

体外診断用医薬品

** 2026 年 7 月改訂 (第 6 版)
* 2013 年 4 月改訂 (第 5 版)
認証番号:223ADAMX00034000

抗核抗体キット
ノバライト HEp-2 ANA

【全般的な注意事項】

1. 本品は体外診断用医薬品です。それ以外の目的には使用できません。
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. 電子化された添付文書以外の使用方法については保証しません。
4. 本品のANAパターンコントロール及びIFA陰性コントロールにはヒト血液由来成分が含まれており、FDAにより認可された検査方法によりHIV抗体、HBs抗原、HCV抗体が陰性であることが確認されています。しかし、HIV、HBV、HCV及び他の感染症の病原体の存在を完全に否定できる検査方法はないため、感染の可能性がある物質として扱ってください。
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。

【形状・構造等(キットの構成)】

1. HEp-2 基質スライド
HEp-2 ANA Slide
ヒト咽頭癌細胞(HEp-2)培養細胞
2. FITC 抗ヒト IgG コンジュゲート
FITC IgG Conjugate
5-イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)標識抗ヒト IgG ヤギポリクローナル抗体
3. ANA パターンコントロール
ANA Titratable Pattern
4. IFA 陰性コントロール
IFA System Negative Control
5. PBS 濃縮液
PBS II Concentrate, 40x
6. 封入剤
Mounting Medium
付属品 : カバースリップ
Coverslips

【使用目的】

血清中の抗核抗体の測定

【測定原理】

本法では、基質スライドに固定したヒト咽頭癌由来の培養細胞 HEp-2 と検体中の抗核抗体 (ANA) を基質細胞中の核抗原と反応させ、未反応の抗体を洗浄除去します。FITC で標識した抗ヒト IgG ヤギポリクローナル抗体を反応させ、未結合の試薬を洗浄除去します。自己抗体陽性検体では細胞質又は細胞核が青リンゴ色 (アップルグリーン) の蛍光を発するので蛍光顕微鏡下で観察して抗核抗体の検出を行い、検体の最高希釈倍数をもって抗体価を定量する。

【操作上の注意】

1. 検体の採取方法
本法には、血清を使用します。
 - ・ アジ化物やその他の防腐剤を検体に添加すると、測定値に負の影響を与えることがあります。
 - ・ 細菌に汚染された検体、熱処理された検体、明らかに凝集塊のある検体は使用しないでください。
 - ・ 過度な溶血や乳び検体の使用は避けてください。
2. 検体の保存方法
全血から分離した血清は次のように保存してください。
 - ・ 検体を室温で 8 時間以上放置しないでください。
 - ・ 測定が 8 時間以内に完了しない場合は 2~8℃で保存してください。
 - ・ 測定が 48 時間以内に完了しない場合、又は輸送する場合には-20℃以下で保存してください。凍結した検体は溶解後に必ず良く混和してから測定してください。

【用法・用量】

1. 試薬・検体・コントロール等の調製
(試薬の調製)
 - 1) 全ての試薬及び検体を室温 (20~26℃) に戻し、良く混和してから使用してください。
 - 2) **PBS 濃縮液の希釈**: PBS 濃縮液 25mL に精製水 975mL を加え 40 倍に希釈し、**希釈緩衝液**とします。希釈緩衝液は検体の希釈及び洗浄液として使用します。希釈緩衝液は 2~8℃で 4 週間安定です。

(検体・コントロール等の調製)

- 1) 定性試験: 検体 1 容量に希釈緩衝液 39 容量を加えて希釈します (例: 検体 50μL に希釈緩衝液 1.95mL を加えて希釈する)。
- 2) 定量試験: 定性試験で陽性と判定された検体は、希釈倍数による抗体価定量のため 40 倍希釈検体を希釈緩衝液で希釈し、2 倍希釈系列を作ってください (例: 1:80, 1:160, …, 1:2560)。

(保存条件)

- 1) 全ての試薬キット及びスライドを 2~8℃で保存してください。凍結しないでください。適切に管理及び保存されていれば使用期限まで安定です。
- 2) PBS 濃縮液は希釈後、2~8℃で保存したとき 4 週間安定です。

2. 必要な器具・器材

- ・ 15~1000μL が分注できるマイクロピペット
- ・ 精製水
- ・ 洗浄ピン若しくはパスツールピペット
- ・ 湿潤箱
- ・ 1L 容器 (洗浄液用)
- ・ ガラスドーズ
- ・ 蛍光顕微鏡: 励起波長 495nm、観察光 515nm を有するもの

3. 測定法

- 1) **基質スライドの準備**: 室温に戻した後に、ポーチから HEp-2 基質スライドを取り出します。鉛筆でラベルに記入し、適切な湿潤箱に置きます。未希釈の ANA パターンコントロール及び IFA 陰性コントロールの 1 滴 (20~25μL) をウェル 1 及び 2 にそれぞれ滴下します。希釈した患者検体の 1 滴 (20~25μL) を残りのウェルに滴下します。
- 2) **スライドのインキュベーション**: 適切な湿度を保つ為に、湿潤箱 (密閉可能なプラスチック若しくはガラス容器の底に湿らせたペーパータオルを敷く) 中で 30±5 分間インキュベーションします。**操作中にスライドを乾燥させないでください。**
- 3) **スライドの洗浄**: インキュベーション後、洗浄ピン又はパスツールピペットを用いて希釈緩衝液で血清を穏やかに洗浄除去します。ウェル相互に希釈緩衝液が流れ込まないようにして洗浄してください。**基質に対するダメージを避けるために、ウェルに直接流れを当てないようにしてください。**必要に応じて、スライドは希釈緩衝液を満たしたガラスドーズ中に 5 分間まで静置できます。
- 4) **蛍光コンジュゲートの添加**: 余剰の希釈緩衝液を払い落とし、スライドを湿潤箱に戻し、各ウェルに蛍光コンジュゲート (FITC 抗ヒト IgG コンジュゲート) を 1 滴滴下して、**直ちに**湿潤箱に蓋をし、30±5 分間インキュベーションします。
- 5) **スライドの洗浄**: 3) を繰り返します。
- 6) **カバースリップ**: カバースリップを被せて封入してください。カバースリップを被せる手技は検査室により異なりますが、次の手技を推奨します。
 - (1) カバースリップをペーパータオルの上に置きます。
 - (2) カバースリップの下端まで一筆書きのように封入剤を塗ります。
 - (3) スライドの余剰希釈緩衝液を払い落とし、スライドの下端とカバースリップの端を合わせます。気泡が入らないように封入剤が下から上に向かうようにカバースリップをスライドにゆっくりと載せます。
- 7) 蛍光顕微鏡で観察し、判定します。

4. 精度管理

ANA パターンコントロール及び IFA 陰性コントロールは、試薬と操作方法が妥当であることを確認するために、スライド毎に測定してください。ヒト血清をコントロールとする場合には、-70℃以下で分割保存したものを使用してください。得られたテスト結果が妥当であるかは、以下の条件を全て満たす必要があります。全てを満たさない場合は、不確かな結果とし再検査してください。

- 1) 未希釈の ANA パターンコントロールが 3+ 以上であること。
- 2) IFA 陰性コントロールが陰性であること。

【測定結果の判定法】

1. 陰性・陽性の判定

陰性反応：特異染色が IFA 陰性コントロールと同等又は以下であるならば、検体は陰性とみなします。検体は、異好性抗体若しくは収縮性たんぱく質といった細胞質構成成分に対する低レベル自己抗体によるバックグラウンドなど、様々な度合いの染色を示します。

陽性反応：IFA 陰性コントロールを超える特異染色を示した場合は、検体を陽性とみなします。蛍光のグレード若しくは強度を決めるには、次の基準を用います。

- 4+ 鮮やかなアップルグリーンの蛍光
- 3+ 明るいアップルグリーンの蛍光
- 2+ 明確に陽性と分かる蛍光
- 1+ 明確にバックグラウンドと区別出来る核若しくは細胞質の低度の特異的な蛍光

2. 染色型の判定

染色型の判定:検体中に存在する自己抗体のタイプ及び相対的な量により、様々なタイプの核或いは細胞質の染色パターンを示します。次のタイプが観察されます。

均質型(Homogeneous):核の均質な染色若しくは核小体のマスキングが明確に無いこと。

核抗原の存在:dsDNA、ssDNA、ヒストン
関連する疾患:高力価は SLE を示唆します。低力価は SLE 若しくは他の結合組織病を示唆します。

辺縁型(Peripheral):均質な核の染色、核の中心部が弱く辺縁部が主に染まります。

核抗原の存在:dsDNA、ssDNA、DNP、ヒストン
関連する疾患:高力価は SLE を示唆します。低力価は SLE 若しくは他の結合組織病を示唆します。

斑紋型(Speckled):微細若しくは粒状の斑点の染色が核内に認められます。一般に核小体は蛍光染色されません。

核抗原の存在:Sm、RNP、Scl-70、SS-A、SS-B、及び他の未だ識別されていない抗原及び抗体。
関連する疾患:高力価は SLE(Sm 抗体)、混合性結合組織病(RNP 抗体)、強皮症(Scl-70 抗体)、シェーグレン-乾燥症合併症(SS-B 抗体)を示唆します。低力価は他の結合組織病を示唆します。

核小体型(Nucleolar):大きく粗い斑点の染色が核内に認められます。一般に一つの細胞内に 6 以下で、細かな斑点を伴う場合と伴わない場合があります。

核抗原の存在:4-6S RNA 及び他の未だ識別されていない核抗原。
関連する疾患:高力価は強皮症及びシェーグレン症候群の可能性が高くなります。

セントロメア型(Centromere):散らばった斑点状の染色を示します。核内の染色は広範囲に散らばり、通常は 46 の倍数となります。

核抗原の存在:染色体セントロメア(動原体:kinetochore)
関連する疾患:クレスト(CREST)症候群、様々な全身性進行性硬化症(PSS)が大きく示唆されます。CREST とは Calcinosis, Raynaud's phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly, Telangiectasia の頭文字です。

ミトコンドリア型(Mitochondrial):細胞核内の少ない染色と比較して細胞質内に散在した斑点状の染色が認められます。

核抗原の存在:多様のミトコンドリア抗原
関連する疾患:高力価は原発性胆汁性肝硬変を示唆します。

核小体型及びセントロメア型の染色パターンによりそれぞれの抗原が明らかに識別出来る以外は、蛍光パターンを用いて自己抗体の特異性を決定することには注意が必要です。多くの自己抗体又は組み合わせが均質若しくは斑点状のパターンを示すため、それらを示した全ての検体に対して特異的な検査(例えば dsDNA 及び ENA といった項目)を追加実施することを推奨します。

3. 測定限界

- 1) ANA 高力価は結合組織病を示唆しますが、その結果だけで診断できません。ANA の測定結果は臨床的な所見や他の血液検査の結果と合わせて使用してください。
- 2) ANA パターンは、エンドポイントから外れ変わることがあります。この現象は、検体の希釈をしていくと低力価となり感度未満を示すためです。
- 3) 測定の感度に影響を与える外的要因には、蛍光顕微鏡の種類、電球の輝度及び寿命、倍率、フィルターシステム及び観察者があります。
- 4) 515nm カットフィルターの代わりにバンドパスフィルターを使用した場合、人為的な染色の増加が観察されることがあります。
- 5) ラベルの記入には鉛筆のみが使用できます。他の筆記具は人為的な染色の原因となることがあります。
- 6) スライド洗浄に用いるガラスドーズに染料の残りがあってはいけません。ガラスドーズ内の染料の残りは人為的な蛍光の原因となります。
- 7) 本法による結果は、臨床的な所見及び他の血清学検査と合わせて考慮しなければなりません。
- 8) 血清以外の試料について本法は測定の性能を保証しません。

【臨床的意義】

抗核抗体は、DNA、RNA、複数の蛋白質を含む核細胞及びリボスクレオタンパク質と反応する様々な自己抗体に関連しています¹⁾。これらの自己抗体は、結合組織病もしくはリウマチ疾患、特に全身性エリテマトーデス(SLE)患者に高頻度で発現します。実質的には全ての SLE 患者は ANA 陽性です。この診断感度は、米国リウマチ学会小委員会による Criteria for the Classification of Systemic Lupus Erythematosus (1982 年改訂)に記載されています²⁾。SLE のスクリーニング検査には ANA 検査が優れていますが(活動期 SLE の陰性結果の実質上の除外³⁾)、特異的検査ではありません。関節リウマチ、強皮症、皮膚筋炎といった他の結合組織病は高頻度で陽性になります。また、低力価の ANA 陽性は他の疾患や健康者でも観察されることがあります。ANA 陽性結果は、重度の熱傷、ウイルス感染症、特に高齢健康者でも観察されると報告されています。特異性が低いので ANA 陽性検体はエンドポイントで力価を測定し、抗 dsDNA 抗体、抗 ENA 抗体などより特異性のある検査を実施することを推奨します。

間接免疫蛍光法は ANA 検査のレファレンス法になっています。基質としては一般的に齧歯動物組織の薄片や種々のタイプの株化細胞があります。急速分裂細胞にはセントロメア、SS-A(Ro)、Scl-70、PCNA/Cyclin など臨床的に関連する抗原を高レベルに含むので、組織切片より株化細胞が一般的に使われています。基質以外に ANA 検査の性能を決める重要な要因としては、1)スライド作成時の固定剤、2)蛋白質に対する蛍光の比率(F/P 比)、3)コンジュゲートの免疫グロブリンのサブクラスの特異性、があります。ある種の固定剤とその組合せは核抗原を確実に破壊することが知られているので、その使用は避けなければなりません。コンジュゲートの感度とバックグラウンドの非特異的な染色は、F/P 比により決定され、コンジュゲートの疾患特異性は、免疫グロブリンのサブクラスの反応性により決定されます。ANA に特異的な IgM や IgA が存在しても、臨床的に意味のある自己抗体は IgG サブクラスの特異性によって発現します⁴⁾。それに対して、健康者の ANA は IgM と IgA サブクラスにしか存在しません⁵⁾。したがって、IgG に対して特異的なコンジュゲートは、疾患に対してもより特異性があります。本法の基質には最適に固定されたヒト上皮(HEp-2)株化細胞を用いており、コンジュゲートにはアフィニティ精製抗ヒト IgG を用い、F/P 比は厳重に管理しています。本法は、他の市販キットでは検出しない臨床的に関連する重要な自己抗体(SS-A 及び Scl-70 を含む)を検出します。更に、特異的な IgG コンジュゲートを使用することにより、高齢健康者においてしばしば見られる生理的な低力価 IgM による偽陽性は除去されています。

【性能】

1. 性能

1) 感度	陰性コントロールを測定するとき陰性を示す。また、ANA パターンコントロールを測定すると希釈倍数は 1:64 から 1:256 である。
2) 正確性	陰性コントロールを測定するとき蛍光が認められない。また、明確な陽性反応又は明確な染色型を示す陽性検体を測定するとき核全体が蛍光染色されるか、核に明確な蛍光染色が認められ、蛍光の強度は 3+以上である。
3) 同時再現性	陰性コントロールを 3 回同時に測定するとき全て蛍光が認められない。明確な陽性反応又は明確な染色型を示す陽性検体を 3 回同時に測定するときすべて核全体に蛍光染色されるか、核に明確な蛍光染色が認められ、蛍光の強度は 3+以上である。
測定範囲	希釈倍数による測定下限は 40 倍です。 高値検体については、必要なだけ希釈倍率を上げることで蛍光を観察する最終希釈倍率を定量できます。

2. 相関性

本品と他社試薬(IFA 法)及び当社試薬(ELISA 法)との相関は、以下のとおりでした。

1) 他社試薬(IFA 法)
定性試験

		他社試薬(IFA 法)	
		陽性	陰性
本品	陽性	27	0
	陰性	3	30

検体数 n=60、 全体一致率=95.0%

定量試験
スピアマン順位相関係数:0.964(検体数 n=60)

2) 当社試薬(ELISA 法)
定性試験

		当社試薬(ELISA 法)	
		陽性	陰性
本品	陽性	27	0
	陰性	4	29

検体数 n=60、 全体一致率=93.3%

定量試験
スピアマン順位相関係数:0.893(検体数 n=60)

3. 校正用の基準物質

IFA 陰性コントロール及び ANA パターンコントロールは、ヒト血清より製したものです。既知濃度管理検体は、ヒト血清をプールしたものです。

4. 臨床検体による検討

本品を用いて、様々な結合組織病及び無作為抽出した健康者血液 200 例を測定しました。その結果は次の通りです。

患者群	例数	陽性数
SLE	105	101
薬剤性エリテマトーデス	24	24
関節リウマチ	40	28
強皮症	24	18
皮膚筋炎	14	10
シェーグレン症候群	14	12
健康者	200	5

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上の注意

- 1) 全てのヒト由来の試料は、FDA により認可された検査方法により HIV 抗体、HBs 抗原、HCV 抗体が陰性であることが確認されています。しかし、HIV、HBV、HCV 及び他の感染症の病原体の存在を完全に否定できる検査方法はないため、ANA パターンコントロール、IFA 陰性コントロールは感染の可能性のある物質として扱ってください⁶⁾。
- 2) アジ化ナトリウムが防腐剤として使われています。誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
- 3) 規定された試薬を扱う場合は、適切な防護器具を各自が使用してください。
- 4) こぼした試薬は直ぐに除去してください。廃液を捨てる場合は、廃棄上の注意に従ってください。

2. 使用上の注意

- 1) 本品によって提供されるもの以外を使用すると不正確な測定値となることがあります。
- 2) ウェルの不十分な洗浄或いは非効率な洗浄は、バックグラウンドの上昇の原因となります。
- 3) 本品の自動検体処理装置への適応及び試薬分注機の全過程或いは部分的な適応は、用手法によって得られた測定値と異なることがあります。各施設の責任において、自動化法による測定値の確認を行ってください。
- 4) 様々な要因が測定時の性能に影響を及ぼします。これらの要因には、操作時の試薬温度、顕微鏡の電源使用頻度、分注操作の正確性と再現性、ウェルの洗浄操作、インキュベート時間などがあります。正確で再現性の良い結果を得るには、同一条件で実施するように注意してください。
- 5) FITC 抗ヒト IgG コンジュゲートは光に曝されると経時的に色調が変化しますが、この色調変化は測定には影響しません。
- 6) 用法及び用量に従って操作してください。

3. 廃棄上の注意

- 1) 検体及び検査に使用した器具類及び廃液は、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度 1,000ppm、1 時間以上浸漬)、グルタルアルデヒド溶液(2%、1 時間以上浸漬)等での消毒、又はオートクレーブ処理(121℃、20 分以上)を行ってください。
- 2) アジ化ナトリウムは防腐剤として使われています。アジ化ナトリウムは、鉛管や銅管と反応して爆発性のある金属アジ化物を形成します。試薬を廃棄にする場合は、金属アジ化物の形成を防ぐために大量の水と共に洗浄シンクに流してください。
- 3) 試薬及び検査に使用する器具類、及び廃液を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等に従って、廃棄してください。

【貯法・有効期間】

貯法	: 2～8℃
有効期間	: 24 ヶ月(使用期限は外箱に表示)

*【包装単位】

製品番号	構成試薬名	包装
708100	HEp-2 基質スライド	12 ウェル/スライド×20 枚
	FITC 抗ヒト IgG コンジュゲート	15mL×1 バイアル
	ANA パターンコントロール	0.5mL×1 バイアル
	IFA 陰性コントロール	0.5mL×1 バイアル
	PBS 濃縮液	25mL×2 バイアル
	封入剤	7mL×1 バイアル
	(付属品)カバースリップ	20 枚×1 袋
708100.100	HEp-2 基質スライド	12 ウェル/スライド×100 枚
	FITC 抗ヒト IgG コンジュゲート	15mL×10 バイアル
	ANA パターンコントロール	0.5mL×10 バイアル
	IFA 陰性コントロール	0.5mL×10 バイアル
	PBS 濃縮液	25mL×20 バイアル
	封入剤	7mL×10 バイアル
	(付属品)カバースリップ	20 枚×10 袋
708101	HEp-2 基質スライド	12 ウェル/スライド×5 枚
	FITC 抗ヒト IgG コンジュゲート	4mL×1 バイアル
	ANA パターンコントロール	0.5mL×1 バイアル
	IFA 陰性コントロール	0.5mL×1 バイアル
	PBS 濃縮液	25mL×1 バイアル
	封入剤	7mL×1 バイアル
	(付属品)カバースリップ	10 枚×1 袋

【主要文献】

- 1) Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): Their immunobiology and medicine. Advances in Immunology 33: 167-239, 1982.
- 2) Tan EM, et al.: The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism 25: 1271-1277, 1982.
- 3) Casalo SP, Friou GJ and Myers LL: Significance of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. Arthritis and Rheumatism 7: 379-390, 1964.
- 4) Gonzalez E and Rothfield N: Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. The New England Journal of Medicine 274: 1333-1338, 1966.
- 5) Wiik A: Antinuclear factors in sera from healthy blood donors. Acta Path Microbiology Scand. 84: 215-220, 1976.
- 6) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control/National Institute of Health, 2007, Fifth Edition

【問い合わせ先】

アイ・エル・ジャパン株式会社
** 東京都品川区東品川 2-5-8
Tel: 0120 (274) 011

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

アイ・エル・ジャパン株式会社
** 東京都品川区東品川 2-5-8

628100ENGR21JPv2