

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

血管内皮増殖因子キット

VEGF ELISA キット「フジモト」

【全般的な注意】

1. 本キットは、体外診断用の測定試薬です。それ以外の目的には使用しないでください。
2. 測定結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果などと合わせて担当医師が総合的に判断してください。
3. この添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。記載された使用方法及び使用目的以外での使用については、測定値の信頼性を保証致しかねます。
4. 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	主成分
1. 抗体固相化マイクロプレート	抗ヒトVEGF抗体（ラット）（モノクローナル抗体）
2. 酵素標識抗体	HRP標識抗ヒトVEGF抗体（ウサギ）（ポリクローナル抗体）
3. 標準物質	細胞培養上清（標準物質の濃度はラベルに表記）
4. 希釈用緩衝液	リン酸緩衝液
5. 標識抗体用溶解液	リン酸緩衝液
6. TMB基質液	3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン（TMB）
7. 停止液	硫酸
8. 濃縮洗浄液	リン酸緩衝液

【使用目的】

血清中の血管内皮増殖因子（VEGF）の測定（クロー・深瀬（POEMS）症候群の診断補助）

【測定原理】

本品は血清中 VEGF 値を ELISA（酵素免疫測定法）により測定するキットです。抗体固相化マイクロプレートに検体を添加することで、血清中の VEGF と抗体固相化マイクロプレートに固相化された固相抗体（抗ヒト VEGF 抗体（ラット）（モノクローナル抗体））が抗原抗体反応により固相抗体-VEGF の複合体を形成します（一次反応）。洗浄後、標識抗体（HRP 標識抗ヒト VEGF 抗体（ウサギ）（ポリクローナル抗体））を添加することで固相抗体-VEGF-標識抗体の複合体が形成されます（二次反応）。再度洗浄後、TMB 基質液を加えることで、複合体の西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）に基質（3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン）が反応し、発色します。停止液にて反応停止後、この発色の吸光度を測定することにより、血清中 VEGF 値が求められます。

【操作上の注意】

1. 検体
検体は、ヒト血清を使用してください。
静脈血を採取してください。採血後 1 時間静置し、検体が凝固していることを確認した上で採血後 2 時間以内に 3,000 rpm/10 min（目安）で遠心分離を行ってください。採取後

直ちに測定できない場合は、-80℃以下に保存してください。凍結保存した検体は、融解後室内温度に戻し、よく混和してから測定に使用してください。凍結融解は 3 回までとしてください。

2. 妨害物質
遊離ビリルビン 19.1 mg/dL まで、抱合型ビリルビン 20.7 mg/dL まで、溶血ヘモグロビン 490 mg/dL まで、乳ビ 1,650 FTU まで、アスコルビン酸 50 mg/dL まで測定に影響ありません。
3. 非特異反応
測定試料によっては非特異反応が生じる場合があります。診断は他の検査や臨床症状等を考慮して総合的に判断してください。
4. 標準物質の溶解方法
 - (1) バイアル瓶を室内温度に戻してください。
 - (2) アルミキャップを開封後、静かにゴム栓を開けてください。
 - (3) 希釈用緩衝液を所定量加え、室内温度で 5 分間静置してください。
 - (4) 以下の点に注意し、攪拌してください。
 - ・ボルテックスの場合、溶液が泡立たないように、5 秒間、攪拌してください。
 - ・ピペットの場合、バイアル瓶の内壁を洗うように 10 回ピペッティングしてください。

【用法・用量（操作方法）】

1. 試薬の調製方法
各試薬を使用・調製する際には、操作の前に室内温度に戻してから行ってください。
 - (1) 抗体固相化マイクロプレート
そのまま使用します。
開封した抗体固相化マイクロプレートは、密閉後 2~10℃で保存し、2 週間以内にご使用ください。
 - (2) 酵素標識抗体
酵素標識抗体を必要量とり、標識抗体用溶解液で 30 倍希釈して標識抗体液とします。
調製後の標識抗体液は 2~10℃で保存し、2 週間以内にご使用ください。
 - (3) 標準物質
標準物質を 0.5 mL の希釈用緩衝液で溶解し、標準液とします。
 - (4) 希釈用緩衝液
そのまま使用します。
 - (5) 標識抗体用溶解液
そのまま使用します。
 - (6) TMB 基質液
そのまま使用します。
開封後は 2~10℃で保存し、2 週間以内にご使用ください。
 - (7) 停止液
そのまま使用します。

- (8) 濃縮洗浄液
濃縮洗浄液を必要量とり、精製水で 40 倍希釈して洗浄液とします。
調製後の洗浄液は 2~10℃で保存し、2 週間以内にご使用ください。

2. 必要な器具・器材・試料等

- (1) マイクロプレートリーダー [波長 450 nm]
(2) マイクロピペット
(3) マイクロプレートウォッシャー
(4) 恒温槽 [25 (±2) °C、2~10℃]
(5) 精製水

3. 測定 (操作) 法

測定は二重測定で行う。

- (1) 検体ブランクウェルを設定し、希釈用緩衝液 100 μL を添加します。
(2) 標準液を希釈用緩衝液で 2 倍連続希釈し、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍、32 倍、64 倍、128 倍希釈標準液を作製します。
(3) 検体ウェルを設定し、希釈用緩衝液であらかじめ 10 倍希釈した検体を 100 μL ずつ添加します。
(4) 標準液ウェルを設定し、各希釈倍率の希釈標準液を 100 μL ずつ添加します。
(5) 25 (±2) °C で一晩 (17~24 時間) 放置し、一次反応させます。
(6) ウェルの反応液を除去し、1 回あたり 350 μL の洗浄液を用いてプレートの洗浄を 4 回行います。
(7) 標識抗体液を各ウェルに 100 μL ずつ入れます。
(8) 2~10℃で 1 時間放置し、二次反応させます。
(9) ウェルの反応液を除去し、1 回あたり 350 μL の洗浄液を用いてプレートの洗浄を 5 回行います。
(10) TMB 基質液を各ウェルに 100 μL ずつ添加し、プレートを遮光します。
(11) 25 (±2) °C で 30 分間放置し、発色させます。
(12) 停止液を各ウェルに 100 μL ずつ添加します。
(13) 停止液を添加後 30 分以内に、検体ブランクを対照とした検体及び希釈標準液の 450 nm における吸光度を測定してください。得られた吸光度をもとに検量線を作成し、血清中 VEGF 値を求めます。なお、測定範囲外の高値検体は、希釈用緩衝液にて適切に希釈を行ってから再測定してください。

測定操作一覧

	検体ブランクウェル	検体ウェル	標準液ウェル
希釈用緩衝液	100 μL/ウェル		
試料		100 μL/ウェル	100 μL/ウェル
一次反応	25 (±2) °C 17~24 時間放置		
洗浄	反応液を除去後、ウェルを洗浄液で 4 回洗浄		
標識抗体液	100 μL/ウェル	100 μL/ウェル	100 μL/ウェル
二次反応	2~10℃ 1 時間放置		
洗浄	反応液を除去後、ウェルを洗浄液で 5 回洗浄		
TMB 基質液	100 μL/ウェル	100 μL/ウェル	100 μL/ウェル
発色反応	遮光をして 25 (±2) °C 30 分間放置		
停止液	100 μL/ウェル	100 μL/ウェル	100 μL/ウェル
吸光度測定	30 分以内に波長 450 nm における吸光度を測定		

4. 血清中 VEGF 値の算出方法

- (1) グラフの X 軸に標準液濃度を、Y 軸にその吸光度の平均値をプロットします。各プロットに適当な回帰曲線を当てはめ (例: 両対数変換の二次回帰等)、検量線を

作成します。

- (2) 検体の吸光度を検量線に当てはめ、濃度を読みとります。
(3) 「3. 測定 (操作) 法」に従って操作することで検体は 10 倍希釈されますが、本品の標準液は検体希釈倍率を乗じる必要が無いよう、あらかじめ 10 倍濃い濃度に設定されております。したがって、得られた濃度に希釈倍率を乗じることなく、血清中 VEGF 値を算出することが出来ます。
測定範囲外の高値検体は、希釈用緩衝液にて適切に希釈を行ってから再測定してください。標準物質の濃度は、実際の濃度よりも 10 倍高い値が表記されておりますので、検量線から読み取った値を 10 で除し、さらに再測定時の高値検体の希釈倍率を乗じて血清中 VEGF 値を算出してください。
(例) 測定範囲外の高値検体を希釈倍率 40 倍で再測定したときは、検量線から得られた値を 10 で除し、さらに再測定時の希釈倍率 40 を乗じて血清中 VEGF 値を求めます。
(4) 二重測定の平均値を各検体中の VEGF 濃度の報告値とします。

【測定結果の判定法】

1. 判定基準

本邦の難病患者に対する医療等に関する法律に基づき指定される指定難病 (平成 27 年 1 月 1 日施行) の内、POEMS 症候群の診断基準の大基準として、血清 VEGF 上昇 (1,000 pg/mL 以上) が含まれています¹⁾ (参考基準範囲: 健康成人 143.1~658.8 pg/mL)。POEMS 症候群に対するサリドマイドの適応追加を目的とした医師主導治験 (J-POST) では、被験者の選択基準を血清中 VEGF 値 1,000 pg/mL 以上とし、主要評価として血清中 VEGF 値の減少率を採用しています²⁾。

2. 判定上の注意

検体により、検体中の目的成分以外の物質との反応や妨害反応を生じることがあります。測定値や測定結果に疑問がある場合は、再検査や希釈再検査、あるいは他の検査方法により確認してください。

【臨床的意義】

POEMS 症候群は多発性骨髄腫の類縁疾患であり、形質細胞異常を基盤に、多発神経炎による末梢神経障害、臓器腫大 (肝脾腫)、浮腫・胸腹水、皮膚症状 (剛毛、色素沈着、血管腫)、骨硬化性病変、M タンパク血症などを呈する全身性疾患です³⁻⁶⁾。その病態には VEGF が関与していると考えられ、血清 VEGF 値と臨床症状/予後の関連が示唆されるデータが報告されています^{7)、8)}。国内外の POEMS 症候群の診断基準において、大基準として「VEGF 上昇」が規定され^{9)、10)}、さらに平成 27 年 1 月 1 日施行の指定難病において、POEMS 症候群は診断基準中の大基準として「血清 VEGF 上昇 (1,000 pg/mL 以上)」が規定されています¹⁾。血清 VEGF 上昇以外の診断基準としては、多発ニューロパチー (必須項目) と M 蛋白 (血清又は尿中 M 蛋白陽性 [免疫固定法により確認]) が大基準として、小基準として、骨硬化性病変、キャッスルマン病、臓器腫大、浮腫、胸水、腹水、心嚢水、内分泌異常 (副腎、甲状腺、下垂体、性腺、副甲状腺、膵臓機能)、皮膚異常 (色素沈着、剛毛、血管腫、チアノーゼ、爪床蒼白)、乳頭浮腫、血小板増多、などが挙げられています¹⁾。

本邦において、自己末梢血幹細胞移植の適応とならない POEMS 症候群患者 24 例に、サリドマイド (隔日 100 mg~1 日 200 mg) 又はプラセボをデキサメタゾン併用^{注)} 下で 24 週間 (6 サイクル) 投与した二重盲検比較試験期において、サリドマイド投与群の血清 VEGF 減少率はプラセボ群と比較して有意に高く、

サリドマイドによるデキサメタゾンへの上乗せ効果が認められました。また、徒手筋力試験の合計スコアにおいてサリドマイド投与群に改善が認められました¹¹⁾。

投与 24 週後の血清 VEGF 減少率 (FAS^{a)}/PPS^{b)} LOCF^{c)})

投与群	例数	ベースラインからの減少率	群間差	
			95%信頼区間	p 値
本剤群	13	0.388±0.135	0.409	0.040
プラセボ群	11	-0.021±0.149	(0.020-0.799)	

最小二乗平均値±標準誤差

注) 4 週間を 1 サイクルとしてデキサメタゾン (12 mg/m²、最大 20 mg/日) を各サイクルの 2~5 日目に経口投与

a) Full analysis set, b) Per protocol set, c) Last observation carried forward (中止例及び長期試験期への早期移行例の欠測値は、中止時/早期移行時の直前の規定ピジットでの測定値で補完)

二重盲検比較試験期から移行した患者 23 例にサリドマイド (隔日 100 mg~1 日 300 mg) を 48 週間 (12 サイクル) 投与した長期試験期において、血清 VEGF 減少率 (平均値±標準偏差 [95% 信頼区間] (例数)) はサイクル 1 終了時が 0.0441±0.27362 [-0.08044, 0.16866] (21 例) で、サイクル 4 終了時は 0.0635±0.48305 [-0.16934, 0.29631] (19 例)、サイクル 8 終了時は 0.2848±0.36547 [0.07375, 0.49578] (14 例) と減少率は上昇しました。その後も減少率は維持し、終了時の減少率は 0.2782±0.40101 [0.04666, 0.50974] (14 例) であり、長期投与による血清 VEGF 値の改善が確認されました¹¹⁾。POEMS 症候群患者に、大量化学療法を伴う自己末梢血幹細胞移植療法の前治療としてサリドマイド (隔日 100 mg~1 日 300 mg)、デキサメタゾン (20 mg/日、1-2 サイクル: 2~5、16~19 日目、3-6 サイクル: 2~5 日目) を 24 週間 (6 サイクル) 投与した国内臨床試験において、サリドマイドが投与された 10 例における 24 週後の血清 VEGF 減少率は 0.69±0.33 (平均値±標準偏差)、中央値は 0.85 (範囲: 0.0-1.0) であり、血清 VEGF 値の改善が認められました¹¹⁾。

以上より、POEMS 症候群患者の治療において、血清中 VEGF 値の減少が十分でない場合には治療の強化を、十分減少した場合は治療の適切な漸減または中止の判断につなげることができます。当社において、本品と同一測定法 (ELISA 法) である A 社製品 (研究用試薬) と POEMS 症候群患者 29 例の血清 141 検体について相関性を検討した結果、良好な相関が得られました (図 1)。また、本品を用いた POEMS 症候群の診断のカットオフ値を、POEMS 症候群患者及び健康成人の血清中 VEGF 値を基にした ROC 曲線解析により算出しました。その結果、指定難病で示されている診断基準値 1,000 pg/mL において、高い感度 (100%)、特異性 (100%) を示しました (図 2)。

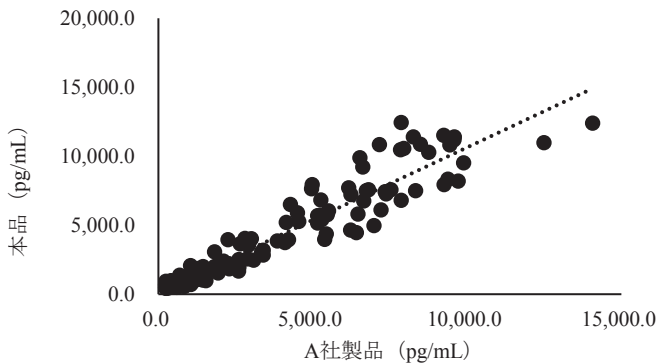


図 1. 本品と A 社製品の相関性
y = 1.0503x + 133.94, R = 0.9504

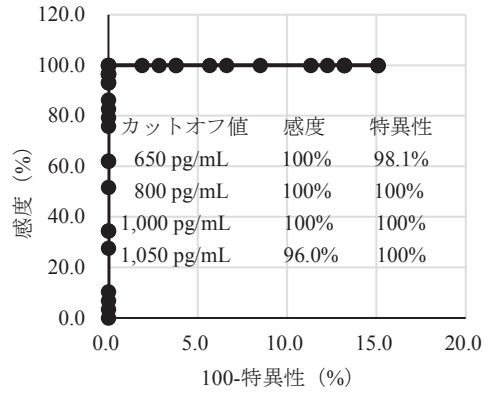


図 2. ROC 曲線とカットオフ値の算出

【性能】

当社試験法による性能は以下の通りです。

1. 感度
標準物質 0 pg/mL (希釈用緩衝液) 及び標準物質 132.8 pg/mL について、それぞれ二重測定するとき、標準物質 0 pg/mL の吸光度は 0.200 以下であり、標準物質 132.8 pg/mL と標準物質 0 pg/mL の吸光度差は 0.020 以上です。
2. 正確性
濃度の異なる 3 種類の既知濃度管理検体について、それぞれ二重測定するとき、既知濃度に対する測定値は、80~120% の範囲です。
3. 同時再現性
濃度の異なる 3 種類の既知濃度管理検体について、それぞれ 4 回同時に測定するとき、測定値の変動係数 (CV 値) は 15% 以下です。
4. 測定範囲 (例示)
13.28~850 pg/mL (ただし、希釈した検体での実測値。) 表示される測定範囲 (検体を 10 倍希釈した場合): 132.8~8,500 pg/mL (測定結果は、希釈係数で補正された値にて報告されます。)
5. 既知濃度管理検体に関する情報
既知濃度管理検体には、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞由来リコンビナント VEGF 蛋白をリン酸緩衝液に溶解したものを使用しています。
6. 較正用基準物質
国際的に認められた標準品は存在しません。

【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) 検体は、HIV、HBV、HCV 等の感染の恐れがあるものとして十分に取扱いに注意してください。
 - (2) 試薬は動物由来の物質を含みます。誤って目や口に入った場合、皮膚に付着した場合は水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
 - (3) 抗体固相化マイクロプレート、酵素標識抗体、標準物質、希釈用緩衝液、標識抗体用溶解液、濃縮洗浄液には防腐剤としてプロクリン 300 が含まれておりますので、皮膚等を刺激する場合があります。誤って目や口に入った場合、皮膚に付着した場合は速やかに水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
 - (4) 停止液には硫酸が含まれておりますので目や皮膚につかないように注意してください。誤って目に入った場合は速やかに流水で洗眼した後、医師の手当てを受けてください。皮膚や衣服については速やかに洗い流してください。

2. 使用上の注意
- (1) 使用期限を過ぎた試薬は、測定値の信頼性を保証し兼ねますので使用しないでください。
 - (2) 凍結した試薬は使用しないでください。
 - (3) 製造番号の異なる試薬を組み合わせ使用しないでください。また、同一の製造番号の試薬であっても注意不足して使用しないでください。
3. 廃棄上の注意
- (1) 検体、検査に使用した器具類などを廃棄する前に、0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液に1時間以上浸すか、又はオートクレーブ（121℃、20分間以上）で処理してください。
 - (2) 試薬及び器具等を廃棄する場合には、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規制に留意して処理してください。
 - (3) 検体又は検体を含む溶液が飛散した場合は、感染を防止するために、0.1%以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液等でよく拭き取ってください。
4. その他
- (1) 容器等は他の目的に転用しないでください。

【貯蔵方法・有効期間】

1. 貯蔵方法：2～10℃
2. 有効期間：18ヶ月（使用期限は、外装に記載してあります。）

【包装単位】 製品コード 27115 1キット

製品名	構成試薬名	包装
VEGF ELISA キット「フジモト」	抗体固相化マイクロプレート	96 ウェル × 1
	酵素標識抗体	0.4 mL × 1
	標準物質	0.5 mL用 × 2
	希釈用緩衝液	30 mL × 1
	標識抗体用溶解液	12 mL × 1
	TMB 基質液	15 mL × 1
	停止液	12 mL × 1
	濃縮洗浄液	50 mL × 1

【主要文献】


- 1) https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/nanbyou/index.html
- 2) Katayama K. Misawa S. Sato Y. et al. Japanese POEMS syndrome with Thalidomide (J-POST) Trial: study protocol for a phase II/III multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *BMJ Open*. 2015;5(1):e007330.
- 3) Crow RS. Peripheral neuritis in myelomatosis. *Br Med J*. 1956;2(4996):802-4.
- 4) Bardwick PA. Zvaifler NJ. Gill GN. et al. Plasma cell dyscrasia with polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, M protein, and skin changes: the POEMS syndrome. Report on two cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1980;59(4):311-22.

- 5) Takatsuki K. Sanada I. Plasma cell dyscrasia with polyneuropathy and endocrine disorder: clinical and laboratory features of 109 reported cases. *Jpn J Clin Oncol*. 1983;13(3):543-55.
- 6) Nakanishi T. Sobue I. Toyokura Y. et al. The Crow-Fukase syndrome: a study of 102 cases in Japan. *Neurology*. 1984;34(6):712-20.
- 7) Misawa S. Sato Y. Katayama K. et al. Vascular endothelial growth factor as a predictive marker for POEMS syndrome treatment response: retrospective cohort study. *BMJ Open*. 2015;5(11):e009157.
- 8) Ohwada C. Sakaida E. Kawajiri-Manako C. et al. Long-term evaluation of physical improvement and survival of autologous stem cell transplantation in POEMS syndrome. *Blood*. 2018;131(19):2173-6.
- 9) Dispenzieri A. POEMS Syndrome: 2019 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2019;94(7):812-827.
- 10) 一般社団法人日本血液学会編 造血器腫瘍診療ガイドライン 2018年版（2018年）金原出版株式会社
- 11) 社内資料：FPF300 のクローウ・深瀬（POEMS）症候群に対する臨床試験（2021年2月24日承認、CTD2.7.6.1）

【問い合わせ先】

藤本製薬株式会社 学術部
〒580-8503 大阪府松原市西大塚1丁目3番40号
TEL：0120-225-591 FAX：0120-116-026

【製造販売業者の氏名又は名称及び住所】

製造販売元
 藤本製薬グループ
藤本製薬株式会社
〒580-8503 大阪府松原市西大塚1丁目3番40号

製造元

 **株式会社 免疫生物研究所**
〒375-0005 群馬県藤岡市中 1091-1