

## 研究用試薬

※※2022年12月改訂（ 部分、第3版）

※2016年3月改訂（ 部分、第2版）

ヒトアクアポリン2 ELISA キット  
使用説明書

本キットは研究用試薬であり、疾病の診断若しくはその補助の目的で使用することはできない。

## 【一般的な注意】

- 1.本キットは、尿中のヒトアクアポリン2を測定するキットであり、それ以外の目的に使用しないでください。
- 2.使用する際には、使用説明書をよく読んでください。
- 3.使用する機器の添付文書及び取扱い説明書をよく読んでから使用してください。

## 【形状・構造等（キットの構成）】

	構成試薬名	容量	成分等
①	洗浄用原液	40 mL×1 ボトル	緩衝剤ほか
③	1 次反応用緩衝液	15 mL×2 ボトル	緩衝剤ほか
④	抗体プレート	96 ウェル×1 枚	抗ヒトアクアポリン2 モノクローナル抗体 固相化プレート
⑤	抗ヒトアクアポリン2 抗血清原液	100µL×1 チューブ	抗ヒトアクアポリン2 抗血清（ウサギ）ほか
⑥	2 次・3 次反応用 緩衝液	40 mL×1 ボトル	緩衝剤ほか
⑦	酵素標識抗ウサギ IgG 原液	100µL×1 チューブ	西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ポリクローナル抗体（ヤギ）ほか
⑧	基質液 A	7.5 mL×1 ボトル	3、3′、5、5′-テトラ メチルベンジジンほか
⑨	基質液 B	7.5 mL×1 ボトル	過酸化水素ほか
⑩	反応停止液	15 mL×1 ボトル	硫酸ほか

付属品：プレートシール6枚

別包装（凍結：-20℃以下保存）

	構成試薬名	容量	成分等
②	標準液 (600ng/mL)	200µL×1 チューブ	リコンビナントヒト アクアポリン2ほか

## 【使用目的】

尿中のヒトアクアポリン2の測定

## ※【測定原理】

本キットは、ELISA 法を原理としてヒトアクアポリン2を測定します。測定原理概要を図1に示します。抗ヒトアクアポリン2モノクローナル抗体を固相したプレート（抗体プレート）に、標準液又は前処理済み尿検体を加えて反応させると、溶液中のヒトアクアポリン2が抗体プレートに結合します（第1反応）。次に抗ヒトアクアポリン2抗血清を反応させ（第2反応）、

さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ（酵素）標識抗ウサギ IgG を反応させます（第3反応）。次に基質液を加えて発色させ（発色反応）、450 nm における吸光度を測定します。標準液の吸光度より標準曲線を求め、尿検体中のヒトアクアポリン2濃度を算出します。

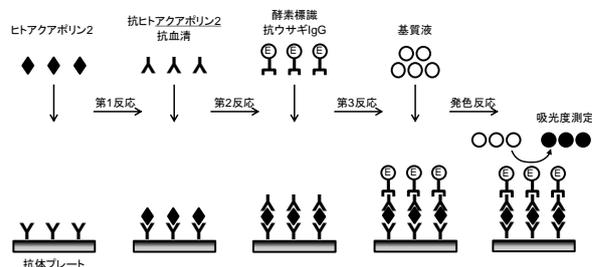


図1 測定原理概要

## ※【操作上の注意事項】

## 1. 測定試料に関する事項

- (1) 尿検体は前処理後、測定に使用してください。
- (2) 尿検体は前処理直前に試験管ミキサーで十分混和してください。
- (3) 前処理済み尿検体は、5回まで凍結融解しても測定への影響はありませんでした。
- (4) 尿検体を輸送する場合は冷蔵で行ってください。尿検体は冷蔵又は-20℃以下で保存した場合、9ヵ月まで測定への影響はありませんでした。
- (5) 前処理済み尿検体は30℃で保存した場合は、24時間まで、冷蔵又は-20℃以下で保存した場合は、80日まで測定への影響はありませんでした。

## 2. 尿検体の前処理法

## (1) 必要な試薬、容器

尿検体の前処理液調製には以下の試薬が必要です。本キットには含まれていませんので測定開始にあたって準備してください。

- Triton X - 305（シグマアルドリッチ社：X305-500ML：70%）
- フェノールレッド（特級）
- 水酸化ナトリウム（特級）医薬用外劇物
- 塩酸（特級）医薬用外劇物
- HEPES：2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
- 容器：ポリエチレン、ポリプロピレン、ガラス製等の

100 mL 程度の密閉可能な容器を用いてください。

ただし、4N 水酸化ナトリウム溶液はガラス容器に保管しないでください。

### (2) 前処理液の調製に関する注意事項

- 1) 水酸化ナトリウムおよび塩酸は、事前に安全性データシート (SDS) を確認の上、必ず保護具を着用する等適切に取り扱ってください。
- 2) 調製した 4N 水酸化ナトリウム溶液および 4N 塩酸/1M HEPES 溶液も劇物に該当します。必ず保護具を着用する等適切に取り扱ってください。保管する場合は容器に「医薬外用劇物」と表示して適切な場所に保管してください。
- 3) 各前処理液は 2~8°C で保管して下さい。
- 4) Triton X - 305 は粘性が高いため、慎重に秤取し共洗いに より正確な量を添加してください。

### (3) 前処理液の調製

- 1) 5% Triton X - 305 溶液  
4 mL の 70% Triton X - 305 と 1 mg のフェノールレッドを 52 mL の精製水で溶解します。
- 2) 4N 水酸化ナトリウム溶液  
水酸化ナトリウム 8 g を 50 mL の精製水で溶解します。
- 3) 4N 塩酸/1M HEPES 溶液  
14.3 g の HEPES を 30 mL 精製水で溶解します。HEPES 溶液に 20 mL の濃塩酸を少量ずつ攪拌しながら加え、精製水で 60 mL に調製します。

### (4) 尿検体の前処理方法

- 1) 各前処理液を 20~30°C に戻します。
- 2) 検体前処理用のマイクロチューブ (容量 1.5 mL 以上の密閉可能な容器) を用意します。
- 3) 尿検体を試験管ミキサーで十分に攪拌後、速やかに 200  $\mu$ L をマイクロチューブに分注します。このとき尿沈さを除去しないでください。(沈さ中にもヒトアクアポリン 2 が存在するため均一に攪拌し、沈さも含めて素早く採取して下さい。)
- 4) 各マイクロチューブに 20  $\mu$ L の 5% Triton X - 305 溶液を加え、混合します。
- 5) 各マイクロチューブに 20  $\mu$ L の 4N 水酸化ナトリウム溶液を加え、混合します。
- 6) 各マイクロチューブを 20 分間室温で静置します。
- 7) 各マイクロチューブに 20  $\mu$ L の 4N 塩酸/1M HEPES 溶液を加え、混合します。この前処理した尿検体を測定に供します。(前処理済み尿検体中の沈さはサンプリングしないでください。)

### 3. 妨害物質

血液は 2.0% まで、ヒト  $\gamma$ -グロブリンは 10.0 mg/dL まで、ヘモグロビンは 1.0 mg/dL まで、測定に影響はありませんでした。

### 4. 操作に関する事項

- (1) 測定時のコンタミネーションを避けるため、尿検体、前処理済み尿検体や試薬類の分注に際しては十分注意してください。
- (2) 洗浄後のウェルを乾燥させないように注意してください。

また、洗浄中はウェルを傷つけないように注意してください。

- (3) 各構成試薬は 20~30°C に戻し、よく混和してから使用して下さい。洗浄用原液に結晶が析出している場合は、加温し溶解後に使用してください。
- (4) 本キットは 4 回まで分割使用が可能です。
- (5) 使用後、残った構成試薬等は密閉して 2~8°C (標準液は -20°C 以下) で保存して下さい。未使用の抗体プレートは、乾燥剤とともにアルミラミネート袋に戻し、密閉して 2~8°C で保存して下さい。
- (6) 標準液 (600 ng/mL) は 7 回まで凍結融解しても測定に影響はありませんでした。

### ※【測定方法】

#### 1. 必要器具、機器等

- (1) メスシリンダー
- (2) メスピペット
- (3) マイクロピペット及びチップ
- (4) プレートシェイカー
- (5) プレートウォッシャー
- (6) インキュベーター
- (7) ペーパータオル
- (8) プレートリーダー (測定波長: 450 nm)
- (9) マイクロチューブ等 (容量 1.5 mL 以上の密閉可能な容器)

#### 2. 試薬の調製法・保存法

##### (1) 洗浄液

洗浄用原液全量 (40 mL) に精製水を 960 mL の割合で混和し調製する。洗浄用原液に結晶が析出している場合は、加温して溶解後に調製します。

##### (2) 標準液

標準液 (600 ng/mL) 20  $\mu$ L を 1 次反応用緩衝液 380  $\mu$ L で 20 倍希釈し、30.0 ng/mL 標準液とします。30.0 ng/mL 標準液を 2 段階階希釈して、15.0 ng/mL、7.50 ng/mL、3.75 ng/mL、1.88 ng/mL、0.94 ng/mL、0.47 ng/mL の濃度の標準液を調製します。なお 0 ng/mL 標準液は 1 次反応用緩衝液を使用します。標準液の希釈方法を表 1 に示します。

表 1 標準液の希釈方法

調製後濃度 (ng/mL)	採取標準液		1 次反応緩衝液 ( $\mu$ L)
	(ng/mL)	( $\mu$ L)	( $\mu$ L)
30.0	600	20	380
15.0	30.0	200	200
7.50	15.0	200	200
3.75	7.50	200	200
1.88	3.75	200	200
0.94	1.88	200	200
0.47	0.94	200	200

- (3) 抗ヒトアクアポリン 2 抗血清希釈液 (201 倍希釈)  
2 次・3 次反応用緩衝液 12 mL に抗ヒトアクアポリン 2 抗血清原液を 60  $\mu$ L の割合で混和し、必要量調製します。第 2 反応の直前に調製します。
- (4) 酵素標識抗ウサギ IgG 希釈液 (201 倍希釈)

2次・3次反応用緩衝液 12 mL に酵素標識抗ウサギ IgG 原液を 60  $\mu$ L の割合で混和し、必要量調製します。第3反応の直前に調製します。

(5) 基質液

基質液 A 6 mL に基質液 B を 6 mL の割合で混和し、必要量調製します。発色反応の直前に調製し、速やかに使用します。

3. 操作方法

操作方法の概略を図2に示しました。

標準液及び前処理済み尿検体（試料）は、2重測定をお勧めします。

- (1) 各構成試薬を 20~30°C に戻します。
- (2) 洗浄液、各濃度の標準液を調製します。
- (3) 抗体プレートのアルミラミネート袋を開封し、測定に必要なストリップだけを取り出します。データシート、プレートマップ等で標準液や試料の位置を確認します。
- (4) 洗浄液を抗体プレートの各ウェルに約 350  $\mu$ L ずつ加えた後、プレートウォッシャーでウェルの液を完全に吸引除去します。続けて抗体プレートを逆さにしてペーパータオル等に軽く叩きつけ、ウェル内に残った洗浄液を除去します。
- (5) あらかじめ 1 次反応用緩衝液を各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ加えた後、各濃度の標準液又は試料を各ウェルに 50  $\mu$ L ずつ加えます。標準液は測定ごと、抗体プレートごとに必ず測定します。
- (6) プレートシールで抗体プレートをカバーし、20~30°C で 120 分間振とう反応（400~800 rpm）させます。（機種により若干の違いがあります。） **<第1反応>**
- (7) 液ハネ等しないように注意して抗体プレートからプレートシールを取り除き、プレートウォッシャーで各ウェルの液を完全に吸引除去します。続いて、洗浄液を各ウェルに約 350  $\mu$ L ずつ加え、速やかに吸引除去します。このとき、洗浄液があふれないように注意してください。この洗浄と吸引の操作をさらに 2 回繰り返した後、(4)と同様にウェル内に残った洗浄液を除去します。
- (8) 調製した抗ヒトアクアポリン2抗血清希釈液を抗体プレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ加えます。
- (9) プレートシールで抗体プレートをカバーし、20~30°C で 120 分間振とう反応させます。 **<第2反応>**
- (10) (7)と同様にウェルを洗浄します。
- (11) 調製した酵素標識抗ウサギ IgG 希釈液を抗体プレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ加えます。
- (12) プレートシールで抗体プレートをカバーし、20~30°C で 120 分間振とう反応、又は、4°C で 17 時間静置します。 **<第3反応>**
- (13) (7)と同様にウェルを洗浄します。
- (14) 調製した基質液を抗体プレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ加えます。20~30°C でストップウォッチ等を用いて、それぞれのウェルの発色反応が正確に 10 分間となるように静置反応させます。 **<発色反応>**
- (15) 反応停止液を抗体プレートの各ウェルに 100  $\mu$ L ずつ加え

ます。

- (16) プレートリーダーにより各ウェルの 450 nm（2 波長測定の場合には対照波長 650 nm）における吸光度を測定します。

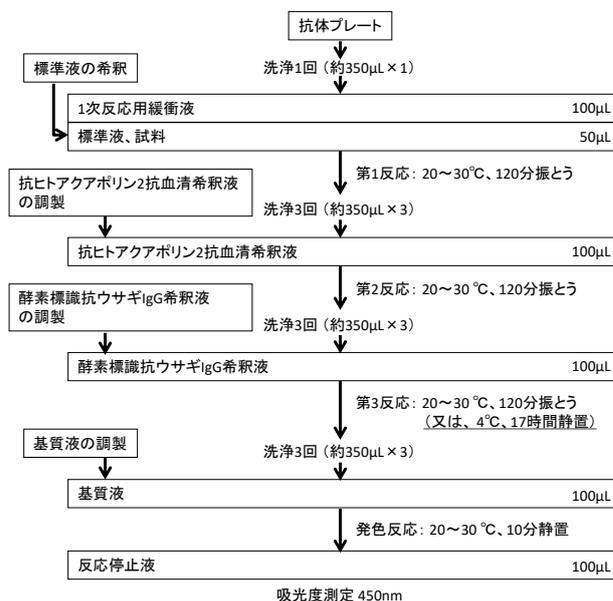


図2 操作方法概略

4. ヒトアクアポリン2濃度の算出方法

各濃度の標準液及び検体の吸光度から標準液 0 ng/mL の吸光度（ブランク値）の平均値を差し引いて、各実質吸光度を算出します。

X 軸に標準液の濃度を、Y 軸にその実質吸光度をプロットします。適切な回帰式を用い（例：4パラメーターロジスティック曲線による検量線作成例、図3参照）、検量線を作成します。検量線から試料の実質吸光度に対応する、ヒトアクアポリン2濃度を読みとります。

尿検体中のヒトアクアポリン2濃度は、読み取った濃度に前処理時の検体希釈倍率である 1.3 を乗じて容積補正し算出します。

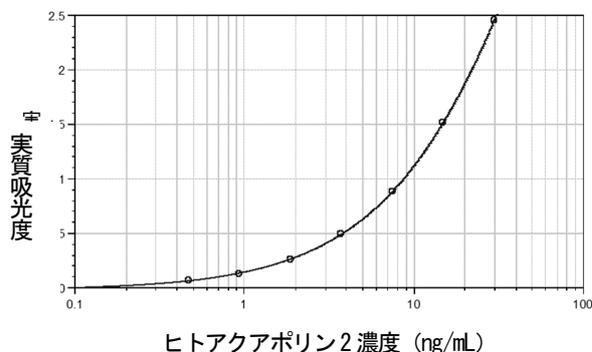


図3 4パラメーターロジスティック曲線による検量線作成例

※【性能】

1. 感度試験

標準液 0 ng/mL の吸光度は 0.100 以下を示します。

標準液 0.47 ng/mL の吸光度から 0 ng/mL の吸光度を引いた

値は、0.030以上を示します。

標準液 30.0 ng/mL の吸光度から 0 ng/mL の吸光度を引いた値は、1.000 以上を示します。

## 2. 正確性試験

3 種類の管理検体の測定値は既知濃度の $\pm 30\%$ 以内の値を示します。

## 3. 同時再現性試験

3 種類の管理検体を 2 重測定で同時に 4 回測定するとき、測定値の変動係数はいずれも 20% 以下の値を示します。

## 4. 測定範囲

自社施設にて、測定試料として前処理済み尿検体を用いた試験の結果、ヒトアクアポリン 2 の測定範囲は 0.27~30.0 ng/mL (前処理前の尿検体での測定範囲は、容積補正として 1.3 倍した 0.35~39.0 ng/mL) と設定しました。

## 【使用上又は取扱い上の注意】

### 1. 取り扱い上 (危険防止) の注意

- (1) サンプリング等に使用するピペットには口をつけないでください。
- (2) 標準液及び検体は常に感染の危険性が伴うものとして取扱いには十分注意してください。検体に接触したチップ等の器具やそれらの残液及びその容器等も同様に扱ってください。
- (3) 測定操作にあたっては、感染の危険性を避けるために、マスク及びディスポーザブルゴム手袋、実験着及び保護眼鏡を着けて操作してください。また、取扱い後は手をよく洗ってください。
- (4) 反応停止液は硫酸を含んでいますので、皮膚等に付着しないよう取扱いには十分注意してください。
- (5) 試薬が誤って目や口に入った場合や手等に触れた場合には、水で十分に洗い流すなどの応急処置を行い、必要であれば医師の手当等を受けるようにしてください。

### 2. 使用上の注意

- (1) 使用期限を過ぎたキットは使用しないで下さい。
- (2) 製造番号の異なるキット中の構成試薬を組み合わせて使用しないでください。
- (3) 製造番号は同じキットであっても、異なるパッケージの構成試薬、抗体プレートを組み合わせて使用しないでください。
- (4) 本キットの標準液は $-20^{\circ}\text{C}$ 以下、その他の構成試薬は $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ で保存し、使用前に各構成試薬を $20\sim 30^{\circ}\text{C}$ に戻してください。

### 3. 廃棄上の注意

- (1) 使用後の容器やピペット等は焼却処理するか、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又は産業廃棄物等区別して処理してください。
- (2) 標準液及び検体に接触したチップ等の器具やそれらの残液及びその容器等は、感染の危険性があるものとし、オートクレーブ ( $121^{\circ}\text{C}$ 、20 分) で滅菌処理するか、又は次亜塩素酸ナトリウム溶液 (有効塩素濃度 1,000 ppm 以上) に

1 時間以上浸してから処理してください。

- (3) 4N 水酸化ナトリウム溶液、4N 塩酸/1M HEPES 溶液を廃棄する場合は、中和し大量の水で希釈することにより劇物に該当しない物とした後、県や市等の廃棄物に関する条例や指針に従って処理してください。

## 【包装】

96 テスト用  
(標準液別包装)

## 【貯法・有効期間】

キット本体： $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  保存  
標準液 (別包装)： $-20^{\circ}\text{C}$  以下保存  
製造日より 18 ヶ月 (使用期限は外箱に表示)

## 【主要文献】

- 1) Sasaki S, Ohmoto Y, Mori T, Iwata F, Muraguchi M. Daily variance of urinary excretion of AQP2 determined by sandwich ELISA method. Clin Exp Nephrol. 2012; 16: 406-10.

## ※※【問い合わせ先】

大塚製薬株式会社 診断事業部  
TEL : 03-6717-1400

## 【製造発売元】

大塚製薬株式会社  
東京都千代田区神田司町 2-9

## 【包材等の材質】



袋 (抗体プレート) : PE、PET、金属 (アルミ)  
ボトル (洗浄用原液、1 次反応用緩衝液、2 次・3 次反応用緩衝液、基質液 A、基質液 B、反応停止液) : PE  
チューブ (抗ヒトアクアポリン 2 抗血清原液、酵素標識抗ウサギ IgG 原液、標準液 (600 ng/mL)) : PP  
キャップ (洗浄用原液、1 次反応用緩衝液、2 次・3 次反応用緩衝液、基質液 A、基質液 B、反応停止液、抗ヒトアクアポリン 2 抗血清原液、酵素標識抗ウサギ IgG 原液、標準液 (600 ng/mL)) : PP  
抗体プレート本体 : PS



ダンボール

個装箱 (キットケース)、ケース内仕切り : ダンボール