

体外診断用医薬品		
日本標準商品分類番号	877449	
承認番号	20500AMZ00261000	

**2023年 6月改訂（第8版）
 **2023年 4月改訂（第7版）

ご使用の際はこの電子添文をよく読んでから使用してください。

肝細胞増殖因子キット

HGF「オーツカ」ELISAキット

TI2522112

【全般的な注意】

1. 本キット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。
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. 電子添文以外での使用方法については保証をいたしません。
4. 使用する機器の電子添文及び取扱説明書をよく読んでから使用してください。

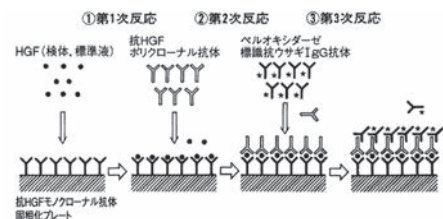


図1 測定原理

**【形状・構造等（キットの構成）】

構成試薬名	容量・本数等	成分
1 洗浄用原液	40mL×1ボトル	リン酸水素ナトリウムほか
2 抗体プレート	96ウェル×1枚	抗HGFモノクローナル抗体(マウス)ほか
3 リン酸緩衝液	22mL×1ボトル	リン酸水素ナトリウムほか
4 ⁻¹ HGF標準液 0ng/mL	0.4mL×1チューブ	リコンビナント肝細胞増殖因子(HGF)ほか
4 ⁻² HGF標準液 0.313ng/mL	0.4mL×1チューブ	
4 ⁻³ HGF標準液 0.625ng/mL	0.4mL×1チューブ	
4 ⁻⁴ HGF標準液 1.25ng/mL	0.4mL×1チューブ	
4 ⁻⁵ HGF標準液 2.5ng/mL	0.4mL×1チューブ	
4 ⁻⁶ HGF標準液 5.0ng/mL	0.4mL×1チューブ	
4 ⁻⁷ HGF標準液 10.0ng/mL	0.4mL×1チューブ	
5 第1抗体液	11mL×1バイアル	抗HGF抗体(ウサギ)ほか
6 第2抗体希釈液	15mL×1バイアル	リン酸水素ナトリウムほか
7 第2抗体原液	0.6mL×1バイアル	ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体(ヤギ)ほか
8 酵素反応基質液	27mL×1ボトル	過酸化水素ほか
9 OPD錠	2錠×1バイアル	o-フェニレンジアミン二塩酸塩ほか
10 反応停止液	15mL×1ボトル	硫酸ほか

【使用目的】

血清及び血漿中の肝細胞増殖因子（HGF）の測定

【測定原理】

HGF「オーツカ」ELISAキット（以下、本キット）は、酵素免疫測定法（ELISA）による血清及び血漿中HGF測定用キットです。測定原理は、図1に示すように抗HGFモノクローナル抗体（マウス）固相プレート（抗体プレート）にHGF標準液又は検体を加え反応させ（第1次反応）、さらに抗HGFポリクローナル抗体（ウサギ）を加えて反応させ（第2次反応）、サンドイッチを形成させます。その後、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体（ヤギ）を加えて反応させます（第3次反応）。反応後、OPD基質液を加えて酵素反応（発色反応）を行い、各ウェルの吸光度を測定します。同時に測定した既知濃度のHGF標準液から作成した標準曲線より、検体中のHGF濃度を算出します。

【操作上の注意】

1. 検体は凍結保存してください。
2. 検体として、血清の他にクエン酸血漿、EDTA血漿、メシル酸ナファモスタット血漿が使用できます。しかし、ヘパリン血漿は、測定値が有意に高くなるため、検体として使用することはできません。
3. 各試薬の調製は、【用法・用量（操作方法）】の2. 試薬の調製方法に従って、適切なタイミングで行ってください。
4. 試薬分注時には、必ず試薬ごとにピペットのチップを交換してください。
5. 標準液、検体とも同時に2回以上の測定をお奨めします。
6. 標準曲線の範囲外の高濃度検体は、リン酸緩衝液で希釈して再測定してください。
7. 抗体プレートを分割使用する場合、未使用の抗体プレートを乾燥剤とともに袋に入れチャックをした後、テープ等で密閉し冷凍保存してください。
8. 検体や試薬間のコンタミネーションを避けるため、検体や試薬類の分注に際しては十分注意してください。

【用法・用量（操作方法）】

各構成試薬は使用前に室温放置又は水浴で室温に戻し、泡立てないように均一に混和して使用してください。

< >の中の数字は【形状・構造等（キットの構成）】中の構成試薬の番号を示します。

1. 必要器具、機器等
 - (1) メスシリンダー
 - (2) メスピペット
 - (3) マイクロピペット及びチップ
 - (4) プレートシェーカー（振とう数500rpm以上）
 - (5) プレートウォッシャー
 - (6) ペーパータオル
 - (7) プレートリーダー（測定波長488～492nm）
2. 試薬の調製方法
 - (1) 洗浄液
洗浄用原液<1>全量40mLに960mLの蒸留水又は精製水を加え調製します。ボトル内に残存する少量の原液も、希釈混和した洗浄液で洗い込みます。調製後の洗浄液は、2～8℃で保存してください。
 - (2) 第2抗体液（第1次反応を行っている間に調製）
第2抗体希釈液<6>12mLに対して第2抗体原液<7>を250μL加え、ゆっくり泡立てないようによく混和します。2回に分けて使用するときは第2抗体希釈液6mLに対して第2抗体原液125μLを加えます。
 - (3) OPD基質液（発色反応直前に調製）
酵素反応基質液<8>12mLにOPD錠<9>1錠を加えて溶解します。

3. 操作方法

操作手順を図2に示します。

- (1) 洗浄
抗体プレート＜2＞の各ウェルに、350 μ Lの洗浄液を加えて3回洗浄し、ペーパータオルにたたきつけるなどして水分を取り除きます。
- (2) 第1次反応
リン酸緩衝液＜3＞50 μ Lを各ウェルに加え、さらにHGF標準液＜4⁻¹～4⁻⁷＞又は検体50 μ Lを各ウェルに加え、シールでカバーした後、プレートシェーカーで振とうしながら20～30℃で1時間反応させます。
- (3) 洗浄
反応液を吸引除去後、洗浄液で5回洗浄します。
- (4) 第2次反応
第1抗体液＜5＞を100 μ Lずつ各ウェルに加え、シールでカバーした後、プレートシェーカーで振とうしながら20～30℃で1時間反応させます。
- (5) 洗浄
反応液を吸引除去後、洗浄液で5回洗浄します。
- (6) 第3次反応
第2抗体液を100 μ Lずつ各ウェルに加え、シールでカバーした後、プレートシェーカーで振とうしながら20～30℃で1時間反応させます。
- (7) 洗浄
反応液を吸引除去後、洗浄液で5回洗浄します。
- (8) 発色反応
OPD基質液を100 μ Lずつ各ウェルに加えて、20～30℃で10分間反応させます。
- (9) 酵素反応停止
反応停止液＜10＞を100 μ Lずつ各ウェルに加え、反応を停止させます。反応時間が各ウェルで均等になるように分注時間を調整してください。
- (10) 吸光度測定
プレート裏面の汚れや水分を柔らかいペーパータオル等でふきとった後、プレートリーダーを用いて各ウェルの吸光度を波長488～492nmで測定します。2波長の場合は、測定波長488～492nm、参照波長620nm以上で測定します。

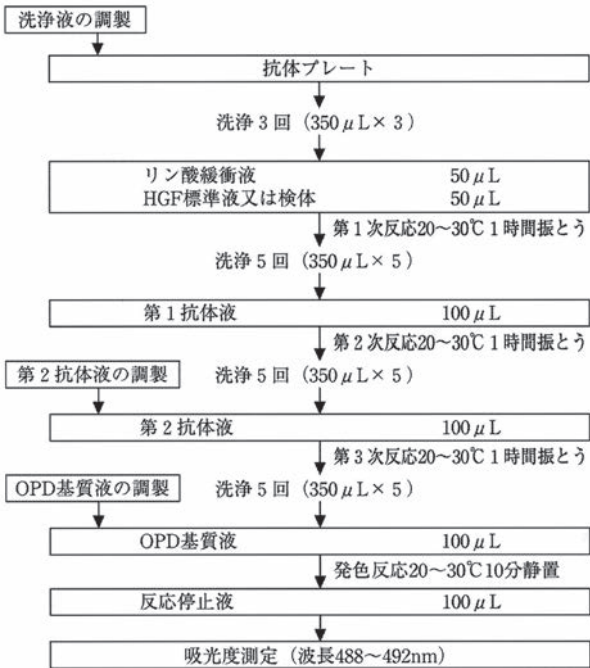


図2 操作手順

4. HGF濃度の算出

- (1) ウェルの吸光度からHGF標準液0ng/mLの吸光度（ゼロブランク）を差し引いて、各ウェルの特異的吸光度を算出します（表1）。
- (2) X軸に標準液の濃度を、Y軸に対応する特異的吸光度をとり、両対数変換の2次回帰により標準曲線を作成します（図3）。
- (3) 検体の特異的吸光度を標準曲線に当てはめ、そのHGF濃度を読み取ります。

表1 標準液測定値の例

HGF標準液 (ng/mL)	吸光度	特異的吸光度
0	0.011	…
0.313	0.103	0.092
0.625	0.198	0.187
1.25	0.395	0.384
2.5	0.711	0.700
5.0	1.253	1.242
10.0	2.114	2.103

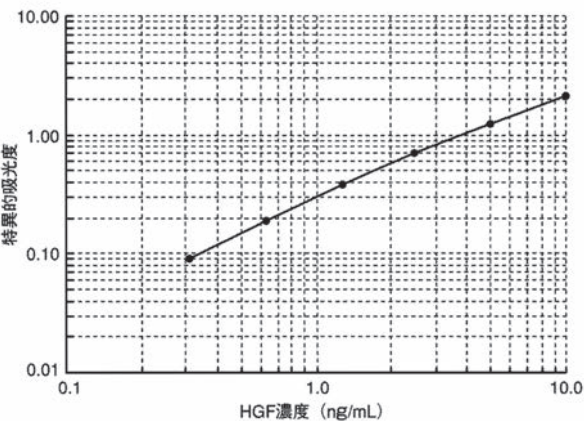


図3 標準曲線の例

【臨床的意義】

劇症肝炎は、その治療法の進歩及び医療体制の整備にもかかわらず、いまだ救命率が約20%で予後不良の疾患です。劇症肝炎の救命率を向上させるためには、その病態を明らかにし、新しい治療法の開発が必要であると同時に、現状の治療法においては早期に劇症化（脳症の発現）を予測し、できるだけ早期に治療を開始することが重要と考えられています。本疾患の診断には、プロトロンビン時間、ヘパプラスチンテスト等の血液凝固系因子の検査が用いられています。しかしながら、これらの値が異常値を呈するときには既に高度に肝細胞壊死が進行している場合もあり、肝細胞破壊が軽度な時期に劇症化を診断できる検査方法が望まれています。我々は、血清中の新しい生理活性物質である肝細胞増殖因子（HGF、図4）^{1, 2)} 濃度が劇症肝炎の予知に有用ではないかと考え³⁾、坪内らとの共同研究により簡便な酵素免疫測定法（ELISA）キットを開発し、臨床的有用性を検討しました^{4, 5)}。その結果、脳症発現に先がけて測定が可能であった劇症肝炎のほぼ全例で脳症発現前に血清HGF値が異常高値を呈していることが判明しました⁶⁾。また、劇症肝炎「亜急性型」でプロトロンビン時間、ヘパプラスチンテストが異常値を示すよりも早期に、血清HGF値が上昇している症例が確認されました。血清HGF値の測定は劇症肝炎の予知に有用であり、とりわけ予後不良とされる劇症肝炎「亜急性型」における血漿交換療法等の特殊治療導入の時期決定の指標として用いることにより、早期治療を可能とし、本疾患の救命率向上に寄与しうる検査であると考えられます^{7～12)}。

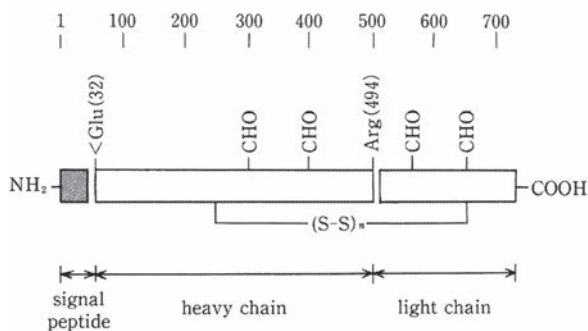


図4 HGF一次構造の模式図

図上段の数字は最初のメチオニンコドン、ATGを1として数えたアミノ酸の番号を示す。CHOは糖鎖の結合推定部位を、S-Sはジスルフィド結合を表す。

1. 健康成人の測定値

男性90例、女性110例の合計200例の健康成人の血清HGF値を測定しました。その分布は図5のようになり平均値±標準偏差 (mean±SD) は0.19±0.05ng/mL、最大値は0.38ng/mLであり、正常上限値をmean+4SDとすると0.39ng/mLでした。各年齢層及び男女間での有意差は認められませんでした。

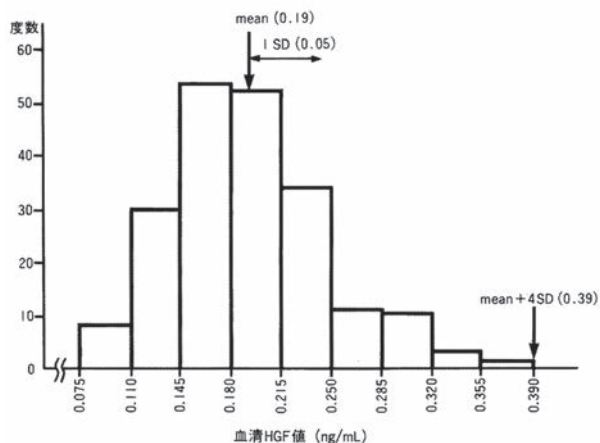


図5 健康成人200例の分布

2. 各種肝疾患患者の測定値

各種肝疾患患者での血清HGF値の分布を図6に示します。劇症肝炎は各種肝疾患の中でも最も高値を示し、そのmean±SDは10.17±24.77ng/mLでした。その他、劇症肝炎「亜急性型」と類似の病態を呈する亜急性肝炎 (mean±SD: 2.71±2.52ng/mL)、慢性肝炎から肝炎ウイルスの重感染や薬物等が原因となり急激な肝不全を引き起こすAcute on Chronic (7.91±7.04ng/mL) 及び外科手術を契機に肝機能障害が著しく進行し肝不全を引き起こす術後肝不全 (2.04ng/mL) 等の重篤な肝不全症状を呈する疾患で比較的高値を示しました。一方、急性肝炎 (0.40±0.16ng/mL)、慢性肝炎 (0.35±0.16ng/mL)、肝硬変 (0.60±0.35ng/mL) 及び肝癌 (0.56±0.36ng/mL) においては比較的低値でした。また、劇症肝炎症例の90% (18例/20例) の症例が1.0ng/mL以上を示し、他の肝疾患症例の87% (111例/128例) の症例が1.0ng/mL未満であることより、劇症肝炎診断における血清HGF値の基準値は1.0ng/mLが妥当と考えられました。

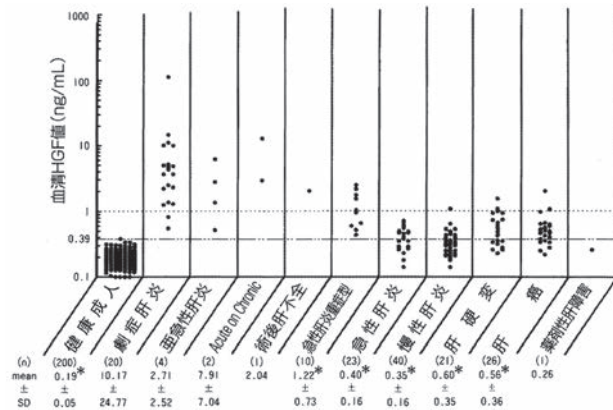


図6 健康成人及び各種肝疾患患者における分布

*は劇症肝炎に対する有意差検定 (t 検定) での危険率 $p<0.01$ を示す。

3. 劇症肝炎の予知

劇症肝炎と診断された症例のうち、脳症発現に先がけて血清HGF値、プロトロンビン時間及びヘパプラスチンテストの3項目を同時に測定できた症例が6例でした。その内訳は、「急性型」3例、「亜急性型」3例でした。

図7a) は、「急性型」3例において脳症発現に先がけて測定できた3項目の全測定値を対象に、三者を比較したものです。それぞれの基準値を血清HGF値1.0ng/mL、プロトロンビン時間40%、ヘパプラスチンテスト30%とすると、血清HGF値0.91ng/mLの1測定値を除き、三者ともその他の測定値はすべて異常値を示しました。

一方、図7b) は、「亜急性型」3例において同様に3項目を比較したものです。1例 (症例F) は3項目とも異常値を呈しましたが、他の2例 (症例D、E) では、プロトロンビン時間、ヘパプラスチンテストが正常な時点で既に血清HGF値は異常高値を示していました。

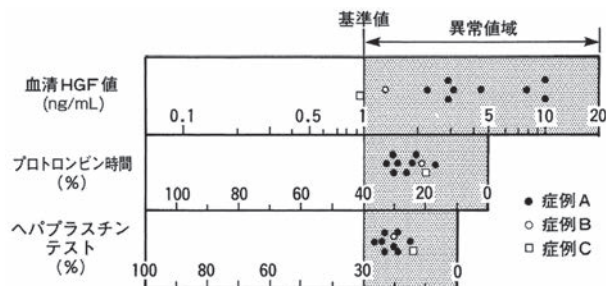


図7a) 劇症肝炎「急性型」3例における脳症発現前の血清HGF値、プロトロンビン時間及びヘパプラスチンテストの比較

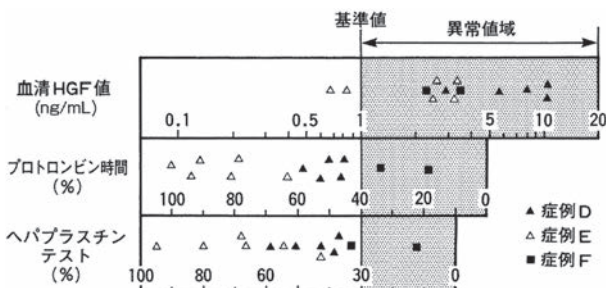


図7b) 劇症肝炎「亜急性型」3例における脳症発現前の血清HGF値、プロトロンビン時間及びヘパプラスチンテストの比較

4. 劇症肝炎の経過観察

劇症肝炎患者における血清HGF値の経時的変動を図8に示します。劇症肝炎生存例6例では、脳症発現時に血清HGF値が高値であったものが、経過とともに1.0ng/mL以下に低下しました（図8a）。

一方、劇症肝炎死亡例9例では、脳症発現後も血清HGF値は全例1.0ng/mL以上の高値を持続しました（図8b）。

このように経過観察中の血清HGF値が、患者の予後を反映していることが示されました。

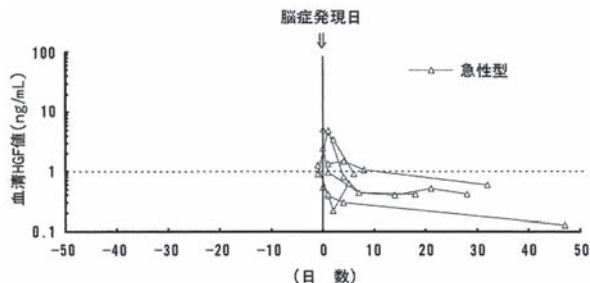


図8a) 劇症肝炎生存例6例における経時的変動

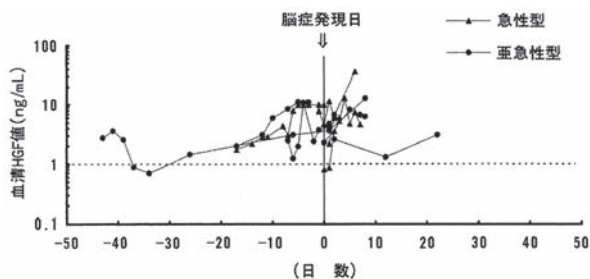


図8b) 劇症肝炎死亡例9例における経時的変動

【性能】

自社施設において用法・用量（操作方法）に従って、感度、正確性及び同時再現性の各試験を行った場合、下記の規格に適合しました。

1. 感度試験

自社施設における感度試験は表2に示すとおりでした。

表2 感度試験の規格

吸光度	規格値
Amin	0.030以上
Amax	1.000以上

なお、Amin及びAmaxは次式によって求めます。

Amin= (HGF標準液0.313ng/mLの吸光度) - (HGF標準液0ng/mLの吸光度)

Amax= (HGF標準液10.0ng/mLの吸光度) - (HGF標準液0ng/mLの吸光度)

2. 正確性試験

自社施設において3種類の管理血清の測定値は既知濃度の±20%以内でした。

3. 同時再現性試験

自社施設において3種類の管理血清を同時に5回測定するとき、これらの測定値の変動係数はいずれも15%以下でした。

4. 測定範囲

自社施設における最少検出濃度は0.010ng/mLでした。

測定の上限は10.0ng/mLであり、それを越える値を求める場合は希釈を要します。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上（危険防止）の注意

(1) 第1抗体液に含まれるヒト血液由来成分の原料血液は、HBs抗原、HIV抗体及びHCV抗体検査を行い、陰性の結果を得ていますが、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分に注意して取り扱ってください。

(2) 反応停止液は硫酸を含むので、皮膚等に付着しないよう取扱いは十分注意してください。

(3) OPD錠やOPD基質液を目、皮膚等に付着させないように注意してください。OPDは炎症の原因となることがあります。

(4) 試薬が誤って目や口に入った場合や手等に触れた場合には、水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要があれば医師の手当等を受けるようにしてください。

2. 使用上の注意

(1) 使用期限を過ぎたキットは使用しないでください。

(2) 製造番号の異なるキット中の構成試薬を組み合わせ使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

(1) 使用後の容器やピペット等は焼却処理するか、廃棄する場合には廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物又は産業廃棄物等区別して処理してください。

(2) 検体等に接触したチップ等の器具やそれらの残液は、感染の危険性があるものとし、オートクレーブ（121℃、20分）で滅菌処理するか又は次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度1,000ppm以上）に1時間以上浸してから処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法

-20℃以下

有効期間

製造日より12ヵ月

（使用期限は外箱に記載してあります。）

【包装単位】

*96テスト用

【主要文献】

- Gohda E, et al. : J Clin Invest. 1988 ; 81 : 414-419.
- Miyazawa K, et al. : Biochem Biophys Res Commun. 1989 ; 163 : 967-973.
- Tsubouchi H, et al. : Hepatology. 1989 ; 9 : 875-881.
- Tsubouchi H, et al. : Hepatology. 1991 ; 13 : 1-5.
- 二井谷 好行ほか：臨床検査. 1991 ; 35 : 1360-1364.
- 武藤 泰敏ほか：肝胆膵. 1992 ; 25 : 541-549.
- 木許 政義ほか：基礎と臨床. 1992 ; 26 : 3975-3981.
- 杉原 潤一ほか：新薬と臨床. 1992 ; 41 : 2212-2216.
- 上木 昇ほか：医学と薬学. 1992 ; 28 : 342-347.
- 渋谷 明隆ほか：肝胆膵. 1993 ; 26 : 337-342.
- 白崎 敬二ほか：臨床と研究. 1993 ; 70 : 289-292.
- 白崎 敬二ほか：薬理と臨床. 1993 ; 2 : 753-760.

【問い合わせ先】

大塚製薬株式会社 医薬情報センター

〒108-8242 東京都港区港南2-16-4

品川グランドセントラルタワー

電話 0120-189-840

FAX 03-6717-1414

【製造販売元】



大塚製薬株式会社
Otsuka 東京都千代田区神田司町2-9