

* 2024年08月改訂 (第3版)
* 2022年09月改訂 (第2版)

この電子添文をよく読んでから使用すること。

17-ヒドロキシプロゲステロンキット

17-OHプロゲステロンELISA「DP」

17-OH PROGESTERONE ELISA「DP」

【一般的な注意】

- 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。
- 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。
- 電子添文以外の使用方法については保証できない。
- 標準血清 0～6、コントロール 1、2 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。
- 使用する機器の電子添文及び取扱説明書をよく読んでから使用すること。

【形状・構造等（キットの構成）】

- マイクロプレート…………… 96ウェル 1枚
抗ウサギ IgG ヤギポリクローナル抗体
抗17-OHP IgG ウサギポリクローナル抗体
- 標準血清 0、1、2、3、4、5、6
…………… 1 mL 各1本
0、0.08、0.4、1.3、2.5、7.5、15ng/mL
- コントロール 1、2（凍結乾燥品）
…………… 1 mL用 各1本
- HRP標識17-OHP…………… 0.3mL 1本
ペルオキシダーゼ標識17α-ヒドロキシプロゲステロン抗原
- 緩衝液…………… 30mL 1本
ウシ血清アルブミン
- 洗浄液…………… 10mL 1本
- * 7. 発色液…………… 13mL 1本
3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン
- * 8. 反応停止液…………… 13mL 1本
硫酸 0.2mol/L

【使用目的】

血清中の17α-ヒドロキシプロゲステロンの測定

【測定原理】

17-OHプロゲステロンELISA「DP」は、ELISA（酵素免疫測定法）を原理とする血清中の17α-ヒドロキシプロゲステロン（以下、17-OHP）量を測定するキットである。
標準血清、コントロール、及び検体に含まれる17-OHPは、HRP標識17-OHPと競合的にマイクロプレートに固相化された抗体に結合する。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抗原が除去される。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たあと、反応停止液で反応を停止後、波長450nmにて吸光度を測定することで、既知濃度の標準血清を用いて作成した標準曲線から、検体中の17-OHP濃度を求める。

【操作上の注意】

- 測定試料の性質、採取法
1) 検体は測定まで2～8℃で保管し、24時間以内に測定すること。24時間以内に測定できない場合は-20℃以下で保存すること。
2) 検体の凍結融解は繰り返さない。
3) 検体の希釈が必要な場合は本品の標準血清 0 を用いて希釈し測定すること。

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ビを添加し、17-OHP測定値への影響を検討した。本キットにて妨害物質添加前と添加後の検体の17-OHP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、ビリルビン・C、溶血ヘモグロビン、乳ビについて表中に示す濃度まで影響は認められなかった。

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

17-OHP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 (ng/mL)		妨害率 (%)	妨害物質 (ng/mL)		妨害率 (%)
	(+)	(-)		(+)	(-)	
ビリルビン・F (18.5mg/dL)	0.97	0.91	107	8.11	8.53	95
ビリルビン・C (20.8mg/dL)	0.94	0.88	107	8.84	9.40	94
溶血ヘモグロビン (490mg/dL)	0.94	0.96	98	7.73	8.49	91
乳ビ (1640FTU)	0.89	0.93	96	7.18	8.63	83

* 3. 交差反応性

関連物質	交差率（\%）
17OH-Progesterone	100
Progesterone	0.45
17- <i>a</i> -hydroxypregnenolone	0.22
21-deoxycortisol	0.96
Pregnenolone	0.01
11-deoxycortisol	0.13
Corticosterone	0.00
11-deoxycorticosterone	0.06
Testosterone	0.01
Androstenedione	0.01
Estradiol	0.00
17- <i>a</i> -hydroxypregnenolone sulfate	ND

ND : non detectable

新生児期～乳児早期では、17-*a*-hydroxypregnenolone sulfateが高値を示すことが知られていることから、交差反応性に及ぼす影響を防ぐため、生後4か月以下の検体*については【用法・用量（操作方法）】4. 測定（操作）法 1) 抽出操作を行うこと。

※この電子添文では生後4か月以下の検体を「新生児検体」と表記する。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法

- コントロール
1 mLの精製水を加えて溶解する。
- HRP標識17-OHP溶液
20μLのHRP標識17-OHPに緩衝液 2 mLを加え、よく攪拌して調製する。なお、使用直前に調製すること。

- 3) 洗浄溶液
1 mLの洗浄液を199mLの精製水で希釈し全量を200mLにして用いる。
- 4) その他の試薬
そのまま用いる。

2. 試薬の調製及び取り扱い上の注意

- 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) 試薬は用時調製し、未使用分は破棄すること。ただしコントロールについては調製後2～8℃で8週間、-20℃で4カ月まで保存可能であるが、凍結融解を避けること。

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
ボルテックスミキサー
マグネチックスターラー
振とう器（プレートシェーカー300～500rpm）
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630もしくは650nm）
恒温槽
吸収紙
精製水

（新生児検体抽出用）

ジエチルエーテル（分析用、純度 >98%）
栓付き試験管（12×75mm）
新生児抽出検体用溶解液（別売り）
空気による溶媒蒸発装置（プランジャー）
恒温水槽
局所排気装置
冷凍庫

4. 測定（操作）法

測定は少なくとも二重測定で行うこと。

1) 抽出操作（新生児検体の場合のみ）

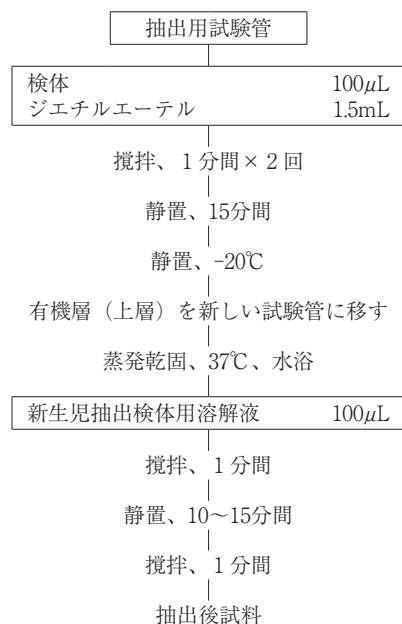
- ①100μLの検体に、1.5mLのジエチルエーテルを添加する。抽出用試験管を1分間×2回攪拌後15分間静置し、ジエチルエーテル層と水層に分離する。
- ②抽出用試験管を-20℃に静置し、水層が凍結したことを確認後、ジエチルエーテル層のみを別の試験管に移す。この際、水層の混入に注意する。
- ③試験管を37℃の水浴で加温し、プランジャーにて空気を送り込み、ジエチルエーテル層を完全に蒸発乾固させる。ジエチルエーテルは第二種有機溶剤のため、局所排気装置内で作業を実施すること。
- ④100μLの新生児抽出検体用溶解液（別売り）を③で得られた抽出物に添加し、1分間攪拌し、溶解する。
- ⑤10～15分間静置し、再び1分間攪拌する。
- ⑥⑤で得られた溶液を17-OHPの測定に用いる。

2) 操作方法

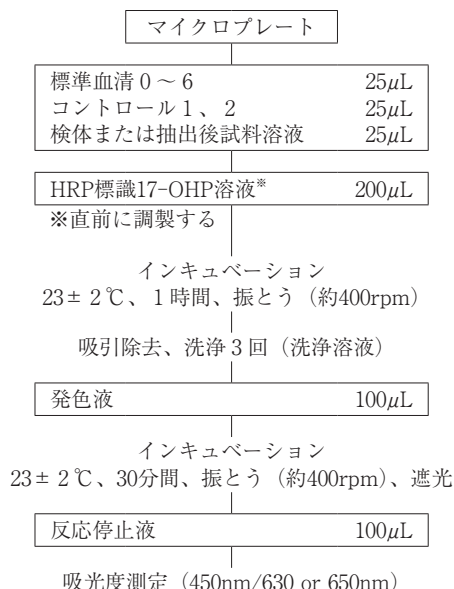
- ①標準血清、コントロール、検体を各25μLずつ、マイクロプレートのウェルに添加する。
- ②HRP標識17-OHP溶液をウェルに200μLずつ添加する。
- ③約400rpmで振とうしながら、23±2℃で1時間インキュベートする。
- ④反応液を吸引除去する。
- ⑤ウェルに洗浄溶液0.4mLずつ添加後、加えた洗浄溶液を吸引除去する。この操作を3回繰り返す。
- ⑥洗浄後15分以内にウェルに発色液を100μLずつ添加する。
- ⑦約400rpmで振とうしながら、23±2℃で30分間インキュベートする。この際、遮光すること。
- ⑧ウェルに反応停止液を100μLずつ添加し、波長450nm（副波長630nmもしくは650nm）にて1時間以内に吸光度を測定する。

5. 測定（操作）法概略

1) 新生児検体抽出操作



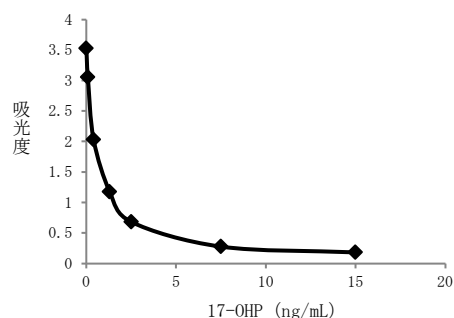
2) 17-OHP測定操作



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、横軸に標準血清0～6の17-OHP濃度を、縦軸に対応する吸光度をプロットして、標準曲線を作成する。
- 3) 作成した標準曲線から、検体、抽出後試料溶液及びコントロール1、2の17-OHP濃度を読み取る。

7. 標準曲線例



【測定結果の判定法】

- 1) 日本人健康児64例を対象に17-OHP値を測定した結果、参考基準値は以下の通りであった⁽¹⁾。
参考基準範囲：0.082～2.285ng/mL**
※※本参考基準範囲は、社内で実施した臨床性能試験の64例の測定値を対数変換し、平均値±2×標準偏差を算出することで測定範囲を特定後、当該測定範囲を元の測定値に変換し直したものです。
- 2) 参考基準値は種々の条件下、各施設により変動する可能性があるため、各施設に適した値を設定すること。

【臨床的意義】

先天性副腎過形成症は、副腎皮質での糖質コルチコイド合成に必要な酵素の先天的な欠損により、糖質コルチコイドの合成障害とACTHの過剰分泌をきたす常染色体劣性遺伝子疾患の総称である。先天性副腎過形成症全体の95%を占めるのが21-水酸化酵素欠損症であり、21-水酸化酵素の欠損により血中17-OHPの著明な増加が認められる。この疾患が新生児期に見逃され、診断の遅れや治療コントロールが悪い場合には、副腎皮質機能不全等で死に至ることがあることから、早期診断や治療のモニタリングの指標として血清17-OHPの測定が有用となる⁽²⁾。

【性能】

1. 性能

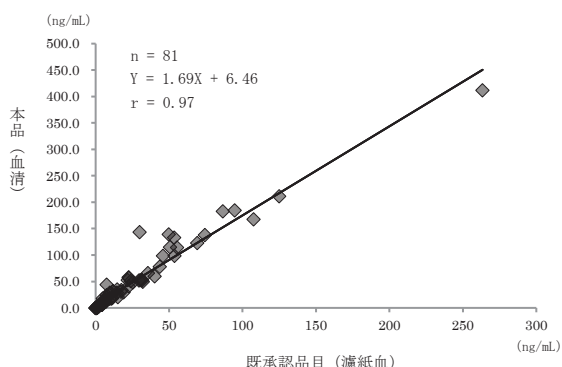
- 1) 感度
標準血清0（0ng/mL）を3重測定するとき吸光度の平均値は1.2以上である。
- 2) 正確性
17-OHP濃度の異なる3種類の管理用検体を3回同時に測定するとき、測定値はそれぞれ既知濃度の±20%以内である。
- 3) 同時再現性
17-OHP濃度の異なる3種類の管理用検体を3回同時に測定するとき、測定値の変動係数（C.V.値）は、いずれも15%以下である。

* 4) 測定範囲

0.03ng/mLから15ng/mL

2. 相関性試験成績

本キットと既承認品目（他社ELISAキット）との相関性を下図に示す。



3. 較正用基準物質

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、反応停止液は硫酸が含まれているため、皮膚等につかないように取扱いには十分注意すること。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。

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、標準血清0～6及び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。
- 8) 発色液と反応停止液を分注する際には、金属製ピペットを使用しないこと。

3. 廃棄上の注意

- 1) 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。
- 2) 試薬及び使用後の容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定、水質汚濁防止法等の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48週間

【包装単位】

96テスト用（標準曲線作成用を含む）

【主要文献】

- (1) 社内資料
- (2) 副腎ホルモン産生異常に関する調査研究（H26-難治等（難）一般-027）で策定した診断基準、重症度分類一覧（平成26年度難治性疾患政策研究事業）

【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：

DIAsource ImmunoAssays SA（ベルギー）