

この添付文書をよく読んでから使用して下さい。

※令和3年8月改訂
平成17年5月全面改訂

日本標準商品分類番号
87749

体外診断用医薬品

補体制御因子キット

承認番号 20900AMZ00539000

アクロビーズテスト[®]

ACROBEADS TEST[®]

射精直後のヒト精子はたとえ運動能力を備え、形態的に正常であっても卵子と受精することはできません。ヒト精子は雌性生殖路内を移動する間に受精能を獲得（キャパシテーション）し、その後に先体反応（アクロソームリアクション）を誘起して、初めて受精可能な状態となります。精子数、運動率、奇形率及び精液量の測定などの一般精液検査では、受精能についての情報を得ることはできません。

体外受精では運動性のある精子と卵子を直接混合して受精させるため、受精能を測定することが、より重要と考えられています。

受精能を測定する手段としてハムスターテスト¹⁾、トリプルステイン法²⁾や蛍光標識PSA法³⁾などが考案されていますが、いずれも操作に熟練が必要なこと、操作が煩雑であることから、日常的な検査として使用するには難点がありました。

本キットでは、検出系に先体反応誘起ヒト精子と特異的に反応するモノクローナル抗体⁴⁾結合ビーズ^{5~8)}を用いることにより、簡便かつ再現性よくヒト精子受精能が測定出来るようになりました。

また、ビーズに結合した精子の運動性によるビーズの凝集形成を判定の指標にしているため、検査値に先体反応誘起精子の運動性も加味されています。

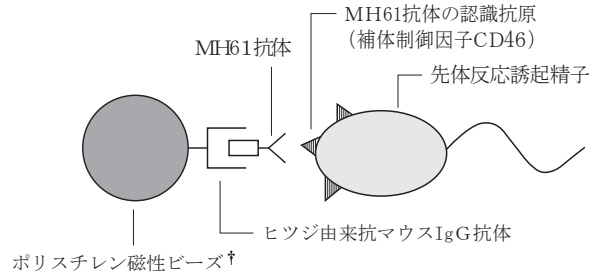


図1. ビーズと精子の結合模式図

† Dynabeads M-450 (DYNAL AS. Oslo)

酸化鉄を核とし、その周りをポリスチレンで被覆した粒子であり、ビーズ自身が磁性を帯びているものではありません。

更に培養すると先体反応を誘起した精子数が増え、結合した精子の運動性によりビーズの凝集が起こり、やがては精子結合のないビーズが存在しなくなります。

ビーズに反応させる精子数を段階的に変化させ、このときのビーズと精子の結合状態を観察することにより、精子先体反応を検出することができます。

5. 操作上の注意

(1) 検体

- ・3日以上禁欲期間を置き、用手法（マスターベーション）により精液を滅菌容器に採取し、3時間以内に検査に供して下さい。
- ・本キットの反応系には、白血球が影響を及ぼすので、尿路感染症患者の検体には使用しないで下さい。

(2) 妨害物質

- ・反応系に血清が混入すると検査値が低下するので、血清を添加した培養液を使用した場合、本キット内の培養液で洗浄して下さい。
- ・反応系に精漿（精液の液体成分）及び白血球が混入すると検査値が低下するので、精子懸濁液調製の際には注意して下さい。

(3) 測定上の注意

- 正確な検査結果を得るために以下の点に注意して下さい。
- ・滅菌した器具を使用して下さい。
 - ・精子懸濁液調製時、精子濃度は正確に調整して下さい。
 - ・ビーズ希釈懸濁液は分散状態が悪く、かつ沈殿しやすいのでミキサー等で十分懸濁させ、直ちに添加して下さい。
 - ・精子懸濁液とビーズ希釈懸濁液を混和した後、マイクロプレートには振動を与えないで下さい。〔ビーズに結合した精子が遊離するおそれがあります。〕

6. 用法・用量（操作方法）

【器具・装置】

操作上、次のような器具、装置が必要です。

- (1) クリーンベンチ：培養液の調製
- (2) 炭酸ガスインキュベーター
- (3) 倒立型顕微鏡（位相差又は微分干渉型）：100倍で観察可能なもの
- (4) 遠心分離機：500Gの遠心が可能なもの

1. 全般的な注意

- (1) 本製品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないで下さい。
- (2) 検査結果に基づく臨床診断は、臨床症状や他の検査結果等と合わせて担当医師が総合的に判断して下さい。
- (3) 添付文書以外での使用方法については保証を致しません。

2. 形状・構造等（キットの構成）※

	5回用
①培養液-1	22mL/バイアル×5
②培養液-2	2mL/アンプル×5
③培養補助剤 (ウシ血清アルブミン)	0.14g/バイアル×5
④MH61抗体結合ビーズ懸濁液 (MH61抗体結合ビーズ)	0.02mL中 6×10 ⁹ 個/チューブ×5

* MH61抗体：マウス由来モノクローナル抗体

3. 使用目的

先体反応精子頭部の補体制御因子CD46の検出

4. 測定原理

先体反応を誘起したヒト精子と特異的に反応するモノクローナル抗体を結合させたポリスチレン磁性ビーズ（以下ビーズ）と運動精子を、マイクロプレートのウェル内で一定時間共培養すると、数時間で先体反応が誘起し始めるため、抗原抗体反応による精子とビーズの結合が起こり始めます（図1）。

- (5)精子数計測用計算盤：マクラー精子カウントチャンバー、トーマ等
- (6)チップ式ピペット(1mL, 200 μ L, 20 μ L用) 及び滅菌チップ
- (7)滅菌ツベルクリン用注射筒(針付)
- (8)試験管ミキサー
- (9)滅菌96ウェル平底マイクロプレート
- (10)滅菌丸底試験管(10mL) プラスチック又はガラス製：精子のスィムアップ用
- (11)滅菌遠沈管(10mL) プラスチック又はガラス製：精子洗浄用
- (12)滅菌マイクロチューブ(0.5mL)：免疫ビーズ及び精子希釈用
- (13)アルミホイル又は滅菌アルミキャップ：培養液瓶及び試験管のフタ

【操作法】

(1)培養液の調製法

以下の操作はすべてクリーンベンチ内で無菌的に実施して下さい。

①A液

培養液-1 1バイアルに培養液-2 1.0mLを加え、混和します。

②B液

培養補助剤1バイアルにA液4mLを加え、泡立てないように溶解します。

③C液

A液にB液1.8mLを加え、混和します。
B液及びC液の瓶口を火炎滅菌したアルミホイル又は滅菌アルミキャップなどでフタをし、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内で1~18時間平衡化した後、以下の検査に使用します。
(37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内で保存するとき、2日間安定です。

(2)MH61抗体結合ビーズ希釈懸濁液の調製※

5回用：

MH61抗体結合ビーズ懸濁液にC液380 μ Lを加えます。
(調製後は2~10 $^{\circ}$ Cで保存し、当日中に使用して下さい。)

(3)精子懸濁液の調製

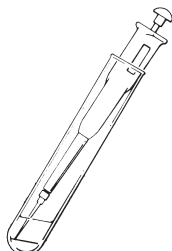
用手法により採取した精液を室温にて30~60分間放置して液化した後、以下の操作を行います。

①



C液2mLを加えた試験管を精液量に応じて2~5本準備します。

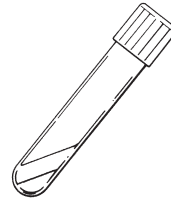
②



精液を加える際、気泡を入れないように注意して下さい。

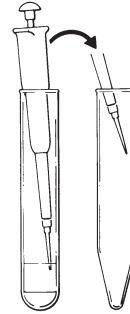
試験管底に液化した精液をそれぞれ0.5~1.0mLずつ静かに加えます。

③



試験管のフタを軽くしめ(又は滅菌アルミホイルでフタをした後)、約30 $^{\circ}$ に傾け、37 $^{\circ}$ C、5%炭酸ガスインキュベーター内で1時間静置し、精子のスィムアップを待ちます。

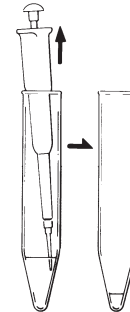
④



それぞれの試験管の上層部分約1.2mLを下層の精液を吸引しないよう^{注1)}に注意深く取り、1本の滅菌遠沈管に移します。

注1) 下層を吸い取ると精漿や精液に含まれる白血球が混入し、検査に支障を来たすので注意して下さい。

⑤



15~30 $^{\circ}$ Cで500G、5分間遠心し、素早く上清を捨てます。

⑥



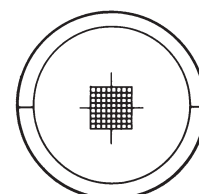
沈渣にC液4mLを加えて軽く混和して懸濁^{注2)}させた後、⑤と同一条件で遠心し、素早く上清を捨てます。
注2) 軽く操作して下さい。

⑦



沈渣の量に応じて0.1~0.3mLのB液を加え、懸濁させて下さい。なお、沈渣の量が極端に少ない時には添加量を0.1mLとします。その一部を取り、精子数を計測します。

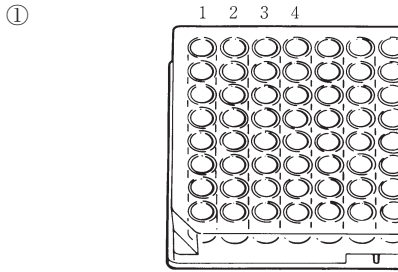
⑧



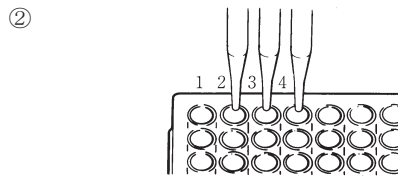
精子数を正確に計測して下さい。この結果に基づいて精子数を 4×10^6 /mLの濃度にB液を用いて調整して下さい。

(4)精子懸濁液とMH61抗体結合ビーズ希釈懸濁液の反応

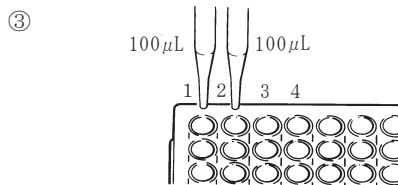
以下の操作を実施する際、ウェル内に気泡が生じると、結果の判定に支障を来すので注意して下さい。



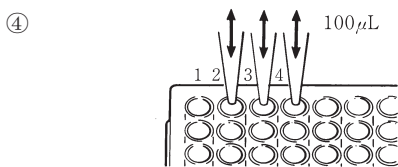
滅菌96ウェル平底マイクロプレートの4ウェルを用いて検査を実施します。



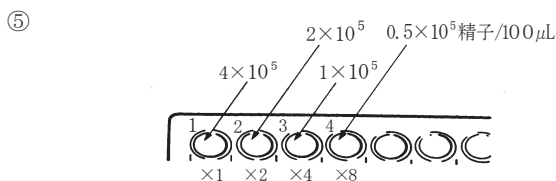
B液100 μ Lを2, 3及び4番目のウェルに加えます。



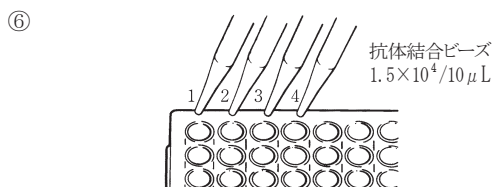
操作法の(3)で調製した精子懸濁液をよく懸濁^{注3)}させた後、100 μ Lを1番目及び2番目のウェルに加えます。
注3) 軽く操作して下さい。



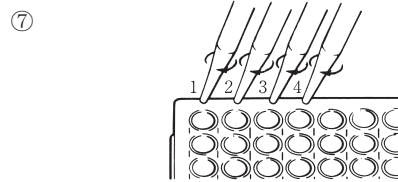
2番目のウェル内の液をピペッティングにより混和した後、100 μ Lを3番目のウェルに加えます。以下同様の操作を4番目のウェルまで繰り返し、4番目のウェルから100 μ Lを捨てます。



以上の操作により精子懸濁液の1, 2, 4及び8倍の希釈段階を作製して下さい。



操作法の(2)で 1.5×10^6 /mLに調整したMH61抗体結合ビーズ希釈懸濁液をミキサでよく懸濁させた後、1~4番目のウェルに10 μ Lずつ加えます。なお、添加の際にはピペット先端を液面に接触させるようにして行い、ピペット内の空気を吹き込まないようにして下さい。結果的にピペット内にビーズが少し残りますが、少量の場合は影響がありません。



直ちに各ウェルを4から1の順にピペットの先端で軽く混和します。

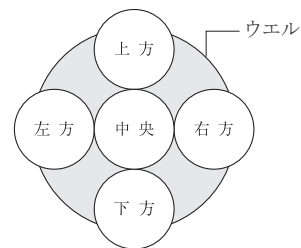
⑧ 37 $^{\circ}$ C, 5%炭酸ガスインキュベーター内で24時間静置培養します。これ以後、ビーズに結合した精子が遊離することを防ぐため、プレートに振動を与えないように注意して下さい。

7. 測定結果の判定法

【検査値の確定及び精子受精能の判定】

24時間静置培養後、倒立型顕微鏡(100倍)で各ウェル内の5視野(図2)についてビーズと精子の結合状態を観察します。

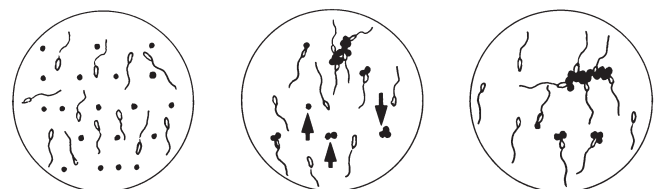
1視野で全てのビーズに精子が結合し、精子-ビーズ結合塊形成反応(凝集)が認められた場合を陽性とし、精子結合のない遊離のビーズが1個でもあれば陰性とします。ウェル内の5視野中3視野以上が陽性のとき、そのウェルの判定を凝集反応陽性(+)とします。



ビーズと精子の結合状態の判定は

陰性：精子が結合していないビーズが存在するとき (図3①, ②)
陽性：精子が結合していないビーズが存在せず、ビーズに精子が結合し凝集が認められたとき (図3③)

図2. ビーズと精子の結合状態を観察するに当たった5視野



①陰性 ビーズに精子はほとんど結合していない。
②陰性 一部のビーズに精子が結合しているが、精子が結合していないビーズ (図中矢印↑) も存在する。
③陽性 精子が結合していないビーズはなく、ビーズの凝集も認められる。

図3. ビーズと精子の結合状態

5視野中3視野以上が陽性のとき、そのウェルは凝集反応陽性(+)と判定し、各ウェルの凝集反応結果から以下の基準により検査値(0~4)を確定し、精子受精能を判定します。

精子希釈倍率	各ウェルの凝集反応結果				
1 倍	-	+	+	+	+
2 倍	-	-	+	+	+
4 倍	-	-	-	+	+
8 倍	-	-	-	-	+
検査値	0	1	2	3	4
精子受精能	不良	良好			優良

【参考】9)

臨床試験結果（210症例）に基づく、体外受精成績と本検査値の比較結果を示します。

表 本検査値から評価し得るヒト精子受精能評価

本検査値		0	1～3	4
ヒト精子受精機能		不良	良好	優良
体外受精結果	分割率の平均	25%	54%	72%
	分割率0%の症例の割合	48%	13%	0%

上段：Mann-Whitney検定

下段： χ^2 検定又は

Fisherの直接確率計算法

p<0.01(上段), p<0.01(上段)
p<0.01(下段), p<0.05(下段)
p<0.01(上段), p<0.01(下段)

以上のとおり、検査値は3つのカテゴリーに分類され、検査値0の先体反応精子が極めて少ない検体を受精能「不良」、検査値4の先体反応精子が極めて多い検体を受精能「優良」とし、又、検査値1～3の間に有意な差がないことから、これらを受精能「良好」と判定しました。

8. 性能

用法・用量欄の操作法により、感度、正確性、同時再現性の各試験を行うとき、次の規格に適合します。

(1) 感度試験及び正確性試験

- ①同時再現性試験を準用するとき、これに適合します。また、精液を使用せずに検査を実施する空試験には、ビーズの結合塊の形成は認められません。
- ②既知検査値の精液を5検体用いて試験するとき、4検体以上の検査値が既知検査値と一致し、しかも1段階を超える差を生じることはありません。
- ③4倍希釈精子液のウエル内で培養24時間後にビーズに結合した100の精子を観察するとき、95以上の精子が頭部でビーズに結合します。

(2) 同時再現性試験

既知検査値の精液を3検体用いて5回試験するとき、各検体の検査値が1段階の差を生じることが1回以下で、かつ1段階を超える差を生じることはありません。

9. 使用上又は取扱い上の注意

【取扱い上の注意】

- (1)検体中にHIVや肝炎ウイルスなどが存在する場合がありますので、感染しないように注意して下さい。
- (2)試薬が誤って目や口に入った場合には、水で十分に洗い流す等の応急処置を行い、必要があれば医師の手当てを受けて下さい。

【使用上の注意】

- (1)添付文書に記載された操作法に従って測定して下さい。〔記載された操作法で操作しない場合、正しい結果が得られません。〕
- (2)本キットは用時調製を原則としています。開封、調製後の保存に際し、以下の点に注意して下さい。
 - ・MH61抗体結合ビーズ懸濁液は使用後直ちに容器のふたを閉め、キットの箱に戻し、指定の貯蔵方法（2～10℃）で保存して下さい。
 - ・調製し、炭酸ガスで平衡化したB液及びC液は5%炭酸ガスインキュベーター内で保存し、2日以内に使用して下さい。
 - ・希釈したMH61抗体結合ビーズ懸濁液は、2～10℃で保存し、調製当日中に使用して下さい。
- (3)培養液-1に培養液-2 1.0mLを加えたA液はピンク色で澄明です。液が濁っている場合や赤色の場合は使用しないで下さい。また、5%炭酸ガスインキュベーター内での保存中に濁った場合も使用しないで下さい。
- (4)誤って凍結させた試薬は、品質が変化して正しい結果が得られないことがあるので使用しないで下さい。
- (5)使用期限を過ぎた試薬を使用しないで下さい。

- (6)ロット番号の異なるキットの試薬を混合して使用しないで下さい。

【廃棄上の注意】

- (1)本キットのMH61抗体結合ビーズ懸濁液には、防腐剤として0.02%のアジ化ナトリウムを含有しています。アジ化ナトリウムは、鉛管、銅管と反応して爆発性の金属アジドを生成することがありますので、廃棄する場合は、大量の水と共に流して下さい。
- (2)検体に接触した器具、試薬及び試薬容器等は感染の危険があるものとし、オートクレーブ（121℃、30分以上）等で滅菌処理するか、「感染性廃棄物処理マニュアル」に従って処理して下さい。
- (3)使用後の容器は、焼却処理するか、廃棄する場合には、「医療廃棄物処理ガイドライン」に従って処理して下さい。

10. 貯蔵方法・有効期間

貯蔵方法：2～10℃（凍結厳禁）

有効期間：2年

*使用期限は、外装に記載してあります。

11. 包装単位 ※

5回用/箱

12. 主要文献

- 1) Yanagimachi R., J. Reprod. Fertil., **28**, 477 (1972)
- 2) Talbot P. et al., J. Exp. Zool., **215**, 201 (1981)
- 3) Cross N. L. et al., Gamete Res., **15**, 213 (1986)
- 4) Okabe M. et al., Fertil. Steril., **54**, 1121 (1990)
- 5) Okabe M. et al., Mol. Reprod. Dev., **32**, 389 (1992)
- 6) Ohashi K. et al., Fertil. Steril., **58**, 803 (1992)
- 7) Ohashi K. et al., Fertil. Steril., **63**, 625 (1995)
- 8) 谷澤 修ほか：日本不妊学会雑誌, **40**, 368 (1995)
- 9) 扶桑薬品工業株式会社 社内資料

【問い合わせ先】 扶桑薬品工業株式会社 研究開発センター 学術室
〒536-8523 大阪市城東区森之宮二丁目3番30号

製造販売元



扶桑薬品工業株式会社

大阪市城東区森之宮二丁目3番11号

UM-308-308B