体外診断用医薬品
製品番号 6604894

**2009 年 11 月改訂
*2007 年 2 月改訂
承認番号 21600AMY00088000

| 日本標準商品分類番 |
| --- |
| 877449 |

# *NK 細胞キット
# サイトスタット
# CD16-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 |
| --- | --- | --- |
| モノクローナル抗体試薬 | | |
| | フルオレセインイソチオシアネート結合<br>抗ヒト CD16 マウスモノクローナル抗体 | 0.63μg/テスト |

＊フルオレセインイソチオシアネート:FITC と略記

**クローン:**
3G8
ヒト好中球で免疫した BALB/c マウスの脾臓細胞と SP2/0 マウス骨髄腫細胞の融合細胞から分離

**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:**
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

**蛍光標識:**
Fluorescein isothyocyanate （FITC）
励起波長 : 468～509nm
蛍光波長 : 504～541nm

**色素／抗体モル比:**
FITC／抗体タンパク比 ＝ 3～10

**試薬の組成:**
抗体タンパク以外の成分として、ウシ血清アルブミン（BSA）0.2%、リン酸カリウム 0.01M、塩化ナトリウム 0.15M、アジ化ナトリウム 0.1%及び安定剤を含みます。

## 使用目的

全血中のリンパ球細胞表面抗原の分析及び NK 細胞の測定

サイトスタット CD16-FITC は、NK 細胞に発現する CD16 抗原に特異的に結合する蛍光標識モノクローナル抗体試薬です。フローサイトメトリー法で全血中の NK 細胞を測定できます。

## 測定原理

この分析方法は、細胞表面に発現する特定の抗原決定基に対するモノクローナル抗体の結合によります。全血にモノクローナル抗体試薬を添加して、細胞を特異的に染色します。サイトスタット CD16-FITC モノクローナル抗体試薬は、蛍光色素を結合した抗ヒト CD16 マウスモノクローナル抗体を用いています。

赤血球を COULTER IMMUNOPREP™ Reagent System と Q-Prep™、Multi-Q-Prep™、または TQ-Prep™ワークステーションで溶血して、残存する血液細胞をリンパ球にゲートを設定したフローサイトメトリーで分析します。前方散乱光（FS）と側方散乱光 (SS)でリンパ球領域に解析ゲートを設定し、Cyto-Stat/COULTER CLONE MSIgG1-FITC アイソタイプコントロール試薬で染色したサンプルを対照として、リンパ球の CD16 陽性率を測定します。

## 操作上の注意

1. 最適な結果を得るには、検体は採取後 6 時間以内に染色してください。染色するまでの間、検体は採血管のまま室温保存してください。検体を冷蔵しないでください。
2. 精度の低下を最小限にするため、染色後のサンプルは速やかに測定してください。
3. 静脈血検体の血球生存率は 90%以上が適当ですが、一部の異常検体では、これを下回ることがあります。
4. 血球を長時間溶血試薬にさらすと、白血球が破壊され、目的とする細胞が失われるおそれがあります。
5. 有核赤血球、タンパク濃度異常、異常ヘモグロビン症などでは、赤血球の溶血が不完全になる場合があります。この場合、溶血しなかった赤血球が白血球として計測されるため、測定結果が誤って低くなるおそれがあります。
6. この試薬は全血検体用に調製されています。新鮮または凍結保存した単核細胞検体への使用はお勧めできません。
7. 試薬を希釈、小分け分注、もしくは凍結保存しないでください。試薬はそのままでご使用ください。
8. この試薬はフローサイトメトリー専用です。
9. 健康状態の異常が常に特定の白血球集団の陽性率異常となって現れるとは限りません。健康状態が異常でも、健常者と同程度の陽性率を示す場合があります。分析結果は臨床所見や他の検査データと合わせてご使用ください。
10. 一部の患者検体では、特定の細胞集団の細胞数が変動もしくは低下することによる問題が生じる場合があります。
11. レーザ光軸の調整不良やゲートの設定が適切でない場合、フローサイトメトリーで得られる結果は不正確となります。
12. リンパ球絶対数の測定において、分析方法の違いによって許容範囲を超える施設間差がみられるため、用いる測定方法の正確性の評価が必要です。

## 用法・用量（操作方法）

【試薬の調製】

調製の必要はありません。サイトスタットモノクローナル抗体試薬は、バイアルから直接使用します（10μL/テスト）。試薬は 20～25℃ に戻してからご使用ください。

【検体の採取と調製】

**注意事項:**
血液検体の安定性は検体により異なります。最適な結果を得るには、採血後 6 時間以内に検査を始めてください。未染色の血液検体は調製を開始するまで 20～25℃で保存してください。検体を冷蔵しないでください。

適当な抗凝固剤（EDTA 推奨）を用いた採血管に静脈穿刺で血液検体を採取します。1 テストあたり 100 μL の全血が必要です。テスト及び各コントロールの測定と検体希釈が必要な場合の希釈用自己血漿を採取するのに十分な量の血液（1～2mL）を採取します。各施設で用いている方法によって、各検体の白血球数と生残率を測定します。推奨される生残率は 90%以上ですが、検体によってはそれ以下となる場合があります。

## [サイトスタット CD16-FITC による細胞表面染色]

【試薬】

サイトスタット CD16-FITC
製品番号　6604894:　容量 50 テスト(0.5mL)

【その他に必要な試薬等】

・赤血球溶血試薬(適当なものを選択):
COULTER Q-Prep ワークステーション用 COULTER IMMUNOPREP 試薬システム
製品番号 7546946:　100 テスト

または、

COULTER Multi-Q-Prep または TQ-Prep ワークステーション用 COULTER IMMUNOPREP 試薬システム
製品番号 7546999:　300 テスト

・検体希釈用の自己血漿(必要に応じて)

・アイソタイプコントロール試薬
Cyto-Stat/COULTER CLONE MSIgG1-FITC
製品番号 6603864:　50 テスト

・オプション試薬(絶対数直接測定用)
FLOW-COUNT 蛍光粒子
製品番号 7547053 (20 mL)

・12 x 75 mm 試験管

・抗凝固剤(EDTA 推奨)入り真空採血管

・ホールピペット

・パスツールピペット

・マイクロピペッタ

・ボルテックスミキサ

・フローサイトメーター (CYTOMICS FC 500、EPICS XL/XL-MCL または相当品)

・血球アナライザー(コールターLH700 シリーズまたは相当品)または血球算定板

・綿棒

【染色操作】

1. 染色に最適な白血球数の範囲は 3～10×$10^3$個/μL です。白血球数が 10×$10^3$個/μL を超える場合は検体を希釈します。3×$10^3$ 個/μL より少ない場合は遠心濃縮します。

   Q-PREP/IMMUNOPREP 試薬システムを用いて赤血球を溶血する場合には、同一患者の血漿で検体を希釈してください。

**白血球数が異常な検体の細胞数調整**

a)白血球数が多い検体の場合(＞10×$10^3$個／μL)

| 白血球数 | | 希釈倍率 |
|---|---|---|
| 10～20 | ×$10^3$ | 1:2 |
| 20～30 | ×$10^3$ | 1:3 |
| 30～40 | ×$10^3$ | 1:5 |
| 40～60 | ×$10^3$ | 1:6 |
| 60～100 | ×$10^3$ | 1:10 |
| 100～200 | ×$10^3$ | 1:20 |

b)白血球数が少ない検体の場合(＜3×$10^3$個/μL)

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。白血球全部を確実に回収するため赤血球と血漿も一部を回収してください。
(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LH700 シリーズ等のヘマトロジーアナライザーか血球計算板を用いて細胞濃度を測定します。
(5) 自己血漿で細胞濃度を 10×$10^3$個／μL に調整します。

2. 12mmφ×75mm の試験管をテスト用、アイソタイプコントロール用の 2 本用意し、対応する試験管にサイトスタット CD16-FITC、Cyto-Stat/COULTER CLONE MSIgG1-FITC コントロールをそれぞれ 10μL 分注します。
3. 試験管に全血を 100μL ずつ分注します。溶血不良を避けるため、血液を試験管の上部側面に付けないように注意します。
4. よく撹拌した後、室温で 10～12 分間反応させます。

**重要**: 未溶血の赤血球が調製後のサンプルに混入して誤差を生じるおそれがあるため、血液飛沫が試験管上部に残っている場合は、必ず取り除いてください。付着した血液飛沫は、綿棒で取り除くことができます。

5. TQ-Prep、Multi-Q-Prep または Q-Prep のいずれかを用いて赤血球を溶血処理します。
6. 調製したサンプルをフローサイトメーターで測定します。用いるフローサイトメーターは正しく調整し、サンプル測定手順の項にしたがって適切にリンパ球領域にゲーティングします。良好な結果を得るために、調製後は速やかに測定してください。
   a. フローサイトメーターの蛍光パラメータの取得はログスケールで行ってください。
   b. 前方散乱光(FS)と側方散乱光(SS)の取得はリニアスケールで行ってください。

【精度管理手順】

フローサイトメーターは、機器の取扱説明書に記載されている手順に従って正しく調整し、散乱光及び蛍光の感度設定を標準化してください 。

陽性コントロール検体 (健常者末梢血や精度管理用コントロール細胞等)を測定して、抗体試薬の反応性を確認してください。

抗体の Fc 部分の単球や顆粒球への特異的もしくは非特異的な結合は、フローサイトメーターのリンパ球ゲートを適切に設定することにより排除できます。

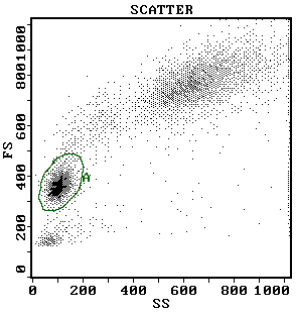
Cyto-Stat/COULTER CLONE MSIgG1-FITC アイソタイプコントロールを用いて、リンパ球における非特異的な Fc 結合を確認した上でカーソル位置を設定します。カーソルは、MSIgG1-FITC 陰性の分画がおおむね 98%以上となる位置を目安に設定します。アイソタイプコントロールの非特異的蛍光は、正常検体では通常 2%以内です(2%を超えた場合は結果に誤差が含まれるおそれがあります)が、腫瘍細胞検体ではこれより強い非特異的蛍光を示すことがあります。

【サンプル測定手順】

**注意:** フローサイトメーターのレーザ光軸の調整不良、フィルタ選択が不適切な場合、またはゲートが正しく設定されていない場合、測定結果が不正確になることがあります。

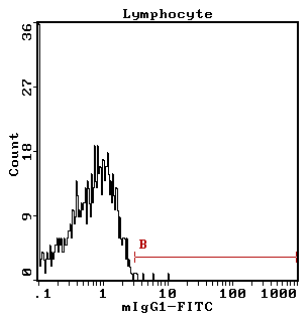
1. アイソタイプコントロールを測定し、前方散乱光(FS)と側方散乱光(SS)の 2 パラメータヒストグラムを取得します。白血球の 3 パート分画パターンが得られます。FS、SS とも低いリンパ球領域にゲートを設定します(図 1 参照)。

**図 1. 散乱光(FS/SS)2 パラメータヒストグラムの例**



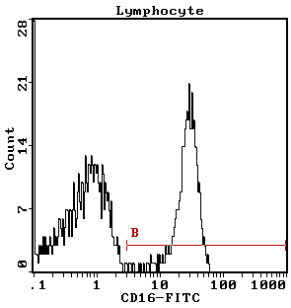

2. リンパ球にゲーティングした MsIgG1-FITC(FL1 Log)のヒストグラムを取得します。MSIgG1-FITC 陰性の分画が 98%以上となる位置を目安にカーソル位置を設定します(図 2 参照)。

**図 2. アイソタイプコントロールのリンパ球領域ヒストグラム**



3. サイトスタット CD16-FITC を測定し、アイソタイプコントロールで設定したカーソルを用いて、リンパ球にゲーティングした CD16-FITC ヒストグラムを解析します（図 3 参照）。

**図 3. サイトスタット CD16-FITC のリンパ球領域ヒストグラム**




【絶対数の測定】

絶対数の測定には、以下の 2 方法があります。

（1）絶対数測定の標準（間接）法： 血球計数とフローサイトメトリーの結果を組み合わせたもので、以下の式を使用します。

絶対数（細胞/μL）
= 全白血球数（細胞/μL）×% リンパ球比率×% 陽性率／$10^4$

（2）FLOW-COUNT 法（直接法）： FLOW-COUNT 蛍光粒子を使用して絶対数を直接測定します。以下の式を使用します。

絶対数（細胞/μL）
=（測定した対象細胞数／測定した FLOW-COUNT 蛍光粒子数）
×FLOW-COUNT 蛍光粒子アッセイ濃度

## 測定結果の判定方法

【期待値（正常参考値）】

自社施設にて、健常者（n=20）の末梢血をサイトスタット CD16-FITC で染色し、EPICS XL-MCL フローサイトメーターで測定しました。

これらは正常参考値の一例です。正常参考値は施設ごとに各地域の正常検体を用いて設定してください。

| | 平均値±1SD |
|---|---|
| CD16 陽性率（リンパ球領域中） | 11.5±8.15 % |

## 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（骨髄由来）、NK 細胞（ナチュラルキラー細胞、null 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 細胞が特異的抗原を認識して、エフェクタ機能を発揮し、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、細胞障害性エフェクタ活性を持ち、T 細胞や B 細胞とは異なる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、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。

NK 細胞の定量には、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いますが、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。本製品は、NK 細胞に発現する細胞表面抗原である CD16 に特異的に結合するモノクローナル抗体によって、全血中の NK 細胞を測定します。

**CD16（分子量 51～73kD）**

CD16 抗原は、凝集した IgG の Fc 部分に対する低親和性の受容体で、NK 細胞の大部分や単球の一部などに発現する膜貫通型の CD16a（別名 FcγRⅢA）と好中球に発現する GPI アンカー型の CD16b（別名 FcγRⅢb）の 2 種類のアイソフォームが存在します。末梢血において、CD16 抗原は NK 細胞の約 90%と単球の 10%未満、好中球に発現し、B 細胞や T 細胞にはほとんど発現していません。

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する細胞集団として、機能的に定義されています。CD16 抗原の発現は NK 細胞の細胞障害活性と関連しており、末梢血中で強い細胞障害活性を示す NK 細胞は CD16 陽性です。

## 性能

【特異性】

末梢血リンパ球において、NK 細胞の約 90%が CD16 陽性です。B 細胞と T 細胞には通常 CD16 は発現しませんが、まれに CD16 陽性の T 細胞（CD3 陽性）が認められることがあります。

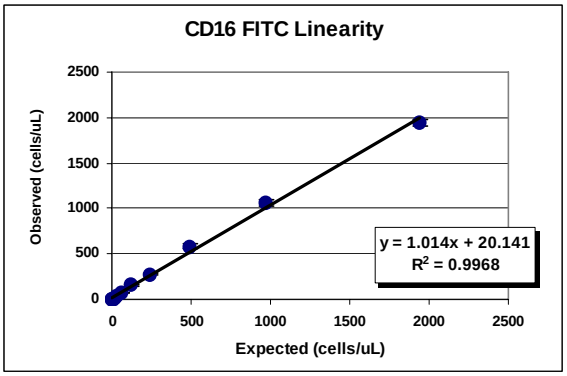
単球の 10%未満及び好中球にも CD16 抗原が発現しています。

本製品で用いられている CD16 モノクローナル抗体は、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。

抗体試薬の非特異的な反応を管理するための手法については、精度管理手順の項を参照してください。

【直線性】

自社施設にて、濃縮した COULTER CYTO-TROL コントロール細胞で 12 段階の希釈系列を作り、サイトスタット CD16-FITC で染色して、コールターEPICS XL-MCL で CD16 陽性リンパ球を測定しました。結果を以下に図示します。数値は標準法による絶対数（細胞/μL）で表示しています。




【同時再現性】

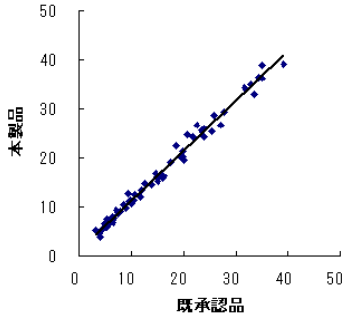
自社施設にて、精度管理用コントロール細胞（IMMUNOTROL）を 10 回測定して得られた陽性率及び変動係数（%CV）は以下のとおりです。10 本の染色サンプルを調製し、各々のリンパ球領域及び顆粒球領域の陽性率を EPICS XL-MCL フローサイトメーターで測定しました。

| | リンパ球領域陽性率 | | 顆粒球領域陽性率 | |
|---|---|---|---|---|
| n | Mean±1SD | %CV | Mean±1SD | %CV |
| 10 | 8.9±0.31 | 3.5 | 99.2±0.97 | 0.1 |

【既承認品との相関性】

自社施設にて、末梢血検体（58 検体）を用いて、本製品と既承認品との相関性について調べた結果、以下の通り良好な相関性が得られました。

CD16 陽性率（リンパ球領域）： y＝1.01x＋1.16 r＝0.994



## 使用上または取扱上の注意

1. この試薬はアジ化ナトリウムを 0.1% 含みます。アジ化ナトリウムは、酸性条件下で非常に毒性の強いヒドラジン酸を発生します。このため、アジ化物は水を大量に流しながら廃棄してください。これにより金属製配水管内への爆発性堆積物の蓄積を防ぐことができます。
2. 検体、サンプル、及びこれらに接触したものはすべて感染性があるものとして取り扱い、注意事項を順守して廃棄してください。
3. 口でサンプルをピペッティングしないでください。また、皮膚や粘膜に触れないようにしてください。
4. バイアルのラベルに表示された有効期限を過ぎた試薬は使わないでください。
5. 保管時及び使用時に、できるだけ試薬を光に当てないようにしてください。
6. 試薬が微生物に汚染されないように注意してください。汚染された試薬では誤った結果が出るおそれがあります。
7. この試薬を取り扱う際には、GLP（Good Laboratory Practices）を実践してください。
8. 飲み込むと有害です。
9. 皮膚や眼に触れた場合は、直ちに大量の水で洗ってください。
10. 試薬の物性・外観（正常な外観は透明で淡黄色の液体）に変化がみられる場合、コントロールサンプルの測定値に大幅な変動がみられる場合は、製品が劣化している可能性があるため使用しないでください。

## 貯法、有効期限、安定性

サイトスタット CD16-FITC

冷暗所（2～8℃）　有効期間：18 箇月

1. 未開栓の試薬は、2～8℃で保存すればバイアルのラベルに表示された有効期限まで使用できます。
2. バイアル開栓後は、2～8℃で保存した場合 90 日間安定です。使用後は速やかに 2～8℃に戻してください。凍結させないでください。できるだけ光に当てないようにしてください。

## 包装単位

サイトスタット CD16-FITC

製品番号 6604894：　容量 50 テスト（0.5mL）

## 主要文献


1. Fleit HB, Wright SD and Unkless JC: 1982. Human neutrophil Fcγ receptor distribution and structure. Proc Natl Acad Sci USA 79:3275-3279.
2. Fleit HB and Kuhnle M: 1988. Biochemical characterization of an Fcγ receptor purified from human neutrophils. J Immunol 140:3120-3125.
3. Anderson CL, Looney RJ, Culp DJ, Ryan DH, Fleit HB, Utell MJ, Frampton MW, Manganiello PD and Guyre PM: 1990. Alveolar and peritoneal macrophages bear three distinct classes of Fc receptors for IgG. J Immunol 145: 196-201.
4. Perussia B and Trinchieri G: 1984. Antibody 3G8, specific for the human neutrophil Fc receptor, reacts with natural killer cells. J Immunol 132:1410-1415.
5. Vivier E, Morin P, O'Brien C, Drucker B, Schlossman SF and Anderson P: 1991. Tyrosine phosphorylation of the FcγRIII(CD16): Zeta complex in human natural killer cells. Induction by antibody-dependent cytotoxicity but not by natural killing. J Immunol 146:206-210.
6. Cassatella MA, Anegon I, Cuturi MC, Griskey P, Trinchieri G and Perussia B: 1989. FcγR (CD16) interaction with ligand induces Ca2+ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca2+ in FcγR (CD16) - induced transcription and expression of lymphokine genes. J Exp Med 169:549-567.
7. Lanier LL, Kipps TJ and Phillips JH: 1985. Functional Properties of a unique subset of cytotoxic CD3+ T lymphocytes that express Fc receptors for IgG (CD16/Leu-11 antigen). J Exp Med 162:2089-2106.



**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


6604894_0911