

体外診断用医薬品

製造販売承認番号 23000EZ00061000

* この電子添文をよく読んでから使用してください。

JAK2遺伝子変異キット

ipsogen JAK2 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 ^{注1)}	反応系に関する成分
JAK2 MT Quant Standard 1	
JAK2 MT Quant Standard 2	
JAK2 MT Quant Standard 3	
JAK2 MT Quant Standard 4	
JAK2 WT Quant Standard 1	
JAK2 WT Quant Standard 2	
JAK2 WT Quant Standard 3	
JAK2 WT Quant Standard 4	
JAK2 MT Reaction Mix	JAK2 Forward Primer、JAK2 MT Reverse Primer、JAK2 probe、dNTPs ^{注2)} 、MgCl ₂
JAK2 WT Reaction Mix	JAK2 Forward Primer、JAK2 WT Reverse Primer、JAK2 probe、dNTPs ^{注2)} 、MgCl ₂
Taq DNA Polymerase	DNA 合成酵素
TE Buffer for sample dilution	
JAK2 Mutant Control	
JAK2 WT Control	
Water for no template control (Water for NTC)	

注1) 構成試薬名中の MT または WT はそれぞれ JAK2V617F 遺伝子変異、JAK2 野生型遺伝子を意味します。

注2) デオキシアデニン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸の混合液

【使用目的】

血球成分より抽出したゲノム DNA の JAK2V617F 遺伝子変異割合の測定（真性赤血球増加症、本態性血小板血症及び原発性骨髄線維症の診断補助）

【測定原理】

本品は、血球成分から抽出されたゲノム DNA を検体とした、アレル特異的定量 PCR (AS-qPCR) を用いて測定します。本 AS-qPCR では変異塩基に相同な塩基を 3' 末端とし、その 1 塩基又は 2 塩基隣りがミスマッチ配列を有するように設計されたプライマー (JAK2V617F 遺伝子変異測定用として JAK2 Forward Primer と JAK2 MT Reverse Primer) と 5' 末端に蛍光色素及び 3' 末端に消光色素を有する蛍光プローブ (JAK2 Probe)、DNA 合成酵素、dNTPs 及び MgCl₂ により PCR 反応を行います。本 PCR 反応における DNA 伸長の過程で、JAK2 Probe が分解されると、それまで消光されていた蛍光色素が遊離し蛍光が発せられるため、その蛍光量を遺伝

子増幅装置で測定します。同様に JAK2 野生型遺伝子測定用として上記の JAK2 MT Reverse Primer に代えて JAK2 WT Reverse Primer を用いて PCR 反応を行い、蛍光量を測定します。検体中に含まれる DNA 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を用いて、既知濃度のプラスミド溶液により作成された検量線を元に、検体中の JAK2V617F 遺伝子変異及び JAK2 野生型遺伝子のコピー数 (CN) を求め、各々の CN から JAK2V617F 遺伝子変異の割合を算出します。

【操作上の注意】

測定試料の性質、採取法

1. 測定検体は血球成分から抽出されたゲノム DNA です。この他の検体は測定しないでください。
2. DNA 抽出は使用するゲノム DNA 抽出試薬の説明書に記載のある方法で行ってください。抽出された DNA は分光光度計で波長 260 nm の吸光度を測定し濃度を確認してください。1 反応あたり DNA の検体量は 5 µL、濃度は 10 ng/µL 以上必要です。

操作に関する事項

- * 1. 検体または試薬の添加量が不十分の場合は正確な測定結果が得られません。本電子添文の記載どおりの量を添加し測定を行ってください。
- 2. JAK2 MT Reaction Mix、JAK2 WT Reaction Mix は光による影響を受けやすいため、それぞれの試薬と調製した反応液は遺伝子増幅装置での反応を行うまで遮光して保存してください。
- 3. マイクロチューブを遺伝子増幅装置にセットする際に正しい位置であることを確認してください。

妨害物質・妨害薬剤

本品は、抽出されたゲノム DNA を検体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影響はありません。

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」または同等品を使用しなければ正確に測定できません。

【用法・用量（操作方法）】

検体の準備

抽出したゲノム DNA の濃度を TE Buffer for sample dilution で 10 ng/µL に調製します。

試薬の調製方法

以下の各反応液はコントロール類を含めた検体の反応数に 1 反応分足した、「必要反応数+1 反応」の用量をまとめて調製してください。

1. JAK2V617F 遺伝子変異用 qPCR 反応液の準備
1 反応あたり、JAK2 MT Reaction mix 19.8 µL と Taq DNA polymerase 0.2 µL をマイクロチューブに加えて混和し、JAK2V617F 遺伝子変異用反応液とします。
2. JAK2 野生型遺伝子用 qPCR 反応液の準備
1 反応あたり、JAK2 WT Reaction mix 19.8 µL と Taq DNA polymerase 0.2 µL をマイクロチューブに加えて混和し、JAK2 野生型遺伝子用反応液とします。

必要な器具・器材・試料等

- ・マイクロチューブ（遺伝子増幅装置用、qPCR 用）
- ・マイクロチューブキャップ（遺伝子増幅装置用、qPCR 用）
- ・マイクロピペット（0.1~2.5 µL、2~20 µL、20~1000 µL を採取することのできる、各用量に対応したマイクロピペット）
- ・ピペットチップ
- ・ゲノム DNA 抽出試薬
- ・分光光度計
- ・試験管ミキサー
- ・卓上遠心機
- ・遺伝子増幅装置：ロータージェン Q MDx 5plex HRM 等

測定（操作）法

- 1 反応あたり JAK2V617F 遺伝子変異用反応液 20 µL に対し、検体、陰性コントロール（Water for NTC）、陽性コントロール（JAK2 Mutant Control）及び検量線キャリブレーション（JAK2 MT Quant Standard 1~4）の 5 µL をそれぞれ加えて混和してください。
- 2 1 反応あたり JAK2 野生型遺伝子用反応液 20 µL に対し、検体、陰性コントロール（Water for NTC）、陽性コントロール（JAK2 WT Control）及び検量線キャリブレーション（JAK2 WT Quant Standard 1~4）の 5 µL をそれぞれ加えて混和してください。
- 3 検出反応（qPCR）
遺伝子増幅装置に検体を加えた反応液が入ったマイクロチューブをセットした後に、以下の PCR プログラムを実行します。
サイクル 1~45 の各反応において励起波長 470 ± 10 nm、蛍光波長 510 ± 5 nm の蛍光量を測定します。
 ホールド 95 °C で 10 分間
 サイクル 1~45 95 °C で 15 秒間、60 °C で 1 分間
- 4 検量線の作成
遺伝子増幅装置から、検体及び検量線キャリブレーション（JAK2 MT Quant Standard 1~4、JAK2 WT Quant Standard 1~4）、陰性コントロール（Water for NTC）、陽性コントロール（JAK2 Mutant Control）及び JAK2 WT Control の各 Ct 値が出力されます。標的遺伝子（JAK2V617F 遺伝子変異又は JAK2 野生型遺伝子）について、検量線キャリブレーションの表示値（コピー数の常用対数値（Log CN））と検量線キャリブレーションの測定値（Ct 値）から求められる回帰直線を検量線とします。
- 5 CN の算出
作成された検量線の切片及び傾きを用いて、検体及び陰性コントロール、陽性コントロールの Log CN を求め、その値から JAK2V617F 遺伝子変異及び JAK2 野生型遺伝子の CN を換算します。
- 6 JAK2V617F 遺伝子変異割合（%）の算出
検体から換算した JAK2V617F 遺伝子変異の CN と JAK2 野生型遺伝子の CN を以下の式に代入し算出し JAK2V617F 遺伝子変異割合を算出します。

$$\text{JAK2V617F 遺伝子変異割合} = \frac{\text{JAK2V617F 遺伝子変異のコピー数}}{\text{JAK2V617F 遺伝子変異のコピー数} + \text{JAK2 野生型遺伝子のコピー数}} \times 100 (\%)$$

【測定結果の判定法】

判定法

JAK2V617F 遺伝子変異の有無は骨髄性増殖腫瘍の診断の補助となります。JAK2V617F 遺伝子変異割合 1% を参考基準値とし、1% 超のときに JAK2V617F 変異陽性と考えます^{(1), (2)}。

判定上の注意

検体と検量線キャリブレーション（JAK2 MT Quant Standard 1~4、JAK2 WT Quant Standard 1~4）、陰性コントロール（Water for NTC）、陽性コントロール（JAK2 Mutant Control）及び JAK2 WT Control を同時に測定し、反応が適切に行われていることを確認してください。適切に行われていないと判断される場合は再測定を実施してください。

【臨床的意義】

骨髄増殖性腫瘍（Myeloproliferative Neoplasms: MPN）は、造血幹細胞レベルの細胞が腫瘍化することで血液細胞が著しく増殖することを特徴とする疾患の総称です。MPN は、フィラデルフィア染色体（Ph）の有無で大別され、Ph 陽性の場合は慢性骨髄性白血病（CML）、Ph 陰性の場合は真性赤血球増加症（Polycythemia Vera: 以下、PV）、本態性血小板血症（Essential Thrombocythemia: 以下、ET）及び原発性骨髄線維症（Primary Myelofibrosis: 以下、PMF）等に分類されます。

2005 年、独立した 3 つのグループから、PV、ET 及び PMF の症例において JAK2 遺伝子の 14 番目のエキソン部位で共通の点変異（1849 番目の核酸が G（グアニン）から T（チミン）に置換）が報告されました^{(3), (4), (5)}。JAK2 遺伝子は、血液細胞の増殖や分化において重要な役割を果たす JAK 型チロシンキナーゼ（Janus Kinase）の一種をコードする遺伝子です。報告された遺伝子変異は、JAK2 キナーゼの 617 番目のアミノ酸がバリン（V）からフェニルアラニン（F）に置換されることから JAK2V617F 変異と称され、この変異が入った JAK2 キナーゼはリガンド非依存的に活性化するため細胞の無秩序な増殖を引き起こし、上記した MPN 発症の一因になっていると考えられています。

国際的な診断ガイドラインである WHO 分類では、第 4 版以降で JAK2V617F 変異の有無が PV、ET 及び PMF の診断基準に盛り込まれ、各疾患のファーストスクリーニング検査として位置づけられています⁽⁶⁾。

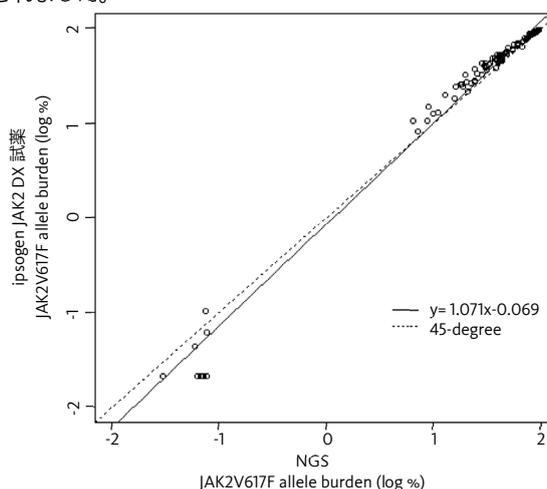
本品は血液成分より抽出されたゲノム DNA 中の JAK2V617F 遺伝子変異割合を測定するものです。現在臨床の現場で提唱されているカットオフ値（JAK2V617F 遺伝子変異割合 1%）以下までを分析するに十分な性能を有する方法として、次世代シーケンサー（以下 NGS）が挙げられています⁽⁷⁾。NGS（Illumina 社 MiSeq）を比較対照法とした臨床性能試験の結果、両者の測定結果に良好な相関関係があることが確認されました。従って、本品による JAK2V617F 遺伝子変異割合の測定は、MPN の診断の補助として有用であると考えられます。

臨床成績

PV、ET 及び PMF と診断された患者及び健常者から採取された末梢血から抽出したゲノム DNA を対象として多施設共同臨床性能試験を実施し、本品による測定結果と比較対照法である NGS の測定結果を比較検討しました。計 232 例の被験者が登録され、このうち 210 例（PV 70 例、ET 74 例、PMF 12 例、健常者 54 例）が有効性解析に用いられました。なお、有効性解析からの除外例は、登録後採血に至らなかった 11 例と採血後に脱落基準に抵触した 11 例（本品の操作不備 4 例を含む）です。

1. 本品と NGS による JAK2V617F 遺伝子変異割合の相関

PV、ET 及び PMF と診断された患者の 156 例について本品及び NGS の測定結果（遺伝子変異割合: allele burden）を比較したところ、相関係数は 0.998 となり以下のような良好な関係が確認されました。



2. 健常者における JAK2V617F 遺伝子変異割合の分布の検討
健常者の 54 例について、本品による JAK2V617F 遺伝子変異割合の記述統計量を算出したところ平均値 0.0004 %、最大値が 0.021 % であり、全例で本品の測定下限値 0.042 % 未満でした。
3. JAK2V617F 遺伝子変異割合 1% をカットオフ値とした際の本品の NGS に対する JAK2V617F 遺伝子変異有無の判定の一致率・感度・特異度
PV、ET 及び PMF と診断された患者及び健常者の 210 例について、海外報告等を参考として JAK2V617F 遺伝子変異割合 1% をカットオフ値とした際の本品の NGS に対する JAK2V617F 遺伝子変異有無の判定の一致率・感度・特異度を評価しました。その結果、本品と NGS による判定が一致した症例は 210 例であり、一致率は 1.000 (95 % CI: 0.983-1.000) でした。また、感度及び特異度はともに 1.000 (95 % CI: 0.966-1.000 及び 0.964-1.000) でした。

N = 210		NGS	
		陽性	陰性
ipsogen JAK2 DX 試薬	陽性	108	0
	陰性	0	102

【性能】

性能

1. 感度
- (1) JAK2 野生型遺伝子の測定
- ** 1) 5×10^4 copies/5 μ L の JAK2 野生型遺伝子含有プラスミド溶液を測定するとき、その Ct 値は 30 以下を示します。
- 2) 5×10^1 、 5×10^2 、 5×10^3 及び 5×10^4 copies/5 μ L の JAK2 野生型遺伝子含有プラスミド溶液をそれぞれ測定するとき、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 ~ -3.07 を示します。
- (2) JAK2V617F 遺伝子変異の測定
- ** 1) 5×10^4 copies/5 μ L の JAK2 変異型遺伝子含有プラスミド溶液を測定するとき、その Ct 値は 30 以下を示します。
- 2) 5×10^1 、 5×10^2 、 5×10^3 及び 5×10^4 copies/5 μ L の JAK2V617F 変異型遺伝子含有プラスミド溶液をそれぞれ測定するとき、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 ~ -3.07 を示します。
2. 正確性
- (1) 高濃度管理検体を測定するとき、その JAK2V617F 遺伝子変異割合は既知の JAK2V617F 遺伝子変異割合の 1/2 ~ 2 倍の値を示します。
- (2) 中濃度管理検体を測定するとき、その JAK2V617F 遺伝子変異割合は既知の JAK2V617F 遺伝子変異割合の 1/2.5 ~ 2.5 倍の値を示します。
- ** (3) 低濃度管理検体を測定するとき、その JAK2V617F 遺伝子変異割合は 0.042 % 以上かつ 1% 以下の値を示します。
3. 同時再現性
- ** (1) 高濃度管理検体を 4 回同時に測定するとき、その JAK2V617F 遺伝子変異割合の変動係数は 20 % 以下です。
- ** (2) 中濃度管理検体を 4 回同時に測定するとき、その JAK2V617F 遺伝子変異割合の変動係数は 40 % 以下です。
- ** (3) 低濃度管理検体を 4 回同時に測定するとき、その JAK2V617F 遺伝子変異割合の変動係数は 40 % 以下です。
- 注) 各管理検体は次の値を示すゲノム DNA 溶液です。
高濃度管理検体： JAK2V617F 遺伝子変異割合として 30 % 以上高値
中濃度管理検体： JAK2V617F 遺伝子変異割合として 1 % 以上高値かつ 30 % 未満
低濃度管理検体： JAK2V617F 遺伝子変異割合として 1 % 未満

4. 測定範囲 (例示)

JAK2V617F 遺伝子変異割合として 0.042 % から 100 %
測定機器：ロータージェン Q MDx 5plex HRM

較正用基準物質に関する情報

社内標準品

【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. スクレアーフリーの実験器具 (例えばピペット、ピペットチップ) を使用してください。
3. 使用する遺伝子増幅装置に適した消耗品を使用してください。
4. 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、コンタミネーションに注意して測定を行ってください。
5. 使用期限切れのキットは使用しないでください。
6. 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整・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。
7. 各構成試薬は開封状態で放置しないでください。
8. 構成試薬は光への曝露は最小限にとどめてください。
9. 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ない、開栓時に液が飛散しないように注意してください。
10. 異なる製造番号の構成試薬を注ぎ足したり、混合して使用することはやめてください。
11. JAK2 野生型遺伝子と JAK2V617F 遺伝子変異は同時に同一装置内で測定してください。
12. 使用する器具、器材等については、定期的に点検・校正されたものを使用してください。
13. 誤って検体をこぼした場合は、保護具を着用し検体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、チューブ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、各施設の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、各施設の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】

1. 貯蔵方法
-30 °C ~ -15 °C に保存
2. 有効期間
24 カ月 (使用期限は、外箱に表示しています。)

【包装単位】

24 テスト用

【主要文献】

- (1) Martinaud C, et al., Am J Hematol. 2010;85(4):287-8.
- (2) Tefferi A, et al., J Mol Diagn. 2011;13(5):461-6.
- (3) Kralovics R, et al., N Engl J Med. 2005;352(17):1779-90.
- (4) James C, et al., Nature. 2005;434(7037):1144-8.
- (5) Levine RL, et al., Cancer Cell. 2005;7(4):387-97.
- (6) Tefferi A, et al., Leukemia. 2008;22(1):14-22.
- (7) Flaherty P, et al., Nucleic Acids Res. 2012;40 (1):e2

*【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 1-3-2 〒651-2241
Tel 0120-413-034



カタログ番号



ロット番号



添付の文書参照



テスト数



使用期限

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