使用に際してはこの添付文書をよくお読みください。
また、必要な時に読めるように保管しておいてください。

U8A02T
体外診断用医薬品
製造販売承認番号：20900AMZ00310000

＊＊2019年 3月改訂（第7版）
＊2014年11月改訂（第6版）

サイトメガロウイルス抗原キット

CMV抗原テスト「ＦＲ」

白血球中サイトメガロウイルス（CMV）抗原の検出キット

■全般的な注意

（1）本製品は体外診断用であり、それ以外の目的には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）添付文書以外の使用方法については保証をいたしません。
（4）本試薬および検体は、感染の危険性があるものとして十分に注意して取扱ってください。
（5）使用する機器の添付文書および取扱説明書をよく読んでから使用してください。
（6）本製品には、過酸化水素および保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれていますので、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、必要に応じて医師の手当て等を受けてください。

■形状・構造等（キットの構成）

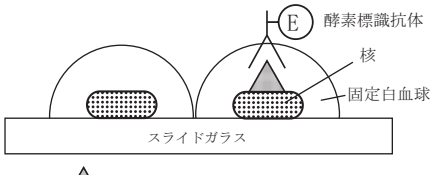
以下8種類の試薬が含まれており、1キット50回用である。
①㊎内因性ペルオキシダーゼ不活化液A …… 3mL×1本
過酸化水素30%
②内因性ペルオキシダーゼ不活化液B …… 3mL×1本
③酵素標識抗体液 …… 3mL×1本
ペルオキシダーゼ標識ヒト抗サイトメガロウイルス初期抗原p65モノクローナル抗体を含みます。
④発色剤（凍結乾燥品） …… 2mL用×5本
3、3’-ジアミノベンジジン-四塩酸塩
⑤基質液 …… 12mL×1本
過酸化水素
⑥カウンター染色液 …… 4mL×2本
⑦封入液 …… 4mL×1本
⑧洗浄用緩衝液用剤 …… 1L用×5袋

■使用目的

白血球中サイトメガロウイルス（CMV）抗原の検出

■測定原理

本法はペルオキシダーゼ標識ヒト抗CMVp65抗原モノクローナル抗体を用いて、末梢血白血球のCMVp65抗原を検出する直接免疫染色法です[(1)、(7)]。
スライドガラス上に固定した白血球細胞検体に、酵素標識したヒト抗CMVp65抗原モノクローナル抗体を反応させることにより、抗原抗体複合体を形成させます。
次いで、酵素反応系により発色させて、光学顕微鏡下で発色した細胞核を観察することにより、固定した白血球中のCMV抗原陽性細胞を検出します。
測定原理を図1に示します。CMV抗原陽性細胞のみがヒト抗CMVp65抗原モノクローナル抗体と反応し、標識した酵素により発色します。したがってこの発色した細胞の核を検出することによりCMV抗原陽性細胞の検出が可能です。



：CMVp65抗原
図1．CMV抗原陽性細胞の検出原理

■操作上の注意[(8)、(9)]

1．測定試料の性質、採取法

（1）本キットによる検出にはEDTA加血液を用いてください。クエン酸加血液およびヘパリン加血液については検討しておりません。
（2）血液は常温保存し、白血球固定は採血から24時間以内に行ってください。24時間以内に白血球固定ができない場合は、採血後全血のまま冷蔵保存し、48時間以内に固定を行ってください。

2．妨害物質・妨害薬剤

（1）本キットによる検出は、乳び（ホルマジン濁度）3000度、ビリルビン（FおよびC）0.2mg/mLまで影響を受けません。
（2）本キットによる検出はガンシクロビル25μg/mL、シクロスポリン10μg/mLまで影響を受けません。

3．その他

（1）試薬および反応液は、保存中や反応中は直射日光を避けてください。
（2）試薬の取扱い時には、汚染に注意し、濁りなどの異常が生じた場合には使用しないでください。
（3）基質溶液は使用直前（10分前）に調製し、速やかに使用してください。（1時間以上経過したものは着色しますので使用しないでください。）
（4）カウンター染色液は、保存中に結晶を生じることがありますが、測定には影響ありませんので、そのままご使用ください。

■用法・用量（操作方法）

1．試薬の調製方法

（1）キットに含まれる試薬の調製法（50回用）

No.	試薬	成　分	剤型	数量		調製方法
1	内因性ペルオキシダーゼ不活化液A	過酸化水素30%	水溶液3mL	1本	⇒	内因性ペルオキシダーゼ不活化液AおよびBを各々0.5mLずつ採取し、メタノール150mLに添加混合して調製し、内因性ペルオキシダーゼ不活化用メタノール溶液とします。
2	内因性ペルオキシダーゼ不活化液B	アジ化ナトリウム他	水溶液3mL	1本		
3	酵素標識抗体液	ペルオキシターゼ標識ヒト抗CMV初期抗原p65モノクローナル抗体他	水溶液3mL	1本	⇒	常温に戻した後、そのまま使用します。
4	発色剤	3、3’-ジアミノベンジジン-四塩酸塩他	凍結乾燥品	5本	⇒	発色剤1本に基質液2mLを添加溶解して調製し、基質溶液とします。（必要量を使用10分前に調製し、遮光保存します。）
5	基質液	過酸化水素他	水溶液12mL	1本		
6	カウンター染色液	ヘマトキシリン他	水溶液4mL	2本	⇒	常温に戻した後、そのまま使用します。
7	封入液	グリセロール他	水溶液4mL	1本	⇒	常温に戻した後、そのまま使用します。
8	洗浄用緩衝液用剤	リン酸一ナトリウム他	粉末	5袋	⇒	1袋を精製水1Lに溶解して調製し、洗浄用緩衝液とします。

（2）キットに含まれない試薬の調製法
白血球分離に用いるデキストラン液および赤血球溶血試薬は、以下の処方で調製してください。
①白血球分離用5%デキストラン液…2～8℃保存
デキストラン5g（富士フイルム和光純薬：白血球分離用）、NaCl 0.9gに精製水を加えて総量100mLに調製する。
②赤血球溶血試薬…2～8℃保存
NH_4Cl 8.3g、$KHCO_3$ 1.0g、EDTA・2Na 40mgに精製水を加え、総量1000mLに調製する。

2．必要な器具・器材・試料等（50回用）

5%デキストラン液	約25mL
赤血球溶血試薬	約150mL
アセトン	約750mL
メタノール	約750mL
細胞分離用0.01Mリン酸緩衝液（PBS.pH7.2）	約125mL
精製水	約3L
ワックスペン	1本
スライドガラス	50枚
サイトスピン	1台
カバーガラス	50枚
スライドガラス立て	1台
染色用ガラス容器	3個
マイクロピペット（100μL）	1本
マイクロピペット（500μL）	1本
マイクロピペット用チップ	必要量
プラスチックチューブ（10mL）	100本
湿潤箱	1台
光学顕微鏡	1台
血球計算盤	1台

3. 操作法

（1）白血球分離

ＥＤＴＡ加血液約３ｍＬをプラスチックチューブに分取し、ＰＢＳを1.5mL（血液量の1/2）加えて希釈する。

⇩

これに、5%デキストラン液を0.5mL（血液量の1/6）添加混和する。

⇩

３７℃の恒温槽中で、プラスチックチューブを約４５度に傾け、１５～２０分静置し、赤血球沈渣との境界面に存在する白血球層を別のプラスチックチューブに分取する。

⇩

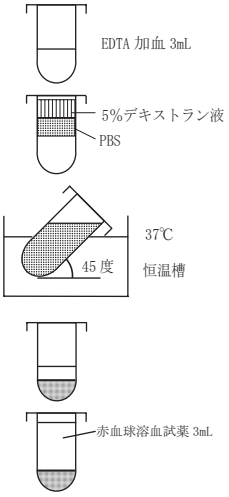
常温で１２００ｒｐｍ（３００Ｇ）×10分間遠心分離し、上澄みを除去して沈渣を残す。

⇩

これに氷冷した赤血球溶血試薬を3mL（血液と同量）加え、４℃で4～６分間静置して赤血球を溶血させる。

⇩

常温で１２００ｒｐｍ（３００Ｇ）×10分間遠心分離し、上澄みを除去する。白血球の分離操作中、赤血球溶血が不十分な時には赤血球溶血試薬の添加、遠心分離操作を繰り返す。



（2）白血球固定

沈渣を1mLのＰＢＳに懸濁させる。血球計算盤により、細胞数を計測し、ＰＢＳで1.5×10^{6}個/mLに希釈し、１００μＬをサイトスピンに５００～５５０ｒｐｍで5分間かけて、スライドガラス上に細胞を固着させる。

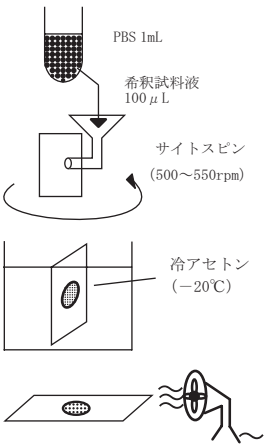
⇩

スライドガラスを冷アセトンに10分間浸漬し固定する。

⇩

常温で10分間風乾した後、スライドガラス上の細胞固定面を囲むようにワックスペンでマークする。

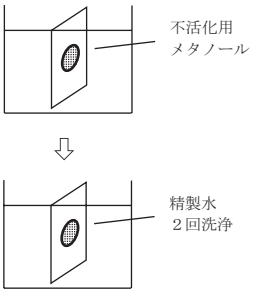
白血球固定後7日以内（室温保存）に次の染色操作を行う。



（3）染色操作

内因性ペルオキシダーゼ不活化反応

内因性ペルオキシダーゼ不活化用メタノール溶液（２５～３５℃）にスライドガラスを１００秒間浸漬した後、精製水で静かに洗浄し、更に1回新しい精製水で洗浄する。



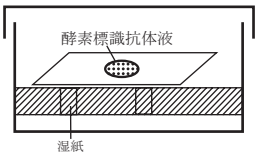
（4）CMV抗原抗体反応

スライドガラスに酵素標識抗体液５０μＬ（1滴）を添加し、細胞固定面全体に広げ、湿潤液中（１５～３７℃）で６０分間反応させる。

⇩

洗浄用緩衝液で静かに洗浄する。更に2回、新しい洗浄用緩衝液を用いて繰り返す。この操作を５分以内に行う。

⇩

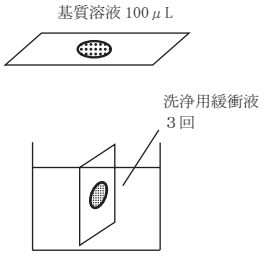


染色反応

スライドガラスに基質溶液１００μＬ（２滴）を添加し、１５～３７℃で１０分間反応させる。

⇩

洗浄用緩衝液で静かに洗浄する。更に2回、新しい洗浄用緩衝液を用いて繰り返す。この操作を５分以内に行う。

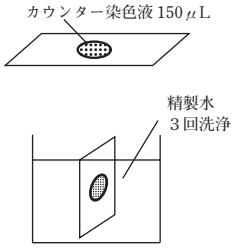


カウンター染色

スライドガラスにカウンター染色液１５０μＬ（３滴）を添加し、常温で３０秒間染色する。

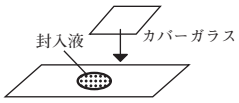
⇩

精製水で静かに洗浄する。この操作を更に2回、新しい精製水を用いて繰り返す。



細胞の封入

スライドガラスに封入液を５０μＬ（１滴）添加し、カバーガラスをのせて封入する。



（5）陽性細胞の観察

固定したスライドガラス上の白血球を光学顕微鏡を用いて、核が染色されたＣＭＶ抗原陽性細胞の有無を観察する。

■測定結果の判定法

1. CMV抗原血症の判定法

スライドガラス上にＣＭＶ抗原陽性細胞が1個以上検出された場合はCMV抗原血症陽性、検出されなかった場合は陰性と判定する。

■臨床的意義

参考データ

（1）臨床試験の実施方法

骨髄移植、生体肝移植、腎移植症例および健常人から採血し、本キットを用いてＣＭＶ抗原血症を検出した。一方、不明熱、白血球減少症、血小板減少症、間質性肺炎、肝炎、腎症、胃腸炎等の臨床症状を呈した症例について、その原因がCMV感染症か非CMV感染症かを以下のように判定した。

- ●CMV感染症の判定：ＣＭＶ抗体価の上昇、尿中または血中からのＣＭＶ検出、抗ＣＭＶ剤による治療効果、等によりCMVが原因と判断できた場合。
- ●非CMV感染症の判定：CMV以外の起因ウイルスや細菌の検出、抗生剤等による治療効果、病理組織学的検査によるＧＶＨＤの確認、等によりＣＭＶ以外の原因によると判断できた場合。
- ●併発例の判定：上記両判定を満たす症例は併発例とし、ＣＭＶ感染症とした。

（2）臨床試験結果の概略[(2)、(3)、(4)、(6)、(7)]

①骨髄移植、生体肝移植、腎移植を対象とした臨床試験で上記の方法によりＣＭＶ感染症と判定された症例の本キットによるＣＭＶ抗原血症陽性率は骨髄移植９４％（３１/３３）、生体肝移植１００％（１３/１３）、腎移植７８％（7/9）であった。非CMV感染症と判定された症例の陽性率は4％（３/８４）であった。このことから本キットによるＣＭＶ抗原血症の検出はCMV感染症の鑑別診断に有用と考えられた。

②CMV感染症と判定され、症状が認められる1週間前に検査が行われた症例の本キットによるＣＭＶ抗原血症陽性率は骨髄移植８８％（１４/１６）、腎移植８３％（５/６）であった。

③骨髄移植、生体肝移植、腎移植を対象とした臨床試験で上記の発熱等の臨床症状を呈しなかった症例の本キットによるＣＭＶ抗原血症陽性率は、骨髄移植１２％（４/３４）、生体肝移植２５％（２/８）、腎移植４０％（４/１０）であった。ＣＭＶ抗原血症陽性の場合には、その他の検査成績や基礎疾患の病状等を合わせて、総合的に判定してください。なお、健常人の陽性率は0％（０/２６）であった。

④本キットによりＣＭＶ抗原血症が検出された症例における、陽性化後のＣＭＶ感染症発症率は以下のとおりであった。

	2週間後の発症率	4週間後の発症率
骨髄移植症例	４８％（11/２３）	６５％（15/２３）
腎移植症例	６０％（6/10）	６０％（6/10）

また、本キットでＣＭＶ抗原血症が陰性で、検査から２週間以内のＣＭＶ感染症発症率は骨髄移植で６％（５/８３）。腎移植で２５％（２/８）であった。

⑤骨髄移植症例において、CMV感染症発症後、経時的に本キットによる検査が継続された２６症例のCMV抗原血症陽性率を以下に示した。

	発症時	治療中	症状消失時
抗原血症陽性率	92%（24/26）	83%（15/18）	39%（10/26）

以上のようにCMV感染症の症状消失時にはCMV抗原血症の陽性率は低下した。

⑥移植後、経時的に本キットでCMV抗原血症を検査した症例においてCMV抗原血症が初めて検出される時期およびCMV感染症の発症時期を検討した。

CMV抗原の陽性化が認められた時期は骨髄移植後２～１１週間目（37/39）、腎移植後２～６週間目（１２/１３）に、一方、CMV感染症の発症時期は骨髄移植後３～１３週間目（２８/３３）、腎移植後３～６週間目（9/9）にそれぞれ集中していた。

■性能

１．性能

（1）感度

①■**用法・用量（操作方法）**に従い、サイトメガロウイルス（CMV）感染細胞を含まない試料を試験した時、CMV抗原陽性細胞を認めません。

②■**用法・用量（操作方法）**に従い、CMV感染細胞を含む試料を試験した時、CMV抗原陽性細胞を認めます。

（2）正確性

■**用法・用量（操作方法）**に従い、水痘帯状疱疹ウイルス（VZV）感染細胞を含む試料を試験した時、CMV抗原陽性細胞を認めません。

（3）同時再現性

■**用法・用量（操作方法）**に従い、CMV感染細胞を含む試料を8回同時に試験する時、すべての試験においてCMV抗原陽性細胞を認めます。

■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）検体中にはHBV、HIV、HCVなどの存在が考えられますので、検体の取扱いには十分に注意してください。

（2）本キットの内因性ペルオキシダーゼ不活化液Bおよび封入液は、保存剤としてアジ化ナトリウムを含んでいます。誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で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。

（3）内因性ペルオキシダーゼ不活化液Aは３０％過酸化水素（劇薬）です。ゴム手袋、保護メガネの着用など必要な安全対策をとり、注意して取扱ってください。

２．使用上の注意

（1）添付文書に記載された方法に従って使用してください。

（2）本キットは入手後、２～8℃に保存し、保存条件を厳守してください。

（3）本キット内の試薬を白血球中サイトメガロウイルス（CMV）抗原の検出以外の目的で使用しないでください。

（4）使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。

（5）キット内の試薬は正確な反応が得られるように組み合わせてありますので、製造番号の異なる試薬を組み合わせて使用しないでください。また、同一製造番号の試薬であっても試薬をつぎ足すことは行わないでください。

（6）未開封でも、保存温度が守られなかったものの使用は避けてください。

３．廃棄上の注意

（1）使用した試薬、廃液および器具類は、次亜塩素酸剤などによる消毒や、オートクレーブ処理（１２１℃、２０分間以上）を行ってください。

（2）本キットの内因性ペルオキシダーゼ不活化液Bおよび封入液は、保存剤としてアジ化ナトリウムを含んでいますので、廃棄する際には爆発性の金属アジドが生成されないように多量の水で流してください。

（3）使用後の容器、試薬、廃液および器具等を廃棄する場合には、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

１．貯蔵方法

２～8℃で保存（凍結を避けて保存すること）

２．有効期間

１８ヵ月（外箱に表示された期間内に使用すること）

■包装単位

５０回用

■主要文献

1）Yoshito Eizuru et al.：Rapid Diagnosis of Cytomegalovirus Infections by Direct Immunoperoxidase Staining with Human Monoclonal Antibody against an Immediate Early Antigen. Microbiol. Immunol. 35, 1015-1022 (1991)

2）Hisashi Gondo et al.：Cytomegalovirus (CMV) antigenaemia for rapid diagnosis and monitoring of CMV-associated disease after bone marrow transplantation. British Journal of Haematology 86, 130-137 (1994)

3）正岡　徹、他：HRP-C7を用いた骨髄移植後のサイトメガロウイルス感染症の早期診断とモニタリング ；今日の移植　9 (4), 397 - 405 (1996)

4）猪股裕紀洋、他：サイトメガロウイルス（CMV）抗原血症を指標とした生体部分肝移植後のCMV感染症の早期発見とモニタリング　今日の移植　7 (5), 481-486 (1994)

5）花房秀次、他：AIDSに合併したサイトメガロウイルス（CMV）感染症の早期診断および治療効果判定におけるCMV 抗原検索の有用性　感染症学雑誌68 (9), 1105-1112 (1994)

6）高橋公太、他：HRP-C7を用いた腎移植後のサイトメガロウイルス（CMV）抗原血症のモニタリング：CMV感染症の発症予知診断　今日の移植　9 (4), 407-416 (1996)

7）菅野　徹、他：HRP-C7を用いた直接免疫染色ペルオキシダーゼ法によるサイトメガロウイルス抗原血症の検出　今日の移植　9 (4), 387-395 (1996)

8）峰松俊夫、他：抗サイトメガロウイルス・ヒトモノクローナル抗体F (ab')$_2$分画を用いた直接免疫ペルオキシターゼ法による抗原陽性白血球検出法の基礎的検討 感染症学雑誌　68 (10), 1278-1284 (1994)

9）社内資料

■問い合わせ先

＊＊富士レビオ株式会社　お客様コールセンター
TEL：0120-292-832

■製造販売元

富士レビオ株式会社
＊東京都八王子市小宮町５１番地

富士レビオ株式会社