体外診断用医薬品
製品番号 6607015

**2009 年 11 月改訂
*2006 年 9 月改訂
承認番号 21200AMY00111000

日本標準商品分類番号
877449

クラスⅡ免疫検査用シリーズ サイトスタット triCHROME シリーズ

白血球キット／T細胞サブセットキット／T 細胞キット

サイトスタット triCHROME CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5

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. 診断は他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）

サイトスタット triCHROME 試薬は、FITC（Fluorescein isothyocyanate）、RD1（PhycoerythrIn＝PE）及び PC5（Phycoerythrin-Cy5）でそれぞれ標識したモノクローナル抗体の混合試薬（溶液）です。1 テストあたり以下の抗体タンパクを含有しています。

CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
CD45-FITC : 0.5～2.4μg/テスト
CD4-RD1 : 0.0625～0.30μg/テスト
CD3-PC5 : 1.25～0.6μg/テスト

対象抗原:

CD45（分子量 180/190/210/220kD）
CD45 抗体は、白血球共通抗原（LCA）として知られている、CD45 ファミリー汎白血球抗原を認識します。CD45 抗原は、赤血球とその前駆細胞を除く、いずれの白血球にも発現しています。この抗原は、非造血組織の細胞には発現していません。

CD3（分子量 20kD）
CD3 抗体は、TCR と複合体を形成している 5 つの CD3 抗原分子鎖のうちの ε 鎖を認識しています。この抗原は、系統特異的な”Pan-T 細胞”表面抗原で、成熟胸腺細胞と末梢血の休止期及び活性化 T 細胞（インデューサ及びサプレッサ／細胞障害の両方のサブセットを含む）に発現しています。

CD4（分子量 62kD）
CD4 は、胸腺細胞の一部と末梢血のインデューサ T 細胞亜群、及び単球に発現しています。単球にも低密度で発現しています。CD4 陽性リンパ球は、免疫応答において中心的な役割を果たしており、末梢血では、CD4 陽性リンパ球は、T 細胞と T 細胞、T 細胞と B 細胞、T 細胞とマクロファージの各々の相互作用でインデューサ機能をつかさどっています。CD4 抗原分子は、標的細胞上の class-Ⅱ主要組織適合遺伝子複合体（MHC）抗原分子に結合します。

クローン:

CD45: B3821F4A
CD45 cDNA トランスフェクタントで免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞と NS-1 マウスミエローマ細胞の融合細胞から分離

CD3: UCHT1
セザリー病患者から得られた末梢血リンパ球及び胸腺細胞で免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞と NS-1 マウスミエローマ細胞の融合細胞から分離

CD4: SCFI12T4D11（T4）
ヒト末梢血 T 細胞で免疫した BALB/cJ マウスの脾臓細胞と NS-1 マウスミエローマ細胞の融合細胞から分離

Ig 構造:

マウス IgG2b-H 鎖及びκ-L 鎖（CD45）
マウス IgG1-H 鎖及びκ-L 鎖（CD3、CD4）

細胞毒性:

補体依存性（CD45）
なし（CD3、CD4）

原料及び精製法:

マウス腹水よりアフィニティクロマトグラフィで精製 （CD45）融合細胞の培養上清よりアフィニティクロマトグラフィで精製（CD3、CD4）

標識:

FITC／抗体タンパク比 : 3～10
励起波長 : 468～509nm
蛍光波長 : 504～541nm

RD1／抗体タンパク比 : 0.5～1.5
励起波長 : 486～580nm
蛍光波長 : 568～590nm

PC5／抗体タンパク比 : 0.5～1.5
励起波長 : 486～580nm
蛍光波長 : 660～680nm

抗体以外の各種成分と濃度:

1 バイアル（0.5mL）中

BSA :0.2%
リン酸カリウム :0.01M
NaCl :0.15M
NaN3 :0.1%
スタビライザ

使用目的

CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
リンパ球細胞表面抗原の分析及び T 細胞とヘルパ／インデューサ T 細胞の測定

測定原理

測定方法は、フローサイトメトリーを用いた 3 カラー直接免疫蛍光法です。すなわち、サイトスタット triCHROME 試薬をリンパ球表面の CD45 抗原及び CD3 抗原と、CD4 抗原に同時に反応させ、細胞に波長 488nm の励起光を照射して緑色蛍光（FITC）、深赤色蛍光（PC5）及びオレンジ色蛍光（RD1）を発光させ、それぞれの蛍光を光電子増倍管で増幅し、その電気信号をコンピュータで解析、表示させることにより各抗体陽性細胞の計測を行います。

測定には 5 パラメータ以上の検出器のあるフローサイトメーターを使用します。前方散乱光（FS）と側方（90°方向）散乱光（SS）によるサイトグラムに加えて、CD45 蛍光と側方散乱光のサイトグラムでもリンパ球領域にゲートを設定することにより、赤血球の妨害なしに蛍光陽性リンパ球の測定ができます。リンパ球ゲート内の解析細胞数を数千～数万に設定することで、高精度で再現性の良い結果が得られます。

使用するフローサイトメーターは、あらかじめ蛍光のコンペンセーション（FITC、RD1、PC5 相互の蛍光波長のオーバーラップ分の補正）が適切に設定されている必要があります。コンペンセーションの設定は、CYTO-COMP 及び CYTO-COMP CELL（別売）等を用います。コンペンセーションの確認と調整は測定前に必ず行い、測定中もレーザ光軸の再調整や PMT ハイボルテージの再設定等を行った際には修正・確認をする必要があります。

操作上の注意

1. サイトスタット triCHROME はフローサイトメトリー専用試薬です。蛍光顕微鏡には使用できません。
2. サイトスタット triCHROME は全血検体用に調製されています。
3. サイトスタット triCHROME の測定には、3 カラー（525nm、575nm、670nm）の蛍光測定に対応できるフローサイトメーターが必要です。
4. フローサイトメーターのレーザ光軸の調整不良や蛍光感度とコンペンセーションの調整不良、不適切なゲート設定などにより、誤った結

果が得られる場合があります。
5. 検体は、採血後は室温で保存し、6 時間以内に染色してください。
6. 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。
7. 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、綿棒等で除去してください。
8. 有核赤血球、血漿蛋白濃度異常、ヘモグロビン合成異常がみられる検体では、赤血球の溶血が不完全となることがあります。
9. 溶血時間が長すぎると白血球にもダメージが及ぶことがあります。
10. 調製済みのサンプルは、できるだけ速やかに測定してください。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

サイトスタット triCHROME は、そのまま使用します（10μL／テスト）。
その他に必要な試薬については、「使用上及び取扱上の注意」を参照してください。

【その他必要な試薬】

1. TQ-Prep（または Multi-Q-Prep）を用いてサンプルの処理を行う場合

   イムノプレップ試薬（Immuno-Prep；TQ-Prep 専用溶血・固定試薬）
   製品番号 7546999： 容量 300 テスト

   イムノプレップ試薬は以下の 3 つの試薬で構成されています。

   ①イムノプレップ A（溶血剤）
   ②イムノプレップ B（反応停止剤）
   ③イムノプレップ 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

   製品番号 6603152 容量 300 テスト

   イムノライズ*1mLにPBS（下記）24mL を加えます（25 倍希釈）。
   フィクサティブ**はそのまま使用します。

   *イムノライズ：キット中の溶血試薬
   **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）
   PBS バッファ（製品番号 6603369）1 パックを蒸留水 500mL に溶解します。調製後の pH は 7.2±0.2 で、防腐剤等は含んでいません。

3. アイソタイプコントロール
   サイトスタット
   triCHROME CD45-FITC/MslgG1-RD1/MslgG1-PC5
   製品番号 6607019 容量 50 テスト（0.5mL）

【検体の採取と白血球数の調整】

検体には、抗凝固剤に EDTA を用いて採血した末梢血を使用します。血液は、試験管 1 本につき 100μL 使用します。

染色に最適な白血球数の範囲は 3～10×10^3 個/mm^3 です。もし白血球数が 10×10^3 個/mm^3 を超える場合は検体を希釈します。また、3×10^3 個/mm^3 より少ない場合は遠心濃縮します。コールターQ-PREP／イムノプ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てください。それ以外の溶血剤を用いる場合にはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈してください。

注）検体は採血後室温（20～25℃）で保存してください。良好な分析結果を得るには、できるだけ採血してから 6 時間以内に操作を開始してください。

注）検体は採血後室温（20～25℃）で保存します。良好な分析結果を得るには採血してから 6 時間以内に操作を開始してください。

細胞数の調整

a）白血球数が多い検体（＞10×10^3 個/mm^3）

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

b）白血球数が少ない検体（＜3×10^3 個/mm^3）

バフィーコート法
（1）検体を 25℃で 500×g、5 分間遠心します。
（2）白血球の層をピペットで採取します。この際、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てください。
（3）数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
（4）コールターLH 700シリーズ等の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）同一患者の血漿で細胞濃度を 10×10^3 個/mm^3 に調整します。

【操作方法】

1. イムノプレップ試薬（Immuno-Prep）を用いる場合（Q-PREP 法）

   イムノプレップ試薬は、TQ-Prep*用にコールター社が開発した溶血試薬キットで、以下の 3 つの試薬で構成されています。

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

   * TQ-Prep：フローサイトメトリー用のサンプル自動調製システム。イムノプレップを組み込むことにより一定時間ごとに溶血剤、反応停止剤、固定剤を試験管に自動的に分注、撹拌することにより、一度に多検体のサンプル自動処理ができます。

   1） モノクローナル抗体反応用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
   2） サイトスタット triCHROME 試薬 10μL を抗体反応用の試験管に添加します。対照用の試験管には、サイトスタット triCHROME CD45-FITC/MSlgG1-RD1/MslgG1-PC5 コントロール試薬（別売）を 10μL 添加します。
   3） それぞれの試験管に全血を 100μL ずつ分注します。
   4） よく撹絆した後、室温で 10 分間反応させます。
   5） TQ-Prep で溶血・固定処理します。
   6） EPICS®XL 等の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。調製したサンプルは、調製後 2 時間まで室温で保存できます。2 時間を超えるときは、2～8℃で遮光保存し、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を 100μL ずつ分注します。
   3） サイトスタット triCHROME 試薬 10μL を抗体反応用の試験管に添加します。対照用の試験管には、サイトスタット triCHROME CD45-FITC/MSlgG1-RD1/MslgG1-PC5 コントロール試薬（別売）を 10μL 添加します。
   4） よく撹拌し、室温で 45 分間反応させます。
   5） PBS を 2～3mL 加え撹拌し、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 1mL 加えてよく撹絆し、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 250μL 加え、撹拌します。
   9） PBS を 2mL 加え、再度撹拌します。
   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） 7）～9）の操作を繰り返します。
   13） 適量（0. 5～1mL）の PBS を加え、よく撹拌します。
   14） EPICS® XL 等の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。調製したサンプルは、2～8℃で遮光保存し、できるだけ速やかに測定を行ってください。

測定結果の判定方法

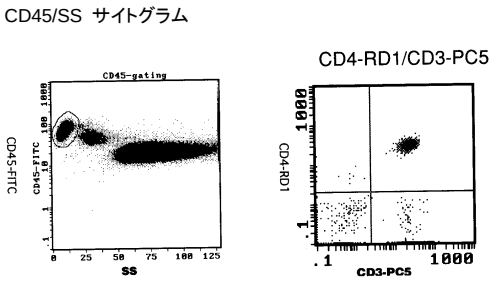
1. 正しく調整し、適切にゲートを設定したフローサイトメーターを用いてサンプルを測定してください。
2. Q-PREP 法で処理した検体を EPICS®フローサイトメーター以外の装置（FS を狭角で検出するようなフローサイトメーター）で測定する場合には、Q-PREP 法で処理したサンプルに、イオン交換水または蒸留水を 0.5mL 加えます。
3. 散乱光サイトグラムにおいて、明瞭な三分画（リンパ球、単球、顆粒球の各領域）が得られるようにノイズディスクリミネータ（またはスレッショルド）と散乱光の感度を調整します。
4. CD45 蛍光と側方散乱光のサイトグラムにおいて、明瞭な三分画（リン

パ球、単球、顆粒球の各領域）が得られるように CD45（FITC）蛍光の明瞭な三分画（リンパ球、単球、顆粒球の各領域）が得られるように感度を調整します。蛍光感度を調整した後は、必ずコンペンセーションの確認と再調整を行ってください。リンパ球（CD45 が強蛍光で側方散乱光が低い）領域に解析ゲートリージョンを設定します。

5. リンパ球領域ゲートを満たすイベントについて、RD1 蛍光（Log スケール）及び PC5 蛍光（Log スケール）の 2 パラメータ蛍光ヒストグラムを取得します。

   ヒストグラムの縦軸に RD1 蛍光、横軸に PC5 蛍光をとった場合、CD3-PC5 陽性率は、Quadrant2（CD3+/RD1+）と Quadrant 4（CD3+/RD1-）の各分画のパーセンテージの和となります。同様に、RD1 標識抗体の陽性率は Quadrant1（CD3-/RD1+）と Quadrant 2（CD3+/RD1+）の各分画のパーセンテージの和となります。ダブルポジティブの陽性率は、Quadrant2（CD3+/RD1+）のパーセンテージに相当します。

図. ヒストグラム例（健常者末梢血、Q-PREP 法、EPICS XL で測定）



絶対数の計算

各々の陽性細胞の絶対数は、Flow-Count（絶対数測定試薬、製品番号 7547053）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（コールターLH 700 シリーズ等による）の結果から次式により計算することもできます。

絶対数（個/mm^3）＝

総白血球数（個/mm^3）×リンパ球％×陽性率％／10^4

【測定条件の確認】

測定条件が正しいかどうかを確認するには、IMMUNO-TROL（精度管理用全血コントロール、製品番号 6607077）または健常者末梢血を陽性コントロール検体として、検体と同様に染色、測定します。抗体試薬の性能確認には CYTO-TROL（精度管理用コントロール細胞、製品番号 6604248）も使用できます。

正常参考値は施設ごとに設定してください。

Fc レセプタを介した単球、顆粒球に対する非特異結合はリンパ球領域を正しくゲーティングすることで除外できます。リンパ球は、CD45 が強蛍光で、側方散乱光が低い細胞集団です。

末梢血リンパ球は T 細胞、B 細胞、NK 細胞の 3 者で構成されているため、理想的な測定条件では、同一検体のリンパ球領域での CD3 陽性率（T 細胞）、CD19 陽性率（B 細胞）及び CD3-/CD56 陽性率（NK 細胞）の合計の期待値は 100%になります。陽性率の合計が 100%を大きく下回る場合、リンパ球領域への単球その他の細胞集団の混入によるゲートリージョン内のリンパ球純度の低下が考えられるため、ゲートリージョンを修正したうえで陽性率を再解析してください。

各検体のリンパ球に対する非特異的な抗体の Fc 結合を確認するために適切なアイソタイプコントロール試薬（サイトスタット triCHROME CD45-FITC/MSIgG1-RD1/MsIgG1-PC5）を使用します。健常者検体の場合、コントロール試薬のリンパ球領域陽性率は通常 1～2%です（コントロール試薬において Quadrant1、2、4 のいずれかが 2%を上回る場合、測定結果は誤差を含んでいるおそれがあります）。コントロール試薬の陽性率は、腫瘍検体ではより高い値を示すことがあります。

【測定結果の判定に関わる注意事項】

1. CD3 は最も特異性の高い T 細胞マーカーですが、CD3 陽性の T 細胞は機能的に成熟した T 細胞であるため、胸腺細胞など未熟な T 細胞の検出には CD2、CD5 など他の T 細胞マーカーを併用してください。
2. 臓器移植等の患者で、治療目的で CD3 抗体の投与を受けている場合は、CD3 陽性率（T 細胞）の測定に影響することがあるので、CD2、CD5 など他の T 細胞マーカーを併用してください。
3. ヘルパ／インデューサ T 細胞サブセット（CD3 陽性かつ CD4 陽性）の他、単球も CD4 が陽性です（CD3 は陰性）。
4. 顆粒球及び赤血球は、CD3、CD4 のいずれも陰性です。
5. 白血球はすべて CD45 陽性ですが、その蛍光強度はリンパ球＞単球＞顆粒球（好中球）の順で弱くなります。赤血球及び血小板は CD45 陰性です。
6. サイトスタット triCHROME 試薬は、リンパ球のゲーティングに CD45 蛍光を用いるため、リンパ球領域への未溶血赤血球の混入の可能性は非常に小さいと考えることができます。
7. 病態と特定の自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データと共に使用してください。
8. 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令、性別、喫煙習慣等の影響も考慮してください。

臨床的意義

ヒト末梢血のリンパ球は、T 細胞（胸腺由来）、B 細胞（骨髄細胞）、NK 細胞（ナチュラルキラー細胞、ヌル細胞）の 3 つの細胞集団で構成されています。これらの細胞型は、顕微鏡検査では形態学的に区別できませんが、細胞膜上の特有な抗原の違いによって同定が可能です。

T 細胞、B 細胞、及び NK 細胞は免疫機能の中心的役割を果たしています。種々の T 細胞サブタイプが特異的抗原を認識して、エフェクタ機能を発揮したり、細胞性／体液性免疫応答を調節しています。抗原特異的な B 細胞は、T 細胞を介した、抗原やマクロファージによる活性化の過程で、抗原特異的な免疫グロブリン（Ig）を産生・分泌する形質細胞へと分化します。NK 細胞は、独立した細胞障害性エフェクタ細胞集団として同定され、造血の調節、ウィルス感染の防御、悪性腫瘍細胞の破壊などに必須の役割を果たしています。NK 細胞による細胞障害は、クラス I または II の主要組織適合性複合体（MHC）抗原による拘束性を示すことなく起こります。NK 細胞は、骨髄中の前駆細胞に由来し、胸腺での成熟過程を必要とせずに骨髄内で分化することが示されています。

歴史的に、T 細胞と B 細胞は、それぞれヒツジ赤血球に対するレセプタ（E-ロゼット・レセプタ）と細胞表面免疫グロブリン（SmIg）により同定されていました。E-ロゼット法は、T 細胞に特異的であるものの、光学顕微鏡下で羊赤血球と T 細胞の結合を観察し細胞数を数えねばなりません。SmIg の測定による B 細胞の同定・定量も、他の細胞集団に Ig-Fc 部分に対するレセプタに結合した Ig による SmIg 偽陽性がみられるため、精度に限界があります。NK 細胞の同定・定量には、従来より、クロム遊離法などの標準的な細胞障害性試験が用いられてきました。

近年、T、B、NK 細胞とそれらの亜分画を同定するためのモノクローナル抗体が開発されました。従来の比較的特異性の低いポリクローナル抗体（異種抗血清）に比べ、モノクローナル抗体は各々が異なる表面抗原を特異的に認識します。これにより、正確で確実なリンパ球測定だけでなく、他の細胞マーカー（TdT、HLA-DR 関連抗原、SmIg）と組み合せて、T 細胞及び B 細胞分化段階の同定も行うことができます。

細胞表面抗原は、細胞の成熟（分化）段階や機能を反映する形で、T 細胞、B 細胞上に発現あるいは消失しています。ある抗原が発現した細胞には、他の表面抗原もその一部または全部が様々な期間発現しています。

T 細胞における”pan-T 細胞”抗原は、CD7（初期前胸腺細胞）；CD2；CD5（未熟胸腺細胞）；細胞質内 CD3（未熟及び中間型胸腺細胞）；細胞表面 CD3（成熟胸腺細胞）というような順序で発現していきます。これに伴って、CD4 と CD8 の同時発現（中間型胸腺細胞）とその後の各々単独の発現（成熟胸腺細胞）がみられます。これらの表面抗原は、末梢血やリンパ組織中の休止期及び活性化 T 細胞に至るまで、分化段階を通してその発現が継続します。

B 細胞における”pan-B 細胞”抗原は、CD19（B 前駆細胞／pre-pre-B 細胞）；CD20（pre-B 細胞）という順序で発現していきます。CD19、CD20 ともに、一度発現した後、休止期及び活性化 B 細胞やリンパ組織 B 細胞を含む成熟 B 細胞の分化段階まで発現が継続します。どちらも B 細胞分化の最終段階である形質細胞で消失します。

CD21 や CD22 は、末梢血またはリンパ組織の成熟 B 細胞の活性化に伴い消失する、「限定 B 細胞表面抗原」です。細胞表面の CD22 発現より早い段階（pre-pre-B 細胞）で、細胞質内に CD22 が検出されます。

“Pan-T 細胞”抗原、”Pan-B 細胞”抗原及び”Pan-NK 細胞”抗原に特異的なモノクローナル抗体は、それぞれ成熟 T 細胞、B 細胞及び NK 細胞の同定・定量に用いることができます。また、リンパ球の成熟（分化）段階や機能的分類は、特定の細胞表面抗原に特異的なモノクローナル抗体

を用いて確定することができます。サイトスタット triCHROME シリーズは、白血球共通抗原である CD45 と、”Pan-T 細胞”及び”インデューサ T 細胞”、サプレッサ／細胞障害性 T 細胞の表面抗原である CD3、CD4、CD8、”Pan-B 細胞”抗原及び”Pan-NK 細胞”抗原である CD19、CD56 のそれぞれに特異的に結合するモノクローナル抗体によって、末梢血中のT細胞及びそのサブセット、B細胞及びNK細胞を測定します。さらに、本品は、同じ全血サンプル中の異なるリンパ球集団を一度に分析することができます。

免疫蛍光法によりリンパ球の分類を行う場合、通常は比重遠心分離あるいは溶血処理により赤血球を除去し、リンパ球分画を回収しています。いずれの方法とも混入した分離液や溶血剤あるいは未反応の抗体を除去するため、撹拌～遠心分離～アスピレーションの操作を繰り返す必要があります。この一連の操作の繰り返しにより、腫瘍細胞や活性化細胞がダメージを受けるおそれがあります。また、アスピレーション操作による細胞のロスも生じます。この問題を解決するため、遠心分離～アスピレーションの操作のない検体処理法（No Wash 法）が考案され、全血サンプルを No Wash 法で処理する自動前処理システムとしてコールター Q-PREP 及び TQ-Prep が開発されています。サイトスタット triCHROME はバックグラウンドの蛍光が低く、さらに CD45 モノクローナル抗体により赤血球デブリスの混入による誤差を除外できるため、コールター TQ-Prep を用いた No Wash 全血法に最適なリンパ球サブセット分析用モノクローナル抗体試薬です。

T 細胞、B 細胞、NK 細胞及び CD4 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球の割合（陽性率）と陽性細胞数（絶対数）は、既知あるいは未知の疾病下にある患者の免疫機能の評価や、臓器移植後のリンパ球レベルのモニターに有用です。

すなわち、T 細胞、B 細胞、及び CD4 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球数の異常は、白血球数の減少を来たしている未知の疾患の患者の診断及び予後判定に役立ちます。T 細胞、B 細胞及び CD4 陽性リンパ球、CD8 陽性リンパ球の変動が腎、心、肝、肺などの臓器移植に伴って認められ、これらの細胞集団のモニタリングが有用であることが示唆されます。

NK 細胞は、ある種の癌細胞やウィルス感染細胞などの標的に対して、MHC 非拘束性の細胞障害を媒介できる細胞集団として、機能的に定義されています。

CD4 陽性リンパ球数の異常を確認することは、免疫不全症の診断や予後判定にも有用です。例えば、後天性免疫不全症候群（AIDS）の病原体であるヒト免疫不全ウィルス（HIV）に感染すると、HIV のレセプタ（CD4 抗原分子そのもの）を発現している CD4 陽性リンパ球が選択的に死滅することにより免疫抑制が起こります。臨床上、免疫学上の異常の進行は、一般に CD4 陽性リンパ球数の減少と相関しています。

疾病に関連した CD4 もしくは CD8 陽性リンパ球数の変化は、CD4/CD8（T4/T8）比、すなわちインデューサ T 細胞とサプレッサ／細胞障害性 T 細胞の比の変化をもたらします。したがって、T4/T8 比は診断及び免疫機能の予後指標として有用です。

T4/T8 比及び CD4 陽性リンパ球数は、ARC（AIDS-related complex）及び AIDS の判定に最も広く用いられている検査項目です。進行した AIDS 患者では、CD4 陽性リンパ球数が検出限界未満になるとともに、T4/T8 比が 0（ゼロ）に近づきます。このような症例では、CD8 陽性リンパ球数は正常、増加、あるいは減少と様々です。

T4/T8 比に有意な変動を来たさない程度の CD4 陽性リンパ球の陽性率減少と CD8 陽性リンパ球の陽性率増加が、腎移植後の腎機能が安定している時期の患者で観察されています。また、自家骨髄移植後の造血系再構築の過程で、T4/T8 比と CD4 陽性リンパ球の陽性率低下が認められています。

サイトスタット triCHROME シリーズのうち、CD45-FITC/CD19－RD1/CD3-PC5 と CD45-FITC/CD19-RD1/CD3-PC5 は、ヒトの主要リンパ球サブセットである T 細胞、B 細胞、NK 細胞の算定に用いられます。以下の式から「全リンパ球陽性率」を求めることで、検体ごとに精度管理チェックができます。

全リンパ球陽性率（%）＝
CD3（T）陽性率（%）＋CD19（B）陽性率（%）＋CD3 陰性／CD56（NK）陽性率（%）

サイトスタット triCHROME シリーズの各構成製品は、一連のパネルとして測定して CD3 陽性リンパ球測定値のパネル内再現性をみることで、検体ごとに精度管理チェックができます。

性能

【期待値】

自社施設にて、18～85 歳の健常者男女の末梢血をサイトスタット triCHROME シリーズの各構成製品で測定して得られた CD3+、CD4+、それぞれの陽性率及び陽性細胞絶対数は以下のとおりです。各々の陽性率は、EPICS XL-MCL フローサイトメーターでリンパ球領域にゲートリージョンを設定して測定しました。絶対数は、コールターヘマトロジーアナライザーで測定したリンパ球数と各々の陽性率から算出しています。

CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5（n＝200）

	Min	Max	Mean±1SD
CD3 陽性率（%）	54	94	74.9±6.7
CD4 陽性率（%）	15	72	48.7±9.0
CD3+/CD4+陽性率（%）	14	72	47.3±9.0
CD3 絶対数（個/mm^3）	443	3577	1512±523
CD4 絶対数（個/mm^3）	145	2644	987±385
CD3+/CD4+絶対数（個/mm^3）	140	2639	961±383

これらは期待値の一例です。期待値は施設ごとに設定してください。

【特異性】

サイトスタット triCHROME 試薬で用いられている CD3、CD4 モノクローナル抗体は、いずれも過去の白血球分化抗原に関する国際ワークショップにおいて認定されています。

サイトスタット triCHROME シリーズの各構成製品は、CD3、CD4 陽性率が既知の管理用検体を用いて特異性を確認しています。また、CD45 蛍光と側方散乱光のサイトグラムにおいて、リンパ球、単球、顆粒球を明瞭に区別できることを確認しています。

【再現性】

1）同時再現性
自社施設にて、CD3、CD4 陽性率の異なる健常者末梢血検体を各々 10 回測定して得られた陽性率及び変動係数（%CV）は以下のとおりです。検体には、モノクローナル抗体結合磁気ビーズを用いて CD4 陽性細胞の割合を調節した全血（CD45/CD4/CD3）を用いています。検体ごとに 10 本の全血サンプルを調製し、各々のリンパ球領域陽性率を EPICS XL-MCL フローサイトメーターで測定しました。

CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5

		CD3 陽性率（%）		CD4 陽性率（%）	
検体	n	Mean±1SD	%CV	Mean±1SD	%CV
1	10	47.9±0.46	0.97	18.6±1.07	5.78
2	10	72.0±0.85	1.18	50.0±0. 69	1.39
3	10	83.4±0.66	0.79	67.4±0.67	0.99

2）施設間差
異なるフローサイトメーターを使用している複数の自社研究室で、同じ検体を同時に測定しました。健常者２名の末梢血検体をそれぞれ３等分し、それぞれ 3 箇所の研究室で、この検体から 10 本の全血サンプルを調製、測定して得られた、CD3、CD4 の各陽性率及び変動係数（%CV）は以下のとおりです。

CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5

		CD3 陽性率（%）			CD4 陽性率（%）	
研究室（機種）	n	Mean±1SD	%CV		Mean±1SD	%CV
1 （EPICS XL-MCL）	10	69.8±0.90	1.29		52.2±0.62	1.18
2 （EPICS XL-MCL）	10	71.5±0.73	1.02		52.5±0.41	0.78
3 （EPICS XL-MCL）	10	70.9±0.29	0.40		52.8±0.42	0.90

【既承認品との相関性】

末梢血検体を用いて、サイトスタット triCHROME と既承認品との相関性について調べた結果、以下のとおり良好な相関性が得られました。

CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5（n=305）

CD3＋	:	y＝0.955x＋2.94	r＝0.985
CD4＋	:	y＝0.997x－0.60	r＝0.997
CD3＋/CD4＋	:	y＝0.987x＋0.03	r＝0.997

使用上または取扱上の注意

1. 本品はアジ化ナトリウムを 0.1%含んでいます。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産生するため、取り扱いには十分

注意してください。また、アジ化物が金属性の排水管内に蓄積することによる爆発の危険性を避けるため、アジ化物を廃棄する際は、施設で定められた方法に従うか、多量の流水で希釈してください。
2. 検体及び検体に触れた器具類は感染の危険性があるものとして取り扱い、適当な表示、処理をした上で廃棄してください。
3. ピペットを口で吸引しないでください。皮膚や粘膜への検体の接触を避けてください。
4. 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。
5. 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
6. 有効期限を過ぎた試薬を使用しないでください。

貯法、有効期限、安定性

1. 未開封の試薬は、冷蔵（2～8℃）で保存した場合に各バイアルに明記してある有効期限まで使用できます。
2. 試薬を凍結したり長時間光にさらさないでください。すべての試薬は使用する前に室温（20～25℃）にもどしてください。
3. 試薬の外観に変化が見られたり、コントロール検体の測定値に大きな変化がある場合は、試薬の劣化が考えられるので使用しないでください。試薬の正常な外観は、ピンク色がかった透明な液体です。

包装単位

サイトスタット triCHROME シリーズ CD45-FITC/CD4-RD1/CD3-PC5
製品番号 6607015　容量 50 テスト（0.5 mL）

主要文献

1. Schlossman SF, et al., eds: 1995. Leukocyte a Typing V. Oxford University Press. pp.262,263,268,270,507-511, 1398-1400.
2. Bernard A, et al., eds: 1984. Leukocyte Typing. New York: Springer-Verlag. pp.28, 41-42,44,196.
3. McMichael AJ, ed: 1987. Leukocyte a Typing Ⅲ. Oxiord: Oxford University Press. pp.38,40,42,43,116,167,170-172,176,199, 202,206,302-308,315,475,796-801.
4. Reinherz EL and Schlossman SF: 1980. The difterentiation and function of human T lymphocyies. Cell 19:821-827.
5. Robertson MJ, et al.: 1996. Characterization of a cell line, NKL, derived from an aggressive human natural killer cell leukemia. Experimental Hematology 24:406-415.
6. Aiuta F, et al.: 1975, Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocyies from human peripheral blood, International Union of Immunological Societies (lUIS), Report - July 1974. Clin Immunol and Immunopathol 3: 584-597
7. Foon KA and Todd RF: 1986. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 68: 1-31.
8. Hercend T, et al. 1982. Generation of a cloned NK cell iine derived from the “null cell” fraction of human peripheral blood. J Immunol 129: 1299-1305.
9. Drexler HG, et al.: 1988. Routine immunophenotyping of acute leukaemias. Blut 57:327-339,
10. Robertson MJ and Ritz J: 1990. Biology and clinicat relevance of human natural killer cells. Blood 76: 2421-2438.
11. Reinherz EL, et al.: 1986. Leukocyte Typing Ⅱ. New York: Springer-Verlag. V012, p.8, 15-25, 37.
12. Newman W, et al.: 1984. Immunological and immunochemical aspects of the T-200 family of glycoproteins. Mol Immunol 21:1113-1121.
13. Fabre JW, et al.: 1977. Quantitative serological analysis of a rabbit anti-rat serum and preliminary biochemicai characterization of the major antigen recognized. Transplantation 23: 349-359.
14. Coffman RL, et al.: 1981. B220: A B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. Nature 289:681-683.
15. Dalchau R, et al.: 1980. Identification with a monoclonal antibody of a predominantly B lymphocyte-specific determinant of the human leukocyte common antigen.JExp Med 153:753-765.
16. Omary MB, et al.: 1980. Human homologue of murine T200 glycoprotein. J Exp Med 1 52: 842-852.
17. Dalchau R, et al.: 1981. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprctein probably homologous to the leukocyie-common (L-C) antigen of the rat. Eur J Immunol 10: 737-744.
18. Nadler LM, et al.: 1983. B4, human B lymphocyie associated antigen expressed on normal, mitogen activated and malignant B lymphocyies. J Immunol 131:244-250.
19. Reinherz EL, et al.: 1983* The delineation of antigen receptors on human T lymphocyies. Immunol Today 4: 5-8.
20. Reinherz EL, et al.: 1982. Heterogeneity of human T4+ inducer T cells defined by a monoclonal antibody that delineates two functional subpopulations. J Immunol 128:463-468.
21. de Martini RM and Parker JW: 1989. Immunologic alterations in human immunodeficiency virus infection: A review. J Clin Lab Anal 3: 56-70.
22. Reinherz EL, et al.: 1981. Antibody directed at a surface structure inhibits cytotoxicity but not suppressor function of human T lymphbcytes. Nature 294: 168-170.
23. Caligiuri M, et al.: 1987. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. J Immonol 139: 3306-3313.
24. Morimoto C, et al.: Ig85. The isolation and characterization of the human suppressor inducer T cell subset. J Immunol 1 34: 1508-1515.
25. Morimoto C, et al.: 1986. The cellular basis for the induction of antigen-specific T8-suppressor cells. Eur J Immunal 16:196-204.
26. Meuer SC, et al.: 1982. Clonal analysis of human cytotoxic T lymphocyies: T4+ and T8+ eftector T cells recognize products of differient major histocompatibility regions. Proc Natl Aced Sci USA 79: 4395-4399.
27. Barclay AN, et al., ed: 1993. The Leucocyte Antigen Facts Book. Academic Press, pp. 106-109.
28. Tedder TF and Isaacs CM: 1989. isolation of a CDNAS encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocyles: a new member of the immunoglobulin superfamily. J Immunol 143:712-717.
29. Tedder TF, et al.: 1997. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. Immunity 6: 107-118.
30. Griftin JD, et al.: 1983. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cellsL J Immunol 130: 2947-2951 .
31. Hercend T, et al.: 1985. Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKHIA and NKH2. J Clin Invest 75: 932-943.
32. Shmidt RE, et al.: 1986. A subset of natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. J Exp Med 164: 351-356.
33. Schmidt RE, et al.: 1987. Enhancement of natural killer function through activation of the T1 1 E rosette receptor. J Clin Invest 79:305-308.
34. Reinherz EL, et al.: 1982. Antigen recognition by human T lymphocyies is linked to surface expression of the T3 molecular complex. Cell 30: 735-743.
35. Meuer SC, et al.: 1983. Evidence for the T3-associated 90K heterodimer as the T-cell antigen receptor. Nature 303: 808-81O.
36. Benjamini E and Leskowitz S: 1991. Immunology: A Short Course. Second Edition. New York: Wiley-Liss. p .211-244.
37. Reinherz EL, et al.: 1980. The cellular basis for viral-induced Immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. J Immunal 125: 1269-1 274.
38. Felsenstein D, et al.: 1985. Phenotypic properties of atypical lymphocyies in cytomegalovirus-induced mononucleosis. J Infect Dis 152: 198-203.
39. Rinaldo CR, et al.: 1983. Lymphocyte subsets and natural killer cell responses during cytomegaloVirus mononucleosis. Infect Immun 40: 472-477.
40. Goldstein G, et al.: 1982. Immunoregulatory changes in human disease defected by monoclonal antibodies to T lymphocytes. In: Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine. McMichael AJ and Febre JW, eds. New York, NY: I AcademicPress. p.39-70.
41. Schmidt RE: 1989. Monoclonal antibodies ' for diagnosis of immunodeficiencies. Bult 59: 200-206.
42. Pedrazzini A, et al.: 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.
43. Preijers FWMB, et al.: 1989. Autologous transplantation of bone marrow purged in vitro with anti-CD7-(WTl-) Ricin A Immunotoxin in T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. Blood 74: 1152-1158.
44. Ramos EL, et al.: 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.
45. Trinchieri G: 1 989. Biology of natural killer cells. Adv Immunol 47:187.
46. Fauci AS: 1988. The human deficiency virus: Infectivity and mechanism of pathogenesis. Science 239:617-622.
47. Taylor MGJ, et al.: 1 989. CD4 percentage. CD4 number and C04:CD8 ratio in HIV infection: How to choose and how to use. J AIDS 2:114-124.
48. Center for Disease Control and Prevention: 1997. Revised guidelines for performing CD4+ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV). MMWR 1997, 46 (No.RR.2): 1-29.
49. Knapp W, et al., ed: 1989. Leukocyte a Typing IV. Oxiord University Press. pp.22,36-38,536,541 ,699-702.
50. Reinherz EL, et al.: 1979. A monoclonal antibody with selective reactivity with functionally mature human thymocytes and all peripheral human T cells. J Immunol 123:1312-1317.
51. Beverly PCL and Callard RE: 1981. Distinctive functional characteristics of human 'T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cells antibody. Eur J Immunol 11:329-334.
52. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Procedures for the collection of diagnostic biood specimen by venipuncture; Approved Standard. 1991. NCCLS Document H3-A3.
53. Loken MR, et al.: 1990. Establishing optimal lymphocyie gates for immunophenotyping by flow cytometry. Cyiometry 11:453-459.
54. Nicholson JKA, et al.: 1996. Use of CD45 fluorescence and side scatter characteristics for gating lymphocytes when using the whole blocd lysis procedure and flow cytometry. Cyiometry 11:453-459.
55. Gebel HM, et al.: 1989. Discordant expression of CD3 and T-cell receptor antigens on lymphocytes from patients treated wlth OKT3. Transplantation Proceedings 1:1745-1746.
56. Tunnaclitfe A, et al.: 1989. The majority of CD3 epitopes are conferred by the epsilon chain. In Leukocyte Typing IV, White Cell Difterentiation Antigens. W Knapp et al., eds, Oxford: Oxford University Press. p. 295-296.
57. Schroeder Tl and Chatenoud L: Immunoiogical monitoring during treatment with OKT3. Presented under the auspices of the American Society ofTransplantSurgeons. Citation to befilled in when available from authors.Koepke JA and Landay AL: 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.
58. Koepke JA and Landay AL:1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyie counts. Clin Immunol Immunopathol 52:19-27.

**問い合わせ先

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

TEL： 0120-566-730 FAX： 03-5530-2460

**製造販売元

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