

## 使用説明書

IVD

## リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査®

FMS 様チロシンキナーゼ 3 (*FLT3*) 遺伝子における内部縦列重複 (ITD) およびチロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異検出用

**IVD** 体外診断用医薬品



カタログ番号

**REF** K-412-0331

製品

リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査®

数量

33 反応分

INVIVOSCRIBE の秘密情報および専有情報であり、  
無許可の使用、複写、または配布を禁じます。

# 目次

1.	商標名	4
2.	使用目的	4
3.	用語	4
4.	テストの概要と説明	4
5.	方法の原理	5
5.1.	<i>FLT3</i> の内部縦列重複 (ITD) 変異	5
5.2.	<i>FLT3</i> のチロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異	6
6.	試薬および材料	7
7.	機器 / アクセサリー	10
7.1.	ソフトウェア (検査キットに含まれます)	10
8.	警告および注意	11
8.1.	サイバーセキュリティー注意事項	12
9.	検体の採取と準備	13
9.1.	注意	13
9.2.	阻害物質	13
9.3.	検体の要件および取り扱い	13
10.	アッセイ手順	13
10.1.	検体の点検	13
10.2.	検体処理の準備	13
10.3.	臨床検体の希釈	14
10.4.	単核球 (MNC) の分離	14
10.5.	単核球の計数	15
10.6.	DNA の抽出および分離を完了するための検体の準備	15
10.7.	QIAcube 自動化ステーションの準備	16
10.8.	DNA 抽出	16
10.9.	DNA の定量および希釈	17
10.10.	増幅	18
10.11.	制限酵素による消化 (TKD 変異のみ)	19
10.12.	キャピラリー電気泳動による検出	20
10.13.	サイズスタンダード溶液の準備 (必要な場合)	21
10.14.	検体プレートの準備	21
10.15.	リューコストラット CDx <i>FLT3</i> ソフトウェアによる PlateMapper のセットアップ <b>注記:</b> リューコストラット CDx <i>FLT3</i> ソフトウェアをインストールするには、管理者 (アドミニストレーター) 権限が必要です。	22
10.16.	3500xL Dx ソフトウェアのセットアップ	31
10.17.	3500xL Dx Genetic Analyzer のラン	32
10.18.	GeneMapper ソフトウェアによるデータ解析	33
10.19.	リューコストラット CDx <i>FLT3</i> ソフトウェアによるデータ解析	36
11.	品質管理	42
11.1.	ランの妥当性	42
11.2.	抽出コントロールと検体の妥当性	42
12.	結果の解釈	43
13.	再検査	44
13.1.	無効なラン	44
13.2.	有効なランにおける無効な抽出コントロール	44
13.3.	有効なランにおける無効な検体	44

13.4.	Fail Detail と再検査.....	44
13.5.	一回のランにおける複数の不具合 .....	48
13.6.	色素シフト .....	49
<b>14.</b>	<b>方法の限界.....</b>	<b>50</b>
<b>15.</b>	<b>予測される値.....</b>	<b>51</b>
15.1.	増幅産物の予測されるサイズ .....	51
<b>16.</b>	<b>非臨床的なパフォーマンス評価 .....</b>	<b>51</b>
16.1.	分析感度 - ブランク上限 (LoB) .....	51
16.2.	分析感度 .....	51
16.3.	精度 .....	53
16.4.	オペレーターごとの再現性 (細胞株) .....	53
16.5.	オペレーターごとの再現性 (臨床検体) .....	53
16.6.	ロットごとおよび器具ごとの再現性 .....	54
16.7.	阻害物質 - 外因性 .....	54
16.8.	阻害物質 - 内因性 .....	54
16.9.	阻害物質 - 治療薬 .....	55
16.10.	キャリアオーバーおよび交差汚染 .....	55
16.11.	DNA インプット .....	55
16.12.	EDTA 採血管の検証.....	55
16.13.	NEBuffer r3.1 と NEBuffer 3.1 の同等性について.....	56
16.14.	密度勾配媒体の検証 .....	56
<b>17.</b>	<b>臨床的なパフォーマンス評価 .....</b>	<b>57</b>
17.1.	試験の概要 (IVS-056-001) .....	57
17.2.	試験の目的 (IVS-056-001) .....	57
17.3.	患者集団 (IVS-056-001) .....	57
17.4.	リファレンステスト用検体の選択 (IVS-056-001).....	57
17.5.	安全性解析 (IVS-056-001) .....	57
17.6.	有効性 (IVS-056-001) .....	58
17.7.	結論 (IVS-056-001) .....	60
17.8.	ピボタル・ブリッジング試験の概要 (IVS-062-002).....	60
17.9.	治験の目的 (IVS-062-002) .....	60
17.10.	患者集団 (IVS-062-002) .....	60
17.11.	安全性解析 (IVS-062-002) .....	61
17.12.	有効性 (IVS-062-002) .....	61
17.13.	結論 (IVS-062-002) .....	61
17.14.	ピボタル・ブリッジング試験の概要 (IVS-062-005).....	61
17.15.	治験の目的 (IVS-062-005) .....	62
17.16.	患者集団 (IVS-062-005) .....	62
17.17.	安全性解析 (IVS-062-005) .....	62
17.18.	有効性 (IVS-062-005) .....	62
17.19.	結論 (IVS-062-005) .....	63
<b>18.</b>	<b>参考文献.....</b>	<b>63</b>
<b>19.</b>	<b>テクニカルおよびカスタマーサービス.....</b>	<b>64</b>
<b>20.</b>	<b>記号.....</b>	<b>64</b>
<b>21.</b>	<b>免責事項.....</b>	<b>64</b>

## 1. 商標名

リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査

## 2. 使用目的

リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査は PCR ベースの *in vitro* 診断用検査で、急性骨髄性白血病と診断された患者の末梢血または骨髄穿刺液中の単核細胞から抽出したゲノム DNA を用いて、*FLT3* 遺伝子の内部タンDEM重複 (ITD) 変異およびチロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異 D835 および I836 を検出するようにデザインされています。

リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査の使用は、ギルテリチニブフマル酸塩の AML 患者への適応を判定するための補助に用いる。

リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査の使用は、キザルチニブ塩酸塩の AML 患者への適応を判定するための補助に用いる。

## 3. 用語

リユーコストラット CDx *FLT3* ソフトウェア      リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査のデータ解析用のソフトウェア。

### 内部縦列重複 (ITD) 変異

*FLT3* 遺伝子の膜近傍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を表わします。

EC

抽出コントロール

NTC

テンプレートを含まないコントロール

PC

ポジティブコントロール

シグナル比 (SR)

変異型ピーク面積を野生型ピーク面積で割って算出します。

### チロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異

*FLT3* 遺伝子のコドン 835 や 836 に変化をもたらすヌクレオチドの変化で、チロシンキナーゼドメイン内にある EcoRV 制限酵素部位が切断されなくなることによって検出されます。

AR

アレル比

CR

完全寛解

CRh

血液の回復が部分的な完全寛解

## 4. テストの概要と説明

一般に急性骨髄性白血病 (AML) の予後は不良です。通常の AML では、核型による *FLT3* (fms 関連チロシンキナーゼ 3) レセプター遺伝子の変異状態 (しばしば重度) の評価が疾病の予後を示す最も重要な指標であり、AML にみられる *FLT3* の活性型変異は予後不良の前兆であることが多くの研究によって示されています。<sup>1,2</sup> リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、内部縦列重複 (ITD)、ならびに D835 および I836 変異のようなチロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異を同定するための *FLT3* 遺伝子の領域を標的としており、国際臨床試験においてその有効性が認められています。

リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査には、患者検体から単核球を分離後に DNA を抽出して *FLT3* 変異の有無を確認するための、試薬、器具、ソフトウェアおよび方法が含まれています。PCR による DNA 増幅によって得られた TKD 増幅産物を制限酵素で消化した後、その増幅産物をキャピラリー電気泳動で検出します。リユーコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアを用いて *FLT3* の変異状態を判定します。変異型 対 野生型のシグナル比が 0.05 のカットオフ値以上であった場合に、*FLT3* の ITD 変異や TKD 変異は **陽性** と報告されます (セクション 12 の結果の解釈をご参照ください)。操作方法の概略を図 1 に示します。

## 5. 方法の原理

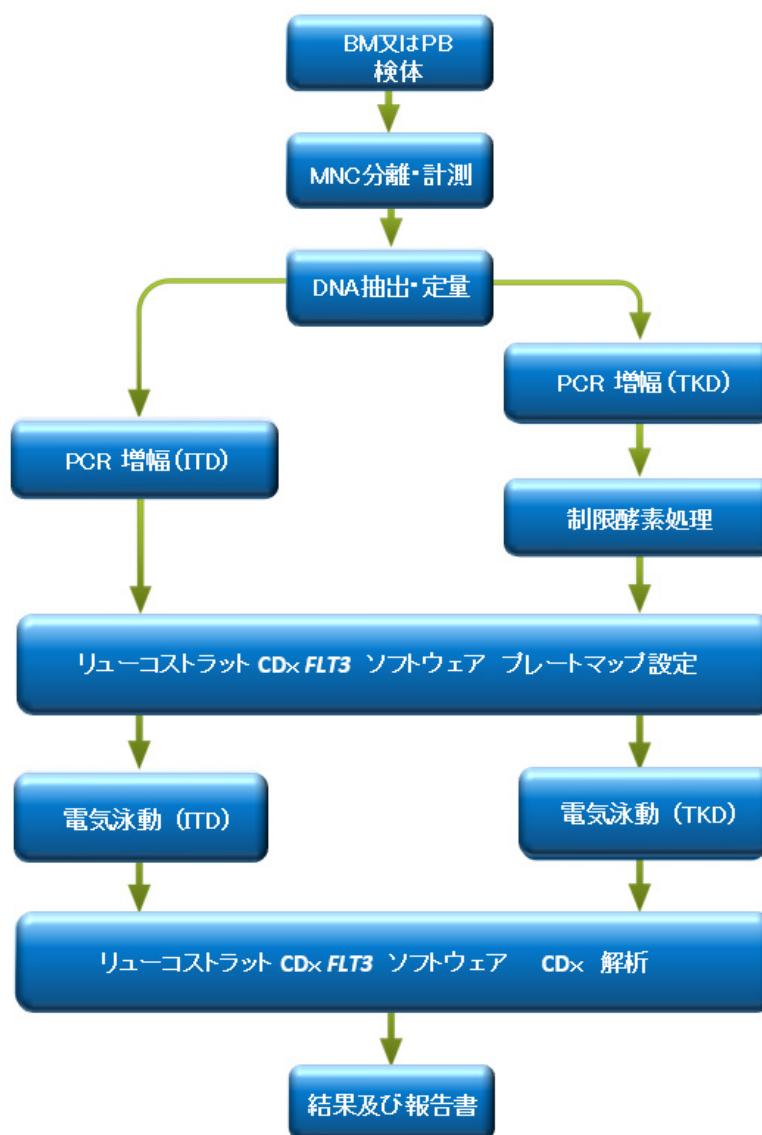


図 1 操作方法の概略

### 5.1. FLT3 の内部縦列重複 (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。<sup>1</sup>

リューコストラット CDx FLT3 変異検査では、JM 領域の内部および周辺領域のプライマーを使用します。検体中のシグナルが確認できる異なる蛍光色素を用いて、順方向と逆方向の PCR プライマーを蛍光標識しています。本アッセイの測定によれば、野生型 FLT3 アレルでは  $327 \pm 1$  bp の産物が増幅されますが、ITD 変異が含まれるアレルでは産物の長さが  $330 \pm 1$  bp を超えます (図 2)。

## 5.2. FLT3 のチロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異

FLT3 TKD 変異は、D593、D835、I836、Y842 のアミノ酸に該当する核酸コドン配列の置換や欠失によって引き起こされる高度に保存された触媒中心のアミノ酸配列の変化を惹起します。D835 と I836 にみられる置換および欠失のような TKD 変異により、FLT3 の恒常的な自己リン酸化および活性化がもたらされます。<sup>2</sup> リューコストラット CDx FLT3 変異検査は、これら変異のうち D835 変異及び I836 変異のみ検出可能であります。

FLT3 遺伝子の野生型アレルには EcoRV 制限酵素によって消化される部位が含まれます。D835 又は I836 に置換や欠失がある場合、制限酵素の認識部位は消失し、EcoRV エンドヌクレアーゼは、この部位の DNA を認識および消化できなくなります。リューコストラット CDx FLT3 変異検査では、TKD 領域のいずれかの端を標的としたプライマーを使用します。FLT3 の標的領域を PCR によって増幅した後、EcoRV 制限酵素による消化を行います。PCR プライマーのうちの一つを蛍光色素で標識し、もう一つに EcoRV 制限酵素部位が含まれるような改変を行うと、野生型と変異型どちらのアレルも消化されるようになります。消化のパターンによって、正常遺伝子配列が失われていることが同定できると共に、消化が起こったことも確認できます。本アッセイの測定によれば、145±1 bp または 147±1 bp である最初の未消化増幅産物から得られた FLT3 遺伝子の野生型アレルの消化産物は 79±1 bp ですが、変異型アレルでは 125±1 bp または 127±1 bp になります (図 2)。

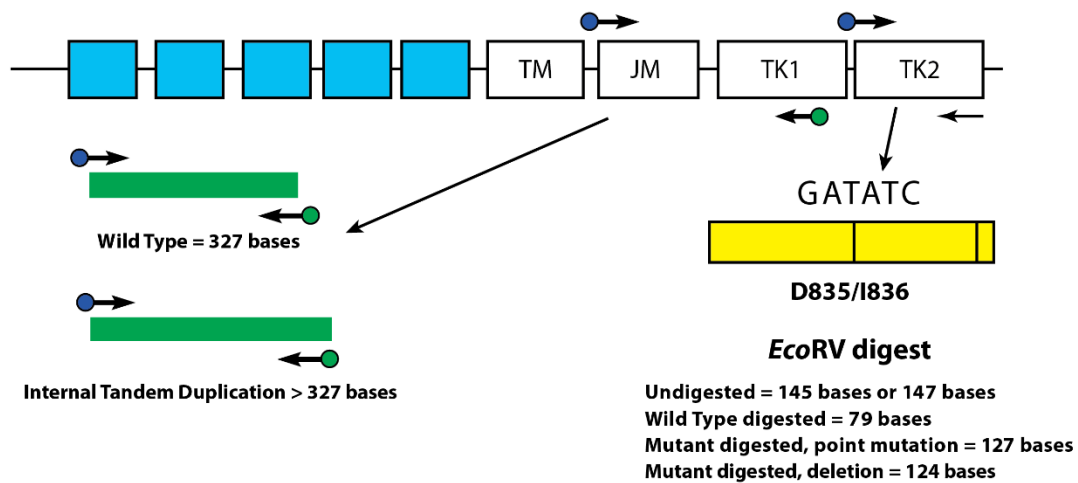


図 2: FLT3 膜近傍 (JM) 領域 (TM = 膜貫通) およびチロシンキナーゼ (TK) ドメインの活性化ループの図示。黒の矢印は、ITD に対する JM 領域の内部および周辺領域を、または TKD に対するキナーゼドメインの活性化ループを標的としたプライマーの相対的位置を示す。色つきの丸印は標識プライマーの蛍光色素を表す。黄色のボックス内の黒い縦線は EcoRV 制限酵素による消化部位の位置を示す。

## 6. 試薬および材料

**注記：** リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査キットは、表 1 の記載に従って保管した場合、ラベルに記載された有効期限まで使用できます。

表 1: リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査 キット (品番 K-412-0331) の試薬リスト

カタログ番号	試薬名	保管温度	単体量	単位数 / キット
<b>REF</b> R0880220**	<i>FLT3</i> 抽出コントロール		1800 µL / バイアル	1 バイアル
<b>REF</b> B4120131*	<i>FLT3</i> ITD マスターミックス		1500 µL / バイアル	1 バイアル
<b>REF</b> B4120141*	<i>FLT3</i> TKD マスターミックス		1500 µL / バイアル	1 バイアル
<b>REF</b> R0880200**	<i>FLT3</i> ITD 陽性コントロール		100 µL / バイアル	1 バイアル
<b>REF</b> R0880210**	<i>FLT3</i> TKD 陽性コントロール		100 µL / バイアル	1 バイアル
<b>REF</b> R0930060**	<i>FLT3</i> NTC (テンプレートを含まないコントロール)		200 µL / バイアル	1 バイアル
<b>REF</b> 261604	Taq DNA ポリメラーゼ		200 µL / バイアル	1 バイアル
<b>REF</b> 261779	EcoRV 酵素		200 µL / バイアル	1 バイアル
<b>REF</b> 261985	NE 緩衝液 r3.1		1250 µL / バイアル	1 バイアル

\* 開封したマスターミックスバイアルおよび NE 緩衝液 r3.1 は、凍結保存後 4 サイクルまで凍結融解が可能です。

\*\* 開封したコントロールバイアルは、凍結保存後 8 サイクルまで凍結融解が可能です。

表 2: その他の必要な試薬、材料、および器具 (含まれていません)

試薬 / 材料	推奨される試薬 / 材料および供給業者	カタログ番号	注記
Hi-Di ホルムアミド	Thermo Fisher Scientifics 社 • Hi-Di™ ホルムアミド	4440752	該当せず
Liz サイズスタンダード	Thermo Fisher Scientifics 社 • GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0 - Dx	A25794	該当せず
ポリマー	Thermo Fisher Scientific 社 • POP-7™ Polymer (384 検体) 3500 Dx シリーズ	4393709	該当せず
バッファー	Thermo Fisher Scientific 社 • 3500 Dx / 3500xL Dx Genetic Analyzer 用の Anode Buffer Container	4393925	該当せず
	Thermo Fisher Scientific 社 • 3500 Dx / 3500xL Dx Genetic Analyzer 用の Cathode Buffer Container	4408258	該当せず
キャピラリー電気泳動機器 およびソフトウェア	Thermo Fisher Scientific 社 • 3500xL Dx Genetic Analyzer シリーズ • 3500 Data Collection ソフトウェア v3.0	A27856	Dx には Fragment Analysis Software Module が必要です
	GeneMapper® v4.1.1 x ソフトウェア	4366925	該当せず

表 2: その他の必要な試薬、材料、および器具 (含まれていません)

試薬 / 材料	推奨される試薬 / 材料および供給業者	カタログ番号	注記
キャピラリーアレイ	Thermo Fisher Scientific 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>3500xL Dx Genetic Analyzer 24-Capillary Array 50 cm</li> </ul>	4404688	該当せず
セプタ	Thermo Fisher Scientific 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>3500 Dx / 3500xL Dx Genetic Analyzer 用の Septa Cathode Buffer Container</li> </ul>	4410716	該当せず
	Thermo Fisher Scientific 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>3500 / 3500xL Dx Genetic Analyzer 用のセプタ、96 ウェル</li> </ul>	4410700	該当せず
3500xL Dx 用のリテナーとベースのセット	Thermo Fisher Scientific 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>3500 Dx / 3500xL Dx Genetic Analyzer 用の 3500 シリーズ 96 ウェルスタンダードリテナー &amp; ベースセット (スタンダード)、96 ウェル</li> </ul>	4410227	該当せず
スペクトル校正色素セット	Thermo Fisher Scientific 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>DS-33 マトリックス標準セット (色素セット G5) Dx</li> </ul>	4482974	該当せず
校正済ピペット	Sartorius 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>eLINE® Single Channel 5 - 120µL</li> <li>eLINE® 8 Channel 0.2-10 µL または同等品</li> </ul> Gilson 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>P-2M, P-10N, P-20N, P100N, P-200N, and P-1000N ピペットまたは同等品</li> </ul>	該当せず	0.5µL から 1000 µL の量を正確に測定できること
サーマルサイクラー	Thermo Fisher Scientific 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>Veriti™ Dx 96-ウェルサーマルサイクラー</li> </ul>	4452300 (VRTI DX 200-Q)	該当せず
ボルテックスミキサー	N / A	該当せず	該当せず
PCR 用プレートまたはチューブ	N / A	該当せず	滅菌済、スカート付きプレート
フィルターバリア付きピペットチップ	N / A	該当せず	滅菌済、RNase / DNase / 発熱物質フリー
微量遠心分離機	N / A	該当せず	該当せず
96-ウェルアルミホイルシート	N / A	該当せず	該当せず
96-ウェル 8-キャップストリップ	N / A	該当せず	該当せず
分子生物学用グレードまたは USP 規格の蒸留済脱イオン水	N / A	該当せず	水は滅菌済で DNase および RNase を含まないこと。
DNA 抽出	QIAGEN 社 <ul style="list-style-type: none"> <li>QIAamp® DNA Blood Mini Kit</li> </ul>	51104	AL バッファー、AW1 バッファー、AW2 バッファー、AE バッファー、プロテアーゼ用溶媒、プロテアーゼ、溶出用チューブ、溶解用チューブ、およびスピンカラムを含む。



表 2: その他の必要な試薬、材料、および器具（含まれていません）

試薬 / 材料	推奨される試薬 / 材料および供給業者	カタログ番号	注記
単核球分離	密度勾配媒体	該当せず	密度 1.077g/mL
緩衝生理食塩水	Mediatech Inc. (Corning) 社 • Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS)	21-031-CVR	該当せず
増殖培地	Mediatech Inc. (Corning) 社 • L-グルタミン含有 RPMI 1640	10-040-CVR	該当せず
細胞計数装置	N / A	該当せず	該当せず
微量 UV 分光光度計	Microvolume UV Spectrophotometer	該当せず	核酸濃度計算のために 260nm での吸光度を測定可能なもの
エチルアルコール / エタノール	N / A	該当せず	エタノールは 200 プルーフで、無水の ACS / USP グレードであること
DNA 抽出装置	QIAGEN 社 • QIAcube システム (230 V)	9001882	該当せず
DNA 抽出装置試薬ボトル	QIAGEN 社 • Reagent Bottles, 30 mL (6)	990393	該当せず
DNA 抽出装置試薬ボトルラック	QIAGEN 社 • 試薬ボトルラック	990390	該当せず
DNA 抽出装置ローターアダプターおよびそのホルダー	QIAGEN 社 • Rotor Adapters (10 x 24) • Rotor Adapter Holder	990394 990392	該当せず

表 3: 一般的な実験用具（含まれていません）

用具の説明
15 mL コニカルチューブ
50 mL コニカルチューブ
血清ピペット - 5 mL, 10 mL, 25 mL
リントフリーワイプ
較正済タイマー
QIAcube 用消毒剤 (Steris Coverage Spray TB など)
氷および氷バケツ
廃液用容器
DNA の希釈および分割に使用する、容積が適切で表面への付着がないチューブ
DPBS, PCR, および Digestion Master Mix 溶液のための、適切な容積のチューブ
QIAcube 検体チューブ
QIAcube 検体チューブのスクリュウキャップ
使い捨てのトランスファーピペット
ピペットチップ
キャピラリー電気泳動プレート、96 ウェル、スカート付き

## 7. 機器 / アクセサリー

**注記：** 本検査は 3500xL Dx Genetic Analyzer および各機器にインストールされている Data Collection ソフトウェアを用いて使用してください。

**注記：** すべての器具は、製造者の指示に従って適切に維持することが求められます。

- 2° C から 8° C での保管が可能な冷蔵庫
- -30° から -15° C での保管が可能な冷凍庫
- 空気の循環がないクリーンベンチ (Dead air box)
- ピペットエイド
- 連続分注器
- 手動および電動のマルチチャンネルピペット
- スイングローター使用で 1000 x g の冷却遠心が可能な遠心分離機
- スイングローター使用で 1400 x g の遠心が可能な遠心分離機
- 上記の機器およびアクセサリは含まれていません

### 7.1. ソフトウェア (検査キットに含まれます)

- リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェア v1.1.x. IVD (REF K-412-0341)

**注記：** LeukoStrat ソフトウェアアプリケーションの検証は、1920 x 1200 の解像度に設定されたディスプレイで、スクリーンサイズ「小さい - 100%」の設定で実行されました。表示の問題は、他の解像度で発生する可能性があります。

#### ○ コンピュータの動作環境:

オペレーティングシステム: Windows™ 10 もしくは Windows™ 11 Pro

プロセッサ: Intel Core 2 Duo 以降の CPU が推奨されます

RAM: 最小 4 GB

ディスク空き容量: 最小 5 GB

CD-ROM ドライブ

出力されたレポートを調べるために PDF 閲覧ソフトウェア (Adobe Reader など) が必要です。

## 8. 警告および注意



アッセイ手順を開始する前に使用説明書をよく読み、各ステップに厳密に従ってください。

- **IVD** 本製品は体外診断用医薬品です。
- 本検査は、3500xL Dx Genetic Analyzer および機器にインストールされている Data Collection ソフトウェアの使用についてのみ検証されています。
- 本検査は 1 つのシステムとして使用する必要があります。他のメーカーの試薬を代用しないでください。
- 希釈、少量での増幅反応など、本プロトコルを逸脱した場合には、本検査の成績に影響を及ぼしたり、本検査キットの購入に付随する制限付き再実施権が無効になることがあります。ロット番号が異なるキットの試薬を混合したり、組み合わせて使用しないでください。
- 指示通りに保管・使用したキット内容は、ラベルに記載される有効期限まで安定です。有効期限を過ぎたキットは使用しないでください。
- 未使用の試薬および廃棄物は、国、都道府県、市町村などが定める規則に従って廃棄してください。
- 凍結融解を行った回数を記録してください。
- 検査室でのすべての作業には、標準的な個人用保護装備を使用してください（手袋、白衣、および保護メガネ）。検査室の作業者が検体を扱う場合には、GLP（優良試験所規範）と一般的注意に従ってください。ピペットを口で扱わないでください。検査室の作業エリアで飲食や喫煙を行わないでください。検体やアッセイ用の試薬を扱った後には、手をよく洗浄してください。検体は承認された安全な生物学的封じ込め施設にて扱い、認定された生物学的安全キャビネット内でのみ開封してください。
- 本検査の分析感度を保つため、試薬、または検体、コントロール、もしくは増幅対象物との増幅用混合液の汚染を避けるよう、十分な注意をはらってください。検体ごと、および分注試薬ごとに、新しいフィルター付きピペットチップを使用してください。すべての試薬について、汚染の徴候がみられないかどうかを厳密に観察してください（例えばネガティブコントロールにポジティブシグナルが検出されるなど）。汚染が疑われる試薬は廃棄してください。
- 汚染を最小限にするため、検体や試薬を扱う際には清潔な手袋を着用し、PCR を行う前には作業エリアやピペットを清潔にすることを日常的に行ってください。
- DNA による汚染はオートクレーブでは除去できません。PCR 実施室でのワークフローは、別々の作業エリア間で常に一方方向に進む必要があります。つまり検体の準備から始まり、次に増幅、最後に検出を行ってください。増幅した DNA を検体準備用のエリアへ持ち込まないでください。
- 特定のエリアで用いるすべてのピペット、ピペットチップ、およびいずれの器具も、検査室のそのエリア内のみで使用してください。
- RNase、DNase、または交差汚染を避けるため、可能な限り滅菌済の使い捨てプラスチック用品を使用してください。
- すべての機器および器具は、製造者の推奨に従った保守および校正が必要になります。
- パウチが室温に戻ったら、取り付け時に各パウチ型 POP-7 ポリマーの首部分の内側を調べて、パウチ装着部分に乾燥または結晶化したポリマーが含まれていないことを確認してください。結晶化が確認された場合は、パウチを 3500xL Dx 機器に取り付けしないでください。結晶化は、LeukoStrat CDx FLT3 変異検査および 3500xL Dx 機器の性能に影響を与える可能性があります。結晶化が確認された場合は、パウチを 3500xL Dx 機器に取り付けず、Thermo Fisher 社のカスタマーサポートに連絡してください。
- デバイスが想定どおりに機能しない、または検査結果を正しく解釈できないと、FLT3 変異結果が不正確になり、その後、AML 治療における患者管理の決定が不適切になる可能性があります。
  - 偽陰性の検査結果により、AML 患者はギルテリチニブフマル酸塩またはキザルチニブ塩酸塩の治療を受けることに関連する潜在的な利益を受けることができない可能性があります。しかし、患者は AML の標準治療として強力な化学療法を受けます。
  - 検査結果が偽陽性の患者は、効果が期待できないギルテリチニブフマル酸塩またはキザルチニブ塩酸塩による治療を受ける可能性があります。これらの治療に関連する有害事象については、関連する製薬会社の電子添文等を参照してください。

**注記：** 誤った検体や試薬が使用されている場合、および/またはこれらの指示に正しく従わない場合、検査結果が遅延するリスクがあり、治療の遅れにつながる可能性があります。

## 8.1. サイバーセキュリティ注意事項

- コンピューターとネットワークは保護され常に更新されていなければ、安全の脅威になります。サイバーリスクは回避可能ですので、コンピューターとネットワークのセキュリティを適切に実行する事により、データの感染、損失、若しくは破損を防ぐ事ができます。全てのコンピューターは、最新で有効なアンチウイルス・ソフトウェアで保護されている必要があります。
  - ネットワーク・トラフィックはファイアウォールでフィルターされ、保護されている必要があります。
  - ネットワークを介して機密性の高いデータを転送する等のサイバーセキュリティ・リスクを減らすため、ユーザーはローカル・コンピューターにデータを格納しなくてはならない。
  - ソフトウェアの不正使用を避けるため、ソフトウェアはローカル・ユーザー専用インストールしてください。
  - ウィンドウズとアドビ・アクロバット・リーダーが常に最新の有効セキュリティパッチに更新されている事を確認してください。
  - ウィンドウズの既定 PDF リーダーがアドビ・アクロバット・リーダーである事を確認してください。インターネット・ブラウザでサンプルとラン・レポートを開く事により、患者情報がサイバーセキュリティ・リスクにさらされる可能性があります。
  - LeukoStrat CDx *FLT3*ソフトウェアは、次のウイルス対策ソフトウェアで検証されています。
- SymantecEndpointProtection バージョン 14.3
  - McAfeeEndpointSecurity バージョン 10.7
  - ESET エンドポイントセキュリティバージョン 10.0

## 9. 検体の採取と準備

### 9.1. 注意

- ヒト由来の生物学的検体は、感染源となる物質を含む可能性があります。すべての検体は、所属施設の血液媒介病原体プログラムやバイオセーフティレベル 2 に従って取り扱ってください。
- 本検査は、ヘパリンナトリウムまたは EDTA で抗凝固処理された血液と骨髄について検証されています。

### 9.2. 阻害物質

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ない)

下記の検査の阻害物質を検討し、リューコストラット CDx FLT3 変異検査の性能には影響が無いことを確認している:

- 外因性阻害物質として 0.8 mg/mL のヘパリンナトリウムと 10% の DNA 抽出の際に洗浄に使用した緩衝液の添加で影響がなかった。
- 内因性阻害物質として 60 mg/mL のヒト血清由来のアルブミン、2 mg/mL のヘモグロビン、0.19 mg/mL (342 μM) ビリルビン、及びおおよそ 37 mM の脂質 / トリグリセリドの添加で影響がなかった。
- 汎用薬剤として 24 μg/mL のシタラピンと 180 ng/mL のダウノルピシンの添加で影響がなかった。

### 9.3. 検体の要件および取り扱い

- 9.3.1. リューコストラット CDx FLT3 変異検査には、ヘパリンナトリウムまたは EDTA によって抗凝固処理した、少なくとも 1 mL の末梢血および 0.25 mL の骨髄が必要です。
- 9.3.2. 検査前、検体は 2°C から 8°C で最長 7 日間保管できます。
- 9.3.3. 検体チューブの完全性及び検体自体が損なわれていないこと (輸送中の凍結状態等)

## 10. アッセイ手順

### 10.1. 検体の点検

- 10.1.1. 末梢血 (PB) および/または骨髄穿刺液 (BM) 検体を開梱し、セクション 9.3 に記載されている要件を満たさない検体は使用しないでください。

### 10.2. 検体処理の準備

- 10.2.1. 指定の検体処理用スペースで、検体処理を行います。
- 10.2.2. ラベル付けした 50 mL コニカルチューブ内に、検体あたり 14 mL の RPMI-1640 培地を分注します。少なくとも 1.75 時間静置して、培地を室温 (15°C から 30°C) に戻します。
  - 10.2.2.1. 15 mL コニカルチューブに冷たい RPMI-1640 培地を分注した場合には、少なくとも 45 分間室温 (15°C から 30°C) にて温めます。
- 10.2.3. ラベル付けした 15 mL コニカルチューブ内に、検体あたり 3 mL の密度勾配媒体を分注します。
  - 10.2.3.1. 密度勾配媒体が 2°C から 8°C で保管されていた場合は、使用前に分注した密度勾配媒体を室温 (15°C から 30°C) にて 1 時間温めます。

- 10.2.4. ラベル付けした適切な容積のチューブ内に、検体あたり約 200  $\mu$ L の DPBS を分注し、使用前に少なくとも 45 分間室温（15° C から 30° C）で温めます。

### 10.3. 臨床検体の希釈

**注記：** DNA 抽出に QIAcube を使用する際の説明が本マニュアルに含まれています。QIAcube が推奨されますが、必須ではありません。QIAcube を使用する際には、抽出コントロールに使用するスペースを 1 つ確保してください。

- 10.3.1. 検体チューブを 4~6 回転倒混和します。すべての検体の一定分量（1-3 mL の末梢血または 0.25-0.75 mL の骨髄）を、検体別にラベル付けした 15 mL コニカルチューブに加えます。
- 10.3.2. 一定分量の各検体に RPMI-1640 培地を加えて、全量を 6 mL とします。チューブのキャップをしっかり閉めた後 3~5 回穏やかに転倒するか、またはピペットでの出し入れを繰り返して、混合液が均一になるまで混和します。
- 残りの検体は 2° C から 8° C にて保管できます。

### 10.4. 単核球（MNC）の分離

- 10.4.1. トランスファーピペットを用いて、希釈された末梢血または骨髄検体を密度勾配媒体溶液の上に静かに重層します。密度勾配媒体を入れたチューブを傾け、上層の検体を、層が混合しないよう充分にゆっくりとピペッティングします。
- 10.4.2. 検体全体をピペッティングした後、チューブを静かに垂直な位置に戻し、キャップをしっかりと閉めます。
- 10.4.3. 15 mL コニカルチューブを以下の条件にて遠心します。ブレーキが完全にオフであることを確認してください：
- 遠心力 = 400 x g (rcf)
  - 時間 = 30 分
  - 温度 = 20° C
  - 加速 / 減速 = 最小
- 10.4.4. 処理を行う各検体ごとに、新たにラベル付けした 15 mL コニカルチューブ内に 6 mL の RPMI-1640 培地を分注します。
- 10.4.5. 遠心分離後、トランスファーピペットを用いて MNC 層をゆっくりと吸引します。採取量は 3 mL を超えないようにしてください。15 mL コニカルチューブの境界線に従って、チューブ内の総量が 3 mL 減少すると、3 mL が採取されたこととなります。
- 10.4.6. 収集した MNC 層の懸濁液を、適切にラベル付けされた、6 mL の RPMI-1640 培地を含む 15 mL コニカルチューブ内へ分注します。チューブのキャップを閉め、穏やかに 3~5 回転倒混和します。
- 10.4.7. コニカルチューブを以下の条件にて遠心します：
- 遠心力 = 355-364 x g (rcf)
  - 時間 = 10 分
  - 温度 = 20° C
  - 加速 / 減速 = 最大
- 10.4.8. チューブを 1 回だけ逆さまにして、細胞ペレットから上清を捨てた後、垂直な位置に戻します。チューブをタッピングして、残った液体にペレットを再懸濁します。タッピングは 10~15 回か、またはペレットが再懸濁されるまで行います。
- 10.4.9. 再懸濁したペレットに 1 mL の RPMI-1640 培地を加えます。チューブのキャップを閉めた後、6~8 回タッピングして穏やかに混合します。
- 10.4.10. 単核球の計数が完了するまで、検体チューブを氷水浴内に静置します。



## 10.5. 単核球の計数

- 10.5.1. 適切な細胞計数システムを用いて単核球を計数します。
- 10.5.2. アッセイに十分な量の DNA を確保するため、細胞計数に使用する量は最少になるようにします。
- 10.5.3. 細胞計数に使用したサンプルは廃棄します。

## 10.6. DNA の抽出および分離を完了するための検体の準備

- 10.6.1. 報告された濃度が  $\leq 5$  百万細胞 / mL の場合、細胞懸濁液の全量を処理します。ステップ 10.6.3 に進んでください。
- 10.6.2. QIAcube スピнкаラムには  $\leq 5$  百万細胞のみが対応可能であるため、報告された濃度が  $> 5$  百万細胞 / mL の場合には、5 百万個の生細胞 ( $V_i$ ) を含む検体量を算出します。
- 10.6.2.1. 式  $C_i V_i = C_f V_f$  を用いて、各検体の  $V_i$  を求めてください。
- $C_i$  = MNC 計数から得た細胞濃度 (細胞 / mL)
  - $C_f$  = 最終濃度 (5 百万細胞 / mL)
  - $V_f$  = 最終液量 (1 mL)
  - $V_i = \frac{(5,000,000 \text{ 細胞/mL}) \times 1 \text{ mL}}{C_i}$
- 10.6.2.2. 式  $V_f - V_i$  を用いて、 $V_i$  に加えて全量を 1000  $\mu$ L にするための RPMI-1640 培地の量を求めてください。
- 10.6.2.3. チューブを 6~8 回タッピングして、 $> 5$  百万細胞 / mL の検体を穏やかに混合します。
- 10.6.2.4. 各検体ごとに算出した量を、ラベル付けした 15 mL コニカルチューブに移します。
- 10.6.3. 細胞懸濁液を含んだ 15 mL コニカル検体チューブを以下の条件にて遠心します：
- 遠心力 = 355-364 x g(rcf)
  - 時間 = 10 分
  - 温度 = 20° C
  - 加速 / 減速 = 最大
- 10.6.4. トランスファーピペットを用いて、細胞ペレットから上清を吸引します。少量の培地が残っても構いません。
- 10.6.5. 15 mL コニカルチューブを、10~15 回か、またはペレットがチューブから遊離するまでタッピングします。
- 10.6.6. 200  $\mu$ L の DPBS を加え、チューブを 10~15 回タッピングして穏やかに混合し、細胞を再懸濁します。キャップを閉めた検体を氷水浴内に静置します。

## 10.7. QIAcube 自動化ステーションの準備

**注記:** DNA 抽出に QIAcube を使用する際の説明が本マニュアルに含まれています。QIAcube は推奨されますが、必須ではありません。DNA 抽出は、Qiagen DNA Blood Mini Kit を用いて、QIAcube を使用せずに実施可能です。

- 10.7.1. 以下に述べる事項以外の記載がない限り、QIAcube 自動化ステーションのすべての工程には、製造者の指示に従った設置、操作、校正、洗浄および保守の手順が含まれます。
- 10.7.2. QIAcube 自動化ステーションの保守は QIAgen ガイドラインに従って行いますが、一つだけ例外があります。気密試験は 6 か月おきではなく、毎月行ってください。
- 10.7.3. QIAcube 自動化ステーションの使用準備を行い、機器内へ材料および試薬をロードします。
  - 10.7.3.1. QIAcube は最大 12 チューブまで処理できますが、1 つのスペースを抽出コントロール（抽出汚染コントロールおよび PCR 陰性コントロールとして使用）用に確保します。遠心バランスが取れないため、1 または 11 チューブは使用できません。
  - 10.7.3.2. 抽出コントロールを含む抽出数が 11 チューブになる場合には、DPBS を用いたブランクチューブが使用できます。
- 10.7.4.  $-30^{\circ}\text{C}$  から  $-15^{\circ}\text{C}$  の冷凍庫から抽出コントロール (EC) のチューブを取り出し、室温 ( $15^{\circ}\text{C}$  から  $30^{\circ}\text{C}$ ) で解凍します。コントロール EC のチューブは使用後に冷凍庫へ戻します。凍結融解を行った回数を記録してください。
- 10.7.5. EC チューブを最大スピードで 5~15 秒間ボルテックスします。蓋に液体が付着した場合には、チューブを 2~5 秒間遠心します。検体チューブに 200  $\mu\text{L}$  の抽出コントロールを加えます。この EC チューブのキャップを閉め、機器の準備ができるまで、 $2^{\circ}\text{C}$  から  $8^{\circ}\text{C}$  で保管します。

## 10.8. DNA 抽出

**注記:** DNA 抽出に QIAcube を使用する際の説明が本マニュアルに含まれています。QIAcube は推奨されますが、必須ではありません。DNA 抽出は、Qiagen DNA Blood Mini Kit を用いて、QIAcube を使用せずに実施可能です。

- 10.8.1. ピペットによる細胞懸濁液の出し入れを (10.6.6 より) 4~6 回行って細胞を再懸濁します。細胞の DPBS 懸濁液の全量を検体チューブに移します。溶液の大部分がチューブの底にあることを確認します。
- 10.8.2. 抽出コントロール検体チューブを実行の最後に配置します。
- 10.8.3. 残りのすべての検体チューブ、試薬、および分注したプロテアーゼ溶液を機器内にロードします。
- 10.8.4. 次の事項が選択されていることを確認して、実行を開始します。
  - 10.8.4.1. QIAamp DNA Blood Mini プロトコルを使用
  - 10.8.4.2. 出発物質として血液または体液を選択
  - 10.8.4.3. 溶出量を 100  $\mu\text{L}$  に設定
- 10.8.5. 抽出完了後、DNA 検体チューブのキャップを閉め、定量を行うまで  $2^{\circ}\text{C}$  から  $8^{\circ}\text{C}$  にて保管します。



## 10.9. DNA の定量および希釈

- 10.9.1. 以下に述べる事項以外の記載がない限り、微量 UV 分光光度計のすべての工程には、製造者の指示に従った設置、操作、校正、洗浄および保守の手順が含まれます。
- 10.9.2. DNA 検体チューブを最大スピードで 5 から 15 秒間ボルテックスします。微量遠心分離機により DNA 検体チューブを 2 から 5 秒間遠心して、蓋に付着した液体を除去します。
- 10.9.3. 2  $\mu$ L の AE バッファを機器のブランクとします。
- 10.9.4. 各 DNA 検体につき、一度に 2  $\mu$ L を読み取ります。
- 10.9.5. 読み取った DNA 検体の濃度が  $\leq 9.4$  ng /  $\mu$ L であった場合には、新しい 2  $\mu$ L の分割量を用いて DNA 検体をさらに 2 回定量します。微量 UV 分光光度計の不正確な読み取りを避けるため、検体が十分に混合されたことを確認してください。3 回の読み取りの平均を最終的な DNA 濃度とみなします。

**注記:** 最終的な定量値が  $\leq 9.4$  ng /  $\mu$ L であった場合、その DNA 検体をリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査によって検査することはできません。十分な DNA を得るため、検体を再処理してください。

**注記:** 抽出コントロールの最終的な定量値が  $\leq 9.4$  ng /  $\mu$ L であった場合、それに関連する DNA 検体をリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査によって検査することはできません。十分な DNA を得るため、検体を再処理してください。

- 10.9.6. 未希釈の DNA 検体は、 $-30^{\circ}$  C から  $-15^{\circ}$  C にて最長一年間保管できます。あるいは、未希釈または 10 ng /  $\mu$ L に希釈した DNA 検体は、 $2^{\circ}$  C から  $8^{\circ}$  C にて最長 7 日間保管できます。

**注記:** 未希釈の DNA には、凍結／融解サイクルを 5 回まで行うことができます。

- 10.9.7.  $\geq 10.5$  ng /  $\mu$ L の DNA 検体は、表面が非吸着性のチューブ内で、AE バッファにより 10 ng /  $\mu$ L に希釈する必要があります。式  $C_i V_i = C_f V_f$  を用いて、表 4 から 最終液量 ( $V_f$ ) を選択後、 $V_i$  を求めてください。

- $V_i = \frac{V_f \times 10 \text{ ng} / \mu\text{L}}{C_i}$
- $C_i$  = 微量 UV 分光光度計読み取り値からの DNA 濃度
- $C_f$  = 最終 DNA 濃度 (10 ng /  $\mu$ L)
- $V_i$  = 希釈されるべき未希釈の DNA 量
- $V_f$  = 希釈された DNA の最終液量 (表 4 より)
- $V_f - V_i$  =  $V_i$  に添加すべき AE バッファの量

**表 4:** 定量値による最終液量の決定

微量 UV 分光光度計からの DNA 濃度 ( $C_i$ )	最終液量 ( $V_f$ )
$C_i \leq 9.4$ ng / $\mu$ L	検査不可
$9.5 \leq C_i \leq 10.4$ ng / $\mu$ L	そのまま検査
$10.5 \leq C_i \leq 50.4$ ng / $\mu$ L	35 $\mu$ L
$50.5 \leq C_i \leq 200.4$ ng / $\mu$ L	100 $\mu$ L
$C_i \geq 200.5$ ng / $\mu$ L	180 $\mu$ L

## 10.10. 増幅

- 注記:** ITD または TKD 検査を実行するためには、本セクションのすべてのステップを一日で完了させること。  
**注記:** マスターミックスの光への曝露を最小限にすること。  
**注記:** Taq が  $-30^{\circ}\text{C}$  から  $-15^{\circ}\text{C}$  の保管状態から取り出される時間を最小限にすること。

- 10.10.1. VeritiDx サーマルサイクラーのインストール、操作、校正、清掃、およびメンテナンスを含むすべてのステップは、以下で特に断りのない限り、製造元の指示に従った手順で実行します。
- 10.10.2. すべてのマスターミックス (ITD マスターミックス、および TKD マスターミックス) を室温 ( $15^{\circ}\text{C}$  から  $30^{\circ}\text{C}$ ) にて解凍します。コントロールチューブ (ITD 陽性コントロール、TKD 陽性コントロール、抽出コントロール、および NTC<No Template Control、テンプレートを含まないコントロール) を適切な保管場所から取り出し、室温 ( $15^{\circ}\text{C}$  から  $30^{\circ}\text{C}$ ) にて解凍します。コントロールチューブは使用後に冷凍庫へ戻します。凍結・解凍を行った回数を記録してください。試薬を室温 ( $15^{\circ}\text{C}$  から  $30^{\circ}\text{C}$ ) に戻している間、96-ウェルプレートを ITD PCR または TKD PCR 用であることが識別可能になるようにラベル付けします。

- 注記:** すべての検体の検査が、抽出コントロールが付随する同じ PCR プレート上で実行されるようにしてください。

- 10.10.3. ITD および TKD プレートにおける検査に必要なプレートウェル数 (検体、TKD 陽性コントロール、ITD 陽性コントロール、抽出コントロール、および NTC<No Template Control、テンプレートを含まないコントロール) を決定します。ITD または TKD プレートあたりの、検査に必要なプレートウェルの総数 =  $X$  とします。少量の試薬をピペティングした際の変動を避けるため、 $X$  の最小値は 2 とします。

- 10.10.3.1. 必要なマスターミックスおよび Taq の量を算出します。この計算では、45  $\mu\text{L}$  の ITD または TKD に  $(X+3)$  を乗じ、0.2  $\mu\text{L}$  の Taq に  $(X+3)$  を乗じます。ピペティングのエラーを補うため、 $X$  にはさらに 3 検体を追加します。

- 10.10.4. マスターミックス、コントロール、および DNA 検体チューブを最大スピードで 5 から 15 秒間ボルテックスします。
- 10.10.5.  $-30^{\circ}\text{C}$  から  $-15^{\circ}\text{C}$  の保管場所から Taq を取り出します。ボルテックスはしないでください。
- 10.10.6. 微量遠心分離機によりすべてのチューブ (Taq を含む) を 2 から 5 秒間遠心して、蓋に付着した液体を除去します。
- 10.10.7. ITD および TKD プレートに使用するため、ラベル付けした適当な容積のチューブに、算出した量のマスターミックスおよび Taq を加えます。
- 10.10.8. チューブのキャップを閉め、最大スピードで 5 から 15 秒間ボルテックスして混合します。可能な場合、微量遠心分離機を使用して 2 から 5 秒間遠心してください。Taq を  $-30^{\circ}\text{C}$  から  $-15^{\circ}\text{C}$  の保管場所へ戻します。
- 10.10.9. マスターミックスと Taq の混合液の 45  $\mu\text{L}$  を、PCR プレートレイアウトの適切なウェルに分注します。
- 10.10.10. PCR プレートレイアウトに従い、96-ウェルプレートの適切なウェルに、10 ng/ $\mu\text{L}$  の DNA 検体およびコントロールを 5  $\mu\text{L}$  加えます。
- 10.10.11. PCR プレートの列をウェルストリップでシールします。96-ウェルプレートを  $1400\times g$  にて 1 分間遠心します。
- 10.10.12. PCR プレートを Veriti Dx サーマルサイクラーに配置して蓋を閉めます。表 5 に示すステップによってサーマルサイクラーをプログラミングします。

表 5: PCR 増幅用サーマルサイクラープログラム

ステップ	FLT3 ITD CDx 用プログラム	FLT3 TKD CDx 用プログラム
1	95° C、11 分	94.5° C、11 分
2	94° C、30 秒	93.5° C、30 秒
3	57° C、60 秒	56.5° C、60 秒
4	72° C、2 分	71.5° C、2 分
5	ステップ 2 から 4 を 24 回反復	ステップ 2 から 4 を 28 回反復
6	94° C、30 秒	93.5° C、30 秒
7	60° C、45 分	59.5° C、45 分
8	4° C に保持	4° C に保持
ランプ速度、75%。		

- 10.10.13. Run を押して次のスクリーンに進みます。反応量が 50 µL、カバー温度が 105.0° C に設定されていること、および作動時にカバーが加熱されることを確認してください。Start Run Now を押して、PCR を開始します。
- 10.10.14. 残りの試薬および DNA は保管します。開封したマスターミックスは -30° C から -15° C で保管してください。凍結融解を行った回数を記録してください。
- 10.10.15. PCR 完了後、PCR プレートは 2° C から 8° C で最大 72 時間まで保管できます。保管しない場合には、TKD プレートは制限酵素による消化へ、ITD プレートはキャピラリー電気泳動による検出へと進みます。

#### 10.11. 制限酵素による消化（TKD 変異のみ）

**注記:** 本セクションのすべてのステップは一日で完了させること。

**注記:** 制限酵素による消化は、TKD の増幅産物のみに行ってください。

**注記:** EcoRV が -30° C から -15° C の保管状態から取り出される時間を最小限にすることが推奨されます。

- 10.11.1. NEBuffer r3.1 のチューブを室温（15° C から 30° C）で解凍します。
- 10.11.2. 試薬を室温（15° C から 30° C）に戻している間、96-ウェルプレートが TKD 消化用であると識別可能になるようにラベルを付します。
- 10.11.3. プレートでの消化に必要なプレートウェル数（検体およびコントロール）を決定します。消化される検体の総数 = Y とします。少量の試薬をピペティングした際の変動を避けるため、Y の最小値は 4 とします。
- 10.11.3.1. 必要な消化用混合液の量を算出します。この計算では、1.1 µL の NEBuffer<sup>™</sup> r3.1 に (Y+6) を乗じ、0.5 µL の EcoRV に (Y+6) を乗じます。ピペティングのエラーを補うため、Y にはさらに 6 検体を追加します。
- 10.11.4. NEBuffer r3.1 チューブを最大スピードで 5 から 15 秒間ボルテックスします。
- 10.11.5. -30° C から -15° C の保管場所から EcoRV を取り出します。ボルテックスはしないでください。
- 10.11.6. 微量遠心分離機によりすべてのチューブ（EcoRV を含む）を 2 から 5 秒間遠心して、蓋に付着した液体を除去します。
- 10.11.7. ラベル付けした適当な容積のチューブに、算出した量の NEBuffer<sup>™</sup> r3.1 および EcoRV を加えます。
- 10.11.8. 5 から 10 回ピペティングして溶液を混合します。EcoRV を -30° C から -15° C の保管場所へ戻します。
- 10.11.9. 消化用混合液の 1.5 µL を、消化用プレートの適切なウェルに分注します。

- 10.11.10. サーマルサイクラーまたは 2° C から 8° C の保管場所から TKD PCR プレートを取り出し（プレートを室温に温める必要はありません）、1400×g にて 1 分間遠心します。
- 10.11.11. 8.5 µL の検体を PCR プレートから消化用プレートの適切なウェルに加えます。消化用プレートの列をキャップストリップでシールします。
- 10.11.12. プレートを 1400×g にて 1 分間遠心します。
- 10.11.13. 消化用プレートを Veriti Dx サーマルサイクラーに配置して蓋を閉めます。
- 10.11.14. 以下に示すステップによってサーマルサイクラーをプログラミングします（ランプ速度は 75%）。
- ステップ 1: 37° C、1 時間
  - ステップ 2: 65° C、10 分
  - ステップ 3: 4° C に保持
- 10.11.15. Run を押して次のスクリーンに進みます。反応量が 10 µL、カバー温度が 105.0° C に設定されていること、および作動時にカバーが加熱されることを確認してください。Start Run Now を押して、PCR を開始します。
- 10.11.16. 消化プロトコルの完了後、消化用プレートは 2° C から 8° C で最大 72 時間まで保管できます。光への曝露は最小限にしてください。保管しない場合には、キャピラリー電気泳動による検出へと進みます。

## 10.12. キャピラリー電気泳動による検出

**注記:** 2° C から 8° C の保管場所以外に Liz サイズスタンダードチューブを配置する時間は、最小限にしてください。

**注記:** 3500xL Dx は、96-ウェルプレート上で縦列 3 × 横列 8 を含む 24 キャピラリーのセットによりインジェクションと呼ばれる動作を実行します。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独立してプログラミング可能ですが、部分的なインジェクションはできません。

- 10.12.1. 3500xL Dx の据え付け、操作、校正、清掃、およびメンテナンスを含むすべてのステップは、以下で特に断りのない限り、製造元の指示に従った手順で実行します。
- 10.12.2. ITD および TKD アッセイは、異なったインジェクション条件により、異なったインジェクションとして実行する必要があります。3500xL Dx ITD および TKD の条件を以下の表 6 に示します。これらの設定は今後の使用のため 3500xL Dx に保存できます。

表 6: 3500xL Dx Genetic Analyzer の条件

パラメータ	ITD CDx アッセイパラメータ	TKD CDx アッセイパラメータ
インジェクション時間	12 秒	7 秒
インジェクション電圧	1.2 キロボルト	1.0 キロボルト
キャピラリーの長さ	50 cm	
ポリマー	POP-7	
色素セット	G5	
オープン温度	60° C	
ランタイム	1630 秒	
ラン電圧	19.5 キロボルト	
プレランタイム	180 秒	
プレラン電圧	15 キロボルト	
データ遅延	1 秒	

- 10.12.3. Refresh をクリックして、消耗品の機器における使用回数および 3500xL Dx ダッシュボード上で行ったインジェクション数を更新します。3500xL Dx のダッシュボードをチェックして、バッファー、ポリマー、およびキャピラリーが、表 7 に示す、この機器での本アッセイにおける最大許容時間を超えていないことを確認してください。POP-7 用に残っている検体数（インジェクション用のみではない）がランに十分であることを確認してください。消耗品の交換が必要な場合には、始める前に必要な保守を行ってください。

表 7: 3500xL Dx 材料の最大許容使用時間

3500xL Dx 材料	機器での最大許容使用時間
POP-7 ポリマー	7 日間
陰極バッファー	7 日間
陽極バッファー	7 日間
3500xL Dx キャピラリーアレイ	160 インジェクション

### 10.13. サイズスタンダード溶液の準備（必要な場合）

- 10.13.1. サイズスタンダード溶液は、Liz サイズスタンダードと HIDI ホルムアミドの混合液から構成されます。
- 10.13.2. 入手できる場合、サイズスタンダード溶液のチューブを 2° C から 8° C の保管場所から取り出して、ステップ 10.13.6 へ進みます。入手できない場合、次の 3 ステップに従ってサイズスタンダード溶液チューブを調製します。
- 10.13.3. HIDI ホルムアミドのボトルを室温（15° C から 30° C）で解凍します。Liz サイズスタンダードのチューブを 2° C から 8° C の保管場所から取り出します。新たに開封した Liz サイズスタンダードの開封日をラベルに記載します。
- 10.13.4. チューブを最大スピードで 5 から 15 秒間ボルテックスします。微量遠心分離機を使用してチューブを 2 から 5 秒間遠心します。
- 10.13.5. 59  $\mu$ L の Liz サイズスタンダードを 1050  $\mu$ L の HIDI ホルムアミドに加えます。サイズスタンダード溶液のチューブのラベルに日付と Liz サイズスタンダードのロット番号を記載します。開封した Liz サイズスタンダードは 2° C から 8° C で保管します。
- 10.13.6. サイズスタンダード溶液チューブを最大スピードで 5 から 15 秒間ボルテックスします。微量遠心分離機を使用して混合液のチューブを 2 から 5 秒間遠心します。未使用の溶液はいずれも 2° C から 8° C で最長 7 日間まで保管できます。7 日間を過ぎたものは廃棄してください。

### 10.14. 検体プレートの準備

- 10.14.1. 96-ウェルの ITD PCR および / または TKD 消化用プレートを 1400 $\times$ g にて 1 分間遠心します。
- 10.14.2. 96-ウェルプレートを ITD CE および / または TKD CE であることが識別可能になるようにラベル付けします。

**注記:** ITD および TKD アッセイは、同じキャピラリー電気泳動 (CE) プレート上で実施できますが、インジェクションは別々に行う必要があります。

- 10.14.3. 実施に必要なインジェクション数を決定し、 $x$  = インジェクション数とします。インジェクションの総数に 24 を乗じ、4 を加えます ( $24x + 4$ )。必要なサイズスタンダード溶液の最大量は 9.5  $\mu$ L に ( $24x + 4$ ) を乗じたものになります。ピペティングのエラーを補うため、 $x$  にはさらに 4 検体を追加します。
- 10.14.4. 9.5  $\mu$ L のサイズスタンダード溶液を、検体を含んだ CE プレートのウェルに加えます。9.5  $\mu$ L のサイズスタンダード溶液または HIDI ホルムアミドのみを、検体を含まずにインジェクトする残りのウェル (24 の倍数) に加えます。

**注記:** 一回のインジェクションの 24 ウェルはすべて、サイズスタンダード溶液と混合した検体、サイズスタンダード溶液のみ、またはHIDI ホルムアミドのみを含むようにしてください。

- 10.14.5. PCR ウェル (ITD のみ) または消化ウェル (TKD のみ) それぞれから、0.5 µL の PCR 産物または消化産物を、CE プレートの対応するウェルへ電動マルチチャンネルピペットを用いて移します。

**注記:** シングルチャンネルピペットは、個別のウェルの再検査時に、PCR 産物 / 消化産物を移すために使用します。

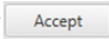
- 10.14.6. CE プレートをホイルシールによってシールした後、1400×g にて 1 分間遠心します。
- 10.14.7. CE プレートを Veriti Dx サーマルサイクラーに配置して蓋を閉めます。
- 10.14.8. 以下に示すステップによってサーマルサイクラーをプログラミングします (ランプ速度は 75%)。
- ステップ 1: 95° C、3 分
  - ステップ 2: 4° C、5 分
- 10.14.9. Run を押して次のスクリーンに進みます。反応量が 10 µL、カバー温度が 105.0° C に設定されていること、および作動時にカバーが加熱されることを確認してください。Start Run Now を押して、PCR を開始します。
- 10.14.10. PCR 完了後、プレートウェルを目視して気泡がないことを確認します。気泡がみられた場合、CE プレートを 1400×g にて 1 分間遠心して除去します。
- 10.14.11. 各 CE プレートを 3500xL Dx 96-ウェルプレートベースに配置してアSEMBリします。ノッチのある角が合っていることを確認してください。ホイルシールを除き、プレート上に新しい 96-ウェルプレートセプタを配置します。セプタが平らで、すべてのセプタの穴が塞がっていないことを確認してください。3500xL Dx 96-ウェルプレートリテーナーを乗せてパチンと留めます。

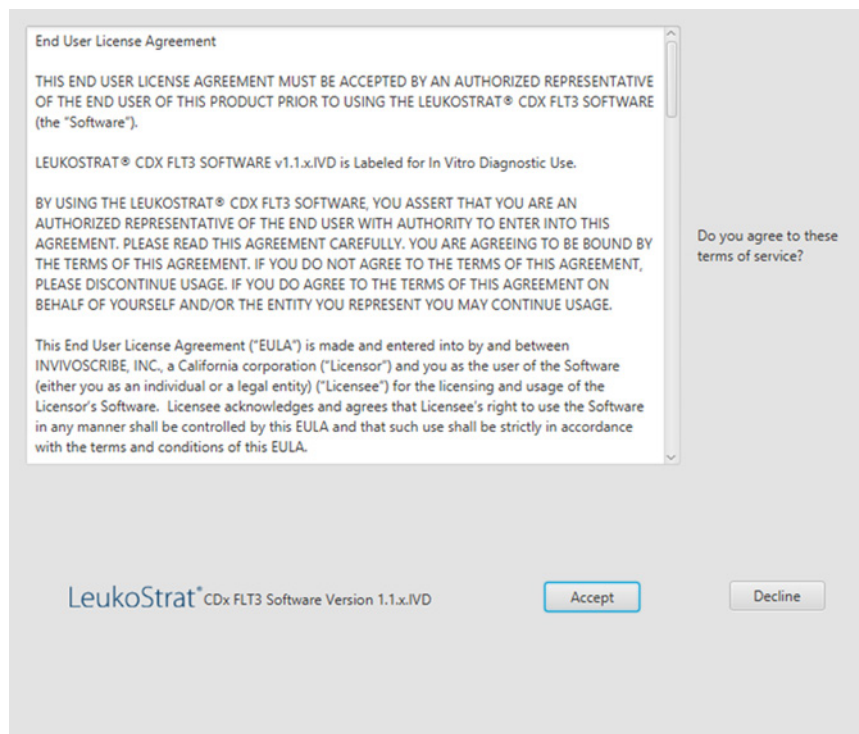
## 10.15. リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアによる PlateMapper のセットアップ

**注記:** リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアをインストールする際には、管理者 (アドミニストレーター) 権限が必要です。

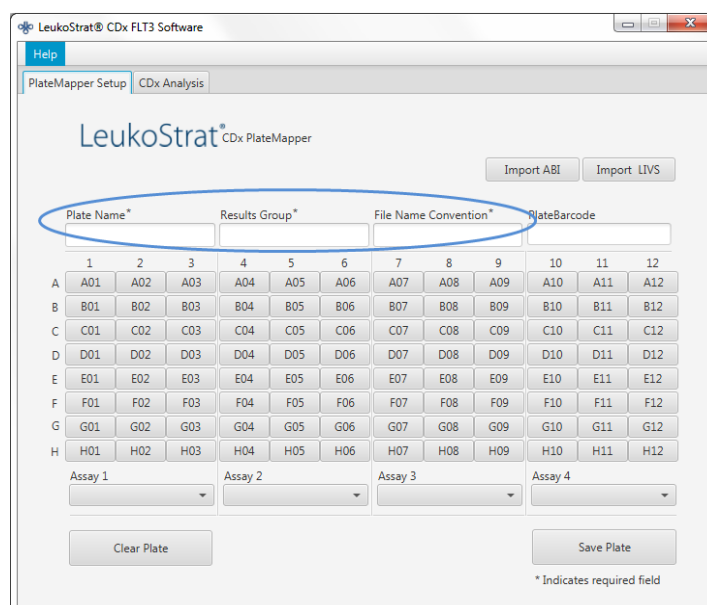
- 10.15.1. リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアをインストールします。
- 10.15.1.1. *LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi* インストーラーを、ソフトウェア CD からコンピュータのローカルドライブへコピーします。
- 10.15.1.2. **“LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi”** ファイルをダブルクリックします。
- 10.15.1.2.1. *msi* ファイルをダブルクリック後、*Microsoft Defender SmartScreen* メッセージが表示される場合は、**“More info”** をクリックしてください。
- 10.15.1.2.2. 発行者が Invivoscribe, Inc. であることを確認してください。インストールを続行するため、**“Run anyway”** をクリックしてください。
- 10.15.1.3. *LeukoStratCDx-1.1.x.IVD.msi* セットアップウィザードボックスが表示されます。**“Next”** をクリックしてください。
- 10.15.1.4. デフォルトのインストールの場所は、*C:\Invivoscribe\LeukoStratCDx-1.1.x.IVD* です。**“Next”** をクリックしてください。
- 10.15.1.5. **“Install”** をクリックしてください。インストールが開始されます。
- 10.15.1.6. *A User Account Control* ダイアログボックスが表示されます。**“Yes”** をクリックしてください。
- 10.15.1.7. **“Finish”** をクリックして、セットアップウィザードを終了してください。



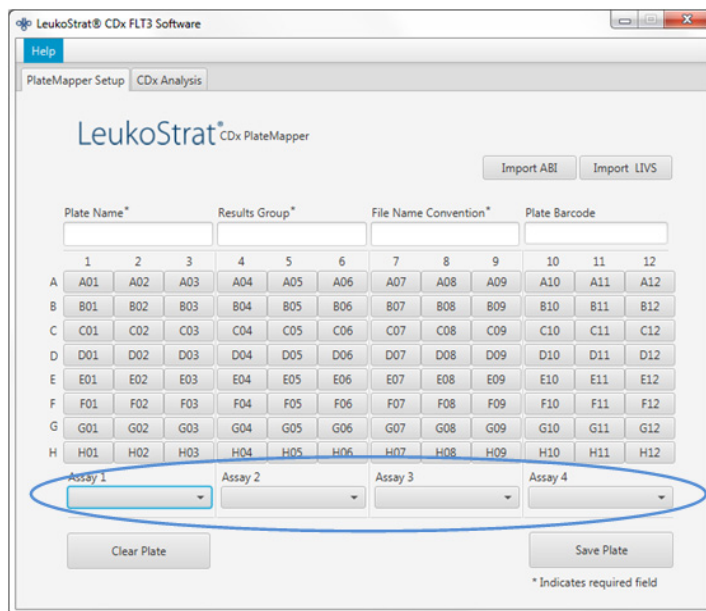
- 10.15.2. リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアを開きます。“Accept” (  ) をクリックして、サービス条件に同意してください。




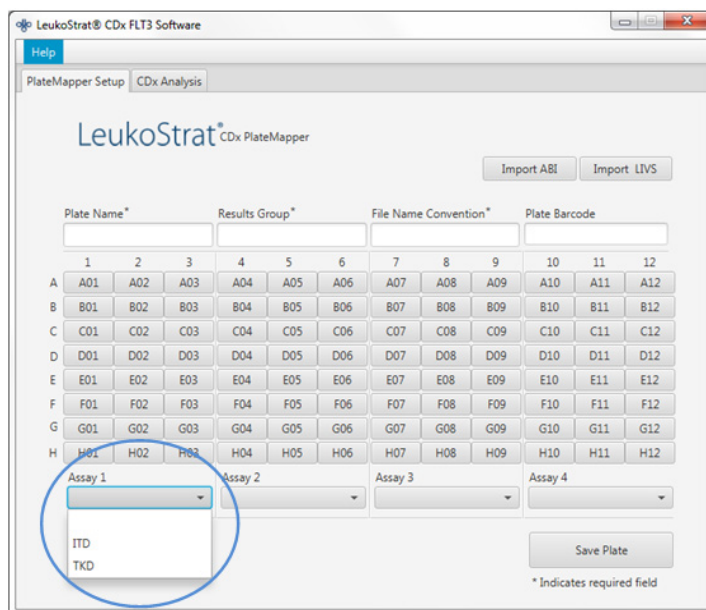
- 10.15.3. PlateMapper Setup 内で、プレートマップの上にある 3 つの必須フィールドに入力してください。必須フィールドは “Plate Name”, “Results Group”, および “File Name Convention” です (下図の丸で囲んだ部分)。
- 10.15.3.1. プレートマップ名に使用できるのは、[A-Z, a-z, 0-9]、シングルスペース、およびハイフンを含む 50 字以内です。
- 10.15.3.2. “Results Group” および “File Name Convention” エントリーは、3500xL Dx (ステップ 10.16.13 で選択) においてユーザーによりプログラムされた対応するエントリーの名前と一致している必要があります。



- 10.15.4. プレートマップでは、プレートあたり 4 回のアッセイが可能です（アッセイあたり 3 つの縦列）。各アッセイは、3500xL Dx の作動中に実行されるインジェクションに対応します。アッセイはインジェクションあたり一回のみ実行できます（ITD または TKD）。



- 10.15.5. ドロップダウンメニューからアッセイを選択してください（）。これは、その上にある PlateMapper Setup スクリーン内に表示される検体に対応します。



- 10.15.6. プレートマップ内で、各ウェルに対し、検体またはコントロールのどちらを分析するかについての情報を入力します。

**注記:** ウェルの情報入力時には、抽出コントロール（EC）、陽性コントロール（PC）、および NTC（No Template Control、テンプレートを含まないコントロール）を最初に入力する必要があります。コントロールは最初の 3 つのウェルに限らず、プレートのどこにでも置くことができます。SAMPLE ウェルは、対応する抽出コントロールと関連付ける必要があるため、後で入力してください。陽性コントロールと NTC は抽出コントロールとリンクしていません。



- 10.15.6.1. 情報を入力するには、それぞれのウェル（例えば A01）の上をクリックしてください。以下のようなボックスが開きます。

- 10.15.7. そのウェルを表す検体名を Sample Name に入力します。検体名に使用できるのは、[A-Z, a-z, 0-9]、シングルスペース、およびハイフンを含む 50 字以内です。
- 10.15.7.1. ユーザーはまた検体名を、Thermo Fisher Scientific 社の 3500 プレートレイアウトファイルのバージョン 1.0 を使って、プレートマップにインポートすることもできます。3500 プレートレイアウトファイルに検体名を入力して “Import ABI” ボタンを使ってインポートします。

10.15.8. ドロップダウンメニューからウエルの Sample Type を選択してください。選択オプションは以下のとおりです：

- SAMPLE = 未知
- EC = Extraction Control （抽出コントロール）
- NTC = No Template Control （テンプレートを含まないコントロール）
- PC= Positive Control （陽性コントロール）

The screenshot shows the 'LeukoStrat<sup>®</sup> CDx Edit Well' window. The 'Sample Name' field is empty. The 'Well ID' is 'A01'. The 'Sample Type' dropdown menu is open, displaying a list of options: 'SAMPLE' (highlighted), 'EC', 'NTC', 'PC', and 'EC'. To the right of the dropdown is a '+' button. Below the dropdown is another dropdown menu. At the bottom of the window are 'Clear Well' and 'Save Well' buttons.

10.15.8.1. ドロップダウンメニューから Run 番号を選択してください。新規のラン番号を追加するには、ドロップダウンメニューの隣にある “+” サインをクリックします。

**注記：** “ラン” は、すべての検体、一つの陽性コントロール、テストされる検体に付随するすべての抽出コントロール、および一つの NTC により定義されます。ランは複数のインジェクションにわたることがあり、複数のランが一つのプレートで試験される場合があります。

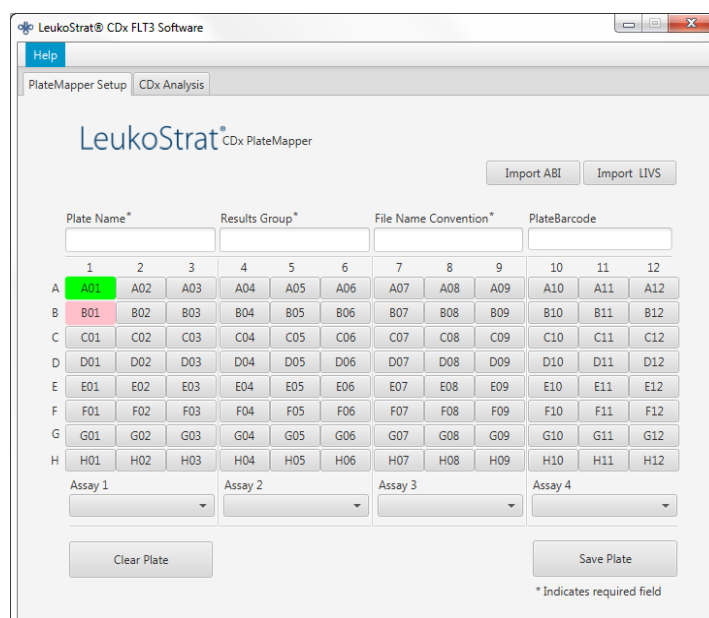
The screenshot shows the 'LeukoStrat<sup>®</sup> CDx Edit Well' window. The 'Sample Name' field contains 'Test1'. The 'Well ID' is 'A01'. The 'Sample Type' dropdown menu is set to 'SAMPLE'. The 'Run' dropdown menu is open, showing the number '1' (highlighted). To the right of the dropdown is a '+' button. Below the dropdown is another dropdown menu. At the bottom of the window are 'Clear Well' and 'Save Well' buttons.

- 10.15.8.2. ドロップダウンメニューから関連する EC を選択してください (Sample Type が “SAMPLE” の場合のみに必要です)。一つの抽出コントロールに関連するのは最大 11 検体です。

- 10.15.9. 検体またはコントロールについての追加コメントは、“Sample Notes” フィールドに入力します。入力したコメントは、Sample Report にて見ることができます。
- 10.15.10. ウェルの情報をすべて入力した後、“Save Well” をクリックして保存してください。ウェルの入力内容を消去するには “Clear Well” をクリックします。

- 10.15.11. ウェルの保存後、プレートマップのそのウェルの色が変化します。ウェルのセットアップが正しく行われると、そのウェルは緑色になります（下図を参照）。ウェルのセットアップで何か不足していたり間違っていると、そのウェルは赤色になります（下図を参照）。

**注記：** 正しい場合、抽出コントロールのウェルの色はそのウェルの上にカーソルが置かれるまで緑色に変わりません。



- 10.15.12. PlateMapper Setup スクリーン上で、分析するプレートのすべてのウェルが緑色になるまで入力が続けます。

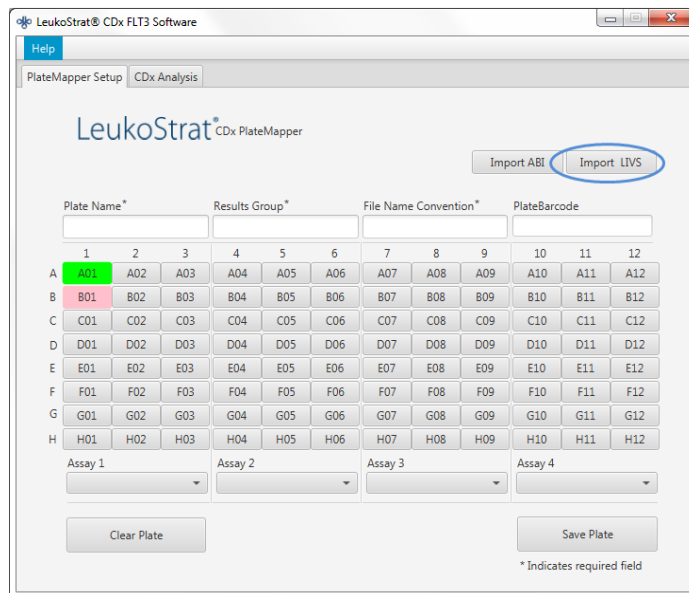
- 10.15.13. すべてのウェルに入力後、“**Save Plate**” をクリックすると、ソフトウェアによって作成された ABI ファイル（3500 Plate Layout File Version 1.0）および LIVS ファイルへの保存が促されます。プレートセットアップごとに、ABI ファイルと LIVS ファイルがそれぞれ一つずつ作成されます。

**注記：** リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアによって作成された ABI ファイルを変更しないでください。変更すると 3500xL Dx へのアップロード時にエラーとなります。

**注記：** プレートマップが生成された後、LeukoStrat CDx FLT3 ソフトウェアが閉じられない場合、出力ファイルで自動的に割り当てられた実行 ID は固有のものではなく、複数の実行にわたって繰り返されます。

10.15.13.1. 作成された LIVS ファイルは、“Import LIVS” をクリックした後、保存場所へ進んで確認できます。

**注記：** Import LIVS の機能は、プレートセットアップの確認のみです。別のランで使用する新しいプレートマップ作成のために、LIVS ファイルを変更することはできません。変更するとエラーになります。



10.15.14. 3500xL Dx の実行が完了後、ユーザーはソフトウェアを続行します。

10.15.15. リューコストラット CDx FLT3ソフトウェアによって作成された ABI ファイルを用いて、プレートを 3500xL Dx にアップロードします。

10.15.16. 3500xL Dx でのプレートの保存に失敗した場合、表 8 の推奨事項に従ってください。さらに援助等が必要な場合は、Invivoscribe テクニカルサポート ([support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com)) までご連絡ください。

表 8: プレート保存エラーメッセージおよび解決策

プレート保存エラーメッセージ [コード]	可能性のある原因	解決策
-Corrupted sample detected. (検体の破損が検出される) [PM01] -Could not detect well for object UUID. (オブジェクト UUID に対するウェルを検出できない) [PM02] -Control detected unknown links for well (A-H, 01-12). (コントロールがウェル (A-H, 01-12) への不明なリンクを検出する) [PM03]	変更された .LIVS ファイルをアップロードしようとしている。	.LIVS ファイルを変更しないでください。ファイルが破損した場合には、新しい .LIVS ファイルを作成してください。
-Missing required field “Plate Name”. (必須フィールドの “Plate Name” がみつからない) [PM04] -Illegal character detected in “Plate Name”. (“Plate Name” に不法な文字が検出される) [PM05] -Multiple spaces detected in “Plate Name”. (“Plate Name” に複数のスペースが検出される) [PM06] -Plate Name must be 50 characters or less. (Plate Name は 50 文字以内) [PM28]	プレートに名前を付ける際、IFU の指示に従っていない。	プレートマップ名に使用できるのは、[A-Z, a-z, 0-9]、シングルスペース、およびハイフンを含む 50 字以内です。
-Missing required field “Result Group” (必須フィールドの “Result Group” がみつからない) [PM07]	Result Group に名前を付ける際、使用説明書の指示に従っていない。	Result Group は、3500xL Dx 上で定義されています。

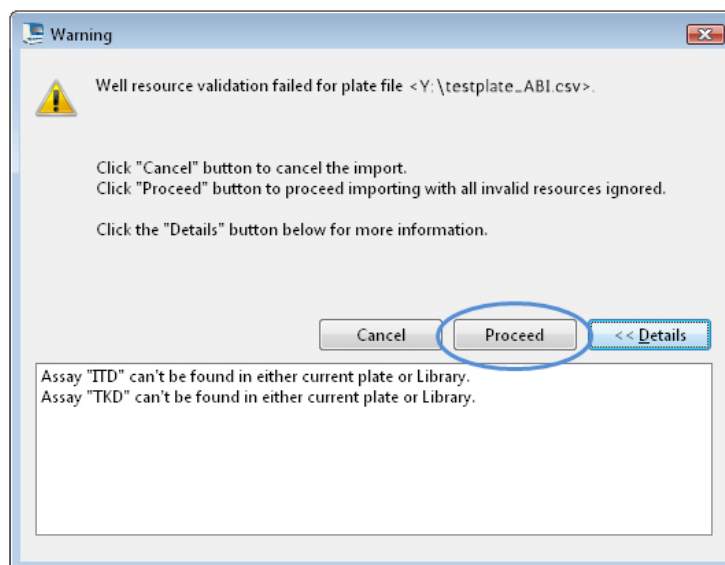
表 8: プレート保存エラーメッセージおよび解決策

プレート保存エラーメッセージ [コード]	可能性のある原因	解決策
-Missing required field “File Naming Convention”. (必須フィールドの “File Naming Convention” がみつからない) [PM08]	File Naming Convention に名前を付ける際、使用説明書の指示に従っていない。	File Naming Convention は、3500xL Dx 上で定義されています。
-Assay not selected for all samples. (アッセイがすべての検体に対して選択されていない) [PM09] -Run contains more than 1 Assay type. (ランに複数のアッセイタイプが含まれている) [PM10]	アッセイタイプを指定する際、使用説明書の指示に従っていない。	すべてのウェルにアッセイタイプを指定する必要があります。また、ランに含めることのできるアッセイタイプは 1 つのみです。
-Sample name not detected for well (A-H, 01-12). (ウェル (A-H, 01-12) の検体名が検出されない) [PM11] -Illegal character detected in Sample Name. (Sample Name に不法な文字が検出される) [PM12] -Multiple spaces detected in Sample Name. (Sample Name に複数のスペースが検出される) [PM13] -Sample name must be 50 characters or less. (Sample Name は 50 文字以内) [PM14]	検体に名前を付ける際、使用説明書の指示に従っていない。	検体名に使用できるのは、[A-Z, a-z, 0-9]、シングルスペース、およびハイフンを含む 50 字以内です。
-Sample Type not selected for well (A-H, 01-12) (ウェル (A-H, 01-12) の検体タイプが選択されていない) [PM15].	検体タイプを選択する際、使用説明書の指示に従っていない。	すべてのウェルに検体タイプを指定する必要があります。選択肢は PC、NTC、EC、および SAMPLE です。
-Run not selected for well (A-H, 01-12) (ウェル (A-H, 01-12) のランが選択されていない) [PM16] -No Runs created for Plate. (プレートにランが設定されていない) [PM17]	ランを選択する際、使用説明書の指示に従っていない。	すべてのウェルにランを指定する必要があります。最初のウェルにランを指定した後、ユーザーはランカウントを増やす必要があります (“+” ボタンは Run 選択の隣にあります)。それに続くウェルに対しては、ランカウントを増やすか、または以前に使用したランカウントを選択できます。
-EC not selected for well (A-H, 01-12) (ウェル (A-H, 01-12) の EC が選択されていない) [PM18] -Sample attached to unknown EC for well (A-H, 01-12). (ウェル (A-H, 01-12) の不明の EC に検体が関連している) [PM19] -EC selected on control for well (A-H, 01-12). (ウェル (A-H, 01-12) のコントロールに対して EC が選択されている) [PM20] -No samples linked to EC for well (A-H, 01-12) (ウェル (A-H, 01-12) の EC に検体がリンクされていない) [PM21]	EC を指定する際、使用説明書の指示に従っていない。 Attempt to upload a modified .LIVS file (変更された .LIVS ファイルをアップロードしようとしている。)	すべての “SAMPLE” ウェルに EC を指定する必要があります。コントロールウェルに EC を指定することはできません。それぞれの EC は少なくとも一つの検体にリンクされる必要があります。
-Run missing PC, NTC, EC. (ランに PC、NTC、EC がみつからない) [PM22] -Run detected control in sample list. (ランが検体リストにコントロールを検出) [PM23] -Run missing samples. (ランに検体が含まれない) [PM24] -Run contains more than 1 Assay type. (ランに複数のアッセイタイプが含まれている) [PM25]	ランを指定する際、使用説明書の指示に従っていない。 変更された .LIVS ファイルをアップロードしようとしている。	それぞれのランは、各コントロールタイプ (PC、NTC、EC) のうちの一つを含む必要があります。ランは、タイプが “SAMPLE” のウェルを少なくとも一つ含む必要があります。ランはただ一つのアッセイタイプのみを含む必要があります。
-Too many samples linked to EC for well (A-H, 01-12). (ウェル (A-H, 01-12) の EC に非常に多くの検体がリンクされている) [PM26] -EC linked to more than one run for well (A-H, 01-12). (EC がウェル (A-H, 01-12) の複数のランにリンクされている) [PM27]	EC を指定する際、使用説明書の指示に従っていない。	単一の EC がリンクできるのは最大 11 検体までです。単一の EC は、複数のランにまたがって検体にリンクされることはありません。

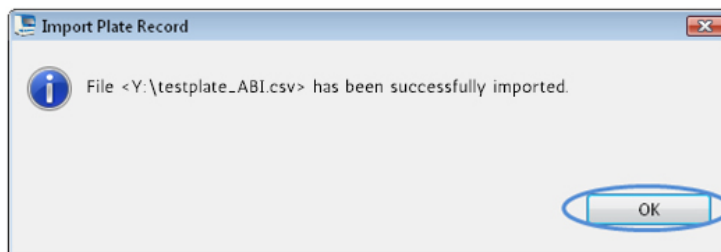
## 10.16. 3500xL Dx ソフトウェアのセットアップ

**注記:** リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアは、3500xL Dx (ABI ファイル) へインポートするファイルを作成します。このファイルは検体名に情報を付加します。3500xL Dx ソフトウェアは、追加情報を付加します。

- 10.16.1. 以下に述べる事項以外の記載がない限り、3500xL Dx のすべての工程には、製造者の指示に従った設置、操作、校正、洗浄および保守の手順が含まれます。
- 10.16.2. 3500xL Dx のダッシュボードスクリーンから、“**Create New Plate**” アイコンをクリックします。
- 10.16.3. “*Plate Name*” に短いキーワードを入力します。
- 10.16.4. ウェル数が 96 に設定されていることを確認してください。
- 10.16.5. プレートタイプには、ドロップダウンメニューから “**Fragment**” を選択します。
- 10.16.6. キャピラリー長が **50 cm**、ポリマーが **POP7** であることを確認してください。
- 10.16.7. オーナーセクションにオペレーターのイニシャルを入力してください。
- 10.16.8. “Assign Plate Contents” をクリックします。
- 10.16.9. スクリーン上部の “**Import**” ボタンをクリックすると、ポップアップウィンドウが現れます。リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアによって作成された 3500xL Dx import file (ABI ファイル) に進みます。ポップアップウィンドウの “**OPEN**” をクリックした後、インポート確認ポップアップウィンドウの “**OK**” をクリックします。
  - 10.16.9.1. ABI ファイルのアッセイ名が 3500xL Dx ライブラリーにみつからない場合には、以下に示すポップアップの “**Proceed**” をクリックします:



10.16.10. 以下のポップアップウィンドウの “OK” をクリックします。



10.16.11. インポートが完了すると、検体 ID はスクリーン上のプレートレイアウトに読み込まれます。スクリーン上の検体 ID をレビューして、スクリーンにてプレートレイアウトが正しいことを確認してください。検体が意図したセットアップに対応しない場合には、リユーストラット CDx FLT3ソフトウェア内での新しいABIファイルの作成と、ABI 3500xL Dx への再インポートが必要になります。

**注記:** 3500xL Dx プレートマップの検体 ID は変更しないでください。これを行うとエラーが発生します。

10.16.12. 必要に応じ、ITD CDx アッセイまたは TKD CDx アッセイのための表 6 に挙げるパラメータを用いて、3500xL Dx をプログラミングしてください。プログラムは今後の使用のため 3500xL Dx アッセイライブラリーに保存できます。

10.16.13. 必要に応じ、検体およびコントロールを含むすべてのウェルに、Assay、Results Group、および File Name Convention を指定してください。

**注記:** 第一の属性として Sample Name を File Name Conversion へ含めなければなりません。

10.16.14. 3500xL Dx にプレートをロードします。

10.16.15. “Link Plate for Run” をクリックします。促された場合には、変更をプレートに保存します。第二のプレートをランする場合には、ステップ 10.16.2 から 10.16.14 を繰り返してください。

## 10.17. 3500xL Dx Genetic Analyzer のラン

10.17.1. POP-7 チューブ内の気泡をチェックします。必要に応じ、気泡を除去してください。

10.17.2. “Start Run” をクリックして 3500xL Dx におけるランを開始します。

10.17.3. ラン完了後、セプタを取り除いて廃棄し、CE プレートも廃棄します。

**注記:** 3500xL または 3500xL Dx 機器と Data Collection ソフトウェアを実行しているコンピューターとの間に接続エラーが発生した場合は、機器の製造元のトラブルシューティング手順に従ってください。



## 10.18. GeneMapper ソフトウェアによるデータ解析

**注記:** GeneMapper ソフトウェアのウェルのサイズスタンダードエラーを無効にしないでください。

- 10.18.1. GeneMapper v4.1.x ソフトウェアを開きます。
- 10.18.2. “*File Menu*” の下で “*New Project*” を選択し、次に “**Microsatellite**” を選択します。“**OK**” をクリックします。“*File Menu*” に戻り、“*Add Samples to Project*” を選択します。
- 10.18.3. 左パネルで 3500xL Dx データフォルダ (Results Group により指定される) 内のデータファイルへ進み、“**Add to List**” をクリックしてそれらを右パネルへ移します。“**Add**” または “**Add & Analyze**” ボタンをクリックします。
- 10.18.4. すべての検体につき、“*Analysis Method*” が Microsatellite method に設定されていること、および “*Size Standard*” が “*GS600LIZ+Normalization*” に設定されていることを確認してください。

**注記:** 一つのプレートに複数のアッセイタイプが存在する場合には、ワークフローを容易にするため、Analysis Method および Size Standard オプションはインジェクションごとに設定してください。インジェクションは Project ウィンドウから選択できます。

- 10.18.5. 図 3: に従って Analysis Method を設定します。
  - 10.18.5.1. スクリーン上部のメニューから “**Analysis**” をクリックした後、“**Analysis Method Editor**” をクリックします。
  - 10.18.5.2. “Peak Detector” タブの “Peak Detection Algorithm” が “Advanced” に設定されていることを確認してください。
  - 10.18.5.3. “*Peak Amplitude Thresholds*” で、“**100**” が B (青) および G (緑) 色素チャンネルに入力され、“**50**” が残りの Y (黄)、R (赤)、P (紫)、および O (オレンジ) 色素チャンネルに入力されていることを確認してください。黄および紫色素チャンネルは、リユーコストラット CDx FLT3 変異検査では使用しません。
  - 10.18.5.4. *Polynomial Degree* が、ITD については “**3**”、TKD については “**5**” に設定されていることを確認してください。
  - 10.18.5.5. ウィンドウの下部で “**OK**” をクリックしてください。

**注記:** ITD および TKD に特異的な Analysis Methods は、GeneMapper で設定した後に使用できます。“*Tools*” へ進み、“*GeneMapper Manager*” を選択してください。“*Analysis Methods*” タブから “New…” ボタンをクリックした後、分析タイプとして “Microsatellite” を選択してください。“OK” をクリックしてください。“*General*” タブで、Name、Description および Instrument を入力した後、上記のように、また図 3: に示すように、“*Peak Detector*” タブを設定します。“*Allele*”、“*Peak Quality*” および “*Quality Flags*” タブは初期設定の “Microsatellite” とします。“Done” を選択すると、新規の Analysis Method が選択可能になります。

- 10.18.6. 緑色の “play” ボタンをクリックして、解析を開始します。これにより、ファイルの保存が促されます。GeneMapper プロジェクトを適切な名前でも保存してください。許容されるファイルパス名は最大 256 文字です。
- 10.18.7. GeneMapper ソフトウェアで解析する検体およびコントロールを強調表示した後、“**Display Plots**” ボタンをクリックします。
  - 10.18.7.1. ITD の場合、“**Sizing Table**” のアイコンが選択され “**Sample Plots**” のウィンドウで青、緑、および赤の色素が選択されていることを確認してください。
  - 10.18.7.2. TKD の場合、“**Sizing Table**” のアイコンが選択され青、緑、および赤の色素が選択されていることを確認してください。

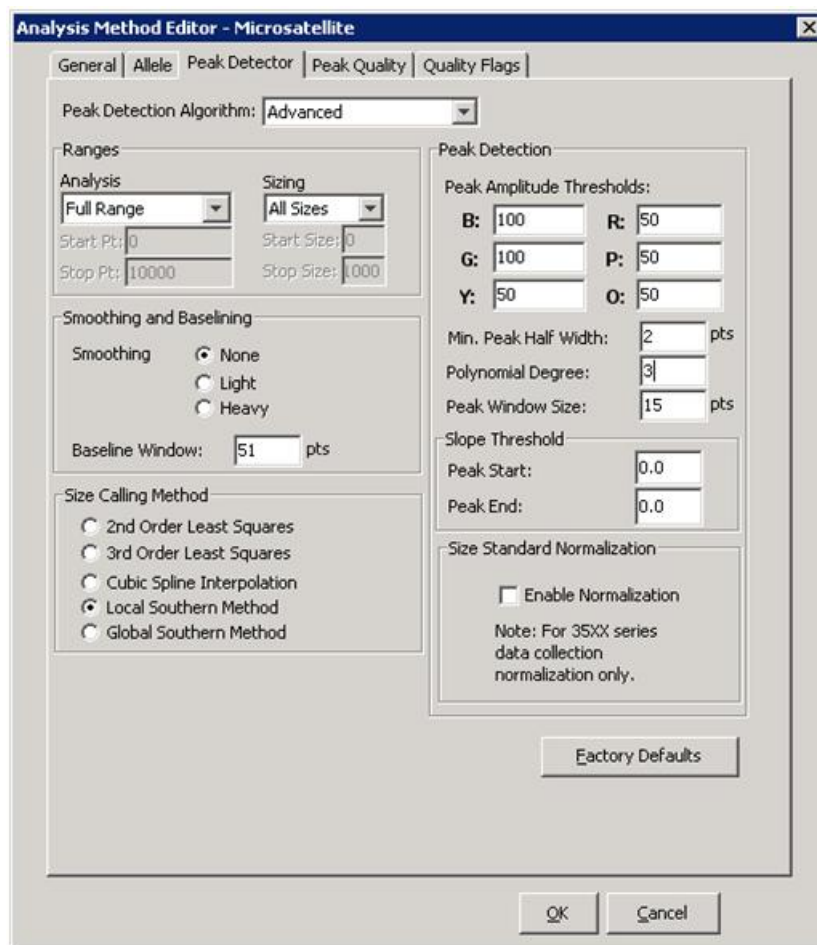
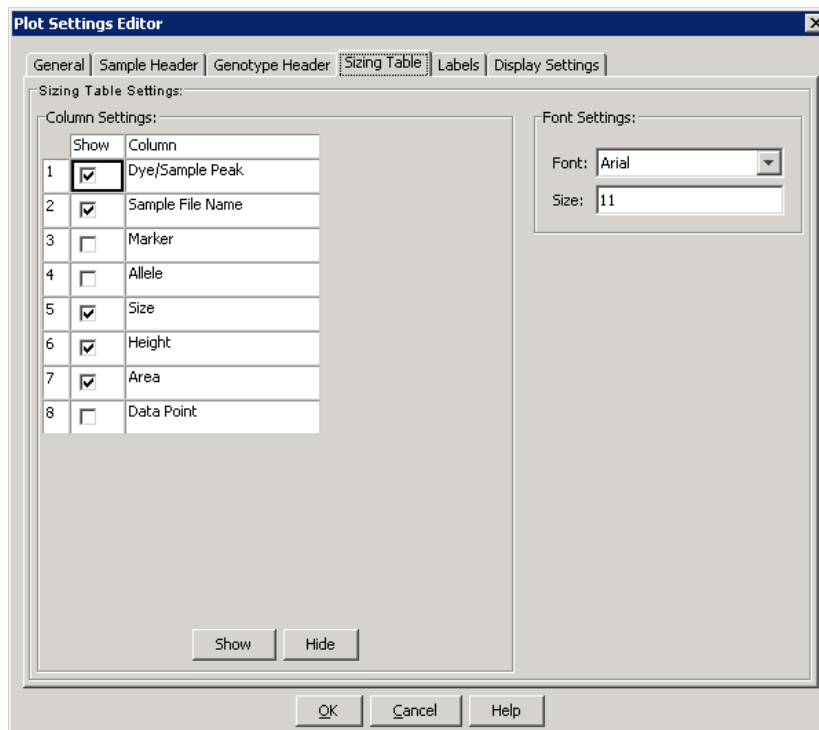


図 3: ITDの解析法設定TKDの設定も同様ですが、Polynomial Degreeは“5”に設定してください。

- 10.18.8. 以下に示す表で、電気泳動図に次のカラム: **Dye/Sample Peak**、**Sample File Name**、**Size**、**Height**、および **Area** が含まれていることを確認してください。



10.18.9. サイズ表の情報をエクスポートするには、“*Samples Plot*”メニューから“*File*”を選択して、“*Export Table*”を選択してください。

10.18.9.1. ファイル名を入力した後、ファイルを保存する場所を選択します。

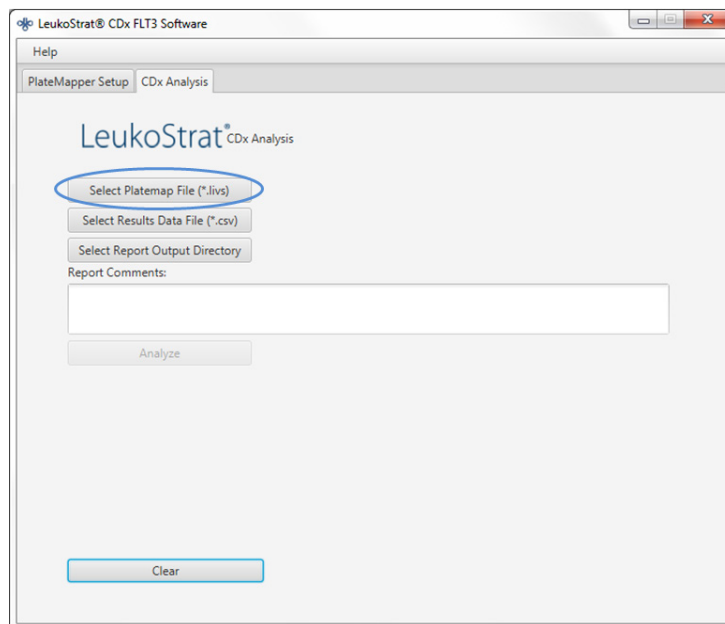
10.18.9.2. ドロップダウンメニューの“*Export File As*”から“*Comma-separated values (.csv)*”を選択します。

10.18.9.3. “*Export*”をクリックします。

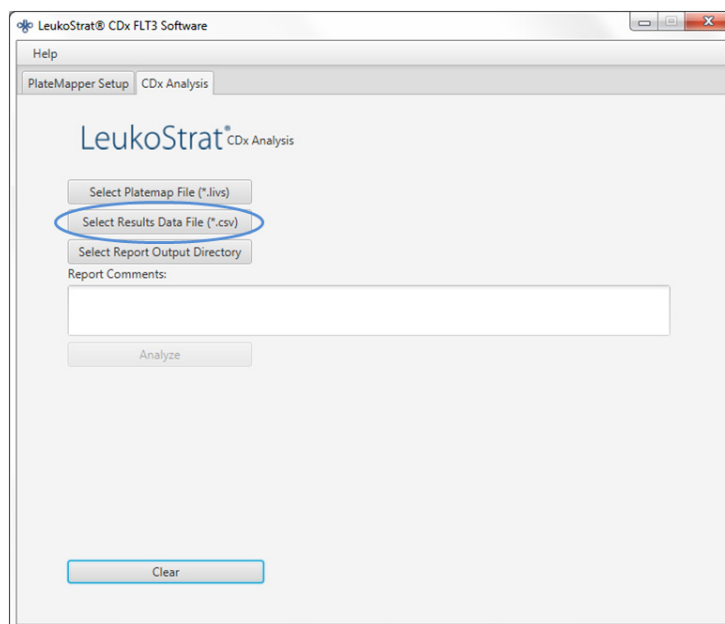
**注記:** CSV ファイルはいかなる場合も編集しないでください。

## 10.19. リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアによるデータ解析

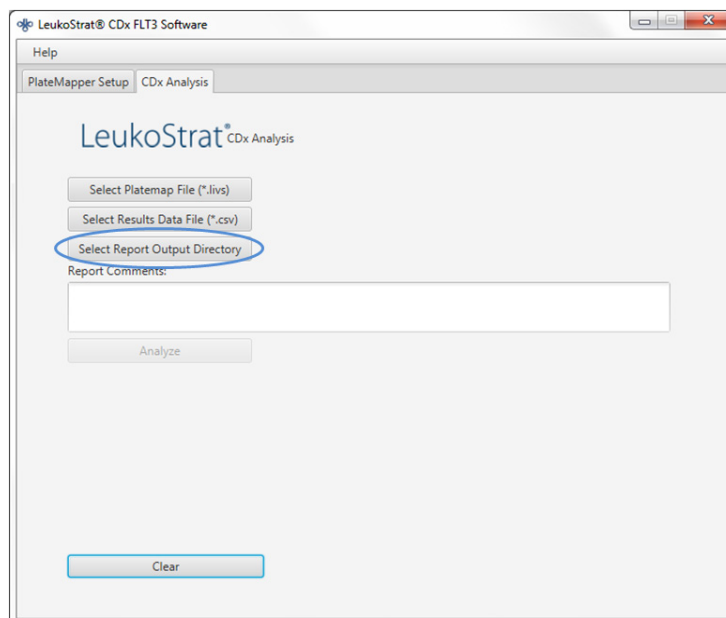
- 10.19.1. リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアを開き、ライセンス契約に同意した後、リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアの “CDx Analysis” タブをクリックします。“**Select Platemap File (\*.livs)**” をクリックして、PlateMapper Setup タブから作成された LIVS ファイルへ進みます。



- 10.19.2. 解析のため、“**Select Results Data File (\*.csv)**” をクリックして、ステップ 10.18.9 からエクスポートされた CSV ファイルを選択します。



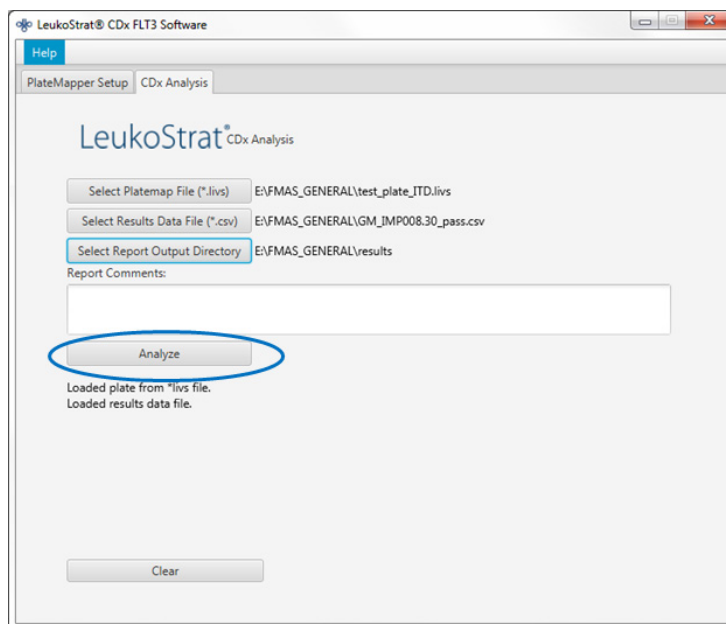
10.19.3. “Select Results Output Directory” をクリックして、結果を送るフォルダを選択します。



10.19.3.1. ラン、検体、またはコントロールについての追加コメントは、“*Report Comments*” フィールドに入力できます。入力したコメントは、Run Reportにて見ることができます。

**注記:** すべてのファイルを選択したら、現行のラン/データの解析前に新しい *Plate Map* を *PlateMapper Setup* タブに作成又はインポートしないでください。Analyze ボタンを選択する前に、*PlateMapper Setup* タブを変更すると正しくない *Plate Name* が報告書に表示されます *PlateMapper Setup* タブと *CDxAnalysis* タブを切り替える前に、LeukoStrat CDxFLT3 ソフトウェアを閉じてください。

- 10.19.4. 三つすべてが選択されると、解析ボタンが選択可能になります。“**Analyze**” をクリックすると、目的のフォルダにレポートが作成されます。三つのレポートタイプ、PDF Run Report、PDF Sample Report（複数の場合あり）、および CSV ランエクスポートファイルが作成されます（図 4、図 5、および図 6 を参照）。Run Report には、すべてのコントロールおよび検体の結果のサマリーが含まれます。Sample Report には、コントロールの結果、および検体の結果の詳細が含まれます。CSV ランエクスポートファイルには、スプレッドシートフォーマットによるすべてのランの結果が含まれます。リューコストラット CDx FLT3 ソフトウェアレポートの ID は、ソフトウェアによって生成された ID の最後の 12 文字です。



# LeukoStrat® CDx FLT3 Software

## Run Report:

Run Information			
Run ID	fb170062-996c-4859-90c7-000000000001		
Plate ID	9dd67e4f-d8d0-4016-b72c-f7179eaae829	Assay	ITD
Plate Barcode	01234	Analysis Date	2022-12-02 10:49:49 AM
Plate Name	UnitTestPlate	Run Pass/Fail	Pass

Controls				
Type	Name	ID	Pass/Fail	Fail Detail
PC	PCControl1_ITD_PC_H01	08277bd1d8e5	Pass	
NTC	NTCCControl1_ITD_NTC_F01	4a6bf004cd22	Pass	
EC	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	4e614e4d9b70	Pass	

Samples				
Sample Name	EC ID	Pos/Neg/Fail	Signal Ratio	Fail Detail
SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	4e614e4d9b70	Positive	0.09	
SampleA02_ITD_SAMPLE_A02	4e614e4d9b70	Positive	0.07	
SampleA03_ITD_SAMPLE_A03	4e614e4d9b70	Positive	0.11	
SampleA04_ITD_SAMPLE_A04*	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA05_ITD_SAMPLE_A05	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA06_ITD_SAMPLE_A06	4e614e4d9b70	Negative	0.00	
SampleA07_ITD_SAMPLE_A07	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA08_ITD_SAMPLE_A08	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA09_ITD_SAMPLE_A09	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA10_ITD_SAMPLE_A10	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91
SampleA11_ITD_SAMPLE_A11	4e614e4d9b70	Fail	N/A	IR91

Report Comments
N/A

\* Indicates additional notes on Sample Report

図 4: ランレポートの例



# LeukoStrat® CDx FLT3 Software

## Sample Report:

Sample and Run Information			
Sample Name	SampleA01_ITD_SAMPLE_A01		
Sample ID	21c1a415-6fad-4f69-af8e-535ad212c275		
Plate ID	9dd67e4f-d8d0-4016-b72c-f7179eaae829	Assay	ITD
Plate Barcode	01234	Analysis Date	2022-12-02 10:49:49 AM
Plate Name	UnitTestPlate		
Run ID	fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	Sample Pos/Neg/Fail	Positive

Controls				
Type	Name	ID	Pass/Fail	Fail Detail
PC	PControl1_ITD_PC_H01	08277bd1d8e5	Pass	
NTC	NTCControl1_ITD_NTC_F01	4a6bf004cd22	Pass	
EC	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	4e614e4d9b70	Pass	

Sample				
Sample Name	EC ID	Pos/Neg/Fail	Signal Ratio	Fail Detail
SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	4e614e4d9b70	Positive	0.09	

Sample Notes
N/A

Report Comments
N/A

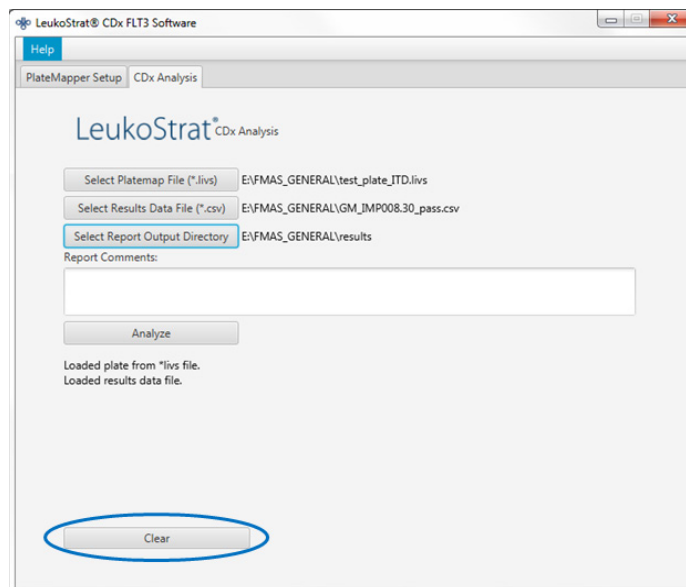
図 5: サンプルレポートの例



Run ID	Assay	Run Result	Sample ID	Sample Type	EC ID	Sample Name	Sample Result	Signal Ratio	Sample Notes	Software Version
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	f7abf689-888c-4942-8202-08277bd1d8e5	PC		PControl1_ITD_PC_H01	POS	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	323e17c2-c7bf-4d57-9c86-4a6bf004cd22	NTC		NTControl1_ITD_NTC_F01	UNSET	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	EC	08b5ee54-77a5-4159-a028-11f364c3c963	ExtractionControl1_ITD_EC_E01	NEG	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	21c1a115-6fad-4f69-af8e-535ad212c275	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA01_ITD_SAMPLE_A01	POS	0.09		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	29533bf-b916-48c9-8ec1-e74444ca2be5	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA02_ITD_SAMPLE_A02	POS	0.07		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	5a6a01c9-d38d-48ea-a433-aa347e01b72b	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA03_ITD_SAMPLE_A03	POS	0.11		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	76a3ae2d-417d-4690-92f6-55521e593a6f	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA04_ITD_SAMPLE_A04	NEG	0	Validation Sample Note	v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	dd33cd5b-aa6f-473b-8565-386398d84912	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA05_ITD_SAMPLE_A05	NEG	0		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	8cf778b8-0353-49c7-bf93-cf842fc77b3a	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA06_ITD_SAMPLE_A06	NEG	0		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	55265e37-070c-4e9d-a418-95dd07099dbb	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA07_ITD_SAMPLE_A07	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	d3c89c59-db82-4c39-8504-23153e174140	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA08_ITD_SAMPLE_A08	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	b19bcd10-092c-47e1-bed1-fc0e30ed3dcf	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA09_ITD_SAMPLE_A09	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	ac125670-78fe-42df-ab0e-1acae7f4a9c2	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA10_ITD_SAMPLE_A10	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD
fb170062-996c-4859-90c7-000000000001	ITD	PASS	7a3b21f1-c898-424a-bb66-72c796c5c13	SAMPLE	d2a45feb-9d24-42c8-b2d0-4e614e4d9b70	SampleA11_ITD_SAMPLE_A11	FAIL	N/A		v1.1.x.IVD

図 6: CSV ランエクスポートファイルの例

10.19.5. すべてのフィールドをリセットするには “Clear” をクリックしてください。



10.19.6. 結果が得られない場合には、すべてのステップが正しく完了しているかどうかを確認してください。データ結果のエラーのトラブルシューティングについては表 9 をご参照ください。さらにご質問等ございましたら、Invivoscribe テクニカルサポート ([support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com)) までご連絡ください。

表 9: データ結果エラーメッセージおよび解決策

データ結果アップロードエラーメッセージ	可能性のある原因	解決策
-Unrecognized dye: <dye letter> (色素が認識されない: <色素を表す文字>) [AD01]	GeneMapper 解析ステップの間に使用されない色素を選択している。	GeneMapper 解析ステップの間は、赤、緑、青の色素のみ選択してください。
-No red dye detected. Please make sure red dye is selected during previous signal analysis step. (赤の色素が検出されません。以前のシグナル解析ステップの間に赤の色素を確実に選択してください。) [AD02]	GeneMapper 解析ステップの間に赤の色素が選択されていない。	GeneMapper 解析ステップの間に赤の色素を確実に選択してください。
-Unrecognized data results file format. (認識できないデータ結果ファイルフォーマット) [AD03]	GeneMapper ファイルが破損している。	GeneMapper ファイルにはいかなる変更も行わないでください。
-Unable to load LIVS platemap file; incorrect format. (*.livs プレートマップファイルがロードできません; 不正確なフォーマット) [AD04]	LIVS ファイルが破損している。	.LIVS ファイルにはいかなる変更も行わないでください。
-Did not find run for runId <runId> (この runId runId>のランが見つかりませんでした) [AD05] -Did not find sample for sample name <sampleName> (この検体名 sampleName>の検体が見つかりませんでした) [AD6]	不正確な .LIVS ファイルが選択されている、または .LIVS ファイルが破損している。	解析する検査に対応した正確な .LIVS ファイルが選択されていることを確認してください。
-General error loading results data file; please contact technical support. (結果データファイルのロードに関する一般的なエラー; テクニカルサポートまでご連絡ください) [AD07]	不明なエラー。	テクニカルサポートまでご連絡ください。
-String index out of range:1 文字列インデックスが範囲外:1	<Sample Name>が、File name conversion を指定するときに選択された最初の属性ではありません (ステップ 10.16.3 で実行されるもの)	正しい File name conversion を使用したキャピラリー電気泳動による検出から始まるセクション 10.12 のランを再度実施してください。
-String index out of range:15 文字列インデックスが範囲外:15	CSV 結果ファイルが編集されている。	GeneMapper から CSV 結果ファイルを再度エクスポートしてください。CSV ファイルはいかなる場合も編集しないでください。

## 11. 品質管理

### 11.1. ランの妥当性

- 11.1.1. リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアは自動的に結果を評価します。
- 11.1.2. ランの状態が機能しない場合、同じランのすべてのテスト結果は無効になります。Fail Detail に応じて、ランをアッセイ内の異なる開始ポイントから繰り返す必要があります (セクション 13. 再検査を参照)。

### 11.2. 抽出コントロールと検体の妥当性

- 11.2.1. 有効なランの中で、個別の検体には無効 (機能しない) なものがあります。抽出コントロールが妥当性の基準を満たさない場合には、その抽出コントロールに関連するすべての検体は機能しないものとされます。
- 11.2.2. すべてのコントロールが有効な検体でも、それらが個別に仕様を満たさなければ機能しない可能性があります。リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアの Fail Detail に応じて、検査をアッセイ内の異なる開始ポイントから繰り返す必要があります (セクション 13. 再検査を参照)。

**注記:** 一つのランで、同じ Fail Detail Type の不具合が複数認められる場合には、再検査の方法は個別のコントロールまたは検体の不具合とは異なります (セクション 13. 再検査を参照)。

## 12. 結果の解釈

- 12.1. 臨床カットオフ値以上の *FLT3* ITD または TKD 変異が検出される AML 患者には、ギルテリチニブフマル酸塩による治療の適応の判断ができます。
- 12.2. 臨床カットオフ値以上の *FLT3* ITD 変異が検出される AML 患者には、キザルチニブ塩酸塩による治療の適応の判断ができます。臨床カットオフ値以上の *FLT3* TKD 変異のみが検出される AML 患者には、キザルチニブ塩酸塩による治療の適応の判断はできません。
- 12.3. リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアは、変異型 対 野生型シグナル比を算出した後、0.05 の臨床的カットオフ値（医療上の決定を行う点）に対する評価を自動的に行います。シグナル比は、変異型シグナル（存在する場合）のピーク面積を野生型シグナル（存在する場合）のピーク面積で割った値で表されます。変異型 対 野生型シグナル比は、小数点以下第二位まで表示されます。
- 12.4. ITD 変異が複数の変異である場合には、変異型のピーク面積を合計して、変異型の総シグナルを算出する事に注意してください。さらに、検体に野生型のシグナルが含まれない場合もあります（純粋な変異型）。このような場合に、リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアは、変異型 対 野生型シグナル比を **100** として報告します。これは比の値を示すことを意図したものではありません。
- 12.5. 全体的な *FLT3* 変異状態またはギルテリチニブフマル酸塩による治療適用の判断について：
- 12.5.1. 有効な検体における ITD または TKD どちらか一方が変異型 対 野生型シグナル比の結果が 0.05 の臨床的カットオフ値以上である場合には、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。
- 12.5.2. 有効な検体における ITD 及び TKD いずれも変異型 対 野生型シグナル比の結果が 0.05 の臨床的カットオフ値未満である場合には、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。
- 12.5.3. 検体の変異状態は表 10 に示すルールによって定義されます。

**表 10:** 検体の変異状態の決定（全体的な *FLT3* 変異状態の報告またはギルテリチニブフマル酸塩による治療適用が該当する）

シナリオ	ITD ソフトウェアの結果	ITD シグナル比	TKD ソフトウェアの結果	TKD シグナル比	アッセイの最終結果
1	陽性	≥0.05	陽性	≥0.05	陽性
2	陰性	<0.05	陰性	<0.05	陰性
3	無効	N / A	無効	N / A	無効
4	陽性	≥0.05	陰性	<0.05	陽性
5	陰性	<0.05	陽性	≥0.05	陽性
6	陽性	≥0.05	無効	N / A	陽性
7	陰性	<0.05	無効	N / A	無効
8	無効	N / A	陽性	≥0.05	陽性
9	無効	N / A	陰性	<0.05	無効

- 12.6. キザルチニブ塩酸塩での治療適用の決定について：
- 12.6.1. 有効な検体における ITD の変異型 対 野生型シグナル比の結果が 0.05 の臨床的カットオフ値以上である場合には、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。
- 12.6.2. 有効な検体における ITD の変異型 対 野生型シグナル比の結果が 0.05 の臨床的カットオフ値未満である場合には、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。
- 12.6.3. ITD の結果が無効である場合、その結果が ITD 無効と報告され、キザルチニブ塩酸塩の適応は判断できません。
- 12.7. Fail Details についてはリューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアレポートでご覧になれます。再検査のセクションに記載される指示に従ってランを繰り返すか、または検体を再検査してください。

## 13. 再検査

### 13.1. 無効なラン

- 13.1.1. 陽性コントロールもしくは NTC (No Template Control、テンプレートを含まないコントロール)、またはその両方が妥当性の基準を満たさない場合には、そのランは無効なランです。すべての検体、陽性コントロール、関連するすべての抽出コントロール、および NTC を含むランを繰り返してください。ITD および TKD のランは互いに独立しています。
- 13.1.2. リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアレポートのコントロールセクションに挙げられているアッセイおよび特定の Fail Detail (複数の場合あり) に基づき、表 11 または表 12 に従ってランを繰り返してください。機能しない陽性コントロールまたは NTC に対して示される Fail Detail (複数の場合あり) は、すべての抽出コントロールおよび検体の Fail Detail よりも優先されます。

### 13.2. 有効なランにおける無効な抽出コントロール

- 13.2.1. 有効なランにおいて機能しない抽出コントロール (複数の抽出コントロールが含まれる場合あり) については、適切な ITD または TKD ランに対し、機能しないすべての抽出コントロール、関連する検体、陽性コントロール、および NTC を再検査してください。リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアレポートのコントロールセクションに挙げられているアッセイおよび特定の Fail Detail (複数の場合あり) に基づき、表 11 または表 12 に従って再検査してください。機能しない抽出コントロールに対して示される Fail Detail (複数の場合あり) は、すべての検体の Fail Detail よりも優先されます。

### 13.3. 有効なランにおける無効な検体

- 13.3.1. 有効なランにおいて機能しない検体については、適切な ITD または TKD ランに対し、検体 (複数の場合あり)、陽性コントロール、機能しない検体 (複数の場合あり) に関連する抽出コントロール (複数の場合あり)、および NTC を再検査してください。リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアレポートの検体セクションに挙げられているアッセイおよび特定の Fail Detail (複数の場合あり) に基づき、表 11 または表 12 に従って再検査してください。検体の再検査には、関連する抽出コントロールの再検査を含むようにしてください。

### 13.4. Fail Detail と再検査

- 13.4.1. 表 11 または表 12 には、ITD および TKD それぞれの検体タイプによる Fail Detail に基づいた再検査について要約しています。表 11 および表 12 に挙げた再検査のコードについては、表 13 を参照してください。
- 13.4.2. 再検査の階層は次の通りです。1) ITD または TKD の無効な陽性コントロール (PC) または No Template Control (NTC) (セクション 13.1 を参照); 2) 有効なランにおける無効な抽出コントロール (EC) (セクション 13.2 を参照); および 3) 有効なランにおける無効な検体 (セクション 13.3 を参照)。図 7 再検査の階層図
- 13.4.3. 単一の検体またはコントロールに複数の不具合が生じた場合、アッセイ手順の開始時に近いステップに戻って再検査を行ってください。
  - 13.4.3.1. 同じコントロール / 検体において、同じ不具合が起こった場合、次の再検査開始点に進んでください。すべてのトラブルシューティングの対応完了後、同じ不具合が再度起こった場合は、そのコントロール / 検体の結果は無効です。
  - 13.4.3.2. 再検査の結果が最初の結果とは異なる不具合を示した場合には、再検査による新しい不具合について記載されたトラブルシューティングに従ってください。

**注記:** 単一のコントロール / 検体に許可される再検査は最大で 4 回までです。

- 13.4.4. 無効な検体は別々に評価されるため、単一のランにそれぞれが異なった Fail Detail を示す複数の検体が含まれる場合には、各検体に適した再検査を行ってください。

注記: さらにご質問等ございましたら、Invivoscribe テクニカルサポート ([support@invivoscribe.com](mailto:support@invivoscribe.com)) までご連絡ください。

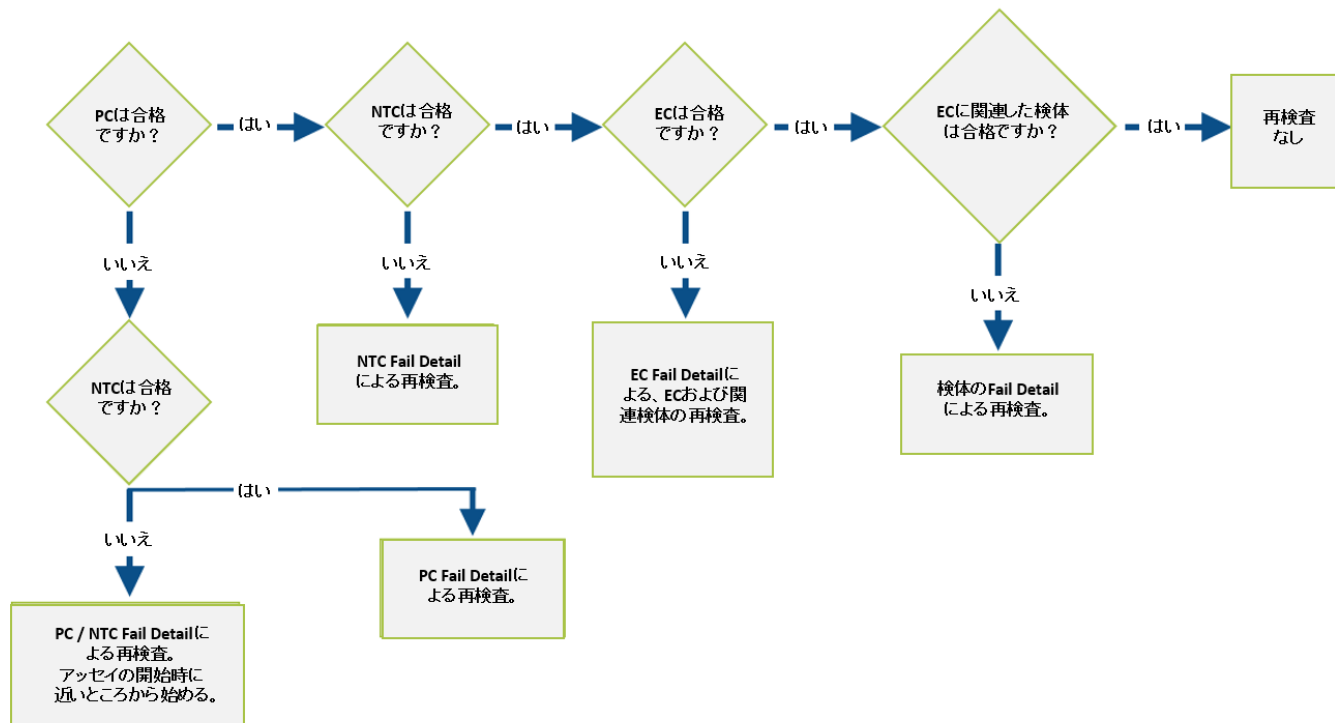


図 7: 再検査の階層図。

表 11: 再検査、ITD コントロールおよび検体

ITD Fail Detail	コントロール			検体	
	PC	NTC	EC	陽性検体	陰性検体
IR05: 検体またはコントロールが機能しない。	Amp		Amp		Quant / Proc
IR06: 検体またはコントロールが機能しない。	Amp				Quant / Proc
IR07: 検体が機能しない。				CE-DS	CE-DS
IR09: 検体またはコントロールが機能しない。	CE	CE	CE	CE / Proc	CE / Proc
IR12: 検体またはコントロールが機能しない。	Amp		Q-Amp	Quant / Proc	Quant / Proc
IR13: コントロールが機能しない。	CE				
IR20: コントロールが機能しない。				Ctrl	Ctrl
IR21: コントロールが機能しない。				Ctrl	Ctrl
IR31: コントロールが機能しない。	Amp				
IR32: コントロールが機能しない。	CE / Amp				
IR33: コントロールが機能しない。	CE / Amp				
IR34: コントロールが機能しない。	Amp				
IR40: コントロールが機能しない。		Amp			
IR51: コントロールが機能しない。			Q-Amp		
IR52: コントロールが機能しない。			CE / Q-Amp		
IR53: コントロールが機能しない。				Ctrl	Ctrl
IR70: 検体が機能しない。				CE / Proc	
IR80: 検体が機能しない。					Quant / Proc
IR91: 検体またはコントロールが機能しない。	CE	CE	CE	CE	CE

表 12: 再検査、TKD コントロールおよび検体

TKD Fail Detail	コントロール			検体	
	PC	NTC	EC	陽性検体	陰性検体
TR07: 検体またはコントロールが機能しない。	Dig		Dig		Dig / Proc
TR09: 検体またはコントロールが機能しない。	CE	CE	CE	CE / Proc	CE / Proc
TR12: 検体またはコントロールが機能しない。	Amp		Q-Amp	Quant / Proc	Quant / Proc
TR20: コントロールが機能しない。				Ctrl	Ctrl
TR21: コントロールが機能しない。				Ctrl	Ctrl
TR30: コントロールが機能しない。	Xtalk / Amp				
TR31: コントロールが機能しない。	CE / Amp				
TR32: コントロールが機能しない。	CE / Amp				
TR33: コントロールが機能しない。	Amp				
TR40: コントロールが機能しない。		Amp			
TR50: コントロールが機能しない。			Xtalk / Q-Amp		
TR51: コントロールが機能しない。			CE / Q-Amp		
TR52: コントロールが機能しない。			Dig		
TR53: コントロールが機能しない。				Ctrl	Ctrl
TR70: 検体が機能しない。				Xtalk / Quant / Proc	
TR71: 検体が機能しない。				CE / Proc	
TR72: 検体が機能しない。				Dig / Proc	
TR80: 検体が機能しない。					Xtalk / Quant / Proc
TR81: 検体が機能しない。					Quant / Proc
TR93: 検体またはコントロールが機能しない。	CE	CE	CE	CE	CE



表 13: 再検査コード、コントロールおよび検体の再検査

再検査コード	説明	再検査開始点
Amp	以前に調製した DNA 検体希釈液を用いて、再検査を増幅から開始する。	10.10. 増幅
CE	再検査をキャピラリー電気泳動から開始する。新しい増幅産物（保管している ITD PCR または TKD 消化用プレートから）を用いて新しい CE プレートを準備する。陽性コントロール、NTC (No Template Control)、および関連する抽出コントロール（複数の場合あり）が、機能しない検体と共にプレートに確実に含まれるようにすること。アーチファクトが原因の再検査は、同じサイズのアーチファクトが 2 回のランで連続して出現する場合には行わないこと。異なるサイズのアーチファクトは固有の不具合として考慮される。	10.12. キャピラリー電気泳動による検出
CE / Amp CE / Q-Amp	CE 再検査コードの指示に従って再検査を行う。再検査の結果が同じ Fail Detail を示した場合には、所定の Amp または Q-Amp の指示に従って再検査を繰り返す。	10.12. キャピラリー電気泳動による検出 10.9. DNA の定量および希釈 10.10. 増幅
CE / Proc	CE 再検査コードの指示に従って再検査を行う。再検査の結果が同じ Fail Detail を示した場合には、末梢血または骨髓穿刺液から始まる検体の再処理を行う。	10.12. キャピラリー電気泳動による検出 10.2. 検体処理の準備
CE-DS	再検査をキャピラリー電気泳動から開始する。新しい増幅産物（保管している ITD PCR プレートから）を用いて新しい CE プレートを準備する。陽性コントロール、NTC (No Template Control)、および関連する抽出コントロール（複数の場合あり）が、プレートに確実に含まれるようにすること。同じ不合格の詳細 (IR07) が 2 回発生した場合は、サンプルを無効として報告する。	10.12. キャピラリー電気泳動による検出
Ctrl	機能しないコントロールの指示に従って再検査を行う。	多様
Dig	検体（複数の場合あり）、関連する抽出コントロール（複数の場合あり）、およびコントロールの新しい増幅産物（保管している TKD PCR プレートから）を用いて、再検査を消化から開始する。	10.11. 制限酵素による消化 (TKD 変異のみ)
Dig / Proc	Dig 再検査コードの指示に従って再検査を行う。再検査の結果が同じ Fail Detail を示した場合には、末梢血または骨髓穿刺液から始めて検体を再調製する。	10.11. 制限酵素による消化 (TKD 変異のみ) 10.2. 検体処理の準備
Q-Amp	以前に調製した DNA 検体希釈液を用いて、再検査を抽出コントロール（複数の場合あり）の定量から開始する。	10.9. DNA の定量および希釈 (抽出コントロール (複数の場合あり)) 10.10. 増幅 (検体)
Quant	再検査をすべての検体（複数の場合あり）および関連する抽出コントロール（複数の場合あり）の定量から開始する。	10.9. DNA の定量および希釈
Quant / Proc	Quant 再検査コードの指示に従って再検査を行う。再検査の結果が同じ Fail Detail を示した場合には、末梢血または骨髓穿刺液から始まる検体の再処理を行う。	10.9. DNA の定量および希釈 10.2. 検体処理の準備
Xtalk / Amp Xtalk / Q-Amp Xtalk / Quant / Proc	全検体が 5 つの空のキャピラリーで分離されるように、新しい CE プレートを作製する。（例: つまり、インジェクション 1 のウェル A01、C01、E01、および G01 のみにサンプルをロードする。残りのインジェクションについても同等のウェルにサンプルをロードする。）再検査の結果が同じ Fail Detail を示した場合には、所定の Amp、Q-Amp、または Quant の指示に従って再検査を繰り返す。Quant に従った再検査の結果が同じ Fail Detail を示した場合には、末梢血または骨髓穿刺液から始まる検体の再処理を行う。	10.12. キャピラリー電気泳動による検出 10.9. DNA の定量および希釈 (抽出コントロール (複数の場合あり)) 10.10. 増幅 (検体、PC) 10.2. 検体処理の準備



### 13.5. 一回のランにおける複数の不具合

- 13.5.1. 単独の無効検体またはコントロールの結果とは対照的に、一部の Fail Detail は反応ウェルの数個から全部において観察されます。このようなタイプの不具合がみられた場合、表 14 に従い、すべての検体、陽性コントロール、関連するすべての抽出コントロール、および NTC (No Template Control) を含むランを繰り返し行います。再検査コードを表 15 に示します。
- 13.5.2. さらなるトラブルシューティングには以下の事項が含まれます：
- 13.5.2.1. Analysis Method の設定、Size Standard の設定、およびその他の GeneMapper ソフトウェアの設定が正しいことを確認する。
  - 13.5.2.2. GeneMapper セクションのすべてのステップに従ったことを確認する。例えば緑の play ボタンを押していないなど、忘れられたステップがあると、間違った結果を導く場合がある。
  - 13.5.2.3. CSV ファイルを開き、関連する 3500xL Dx \*.fsa ファイルを有するすべての検体およびコントロールウェルの結果が含まれていることを確認する。
  - 13.5.2.4. CSV ファイルでは、適切なカラムが存在し、ピーク閾値が正確で（すなわち青もしくは緑で 100 未満のピークが無い、または赤で 50 未満のピークが無い）、かつカラムの番号がゼロではないことを確認する。
  - 13.5.2.5. GeneMapper ソフトウェアにより提供される電気泳動図を参照して、ピークの存在、形、およびサイズを可視化する。

表 14: 一回のランにおける複数の不具合の再検査

検体タイプ	不具合コード	再検査コード
ITD PC	IR31	Amp
ITD NTC	IR40	
ITD EC	IR51	
TKD PC	TR30	
TKD NTC	TR40	
TKD EC	TR50	
ITD PC	IR33	CE / Amp
ITD 検体	IR70	
TKD PC	TR32	
TKD 検体	TR71	
ITD PC	IR32	Analysis / Amp
ITD EC	IR52	
ITD 検体	IR80	
TKD PC	TR31	
TKD EC	TR51	
TKD 検体	TR81	
一回のインジェクション内のすべての ITD	IR91	CE-SS
一回のインジェクション内のすべての TKD	TR93	
一回のラン内のすべての ITD	IR04	GM
一回のラン内のすべての TKD	TR04	

表 15: 複数の不具合の再検査コード

再検査コード	説明	再検査開始点
Analysis / Amp	GeneMapper での解析を繰り返し、緑の play ボタンを確実に押してデータを解析する（ステップ 10.18.6）。 GeneMapper で繰り返した解析が同じ結果であった場合には、以前に調製した検査検体 DNA 希釈液を用いて、再検査を増幅から開始する。指示によってすべてのチューブをボルテックスしたことで、Taq を加えたことを確認する。	10.18. GeneMapper ソフトウェアによるデータ解析 10.10. 増幅
Amp	以前に調製した検査検体 DNA 希釈液を用いて、再検査を増幅から開始する。指示に従いすべてのチューブをボルテックスしたことで、Taq を加えたことを確認する。	10.10. 増幅
CE	再検査をキャピラリー電気泳動から開始する。新しい増幅産物（保管している ITD PCR または TKD 消化用プレートから）と新しいサイズスタンダード溶液を調製する。陽性コントロール、NTC（No Template Control）、および関連する抽出コントロール（複数の場合あり）が、機能しない検体と共にプレートに確実に含まれるようにすること。	10.12. キャピラリー電気泳動による検出
CE / Amp	CE 再検査コードの指示に従って再検査を行う。再検査の結果が同じ Fail Detail を示した場合には、所定の Amp の指示に従って再検査を繰り返します。	10.12. キャピラリー電気泳動による検出 10.10. 増幅
CE-SS	新たに調製したサイズスタンダード溶液を用いて、再検査をキャピラリー電気泳動から開始する。	10.12. キャピラリー電気泳動による検出
GM	GeneMapper ソフトウェアからエクスポートデータファイルの作成を繰り返す。閾値（複数の場合あり）を 100 RFU に確実に設定すること。	10.18. GeneMapper ソフトウェアによるデータ解析

## 13.6. 色素シフト

- 13.6.1. 一部の長い ITD 挿入に対し、リューコストラット CDx *FLT3* ソフトウェアは、まれに変異型ピークの確認を誤ることがあります。色素シフトの確認のため、保管した ITD PCR プレートからの新しい増幅産物を用いて新しい CE プレートを準備し、キャピラリー電気泳動を繰り返してください。

## 14. 方法の限界

- 14.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、末梢血および骨髄穿刺液の使用のみについて検証されています。指示された検体タイプのみ検査してください。信頼できる結果は、検体の適切な保管および処理に依存します。本説明書に記載する方法に従ってください。
- 14.2. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、ゲノム DNA の抽出に関し、QIAamp DNA Blood Mini Kit のみについて検証されています。
- 14.3. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、3 bp から 323 bp のサイズの ITD 変異を検出しますが、検証されているのは 30 bp から 279 bp のサイズの変異の検出のみです。
  - 14.3.1. 3 bp から 30 bp の間の ITD 挿入は、ITD 変異として報告されます。
  - 14.3.2. 279 bp から 323 bp の間の ITD 挿入は、ITD 変異として報告されます。
  - 14.3.3. 323 bp を超えるサイズの ITD 挿入は、挿入として報告されません。
- 14.4. 本アッセイは、アッセイの感受性レベル未満の *FLT3* 変異を検出しない可能性があります。
  - 14.4.1. ITD 挿入が 30 bp から 126 bp のサイズ範囲に含まれ、アレル比が 0.08 である場合、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の結果は陽性となります。
  - 14.4.2. ITD 挿入が 129 bp から 279 bp のサイズ範囲に含まれ、アレル比が 1 である場合、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の結果は陽性となります。
  - 14.4.3. EcoRV 部位を変化させる TKD 変異で、アレル比が 0.18 である場合、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の結果は陽性となります。
- 14.5. 本アッセイの結果は常に、臨床データおよび患者に実施したその他の検査結果との関連において解釈する必要があります。
- 14.6. 変異の検出は、検体中に存在する変異配列のコピー数に依存すると共に、検体の完全性、分離された DNA の量、および干渉物質の存在にも影響される可能性があります。PCR ベースのアッセイは、DNA の分解による干渉や、EDTA およびその他の薬品による PCR の阻害に影響されます。
- 14.7. 本製品の使用は、PCR 技術およびリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の使用について訓練を受けた者に限定されます。
- 14.8. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は定性的な検査です。本検査は ITD または TKD 変異の定量的測定を目的としたものではありません。
- 14.9. 本アッセイを用いて、検体のアレル比を算出、測定、または決定することはできません。

## 15. 予測される値

### 15.1. 増幅産物の予測されるサイズ

15.1.1. 3500xL Dx 機器を用いて決定した増幅産物のサイズを示します(表 16)。

**注記:** “色素チャンネル” は、ABI 蛍光検出システムにおいて指定された初期色を用いた際に、マスターミックスによって生成された産物の色を示します。

表 16: 予測される増幅産物サイズ

マスターミックス	品番	ターゲット	色素チャンネル	コントロール DNA	ヌクレオチドによる産物サイズ
<i>FLT3</i> ITD	R0880200 R0880220	エクソン 14 および 15	青および緑	有効サイズの範囲	326-650
				<i>FLT3</i> ITD 陽性コントロール DNA	327±1, 357±1
				<i>FLT3</i> 抽出コントロール DNA	327±1
<i>FLT3</i> TKD	R0880210 R0880220	エクソン 20	青	有効サイズの範囲	78-80, 124-128
				<i>FLT3</i> TKD 陽性コントロール DNA	79±1, 127±1
				<i>FLT3</i> 抽出コントロール DNA	79±1, 127±1*

\*127 塩基対 (bp) の小さい産物ピークは、抽出コントロールに存在する場合と存在しない場合があります。

## 16. 非臨床的なパフォーマンス評価

### 16.1. 分析感度 - ブランク上限 (LoB)

16.1.1. 野生型 DNA のみを含む検体 (すなわち変異型ブランク) をリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査によって検査すると、シグナル比 (SR) は ITD アッセイで 0.00、TKD アッセイで 0.00 から 0.01 でした。このブランク上限は、0.05 の臨床カットオフ値 SR よりも十分低いものです。

### 16.2. 分析感度

16.2.1. アッセイの検出限界 (LoD) を 2 回の試験で評価しました。最初の試験では、細胞株と白血球を除去した全血を混合することによって作製した人工的なサンプルを用いました。細胞株サンプルは、サイズが 21 bp の挿入、30 bp の挿入、126 bp の挿入、および 279 bp の挿入である、3 つの ITD 挿入を表すために用いました。D835 変異を含む、追加の細胞株についても評価を行いました。DNA を 5 ng /  $\mu$ L、10 ng /  $\mu$ L、および 15 ng /  $\mu$ L に希釈し、各細胞株について複数のアレル比を調べました。臨床検体を用いた 2 番目の試験は、細胞株によって得た LoD の知見を確認するために行いました。ターゲットシグナル比 (TSR) が適切な細胞株検量線の直線範囲内で読み取れるように、5 つの臨床検体を臨床的な陰性検体によって希釈しました (表 17)。各検体を、低度陰性 (LN)、高度陰性 (HN)、カットオフ値付近 (CO)、低度陽性 (LP)、および中等度陽性 (MP) を表わす 5 レベルに希釈しました。直線範囲にあるこれらの検体をリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査によって検査して、平均 SR 値を決定しました。各臨床 LoD 検体の希釈液を、各希釈レベルに付き 20 回、連続しない 4 日間 (1 日あたり 5 回の反復) に、1 名のオペレーターによって 1 つの器具セットを用いて検査しました。各臨床 LoD 検体希釈液のアレル比 (AR) を、細胞株検量線から推定した AR を用いて算出しました。臨床 LoD 検体の AR は、以下に挙げる許容基準を満たす試験に基づいて推定しました:

- *FLT3* 変異が  $\geq 95\%$  の再現性でブランク上限 (LoB) を超えて検出できる SR および AR (分析 LoD)。
- 臨床カットオフ値に近い AR、0.04~0.06 の SR (カットオフ値)。
- $\geq 95\%$  の再現性で臨床カットオフ値もしくはその値を超えて検出される AR および SR (カットオフ値超)。

表 17: 各検体および希釈レベルごとの SR、AR、および LoD

検体 ID	変異	レベル	TSR	SR 平均	混合物の AR	有効 N	N (%) SR > LoB	N (%) SR ≥ 0.05	*分類
TKD CS1	TKD I836	LN	0.02	0.02	0.039	20	20 (100.0)	0	分析LoD
		HN	0.03	0.03	0.057	20	20 (100.0)	0	-
		CO	0.05	0.05	0.094	20	20 (100.0)	16 (80.0%)	カットオフ値
		LP	0.08	0.07	0.144	20	20 (100.0)	20 (100.0)	カットオフ値超
		MP	0.13	0.12	0.224	20	20 (100.0)	20 (100.0)	-
TKD CS2	TKD D835	LN	0.01	0.02	0.023	20	20 (100.0)	0	分析LoD
		HN	0.02	0.03	0.047	20	20 (100.0)	0	-
		CO	0.04	0.05	0.089	20	20 (100.0)	19 (95.0)	カットオフ値 カットオフ値超
		LP	0.07	0.08	0.152	20	20 (100.0)	20 (100.0)	-
		MP	0.13	0.15	0.269	20	20 (100.0)	20 (100.0)	-
ITD CS1	ITD 24 bp	LN	0.02	0.02	0.044	20	20 (100.0)	0	分析LoD
		HN	0.03	0.03	0.065	20	20 (100.0)	0	-
		CO	0.05	0.05	0.107	20	20 (100.0)	20 (100.0)	カットオフ値 カットオフ値超
		LP	0.08	0.08	0.165	20	19 (95.0)	19 (95.0)	-
		MP	0.13	0.13	0.257	20	20 (100.0)	20 (100.0)	-
ITD CS2	ITD 66 bp	LN	0.02	0.02	0.045	20	20 (100.0)	0	分析LoD
		HN	0.03	0.03	0.066	20	20 (100.0)	0	-
		CO	0.05	0.05	0.110	20	20 (100.0)	18 (90.0)	カットオフ値
		LP	0.09	0.08	0.189	20	20 (100.0)	20 (100.0)	カットオフ値超
		MP	0.14	0.13	0.280	20	20 (100.0)	20 (100.0)	-
ITD CS3	ITD 217 bp	LN	0.01	0	0.073	20	2 (10.0)	0	-
		HN	0.02	0.02	0.147	20	15 (75.0)	0	-
		CO	0.04	0.04	0.276	20	20 (100.0)	9 (45.0)	分析LoD カットオフ値
		LP	0.08	0.08	0.539	20	19 (95.0)	19 (95.0)	カットオフ値超
		MP	0.13	0.13	0.838	20	20 (100.0)	20 (100.0)	-
True Neg ITD	なし	TN	N/A	0	0	20	0	0	N/A
TrueNeg TKD	なし	TN	N/A	0	0	20	0	0	N/A

\*分類は以下のように定義される。1: 分析 LoD = 検体が 95%の確率で LoB を超えて検出される最小 AR、2: カットオフ値は、検体が SR 0.05 に近い AR、3: カットオフ値超 = 検体が 95%の確率で SR 0.05 もしくはその値を超えて検出され得る最小 AR。

16.2.2. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、以下に挙げる変異タイプ<sup>®</sup>の臨床カットオフ値を超えた、以下に挙げる変異型 / 野生型アレル比を検出可能です:

16.2.3. サイズが 24 bp の ITD 挿入については、95%を超える検体で、0.107 のアレル比がカットオフ値 SR を超えて検出されました。これらの検体の SR %CV は 7.1%でした。

16.2.3.1. サイズが 66 bp の ITD 挿入については、95%を超える検体で、0.189 のアレル比がカットオフ値 SR を超えて検出されました。これらの検体の SR %CV は 7.1%でした。

16.2.3.2. サイズが 217 bp の ITD 挿入については、95%を超える検体で、0.539 のアレル比がカットオフ値 SR を超えて検出されました。これらの検体の SR %CV は 25.6%でした。

16.2.3.3. EcoRV 部位を破壊する D835 TKD 変異については、95%を超える検体で、0.089 のアレル比がカットオフ値 SR を超えて検出されました。これらの検体の SR %CV は 4.5%でした。

16.2.3.4. EcoRV 部位を破壊する I836 TKD 変異については、95%を超える検体で、0.144 のアレル比がカットオフ値 SR を超えて検出されました。これらの検体の SR %CV は 5.7%でした。

16.2.3.5. AR 値の % 変異への換算を以下の表 18 に示します。

表 18: 分析感度、アレル比および % 変異

検体 ID	変異	変異の分類	カットオフ値超 95% SR ≥ 0.05		
			AR	SR	%変異
TKD CS1	TKD I836	TKD I836 欠失	0.144	0.07	12.6
TKD CS2	TKD D835	TKD D835 置換	0.089	0.05	8.2
ITD CS1	ITD 24bp	短い ITD 挿入 <30bp	0.107	0.05	9.7
ITD CS2	ITD 66bp	中程度の ITD 挿入 30~100bp	0.189	0.08	15.9
ITD CS3	ITD 217bp	長い ITD 挿入 ~200bp	0.539	0.08	35.0

### 16.3. 精度

- 16.3.1. 21 bp から 126 bp の範囲の挿入を有する ITD 変異検体および TKD 変異検体それぞれについて、3 名のオペレーターが独立してテストを 10 回反復することにより、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の精度を決定しました。テストの 10 回の反復とは、2 回のバッチを 5 回の別々の時間に行ったものです。
- 16.3.2. ITD 変異検体について、3 名のオペレーターによる SR %CV の範囲は、7.4% から 15.0%、3.7% から 13.0%、および 4.2% から 8.8% でした。
- 16.3.3. TKD 変異検体について、3 名のオペレーターによる SR %CV の範囲は、6.3% から 11.2%、5.8% から 9.3%、および 5.5% から 8.3% でした。

### 16.4. オペレーターごとの再現性（細胞株）

- 16.4.1. 21 bp、30 bp、および 126 bp の挿入 ならびに D835 TKD 変異を含む ITD 細胞株からなる検体。これらの検体は、短い内部縦列重複（ITD）挿入、長い ITD 挿入、およびチロシンキナーゼドメイン（TKD）変異に対する、低度（カットオフ値付近）、中等度、 および高度（100%変異型の細胞株）の変異型対 野生型シグナル比（SR）を表現するものでした。3 名のオペレーターが、1 ロットの試薬と 1 台の装置を使って、15 ランを各 10 レプリケートでテストしました。SR %CV の範囲は 6.6%から 13.3% でした。
- 16.4.2. TKD 変異検体について、SR %CV の範囲は 7.9%から 9.3% でした。
- 16.4.3. 30 bp までの挿入を有する ITD 変異検体について、SR %CV の範囲は 6.6%から 9.4% でした。
- 16.4.4. 126 bp の挿入を有する ITD 変異検体について、SR %CV の範囲は 9.0%から 13.3% でした。

### 16.5. オペレーターごとの再現性（臨床検体）

- 16.5.1. 2 番目の試験では、7 臨床検体（5 PB および 2 BM）から得た臨床 DNA 検体を用いて精度を評価しました。これらの臨床検体には、ITD の長さが 21 bp、24 bp、66 bp、90 bp、および 217 bp である検体、TKD D835 置換を有する検体、TKD I836 欠失を有する検体、および 8（4 PB および 4 BM）*FLT3* 変異陰性検体が含まれました。アッセイの臨床カットオフ値に近い 3 つのターゲット SR レベル（すなわち高度陰性、低度陽性、および中等度陽性）を達成するため、*FLT3* 変異陰性の臨床検体から得た DNA をプールして、*FLT3* 変異陽性検体の希釈に用いました。*FLT3* 変異陽性臨床検体のうち 5 つは PB に由来し、2 つは BM に由来しました。5 つの ITD 陽性検体、2 つの TKD 陽性検体、および 1 つの真に陰性であるプール検体の 3 回の反復テストを、3 名の異なるオペレーター / 器具セットにより行いました。テストは 1 つの試薬ロットを用いて、連続しない 5 日間、陽性検体については 3 つの希釈レベルで、陰性検体は希釈せずに行いました。各オペレーターは、希釈レベルあたり合計 15 レプリケートをテストしたので、全体ではレベルあたり 45 レプリケートになりました。



- 16.5.2. すべての変異タイプおよびレベルの全体的%CVを以下の表に示します。長い ITD 挿入 (217 bp) を有する検体を除くすべての変異タイプの%CVは、4.2%から 16.1%の範囲でした。217 bp の変異を有する検体の%CVは、26.9%から 27.2%の範囲でした。217 bp の検体では低度陽性 (LP) 希釈レベルの%CVが 26.9%であったため、SR については $\leq 25\%$  CV であるという試験の受け入れ基準を満たしませんでした。結果は、D835 および I836 TKD 変異の両方、ならびに最大 217 bp までの ITD 変異については、受け入れ基準を満たしていることを示しました。したがって、217 bp ITD 変異の変動が 25%を超えたことは、最も長い ITD の周辺では不正確度が高くなることを示しています。

表 19: 変異タイプおよび希釈レベルあたりの分散成分

検体 ID	変異タイプ	希釈レベル	平均 SR	以下の原因によるSRの変動			全体的変動	
				オペレーター / 器具 SD (%)	実施日 SD (%)	偶然誤差 SD (%)	SD	%CV
S1	TKD I836	HN	0.03	0.000 (3.22%)	0.000 (0.00%)	0.002 (96.78%)	0.002	7.1
		LP	0.077	0.001 (2.60%)	0.000 (0.00%)	0.005 (97.40%)	0.005	5.9
		MP	0.132	0.002 (6.67%)	0.003 (17.43%)	0.005 (75.90%)	0.006	4.6
S2	TKD D835	HN	0.04	0.001 (7.13%)	0.000 (0.00%)	0.002 (92.87%)	0.002	5.3
		LP	0.08	0.002 (14.02%)	0.001 (2.47%)	0.004 (83.51%)	0.004	5.3
		MP	0.165	0.003 (16.28%)	0.000 (0.00%)	0.007 (83.72%)	0.007	4.2
S3	ITD 21 bp	HN	0.03	0.000 (0.00%)	0.000 (0.00%)	0.001 (100.0%)	0.001	5
		LP	0.074	0.000 (0.00%)	0.002 (8.08%)	0.005 (91.92%)	0.005	7.2
		MP	0.133	0.002 (14.46%)	0.000 (0.00%)	0.005 (85.54%)	0.006	4.4
S4	ITD 24 bp	HN	0.029	0.000 (0.00%)	0.000 (0.00%)	0.004 (100.0%)	0.004	15.2
		LP	0.07	0.000 (0.00%)	0.000 (0.92%)	0.004 (99.08%)	0.004	5.3
		MP	0.147	0.002 (8.20%)	0.001 (3.28%)	0.006 (88.52%)	0.007	4.5
S5	ITD 66 bp	HN	0.029	0.001 (4.28%)	0.000 (0.00%)	0.005 (95.72%)	0.005	16.1
		LP	0.083	0.000 (0.00%)	0.001 (1.13%)	0.007 (98.87%)	0.007	8
		MP	0.185	0.000 (0.00%)	0.000 (0.00%)	0.010 (100.0%)	0.01	5.3
S6	ITD 90 bp	HN	0.03	0.001 (5.15%)	0.000 (0.00%)	0.003 (94.85%)	0.003	10.1
		LP	0.091	0.004 (25.23%)	0.002 (8.42%)	0.007 (66.35%)	0.008	8.5
		MP	0.206	0.013 (44.26%)	0.005 (7.34%)	0.013 (48.40%)	0.019	8.5
S7	ITD 217 bp	HN	0.032	0.001 (0.90%)	0.002 (7.20%)	0.008 (91.90%)	0.009	27.2
		LP	0.079	0.013 (31.42%)	0.009 (14.86%)	0.017 (53.71%)	0.023	26.9
		MP	0.162	0.029 (36.75%)	0.015 (9.86%)	0.035 (53.39%)	0.047	27.2

## 16.6. ロットごとおよび器具ごとの再現性

- 16.6.1. 1 名のオペレーターが、3 ロットの試薬を 3 セットの器具を用いて同じ検体のセットをテストすることにより、ロットごとおよび器具ごとの再現性を決定しました。細胞株検体は、サイズが 21 bp から 126 bp の範囲の挿入を含む ITD 変異検体および TKD 変異検体から構成されました。
- 16.6.2. ITD 変異検体について、SR %CV の範囲は 3.0%から 8.4%でした。
- 16.6.3. TKD 変異検体について、SR %CV の範囲は 5.4%から 10.6%でした。

## 16.7. 阻害物質 - 外因性

- 16.7.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、18 bp から 114 bp のサイズの ITD 変異および TKD 変異を、DNA 分離過程で使用するヘパリンナトリウムおよび洗浄バッファの存在下で検出可能です。

## 16.8. 阻害物質 - 内因性

- 16.8.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、18 bp から 114 bp のサイズの ITD 変異および TKD 変異を、脂質 / トリグリセリド、ヘモグロビン、タンパク質、およびビリルビンの存在下で検出可能です。



## 16.9. 阻害物質 - 治療薬

- 16.9.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、18 bp から 114 bp のサイズの ITD 変異および TKD 変異を、シタラピンおよびダウノルピシンの存在下で検出可能です。

## 16.10. キャリーオーバーおよび交差汚染

- 16.10.1. 典型的なチェッカーボードプレートマップのセットアップを通じた検証により、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査にとってキャリーオーバーおよび交差汚染による問題がないことが示されました。
- 16.10.2. キャリーオーバー / 交差汚染の検出は 0% でした。
- 16.10.3. ITD および TKD の NTC (No Template Control) の不具合率は 0% でした。

## 16.11. DNA インプット

この試験の目的は、本アッセイにおいて  $10 \pm 3$  ng /  $\mu$ L の DNA インプットを用いた際に同等性が示されるという証拠を提供することでした。人工的な検体による検出限界およびダイナミックレンジ試験で使用した抽出 DNA のレプリケートを使用しました。試験にはアレル比が最も低い検体パネルメンバーに属するものだけを使用しました。以下に挙げる DNA 検体を 7、10、および 13 ng /  $\mu$ L に希釈してアッセイを行いました。陰性コントロールの反復試験は 1 回としました。

- AR 0.03 30 bp ITD (各 DNA インプットレベルにおいて 33 回の反復試験)
- AR 0.05 D835 TKD (33 回の反復試験)
- AR 0.05 126 bp ITD (22 回の反復試験)
- AR 1 279 bp ITD (11 回の反復試験)

許容基準を満たしていたのは 30 bp ITD、126 bp ITD、および D835 TKD 細胞株検体でした：1) すべての検体タイプおよび DNA インプットに対し、 $>93.9\%$  の反復試験が検体の妥当性の基準を満たしており；2) すべての検体タイプに対する全体的な変動係数 (CV) が  $<20.5\%$  で；かつ 3) 7~10 ng /  $\mu$ L および 13~10 ng /  $\mu$ L の DNA インプットによる反復試験をまとめると、すべての検体タイプに対する CV が  $<21.0\%$  でした。ITD が長い細胞株は、許容基準を満たしていませんでした。100% のレプリケートが妥当性の基準を満たしていましたが、全体的な CV、およびプールした DNA インプット間の CV は 25% を超えていました。

DNA インプット間の変異型 対 野生型シグナル比 (SR) の平均値の差は 0.022 を超えず、このような平均値の差は有意ではありませんでした。本アッセイでは、 $10 \pm 3$  ng /  $\mu$ L の DNA インプットを用いることで、一貫した結果が得られます。

## 16.12. EDTA 採血管の検証

- 16.12.1. 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、および 279bp の挿入を含む ITD 細胞株と、D835 TKD 変異細胞株を添加した、Na-ヘパリンまたは 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)、および中程度陽性変異体：野生型 S R 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。
- 16.12.2. 低度陽性検体および中程度陽性検体では、EDTA および Na-ヘパリンの両方において陽性判定は 100% の複製を示しました。高度陰性および真の陰性の検体では、EDTA および Na-ヘパリン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。
- 16.12.3. EDTA および Na-ヘパリンにおける SR 値の %CV は、それぞれ 6.7%~17.8% および 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。
- 16.12.4. 全ての検証の許容基準が満たされたため、EDTA 採血管はリューコストラット 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。

## 16.13 NEBuffer r3.1 と NEBuffer 3.1 の同等性について

- 16.13.1 本試験より、LeukoStrat CDx *FLT3* 変異検査に含まれる、NEBuffer 3.1 と NEBuffer r3.1 が同等であるという客観的な証拠を提示します。NEBuffer (3.1 または r3.1) は、LeukoStrat CDx *FLT3* 変異検査で 2 つの TKD 変異 (D835 および I836) の検出を目的として、TKD 増幅産物を消化するために制限エンドヌクレアーゼ EcoRV 酵素と共に使用します。NEBuffer 3.1 と NEBuffer r3.1 の唯一の違いは、NEBuffer 3.1 に含まれるウシ血清アルブミンが NEBuffer r3.1 ではリコンビナントアルブミンに変更されたことです。本試験は、3 ロットの NEBuffer r3.1 と 1 ロットの NEBuffer 3.1 を使用し、8 つの TKD 陽性の臨床 DNA 検体 (少なくとも、I836 変異を有する 1 つの検体を含む) および 8 つの TKD 陰性の臨床 DNA 検体を 3 つのレプリケートで実施し、NEBuffer r3.1 と NEBuffer 3.1 の結果を比較するように設計されました。
- 16.13.2 すべての検体において NEBuffer r3.1 と NEBuffer 3.1 は、100% 一致しました。TKD 陽性検体はすべて正確に陽性と判定され、また TKD 陰性検体もすべて正確に陰性と判定されました。
- 16.13.3 NEBuffer r3.1 は、許容基準をすべて満たしたため、LeukoStrat® CDx *FLT3* 変異検査での使用が実証されました。

## 16.14 密度勾配媒体の検証

- 16.14.1 本試験は、LeukoStrat CDx *FLT3* 変異検査における密度勾配媒体 (密度 1.077 g/mL) の使用を検証することを目的としました。本試験では、変異細胞の小集団 (または割合) を分離する密度勾配媒体 (DGM) の能力を検証しました。細胞株 (21 bp 挿入、279 bp 挿入、および TKD D835) を、細胞株あたり 3 つの低い変異細胞画分で正常な末梢血と混合しました (最終的に、9 つのパネルメンバーになる)。21bp 挿入 ITD および TKD 細胞株の人工的なパネルメンバーは、最大 5% の細胞に変異体が含まれていました。長い ITD 挿入は、挿入の長さに対する PCR バイアスの結果として既知の検査の限界により、最大 30% の細胞に変異体が含まれていました。正常な末梢血も *FLT3* 陰性サンプルとして検査を行いました (その結果 1 つのパネルメンバーになる)。単核細胞は、2 日間に 2 人のオペレーターが 3 つの密度勾配媒体 (DGM) のメーカーの製品を使用して、2 つのレプリケートから分離し、密度勾配媒体ごとにパネルメンバーあたり、合計 8 つの分離レプリケートを生成しました。
- 16.14.2 追加された 2 つの DGM メーカー (DGM2 および DGM3) の全体的な陽性判定の割合を、LeukoStrat CDx *FLT3* 変異検査 (DGM1) での使用が最初に検証された DGM と比較しました。変異体の含量はすべてのパネルメンバーで低かったため、パネルメンバーのレプリケートのごく一部のみが陽性の SR 値をもたらすと予想されました (臨床カットオフ値を上回る)。DGM2 による陽性判定は DGM1 による陽性判定の 2.5% 以内であり、DGM3 による陽性判定は DGM1 による陽性判定の 1.2% 以内でした。従って、全体的な陽性判定が DGM1 の 10% 以内であるという要件を満たしました。
- 16.14.3 DGM1 を基準として、PPA の推定値は、DGM2 と DGM3 でそれぞれ 93.3% と 96.7% でした。DGM1 を基準とした NPA の推定値は、DGM2 と DGM3 の両方で 100% でした。
- 16.14.4 LeukoStrat CDx *FLT3* 変異検査における任意の 1.077 g/mL 密度勾配媒体の使用を検証する本試験の許容基準をすべて満たしました。

## 17. 臨床的なパフォーマンス評価

### 17.1. 試験の概要 (IVS-056-001)

- 17.1.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は Invivoscribe (IVS) によって開発され、急性骨髄性白血病 (AML) の評価の補助に使用するコンパニオン診断薬として FDA の承認を得ています。コンパニオン診断 (CDx) 検査としての臨床の有用性を立証するために、被験者は自身の検体がピボタル臨床試験 (ASP2215 の有効性を評価する第 III 相試験 2215-CL-0301) への登録に際しリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査によって検査されることへの同意説明文書を提出しました。*FLT3* CDx 検査で検出される 2 種類の *FLT3* 遺伝子の変異は内部縦列重複 (ITD) とチロシンキナーゼドメイン (TKD) 変異です。
- 17.1.2. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の正確性を評価するために、Illumina 社の MiSeq プラットホームを用いた次世代シーケンシング法を、ITD および TKD 変異の独立したシーケンス情報源としました。Invivoscribe はリファレンステストを開発し、*FLT3* ITD および TKD 変異の有無を評価する能力を検証しました。次に 2215-CL-0301 試験のスクリーニングと登録中に収集された生物検体から抽出された DNA を使ってリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の正確性を評価しました。

### 17.2. 試験の目的 (IVS-056-001)

- 17.2.1. 中間解析における本試験の主要目的の 1 つは、一次治療に対して難治性、または一次治療後に再発がみられた *FLT3* 変異陽性を示す AML 被験者における完全寛解および造血系の回復を伴う完全寛解 (CR / CRh) の達成率を評価することにより、ギルテリチニブフマル酸塩 (ASP2215) 療法の有効性を確定することでした。
- 17.2.2. 最終解析では、本試験の主要目的の 1 つである全生存期間において、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査で陽性を示す被験者において、層別 ログランク 検定によるギルテリチニブフマル酸塩の有効性を推定することでした。
- 17.2.3. 本試験の目的のリファレンス法は、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の正確さを確認するために、Illumina 社から販売されている次世代シーケンシングプラットフォーム MiSeq を用い、次世代 DNA シーケンシングによって *FLT3* 変異の有無を独立して評価することです。本試験の目的は、ASP2215 化合物に対する リューコストラット *FLT3* 変異検査 CDx のピボタル試験の副次目的に記載されています。

### 17.3. 患者集団 (IVS-056-001)

- 17.3.1. 中間解析では、485 被験者からの 594 を超える検体がリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査を使ってスクリーニングされました。ギルテリチニブフマル酸塩 / ASP2215 群の 142 被験者が最初の中間解析に含まれていました。被験者は BM または PB 検体中の *FLT3* 変異による識別に基づき、本試験に登録されました。本試験の臨床的カットオフ値は 0.05 (変異型 対 野生型シグナル比) に設定されました。
- 17.3.2. 最終解析では、633 被験者から 771 検体がリューコストラット 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。リューコストラット 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。

### 17.4. リファレンステスト用検体の選択 (IVS-056-001)

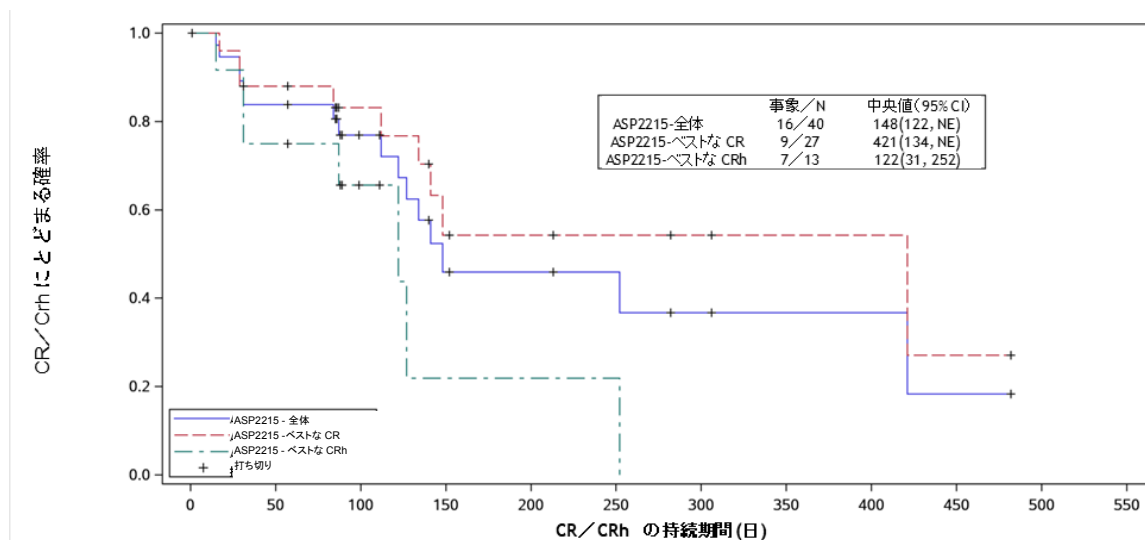
- 17.4.1. リファレンステストのために、被験者 1 名あたり 1 検体を選択しました。リファレンステストを行うには量が不十分な検体は本試験から除外しました。合計 467 検体がリファレンステストされました。

### 17.5. 安全性解析 (IVS-056-001)

- 17.5.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査が実際の、または潜在的な有害作用の直接的な原因になることは予想されませんが、検査結果は患者の治療リスクに直接影響する可能性があります。

17.6. 有効性 (IVS-056-001)

17.6.1. 初回の中間解析では、CR / CRh を達成した被験者における CR/CRh 持続期間の中央値は 148 日間でした（事象=16；打ち切り=40）。最良効果として CR を達成した被験者群における奏功期間の中央値は、421 日間でした（事象=9；打ち切り=27）。CRh を達成した被験者群における奏功期間の中央値は、122 日間でした（事象=7；打ち切り=13）。図 8: に Kaplan・マイヤープロットを示します。



リスクのある被験者数	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500	550
ASP2215 - 全体	40	30	17	7	6	5	3	2	2	1	0	0
ASP2215 - ベストな CR	27	21	13	6	5	4	3	2	2	1	0	0
ASP2215 - ベストな CRh	13	9	4	1	1	1	0	0	0	0	0	0

図 8: - CR / CRh 期間の Kaplan・マイヤープロット

17.6.2. 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 ヶ月)に対し、全生存期間がより長い(9.3 ヶ月)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)。図 9: に Kaplan・マイヤープロットを示します。

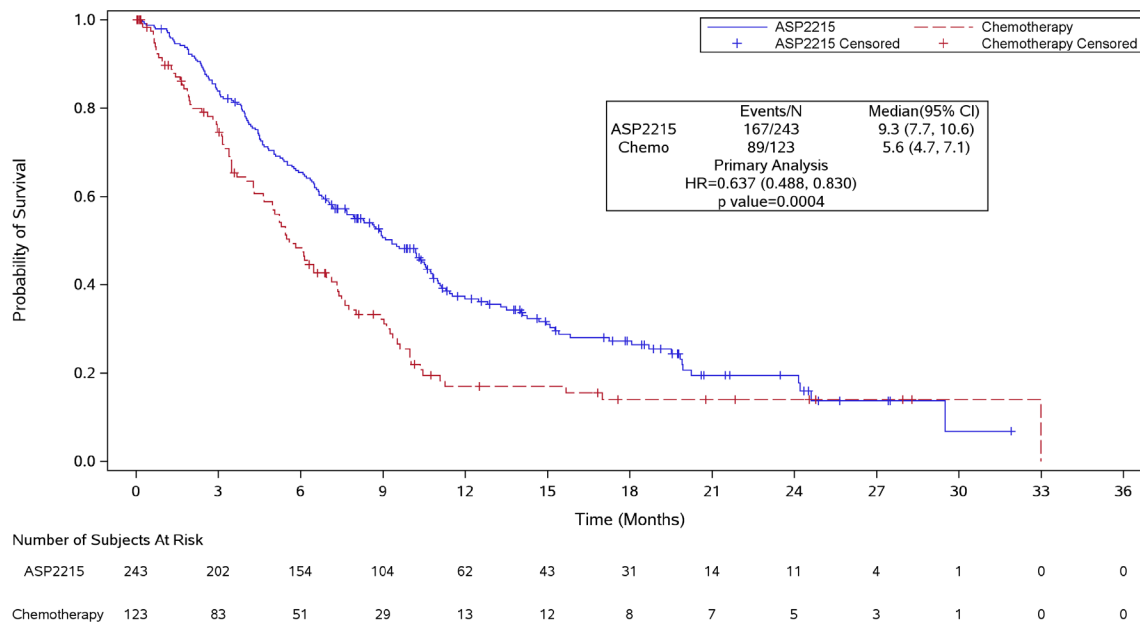


図 9: 全生存期間のカプラン・マイヤープロット

17.6.3. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査とリファレンス法は一致していることが示されました。全体的な一致率は高いものでした (97.2%)。OPA の 95%信頼区間の下限は 90%を超えていることから、*FLT3* 変異 CDx と MiSeq シークエンシングアッセイ間の一致が示されています。

表 20: CDx と MiSeq シークエンシング間的一致

一致	一致率 (N)	95% CI <sup>(1)</sup>
PPA	100% (300 / 300)	(98.8%, 100%)
NPA	92.0% (150 / 163)	(86.7%, 95.7%)
OPA	97.2% (450 / 463)	(95.2%, 98.5%)

<sup>(1)</sup> 95% CI は 正確 (Clopper Pearson) 法を用いて算出。

ITD の PPA、NPA、および OPA の点推定値はそれぞれ 100%、92.8%、および 97%です。

表 21: ITD CDx と MiSeq シークエンシング間の分割表

CDx	MiSeq		総数
	MiSeq+	MiSeq-	
CDx+	270	14	284
CDx-	0	180	180
総数	270	194	464

TKD の PPA、NPA、および OPA の点推定値はそれぞれ 100%、99.3%、および 99.4%です。

表 22: TKD CDx と MiSeq シークエンシング間の分割表

CDx	MiSeq		総数
	MiSeq+	MiSeq-	
CDx+	32	3	35
CDx-	0	431	431
総数	32	434	466



## 17.7. 結論 (IVS-056-001)

- 17.7.1. 初回の解析では、142 名中 40 名の被験者が最良効果として CR / CRh を達成しました (CR / CRh 率: 28.2%、95% CI: 20.9%、36.3%)。CR / CRh 率の 95% CI の下限は、本共同主要評価項目として予め指定した 12%の閾値を超えていました。リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査によって *FLT3* 変異陽性であった被験者の CR / CRh 率の評価は、同程度の結果を示しました。CR / CRh 率の 95% CI の下限は 20.3%と算出されました。*FLT3* 変異状態が不明 / 紛失 / その他の理由により 4 被験者が除外されたにも関わらず、本試験は許容基準を満たしました。
- 17.7.2. 最終解析では、366 被験者が FAS に含まれました。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済化学療法群 (5.6 ヶ月) に対し、全生存期間がより長い (9.3 ヶ月) 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、救済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)。
- 17.7.3. 検査のレファレンス方法について、本試験の許容基準は満たされました: 全体的な一致の (OPA) 95% 両側正確 (Clopper-Pearson) 信頼区間の下限は 90%を超えました。リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査と MiSeq 次世代シーケンシング リファレンス法間の一致が確立されたと考えられます。

## 17.8. ビボタル・ブリッジング試験の概要 (IVS-062-002)

- 17.8.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査 (CDx) の安全性と有効性の評価を裏付けるために、ITT 解析集団において *FLT3*-ITD 変異状態について AC220-007 治験時に使用された検査 (CTA) とリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査で臨床的な一致を示すことが必要でした。このビボタル・ブリッジング試験は、AML の一次治療後から 6 か月以内の *FLT3*-ITD 変異陽性の再発・難治の AML 被験者を対象とするキザルチニブ塩酸塩の第 III 相 AC220-007 治験に対応しています。リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、*FLT3*-ITD 変異を有する AML 患者に対し医師が適応を判定するための補助となることを意図しています。
- 17.8.2. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、キザルチニブ塩酸塩の AML への適応を判定するための補助に役立てるために使用するコンパニオン診断として Invivoscribe によって開発されました。リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査によって層別化された際の CTA との性能一致および薬効について、本ビボタル・ブリッジング試験で評価しました。

## 17.9. 治験の目的 (IVS-062-002)

- 17.9.1. 第一三共株式会社が治験で使用した検査 (CTA) とリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査 (ITD 部分のみ) 間で判定の全体一致率な陽性一致率および陰性一致率を評価することによって、これら 2 つの検査間で *FLT3* 変異患者の選定に関する一致を確立します。
- 17.9.2. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査で判定された AML の一次治療後から 6 か月以内の *FLT3*-ITD 変異陽性の再発・難治の被験者を対象とするキザルチニブ塩酸塩単剤療法における、救済化学療法と比較した全生存期間 (OS) の延長について判定します。

## 17.10. 患者集団 (IVS-062-002)

- 17.10.1. AC220-007 への登録のために第一三共株式会社の治験検査で 535 名がスクリーニングされました。本ビボタル・ブリッジング試験へ選択された被験者は、AC220-007 治験でスクリーニングされ、説明同意を得て保管されていた利用可能な検体から選択されました。被験者 531 名より得られた検体が、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の検査に利用可能でした。被験者 531 名の内、431 名は CTA+で、99 名は CTA-でした。CDx で検査した被験者 1 名は CTA データセットで利用できませんでした。
- 17.10.2. 保管された検体についてのリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の完了時に、被験者 528 名において CTA と CDx の両方で有効な結果が得られ、この一致解析に利用できました。

## 17.11. 安全性解析 (IVS-062-002)

- 17.11.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査が実際の、または潜在的な有害作用の直接的な原因になることは予想されませんが、検査結果は患者の治療リスクに直接影響する可能性があります。

## 17.12. 有効性 (IVS-062-002)

- 17.12.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は CTA との一致し、AC220-007 治験の結果と同様の性能を示しました。

### 17.12.1.1. 主要解析で立証された事項:

CDx と CTA の有効な結果を有する被験者 520 名のサブセットを基に、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査と第一三共株式会社が試験で使用した CTA との一致が示されました。陽性一致率 (PPA)、陰性一致率 (NPA) および全体一致率 (OPA) の点推定は 90% を超えました。

表 23: ITD CTA 比較についての主要解析。

ITD CDx	ITD CTA		総数
	CTA+	CTA-	
CDx+	412	0	412
CDx-	10	98	108
無効な検査	0	0	0
総数	422	98	520

無効な検査とは、CDx 法で検査したある検体において有効な検査結果が得られなかった事を示す。

一致率 (95% CI):

- PPA 97.6% (95.7%, 98.9%)
- NPA 100% (96.3%, 100%)
- OPA 98.1% (96.5%, 99.1%)

### 17.12.1.2. (CTA+, CDx+) 集団 (351 名の被験者) における薬効評価:

CDx 陽性集団の全生存率についてキザルチニブ塩酸塩の薬効が評価されました。救援化学療法と比較し、キザルチニブ塩酸塩での治療は、OS において統計学的有意な臨床的改善を認めました。OS の中央値は、救援化学療法群では 20.0 週間であったが、キザルチニブ塩酸塩群では 26.9 週間と 6.9 週間延長した結果 ( $p = 0.0187$  片側、層別化ログランク解析) が得られました。Cox 回帰は、救援化学療法群との比較によって推定された層別化ハザード比 (HR) は 0.757 (0.580, 0.956) と推定され、キザルチニブ塩酸塩群が優位性を示す 24.3% の死亡の相対リスクの低減に相当しました。

## 17.13. 結論 (IVS-062-002)

- 17.13.1. 全体的にこれらの結果は、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査が、*FLT3* ITD 遺伝子変異について、AC220-007 治験に登録した同一の AML 患者集団を同定し得たことを裏付けています。

## 17.14. ピボタル・ブリッジング試験の概要 (IVS-062-005)

- 17.14.1. リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査 (CDx) の安全性と有効性の評価を裏付けるため、AC220-A-U302 試験において使用された検査 (CTA) とリューコストラット CDx *FLT3* 変異検査の間で ITT 解析集団における *FLT3*-ITD 変異状態について臨床的な一致性を確認するピボタル・ブリッジング試験を実施しました。本ピボタル・ブリッジング試験は、初発の *FLT3*-ITD 変異を有する AML と診断された患者を対象としたキザルチニブ塩酸塩の第 III 相試験 (AC220-A-U302 試験: QuANTUM-First 試験) に対応しています。本ピボタル・ブリッジング試験は、リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査で *FLT3*-ITD 変異陽性と診断された AML 患者に、キザルチニブ塩酸塩が投与された場合の本製品と薬剤の安全性と有効性を示しています。リューコストラット CDx *FLT3* 変異検査は、*FLT3*-ITD 変異を有する AML 患者に対し医師が *FLT3* 阻害剤の適応を判定するための補助となることを意図しています。



- 17.14.2. リューコストラット CDx FLT3 変異検査は、キザルチニブ塩酸塩の AML への適応を判定するための補助に使用するコンパニオン診断薬として Invivoscribe によって開発されました。 リューコストラット CDx FLT3 変異検査によって層別化された際の CTA との性能一致および薬効について、本ピボタル・ブリッジング試験で評価しました。

#### 17.15. 治験の目的 (IVS-062-005)

- 17.15.1. 2つの検査間の陽性一致率及び陰性一致率 (PPA と NPA) を評価することにより、AC220-A-U302 試験で使用した検査 (CTA) とリューコストラット CDx FLT3 変異検査の間で、FLT3-ITD 変異陽性患者の選択の一致を示すことを目的としました
- 17.15.2. また、リューコストラット CDx FLT3 変異検査によって陽性 (CTA (+)、CDx (+) 集団) と判定された初発の FLT3-ITD 変異を有する AML と診断された被験者において、キザルチニブがプラセボと比較して全生存期間 (OS) を延長するかどうかを評価しました。

#### 17.16. 患者集団 (IVS-062-005)

- 17.16.1. AC220-A-U302 試験への登録のため 3468 名の患者が、第一三共株式会社が使用した検査 (CTA) でスクリーニングされ、第一三共株式会社から 1033 名のサンプルが本ブリッジング試験のために提供されました。 そのうち 1029 名の被験者のサンプルは、リューコストラット CDx FLT3 変異検査の実施基準を満たしていました。 これらの 1029 名の被験者のうち、513 名が CTA +、516 名が CTA - でした。
- 17.16.2. リューコストラット CDx FLT3 変異検査によるサンプルの検査完了後、1023 名の被験者が CTA と CDx の両方で有効な結果を出し、6 名の被験者は CDx で有効な結果が得られませんでした。

#### 17.17. 安全性解析 (IVS-062-005)

- 17.17.1. リューコストラット CDx FLT3 変異検査が実際のまたは潜在的な有害作用の直接的な原因になることは想定されませんが、検査結果は患者の治療リスクに直接影響する可能性があります。

#### 17.18. 有効性 (IVS-062-005)

- 17.18.1. リューコストラット CDx FLT3 変異検査結果は CTA の結果と一致し、AC220-A-U302 試験の結果と同様の有効性を示しました。

##### 17.18.1.1. 主要解析で立証された事項

被験者 1029 名のサブセットに基づいて、リューコストラット CDx FLT3 変異検査結果と CTA の結果と

の一致が示されました。陽性一致率 (PPA)、陰性一致率 (NPA) の点推定値は 90% を超えました。

表 24: CDx と CTA の分割表

ITD CDx	ITD CTA		Total
	CTA+	CTA-	
CDx+	483	0	483
CDx-	27	513	540
無効な検査	3	3	6
総数	513	516	1029

無効な検査とは、CDx 法で検査したある検体において有効な検査結果が得られなかった事を示す。

CDx 無効結果を含む一致率 (95% CI) は次のとおりです。

- PPA 94.2% (91.8%, 96.0%)
- NPA 99.4% (98.3%, 99.9%)

#### 17.18.1.2. (CTA+, CDx+) 集団 (483 名の被験者)における被験者:

CDx 陽性集団の全生存率 (OS) に対するキザルチニブ塩酸塩の有効性を評価しました。(CTA+, CDx+) 集団では、標準的な化学療法と併用したキザルチニブ治療により、プラセボと比較して OS の延長が認められました。キザルチニブ群の OS 中央値は 29.4 か月 (19.1, NE) でしたが、プラセボでは 14.8 か月 (13.1, 26.2) であり、OS 中央値は 14.6 か月延長しました (両側、層別ログランク p 値= 0.0640)。層別ハザード比 (HR) は、プラセボと比較して 0.794 (0.621, 1.014) と推定されました。これは、キザルチニブの投与により死亡の相対リスクが 20.6%低減したことに相当します。この結果は、QuANTUMFirst (AC220-A-U302) 試験で観察された結果と同等でした。

#### 17.19. 結論(IVS-062-005)

17.19.1. 以上の結果は、リユーコストラット CDx *FLT3* 変異検査が、*FLT3*-ITD 遺伝子変異に関して AC220-A-U302 試験に登録された被験者と同じ AML 患者集団を同定し得たことを裏付けています。

## 18. 参考文献

1. Murphy KM, Levis M, Hafez MJ, Gieger T, Copper LC, Smith BD, Small D and Berg KD. 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**:96-102.
2. Yamamoto, Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 2001, **97**(8):2434-9.

## 19. テクニカルおよびカスタマーサービス

### 連絡先



Invivoscribe, Inc.  
10222 Barnes Canyon Road, Bldg. 1  
San Diego, California 92121-2711  
USA

Phone: +1 858 224-6600  
Fax: +1 858 224-6601  
Technical Service: support@invivoscribe.com  
Customer Service: sales@invivoscribe.com

Website: www.invivoscribe.com  
Business Hours: 7:00AM~5:00PM PST / PDT

### 日本における製造販売業者および技術サポート

LabPMM 合同会社  
〒210-0821 神奈川県川崎市川崎区  
殿町三丁目 25 番 13 号

電話（日本国内）: 044 281.1500  
Fax（日本国内）: 03 6745.9346  
テクニカルサービス: support@invivoscribe.com  
カスタマーサービス: services@labpmm.co.jp

ウェブサイト: www.invivoscribe.com/japan-cdxflt3/  
営業時間: 9:00AM~5:00PM（日本時間）

テクニカルおよびカスタマーサービス担当者は、月曜日から金曜日まで、電話、電子メール、またはホームページからのお問い合わせにお答え致します。

## 20. 記号

Invivoscribe の診断用製品のラベル表示には次の記号が使用されています。



体外診断用医薬品



カタログ番号



内容量



ロット番号



保管条件



有効期限



製造者



使用説明書をご覧ください

## 21. 免責事項

本製品は体外診断用医薬品です。

これらの製品の多くは、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの核酸増幅法を必要とします。増幅プロセスまたは酵素を使用するためのこれらの特許に基づくライセンスは、この製品の購入によって明示的にも、また暗示的にも購入者に伝えられることはありません。

©2023 Invivoscribe, Inc. 無断複写 転載を禁じます。本書に記載されている商標は、Invivoscribe, Inc. および/またはその関連会社、または（本書で使用されている他の商標に関しては）各所有者の知的財産です。