

*肝細胞増殖因子キット

イムニス® HGF EIA

肝細胞増殖因子 (HGF) 測定用キット

本試薬は、添付文書をよく読んでから使用すること。

【一般的な注意】

1. 本キット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. 本添付文書に記載された使用方法に従って使用すること。記載された使用目的及び用法・用量以外での使用については、測定結果の信頼性を保証しかねる。
4. 使用する機器の添付文書又は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)】

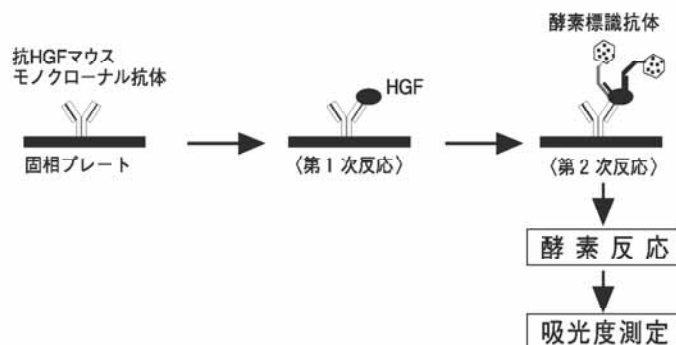
1. 抗HGF抗体固相プレート (8ウェル×12) 1枚 (抗HGFマウスモノクローナル抗体)
2. HGF標準液 1 (0 ng/mL) 0.5 mL × 1本
HGF標準液 2 (0.1 ng/mL) 0.5 mL × 1本
HGF標準液 3 (0.3 ng/mL) 0.5 mL × 1本
HGF標準液 4 (1.0 ng/mL) 0.5 mL × 1本
HGF標準液 5 (3.0 ng/mL) 0.5 mL × 1本
3. 検体希釈液 15 mL × 1本
- **4. 酵素標識モノクローナル抗体 10 mL × 1本 (ペルオキシダーゼ標識抗HGFマウスモノクローナル抗体)
5. 酵素基質 30 mL × 1本 (過ほう酸ナトリウム)
6. 発色剤 4錠 (o-フェニレンジアミン・二塩酸塩錠剤)
7. ㊟ 反応停止液 6 mL × 1本 (2 mol/L 硫酸)
8. 洗浄原液 (20倍濃縮液) 25 mL × 2本
付属品: プレートシール 3枚

【使用目的】

血清中の肝細胞増殖因子 (HGF) 濃度の測定

**【測定原理】

酵素免疫測定法 (EIA) を応用した本測定系は、遺伝子組換えにより産生されたHGFを免疫原として得られたマウスモノクローナル抗体を使用し、二段階の抗原抗体反応と酵素呈色反応とからなる。第1次抗原抗体反応では、プレートに固相された抗HGFマウスモノクローナル抗体と被検検体中のHGFとを反応させ、第2次抗原抗体反応では、固相抗体に結合したHGFと酵素標識抗体 (ペルオキシダーゼ標識抗HGFマウスモノクローナル抗体) とを反応させる。その後、酵素反応により、検体中のHGF量に応じて呈色物質が生成される。一定時間で反応を停止させて吸光度を測定する。
HGF標準液を用いて検量線を作成し、検量線より検体中のHGF濃度を求める。



【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法
 - (1) 採血は溶血を避け、速やかに血清分離を行うこと。本キットによる測定は血清を用いること。
 - (2) 採血および検体の保存には、ポリプロピレン製チューブ、ポリエチレン製チューブ又はシリコンコートしたガラス製チューブを使用すること。
 - (3) 検体は、4℃で1週間保存できる。1週間以上保存する場合は、-20℃以下で保存する。なお、検体の凍結融解の繰り返しは避けること。
 - (4) 被検検体を冷蔵、冷凍保存した場合は室内温度に戻してから使用すること。
 - * (5) 未使用の発色剤は、乾燥剤とともにアルミ袋に入れ、チャックをして密封後、2～10℃で保存すること。
2. 妨害物質・妨害薬剤
乳ビ1,500度 (ホルマジン濁度数)、ビリルビンC 4.0 mg/dL、ビリルビンF 20.0 mg/dL、溶血ヘモグロビン 500 mg/dLの濃度までは影響がない。
3. その他
 - (1) 測定器具の精度を確認し、各器具の操作法に従い測定すること。
 - (2) 検査に用いる器具は、よく洗浄し、精製水でよく濯いだものを使用すること。
 - * (3) 抗HGF抗体固相プレートに白い粉が付着していることがあるが、測定には影響がない。
 - (4) 検体ごと及び試薬ごとにマイクロピペットのチップを替えること。
 - (5) HGF標準液用ウェルは、測定ごとに設けること。
 - (6) 検体の添加後、ピペッティングにより十分攪拌し、検体濃度を均一にすること。
 - (7) 操作開始後は定められた時間で速やかに全操作を行うこと。
 - (8) 1次、2次の抗原抗体反応および酵素反応は20～30℃の範囲で行うこと。
 - * (9) 発色剤の形状 (白色の錠剤) に何らかの異常 (錠剤の溶解、黄色～褐色の変色、形状の崩れ) が発見された場合は、その錠剤を使用しないこと。
 - * (10) 有機溶剤を含む発色剤、テトラメチルベンチジン (TMB) を使用した他のELISA測定系と同じ場所で酵素反応を行うと、発色剤 (OPD) の反応が阻害され、測定に影響を与えることがある。
 - (11) 酵素反応停止後、2時間以内に吸光度を測定すること。
 - (12) 操作中、プレートを強くこすったり、底面に触れないこと。又、ウェル内面が乾燥しないように注意すること。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法

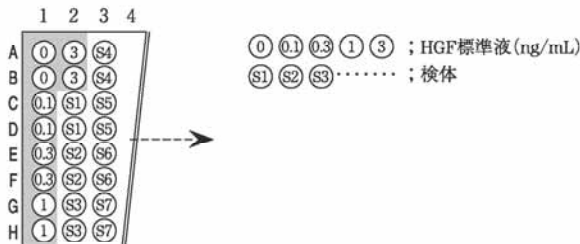
- (1) 酵素基質液（発色剤含有）
調製は使用の直前（約15分前）に行う。
酵素基質 3 mL に発色剤 1 錠を加えて暗所に静置し、錠剤が完全に溶解したのを確認した後、よく混合する。使用するウェルの数に応じて必要量を調製する。調製した酵素基質液は 60 分以内に使用すること。
- (2) 洗浄液
洗浄原液を精製水で 20 倍に希釈する。未使用の洗浄液は 2~10℃ で保存すること。
- キットの試薬及び洗浄液（2~10℃ で保存）は使用前に必ず 20~30℃ に戻すこと。
- プレートは着脱式で 12 分割が可能である。必要数を使用し、未使用のものは乾燥剤とともにアルミ袋に密封し、2~10℃ で保存する。

2. 必要な器具・器材・試料等

- (1) マイクロピペット 50 μL、100 μL
- (2) メスピペット 10 mL
- (3) メスシリンダー 1 L
- (4) マイクロプレート振盪器
- (5) アスピレーター及びポリ洗浄瓶又はマイクロプレートウォッシャー
- (6) 暗箱（暗い戸棚又は引き出しでも可）
- (7) マイクロプレートリーダー（主波長 492 nm 又は 490 nm、副波長 620 nm 以上 / 2 波長測定の場合）
- (8) 両対数方眼紙

3. 測定（操作）法

測定は原則として二重以上で行うことが望ましい。
下図に示すように、測定ごとに HGF 標準液用ウェル（2 ウェル × 5 種 = 10 ウェル）を設けて測定すること。



- (1) 検体希釈液の添加
プレートの HGF 標準液用及び検体用ウェルに検体希釈液を 50 μL ずつ加える。
- (2) HGF 標準液及び検体の添加
HGF 標準液用ウェルに各標準液を 50 μL ずつ加える。また、検体用ウェルには検体を 50 μL ずつ加える。（高値検体の希釈）
検量線の上限を超える可能性のある検体は、検体希釈液を用いてあらかじめ適宜希釈してから測定すること。
- (3) 第 1 次反応
プレート上面に添付のプレートシールを貼り、マイクロプレート振盪器に固定して、20~30℃ で 1 時間振盪する（200~700 rpm）。
- (4) 洗浄
プレートシールをはがし、ウェルの内容物をアスピレーターで吸引除去する。
プレートの各ウェルを、ポリ洗浄瓶を用いて「1. 試薬の調製方法 (2)」で調製した洗浄液で満たし、プレートを逆さにして洗浄液を振り流す。この洗浄操作を 5 回繰り返して行う。マイクロプレートウォッシャーを用いて洗浄する場合も 5 回洗浄すること。
最後に清潔なペーパータオル上でプレートを逆さにして叩き、ウェルから十分に洗浄液を除く。
○ 洗浄操作中、プレートのウェル内面が乾燥しないように注意し、洗浄終了後は迅速に次の操作を行うこと。
- (5) 酵素標識モノクローナル抗体の添加
全ウェルに酵素標識モノクローナル抗体を 100 μL ずつ加える。

- (6) 第 2 次反応
プレートシールを貼り、マイクロプレート振盪器に固定して、20~30℃ で 1 時間振盪する。
- (7) 酵素基質液（発色剤含有）の調製
第 2 次反応終了の約 15 分前に、「1. 試薬の調製方法 (1)」の順序に従って酵素基質液（発色剤含有）を調製する。
- (8) 洗浄
(4) と同じ手順でプレートを洗浄する。
- (9) 酵素基質液（発色剤含有）の添加
(7) で調製した酵素基質液（発色剤含有）を全ウェルに 100 μL ずつ加える。
- (10) 酵素反応
プレートを暗所に入れて、20~30℃ で 30 分間静置する。
- (11) 反応停止液の添加
全ウェルに反応停止液 50 μL を加えてよく混合する。
- (12) 吸光度の測定
マイクロプレートリーダー（主波長 492 nm 又は 490 nm）で各ウェルの吸光度を測定する。2 波長測定の場合の副波長は 620 nm 以上とする。

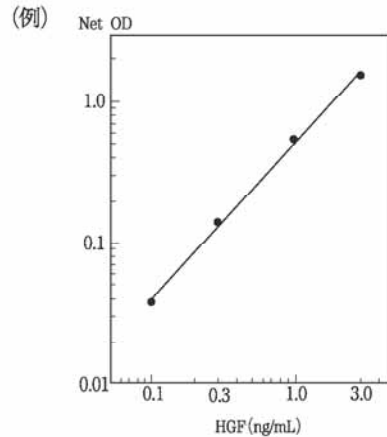
割付と手順

	HGF 標準液	検体*
1	1A~1H, 2A, 2B	2C~12H
2	HGF 標準液及び検体の添加 検体希釈液 HGF 標準液 検体*	50 μL — 50 μL
3	第 1 次反応	20~30℃、1 時間振盪
4	洗 浄	5 回繰り返す
5	酵素標識モノクローナル抗体の添加	100 μL
6	第 2 次反応	20~30℃、1 時間振盪
7	洗 浄	5 回繰り返す
8	酵素基質液（発色剤含有）の添加	100 μL
9	酵素反応	20~30℃、30 分静置
10	反応停止液の添加	50 μL
11	吸光度の測定	主波長 492 nm 又は 490 nm（副波長 620 nm 以上）
12	結果の判定	

*又は検体希釈液で希釈したもの

【測定結果の判定法】

1. 測定系の確認と特異的吸光度（Net OD）の算出
 - (1) HGF 標準液 1（0 ng/mL）の吸光度が 0.050 未満であることを確認する。
 - (2) HGF 標準液 1 の吸光度の 2 ウェルの平均値を算出する。もし 2 ウェルのうち、いずれか一方が 0.050 以上となった場合には、平均せずに 0.050 未満の吸光度を使用する。2 ウェル共に吸光度が 0.050 以上となった場合には、再測定すること。
 - (3) 各ウェルの吸光度から HGF 標準液 1 の吸光度の平均値を差し引いて、各ウェルの Net OD を算出する。
2. HGF 標準液による検量線の作成及び HGF 濃度の算出
 - (1) 両対数グラフの X 軸に標準液の濃度を、Y 軸に Net OD をプロットし検量線を作成する。
 - (2) 検体の Net OD を検量線に当てはめ、HGF 濃度を読みとる。



3. 判定上の注意

- (1) 検体の吸光度がHGF標準液5(3.0 ng/mL)の吸光度を超えた場合は検体を希釈して再測定すること。

【性能】

1. 感度試験

HGF標準液1(0 ng/mL)を3回及びHGF標準液2(0.1 ng/mL)を3回測定するとき、そのA₄₉₂測定値について以下の関係が成立する。

$$\begin{aligned} & \text{HGF標準液2(0.1 ng/mL)の(平均値-標準偏差}\times 2) \\ & > \text{HGF標準液1(0 ng/mL)の(平均値+標準偏差}\times 2) \end{aligned}$$

2. 特異性試験

3種類の管理用血清(L、M、H)を測定するとき、測定値Lは既知濃度の±25%以内、測定値M、Hは既知濃度の±20%以内である。

3. 同時再現性試験

HGF管理用血清を10回測定する時、そのHGF値のCV値は、15%以下である。

4. 測定範囲

0.1 ng/mL(検量線下限)~3.0 ng/mL(検量線上限)

5. 相関性試験成績

本品と同じ測定法を採用しているA社キットとの相関性を検討した。

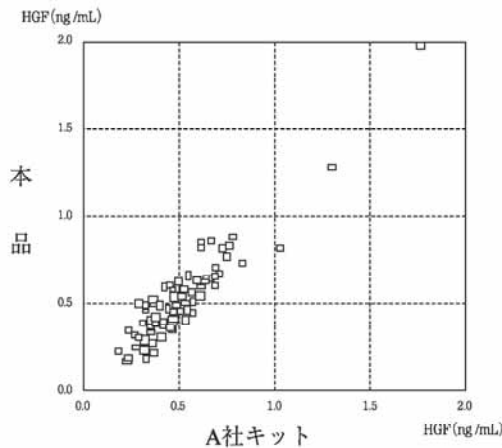
(結果)

85検体について測定を行った結果、

$$\text{回帰式 } y = 1.002x + 0.026$$

$$\text{相関係数 } r = 0.924$$

と良い相関を示した。



【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) 検体はHBV、HCV、HIVなどによる感染の危険性があるものとして取り扱うこと。検査にあたっては感染の危険を避けるために使い捨て手袋を着用し、また口によるピペティングを行わないこと。
- (2) 酵素基質、発色剤及び反応停止液は皮膚や粘膜に接触させないように注意すること。もし皮膚にかかったときは多量の水で洗い流すこと。(毒性、刺激性で火傷のおそれがある。)必要があれば医師の手当等を受けること。

2. 使用上の注意

- (1) 本品は凍結を避け、貯蔵方法に従い保存すること。試薬は、使用時以外は遮光保存すること。
- (2) HGF標準液の使用後は蓋をして2~10℃で保存すること。
- (3) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないこと。
- (4) 製造番号の異なるキットの試薬を組み合わせ使用しないこと。また、同一製造番号の試薬であっても、試薬を注ぎ足さないこと。プレートの再利用をしないこと。
- (5) 試薬が微生物に汚染されないよう注意すること。

3. 廃棄上の注意

- ** (1) 使用後の検体、試薬、検体に使用した器具類は廃棄前に下記のいずれかの方法で処理を行うこと。

- ① 0.05 w/v%ホルマリン溶液に37℃、72時間以上浸す。
- ② 2 w/v%グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸す。
- ③ 次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度1,000 ppm以上)に1時間以上浸す。
- ④ 121℃、20分以上オートクレーブにかける。

- (2) 検体希釈液及びHGF標準液にはアジ化ナトリウムが添加されているので、廃棄の際には爆発性の金属アジドが生成しないように十分注意して多量の水を流しながら行うこと。

- (3) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、医療廃棄物等の廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規制に従って処理すること。

- ** (4) 検体、廃液等が飛散した場合には、次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度1,000 ppm以上、1時間以上浸漬)、グルタルアルデヒド(2 w/v%、1時間以上浸漬)等による拭き取りと消毒を行ってください。

【貯蔵方法・有効期間】

凍結を避け、2~10℃で遮光保存。

製造後1年間有効(包装に表示の使用期限内に使用すること。)

【包装単位】

96テスト(CODE:1EH1)

【主要文献】

- 1) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatocytized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122: 1450-1459, 1984.
- 2) Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, et al: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342: 440-443, 1989.
- 3) Nakamura T: Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor Res* 3: 67-85, 1991.
- 4) 武藤泰敏、河合忠、佐藤俊一、他: 肝疾患患者における血清ヒト肝細胞増殖因子(hHGF)レベル測定の臨床的意義(全国19施設による検討). *肝胆臓* 25: 541-549, 1992.
- 5) 松田康伸、中村敏一: 肝細胞増殖因子(HGF)の分子生物学. *日本臨床* 51: 435-445, 1993.

【問い合わせ先】

株式会社 特殊免疫研究所 営業部

〒112-0004

東京都文京区後楽一丁目1番10号

日本生命水道橋ビル

TEL 03-3814-4081 FAX 03-3814-5957

