推奨事項に従い、サンプルを定量します。
2. TEB の調製：転倒混和またはボルテックスして混合します。

手順

プレートの準備

以下のいずれかのオプションを選択して、プレートを準備します。

- gDNA サンプルを、PCF MIDI プレートにある cDNA サンプルと同時に処理する。
 - a. PCF MIDI プレートに「LP」(Library Preparation) というラベルを付けます。
 - b. 低温に維持し、51 ページの「断片化 DNA の移動」で使用するまで脇に置いておきます。
- gDNA サンプルと cDNA サンプルを同時に処理する。PCF PCR プレートは凍結されている。
 - a. PCF PCR プレートを室温で融解します。
 - b. 280 × g で 1 分間遠心します。
 - c. 10 回ピペティングして混合します。
 - d. 新しい 96 ウェル MIDI プレートに「LP」(Library Preparation) というラベルを付けます。
 - e. PCF PCR プレートから各サンプルの全量 (50 μL) を LP MIDI プレートの対応するウェルに移します。
 - f. 空になった PCF PCR プレートを廃棄します。
 - g. 粘着プレートシールを貼付し、51 ページの「断片化 DNA の移動」まで低温に維持します。
- gDNA のみのサンプルを処理する。
 - a. 新しい 96 ウェル MIDI プレートに「LP」(Library Preparation) というラベルを付けます。
51 ページの「セーフストップポイント」で中断する場合は、PCR プレートを使用します。
 - b. カバーを付け、51 ページの「断片化 DNA の移動」で使用するまで脇に置いておきます。

gDNA の希釈

1. gDNA サンプルと DNA コントロールを室温で融解します。
2. 各 gDNA サンプルを 10 回ピペティングして混合します。
3. チューブを短時間遠心してドロップレットを回収します。
4. TEB を転倒混和またはボルテックスして混合します。
5. TEB を使用して各 gDNA サンプルを調製し、52 μL の最終液量を用意します。サンプルタイプに基づくインプット量と最低濃度については、次の表を参照してください。
 - 本アッセイでは、少なくとも 40 μL の TEB を使用して 52 μL の液量を用意できるように、最低限必要な抽出濃度が定められています。
 - DNA コントロールについては、チューブラベルに記載されている濃度を使用します。
 - サンプルロスを防ぐため、2 μL 未満のサンプルをこの希釈液にピペティングしないでください。

サンプルタイプ	インプット量 (ng)	最低濃度 (ng/μL)
FFPE	40	3.33
コントロール	40	チューブラベルを参照

断片化

- 52 μ L の各 gDNA サンプルを超音波発生装置用チューブの別々のウェルに加えます。



警告

gDNA をチューブにゆっくりとロードし、チューブの底にエアギャップが生じないようにしてください。詳細については、[29 ページの「アッセイ」](#) および製造元の指示を参照してください。

- ストリップの向きを記録します。
- 超音波発生装置で gDNA を断片化します。

断片化 DNA の移動

- サンプルプレートのレイアウトと各サンプルのインデックスが、TSO Comprehensive 解析モジュールで解析用に選択したランと一致していることを確認します。
- 超音波発生装置の製造元の指示に従い、サンプルを回収します。
超音波発生装置用チューブのタイプによっては、チューブ内のサンプルを集めるために遠心分離が必要となる場合があります。
- 断片化した gDNA サンプルごとに、先の細いピペットを使用して、サンプルを 16.7 μ L ずつ 3 回に分けて LP MIDI プレートの空のウェルに移します。
- 粘着プレートシールを LP MIDI プレートに貼付します。

セーフストップポイント

中断する場合は、粘着プレートシールを LP PCR プレートに貼付し、280 × g で 1 分間遠心します。
-25°C ~ -15°C で保管します（最長 7 日間）。

プロトコールの準備

この準備は、次のセーフストップポイントに至るまでのプロトコールステップを実行するために必要です。

増幅後サーマルサイクラーのプログラムが設定されていることを確認します。[43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」](#) を参照してください。

- アイスバケットまたは同等品を準備します。
- 試薬チューブを箱から取り出し、指示に従って融解します。

表 16 TruSight Oncology Comp Library Prep (2/8) (凍結) Box (REF : 20031118)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
ERA1-A	-25°C ~ -15°C	低温に維持します。	末端平滑化と A-tailing の実施
ERA1-B	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。	末端平滑化と A-tailing の実施
ALB1	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。	アダプターのライゲーシオン
LIG3	-25°C ~ -15°C	低温に維持します。	アダプターのライゲーシオン

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
SUA1 (青色のキャップ)	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。	アダプターのライゲーション
UMI (白色のキャップ)	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。	アダプターのライゲーション
STL	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。	アダプターのライゲーション
EPM	-25°C ~ -15°C	低温に維持します。	インデックス PCR

表 17 TruSight Oncology Comp Library Prep (3/8) (冷蔵) Box (REF : 20031119)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
SPB (薄緑色のラベル)	2°C ~ 8°C	30 分間かけて室温に戻します。	ライゲーションのクリーンアップ
RSB	2°C ~ 8°C	室温に戻します。	ライゲーションのクリーンアップ

表 18 TruSight Oncology Comp UP Index Primers (4/8) Box (REF : 20031120)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
UPxx	-25°C ~ -15°C	適切なインデックスプライマーチューブを室温で融解します。	インデックス PCR

表 19 TruSight Oncology Comp CP Index Primers (5/8) Box (REF : 20031126)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
CPxx	-25°C ~ -15°C	適切なインデックスプライマーチューブを室温で融解します。	インデックス PCR

末端平滑化と A-tailing の実施

このプロセスでは、End Repair A-Tailing マスターミックス (ERA1) を使用して、断片化の結果生じたオーバーハングを平滑化し、末端にアデニンを付加します。

このミックスの 3'-5' エキソヌクレアーゼ活性によって 3' オーバーハングが除去され、5'-3' ポリメラーゼ活性によって 5' オーバーハングが埋められます。この反応中に、3' 末端にアデニンが付加されます。これにより、アダプターライゲーション反応中にこれらの末端が互いにライゲーションされなくなります。

事前準備

- MIDI ヒートブロックインサートを取り付けたマイクロサンプルインキュベーター 2 台を次のように予熱します。
 - 1 台のマイクロサンプルインキュベーターを 30°C に予熱します。
 - もう 1 台のマイクロサンプルインキュベーターを 72°C に予熱します。

2. 次の試薬を準備します。

- ERA1-A：短時間遠心してから、ピペティングして混合します。低温に維持します。
- ERA1-B：ボルテックスして混合し、短時間遠心します。沈殿物がないか確認します。沈殿物がある場合は、チューブを 37°C に温めてから、沈殿物が溶解するまでピペティングして混合します。

3. ERA1 マスターミックスをマイクロチューブで調製します。

表 20 ERA1 マスターミックス *

マスターミックス の成分	4 ライブラリー	8 ライブラリー	16 ライブラリー	24 ライブラリー	48 ライブラリー
ERA1-B	35 µL	69 µL	138 µL	207 µL	415 µL
ERA1-A	13.5 µL	27 µL	54 µL	81 µL	161 µL

* この表に記載されている量は若干多めになっています。計算式については、[33 ページの「試薬の取り扱い」](#)を参照してください。

- 均質性を確保するためにゆっくりと 10 回ピペティングし、短時間遠心します。ERA1 マスターミックスを低温に維持します。
- プレートを準備するため、以下のいずれかのオプションを選択します。
 - サンプルが MIDI プレートにある場合は、次のように準備します。
 - MIDI プレートのラベルを「LP2」（Library Preparation 2）に貼り替えます。
 - 一部のサンプルが別の MIDI プレートにある場合は、プレートレイアウトに従い、すべてのサンプルを同じ MIDI プレートの別々のウェルに移します。
 - プレートが凍結している場合は、次のように準備します。
 - PCF PCR プレートまたは LP PCR プレートを室温で融解します。
 - プレートを 280 × g で 1 分間遠心します。
 - 10 回ピペティングして混合します。
 - 新しい 96 ウェル MIDI プレートに「LP2」（Library Preparation 2）というラベルを付けます。
 - PCF PCR プレートまたは LP PCR プレートから各サンプルの全量 (50 µL) を LP2 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
 - PCF PCR プレートまたは LP PCR プレートを廃棄します。

手順

- 10 µL の ERA1 マスターミックスを LP2 MIDI プレートの各サンプルウェルに添加します。
- 残りの ERA1 マスターミックスを廃棄します。
- 粘着プレートシールを LP2 MIDI プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
- 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 30°C に予熱したマイクロサンプルインキュベーターで 30 分間インキュベートします。
- 2 台目の予熱したマイクロサンプルインキュベーターにすぐに移します。

7. 72°Cで 20 分間インキュベートします。
8. LP2 MIDI プレート低温に維持し、5 分間待ちます。

アダプターのライゲーション

このプロセスでは、アダプターを cDNA 断片または gDNA 断片（あるいはその両方）の末端にライゲーションします。

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイには、SUA1アダプターと UMI アダプターが含まれています。

- SUA1 アダプターは RNA サンプルで使用してください。
- UMI アダプターは DNA サンプルで使用してください。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。
 - ALB1：少なくとも 10 秒間ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - LIG3：短時間遠心してから、ピペティングして混合します。低温に維持します。
 - SUA1：少なくとも 10 秒間ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - UMI：少なくとも 10 秒間ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - STL：手順で使用するまで脇に置いておきます。

手順

1. LP2 MIDI プレート氷または同等品の上から降ろします。
2. 60 μ L の ALB1 を LP2 MIDI プレートの各サンプルウェルに添加します。ALB1 は粘性の高い溶液です。ゆっくりとピペティングしてできるだけ気泡が生じないようにしてください。
3. 5 μ L の LIG3 を各サンプルウェルに添加します。
4. アダプターを次のように添加します。
異なるタイプのアダプターを組み合わせ使用しないでください。
 - RNA サンプルウェル: 10 μ L の SUA1 (青色のキャップ) を RNA に由来する各サンプルに添加します。
 - DNA サンプルウェル: 10 μ L の UMI (白色のキャップ) を DNA に由来する各サンプルに添加します。
5. 粘着プレートシールを LP2 MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
6. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
7. 室温で 30 分間インキュベートします。
8. STL をボルテックスして混合し、短時間遠心します。
9. 5 μ L の STL を LP2 MIDI プレートの各サンプルウェルに添加します。

10. 粘着プレートシールを LP2 MIDI プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
11. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。

ライゲーションのクリーンアップ

このプロセスでは、SPB を使用してアダプターがライゲーションされた cDNA または gDNA 断片を精製し、不要な産物を除去します。用時調製した 80% エタノールでビーズを 2 回洗浄します。アダプターがライゲーションされたサンプルを RSB で溶出します。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。
 - SPB：30 分間かけてビーズを室温に戻します。
 - RSB：手順で使用するまで脇に置いておきます。
2. 15 mL または 50 mL のコニカルチューブで 80% EtOH を用時調製します。

表 21 80% エタノールの用時調製

試薬	4 ライブラリー	8 ライブラリー	16 ライブラリー	24 ライブラリー	48 ライブラリー
100% EtOH、純正	2 mL	4 mL	8 mL	12 mL	24 mL
RNase/DNase フリー水	500 µL	1 mL	2 mL	3 mL	6 mL

3. 用時調製した 80% EtOH をボルテックスして混合します。
4. 磁気スタンドを用意します。

手順

結合

1. SPB を 1 分間ボルテックスしてビーズを懸濁します。
2. すぐに 112 µL の SPB を LP2 MIDI プレートの各サンプルウェルに加えます。
トラフを使用して SPB を分注する場合は、サンプルあたりの溶液の量が十分になるように、1.15 の余裕係数を掛けて分量を計算します。SPB を各サンプルウェルに加えた後、残りの溶液を廃棄します。
3. 粘着プレートシールを LP2 MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
4. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
5. 室温で 5 分間インキュベートします。
6. LP2 MIDI プレートを磁気スタンドに載せ、10 分間待ちます。

7. ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各サンプルウェルからすべての上清を除去して廃棄します。

洗浄

1. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. LP2 MIDI プレートに磁気スタンドに載せたまま、200 μ L の用時調製した 80% EtOH を各サンプルウェルに添加します。
 - b. 30 秒間待ちます。
 - c. ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各サンプルウェルからすべての上清を除去して廃棄します。
2. 2 回目のビーズの洗浄を行います。
3. 先の細いピペットを使用して、各ウェルに残っている EtOH を除去します。
4. 使用しなかった 80% EtOH を廃棄します。

溶出

1. LP2 MIDI プレートに磁気スタンドから取り外します。
2. RSB を転倒混和またはボルテックスして混合します。
3. 27.5 μ L の RSB を各サンプルウェルに添加します。
4. 粘着プレートシールを LP2 MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
5. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
6. 室温で 2 分間インキュベートします。
7. LP2 MIDI プレートに磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
8. 新しい 96 ウェル PCR プレートに「LS」(Library Samples) というラベルを付けます。
9. LP2 MIDI プレートから 25 μ L の各溶出液を LS PCR プレートの対応するウェルに移します。
10. 空になった LP2 MIDI プレートを廃棄します。

インデックス PCR

このステップでは、サンプルマルチプレックス用のインデックス配列を追加するプライマーを使用して、ライブラリー断片を増幅します。生成産物には、クラスター形成に必要なアダプターが両端に付加された cDNA または DNA 断片 (あるいはその両方) の完全なライブラリーが含まれます。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。
 - EPM: 低温に維持します。
 - UPxx: ボルテックスして混合し、短時間遠心します。UPxx は、ランセットアップ中に Local Run Manager ソフトウェアの [Create Run] 画面で選択したインデックスプライマーです。

- CPxx：ボルテックスして混合し、短時間遠心します。CPxxは、ランセットアップ中に Local Run Manager ソフトウェアの [Create Run] 画面で選択したインデックスプライマーです。
2. 各サンプルのインデックスが、ランセットアップ中に TSO Comprehensive 解析モジュールで計画したランと一致していることを確認します。36 ページの「ライブラリーの数とインデックスの選択」に記載されたインデックス選択に関する指示に必ず従ってください。



警告

サンプルとインデックスプライマーが一致していないと、サンプルが確実に同定されないため、結果報告が誤ったものになります。

手順

1. 選択したインデックスに従い、5 μ L の適切なインデックスプライマー (UPxx または CPxx) を LS PCR プレートの対応するサンプルウェルに添加します。



警告

同時に複数のインデックスプライマーチューブを扱うこと、および開栓することは避けてください。使用後すぐに各インデックスチューブに新しいキャップを付けてください。両方のインデックスプライマーを組み合わせて使用しないでください。

2. EPM を 5 秒間ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
3. 20 μ L の EPM を各サンプルウェルに添加します。
4. 粘着プレートシールを LS PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
5. 1200 rpm で 1 分間攪拌します。
6. 増幅前試薬を保管庫に戻します。



警告

増幅産物のキャリーオーバーを防ぐため、以降のステップはすべて増幅後エリアで実施してください。

7. LS PCR プレートを 280 \times g で 1 分間遠心します。
8. 事前にプログラムした増幅後サーマルサイクラーの上に置き、I-PCR プログラムを実行します。
43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」を参照してください。
続いて 58 ページの「1 回目のハイブリダイゼーションの準備」に進む場合は、「プロトコールステップの準備」セクションの試薬融解の指示に従います。
9. I-PCR プログラムが完了したら、LS PCR プレートを 280 \times g で 1 分間遠心します。
10. プレートのラベルを「ALS」(Amplified Library Samples) に貼り替えます。

セーフストップポイント

中断する場合は、ALS PCR プレートを -25°C ~ -15°C で保管します (最長 30 日間)。

プロトコルの準備

この準備は、一晚のハイブリダイゼーションに至るまでのプロトコルステップを実行するために必要です。

1. 増幅後サーマルサイクラーのプログラムが設定されていることを確認します。43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」を参照してください。
2. 試薬チューブを箱から取り出し、指示に従って融解します。

表 22 TruSight Oncology Comp Enrichment (6/8) (冷蔵) Box (REF : 20031123)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコルステップ
TCB1	2°C ~ 8°C	室温に戻します。	1回目のハイブリダイゼーションの準備

表 23 TruSight Oncology Comp Enrichment (7/8) (凍結) Box (REF : 20031121)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコルステップ
TCA1	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。	1回目のハイブリダイゼーションの準備

表 24 TruSight Oncology Comp Content Set (8/8) Box (REF : 20031122)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコルステップ
OPR1 (赤色のキャップ)	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。	1回目のハイブリダイゼーションの準備
OPD2 (白色のキャップ)	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。	1回目のハイブリダイゼーションの準備

1回目のハイブリダイゼーションの準備

このプロセス中に、オリゴプールが cDNA ライブラリーにハイブリダイズし、オリゴプールが 56 ページの「インデックス PCR」で調製した gDNA ライブラリーにハイブリダイズします。ターゲット領域の濃縮には 2 回のハイブリダイゼーションステップが必要です。1回目のハイブリダイゼーションでは、オリゴが一晚 (8 ~ 24 時間) かけて cDNA または gDNA ライブラリー (あるいはその両方) にハイブリダイズします。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。
 - TCB1 : チューブを 37°C で 5 分間温めます。10 秒間ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - TCA1 : ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - OPR1 : ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - OPD2 : ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
2. ALS PCR プレートを保管していた場合は、室温で融解し、280 × g で 1 分間遠心します。ピペッティングして混合します。
3. 新しい 96 ウェル PCR プレートに「HYB1」(Hybridization 1) というラベルを付けます。

手順

1. ALS PCR プレートから 20 μ L の各 cDNA または gDNA ライブラリー（あるいはその両方）を HYB1 PCR プレートの対応するウェルに移します。
2. 粘着プレートシールを ALS PCR プレートに貼付し、脇に置いておきます。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
3. TCB1 に沈殿物がないか確認します。沈殿物がある場合は、チューブを再び温め、結晶が溶解するまでチューブをボルテックスします。
4. 15 μ L の TCB1 を HYB1 PCR プレートの各ライブラリーウェルに添加します。
5. 10 μ L の TCA1 を HYB1 PCR プレートの各ライブラリーウェルに添加します。
6. プローブを添加します。
異なるタイプのプローブを組み合わせて使用しないでください。ウェルあたり 1 つのプローブセットのみを添加します。
 - **RNA ライブラリーウェル**：5 μ L の OPR1（赤色のキャップ）を RNA に由来する各ライブラリーに添加します。
 - **DNA ライブラリーウェル**：5 μ L の OPD2（白色のキャップ）を DNA に由来する各ライブラリーに添加します。
7. 粘着プレートシールを HYB1 PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
8. 1200 rpm で 2 分間攪拌します。
9. サーマルサイクラーの上に置き、HYB1 プログラムを実行します。
[43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」](#)を参照してください。
10. 57°C で 8 ~ 24 時間ハイブリダイズします。
11. ハイブリダイゼーション試薬を保管庫に戻します。
12. ALS PCR プレートを -25°C ~ -15°C で保管します（最長 30 日間）。

プロトコールの準備

この準備は、次のセーフストップポイントに至るまでのプロトコールステップを実行するために必要です。

1. 2 日目の初めに、試薬チューブを箱から取り出し、指示に従って融解します。

表 25 TruSight Oncology Comp Enrichment (6/8) (冷蔵) Box (REF : 20031123)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
SMB (紺青色のラベル)	2℃～8℃	30 分間かけて室温に戻します。	ターゲットキャプチャー 1 ターゲットキャプチャー 2
ET2	2℃～8℃	室温に戻します。	ターゲットキャプチャー 1 ターゲットキャプチャー 2
HP3	2℃～8℃	室温に戻します。	ターゲットキャプチャー 1 ターゲットキャプチャー 2 ライブラリーのノーマライズ
TCB1	2℃～8℃	室温に戻します。	2 回目のハイブリダイゼーションの準備
RSB	2℃～8℃	室温に戻します。	ターゲットキャプチャー 2 増幅した濃縮ライブラリーのクリーンアップ

表 26 TruSight Oncology Comp Enrichment (7/8) (凍結) Box (REF : 20031121)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
EE2	-25℃～-15℃	室温で融解します。	ターゲットキャプチャー 1 ターゲットキャプチャー 2 ライブラリーのノーマライズ
EEW	-25℃～-15℃	室温で融解します。	ターゲットキャプチャー 1
TCA1	-25℃～-15℃	室温で融解します。	2 回目のハイブリダイゼーションの準備

表 27 TruSight Oncology Comp Content Set (8/8) Box (REF : 20031122)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
OPR1 (赤色のキャップ)	-25℃～-15℃	室温で融解します。	2 回目のハイブリダイゼーションの準備
OPD2 (白色のキャップ)	-25℃～-15℃	室温で融解します。	2 回目のハイブリダイゼーションの準備

ターゲットキャプチャー 1

このステップでは、SMB を使用して、目的のターゲット領域にハイブリダイズしたプローブをキャプチャーします。EEW でビーズを 3 回洗浄します。用時調製した EE2 + HP3 溶出ミックスを使用して濃縮ライブラリーを溶出し、ET2 で中和します。

事前準備

- MIDI ヒートブロックインサートを取り付けたマイクロサンプルインキュベーターを 57℃ に予熱します。
- 次の試薬を準備します。
 - EEW : 1 分間ボルテックスして混合します。

- EE2：ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - HP3：ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - SMB：30 分間かけてビーズを室温に戻します。
この手順では、SPB ではなく、必ず **SMB** を使用してください。
 - ET2：手順で使用するまで脇に置いておきます。
3. EE2 + HP3 溶出ミックスをマイクロチューブで用時調製します。

表 28 ターゲット 1 のキャプチャー用の EE2 + HP3 溶出ミックス *

溶出ミックス の成分	4 ライブラリー	8 ライブラリー	16 ライブラリー	24 ライブラリー	48 ライブラリー
EE2	114 µL	228 µL	456 µL	684 µL	1368 µL
HP3	6 µL	12 µL	24 µL	36 µL	72 µL

* この表に記載されている量は若干多めになっています。計算式については、[33 ページの「試薬の取り扱い」](#)を参照してください。

4. EE2 + HP3 溶出ミックスをボルテックスしてから、短時間遠心します。[62 ページの「溶出」](#)ステップで使用するまで脇に置いておきます。
5. 新しい 96 ウェル MIDI プレートに「CAP1」(Capture 1) というラベルを付けます。
6. 磁気スタンドを用意します。

手順

結合

1. HYB1 PCR プレートをサーマルサイクラーから取り出します。
2. HYB1 PCR プレートを 280 × g で 1 分間遠心します。
3. SMB を 1 分間ボルテックスしてビーズを懸濁します。
沈殿物またはビーズペレットが存在する場合は、室温に達していることを確認し、ピペットアップおよびピペットダウンしてペレットを放出し、ボルテックスミキサーで懸濁します。
4. すぐに 150 µL の SMB を CAP1 MIDI プレートの各ライブラリーウェルに加えます。
トラフを使用して SMB を分注する場合は、サンプルあたりの溶液の量が十分になるように、1.15 の余裕係数を掛けて分量を計算します。
5. SMB を各サンプルウェルに加えたら、残りの溶液を廃棄します。
6. ピペットを 50 µL に設定し、HYB1 PCR プレートから各ライブラリーの全量を CAP1 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
7. 空になった HYB1 PCR プレートを廃棄します。
8. 粘着プレートシールを CAP1 MIDI プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
9. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。

10. 57°Cに予熱したマイクロサンプルインキュベーターで 25 分間インキュベートします。
11. CAP1 MIDI プレートに磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
12. プレートを磁気スタンドに保持します。ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 µL に設定したピペットを使用して、各ウェルからすべての上清を除去して廃棄します。



警告

直ちに次のステップ（62 ページの「洗淨」）に進んでください。液体がない状態でビーズペレットを長時間放置しないでください。

洗淨

1. 次の手順でビーズを洗淨します。
 - a. CAP1 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
 - b. 200 µL の EEW を各ウェルに添加します。
 - c. 150 µL に設定したピペットで、少なくとも 10 回ピペッティングして混合します。すべてのビーズが懸濁されたことを確認します。

ウェルのビーズ溶液全体を慎重にチップに吸引して、ビーズペレットが存在しないことを確認します。各ウェルの底を目視点検します。ビーズペレットが存在する場合は、洗淨ステップ中にピペットチップをペレットの方に傾けてペレットを除去します。ビーズペレットが溶液中に完全に浸漬したことを確認します。溶液は見た目が暗褐色で、濃度が均一である必要があります。
 - d. 粘着プレートシールを CAP1 MIDI プレートに貼付します。
 - e. 蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
 - f. 1800 rpm で 4 分間攪拌します。
 - g. 57°Cのマイクロサンプルインキュベーターで 5 分間インキュベートします。
 - h. CAP1 MIDI プレートを磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
 - i. プレートを磁気スタンドに保持します。ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 µL に設定したピペットを使用して、各ウェルからすべての上清を除去して廃棄します。
2. 2 回目のビーズの洗淨を行います。
3. 3 回目のビーズの洗淨を行います。
4. 先の細いピペットを使用して、各ウェルに残っている EEW を除去します。

溶出

1. CAP1 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
2. 用時調製した EE2 + HP3 溶出ミックスをボルテックスしてから、短時間遠心します。
3. 17 µL の EE2 + HP3 溶出ミックスを CAP1 MIDI プレートの各ライブラリーウェルに慎重に添加します。
4. 残りの EE2 + HP3 溶出ミックスを廃棄します。
5. 粘着プレートシールを CAP1 MIDI プレートに貼付します。

縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
6. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
7. 磁気スタンドに載せて 2 分間待ちます。

8. 新しい96 ウェル PCR プレートに「ELU1」(Elution 1) というラベルを付けます。
9. ET2 をボルテックスして混合し、短時間遠心します。
10. 5 μ L の ET2 を新しい ELU1 PCR プレートの対応する各ライブラリーウェルに加えます。
11. CAP1 MIDI プレートの各ライブラリーウェルから 15 μ L の溶出液を ELU1 PCR プレートの対応するウェルに慎重に移します。
12. 空になった CAP1 MIDI プレートを廃棄します。
13. 粘着プレートシールを ELU1 PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
14. 1200 rpm で 2 分間攪拌します。
15. EEW を保管庫に戻します。

2 回目のハイブリダイゼーションの準備

このステップでは、濃縮した cDNA または gDNA ライブラリー (あるいはその両方) のターゲット領域をキャプチャープローブともう一度結合させます。この 2 回目のハイブリダイゼーションにより、キャプチャー領域の高い特異度が確保されます。ライブラリーを最適に濃縮するため、2 回目のハイブリダイゼーションステップを 57°C で 1.5 ~ 4 時間実施します。

事前準備

1. 次の試薬を準備します。
 - TCB1: チューブを 37°C で 5 分間温めます。10 秒間ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - TCA1: ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - OPR1: ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - OPD2: ボルテックスして混合し、短時間遠心します。

手順

1. TCB1 に沈殿物がないか確認します。沈殿物がある場合は、チューブを再び温め、結晶が溶解するまでボルテックスします。
2. 15 μ L の TCB1 を ELU1 PCR プレートの各ライブラリーウェルに添加します。
3. 10 μ L の TCA1 を各ライブラリーウェルに添加します。
4. 1 回目のハイブリダイゼーションで使用したのと同じプローブを各ウェルに追加します。ウェルごとにプローブセットを 1 つだけ追加します。

異なるタイプのプローブを組み合わせて使用しないでください。

- RNA ライブラリーウェル: 5 μ L の OPR1 (赤色のキャップ) を RNA に由来する各ライブラリーに添加します。

- DNA ライブラリーウェル：5 μ L の OPD2（白色のキャップ）を DNA に由来する各ライブラリーに添加します。
5. 粘着プレートシールを ELU1 PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
 6. 1200 rpm で 2 分間攪拌します。
 7. サーマルサイクラーの上に置き、HYB2 プログラムを実行します。
[43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」](#)を参照してください。
 8. 57°C で 1.5 ~ 4 時間ハイブリダイズします。
 9. ハイブリダイゼーション試薬を保管庫に戻します。

ターゲットキャプチャー 2

このステップでは、SMB を使用して、目的のターゲット領域にハイブリダイズしたプローブをキャプチャーします。RSB でビーズを 1 回洗浄します。用時調製した EE2 + HP3 溶出ミックスを使用して濃縮ライブラリーを溶出し、ET2 で中和します。

事前準備

1. MIDI ヒートブロックインサートを取り付けたマイクロサンプルインキュベーターを 57°C に予熱します。
2. 次の試薬を準備します。
 - EE2：ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - HP3：ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - SMB：30 分間かけてビーズを室温に戻します。
この手順では、SPB ではなく、必ず **SMB** を使用してください。
 - RSB：手順で使用するまで脇に置いておきます。
 - ET2：手順で使用するまで脇に置いておきます。
3. EE2 + HP3 溶出ミックスをマイクロチューブで用時調製します。

表 29 ターゲット 2 のキャプチャー用の EE2 + HP3 溶出ミックス *

溶出ミックスの成分	4 ライブラリー	8 ライブラリー	16 ライブラリー	24 ライブラリー	48 ライブラリー
EE2	114 μ L	228 μ L	456 μ L	684 μ L	1368 μ L
HP3	6 μ L	12 μ L	24 μ L	36 μ L	72 μ L

* この表に記載されている量は若干多めになっています。計算式については、[33 ページの「試薬の取り扱い」](#)を参照してください。

4. ボルテックスして混合し、短時間遠心します。[66 ページの「溶出」](#)ステップで使用するまで脇に置いておきます。

5. 新しい96 ウェル MIDI プレートに「CAP2」(Capture 2) というラベルを付けます。
6. 磁気スタンドを用意します。

手順

結合

1. ELU1 PCR プレートをサーマルサイクラーから取り出します。
2. ELU1 PCR プレートを 280 × g で1分間遠心します。
3. SMB を1分間ボルテックスしてビーズを懸濁します。
沈殿物またはビーズペレットが存在する場合は、室温に達していることを確認し、ピペットアップおよびピペットダウンしてペレットを放出し、ボルテックスミキサーで懸濁します。
4. すぐに 150 μL の SMB を CAP2 MIDI プレートの各ライブラリーウェルに加えます。
トラフを使用して SMB を分注する場合は、サンプルあたりの溶液の量が十分になるように、1.15 の余裕係数を掛けて分量を計算します。
5. SMB を各サンプルウェルに加えたら、残りの溶液を廃棄します。
6. ピペットを 50 μL に設定し、ELU1 PCR プレートから各ライブラリーの全量を CAP2 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
7. 空になった ELU1 PCR プレートを廃棄します。
8. 粘着プレートシールを CAP2 MIDI プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
9. 1800 rpm で2分間攪拌します。
10. 57°Cのマイクロサンプルインキュベーターで25分間インキュベートします。
続いて [67ページ](#)の「濃縮ライブラリーの増幅」に進む場合は、「プロトコールの準備」セクションの試薬融解の指示に従います。
11. 磁気スタンドに載せて2分間待ちます。
12. CAP2 MIDI プレートを磁気スタンドに保持します。ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μL に設定したピペットを使用して、各ウェルからすべての上清を除去して廃棄します。



警告

直ちに次のステップ ([65 ページ](#)の「洗淨」) に進んでください。液体がない状態でビーズペレットを長時間放置しないでください。

洗淨

1. CAP2 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
2. RSB を転倒混和またはボルテックスして混合します。
3. 200 μL の RSB を各ウェルに添加します。

4. 粘着プレートシールを CAP2 MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
5. 1800 rpm で 4 分間攪拌します。
6. プレートを磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
7. プレートを磁気スタンドに保持します。ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各ウェルからすべての上清を除去して廃棄します。
8. 先の細いピペットを使用して、各ウェルに残っている RSB を除去します。

溶出

1. CAP2 MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
2. 用時調製した EE2 + HP3 溶出ミックスをボルテックスしてから、短時間遠心します。
3. 22 μ L の EE2 + HP3 溶出ミックスを CAP2 MIDI プレートの各ライブラリーウェルに添加します。
4. 残りの EE2 + HP3 溶出ミックスを廃棄します。
5. 粘着プレートシールを CAP2 MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
6. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
7. 磁気スタンドに載せて 2 分間待ちます。
8. 新しい 96 ウェル PCR プレートに「ELU2」(Elution 2) というラベルを付けます。
9. ET2 をボルテックスして混合し、短時間遠心します。
10. 5 μ L の ET2 を新しい ELU2 PCR プレートの対応する各ライブラリーウェルに加えます。
11. CAP2 MIDI プレートの各ライブラリーウェルから 20 μ L の溶出液を ELU2 PCR プレートの対応するウェルに慎重に移します。
12. 空になった CAP2 MIDI プレートを廃棄します。
13. 粘着プレートシールを ELU2 PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
14. 1200 rpm で 2 分間攪拌します。
15. SMB、EE2、HP3、RSB、ET2 を保管庫に戻します。

セーフストップポイント

中断する場合は、ELU2 PCR プレートを 280 \times g で 1 分間遠心し、 -25°C ~ -15°C で保管します (最長 7 日間)。

プロトコールの準備

この準備は、次のセーフストップポイントに至るまでのプロトコールステップを実行するために必要です。

1. アイスバケットまたは同等品を準備します。
2. 試薬チューブを箱から取り出し、指示に従って融解します。

表 30 TruSight Oncology Comp Enrichment (7/8) (凍結) Box (REF : 20031121)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
PPC3	-25℃～-15℃	室温で融解します。	濃縮ライブラリーの増幅
EPM	-25℃～-15℃	低温に維持します。	濃縮ライブラリーの増幅

表 31 TruSight Oncology Comp Enrichment (6/8) (冷蔵) Box (REF : 20031123)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
SPB (薄緑色のラベル)	2℃～8℃	30分間かけて室温に戻します。	増幅した濃縮ライブラリーのクリーンアップ
RSB	2℃～8℃	室温に戻します。	増幅した濃縮ライブラリーのクリーンアップ シーケンスの準備

濃縮ライブラリーの増幅

このステップでは、プライマーを使用して濃縮ライブラリーを増幅します。

事前準備

1. ELU2 プレートを保管していた場合は、室温で融解し、280 × g で1分間遠心します。

手順

1. PPC3 をボルテックスして混合し、短時間遠心します。
2. 5 μL の PPC3 を ELU2 PCR プレートの各ライブラリーウェルに添加します。
3. EPM を 5 秒間ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
4. 20 μL の EPM を各ライブラリーウェルに添加します。
5. 粘着プレートシールを ELU2 PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
6. 1200 rpm で 2 分間攪拌します。
7. サーマルサイクラーの上に置き、EL-PCR プログラムを実行します。
[43 ページの「サーマルサイクラーのプログラミング」](#)を参照してください。
続いて [70 ページの「ライブラリーのノーマライズ」](#)に進む場合は、「[プロトコールの準備](#)」セクションの試薬融解の指示に従います。
8. PPC3 と EPM を保管庫に戻します。

増幅した濃縮ライブラリーのクリーンアップ

このステップでは、SPB を使用して不要な反応成分を除去することにより、濃縮ライブラリーを精製します。用時調製した 80% エタノールでビーズを 2 回洗浄します。RSB でライブラリーを溶出します。

事前準備

- 次の試薬を準備します。
 - SPB：30 分間かけてビーズを室温に戻します。この手順では、SMB ではなく、必ず **SPB** を使用してください。
 - RSB：手順で使用するまで脇に置いておきます。
- 15 mL または 50 mL のコニカルチューブで 80% エタノールを用時調製します。

表 32 80% エタノールの用時調製

試薬	4 ライブラリー	8 ライブラリー	16 ライブラリー	24 ライブラリー	48 ライブラリー
100% EtOH、純正	2 mL	4 mL	8 mL	12 mL	24 mL
RNase/DNase フリー水	500 µL	1 mL	2 mL	3 mL	6 mL

- 用時調製した 80% EtOH をボルテックスして混合します。
- 新しい 96 ウェル MIDI プレートに「BIND2」(Clean Up Binding) というラベルを付けます。
- 磁気スタンドを用意します。

手順

結合

- ELU2 PCR プレートをサーマルサイクラーから取り出します。
- ELU2 PCR プレートを 280 × g で 1 分間遠心します。
- SPB を 1 分間ボルテックスしてビーズを懸濁します。
- すぐに 110 µL の SPB を BIND2 MIDI プレートの各ライブラリーウェルに加えます。
- ELU2 PCR プレートから 50 µL の各ライブラリーを BIND2 MIDI プレートの対応するウェルに移します。
- 空になった ELU2 PCR プレートを廃棄します。
- 粘着プレートシールを BIND2 MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
- 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
- 室温で 5 分間インキュベートします。

10. BIND2 MIDI プレート を磁気スタンドに載せ、5 分間待ちます。
11. プレート を磁気スタンドに保持します。ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各ウェルからすべての上清を除去して廃棄します。

洗淨

1. 次の手順でビーズを洗淨します。
 - a. BIND2 MIDI プレート を磁気スタンドに載せたまま、200 μ L の用時調製した 80% EtOH を各ウェルに添加します。
 - b. 30 秒間待ちます。
 - c. ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各ウェルからすべての上清を除去して廃棄します。
2. 2 回目のビーズの洗淨を行います。
3. 先の細いピペットを使用して、各ウェルに残っている EtOH を除去します。
4. 使用しなかった 80% EtOH を廃棄します。

溶出

1. BIND2 MIDI プレート を磁気スタンドから取り外します。
2. RSB を転倒混和またはボルテックスして混合します。
3. 32 μ L の RSB を各ライブラリーウェルに添加します。
4. 粘着プレートシールを BIND2 MIDI プレート に貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
5. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
6. 室温で 2 分間インキュベートします。
7. 磁気スタンドに載せて 2 分間待ちます。
8. 新しい 96 ウェル PCR プレート に「PL」(Purified Libraries) というラベルを付けます。
9. BIND2 MIDI プレート から 30 μ L の各溶出液を PL PCR プレート の対応するウェルに移します。
10. 空になった BIND2 MIDI プレート を廃棄します。
11. 粘着プレートシールを PL PCR プレート に貼付します。
12. SPB と RSB を保管庫に戻します。

セーフストップポイント

中断する場合は、PL PCR プレート を 280 \times g で 1 分間遠心し、-25°C ~ -15°C で保管します (最長 30 日間)。

プロトコールの準備

この準備は、次のセーフストップポイントに至るまでのプロトコールステップを実行するために必要です。

1. 試薬チューブを箱から取り出し、指示に従って融解します。

表 33 TruSight Oncology Comp Enrichment (7/8) (凍結) Box (REF : 20031121)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
LNA1	-25℃～ -15℃	室温で融解します。	ライブラリーのノーマライズ
EE2	-25℃～ -15℃	室温で融解します。	ライブラリーのノーマライズ

表 34 TruSight Oncology Comp Enrichment (6/8) (冷蔵) Box (REF : 20031123)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコールステップ
LNB1	2℃～ 8℃	30 分間かけて室温に戻します。	ライブラリーのノーマライズ
HP3	2℃～ 8℃	室温に戻します。	ライブラリーのノーマライズ シーケンスの準備
LNW1	2℃～ 8℃	室温に戻します。	ライブラリーのノーマライズ
LNS1	2℃～ 8℃	室温に戻します。	ライブラリーのノーマライズ

2. 同じ日のうちに [74 ページ](#)の「シーケンスの準備」に進む場合は、「プロトコールの準備」セクションの試薬融解の指示に従います。

ライブラリーのノーマライズ

このプロセスでは、プールされたライブラリーが均等に含まれるように、LNB1 と添加剤 (LNA1) を使用して各ライブラリーの量をノーマライズします。LNW1 でビーズを 2 回洗浄します。用時調製した EE2 + HP3 溶出ミックスを使用してライブラリーを溶出し、LNS1 で中和します。

事前準備

- 次の試薬を準備します。
 - LNB1 : 30 分間かけてビーズを室温に戻します。
 - LNA1 : ボルテックスして混合します。
 - EE2 : ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - HP3 : ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
 - LNW1 : ボルテックスして混合します。手順で使用するまで脇に置いておきます。
 - LNS1 : ボルテックスして混合します。手順で使用するまで脇に置いておきます。
- LNB1 を 1 分間ボルテックスしてビーズを懸濁します。
LNB1 チューブを転倒混和し、すべてのビーズが懸濁されたことを確認します。
- 確実に懸濁するため、800 μ L に設定したピペットを使用して、LNB1 を上下に 10 回ピペッティングします。
- 直ちに LNA1 + LNB1 マスターミックスをコニカルチューブで用時調製します。

**警告**

クラスター密度が不均一になるのを防ぐため、チューブの底で LNB1 ビーズペレットを完全に懸濁してください。

表 35 LNA1 + LNB1 マスターミックス *

マスターミックスの成分	4 ライブラリー	8 ライブラリー	16 ライブラリー	24 ライブラリー	48 ライブラリー
LNA1	305 µL	610 µL	1219 µL	1829 µL	3658 µL
LNB1	55 µL	110 µL	221 µL	331 µL	662 µL

* この表に記載されている量は若干多めになっています。計算式については、33 ページの「試薬の取り扱い」を参照してください。

- LNA1 + LNB1 マスターミックスをボルテックスします。71 ページの「結合」ステップで使用するまで脇に置いておきます。
- EE2 + HP3 溶出ミックスをマイクロチューブで用時調製します。

表 36 ライブラリーのノーマライズ用の EE2 + HP3 溶出ミックス *

溶出ミックスの成分	4 ライブラリー	8 ライブラリー	16 ライブラリー	24 ライブラリー	48 ライブラリー
EE2	152 µL	304 µL	608 µL	912 µL	1824 µL
HP3	8 µL	16 µL	32 µL	48 µL	96 µL

* この表に記載されている量は若干多めになっています。計算式については、33 ページの「試薬の取り扱い」を参照してください。

- 用時調製した溶出ミックスをボルテックスしてから、短時間遠心します。72 ページの「溶出」ステップで使用するまで脇に置いておきます。
- PL PCR プレートを保管していた場合は、室温で融解し、280 × g で1分間遠心します。ピペティングして混合します。
- 新しい96 ウェル MIDI プレートに「BBN」(Bead-Based Normalization) というラベルを付けます。
- 磁気スタンドを用意します。

手順**結合**

- LNA1 + LNB1 マスターミックスをボルテックスします。
- すぐに 45 µL の LNA1 + LNB1 マスターミックスを BBN MIDI プレートの各ライブラリーウェルに加えます。
- 残りの LNA1 + LNB1 マスターミックスを廃棄します。
- 20 µL の各ライブラリーを PL PCR プレートから BBN MIDI プレートの対応するウェルに移します。

5. 粘着プレートシールを BBN MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
6. 1800 rpm で 30 分間攪拌します。
7. 粘着プレートシールを PL PCR プレートに貼付し、保管庫に戻します。
8. BBN MIDI プレートを磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
9. プレートを磁気スタンドに保持します。ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各ウェルからすべての上清を除去して廃棄します。

洗浄

1. 次の手順でビーズを洗浄します。
 - a. BBN MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
 - b. 45 μ L の LNW1 を各ライブラリーウェルに添加します。
 - c. 粘着プレートシールを BBN MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
 - d. 1800 rpm で 5 分間攪拌します。
 - e. BBN MIDI プレートを磁気スタンドに載せ、2 分間待ちます。
 - f. プレートを磁気スタンドに保持します。ビーズペレットを乱さないよう注意しながら、200 μ L に設定したピペットを使用して、各ウェルからすべての上清を除去して廃棄します。
2. 2 回目のビーズの洗浄を行います。
3. 先の細いピペットを使用して、各ウェルに残っている上清を除去します。

溶出

1. BBN MIDI プレートを磁気スタンドから取り外します。
2. 用時調製した EE2 + HP3 溶出ミックスをボルテックスしてから、短時間遠心します。
3. 32 μ L の EE2 + HP3 溶液を BBN MIDI プレートの各ライブラリーウェルに添加します。
4. 残りの溶出ミックスを廃棄します。
5. 粘着プレートシールを BBN MIDI プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
6. 1800 rpm で 2 分間攪拌します。
7. 磁気スタンドに載せて 2 分間待ちます。
8. 新しい 96 ウェル PCR プレートに「NL」（Normalized Libraries）というラベルを付けます。
9. BBN MIDI プレートの各ライブラリーウェルから 30 μ L の溶出液を NL PCR プレートの対応するウェルに慎重に移します。



警告

ビーズがピペットチップに吸引された場合は、ビーズを磁気スタンド上のプレートに戻し、液体が透明になるまで（約 2 分間）待ってから、手順の次のステップに進みます。

10. 空になった BBN MIDI プレートを廃棄します。
11. LNS1 をボルテックスして混合します。
12. 30 μ L の LNS1 を新しい NL PCR プレートの対応する各ライブラリーウェルに添加します。
13. 5 回ピペティングして混合します。
14. 粘着プレートシールを NL PCR プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
15. LNB1、LNA1、EE2、LNW1、LNS1 を保管庫に戻します。

セーフストップポイント

中断する場合は、NL PCR プレートを 280 × g で 1 分間遠心し、-25°C ~ -15°C で保管します (最長 32 日間)。

プロトコルの準備

この準備は、シーケンスに至るまでのプロトコルステップを実行するために必要です。

使用する少なくとも 1 時間前に、NextSeq 550Dx High Output Reagent Kit v2.5 (300 cycles) (REF: 20028871) のシーケンス消耗品の準備を開始します。

1. -25°C ~ -15°C の保管庫からライブラリー希釈緩衝液 (HT1) を取り出します。室温で融解してから低温に維持します。
2. キットに含まれる他の消耗品については、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』(文書番号: 1000000009513) に記載された準備手順に従ってください。
 - NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx Buffer Cartridge v2 (300 cycles)
 - NextSeq 550Dx High Output Flow Cell Cartridge v2.5 (300 cycles)
3. 試薬チューブを箱から取り出し、指示に従って融解します。

表 37 TruSight Oncology Comp Enrichment (7/8) (凍結) Box (REF: 20031121)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコルステップ
PhiX Internal Control (PX3 または PhiX)	-25°C ~ -15°C	室温で融解します。低温に維持します。	シーケンスの準備

表 38 TruSight Oncology Comp Enrichment (6/8) (冷蔵) Box (REF: 20031123)

試薬	保管条件	融解の指示	プロトコルステップ
HP3	2°C ~ 8°C	室温に戻します。	シーケンスの準備
RSB (ピンク色のラベル)	2°C ~ 8°C	室温に戻します。	シーケンスの準備

シーケンスの準備

DNAおよびRNAの各シーケンスランには、陽性コントロールとNTCを含める必要があります。DNAおよびRNAのNTCは、必要に応じて繰り返しシーケンスされるため、各ランにはNTCが含まれます。DNAおよびRNAの各ランには、個別の陽性コントロールが含まれます。

事前準備

1. 36 ページの「ライブラリーの数とインデックスの選択」のガイドラインを参照してください。
2. マイクロチューブに「dHP3」（diluted HP3）というラベルを付けます。
3. マイクロチューブに「dPhiX」（diluted PhiX）というラベルを付けます。
4. マイクロチューブ用のヒートブロックを 96°C に予熱します。
5. アイスバケットまたは同等品を準備します。

PhiX コントロールの希釈と変性

1. HP3 をボルテックスして混合し、短時間遠心します。
2. dHP3 マイクロチューブで以下の分量を混合します。
 - 10 μ L の HP3
 - 190 μ L の RNase/DNase フリー水
3. dHP3 をボルテックスして混合し、短時間遠心します。
4. RSB を転倒混和またはボルテックスして混合します。
5. PhiX コントロールをボルテックスして混合し、短時間遠心します。
6. dPhiX マイクロチューブで以下の分量を混合します。
 - 8 μ L の RSB
 - 2 μ L の PhiX コントロール
7. 10 μ L の dHP3 を dPhiX チューブに添加します。
8. dHP3 チューブを廃棄します。
9. dPhiX チューブをボルテックスして混合し、短時間遠心します。
10. dPhiX を室温で 5 分間インキュベートして変性させます。
11. HT1 をボルテックスして混合します。
12. すぐに 980 μ L の予冷した HT1 を dPhiX に添加します。
13. ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
14. 2 回目の希釈液の調製に使用するまで、PhiX を低温に維持します。
最終濃度は 20 pM dPhiX です。
15. PhiX、HP3、RSB を保管庫に戻します。

TSO Comprehensive パネルシステム用ライブラリーのプーリングと変性

1. NL PCR プレートを保管していた場合は、室温で融解し、280 × g で1分間遠心します。
2. 30 µL に設定したマルチチャンネルピペットを使用して、NL PCR プレートのライブラリーを優しく 5 回ピペッティングして混合します。ライブラリーごとに新しいチップを使用します。



警告

最適な性能を得るため、必ずライブラリーを十分に混合してください。

3. 以下のいずれかのオプションを選択して、ライブラリーをプール、変性、および希釈します。
 - [オプション 1] RNA サンプル由来のライブラリーと DNA サンプル由来のライブラリーを同時にシーケンスする。75 ページの「[オプション 1: DNA ライブラリーと RNA ライブラリーの両方](#)」を参照してください。
 - [オプション 2] DNA サンプル由来のライブラリーのみをシーケンスする。76 ページの「[オプション 2: DNA ライブラリーのみ](#)」を参照してください。
 - [オプション 3] RNA サンプル由来のライブラリーのみをシーケンスする。77 ページの「[オプション 3: RNA ライブラリーのみ](#)」を参照してください。

オプション 1: DNA ライブラリーと RNA ライブラリーの両方

1. マイクロチューブに「PRL」(Pooled RNA Libraries) というラベルを付けます。
2. マイクロチューブに「PDL」(Pooled DNA Libraries) というラベルを付けます。
3. NL プレートから 10 µL の各ノーマライズ済み RNA (cDNA) ライブラリーを PRL チューブに移します。インデックスプライマーが同一の 2 つのライブラリーをプールしないでください。
4. NL プレートから 10 µL の各ノーマライズ済み DNA ライブラリーを PDL チューブに移します。インデックスプライマーが同一の 2 つのライブラリーをプールしないでください。
5. 粘着プレートシールを NL PCR プレートに貼付します。縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
6. PRL チューブと PDL チューブをボルテックスして混合します。
7. PRL チューブと PDL チューブを短時間遠心します。
8. PRL チューブと PDL チューブを 96°C のヒートブロックで 2 分間インキュベートします。
9. PRL チューブと PDL チューブを低温に維持し、5 分間待ちます。
10. PRL チューブと PDL チューブをボルテックスして混合し、短時間遠心します。
11. PRL チューブと PDL チューブを低温に維持します。

1 回目の希釈液の調製

1. マイクロチューブに「DIL1」(Dilution 1) というラベルを付けます。
2. 20 µL の PDL を空の DIL1 チューブに移します。
3. 5 µL の PRL を DIL1 に添加します。

4. PDL チューブと PRL チューブを廃棄します。
5. 475 μ L の予冷した HT1 を DIL1 チューブに添加します (1:20 の希釈比)。
6. DIL1 チューブをボルテックスして混合し、短時間遠心します。

2 回目の希釈液の調製

1. 2.0 mL のマイクロチューブに「DIL2」(Dilution 2) というラベルを付けます。
2. 40 μ L の DIL1 を空の DIL2 チューブに移します。
3. DIL1 チューブを廃棄します。
4. 1660 μ L の予冷した HT1 を DIL2 チューブに添加します (1:850 の希釈比)。
5. 調製済みの 20 pM dPhiX をボルテックスして混合し、短時間遠心します。
6. 2.5 μ L の調製済み 20 pM dPhiX を DIL2 チューブに添加します。
7. ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
8. 1300 μ L の DIL2 を、融解した NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) にロードします。
詳細については、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』(文書番号 : 1000000009513) を参照してください。
9. DIL2 チューブを廃棄します。
10. NL PCR プレートを 280 \times g で 1 分間遠心し、25°C ~ 15°C で保管します (最長 32 日間)。
11. シーケンスに進みます。
詳細については、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』(文書番号 : 1000000009513) を参照してください。

オプション 2 : DNA ライブラリーのみ

1. マイクロチューブに「PDL」(Pooled DNA Libraries) というラベルを付けます。
2. NL プレートから 10 μ L の各ノーマライズ済み DNA ライブラリーを PDL チューブに移します。
インデックスプライマーが同一の 2 つのライブラリーをプールしないでください。
3. 粘着プレートシールを NL PCR プレートに貼付します。
縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
4. PDL チューブをボルテックスして混合し、短時間遠心します。
5. PDL チューブを 96°C のヒートブロックで 2 分間インキュベートします。
6. PDL チューブを低温に維持し、5 分間待ちます。
7. PDL チューブをボルテックスして混合し、短時間遠心します。
8. PDL チューブを低温に維持します。

1 回目の希釈液の調製

1. マイクロチューブに「DIL1」(Dilution 1) というラベルを付けます。

2. 10 μ L の PDL を空の DIL1 チューブに移します。
3. PDL チューブを廃棄します。
4. 190 μ L の予冷した HT1 を DIL1 チューブに添加します (1:20 の希釈比)。
5. DIL1 をボルテックスして混合し、短時間遠心します。

2 回目の希釈液の調製

1. 2.0 mL のマイクロチューブに「DIL2」(Dilution 2) というラベルを付けます。
2. 40 μ L の DIL1 を空の DIL2 チューブに移します。
3. DIL1 チューブを廃棄します。
4. 1660 μ L の予冷した HT1 を DIL2 チューブに添加します (1:850 の希釈比)。
5. 調製済みの 20 pM dPhiX をボルテックスし、短時間遠心します。
6. 2.5 μ L の調製済み 20 pM dPhiX を DIL2 チューブに添加します。
7. ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
8. 1300 μ L の DIL2 を、融解した NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) にロードします。
詳細については、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』(文書番号 : 1000000009513) を参照してください。
9. DIL2 チューブを廃棄します。
10. NL PCR プレート を 280 \times g で 1 分間遠心し、25°C ~ 15°C で保管します (最長 32 日間)。
11. シーケンスに進みます。
詳細については、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』(文書番号 : 1000000009513) を参照してください。

オプション 3 : RNA ライブラリーのみ

1. マイクロチューブに「PRL」(Pooled RNA Libraries) というラベルを付けます。
2. NL プレートから 10 μ L の各ノーマライズ済み RNA (cDNA) ライブラリーを PRL チューブに移します。
インデックスプライマーが同一の 2 つのライブラリーをプールしないでください。
3. 粘着プレートシールを NL PCR プレートに貼付します。
蒸発を防ぐため、縁端部とウェルを完全にシールで覆ってください。
4. PRL チューブをボルテックスして混合します。
5. PRL チューブを短時間遠心します。
6. PRL チューブを 96°C のヒートブロックで 2 分間インキュベートします。
7. PRL チューブを低温に維持し、5 分間待ちます。
8. PRL チューブをボルテックスして混合し、短時間遠心します。
9. PRL チューブを低温に維持します。

1 回目の希釈液の調製

1. マイクロチューブに「DIL1」(Dilution 1) というラベルを付けます。
2. 10 μ L の PRL を空の DIL1 チューブに移します。
3. PRL チューブを廃棄します。
4. 190 μ L の予冷した HT1 を DIL1 チューブに添加します (1:20 の希釈比)。
5. DIL1 をボルテックスして混合し、短時間遠心します。

2 回目の希釈液の調製

1. 2.0 mL のマイクロチューブに「DIL2」(Dilution 2) というラベルを付けます。
2. 40 μ L の DIL1 を空の DIL2 チューブに移します。
3. DIL1 チューブを廃棄します。
4. 1646 μ L の予冷した HT1 を DIL2 チューブに添加します (1:843 の希釈比)。
5. 調製済みの 20 pM dPhiX をボルテックスし、短時間遠心します。
6. 16.7 μ L の調製済み 20 pM dPhiX を DIL2 チューブに添加します。
7. ボルテックスして混合し、短時間遠心します。
8. 1300 μ L の DIL2 を、融解した NextSeq 550Dx High Output Reagent Cartridge v2 (300 cycles) にロードします。
詳細については、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』(文書番号 : 1000000009513) を参照してください。
9. DIL2 チューブを廃棄します。
10. NL PCR プレート を 280 \times g で 1 分間遠心し、25°C ~ 15°C で保管します (最長 32 日間)。
11. シーケンスに進みます。
詳細については、『NextSeq 550Dx システム Instrument Reference Guide』(文書番号 : 1000000009513) を参照してください。

結果の解釈

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイのシーケンス結果は、PDF レポートと JSON レポートでサンプルごとに個別に報告されます。低深度レポート (LowDepthReport.tsv) もサンプルレベルで生成されます。

ランレベルでは、以下の出力ファイルが生成されます。

- ControlOutput.tsv
- MetricsOutput.tsv

PDF および JSON レポートには、品質管理に合格したバリエーションだけが含まれます。

詳細な解析情報については、『Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module Workflow Guide』(文書番号: 200049183) を参照してください。

腫瘍プロファイリングバリエーション

TSO Comprehensive パネルシステムは、臨床的に有意なエビデンスがあるバリエーション (レベル 2) または臨床的に有意な可能性があるバリエーション (レベル 3) を報告するときに体細胞バリエーションを報告するように設計されています。TruSight Oncology Comprehensive 解析モジュールは、KB を使用して、検出された適格な各バリエーション (表 1) が臨床的に有意であるか、または臨床的に有意な可能性があるかを治療的、診断的、または予後的関連性に基づいて決定します。KB では、テストされたがん種において関連性が確立されているかどうかも考慮されます。癌を発症しやすいか、またはがんリスクの関連性は、KB に含まれていません。一般的な多型は除去されています。

腫瘍プロファイリングバリエーションの陽性結果は、インストールされている KB と同定されたがん種に従って、Genomic Findings with Evidence of Clinical Significance (臨床的に有意なエビデンスがあるゲノムの所見、レベル 2) または Genomic Findings with Potential Clinical Significance (臨床的に有意な可能性があるゲノムの所見、レベル 3) に分類されます。

品質管理の仕様が満たされていない場合、不合格の品質管理メトリクスに関連するバリエーションタイプの結果は得られません。詳細については、表 39 および表 40 を参照してください。深度が不十分な腫瘍プロファイリングの位置は低深度レポートで報告されます。TSO Comprehensive パネルシステムレポートでは報告されません。

品質管理

- 核酸定量に関する情報とインプット核酸の最低限の要件については、[26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」](#)を参照してください。
- シーケンスランとサンプルの有効性は、TSO Comprehensive 解析モジュールによって自動的に判定され、報告されます。詳細な解析情報については、『Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module Workflow Guide』（文書番号：200049183）を参照してください。
- 品質管理の結果は、TSO Comprehensive パネルシステムレポート（PDF 形式と JSON 形式で提供される）にまとめられます。これらのレポートファイルは解析フォルダーにあります。解析フォルダー（PDF レポートと JSON レポートを含む）とランフォルダーの場所については、『Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module Workflow Guide』（文書番号：200049183）を参照してください。

表 39 TSO Comprehensive パネルシステムレポート結果の QC メトリクス

出力タイプ	メトリクス	仕様	説明	仕様を満たさなかった場合の影響*
シーケンスラン	PCT_PF_READS (%)	≥ 80.0	フィルターをパスした (PF) リードの割合。	シーケンスランが無効になります。そのランのすべてのサンプルについて結果が報告されません。
	PCT_Q30_R1 (%)	≥ 80.0	Read 1 のクオリティスコアが Q30 以上であるベースコールの平均割合。	
	PCT_Q30_R2 (%)	≥ 80.0	Read 2 のクオリティスコアが Q30 以上であるベースコールの平均割合。	
DNA ライブラリー	CONTAMINATION_SCORE	≤ 3,106、 または > 3,106 かつ P_VALUE ≤ 0.049	コモンバリエーションの VAF を使用してコンタミネーションの可能性を評価したメトリクス。コンタミネーションスコアは SNP の VAF 分布に基づきます。コンタミネーション p 値は大規模に再編成されたゲノムの評価に使用され、コンタミネーションスコアが仕様上限を上回る場合にのみ適用されます。	DNA の結果が報告されません。
	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 70	サンプルのフラグメント長の中央値。	TMB または スモール DNA バリエーションの結果が報告されません。
	MEDIAN_EXON_COVERAGE (カウント)	≥ 150	全エクソン塩基にわたるエクソンフラグメントカバレッジの中央値。	
	PCT_EXON_50X (%)	≥ 90.0	50x フラグメントカバレッジを持つエクソン塩基の割合。	

出力タイプ	メトリクス	仕様	説明	仕様を満たさなかった場合の影響*
	USABLE_MSI_SITES (カウント)	≥ 40	MSI コールに使用可能な MSI 部位の数 (マイクロサテライト不安定性を同定するのに十分なスパンングリードを持つマイクロサテライト部位の数)。	MSI の結果が報告されません。
	COVERAGE_MAD (カウント)	≤ 0.210	各 CNV ターゲット領域のノーマライズされたカウントの中央値からの絶対偏差の中央値。	遺伝子増幅の結果が報告されません。
	MEDIAN_BIN_COUNT_CNV_TARGET (カウント)	≥ 1.0	CNV ターゲットあたりの生の bin カウントの中央値。	
RNA ライブラリー	MEDIAN_INSERT_SIZE (bp)	≥ 80.0	サンプルのフラグメント長の中央値。	融合遺伝子またはスプライスバリエーションの結果が報告されません。
	MEDIAN_CV_GENE_500X (係数)	≤ 0.93	MEDIAN_CV_GENE_500X は、カバレッジ均一性の尺度です。500x カバレッジ以上の遺伝子ごとに、遺伝子ボディ全体のカバレッジの変動係数が計算されます。このメトリクスはこれらの値の中央値です。高い値は変動の度合いが高いことを示し、サンプルインプット量の不足やプローブでの濃縮時のプルダウンの問題などのライブラリー調製の問題があることを示唆します。このメトリクスはすべてのリード (重複と判定されたリードを含む) を使用して計算されます。	
	TOTAL_ON_TARGET_READS (カウント)	≥ 9,000,000	ターゲット領域にマッピングされたリードの総数。このメトリクスはすべてのリード (重複と判定されたリードを含む) を使用して計算されます。	

* 仕様を満たしている結果には「PASS」と表示されます。

表 40 TSO Comprehensive パネルシステムレポート結果のコントロールメトリクス

出力タイプ	メトリクス	仕様	仕様を満たさなかった場合の影響 *
陽性コントロール	DNA External Control	24 個中 23 個の指定バリエーションを検出	コントロールサンプルの結果に基づいて、患者サンプルが自動的に無効になります。DNA External Control：スモール DNA バリエーション、遺伝子増幅、TMB、または MSI の結果は報告されません。
	RNA External Control	13 個中 12 個の指定バリエーションを検出	RNA External Control：融合遺伝子またはスプライスバリエーションの結果は報告されません。
NTC	DNA Median Exon Coverage for TSO Comprehensive パネルシステム	≤ 8	コントロールサンプルの結果に基づいて、患者サンプルが自動的に無効になります。DNA Median Exon Coverage for TSO Comprehensive パネルシステム：スモール DNA バリエーション、遺伝子増幅、TMB、または MSI の結果は報告されません。
	RNA Gene Above Median Cutoff	≤ 1	RNA Gene Above Median Cutoff：融合遺伝子またはスプライスバリエーションの結果は報告されません。

* 仕様を満たしている結果には「PASS」と表示されます。

- 無効なシーケンスランは再度実行してください。
- 以下の結果になったライブラリーは再テストしてください。
 - DNA ライブラリーのコンタミネーション
 - 無効な RNA ライブラリー
 - 1つの（すべてではない）バリエーションタイプについて無効にされた DNA ライブラリーは、再テストすることで追加のバリエーションまたはバイオマーカーの結果を得ることができます。
- 陽性コントロールは、バリエーションコールについて評価されます。陽性コントロールがバリエーションコールの仕様を満たしていない場合は、コントロールサンプルの結果に基づいて、患者サンプルが自動的に無効になります。
- NTC は、DNA についてはエクソンカバレッジの中央値に対して、RNA についてはカットオフ中央値を超える遺伝子に対して評価されます。
- 国や地域の規制、または認定要件に従って、追加の品質管理措置を講じてください。

シーケンスランまたはライブラリーのテストの再実行の詳細については、[83 ページの「トラブルシューティング」](#)を参照してください。

トラブルシューティング

ワークフローで問題が発生した場合は、以下の表に従ってトラブルシューティングを行います。ある特定のサンプルのシーケンスランまたはライブラリー調製が2回失敗した場合は、追加のトラブルシューティングが必要になります。イルミナのテクニカルサポートにお問い合わせください。

状況	考えられる原因	推奨措置
シーケンスランがランの品質管理仕様に合格しない	<ul style="list-style-type: none"> • プーリングエラー • 希釈エラー • PRL/PDLの熱変性が不完全 • シーケンス消耗品の準備に関する問題（例：十分に融解されていない、フローセルの結露や異物の付着） 	<ul style="list-style-type: none"> • ノーマライズ済みライブラリー（NL）PCRプレートからライブラリーのシーケンスをやり直します。74 ページの「シーケンスの準備」を参照してください。
	<ul style="list-style-type: none"> • 濃縮プローブの不適切な使用（例：DNAサンプルに対するOPR1プローブの使用、RNAサンプルに対するOPD2プローブの使用） • 1回目のハイブリダイゼーションステップの実施中または実施後のライブラリー調製ワークフローのエラー 	<p>増幅済みライブラリーサンプル（ALS）PCRプレートからライブラリーの濃縮ステップを繰り返します。58 ページの「1回目のハイブリダイゼーションの準備」を参照してください。</p>
サンプルインプットの要件が満たされていない		<p>ワークフローの最初からライブラリー調製をやり直します。45 ページの「RNAの変性とアニーリング」または49 ページの「gDNAの断片化」を参照してください。</p>
	インデックスPCRステップの実施中または実施前のライブラリー調製ワークフローのエラー	<p>増幅済みライブラリーサンプル（ALS）PCRプレートからライブラリーの濃縮ステップを繰り返します。58 ページの「1回目のハイブリダイゼーションの準備」を参照してください。</p>
	装置の問題	<p>イルミナのテクニカルサポートにお問い合わせください。</p>
レポート生成のエラー、または装置の一般的なエラー（ネットワークエラー、試薬のロード/取り出しのエラーなど）	ソフトウェアまたは装置の問題	<p>レポート生成に関するヘルプについては、『Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module Workflow Guide』（文書番号：200049183）を参照してください。その他のヘルプについては、イルミナのテクニカルサポートにお問い合わせください。</p>

状況	考えられる原因	推奨措置
DNA ライブラリーが品質管理仕様に合格しない	サンプルインプットの要件が満たされていない	<p>サンプルインプットが適切であることを確認し、「gDNAの断片化」ステップからライブラリー調製をやり直します。26 ページの「サンプルの要件」 および 26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」 を参照してください。</p>
	アッセイワークフローにおける使用エラーまたは機器エラー	<p>疑わしい使用エラーまたは機器エラーがどこで発生したかに応じて、以下のいずれかのステップからライブラリー調製をやり直します。不明な場合、またはこれら以外のエラーが発生した場合は、イルミナのテクニカルサポートに連絡してランのトラブルシューティングを行います。</p> <ul style="list-style-type: none"> ノーマライズ済みライブラリー (NL) PCR プレートからライブラリーのシーケンスをやり直します。74 ページの「シーケンスの準備」 を参照してください。 増幅済みライブラリーサンプル (ALS) PCR プレートからライブラリーの濃縮ステップを繰り返します。58 ページの「1 回目のハイブリダイゼーションの準備」 を参照してください。 ワークフローの最初からライブラリー調製をやり直します。49 ページの「gDNA の断片化」 を参照してください。
	CONTAMINATION_SCORE、CONTAMINATION_P_VALUE 基準が満たされない	<p>「警告および注意」を読み直して、クロスコンタミネーションの防止に関する情報を再確認します。プレートレイアウトとライブラリーインデックスを再確認して、同じインデックスのライブラリーと一緒にシーケンスされていないか確かめます。</p> <p>影響を受けたライブラリーについて、ワークフローの最初からライブラリー調製をやり直します。49 ページの「gDNA の断片化」 を参照してください。</p> <p>サンプル抽出時にコンタミネーションが発生していた可能性もあります。場合によっては、サンプルにコンタミネーションがないことを確実にするため、再度抽出を実施しなければならないことがあります。</p>
	使用可能な MSI が不十分	<p>超音波発生装置の製造元による使用と操作に関する設定を再確認します (水位やチューブタイプなど)。</p> <p>アッセイへのサンプルインプットが適切であることを確認します。26 ページの「サンプルの要件」 および 26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」 を参照してください。</p> <p>サンプルが過度に断片化または損傷している場合は、新たにサンプル抽出をやり直すか、「gDNA の断片化」ステップを再度実施することが必要となる場合があります。</p>

状況	考えられる原因	推奨措置
DNA ライブラリーが品質管理仕様に合格しない (続き)	サンプルが過度に断片化しているか、サンプルに含まれる核酸が損傷していて、十分なユニークライブラリーを生成できない	<p>23 ページの「DNA 断片化用超音波発生装置の構成」と、超音波発生装置の製造元による使用と操作に関する設定を再確認します (水位やチューブタイプなど)。</p> <p>アッセイへのサンプルインプットが適切であることを確認します。26 ページの「サンプルの要件」および 26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」を参照してください。</p> <p>サンプルが過度に断片化または損傷している場合は、新たにサンプル抽出をやり直すか、「gDNA の断片化」ステップを再度実施することが必要となる場合があります。</p>
RNA ライブラリーが品質管理仕様に合格しない	サンプルインプットの要件が満たされていない	<p>サンプルインプットが適切であることを確認し、「RNA の変性とアニーリング」ステップからライブラリー調製をやり直します。</p> <p>26 ページの「サンプルの要件」および 26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」を参照してください。</p>
アッセイワークフローにおける使用エラーまたは機器エラー	疑わしい使用エラーまたは機器エラー	<p>疑わしい使用エラーまたは機器エラーがどこで発生したかに応じて、以下のいずれかのステップからライブラリー調製をやり直します。不明な場合、またはこれら以外のエラーが発生した場合は、イルミナのテクニカルサポートに連絡してランのトラブルシューティングを行います。</p> <ul style="list-style-type: none"> ノーマライズ済みライブラリー (NL) PCR プレートからライブラリーのシーケンスをやり直します。74 ページの「シーケンスの準備」を参照してください。 増幅済みライブラリーサンプル (ALS) PCR プレートからライブラリーの濃縮ステップを繰り返します。58 ページの「1 回目のハイブリダイゼーションの準備」を参照してください。 ワークフローの最初からライブラリー調製をやり直します。45 ページの「RNA の変性とアニーリング」を参照してください。
	サンプルが過度に断片化しているか、サンプルに含まれる核酸が損傷していて、十分なユニークライブラリーを生成できない	<p>サンプルインプットが適切であることを確認します。</p> <p>26 ページの「サンプルの要件」および 26 ページの「核酸抽出、定量、および保管」を参照してください。</p> <p>サンプルが過度に断片化または損傷している場合は、新たにサンプル抽出をやり直すことが必要となる場合があります。</p>

状況	考えられる原因	推奨措置
陽性コントロールの不良 (DNA/RNA)	陽性コントロールに関するサンプルインプットの要件が満たされていない	<p>アッセイへのインプットが適切であることを確認します。プレートレイアウトを再確認し、適切な試薬（プローブ、インデックス）が適切なウェルにあることを確かめます。</p> <p>陽性コントロールサンプルがラベルに従って保管されていたことを確認します。</p> <p>問題の陽性コントロールを共有しているすべてのサンプルについて、疑わしい使用エラーまたは機器エラーがどこで発生したかに応じて、以下のいずれかのステップからライブラリー調製をやり直します。不明な場合、またはこれら以外のエラーが発生した場合は、イルミナのテクニカルサポートに連絡してランのトラブルシューティングを行います。</p>
	アッセイワークフローにおける使用エラーまたは機器エラー	<ul style="list-style-type: none"> ノーマライズ済みライブラリー (NL) PCR プレートからライブラリーのシーケンスをやり直します。74 ページの「シーケンスの準備」を参照してください。 増幅済みライブラリーサンプル (ALS) PCR プレートからライブラリーの濃縮ステップを繰り返します。58 ページの「1 回目のハイブリダイゼーションの準備」を参照してください。 ワークフローの最初からライブラリー調製をやり直します。45 ページの「RNA の変性とアニーリング」または 49 ページの「gDNA の断片化」を参照してください。
NTC の不良 (DNA/RNA)	クロスコンタミネーションが発生したか、作業エリアにコンタミネーションがある	<p>「警告および注意」セクションを読み直して、作業エリアの消毒とクロスコンタミネーションの防止に関する情報を再確認します。</p> <p>プレートレイアウトとライブラリーインデックスを再確認して、同じインデックスのライブラリーと一緒にシーケンスされていないか確かめます。</p>
	ライブラリーのインデックスが正しくない	<p>問題の NTC を共有しているすべてのライブラリーについて、ワークフローの最初からライブラリー調製をやり直します。</p>
ソフトウェアから、陽性または陰性コントロールがシーケンスランに含まれていないと通知された	Local Run Manager によるラン計画の作成時にがんタイプの割り当てが間違っていた	<p>Analysis Module Workflow Guide の説明に従い、正しく識別されたコントロールを使用して解析をリキューします（『Local Run Manager TruSight Oncology Comprehensive パネルシステム Analysis Module Workflow Guide』（文書番号:200049183）を参照）。</p>

性能特性

TSO Comprehensive パネルシステムは、517 の遺伝子を含む NGS パネルです。スモール DNA バリエーション（一塩基変異（SNV）、多塩基変異（MNV）、挿入、欠失）は、517 のすべての遺伝子について報告の対象となります。遺伝子増幅は、MET 遺伝子と ERBB2 遺伝子について報告の対象となります。融合遺伝子は、1 ページの「アッセイの概要と説明」で示されている 23 の遺伝子について報告の対象となります。スプライスバリエーションは、MET 遺伝子と EGFR 遺伝子について報告の対象となります。報告されるための条件は、バリエーションがアッセイで検出されること、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイの KB にそのバリエーションに関するエビデンスがあること、およびテストされた組織タイプに基づいてバリエーションが適格であることです。報告されるための条件は、NTRK 融合遺伝子において融合パートナーが 5' にあること、および NTRK キナーゼドメインが無傷であることです。

スモール DNA バリエーションについては、SNV、MNV、挿入、欠失を表すデータを使用して、本パネルのターゲット遺伝子を検証する代表的アプローチが実施されました。遺伝子増幅、融合遺伝子、およびスプライスバリエーションについては、遺伝子レベルでテストが実施されました。

表 41 に、各種試験で計算されたメトリクスの定義を示します。

表 41 メトリクスの定義

用語	定義
Positive Percent Agreement (PPA)	直交法と比較した、全陽性中の正しく同定された陽性の割合。
Negative Percent Agreement (NPA)	直交法と比較した、全陰性中の正しく同定された陰性の割合。
Overall Percentage Agreement (OPA)	直交法と比較した、全観測中の正しく同定された陽性および陰性の割合。
Percent Positive Call (PPC)	あるターゲットについて陽性であることが期待されるすべての観測のうち、そのターゲットが陽性である観測の割合。
Percent Negative Call (PNC)	あるターゲットについて陰性であることが期待されるすべての観測のうち、そのターゲットが陰性である観測の割合。
n/N	陽性または陰性の観測数 (n) を総観測数 (N) で割ることで、それぞれ PPC または PNC を計算します。n と N の値は、異なるレベル（例：バリエーションまたは遺伝子）でも、グループ全体（例：SNV）で組み合わせることもできます。
Standard Deviation (SD)	ある変数の値の平均を中心とした変動量の尺度。
Percent Coefficient of Variation (%CV)	標準偏差を平均値で割り、パーセントで表した値。

クロスコンタミネーション

偽陽性の結果がサンプルライブラリー調製中のウェル間コンタミネーションまたは連続するシーケンスラン間のラン間コンタミネーションに起因するかどうかを評価するために、クロスコンタミネーション試験を実施しました。この解析は、スモール DNA バリエーション、融合遺伝子、および遺伝子増幅について行われました。この解析は、スモール DNA バリエーション（これは TMB にも影響します）、融合遺伝子、遺伝子増幅、および MSI について行われました。ウェル間コンタミネーションの評価についてはサンプルを交互に配置したチェッカーボードレイアウト、同じ NextSeq 550Dx システムで連続的にシーケンスしたときのシーケンスラン間コンタミネーションの評価についてはインデックスを交互に配置したチェッカーボードレイアウトを使用して、特性化されたサンプルからライブラリーを調製しました。各サンプルで検出されたバリエーションを調べた結果、偽陽性は検出されておらず、クロスコンタミネーション事象は認められませんでした。

CONTAMINATION_SCORE と P_VALUE の 2 つの QC メトリクスは、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイにおいて DNA サンプルのサンプルコンタミネーションを検出することを目的に設計されています。コンタミネーション検出感度を評価しました。FFPE 腫瘍 DNA サンプルをさまざまな量の FFPE 正常 DNA サンプルと混合して、コンタミネーションされたサンプルを意図的に作製しました。

計 1,112 件のコンタミネーション観測のうち、95% (1,054 件) でコンタミネーションが検出されました。コンタミネーション比率を 10% ~ 90% (質量 / 質量) の範囲に絞ると、検出率は 96% (939/976) に上昇しました。10% ~ 90% のコンタミネーション比率でコンタミネーションが検出されなかった 37 件の観測のうち、12 件はスモール DNA バリエーションをコールするためのカバレッジ仕様を満たしていませんでした。低カバレッジはコンタミネーションの検出を妨げますが、スモール DNA バリエーションは報告されないため、コンタミネーションの影響は軽減されます。15 件は、遺伝子増幅をコールするための遺伝子増幅仕様 (bin カウント中央値 QC メトリクス) を満たしていませんでした。これらのサンプルについては、遺伝子増幅の結果は報告されていません。

この試験から、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイでウェル間またはラン間のクロスコンタミネーションが発生する可能性は低いと予想されます。これらの結果は、ソフトウェアのコンタミネーションメトリクスとともに、サンプルのコンタミネーションが原因で誤ったバリエーションの結果が報告されるリスクを軽減します。

核酸抽出キットの評価

市販されている 3 種類の DNA および RNA 抽出キットを TSO Comprehensive パネルシステムと組み合わせて評価しました。これら 3 種類の抽出キットは、同じ FFPE 組織切片から DNA と RNA の両方を分離しました。各キットの脱パラフィン剤と核酸結合手順は異なります (表 42)。TSO Comprehensive パネルシステムの性能の判定には主に抽出キット 1 が使用されました。

表 42 キットの特性

キット	脱パラフィン剤	核酸結合
1	独自開発	カラム
2	キシレン	カラム
3	ミネラルオイル	磁気ビーズ

表 43 と表 44 は、各抽出キットがライブラリーの有効性とバリエーションコールに及ぼす影響をまとめたものです。抽出キットの平均値に有意差がある場合、差異が報告されています。TSO Comprehensive パネルシステム解析試験に使用した核酸のほとんどはキット 1 を使用して抽出されたため、キット 1 を対照として抽出キット間の平均差を計算しました。キット 1 と比較した平均差は、別の抽出キットを使用した場合に他の TSO Comprehensive パネルシステム解析試験にどのような影響があるかを示しています。

表 43 抽出キットがライブラリーの有効性に及ぼす影響

バリエーションタイプ	ライブラリー QC メトリクス	キット 1 と比較した平均差
スモール DNA バリエーション	Median Exon Coverage (カウント) PCT Exon 50X (%) Median Insert Size (bp)	キット 2 : 56 リード少ない キット 3 : 0.298% 高い キット 2 およびキット 3 : 3 bp 少ない
DNA 遺伝子増幅	Coverage MAD (カウント) Median Bin Count	キット 2 : 0.0043 少ない キット 2 : 0.5825 少ない キット 3 : 0.3086 多い
RNA (融合遺伝子 / スプライスバリエーション)	Median Insert Size (bp) Log (Median CV Gene500X) Total on Target Reads	キット 3 : 2 bp 多い キット 2 : 0.029 高い 有意差なし

抽出キット 2 および 3 を使用した場合、サポートリードが増加することが認められています。そのため、選択する抽出キットによって、LoD 付近の融合遺伝子およびスプライスバリエーションの検出確度が高くなります。

表 44 抽出キットがバリエーションコールに及ぼす影響

バリエーションタイプ (単位)	バリエーションコール (キット 1 と比較した平均差)
スモール DNA バリエーション (VAF)	実用上有意差なし ターゲットバリエーション : キット間の偏差は残差と比較して小さかった 非ターゲットバリエーション : 最初の 2 つの VAF bin について有意差なし 統計的有意性が認められた場合に意味のある差はなかった
遺伝子増幅 (倍率変化)	キット 2 (0.06) およびキット 3 (0.08) : 倍率変化が高い
融合遺伝子 (サポートリード数)	キット 2 は 51%、キット 3 は 23% サポートリードが多い
スプライスバリエーション (サポートリード数)	キット 2、キット 3 とともに 48% サポートリードが多い

干渉物質

予想される内因性および外因性物質が TSO Comprehensive パネルシステムアッセイの性能に及ぼす影響を評価しました。内因性物質（メラニン、ヘモグロビン）を核酸抽出プロセス中にサンプルに添加しました。外因性物質（エタノール、キシレン、Proteinase K）は核酸抽出プロセス中に存在していましたが、さらにライブラリー調製前の精製済み核酸にこれらの物質を添加しました。Proteinase K の添加によって干渉が認められた場合は、抽出プロセス中の Proteinase K の濃度の増加も評価しました。ライブラリー調製中に、余分なインデックスプライマー（15% および 30%）が添加されました。インデックスプライマーを除き、脳、乳房、結腸、肺、甲状腺髄様、NSCLC、卵巣、前立腺、唾液腺、皮膚、軟部組織、甲状腺組織から FFPE サンプルに物質が添加され、DNA 解析用に 8 個、RNA 解析用に 13 個のサンプルを抽出しました。インデックスプライマーについては、DNA 解析用に 3 種類の組織タイプ（甲状腺、膀胱、結腸）から作製した 6 つの FFPE サンプルが使用され、RNA 解析用に 4 種類の組織タイプ（肺、甲状腺、結腸、乳房）から作製した 5 つの FFPE サンプルが使用されました。固有の 16 サンプルごとに、物質を添加しない内因性対照群と、緩衝液または水を添加した外因性対照群を用意しました。脳、結腸、肺組織から作製した 8 個の FFPE サンプルの個々のセットで、壊死の影響を評価しました。壊死サンプルごとに、マクロダイセクションした壊死なしの対照群を用意しました。すべての干渉物質について、物質ごとにサンプルあたり 4 つのレプリケートを TSO Comprehensive パネルシステムアッセイでテストし、スモール DNA バリエント、遺伝子増幅、RNA 融合遺伝子、RNA スプライスバリエントの検出について、それぞれの対照条件と比較しました。

DNA バリエントの検出

メラニン（0.2 µg/mL）、ヘモグロビン（2 mg/mL）、エタノール（5%）、Proteinase K（核酸中に 0.04 mg/mL）、キシレン（0.0001%）は、スモール DNA バリエント、および遺伝子増幅には干渉しませんでした。

RNA バリエントの検出

メラニン（0.2 µg/mL）、エタノール（5%）、キシレン（0.0001%）については、RNA 融合遺伝子またはスプライスバリエントには干渉しないことがデータで裏付けられました。ヘモグロビン（2 mg/mL）は、MET 遺伝子における 3 種類のスプライスバリエントに干渉しました（サポートリードが減少しました）。AR 遺伝子（3 種類のサンプル）と EGFR 遺伝子（1 種類のサンプル）のスプライスバリエントは影響を受けませんでした。本アッセイで RNA を使用する場合は、組織ブロックをスライスする際にヘモグロビンを含む組織を避けるか、できるだけ少なくしてください。

Proteinase K（核酸中に 0.04 mg/mL）は、RNA 融合遺伝子とスプライスバリエントに干渉しました。抽出プロセス中に 2.6 mg/mL と 5.2 mg/mL の濃度の Proteinase K をテストしました。これは市販キットの標準濃度のそれぞれ 2 倍と 4 倍です。融合遺伝子は、4 倍の Proteinase K では干渉を受けましたが、2 倍の Proteinase K では干渉を受けませんでした。スプライスバリエントは、2 倍の Proteinase K で干渉を受けました。抽出時に、Proteinase K または同等の酵素を抽出キットで提供されている標準濃度より高くしないでください。

壊死

70% までの壊死組織の存在は、スモール DNA バリエントに干渉しませんでした。RNA バリエント（サポートリード数）と遺伝子増幅（倍率変化）の検出は、組織面積中の壊死内容物の割合がそれぞれ 25% 以上および 23% 以上（面積比）のサンプルでは減少しました。サンプル切片的壊死の割合が総組織面積の 23% 以上の場合は、壊死組織のマクロダイセクションを行う必要があります。

安定性

リアルタイムの安定性

ラベル条件に従って保管した TruSight Oncology Comprehensive Kit の品質保持期間を確立するため、リアルタイム安定性試験を実施しました。この試験のデザインは 3 ロットの試薬のテストに基づくもので、CLSI EP25-A で規定されている従来の安定性試験デザインが使用されました。最終キット構成の形にしたテスト対象のキットを、製品ラベルに記載された保管条件に従って試験期間中保管しました。凍結キットのコンポーネントは -15°C ~ -25°C で保管しました。冷蔵キットのコンポーネントは 2°C ~ 8°C で保管しました。

その後指定の時点で、外見および機能的なキットリリース基準についてキットをテストしました。また、QC コントロール物質について、バリエーションとサンプル QC メトリクスを分析しました。各試薬の品質保持期間を決定しました。有効期限は、製造日と品質保持期間に基づいて指定されています。キットの有効期限は、有効期限が最も早い試薬に基づいて指定されています。

キット使用中の安定性

同一キットの複数回の使用を支持するため、品質保持期間全体にわたり、標準使用条件の下で TruSight Oncology Comprehensive Kit の使用中の安定性を評価しました。同一キットの最大 4 回の使用について検証するため、試薬キットの凍結 / 融解を複数回繰り返してテストを行いました。さらに、8 個の RNA ライブラリーと 8 個の DNA ライブラリーを計 3 回調製し、サポートされているライブラリーの最大数（キットあたり 24 個の DNA ライブラリーと 24 個の RNA ライブラリー）をテストしました。テストしたすべての凍結融解サイクルおよびテスト時点において、機能的なキットリリース基準はすべて満たされていました。開封後、使用中の試薬の状態が、バリエーションに及ぼす影響を評価するため、製造後 25 か月以上経過した試薬を用いて FFPE サンプルのテストを実施しました。ターゲットバリエーションの定性的解析により、使用中イベントはバリエーションに影響を与えなかったことが実証されています。

核酸の安定性

複数の組織タイプから作製した FFPE サンプルを使用して、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイで使用する核酸（DNA および RNA）の安定性とその定量を評価しました。FFPE ブロックから切片を作製し、すべての核酸を一度に抽出しました。抽出された核酸をしっかりと混合して定量し、核酸の質をチェックした後、T0 対照群（ベースライン）と T1 試験群（28 日目以降）の各時点用に用意した 2 セットの使い切りチューブに核酸を分配し、これを凍結しました。抽出されたすべての RNA を -85°C ~ -65°C 、抽出されたすべての DNA を -25°C ~ -15°C で指定期間保管した後、複数のオペレーターが複数のレプリケートを使用して TSO Comprehensive パネルシステムアッセイでそれらの核酸を処理しました。遺伝子増幅、スモール DNA バリエーション、RNA 融合遺伝子、RNA スプライスバリエーションについて、T1 試験条件を対照と比較しました。データによると、推奨温度（RNA： -85°C ~ -65°C 、DNA： -25°C ~ -15°C ）で保管した場合、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイで使用する核酸とその定量は最長 28 日間安定しています。

ライブラリーの安定性

アッセイの6つのセーフストップポイント（表4を参照）それぞれを用いたライブラリーの安定性を、複数の組織タイプに由来するFFPEサンプルを使用して評価しました。コントロールライブラリー（T0、停止点なし）は、ワークフロー終了直後にシーケンスしました。表4に記載されている日数に対応するため、同じライブラリーから得られたアリコートは、ストップポイントで-25°C～-15°Cになるよう一定時間（T1）保持しました。T1は、スモールDNAバリエーション、遺伝子増幅、RNA融合遺伝子、RNAスプライスバリエーション、および腫瘍プロファイリングバリエーションについてT0と比較しました。データによると、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイによって生成されたライブラリーは、「使用説明」に記載のとおり安定していることが示されています。

スライド上のFFPE組織の安定性

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイで使用するスライド上のFFPE組織の安定性を評価するため、さまざまな固有サンプルのFFPEブロックから作製した厚さ5 µmの切片をスライドに載せた後、2つの時点まで室温（22°C）で保管しました。RNAとDNAを抽出し、RNAを-65°C～-85°C、DNAを-15°C～-25°Cでテスト開始前の最長1週間保管しました。核酸物質を定量した後、各時点において24時間以内にTSO Comprehensive パネルシステムアッセイで処理しました。各時点において、サンプルあたり複数のレプリケートとオペレーターをTSO Comprehensive パネルシステムアッセイでテストし、腫瘍プロファイリングバリエーションを含む遺伝子増幅、スモールDNAバリエーション、RNA融合遺伝子、およびRNAスプライスバリエーションについて、T0時点と比較しました。バリエーションコールを評価したところ、すべての合格基準を満たしていました。これは、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイで使用するスライド上のFFPE組織が室温で最長4週間（28日間）安定していることを示します。RNA融合遺伝子およびスプライスバリエーションについては、スライド上で4週間（28日間）保存後に、サポートリード数が29%減少しました。

核酸インプット量のガードバンディング

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイの核酸インプットを評価するため、17種類の組織タイプを含む33個のFFPEサンプルから抽出したDNAを10 ng～500 ngのインプットレベルでテストし、5種類の組織タイプから作製した5個のFFPEサンプルより抽出したRNAを10 ng～85 ngのインプットレベルでテストしました。ライブラリーQCメトリクスを評価したところ、結果はサンプルによって異なりました。DNAの結果では、一部の（すべてではない）DNAサンプルQCメトリクスは、40 ng（公称インプット）を超えるインプットの増加に反応しました。

- MEDIAN_INSERT_SIZE は、30 ng を超えるインプットに反応しませんでした。
- MEDIAN_EXON_COVERAGE は、インプットの増加と正の相関関係がありました。
- PCT_EXON_50X は、インプットが80 ng まで増えるにつれて増加しました。
- MEDIAN_BIN_COUNT_CNVTARGET は、インプットが増えるにつれて増加しました。
- インプットが増えるにつれて、COVERAGE_MAD は仕様上限の近くまで増加しました。

RNAサンプルのQCメトリクスは、10 ng～40 ngのインプット範囲では、MEDIAN_INSERT_SIZE とTOTAL_ON_TARGET_READS については増加し、MEDIAN_CV_GENE_500X については減少しましたが、40 ng～85 ngの範囲ではおおむね変化しませんでした。

ブランク限界

偽陽性の割合（予期される総陰性数に対する割合）は、体細胞バリエーションを含まないFFPEが正常または良性の隣接組織を用いて、スモールDNAバリエーション、遺伝子増幅、RNA融合遺伝子、およびRNAスプライスバリエーションについて、レプリケートテストを実施して評価しました。DNAのFFPEサンプル6個とRNAのFFPEサンプル6個の2つの試薬ロットそれぞれについて、2人のオペレーターが3日間にわたり重複して処理しました。サンプルのサブセットを再プールして、3x DNAのみおよび3x RNAのみの形式で再シーケンスし、本装置がサポートする複数のマルチプレックス構成で偽陽性を評価しました。さらに、30個の追加RNAサンプルを2人のオペレーターに分担し、1つの試薬ロットで重複して処理しました。合計では、バリエーションタイプごとに無効なライブラリーによって減少した可能性のある観測数はDNAが168件、RNAが228件でした。偽陽性の割合は、増幅については遺伝子レベルで、小さなDNAバリエーションについては位置レベル（約190万位置）で計算されています。DNAバリエーションタイプごとの偽陽性の割合は表 45に示すとおりです。TSO Comprehensive パネルシステムにはスモールDNAバリエーションに対するCDx（レベル1）クレームがないため、レベル1についてはスモールDNAバリエーションの偽陽性は報告されません。TSO Comprehensive パネルシステムKnowledge Baseでは、271件の偽陽性がレベル分けされています。臨床的に有意な偽陽性（レベル2）は認められていません。レベル3では、168件の観測結果のうち4件の観測結果（2.4%）にわたって2つのバリエーションから4件の偽陽性が認められています。RNA融合遺伝子およびスプライスバリエーションの偽陽性の割合は、表 46に示すように0%でした。

表 45 DNAバリエーションタイプ別の偽陽性

バリエーションタイプ	偽陽性
遺伝子増幅	0% (0/9912)
スモール DNA バリエーション	0.0001% (271/295,801,567)

表 46 RNAバリエーションタイプ別の偽陽性

バリエーションタイプ	偽陽性
融合遺伝子	0% (0/227)
スプライスバリエーション	0% (0/227)

検出限界

TSO Comprehensive パネルシステムの検出限界を評価するために、2つの試験が実施されました。試験1では、RETスモールDNAバリエーション、RET融合遺伝子、NTRK1~3融合遺伝子が評価されました。試験2では、その他の腫瘍プロファイリングバリエーションが評価されています。

試験1

NTRK1、NTRK3、RETスモールDNAバリエーションおよびNTRK1~3融合遺伝子ならびにRET融合遺伝子の検出限界（LoD）を特定しました。LoDとは、一貫して検出可能（95%検出限界または第二種過誤5%）な検体（例：バリエーションアリル頻度、サポートリード数など）の最低値です。この試験では、RETスモールDNAバリエーション（甲状腺髄様がん）、RET融合遺伝子（乳頭甲状腺がん、非定型スピッツ腫瘍）、およびNTRK1~3融合遺伝子（低悪性度神経膠腫、多形性神経膠芽腫、筋線維芽細胞肉腫、肉腫、分泌性乳がん、

結腸がん)を含むFFPE組織、ならびにNTRK1およびNTRK3スモールDNAバリエーションを含むFFPE処理細胞株が使用されました。各サンプルは少なくとも5つのテストレベル(スモールDNAバリエーションについては約0.01~0.10 VAF、融合遺伝子については2~25のサポートリード数)に希釈されています。3人のオペレーターと3台のシーケンス装置により、各サンプルテストレベルの2つのレプリケートを使用して連続しない3日間にライブラリー調製を開始し、ロットおよびバリエーションあたり各テストレベルについて18件の観測結果が得られました。テストされたのは2つの試薬ロットです。

DNAバリエーションについては、2つのロットをそれぞれ独立してプロビット回帰法またはヒット率法(ヒット率(点推定値)が95%以上の最低テストレベル)を用いて解析し、ロットごとのバリエーションの検出限界(LoD)を特定しました。2つの試薬ロットのうち大きい方のLoDを、当該バリエーションの検出限界としています(表 47)。

RNA融合遺伝子については、FFPE細胞株を用いて各融合遺伝子の検出限界(LoD)を推定しました。その後、3名のオペレーター、3種類の装置、3種類の試薬ロットにより、重複したライブラリー調製物を使用してFFPE組織で検出限界(LoD)を検証し、FFPE細胞株で確立されたLoD付近のバリエーションごとに54件の観測値を生成しました。各融合遺伝子の検出限界(表 48)は、ヒット率(点推定値)が95%以上に達したサポートリードの最低平均値です。

表 47 NTRK1、NTRK3、RETスモールDNAバリエーションの検出限界

マーカー	Chr ¹	位置	参照型	変異型	検出限界(バリエーションアレル頻度)
NTRK1 G595R (SNV) ²	Chr1	156846342	G	A	0.038
NTRK3 F617L (SNV) ²	Chr15	88476283	A	G	0.032
NTRK3 G623R (SNV) ²	Chr15	88476265	C	T	0.036
NTRK3 G696A (SNV) ²	Chr15	88472468	C	G	0.027
RET C618R (SNV)	Chr10	43609096	T	C	0.053
RET M918T (SNV)	Chr10	43617416	T	C	0.045
RET C634Y (MNV)	Chr10	43609949	GC	AT	0.045
RET D898_E901del (欠失) ²	Chr10	43615611	GAGATGTTTATGA	G	0.055

¹ Chr = 染色体

² これらのDNAバリエーションはプロビット回帰法によって解析され、その他のDNAバリエーションはヒット率法によって解析されています。

表 48 NTRKおよびRET融合遺伝子の検出限界

遺伝子	融合遺伝子	検出限界（サポートリード数）
NTRK1	LMNA-NTRK1	12.2
	TPM3-NTRK1	20.2
	BCAN-NTRK1	53.2
NTRK2	STRN-NTRK2	13.6
	ETV6-NTRK2	20.3
NTRK3	KANK1-NTRK3	13.5
	ETV6-NTRK3	16.2
RET	NCOA4-RET	15.8
	KIF5B-RET	16.6
	CCDC6-RET	18.7

試験2

TSO Comprehensive パネルシステムによって報告された腫瘍プロファイリングバリエントの検出限界（LoD）を評価しました。LoDとは、一貫して検出可能（95%のヒット率または第二種過誤5%）な検体（バリエントアリル頻度、倍率変化、またはサポートリード数）の最低値です。バリエントを含む17個の組織タイプから採取したFFPEサンプルを複数のテストレベルに希釈しました。2人のオペレーターがそれぞれ異なる試薬ロットと装置を使用して、レベルごとに6つの観測結果を生成しました。

DNAバリエント

10個のsmall DNAバリエントクラス（合計25個のバリエント）と2つのDNA遺伝子増幅（ERBB2およびMET）のLoDを特定し、範囲としてまとめました（表 49）。試験1のLoDのRETバリエントも含まれています。5 bpを超える3つの挿入のうち2つはLoDが0.034 VAFおよび0.036 VAFであり、3番目はLoDが0.215 VAFでした。後者は複雑度の低い領域への挿入であり、挿入によって反復が追加され、アライメントに影響を与えるため、一貫した検出のためにより多くのリードが必要になります。そのため、一部の低複雑度のゲノムコンテキストでは、5 bpを超える挿入の検出に影響を及ぼす可能性があります。

表 49 スモールDNAバリエントと遺伝子増幅の検出限界

タイプ (LoD の単位)	バリエントクラス / ゲノムコンテキスト	バリエント数	範囲 (VAF)
スモール DNA バリエント (バリエントアリル頻度)	SNVs	5	0.016–0.064
	MNVs	3	0.022–0.048
	ホモポリマー反復配列付近の挿入 (1～2 bp)	2	0.086–0.104
	ジヌクレオチド反復配列付近の挿入 (1～2 bp)	2	0.038–0.051
	挿入 (3～5 bp)	2	0.030–0.056
	挿入 (5 bp 超、最大 25 bp)	3	0.034–0.215
	ホモポリマー反復配列付近の欠失 (1～2 bp)	2	0.094–0.100
	ジヌクレオチド反復配列付近の欠失 (1～2 bp)	2	0.033–0.070
	欠失 (3～5 bp)	2	0.028–0.064
	欠失 (5 bp 超、最大 25 bp)	2	0.047–0.055
遺伝子増幅 (倍率変化)	遺伝子別 (ERBB2、MET)	2	1.539, 1.570

非ターゲットバリエントの解析は、少なくとも5つのテストレベルを持つ試験1のサンプルから行われました。非ターゲットバリエントはそれぞれ個別に解析し、ヒット率が0%を超え95%以下のレベルが少なくとも1つ、およびヒット率が95%以上のレベルが少なくとも1つあるバリエントについてのみ、LoDを推定しました。表 50は、非ターゲットバリエントのクラス別LoDのパーセンタイル値と、最小および最大のLoDを示したものです。非ターゲットバリエントは、試験2でテストされたクラスよりも多くのバリエントを提供しており、表 49のLoD範囲と一致しています。

表 50 非ターゲットバリエントのクラス別検出限界の要約統計 (試験1)

クラス	N	最小	25%	50%	75%	90%	最大
SNV	862	0.02	0.047	0.059	0.079	0.097	0.592
MNV	5	0.038	0.04	0.05	0.086	0.095	0.095
挿入	24	0.039	0.06	0.084	0.097	0.166	0.261
欠失	24	0.034	0.063	0.081	0.089	0.124	0.167

融合遺伝子

TSO Comprehensive パネルシステムパネルの20個の遺伝子に相当する19個の融合遺伝子についてLoDを特定しました。そのサポートリード数は9~31.3でした（表 51）。また、さらに3つの遺伝子（NTRK1~3）を他の試験でテストしました。RET遺伝子は、この試験と他の試験の両方でテストしています。LoDを特定した16個の融合遺伝子は、両側95%の上側信頼限界（UCL）を用いた場合、サポートリード数が16という共通のLoDと一致していました。2つの融合遺伝子については、LoDが24.7と31.3であり、サポートリード数は共通のLoDと一致しませんでした。

LoD値が24.7のサポートリード数を持つFGFR2-SRPK2融合遺伝子は、ブレイクポイント内に反復重複領域を持っており、TSO Comprehensive 解析モジュールによってアノテーションされました。ブレイクポイント内の反復領域は、リードがゲノム内の他の場所にマッピングされたり、アラインメントされていなかったりする可能性があるため、通常はエビデンスレベルが低くなります。さらに、反復領域によってアセンブリプロセス（融合配列の同定に使用）はより困難になるため、正しい配列を構築するために追加のエビデンスが必要になります。ブレイクポイントに相同配列を持つ融合遺伝子のその他の例としては、SEPT14-EGFRが挙げられます。

LoD値が31.3のサポートリード数を持つBCL2-IGHJ5融合遺伝子は、エクソンの開始点付近にブレイクポイントがある非常に短い遺伝子（IGHJ5）を持っており、ギャップのある短いアラインメントが必要でした。そのため、一貫した検出の実現には、多くのリードが必要でした。

表 51 融合遺伝子の検出限界

融合遺伝子	遺伝子 A のブレイクポイント	遺伝子 B のブレイクポイント	LoD	共通の LoD
NCOA4-RET	51582937	43612030	15.8	はい
TMPRSS2-ERG	42880007	39817543	13.2	はい
TMPRSS2-PMFBP1	42866283	72153988	9.0	はい
KIF5B-RET	32311775	43612032	16.6	はい
ACPP-ETV1	132036419	14028762	9.5	はい
FGFR3-TACC3	1801536	1736997	17.5	はい
EML4-ALK	42553391	29446394	12.8	はい
FGFR1-GSR	38274821	30569602	23.7	はい
EGFR-GALNT13	55087056	155295102	12.3	はい
ESR1-CCDC170	152023138	151914240	13.5	はい
FGFR2-SRPK2	123353223	104926165	24.7	いいえ
HNRNPUL1-AXL	41782201	41743847	26.3	はい
CD74-ROS1;GOPC	149784243	117645578	9.2	はい
SPIDR-NRG1	48353103	32453345	12.8	はい
RAF1-VGLL4	12641189	11606492	11.2	はい
DHX8;ETV4-STAT3	41613847	40474300	16.2	はい

融合遺伝子	遺伝子 A のブレイクポイント	遺伝子 B のブレイクポイント	LoD	共通の LoD
MKRN1-BRAF	140158806	140487383	11.0	はい
BCL2-IGHJ5	60793496	106330066	31.3	いいえ
PAX3-FOXO1	223084859	41134997	19.0	はい

スプライスバリエント

2つのRNAスプライスバリエント、METとEGFRのサポートリード数のLoDは、それぞれ18.7と16.7でした。

腫瘍含有量

この試験結果は、臨床検体の腫瘍含有量に関する推奨事項を示しています。一般的に、腫瘍含有量が多いほど、腫瘍内のバリエントに関するシグナル（VAF、倍率変化、またはサポートリード）が高くなります。最小腫瘍含有量の推奨事項は、次の観測結果に基づいています。スモールDNAバリエントのLoD値は、0.104 VAF以下です（TP53挿入を除く）。腫瘍内のドライバー変異（バリエントアリル頻度0.50）を検出するには、これらの変異のVAFが0.10でLoD以上になるように、腫瘍含有量を20%にすることが推奨されます。腫瘍含有量が20%の場合、5.5倍の変化（11コピー）に増幅された遺伝子は、倍率変化1.8の検出限界に基づいて一貫して検出されます。腫瘍含有量が20%の場合、74のサポートリードを持つ融合遺伝子は、サポートリード数の検出限界14.7に基づいて一貫して検出されます。

再現性

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイの再現性を評価するために、2つの試験が実施されました。試験1では、NTRKおよびRET融合遺伝子バリエントに加えて、RETスモールDNAバリエントが評価されました。試験2では、その他の腫瘍プロファイリングバリエントが評価されています。

試験1

この試験はTSO Comprehensive パネルシステムアッセイの再現性の評価を目的としており、3か所のテストサイト（内部1、外部2）において、各サイトにつき2名のオペレーター、2つのラン内レプリケート、3日間の連続しない試験日を用いて実施されました。試験は、特定の既知のRETスモールDNAバリエントを含むDNAサンプルと、特定の既知のNTRK1~3およびRET融合遺伝子バリエント（ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織検体および細胞株から採取）を含むRNAサンプルで構成された再現性パネルを使用して実施されました。このパネルには低バリエントレベルと高バリエントレベルのDNAおよびRNAパネルメンバーが含まれており、各バリエントクラスの低レベルおよび高レベルのメンバー数は同じでした。高レベルのパネルメンバーはLoDの約2~3倍がターゲットとして設定され、低レベルのパネルメンバーはLoDとほぼ同じ範囲がターゲットとして設定されました。各サイトでは、各オペレーターがパネルメンバーを3回ずつテストし、パネルメンバーごと、ターゲットごとに6つの観測結果を生成しました。3つのサイトすべてから、パネルメンバーごとに36件の観測結果が生成されています（3か所のサイト/3種類の装置 × 2人のオペレーター × 2つのラン内レプリケート × 3つの開始日）。

主要評価項目は、高レベルのターゲットスモールDNAバリエーションおよびターゲットRNA融合遺伝子バリエーションのPPCおよびPNCに決定されました。低レベルのターゲットスモールDNAバリエーションおよびターゲットRNA融合遺伝子バリエーションのPPCおよびPNCは副次評価項目として計算されました。すべての評価項目に関連する両側95%信頼区間 (CI) は、ウィルソンスコア法を使用して計算されました。一次解析は、ターゲットとした高レベルパネルメンバーにおけるPPCおよびPNC (関連する95%CIを含む) を推定する目的で実施しました。これは、サイト/装置、オペレーター、およびランにわたって、該当するバリエーションクラス (スモールDNAバリエーションやRNA融合遺伝子など) を表すパネルメンバーのグループの特定のターゲットに対するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイの観測結果を組み合わせることによって行いました。各ターゲットバリエーションについて、同じバリエーションタイプをターゲットとした高レベルの他のパネルメンバーにおけるTSO Comprehensive パネルシステムアッセイの観測結果 (ただし、多数決により決定された同じバリエーションを含まない) を組み合わせることでPNCを算出しました。低レベルのターゲットパネルメンバーの全体的なPPCとPNCは、同様の方法で特定しました。

RETスモールDNAバリエーション

高レベルのスモールDNAバリエーションのパネルメンバーでは、全体のPPCは100.0% (207/207、95%信頼区間: 98.2%~100.0%) でした (表 52)。高レベルのスモールDNAバリエーションのパネルメンバー全体のPNCは100.0% (1035/1035、95%信頼区間: 99.6%~100.0%) でした (表 53)。低レベルのターゲットスモールDNAバリエーションのパネルメンバーでは、低レベルのターゲットスモールDNAバリエーションのパネルメンバー全体のPPCは99.1% (210/212、95%信頼区間: 96.6%~99.7%) で、全体のPNCは100.0% (1026/1026、95%信頼区間: 99.6%~100.0%) でした。

表 52 高レベルおよび低レベルのターゲットパネルメンバーにおけるRETスモールDNAバリエーションの検出に使用するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイのPPC

バリエーションレベル	バリエーションタイプ	ターゲットバリエーション (ヌクレオチド)	ターゲットバリエーション (アミノ酸)	N	平均 VAF ¹	PPC (%) (n/N)	95% 信頼区間 ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0.156	100.0 (34/34)	(89.8, 100.0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0.140	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0.116	100.0 (33/33)	(89.6, 100.0)
	MNV	chr10_43609949_GC_ AT	RET C634Y	35	0.195	100.0 (35/35)	(90.1, 100.0)
	欠失	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0.199	100.0 (33/33)	(89.6, 100.0)
	挿入	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0.095	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	すべてのスモール DNA バリエーション (高)	すべてのスモール DNA バリエーション (高)	すべてのスモール DNA バリエーション (高)	207	N/A ¹	100.0 (207/207)	(98.2, 100.0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0.042	100.0 (35/35)	(90.1, 100.0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0.033	94.3 (33/35)	(81.4, 98.4)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0.044	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	MNV	chr10_43609949_GC_ AT	RET C634Y	36	0.071	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	欠失	chr10_43615611_ GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0.065	100.0 (34/34)	(89.8, 100.0)
	挿入	chr10_43609946_T_ TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0.037	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	すべてのスモール DNA バリエーション (低)	すべてのスモール DNA バリエーション (低)	すべてのスモール DNA バリエーション (低)	212	N/A ¹	99.1 (210/212)	(96.6, 99.7)

¹ 略語: N/A: 該当なし、VAF: バリエーションアリル頻度

² 両側95%信頼区間は、ウィルソンスコア法を使用して計算されています。

表 53 高レベルおよび低レベルのターゲットパネルメンバーにおけるRETスモールDNAバリエーションの検出に使用するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイのPNC

バリエーションレベル	バリエーションタイプ	ターゲットバリエーション (ヌクレオチド)	ターゲットバリエーション (アミノ酸)	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% 信頼区間 ²
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	173	100.0 (173/173)	(97.8, 100.0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	171	100.0 (171/171)	(97.8, 100.0)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	174	100.0 (174/174)	(97.8, 100.0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	172	100.0 (172/172)	(97.8, 100.0)
	欠失	chr10_43615611_GAGATGTTTATGAG	RET D898_E901del	174	100.0 (174/174)	(97.8, 100.0)
	挿入	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	171	100.0 (171/171)	(97.8, 100.0)
	すべてのスモール DNA バリエーション (高)	すべてのスモール DNA バリエーション (高)	すべてのスモール DNA バリエーション (高)	1035	100.0 (1035/1035)	(99.6, 100.0)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	177	100.0 (177/177)	(97.9, 100.0)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	143	100.0 (143/143)	(97.4, 100.0)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	176	100.0 (176/176)	(97.9, 100.0)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	176	100.0 (176/176)	(97.9, 100.0)
	欠失	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	178	100.0 (178/178)	(97.9, 100.0)
	挿入	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	176	100.0 (176/176)	(97.9, 100.0)
	すべてのスモール DNA バリエーション (低)	すべてのスモール DNA バリエーション (低)	すべてのスモール DNA バリエーション (低)	1026	100.0 (1026/1026)	(99.6, 100.0)

¹ すべての観測結果は、過半数のコールが陰性であるパネルメンバーとバリエーションの組み合わせ（50%未満のコールが陽性である融合遺伝子を含むターゲットバリエーション）からプールされています。

² 両側95%信頼区間は、ウィルソンスコア法を使用して計算されています。

表 54は、パネルメンバーそれぞれについて、約36件の観測結果にわたるバリエーションアレル頻度（VAF）の分散成分解析を示したものです。ターゲットのRETスモールDNAバリエーションごとに標準偏差（SD）と変動係数（%CV、合計およびソースごと）計算し、提示しました。

表 54 ターゲットスモールDNAバリエーションのパネルメンバーにおけるVAFのTSO Comprehensive パネルシステムアッセイの分散成分解析

バリエーションレベル	バリエーションタイプ	ターゲットバリエーション (ヌクレオチド)	ターゲットバリエーション (アミノ酸)	N	平均 VAF	サイトの SD (%CV)	オペレーター SD (%CV)	試験日の SD (%CV)	レプリケートの SD (%CV)	合計の SD (%CV)
~2-3x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	34	0.156	0.011 (7.2)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.017 (10.8)	0.020 (13.0)
	SNV	chr10_43609949_G_C	RET C634S	36	0.140	0.006 (4.6)	0.000 (0.0)	0.005 (3.7)	0.014 (10.2)	0.017 (11.8)
	SNV	chr10_43614996_G_A	RET V804M	33	0.116	0.005 (4.1)	0.000 (0.0)	0.002 (1.7)	0.012 (10.7)	0.013 (11.6)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	35	0.195	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.009 (4.4)	0.012 (6.0)	0.015 (7.5)
	欠失	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	33	0.199	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.011 (5.5)	0.017 (8.6)	0.020 (10.2)
	挿入	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0.095	0.003 (3.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.009 (9.6)	0.010 (10.1)
~1x LoD	SNV	chr10_43617416_T_C	RET M918T	35	0.042	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.009 (22.2)	0.009 (22.2)
	SNV	chr10_43601830_G_A	RET V292M	35	0.033	0.000 (0.0)	0.003 (9.8)	0.002 (6.2)	0.007 (21.7)	0.008 (24.6)
	SNV	chr10_43613840_G_C	RET E768D	36	0.044	0.003 (6.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.008 (17.5)	0.008 (18.5)
	MNV	chr10_43609949_GC_AT	RET C634Y	36	0.071	0.000 (0.0)	0.008 (10.7)	0.000 (0.0)	0.011 (14.9)	0.013 (18.4)
	欠失	chr10_43615611_GAGATGTTTATGA_G	RET D898_E901del	34	0.065	0.002 (2.5)	0.006 (9.9)	0.004 (6.4)	0.010 (16.2)	0.013 (20.2)
	挿入	chr10_43609946_T_TGTGCCGCAC	RET C634_T636dup	36	0.037	0.005 (13.8)	0.000 (0.0)	0.003 (9.1)	0.006 (15.9)	0.008 (22.9)

NTRK 1~3およびRET融合遺伝子

高レベルのRNA融合遺伝子のパネルメンバーでは、全体のPPCは99.3%（285/287、95%信頼区間：97.5%~99.8%）でした（表 55）。BCAN-NTRK1パネルメンバーを除く各高レベルパネルメンバーのPPCは100%（PPC = 94.4% [34/36、95%信頼区間：81.9%~98.5%]）でした。高レベルのRNA融合遺伝子のパネルメンバーでは、全体のPNCは100.0%（1724/1724、95%信頼区間：99.8%~100.0%）でした（表 56）。低レベルのターゲットRNA融合遺伝子のパネルメンバーでは、全体のPPCは95.4%（272/285、95%信頼区間：92.3%、97.3%）で、全体のPNCは100.0%（1851/1851、95%信頼区間：99.8%~100.0%）でした。

表 55 高レベルおよび低レベルのターゲットパネルメンバーにおけるNTRKおよびRET融合遺伝子の検出に使用するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイのPPC

バリエーションレベル	ターゲット融合遺伝子	N	平均サポートリード数	PPC (%) (n/N)	95% 信頼区間 *
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37.9	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	BCAN-NTRK1	36	33.6	94.4 (34/36)	(81.9, 98.5)
	ETV6-NTRK2	36	24.6	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	TRIM24-NTRK2	36	36.6	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	ETV6-NTRK3	36	56.4	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	BTBD1-NTRK3	35	32.9	100.0 (36/36)	(90.1, 100.0)
	NCOA4-RET	36	36.7	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	CCDC6-RET	36	33.4	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	すべての融合遺伝子 (高)	287	36.5	99.3 (285/287)	(97.5, 99.8)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13.8	94.4 (34/36)	(81.9, 98.5)
	BCAN-NTRK1	36	16.9	80.6 (29/36)	(65.0, 90.2)
	ETV6-NTRK2	35	15.2	94.3 (33/35)	(81.4, 98.4)
	STRN-NTRK2	36	13.6	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	ETV6-NTRK3	36	24.8	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	BTBD1-NTRK3	36	18.1	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
	NCOA4-RET	36	15.8	97.2 (35/36)	(85.8, 99.5)
	KIF5B-RET	34	16.6	97.1 (33/34)	(85.1, 99.5)
	すべての融合遺伝子 (低)	285	16.8	95.4 (272/285)	(92.3, 97.3)

* 両側95%信頼区間 (CI) は、ウィルソンスコア法を使用して計算されています。

表 56 高レベルおよび低レベルの非ターゲットパネルメンバーにおけるNTRKおよびRET融合遺伝子の検出に使用するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイのPNC

バリエントレベル	ターゲット融合遺伝子	N ¹	PNC (%) (n/N)	95% 信頼区間 *
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	180	100.0 (180/180)	(97.9, 100.0)
	BCAN-NTRK1	251	100.0 (251/251)	(98.5, 100.0)
	ETV6-NTRK2	251	100.0 (251/251)	(98.5, 100.0)
	TRIM24-NTRK2	216	100.0 (216/216)	(98.2, 100.0)
	ETV6-NTRK3	144	100.0 (144/144)	(97.4, 100.0)
	BTBD1-NTRK3	216	100.0 (216/216)	(98.2, 100.0)
	NCOA4-RET	215	100.0 (215/215)	(98.2, 100.0)
	CCDC6-RET	251	100.0 (251/251)	(98.5, 100.0)
	すべての融合遺伝子 (高)	1724	100.0 (1724/1724)	(99.8, 100.0)
~1x LoD	LMNA-NTRK1	213	100.0 (213/213)	(98.2, 100.0)
	BCAN-NTRK1	249	100.0 (249/249)	(98.5, 100.0)
	ETV6-NTRK2	250	100.0 (250/250)	(98.5, 100.0)
	STRN-NTRK2	249	100.0 (249/249)	(98.5, 100.0)
	ETV6-NTRK3	177	100.0 (177/177)	(97.9, 100.0)
	BTBD1-NTRK3	249	100.0 (249/249)	(98.5, 100.0)
	NCOA4-RET	213	100.0 (213/213)	(98.2, 100.0)
	KIF5B-RET	251	100.0 (251/251)	(98.5, 100.0)
	すべての融合遺伝子 (低)	1851	100.0 (1851/1851)	(99.8, 100.0)

¹ すべての観測結果は、過半数のコールが陰性であるパネルメンバーとバリエントの組み合わせ（50%未満のコールが陽性である融合遺伝子を含むターゲットバリエント）からプールされています。

² 両側95%信頼区間 (CI) は、ウィルソンスコア法を使用して計算されています。

表 57は、ターゲット融合遺伝子それぞれについて、約36件の観測結果にわたるサポートリードの分散成分解析を示したものです。ターゲット融合遺伝子ごとに、SDと%CV（合計およびソースごと）を計算し、提示しています。

表 57 ターゲットのRNA融合遺伝子パネルメンバーにおけるサポートリードのTSO Comprehensive パネルシステムアッセイの分散成分解析

バリエントレベル	融合遺伝子	N	平均サポートリード数	サイトの SD (%CV)	オペレーターの SD (%CV)	試験日の SD (%CV)	レプリケートの SD (%CV)	合計の SD (%CV)
~2-3x LoD	LMNA-NTRK1	36	37.9	3.52 (9)	3.37 (9)	6.93 (18)	9.04 (24)	12.39 (33)
	BCAN-NTRK1	36	33.6	13.75 (41)	7.87 (23)	5.40 (16)	8.95 (27)	18.98 (57)
	ETV6-NTRK2	36	24.6	8.03 (33)	3.50 (14)	4.20 (17)	4.86 (20)	10.86 (44)
	TRIM24-NTRK2	36	36.6	11.44 (31)	4.24 (12)	6.82 (19)	6.87 (19)	15.57 (43)
	ETV6-NTRK3	36	56.4	11.49 (20)	10.20 (18)	9.25 (16)	8.69 (15)	19.93 (35)
	BTBD1-NTRK3	35	32.9	1.49 (5)	2.65 (8)	2.16 (7)	10.47 (32)	11.11 (34)
	NCOA4-RET	36	36.7	4.64 (13)	4.09 (11)	6.17 (17)	5.20 (14)	10.17 (28)
	CCDC6-RET	36	33.4	7.25 (22)	2.56 (8)	6.53 (20)	5.51 (16)	11.49 (34)
	~1x LoD	LMNA-NTRK1	36	13.8	1.79 (13)	0.00 (0)	2.74 (20)	4.37 (32)
BCAN-NTRK1		36	16.9	2.92 (17)	2.98 (18)	4.61 (27)	5.82 (34)	8.52 (50)
ETV6-NTRK2		35	15.2	0.00 (0)	3.41 (22)	3.83 (25)	4.39 (29)	6.75 (45)
STRN-NTRK2		36	13.6	1.77 (13)	0.61 (5)	2.33 (17)	2.57 (19)	3.95 (29)
ETV6-NTRK3		36	24.8	6.03 (24)	3.46 (14)	0.00 (0)	6.39 (26)	9.44 (38)
BTBD1-NTRK3		36	18.1	0.93 (5)	0.00 (0)	0.00 (0)	6.64 (37)	6.71 (37)
NCOA4-RET		36	15.8	2.08 (13)	1.03 (7)	0.00 (0)	5.11 (32)	5.61 (36)
KIF5B-RET		34	16.6	2.07 (12)	0.00 (0)	1.58 (10)	5.83 (35)	6.39 (39)

試験2

試験2はTSO Comprehensive パネルシステムアッセイの再現性の評価を目的としており、3か所のテストサイト（内部1、外部2）において、各サイトにつき2名のオペレーター/2種類の装置、3つの固有の試薬ロット、4日間の連続しない試験日、およびサンプルライブラリーあたり2回のシーケンスランを用いて実施されました。

テストは、41個のFFPE組織検体と1個のFFPE細胞株から抽出したDNAおよびRNAサンプルを使用して実施されました（FFPE組織検体1個とFFPE細胞株をそれぞれ2個のパネルメンバーを作成するために使用）。組織検体の種類は、膀胱、骨、脳、乳房、結腸、空腸、腎臓、肝臓、肺、卵巣、前立腺、皮膚、軟部組織、胃、甲状腺、子宮です。テストが実施されたのは、スモールDNAバリエント（SNV、MNV、挿入、および欠失）、遺伝子増幅を持つDNAパネルメンバー、および融合遺伝子とスプライスバリエントを持つRNAパネルメンバーで構成された合計44個のパネルメンバーです。ほとんどのパネルメンバーは、バリエント固有の検出限界（LoD）の約2~3倍のレベルの既知のターゲットバリエントを持っていました。

LoDとは、観測されたアッセイの結果が、95%以上の時点で陽性（TSO Comprehensive パネルシステムアッセイのカットオフ値との相対でバリエーションが検出される）となる検体の濃度です。観測されたバリエーションレベルの平均は、LoDの約2倍未満（観測されたバリエーションレベルはLoDの1.5倍未満）、LoDの約2~3倍（観測されたバリエーションレベルはLoDの1.5~3.4倍）、LoDの約3倍超（観測されたバリエーションレベルはLoDの3.4倍超）に分類されています。

スモールDNAバリエーション、遺伝子増幅、およびRNAバリエーションのPPCは、シーケンスランおよびサイト間の観測結果を統合して算出しました。またPNCは、スモールDNAバリエーション、融合遺伝子、およびRNAバリエーションについて同様に算出しました。既知のターゲットバリエーションごとに、同じバリエーションタイプ（ただし他のバリエーションを含む）で同じソース検体に由来せず、そのバリエーションの多数決（陽性判定が50%未満）を満たさないパネルメンバーにおけるTSO Comprehensive パネルシステムアッセイの観測結果を、サイト、オペレーター/装置、試験日、試験ロット、およびシーケンスラン間で統合してPNCを算出しました。両側95%信頼区間（CI）は、ウィルソンスコア法を使用して計算されています。

スモールDNAバリエーション

表 58は、ターゲットスモールDNAバリエーションのPPCを示したものです。PPCの範囲は、91.3%（BRAF SNV）から100%（大部分のスモールDNAバリエーション）まででした。

表 58 統合されたターゲットパネルメンバーにおけるスモールDNAバリエーションの検出に使用するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイのPPC

観測されたバリエーションレベル ¹	バリエーションタイプ	ターゲットバリエーション（ヌクレオチド）	ターゲットバリエーション（アミノ酸）	平均 VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% 信頼区間 ³
~2-3x LoD	DELETION	chr5_112175751_CT_C	APC L1488fsTer19	0.181	100.0 (28/28)	(87.9, 100.0)
~2-3x LoD	DELETION	chr5_112175675_AAG_A	APC S1465WfsTer3	0.166	100.0 (40/40)	(91.2, 100.0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr5_112175951_G_GA	APC T1556NfsTer3	0.227	100.0 (32/32)	(89.3, 100.0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr5_112175675_A_AAG	APC S1465fs*9	0.100	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
< 2x LoD	INSERTION	chr1_27024001_C_CG	ARID1A Q372fs*28	0.084	100.0 (4/4)	(51.0, 100.0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_140453136_A_T	BRAF V600E	0.045	91.3 (42/46)	(79.7, 96.6)
~2-3x LoD	DELETION	chr7_55242465_GGAATTAAGAGAAGCA_G	EGFR E746_A750del	0.112	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
~2-3x LoD	SNV	chr7_55259515_T_G	EGFR L858R	0.045	100.0 (38/38)	(90.8, 100.0)
~2-3x LoD	DELETION	chr22_41574678_GC_G	EP300 H2324fs*29	0.245	100.0 (44/44)	(92.0, 100.0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr17_37880981_A_AGCATACGTGATG	ERBB2 Y772_A775dup	0.075	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
~2-3x LoD	SNV	chr2_209113112_C_T	IDH1 R132H	0.155	100.0 (36/36)	(90.4, 100.0)
~2-3x LoD	MNV	chr12_25398284_CC_AT	KRAS G12I	0.111	100.0 (38/38)	(90.8, 100.0)

観測されたバリエーションレベル ¹	バリエーションタイプ	ターゲットバリエーション (ヌクレオチド)	ターゲットバリエーション (アミノ酸)	平均 VAF ²	PPC (%) (n/N)	95% 信頼区間 ³
~2-3x LoD	INSERTION	chr9_139399350_C_CG	NOTCH1 R1598fs*12	0.146	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
~2-3x LoD	DELETION	chr10_89720798_GTACT_G	PTEN T319fs*1	0.157	100.0 (44/44)	(92.0, 100.0)
< 2x LoD	INSERTION	chr17_7578470_C_CGGGCGG	TP53 P152_P153dup	0.157	100.0 (2/2)	(34.2, 100.0)
~2-3x LoD	INSERTION	chr17_7574029_C_CGGAT	TP53 R333HfsTer5	0.154	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)

¹ 観測されたバリエーションアレル頻度の平均から計算されたバリエーションレベル。

² 観測されたアッセイの結果から計算された平均バリエーションアレル頻度。

³ 両側95%信頼区間は、ウィルソンスコア法を使用して計算されています。

PNCはスモールDNAバリエーション全体で100%でした。

表 59は、ターゲットスモールDNAバリエントを持つすべてのパネルメンバーにおける各変異原と合計変動量のVAFの結果について分散成分解析を示したものです。

表 59 ターゲットスモールDNAバリエントのVAFの分散成分解析

ターゲットバリエント (ヌクレオチド)	N	平均 VAF	サイトの SD (%CV)	オペレーター (サイト) の SD (%CV)	試験日(サイト、 オペレーター) の SD (%CV)	ロットの SD (%CV)	ランの SD (%CV)	合計の SD (%CV)
chr2_209113112_C_T	36	0.155	0.008 (4.9)	0.006 (4.1)	0.034 (22.1)	0.000 (0.0)	0.016 (10.2)	0.039 (25.2)
chr4_153332910_C_ CAGG	44	0.130	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.013 (10.3)	0.014 (11.1)	0.008 (6.1)	0.021 (16.3)
chr5_112175675_A_AAG	48	0.100	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.010 (10.4)	0.003 (2.9)	0.003 (3.3)	0.011 (11.3)
chr5_112175675_AAG_A	40	0.166	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.024 (14.2)	0.000 (0.0)	0.011 (6.7)	0.026 (15.7)
chr5_112175751_CT_C	28	0.181	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.029 (15.8)	0.019 (10.8)	0.008 (4.7)	0.036 (19.7)
chr5_112175751_CTTTA_ C	46	0.155	0.000 (0.0)	0.009 (5.6)	0.023 (14.9)	0.015 (9.7)	0.008 (5.5)	0.030 (19.4)
chr5_112175951_G_GA	32	0.227	0.000 (0.0)	0.006 (2.5)	0.034 (15.1)	0.000 (0.0)	0.011 (4.9)	0.036 (16.1)
chr7_55242465_ GGAATTAAGAGAAGCA_ G	46	0.112	0.000 (0.0)	0.004(3.8)	0.015 (13.7)	0.005 (4.1)	0.008 (6.9)	0.018 (16.3)
chr7_55259515_T_G	38	0.045	0.003 (6.0)	0.000 (0.0)	0.012 (27.3)	0.000 (0.0)	0.003 (6.8)	0.013 (28.8)
chr7_140453136_A_T	46	0.045	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.016 (34.9)	0.000 (0.0)	0.006 (12.2)	0.017 (36.9)
chr7_140453136_AC_TT	46	0.130	0.000 (0.0)	0.004 (2.9)	0.017 (13.4)	0.003 (2.6)	0.006 (4.9)	0.019 (14.8)
chr9_139399350_C_CG	48	0.146	0.015 (10.2)	0.000 (0.0)	0.012 (8.2)	0.000 (0.0)	0.004 (2.8)	0.020 (13.4)
chr10_89720798_GTACT_ G	44	0.157	0.000 (0.0)	0.003 (2.0)	0.021 (13.6)	0.002 (1.6)	0.010 (6.4)	0.024 (15.3)
chr12_25398284_CC_AT	38	0.111	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.019 (16.8)	0.003 (2.5)	0.008 (7.3)	0.020 (18.5)
chr17_7574002_CG_C	44	0.158	0.007 (4.2)	0.000 (0.0)	0.021 (13.5)	0.013 (8.6)	0.013 (8.2)	0.029 (18.4)
chr17_7574029_C_ CGGAT	48	0.154	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.017 (11.0)	0.006 (3.8)	0.010 (6.6)	0.021 (13.4)
chr17_37880981_A_ AGCATACGTGATG	36	0.075	0.013 (16.9)	0.006 (8.1)	0.013 (16.7)	0.000 (0.0)	0.004 (4.7)	0.019 (25.5)
chr22_41574678_GC_G	44	0.245	0.006 (2.4)	0.002 (0.6)	0.019 (7.9)	0.000 (0.0)	0.005 (2.1)	0.021 (8.6)

観測数が少なすぎて分散成分モデルを適合させることができなかったターゲットスモールDNAバリエントが2つありました。これら2つのターゲットバリエントについて、全体のSDはバリエントchr1_27024001_C_CGで0.027、バリエントchr17_7578470_C_CGGCGGで0.001でした。

遺伝子増幅

表 60は、ターゲット遺伝子増幅のPPCを示したものです。PPCは、METについては100.0%、ERBB2については100.0%でした。

表 60 統合されたターゲットパネルメンバーにおける遺伝子増幅の検出に使用するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイのPPC

観測されたバリエーションレベル ¹	ターゲットバリエーション	観測された平均倍率変化 ²	Percent Positive Call (%)	95% 信頼区間 ³
~2-3x LoD	MET	5.14	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
~2-3x LoD	ERBB2	2.33	100.0 (47/47)	(92.4, 100.0)

¹ 観測された倍率変化の平均から計算されたバリエーションレベル。

² 観測されたアッセイの結果から計算された倍率変化。

³ 両側95%信頼区間は、ウィルソンスコア法を使用して計算されています。

PNCは遺伝子増幅全体で100%でした。

表 61は、ターゲット遺伝子増幅を持つすべてのパネルメンバーにおける各変異原と合計変動量の倍率変化の結果について分散成分解析を示したものです。

表 61 ターゲット遺伝子増幅の倍率変化の分散成分解析

ターゲットバリエーション	N	平均倍率変化	サイトの SD (%CV)	オペレーター (サイト) の SD (%CV)	試験日 (サイト、オペレーター) の SD (%CV)	ロットの SD (%CV)	ランの SD (%CV)	合計の SD (%CV)
ERBB2	47	2.33	0.02 (0.6)	0.01 (0.4)	0.02 (0.9)	0.01 (0.4)	0.01 (0.5)	0.03 (1.3)
MET	48	5.14	0.05 (1.0)	0.12 (2.4)	0.14 (2.6)	0.00 (0.0)	0.03 (0.6)	0.19 (3.7)

RNAバリエーション

表 62は、ターゲットRNAバリエーションのPPCを示したものです。PPCの範囲は、91.7% (KIF5B-RET) から100% (ほとんどのRNAバリエーション) まででした。

表 62 統合されたターゲットパネルメンバーにおけるRNAバリエーションの検出に使用するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイのPPC

観測されたバリエーションレベル ¹	バリエーションタイプ	ターゲットバリエーション	平均サポートリード数 ²	PPC (%) (n/N)	95% 信頼区間 ³
> 3x LoD	融合遺伝子	ACPP-ETV1	44.7	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
	融合遺伝子	BCL2-IGHJ5	124.9	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
	融合遺伝子	CD74-ROS1;GOPC	56.6	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
	融合遺伝子	EGFR-GALNT13	49.8	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
	融合遺伝子	EML4-ALK	49.3	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
	融合遺伝子	PAX3-FOXO1	70.1	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
	融合遺伝子	SPIDR-NRG1	51.5	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
~2-3x LoD	融合遺伝子	DHX8;ETV4-STAT3	48.9	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
	融合遺伝子	ESR1-CCDC170	45.1	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
	融合遺伝子	FGFR1-GSR	61.1	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
	融合遺伝子	FGFR2-SRPK2	53.4	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
	融合遺伝子	FGFR3-TACC3	53.5	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
	融合遺伝子	HNRNPUL1-AXL	58.0	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
	融合遺伝子	MKRN1-BRAF	33.4	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)
< 2x LoD	融合遺伝子	KIF5B-RET	11.6	91.7 (44/48)	(80.4, 96.7)
	融合遺伝子	RAF1-VGLL4	15.9	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
> 3x LoD	スプライスバリエーション	EGFR VIII	64.0	100.0 (46/46)	(92.3, 100.0)
~2-3x LoD	スプライスバリエーション	MET エクソン 14 スキッピング	61.2	100.0 (48/48)	(92.6, 100.0)

¹ 観測されたサポートリード数の平均から計算されたバリエーションレベル。

² 観測されたアッセイの結果から計算されたサポートリード数の平均。

³ 両側95%信頼区間は、ウィルソンスコア法を使用して計算されています。

PNCは、FGFR2-SRPK2融合遺伝子を除き、各ターゲットRNAバリエーションについて100%でした。FGFR2-SRPK2融合遺伝子は、PNC = 99.60% (984/988、95%信頼区間：98.96%～99.84%) でした。

表 63は、ターゲットRNAバリエーションを持つすべてのパネルメンバーにおける各変異原と合計変動量のサポートリード数の結果について分散成分解析を示したものです。

表 63 ターゲットRNAバリエーションのサポートリード数の分散成分解析

ターゲットバリエーション	N	平均サポートリード数	サイトのSD (%CV)	オペレーター (サイト) のSD (%CV)	試験日 (サイト、オペレーター) のSD (%CV)	ロットのSD (%CV)	ランのSD (%CV)	合計のSD (%CV)
ACPP-ETV1	46	44.7	10.38 (23)	0.00 (0)	13.01 (29)	5.90 (13)	2.28 (5)	17.80 (40)
BCL2-IGHJ5	46	124.9	38.22 (31)	13.24 (11)	29.08 (23)	9.51 (8)	8.30 (7)	51.39 (41)
CD74-ROS1;GOPC	48	56.6	0.00 (0)	3.98 (7)	17.18 (30)	0.00 (0)	3.00 (5)	17.89 (32)
DHX8;ETV4-STAT3	46	48.9	18.27 (37)	13.42 (27)	17.01 (35)	0.00 (0)	1.50 (3)	28.38 (58)
EGFR-GALNT13	46	49.8	0.00 (0)	6.90 (14)	14.86 (30)	2.08 (4)	2.82 (6)	16.75 (34)
EML4-ALK	48	49.3	0.00 (0)	12.18 (25)	19.10 (39)	8.83 (18)	1.94 (4)	24.39 (49)
ESR1-CCDC170	46	45.1	2.30 (5)	0.00 (0)	12.37 (27)	0.00 (0)	8.08 (18)	14.95 (33)
FGFR1-GSR	46	61.1	8.57 (14)	1.31 (2)	11.15 (18)	9.23 (15)	5.18 (8)	17.65 (29)
FGFR2-SRPK2	48	53.4	3.18 (6)	10.90 (20)	15.85 (30)	15.29 (29)	3.10 (6)	24.97 (47)
FGFR3-TACC3	48	53.5	17.43 (33)	0.00 (0)	12.38 (23)	5.81 (11)	3.46 (6)	22.42 (42)
HNRNPUL1-AXL	48	58.0	0.00 (0)	12.15 (21)	18.22 (31)	0.00 (0)	3.96 (7)	22.26 (38)
KIF5B-RET	48	11.6	0.89 (8)	0.00 (0)	3.97 (34)	1.44 (12)	1.09 (9)	4.45 (38)
MKRN1-BRAF	48	33.4	6.98 (21)	8.19 (25)	13.02 (39)	6.63 (20)	4.00 (12)	18.58 (56)
PAX3-FOXO1	48	70.1	12.45 (18)	10.79 (15)	17.91 (26)	3.02 (4)	2.42 (3)	24.65 (35)
RAF1-VGLL4	46	15.9	1.46 (9)	1.52 (10)	3.80 (24)	4.42 (28)	1.23 (8)	6.32 (40)
SPIDR-NRG1	48	51.5	4.78 (9)	0.00 (0)	10.69 (21)	5.94 (12)	3.29 (6)	13.54 (26)
TMPRSS2-ERG	48	43.5	5.63 (13)	8.81 (20)	9.98 (23)	0.00 (0)	6.21 (14)	15.73 (36)
EGFR vIII splice variant	46	64.0	12.70 (20)	0.42 (1)	17.69 (28)	0.00 (0)	2.34 (4)	21.90 (34)
MET exon 14 skipping splice variant	48	61.2	11.42 (19)	3.43 (6)	19.84 (32)	7.55 (12)	2.10 (3)	24.43 (40)

ラボ内精度

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイのラボ内精度を評価するために、2つの試験が実施されました。試験1では、NTRKおよびRET融合遺伝子と、RETスモールDNAバリエーションが評価されました。

試験1

NTRK1~3融合遺伝子（低悪性度神経膠腫、多形性神経膠芽腫、筋線維芽細胞性肉腫、分泌型乳がん）、RET融合遺伝子（甲状腺がんおよび未知のがんの皮膚組織）、およびRETスモールDNAバリエーション（髄様甲状腺がん）について、指定されたがんのFFPE組織を用いて、ラボ内精度を評価しました。各サンプルは、LoDの約1倍（低バリエーションレベル）およびLoDの約2~3倍（高バリエーションレベル）の2つのバリエーションレベルでテストしました。ただし、CCDC6-RETを持つサンプルは低バリエーションレベルでのみテストしました。各サンプルは、それぞれのテストレベルにおいて、3人のオペレーターによる各ライブラリー調製イベントで重複して実行されました。各オペレーターは、連続しない3日の開始日にライブラリー調製を開始し、3台の指定されたNextSeq 550Dx システムでシーケンスしました。3つの試薬ロットがテストされ、レベルごとに54の観測結果が生成されました。ただし一部のレベルでは、無効なライブラリーが発生したため、観測結果数が54を下回っています。

定性的解析

すべての変数（オペレーター、試薬ロット、装置、試験日、およびレプリケート）にわたってプールされた観測結果から、あるバリエーションの2つのバリエーションレベルについて、バリエーションコールの定性的一致性を個別に評価しました。PPCとPNC、および関連する両側95%信頼区間（ウィルソンスコア）は、表 64（スモールDNAバリエーション）および表 65（RNA融合遺伝子）にまとめられています。

高バリエーションレベル（LoDの約2~3倍）では、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイにより、テストされたすべてのバリエーションに対してPPCおよびPNCが100%であることが示されました。

低バリエーションレベル（LoDの約1倍）では、スモールDNAバリエーションのPPCは83.3%から98.1%、RNA融合遺伝子のPPCは90.7%から100%の範囲でした。PPCが95%未満のバリエーションでは、平均VAF（RET C634YおよびRET D898_ E901del）またはサポートリード数（NCOA4-RETおよびBCAN-NTRK1）がそれぞれ検出限界を下回りました。低バリエーションレベルでは、すべてのバリエーションで100%のPNCが達成されました。

表 64 ターゲットDNAバリエーションの定性的結果

バリエーションレベル	バリエーション	バリエーションタイプ	平均 VAF	PPC (%) (n/N) (95% 信頼区間)	PNC (%) (n/N) (95% 信頼区間)
~1x LoD	RET C634Y	MNV	0.028	83.3 (45/54) (71.3, 91.0)	100.0 (215/215) (98.2, 100.0)
	RET D898_ E901del	DELETION	0.048	87.0 (47/54) (75.6, 93.6)	100.0 (215/215) (98.2, 100.0)
	RET C618R	SNV	0.045	94.4 (51/54) (84.9, 98.1)	100.0 (215/215) (98.2, 100.0)
	RET M918T	SNV	0.042	96.2 (51/53) (87.2, 99.0)	100.0 (216/216) (98.3, 100.0)
	RET D631_ L633delinsE*	DELETION	0.056	98.1 (53/54) (90.2, 99.7)	100.0 (215/215) (98.2, 100.0)

バリアントレベル	バリアント	バリアントタイプ	平均 VAF	PPC (%) (n/N) (95% 信頼区間)	PNC (%) (n/N) (95% 信頼区間)
~3x LoD	RET C634Y	MNV	0.095	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (192/192) (98.0, 100.0)
	RET D898_ E901del	DELETION	0.088	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (192/192) (98.0, 100.0)
	RET C618R	SNV	0.146	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (192/192) (98.0, 100.0)
	RET M918	SNV	0.078	100.0 (52/52) (93.1, 100.0)	100.0 (194/194) (98.1, 100.0)
	RET D631_ L633delinsE*	DELETION	0.161	100.0 (32/32) (89.3, 100.0)	100.0 (214/214) (98.2, 100.0)

* ヌクレオチドの変化は、RET D631_L633delinsE（染色体10、位置43609940、参照ACGAGCT、代替A）を除き、検出限界セクションの各バリアントについて一覧に示されます。

表 65 ターゲットRNA融合遺伝子の定性的結果

バリエントレベル	融合遺伝子	平均サポートリード数	PPC (%) (n/N) (95% 信頼区間)	PNC (%) (n/N) (95% 信頼区間)
~1x LoD	TPM3-NTRK1	20.2	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (537/537) (99.3, 100.0)
	BCAN-NTRK1	22.1	94.4 (51/54) (84.9, 98.1)	100.0 (591/591) (99.4, 100.0)
	LMNA-NTRK1	12.2	98.1 (51/52) (89.9, 99.7)	100.0 (539/539) (99.3, 100.0)
	ETV6-NTRK2	20.3	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (591/591) (99.4, 100.0)
	ETV6-NTRK3	16.2	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (537/537) (99.3, 100.0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE 細胞株)	23.1	98.1 (53/54) (90.2, 99.7)	
	KANK1-NTRK3	13.5	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (591/591) (99.4, 100.0)
	NCOA4-RET	13.3	90.7 (49/54) (80.1, 96.0)	100.0 (537/537) (99.3, 100.0)
	CCDC6-RET	18.7	98.1 (53/54) (90.2, 99.7)	100.0 (591/591) (99.4, 100.0)
	KIF5B-RET (サンプル 1)	17.3	95.4 (103/108) (89.6, 98.0)	100.0 (430/430) (99.1, 100.0)
	KIF5B-RET (サンプル 2)	17.3	96.2 (51/53) (87.2, 99.0)	

バリエントレベル	融合遺伝子	平均サポートリード数	PPC (%) (n/N) (95% 信頼区間)	PNC (%) (n/N) (95% 信頼区間)
~2-3x LoD	TPM3-NTRK1	57.1	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (481/481) (99.2, 100.0)
	BCAN-NTRK1	53.2	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (535/535) (99.3, 100.0)
	LMNA-NTRK1	35.1	99.0 (103/104) (94.8, 99.8)	100.0 (431/431) (99.1, 100.0)
	ETV6-NTRK2	52.0	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (535/535) (99.3, 100.0)
	ETV6-NTRK3	41.7	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (481/481) (99.2, 100.0)
	ETV6-NTRK3 (FFPE 細胞株)	28.3	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	
	KANK1-NTRK3	39.2	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (535/535) (99.3, 100.0)
	NCOA4-RET	24.8	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (481/481) (99.2, 100.0)
	CCDC6-RET	N/A	Not tested	100.0 (589/589) (99.4, 100.0)
	KIF5B-RET (サンプル 1)	43.8	100.0 (54/54) (93.4, 100.0)	100.0 (428/428) (99.1, 100.0)
	KIF5B-RET (サンプル 2)	44.6	100.0 (53/53) (93.2, 100.0)	

定量分析

制限付き最尤法 (REML) 分散成分解析を実施して基礎となる連続変数 (スモールDNAバリエントについては VAF、RNA 融合遺伝子については サポートリード数) の全変動を評価し、変異原 (オペレーター、装置、試験日、試薬ロット、残差、合計) ごとに精度の構成要素 (標準偏差 (SD)、変動係数 (CV)) を推定しました。この結果は、表 66 (スモールDNAバリエント) および表 67 (RNA 融合遺伝子) に示されています。

VAF の変動量は、二項分布から予想されるとおり、平均値とともに増加しました。またサポートリード数の変動量は、カウントデータから予想されるとおり、平均値とともに増加しました。残差成分は、両レベルのスモールDNAバリエントおよび RNA 融合遺伝子の両方において、合計変動量に対する最大の寄与因子であり、TSO Comprehensive パネルシステムによるこれらのバリエントの検出は、オペレーター、ロット、装置、および試験日に対してロバストであるという結論を裏付けています。

表 66 ターゲットDNAバリエーションの定量的SDおよびCV

VAF レベル	バリエーション	バリエーション タイプ	Nの有効 試行回数	平均 VAF	オペレー ターの SD (%CV)	装置の SD (%CV)	ロットの SD (%CV)	試験日の SD (%CV)	残差の SD (%CV)	合計の SD (%CV)
~1x LoD	RET D898_ E901del	DELETION	54	0.048	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.004 (8.7)	0.014 (30.0)	0.015 (31.2)
	RET C618R	SNV	54	0.046	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.014 (31.3)	0.014 (31.3)
	RET M918T	SNV	53	0.042	0.000 (0.0)	0.001 (3.0)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.011 (25.6)	0.011 (25.7)
	RET C634Y	MNV	54	0.028	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.001 (3.3)	0.000 (0.0)	0.009 (30.7)	0.009 (30.9)
	RET D631_ L633delinsE	DELETION	54	0.056	0.000 (0.0)	0.002 (3.0)	0.006 (11.6)	0.000 (0.0)	0.010 (18.5)	0.012 (22.0)
~3x LoD	RET D898_ E901del	DELETION	54	0.088	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.001 (1.4)	0.006 (7.0)	0.017 (19.2)	0.018 (20.5)
	RET C618R	SNV	54	0.146	0.003 (1.7)	0.000 (0.0)	0.020 (13.7)	0.002 (1.1)	0.018 (12.6)	0.027 (18.7)
	RET M918T	SNV	52	0.078	0.002 (3.1)	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.007 (9.1)	0.018 (23.1)	0.020 (25.0)
	RET C634Y	MNV	54	0.095	0.000 (0.0)	0.002 (2.5)	0.002 (2.1)	0.000 (0.0)	0.014 (15.0)	0.015 (15.3)
	RET D631_ L633delinsE	DELETION	52	0.164	0.000 (0.0)	0.000 (0.0)	0.005 (3.0)	0.000 (0.0)	0.020 (12.1)	0.020 (12.4)

表 67 ターゲットRNA融合遺伝子の定量的SDおよびCV

平均サポート リード数のレ ベル	融合遺伝子	Nの有効試行 回数	平均サポート リード数	オペレー ターの SD(%CV)	装置の SD (%CV)	ロットの SD (%CV)	試験日の SD (%CV)	残差の SD (%CV)	合計の SD (%CV)
~1x LoD	TPM3- NTRK1	54	20.2	2.33 (12)	0.94 (5)	3.31 (16)	0.83 (4)	5.70 (28)	7.10 (35)
	BCAN- NTRK1	54	22.1	3.38 (15)	1.41 (6)	1.78 (8)	0.00 (0)	6.03 (27)	7.28 (33)
	LMNA- NTRK1	52	12.2	1.36 (11)	1.25 (10)	1.59 (13)	0.00 (0)	4.74 (39)	5.33 (44)
	ETV6- NTRK2	54	20.3	0.00 (0)	3.18 (16)	4.36 (21)	0.00 (0)	8.30 (41)	9.90 (49)
	ETV6- NTRK3	54	16.2	2.28 (14)	2.36 (15)	2.17 (13)	0.00 (0)	4.65 (29)	6.10 (38)
	ETV6- NTRK3 (細胞株)	54	23.1	4.55 (20)	1.18 (5)	0.00 (0)	0.00 (0)	6.73 (29)	8.21 (36)
	KANK1- NTRK3	54	13.5	0.74 (5)	0.11 (1)	1.09 (8)	0.00 (0)	4.22 (31)	4.42 (33)
	NCOA4-RET	54	13.3	1.67 (13)	0.00 (0)	0.00 (0)	1.67 (13)	5.09 (38)	5.61 (42)
	CCDC6-RET	54	18.7	0.00 (0)	1.14 (6)	5.44 (29)	0.00 (0)	6.17 (33)	8.30 (44)
	KIF5B-RET (サンプル1)	108	17.3	2.11 (12)	2.50 (14)	2.89 (17)	3.52 (20)	7.09 (41)	9.04 (52)
	KIF5B-RET (サンプル2)	53	17.3	2.05 (12)	3.72 (22)	3.65 (21)	2.41 (14)	5.95 (34)	8.52 (49)

平均サポートリード数のレベル	融合遺伝子	Nの有効試行回数	平均サポートリード数	オペレーターのSD(%CV)	装置のSD(%CV)	ロットのSD(%CV)	試験日のSD(%CV)	残差のSD(%CV)	合計のSD(%CV)
2-3x LoD	TPM3-NTRK1	54	57.1	11.21 (20)	1.18 (2)	5.68 (10)	2.03 (4)	11.86 (21)	17.44 (31)
	BCAN-NTRK1	54	53.2	8.22 (15)	0.76 (1)	5.59 (11)	2.89 (5)	11.34 (21)	15.37 (29)
	LMNA-NTRK1	104	35.1	1.47 (4)	5.92 (17)	8.11 (23)	2.92 (8)	10.69 (30)	15.03 (43)
	ETV6-NTRK2	54	52	0.00 (0)	4.07 (8)	7.07 (14)	5.72 (11)	12.91 (25)	16.31 (31)
	ETV6-NTRK3	54	41.7	7.16 (17)	0.40 (1)	6.40 (15)	0.00 (0)	10.74 (26)	14.41 (35)
	ETV6-NTRK3 (細胞株)	54	28.3	7.93 (28)	1.02 (4)	0.00 (0)	0.00 (0)	9.05 (32)	12.08 (43)
	KANK1-NTRK3	54	39.2	5.10 (13)	0.00 (0)	4.78 (12)	0.00 (0)	9.44 (24)	11.74 (30)
	NCOA4-RET	54	24.8	3.05 (12)	0.00 (0)	5.92 (24)	0.00 (0)	6.78 (27)	9.50 (38)
	KIF5B-RET (サンプル 1)	54	43.8	4.15 (9)	0.96 (2)	12.57 (29)	6.52 (15)	15.23 (35)	21.23 (48)
	KIF5B-RET (サンプル 2)	53	44.6	5.37 (12)	4.97 (11)	13.73 (31)	0.00 (0)	12.41 (28)	19.90 (45)

腫瘍プロファイリングの正確さ

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイによるバリエーションの検出結果を、参照法の結果と比較しました。スモールDNAバリエーションについては、外部の検証済み全エクソームNGS法と比較しました。遺伝子増幅については同じ全エクソームNGS法、HER2増幅については検証済みのDual In-Situ Hybridization (DISH) 法と比較しました。RNAスプライスバリエーションについては、外部の検証済み定量PCR (qPCR) 法と比較しました。ROS1およびALK融合遺伝子については、検証済みのFISHアッセイと比較しました。その他の融合遺伝子は、検証済みのRNA全エクソームNGS アッセイ (RNGS1)、ターゲットNGSパネル (RNGS2)、およびドロップレットデジタルPCR (ddPCR) から成る複合法と比較しました。

スモールDNAバリエーションの検出

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイによるスモールDNAバリエーションの検出結果を、生殖系列および体細胞系列のスモールバリエーションコールに一致する腫瘍正常サンプルのペアを用いた全エクソームシーケンス (WES) の結果と比較しました。一塩基変異 (SNV)、挿入、および欠失で構成されるスモールバリエーションの比較は、TSO Comprehensive パネルシステムとWESの両方に対して有効な14種類の組織から採取した124個のサンプルに基づいています。TSO Comprehensive パネルシステムアッセイでは、フェージングを必要とする多塩基変異 (MNV、2~3 bp) を検出できますが、WESアッセイでは検出できません。TSO Comprehensive パネルシステムのMNVは、WESに対する個別のSNVとして評価されました。すべてのバリエーションコールに対する陽性一致率 (PPA) および陰性一致率 (NPA) を含むバリエーションレベルでの一致の概要は、表 68に示すとおりです。

表 68 生殖系列または体細胞系列の状態によって評価されたスモールバリエントコールの一致の概要

	WES 体細胞系列コール	WES 生殖系列コール	WES コールなし
TSO Comprehensive パネルシステム コール	382	33,163	426
TSO Comprehensive パネルシステム コールなし	69	61	70,000,481
合計	451	33,224	70,000,907
一致率	PPA: 85% (382/451), 95% CI: [81%, 87%]	PPA: > 99% (33,163/33,224) 95% CI: [99.8%, 99.9%]	NPA: > 99% (70,000,481/70,000,907) 95% CI: [99.999%, 99.999%]

TSO Comprehensive パネルシステムでは、WES法では検出されなかった合計426個のバリエントがコールされています。これらのバリエントのうち204個（48%）では、WES法のコールのしきい値を下回るバリエントアリル頻度が示されています。残りの潜在的な偽陽性バリエントについては、WES法でのバリエントコールのエビデンスは裏付けの低いものでした。また、多くのバリエントは、一致する正常サンプルにおいて非常に低いレベルのWESエビデンスを持っていました。この結果から、WES法では正常な腫瘍内コンタミネーションにより、このようなバリエントが見逃されていたことが示唆されます。

遺伝子増幅の検出

TSO Comprehensive パネルシステムアッセイによる遺伝子増幅の検出を、腫瘍と正常細胞の一致サンプルまたは腫瘍のみのサンプルを使用した同じWESアッセイの結果と比較しました。合計420個のサンプルのうち183個のサンプルでは腫瘍と正常細胞の直交法を使用し、237個のサンプルでは腫瘍のみの手法を使用しました。420個のサンプルのうち、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイまたは先行するアッセイで増幅陽性であった50個のサンプルが試験用に選択されました。このように特徴付けされたサンプルの成績は、融合遺伝子の平均有病率を使用して調整しました。特徴付けされたサンプルと特徴付けされていないサンプル全体の成績には、逆分散加重平均を使用しました。サンプルは14種類の組織タイプから採取し、55個の遺伝子からの増幅が含まれていました。TSO Comprehensive パネルシステムは、MET遺伝子とERBB2遺伝子からの遺伝子増幅を報告します。ただし、正確さは55個の遺伝子すべてについて評価しました。遺伝子増幅コールの概要は、表 69に示すとおりです。

表 69 遺伝子増幅の一致の概要

PPA (95% CI*)	NPA (95% CI*)
88.80% (84.61, 92.43)	99.02% (98.93, 99.12)

* 信頼区間はブートストラップ法によって計算されています。

胃組織および乳房組織におけるERBB2 (HER2) 増幅は、Dual In-Situ Hybridization (DISH) 法を用いて、他の遺伝子増幅とは別に解析しました。合計116個の乳房および胃のサンプル（そのうち64個はIHCまたはFISHでHER2陽性と判定されていた）をテストしました。1つのサンプルは抽出に失敗し、4つのサンプルはTSO Comprehensive パネルシステムの有効性検査で不合格となり、3つのサンプルはDISHアッセイの有効性検査で不合格となりました。108個のサンプルのうち20個（18.5%）は、DISH法のカットオフ値2.0付近のボーダーラインスコア（1.5～2.5）を示しました。全サンプルのPPAとNPAを含み、ボーダーラインのHER2 DISHのケースを除外した一致結果は、表 70に示すとおりです。

表 70 HER2遺伝子増幅を含むTSO ComprehensiveとHER2 DISHの一致に関する概要

すべての HER2 遺伝子増幅 (乳房および胃)	HER2 DISH 増幅	HER2 DISH 増幅なし
TSO Comprehensive パネルシステム陽性	17 (1件のボーダーラインを 含む)	13 (1件のボーダーラインを含む)
TSO Comprehensive パネルシステム陰性	10 (6件のボーダーライン を含む)	68 (12件のボーダーラインを含む)
ボーダーラインのケースを含む 一致率	PPA: 63% (17/27) 95% CI: [44%, 78%]	NPA: 84% (68/81) 95% CI: [74%, 90%]
ボーダーラインのケースを除く 一致率	PPA: 80% (16/20) 95% CI: [58%, 92%]	NPA: 82% (56/68) 95% CI: [72%, 90%]

RNAスプライスバリエントの検出

スプライスバリエント検出の正確さは、TSO Comprehensive パネルシステムの結果と、スプライスバリエントそれぞれについて既知の陽性RNAを1つずつ含むEGFRvIIIおよびMETエクソン14スキッピングのqPCRアッセイとを比較することにより算出しました。また、TSO Comprehensive パネルシステムと参照法の両方で利用可能なデータを持つ14種類の組織タイプから採取した合計230個の固有のFFPE RNAサンプルに対して一致解析を実行しました。すべてのサンプルについてMETエクソン14スキッピングのテストを実施しましたが、EGFRvIIIについては脳組織でのみテストを行いました。qPCRによってMETエクソン14スキッピング陽性と判定され、TSO Comprehensive パネルシステムでは陽性と判定されなかった3つのサンプルの平均Ctは37を超えており、TSO Comprehensive パネルシステムのLoDレベルを下回っていました。表 71は、一致試験の結果をまとめたものです。

表 71 RNAスプライスバリエントに対するTSO Comprehensive パネルシステムアッセイとqPCRアッセイの一致解析の概要

RNA スプライスバリエント	qPCR 陽性	qPCR 陰性
TSO Comprehensive パネル システム陽性 (EGFRvIII)	3	0
TSO Comprehensive パネル システム陰性 (EGFRvIII)	0	13
TSO Comprehensive パネル システム陽性 (MET エクソン 14 スキッピング)	1	0

RNA スプライスバリエント	qPCR 陽性	qPCR 陰性
TSO Comprehensive パネルシステム陰性 (MET エクソン 14 スキッピング)	3	217
合計	7	230
一致率	PPA: 57% (4/7) 95% CI: [25%, 84%]	NPA: 100% (230/230) 95% CI: [98%, 100%]

RNA融合遺伝子の検出

複合法との比較

TSO Comprehensive パネルシステムの融合遺伝子を、NGSパネル (RNGS1)、ターゲットNGS融合遺伝子パネル (RNGS2)、およびドロップレットデジタルPCR (ddPCR) を使用したRNA全エクソームシーケンスで構成された複合法と比較しました。

RNGS1法は、TSO Comprehensive パネルシステムが融合遺伝子を検出できるすべての遺伝子と重複しています。ただし、重複する融合遺伝子コールで観測されたサポートリード数に基づくと、RNGS1法の検出限界はTSO Comprehensive パネルシステムの4~8倍でした。そのため、WES (RNGS1) 法に加え、感度は高いものの融合遺伝子の検出範囲が狭い2つの追加手法を組み合わせた複合法を使用しました。

14種類の組織タイプを代表し、TSO Comprehensive パネルシステムのメトリクスに合格した合計255個の固有のRNAサンプルをRNGS1でテストしました。2つのサンプルはRNGS1サンプルQCに対して無効であったため、追加の解析から除外されました。TSO Comprehensive パネルシステムによってコールされた82個の融合遺伝子のうち、4個はRNGS1サンプルQCの失敗により評価から除外され、さらに7個の融合遺伝子はRNGS1パネルにターゲットがないためコールできませんでした。TSO Comprehensive パネルシステムによってコールされた残り71個の融合遺伝子のうち、RNGS1によって確認されたのは9個の融合遺伝子でした。RNGS1は、TSO Comprehensive パネルシステムによってコールされなかった4個の融合遺伝子をコールしました。

TSO Comprehensive パネルシステムで陽性でRNGS1では検出されなかった62個の融合遺伝子のうち、13個の遺伝子はRNGS2と重複し、RNGS2で確認されました。1つの融合遺伝子はRNGS2でコールされましたが、TSO Comprehensive パネルシステムではコールされませんでした。

次に、TSO Comprehensive パネルシステムでコールされ、RNGS1ではコールされなかった (またはコールできなかった) 融合遺伝子のうち、RNGS2では評価できなかった融合遺伝子に対して、ドロップレットデジタルPCRを使用しました (49)。さらに、TSO Comprehensive パネルシステムとRNGS1で偽陰性であった4つの融合遺伝子のうちの2つと、TSO Comprehensive パネルシステムとRNGS1で一致した9つの融合遺伝子のうちの2つを再評価するために、ddPCRを使用しました。また特異性を確認するために、陽性の各融合遺伝子サンプルのテストに5つの陰性の融合遺伝子サンプルを含めました。18個の融合遺伝子については、プライマー/プローブを設計できないこと、融合遺伝子の遺伝子パートナーが複数あること、または残りのFFPE材料が不十分なことを理由として、ddPCRでのテストを行いませんでした。ddPCRについては、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイで観測されたブレイクポイントに対してプライマーとプローブを設計しました。

ddPCRによって合計52個の融合遺伝子が検出され、そのうち41個はTSO Comprehensive パネルシステムでコールされたものの、RNGS1ではコールされなかった、またはコール不可能でした。9つの融合遺伝子はddPCRでコールされたものの、TSO Comprehensive パネルシステムまたはRNGS1では陰性でした。ddPCR陽性の2つの融合遺伝子は、TSO Comprehensive パネルシステムとRNGS1で一致する2つの融合遺伝子であることを確認しました。RNGS1を用いて再評価された2例のTSO Comprehensive パネルシステムでの偽陰性については、ddPCRでは融合遺伝子が検出されませんでした。RNGS1の比較に基づいて偽陰性としてカウントされました。

255個のサンプルのうち、TSO Comprehensive パネルシステムアッセイまたは先行するアッセイで融合陽性であった35個のサンプルを試験用を選択しました。このように特徴付けされたサンプルの成績は、融合遺伝子の平均有病率を使用して調整しました。特徴付けされたサンプルと特徴付けされていないサンプル全体の成績には、逆分散加重平均を使用しました。融合遺伝子に関する複合一一致率の結果は、表 72に示されています。

複合法で一致する66個の融合遺伝子（そのうち54個は固有の融合遺伝子）は、TSO Comprehensive パネルシステムパネルの43個の遺伝子を代表していました。ただし融合遺伝子は、表 72に示されている23個の遺伝子についてのみ報告の対象となります。

表 72 RNA融合遺伝子の一致の概要

PPA (95% CI*)	NPA (95% CI*)
80.38% (64.20, 92.32)	99.96% (99.94, 99.98)

* 信頼区間はブートストラップ法によって計算されています。

ROS1融合遺伝子およびALK融合遺伝子に関するFISH法との比較

25個のNSCLCサンプルを対象として、ROS1融合遺伝子およびALK融合遺伝子についてFISH法でテストを行いました。また、さらに5つのNSCLCサンプルを対象として、ROS1融合遺伝子についてテストを行いました。8つのサンプルは組織が不十分であったため、ROS1についてはFISH法で不合格となりました。2つのROS1融合遺伝子と1つのALK融合遺伝子については、TSO Comprehensive パネルシステムとFISH法の両方で検出されました。不一致の結果は認められませんでした。表 73は、TSO Comprehensive パネルシステムとFISH法によるROS1融合遺伝子およびALK融合遺伝子の一致結果をまとめたものです。

表 73 TSO Comprehensive パネルシステムとFISH法によるROS1融合遺伝子およびALK融合遺伝子の一致結果の概要

ALK+ROS1	FISH 陽性	FISH 陰性
TSO Comprehensive パネルシステム陽性	3	0
TSO Comprehensive パネルシステム陰性	0	44
合計	3	44
一致率	PPA: 100% (3/3) 95% CI: [44%, 100%]	NPA: 100% (44/44) 95% CI: [92%, 100%]

サンプルの有効性

採取から5年以内のFFPEブロックから得た181個の固有のRNAサンプルと272個の固有のDNAサンプルについて、サンプルの有効性（初回試行）を測定しました。これらのサンプルは組織の種類と利用可能な材料に基づいて選択されたため、アッセイの有効性は不明でした。バリエントタイプが有効と判断されるためには、ライブラリーQCメトリクスが合格である必要があります。サンプルの有効性は、バリエントタイプ（スモールDNAバリエント、遺伝子増幅、融合遺伝子/スプライスバリエント）ごとに個別に評価され、表 74に示されています。

表 74 サンプルの有効性

バリエントタイプ	サンプルの有効性
融合遺伝子 / スプライスバリエント (RNA)	76%
スモール DNA バリエント	75%
遺伝子増幅	94%

付録 A

使用目的

TruSight Oncology DNA Control と TruSight Oncology RNA Control で構成される TruSight Oncology Controls は、特定の DNA および RNA バリエーションの検出に使用される次世代シーケンサー（NGS）ベースの分子診断アッセイのライブラリー調製、シーケンス、および解析ステップの解析パフォーマンスをモニタリングする品質コントロールとして、定性的体外診断に使用することを目的とします。また、遺伝子検査における解析的逸脱（試薬や装置の変動に起因するものなど）を検出することで NGS テストシステムの性能のモニタリングを支援することも目的とします。

製品説明

TruSight Oncology Controls は、TSO DNA Control と TSO RNA Control という 2 種類の個別に入手可能な製品で構成されています。

TSO DNA Control は、DM24385 細胞株 DNA をバックグラウンドとする生合成 DNA のマルチプレックス化された混合物です。28 種類の遺伝子の、一塩基変異、挿入、欠失、再構成を表す 40 のバリエーションが含まれます（表 75）。

表 75 TSO DNA Control に存在するバリエーション

COSMIC ID	遺伝子	ヌクレオチド変化	アミノ酸変化
COSM33765	AKT1	c.49G>A	p.E17K
COSM13127	APC	c.4348C>T	p.R1450*
COSM18561	APC	c.4666dup	p.T1556Nfs*3
COSM21924	ATM	c.1058_1059del	p.C353Sfs*5
COSM476	BRAF	c.1799T>A	p.V600E
COSM5664	CTNNB1	c.121A>G	p.T41A
COSM12378	EGFR	c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG
COSM6225	EGFR	c.2236_2250del	p.E746_A750del
COSM6224	EGFR	c.2573T>G	p.L858R
COSM6240	EGFR	c.2369C>T	p.T790M
COSM682	ERBB2	c.2313_2324dup	p.Y772_A775dup
COSM715	FGFR3	c.746C>G	p.S249C
COSM783	FLT3	c.2503G>T	p.D835Y
COSM33661	FOXL2	c.402C>G	p.C134W
COSM52969	GNA11	c.626A>T	p.Q209L
COSM28758	GNAQ	c.626A>C	p.Q209P

COSMIC ID	遺伝子	ヌクレオチド変化	アミノ酸変化
COSM27887	GNAS	c.2530C>T	p.R844C
COSM28747	IDH1	c.394C>T	p.R132C
COSM12600	JAK2	c.1849G>T	p.V617F
COSM1314	KIT	c.2447A>T	p.D816V
COSM521	KRAS	c.35G>A	p.G12D
COSM18918	MPL	c.1544G>T	p.W515L
COSM17559	NPM1	c.860_863dup	p.W288Cfs*12
COSM584	NRAS	c.182A>G	p.Q61R
COSM736	PDGFRA	c.2525A>T	p.D842V
COSM28053	PDGFRA	c.1694_1695insA	p.S566Qfs*6
COSM763	PIK3CA	c.1633G>A	p.E545K
COSM775	PIK3CA	c.3140A>G	p.H1047R
COSM12464	PIK3CA	c.3203dup	p.N1068Kfs*5
COSM5809	PTEN	c.800del	p.K267Rfs*9
COSM4986	PTEN	c.741dup	p.P248Tfs*5
COSM965	RET	c.2753T>C	p.M918T
COSM14105	SMAD4	c.1394dup	p.A466Gfs*28
COSM6530	TP53	c.723del	p.C242Afs*5
COSM10648	TP53	c.524G>A	p.R175H
COSM10662	TP53	c.743G>A	p.R248Q
COSM10660	TP53	c.818G>A	p.R273H
COSM18610	TP53	c.267del	p.S90Pfs*33
該当なし	NCOA4-RET	該当なし	該当なし
該当なし	TPR-ALK	該当なし	該当なし

TSO RNA Control は、GM24385 RNA をバックグラウンドとする RNA 転写産物のマルチプレックス化された混合物です。26 種類の遺伝子の 16 の融合遺伝子と 2 種類の遺伝子の 2 つのスプライスバリエントが含まれます (表 76)。融合遺伝子は、5' パートナー + ハイフン + 3' パートナーの形式で表記されています。

表 76 TSO RNA Control に存在するバリエーション

バリエーション	バリエーション	バリエーション
CCDC6-RET	FGFR3-TACC3	SLC45A3-BRAF
CD74-ROS1	KIF5B-RET	TFG-NTRK1
EGFR-SEPT14	LMNA-NTRK1	TMPRSS2-ERG
EML4-ALK	NCOA4-RET	TPM3-NTRK1
ETV6-NTRK3	PAX8-PPARG	EGFR VIII
FGFR3-BAIAP2L1	SLC34A2-ROS1	MET Exon 14

制限

本製品は医療機器です。

ラベルに表示されている結果は代表的なアッセイによって得られたものです。性能特性は情報提供のみを目的としています。TruSight Oncology Controls のバリエーション検出結果は、ライブラリー調製方法、シーケンス方法、およびバイオインフォマティクスパイプラインによって異なる場合があります。使用するシステムに適した独自の性能基準を確立するのはエンドユーザーの責任となります。

TruSight Oncology DNA Control での NCOA4-RET と TPR-ALK の検出については、イルミナでは評価していません。

製品のコンポーネント

製品	REF	数量	液量	濃度 *	活性成分	保管温度
TruSight Oncology DNA Control	20065041	1	25 µL	20 ng/µL	合成 DNA プール	-25°C ~ -15°C
TruSight Oncology RNA Control	20065042	1	25 µL	25 ng/µL	合成 RNA プール	-85°C ~ -65°C

* 最低濃度が示されています。実際の濃度はロットによって異なり、チューブラベルに記載されています。

保管および取り扱い

TSO DNA Control は、-15°C以下で保管した場合、チューブラベルとキットの箱に記載されている有効期限まで安定しています。チューブは複数回使用することが可能で、凍結と融解を 10 回繰り返すことができます。コンタミネーションを避けるため、Good Laboratory Practice に従ってください。

TSO RNA Control は、-65°C以下で保管した場合、チューブラベルとキットの箱に記載されている有効期限まで安定しています。チューブは複数回使用することが可能で、凍結と融解を 10 回繰り返すことができます。コンタミネーションを避けるため、Good Laboratory Practice に従ってください。

アリコートに分注しないでください。

警告および注意

- クロスコンタミネーションを防止してください。
- 本製品を取り扱う際は、適切なラボ慣行に従ってください。
- 別のサンプルまたは別の製品の分注に移るときは、新しい消耗ラボウェアと新しいピペットチップを使用してください。
- クロスコンタミネーションのリスクを軽減するため、エアゾール防止フィルター付きピペットを使用してください。
- 適切なアッセイ手順に従い、安全性、ラボ、およびアッセイに関する警告と注意に気をつけてください。
- ラボで日常的に実践している予防策をとってください。口でピペットティグしないでください。指定された作業エリアでの飲食や喫煙は避けてください。本製品を取り扱う際は使い捨て手袋と実験着を着用してください。本製品を取り扱った後は手をよく洗ってください。
- マイクロチューブ、プレート、ピペットチップ、リザーバーはヌクレアーゼフリーのものを使用してください。
- 本製品を正確に分注するために、高精度ピペットを使用してください。製造元の仕様に従って定期的に校正してください。
- チューブラベルに記載された有効期限が過ぎた TSO Controls を使用しないでください。

使用説明

以下の説明は、TSO DNA Control と TSO RNA Control の両方に適用されます。

1. 氷上で融解します。
2. チューブを優しくボルテックスまたは転倒混和して混合してから、短時間遠心して内容物をチューブの底に集めます。
3. 適切な緩衝液で希釈して目的の濃度にします。希釈が必要な場合は、コントロールの特定のロットのチューブラベルに記載された実際の濃度を希釈の計算に使用します。
TSO DNA Control に推奨される希釈溶液は Tris-EDTA (10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0) です。
TSO RNA Control に推奨される希釈溶液は DNase/RNase フリー水です。
4. コントロールは、アッセイサンプルと同様に、アッセイサンプルとともにテストします。
5. 使用と使用の間はラベルに記載された条件で保管します。

参考資料

1. アメリカ臨床腫瘍学会 (www.asco.org)。2016 年 10 月 3 日にアクセスして確認。
2. 欧州臨床腫瘍学会 (www.esmo.org)。2016 年 10 月 3 日にアクセスして確認。

改訂履歴

改訂	日付	変更内容
Document # 200041566 v01	2025 年 5 月	<p>ソフトウェアのバージョンと製品番号に関する記述を削除しました。 手順の制限事項の壊死組織に関する情報を更新しました。 MSI および TMB の三次解析が、日本で認可された適用の範囲外であることを明確にしました。</p> <p>更新した内容：</p> <ul style="list-style-type: none">融合遺伝子が報告の対象となる遺伝子の数を 23 に更新NTC の脚注を最小および最大の両方のライブラリーに適用装置および消耗品のリストにプレート遠心機の仕様とピペットの単位を記載SPB の超過計算を 1.05 倍から 1.15 倍に更新市販の TSO Comprehensive 製品に合わせて表現と文の構成を更新 <p>追加した内容：</p> <ul style="list-style-type: none">TSO Comprehensive アッセイ遺伝子パネルと臨床説明ターゲットキャプチャー 1 および 2 の SMB に関する注記「シーケンスの準備」の概要追加の超音波発生装置情報 <p>「性能特性」の明確化と結果の更新：</p> <ul style="list-style-type: none">干渉物質ライブラリーの安定性と保管情報ブランク限界、検出限界、再現性、ラボ内精度、腫瘍プロファイリングの正確さ、NTRK の臨床成績に関する情報 <p>参考資料の引用</p>
Document # 200041566 v00	2024 年 2 月	初版リリース

特許および商標

本文書およびその内容は、Illumina, Inc. およびその関連会社（以下、「イルミナ」という）の所有物であり、本文書に記載された製品の使用に関連して、イルミナの顧客が契約上を使用することのみを意図したものであり、その他の目的を意図したものではありません。本文書およびその内容を、イルミナの書面による事前同意を得ずにその他の目的で利用または配布してはならず、また方法を問わず、その他伝達、開示または複製してはなりません。イルミナは、本文書によって、自身の特許、商標、著作権またはコモンロー上の権利に基づきいかなるライセンスも譲渡せず、また第三者の同様の権利も譲渡しないものとします。

本文書に記載された製品の適切かつ安全な使用を徹底するため、資格を有した、適切なトレーニングを受けた担当者が、本文書の指示を厳密かつ明確に遵守しなければなりません。当該製品の使用に先立ち、本文書のすべての内容を熟読し、理解する必要があるものとします。

本文書に含まれるすべての説明を熟読せず、明確に遵守しない場合、製品を損ない、使用者または他者を含む個人に傷害を負わせ、その他の財産に損害を与える結果となる可能性があり、また本製品に適用される一切の保証は無効になるものとします。

イルミナは、本文書に記載された製品（その部品またはソフトウェアを含む）の不適切な使用から生じる責任、または、顧客による当該製品の取得に関連してイルミナから付与される明示的な書面によるライセンスもしくは許可の範囲外で当該製品が使用されることから生じる責任を一切負わないものとします。

© 2025 Illumina, Inc. All rights reserved.

すべての商標および登録商標は、Illumina, Inc. または各所有者に帰属します。商標および登録商標の詳細は jp.illumina.com/company/legal.html を参照してください。

連絡先



イルミナ株式会社
東京都港区芝 5-36-7
三田ベルジュビル 22 階
サポート専用フリーダイヤル
0800-111-5011
techsupport@illumina.com
jp.illumina.com



製品ラベル

製品パッケージとラベルに表示された記号の意味については、jp.support.illumina.com にある該当するキットの [ドキュメント] タブで記号キーを参照してください。