

Major bcr-abl mRNAキット

ipsogen BCR-ABL1 Mbc r IS-MMR DX試薬

【全般的な注意】

1. 本品は体外診断用医薬品です。これ以外の目的に使用しないでください。
- ** 2. 電子添文に記載された以外の使用方法については保証をいたしかねます。
- ** 3. 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。
4. 測定結果に基づく判定は、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行ってください。

【形状・構造等(キットの構成)】

本キットは、次の試薬により構成されています。

構成試薬名		略語
Reverse Transcription Kit	RT buffer	-
	Random primer Random primer	-
	DTT 0.1M	DTT
	Reverse transcriptase 逆転写酵素	-
	dNTP 10 mM 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	dNTP
	RNase inhibitor	-
Calibration Kit	SP1-BCR-ABL Mbc r & ABL	SP1
	SP2-BCR-ABL Mbc r & ABL	SP2
	SP3-BCR-ABL Mbc r & ABL	SP3
	SP4-BCR-ABL Mbc r & ABL	SP4
	SP5-BCR-ABL Mbc r & ABL	SP5
	SP6-BCR-ABL Mbc r & ABL	SP6
	IS-MMR Calibrator	-
qPCR Kit	qPCR mix DNA合成酵素	-
	ROX II	-
	Water	-
	PPF-Mbc r Forward Primer for Mbc r Reverse Primer for Mbc r FAM-TAMRA probe for Mbc r	-
	PPC-ABL Forward Primer for ABL Reverse Primer for ABL FAM-TAMRA probe for ABL	-

注) ROX I は本測定では使用しません。

High positive RNA controlは必要に応じて精度管理用物質(陽性コントロール)として使用してください。

【使用目的】

血球成分より抽出したRNAからのMajor BCR-ABL mRNA/ABL mRNA比(国際標準値)の測定(慢性骨髄性白血病患者における治療効果のモニタリング)

【測定原理】

本品は、慢性骨髄性白血病(CML)患者の血球成分から抽出されたRNAを検体として用います。検体を逆転写酵素、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(以上4種をdNTPとする)及びRandom primerと混合し、50°Cの恒温反応にて、cDNAを得ます。得られたcDNAをDNA合成酵素、dNTP、Major BCR-ABL cDNAに対する特異的プライマー及びプローブであるForward Primer for Mbc r、Reverse Primer for Mbc r、FAM-TAMRA probe for Mbc r又はABL cDNAに対する特異的プライマー及びプローブであるForward Primer for ABL、Reverse Primer for ABL、FAM-TAMRA probe for ABLと混合し、遺伝子増幅装置にてcDNAの増幅反応(qPCR)を進行させます。本増幅反応におけるDNA伸長の過程で、

5'末端に蛍光色素であるFAM、3'末端に消光色素であるTAMRAを有する特異的プローブの分解に伴い、それまで発光が抑えられた蛍光色素であるFAMが遊離することで発せられた蛍光を遺伝子増幅装置で検出します。

検体中に含まれるmRNA量と発せられる蛍光量が閾値を越えるまでにかかる増幅サイクル数(Threshold Cycle: Ct値)には高い相関関係があることから、既知濃度のMajor BCR-ABL & ABL含有プラスミド溶液により作成された検量線を元に測定検体中のMajor BCR-ABL mRNA及びABL mRNAのコピー数(CN)を求めることができます。求められた各々のCNからABL mRNA 100コピーあたりのMajor BCR-ABL mRNAのCN(NCN)を算出し、同時に測定したIS-MMR Calibratorの測定値から求められた国際標準値(IS)に換算できる係数(IS変換係数)をNCNに乘じることで、ISに換算されたNCN(IS-NCN)への変換を行います。

【操作上の注意】

検体に関する事項

1. 血球成分から抽出されたRNA以外は測定しないでください。
2. 末梢血の血球成分からRNAを抽出する際には、全血をEDTAナトリウム又はEDTAカリウムで抗凝固処理してください。

妨害物質・妨害薬剤

本品は、抽出されたRNAを試料として測定することから、ヘモグロビン、ビリルビン及び乳びの混入はないと考えられます。従って、妨害物質の測定への影響はないものと考えられます。

その他

本品の測定には、遺伝子増幅装置「ロータージーンQ MDx 5plex HRM」、「アプライドバイオシステムズ 7500 Fast Dx」又はこれらの同等品を使用してください。他の装置では使用できません。

【用法・用量(操作方法)】

試薬の調製方法

各構成試薬は、融解を確認した後、試験管ミキサーにて混和し、スピンドウンして速やかに2~8°Cに保冷して用いてください。SP1~SP6、IS-MMR Calibratorは2重測定に必要な試薬量を調製してください。なお、以下の1~3の各プレミックスは、コントロール類を含めた検体の測定に必要な容量に、1測定分を足した分量をまとめて調製してください。

1. RTプレミックス
1測定あたりRT buffer 5µL、Random primer 5.25µL、dNTP 2.0µL、DTT 1.25µL、Reverse transcriptase 1µL及びRNase inhibitor 0.5µLをマイクロチューブに加えて穏やかに混和してください。
 2. qPCRプレミックス(Major BCR-ABL用)
1測定あたりqPCR mix 12.5µL、PPF-Mbc r 1µL及びWater 6.5µL^{※1}をマイクロチューブに加えて混和してください。
 3. qPCRプレミックス(ABL用)
1測定あたりqPCR mix 12.5µL、PPC-ABL 1µL及びWater 6.5µL^{※1}をマイクロチューブに加えて混和してください。
- ※1: アプライドバイオシステムズ 7500 Fast Dxで測定する場合は1検体当たりのWaterを6µLとし、1検体あたり、ROX II 0.5µLをマイクロチューブに追加してください。

必要な器具・器材・試料等

1. マイクロチューブ又は96-well plate(サーマルサイクラー用、qPCR用)
2. マイクロチューブキャップ又は96-well plate用シール(サーマルサイクラー用、qPCR用)
3. RNA抽出・希釈用水(RNase free)
4. ピペット・ピペットチップ
・ 0.5~1,000µLを採取することのできる、各容量に対応したマイクロピペット
・ RNase freeのフィルター付きチップ
5. 試験管ミキサー
6. 1.5mLチューブ用遠心機
7. 96-well plate用遠心機
8. サーマルサイクラー
9. 遺伝子増幅装置「ロータージーンQ MDx 5plex HRM」、「アプライドバイオシステムズ 7500 Fast Dx」又はこれらの同等品
10. RNA抽出用試薬

検体の採取及び調製方法

血球成分よりRNA抽出用試薬を用いてRNAを抽出します。抽出したRNAは分光光度計にて波長260nmにおける吸光度を測定して、濃度を求めてください。0.01~1µg/µLの範囲で測定できます。

操作方法

SP1~SP6、IS-MMR Calibratorは2重測定にて測定してください。

1. 逆転写反応

- (1) 各マイクロチューブに、検体、IS-MMR Calibrator及びRTneg^{※2}を10µLずつ分注してください。
- (2) 各マイクロチューブを、サーマルサイクラーを用いて65°Cで5分間熱変性させた後、直ちに氷上で5分間冷却してください。
- (3) 熱変性後の各マイクロチューブにRTプレミックスを15µLずつ添加し、サーマルサイクラーにて、次のプログラムを実行してください。

逆転写反応	25°C	10分間
	50°C	60分間
不活化	85°C	5分間
冷却	4°C	5分間

※2: 逆転写反応からの陰性コントロール(RNA抽出・希釈用水(RNase free)など)を用いてください

2. Major BCR-ABLのqPCR反応溶液の準備

- (1) マイクロチューブにqPCRプレミックス(Major BCR-ABL用)を20µL分注してください。
- (2) 各々のマイクロチューブに逆転写反応済みの検体(IS-MMR Calibratorを含む)とSP1、SP2、SP3、SP5、SP6又はWater^{※3}を5µL加えてください^{※4}。

※3: qPCRからの陰性コントロール(本品に同梱されたWaterを用いてください)

※4: 0.1µg/µLのRNAから逆転写反応を行った場合、qPCRに供される検体は、0.2µgのRNAから逆転写された産物となります。

3. ABLのqPCR反応溶液の準備

- (1) マイクロチューブにqPCRプレミックス(ABL用)を20µL分注してください。
- (2) 各々のマイクロチューブに逆転写反応済みの検体(IS-MMR Calibrator及びRTnegを含む)とSP3、SP4、SP5、SP6又はWaterを5µL加えてください。

4. qPCRと検出反応

遺伝子増幅装置にて、以下のPCRプログラムを実行してください。サイクル1~50の各反応において波長460~495nmで励起を行い、波長500~540nmの蛍光量を測定してください。反応完了後にCt値が出力されます。2重測定されたものについては平均のCt値を算出してください。

ホールド	95°C	10秒間
サイクル1~50	95°C	5秒間
	60°C	30秒間
ホールド	36°C	1分間

5. 検量線の作成

遺伝子増幅装置から出力された検量線キャリブレーター(SP1~SP6)のCt値と表示値(コピー数の常用対数値(Log CN))から標的遺伝子(Major BCR-ABL mRNA)及び内部標準遺伝子(ABL mRNA)の検量線を作成してください。

6. CNの算出

作成された検量線を用いて、検体及びIS-MMR Calibratorのコピー数の常用対数値(Log CN)を求め、その値からCNを算出してください。

7. NCNの算出

得られたMajor BCR-ABL mRNA及びABL mRNAのCNから、以下の式により検体及びIS-MMR CalibratorのNCNを算出してください。

$$NCN(\%) = (Major\ BCR-ABL\ mRNA\ CN) / (ABL\ mRNA\ CN) \times 100$$

8. IS変換係数の算出とIS-NCNの算出

算出されたIS-MMR CalibratorのNCNと本品に同封されているCertificateに記載されたIS-MMR Calibratorの表示値を用いて、以下の式によりIS変換係数を算出してください。

$$IS\ 変換係数 = (IS-MMR\ Calibrator\ の\ 表示値\ (IS-NCN)) / (IS-MMR\ Calibrator\ の\ 算出値\ (NCN))$$

各々の検体のNCNにIS変換係数を乗じることにより、検体のIS-NCNを算出してください。

$$IS-NCN(\%) = 検体のNCN \times IS\ 変換係数$$

【測定結果の判定法】

判定法

IS-NCNが0.1%以下となった際には分子遺伝学的大奏功(MMR)と判定してください。また、本品による測定値の増加は、BCR-ABL遺伝子の薬剤耐性変異出現やCMLの再発の兆候を見出す際の指標となります⁽¹⁾。

判定上の注意

1. 本キットではMajor BCR-ABL mRNAのみが測定可能であり、他のタイプのBCR-ABL mRNAの測定はできません。測定結果の判定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行ってください⁽²⁾。
2. 急性骨髄性白血病と急性リンパ性白血病の一部ではBCR-ABL遺伝子が認められるため、CML以外の症例においても本品の測定値が上昇する可能性があります^(3,4)。
3. IS-MMR CalibratorのNCNが0.05%以上、0.3%以下であることを確認し、この範囲から逸脱した場合には測定結果の判定に用いないでください。
4. ABL mRNAのCNが10,000コピー未満であった場合、測定に十分な感度を有していない可能性があります。

【臨床的意義】

CMLは、染色体相互転座t(9;22)(q34;q11.2)により形成されたフィラデルフィア(Ph)染色体上のBCR-ABL融合遺伝子がコードする蛋白質が恒常的活性化型チロシンキナーゼとして機能し、造血幹細胞が異常増殖することで発症します。その治療成績は、BCR-ABL蛋白質を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤の登場により飛躍的に改善され、その高い治療効果を高感度にモニタリングする検査の需要が高まりつつあります⁽⁵⁾。その中でもMajor BCR-ABL mRNAの定量は、高感度な測定や予後との関係によりその有用性が十分に確認されていますが、その測定方法・試薬材料が測定施設で異なることから測定値の標準化に支障をきたしていました。それを解決する試みとして、測定値の標準化を行う目的でISが定められ、測定結果をISに変換できる係数(Conversion Factor: CF)がリファレンスラボから付与される仕組みが整いました。しかしながら、CFを用いたIS変換には、リファレンスラボに複数の検体を送付する必要があり大変な労力を要することや、取得したCFを安定に維持することが困難である等、解決すべき課題が残されていました⁽⁶⁾。

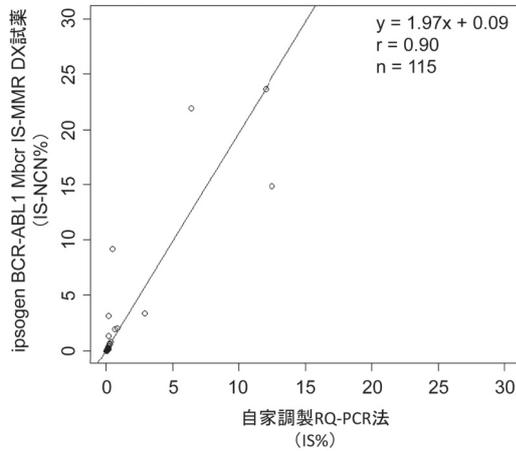
本品はMajor BCR-ABL mRNA/ABL mRNA比を測定し、WHO国際標準品に紐づく較正物質を用いてISへ換算することにより、従来のCFを用いたIS変換の課題を解決するために開発された体外診断用医薬品です。多施設臨床性能試験の結果からは、CFを有する国内検査機関において実施された自家調製による定量RT-PCR法(自家調製RQ-PCR法)の測定結果と良好な相関関係があることが確認され、微小残存病変の有無を検出できることが示唆されています。

臨床成績

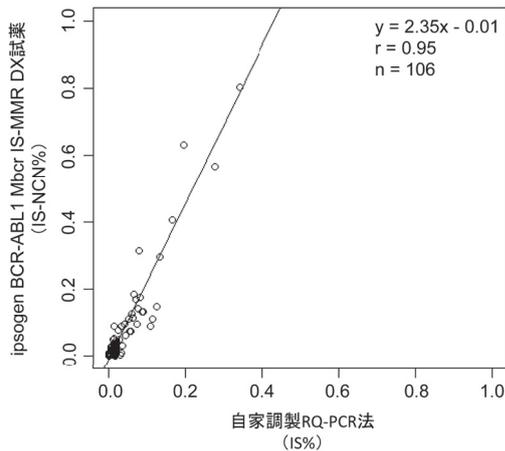
国内における多施設共同臨床性能試験がCML患者から採取された血液を対象として実施され、本品による測定結果、国際標準値報告可能な自家調製RQ-PCR法の測定結果、及びTMA法による既承認試薬の測定結果が比較検討されました。なお、本品による測定は2施設にて実施され、それらの測定結果が比較検討されました⁽⁷⁾。

1. 本品と自家調製RQ-PCR法の測定結果の比較検討

本品による結果と自家調製RQ-PCR法による結果について、有効性解析対象127検体中のうち、本品及びRQ-PCR法の測定結果が共に30%以下であった115検体を対象に比較検討した結果、以下のような良好な関係が確認されました。

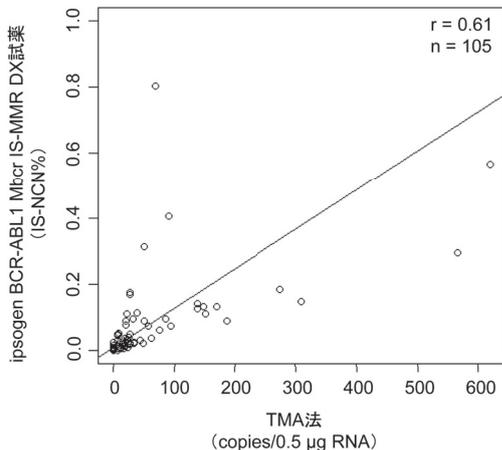


また、本品の結果と自家調製RQ-PCR法の結果が共に1%以下であった106検体を対象に比較検討した結果、以下のような良好な関係が確認されました。



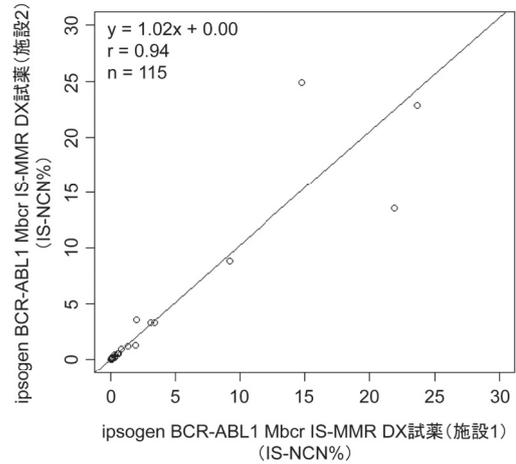
2. 本品とTMA法の測定結果の比較

本品による結果とTMA法の結果について、有効性解析対象127検体のうち、本品の結果が1%以下、かつTMA法の結果が測定範囲上限以下であった105検体を対象に比較検討した結果、相関係数は0.61となり、本品と自家調製RQ-PCR法の測定結果の相関係数よりも低い値でした。その原因として、TMA法では内部標準遺伝子で補正していないことが考えられました。



3. 施設間差の評価

国内2施設における本品の測定結果について、有効性解析対象127検体のうち、両施設における本品の測定結果が共に30%以下であった115検体を対象に比較検討した結果、以下のような良好な関係が確認されました。



【性能】

性能

1. 感度

Major BCR-ABL mRNAの測定

(1) 10^6 copies/5 μ LのMajor BCR-ABL & ABL含有プラスミド溶液を2重測定するとき、そのCt値は20.8未満です。

(2) 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^5 及び 10^6 copies/5 μ LのMajor BCR-ABL & ABL含有プラスミド溶液をそれぞれ2重測定するとき、そのCt値と対数変換された既知濃度の間に得られる検量線の傾きは-3.81~-3.05です。

ABL mRNAの測定

(1) 10^6 copies/5 μ LのMajor BCR-ABL & ABL含有プラスミド溶液を2重測定するとき、そのCt値は22.1未満です。

(2) 10^3 、 10^4 、 10^5 及び 10^6 copies/5 μ LのMajor BCR-ABL & ABL含有プラスミド溶液をそれぞれ2重測定するとき、そのCt値と対数変換された既知濃度の間に得られる検量線の傾きは-3.81~-3.05です。

2. 正確性

低濃度管理試料、中濃度管理試料及び高濃度管理試料を2重測定するとき、そのIS-NCNは既知IS-NCNの1/2~2倍の値を示します。

3. 同時再現性

低濃度管理試料、中濃度管理試料及び高濃度管理試料をそれぞれ3回同時に2重測定するとき、そのIS-NCNの変動係数は20%未満です。

注) 管理用試料(低濃度、中濃度、高濃度)

K562細胞(Major BCR-ABL発現細胞株)とKG1a細胞(Major BCR-ABL非発現細胞株)を較正用基準物質と同程度のIS-NCNとなるように混合し、それらをRNA安定化保存液に懸濁したものです。

低濃度管理試料(IS-NCNとして0.04%~0.25%)

中濃度管理試料(IS-NCNとして0.4%~2.5%)

高濃度管理試料(IS-NCNとして4%~25%)

4. 測定範囲(例示)

Major BCR-ABL mRNAの測定範囲は3~1,000,000copies/assayです。

ABL mRNAの測定範囲は1,000~1,000,000copies/assayです。

測定装置: ロータージーンQ MDx 5plex HRM

臨床研究成績[※]:

CML患者由来の7mL末梢血(50検体)を測定した結果^{※5}、47検体がIS-NCNとして0.0032%(MR4.5)^{※6}を測定するために必要なABL mRNAである94,000copies/assay^{※6}を上回りました。ABL mRNAの中央値及び最小値、最大値は以下のとおりです。

中央値: 170,000copies/assay (IS-NCNとして0.0018%; MR4.7)^{※6}

最小値: 82,000copies/assay (IS-NCNとして0.0037%; MR4.4)^{※6}

最大値: 420,000copies/assay (IS-NCNとして0.0007%; MR5.2)^{※6}

測定装置: Applied biosystems 7500FastリアルタイムPCRシステム

※5: 平均0.28 μ g/ μ LのRNA溶液を逆転写反応に供しました。qPCRに供された検体は平均0.56 μ gのRNAから逆転写された産物です。

※6: Major BCR-ABL mRNAの測定下限である3copies/assayを基に、IS変換係数を1として、IS-NCNの測定下限を算出しています。

較正用基準物質に関する情報

WHO Standard 09/138

【使用上又は取扱い上の注意】

取扱い上(危険防止)の注意

1. 試薬には、毒劇物や感染の恐れのあるものは含まれていません。
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等(パウダーフリー)及びマスクを着用してください。

使用上の注意

1. 正確な結果を得るために、遺伝子検査の熟練者あるいはその指導のもとに測定を行ってください。
2. ヌクレアーゼフリーの実験器具(例えばピペット、ピペットチップ)を使用してください。
3. 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にて、使い捨て手袋等(パウダーフリー)及びマスクを着用して測定を行ってください。
4. 使用期限切れのキットは使用しないでください。
5. キットの各構成試薬が冷凍庫外に長時間放置されないように素早く調製・使用してください。また、冷凍庫外に出されたキットの各構成試薬及びそれらを用いて調製された試薬類は氷上で取り扱ってください。
6. プライマー&プローブミックス(PPF-Mbcr及びPPC-ABL)の光への曝露は最小限にとどめてください。
7. 融解後のキットの各構成試薬及びそれらを用いて調製された試薬類は液が均一になるまで十分に攪拌し、スピンドウンを十分に行ってください。
8. 異なる製造番号の構成成分を注ぎ足したり、混合して使用することはやめてください。
9. 測定装置については定期的に校正されたものを使用してください。
10. 誤って試料をこぼした場合は、保護具を着用し試料が飛び散らないようにペーパータオルなどで静かに拭き取ってください。拭き取った後は、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度1.0%以上)で浸すように拭き取り、その後水拭きしてください。

廃棄上の注意

1. PCR反応生成物は、コンタミネーションを避けるため、キャップ又はプレートシールを開けずに密閉できるビニール袋を2重に施し、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物として処理してください。
2. 検体及び本品を取り扱う際に使用した器具類や残液は感染の危険があるものとし、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物として処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法:

-30°C ~ -15°Cに保存

有効期間:

20カ月(使用期限は外箱に表示しています。)

**【包装単位】

96テスト用^{※7}

※7: 検量線キャリブレーター(SP1~SP6)、IS-MMR Calibrator及び陰性コントロールの測定も含めて96テスト(qPCRとして2反応(Major BCR-ABLとABL)を1テスト)が実施可能です。なお、Calibration Kitは3回分の分量が入っています。

製品には別容量の包装があります。弊社までお問い合わせください。

【主要文献】

- (1) Hughes T et al., Blood, **108**, 28 (2006)
- (2) Selleri L et al., Blood, **75**, 1146 (1990)
- (3) Soupir CP et al., Am. J. Clin. Pathol., **127**, 642 (2007)
- (4) Kantarjian HM et al., Blood, **78**, 2411 (1991)
- (5) Druker BJ et al., N. Engl. J. Med., **355**, 2408 (2006)
- (6) Müller MC et al., ASH Annual Meeting Abstracts: Blood, **116**, Abstract 893 (2010)
- (7) 宮村 耕一ら 臨床血液, **55**, 534 (2014)
- (8) 社内文書

**【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

*  カタログ番号

 使用期限

 テスト数

 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1-5-1 〒651-0073
TEL(078)265-0500(代)