

## ConcizuTrace™ ELISA キット

## 【全般的な注意】

- 1.本品は体外診断用です。それ以外の目的に使用しないでください。
- 2.本品は、コンシズマブの用量調整のために血漿中のコンシズマブ濃度を測定するものですが、結果に基づく判定は、臨床症状などと合わせて担当医師が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使用方法に従って使用してください。記載された方法以外での使用については、信頼性を保証できません。
- 4.キャリブレーター及びコントロールにはヒト由来血液成分が含まれています。HBs 抗原、HCV 1/2 抗体及び HCV 抗体が陰性であることを確認していますが、これらのウイルス及び他のウイルスは、完全には否定することはできないので、感染の可能性があるものとして取り扱ってください。

## 【形状・構造等（キットの構成）】

- |                         |            |
|-------------------------|------------|
| 1) TFPI 固相化マイクロタイタープレート | 96 ウェル x 1 |
| 2) 酵素標識抗ヒト IgG 抗体       | 70 µL      |
| 3) 基質液                  | 25mL x 1   |
| 4) 洗浄液（濃縮）              | 30mL x 4   |
| 5) 緩衝液                  | 30mL x 1   |
| 6) 酸性化・中和用プレート          | 96 ウェル x 6 |
| 7) 12%酢酸液               | 20mL x 1   |
| 8) 中和液                  | 25mL x 1   |
| 9) 停止液                  | 25mL x 1   |
| 10) キャリブレーター（Level 1~8） | 500 µL x 8 |
| 11) コントロール（高・中・低）       | 500 µL x 3 |
| 12) 検体希釈液               | 5mL x 3    |

## 【使用目的】

血漿中のコンシズマブ濃度の測定（先天性血友病患者におけるコンシズマブ用量調整の補助）

## 【測定原理】

本品は、酵素免疫測定法（ELISA）を原理としたサンドイッチ法を採用している。捕捉試薬（組み換えヒト組織因子経路阻害剤（TFPI）がマイクロタイタープレートに吸着されており、これに検体中のコンシズマブが結合する。マイクロタイタープレートにホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 4 試薬を添加すると、これがマイクロタイタープレートに結合しているコンシズマブに結合し、TFPI - コンシズマブ - ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ標識抗ヒト IgG 4 抗体の複合体が形成される。洗浄後、テトラメチルベンジジン基質液を添加することにより複合体のコンシズマブを発色させ、吸光度を測定し、検体中のコンシズマブ濃度を算出する。

## 【操作上の注意】

## 測定試料の性質、採取法

検体は 3.2%クエン酸ナトリウム添加血漿を用います。別途提供している ConcizuTrace™ 採血用キットを用いて採取した検体を使用すること。

## 妨害物質・妨害薬剤

以下の物質はすべて、本品による測定を妨害しないことが認められた。

## 1) 内因性妨害物質

遊離ビリルビン（40mg/dL）、抱合型ビリルビン（40mg/dL）、ヘモグロビン（1000mg/dL）、ビオチン（19.7mg/dL）、HAMA IgG Type I（1000mg/mL）、HAMA IgG Type II（1000mg/mL）、RF IgM（1350IU/mL）、アスコルビン酸（5.25mg/dL）、トリグリセライド（1500mg/dL）、コレステロール（400mg/dL）、TFPI（500ng/mL）、尿酸（23.5ng/dL）

## 2) 外因性妨害物質

アセトアミノフェン（パラセタモール）（15.6mg/dL）、イブプロフェン（21.9mg/mL）、ナプロキサン（36.0mg/dL）、ACE 阻害剤（リシノプリル）（36.0mg/dL）、プロトンポンプ阻害剤（オメプラゾール）（0.84mg/dL）、HMG-CoA 還元酵素阻害剤（アトルバスタチン）（0.075ng/dL）、抗ヒスタミン剤（フェキソフェナジン）（0.116mg/dL）、インテグラーゼ阻害剤（ラルテグラビル）（1.5mg/dL）、プロテアーゼ阻害剤（アタザナビル）（1.95mg/dL）、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（ドラビリン）（2.886 µg/mL）、逆転写拮阻害剤（テノフォビル）（1.14 µg/mL）、過剰クエン酸ナトリウム（0.64%）、リバビリン（11.046 µg/mL）、ソフォスブビル（0.1854mg/dL）、レジバスビル（0.0969mg/mL）、ダサブビル（2 µg/mL）、ベルパタスビル（777ng/mL）、エルバスビル（362ng/mL）、グラズプレビル（495ng/mL）、N-PEG 化第 IX 因子（N9-GP SRM(499-0113)）（561IU/dL）、組換え第 VII 因子（rFVII SRM(499-0033)）（504IU/dL）、組換え第 VIII 因子（N8 SRM(499-0070)）（609IU/dL）、N-PEG 化第 VIII 因子（ツロクトコグ アルファ ペゴル、イスパロクト®(499-0083)）（594IU/dL）、組換え第 IX 因子（rFIX SRM(499-0112)）（480IU/dL）、エンテカビル（28.6ng/mL）

## 【用法・用量（操作方法）】

すべての構成試薬は、使用前に室内温度に戻すこと。マイクロタイタープレートは、粘着シールで密封しておくことを推奨する。

## 必要な器具・器材・試料等

- ①マイクロプレートリーダー
- ②プレートウォッシャー
- ③プレートシェーカー
- ④ピペット
- ⑤プレートシール
- ⑥遠心分離機

## 測定（操作）法

## i) 検体の準備

- ①検体希釈液を正確に秤量した 5mL の脱イオン水で溶解し、ローラーで 30 分間混和する。
- ②キャリブレーターとコントロールを 0.5mL の脱イオン水で溶解し、ローラーで 30 分間混和する。検体を 1000g

で 2 分間遠心分離する。遠心分離後、生成された層は、希釈ステップに進む前に除去する。キャリブレーターとコントロールは遠心分離を要さない。

- ③検体（コントロールを含む）を検体希釈液で 1:20 に希釈する。このとき、検体と希釈液を十分に混和する。キャリブレーターは希釈を要さない。

#### ii) 検体の前処理

検体の酸化/中和ステップは、一重項で行うため、各検体はマイクロタイタープレートの 1 ウエルに添加し、別途、酸性化/中和用プレートを用意する。

- ①1 ウエルにつき、60  $\mu$ L の検体を酸性化・中和用プレートに加える。ついで、12%酢酸液 30  $\mu$ L をリバースピベッティングで各ウエルに加える。
- ②酸性化/中和用プレートを密閉し、プレートシェーカーにセットして 25°C、400rpm で 30 分間インキュベートする。
- ③1 ウエルにつき、200  $\mu$ L の中和液を加える。
- ④酸性化した検体 50  $\mu$ L を中和液に加える。ピペットで吸引、排出を繰り返して酸性化検体と中和液をよく混和する。
- ⑤酸性化・中和用プレートを密閉し、プレートシェーカーにセットして 25°C、350rpm で 30 分間インキュベートする。

#### iii) 検体の添加

- ①30mL の希釈液・洗浄液（濃縮）を 220mL の脱イオン水で希釈し、静かに混和し、250mL の洗浄液使用液とする。
- ②TFPI 固相化マイクロタイタープレートを、自動プレート洗浄機を用い、洗浄液使用液で 4 回洗浄する。最終洗浄後、プレートを傾け、リントフリーのティッシュペーパーに吸引させて残留している洗浄液使用液を除去する。
- ③検体を酸性化・中和用プレートから TFPI 固相化マイクロタイタープレートに移行させるにあたっては、酸性化・中和用プレートの 1 ウエル内の検体を TFPI 固相化マイクロタイタープレートの 2 ウエルに分注する。
- ④酸性化・中和用プレートから 1 ウエルあたり 100  $\mu$ L の検体を TFPI 固相化マイクロタイタープレートの 2 ウエルに、プレートプランにしたがって、分注する。このとき、ピペット内で検体を上下させよく混和させる。
- ⑤TFPI 固相化マイクロタイタープレートを密封し、プレートシェーカー上で 25°C、350rpm で 1 時間、インキュベートする。
- ⑥酵素標識抗ヒト IgG 抗体を緩衝液で 5000 倍に希釈、ローラー上で 10 分間混和する。
- ⑦TFPI 固相化マイクロタイタープレートを自動プレートウォッシャーを用いて、洗浄液使用液で 4 回洗浄する。4 回目の洗浄後、プレートを反転させたり、またリントフリーのティッシュペーパーに吸引させて、残留している洗浄液使用液を除去する。

#### iv) 酵素標識抗ヒト IgG 抗体の添加

- ①希釈した酵素標識抗ヒト IgG 抗体を 1 ウエルにつき 100  $\mu$ L ずつマルチチャンネルピペットを用い、リバースピベッティングにて、バブルが生じないように注意して添加する。
- ②TFPI 固相化マイクロタイタープレートを密封し、プレートシェーカー上で 25°C、350rpm で 1 時間インキュベートする。
- ③TFPI 固相化マイクロタイタープレートを自動プレートウォッシャーを用いて、洗浄液使用液で 4 回洗浄する。4 回目の洗浄後、プレートを反転させたり、またリントフリーのティッシュペーパーに吸引させて、残留している洗浄液使用液を除去する。

#### v) 基質液の添加

- ①基質液を 1 ウエルにつき 100  $\mu$ L ずつ、マルチチャンネルピペットを用い、リバースピベッティングにて、バブルが生じないように注意して添加する。
- ②TFPI 固相化マイクロタイタープレートを密封し、25°C で 5 分間、振盪せず、遮光して、インキュベートする。

- ③停止液を 1 ウエルにつき 100  $\mu$ L ずつ、基質液を添加した順番どおりに、マルチチャンネルピペットを用い、リバースピベッティングで、バブルが生じないように注意して添加する。このとき、十分に混和されることに留意する。

- ④停止液添加後 15 分以内にプレートリーダーを用いて、バックグラウンドリファレンスを 620nm として、450nm で吸光度を測定する。

#### vi) キャリブレーション

キットに含まれるキャリブレーターを用いてプレート毎にキャリブレーションを実施し、解析ソフトウェアにて検量線を作成する。ソフトウェアにより、以下の手順でコンシズマブ濃度が算出される。

- ①マイクロタイタープレートリーダーで読み取った吸光度 (OD) につき、キャリブレーター、コントロール及び検体の各平均吸光度を計算する。
- ②キャリブレーターの吸光度がキャリブレーター濃度に対してプロットされ、検量線が作成される。
- ③検量線より、コントロールと検体の吸光度から、濃度を逆算する。希釈係数 ( $\times 20$ ) を乗じて、検体中に存在するコンシズマブの濃度 (ng/mL) が得られる。

## 【臨床的意義】

コンシズマブは、皮下投与の組織因子経路インヒビター阻害薬（販売名：アレモ皮下注、製造販売元：ノボ ノルディスクファーマ株式会社）で、インヒビターを保有または保有していない血友病 A 及び血友病 B 患者の治療薬として開発され、血友病患者の出血傾向の抑制を適応としている。血友病は、希少疾患であり、生命を脅かす重篤な出血性疾患である。コンシズマブは、血液凝固第 VIII 因子インヒビターを保有している血友病 A 患者及び血液凝固第 IX 因子インヒビターを保有している血友病 B 患者の出血を防止または出血頻度の減少のための日常的な予防法として用いられる。

コンシズマブによる治療の有効性と安全性を担保するため、用量の調整が重要と認められ、コンシズマブ治療中の患者の血漿中コンシズマブ濃度の測定が必要となったため、本品によるコンシズマブの血漿中濃度測定が必要とされる。

## 【性能】

### 性能

- 1) 感度試験  
管理用検体 (SS) を本品 3 ロットを用い、1 ロットにつき 3 回、1 回につき二重測定で 8 回試験するとき、測定値の %CV は  $\leq 20\%$ 、%RE は  $\leq \pm 20\%$  である。
- 2) 正確性試験  
管理用検体 (PM1-3) を本品 3 ロットを用い、1 ロットにつき 3 回、1 回につき二重測定で 8 回試験するとき、各 %RE は  $\leq \pm 15\%$  である。
- 3) 同時再現性試験  
精度管理用検体 (PM1-3) を二重測定で 8 回試験するとき、各精度管理用検体の %CV は、 $\leq 15\%$  である。

用いた較正用基準物質は以下のとおり。

管理用検体(SS):本品の定量限界の濃度 94.21ng/mL に調整した感度試験用検体

管理用検体(PM1):キットに含まれるコントロール(低)コンシズマブ濃度 188.42ng/mL

管理用検体(PM1):キットに含まれるコントロール(中)コンシズマブ濃度 1381.52ng/mL

管理用検体(PM1):キットに含まれるコントロール(高)コンシズマブ濃度 3413.52ng/mL

- 2) 測定範囲  
102.04 ng/mL - 4640 ng/mL

## 相関性試験成績

対照法（コンシズマブ第3相臨床試験で用いられた Celerion 社のクリニカルテストアッセイ（CTA））と本品との相関性を検討したところ以下の結果が得られた。

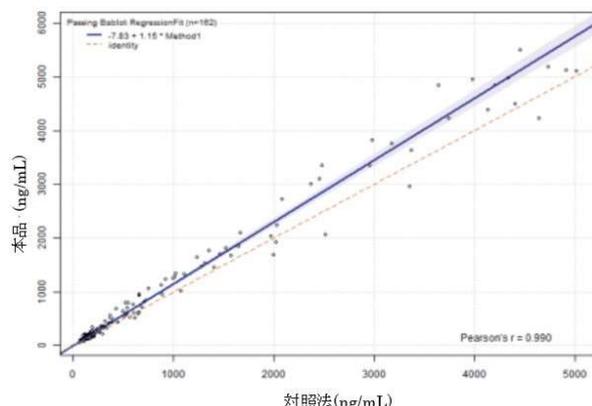


図 1 本品と対照法の測定結果をプロットし、Passing-Bablok 法 95%信頼区間にて解析

各容量判定ポイント濃度ごとの一致率を検討したところ、以下の結果が得られた。

表 1

		対 照 法			TOTAL
		>4000 ng/mL	200- 4000 ng/mL	<200 ng/mL	
本 品	>4000 ng/mL	23	4	0	27
	200- 4000 ng/mL	0	83	13	96
	<200 ng/mL	0	3	51	54
	TOTAL	23	90	64	177

## 【使用上又は取扱い上の注意】

### 取扱い上（危険防止）の注意

1. 検体は HIV、HBV、HCV 等の感染の危険性があるものとして取り扱ってください。感染の危険を避けるため、ラボ用ガウン、使い捨て手袋を着用し、口でのピペティングは行わないでください。
2. 試薬が口や目に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流し、必要があれば医師の診察を受けてください。
3. 希釈液・洗浄液（濃縮）には、保存剤が含まれているので、飲み込んだり、皮膚や粘膜への接触を避けてください。
4. すべての生物学的物質、化学物質は、地域の規制に従って廃棄してください。
5. 本品は、本品の使用目的のためだけに、適切な検査室で有資格の検査技師が使用してください。
6. 停止液及び 12% 酢酸液は、皮膚に触れたり、目に入ったりしたら、水で十分に洗い流してください。

## 使用上の注意

1. マイクロタイタープレートのアルミホイルに損傷がないか、水分の混入した痕跡がないか、チェックしてください。
2. 外箱記載の使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
3. 異なるロットのキットの中の試薬を組み合わせ使用しないでください。

## 廃棄上の注意

使用後の構成成分を廃棄する場合は、廃棄物に関する規定に従って処理してください。

## 【貯蔵方法、有効期間】

### 貯蔵方法

2～8℃で保管

### 有効期間

6か月

## 【包装単位】

34 検体用

## 【主要文献】

### 主要文献

- 1) World Federation of Hemophilia. Annual Global Survey 2022.
- 2) Srivastava A, et al. WFH Guideline for the Management of Hemophilia, 3<sup>rd</sup> edition. Haemophilia. 2020
- 3) Male C, Anderson NG, Rafowicz A, et al. Inhibitor incidence in an unselected cohort of previously untreated patients with severe haemophilia B: a PedNet Study. Haematologica. 2021 Jan;106(1):123-129
- 4) 血液凝固異常症 令和 4 年度報告書、公益財団法人エイズ予防財団 令和 5 年 3 月 20 日

## 【問い合わせ先】

コージンバイオ株式会社  
埼玉県坂戸市千代田 5-1-3  
電話 049-284-3761

## 【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

選任製造販売業者  
パシフィックブリッジメディカル株式会社  
東京都港区東新橋 2-10-10 東新橋ビル  
電話 03-6809-1123  
販売元  
コージンバイオ株式会社  
製造元  
Randox Laboratories Ltd. (UK)

**RANDOX**