

サイトケラチン18フラグメントキット

イムニス[®] サイトケラチン 18F EIA

本試薬は、電子化された添付文書(電子添文)をよく読んでから使用すること。

【全般的な注意】

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。特に、非アルコール性脂肪性肝炎の診断に際しては、線維化マーカー測定結果を踏まえて判断してください。
3. 本電子添文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ます。
4. 使用する機器の添付文書等又は取扱説明書をよく読んでから使用してください。

【形状・構造等 (キットの構成)】

構成試薬

1. CK-18 抗体固相プレート (8 ウェル × 12) ……1 枚 (抗 CK-18 マウスモノクローナル抗体)
 2. 標準液 1 (0 U/L ・ 白色) ……1.5 mL × 1 本
 - 標準液 2 (125 U/L ・ 緑色) ……0.25 mL × 1 本
 - 標準液 3 (250 U/L ・ 青色) ……0.25 mL × 1 本
 - 標準液 4 (500 U/L ・ 黄色) ……0.25 mL × 1 本
 - 標準液 5 (1000 U/L ・ 赤色) ……0.25 mL × 1 本
 - 標準液 6 (2000 U/L ・ 橙 / 茶色) ……0.25 mL × 1 本
 3. 酵素標識抗体原液 ……0.5 mL × 1 本 (ペルオキシダーゼ標識抗 CK-18F マウスモノクローナル抗体)
 4. 標識抗体希釈液 ……11 mL × 1 本
 5. 酵素基質液 ……12 mL × 1 本 (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンチジン (TMB))
 6. 反応停止液 ……7 mL × 1 本 (4.9% (0.5 M) 硫酸)
 7. 洗浄原液 (20 倍濃縮液) ……50 mL × 1 本
- 付属品：プレートシール ……2 枚

【使用目的】

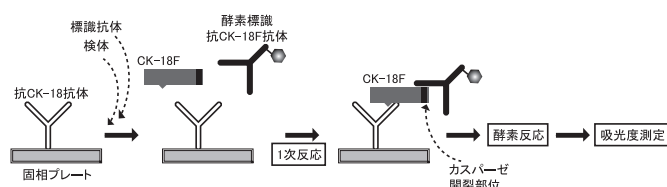
血清中のヒトサイトケラチン 18 フラグメント (CK-18F) の測定 (非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) 診断の補助)

【測定原理】

本キットは、ワンステップのサンドイッチ酵素免疫測定法 (EIA) を原理とし、カスパーゼによって切断された CK-18F を測定します。

抗 CK-18 マウスモノクローナル抗体固相プレートに CK-18F を含む検体を加え、HRP 標識抗 CK-18 フラグメントマウスモノクローナル抗体を添加すると、固相化抗 CK-18 抗体 / CK-18F / 酵素標識抗 CK-18F 抗体のサンドイッチ免疫複合体が形成されます (1 次反応)。洗浄後、酵素基質を添加すると、検体中の CK-18F 量に応じて呈色反応が進行します (酵素反応)。反応停止後吸光度を測定し、標準液で作成した検量線から検体中の CK-18F の濃度を求めます。

《測定原理図》



【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ってください。本キットによる測定は血清を用いてください。
 - 2) 可能な限り新鮮な検体を用いてください。検体を保存する場合は、4℃で1週間以内とし、長期間保存する場合は、-80℃で保存して、検体の凍結融解の繰り返しは避けてください。
 - 3) 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してください。
 - 4) 検体に濁りがあった場合は、軽く遠心して上清を試料としてください。
2. 妨害物質・妨害薬剤
 - 1) 検体に以下の物質を添加して試験した結果、それぞれの濃度まで、測定に影響は認められませんでした。ヘモグロビン (490 mg/dL)、ビリルビン C (20.9 mg/dL)、ビリルビン F (19.5 mg/dL)、乳び (1450 FTU)、リウマチ因子 (50 IU/mL)、HAMA (500 ng/mL)
 - 2) 検体に抗凝固剤 (1.34 mg/mL シュウ酸ナトリウム、4 mmol/L EDTA-2 ナトリウム、3.8 mg/mL クエン酸ナトリウム、13 U/mL ヘパリンナトリウム) を添加して試験した結果、いずれも測定に影響は認められませんでした。
 - 3) 検体に以下の自己抗体陽性検体を添加して試験した結果、いずれも測定に影響は認められませんでした。Acetylcholine receptor (ACTHR)、LKM、Anti-mitochondrial antibody (AMA)、C-ANCA、Sm (Smith antibody)、Anti-nuclear antibodies (ANA)、dsDNA、Centromere、Parietal cell (APCA)、GBM、Smooth muscle (ASMA)
 - 4) アジ化ナトリウムを添加した保存検体の場合、測定に影響を及ぼす可能性があります。
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してください。
 - 2) 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、コンタミネーションを避けてください。
 - 3) 標準液用ウェルは、測定ごとに設けてください。
 - 4) 1 次反応及び酵素反応は 22 ~ 28℃ の範囲で行ってください。
 - 5) 操作開始後は定められた時間で速やかに全操作を行い、各検体の反応時間が一定になるよう留意してください。また、ウェル内面が乾燥しないように注意してください。
 - 6) 酵素反応停止後、30 分以内に吸光度を測定してください。
 - 7) 操作中、プレートを強く擦ったり、底面に触れないでください。
 - 8) CK-18 抗体固相プレートに白い粉状の物質が付着していることがありますが、測定に影響はありません。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製法

1) 標識抗体の調製

酵素標識抗体原液を標識抗体希釈液で 24 倍希釈します。
(1 プレート分の場合は、9.2 mL の標識抗体希釈液に 0.4 mL の酵素標識抗体原液を添加)
使用するウェルに応じて必要量を調製してください。
調製は使用の直前（15 分前以内）に行ってください。

**2) 洗浄液

洗浄原液を精製水で 20 倍に希釈します。
未使用の洗浄液は 2～8℃で保存し、5 週間以内に使用してください。

○キットの試薬及び洗浄液（2～8℃で保存）は使用前に必ず室内温度に戻してください。

2. プレートは着脱式で 12 分割が可能です。必要数を使用し、未使用のものは乾燥剤と共にアルミ袋に密封し、2～8℃で保存してください。

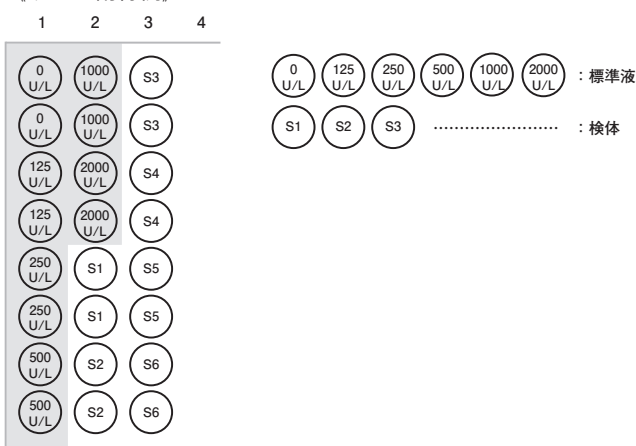
3. 必要な器具・器材・試料等

- 1) マイクロピペット
- 2) メスシリンダー
- 3) プレート振とう器（300～900 rpm）
- 4) マイクロプレートウォッシャー
- 5) マイクロプレートリーダー（主波長 440～460 nm、副波長 550～750 nm / 2 波長測定の場合）
- 6) 検量線作成ソフト等

4. 測定（操作）法

1 検体に対して二重測定を推奨しますが、1 ウェル測定も可能です。
二重測定する場合は下図に示すように、測定ごとに標準液用ウェル（2 ウェル×6 種類 = 12 ウェル）を設けて測定してください。

《ウェル割付例》



1) 検体と標識抗体の添加

プレートのウェルに標準液 1～6 または検体を 25 μL ずつ、及び調製した標識抗体を 75 μL ずつ添加します。
検量線の上限を超える可能性のある検体は、標準液 1 を用いてあらかじめ適宜希釈してから測定してください。

2) 1 次反応

プレート上面に添付のプレートシールを貼り、プレート振とう器に固定して、600 rpm（300～900 rpm）、22～28℃で 1 時間振とうします。

○定められた条件範囲で振とうしてください。

3) 洗浄

プレートシールをはがし、マイクロプレートウォッシャー等を用いて、1 ウェルあたり 350 μL の洗浄液を添加して 5 回洗浄します。
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きます。

○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ってください。

4) 酵素基質液の添加

酵素基質液を 1 ウェルあたり 100 μL 添加します。

5) 酵素反応

プレート上面に添付のプレートシールを貼り、プレートを 22～28℃で 30 分間静置します。

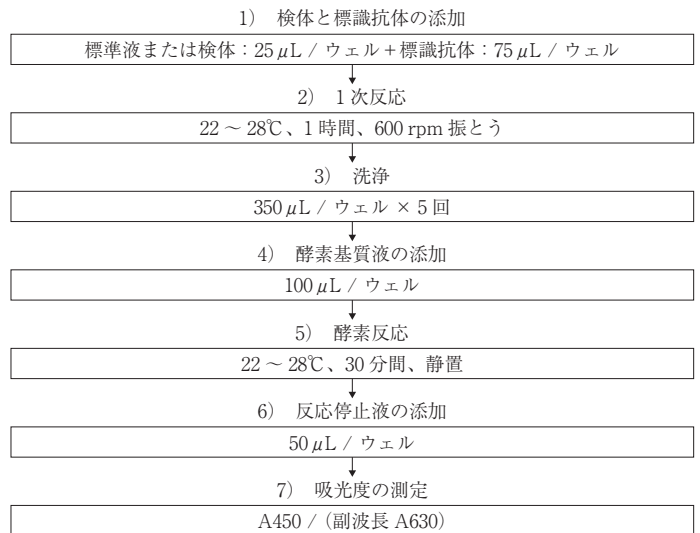
6) 反応停止液の添加

プレートシールをはがし、1 ウェルあたり反応停止液を 50 μL 添加して、よく混合します。

7) 吸光度の測定

マイクロプレートリーダーで各ウェルの 450 nm（440～460 nm）の吸光度を測定します。2 波長測定の場合の副波長は 630 nm（550～750 nm）とします。

○操作法簡易フローチャート



【測定結果の判定法】

1. 標準液による検量線の作成及び CK-18F 濃度の算出

- 1) 二重以上で測定した場合は、吸光度（A450）平均値を算出します。
- 2) 検量線作成ソフト等を使用して検量線を作成します。
- 3) 検体の吸光度を検量線に当てはめ、CK-18F の濃度を読みとります。

2. 判定上の注意

- 1) 検体の吸光度が標準液 6（2000 U/L）の吸光度を超えた場合は、標準液 1 を用いて検体を希釈し、再測定してください。

**2) 低濃度のヒト血清検体では、測定値の再現性が低下する場合があります。なお、社内検討（n=23）では、検量線下限の 125 U/L 以上のヒト血清 18 検体はいずれも同時再現性 CV 値が 20% 未満でした。

【臨床的意義】

非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）は、病態が進行する NASH とそれ以外の非アルコール性脂肪肝（NAFL）に分類されます。NASH は、進行すると 5～20% が NASH 肝硬変となり、このうち約 15% が肝細胞がんに進展するとされています¹⁾。NASH の確定診断は、肝生検によって行われます。一般的に、線維化マーカーを測定して線維化進展例を推測し、肝生検が必要な患者のスクリーニングが行われていますが、NASH を診断する非侵襲的な検査法は確立していません。

CK-18 は分子量 45kDa の酸性ケラチンで、CK-8 とともに存在し、肝臓蛋白質の約 5% を占めており、アポトーシスとの関連があることが報告されています²⁾⁻³⁾。CK-18F は健常者や NAFL 患者と比較して、NASH 患者では有意に高値であると報告されています⁴⁾⁻⁶⁾。CK-18F 値は肝生検による組織学的スコアと相関し、NASH 診断を確定するための肝生検を実施すべき患者の鑑別に有用とされています⁷⁾。線維化高度例では軽度と比較して、有意に高値とする報告もあります⁵⁾。

多施設共同研究において、本キットによる CK-18F 値について評価した結果を、以下に示します。

** 1. NAFLD 患者血清の CK-18F 測定値⁸⁾

NAFLD 患者 246 例 (NASH 185 例、NAFL 61 例) の血清検体について、本キットによる CK-18F 濃度と肝生検病理組織の組織学的評価 (NASH / NAFL) と比較検討を行いました。CK-18F 値の中央値は全体、NASH 群、NAFL 群でそれぞれ、432.491、507.695、244.156 U/L であり、NAFL 群と比較して、NASH 群の CK-18F 値は有意に高値 (p<1.31E⁻¹⁰) でした。

NASH の肝疾患死リスクは NAFL の 5.71 倍、NAFLD のうち NASH の有病率は 25% との文献報告⁹⁾ から、偽陽性に対する偽陰性の重み付けを 5.71、有病率 0.25 と重みづけ設定をして ROC 解析を行ったところ、CK-18F の ROC 曲線下面積は 0.774 であり、カットオフ値を 260 U/L とした場合の組織診断との相関は以下のとおりでした。

表 1. 組織診断と本品の相関

本品		組織診断		
		NASH	NAFL	計
	260 U/L 以上	153	26	179
	260 U/L 未満	32	35	67
	計	185	61	246

感度 : 82.7%
特異度 : 57.4%
診断効率 : 76.4%

** 2. 線維化指標と CK-18F の組み合わせ⁸⁾

精密検査を要する NASH 患者を拾い上げるため、線維化指標と CK-18F を組み合わせ判定する検討を行いました。

FIB4 index のカットオフ値 1.3 または CK-18F 値 260 U/L 以上の場合を拾い上げ対象 (陽性) とした場合の組織診断との相関は以下のとおりでした。

表 2. 組織診断と FIB4 index ・本品の組み合わせ判定の相関

FIB4 index と本品組み合わせ判定		組織診断		
		NASH	NAFL	計
	陽性	177	42	219
	陰性	8	19	27
	計	185	61	246

感度 : 95.7%
特異度 : 31.1%
診断効率 : 79.7%

不一致例については、以下のとおり考察しました。

組み合わせ判定で陰性と判定され、肝生検の組織診断結果が NASH であった 8 例のうち、5 例は他の線維化を予測できる指標がカットオフ値以上、2 例は組織所見の NAFLD Activity Score (NAS) 脂肪化のスコアが 3 (66% 以上) でしたが、いずれも NAS 風船様変化のスコアは 1 以下であり、風船様変化が少ないが線維化あるいは脂肪化を有する症例と考えられました。その他の 1 例については、不一致の原因を推察することができませんでした。

一方、組織診断で NAFL と診断され、組み合わせ判定で陽性となった 42 例のうち、35 例は他の線維化を予測できる指標がカットオフ値以上で線維化を有する症例と考えられました。その他 7 例のうち 6 例は NAS スコアが 3 以上で、また 7 例全てが 5% 以上の脂肪化ありと判断された症例でした。

また、FIB4 index 及び他の線維化指標について、線維化指標単独の場合と本品との組み合わせで判断した場合の比較を表 3 に示しました。

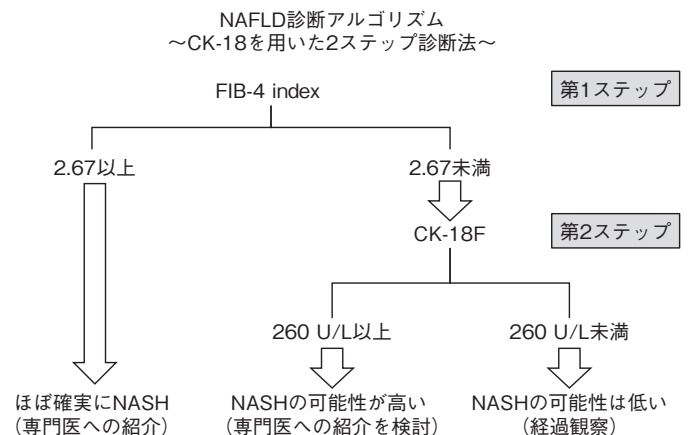
表 3. 各線維化指標単独と本品との組み合わせ判定の比較

線維化指標等	CO 値 (陽性判定基準)	単独 / + CK-18F	AUR OC	感度	特異度	全体一致率
FIB4 index	1.3 (以上)	単独	0.776	74.6%	59.0%	70.7%
		+ CK-18F	0.859	95.7%	31.1%	79.7%
	2.67 (以上)	単独	0.776	35.7%	95.1%	50.4%
		+ CK-18F	0.859	88.6%	54.1%	80.1%
IV 型コラーゲン・7S	5 ng/mL (以上)	単独	0.726	59.8%	84.7%	66.0%
		+ CK-18F	0.843	91.1%	55.9%	82.4%
Mac-2 結合蛋白糖鎖異性体	1.0 C.O.I. (以上)	単独	0.604	32.7%	82.8%	45.4%
		+ CK-18F	0.807	87.7%	51.7%	78.6%
ヒアルロン酸	50 ng/mL (以上)	単独	0.64	48.7%	69.4%	53.6%
		+ CK-18F	0.819	89.9%	40.8%	78.3%
血小板	19.2 (万/ μ L未満)	単独	0.664	48.6%	73.8%	54.9%
		+ CK-18F	0.818	92.4%	44.3%	80.5%
AST/ALT (AAR)	0.8 (以上)	単独	0.643	48.6%	68.9%	53.7%
		+ CK-18F	0.825	93.5%	37.7%	79.7%
NAFLD fibrosis score	-1.455 (以上)	単独	0.704	68.1%	59.0%	65.9%
		+ CK-18F	0.852	94.1%	32.8%	78.9%

** 3. 診断アルゴリズム (上記試験の解析結果検討報告書¹⁰⁾ から引用)

以上の結果を踏まえて、FIB-4 index と CK-18F を組み合わせた 2 ステップ診断アルゴリズムを構築しました。下記のように 1st step としては簡便に計算できる FIB-4 index を測定し、2.67 未満の例では、2nd step として CK-18F を測定します。

CK-18F が 260 U/L 以上であれば肝臓専門医への紹介を考慮し、260 U/L 未満であれば経過を観察します。



注: 個々の症例に応じてフィブロスキャン等や、各種肝線維化マーカーを組み合わせで総合的に判断する。

** 4. 健康成人血清の測定値 (参考基準範囲)^{8), 10)}

健康成人 64 例 (男性 47 例、女性 17 例、年齢平均値 27.5 歳) について、血清中の CK-18F 値を測定し、95% 信頼区間から算出した基準範囲は、36~205 U/L でした。

【性能】

1. 感度試験
標準液 0 U/L と標準液 125 U/L を 3 回測定するとき、125 U/L における吸光度の平均値 -2SD は 0 U/L における吸光度の平均値 +2SD 以上です。
2. 正確性試験
管理用検体 L、M、H を 3 回測定するとき、CK-18F 測定値の平均値はいずれも既知濃度の ±20% 以内です。
3. 同時再現性試験
管理用検体 L、H を 3 回同時に測定するとき、CK-18F 測定値の CV 値はそれぞれ 10% 以下です。

- ** 4. 測定範囲 (例示)
35 U/L ~ 2000 U/L (自社標準品の場合)
※管理用物質は自社標準品で値付けしたもの

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取り扱い上 (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ってください。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、マスク、保護衣及び保護用眼鏡を着用するなど、人体に直接触れないように注意してください。また口によるビベッティングを行わないでください。
 - 2) 試薬は皮膚や粘膜に接触させないよう注意してください。標準液が付着するとアレルギー性皮膚反応を起こす可能性があります。もし皮膚にかかったときは多量の水で洗い流してください。(特に反応停止液は、毒性、刺激性で火傷のおそれがあります。) 必要があれば医師の手当等を受けてください。
 - 3) 反応停止液は硫酸を含んでいますので、皮膚等に付着しないように取扱いには十分注意してください。
2. 使用上の注意
 - 1) 本キットは凍結を避け、貯蔵方法に従い保存してください。指定の貯蔵方法以外で保存した試薬は使用しないでください。
 - 2) 使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
 - 3) プレート、試薬容器が破損、液漏れしている場合は、使用しないでください。
 - 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でください。また、同一製造番号の試薬であっても試薬を継ぎ足さないでください。プレートの再利用をしないでください。
 - 5) 試薬の使用後は、速やかに蓋をして 2 ~ 8℃で保存してください。また、試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
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以下のいずれかの方法で処理を行ってください。
 - 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)、グルタルアルデヒド (2 w/v %) 等に 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、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) 等による拭き取りと消毒を行ってください。
 - 3) 試薬は、多量の水を流しながら廃棄してください。
 - 4) 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してください。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法：凍結を避け、2 ~ 8℃で保存
有効期間：製造後 8 箇月 (包装に表示の使用期限内に使用してください。)

- **【包装単位】
96 テスト (CODE : 1A91)

【主要文献】

- 1) NAFLD/NASH の診療ガイドライン 2014, 日本消化器病学会編, 2014.
- 2) Strnad P, et al: Keratins: markers and modulators of liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* **28**: 209-216, 2012.
- 3) Leers MPG, et al: Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J Pathol* **187**: 567-572, 1999.
- 4) Wieckowska A, et al: In vivo assessment of liver cell apoptosis as a novel biomarker of disease severity in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **44**: 27-33, 2006.
- 5) Yilmaz Y et al: Soluble forms of extracellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* **13**: 837-844, 2007.
- 6) Diab DL et al: Cytokeratin 18 fragment levels as noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis in bariatric surgery patients. *Clin Gastroenterol Hepatol* **6**: 1249-1254, 2008.
- 7) Feldstein AE et al: Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology* **50**: 1072-1077, 2009.
- ** 8) 製造販売承認申請書類 (社内資料)
- 9) Musso G, et al: Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* **43**: 617-649, 2011.
- 10) 「NASH の拾い上げにおける CK-18F の有用性について」、本キット臨床性能試験 解析検討委員会 (代表：一般社団法人 日本医療戦略研究センター 代表理事 角田圭雄, 他 3 名) による解析結果 検討報告書 (社内資料)。

【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

「イムニス」は株式会社特殊免疫研究所の登録商標です。