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。 008

体外診断用医薬品

**2023年8月改訂（第3版）
*2019年7月改訂（第2版）

組織検査用蛋白キット

ヒストファイン BRIGHTEST EMA

認証番号：230AAEZX00102000

【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 成分	製品区分		
	BRIGHTEST (AT用) 500テスト	**DAB基質 キットII(AT用) 500テスト	第一抗体 (AT用) 50テスト
第一抗体 抗上皮膜抗原モノクローナル抗体(クローン：E29)(動物種：マウス)	—	—	6.5mL ×1本
陰性コントロール注1 マウスイムノグロブリン	—	—	—
第一ポリマー試薬（試薬A） ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGポリクローナル抗体(Fab')(動物種：ヤギ) 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)	13mL ×5本	—	—
架橋試薬（試薬B） 抗ペルオキシダーゼモノクローナル抗体(動物種：マウス)	13mL ×5本	—	—
第二ポリマー試薬（試薬C） ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG ポリクローナル抗体(Fab')(動物種：ヤギ)	13mL ×5本	—	—
**発色基質II 3,3'－ジアミノベンジジン・4HCl	—	11mL ×5本	—
**発色試薬II 過酸化水素水	—	11mL ×5本	—

**付属品	製品区分	
脱パラ溶液1	Dewax-1(AT用) 500テスト	12mL×10本
脱パラ溶液2	Dewax-2(AT用) 500テスト	10mL×10本
抗原賦活化液	TR-pH9(AT用) 300テスト	12.5mL×12本
洗浄液	TBS(AT用) (10倍濃縮液)	1L×1本

注1　陰性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、細胞中の上皮膜抗原(EMA)の検出

【測定原理】

本キットは、組織、細胞に対する免疫組織化学染色法により、組織、細胞中の上皮膜抗原(EMA：Epithelial Membrane Antigen)を検出する。染色操作は、自動染色装置(ヒストステイナーATおよびそれと同等の装置)を用いて行う。
組織または細胞に、まず第一抗体を反応させ、次に酵素と抗体を結合させたアミノ酸ポリマー(第一ポリマー試薬)を反応させる。更に、架橋試薬を反応させた後、酵素と抗体を結合させたアミノ酸ポリマー(第二ポリマー試薬)を反応させる。その結果、抗原・第一抗体・第一ポリマー試薬・架橋試薬・第二ポリマー試薬の複合体を形成させ、この複合体の酵素活性を利用して基質を発色させる。このようにして抗原部位を視覚化し、光学顕微鏡により抗原の有無を確認する。

第一抗体である抗上皮膜抗原モノクローナル抗体(クローン：E29)(動物種：マウス)は、ヒト組織中の正常上皮の上皮膜抗原(EMA)ならびに癌、中皮腫瘍、滑膜および上皮肉腫の大部分と反応する。しかし、悪性リンパ腫、メラノーマ、軟部腫瘍とは大部分反応しない。

【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が生じることがあるので、指定された固定液を使用する。
(2)抗原は熱に弱いので、組織を包埋する際には、使用するパラフィンの融解温度を大きく超えないように注意すること。
(3)薄切切片を長期保存すると、切片中の抗原が劣化して、偽陰性の染色結果を示す場合がある。薄切後4－6週間以内に染色することを推奨する。

【用法・用量(操作方法)】

○検体の準備

組織または細胞を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋(Formalin-Fixed Paraffin-Embedded：FFPE) ブロックを作製する。
組織形態や抗原活性を維持した最適固定を得るため、できるだけ新鮮な組織切片の使用と、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

固定後、水洗い、エタノールに浸して脱水、キシレンに浸して脱アルコールを行い、パラフィン浸透をしてパラフィン包埋ブロックを作製する。

○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、poly-L-lysineまたはシラン等の切片用接着剤をコーティングしたスライドに貼り付ける。37℃の恒温器で十分に乾燥させる。

[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、第一抗体の代わりに陰性コントロールを使用して染色操作を行う。

[検体対照スライドの準備]

(1)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、細胞スライドを準備する。

(2)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、細胞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。

[スライドラベルの印字と貼付]

(1)ヒストステイナーATの操作法に従って各スライドのスライドラベルを作成する。
(2)スライ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、印字文字と二次元コードが重なっていないかを確認する。
重なっていると二次元コードを読み取れない場合がある。

○操作方法

[必要な試薬、器具･機器]

・スライドガラス(poly-L-lysine またはシランコーティングスライド)
・恒温器　　・タイマー
・キシレン、アルコール(透徹用)
・洗浄用容器
・自動染色装置ヒストステイナーAT
・スライドラベル(AT 用)
・スライドスタンド　・精製水
・対比染色試薬(ヘマトキシリン)
・封入剤(非水溶性封入剤)
・カバーガラス　　・光学顕微鏡

[構成試薬]

・第一抗体　　・陰性コントロール
・第一ポリマー試薬　・架橋試薬　　・第二ポリマー試薬
**・発色基質Ⅱ　　**・発色試薬Ⅱ

** [付属品]

・脱パラ溶液 1　　・脱パラ溶液 2　　・抗原賦活化液　　・洗浄液

** [構成試薬の調製方法]

構成試薬はそのまま用いる。

[付属品の調製方法]

(1)洗浄液の調製方法
精製水で 10 倍に希釈する。

その他の付属品はそのまま用いる。

[RFID タグの登録の確認または登録]

(1)ヒストステイナーAT を用いて染色するには、専用の試薬ボトルに付属している RFID タグ内に試薬情報が登録されている必要がある。試薬情報が登録されていることを確認する。登録がない場合、ヒストステイナーAT の操作法に従って登録を行うこと。

[染色方法の設定]

染色操作は、自動染色装置(ヒストステイナーATおよびそれと同等の装置)を用いて行う。自動染色装置の詳細な設定方法は、装置のマニュアルにしたがう。

下記、染色方法のプログラムを設定する。

EMA

項目	内容
タイプ	HRP Heat
プロトコル名	EMA-AT
Dewax	Dewax2-AT
TR	TRpH9-AT
温度(℃)	101
ブロッキング	Buffer
試薬名	EMA-AT
第一抗体反応時間(分)	20
第一抗体反応温度(℃)	25

[免疫染色の準備・開始]

**(1)脱パラ溶液1、脱パラ溶液2、抗原賦活化液、洗浄液、第一抗体、陰性コントロール、第一ポリマー試薬、架橋試薬、第二ポリマー試薬、発色基質Ⅱ、発色試薬Ⅱをセットする。
(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)スライドをセットする。
(3)ヒストステイナーATの操作法に従って染色を開始する。

[免疫染色]

(1)脱パラ溶液 1 を各スライドに添加し反応させる。
(2)脱パラ溶液 2 を各スライドに添加し反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
(3)抗原賦活化液を各スライドに添加し反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
(4)第一抗体を試薬対照スライド以外の各スライドに添加し、試薬対照スライドには、第一抗体の代わりに陰性コントロールを添加し反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
(5)第一ポリマー試薬を各スライドに添加し反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
(6)架橋試薬を各スライドに添加し反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
(7)第二ポリマー試薬を各スライドに添加し反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。
**(8)発色基質Ⅱ、発色試薬Ⅱを各スライドに添加し反応させる。その後、洗浄液で洗浄する。

** [免疫染色の終了]

(1)全てのスライドをモジュールから取り出し、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)セットした試薬は、ボトルキャップをして試薬ラック(AT 用)ごと取り出し、2－8℃で保存する。

[封入]

脱水、キシレンによる透徹後、非水溶性封入剤で封入し、カバーガラスをかける。

【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。
検体組織中の上皮細胞の細胞膜や細胞質が茶褐色を呈するとき、これを陽性所見とする。

[検体対照スライド、試薬対照スライドの染色性]

・陽性コントロールスライド
上皮膜抗原(EMA)の発現がある判定結果を認める。
・陰性コントロールスライド
上皮膜抗原(EMA)の発現がある判定結果を認めない。
・試薬対照スライド
上皮膜抗原(EMA)の発現がある判定結果を認めない。このスライドに陽性所見が認められた場合、非特異的なタンパク結合による非特異的反応が考えられる。

○判定基準

(1)陽性
検体組織中に明らかな特異染色像(茶褐色)を呈している細胞がある。
(2)陰性
検体組織中に明らかな特異染色像(茶褐色)を呈している細胞がない。

[判定不可]

各対照スライドにおいて以下の結果を得た場合は、検鏡を停止し、判定をしないこと。

現象	原因
(1)陽性コントロールスライド上に陽性所見が認められない場合	・陽性コントロールスライドが不適切であった。 ・染色操作に誤りがあった。
(2)陰性コントロールスライド上に陽性所見を認めた場合	・陰性コントロールスライドが不適切であった。 ・染色操作に誤りがあった。
(3)試薬対照スライド上に陽性所見を認めた場合	・組織に対し、何らかの非特異反応があると考えられるので、本検体については判定をしないこと。

○判定上の留意事項

(1)染色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)以下のような場合には偽陽性反応が生じることが考えられるので、必ず検体対照スライドおよび試薬対照スライドの染色結果と比較して十分に注意して判定すること。
・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。偽陽性反応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。
・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。
・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。
・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。

【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)感度試験

第一抗体および、第一抗体を第一抗体希釈液にて 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とき、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。

(2)正確性試験

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とき、明らかな特異染色像(茶褐色)が観察される。第一抗体の代わりに陰性コントロールを用いて染色するとき、特異染色像は観察されない。

(3)同時再現性試験

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 枚を染色するとき、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。

注 1) 第一抗体希釈液
ウシ血清アルブミン(BSA)とアジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)

注 2) 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、細胞スライド。

○相関性

腫瘍組織および正常組織における本キットと対照品の染色性を比較した結果を下記に示す。本キットと対照品の間に良好な相関性が得られた。

対照品 1

本キット	陽性	陰性	合計
陽性	160	0	160
陰性	2	245	247
合計	162	245	407

陽性一致率＝98.8%(160 検体／162 検体)
陰性一致率＝100% (245 検体／245 検体)
全体一致率＝99.5%(405 検体／407 検体)

対照品 2

本キット	陽性	陰性	合計
陽性	160	0	160
陰性	1	246	247
合計	161	246	407

陽性一致率＝99.4%(160 検体／161 検体)
陰性一致率＝100%(246 検体／246 検体)
全体一致率＝99.8%(406 検体／407 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)検体組織には、HIV、HBV などの感染のおそれがあるので、取扱いには十分注意すること。
(2)検査にあたっては、感染の危険を避けるため、使い捨て手袋等を着用すること。
(3)試薬が皮膚などへ接触しないようにすること。
(4)第一抗体にはアジ化ナトリウムが含まれているので、取扱いに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、取扱いには十分注意すること。
**(6)発色試薬Ⅱには過酸化水素水が含まれているので、取扱いには十分注意すること。

2.使用上の注意

(1)すべての試薬は 2－8℃で保存すること。
(2)使用期限の過ぎた試薬は使用しないこと。
(3)異なるロットの試薬や他製品の試薬を混ぜて使用しないこと。

3.廃棄上の注意

(1)第一抗体にはアジ化ナトリウムが含まれており、使用後は一般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、鉛と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)発色基質Ⅱには 3,3'－ジアミノベンジジン・4HCl 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、廃棄する前に、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した後、医療廃棄物等に関する規定および水質汚濁防止法等の規制に従って処理すること。
(4)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	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チャンバーが劣化しているため、試薬が全体に広がらず、試薬の吸引および添加が不十分となり、切片が乾燥したり、反応が不十分になる。	・劣化したチャンバーは廃棄し、正常なチャンバーを使用する。
○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、固定や包埋に弱いものがあるので、穏やかな固定剤を使用し固定時間を短縮する。
		・指定された抗原賦活化処理を設定する。または設定されているかを確認する。
	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。
○全ての染色スライドのバックグラウンドが強く(弱く)染色される。	①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。
	②チャンバーが劣化しているため、染色工程の洗浄が不十分になる。	・劣化したチャンバーは廃棄し、正常なチャンバーを使用する。
	③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。
	④内因性ペルオキシダーゼの処理が不十分。	・[染色方法の設定]の「ブロッキング」に設定している「Buffer」の代わりに「H2O2-AT」を設定し、0.5%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼ処理を行う。
○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：18 ヶ月

【包装単位】

製品名	コード	包装単位
ヒストファイン BRIGHTEST EMA		
第一抗体 抗上皮膜抗原モノクローナル抗体(AT 用)	AT2202-1	50 テスト (6.5mL×1 本)
BRIGHTEST(AT 用) 第一ポリマー試薬 架橋試薬 第二ポリマー試薬	AT2449-1	500 テスト 13mL×5 本 13mL×5 本 13mL×5 本
**DAB 基質キットⅡ(AT 用) 発色基質Ⅱ 発色試薬Ⅱ	AT2541-1	500 テスト 11mL×5 本 11mL×5 本

製品名	コード	包装単位
脱パラ溶液 1 Dewax-1(AT 用)	AT1532-1	500 テスト (12mL×10 本)
脱パラ溶液 2 Dewax-2(AT 用)	AT1533-1	500 テスト (10mL×10 本)
抗原賦活化液 TR-pH9(AT 用)	AT1534-1	300 テスト (12.5mL×12 本)
洗浄液（10 倍濃縮） TBS(AT 用)	AT1537-1	1L×1 本

**BRIGHTEST(AT 用)(コード：AT2449-1)および DAB 基質キットⅡ(AT 用)(コード：AT2541-1)は、以下の製品と共通で使用できるため、組み合わせて使用する場合は、それぞれの電子化された添付文書をよく読んで使用してください。

一般的名称	販売名	承認/認証番号
クラスⅢ免疫組織学検査用シリーズ	ヒストファイン BRIGHTEST	23000EZX00044000
組織検査用細胞性免疫キット	ヒストファイン BRIGHTEST LCA	230AAEZX00078000
組織検査用細胞性免疫キット	ヒストファイン BRIGHTEST CD3(PS1)	230AAEZX00091000
組織検査用細胞性免疫キット	ヒストファイン BRIGHTEST CD3(SP7)	230AAEZX00092000
組織検査用細胞性免疫キット	ヒストファイン BRIGHTEST UCHL1	230AAEZX00100000
組織検査用蛋白キット	ヒストファイン BRIGHTEST Vimentin	230AAEZX00101000
組織検査用蛋白キット	ヒストファイン BRIGHTEST S-100	230AAEZX00104000
組織検査用細胞性免疫キット	ヒストファイン BRIGHTEST CD20(L26)	230AAEZX00105000

【主要文献】

(1) Warnke RA,et al. Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. N Engl J Med. 1983 Nov 24;309(21):1275-81.
(2) Gatter KC, et al. The differential diagnosis of routinely processed anaplastic tumors using monoclonal antibodies. Am J Clin Pathol. 1984 Jul;82(1):33-43.
(3) Pinkus GS, et al. Epithelial membrane antigen--a diagnostic discriminant in surgical pathology: immunohistochemical profile in epithelial, mesenchymal, and hematopoietic neoplasms using paraffin sections and monoclonal antibodies. Hum Pathol. 1985 Sep;16(9):929-40.
(4) Heyderman E, et al. A new monoclonal antibody to epithelial membrane antigen (EMA)-E29. A comparison of its immunocytochemical reactivity with polyclonal anti-EMA antibodies and with another monoclonal antibody, HMFG-2. Br J Cancer. 1985 Sep;52(3):355-61.
(5) Ormerod MG, et al. Epithelial membrane antigen: partial purification, assay and properties. Br J Cancer. 1983 Oct;48(4):533-41.
(6) Leong, A. S. Y.: Applied Immunohistochemistry for the surgical pathologist, 1993

【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