**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

組織検査用蛋白キット

ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO(R)（ヒストステイナー用）

**2025年2月改訂(第6版)
*2013年2月改訂(第5版)

承認番号：21300AMZ00406000

【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 注1 成分	製品区分		
	ﾕﾆﾊﾞｰｻﾙ試薬 600テスト	DAB基質ｷｯﾄ注3 600テスト	第一抗体 60テスト
第一抗体 **抗S-100タンパクポリクローナル抗体(動物種：ウサギ)	—	—	12mL ×1本
酵素標識第二抗体 **ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGポリクローナル抗体(Fab') (動物種：ヤギ)	12mL ×1本 110mL ×1本	—	—
ネガティブコントロール 注2 ウサギ正常血清	—	—	—
発色基質 **3,3'-ジアミノベンジジン・4HCl	—	3mL ×2本	—
基質緩衝液	—	3mL ×2本	—
発色試薬 **過酸化水素水	—	3mL ×2本	—

注1： 各試薬は、組織切片(約1cm×1cm)あたり、100μLを設定する。
なお、各試薬は、組織の大きさに応じて200μLまで設定できるよう用意されている。
注2： 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。
注3： 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(R)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　シンプルステインMAX-PO(MULTI) DAB基質キット(ヒストステイナー用)」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) 基質緩衝液（試薬B) 発色試薬（試薬C)	DAB基質キット (ヒストステイナー用)	725191	600テスト

注)基質溶液用専用試薬ボトル(空ボトル)　2本付

【使用目的】

組織、細胞中のS-100タンパクの検出。

【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】

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

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タンパク分解酵素処理を行う場合は、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（ウサギ正常血清）を使用して染色操作を行う。

[検体対照スライドの準備]

・陽性コントロールスライド
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
・陰性コントロールスライド
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

以上の検体対照スライドを用意し、検体標本スライド及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。

[スライドバーコードラベルの印字と貼付]

(1)ヒストステイナーの操作法に従って各スライドのスライドバーコードラベルを作成する。
(2)スライドバーコードラベルをスライドのフロスト部分に貼り付ける。
この時、バーコードが切片側にくるように注意する。

○操作方法

[必要な試薬、器具･機器]

・スライドガラス
・乾燥器　・タイマー
・染色ドーゼ
・キシレン　・95%エタノール　・100%エタノール
・洗浄用容器　・洗浄ビン
・PBS(研究用試薬「PBS Code:415223」を使用することを推奨する。)
・試験管
・自動染色装置ヒストステイナーシステム
・スライドバーコードラベル(ヒストステイナー用)(Code:LV－K21004)
・試薬ボトル(ヒストステイナー用)(Code:LV - K00029)
・スライドスタンド　・精製水
・バッファー
(研究用試薬「PBS(ヒストステイナー用) Code:715224(10倍濃縮)」を使用することを推奨する。)

・ブロッキング試薬（3%過酸化水素水）
(研究用試薬「過酸化水素水(ヒストステイナー用) Code:715242」を使用することを推奨する。あるいは、30%過酸化水素水を精製水で 10 倍に希釈する。)
・ネガティブコントロール（ウサギ正常血清）
・対比染色試薬
・カバーガラス　　・封入剤(非水溶性永久封入剤)
・ティッシュペーパー　　・光学顕微鏡
・組織切片用接着剤（0.02%poly-L-lysine、シランなど）

[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) 酵素標識第二抗体の調製方法
そのまま用いる。ヒストステイナーにセットする際、110mL のボトルから 12mL のバイアルに移しかえて使用する。

*(2) 基質溶液の調製方法
発色基質、基質緩衝液、発色試薬を用いて、基質溶液を調製する。
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)を加え、再び泡立てないように注意して混合する。取り扱いに注意し、静かに基質溶液用専用試薬ボトルに移す。遮光して冷蔵(2－8℃)保存し、一週間以内に使用する。

注 1）調製日の異なる基質溶液は、混合して使用しないこと。
注 2）基質溶液用専用試薬ボトル中の液面上に泡があるとヒストステイナーのノズルが、泡の表面を液面と誤認識する事があり、その結果、液面までノズルが下がらず、設定された試薬量を採取できない場合がある。試薬を基質溶液用専用試薬ボトルに移した後やヒストステイナーにセットする前には必ず、泡の有無を確認し、泡をピペットなどで取り除いて使用すること。

その他の試薬は、そのまま用いる。

[試薬バーコードラベルの印字と貼付]
(1)ヒストステイナーの操作法に従ってネガティブコントロールの試薬バーコードラベルを作成する。また、ブロッキング試薬（3%過酸化水素水）を自家調製する場合はブロッキング試薬の試薬バーコードラベルも作成する。
(2)試薬バーコードラベルをネガティブコントロールおよびブロッキング試薬(必要な場合)を入れた試薬ボトルの上部平面部分に貼り付ける。この時、印字した文字が試薬ボトルの開口部側にくるように注意する。

[染色方法の設定]
ヒストステイナーの操作法に従って下記染色方法のプログラムを設定する。
注)(　)内の名称はヒストステイナープログラム内の「プロトコール要素」設定の際の名称である。

**(1)ブロッキング試薬(過酸化水素水)(End.Enz.Block)	5 分間
(2)バッファー(Rinse Buffer)	1 回
(3)第一抗体(Primary Antibody)	30 分間
検体標本スライド、検体対照(陽性コントロール、陰性コントロール)スライドには第一抗体、試薬対照スライドにはネガティブコントロールを反応させる。	
(4)バッファー(Rinse Buffer)	2 回
(5)酵素標識第二抗体(Labelled Polymer)	30 分間
(6)バッファー(Rinse Buffer)	2 回
(7)基質溶液(Substrate)	10 分間
(8)バッファー(Rinse Buffer)	1 回
(9)精製水(Rinse Water)	1 回

滴下する試薬の用量は、組織切片(約 1cm×1cm)あたり、100μL を推奨する。なお、各試薬は、200μL まで設定できるよう用意されている。組織切片の大きさに応じて 150μL、200μL、400μL あるいは 600μL に設定することが可能である。

**[試薬バーコードラベル]
試薬バーコードラベルを使用する場合は、自動染色装置ヒストステイナーのプログラムにバーコードラベル情報を入力する必要がある。本製品が未登録の場合は、下記データを入力(漢字のみ全角、他半角入力)し、登録すること。

専用ボトルに貼付されているバーコードラベル内の情報

登録するカテゴリ	Labelled Polymer
試薬名	ｼﾝﾌﾟﾙｽﾃｲﾝ MAX-PO(R)
試薬略称（10 文字）	MAXPO-R
バーコード	MAXPO-R
時間(分)	30

上記以外の構成試薬の試薬バーコードラベル内の情報は、各試薬の使用説明書参照のこと。

[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)余分な液を振り払い、さらに別のキシレンに 3 分間浸す。

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)余分な液を振り払い、95%エタノールに 3 分間浸す。
(4)余分な液を振り払い、別の 95%エタノールに 3 分間浸す。

3.洗浄
余分な液を振り払い、PBS またはバッファーでよくすすぐ (3 分間ずつ容器を 2 度かえるか、または洗浄ビンを使用する)。

[免疫染色の準備・開始]
(1)ブロッキング試薬、第一抗体、ネガティブコントロール、酵素標識第二抗体、基質溶液は試薬ラック(ヒストステイナー用)にセットし、バッファー、精製水は各給液ボトルにセットする。
(2)検体標本スライド、試薬対照スライド、検体対照(陽性コントロール、陰性コントロール)スライドをスライドラック（ヒストステイナー用）にセットする。洗浄ビンにバッファーを入れておき、セット後、すぐに組織が覆われるようにバッファーをかけておく。
注)染色開始までの間に切片が乾燥しないように注意する。バッファーをかけた後、30分以上放置する場合は、30分おきにバッファーを組織が覆われるようにかけること。
(3)ヒストステイナーの操作法に従って染色を開始する。

[免疫染色の終了、対比染色]
(1)全てのスライドをスライドラック（ヒストステイナー用)から取り出し、流水洗する。
(2)対比染色試薬にスライドを浸す。
(3)流水洗する。
(4)セットした試薬を試薬ラック(ヒストステイナー用) から取り出し、2－8℃で保存する。
* (5)基質溶液用専用試薬ボトルに残った基質溶液を保存せず廃棄する場合、基質溶液のみを廃棄後、ボトル内を精製水で洗浄し、完全に乾かしてボトルは再利用する。

[封入]
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。
・陽性コントロールスライド
陽性所見が得られる。
・陰性コントロールスライド
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、陰性コントロールスライドと比較し、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、陰性コントロールスライドと比較し、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、必ず陰性コントロールスライドと比較し、十分注意して判定すること。

【性能】

用法・用量の操作方法に基づいて感度試験、正確性試験及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、陽性コントロール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

陽性コントロール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

陽性コントロールスライド 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。

○相関性

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。

		既承認品	
		陽性	陰性
本品	陽性	50	0
	陰性	0	50

陽性一致率＝100%　(50 検体／ 50 検体)
陰性一致率＝100%　(50 検体／ 50 検体)
全体一致率＝100%　(100 検体／ 100 検体)

**【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)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)キット内の構成試薬は 2－8℃で保存すること。

(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)使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。

(4)染色開始前は、いかなる過程でも切片を乾燥させないようにすること。なお、バッファーを洗浄ビンに入れておき、スライドラック(ヒストステイナー用)にセットした後すぐに、組織が覆われるようにバッファーをかけておく。その後 30 分以上放置する場合は、30 分おきにバッファーを組織が覆われるようにかけること。

(5)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。

(6)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。

(7)脱パラフィンおよび封入過程で、キシレンがスライドバーコードラベルに接しないように注意する。キシレンがラベルに接すると、印字が消えやすくなる。もしラベルがキシレンで濡れたり、キシレンを取り扱った手袋で触れた場合、完全に乾燥するまでラベルに触れないようにスライドを扱うこと。

(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)構成試薬のうち、第一抗体および DAB 基質キット（発色基質、基質緩衝液、発色試薬）は個別に補充すること。

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おり、使用後は非有害廃液ボトルへ蓄積される。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、蓄積された試薬は多量の水とともに排水管へ流すこと。

(2)調製した基質溶液には 3,3'-ジアミノベンジジンが含まれており、使用後は有害廃液ボトルへ蓄積される。蓄積された試薬は各施設のルールに従い、適切に処理すること。

(3)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 1.0vol%次亜塩素酸などの消毒液に浸して一晩処理すること。

妨害物質と問題対策

問題点	考えられる原因	対策
○陽性コントロールスライド及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、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。 ・キシレン、エタノール溶液を取り替える。
	③酵素や抗体反応が不十分。	・基質溶液をヒストステイナーにセットする直前に調製する。 ・抗体との反応時間を十分にする。特に、第一抗体では指定されたインキュベーション時間を設定する。
	*④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。
	*⑤強度が弱い原因が不明。	*・精製水1mLに対して、発色基質(試薬 A)2 滴(約 40μL)、基質緩衝液(試薬 B)2 滴(約 40μL)、発色試薬(試薬 C)1 滴(約 40μL)の基質溶液を調製し、使用する。
○陽性コントロール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。
	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設定する。
○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%過酸化水素水)による指定された処理を設定する。または、設定処理時間を 5 分間から 10 分間に延長する。
	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。	・抗体の洗浄の回数を増やす。
	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。
○反応中に組織切片がスライドからはがれてしまう。	①スライドへの切片の貼り付けが不十分。	・0.02%poly-L-lysine、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 (R) (ヒストステイナー用)		
ユニバーサル試薬 酵素標識第二抗体	724142	600 テスト (12mL×1 本、110mL×1 本)
DAB 基質キット (ヒストステイナー用)	下記参照	
第一抗体 抗 S-100 タンパクポリクローナル抗体 (ヒストステイナー用) (動物種：ウサギ)	722091	60 テスト (12mL×1 本)

以下の製品はヒストファイン　シンプルステイン MAX-PO(R)の構成試薬として発売していないが、「ヒストファイン　シンプルステイン MAX-PO (MULTI) DAB 基質キット(ヒストステイナー用)」が使用できる。

製品名	コード	包装単位
DAB 基質キット (ヒストステイナー用)	725191	600 テスト
発色基質（試薬 A） 基質緩衝液（試薬 B） 発色試薬（試薬 C） 基質溶液用専用試薬ボトル		3mL×2 本 3mL×2 本 3mL×2 本 2 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】

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