

****使用に際してはこの電子添文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。**

Q L O G T

**2022年 5月改訂 (第6版)
*2018年 2月改訂 (第5版)

体外診断用医薬品

製造販売承認番号：21800AMY10083000

ベータクロスラプスキット

フレライザ®βクロスラプス®-N

血清又は血漿中のβクロスラプス測定用

■全般的な注意

1. 本試薬は体外診断用であるため、それ以外の目的には使用しないでください。
2. 本書以外の使用方法については保証を致しません。
3. 本試薬で骨吸収抑制剤投与の効果および経過観察を初めて行う場合、被験者の治療の有無を確認してください。特に、カルシウム代謝に影響する薬剤の服用は、少なくとも1ヵ月の休薬期間が、ビスフォスフォネートの服用は、6ヵ月以上の休薬期間が必要とされています。
4. 本試薬は治療開始前後の測定値変化を観察するため、治療開始前の検体採取は必ず行い、βクロスラプス値を予め測定しておいてください。なお、骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン(2004年度版)¹⁾では、「骨吸収マーカーの変動幅が大きい場合には治療開始前に2回以上測定し、平均値をベースラインとするのもよい」とされており、基礎値(治療前値)は正確性を期する目的にて、採取時間を一定に保って一個人の異なる2検体以上の測定を行い、平均値を基礎値(治療前値)とすることをお奨めします。また、経過観察に用いる検体は、治療開始前と同一の条件で検体採取を行ってください。
5. 食事摂取の有無が本試薬の測定結果に影響を与える可能性があることが報告されています²⁾。検体採取を行う前日夜から採血前まで食事摂取の有無に配慮してください。
6. 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。

■形状・構造等(キットの構成)

1. 反応プレート(平底プレート、8ウエル×12)
ストレプトアビジン結合ウェルです。
2. βクロスラプス標準液A(液状、5mL×1本)
3. βクロスラプス標準液B(液状、0.4mL×1本)
4. βクロスラプス標準液C(液状、0.4mL×1本)
5. βクロスラプス標準液D(液状、0.4mL×1本)
6. βクロスラプス標準液E(液状、0.4mL×1本)
7. βクロスラプス標準液F(液状、0.4mL×1本)
βクロスラプス標準液A～Fの濃度はラベルに印字されております。
8. 標準コントロール(液状、0.5mL×1本)
標準コントロールの濃度はラベルに印字されております。
9. ビオチン化抗体(液状、0.25mL×1本)
ビオチン化抗βクロスラプスモノクローナル抗体(マウス)を含みます。
10. 酵素標識抗体(液状、0.25mL×1本)
ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ標識抗βクロスラプスモノクローナル抗体(マウス)を含みます。
11. 反応用緩衝液(液状、19mL×1本)
12. 基質液(液状、12mL×1本)
テトラメチルベンジジン(TMB)を含みます。
13. 反応停止液(液状、12mL×1本)
14. 洗浄液(液状、20mL×1本)
○ 付属品：シーリングテープ

■使用目的

血清又は血漿中のβクロスラプスの測定

■測定原理

「フレライザβクロスラプス-N」は酵素免疫測定法(Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)を用いたβクロスラプス測定用の試薬です^{3), 4)}。
ストレプトアビジンを結合させたプレート(固相)に検体と2種類の抗体混合液(ビオチンを結合させたβクロスラプスに対するモノクローナル抗体およびホースラディッシュペーパーオキシダーゼ(HRP)を標識したβクロスラプスに対するモノクローナル抗体)を加えて反応させます。プレート上のストレプトアビジンに結合したビオチン化モノクローナル抗体上で、検体中のβクロスラプスを介してHRP標識したβクロスラプスに対する抗体との抗原抗体複合体が形成されます。未反応のHRP標識抗体を洗浄除去した後、テトラメチルベンジジン(TMB)を加えて酵素反応を行います。固相上に結合した検体中のβクロスラプス量は、酵素反応による発色の度合いに反映されますので、これを測定することによりβクロスラプス濃度の測定を行うことができます。

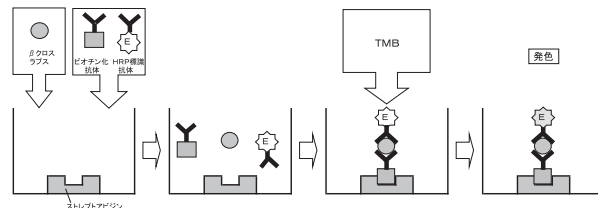


図1 反応原理

■操作上の注意

1. 測定検体の性質、採取法

- (1) 検体には血清または血漿(EDTA-二カリウム)を用い、赤血球・その他の有形成分が含まれている場合は遠心、除去したのち検査に使用してください。また、可能なかぎり新鮮な検体を使用し、保存する場合は-20℃以下で凍結保存してください。
- (2) 不活性化(非働化)された検体は検査結果に影響を及ぼす可能性がありますので使用しないでください。

2. 妨害物質・妨害薬剤

- (1) 検体にビリルビンF、ビリルビンC、ヘモグロビン、中性脂肪を添加して試験した結果、それぞれ18.9mg/dL、21.8mg/dL、470mg/dL、2890濁度まで測定値に影響ありませんでした。
- (2) 検体にEDTA-二カリウムを添加して試験した結果、10mg/mLまで測定値に影響ありませんでした。

3. 操作上の留意事項

- (1) 全ての試薬は、使用する前に室温に戻してから使用してください。
- (2) 本試薬の測定にあたっては操作方法欄の操作手順を守ってください。また、分注操作は測定精度に影響を与えますので正確に行い、検体相互間の汚染による誤差を防ぐために検体ごとに新しいチップを使用してください。
- (3) 検体および標準液は二重測定をお奨めします。
- (4) 反応時間(第一反応2時間、酵素反応15分)および反応温度(18～22℃)を厳守してください。また、一定間隔で試薬を分注し、同じ順番および同じ間隔で洗浄または反応停止液を分注してください。
- (5) 洗浄操作は精度に影響を与えることがありますので、正確に行ってください。また、洗浄後はプレート表面が乾燥しないように速やかに次の操作に進んでください。
- (6) 呈色後は2時間以内に測定を終了してください。
- (7) 金属イオンは基質液に影響を及ぼしますので注意してください。
- (8) 試薬の保存時および操作中は強い光を当てないように注意してください。
- (9) 本試薬の使用に際して機器を用いる場合は、その取扱説明書に従って使用してください。
- (10) 本キットは製造番号毎に正確な結果が得られるように管理されておりますので、製造番号の異なる試薬を組合せて使用しないでください。
- (11) 標準曲線は測定毎に作成してください。

■用法・用量(操作方法)

1. 試薬の調製法

- 各構成試薬は、試験に用いる前に室温に戻してから使用してください。
- (1) 反応プレート
必要な数のモジュールを反応プレートのフレームにセットします。未使用のモジュールは保存袋に戻し、密封して冷蔵保管してください。
 - (2) ビオチン化抗体、酵素標識抗体、反応用緩衝液
ビオチン化抗体、酵素標識抗体および反応用緩衝液を1:1:100の割合で混合し、反応用混合液とします。反応用混合液は、試験開始30分以内に必要量を調製し、残液は廃棄してください。
 - (3) 洗浄液
洗浄液(濃縮液)を精製水で51倍に希釈し、調製済み洗浄液とします。
 - (4) βクロスラプス標準液A～F、標準コントロール、基質液および反応停止液はそのまま使用してください。

2. 必要な器具・器材

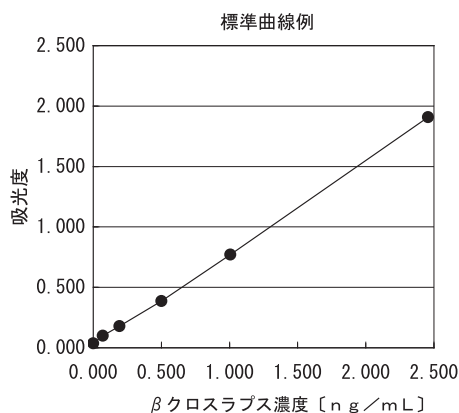
- (1) メスシリンダー（1 L）
- (2) マイクロピペット（50 μ L、100 μ L、300 μ L）
- (3) マルチピペット（100～150 μ L）
- (4) ピペット（5 mL～20 mL）
- (5) 洗浄液および反応用混合液用のボトルまたはビーカー
- (6) インキュベーター（18～22℃）
- (7) 水平振盪機
- (8) マイクロプレートリーダー（450 nm、二波長で測定する場合は650 nmを副波長としてください）
- (9) グラフ用紙

3. 測定法

- (1) 検体、標準コントロールまたは β クロスラプス標準液A～Fを50 μ Lとり、反応プレートの各ウェルに分注します。
- (2) 各ウェルに反応用混合液を150 μ L加えて混和し、シーリングテープをして18～22℃で振盪させながら2時間反応させます。
- (3) 調製済み洗浄液で洗浄（洗浄液量 約0.35 mL）を5回繰り返し行います。
- (4) 各ウェルに基質液を100 μ L加えて混和し、シーリングテープをして18～22℃で暗所に振盪させながら15分間反応させます。
- (5) 反応停止液を100 μ L分注し、2時間以内に主波長450 nm、副波長650 nmにおける吸光度を測定します。

4. β クロスラプス濃度の算出法

- (1) β クロスラプス標準液A～Fの吸光度の平均値を求めます。
- (2) グラフ用紙を用いて、横軸に β クロスラプス濃度（ng/mL）、縦軸に β クロスラプス標準液の吸光度の平均値をプロットして標準曲線を作成します。



- (3) 各検体の吸光度の平均値を求めます。
- (4) 検体の吸光度と得られた標準曲線を用いて、検体濃度を求めます。
- (5) 標準曲線の測定範囲を超える検体は正確な値を求めるために、 β クロスラプス標準液Aで希釈して再測定してください。

■測定結果の判定法

1. 判定

- (1) 参考基準値
閉経前健康女性91例（30～44歳）、閉経後健康女性49例（44～83歳）および健康男性60例（40～60歳代）を対象として、日本骨粗鬆症学会の骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用ガイドラインの解析手順に従い参考基準値を求めたところ、表1の結果となりました（横浜市立大学および川崎医科大学検討成績^{5) 6)}）。

表1 単位: ng/mL

	例数	平均値	参考基準値
閉経前健康女性 (30～44歳)	91例	0.255	0.100～0.653
閉経後健康女性 (44～83歳)	49例	0.345	0.115～1.030
健康男性 (40～60歳代)	60例	0.408	0.196～0.845

- (2) カットオフ値

本品の使用目的は、「骨粗鬆症におけるホルモン補充療法（Hormone Replacement Therapies, HRT）およびビスフォスフォネート療法等、骨吸収抑制能を有する薬物療法の治療効果判定または治療経過観察を行うことであり、治療開始前および治療開始3ヵ月から6ヵ月後の測定値を比較する事により行うこと」です。すなわち、治療開始前および治療開始3ヵ月から6ヵ月後に血清または血漿中の β クロスラプスの測定を行い、得られた測定値を用いて次の式にて変化率（%）を算出します。

$$\text{変化率 (\%)} = \frac{\text{治療前測定値} - \text{治療後測定値}}{\text{治療前測定値}} \times 100$$

算出された変化率（%）の低下が、26.7%以上の場合には「治療効果あり」と判定し、26.7%未満の低下の場合には「治療効果なし」と判定します。

と判定します。

カットオフ値（26.7%）の設定には、閉経前健康人女性10名から1日1回、不連続の5日間、ほぼ同一時間に採血した血清検体を用い、日差変動および個人間差を考慮して、平均CV値+2SD（26.7%、表2）をカットオフ値としました。

なお、カットオフ値は試験に用いた集団により異なることがありますので、設定した26.7%は参考カットオフ値とし、必要に応じて各施設で独自の値を設定することをお奨めします。

表2 参考カットオフ値の検討

測定回数 被験者	1日	2日	3日	4日	5日	平均値	SD	CV (%)
被験者A	0.161	0.144	0.203	0.123	0.141	0.1544	0.0303	19.6
被験者B	0.123	0.137	0.122	0.118	0.118	0.1236	0.0078	6.3
被験者C	0.702	0.818	0.799	0.747	0.785	0.7702	0.0462	6.0
被験者D	0.381	0.300	0.292	0.222	0.362	0.3114	0.0631	20.3
被験者E	0.458	0.323	0.234	0.384	0.332	0.3462	0.0825	23.8
被験者F	0.149	0.153	0.152	0.143	0.146	0.1486	0.0042	2.8
被験者G	0.382	0.389	0.375	0.280	0.284	0.3420	0.0550	16.1
被験者H	0.174	0.170	0.152	0.166	0.164	0.1652	0.0083	5.0
被験者I	0.180	0.178	0.174	0.177	0.152	0.1722	0.0115	6.7
被験者J	0.378	0.332	0.379	0.401	0.379	0.3738	0.0253	6.8
単位: ng/mL 被験者10名の平均年齢は31歳						平均CV	11.3	
						CV値のSD	7.71	
						平均CV+2SD	26.7	

- (3) 判定

β クロスラプス変化率陽性（骨吸収抑制効果あり）：

HRTまたはビスフォスフォネート療法の効果判定で、投与後の β クロスラプス値の減少率が基礎値（治療前値）より26.7%以上の時は陽性と判定します。

β クロスラプス変化率陰性（骨吸収抑制効果なし）：

HRTまたはビスフォスフォネート療法の効果判定で、投与後の β クロスラプス値の減少率が基礎値（治療前値）より26.7%未満の時は陰性と判定します。

2. 判定上の注意

本試薬の測定結果は臨床所見および他の診断結果と合わせて判断し、本測定結果のみで治療の開始および変更は行わないでください。

■臨床的意義

β クロスラプスは1994年デンマークのC. Christiansenらにより、骨のI型コラーゲンのC末端テロペプチド領域の分解産物として発見され⁷⁾、骨吸収の定量的指標として臨床応用が進められてきました⁸⁾。 β クロスラプスは骨吸収過程において、骨マトリクスI型コラーゲンが破骨細胞由来のカテプシンKおよびその他の非特異的プロテアーゼの作用により分解されて生じるペプチド断片のうち、アスパラギン酸（D）が β 転移したEK AHD β GGRの8個のアミノ酸配列の名称です⁹⁾。本試薬はこの β クロスラプスペプチドをC末端に持つ様々な分子量の血中ペプチドを特異的に測定します（図2）。血中 β クロスラプスは骨吸収を特異的かつ鋭敏に反映し、骨吸収抑制療法の治療効果判定（骨塩量改善効果の早期予測）および治療経過観察に有用です¹⁰⁾。

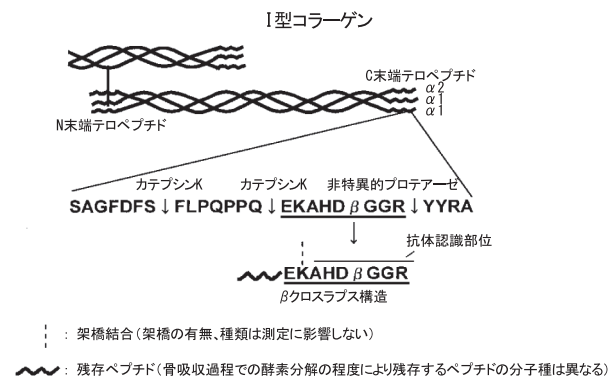


図2 β クロスラプスの基本構造および由来⁷⁾

■性能

1. 性能

- (1) 感度

β クロスラプス標準液Aおよび β クロスラプス標準液Fを所定の操作で測定するとき、 β クロスラプス標準液Aの吸光度が0.15未満であり、 β クロスラプス標準液Fの吸光度は0.6以上になります。

- (2) 正確性

自家管理検体3例を所定の操作で測定するとき、測定値は各管理値に対して $\pm 20\%$ 以内になります。

- (3) 同時再現性

自家管理検体を所定の操作で5回繰返し試験する時、変動係数（CV値）は10%以下になります。

- (4) 測定範囲

本品の測定範囲は、0.075 ng/mL～約2.5 ng/mL（ β ク

ロスラブ標準液Fの表示値^(注))です。
注) バイアルラベルの表示をご参照ください。

2. 相関性試験成績

- (1) 対照品との相関性試験成績
同一人から採取した尿と血清のペア検体60例を用いて本品と対照品(フレライザβクロスラプス、ELISA法)における相関性を検討したところ、回帰式 $y = 0.001x + 0.136$ 、相関係数 $r = 0.837$ の結果が得られました。

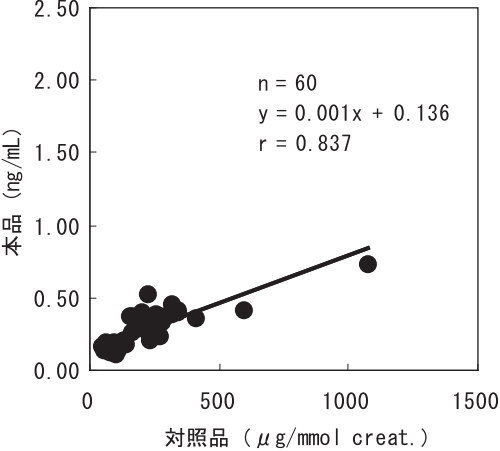


図3 対照品との相関性

本品と対照品の測定対象物質は同一のβクロスラプスですが、測定に使用する検体が異なるため、測定単位も異なりβクロスラプスの存在濃度も異なります。
そこで、骨粗鬆症患者におけるHRTまたはビスフォスフォネート治療時に対照品と同時に測定を行い、骨吸収抑制療法の治療効果判定(骨塩量改善効果の早期予測)および治療経過観察としての有用性の比較を行いました。HRT治療(エストラジオール投与)群118例およびビスフォスフォネート治療(アレンドロネート投与)群37例、未治療群(プラセボ投与)群53例について、対照品と本品での測定を行い、対照品では33%以上の測定値の減少が認められたものを治療効果ありと判定し、本品では26.7%以上の測定値の減少が認められたものを同様に治療効果ありと判定しました。

表3 HRTおよびビスフォスフォネート治療における対照品と本品の治療効果判定結果の一致率

		対 照 品		合 計
		治療効果あり (33%以上)	治療効果なし (33%未満)	
本 品	治療効果あり (26.7%以上)	141	8	149
	治療効果なし (26.7%未満)	3	3	6
合 計		144	11	155

表4 未治療(プラセボ投与)群における対照品と本品の治療効果判定結果の一致率

		対 照 品		合 計
		治療効果あり (33%以上)	治療効果なし (33%未満)	
本 品	治療効果あり (26.7%以上)	5	3	8
	治療効果なし (26.7%未満)	4	41	45
合 計		9	44	53

対照品および本品にて治療効果があると判定された場合を陽性、治療効果がないと判定された場合を陰性とする、HRTおよびビスフォスフォネート治療群における陽性一致率は97.9%(141/144例)で、未治療(プラセボ投与)群での陰性一致率は93.2%(41/44例)でした。

- (2) 血清と血漿における相関性試験成績
同一人から採取した血清と血漿(EDTA—二カリウム)のペア検体55例を使用し、本品での相関性を検討したところ、回帰式 $y = 1.065x + 0.009$ 、相関係数 $r = 0.954$ と良好な相関性が得られました。

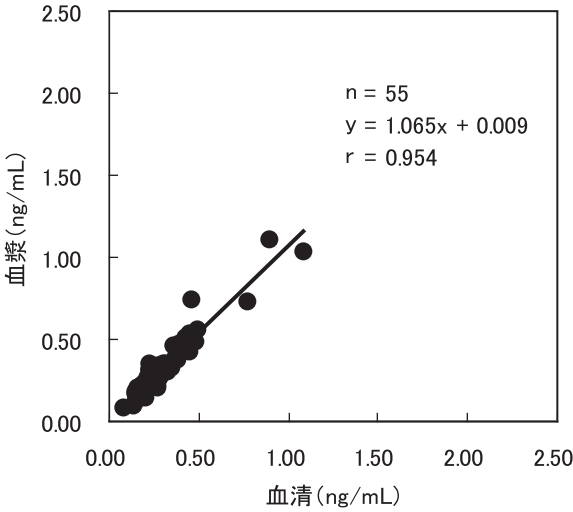


図4 血清と血漿の相関性

3. 血中βクロスラプスの測定値の日内変動

血中βクロスラプスの測定値の日内変動に関しては、伊藤らの報告では、βクロスラプスを含め骨代謝マーカーには日内変動があり、測定値に大きな影響を及ぼす。すべての骨代謝マーカーは夜間に増加し、2:00~8:00の間にピークに達する。その後は急速に減少し、13:00~23:00の間で最低レベルに達する。絶食中は血中βクロスラプスの変動が著しく減少する。したがって、臨床場において骨代謝マーカーを測定する際には、日内変動の影響を減じるために検体採取の時刻を一定に保つ事が重要である、と述べられています¹⁾。さらに、Stephan Cの報告でも同様に、血中βクロスラプスの値は昼間が低く深夜から早朝が高値となっており、前夜からの絶食(22:00~08:00)によりこの変動が減少していました²⁾。

■使用上又は取扱い上の注意

1. 取扱い上(危険防止)の注意

- 検体中にはHBV、HCV、HIVなどが存在する場合がありますので、検体の取扱いには十分注意してください。また、使用した器具(ピペット、試験管など)、廃液、チップ、プレートなどは、次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度 1000ppm、1時間以上浸漬)、グルタールアルデヒド(2%、1時間以上浸漬)などによる消毒のほかオートクレーブ(121℃、20分以上)による滅菌や焼却などの処理を行ってください。
- 基質液および反応停止液は皮膚や粘膜につかないよう注意し、万一接触した場合にはすばやく大量の水で洗い流してください。
- 試薬が誤って目や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当等を受けてください。

2. 使用上の注意

- 本試薬内の構成試薬を血中βクロスラプス測定以外の目的に使用しないでください。
- 試薬は微生物に汚染されないよう注意してください。もし混濁が見られた場合は廃棄してください。
- 一度使用したモジュールは再使用しないでください。未使用のモジュールは保存袋に戻し、密封して冷蔵保管してください。
- 本試薬の保存条件は厳守してください。特に、凍結しないように注意してください。

3. 廃棄上の注意

試薬および容器等を廃棄する場合は、廃棄物に関する規程に従って、医療廃棄物または産業廃棄物等区別して処理してください。

■貯蔵方法・有効期間

1. 貯蔵方法

2~10℃で保存してください。

2. 有効期間

1年

使用期限については、各構成試薬の外箱および容器の表示をご参照ください。

■包装単位

96ウェル (Code No. : 290644)

■主要文献

1. 日本骨粗鬆症学会：骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用に関する指針検討委員会：骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン(2004 年度版). Osteoporosis Japan, 12(2), 191-207. 2004.
2. Stephan C.: Circadian Valiation in Serum CrossLaps Concentration Is Redused in Fasting Individuals. Clin Chem. 46(3): 431, 2000.
3. Christian R, et al.: Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. Clin Chem. 44(11): 2281- 2289, 1998.
4. 和田直子、他：血中 β クロスラプス測定試薬「フレライザ[®] β クロスラプス[®]-N」の基礎的検討. 医学と薬学, 56(3), 463-471, 2006.
5. Nomura Y et al: Study of the distribution by age group of serum cross-linked C-terminal telopeptide of type I collagen and procollagen type 1 N-propeptide in healthy Japanese women to establish reference values. Journal of Bone and Mineral Metabolism, 31: 644-651, 2013.
6. 曾根照喜、他：血中 β クロスラプス測定試薬「フレライザ β クロスラプス-N」およびIntact PINP 測定試薬「プロコラーゲンIntact PINP」による男性の基準値, 18(3), 207-214, 2010.
7. Martin B, et al.: Immunoassay for Quantifying Type I collagen degradation products in urine evaluated. Clin Chem. 40(11): 2022-2025, 1994.
8. Martin B, et al.: Applications of an enzyme immunoassay for a new marker of bone resorption (CrossLaps): follow-up on hormone replacement therapy and osteoporosis risk assessment. J Clin Endocrin Met. 80(3): 864-868, 1995.
9. Christian F, et al.: Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen. J Biol Chem. 272(15): 9755-9763, 1997.
10. Stephan C, et al.: Clinical evaluation of the Serum CrossLaps One Step ELISA, a new assay measuring the serum concentration of bone-derived degradation products of type I collagen C-telopeptides. Clin Chem, 44(11): 2290-2300, 1998.
11. 伊藤祐司、他：福永仁夫編「実践骨代謝マーカー」、第Ⅲ章骨代謝マーカーの各論：臨床応用、2 骨吸収マーカー、3.CTX、3 日内変動、161-162. メディカルレビュー社

■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

■製造発売元

富士レビオ株式会社
**神奈川県相模原市中央区田名塩田 1 丁目 3 番 1 4 号

