

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

＊ 2019 年 12 月改訂（第 2 版）
2017 年 5 月作成（第 1 版）

製造販売承認番号 22900EZK00021000

膀胱癌関連染色体異常検出キット
ウロビジョン[®] DNA 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. 診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断すること。
- 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. 使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

- 1) ウロビジョン DNA FISHプローブ
 - CEP 3 スペクトラムレッド DNA プローブ
 - CEP 7 スペクトラムグリーン DNA プローブ
 - CEP 17 スペクトラムアクア DNA プローブ
 - LSI 9p21 スペクトラムゴールド DNA プローブ
 - （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 II 対比染色液
 - （主な含有物：緩衝液、DAPI（4',6'-ジアミジノ-2'-フェニルインドール）、1,4-フェニレンジアミン、グリセロール）
- 3) NP-40
 - （主な含有物：NP-40（非イオン性界面活性剤））
- 4) 20× SSC 塩
 - （主な含有物：塩化ナトリウム、クエン酸ナトリウム）

【使用目的】

尿中細胞の 3 番、7 番及び 17 番染色体の異数倍体数、並びに 9p21 遺伝子座の欠失の検出（膀胱癌の再発の診断補助）

【測定原理】

本キットは、FISH（Fluorescence *in situ* hybridization）法により尿中細胞の 3 番、7 番及び 17 番染色体の異数倍体数、並びに 9p21 遺伝子座の欠失の検出をするためのものである。

in situ ハイブリダイゼーションは細胞標本における固有核酸配列を可視化する技術であり、特に DNA FISH は蛍光標識された一本鎖 DNA プローブの相補的ターゲット配列への正確なアニーリングを必要とする。細胞の DNA 部位とプローブとのハイブリダイゼーション結果は蛍光顕微鏡を用いて直接的に観察することができる。

本キットに含まれるプローブは、尿検体のスライド標本に対する FISH 法に用いる蛍光標識した核酸プローブで、3 番、7 番、9 番、17 番染色体上の特異的な領域とホモロジーを持つ 4 色 4 種のプローブ配列の混合液である。この混合液は、3 番染色体のセントロメア領域を認識するプローブと蛍光標識を結合させた CEP 3 スペクトラムレッド（赤色）、同様に 7 番染色体を認識する CEP 7 スペクトラムグリーン（緑色）、17 番染色体を認識する CEP 17 スペクトラムアクア（青緑色）並びに 9 番染色体の p16（CDKN2A）領域を認識する LSI 9p21 スペクトラムゴールド（金色）からなる。これらのプローブは使いやすいように前もってハイブリダイゼーション緩衝液中に混和・変性されており、非特異反応を抑えるためのブロッキング DNA も含んでいる。これらを用いたハイブリダイゼーション・可視化（蛍光顕微鏡）により、染色体コピー数に関する情報を得ることができる。

【操作上の注意】

（1）測定試料の性質、採取法

検体採取および輸送

本キットは検体として自然尿を使用する。医療機関で 33 mL 以上の尿を採取し、尿と保存剤を 2:1 (v:v) の割合で混和する。保存剤はカーボワックス (50%エタノール、2%ポリエチレングリコール) または PreservCyt を推奨する。混和した検体を、50 mL 遠心チューブまたは密封可能なプラスチック容器に移す。他の種類の保存剤を使用する場合は、各施設において有効性を検証すること。採取後すぐに検査施設に輸送しない場合は、直ちに冷蔵して 24 時間以内に輸送すること。

冷蔵で保存し、輸送時は保冷剤と共に輸送することを推奨するが、25℃以下で保存または輸送することもできる。保存剤としてカーボワックスまたは PreservCyt を使用し、上記の条件で輸送、保存した検体は 1 週間安定であるが、採取から 72 時間以内に固定済み細胞ペレット（【用法・用量（操作方法）】（3）測定（操作）法 2. 検体の処理と調製（1）検体の処理 ステップ 7）参照）の状態まで処理しておくことを推奨する。上記以外の条件で検体を取り扱う場合は、各施設において取扱い条件を検討し、本キットに適合していることを検証すること。

（2）妨害物質・妨害薬剤

健康成人の自然尿プール 3 例（男性 1 例、女性 1 例、男女混合 1 例）に表 1 に示した物質を添加した後、本キットを用いて測定を行い、干渉物質の影響を評価した。尿プールに各物質を添加したサンプルをそれぞれ 2 例ずつ調製し（すなわち各物質につき 6 例のサンプル）、各サンプルの細胞を連続的に 25 個計数した結果、すべての検体が陰性であり（すなわち異常細胞 4 個未満、本添付文書の定義による）、評価したいずれの物質についても測定結果への影響は認められなかった。物質名および各物質の試験濃度のうち最も高い濃度を表 1 に示す。同様の検討を膀胱癌患者の尿検体で行うには、各条件で試験を実施できる程十分な数の細胞が必要となるが、大量の尿を得ることは難しいため、形態学的異常細胞を含む検体での干渉物質の検討は行っていない。

表 1 試験物質	
物質	濃度
尿に含まれる可能性のある成分	
アルブミン	1.0 g/dL
アスコルビン酸	5 g/dL
ビリルビン（非抱合型）	2 mg/mL
ヘモグロビン	100 mg/mL
IgG	10 mg/dL
赤血球（ヒト）	1 × 10 ⁶ cells/mL
白血球（ヒト）	1 × 10 ⁶ cells/mL
塩化ナトリウム	730 mg/dL
尿酸	250 mg/dL
カフェイン	117 mg/dL
エタノール	1 % (v/v)
ニコチン	28 mg/dL
尿中に混入する可能性のある微生物	
<i>Candida albicans</i>	2.5 × 10 ¹⁰ CFU/mL
<i>Escherichia coli</i>	2.5 × 10 ¹⁰ CFU/mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.5 × 10 ¹² CFU/mL
薬剤	
アセトアミノフェン	5.2 g/dL
アセチルサリチル酸	5.2 g/dL
アンピシリン	600 mg/dL
BCG	20 mg/dL
塩酸ドキシソルピシン	10 mg/dL
マイトマイシン C	10 mg/dL
ニトロフラントイン	50 mg/dL
塩酸フェナゾピリジン	200 mg/dL
チオデパ	10 mg/dL
Trimethoprin	50 mg/dL
保存剤	
カーボワックス	(50%エタノール、2%ポリエチレングリコール) (尿 33 mL に保存剤 17 mL を添加)
UroCor, Inc. 固定液	尿と 50 : 50 に混合
CytoRichRed (Autocyte)	尿と 50 : 50 に混合
Saccamono's solution	尿と 50 : 50 に混合
PreservCyt 溶液 (Hologic)	尿と 50 : 50 に混合
100%エタノール	尿と 50 : 50 に混合

【用法・用量（操作方法）】

（1）試薬の調製方法

- 1) ウロビジョン DNA FISH プローブ
 - そのまま用いる。
- 2) DAPI II 対比染色液
 - そのまま用いる。

- 3) NP-40
そのまま用いる。
なお、使用時には、2 × SSC 溶液及び 0.4 × SSC 溶液でそれぞれ 0.3% 及び 0.1% とする。
- 4) 20 × SSC 塩
精製水に溶解して、20 × SSC 溶液とする。
なお、使用時には、精製水で 2 × SSC 溶液及び 0.4 × SSC 溶液とする。

(2) 必要な器具・器材・試料等

1. コントロールスライドおよび試薬

- プローブチェック ウロビジョン コントロールスライド
(ProbeChek UroVysion Bladder Cancer Kit Control Slides)
(製品番号: 2J27-11)
スライド 3 枚 (スライド 1 枚につき陽性ターゲットエリア 1 個、陰性ターゲット
エリア 1 個)
(主な含有物: スライドガラス上に固定したヒト男性正常リンパ芽球培養細胞
(GM11854、陰性ターゲット) およびヒト膀胱癌培養細胞 (UM-UC-3、陽性ター
ゲット))
- FISH プレトリートメントキット (ウロビジョン DNA FISH プローブキット用)
(Vysis FISH Pretreatment Reagent Kit)
(製品番号: 2J03-32)
 - プロテアーゼ (Vysis Protease) 25 mg × 3
ペプシン活性: 1 : 3000 ~ 1 : 3500
注: ペプシンはその重量の 3000 ~ 3500 倍の凝固卵白アルブミンを分解する。
 - プロテアーゼ緩衝液 (Vysis Pepsin Buffer) 50 mL × 3
10 mM 塩酸
 - PBS (Vysis PBS) 250 mL × 2
1 × PBS
 - 100 × 塩化マグネシウム (Vysis 100X MgCl₂) 0.5 mL × 3
2 mol/L 塩化マグネシウム
 - 20 × SSC 塩 (Vysis 20X SSC) 66 g
 - 10% 中性緩衝ホルマリン溶液
 - カルノア固定液 (メタノールと氷酢酸を 3:1 (v:v) で混合): 使用日ごとに調製する。
 - 蛍光顕微鏡油浸オイル: 15 ~ 30℃ で保存する。
 - エタノール (100%): 室温で保存する。
 - 濃塩酸 (12N)
 - 1N 水酸化ナトリウム
 - 精製水 (Milli-Q 水): 室温で保存する。
 - ペーパーボンド
 - ホルムアミド (特級)
 - カーボワックス (50% エタノール、2% ポリエチレングリコール)
 - ThinPrep PreservCyt 溶液、Hologic 社

2. 器具・装置

- カバーガラス (12 mm 円形、18 mm 正方形を推奨)
- スライドガラス (12 穴 6 mm 円形ウエル)
- 微量ピペット (1 ~ 10 µL、20 ~ 200 µL) および清浄なピペットチップ
- コニカル型遠心チューブ (15 mL、50 mL)
- タイマー (± 1 秒)
- マグネティックスターラー
- ボルテックスミキサー
- マイクロ遠心機
- 卓上遠心機
- メスシリンダー
- 温浴槽 (37 ± 1℃、73 ± 1℃)
- ハイブリダイゼーション用湿潤箱
- 気相恒温槽 (インキュベーター) (37 ± 1℃)
- ピンセット
- コプリンジャー (5 枚用) 10 個
- 100 W 水銀ランプおよび適切なフィルターを装着した落射型蛍光顕微鏡
推奨フィルター:
 - イエロー (ゴールド) シングルバンドパス (Yellow (Gold) single-bandpass)
 - アクアシングルバンドパス (Aqua single-bandpass)
 - DAPI シングルバンドパス (DAPI single-bandpass)
 - グリーン/レッドデュアルバンドパス (Green/Red dual-bandpass)
- 20 倍の対物レンズを装着した位相差顕微鏡
- pH メーター、pH 試験紙
- 校正済み温度計
- 濾過用フィルターユニット (ポアサイズ: 0.45 µm)
- 乾燥剤
- 自動共変性装置 (オプション)
 - ThermoBrite: 機器の取扱説明書を参照すること。
- 自動前処理装置 (オプション)
 - VP 2000 プロセッサー: 機器の取扱説明書を参照すること。

3. 顕微鏡装置および付属品

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。施設が所有している蛍光顕微鏡を使用する場合は、その顕微鏡が蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 検体の観察に適していることをあらかじめ確認しておく必要がある。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 測定には適さないことがある。顕微鏡はいつも清潔に保ち、製造業者による定期的なメンテナンスを受けることを推奨する。

注: 一般的に FISH 測定に失敗した場合、試薬の不具合が原因として疑われることがあるが、実際の原因は蛍光顕微鏡の不具合や不適切な使用方法、誤ったフィルターの使用などであって、ハイブリダイゼーション自体は成功している例が多い。

励起光の光源:

励起光ランプの光によって蛍光物質が励起され蛍光を発する。至適な状態で画像を観察するには、励起光ランプを適切に調整しておく必要がある。励起光の光源として最大約 200 時間の寿命のある 100 W 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こと。

対物レンズ:

対物レンズは視野の明るさ、解像度、画質全般に大きく影響する。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。40 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、検体のスキャンに適している。FISH の解析およびシグナルの計数には、60 倍、63 倍、100 倍のいずれか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:

以下はほとんどの顕微鏡で使用可能で、CEP および LSI DNA プローブキット用に至適化された弊社の蛍光顕微鏡用フィルターセットである。他のフィルターを使用する場合は、本キットに対する性能を確認、検証してから使用すること。

本キットに推奨されるフィルター

- イエロー (ゴールド) シングルバンドパス (Yellow (Gold) single-bandpass)
- アクアシングルバンドパス (Aqua single-bandpass)
- DAPI シングルバンドパス (DAPI single-bandpass)
- グリーン/レッドデュアルバンドパス (Green/Red dual-bandpass)

各プローブで標識された箇所が発する蛍光はそれぞれ、LSI 9p21 プローブがゴールド (イエロー)、CEP 3 プローブがレッド、CEP 7 プローブがグリーン、CEP 17 プローブがアクアである。その他の核 DNA は DAPI 染色によりブルーの蛍光を発する。

(3) 測定 (操作) 法

1) スライドの前処理

- スライドを乾燥させる。
- プロテアーゼ溶液にスライドを浸漬する。
- 1% ホルムアルデヒド溶液でスライドを固定する。
- エタノールでスライドを脱水し、乾燥させる。

2) ハイブリダイゼーション

A. 手法

- 73 ± 1℃ で 5 ± 1 分間、変性溶液にスライドを浸漬し、検体 DNA を変性させる。
- エタノールでスライドを脱水する。
- 3 µL のウロビジョン DNA FISH プローブをスライドに添加する。
- 37 ± 1℃ で一晩 (約 16 時間) インキュベーションする。

B. 自動処理操作 (共変性法)

- 3 µL のウロビジョン DNA FISH プローブをスライドに添加する。
- 76℃ で 3 分間変性し、39℃ で 14 ~ 18 時間ハイブリダイゼーションする。

3) ハイブリダイゼーション後のスライド洗浄

- 73 ± 1℃ で 2 分間、0.4 × SSC/0.3% NP-40 にスライドを浸漬する。
- 15 ~ 30℃ で 5 秒 ~ 1 分間、2 × SSC/0.1% NP-40 にスライドを浸漬する。
- 遮光した状態でスライドを乾かす。
- 10 µL の DAPI II 対比染色液をスライドに添加する。

4) 検体スライドの評価

- 蛍光顕微鏡で形態学的異常細胞 25 個について 4 つのプローブのシグナル数を計数する。
- 25 個の形態学的異常細胞を解析した後、以下の基準のいずれかに該当した場合、解析を終了し陽性と報告する。
 - 25 個中 4 個以上の細胞で、細胞内の 2 種類以上の染色体 (3 番、7 番又は 17 番) の増加が見られる。
 - 25 個中 12 個以上の細胞で、9p21 シグナルが 2 つとも欠失している。
- 当てはまらない場合は以下のいずれかを満たすまで解析を継続する。
 - 染色体が増加した細胞を 4 個検出した。
 - 9p21 シグナルが 2 つとも欠失している細胞を 12 個検出した。
 - サンプル全体の解析を終えた。

1. 試薬の調製

(1) 1%ホルムアルデヒド溶液

以下を混合する。

12.5 mL	10% 中性緩衝ホルマリン溶液
37 mL	1 × PBS
<u>0.5 mL</u>	100 × 塩化マグネシウム (FISH プレトリートメントキットから 1 本使用)
50 mL	全量

十分に攪拌した後、溶液をコプリンジャーに入れる。1 週間使用した溶液は廃棄する。未使用の溶液は、2 ~ 8℃ で 6 ヶ月間保存できる。

(2) 20 × SSC 溶液 (3 mol/L 塩化ナトリウム、0.3 mol/L クエン酸ナトリウム、pH 5.3)

以下を混合し、20 × SSC 溶液 pH 5.3 を調製する。

66 g	20 × SSC 塩
200 mL	精製水
250 mL	全量

十分に攪拌した後、pH メーターを使用して室温で pH を測定し、濃塩酸で pH 5.3 に調整する。精製水で全量 250 mL とする。ポアサイズ 0.45 μm のフィルターでろ過する。室温で 6 ヶ月間保存できる。

(3) 変性溶液 (70%ホルムアミド /2 × SSC、pH 7.0 ～ 8.0)

注：ThermoBrite で自動処理 (共変性法) する場合は不要である。

以下を混合し、変性溶液を調製する。

49 mL	ホルムアミド
7 mL	20 × SSC 溶液、pH 5.3
14 mL	精製水
70 mL	全量

十分に攪拌する。pH 試験紙を使用して室温で pH を測定し、pH 7.0 ～ 8.0 であることを確認する。調製後は 1 週間使用できる。使用前に毎回 pH を確認すること。使用しないときは、密栓容器に入れて 2 ～ 8℃ で保存する。

(4) エタノール洗浄液

100%エタノールと精製水を用いて、70%および 85% (v/v) エタノール溶液を調製する。これらのエタノール溶液は、蒸発していない場合、または何度も使用して溶液が希釈されていない場合に限り、1 週間使用可能である。使用しないときは、密栓容器に入れて室温で保存する。

(5) 0.4 × SSC/0.3% NP-40

以下を混合して調製する。

20 mL	20 × SSC 溶液、pH 5.3
877 mL	精製水
3 mL	NP-40
1000 mL	全量

十分に攪拌した後、pH メーターを使用して室温で pH を測定する。1N 水酸化ナトリウムで、pH 7.5 ± 0.2 に調整する。精製水で全量 1 L とする。ポアサイズ 0.45 μm のフィルターでろ過する。使用した溶液は、使用日ごとに廃棄する。未使用の溶液は、室温で 6 ヶ月間保存できる。

(6) 2 × SSC/0.1% NP-40

以下を混合して調製する。

100 mL	20 × SSC 溶液、pH 5.3
849 mL	精製水
1 mL	NP-40
1000 mL	全量

十分に攪拌した後、pH メーターを使用して室温で pH を測定する。1N 水酸化ナトリウムで、pH 7.0 ± 0.2 に調整する。精製水で全量 1 L とする。ポアサイズ 0.45 μm のフィルターでろ過する。使用した溶液は、使用日ごとに廃棄する。未使用の溶液は、室温で 6 ヶ月間保存できる。

2. 検体の処理と調製

(1) 検体の処理

- 50 mL 遠心チューブに入れた尿検体を 600 × g で 10 分間、15 ～ 30℃ で遠心分離する。
- 細胞ペレットと上清を約 1 ～ 2 mL 残し、ペレットが崩れないように注意しながら上清を捨てる。
- 残した上清 1 ～ 2 mL に細胞ペレットを再懸濁してから、懸濁液をコンカル型 15 mL 遠心チューブに移す。10 mL の 1 × PBS で 50 mL 遠心チューブを洗い、洗った後の溶液を 15 mL 遠心チューブに移す。
注：同一患者検体の細胞ペレットは足して混ぜてもよい。
- 検体を 600 × g で 10 分間、15 ～ 30℃ で遠心分離する。
- 細胞ペレットと上清を約 0.5 mL 残し、上清を捨てる。
- 残した上清 0.5 mL に細胞ペレットを再懸濁する。調製したの固定液 (メタノールと酢酸を 3 : 1 (v:v) で混合) 1 ～ 5 mL を徐々に添加する。最初は、よく攪拌しながら少しずつ滴下すること。
- 固定した検体を -20℃ に最低 30 分間置く。
注：この状態で一晩、あるいはそれ以上 (10 日間まで) 保存することができる。
- 検体を 600 × g で 5 分間、15 ～ 30℃ で遠心分離する。注意しながら上清を捨てる。
注：ペレットが見えない、またはわずしかが見えない場合は、細胞の流出を避けるためこの後さらに洗浄することは推奨しない。そのまま、ステップ 11) に進むこと。検体を一晩以上放置した場合は、スライド作製の前に新しく調製した固定液に懸濁する。
- 1 ～ 5 mL の固定液にペレットを再懸濁し、洗浄する。
- 検体を 600 × g で 5 分間、15 ～ 30℃ で遠心分離する。ステップ 8) と 9) を 2 回繰り返す。
- 固定液に懸濁した細胞を遠心分離した後：
 - 細胞ペレットが非常に小さくほとんど見えない場合は、上清が 100 μL になるまで慎重に可能な限り固定液を取り除く。
 - 細胞ペレットがはっきり見える場合は、可能な限り固定液を取り除いた後、新しい固定液を 0.5 ～ 1 mL 添加する。
- 直ちにスライドの調製を行う。

(2) スライドの調製

- 12 ヶスライドを使用する。
- 細胞ペレットを再懸濁し、3 つのスライドウェル (ウェル番号 1、2、3) にそれぞれ 3 μL、10 μL、30 μL の細胞懸濁液を滴下する。
- サンプルを風乾する。
- 細胞の密度を確認し、ハイブリダイゼーションを行うウェル (ウェル番号 1、2、3 のいずれか) を選択する。視野の中に細胞が 100 ～ 200 個見えるウェルがハイブリダイゼーションに適している。
 - 細胞懸濁液の量が多すぎても多い 3 番のウェルでも細胞密度が低い場合 (視野の中の細胞が 50 個未満) は、さらに 30 μL の細胞懸濁液を 3 番のウェルに滴下する。風乾させた後、位相差顕微鏡でスライドを観察する。必要に応じてこのステップを繰り返す。
 - 細胞懸濁液の量が多すぎても少ない 1 番のウェルでも細胞密度が高い場合 (視野の中の細胞が 400 個超) は、細胞懸濁液を固定液で希釈し、ステップ 1) ～ 4) を繰り返す。
注：細胞の破片などが多い場合は、再度前処理を行ってからハイブリダイゼーションを行うウェルを選択する。
- 上記 ステップ 1) ～ 4) に従って、少なくとも 1 枚予備のスライドを作製しておくこと。予備のスライドは乾燥剤入りの容器に入れて -20℃ で保存する。
注：固定したスライドは -20℃ で 12 ヶ月間保存できる。残った細胞懸濁液は、スライド作製がさらに必要になった場合に備えて保存しておく。 -20℃ で 1 ヶ月間保存できる。

(3) スライドの前処理

スライドは本キットによる染色操作の前に前処理して固定する必要がある。FISH プレトリートメントキットの使用方法是以下のとおりである。

- プロテアーゼ緩衝液
プロテアーゼ緩衝液ボトルを 1 本 (50 mL)、37 ± 1℃ の温浴槽で加温する。使用する直前に、プロテアーゼ緩衝液の温度が 37 ± 1℃ になっていることを確認してから、プロテアーゼ 25 mg (1 本) を加えてプロテアーゼ溶液とする。キャップを閉めて、穏やかに数回転倒混和する。プロテアーゼ溶液をコプリンジャーに入れる。1 日経過した後は廃棄すること。
- 1%ホルムアルデヒド溶液
10%中性緩衝ホルマリン溶液 12.5 mL、1 × PBS 37 mL、100 × 塩化マグネシウム 0.5 mL (1 本) を混合する。1%ホルムアルデヒド溶液をコプリンジャーに入れる。室温で使用する。1 週間経過した後は廃棄すること。使用しないときは、2 ～ 8℃ で保存すること。
- エタノール洗浄液
100%エタノールと精製水を用いて、70%、85% (v/v) エタノール溶液を調製する。コプリンジャーに入れて室温で使用する。これらのエタノール溶液は、蒸発していない場合、または何度も使用して溶液が希釈されていない場合に限り、1 週間使用可能である。使用しないときは、室温で密栓容器にて保存する。
- 1 × PBS
コプリンジャーに 1 × PBS を入れる。室温で使用する。1 日経過した後は廃棄すること。
- 20 × SSC 溶液
FISH プレトリートメントキットの 20 × SSC 塩 66 g と精製水 200 mL を混合する。十分に攪拌した後、pH メーターを使用して室温で pH を測定し、濃塩酸で pH 5.3 に調整する。精製水で全量 250 mL とする。ポアサイズ 0.45 μm のフィルターでろ過する。室温で 6 ヶ月間保存できる。
- 2 × SSC 溶液
20 × SSC 溶液 100 mL と精製水 850 mL を混合する。十分に攪拌した後、pH メーターを使用して室温で pH を測定し、pH 7.0 ～ 7.5 に調整する。精製水で全量 1000 mL とする。ポアサイズ 0.45 μm のフィルターでろ過する。1 日経過した後は廃棄すること。未使用の溶液は、室温で 6 ヶ月間保存できる。

マニュアル前処理	自動前処理 (オプション)
- 検体スライドを室温で完全に乾燥させる。 73 ± 1℃ の 2 × SSC 溶液に 2 分間 (2 ～ 2.5 分間) 浸漬する。 37 ± 1℃ のプロテアーゼ溶液に 10 分間 (± 1 分間) 浸漬する。 - 室温の 1 × PBS で 5 分間 (± 1 分間) 洗う。 - 室温の 1%ホルムアルデヒド溶液で 5 分間 (± 1 分間) 固定する。 - 室温の 1 × PBS で 5 分間 (± 1 分間) 洗う。 - 室温の 70%エタノールに浸漬して脱水する。スライドは少なくとも 1 分間、エタノール中に立てた状態にしておく。同じ操作を、85%エタノール、続いて 100%エタノールで繰り返す。 - スライドを完全に乾燥させる。	- 検体スライドを室温で完全に乾燥させる。 73 ± 1℃ の 2 × SSC 溶液に 2 分間 (2 ～ 2.5 分間) 浸漬する。 37 ± 1℃ のプロテアーゼ溶液に 10 分間 (± 1 分間) 浸漬する。 - 室温の 1 × PBS で 5 分間 (± 1 分間) 洗う。 - 室温の 1%ホルムアルデヒド溶液で 5 分間 (± 1 分間) 固定する。 - 室温の 1 × PBS で 5 分間 (± 1 分間) 洗う。 - 室温の 70%エタノールに浸漬して脱水する。スライドは少なくとも 1 分間、エタノール中に立てた状態にしておく。同じ操作を、85%エタノール、続いて 100%エタノールで繰り返す。 - スライドを 25℃ (air-drying station 中) で 3 分間、あるいは完全に乾くまで乾燥させる。 - 本キットによる処理に進む。

3. FISH 操作（本キットによる処理）

マニュアル操作

（ThermoBrite を使用する自動処理（共変性法）の操作法については次項参照）

注：プローブの準備（プローブの準備 ステップ 1）～3）は、検体 DNA を変性する（検体 DNA の変性 ステップ 1）～7））タイミングに合わせて行い、ハイブリダイゼーション開始時にプローブの準備と検体 DNA の変性が同時に終わるようにすること。

(1) 検体 DNA の変性

- 1) 検体スライドの処理前に、 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーター内で湿潤箱（気密性容器の側面に約 $2.5 \text{ cm} \times 7.5 \text{ cm}$ 角の吸水させた吸収紙やペーパータオルをテープで貼ったもの）を $37 \pm 1^\circ\text{C}$ になるまで予備加温する。湿潤箱の吸収紙やペーパータオルは毎回使用するごとに吸水させること。
- 2) 変性溶液をコプリンジャーに入れ、 $73 \pm 1^\circ\text{C}$ の温浴槽に少なくとも 30 分間置くか、溶液が $73 \pm 1^\circ\text{C}$ になるまで温浴槽で加温する。使用前に溶液温度を確認すること。
注：変性溶液が $2 \sim 8^\circ\text{C}$ で保存されていた場合は、温浴槽に入れる前に、溶液とコプリンジャーが室温になるまで待つこと。
- 3) 検体スライドを $73 \pm 1^\circ\text{C}$ の変性溶液の入ったコプリンジャーに 5 分間（ ± 1 分間）浸漬し、検体 DNA を変性させる。スライドはコプリンジャー 1 個につき 4 枚入れる。一度に 4 枚を超えるスライドを入れないこと。また、スライドが 4 枚より少ない場合は、合計 4 枚になるようブランクのスライドを追加すること。
注：毎回、使用前にコプリンジャー内の溶液の温度を確認すること。
- 4) ピンセットを使って、検体スライドを変性溶液から取り出し、すぐに室温の 70% エタノールに入れる。ホルムアミドを除くためにスライドを振盪する。スライドは少なくとも 1 分間、エタノール中に立てておく。
- 5) 検体スライドを 70% エタノールから取り出す。ステップ 4) の操作を、85% エタノール、100% エタノールで繰り返す。
- 6) 検体スライドグラスの下端をペーパータオルに付けてエタノールを取り除き、スライドグラスの裏側をペーパータオルで拭く。
- 7) 検体スライドを $45 \sim 50^\circ\text{C}$ のスライドウォーマーで乾燥させる。乾燥は 2 分以内とする。

(2) プローブの準備

- 1) プローブを -20°C から取り出し、室温に戻す。ボルテックスミキサーで混和する。各々のチューブを卓上遠心機で 1 ～ 3 秒遠心して、溶液をチューブの底に落とし、再びボルテックスミキサーで穏やかに混和する。
- 2) プローブ溶液を $73 \pm 1^\circ\text{C}$ の温浴槽で 5 分間加温する。
- 3) プローブ溶液を $45 \sim 50^\circ\text{C}$ のスライドウォーマーに置く。

(3) ハイブリダイゼーション

- 1) 選択した検体スライドのターゲットエリアに $3 \mu\text{L}$ のプローブ溶液を添加し、ただちに、12 mm 円形カバーグラスを被せる。プローブ溶液がカバーグラス全体に均一に広がるように、慎重にカバーグラスを軽く押す。ハイブリダイゼーションの妨げとなるため、泡が入らないよう注意する。残ったプローブ溶液は直ちに -20°C の保存場所に戻す。
- 2) ペーパーバンドでカバーグラスをシールする：ペーパーバンドがカバーグラスとスライドの両方にかかるようにしながら、カバーグラスの外周に少しずつペーパーバンドを押し出してシールする。
- 3) 前もって加温した湿潤箱に検体スライドを入れ、蓋をして $37 \pm 1^\circ\text{C}$ のインキュベーターで一晩（約 16 時間）ハイブリダイゼーションを行う。
- 4) ハイブリダイゼーション後のスライド洗浄に進む。

自動処理操作

（ThermoBrite を使用する共変性法、オプション）

(1) プローブの調製と添加

- 1) プローブを -20°C から取り出し、 $15 \sim 30^\circ\text{C}$ に戻す。ボルテックスミキサーで混和する。各々のチューブを卓上遠心機で 1 ～ 3 秒遠心して、溶液をチューブの底に落とし、再びボルテックスミキサーで穏やかに混和する。
- 2) 選択した検体スライドのターゲットエリアに $3 \mu\text{L}$ のプローブ溶液を添加し、直ちに、12 mm の円形カバーグラスを被せる。プローブ溶液がカバーグラス全体に均一に広がるように、慎重にカバーグラスを軽く押す。ハイブリダイゼーションの妨げとなるため、泡が入らないよう注意する。残ったプローブ溶液は直ちに -20°C の保存場所に戻す。
- 3) ペーパーバンドでカバーグラスをシールする：ペーパーバンドがカバーグラスとスライドの両方にかかるようにしながら、カバーグラスの外周に少しずつペーパーバンドを押し出してシールする。

(2) ThermoBrite 上での検体 DNA の変性とハイブリダイゼーション

- 1) humidity card 2 枚を水で湿らせて、蓋のクリップにセットする。humidity card はそれぞれ 8 ～ 10 mL の蒸留水または脱イオン水で湿らせること。humidity card を次回再使用する場合は、ThermoBrite の取扱説明書を参照すること。
- 2) ThermoBrite をオンにする。
- 3) プログラムを変性温度（Denat Temp） 76°C 、変性時間（Denat Time）3 分間、ハイブリダイゼーション温度（Hyb Temp） 39°C 、ハイブリダイゼーション時間（Hyb Time）14 ～ 18 時間にセットする。
- 4) 画面に指示が出たら、スライドを機器のヒーティング面に置く。スライドが平らな状態で所定の位置に置かれていることを確認する。
- 5) ThermoBrite の蓋を閉め、プログラムを開始する。

(3) ハイブリダイゼーション後のスライド洗浄（マニュアル操作および自動処理操作）

- 1) 洗浄を開始する 30 分前に、コプリンジャーに $0.4 \times \text{SSC}/0.3\%$ NP-40 を入れて $73 \pm 1^\circ\text{C}$ の温浴槽で加温する。スライドの洗浄を開始する前に、校正済みの温度計を使用してコプリンジャー内の溶液の温度が $73 \pm 1^\circ\text{C}$ になっていることを確認する。
- 2) 別のコプリンジャーに $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ NP-40 を入れて室温に置いておく。いずれの溶液も 1 日使用した後は廃棄すること。
- 3) スライドからペーパーバンドとカバーグラスを取り除く。
注：ペーパーバンドとカバーグラスは取り除く操作はスライド 1 枚ずつ行い、取り除いた後は直ちに $0.4 \times \text{SSC}/0.3\%$ NP-40 の入ったコプリンジャーに入れること。
- 4) カバーグラスを外したスライドは直ちに $0.4 \times \text{SSC}/0.3\%$ NP-40 の入ったコプリンジャーに入れる。スライドがすべてコプリンジャーに入ったら（コプリンジャー 1 個に 4 枚まで）、 $73 \pm 1^\circ\text{C}$ で 2 分間インキュベーションする。コプリンジャーには一度に 4 枚を超えるスライドを入れないこと。また、スライドが 4 枚より少ない場合は、合計 4 枚になるようにブランクのスライドを追加すること。
注：スライドをコプリンジャーに入れる操作は 2 ～ 3 秒以内に行うこと。もしこれより長かった場合は、スライドが 2 分間を超えて洗浄液に浸かることのないよう注意すること。続けてスライドを洗浄する場合は、スライドを取り出した後コプリンジャーを $73 \pm 1^\circ\text{C}$ まで再び加温する。
- 5) 2 分後にスライドを洗浄液から取り出し、室温の $2 \times \text{SSC}/0.1\%$ NP-40 が入っているコプリンジャーに入れる。5 秒間～1 分間インキュベーションする。
- 6) スライドを洗浄液から取り出し、遮光した状態で（引き出しの中など）ペーパータオル上で立てかけて完全に乾かす。
- 7) $10 \mu\text{L}$ の DAPI II 対比染色液をスライドのターゲットエリアに添加し、泡が入らないように注意してカバーグラス（18 mm 正方形を推奨）を被せる。スライドはシグナル計数まで遮光して保存する。

(4) スライドの保存

ハイブリダイゼーション後のスライド（カバーグラスを被せた状態）は、遮光して -20°C で保存する。蛍光顕微鏡で観察する前に、スライドを -20°C の保存場所から取り出して室温に戻す。

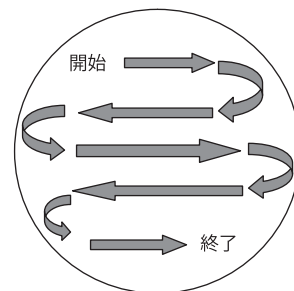
(5) シグナル解析の準備

本キットのプローブのシグナルと DAPI 染色の結果は以下のフィルターを使用して観察する。

- ・ DAPI シングルバンドパス（DAPI single-bandpass）
 - ・ アクアシングルバンドパス（Aqua single-bandpass、17 番染色体）
 - ・ イエロー（ゴールド）シングルバンドパス（Yellow (Gold) single-bandpass、9p21 遺伝子座）
 - ・ グリーン/レッドデュアルバンドパス（Green/Red dual-bandpass、3 番および 7 番染色体）
- 100 W の水銀ランプを装着した落射型蛍光顕微鏡を使用することを強く推奨する。DAPI 対比染色液により、細胞の核は明るいブルーの蛍光に染色される。

(6) 検体スライドの解析

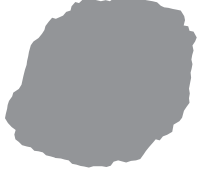
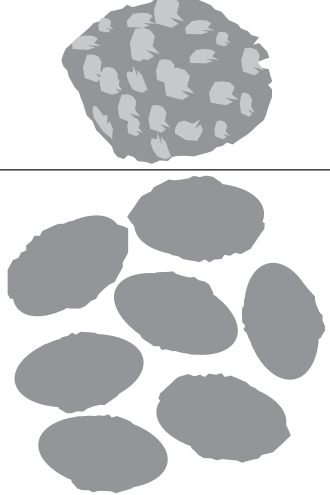
- 1) 上記のフィルターを使用し、倍率 400 倍でターゲットエリアをスキャンする（シグナルの計数は倍率 600 倍または 1000 倍で行う、ステップ 5）参照）。
- 2) 焦点深度を合わせて、ターゲットシグナルのサイズ、形状やノイズ（破片など）を確認する。
- 3) ターゲットエリアの左上から見始め、横方向に移動しながら、同じエリアが入らないように徐々に下に下がっていく（下図参照）。
注：スライド 1 枚は視野 70 ～ 80 個分に相当する。



- 4) 以下の基準（図 1 参照）に従って、悪性（形態学的異常）の疑いがある細胞を選定する。
 - a. 核サイズが大きい
 - b. 核形状が不規則
 - c. DAPI 染色が不均一
 - d. 細胞のクラスター（クラスター内で重なり合っている細胞は計数しないこと）

注：形態学的に異常な細胞からシグナルのカウントを始めること。形態学的に異常な細胞がほとんどない場合は、最も大きな細胞、あるいは最も核の大きな細胞を選択する。形態学的に異常な細胞がすぐに見つからない場合は、スライドを全体に渡ってスキャンし、形態学的にもっとも異常な細胞の核からシグナルを計数する。

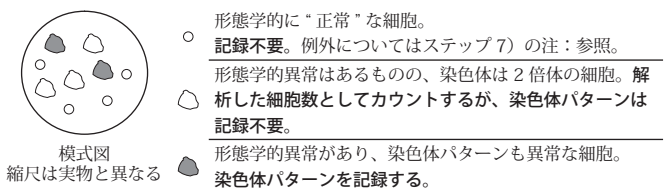
図1 細胞選択基準

正常：計数しない	単独の細胞	
	2つ重なった細胞	
悪性の疑いあり：計数する	核の形態学的異常あり (a、b、c)	
	細胞クラスター (d)	

- 5) 倍率を 600 倍、1000 倍へと上げていく。核内のすべてのシグナルが確認できる
よう、焦点を上下させること。
- 6) 形態学的異常細胞※ 25 個について、前述のフィルターを使用して 4 つのプロ
ープのシグナル数を計数する（図 2、3、4 参照）。
- 7) 以下のいずれかの染色体パターンがあった場合にのみ記録する。
- ・ 3 番（レッド）、7 番（グリーン）、17 番染色体（アクア）のうち、2 種類以上
の染色体数が多い（シグナルが 3 個以上ある）
 - ・ 9p21 遺伝子座が 2 つとも欠失している

3 番、7 番、17 番染色体のシグナルのいずれかが 2 つともない場合は、ハイブリ
ダイゼーションが失敗している可能性があるため、該当する細胞はシグナルの計
数に使用しないこと。

注：周囲の細胞が上記のような異常な染色体パターンを示している場合は、たと
え形態学的異常がなくても記録すること。



※ 形態学的に異常な細胞がすぐに見つからない場合は、スライドを全体に渡っ
てスキャンし、形態学的にもっとも異常な細胞の核からシグナルを計数する。

- 8) 形態学的な異常が見られた細胞の合計数を記録する（2 倍体および異常）。
- 注：2 倍体ではないもののステップ 7) で述べた条件には当てはまらず、4 つの
プローブそれぞれに少なくとも 1 つシグナルが確認できる細胞は、個々のシ
グナル数を記録する必要はないが、2 倍体の細胞と同様に形態学的異常細胞
としてカウントすること。
- 9) 25 個の形態学的異常細胞を解析した後※、以下の基準のいずれかが当てはまった
場合は解析を終了する。
- ・ 25 個中 4 個以上の細胞で、細胞内の 2 種類以上の染色体 (3 番、7 番または 17 番)
が増加している
 - ・ 25 個中 12 個以上の細胞で、9p21 シグナルが 2 つとも欠失している
- 当てはまらない場合は以下のいずれかを満たすまで解析を継続する。
- ・ 染色体が増加した細胞を 4 個検出した
 - ・ 9p21 遺伝子座が 2 つとも欠失している細胞を 12 個検出した
 - ・ サンプル全体の解析を終えた

※ 形態学的に異常な細胞がすぐに見つからない場合は、スライドを全体に渡っ
てスキャンし、形態学的にもっとも異常な細胞の核からシグナルを計数する。

(7) コントロールスライドの解析

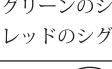
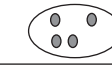
コントロールスライドのシグナルの計数は、まず上記のステップ 1) ～ 6) に従う。
細胞を連続的に 25 個計数し、結果を記録する。形態学的異常細胞だけを選択して計
数しないこと。また、検体スライドのように異常な細胞を 4 個あるいは 12 個検出し
てもその時点で解析を終えないこと。

図2 単色シグナル計数ガイド

1		カウントせずに無視する。それぞれに 1 個のシグナルがある 2 個の細胞か、ねじれた核 1 個である。
2		シグナル 2 個と数える。1 つは非常に小型で、もう 1 つは拡散している※。
3		カウントせずに無視する。どの細胞のシグナルか判別できない。
4		シグナル 2 個と数える。1 個はスプリット型である※。
5		シグナル 3 個と数える。
6		シグナル 4 個と数える。
7		シグナル 3 個と数える。1 個はスプリット型である。

※ 拡散シグナルが 1 ケ所に固まっていて核の境界の内側にある場合にはシグナル
1 個と数える。シグナルが 2 個あってもつながっていることが確認できる場合
は 1 個と数える（スプリットシグナル）。拡散シグナルやスプリットシグナルは
核内の DNA 凝縮の状態によって発生し、凝縮の程度はその細胞が分裂のどの段
階にあるかで異なる。染色体数の増加ではないので注意すること。

図3 2色シグナル計数ガイド

○ グリーンのシグナル ● レッドのシグナル		
1		計数しない。核が重なっており、どちらの核も全体が見えない。
2		レッドシグナル 1 個、グリーンシグナル 1 個とカウントする。レッドシグナルは拡散している※。
3		計数しない。核と核が近すぎるため、境界が判別できない。
4		レッドシグナル 1 個、グリーンシグナル 1 個とカウントする。レッドシグナルはスプリット型である※。
5		レッドシグナル 1 個、グリーンシグナル 2 個とカウントする。グリーンシグナルの 1 つとレッドシグナルはスプリット型である※。
6		レッドシグナル 2 個、グリーンシグナル 1 個とカウントする。
7		レッドシグナル 3 個、グリーンシグナル 1 個とカウントする。
8		レッドシグナル 4 個と数える。

※ 拡散シグナルが 1 ケ所に固まっていて核の境界の内側にある場合にはシグナル
1 個と数える。シグナルが 2 個あってもつながっていることが確認できる場合
は 1 個と数える（スプリットシグナル）。拡散シグナルやスプリットシグナルは
核内の DNA 凝縮の状態によって発生し、凝縮の程度はその細胞が分裂のどの段
階にあるかで異なる。染色体の増加ではないので注意すること。

図4 正常染色体細胞と異常染色体細胞の例

○ 3 番染色体(レッド) ● 17 番染色体(アーク)	
⊗ 7 番染色体(グリーン) ● 9p21 遺伝子座(ゴールド (イエロー))	
1	 正常染色体細胞
2	 染色体異常のある細胞：3 番、17 番染色体が多い
3	 染色体異常のある細胞：9p21 遺伝子座のホモ欠失

4. 品質管理

- コントロールスライドは、ハイブリダイゼーションを行った後、本添付文書に従った適切な顕微鏡、ランプ、フィルターを用いて、各スライドのシグナルの特異性や強度、バックグラウンドノイズとの差、全般的な視認性を確認すること。以上の観点で一定の水準に達していないスライドはシグナルの計数に使用しないこと。
- 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処理、計数すること。各 FISH 処理ごとに、また新しいロットの本キットを使うごとに、コントロールスライドを 1 枚（スライド 1 枚に陽性ターゲット 1 個、陰性ターゲット 1 個）測定すること。コントロールスライドは、検体スライドと同時に本キットによるプローブ染色を行うこと。
- 前述のコントロールスライドの解析手順に従って、シグナルの計数を行う。計数した細胞 25 個分のデータから、各プローブの細胞 1 個当たりの平均シグナル数を算出する。結果が本添付文書の管理範囲に入っていることを確認する。
- コントロールスライドのシグナルの状態が一定の水準に達していない場合、処理が適切に行われなかったか、または本キットの試薬が適切に使用されなかった可能性がある。この場合は、測定結果を一切報告しないこと。コントロールスライドのシグナルの状態は一定の水準に達しているものの、計数結果が管理範囲に入っていない場合は細胞の計数が正しく行われていない可能性があるため、同じスライドをもう一度解析する。検体スライドあるいはコントロール、スライドのいずれかのハイブリダイゼーションが失敗している場合は、【その他】トラブルシューティングガイドを参照すること。
- 臨床検体のハイブリダイゼーションシグナルの判定が困難な場合は、そのスライドの測定は無効である。細胞の数が解析に不十分な場合も、そのスライドの測定は無効である。
- 患者検体は各施設が定めた要件に従って管理すること。ハイブリダイゼーションの質および計測結果は、適切な書式で文書化すること。測定結果の判定を行う際は、ハイブリダイゼーションの質および効率が適切に確認すること。

【測定結果の判定法】

1. 結果の判定

形態学的異常細胞を最低 25 個解析する。これらの細胞について、3 番（レッド）、7 番（グリーン）、17 番（アーク）染色体のうち 2 種類以上の染色体数が増加している（シグナルが 3 個以上ある）場合、または 9p21 遺伝子座のホモ欠失が生じている（9p21 を示すゴールド（イエロー）シグナルが 1 つもない）場合は記録すること。2 種類以上の染色体数が増加している細胞を 4 個以上検出、9p21 遺伝子座のホモ欠失が生じている細胞を 12 個以上検出、あるいはサンプル全体の確認を完了のいずれかの状態になるまで解析を続ける。染色体異常（2 種類以上の染色体数の増加、9p21 遺伝子座のホモ欠失）があった細胞の総数を計算する。測定結果は陽性または陰性で報告する。海外で行われた臨床試験の結果では、膀胱癌再発患者の検体は、2 種類以上の染色体数が増加している細胞が 4 個以上、あるいは 9p21 遺伝子座が欠失している細胞が 12 個以上検出されることが示されている。

結果がカットオフ値（2 種類以上の染色体数が増加している細胞 4 個、あるいは 9p21 遺伝子座のホモ欠失が生じている細胞 12 個）付近の場合は、慎重に判定を行う必要がある。別の測定者が検体スライドを再度計数し、結果を確認すること。引き続き疑わしい結果が出た場合は、新しい検体スライドで再測定を行う。測定結果が臨床所見と矛盾する場合は、病理医と担当医間の協議が必要である。

再測定が必要な場合

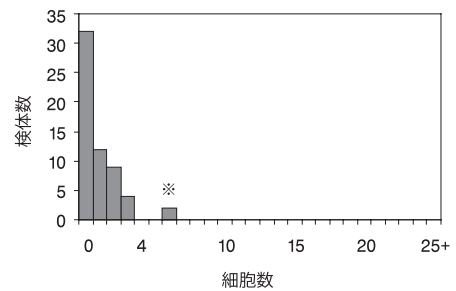
以下の場合、検体を採取し直すかまたは別の検体スライドおよびコントロールスライドを使って再測定を行う。可能性のある原因と対策については【その他】トラブルシューティングガイドを参照すること。

- コントロールスライドのターゲットエリアのいずれかあるいは両方のシグナル計数結果が管理範囲に入っていない場合は、検体スライドの結果の信頼性を担保することができないため再測定すること。
- 解析可能な核が 25 個未満の場合、測定は無効であるため再測定を行うこと。
- スライドの染色状態が技術的な観点（シグナル強度、バックグラウンド、クロスハイブリダイゼーション）で十分ではない場合は、再測定を行うこと。

健康成人における測定値

健康成人 59 名（非喫煙者 50 名、喫煙者 9 名）の尿検体を使用して本キットによる FISH 解析を行った。検討は特異性の検討（【性能】（2）分析特異性の項参照）の一部として実施した。59 名の本キットの結果はすべて陰性であった。これら健康成人の染色体異常細胞数ごとの分布を図 5 に示す。2 例は染色体異常細胞の数が 4 個以上であったが（図 5、※部分）、異常細胞 6 個の内訳はともに 9p21 のホモ欠失のみであった。9p21 欠失に対するカットオフ値は 12 個以上であるため、これら 2 例は陰性と判定される。

図 5 健康成人の染色体異常細胞数分布



本邦におけるカットオフ値の妥当性の検証

健康成人 57 例（喫煙歴あり：26 名、喫煙歴なし：31 名）の尿検体を用いて、本邦における本キットのカットオフ値の妥当性を検証した。

57 例中 56 例で、3 番、7 番および 17 番染色体の異数倍体による染色体異常細胞が 4 個未満であった。57 例中 1 例で、3 番、7 番および 17 番染色体の異数倍体による染色体異常細胞が 4 個以上であった（図 6）。

57 例すべての被験者で 9p21 遺伝子座の欠失による染色体異常細胞が 12 個未満であった（図 7）。

図 6 染色体異常細胞数の分布（異数倍体）

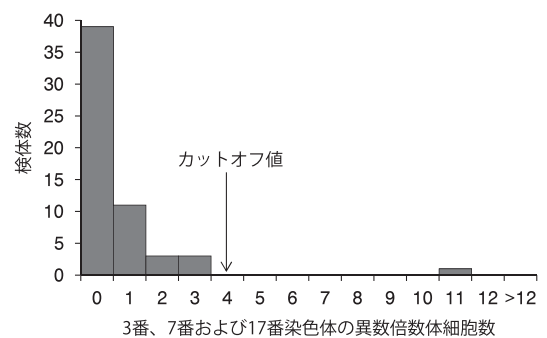
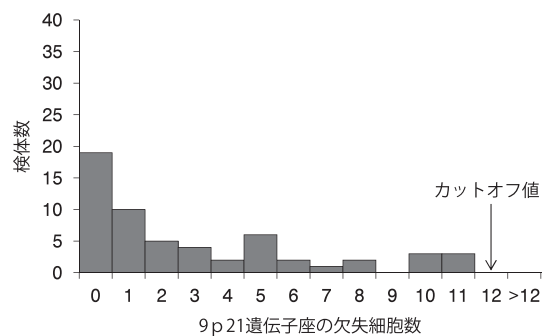


図 7 染色体異常細胞数の分布（欠失）



膀胱癌既往患者における測定値

膀胱癌の既往歴を持つ患者を長期に渡りプロスペクティブに調査した結果、17 ヶ月以内に 62 名の患者が膀胱鏡検査 / 組織診で再発と診断された（【性能】（5）海外臨床性能試験 再発膀胱癌：標準的方法との比較参照）。これら 62 名の患者の染色体異常細胞数ごとの分布を図 8 に示す。また、標準的な検査法（膀胱鏡検査 / 組織診）で再発が確認されなかった患者 114 名の、染色体異常細胞数ごとの分布を図 9 に示す。

図 8 膀胱鏡検査 / 組織診で再発が確認された患者の染色体異常細胞数分布

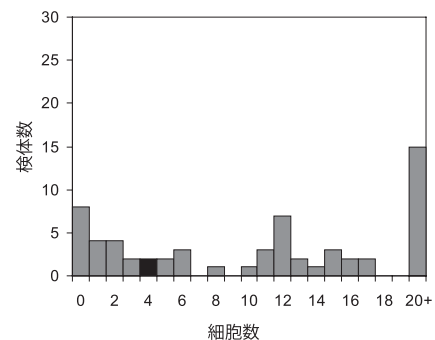
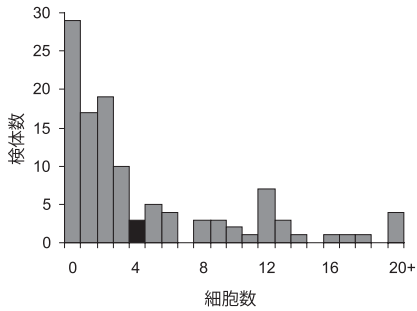


図9 膀胱鏡検査／組織診で再発が確認されなかった患者の染色体異常細胞数分布



コントロールスライド

海外で行った臨床試験において、各試験でプローブチェック ウロビジョン コントロールスライドの陰性ターゲットエリア1個、陽性ターゲットエリア1個（プローブチェック ウロビジョン コントロールスライド1枚）を測定し、検証を行った。シグナルの計数は本添付文書のガイドラインに従って行った。CEP 3、CEP 7、CEP 17、LSI 9p21 プローブのシグナル分布を表2に示す。本添付文書のガイドラインに従って計数を行った場合、シグナルの分布は以下に示した管理範囲に入る。計数結果が管理範囲を外れている場合は、本添付文書のトラブルシューティングガイドを参照すること。

表2 プローブチェック ウロビジョン コントロールスライドのシグナル分布^a

プローブ	データ	シグナル数	
		陰性ターゲット (n = 170)	陽性ターゲット (n = 155)
CEP 3	平均値	2.06	3.97
	SD	0.08	0.23
	CV (%)	4.0%	5.9%
	管理範囲	1.81 ~ 2.31	3.27 ~ 4.68
CEP 7	平均値	1.99	4.02
	SD	0.04	0.30
	CV (%)	2.2%	7.4%
	管理範囲	1.86 ~ 2.13	3.13 ~ 4.92
CEP 17	平均値	1.98	3.23
	SD	0.05	0.22
	CV (%)	2.8%	6.9%
	管理範囲	1.82 ~ 2.15	2.56 ~ 3.89
LSI 9p21	平均値	1.99	0.03
	SD	0.07	0.11
	CV (%)	3.4%	376.3%
	管理範囲	1.79 ~ 2.19	0.00 ~ 0.37

a 細胞25個を計数

ハイブリダイゼーションは本キットを用いて行った。各ロットごとの計数結果はプローブチェック ウロビジョン コントロールスライドのデータシートを参照すること。

2. 判定上の注意

- 本キットはヒト尿検体中の3番、7番、17番染色体および9p21 遺伝子座の特定と計数を目的として至適化されている。
- 本キットの性能は、本添付文書に記載されている手順に従った場合のみに対して検証されている。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行うこと。
- 検体の品質や検体スライドの調製状態が適切ではない場合（例：過剰な粒子、大量の細菌）、本キットの測定結果は無効である。
- シグナルの計数は、レッドとグリーンのシグナルを視覚的に識別できる測定者が行うこと。
- 膀胱癌再発の兆候が全くないにも関わらず本キットの結果が陽性の場合、他の尿路関連癌（例：尿管、尿道、腎臓、男性の前立腺）の可能性があるため、フォローアップが必要である。血尿の症状を持つ患者で行った検討では、初回膀胱鏡検査が陰性で、本キットの結果が陽性だった患者3名が、その後6ヶ月以内に腎臓癌と診断された。
- 本キットが陰性であっても、標準的な検査法（細胞診、膀胱鏡検査など）で陽性の場合、標準的な検査法の結果を優先させること。本キットは膀胱癌にもっとも多いタイプの遺伝子変異を検出するが、本キットでは検出できない遺伝子変異を持つ膀胱癌も存在する。
- サイズ5mm未満、深達度Taの孤立性腫瘍は本キットでは検出できない¹。本キットの結果はスライドに付着した癌細胞の量に依存する。
- プローブチェック ウロビジョン コントロールスライドの性能は、本添付文書に記載されている手順に従った場合のみに対して検証されている。手順を変更すると、プローブチェック ウロビジョン コントロールスライドの測定結果に影響を与える可能性がある。
- 測定者の主観的なシグナル判定やハイブリダイゼーション不良は、プローブチェック ウロビジョン コントロールスライドの測定結果に影響を与える可能性がある。
- プローブチェック ウロビジョン コントロールスライドは培養細胞株から作製されているため、細胞のサイズや形態が尿検体とは異なる場合がある。

【臨床的意義】

本キットは、尿中細胞の3番、7番、17番染色体の異数倍体数、並びに9番染色体の9p21 遺伝子座の欠失を検出することにより、膀胱癌の再発の診断補助に用いる。

【性能】

(1) ハイブリダイゼーション効率（出典：社内資料）

海外で行った臨床試験においてプローブチェック ウロビジョン コントロールスライドを測定したところ、ターゲットの1.2%（4/328、95% CI（信頼区間）：0.3%、3.1%）にハイブリダイゼーション不良が認められた。コントロールスライドは、培養したヒト膀胱癌細胞株（陽性ターゲット）および正常リンパ芽球株（陰性ターゲット）で作製されており、ハイブリダイゼーションに最適な条件となっている。ハイブリダイゼーション効率は98.8%（324/328、95% CI：96.9%、99.7%）で、いずれのプローブのシグナルも認められない細胞は2%未満であった。別のコントロールスライド6枚を自動で前処理し（VP 2000 プロセッサーを使用）、自動共変性装置 HYBrite を使用してスライド調製を行ったところ、ハイブリダイゼーション効率は100%（6/6、95% CI：54.1%、100%）であった。

再現性の検討において、ヒト膀胱癌細胞株を検体としてスライドの前処理と調製をマニュアル操作で行ったところ、初回の試験では80例中76例で有効な結果を得た。結果が無効とされた4例のうち、3例にハイブリダイゼーション不良が認められたため、ハイブリダイゼーション効率は96.2%（76/79、95% CI：89.3%、99.2%）であった。ハイブリダイゼーション効率の計算式は以下のとおりである。

ハイブリダイゼーション効率（%）＝

$$100 - \frac{\text{ハイブリダイゼーション不良検体数}}{(\text{有効結果検体数} + \text{ハイブリダイゼーション不良検体数})} \times 100$$

特異性の検討において、膀胱癌の既往のない患者の尿を検体としてスライドの前処理と調製をマニュアル操作で行ったところ、初回の試験では309例中230例で有効な結果を得た。結果が無効とされた検体のうち18例でハイブリダイゼーション不良が認められたため、ハイブリダイゼーション効率は93%（230/248、95% CI：88.8%、95.6%）であった。ハイブリダイゼーション効率の計算式は前述のとおりである。その他の検体で結果が無効となった原因は、検体の質（細胞数の不足など）や技術的な問題（オイルがカバーガラスの下に入ったなど）であった。

結果が無効とされた検体79例のうち12例は検体量が不足しており再検査を実施することができなかったため、残りの67例について再検査を行った。再検査を行った67例のうち45例で有効な結果が得られ、最終的に有効な結果が得られなかった検体は34例であった（検体量が不足し再検査を実施できなかった12例を含む）。初回検査と再検査の結果を総合すると、89%の検体（275/309、95% CI：85.0%、92.3%）で有効な結果が得られた。

同様に、海外で行った臨床試験において、膀胱癌既往患者の尿を検体としてスライドの前処理と調製をマニュアル操作で行ったところ、初回検査では251例中175例で有効な結果を得た。結果が無効とされた検体76例のうち、26例でハイブリダイゼーション不良が認められた。これらの検体のハイブリダイゼーション効率は87.1%（175/201、95% CI：81.6%、91.4%）であった。ハイブリダイゼーション効率の計算式は前述のとおりである。その他の検体で結果が無効となった原因は、検体の質（細胞数の不足など）や技術的な問題（スライドの破損など）であった。

検体76例のうち6例は検体量が不足しており再検査を実施することができなかったため、残りの70例についてマニュアル操作で再検査を行った。再検査を行った70例のうち59例は有効な結果が得られ、最終的に有効な結果が得られなかった検体は17例であった（検体量が不足し再検査を実施できなかった6例を含む）。初回検査と再検査の結果を総合すると、93.2%の検体（234/251、95% CI：89.4%、96.0%）で有効な結果が得られた。

海外で行った臨床試験において、膀胱癌と同様の症状を示す患者の尿を検体としてスライドの調製を自動処理で行ったところ、初回検査では570例（適格患者497例およびフォローアップ患者73例）中521例で有効な結果を得た。結果が無効とされた検体49例のうち、5例でハイブリダイゼーション不良が認められた。これらの検体のハイブリダイゼーション効率は99.0%（521/526、95% CI：97.8%、99.7%）であった。ハイブリダイゼーション効率の計算式は前述のとおりである。その他の検体が無効となった原因は、検体の質（細胞数の不足など）や技術的な問題（スライドの破損、コントロールスライドの結果が規格外など）であった。またこれらのうち44例について前処理を自動で行ったところ、ハイブリダイゼーション効率は96.7%（29/30、95% CI：82.8%、99.9%）であった。

結果が無効とされた49例のうち、検体量が不足していた6例を除き、43例について再検査を行った。再検査を行った43例のうち26例で有効な結果が得られ、最終的に有効な結果が得られなかった検体は23例であった（検体量が不足し再検査を実施できなかった6例を含む）。初回検査と再検査の結果を総合すると、96.0%の検体（547/570、95% CI：94.0%、97.0%）で有効な結果が得られた。

通常の臨床現場における条件を想定した以上の検討の結果では、ハイブリダイゼーション効率は87%以上であった。また、検体の処理をマニュアル操作で行った場合と自動処理した場合のハイブリダイゼーション効率は同等であった。

(2) 分析特異性（出典：社内資料）

分裂中期染色体における本キットのプローブのハイブリダイゼーション位置に対する特異性を、社内プロトコルに従って検討した。計42個の分裂中期細胞について、Reverse DAPI banding 法で3番、7番、17番染色体および9p21 遺伝子座の位置を特定し、続いて本キットによる測定を行った。細胞42個いずれにおいても他の染色体部位へのクロスハイブリダイゼーションは確認されず、4つのプローブは目的とするターゲット領域のみにハイブリダイズしていた。

(3) 再現性

患者検体

膀胱癌患者では患者 1 名から得られる細胞数が少なく、複数の検査者で検査を行って再現性の検討を行うことができない。このため形態学的異常細胞における再現性の検討は行っていない。同一検体で複数回測定を行った検討結果がないため、検体の取り扱い操作や染色、および計数時の誤差などによってもたらされる測定結果の変動幅は不明である。少数の解析結果から、形態学的異常細胞の数が【測定結果の判定法】に示されているカットオフ値（4 個あるいは 12 個）付近であるサンプルでは、相対的にばらつきが大きくなることが示唆される。

膀胱癌培養細胞株検体

本キットの再現性を検討するため、4 種類の異なる膀胱癌培養細胞株を用いてスライドを作製し、4 施設において CEP 3、CEP 7、CEP 17、LSI 9p21 のシグナル分布を解析した。シグナル分布が正常な膀胱癌培養細胞株 1 例、およびシグナル分布に異常のある膀胱癌培養細胞株 3 例を用いて検体スライドを調製した後、本添付文書のコントロールスライドの解析手順に従って、CEP 3、CEP 7、CEP 17、LSI 9p21 の各シグナルを解析した。各施設において同じ培養細胞株のスライドを 1 日に 4 枚調製し、これを 4 日間繰り返した（1 日に培養細胞株 1 種類）。プローブはすべての検体に対して同じロットを使用した。計数時の偏りを排除するため各測定日ごとに本来測定すべき検体とは別にダミー検体を 1 例追加し、このダミー検体の結果は最終的なデータ解析では除外した。各施設において 1 名の検査者が検体を評価した。初回検査では 95.0% (76/80) の検体で有効な結果が得られた。再検査ではすべてのスライドのハイブリダイゼーションが成功した。

各プローブのシグナルの平均値、標準偏差、CV（%）を表 3 に示す。表に示されているとおり、各プローブの平均値の変動幅は小さかった。検体 2 は 9p21 遺伝子座が欠失しているためこのプローブの CV（%）が大きいものの、9p21 遺伝子座の欠失は容易に特定が可能で、この検体の試験結果の 95%（19/20）は、LSI 9p21 シグナル数の平均値が 0.2 個未満であった。

膀胱癌培養細胞株を用いた本検討では偽陰性は見られず、検体 2、3、4 の結果のすべて（各検体 16 回分、48/48）が陽性と判定された。陽性の判定基準は、染色体数が増加している細胞 4 個以上（CEP 3、CEP 7、CEP 17 のうち 2 種類以上でシグナルが 3 個以上）、あるいは 9p21 遺伝子座のホモ欠失（LSI 9p21 シグナルなし）が生じている細胞 12 個以上である。シグナルが正常な検体の 16 回の測定結果のうち、1 回は上記の判定基準で陽性と判定された。このケースでは、細胞 6 個で染色体数が増加していた。

表 3 施設間再現性

検体		シグナル数			
		CEP 3	CEP 7	CEP 17	LSI 9p21
1	平均値	2.21	2.12	2.14	2.19
	SD	0.15	0.12	0.12	0.21
	CV（%）	6.79%	5.52%	5.66%	9.66%
	範囲	2.08 ～ 2.68	1.92 ～ 2.40	1.96 ～ 2.52	2.00 ～ 2.92
	n	16	16	16	16
2	平均値	3.95	4.31	3.42	0.03
	SD	0.10	0.25	0.16	0.07
	CV（%）	2.49%	5.76%	4.76%	220.44%
	範囲	3.84 ～ 4.16	3.76 ～ 4.84	3.16 ～ 3.72	0.00 ～ 0.24
	n	16	16	16	16
3	平均値	4.28	3.55	3.42	3.86
	SD	0.32	0.34	0.25	0.47
	CV（%）	7.58%	9.47%	7.21%	12.14%
	範囲	3.88 ～ 5.04	3.12 ～ 4.24	3.04 ～ 3.96	3.16 ～ 4.72
	n	16	16	16	16
4	平均値	3.18	3.88	3.84	3.85
	SD	0.15	0.10	0.10	0.15
	CV（%）	4.63%	2.45%	2.70%	3.90%
	範囲	2.96 ～ 3.52	3.64 ～ 4.04	3.64 ～ 4.12	3.56 ～ 4.24
	n	16	16	16	16

(4) 国内臨床性能試験

国内 12 施設で膀胱癌の既往歴のある患者 486 症例を対象に尿検体を用いて、本キットの再発膀胱癌の検出における有用性を検討した。

本試験は、エントリー後の最初のフォローアップのための来院時に実施し（1 回目）、1 回目で組織診を実施しなかった患者は次のフォローアップのための来院時にも実施した（2 回目）。

486 症例中 5 例は適格基準に合致しなかったため 481 例を「組入れ」とした。被験者の背景を次の表に示す。

表 4 被験者背景のまとめ（481 例）

性別	男	416	86.5%
	女	65	13.5%
年齢	平均	70.7	
	中央値	72.0	
	範囲	26 ～ 91	
初発再発	初発	326	67.8%
	再発	155	32.2%
腫瘍数	単発	201	41.8%
	多発	221	45.9%
	判定不能	59	
異型度※	低異型度	164	42.2%
	高異型度	190	48.8%
	判定困難	35	
異型度（旧規約分類）※	G1	56	17.6%
	G2	150	47.0%
	G3	104	32.6%
	GX	9	2.8%
深達度	Ta	279	58.0%
	T1	146	30.4%
	T2 以上	12	2.5%
	Tis	33	6.9%
	判定困難	11	
併発 CIS	なし	342	71.1%
	あり	102	21.2%
	不明	37	

※ 異型度の所見は計 389 例であり、膀胱癌取扱い規約第 3 版（2001 年）の旧規約分類に基づいた所見のみの症例が 92 例であった。

481 例のうち、計画書逸脱 13 例および評価不可の 4 例をデータ解析から除外し、464 例を本キットの 1 回目評価対象とした。

468 例のうち、1 回目解析で試験が完了した 54 例、計画書逸脱 15 例、および評価不可の 3 例をデータ解析から除外し、396 例を本キットの 2 回目評価対象とした。

なお、本試験では、病理組織学的に膀胱癌と確認された症例を癌陽性として、本キットの感度・特異度を算出した。

1 回目の感度は 50.0%（95% CI：35.2 – 64.8%）、特異度は 72.4%（95% CI：68.3 – 76.8%）であった（表 5）。

2 回目の感度は 33.3%（95% CI：9.5 – 57.2%）、特異度は 84.0%（95% CI：80.3 – 87.7%）であった（表 6）。

表 5 1 回目の感度・特異度

		膀胱癌		
		陽性	陰性	計
本キット	陽性	22	116	138
	陰性	22	304	326
	計	44	420	464

感度：50.0%（95% CI：35.2 – 64.8%）

特異度：72.4%（95% CI：68.3 – 76.8%）

陽性的中率：15.9%

陰性的中率：93.3%

表 6 2 回目の感度・特異度

		膀胱癌		
		陽性	陰性	計
本キット	陽性	5	61	66
	陰性	10	320	330
	計	15	381	396

感度 33.3%（95% CI：9.5 – 57.2%）

特異度 84.0%（95% CI：80.3 – 87.7%）

陽性的中率：7.6%

陰性的中率：97.0%

1 回目癌陽性患者 44 例の組織学的所見「腫瘍の異型度・深達度・数・大きさ・併発 CIS の有無」ごとの本キットの感度を表 7 に示す。

2 回目癌陽性患者 15 例の組織学的所見「腫瘍の異型度・深達度・数・大きさ・併発 CIS の有無」ごとの本キットの感度を表 8 に示す。

表 7 1 回目癌陽性被験者 44 例の組織学的所見ごとの感度

		症例数	感度
異型度	低異型度	24	41.7%
	高異型度	18	66.7%
	判定困難	2	—
深達度	Tis	4	100.0%
	Ta	26	38.5%
	T1	5	80.0%
	T2 以上	6	66.7%
	判定困難	3	—
腫瘍数	単発	15	46.7%
	多発	19	42.1%
	測定不能	10	—
腫瘍径	3 cm 以下	24	37.5%
	3 cm より大	0	—
	不詳	20	—
併発 CIS	なし	33	42.4%
	あり	8	87.5%
	不明	3	—

表 8 2 回目癌陽性被験者 15 例の組織学的所見ごとの感度

		症例数	感度
異型度	低異型度	12	41.7%
	高異型度	2	0.0%
	判定困難	1	—
深達度	Tis	1	0.0%
	Ta	13	38.5%
	T1	1	0.0%
	T2 以上	0	—
	判定困難	0	—
腫瘍数	単発	10	20.0%
	多発	5	60.0%
	測定不能	0	—
腫瘍径	3 cm 以下	11	36.4%
	3 cm より大	0	—
	不詳	4	—
併発 CIS	なし	12	33.3%
	あり	2	50.0%
	不明	1	—

1 回目癌陽性被験者 44 例の各組織学的所見と異数倍数体、並びに遺伝子座の欠失との関係を表 9 に示す。

表 9 1 回目癌陽性被験者 44 例の各組織学的所見と異数倍数体、並びに遺伝子座の欠失との関係

	症例数	本キット陽性	(異数倍数体)	(欠失)	(倍数体 + 欠失)
全体	44	22	18	1	3
	症例数	本キット陽性	(異数倍数体)	(欠失)	(倍数体 + 欠失)
低異型度	24	10	9	1	0
高異型度	18	12	9	0	3
判定困難	2	0	0	0	0
	症例数	本キット陽性	(異数倍数体)	(欠失)	(倍数体 + 欠失)
pTis	4	4	3	0	1
pTa	26	10	9	1	0
pT1	5	4	3	0	1
pT2 以上	6	4	3	0	1
判定困難	3	0	0	0	0
	症例数	本キット陽性	(異数倍数体)	(欠失)	(倍数体 + 欠失)
単発	15	7	7	0	0
多発	19	8	5	1	2
測定不能	10	7	6	0	1
	症例数	本キット陽性	(異数倍数体)	(欠失)	(倍数体 + 欠失)
併発 CIS なし	33	14	12	1	1
併発 CIS あり	8	7	5	0	2
不明	3	1	1	0	0

本キットと尿細胞診を併用した場合の 1 回目の感度は 56.8%、特異度は 70.7% であった。(表 10)

なお、本試験では、尿細胞診の Class III を陰性と判定したが、本解析では Class III を陽性と判定し、本キットもしくは尿細胞診のいずれかで陽性と判定された症例を陽性、いずれでも陰性の症例を陰性とした。

すなわち、Class IV、V の 2 例に Class III 8 例を加えた 10 例に本キットでのみ陽性と判定された 15 例の計 25 例を陽性として、評価した。

表 10 1 回目の感度・特異度（本キットと尿細胞診の併用（Class III を含めた場合））

		膀胱癌		
		陽性	陰性	計
本キット + 尿細胞診	陽性	25	123	148
	陰性	19	297	316
	計	44	420	464

感度：56.8%

特異度：70.7%

陽性的中率：16.9%

陰性的中率：94.0%

また、Class III を陽性と判定した場合の尿細胞診の 1 回目の感度は 22.7%、特異度は 94.3% であった。(表 11)

表 11 1 回目の感度・特異度（尿細胞診（Class III を含めた場合））

		膀胱癌		
		陽性	陰性	計
尿細胞診	陽性	10	24	34
	陰性	34	399	433
	計	44	423	467

感度：22.7%

特異度：94.3%

陽性的中率：29.4%

陰性的中率：92.1%

(5) 海外臨床性能試験（出典：社内資料）

再発膀胱癌：標準的方法との比較

検討概要

膀胱癌患者の再発をモニタリングする方法として標準的な膀胱鏡検査および組織診と比較した本キットの性能を、21 施設で 17 ヶ月に渡って評価することにより、複数施設によるプロスペクティブな縦断的研究を行った。すべての算定に用いた比較対照は、膀胱鏡検査で陽性あるいは疑いありと判定された症例を組織診で確認した。膀胱鏡検査で陽性だったものの組織診の結果がない検体（例えば病変部に高周波療法が行われたケースなど）は、膀胱癌と判断した。膀胱鏡検査で疑いありだったものの組織診の結果がない検体は、解析から除外した。21 施設において計 309 例の外来受診があり、うち 251 例が有効であった。無効とした 58 例の内訳は次の通りである。適格基準を満たさない：17 例、尿検体量の不足：16 例、膀胱鏡検査で疑いありだが組織診の結果がない：10 例、尿検体が検査施設に届かなかった：15 例。検体の保存にはすべてカーボワックスを使用し、尿検体の前処理と分析はすべて 1 施設で行った。前処理と FISH 操作はすべてマニュアル操作で行った。有効な外来受診 251 例のうち、234 例（患者数 176 名）において本キットの有効な結果が得られた。検討期間中に再発した（膀胱鏡検査 / 組織診による診断）患者は、初回再発診断時の検査結果を使用した（すなわち再発が確定した受診時の結果）。再発しなかった患者で複数回受診している場合は、最後の検査結果を使用した。176 名の患者の内訳を表 12 に示す。

表 12 患者の内訳
再発膀胱癌の検討

性別		
男性		132
	女性	44
人種		
白色人種		153
	アフリカ系アメリカ人	3
	ヒスパニック系	3
	その他	13
	不明	4
年齢		
範囲		36 ～ 98 歳
	平均	71 歳

標準法との比較

適格基準を満たし、本キットにおいて有効な結果が得られた患者のうち、62 例は膀胱鏡検査 / 組織診により陽性と診断された。癌の深達度と異型度別の患者数の内訳を表 13 に示す。

表 13 再発膀胱癌の検討
深達度、異型度別患者数

深達度	異型度					計
	ND	1	2	3	不明	
ND	11	0	0	0	0	11
Ta	0	20	6	6	0	32
T1	0	0	2	3	1	6
T2	0	0	0	2	1	3
Tis	0	0	0	7	0	7
不明	0	2	1	0	0	3
計	11	22	9	18	2	62

ND = 評価なし、または生検未実施

生検の結果があるすべての検体について、膀胱鏡検査 / 組織診による結果に対する本キットの測定結果を、深達度と異型度別に表 14 に示す。膀胱鏡検査 / 組織診と比較した場合、本キットは深達度が重度な症例 (T2 と Tis) において、もっとも高い臨床的感度を示した (100%)。

表 14 膀胱鏡検査 / 組織診に対する、
本キットの深達度と異型度別再発膀胱癌検出能 ^a

臨床的感度 (%)	
深達度	
全患者	36/48 (75.0%)
Ta、異型度 1	11/20 (55.0%)
Ta、異型度 2, 3	10/12 (83.3%)
T1	5/6 (83.3%)
T2	3/3 (100%)
Tis	7/7 (100%)
異型度	
全患者	36/49 (73.5%)
1	12/22 (54.5%)
2	7/9 (77.8%)
3	17/18 (94.4%)

^a 生検未実施例が 11 例あった。また 3 例は深達度の評価なし、2 例は異型度の評価なしであった。

膀胱鏡検査 / 組織診に対する本キットの性能を表 15 に示す。膀胱鏡検査で陽性または陽性の疑いありで組織診を行った検体における、本キットによる FISH 解析の結果は、臨床的感度 71.0%、臨床的特異性 65.8%であった。

注：本検討では、膀胱鏡検査陽性で生検未実施の患者を陽性と判断した。

表 15 本キットと膀胱鏡検査 / 組織診の再発膀胱癌検出能の比較

		膀胱鏡検査 / 組織診		
		陽性	陰性	計
本キット	陽性	44	39	83
	陰性	18	75	93
	計	62	114	176

臨床的感度 = 71.0% (44/62) (95% CI = 58.1 - 81.8%)
臨床的特異性 = 65.8% (75/114) (95% CI = 56.3 - 74.4%)
診断精度 = 67.6% (119/176) (95% CI = 60.2 - 74.5%)
陽性的中率 = 53.0% (44/83) (95% CI = 41.7 - 64.1%)
陰性的中率 = 80.6% (75/93) (95% CI = 71.1 - 88.1%)
有病率 = 35.2% (62/176) (95% CI = 28.2 - 42.8%)

有病率を 10%、20%、30%とした場合の陽性的中率と陰性的中率を推定した。結果を表 16 に示す。これらの値は臨床的感度 71.0%、臨床的特異性 65.8% (表 15) を前提として推定した。

表 16 本キットの陽性的中率と陰性的中率の推定値

再発膀胱癌有病率	陽性的中率	陰性的中率
10%	18.7%	95.3%
20%	34.2%	90.1%
30%	47.1%	84.1%

本キットによる測定の過去 3 ヶ月以内に、直近の治療として BCG 膀胱療法を受けていた患者における、本キットと膀胱鏡検査 / 組織診の検出能を比較した結果を表 17 に示す。BCG 療法の実施期間は平均 1.3 ヶ月 (範囲: 0.4 ~ 3.4 ヶ月) であった。BCG 療法の終了から本キットの測定までの期間は平均 1.3 ヶ月で、0 ヶ月 (本キット測定時に BCG 療法中) ~ 3 ヶ月の範囲であった。陽性患者 12 例の内訳は、Tis が 3 例、深達度 Ta 異型度 1 が 3 例、深達度 Ta 異型度 3 が 3 例、深達度 T1 異型度 3 が 2 例、深達度 T2 異型度 3 (筋層浸潤) が 1 例であった。偽陰性 1 例は深達度 Ta 異型度 1 であった。

表 17 3 ヶ月以内に BCG 療法を受けた患者における
本キットと膀胱鏡検査 / 組織診の再発膀胱癌検出能の比較

		膀胱鏡検査 / 組織診		
		陽性	陰性	計
本キット	陽性	12	10	22
	陰性	1	16	17
	計	13	26	39

臨床的感度 = 92.3% (95% CI = 64.0 - 99.8%)
臨床的特異性 = 61.5% (95% CI = 40.6 - 79.8%)
診断精度 = 71.8% (95% CI = 55.1 - 85.0%)
陽性的中率 = 54.5% (95% CI = 32.2 - 75.6%)
陰性的中率 = 94.1% (95% CI = 71.3 - 99.9%)
有病率 = 33.3% (95% CI = 19.1 - 50.2%)

縦断的研究

上記複数施設によるプロスペクティブ研究に続いて、臨床試験期間中の受診では再発が確認されなかった患者 (すなわち膀胱鏡検査 / 組織診で陰性) について、その後約 1 年間に渡り外来受診情報 (本キットや BTastat TEST の測定はなし) を収集した。その結果、適格基準を満たす患者 114 名のうち 105 名から計 335 例の外来受診結果が得られ、うち有効な受診結果は患者 104 名分、計 299 例であった。

注：患者 1 名は外来を 1 回受診していたが、適格基準を満たしていなかった。

無効とした外来受診結果 36 例の内訳は、適格基準を満たしていないケースが 21 例、膀胱鏡検査で疑いありとされたものの組織診の結果がないケースが 15 例であった。再発が認められた (膀胱鏡検査 / 組織診による診断) 患者は、初回再発診断時の外来受診時のデータを使用し、再発しなかった患者が複数回受診している場合は、最後の外来受診時のデータを使用した。

本キット陽性、膀胱鏡検査 / 組織診陰性の患者群は、本キットと膀胱鏡検査 / 組織診がともに陰性の患者群よりも高い再発率を示した。結果を表 18 に示す。

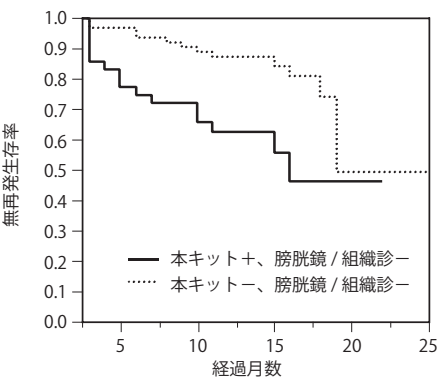
表 18 縦断的検討結果の概要

	本キット陰性 膀胱鏡検査 / 組織診陰性	本キット陽性 膀胱鏡検査 / 組織診陰性
再発率 (%)	19.12% (13/68)	41.67% (15/36)
フォローアップ期間 (月) :		
再発なし	14.3 ± 3.9	13.5 ± 3.4
再発あり	11.0 ± 5.8	6.9 ± 4.4
再発例の詳細 ^a :		
深達度		
Ta、異型度 1	5	3
Ta、異型度 2, 3	0	1
T1	2	0
Tis	0	1
異型度		
1	5	5
2	1	1
3	1	1

^a 8 例 (本キット陽性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性 4 例、本キット陰性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性 4 例) では生検が実施されていなかった。医療機関から評価を行った病理医にスライドが提供されなかったケースが 6 例 (本キット陽性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性 4 例、本キット陰性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性 2 例) があった。また本キット陽性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性の 2 例は深達度の評価なしであった。

経過月数による無再発率の推移を、右側打ち切り product-limit 法 (カプラン・マイヤー法) で示した。log-rank 検定により 2 つの患者群 (推定陽性群、真の陰性群) の均一性を評価した。図 10 に示した通り、本キット陽性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性群と本キット陰性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性群では、フォローアップ期間を通して統計的な相違が認められ、p 値は 0.0031 であった。区間打ち切りを直接考慮したパラメトリックなワイブル分布を当てはめて同様の分析を行ったところ、同様に 2 つの群には明らかな相違があり、p 値は 0.0236 であった。

図 10 本キット陰性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性群と
本キット陽性および膀胱鏡検査 / 組織診陰性群における無再発生存率



特異性

検討概要

本キットの特異性は、再発膀胱癌の検討では65.8%、血尿患者による検討では77.7%であったが、膀胱癌の既往歴や臨床的エビデンスがない健康成人および泌尿器疾患患者における本キットの特異性を算出するため、複数施設においてプロスペクティブ研究を行った。

検討期間中に計315例の外來受診があり、309例の有効な受診結果を得た。無効とした6例の内訳は、適格基準を満たさなかったケースが1例、尿検体量の不足が4例、尿検体が検査施設に届かなかったケースが1例であった。検体の保存にはすべてカーボワックスを使用し、前処理とFISH操作はすべてマニュアル操作で行った。患者によっては健康状態が複数のカテゴリーに適合するため、275名の被験者検体から述べ357件の有効なデータポイントが得られた。カテゴリーごとの被験者数を表19に示す。

表 19 被験者のカテゴリー

カテゴリー	被験者数
健康成人	59
非喫煙者	50
喫煙者	9
非泌尿生殖器良性疾患	48
非泌尿生殖器癌	3
泌尿生殖器疾患	184
前立腺肥大症	58
顕微鏡的血尿	15
間質性膀胱炎	11
炎症 / 感染症：その他	17
性感染症	2
その他	81
泌尿生殖器癌（膀胱以外）	61
前立腺	58
腎臓	3
泌尿生殖器損傷	2
計	357

特異性

膀胱癌の既往歴や臨床的エビデンスがない健康成人および泌尿器疾患患者における本キットの総特異性は、93.0% (332/357) であった。総特異性の概要およびカテゴリーごとの特異性を表20に示す。本検討では被験者が複数のカテゴリーに属しているケースがあり、各カテゴリーで重複してカウントした場合、潜在的なバイアスが発生する可能性がある。このため、被験者1名につき一度のみカウントして特異性を算出したところ、94.5% (260/275、表20) であった。

表 20 概要：本キットの特異性

総特異性	93.0% (332/357)
各被験者を一度のみカウント	94.5% (260/275)
健康成人 vs 非健康成人	
健康	100% (59/59)
非健康	93.1% (201/216)
喫煙者 vs 非喫煙者^a	
喫煙者	95.2% (40/42)
非喫煙者	94.7% (234/247)
カテゴリーごと^b	
健康成人	100% (59/59)
健康非喫煙者	100% (50/50)
健康喫煙者	100% (9/9)
非泌尿生殖器良性疾患	91.7% (44/48)
非泌尿生殖器癌 ^c	66.7% (2/3)
泌尿生殖器疾患	91.9% (169/184)
前立腺肥大症	91.4% (53/58)
顕微鏡的血尿	86.7% (13/15)
間質性膀胱炎	90.7% (10/11)
炎症 / 感染症：その他	100% (17/17)
性感染症	100% (2/2)
その他	91.4% (74/81)
泌尿生殖器癌（非膀胱）	91.8% (56/61)
前立腺	91.4% (53/58)
腎臓	100% (3/3)
泌尿生殖器損傷	100% (2/2)

^a 1名は喫煙状態不明であった。
^b 合計数が275名を超えているのは、複数の疾患カテゴリーに属する非健康成人被験者がいたためである。
^c 非泌尿生殖器癌の内訳は、乳癌1名、結腸癌1名、白血病1名であった。

以上の結果から、マニュアル法による前処理とFISH操作を行った場合の本キットの特異性は、全体で93.0% (332/357)、健康成人では100% (59/59) であることが示された。被験者1名につき一度のみカウントした場合の特異性は94.5% (260/275) であった。偽陽性を示した15例の内訳は次の通りであった（同一の被験者が複数のカテゴリーに属している場合もある）：非泌尿生殖器良性疾患4例、非泌尿生殖器癌1例、泌尿生殖器疾患15例、泌尿生殖器癌5例。以上は、これらの検体群に対する本キットの高い特異性を示唆しており、本キットのプロープが意図した染色体のみにハイブリダイズしていることを示している。

【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。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 Laboratories²、OSHA Standards on Bloodborne Pathogens³、CLSI Document M29-A3⁴、または他の適切なバイオセーフティ基準⁵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。
- すべての生体検体は、感染性病原体を伝播する可能性があるものとして取り扱うこと。本キットとともに使用することが推奨されているプロープチェック ウロビジョン コントロールスライドは、ヒト培養細胞株をカルノア固定液で固定して作製している。ヒト由来物質が完全に感染伝播しないことを保証することは不可能であるため、すべてのヒト検体およびコントロールスライドは一般的な注意事項に従って取り扱うこと。米国のCenters for Disease Control and Preventionでは検体取り扱いのガイドラインを提供している⁶。
- 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。
- 本キットのプロープは催奇形物質であるホルムアミドを含む。皮膚および粘膜に触れないようにすること。詳細は安全データシート（SDS）を参照すること。
- プロープチェック ウロビジョン コントロールスライドは、皮膚および粘膜に触れないようにすること。
- 次の試薬類に関する危険有害性情報、注意事項を示す。

・ウロビジョン DNA FISH プロープ



危険：ホルムアミドを含む

- H360D 胎児への悪影響のおそれ
- P201 使用前に取扱説明書入手すること。
- 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。

・NP-40



危険：Triton X-100を含む

- H302 飲み込むと有害
- H318 重篤な眼の損傷
- H412 長期継続的影響により水生生物に有害
- 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。
- P273 環境への放出を避けること。
- P305+P351+P338 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+P312 飲み込んだ場合：気分が悪い時は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。



- ・次の試薬類に関する危険有害性情報、注意事項を示す。

・FISH プレトリートメントキットのプロテアーゼ



危険：ペプシン A 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

P284 換気が不十分な場合、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+P338 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ぐこと。

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。

・FISH プレトリートメントキットのプロテアーゼ緩衝液



危険

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。

P305+P351+P338 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。

P303+P361+P353 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。

P310 直ちに医師に連絡すること。

P301+P330+P331 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。

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。

注：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。
- ・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。
- ・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完全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。
- ・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やハイブリダイゼーション後のスライドを取り扱うすべての操作は、なるべく暗い場所で行うこと。明るさが必要ない工程（インキュベーション、スライドの乾燥など）は、すべて遮光下で行うこと。
- ・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。
- ・未開封の本キットは遮光および防湿し、キットごと -20℃で保存すること。20 × SSC 塩および NP-40 は、キットから取り出して室温で保存することもできる。未開封の構成試薬の使用期限は、各構成試薬のラベルに表示されている。以上の保存条件は、開封前と開封後のどちらのキットにも適用される。
- ・一部の構成試薬は光、高温、多湿で劣化するため、このような条件下に置かないこと。本添付文書やキットに表示されている保存条件に従わなかった場合、正しい測定結果が得られない可能性がある。
- ・注：本添付文書またはラベルに保存条件が示されていない試薬類は、製造元が推奨する保存条件に従うこと。
- ・使用前のプロブチェック ウロビジョン コントロールスライドは、-20℃で保存すること。30℃を超える温度に長時間置かないこと。
- ・プロブチェック ウロビジョン コントロールスライドは、湿度を避けるため乾燥剤入りの密閉容器に入れて -20℃で保存した場合、使用期限まで安定である。

- ・FISH プレトリートメントキットの各試薬の保存条件は以下のとおりである。

・プロテアーゼ緩衝液	2 ～ 25℃
・プロテアーゼ	-20 ～ 8℃
・PBS	2 ～ 25℃
・100 × 塩化マグネシウム	2 ～ 25℃
・20 × SSC 塩	-25 ～ 30℃

(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）またはグルタルアルデヒド（2%、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に従って処理すること⁵。
- ・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²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、-20℃で保存する。

有効期間： 1 年
使用期限は、外装に表示されている。

【包装単位】

○ 20 テスト用	製品番号 2J27-21
・ウロビジョン DNA FISH プロブ	60 μL × 1
・DAPI II 対比染色液	300 μL × 1
・NP-40	2 mL × 2
・20 × SSC 塩	66 g

1 回の測定のターゲットエリアを直径 6 mm の円と定義した場合、本キットは 20 テストの測定が可能である。

【主要文献】

1. Riesz, P., G. Lotz, et al. (2007). "Detection of bladder cancer from the urine using fluorescence in situ hybridization technique." *Pathol Oncol Res.* 13(3):187-94.
2. US Department of Health and Human Services. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories*, Fifth Edition. Washington, DC: US Government Printing Office, December 2009.
3. US Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration, 29 CFR Part 1910.1030, Occupational Safety and Health Standards: Bloodborne Pathogens.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI Document M29-A3 (ISBN 1-56238-567-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
5. World Health Organization. *Laboratory Biosafety Manual*, Geneva: World Health Organization, 2004.
6. U.S. Centers for Disease Control. Morbidity and Mortality Weekly Review. 1987;36(suppl. 2S):2S-18S.

【その他】

(1) トラブルシューティングガイド

問題点	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。
	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。
	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）。
	水銀ランプが古い	・新しいランプに交換する。
	水銀ランプの付け間違い	・水銀ランプを付け直す。
	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。
	ハイブリダイゼーション条件が適切でない	・変性温度とハイブリダイゼーション温度を確認する。
		・ハイブリダイゼーションを16時間以上行う。
	ポストハイブリダイゼーション洗浄温度が適切でない	・温浴槽の温度が73±1℃であることを確認する。
	カバーガラスの下に泡があり、プローブが均一に行き渡っていない	・カバーガラスをかぶせる時はまず、ハイブリダイゼーション溶液の表面に触れるように置く。
	プロテアーゼ処理が不十分	・温浴槽の温度が37±1℃であることを確認する。 ・緩衝液がpH 2.0±0.2であることを確認する。 ・酵素処理時間を最大20分まで延長する。
シグナルの特異性が低い	DNAが確認できない（DAPI染色不良）	・固定条件を確認する。
	プローブが適切に保存されていない	・プローブを遮光して-20℃で保存する。
	ハイブリダイゼーション条件が適切でない	・変性温度とハイブリダイゼーション温度を確認する。
バックグラウンドのノイズが高い	洗浄温度が低すぎる	・洗浄温度を73±1℃に保つ。
	洗浄の厳密さ（ストリンジェンシー）が不適切	・洗浄緩衝液のpHを確認する。 ・温浴槽の温度が73±1℃であることを確認する。 ・洗浄中に穏やかにかき混ぜる。
シグナルが明るすぎる	使用している顕微鏡に対して、プローブ濃度が高すぎる	・励起経路に減光フィルターを装着してシグナルを弱める。
細胞の構造が壊れている	酵素処理が過剰	・プロテアーゼ処理時間を短くする。

(2) 操作方法の概略

検体の採取

(1) 検体の採取		
	① 尿検体 33 mL 採取	
	② 保存剤と2：1（v：v）の割合で混和	
	③ 50 mL 遠心チューブまたは他の密栓プラスチック容器に移す	

検体の処理と調製

(1) 検体処理		
	① 600 × g で遠心（15 ～ 30℃）	10 分間
	② 約 1 ～ 2 mL 残して上清除去	
	③ 再懸濁、15 mL のコニカル型遠心チューブに移す	
	④ 1 × PBS（10 mL）で 50 mL 遠心チューブを洗い、15 mL の遠心チューブに移す	
	⑤ 600 × g で遠心（15 ～ 30℃）	10 分間
	⑥ 約 0.5 mL 残して上清除去	
	⑦ 再懸濁し、固定液 1 ～ 5 mL を加える	
	⑧ 静置（-20℃）	30 分間
	⑨ 600 × g で遠心（15 ～ 30℃）	5 分間
	⑩ 上清除去	
	⑪ 1 ～ 5 mL の固定液で再懸濁して洗う	
	⑫ 600 × g で遠心（15 ～ 30℃）	5 分間
	⑬ ⑨～⑫を2回繰り返す	
	⑭ 細胞懸濁液の遠心後 ・細胞ペレットが非常に小さくほとんど見えない場合、上清が100 μL になるまで慎重に可能な限り固定液を除去する。 ・細胞ペレットがはっきり見える場合、可能な限り固定液を除去し、新しい固定液（0.5 ～ 1 mL）を加える。	
(2) スライドの調製		
12 穴スライドを用いる		
	① 細胞ペレットを再懸濁する	
	② 3 つのスライドウェルにそれぞれ 3 μL、10 μL、30 μL の細胞懸濁液を乗せる	
	③ サンプルを風乾	
	④ スライドを観察する	
	⑤ ウェル番号 1、2、3 より、ハイブリダイゼーションエリアを選択する	
	⑥ 最も適合するウェルを FISH ハイブリダイゼーションに用いる	
	⑦ 1 枚予備のスライドを製作しておく	
(3) スライドの前処理（マニュアル法、自動法）		
FISH プレトリートメントキットを用いる		
マニュアル前処理		
	① 完全に乾燥（室温）	
	② 2 × SSC 溶液に浸漬（73 ± 1℃）	2 分間（2 ～ 2.5 分間）
	③ プロテアーゼ溶液に浸漬（37 ± 1℃）	10 分間（± 1 分間）
	④ 1 × PBS にて洗う（室温）	5 分間（± 1 分間）
	⑤ 1%ホルムアルデヒド溶液で固定（室温）	5 分間（± 1 分間）
	⑥ 1 × PBS にて洗う（室温）	5 分間（± 1 分間）
	⑦ 脱水：70%エタノール（室温）に浸漬	1 分間
	⑧ 脱水：85%エタノール（室温）に浸漬	1 分間
	⑨ 脱水：100%エタノール（室温）に浸漬	1 分間
	⑩ 乾燥	
自動前処理（オプション）		
	① 乾燥（室温）	
	② 2 × SSC 溶液に浸漬（73 ± 1℃）	2 分間（2 ～ 2.5 分間）
	③ プロテアーゼ溶液に浸漬（37 ± 1℃）	10 分間（± 1 分間）
	④ 1 × PBS にて洗う（室温）	5 分間（± 1 分間）
	⑤ 1%ホルムアルデヒド溶液で固定（室温）	5 分間（± 1 分間）
	⑥ 1 × PBS にて洗う（室温）	5 分間（± 1 分間）
	⑦ 脱水：70%エタノール（室温）に浸漬	1 分間
	⑧ 脱水：85%エタノール（室温）に浸漬	1 分間
	⑨ 脱水：100%エタノール（室温）に浸漬	1 分間
	⑩ 乾燥：air-drying station 中（25℃）	3 分間

FISH 染色操作

(変性～ハイブリダイゼーション：マニュアル操作)

(1) 検体 DNA の変性		
① 湿潤箱を 37 ± 1℃ に予備加温		
② 変性溶液を 73 ± 1℃ に温浴槽で加温	30 分間	
③ 使用前に溶液温度を確認		
④ 変性溶液 (73 ± 1℃) に浸漬	5 分間 (± 1 分間)	
⑤ 70%エタノール (室温)、振盪、浸漬	1 分間	
⑥ 85%エタノール (室温)、振盪、浸漬	1 分間	
⑦ 100%エタノール (室温)、振盪、浸漬	1 分間	
⑧ 乾燥：スライドウォーマー (45 ~ 50℃)	2 分間	
(2) プローブの前処理		
① 室温に戻す		
② ボルテックスミキサーで混和		
③ 遠心機でチューブを回す	1 ~ 3 秒間	
④ ボルテックスミキサーで混和		
⑤ 温浴槽 (73 ± 1℃) で温める	5 分間	
⑥ スライドウォーマー (45 ~ 50℃) に置く		
(3) ハイブリダイゼーション		
① プローブ溶液を 3 µL 添加		
② カバーガラスを被せプローブを広げる		
③ カバーガラスの周囲をシール		
④ 37℃ に予備加温した湿潤箱に入れる		
⑤ ハイブリダイゼーション：インキュベーション (37 ± 1℃)	16 時間	

FISH 染色操作

(変性～ハイブリダイゼーション：自動処理操作)

ThermoBrite 使用

(1) プローブの調製と適用		
① 15 ~ 30℃ に戻す		
② ボルテックスミキサーで混和		
③ 遠心機でチューブを回す	1 ~ 3 秒間	
④ ボルテックスミキサーで混和		
⑤ プローブ溶液を 3 µL 添加		
⑥ カバーガラスを被せ均一にプローブを広げる		
⑦ カバーガラスの周囲をシール		
(2) 検体 DNA の変性とハイブリダイゼーション		
① humidity card 2 枚を水で湿らし、蓋のクリップにセットする。		
② ThermoBrite をオンにする。		
③ プログラムをセット		
④ スライドを機器のヒーティング面に置く		
⑤ ThermoBrite のカバーを閉じる		
⑥ プログラムを動作	14 ~ 18 時間	



スライドの洗浄

(マニュアル操作、自動処理操作共通)

① 30 分前、0.4 × SSC/0.3% NP-40 でコプリンジャーを満たす	
② 温浴槽に入れる (73 ± 1℃)	
③ 2 × SSC/0.1% NP-40 で別のコプリンジャーを満たす (室温)	
④ ペーパーバンド、カバーガラスを取り除く	
⑤ 0.4 × SSC/0.3% NP-40 中に浸す	
⑥ インキュベート (73 ± 1℃)	2 分間
⑦ 2 × SSC/0.1% NP-40 の入ったコプリンジャーの中に浸す (室温)	
⑧ インキュベーション	5 秒 ~ 1 分間
⑨ 遮光下で完全に乾燥	
⑩ 10 µL DAPI 対比染色液を添加	
⑪ カバーガラスを被せる	

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 2019