

体外診断用医薬品

抗MDA5抗体キット

MESACUP™ anti-MDA5テスト

[全般的な注意]

- 本品は体外診断用です。それ以外の目的で使用しないでください。
- 本品は、血清中の抗MDA5抗体（抗CADM140抗体）を測定する試薬です。診断は、他の関連する検査結果や臨床症状等とあわせて担当医師が総合的に判断してください。
- 抗MDA5抗体検査は、皮膚筋炎（臨床的に筋症状に乏しい皮膚筋炎を含む）の診断の補助目的で行われます。間質性肺炎症例に対して検査を行う場合も、皮膚筋炎（dermatomyositis: DM）が疑われる症例を対象としてください。
- 添付文書以外の方法については保証致しません。
- 本品の構成試薬のうち、陰性コントロールには、ヒト血清由来成分が含まれています。体外診断用医薬品を用いてHBs抗原、HCV抗体及びHIV抗体が陰性であることを確認していますが、これらのウイルス及び他のウイルスを完全に否定できる試験方法ではありませんので、検体同様、感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。
- 標準液1、抗MDA5抗体標準液2、抗MDA5抗体陽性コントロール、陰性コントロール及び反応緩衝液には、保存剤として0.09%のアジ化ナトリウムが添加されています。目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。

[形状・構造等(キットの構成)]

構成試薬	包装	数量
MDA5感作マイクロカップ MDA5たん白質	*8連 12本	1
標準液 1	1.5 mL	1
抗MDA5抗体標準液2	1.5 mL	1
酵素標識抗体 ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGポリ クローナル抗体(ヤギ)	15 mL	1
反応緩衝液	50 mL	*2
洗浄緩衝液(20倍濃縮品)	50 mL	1
酵素基質液 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン, 過酸化水素	*20 mL	1
反応停止液	20 mL	1
抗MDA5抗体陽性コントロール	1.5 mL	1
陰性コントロール	1.5 mL	1

[使用目的]

血清中の抗MDA5抗体の測定(皮膚筋炎の診断の補助)

[測定原理]

本品は、ELISA法によって血清中の抗MDA5抗体を測定する試薬です。抗原としてMDA5たん白質を固相化したマイクロカップ(MDA5感作マイクロカップ)に検体を添加し、抗原・抗体反応(一次反応)をさせます。洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGポ

リクローナル抗体(ヤギ)(酵素標識抗体)を添加して反応(二次反応)させ、抗原・抗体・酵素標識抗体の複合物を形成させます。再び洗浄した後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンと過酸化水素の溶解液(酵素基質液)を添加し、酵素(ペルオキシダーゼ)によって発色させます(酵素反応)。反応停止後、吸光度(A450)を測定して、血清中の抗MDA5抗体を測定します。

[操作上の注意]

- 検体について
 - 検体は血清を用います。検体は新鮮なものを用いてください。
 - 検体の非働化はしないでください。
 - 検体の保存方法
 - 採血後はなるべく早く試験を行ってください。
 - 血清を保存する場合：-20℃以下で凍結してください。-20℃以下で1箇月安定であることを確認しています。ただし、凍結融解の繰り返しは避けてください。
 - 不溶物を含む検体は遠心分離またはろ過によって不溶物を除去した後使用してください。
- 共存物質の影響

共存物質の影響を試験したところ、ヘモグロビン(487.0 mg/dL)、ビリルビンC(20.9 mg/dL)、ビリルビンF(19.5 mg/dL)、乳び(1410.0ホルマジン濁度)、RF(550.0 IU/mL)までの添加において試験結果に影響は見られませんでした。しかし、上記より高い濃度では試験結果に与える影響が確認されていないため、著しい乳び、溶血が認められる検体は使用しないでください。

[用法・用量(操作方法)]

- 準備するもの
 - 自動分光光度計(マイクロプレート専用機)
 - マイクロピペット
 - マルチチャンネルマイクロピペット(マルチピペット)
 - 自動洗浄機(マイクロプレート専用機)又は洗浄ビン
 - 一次反応準備用マイクロプレート
 - リザーバー
 - 精製水

全ての機器は、適切に整備されたものを使用してください。自動EIA機器を用いて測定する場合は、機種によって操作方法が異なる場合があります。使用する機種の操作方法に従って試験してください。

対応機種及び操作方は、問い合わせ先にご連絡ください。
- 試薬の調製

全ての構成試薬は室温(20~30℃)に戻してから使用してください。

 - 洗浄液の調製(操作前に実施)

必要量の洗浄緩衝液(20倍濃縮品)を精製水で20倍希釈し、洗浄液とします。洗浄液は2~8℃で2週間安定です。

例) 洗浄緩衝液(20倍濃縮品) 50 mL に精製水 950 mL を加えて20倍希釈します。
 - その他の構成試薬

そのまま用います。

3. 操作方法

(1) 検体の希釈

1) 検体を反応用緩衝液で101倍希釈します。

例) 検体10 μ Lを反応用緩衝液1000 μ Lに加えて101倍希釈します。

2) 標準液1、抗MDA5抗体標準液2、抗MDA5抗体陽性コントロール、陰性コントロール及び希釈した検体を150 μ Lずつ、一次反応準備用マイクロプレートに実際の測定と同じ配置になるように添加します。

(2) 一次反応

1) MDA5感作マイクロカップをアルミ袋から取り出し、一次反応準備用マイクロプレートに準備した標準液1、抗MDA5抗体標準液2、抗MDA5抗体陽性コントロール、陰性コントロール及び希釈した検体をマルチピペットでMDA5感作マイクロカップに100 μ Lずつ移します。

注意) MDA5感作マイクロカップに検体を添加した時点で反応が始まります。操作は短時間のうちに行ってください。

注意) MDA5感作マイクロカップは開封時においてありますが、品質に問題はありません。

2) 室温(20~30 $^{\circ}$ C)で30分間静置反応させます。

(3) 洗浄

自動洗浄機(マイクロプレート専用機)又は洗浄ピンを用いて洗浄液でMDA5感作マイクロカップを洗浄します。洗浄液は必ず室温(20~30 $^{\circ}$ C)のものを使用してください。

洗浄回数：自動洗浄機・・・4回

洗浄ピン・・・4回

注意) 自動洗浄機によって設定方法及び最適な洗浄回数が異なる場合があります。あらかじめ各施設で用いる自動洗浄機の設定方法及び最適な洗浄回数を確認することを推奨します。

(4) 二次反応

1) MDA5感作マイクロカップに残った洗浄液を完全に除去した後、リザーバーに移した酵素標識抗体をマルチピペットで100 μ Lずつ添加します。

注意) 試薬間のコンタミネーションを避けるため、残った酵素標識抗体は絶対に試薬ボトルに戻さないでください。

2) 室温(20~30 $^{\circ}$ C)で30分間静置反応させます。

(5) 洗浄

(3)と同様にMDA5感作マイクロカップを洗浄します。

(6) 酵素反応

1) MDA5感作マイクロカップに残った洗浄液を完全に除去した後、リザーバーに移した酵素基質液をマルチピペットで100 μ Lずつ添加します。

注意) 酵素標識抗体を入れるリザーバーと酵素基質液を入れるリザーバーは、必ず別のものを使用してください。試薬間のコンタミネーションを避けるため、残った酵素基質液は絶対に試薬ボトルに戻さないでください。

2) 室温(20~30 $^{\circ}$ C)で15分間静置反応させます。

(7) 反応停止

反応終了後、リザーバーに移した反応停止液をマルチピペットで100 μ Lずつ添加します。

(8) 吸光度測定

自動分光光度計(マイクロプレート専用機)にMDA5感作マイクロカップをセットして、吸光度(A450)を測定します。

吸光度は反応停止後20分以内に測定してください。

「Index値の算出法」

下記の式を用いてIndex値を算出します。

$$\text{Index 値} = \frac{\text{検体の吸光度} - \text{標準液 1 の吸光度}}{\text{抗MDA5抗体標準液 2 の吸光度} - \text{標準液 1 の吸光度}} \times 100$$

「測定結果の判定法」

以下の値を参考にしてください。

Index 値=32未満：陰性

Index 値=32以上：陽性

上記の値は、多発性筋炎患者検体65例、皮膚筋炎(臨床的に筋症状に乏しい皮膚筋炎を含む)患者166例を用いて、本品と免疫沈降試験との結果を比較した場合に、最も一致率が高いIndex値として算出されたものです。

「判定上の注意」

1. この数値は参考値です。施設ごとに基準となる数値を設定することを推奨します。
2. 抗MDA5抗体陽性コントロール及び陰性コントロールの測定値がそれぞれの容器ラベルに表示されている濃度範囲内であることを確認してください。
3. 吸光度の測定は、事前に、使用する自動分光光度計の性能を確認した上で行ってください。自動分光光度計の性能範囲を超える吸光度を示した場合に、測定値の信頼性はありません。
- *4. 抗体価の変動は患者の疾患活動性を把握するために有用と考えられます。
本品の測定範囲の上限はIndex値=150ですが、検体によって、Index値=150以下でも抗体価の変動を明確に捉えられない場合があります。抗体価の変動をモニターする場合、Index値=100以上の検体は、5,050倍希釈して再測定することを推奨します。ただし、検体によって希釈によるIndex値の変化が異なる場合があるため、希釈再検の条件は必要に応じて各施設で設定してください。
5. 治療薬の試験結果への影響については確認していません。治療中の患者検体の測定結果に基づく診断は、他の検査結果や臨床症状等とあわせて総合的に判断してください。
6. 検体によって非特異的の反応が起こる可能性があります。また、試験結果が陰性であっても免疫機能低下により抗体産生能が低下している場合がありますので、試験結果に基づく診断は他の検査結果や臨床症状等とあわせて総合的に判断してください。

「臨床的意義」

多発性筋炎・皮膚筋炎(Polymyositis/Dermatomyositis; PM/DM)は、筋力低下を主徴とする原因不明の炎症性疾患です。筋以外にも多彩な全身の臓器病変を合併することが多く、症状が筋肉及び内臓にとどまるものをPM、それに加えて皮膚症状をとるものをDMと呼びます。DMの中でも臨床的に筋症状のないDMは、clinically amyopathic DM(CADM)と呼ばれています。CADMはDMに特徴的な皮疹を有しており、筋力低下などの筋症状が乏しいだけでなく、筋電図などの筋炎を示唆する検査所見においても異常が認められないことがあります¹⁾。

抗MDA5抗体(抗CADM140抗体)はDM(CADMを含む)において特異的に現れる自己抗体であり^{2)~4)}、成人DMにおける出現頻度は10~25%で、他の膠原病ではほとんど検出されません⁵⁾。抗MDA5抗体陽性の患者はDMの中でもCADMに多く、数日から数週間で急速に呼吸不全が進行する間質性肺炎(急速進行性間質性肺炎:RP-ILD)を合併するDMと相関が非常に高いことが知られており^{2)~5)}、抗MDA5抗体陽性の患者におけるRP-ILDの合併頻度は

50~70%であることが報告されています⁵⁾。RP-ILDを合併したDMは治療抵抗性を示し、短期的な死亡率が高く、予後不良となるリスクが高いという臨床的特徴が認められます。小児DMにおいては抗MDA5抗体に関する報告例が少ないため、出現頻度は不明ですが、抗MDA5抗体は間質性肺炎合併例で高率に見られ、高値例ではRP-ILDを合併する傾向があるとされています⁵⁾。抗MDA5抗体陽性の患者におけるこれらの傾向は、日本人を含むアジア人だけでなく、欧米でも報告されています⁶⁾。

[性能]

1. 性能

(1) 感度試験

- 1) 抗MDA5抗体標準液2(Index値=100)を用いて試験を行うとき、吸光度(A450)は0.500以上です。
- 2) 標準液1(Index値=0)を用いて試験を行うとき、吸光度(A450)は0.100以下です。

(2) 正確性試験

既知濃度の管理検体3例(低値検体1例[Index値=25以上70以下]、中値検体1例[Index値=75以上100以下]、高値検体1例[Index値=105以上150以下])を試料として測定するとき、いずれも測定値が期待値の±20%の範囲内です。

(3) 同時再現性試験

陽性管理検体3例(低値検体1例[Index値=25以上70以下]、中値検体1例[Index値=75以上100以下]、高値検体1例[Index値=105以上150以下])を6回同時測定した場合の定量値の変動係数(CV%)は15%以内です。

(4) 測定範囲

本品の測定範囲はIndex値=3.5~150です。ただし測定上限は、使用する分光光度計の性能によって異なる場合があります。

2. 臨床性能試験結果

(1) 免疫沈降試験との一致率

PM患者検体65例、DM(CADM含む)患者検体166例について、本品による試験と免疫沈降試験を実施しました。その結果、陽性一致率98.1%、陰性一致率100%、判定一致率99.6%でした。(表1)。

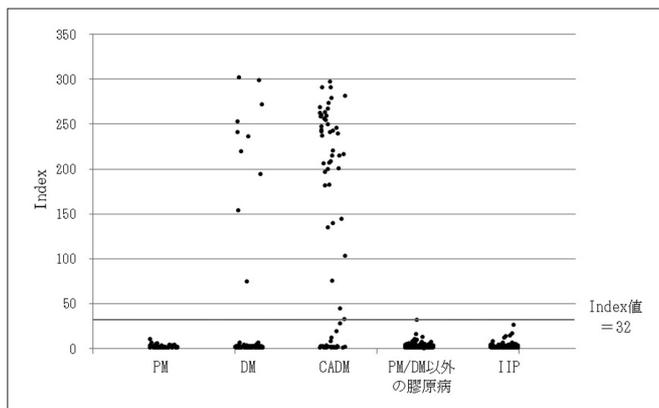
(表1) 免疫沈降試験との一致率

		免疫沈降試験		合計
		陽性	陰性	
本品	陽性	53	0	53
	陰性	1	177	178
合計		54	177	231

(2) 疾患別陽性率

PM患者検体65例、DM(CADM含む)患者検体166例、PM/DM以外の膠原病患者検体190例、特発性間質性肺炎(IIP)患者検体154例について本品を用いて試験したところ、Index値の分布は(図1)、陽性率は(表2)に示すとおりでした。

(図1) 各疾患における抗MDA5抗体Index値分布図



(表2) 各疾患における陽性率

疾患	PM	合計	DM(CADMを含む)		PM/DM以外の膠原病	IIP
			DM(CADMを除く)	CADM		
陽性率	0.0%	31.9%	10.0%	65.2%	0.0%	0.0%
(陽性数/症例数)	(0/65)	(53/166)	(10/100)	(43/66)	(0/190)	(0/154)

※ IIP症例は、「厚生労働省特定疾患認定基準 36 特発性間質性肺炎」に従って定義される症例を登録しました。

※ 上記 IIP 症例は、呼吸器内科を受診して IIP と診断された患者であり、PM/DM が疑われる IIP 症例と PM/DM が疑われない IIP 症例の両方が含まれます。

※ PM/DM 以外の膠原病とは、主に関節リウマチ、強皮症、全身性エリテマトーデス、シェーグレン症候群、混合性結合組織病等の疾患です。

※ なお、当社研究所にて健康人検体123例を本品を用いて測定したところ、測定結果はいずれも陰性でした(当社社内データ)。

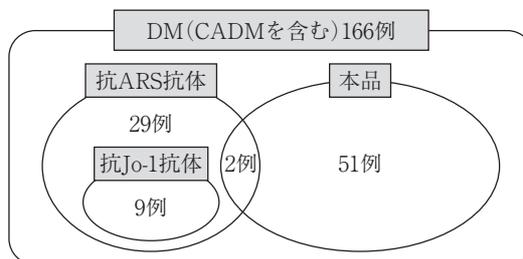
(3) 抗Jo-1抗体及び抗ARS抗体検査結果との比較

DM(CADM含む)患者検体166例について、抗Jo-1抗体及び抗ARS抗体をそれぞれ検出する体外診断用医薬品(ELISA試薬)と本品を用いて試験し、結果を比較しました(表3)。その結果、本品による試験の陽性群は、抗Jo-1抗体及び抗ARS抗体検査の陽性群とはほとんど重ならず、DMにおいて単独陽性でした(図2)。

(表3) 抗Jo-1抗体及び抗ARS抗体検査と本品の試験結果の比較

本品	疾患	PM	合計	DM(CADMを含む)		PM/DM以外の膠原病	IIP
				DM(CADMを除く)	CADM		
本品	陽性率	0.0%	31.9%	10.0%	65.2%	0.0%	0.0%
	(陽性数/症例数)	(0/65)	(53/166)	(10/100)	(43/66)	(0/190)	(0/154)
抗Jo-1抗体	陽性率	20.0%	5.4%	9.0%	0.0%	1.6%	2.6%
	(陽性数/症例数)	(13/65)	(9/166)	(9/100)	(0/66)	(3/190)	(4/154)
抗ARS抗体	陽性率	30.8%	18.7%	28.0%	4.5%	2.6%	9.1%
	(陽性数/症例数)	(20/65)	(31/166)	(28/100)	(3/66)	(5/190)	(14/154)

(図2) DM患者検体における各自己抗体の陽性検体数



3. 校正用基準物質の設定

抗MDA5抗体には公的標準品、市販標準品が存在しないため、社内試験規格に基づいて校正用基準物質を設定しています。免疫沈降法によって抗MDA5抗体陽性と判定された検体について、吸光度(A450)の1/2の値をIndex値=100と設定し、校正用基準物質を作製しました。

【使用上又は取扱い上の注意】

1. 取扱い上の注意

- (1) 検体は、HIV、HBV、HCV等の感染の可能性があるものとして注意して扱ってください。試験にあたって、感染の危険を避けるため、使い捨て手袋を着用し、口によるピペティングは行わないでください。
- (2) 試薬が目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置をして、必要があれば医師の手当てを受けてください。
- (3) 反応停止液は0.25 mol/L 硫酸を含んでいます。皮膚、目、粘膜などに付けないよう注意して取り扱いしてください。皮膚などにかかったときは大量の水で洗い流し、必要があれば医師の手当てを受けてください。

2. 使用上の注意

- (1) 試薬は貯蔵方法に従って保存し、使用期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
- (2) 異なる製品ロットの試薬を組み合わせ使用しないでください。
- (3) 全ての構成試薬は、室温(20~30℃)に戻してから使用してください。
- (4) 保存及び使用中に、試薬に直射日光を当てないでください。
- (5) 検体、試薬への微生物の混入や試薬間のコンタミネーションを避けてください。
- (6) 反应用緩衝液は沈殿を生じることがありますが、キットの性能には影響を及ぼしません。
- (7) 反応温度、反応時間、検体の希釈率を厳守してください。
- (8) 洗浄が適切でない場合、ばらつきや偽陰性、偽陽性を生じることがありますので、適切な洗浄条件を設定してください。
- (9) マイクロカップの間のコンタミネーションを防ぐため、液の泡立ちや、周囲への付着が起こらないようにしてください。
- (10) 酵素基質液は金属イオンによって酸化されやすいので、ディスポーザブルの新しい器具を使用し、試薬ボトルからリザーバーに酵素基質液を移す際にもディスポーザブルのピペットを使用してください。また、一度リザーバーへ移した酵素基質液は試薬ボトルに戻さないでください。
- (11) MDA5感作マイクロカップは、湿気及び酸化を避けるため、開封後はアルミ袋のチャックを確実に閉めて保存してください。
- (12) 洗浄液緩衝液(20倍濃縮品)は、2~8℃で保存したとき、結晶を認める場合がありますが、試薬性能に影響はありません。洗浄液調製時、十分に溶解してから使用してください。

3. 廃棄上の注意

- (1) 検体は感染の可能性があるものとして注意して取り扱ってください。検体及び試験に使用した器具は、廃棄又は次のいずれかの方法で処理してください。
 - ・最終濃度2% グルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。
 - ・0.1% 次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素 約1,000 ppm)に1時間以上浸漬する。

・121℃で20分間以上高圧蒸気滅菌する。

- (2) 試薬や器具等を廃棄する場合は、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定に従ってください。
- (3) 標準液1、抗MDA5抗体標準液2、抗MDA5抗体陽性コントロール、陰性コントロール及び反应用緩衝液には、0.09%のアジ化ナトリウムが添加されています。アジ化ナトリウムは配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが報告されています。アジ化ナトリウムを含む廃液は十分な量の水で洗い流してください。
- (4) 血液等が飛散した場合は、手袋着用の上、ペーパータオル等で拭き取り、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液で清拭してください。また、使用した手袋やペーパータオル等は廃棄上の注意(1)(2)に従って処理・廃棄してください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法

2~8℃で保存

2. 有効期間

24箇月(使用期限は外箱に記載されています。)

*【包装単位】

CODE No.7874 1キット96ウエル

【主要文献】

1. Sontheimer, R. D. J Am Acad Dermatol. 2002, vol. 46, no. 4, p. 626-636.
2. Sato, S. et al. Arthritis Rheum. 2005, vol. 52, no. 5, p. 1571-1576.
3. Sato, S. et al. Arthritis Rheum. 2009, vol. 60, no. 7, p. 2193-2200.
4. Nakashima, R. et al. Rheumatology (Oxford). 2010, vol. 49, no. 3, p. 433-440.
5. 藤本学. Arthritis Care Res. 2016, vol. 68, no. 5, p. 689-694.
6. Moghadam-Kia, S. et al. Arthritis Care Res. 2016, vol. 68, no. 5, p. 689-694.
- **7. Gono, T. et al. Mod Rheumatol. published online: 09 Apr 2018.

*【問い合わせ先】

株式会社医学生物学研究所 学術部
〒105-0012 東京都港区芝大門2丁目11番8号
住友不動産芝大門二丁目ビル
TEL : 03-6854-3613 E-mail : kensa@mbl.co.jp

【製造販売元】

株式会社医学生物学研究所
〒396-0002 長野県伊那市手良沢岡1063-103
TEL : 0265-76-1777 FAX : 0265-76-0584

「MESACUP™」は株式会社医学生物学研究所の登録商標です。
(登録商標 第2422835号)