体外診断用医薬品

＊＊2023年 4月改訂(第4版)
＊2020年 4月改訂(第3版)

承認番号　16200EZZ01425000

** ご使用の際は，電子化された添付文書をよくお読みください

クラスⅢ免疫検査用シリーズ
マイコプラズマ抗体キット

肺炎マイコプラズマＣＦ試薬「生研」

ＣＦ抗原

【全般的な注意】

1．本品は，体外診断用医薬品であり，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．電子化された添付文書に記載された操作法に従って使用してください。記載された操作法及び使用目的以外での使用については，結果の信頼性を保証致しません。
**4．使用する機器の電子化された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)】

・肺炎マイコプラズマＣＦ抗原　1mL分×1本
肺炎マイコプラズマＣＦ抗原を含みます。

別売品(別売品は体外診断用医薬品ではありません)
・肺炎マイコプラズマＣＦ試薬「生研」ＣＦ正常抗原　0.5mL分×1本
・肺炎マイコプラズマＣＦ試薬「生研」ＣＦ抗血清　1mL分×1本

【使用目的】

血清中の肺炎マイコプラズマＣＦ抗体価の測定

【測定原理】

国立予防衛生研究所学友会編：ウイルス実験学，総論，改訂2版に記載された，補体結合反応の50%溶血法(マイクロタイター法)[1) 2) 3)]に基づいています。

【操作上の注意】

1．測定試料の性質，採取法
分離した血清は分離当日中に試験を行ってください。試験が翌日以降になる場合は血清を-20℃以下で凍結保存し，試験時に常温(15～25℃)で融解して使用してください。-20℃の凍結保存では凍結後1箇月まで，安定な成績が得られることが確認されています。
また，凍結した血清は凍結融解を2回以上繰り返さないでください。凍結融解を繰り返すと抗体価が変動し，試験結果に影響を与える可能性があります。

2．妨害物質・妨害薬剤
1) 被検血清中の補体が反応に影響しますので，必ず1:4に希釈した後，非働化(56℃で30分間加温処理)を行ってください。
2) 被検血清がＣＦ正常抗原と反応しないことを必ず確認してください。
3) 検体は薬剤添加などの処理をしない新鮮な血清を用いてください。

3．その他
試験結果に影響しますので反応に使用する希釈液，ヒツジ赤血球液，溶血素，補体等の調製には十分注意してください。

【用法・用量(操作方法)】[1)]

1．準備する器具，機材
1) マイクロピペット及びチップ
(10μL～100μL用，100μL～1 000μL用)
2) ダイリューター(25μL用)
3) ドロッパー(25μL用，50μL用)
4) U型マイクロプレート(リジットタイプ)
5) 小試験管(容量5～7mL)
6) 試験管(容量10～15mL)
7) メスピペット
8) マイクロプレート用ミキサー
9) プレートシール用フィルム
10) マイクロプレート用遠心機
11) 恒温水槽(37℃，56℃)
12) 分光光度計

2．試薬の調製方法
肺炎マイコプラズマＣＦ抗原は精製水1mLを加え，溶解して使用します。溶解後は2～10℃に保存して当日中に使用します。
1) 希釈液
ベロナール緩衝塩化ナトリウム液(ＶＢＳ)に，ゼラチンを0.01w/v%に添加したもので，通常，5倍濃度ＶＢＳを調製保存(表１参照)し，使用時に精製水4倍容を加えて5倍に希釈し，かつ，1w/v%ゼラチン保存液を1/100容加えて調製します。
pH7.2～7.5　　イオン強度　0.147

表１．5倍濃度ＶＢＳ調製例：2L(ＶＢＳ 10L分)

NaCl	85.0g	精製水で加熱溶解して2Lとします。
バルビタール	5.75g	
バルビタール・ナトリウム	3.75g	
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1.68g	
$CaCl_2$	0.28g	

2) 1.7%ヒツジ赤血球浮遊液
ヒツジ血液を生理食塩液等で遠心洗浄し，市販のヘモグロビン測定用試薬を用いて，1.7%ヒツジ赤血球浮遊液を調製します。調製後は2～10℃に保存して，3日間以内に使用してください。なお保存中に溶血が認められた場合は，使用しないでください。
3) 溶血素の定量と至適希釈度の決定
(1) 8mL以上入る試験管を7本用意し，あらかじめ1 000倍に希釈した溶血素を表２のように各試験管に入れます。次に表２のように希釈液を加え溶血素の希釈系列を作ります。

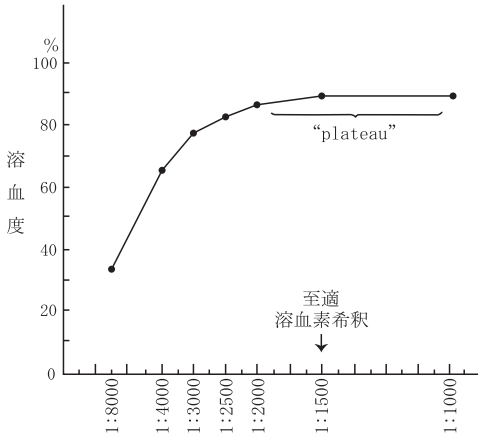
表２．

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7
最終希釈倍数	1000	1500	2000	2500	3000	4000	8000
希釈液(mL)	－	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	7.0
1:1000希釈溶血素(mL)	2.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

(2) 試験管7本に1.7%ヒツジ赤血球浮遊液を1mLずつ入れ，希釈溶血素を各1mLずつ加えて十分に混和し，37℃で15分間置き，赤血球を感作します。
(3) 補体を氷水中で1:400に希釈します。希釈補体は2時間以内に使用してください。

(4)試験管7本に希釈液1.5mL，1:400補体1.5mL及び(2)で作製した各感作赤血球をそれぞれ1.5mL加えて十分に混和し，37℃恒温水槽に60分間入れます。途中，30分後に試験管を振ります。
(5)2 000rpmで10分間遠心後，その上清の540nmでの吸光度を測定します(希釈液をブランクとします)。
(6)(4)の使用残感作赤血球をプールして，その1.5mLをドライアイス・アセトンで凍結融解し，完全溶血を起こさせます。これに，希釈液3mLを加えて吸光度を測定します(100%溶血)。
(7)各溶血素希釈での溶血度(%)を求めて，これを図1のように方眼紙にプロットします。
(8)溶血度がプラトー(plateau)にある部分の左から2番目の希釈を，至適溶血素希釈とし，以下の感作赤血球作製に用います。

図1．至適溶血素希釈の求め方



※1 横軸には，
$\frac{1}{8000}:\frac{1}{4000}:\frac{1}{3000}:\frac{1}{2500}:\frac{1}{2000}:\frac{1}{1500}:\frac{1}{1000}$
＝1.5：3：4：4.8：6：8：12 の比にとる。

4) 補体の定量
(1)1.7%ヒツジ赤血球浮遊液15mLに，至適希釈溶血素15mLを少しずつ加えてよく混和し，37℃恒温水槽に15分間入れて赤血球を感作します。
(2)希釈液と1:400希釈補体(1:400C)から，表3に示す希釈補体列をつくります。

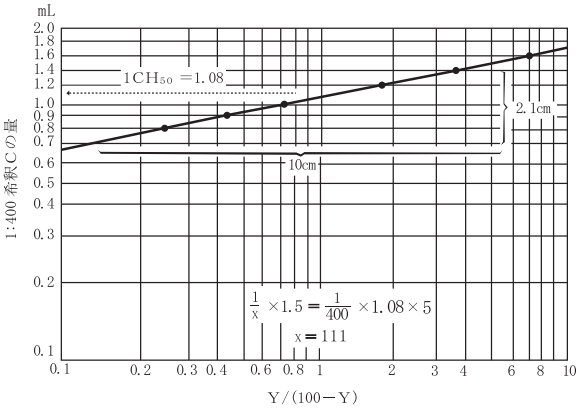
表3．CH_{50}単位の測定例

試験管番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
希釈液(mL)	3.0	2.3	2.2	2.1	2.0	1.8	1.6	1.4	1.2	3.0
1:400C(mL)	−	0.7	0.8	0.9	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	−
感作赤血球(mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5※2
吸光度(540nm)	0	0.060	0.120	0.180	0.260	0.390	0.490	0.542	0.580	0.620
溶血度(Y%)	0	9.7	19.4	29.0	41.9	62.9	79.0	87.4	93.5	100
Y/(100-Y)			0.24	0.41	0.72	1.70	3.76	6.94		

※2:試験管番号10を凍結融解して100%溶血とします。

(3)感作赤血球を各試験管に1.5mL加えてよく混和し，37℃恒温水槽に60分間静置します(途中，30分後に試験管をよく振ります)。
(4)各試験管内容を遠心管に移し，2 000rpmで10分間遠心します。上清の吸光度を，試験管番号1をブランクとして540nmで測定します。試験管番号10を100%溶血とし，それぞれの溶血度(Y%)を計算します。Yが10～90%の範囲内で，Y/(100-Y)を求めます。
(5)図2のように，両対数グラフの縦軸に1:400希釈の補体量を，横軸にY/(100-Y)をとり，各点をプロットします。各点に対する距離が最小になるような直線を引き，この直線の左端(1:400Cの量の0.7mL量との交点)から水平に10cmを右にとり，この端から垂直に線を引き，上の直線と交わる点までの距離を測ります。この長さが1.8～2.2cmの範囲内にあることを確かめます。

図2．CH_{50}単位の測定例



(6)Y/(100-Y)＝1(50%溶血相当)が直線と交わる点の縦軸の値が1CH_{50}であり，図2では1:400希釈補体の1.08mLが1CH_{50}となります。CF試験では5CH_{50}の補体量を必要とするので，1.5mL中では，

$\frac{1}{X}\times1.5=\frac{1}{400}\times1.08\times5$　　X＝111

となり，1:111希釈補体の1.5mLが5CH_{50}を含むことになります。マイクロ法でも，反応用量比が同じであるので，同一希釈度でよいことになります。

5) CF抗原及びCF抗血清の力価測定(Box titration)
U型マイクロプレート(以下，プレートと略す)を用い，表4のようにレイアウトします。

表4．CF抗原の定量－Box titration(例)

		抗血清希釈							補体対照				
		1:4	8	16	32	64	128	256	5	3.75	2.5	1.25 CH_{50}	
CF抗原希釈	1:4[a]	4[b]	4	3	2	−	−	−	−	−	±	4	
	8	4	4	4	3	−	−	−	−	−	±	4	至適抗原希釈
	16	4	4	4	3	±	−	−	−	−	±	3	
	32	4	4	4	2	±	−	−	−	−	−	2	
	64	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	2	
	128	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	2	
N 1:4		−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	2	
希釈液		−	−	−	−	−	−	−	−	−	±	3	

a　1:2から始まってもよい
b　4：不溶血　3：25%溶血　2：50%溶血　1：75%溶血
±：わずかに未溶血血球存在　−：100%溶血

(1)CF抗血清1:4(56℃で30分間加温処理済み)希釈から，2倍階段希釈液をつくり，補体対照を除く各希釈ごとの縦列の穴にそれぞれドロッパーで25μL入れます。
(2)CF抗原の2倍階段希釈液をつくり，CF正常抗原(N抗原)及び希釈液対照を除く対応CF抗原希釈列に，それぞれ25μL加えます。
(3)CF正常抗原を1:4に希釈し，N列の穴に25μLずつ加えます。また，希釈液のみの対照列の穴にも希釈液を25μLずつ加えます。
(4)補体を5CH_{50}/50μLになるように希釈し，氷水中で冷却したものを，50μLずつ加えます。ただし，補体対照は表5のようにして調製します。

表5．補体対照群における希釈補体の加え方

	5 CH_{50}	3.75 CH_{50}	2.5 CH_{50}	1.25 CH_{50}
希釈液(μL)	25	−	25	50
5CH_{50}/50μL(μL)	50	−	−	−
2.5CH_{50}/50μL(μL)	−	75	50	25

(5)マイクロプレート用ミキサーで反応液を混和後，4～6℃に一夜置きます。

(6)プレートを取り出し，常温(15～25℃)に15分間静置します。
(7)37℃に加温調製した感作赤血球をすべての穴に50μLずつ加えます。
(8)プレート表面の水分を，ろ紙等で拭きとってから，接着力のよい圧着フィルムでシールします。次いで，プレートをよく振り，反応液を十分に混和してから37℃の恒温水槽に60分間入れます。(途中，20分おきにプレートをよく振ります。)
(9)プレートを1 000rpmで3分間遠心してから，別に作った溶血度標準(表６)と照応しながら観察し，溶血度を判定します。

表６．溶血度標準の作り方

溶血度(%)	0	25	50	75	100
表　　示	4	3	2	1	－
1:2希釈感作赤血球(溶血)※3 (μL)		25	50	75	100
1:2希釈感作赤血球(不溶血) (μL)	100	75	50	25	
希　釈　液 (μL)	50	50	50	50	50

※3：凍結融解で溶血させる。
注）溶血度標準もプレートを用いてつくり，前記のように1 000rpmで3分間遠心してから観察します。
(10)ＣＦ抗血清，ＣＦ抗原等の抗補体作用等の有無を調べます。希釈液対照のＣＦ抗血清希釈列が完全溶血を示せば，このＣＦ抗血清には抗補体作用がありません。また，Ｎ抗原対照列も同様であれば，このＣＦ抗血清にはＣＦ正常抗原に対する抗体を含有しません。ＣＦ抗原の抗補体作用は，表７の許容範囲と照合して確かめます。

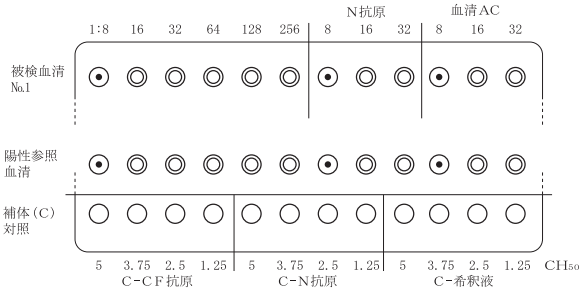
表７．補体対照群における溶血度の許容範囲

	5 CH_{50}	3.75 CH_{50}	2.5 CH_{50}	1.25 CH_{50}
ＣＦ抗原	－	－	±	2～4
Ｎ 抗 原	－	－	±	1～4
希 釈 液	－	－	±	2～3

(11)抗補体作用を示さないＣＦ抗原希釈で，4及び3の溶血度表示を示すものをＣＦ反応陽性とし，最も血清抗体価の高くでたＣＦ抗原希釈を至適抗原希釈とします。

３．操作法
血清ＣＦ抗体価の測定(Line titration)
血清(検体)のLine titrationでは，ＣＦ抗体陽性血清(ＣＦ抗血清など)を用いて使用ＣＦ抗原の抗原活性を確認するとともに，被検血清のＣＦ正常抗原に対する抗体及び抗補体作用(ＡＣ)対照(各血清希釈にＣＦ抗原のかわりに希釈液を加えた列)が陰性であることを必ず確認します。
1）検体の前処理
被検血清0.1mLに希釈液0.3mLを加えて1:4に希釈し，56℃で30分間加温処理を行います。
2）出発希釈は1:4または1:8とし，1:8から始める場合は図３のようにします。

図３．血清ＣＦ抗体価の測定



3）1:8希釈血清をマイクロピペットで50μLずつ1:8の⊙の穴に入れます。各検体ごとにマイクロピペットのチップを替えます。
4）希釈液25μLずつを◎穴に入れます。
5）25μLのダイリューターで左端から1:256まで，Ｎ抗原の1:8～1:32まで，血清ＡＣの1:8～1:32まで，それぞれ2倍階段希釈をします。
6）至適濃度に希釈した(至適抗原希釈)ＣＦ抗原25μLずつを血清の1:8～1:256の全ての穴及びＣ－ＣＦ抗原対照の4穴に入れます。
7）至適濃度に希釈したＮ抗原25μLずつをＮ抗原の1:8～1:32及びＣ－Ｎ抗原対照の穴に入れます。
8）希釈液25μLずつを血清ＡＣの1:8～1:32及びＣ－希釈液対照の穴に入れます。以下,5)Box titrationの(4)～(10)と同様に行います。

【測定結果の判定法】
１．溶血度判定の結果，Ｎ抗原と血清ＡＣが(－)であれば，ＣＦ抗原を加えた血清希釈で溶血度表示4又は3を示す最高希釈倍数がＣＦ抗体価になります。
２．陽性血清対照(ＣＦ抗血清)が既知のＣＦ抗体価と1管差以内を示し，かつ，Ｃ－ＣＦ抗原対照が前記溶血度の許容範囲内を示せば，この試験の信頼性が確認されたことになります。

「判定上の注意」
以下のことを確認してください。
抗補体作用が強い場合，又は被検血清のＣＦ正常抗原に対する抗体が強い場合は判定不能となります。
1）ＣＦ抗原，ＣＦ正常抗原，ＣＦ抗血清の抗補体作用の有無を確認します。
2）被検血清のＣＦ正常抗原に対する抗体及び抗補体作用の有無を必ず確認します。

【性　能】
１．感度
自家参照抗肺炎マイコプラズマ陽性パネル血清を用いて，ＣＦ試験を行ったとき，32倍～64倍のＣＦ抗体価を示します。

２．正確性
自家参照抗肺炎マイコプラズマ陰・陽性パネル血清を用いて，ＣＦ試験を行ったとき，陰性は4倍未満であり，陽性は4倍以上のＣＦ抗体価を示します。

３．同時再現性
自家参照抗肺炎マイコプラズマ陽性パネル血清を用いて，3回，同時にＣＦ試験を行ったとき，ＣＦ抗体価のぶれは1管差以内です。

【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）検体はＨＩＶ，ＨＢＶ，ＨＣＶ等の感染の恐れが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，マスクなどを着用し，また口によるピペッティングを行わないでください。
2）検体を取扱う際には，検体が手指・衣服等に付着しないように注意し,付着した場合は速やかに消毒してください。
＊3）本品が，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。

２．使用上の注意
1）マイクロタイター法の手技，特に，ドロッパーやダイリューターの操作及び赤血球の濃度等は，試験精度の基本となるため，正しい操作の習熟が必要です。
2）本品は，指定された条件で保管し，使用期限を過ぎたものは使用しないでください。
3）容器のゴム栓は取り違えないようにしてください。
4）製造番号の異なる試薬を組み合わせたり，混ぜ合わせて使用しないでください。また，同一ロットの試薬であっても試薬間の注ぎ足しは測定誤差を生じる原因となりますので避けてください。
5）検体相互間の汚染を防ぐため,検体をサンプリングする際,同一チップの使用は避けてください。

３．廃棄上の注意

1）検体中には,感染性物質が存在する可能性がありますので,検体，廃液，使用済みの容器及び検査に使用したすべての器具類は，次のいずれかの方法で滅菌処理を行ってください。

(1)最終濃度3.5vol%グルタルアルデヒド溶液に，30分間以上浸漬する。

(2)0.5w/v%次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素5 000ppm)に，1時間以上浸漬する。

(3)121℃で，20分間以上高圧蒸気滅菌をする。

2）試薬及び器具等を廃棄する場合には，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処理してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1）貯蔵方法　10℃以下に保存

2）有効期間　1年

（ラベルに表示の使用期限内にご使用ください。）

【包装単位】

コードNo.	品　名	包　装
310880	肺炎マイコプラズマＣＦ試薬 「生研」ＣＦ抗原(凍結乾燥)	1mL分×1本

別売品

コードNo.	品　名	包　装
310637	肺炎マイコプラズマＣＦ試薬 「生研」ＣＦ正常抗原(凍結乾燥)	0.5mL分×1本
300331	肺炎マイコプラズマＣＦ試薬 「生研」ＣＦ抗血清(凍結乾燥)	1mL分×1本

【主要文献】

1）国立予防衛生研究所学友会編：補体結合反応，ウイルス実験学，総論，改訂2版，丸善，226(1973).

2）井上　榮：マイクロ法による補体結合試験，臨床検査，17.838(1973).

3）厚生省監修:補体結合反応，微生物検査必携，ウイルス・クラミジア・リケッチア検査，第3版，第Ⅰ分冊，総論，日本公衆衛生協会，31(1987).

【問い合わせ先】

デンカ株式会社　試薬学術担当

〒103-8338　東京都中央区日本橋室町二丁目1番1号

フリーダイヤル　0120-206-072

受付時間　9:00～17:00　（土日祝日・弊社休業日を除く）

＊製造販売元

デンカ株式会社

新潟県五泉市木越字鏡田１３５９番地１