

* 2023年6月改訂 (第5版)
* 2020年4月改訂 (第4版)

この電子添文をよく読んでから使用すること。

遊離メタネフリン2分画キット

2-MET Plasma・ELISAキット「SML」

2-MET Plasma・ELISA kit「SML」

【重要な基本的注意】

1. 安静にせずに採血を行うと、測定値が上昇するおそれがあるため、採血は仰臥位にて20分間安静にした後に行うこと⁽¹⁾。

【全般的な注意】

1. 本キットは、体外診断用医薬品でありそれ以外の目的には使用しないこと。
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すること。
3. 電子添文以外の使用方法については保証できない。
4. 前処理用添加液については、HIV抗体、HBs抗原及びHCV抗体が陰性であることを確認したヒト由来成分が含まれているが、感染の危険性を完全に否定できないので、感染性のあるものとして取り扱うこと。
5. 本キットには、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれており、皮膚等を刺激する場合がある。もし、皮膚や衣類等についた時は速やかに水で洗い流すこと。皮膚等に異常が生じた場合は、医師の手当てを受けること。

【形状・構造等（キットの構成）】

1. メタネフリンマイクロプレート
..... 96ウェル 1枚
2. ノルメタネフリンマイクロプレート
..... 96ウェル 1枚
3. メタネフリン抗血清..... 6mL 1本
抗メタネフリンウサギポリクローナル抗体
4. ノルメタネフリン抗血清..... 6mL 1本
抗ノルメタネフリンウサギポリクローナル抗体
5. 酵素標識抗体..... 12mL 2本
ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギポリクローナル抗体
6. 標準A、B、C、D、E、F 4mL 各1本
(遊離メタネフリン及び遊離ノルメタネフリン含有)
遊離メタネフリン 0、36、120、360、1,200、3,600pg/mL
遊離ノルメタネフリン 0、72、240、720、2,400、7,200pg/mL
7. コントロール1、2..... 4mL 各1本
(遊離メタネフリン及び遊離ノルメタネフリン含有)
8. アシル化剤濃縮液..... 1.5mL 1本
9. 緩衝液..... 10mL 1本
10. 洗浄液..... 20mL 2本
11. 発色液..... 12mL 2本
3,3', 5,5'-テトラメチルベンジジン
12. 反応停止液..... 12mL 2本
硫酸0.25mol/L
13. 前処理用添加液..... 14mL 1本
14. 前処理用抽出プレート..... 96ウェル 1枚
15. 前処理用緩衝液..... 30mL 1本
16. 前処理用洗浄液..... 20mL 1本
17. 前処理用溶出液..... 14mL 1本
水酸化ナトリウム0.1mol/L
18. プレートシール..... 4枚 2包

【使用目的】

血漿中の遊離メタネフリン及び遊離ノルメタネフリンの測定（褐色細胞腫の診断の補助）

【測定原理】

2-MET Plasma・ELISAキット「SML」は、ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent assay：酵素免疫測定法) を原理とする血漿中の遊離メタネフリン及び遊離ノルメタネフリン量を測定するキットである。

検体に含まれる遊離メタネフリン及び遊離ノルメタネフリンは、アシル化剤でアシル化された後、各マイクロプレートに固定化されたメタネフリン又はノルメタネフリンと競合的に、各抗血清に含まれる第一抗体と結合する。

反応後、マイクロプレートを洗浄することで固相に結合しなかった第一抗体を除去し、固相に結合した第一抗体にペルオキシダーゼ酵素標識抗体（第二抗体）を結合させ、3,3', 5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を含む発色液で発色させる。反応停止液で発色反応を停止後、波長450nmにて吸光度を測定することで、既知濃度の標準A～Fを用いて作成した標準曲線から、検体中の遊離メタネフリン濃度及び遊離ノルメタネフリン濃度を求める。

【操作上の注意】

** 1. 測定試料の性質、採取法

- 1) 検体はEDTA又はヘパリンで処理された血漿を使用する。
- 2) 検体の凍結融解は繰り返さない。
- 3) 溶血血漿及び高脂血漿は検体として用いない。
- 4) 血漿検体は2～8℃で保存し、3日間以内に測定すること。測定までに3日間を越える場合は-20℃以下で保存し、6ヵ月以内に測定すること。
- 5) セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤、三環系抗うつ剤、MAO阻害剤、L-DOPA、交感神経刺激剤等の薬物投与を受けた後の検体では、測定値に影響を与えることがある。

2. 妨害物質・妨害薬剤

高低2濃度の検体に、次の妨害物質、ビリルビン・F、ビリルビン・C、溶血ヘモグロビン及び乳び（ホルマジン濁度）を添加し、遊離メタネフリン測定値及び遊離ノルメタネフリン測定値への影響を検討した。妨害物質添加前と添加後の検体を本キットにて遊離メタネフリン濃度及び遊離ノルメタネフリン濃度を測定し、下記の計算式に従って各妨害物質の妨害率を算出した。

ビリルビン・F及びビリルビン・Cは、表中に示す濃度まで影響は認められなかった。溶血ヘモグロビン及び乳びについては、測定値への影響が認められるため、溶血血漿及び高脂血漿は測定に用いないこと。

$$\text{妨害率 (\%)} = \frac{\text{妨害物質添加検体の測定値}}{\text{妨害物質無添加検体の測定値}} \times 100$$

遊離メタネフリン測定値への影響

妨害物質 (添加濃度)	検体 1			検体 2		
	妨害物質 (pg/mL)		妨害率 (%)	妨害物質 (pg/mL)		妨害率 (%)
	(+)	(-)		(+)	(-)	
ビリルビン・F (20mg/dL)	138.4	146.9	94	354.0	357.3	99
ビリルビン・C (20mg/dL)	110.7	95.60	116	276.1	297.3	93
溶血ヘモグロビン (500mg/dL)	100.9	167.5	60	345.2	513.9	67
乳び (2500濁度)	243.0	117.2	207	600.9	464.2	129

遊離ノルメタネフリン測定値への影響^{※※}

妨害物質 (添加濃度)	検体 1			検体 2		
	妨害物質 (pg/mL)	妨害率 (%)	妨害物質 (pg/mL)	妨害率 (%)		
	(+)		(-)		(+)	(-)
ビリルビン・F (20mg/dL)	468.3	536.4	87	1235	1095	113
ビリルビン・C (20mg/dL)	447.8	520.0	86	1301	1209	108
溶血ヘモグロビン (500mg/dL)	104.2	284.7	37	595.5	979.1	61
乳び (2500濁度)	311.9	265.4	118	985.3	889.9	111

※※本キットは妨害物質・妨害薬剤の検討試験を実施後にキャリブレーションを変更したため、上の表に示す値はキャリブレーション変更後の換算値である。

※ 3. 交差反応性

関連物質	遊離メタネフリン測定 交差率 (%)	遊離ノルメタネフリン測定 交差率 (%)
Metanephrine	100	0.7
Normetanephrine	ND	100
3-methoxytyramine	ND	6.5
Adrenaline	ND	ND
Noradrenaline	ND	ND
Dopamine	ND	ND
Vanillic mandelic acid	ND	ND
Homovanillic acid	ND	ND
L-DOPA	ND	ND
L-Tyrosin	ND	ND
Tyramine	ND	ND
Acetaminophen	ND	ND
Serotonin	ND	ND
5-HIAA	ND	ND

ND : <0.1%

遊離ノルメタネフリン測定における3-methoxytyramineの交差率は3-methoxytyramineが正常値の場合には問題とならないが、ドパミン過剰産生腫瘍等により3-methoxytyramineが著しく高値の場合、遊離ノルメタネフリン測定値が偽陽性となり得ることから、注意すること。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法

- 1) 前処理用洗浄液
20mLの前処理用洗浄液を精製水で25倍に希釈し全量を500mLにして用いる。
- 2) 洗浄液
20mLの洗浄液を精製水で50倍に希釈し全量を1000mLにして用いる。
- 3) アシル化剤
使用の直前に80μLのアシル化剤濃縮液に3mLの精製水を加え混和して調製する。なお、調製後3分以内にウェルに添加すること。
- 4) その他の試薬
そのまま用いる。

2. 試薬の調製及び取扱い上の注意

- 1) 試薬の溶解は、泡立てないように穏やかに溶解すること。
- 2) ピペット操作は、可能な限り正確に行うこと。

3. 必要な器具・器材・試料等

マイクロピペット
メスシリンダー
連続分注器
振とう器（プレートシェーカー600rpm）
マイクロプレート洗浄器
吸光マイクロプレートリーダー
（主波長450nm/副波長620～650nm）
ボルテックスミキサー
タイマー又は時計
恒温槽
吸収紙
精製水

4. 測定（操作）法

測定は少なくとも二重測定で行うこと。

1) 前処理（抽出操作）

- ①標準A～F、コントロール1、2の前処理に使用する前処理用抽出プレートのウェルを選び、標準A～F、コントロール1、2を20μLずつ添加する。
- ②検体の前処理に使用する前処理用抽出プレートのウェルを選び、標準Aを20μL添加する。
- ③標準A～F、コントロール1、2を添加したウェルに前処理用添加液200μLを添加する。
- ④標準Aを添加した検体用のウェルに検体200μLを添加する。
- ⑤600rpmで振とうしながら、20～24℃で2時間、インキュベーションする。
- ⑥内容液を吸引除去し、逆さにして吸収紙に余分な水分を吸わせた後、前処理用緩衝液250μLをウェルに添加し、600rpmで振とうしながら、20～24℃で5分間、インキュベーションする。
- ⑦内容液を吸引除去し、逆さにして吸収紙に余分な水分を吸わせた後、前処理用洗浄液350μLをウェルに添加し、内容液を吸引除去する。本操作を繰り返し計3回洗浄する。
- ⑧逆さにして吸収紙に余分な水分を吸わせた後、前処理用溶出液100μLを添加し、プレートシールを貼り、600rpmで振とうしながら、20～24℃で15分間、インキュベーションする。
- ⑨得られた前処理後溶液は、遊離メタネフリンの測定及び遊離ノルメタネフリンの測定にそれぞれ用いる。

2) 遊離メタネフリンの測定

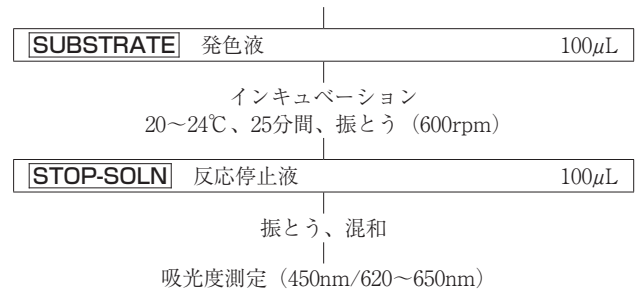
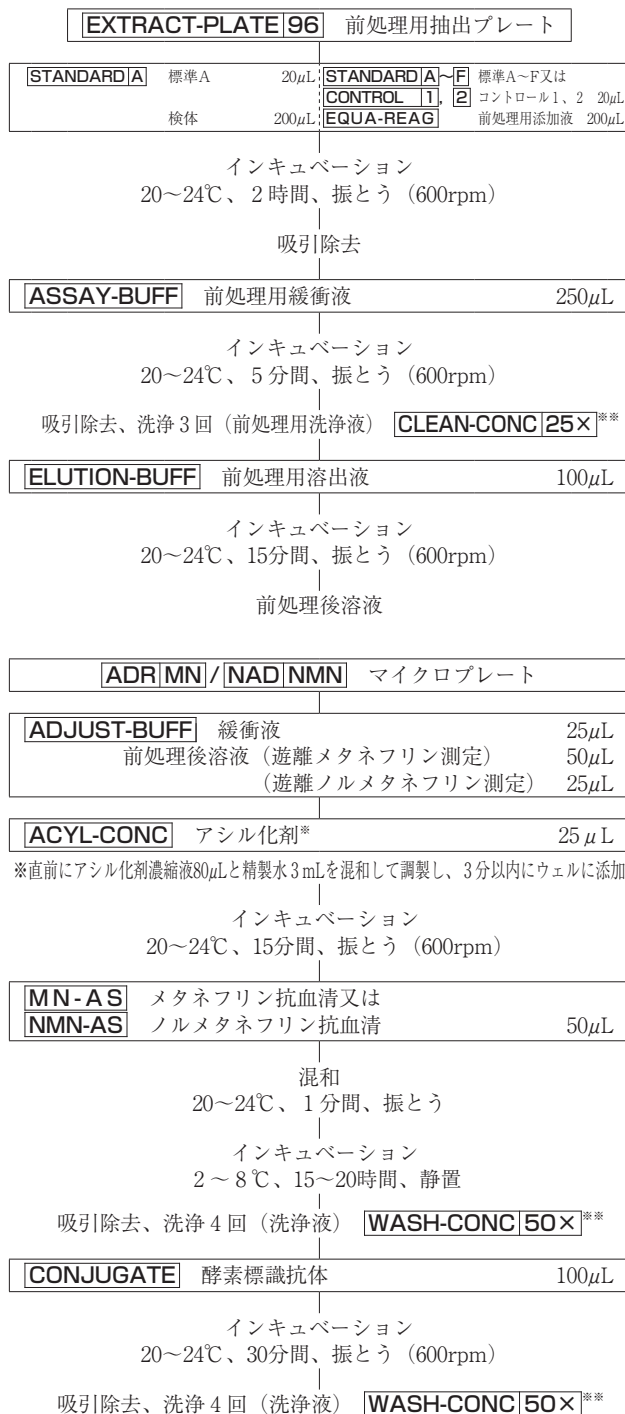
- ⑩前処理後溶液の遊離メタネフリン測定に使用するメタネフリンマイクロプレートのウェルを選び、緩衝液25μLを添加する。
- ⑪前処理後溶液を50μLずつウェルに添加する。
- ⑫アシル化剤25μLを調製後3分以内にウェルに添加する。
- ⑬600rpmで振とうしながら、20～24℃で15分間、インキュベーションする。
- ⑭メタネフリン抗血清50μLをウェルに添加し、メタネフリンマイクロプレートにプレートシールを貼り、1分間、20～24℃で振とう、混和する。
- ⑮メタネフリンマイクロプレートを2～8℃で、15～20時間、インキュベーションする。
- ⑯プレートシールをはがし、反応液を吸引除去後、洗浄液300μLをウェルに添加し、内容液を吸引除去する。本操作を繰り返し計4回洗浄する。
- ⑰逆さにして吸収紙に余分な水分を吸わせた後、酵素標識抗体100μLをウェルに添加し、600rpmで振とうしながら、20～24℃で30分間インキュベーションする。
- ⑱反応液を吸引除去後、洗浄液300μLをウェルに添加し、内容液を吸引除去する。本操作を繰り返し計4回洗浄する。
- ⑲逆さにして吸収紙に余分な水分を吸わせた後、発色液100μLをウェルに添加し、600rpmで振とうしながら、20～24℃で25分間インキュベーションする（直射日光を避けること）。
- ⑳反応停止液100μLをウェルに添加し、振とう後、10分以内に吸光マイクロプレートリーダーで主波長450nm/副波長620～650nmにて吸光度を測定する。

3) 遊離ノルメタネフリンの測定

- ⑩前処理後溶液の遊離ノルメタネフリン測定に使用するノルメタネフリンマイクロプレートのウェルを選び、緩衝液25μLを添加する。
- ⑪前処理後溶液を25μLずつウェルに添加する。
- ⑫アシル化剤25μLを調製後3分以内にウェルに添加する。
- ⑬600rpmで振とうしながら、20～24℃で15分間、インキュベーションする。
- ⑭ノルメタネフリン抗血清50μLをウェルに添加し、ノルメタネフリンマイクロプレートにプレートシールを貼り、1分間、20～24℃で振とう、混和する。
- ⑮ノルメタネフリンマイクロプレートを2～8℃で、15～20時間、インキュベーションする。

- ⑯プレートシールをはがし、反応液を吸引除去後、洗浄液300 μ Lをウェルに添加し、内容液を吸引除去する。本操作を繰り返し計4回洗浄する。
- ⑰逆さにして吸収紙に余分な水分を吸わせた後、酵素標識抗体100 μ Lをウェルに添加し、600rpmで振とうしながら、20～24℃で30分間インキュベーションする。
- ⑱反応液を吸引除去後、洗浄液300 μ Lをウェルに添加し、内容液を吸引除去する。本操作を繰り返し計4回洗浄する。
- ⑲逆さにして吸収紙に余分な水分を吸わせた後、発色液100 μ Lをウェルに添加し、600rpmで振とうしながら、20～24℃で25分間インキュベーションする（直射日光を避けること）。
- ⑳反応停止液100 μ Lをウェルに添加し、振とう後、10分以内に吸光マイクロプレートリーダーで主波長450nm/副波長620～650nmにて吸光度を測定する。

* 5. 測定（操作）法概略

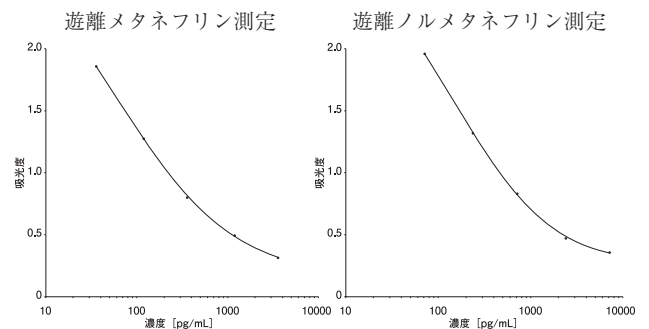


※※【用法・用量（操作方法）】1. 試薬の調製方法に従い調製した溶液を用いる。

6. 結果の計算

- 1) 測定した各測定値からバックグラウンドを差し引き、各吸光度を求める。
- 2) グラフを用いて、横軸に標準A～Fの遊離メタネフリン濃度又は遊離ノルメタネフリン濃度を、縦軸に対応する吸光度をプロットして、それぞれ標準曲線を作成する。
- 3) 作成した標準曲線から、検体及びコントロール1、2の遊離メタネフリン濃度及び遊離ノルメタネフリン濃度を読み取る。

7. 標準曲線例



【測定結果の判定法】

遊離メタネフリン測定値が130pg/mL超又は遊離ノルメタネフリン測定値が506pg/mL超の場合、褐色細胞腫陽性と判定する。

遊離メタネフリン測定値が130pg/mL以下かつ遊離ノルメタネフリン測定値が506pg/mL以下の場合、褐色細胞腫陰性と判定する。

当該カットオフ値は参考であり、施設ごとに設定すること。

*【臨床的意義】

褐色細胞腫は、高血圧、動悸、頻脈、胸痛、頭痛、顔面蒼白、不安感など多彩な臨床症状を示す。代謝面からは、高血糖、乳酸アシドーシス、体重減少等を認めることが多いが、無症候性、正常血圧性で副腎偶発腫瘍として発見されることもある⁽²⁾。

褐色細胞腫は、副腎髄質又は傍神経節においてクロム親和性細胞から発生し、カテコールアミンであるアドレナリン及びノルアドレナリン等を産生する。産生されたアドレナリン及びノルアドレナリンは、カテコールアミン代謝酵素COMT（catechol-O-methyl transferase）によって、遊離メタネフリン及び遊離ノルメタネフリンに代謝される。褐色細胞腫ではカテコールアミンの産生に加えてCOMTが高濃度で発現しているため、褐色細胞腫患者の体内では遊離メタネフリン及び遊離ノルメタネフリンが持続的に分泌され、血中濃度が上昇する。

褐色細胞腫診断に関する血中遊離メタネフリン・ノルメタネフリン測定の成人を対象とした臨床試験結果によって、本キットの臨床性能を評価した。その結果、褐色細胞腫の診断における感度は96.2%、特異度は100.0%であった⁽³⁾。

表1 褐色細胞腫の検査結果と疾患有無の四分表

	病気有	病気無	計
検査陽性	25	0	25
検査陰性	1	115	116
計	26	115	141

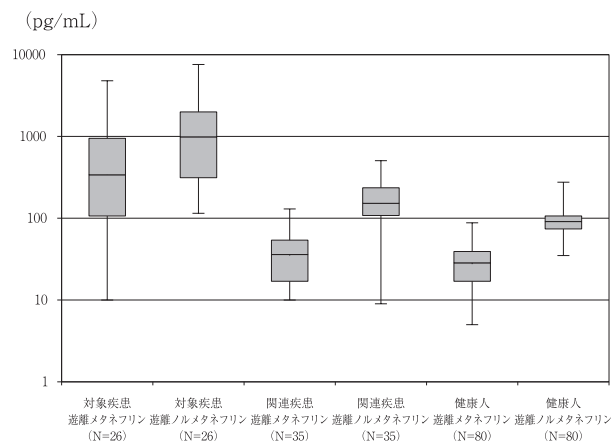


図1 臨床性能試験結果換算値*

※本キットは、臨床性能試験を実施後にキャリブレーションを変更したため、図1に示す値はキャリブレーション変更後の換算値である。

また、インドにおいて、本キットを用いて小児116例を診断した結果、小児用のカットオフ値を適用した場合、感度100%、特異度90.5%であった（成人用のカットオフ値を適用した場合は、感度100%、特異度81%であった）⁽⁴⁾。

従って、小児用のカットオフ値は【測定結果の判定法】に示すカットオフ値とは異なる可能性があるため、【測定結果の判定法】を参考に各施設で独自に設定すること。

【性能】

1. 性能

- 1) 感度
標準Aを測定するとき、吸光度は1.25以上である。
- 2) 正確性
遊離メタネフリン濃度及び遊離ノルメタネフリン濃度の異なる3種類の管理用検体を3回同時に測定するとき、測定値の平均値はそれぞれ既知濃度の±40%以内である。
- 3) 同時再現性
遊離メタネフリン濃度及び遊離ノルメタネフリン濃度の異なる3種類の管理用検体を3回同時に測定するとき、測定値の変動係数（C.V.値）は、いずれも25%以下である。
- 4) 測定範囲
遊離メタネフリン：13pg/mLから3,600pg/mL
遊離ノルメタネフリン：30pg/mLから7,200pg/mL

2. 校正用基準物質

社内標準物質

【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) 試薬が目や皮膚に付着したり、口に入ったりしないよう十分に注意すること。また、誤って目や皮膚に付着したり、口に入ったりした場合は、直ちに水で十分に洗い流すなどの応急措置を行うこと。異常があれば、医師に相談すること。
- 2) 検体を取り扱うときは、感染の危険性を考慮して使い捨ての手袋を着用するなど慎重に取り扱うこと。
- 3) 反応停止液は0.25mol/Lの硫酸を含有しており火傷をする可能性があるため、目、皮膚及び衣類等に触れないようにすること。もし、接触した場合は、大量の水で洗い流すこと。
- 4) 前処理用溶出液は0.1mol/Lの水酸化ナトリウムを含有しており火傷をする可能性があるため、目、皮膚及び衣類等に触れないようにすること。もし、接触した場合は、大量の水で洗い流すこと。

2. 使用上の注意

- 1) 本キットは入荷次第、貯蔵方法に従って冷蔵庫（2～8℃）に保存すること。
- 2) 試薬の凍結・融解はしないこと。誤って凍結させた試薬は品質が変化して、正しい測定値は得られないことがあるので、使用しないこと。

- 3) 使用期限の過ぎた試薬は、測定値の信頼性を保証できないので、使用しないこと。
- 4) 本キットは、同一のキット中の試薬の組み合わせで正確な反応を示すよう調整されているので、異なる製造番号のキット中の試薬と組み合わせたり、混ぜ合わせたりしないこと。
- 5) 標準曲線は測定ごとに作成すること。
- 6) 測定結果は、反応条件（インキュベーションの時間や温度など）に影響されるので、標準A～Fと検体は同一の指定された条件で同時に操作すること。
- 7) 容器が試薬で汚染されている可能性を考慮して、キット中の容器を他の目的に転用することは避けること。

3. 廃棄上の注意

- 1) 保存剤としてアジ化ナトリウムを含むので、使用済みなどによりその溶液を廃棄する場合は、鉛や銅などの金属製の排水管中で爆発性の金属アジ化物が形成されないように、必ず、大量の水で十分希釈しながらゆっくり洗い流すこと。
- 2) 検体に接触した器具、試薬、試薬容器及び検体の残りなどは感染の危険があるものとして、オートクレーブ（121℃、20分以上）などで滅菌するか、又は、次亜塩素酸ナトリウム（有効塩素濃度5,000ppm）に1時間以上浸すなどの処理をすること。
- 3) 反応停止液には0.25mol/Lの硫酸が含まれているので廃棄する場合には中和する等の注意を要すること。
- 4) 前処理用溶出液には、0.1mol/Lの水酸化ナトリウムが含まれているので廃棄する場合には中和する等の注意を要すること。
- 5) 使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って医療廃棄物、産業廃棄物など区別して処理すること。

【貯蔵方法・有効期間】

貯蔵方法：2～8℃

有効期間：製造日より24ヵ月間

【包装単位】

96テスト用（標準曲線作成用を含む）

【主要文献】

- (1) Tanaka Y, et al. : Plasma free metanephrines in the diagnosis of pheochromocytoma : diagnostic accuracy and strategies for Japanese patients. Endocrine Journal 2014 ; 61(7) : 667-673.
- (2) 日本内分泌学会「悪性褐色細胞腫の実態調査と診療指針の作成」委員会：褐色細胞腫・パラガングリオーマ診療ガイドライン2018
- (3) 社内資料
- (4) Vijaya Sarathi, et al. : Performance of plasma fractionated free metanephrines by enzyme immunoassay in the diagnosis of pheochromocytoma and paraganglioma in children. Endocrine Practice 2012 ; 18(5) : 694-699.

【問い合わせ先】

DENISファーマ株式会社 営業部

〒100-0013

東京都千代田区霞が関三丁目6番7号

TEL : 03-5510-2932 FAX : 03-5510-0130

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

製造販売業者：

DENISファーマ株式会社

〒285-0802

千葉県佐倉市大作一丁目8番5号

TEL : 043-498-2031

製造業者：

Labor Diagnostika Nord GmbH & Co. KG（ドイツ）