

※NASH: nonalcoholic steatohepatitis (非アルコール性脂肪性肝炎)

製造承認番号	30300EZ00064000
製造承認年月	2021年7月
保険収載年月	2024年1月

キット構成

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



製造販売元  **株式会社 特殊免疫研究所**
〒112-0004 東京都文京区後楽 1-1-10 <https://www.tokumen.co.jp/>
(お問い合わせ先) 営業部 TEL: 03-3814-4081

NASH用体外診断薬

体外診断用医薬品

サイトケラチン18フラグメントキット

保険収載

 **イムニス[®] サイトケラチン18F EIA**
IMMUNIS[®] CYTOKERATIN 18F EIA

新発売

 **株式会社 特殊免疫研究所**

体外診断用医薬品

サイトケラチン18フラグメントキット

保険収載

イムニス® サイトケラチン18F EIA

IMMUNIS® CYTOKERATIN 18F EIA

概要

- 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. 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) (抗CK-18マウスモノクローナル抗体)

1.5mL×1本

2. 標準液1 (0U/L・白色)

0.25mL×1本

標準液2 (125U/L・緑色)

0.25mL×1本

標準液3 (250U/L・青色)

0.25mL×1本

標準液4 (500U/L・黄色)

0.25mL×1本

標準液5 (1000U/L・赤色)

0.25mL×1本

標準液6 (2000U/L・橙 / 茶色)

0.25mL×1本

3. 酵素標識抗体原液(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)

0.5mL×1本

4. 標識抗体希釈液

11mL×1本

5. 酵素基質液(3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン(TMB))

12mL×1本

6. 反応停止液(4.9%(0.5M) 硫酸)

7mL×1本

7. 洗浄原液(20倍濃縮液)

50mL×1本

付属品: プレートシール

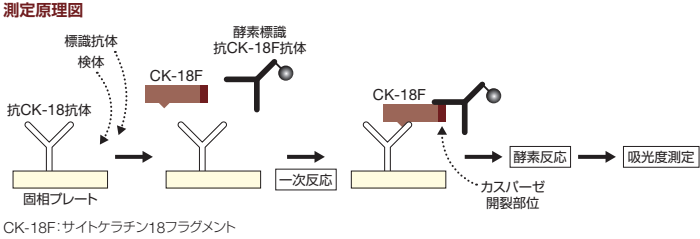
2枚

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。



- 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) 検体に漏りがあった場合は、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(490mg/dL)、ビリルビンC(20.9mg/dL)、ビリルビンF(19.5mg/dL)、乳び(1450 FTU)、リウマチ因子(50IU/mL)、HAMA(500ng/mL)

2) 検体に抗凝固剤(1.34mg/mLシチュウ酸ナトリウム、4mmol/L EDTA-2ナトリウム、3.8mg/mL クエン酸ナトリウム、13U/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) アジヒ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。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、9.2mLの標識抗体希釈液に0.4mLの酵素標識抗体原液を添加)
- | | |
|----------|-------------------------------|
| 製造販売承認番号 | 30300EZXX00064000 |
| 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。) |
| 承認年月 | 2021年7月 |
- 使用するウェルに応じて必要量を調整してください。
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(300～900rpm)

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440～460nm、副波長550～750nm/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	2	3	4
0 U/L	1000 U/L	S3	
0 U/L	1000 U/L	S3	
125 U/L	2000 U/L	S4	
125 U/L	2000 U/L	S4	
250 U/L		S1	S5
250 U/L		S1	S5
500 U/L		S2	S6
500 U/L		S2	S6

0 U/L 125 U/L 250 U/L 500 U/L 1000 U/L 2000 U/L : 標準液

S1 S2 S3 : 検体
- 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25μLずつ、及び調製した標識抗体を75μL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、600rpm(300～900rpm)、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350μL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100μL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50μL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450nm(440～460nm)の吸光度を測定します。2波長測定の場合の副波長は630nm(550～750nm)とします。
- 操作法簡易フローチャート

1) 検体と標識抗体の添加

標準液または検体: 25μL/ウェル＋標識抗体: 75μL/ウェル

↓

2) 1次反応

22～28℃、1時間、600rpm振とう

↓

3) 洗浄

350μL/ウェル×5回

↓

4) 酵素基質液の添加

100μL/ウェル

↓

5) 酵素反応

22～28℃、30分間、静置

↓

6) 反応停止液の添加

50μL/ウェル

↓

7) 吸光度の測定

A450/(副波長A630)
- 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(2000U/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125U/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。

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。

臨床性能試験

1. NAFLD患者血清のCK-18F測定値

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、244.156U/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(Musso G et al.; Ann Med 43: 617-649, 2011)から、偽陽性に対する陰性性の重み付けを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260U/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
	260U/L以上	153	26
260U/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

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を組み合わせで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260U/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	AUROC	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	5ng/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	1.0C.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	50ng/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/μL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%

●詳細は電子化された添付文書(電子添文)をご参照ください。 ●電子添文の改訂には十分ご留意ください。

3. 診断アルゴリズム(上記試験の解析結果検討報告書から引用)

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

NAFLD診断アルゴリズム ～CK-18Fを用いた2ステップ診断法～

第1ステップ

FIB-4 index

2.67以上

2.67未満

第2ステップ

CK-18F

260U/L以上

260U/L未満

ほぼ確実にNASH
(専門医へ紹介)

NASHの可能性が高い
(専門医への紹介を検討)

NASHの可能性は低い
(経過観察)

注: 個々の症例に応じてフィブロスコップ等や、各種肝臓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)

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、36～205U/Lでした。

性能

1. 感度試験

標準液0U/Lと標準液125U/Lを3回測定するとき、125U/Lにおける吸光度の平均値-2SDは0U/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)

35U/L～2000U/L(自社標準品の場合)
※管理用物質は自社標準品で値付けたもの

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。また口によるビベデ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に注意してください。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で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 0.05w/v%ホルマリン溶液に37℃、72時間以上浸す。

② 2w/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1,000ppm以上)、グルタルアルデヒド(2w/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1,000ppm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)

電子添文 2023年12月作成(第2版)より作成