

※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

組織検査用細胞性免疫キット

ヒストファイン シンプルステインMAX-PO(M)

※2025 年 2 月改訂(第 4 版)  
※2012 年 8 月改訂(第 3 版)



承認番号：21300AMZ00405000

【全般的な注意】

- 1. 本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないこと。
- 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すること。
- ※3. 電子化された添付文書の記載から逸脱した使用方法については保証しない。
- 4. ヒト由来の検体は、感染の危険があるものとして取り扱いに注意すること。
- ※5. 使用する機器の電子化された添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用すること。

【形状・構造等(キットの構成)】

| 構成試薬<br>成分                                                      | 製品区分        |             |             |              |            |
|-----------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|------------|
|                                                                 | ユニバーサル試薬    |             |             | DAB基質<br>キット | 第一<br>抗体   |
|                                                                 | 170<br>テスト  | 500<br>テスト  | 1500<br>テスト | 500<br>テスト   | 50<br>テスト  |
| 第一抗体 注1<br>※※ 抗白血球共通抗原モノクローナル<br>抗体(動物種:マウス)                    | —           | —           | —           | —            | 6mL<br>×1本 |
| 酵素標識第二抗体<br>※※ ペルオキシダーゼ標識抗マウス<br>IgGポリクローナル抗体(Fab')<br>(動物種:ヤギ) | 17mL<br>×1本 | 17mL<br>×3本 | 17mL<br>×9本 | —            | —          |
| 発色基質 注2<br>※※ 3,3'-ジアミノベンジジン・4HCl                               | —           | —           | —           | 3mL<br>×1本   | —          |
| 基質緩衝液 注2                                                        | —           | —           | —           | 3mL<br>×1本   | —          |
| 発色試薬 注2<br>※※ 過酸化水素水                                            | —           | —           | —           | 3mL<br>×1本   | —          |
| ネガティブコントロール 注3<br>マウス正常血清                                       | —           | —           | —           | —            | —          |

注1 第一抗体はヒストファイン シンプルステインMAX-PO(M)の構成試薬として販売していないので、別売りの体外診断用医薬品「ヒストファイン SAB-PO(M)キット 第一抗体」を使用すること。(下表参照)

| 構成試薬 | 製品名                   | コード    | 包装単位              |
|------|-----------------------|--------|-------------------|
| 第一抗体 | 抗白血球共通抗原<br>モノクローナル抗体 | 422071 | 50テスト<br>(6mL×1本) |

注2 発色基質、基質緩衝液、発色試薬はヒストファイン シンプルステインMAX-PO(M)の構成試薬として販売していないので、別売りの体外診断用医薬品「ヒストファイン SAB-PO(M)キット DAB基質キット」を使用すること。(下表参照)

| 構成試薬                                    | 製品名      | コード    | 包装単位   |
|-----------------------------------------|----------|--------|--------|
| 発色基質 (試薬A)<br>基質緩衝液 (試薬B)<br>発色試薬 (試薬C) | DAB基質キット | 425011 | 500テスト |

注3 ネガティブコントロールは販売していないので、自家調製すること。

【使用目的】

組織・細胞中の白血球共通抗原の検出。

【測定原理】

組織や細胞塗末標本、サイトスピン標本中の抗原同定は免疫組織学および免疫細胞学的技術によって可能になる。本品は、多数の酵素と第二抗体をアミノ酸ポリマーに結合させた試薬である酵素標識第二抗体を用いることによって、効率的にかつ鋭敏に免疫組織染色を行うことができる。

ストレプトアビジン-ビオチン (SAB) 法では第一抗体と反応後、ビオチン化第二抗体および酵素標識ストレプトアビジンとの2段階の反応が必要であるが、本品の酵素標識第二抗体はアミノ酸ポリマーに酵素と第二抗体が結合しているため、これらの操作を1段階に省略できる点がユニークな特徴である。また、アビジン-ビオチン系を使用しないため内因性ビオチンの影響を受けない。

第二抗体には免疫した動物血清より精製したIgGフラクションを消化したFab'を使用している。抗原を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製、更にこれをヒト血清タンパク質で吸収している。また、このシステムで用いる酵素はEIAグレードの西洋わさびペルオキシダーゼである。

酵素抗体法により、組織中の抗原を検出する。組織、または細胞に、まず第一抗体を反応させ、次に酵素と第二抗体を結合させたアミノ酸ポリマー (酵素標識第二抗体) を反応させる。その結果、抗原・抗体・ポリマー・酵素の複合体を形成することができる。この複合体の酵素活性を利用して基質を発色させ、抗原部位を染色する。このようにして視覚化し、光学顕微鏡観察によって抗原の有無を判定する。

※【操作上の注意】

(1)高濃度の固定液にさらしたり、長時間の固定を行ったりすると、組織崩壊や抗原変性を生じさせることがあるので、指定された固定液を使用する。

【用法・用量(操作方法)】

○検体の準備

【パラフィン包埋切片】

組織形態や抗原活性を維持した最適固定を得るため、できるだけ新鮮で小さな組織切片 (約1cm×1cm×0.5cm) の使用と、下表の固定液の使用を勧める。

| 固定液          | 固定時間    |
|--------------|---------|
| 10%(緩衝)ホルマリン | 24-48時間 |
| 20%ホルマリン     | 12-24時間 |

○切片および標本の準備

【パラフィン包埋切片】

切片を3-6μmに薄切し、スライドに付着させる。もし、熱による抗原賦活化処理やトリプシン処理を行う場合は、0.02%poly-L-lysineあるいはシランなどの組織切片用接着剤を使用する。

【検体標本スライドの準備】

検体標本スライドとして1検体あたり、2枚準備する。  
1枚は、試薬対照スライドとして、第一抗体のかわりにネガティブコントロール (マウス正常血清) を使用して染色操作を行う。

【検体対照スライドの準備】

- ・陽性対照スライド  
検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ目的抗原が存在することを確認している組織切片スライドを準備する。
- ・陰性対照スライド  
検体標本スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ目的抗原が存在しないことを確認している組織切片スライドを準備する。

以上の検体対照スライドを用意し、検体標本スライドおよび試薬対照スライドと並行して、検体の準備から染色処理、検鏡までの全工程を行う。

○操作方法

【必要な試薬、器具】

- ・キシレン
- ・100%エタノール
- ・95%エタノール
- ・3%過酸化水素加メタノール  
(30%過酸化水素水をメタノールで10倍希釈)
- ・リン酸緩衝生理食塩水(PBS)(pH7.6±0.2)
  - NaCl 7.75g
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.50g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.20g
  - 精製水1L
- ・組織切片用接着剤 (0.02%poly-L-lysine、シランなど)
- ・ネガティブコントロール (マウス正常血清)
- ・対比染色試薬
- ・光学顕微鏡
- ・精製水
- ・湿潤箱
- ・非水溶性封入剤
- ・タイマー
- ・洗浄用容器
- ・ティッシュペーパー
- ・カバーガラス

【構成試薬】

- ・第一抗体
- ・酵素標識第二抗体
- ・発色基質
- ・基質緩衝液
- ・発色試薬

【試薬の調製方法】

※(1)基質溶液の調製方法

発色基質(試薬A) 1滴(約20μL)と基質緩衝液(試薬B) 1滴(約20μL)を精製水 1mLに加え、泡立てないように注意して混合する。次に発色試薬(試薬C) 1滴(約40μL)に加え、再び泡立てないように注意して混合する。基質溶液は、遮光して冷蔵(2-8℃)保存し、調製後一週間以内に使用する。

注)混合時、溶液表面が泡立った場合は、使用時に泡を取り除くか、泡を避けて使用すること。

その他の試薬は、そのまま用いる。

## 【脱パラフィン】

### 1. キシレン処理

- (1) スライドをキシレンに3分間浸す。
- (2) 余分な液を振り払い、別のキシレンに3分間浸す。
- (3) さらにもう1つ別のキシレンで、上記ステップ1.(1)の操作をする。

### 2. エタノール処理

- (1) 100%エタノールに3分間浸す。
- (2) 余分な液を振り払い、別の100%エタノールに3分間浸す。
- (3) さらに95%エタノールで、上記のように2回処理する。

### 3. 洗浄

- (1) 余分な液を振り払い、PBSに5分間浸す。

## 【操作方法（染色手順）】

### 1. ブロッキング試薬による処理(内因性ペルオキシダーゼの除去)

- (1) 余分な水分を取り除くためスライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように、すべてのスライドをブロッキング試薬(3%過酸化水素加メタノール)に浸し、常温(15-25℃)で10-15分間反応させる。
- (3) PBSでよくすすぐ(5分間ずつ容器を2度かえるか、または洗浄びんを使用する。)

### 2. 第一抗体の添加・反応

- (1) スライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように第一抗体を2滴（100μL）検体標本スライド、陽性対照スライドおよび陰性対照スライドに滴下する。
- (3) 試薬対照スライドには、第一抗体のかわりにネガティブコントロール（マウス正常血清）を2滴（100μL）滴下する。
- (4) 常温で1時間反応させる。
- (5) PBSでよくすすぐ。

### 3. 酵素標識第二抗体の添加・反応

- (1) スライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように酵素標識第二抗体を2滴（100μL）すべてのスライドに滴下する。常温で30分間反応させる。
- (3) PBSでよくすすぐ。

### 4. 基質溶液の添加・反応

- (1) スライド上の切片周辺を注意深く拭く。
- (2) 切片が完全に覆われるように基質溶液を2滴（100μL）すべてのスライドに滴下する。常温で5-20分間反応させる。
- (3) 精製水でよくすすぐ。

## 【対比染色】

- (1) 対比染色試薬にスライドを浸す。
- (2) 流水洗す。

## 【封入】

- (1) 水洗、脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入する。

## 【測定結果の判定法】

### ○判定方法

光学顕微鏡によって陽性反応を観察する。

染色結果の判定は、3種類の対照スライドとの比較により行う。

- ・陽性対照スライド  
陽性所見が得られる。
- ・陰性対照スライド  
陽性を呈する細胞が認められない。
- ・試薬対照スライド  
陽性を呈する細胞が認められない。このスライドが染色されれば、非特異的なタンパク結合などによる非特異的反応が考えられる。

### ○判定上の留意事項

- (1) 検出結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果等とあわせて、担当医師が総合的に判断すること。
- (2) 必ず各検体対照スライドの染色結果と比較して、染色結果を判定すること。
- (3) 明瞭な染色を得るには、包埋剤を完全に除去することが大切である。パラフィンの残存物は、バックグラウンド染色を強める原因となる。
- (4) 一般的にタンパク質や基質反応生成物の非免疫的結合により、偽陽性結果が観察される場合がある。偽陽性結果は赤血球による偽ペルオキシダーゼ反応やサイトクロームCによる内因性ペルオキシダーゼ反応によっても起きることがある。
- (5) 検体組織の壊死部分は、抗体が非特異的に結合しやすく、非特異染色の原因となりやすいので、陰性対照スライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (6) 間質系のコラーゲンは固定後疎水性となって抗体と結合しやすくなり、また、陰性に帯電しているため陽性に帯電している抗体と結合しやすく、非特異染色の原因となりやすいので、陰性対照スライドと比較し、十分注意して判定すること。
- (7) 顆粒球の一部およびマクロファージなどは細胞膜表面にFcレセプターを有するため、抗体のFc部分と結合する可能性がある。抗体本来の特異的反応部位以外に染色が現れることがあるため、必ず陰性対照スライドと比較し、十分注意して判定すること。

## 【性能】

### ○性能

用法・用量の操作方法に基づいて感度試験、正確性試験および同時再現性試験を行った場合、下記の規格に適合する。

### (1) 感度

第一抗体を0.01mol/Lリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で2倍希釈したものを用い、陽性対照スライドまたはあらかじめ陽性であることが確認されている組織標本の近傍切片スライド3枚を染色する時、明らかな特異染色像(茶褐色)が観察される。

### (2) 正確性

陽性対照スライドまたはあらかじめ陽性であることが確認されている組織標本の近傍切片スライド3枚を染色する時、明らかな特異染色像(茶褐色)が観察される。第一抗体のかわりにネガティブコントロールを用いて染色する時は、特異染色像は観察されない。

### (3) 同時再現性

陽性対照スライド3枚またはあらかじめ陽性であることが確認されている組織標本の近傍切片スライド3枚を染色する時、いずれのスライドにおいても明らかな特異染色像(茶褐色)が観察される。

### ○関連性

検体100例について本品と既承認品の染色性を比較した結果を下記に示す。本品と同一の原理を用いた既承認品とを比較した場合、同等の染色結果が得られた。

| 本<br>品 | 既承認品 |    |                                                    |
|--------|------|----|----------------------------------------------------|
|        | 陽性   | 陰性 |                                                    |
|        | 50   | 0  | 陽性一致率=100%（ 50検体／ 50検体）<br>陰性一致率=100%（ 50検体／ 50検体） |
|        | 0    | 50 | 全体一致率=100%（ 100検体／ 100検体）                          |

## \*\*【使用上又は取扱上の注意】

### \*\*1. 取扱上（危険防止）の注意

- (1) ヒト由来の検体は、取り扱い者に感染を引き起こす危険性がある。従って、適切な取り扱いを必要とする。
- (2) 検体組織には、HIV、HBVなど、感染のおそれがあるので、取り扱いには十分注意すること。
- (3) 皮膚などへの接触は避けること。
- \* (4) 第一抗体にはアジ化ナトリウムが含まれているので、取り扱いに際しては十分注意すること。
- (5) 発色基質である3,3'-ジアミノベンジジン・4HClは変異原性が認められているので、取り扱いに際しては十分注意すること。
- \*\* (6) 発色試薬には過酸化水素水が含まれているので、取り扱いに際しては十分注意すること。

### 2. 使用上の注意

- (1) 試薬は2-8℃にて保存する。
- (2) すべての試薬は使用前に常温（15-25℃）に戻して使用すること。
- (3) 有効期間の過ぎた試薬は使用しないこと。
- \* (4) 他製品の試薬を混ぜて使用しないこと。
- (5) 染色過程のいかなる時点においても切片を乾燥させてはならない。試薬と反応させている間、切片を湿潤箱に入れておくこと乾燥を防ぐことができる。
- (6) 抗原は熱に弱いので、組織を包埋する際に、パラフィンの温度を58℃以上に上げてはならない。
- (7) 脱パラフィンに用いるキシレンおよびエタノールは、スライドを40枚処理するごとに取り替える。
- (8) ステロイドやその他小さな分子は、有機溶媒に極めて溶けやすく、抗原の損失を防ぐには、固定剤の選択に注意する必要がある。
- (9) 各構成試薬は、個別に補充できる。

### 3. 廃棄上の注意

- \*\* (1) キット中の第一抗体にはアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムは水道管に含まれる銅、鉛の反応によって爆発の危険性があるので、これらの試薬を排水管より処理した後は多量の水を流すこと。
- (2) 検体組織に接触した器具・試薬および試薬容器等は感染の危険性があるので、オートクレーブで120℃、20分間滅菌処理するか、または1.0V/V%次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晚処理すること。
- \* (3) 試薬が飛散した場合は、アルコールスプレーなどを用いてふき取りと消毒を行うこと。

妨害物質と問題対策

| 問題点                                  | 考えられる原因                                                                | その対策                                                                                                             |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ○陽性対照スライドおよび標本スライドの染色が認められない、あるいは弱い。 | ① 切片が乾燥している。                                                           | ・ 切片を湿潤させた後は、湿潤箱などを用いて乾燥させない。                                                                                    |
|                                      | ② 包埋剤が不適当あるいはパラフィン包埋組織からのパラフィン除去が不完全である。                               | ・ 適当な包埋剤を選択する。また、包埋組織から、パラフィンを完全に除去する。<br>・ キシレン、エタノール溶液を取り替える。                                                  |
|                                      | ③ 緩衝液中の微量のアジ化ナトリウムがペルオキシダーゼを不活性化し、染色を不可能にする。                           | ・ アジ化ナトリウムを含有しない緩衝液を使用する。<br>・ 緩衝液を取り替える。                                                                        |
|                                      | ④ 酵素や抗体反応が不十分。                                                         | ・ 各ステップでの、水分の拭き取りを完全にする。<br>・ 抗体との反応時間を十分にずる。特に、第一抗体では添付書のインキュベーション時間を守る。                                        |
|                                      | *⑤ 基質溶液の反応が不十分。                                                        | * 基質溶液を調製してから1日以上経過している場合には、基質溶液を再調製し、調製当日中に使用する。                                                                |
|                                      | *⑥ 強度が弱い原因が不明。                                                         | * 精製水1 mL に対して、発色基質(試薬A) 2 滴(約40 μ L)、基質緩衝液(試薬B) 2 滴(約40 μ L)、発色試薬(試薬C) 1 滴(約40 μ L)の基質溶液を調製し、使用する。              |
| ○陽性対照スライドは染色されるが、標本スライドは染色されない。      | ① 抗原が固定あるいは包埋過程で変性したり、マスクされている。                                        | ・ 抗原の中には、固定や包埋に敏感なものがあるので、穏やかな固定剤を使用し固定時間を短縮する。<br>・ 場合によっては、染色前に抗原を露出させるため、熱による抗原賦活化処理あるいはトリピンなどのタンパク分解酵素処理を行う。 |
|                                      | ② 自己消化により抗原が破壊されている。                                                   | ・ 可能な限り、生検あるいは外科組織を使用する。                                                                                         |
|                                      | ③ 組織に存在する抗原が少ない。                                                       | ・ インキュベーション時間を長くする。                                                                                              |
| ○全ての染色スライドのバックグラウンドが強く染色される。         | ① 内因性ペルオキシダーゼを不活性化するための処理が不十分。                                         | ・ ブロッキング試薬(3%過酸化水素加メタノール)による処理を確実にを行う。                                                                           |
|                                      | ② 非特異結合成分がある。                                                          | ・ 第一抗体の添加前に 10%ヤギ正常血清で処理する。                                                                                      |
|                                      | ③ 自己消化の結果、組織液に遊離した抗原が過剰に存在する。                                          | ・ 可能なならば、新鮮な組織を包埋する。                                                                                             |
|                                      | ④ 不完全なパラフィン除去。                                                         | ・ キシレン、エタノール溶液を取り替える。                                                                                            |
|                                      | ⑤ 不十分な抗体の洗浄。                                                           | ・ 抗体の洗浄を十分に行う。                                                                                                   |
|                                      | ⑥ 室内温度が高すぎて、酵素反応が早すぎる。                                                 | ・ 常温(15-25℃)にコントロールする。<br>・ 反応時間を短縮する。                                                                           |
| ○反応中に組織切片がスライドからはがれてしまう。             | ① 抗原によってはその同定のために、熱による抗原賦活化処理あるいは第一抗体との長時間の反応を必要とする。このような場合には、はがれ易くなる。 | * 0.02%poly-L-lysine、0.1%ネオブレン、シランなどの組織切片用接着剤を使用する。                                                              |

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法：2-8℃で保存

有効期間：製造後1年6ヶ月（使用期限は外箱に表示）

【包装単位】

| 製品名                                                 | コード    | 包装単位              |
|-----------------------------------------------------|--------|-------------------|
| ヒストファイン シンプルステインMAX-PO(M)                           |        |                   |
| ユニバーサル試薬                                            | 424131 | 170テスト (17mL×1本)  |
|                                                     | 424132 | 500テスト (17mL×3本)  |
|                                                     | 424134 | 1500テスト (17mL×9本) |
| DAB基質キット<br>発色基質 (試薬A)<br>基質緩衝液 (試薬B)<br>発色試薬 (試薬C) | 下記参照   |                   |
| 第一抗体<br>抗白血球共通抗原<br>モノクローナル抗体                       | 下記参照   |                   |

以下の製品はMAX-PO(M)キットの構成試薬として発売していないが、SAB-PO(M)キットの構成試薬が使用できる。

| 構成試薬                                    | 製品名                   | コード    | 包装単位              |
|-----------------------------------------|-----------------------|--------|-------------------|
| 発色基質 (試薬A)<br>基質緩衝液 (試薬B)<br>発色試薬 (試薬C) | DAB基質キット              | 425011 | 500テスト            |
| 第一抗体                                    | 抗白血球共通抗原<br>モノクローナル抗体 | 422071 | 50テスト<br>(6mL×1本) |

\*\*【主要文献】

- 1) Ikehara M, et al. Expression of survivin correlated with vessel invasion is a marker of poor prognosis in small adenocarcinoma of the lung. Oncol Rep. 2002 Jul-Aug;9(4):835-8.
- 2) Hoshino Y, et al. Maximal HIV-1 replication in alveolar macrophages during tuberculosis requires both lymphocyte contact and cytokines. J Exp Med. 2002 Feb 18;195(4):495-505.
- 3) Naito Z, et al. Expression and accumulation of lumican protein in uterine cervical cancer cells at the periphery of cancer nests. Int J Oncol. 2002 May;20(5):943-8.
- 4) Sawada H, et al. Characterization of an anti-decorin monoclonal antibody, and its utility. J Biochem. 2002 Dec;132(6):997-1002.
- 5) 高橋朋子 他. リンパ球系マーカーにおける免疫組織化学染色法の比較. 郡臨衛技会誌 別冊. 2001;40(1):58-61.
- 6) Kanamori Y, et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. Clin Cancer Res. 2001 Apr;7(4):892-5.
- 7) 西 国広, 太田 喜孝. IV 細胞診に用いられる染色法と実際のコツ. ～基礎から学ぶ～細胞診のすすめ方. 西 国広 編. 東京: 近代出版; 2001. p.17-22.
- 8) 川井健司 他. 3)増感法. 病理と臨床. 2000;18(臨時増刊):38-43.

問合せ先、製造販売元、販売元は裏面に記載。

【問合せ先、製造販売元、販売元】

**株式会社ニチレイバイオサイエンス** 

〒104-8402 東京都中央区築地6-19-20

TEL : 03-3248-2208 FAX : 03-3248-2243