

使用説明書

LymphoTrack® MRD Software v2.0.x

研究専用(RUO: Research Use Only) LymphoTrack MRD Software v2.0.x はバイオインフォマティクスツールであり、サポートされている Microsoft Windows® プラットフォーム上でご利用いただけます。本ソフトウェアは、Invivoscribe® LymphoTrack Assays とそれらに付属している LymphoTrack バイオインフォマティクスソフトウェアを使用して作成された出力ファイル内の *IGHV Leader*、*IGH FR1/2/3*、*TRG*、*TRB* クローン配列の存在を検出することを目的とするもので、それらの配列を見出すことの重要性を明示するものではありません。

結果が MRD Detected (MRD **検出あり**) の場合、ソフトウェアは、リード数と完全なシーケンスマッチと類似シーケンス (最大 2 つまでのヌクレオチドがミスマッチ) の累積頻度をレポートします。

結果が MRD Not Detected (MRD **検出なし**) の場合、ソフトウェアは、リード数と完全なシーケンスマッチと類似シーケンス (最大 2 つまでのヌクレオチドがミスマッチ) の累積頻度をレポートします。さらに、ソフトウェアは、サンプル DNA 投入使用量と得られたリードデプスに基づいて検索されたシーケンスに対して、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} の感度で信頼度をレポートします。

微小残存病変 (MRD) 研究のサンプル設定に関する詳細情報については、テクニカルブリテン *Study of MRD - Using LymphoTrack Assays* (MRD 研究 - LymphoTrack Assays を使用する) (REF MM-0036) を参照してください。本テクニカルブリテンおよび MRD Software (MRD ソフトウェア) テクニカルブリテン (REF MM-0031) をご希望の場合は marketing@invivoscribe.com までメールでご連絡ください。

最低システム要件

- プロセッサ: Intel Core 2 Duo以降のCPUを推奨します。
- ハードドライブ: 1 GB以上の空きディスクスペースが必要です。2 GBを推奨します。
- RAM: 4 GBが必要です。8 GB以上を推奨します。
- オペレーティングシステム: Windows 10または Windows 11 (64ビット) が必要です。
- CD-ROMドライブ

警告および注意

- **使用説明書**: LymphoTrack MRD Software (LymphoTrack MRD ソフトウェア) を使用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。
- **スリープまたは休止状態の設定**: 一定時間コンピュータを使用しないとスリープまたは休止状態になるように設定されている場合は、LymphoTrack MRD Softwareを使用する前に、この設定を無効にするようにしてください。コンピュータがスリープまたは休止状態になると、ソフトウェアの解析が途中で終了してしまう可能性があります。
- **ファイル名**: LymphoTrack MRD Softwareの出力によって複数のファイルが作成されるため、わかりやすい特徴のあるファイル名を使用するようにしてください。
- **パス名およびファイル名に使用する文字**: 1) 解析対象のファイルのパス名にはスペースを使用しないでください (パス名にはファイルのフォルダ名とファイル名が含まれます)。2) ファイル名には次の文字以外使用しないでください: A-Z、a-z、0-9、_ (アンダーバー)、- (ハイフン)。その他の文字を使用した場合、ソフトウェアが解析を完了できない可能性があります。

製品の互換性

RUO LymphoTrack MRD software v2.0.x は、以下の Invivoscribe LymphoTrack アッセイおよびコントロールを併用して、対応する LymphoTrack Software によって同定されたクローン配列を追跡することを目的とします（Ion S5/PGM™ の場合はREF 75000007 または MiSeq™ の場合はREF 75000009）。

カタログ番号	製品名	数量
REF 40880098	LymphoTrack B-cell Low Positive Control (LymphoTrack B細胞低値陽性コントロール)	1チューブ-5反応
REF 40880118	LymphoQuant® B-cell Internal Control (LymphoQuant B細胞内部コントロール)	1チューブ-120反応
REF 40880108	LymphoTrack T-cell Low Positive Control (LymphoTrack T細胞低値陽性コントロール)	1チューブ-5反応
REF 40880128	LymphoQuant T-cell Internal Control (LymphoQuant T細胞内部コントロール)	1チューブ-120反応
REF 71210009	LymphoTrack IGH FR1 Assay Kit A – MiSeq (LymphoTrack IGH FR1アッセイキットA-MiSeq)	8インデックス-各5反応
REF 71210039	LymphoTrack IGH FR1 Assay Panel – MiSeq (LymphoTrack IGH FR1アッセイパネル-MiSeq)	24インデックス-各5反応
REF 71210149	LymphoTrack IGH FR1 Assay Panel B – MiSeq (LymphoTrack IGH FR1アッセイパネルB-MiSeq)	24インデックス-各5反応
REF 71210089	LymphoTrack IGH FR2 Assay Kit A - MiSeq (LymphoTrack IGH FR2アッセイキットA-MiSeq)	8インデックス-各5反応
REF 71210099	LymphoTrack IGH FR2 Assay Panel – MiSeq (LymphoTrack IGH FR2アッセイパネル-MiSeq)	24インデックス-各5反応
REF 71210109	LymphoTrack IGH FR3 Assay Kit A – MiSeq (LymphoTrack IGH FR3アッセイキットA-MiSeq)	8インデックス-各5反応
REF 71210119	LymphoTrack IGH FR3 Assay Panel – MiSeq (LymphoTrack IGH FR3アッセイパネル-MiSeq)	24インデックス-各5反応
REF 71210129	LymphoTrack IGH FR1/2/3 Assay Kit A – MiSeq (LymphoTrack IGH FR1/2/3アッセイキットA-MiSeq)	FR領域ごとに8インデックス-各5反応
REF 71210139	LymphoTrack IGH FR1/2/3 Assay Panel – MiSeq (LymphoTrack IGH FR1/2/3アッセイパネル-MiSeq)	FR領域ごとに24インデックス-各5反応
REF 71210059	LymphoTrack IGHV Leader Somatic Hypermutation Assay Kit A – MiSeq (LymphoTrack IGHV Leader体細胞超変異アッセイキットA-MiSeq)	8インデックス-各5反応
REF 71210069	LymphoTrack IGHV Leader Somatic Hypermutation Assay Panel – MiSeq (LymphoTrack IGHV Leader体細胞超変異アッセイパネル-MiSeq)	24インデックス-各5反応
REF 72250009	LymphoTrack TRB Assay Kit A – MiSeq (LymphoTrack TRBアッセイキットA-MiSeq)	8インデックス-各5反応
REF 72250019	LymphoTrack TRB Assay Panel – MiSeq (LymphoTrack TRBアッセイパネル-MiSeq)	24インデックス-各5反応
REF 72270009	LymphoTrack TRG Assay Kit A – MiSeq (LymphoTrack TRGアッセイキットA-MiSeq)	8インデックス-各5反応
REF 72270019	LymphoTrack TRG Assay Panel – MiSeq (LymphoTrack TRGアッセイパネル-MiSeq)	24インデックス-各5反応
REF 71210007	LymphoTrack IGH FR1 Assay - S5/PGM (LymphoTrack IGH FR1アッセイ - S5/PGM)	12インデックス-各5反応
REF 71210037	LymphoTrack IGH FR2 Assay - S5/PGM (LymphoTrack IGH FR2アッセイ - S5/PGM)	12インデックス-各5反応
REF 71210047	LymphoTrack IGH FR3 Assay - S5/PGM (LymphoTrack IGH FR3アッセイ - S5/PGM)	12インデックス-各5反応
REF 71210057	LymphoTrack IGH FR1/2/3 Assay - S5/PGM (LymphoTrack IGH FR1/2/3アッセイ - S5/PGM)	FR領域ごとに12インデックス-各5反応
REF 72270007	LymphoTrack TRG Assay - S5/PGM (LymphoTrack TRGアッセイ - S5/PGM)	12インデックス-各5反応

目次

1. 用語.....	4
2. MRD 配列の選択.....	5
2.1. 免疫グロブリン重鎖 (IGH).....	5
2.2. 免疫グロブリンカッパ鎖 (IGK).....	5
2.3. T 細胞受容体ガンマ (TRG).....	5
2.4. T 細胞受容体ベータ (TRB).....	5
3. ソフトウェアをインストールする.....	6
4. プロジェクトプランを作成する.....	7
5. 被験者とサンプルを追加する.....	8
6. 低値陽性コントロールを添加する.....	10
7. プロジェクトを保存・ロードする.....	10
8. MRD 解析を実施する.....	10
9. ソフトウェアの結果.....	11
10. データ解析.....	11
11. トラブルシューティング.....	12
12. テクニカルおよびカスタマーサービス.....	13
13. 記号.....	13
14. 免責事項.....	13

1. 用語

表 1. 一般に使用される用語および語句

用語	定義
Low Positive Control (LPC)* (低値陽性コントロール)	LymphoTrack Low Positive Control (Lymphotrack 低値陽性コントロール) は MRD 検査専用で、LymphoQuant Internal Control (LymphoQuant 内部コントロール) と併用することを前提に最適化されています。これらのコントロールを併用してアッセイを実施することで LymphoQuant Internal Control が使用されているサンプルの MRD レベルが目的の感度で検出されていることを確認できます。
LymphoQuant Internal Control (LQIC)* (LymphoQuant 内部コントロール)	LymphoQuant Internal Controls は、サンプル PCR にスパイクして各クローン細胞相当量を概算し、クローンの存在率を計算することができます。スパイク-イン内部コントロールをサンプル PCR に添加すると、追加のシーケンシングランにコストをかけることなく、経時的なクローン追跡が容易になります。スパイク-イン内部コントロールを常に使用することで、高度に標準化された高感度な方法によるクローン型の客観的モニタリングを経時的に行うことができます。
# of Replicates (レプリケート数)	サンプルごとに独立して行った PCR の数。 1 つのサンプルに対する 1 つの PCR レプリケートは、 <u>1 つの特有な LymphoTrack マスターミックス (インデックス) を用いて行った、独立した PCR</u> として定義されます。 <ul style="list-style-type: none"> 例えば、サンプルAがそれぞれ、TRG MiSeq 01、TRG MiSeq 02、TRG MiSeq 03によって、3回の個別のPCRで検査される場合、サンプルAは3種類のPCRレプリケートを持つこととなります。 シーケンスされたPCRレプリケートはそれぞれ、LymphoTrackソフトウェアによって作成された*.unique_reads ファイルを1つ持ちます。
# of Resequences (リシーケンス数)	サンプルが最初にシーケンスされた適切なリードデプスに到達しなかったと考えられるために、同じ PCR レプリケートが異なるシーケンシングランでシーケンスされる回数。
# of Reads per Sequencing (シーケンシングごとのリード数)	シーケンス済の PCR レプリケート各々に対する望ましいリードデプスであり、Project Planner (プロジェクトプランナー) を使用して実験を計画する際のガイドとして提供されています。この数値はシーケンスされるレプリケート各々に割り当てられますが、それには予定される各々のリシーケンシングランまたはサンプルも含まれます。
Read Depth (リードデプス)	サンプルまたはサンプルレプリケートごとの 1 回のランにおけるシーケンスリードの回数。Project Planner (プロジェクトプランナー) ではリードデプスを # of Reads per Sequencing (シーケンシングごとのリード数) と呼んでいます。
Amount of DNA (DNA 量)	各 PCR レプリケートで使用された DNA の量。すべてのレプリケートに使用された DNA の合計量ではありません。
Run (ラン)	リシーケンスを含めて、対象となるアッセイごとのサンプルとコントロールの組み合わせに関連したワークフロー全体。
Index (インデックス)	サンプルまたは同じサンプルの PCR レプリケートを同定するために使用される特有のオリゴ配列。
Confidence (信頼度)	ある閾値ですべての配列が真の陰性になる確率 (# of Replicates (レプリケート数)、# of Resequences (リシーケンス数)、# Reads per Sequencing (シーケンシングごとのリード数)、Amount of DNA (DNA 量) を使用して計算します)。
Cumulative Read Count (累積リード数)	本ソフトウェアにおいては、完全にマッチするリード数に 1 つのミスマッチと 2 つのミスマッチのリード数を加えた合計。
Cumulative Read Frequency (CRF) (累積リード頻度)	LymphoTrack Software において特定のサンプル配列により作成されたリード数をそのサンプルで作成されたリード数の合計で除算して求められる値。
Estimated Clonal Cell Equivalents (推定クローン細胞同等物)	サンプル内で検出したクローン配列を含有する細胞相当数の概算。
Bi-allelic Clonal (両アレル性クローン)	同じ遺伝子のアレルが 2 つ存在することによる 2 つの特有なクローン配列。ただし、検出された 2 つのアレルは、単アレルのクローン型が 2 つ存在するためである可能性もあります。
Semantic Versioning (セマンティックバージョンング)	アップデートのリスク要因に合わせた 3 つの数字 (メジャー、マイナー、パッチ) で構成されるソフトウェアバージョンスキーム。

* LymphoTrack B-cell Low Positive Control と LymphoQuant B-cell Internal Control は LymphoTrack IGK アッセイと併用できません

2. MRD配列の選択

LymphoTrack Software により、*IGHV* Leader、*IGH* FR1/2/3、*TRG*、*TRB* クローン配列の経時的な MRD 追跡に高感度で客観的なアプローチが可能になります。LymphoTrack アッセイに LPC と LQIC をそれぞれ使用することで、MRD ワークフローが標準化されて能率的になります。LymphoTrack Software は MRD 追跡のためのクローン配列同定を支援しますが、各遺伝子座の性質は特有であるため、クローン配列が MRD 追跡に適しているかどうかを判断する際には、細心の注意が必要です。

2.1. 免疫グロブリン重鎖 (*IGH*)

*IGH*の遺伝的多様性が高いため、一般には、MRD追跡のための配列を選択する際に考慮すべき特別な検討事項はありません。

2.2. 免疫グロブリンカッパ鎖 (*IGK*)

MRD検査で*IGK*を標的とすることは理想的でなく、この遺伝子座の遺伝的多様性が低いために注意が必要です。LymphoTrack B-cell Low Positive ControlとLymphoQuant B-cell Internal Controlは、LymphoTrack *IGK* Assaysと併用できません。代替の*IGK*コントロールを利用する場合は、MRD追跡の配列を使用する前に、陰性コントロールデータには同定されたクローンの*IGK*配列がないことを確認してください。一般的な*IGK*再構成配列は、多クローン性陰性サンプル内に高頻度で観察されるものが多いため、MRD解析には不適切な場合があります。例えば、以下に挙げる3つのクローン配列はMRD解析に適さない可能性があります：

- イントロン-K_{del}
- Jまたは K_{del}を伴う V3D-20
- Jまたは K_{del}を伴う V3-11

2.3. T細胞受容体ガンマ (*TRG*)

*TRG*の遺伝子座は、*IGH*、*IGK*、*TRB*よりも少ない遺伝子セグメントから構成されるため、多様性が大幅に低下します。この多様性の欠如により、細胞間で同じ配列の*TRG*遺伝子再構成が高頻度で検出される率が高くなり、MRDの結果は偽陽性率が高まります。このリスクを抑制するため、MRD Softwareは完全にマッチするものだけを使用して*TRG*を計算します。同様に、以下も推奨されます：

- 2つのクローン配列を追跡して、偽陽性の確率を低減します。 *TRG* 遺伝子座は両アレルとも再構成される傾向が強く、LymphoTrack では2つのクローン配列がアウトプットとして示されます。これら両方の配列を使用してMRDを追跡します。
- 二クローン性のサンプルの場合、結果として2種類を超える複数のクローン配列が検出される可能性があり、複数の配列が追跡可能となりアッセイの特異性を改善することができます。

2.4. T細胞受容体ベータ (*TRB*)

*TRB*遺伝子再構成を追跡する場合、D-J再構成は、未完成である場合があります、多様性が低下しているため、MRD検査にはあまり適さないことに注意してください。MRDの結果における偽陽性のリスクを最少限にするため、*TRB*クローン追跡では完全に配列をマッチさせます。

3. ソフトウェアをインストールする

LymphoTrack MRD ソフトウェア パッケージは、Invivoscribe ソフトウェア ポータルからダウンロードするか、付属の CD からコピーできます。

注: ソフトウェアをインストールするには管理者権限が必要です

- 3.1. LymphoTrack MRD ソフトウェア CD をディスク ドライブにロードします。 **または**
- 3.2. Invivoscribe ソフトウェア ポータルから LymphoTrack MRD ソフトウェアをダウンロードする
 - 3.2.1. 任意の Web ブラウザを使用して、<https://catalog.invivoscribe.com/softwareportal/> に移動します。
 - 3.2.2. 次のテキストフィールドに入力します。
 - 3.2.2.1. 電子メール: 有効な電子メール アドレスを入力します。ソフトウェアのダウンロードへのリンクがこのアドレスに送信されます。
 - 3.2.2.2. 顧客アカウント番号: Invivoscribe で注文するとき使用する一意の ID を入力します。
 - 3.2.2.3. ソフトウェア コード: 販売注文の下部にソフトウェア コードを入力します。
 - 3.2.3. 利用規約ボックスにチェックを入れて次に進みます。
 - 3.2.4. 「ソフトウェアをリクエスト」アイコンをクリックします。
 - 3.2.5. 上記フィールドに有効なテキストを入力すると、ソフトウェア ダウンロードへのリンクが指定された電子メール アドレスに送信されます。
- 3.3. **リンクをクリックするか、コピーして Web ブラウザに貼り付けます。ソフトウェアは自動的にダウンロードされます。**
 - 3.3.1. LymphoTrack_MRDR-2.0.x.RUO.msi ファイルをダブルクリックします。
 - 3.3.1.1. Windows が PC を保護したことを示すメッセージが表示された場合は、「詳細」をクリックして発行者が Invivoscribe, Inc. であることを確認し、Run anyway をクリックします。
 - ソフトウェア インストーラが開き、ソフトウェアをコンピュータのローカルドライブにインストールできるようになります。
 - デフォルトのインストール場所は C:\Invivoscribe\LymphoTrack_MRDR-2.0.x.RUO です。
 - 3.3.2. Windows セットアップ ウィザードのインストール プロンプトに従い、ソフトウェアを保存するディレクトリ ファイルパスを選択し、Install をクリックします。
 - ソフトウェアはローカルドライブ(ネットワーク ドライブではない)にのみインストールしてください。ネットワーク接続経由でソフトウェアを実行すると、ソフトウェアが正しく機能しない可能性があります。
 - 3.3.2.1. [ユーザー アカウント制御] ダイアログが表示された場合は、Yes をクリックします。
 - 3.3.3. インストールが完了したら、Finish をクリックします。
 - これでソフトウェアを使用する準備が整い、[スタート] メニューまたは手順 3.3.2 で選択したディレクトリ ファイルパスに移動してアクセスできるようになります

4. プロジェクトプランを作成する

MRD 検査では、追跡対象の配列を持つ細胞がサンプルに含有されている確率が低いため、ベースラインとなる初期検査より感度を上げる、つまり、DNA 投入量を増やす必要があります。Project Planner は、LymphoTrack MRD Software 内の実験計画を補助するツールで、信頼区間計算機能を備え、レプリケート数、リシーケンス数、シーケンシングごとのリード数、DNA 投入使用量から真の MRD 陰性サンプルの信頼度を推定します。Project Planner ツールを使用すると、ユーザーが定義した実験計画が MRD モニタリングに必要な感度と信頼度の組み合わせについて要件を確実に満たすことができるかどうか確認できます。

- 4.1. スタートメニューを開き、「LymphoTrack_MRDR」と入力して、ソフトウェアを検索し、開きます。
- 4.2. 使用許諾契約をお読みください。使用条件に同意する場合は、Accept (同意) ボタンをクリックして続けてください。
- 4.3. メインウィンドウで、ウィンドウの左上のツールバーから Projects (プロジェクト) タブをクリックし、次にドロップダウンメニューの Create New Project Plan (プロジェクトプランを新規作成) を選択します。
 - 新しいウィンドウが表示され、ユーザーは、実験設定の変数に応じて、真に陰性の MRD 結果の信頼度を計算することができます。
- 4.4. 新しいウィンドウで、以下の情報を入力します：
 - # of Replicates (レプリケート数)。以下の値 (# of Resequences/# of Reads/Amount of DNA) は、**それぞれの** PCR レプリケートについてのものであって、すべてのレプリケートの合計ではないことに注意してください。
 - # of Resequences (リシーケンス数)。このフィールドの値は一般に 1 です (1 回だけのシーケンシングランを意味します)。
 - 定義によれば、リシーケンスは、同じサンプルインデックスを持ち、選択された特有の読み取りファイルにはソフトウェアの「Replicate」フィールド内の同じ PCR レプリケート番号が割り当てられます (セクション 5.7 に説明されています)。
 - # of Reads per Sequencing (シーケンシングごとのリード数)。フローセルまたはチップの最大リード数をフローセルまたはチップ上で実施したサンプルとサンプルレプリケートのランの数で割算して求めた推定されるリードデプス。
 - シーケンシングを初回だけとして実施する単一のレプリケートに 100,000 の値が割り当てられた場合、リード数合計は 100,000 になります。
 - 初回のシーケンシングとリシーケンスランを実施し、単一のレプリケートに 100,000 の値が割り当てられた場合 (リシーケンス数は 2 の値)、リード数合計は 200,000 になります。
 - Amount of DNA (DNA 量)。これは、各 PCR レプリケートに投入使用される DNA の量です。例えば、5 つのレプリケートをそれぞれ 1000 ng の DNA でシーケンシングする実験を設定する場合、入力する値は 1000 で、5000 ではありません。
- 4.5. 希望する信頼度に調整してから、Calculate Confidence (信頼度を計算) をクリックします。ウィンドウの右下には、# of PCR Replicates、# of Resequences、Amount of DNA、# of Reads per Sequencing を考慮した場合の各感度での陰性結果のパーセントによる信頼度が表示されます。
 - 例えば、95% を超える信頼度で $1E-4$ の感度を達成するには、200 ng の DNA で少なくとも 500,000 のリードをシーケンスすることが必要です。
 - 95% を超える信頼度で $1E-5$ の感度を達成するには、少なくとも 4 μ g の DNA でシーケンスすることが必要です。
 - 1 個の対象細胞を 100 万個の細胞の中 ($1E-6$) から 95% を超える信頼度で検出するためには、少なくとも 20 μ g の DNA をシーケンスします (~310 万個の細胞)。
- 4.6. 実験計画を立て終わったら、右上隅の X をクリックして、Project Planner ウィンドウを閉じます。

5. 被験者とサンプルを追加する

LymphoTrack MRD Softwareを用いてサンプルとコントロールデータを解析する前に、初回のクローン性の高いサンプルを使用する機器と標的となる遺伝子にあった LymphoTrack Assayとそれに対応するLymphoTrack Softwareを用いて解析し、追跡対象のクローン配列を同定します (Ion S5/PGMでは **REF** 75000007 または MiSeqでは **REF** 75000009)。クローン配列が同定できたら、LymphoTrack MRD Softwareを使用して追跡することができます。サンプル処理ワークフローの概要については、図1を参照してください。LymphoQuant Internal Controlの使用の有無にかかわらず、次のステップに従って被験者サンプルを解析します。

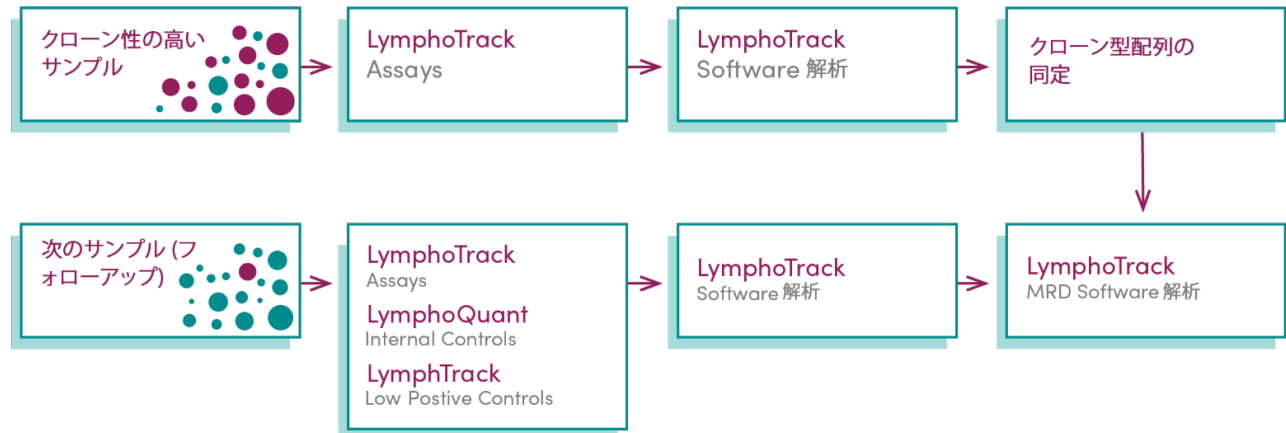


図 1. MRD サンプルの検査ワークフローは、LymphoTrack アッセイキットとソフトウェアを用いて、クローン性の高いサンプルからクローン配列を同定することから始まります。経時的にクローン配列を追跡するには、次のサンプル検査で、LymphoTrack アッセイキットに加えて、B-または T-cell LymphoQuant Internal Control と LymphoTrack Low Positive Control を使用して実施します。最後に、LymphoTrack MRD Software を使用して、経時的なクローン頻度を推定し、追跡します。

- 5.1. Add/Edit Subjects (被験者を追加/編集) をクリックすると、メインの被験者テーブルウィンドウが開きます。
- 5.2. Subject ID (被験者 ID) は、文字 (A-Z, a-z, 0-9, _, -) だけを使用して入力します。Subject ID の欄にはスペースを 2 つ以上連続して使用しないでください。
- 5.3. Add Subject (被験者を追加) ボタンをクリックします。新しく追加した被験者は、リストの Subject ID という欄の下に表示されます。
- 5.4. 被験者の欄を編集するには、リストの Subject をクリックします。
- 5.5. ドロップダウンメニューから Gene Target (標的遺伝子) を選択します。
 - 選択した標的遺伝子は、サンプルをアッセイするために使用した LymphoTrack アッセイの種類を反映する必要があります。
- 5.6. 追跡するクローン配列の名前は、文字 (A-Z, a-z, 0-9, _, -) だけを使用して入力します。Sequence 1 Name (配列 1 の名称) の欄にはスペースを 2 つ以上連続して使用しないでください。LymphoTrack Report (LymphoTrack レポート) または追跡対象の出力ファイルから希望するサンプルのクローン配列をコピーし、配列名の下テキストボックスにペーストします。
 - 配列にはスペースが入らないようにし、大文字 [例 ACGT] だけになるようにしてください。
 - クローン配列のすべてを完全にコピーアンドペーストするようにしてください。ヌクレオチドが欠けていると、ミスマッチとして処理され、不正確な結果になる可能性があります。
- 5.7. 2 つ以上のクローン配列を追跡している場合は、次の Sequence (配列) タブを選択し、上記のステップを繰り返します。
 - 最大で 5 つの特有な配列を同時に追跡できます。
 - 全ての配列を入力したら、Save (保存) をクリックします。

重要! クローン配列の名称は、出力ファイル名に使用されます。Windowsではファイルのパス名が255文字に制限されていますが、NGSデータの命名はいたずらに長くなりがちなため、この制限について忘れないようにしてください。

- 5.8. 被験者のデータに新しいタイムポイントを追加するには、*Subject Setup* (被験者設定) ウィンドウの左側にある **Add Sample (サンプルを追加)** をクリックします。*Subject ID* ドロップダウンメニューから新しいタイムポイントに関連付ける被験者を選択します。
- 5.8.1. *Sample Unique Identifier* (サンプル特有の識別名) の名称 (例 1回目フォローアップ) と *Sample Type* (サンプルタイプ) (例 骨髄、抹消血など) を、対応する欄にそれぞれ、文字 (A-Z、a-z、0-9、_、-) だけを使用し、2つ以上連続してスペースを入れずに入力します。
- 5.8.2. *Collection Date* (採取日) を対応するフィールドにYYYY/MM/DDの形式で入力するか、選択します。
- 5.9. **0 Replicates (0 レプリケート)** ボタンをクリックすると、*Replicate Setup* (レプリケートの設定) ウィンドウが開きます。
- 5.9.1. それぞれのレプリケートに、対応するLymphoTrack Assay Softwareによって作成された Unique Reads File (特有なリードファイル) を追加します。
- 5.9.2. ラッグアンドドロップするか、またはSelect Unique Reads Files (特定のリードファイルを選択) ボタンをクリックして*.fastq_unique_reads.tsvファイル拡張子を含む正しいファイルフォルダへ移動して、ファイルを追加します。
- これらのファイルはLymphoTrack Software を使用して作成されます (Ion S5/PGM 用 **REF** 75000007 または MiSeq 用 **REF** 75000009)。ファイルの拡張子は TSV になる可能性があり、MiSeq, Ion S5, または Ion PGM 装置のいずれかにより得られた FASTQ データの最初の解析後に LymphoTrack Software によって作成された *_output run フォルダ内に保存されます。
 - *.CDR3_unique_reads ファイルは、CDR3 配列を追跡するためにのみ解析できます。このファイルを選択する場合は、メインウィンドウの対応する *Sequence* (配列) タブで必ず CDR3 配列を使用してください。
- 重要!** クローン配列と *.unique_reads ファイルの両方がLymphoTrack Softwareの同じバージョン由来であることが必要です。ソフトウェアのバージョンが一致しない配列またはファイルを解析すると、偽陰性のレポートが作成される可能性があります。使用した LymphoTrack Softwareのバージョンを確認するには、*_output run フォルダにあるログファイルを開きます。ソフトウェアバージョンは *****System info***** タグの直後に示されます。
- 重要!** シークエンスされたPCRレプリケートは、それぞれLymphoTrack Softwareによって作成された *.unique_reads ファイルを1つ持ちます。Select a Unique Reads Fileをクリックすると、各ファイルは、Replicateドロップダウンリストの異なるレプリケート番号に関連付けられています。
- 5.10. **Enter DNA Amount (DNA 量を入力)** をクリックして、対応する *Replicate* の行に、使用する *Amount of DNA (ng)* を入力して **Save** をクリックします。
- この値は 50 ng ~ 7000 ng にすることができます。
 - 小数点を使用しないでください。
 - LymphoTrack Low Positive Control を解析する場合、*Amount of DNA* は 200 ng です。
 - LymphoQuant の隣のボックスがチェックされている場合、ユーザーは示された追加情報を入力する必要はありません。
- 5.11. LymphoQuant Internal Control はデフォルトで選択されています。LymphoQuant Internal Control をサンプルに追加しなかった場合は、LymphoQuant ボックスの隣のチェックマーク (✓) の選択を解除し、**Create Sample (サンプルの作成)** をクリックします。

6. 低値陽性コントロールを添加する

- 6.1. *Low Positive Control Setup* (低値陽性コントロール設定) ウィンドウを開くには、**Add Low Positive Control** (低値陽性コントロールを添加) ボタンをクリックします。
- 6.2. *Subject ID* (と *Sample Unique Identifier* (例: B-cell LPC)) は、文字 (A-Z、a-z、0-9、_、-) だけを使用して対応する欄に入力します。*Subject ID* の欄にはスペースを 2 つ以上連続して使用しないでください。

重要! *Subject ID* は各ランに対して特有でなければなりません。

- 6.3. ドロップダウンメニューから使用した *Gene Target* を選択し、**0 Replicates** ボタンをクリックして、*Replicate Setup* (ウィンドウを開きます)。
- 6.4. *Low Positive Control* の **.fastq_unique_reads* ファイルを追加するには、*Drag and Drop* (するか、または **Select Unique Reads Files** ボタンをクリックし、LymphoTrack Assay Software によって作成された対応するファイルを含む正しいファイルフォルダへ移動します)。
- 6.5. 対応する *Low Positive Control* の *Replicate* の行に、検査した *Amount of DNA (ng)* として 200 を入力し、**Save** をクリックします。

7. プロジェクトを保存・ロードする

- 7.1. 被験者とサンプルは、**.mrd* ファイルとして保存して、後でロードすることができます (例/Subject ID に新しいタイムポイントを追加するため)。後で使用するためにプロジェクトを保存するには、**Projects** (プロジェクト) を選択し、次にドロップダウンメニューから **Save...** を選択します。
- 7.2. **.mrd* ファイルを保存するフォルダーをブラウズして、**Select Folder** (フォルダーを選択) をクリックします。**.mrd* ファイルはプロジェクト内の *Subject* それぞれについて 1 つ作成されます。
- 7.3. 現在の *Project* に被験者をロードするには、**Projects** を選択し、次にドロップダウンメニューから **Load...** (ロード...) を選択します。
- 7.4. ファイルの保存先をブラウズしてから、希望する **.mrd* ファイル (複数可) を選択し、**Open** (開く) をクリックします。すべての被験者は、その *Subject IDs* が特有のものである限り、現在のプロジェクトにロードされます。

8. MRD解析を実施する

- 8.1. それぞれのサンプルと被験者の *Replicate* 情報がすべて正しいことを確認します。
 - 何らかの情報が正しくない場合は、その行を選択し、**Edit Replicates** (レプリケートを編集) ボタンをクリックするか、変更する行の情報を直接クリックすると編集できます。*Replicate* を削除するには、対応する行を選択し、**Delete** (消去) をクリックします。
- 8.2. **Perform MRD Analysis** (MRD 解析を実施) ボタンをクリックして、解析を開始します。
 - 解析を続けるには、エラーメッセージを修正する必要があります。エラーメッセージの詳細については、セクション 11: **トラブルシューティング** を参照してください。また www.invivoscribe.com/mrd-software-help にアクセスして「よくある質問 (FAQ)」をご覧ください。
- 8.2.1. 警告メッセージが表示された場合は、**Cancel** (キャンセル) をクリックして問題に対処するか、**OK** をクリックして継続してください。
 - エラーや警告をすべて解決したら、新しいウィンドウが開き、出力場所を選択することができます。
- 8.2.2. LymphoTrack MRD Software によって作成される出力ファイルの保存先として希望するフォルダの場所を選択します。
 - 解析処理が自動的に始まります。
 - 解析が完了したら、新しいウィンドウに出力先のフォルダが開きます。

重要！ 解析の実行時間は、解析されているサンプルファイルのサイズ並びにコンピュータのプロセッサ速度に依存します。特異のリード数が100,000となった一般的なサンプルでの解析所要時間は通常3分以内です。この実行時間は、それぞれのリードの複雑さによって大きく変動することがあります。

- 8.3. MRD ソフトウェアのインターフェイスで、Finish (終了) と X をクリックしてソフトウェアを閉じます。
- 8.4. 出力フォルダ内の Raw Data (生データ) と Sample (、対応する Summary Report(s) (サマリーレポート) を確認します。

9. ソフトウェアの結果

解析が完了すると、出力ファイルが保存されたフォルダが自動的に開きます。

- 各配列のために作成されたファイルは以下の表 2 に示されています。

表 2. 出力ファイル

作成される出力ファイル	ファイルの説明
SampleUniqueID_SequenceName_GeneTarget_output_table	CSVフォーマットのファイルで、フル出力を作成するために使用した中間データの数値を含みません。
SampleUniqueID_SequenceName_GeneTarget_one_mismatch_sequences	FASTAフォーマットのファイルで、標的配列とのミスマッチが1つだけの配列をすべて含みます。
SampleUniqueID_SequenceName_GeneTarget_two_mismatch_sequences	FASTAフォーマットのファイルで、標的配列とのミスマッチが2つだけの配列をすべて含みます。
SampleUniqueID_Sample_Report	PDFファイルで、プロジェクトと配列情報を含むと同時に、各ランの完全な配列マッチと1つまたは2つのヌクレオチドがミスマッチの配列が認められた累積リード頻度の平均を含む結果を示します。
SubjectID_Summary_Report	PDFファイルで、特定のSubject IDについて検査されたすべての配列およびすべてのタイムポイントの概要を含みます。解析された配列それぞれについての表とグラフを提供します。
SubjectID_Date.mrd	.mrd ファイルで、LymphoTrack MRD Software の Project メニューから Load... を選択したときのみを開くことができます。Project を手動で保存していた場合、このファイルは MRD Project (情報のすべて) を含みます。

10. データ解析

設定したランの条件と以下の情報に基づいて、ランが有効だったかどうかを決定します。

- 10.1. Low Positive Control を使用した場合は、Low Positive Control Sample Report (低値陽性コントロールサンプルレポート) を開きます。
 - Low Positive Control で十分なリード数が検出された場合、ランの状態は *Passed* (合格) と表示され、リード数が不十分な場合 *Failed* (失敗) と表示されます。Low Positive Control を使用しなかった場合は、*N/A* (該当せず) が示されます。
 - LymphoQuant Internal Control が Low Positive Control にスパイクされていた場合、LymphoQuant の Status (状態) は、リード数が十分な場合は *DETECTED* (検出あり)、リード数が不十分な場合は *NOT DETECTED* (検出なし) になります。LymphoQuant Internal Control を使用しなかった場合は、*N/A* が示されます。
- 10.2. 被験者 MRD サンプルレポートを開きます。
 - 被験者サンプルレポートでは、Low Positive Control の状態はいつも *N/A* になります。これは、Low Positive Control は被験者 ID に直接関連付けられていないためです。*N/A* は予想される結果で、Low Positive Control のランが失敗したことを示すものではありません。
 - LymphoQuant Internal Control が PCR レプリケートに追加されていた場合、LymphoQuant の Status (状態) は、リードが十分な場合は *DETECTED*、リードが不十分な場合は *NOT DETECTED* になります。LymphoQuant Internal Control を使用しなかった場合は、*N/A* と示されます。

重要！ B-cell Low Positive Control と B-cell LymphoQuant Internal Control は *IGK* と併用できません。

11. トラブルシューティング

以下のエラーメッセージは、入力パラメータがない場合または不適切な場合にアプリケーションの入力画面に表示されます。

表 3. 入力パラメータのエラーメッセージとその対処法

エラーメッセージ	原因	解決策
被験者情報が不完全です	選択した被験者 ID に遺伝子ターゲットが割り当てられていないか、配列が割り当てられていない。	以下の情報が入力されていることを確認する： <ul style="list-style-type: none"> Sequence (配列) ボックスに、大文字の A、C、G、T のみを使用した DNA 配列が入力されている Sequence Name (配列名) ボックスに配列名が入力されている ドロップダウンから正しい Target (標的) が選択されている
被験者の許容最大検体数が超過しています	選択した被験者 ID に 11 個以上の検体が割り当てられている - これ以上検体を追加することはできない。	1 つの被験者 ID に割り当てられる検体は 11 個のみである。
許容最大検体数を超えています。一度に解析できる検体数は 50 個です	検体が 50 個以上作成され、Sample Table (検体テーブル) に存在する。	Sample Table (検体テーブル) には最大 50 検体まで追加することができる。
被験者 ID に不正な文字が含まれています	被験者 ID に以下の不正な文字が含まれている： ~@*+%?:{}<>^	警告及び使用上の注意に記載されているように、アルファベット、数字、文字および半角スペースのみを使用すること。
この名前の被験者は既に存在します	Add Subject (被験者の追加) ボタンがクリックされ、同名の被験者 ID が既に存在する。	新しい被験者 ID は固有のものでなければならない。
<SUBJECT (被験者)>に遺伝子ターゲットがありません	被験者 ID に遺伝子 Target (標的) が割り当てられておらず、解析ができなかった。	ドロップダウンから正しい遺伝子 Target (標的) を選択する。
<SUBJECT (被験者)>に配列がありません	被験者 ID に遺伝子 Sequences (配列) が割り当てられておらず、解析ができなかった。	大文字の A、C、G、T のみを使用して Sequence (配列) ボックスに DNA 配列を追加する。
配列名は固有でなければなりません	被験者 ID に同一の配列が 2 つ以上割り当てられており、被験者 ID の保存に失敗した。	同一のレプリケート番号を共有する検体には異なる DNA 量を入力することはできない。 レプリケート番号を共有するレプリケートは再配列として識別され、最初の PCR レプリケートライブラリから得ることができる。
検体に名前がありません	検体に固有の識別子 (検体 ID) が割り当てられておらず、解析ができなかった。	解析を実行する前に、各検体に固有の Sample ID (検体 ID) を割り当てる必要がある。
<SAMPLE (検体)>にレプリケートがありません	検体 ID にレプリケートが割り当てられておらず、解析ができなかった。	レプリケートの全データが入力され、レプリケートが保存されたことを確認してから Edit Replicate (レプリケートの編集) 画面を閉じる。
Unique Reads ファイルが不正です	アップロードされた Unique Reads ファイルのフォーマットが無効。	Unique Reads ファイルが手動で編集されていないことを確認する。
Unique Reads ファイルからリードが検出されません	アップロードされた Unique Reads ファイルのフォーマットが無効。	Unique Reads ファイルが手動で編集されていないことを確認する。
レプリケートに DNA 量がありません	レプリケートテーブルに DNA amount (DNA 量) が割り当てられておらず、レプリケートの保存に失敗した。	レプリケートの全データが入力され、レプリケートが保存されたことを確認してから Edit Replicate (レプリケートの編集) 画面を閉じる。
再配列されたレプリケート (レプリケート番号の一致で示される) は DNA 量が等しくなければなりません	再配列されたレプリケートに割り当てられた DNA amount (DNA 量) が一致していない。	レプリケートの全データが入力され、レプリケートが保存されたことを確認してから Edit Replicate (レプリケートの編集) 画面を閉じる。

12. テクニカルおよびカスタマーサービス

弊社製品をご購入いただきありがとうございます。本ソフトウェアについてご理解いただけるよう喜んで支援するとともに、お客様が本アッセイを効率的にお使いいただけるよう、下記の内容で平日に技術支援を提供しております。

連絡先情報



Invivoscribe Inc.

10222 Barnes Canyon Road | Building 1 | San Diego | CA 92121-2777 | USA

電話： +1 858 224-6600 | ファックス： +1 858 224-6601 | 営業時間： 午前7時～午後5時 (太平洋標準時/太平洋夏時間)

技術サービス：support@invivoscribe.com | カスタマーサービス：sales@invivoscribe.com | ウェブサイト：www.invivoscribe.com

13. 記号

以下の記号は Invivoscribe NGS 製品のラベル表示に使用されています。



カタログ番号



製造者



ロット番号



使用説明書をご覧ください



保管条件



有効期限日

14. 免責事項

本製品は、米国特許番号 7785783、米国特許番号 8859748、米国特許番号 10280462、欧州特許番号 EP 1549764B1 (16 カ国で有効化、関連する欧州特許番号 EP2418287A3 および EP 2460889A3 により増補)、日本特許番号 JP04708029B2、日本特許出願番号 2006-529437、ブラジル特許出願番号 PI0410283.5、カナダ特許番号 CA2525122、インド特許番号 IN243620、メキシコ特許番号 MX286493、中国特許番号 CN1806051、および韓国特許番号 101215194 を含む、Invivoscribe, Inc.によって所有または排他的にライセンスされている 1 つ以上の特許および特許出願によって保護されています。

本製品の使用には、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のような核酸の増幅法が必要な場合があります。第三者の特許によって保護されている増幅法の実施、または試薬、増幅用酵素もしくは器具の使用にあたって必要ないずれのライセンスについても、ユーザーの責任に委ねられており、明示的にも、また暗示的にも、このようなライセンスが Invivoscribe, Inc. から付与されることはありません。

©2024 Invivoscribe, Inc. 不許複製・禁無断転載。本使用説明書で言及されている商標は Invivoscribe, Inc. および/またはその関連会社の知的財産です。また、本使用説明書で使用されている、所有者が当社以外である商標は、それぞれの所有者の知的財産です。

THERMO FISHER SCIENTIFIC®並びに ION PGM™ および ION S5™ は Thermo Fisher Scientific またはその子会社の商標です。

ILLUMINA® および MISEQ™ は Illumina, Inc. の登録商標です。

MICROSOFT®、WINDOWS® および EXCEL® は Microsoft Corporation の登録商標です。