

貯蔵方法：2～10℃で遮光保存

有効期間：18ヵ月

【包装単位】

管理コード	構成試薬	包装
CY-5000	抗体固相化プレート	96ウェル×1
	VWF73基質	6 mL用×2
	反応用緩衝液	30 mL×1
	酵素標識抗体液	12 mL×1
	発色液	12 mL×1
	洗浄原液	53 mL×1
	反応停止液	12 mL×1
	非働化血漿	1 mL×1
	希釈用プレート	96ウェル×1
	プレートシール（付属品）	3枚

【主要文献】

- 1) Gerritsen HE, Robles R, Lämmle B, et al : Blood, 98 : 1654-1661 (2001)
- 2) 藤村吉博：別冊・医学のあゆみ 血液疾患 ver. 3 : 748-751 (2005)
- 3) Furlan M, Robles R, Lämmle B : Blood, 87 : 4223-4234 (1996)
- 4) Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, et al : Blood, 103 : 607-612 (2004)
- 5) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, et al : Br J Haematol, 129 : 93-100 (2005)
- 6) Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, et al : Transfusion, 46 : 1444-1452 (2006)
- 7) 松本雅則：血栓止血学会誌, 17(4) : 393-401 (2006)
- 8) 伊藤 晋, 山本 茂一, 林 司, 他：日本輸血細胞治療学会誌, 56(1) : 27-35 (2010)

【問い合わせ先】

株式会社カインス 学術部
 〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18
 ☎ 03(3816)4480 FAX 03(3816)6544

ADAMTS13活性測定試薬

注：この使用説明書をよく読んでから使用してください。

【全般的な注意】

- 1) 本製品は研究用試薬であるため、診療上の診断に用いるものではありません。
- 2) 使用説明書に記載された使用方法に従って、使用してください。使用説明書以外での使用は、測定値の信頼性を保証できません。
- 3) 本製品の非働化血漿は、ヒト由来血漿を使用しております。HBs抗原、HCV抗体及びHIV-1抗体及びHIV-2抗体の検査を行い、陰性の結果を得ておりますが、感染の危険性を完全に否定できる検査法がありません。また、それ以外のウイルスに関する検査はしておりませんので、感染の危険性があるものとして、検体と同様に十分注意して取扱ってください。

【はじめに】

ADAMTS13 (a disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif 13) は止血因子である von Willebrand 因子 (VWF) を特異的に切断する酵素 (VWF-cleaving protease, VWF-CP) です。ADAMTS13の基質であるVWFは血漿糖蛋白であり、血管壁の損傷によって露出したコラーゲンや、血小板表面の受容体蛋白質に結合することによって、血小板を凝集させる働きを持ちます。通常、ADAMTS13により、VWFが部分的に切断されることによって正常な止血機能が維持されています。何らかの原因でADAMTS13活性が低下すると、血液中に過剰のVWFが蓄積して血小板凝集による血栓を起こし易くなり、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP; thrombotic thrombocytopenic purpura) を発症するとされています。

近年、ADAMTS13の最小基質であるVWF-A2ドメインの73アミノ酸残基 (VWF73) に蛍光基を導入したFRETS-VWF73による測定法が開発され、さらにADAMTS13によって切断されて生じるVWF-A2断端アミノ酸Tyr1605を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いたELISA法による新規な活性測定法が確立されました。

【形状・構造等（キットの構成）】

- 1) 抗体固相化プレート (Anti-GST Antibody coated Microplate) :
抗GSTマウスモノクローナル抗体
- 2) VWF73基質 (VWF73 Substrate) :
GST-VWF73-His
- 3) 反応用緩衝液 (Reaction Buffer)
- 4) 酵素標識抗体液 (HRP conjugated Antibody) :
ペルオキシダーゼ結合マウスモノクローナル抗N10抗体
- 5) 発色液 (Color Reagent) :
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ)、尿素過酸化水素
- 6) 洗浄原液 (Wash Buffer Concentrate)
- 7) 反応停止液 (Stop Solution) :
0.5mol/L 硫酸
- 8) 非働化血漿 (Inactivated Plasma)
- 9) 希釈用プレート (Sample Dilution Microplate)

付属品

- 10) プレートシール (Plate Sealer)

【使用目的】

血漿中のADAMTS13活性の測定

【測定原理】

1. 原理

本製品による血漿中ADAMTS13活性の測定は、検体中のADAMTS13により切断された生成物を抗GSTマウスモノクローナル抗体とペルオキシダーゼ結合マウスモノクローナル抗N10抗体によりサンドイッチ法で捉えるものです。

マイクロプレートに固相されている抗GSTマウスモノクローナル抗体にVWF73基質 (GST-VWF73-His) を反応させます。次に検体を反応させ、ADAMTS13によりVWF73基質の切断反応を行います。さらにペルオキシダーゼ結合マウスモノクローナル抗N10抗体 (酵素標識抗体) を反応させると、切断生成物を挟んだ3者のサンドイッチ複合体が形成されます。

切断生成物の量はADAMTS13活性に依存しますので、その切断生成物に結合する酵素標識抗体の量は、ADAMTS13活性を反映します。尿素過酸化水素 (H₂O₂) 及び3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMBZ) を標識酵素の基質として用い、遊離するTMBZ酸化物 (発色体) を比色定量して、その酵素活性を測定することにより、血漿中のADAMTS13活性を測定することができます。

製造販売元



株式会社 カインス

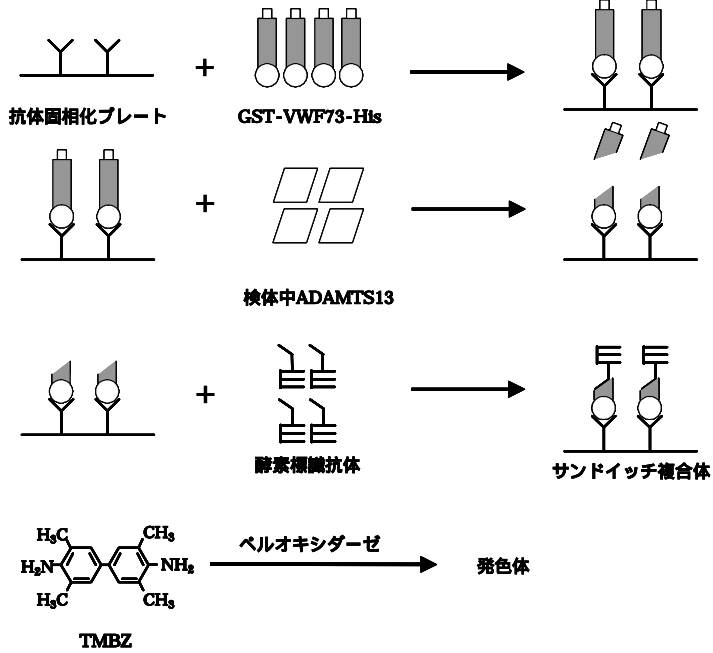
〒113-0033 東京都文京区本郷 2-38-18 ☎ 03(3816)4485

* 本製品は国立循環器病研究センターのライセンスを受けています。

2. 特徴

- 1) SDSアガロース電気泳動法との相関が良好で、操作性と安定性に優れています。
- 2) 正常検体の活性値を100%とした場合、最小検出感度は0.5%と高感度です。
- 3) 特別な測定機器を必要としません。

3. 原理図



【操作上の注意】

1. 測定試料の性質、採取法

- 1) 検体には、クエン酸血漿を使用してください。
- 2) 検体は、新鮮なものを使用してください。すぐに測定しない場合は凍結（-20 以下）保存してください。

2. 妨害物質・妨害薬剤

- 1) ADAMTS13はメタロプロテアーゼですので、EDTA採血は活性著減を示します。
- 2) 血清検体は、トロンビンによるADAMTS13の分解が報告されていますので、避けてください。

3. その他

- 1) ADAMTS13による切断時間を一定化するために、検体及び標準血漿は、操作手順通りに希釈用プレート等を使用してあらかじめ希釈しておき、添加時間の誤差が少なくなるよう、抗体固相化プレートのウェルに添加してください。
- 2) 多検体を測定する場合は、各反応時間を定められた時間に統一するよう注意してください。
- 3) 希釈用プレートは、特別な処理をしているものではありません。不足した場合は、市販のポリスチレンプレート等をご使用ください。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試液の調製法

- 1) 抗体固相化プレート、反作用緩衝液、酵素標識抗体液、発色液、反応停止液 室温に戻してからそのまま使用してください。
- 2) VWF73基質液
VWF73基質1本に精製水6 mLを添加し、転倒混和して完全に溶解してください。溶解後に使用しない場合は、凍結保存してください。凍結融解の繰り返しは5回まで可能です。
- 3) 洗浄液
洗浄原液を精製水を用いて10倍希釈してください。
洗浄原液は結晶が析出することがありますが、性能に影響はありません。結晶を恒温槽で溶解してから使用してください。
- 4) 非働化血漿、希釈用プレート
そのまま使用してください。
- 5) 標準血漿
非働化血漿を標準血漿0%、健常人血漿（クエン酸血漿）を標準血漿100%として使用してください。（標準血漿100%は、5~10人の血漿をプールして作成するのが望ましい）
標準血漿は非働化血漿を用いて、各活性値に希釈し、調製してください。（活性値は0、20、40、60、80、100%を推奨します）
調製後の標準血漿はその日のうちに使用してください。

2. 操作法

- 1) 抗体固相化プレートの各ウェルにVWF73基質液を100 μL ずつ分注します。
- 2) プレートシールを貼付後、室温で1時間静置します。
- 3) 希釈プレートを使用し、検体及び標準血漿を反作用緩衝液で31倍希釈します。（例：検体及び各標準血漿5 μL 、反作用緩衝液150 μL ）
- 4) 2)の操作終了後、反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μL 分注し、洗浄します。この操作を3回行った後、ペーパータオル上で叩く等して水滴を完全に除きます。

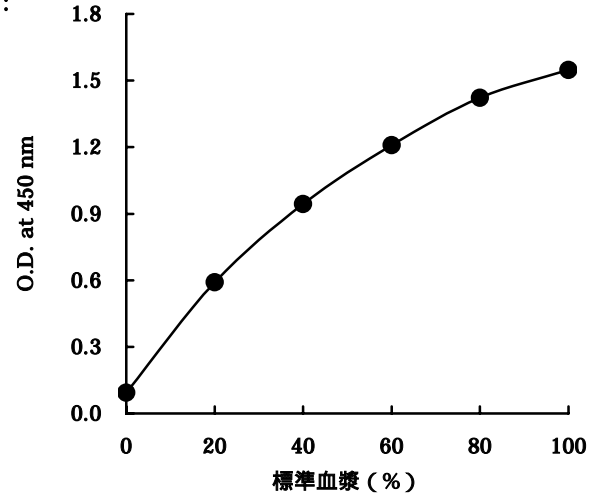
- 5) 3)で調製した希釈検体及び標準血漿を100 μL ずつ分注します。
- 6) プレートシール貼付後、室温で30分間静置します。
- 7) 反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μL 分注し、洗浄します。この操作を3回行った後、ペーパータオル上で叩く等して水滴を完全に除きます。
- 8) 酵素標識抗体液を100 μL ずつ分注します。
- 9) プレートシール貼付後、室温で1時間静置します。
- 10) 反応液を除去した後、各ウェルに洗浄液を350 μL 分注し、洗浄します。この操作を3回行った後、ペーパータオル上で叩く等して水滴を完全に除きます。
- 11) 発色液を100 μL ずつ分注します。
- 12) プレートシール貼付後、室温で30分間遮光して静置します。
- 13) 反応停止液を100 μL ずつ分注します。
- 14) 10分以内に波長450 nmで吸光度を測定します。

【測定結果の判定法】

1. 判定方法

標準血漿0~100%より作成した検量線から検体中のADAMTS13活性を読み取ってください。

検量線例：



2. 判定上の注意

- 1) 測定結果が100%を超える場合は、非働化血漿にて検体を希釈し、再測定を行ってください。
- 2) 検量線は測定毎に作成してください。

【性能】

1. 再現性

同一検体を6回同時に測定するとき、測定値のC.V.値は10.0%以下です。

2. 測定範囲

測定範囲は、0.5~100%です。

【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HIV、HBV、HCV等の感染性のあるものとして取扱いには十分注意してください。また、検体に接触した器具等は検体と同様、感染の危険性のあるものとして取扱ってください。
- 2) 試薬が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受けてください。
- 3) 反応停止液には0.5 mol/L 硫酸が、発色液には尿素過酸化水素が含有されていますので、取扱いには十分注意してください。

2. 使用上の注意

- 1) 貯蔵方法に示した以外の保管条件では、使用期限内であっても十分に性能を維持できない場合があります。特に誤って凍結させた試薬は使用しないでください。
- 2) 開封後の試薬は、蓋を閉めて2~10 で遮光保存してください。
- 3) ラベル記載の使用期限内に使用してください。
- 4) ロットの異なる試薬を混合して使用しないでください。

3. 廃棄上の注意

- 1) 本製品を廃棄する場合は、水質汚染防止法等の関連法規に従って処理してください。
- 2) 使用後の容器を廃棄する場合は、貴施設の廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物や産業廃棄物等に区別して処理してください。
- 3) 本製品が漏出又は飛散した場合は、少量のときは吸水紙等で拭き取り、大量のときは水で洗い流してください。
- 4) 本製品には、防腐剤としてケーンソンCGが含有されています。廃液等は大量の水で流すよう注意してください。