

## Human LRG Assay Kit - IBL

96 Well

## 1. はじめに

歩行障害、認知症などの症状を示す高齢者の特発性正常圧水頭症(iNPH)と鑑別すべき疾患の中には、アルツハイマー病、前頭側頭葉変性症 (FTLD)、パーキンソン病関連疾患などの神経変性疾患があります。iNPHは脳室腹腔短絡術により治療することが可能なため、早期に神経変性疾患と鑑別可能な髄液マーカーが求められてきました。新井、宮嶋らは、iNPHの脳脊髄液中にleucine-rich alpha-2-glycoprotein (LRG)が高濃度に存在していることを同定し、その測定がiNPHの鑑別に有用であると報告しています。

本測定キットは、脳脊髄液、血液および尿中のLRGを測定するELISAキットです。脳脊髄液中のLRG測定により、アルツハイマー病などの神経変性疾患からiNPHを鑑別することが可能となり、今後、iNPHの早期診断および早期治療により患者の予後の改善につながることを期待されます。

## 2. 原理および測定方法

本製品は、サンドイッチ法によるEIA (Enzyme Immuno Assay)キットです。1次抗体は、プレートに固相されていますので、検体および標準物質を加え、1次反応をおこない洗浄後 HRP 標識された2次抗体を加え2次反応をおこないます。反応後、過剰の2次抗体を洗浄除去します。Tetra Methyl Benzidine (TMB) により発色させます。この発色は、Human LRG の量に比例します。

## 3. 測定範囲

1.56 ~ 100 ng/mL

## 4. 使用目的

- ヒトの脳脊髄液、血清、EDTA 血漿および尿中の Human LRG を測定できます。
- ヒト血清および血漿の希釈の目安は 2,000 - 10,000 倍ですが、検体によってはこの限りではありませんので、測定に際しご検討ください。

## 5. 構成試薬

1	抗体プレート (抗 Human LRG (162) Rabbit IgG A.P. 固相)	96Well x 1
2	標識抗体濃縮液 (30 倍濃度 HRP 標識抗 Human LRG (329) Rabbit IgG Fab' A.P.)	0.4mL x 1
3	標準物質 (Recombinant Human LRG)	0.5mL x 2
4	希釈用緩衝液	30mL x 1
5	標識抗体用溶解液	12mL x 1
6	TMB 基質液	15mL x 1
7	停止液	12mL x 1
8	濃縮洗浄液	50mL x 1

## 6. 用法および用量 (操作方法)

## (1) 必要な器具・器材

プレートリーダー (測定波長: 450nm)	マイクロピペットおよびチップ
希釈用テストチューブ	メスシリンダーおよびビーカー
精製水	グラフ用紙 (両対数)
ペーパータオル	洗浄ピン
冷蔵庫 (4°C として)	採取用容器 (清潔な試験管など)
恒温器 (37°C±1°C)	

必要に応じて、別途追加購入の希釈用緩衝液 (6.-(2) 検体の希釈方法 参照)

## (2) 準備

## 濃縮洗浄液の希釈方法

濃縮洗浄液は、40 倍濃度です。使用前に常温に戻し十分に転倒混和します。濃縮洗浄液 50mL に対して精製水を 1,950mL 加え混和します。これを洗浄液とします。冷蔵保存し 2 週間以内に使用してください。

## 標識抗体濃縮液の希釈方法

標識抗体濃縮液は 30 倍濃度です。別に用意した採取用容器にて、必要量に応じて標識抗体濃縮液を標識抗体用溶解液で 30 倍希釈してください。これを標識抗体とします。

## 希釈例)

1 スリット (8 ウェル) 使用する場合は 800 μL 必要(最低量)  
(標識抗体濃縮液を 30 μL とり、標識抗体用溶解液 870 μL を加え良く混和し、100 μL ずつ使用します。)

この操作は、標識抗体添加の直前におこなってください。

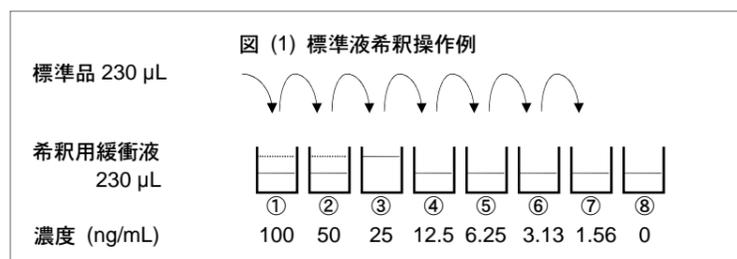
標識抗体濃縮液の残りは、蓋をしっかりと閉め冷蔵にて保存してください。有効期限内に再度使用できます。

## 標準物質の希釈方法

標準物質バイアル瓶に精製水\*を 0.5 mL 加えて完全に溶解します。この時標準物質濃度は 200 ng/mL となります。溶解後の標準物質は凍結保存することができます。凍結融解の繰り返しはできません。

希釈用テストチューブを 8 本用意し希釈用緩衝液を 230 μL ずつ量り取ります。各々のテストチューブに 100 ng/mL, 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12.5 ng/mL, 6.25 ng/mL, 3.13 ng/mL, 1.56 ng/mL, 0 ng/mL の表示をします。

100 ng/mL の希釈用テストチューブに 200 ng/mL の標準物質溶液を 230 μL 加え混和しその溶液 230 μL を 50 ng/mL の希釈用テストチューブに加え混和します。順次 2 倍連続希釈をおこない 100 ng/mL~1.56 ng/mL までの 7 点を希釈標準品とし、0 ng/mL を検体ブランクとします。(図(1) 参照)



## 検体の希釈方法

検体は必ずキット添付の希釈用緩衝液で適宜希釈して測定してください。本希釈用緩衝液に測定反応に重要な成分を含んでおりますので、PBS や他の製品の希釈液で代用しないでください。

添付の希釈用緩衝液で足りない場合は、追加購入用 EIA buffer (100mL: 製品番号 27769D100) の用意がございますので、ご利用ください。

## 検体の希釈例: 血清または EDTA 血漿を 10,000 倍希釈する場合

まず検体 10 μL に希釈用緩衝液を 990 μL 加えよく混和し、100 倍希釈サンプルとします。この 100 倍希釈サンプル 10 μL に、希釈用緩衝液を 990 μL 加え希釈します。これで 10,000 倍希釈サンプルが 1 mL できますので、これを測定に供します。

高倍希釈による誤差を防ぐため、2~3 段階に分けて希釈することをお奨めします。これは一例ですので、状況に応じて適宜調整してください。

## (3) 測定操作方法

試薬は使用前に常温に戻し、数回静かに転倒混和し変化のない事を確かめてください。

検体の測定と同時に希釈標準品を測定し検量線を設定してください。

- 1 ブランクの添加 (以降図 (2) 参照)  
試薬ブランクを設定し希釈用緩衝液を 100 μL 入れます。
- 2 検体、希釈標準品の添加  
検体 100 μL および希釈標準品各 100 μL ならびに検体ブランク 100 μL を入れます。
- 3 プレートカバーをして 4 °C 18 時間反応
- 4 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
- 5 標識抗体の添加  
検体、標準、検体ブランクに標識抗体を各々 100 μL 添加します。
- 6 プレートカバーをして 37 °C 30 分間反応
- 7 ウェルの反応液を除去します。洗浄液を加え除去します。
- 8 TMB 基質液の添加  
あらかじめ必要量を採取用容器にとり、そこからすべてのウェルに TMB 基質液を 100 μL 添加します。TMB 基質液添加後、反応液は徐々に青色に変わります。この時の反応は遮光してください。また、採取用容器に残った TMB 基質液は、コンタミの原因になりますので元に戻さないでください。
- 9 遮光をして常温 30 分間反応
- 10 停止液の添加  
すべてのウェルに停止液を 100 μL 添加します。プレートの側面を軽くたたいて混和します。反応液は青色から黄色に変化します。
- 11 吸光度測定  
プレート底面のよごれや水滴を拭き取り液面に気泡がないことを確認した後、30 分以内に試薬ブランクを対照として検体および標準ならびに検体ブランクの波長 450nm における吸光度を測定してください。

図 (2) 測定操作一覧

	検体	標準	検体ブランク	試薬ブランク
試料	検体 100 μL	希釈標準品 100 μL	希釈用緩衝液 100 μL	希釈用緩衝液 100 μL
プレートカバーをして 4°C 18 時間反応				
洗浄 4 回 (洗浄液 350 μL 以上)				
標識抗体	100 μL	100 μL	100 μL	-
プレートカバーをして 37 °C 30 分間反応				
洗浄 5 回 (洗浄液 350 μL 以上)				
TMB 基質液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
遮光常温 30 分間反応				
停止液	100 μL	100 μL	100 μL	100 μL
プレートをたたいて反応液を混和し、30 分以内に試薬ブランクを対照として 450 nm における検体、標準、検体ブランクの吸光度を測定				

## 7. 操作上の注意事項

- 1 検体は、採取後速やかに測定してください。保存する場合は、凍結保存とし、検体の凍結融解を繰り返さないでください。また、融解は低温でおこない測定前に十分混和してください。また、希釈した検体は速やかに測定してください。
- 2 検体は必ずキット添付の希釈用緩衝液で希釈してください。
- 3 検体や標準物質は、二重測定をおすすめします。
- 4 検体は、中性域のものを使用してください。また、有機溶媒等の混入も反応に障害がありますので注意してください。
- 5 抗体プレートの洗浄は必ず付属の洗浄液を使用してください。不十分な洗浄は、測定誤差の原因となりますので正確におこなってください。
- 6 洗浄液は、プレートをペーパータオルの上でたたいて完全に除去してください。ペーパータオルをウェルの中に入れる事はしないでください。
- 7 TMB 基質液は、光に対して敏感です。遮光保存してください。金属との接触も避けてください。

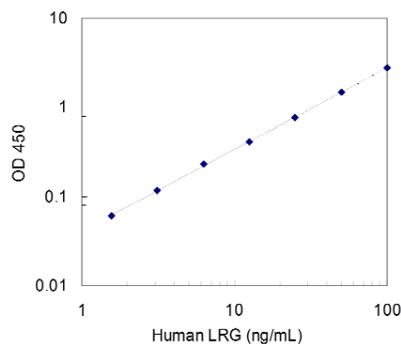
8 吸光度測定は、停止液添加後 30 分間以内におこなってください。

## 8. 測定結果の算出方法

対数グラフの縦軸に吸光度を、横軸に検体濃度を取り各標準物質濃度の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値をとり検量線を設定します。  
試料検体の吸光度値から検体ブランクの吸光度値を引いた値を検量線に当てはめ、検体濃度を読みとります。

## 9. 測定値と検量線作成例

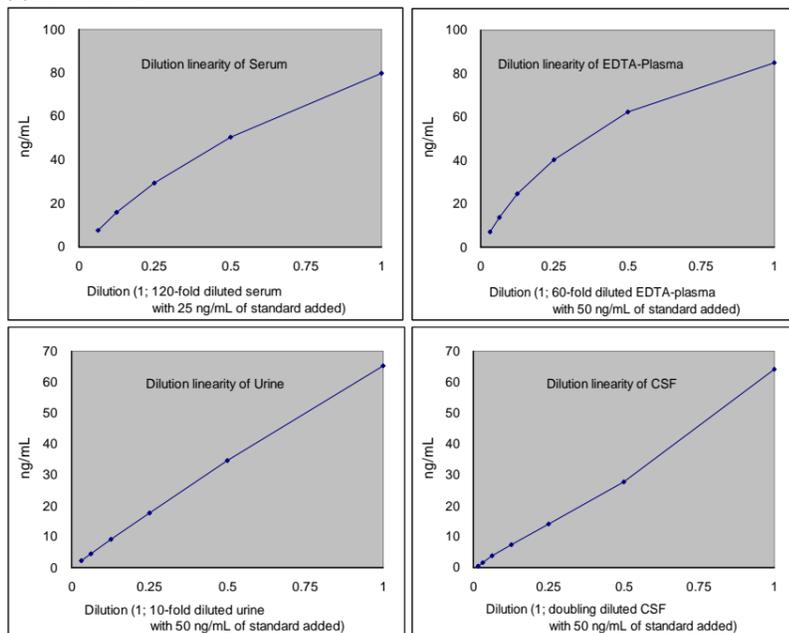
標準品濃度 (ng/mL)	吸光度 (450nm)
100	2.893
50	1.577
25	0.860
12.5	0.507
6.25	0.329
3.13	0.215
1.56	0.160
0 (検体ブランク)	0.099



\* 上記検量線は作成例です。測定に当たってはその都度検量線を作成してください。

## 10. キットの性能

### (1) 希釈直線性



### (2) 添加回収試験

検体	添加量 (ng/mL)	理論値 (ng/mL)	測定値 (ng/mL)	%
血清 (健康人) X100	12.5	75.78	76.92	101.5
	6.25	69.53	73.72	106.0
	3.12	66.40	70.09	105.5
血漿 (健康人) (EDTA) X100	12.5	50.18	50.64	100.9
	6.25	43.93	47.92	109.0
	3.12	40.80	44.90	110.0
尿 (健康人) X10	50	66.83	64.86	97.0
	25	41.83	42.07	100.5
	12.5	29.33	29.99	102.2
脳脊髄液 x2	6.25	24.59	23.84	96.9
	3.12	21.46	21.89	102.0
	1.56	19.90	20.69	103.9

### (3) 同時再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
85.34	2.60	3.0	14
22.78	1.05	4.6	14
5.23	0.26	4.9	14

### (4) 測定間再現性

測定値 (ng/mL)	SD 値	CV 値 (%)	n
87.30	3.69	4.2	3
22.60	0.59	2.6	3
5.09	0.26	5.1	3

### (5) 特異性

測定物質	交差率
Human LRG	100 %
Human Aβ (1-42)	< 0.01 %
Human sAPPβ (w)	< 0.01 %
Human sAPPα	< 0.01 %

### (6) 感度

0.17 ng/mL

本キットの感度は、NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) の評価方法に従い求めました。(National Committee for Clinical Laboratory Standards Evaluation Protocols, SC1, (1989) Villanova, PA : NCCLS 参照)

### 11. 使用上または取り扱い上の注意

- 1 保存は、2~8°C としてください。使用前に全ての試薬は常温に戻してください。
- 2 標準物質は、凍結乾燥品です。開封は、十分注意しゆっくりとおこなってください。
- 3 停止液は強酸性 (1N 硫酸) です。衣服 皮膚等への接触および廃棄には十分注意してください。
- 4 使用後の抗体プレートや試薬は、多量の水で洗い流してから廃棄してください。
- 5 希釈用緩衝液、標識抗体濃縮液および濃縮洗浄液は、まれに析出を認める場合がありますが、性能に問題はありません。
- 6 構成試薬には動物血液成分を含む物があります。取り扱いに注意し使用後は手洗いなどをおこなってください。
- 7 ロットが異なる製品の構成試薬や他のキットの構成試薬を混ぜたり、交換したりして使用することは避けてください。
- 8 有効期限切れの試薬は、使用しないでください。
- 9 本キットは、研究用試薬です。診断等に用いることはできません。

### 12. 保存方法および有効期限

2~8°C 保存

使用期限は外箱に記載

### 13. 包装単位および製品番号

96 Well

製品番号 27769

### 14. 参考文献

1. Li X, Miyajima M, Mineki R, Taka H, Murayama K, Arai H. Analysis of potential diagnostic biomarkers in cerebrospinal fluid of idiopathic normal pressure hydrocephalus by proteomics. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006 Aug;148(8):859-64
2. Serada S, Fujimoto M, Ogata A, Terabe F, Hirano T, Iijima H, Shinzaki S, Nishikawa T, Ohkawara T, Iwahori K, Ohguro N, Kishimoto T, Naka T. iTRAQ-based proteomic identification of leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG) as a novel inflammatory biomarker in autoimmune diseases. *Ann Rheum Dis*. 2010 Apr;69(4):770-4.
3. 中島円、宮嶋雅一、野中康臣、荻野郁子、渡邊麻季、新井一、萩原良明、小林恭子、田中絵美 特発性正常圧水頭症の髄液補助診断法 ; Leucine-rich α-2-glycoprotein (LRG) の有用性について Diagnostic value of the SF biomarker profile in idiopathic normal pressure hydrocephalus; leucine-rich α-2-glycoprotein is a potential biological marker. *Geriatric Neurosurgery*, Vol. 21
4. Nakajima M, Miyajima M, Ogino I, Watanabe M, Miyata H, Karagiozov KL, Arai H, Hagiwara Y, Segawa T, Kobayashi K, Hashimoto Y. Leucine-rich α-2-glycoprotein is a marker for idiopathic normal pressure hydrocephalus. *Acta Neurochir*. 2011 Jun;153(6):1339-46.
5. Watson CJ, Ledwidge MT, Phelan D, Collier P, Byrne JC, Dunn MJ, McDonald KM, Baugh JA. Proteomic analysis of coronary sinus serum reveals leucine-rich α2-glycoprotein as a novel biomarker of ventricular dysfunction and heart failure. *Circ Heart Fail*. 2011 Mar 1;4(2):188-97.

### 15. 問合せ先

株式会社 免疫生物研究所

Version. 5.

2019年6月更新