

遺伝子増幅検出装置 RD-200 / リノアンプ CK19 の基礎的評価

関 あかね^{*1}, 小林 万祐子^{*2}, 開 文美^{*2}, 芦田 衛^{*2}, 吉本 倫子^{*1},
森永 哲郎^{*2}, 伊藤 美津枝^{*1}, 大東 元就^{*2}, 沼田 修一^{*1}

*1 シスメックス株式会社 学術本部 学術情報部：神戸市西区室谷 1-3-2 (〒651-2241)

*2 シスメックス株式会社 LS 事業本部 遺伝子検査事業部

要 旨

OSNA (One-step Nucleic Acid Amplification; 以下, OSNA) 法とは, 専用の可溶化試薬を用いてホモジナイズしたリンパ節中に含まれる標的遺伝子 サイトケラチン 19 (CK19) mRNA を, 専用の遺伝子増幅検出装置と試薬を用いて増幅・検出し, リンパ節へのがん転移診断の補助を行う手法である。既存システムである遺伝子増幅検出装置 RD-100i / リノアンプ BC (シスメックス株式会社; 以下, シスメックス) は現在グローバルに多くの施設で導入され, 乳癌領域を中心に運用されている。

今回, 各癌腫の臨床的背景にも対応した新システム (遺伝子増幅検出装置 RD-200 / リノアンプ CK19 (シスメックス)) を発売したため, システムの臨床性能および分析性能の評価を行った。乳癌所属リンパ節を既存システムと新システムの双方で測定し, 判定一致率を確認した結果, 両システムの臨床性能は同等であることが明らかとなった。加えて, 新システムは既存システムに対する市場要望を基にユーザビリティなどを改良し, 臨床現場での運用を簡便化, 迅速化した。今後は, 既存システムに替わる有用なシステムとして活用されることが期待される。

キーワード OSNA 法, RD-200, RD-210, リノアンプ CK19, LYNOAMP CK19 E, CK19

はじめに

OSNA (One-step Nucleic Acid Amplification) 法とは, 専用の可溶化試薬を用いてホモジナイズしたリンパ節中

に含まれる標的遺伝子 サイトケラチン 19 (CK19) mRNA を, 専用の遺伝子増幅検出装置と試薬を用いて増幅・検出し, リンパ節へのがん転移診断の補助を行う手法である (図 1)。

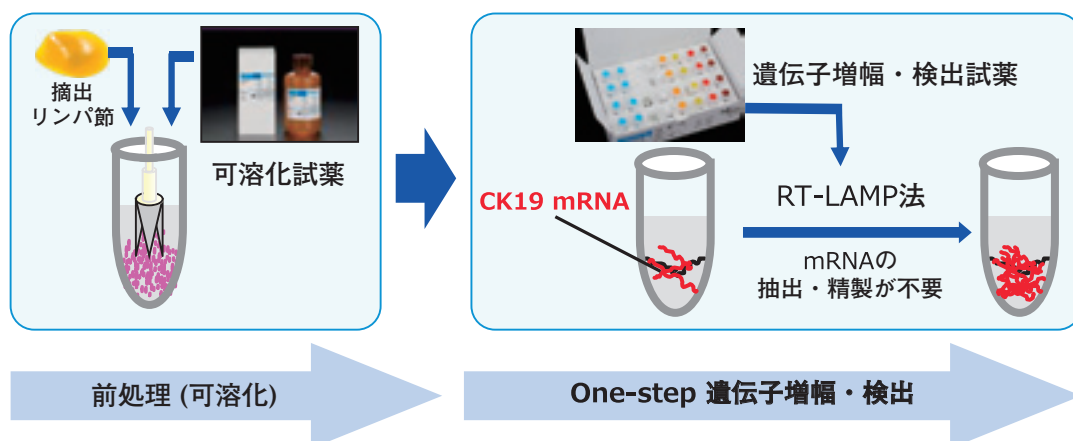


図 1. OSNA (One-step nucleic acid amplification) 法

リノアンプ BC (シスメックス株式会社；以下、シスメックス) は、まず乳癌所属リンパ節中の CK19 mRNA 検出試薬として 2008 年に製造販売承認を取得し、リンパ節転移診断の自動化、迅速化を達成した (遺伝子増幅検出装置 RD-100i (シスメックス；以下、RD-100i) は、2006 年に医療機器として届出)。その後、大腸癌 (2010 年)、胃癌 (2012 年)、非小細胞肺癌 (2015 年) に適用を拡大し、現在グローバルに多くの施設で導入され、運用されている。その一方で、各癌種においては異なる臨床背景があることから、測定検体数の増加、測定時間の短縮、測定手技の簡便化、ヒューマンエラーの低減などが望まれており、このようなニーズに対応することもメーカーの責務となっていた。

このような背景から、既存システム (RD-100i / リノアンプ BC (シスメックス)) の性能面や、ユーザビリティの課題を改善した国内用の新システム (遺伝子増幅検出装置 RD-200；以下、RD-200 / リノアンプ

CK19 (シスメックス)) を開発し、2018 年 7 月に発売を開始することになった。欧州では既に 2017 年 7 月より新システムと互換性を有するシステム (遺伝子増幅検出装置 RD-210 / LYNOAMP CK19 E (シスメックス)) を発売し、臨床現場での利用が開始されている。

新システムの詳細について、以下に説明する。

製品仕様

1. 試薬の仕様と特徴

新試薬の仕様を (表 1) に示す。

リノアンプ CK19 は、120 テスト / 箱、開封後の使用期間が 2 ヶ月であり、従来品であるリノアンプ BC (240 テスト / 箱、開封後使用期間 1 ヶ月) では期間内に使い切ることが難しかった症例数が少ない施設にも対応し、多様な運用方法に対応できる試薬構成となっている。また 2 次元バーコードによる試薬管理機能を搭載したことで、ロット番号入力や凍結融解回数、試

表 1. 既存試薬と新試薬の仕様比較

試薬名	既存試薬 リノアンプ BC	新試薬 リノアンプ CK19
使用目的	摘出された乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌の所属リンパ節中の CK19mRNA の検出 (乳癌、大腸癌、胃癌又は非小細胞肺癌におけるリンパ節転移診断の補助に用いる)	摘出された乳癌、大腸癌、胃癌所属リンパ節の CK19mRNA の検出 (乳癌、大腸癌、又は胃癌におけるリンパ節転移診断の補助に用いる) ※2018 年 9 月現在
貯蔵方法	-25 ~ -15℃	-25 ~ -15℃
有効期間	12 か月	12 か月
開封後使用期間	1 か月	2 か月
包装単位	240 テスト用 CK19 プライマー溶液：720 μL × 8 本 酵素溶液：450 μL × 2 本 CK19 陽性コントロール：110 μL × 4 本 CK19 陰性コントロール：110 μL × 4 本 キャリブレーターレベル 1：110 μL × 4 本 キャリブレーターレベル 2：110 μL × 4 本 キャリブレーターレベル 3：110 μL × 4 本	120 テスト用 (LAC-701A) CK19 プライマー溶液：1,400 μL × 3 本 酵素溶液：450 μL × 1 本 CK19 陽性コントロール：110 μL × 3 本 陰性コントロール：110 μL × 3 本 CK19 キャリブレーター レベル 1：110 μL × 3 本 CK19 キャリブレーター レベル 2：110 μL × 3 本 CK19 キャリブレーター レベル 3：110 μL × 3 本

薬の残量確認などの管理が自動化され、測定前の準備に要する時間の短縮や入力ミスなどのヒューマンエラーの防止にも繋がっている（図2）。

さらに、試薬バイアルについては OSNA 法専用の自社製バイアルを採用し、従来品の操作性やコンタミネーションのリスクなどの課題を克服している（図3）。

性能面では、試薬の組成を見直すことにより、標的遺伝子の増幅効率が向上し、課題であった測定時間の短縮を達成することができた。これに起因して、新システム用には新たなカットオフ値を設定した。詳細データについては、後述する。

また操作性や検査時間について、既存システムでは、一部の検体で検体成分由来の遺伝子増幅反応阻害が存在することが確認されている¹⁾。そのため測定サンプルに加えてさらに 10 倍希釈した希釈サンプルも合わせて測定し、判定の参考としていた。一方、新システムでは試薬改良により遺伝子増幅反応

阻害の影響が小さくなり、測定サンプルのみで既存システムと同等の判定ができることが臨床研究において確認された。そのため新システムでは既存システムで測定する希釈サンプルを省略し、測定サンプルのみで転移陽性／陰性を判定する仕様に変更した。新システムではサンプル調製に要していた時間が短縮され、簡便性、操作性の向上に加え、検査システム全体の TAT（Turnaround Time）の短縮にも繋がっている。

2. システムの特徴

1) 省スペース化

操作端末は装置内蔵のタッチパネルとなり、ノートパソコンが不要となった。そのため同時測定検体数が 14 検体に増えたにもかかわらず、設置スペースは既存システムの RD-100i と比較するとノートパソコン 1 台分削減となっている（図4）。



図2. 2次元バーコードによる試薬管理



図3. OSNA 法専用の自社製バイアル「RD サンプルバイアル」

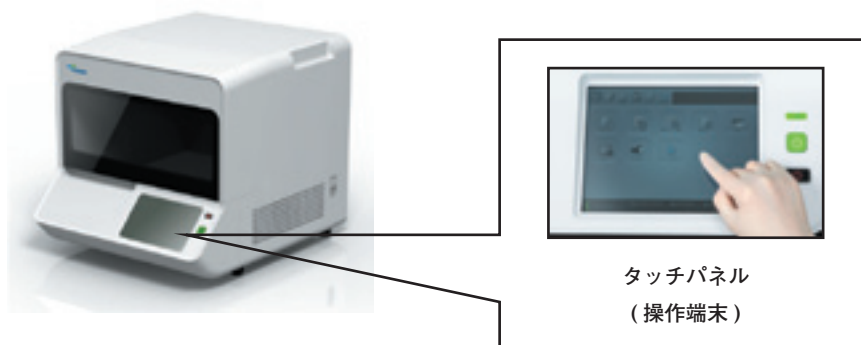


図4. RD-200 の外観

またチップ廃棄部は、既存システムの装置側面から新システムでは装置内部へと配置を変更したことにより、装置横のスペースの確保が不要となり、スペースの有効利用が可能となった。

2) 内部精度管理機能の強化

内部精度管理画面では、精度管理項目として陽性コントロールの測定データ（立ち上がり時間、CK19 mRNA 定量値）と検量線の傾き情報がリアルタイムにグラフ上にプロットされる。陽性コン

トロールの測定データについては施設内の平均値、2SD、3SD の値が自動で算出、グラフ上に表示されるため、各項目の測定データの変動から試薬や装置の状況の把握が可能である。

さらに、新システムでは過去ロット（既存システムでは直前のロットのみ）の精度管理データが自動的に装置内に保存されるため、過去データとの比較なども可能となった（図5）。

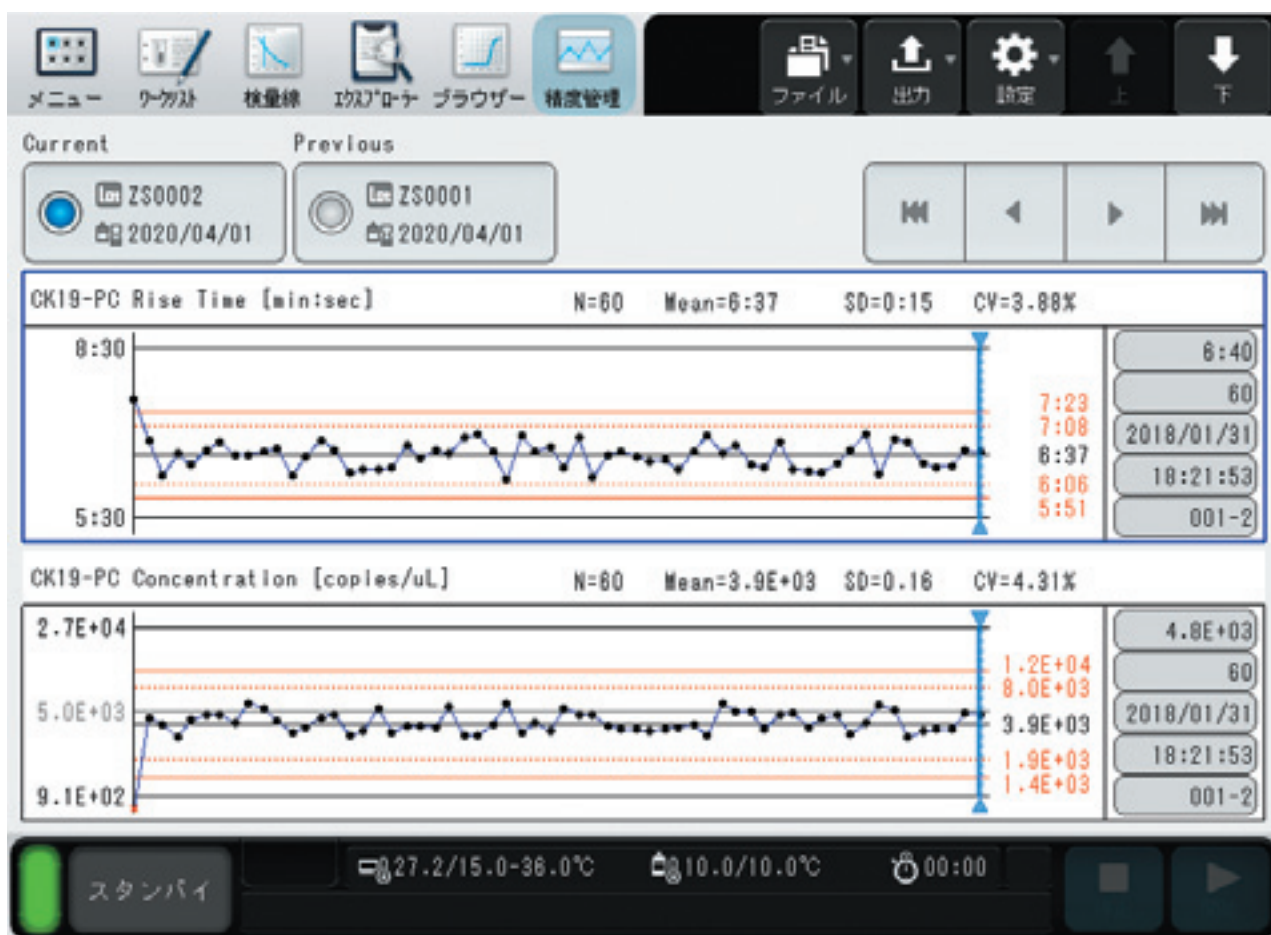


図5. 内部精度管理画面

3) 測定時間 (RD-100i と RD-200 との比較)

RD-200 では装置の測定時間 (測定開始ボタンを押してから判定結果が表示されるまでの時間) が RD-100i と比較して短縮している。装置間の測定時間を比較した試験結果を以下に示す。

(1). 方法

①対象検体：陰性コントロール

②検体数：以下の検体数を各 1 バッチずつ測定

(RD-100i, RD-200 は各 1 台使用)

既存システム：1, 2, 3, 4

新システム：1, 2, 3, 4, 14

(2). 結果

1～4 サンプルまでのすべてのサンプル数において RD-200 は RD-100i よりも 5 から 10 分まで測定時間が短縮しており、サンプル数が増加するにつれてその差は大きくなった (表 2)。4 サンプル測定時では RD-100i と比較して約 10 分の短縮となった。また、RD-200 では 14 サンプルを約 30 分以内に測定完了できるため、リンパ節が摘出されてからリンパ節転移検査結果が報告されるまで約 40 分以内といわれている術中迅速診断においてもより多くのサンプルについて RD-200 1 台で対応可能になると考えられた (図 6)。

表 2. 試験結果

検体数	RD-100i	RD-200
1	22 分 18 秒	16 分 58 秒
2	24 分 38 秒	17 分 09 秒
3	26 分 46 秒	18 分 58 秒
4	29 分 17 秒	19 分 19 秒
14	—	29 分 50 秒

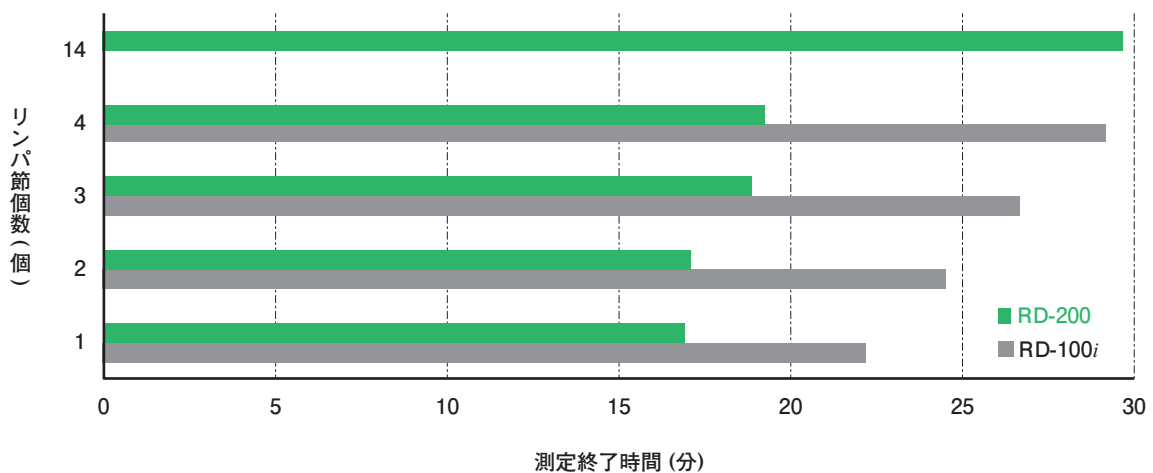


図 6. RD-100i と RD-200 の測定時間の比較

(注) RD-100i/200 における測定時間のみを比較しており、サンプルの前処理 (リンパ節の破碎、測定サンプルの調製、試薬の準備など) の時間は含まれません。

臨床性能評価

1. カットオフ値の設定

新システムでは試薬組成を見直し、遺伝子増幅効率が増加したため、同一リンパ節から調製した検体を測定した場合に、新システムでは既存システムと比較して高値傾向にある。そこでカットオフ値を再設定した。具体的には、新システムに対して仮のカットオフ値（カットオフポイント）を設定し、各カットオフポイントにて既存システムと判定を比較した。既存システムとの判定一致率が最も高く、また Receiver Operating Characteristics（以下、ROC）曲線にて感度および特異度 100% の頂点からの距離が最小となるカットオフポイントを、新システムのカットオフ値とした。

1) 方法

①対象検体

対象検体は、大阪警察病院、北九州市立医療センター、相良病院、新潟県立がんセンター新潟病院の 4 施設で手術を受けた下記の選択基準を満たす乳癌患者から取得した乳癌所属リンパ節とした。
〈選択基準〉

- 乳癌と診断され手術を受ける者
- 20 歳以上である者
- 研究参加の同意が得られている者

〈除外基準〉

- 乳癌以外の癌が疑われる者
- 過去に乳癌以外の癌に罹患した者
- 担当医により、試験への参加が難しいと判断された者
- 下記以外の薬物を術前に投与された者：
アンスラサイクリン、5-FU、タキサン、トラスツズマブ、シクロフォスファミド、カルボプラチン

②検体数

CLSI EP24-A2 に準拠し、信頼区間を 95% で有意水準 (α) 5%, 新システムにおける感度および特異度 (TPF) を 95% と仮定すると、下式より陽性および陰性の必要検体数はそれぞれ 73 検体以上と算出された。よって既存システムで判定した場合に、陽性、陰性ともに 73 検体以上が含まれるよう、合計 288 検体を収集した。

$$n = \frac{(G(1-\alpha/2)\sqrt{TPF(1-TPF)})^2}{L^2}$$

L: 感度の信頼区間（外側）の 1/2 の値（95% のとき 2.5%）

TPF: True-positive fraction (= 感度)

G(1 - α /2): 標準正規分布における (1 - α /2) 百分率 ($\alpha=0.05$ のとき 0.975)

③リンパ節の破碎

採取したリンパ節は、直ちにリノアグで破碎後、リンパ節可溶化液を調製した。既存システム用のサンプルとして、リンパ節可溶化液をリノアグで 10 倍希釈した「測定サンプル」および 100 倍希釈した「希釈サンプル」を調製した。また同一のリンパ節可溶化液から、新システム用のサンプルとして、「測定サンプル」のみを調製した。

④ OSNA 法測定

各システムの試薬 3 ロットを異なる 3 台の装置に設置し、サンプルは連続 3 回測定した。既存システムでは、計 9 データのうち中央値であった測定サンプル、およびその対として測定した希釈サンプルから得られた判定を採用した。新システムでは、計 9 データのうち中央値を測定値として採用した。 (+)/(++) カットオフ値を設定する場合、既存システムでの (+) I 判定は (+) または (++) のいずれかに分類することができないため、計 9 データのうち 1 回以上 (+) I 判定された 14 検体は除外した。

⑤データ解析

新システムでは、カットオフポイントごとに各検体を判定した。装置 RD-200 の分解能が 1 秒であり、立ち上がり時間が 1 秒変化すると、CK19 mRNA 測定値は約 0.04 log copies/ μ L 変化すること、また新システムのカットオフ値は既存システムと同等であると仮定し、 (-)/(+) は 25 copies/ μ L ごと、 (+)/(++) は 500 copies/ μ L ごとにカットオフポイントを設定した。

判定一致率は以下のとおり算出した (表 3, 4)。

また、x 軸を偽陽性率 (1-特異度)、y 軸を感度とするグラフに、各カットオフポイントでの値をプロットし、グラフ左上からの距離を指標として ROC 解析した。

2) 結果

① (-)/(+) cut-off

900 および 925 copies/ μ L にて, 判定一致率が最高であり, またグラフ左上から ROC 曲線の距離は

最小であった. このうち, 偽陰性判定を避けるため, 900 copies/ μ L をリノアンプ CK19 (-)/(+) カットオフ値として設定した(表5, 図7).

表3. (-)/(+) カットオフ値における算出方法

		既存システム	
		(++), (+), (+) I	(-)
新システム	カットオフポイント以上	a	b
	カットオフポイント未満	c	d

判定一致率: $(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$ [%]

表4. (+)/(++) カットオフ値における算出方法

		既存システム	
		(++)	(+), (-)
新システム	カットオフポイント以上	a	b
	カットオフポイント未満	c	d

判定一致率: $(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$ [%]

表5. 各 (-)/(+) カットオフポイントでの既存システムとの比較結果

新システム カットオフポイント CK19 mRNA [copy/ μ L]	875	900	925	950
判定一致率 陽性 ((+), (++) と陰性 (-)	99.0%	99.3%	99.3%	99.0%
感度	98.9%	98.9%	98.9%	97.8%
特異度	99.0%	99.5%	99.5%	99.5%
ROC 解析 (グラフ左上からの距離)	0.0002	0.0001	0.0001	0.0005

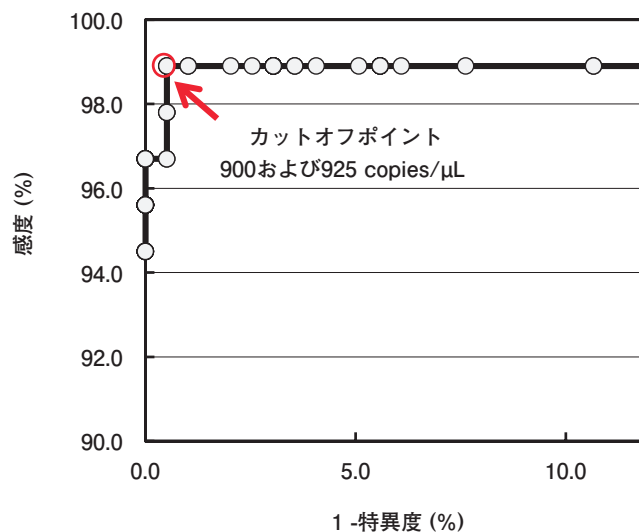


図7. 新システムを既存システムと比較した場合の ROC 曲線

i) (+)/(++) cut-off

14,000 から 14,500 copies/ μ L および 29,500 から 30,000 copies/ μ L の範囲で判定一致率が最高であった。このうち、グラフ左上から ROC 曲線の距離が小さいのは 14,000 から 14,500 copies/ μ L であった。よって判定一致率および感度と特異度から算出した ROC 曲線の結果に加え、偽陰性判定を避けるため、14,000 copies/ μ L をリノアンプ CK19 (+)/(++) カットオフ値として設定した (表 6, 図 8)。

2. 換算式の設定

欧州では、既存システムの CK19 mRNA 測定値を乳癌における治療方針の判断基準として利用する動向がある。例えば各センチネルリンパ節中の CK19 mRNA 測定値の合計から算出する TTL (Total Tumor Load) を治療に活用することを提唱する報告がある²⁾。このように既存システムの測定値は臨床応用の例があり、測定値の変化によるユーザーの混乱を避けるため、新システムでの測定値を既存システム相当に変換する換算式を設定した。

表 6. 各 (+)/(++) カットオフポイントでの既存システムとの比較結果

新システム カットオフポイント CK19 mRNA [copy/ μ L]	13,500	14,000	14,500	15,000	29,000	29,500	30,000	30,500
判定一致率 強陽性 (+) とその他	96.7%	97.4%	97.4%	97.1%	97.1%	97.4%	97.4%	97.1%
感度	100.0%	100.0%	100.0%	98.3%	98.1%	98.6%	98.6%	98.6%
特異度	95.8%	96.7%	96.7%	96.7%	93.3%	93.3%	93.3%	91.7%
ROC 解析 (グラフ左上からの距離)	0.0018	0.0011	0.0011	0.0013	0.0048	0.0046	0.0046	0.0071

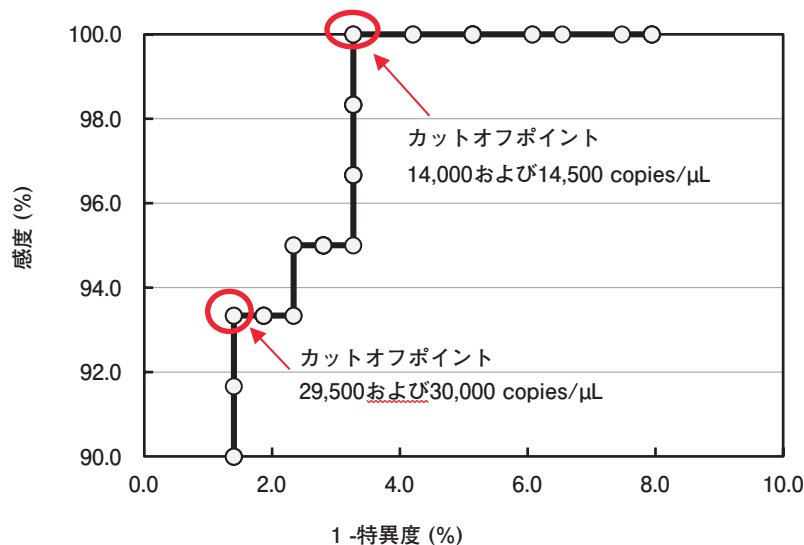


図 8. 新システムを既存システムと比較した場合の ROC 曲線

カットオフ値 2 点を基準として、検体群を補正するための換算式を以下のとおり設定した。また新システムでの換算値は、新しい単位 cCP/μL を用いて表す。

【換算式】

y：新システムで測定した CK19 mRNA 測定値

y'：CK19 mRNA 換算値

$$y' [\text{cCP}/\mu\text{L}] = 10^{\frac{\log_{10} y [\text{copies}/\mu\text{L}] - 0.79276}{0.90345}}$$

新システムでの測定値を換算式で変換した場合、(-)/(+) カットオフ値である 900 copies/μL は 250 cCP/μL に、14,000 copies/μL は 5,000 cCP/μL に変換され、既存システムと同値である (表 7)。

この換算式の妥当性を確認するため、同一の検体サンプルを測定し、新システムを用いた測定値の換

算値と既存システムを用いた測定値を比較した。

1) 方法

陰性リンパ節の可溶化液に CK19 mRNA を添加し、10 濃度 (2.2×10^2 , 2.7×10^2 , 3.2×10^3 , 3.7×10^3 , 4.2×10^4 , 4.7×10^4 , 5.2×10^5 , 5.7×10^5 , 6.2×10^6 , 6.7×10^6 cCP/μL) のサンプルを作製した。各サンプルは連続 3 回測定を実施して平均値を算出し、グラフ (x 軸：既存システム測定値 [log copy/μL], y 軸：新システム測定値の換算値 [log cCP/μL]) にプロットした。

2) 結果

各プロットを結ぶ近似直線は $y=1.1039x-0.182$ 、相関係数 (R^2) は 0.9975 と算出され、新システムを用いた測定値の換算値と既存システムを用いた測定値はよく相関した (図 9)。

表 7. カットオフ値の比較

	既存システム	新システム	
	[copy/μL]	[copy/μL]	[cCP/μL]
(+)/(++) カットオフ値	5,000 copies/μL	14,000 copies/μL	5,000 cCP/μL
(-)/(+) カットオフ値	250 copies/μL	900 copies/μL	250 cCP/μL

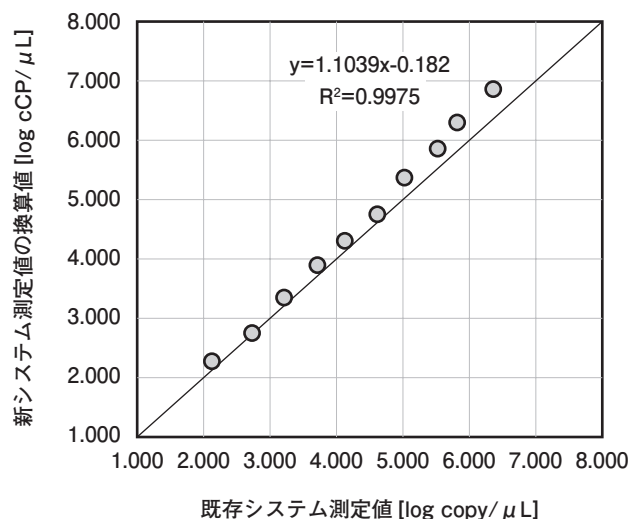


図 9. 測定結果 (x 軸：既存システム測定値 [log copy/μL], y 軸：新システム測定値の換算値 [log cCP/μL])

3. カットオフ値および希釈サンプル省略の妥当性評価

乳癌所属リンパ節を、新たに設定したカットオフ値を適用した新システムと、既存システムの双方で測定し、陽性／陰性の判定一致率を評価した。

1) 方法

①対象検体

対象検体は、京都府立医科大学、近畿大学、熊本市市民病院の3施設で手術を受けた下記の選択基準を満たす乳癌患者から取得した乳癌所属リンパ節とした。

〈選択基準〉

- 乳癌と診断され手術を受ける者
- 20歳以上である者
- 研究参加の同意が得られている者

〈除外基準〉

- 乳癌以外の癌が疑われる者
- 過去に乳癌以外の癌に罹患した者
- 担当医により、試験への参加が難しいと判断された者
- 下記以外の薬物を術前に投与された者：
アンスラサイクリン、5-FU、タキサン、トラスツズ

マブ、シクロフォスファミド、カルボプラチン

②検体数

“相関性試験に必要な検体数および承認基準および試験方法³⁾”に記載の判定一致率と検体数の基準から、判定一致率の95%信頼区間は0.83-0.95と算出たため、判定一致率の閾値を0.83と考えた。予備検討における既存システムと新システムの判定一致率から予想一致率を0.92とした場合、有意水準(α)5%、検出力($1-\beta$)90%で閾値0.83を下回らないことを検討するために必要な検体数は146検体と算出された。よって150検体を収集した。

③リンパ節の破碎

採取したリンパ節は、直ちにリノアグで破碎後、リンパ節可溶化液を調製した。既存システム用の検体として、リンパ節可溶化液をリノアグで10倍希釈した「測定サンプル」および100倍希釈した「希釈サンプル」を調製した。また同一のリンパ節可溶化液から、新システム用の検体として、「測定サンプル」のみを調製した。

④OSNA法測定

各サンプルは1回測定した。新システムには新たに定めたカットオフ値を適用した(表8, 9)。

表8. 既存システムでの判定方法

			希釈サンプル CK19 mRNA (copies/ μ L)		
			< 250	≥ 250 , <5,000	$\geq 5,000$
測定サンプル CK19 mRNA (copies/ μ L)	$\geq$ カットオフ値 (≥ 250)	$\geq 5,000$	陽性 (++)		
		≥ 250 , <5,000	陽性 (+)		陽性 (+) I
	<カットオフ値 (< 250)	<250	陰性 (-)	陽性 (+) I*	

*: 測定サンプルによっては反応が阻害され、測定サンプルのコピー数が250 copies/ μ L未満かつ希釈サンプルのコピー数が250 copies/ μ L以上、もしくは測定サンプルのコピー数が250 copies/ μ L以上5,000 copies/ μ L未満かつ希釈サンプルのコピー数が5,000 copies/ μ L以上となる場合があります。この場合は、増幅反応阻害検体(増幅反応を阻害するサンプル)として扱い、RD-100iでの判定結果には(+)Iと表示され陽性と判定されます。

表9. 新システムでの判定方法

測定サンプル CK19 mRNA (copies/ μ L)	$\geq$ カットオフ値 (≥ 900)	$\geq 14,000$	陽性 (++)
		≥ 900 , <14,000	陽性 (+)
	<カットオフ値 (< 900)	<900	陰性 (-)

⑤データ解析

判定一致率は以下のとおり算出した(表10)。

判定一致率： $(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$ [%]

⑥追加測定

既存システムと新システムで陽性／陰性判定が不一致の場合、各システムで3回ずつ追加測定を実施した。

2) 結果

陽性／陰性の判定一致率は94.7%であり、良好な結果であった。よって新システムのカットオフ値は妥当であり、既存システムと同等の臨床性能であることが明らかとなった(表11)。

3) 不一致検体

試験結果を詳細に考察するため、立ち上がり時間を検量線に当てはめて低濃度域の測定値も算出した(表12)。

表10. 判定一致率の算出方法

			既存システム			
			陽性			陰性
			(++)	(+)	(+) I	(-)
新システム	陽性	(++)	a			b
		(+)				
	陰性	(-)	c			d

表11. 試験結果

			既存システム			
			陽性			陰性
			(++)	(+)	(+) I	(-)
新システム	陽性	(++)	26	0	2	0
		(+)	1	15	4	4
	陰性	(-)	0	3	1	94

表12. 判定不一致検体

検体番号	既存システム					新システム	
	測定サンプル		希釈サンプル		総合判定	測定サンプル	
	CK19 mRNA [copy/μL]	判定	CK19 mRNA [copy/μL]	判定		CK19 mRNA [copy/μL]	総合判定
1	3.2×10^2	(+)	6.9×10^{-3}	(-)	(+)	1.5×10	(-)
2	2.5×10^2	(+)	7.8×10^{-2}	(-)	(+)	8.3×10	(-)
3	2.5×10^2	(+)	ND*	(-)	(+)	4.7×10	(-)
4	2.5×10	(-)	7.8×10	(-)	(-)	9.5×10^2	(+)
5	9.5×10	(-)	6.4×10	(-)	(-)	1.2×10^3	(+)
6	1.7×10^2	(-)	1.1	(-)	(-)	1.5×10^3	(+)
7	1.7×10^2	(-)	5.3×10^{-2}	(-)	(-)	1.7×10^3	(+)
8	3.9×10^{-4}	(-)	7.0×10^2	(+)	(+) I	1.1×10^2	(-)

*ND：測定時間11分以内に遺伝子増幅が検出されなかった

検体 1, 2, 3, 4, 5 は, 追加 3 回測定にて, 両試薬ともすべて (-) 判定で一致した. 検体 6 は追加 3 回測定にて, 既存システムで (-) 判定が 3 回, また新システムで (+) 判定が 1 回と (-) 判定が 2 回であった. 以上 6 検体は測定再現性の範囲内での判定不一致であったと考えられる.

検体 7 は追加 3 回測定にて, 既存システムで (-) 判定が 3 回, また新システムで (+) 判定が 3 回であった. 既存システムでは (-) 判定だが, CK19 mRNA が検出されている. 加えて, この症例はリンパ管侵襲が確認されているため, リンパ節転移の可能性がある. よって一定量の CK19 mRNA は発現しており, 測定再現性の範囲内での判定不一致であると考えられる.

検体 8 は, 追加 3 回測定にて, 既存システムで (+) I が 2 回と (-) 判定が 1 回, また新システムでは (-) 判定が 3 回であったが, すべての測定において測定時間内に立ち上がりが見られた. 新システムでもカットオフ値未満ではあるが CK19 mRNA

が検出されたことから, 測定再現性の範囲内での判定不一致であったと考えられる.

4) 既存システム (+) I 判定検体の追加考察

既存システムで (+) I 判定された 7 検体について, 追加考察した. 試験結果を詳細に考察するため, 立ち上がり時間を検量線に当てはめて低濃度域の測定値も算出した (表 13).

その結果, 既存システムで (+) I 判定された 7 検体のうち 6 検体が, 新システムでも陽性判定であり, 既存システムと比較して遺伝子増幅反応阻害の影響が小さくなったことが改めて確認できた.

検体 7 は, 追加 3 回測定にて, 既存システムで (+) I が 2 回と (-) 判定が 1 回, 新システムでは (-) 判定が 3 回であった. 反応阻害作用の強い低コピー数の検体であり, 測定再現性が判定に影響を与えたため, 判定不一致に繋がったと考えられる.

なお既存システムおよび新システムは, 他の関連する検査結果や臨床症状などと合わせて, 医師が総合的に判断することが求められる.

表 13. (+) I 検体の詳細

検体 番号	既存システム					新システム	
	測定サンプル		希釈サンプル		総合 判定	測定サンプル	
	CK19 mRNA [copy/μL]	判定	CK19 mRNA [copy/μL]	判定		CK19 mRNA [copy/μL]	総合 判定
1	3.6×10^3	(+)	2.5×10^5	(++)	(+) I	1.4×10^5	(++)
2	2.3×10^3	(+)	7.8×10^3	(++)	(+) I	4.2×10^4	(++)
3	2.3×10^3	(+)	3.9×10^4	(++)	(+) I	7.6×10^3	(+)
4	1.5×10^2	(-)	1.0×10^3	(+)	(+) I	3.4×10^3	(+)
5	2.2×10^2	(-)	3.2×10^2	(+)	(+) I	2.2×10^3	(+)
6	1.7×10^2	(-)	2.5×10^2	(+)	(+) I	1.5×10^3	(+)
7	3.9×10^{-4}	(-)	7.0×10^2	(+)	(+) I	1.1×10^2	(-)

分析性能評価

診断システムを臨床で使用するにあたり、診断精度を把握し、また精度管理を実施するうえで、製品の分析性能を把握することは重要である。そこで NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 米国臨床検査標準委員会) が発行する Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ガイドラインに従い、新システムで検体サンプルを測定し、分析性能を評価した (表 14)。

1. 室内再現精度 Single-site Precision

同一施設、同一装置、同一オペレーターで測定した場合に生じる再現性を解析した。

1) 方法

①対象検体

陰性リンパ節の可溶化液に CK19 mRNA を添加し、5 濃度 (1.6×10^2 , 2.5×10^2 , 5.2×10^3 , 2.8×10^4 , 2.4×10^6 cCP/ μ L) のサンプルを作製した。

②測定

各サンプルは 1 日 4 回 (連続 2 回/バッチ, 2 バッチ) 測定を 20 日間 (10 日間/ロット, 試薬 2 ロット) 実施した。

③データ解析

各サンプルの室内再現精度は CLSI ガイドライン EP05-A3 に従い、ANOVA 法で解析した。

2) 結果

各サンプルの室内再現精度は表 15 のとおり算出された。

表 14. 各測定値を log cCP/ μ L 単位で算出した場合の分析性能一覧

項目	結果 (log cCP/ μ L 単位で解析)
室内再現精度 Single-site Precision	サンプル A (1.6×10^2 cCP/ μ L) : CV 8.2%
	サンプル B (2.5×10^2 cCP/ μ L) : CV 4.9%
	サンプル C (5.2×10^3 cCP/ μ L) : CV 2.5%
	サンプル D (2.8×10^4 cCP/ μ L) : CV 1.6%
	サンプル E (2.4×10^6 cCP/ μ L) : CV 1.0%
室間再現精度 Multi-site Precision (Reproducibility)	サンプル A (1.6×10^2 cCP/ μ L) : CV 9.2%
	サンプル B (2.5×10^2 cCP/ μ L) : CV 7.9%
	サンプル C (5.2×10^3 cCP/ μ L) : CV 3.3%
	サンプル D (2.8×10^4 cCP/ μ L) : CV 2.3%
	サンプル E (2.4×10^6 cCP/ μ L) : CV 1.2%
バイアス Bias	試薬 3 ロットの最大値 : 0.309 log cCP/ μ L
正確性 (総分析誤差) Accuracy	試薬 3 ロットの最大値 : 0.889 log cCP/ μ L
ブランク上限 Limit of blank (LoB)	13 cCP/ μ L (63 copies/ μ L)
定性限界 Limit of detection (LoD)	56 cCP/ μ L (240 copies/ μ L)
定量限界 Limit of quantification (LoQ)	160 cCP/ μ L (600 copies/ μ L)
測定範囲 Measuring range	2.200 log cCP/ μ L から 8.200 log cCP/ μ L (160 cCP/ μ L から 1.6×10^8 cCP/ μ L)

表 15. 室内再現精度

対象検体	理論値		CV (%)	室内再現精度 (平均値 $\pm$ SD)	
	(cCP/ μ L)	(log cCP/ μ L)		(cCP/ μ L)	(log cCP/ μ L)
サンプル A	1.6×10^2	2.200	8.2	$1.1 \times 10^2 - 2.7 \times 10^2$	2.058 - 2.425
サンプル B	2.5×10^2	2.392	4.9	$2.4 \times 10^2 - 4.2 \times 10^2$	2.382 - 2.628
サンプル C	5.2×10^3	3.712	2.5	$4.9 \times 10^3 - 7.4 \times 10^3$	3.686 - 3.872
サンプル D	2.8×10^4	4.454	1.6	$2.6 \times 10^4 - 3.7 \times 10^4$	4.422 - 4.567
サンプル E	2.4×10^6	6.382	1.0	$4.7 \times 10^6 - 6.4 \times 10^6$	6.674 - 6.809

2. 室間再現精度 Multi-site Precision (Reproducibility)

複数の施設、装置、オペレーターで測定した場合に生じる再現性を解析した。

1) 方法

①対象検体

陰性リンパ節の可溶化液に CK19 mRNA を添加し、5 濃度 (1.6×10^2 , 2.5×10^2 , 5.2×10^3 , 2.8×10^4 , 2.4×10^6 cCP/ μ L) のサンプルを作製した。

②測定

3 施設で実施し、各施設は異なるオペレーター、異なる装置で測定した。

③データ解析

各サンプルは 54 回 (連続 3 回/バッチ, 3 バッチ/日, 2 日間/ロット, 3 ロット/施設) 測定を実施した。各サンプルの室内再現精度は CLSI ガイドライン EP05-A3 に従い、ANOVA 法で解析した。

2) 結果

各サンプルの室間再現精度は表 16 のとおり算出された。

3. バイアス Bias

測定範囲の濃度域において、測定結果の期待値に生じる理論値との誤差を解析した。

1) 方法

①対象検体

陰性リンパ節 10 検体の各可溶化液に 12 濃度

(160, 500, 1.6×10^3 , 5.0×10^3 , 1.6×10^4 , 5.0×10^4 , 1.6×10^5 , 5.0×10^5 , 1.6×10^6 , 5.0×10^6 , 1.6×10^7 , 5.0×10^7 cCP/ μ L) の CK19 mRNA を添加し、サンプルを作製した。

②測定

各サンプルは 1 回測定とし、4 日間にかけて測定した。

③データ解析

試薬 3 ロットにて実施し、各 120 データを試薬ロットごとに解析した。実測濃度と理論値のバイアスは CLSI ガイドライン EP09-A3 に従い算出した。

2) 結果

バイアスは 3 ロットの最大値が $0.309 \log$ cCP/ μ L であった。

4. 正確性 (総分析誤差) Accuracy

バイアスおよび再現精度から、個々の測定結果に発生しうる理論値からの誤差を解析した。

1) 方法

①対象検体

陰性リンパ節 10 検体の各可溶化液に 12 濃度 (160, 500, 1.6×10^3 , 5.0×10^3 , 1.6×10^4 , 5.0×10^4 , 1.6×10^5 , 5.0×10^5 , 1.6×10^6 , 5.0×10^6 , 1.6×10^7 , 5.0×10^7 cCP/ μ L) の CK19 mRNA を添加し、サンプルを作製した。

表 16. 室間再現精度

対象検体	理論値		CV (%)	室内再現精度 (平均値 $\pm$ SD)	
	(cCP/ μ L)	(log cCP/ μ L)		(cCP/ μ L)	(log cCP/ μ L)
サンプル A	1.6×10^2	2.200	9.2	$1.6 \times 10^2 - 4.6 \times 10^2$	2.213 - 2.659
サンプル B	2.5×10^2	2.392	7.9	$2.7 \times 10^2 - 7.0 \times 10^2$	2.425 - 2.842
サンプル C	5.2×10^3	3.712	3.3	$4.7 \times 10^3 - 8.4 \times 10^3$	3.676 - 3.925
サンプル D	2.8×10^4	4.454	2.3	$3.0 \times 10^4 - 4.8 \times 10^4$	4.472 - 4.685
サンプル E	2.4×10^6	6.382	1.2	$4.1 \times 10^6 - 5.8 \times 10^6$	6.612 - 6.767

②測定

各サンプルは1回測定とし、4日間にかけて測定した。この測定を試薬3ロットにて実施し、各120データを試薬ロットごとに解析した。

③データ解析

CLSIガイドライン EP21-A に従い、実測濃度 ($\log \text{cCP}/\mu\text{L}$) の平均値 $\pm 3\text{SD}$ と理論値 ($\log \text{cCP}/\mu\text{L}$) の差として、総分析誤差を算出した。

2) 結果

総分析誤差は3ロットの最大値が $0.889 \log \text{cCP}/\mu\text{L}$ であった。

5. ブランク上限 Limit of blank (LoB)

1) 方法

①対象検体

陰性リンパ節4検体の可溶化液を3ロットのリノアンプCK19で測定した。各サンプルは15回(連続5回/バッチ, 3日間)測定し、計60データを試薬ロットごとに解析した。各試薬ロットのLoBは、CLSIガイドライン EP17-A2 に記載の classical approach にしたがって算出し試薬3ロットの最大値をLoBとした。

2) 結果

LoB は $13 \text{ cCP}/\mu\text{L}$ ($63 \text{ copies}/\mu\text{L}$) と算出された。

6. 検出限界 Limit of detection (LoD)

1) 方法

①対象検体

陰性リンパ節可溶化液にCK19 mRNAを添加し、5濃度(10, 16, 25, 40, $63 \text{ cCP}/\mu\text{L}$)のサンプルを作製し、それぞれ3ロットのリノアンプCK19で測定した。

②測定

各サンプルは12回(連続4回/バッチ, 3日間)測定し、計60データを試薬ロットごとに解析した。

③データ解析

各試薬ロットのLoDは、CLSIガイドライン EP17-A2 に記載の classical approach に従って算出し、試薬3ロットの最大値をLoDとした。

2) 結果

LoD は $56 \text{ cCP}/\mu\text{L}$ ($240 \text{ copies}/\mu\text{L}$) と算出された。

なお測定再現性を考慮し、新システムとしての定性限界は $250 \text{ copies}/\mu\text{L}$ を保証する。

7. 定量限界 Limit of quantification (LoQ)

1) 方法

①対象検体

陰性リンパ節可溶化液にCK19 mRNAを添加し、6濃度(20, 40, 79, 160, 320, $630 \text{ cCP}/\mu\text{L}$)のサンプルを作製し、それぞれ3ロットのリノアンプCK19で測定した。

②測定

各サンプルは9回(連続3回/バッチ, 3日間)測定し、サンプル、試薬ロットごとに解析した。

③データ解析

総分析誤差および精密度の規格を満たす最低濃度のサンプルを各試薬ロットのLoQとし、試薬3ロットの最大値をLoQとした。

2) 結果

LoQ は $160 \text{ cCP}/\mu\text{L}$ ($600 \text{ copies}/\mu\text{L}$) と算出された。

8. 測定範囲 Measuring range

1) 方法

①対象検体

陰性リンパ節可溶化液に9濃度($160, 500, 1.6 \times 10^3, 5.0 \times 10^3, 1.6 \times 10^4, 5.0 \times 10^4, 1.6 \times 10^6, 1.6 \times 10^7, 1.6 \times 10^8 \text{ cCP}/\mu\text{L}$)のCK19 mRNAを添加してサンプルを作製した。

②測定

各サンプルは連続3回測定とし、試薬3ロットで測定した。

③データ解析

試薬ロットごとにCLSIガイドライン EP06-A に従い解析し、理論値と実測濃度の直線性を評価して、測定範囲を算出した。

2) 結果

理論値と実測濃度の直線性が確認できた、リノアンプCK19の測定範囲は2.200 から $8.200 \log \text{cCP}/\mu\text{L}$ (160 から $1.6 \times 10^8 \text{ cCP}/\mu\text{L}$) であった。

結 語

シスメックスは、OSNA 法の新システム（装置：RD-200，試薬：リノアンプ CK19）を開発した。既存システム（装置：RD-100i，試薬：リノアンプ BC）からの改良点は表 17 のとおりである。

新システムでは、既存システムと比較し、測定が迅速で操作性が高く、各癌種での使用方法や施設での手術状況にも適用した新システムを構築することができた。また試薬性能の変化に伴う測定値の乖離は、換算式および単位「cCP/μL」を提供することで、既存システムとの比較を容易とした。

新システムでは、カットオフ値を新たに設定し、

また希釈サンプルを省略する仕様である。これらの妥当性は、既存システムとの同等性を評価した臨床試験にて確認することができた。よって新システムの臨床性能は十分であることが明らかとなった。

また検体サンプルを測定した場合の分析性能も評価した。CLSI ガイドラインに従い評価した本分析性能は、精度管理の参考データとなることが期待される。

以上のとおり、OSNA 法の新システムを開発し、臨床性能および分析性能を確認した。既存システムと同等の臨床性能に加え、既存システムに対する市場要望を基に、臨床現場での運用を簡便化した。今後は、既存システムに替わる有用なシステムとして活用されることが期待される。

表 17. 既存システムと新システムの比較

	既存システム RD-100i/リノアンプBC	新システム RD-200/リノアンプCK19
		
測定時間 (装置へのセット～判定)	2検体測定で24.5分／測定	2検体測定で17分／測定
分析性能	定性 (-)/(+)カットオフ値250 copies/μL (+)/(++)カットオフ値5,000 copies/μL	定性 (-)/(+) カットオフ値900 copies/μL (250 cCP/μL) (+)/(++) カットオフ値14,000 copies/μL (5,000 cCP/μL)
対象検体	測定サンプル／希釈サンプル	測定サンプル (希釈サンプル省略)
測定可能検体数	最大4リンパ節／測定	最大14リンパ節／測定
試薬の仕様	240テスト／キット 開封後有効期限1ヶ月	120テスト／キット 開封後有効期限2ヶ月
ユーザビリティ機能	—	QRコードによる残量管理 操作画面内蔵による省スペース化 内部精度管理の強化 蓋と本体が一体型の試薬容器

謝 辞

共同研究にご協力いただいたご施設

医療法人 創起会 くまもと森都総合病院

- ・統括副院長 乳腺センター 西村令喜 先生
- ・病理診断科 診療部長 有馬信之 先生

大阪警察病院

- ・病理診断科 部長 辻本正彦 先生

北九州市立医療センター

- ・乳腺甲状腺外科 主任部長 阿南敬生 先生
- ・病理診断科 主任部長 田宮貞史 先生

京都府公立大学法人 京都府立医科大学大学院
医学研究科

- ・内分泌・乳腺外科学 講師 阪口晃一 先生

近畿大学大学院医学研究科

- ・外科学教室 乳腺内分泌外科部門 教授
菰池佳史 先生
- ・病理学講座 教授 佐藤隆夫 先生
- ・病理学講座 植田清文 先生

社会医療法人博愛会 相良病院

- ・副院長 病理診断科部長 大井恭代 先生

- ・病理診断科 臨床検査科長 前田ゆかり 先生
- ・病理診断科 皆倉愛美 先生

地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪はびきの医療センター

- ・乳腺外科 診療主任 久保田倫代 先生

新潟県立がんセンター新潟病院

- ・院長 乳腺外科 佐藤信昭 先生
- ・副院長 病理診断科 本間慶一 先生

(施設名 五十音順)

参考文献

- 1) Yoshiya Horimoto. Elucidation of inhibitory effects on metastatic sentinel lymph nodes of breast cancer during One-Step Nucleic Acid Amplification. Scientific Reports. 2018 ; 8, Article number : 7563
- 2) V Peg et al. Intraoperative molecular analysis of total tumor load in sentinel lymph node: a new predictor of axillary status in early breast cancer patients. Breast Cancer Research and Trea. 2013 ; 139 (1) : 87-93. doi:10.1007/s10549-013-2524-z.
- 3) 厚生労働省医薬食品局長 . 薬食発 0120 第 1 号 (平成 27 年 1 月 20 日).

Basic Evaluation of Gene Amplification Detector RD-200 and LYNOAMP CK19

Akane SEKI^{*1}, Mayuko KOBAYASHI^{*2}, Ayami HIRAKI^{*2}, Mamoru ASHIDA^{*2}, Michiko YOSHIMOTO^{*1},
Tetsuro MORINAGA^{*2}, Mitsue ITO^{*1}, Motonari DAITO^{*2} and Shuichi NUMATA^{*1}

*1 Scientific information, Scientific Affairs, Sysmex Corporation, 1-3-2 Murotani, Nishi-ku, Kobe 651-2241, Japan

*2 Gene Testing Business, LS Business, Sysmex Corporation

SUMMARY

One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA), refers to a method for facilitating diagnosis of lymph node metastasis of cancer cells, using a specially designed detector and reagents for amplification and detection of the target gene, cytokeratin (CK) 19 mRNA, which may be present in the lymphatic tissue sample homogenized by the dedicated solubilizing agent. RD-100i gene amplification detector and LYNOAMP BC, the conventional system using this method, has already been introduced to a number of institutions around the world, being utilized mainly in breast cancer-related diagnosis.

Now, with the introduction to the market of a new gene amplification and detection system, RD-200 gene amplification detector and LYNOAMP CK19, which should be useful clinically in diagnosing many types of cancer, the clinical performance of this new system and analytical capacities of the new reagent set were evaluated. Regional lymph nodes of breast cancer were analyzed both with the conventional system and the new system, and concordance rates were calculated; the results were that both systems were found to be comparable in clinical performance. Furthermore, it was shown that the new system, which was improved in usability in response to the market needs arising in relation to the conventional system, facilitated diagnosis with simplified operation in the clinical setting. The new system is expected to supersede the conventional system as a more useful means of diagnosis.

Key Words OSNA, RD-200, RD-210, LYNOAMP CK19, LYNOAMP CK19 E, Cytokeratin 19 (CK19)
