

OncoGuide[®] F-P融合遺伝子検出FISHキット

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用医薬品です。それ以外の目的には使用しないでください。
2. この添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用方法および使用目的以外での使用については、検査結果の信頼性を保証しかねます。
3. 本製品は、蛍光in situハイブリダイゼーション法（以下「FISH法」）に関して十分な経験を有する専門家のみが使用することを前提に提供されています。専門家以外の方は使用しないでください。専門家についての指標の概要を別添資料CDの『「FISH法に関して十分な経験を有する専門家」の指標（参考）』にまとめたので、参考にしてください。
4. 本製品のプローブミックスには催奇形性を有するホルムアミドが含まれています。また、対比染色液には発癌性の可能性のあるDAPI（4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール）が含まれています。本キット取扱い時には防着、防御用手袋、防御用眼鏡を着用し、換気フード内で行ってください。
5. 本製品中に含まれる試薬が誤って目や口に入った場合や皮膚に付着した場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
6. 本製品の使用に当たっては、蛍光顕微鏡およびFISH法スライド標本作製用器具等が必要です。蛍光顕微鏡および器具等の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）】

1. プローブミックス

- ・ FIP1L1プローブ
- ・ CHIC2プローブ
- ・ PDGFR α プローブ
- ・ 他の含有物：ホルムアミド、デキストラン硫酸、クエン酸緩衝液

2. 対比染色液

- ・ DAPI（4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール）
- ・ 他の含有物：蛍光染色用封入剤（退色防止剤を含む）

本製品の構成試薬のMSDSについては弊社にお問い合わせください。

【使用目的】

末梢血または骨髓由来細胞におけるFIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子の検出（慢性好酸球性白血病（CEL）または好酸球増多症候群（HES）におけるFIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子の判定の補助）

【測定原理】

FISH法は、ゲノムマッピングの技術であり、細胞スライド標本の染色体上の特定の遺伝子座を直接検出することができます。目的とする遺伝子座と相同の配列を有し蛍光物質で標識したプローブを検査対象のスライド標本の細胞に滴下して熱変性させると、細胞中のDNAおよびプローブが一本鎖となり、この混合物を冷却すると細胞DNAとプロ

ーブがハイブリダイゼーションを起こし（アニーリング）、細胞DNA中の目的とする遺伝子座がプローブの蛍光物質により標識されます。これを蛍光顕微鏡下で観察することにより目的とする遺伝子座を直接検出することができます。慢性好酸球性白血病（CEL）および好酸球増多症候群（HES）の患者に認められるFIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子は、第4番染色体長腕の12（4q12）に位置するCHIC2遺伝子が欠失することによりFIP1L1遺伝子とPDGFR α 遺伝子が融合して形成されます（図1参照）。

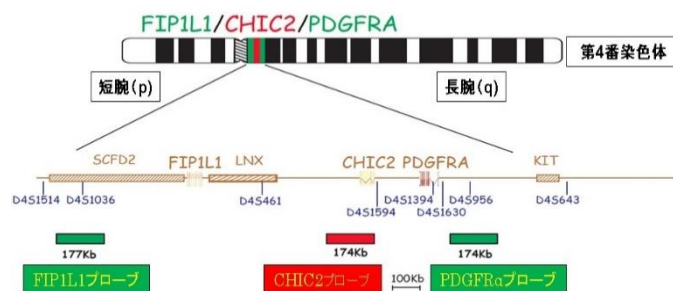


図1 第4番染色体とプローブ

本製品には以下のプローブが含まれています。

- ・ FIP1L1プローブ：FIP1L1遺伝子検出のための緑色*で蛍光標識された177Kbプローブ（図1の177Kb緑色プローブ）
- ・ CHIC2プローブ：CHIC2遺伝子検出のための赤色**で蛍光標識された174Kbプローブ（図1の174Kb赤色プローブ）
- ・ PDGFR α プローブ：PDGFR α 遺伝子検出のための緑色*で蛍光標識された174Kbプローブ（図1の174Kb緑色プローブ）

* 緑色蛍光色素：フルオレセインイソチオシアネート（FITC）

** 赤色蛍光色素：テキサスレッド（Texas red）

これらのプローブを検査対象の細胞に滴下し、プローブおよび細胞核DNAの熱変性による一本鎖化およびアニーリングを行わせると、プローブが相同の細胞DNAとハイブリダイズし、染色体中のFIP1L1遺伝子は緑色に、CHIC2遺伝子は赤色に、また、PDGFR α 遺伝子は緑色にin situで蛍光標識されます。この蛍光シグナルを蛍光顕微鏡下で観察することにより、各遺伝子の状態が評価できます。

正常細胞核（融合遺伝子陰性）の染色体にはFIP1L1、CHIC2およびPDGFR α 遺伝子が存在するため、赤色および緑色蛍光シグナルが検出されますが、蛍光顕微鏡下での目視評価の際は、これらの蛍光シグナルが重なり合った黄色蛍光シグナルとして観察される場合もあります。これを「1F」と表します。従って、正常細胞核の目視評価では、1個の細胞核内に相同染色体に由来する各2個の赤色蛍光シグナルおよび緑色蛍光シグナルあるいは2個の黄色蛍光シグナルが観察されます。これを「2F」と表します。自動解析装置を用いて観察する場合は、赤色および緑色蛍光シグナルは識別されます。一方、FIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子を有する細胞核では、一部の染色体上のCHIC2遺伝子が欠失しているため赤色蛍光シグナルが検出されず、CHIC2遺

伝子が欠失した染色体では緑色蛍光シグナルのみが観察されます。これを「1G」と表します。*FIP1L1-PDGR α* 融合遺伝子陽性細胞核の場合、相同染色体の内の1本は通常、融合遺伝子陰性の正常染色体ですので、融合遺伝子陽性細胞核の目視評価では、1個の細胞核内に融合遺伝子陽性の1G染色体と融合遺伝子陰性の正常1F染色体が観察されます。これを「1G1F」（あるいは「1F1G」）と表します。

本製品を用いてFISH法を実施した際に認められる細胞核の蛍光シグナルパターンを融合遺伝子陰性、陽性に模式化して図2（陰性）、図3（陽性）に示します。

なお、以下の模式図には示していませんが、1Fの蛍光シグナルの場合、黄色蛍光シグナルに重なって緑色蛍光シグナルあるいは赤色蛍光シグナルあるいはその両方の蛍光シグナルが薄く観察される場合もありますが、これらはすべて1Fとなります。

陰性細胞核の判定

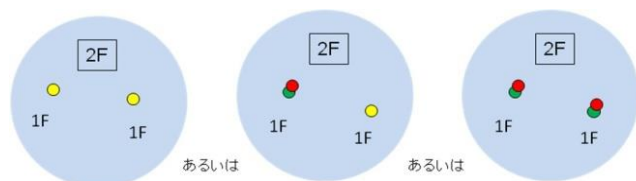


図2 融合遺伝子陰性細胞核の蛍光シグナルパターン

陽性細胞核の判定

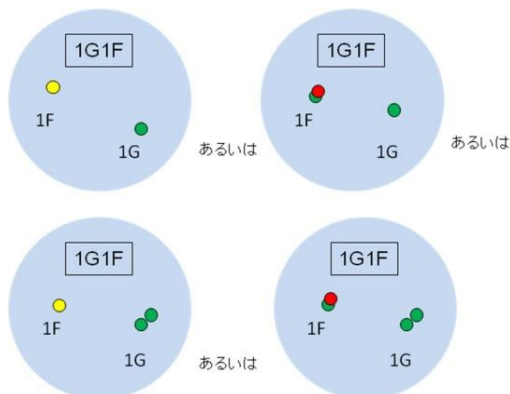


図3 融合遺伝子陽性細胞核の蛍光シグナルパターン

緑色蛍光シグナルのみの2Gの蛍光シグナルパターンを示す場合も可能性として考えられますが、今まで観察経験の詳細な報告はありません。万一このような蛍光シグナルパターンが観察された場合はスライド標本の作製から再検査してください。再検査後も同様の結果が得られた場合は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法等の他の方法での検討を推奨します。

まれにですが、*CHIC2*遺伝子が欠失せずに転座を起こす例¹⁾が知られています。この場合は図4に示すように、1細胞核の中に1Fと1Gの他に1Gから遠く離れた位置に1Rが観察され、1G1F1Rとなります。このような転座の場合も融合遺伝子陽性とされています¹⁾。

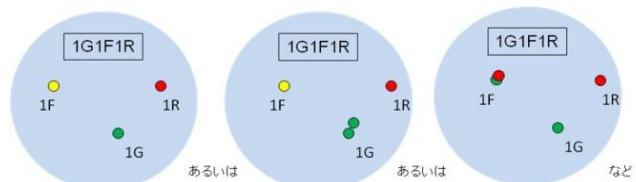


図4 *CHIC2*遺伝子転座の場合の蛍光シグナルパターン（融合遺伝子陽性）

また、*FIP1L1-PDGR α* 融合遺伝子陽性細胞株として樹立されたEoL-1細胞²⁾という細胞株がありますが、本細胞株は三倍体（Trisomy）であり、図5に示すように1本の染色体では1Fが、他の2本の染色体では融合遺伝子（2G）が観察され、2G1Fとなります。まれに認められる三倍体の場合、図5に示すような蛍光シグナルパターンが観察される可能性があります。

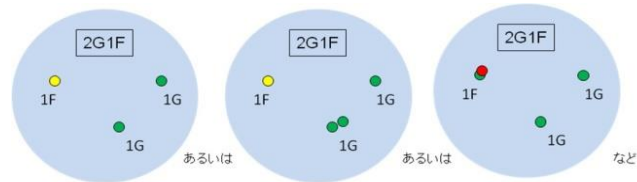


図5 三倍体EoL-1細胞の蛍光シグナルパターン（融合遺伝子陽性）

このような三倍体の場合、1G2Fあるいは3Gの蛍光シグナルパターンを示す可能性が考えられますが、今まで観察経験の詳細な報告はありません。万一このような蛍光シグナルパターンが観察された場合はスライド標本の作製から再検査してください。再検査後も同様の結果が得られた場合は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法等の他の方法での検討を推奨します。三倍体で3Fの蛍光シグナルパターンを示す場合は融合遺伝子陰性と考えられます。

以上の融合遺伝子陰性、陽性、三倍体EoL-1細胞の蛍光顕微鏡画像例を不適切な染色画像例や高バックグラウンドの画像例とともに別添資料CDの「蛍光顕微鏡画像例」に示しますので参照してください。

【操作上の注意】

1. 本製品は、末梢血由来細胞または骨髓細胞あるいはそれらの培養物を対象として*FIP1L1-PDGR α* 融合遺伝子を検出するために最適化されています。他の種類の細胞やホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）検体に対しては使用しないでください。
2. 末梢血はヘパリン採血管あるいはヘパリン処理をした注射器で採取し、骨髓液はヘパリン処理をした注射器で採取してください。
3. 本製品および推奨試薬以外の試薬類は、ハイブリダイゼーションに悪影響を及ぼす可能性がありますので、使用しないでください。
4. 試薬や恒温水槽、恒温器等の温度は、本製品の性能を最大に発揮させるために重要な因子ですので、温度計は校正されたものを用いてください。
5. スライド標本の洗浄に用いる洗浄液の試薬濃度、pH、温度は重要であり、指定の濃度、pH、温度から外れると、プローブの非特異的な結合が起こる、あるいは蛍光が観察できない可能性もあります。
6. 不十分な熱変性により蛍光シグナルが観察できなくなる可能性があります。また、過剰な熱変性によりプローブの非特異的な結合が起こる可能性があります。
7. 蛍光顕微鏡下での観察に当たっては、使用する蛍光顕微鏡の取扱説明書に従って適切な方法で観察してください。蛍光顕微鏡は清潔に保ち、製造業者による定期的な整備・調整を行うことを推奨します。特にランプ光源については製造業者による定期的な調整を行うことを推奨します。
8. 自動解析装置を使用する場合は、その取扱説明書に従ってください。
9. FISHスライド標本の加熱乾燥や長期保管は、蛍光シグナルを減弱させる可能性があるため推奨できません。

10. 本添付文書に指定のない操作については日本染色体遺伝子検査学会「染色体遺伝子検査の品質保証のための指針第2編」(平成26年4月)に従って実施してください。

【用法・用量（操作方法）】

1. 別途必要な機器、器具、試薬等

- ① ホットプレート :80℃まで正確に温度管理ができるもの
- ② 可変容量マイクロピペットおよびチップ (1 μ L-200 μ L)
- ③ 恒温水槽 :72℃において正確に温度管理ができるもの
- ④ 遠心分離用チューブ (0.5 mL)
- ⑤ 蛍光顕微鏡 :100ワット水銀ランプおよび63倍あるいは100倍のプランアポクロマート対物レンズの使用を推奨します。解像度を上げるために油浸オイルを用いても構いません。3種類のプローブおよび対比染色 (DAPI) の蛍光シグナルを同時に観察するには三帯域フィルター・DAPI/FITC/Texas Redが最適です。
- ⑥ コプリンジャー :プラスチック製あるいはガラス製 (染色瓶)
- ⑦ ピンセット
- ⑧ 油浸オイル :無蛍光あるいは低自家蛍光の蛍光顕微鏡用を使用します。
- ⑨ ベンチトップ遠心分離機
- ⑩ スライドガラス
- ⑪ カバーガラス (24×24 mm)
- ⑫ タイマー
- ⑬ 37℃恒温器
- ⑭ 湿潤箱
- ⑮ カルノア固定液
- ⑯ 2×SSC (saline-sodium citrate)
- ⑰ 0.4×SSC (pH7.0)
- ⑱ 2×SSC, 0.05% Tween-20 (pH7.0)
- ⑲ 70%、85%、100%エタノール
- ⑳ 接着剤 (ペーパーボンドなど)

2. 試薬の調製

- ① プローブミックス
-20℃フリーザーより取り出し、室温に戻した後、繰り返しゆっくりとピペット混合し、内容を均一にします。1テストにつき10 μ Lのプローブミックスを取り出し、遠心分離用チューブ (0.5 mL) に分注します。残りのプローブミックスはキャップをして-20℃フリーザーに戻してください。
- ② 対比染色液
-20℃フリーザーより取り出し、室温に戻した後、繰り返しゆっくりとピペット混合し、内容を均一にします。1テストにつき10 μ Lの対比染色液を取り出し、遠心分離用チューブ (0.5 mL) に分注します。残りの対比染色液はキャップをして-20℃フリーザーに戻してください。

3. 操作方法

3-1 試料細胞液の調製

- ① 末梢血細胞液または骨髓細胞液をそのまま、あるいは培養後に低張処理を行い、カルノア液で固定します。通常の検査においては、培養せずにそのまま低張処理とカルノア固定を行うことを推奨します。低張処理とカルノア固定について推奨する方法を別添資料CDの「試料細胞液の調製 推奨方法」に示しますので参照してください。

3-2 スライド標本の作製

- ② 固定した細胞液 (約 3×10^6 細胞/mL) をスライドガラス上に滴下し、乾燥させてスライド標本を調製します。
- ③ スライド標本を2×SSC (saline-sodium citrate) に浸漬させ、室温にて攪拌せずに2分間洗浄します。
- ④ 70%、85%、100%のエタノール系列で順次室温にて各2分間脱水し、乾燥させます。

3-3 熱変性準備

- ⑤ プローブミックスの入った遠心分離用チューブおよびスライド標本を $37\pm 1^\circ\text{C}$ のホットプレート上に5分間静置し、予備加熱します。
- ⑥ 遠心分離用チューブ内のプローブミックス10 μ Lをスライド標本上の試料細胞に滴下し、注意してカバーガラスを被せてください。スライドガラスとカバーガラスの間は接着剤でシールし、接着剤を完全に乾燥させてください。接着剤としては、後から剥がしやすく蛍光がないペーパーボンド、Rubber Solution Glue、Fixogumラバーセメントなどを推奨します。

3-4 熱変性

- ⑦ スライド標本を $75\pm 1^\circ\text{C}$ のホットプレート上で2分間加熱し、試料細胞DNAおよびプローブを同時に熱変性させます。

3-5 ハイブリダイゼーション

- ⑧ スライド標本を遮光した湿潤箱に入れ、 $37\pm 1^\circ\text{C}$ に設定した恒温器に一晩静置してください。

3-6 ハイブリダイゼーション後のスライド標本の洗浄

- ⑨ 接着剤をピンセットで完全に除去するか、次の⑩で使用する洗浄液中で自然落下させることにより、スライドガラスからカバーガラスを注意して外してください。
- ⑩ 恒温水槽中で $72\pm 1^\circ\text{C}$ に保温した0.4×SSC (pH7.0) 入りのコプリンジャー (染色瓶) にスライド標本を浸漬させ、 $72\pm 1^\circ\text{C}$ にて攪拌せずに2分間洗浄します。
- ⑪ スライド標本を水切り後、2×SSC, 0.05% Tween-20 (pH7.0) に浸漬させ、室温にて攪拌せずに30秒間洗浄します。

3-7 封入および対比染色

- ⑫ スライド標本を水切りし、遠心分離用チューブ内の対比染色液 (DAPI/Antifade) 10 μ Lをスライド標本上の試料細胞に滴下した後、カバーガラスを被せて封入します。気泡があれば除去してください。
- ⑬ 対比染色のため暗所に10分間静置します。
上記操作手順にて作製したスライド標本を以下「FISHスライド標本」と呼びます。

3-8 検鏡

- ⑭ FISHスライド標本を蛍光顕微鏡下で観察します。1細胞検体につき最低100細胞核を観察します。観察に当たっては、100ワット水銀ランプおよび60倍から100倍のプランアポクロマート対物レンズの使用を推奨します (接眼レンズは10倍)。解像度を上げるために油浸オイルを用いても構いません。3種類のプローブおよび対比染色 (DAPI) の蛍光シグナルを同時に観察するにはFITC/DAPI/Texas Red Triple Filter (Cytocell Ltd.)、XF467 DAPI/FITC/Texas Red Triple Band Premium Fluorescence Filter Set (Omega Optical, Inc.)、69002-ET -DAPI/FITC/Texas Red (Chroma Technology Corporation) などの三帯域フィルターを推奨します。FISHスライド標本は、暗所、室温以下の保存条件下で作製後1ヶ月まで分析可能です。

【測定結果の判定法】

蛍光顕微鏡下の目視観察では、図2あるいは図3の模式図に示した蛍光シグナルパターンが観察されます。融合遺伝子陰性の正常細胞核では、2本の相同染色体上にはともに1組の緑色蛍光シグナルと赤色蛍光シグナルあるいはそれらが重なり合った1個の黄色蛍光シグナルが観察されます (2F; 図2)。融合遺伝子陽性の細胞核では1個あるいは近接

した2個の緑色蛍光シグナルと1組の緑色蛍光シグナルと赤色蛍光シグナルあるいはそれらが重なり合った1個の黄色蛍光シグナルが観察されます(1G1F;図3)。また、CHIC2遺伝子の転座により観察される1G1F1R(図4)や三倍体で観察される2G1F(図5)も融合遺伝子陽性の細胞核です。なお、以下の判定において、【測定原理】の項で述べたEoL-1細胞²⁾を融合遺伝子陽性対照として参照することは有効です。EoL-1細胞は理化学研究所バイオリソースセンター(Cell No. RCB0641)等より入手することができます。EoL-1細胞は三倍体(Trisomy)であり、2G1Fの蛍光シグナルパターンを示します(図5)。

(1) 事前準備

検査施設ごとに本製品を用いてバリデーション(有効性、感度・特異性の確認)を実施し、また、融合遺伝子陰性検体における1G1F細胞核(あるいは1G1F1R細胞核、2G1F細胞核)のカットオフ値を決定しておきます。方法は以下のとおりです。

[本製品のバリデーション方法とカットオフ値の決定方法]

①有効性の確認

最低5個の正常な分裂期中期細胞核を観察し、プローブが標的ゲノム(4q12)のみとハイブリダイズし、他のいかなる領域ともハイブリダイズしないことを確認します。(別添資料CD「蛍光顕微鏡画像例」→「融合遺伝子陰性画像例」の分裂期中期核の画像例を標的ゲノム(4q12)の位置の判断の補助として参照してください。)

②感度・特異性の確認

正常な最低5検体の分裂期中期細胞核を各20個(計100個)観察し、蛍光シグナルが正しい標的ゲノム(4q12)の位置にあることを確認します(感度)。また、蛍光シグナルが正しい位置だけにあり、異常な位置にはないことを確認します(特異性)。

③カットオフ値の決定

正常な最低10検体を用いて、各検体につき最低100個の間期細胞核を分析します。合計最低1,000個の間期細胞核のうちの1G1F(あるいは1G1F1R、2G1F)を示す細胞核の割合(%)を求め、この値を正常カットオフ値とします。

(2) 判定方法

1検体につき最低100個の間期細胞核を観察し、1G1F細胞核数(あるいは1G1F1R細胞核数、2G1F細胞核数)、2F細胞核数およびその他の細胞核数を計数します。融合遺伝子陽性細胞核である1G1F細胞核(あるいは1G1F1R細胞核、2G1F細胞核)の数の観察した全細胞核数に対する割合(%)を求め、本割合(%)があらかじめ決定された正常カットオフ値より大きい場合は融合遺伝子「陽性」、正常カットオフ値以下である場合は融合遺伝子「陰性」と判定します。判定に当たっては、FISH法に関して十分な経験を有する判定者2名により評価を行ってください。二倍体で緑色蛍光シグナルのみの2Gや三倍体で1G2Fあるいは3Gの蛍光シグナルパターンを示した場合はスライド標本の作製から再検査してください。再検査後も同様の結果が得られた場合は逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法等の他の方法での検討を推奨します。三倍体で3Fの蛍光シグナルパターンを示す場合は融合遺伝子陰性と考えられます。

注1) 本製品を実際の検査に使用する前に、事前準備として必ず本製品を用いてバリデーションを実施し、正常カットオフ値を決定してください。

注2) 検査者、判定者の熟練度や陰性検体のデータの蓄積等により正常カットオフ値が変化する可能性も考えられますので、十分な精度管理と教育訓練を行うと

ともに正常カットオフ値の定期的な見直しを行うことを推奨します。

注3) 融合遺伝子陽性細胞核の割合が決定された正常カットオフ値付近となり判定が難しいと判断した場合は、さらに最低100個の間期細胞核を観察し、最初の結果と併せて判定してください。

注4) 検査結果を検査依頼者に報告する際には、測定結果の他に検査実施施設における正常カットオフ値についても報告してください。また、代表的な画像を添付して報告してください。

[参考情報]

- (1) 文献においては、融合遺伝子陽性検体の陽性細胞核(1G1F細胞核に相当)割合の最低値は58.0%³⁾、42.0%⁴⁾、41.5%⁵⁾、44%⁶⁾、10%⁷⁾、40%⁸⁾、8%⁹⁾と報告されています。また、陽性細胞核割合の正常カットオフ値として2.5%¹⁾、4.5%³⁾、3.0~4.5%⁴⁾、1~5%⁶⁾、5%あるいは2%⁹⁾の値が報告されています。
- (2) 本製品を用いた臨床性能試験においては、融合遺伝子陽性検体の陽性細胞核(1G1F細胞核)割合の最低値は40%であり、陽性細胞核(1G1F細胞核)割合の正常カットオフ値は0.0%でした。
- (3) 日本の検査施設2施設で実施した融合遺伝子陰性の正常検体に対する本製品を用いた性能試験において、陽性細胞核(1G1F細胞核)割合の正常カットオフ値は1施設では0.0%、他のもう1施設では0.1~0.2%でした。

【臨床的意義】

本邦においてはFIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子陽性の慢性好酸球性白血病(CEL)および好酸球増多症候群(HES)*に対する薬物療法ではチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブメシル酸塩(販売名:グリベック錠100mg[ノバルティスファーマ株式会社])が「染色体検査または遺伝子検査によりFIP1L1-PDGFR α 陽性であることが確認された患者に使用する」という「効能・効果に関連する使用上の注意」の条件下に承認されています。従って、イマチニブメシル酸塩による治療においてはFIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子の検査が求められています。本製品は、FIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子を検出する体外診断用医薬品であり、CELまたはHESにおけるFIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子の判定の補助として用いることができます。

* WHO分類では、FIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子陽性のCELおよびHESはPDGFRA遺伝子再構成を伴うまれな疾患として位置づけられ、異常に亢進したチロシンキナーゼ活性を有するためイマチニブメシル酸塩等のチロシンキナーゼ阻害剤に反応するとされています。

【性能】

1. 品目仕様

FIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子陰性の2種類の検体(末梢血リンパ球および骨髓細胞)に対して、本製品を用いて【用法・用量(操作方法)】に従って作製したFISHスライド標本の分裂期中期(Metaphase)あるいは間期(Interphase)にある細胞核の最低限10個を蛍光顕微鏡下目視で観察します。観察された緑色および赤色、あるいは緑色と黄色が重なり合った黄色の蛍光シグナルを表1に示すスケールに従ってスコア化します。また、バックグラウンド強度を表2に示すスケールに従ってスコア化します。各スコアの中間の強度を示す場合は、スコアとして「0-1」、「1-2」および「2-3」を使用します。

表1 蛍光シグナルのスケール

スコア	スケールの内容
シグナル0	どのフィルターを用いても蛍光シグナルが観察されない。
シグナル1	三帯域フィルターを用いた場合、かすかな蛍光シグナルが観察される。(適切な単一帯域フィルターを用いればクリアな蛍光シグナルが観察される。)
シグナル2	三帯域フィルターを用いて明るい蛍光シグナルが観察される。
シグナル3	三帯域フィルターを用いて非常に明るい蛍光シグナルが観察される。
シグナル3+	極めて明るい蛍光シグナルが観察される。

表2 バックグラウンド強度のスケール

スコア	スケールの内容
0あるいは-	バックグラウンドが観察されない。
1	三帯域フィルターを用いた場合、かすかなバックグラウンドが観察される。(適切な単一帯域フィルターを用いればクリアなバックグラウンドが観察される。)
1-2	蛍光シグナルを不明瞭にさせるバックグラウンドが三帯域フィルターを用いて観察される。
2	明るい縞模様が観察される。あるいは、明るい微細粒子状または斑点状のバックグラウンドが広い範囲に渡って観察される。
3	非常に明るい縞模様が観察される。あるいは、非常に明るい微細粒子状または斑点状のバックグラウンドが広い範囲に渡って観察される。

この時、観察した分裂期中期 (Metaphase) あるいは間期 (Interphase) の細胞核のすべてについて、蛍光シグナルのスコアは「シグナル2」以上 (シグナル2、2-3、3、3+)、バックグラウンド強度のスコアは「1」以下 (0、-、0-1、1) となります。

2. 臨床性能試験成績

本製品およびFIP1L1-PDGFR α 融合遺伝子検出に汎用されているON FIP1L1-CHIC2-PDGFR A (4q12) Deletion, Break probe (Kreatech Diagnostics, Vlierweg 20, 1032 LG Amsterdam, The Netherlands) (以下「Kreatech社プローブ」と略す) を用いて臨床検体20検体についてFISH法で解析し、全細胞核に対する1G1F細胞核の割合を比較した結果、表3に示すとおり、本製品による1G1F細胞核割合とKreatech社プローブによる1G1F細胞核割合に強い正の相関が認められました。

表3 臨床検体を用いた試験成績

細胞検体	細胞の種類	観察細胞核数 (個)		本製品による1G1F細胞核割合 (%)	Kreatech社プローブによる1G1F細胞核割合 (%)
		間期	中期		
F1CH2PDG2	末梢血細胞	100	0	0.00	0.00
F1CH2PDG3	骨髄細胞	95	5	0.00	0.00
F1CH2PDG4	骨髄細胞	95	5	0.00	0.00
F1CH2PDG6	末梢血細胞	107	0	0.00	0.00
F1CH2PDG8	末梢血細胞	101	0	0.00	0.00
F1CH2PDG9	骨髄細胞	95	5	0.00	0.00
F1CH2PDG10	骨髄細胞	95	5	0.00	0.00
F1CH2PDG14	骨髄細胞	95	5	0.00	0.00
F1CH2PDG16	末梢血細胞	101	2	0.00	0.00
F1CH2PDG18	末梢血細胞	98	5	0.00	0.00
F1CH2PDG1	末梢血細胞	120	0	83.33	79.41
F1CH2PDG5	末梢血細胞	90	12	78.43	87.38
F1CH2PDG7	骨髄細胞	93	7	85.00	86.54
F1CH2PDG11	末梢血細胞	105	5	83.64	54.29
F1CH2PDG12	末梢血細胞	105	0	79.05	79.63
F1CH2PDG13	末梢血細胞	110	5	86.96	32.00
F1CH2PDG15	骨髄細胞	105	10	40.00	45.45
F1CH2PDG17	骨髄細胞	94	6	74.00	83.33
F1CH2PDG19	骨髄細胞	115	5	47.50	49.06
F1CH2PDG20	骨髄細胞	99	1	82.00	77.67

本製品による1G1F細胞核割合を横軸に、Kreatech社プローブによる1G1F細胞核割合を縦軸にとった場合の直線回帰式と決定係数は以下のとおりです。

- ・直線回帰式 : $y = 0.8777x + 1.2654$
- ・決定係数 : $R^2 = 0.8691$

【使用上または取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- ① 検体はHBV、HCV、HIVなどの感染のおそれがあるものとして取扱ってください。検査に当たっては感染の危険を避けるため、必ず防御着、防御用手袋、防御用眼鏡を着用し、また、口によるピペッティングを行わないでください。
- ② 検体や検体を含む溶液等が飛散して汚染された場所は、感染防止のため、0.1%濃度以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液や70%エタノール溶液等でよく拭き取り、消毒・清掃してください。
- ③ 本製品のプローブミックスには催奇形性を有するホルムアミドが含まれています。また、対比染色液には発癌性の可能性のあるDAPI (4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール) が含まれています。本キット取扱い時には防御着、防御用手袋、防御用眼鏡を着用し、換気フード内で行ってください。
- ④ 本製品中の試薬が誤って目や口に入った場合や皮膚に付着した場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。

2. 使用上の注意

- *① 本製品は、貯蔵方法に従い、遮光下-20℃にて保存してください。本製品の凍結融解の繰返しは8回まで可能です。
- ② 使用期限を過ぎた本製品は使用しないでください。使用期限を過ぎた本製品の使用については検査結果の信頼性を保証しかねます。
- ③ 本添付文書に記載された操作上の注意や使用方法・操作方法に従って使用してください。記載された使用方法および使用目的以外での使用については検査結果の信頼性を保証しかねます。

- ④ キット内あるいは異なるキットの試薬を混ぜて使用しないでください。また、同一のロット番号の試薬であっても試薬を注ぎ足すことはしないでください。

3. 廃棄上の注意

- ① 使用済みの検体および検体に使用した器具などの廃棄処理を行う場合も、感染防止のため、必ず防御着、防御用手袋、防御用眼鏡を着用してください。
- ② 使用済みの検体および検体に使用した器具などを廃棄する場合は、感染防止のため、廃棄前に0.1%濃度以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸すか、あるいはオートクレーブ処理（121℃、20分間以上）などにより滅菌してください。その後、各自治体などの廃棄物に関する規定に従って医療用廃棄物あるいは産業廃棄物として廃棄してください。
- ③ 使用済みの本製品を廃棄する場合は、各自治体などの廃棄物に関する規定に従って医療用廃棄物あるいは産業廃棄物として廃棄してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

遮光下-20℃保存

2. 有効期間

*製造後24箇月間

使用期限は外装のラベルに記載してあります。

【包装】

5テスト用、10テスト用

製品番号/ テスト数	プローブミックス	対比染色液
A064/ 5テスト用	50 µL×1	150 µL×1
A065/ 10テスト用	100 µL×1	150 µL×1

【主要文献】

- 1) Fink SR, Belongie KJ, Paternoster SF, et al. (2009) Validation of a new three-color fluorescence in situ hybridization (FISH) method to detect *CHIC2* deletion, *FIP1L1/PDGFR* fusion and *PDGFR* translocations. *Leuk Res* ; **33** : 843-6.
- 2) Saito H, Bourinbaier A, Ginsburg M, et al. (1985) Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. *Blood* ; **66** : 1233-40.
- 3) Pardanani A, Ketterling RP, Brockman SR, et al. (2003) *CHIC2* deletion, a surrogate for *FIP1L1-PDGFR* fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy. *Blood* ; **102** : 3093-6.
- 4) Pardanani A, Brockman SR, Paternoster SF, et al. (2004) *FIP1L1-PDGFR* fusion: prevalence and clinicopathologic correlates in 89 consecutive patients with moderate to severe eosinophilia. *Blood* ; **104** : 3038-45.
- 5) Vandenberghe P, Wlodarska I, Michaux L, et al. (2004) Clinical and molecular features of *FIP1L1-PDFGRA* (+) chronic eosinophilic leukemias. *Lukemia* ; **18** : 734-42.
- 6) La Starza R, Specchia G, Cuneo A, et al. (2005) The hypereosinophilic syndrome: fluorescence *in situ* hybridization detects the del(4)(q12)-*FIP1L1/PDGFR* but not genomic rearrangements of other tyrosine kinases. *Haematologica* ; **90** : 596-601.
- 7) Roche-Lestienne C, Lepers S, Soenen-Cornu V, et al. (2005) Molecular characterization of the idiopathic hypereosinophilic syndrome (HES) in 35 French patients

with normal conventional cytogenetics. *Leukemia* ; **19** : 792-8.

- 8) Ma ESK, Wong KF, Wong CLP, et al. (2007) Detection of *FIP1L1-PDGFR* fusion by FISH. *Br J Haematol* ; **138** : 279.
- 9) Arefi M, Garcia JL, Briz MM, et al. (2012) Response to imatinib mesylate in patients with hypereosinophilic syndrome. *Int J Hematol* ; **96** : 320-6.

【問い合わせ先】

株式会社理研ジェネシス 薬事統括部

*〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号

*電話番号： 03-5759-6041

*FAX番号： 03-5759-6043

【製造販売業者】

株式会社理研ジェネシス

*〒141-0032 東京都品川区大崎一丁目2番2号

*電話番号： 03-5759-6041

*FAX番号： 03-5759-6043