

## サイトケラチン19mRNAキット

# リノアンプ™ BC

### 【重要な基本的注意】

非小細胞肺癌においては、本品の使用前に、組織型を確定してください。腺癌及び扁平上皮癌を除く組織型では、原発巣中のCK19蛋白の発現が認められない症例が腺癌及び扁平上皮癌に比べて高い割合で確認されています。<sup>(1)</sup> これらの組織型由来のリンパ節における本品の性能については十分な検討ができておりません。

### 【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品です。これ以外の目的には使用しないでください。
- \* 2. リンパ節転移診断の際には、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて医師が総合的に判断してください。
3. 必要に応じて、病理組織検査或いは細胞診を併用する等の運用を検討してください。
4. 本品による結果を踏まえたリンパ節転移診断の結果を病期分類や進行度分類に使用する場合には、あらかじめ病理専門医が臨床医と定めた方法に従って報告してください。
- \*\* 5. 電子添文に記載された以外の使用方法については保証いたしかねます。
- \*\* 6. 測定に使用する機器の電子添文及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

### 【形状・構造等(キットの構成)】

構成試薬 (略称)	容量/本数	反応系に関与する成分
CK19プライマー溶液 (P-CK19)	720µL 8本	CK19FAプライマー CK19RAプライマー CK19F3プライマー CK19R3プライマー CK19LPFプライマー CK19LPRプライマー デオキシアデノシン5'-三リン酸 デオキシシチジン5'-三リン酸 デオキシグアノシン5'-三リン酸 デオキシチミジン5'-三リン酸 硫酸マグネシウム
酵素溶液 (Enz)	450µL 2本	逆転写酵素 DNA合成酵素
キャリブレーションレベル1 (CK19-C1) (2,500 copies/µL)	110µL 4本	
キャリブレーションレベル2 (CK19-C2) (250,000 copies/µL)	110µL 4本	
キャリブレーションレベル3 (CK19-C3) (25,000,000 copies/µL)	110µL 4本	
CK19陽性コントロール (CK19-PC)	110µL 4本	
CK19陰性コントロール (NC)	110µL 4本	

### 【使用目的】

摘出された乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌所属リンパ節中のCK19 mRNAの検出(乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌におけるリンパ節転移診断の補助に用いる)

### 【測定原理】

本品は、被検リンパ節の可溶化から遺伝子増幅反応までを1段階で行うOSNA™(One-Step Nucleic Acid Amplification)法に用いられます。<sup>(2)(3)(4)(5)(6)</sup> 遺伝子増幅原理として、RT-LAMP(Reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification)法を利用しています。<sup>(7)</sup>

本品では、被検リンパ節を200mMグリシン緩衝液(pH3.5)に可溶化した乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌患者由来のリンパ節の可溶化液を用います。

このリンパ節可溶化液と、6種類のCK19プライマー、4種類のデオキシクレオチド三リン酸、逆転写酵素、DNA合成酵素及び硫酸マグネシウムとを混合し、65°Cの一定温度下で反応させます。リンパ節可溶化液中のサイトケラチン19(以下CK19)mRNAをもとに、逆転写酵素によりcDNAが合成されます。このcDNAをもとにDNA合成酵素により増幅反応が進行します。DNA増幅の検出は、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム(白色沈殿物質)による濁度が所定の閾値を越えるまでの時間を測定することにより行います。

CK19 mRNA濃度と反応開始から濁度が所定の閾値を越えるまでの時間とは直線関係が成立しますので、既知の濃度のCK19 mRNAより検量線を作成し、この検量線をもとに、測定試料中のCK19 mRNA濃度を算出することができます。この算出されたCK19 mRNA濃度をあらかじめ設定したカットオフ値と比較することにより、リンパ節転移の陽性又は陰性を判定します。

### 【操作上の注意】

#### 測定試料の性質、採取法

- \* 1. 使用するリンパ節は25 ~ 600mgの範囲としてください。リンパ節が600mgを超える場合には、増幅反応が阻害されるおそれがあり、また、25mgを下回る場合には、リンパ節が十分に破碎されないおそれがあります。いずれの場合にも、正しい結果が得られないことがあります。
- \* 2. 使用するリンパ節の重量を正確に計測するため、リンパ節に付着した脂肪組織はできるだけ取り除いてください。
3. 使用するリンパ節は、摘出後、経時的なRNAの分解を防ぐため、乾燥を避けて冷蔵又は氷上(0 ~ 4°C相当)で保存し、速やかに測定してください。摘出後8時間以内に測定できない場合は、-80°Cで凍結保存してください。なお、この場合でも、時間の経過とともにRNAの分解が進み、正確な結果が得られなくなる可能性がありますので、できる限り早く測定してください。また、凍結保存したリンパ節を使用する場合は、氷上に置いた下記グリシン緩衝液(pH3.5)中で融解させた後、可溶化を行ってください。
4. リンパ節を、20%ジメチルスルホキシド(DMSO)及び5%界面活性剤を含む200mMグリシン緩衝液(pH3.5)4mLが入った容器に入れ、ホモジナイザを用いて、リンパ節の可溶化を行ってください(ホモジナイザは、規定の条件にて使用してください。なお、未破碎の組織片が認められる場合には、更に規定の条件で再度可溶化を行ってください)。その後、10,000 G、60秒、室温の条件で遠心分離し中間層を取り分けたものを「リンパ節可溶化液」とします。なお、200mMグリシン緩衝液(pH3.5)は、リノアグとして別売されています。以下、200mM グリシン緩衝液(pH3.5)は、「リノアグ」として記載します。
5. 4.のリンパ節の可溶化と遠心分離後の中間層の取り分けは氷上で冷却しながら実施してください。冷却せずに実施した場合、RNAが分解し正確な測定結果が得られない可能性があります。
6. リンパ節可溶化液に脂肪成分や沈殿物等の不溶物が含まれないよう注意してください。これら不溶物が含まれると、その不溶物に相当した測定対象物(CK19 mRNA)の量が減少し、正確な測定結果が得られない可能性があります。不溶物が混入した場合は、リンパ節可溶化液の遠心分離等をした後、ピペット等で不溶物を取り除いてください。
7. 本品の対象とする試料はリンパ節です。可溶化する試料中にリンパ節組織が必ず含まれるように、試料をサンプリングする際は注意してください。なお、非小細胞肺癌所属リンパ節を試料とする場合、リンパ節外に付着した肺実質を取り除いてください。肺実質中の肺上皮においてCK19 mRNAの発現が確認されており、混入した場合、正確な測定結果が得られない可能性があります<sup>(8)</sup>。

**\*\* 妨害物質・妨害薬剤**

以下の物質・薬剤を添加したCK19 mRNA標準液を、本品を用いて測定し、増幅反応への影響を確認しました。

評価物質		許容混入量 (リノアーク4mL中)
リンパ節以外の ヒト組織	末梢血	100 $\mu$ L
	脂肪組織	600 mg
色素	パテントブルー バイオレット	100 mg
	インドシアニン グリーン	25 mg
	インジゴカルミン	20 mg
	墨汁	20 $\mu$ L
放射性トレーサー	スズコロイド	0.285 mg
	フチン酸	0.68 mg
	ヒト血清アルブミン	51 mg

※墨汁、及びフチン酸 については、記載の混入量を超える場合には、増幅反応への影響が認められました。

※墨汁、及びフチン酸 以外の物質・薬剤については、各物質の電子添文や文献情報を基にリンパ節に混入が想定される最大量を算出して添加した結果、増幅反応への影響は認められませんでした。

※リンパ節に付着した脂肪組織の影響については、本項「測定試料の性質、採取法」も併せて参照してください。

※上記以外の物質・薬剤については、増幅反応への影響の有無を確認しておりませんので、使用の際はご注意ください。

**【用法・用量(操作方法)】**

**試薬の調製方法**

- \* 1. -20°Cで保存していた酵素溶液以外の試薬は、室温で融解し、完全に融解したことを確認した後直ちにボルテックスミキサー(約5～10秒)にてかくはんしてください。
- 2. 酵素溶液は融解の必要性がありませんので、泡立たないように転倒かくはん(5～10回)してください。
- \* 3. かくはん後、全ての試薬は気泡がなくなるまで卓上遠心機(約5秒)でスピンドウンしてください。
- 4. スピンドウン後の試薬は直ちに氷上で保管もしくは専用の遺伝子増幅検出装置(RD-100i)の所定の位置に設置します。RD-100iの試薬サンプル設置部の温度が適正温度であること(エラー表示が出ていないこと)を確認してください。

**必要な器具・器材・試料等**

- 1. リンパ節の可溶化には、別売のリノアーク(200mMグリシン緩衝液(pH3.5))を使用します。リノアークの使用説明書に従って使用してください。
- 2. ホモジナイザ及び容器  
ホモジナイザ及び容器は推奨品をお使いください。推奨品については弊社営業担当もしくは代理店にお問い合わせください。使用の際はホモジナイザの取扱説明書をよくお読みください。なお、破碎に用いるホモジナイザにより、回転数の設定条件が異なることがあります。
- 3. 遠心分離機  
10,000 Gの遠心加速度を出せるものがが必要です。
- 4. サンプル容器  
AXYGEN社製ST-050(容器)、SCO-LP-C(キャップ)又はその相当品を使用してください。
- 5. マイクロピペット・チップ  
10～100 $\mu$ Lと100～1,000 $\mu$ Lが量り採れるものを使用してください。  
RNase freeのフィルター付きチップを使用してください。
- 6. 50mLチューブ及び1.5mLマイクロチューブ(市販品)  
チューブは滅菌済を使用してください。  
リンパ節可溶化液の調製に使用します。
- 7. 卓上遠心機
- 8. ボルテックスミキサー
- 9. 冷却用ラック及び氷(クラッシュアイス)
- \*\* 10. RD-100i及びその関連する消耗品(電子添文及び取扱説明書を参照してください。)

**測定(操作)法**

**1. 測定試料の準備**

- (1) 測定試料としてリンパ節あたり以下の2種類のサンプルを調製します。
  - 1) リンパ節可溶化液をリノアークで10倍希釈し(リンパ節可溶化液20 $\mu$ L+リノアーク180 $\mu$ L)「測定サンプル」とします。専用のサンプル容器を使用してください。
  - 2) 1)の測定サンプルの一部をとって、リノアークで更に10倍に希釈し(測定サンプル20 $\mu$ L+リノアーク180 $\mu$ L)「希釈サンプル」とします。専用のサンプル容器を使用してください。

(2)測定試料の準備に際しては、以下の注意事項に従ってください。

- 1) 測定サンプル及び希釈サンプルは、それぞれ50 $\mu$ L以上の液量を準備してください。
- 2) 測定サンプル及び希釈サンプルは、調製後速やかに測定してください。
- 3) やむを得ず速やかに測定できない場合(測定エラー等により測定できない場合も含む)は、必ずキャップをして冷蔵または氷上(0～4°C相当)で保管し、調製後2時間以内に測定してください。調製後2時間を経過した測定サンプル及び希釈サンプルは廃棄し、リンパ節可溶化液から再度調製して測定してください。なお、冷蔵または氷上(0～4°C相当)で保管する場合、サンプル容器の内壁に結露することがありますので、十分混合し卓上遠心機でスピンドウンして測定してください。

\*

- 4) 当日に測定できない場合、リンパ節可溶化液を-80°Cで凍結保存することが可能です。この場合でも、時間の経過とともにRNAの分解が進み、正確な結果が得られなくなる可能性がありますので、調製後2時間以内に-80°Cで凍結保存し、1カ月以内に測定してください。
- 5) 凍結保存したリンパ節可溶化液の融解は氷上で行ってください。またリンパ節可溶化液の凍結融解は2回までに行ってください。

**2. 操作法**

**(1) 検量線の作成**

- 1) キャリブレーション レベル1、2、3、CK19陽性コントロール及びCK19陰性コントロールを試料として準備します。
- 2) CK19プライマー溶液20 $\mu$ L、酵素溶液3 $\mu$ L及び試料2 $\mu$ Lのそれぞれを検出セルへ加えて混合した後、65°Cまで昇温し、昇温開始時点から16分間反応させます。
- 3) 波長465nmの透過光量を検出セル中の反応液の濁度としてモニターします。
- 4) 昇温開始時点から濁度が所定の閾値(0.1)を越えるまでの時間(分)を計測し、これを立ち上がり時間とします。
- 5) 各キャリブレーションの立ち上がり時間とCK19 mRNA濃度から検量線を作成します。  
※検量線は測定試料を測定する前に作成してください。  
※検量線作成後12時間以内に測定試料の測定を行ってください。  
※試薬パイアルが替わる場合は、改めて検量線を作成してください。
- 6) 検量線を確認後、CK19陽性コントロールが陽性となること、CK19陰性コントロールが陰性となることを確認した上で、測定サンプル及び希釈サンプルの測定を行ってください。正しく判定されていない場合はこの検量線を使用しないでください。

**(2) 測定**

- 1) 測定サンプル、希釈サンプル、CK19陽性コントロール、CK19陰性コントロールを試料として準備します。
- 2) CK19プライマー溶液20 $\mu$ L、酵素溶液3 $\mu$ L及び試料2 $\mu$ Lのそれぞれを検出セルへ加えて混合した後、65°Cまで昇温し、昇温開始時点から16分間反応させます。
- 3) 波長465 nmの透過光量を検出セル中の反応液の濁度としてモニターします。
- 4) 昇温開始時点から濁度が所定の閾値(0.1)を越えるまでの時間(分)を計測し、これを立ち上がり時間とします。
- 5) 測定後、CK19陽性コントロールが陽性となること、CK19陰性コントロールが陰性となることを確認してください。正しく判定されていない場合は測定結果の判定に使用しないでください。
- 6) 事前に作成した検量線により、測定サンプル及び希釈サンプルのCK19 mRNA濃度を算出します。
- 7) 算出したCK19 mRNA濃度より、測定結果の判定法に基づいて、(++)、(+)又は(-)が表示されます。

上記操作法の(1)の2)～5)、(2)の2)～4)及び6) 7)は、RD-100iで行われます。RD-100iで測定結果にフラッグが表示された場合は、RD-100i取扱説明書及びソフトウェアガイドを参照して判断してください。



**\*\* 3. 試薬消費量, 反応条件等**

CK19プライマー溶液	20μL (1テストあたり)
	40μL (1検体あたり2テスト)
酵素溶液	3μL (1テストあたり)
	6μL (1検体あたり2テスト)
試料(キャリブレータ、CK19陽性コントロール、CK19陰性コントロール、測定サンプル及び希釈サンプル)	各2μL (1テストあたり)
反応温度	65°C
反応時間	昇温開始後16分

※RD-100iは、判定結果が出るまで約30分を要します(4検体同時測定の場合)。詳細はRD-100iの電子添文及び取扱説明書を参照してください。

**【測定結果の判定法】**

**判定法**

測定サンプルの判定は、検量線に基づきCK19 mRNA濃度を算出し、カットオフ値 250(copies/μL)として下表の基準で行います。

		希釈サンプルのコピー数 (copies/μL)			
		<250	250≤、<5,000	5,000≤	
測定サンプルのコピー数 (copies/μL)	カットオフ値以上(250≤)	5,000≤	陽性(++)		
		250≤、<5,000	陽性(+)	陽性(+)i <sup>1)</sup>	
	カットオフ値未満(<250)	<250	陰性(-)	陽性(+)i <sup>2)</sup>	

RD-100iでは、検量線の作成とその確認、及び測定試料の判定を自動で行います。

判定へのフラグging:

a<sup>1)</sup>:測定サンプルによっては反応が阻害され、測定サンプルのコピー数が250copies/μL未満かつ希釈サンプルのコピー数が250copies/μL以上、もしくは測定サンプルのコピー数が250copies/μL以上5,000copies/μL未満かつ希釈サンプルのコピー数が5,000copies/μL以上となる場合があります。この場合は、増幅反応阻害検体(増幅反応を阻害するサンプル)として扱い、RD-100iでの判定結果には(+)iと表示され陽性と判定されます。

**判定上の注意**

- 本品は乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌所属リンパ節中のCK19 mRNA検出用です。他の癌の所属リンパ節のCK19 mRNAの検出には使用できません。
- リンパ節転移があるにもかかわらず、リンパ節中のCK19 mRNAの発現量が低い症例が存在します。<sup>9)</sup> これらの場合は、正しい結果が得られない可能性がありますので、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて、総合的に診断してください。必要に応じてリンパ節の一部を保存し、病理組織検査等により、転移有無の確認を行うなどの運用を実施してください。
- アンスラサイクリン、タキサン、シクロフォスファミド、5-FUを用いた術前薬物療法を受療した乳癌患者では臨床研究の成績が得られています。その他の薬剤(ホルモン治療薬、分子標的薬、その他の化学抗癌剤)による術前薬物療法を受療した乳癌患者及びおよびその他の術前補助療法を受療した乳癌患者については十分な検討ができておりません。
- 術前・術中補助療法を受けた大腸癌患者、胃癌又は非小細胞肺癌患者から採取されたリンパ節では、臨床試験成績がありませんので、正しい結果が得られない可能性があります。術前・術中補助療法を受けた大腸癌患者、胃癌又は非小細胞肺癌患者のリンパ節転移有無の判定には使用しないでください。
- 本品による陽性判定((++), (+), (+)i)は、リンパ節転移陽性を示唆しています。なお、術前補助療法を受療していない乳癌患者のリンパ節転移検査においては、多施設臨床性能試験の結果より(++)はマクロ転移(2mmより大きい転移)と高い一致率が確認されましたので、参考情報として使用してください。
- 複数のがんが併発した症例、男性乳癌、又はがんの既往歴のある症例においては、十分なデータがありません。これらの場合は正しい結果が得られない可能性がありますので、他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて、総合的に診断してください。(なお、がんにはリンパ腫などの血液癌も含まれます。)

**【臨床的意義】**

本品は、乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌所属リンパ節中のCK19 mRNAを特異的に検出することにより、転移診断の補助に用います。

本品の精度は、術前補助療法を受療していない乳癌患者のリンパ節転移検査において、確定診断法として用いられる術後の病理組織検査法による転移陽性(マクロ転移とミクロ転移)及び転移陰性に対する判定精度と同等であることが臨床性能試験により確認されています。また、本品はマクロ転移に関して高い精度で判定できることも確認されています。加えて、術前薬物療法(主にアンスラサイクリン、タキサン、シクロフォスファミド、5-FUによる化学療法)を受療した乳癌患者のリンパ節転移検査においても、病理組織検査法の判定精度と同等であることが多施設共同臨床研究により確認されています。術前・術中補助療法を受療していない大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌患者のリンパ節転移検査においては、2mm間隔又は3割面から作製した永久標本を用いる病理組織検査の転移陽性及び転移陰性に対する判定精度と同等であることが臨床性能試験により確認されています。本品は、遺伝子増幅検出装置RD-100iを用いることにより、術中に判定結果を得ることができる迅速性を有し、また、トレーニングを受けた検査技師が実施可能な簡便性を有しています。以上のことから、本品が、乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌において臨床診断上有用であることが示されました。

**<臨床性能試験成績>**

(乳癌 術前補助療法なし)

多施設共同臨床性能試験において、永久標本を用いる病理組織検査(H&E染色及び免疫組織染色)の結果と本品による判定結果を比較しました(盲検化比較試験)。摘出されたリンパ節は、4分割して2ブロックずつ(各ブロックの厚みは1mmもしくは2mm)交互にそれぞれ本品による検討(OSNA法)及び病理組織検査に用いました。<sup>9)</sup>

・特異度

0.2mm間隔で作製した永久標本を用いる病理組織検査(H&E染色及び免疫組織染色)により転移陰性と判定されたリンパ節について、本品の特異度を評価しました。その結果、特異度は97.1%(95%信頼区間 0.918 ~ 0.994) (101/104)でした。

N=124			病理組織検査	
			陽性	陰性
OSNA法	陽性	(++)	16	0
		(+)	3	3
	陰性		1	101

なお、判定が異なったリンパ節については、以下のとおり不一致の原因が考察されました。

OSNA法陽性かつ病理組織検査陰性の3リンパ節の内2リンパ節については、病理組織検査に用いた標本にITC(遊離癌細胞)が観察され、OSNA法に用いたリンパ節ブロックに転移巢が存在していたことが示唆されました。また、残りの1リンパ節については、不一致の原因と考えられる情報を得ることはできませんでした。

・一致率

永久標本3割面の病理組織検査(H&E染色及び免疫組織染色)と本品との判定結果の一致率を評価しました。その結果、一致率は92.9%(95%信頼区間 0.901~0.951) (418/450)でした。

N=450			病理組織検査		
			陽性		陰性
			マクロ転移	ミクロ転移	
OSNA法	陽性	(++)	54	2	0
		(+)	10	4	22
	陰性		4	6	348

なお、判定が異なったリンパ節については、以下のとおり不一致の原因が考察されました。

OSNA法陰性かつ病理組織検査陽性の10リンパ節の内2リンパ節は、抗CK19抗体を用いた免疫染色により、転移巣におけるCK19の低発現が確認されました。残りの8リンパ節については、詳細な病理組織学的検討により、転移巣が病理組織検査に用いたリンパ節ブロックに局在していたことが示唆されました。一方、OSNA法陽性かつ病理組織検査陰性の22リンパ節の内4リンパ節は生化学的方法(CK19タンパク質濃度の測定)により、12リンパ節は当該症例の臨床病理所見より、いずれもOSNA法に用いたリンパ節ブロックのみに転移巢が存在していた可能性が示唆されました。また、残りの6リンパ節については、不一致の原因と考えられる情報を得ることはできませんでした。

(大腸癌 術前・術中補助療法なし)

多施設共同臨床性能試験において、永久標本を用いる病理組織検査結果と本品による判定結果を比較しました(盲検化比較試験)。摘出されたリンパ節は等分割(特異度の解析は1mm間隔、一致率の解析は2mm間隔)し、交互に本品による検討(OSNA法)及び病理組織検査に用いました。<sup>10)</sup>

・特異度

0.1mm間隔で作製した永久標本を用いる病理組織検査(H&E染色及び免疫組織染色)により転移陰性と判定されたリンパ節(病理組織学的陰性リンパ節)について検討(OSNA法)し、本品の特異度を評価しました。その結果、特異度は100% (95%信頼区間0.976～1) (121/121)でした。

N=121		病理組織学的 陰性リンパ節	
OSNA法	陽性	0	
	陰性	121	

・一致率

2mm間隔で作製した永久標本を用いる病理組織検査(H&E染色)と本品との判定結果の一致率を評価しました。その結果、一致率は97.1% (95%信頼区間0.950～0.984) (374/385)でした。

N=385		2mm間隔病理組織検査	
		陽性	陰性
OSNA法	陽性	79	7
	陰性	4	295

なお、判定が異なったリンパ節については、以下のとおり不一致の原因が考察されました。OSNA法陰性かつ2mm間隔病理組織検査陽性の4リンパ節は、詳細な病理組織学的検討により、いずれも転移巣が2mm間隔病理組織検査に用いたリンパ節ブロックに局在していたことが示唆されました。一方、OSNA法陽性かつ2mm間隔病理組織検査陰性の7リンパ節は、OSNA法の特異度評価の結果から、OSNA法の偽陽性の確率は極めて小さく、OSNA法に用いたリンパ節ブロックのみに転移巣が存在していた可能性が示唆されました。

(胃癌 術前・術中補助療法なし)

多施設共同臨床性能試験において、永久標本を用いる病理組織検査結果と本品による判定結果を比較しました(盲検化比較試験)。抽出されたリンパ節は2mm間隔で等分割し、交互に本品による検討(OSNA法)及び病理組織検査に用いました。<sup>(11)</sup>

・一致率

2mm間隔で作製した永久標本を用いる病理組織検査(H&E染色)と本品との判定結果の一致率を評価しました。その結果、一致率は94.2% (95%信頼区間0.914～0.963) (371/394)でした。

N=394		2mm間隔病理組織検査	
		陽性	陰性
OSNA法	陽性	45	14
	陰性	9	326

なお、判定が異なったリンパ節については、以下のとおり不一致の原因が考察されました。OSNA法陰性かつ病理組織検査陽性の9リンパ節の内、6リンパ節については抗CK19抗体を用いた免疫染色により、転移巣におけるCK19の低発現が確認されました。これら6リンパ節は2症例から得られたリンパ節でした。なお、胃癌におけるこれまでの臨床的な知見として、低分化腺癌及び印環細胞癌の一部でCK19低発現が確認されています。残りの3リンパ節については、詳細な病理組織学的検討により、転移巣が病理組織検査に用いたリンパ節ブロックに局在していたことが示唆されました。一方、OSNA法陽性かつ病理組織検査陰性の14リンパ節の内5リンパ節は生化学的方法(CK19タンパク質濃度の測定)により、7リンパ節は当該症例の臨床病理所見より、いずれもOSNA法に用いたリンパ節ブロックのみに転移巣が存在していた可能性が示唆されました。また、残りの2リンパ節については、不一致の原因と考えられる情報を得ることはできませんでした。

・特異度

一致率評価を行った症例のうち、臨床病理組織検査によりリンパ節転移陰性と判断された症例を対象とし、本品の特異度を評価した結果、特異度は99.1% (95%信頼区間0.966～0.999) (209/211)でした。

N=211		病理組織学的 陰性リンパ節	
OSNA法	陽性	2	
	陰性	209	

(非小細胞肺癌 術前・術中補助療法なし)

多施設共同臨床性能試験において、永久標本を用いる病理組織検査結果と本品による判定結果を比較しました(盲検化比較試験)。抽出されたリンパ節は等分割し、交互に本品による検討(OSNA法)及び病理組織検査に用いました。

・一致率

永久標本を用いた3面病理組織検査(H&E染色)と本品との判定結果の一致率を評価しました。その結果、一致率は92.7% (95%信頼区間0.897～0.950) (380/410)でした。なお、腺癌及び扁平上皮癌のみの一致率は93.1% (95%信頼区間0.900～0.955) (336/361)でした。

N=410*		3面病理組織検査	
		陽性	陰性
OSNA法	陽性	47	18
	陰性	12	333

※腺癌:77症例(281リンパ節)、扁平上皮癌:21症例(80リンパ節)、腺扁平上皮癌:6症例(22リンパ節)、大細胞癌:1症例(4リンパ節)、多形、肉腫様あるいは肉腫成分を含む癌:4症例(16リンパ節)、その他:2症例(7リンパ節)

また、判定が異なったリンパ節については、以下のとおり不一致の原因が考察されました。OSNA法陰性かつ病理組織検査陽性の12リンパ節の内、9リンパ節については詳細な病理組織学的検討及び生化学的方法により、転移巣が病理組織検査に用いたリンパ節ブロックに局在していたことが示唆されました。残りの3リンパ節の内、2リンパ節については生化学的方法により、検体の品質不良が原因であると考えられました。残りの1リンパ節については不一致の原因と考えられる情報を得ることはできませんでした。一方、OSNA法陽性かつ病理組織検査陰性の18リンパ節の内、9リンパ節は詳細な病理組織学的検討及び臨床病理所見より、いずれもOSNA法に用いたリンパ節ブロックのみに転移巣が存在していた可能性が示唆されました。残りの9リンパ節の内、6リンパ節は病理所見においてリンパ節標本に肺上皮が混入していたことが原因であると考えられました。残りの3リンパ節については、不一致の原因と考えられる情報を得ることはできませんでした。

・特異度

一致率評価を行った症例のうち、臨床病理組織検査によりリンパ節転移陰性と判断された症例を対象とし、本品の特異度を評価した結果、特異度は97.4% (95%信頼区間0.943～0.990) (221/227)でした。

N=227*		病理組織学的 陰性リンパ節	
OSNA法	陽性	6	
	陰性	221	

※腺癌:45症例(161リンパ節)、扁平上皮癌:11症例(40リンパ節)、腺扁平上皮癌:3症例(11リンパ節)、大細胞癌:1症例(4リンパ節)、多形、肉腫様あるいは肉腫成分を含む癌:2症例(8リンパ節)、その他:1症例(3リンパ節)

<臨床研究成績>

(乳癌 術前補助療法あり)

多施設共同臨床研究において、術前薬物療法を受療した乳癌患者80例より抽出されたリンパ節302個を用いて、永久標本を用いる病理組織検査(H&E染色及び免疫組織染色)の結果と本品による判定結果を比較しました。抽出されたリンパ節は2mm間隔で等分割し、交互に本品による検討(OSNA法)及び病理組織検査に用い、本品との判定結果の一致率を評価しました。なお、本試験において、術前薬物療法として使用されたレジメンの内訳は下記の通りでした。大部分の症例ではアンスラサイクリン、タキサン、シクロフォスファミド、5-FUが使用されており、その他の薬剤(CBDCA、トラスツズマブ)投与例は少数でした。<sup>(12)</sup>

アンスラサイクリン+シクロフォスファミド+5-FU:4例  
アンスラサイクリン+タキサン+シクロフォスファミド+5-FU:50例  
タキサン+シクロフォスファミド:7例  
アンスラサイクリン+タキサン+シクロフォスファミド+5-FU+CBDC:3例  
アンスラサイクリン+タキサン+シクロフォスファミド+5-FU+トラスツズマブ:15例  
タキサン+トラスツズマブ:1例



#### ・一致率

2mm間隔で作製した永久標本を用いる病理組織検査(H&E染色及び免疫組織染色)と本品との判定結果の一致率を評価しました。その結果、一致率は91.1%(95%信頼区間0.873~0.940)(275/302)でした。

N=302		2mm間隔病理組織検査	
		陽性	陰性
OSNA法	陽性	53	20
	陰性	7	222

なお、判定が異なったリンパ節については、以下のとおり不一致の原因が考察されました。OSNA法陰性かつ2mm間隔病理組織検査陽性の7リンパ節のうち、6リンパ節は微小な転移巣が2mm間隔病理組織検査に用いたリンパ節ブロックのみに局在していたことが示唆されました。一方、OSNA法陽性かつ2mm間隔病理組織検査陰性の20リンパ節のうち、7リンパ節には病理組織検査により微小な癌細胞の存在が確認され、12リンパ節は当該症例の臨床病理所見より、いずれもOSNA法に用いたリンパ節ブロックのみに転移巣が存在していた可能性が示唆されました。残りの1リンパ節は、リンパ節転移陽性を示す所見が認められませんでした。

### 【性能】

#### 性能

##### 1. 感度

- (1) CK19 mRNA 2,500 copies/ $\mu$ Lの陽性標準液を測定するとき、15分以内に増幅が認められます。
- (2) CK19 mRNA陰性標準液を測定するとき、16分以内には増幅が認められません。

##### 2. 正確性

- (1) CK19 mRNA 250,000 copies/ $\mu$ Lの陽性標準液を測定するとき、陽性と判定されます。
- (2) CK19 mRNA陰性標準液を測定するとき、陰性と判定されます。

##### 3. 同時再現性

- (1) CK19 mRNA 250,000 copies/ $\mu$ Lの陽性標準液を連続3回測定するとき、いずれの測定も陽性と判定されます。
- (2) CK19 mRNA陰性標準液を連続3回測定するとき、いずれの測定も陰性と判定されます。

##### 4. 検出感度

CK19 mRNA 250 copies/ $\mu$ L

#### 較正用基準物質に関する情報

CK19 mRNAをクローニングしたプラスミドから合成したCK19 mRNAの既知濃度の自社調製品

### 【使用上又は取扱い上の注意】

#### 取扱い上(危険防止)の注意

試薬には、毒劇物や感染のおそれのあるものは含まれていません。

#### 使用上の注意

1. 正確な結果を得るために、本品は弊社によるトレーニングを受けた技術者あるいはその指導のもとで使用してください。
2. コンタミネーションには注意し、遺伝子検査に適した試験設備環境で行ってください。
3. 試薬が目や口に入った場合は、十分な流水で洗い流し医師の指示に従ってください。
- \* 4. 試薬バイアルを取扱う際は、パウダーフリーの使い捨て手袋とマスクを着用してください。また試薬バイアルのキャップの内側や開口部には触れないようにしてください。
- \* 5. 各試薬及び測定サンプル、希釈サンプルの容器は、キャップを開けた状態でキャップのみを持つと、溶液がこぼれてコンタミネーションの原因となります。ご使用の際は容器本体を持つようにしてください。
6. 試薬をつぎ足して使用しないでください。
7. 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
8. 本品は製造番号(ロット番号)毎に正確な結果が得られるように管理されていますので、製造番号の異なる試薬を組み合わせ使用しないでください。
9. 試薬を装置にセットする際、気泡が生じていると測定が正常に行われなことがありますが、卓上遠心機でスピンドウンし、気泡が取り除かれたことを確認の上使用してください。
10. 貯蔵方法に従って保存している試薬は酵素溶液を除き凍結していますので、使用前には室温で融解してください。その後、酵素溶液を含む全ての試薬を泡立たないようにゆっくりよく混合した後、卓上遠心機でスピンドウンし使用してください。
11. 貯蔵方法に従って保存していた酵素溶液は、酵素溶液以外の試薬を室温で融解している間、氷上で保管もしくはRD-100iの所定の位置に設置してから使用してください。すぐに測定に使用した場合、正確な測定結果が得られない可能性があります。

12. 試薬バイアルの開栓後は、菌やゴミの混入がないように注意してください。

- \*\* 13. 本品はRD-100iの専用試薬です。必ずRD-100iの電子添文及び取扱説明書を参照し、操作法をよく理解して使用してください。
- \* 14. 購入時に外装袋の破損により陰圧包装されていない試薬は使用しないでください。
- \* 15. 酵素溶液以外の試薬は、-20°Cで保存している場合であっても過冷却現象により凍結しないことがあります。本品の性能には影響はありません。凍結していない場合であっても、1回分の凍結融解として管理してください。

### 廃棄上の注意

1. 測定後、RD-100i専用消耗品のピペットチップや検出セルは、専用の廃棄袋に入れて廃棄してください。
2. 増幅産物が飛散するとその後の測定結果に影響を与えますので、測定後の検出セルは絶対にフタを開けないでください。
3. 測定後の検出セルは、使用施設内でオートクレープ処理しないでください。処理を行うと増幅産物が施設内に飛散し、以後の測定結果に影響が出ることがあります。
4. ヒトリンパ節由来の試料の操作及び測定に用いたチップや検出セル等は、感染の可能性があるものとして取り扱って下さい。
5. 試薬溶液は規定のテスト数消費後であっても容器内に少量残存しています。試薬容器を廃棄する際にこれらが飛散しないようにキャップをして廃棄してください。飛散した場合、以後の測定結果に影響が出ることがあります。

### 【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法: -20°C

有効期間: 12カ月

使用期限は外装に記載されています。

各試薬バイアルは、開封後1カ月以内に使用するものとし、凍結融解は5回までとさせていただきます。

### 【包装単位】

240テスト用

構成試薬	容量/本数
CK19プライマー溶液	720 $\mu$ L 8本
酵素溶液	450 $\mu$ L 2本
キャリブプレート レベル1	110 $\mu$ L 4本
キャリブプレート レベル2	110 $\mu$ L 4本
キャリブプレート レベル3	110 $\mu$ L 4本
CK19陽性コントロール	110 $\mu$ L 4本
CK19陰性コントロール	110 $\mu$ L 4本

### 関連製品

品番	製品名	容量
05413410	リノアグ	110mL

※この製品は別売品となります。

### 【主要文献】

- (1) Masai K. et al., Lung Cancer, 86(3): 318-323, 2014
- (2) Tsujimoto M. et al., Clinical Cancer Research, 13: 4807-4816, 2007
- (3) Visser M. et al., International Journal of Cancer, 122: 2562-2567, 2008
- (4) Yamamoto N. et al., Japanese Journal of Clinical Oncology, 43: 264-270, 2013
- (5) Yaguchi Y. et al., Annals of Surgical Oncology, 18: 2289-2296, 2011
- (6) Inoue M. et al., Lung Cancer, 78: 212-218, 2012
- (7) Notomi T. et al., Nucleic Acids Research, 28: E63, 2000
- (8) 社内学術資料「肺実質混入によるOSNA®法測定結果への影響検討」
- (9) Tamaki Y. et al., Clinical Cancer Research, 15: 2879-2884, 2009
- (10) Yamamoto H. et al., Annals of Surgical Oncology, 18: 1891-1898, 2011
- (11) Kumagai K. et al., Gastric Cancer, 17: 273-280, 2014
- (12) Osaka T. et al., British Journal of Cancer, 109: 1693-1698, 2013

### \* 【問合せ先】

シスメックス株式会社 カスタマーサポートセンター  
〒651-2241 神戸市西区室谷1丁目3番地の2  
TEL 0120-413-034

\*\*

**REF** カタログ番号

 添付の文書参照

**IVD** 体外診断用の専用製品

 保存温度

 製造販売元

 使用期限

**EC REP** 欧州代理人

**LOT** ロット番号

---

製造販売元

**シスメックス株式会社**

神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 〒651-0073  
TEL(078)265-0500(代)