

体外診断用医薬品	
日本標準商品分類番号	87 749
承認番号	21800AMZ10388000

※※2011年 3月改訂 (部分、第5版)
 ※2010年 3月改訂 (部分、第4版)

ご使用の際はこの添付文書をよく読んでから使用してください。

※ウイルス腫瘍-1遺伝子 (WT1) mRNAキット

WT1 mRNA測定キット「オーツカ」

※末梢血白血球又は骨髓液有核細胞より抽出したRNA中のウイルス腫瘍-1遺伝子 (WT1) mRNA測定用試薬

TI25502105

【全般的な注意】

1. 本キットは体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断は他の関連する検査結果や臨床症状等に基づいて総合的に判断してください。
3. 添付文書以外の使用方法については保証を致しません。
4. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

【形状・構造等 (キットの構成)】

	構成試薬名	容量・本数等	成分	
逆転写反応用試薬	1	ランダムプライマー液	100 μ L \times 1チューブ	ランダムプライマー (N6) ほか
	2	逆転写用緩衝液	500 μ L \times 1チューブ	
	3	逆転写用dNTPs液	250 μ L \times 1チューブ	デオキシアデノシン5'-三リン酸、デオキシシチジン5'-三リン酸、デオキシグアノシン5'-三リン酸、デオキシチミジン5'-三リン酸ほか
	4	逆転写酵素液	100 μ L \times 1チューブ	リバーストランスクリプターゼほか
	5	RNase阻害液	100 μ L \times 1チューブ	
	6	逆転写用DEPC処理水	1.0mL \times 1チューブ	
定量リアルタイムPCR用試薬	7-1	WT1標準液 5 \times 10 ³ copy/mL	100 μ L \times 1チューブ	
	7-2	WT1標準液 5 \times 10 ² copy/mL	100 μ L \times 1チューブ	
	7-3	WT1標準液 5 \times 10 ¹ copy/mL	100 μ L \times 1チューブ	
	8	WT1-PCR緩衝液	5.0mL \times 2ボトル	
	9	WT1蛍光プライマー・プローブ液	25 μ L \times 1チューブ	WT1フォワードプライマー、WT1リバースプライマー、WT1プローブほか
	10-1	GAPDH標準液 5 \times 10 ⁶ copy/mL	50 μ L \times 1チューブ	
	10-2	GAPDH標準液 5 \times 10 ⁵ copy/mL	50 μ L \times 1チューブ	
	10-3	GAPDH標準液 5 \times 10 ⁴ copy/mL	50 μ L \times 1チューブ	
	11	GAPDH-PCR緩衝液	5.0mL \times 2ボトル	
	12	GAPDH蛍光プライマー・プローブ液	25 μ L \times 1チューブ	GAPDHフォワードプライマー、GAPDHリバースプライマー、GAPDHプローブほか
	13	PCR用dNTPs液	500 μ L \times 1チューブ	デオキシアデノシン5'-三リン酸、デオキシシチジン5'-三リン酸、デオキシグアノシン5'-三リン酸、デオキシウリジン5'-三リン酸ほか
	14	Taqポリメラーゼ酵素液	45 μ L \times 1チューブ	Taq DNAポリメラーゼほか
	15	UDG酵素液	45 μ L \times 1チューブ	

※※【使用目的】

末梢血白血球又は骨髓液有核細胞より抽出したRNA中のウイルス腫瘍-1遺伝子 (WT1) mRNAの測定

(末梢血白血球より抽出したRNA中のWT1 mRNAは、AML患者におけるMRDモニタリングマーカーとして又はMDS患者における診断補助及び進行度モニタリングマーカーとして使用します。骨髓液有核細胞より抽出したRNA中のWT1 mRNAは、MDS患者における診断補助及び進行度モニタリングマーカーとして使用します。)

※※【測定原理】

本キットは、末梢血白血球又は骨髓液有核細胞より抽出したRNAを検体として用い、WT1 mRNAの発現量を測定するキットです。

測定原理は、逆転写反応 (RT) 及び蛍光標識プローブを用いた定量リアルタイムPCRによる増幅・測定 の2段階からなる定量リアルタイムRT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) です (図1)。

1. 逆転写反応

末梢血白血球又は骨髓液有核細胞から抽出した検体中のmRNAに対して、任意の6塩基からなるオリゴヌクレオチドであるランダムプライマーがハイブリダイゼーションし、逆転写反応によって第1鎖cDNA (complementary DNA) が合成されます (図1-①、②)。

2. 定量リアルタイムPCR

各標準液及び検体から合成された第1鎖cDNA中のWT1 mRNA又はGAPDH (グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ) mRNA由来cDNAに対して、WT1又はGAPDHフォワードプライマーがハイブリダイゼーションし、Taq DNAポリメラーゼによって2本鎖cDNAが合成されます (図1-③、④)。この合成された2本鎖cDNAを鋳型として、PCRの増幅サイクル (図1-④～⑧) を42～43サイクル行うことにより、標準液及び検体中のWT1 mRNA又はGAPDH mRNA由来cDNAを増幅します。この増幅過程において、2本鎖cDNAの片方にハイブリダイゼーションした蛍光標識プローブ (WT1又はGAPDHプローブ) が分解する際にレポーター色素の蛍光を発生し、その蛍光強度を増幅サイクル毎に測定します (図1-⑧a)。

3. 濃度算出法

PCRの際に既知濃度の標準液と未知濃度の試料を同時に増幅し、横軸に増幅サイクル数、縦軸にレポーター色素の蛍光強度 (対数変換値) をプロットした蛍光増幅曲線を作成します (図2)。蛍光強度 (対数変換値) が直線となる指数関数的増幅領域 (定量領域) の中心付近に横軸と平行な線 (crossing line) を引き、そのラインと増幅曲線の交点である増幅サイクル数を求めます。横軸に各標準液の濃度 (対数変換値)、縦軸に標準液の増幅サイクル数をプロットした標準曲線を作成します (図3)。この標準曲線上に試料の増幅サイクル数を当てはめ、濃度を算出します。

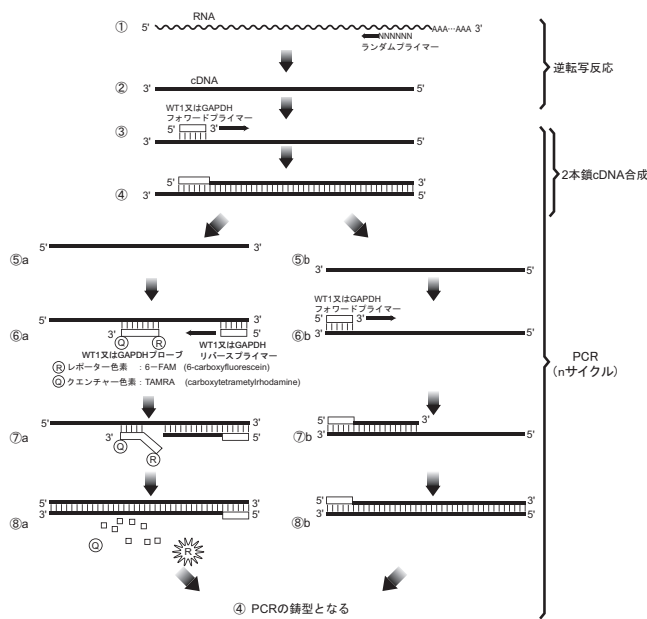


図1 測定原理

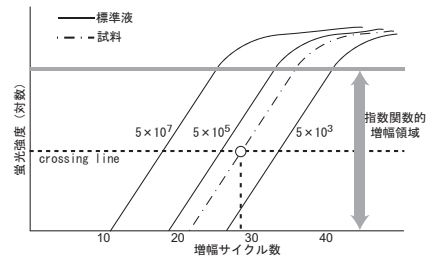


図2 蛍光増幅曲線

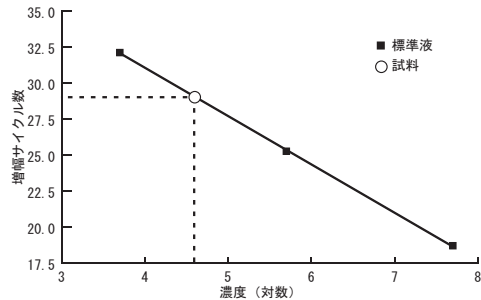


図3 標準曲線 (例)

【操作上の注意】

1. 検体に関する事項

- (1) 抽出RNAは、 -20°C 以下で保存してください。
- (2) 検体の取扱いについて

- 1) 抽出RNAは、凍結融解5回まで測定への影響は認められませんでした。
- 2) cDNA検体は、凍結融解5回まで測定への影響は認められませんでした。

2. 操作に関する事項

- (1) WT1蛍光プライマー・プローブ液及びGAPDH蛍光プライマー・プローブ液は遮光して保存してください。WT1-PCR混和液及びGAPDH-PCR混和液は(光による影響を受け易いため)反応を行うまで遮光して保管してください。
 - (2) 逆転写用緩衝液は、保存状態により沈殿が析出する場合があります。その際には試薬を $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ に戻した後、沈殿が溶解するまで十分に攪拌してください。
 - (3) 各試薬の調製は本キットの操作方法に従って、逆転写反应用試薬は逆転写反応直前、定量リアルタイムPCR用試薬はPCR反応直前にそれぞれ調製し速やかに使用してください。
 - (4) 本キットは、逆転写反応終了時点で測定を中断できます。逆転写反応済みのcDNA検体を保存する場合は -20°C 以下で保存してください。凍結したcDNA検体の再測定を行う場合は、 $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ で完全に融解した後、試験管ミキサーで混和してからPCRを行ってください。
 - (5) 本キットを使用する際には、逆転写用DEPC処理水を少なくとも1本測定し、WT1 mRNA測定及びGAPDH mRNA測定で蛍光増幅が検出されないことを確認してください。逆転写用DEPC処理水の蛍光増幅が検出された場合、その測定はコンタミネーションの可能性があるので、再測定を行ってください。
- また、各標準液を測定した場合の増幅サイクル数が表1に示した規格を満たさない場合、その測定は正しく行っていない可能性がありますので、再測定を行ってください。

表1 標準液の規格

WT1 mRNA測定時	①WT1標準液 5×10^3 copy/mLの増幅サイクル数が42サイクル以下
	②WT1標準液 5×10^7 copy/mLの増幅サイクル数とWT1標準液 5×10^3 copy/mLの増幅サイクル数の差が10～16サイクル
GAPDH mRNA測定時	①GAPDH標準液 5×10^5 copy/mLの増幅サイクル数が38サイクル以下
	②GAPDH標準液 5×10^9 copy/mLの増幅サイクル数とGAPDH標準液 5×10^5 copy/mLの増幅サイクル数の差が10～16サイクル

- (6) 検体や試薬間のコンタミネーションを避けるため、検体や試薬類の分注に際してはフィルターチップを使用し、十分注意して行ってください。
- (7) コンタミネーションを避けるため、操作は紫外線照射装置が装備されたクリーンベンチ内で行ってください。また、器具及びクリーンベンチ内は次亜塩素酸ナトリウム溶液による清掃を行ってください。
- (8) コンタミネーションを避けるため、PCR反応後のチューブはキャップを開けないでください。
- (9) 本キットを取り扱う際には微生物や核酸分解酵素のコンタミネーションを避けてください。汗や唾液に含まれるRNaseが少量でも検体に混入すると、RNAが分解され判定結果に誤りが生じる可能性があるため、ディスポーザブルゴム手袋(パウダーフリー)及びマスクを着用してください。

※【用法・用量(操作方法)】

1. 必要器具、機器等

- (1) ヒートブロック (80°C 及び 95°C に設定可能なもの)
- (2) インキュベーター (42°C に設定可能なもの)
- (3) 卓上遠心機
- (4) 試験管ミキサー
- (5) 分光光度計
- (6) マイクロチューブ (0.65mL、PCR用、DNase・RNase free)
- (7) マイクロテストチューブ (2.0mL、DNase・RNase free)

- (8) マイクロピペット (0.5~1,000 μLを連続して採取することのできる、各容量に対応したマイクロピペット)
- (9) フィルターチップ (滅菌済、フィルター付き、DNase・RNase free)
- (10) リアルタイムPCR装置 (コバス®TaqMan 48)
- (11) PCR反応用チューブ (Kチューブ又はKトレイ)
- (12) RNase free水 (DNase・RNase freeの精製水)
- (13) ディスポーザブルゴム手袋 (パウダーフリー)、マスク
- (14) クリーンベンチ

2. 検体及び試薬の調製方法

(1) RNAの抽出

RNAの抽出は、全血中の白血球成分又は骨髓液中の有核細胞より市販のRNA抽出キットを用いて行います。なお、操作方法については、RNA抽出キットの取扱い説明書をよく読んでから使用してください。(QIAGEN社製QIAamp RNA Blood Mini Kitを推奨します。)

(2) 検体の濃度調整

抽出したRNAの一部を適量のRNase free水にて希釈後、260nmにおける吸光度 (OD₂₆₀) を分光光度計にて測定します。次式によりRNA濃度を算出した後、RNase free水を添加し250ng/μLに調整します。

$$\text{RNA 濃度 (ng/μL)} = \frac{\text{OD}_{260}}{0.025} \quad *; 0.025 : \text{RNA 1ng/μL における OD}_{260}$$

測定に用いる抽出RNA濃度が250ng/μLに満たない場合は、抽出したRNA濃度によって抽出RNAの添加量 (μL) 及び逆転写用DEPC処理水の量を変化させて逆転写反応を行うことができます (表2)。

表2 抽出RNA濃度が250ng/μLに満たない場合の逆転写反応の構成試薬添加量

抽出 RNA 濃度 (ng/μL)	91	100	125	250
抽出 RNA 添加量 (μL)	11.0	10.0	8.0	4.0
逆転写用 DEPC 処理水添加量 (μL)	0.0	1.0	3.0	7.0
ランダムプライマー液添加量 (μL)	1.0	1.0	1.0	1.0
逆転写反応用混和液添加量 (μL)	8.0	8.0	8.0	8.0

(3) 試薬の調製方法

逆転写酵素液、RNase阻害液、Taqポリメラーゼ酵素液及びUDG酵素液は、直前に冷凍庫より取り出し、穏やかに混和後スピンドウンして使用してください。

他の構成試薬は20~30°Cに戻した後、試験管ミキサーで混和後スピンドウンして使用してください。

なお、スピンドウンとは、チューブ内の少量の検体や試薬をチューブの底に集めるための操作であり、卓上遠心機で約5秒間遠心することを指します。

1) 希釈ランダムプライマー液 (逆転写反応直前に調製し、速やかに使用してください。)

1検体あたり、ランダムプライマー液1.0μL、逆転写用DEPC処理水7.0μLの割合で必要量をマイクロテストチューブに加え、試験管ミキサーで混和します。なお、抽出RNA濃度が250ng/μLに満たない場合は、表2に従った添加量により測定を行ってください。

2) 逆転写反応用混和液 (逆転写反応直前に調製し、速やかに使用してください。)

1検体あたり、逆転写用緩衝液4.0μL、逆転写用dNTPs液2.0μL、RNase阻害液1.0μL及び逆転写酵素液1.0μLの割合で必要量をマイクロテストチューブに加え、穏やかに混和します。

3) WT1-PCR混和液 (PCR反応直前に調製し、速やかに使用してください。)

1検体あたり、WT1-PCR緩衝液64.4μL、PCR用dNTPs液2.0μL、WT1蛍光プライマー・プローブ液0.2μL、Taqポリメラーゼ酵素液0.2μL及びUDG酵素液0.2μLの割合で必要量をマイクロテストチューブに加え、穏やかに混和します。

4) GAPDH-PCR混和液 (PCR反応直前に調製し、速やかに使用してください。)

1検体あたり、GAPDH-PCR緩衝液71.4μL、PCR用dNTPs液2.0μL、GAPDH蛍光プライマー・プローブ液0.2μL、Taqポリメラーゼ酵素液0.2μL及びUDG酵素液0.2μLの割合で必要量をマイクロテストチューブに加え、穏やかに混和します。

3. 測定操作

コバス®TaqMan 48使用時の操作方法を以下に示し、その概略を図4に示しました。

逆転写反応(図4 上)	
<ol style="list-style-type: none"> ① 測定検体数分のマイクロチューブに希釈ランダムプライマー液を8.0μLずつ分注します。 ② 各マイクロチューブに抽出RNA (250ng/μL) を4.0μLずつに加え、穏やかに混和後スピンドウンします。 ③ 各マイクロチューブをヒートブロックで80°C、5分間加熱後、直ちに氷水中で5分間冷却しスピンドウンします。 ④ 各マイクロチューブに逆転写反応用混和液を8.0μLずつに加え、穏やかに混和後スピンドウンします。 ⑤ 各マイクロチューブを20~30°Cで10分間静置します。 ⑥ 各マイクロチューブをインキュベーターにて42°Cで60分間静置します。 ⑦ 各マイクロチューブをヒートブロックにて95°Cで5分間加熱し、試験管ミキサーで混和後スピンドウンしcDNA検体を作製します。 	
WT1-PCR (WT1 定量リアルタイムPCR: 図4 左下)	GAPDH-PCR (GAPDH 定量リアルタイムPCR: 図4 右下)
<ol style="list-style-type: none"> ① KキャリアホルダーにKキャリアをセットします。 ② 測定検体数(WT1標準液6本(3濃度、各2重測定)を含む)のKチューブ又はKトレイを用意し、チューブの側面に触れないよう注意しながら、Kチューブ又はKトレイをKキャリアにセットします。 ③ Kチューブを使用する場合には、KチューブキャップをKチューブキャップで開け、キャップをKチューブポジションホルダーに置きます。 ④ Kチューブ又はKトレイの各チューブにWT1-PCR混和液を67.0μLずつ分注します。 ⑤ Kチューブ又はKトレイの各チューブにWT1標準液又はcDNA検体をそれぞれ8.0μL加えます。 ⑥ Kチューブを用いた場合は、KチューブキャップでKチューブのキャップを締めます。Kトレイを用いた場合は、Kトレイにキャップを被せた後、Kトレイキャッピングツールを用いてキャップを1箇所ずつ押し込んでいきます。 ⑦ キャップ後、チューブ内の液量及びチューブ底面・側面に泡等の有無を確認します。泡が存在した場合、壁面にふれないように、かるくタッピングして泡を除き、Kキャリアにセットします。 ⑧ Kキャリアをコバス®TaqMan 48にセットし、WT1 mRNA測定値を求めます。 	<ol style="list-style-type: none"> ① KキャリアホルダーにKキャリアをセットします。 ② 測定検体数(GAPDH標準液6本(3濃度、各2重測定)を含む)のKチューブ又はKトレイを用意し、チューブの側面に触れないよう注意しながら、Kチューブ又はKトレイをKキャリアにセットします。 ③ Kチューブを使用する場合には、KチューブキャップをKチューブキャップで開け、キャップをKチューブポジションホルダーに置きます。 ④ Kチューブ又はKトレイの各チューブにGAPDH-PCR混和液を74.0μLずつ分注します。 ⑤ Kチューブ又はKトレイの各チューブにGAPDH標準液又はcDNA検体をそれぞれ1.0μL加えます。 ⑥ Kチューブを用いた場合は、KチューブキャップでKチューブのキャップを締めます。Kトレイを用いた場合は、Kトレイにキャップを被せた後、Kトレイキャッピングツールを用いてキャップを1箇所ずつ押し込んでいきます。 ⑦ キャップ後、チューブ内の液量及びチューブ底面・側面に泡等の有無を確認します。泡が存在した場合、壁面にふれないように、かるくタッピングして泡を除き、Kキャリアにセットします。 ⑧ Kキャリアをコバス®TaqMan 48にセットし、GAPDH mRNA測定値を求めます。

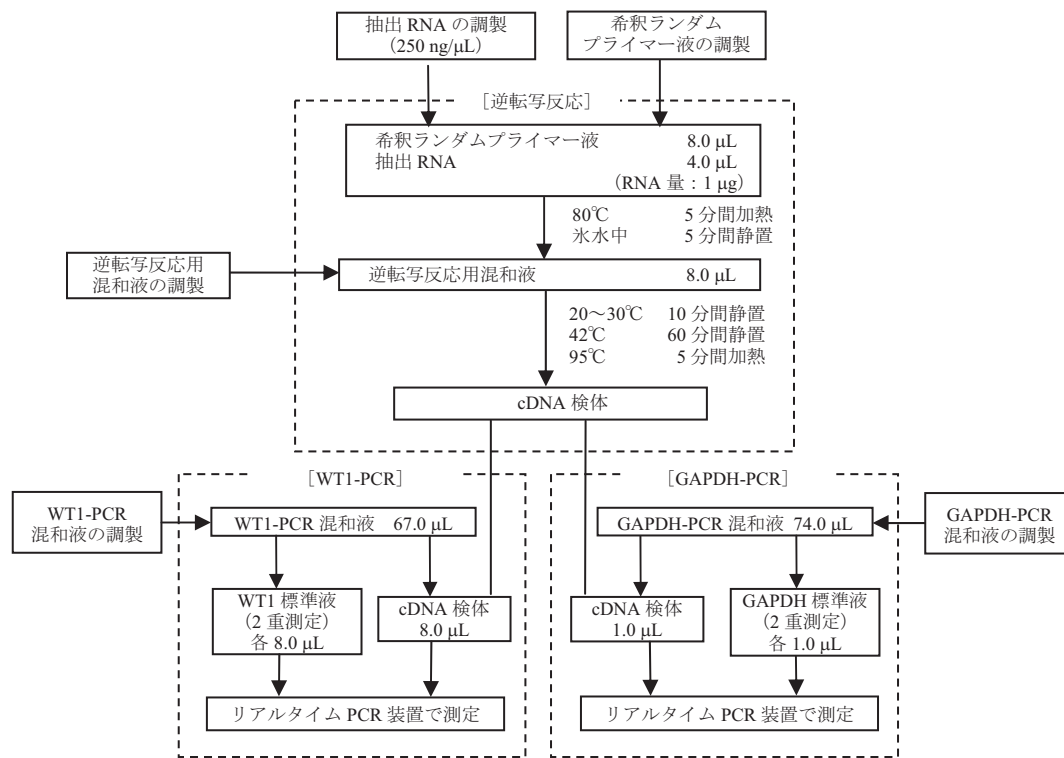


図4 操作方法概略

PCR はエフ・ホフマン・ラ・ロシュ社のライセンスに基づいています。

4. WT1 mRNAの発現量の算出方法

リアルタイムPCR装置の取扱い説明書に従って、WT1 mRNA測定値及びGAPDH mRNA測定値の算出を行います。

WT1 mRNA 発現量は、WT1 mRNA測定値をGAPDH mRNA測定値で除した値（GAPDH mRNA 1コピーあたりのWT1 mRNAコピー数）に、健康成人の1 μgRNAあたりの平均GAPDH mRNAコピー数（GAPDH mRNA発現量）を乗じて算出します。

なお、WT1 mRNA発現量の単位として、copy/μgRNAを任意に設定しました。

以下にWT1 mRNA発現量の算出方法を記します。

$$\text{WT1 mRNA 発現量 (copy/μgRNA)} = \frac{\text{WT1 mRNA 測定値 (copy/mL)}}{\text{GAPDH mRNA 測定値 (copy/mL)}} \times 2.7 \times 10^7 \text{ (copy/μgRNA)}$$

* ; 2.7×10^7 (copy/μgRNA) : 健康成人 1 μgRNA あたりの平均 GAPDH mRNA 発現量

※※【測定結果の判定法】

判定上の注意

1. AMLについて

- (1) 末梢血中のWT1 mRNAは、AML患者において、MRDのモニタリングマーカーとして使用します。AMLの診断目的には使用できません。
- (2) 臨床的にAMLと確定診断された患者でも末梢血中にWT1 mRNAが検出されない場合がありますので、臨床診断においては他の検査結果及び臨床症状等を含め、総合的に判断して行ってください。
- (3) 臨床性能試験成績から、AMLの早期の再発診断における末梢血中の参考基準値は200copy/μgRNAが妥当との結果が得られていますが、再発の診断は、骨髄検査等の他の検査結果や臨床所見と合わせて総合的に判断して行ってください。

2. MDSについて

- (1) 末梢血中又は骨髄液中のWT1 mRNAは、MDS患者において、MDSの診断補助及び進行度モニタリングマーカーとして使用します。
- (2) MDS患者を対象とする臨床性能試験成績は、MDS由来のAML患者11例を含む合計126例より1回採取した末梢血又は骨髄液のWT1 mRNA発現量の解析に基づいています。MDSの病型別あるいはIPSSのリスク群別に末梢血又は骨髄液のWT1 mRNA発現量の分布を比較した結果、病期の進行あるいはリスクの上昇に伴いWT1 mRNA発現量が上昇傾向を示すことから、MDS患者における診断補助及び進行度モニタリングマーカーとして有用と考えられます。しかしながら、MDSにおけるWT1 mRNAは、診断の補助として使用し臨床診断においては血液像、骨髄像や染色体異常など他の検査所見及び臨床症状等を含め、総合的に判断してください。

※※【臨床的意義】

急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia : AML) は、骨髄幹細胞の分化過程が障害され、骨髄造血幹細胞と骨髄系前駆細胞の間の分化過程にある細胞がクローン性に増殖することより、末梢血や骨髄に未分化な白血病細胞が蓄積し広範囲な造血障害をきたす腫瘍疾患です。1990年にCallらにより、小児ウイルス腫瘍の原因遺伝子としてウイルス腫瘍-1遺伝子 (Wilms tumor gene-1 : WT1) が同定されました¹⁾。WT1遺伝子は染色体11p13に存在し、10個のエクソンからなり、52~54kDのジンクフィンガー型の転写制御因子をコードし、種々の成長因子とそのレセプター等の遺伝子の転写を抑制することが報告されています²⁾。

Callらは白血病細胞株K562及びCCRF-CEM細胞でWT1 mRNAの発現を報告しており¹⁾、Miwaらはノーザン・ブロット解析によりAMLの22例中15例にWT1 mRNAの発現を報告しています³⁾。さらにInoueらにより、WT1 mRNAはAMLの初診時に100% (45/45) の症例で発現が認められたと報告されています⁴⁾。また、診断時のWT1 mRNA発現量が予後と関係していること⁴⁾⁵⁾、経時的に測定すると治療により一度陰性化したWT1 mRNA発現量が再発時に再上昇すること⁶⁾、再発時のWT1 mRNA発現量は診断時の発現量よりも増加していることが報告されています⁷⁾。近年開発されたPCR等による白血病の病型特異的な染色体転座に起因するキメラ遺伝子を検出する高感度な微小残存病変* (MRD) 検出法では、比較的発現頻度の高いキメラ遺伝子を5~11種類組み合わせるとAMLにおける出現頻度は30~40%であり⁸⁾⁹⁾、さらに出現頻度の高いMRD検出法の開発が求められています。

このような背景から、本キットは、AMLにおけるMRDのモニタリングマーカーとして早期の再発診断に有用で、かつ骨髄液採取に比し検体採取時の患者への負担が少ない末梢血を測定試料とする体外診断用医薬品として開発されました¹⁰⁾。

その後、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome : MDS) において末梢血又は骨髄液を測定試料として、MDSの診断補助又は進行度モニタリングマーカーとしての有用性が示唆されました。

本キットは、末梢血白血球又は骨髓液有核細胞より抽出したRNA中のWT1 mRNAを定量リアルタイムRT-PCRにて測定するキットです。

* 微小残存病変 (minimal residual disease : MRD)

白血病は化学療法等により寛解に至った後にも、患者体内には顕微鏡下での形態学的検査 (血液学的検査) では検出できないレベルの白血病細胞が残存しており、この残存している白血病細胞を微小残存病変といえます。

《特徴》

1. 定量リアルタイムRT-PCRにより、MRDを高感度に測定することができます。
2. 末梢血中のWT1 mRNAは、AML患者におけるMRDモニタリングマーカーとして早期の再発診断に有用です。またMDS患者における診断補助及び進行度モニタリングマーカーとして使用します。
3. 骨髓液中のWT1 mRNAは、MDS患者における診断補助及び進行度モニタリングマーカーとして使用します。
4. 測定試料として末梢血又は骨髓液を使用します。

臨床性能試験成績

1. AMLについて

臨床性能試験において、23施設の医療機関にてAML症例191例を対象に、1年の経過観察期間を通してAMLの早期再発診断における本キットの臨床的有用性を評価しました¹⁰⁾。

本キットにおけるWT1 mRNAの測定範囲下限値は、2,500copy/mLであり、RNA 1μgあたりのコピー数に換算すると、50copy/μgRNAであることから臨床性能試験においては、50copy/μgRNAをWT1 mRNA発現量の基準とし、50copy/μgRNA以上を陽性とししました。

AMLの初発時に未治療であった114例におけるWT1 mRNAの陽性率は93.9% (107/114) であり、同時に測定し検出されたキメラ遺伝子 (*PML/RARα*、*AML1/MTG8*、*CBFβ/MYH11*、major *bcr/abl*) を合計した陽性率は23.7% (27/114) でした (表3)。

表3 AML初発未治療症例における病型別末梢血WT1 mRNA及びキメラ遺伝子陽性率

AML 病型	WT1 mRNA 陽性率 (症例数)	キメラ遺伝子陽性率 (症例数)
M0	85.7% (6/7)	0% (0/7)
M1	92.3% (12/13)	0% (0/13)
M2	97.6% (40/41)	24.4% (10/41) *4
M3	100% (11/11)	100% (11/11) *5
M4*1	100% (16/16)	37.5% (6/16) *6
M5*2	66.7% (6/9)	0% (0/9)
M6	100% (5/5)	0% (0/5)
M7	0% (0/1)	0% (0/1)
MDS*3 から白血病化した AML	100% (11/11)	0% (0/11)
計	93.9% (107/114)	23.7% (27/114)

*1: M4: 病型 M4Eo を含む

*2: M5: 病型 M5a, M5b を含む

*3: MDS: 骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome)

*4: 10 例中 *AML1/MTG8* 陽性 9 例、major *bcr/abl* 陽性 1 例

*5: 11 例中 *PML/RARα* 陽性 11 例

*6: 6 例中 *CBFβ/MYH11* 陽性 4 例、*AML1/MTG8* 陽性 1 例、major *bcr/abl* 陽性 1 例

経過観察におけるWT1 mRNA発現量は、非寛解症例54例では87.0% (47/54) の症例で経過観察期間中50copy/μgRNA以上 (陽性) を維持していました。寛解症例 (経過観察終了時まで寛解を継続した症例) 66例では全例でWT1 mRNA発現量は寛解に伴い低下し50copy/μgRNA未満 (陰性) となり、経過観察終了時には84.8% (56/66) の症例が陰性を維持していました。また、再発症例 (経過観察期間中に再発した症例) 29例では全例で寛解に伴い低下したWT1 mRNA発現量が再発に伴い上昇に転じていました。

寛解継続症例 (53例) と再発症例 (29例) を対象に、AML早期再発診断のためのWT1 mRNA参考基準値を検討しました。

50~30,000copy/μgRNAで参考基準値を変化させ、各参考基準値における早期再発診断の感度、特異性及び診断効率を算出しました (表4)。

その結果、参考基準値が200~1,500copy/μgRNAのとき診断効率が92.7% (76/82) と最大を示しました。早期再発診断の時期は、参考基準値200copy/μgRNAのときが最も早期 (中央値で43日) であることから、AML早期再発診断におけるWT1 mRNAの参考基準値として200copy/μgRNAが妥当と考えられました。

表4 早期再発診断における末梢血WT1 mRNA参考基準値の検討

参考基準値 (copy/μgRNA)	感度 (症例数)	特異性 (症例数)	診断効率 (症例数)	早期再発診断の時期 中央値 (日)
50	89.7% (26/29)	83.0% (44/53)	85.4% (70/82)	47.5
100	89.7% (26/29)	90.6% (48/53)	90.2% (74/82)	46
150	79.3% (23/29)	98.1% (52/53)	91.5% (75/82)	46
200	79.3% (23/29)	100.0% (53/53)	92.7% (76/82)	43
500	79.3% (23/29)	100.0% (53/53)	92.7% (76/82)	28
1,000	79.3% (23/29)	100.0% (53/53)	92.7% (76/82)	24
1,500	79.3% (23/29)	100.0% (53/53)	92.7% (76/82)	17
2,000	72.4% (21/29)	100.0% (53/53)	90.2% (74/82)	17
5,000	62.1% (18/29)	100.0% (53/53)	86.6% (71/82)	14.5
10,000	48.3% (14/29)	100.0% (53/53)	81.7% (67/82)	14.5
30,000	24.1% (7/29)	100.0% (53/53)	73.2% (60/82)	6

感度: 再発症例 29 例中、WT1 mRNA が陰性化、若しくは最小値となった時点から再発判定直前までの期間内のすべての WT1 mRNA 測定ポイントのうち、WT1 mRNA 発現量がそれぞれの参考基準値以上の値を示すポイントが 1 ポイント以上ある症例の割合としました。

特異性: 寛解継続症例 53 例中、WT1 mRNA が陰性化した時点から経過観察期間終了までの期間内のすべての測定ポイントでの WT1 mRNA 発現量が、それぞれの参考基準値未満であった症例の割合としました。

キメラ遺伝子が同時に測定できた症例においてWT1 mRNA発現量もキメラ遺伝子発現量と類似した変動を示していること等から、WT1

mRNAはキメラ遺伝子と同様に骨髓像等による形態学的検査では検出できないMRDの動態を捉え、再発時には早期にMRDの増加を反映して上昇していることが示唆されました。

2. MDSについて

臨床性能試験において、17施設の医療機関にてMDS症例、MDSが疑われる症例、MDSからAMLへ移行した症例 (acute myeloid leukemia progressed from MDS : AML-MDS) を対象に、MDSの診断補助及び進行度モニタリングマーカーとしての本キットの臨床的有用性を評価しました¹¹⁾。

FAB (French-American-British) 分類のMDS各病型のRA (refractory anemia)、RARS (refractory anemia with ringed sideroblasts)、RAEB (refractory anemia with excess blasts)、RAEB-t (refractory anemia with excess blasts in transformation) にAML-MDSを加えた126例において、各病型の末梢血及び骨髓液のWT1 mRNA発現量を比較しました (表5、図5)。

末梢血及び骨髓液のWT1 mRNA発現量はいずれも、RAからRAEB、RAEB-t、AML-MDSと病期の進行に伴い上昇傾向を示しました。各病型間でのWT1 mRNA発現量の分布を検定した結果、末梢血及び骨髓液ともにRAとRAEB、RAとRAEB-t、RAとAML-MDS、RARSとRAEB、RARSとRAEB-t及びRARSとAML-MDSとの間に有意差が認められました (Tukey-KramerのHSD検定、 $p<0.05$)。

表5 MDS各病型 (FAB分類) 及びAML-MDSでの末梢血及び骨髓液WT1 mRNA発現量

病型	症例数	WT1 mRNA 発現量			
		末梢血		骨髓液	
		mean±S.D. (対数)	平均値 (copy/μgRNA)	mean±S.D. (対数)	平均値 (copy/μgRNA)
RA	69	2.14±0.74	140	3.07±0.71	1200
RARS	9	2.14±0.83	140	2.82±0.90	660
RAEB	24	3.26±0.93	1820	3.92±0.73	8300
RAEB-t	13	3.79±1.10	6200	4.17±0.75	14800
AML-MDS	11	4.10±0.96	12600	4.52±0.77	33100
合計	126	2.69±1.13	490	3.45±0.92	2800

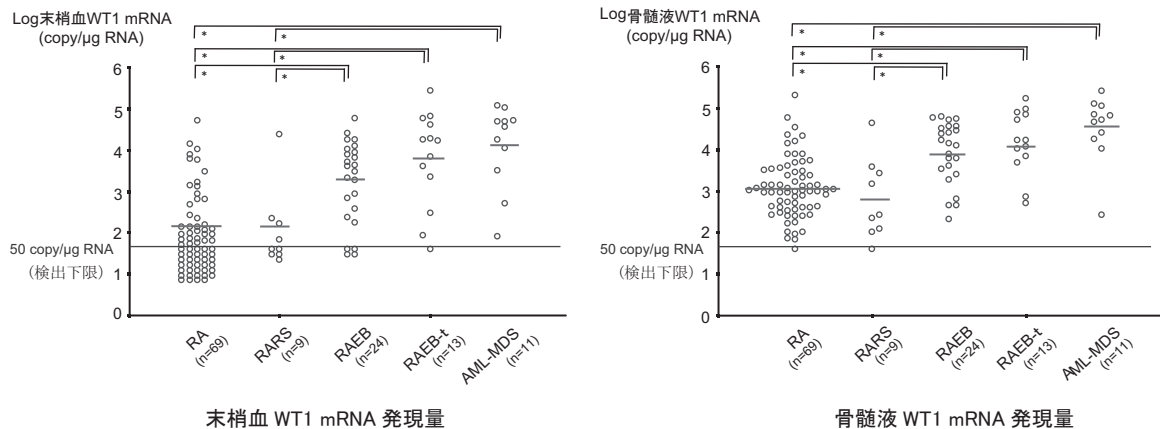


図5 MDS各病型 (FAB分類) 及びAML-MDSでの末梢血及び骨髓液WT1 mRNA発現量

各疾患での横線は平均値を示す。*: Tukey-KramerのHSD検定により $p<0.05$ を示す。

暫定的なカットオフ値を末梢血では50copy/μgRNA、骨髓液では500copy/μgRNAとしたときMDSの各病型におけるWT1 mRNAの陽性率は、WT1 mRNA発現量と同様に病期の進行に伴い上昇傾向を示しました (表6)。

表6 MDS各病型 (FAB分類) 及びAML-MDSでの末梢血及び骨髓液WT1 mRNAの陽性率

病型	症例数	WT1 mRNA の陽性率	
		末梢血	骨髓液
RA	69	50.7% (35/69)	68.1% (47/69)
RARS	9	44.4% (4/9)	44.4% (4/9)
RAEB	24	83.3% (20/24)	87.5% (21/24)
RAEB-t	13	92.3% (12/13)	92.3% (12/13)
AML-MDS	11	100.0% (11/11)	90.9% (10/11)
合計	126	65.1% (82/126)	74.6% (94/126)

RA、RARS、RAEB、RAEB-tの計115例を対象に、国際予後判定システム (International Prognostic Scoring System : IPSS) での各リスク群における末梢血及び骨髓液のWT1 mRNA発現量を比較しました (表7、図6)。

末梢血及び骨髓液のWT1 mRNA発現量はいずれも、lowからintermediate-1、intermediate-2、highとリスクの上昇に伴い上昇傾向を示しました。また、各リスク群間でのWT1 mRNA発現量の分布を検定した結果、末梢血ではlowとintermediate-2、lowとhigh、intermediate-1とintermediate-2及びintermediate-1とhighとの間に、骨髓液ではlowとintermediate-1、lowとintermediate-2、lowとhigh、intermediate-1とintermediate-2及びintermediate-1とhighの間に有意差が認められました (Tukey-KramerのHSD検定、 $p<0.05$)。IPSSスコアとWT1 mRNA発現量との相関について検討したところ、末梢血、骨髓液ともに $r=0.57$ (Pearson) の相関が認められました。

表7 IPSS各リスク群別における末梢血及び骨髄液WT1 mRNA発現量

リスク群	症例数	WT1 mRNA 発現量			
		末梢血		骨髄液	
		mean±S.D. (対数)	平均値 (copy/μgRNA)	mean±S.D. (対数)	平均値 (copy/μgRNA)
low	19	1.79±0.19	60	2.58±0.42	380
intermediate-1	57	2.27±0.83	190	3.17±0.75	1480
intermediate-2	23	3.11±1.03	1290	3.81±0.78	6460
high	16	3.72±1.01	5250	4.27±0.58	18600
合計	115	2.56±1.04	360	3.35±0.87	2240

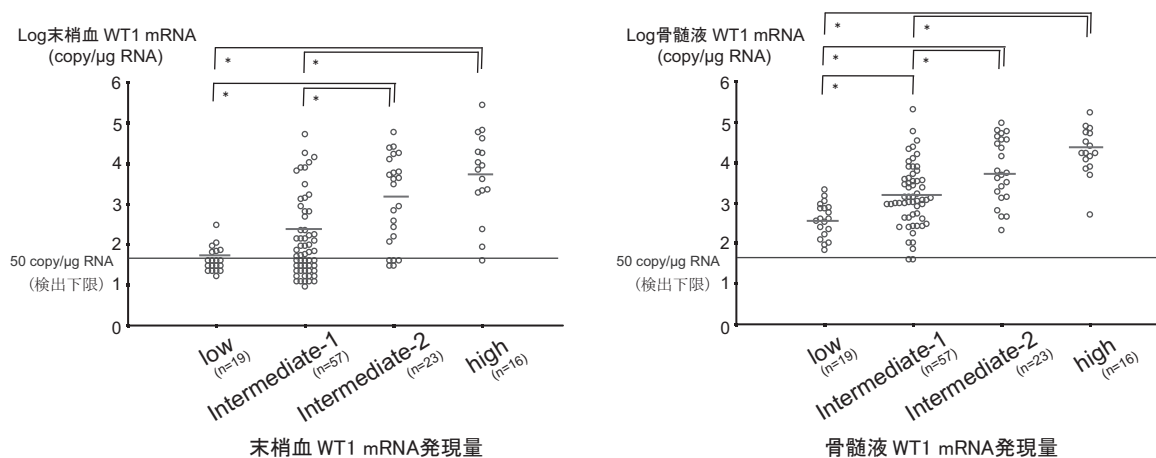


図6 IPSS各リスク群における末梢血及び骨髄液WT1 mRNA発現量

各リスク群での横線は平均値を示す。*: Tukey-KramerのHSD検定により $p < 0.05$ を示す。

臨床性能試験成績から、不応性貧血 (RA) 69例と再生不良性貧血 (AA) 8例の限定された症例数において、鑑別診断のカットオフ値を末梢血中のWT1 mRNA、骨髄液中のWT1 mRNAそれぞれ50copy/μgRNA、500copy/μgRNAと任意に定めた場合、末梢血のWT1 mRNAの感度は50.7% (35/69)、特異度は100% (8/8)、骨髄液中のWT1 mRNAの感度は68.1% (47/69)、特異度は75.0% (6/8) でした。なお、本カットオフ値は小数検体において暫定的に定めた値であるため、臨床診断においては血液像、骨髄像や染色体異常など他の検査所見及び臨床症状等を含め、総合的に判断してください。

【性能】

1. 感度試験、正確性試験及び同時再現性試験

自社施設において用法及び用量 (操作方法) に従って、感度、正確性及び同時再現性の各試験を行った場合、以下の規格に適合します。

(1) WT1 mRNA測定時の規格

1) 感度試験

WT1標準液 5×10^5 copy/mLの増幅サイクル数は42サイクル以下、WT1標準液 5×10^7 copy/mLの増幅サイクル数とWT1標準液 5×10^5 copy/mLの増幅サイクル数の差は10~16サイクルを示します。

2) 正確性試験

陰性管理検体を同時4回 (1重測定を同時に4回) 測定するとき、すべて蛍光増幅が検出されません。低値管理検体 (3.00×10^4 copy/mL相当) 及び高値管理検体 (7.00×10^6 copy/mL相当) を同時4回 (1重測定を同時に4回) 測定するとき、測定値はすべてその既知濃度の1/3~3倍の値を示します。

3) 同時再現性試験

陰性管理検体を同時4回 (1重測定を同時に4回) 測定するとき、すべて蛍光増幅が検出されません。低値管理検体 (3.00×10^4 copy/mL相当) 及び高値管理検体 (7.00×10^6 copy/mL相当) を同時4回 (1重測定を同時に4回) 測定するとき、測定値を対数変換した値の変動係数は10%以下です。

なお、低値管理検体及び高値管理検体の各濃度における相当とは、その濃度の±40%を意味します。

(2) GAPDH mRNA測定時の規格

1) 感度試験

GAPDH標準液 5×10^5 copy/mLの増幅サイクル数は38サイクル以下、GAPDH標準液 5×10^9 copy/mLの増幅サイクル数とGAPDH標準液 5×10^5 copy/mLの増幅サイクル数の差は10~16サイクルを示します。

2) 正確性試験

陰性管理検体を同時4回 (1重測定を同時に4回) 測定するとき、すべて蛍光増幅が検出されません。低値管理検体 (3.00×10^6 copy/mL相当) 及び高値管理検体 (7.00×10^8 copy/mL相当) を同時4回 (1重測定を同時に4回) 測定するとき、測定値はすべてその既知濃度の1/3~3倍の値を示します。

3) 同時再現性試験

陰性管理検体を同時4回 (1重測定を同時に4回) 測定するとき、すべて蛍光増幅が検出されません。低値管理検体 (3.00×10^6 copy/mL相当) 及び高値管理検体 (7.00×10^8 copy/mL相当) を同時4回 (1重測定を同時に4回) 測定するとき、測定値を対数変換した値の変動係数は10%以下です。

なお、低値管理検体及び高値管理検体の各濃度における相当とは、その濃度の±40%を意味します。

2. 測定範囲

自社施設にて、測定試料としてWT1標準液及びGAPDH標準液を用いた試験の結果、WT1 mRNAの測定範囲を $2.50 \times 10^3 \sim 5.00 \times 10^7$ copy/mLと設定し、GAPDH mRNAの測定範囲を $6.25 \times 10^4 \sim 5.00 \times 10^9$ copy/mLと設定しました。

※※【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上（危険防止）の注意

- (1) 検体及び本キットを取り扱うときには、マスク及びディスポーザブルゴム手袋（パウダーフリー）、実験着及び保護眼鏡を着けて操作し、試薬が皮膚、目及び粘膜等に触れないように注意してください。口によるピペティングは行わないでください。また、取扱い後は手をよく洗ってください。
- (2) 検体は常に感染の危険性を伴うものとして取扱いには十分注意してください。これらに接触したチップ等の器具やそれらの残液及びその容器等も同様に扱ってください。

2. 使用上の注意

- (1) キットは、 -20°C 以下で凍結保存してください。
- (2) 使用期限切れのキットは使用しないでください。
- (3) 製造番号の異なる試薬又は残った試薬を混ぜ合わせて使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

- (1) 検体及び本キットを取り扱う際に使用した器具類や残液は感染の危険があるものとし、オートクレーブ（ 121°C ，20分）で滅菌処理するか、または次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1.0%以上）に1時間以上浸してから処理し、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等区別して処理してください。
- (2) 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などで静かに拭き取ってください。拭き取った後は、次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1.0%以上）で浸すように拭き取り、その後水拭きしてください。
- (3) PCR反応産物は、コンタミネーションを避けるため、キャップを開けずに焼却処理又は密閉できるビニール袋を2重に施し廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物として処理してください。なお、PCR反応産物は、飛散を防止するためオートクレーブによる処理は行わないでください。
- (4) 試薬及び器具を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法

-20°C 以下に保存

有効期間

20ヵ月

（使用期限はラベル及び外箱に記載してあります。）

【包装単位】

96テスト用

※※【主要文献】

1. Call KM, et al. : Cell, **60**, 509-520, 1990
2. Gessler M, et al. : Nature, **343**, 774-778, 1990
3. Miwa H, et al. : Leukemia, **6**, 405-409, 1992
4. Inoue K, et al. : Blood, **84**, 3071-3079, 1994
5. Bergmann L, et al. : Blood, **90**, 1217-1225, 1997
6. Inoue K, et al. : Blood, **88**, 2267-2278, 1996
7. Tamaki H, et al. : Blood, **88**, 4396-4398, 1996
8. Osumi K, et al. : Leukemia and Lymphoma, **43**, 2291-2299, 2002
9. Pallisgaard N, et al. : Blood, **92**, 574-588, 1998
10. 宮脇修一ほか：臨床血液, **46**(12), 1279-1287, 2005
11. 小坂修ほか：社内資料（臨床性能試験成績）, 2010

※※【問い合わせ先】

主要文献に記載の社内資料につきましても下記にご請求ください。

大塚製薬株式会社

信頼性保証本部 医薬情報センター

〒108-8242 東京都港区港南2-16-4

品川グランドセントラルタワー

電話 0120-189-840

FAX 03-6717-1414

【製造販売元】



大塚製薬株式会社
Otsuka 東京都千代田区神田司町2-9