使用の前に本電子化された添付文書をよく読んでください。

MBL

体外診断用医薬品

**2024 年 5 月改訂（新様式第 5 版）
*2021 年 3 月改訂（新様式第 4 版）
承認番号　21800AMZ10393000

* 抗 BP180NC16a 抗体キット

MESACUP™ BP180 テスト

*[全般的な注意]

1．本品は体外診断用です。それ以外の目的で使用しないでください。
2．本品は、血清中の抗 BP180NC16a 抗体を測定するものです。被検者の診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等とあわせ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．標準液 1、抗 BP180 抗体標準液 2 及び反応用緩衝液には 0.09% アジ化ナトリウムが添加されています。目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。

[形状・構造等（キットの構成）]

構成試薬	包装	数量
抗原感作マイクロカップ	8連6本	1袋
組換え BP180NC16a タンパク質		
*標準液 1	1.5 mL	1本
*抗 BP180 抗体標準液 2	1.5 mL	1本
酵素標識抗体	8.0 mL	1本
ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ポリクローナル抗体(ヤギ)		
反応用緩衝液	50 mL	1本
洗浄用緩衝液（10 倍濃縮品）	100 mL	1本
酵素基質液	20 mL	1本
3,3', 5,5'- テトラメチルベンジジン、過酸化水素		
反応停止液	20 mL	1本

*[使用目的]

血清中の抗 BP180NC16a 抗体の測定
（水疱性類天疱瘡の診断の補助）

[測定原理]

本品は ELISA 法によって血清中の類天疱瘡の病因抗体である抗 BP180 抗体を測定する試薬です。抗原として組換え蛋白質（BP180NC16a）を固相化したマイクロカップに検体を添加し、抗原･抗体反応（一次反応）をさせます。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgG ポリクローナル抗体(ヤギ)（酵素標識抗体）を添加して反応（二次反応）させ、抗原・抗体・酵素標識抗体の複合物を形成させます。再び洗浄した後、3,3',5,5'- テトラメチルベンジジンと過酸化水素の溶解液（酵素基質液）を添加し、酵素（ペルオキシダーゼ）によって発色させ（酵素反応)、反応停止後、吸光度（A450）を測定して血清中の抗 BP180 抗体を測定します。

[操作上の注意]

1．検体について
（1）検体は血清を用います。血清は常法に従って採血し凝固させた後、2 ～ 8℃、2,500 ～ 3,000 rpm で 5 ～ 10 分間遠心して血餅と分離します。血清の分離は出来るだけ速やかに行い、分離後の血清は 2 ～ 8℃で保存し、1 週間以内に測定してください。
検体を保存する場合は血清を小分けして
1 箇月以内の場合 ：－ 20℃以下で保存してください。
凍結融解の繰り返しは検体の反応性を低下させる可能性がありますので避けてください。
長期保存の場合 ：－ 80℃以下で保存してください。
－ 80℃で保存した場合 13 箇月の安定性が確認されています。
－ 20℃で半年以上保存した場合や凍結融解を繰り返した場合、IgG の変性などによって非特異反応が強くなることがあります。
（2）希釈後の検体を保存する場合は、2 ～ 8℃に保存して 3 日以内に使用してください。
（3）検体の非働化はしないでください。
2．共存物質の影響
自社施設にて、検体における共存物質の影響を試験したところ、ヘモグロビン（440 mg/dL）、ビリルビン C（39 mg/dL）、ビリルビン F（37.2 mg/dL）、乳び（ホルマジン濁度 2350 度）、リウマチ因子（1,000 IU/mL）の添加において定量値に影響は見られませんでした。また、同様に治療薬の影響を検討したところ、プレドニゾロン（125 μg/mL）、シクロスポリン（100 μg/mL）、ミノマイシン（100 μg/mL）、ジアミノジフェニルスルフォン（100 μg/mL）の添加において測定値に影響は見られませんでした。

[用法・用量（操作方法）]

1．準備するもの

標準的な実験装置に加えて、以下が必要です。

(1) マイクロプレートリーダー
(2) マイクロピペット
(3) マルチチャンネルマイクロピペット
(4) 自動洗浄機または洗浄ビン
(5) 一次反応準備用マイクロカップ
(6) リザーバー
(7) 精製水

自動 EIA 機器を用いて測定する場合は、機種によって操作方法が異なる場合があります。使用する機種の操作方法に従ってください。

対応機種及び操作方法は、問い合わせ先にご連絡ください。

2．試薬の調製

（1）洗浄液の調製

洗浄用緩衝液に精製水を加えて 10 倍希釈します。

例）洗浄用緩衝液 50 mL に精製水 450 mL を加えて 10 倍希釈します。

洗浄液は 2 ～ 8℃で 2 週間安定です。

（2）他の試薬はそのまま使用します。

3．検体の希釈

検体 10 μL を反応用緩衝液 1,000 μL に加えて 101 倍希釈します。

多数検体の場合は、あらかじめ抗 BP180 抗体標準液 2（Index 値 =100）、標準液 1 （Index 値 =0）、希釈した検体を 150 μL ずつ一次反応準備用マイクロプレートに実際と同じように添加し、その後、抗原感作マイクロカップにマルチピペットを用いて 100 μL ずつ移すと時間差を小さくすることができます。

4．一次反応

（1）抗原感作マイクロカップをアルミ袋から取り出します。二重測定の場合 1 検体につき 2 カップ用意します。

（2）標準液 1（Index 値 =0）、抗 BP180 抗体標準液 2（Index 値 = 100）及び希釈した検体を抗原感作マイクロカップに 100 μL ずつ移します。

（注意）抗原感作マイクロカップに検体を添加した時点で反応が始まりますので、操作は短時間のうちに行ってください。

（3）最後の検体を加えた後、室温（20 ～ 30℃）で 1 時間静置反応させます。

5．洗浄

自動洗浄機または洗浄ビンを用いて洗浄液で抗原感作マイクロカップを洗浄します。

洗浄回数：自動洗浄機・・・4 回
洗浄ビン・・・・4 回

（注意）自動洗浄機によって設定方法及び最適な洗浄回数が異なる場合があります。あらかじめ各施設で用いる自動洗浄機の設定方法及び最適な洗浄回数を確認することを推奨します。

洗浄液は必ず室温（20 ～ 30℃）のものを使用してください。

6．二次反応

（1）マイクロカップに残った洗浄液を完全に除去した後、リザーバーに移した酵素標識抗体をマルチピペットで 100 μLずつ添加します。

（2）室温(20～ 30℃）で 1 時間静置反応させます。

（注意）酵素標識抗体は、試薬ボトルから必要量をリザーバーに移して使用してください。

リザーバーに移した酵素標識抗体は、試薬ボトルに戻さないでください。

7．5.と同様に抗原感作マイクロカップを洗浄します。

8．酵素反応

（1）抗原感作マイクロカップに残った洗浄液を完全に除去した後、酵素基質液をリザーバーに移し、マルチピペットで 100 μL ずつ添加します。

（2）室温（20 ～ 30℃）で 30 分間静置反応させます。

（注意）酵素基質液は、試薬ボトルから必要量をリザーバーに移して使用してください。

リザーバーに移した酵素基質液は試薬ボトルに戻さないでください。

酵素標識抗体を入れるリザーバーと酵素基質液を入れるリザーバーは、必ず別のものを使用してください。

9．反応停止

反応終了後、リザーバーに移した反応停止液をマルチピペットで 100 μL ずつ添加します。

10. 吸光度測定

自動分光光度計（マイクロプレート専用機：垂直透過型）にマイクロカップをセットして、波長 450 nm の吸光度（副波長 620 nm）を測定します。

（注意）吸光度は反応停止後 20 分以内に測定してください。

11. Index 値の算出

下記の式を用いて Index 値を算出します。

$$\text{Index 値} = \frac{\text{検体の } A_{450} - \text{標準液1の } A_{450}}{\text{抗 BP180 抗体標準液 2 の } A_{450} - \text{標準液 1 の } A_{450}} \times 100$$

[測定結果の判定法]

以下の値を参考にしてください※。

Index 値 9 以上　　：陽性
Index 値 9 未満　　：陰性

※健常人血清 336 例、類天疱瘡患者血清 64 例及び他の水疱性皮膚疾患患者血清 111 例を測定して得た値から設定しました。なお、上記の値はあくまでも参考であり、正常値は、母集団等種々の要因によって変動します。各施設におけるカットオフ値は目的に応じて各施設で独自に設定することを推奨します。

「判定上の注意」

（1）吸光度の測定は、事前に、使用する分光光度計の性能を確認した上で行ってください。分光光度計の性能範囲を超える吸光度を示した場合に、測定値の信頼性はありません。

（2）本品による抗体価の変動は患者の疾患活動性の把握に有用と考えられますが、本品は抗体価を Index 値として表現しており、Index 値が 150 以上になった場合は、抗体価の変化を明確に捕らえられない可能性があります。あらかじめ検体を高希釈（2,020 倍希釈）して測定することによって Index 値の変動を正確に捕らえることができます。

（3）本品は、BP180NC16a を抗原として類天疱瘡患者血清中に存在する抗 BP180 抗体を測定する試薬です。類天疱瘡患者の血清中には、抗 BP180 抗体以外に抗 BP230 抗体が存在することが知られていますが、本品は、抗 BP230 抗体や、BP180 の NC16a 以外のエピトープと反応する抗体は検出できません。また、抗 BP180 抗体は類天疱瘡以外にも、妊娠性疱疹（Herpes Gestationis:H.G.）や瘢痕性類天疱瘡（cicatricial pemphigoid:CP）の一部の患者に存在することが知られています。臨床診断は、本品による結果のみでなく、臨床症状その他の結果とあわせて総合的に判断してください。

（4）本品での測定において、健常人においても低値陽性となる場合があり、また、偽陰性となる検体も存在することが知られています。臨床診断は、本品の結果だけでなく、臨床症状やその他の結果とあわせて総合的に判断してください。

[臨床的意義]

類天疱瘡（bullous pemphigoid：BP）は、主に高齢者に見られる慢性で痒みのある自己免疫性水疱性疾患であり、緊満性水疱と紅斑が混在多発することを特徴とします。患者血清中には、表皮基底膜部に対する IgG 自己抗体が認められ、病変部の基底膜部に IgG と C3 の線状沈着が認められます。

類天疱瘡患者血清中に存在する自己抗体の標的抗原は 230kD の BP230 と、180kD の BP180 であり、これらはそれぞれ BPAG1、BPAG2 とも呼ばれています。

BP180（BPAG2）は膜貫通蛋白質で、細胞外ドメインには Gly-X-Y というコラーゲンに特徴的な配列を認めることから、XVII 型コラーゲンとされています。BP230 は細胞質内に存在することから、自己抗体が直接結合するのは BP180 であると考えられており、BP230 に対する自己抗体は二次的に産生されるとの考え方が現在のところ支配的です。

BP180 の主要なエピトープは、NC16a と呼ばれる最も細胞膜に近い部分に存在し、大部分の患者血清がこの部位の組み換え蛋白質に反応性を示します[1)]。

ウサギに免疫することで得たマウスの BP180 の NC16a 部分に対する抗体は新生仔マウスに投与すると類天疱瘡と同様の水疱が形成されることが確認されています[2)]。

本品は抗原として BP180NC16a を用いており、血清中の抗 BP180 抗体を特異的に測定する試薬です。

[性能]

1．性能

（1）感度試験

標準液 1（Index 値 =0）を試験したとき、波長 450 nm における吸光度は 0.100 以下であり、抗 BP180 抗体標準液 2（Index 値 =100）を試験したとき、波長 450 nm における吸光度は 0.500 以上です。

（2）正確性試験

既知濃度の管理検体 3 例（Index 値 50 未満、Index 値 50 ～ 120、Index 値 120 以上）を測定したとき、いずれも Index 値が期待値の± 15％の範囲内です。

（3）同時再現性試験

既知濃度の管理検体 3 例（Index 値 50 未満、Index 値 50 ～ 120、Index 値 120 以上）をそれぞれ同時に 6 回繰り返して測定したとき、Index 値の変動係数はいずれも 15％以内です。

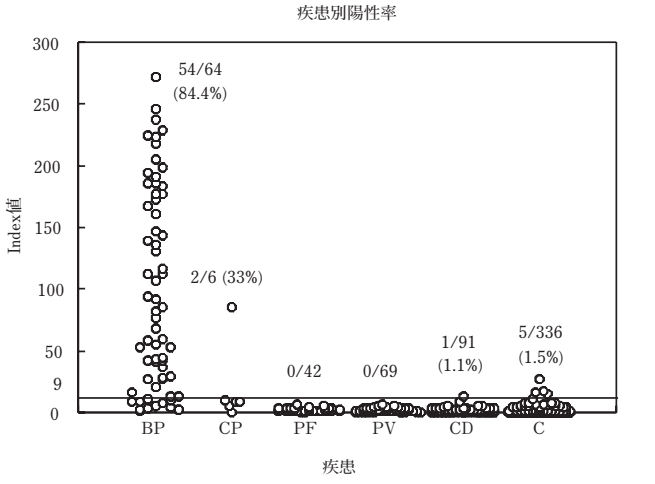
（4）測定範囲

測定範囲は Index 値 7 ～ 150 です。

2．臨床性能試験成績

カットオフ値を Index 値 =9 として、水疱性類天疱瘡（bullous pemphigoid:BP）患者血清 64 例、瘢痕性類天疱瘡（cicatricial pemphigoid:CP）患者血清 6 例、落葉状天疱瘡（pemphigus foliaceus:PF）患者血清 42 例、尋常性天疱瘡（pemphigus vulgaris:PV）患者血清 69 例、膠原病（collagen disease:CD）患者血清 91 例及び健常者（control:C）血清 336 例を測定したときの抗 BP180 抗体の疾患別陽性率は以下でした。

疾患	陽性検体数	陽性率
水疱性類天疱瘡（BP）	54 ／ 64	84.4％
瘢痕性類天疱瘡（CP）	2 ／ 6	33.3％
落葉状天疱瘡（PF）	0 ／ 42	0.0％
尋常性天疱瘡（PV）	0 ／ 69	0.0％
膠原病（CD）	1 ／ 91	1.1％
健常者（C）	5 ／ 336	1.5％



3．抗 BP180 抗体標準液 2 の濃度単位（Index 値）

任意に選択した高値陽性血清について希釈曲線を作成し、吸光度がプラトーとなる最高吸光度のおよそ半分の吸光度を示す濃度を Index 値＝ 100 と設定しました。

[使用上又は取扱い上の注意]

1．取扱い上の注意

（1）検体はHIV、HBV、HCV等の感染の可能性があるものとして扱ってください。検査にあたって、感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、口によるピペッティングを行わないでください。

（2）試薬が目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てなどを受けてください。

2．使用上の注意

（1）使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

（2）抗原感作マイクロカップ、酵素標識抗体及び抗BP180抗体標準液2は異なる製品ロットの試薬を組み合わせて使用しないでください。

（3）保存及び使用中に、試薬に直射日光を当てないでください。

（4）全ての構成試薬は、室温（20～30℃）に戻してから使用してください。

（5）検体、試薬への微生物の混入や試薬間のコンタミネーションを避けてください。

（6）反応温度、反応時間、検体の希釈率を厳守してください。

（7）洗浄が不十分な場合、ばらつきや偽陰性、偽陽性を生じることがありますので、十分に洗浄してください。

（8）マイクロカップの間のコンタミネーションを防ぐため、液の泡立ちや、周囲への付着が起こらないようにしてください。

（9）試薬類は皮膚などに付けないように注意して取り扱ってください。皮膚などにかかったときは大量の水で洗い流してください。

(10) 洗浄用緩衝液は、2～8℃で保存したとき、白濁を認める場合がありますが、試薬性能に影響はありません。洗浄液調製時、十分に溶解してから使用してください。

(11) 抗原感作マイクロカップは湿気を嫌いますので、開封後はアルミ袋のチャックを確実に閉めて保存してください。

3．廃棄上の注意

（1）検体は感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。検査に使用した器具は、廃棄又は次のいずれかの方法で処理してください。

1）最終濃度2％グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。

2）0.1％次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素約1,000 ppm）に1時間以上浸漬する。

3）121℃で20分間以上高圧蒸気滅菌する。

試薬や器具等を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従ってください。

（2）抗BP180抗体標準液2、標準液1及び反応用緩衝液には0.09％アジ化ナトリウムが添加されています。アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含む廃液は十分な量の水で洗い流してください。

[貯蔵方法・有効期間]

貯蔵方法；2～8℃

有効期間；製造後12箇月

（使用期限は外箱に表示されています。）

[包装単位]

CODE No.7695　1キット48ウエル

[主要文献]

1．Matsumura, K. et al. Arch Dermatol Res. 1996, vol. 288, p. 507-509.

2．Liu, Z. et al. J Clin Invest, 1993, vol. 92, p. 2480-2488.

3．Kobayashi, M. et al. J Dermatol Sci. 2002, vol. 30, p. 224-232.

*[問い合わせ先]

株式会社医学生物学研究所　学術部

〒105-0012　東京都港区芝大門二丁目１１番８号
住友不動産芝大門二丁目ビル

TEL：03-6854-3613　　E-mail：kensa@mbl.co.jp

**[製造販売元]

株式会社医学生物学研究所

〒105-0012　東京都港区芝大門二丁目１１番８号
住友不動産芝大門二丁目ビル

TEL：03-6684-6860　　FAX：03-6854-3615

「MESACUP」は、株式会社医学生物学研究所の登録商標です。(登録商標 第2422835号)