体外診断用医薬品　　**改訂 2023 年 7 月（第 11 版）
製造販売承認番号 22200AMX00914000　　*改訂 2022 年 5 月（第 10 版）

ご使用に際しては本添付文書をよく読んでからご使用ください。

マイコバクテリウム核酸キット

ジーンキューブ®ＭＴＢ

［全般的な注意］

1.本品は全自動遺伝子解析装置 GENECUBE®の専用試薬です。
2.本品は、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。
3.添付文書以外の使用目的及び使用方法でご使用されて得られた測定結果については保証を致しかねます。
4.測定結果に基づく診断は、他の検査結果などと併せて担当医師が総合的に判断してください。
5.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。
6.SDSは末尾記載の問い合わせ先に請求し、ご確認ください。

［形状・構造等（キットの構成）］

1.酵素試薬[KOD Mix]
KOD® DNA ポリメラーゼ
dNTP※
2.プライマー・プローブ試薬[MTB Mix]
MTB プライマー F
MTB プライマー R
MTB QProbe
硫酸マグネシウム
3.内部コントロール試薬[IC Mix]
4.陽性コントロール溶液[MTB PC]
5.陰性コントロール溶液[MTB NC]
※「dNTP」はデオキシアデノシン三リン酸、デオキシシチジン三リン酸、デオキシグアノシン三リン酸、デオキシチミジン三リン酸の混合物です。

［使用目的］

体液、組織、気管支洗浄液（鉗子洗浄液、肺胞洗浄液、ブラッシング洗浄液を含む）又はそれらの培養液の結核菌群 DNA の検出（結核診断の補助）

***［測定原理］**

本品は、「Polymerase Chain Reaction (PCR)法による標的核酸増幅」と「蛍光標識プローブ（QProbe※）を用いた標的核酸検出」を利用した結核菌群 DNA 検出試薬です。
結核菌群の *dnaJ* 遺伝子領域[1)]をターゲットに特異的なプライマーF とプライマーR をアニーリングさせます。KOD® DNA ポリメラーゼによって各プライマーの伸長が起こります。この時 dNTP を基質、マグネシウムイオンを酵素の活性触媒として用います。プライマーのアニーリング、伸長を繰り返し行うことで標的核酸を増幅させます。その後、増幅核酸と結核菌群に特異的な配列を持つ MTB QProbe をハイブリダイゼーションさせて蛍光の変化を解析することで結核菌群の DNA 検出を行います。
増幅に「高速増幅可能な KOD® DNA ポリメラーゼ」[2)]、検出に「シンプルな設計の QProbe」[3),4)]を利用して簡便迅速な検出を可能にします。また、容器を開封せずに増幅検出を行うホモジニアス系のためキャリーオーバーコンタミネーションを防止し、偽陽性の発生を抑えることができます。さらに、内部コントロールを増幅・検出反応系に組み込むことで臨床検体由来の妨害物質による PCR 阻害を知ることができ、結核菌群の DNA 検出における偽陰性を防ぐことができます。
※「QProbe」は日鉄環境株式会社が特許権を有する消光プローブです。

***［操作上の注意］**

1.検体について
(1)本品の試料には、検体から抽出した DNA 溶液（検体調製液）又は希釈した培養液を用います。
(2)血液成分、ヘパリンが多量に含まれる検体を試料として用いた場合、もしくは検体中の細胞成分が過量の場合、増幅検出反応が阻害されて正常に測定できないことがあります。
(3)培養液を用いる場合は、菌が発育した時点の培養液を用いてください。
(4)各種検体の採取法は、「抗酸菌検査ガイド 2016」（日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会（編））[5)]を参照してください。
(5)冷凍保存された検体を使用するときは、室温に戻してから使用してください。

2.試料の調製方法
(1)検体（臨床検体）の調製方法
各種検体は、消化・汚染除去を予め行ってください。消化・汚染除去法は以下の方法を用いて実施してください。

・NALC-NaOH 法※1 または準ずる方法
喀痰はタンパク質分解酵素であるセミアルカリプロテアーゼ（SAP）で均質化処理※2 を行った後、NALC-NaOH 法で処理してください。喀痰以外の体液、組織、気管支洗浄液は NALC-NaOH 法で処理してください。処理後の検体から各種核酸抽出法の操作方法に従って核酸を抽出して検体調製液とします。
※1 NALC-NaOH 法については「抗酸菌検査ガイド 2016」（日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会（編））[5)]を参照してください。同法を基本原理とした製品を用いる場合、操作方法の詳細は各製品の添付文書に従ってください。
※2 粘稠性の高い検体、容量の多い検体で特に推奨されます[5)]。操作方法は「抗酸菌検査ガイド 2016」（日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会（編））[5)]を参照してください。SAP 液はスプタザイム（極東製薬工業株式会社）、プレソルブ（日水製薬株式会社）が製品化されています。
(2)検体（培養液）の調製方法
培養液を 80℃で 10 分間加熱後※3、精製水で 100 倍に希釈します。希釈した培養液から核酸を抽出して検体調製液とします。また、希釈した培養液は核酸抽出を行わずにそのまま検体調製液として測定に使用することもできます※4。
すぐに使用しない場合は-20℃以下で保存します。
※3「結核分子疫学調査の手引き 第一版」（公益財団法人 結核予防会 結核研究所（編））では、95℃で 10 分間の加熱が推奨されています[6)]。
※4 検体（培養液）に対して核酸抽出を行わず、検体調製液として測定に使用したとき、検体中に複数の抗酸菌が存在する等で結核菌群の菌量が十分量でない場合、陰性と判定されることがあります。
**(3)核酸抽出方法
核酸抽出にあたっては、各抽出試薬の操作方法に従って行ってください。
核酸抽出にあたってジーンキューブ®専用 イージー・ビーズ、ジーンキューブ®専用 溶解液を用いる際は、以下の操作に従って行ってください。
1)イージー・ビーズに滅菌精製水 1mL を分注します。
2)消化・汚染除去を行った検体を 1)に加えて、13,000×g、3 分間の遠心を行います。
3)チューブに残る溶液が 150μL 以下となるように上清を除去します。
4)溶解液 50μL を加えて、95℃、10 分間加熱します。
5)ボルテックスミキサー※5 で 3 分間激しく撹拌します。
6) 13,000×g、3 分間の遠心を行います。
7)上清を検体調製液として使用します。
※5 ボルテックスミキサーは DIGITAL DISRUPTOR GENIE SI-DD88 もしくは同等性能品を用い、回転速度 2,500rpm 以上の設定で実施してください。用手法や破砕効率の低い撹拌機を用いた場合、十分な DNA が得られないことがあります。

核酸抽出にあたって GENECUBE®を用いる場合は、GENECUBE®及びジーンキューブ®専用 前処理セットの取扱説明書をご参照ください。

3.交差反応
結核菌群 4 種（*Mycobacterium tuberculosis, M. bovis, M. africanum, M. microti*）から抽出した DNA 試料について測定を行ったところ、検出が確認されました。非結核性抗酸菌 38 種から抽出した DNA 試料について測定を行ったところ、交差反応は認められませんでした。

4.共存物質の影響
ヒトゲノム混入における影響については、10 万コピー／テストのヒトゲノムが混入しても本品の測定に影響しないことを確認しました。

また、陽性コントロールに 10μg/mL のイソニアジド、リファンピシン、50μg/mL のストレプトマイシン、ピラジナミド、5μg/mL のエタンブトール、4.9mg/mL の ヘモグロビンを添加して測定したところ、測定に影響しないことを確認しました。

5.コンタミネーションの防止

GENECUBE®は、試薬の分注から増幅専用容器であるプラスチックキャピラリーへの試薬の充填、増幅検出までを自動で行います。増幅検出を一つの容器で開封することなしに行うことができ、測定を終了した試薬はそのまま自動で廃棄するため、キャリーオーバーコンタミネーションによる偽陽性を抑えることができます。しかし、GENECUBE®では検体の調製段階で発生するクロスコンタミネーションは防止することができませんので、以下の操作法を遵守してください。

(1)個人防護具の着用

人体に付着した微生物や体液(例えば唾液、汗)の混入を防ぐため、また検体からの感染防止の観点からも個人防護具(手袋、マスク、防護衣など)を着用して操作を行ってください。GENECUBE®への試薬のセット時には、検体の調製時に使用した手袋は使用せず、新しい手袋を使用してください。

(2)フィルター付ピペットチップの使用

検体の調製時に使用するピペットがエアーディスプレースピペットの場合、サンプルとピストンの間に空気が介在するため、ピペット内部を汚染してしまう可能性があります。ピペット内部の汚染を防止するため、フィルター付のチップを使用してください。

＊[用法・用量(操作方法)]

1.試薬・試液調製法

・酵素試薬[KOD Mix]:そのまま用います。
・プライマー・プローブ試薬[MTB Mix]:そのまま用います。
・内部コントロール試薬[IC Mix]:そのまま用います。
・陽性コントロール溶液[MTB PC]:そのまま陽性コントロールとして用います。
・陰性コントロール溶液[MTB NC]:そのまま陰性コントロールとして用います。

2.必要な器具、器材など

・GENECUBE®及びその付属品、取扱説明書
・マイクロピペット及びチップ
・個人防護具(手袋、マスク、防護衣など)
・ボルテックスミキサー(DIGITAL DISRUPTOR GENIE SI-DD88 推奨)

＜消耗品＞

・ジーンキューブ®専用 プラスチックキャピラリー
・ジーンキューブ®専用 分注チップ
・8,12 連チューブ:株式会社イナ・オプティカ 123015TC,123046TC など※
・サンプルチューブ(0.5mL):ザルスタット株式会社 72.699.00003, 72.704.700 など※

※上記以外の製品をご使用の場合は、適合の可否をお問い合わせください。

3.操作方法

本品は、全自動遺伝子解析装置 GENECUBE®を用いて測定してください。GENECUBE®の操作は、GENECUBE®の取扱説明書に従って行ってください。

(1)酵素試薬[KOD Mix]、プライマー・プローブ試薬[MTB Mix]、各消耗品を機器の所定の位置にセットします。
(2)陽性コントロール溶液[MTB PC]、陰性コントロール溶液[MTB NC]及び検体調製液をそれぞれ分注した 0.5mL チューブを機器の所定の位置にセットします。
(3)検体調製液 3 容量、内部コントロール試薬 [IC Mix]1 容量、酵素試薬[KOD Mix]3 容量、プライマー・プローブ試薬[MTB Mix]3 容量を混合し、反応液を調製します。
(4)反応液をジーンキューブ®専用 プラスチックキャピラリーに充填します。
(5)GENECUBE®の増幅反応パラメーター※1 で、増幅反応を行います。
(6)GENECUBE®の検出反応パラメーター※2 で、検出反応を行います。その後、測定波長 510nm～550nm 及び 573nm～613nm での蛍光値を測定します。
(7)陽性コントロール溶液 [MTB PC]及び陰性コントロール溶液 [MTB NC]について検体調製液と同様に(3)～(6)の操作を行います。
(8)測定した蛍光値は専用の解析ソフトにより、蛍光変化量を表す蛍光微分値に変換されます。蛍光微分値を用いて結果の解析が行われ、測定画面上に判定結果が表示されます。

※1 増幅反応パラメーター

	35.0	℃	0.0	sec
	94.0	℃	30.0	sec
①変性	97.0	℃	1.0	sec
②アニーリング	58.0	℃	3.0	sec
③伸長	63.0	℃	5.0	sec
	35.0	℃	0.0	sec
①～③サイクル回数		50		

※2 検出反応パラメーター

94.0	℃	30.0	sec
39.0	℃	30.0	sec
40.0～75.0	℃	0.09	℃/sec

[測定結果の判定法]

1.判定方法

GENECUBE®では測定結果は自動的に判定され、測定画面上に陽性「＋」、陰性「－」、判定無効「Invalid」で表示されます。

(1)判定無効の場合

「Invalid」と表示された場合、その測定は無効となります。検体の調製から行い、再度測定を実施してください。

(2)陽性コントロール溶液[MTB PC]、陰性コントロール溶液[MTB NC]は、施設の精度管理、試薬の性能確認を目的として使用してください。陽性コントロール溶液[MTB PC]の測定結果が陰性を示した場合、陰性コントロール溶液[MTB NC]の測定結果が陽性を示した場合、全ての試薬を入れ替えて再測定を行ってください。

2.判定上の注意

本品で陰性と判定されても、結核菌群の存在を否定するものではありません。検体中に標的となる DNA が存在しても検体前処理操作で最小検出感度以下になった場合は陰性と判定されますのでご注意ください。

(1)以下の場合、正常に測定できないことがありますのでご注意ください。
　1)血液が混入している、長時間放置した、など良質ではない検体を使用した場合
　2)検体調製が不十分で、菌体のロスまたは DNA の分解が生じている検体を使用した場合
　3)保存方法が適切でない、もしくは有効期限が過ぎている試薬を使用した場合
(2)臨床検体中に含まれる結核菌が死菌である場合、放出された結核菌群 DNA を検出する可能性があります。

[性能]

1.性能

用法・用量(操作方法)欄の操作方法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行なった場合、下記の規格に適合します。

(1)感度試験
　1)陰性コントロールを所定の操作で測定するとき、陰性を示します。
　2)陽性コントロールを所定の操作で測定するとき、陽性を示します。
(2)正確性試験
　1)自家管理陰性試料 1～3 を測定するとき、陰性を示します。
　2)自家管理陽性試料 1～3 を測定するとき、陽性を示します。
(3)同時再現性試験
　1)自家管理陰性試料 1 を 4 回同時に測定するとき、すべて陰性を示します。
　2)自家管理陽性試料 1 を 4 回同時に測定するとき、すべて陽性を示します。
(4)最小検出感度

10 コピー／テスト (GENECUBE®測定)

(5)較正用基準物質

本品の較正用基準物質には結核菌群 *dnaJ* 遺伝子配列の一部を含む DNA 溶液を使用しています。

2.相関性

本品と PCR 法を原理とする既承認品及び培養同定法の相関性を検討しました。

体液 191 例(喀痰 122 例、気管支分泌物 5 例、糞便 7 例、尿 12 例、血液 5 例、胃液 13 例、胸水 19 例、膿 4 例、耳漏 1 例、腸液 1 例、穿刺液 1 例、腹水 1 例)、組織 5 例、気管支洗浄液 170 例、培養液 287 例の臨床検体 653 例を試料に測定を行ったところ、表 1 及び表 2 に示すように一致率は 97.5%で良好な相関を示しました。

表 1 既承認品との相関性試験成績

		既承認品	
		陽性	陰性
本品	陽性	241	14※1
	陰性	2※2	396
全体一致率		97.5% (637/653)	

※1 14 例中 12 例は培養同定検査で陽性、残り 2 例は培養同定検査で陰性と判定されました。

※2 2 例中 1 例は培養同定検査で陽性、残り 1 例は培養同定検査で陰性と判定されました。

表 2 培養同定検査法との相関性試験成績

		培養同定法	
		陽性	陰性
本品	陽性	247	8※3
	陰性	8※4	390
全体一致率		97.5% (637/653)	

※3 8 例中 6 例は既承認品で陽性、残り 2 例は既承認品で陰性と判定されました。

※4 8 例中 1 例は既承認品で陽性、残り 7 例は既承認品で陰性と判定されました。

＊[使用上又は取扱い上の注意]

1.取扱い上の注意

(1)検体の調製は、必ず安全キャビネット内で行い、「抗酸菌検査ガイド 2016」(日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会(編))[5]および各施設の安全管理規定に従って取り扱ってください。

(2)検体を取扱う時は、個人防護具(手袋、マスク、防護衣など)を着用し、検体を吸い込んだり体に付着したりすることがないようご注意ください。

(3)試薬が誤って目や口に入った場合は、直ちに水で十分洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の診察・治療などを受けてください。

(4)試薬が誤って皮膚に付着した場合は、直ちに多量の水で洗い流してください。

(5)試薬が飛散した場合は、拭き取ってください。

(6)検体を含む溶液が飛散した場合は手袋とマスク着用の上、0.5%次亜塩素酸剤などの消毒液を使用して拭き取ってください。

(7)本品の酵素試薬[KOD Mix]は、「ジーンキューブ®MAC」、「ジーンキューブ®MAI」との間で共通試薬として使用できます。

(8)内部コントロール試薬[IC Mix]は、「ジーンキューブ®MAC」との間で共通試薬として使用できます。

2.使用上の注意

(1)機器、試薬及び消耗品は専用のものを使用してください。

(2)本品に含まれる試薬は必ず保管方法に従って保存し、凍結させたり、長時間室温に放置したりしないでください。また、保管方法以外の条件で保存した試薬や使用期限が過ぎている試薬は使用しないでください。

(3)すべての構成試薬は継ぎ足して使用しないでください。

(4)本品で用いているプライマーやプローブは細菌遺伝子のうち保存性が高い遺伝子領域をターゲットとしていますが、稀に発生する遺伝子変異等により反応性が低下し、正確に測定できない場合があります。

3.廃棄上の注意

(1)使用済みの試薬及び器具などを廃棄する場合には医療用廃棄物に関する規定に従って廃棄してください。

(2)試薬を廃棄する場合は水質汚濁防止法などの規制に留意して処理してください。

(3)使用済みの試薬及び消耗品は、溶液を飛散させないように廃棄してください。

[保管方法・有効期間]

保管方法

2～8℃で保存

有効期間

1 年 (期限は外箱に表示)

[包装単位]

商品名	構成試薬名、包装内容
ジーンキューブ®MTB	酵素試薬[KOD Mix] 140μL×6 本
	プライマー・プローブ試薬[MTB Mix] 140μL×6 本
	内部コントロール試薬[IC Mix] 300μL×1 本
	陽性コントロール溶液[MTB PC] 300μL×1 本
	陰性コントロール溶液[MTB NC] 300μL×1 本

[主要文献]

1)Yamada-Noda M. *et al.* *Mycobacterium* species identification - A new approach via *dnaJ* gene sequencing. Syst Appl Microbiol. 2007 Sep; 30(6): 453-462.

2)Takagi M. *et al.* Characterization of DNA Polymerase from *Pyrococcus* sp. Strain KOD1 and Its Application to PCR. Appl Environ Microbiol. 1997 Nov; 63(11): 4504-4510.

3)Kurata S. *et al.* Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY((R)) FL-labeled probe or primer. Nucleic Acids Res. 2001 Mar 15; 29(6): e34.

4)Torimura M. *et al.* Fluorescence-Quenching Phenomenon by Photoinduced Electron Transfer between a Fluorescent Dye and a Nucleotide Base. Anal Sci. 2001 Jan; 17(1): 155-160.

5)日本結核病学会 抗酸菌検査法検討委員会(編)(2016). 抗酸菌検査ガイド 2016

6)公益財団法人 結核予防会 結核研究所(編)(2017 年 9 月修正). 結核分子疫学調査の手引き 第一版

文献請求先　末尾記載の問い合わせ先までご請求ください。

TOYOBO

＊[問い合わせ先]

東洋紡株式会社 診断システム事業部

〒530-0001 大阪市北区梅田一丁目13番1号

大阪梅田ツインタワーズ・サウス

TEL 06-6348-3335 FAX 06-6348-3833

＊[製造販売業者の氏名又は名称及び住所]

東洋紡株式会社

〒914-8550 福井県敦賀市東洋町 10 番 24 号