

この添付文書をよく読んでからご使用下さい。

体外診断用医薬品

レプチンキット

Leptin ELISA 「コスミック」

全般的な注意

1. 本品は体外診断用医薬品であり、それ以外の目的に使用しないで下さい。
2. 疾病の診断は、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下さい。
3. 添付文書に記載された使用方法以外の使用については、測定値の信頼性を保証致しません。
4. 操作上で機器を使用する際は、機器の添付文書または取扱説明書をよく読んでから使用して下さい。

測定原理

本品は、ELISA法による血清中のレプチン濃度の測定用キットである。抗ヒトレプチンモノクローナル抗体（マウス）が予め固相化されたウエルに検体を入れ、検体中のレプチンと反応させる。洗浄後、HRP標識抗ヒトレプチンモノクローナル抗体（マウス）を固相化抗ヒトレプチンモノクローナル抗体（マウス）血清中レプチン複合体と反応させる。洗浄後、発色液（テトラメチルベンジジン）により発色させ、吸光度を測定することにより検体中のレプチン濃度を測定する。

形状・構造等(キットの構成)

No.	構成試薬	96テスト用
1	ヒトレプチン抗体固相化ウエル [抗ヒトレプチンモノクローナル抗体（マウス）固相]	96ウエル×1包 (8ウエル×12ストリップ)
2	HRP標識ヒトレプチン抗体 [HRP標識抗ヒトレプチンモノクローナル抗体（マウス）含有]	250μL×1本
3	標準品	1.0mL分×1本
4	発色液（TMB） [テトラメチルベンジジン含有]	12mL×1本
5	10倍濃縮洗浄液	50mL×1本
6	アッセイ緩衝液	100mL×1本
7	反応停止液	12mL×1本

操作上の注意

1. 検体
 - ① 検体は、血清を用いること。
 - ② 検体は、分離後直ちに冷蔵保存（2～8℃）すること。分離当日に測定しない場合は凍結保存（-20℃以下）すること。
 - ③ 冷蔵または冷凍保存されていた検体は、室内温度（17～28℃）に戻してから使用すること。
 - ④ 検体の凍結融解の繰り返しを避けること。
 - ⑤ 高脂血清、溶血血清の使用は避けることが望ましい。
2. 妨害物質の影響¹⁾
 - ① ヘモグロビンは500mg/dL、ビリルビンC（抱合型）は21.0mg/dL、ビリルビンF（遊離型）は19.0mg/dL、乳ピ（脂質）は1840度数まで影響は受けない。
 - ② ビオチン（ビタミンB₇）は1200ng/mLまで影響は受けない。

使用目的

血清中のレプチンの測定（全身性脂肪萎縮症の診断の補助）

用法・用量(操作方法)※ ※※

1. 必要な機器類

メスシリンダー、精製水、マイクロピペット (25 μ L、100 μ L)、チップ、連続分注器 (100 μ L、300 μ L)、インキュベーター、ELISA用プレートリーダー (450nm)、プレートシェーカー、プレートシール (付属品1枚)

2. 試薬の調製

① ヒトレプチン抗体固相化ウエル

少なくとも30分間室内温度 (17~28 $^{\circ}$ C) に放置し、必要な数だけ固相化ウエルを取り出す。

② 標準品

標準品1本につきアッセイ緩衝液1mLを加えて溶解し、10分以上静置して溶解する。よく混和し、さらにアッセイ緩衝液で10倍希釈し、500pg/mLを調製する。次いで、500pg/mLからアッセイ緩衝液を用いて順次希釈し、250、125、62.5、31.25、15.63、7.82pg/mLを調製する。アッセイ緩衝液のみを0pg/mLとし、0~500pg/mLの8濃度を標準溶液として使用する。標準品は溶解後栓をして2~8 $^{\circ}$ Cで8週間保存できる。

③ HRP標識ヒトレプチン抗体

HRP標識ヒトレプチン抗体をアッセイ緩衝液にて50倍希釈し、HRP標識ヒトレプチン抗体溶液として使用する。希釈後は冷蔵 (2~8 $^{\circ}$ C) で4週間保存できる。

④ 10倍濃縮洗浄液

10倍濃縮洗浄液を精製水にて10倍希釈し、洗浄液として使用する。溶液中に沈殿物がある場合、これを完全に溶解してから使用する。希釈後は冷蔵 (2~8 $^{\circ}$ C) で4週間保存できる。

⑤ その他の試薬

調製済みであるので、そのまま穏やかに混和して均一な溶液とし、室内温度に戻してから使用する。

3. 検体の準備

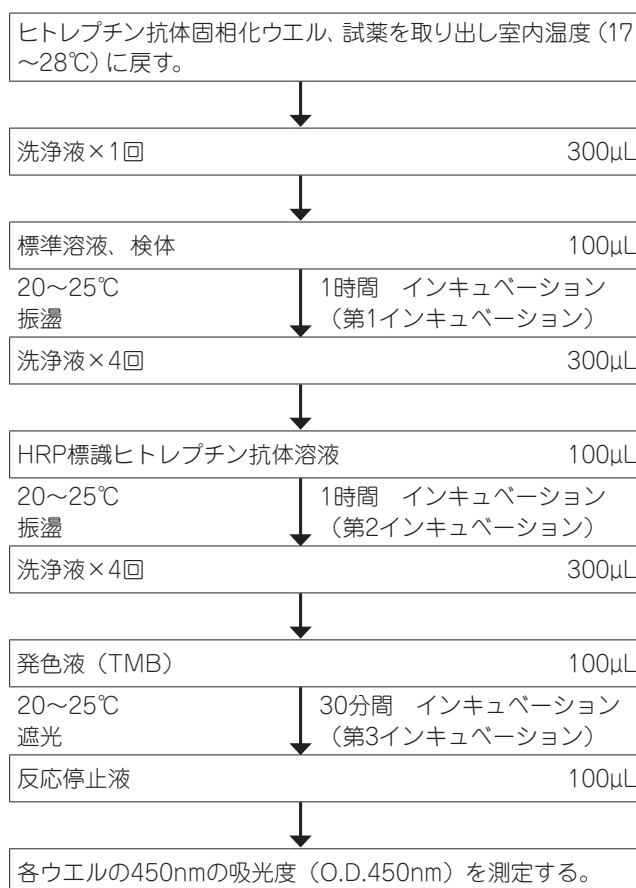
血清をアッセイ緩衝液にて21倍希釈し、検体として使用する。血清中のレプチン濃度が1ng/mL以下であることが疑われる場合は、アッセイ緩衝液で4倍希釈して使用する。

4. 測定法

- ① 洗浄液を300 μ Lずつ各ウエルに分注する。
- ② 洗浄液を除去後、清潔で乾燥した吸収紙上で軽く叩き、水滴が残らないようにする。
- ③ 調製した標準溶液及び検体を100 μ Lずつ各ウエルに分注し、20~25 $^{\circ}$ Cで振盪しながら1時間インキュベーションする。(第1インキュベーション)
- ④ 内容液を除去後、洗浄液を300 μ Lずつ各ウエルに入れる。洗浄液を除去した後は清潔で乾燥した吸

収紙上で軽く叩き、水滴が残らないようにする。

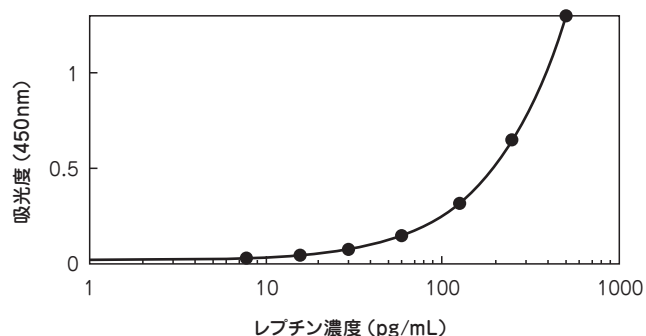
- ⑤ ④の操作を3回繰り返す。(合計4回)
- ⑥ 調製したHRP標識ヒトレプチン抗体溶液を100 μ Lずつ各ウエルに分注し、20~25 $^{\circ}$ Cで振盪しながら1時間インキュベーションする。(第2インキュベーション)
- ⑦ ④、⑤の操作を繰り返す。
- ⑧ 発色液 (TMB) を100 μ Lずつ、各ウエルに分注し、遮光し20~25 $^{\circ}$ Cで30分間発色させる。(第3インキュベーション)
- ⑨ 発色液 (TMB) を捨てずに、停止液を100 μ Lずつ各ウエルに分注する。この際、発色液 (TMB) を入れた順番と速度にならって分注する。
- ⑩ プレート側面を軽く叩くかプレートシェーカーで混合する。
- ⑪ ELISA用プレートリーダーで各ウエルの450nmの吸光度を測定する。
- ⑫ 各ウエルの吸光度を記録する。
- ⑬ 片対数グラフの横軸に標準溶液の濃度、縦軸に吸光度をとり、標準曲線例に従って標準曲線を作成する。
- ⑭ 検体中のレプチン濃度を標準曲線から読み取り、検体の希釈倍率を乗じて血清中のレプチン濃度を算出する。



測定結果の判定法^{1) ※※}

- 健康成人619例より設定したレプチンの基準範囲は、BMIが $18.5 \leq \text{BMI} < 25.0$ の普通体重の成人で男性が $0.6 \sim 8.9 \text{ ng/mL}$ 、女性 $1.9 \sim 26.6 \text{ ng/mL}$ であったが、基準値は施設ごとに設定すること。
- 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果と合わせて担当医師が総合的に判断すること。
- 全身性脂肪萎縮症以外の痩せでも低レプチン血症を呈する可能性がある。
- 部分性脂肪萎縮症においては血中のレプチン濃度が正常値から高値を示す可能性がある。

標準曲線例



臨床的意義^{※※}

1. レプチンの臨床的意義

全身性脂肪萎縮症は、脂肪組織が摂取エネルギー量とは無関係に萎縮し、脂肪組織の減少・消失とともに、重度のインスリン抵抗性、糖尿病、高トリグリセリド血症、脂肪肝等、脂肪萎縮に起因する様々な代謝異常（症）を高率に合併する疾患である。これらの症状は、脂肪細胞から分泌されるレプチンの血中濃度の低下が要因であることが報告されている²⁾。

また血中レプチン濃度は、体脂肪率、体脂肪量と強い正相関を示すことから、脂肪萎縮を定量的に評価できるため、血中レプチン濃度測定は全身性脂肪萎縮症の診断補助手段として有用である³⁾。

2. 疾患別陽性率¹⁾

男性	対象群	非対象群
カットオフ値未満 <0.6ng/mL	5	3
カットオフ値以上 ≥0.6ng/mL	0	294
感度： 100% 特異度： 99.0%		

上記の疾患別陽性率（男性）検討の症例の内訳は、対象群：全身性脂肪萎縮症（5）、非対象群：糖脂質代謝異常（78）、非糖尿病（3）、神経性食欲不振症（1）、健康成人（215）である。

女性	対象群	非対象群
カットオフ値未満 <1.9ng/mL	8	41
カットオフ値以上 ≥1.9ng/mL	0	254
感度： 100% 特異度： 86.1%		

上記の疾患別陽性率（女性）検討の症例の内訳は、対象群：全身性脂肪萎縮症（8）、非対象群：部分性脂肪萎縮症（1）、糖脂質代謝異常（48）、非糖尿病（2）、神経性食欲不振症（59）、健康成人（185）である。

性能¹⁾

1. 感度試験

- ① 標準溶液 0 pg/mL を測定するとき、その吸光度は 0.05 以下である。
- ② 標準溶液 500 pg/mL を測定するとき、その吸光度は 1.00 以上である。

2. 正確性試験

71.6 pg/mL 付近（ $61 \sim 82 \text{ pg/mL}$ ）、 182.8 pg/mL 付近（ $155 \sim 210 \text{ pg/mL}$ ）、 261.7 pg/mL 付近（ $222 \sim 301 \text{ pg/mL}$ ）の管理用検体を測定するとき、その測定値は既知濃度の $\pm 25\%$ 以内である。

3. 同時再現性試験

71.6 pg/mL 付近（ $61 \sim 82 \text{ pg/mL}$ ）、 182.8 pg/mL 付近（ $155 \sim 210 \text{ pg/mL}$ ）、 261.7 pg/mL 付近（ $222 \sim 301 \text{ pg/mL}$ ）の管理用検体を5回同時に測定するとき、そのC.V.値は 15% 以下である。

4. 測定範囲

$7.82 \sim 500 \text{ pg/mL}$

5. 校正用標準物質

NIBSC (97/594)

使用上または取扱い上の注意^{※※}

1. 取扱い上の注意事項

- ① 本試薬には、ヒト由来成分は含まれないが、HIV、HBV、HCV等の感染の恐れがあるものとして検体と同様に取り扱うこと。
- ② 検体は感染の恐れがあるので、取扱いには十分に注意すること。検体に接触した器具、試薬及び試薬容器等は感染の危険があるものとし、オートクレーブで121℃、15分間、高圧蒸気滅菌処理するか、又は1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液を調製して、1時間浸した後、多量の水で洗い流すこと。次亜塩素酸ナトリウム溶液を多量に廃棄する際、酸性下で有毒の塩素ガスを発生するので、廃液は中和した後に、多量の水で流す等の配慮をすること。
- ③ 本試薬には防腐剤として2-クロロアセトアミド、また停止液には硫酸が含まれており、皮膚等を刺激する恐れがある。これらを含む試薬を含め、すべての試薬が誤って目や口に入った場合または身体に付着した場合は、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て等を受けること。
- ④ 身体の汚染及び感染防止のため、作業室内では使い捨てのゴム手袋、専用の実験衣を着用すること。また、口によるピペティングを行わないこと。
- ⑤ 試薬、血清等が誤って体内に入るのを防ぐため、作業室内では飲食、喫煙等はしないこと。

2. 使用上の注意事項

- ① キット内の試薬は正確な反応が得られるように組み合わせるので、ロット番号の異なる試薬を組み合わせ使用しないこと。また、同一ロット番号の試薬であっても試薬の注ぎ足しは行わないこと。
- ② 検体、標準溶液等を分注する際、同じチップは使用しないこと。
- ③ 試薬の開封後は使用期限内でなるべく早く使用し、保存する場合は、蓋を閉めて2～8℃で保存すること。
- ④ 使用期限を過ぎた試薬は使用しないこと。

3. 廃棄上の注意事項

- ① キット内の試薬、容器を他の目的に使用しないこと。使用後の容器は、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、区別して処理すること。余った試薬を廃棄する場合には、水質汚濁防止法等の規程に従って処理すること。
- ② 検体、試薬、廃液等が飛散した場合、飛散箇所に1%の次亜塩素酸ナトリウム溶液を塗布し、1時間経過後ふき取りを行うこと。

- ③ 本試薬は、微量(0.1%以下)のアジ化ナトリウムを含んでいる。排水管等に用いられている銅や鉛と反応して爆発性の金属アジドを形成する恐れがあるため、多量の水で流す等の配慮をすること。

貯蔵方法

2～8℃で保存すること。

有効期間

12ヶ月間

(使用期限については製品包装上面に記載している。)

包装単位

商品コード	包装単位
F10632101	96テスト用

主要文献^{※※}

- 1) 社内資料
- 2) 中尾一和 “最新内分泌代謝学,” 診断と治療社: 455-459, 2013.
- 3) 一般社団法人 日本内分泌学会 「脂肪萎縮症診療ガイドライン」作成委員会. 脂肪萎縮症診療ガイドライン. 日本内分泌学会雑誌. 94(suppl. Sep.), 1-31, 2018

問い合わせ先

株式会社コスミック コーポレーション 営業部
〒112-0002 東京都文京区小石川2丁目7番3号
電話 03 (5802) 5971
FAX 03 (5802) 5974

製造元^{※ ※※}

株式会社イムノ・プローブ
〒355-0225 埼玉県比企郡嵐山町鎌形1331番地3
電話 0493 (62) 6923 (代)

製造販売元

株式会社コスミック コーポレーション
〒112-0002 東京都文京区小石川2丁目7番3号 富坂ビル
電話 03 (5802) 5880 (代)