

FLT3 遺伝子変異検出キット

リューコストラット CDx FLT3 変異検査[®]

**【全般的な注意】

- 本製品はギルテリチニブ フマル酸塩の適応又はギザルチニブ塩酸塩の適応を判定する補助に用います。疾患診断や治療効果確認を目的とした使用については有用性を確認していただくため、当該薬剤の投与前の検査以外の目的では使用しないでください。
- 本製品はギルテリチニブ フマル酸塩の適応又はギザルチニブ塩酸塩の適応の判定に用いる場合には、当該薬剤の本邦における最新の電子添文を参照の上、使用する必要がまいります。
- 本製品は体外診断用であり、目的以外での使用はしないでください。
- 診断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判断してください。
- 電子添文に記載された使用目的と方法に従って使用してください。本来の目的以外での使用は、結果の信頼性を保証しかねます。
- 本製品試薬及び検体は、感染の危険性があるものとして十分に注意して取扱ってください。
- 本書と本製品の取扱説明書、測定にあたり使用する機器の電子添文及び取扱説明書をよく読んで、各手順に従って使用してください。
- 解析は、必ずリューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアを使用してください。
- 本製品は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)及び分子生物学の専門技術者のみが使用してください。

**【形状・構造等(キットの構成)】

構成試薬名	容量 本数	成分
FLT3 ¹ 抽出コントロール	1800 µL × 1 本	FLT3 変異陰性の DNA
FLT3 ¹ ITD ² マスターミックス	1500 µL × 1 本	ITD 領域に対する蛍光標識した 順行プライマーと逆行プライマー を各 0.18 µM/mL 含有
FLT3 ¹ TKD ³ マスターミックス	1500 µL × 1 本	TKD 領域に対する蛍光標識した 順行プライマーと無標識の逆行 プライマーを各 0.18 µM/mL 含有
FLT3 ¹ ITD ² ポジティブコントロール	100 µL × 1 本	ITD 変異陽性の DNA 等
FLT3 ¹ TKD ³ ポジティブコントロール	100 µL × 1 本	TKD 変異陽性の DNA 等
FLT3 ¹ NTC	200 µL × 1 本	PCR 鑄型となる DNA を含ま ない滅菌水
Taq DNA ポリメラーゼ	200 µL × 1 本	Taq DNA polymerase
EcoRV 酵素	200 µL × 1 本	EcoRV
NE 緩衝液 r3.1	1250 µL × 1 本	NE 緩衝液

注 1 FLT3: 細胞膜貫通蛋白 fms 関連のチロシンキナーゼ 3 遺伝子

注 2 ITD: 細胞膜近接領域の FLT3 配列内遺伝子変異

注 3 TKD: チロシンキナーゼ領域の FLT3 配列遺伝子変異

【使用目的】

骨髓穿刺液又は末梢血に含まれる単核細胞より抽出した DNA 中の FLT3 遺伝子の ITD 領域及び TKD 領域における遺伝子変異の検出(ギルテリチニブフマル酸塩及びギザルチニブ塩酸塩の急性骨髄性白血病への適応を判定するための補助に用いる)

【測定原理】

1) FLT3 遺伝子の ITD 変異

長さ変異とも呼ばれる FLT3 の ITD 変異は、FLT3 遺伝子の膜近傍(JM) 領域の内部および周辺領域を含む、FLT3 遺伝子の一部分の重複と挿入によって起こります。このような変異は、挿入された DNA の重複配列の位置および長さによって多様です。ITD 変異は、FLT3 の恒常的な自己リン酸化および活性化をもたらします。本製品では FLT3 遺伝子の細胞膜近傍領域に対応するプライマーを使用する。それぞれ異なる物質で蛍光標識した順行プライマーと逆行プライマーを使用して PCR 法を行い、キャピラリー電気泳動法にて各増幅産物のフラグメントサイズのシグナルを測定する。この検査では、野生型 FLT3 の対立遺伝子の増幅では 327±1 塩基対(bp) 産物が確認され、ITD 変異を含む対立遺伝子の増幅では 327±1 bp を超える産物が確認される(図 1)。

2) FLT3 遺伝子の TKD 変異

FLT3 TKD 領域変異は D593、D835、I836、Y842 等核酸の置換や欠失によって起こり、高度に保存されている酵素触媒中心のアミノ酸配列の変化に伴う恒常的な自己リン酸化や TK レセプターの活性化によるシグナル経路の活性化が引き起こされる。本製品は、これら変異のうち D835 変異及び I836 変異のみ検出可能である。野生型 FLT3 遺伝子の対立遺伝子には EcoRV の制限消化認識部位が含まれているが、D835 変異又は I836 変異がある場合、EcoRV の制限酵素認識部位が消失するため EcoRV による制限消化ができない。

本製品では FLT3 遺伝子の TKD 領域の両端に対応するプライマーを使用して PCR 法を行い、続いてこの増幅産物を EcoRV で制限消化する。PCR プライマーのうち 1 つは蛍光標識されており、もう 1 つは野生型及び変異型のいずれの対立遺伝子でも EcoRV の制限消化を受けるように認識部位の改変がなされている。キャピラリー電気泳動法にて各増幅・消化産物のフラグメントサイズのシグナルを測定する。この検査では野生型 FLT3 遺伝子の対立遺伝子では 79±1 bp の増幅・消化産物が確認され、TKD 変異の対立遺伝子では増幅・消化産物である 125±1 bp(欠失)又は 127±1 bp(置換)が確認される(図 1)。

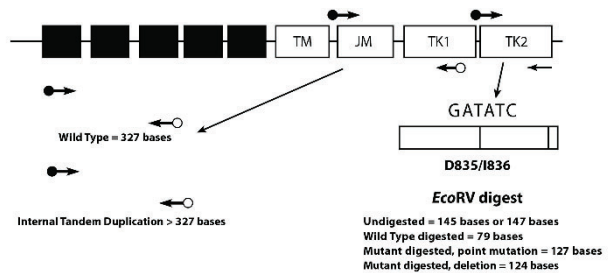


図 1. 測定原理: FLT3 遺伝子の JM 領域(JM)、膜貫通領域(TM)及びチロシンキナーゼ活性領域ループ(TK)を示した。矢印はプライマーの対応位置で、ITD 変異は JM 領域の内部および周辺領域を、TKD 変異は活性ループを標的とする。丸印はプライマーの蛍光標識で、右下箱の TK 領域の縦線は、野生型の EcoRV 制限消化認識部位(GATATC)である。

3) ソフトウェアによる解析

ソフトウェアは検査の妥当性を自動的に評価する。検体と同時に処理された「FLT3 抽出コントロール」、「FLT3 ITD ポジティブコントロール」、「FLT3 TKD ポジティブコントロール」及び「FLT3 NTC」が有効であるかを判定することで、それぞれのコントロールに関連付けられた試料の結果を判定する。有効ではない場合、その詳細に応じた再検査開始点から繰り返す。

ソフトウェアは変異型:野生型シグナル比(SR)を計算し、臨床的カットオフ SR 値 0.05 を自動的に評価する。複数の変異を有する ITD 変異は、全ての変異シグナルを合算する。

ITD 変異の挿入は 3～323 bp のサイズが検出されるが、妥当性が確認されている挿入サイズは 30～279 bp である。323 bp を超える ITD 挿入は、ITD 変異として報告されない。本試験の感度レベルまで達していない *FLT3* 変異は、検出されない場合がある。

【操作上の注意】

1) 測定試料の性質・採取方法

- 本検査にはヘパリンナトリウム又は EDTA で抗凝固処理した単核細胞を含む骨髓穿刺液 0.25～0.75 mL、又は末梢血 1～3 mL が必要です。
- 検体採取は、使用する機器等の電子添文を確認し、指定された方法で実施してください。本検査に用いる検体は 2～8℃で7日間まで保管が可能で、検体輸送の場合も同条件での保管・管理が必要です。以下の検体は不適格となります。
 - 検体採取から7日を超える日数が経過した検体
 - ヘパリンナトリウム又は EDTA 以外の抗凝固剤を用いて採取された検体
 - 検体試験管の異常、凍結状態異常等確認された検体

2) 妨害物質

PCR に干渉する物質として以下が知られています。

- 二価陽イオンキレート剤
- 低残留型ピペットチップ
- エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 但し低濃度での干渉は顕著ではありません。
- 外因性妨害物質では以下添加量まで検査に影響が無いことを確認しました。
 - 0.8 mg/mL ヘパリンナトリウム塩 水溶液
 - 10% v/v DNA 抽出後の洗浄緩衝液
- 内因性妨害物質では以下添加量まで検査に影響が無いことを確認しました。
 - 60 mg/mL ヒト血清由来アルブミン
 - 2 mg/mL ヘモグロビン
 - 0.19 mg/mL ビリルビン
 - 5% v/v 血清脂質
- 薬剤では以下添加量まで検査に影響が無いことを確認しました。
 - 24 µg/mL シトシン β-D-アラビノフラノシド
 - 180 ng/mL ダウノルビン塩酸塩

3) その他

- PCR を行う検査場は、各作業毎に分離した場所で、検体の調製開始、続いて増幅、最後に検出の順とし、常に一方向とします。増幅した DNA は検体調製の開始場所に持ち込まないでください。
- ピペット、ピペットチップ等特定の作業場所で使用する機器は、その特定のエリアでのみ使用し、他のエリアには持ち込みません。
- RNase や DNase の混入又はクロスコンタミネーションを避けるため、常に滅菌された使い捨てのプラスチック製品を使用します。

【用法・用量（操作方法）】

1) 試薬の調製方法

- 構成試薬は使用前に室温 (15～30℃) にて解凍し、そのまま使用してください。
- 冷凍保管後に開封した構成試薬の各マスターミックスは最大 4 回の凍結解凍を行えます。
- 凍結保管後に開封した構成試薬の各コントロールは最大 8 回の凍結解凍を行えます。
- Taq DNA ポリメラーゼ及び EcoRV 酵素を-30～-15℃の保管庫から出す時間は最小限にしてください。

2) 抽出した DNA 試料

- 未希釈の DNA 試料は、-30～-15℃で最長 1 年間保管することができます。凍結融解を最大 5 回繰り返すことができます。
- 未希釈の DNA 試料又は 10 ng/µL に希釈した DNA 試料は、2～8℃で最長 7 日間保管できます。

3) その他必要な器具、機材、試薬等

- その他必要な器具、機材、試薬等を表 1 及び表 2 に示します。詳細は取扱説明書を参照してください。
- 以下の器具及び付属品等は、本製品には付属していません。
- 機器は製造者の指示に従って適切に保守点検してください。

**表 1: 必要な試薬及び材料

機器／試料／材料	必要な試薬及び機器／サプライヤ
ABI キヤピラ電気泳動装置 ソフトウェア Hi-Di ホルムアミド Liz サイズスタンダード ポリマー 緩衝液 キャピラレイ コンデショニング試薬 セブタ リテーナー&ベースセット スペクトラル校正 Dye Set	Thermo Fisher Scientific 社: ABI3500 ジェネティックアナライザー 3500L Dx ABI 3500 Data Collection ソフトウェア v3.0 Gene Mapper® ソフトウェア v4.1 Hi-Di™ ホルムアルデヒド GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0 POP-7™ ポリマー 陽極緩衝液コンテナ 陰極緩衝液コンテナ 3500L Dx ジェネティックアナライザ用 24-キャピラレイ 50 cm セブタ陽極緩衝液コンテナ セブタ陰極緩衝液コンテナ セブタ 96 well 用 96 Well Standard Retainer & Base Set DS-33 Matrix Standard Kit (Dye Set G5)
目盛り付きビベット	0.5～1000 µL の容量を正確に計測できる Sartorius 社: eLINE® シングルチャンネル 5～120 µL eLINE® 8 チャンネル、0.2～10 µL 又は同等のもの Gilson 社: P-2N、P-10N、P-20N、P100N、P-200N、 P-1000N 又は同等のもの
サーマルサイクラー	Thermo Fisher Scientific 社: VRTi™ Dx 96-Well サーマルサイクラー
ボルテックスミキサー	
PCR プレート又はチューブ	滅菌
フィルター・リアルタイムチップ	滅菌、リボヌクレアーゼ/デオキシリボヌクレアーゼ/発熱物質を含まない
微量遠心機	
96-well アルミホイルシート	
96-well 8 キャップ ストリップ	
蒸留脱イオン分子生物学グレードの水又は米国薬局方グレードの水	滅菌されており、DNase 及び RNase を含んでいない
DNA 抽出 抽出装置 抽出試薬キット ボトル及びボトルラック ローターアダプター・ホルダー	QIAGEN 社: QIAcube System (230 V) QIAamp® DNA Blood Mini Kit Reagent Bottles, 30 mL (6) Reagent Bottle Rack Rotor Adapters (10 x 24) Rotor Adapter Holder
MNC 分離	密度勾配媒体 (密度 1.077 g/ml)
緩衝生理食塩溶液 (DPBS)	Mediatech 社 (Corning 社): ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水
増殖培地	Mediatech 社 (Corning 社): L グルタミン含有 RPMI 1640
細胞収納容器	
微量 UV 分光光度計	核酸濃度算出のために 260nm の光吸度を測定できるもの
エタノール	エタノールは 200 proof、完全無水の米国化学会 (ACS) / USP グレードのものであること
リユーコストラット CDx <i>FLT3</i> ソフトウェア	OS: Microsoft® Windows™ 10 もしくは Windows™ 11 Pro プロセッサ: Intel® Core™ 2 Duo 以上を推奨 RAM: 4 GB 以上 ディスク空き容量: 5 GB 以上 CD-ROM ドライブ

表 2: 一般的な実験用材料等

ユニカルチューブ- 15 mL、50 mL
血清用ピペット- 5 mL、10 mL、25 mL
リントフリーワイプ
校正済みタイマー
Steris Coverage Spray TB 等の QIAcube 消毒剤
氷及びアイスバケット
液体廃棄物用容器
DNA 希釈及び分注用に適切な容量の 96 ウell プレート
DPBS、PCR、消化用マスターミックス溶液用に適切な容量の試験管
QIAcube 用試料の試験管
QIAcube 用試料の試験管のスクリーキャップ
使い捨てトランスファーピペット
ピペットチップ
電気泳動用プレート 96-Well Skirted Plate

4) 測定操作手順

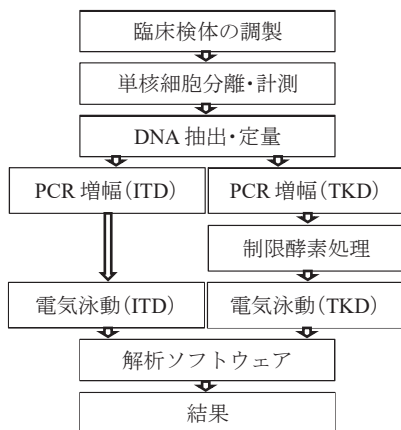


図2 操作方法概略

詳細は本製品の取扱説明書を参照してください。

(1) 試料の処理調製

- ① 1検体につきLグルタミン含有RPMI-1640培地 14 mL以上を50 mL コニカルチューブに分注し、室温 (15~30℃) で105分以上放置します。
- ② 1検体につき密度勾配媒体 (密度 1.077g/ml) 3 mLを、15 mL コニカルチューブに分注し、室温 (15~30℃) で1時間放置します。
- ③ 1検体につき 200 μ L の DPBS を、適量のチューブに分注し、室温 (15~30℃) で45分以上放置します。

(2) 臨床検体希釈

検体チューブを転倒混和し、15 mL のコニカルチューブに、等分した検体 (骨髄穿刺液 0.25~0.75 mL 又は末梢血 1~3 mL) 及びLグルタミン含有RPMI-1640培地を加え、総量を6 mLにします。キャップを締め静かに転倒混和するか、ピペッティングします。

(3) 単核細胞 (MNC) の分離

- ① 希釈した臨床検体を密度勾配媒体 (密度 1.077g/ml) の上に静かに重層し、以下の条件で遠心分離します。

遠心力	時間	温度	加速/減速
400×g (rcf)	30 分	20℃	最小

- ② 遠心分離後、トランスファーピペットを用い MNC 層を3 mLを超えない量で吸引します。
- ③ 新たにLグルタミン含有RPMI-1640培地 6 mLを加えた15 mLのコニカルチューブへMNC層液を分注します。キャップをして、3~5回静かに転倒混和し、以下の条件で遠心分離します。

遠心力	時間	温度	加速/減速
355-364×g (rcf)	10 分	20℃	最大

- ④ コニカルチューブよりデキャントで上清を除去し、その後タッピングして細胞ペレットを再懸濁します。
- ⑤ Lグルタミン含有RPMI-1640培地 1 mLを添加し、キャップをして、タッピングで静かに混合します。これをMNC数の計測終了まで氷水中にて保管します。

(4) MNC数の計測

- ① 試料中の細胞数が 5×10^6 cells/mL 以下の場合、細胞懸濁液の全量を調製します。
 5×10^6 cells/mLを超える場合は、方程式で算出し、追加するLグルタミン含有RPMI-1640培地量 (VfVi)を求めます。

$$V_i = \frac{(5,000,000 \text{ cells/mL}) \times 1 \text{ mL}}{C_i}$$

方程式 $C_i V_i = C_f V_f$

C_i = MNC数から得た細胞濃度 (cells/mL)

C_f = 最終濃度 (5×10^6 cells/mL)

V_f = 最終容量 (1 mL)

- ② 試験管をタッピングして試料を静かに混合し、1.0 mLを15 mLのコニカルチューブに移し、以下の条件で遠心分離します。

遠心力	時間	温度	加速/減速
355-364×g (rcf)	10 分	20℃	最大

- ③ トランスファーピペットで上清を吸引後、DPBS 200 μ Lを添加し、タッピングして細胞を再懸濁させます。キャップをして氷水浴の中に保管します。

(5) DNA抽出

- 試料の細胞懸濁液と同時に、構成試薬の抽出コントロール (EC) のチューブを処理します。
- ① EC用チューブを、最大速度で5~15秒間ボルテックスします。蓋に液体が付着している場合は、チューブを2~5秒間遠心し、そのECの200 μ Lを試料用チューブに分注します。
- ② 試料はピペッティングして細胞を再懸濁し、全量を試料用チューブに分注します。
- 推奨機器 QIAcube を使用する場合は、本製品の取扱説明書に従った手順で以下の条件でDNA抽出を進めます。

プロトコール	開始材料	溶出量
QIAamp® DNA Blood Mini	血液又は体液	100 μ L

- 推奨機器以外を使用する場合は、必ず QIAamp® DNA Blood Mini Kit を使用した上で、その機器の取扱説明書に従った手順でDNA抽出を進めてください。

(6) DNAの定量及び希釈

- ① 対照としてAE緩衝液を用い、各DNA試料2 μ Lを測定します。DNA試料の濃度が9.4 ng/ μ L以下の場合、新たなDNA試料2 μ Lを使用して、さらに2回定量を行います。3回実施した測定の平均を、最終的なDNA濃度とします。

注: 定量値が9.4 ng/ μ L以下の場合、そのDNA試料を使用してFLT3変異試験を行うことはできません。試料を再処理し、適切なDNAを作製してください。

- ② 定量値が10.5 ng/ μ L以上のDNA試料は、ノンバインディングサーフェイスのチューブを使用してAE緩衝液で10 ng/ μ Lに希釈してください。方程式を使用して、表3から最終容量 (Vf)を選択し、Viを求めてください。

$$V_i = \frac{V_f \times 10 \text{ ng}/\mu\text{L}}{C_i}$$

方程式 $C_i V_i = C_f V_f$

C_i = 微量UV分光光度計のDNA濃度

C_f = 最終的なDNA濃度 (10 ng/ μ L)

V_i = 希釈が必要な、未希釈のDNA量

V_f = 希釈したDNAの最終容量 (表3参照)

$V_f - V_i = V_i$ に加えるAE緩衝液の量

表3: 定量値による最終的な容量の決定

微量UV分光光度計のDNA濃度 (C_i)	最終容量 (V_f)
$C_i \leq 9.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$	試験不可
$9.5 \leq C_i \leq 10.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$	そのまま試験を実施
$10.5 \leq C_i \leq 50.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$	35 μ L
$50.5 \leq C_i \leq 200.4 \text{ ng}/\mu\text{L}$	100 μ L
$C_i \geq 200.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$	180 μ L

(7) 増幅

注: ITD又はTKDの増幅に関する本項の手順は、すべて同じ日に完了しなければなりません。

注: マスターミックスの光曝露は最小限に抑えることを推奨します。

注: 全ての試料は、DNA抽出を同時に行った関連するECと共に、同じプレート上で増幅を行います。

- ① ITD用マスターミックス及びTKD用マスターミックスを準備し室温 (15~30℃) にて解凍します。各コントロールを準備し、室温 (15~30℃) にて解凍します。96ウェルプレートに、ITD用PCR又はTKD用PCRの区別及び識別子を記載したラベルを貼付します。
- ② 各試験試料のウェルの位置を特定できるように各PCRプレートのレイアウトを記録します。
- ③ 各マスターミックス、各コントロール、及びDNA試料は全てキャップし、最大速度で5~15秒間ボルテックスで混合します。
- ④ Taq DNAポリメラーゼを準備します。ボルテックスは禁止です。
- ⑤ 蓋に付着した液体を除去する目的で、微量遠心器で全ての試薬・試料を2~5秒間遠心します。
- ⑥ 検査予定のプレートウェル総数 (計算上の最小値を2とします) に3を足した総数に、各マスターミックスには45 μ L、Taq DNAポリメラーゼには0.2 μ Lを積算して試薬液量を算出し、各々をチューブへ分注し

ます。キャップし、最大速度で 5～15 秒間ボルテックスで混合します。
可能であれば、微量遠心器を使用します。

- ⑦ Taq DNA ポリメラーゼは-30℃～-15℃の保存に戻します。
- ⑧ 各マスターミックス及び Taq DNA ポリメラーゼの混合液 45 μ L を PCR プレートレイアウトに従い適切なウェルに分注します。更に DNA 試料 10 ng/ μ L 及びコントロール 5 μ L を PCR レイアウトに従って適切なウェルに分注します。
- ⑨ PCR プレートのカラムをウェルストリップでシールします。ウェルプレートを 1400×g で 1 分間遠心します。
- ⑩ PCR プレートを PCR 増幅サーマルサイクラーにセットします。プログラムが表 4 に記載されている手順であることを確認し、反応量 50 μ L 及びカバー温度 105.0℃の設定、及び実行前にカバーが予熱されることを確認して増幅を実行します。
- ⑪ 増幅完了後、PCR プレートは 2～8℃で最長 72 時間保管することができます。保管しない場合、TKD プレートは制限消化の工程へ、ITD プレートはキャピラリー電気泳動検出の工程へ進みます。

表 4:PCR 増幅サーマルサイクラーのプログラム (温度変化率 75%)

	FLT3 ITD CDx プログラム	FLT3 TKD CDx プログラム
1	95℃で11分間	94.5℃で11分間
2	94℃で30秒間	93.5℃で30秒間
3	57℃で60秒間	56.5℃で60秒間
4	72℃で2分間	71.5℃で2分間
5	手順2～4を24回繰り返す	手順2～4を28回繰り返す
6	94℃で30秒間	93.5℃で30秒間
7	60℃で45分間	59.5℃で45分間
8	4℃で保存	4℃で保存

(8) 制限酵素処理 (TKD 変異のみ)

注: 本項の手順はすべて同じ日に完了しなければなりません。

注: 制限酵素消化を行うのは TKD 増幅産物のみです。

- ① NE 緩衝液を準備し室温 (15～30℃) にて解凍します。96 ウェルプレートに、識別子を記載したラベルを貼付します。
- ② NE 緩衝液を分注したチューブはキャップし、最大速度で 5～15 秒間ボルテックスで混合します。
- ③ EcoRV 酵素を準備します。ボルテックスは禁止です。
- ④ 蓋に付着した液体を除去する目的で、微量遠心器で全ての試薬・試料を 2～5 秒間遠心します。
- ⑤ 検査予定のプレートウェル総数 (計算上の最小値を 4 とします) に 6 を足した総数に、NE 緩衝液には 1.1 μ L、EcoRV 酵素には 0.5 μ L を積算して試薬液量を算出し、各々をチューブへ分注し、ピペッティングで混合します。
- ⑥ 混合液 1.5 μ L を TKD の PCR プレートレイアウトに従い適切なウェルに分注します。
- ⑦ TKD の PCR プレートを準備し、1400×g で 1 分間遠心します。
- ⑧ TKD の PCR プレートから試料 8.5 μ L を消化プレートの適切なウェルに添加します。消化プレートのカラムをキャップストリップでシールします。消化プレートを 1400×g で 1 分間遠心します。
- ⑨ 消化プレートを PCR 増幅サーマルサイクラーにセットします。プログラムが下記の手順であることを確認し、反応量 10 μ L 及びカバー温度 105.0℃の設定、及び実行前にカバーが予熱されることを確認して制限消化を実行します (温度変化率 75%)。

手順 1	手順 2	手順 3
37℃で 1 時間	65℃で 10 分間	4℃で保存

- ⑩ 制限消化工程完了後、消化プレートは光曝露量を最小限にした状態で、2～8℃で最長 72 時間保管することができます。保管しない場合は、キャピラリー電気泳動検出の工程に進みます。

(9) キャピラリー電気泳動の準備

注: Liz® dye Size Standard のチューブを 2～8℃の保管庫から出しておく時間は最小限にします。

注: ABI 3500xL Dx キャピラリー電気泳動装置は、96 ウェルプレート上で 3 段×8 列から成る 24 本キャピラリー (インジェクションと呼びます) をセットとして検出を行います。各キャピラリーは 1 つのウェルに対応します。インジェクションは個別にプログラムできますが、一部を行うことはできません。

- ① ITD 検査および TKD 検査は、それぞれ異なる条件で個別のインジェクションとして実施しなければならない。この条件を表 5 に列挙します。

- ② 必要に応じて Liz サイズスタンダード溶液を作成します。

59 μ L の Liz サイズスタンダードを 1 mL の Hi-Di ホルムアミドへ添加し、最大速度で 5～15 秒間ボルテックスで混合し、微量遠心器を 2～5 秒間使用します。未使用の混合液は 2～8℃で 7 日間保管できます。

表 5: ABI 3500xL Dx キャピラリー電気泳動装置ジェネティックアナライザの条件

パラメータ	ITD CDx 検査条件	TKD CDx 検査条件
Injection Time	12 sec.	7 sec.
Injection Voltage	1.2 kVolts	1.0 kVolts
Capillary Length	50 cm	
Polymer	POP-7	
Dye Set	G5	
Oven Temp	60℃	
Run Time	1630 sec.	
Run Voltage	19.5 kVolts	
PreRun Time	180 sec.	
PreRun Voltage	15 kVolts	
Data Delay	1 sec.	

- ③ ITD の PCR プレート及び TKD の消化プレートを 1400×g で 1 分間遠心します。
- ④ キャピラリー電気泳動プレート (CE プレート) の試料を含むウェルに Liz サイズスタンダード溶液を 9.5 μ L ずつ添加します。試料を含まないウェルには同量の Liz サイズスタンダード溶液を又は Hi-Di™ ホルムアミドを添加します。
- ⑤ 電動マルチチャンネルピペットを使用して、ITD-PCR ウェル又は TKD 消化ウェルから、その 0.5 μ L を対応する CE プレートのウェルに移します。
- ⑥ ホイルシールで CE プレートをシールし、プレートを 1400×g で 1 分間遠心します。
- ⑦ CE プレートをサーマルサイクラーにセットします。プログラムが下記の手順であることを確認し、反応量 10 μ L 及びカバー温度 105.0℃の設定、及び実行前にカバーが予熱されることを確認して実行します (温度変化率 75%)。

手順 1	手順 2
95℃で 3 分間	4℃で 5 分間

- ⑧ 完了後、プレートウェルに気泡がないことを目視で確認し、気泡があった場合は 1400×g で 1 分間遠心します。
- ⑨ この CE プレートを ABI 3500xL Dx キャピラリー電気泳動装置のプレートベースに置き、ホイルシールを除去し、新しいウェルプレートセパタをプレート上に置き、プレートリテーナーを装着します。

* (10) リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアのプレートマッパー

- ① 適切なコンピューターへ、リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアの CD から "LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi" をコピーし、指示に従ってインストールします。
- ② プレートマッパーの設定画面において、必須項目の "Plate Name"、"Results Group" 及び "File Name Convention" について、必ず ABI 3500xL Dx キャピラリー電気泳動装置の対応するユーザープログラムエントリーと一致した情報を入力します。
- ③ 1 プレートあたり 4 アッセイ (1 アッセイにつき 3 カラム) が可能です。各アッセイは、インジェクションに対処し、1 回当たり ITD 又は TKD のどちらかを行うことができます。画面上ドロップダウンメニューよりアッセイとして ITD 又は TKD を選択します。
- ④ プレートマップ内ウェルに、解析するサンプル又はコントロールの情報を入力します。設定が正しい場合、保存後のウェルは緑色表示ですが、不足・間違いの場合は赤色表示となります。
- ⑤ 分析が必要なウェルがすべて緑色表示になるまで入力します。全て入力・保存し、プレート全体を保存すると、ABI ファイルと LIVS ファイルの保存場所の入力を求められます。
- ⑥ リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアで生成された ABI ファイルを ABI キャピラリー電気泳動装置にアップロードします。詳細は、本製品の取扱説明書の推奨事項に従ってください。

(11) キャピラリー電気泳動

- ① ABI 3500xL Dx キャピラリー電気泳動装置及びそのソフトウェアの据え付け、操作、校正、清掃およびメンテナンスは、以下で特に断りのない限り、製造元の指示に従って実行してください。

- ② ダッシュボード画面より ABI ファイルをインポートします。インポートが完了すると、サンプル ID が画面に表示されます。
- ③ CE プレート電気泳動装置にセットし、ジェネティックアナライザを起動します。
- ④ POP-7 チューブの気泡を確認し必要に応じて除去します。
- ⑤ 電気泳動の実行を開始します。
- ⑥ 実行が完了したら、GeneMapper®ソフトウェア v4.1 でデータを解析します。解析方法の詳細は取扱説明書の「GeneMapper ソフトウェアによるデータ解析」を参照してください。

(12) 解析

- ① リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアを開き、LIVS ファイルに移動します。
- ② 「結果データファイル選択」にて電気泳動の結果として出力された CSV ファイルを選択します。「結果の保存先フォルダ」、実行、サンプル、又は制御に関する追加のコメントを入力する「レポートコメント」を確定します。
- ③ 上記 3 つの確定で分析可能となり、PDF 形式で実行レポートとサンプルレポート、CSV 形式で実行エクスポートファイルがレポートとして「結果の保存先フォルダ」に生成されます。

【測定結果の判定方法】

1) 評価方法

- (1) リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアは検査のバリデーションを含め自動的に結果を評価します。
 - ① 検査のバリデーションについては、検査状況が不合格の場合、同時に検査した全ての結果が無効になります。無効の詳細に応じてそれぞれの異なる再検査開始点から繰返さなければなりません(取扱説明書の再検査を参照)。
 - ② 抽出コントロールが有効でない場合、その抽出コントロールに関連付けられた全ての試料の結果が無効と表示されます。
 - ③ 試料が有効ではない場合、その無効の詳細に応じてそれぞれの異なる再検査開始点から繰返さなければなりません(取扱説明書の再検査を参照)。
- (2) 本製品は変異型:野生型シグナル比(SR)を計算して小数点以下 2 桁まで表示し、臨床的カットオフ SR 値 0.05 を自動的に評価します。複数の変異を有する ITD 変異は全ての変異シグナルを合計して計算します。更に野生型シグナルが未検出の場合には便宜上 SR 値は 100 と表示されます。
- (3) 検体の変異状態は、表 6 に記載のルールによって定義されます。

表 6: 検体の変異状態の決定

	ITD ソフトウェア判定	ITD SR 値	TKD ソフトウェア判定	TKD SR 値	最終 判定
1	陽性	0.05 以上	陽性	0.05 以上	陽性
2	陰性	0.05 未満	陰性	0.05 未満	陰性
3	無効	—	無効	—	無効
4	陽性	0.05 以上	陰性	0.05 未満	陽性
5	陰性	0.05 未満	陽性	0.05 以上	陽性
6	陽性	0.05 以上	無効	—	陽性
7	陰性	0.05 未満	無効	—	無効
8	無効	—	陽性	0.05 以上	陽性
9	無効	—	陰性	0.05 未満	無効

- (4) ギルテリチニブフマル酸塩の適応を判定するための補助
 - ① ITD 又は TKD のどちらか一方の SR 値が臨床カットオフ以上である場合、結果は陽性と報告され、ギルテリチニブフマル酸塩の適応が判断できます。
 - ② ITD 及び TKD の SR 値がいずれも臨床カットオフ未満である場合、結果は陰性と報告され、ギルテリチニブフマル酸塩は適応できないと判断できます。
- (5) キザルチニブ塩酸塩の適応を判定するための補助
 - ① ITD の SR 値が臨床カットオフ以上である場合、結果は ITD 陽性と報告され、キザルチニブ塩酸塩の適応が判断できます。
 - ② ITD の SR 値が臨床カットオフ未満である場合、結果は ITD 陰性と報告され、キザルチニブ塩酸塩は適応できないと判断できます。

- ③ ITD の結果が無効である場合、結果は ITD 無効と報告され、キザルチニブ塩酸塩の適応の判断はできません。

2) 判定上の注意事項

(1) 再試験

- ① 各ポジティブコントロール(PC)、NTCのいずれか又はその両方がバリデーション基準を満たさない場合、検査は無効です。同時に検査した全ての試料は、PC、抽出コントロール(EC)及びNTCを含む検査を繰り返します。
- ② 検査が有効な場合の EC の不成功については、その EC が関与する全て(ITD 検査又は TKD 検査に関連する試料、PC 及び NTC)を再検査します。
- ③ 検査が有効な場合における試料の不成功については、適切な ITD 検査又は TKD 検査のための試料、PC、EC 及び NTC を再検査します。再検査の試料には EC を含めてください。
- ④ 単一の試料又はコントロールで複数の不成功が発生した場合、検査手順の最初に最も近い工程から再検査を実行します。
- ⑤ 同じコントロール又は試料において、同じ不合格が発生した場合、次の再検査開始点に進んでください。すべての再検査指示の対応完了後、同じ不合格が再度発生した場合は、そのコントロール又は試料の結果は無効です。
- ⑥ 再試験の結果が初期結果と異なる不合格である場合は、その再試験の不合格の解決工程に従ってください。

注:「不成功」とは検体又は各コントロールの結果が検査として不成立であった場合を言う。

注:1つのコントロール又は試料は、4回までの再テストが可能です。

- ⑦ 不合格は個別の試料で評価されます。同一の検査内の個々の試料で異なる不合格内容が特定された場合、それぞれ適した再検査を実行します。
- (2) 本検査に供する検体のバリデーションは、骨髓穿刺液及び末梢血の使用のみ確認されているため、指定された検体で検査を行ってください。信頼性の高い結果を得るために、適切な試料の保管、処理が必要のため、必ず本書及び取扱説明書に従ってください。
- (3) 本製品は、QIAamp® DNA Blood Mini Kitを使用したゲノム DNA 抽出に対してのみバリデーションが確認されています。
- (4) 本検査では、ITD 変異の挿入は 3~323 bp のサイズが検出されますが、バリデーションが確認されている挿入サイズは 30~279 bp です。
 - ① ITD 挿入サイズ 3~30 bp は、ITD 変異と報告されます。
 - ② ITD 挿入サイズ 279~323 bp は、ITD 変異と報告されます。
 - ③ 323 bp を超える ITD 挿入は、ITD 変異として報告されません。
- (5) 本試験において、対立遺伝子比が以下の基準を満たしていない FLT3 変異は、検出されない場合があります。
 - ① ITD 挿入サイズ 30~126 bp (境界値を含む)の範囲では、対立遺伝子比 0.08 で本検査の結果は陽性となります。
 - ② ITD 挿入サイズ 129~279 bp (境界値を含む)の範囲では、対立遺伝子比 1.00 で本検査の結果は陽性となります。
 - ③ EcoRV の消化認識部位である TKD 変異では、対立遺伝子比 0.18 で本検査の結果は陽性となります。
- (6) 変異の検出は、試料中の変異配列のコピー数に依存し、試料の完全性、DNA の単離量及び干渉物質の存在に影響を受ける可能性があります。PCR 法を基本とした本検査は、EDTA 等による DNA 分解や PCR 抑制による干渉を受けることがあります。
- (7) 本試験は定性試験です。ITD 又は TKD 変異の定量には使用できません。また、本試験を使用して試料の対立遺伝子比を算出、測定又は判定することはできません。

【臨床的意義】

染色体 13q12.2 に位置する細胞膜貫通蛋白 FMS に関連するチロシンキナーゼ 3 (FLT3) は、FLT3 リガンドが結合すると細胞の成長を促進し、アポトーシスを抑制する。FLT3 遺伝子の変異は成人の急性骨髄性白血病 (AML) 患者の約 30% で観察される¹⁾。ITD 変異は FLT3 機能亢進に関与する。また ITD 変異は AML の予後不良因子であると考えられている。TKD 変異は、FLT3 の酵素活性中心を変化させ、恒常的な自己リン酸化や FLT3 の活性化を引き起こす²⁻⁵⁾。

本製品は骨髓穿刺液又は末梢血に含まれる単核細胞より抽出した DNA 中の FLT3 遺伝子の ITD 変異及び TKD 変異を PCR 法とキャピラリー電気泳動を組み合わせで判定するキットである。

1) ギルテリチニブフマル酸塩のコンパニオン診断薬

本製品は、ギルテリチニブフマル酸塩のコンパニオン診断薬として臨床試験を実施している。

ASP2215(ギルテリチニブフマル酸塩)の第Ⅲ相試験(2215-CL-0301 試験)は、AMLの一次治療に対して難治性、又は再発がみられた FLT3 変異陽性を示す AML 患者における ASP2215 の安全性と有効性を救援化学療法に対して比較する、非盲検、多施設共同無作為化第Ⅲ相試験である。おおよそ 330 例の被験者が、2:1 の比率で、ASP2215 療法又は救援化学療法へと無作為化された。中間解析として、「一次治療に対して難治性、又は再発がみられた FLT3 変異陽性を示す AML の被験者における完全寛解及び造血系の回復を伴う完全寛解(CR/CRh)の比率を評価する」を主要目的として解析を行った。

2215-CL-0301 試験に登録された 594 検体中 211 例で FLT3 変異判定が陽性となり、無作為化対象となった。無作為化対象例のうち、対照群へ割付けられた 69 例は今回の解析の対象外とし、ASP2215 群に割付けられた奏効解析対象集団(RAS)の 142 例について解析した。なお、RAS に含まれる中央検査以外の FLT3 変異判定で組入れた 4 例は、全て本製品の FLT3 変異判定にて陰性を報告している。以下に 2215-CL-0301 試験の RAS 集団での中間解析結果を示す。CR/CRh 率の 95%CI の下限は、主要評価項目として指定した 12%の閾値を超えていた。

表 7:ASP2215 の評価結果

解析集団	パラメータ	n/N(%, 95% CI)
奏効解析対象	CR/CRh 率	40/142 (28.2%, 20.9% - 36.3%)
	CR 率	27/142 (19.0%, 12.9% - 26.4%)
	CRh 率	13/142 (9.2%, 5.0% - 15.1%)
奏効解析対象及び FLT3 変異陽性 ^注	CR/CRh 率	38/138 (27.5%, 20.3% - 35.8%)
	CR 率	25/138 (18.1%, 12.1% - 25.6%)
	CRh 率	13/138 (9.4%, 5.1% - 15.6%)

注:中央検査以外の FLT3 変異判定で組入れた 4 例は、全て CDx としての FLT3 変異判定は陰性であった。

被験者の奏効期間の中央値は、CR/CRh 提示群で 148 日間(事象=16; 中止=42)、CR 提示群で 421 日間(事象=9; 中止=27)、CRh 提示群で 122 日間(事象=7; 中止=13)であった。

検出された FLT3 変異別に層別解析を試みた。FLT3-ITD 変異のみ陽性例は全体 142 例との比較は可能だと考えるが、それ以外の集団は、これらのサブグループの例数が少ないため、比較検討は慎重を要する。しかしながら、RAS 集団における CR/CRh 率においては、これら 4 つの層別集団間に大きな違いは観察されなかった。また、FLT3 変異陰性例と比較して FLT3 変異陽性例の安全性評価を比較したところ、大きな違いはないが、層別集団の例数が少なかったため十分な結論に至らなかった。

検出された FLT3 変異で層別した CR/CRh 率の概要を表 8 に示す。この結果により「ギルテリチニブフマル酸塩の AML への適応を判定するための補助に用いる」と結論した。

表 8:ASP2215 の FLT3 変異別の層別評価結果

層別項目	ASP2215 の評価結果		
	CR/CRh	nN(%)	95%CI
奏効解析対象集団全例	40/142	28.2%	20.9% ~ 36.3%
ITD のみ陽性	33/121	27.3%	19.6% ~ 36.1%
TKD のみ陽性	2/12	16.7%	2.1% ~ 48.4%
ITD 及び TKD 両方の陽性	3/5	60.0%	14.7% ~ 94.7%
不明/欠落/陰性	2/4	50.0%	6.8% ~ 93.2%

最終解析では、633 被験者から 771 検体がリ्यूコストラット CDx FLT3 変異検査を使ってスクリーニングされました。371 被験者が最終の ITT 解析に含まれていました。リ्यूコストラット CDx FLT3 変異判定で陰性を示した 5 被験者で、現地の FLT3 検査によって登録された被験者は FAS から除外されました。したがって、無作為化された 366 被験者が、FAS の最終解析に使用されました。最終解析では、ギルテリチニブフマル酸塩投与群における全生存期間の中央値は、CDx FLT3 変異判定で陽性を示した対照群で救援化学療法群(5.6 か月)に対し、全生存期間がより長い(9.3 か月)ことが示されました。層別 Cox 回帰によるハザード比は、0.637 (95%信頼区間 0.488、0.830)と推定され、救援化学療法と比べてギルテリチニブフマル酸塩群の死亡の相対リスクが減少しました (p 値:片側、層別ログランク検定=0.0004)。

2) キザルチニブ塩酸塩のコンパニオン診断薬

本製品の検査 (CDx) は、キザルチニブ塩酸塩の有効性と安全性を評価した AC220-007 試験において、被験者の FLT3 ITD 変異を判断する方法として使用された Navigate Biopharma Services, Inc. の FLT3-ITD Mutation Assay (Navigate CTA) との比較試験を実施し、両検査法の同等性を証明している(5. 臨床性能試験参照)。この同等性を踏まえ、AC220-007 試験の結果について、被験者の FLT3 ITD 変異が CDx 陽性の集団(351 例)を解析対象としたキザルチニブ塩酸塩の有効性の再解析を実施した。キザルチニブ塩酸塩治療群は、救援化学療法群と比較して全生存期間(OS)において統計学的有意な臨床的改善を認めた。OS の中央値は、救援化学療法群では 20.0 週であったが、キザルチニブ塩酸塩群は 26.9 週と 6.9 週間延長した(p= 0.0187 片側、層別あり Log Rank 検定)。Cox 回帰によって推定されたハザード比は 0.757 (95%信頼区間 0.580, 0.956; p= 0.0196 片側、層別あり)と推定され、これは救援化学療法群と比較してキザルチニブ塩酸塩群に有利な 24.3%の死亡の相対的リスク減少に相当する。

《特徴》

1. AML 患者における FLT3 遺伝子の ITD 変異及び TKD 変異を PCR とキャピラリー電気泳動を使用して高感度かつ迅速に判定できます。
2. ギルテリチニブフマル酸塩使用にあたっては、本試験で FLT3 遺伝子の ITD 変異、TKD 変異の少なくともひとつを確認する必要があります。
3. キザルチニブ塩酸塩使用にあたっては、本試験で FLT3 遺伝子の ITD 変異を確認する必要があります。

【性能】

【用法・用量 (操作方法)】欄に従って操作し、下記の各試験を行うとき、次の規格に適合しました。結果は、骨髓及び末梢血について別々に分析され、比較可能であることが実証されました。

1) 感度試験

- (1) 解析感度-ブランク上限(LoB)
本製品で野生型 DNA のみを含むブランク試料(換言すれば変異体ブランク)を検査した場合、ITD の SR 値は 0.00、TKD の SR 値は 0.00-0.01 であった。これら変異体ブランクは、臨床的カットオフ SR 値 0.05 を下回っていた。
- (2) 解析感度
本検査の検出限界(LoD)を 2 つの方法で評価した。
第一の評価は、白血球を枯渇させた全血へ細胞株を混合した人為的検体を使用した。細胞株は、3 種の ITD 変異である 30bp 挿入、126bp 挿入、及び 279 bp 挿入を準備し、TKD 変異である D835 変異を含む細胞株を含め準備した。抽出した DNA を 5ng/μL、10ng/μL および 15ng/μL に希釈し、各細胞株について複数の変異型/野生型の対立遺伝子比 (AR) で検査した。
第二の評価では、臨床検体より得られた細胞株の LoD を確認した。適切な細胞株標準曲線の適切な線形範囲内の標的信号比を得るために、陽性 5 検体を陰性検体で線形範囲内の 5 つのレベル(低陰性、高陰性、カットオフ、低陽性、中等度陽性)に希釈した。本製品で検査し、平均 SR 値を求めた。各検体は 1 つの装置セットを使用する単独の測定者により 4 回の非連続日(1 日 5 回)、各希釈レベルにつき 20 回試験した。各臨床 LoD 検体希釈試料の AR は、細胞株標準曲線から推定された AR を用いて計算した。
臨床 LoD 検体より得られた AR は、以下の合格基準と一致した:
① LoB を有意に超える AR 値及び SR 値の試料は、FLT3 陽性を検出できる。
② 臨床的カットオフ付近の AR 値は、SR 換算で 0.04-0.06 である。
③ 臨床的カットオフを有意に超える AR 値及び SR 値の試料は、FLT3 陽性が検出される。
- (3) 本製品は、以下の変異型について臨床的カットオフを越えて AR を検出することができる。結果を表 9 に要約する。

表 9:測定感度 AR 及び%突然変異体(%Mut)

変異	変異区分	カットオフ以上 95% SR≥ 0.05		
		AR	SR	%Mut
ITD 24bp	Small ITD Insert < 30bp	0.107	0.05	9.7
ITD 66bp	Medium ITD 30-100bp	0.189	0.08	15.9
ITD 217bp	Large ITD ~200bp	0.539	0.08	35.0
TKD D835	TKD D835 Substitution	0.089	0.05	8.2
TKD I836	TKD I836 Deletion	0.144	0.07	12.6

2) 同時再現性試験

(1) 併行精度

挿入サイズ 21 bp～126 bp の ITD 及び TKD 突然変異検体を 3 人の独立した測定者が各々 10 回反復検査して決定した。10 回の反復検査は、製品 2 バッチで合計 5 回、別の機会に検査した。

① ITD 変異の測定者 3 人の SR 値の変動係数範囲は、7.4%～15.0%、3.7%～13.0%、および 4.2%～8.8%であった。

② TKD 変異の測定者 3 人の SR 値の変動係数範囲は、6.3%～11.2%、5.8%～9.3%、および 5.5%～8.3%であった。

(2) 細胞株検体による測定者間同時再現性試験

検体は、挿入長 21 bp、30 bp、及び 126 bp を含む ITD 変異、及び D835 の TKD 変異を含む細胞株で構成し、SR 値は低(カットオフ近傍)、中、及び高(100%変異株)と調整した。3 人の測定者は単一試薬ロット・単一機器にて 15 回の反復検査を 10 回繰り返した。

① 測定者間 SR 値の変動係数範囲は 6.6%～13.3%であった。

② 挿入長 30bp までの ITD 変異の SR 値の変動係数範囲は、6.6%～9.4%であった。

③ 挿入長 126bp の ITD 変異の SR 値の変動係数範囲は、9.0%～13.3%であった。

④ TKD 変異の SR 値の変動係数範囲は、7.9%～9.3%であった。

(3) 臨床検体による測定者間同時再現性試験

この評価は、DNA 試料として変異陽性試料は臨床 7 検体(骨髄 2 及び末梢血 5)由来で、ITD 挿入長は 21 bp、24 bp、66 bp、90 bp 及び 217 bp、TKD は D835 置換、TKD I836 欠失のものを、及び変異陰性試料は *FLT3* 変異陰性の臨床 8 検体(骨髄 4 及び末梢血 4)を用いた。*FLT3* 陽性試料を臨床的カットオフに近い 3 種の目標 SR 値レベル(高い陰性、低い陽性および中等度の陽性)へ希釈するために、プールした *FLT3* 陰性検体の DNA を使用した。3 種の目標 SR 値レベルに調整された臨床 *FLT3* 陽性の 7 検体、プールされた陰性試料 1 検体の複製物は、単一の試薬ロットで 3 種の異なる測定者と器具のセットで 3 回の反復検査を 5 日の連続しない日に検査を実施した。各測定者は、各希釈レベル当たり合計 15 回の反復試験を行い、1 回の希釈レベルにつき合計 45 回反復した。

① 全ての変異タイプおよび希釈レベルを合計した変動係数は、ITD 挿入長(217 bp)検体を除いた全体で 4.2%～16.1%であり、ITD 挿入長 217 bp では、26.9%～27.2%であった。

② 挿入長 217 bp を超える ITD 変異の変動係数は 25%を超えており、基準外であった。

③ 結果は、D835 および I836 の両方の TKD 変異及び挿入長 217 bp までの ITD 変異で合格基準が満たされた。

(4) ロット間及び使用機器間の同時再現性試験

単一評価者が試薬 3 ロットを 3 セットの機器で使用して同じセットの検体を検査した。検体の細胞株は、挿入長範囲 21 bp～126 bp を含む ITD 変異検体及び TKD 変異検体から構成されていた。

① ITD 変異の SR 値の変動係数範囲は 3.0%～8.4%であった。

② TKD 変異の SR 値の変動係数範囲は 5.4%～10.6%であった。

(5) EDTA 採血管の検証

この試験の目的は、EDTA 採血管を検証することでした。この試験では、21bp、126bp、及び 279bp の挿入を含む ITD 細胞腫と、D835 TKD 変異細胞株を添加した、ヘパリンナトリウム又は EDTA を使用して採取した末梢血を考案した検体として使用しました。検体は、高度陰性、低度陽性(カットオフ近傍)、及び中程度陽性変異体:野生型 SR 値を示していました。末梢血のみの検体は真の陰性検体として使用しました。低度陽性検体及び中程度陽性検体では、EDTA 及びヘパリンナトリウムの両方において陽性判定は 100%の複製を示しました。高度陰性及び真の陰性の検体では、EDTA 及びヘパリンナトリウムの両方において陰性判定は 100%の複製を示しました。以上の結果より、許容基準を満たしていました。EDTA 及びヘパリンナトリウムにおける SR 値の%CV は、それぞれ 6.7%～17.8%及び 7.5%～16.3%の範囲でありました。総合的な全体の SR 値の%CV は、8%～24.6%の範囲であり、試験の許容基準を満たしていました。全ての検証の許容基準が満たされたため、EDTA 採血管はリユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査において使用するための検証が確認されました。

3) その他 妨害物質・妨害薬剤等

(1) 干渉物質-外因性

本製品は、DNA 分離プロセス中に使用されるヘパリンナトリウム及び洗浄緩衝液の存在下で挿入長 18 bp～114 bp の ITD 変異および TKD 変異を検出できる。

(2) 干渉物質-内因性

本製品は、脂質/トリグリセリド、ヘモグロビン、タンパク質、及びビリルビンの存在下で、挿入長 18 bp～114 bp の ITD 変異および TKD 変異を検出できる。

(3) 干渉物質-治療薬

本製品は、シタラビンとダウノルビシンの存在下で、挿入長 18 bp～114 bp の ITD 変異および TKD 変異を検出できる。

(4) キャリーオーバー及びクロスコンタミネーション

典型的なチェックボードプレートマップセットアップを介した要求では、本製品ではいずれも問題にならないと示された。

① キャリーオーバー/クロスコンタミネーション検出できなかった。

② ITD 及び TKD の NTC の不合格率は検出できなかった。

(5) DNA 添加

DNA の 10±3 ng/μL を添加した試料での検査の同等性証明をおこなった。以下に列挙する DNA 試料を 7、10 および 13 ng/μL に希釈し、陰性コントロールの単回複製物と共に検査した。

- AR 0.03 30 bp ITD (各 DNA 添加レベルで 33 回複製物)
- AR 0.05 D835 TKD (33 回複製物)
- AR 0.05 126 bp ITD (22 回複製物)
- AR 1 279 bp ITD (11 回複製物)

DNA 添加検体の平均 SR の差は 0.022 を超えず、平均の差も有意ではなかった。本検査は DNA 添加でも一貫した結果を示した。

4) 臨床性能試験 (ギルテリチニブ フマル酸塩)

再発又は難治性の *FLT3* 陽性 AML 患者を対象とした ASP2215 (ギルテリチニブ フマル酸塩)の第Ⅲ相臨床試験に登録された 594 例を超える症例中 485 例が今回の解析対象であった。骨髄穿刺液及び末梢血を検体として、臨床的カットオフを SR 値 0.05 とした本検査(CDx法)の結果を参照して症例が組入れられた。正確性を評価するために、イルミナ社の MiSeq 次世代シーケンシングプラットフォーム(MiSeq シーケンシング法)を利用して、ITD 変異及び TKD 変異の配列を検計した。

(1) 解析対象集団

被験者 1 人につき 1 検体を選択し、不十分な量の試料は除外とした。対象とした 467 検体について検査を実施した。

(2) 陽性一致率及び陰性一致率

表 10: 臨床試験における MiSeq シーケンシング法との一致率

評価	解析対象	
	一致率(数)	95% CI ⁽¹⁾
陽性一致率	100.0% (300/300)	98.8% - 100.0%
陰性一致率	92.0% (150/163)	86.7% - 95.7%
判定一致率	97.4% (450/463)	95.2% - 98.2%

1) 95% 両側 (Clopper-Pearson) 信頼区間

表 11: ITD 変異と TKD 変異における MiSeq シーケンシング法との一致

CDx 法	ITD 変異			TKD 変異		
	MiSeq 法			MiSeq 法		
	陽性	陰性	合計	陽性	陰性	合計
陽性	270	14	284	32	3	35
陰性	0	180	180	0	431	431
合計	270	194	464	32	434	466

(3) 本検査と MiSeq シーケンシング法との判定一致を確立した。

なおギルテリチニブの第Ⅲ相臨床試験のエンドポイントについては、本検査の結果に起因する解析除外 4 例の存在にもかかわらず、予め設定した合格基準を満たしていた。

5) 臨床性能試験 (キザルチニブ塩酸塩)

再発又は難治性の *FLT3* ITD 変異陽性の AML 患者を対象としたキザルチニブ塩酸塩の AC220-007 試験で *FLT3* ITD 変異判定に使用されていた Navigate CTA 法と本製品 (CDx) の比較試験を実施した。AC220-007 試験に登録された 535 例の中で、十分な残余検体量と抽出された DNA 量があり、有効な Navigate CTA の結果を有する 531 検体 (CTA 陽性判定: 431 検体、CTA 陰性判定: 99 検体、CTA の判定を利用できない 1 検体) を対象とした。両試験方法で有効な判定を得た 520 検体で解析した。

陽性一致率及び陰性一致率判定一致率を表 12 に示す。予め設定した許容基準である 95% 信頼区間の下限値 (PPA 及び OPA では 90%以上、NPA では 80%以上) を満たす結果が得られ、AC220-007 試験に登録された *FLT3* ITD 変異陽性の再発・難治 AML 患者と同じ集団を検出することが証明された。

表 13 に判定結果一致に関する分割表を示す。それぞれの判定結果が一致しなかった 10 検体は、いずれも Navigate CTA は陽性判定だが、本品 CDx 法の ITD 変異において臨床カットオフ付近の SR 値を示す陰

性判定であった。いずれも両方法で少なくとも 1 つは同じ ITD 挿入長の変異を検出しており、本試験では単核細胞分離工程の無い検体を利用したことが、本品 CDx 法の臨床カットオフ付近での判定に影響を及ぼしたと考える。

表 12: AC220-007 試験の検体における Navigate CTA 法との一致率

評価	解析対象	
	一致率(数)	95% CI ¹⁾
陽性一致率	97.6% (412/ 422)	95.7% - 98.9%
陰性一致率	100% (98/ 98)	96.3% - 100%
判定一致率	98.1% (510/520)	96.5% - 99.1%

1) 95% 両側 (Clopper-Pearson) 信頼区間

表 13: ITD 変異における Navigate CTA 法との一致

Navigate CTA 法	CDx 法 ITD 変異		
	陽性	陰性	合計
CTA 陽性	412	10	422
CTA 陰性	0	98	98
合計	412	108	520

【使用上又は取扱い上の注意】

1) 取扱い上 (危険防止) の注意

- 検体及び本製品を取扱う際は、適切な個人保護具(グローブ、実験着、保護眼鏡等)を着用し、試薬が皮膚、目及び粘膜等に触れないように注意する。口によるピペッティングは行わない。
- 試薬が誤って目や口に入った場合には水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けること。
- 検体は検査室の安全性基準や標準的感染予防策に従って扱い、認可を受けた安全に生物学的な封じ込めができる施設で取り扱い、開封は認証された生物学的安全なキャビネット内で開封すること。
- 検体若しくは試薬が飛散又は漏洩等した場合は、鋭利な物が混入していないことを確認し、適切な個人保護具を装着した後にはペーパータオル等で拭き取ります。その後、80%アルコール等を使用して十分に拭き取ります。
- 検体に接触した器具やそれらの残渣及びその容器等も同様に扱うこと。

2) 使用上の注意

- 同梱されたキット試薬は 1 つのシステムとして使用してください。ロット番号が異なるキットの試薬と混合、併用はできません。他社製の試薬では代替できません。希釈や増幅反応液量の減少、その他手順逸脱は試験の性能に影響を与える可能性があり、本試験の結果が補償できません。
- 指示に従って保管、使用する限り、試薬の安定性は使用期限まで保たれます。使用期限を過ぎたキットは使用しないでください。
- 凍結融解を行った回数を記録してください。
- 本試験は高感度の検査法であり、試薬や増幅前混合物に臨床試料、コントロール、増幅後の試料が混入しないように細心の注意を払ってください。すべての試薬を注意深く観察し、汚染・混入が疑われる試薬は廃棄してください。
- 汚染・混入を最小限に抑えるために、試料や試薬を扱うときは汚染されていないグローブをはめ、PCR を行う前に定期的に作業エリアとピペットの清浄化を実施してください。
- オートクレーブでは DNA の汚染・混入を除去できません。
- すべての器具及び機器の保守点検及び較正は、その製造者が推奨する方法で行ってください。

3) 廃棄上の注意

- 廃液、使用済容器や器具等は HBV、HCV、HIV 等の感染性のものが存在する恐れがあるので、オートクレーブ (121℃、20 分) で滅菌処理する、又は亜塩素酸ナトリウム (有効塩素濃度 1.0%以上) に 1 時間以上浸して処理し、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等区別して処理してください。
- 試薬及び器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理して下さい。
- 本製品の容器等は他の目的に転用しないで下さい。

【貯蔵方法・有効期間】

- 貯蔵方法: -30~-15℃に保存
- 有効期間: 12 ヶ月 (使用期限は外箱に記載)

【包装単位】

33 テスト用

【主要文献】

- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. Blood 1999, 93(9):3074-3080.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. Blood, 2001, 97(8):2434-2439.
- Levis M, Small D. FLT3: ITD Does matter in Leukemia. Leukemia, 2003, 17(9):1738-1752.
- Gilliland, D.G. and Griffin, JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood, 2002, 100(5):1532-1542.
- Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, et al. Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Change Reaction and Capillary Electrophoresis Assay. Journal of Molecular Diagnostics, 2003, 5(2):96-102.

【問い合わせ先】

LabPMM 合同会社 カスタマーサポートセンター

〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-13

ダイヤルイン 044-281-1500

ファクシミリ 03-6745-9346

製造元

Invivoscribe, Inc.

10222 Barnes Canyon Road, Building 1, San Diego, California 92121-2711, USA

 **invivoscribe**

製造販売元

LabPMM 合同会社

神奈川県川崎市川崎区殿町 三丁目 25 番地 13 号

LabPMM 合同会社

an invivoscribe company

全ての商標の所有権は、各商標の所有者に帰属します。