

この添付文書をよく読んでから使用してください。

体外診断用医薬品

※※ 2020 年 12 月改訂（第 7 版）
※ 2019 年 12 月改訂（第 6 版）

製造販売承認番号 22400AMX00630000

ALK 融合遺伝子検出キット

Vysis® ALK Break Apart FISH プローブキット

【一般的な注意】

- 1. 本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
- 2. 検査を実施する際には、本使用目的欄に記載されている薬剤の本邦における最新の添付文書【効能・効果】および＜効能・効果に関連する使用上の注意＞欄等を参照すること。
- 3. 添付文書に記載された使用方法に従って使用すること。本添付文書に記載された使用方法および使用目的以外での使用については、測定結果の信頼性は保証しない。
- 4. 本測定で使用する試薬類には、ヒト由来成分が含まれているものがあり、感染の危険があるので感染性のあるものとして取り扱うこと。詳細は、【形状・構造等（キットの構成）】または【用法・用量（操作方法）】を参照のこと。
- 5. 本添付文書中の薬剤に関する記述の中には、海外での情報が含まれている。
- 6. トレーニングの必要性
弊社では本キットの使用経験がない測定者に対して、検体の調製、測定操作、判定方法のトレーニングを提供している。すでにトレーニングを受けた施設でも、新たに測定を行う測定者がいる場合、トレーニングを受けることを推奨する。

【形状・構造等（キットの構成）】

- 1) Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH プローブ
Vysis LSI 3'-ALK スペクトラムオレンジ
Vysis LSI 5'-ALK スペクトラムグリーン
（他の含有物：デキストラン硫酸、ホルムアミド、SSC、ブロッキング DNA（ヒト由来））
- 2) DAPI I 対比染色液
（主な含有物：リン酸緩衝液、DAPI（4', 6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール 2 塩酸塩）、フェニレンジアミン 2 塩酸塩、グリセロール、塩化ナトリウム）

※※【使用目的】

がん組織、細胞中の ALK 融合遺伝子の検出

※※（クリゾチニブ、アレクチニブ塩酸塩又はブリゲチニブの非小細胞肺癌患者への適応を判定するための補助に用いる。）

【測定原理】

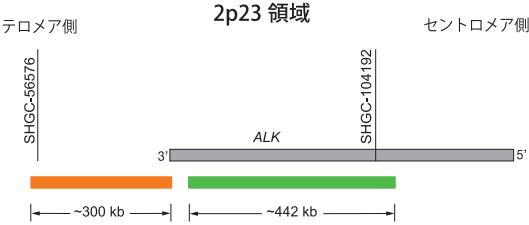
蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法（FISH 法）は、細胞プレパラート内の特定の染色体の核酸配列を視覚化する技術である。特に、FISH 法は一本鎖の蛍光色素分子で標識されたデオキシリボ核酸（DNA）プローブを相補的なターゲット配列に正確にアニーリングする。細胞内 DNA 領域へプローブがハイブリダイゼーションし、蛍光顕微鏡を用いて可視化され、直接検出する。

プローブの種類

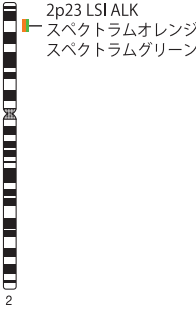
本キットは、デキストラン硫酸、ホルムアミド、SSC、ブロッキング DNA を含むハイブリダイゼーション緩衝液に、2 つの蛍光標識 DNA プローブが入った混合液から成る。

- ・ Vysis LSI 3'-ALK スペクトラムオレンジ（SO）
- ・ Vysis LSI 5'-ALK スペクトラムグリーン（SGn）

これらのプローブのハイブリダイゼーションターゲットは、ALK 遺伝子の切断点を挟んで隣接した両側に位置している。3'-ALK プローブはおおよそ 300kb で切断点のテロメア側にハイブリダイズし、スペクトラムオレンジ蛍光物質で標識されている。5'-ALK プローブはおおよそ 442kb で、切断点のセントロメア側にハイブリダイズし、スペクトラムグリーン蛍光物質で標識されている。



Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH プローブ



【操作上の注意】

(1) 測定試料の性質、採取法

- ・正しい測定結果を得るため、本添付文書に従って適切な検体採取、取り扱い、調製、保存を行うこと。
- ・本キットは、ヒト非小細胞肺癌（NSCLC）患者の原発性並びに転移性のがん組織のホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体の ALK 遺伝子の再配列を識別し、計数するために最適化されている。本キットは、NSCLC 患者の 10% 中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋がん組織に対してのみ使用できる。他のタイプの検体や固定法の異なる検体に対しては使用しないこと。

※※【用法・用量（操作方法）】

(1) 試薬の調製方法

そのまま用いる。

(2) 必要な器具・器材・試料等

1. コントロールスライド

- ・プローブチェック ALK 陰性コントロールスライド II（ProbeChek ALK Negative Control Slides II）（製品番号：6N38-06）
（主な含有物：培養細胞（ヒト由来））
- ・プローブチェック ALK 陽性コントロールスライド（ProbeChek ALK Positive Control Slides）（製品番号：6N38-10）
（主な含有物：培養細胞（ヒト由来））
- ・Hemo-De（または、d-リモネンなどの同等品）
- ・ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色液
- ・蛍光顕微鏡油浸オイル
- ・エタノール（100％）：室温保存
- ・精製水
- ・ペーパーボンド

2. 器具・装置

- ・正荷電処理された顕微鏡用スライドグラス
- ・カバーグラス（22 mm × 22 mm）
- ・滅菌済みマイクロピペット用ピペットチップ（1 ～ 10 μL）
- ・校正済みマイクロピペット（1 ～ 10 μL）
- ・タイマー
- ・マイクロトーム
- ・マイクロ遠心機
- ・メスシリンダー
- ・精製水の恒温槽（37 ～ 42℃）
- ・ダイヤモンドペン（または耐溶剤マーカー）
- ・ピンセット
- ・コプリンジャー（12 × 50 mL）、推奨品：縦型染色瓶
- ・適切なフィルターが装着された蛍光顕微鏡（5. 顕微鏡および付属品の項参照）
- ・校正済み温度計
- ・ボルテックスミキサー
- ・気相恒温槽（インキュベーター） / オープン（オプション）
- ・蓋およびカートンスライドホルダ付き顕微鏡用スライドボックス
- ・ThermoBrite
- ・ThermoBrite humidity cards

3. スライドの処理をマニュアル操作で行う場合に必要な試薬・装置

- Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キット (Vysis Paraffin Pretreatment IV & Post-Hybridization Wash Buffer Kit) (製品番号：1N31-05)
 - ・前処理溶液 (Vysis Pretreatment Solution) (主な含有物:チオシアン酸ナトリウム)
 - ・プロテアーゼ緩衝液 IV (Vysis Protease Buffer IV) (主な含有物: 塩酸)
 - ・プロテアーゼ IV (Vysis Protease IV) (主な含有物: ペプシン)
 - ・洗浄緩衝液 I (Vysis Wash Buffer I) (主な含有物: SSC、NP-40)
 - ・洗浄緩衝液 II (Vysis Wash Buffer II) (主な含有物: SSC、NP-40)
- 静止恒温槽または循環恒温槽 (37℃)
- 循環恒温槽 (74℃、80℃)
注：静止恒温槽では、高温の調整が十分にできない。

4. スライドの処理を VP 2000 プロセッサで行う場合に必要な試薬・装置

- VP 2000 プレトリートメントキット (VP 2000 Pretreatment Kit) (製品番号：8N16-01)
 - ・前処理 SSC 溶液 (Vysis Pretreatment SSC Solution) (主な含有物: 塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム (SSC))
 - ・プロテアーゼ緩衝液 IV (Vysis Protease Buffer IV) (主な含有物: 塩酸)
 - ・プロテアーゼ IV (Vysis Protease IV) (主な含有物: ペプシン)
 - ・洗浄緩衝液 I (Vysis Wash Buffer I) (主な含有物: SSC、NP-40)
 - ・洗浄緩衝液 II (Vysis Wash Buffer II) (主な含有物: SSC、NP-40)
- VP 2000 プロセッサ

5. 顕微鏡および付属品

顕微鏡：

ハイブリダイゼーションの結果を観察するには落射型の蛍光顕微鏡が必要である。顕微鏡が FISH で測定する標本に使えるかどうかを前もって確認することが必要である。一般的な DNA 染色、例えば DAPI、ヨウ化プロビジウムおよびキナクリンに使われる顕微鏡は FISH アッセイには適さないことがある。顕微鏡は定期的に清掃し、製造業者による定期的な調整を行うことを推奨する。特に水銀ランプについては製造業者による定期的な調整を行うことを推奨する。

励起光の光源：

励起光の光源として 100 W の水銀ランプを推奨する。ランプの積算使用時間を記録し、定格寿命を超える前に交換する。ランプが適切に調整されていることを確認する。

対物レンズ：

100 W の水銀ランプ付の顕微鏡を使用するときは、開口数が 0.75 以上の油浸蛍光対物レンズを使用する。10 ～ 25 倍の対物レンズに 10 倍の接眼レンズを取り付けたタイプが計数する範囲を選択するための検体のスキャニングに適している。FISH シグナルの計数には、60 ～ 100 倍の油浸用アクロマート対物レンズを用いる。

油浸用オイル：

油浸用対物レンズに用いるオイルは、低自家蛍光の蛍光顕微鏡用のものを使用する。

フィルター：

ターゲット DNA 領域への ALK プローブのハイブリダイゼーションは、オレンジ色とグリーン色の蛍光で示される。他の DNA は DAPI I 対比染色の結果、ブルー色の蛍光を発する。弊社では FISH DNA プローブキットのために至適化され、殆どの顕微鏡で使用可能なシングルおよびデュアルバンドパスフィルターセットを用意している。

本キットに推奨されるフィルター

- ・グリーン / オレンジデュアルバンドパスフィルター (Dual Bandpass Filter Set, Green/Orange v2)
- ・DAPI シングルバンドパスフィルター (Single BandPass Filter Set, DAPI)
- ・オレンジシングルバンドパスフィルター (Single BandPass Filter Set, Orange)
- ・グリーンシングルバンドパスフィルター (Single BandPass Filter Set, Green)

(3) 測定 (操作) 法

- 1) 非小細胞肺癌患者のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を使用し、組織切片を作成する。
- 2) スライドを脱パラフィン処理し、乾燥させる。
- 3) スライドをプロテアーゼで前処理し、エタノールで脱水し、乾燥させた後、10 μL の Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH プローブをスライドに添加する。
- 4) 73℃で 3 分間、変性させる。
- 5) 37℃で 14 ～ 24 時間ハイブリダイゼーションさせる。
- 6) 洗浄液にスライドを浸漬する。
- 7) 74℃± 1℃に加温した洗浄液で 2 分間スライドを浸漬する。
- 8) スライドを乾燥させ、10 μL の DAPI I 対比染色液をスライドに添加する。
- 9) 蛍光顕微鏡で細胞 50 個のシグナルを計数する。

1) 操作手順

サンプルの調製前に、【使用上又は取扱上の注意】を参照のこと。

1. 検体採取および処理

本添付文書で示す操作手順は、外科的切除、針生検、FFPE 細胞ペレット (例：穿刺吸引細胞診) などによる NSCLC 患者の FFPE 組織検体用 (原発性腫瘍および転移性腫瘍) に至適化されたものである。検体は、脱灰剤のような酸、強い塩基、極端な熱に曝露させないこと。このような条件下では DNA が損傷を受けることが知られており、FISH 法による測定で正しい結果が得られないことがある。

ホルマリン (10%中性緩衝ホルマリン溶液) で固定された NSCLC 患者のがん組織検体を使用し、良好な組織切片を作製する。組織サンプルの最適固定時間は 6 ～ 48 時間である。

2. NSCLC 患者の FFPE 組織検体のスライド調製

注：検体がブロックではなくスライドのみの場合はステップ 5) から操作を始める。

- 1) ミクロトームで 2 枚以上の厚さ 5 ± 1 μm のパラフィン切片を作製する。
- 2) 組織切片を精製水の恒温槽 (37 ～ 50℃) の水面に浮かべる。時間は 30 分以内とする。
- 3) 組織切片を正荷電処理された顕微鏡用スライドガラスにのせる。
- 4) スライドを風乾する。
- 5) 検体スライド 1 枚を従来法で H&E 染色する。
注：H&E 染色した切片から 10 枚以内に位置する切片を測定に使用すること。
注：ステップ 6) は病理医が行う。
- 6) H&E 染色スライドでがんのエリアを探し、できるだけ広い範囲をマークする。壊死 (ネクロシス) 領域、上皮がん領域、小細胞がん領域は避ける。ダイヤモンドペン (または耐溶剤マーカー) を使用する。
- 7) H&E 染色スライドでマークしたエリアを、染色していない別のスライドガラスの対応部分に書き写す。組織片がのっていないスライドガラスの裏面に、ダイヤモンドペンで書き写すこと。
- 8) 4. 脱パラフィン手順 前のベーキングの準備ができるまで、調製されたスライドを室温で保存する。

注：陰性コントロールスライド 1 枚と陽性コントロールスライド 1 枚についてもステップ 9) で処理を開始する。

- 9) 未染色の検体スライドとコントロールスライドを ThermoBrite または気相恒温槽 (インキュベーター) / オープンを使用して、60℃で 2 ～ 24 時間ベーキングする。ベーキングの後に、マニュアル操作または VP 2000 プロセッサ (VP 2000) のいずれかでスライドの処理を行う。

本キットでは、マニュアル操作によるスライドの処理または VP 2000 プロセッサによる自動化されたスライドの処理のいずれかを選択することができる。それぞれの手順は以下を参照すること。

マニュアル操作によるスライドの処理手順

3. 試薬の調製：マニュアル操作

注：マニュアル操作によるスライドの処理では Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キット (製品番号:1N31-05) を使用し、VP 2000 プロセッサでは、VP 2000 プレトリートメントキット (製品番号:8N16-01) を使用する。プレトリートメントキットを入れ替えて使用しないこと。

- 10) Hemo-De の調製：コプリンジャー 3 個に Hemo-De 50 mL を入れる。使用しないときは蓋をする。換気を保った状態で、室温で保存し、7 日間を過ぎた場合は廃棄すること。
- 11) 前処理溶液の調製：コプリンジャー 1 個に前処理溶液 50 mL を入れる。室温の循環恒温槽にコプリンジャーを移し、スライドの脱パラフィン前に恒温槽を 81 ± 2℃ (コプリンジャーの中の設定温度より少し高め) にする。使用前に試薬温度が 80 ± 2℃になっていることを確認する。1 日使用した溶液は廃棄する。
- 12) プロテアーゼ溶液の調製：プロテアーゼ IV (75 mg) 1 バイアルをプロテアーゼ緩衝液 IV 1 ボトルに添加する。バイアルを少量のプロテアーゼ緩衝液 IV で洗い、プロテアーゼ緩衝液 IV のボトルに戻す。キャップを戻して、穏やかに数回転倒混和する。調製した溶液をコプリンジャーに移して、37℃の恒温槽に置く。溶液混和後、最低 1 時間放置し、使用前に温度が 37 ± 1℃であることを確認する。1 日使用した溶液は廃棄する。
- 13) 精製水の調製：コプリンジャー 1 個に精製水 50 mL を入れる。室温で使用する。使用する度に交換する。
- 14) エタノール溶液の調製 (70、85、100%)：100%エタノールと精製水を用いて、70、85% (v/v、体積%) エタノール溶液を作製する。使用しないときは、室温で密栓容器にて保存する。蒸発がない、溶液が希釈されない、使いすぎによる濁りがない限り、エタノール溶液は 1 週間使用可能である。

4. 脱パラフィン手順

- 15) 検体スライドを Hemo-De が入った 1 個目のコプリンジャーに室温で 5 分間浸漬する。
- 16) 毎回新しい Hemo-De を使用して、ステップ 15) の操作を 2 回繰り返す。
- 17) 検体スライドを 100%エタノールに室温で 1 分間浸漬し、脱水する。次の 100% エタノールのコプリンジャーでも同じ操作を繰り返す。
- 18) スライドを 2 ～ 5 分間風乾する (オプション)。

5. スライドの前処理

- 19) 80 ± 2℃に温めておいた前処理溶液に、検体スライドを 8 枚までセットして 12 ± 3 分間浸漬する。

注：必要に応じて、コプリンジャーの両端の溝にはスライドを 1 枚セットし、その他の各溝にはスライド 2 枚を裏面を合わせた形で重ねてセットすることもできる。両端の溝では、スライドの組織切片側をコプリンジャーの内側に向ける。これにより、一度に 8 枚のスライドをコプリンジャーにセットすることができる。

- 20) 検体スライドを精製水に 3 分間浸漬する。

6. 酵素前処理

- 21) スライドを精製水から取り出す。
- 22) ペーパータオルにスライドの下端をつけて余分な水を取り除く。
- 23) 37 ± 1℃に温めておいたプロテアーゼ溶液に検体スライドを 20 ± 4 分間浸漬する。
- 24) 検体スライドを精製水に 3 分間浸漬する。

7. ハイブリダイゼーション手順

ThermoBrite は、変性およびハイブリダイゼーションに使用する。機器の操作方法については、ThermoBrite の取扱説明書を参照のこと。

- 25) 検体スライドを 70%エタノールに 1 分間浸漬する。
26) 検体スライドを 85%エタノールに 1 分間浸漬する。
27) 検体スライドを 100%エタノールに 1 分間浸漬する。
28) スライドを 2 ～ 5 分間風乾する。
29) humidity card を水で湿らせて、ThermoBrite の所定位置にセットする。
ThermoBrite の表面に汚れやゴミがないことを確認する。
30) 変性温度 (Melt Temp) を 73℃、変性時間 (Melt Time) を 3 分間にセットする。
ハイブリダイゼーション温度 (Hyb Temp) を 37℃、ハイブリダイゼーション時間 (Hyb Time) を 14 ～ 24 時間にセットする。
31) プローブ混合液を室温で融解し、ボルテックスミキサーで混和した後、マイクロ遠心機で 2、3 秒間遠心する。各スライドにプローブ混合液を 10 μ L 添加し、直ちにカバーガラスを被せる。カバーガラスを被せる前に、プローブ混合液に泡がないことを確認する。
32) ペーパーボンドでカバーガラスを密封する。
33) ThermoBrite にスライドを置き、ハイブリダイゼーションプログラムを開始する。
スライドを 14 ～ 24 時間ハイブリダイゼーションする。
ハイブリダイゼーション終了後、8. スライドの洗浄手順のステップへ進む。
注：開始準備ができるまで、スライドは ThermoBrite に置いたままにしておく。

8. スライドの洗浄手順

注：スライドはハイブリダイゼーション完了日に洗浄すること。

- 34) 50 mL の洗浄緩衝液 I をコプリンジャーに注ぐ。室温で使用する。1 日使用した溶液は廃棄すること。
35) 50 mL の洗浄緩衝液 II をコプリンジャーに注ぐ。破損を避けるため、コプリンジャーを温める前に室温の恒温槽に入れる。使用前にコプリンジャーを 74 $\pm$ 1℃で 30 分以上温める。1 日使用した溶液は廃棄すること。
36) カバーガラスを動かさないように注意しながら、スライド 1 枚からペーパーボンドを取り除き、スライドを室温の洗浄緩衝液 I に浸漬する。他のスライドでも同じ操作を行いカバーガラスがスライドからはがれるよう、2 ～ 5 分間立てたままにする。
注：洗浄緩衝液 II を適温に保つため、必ずスライド 4 枚を同時に洗浄すること。もしスライドが 4 枚より少ない場合には、合計 4 枚になるようブランクのスライドを追加する。時間の計測は、4 枚目のスライドを浸漬してから開始する。
37) スライドを 74 $\pm$ 1℃の洗浄緩衝液 II に直ちに浸漬する。1 ～ 3 秒間穏やかに振盪する。他のスライドも同じ操作を繰り返す。
38) 2 分後にスライドを取り出す。
注：次の 4 枚のスライドを洗浄する前に、洗浄緩衝液 II の温度が 74 $\pm$ 1℃に戻っていることを確認する。

9. 対比染色方法

- 39) スライドを室温で遮光し、風乾する。
40) DAPI I 対比染色液を室温で融解し、ボルテックスミキサーで混和した後、マイクロ遠心機で 2、3 秒間遠心する。10 μ L の DAPI I 対比染色液を検体スライドのターゲットエリアに添加し、カバーガラスを被せ、最低 5 分間遮光して保存する。
41) 24 時間以内に蛍光顕微鏡で計数するか、または -20 $\pm$ 10℃で保存する。

10. 保存方法 (オプション)

- スライドは、遮光して -20 $\pm$ 10℃で保存する。この条件下では蛍光シグナルが大幅に減少することなく、スライドを DAPI I 対比染色後、2 週間まで保存することができる。
注：観察する前にスライドを室温に戻す。

11. スライド観察

- 42) 適切な蛍光顕微鏡、適切なフィルターセットを使用してスライドを観察する (3. 顕微鏡および付属品 フィルターの項を参照のこと)。

VP 2000 プロセッサを使用したスライドの自動処理手順

- 注：マニュアル操作によるスライドの処理では Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キット (製品番号:1N31-05) を使用し、VP 2000 プロセッサでは、VP 2000 プレトリートメントキット (製品番号:8N16-01) を使用する。プレトリートメントキットを入れ替えて使用しないこと。
注：VP 2000 プロセッサを使用した場合、1 回につき 3 ～ 48 枚の検体またはコントロールスライドを自動で処理することができる。

43) VP 2000 スライド前処理プロトコル

プロトコル編集画面で、VP 2000 スライド前処理プロトコル (表 1) を入力または確認する。機器の操作についての詳細は、VP 2000 プロセッサ取扱説明書を参照のこと。使用前に VP 2000 スライド前処理プロトコルを開く。

表 1 VP 2000 スライド前処理プロトコル

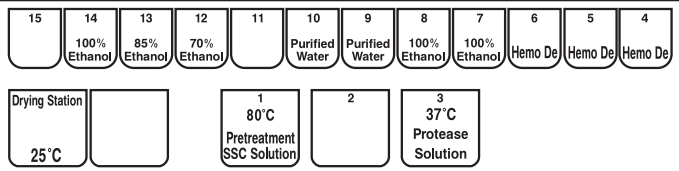
Step	Description	Basin	Reagent	Time	Temp
1	Hemo-De	4	Hemo-De	5 minutes	Ambient
2	Hemo-De	5	Hemo-De	5 minutes	Ambient
3	Hemo-De	6	Hemo-De	5 minutes	Ambient
4	100% Ethanol	7	100% Ethanol	1 minute	Ambient
5	100% Ethanol	8	100% Ethanol	1 minute	Ambient
6	Pretreatment SSC Solution	1	Pretreatment SSC Solution	25 $\pm$ 10 minutes	80°C
7	Purified water	9	Purified water	3 minutes	Ambient

Step	Description	Basin	Reagent	Time	Temp
8	Protease Solution	3	Protease Solution	15 $\pm$ 5 minutes	37°C
9	Purified water	10	Purified water	3 minutes	Ambient
10	70% Ethanol	12	70% Ethanol	1 minute	Ambient
11	85% Ethanol	13	85% Ethanol	1 minute	Ambient
12	100% Ethanol	14	100% Ethanol	1 minute	Ambient
13	Air dry	Drying Station	-----	-----	Ambient

12. 試薬の調製：VP 2000 プロセッサ

注：Basin の位置については、試薬配置図 (図 1) を参照のこと。

図 1 試薬配置図 (例)



- 44) Hemo-De の調製：Basin 4、5、6 にそれぞれ Hemo-De 500 mL を入れる。使用しないときは蓋をする。7 日間を過ぎた場合は廃棄すること。
45) 前処理 SSC 溶液の調製：Basin 1 に前処理 SSC 溶液 (青色の線が入ったボトル) 500 mL (250 mL $\times$ 2) を入れる。スライドの前処理を開始する前に、溶液が設定温度の 80℃に達していることを Run Screen で確認すること。当日の作業が終了した後は廃棄すること (最大 2 回まで使用可能)。
46) プロテアーゼ溶液の調製：Basin 3 にプロテアーゼ緩衝液 IV (250 mL) を 1 本 およびプロテアーゼ IV (750 mg) を 1 バイアル入れる。2 本目のプロテアーゼ緩衝液 IV (250 mL) のボトルから少量のプロテアーゼ緩衝液 IV をプロテアーゼ IV のバイアルに入れ、中を洗ってから Basin 3 に加える。2 本目のプロテアーゼ緩衝液 IV の残りを Basin 3 に入れる。Basin を VP 2000 の所定の位置に戻す。最低 1 時間放置した後、測定開始前に 2 ～ 3 回攪拌する。スライドの前処理を開始する前に、プロテアーゼが溶解していることを目視で確認し、溶液が設定温度の 37℃に達していることを Run Screen で確認すること。当日の作業が終了した後は廃棄すること (最大 2 回まで使用可能)。
47) 精製水の調製：Basin 9、10 にそれぞれ精製水 500 mL を入れる。スライドの前処理を一通り行う度に交換する。
48) エタノール溶液 (70%、85%、100%) の調製：100%エタノールと精製水を用いて、70、85% (v/v、体積%) エタノール溶液を調製する。使用しないときは、室温で密閉容器にて保存する。
・ Basin 7、8、14 にそれぞれ 100%エタノール 500 mL を入れる。
・ Basin 12 に 70%エタノール 500 mL を入れる。
・ Basin 13 に 85%エタノール 500 mL を入れる。
エタノール溶液は、蒸発や希釈、使いすぎによる濁りがない場合に限り、1 週間使用可能である。

13. スライドの前処理

- 49) VP 2000 スライドバスケットに検体およびコントロールスライドをセットして、VP 2000 のロボットアームに取り付ける。前処理 SSC 溶液が 80℃になった後、VP 2000 スライド前処理プロトコルを開始する (ステップ 43、表 1)。VP 2000 スライド前処理プロトコルが完了した後、VP 2000 からスライドバスケットを取り外し、さらにスライドバスケットからスライドを取り外す。

14. ハイブリダイゼーション手順

ThermoBrite は、変性およびハイブリダイゼーションに使用する。機器の操作方法については、ThermoBrite の取扱説明書を参照のこと。

- 50) humidity card を水で湿らせて、ThermoBrite の所定位置にセットする。
ThermoBrite の表面に汚れやゴミがないことを確認する。
51) 変性温度 (Melt Temp) を 73℃、変性時間 (Melt Time) を 3 分間にセットする。
ハイブリダイゼーション温度 (Hyb Temp) を 37℃、ハイブリダイゼーション時間 (Hyb Time) を 14 ～ 24 時間にセットする。
52) プローブ混合液を室温で融解し、ボルテックスミキサーで混和した後、マイクロ遠心機で 2、3 秒間遠心する。各スライドにプローブ混合液を 10 μ L 添加し、直ちにカバーガラスを被せる。カバーガラスを被せる前に、プローブ混合液に泡がないことを確認する。
53) ペーパーボンドでカバーガラスを密封する。
54) ThermoBrite にスライドを置き、ハイブリダイゼーションプログラムを開始する。
スライドを 14 ～ 24 時間ハイブリダイゼーションする。
ハイブリダイゼーション終了後、15. VP 2000 スライド洗浄手順のステップへ進む。
注：開始準備ができるまで、スライドは ThermoBrite に置いたままにしておく。

15. VP 2000 スライド洗浄手順

注：スライドはハイブリダイゼーション完了日に洗浄すること。

- 55) VP 2000 スライド洗浄プロトコル
プロトコル編集画面で VP 2000 スライド洗浄プロトコル (表 2) を入力する。機器の操作についての詳細は、VP 2000 プロセッサ取扱説明書を参照のこと。使用前に VP 2000 スライド洗浄プロトコルを開く。

表2 VP 2000 スライド洗浄プロトコル

Step	Description	Basin	Reagent	Time	Temp
1	Wash Buffer II	2	Wash Buffer II	2 minutes	74°C
2	Air Dry	Drying station	----	30 seconds	Ambient

- 56) Basin 2 に 500 mL (250 mL × 2) の洗浄緩衝液 II (緑色の線が入ったボトル) を入れる。スライドの洗浄を開始する前に、溶液が設定温度の 74℃ に達していることを Run Screen で確認すること。当日の作業が終了した後は廃棄すること (最大 2 回まで使用可能)。
- 57) ハイブリダイゼーションしたスライドの枚数に応じて、必要な数のコプリンジャーに 50 mL の洗浄緩衝液 I (オレンジ色の線が入ったボトル) を入れる。コプリンジャー 1 個につき、8 枚までのスライドをセットすることができる。洗浄緩衝液 I は室温で使用する。当日の作業が終了した後は廃棄すること。
- 58) 洗浄緩衝液 II の温度が 74℃ に達したら、カバーガラスを動かさないように注意しながら、スライドからペーパーバンドを取り除き、スライドを室温の洗浄緩衝液 I に浸漬する。カバーガラスがスライドからはがれるよう、最低 2 分間立てたままにする。すべてのカバーガラスがはがれたことを確認し、もしはがれていない場合は、注意深くはがす。すべてのカバーガラスがはがれたら直ちに次のステップに進む。
- 59) VP 2000 スライドバスケットに検体およびコントロールスライドをセットして、VP 2000 のロボットアームに取り付ける。VP 2000 スライド洗浄プロトコルを開始する (ステップ 55、表 2)。スライドバスケットは 74℃ の洗浄緩衝液 II に 2 分間浸漬され、続いて室温で 30 秒間風乾される。
- 60) VP 2000 スライド洗浄プロトコルが完了したら、VP 2000 からスライドバスケットを取り外し、さらにスライドバスケットからスライドを取り外す。

16. 対比染色方法

- 61) スライドを室温で遮光し、風乾する。
- 62) DAPI I 対比染色液を室温で融解し、ボルテックスミキサーで混和した後、マイクロ遠心機で 2.3 秒間遠心する。10 μL の DAPI I 対比染色液を検体スライドのターゲットエリアに添加し、カバーガラスを被せ、最低 5 分間遮光して保存する。
- 63) 24 時間以内に蛍光顕微鏡で計数するか、または -20 ± 10℃ で保存する。

17. 保存方法 (オプション)

- スライドは、遮光して -20 ± 10℃ で保存する。
- この条件下では蛍光シグナルが大幅に減少することなく、スライドを DAPI I 対比染色した後、2 週間まで保存することができる。
- 注：観察する前にスライドを室温に戻す。

18. スライド観察

- 64) 適切な蛍光顕微鏡、適切なフィルターセットを使用してスライドを観察する (3. 顕微鏡および付属品 フィルターの項を参照のこと)。

2) シグナルの計数

19. 品質管理

- 65) 次の評価基準に従ってコントロールスライドのハイブリダイゼーション状態を確認する。

ハイブリダイゼーション状態の評価基準

- 核形態：DAPI 染色されたがん細胞の核の境界が全体的にはっきりと区別でき、核が完全な状態を保っていること。
 - バックグラウンド：バックグラウンドに、計数に影響する粒子がないこと。
注：核の外に蛍光性のかすみや粒子が見えることがあるが、核に重なっておらずシグナルの計数に影響しない場合は問題ない。
 - プローブシグナルの強度：明るく、識別可能で、判定しやすいシグナルであること。またシグナルは、円形か楕円形で明るく小さくまとまっていること。シグナルが過度に拡散していないこと。
 - ターゲットエリア内のほぼすべての核が、上記の基準を満たしていること。
 - ターゲットエリア内に、評価可能ながん細胞が 50 個以上存在していること。
- 66) コントロールスライドのハイブリダイゼーション状態が基準を満たしている場合は、検体スライドすべてに対してハイブリダイゼーション状態の確認 (ステップ 65) を行う。コントロールスライドのハイブリダイゼーション状態が基準を満たしていない場合は、【測定結果の判定法】(1) 結果の記録 コントロールスライドの項を参照のこと。

20. スライドの評価

- 67) シグナルを計数するエリアを決める。

- 必要に応じて、FISH スライドを観察する前に、H&E 染色スライドでターゲットエリアを確認する。
- 10 ～ 25 倍の対物レンズおよび DAPI シングルバンドパスフィルターを用いて、シグナルを計数するハイブリダイゼーションエリアの位置を決める。
- ネクロシス部分や核の境界があいまいな部分避ける。対比染色が不十分であるために核の境界があいまいな部分も避けること。

** 68) ターゲットエリアの評価

- 60 ～ 100 倍の対物レンズと指定されたフィルターを使用して、シグナルと組織形態の状態を確認する。焦点深度を合わせて、ターゲットとするシグナルのサイズ、形状やノイズ (ゴミ) を確認する。また、バックグラウンドが暗いこと、計数の妨げになるような強い蛍光がほばないことを確認する。
- ターゲットエリア全体を観察する。計数するエリアを決定するため、がん細胞内のシグナル分布を観察する (図 2 参照)。

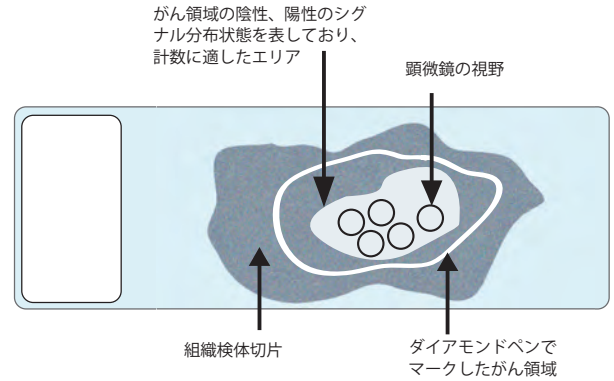
** 69) ターゲットエリア内の細胞を選択して計数する。

- 適切な腫瘍形態と核の分布をしている場所 (例：個々の核が区別できる) を計数エリアとして選択する。ターゲットエリア全体の陽性・陰性等のシグナル分布状態を表していることを確認する。

- 60 ～ 100 倍の対物レンズ、指定されたフィルターを使って、顕微鏡の視野内の細胞を分析する。計数に選択した各細胞のシグナルを計数し、記録する。
- 顕微鏡の視野を、次の計数エリアに移動する (図 2 参照)。
- がん細胞を 50 個計数するまで、上記を繰り返す。
- がん細胞を 50 個計数したら終了する。

注：細胞の周りで絞りを調整すると計数しやすくなる。

図 2 ターゲットエリアの評価



70) シグナル計数のルール

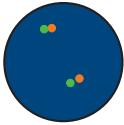
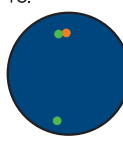
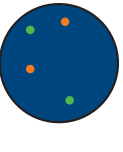
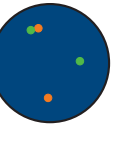
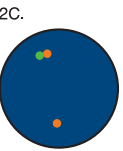
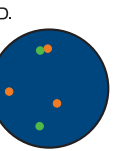
- フォーカスを上下させて、核内のシグナルをすべて確認すること。図 3 のガイドに従って、選択した間期がん細胞核の中のシグナルを計数すること。
- 次の細胞は陰性 (再配列なし) と判断する。
 - オレンジのシグナルとグリーンのシグナルが隣接している、あるいは融合している (グリーン / オレンジデュアルバンドパスフィルターを使用している場合はイエローのシグナルに見える)。オレンジのシグナルとグリーンのシグナルの距離がシグナルの直径の 2 倍未満の場合は、1 つの融合シグナルとみなす (図 4 パネル 1)。
 - グリーンシグナルのみで、対応するオレンジのシグナルが存在しない (図 4 パネル 1)。
- 次の細胞は陽性 (再配列) と判断する。
 - シグナルの直径の 2 倍以上離れているオレンジシグナルとグリーンシグナルのセットが、少なくとも 1 つある (図 4 パネル 2)。
 - 融合シグナルまたは分離シグナルの他に、単独のオレンジシグナル (対応するグリーンのシグナルが存在しない) がある (図 4 パネル 2)。

図 3 シグナル計数ガイド

● オレンジのシグナル
● グリーンのシグナル
● オレンジとグリーンのシグナルが隣接、または融合している

パネル 1： 典型的なシグナル例	説明
	A. オレンジのシグナル、グリーンのシグナルのそれぞれを単独のシグナルとする。
	B. DNA 繊維が乱れたり伸びたりしている場合にはシグナルが拡散して見えるが、単独のシグナルとする。
	C. 隣接したオレンジのシグナルとグリーンのシグナルの距離がシグナルの直径の 2 倍未満の場合、あるいはオレンジとグリーンのシグナルが重なっている場合は 1 つの融合シグナルとする。1 個の核の中に、複数の融合シグナルや分離シグナルが存在する場合もある。
	D. 拡散したシグナルが隣接していたり、繊維状のシグナルが結合している場合は 1 つの融合シグナルとする。1 個の核の中に、複数の融合シグナルや分離シグナルが存在する場合もある。
	E. 同じ色、同じサイズの 2 つのシグナルで、シグナル間の距離がシグナルの直径の 2 倍未満の場合は 1 つのシグナルとする (スプリットシグナルである)。

図4 シグナル計数ガイド：シグナルパターン

陰性シグナルパターン	
パネル 1：オレンジのシグナルとグリーンのシグナルが隣接または融合している	
1A. 	1B.  A, B. オレンジのシグナルとグリーンのシグナルが融合している例である。シグナルが重なっているか、隣接しているか、またはシグナル間の距離がシグナルの直径の 2 倍未満のいずれかである。 注：重なり合ったシグナルは、イエローのシグナルに見える場合がある。 C. 融合シグナル（重なり合っている、隣接しているまたはシグナル間の距離がシグナルの直径の 2 倍未満）の他に、単独のグリーンシグナル（対応するオレンジのシグナルが存在しない）が存在している。これは、オレンジの ALK プローブのターゲット領域が一部欠失していることを示しており、陰性とする。薬剤がターゲットとする領域は、オレンジプローブのターゲット領域内に位置しているためである。 注：オレンジのシグナルのみ、またはグリーンのシグナルのみしか存在しない核は、計数しないこと。
1C. 	
陽性シグナルパターン	
パネル 2：シグナルが分離している、またはグリーンシグナルが存在しない	
2A. 	2B.  核内に分離シグナルが存在する。シグナルの直径の 2 倍以上離れた分離シグナルは、再配列の存在を意味する。シグナル間の距離は、平均的なシグナルサイズで判断する。 A. 核内のシグナルは 2 組とも分離している。 B. 核内のシグナルは 1 組が融合し、もう 1 組が分離している。 C. 同じ核内に融合シグナルまたは分離シグナルに加えて、単独のオレンジシグナル（対応するグリーンのシグナルが存在しない）が存在する。 注：オレンジのシグナルのみ、またはグリーンのシグナルのみしか存在しない核は、計数しないこと。 D. 同じ核内に融合シグナル、分離シグナル、グリーンシグナルの欠失がある。
2C. 	
2D. 	

シグナル計数結果の記録

71) 核50個分のシグナルパターンを記録する。

- それぞれの核について、融合している（隣接している）シグナル数を記録する。
- それぞれの核について、単独のオレンジシグナルの数を記録する。
- それぞれの核について、単独のグリーンシグナルの数を記録する。
- 再配列や欠失を含んでいるか否かに関わらず、各細胞は一度だけ計数する。
- シグナルのない核やシグナルが一色しかない核（融合または分離したシグナルもなく）は計数しない。計数は、オレンジとグリーンのシグナルが少なくともそれぞれ1つ以上存在する核で行う。
- シグナルが弱い核や過度に拡散したシグナルを持つ核は計数しない。

【測定結果の判定法】

(1) 結果の記録

- それぞれの核を表3に従って分類する。

表3 陽性細胞または陰性細胞の分類

シグナルパターン (図4参照)	隣接または融合 シグナル数	単独のオレンジ シグナル数	単独のグリーン シグナル数	分類
1A, 1B	≥ 1	0	0	陰性細胞
1C	≥ 1	0	≥ 1	陰性細胞
2A, 2B, 2D	≥ 0	≥ 1	≥ 1	陽性細胞
2C	≥ 1	≥ 1	0	陽性細胞

- 陰性に分類された細胞数を集計する。
 - 陽性に分類された細胞数を集計する。
 - 細胞50個中、陽性細胞が5個未満（＜5/50または＜10%）のサンプルは陰性とみなす。
 - 細胞50個中、陽性細胞が25個を超える（＞25/50または＞50%）サンプルは陽性とみなす。
 - 細胞50個中、陽性細胞が5～25個（10～50%）のサンプルは判定保留とする。
- 注：判定保留のサンプルは、別の担当者が再度スライドを計数すべきである。
- 1回目と2回目の細胞数を足し、100個の細胞からパーセンテージを算出する（陽性細胞の平均%）。
 - 陽性細胞の平均%が15%未満（＜15/100）の場合、サンプルは陰性とみなす。
 - 陽性細胞の平均%が15%以上（≥15/100）の場合、サンプルは陽性とみなす。

無効な結果

検体が、【用法・用量（操作方法）】(3) 測定（操作）法 19.品質管理の項に示した基準を満たしていない場合は、その検体の測定は無効とすること。

- ターゲットエリアで計数されたがん細胞の核数が50個より少ない場合には、そのスライドの測定結果は無効である。
- スライドの測定結果が無効となった検体は、新しいスライドで測定をやり直すこと。

コントロールスライド

- 陰性および陽性プローブチェックコントロールスライドは、本キットの測定性能をモニターし、シグナル計数の精度を評価するために、検体スライドと同時に測定すること。コントロールスライドは、【用法・用量（操作方法）】(3) 測定（操作）法 2. NSCLC 患者の FFPE 組織検体のスライド調製 ベーキングステップ（ステップ9）から検体スライドと一緒に処理すること。
- コントロールスライドは各日のFISH検査の際に、また新しいロットのキットを使う際に使用する。
- コントロールスライドの基準範囲を表4に示す。

表4 コントロールスライドの基準範囲

陰性コントロールスライドⅡ	< 15% (陽性細胞 0～7個)
陽性コントロールスライド	20～62% (陽性細胞 10～31個)

- コントロールスライドが、基準を満たしていない場合、処理が適切に行われなかったか、またはキットのコンポーネントが適切に使用されなかった可能性がある。いずれかのコントロールスライドが基準を満たしていない場合は、測定結果を報告しないこと。新しいコントロールスライドおよび臨床検体スライドを使った再検査が必要である。

【その他】に、トラブルに対する推定原因と対策を示す。

(2) 正常カットオフ値

ある検体を陰性と判断するにあたり、許容される陽性シグナルパターン間期核の割合（%）の最大値を、正常カットオフ値と定義した。正常カットオフ値は、割合（%）で表される。これは、評価した基準の核数に対する、再配列（rearrangement）が認められたFISH陽性パターン実際の核数を意味している。NSCLC患者の組織検体の正常カットオフ値は、いずれの方法でも15%である。

(3) 判定上の注意

- 本キットの性能は、この添付文書に記載されている手順に従った場合のみ確立されている。この手順を変更すると、本キットの性能に影響を与える可能性がある。
- 測定結果の臨床的な解釈は、患者の医学的な履歴および他の診断試験の結果を考慮に入れてなされるべきである。
- 検体の品質や検体スライドの調製が不十分な場合、FISH測定結果は無効とすること。
- FISHのシグナル計数を行う測定者は、オレンジ、グリーン、イエローのシグナルを視覚的に識別することができなければならない。

***【臨床的意義】

本キットは、FISH法を用いて、ALK融合遺伝子を検出する体外診断用医薬品である。

*** 本キットは、未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）阻害剤（クリゾチニブ、アレクチニブ塩酸塩又はブリグチニブ）による治療の適用を判断することを目的として用いる。

(1) 臨床検体を用いた一致率試験

一致率の検討には、ファイザー社のフェーズⅡ臨床試験プロトコルA8081005に登録するために検査を行い、使用の承諾が得られたNSCLC患者のFFPE組織保存検体を用いた。本キット（IUO：Investigational Use Only）での測定は4施設で行った。

本キット陽性130検体と、入手可能な検体から無作為抽出した本キット陰性260検体を陽性・陰性の別を伏せた上で、対照品（LDT：Laboratory Developed Test）を用いて測定した。

患者および検体の背景を表5、6に示す。

表5 患者背景（1）

患者	カテゴリー	数	本キット陽性	本キット陰性
計		n	130	260
年齢	< 65	n (%)	112 (86.15)	97 (37.31)
	≥ 65	n (%)	18 (13.85)	54 (20.77)
	不明 ^b	n (%)	0 (0.0)	109 (41.92)
性別	男性	n (%)	64 (49.23)	75 (28.85)
	女性	n (%)	66 (50.77)	76 (29.23)
	不明 ^b	n (%)	0 (0.0)	109 (41.92)
人種	白人	n (%)	81 (62.31)	
	アジア人	n (%)	42 (32.31)	
	黒人	n (%)	4 (3.08)	
	その他 ^a	n (%)	3 (2.31)	
ECOGステータス	0	n (%)	36 (27.69)	
	1	n (%)	71 (54.62)	
	2	n (%)	23 (17.69)	
喫煙歴	過去にあり	n (%)	38 (29.23)	
	喫煙歴なし	n (%)	87 (66.92)	
	喫煙中	n (%)	5 (3.85)	

a その他：ヒスパニック系、ポルトガル系各1名と人種不明1名。

b これら本キット陰性患者の年齢と性別は不明であった。

表 6 患者/検体背景 (2)				
患者 / 検体	カテゴリー	数	本キット陽性	本キット陰性
計		n	130	260
疾患の広がり	局所進行性	n (%)	9 (6.92)	
	転移性	n (%)	121 (93.08)	
組織部位 ^a	脳	n (%)	2 (1.54)	3 (1.15)
	肝臓	n (%)	3 (2.31)	3 (1.15)
	肺	n (%)	18 (13.85)	47 (18.08)
	リンパ節	n (%)	10 (7.69)	8 (3.08)
	その他	n (%)	5 (3.85)	33 (12.69)
	不明	n (%)	92 (70.77)	166 (63.85)
組織的分類	腺房腺癌	n (%)	7 (5.38)	
	腺癌 NOS	n (%)	89 (68.46)	
	腺扁平上皮癌	n (%)	3 (2.31)	
	細気管支肺胞上皮癌	n (%)	7 (5.38)	
	大細胞癌	n (%)	1 (0.77)	
	その他	n (%)	4 (3.08)	
	乳頭腺癌	n (%)	6 (4.62)	
	印環細胞腺癌	n (%)	8 (6.15)	
	粘液産生充実型腺癌	n (%)	5 (3.85)	
転移性治療の数 ^b	1	n (%)	8 (6.15)	
	2	n (%)	37 (28.46)	
	3	n (%)	39 (30.00)	
	4	n (%)	19 (14.62)	
	5	n (%)	12 (9.23)	
	6	n (%)	6 (4.62)	
	7	n (%)	1 (0.77)	
	8	n (%)	2 (1.54)	
	10	n (%)	2 (1.54)	
	11	n (%)	1 (0.77)	
	不明	n (%)	3 (2.31)	

a これら 92 例の本キット陽性患者と 166 例の本キット陰性患者の組織情報は、不明であった。

b これら 3 例の患者の治療歴は不明であった。

試験を行った結果、23 名の患者の検体が対照品により無効（必要情報得られず）とされ、1 名の患者の検体が本キットにより無効とされた。

測定結果を表 7 に示す。また、本キットを基準にして算出した陽性一致率、陰性一致率を表 8 に示す。

表 7 対照品 vs 本キットの測定結果			
		本キット	
		陽性	陰性
対照品	陽性	108	13
	陰性	17	228

表 8 一致率			
パラメータ	検体数	割合 (%)	95%信頼区間 (%)
陽性一致率	108/125	86.40	(79.30、91.33)
陰性一致率	228/241	94.61	(90.99、96.82)

(2) 臨床試験情報

局所進行性または転移性の ALK 陽性非小細胞肺癌患者にクリゾチニブ単剤を用いて、多施設、単群で臨床試験が実施された（A8081005 および A8081001）。

国際共同試験（A8081001 試験）

ALK 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌患者 116 例（うち未治療患者 15 例）にクリゾチニブを単独投与した 15 例の日本人患者を含む非盲検、単群、多施設、国際共同試験（A8081001 試験）の成績を以下に示す。2010 年 11 月時点までの集計（クリゾチニブ 250 mg/1 日 2 回投与群）において、奏効率は 61%であり、Kaplan-Meier 法に基づき推定した予備的な奏効期間の中央値は、48.1 週であった。日本人患者における奏効率は 93%（14 例/15 例）であり、15 例中 10 例がまだ継続中ではあったが集計時点での奏効期間の範囲は、15.6 から 53.0 週であった。ALK 陽性の NSCLC 患者は、各治験施設で用いられた測定系で特定された。

A8081001 試験にて主に用いられた治験施設の測定系と Vysis ALK Break Apart FISH プローブキットの一致率を示すための試験が実施された。結果は、陽性一致率が 95%（117/123）、陰性一致率が 95%（228/241）および全体一致率が 95%（345/364）であった。（注：主に用いられた治験施設の測定系の再評価結果からの追加所見に基づく。）

有効性各項目	A8081001 試験 (116 例)
奏効率（95%信頼区間）	61%（52%、70%）
奏効までの期間の中央値（範囲）	7.7 週（4 週、40 週）
奏効期間の中央値 ^a （95% 信頼区間）	48.1 週（36 週、到達せず）
8 週時点における病勢コントロール率 ^b （95% 信頼区間）	79%（71%、86%）

a 予備的な推定値

b 8 週時点の腫瘍評価で RECIST 規準により確定した CR および PR、並びに SD が認められた患者の割合

国際共同試験（A8081005 試験）

A8081005 試験においては、Vysis ALK Break Apart FISH プローブキットが ALK 陽性の NSCLC 患者の特定に用いられた。ALK 融合遺伝子陽性の進行非小細胞肺癌患者 133 例にクリゾチニブを単独投与した 6 例の日本人患者を含む非盲検、単群、多施設、国際共同第 2 相試験（A8081005 試験）の 2011 年 3 月時点までの集計（クリゾチニブ 250 mg/1 日 2 回投与群）において、奏効率は 51%（95%信頼区間:42～60%）であった。

(3) アレクチニブ塩酸塩の国内第Ⅰ / Ⅱ相試験（AF-001JP 試験）において患者選択に用いられた FISH 法と本キットの同等性

アレクチニブ塩酸塩の ALK 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌（NSCLC）患者における有効性は、国内第Ⅰ / Ⅱ相試験（AF-001JP 試験）のステップ 2（phaseⅡ portion）で評価された。

国内第Ⅰ / Ⅱ相試験（AF-001JP 試験）の臨床成績

1 レジメン以上の化学療法歴を有する ALK 融合遺伝子陽性の進行・再発非小細胞肺癌患者を対象とした第Ⅰ / Ⅱ相試験の第Ⅱ相部分（46 例[※]）でアレクチニブ塩酸塩を 1 回 300 mg、1 日 2 回連日経口投与された患者における奏効率は 93.5%（95%信頼区間：82.1～98.6%）であった。

※ 免疫組織化学染色（IHC）法および蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）法を用いて、または逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を用いて検査された（IHC および FISH 法陽性 39 例を含む）。FISH 法は研究機関で設定された検査法が使用された。以下のコンコーダンス試験において、当該検査法と本キットの同等性が確認された。

コンコーダンス試験

AF-001JP 試験の患者選択に用いた研究機関で設定された FISH 法を対照品として、使用の承諾が得られた腫瘍検体（229 検体）を用いてコンコーダンス試験をレトロスペクティブで実施した。

なお、本コンコーダンス試験で用いた検体は、AF-001JP 試験で用いた検体とは異なる。

AF-001JP 試験と本コンコーダンス試験の患者背景の比較を次の表に示す。

表 9 両試験の患者背景の比較					
患者背景		FISH コンコーダンス 試験	AF-001JP (ALK 検査 実施例)	AF-001JP 第Ⅱ相試験 部分（登録例)	AF-001JP (IHC 陰性 FISH 実施例)
組織型	非小細胞肺癌	227 (99%)	436 (100%)	46 (100%)	52 (100%)
	小細胞肺癌	2 (1%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	n	229	436	46	52
性別	男性	99 (43%)	205 (54%)	22 (47.8%)	26 (50%)
	女性	130 (57%)	178 (46%)	24 (52.2%)	26 (50%)
	n	229	383 ^{※1}	46	52
年齢	平均	63	55	50	58
	標準偏差	11	13	12	11
	中央値	64	57	48	62
	最小～最大	25～85	21～85	26～75	37～78
	n	229	384 ^{※2}	46	52

※ 1 スクリーニング全例数 436 例のうち、性別データがある 383 例を集計対象とした。

※ 2 スクリーニング全例数 436 例のうち、年齢データがある 384 例を集計対象とした。

対照品と本キットの測定結果を表 10 に示す。

表10 対照品 vs 本キットの測定結果			
		本キット	
		陽性	陰性
対照品	陽性	41	0
	陰性	0	188

陽性一致率：100%（41/41）

陰性一致率：100%（188/188）

全体一致率：100%（229/229）

*** (4) ブリグチニブ第Ⅲ相国際共同試験（AP26113-13-301 試験）

ALK 阻害剤による治療歴のない ALK 融合遺伝子陽性非小細胞肺癌患者（ステージⅢ B-IV）275 例を対象に、ブリグチニブとクリゾチニブの効果を比較する非盲検無作為化の国際共同試験を実施した。主要評価項目は、RECIST 第 1.1 版に基づく盲検下独立画像評価委員会によって判定される無増悪生存期間とした。第Ⅲ相試験における 275 例の有効性データを示す（表 11）（2018 年 2 月 19 日データカットオフ）。

表 11 ブリグチニブ第Ⅲ相国際共同試験（AP26113-13-301 試験）における有効性（2018 年 2 月 19 日データカットオフ）

ブリグチニブ群(N=137) クリゾチニブ群(N=138)		
無増悪生存期間中央値（月）	NE	9.8
〔95% 信頼区間〕	〔NE、NE〕	〔9.0、12.9〕
ハザード比 ^{※1} 〔95% 信頼区間〕	0.49〔0.32、0.74〕	
p 値（両側） ^{※2}	p = 0.0006	

NE：推定不能（2018 年 2 月 19 日データカットオフでは無増悪生存期間中央値が未達のため）

※ 1：層別 Cox 比例ハザードモデル、※ 2：層別 log-lank 検定

【性 能】

(1) 性能試験

リンパ球、ホルマリン固定パラフィン包埋組織又はブロープチェック ALK 陰性コントロールスライドのいずれかを検体として用い、【用法・用量 (操作方法)】(3) 測定 (操作) 法 により染色した染色標本を蛍光顕微鏡にて観察する。このとき、1) ブロープシグナル強度 2) バックグラウンド 3) 交差反応 (クロスハイブリダイゼーション) 4) 特異性 5) 総合評価の 5 つの項目について、それぞれ 5 段階評価 (性能評価判定法) で判定し、点数を付ける。5 つの評価項目すべての評価点数が 3 以上であることを性能適とする。

なお、本試験は 3 スライドで実施し、2 スライド以上が性能適の場合、適合とする。(適合率：67%以上)

性能評価判定表

1. リンパ球を検体として用いた場合

評価項目	点数	評価基準
1) ブロープシグナル強度		所定のフィルターセットを用いた標的ハイブリダイゼーションにおいて、LSI/CEP シグナルは、明るく、区別可能で、使用者が容易に核及び染色体を評価可能な状態が理想的である。
	1	ハイブリダイゼーションの失敗により、対象領域のどの核 (及び、又は分裂中期) においても検出可能なシグナルが対象領域にない。
	2	対象領域の細胞の 25% 以上において、シグナルが見られない。又はシグナルの強度が弱すぎて、少なくとも 80% の核 / 分裂中期で評価できない。
	3	対象領域の少なくとも 80% の核 / 分裂中期において、判別可能な (明確に区別できる) シグナルが存在を示す。
	4	対象領域の少なくとも 80% の核 / 分裂中期において、明るく、明確に区別できるシグナルが存在する。
	5	対象領域の少なくとも 90% の核 / 分裂中期において、非常に明るく、明確に区別できるシグナルが存在する。

評価項目	点数	評価基準
2) バックグラウンド		対象領域において、蛍光の粒子又はかすみがなく、暗いか又は黒が理想的なスライドのバックグラウンドである。
	1	バックグラウンドに蛍光粒子又は破片が多数あり、対象領域を覆っている。このレベルでのバックグラウンドは LSI/CEP の正確な判読の干渉となる。かすみ、又は蛍光の光が存在する場合もある。かすみ、又は光のレベルは、対象領域の全てを覆い、ブロープの判読が不可能である。
	2	バックグラウンドに様々なサイズの蛍光粒子が多数あるが、対象領域の全てを覆ってはいない。例) 対象領域の中に、バックグラウンドのない領域が存在する。エリアにおいて、粒子が存在する場合、正確な判読を妨げている。かすみ、又は蛍光の光が対象領域の 50% 以上に存在し、かすみ又は光のレベルは、ブロープシグナルの判読又は視覚化が困難である。
	3	バックグラウンドに蛍光粒子は存在するが、ブロープのシグナルと比較して、小さく、蛍光強度が弱い。蛍光粒子はとても低いレベル及びとても弱い強度で対象領域の全て又は、散発的に対象領域に分布している。このレベルのバックグラウンドは判読の妨げにならず、評価を妨げず、問題にならない。かすみ又は蛍光の光も存在する場合もあるが、このレベルにおけるかすみ又は光はブロープの判読に影響を与えない程度である。
	4	時折、蛍光の小さい点又は粒子が、対象領域全体に又は対象領域の特定のエリアに低い密度でのみ存在する。粒子の存在はブロープシグナルの判読の妨げにならない。かすみ又は光は存在しない、又は対象領域においてとても低いレベルであり、対象の評価において、可視性を減弱させて、評価の妨げになることはない。
	5	対象領域において、目に見える粒子又はかすみはない。対象領域のバックグラウンドは黒である。

評価項目	点数	評価基準
3) 交差反応 (クロスハイブリダイゼーション)		LSI/CEP ブロープは、特定の染色体一対の特定の染色体領域に結合し、蛍光を発する。交差反応は、対象領域の分裂中期核で評価可能である。もしブロープが結合し、それが染色体領域である場合 (通常の検体においては、分裂中期の染色体で各色につき、一つの明確なシグナルがあるべきである)、これは交差反応によるものであり、この特性について、3 以下とすべきである。交差反応がない場合は、5 とする。
	1	対象領域の分裂中期の 80% 以上のエリアで交差反応のとても明るく、明瞭なシグナルが観察される。このレベルの交差反応は、ハイブリダイゼーションの失敗である。
	2	対象領域の分裂中期の 25% 以上のエリアで明るいシグナルの交差反応が、一つ又はそれ以上の染色体、染色体領域で検出される。このレベルの交差反応は、ブロープシグナルの正確な判読を妨げ、失敗の原因になる。
	3	対象領域の分裂中期の 10% 未満の染色体又は染色体対で、弱くわずかに検出可能な交差反応が観察される。交差反応の強度はわずかに検出可能な程度で、ブロープシグナルの判読の妨げとならず、失敗の原因とはならない。
	4	とても弱くわずかに検出可能な交差反応が対象領域の、1 個の細胞のみで観察される。このレベルの交差反応は失敗の原因にならない。
	5	交差反応は全く観察されない。

評価項目	点数	評価基準
4) 特異性		LSI/CEP ブロープシグナルは標的染色体領域のみを光らせ、他の染色体や細胞膜の成分にはハイブリダイゼーションしない。正常分裂中期 (メタフェーズ) においては、4 つの染色分体中存在する 4 種類の明確なシグナルが標的の座 / 領域に局在する。核と分裂中期の両方で非特異性が観察される場合があり、LSI シグナルよりも小さいか、同等もしくは強い場合がある。もし非特異性が存在する場合、ブロープの増幅と混同されないことが必須である。
	1	対象領域の全ての核又は分裂中期で非特異的蛍光粒子のサイズ又は均一な蛍光染色が観察される。これらの粒子のサイズが存在又は均一な染色の強度により正確な計数、又は判読は不可能である。このレベルの非特異性は失敗の原因となる。
	2	対象領域における全ての核又は分裂中期にあらゆるサイズの非特異的蛍光粒子又は均一な蛍光染色が存在する。核 / 分裂中期の 75% 以上で観察される重大性のレベルと粒子サイズ又は均一な染色の強度は、容易なシグナルの可視化や正確な計数の判読を妨げる。このレベルにおける非特異性は失敗の原因となる。
	3	対象領域の 75% 以下の核 / 分裂中期で非特異的蛍光粒子 (特定のブロープシグナルよりも小さいシグナル) の存在、又は均一な蛍光染色がある。頻度、重大度及び粒子のサイズ又は均一な蛍光染色の強度のレベルは正確な計数又はシグナルの判読を妨害しない。たとえ核の形態が見えるほどの非特異的なシグナルが存在していても、このシグナルは十分拡散され、シグナルの判読を妨害しない。このレベルの非特異性は失敗の原因にならない。
	4	LSI/CEP のシグナルサイズよりも小さく、対象領域の核の 10% 以下で非特異的蛍光粒子が存在する。このレベルの非特異的粒子の存在、又は均一な染色は正確な計数、視覚化又はシグナルの観察に妨げにならない。このレベルの非特異性は失敗の原因にはならない。
	5	核や分裂中期にあらゆるサイズの非特異的蛍光粒子が存在しない。

評価項目	点数	評価基準
5) 総合評価		総合評点は対象ハイブリダイゼーションの総合的印象を示す。総合評価点数はブロープの性能の受入について他の項目の判定結果も考慮にいれる。
	1	対象が判読できないことを示す。他の 4 つの評価項目のうちの一つ以上で、評価点数 1 である。
	2	対象が読みづらいことを示す。他の 4 つの評価項目のうちの一つ以上で、評価点数 2 である。
	3	観察において、問題なく対象が判読可能であることを示す。他の 4 つの評価項目が 3 以上の評点である。
	4	対象が容易に判読可能であることを示す。他の 4 つの評価項目が 4 以上の評点でなければならない。
	5	優れた判読性を示す。他の 4 つの評価項目は最低でも 4 であり、大多数は 5 の評点である。

2. ホルマリン固定パラフィン包埋組織又はプローブチェック ALK 陰性コントロールスライドを検体として用いた場合

評価項目	点数	評価基準
1) プローブシグナル強度		所定のフィルターセットを用いた標的ハイブリダイゼーションにおいて、LSI/CEP シグナルは、明るく、区別可能で、使用者が容易に間期核を評価可能な状態が理想的である。
	1	ハイブリダイゼーションの失敗により、対象領域内で解析されたどの細胞においても検出可能なシグナルが対象領域にない。
	2	対象領域内で解析された細胞の 25% 以上において、シグナルが見られない。又はシグナルの強度が弱すぎて、解析された細胞の少なくとも 80% で評価できない。
	3	対象領域内で解析された細胞の少なくとも 80% において、判別可能な（明確に区別できる）シグナルが存在を示す。
	4	対象領域内で解析された細胞の少なくとも 80% において、明るく、明確に区別できるシグナルが存在する。
	5	対象領域内で解析された細胞の少なくとも 90% において、非常に明るく、明確に区別できるシグナルが存在する。

評価項目	点数	評価基準
2) バックグラウンド		対象領域において、蛍光の粒子又はかすみがなく、暗いか又は黒が理想的なスライドのバックグラウンドである。
	1	バックグラウンドに蛍光粒子又は破片が多数あり、対象領域を覆っている。このレベルでのバックグラウンドは LSI/CEP の正確な判読の干渉となる。かすみ、又は蛍光の光が存在する場合もある。かすみ、又は光のレベルは、対象領域の全てを覆い、プローブの判読が不可能である。
	2	バックグラウンドに様々なサイズの蛍光粒子が多数あるが、対象領域の全てを覆ってはいない。例）対象領域の中に、バックグラウンドのない領域が存在する。エリアにおいて、粒子が存在する場合、正確な判読を妨げている。かすみ、又は蛍光の光が対象領域の 50% 以上に存在し、かすみ又は光のレベルは、プローブシグナルの判読又は視覚化が困難である。
	3	バックグラウンドに蛍光粒子は存在するが、プローブのシグナルと比較して、小さく、蛍光強度が弱い。蛍光粒子はとても低いレベル及びとても弱い強度で対象領域の全て又は、散発的に対象領域に分布している。このレベルのバックグラウンドは判読の妨げにならず、評価を妨げず、問題にならない。かすみ又は蛍光の光も存在する場合もあるが、このレベルにおけるかすみ又は光はプローブの判読に影響を与えない程度である。
	4	時折、蛍光の小さい点又は粒子が、対象領域全体に又は対象領域の特定のエリアに低い密度でのみ存在する。粒子の存在はプローブシグナルの判読の妨げにならない。かすみ又は光は存在しない、又は対象領域においてとても低いレベルであり、対象の評価において、可視性を減弱させて、評価の妨げになることはない。
	5	対象領域において、目に見える粒子又はかすみはない。対象領域のバックグラウンドは黒である。

評価項目	点数	評価基準
3) 交差反応（クロスハイブリダイゼーション）		パラフィン包埋サンプルは分裂中期を含まないことが予想されるため、交差反応は適切な染色体の染色によって査定することができない。それに代わり交差反応を、ほとんどの間期核において外部シグナルがおおよそ同じ数だけ確認されるかどうかによる特定（通常対象シグナルよりも弱い）により行う。検体の切断時の核の切捨てにより、外部シグナル数は核間で変化する。
	1	核内に明確な交差反応が認められる。このレベルの交差反応はハイブリダイゼーションの失敗である。
	2	対象領域内の解析された全ての核の 50% 以上において、交差反応の明瞭なシグナルが認められる。このレベルの交差反応はハイブリダイゼーションの失敗である。
	3	核内に弱い交差反応が認められ、対象領域内の解析された核の 25% 以下で観察される。交差反応のシグナル強度はほとんど目に見えず、プローブの観察やシグナルの計数の妨げにならない。このレベルの交差反応はハイブリダイゼーションの失敗ではない。
	4	核内にとても弱い交差ハイブリダイゼーションが認められる。このレベルの交差反応はプローブの判読を妨げず、ハイブリダイゼーションの失敗ではない。
	5	交差反応は全く観察されない。

評価項目	点数	評価基準
4) 特異性		パラフィン包埋検体は分裂中期を含むことが想定されないため、特異性は間期核の染色を査定しなければならない。非特異的染色は核を均一に染色している場合があり、とても弱い染色で特定の CEP/LSI の特定の際に妨げにならないものから、明るい染色で特定のシグナルを覆い隠すものまでの範囲がある。非特異的蛍光粒子が存在する場合もあるが、核間での数の変動が大きい（外部シグナルに類似した数について、交差反応を示す）。
	1	対象領域内の解析された全ての細胞で非特異的蛍光粒子のサイズ又は均一な蛍光染色が観察される。これらの粒子のサイズの存在又は均一な染色の強度により正確な計数、又は判読は不可能である。このレベルの非特異性は失敗の原因となる。
	2	対象領域内の解析された全ての細胞にあらゆるサイズの非特異的蛍光粒子又は均一な蛍光染色が存在する。観察した細胞の 50% 以上で、頻度、強度及び粒子のサイズ又は均一な染色の強度から、LSI/CEP シグナルの視覚化、正確な判読や計数を妨げる。このレベルにおける非特異性は失敗の原因となる。
	3	対象領域内の 75% 以下の細胞で弱い非特異的蛍光粒子（特定のプローブシグナルよりも小さく十分に弱いシグナル）の存在、又は均一な蛍光染色がある。頻度、重大度及び粒子のサイズは LSI/CEP シグナル正確なシグナルの判読を妨害しない。均一な又は粒子の粗い核の染色による非特異性の結果、核の形態が確認されるかもしれないが、それは弱く、シグナルの判読の妨げにならない。このレベルの非特異性は失敗の原因にはならない。
	4	LSI/CEP のシグナルサイズよりも小さく、対象領域内の細胞の 25% 以下で非特異的蛍光粒子が存在する。このレベルの非特異的粒子又は均一な染色強度は正確な可視化又は LSI/CEP シグナルの判読の妨げにならない。このレベルの非特異性は失敗の原因にはならない。
	5	解析された細胞にあらゆるサイズの非特異的蛍光粒子が存在しない。

評価項目	点数	評価基準
5) 総合評価		総合評価は対象ハイブリダイゼーションの総合的印象を示す。総合評価点数はプローブの性能の受入について他の項目の判定結果も考慮に入れる。
	1	対象が判読できないことを示す。他の 4 つの評価項目のうちの一つ以上で、評価点数 1 である。
	2	対象が読みづらいことを示す。他の 4 つの評価項目のうちの一つ以上で、評価点数 2 である。
	3	観察において、問題なく対象が判読可能であることを示す。他の 4 つの評価項目が 3 以上の評点である。
	4	対象が容易に判読可能であることを示す。他の 4 つの評価項目が 4 以上の評点でなければならない。
	5	優れた判読性を示す。他の 4 つの評価項目は最低でも 4 であり、大多数は 5 の評点である。

(2) 染色体分裂中期におけるプローブの局在

本キットのプローブのハイブリダイゼーション位置を、inverted DAPI chromosome banding technique を用いて染色した培養リンパ球スライドの分裂中期染色体（計 8 個）について評価した。

本キットの構成品である、Vysis LSI 3'-ALK スペクトラムオレンジプローブおよび Vysis LSI 5'-ALK スペクトラムグリーンプローブは、計 8 個の分裂中期染色体で目的とする遺伝子座（2p23）のみにハイブリダイズすることが示された。

(3) 分析感度、分析特異性

分析感度は、期待される正常のシグナルパターンを示す染色体ターゲットの割合（%）とした。分析特異性は、目的とする遺伝子座のみにハイブリダイズするシグナルの割合（%）とした。

Vysis LSI 3'-ALK スペクトラムオレンジプローブと Vysis LSI 5'-ALK スペクトラムグリーンプローブの分析感度と分析特異性を、5 名のドナーによる核型正常検体の末梢血培養細胞 6 例の分裂中期染色体を用いて評価した（スライドロットとして 6 ロットである）。

分析感度の算出では、Vysis LSI 3'-ALK スペクトラムオレンジプローブと Vysis LSI 5'-ALK スペクトラムグリーンプローブのシグナルを各分裂中期染色体について計数した（正常:2 シグナル）。各プローブについて合計 240 のシグナルが期待された（1 細胞あたり 2 シグナル×分裂中期染色体 20 例×スライドロット 6 ロット）。表 12 を参照のこと。

分析特異性の算出では、期待されるシグナルパターンを示している分裂中期染色体数を計数した。合計 120 例の分裂中期染色体を評価した（分裂中期染色体 20 例×スライドロット 6 ロット）。表 13 を参照のこと。

各プローブの、分析感度は 100.0%（240/240）（95%信頼区間：98.5 ～ 100.0）、分析特異性は 100%（120/120）（95%信頼区間：97.0 ～ 100.0）と算出された。

表 12 分析感度				
プローブ	分裂中期染色体のシグナル数		分析感度	
	計数されたシグナル数	期待されるシグナル数	算出値 (%)	95%信頼区間
Vysis LSI 3'-ALK スペクトラムオレンジ	240	240	100.0	(98.5, 100.0)
Vysis LSI 5'-ALK スペクトラムグリーン	240	240	100.0	(98.5, 100.0)

表 13 分析特異性					
プローブ	分裂中期染色体数			特異性	
	非特異反応数	特異反応数	計	算出値 (%)	95%信頼区間
Vysis LSI 3'-ALK スペクトラムオレンジ	0	120	120	100.0	(97.0, 100.0)
Vysis LSI 5'-ALK スペクトラムグリーン	0	120	120	100.0	(97.0, 100.0)

(4) 微生物試験

本キットは、微生物学的な制御が不可能な製品に対する、米国の Guideline for the Manufacture of In Vitro Diagnostic Products（体外診断用医薬品製造業者のためのガイドライン）1/10/1994 の要求事項を満たしている。いずれの構成試薬においても指定された微生物の増殖は認められず、また実際には微生物を添加して継代培養しても増殖が認められないことから、微生物は死滅すると考えられる。さらに、通常の試薬の品質試験の手順に従って、すべての構成試薬に特定の微生物を添加して 35～37℃で 3 日間インキュベーションした後も、試薬の性能に問題はなかった。

(5) コントロールスライドにおける再現性（マニュアルスライド処理）

コントロールスライドの再現性を、陰性コントロール、陽性コントロールそれぞれ 3 ロットを用いて評価した。各ロットについて、23 日間以上の期間に渡る連続していない 5 日間に、3 名の測定者が測定を行い、合計 90 の測定結果を得た（3 ロット×5 回×3 名の測定者＝45 の結果 / 各コントロールスライド）。

それぞれのコントロールスライドについて各測定者が、ターゲットの融合シグナル、単独のオレンジシグナル、単独のグリーンシグナル数を計数することにより、50 個の核のシグナルを評価した。

有意水準を 0.05 とした Fisher-Freeman-Halton 検定では、判定結果において、3 名の測定者間に統計的に有意な差は認められなかった（表 14、15）。この結果、陰性コントロールと陽性コントロールの再現性は良好であることが示された。この検討では、すべてのスライドが規格を満たしていた。

表 14 陰性コントロールスライドにおける再現性

測定者	測定数		
	ALK 再配列規格内	ALK 再配列規格外	計
1	15	0	15
2	15	0	15
3	15	0	15

Fisher-Freeman-Halton 検定、P 値＝ 1.00

表 15 陽性コントロールスライドにおける再現性

測定者	測定数		
	ALK 再配列規格内	ALK 再配列規格外	計
1	15	0	15
2	15	0	15
3	15	0	15

Fisher-Freeman-Halton 検定、P 値＝ 1.00

(6) コントロールスライドにおける再現性（VP 2000 スライド処理）

陰性および陽性コントロールスライドの再現性を社内の 3 施設で測定を行い評価した。1 回の測定で、2 枚の陰性コントロールスライド、2 枚の陽性コントロールスライドを測定した。各コントロールスライドについて、3 施設それぞれで、20 日間以上に渡る試験期間中連続していない 5 日間に 5 回、スライド処理を VP 2000 プロセッサを使用して行った後、シグナルを計数した。各施設で 20 枚のコントロールスライドが測定され、全施設では 60 枚分のコントロールスライドを測定した。

コントロールスライドが基準を満たす割合 (%) は 100.00% (60/60) (95%信頼区間: 93.98～100.00) と算出された。結果を表 16 に示す。

表 16 基準を満たしたコントロールスライドの結果（VP 2000 スライド処理）

コントロールスライド数	基準を満たしたスライド数	基準を満たしたスライドの割合 (%)	95% 信頼区間
60	60	100.00	(93.98, 100.00)

(7) 組織における再現性（マニュアルスライド処理）

組織における再現性を、肺がん患者の FFPE 切片を用いて評価した。検討は、20 個の NSCLC 患者の FFPE 検体ブロックから作製した、6 枚の連続切片（5 μm）を用いて行った。これらのパネルは、細胞の 50%超で ALK の再配列が認められる陽性検体 3 例、ALK の再配列が細胞の 10～50%で認められる検体 3 例、ALK の再配列が細胞 10%未満である陰性検体 14 例から成っていた。各検体について 2 枚のスライドを作成し、各スライドを 2 名の測定者が測定した後、測定者間再現性（表 17）とスライド間再現性（表 18）を評価した。

P 値を 1.00 とした Fisher-Freeman-Halton 検定において、本キットの測定者間再現性およびスライド間再現性が良好であることが示された。

表 17 測定者間再現性

測定者	パネル数		
	陰性	陽性	計
1	14	6	20
2	14	6	20
3	14	6	20

Fisher-Freeman-Halton 検定、P 値＝ 1.00

表 18 スライド間再現性

スライド	パネル数		
	陰性	陽性	計
1	14	6	20
2	15	5	20
3	14	6	20

Fisher-Freeman-Halton 検定、P 値＝ 1.00

(8) 外部施設における再現性（マニュアルスライド処理）

本キットの再現性を、外部の 3 施設で評価した。使用した 12 例の検体パネル（6 検体、各 2 スライド）はコード化およびランダム化されており、陽性率が異なる ALK 陽性 NSCLC 患者の FFPE 組織検体 4 例（パネル 1、2、3、6）と ALK 陰性 NSCLC 患者の FFPE 組織検体 2 例（パネル 4、5）から成る。

本キット 3 ロットを用いて評価した。1 回の測定で、陰性コントロールスライド、陽性コントロールスライド、各パネルを各 1 回測定した。各 3 施設は試薬 3 ロットのうち 2 ロットを使用してパネルの測定を行った。各 3 施設の 2 名の測定者は、コントロールスライドと 6 例の検体パネルを、20 日間の試験期間中連続していない 5 日間に渡り、1 日 1 回、各試薬ロットで測定した。各施設で 120 枚の検体スライド、合計 360 枚の検体スライドを評価した。これにより各施設で 240 枚のスライドが計数され、少なくとも 720 枚分の計数結果を得た。各施設で 40 枚のコントロールスライド（陽性コントロールスライド 20 枚、陰性コントロールスライド 20 枚）合計 120 枚を評価した。これにより各施設で 80 枚のスライドが計数され、少なくとも 240 枚分の計数結果を得た。各パネルスライドとコントロールスライドは、2 名の測定者が 50 個の核のシグナルパターンを計数した。

全体の kappa 係数は 0.92 であった（95%信頼区間 0.85～0.98）。Z-スコアは 27.08 と、1.96 を超えており、有意水準 0.05 とした場合、kappa 係数はゼロと有意に差があった。これらの結果を表 19 に示す。全測定者による全体一致率は 97.64%（95%信頼区間: 96.25～98.52%）であった。陽性一致率は 96.46%（95%信頼区間: 94.40～97.78%）、陰性一致率は 100.00%（95%信頼区間: 98.42～100.00%）であった。結果を表 20 に示す。施設間再現性の kappa 係数 0.83～0.96、ロット間の kappa 係数は 0.86～0.96 であった。これらの結果を表 21、22 に示す。

表 19 総再現性（マニュアルスライド処理）

パネル	施設間 / ロット間 / 測定間 / 測定者間スライド数		
	陰性	陽性	計
1	1	59	60
2	0	60	60
3	2	58	60
4	60	0	60
5	60	0	60
6	4	56	60

kappa 係数＝ 0.92（95%信頼区間：0.85～0.98）

表 20 全測定者による結果と期待される結果との一致率（マニュアルスライド処理）

測定者による結果	期待される結果		
	陽性	陰性	計
陽性	463	0	463
陰性	17	240	257
計	480	240	720

全体一致率＝ 97.64%（95%信頼区間：96.25～98.52%）

陽性一致率＝ 96.46%（95%信頼区間：94.40～97.78%）

陰性一致率＝ 100.00%（95%信頼区間：98.42～100.00%）

表 21 施設間再現性（マニュアルスライド処理）

施設	パネル	ロット間 / 測定間 / 測定者間スライド数		カッパ解析			
		陰性	陽性	カッパ 係数	95% 信頼区間	標準誤差	Z-スコア
1	1	0	20	0.96	(0.83, 1.00)	0.068	14.21
	2	0	20				
	3	0	20				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	1	19				
2	1	0	20	0.96	(0.83, 1.00)	0.068	14.21
	2	0	20				
	3	0	20				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	1	19				
3	1	1	19	0.83	(0.72, 0.94)	0.056	14.90
	2	0	20				
	3	2	18				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	2	18				

表22 ロット間再現性（マニュアルスライド処理）

ロット	パネル	施設間 / 測定間 / 測定者間スライド数		カッパ解析			
		陰性	陽性	カッパ 係数	95% 信頼区間	標準誤差	Z-スコア
1	1	0	20	0.86	(0.75, 0.98)	0.059	14.75
	2	0	20				
	3	2	18				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	2	18				
2	1	0	20	0.96	(0.83, 1.00)	0.068	14.21
	2	0	20				
	3	0	20				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	1	19				
3	1	1	19	0.93	(0.80, 1.00)	0.065	14.34
	2	0	20				
	3	0	20				
	4	20	0				
	5	20	0				
	6	1	19				

(9) 外部施設における再現性（VP 2000 スライド処理）

スライド処理を VP 2000 プロセッサを使用して行った場合の本キットの再現性を、外部の 3 施設で評価した。使用した 18 例の検体パネル（6 検体、各 3 スライド）はコード化およびランダム化されており、陽性率の異なる ALK 陽性 NSCLC 患者の FFPE 組織検体 4 例（パネル 1、2、3、6）と ALK 陰性 NSCLC 患者の FFPE 組織検体 2 例（パネル 4、5）から成る。

各陰性コントロール、陽性コントロールについては 1 重測定、各パネルについては 3 重測定した。各 3 施設の測定者は、コントロールスライドと 6 例の検体パネルを 20 日間以上の試験期間中連続していない 5 日間に、1 日 1 回 3 重測定した。測定日ごとに、各施設 1 名の測定者が、VP 2000 プロセッサを使用して処理した検体およびコントロールスライドを計数した。各施設、別の測定者でも検体およびコントロールスライドを計数した。各施設で 90 枚の検体スライド、合計 270 枚を評価した。

全体のカッパ係数は 0.94（95% 信頼区間：0.85 ～ 1.00）であった。Z-スコアは 21.86 と、1.96 を超えており、有意水準 0.05 とした場合、カッパ係数はゼロと有意に差があった。結果を表 23 に示す。

全測定者による全体一致率は 99.25%（95% 信頼区間：97.32 ～ 99.80%）であった。陽性一致率は 98.88%（95% 信頼区間：96.00 ～ 99.69%）、陰性一致率は 100.00%（95% 信頼区間：95.91 ～ 100.00%）であった。結果を表 24 に示す。

表 23 VP 2000 スライド処理の再現性

パネル	スライド数（各施設、各測定日合計）		
	陰性	陽性	計
1	0	45	45
2	0	45	45
3	0	44	44 ^a
4	45	0	45
5	45	0	45
6	2	42	44 ^a

カッパ係数＝0.94（95% 信頼区間：0.85 ～ 1.00）

a 1 検体は、無効な結果であった。

表 24 VP 2000 スライド処理の結果と期待される結果との一致率

結果	期待される結果		
	陽性	陰性	計
陽性	176	0	176
陰性	2	90	92
計	178	90	268 ^a
全体一致率＝ 99.25%（95% 信頼区間：97.32 ～ 99.80%）			
陽性一致率＝ 98.88%（95% 信頼区間：96.00 ～ 99.69%）			
陰性一致率＝ 100.00%（95% 信頼区間：95.91 ～ 100.00%）			

a 2 検体は、無効な結果であった。

(10) VP 2000 プレトリートメントキットの再現性

VP 2000 プレトリートメントキットのロット間再現性を、陽性度の異なる ALK 陽性 NSCLC 患者の FFPE 組織検体 2 例と ALK 陰性 NSCLC 患者の FFPE 組織検体 1 例からなる肺がん患者の FFPE 切片を測定して社内評価した。

評価では、3 ロットの VP 2000 プレトリートメントキットと VP 2000 プロセッサを用いて、1 日 1 ロットずつ 3 日間測定した。各ロットごとに、6 例の盲検化スライド（パネル 3 例を 2 回測定）を別々の測定者で各 2 回評価し、計 36 の測定結果を得た。

ロット間差を含む期待される結果との全体一致率は、100.00%（95% 信頼区間：90.26 ～ 100.00%）、陽性一致率は、100.00%（95% 信頼区間：85.75 ～ 100.00%）、陰性一致率は、100.00%（95% 信頼区間：73.54 ～ 100.00%）であった。

結果を表 25 に示す。

表 25 VP 2000 プレトリートメントキットの期待される結果との全体一致率（ロット間差 / パネル間差）

結果	期待される結果		
	陽性	陰性	計
陽性	24	0	24
陰性	0	12	12
計	24	12	36

一致率	値（%）	比率	95.00% 信頼区間（%）
全体一致率	100.00	36/36	(90.26, 100.00)
陽性一致率	100.00	24/24	(85.75, 100.00)
陰性一致率	100.00	12/12	(73.54, 100.00)

(11) マニュアルスライド処理と VP 2000 スライド処理との一致率

NSCLC 患者の FFPE 組織検体のスライドの処理をマニュアル操作で行った場合と、VP 2000 プロセッサを使用して行った場合の測定結果の一致率を外部の 3 施設で評価した。評価では、マニュアルスライド処理の結果に対する VP 2000 スライド処理の結果の一致率を算出した。

ALK 陽性検体 125 例、ALK 陰性検体 110 例からなる計 235 例の検体を使用した。1 検体につき 4 枚のスライドを作製し、うち 1 枚はマニュアル操作でスライドの処理を行い、別の 3 枚は VP 2000 プロセッサを使用してスライドの処理（各施設 1 枚）を行った後測定した。

全体一致率の平均は 95.66%（95% 信頼区間：93.92 ～ 97.26）、陽性一致率の平均は 98.47%（95% 信頼区間：96.88 ～ 99.69）、陰性一致率の平均は 92.96%（95% 信頼区間：89.81 ～ 95.79）であった。

結果を表 26 に示す。

表 26 マニュアルスライド処理と VP 2000 スライド処理との一致率

施設	陽性一致率（%） (n/N)	陰性一致率（%） (n/N)	全体一致率（%） (n/N) ^a
1	98.04 (100/102)	100.00 (113/113)	99.07 (213/215)
2	99.13 (114/115)	93.86 (107/114)	96.51 (221/229)
3	98.18 (108/110)	85.09 (97/114)	91.52 (205/224)
全施設の平均	陽性一致率（%） (95% 信頼区間) ^b 98.47 (96.88, 99.69)	陰性一致率（%） (95% 信頼区間) ^b 92.96 (89.81, 95.79)	全体一致率（%） (95% 信頼区間) ^b 95.66 (93.92, 97.26)

a スライド自体の処理不能、無効な結果などにより、一部の検体スライドは評価対象外であった。

b 95% 信頼区間は、ブートストラップ法で算出した。

【使用上又は取扱い上の注意】

(1) 取扱い上（危険防止）の注意

- 本キットの測定では、ヒト検体を取り扱う。検体は、HIV、HBV、HCV等の感染の恐れがあるものとして取り扱うこと。検査にあたっては、感染の危険を避けるため、専用の着衣、眼鏡、マスクおよび使い捨て手袋を着用し、また口によるビベッティングは行わないこと。

- 【注意】**
本測定で使用する試薬類には、ヒト由来および/または潜在的に感染性のある物質が含まれている。詳細は、**【形状・構造等（キットの構成）】**または**【用法・用量（操作方法）】**を参照のこと。ヒト由来物質または不活化微生物が完全に感染伝播しないことを保証する試験は知られていない。感染性物質を含む、またはその疑いがある物質については、Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories¹、OSHA Standard on Bloodborne Pathogens²、CLSI 文書 M29-A4³、または他の適切なバイオセーフティ基準⁴に従って取り扱うこと。すべてのヒト由来物質は潜在的に感染性があると考えられること。
- 検体や試薬を取り扱う場所では、飲食、喫煙、化粧、コンタクトレンズの取り扱いをしないこと。
 - 試薬が誤って目や口に入った場合には水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けること。
 - 次の試薬類に関する危険有害性情報、注意事項を示す。
 - Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH プローブ



危険：	ホルムアミドを含む
H360	生殖能または胎児への悪影響のおそれ
P201	使用前に取扱説明書を入手すること。
P202	全ての安全注意を読み理解するまで取り扱わないこと。
P281	指定された個人用保護具を使用すること。
P308+P313	ばく露またはばく露の懸念がある場合：医師の診察/手当てを受けること。
P405	施錠して保管すること。
P501	内容物 / 容器を適切な方法で廃棄すること。

- Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キットのプロテアーゼ緩衝液 IV



危険：	塩酸 (HCl) を含む
H290	金属腐食のおそれ
H314	重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷
P260	ミスト / 蒸気 / スプレーを吸入しないこと。
P280	保護手袋 / 保護衣 / 保護眼鏡を着用すること。
P234	他の容器に移し替えないこと。
P264	取扱後は手をよく洗うこと。
P303+P361	皮膚（または髪）に付着した場合：直ちに汚染された衣類をすべて脱ぐこと。皮膚を水 / シャワーで洗うこと。
P305+P351	眼に入った場合：水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。
P301+P330	飲み込んだ場合：口をすすぐこと。無理に吐かせないこと。
P390	物的被害を防止するためにも流出したものを吸収すること。
P310	直ちに医師に連絡すること。
P501	内容物 / 容器を適切な方法で廃棄すること。

- VP 2000 プレトリートメントキットのプロテアーゼ緩衝液 IV



危険：	塩酸 (HCl) を含む
H290	金属腐食のおそれ
H314	重篤な皮膚の薬傷・眼の損傷
P260	ミスト / 蒸気 / スプレーを吸入しないこと。
P280	保護手袋 / 保護衣 / 保護眼鏡を着用すること。
P234	他の容器に移し替えないこと。
P264	取扱後は手をよく洗うこと。
P303+P361	皮膚（または髪）に付着した場合：直ちに汚染された衣類をすべて脱ぐこと。皮膚を水 / シャワーで洗うこと。
P305+P351	眼に入った場合：水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。
P310	直ちに医師に連絡すること。
P304+P340	吸入した場合：空気の新鮮な場所に移し、呼吸しやすい姿勢で休息させること。
P301+P330	飲み込んだ場合：口をすすぐこと。無理に吐かせないこと。
P363	汚染された衣類を再使用する場合には洗濯をすること。
P405	施錠して保管すること。
P406	耐腐食性 / 耐腐食性内張りのある容器に保管すること。
P501	内容物 / 容器を適切な方法で廃棄すること。

- Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キットのプロテアーゼ IV
- VP 2000 プレトリートメントキットのプロテアーゼ IV



危険：	ペブシンを含む
H315	皮膚刺激
H319	強い眼刺激
H334	吸入するとアレルギー、喘息または呼吸困難を起こすおそれ
H335	呼吸器への刺激のおそれ
P285	換気が十分でない場合には、呼吸用保護具を着用すること。
P261	ミスト / 蒸気 / スプレーの吸入を避けること。
P280	保護手袋 / 保護衣 / 保護眼鏡を着用すること。
P264	取扱後は手をよく洗うこと。
P305+P351	眼に入った場合：水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。
P302+P352	皮膚に付着した場合：多量の水で洗うこと。
P304+P341	吸入した場合：呼吸が困難な場合には、空気の新鮮な場所に移し、呼吸しやすい姿勢で休息させること。
P312	気分が悪い時は医師に連絡すること。
P362	汚染された衣類を脱ぎ、再使用する場合には洗濯をすること。
P405	施錠して保管すること。
P501	内容物 / 容器を適切な方法で廃棄すること。

- 安全データシート（SDS）：製品の安全な取り扱い、輸送および廃棄に関する重要な情報が記載されている。
- 安全データシートについては、カスタマーサポートセンターにお問い合わせください。

(2) 使用上の注意

- 使用期限を過ぎた試薬類を使用しないこと。
- キット内または異なるキットの試薬を混ぜて使用しないこと。
- 同一のロット番号の試薬であっても試薬を注ぎ足すことはしないこと。
- 本キットは NSCLC 患者の 10% 中性緩衝ホルマリン固定パラフィン包埋がん組織に対してのみ使用できる。
- VP 2000 プロセッサーおよび ThermoBrite の安全性に関する情報は、各機器の取扱説明書を参照のこと。
- マニュアル操作によるスライドの処理では、Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キット（製品番号：1N31-05）を使用し、VP 2000 プロセッサーでは、VP 2000 プレトリートメントキット（製品番号：8N16-01）を使用する。プレトリートメントキットを入れ替えて使用しないこと。
- 検体は、脱灰剤のような酸、強い塩基、極端な熱に曝露させないこと。このような条件下では DNA が損傷を受けることが知られており、FISH 法による測定で正しい結果が得られないことがある。
- ターゲットエリアを特定するため、H&E 染色は同一ブロック組織のスライド切片 10 枚ごとに行うこと。
- キットに表示された使用期限まで使用するためには、表示された温度で保存することが不可欠である。
- 試薬類に沈殿物や濁りが認められた場合は、その試薬は廃棄し、新たに試薬を調製すること。
- 蛍光物質は、光にさらされると直ちに退色する。退色を防ぐため、蛍光物質を含む試薬、スライドはなるべく暗い場所に取り扱うこと。
- 溶液、恒温槽、インキュベーターの温度の測定には、校正された温度計を使用すること。
- コプリンジャー内の前処理溶液、洗浄液は、各使用前に溶液の温度を校正された温度計で測定し、常に温度を確認すること。
- スライドの変性、ハイブリダイゼーション、検出のすべての手順に従わなかった場合、正しい測定結果が得られない場合がある。
- 弊社以外から提供されている試薬類を使用した場合、良好なハイブリダイゼーション結果が得られない場合がある。
- 本キットは、ドライアイス中で保存して輸送すること。
- 試薬の納品形態がラベルと異なる場合、または破損している場合は、弊社にご連絡ください。
- Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キット、VP 2000 プレトリートメントキットは、2 ～ 8℃で保存した場合、使用期限まで安定である。
注：プロテアーゼ IV はキットを受け取り次第キットから取り出して、-20℃（± 10℃）で保存すること。
- Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キット、VP 2000 プレトリートメントキットを表示された使用期限まで使用するためには、表示された温度で保存することが不可欠である。これ以外の条件で保存したキットでは、正しい測定結果が得られない場合がある。
- Vysis パラフィンプレトリートメント IV & 洗浄緩衝液キット、VP 2000 プレトリートメントキットは、保冷剤と共に輸送すること。
- プローブチェック ALK 陰性 / 陽性コントロールスライドは、15 ～ 30℃で保存すること。

（3）廃棄上の注意

- 検体中には HIV、HBV、HCV 等の感染性のものが存在する恐れがあるので、廃液、使用済み器具などは次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度 1,000 ppm、1 時間以上浸漬）による消毒処理、あるいはオートクレーブ（121℃、20 分以上）による滅菌処理を行うこと。
- 試薬および器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理および清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定、各施設の規定に従って処理すること。
- 試薬類や検体が飛散した場合には、飛散した溶液を吸収剤で吸収し、飛散した場所を洗浄液で拭き取った後、さらに 1.0%次亜塩素酸ナトリウム溶液などの適切な消毒剤¹で拭き取ること。作業は適切な保護用具（手袋、安全眼鏡、実験衣など）を着用して行うこと。

【貯蔵方法、有効期間】

貯蔵方法： 遮光して、-30 ～ -10℃で保存する。
有効期間： 24 箇月
使用期限は、外装に表示されている。

【包装単位】

Vysis ALK Break Apart FISH プローブキット
○ 20 テスト用 製品番号：6N38-21
・ Vysis LSI ALK Dual Color Break Apart FISH プローブ 200 μL × 1
・ DAPI I 対比染色液 300 μL × 1
ターゲットエリア 22 mm × 22 mm の処理を 1 テストとする。

※【主要文献】

1. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*. 5th ed. Washington, DC: US Government Printing Office; December 2009. Available at: <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/index.htm>. Accessed March 28, 2011.
2. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration. 29 CFR Part 1910.1030, *Bloodborne Pathogens*.
- ※ 3. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections: Approved Guideline - Fourth Edition*. CLSI Document M29-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
4. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*. 3rd ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2004.

※【その他】

- FISH アッセイでスライドを評価する際は、顕微鏡が適切に調整され正しく機能していることを確認すること。
次の表は本キットによる測定において、正確な測定結果が得られない場合の例である。推定される原因と対策を示した。

トラブルシューティング

問題点	操作	推定される原因	対策
シグナルが見られない、または弱い	スライドの評価	誤った油浸用オイルを使用	・ 蛍光顕微鏡用の油浸オイルであることを確認する。
		不適切なランプ（例：キセノン、タングステン）	・ 水銀ランプを使用する。（100W を推奨）
		水銀ランプの付け間違い	・ 水銀ランプを付け直す。
		水銀ランプの積算使用時間が長すぎる	・ 新しいランプに交換する。
		スライド観察用のフィルターセットが適切でない	・ 推奨フィルターを使用する。
		蛍光フィルターの損傷	・ 蛍光フィルターを交換する。
		集光レンズの汚れ、または破損	・ レンズを磨く、または交換する。
		ランプハウスの鏡の汚れ、または破損	・ 鏡を磨く、または交換する。
		光路の部品が損傷	・ 顕微鏡の製造元に問い合わせ、必要に応じて部品を交換する。
		顕微鏡が正しく機能していない	・ 顕微鏡の製造元に問い合わせる。
	マニュアルスライド処理または VP 2000 スライド処理	切片が過剰に固定されている	・ 組織の固定時間を長くすると、シグナル強度が減弱するため、場合によっては酵素処理時間を長くする必要がある。
		スライドの前処理が不十分	・ 前処理溶液の温度と前処理時間を確認する。 ・ 許容範囲内で前処理の時間を調整する。
		プロテアーゼ処理が不十分	・ プロテアーゼ溶液の温度と処理時間を確認する。 ・ 許容範囲内でプロテアーゼ処理の時間を調整する。
		カバーガラスの下に泡があり、プローブとの反応が阻害されている	・ カバーガラスをかぶせる時はまず、プローブ溶液の表面に触れるように置く。
		ハイブリダイゼーションの時間が適切でない	・ ハイブリダイゼーション時間を確認する。
		ポストハイブリダイゼーション洗浄温度が適切でない	・ 洗浄緩衝液Ⅱの温度を確認する。
	VP 2000 スライド処理	誤った VP 2000 プロトコルを使用した	・ VP 2000 のプロトコルを確認する。
		VP 2000 の Basin に正しい量の試薬が入っていないかった	・ 試薬の調製：VP 2000 プロセッサの項で各試薬の必要量を確認する。
		VP 2000 で Basin の位置を間違えた	・ 各試薬の位置を試薬配置図で確認する。
無効な結果	スライドの評価	計数できるがん細胞の核が少なすぎる	・ 新しいスライドで再測定する。
	VP 2000 スライド処理	誤った VP 2000 プロトコルを使用した	・ VP 2000 のプロトコルを確認する。
		VP 2000 の Basin に正しい量の試薬が入っていないかった	・ 試薬の調製：VP 2000 プロセッサの項で各試薬の必要量を確認する。
		VP 2000 で Basin の位置を間違えた	・ 各試薬の位置を試薬配置図で確認する。
バックグラウンドのノイズが高い	マニュアルスライド処理または VP 2000 スライド処理	洗浄の厳密さ（ストリンジエンシー）が不適切	・ 洗浄液Ⅱの温度と処理時間を確認する。
	スライドの評価	誤った油浸用オイルを使用	・ 蛍光顕微鏡用の油浸オイルであることを確認する。
		蛍光フィルターの損傷	・ 蛍光フィルターを交換する。

問題点	操作	推定される原因	対策
組織切片内でシグナルの強度にばらつきがある	マニュアルスライド処理またはVP 2000 スライド処理	カバーグラスの下に泡があり、プローブが均一に行き渡らなかった	• 同じ組織片の次の切片を使って再度測定を行う。カバーグラスに泡が残らないように注意する。 • カバーグラスをかぶせる時はまず、プローブ溶液の表面に触れるように置く。
		DAPI 染色後、カバーグラスの下に泡、油浸用オイルがある	カバーグラスを被せ直す。カバーグラスを取り外し、被せ直す場合は、次の手順に従う。 1. 検体スライドを 70%エタノールに 15 分間またはカバーガラスが外れるまで浸漬する。 2. 検体スライドを 85%エタノールに 3 分間浸漬する。 3. 検体スライドを 100%エタノールに 3 分間浸漬する。 4. スライドを遮光して、室温で 2 ～ 5 分間風乾する。 5. 各スライドに DAPI I 対比染色液を 10 μL 添加した後カバーグラスを被せ直し、遮光下に最低 5 分間置く。 6. 24 時間以内に蛍光顕微鏡で計数するか、または -20 $\pm$ 10℃で保存する。
組織が欠落、細胞が破損、または組織の形態が損傷している	マニュアルスライド処理またはVP 2000 スライド処理	使用したスライドが不適切	• 正荷電処理されたスライドを使用する。
		組織切片の固定が不十分 (DAPI 染色不良)	• プロテアーゼ処理時間を確認する。 • 指定範囲内でプロテアーゼの処理時間を短くする。
		スライドのベーキングが不適切	• ThermoBrite の温度を確認する。 • 指定範囲内でベーキング時間を長くする。
		DNA が確認できない (DAPI 染色不良)	• 固定条件を確認する。
		前処理が過剰	• 前処理溶液の時間と温度を確認する。 • 指定範囲内で前処理の処理時間を短くする。
		酵素処理が過剰	• プロテアーゼ溶液の温度を確認する。 • 指定範囲内で酵素処理の時間を短くする。
		変性が過剰	• 変性時間を確認する。
		ハイブリダイゼーション後、カバーグラスを取り除く際に組織切片が裂けた	• カバーグラスをはがす際、洗浄緩衝液に浸ける時間を長くする。
22 mm $\times$ 22 mm のカバーグラスで、すべての組織片を覆うことができない	マニュアルスライド処理またはVP 2000 スライド処理	組織片が大きすぎる	次のサイズのカバーグラスとプローブ溶液または DAPI I 対比染色液を使用する。 • 22 mm $\times$ 30 mm のカバーグラス 1 枚に 14 μL のプローブ溶液および DAPI I 対比染色液を使用する。 • 22 mm $\times$ 22 mm のカバーグラス 2 枚にそれぞれ 10 μL のプローブ溶液および DAPI I 対比染色液を使用する。 • 24 mm $\times$ 50 mm のカバーグラス 1 枚に 20 μL のプローブ溶液および DAPI I 対比染色液を使用する。

すべての商標の所有権は、各商標の所有者に帰属します。

＊【問い合わせ先】

＊ アボットジャパン合同会社

カスタマーサポートセンター

〒 270-2214 千葉県松戸市松飛台 278

TEL 0120-031441

＊【製造販売業者の名称及び住所】

＊ アボットジャパン合同会社

〒 270-2214 千葉県松戸市松飛台 278

TEL 047 (385) 2211 (代表)

©ABBOTT JAPAN LLC 2020