

** この電子化された添付文書をよく読んでから使用してください

体外診断用医薬品

製造販売承認番号 22900EZ00020000

ADAMTS13キット

ADAMTS13-act ELISA「カインス」

【全般的な注意】

1. 本製品は体外診断用医薬品です。こ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などに基づいて総合的に判断してください。
- ** 3. この電子添文に記載以外の使用方法については保証を致しません。
- ** 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。詳細は機器メーカーにお問い合わせください。
5. ADAMTS13 CAL1～CAL6にはヒト由来血液が含まれています。HBs抗原、HCV抗体、HIV-1抗体及びHIV-2抗体の検査を行い、陰性の結果を得ておりますが、感染の危険性を完全に否定できる検査法がありません。また、それ以外のウイルスに関する検査はしておりませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分注意してください。
- * 6. 従来、ADAMTS13活性の測定単位はin-houseで調製されたキャリブプレートによる「%」が用いられておりましたが、国際標準物質 (WHO 1st IS 12/252) の頒布¹⁾ に伴って、本製品の測定単位は「IU/mL」となっております。「%」単位へ換算する場合、1 IU/mL = 100%の変換式を用いてください。

【形状・構造等 (キットの構成)】

- | | |
|---|-------------|
| 1. 抗体固相プレート
抗GSTマウスモノクローナル抗体 | 96ウェル × 1 |
| 2. VWF73基質 (凍結乾燥品)
GST-VWF73 | 6 mL用 × 2 |
| 3. 反応用緩衝液 | 30 mL × 1 |
| 4. 酵素標識抗体液
HRP標識抗N10マウスモノクローナル抗体 | 12 mL × 1 |
| 5. 発色液
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ)、尿素過酸化水素 | 12 mL × 1 |
| 6. 洗浄原液 (10倍濃度液) | 53 mL × 1 |
| 7. 反応停止液 | 12 mL × 1 |
| 8. ADAMTS13キャリブプレート (凍結乾燥品) | |
| 1) ADAMTS13 CAL1 (0.80 ~ 1.40 IU/mL ^{※1}) | 0.5 mL用 × 1 |
| 2) ADAMTS13 CAL2 (0.40 ~ 0.80 IU/mL ^{※1}) | 0.5 mL用 × 1 |
| 3) ADAMTS13 CAL3 (0.20 ~ 0.40 IU/mL ^{※1}) | 0.5 mL用 × 1 |
| 4) ADAMTS13 CAL4 (0.10 ~ 0.20 IU/mL ^{※1}) | 0.5 mL用 × 1 |
| 5) ADAMTS13 CAL5 (0.05 ~ 0.10 IU/mL ^{※1}) | 0.5 mL用 × 1 |
| 6) ADAMTS13 CAL6 (0.00 ~ 0.02 IU/mL ^{※1}) | 0.5 mL用 × 1 |
| 9. 付属品 | |
| 1) 希釈用プレート | 96ウェル × 1 |
| 2) プレートシール | 1シート × 3 |

※1 キャリブプレートの設定は LOT により異なります。

GST: Glutathione S-transferase

HRP: Horseradish Peroxidase

【使用目的】

血漿中の ADAMTS13 活性の測定
(血栓性血小板減少性紫斑病の診断補助)

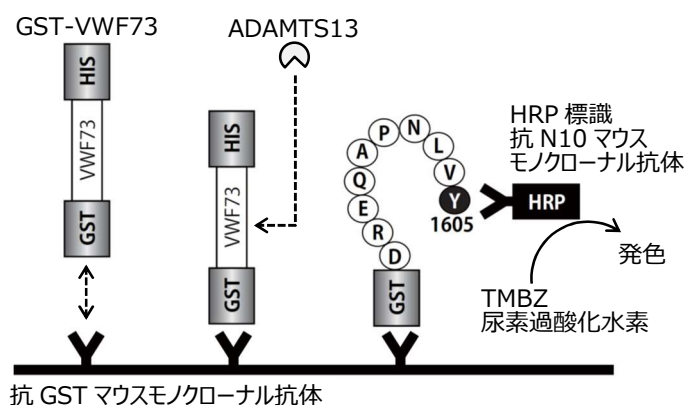
【測定原理】

1. 原理

本製品はADAMTS13によって切断されて生じるVWF-A2断端のアミノ酸Tyr1605を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた固相サンドイッチELISAです²⁾。

- 1) 抗体固相プレートに固相されている抗GSTマウスモノクローナル抗体が、VWF73基質液中のGST-VWF73と特異的に反応します。
- 2) 試料中のADAMTS13が、VWF73基質のチロシン (Tyr1605) とメチオニン (Met1606) 間のペプチド結合を切断します。
- 3) 酵素標識抗体液中のHRP標識抗N10マウスモノクローナル抗体が、ADAMTS13により切断されたVWF断片のチロシン (Tyr1605) と特異的に反応し、サンドイッチ複合体を形成します。
- 4) 発色液中のTMBZと尿素過酸化水素が、プレート上のサンドイッチ複合体のHRPと反応します。生成されるTMBZの酸化物 (発色体) の吸光度を測定します。

吸光度は試料に含まれるADAMTS13の酵素活性を反映し増加するため、あらかじめ既知のADAMTS13活性を含む試料 (ADAMTS13キャリブプレート) を測定して検量線を作成しておくことにより、試料中のADAMTS13活性を求めることができます。



また、第Ⅷ凝固因子のインヒビター測定法であるBethesda法に準じて、本製品を用いて試料中のADAMTS13インヒビター力価を求めることができます。すなわちADAMTS13の酵素活性を失活させた試料と正常血漿を等量混合して反応させた後、残存するADAMTS13活性を測定することで、インヒビター力価を算出します。活性を半分に低下させる力価を1 BU/mL (1 Bethesda単位) と定義します。

【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取方法

- 1) 検体としてクエン酸血漿を使用してください。検体は採取後できるだけ速やかに測定してください。
- 2) 検体の保存が必要な場合は-20℃以下、長期の場合は-70℃以下で凍結保存してください。凍結保存した検体を使用する場合は室温に戻してから使用してください。
- 3) EDTAによりADAMTS13活性が阻害されるため、EDTA血漿は使用できません。また、ヘパリン及びフッ化ナトリウムは測定値に影響を与えることがあります。
- 4) トロンビンによりADAMTS13が分解されるため、血清検体の活性値は血漿に比べ低下します。

2. 妨害物質・妨害薬剤

- 1) 濁りのある検体、溶血が見られる検体は、正しく測定が行えない恐れがあります。
- 2) ヘモグロビン (500 mg/dL)、ビリルビン (ビリルビンF、ビリルビンC 50 mg/dL)、乳び (3000 FTU)、アスコルビン酸 (500 mg/dL) 及びリウマチ因子 (500 IU/mL) は、測定値に影響を与えません。

3. その他

- 1) 検量線は測定毎に作成してください。標準液は2重測定で試験してください。検体は2重測定で試験することを推奨します。
- 2) 各反応時間を定められた時間に統一するよう注意してください。特にADAMTS13による切断時間を一定にするため、操作手順に従い検体をあらかじめ希釈してからウェルに添加してください。
- 3) 分注時間の統一と短縮のため、マルチチャンネルピペットや連続式分注器などの使用が推奨されます。
- 4) 洗浄操作後にウェルを乾燥させないように注意してください。
- 5) 希釈用プレートは特別な処理をしたものではありませんので、不足した場合は市販のポリスチレンプレート等を使用してください。

【用法・用量（操作法）】

1. 試薬の調製方法

- 1) 抗体固相プレート
室温に戻してからそのまま使用してください。開封後は乾燥剤入りのアルミ袋に入れ、2~10℃で保存し、使用期限までに使用してください。
- 2) VWF73基質液
VWF73基質 1本に精製水 6 mLを加え、転倒混和して完全に溶解してください。溶解後は-20℃で凍結保存し、2ヵ月以内に使用してください。凍結融解は5回まで使用可能です。
- 3) 反応用緩衝液、酵素標識抗体液、発色液、反応停止液
室温に戻してからそのまま使用してください。開封後は2~10℃で保存し、使用期限までに使用してください。
- 4) 洗浄液
精製水を用いて洗浄原液を10倍希釈してください。結晶が析出することがありますが、性能には影響ありません。恒温槽で加温し、溶解してから使用してください。希釈後は2~10℃で保存し、2ヵ月以内に使用してください。
- 5) ADAMTS13 標準液1~6
ADAMTS13 CAL1~6 に精製水 0.5 mLを加え、転倒混和して完全に溶解してから、使用してください。溶解後は-20℃以下で凍結保存し、6ヵ月以内に使用してください。

2. 必要な器具・器材・試料等

- 1) マイクロピペット、マルチチャンネルピペット、連続式分注器
- 2) 恒温槽
- 3) マイクロプレート用分光光度計 (波長: 450 nm, 600~700 nm)

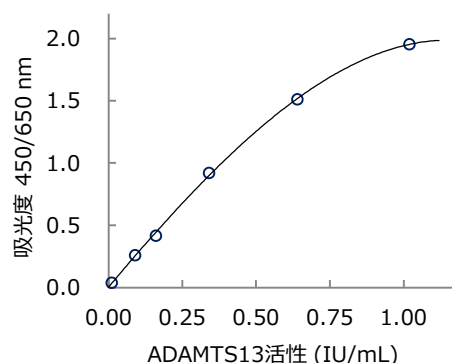
3. ADAMTS13活性測定法

- 1) 抗体固相プレートの各ウェルにVWF73基質液を100 μ Lずつ加え、プレートシールをして、15~30℃で60分間静置します。
- 2) 希釈プレートを使用し、検体及び標準液を反応用緩衝液で31倍に希釈します。(例: 検体及び標準液 5 μ L、反応用緩衝液 150 μ L)
- 3) 1) の反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μ Lずつ加え、洗浄液を除去します。この操作を3回行った後、ペーパータオル上で叩くなどしてウェル内に残った水滴を完全に除去します。
- 4) 2) で調製した希釈検体及び標準液を100 μ Lずつ加え、プレートシールをして、15~30℃で30分間静置します。
- 5) 反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μ Lずつ加え、洗浄液を除去します。この操作を3回行った後、ペーパータオル上で叩くなどしてウェル内に残った水滴を完全に除去します。
- 6) 各ウェルに酵素標識抗体液を100 μ Lずつ加え、プレートにシールをして、15~30℃で60分間静置します。
- 7) 反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μ Lずつ加え、洗浄液を除去します。この操作を3回行った後、ペーパータオル上で叩くなどしてウェル内に残った水滴を完全に除去します。
- 8) 各ウェルに発色液を100 μ Lずつ加え、15~30℃で30分間遮光して静置します。
- 9) 各ウェルに反応停止液を100 μ Lずつ加え、10分以内に主波長450 nm、副波長600~700 nmで吸光度を測定します。
- 10) ADAMTS13 標準液1~6 の吸光度 (2重測定 of 平均値) から標準曲線を作成し、各検体の吸光度からADAMTS13活性 (IU/mL) を算出します。

活性測定 操作手順概略

抗体固相プレート	1 ウェル
VWF73 基質液	100 μ L
↓ 15~30℃で60分間静置	
洗浄 (350 μ L × 3 回)	
試料 (反応用緩衝液で31倍希釈)	100 μ L
↓ 15~30℃で30分間静置	
洗浄 (350 μ L × 3 回)	
酵素標識抗体液	100 μ L
↓ 15~30℃で60分間静置	
洗浄 (350 μ L × 3 回)	
発色液	100 μ L
↓ 15~30℃で30分間遮光で静置	
反応停止液	100 μ L
↓ 10分以内	
吸光度測定	波長 450 nm/600~700 nm

標準曲線例



4. インヒビター力価測定法

- 1) 検体およびコントロール^{※2}として正常血漿^{※3}を56℃で30分間インキュベーションします。
- 2) 遠心分離 (例: 8000 g、2分間) し、上清を分取します。反応用緩衝液を用いて1)で非働化した検体について希釈系列 (2、5、10倍など) を作成します。
- 3) 1)および2) で調製した各試料 (非働化した検体および希釈系列、コントロール^{※2}) とヒト正常血漿^{※3}を等量混合し、37℃で60分間インキュベーションします。
- 4) 3) の各試料を「3. ADAMTS13 活性測定法」に従い、ADAMTS13活性を算出します。
- 5) コントロール^{※2}を対照に残存活性率を求め、残存活性率が25~75%となる希釈倍率の結果からインヒビター力価を算出します。このとき、複数の希釈系列の結果から残存活性率が最も50%に近い希釈系列の結果をインヒビター力価の値とします。インヒビター力価の算出は以下の式を用います。

$$\text{残存活性率} = \text{検体の測定値} \div \text{コントロールの測定値} \times 100$$

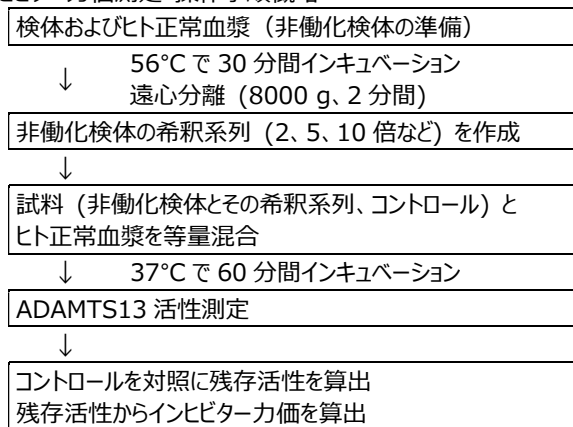
インヒビター力価

$$= (2 - \text{Log}[\text{残存活性率}]) \div 0.30103 \times \text{希釈倍率}$$

※2 正常血漿を56℃で30分反応させた非働化血漿をインヒビター力価のコントロールとします。コントロールはADAMTS13 標準液6または反応用緩衝液を用いることが可能です。

※3 ヒト正常血漿はADAMTS13 標準液1を使用するか、健康人のクエン酸血漿をプールしたものをうけてください。

インヒビター力価測定 操作手順概略



【測定結果の判定法】

1. 判定基準

- * 1) TTP
ADAMTS13活性 0.10 IU/mL未満 (10%未満)³⁾
- 2) 後天性TTP
インヒビター力価 0.5 BU/mL以上⁴⁾

2. 参考基準範囲

0.78~1.57 IU/mL^{※4}

※4 健康人73例の平均値 ± 1.96 SD の値から算出

3. 判定上の注意

- 1) ADAMTS13インヒビター力価の陰性判断は必ずしも容易ではありません。一般的には0.5 BU/mL未満を陰性とします。0.5 BU/mL以上1.0 BU/mL未満の場合については評価が困難なことがあり、1 BU/mL以上については明確な陽性と判断されます。また、先天性TTP (Upshaw-Schulman症候群、USS) の診断は両親のADAMTS13活性測定などを参考に行いますが、確定診断にはADAMTS13遺伝子解析が必要になります。
- 2) TTPを疑う徴候を認めるがADAMTS13活性が著減していない症例は、従来TTPと診断されてきましたが、その病態が明らかでないため、現在ではTTP類縁疾患と考えられています。なお、TTP類縁疾患の場合でも直ちに血漿交換などの治療が必要な症例が存在しますので、注意してください。
- 3) 参考基準値は様々な要因により変動する可能性がありますので、あらかじめ各施設で設定することが望まれます。なお、ADAMTS13活性は性差や年齢差が報告されています⁵⁾。
・ 男性は女性よりわずかに低値を示す。
・ 加齢により低下する。特に60歳以降では顕著な低下がみられる。
- 4) USS 患者の両親は、ヘテロ接合体異常であることからADAMTS13活性は0.30~0.50 IU/mLを示す場合が多い。
- 5) 検体の活性がADAMTS13 標準液1よりも高い場合、反応用緩衝液で2~4倍に希釈して再測定してください。

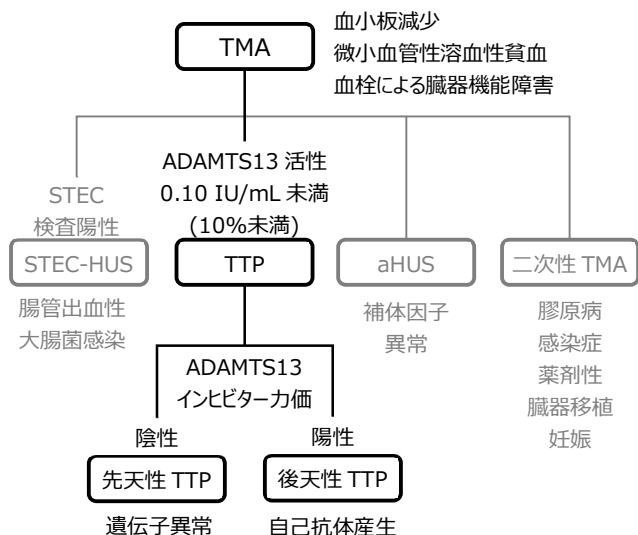
【臨床的意義】

血栓性微小血管症 (thrombotic microangiopathy, TMA) は微小血管障害性溶血性貧血、血小板減少、細血管内血小板血栓による臓器機能障害の病態を示す病理学的診断名であり、TMA の代表的疾患に血栓性血小板減少性紫斑病 (thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP) と、溶血性尿毒症症候群 (hemolytic uremic syndrome, HUS) の2つがあります。TTPは全身の微小血管に血小板血栓が形成されて発症する疾患で、血小板減少、微小血管障害性溶血性貧血、腎機能障害、発熱、動揺性精神神経症状の古典的 5 徴候により診断されていました。最近になり、TTPはADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs 13) の活性低下により診断されるようになりました³⁾。

止血因子であるVWF (von Willebrand factor) は主に血管内皮細胞で産生され、ジスルフィド結合でC末端同士が連結された超高分子量VWF重合体 (unusually large VWF multimer, UL-VWFM) として血中に放出されます。UL-VWFM は細小動脈血内腔で高い圧力を受け、進展し活性化されて強力な血小板凝集を引き起こします。ADAMTS13 は VWF を切断することにより、UL-VWFM の分子サイズを減らし、血小板との結合能を調節することで、病的な血小板凝集や血栓形成を防ぐ役割を担っています。ADAMTS13 活性の著減により、UL-VWFM が切断されず血中に蓄積し、末梢細動脈等で生じる高圧力下で過剰な血小板凝集/血栓を生じることで、TTP を発症することが明らかとなりました。ADAMTS13 活性が著減する原因として、ADAMTS13 遺伝子異常に基づく先天性 TTP と、ADAMTS13 に対するIgG、IgAあるいはIgM型の中和抗体又は非中和自己抗体による後天性 TTP が知られています。

なお、TMA は TTP と HUS 以外で基礎疾患が存在しない特発性以外にも妊娠、薬剤性、膠原病、悪性腫瘍、造血幹細胞や臓器移植、HIV などの感染に続発して発症することがあり、二次性 TMA と定義されます。

* TMA の分類



本製品の臨床性能試験の結果において、TTP 患者 17 例、血漿交換治療後 (PE 後) の TTP 患者 2 例、TTP 以外の血小板減少症 13 例、健常人 73 例での ADAMTS13 活性の分布を図 1 に、インヒター力価の分布を図 2 に示します。ADAMTS13 活性は TTP 患者 0.009 ± 0.012 IU/mL、TTP 以外の血小板減少症 0.605 ± 0.334 IU/mL、健常人 1.175 ± 0.202 IU/mL でした。インヒター力価は TTP 患者 1.7 ± 1.3 BU/mL、TTP 以外の血小板減少症 0.1 ± 0.1 BU/mL でした。

** なお、本試験において TTP 症例は全例が後天性 TTP でした。また、TTP 以外の血小板減少症には播種性血管内凝固症候群 (DIC)、免疫性血小板減少症、非典型溶血性尿毒症症候群 (aHUS)、ヘパリン起因性血小板減少症 (HIT)、巨赤芽球形貧血、再生不良性貧血、TAFRO 症候群が含まれています。

図 1

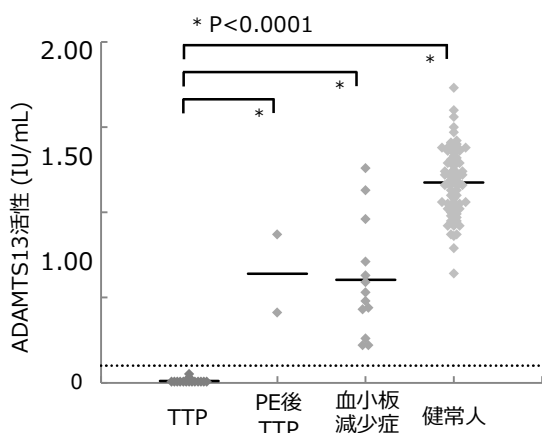
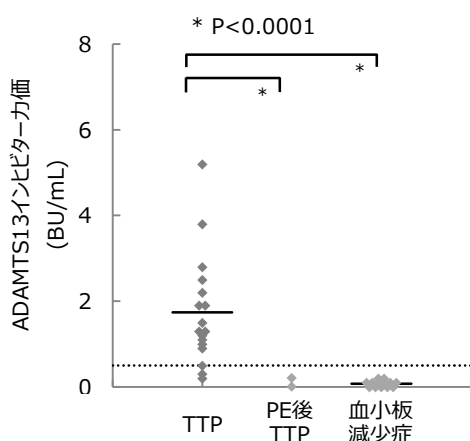


図 2



【性能】

1. 性能

1) 感度

- ADAMTS13 標準液6 ($0.00 \sim 0.02$ IU/mL) を試料として測定するとき、吸光度は0.150以下。
- ADAMTS13 標準液1 ($0.80 \sim 1.40$ IU/mL) を試料として測定するとき、吸光度は0.850~3.000の範囲内。

2) 正確性

活性値の異なる3種の管理用検体^{※5} を試料として測定するとき、測定値は既知活性値の $100 \pm 25\%$ の範囲内。

3) 同時再現性

活性値の異なる3種の管理用検体^{※5} についてそれぞれ6回同時に測定するとき、吸光度のCVは10.0%以下。

4) 測定範囲

$0.005 \sim 1.00$ IU/mL

※5 ADAMTS13 低値管理用検体	$0.05 \sim 0.10$ IU/mL
ADAMTS13 中値管理用検体	$0.25 \sim 0.60$ IU/mL
ADAMTS13 高値管理用検体	$0.60 \sim 0.95$ IU/mL

2. 相関性試験成績

1) ADAMTS13活性 (FRETS-VWF73との相関性)

回帰式 $y = 0.905x + 4.89$
 相関係数 $r = 0.9607$
 例数 $n = 105$

2) インヒター力価 (FRETS-VWF73との相関性)

回帰式 $y = 1.313x - 0.26$
 相関係数 $r = 0.9481$
 例数 $n = 32$

3. 校正用の基準物質

WHO 1st International Standard ADAMTS13 Plasma, 12/252

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上 (危険防止) の注意

- 血清等の検体はHIV、HBV、HCV等の感染の危険性があるものとして取扱いには十分注意してください。また、検体に接触した器具等は検体と同様、感染の危険性のあるものとして取扱ってください。
- 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用してください。
- 感染を避けるため、口によるピペッティングを行わないでください。
- 試薬が誤って眼や口に入った場合、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を受けてください。特に、反応停止液には0.5 mol/Lの硫酸、発色液には尿素過酸化水素が含有していますので、取扱いには注意してください。

2. 使用上の注意

- 本製品は凍結を避け、貯法に従い保存してください。誤って凍結させた試薬は、品質が変化して正しい結果が得られないことがあるので使用しないでください。
- ラベルに記載されている使用期限内に使用してください。
- 異なるロットの構成試薬を組み合わせて使用しないでください。また、同一のロットであっても試薬を注ぎ足し使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

- 本製品を廃棄する場合、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処理してください。
- 検査に使用した器具や試薬等は感染の危険があるものとして適切に処理してください。次亜塩素酸ナトリウム (0.1%以上、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)

による消毒処理又はオートクレーブ (121℃、20分以上) による滅菌処理を行ってください。

- 3) 本製品が漏出または飛散した場合、少量のときは吸水紙等で拭き取り、大量のときは水で洗い流してください。
- 4) 本製品の容器等は他の目的に転用しないでください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 保管方法 : 2～10℃
2. 有効期間 : 24ヵ月 (使用期限は容器ラベル及び外箱に表示)

【包装単位】

製品名	管理コード	包装
ADAMTS13-act ELISA「カインス」	CY-6000	96テスト

【主要文献】

- * 1) Hubbard AR, et al., J Thromb Haemost. 2015, 13, 1151-1153.
2) Kato S, et al., Transfusion. 2006, 46, 1444-1452.
3) Matsumoto M, et al., Int J Hematol. 2017, 106, 3-15.
4) 松本雅則, 臨床血液 2017, 58, 2081-2086.
5) Kokame K, et al., J Thromb Haemost. 2011, 9, 1426-1428.

【問い合わせ先】

株式会社カインス 学術部
〒113-0033 東京都文京区本郷二丁目 38 番 18 号
TEL 03 (3816) 4480 FAX 03 (3816) 6544

【製造販売元】

株式会社 **カインス**

〒113-0033 東京都文京区本郷二丁目 38 番 18 号
TEL 03 (3816) 4485