

機械器具 17 血液検査用器具 その他の医用検体検査装置 高度管理医療機器
生殖細胞系列遺伝子変異解析セット(疾患原因遺伝子検査用)(71115003)

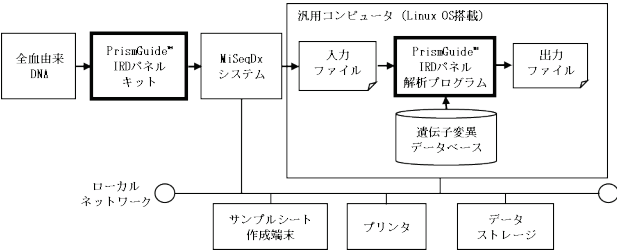
PrismGuide™ IRD パネル システム

【警告】

本品による検査を実施する際には、関連学会が作成した運用指針等に提示される施設要件を満たすことを確認するとともに、ガイドライン等の最新の情報を参考にすること。

【形状・構造及び原理等】

本品は、「PrismGuide IRD パネル 解析プログラム」及び「PrismGuide IRD パネル キット」より構成されるコンビネーション医療機器である。



<PrismGuide IRD パネル システムの構成品>

販売名
PrismGuide IRD パネル 解析プログラム
PrismGuide IRD パネル キット

1. 形状・構造等

1) PrismGuide IRD パネル 解析プログラム

本解析プログラムは独立した汎用コンピュータにインストールし、遺伝子変異解析のために使用する。遺伝子変異データベースは汎用コンピュータにインストールされており、本解析プログラムが参照する。

本解析プログラムの入出力データ等は、オンライン(※)又はオフライン(HDD 等の電子媒体を介してファイルの受け渡しを行う)でのデータ受け渡しが可能である。

※ローカルネットワークを介して、【使用方法等】に記載の次世代シーケンサー(MiSeqDx システム)やサンプルシート作成端末からのファイルの受け渡しを行う。

2) PrismGuide IRD パネル キット

本キットは次の試薬より構成され、次世代シーケンサー解析用のライブラリー調製のために使用する。

IRD NGS Library Preparation Kit
Nuclease-free Water
Step 1: ER Buffer
Step 1: ER Enzyme Mix
Step 2: Ligase Buffer
Step 2: Adaptor A
Step 2: Adaptor B
Step 2: Ligase
Step 3: PCR Buffer
Step 3: Primer
Step 3: PCR Polymerase
IRD NGS Hybridisation & Wash Kit
Nuclease-free Water
Cot Human DNA
Blockers
Hybridisation Buffer
Formamide
Wash Buffer
Bead Priming Buffer
Step 4: PCR Buffer
Step 4: Primers
Step 4: PCR Polymerase
IRD NGS Panel
IRD NGS Panel
IRD NGS Index Plate
Index PCR Primers Set 1
Index PCR Primers Set 2
IRD Pre-Capture NGS Bead Kit
Mag-Bind™ TotalPure NGS
IRD Post-Capture NGS Bead Kit
Dynabeads™ M-270 Streptavidin
Mag-Bind™ TotalPure NGS

2. 原理

本品は、臨床所見に基づき遺伝性網膜ジストロフィ(Inherited Retinal Dystrophies, 以下 IRD)と診断又は原因遺伝子情報による診断が必要と判断された患者由来の全血より抽出及び超音波により断片化された DNA を検体として用いる。「PrismGuide IRD パネル キット」により、断片化された DNA の末端修復及び dA 付加を行い、イルミナ株式会社の次世代シーケンサー(MiSeqDx システム)に対応したアダプター・インデックスを付加したライブラリーを構築後、IRD の原因となるポストキャプチャーDNAライブラリー(NGS 解析用ライブラリー)をハイブリッドキャプチャー法にて調製するため、IRD NGS Panel 試薬等を用いて回収・濃縮する。得られたポストキャプチャーDNA ライブラリーを次世代シーケンサーに付し、塩基配列が決定される。その後、「PrismGuide IRD パネル 解析プログラム」により、塩基置換(SNV; Single Nucleotide Variants, MNV; Multiple Nucleotide Variants)、挿入欠失変異(InDel; Insertion and Deletion)の一括検出後、外部データベースと照合して得られたアノテーション情報(病的バリエーション情報を含む)が付与される。

本品の対象遺伝子は下記のとおりである。

＜対象遺伝子: 82 遺伝子＞

No.	対象遺伝子	No.	対象遺伝子
1	ABCA4	42	NR2E3
2	ADGRV1	43	NRL
3	AIPL1	44	NYX
4	BEST1	45	PCARE
5	C8orf37	46	PDE6A
6	CA4	47	PDE6B
7	CACNA1F	48	PDE6C
8	CDH23	49	PDE6G
9	CDHR1	50	POC1B
10	CEP290	51	PRCD
11	CERKL	52	PROM1
12	CFAP410	53	PRPF3
13	CHM	54	PRPF31
14	CLRN1	55	PRPF6
15	CNGA1	56	PRPF8
16	CNGA3	57	PRPH2
17	CNGB1	58	RBP3
18	CNGB3	59	RDH12
19	CRB1	60	RDH5
20	CRX	61	RGR
21	CYP4V2	62	RGS9BP
22	DHDDS	63	RHO
23	DRAM2	64	RLBP1
24	EYS	65	ROM1
25	FAM161A	66	RP1
26	FSCN2	67	RP1L1
27	GNAT2	68	RP2
28	GRK1	69	RP9
29	GUCA1A	70	RPE65
30	GUCY2D	71	RPGR
31	IDH3B	72	RPGRIP1
32	IMPDH1	73	RS1
33	IMPG2	74	SAG
34	IQCB1	75	SEMA4A
35	KCNV2	76	SNRNP200
36	KLHL7	77	SPATA7
37	LRAT	78	TOPORS
38	MAK	79	TTC8
39	MERTK	80	TULP1
40	MYO7A	81	USH2A
41	NMNAT1	82	ZNF513

＜遺伝子変異の検出方法＞

対象となる遺伝子変異は、以下の条件を満たす。

- ・ 遺伝子変異 (SNV, InDel)
遺伝子変異を示す位置の Depth が 20 以上かつ、遺伝子変異を示す配列のアレル頻度が 20 %以上であること。

＜遺伝子変異の病原性判定方法＞

検出されたバリエーションは、本解析プログラムが参照するデータベースと照合され、ACMGガイドライン・基準に基づく病原性評価が行われる。本品は、病原性に関する 10 の基準 (PVS1, PS1, PS3, PM1, PM2, PM4, PM5, PP2, PP3, PP5)、及び良性に関する 8 の基準 (BA1, BS1, BS3, BP1, BP3, BP4, BP6, BP7)に関する該当性の評価がなされた後、5 つの分類 (Pathogenic, Likely Pathogenic, Benign, Likely Benign, Uncertain Significance)に基づき病原性を判定する。

なお、アノテーション (病原性の判定を含む) 付与の際に参照する遺伝子変異データベースは下表のとおりである。詳細については PrismGuide IRD パネル 解析プログラムの取扱説明書を参照すること。

	参照データベース
臨床的変異データベース	ClinVar, HGMD, PublicP/PublicB (※)、カスタムバリエーションリスト
遺伝子定義データベース	RefSeq, Pfam, RepeatMasker
SNP データベース	1000 ゲノム, gnomAD, dbSNP, GEM-J WGA

※日本人コホートにおける網膜色素変性症を引き起こす遺伝子変異について、病的又は良性変異の情報が含まれる独自のデータベース

【使用目的又は効果】

本品は、遺伝性網膜ジストロフィと診断された患者又は疑われる患者の疾患原因遺伝子の情報を取得する。

〔使用目的又は効果に関連する使用上の注意〕

本品による疾患原因遺伝子の情報に基づく診断や治療方針、ロービジョンケア等の決定においては、遺伝性網膜ジストロフィに精通した医師が、最新の医学知見に基づき、自覚症状、臨床症状及び他の関連する検査結果とあわせて、総合的に判断すること。

【使用方法等】

1. 組み合わせて使用する医療機器

MiSeqDx システム

一般的名称: 遺伝子解析装置

医療機器製造販売届出番号: 13B1X10303000002

製造販売元: イルミナ株式会社

2. 使用方法の概略

- 1) PrismGuide IRD パネル 解析プログラム

＜設置方法＞

本解析プログラムは、下記の仕様を満たす汎用コンピュータに製造販売元が指定した方法でインストールして使用する。

〔汎用コンピュータの仕様 (Linux OS 搭載)〕

構成	仕様
CPU	i9-10980XE@3.00 GHz、2CPU 相当以上
メモリ	64 GB 以上
HDD	1 TB 以上
Linux OS	Ubuntu 20.04 以降
ネットワーク	次世代シークエンサーと汎用コンピュータ間でファイル転送可能なこと
ディスプレイ	SXGA 以上の解像度をもつこと

なお、本解析プログラムが動作する汎用コンピュータは常時起動した状態とし、シャットダウン・電源投入は都度行わないこと。アカウント管理は汎用コンピュータの OS が提供する機能を利用し、ユーザーは、汎用コンピュータに自身の OS アカウント及びパスワードでログイン後に本解析プログラムを起動する。

- 2) PrismGuide IRD パネル キット

＜試薬の調製方法＞

IRD NGS Library Preparation Kit:

Step 1: ER Enzyme Mix、Step 2: Ligase 及び Step 3: PCR

Polymerase:

各試薬を氷上で融解後、タッピングで攪拌し、氷上で保管する。

上記以外の各試薬:

各試薬を室温で融解後、ボルテックスで攪拌し、氷上で保管する。

IRD NGS Hybridisation & Wash Kit

Step 4: PCR Polymerase:

試薬を氷上で融解後、タッピングで攪拌し、氷上で保管する。

Wash Buffer 及び Bead Priming Buffer:

各試薬を室温で融解後、ボルテックスで攪拌する。

上記以外の各試薬:

各試薬を室温で融解後、ボルテックスで攪拌し、氷上で保管する。

IRD NGS Panel/ IRD NGS Index Plate:

各試薬を室温で融解後、ボルテックスで攪拌し、氷上で保管する。

IRD Pre-Capture NGS Bead Kit:

試薬を室温に戻し、ボルテックスで攪拌する。

IRD Post-Capture NGS Bead Kit:

各試薬を室温に戻し、ボルテックスで攪拌する。

＜1 サンプル分の用量＞

- ① 末端修復及び dA 付加

断片化された DNA	25 µL
マスターミックス	
Nuclease-free Water	9 µL
Step 1: ER Buffer	10 µL
Step 1: ER Enzyme Mix	6 µL

② ライゲーション

末端修復及び dA 付加した DNA	50 µL
マスターミックス	
Step 2: Ligase Buffer	3 µL
Step 2: Adaptor A	5 µL
Step 2: Adaptor B	5 µL
Step 2: Ligase	2 µL

③ ライブラリー増幅

アダプター付加した DNA	15 µL
Index PCR Primers Set 1 又は Set 2 の各 Index Primer	5 µL
マスターミックス	
Nuclease-free Water	22 µL
Step 3: PCR Buffer	5 µL
Step 3: Primer	1 µL
Step 3: PCR Polymerase	2 µL

④ ハイブリダイゼーション 1

Cot Human DNA	5 µL
Blockers	7 µL

⑤ ハイブリダイゼーション 2

濃縮したプール DNA	2.5 µL
Hybridisation Buffer	7.5 µL
Formamide	3 µL
IRD NGS Panel	2 µL

⑥ ポストキャプチャーDNA ライブラリー増幅

ポストキャプチャーDNA ライブラリー	14 µL
マスターミックス	
Nuclease-free Water	26.5 µL
Step 4: PCR Buffer	5 µL
Step 4: Primers	2.5 µL
Step 4: PCR Polymerase	2 µL

<別途必要な器具・器材・試料等>

器具・器材

- (1) マイクロピペット
- (2) 遠沈管 (15 mL、50 mL)
- (3) マイクロチューブ (1.5 mL)
- (4) 0.2 mL 8-strip PCR Tubes
- (5) 1.5 mL 用 Magnetic rack, 96 well magnetic plate
- (6) フィルター付きピペットチップ (ヌクレアーゼフリー)
- (7) 96 ウェルプレート
- (8) 全自動電気泳動システム (TapeStation 2200 又は相当品)
- (9) DNA Shearing システム (Covaris M220 又は相当品)
- (10) 遠心濃縮システム
- (11) ヒートブロック
- (12) 分光光度計 (NanoDrop)
- (13) フルオロメーター (Qubit)
- (14) サーマルサイクラー

* (15) ボルテックスミキサー

* (16) プレートミキサー

試薬

- (1) QIAamp DNA Blood Mini Kit 又は相当品
- (2) D1000 ScreenTape 又は相当品
- (3) D1000 Reagents 又は相当品
- (4) D1000 Ladder 又は相当品
- (5) High Sensitivity D1000 ScreenTape 又は相当品
- (6) High Sensitivity D1000 Reagents 又は相当品
- (7) High Sensitivity D1000 Ladder 又は相当品
- (8) Qubit dsDNA BR Assay Kit 又は相当品
- (9) Qubit dsDNA HS Assay Kit 又は相当品
- (10) 無水エタノール (100 %)
- (11) 5.0 M 水酸化ナトリウム
- (12) Molecular Biology Grade water
- (13) Nuclease-free Water
- * (14) TE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1 mM EDTA)
- (15) PhiX Control
- (16) Tween 20
- * (17) MiSeqDx Reagent Kit
- * (18) Buffer EB (10 mM Tris-HCl, pH8.5)

<操作方法の概略>

① DNA 抽出及び断片化

検体 (全血) から、市販品 (QIAamp DNA Blood Mini Kit 等) を用いて DNA を抽出し、Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いて DNA 濃度を確認する。その後、1000 ng 以上の DNA 量を含む DNA 溶液を用いて、超音波処理により DNA を断片化し、IRD Pre-Capture NGS Bead Kit を用いて精製する。精製後、TapeStation を用いてフラグメントサイズを確認する。

② 末端修飾と dA 付加

IRD NGS Library Preparation Kit の構成試薬を用いて「1 サンプル分の用量」の①末端修復及び dA 付加に記載のマスターミックスを調製し、前工程で作製した断片化された DNA と混合し、下記プログラム 1 の条件で反応させる。

プログラム 1

ステップ	温度	時間
1	20 °C	30 分
2	72 °C	30 分
3	4 °C	Hold

③ ライゲーション

プログラム 1 の反応後、IRD NGS Library Preparation Kit の構成試薬を用いて「1 サンプル分の用量」の②ライゲーションに記載のマスターミックスを調製し、前工程で作製した末端修復及び dA 付加した DNA と混合し、20 °C で 15 分インキュベートする。その後、IRD Pre-Capture NGS Bead Kit を用いて精製し、ライブラリーを作製する。精製後、Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いて DNA 濃度を確認し、TapeStation を用いてフラグメントサイズを確認する。

④ ライブラリー増幅

IRD NGS Library Preparation Kit の構成試薬を用いて「1 サンプル分の用量」の③ライブラリー増幅に記載のマスターミックスを調製し、IRD NGS Index Plate の構成試薬 (Index PCR Primers Set 1 又は Set 2 の各 Index Primer) と前工程でアダプター付加した DNA を加え、下記プログラム 2 の条件で PCR により増幅する。その後、IRD Post-Capture NGS Bead Kit を用いて精製する。精製後、Qubit dsDNA BR Assay Kit を用いて DNA 濃度を確認し、TapeStation を用いてフラグメントサイズを確認する。

プログラム 2

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	98 °C	3 分	1
2	98 °C	30 秒	6
	65 °C	30 秒	
	72 °C	60 秒	
3	72 °C	10 分	1
4	4 °C	Hold	1

⑤ ハイブリダイゼーション

前工程で作製した増幅精製後のサンプルをプールし、IRD NGS Hybridisation & Wash Kit の構成試薬と混合し (詳細は「1 サンプル分の用量」の④ハイブリダイゼーション 1 参照)、高温で乾燥させる。Nuclease-free Water を加えて溶解させ濃縮したプール DNA を調製し、IRD NGS Hybridisation & Wash Kit の構成試薬とIRD NGS Panel を加え (「1 サンプル分の用量」の⑤ハイブリダイゼーション 2 参照)、下記プログラム 3 の条件で反応させる。

プログラム 3

ステップ	温度	時間
1	95 °C	5 分
2	65 °C	Hold

⑥ DNA ライブラリーキャプチャー

前工程で作製したハイブリダイゼーション後のサンプルと洗浄したIRD Post-Capture NGS Bead Kit の Dynabeads™ M-270 Streptavidin を混合し、65 °C で 45 分反応させる。その後、IRD NGS Hybridisation & Wash Kit の構成試薬である Wash Buffer を用いて洗浄し、ポストキャプチャーDNA ライブラリーを作製する。

⑦ ポストキャプチャーDNA ライブラリーの増幅

IRD NGS Hybridisation & Wash Kit の構成試薬を用いて「1 サンプル分の用量」の⑥ポストキャプチャーDNA ライブラリー増幅に記載のマスターミックスを調製し、前工程で作製したポストキャプチャーDNA ライブラリーと混合し、下記プログラム 4 の条件で PCR により増幅する。その後、IRD Post-Capture NGS Bead Kit を用いて精製する。

プログラム 4

ステップ	温度	時間	サイクル数
1	98 °C	3 分	1
2	98 °C	30 秒	12
	65 °C	30 秒	
	72 °C	60 秒	
3	72 °C	10 分	1
4	4 °C	Hold	1

⑧ 濃度確認

前工程で作製した増幅精製後のポストキャプチャーDNA ライブラリーを、Qubit dsDNA HS Assay Kit を用いて DNA 濃度が 0.9 ng/μL 以上であることを確認し、TapeStation (High Sensitivity D1000) を用いてフラグメントサイズを確認する。

⑨ シークエンシング

前工程で濃度を確認したポストキャプチャーDNA ライブラリー 12 pM と 1 % の PhiX Control を混合し、MiSeqDx システムを用いてシークエンスを行い、塩基配列を決定する。なお、1 回のシークエンシングには 12 サンプルから調製されたポストキャプチャーDNA ライブラリーを用いる。

⑩ 解析

本解析プログラムを用いて、次世代シークエンサーから出力された塩基配列情報より解析する。解析結果として遺伝子変異 (SNV、MNV、InDel)、アノテーション情報を含むレポートを出力する。

- 汎用コンピュータにログインする。
- 本解析プログラムを起動しログインする。
- 汎用コンピュータ内の入力用フォルダに入力ファイル一式 (サンプルシート、患者情報ファイル、FASTQ ファイル) をセットする。
- 本解析プログラムのメイン画面でファイルスキャンを実行し、解析バッチ登録を行う。
- Create and Start Batch ボタンから解析を開始する。
※解析処理中は汎用コンピュータからログアウトすることも可能である。
- バッチ確認画面で解析が完了していることを確認する。
- メイン画面の View Batch ボタンから解析結果を確認する。
解析が完了したオーダーを選択し、Finalize ボタンをクリックし、以下のレポートを確認する。
 - サマリーレポート
 - シークエンシングレポート
- 本解析プログラムを終了し、汎用コンピュータからログアウトする。
※使用方法の詳細については、本解析プログラムの取扱説明書を参照すること。

【使用上の注意】

- 重要な基本的注意
 - 本品による検査を実施する際には、関連学会が提示する施設要件を満たした医療機関からの依頼であることを確認すること。また、遺伝子パネル検査の品質管理、精度管理に関して、関連するガイドランス等を参照すること。
 - 本品により得られる遺伝子変異結果を用いた診断や治療方針の決定は、関連学会が提示する要件を満たしたエキスパートパネルで行うこと。本品が搭載する遺伝子による診断が可能な RetNet (Retinal Information Network) に基づく IRD の疾患分類名は、Retinitis pigmentosa, Choroidal dystrophy, Cone or cone-rod dystrophy, Congenital stationary night blindness, Macular dystrophy, Syndromic/systemic diseases with retinopathy, Usher syndrome, Bardet-Biedl syndrome, Leber congenital amaurosis, Other retinopathy, Deafness alone or syndromic である。
 - 本品の結果を用いて遺伝カウンセリングを行う際には、必ず関連学会が提示する要件を満たしたエキスパートパネルで総合判断された結果を用いて実施すること。
 - 判定には必ず「PrismGuide IRD パネル 解析プログラム」を使用すること。なお、本解析プログラムは「遺伝子異常」が確認された遺伝子のみがサマリーレポート及びシークエンシングレポートに出力される。
- その他の注意
 - PrismGuide IRD パネル システム
 - 本品による検査は、遺伝カウンセリング実施体制及びエキスパートパネル実施体制を有する医療機関の体制下にあり品質保証において第三者認定を受けていること、もしくは外部委託した場合においては、第三者認定を受けた検査機関で必ず実施すること。
 - 検出されたバリエーションの病原性評価は ACMG ガイドラインの分類プロセス・基準に基づき行われるが、一部の評価においては患者血縁者の変異情報等が必要となる場合がある。本品による病的

バリエーション情報は、＜遺伝子変異の病原性判定方法＞に記載の分類プロセス・基準により判定された結果であることをふまえ、関連学会が提示する要件を満たしたエキスパートパネルが血縁者解析や臨床所見も考慮し病原性総合判定を行うこと。

- 高い GC 含量 (例: High GC content 約 70 % 以上) の場合の本品への影響は確認していない。GC 含量が高い場合、本品によるカバレッジの Depth (読み深度) や Evenness (均一性・網羅性) に影響する可能性がある。また、遺伝子領域 (繰り返し配列領域等) によっては、リファレンス配列へのミスマッピングが生じる可能性も否定できないため、関連学会が提示する要件を満たしたエキスパートパネルにより総合的に判断することを推奨する。
 - 他者の遺伝情報が混在する検体は、検査結果に影響を及ぼすことから検査に不適となる。他者の遺伝情報が混在する検体の例を以下に示す。
 - 同種造血幹細胞移植を受けた患者の全血等
 - 検査を検討している患者が白血病等の血液悪性腫瘍と診断された場合、生殖細胞系列の遺伝子変異状態が反映されず、結果が異なる可能性がある。
 - 本品で出力されたバリエーション病的分類及び解釈は、レポートが発行された時点での科学的知見に基づくものである。新たな科学的知見が得られるに従い、バリエーションの分類や解釈が変わる場合がある。
- (2) PrismGuide IRD パネル 解析プログラム
- 本解析プログラムは、次世代シークエンサーから得られる遺伝子データの解析や品質評価に必要なバイオインフォマティクスに関する十分な知識を有する専門家の責任のもとで使用すること。また、出力された結果に対して専門家が再確認を行うなど、結果の取り扱いには注意すること。
 - 本解析プログラムを海外に持ち出す場合は、外国為替及び外国貿易法 (安全保障貿易等) を確認して適切に取り扱うこと。
 - 本解析プログラムのインストールやアップデートは製造販売元のサービスマンが行う。
 - 本解析プログラムで使用しているデータベース情報等は、製造販売元が開示した最新の状態で使用すること。アップデートがある場合には、製造販売元より連絡する。
 - 本解析プログラムをインストールしたコンピュータならびに関連するシステムは、施設で定められたセキュリティポリシーに従い管理すること。
 - 本解析プログラムの管理者を 1 名設置し、管理者は、ユーザーごとに適切なアクセス権限を設定すること。アクセス権限が適切に設定されていない場合は、管理者の意図しない変更が行われる恐れがあることに注意すること。
 - 本解析プログラムをインストールしたコンピュータでは、以下の点に注意すること。
 - ユーザーごとに OS アカウントを作成し、全ての OS アカウントでパスワードを設定すること。また OS アカウントのパスワードは十分な強度となるよう設定し、外部に漏えいしないよう適切に管理すること (推奨: 大小英数字混在の 8 文字以上)。管理者のパスワードは、本解析プログラムのアップデート等に必要であるため、記録・保管等予防の方法を検討すること。
 - 外部ネットワーク (インターネット等) に接続しないこと。
 - ローカルネットワークに接続する場合は、接続先やフォルダを限定すること。
 - リモートアクセスやファイル共有等のネットワークサービス機能を停止すること。運用上やむを得ない場合には、コンピュータシステムを設置した専門業者に相談するなど、セキュリティに十分な配慮を行うこと。
 - USB ポートは使用しないこと。
 - 本解析プログラムの使用停止、置き換えや廃棄に際しては、解析時に使用したゲノム情報等のデータを確実に消去すること。お客様ご自身での実施が困難な場合には、コンピュータシステムを設置した専門業者に相談するなど、セキュリティに十分な配慮を行うこと。

(3) PrismGuide IRD パネル キット

- 試薬には毒劇物や感染の恐れのあるものは含まれていない。
- 試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに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ること。
- 使用前に本添付文書をよく読んでから使用すること。詳細な使用方法は操作手順書を参照すること。
- 使用期限を過ぎた試薬は使用しないこと。
- 異なる製造番号の試薬又は残った試薬を注ぎ足して使用しないこと。
- 本キットによる検査を行う際に、コンタミネーションを防ぐために、操作上の遺伝子増幅と検出は異なるエリアで行うこと。
- 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試薬や試料の添加量、添加位置に十分に注意して測定を行うこと。

- 8) スクレアゼフリーの実験器具(例えばピペット、ピペットチップ)を使用すること。
- 9) コンタミネーションに注意し、遺伝子検査に適した試験設備環境にて、保護衣・使い捨て手袋等(パウダーフリー)・マスク等の保護具を適切に着用して測定を行うこと。試薬や試料が手袋等に付着した場合は直ちに新しいものに取り替えること。
- 10) 酵素は冷凍庫外で長時間放置を避け、素早く調製・使用すること。また、冷凍試薬の各構成試薬及びそれらを用いて調製した試薬類は、特に指定がない場合は氷上で取り扱うこと。
- 11) 操作中に加温状態で試薬を長時間放置しないこと。また、蓋を閉めた状態で加温すること。
- 12) 各構成試薬は十分に融解してから使用すること。
- 13) 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、蓋を開ける前にスピンドウンを行うこと。
- * 14) 本キットの冷凍保管試薬は、有効期間(25 カ月)以内であれば、2 回まで融解できることを確認している。また、製造後 10 カ月以内であれば、4 回まで融解できることを確認している。
- 15) IRD NGS Index Plate は必ず Index PCR Primers Set 1 (Index Primer 1~12) 又は Index PCR Primers Set 2 (Index Primer 13~24) の組み合わせで使用する。Index Primer 番号(1~24)と IRD NGS Index Plate の well 位置の関係は下表の通りである。

Index PCR Primers Set 1		Index PCR Primers Set 2	
Index Primer 番号	well 位置	Index Primer 番号	well 位置
Index Primer 1	A01	Index Primer 13	A04
Index Primer 2	B01	Index Primer 14	B04
Index Primer 3	C01	Index Primer 15	C04
Index Primer 4	D01	Index Primer 16	D04
Index Primer 5	E01	Index Primer 17	E04
Index Primer 6	F01	Index Primer 18	F04
Index Primer 7	A02	Index Primer 19	A05
Index Primer 8	B02	Index Primer 20	B05
Index Primer 9	C02	Index Primer 21	C05
Index Primer 10	D02	Index Primer 22	D05
Index Primer 11	E02	Index Primer 23	E05
Index Primer 12	F02	Index Primer 24	F05

- 16) 測定装置及び使用備品は定期的に点検及び校正を行ない、使用すること。
- 17) 測定装置の取扱説明書を参照し、適切な設定を行い、装置に適した動作環境で使用する。
- 18) 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等で静かに拭き取ること。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、その後水拭きすること。
- 19) PCR 反応生成物は、コンタミネーションを避けるため、ビニール袋で密閉し、各施設の規定に従って廃棄処理すること。
- 20) DNA 抽出前の検体を取り扱う際に使用した器具類は感染の可能性のあるものとし、オートクレーブ等で滅菌処理するか又は 1 %次亜塩素酸等の消毒液に浸して処理し、各都道府県の規定に従って廃棄処理すること。
- 21) 廃液は水質汚濁防止法等の規制及び各都道府県の条例等に留意して廃液処理すること。
- 22) 使用後の包装・容器等は、各都道府県の規定に従って適切に廃棄又はリサイクルを実施すること。

(4) 測定試料の性質、採取法

- 1) 測定検体は全血から抽出した DNA 以外は使用しないこと。
- * 2) 全血は、抗凝固剤(EDTA)入りの採血管を用いることを推奨する。採血された全血を用いて、抽出試薬キットの推奨方法に従い有核細胞由来の DNA を準備すること。
- 3) 採血後は直ちに十分な転倒混和を行い、各種の検体取扱ガイドライン(例:検体品質管理マニュアル:日本臨床検査標準協議会作成、等)に記載の条件に基づいて、適切に取り扱うこと。採血後 4 °C で保管された全血検体は 30 日間、30 °C で保管された全血検体は 7 日間まで検査に使用できることを確認している。
- 4) 全血から DNA を抽出後、蛍光光度計等により、DNA 濃度を算出すること。検査には、DNA 量として 1,000 ng 以上の DNA 溶液を使用する。
- 5) 全血から DNA を抽出後、すぐに検査を行わない場合は、凍結保管すること。各種の検体取扱ガイドライン(例:検体品質管理マニュアル:日本臨床検査標準協議会作成、等)に記載の条件に基づいて、適切に取り扱うこと。抽出後 4 °C で保管された DNA 検体は 30 日間、-20 °C で保管された DNA 検体は 90 日間、凍結融解回数としては 4 回まで検査に使用できることを確認している。
- * 6) 本品に付する全血検体に含まれる内因性妨害物質(ビリルビン(抱合型)、ヘモグロビン、コレステロール、トリグリセライド、アルブミン、IgG)、及び外因性妨害物質(EDTA)が本品へ与える影響を検証した結果、ビリルビン(抱合型)は 575 µg/mL、ヘモグロビンは

2.0 g/L、コレステロールは 5.0 g/L、トリグリセライドは 33.0 mg/mL、アルブミンは 60 g/L、IgG は 60 g/L、EDTA は 23.0 µmol/L の濃度まで、本品による測定及び解析には影響がないことを確認している。

(5) 性能

1) 実使用における工程管理に関する規格(システム適合性)

本品の【使用方法等】に従い、12 検体を用いて検査を実施したとき、各工程(ライブラリー調製工程、シーケンシング工程、プログラム解析工程)で以下の結果が得られることを確認する。なお、ライブラリー調製工程を開始するにあたり必要な DNA 量は 1,000 ng 以上とする。

* <ライブラリー調製工程の基準>

ポストキャプチャーライブラリーの濃度(推奨値): 0.9 ng/µL per pool 以上

※12 検体のプレキャプチャーライブラリーを混合後、反応させた場合

<シーケンシング工程の基準>

Cluster passing filter : 80 %以上

Q30 score : 70 %以上

<プログラム解析工程の基準>

% On target reads : 60 %以上

Evenness : 75 %以上

Mean target coverage : 240 以上

Low coverage(>=100x) : 95 %以上

2) 精密性(室内再現精度)

出荷判定時に使用される陽性管理用検体を用いて、本品によりライブラリー調製(n=72/オペレーター×2人で計 n=144)から解析を行い室内再現精度(日差、ロット間差、オペレーター間差を含む)を評価した場合、本品が対象とするバリエーション型(エクソン領域及びイントロン領域の SNV、ホモポリマー領域の SNV、InDel)を検出したサンプルの割合は 100 %であることを確認した。

3) 真度

特定の IRD 原因遺伝子領域のバリエーション部位を対象に、臨床検体 42 例を用いてサンガーシーケンス法による解析結果と本品による判定結果の一致率を算出した結果、SNV 及び InDel において陽性一致率(PPA)及び陰性一致率(NPA)はともに 100%であった(表 1)。

表 1 同等性評価結果

		サンガーシーケンス法による 測定・解析結果	
		陽性バリエーション数 (SNV 35 個、 InDel 8 個)	陰性バリエーション数
本品 による 測定・ 解析 結果	陽性バリエーション数	43	0
	陰性バリエーション数	0	4281 *
	合計	43	4281
		PPA: 100 % [95 %信頼区間: 91.8 %-100 %]	NPA: 100 % [95 %信頼区間: 99.9 %-100 %]

※本品とサンガーシーケンス法の両方で検出されなかったバリエーション数は 4281 バリエーションであった。

また、参考試験として、本品の解析対象遺伝子のうちエビデンスレベルの高い RPE65 遺伝子変異に係る本品の真度を評価した。両アレル性 RPE65 遺伝子変異による IRD 患者由来の 4 検体を用いて本品の真度を評価したところ、バリデーションされた対照法(サンガーシーケンス法、NGS 法)と本品の変異検出に係る陽性一致率は 100 % [95 %信頼区間: 63.1 %-100 %] であった。また、医療機関で決定された当該変異の病原性判定に対する本品の判定一致率は 100 % [95 %信頼区間: 63.1 %-100 %] であった。

4) 特異性(バイト特異性)

臨床検体及び出荷判定時に使用される陽性/陰性管理用検体(※)を用いて、本品によりライブラリー調製(n=3)から解析を行い、IRD 原因遺伝子解析対象領域に対する 100 リード以上のカバレッジを有する塩基領域の割合を算出した結果、99.4 %以上の値を示すことを確認した。
※陽性管理用検体: NA24385 (Coriell 社製)
陰性管理用検体: NA18565 (Coriell 社製)

5) 感度(最小検出感度)

インプットとなる DNA 量を規定量及び規定量以下にして本品による検査を実施した場合、代表的なバリエーション型を検出可能を確認した。出荷判定時に使用される陽性管理用検体 1,000 ng (規定量)、500 ng を用いて、本品によりライブラリー調製 (n=24) から解析を行い、本品が対象とする全バリエーション型 (エクソン領域及びイントロン領域の SNV、ホモポリマー領域の SNV、InDel) に対する Hit Rate を算出した。その結果、1,000 ng では全バリエーション型を全て検出することができた (表 2)。

表 2 最小検出感度

バリエーション型	500 ng Hit Rate [%] (検出回数/ 解析回数)	1,000 ng Hit Rate [%] (検出回数/ 解析回数)
エクソン領域の SNV※1	100 (192/192)	100 (192/192)
ホモポリマー領域の SNV※2	100 (24/24)	100 (24/24)
イントロン領域の SNV※3	100 (48/48)	100 (48/48)
Insertion※4	100 (24/24)	100 (24/24)
Deletion※5	97.2 (70/72)	100 (72/72)

※1: USH2A, ABCA4, RPGRIP1 遺伝子領域に存在する 8 SNVs
※2: RP1L1 遺伝子領域に存在する 1 SNV
※3: ABCA4, RHO 遺伝子領域に存在する 2 SNVs
※4: ADGRV1 遺伝子領域に存在する 1 Insertion
※5: EYS, MYO7A, POC1B 遺伝子領域に存在する 3 Deletion

6) 本品による原因遺伝子同定
臨床所見に基づき診断された IRD 患者由来の 80 例を対象に、本品を用いて生殖細胞系列遺伝子変異の検出及び病的バリエーション情報を取得後、医療機関でのエキスパートパネルによる原因遺伝子同定率を確認した。42.5 % (34 例/80 例) の患者において、本品及びエキスパートパネルで原因遺伝子が同定された。原因遺伝子が同定された 34 例中、31 例 (91.2 %) は、本品が判定した病的バリエーション (Pathogenic, 又は Likely pathogenic) を有する遺伝子であった。一方、3 例 (8.8 %) は、本品により VUS (Variant of uncertain significance) として判定されたバリエーションを有する遺伝子であり、医療機関が保有する臨床情報や家系情報に基づくエキスパートパネルでの総合判定の結果、原因遺伝子として同定された。本結果より、本品から得られた情報が、IRD の原因遺伝子同定の補助として寄与すること、ならびに医療機関のエキスパートパネルにおいて、本品からの結果に加え、臨床情報や家系情報に基づき病原性有無に係る総合判定を行う運用が妥当であることが示された。

【保管方法及び有効期間等】

PrismGuide IRD パネル キット

1. 保管方法
- IRD NGS Library Preparation Kit

IRD NGS Hybridisation & Wash Kit

IRD NGS Panel

IRD NGS Index Plate

IRD Pre-Capture NGS Bead Kit

IRD Post-Capture NGS Bead Kit

指定された温度で保存すること。

- ※ 2. 有効期間
- 25 カ月 (使用期限は外箱に表示)

【保守・点検に係る事項】

PrismGuide IRD パネル 解析プログラム

1. 使用者による保守点検事項
- 本解析プログラム起動毎に、モニタに初期画面が正常に表示されることを確認すること。
2. 業者による保守点検事項
- 特になし。

【承認条件】

遺伝性網膜ジストロフィに関連する十分な知識及び経験を有する医師が、関連学会の最新のガイドライン等に基づく検査の対象及び運用指針を遵守した上で、遺伝性網膜ジストロフィパネル検査に基づく診療体制が整った医療機関で本品を用いるよう、必要な措置を講ずること。

【主要文献】

1. 「遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル」日本臨床検査標準協議会
2. Richards S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genet Med. 17, 405-24 (2015).
3. Koyanagi Y, Akiyama M, Nishiguchi MK, Momozawa Y, Kamatani Y, Takata S, et al. Genetic characteristics of retinitis pigmentosa in 1204 Japanese patients. J Med Genet. 2019;56:662-670. doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105691.
4. 「網膜ジストロフィにおける遺伝学的検査のガイドライン」日本網膜硝子体学会
5. 「遺伝性網膜ジストロフィーの原因となりうる主な遺伝子」リスト 日本網膜硝子体学会

【他社との契約による記載要求事項】

Dynabeads は Thermo Fisher Scientific Inc. の商標です。
Mag-Bind は Omega Bio-Tek, Inc. の商標です。

※ ※【製造販売業者及び製造業者の氏名又は名称等】
[製造販売元]
シスメックス株式会社

[製造元]
Cytocell Limited

[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

PrismGuide IRD パネル システム 専用フリーダイヤル:
Tel 0120-056-034