



B 細胞キット

IO テスト PE 標識抗体 CD22

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了場合は、保証の対象とはなりません。
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 IO テスト PE 標識抗体 CD22

成分 R-Phycoerythrin 標識抗ヒト CD22 マウスモノクローナル抗体
(PE 標識マウスモノクローナル抗体 IgG 画分)

【対象抗原】

CD22(分子量 130-140 kDa)

CD22 抗原(BL-CAM)は、免疫グロブリン・スーパーファミリーの膜貫通型糖タンパクです。 α フォーム(130 kDa)及び β フォーム(140 kDa)の 2 種類のアイソフォームが発現していると考えられています。CD22 は、B 前駆細胞の細胞質や成熟 B 細胞の表面に発現する B 細胞特異抗原です。CD22 の発現は、B 細胞が活性化した後、形質細胞期に入る前に消失します。末梢血 T 細胞、顆粒球、単球には存在しません。^{1,2}

【クローン(アイソタイプ及び免疫原)】

SJ10.1H11(マウス IgG1、ヒト B 細胞で免疫)

【標 識】

PE: R-Phycoerythrin

励起波長 486~575 nm、蛍光波長 560~590 nm

使用目的

生体由来の全血、骨髓液及び細胞浮遊液中の白血球細胞表面抗原(CD22 抗原陽性細胞)の測定(B 細胞性急性リンパ性白血病の診断の補助)

測定原理

【測定法】蛍光抗体法

【測定原理】測定方法はフローサイトメトリーを用いた直接免疫蛍光法です。細胞に PE(オレンジ色蛍光色素)で標識した抗体を反応させ、フローサイトメーターを用いて各抗体の陽性細胞の計測を行います。

操作上の注意

1. IO テストは、フローサイトメトリー用の抗体試薬です。
2. 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、いずれの場合も採血後は室温で保存します。
3. 長時間(おおむね採血後 6 時間以上)検体を保存する場合は、検体の安定性についてあらかじめ検討してください。
4. 溶血不良となるおそれがあるため、血液を試験管に分注する際は試験管の上部壁面に血液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。
5. 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等では、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白血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。
6. 溶血時間が長すぎると白血球にも影響が及ぶことがあります。
7. Ficoll-Paque 分離液による単核細胞の比重遠心分離に伴い、白血球中の特定の細胞集団が選択的に失われることがあります。
8. フローサイトメーターの調整不良、感度やゲート等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。
9. サンプル調製方法や試薬、フローサイトメーターの機種や測定条件などの違いにより測定値が影響を受けるおそれがあるため、正常参考値は施設ごとに設定してください。
10. 各々の白血球細胞集団の変動は必ずしも病態と一致するとは限らない

ため、測定結果は臨床所見及び他の検査データと共に使用してください。

11. 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)

1. 試薬の調製

モノクローナル抗体試薬はそのまま使用できます(20 μ L/テスト)。

【その他必要な試薬】

(1) 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 500 mL 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。ウシ血清アルブミン(BSA、終濃度 0.5%)やアジ化ナトリウム(終濃度 0.1%)等を添加したのもも使用可能です。

(2) ホルムアルデヒド加 PBS

溶血試薬(下記)に VersaLyse を用いる場合は、PBS 1 mL に対し IO Test 3 固定試薬(製品番号 A07800)12.5 μ L の割合で希釈します(0.1%ホルムアルデヒド加 PBS)。

(3) 溶血試薬

以下のフローサイトメトリー用溶血試薬のいずれかを使用してください。溶血試薬は添付の取扱説明書に従って調製、使用してください。

製品番号 A09777 VersaLyse 溶血試薬

製品番号 IM1400 OptiLyse B (他社フローサイトメーター用)

製品番号 A11895 OptiLyse C (ベックマン・コールター社フローサイトメーター用)

製品番号 A07799 IO Test 3 溶血試薬

(4) コントロール試薬(アイソタイプコントロール抗体)

IO Test Mouse IgG1-PE

製品番号 A07796 容量 100 テスト (2 mL)

2. 全血サンプルを検体とする場合(全血法)

【検体の採取と調製】

試験管 1 本につき血液を 100 μ L 必要とします。

抗体の染色に最適な白血球数が 5×10^3 個/ mm^3 です。

【染色操作法】

- (1) 抗体反応用と対照用に 12 mm $\phi \times$ 75 mm の試験管を用意します。
- (2) 各々の試験管に全血 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ってください。
- (3) モノクローナル抗体試薬 20 μ L を反応用の試験管に添加します。対照用の試験管には、コントロール試薬(IO Test Mouse IgG1-PE など、別売)を 20 μ L 加えます。
- (4) よく攪拌し、室温、暗所で 15~20 分間反応させます。
- (5) 赤血球を溶血させます。用いる溶血試薬の取扱説明書に従って、溶血処理を行ってください。
- (6) 溶血が完了(サンプルの濁りが消える)したら、PBS を 3 mL 加え、攪拌します。
- (7) 150 $\times$ g、5 分間遠心分離した後、上清を吸引除去します。
- (8) (6)~(7)の操作を繰り返します。
- (9) 沈渣に適量(0.5~1 mL)の 0.1%(又は 0.5%)ホルムアルデヒド加 PBS を加え、よく攪拌します。測定が調製後 2 時間以内の場合は、PBS を用いて攪拌します。
- (10) フローサイトメーターで目的の細胞の蛍光陽性率を測定します。サンプルはアイスバス中で遮光保存し 24 時間以内に測定してください。

3. 骨髓液サンプルを検体とする場合

【検体の採取と調製】

試験管 1 本につき細胞数を調整した骨髓液を 100 μ L 必要とします。

- (1) 血清加 PBS をほぼ等量加え、よく攪拌し、4°C で、400 $\times$ g、4 分間遠心します。
- (2) 上清を吸引除去し、沈渣に PBS を加え、細胞濃度を $3 \sim 10 \times 10^3$ 個/ mm^3 ($3 \sim 10 \times 10^6$ 個/mL)に調製します(脂肪や異物の混入が著しい場合は、40 μ m ナイロンメッシュで濾過してください)。
- (3) Fc レセプターによる非特異染色が予想される場合は、抗体反応の 10~15 分前にヒト γ グロブリンを最終濃度 1 mg/mL になるよう加えます。表面イムノグロブリンを染色する場合は、ヒト γ グロブリンは入れないでください。
- (4) 数回ピペッティングして、十分に懸濁させます。
- (5) ユニセル DxH800 等のヘマトロジーアナライザーや血球計算板を用いて白血球数を測定します。
- (6) PBS で白血球数を $5 \sim 10 \times 10^3$ 個/ mm^3 の範囲に調整します。

【染色操作法】

全血法と同様に行います。

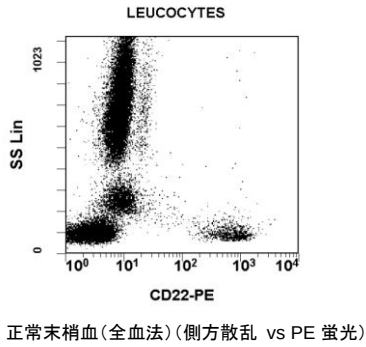
測定結果の判定法

【フローサイトメーターによる測定】

使用するフローサイトメーターは、あらかじめ光学系の設定と散乱光及び蛍光の感度調整を行ってください。詳細は機器取扱説明書をご参照ください。前方散乱光 (FS) と側方 (90° 方向) 散乱光 (SS) によるスキャットサイトグラム上で目的とする細胞領域にゲートを設定します。ゲート内解析細胞数を数千個以上とすることで、精度の良い分析結果が得られます。データ解析は、PE 蛍光 (Log スケール) ヒストグラムで行います。蛍光陽性分画のカーソルは、コントロール試薬と同様に染色処理したサンプルを対照として設定します。

【カットオフ値、陽性・陰性の判定】

測定値として算出された CD22 陽性細胞比率を用いたカットオフ値や陽性・陰性判定の基準は施設ごとに設定してください。



正常末梢血(全血法) (側方散乱 vs PE 蛍光)

臨床的意義

白血球は、T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、顆粒球などで構成されておりそれぞれの細胞群は、機能の異なる亜群(サブセット)、あるいは異なる分化段階の細胞に細分化することができます。免疫応答はこれらのサブセットの相互作用及び直接作用により調節されており、それぞれのサブセットは特徴的な細胞表面抗原を有しています。細胞融合法の確立によって各種のモノクローナル抗体が作製され、それらを利用して分化段階や機能の異なるサブセットを細胞表面抗原の発現様式で解析することが可能となりました。白血球の各細胞集団とそれらのサブセットの分析は、白血球の機能的分類及び分化段階の検索はもとより、疾病に関連した免疫応答の解析、免疫機能異常の診断や治療においても重要です。さらに、白血病やリンパ腫などの造血系腫瘍においては、腫瘍細胞の細胞系列や分化段階の同定(タイピング)に有用です。IO テストは、白血球の細胞表面抗原をフローサイトメトリーで分析するためのモノクローナル抗体試薬です。

性能

【感度】

CD22 陽性検体と CD22 陰性検体の混合比 2:98(測定理論値 2%) を 3 回測定し、その測定値の平均－2SD は、混合比 0:100(測定理論値 0%) の測定値の平均＋2SD より大きくなります。

【正確性】

CD22 陽性細胞率が 15% 以下の検体については、対照品測定値との差が 3% 以下です。CD22 陽性細胞率が 15% を超える検体については、対照品測定値との差が 5% 以下です。

【同時再現性】

健康人全血 (CD22 陽性細胞率%: 3.0~10.0) を 12 回同時に測定するとき、陽性細胞率の変動係数 (CV%) は <15% です。

【臨床性能試験】

B 細胞性急性リンパ性白血病 (B 細胞性 ALL) 患者 200 例で臨床的感度、非 B 細胞性白血病 (AML 及び T-ALL) 100 例で特異度を検討したところ、下記の結果となり、良好な感度・特異度が得られました。

	IO テスト PE 標識抗体 CD22	
	陽性症例数	陰性症例数
B 細胞性 ALL	193 例	7 例
AML+T-ALL	0 例	100 例

感度(検出率, %) : 193 / (193 + 7) × 100 = 96.5%
特異度(%) : 100 / (0 + 100) × 100 = 100%
※この試験での陽性症例とは、検体中の CD22 細胞比率が 20% 以上の症例を指します。

使用上又は取扱上の注意

- 1. 本品には、保存剤としてアジ化ナトリウムが含まれております。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. 試薬を凍結保存しないでください。
- 3. 試薬の外観に変化が見られる場合や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。

- 4. 使用期限を過ぎた試薬を使用しないでください。
- 5. 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、適切な表示及び処理をした後に医療廃棄物等に関する規定に従い廃棄してください。
- 6. 皮膚や粘膜に検体や試薬が触れないように注意してください。ピペットを口で吸引しないでください。
- 7. 保管や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。
- 8. 試薬が微生物に汚染されないようご注意ください。
- 9. 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。
- 10. 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を着用してください。
- 11. 廃棄にあたっては、水質汚濁防止法等の記載に留意して処理してください。
- 12. 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。
- 13. 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。

貯蔵方法・有効期間

貯蔵方法 : 2~8℃ (遮光保存) 有効期間 : 12 箇月
(使用期限は、ボトルに表示があります。)

包装単位

IO テスト PE 標識抗体 CD22
製品番号 IM1835 容量 100 テスト (2 mL)

主要文献

1. Kehrl, J., "CD22 workshop Panel report", 1995, Leucocyte Typing V, White Cell Differentiation Antigens. Schlossman, S.F., et al., Eds., Oxford University Press, 523-527.

2. Deneys, V., Mazzon, AM., Marques, JL., Benoit, H., De Bruyere, M., "Reference values for peripheral blood B-lymphocyte subpopulations: a basis for multiparametric immunophenotyping of abnormally mphocytes", 2001, J.Immunol Methods,1; 253,1-2, 23-36.

3. Sanchez, ML., Almeida, J., Vidriales, B., Lopez-Berges, MC., Garcia-Marcos, MA., Moro, MJ., Corrales, A., Calmuntia, MJ., San Miguel, JF., Orfao, A., "Incidence of phenotypic aberrations in a series of 467 patients with B chronic lymphoproliferative disorders: basis for the design of specific four-color stainings to be used for minimal residual disease investigation", 2002, Leukemia,16, 8, 1460-1469

4. Babusikova, O., Tomova,A., "Hairy cell leukemia: early immunophenotypical detection and quantitative analysis by flowcytometry", 2003, Neoplasma 50, 350-356.

5. Miller, ML., Fishleder, AJ., Tubbs, RR., "The expression of CD22 (Leu 14) and CD11c (LeuM5) in chronic lymphoproliferative disorders using two-color flowcytometric analysis", 1991, Am J Clin Pathol., 96, 100-108.

6. Tedder, T.F., Tuscano, J., Sato, S., Kehrl, J.H., "CD22, A B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling", 1997, Rev. Immunol., 15, 481 -504.

7. Unkeless, J.C., Jin, J., "Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases", 1997, Curr. Opin. Immunol., 9, 338-343.

8. Buhl, A.M., Cambier, J.C., "Co-receptor and accessory regulation of B-cell antigen receptor signal transduction", 1997, Immunol. Rev., 160, 127-138.

9. Law, C.L., Sidorenko, S.P., Clark, E.A., "Regulation of lymphocyte activation by the cell-surface molecule CD22", 1994, Immunol. Today, 9, 15, 442-449.

10. Doody, G.M., Dempsey, P.W., Fearon, D.T., "Activation of B lymphocytes: integrating signals from CD19, CD22 and FcγRIIb1", 1996, Curr. Opin. Immunol., 8, 378-382.

11. LynnWilson, G., "Genomic structure and chromosomal mapping of the human CD22 gene", 1993, J.Immunol., 11, 150, 5013.

12. Stamenkovic, I., Sgroi, D., Aruffo, A., Sy, M.S., Anderson, T., "The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells", 1991, Cell, 66, 1133-1144.

13. Reinherz, E.L., et al., "CD22 workshop Panel report", 1984, Leucocyte Typing II, White Cell Differentiation Antigens., (WS code: B40, section: B cells), Eds., Springer-Verlag, volume 2, 154-167.

14. H42-A2Vol.27No. 16. P30. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline Second Edition.

15. Ibrahim FF, Ghannam MM, Ali FM., "Effect of dialysis on erythrocyte membrane of chronically hemodialyzed patients", 2002. Ren Fail., Nov;24(6): 779-90.

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

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