

サイトケラチン19 mRNAキット

リノアンプ™ CK19

【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、原発集中の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。⁽¹⁾ 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、病理組織検査ある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. 電子添文以外の使用方法については保証をいたしかねます。
- * 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。
7. 本品を術中でのリンパ節転移診断の補助に使用する場合には、関連学会が作成したガイドライン等の最新の情報を参照した上で使用してください。

【形状・構造等(キットの構成)】

構成試薬 (略称)	主要成分
CK19プライマー溶液 (P-CK19)	(反応系に関与する成分) CK19 FAプライマー CK19 RAプライマー CK19 F3プライマー CK19 R3プライマー CK19 LPFプライマー CK19 LPR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 II)	(反応系に関与する成分) 逆転写酵素 DNA合成酵素
CK19キャリブレーター レベル1 (CK19-C1) (CK19 mRNA 2.5×10^3 copies/ μ L)	
CK19キャリブレーター レベル2 (CK19-C2) (CK19 mRNA 2.5×10^5 copies/ μ L)	
CK19キャリブレーター レベル3 (CK19-C3) (CK19 mRNA 2.5×10^7 copies/ μ L)	
CK19陽性コントロール (CK19-PC) (CK19 mRNA 5.0×10^3 copies/ μ L)	
βアクチンプライマー溶液 (P-βact)	βアクチン FAプライマー βアクチン RAプライマー βアクチン F3プライマー βアクチン R3プライマー βアクチン LPFプライマー βアクチン LPR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

βアクチン陽性コントロール (βact-PC)	
βアクチンカットオフコントロール (βact-CC)	
陰性コントロール (NC)	

【使用目的】

摘出された乳癌、大腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、子宮頸癌又は子宮体癌所属リンパ節中のサイトケラチン19 (CK19) mRNAの検出 (乳癌、大腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、子宮頸癌又は子宮体癌におけるリンパ節転移の診断補助)

【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段階でおこなうOSNA™ (One-Step Nucleic Acid Amplification) 法に用いられます。⁽²⁾ 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。⁽³⁾ 本品は、試料として200mMグリシン緩衝液 (pH 3.5) に可溶化した乳癌、大腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、子宮頸癌又は子宮体癌患者由来の被検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種類のデオキシヌ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を混合し、一定温度下で反応させます。リンパ節可溶化液中の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) による濁度変化が所定の閾値を超えるまでの時間を測定することにより行います。既知のCK19 mRNA濃度と反応開始から濁度変化が所定の閾値を超えるまでの時間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濃度を算出します。この算出した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、試料中のリンパ節転移の陽性又は陰性を判定します。また、ヒトリンパ節内在性参照物質として、CK19 mRNAと同様の原理にてβアクチンmRNAを検出し、試料の信頼性を確認することができます。

【操作上の注意】

リンパ節の性質、採取法

1. 本品の対象とする検体はリンパ節です。可溶化する検体中にリンパ節組織が必ず含まれるように、検体をサンプリングする際は注意してください。
2. 使用するリンパ節は25～600 mgの範囲としてください。リンパ節が600 mg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、25 mg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。
3. 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。
4. 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 (2～8 °C相当) 又は氷上で保存し、速やかに測定してください。摘出後、室温で1時間以上が経過すると、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。
5. 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、できるだけ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200mMグリシン緩衝液 (pH 3.5) 中で融解させたあと、可溶化を行ってください。
6. 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。⁽⁴⁾

リンパ節可溶化液の性質、調製法

- リンパ節を200mMグリシン緩衝液(pH 3.5) 4 mLが入った容器に入れて氷上に置き、ホモジナイザーによりリンパ節を破碎します(ホモジナイザーは、規定の条件にて使用してください。なお、未破碎の組織片が確認できる場合は、規定の条件で再度破碎し、均一な破碎片が得られるようにします。)。その後、10,000G、60秒、室温(1~30℃)の条件で遠心分離し、すみやかに中間層を取り分けたものを「リンパ節可溶化液」とし、測定サンプルを調製するまで氷上に保管します。
- リンパ節可溶化液の調製方法の詳細や注意事項については、リノアグの使用説明書を参照してください。
- 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。可溶化された脂肪組織が増幅反応へ影響しないことは確認していますが(本項「妨害物質・妨害薬剤」を参照)、リンパ節可溶化液に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及びβアクチンmRNA)の量が変動し、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、リンパ節可溶化液を再度遠心分離したあと、ピペット等で不溶物を取り除いてください。
- リンパ節可溶化液の調製日当日に測定できない場合は、リンパ節可溶化液を-80℃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℃で凍結保存し、1カ月以内に測定してください。
- 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融解は2回まで^{a)}です。
a): 「融解は2回まで」とは、凍結と融解を繰り返し、2回目の融解までのことを意味します。

測定サンプルの性質

- 調製の際は必ず、RDサンプルバイアルを使用し、氷上で実施してください。他のサンプル容器を使用しないでください。
- 測定サンプルは、それぞれ50 µL以上の液量を準備してください。
- 測定サンプルは、調製後速やかに測定してください。
- 測定サンプル調製後、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、必ずサンプル容器のキャップを閉めて冷蔵(2~8℃相当)又は氷上で保管し、調製後2時間以内に測定してください。調製後2時間を経過した場合は測定サンプルを廃棄し、リンパ節可溶化液から測定サンプルを再度調製して測定してください。
- 測定サンプルを冷蔵(2~8℃相当)又は氷上で保管する場合は、サンプル容器の内壁に結露することがありますので、測定を開始する直前に十分混合し遠心機でスピンドアウンしてから測定してください。

* 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 (リノアグ4 mL中)
リンパ節以外の ヒト組織	末梢血	100 µL
	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 µL
	スズコロイド	0.285 mg
放射性トレーサー	フチン酸	3.40 mg
	ヒト血清アルブミン	50.5 mg
	バクリタキセル	6.7 µg
抗癌剤	ドセタキセル	2.2 µg
	5-FU	10.9 µg
	ドキソルビシン	3.0 µg
	エビルビシン	6.1 µg
	シクロフォスファミド	1.5 µg

※末梢血、及び墨汁については、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。

※末梢血、及び墨汁以外の物質・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「リンパ節の性質、採取法」及び「リンパ節可溶化液の性質、調製法」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いませんので、使用の際はご注意ください。

その他

本品は遺伝子増幅検出装置RD-200の専用試薬です。必ずRD-200の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。

【用法・用量(操作方法)】

必要な器具・器材・試料等

- 遠心機
- ボルテックスミキサー
- 冷却用ラック及び氷(クラッシュアイス)
- 専用の遺伝子増幅検出装置RD-200(以下、RD-200)、(シスメックス社製)及びその関連する消耗品(RD-200の取扱説明書を参照してください)
- 200mMグリシン緩衝液(pH 3.5)は別売りのリノアグ(シスメックス社製)を使用してください。
- RDサンプルバイアル(シスメックス社製)

試薬及びキャリブレーター、コントロールの準備

- 20℃で保存していた必要な試薬(酵素溶液以外)及びキャリブレーター、コントロールは、室温(1~30℃)で融解し、完全に融解したことを確認したあと直ちにボルテックスミキサー(約5~10秒)にて攪拌してください。
- 酵素溶液は融解の必要がありませんので、泡立たないように転倒攪拌(5~10回)してください。
- 攪拌後、すべての試薬及びキャリブレーター、コントロールは気泡がなくなるまで遠心機(約5秒)でスピンドアウンしてください。
- スピンドアウン後の試薬及びキャリブレーター、コントロールは直ちに氷上保管もしくはRD-200の所定の位置にセットします。RD-200に試薬及び試料をセットする際は、試薬サンプルセット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。

※試薬及び試料のセット方法については、RD-200の取扱説明書を参照してください。

測定サンプル調製法

予め氷上に用意しておいたサンプル容器にて、リンパ節可溶化液を200 mMグリシン緩衝液(pH3.5)で10倍希釈し(リンパ節可溶化液200 µL + 200 mMグリシン緩衝液(pH3.5) 180 µL)、ボルテックスミキサーにてよく攪拌します。これを「測定サンプル」とします。

測定(操作)法

(CK19項目のみ測定する場合)

- 検量線の作成
 - 試薬としてCK19プライマー溶液及び酵素溶液をRD-200にセットします。
 - 試料としてCK19キャリブレーター レベル1、2、3、CK19陽性コントロール、及び陰性コントロールをRD-200にセットします。
 - CK19プライマー溶液20 µL、酵素溶液3 µL及び試料2 µLを混合します。
 - その後、64℃で11分間反応させます。
 - 反応液の濁度を波長465 nmの透過光の変化として検出します。この透過光の変化から濁度曲線を作成します。
 - この濁度曲線から濁度が0.1を超える時間を算出し、この時間を立ち上がり時間とします。
 - 各キャリブレーターの立ち上がり時間とCK19 mRNA濃度から検量線を作成します。
 - 検量線を確定します。

※RD-200では、上記測定法の(3)~(7)を自動的に行います。

※消耗品のセット方法及び廃棄方法、検量線の測定登録及び試薬登録方法、試薬及び試料のセット方法、RD-200の操作方法の詳細及び各操作の注意事項については、RD-200の取扱説明書を参照してください。

※エラーの表示により検量線が確定できない場合は、RD-200の取扱説明書を参照してください。

※検量線は測定サンプルを測定する前に作成してください。

※検量線作成後、12時間以内にサンプルの測定を行ってください。

※試薬バ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。

2. サンプルの測定

- 試薬としてCK19プライマー溶液及び酵素溶液をRD-200にセットします。
- 試料として測定サンプル、CK19陽性コントロール及び陰性コントロールをRD-200にセットします。
- CK19プライマー溶液20 µL、酵素溶液3 µL及び試料2 µLを混合します。
- その後、64℃で11分間反応させます。
- 反応液の濁度を波長465 nmの透過光の変化として検出します。この透過光の変化から濁度曲線を作成します。

- (6) この濁度曲線から濁度が0.1を超える時間を立ち上がり時間とします。
- (7) 事前に作成した検量線により、測定サンプル中のCK19 mRNA濃度を算出します。
- (8) 測定終了後、CK19陽性コントロール及び陰性コントロールの測定結果に「*」フラグ及びマスクが表示されていないことを確認してください。フラグやマスクが表示されている場合は、測定結果を判定に使用しないでください。
- (9) 算出したCK19 mRNA濃度より、測定結果の判定法に基づいて陽性(Positive)又は陰性(Negative)を判定します。

※RD-200では、上記測定法の(3)～(7)、(9)を自動的に行います。
 ※消耗品のセット方法及び廃棄方法、サンプルの測定登録、試薬及び試料のセット方法、RD-200の操作方法の詳細及び各操作の注意事項については、RD-200の取扱説明書を参照してください。
 ※フラグ及びマスクは下表を参照してください。測定結果に「*」フラグが表示された場合は、RD-200の取扱説明書を参照して判断してください。

(CK19項目とβアクチン項目を測定する場合)

1. 検量線の作成及びβアクチンカットオフ値の設定
 - (1) 試薬としてCK19プライマー溶液、βアクチンプライマー溶液及び酵素溶液をRD-200にセットします。
 - (2) 試料としてCK19キャリブレーター レベル1、2、3、βアクチンカットオフコントロール、CK19陽性コントロール、βアクチン陽性コントロール及び陰性コントロールをRD-200にセットします。
 - (3) CK19プライマー溶液又はβアクチンプライマー溶液20 µL、酵素溶液3 µL及び試料2 µLを混合します。
 - (4) その後、64 °Cで11分間反応させます。
 - (5) 反応液の濁度を波長465 nmの透過光の変化として検出します。この透過光の変化から濁度曲線を作成します。
 - (6) この濁度曲線から濁度が0.1を超える時間を立ち上がり時間とします。
 - (7) 各キャリブレーターの立ち上がり時間とCK19 mRNA濃度から検量線を作成します。また、βアクチンカットオフコントロールの立ち上がり時間とオフセット数値からβアクチンカットオフ値を設定します。
 - (8) 検量線とβアクチンカットオフ値を確定します。

※RD-200では、上記測定法の(3)～(7)を自動的に行います。
 ※消耗品のセット方法及び廃棄方法、検量線の測定登録及び試薬登録方法、試薬及び試料のセット方法、RD-200の操作方法の詳細及び各操作の注意事項については、RD-200の取扱説明書を参照してください。

※エラーの表示により検量線及びβアクチンカットオフ値が確定できない場合は、RD-200の取扱説明書を参照してください。
 ※検量線の作成及びβアクチンカットオフ値の設定は測定サンプルを測定する前に実施してください。
 ※検量線作成後及びβアクチンカットオフ値の設定後、12時間以内にサンプルの測定を行ってください。
 ※試薬バイアルが替わる場合は、改めて検量線の作成及びβアクチンカットオフ値設定を実施してください。

2. サンプルの測定
 - (1) 試薬としてCK19プライマー溶液、βアクチンプライマー溶液及び酵素溶液をRD-200にセットします。
 - (2) 試料として測定サンプル、CK19陽性コントロール、βアクチン陽性コントロール及び陰性コントロールをRD-200にセットします。
 - (3) CK19プライマー溶液又はβアクチンプライマー溶液20 µL、酵素溶液3 µL及び試料2 µLを混合します。
 - (4) その後、64 °Cで11分間反応させます。
 - (5) 反応液の濁度を波長465 nmの透過光の変化として検出します。この透過光の変化から濁度曲線を作成します。
 - (6) この濁度曲線から濁度が0.1を超える時間を立ち上がり時間とします。
 - (7) 事前に作成した検量線により、測定サンプル中のCK19 mRNA濃度を算出します。
 - (8) 測定終了後、CK19陽性コントロール及び陰性コントロールの測定結果に「*」フラグ及びマスクが表示されていないことを確認してください。フラグやマスクが表示されている場合は、測定結果を判定に使用しないでください。
 - (9) 算出したCK19 mRNA濃度より、測定結果の判定法に基づいて陽性(Positive)又は陰性(Negative)を判定します。
 - (10) βアクチンの測定結果を参考にする場合は、βアクチン陽性コントロール及び陰性コントロールの測定結果に「*」フラグが表示されていないことを確認してください。

※RD-200では、上記測定法の(3)～(7)、(9)を自動的に行います。

※消耗品のセット方法及び廃棄方法、サンプルの測定登録、試薬及び試料のセット方法、RD-200の操作方法の詳細及び各操作の注意事項については、RD-200の取扱説明書を参照してください。
 ※フラグ及びマスクは下表を参照してください。測定結果に「*」フラグが表示された場合は、RD-200の取扱説明書を参照して判断してください。

<フラグ>

マーク	説明	表示箇所
*	反応曲線異常や精度管理異常が認められ、信頼性の低いデータに表示されます。	立ち上がり時間、濃度、半定量値、定性判定値

<マスク>

マスク	説明	表示箇所
**:*	装置異常や反応曲線異常等の理由で、測定結果が得られなかった場合に表示されます。	立ち上がり時間
-----	反応曲線異常や関連項目のデータが算出できなかった等の理由で、測定結果を算出できなかった場合に表示されます。	濃度、半定量値、定性判定値
XXXXXXX	検量線が未確定で濃度算出できない場合に表示されます。	濃度

試薬消費量、反応条件等

1. CK19項目

CK19プライマー溶液	20 µL (1テストあたり)
酵素溶液	3 µL (1テストあたり)
試料 (CK19キャリブレーター、CK19陽性コントロール、陰性コントロール、測定サンプル)	各2 µL (1テストあたり)
 2. βアクチン項目

βアクチンプライマー溶液	20 µL (1テストあたり)
酵素溶液	3 µL (1テストあたり)
試料 (βアクチンカットオフコントロール、βアクチン陽性コントロール、陰性コントロール、測定サンプル)	各2 µL (1テストあたり)
 3. 反応温度 64.0 °C ± 0.5 °C
 4. 反応時間 11分
- ※詳細はRD-200の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

CK19 mRNAの検量線に基づいて測定サンプル中のCK19 mRNA濃度を算出し、カットオフ値を900 copies/µLとして下表の基準で判定を行います。

測定サンプルのCK19 mRNA濃度	判定
カットオフ値以上 (900 copies/µL ≤)	陽性 (Positive)
カットオフ値未満 (<900 copies/µL)	陰性 (Negative)

※RD-200では、検量線の作成と上記判定を自動で行います。

判定上の注意

1. 本品は乳癌、大腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、子宮頸癌又は子宮体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。
- ** 2. 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。⁽⁵⁾ この場合は、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、転移有無の確認をおこなう等の運用を実施してください。
3. 乳癌患者のリンパ節転移検査においては、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以外を用いた術前薬物療法を受療した患者の臨床研究の成績がありません。
4. 大腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、子宮頸癌又は子宮体癌患者のリンパ節転移検査においては、術前・術中補助療法を受療した患者の臨床試験の成績がありません。正しい結果が得られない可能性がありますので、術前・術中補助療法を受けた大腸癌患者、胃癌患者、非小細胞肺癌患者、子宮頸癌患者又は子宮体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。

5. 乳癌患者のリンパ節転移検査においては、RD-200は参考情報として半定量情報が表示されます。この場合、CK19 mRNA 14,000 copies/μL以上を(++)、900 copies/μL以上14,000 copies/μL未満を(+)と表示します。本品による陽性判定((++), (+))は、「リノアンブBC」の陽性判定((++), (+))と97.9 % (141/144)という高い一致率を示しました。「リノアンブBC」では、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診断において、(++)はマクロ転移(2 mmより大きい転移)と96.4 % (434/450)という高い一致率が確認されています。
6. 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、がんにはリンパ腫等の血液癌も含まれます。)
7. サンプルに含まれる内在性参照物質としてβアクチンmRNAを測定することによって、測定に適した品質の試料であることを確認することができます。βアクチンmRNA 14,000 copies/μLの立ち上がり時間をカットオフ値として、サンプルの立ち上がり時間がカットオフ値よりも遅い場合には試料の品質が悪い可能性があります。
- ** 8. リンパ節中にCK19 mRNAを発現する良性の上皮性病変(子宮内腺症、卵管内腺症等)が混入する症例が稀に存在します。(6)(7) この場合、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。

* 【臨床的意義】

本品は、乳癌、大腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、子宮頸癌又は子宮体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・術中補助療法を受療していない乳癌、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、本品と同様にOSNA法を利用した既承認体外診断用医薬品「リノアンブBC」(製造販売承認番号 22000AMX01627000)による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相関性試験により確認されています。「リノアンブBC」の臨床的意義については電子添文を参照してください。

また、術前・術中補助療法を受療していない子宮頸癌又は子宮体癌患者のリンパ節転移検査において、2 mm間隔で作製した永久標本を用いる病理組織検査による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-200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技術者あるいはその指導のもとで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、非小細胞肺癌、子宮頸癌又は子宮体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>

(子宮頸癌及び子宮体癌 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(H&E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、2 mm間隔に分割され、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。(8)

・一致率

2 mm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97.9 % (95 %信頼区間0.961~0.991) (428/437)でした。

N=437		2 mm 間隔病理組織検査	
		陽性	陰性
リノアンブ CK19	陽性 (Positive)	56	4
	陰性 (Negative)	5	372

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5リンパ節の内、3リンパ節については、詳細な病理組織学的検討及び分子生物学的方法により、転移巢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2リンパ節の内、1リンパ節については、詳細な病理組織学的検討及び分子生物学的方法により、OSNA法に用いたリンパ節ブロックに十分な量の転移巢が含まれず、判定が不一致となった可能性が示唆されました。残りの1リンパ節については、抗CK19抗体を用いた免疫染色により、転移巢におけるCK19の低発現が確認されました。

一方、OSNA法陽性かつ病理組織検査陰性の4リンパ節の内、1リンパ節については、病理組織検査に用いた標本にITC(遊離腫瘍細胞)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。残りの3リンパ節については、詳細な病理組織学的検討及び分子生物学的方法により、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。

【性能】

性能

1. 感度
 - 項目: CK19
 - (1) CK19 mRNA標準液(2.5 × 10² copies/μL)を測定した場合、11分0秒以内に立ち上がり時間が検出されます。
 - (2) CK19 mRNA陰性標準液を測定した場合、11分0秒以内に立ち上がり時間が検出されません。
 - 項目: βアクチン
 - (1) βアクチンmRNA標準液(2.5 × 10² copies/μL)を測定した場合、11分0秒以内に立ち上がり時間が検出されます。
 - (2) βアクチンmRNA陰性標準液を測定した場合、11分0秒以内に立ち上がり時間が検出されません。
2. 正確性
 - 項目: CK19
 - (1) CK19 mRNA標準液(5.0 × 10³ copies/μL)を測定した場合、陽性と判定されます。
 - (2) CK19 mRNA陰性標準液を測定した場合、陰性と判定されます。
 - 項目: βアクチン
 - (1) βアクチンmRNA標準液(2.5 × 10⁵ copies/μL)を測定した場合、カットオフ値より早く立ち上がり時間が検出されます。
 - (2) βアクチンmRNA陰性標準液を測定した場合、カットオフ値より遅く立ち上がり時間が検出されます。
3. 同時再現性
 - 項目: CK19
 - (1) CK19 mRNA標準液(5.0 × 10³ copies/μL)を連続3回測定した場合、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回測定した場合、いずれの測定も陰性と判定されます。
 - 項目: βアクチン
 - (1) βアクチンmRNA標準液(2.5 × 10⁵ copies/μL)を連続3回測定した場合、いずれの測定もカットオフ値より早く立ち上がり時間が検出されます。
 - (2) βアクチンmRNA陰性標準液を連続3回測定した場合、いずれの測定もカットオフ値より遅く立ち上がり時間が検出されます。
4. 最小検出感度(例示)
 - CK19 mRNA 2.5 × 10² copies/μL (RD-200使用時)

相関性

本品と同様にOSNA法を利用した既承認体外診断用医薬品「リノアンブBC」(製造販売承認番号 22000AMX01627000)との相関性について検討しました。

- * 1. 体外診断用医薬品「リノアンブBC」に関して
「リノアンブBC」とは、本品と同様に摘出した乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌所属リンパ節中のCK19 mRNAを検出することを目的とし、リンパ節転移診断の補助に用いる弊社の体外診断用医薬品です。「リノアンブBC」の臨床性能については電子添文を参照してください。
- * 2. 相関性試験結果
乳癌、大腸癌、胃癌及び非小細胞肺癌所属リンパ節を「リノアンブBC」及び本品で測定し、両試薬の判定結果を比較しました。(乳癌)
乳癌所属リンパ節における「リノアンブBC」⁽⁵⁾⁽⁹⁾ 及び本品の判定結果の一致率は98.0 % (95 %信頼区間94.3~99.3 %) (147/150)でした。⁽¹⁰⁾

N=150		リノアンプBC	
		陽性 (++, +, +I)	陰性 (-)
リノアンプ CK19	陽性 (Positive)	62	1
	陰性 (Negative)	2	85

参考結果
(++)と(++)以外の判定結果について、「リノアンプBC」と最も高い一致率97.9 % (95 %信頼区間94.1～99.3 %) (141/144)* を示したことから、14,000 copies/μLを本品の(++) 判定のカットオフ値として設定しました。乳癌所属リンパ節における「リノアンプBC」及び本品の半定量情報の相関性は以下のとおりでした。

N=150			リノアンプBC			
			陽性			陰性
			++	+	+I	-
リノアンプ CK19	陽性 (Positive)	++	39	1	5	0
		+	2	14	1	1
	陰性 (Negative)	-	0	2	0	85

*リノアンプBCにおいて(+)Iと判定された6検体は、(++) もしくは(+)の判別ができないため除外し、144検体での結果で算出しています。

- （大腸癌）
大腸癌所属リンパ節における「リノアンプBC」⁽¹¹⁾ 及び本品の判定結果の一致率は96.0 % (95 %信頼区間91.5～98.1 %) (143/149) でした。

N=149		リノアンプBC	
		陽性 (++, +, +I)	陰性 (-)
リノアンプ CK19	陽性 (Positive)	52	3
	陰性 (Negative)	3	91

- （胃癌）
胃癌所属リンパ節における「リノアンプBC」⁽¹²⁾ 及び本品の判定結果の一致率は99.3 % (95 %信頼区間96.3～99.9 %) (149/150) でした。

N=150		リノアンプBC	
		陽性 (++, +, +I)	陰性 (-)
リノアンプ CK19	陽性 (Positive)	48	0
	陰性 (Negative)	1	101

- （非小細胞肺癌）
非小細胞肺癌所属リンパ節における「リノアンプBC」⁽¹³⁾ 及び本品の判定結果の一致率は96.2 % (95 %信頼区間92.0～98.3 %) (152/158) でした。⁽¹⁴⁾

N=158		リノアンプBC	
		陽性 (++, +, +I)	陰性 (-)
リノアンプ CK19	陽性 (Positive)	55	2
	陰性 (Negative)	4	97

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

（参考データ）

検出範囲

CK19 mRNA 2.5×10² copies/μL ～ 1.0 × 10⁸ copies/μL

直線性

CK19 mRNA 2.5 × 10² copies/μL ～ 2.5 × 10⁸ copies/μLの7濃度の測定サンプルを連続8回測定したとき、各測定サンプルの濃度と測定結果の平均値には良好な直線性（相関係数R²=0.999）が得られました。

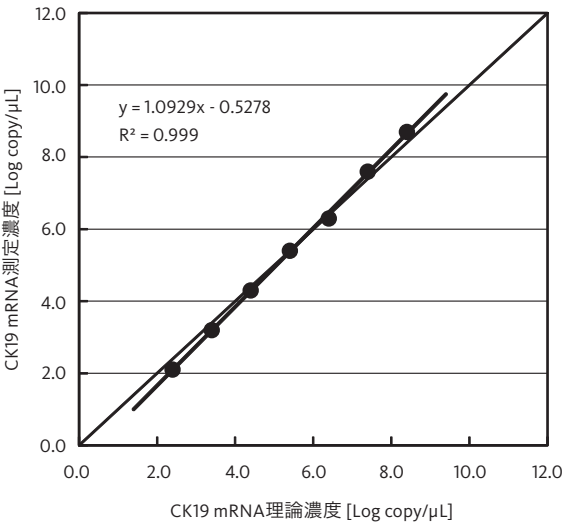


図 検出範囲における直線性

【使用上又は取扱い上の注意】

取扱い上（危険防止）の注意

1. 検体はHBV、HCV、HIV等を含むものがありますので、感染性を考慮して取扱いには厳重な注意をしてください。
2. 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が、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。

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. 試薬を取扱う際は、パウダーフリーのラテックス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。
4. 使用期限及び開封後有効期間を過ぎた試薬は使用しないでください。
5. 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。
6. 試薬をつぎ足して使用しないでください。
7. 試薬ラックに表示されているバーコードの下の数字はキット（箱）ごとの管理番号を示しています。キット（箱）が異なる試薬を組み合わせ使用しないでください。
8. 本品は試薬ラックに表示されているバーコードにより試薬消費量をラックごとに管理しています。使用後の試薬は元のラックに戻し、異なるラックの試薬と組み合わせ使用しないでください。
9. 1キット（箱）を複数の装置で使用すると試薬消費量の管理ができませんので、最後まで同じ装置で使用してください。
10. 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いことがありますので、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。
11. 検量線を作成してから測定サンプルを測定するまでの間は、試薬を凍結しないでください。
12. 使用時は、装置の試薬サンプルセット部あるいは氷上にて保存してください。また測定中以外は、試薬を30分以上装置内に放置しないでください。次の測定まで30分以上要する場合は試薬バイアルのキャップを閉め氷上に一度戻してください。
13. 試薬はこぼさないよう十分に注意してください。こぼれた場合は、直ちに消毒用エタノール等で拭き取ってください。
14. 使用後の試薬は必ずバイアルのキャップを閉め、-25 ～ -15℃で保存してください。
15. 酵素溶液以外の試薬は、-25 ～ -15℃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。
16. 試薬はよく混合した後に遠心機でスピンドウンし、試薬バイアルのキャップに付着していないことを確認してから使用してください。
17. 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-200の所定の位置にセットしてから使用してください。すぐに測定に使用した場合は、所定の温度より低いため、正確な測定結果が得られない可能性があります。

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

廃棄上の注意

- 1. 測定後RD-200専用消耗品は、専用の廃棄袋に入れて廃棄してください。
- 2. 測定後の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、測定後の検出セルのフタは絶対に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ブ処理しないでください。処理をおこな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場合があります。
- 4. ヒトリンパ節由来の物質を含む試料の調製及び測定に用いた消耗品等は、感染の可能性があるものとして取り扱い、医療廃棄物等に関する規定に従って処理してください。
- 5. 試薬は規定のテスト数消費後であっても試薬バイアル内に少量残存しています。試薬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。飛散した場合は、以後の測定結果に影響が出る場合がありますので、エタノールで濡らした布等で拭き取ってください。
- 6. CK19プライマー溶液及びβアクチンプライマー溶液は、硫酸アンモニウムを含有しています。アンモニウム化合物ですので試薬を廃棄する場合は、水質汚濁防止法の規制に留意して処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

- 1. 貯蔵方法：-25℃～-15℃
 - 2. 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2カ月以内に使用するものとし、凍結融解は5回までとしてください。

【包装単位】

120テスト用 (LAC-701A)

構成試薬	容量/本数
CK19プライマー溶液	1,400 μL / 3本
酵素溶液	450 μL / 1本
CK19キャリブレーター レベル1	110 μL / 3本
CK19キャリブレーター レベル2	110 μL / 3本
CK19キャリブレーター レベル3	110 μL / 3本
CK19陽性コントロール	110 μL / 3本
陰性コントロール	110 μL / 3本

120テスト用 (LAC-700A)

構成試薬	容量/本数
CK19プライマー溶液	1,400 μL / 2本
酵素溶液	450 μL / 1本
CK19キャリブレーター レベル1	110 μL / 2本
CK19キャリブレーター レベル2	110 μL / 2本
CK19キャリブレーター レベル3	110 μL / 2本
CK19陽性コントロール	110 μL / 2本
βアクチンプライマー溶液	920 μL / 2本
βアクチン陽性コントロール	110 μL / 2本
βアクチンカットオフコントロール	110 μL / 2本
陰性コントロール	110 μL / 2本

関連製品

品 番	製 品 名	容量/本数
05413410	リノアーク [※]	110 mL / 1本

※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** : 318 (2014)
- (2) Tsujimoto M. et al., Clinical Cancer Research, **13** : 4807 (2007)
- (3) Notomi T. et al., Nucleic Acids Research, **28** : E63, (2000)
- (4) 社内学術資料「肺実質組織混入によるOSNATM法 (RD-200) 測定結果への影響について」
- (5) Tamaki Y. et al., Clinical Cancer Reserch, **15** : 2879 (2009)
- (6) López-Ruiz ME. et al., Gynecologic Oncology, **143** : 54 (2016)
- (7) Shiino S. et al., Virchows Archiv, **474** : 633 (2019)
- (8) Togami S. et al., Gynecologic Oncology, **170** : 70 (2023)
- (9) Osako T. et al., British Journal of Cancer, **109** : 1693 (2013)
- (10) Shimazu K. et al., Medical Oncology, **36** : Article number 54 (2019)
- (11) Yamamoto H. et al., Annals of Surgical Oncology, **18** : 1891 (2011)
- (12) Kumagai K. et al., Gastric Cancer, **17** : 273 (2014)
- (13) Nakagawa K. et al., Lung Cancer, **97** : 1 (2016)
- (14) Ose N. et al., PLoS One, **17** : e0265603 (2022)

【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
神戸市西区室谷1丁目3番地の2 〒651-2241
Tel 0120-413-034

 カタログ番号

 体外診断用の専用製品

 製造販売元

 添付の文書参照

 保存温度

 使用期限

 ロット番号

 内容数(テスト数)

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