

体外診断用医薬品

製造販売承認番号 30700EZX00010000

IDH1/2 遺伝子変異検出キット

ipsogen® IDH1 変異検出キット RGQ 「キアゲン」

【重要な基本的注意】

末梢血検体については骨髓液検体での検査が困難な症例で使用することを考慮してください。

【一般的な注意】

- 遺伝子診断に際して、患者に遺伝子診断の目的・方法及び精度、特に不可避な診断限界などについて正確な情報を伝えること。
- 検査の実施にあたっては、使用目的欄に記載される医薬品の最新の電子添文を参照すること。
- 偽陽性の可能性を考え、本品にて適用可能なタイプの変異と判定された場合でも薬剤投与後は十分な経過観察を行うこと。
- 本品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的には使用しないこと。
- 本品は資格を有する医療従事者のみが専門的な実験設備のある場所で使用すること。
- 診断は、医師が臨床症状や他の検査結果を含めて総合的に判断すること。
- 電子添文に記載された使用方法及び使用目的以外の使用については、測定結果の信頼性を保証できない。記載内容に従って使用すること。
- *8. ipsogen IDH1 変異検出キット RGQ 「キアゲン」のハンドブック、ロータージーン Q MDx 5plex HRMの電子添文及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）】

I. 本品は全てが液剤からなる以下の構成試薬よりなる。

| | |
|------------------------------|--------|
| 1. IDH1 Reaction Mix 1 (緑) | 950 μL |
| 2. IDH1 Reaction Mix 2 (紫) | 950 μL |
| 3. IDH1 Positive Control (赤) | 120 μL |
| 4. Taq Polymerase (ミント) | 85 μL |
| 5. Water for NTC (白) | 1.9mL |
| 6. Water for sample dil. (白) | 1.9mL |

II. 別途必要な器具・器材、試料等

- 試薬
 - QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, cat. no. 1123047)
 - DNAZap™ PCR分解液または同等の洗浄液
 - Distel High Level Laboratory Disinfectantおよびイソプロピルアルコール(IPA) 洗浄液または同等の洗浄液
- 消耗品
 - 72ウェルローター向けの0.1mLストリップチューブおよびキャップ (QIAGEN, cat.no. 981103 またはcat.no 981106)
 - マスターミックスを調製するためのヌクレアーゼフリー、低DNA結合性マイクロ遠心チューブ
 - エアロゾル障壁を有するヌクレアーゼフリーのピペットチップ
- 機器
 - 油性マーカー
 - ロータージーン Q MDx 5plex HRM (医療機器届出番号 : 13B2X10223000004)
 - Rotor-Gene Assay Manage v2.1、Gamma Plug-inおよび「ipsogen_IDH1_IVD」Assay Profile
 - 試料調製用専用ピペット(調整可能)
 - PCRマスターミックス調製用の専用ピペット(調整可能)
 - 鑄型DNAの分注用専用ピペット(調整可能)
 - 1.5mL管用ローター付きベンチトップ遠心分離機
 - 56°C、70°C、90°Cでインキュベート可能なサーモキサーア、加熱振盪インキュベーター、ヒーティングブロック又は水浴
 - QIAvac 24 Plus vacuum manifold (cat.no.19413)
 - QIAvac接続システム(cat. no. 19419)
 - 真空ポンプ(cat. no. 84010) またはこれに相当する真空ポン

プ -800～-900mbar

- 72×0.1mLチューブ向けロードブロック : アルミニウム製手動反応設定用 (QIAGEN, cat.no.9018901)
- 96×0.2mL PCRチューブ向けロードブロック ; 96×0.2mL PCRチューブ、單一チャネルルピペットによる反応セットアップ向けアルミニウム製のブロック (QIAGEN, cat.no. 9018905)
- 0.1mLの反応容量10～50μLストリップチューブおよびキャップを保持するための72-ウェル・ローター; 72-ウェル・ローターロッキングリング(QIAGEN, cat.no.9018903)が必要。
- 0.1mLストリップチューブおよびキャップをロックする72-ウェル・ローターロッキングリング (QIAGEN, cat.no.9018904)

【使用目的】

末梢血又は骨髓液から抽出したゲノムDNA中のIDH1遺伝子変異の検出（イボシデニブの急性骨髓性白血病患者への適応を判定するための補助に用いる）

【測定原理】

本品は、オリゴヌクレオチド加水分解原理を用いたリアルタイムPolymerase Chain Reaction (PCR) 法により、末梢血あるいは骨髓液から抽出したゲノムDNA中のIDH1変異を検出する。

＜本品が測定対象とする遺伝子変異一覧＞

| 変異 | 塩基変化 | COSMIC ID |
|-------|--------|--------------|
| R132H | 395G>A | COSV61615239 |
| R132C | 394C>T | COSV61615256 |
| R132S | 394C>A | COSV61615649 |
| R132G | 394C>G | COSV61615456 |
| R132L | 395G>T | COSV61615420 |

【操作上の注意】

- 検体は、EDTA採血管に採取した新鮮または凍結ヒト全血、または骨髓穿刺検体でなければならない。
- 検体の品質を保証するために、は病理学的に標準となる方法で輸送すること。

その他の留意事項

- 検体中に、PCRの妨害物質が存在すると正しい判定結果が得られないで注意すること。
- PCR增幅産物が汚染しないよう細心の注意を払うこと。Reaction Mixをセットアップする際およびPositive ControlやDNA検体を添加する際には、それぞれ専用のピペットを使用することが推奨される。
- サンプリングや操作などのミスに注意し、正確な検査を実施すること。
- 検体中に標的DNAが存在しても最小検出感度以下である場合には、陰性と判定されることがあるので注意すること。

【用法・用量（操作方法）】

- 検体DNA抽出の手順

DNAの精製はQIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, cat. no. 61104) を用いる。QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit Handbookに従い、200μL Elution Buffer (AE) を用いてDNA精製を行う。
- gDNAの定量および濃度調製

全血または骨髓穿刺検体から抽出したgDNAを用いる。測定濃度が1ng/μL未満の場合は、検体を再抽出する必要がある。測定濃度が6ng/μLを超える場合は、下式に従い、本キットに含

まれる希釈用水(Dil.)を用いて、5ng/μLに希釈する：

$$Ci \times Vi = Cf \times Vf$$

Ci : 抽出したgDNAの初期濃度
 Cf : 目標とする最終濃度=5ng/μL
 Vf : 測定に必要な最終容量 (10 μL + ピッティングエラーフィーの容量)
 Vi : 抽出したgDNAの初期量

3. 測定

1) 機器の準備

- Rotor-Gene Assay Managerソフトウェアv2.1を、Rotor-Gene Q MDxに接続されたコンピュータにインストールする。Rotor-Gene Assay Manager v2.1コアソフトウェアのインストールは、Rotor-Gene Assay Manager v2.1 MDx Core Application User Manualを参照して行う。
- Gamma plug-inのプラグインを、Rotor-Gene Assay manager v2.1 が既に搭載されているコンピュータにインストールする。
- ipsogen_IDH1_1VD Assay Profileをインストールする。これは、PCRアッセイのサイクリングおよび分析に必要なすべてのパラメータを含む。

2) マスターミックスの調製

- Taq Polymerase (Taq) 以外のすべての試薬を室温(15~25°C)で最短30分間、最長2時間で解凍する。Taqは、試薬が解凍してから取り出す。局所的な高塩濃度を避けるため、Taq以外のすべての試薬を3~5秒間ボルテックスして混ぜた後、短時間遠心分離し、試験管の底部に内容物を採取する。(注：Taqはボルテックスしてはならない。)
- DNA検体、Positive Control (PC)、およびNo Template Control (NTC) 反応のそれぞれについて十分なマスターミックス(表3-1. IDH1反応混合物+Taq)を調製する。必要な試薬量は表3-2および表3-3に従う。PCR設定のために、n+2反応分を追加した試薬量を準備する。本品による測定において、最適な検体数を使用した最大ラン数は、1ランにつき8サンプルの3ランである。マスターミックスを調製後、直ちにIDH1反応混合物とTaqを冷凍庫(-30~−15°C)に戻す。

表3-1. 72チューブローターを使用するときの反応数

| サンプル | 反応 |
|----------------------------------|--------------|
| With the IDH1 Mastermix 1 (MM 1) | |
| 24 gDNA samples | 24 reactions |
| Positive Control (PC) | 1 reaction |
| No Template Control (NTC) | 1 reaction |
| With the IDH1 Mastermix 2 (MM 2) | |
| 24 gDNA samples | 24 reactions |
| Positive Control (PC) | 1 reaction |
| No Template Control (NTC) | 1 reaction |

表3-2. IDH1 MM 1 の調製

| 構成試薬 | 量 |
|----------------------|------------------|
| IDH1 Reaction Mix 1 | 19.6 μL x (n+2) |
| Taq polymerase (Taq) | 0.4 μL x (n+2) |
| Total volume | 20.0 μL/reaction |

表3-3. IDH1 MM 2 の調製

| 構成試薬 | 量 |
|----------------------|------------------|
| IDH1 Reaction Mix 2 | 19.6 μL x (n+2) |
| Taq polymerase (Taq) | 0.4 μL x (n+2) |
| Total volume | 20.0 μL/reaction |

- 3~5 秒間ボルテックスすることで、マスターミックスを十分に混合する。ローディングブロックに適切な数のストリップチューブを配置する。各 PCR ストリップチューブに直ちにマスターミックス 20μL を加える。
- キャップは必要になるまでプラスチック容器に入れたままにしておく。MM1 と MM2 を並んだ列に追加する。
- 直ちに No Template Control (NTC) 5μL を No Template Control チューブ(サンプル位置 3 および 4)に加え、チューブにキャップする。
- 検体(サンプル位置 5~52)を 5μL ずつ加え、キャップする。

PC チューブ(サンプル位置 1、2)に PC5μL を加え、キャップする。

- チューブを装填する方向を示すため、チューブの蓋に印を付ける。
- すべてのチューブにキャップを付けた後、検体チューブの充填レベルを目視で確認し、すべてのチューブに検体が添加されていることを確認する。
- PCR ストリップチューブを 72 ウエルローターの適切な位置にセットする(表3-4)。ローターが完全に占有されていない場合は、ローターの空の位置をすべてキャップ付きの空のチューブで満たす。
- 直ちに 72 ウエルローターを Rotor-Gene Q MDx に搭載する。ローターの上にロックリング装着されていることを確認する。

表3-4. ローディングブロック内の試験サンプルのレイアウト

| Mix | S 3 MM1 (1) | S 7 MM1 (9) | S 11 MM1 (25) | S 15 MM1 (33) | S 19 MM1 (41) | S 23 MM1 (49) | - | - |
|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---|---|
| PC MM2 (2) | S 3 MM2 (10) | S 7 MM2 (18) | S 11 MM2 (26) | S 15 MM2 (34) | S 19 MM2 (42) | S 23 MM2 (50) | - | - |
| NTC MM1 (3) | S 4 MM1 (11) | S 8 MM1 (19) | S 12 MM1 (27) | S 16 MM1 (35) | S 20 MM1 (43) | S 24 MM1 (51) | - | - |
| NTC MM2 (4) | S 4 MM2 (12) | S 8 MM2 (20) | S 12 MM2 (28) | S 16 MM2 (36) | S 20 MM2 (44) | S 24 MM2 (52) | - | - |
| S1 MM1 (5) | S 5 MM1 (13) | S 9 MM1 (21) | S 13 MM1 (29) | S 17 MM1 (37) | S 21 MM1 (45) | - | - | - |
| S1 MM2 (6) | S 5 MM2 (14) | S 9 MM2 (22) | S 13 MM2 (30) | S 17 MM2 (38) | S 21 MM2 (46) | - | - | - |
| S2 MM1 (7) | S 6 MM1 (15) | S 10 MM1 (23) | S 14 MM1 (31) | S 18 MM1 (39) | S 22 MM1 (47) | - | - | - |
| S2 MM2 (8) | S 6 MM2 (16) | S 10 MM2 (24) | S 14 MM2 (32) | S 18 MM2 (40) | S 22 MM2 (48) | - | - | - |

S:サンプル、MM: Master Mix

3) 反応の開始

- デスクトップアイコンをダブルクリックして、Rotor-Gene Assay Manager v2.1 ソフトウェアを開く。
- 本キットのユーザーマニュアルに従い、IDH1 ラン開始に必要な情報を入力し反応を開始する。

表3-5 サイクリング条件

| ステップ | 時間 | 温度 | コメント |
|--------------------------------------|------------------|--------------|------------------------------|
| PCR の最初の活性化 | 15 min | 95°C | Taq Polymerase の活性化 |
| 2ステップサイクリング ・変性 ・アニーリング/ 伸長 | 30 sec 60 sec | 95°C 60°C | 複合アニーリング/ 伸長段階 蛍光データ収集 |
| サイクル数 | 40 | | |

4) 結果の解釈

- 特定の反応からの蛍光が本キットのアッセイプロファイルに予め設定された閾値を越えるPCRサイクルをCt値とした。Ct値は、検体DNAの量を示す。Ct値が低いと検体DNA濃度が高く、Ct値が高いと検体DNA濃度が低いことを意味する。
- 予備試験でDNA検体を評価し、得られたCt値に基づいて、検体が分析に適したDNA濃度になっているか、また、分析前に希釈が必要かを判定する。
- 検体を評価し、それぞれのCt値を決定し、以下の式によりΔCt値を決定する：
- $\Delta Ct = [\text{検体測定Ct値}] - [\text{コントロールのCt値}]$
- あらかじめ定められた標準Ct値およびΔCt値により、DNA検体の変異状態を定性的に判定し、検体に変異が含まれている場合に検出が報告される。
- ランコントロール(PCおよびNTC)により、検体のCt値が、許容範囲内であることを確認し、反応が正常に実行されたことを確認する。
- Ct値が検体Ct基準を下回った場合、これはDNA濃度が高すぎることを意味し、検体を希釈する必要がある。
- Rotor-Gene Assay Manager v2.1ソフトウェアは、アッセイプロファイルに定義されている分析アルゴリズムに従って、各ターゲットの結果を決定する。
- 個々の検体について以下の結果が示される：
- IDH1変異を検出

- 変異検出せず
- 無効：解析中一つ以上のフラッグが上がった場合

【測定結果の判定法】

・標的毎の測定に使用するチャンネルとカットオフ値を下表に示した。

| Reaction Mix | 標的変異 | チャンネル | 検体 Ct 基準 | ΔCt カットオフ値 |
|--------------|-------------------|---------|----------------------------|------------------------|
| IDH1 RM1 | Control | Yellow | $21.54 \leq Ct \leq 25.25$ | N/A |
| | R132H (395G>A) | Crimson | N/A | $\Delta Ct \leq 14.75$ |
| | R132C (394C>T) | Orange | N/A | $\Delta Ct \leq 14.75$ |
| | R132S (394C>A) | Red | N/A | $\Delta Ct \leq 14.75$ |
| IDH1 RM2 | Control | Yellow | $21.54 \leq Ct \leq 25.25$ | N/A |
| | R132G (394C>G) | Orange | N/A | $\Delta Ct \leq 14.75$ |
| | R132L (395G>T) | Red | N/A | $\Delta Ct \leq 14.75$ |

【臨床的意義】

イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1 は、ヒトでは 2 番染色体上の IDH1 遺伝子によりコードされている酵素である。IDH1 遺伝子の R132 における IDH1 ホットスポット変異は、D-2-ヒドロキシグルタル酸 (2HG) を産生する機能獲得型変異をもたらす。2HG は、DNA およびヒストンの過剰メチルに関与するオンコメタボライトであり、遺伝子転写の調節抑制および細胞分化の阻害につながる¹⁾。IDH1 突然変異は、主に急性白血病 (AML) における血液型腫瘍、骨髄異形成症候群 (MDS) に見られることから変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ阻害剤イボシデニブの、AML 患者での臨床有用性が示唆されている²⁾。そのため、イボシデニブ治療に適した患者の選択に IDH1 変異を特定することは重要である。

米国で実施されたイボシデニブの臨床試験で使用された検査 (CTA) と本品 (CDx) のブリッジング試験の結果を示す。

骨髄液検体での CTA と CDx 検査結果の一致割合

| | 一致割合 | Copper-Pearson 95%信頼下限 | Copper-Pearson 95%信頼上限 |
|--------|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| 全体一致割合 | 99.10%(219/221) | 96.77% | 99.89% |
| 陽性一致割合 | 98.77%(80/81) | 93.31% | 99.97% |
| 陰性一致割合 | 99.29%(139/140) | 96.08% | 99.98% |

末梢血検体での CTA と CDx 検査の一致割合

| | 一致割合 | Copper-Pearson 95%信頼下限 | Copper-Pearson 95%信頼上限 |
|--------|----------------|---------------------------|---------------------------|
| 全体一致割合 | 87.50% (28/32) | 71.01% | 96.49% |
| 陽性一致割合 | 84.62% (22/26) | 65.13% | 95.64% |
| 陰性一致割合 | 100% (6/6) | 54.07% | 100% |

【性能】

1. 性能試験

・感度・正確性試験

WT サンプル、R132C、R132H、R132G、R132S および R132L をそれぞれ測定するとき、各変異体測定は全て検出となり、WT は全て検出せずとなる。

・同時再現性試験

WT サンプル、R132C、R132H、R132G、R132S および R132L をそれぞれ 2 回繰り返し測定するとき、各変異体測定は全て検出となり、WT は全て検出せずとなる。

・管理用物質

WT は臨床検体から精製した野生型ゲノムDNAの検体（末梢血検体由来および骨髄検体由来の2種類）。R132C、R132H、R132G、R132S、R132Lは、WTゲノムDNAを含む末梢血により、各変異を含む細胞株から精製したゲノムDNAを2.25 x LODに希釈した検体、また、WTゲノムDNAを含む骨髄液により同様に希釈した検体の各2種類である。

2. 最小検出感度

| 標的 | MAF (%) |
|-------|---------|
| R132C | 2.7 |
| R132H | 1.25 |
| R132S | 4.7 |
| R132G | 3.2 |
| R132L | 2.9 |

【使用上および取り扱い上の注意】

1. 取り扱い上（危険防止）の注意
 - 1) 検体は、HBV、HIV、HCV等の感染の恐れがあるものとして取り扱うこと。
 - 2) 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用すること。
 - 3) ピペットは口で吸わないこと。
 - 4) 試薬が誤って皮膚及び粘膜に付着した場合は、直ちに大量の水で洗い流す等の処置をすること。
 - 5) 試薬をこぼした場合は水で希釈してから拭きとること。
 - 6) 抽出検体が床等にこぼれた場合、次亜塩素酸剤（有効塩素濃度5000 ppm, 0.5%）などの消毒液を使用して十分に拭き取ること。なお、拭き取る際には、ゴム製の手袋などにより手を保護する措置を講ずること。
 - 7) 検体及び本品を取り扱う場所では飲食又は喫煙を避けること。
 - 8) 検体を取り扱う際に使用した器具類は高圧蒸気滅菌器を用いて121°Cで20分以上加熱滅菌処理をするか、次亜塩素酸剤（有効塩素濃度5000 ppm, 0.5%）に1時間以上浸すなどの消毒を行う。これらの作業中は十分に換気すること。
 - 9) 白衣、手袋、保護メガネなど、必要な保護具を身に着けること。
2. 使用上の注意
 - 1) 全血または骨髄穿刺検体を用いること。
 - 2) 試薬および消耗品は専用のものを使い、その容器・付属品などは他の目的に使用しないこと。本品に同梱されている全ての試薬が本品専用である。性能を維持するために他の試薬で代用しないこと。
 - 3) 各試薬は最適濃度で希釈されている。反応が悪くなることがあるので、これ以上希釈はしないこと。
 - 4) 偽陰性となるリスクを避けるため、反応液は25 μ Lを下回らないようにすること。
 - 5) 試薬は必ず貯蔵方法に従って保存し、指定の条件以外で保存したものや、有効期間（外箱に表示された使用期限）を過ぎたものは使用しないこと。
 - 6) 性能に支障をきたす恐れがあるので、ロットの異なる試薬又は残った試薬を混ぜ合わせて使用しないこと。
 - 7) 本品内のTaq Polymeraseのみを使用し、別キットや別会社のTaq Polymeraseは使用しないこと。
 - 8) 試薬はマニュアル用に検証されているため、自動測定の場合はdead volume入力が求められ反応数が減る可能性がある。
 - 9) 全ての試薬は1時間以上常温（15°C～25°C）に置き、常温に戻してから使用すること。使用後は再び-30°C～-15°Cで保存すること。
 - 10) 全ての試薬は保存又は反応中に強い光を当てないこと。全ての試薬は性能を維持し光変性を避けるため遮光が必要である。
 - 11) 全ての試薬は開封又は分注時に微生物による汚染を避けること。
 - 12) PCやReaction Mixはコンタミネーションしないように注意すること。PC及び検体は他の試薬とは離して保管及び抽出し、他の試薬とは離れた場所でマスター・ミックスに分注すること。
 - 13) Reactionの調製・分注はテンプレートとは離れた場所で行うこと。
 - 14) PCR反応の準備は紫外線照射装置を完備したクリーンベンチ内で行うこと。ピペットなどは常にこのクリーンベンチ内に保管すること。PCR反応を準備するエリアには増幅後のDNAを持ち込まないこと。また、検体の分注には疎水性フィルター付きの使い捨てチップを使用すること。
 - 15) コンタミネーション防止のため、検体を添加した際にチューブの蓋をすぐに閉めること。PCR反応後の反応チューブの蓋を開けないこと。

- 16) 検査区域の分割やピペットの専用化及び次亜塩素酸(有塩素濃度5000 ppm, 0.5%)による器具、実験台の清掃を徹底して行うこと。
- 17) 本品を取り扱う際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けること。汗や唾液に含まれるDNaseが少量でも検体に混入した場合、DNAが分解され測定結果に誤りが生じる可能性がある。
- 18) 操作の詳細については、ハンドブック、RGQの電子添文及び取扱説明書を参照すること。
- 19) ローディングブロックを使用する前に除染することまた、使用前に乾燥すること。
- 20) 使用時には製品番号を確認すること。

3. 廃棄上の注意

- 1) 測定により生じた廃液については、検体などと同様に滅菌又は消毒の処置を行うこと。また、これらを廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従い、廃棄すること。
- 2) 使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従い、医療廃棄物又は産業廃棄物など区別して処理すること。
- 3) 遺伝子検査後の核酸試料及び増幅されたDNAの廃棄は、次亜塩素酸剤を加えて、有効塩素濃度5000 ppm, 0.5%になるように混和後、一晩放置するなど、DNAを破壊してから、廃棄すること。
- 4) DNAを扱ったピペットチップおよびプラスチック容器などは、次亜塩素酸剤(有効塩素濃度5000 ppm, 0.5%)に一晩浸すなどによりDNAを破壊してから焼却処理又は医療廃棄物として処理すること。

* 【貯蔵方法及び有効期間】

1. 貯蔵方法：遮光、-30°C～-15°Cで保存
2. 有効期間：11ヶ月

【包装単位】

| 製品番号 | 包装内容 | 包装単位 |
|--------|-----------------------------------|-------|
| 675253 | ipsogen IDH1 変異検出キット RGQ「キアゲン」 | 24テスト |

各構成試薬の詳細については【形状・構造等(キットの構成)】を参照。

【主要文献】

- 1) Oltevai, Z.N., S.E.Harley, D. et al (2021); Assessing acquired resistance to IDH1 inhibitor therapy by full-exon IDH1 sequencing and structural modeling. Cold Spring Harb Mol Case Stud 7(2).
- 2) Cadoux-Hudson, T., C.J.Schofield et al (2021); Isocitrate dehydrogenase gene variants in cancer and their clinical significance. Biochem Soc Trans 49(6): 2561-2572.

【お問い合わせ先】

株式会社キアゲン
〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1
フォーフロント・タワーII
TEL 03-6890-7300
FAX 03-5547-0818

【製造販売業者の氏名又は名称および住所】

株式会社キアゲン
〒104-0054 東京都中央区勝どき3-13-1
フォーフロント・タワーII