

# レナプロ<sup>®</sup> L-FABP テスト HS(高感度)

## ヒトL型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) キット

使用に際してはこの添付文書をよくお読みください。また、必要ときに読めるように保管しておいてください。

### ■全般的な注意

- 1 本キットは体外診断用であるため、それ以外の目的には使用しないでください。
- 2 診断の際は本測定値以外に他の検査結果や臨床症状等もあわせて考慮し、総合的に判断してください。
- 3 本添付文書の注意事項をよく読み、記載された使用方法に従って検査を行ってください。記載された使用方法及び使用目的以外での使用における測定結果の信頼性については保証致しかねます。
- 4 本キットは使用前に必ず20～28℃に戻してからご使用ください。
- 5 誤って凍結させた試薬及び有効期間を過ぎた試薬は測定値の信頼性を保証しかねますので使用しないでください。
- 6 使用にあたっては本書とあわせて使用する測定機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでからご使用ください。

### ■形状・構造等（キットの構成）

#### [構成試薬]

No.	構成試薬名	容量・本数等	成分（含量）等
1	L-FABP 抗体固相化マイクロプレート	96 ウェル × 1	抗ヒトL-FABP マウスモノクローナル抗体〔クローンL 産生細胞株〕 結合ウェル
2	前処理液	12mL × 1	緩衝剤、界面活性剤ほか
3	反応緩衝液	12mL × 1	緩衝剤ほか
4	酵素標識抗体	12mL × 1	パーオキシダーゼ標識抗ヒトL-FABP マウスモノクローナル抗体〔クローン2 産生細胞株〕
5	酵素基質液	12mL × 1	3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、過酸化水素水ほか
6	洗浄剤	50mL × 1	緩衝剤、界面活性剤ほか
7	反応停止液	12mL × 1	1N 硫酸
8	標準緩衝液 (0ng/mL)	2.5mL × 1	緩衝剤ほか
9	標準L-FABP (400ng/mL)	0.5mL × 1	リコンビナントヒトL-FABP、緩衝剤ほか

#### [付属品]

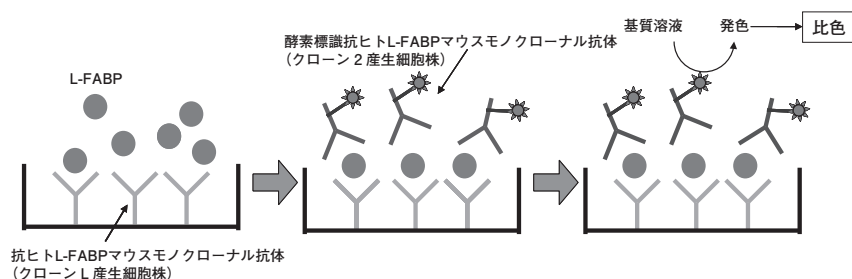
- 1 前処理用マイクロプレート 96 ウェル × 1
- 2 プレートシール 2 枚

### ■使用目的

尿中のL型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) の測定（尿管機能障害を伴う腎疾患の診断の補助）

### ■測定原理

本法は酵素免疫測定法（ELISA）に基づく尿中ヒトL型脂肪酸結合蛋白定量用キットです。標準L-FABPまたは尿検体を前処理液で処理後、反応緩衝液を分注した抗L-FABP抗体固相化プレートに添加し反応させます。この時、反応液中のL-FABPは固相化抗体に結合します。プレートを洗浄し、2次抗体として酵素標識抗体を添加し反応させることにより、L-FABPの量に応じた固相抗体-抗原-酵素標識抗体から成るサンドイッチ結合物を形成します。反応後、洗浄し基質溶液を加えて酵素反応を行うと、L-FABP抗原量に応じた発色が認められます。この吸光度をマイクロプレート用吸光度計を用いて測定し、得られた吸光度をもとに検量線を作成し、L-FABP濃度を求めます。



### ■測定試料の採取・保存法、操作上の注意

- 1) 検体は採取後速やかに測定してください。保存する場合は、冷蔵で保存したものを2日以内に測定するか、または凍結（-20～-80℃）とし、検体の凍結融解の繰り返しは避けてください。また、凍結保存した検体の融解は、室温または水浴中（2～28℃）に放置して行い、測定前に十分混和してから用いてください。なお、-80℃で凍結保存した検体は1年間安定であることが確認されています。
- 2) 検体は必要に応じて標準緩衝液にて希釈してください。得られた測定値が60ng/mLを超える場合は希釈して再検査してください。
- 3) L-FABP抗体固相化マイクロプレートを分割使用する場合は、未使用のプレートを乾燥剤とともに袋に入れチャックした後、テープ等で密封し2～8℃で保存してください。
- 4) 塩酸を添加した蓄尿は、検査値に影響を及ぼす場合があります。トルエンを用いる蓄尿の場合は、検査値への影響はありません。
- 5) 反応時にはプレートシールをしっかり貼ってください。蒸発により反応液が濃縮され吸光度が高くなる場合があります。
- 6) マイクロプレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は測定誤差の原因となるので正確に行ってください。
- 7) 吸光度を測定する前にプレートの底面に汚れがないことを確認してください。反応停止後の呈色液の吸光度は低下することが確認されていますので、反応停止後速やか（30分以内）に測定してください。
- 8) 各反応は時間、温度等の影響を若干受けますので測定のと都度、検量線を作成してください。

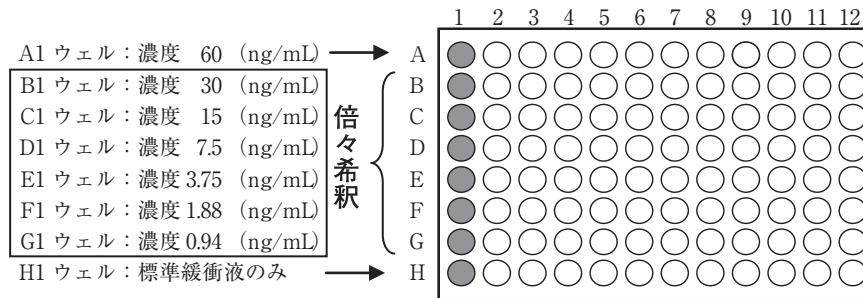
### ■妨害物質・妨害薬剤

- 1) 検体に、高濃度のビリルビン、ヘモグロビン、グルコース、アスコルビン酸が含まれると、正確な結果が得られない場合があります。
  - ・遊離型ビリルビン：19.7mg/dLまで測定値に影響は認められません。
  - ・抱合型ビリルビン：21.8mg/dLまで測定値に影響は認められません。
  - ・ヘモグロビン：24.4mg/dLまで測定値に影響は認められません。
  - ・グルコース：45mg/mLまで測定値に影響は認められません。
  - ・アスコルビン酸：12.5mg/mLまで測定値に影響は認められません。

**■用法・用量（操作方法）**

1 準備

- 1) 洗浄液：洗浄剤（40 倍濃度品）全量に精製水を加えて 2000mL としたものを洗浄液とします。
- 2) L-FABP 標準溶液の調製：  
標準溶液の調製は、標準 L-FABP（400ng/mL）を標準緩衝液（0ng/mL）で希釈し、濃度 60ng/mL を作成した後、その溶液を倍々希釈します。  
●標準溶液の希釈方法の例  
標準溶液を希釈する際には、前処理用マイクロプレートの 1 列目（A1～H1 ウェル）を使用します。  
以下に標準溶液の希釈方法の一例を示します。
  - ① 前処理用マイクロプレートの B1 ウェルから H1 ウェルに標準緩衝液（0ng/mL）を 50 μL ずつ分取します。
  - ② A1 ウェルに「標準 L-FABP（400ng/mL）15 μL」と「標準緩衝液（0ng/mL）85 μL」を加え、混和（10 回ピペッティング）します。
  - ③ ②で混和した溶液 50 μL を A1 ウェルから B1 ウェルに加え混和します。
  - ④ 順次 C1 ウェルから G1 ウェルまで倍々希釈をおこない、G1 ウェルは溶液 50 μL を取り除いてください。



※検量線用標準溶液は用時調製してください

前処理用マイクロプレート

2 必要な器具・器材

- 1) マイクロピペット：15～85 μL が分注可能なもの
- 2) 連続分注器：50, 100 μL が分注可能なもの
- 3) メスシリンダー：2000mL 用
- 4) プレートウォッシャーまたは洗浄ピン
- 5) プレートミキサー
- 6) マイクロプレート用吸光度計：波長 450nm（副波長 610nm 以上）

3 測定操作方法

キットは使用前に 20～28℃ に戻し、液状の試薬は数回静かに転倒混和し、沈殿・着色など変化のないことを確かめます。検体の測定と同時に L-FABP 標準溶液を測定し、検量線を作成します。

- 1) 前処理
  - ① L-FABP 標準溶液調製後、前処理用マイクロプレートの 3 列目から検体を 50 μL ずつ各ウェルに分取します。
  - ② 前処理液を L-FABP 標準溶液及び検体の分取されているウェルに 50 μL ずつ添加します。前処理用マイクロプレートをシールし、プレートミキサーで 5 分間以上撈拌します。
- 2) L-FABP 抗体固相化マイクロプレートに、使用するレーン（L-FABP 標準溶液用レーン+検体用レーン）をセットし、各ウェルに反応緩衝液を 100 μL ずつ添加します。
- 3) 前処理用マイクロプレートから L-FABP 標準溶液を 20 μL ずつ L-FABP 抗体固相化マイクロプレートに移します。
- 4) 前処理用マイクロプレートの検体も同様に 20 μL ずつ L-FABP 抗体固相化マイクロプレートに移します。
- 5) L-FABP 抗体固相化マイクロプレートをシールしプレートミキサーで 5 分間撈拌し、引き続き 20～28℃ で 55 分間静置反応させます。
- 6) 静置反応させた後 L-FABP 抗体固相化マイクロプレートの反応液を除去します。
- 7) 全ウェルに洗浄液を 350 μL ずつ加え、洗浄液を除去します。この洗浄操作は 3 回行いプレートの洗浄液をよく切ります。（プレートウォッシャーでも、350 μL、3 回）
- 8) 酵素標識抗体を 100 μL ずつウェルに添加します。
- 9) プレートをシールしプレートミキサーで 5 分間撈拌し、引き続き 20～28℃ で 25 分間静置反応させます。
- 10) 反応終了後、反応液を除去します。7) と同様に洗浄操作を 3 回行います。
- 11) プレートの洗浄液をよく切り、酵素基質液を 100 μL ずつ全ウェルに添加します。
- 12) プレートをシールし、遮光下プレートミキサーで 5 分間撈拌します。遮光下、20～28℃ で 25 分間静置反応させます。
- 13) 反応停止液を 100 μL ずつ全ウェルに添加し、酵素反応を停止させます。
- 14) プレートの縁を軽くたたいて反応液を混和し、30 分以内にマイクロプレート用吸光度計を用いて各ウェルの吸光度を波長 450nm、副波長 610nm 以上で測定します。
- 15) L-FABP 標準溶液の吸光度をもとに検量線を作成し、検体中の L-FABP 量を算出します。

測定操作一覧

	検体	検量線	ブランク
前処理	検体	L-FABP 標準溶液	標準緩衝液 (0ng/mL)
	50 μL	50 μL	50 μL
前処理液 50 μL			
プレートシールをしてプレートミキサーで 5 分間以上撈拌			
反応緩衝液	100 μL	100 μL	100 μL
処理検体	20 μL	20 μL	20 μL

プレートシールをしてプレートミキサーで5分間攪拌			
20～28℃で55分間反応（静置）			
洗浄3回			
酵素標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL
プレートシールをしてプレートミキサーで5分間攪拌			
20～28℃で25分間反応（静置）			
洗浄3回			
酵素基質液	100 μL	100 μL	100 μL
プレートシールをしてプレートミキサーで遮光下5分間攪拌			
遮光下20～28℃で25分間反応（静置）			
反応停止液	100 μL	100 μL	100 μL
プレートをたたいて反応液を混和し、30分以内に450nm（副波長610nm以上）における吸光度を測定			

## 測定結果の判定法

- ①各ウェルの吸光度から標準緩衝液（0ng/mL）の吸光度を差し引いて各ウェルの吸光度補正值を算出します。
- ②縦軸にL-FABP標準溶液の吸光度補正值を、横軸にL-FABP濃度をプロットして検量線を作成します。
- ③検体の吸光度補正值を検量線に当てはめ、検体中のL-FABP濃度を読みとります。
- ④尿中クレアチニン値で補正して尿中クレアチニン1g当たりのL-FABP量（μg/gCr）を算出して判定してください。

### 1. 参考基準範囲

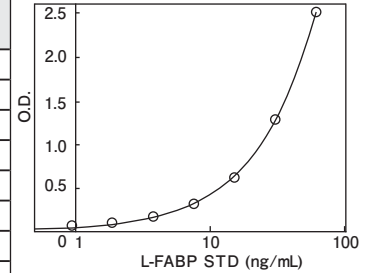
健康人412例の尿中L-FABPの量から算出された参考基準範囲は8.4 μg/gCr以下でした。

### 2. 判定上の注意

L-FABP濃度が60ng/mLを超えた検体は標準緩衝液（0ng/mL）で希釈して再測定して下さい。

## 測定値と検量線作成例

L-FABP濃度 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
60	2.508
30	1.278
15	0.618
7.5	0.316
3.75	0.170
1.88	0.101
0.94	0.066
0 (検体ブランク)	0.031



●上記検量線は作成例です。自動演算ソフトを使用する場合は、最も良くフィッティングする検量線を選んでください。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

## 臨床的意義

L-FABPは、腎臓において近位尿細管に特異的に発現する分子量約14kDaの低分子可溶性蛋白質で、生理的には腎臓の再吸収機能を担う尿細管においてエネルギー及び脂質代謝に重要な働きをしていると考えられています<sup>1</sup>。腎疾患進行過程に出現する蛋白尿や微小血流障害などのストレスにตอบสนองして誘導を受け、尿中に排出されます<sup>2,13</sup>。これまでの腎機能障害の破綻の結果を反映するものがほとんどであったのに対し、L-FABPは腎機能障害の程度について経過観察することが可能です<sup>3,5</sup>。現在、透析導入原因疾患の第1位である糖尿病患者の生命予後は極めて不良であるといわれています。これら糖尿病患者の尿中L-FABPを測定することにより糖尿病性腎症の早期診断及び重症化防止の指標となりうると考えられます<sup>7</sup>。

弊社が実施した臨床性能試験における健康人と糖尿病患者の尿中L-FABP値の分布は図1に示したとおりです。糖尿病性腎症患者では健康人に対して有意に高いL-FABP値（μg/gCr）を示しました。また、従来から早期糖尿病性腎症の診断に使用されているIV型コラーゲンとL-FABPの有病正診率および無病正診率は表1のとおりでした。

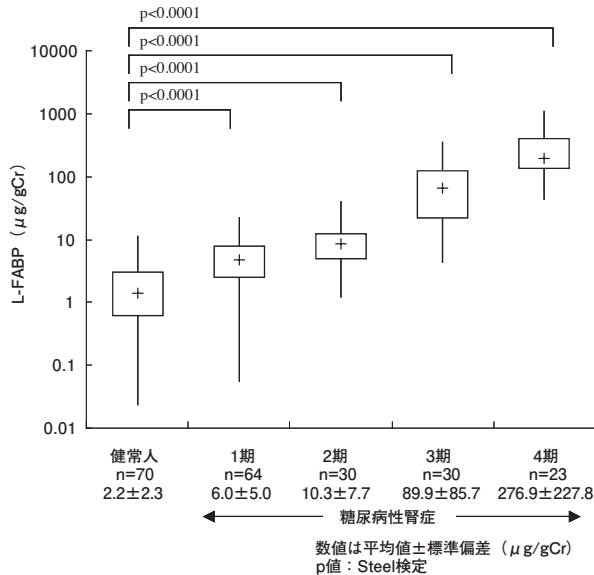


図1 糖尿病性腎症の各病期患者と健康人の尿中L-FABP値の分布

表1 有病正診率と無病正診率 既存の診断法との比較

	有病正診率(糖尿病性腎症患者-病期ごと)				無病正診率
	1期	2期	3期	4期	健康人
L-FABP	21.9%	50.0%	96.7%	100.0%	97.1%
IV型コラーゲン	9.4%	46.7%	60.0%	91.3%	95.8%

## 性能

### 1 性能

#### 1) 感度

最小検出感度: 0.3ng/mL

- (1) 添付の標準緩衝液（0ng/mL）を試料として操作した場合の吸光度は0.1以下である。
- (2) L-FABP（60ng/mL）標準溶液を試料として操作した場合の吸光度は1.5以上である。

#### 2) 正確性

0.94～60ng/mLの既知濃度のrL-FABPを含む濃度の異なる2種類の管理試料をそれぞれ1回測定するとき、いずれも既知濃度の±20%以内にある。

#### 3) 同時再現性

0.94～60ng/mLの2種類以上の同一検体をそれぞれ8回同時に測定するとき、いずれも測定値のCV値は15%以下である。

#### 4) 管理用物質

##### (1) 正確性試験用管理試料

標準L-FABPは微生物由来のヒトL-FABP遺伝子組み換え蛋白を標準物質として値付けを行って作製する。濃度既知管理

試料は、この標準 L-FABP を希釈して作製した L-FABP 標準溶液である。

(2) 同時再現性試験用管理検体

管理検体はヒト尿検体を原料とし、この原料同士を組み合わせることで濃度調整を行う。

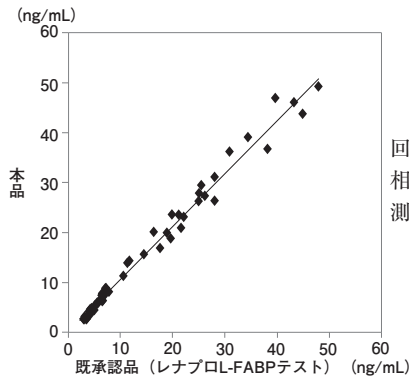
5) 測定範囲

モレキュラーデバイス社「SPECTRA Max 340PC<sup>384</sup> マイクロプレートリーダー」を使用したときの測定範囲は 0.3 ~ 60ng/mL である。

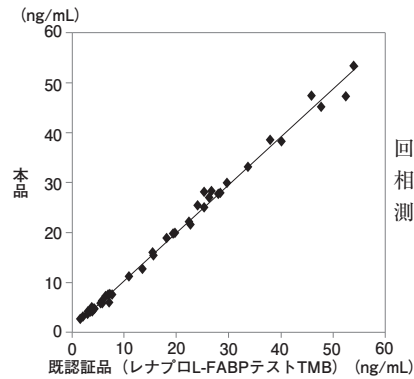
2 相関性試験成績

本キットと既承認品、既認証品との相関性を検討したところ、下図のような結果が得られました。

(既承認品：レナプロ L-FABP テスト, 既認証品：レナプロ L-FABP テスト TMB)



回帰式： $y=1.0621x-0.0146$   
相関係数： $r=0.9927$   
測定検体数： $n=52$



回帰式： $y=0.9605x+0.7680$   
相関係数： $r=0.9974$   
測定検体数： $n=52$

3 校正用の基準物質

ヒト L-FABP 遺伝子組み換え蛋白

■使用上または取扱い上の注意

1 取扱い上 (危険防止) の注意

- 1) 検査にあたっては感染の危険を避けるため使い捨て手袋を着用し、また口によるピペッティングを行わないでください。
- 2) 構成試薬には動物血液成分を含む物があるので取扱いに注意し、使用後は手洗いなどを行ってください。
- 3) 反応停止液は強酸性 (1N 硫酸) のため衣服・皮膚等への接触には十分に注意してください。
- 4) 試薬が誤って目や口に入った場合は、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば、医師の手当等をしてください。

2 使用上の注意

- 1) 使用に際しては本書に記載された使用方法に従ってください。
- 2) 保存は 2 ~ 8℃ とし、使用前に全ての試薬は 20 ~ 28℃ に戻してからご使用ください。
- 3) 測定結果は反応の時間や温度に影響されるので、標準及び検体ともに決められた条件下で同時に操作を行ってください。
- 4) ロット番号が異なる構成試薬を混ぜたり、交換して使用することは避けてください。
- 5) 使用期限切れの試薬は使用しないでください。

3 廃棄上の注意

- 1) 反応停止液は強酸性 (1N 硫酸) のため廃棄には十分注意してください。
- 2) 反応緩衝液、標準緩衝液、標準 L-FABP は、防腐剤としてアジ化ナトリウムを含んでいます。廃棄する際には爆発性の金属性アジドが生成されないように、多量の水で希釈し流してください。
- 3) 試薬及び容器等を廃棄する場合は、廃棄物に関する規定に従って、医療廃棄物または産業廃棄物等区別して処理してください。
- 4) 検体は感染の危険性があるものとして取り扱い、使用した器具 (ピペット、試験管等)、廃液、サンプリングチップ等は廃棄前に下記のいずれかの方法で処理を行ってください。
  - ① 0.05%ホルマリン溶液に 37℃、72 時間以上浸す。
  - ② 2%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 1000ppm) に 1 時間以上浸す。
  - ④ 121℃、20 分間オートクレーブにかける。

\*\* ■貯蔵方法・有効期間

貯蔵方法 : 2 ~ 8℃ 保存 (凍結を避けてください)  
有効期間 : 24ヶ月 (使用期限は外箱に記載)

■包装単位

96 テスト × 1

■主要文献

1. Veerkamp JH and Maatman RG. Prog Lipid Res. 34, 17-52, 1995
2. 菅谷健, 細胞. 33, 24-27, 2001
3. 上條敦子ら, 臨床病理. 51, 219-224, 2003
4. Kamijo A et al. J Lab Clin Med. 143, 23-30, 2004
5. Kamijo A et al. Am J Pathol. 165, 1243-1255, 2004
6. Kamijo A et al. J Lab Clin Med. 145, 125-133, 2005
7. Nakamura T et al. Diabetes Care. 28, 2728-2732, 2005
8. Mayer GL and Sugaya T. Fats of Life. XX, 4-12, 2006
9. Nakamura T et al. Am J Kidney Dis. 47, 439-444, 2006
10. Kamijo-Ikemori A et al. Clin Chim Acta. 374, 1-7, 2006
11. Nakamura T et al. Diabetologia. 50, 490-492, 2007
12. Negishi K et al. Kidney Int. 72, 348-358, 2007
13. Yamamoto T et al. J Am Soc Nephrol. 18, 2894-2902, 2007
14. Portilla D et al. Kidney Int. 73, 465-472, 2008
15. Nakamura K et al. Drug Metab Pharmacokinet. 23, 271-278, 2008
16. Nakamura T et al. SHOCK. 31, 454-459, 2009
17. Noiri E et al. Am J Physiol Renal Physiol. 296, 669-679, 2009
18. Nielsen SE et al. Diabetes Care. 32, 1684-1688, 2009
19. McMahon BA and Murray PT, Kidney Int. 77, 657-659, 2010
20. Nielsen SE et al. Diabetes Care. 33, 1320-1324, 2010

■問い合わせ先

シミックホールディングス株式会社 L-FABP 事業部  
〒105-0023 東京都港区芝浦 1-1-1 浜松町ビルディング  
TEL: 03-6779-8017

製造販売元

シミックホールディングス株式会社  
東京都港区芝浦 1-1-1 浜松町ビルディング