体外診断用医薬品
製品番号 6603857

**2009 年 11 月改訂
*2007 年 2 月改訂
承認番号 21400AMY00053000

日本標準商品分類番号
877449

*NK 細胞キット
サイトスタット
NKH-1-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）

構成試薬名　成分　分量（1 回測定分）

抗ヒト CD56 マウスモノクローナル抗体（フィコエリスリン結合）
0.4μg

フィコエリスリン：RD1 と略す

抗体以外の各種成分と濃度
1 バイアル（0.5mL）中

BSA	: 0.2%
リン酸カルシウム	: 0.01M
NaCl	: 0.15M
NaN_3	: 0.1%
スタビライザ	

対象抗原：

CD56（分子量 135～220kDa）
CD56 は末梢血中で TCR を介さずに細胞傷害性を示すことのできるリンパ球のすべてに発現しており、このサブセットには NK 細胞（CD3-/CD56+）と少数のＴ細胞サブセット（CD3+/CD56+）の両方が含まれます。その他の T 細胞や B 細胞、単球、顆粒球、赤血球には通常発現していません。

CD56 抗体は神経細胞接着分子（NCAM）のアイソフォームを認識します。オルタネートスプライシングと糖鎖付加の違いにより NCAM の分子量は 135～220kDa の範囲になりますが、造血系の細胞においては NK 活性を示すリンパ球サブセットのみに 140kDa のアイソフォームが発現しています。

クローン：
NKH-1（N901）
ヒト慢性骨髄性白血病細胞で免疫した BALB/cJ マウスの脾臓細胞及びマウス NS-1 エミローマ細胞の融合細胞より分離

Ig 構造：
マウス IgG1-H 鎖及びκ-L 鎖

細胞毒性：
なし

原料及び精製法：
マウス腹水よりアフィニティークロマトグラフィで精製

標識：
RD1（Phycoerythrin = PE）

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

使用目的

全血中のリンパ球表面抗原の分析及び NK 細胞の測定

測定原理

フローサイトメトリーによる直接免疫蛍光法

測定には、488nm で励起し、575（568～590）nm の蛍光を検出できるフローサイトメーターを用います。

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、蛍光顕微鏡には用いないでください。
2. 本品は全血検体用に調製されており、新鮮また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 EDTA、ヘパリン等を用いることができますが、いずれを用いて採血した場合でも採血後は常温に保存し、24 時間以内に測定することをお勧めします。
4. 末梢血検体の場合、細胞のバイアビリティ（生残率）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。白血病細胞などでは、保存により急激に生残率の低下を来たす場合があるため、注意が必要です。
5. 白血球数が 10,000 個/mm^3 を超える検体は、同一患者の血漿またはリン酸緩衝液（PBS）を用いて白血球数が 10,000 個/mm^3 以下になるように希釈して用いてください。
6. 全血法によるサンプル処理では、赤血球の溶血残滓や溶血されなかった赤血球が誤差要因となるので、溶血操作を確実に行ってください。試験管上部壁面に付着した血液飛沫は綿棒等で除去しておいてください。
7. タンパク濃度が異常な場合や、有核赤血球、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ことがあります。この場合、溶血していない赤血球がリンパ球としてカウントされ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十分に注意してください。
8. 溶血時間が長いと、白血球にもダメージが及ぶ場合があります。
9. 抗体試験の非特異的反応が予想される検体の対照には、サイトスタット/コールタークローン MsIgG1-RD1 などの陰性コントロール抗体試薬を使用してください。
10. フローサイトメーターのレーザ光軸の調整不良や感度及びゲートの不適切な設定により、誤った結果が得られる場合があります。
11. 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ので、理想的な測定条件では、同一検体の CD3（T 細胞）陽性率、CD19（B 細胞）陽性率、CD56 陽性率を合計した数値は 100%をわずかに上回ります。リンパ球領域の測定において、この合計値が 100%を大きく下回る場合、サンプルの溶血不良などによる、解析ゲートリージョン内のリンパ球純度の低下が考えられます。

用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

モノクローナル抗体はそのまま用います（10μL／テスト）

【その他必要な試薬】

1. 溶血試薬
次のいずれかを用いる。
   1）イムノプレップ試薬システム
   製品番号 7546999　容量 300 テスト（TQ-Prep、Multi-Q-Prep 用）
   製品番号 7546946　容量 100 テスト（Q-Prep 用）
   2）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（溶血試薬）1mL に PBS（下記）24mL を加えます。
   フィクサティブ（固定試薬）はそのまま使用します。
   （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。）
   3）その他のフローサイトメトリー用溶血試薬
   溶血試薬の添付文書に従って調製、使用します。
   健常者末梢血等の陽性コントロール検体を用いて、本品に使用可能であることを事前に確認してください。

2. PBS（リン酸緩衝生理食塩水、イムノプレップ試薬システムを用いる場合は原則として不要）
   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。調整後のpH は 7.2±0.2 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）
サイトスタット／コールタークローン MsIgG1-RD1
製品番号 6604112 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（EDTA 推奨）を用いて採血した末梢血を用います。試験管 1 本につき 100μL の血液を用いるため、測定項目数＋対照の試験管分と検体希釈のための自己血漿採取用として、通常 1 検体につき 1～2mL の血液が必要となります。

染色を行ううえで、白血球数が 3～10×10^3 個/mm^3 であることをお勧めします。検体中の白血球数がこの範囲を外れる場合には、希釈またはバフィーコート法などにより濃縮して調整してください。

また、採血後の検体を保存する場合は室温（20～25℃）で保存し、できるだけ採血後 6 時間以内に操作を開始することをお勧めします。

* 溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いる場合には、同一患者の血漿で希釈を行ってください。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）で希釈してください。

【参考： 白血球数の調整法】

a） 白血球数が多い検体の場合（＞10×10^3 個/mm^3）

白血球数			希釈倍数
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の場合（＜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） 白血球の層をパスツールピペットで採取します。この際、すべ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） コールターLH700 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） 細胞濃度を 3～10×10^3 個/mm^3 に調整します。1 テストあたり 100μL を用い、以下の操作手順に従って処理します。

【操作方法】

溶血試薬には、以下のいずれかを用います。

1. イムノプレップ試薬システム（TQ-Prep™ または Q-Prep™ 自動サンプル処理装置専用の溶血・固定試薬）
① イムノプレップ A（溶血試薬）
② イムノプレップ B（反応停止試薬）
③ イムノプレップ C（固定試薬）

2. コールター全血ライジングキットなどフローサイトメトリー用溶血試薬
注） 溶血試薬の添付文書に従って操作してください。

A） 溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いてサンプル処理を行う場合
1） テスト用と対照用に 12mmφ×75mm の試験管を用意します。
2） それぞれの試験管に全血 100μL 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 10μL をテスト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 MSIgG1-RD1 または MSIgG1-FITC、別売）を 10μL 加えます。
4） よく撹拌した後、室温で 10 分間反応させます。
5） 試験管を TQ-Prep（または Q-Prep）で溶血・固定処理します。
注）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、溶血後のサンプルにイオン交換水または蒸留水を 0.5mL 加えます。
6） フローサイトメーターで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、調製後 24 時間以内に測定してください。

B） コールター全血ライジングキットを用いる場合
注） その他の溶血試薬を用いる場合は、溶血試薬の添付文書に従って操作してください。
1） テスト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 100μL 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 10μL をテスト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 MSIgG1-RD1 または MSIgG1-FITC、別売）を 10μL 加えます。
4） よく撹拌し、室温で 45 分間反応させます。
5） PBS を 2～3mL 加えて撹拌し、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） 溶血試薬（キット中の「イムノライズ」を PBS で 25 倍希釈）を 1mL 加えてよく撹拌し、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） 9）～11）の操作を繰り返します。
13） PBS を 500μL 加え、よく撹拌します。
14） フローサイトメーターで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。

測定結果の判定方法

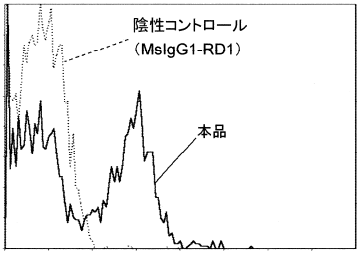
1. 正しく調整されたフローサイトメーターを用います。
2. 前方散乱光（FS）と側方（90°方向）散乱光（SS）のサイトグラム上で明瞭な白血球 3 分画（リンパ球、単球、顆粒球）が得られるように FS のスレッショルドと散乱光のゲインを確認、調整します。
3. リンパ球領域に解析ゲートを設定し、RD1（PE）蛍光（Log スケール）の 1 パラメータ蛍光ヒストグラムを取得します。
対照用のサンプルで蛍光陽性領域を設定します。

【ヒストグラム例】

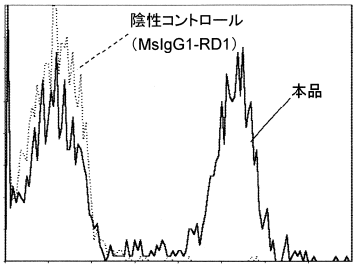
本品により健常者末梢血中の CD56 陽性細胞を測定したときのヒストグラム例を示します。

陰性コントロール抗体試薬：
サイトスタット／コールタークローン MsIgG1-RD1
フローサイトメーター：EPICS® XL™

溶血試薬にイムノプレップ試薬システムを用いてサンプル処理を行った場合（用法・用量の操作手順 A）



コールター全血ライジングキットを用いてサンプル処理を行った場合（用法・用量の操作手順 B））



【絶対数の計算】

以下のいずれかの方法により、CD56 陽性細胞の絶対数を測定することができます。

1） Flow-Count™（細胞絶対数測定用試薬、製品番号 7547053）の併用による方法。簡便かつ高精度な測定が可能。使用にあたっては当該製品の添付文書をご参照ください。
2） CD56 陽性率及び血球数算定の結果から算出する方法。

絶対数（個/mm^3）＝
白血球数（個/mm^3）×リンパ球%×陽性率%／10^4

【測定条件の確認】

サイトトロール（製品番号 6604248）やイムノトロール（製品番号 6607077）などの精度管理用コントロール細胞や健常者の末梢血などを用いて、フローサイトメーターの設定やゲーティングなどの測定条件の正確性を確認することをお勧めします。

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。

検体ごとに抗体の非特異的な結合を確認するため、適切なアイソタイプコントロール試薬（サイトスタット／コールタークローン MSIgG1-RD1 または MSIgG1-FITC）を用います。健常者検体の場合、コントロール試薬の陽性率は通常 1～2%となります（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）が、腫瘍検体ではより高い値を示すことがあります。

【測定結果の判定方法】

1） 本品で測定した参考基準値は以下のとおりです。

CD56 陽性率（リンパ球領域）±1SD: 9.3±4.7% N=171

これはあくまでも基準値の一例であり、各施設で基準値を設定してください。

2） 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データに十分注意して判定してください。
3） 測定結果の解釈にあたっては、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、Ｂ細胞及び NK 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、顕微鏡検査による形態によって区別できませんが、細胞膜上に発現する分化成熟段階や機能的サブセットに特有な抗原を利用することによって同定することが可能です。

T 細胞、B 細胞及び NK 細胞は免疫機能の中心的な役割を担っており、種々の T 細胞サブタイプによる特異的抗原の認識につづくエフェクタ機能の発現や、細胞性／体液性免疫応答の調節をしています。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形質細胞へと分化し、抗原特異的な免疫グロブリン（Ig）を産生、分泌します。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おり、T細胞、B細胞とは独立した細胞障害性をもつ細胞集団として同定されています。また、機能的にはある種の癌やウィルス感染細胞などの標的に対して MHC 非拘束性の細胞傷害活性を媒介できる細胞集団として機能的に定義されており、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おいて必須の役割を果たしています。

疾患とのかかわりにおいては、種々の疾患において NK 細胞数の変動が見られることが報告されており、慢性疲労症候群（CFS）においては CD3-/CD56+の NK 細胞が減少することが知られています。また、NK 細胞に由来するリンパ増殖性疾患の同定にも有用です。

本品は pan-NK 細胞抗原である CD56 と特異的に結合するモノクローナル抗体（NKH-1）によって末梢血中の NK 細胞を測定するもので、バックグラウンドの蛍光強度が低く、フローサイトメトリーによる No-Wash 法に最適化された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。

性能

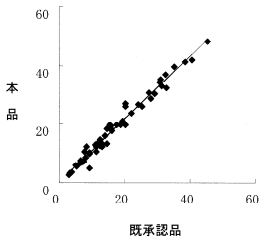
【特異性】

NKH-1 モノクローナル抗体は、白血球分化抗原に関する国際ワークショップにおいて CD56 のリファレンスモノクローナル抗体として使用されています。
CD56 は、末梢血の NK 細胞（CD3-/CD56+）と少数の T 細胞サブセット（CD3+/CD56+）に発現します。その他のＴ細胞やＢ細胞、単球、顆粒球、赤血球には通常発現していません。

【相関性】

本品と既承認品との相関性は、以下のとおり良好でした。

CD56 陽性率（%）: y=1.08x＋0.26 r=0.99



使用上または取扱上の注意

1. 本品にはアジ化ナトリウムが含まれています。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ので、取り扱いに十分注意してください。また、アジ化物が金属製の配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、アジ化物の廃棄は多量の流水で希釈して行ってください。
2. 有効期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
3. 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、適切な表示、処理の後に廃棄してください。
4. ピペットを口で吸引しないでください。また、皮膚や粘膜への検体の接触を避けてください。
5. 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。
6. 試薬が微生物に汚染されないよう注意してください。
7. 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結果に大きな変化がある場合には、試薬劣化の可能性が考えられるため使用しないでください。本品の正常な状態での外観は、淡赤色の透明な液体である。

貯法、有効期限、安定性

サイトスタット NKH-1-RD1
冷暗所（2～8℃）保存 18 箇月

1）本品は冷蔵（2～8℃）で保存してください。凍結させないでください。
2）長時間光にさらすことは避けてください。
3）有効期限は、各バイアルに明記されています。

包装単位

サイトスタット NKH-1-RD1
製品番号 6603857 容量 50 テスト（0.5mL）

主要文献

1. Knapp W, et al., ed : 1989. Leukocyte Typing IV. Oxford University Press. Pp.536, 541, 699-7002
2. Schlossman SF, et al., ed : 1995. Leukocyte Typing V. Oxford University Press. Vol.1 p.270, Vol.2. pp 1398-1400
3. Barclay AN, et al., ed : 1993. The Leukocyte Antigen Facts Book. Academic Press. Pp. 106-109, 228-229
4. Robertson MJ and Ritz J : 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. Blood. 76 : 2421-2438
5. Griffin JD, et al. : 1983. Characterization of an antigen expressed by human natural killer cells. J Immunol. 130: 2947-2951
6. Hercend T, et al. : 1985 Generation of monoclonal antibodies to a human natural killer clone. Characterization of two natural killer-associated antigens, NKH1A and NKH2. J Clin. Invest. 75 : 932-943
7. Schmidt RE, et al. : 1986. A subset of human natural killer cells in peripheral blood displays a mature T cell phenotype. J Exp Med 164 : 351-356
8. Schmidt RE, et al. : 1987. Enhancement of natural killer function through activation of the T11 E rosette receptor. J Clin Invest 79 : 305-308
9. Caligiuri M, et al. : 1987. Phenotype and functional deficiency of

natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. J Immunol 139 : 3306-3313
10. Koepke JA and Landay AL : 1989. Precision and accuracy of absolute lymphocyte 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

6603857_0911