



胸腺細胞キット コールタークローン T6-RD1

ご使用に際しては、本添付文書をよくお読みください。

全般的な注意

1. 本品は体外診断用であり、それ以外の目的に使用しないでください。
2. 診断はほか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してください。
3. 添付文書等に記載した内容以外の方法で使用した場合には、保証しません。
4. ご使用にあたっては、測定装置の取扱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:モノクローナル抗体試薬(単一試薬)
成分:抗ヒト胸腺細胞マウスモノクローナル抗体 T6(CD1)
(フィコエリスリン結合)

使用目的

ヒト胸腺細胞の T6 抗原(CD1a)と特異的に反応することにより胸腺細胞を検出する。

測定原理

フローサイトメトリーによる蛍光抗体法

操作上の注意

1. 本品はフローサイトメトリー専用試薬であるので、蛍光顕微鏡には用いないでください。
2. 凝固剤としては、EDTA、ヘパリン等を用いることができますが、いずれの場合でも採血後は室温で保存(冷蔵しないでください)し、6 時間以内に染色してください。特に白血病細胞等では、保存によって急激に陽性率の低下を来す場合がありますので注意してください。
3. 静脈血検体の場合、細胞のバイアビリティ(生存率)は 90%以上が理想的ですが、異常検体ではこれを下回ることがあります。
4. 凍結検体の場合、細胞のバイアビリティが 85%以上でないと、誤った結果が得られるおそれがあります。
5. Ficoll-Paque 調製サンプルを用いる場合、分離条件により結果が異なる場合があります。分離後の細胞が Ficoll-Paque 分離液に長時間接触するとバイアビリティが低下するため、分離後は 5 分以内に洗浄してください。
6. 全血検体を Ficoll-Paque 等で比重遠心分離した場合、分離して得られた単核細胞と分離前の全血検体とでリンパ球サブセットの比率が異なる場合があります。この場合、白血球数が正常範囲内にあるような検体では比較的影響が少ないですが、白血球減少症患者の検体では、特定のサブセットの選択的な喪失が測定結果の精度に影響を及ぼすことがあります。
7. 白血球の大きさが異常な検体や分離の操作が不適切な場合は、分離が不完全となることがあります。分離後、明瞭な単核球層が認められなかったり、赤血球、赤血球破片、成熟顆粒球が多量に混入している場合は、分離をやり直すことをお勧めします。
8. Fc レセプタを介した抗体の非特異的結合が予想される検体の場合は、抗体試薬を反応させる 10~15 分前に、ヒト又はマウスの γ -グロブリンを加えてください(終濃度 1 mg/mL)。
9. 全血法の場合、溶血不良となるおそれがあるため、検体を試験管に分注する際は試験管の口や壁面に検体を付けないよう注意してください。付着した血液は、綿棒等で取り除いてください。
10. 有核赤血球、蛋白濃度の異常、ヘモグロビン合成異常などがみられる検体は、全血法で赤血球の溶血が不完全となることがあります。この場合、溶血していない赤血球をリンパ球としてカウントするために陽性率が実際よりも低くなるおそれがありますので注意してください。
11. 溶血時間が長すぎると白血球も影響を受けることがあります。

12. フローサイトメーターのレーザ光軸などの調整不良や不適切なゲート設定により、誤った結果が得られる場合があります。
13. CD1a は胸腺細胞のマーカーであり、正常な末梢血にはコールタークローン T6-RD1 陽性細胞はほとんど存在しません。
14. 白血球中の特定の細胞集団の変動は、必ずしも病態と一致しないため、測定結果はほかの臨床及び診断データと共に使用してください。
15. 測定結果の解釈を行う場合には、測定条件及び供血者の年齢、性別、喫煙習慣等の影響も考慮してください。
16. モノクローナル抗体反応液の調製にあたっては、用法・用量を守り、過剰な希釈は行わないでください。正常検体では問題ない抗体濃度でも白血病検体等では陽性率の低下を来す場合があります。

用法・用量(操作方法)

【試薬の調製】

<抗体反応液の調製>

使用時に検体数に応じて必要量(1 検体当たり 5 μ L)の抗体試薬を分取し、抗体試薬 5 μ L につき 195 μ L の血清加 PBS を加えたものをモノクローナル抗体反応液として用います。モノクローナル抗体反応液は使用時に調製し、保存は避けてください。

<ほかに準備するもの>

血清加 PBS: PBS に次の試薬を溶解します。2~8℃で保存します。

NBS(新生仔ウシ血清)	: 2%
{又は BSA(ウシ血清アルブミン)}	: 0.1%
アジ化ナトリウム	: 0.1%

【そのほか必要な試薬】

1. PBS(リン酸緩衝生理食塩水)(別売)
PBS バッファ(製品番号 6603369)1 パックを蒸留水 500 mL に溶解します。調製後の pH は 7.2 $\pm$ 0.2 で、防腐剤等は含んでいません。必要に応じてアジ化ナトリウム(0.1%)等を添加します。
2. 溶血剤(次の 1)、2)のいずれかを使用します)
 - 1) コールター全血ライジングキット(別売)
(製品番号 6603152 容量 300 テスト用)
PBS 24 mL にイムノライズ^{※1} 1 mL を加えます。
フィクサティブ^{※2} はそのまま使用します。
^{※1} イムノライズ:キット中の溶血試薬
^{※2} フィクサティブ:キット中の固定剤
(医薬用外劇物 ホルムアルデヒドを 9.25%含有)
 - 2) 塩化アンモニウム溶血剤(別売)
蒸留水 1 L に以下の試薬を溶かします。
塩化アンモニウム : 8.26 g
炭酸カリウム : 1.0 g
EDTA4Na(又は 2Na) : 37 mg
pH を 7.2~7.4 に調整し、密栓して室温保存します(1 週間安定)。
注意: 1)、2)の各溶血剤は溶血に要する時間が異なります。コールター全血ライジングキットは 30 秒~2 分で溶血が完了します。一方、塩化アンモニウム溶血剤は溶血に 10~15 分必要ですが、細胞に与える作用は比較的緩徐で、溶血剤のまま 20~30 分放置しても結果に及ぼす影響は少ないとされています。
3. コントロール試薬(アインタイプ・コントロール抗体)(別売)
コールタークローン MslgG1-RD1
製品番号 6602884 容量 100 テスト(0.5 mL)

【検体の採取と白血球数の調整】

検体には EDTA、ヘパリン等の抗凝固剤を用いて採血した末梢血を用います。

1. 全血を検体とする場合

試験管 1 本につき 100 μ L の血液を用います。
染色に最適な白血球数の範囲は 3~10 $\times$ 10³ 個/mm³ であるため、白血球数が 10 $\times$ 10³ 個/mm³ を超える場合は検体を希釈します。逆に 3 $\times$ 10³ 個/mm³ より少ない場合は遠心して再浮遊させます。検体の希釈には PBS を用います。

注) 検体は採血後室温(20~25℃)で保存してください。採血後 6 時間以内に操作を開始してください。

白血球数の調整

a) 白血球数が多い検体(>10 $\times$ 10³ 個/mm³)

白血球数	希釈倍率
10~ 20 $\times$ 10 ³	: 2 倍
20~ 30 $\times$ 10 ³	: 3 倍
30~ 40 $\times$ 10 ³	: 5 倍
40~ 60 $\times$ 10 ³	: 6 倍
60~100 $\times$ 10 ³	: 10 倍
100~200 $\times$ 10 ³	: 20 倍

- b) 白血球数が少ない検体 ($<3 \times 10^3$ 個/mm³)
- バフィーコート法
- (1) 検体を 25℃で 500 × g (1,700 rpm) で 5 分間遠心します。
 - (2) 白血球の層をパスツールピペットで採取します。この際、全ての白血球全部を確実に回収するため赤血球及び血漿も一部回収します。
 - (3) 数回ピペティングして、十分に懸濁させます。
 - (4) ヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
 - (5) 細胞濃度を 10×10^3 個/mm³ に調整します。1 テスト当たり 100 μL を用い、以下の操作手順に従って処理してください。
2. Ficoll-Paque 調製サンプルを検体とする場合
- (1) 試験管に血液 (抗凝固剤を含む) を 4 mL 取り、ほぼ等量の PBS を加え、転倒混和します。
 - (2) 別の試験管に Ficoll-Paque 分離液を 4 mL 入れ、その上に (1) の希釈血液を重層します。
 - (3) 2～8℃で 400～450 × g、30 分間遠心分離します (遠心条件は分離液によって異なります)。
 - (4) Ficoll-Paque 分離液と血漿の間の層をパスツールピペットで取り、別の試験管に移します。
 - (5) 2～8℃の PBS を加えてよく攪拌し、2～8℃で 400～450 × g、8 分間遠心分離します。
 - (6) 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加えてよく攪拌します。
 - (7) 2～8℃で 400～450 × g、4 分間遠心分離します。
 - (8) 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加えてよく攪拌します。
 - (9) 2～8℃で 400～450 × g、3 分間遠心分離します。
 - (10) 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加えて細胞濃度 1×10^3 個/mm³ (1×10^6 個/mL) 程度に調整します。
 - (11) 以下の a) 又は b) の方法を用いて、細胞のバイアビリティ (生存率) をチェックします。バイアビリティは 90% 以上が理想的ですが、異常検体ではこれを下回ることがあります。
- a) フローサイトメトリー法によるバイアビリティの確認
- (1) 試験管に 1×10^6 個 (細胞濃度が 1×10^3 個/mm³ の場合 1 mL) の細胞を分注します。
 - (2) 2～8℃の PBS を加え、2～8℃で 400～450 × g、4 分間遠心分離します。
 - (3) 上清を吸引除去し、0.05 mg/mL の Propidium Iodide を 3 滴加えて攪拌し、1 分間放置します。
 - (4) 2～8℃の PBS を加えて攪拌し、2～8℃で 400～450 × g、4 分間遠心分離した後、上清を吸引除去します。
 - (5) a) (4) の操作を繰り返します。
 - (6) フローサイトメーターで測定します。バイアビリティが 85% 未満の場合は、サンプルの調製をやり直すことをお勧めします。
- b) 蛍光顕微鏡法によるバイアビリティの確認
- (1) スライドグラスに 25,000 個 (細胞濃度が 1×10^3 個/μL の場合、25 μL) の細胞を載せます。
 - (2) Propidium Iodide (0.01 mg/mL) を 10 μL 載せ、マイクロピペットのチップの先で静かに攪拌します。
 - (3) 30 秒間放置した後、Acridine orange (0.005 mg/mL) を 10 μL 載せ、マイクロピペットのチップの先で静かに攪拌して 3 秒間放置します。
 - (4) カバーグラスをかけ、周囲をストップコック・グリスでシールし、直ちに蛍光顕微鏡で観察します。
 - (5) 細胞を 100 個カウントします。生細胞は明るい緑色に、死細胞は赤色に観察されます。バイアビリティが 85% に満たない場合は、サンプルの調製をやり直すことをお勧めします。

【操作方法】

<ほかに準備するもの>

PBS、溶血試薬、コントロール試薬: 「使用上又は取扱い上の注意」の項を参照してください。

血清加 PBS: PBS に次の試薬を溶解します (2～8℃保存)。

NBS (新生仔ウシ血清)	: 2%
{又は BSA (ウシ血清アルブミン)}	: 0.1%
アジ化ナトリウム	: 0.1%

再浮遊用 PBS: PBS にアジ化ナトリウムを 0.1% 溶解します (2～8℃保存)。

<サンプル調製手順>

1. 全血サンプルを用いた試験管法 (全血法)
- (1) モノクローナル抗体反応用と対照用の試験管を用意します。
- (2) それぞれの試験管に全血 100 μL を分注します。管壁に付着した血液は綿棒等で拭き取ります。
- (3) モノクローナル抗体反応液 200 μL を反応用の試験管に加えます。対照用の試験管には、抗体試薬と同様に濃度調整したコントロール試薬 (コールタークローン MslgG1-RD1、別売) の反応液を 200 μL 加えます。
- (4) よく攪拌し、室温で 45 分間反応させます。
- (5) PBS を 2～3 mL 加えて攪拌し、400～450 × g、5 分間遠心分離した後、上清を吸引除去します。
- (6) 以下の a)、b) のいずれかの方法で赤血球を溶血させます。
- a) 塩化アンモニウム溶血剤を用いる場合
調製した溶血剤 2 mL を加えてよく攪拌し、溶血が完了する (サンプルの濁りが消える) まで 5～15 分間常温で放置します。

- b) コールター全血ライジングキットを用いる場合
溶血剤 (キット中の「イムノライズ」を PBS で 25 倍希釈) を 1 mL 加えてよく攪拌し、30 秒～2 分間室温で放置します。
溶血が完了 (サンプルの濁りが消える) したら、直ちにキット添付の「フィクサティブ」を 250 μL 加えて攪拌します。
 - (7) PBS を 2 mL 加え、攪拌します。
 - (8) 400～450 × g、5 分間遠心分離した後、上清を吸引除去します。
 - (9) (7)～(8) の操作を繰り返します。
 - (10) 沈渣に適量 (0.5～1 mL) の再浮遊用 PBS を加え、よく攪拌します。
 - (11) 以上の処理を行った後、フローサイトメーターを用いてリンパ球領域の蛍光陽性率を測定します。検体はアイスバス中で遮光保存し、速やかに測定を行います。
2. Ficoll-Paque 調製サンプルを用いた試験管法
- (1) 抗体反応用と対照用に 12 mm φ × 75 mm の試験管を用意します。
 - (2) 各々の試験管に Ficoll-Paque 調製サンプルを 1×10^6 個 (細胞濃度が 1×10^3 個/mm³ の場合 1 mL) ずつ分注します。
 - (3) 2～8℃で 400～450 × g、4 分間遠心分離し、上清を注意深く吸引除去します。
 - (4) モノクローナル抗体反応液 200 μL を反応用の試験管に加えます。対照用の試験管には、抗体試薬と同様に濃度調整したコントロール試薬 (コールタークローン MslgG1-RD1、別売) の反応液を 200 μL 加えます。
 - (5) よく攪拌し、2～8℃で 30 分間反応させます。
 - (6) 血清加 PBS 1 mL を加え、2～8℃で 400～450 × g、4 分間遠心分離し、上清を吸引除去します。
 - (7) (6) の操作を 2 回繰り返します。
 - (8) 適量 (0.5～1 mL) の再浮遊用 PBS を加え、よく攪拌します。
 - (9) 以上の処理を行った後、フローサイトメーターを用いて測定します。検体はアイスバス中で遮光保存し、速やかに測定を行います。
3. Ficoll-Paque 調製サンプルを用いたマイクロタイタープレート法
- (1) あらかじめ 1×10^6 個/200 μL に調整した Ficoll-Paque 調製サンプルを U 底 96 穴マイクロタイタープレートに 200 μL 分注します。
 - (2) プレートを 2～8℃で 400～450 × g、5 分間遠心分離します。
 - (3) ペレットを壊さないように注意して上清を吸引除去します (先端を少し曲げたパスツールピペットを用いてください)。
 - (4) プレートにふたをして、プレートの底にボルテックスミキサの先端をあてて、プレートの隅々までゆるやかにかつ十分に攪拌し 1 ペレットをほぐします。
 - (5) モノクローナル抗体反応液 200 μL を反応用のウエルに加えます。対照用のウエルには、抗体試薬と同様に濃度調整したコントロール試薬 (コールタークローン MslgG1-RD1、別売) の反応液を 200 μL 加えます。
 - (6) 2～8℃で 30 分間反応させます。
 - (7) プレートを 2～8℃で 400～450 × g、5 分間遠心分離します。
 - (8) (3) 及び (4) の操作を行います。
 - (9) 血清加 PBS を 200 μL 加え、2～8℃で 400～450 × g、5 分間遠心分離します。
 - (10) (3) 及び (4) の操作を行います。
 - (11) 再浮遊用 PBS を 200 μL 加え、適当な試験管に移し、フローサイトメーターを用いて測定します。

測定結果の判定法

1. 正しく調整し、適切にゲートをかけたフローサイトメーターを用いて細胞を測定します。
2. 全血サンプルの場合は明瞭な三分画 (リンパ球、単球、顆粒球領域)、Ficoll-Paque 調製サンプルの場合は、適切な位置にリンパ球集団が出現するようにスレッシュホールドと散乱光のゲインを調整します。
3. リンパ球領域に解析ゲートを設定し、RD1 (PE) 蛍光 (Log スケール) の 1 パラメータ蛍光ヒストグラムを取得します。
コントロール試薬を対照として設定されたカーソルの右側部分が、CD1a 陽性細胞となります。

性能

用法用量欄の操作法によりフローサイトメーターを用いて、感度、特異性、再現性の各試験を行ったとき、下記の規格値に適合します。

【感度試験】

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で希釈した被験モノクローナル抗体及び※³ 前ロットのモノクローナル抗体反応液を用いて管理用検体を測定するとき、両者の陽性率の差は 4 倍希釈までは 5% 以内です。また、被験モノクローナル抗体反応液の蛍光陽性分画の平均蛍光強度は、前ロットのモノクローナル抗体反応液のそれに対して 5 チャンネル (256 チャンネル・リニアスケール測定時) 又は 14% (1024 チャンネル・ログスケール測定時) を越える低下を認めません。

注) ※³ 前ロットのモノクローナル抗体

本規格による試験に合格済のロットで有効期間内のもの

【特異性試験】

- 1) 陽性率既知の管理用検体を測定するとき、その値は既知陽性率 ± 5% 以内です。

- 2) 被験モノクローナル抗体反及び対照として※⁴ マウス IgG1 コントロールを用いて、自家参照品とした B 細胞の形質を有する培養細胞株及び正常末梢血リンパ球を測定するとき、対照との陽性率の差は 5% 以内です。
※⁴ ヒトの体成分には特異性を示さないマウス免疫グロブリン

【再現性試験】

同一検体を 3 回測定するとき、測定値の CV (変動係数) は 5% 以下です。

使用上又は取扱い上の注意

【取扱い上 (危険防止) の注意】

1. 本品には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれています。誤って目や口に入ったり、皮膚に付着したりし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てを受けてください。
2. 検査にあたっては感染の危険を避けるため、使い捨て手袋やゴーグルを着用し、また口によるピペティングを行わないでください。
3. 試料は HIV、HBV、HCV 等の感染のおそれがあるものとして取り扱ってください。

【使用上の注意】

1. 有効期限を過ぎた試薬は使用しないでください。
2. 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
3. 保管及びインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないでください。
4. 本品を凍結したり長時間光にさらしたりすることは避けてください。
5. 全ての試薬は使用する前に室温 (20~25℃) に戻してください。
6. 試薬の外観に変化が見られたり、コントロール検体による測定値に大きな変化があったりする場合は、試薬の劣化が考えられるので使用しないでください。

【廃棄上の注意】

1. 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定に従って処理してください。
2. アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性の高い金属アジドを生成することがあるので、廃棄の際は大量の水と共に洗い流してください。
3. 検体又は検体を含む溶液が飛散した場合、感染防止のために 0.1% 濃度以上の次亜塩素酸ナトリウム溶液等でふき取ってください。

貯蔵方法、有効期間

貯蔵方法: 冷暗所 (2~8℃)

有効期間: 2 年間

(使用期限は外装に記載しています。)

包装単位

コールタークロウン T6-RD1

製品番号 6603185 容量 100 テスト (0.5 mL)

主要文献

1. Reinherz, EL, Kung, PC, Goldstein G, Levey R and Schlossman SF: 1980. Discrete stages of human intrathymic differentiation: Analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T lineage. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77: 1588.
2. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell: 821.
3. Reinherz EL and Schlossman SF: 1981. Derivation of human T cell leukemias. Cancer res. 41 : 4767
4. Bharn AK, Reinherz EL, Poppema S, McCluskey R, and Schlossman SF: 1980. Location of T cell and MHC antigens in the human thymus. J.Exp.Med. 1 52: 772.
5. Boumsell L, Bernard A, Reinherz EL, Nadlar LM, Ritz J, Coppin H, Richard H, Dubertret L, Dagos J, Lermil J, Flandrin G, Dausset J and Schlossman SF: 1981. Surface antigens on malignant Sezary and T-CLL cells corresponds to those mature T cells. Blood 57: 52.
6. Reinherz EL, Schlossman SF and Rose Fs: 1980. Human immunodeficiency states resulting from disorders of T cell maturation and regulation. In: 'Primary Immunodeficiencies' . (Seligmann M and Hitzig WH, eds.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Amsterdam, pp. 109.
7. Bernard A, Boumsell L, Reinherz EL, Nadlar LM, Ritz J, Coppin H, Richard H, Valensi F, Dausset J, Flandrin G, Lemerle J and Schlossman SF: 1 981. Cell surface characterization of malignant T cells from lymphoblastic lymphoma using monoclonal antibodies. Evidence for phenotypic differences between malignant T cells from patients with acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma. Blood 57: 1105.
8. V Terhorst C, an Agthoven A, LeClair K, Snow P, Reiherz EL and Schlossman SF: 1981. Biochemical studies of the human thymic differentiation antigens T6, T9, and 11 : Cell 23: 771 .

9. Nadler LM, Ritz J, Griffin JD, Todd RF, Reinherz EL and Schlossman SF: 1981. Diagnosis and treatment of human leukemias and lymphomas utilizing monoclonal antibodies. In: 'Progress In Hematology (Brown EB, ed.) vol. XII: pp.187.
10. McMichael AJ, Pilch J, Galfey G, Mason DY, Fabre JW and Milstein C: 1979. A human thymocyte antigen defined by hybrid myeloma monoclonal antibodies. Eur.J.Immunol. 9: 205.
11. Reinherz EL, Cooper MD, Schlossman SF and Rosen FS: 1979. Abnormalities of T cell maturation and regulation in human beings with immunodeficiency. J.Clin.Invest. 68: 699.
12. Reinherz EL and Rosen FS: 1 981 . New concepts of immunodeficiency. Am.J.Med. 71 : 511 .
13. Reinherz EL, Geha R, Rapoport JM, Wilson M, Penta AC, Hussey RE, Fitzgerald KA, Daley JF, Levine H, Rose RS and Schlossman SF: 1982. Reconstitution after transplantation with T lymphocyte depleted HLA haplotype mismatched bone marrow for severe combined immunodeficiency. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79: 6047.
14. Umiel T, Daley JF, Bhan AK, Levey R, Schlossman SF and Reinherz EL: 1980. Acquisition of immune competence by a subset of human cortical thymocytes expressing mature T cell antigens. J, Immunol. 129: 1054.
15. Koepke JA and Landay AL: 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52: 19-27.

参考情報

詳細に関する情報は下記をご参照ください。

当社 Web サイト: サイトメトリードットコム

<https://www.bc-cytometry.com/>

問い合わせ先

ベックマン・コールター株式会社 お客様サポートセンター

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目 5 番 7 号 TOC 有明ウエストタワー

TEL: 0120-566-730

製造販売業者の氏名又は名称及び住所

ベックマン・コールター株式会社

〒135-0063 東京都江東区有明三丁目 5 番 7 号 TOC 有明ウエストタワー