



B 細胞キット

サイトスタット/コールタークローン

B4-FITC

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

成分: 抗ヒト B 細胞マウスモノクローナル抗体 B4 (CD19)
(フルオレセインイソシアナート結合)

使用目的

全血中の B 細胞の測定

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すので、蛍光顕微鏡には使用しないでください。
2. 本品は全血検体用に調製されています。新鮮又は凍結保存した分離単核球検体への使用は好ましくありません。
3. 抗凝固剤としては、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し、6 時間以内に染色することをお勧めします。特に白血球細胞等では、保存によって急激に陽性率の低下を来す場合があるので注意してください。
4. 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。
5. 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、綿棒等で取り除きます。
6. 病態と特定の白血球ポピュレーションの変動とは必ずしも一致しないため、測定結果は臨床及び他の診断上データと共に使用してください。
7. 有核赤血球、蛋白濃度が異常な場合、ヘモグロビン合成異常では、赤血球の溶血が不完全となる場合があります。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るので注意してください。
8. 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。
9. サンプルの前処理をイムノブレップで行う場合は、遠心洗浄の操作は不要です。サンプル自動調製システム TQ-Prep を用いることにより、サンプル処理が短時間で簡単にできます。
10. フローサイトメーターのレーザ光軸の設定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。
11. B 細胞に反応するモノクローナル抗体を用いて得られた B 細胞数は、細胞表面免疫グロブリン陽性細胞の数と異なる場合があります。全身性エリテマトーデスなど、血漿中の IgG 量が高い場合に、細胞表面免疫グロブリン陽性細胞数が異常な高値を示すことがあります。
12. 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。

用法・用量(操作方法)

【試薬の調製】

モノクローナル抗体試薬はそのまま用います(1テスト当たり 10 μ L)。

【その他必要な試薬】

1. TQ-Prep(又は Multi-Q-Prep)を用いてサンプルの処理を行う場合
イムノブレップ(専用試薬;別売)
製品番号 7546999 容量 300 テスト(TQ-Prep, Multi-Q-Prep 用)
イムノブレップは以下の 3 つの試薬で構成されます。

- ①イムノブレップ A(溶血剤)
- ②イムノブレップ B(反応停止剤)
- ③イムノブレップ C(固定剤)

2. コールター全血法でサンプルの処理を行う場合

- 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
イムノライズ^{※1} 1 mL に PBS(下記) 24 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: 9.25%のホルムアルデヒドを含有するため、取り扱いには十分注意してください。)

- 2) 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。調整後の pH は 7.2~7.4 で、防腐剤等は含んでいません。

3. コントロール試薬(アイソタイプ・コントロール抗体)(別売)

サイトスタット/コールタークローン MslgG1-FITC(B4-FITC 用)
製品番号 6603864 容量 50 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。試験管 1 本につき 100 μ L の血液を用いるため、テスト及び対照と検体希釈のための自家血漿採取用として、1 検体につき 1~2 mL の血液が必要となります。

染色に最適な白血球数の範囲は 3~10 $\times 10^3$ 個/ mm^3 であるため、白血球数が 10 $\times 10^3$ 個/ mm^3 を超える場合は検体を希釈します。逆に 3 $\times 10^3$ 個/ mm^3 より少ない場合は遠心して再浮遊させます。Q-Prep/イムノブレップ試薬システムを用いて赤血球を溶血する場合は、同一患者の血漿で検体を希釈します。それ以外の溶血試薬を用いる場合にはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈します。

注) 検体は採血後室温(20~25 $^{\circ}$ C)で保存してください。採血後 6 時間以内に操作を開始することをお勧めします。

白血球数の調整

- a) 白血球数が多い検体の場合(>10 $\times 10^3$ 個/ mm^3)

白血球数	希釈倍数
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の場合(<3 $\times 10^3$ 個/ mm^3)

バフィーコート法

- (1) 検体を 25 $^{\circ}$ C で 500 $\times$ g、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) 数回ピペッティングして、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 $\times 10^3$ 個/ mm^3 に調整します。1テスト当たり 100 μ L を用い、以下の操作手順に従って処理します。

【操作方法】

1. イムノブレップを用いる場合(Q-Prep 法)

- (1) モノクローナル抗体反応用と対照用に 12 mm ϕ $\times$ 75 mm の試験管を用意します。
- (2) それぞれの試験管に全血 100 μ L 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。

重要: 試験管の上部に血液が付着した場合、最終的にサンプルに未溶血の赤血球が混入して結果が不正確になります。付着した血液は綿棒で拭き取ります。

- (3) モノクローナル抗体試薬 10 μL を反応用の試験管に加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬(サイトスタット/コールタークローン MslgG1-FITC、別売)を 10 μL 加えます。
- (4) よく攪拌した後、室温で 10～12 分間反応させます。
- (5) 試験管を TQ-Prep(又は Multi-Q-Prep)で溶血・固定処理します。
- (6) 5～35 分室温放置し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。
- (7) 調製したサンプルは、室温で 2 時間まで保存できます。2 時間を超えるときは、2～8℃で遮光保存します。調製後 24 時間以内に測定してください。

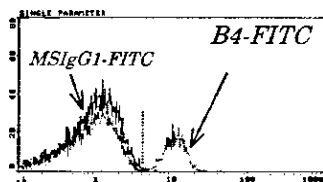
2. コールター全血ライジングキットを用いる場合(コールター全血法)

- (1) モノクローナル抗体反応用と対照用に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試薬 10 μL を反応用の試験管に加えます。対照用の試験管にはコントロール試薬(サイトスタット/コールタークローン MslgG1-FITC、別売)を 10 μL 加えます。
- (4) よく攪拌した後、室温で 45 分間反応させます。
- (5) PBS を 2～3 mL 加えて攪拌させ、400～450 × g、5 分間遠心分離します。
- (6) 上清を吸引除去します。
- (7) 溶血剤(キット中の「イムノライズ」を PBS で 25 倍希釈)を 1 mL 加えてよく攪拌させ、30 秒～2 分間室温で放置します。
- (8) 溶血が完了(サンプルの透明度が増す)したら、直ちにキット添付の「フィクサティブ」を 250 μL 加え、攪拌します。
- (9) PBS を 2 mL 加え、再度攪拌します。
- (10) 400～450 × g、5 分間遠心分離します。
- (11) 上清を吸引除去します。
- (12) (9)～(11)の操作を繰り返します。
- (13) PBS を 500 μL 加え、よく攪拌します。
- (14) 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。

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. Q-Prep 法で処理した検体を、ベックマン・コールター社製フローサイトメーター以外の装置(前方散乱光を狭角で検出する装置)で測定する場合には、Q-Prep 法で処理した後に、イオン交換水又は蒸留水 0.5 mL を試験管に加えます。明瞭な三分画(リンパ球、単球、顆粒球領域)が得られ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、FITC 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、CD19 陽性細胞となります。

図 1. ヒストグラム例(Q-Prep 法、遠心洗浄なし)



絶対数の計算

CD19陽性細胞の絶対数は、Flow-Count(絶対数測定用試薬、別売)を併用して簡便かつ高精度に測定できます。また、各サブセットの陽性率と血球数算定の結果から次式により計算することもできます。

$$\text{絶対数(個/mm}^3\text{)} =$$

$$\text{総白血球数(個/mm}^3\text{)} \times \text{リンパ球}\% \times \text{陽性率}\% / 10^4$$

性能

用法・用量(操作方法)欄の操作方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。

【特異性試験】

陰性の cell line を用いて特異性の確認が行われた既承認のモノクローナル抗体(コールタークローン B4-FITC 等)で陽性率を求めた検体を管理用検体として使用したとき、以下の規格を満たします。
被験モノクローナル抗体を用いて陽性率既知の管理用検体を測定する時、その陽性率は既知陽性率の±10%以内にありま

【感度試験】

被験モノクローナル抗体を用いて上記(特異性)の試験を行なうとき、2 倍希釈までは上記(特異性)の規格を満たします。

【再現性試験】

同一検体を 3 回以上測定するとき、測定値の CV(変動係数)は 10%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、また口によるピペッ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. 本品はアジ化ナトリウムを含んでいます。アジ化ナトリウムは鉛管、銅管と反応して爆発性の高い金属アジドを生成することがありますので、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拭き取ってください。

貯蔵方法、有効期間

貯蔵方法: 冷暗所(2～8℃)

有効期限: 18 箇月

(使用期限は外装に記載しています。)

包装単位

サイトスタット/コールタークローン B4-FITC

製品番号 6603859 容量 50 テスト(0.5 mL)

主要文献

1. McMichael A.J. ed: 1987. Leukocyte Typing III. Oxford: Oxford University Press, p.38-40, 42, 106-107, 116, 199, 302-306, 308, 315, 475.
2. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell: 821-827.
3. Reinherz EL, Haynes BF, Nadler LM and Bernstein ID: 1986. Leukocyte Typing II. New York: Springer-Verlag. Vol. 2, p.8, 15-25, 37.
4. Drexler HG, Gignac SM and Minowada J: 1988. Routine immunophenotyping of acute leukemias. Bult 57: 327-339.
5. Nadler LM, Anderson KC, Marti G, Bates M, Park E, Daley JF and Schlossman SF: 1983. B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. J Immunol 131: 244-250.
6. Benjamini E and Leskowitz S: 1991. Disorders of the Immune Response. In: Immunology: A Short Course. Second Edition. New York: Wiley-Liss. p.211-244.
7. Reinherz EL, O'Brien C, Rosenthal P and Schlossman SF: 1980. The cellular basis for viral-induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunol 125: 1269-1274.
8. Felsenstein D, Camey WP, Iacoviello VR and Hirsch MS: 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocytes in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152: 198-203.
9. Rinaldo CR, Ho M, Hamoudi WH, Gui X and DeBiasio RL: 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegalovirus mononucleosis. Infect Immun 40: 472-477.

10. Schmidt RE: 1989. Monoclonal antibodies for diagnosis of immunodeficiencies. Blut 59: 200-206
11. de Martini RM and Parker JW: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3: 56-70.
12. Fauci AS: 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239: 617-622.
13. Pedrazzini A, Freedman AS, Andersen J, Heflin L, Anderson K, Takvorian T, Canellos GP, Whitman J, Coral F, Ritz J and Nadler LM: 1989. Anti-B cell monoclonal antibody purged autologous bone marrow transplantation for B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Phenotypic reconstitution and B-cell function: Blood 74: 2203-2211.
14. Ramos EL, Turka LA, Leggat JE, Wood IG, Milford EL and Carpenter CB: 1989. Decrease in phenotypically defined T helper inducer cells (T4+4B4+) and increase in T suppressor effector cells (T8+2H4+) in stable renal allograft recipients. Transplantation 47: 465-471.
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