

認証番号222AAAMX00081000号

この添付文書をよく読んでから使用してください。

クラスⅡ免疫組織学検査用シリーズ
組織検査用細胞性免疫キットライカ IHC
Refine/NovoLinkキット「CD20」

Refineキット「CD20」

●一般的な注意

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. 添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。本添付文書に記載された使用方法および使用目的以外での使用については、検出結果の信頼性は保証いたしません。
4. 使用する機器の添付文書及び取扱説明書(使用説明書)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）

1. 一次抗体
抗CD20マウスモノクローナル抗体
2. Refineキット（別売）
 - 1) ブロッキング試薬
過酸化水素
 - 2) ポストプライマリー試薬
ウサギ抗マウスIgG抗体
 - 3) ポリマー試薬
HRP標識抗ウサギIgG抗体
 - 4) DAB試薬1
3,3'-ジアミノベンジジン
 - 5) DAB試薬B
過酸化水素
 - 6) ヘマトキシリン試薬
ヘマトキシリン

●使用目的

組織・細胞中のB細胞の検出

●検出原理

脱パラフィンや抗原賦活化等、通常の検体処理を行った組織切片に、一次抗体を反応させると組織、細胞に存在するB細胞と反応する。
次にRefineキット中のポストプライマリー試薬(ウサギ抗マウスIgG抗体)を反応させ、洗浄後、ポリマー試薬(HRP標識抗ウサギIgG抗体)を反応させると、スライドグラス上に<CD20-抗CD20マウスモノクローナル抗体-ウサギ抗マウスIgG抗体-HRP標識抗ウサギIgG抗体>複合体が形成される。この複合体にDAB試薬1及びDAB試薬Bを添加すると、試薬中の3,3'-ジアミノベンジジン及び過酸化水素の反応によりスライドグラス上の組織、細胞中にあるB細胞が茶褐色に染色される。染色された組織標本を鏡検により観察し、B細胞の陽性・陰性の判定を行う。

●操作上の注意

1. 検体にはパラフィン切片を使用すること。
2. 検体（病理組織）はできるだけ新鮮なものを使用すること。
3. パラフィンの残留はバックグラウンド染色の原因となるので、完全に除去した後に染色操作を行うこと。そのため、脱パラフィンに用いるキシレン及びエタノールは、新しいものを使用すること。
4. 抗原が一部変性していたり、抗原の濃度が低い場合には、抗体との結合力が落ちて陰性を呈する恐れがある。

5. 固定液の種類、高濃度の固定液、長時間の固定、急激な高温処理などにより、抗原物質が変性したり、タンパク間にメチレン結合が過剰に生じて抗原が覆われたりすることがある。覆われた抗原は熱処理（抗原賦活化処理）によって露出させることが可能な場合がある。但し、熱処理により切片がスライドガラスから剥がれやすくなる恐れがあるので、0.02%ポリ-L-リジンあるいはシランコートされたスライドガラスを使用すること。アルブミンスライドの使用は避けること。
6. ホルマリン固定は室温で行う。組織容量の15~20倍の固定液に浸けること。
7. 組織は3~6μmの厚さに薄切し、スライドグラスに付着させること。
8. 一次抗体（凍結乾燥品）を希釈する際は滅菌水で溶解し、その後緩衝液で適切な濃度に希釈して使用すること。
9. スライドの種類や保存状態が染色結果に影響する場合がある。
10. 染色を行う場合には、必ず同時に精度管理用コントロールスライドの染色を行い、染色操作が適切に行われたことを確認すること

●用法・用量（操作方法）*

1. 必要な器具・器材・試料等
自動染色装置 Bond™シリーズ及び同等の性能を有する自動染色装置の取扱説明書にしたがう。

【コントロールスライド】

・陽性コントロールスライド

検体組織スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ目的抗原が存在することを確認している組織切片スライドを用意する。このスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を行い、結果を比較する。

・陰性コントロールスライド

検体組織スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ目的抗原が存在しないことを確認している組織切片スライドを用意する。このスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を行い、結果を比較する。

2. 検体スライドの準備

【パラフィン包埋切片】

- 1) 組織形態や抗原活性を維持した最適固定を得るため、できるだけ新鮮で小さな組織切片(約1cm×1cm×0.5cm)の使用と、下表の固定液の使用を勧める。

固定液	固定時間
10%(緩衝)ホルマリン	24~48 時間
20%ホルマリン	12~24 時間

- 2) 切片を3~6μmに薄切し、スライドに付着させる。熱による抗原賦活化処理を行う場合は、0.02%ポリ-L-リジンあるいはシランなどの組織切片用接着剤を使用する。検体標本スライドとして1検体あたり、2枚準備する。1枚は、試薬対照スライドとして、一次抗体のかわりに陰性対照コントロール(一次抗体の免疫動物の正常血清)を使用して染色操作を行う。
- 3) 使用するスライドガラスは、製造後、なるべく新しいものを使用する。
- 4) 薄切後は40℃±3℃の恒温槽内で十分乾燥させることが望ましい。短時間で乾燥させる場合や、組織剥離防止のためにペーキングさせる場合でも、なるべく短時間(1時間以内)で処理を行い、スライド標本をそれ以上の時間、高温に置くことは避ける。
- 5) 作製したスライド標本は早めに使い切ることが望ましいが、保存する際には遮光したケースに並べて冷蔵庫(2~8℃)で保管する。

3. 試薬の調製方法

試薬は必要に応じて適切な濃度に希釈して用いる。

4. 測定(操作)法*

検体標本スライドおよび試薬対照スライドと並行して、検体

の準備から染色処理、検鏡までの全工程を行う。

自動染色時の詳細なパラメータ設定方法は自動染色装置 Bond™ シリーズ及び同等の性能を有する自動染色装置の取扱説明書を参照すること。

検体組織スライドは、調製時に必要に応じて脱パラフィンと抗原賦活化処理を行い、次に100～150μLのブロッキング試薬を加え5分間反応させた後に洗浄する。次いで、検体組織スライド上に所定濃度の一次抗体を100～150μL加え、15分間反応させる。洗浄後、100～150μLのポストプライマリー試薬を加え、8分間反応させた後に洗浄する。次に、100～150μLのポリマー試薬を加え、8分間反応させた後に洗浄し、あらかじめ混合しておいたDAB試薬1、DAB試薬Bを加えて10分間反応させる。洗浄後、100～150μLのヘマトキシリン試薬を加えて5分間反応させて洗浄し、透徹、封入して光学顕微鏡下で観察する。

●染色結果の判定法

1. 検体組織スライド及び陽性コントロールスライドの染色態度を光学顕微鏡で観察し、陽性反応を観察し、染色操作が正しく行われたかを判定する。
2. 検体組織スライド及び陰性コントロールスライドの染色態度を光学顕微鏡で観察し、非特異染色を判定する。
3. 特異染色像を観察する。

●性能

1. 性能

1) 感度

本品を用いて陽性コントロールスライドを染色するとき、明らかな特異染色像が観察される。

2) 正確性

本品を用いて陽性コントロールスライドを染色するとき、明らかな特異染色が観察される。背景組織には顕著な染色は認められない。

3) 同時再現性

本品を用いて陽性コントロールスライドを3枚同時に染色するとき、3枚とも特異染色像が観察され、背景組織には顕著な染色は認められない。

2. 最小検出感度及び測定範囲

本品はスライド上の組織切片を検体として免疫組織染色を行うものであり、組織切片中の抗原量を正確に測定することができないため、本品の最小検出感度または測定範囲を定量的に示すことはできない。

3. 相関性試験

本品の免疫組織染色が適切なものであることを確認するために、163例の患者から得られたスライド標本を用い、本品と既承認体外診断用医薬品（既承認品）①及び既承認体外診断用医薬品（既承認品）②との相関性について検討を行った。

表1 本品と既承認薬①によるスライド標本の染色結果

		既承認薬①		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	81	2	83
	陰性	2	78	80
計		83	80	163
一致率		98%		

表2 本品と既承認薬②によるスライド標本の染色結果

		既承認薬②		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	82	1	83
	陰性	2	78	80
計		84	79	163
一致率		98%		

●使用上又は取り扱い上の注意

1. 取り扱い上の注意

- ・組織標本や試薬を取り扱っている間は、使い捨ての手袋を着用することが望ましい。
- ・組織標本や試薬を取り扱っている場所での喫煙・飲食は避けること。
- ・組織標本や検体は、感染性のあるものとして取り扱い、適切な予防措置をとること。
- ・口でのピペット操作はしないこと。
- ・試薬、組織標本が皮膚や粘膜に直接接触しないように注意すること。
- ・試薬がこぼれたり、漏れたりした場合は、消毒剤及び洗浄剤できれいにふき取ること。
- ・試薬が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には、水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受ける。

2. 使用上の注意

- ・表示されている有効期限を過ぎた試薬は使用しないこと。試薬を装置にセットする場合は、必ずキャップとストッパーを外してからセットすること。
- ・使用後の試薬は、できるだけ速やかにキャップをはめて2～8℃に保管する。
- ・全ての試薬は常温に戻してから使用すること。
- ・染色過程のいかなる段階においても、切片を乾燥させてはならない。

3. 廃棄上の注意

本品の一次抗体にはアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムは水道管に含まれる銅、鉛の反応によって爆発の危険性があるので、これらの試薬を配水管より処分した後には多量の水を流すこと。

●保管方法、有効期間

保管方法：2～8℃に保存する。

有効期間：18ヶ月

（一次抗体：36ヶ月 Refineキット：18ヶ月）

●包装

一次抗体

製品名	希釈済		凍結乾燥品	
	コード番号	容量	コード番号	容量
CD20	PA0906	7mL	NCL-CD20-MJ1	1mL

Refineキット

構成試薬	コード番号	容量
ブロッキング試薬	DS9800	30mL
ポストプライマリー試薬		30mL
ポリマー試薬		30mL
DAB 試薬 1		2.4mL
DAB 試薬 B		30mL (2本)
ヘマトキシリン試薬		30mL

NovoLinkキット「CD20」

●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. 添付文書に記載された使用方法に従って使用してください。本添付文書に記載された使用方法および使用目的以外での使用については、検出結果の信頼性は保証いたしません。

●形状・構造等（キットの構成）

1. 一次抗体
抗CD20マウスモノクローナル抗体
2. NovoLinkキット（別売）
 - 1) ブロッキング試薬
過酸化水素
 - 2) プロテインブロック試薬
カゼイン含有リン酸緩衝生理食塩水
 - 3) ポストプライマリー試薬
ウサギ抗マウスIgG抗体
 - 4) ポリマー試薬
抗ウサギペルオキシダーゼ標識ポリマーIgG抗体
 - 5) DABクロモゲン試薬
3,3'-ジアミノベンジジン
 - 6) DAB基質緩衝液
過酸化水素
 - 7) ヘマトキシリン試薬
ヘマトキシリン

●使用目的

組織・細胞中のB細胞の検出

●検出原理

脱パラフィン、抗原賦活化等の通常の処理を行った組織切片に、一次抗体を反応させると組織、細胞に存在するB細胞と反応する。次にNovoLinkキット中のポストプライマリー試薬（ウサギ抗マウスIgG抗体）を反応させ、洗浄後、ポリマー試薬（HRP標識抗ウサギIgG抗体）を反応させるとスライドガラス上に、<CD20-抗CD20マウスモノクローナル抗体-ウサギ抗マウスIgG抗体-HRP標識抗ウサギIgG抗体>複合物が形成される。この複合物にDABクロモゲン試薬及びDAB基質緩衝液を添加すると、試薬中の3,3'-ジアミノベンジジン及び過酸化水素の反応によりスライドガラス上の組織、細胞中にあるB細胞が茶褐色に染色される。染色された組織標本を顕微鏡により観察し、B細胞の陽性・陰性の判定を行う。

●操作上の注意

1. 検体にはパラフィン切片を使用すること。
2. 検体（病理組織）はできるだけ新鮮なものを使用すること。
3. パラフィンの残留はバックグラウンド染色の原因となるので、完全に除去した後に染色操作を行うこと。そのため、脱パラフィンに用いるキシレン及びエタノールは、新しいものを使用すること。
4. 抗原が一部変性していたり、抗原の濃度が低い場合には、抗体との結合力が落ちて陰性を呈する恐れがある。
5. 固定液の種類、高濃度の固定液、長時間の固定、急激な高温処理などにより、抗原物質が変性したり、タンパク間にメチレン結合が過剰に生じて抗原が覆われたりすることがある。覆われた抗原は抗原賦活化処理（タンパク分解酵素処理や熱処理）によって露出させることが可能な場合がある。但し、これら抗原賦活化処理により切片がスライドガラスから剥がれやすくなる恐れがあるので、0.02%ポリ-L-リジンあるいはシリコートされたスライドガラスを使用すること。アルブミンスライドの使用は避けること。
6. ホルマリン固定は室温で行う。組織容量の15~20倍の固定液に浸けること。
7. 組織は3~6μmの厚さに薄切し、スライドガラスに付着さ

せること。

8. 一次抗体（凍結乾燥品）を希釈する際は滅菌水で溶解し、その後緩衝液で適切な濃度に希釈して使用すること。
9. スライドの種類や保存状態が染色結果に影響する場合がある。
10. 反応の際には、検体組織が乾かないように注意し、必要に応じて湿潤箱を用いること。
11. 人為的に生じる染色性の低下及び偏った染色を防ぐために、余分な水分を除去し試薬を均一に広げるように注意すること。
12. 染色を行う場合には、必ず同時に精度管理用コントロールスライドの染色を行い、染色操作が適切に行われたことを確認すること。

●用法・用量（操作方法）

1. 必要な器具・器材・試料等

- | | |
|--------------------------------------|------------------|
| ・洗浄びん | ・カバーガラス |
| ・ろ紙 | ・スライドガラス（シリコート等） |
| ・タイマー | ・染色ドーゼ |
| ・温浴槽 | ・湿潤箱 |
| ・乾燥器 | |
| ・光学顕微鏡 | |
| ・キシレン | ・適切な濃度のエタノール |
| ・トリス塩酸緩衝生理食塩水（TBS）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS） | ・精製水 |
| ・対比染色液 | ・封入剤 |

[コントロールスライド]

・陽性コントロールスライド

検体組織スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ目的抗原が存在することを確認している組織切片スライドを用意する。このスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を行い、結果を比較する。

・陰性コントロールスライド

検体組織スライドと同様の方法で作製され、あらかじめ目的抗原が存在しないことを確認している組織切片スライドを用意する。このスライドを検体組織スライドと並行して染色操作を行い、結果を比較する。

2. 検体スライドの準備

[パラフィン包埋切片]

- 1) 組織形態や抗原活性を維持した最適固定を得るため、できるだけ新鮮で小さな組織切片（約1cm×1cm×0.5cm）の使用と、下表の固定液の使用を勧める。

固定液	固定時間
10%(緩衝)ホルマリン	24~48 時間
20%ホルマリン	12~24 時間

- 2) 切片を3~6μmに薄切し、スライドに付着させる。タンパク分解酵素処理や熱処理による抗原賦活化処理を行う場合は、0.02%ポリ-L-リジンあるいはシリコートなどの組織切片用接着剤を使用する。
- 3) 薄切後は40℃±3℃の恒温槽内で十分乾燥させることが望ましい。短時間で乾燥させる場合や、組織剥離防止のためにペーキングさせる場合でも、なるべく短時間（1時間以内）で処理を行い、スライド標本をそれ以上の時間、高温に置くことは避ける。
- 4) 作製したスライド標本は早めに使切ることが望ましいが、保存する際には遮光したケースに並べて冷蔵庫（2~8℃）で保管する。
- 5) キシレン（約5分）×2回→100%エタノール（約3分）×2回→90%エタノール（約3分）→80%アルコール（約3分）の順にスライドガラスを浸す。最後に精製水を入れたバットで約5分浸水させる（脱パラフィン）。

3. 試薬の調製方法

試薬は必要に応じて適切な濃度に希釈して用いる。

4. 測定(操作)法

検体組織スライドおよび試薬対照スライドと並行して、検体の準備から染色処理、検鏡までの全工程を行う。

検体組織スライドは、調製時に必要に応じて脱パラフィンと抗原賦活化処理を行い、次に100~150 μ Lのプロッキング試薬を加え、5分間反応させた後に洗浄する。次いで、プロテインブロック試薬を100~150 μ L加え、5分間反応させた後に洗浄する。検体組織スライド上に所定濃度の一次抗体を100~150 μ L加え、所定時間反応させる。洗浄後、100~150 μ Lのポストプライマリー試薬を加え、30分間反応させた後に洗浄する。次に、100~150 μ Lのポリマー試薬を加え、30分間反応させた後に洗浄し、あらかじめDABクロモゲン試薬を50 μ L、DAB基質緩衝液を1mLの組成で混和した試薬を100~150 μ L加えて5分間反応させる。洗浄後、100~150 μ Lのヘマトキシリン試薬を加えて所定時間反応させて洗浄し、透徹、封入して光学顕微鏡下で観察する。

●染色結果の判定法

1. 検体組織スライド及び陽性コントロールスライドの染色態度を光学顕微鏡で観察し、陽性反応を観察し、染色操作が正しく行われたかを判定する。
2. 検体組織スライド及び陰性コントロールスライドの染色態度を光学顕微鏡で観察し、非特異染色を判定する。
3. 特異染色像を観察する。

●性能

1. 性能

1) 感度

本品を用いて陽性コントロールスライドを染色するとき、明らかな特異染色像が観察される。

2) 正確性

本品を用いて陽性コントロールスライドを染色するとき、明らかな特異染色が観察される。背景組織には顕著な染色は認められない。

3) 同時再現性

本品を用いて陽性コントロールスライドを3枚同時に染色するとき、3枚とも特異染色像が観察され、背景組織には顕著な染色は認められない。

2. 最小検出感度及び測定範囲

本品はスライド上の組織切片を検体として免疫組織染色を行うものであり、組織切片中の抗原量を正確に測定することができないため、本品の最小検出感度または測定範囲を定量的に示すことはできない。

3. 相関性試験

本品の免疫組織染色が適切なものであることを確認するために、163例の患者から得られたスライド標本を用い、本品と既承認体外診断用医薬品(既承認品)①及び既承認体外診断用医薬品(既承認品)②との相関性について検討を行った。

表1 本品と既承認薬①によるスライド標本の染色結果

		既承認薬①		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	81	2	83
	陰性	2	78	80
計		83	80	163
一致率		98%		

表2 本品と既承認薬②によるスライド標本の染色結果

		既承認薬②		計
		陽性	陰性	
本品	陽性	82	1	83
	陰性	2	78	80
計		84	79	163
一致率		98%		

●使用上又は取り扱い上の注意

1. 取り扱い上の注意

- ・組織標本や試薬を取り扱っている間は、使い捨ての手袋を着用することが望ましい。
- ・組織標本や試薬を取り扱っている場所での喫煙・飲食は避けること。
- ・組織標本や検体は、感染性のあるものとして取り扱い、適切な予防措置をとること。
- ・口でのピペット操作はしないこと。
- ・試薬、組織標本が皮膚や粘膜に直接触れないように注意すること。
- ・試薬がこぼれたり、漏れたりした場合は、消毒剤及び洗浄剤できれいにふき取ること。
- ・試薬が誤って目や口に入ったり、皮膚に付着した場合には、水で十分に洗い流す等の応急措置を行い、必要があれば医師の手当て等を受ける。

2. 使用上の注意

- ・表示されている有効期限を過ぎた試薬は使用しないこと。
- ・使用後の試薬は、できるだけ速やかにキャップをはめて2~8℃に保管する。
- ・全ての試薬は常温に戻してから使用すること。
- ・染色過程のいかなる段階においても、切片を乾燥させてはならない。試薬と反応させている間、切片を湿潤箱に入れておく乾燥を防ぐことができる。
- ・各構成試薬は、個別に補充できる。

3. 廃棄上の注意

本品の一次抗体にはアジ化ナトリウムが含まれている。アジ化ナトリウムは水道管に含まれる銅、鉛の反応によって爆発の危険性があるので、これらの試薬を配水管より処分した後には多量の水を流すこと。

●保管方法、有効期間

保管方法：2~8℃に保存する。

有効期間：15ヶ月

(一次抗体：36ヶ月 Nov o L i n kキット：15ヶ月)

●包装**

一次抗体

製品名	希釈済		凍結乾燥品	
	コード番号	容量	コード番号	容量
CD20	PA0906	7mL	NCL-CD20-MJ1	1mL

Nov o L i n kキット

1. キット製品

構成 試薬	コード番号	RE7150-K	RE7140-K	RE7290-K
	包装単位	500テスト	250テスト	50テスト
プロッキング 試薬	125mL			
	25mL	2本	1本	
	5mL			1本
プロテイン ブロック試薬	125mL			
	25mL	2本	1本	
	5mL			1本
ポスト プライマリー 試薬	125mL			
	25mL	2本	1本	
	5mL			1本
ポリマー 試薬	125mL			
	25mL	2本	1本	
	5mL			1本
DAB クロモゲン 試薬	8mL			
	3mL	1本	1本	
	1mL			1本
DAB 基質 緩衝液	150mL			
	30mL	2本	1本	
	5mL			1本
ヘマトキシリン 試薬	125mL			
	25mL	2本	1本	
	5mL			1本

構成 試薬	コード番号	RE7260-K	RE7200-K
	包装単位	1250 テスト	250 テスト
ブロッッキング 試薬	125mL		
	25mL		
	5mL		
プロテイン ブロッグ試薬	125mL		
	25mL		
	5mL		
ホスト プライマリー試 薬	125mL	1 本	
	25mL		1 本
	5mL		
ポリマー 試薬	125mL	1 本	
	25mL		1 本
	5mL		
DAB クロモゲン 試薬	8mL		
	3mL		
	1mL		
DAB 基質 緩衝液	150mL		
	30mL		
	5mL		
ヘマトキシリン 試薬	125mL		
	25mL		
	5mL		

構成 試薬	コード番号	RE7270-K	RE7230-K
	包装単位	1250 テスト	250 テスト
ブロッッキング 試薬	125mL		
	25mL		
	5mL		
プロテイン ブロッグ試薬	125mL		
	25mL		
	5mL		
ホスト プライマリー試 薬	125mL		
	25mL		
	5mL		
ポリマー 試薬	125mL		
	25mL		
	5mL		
DAB クロモゲン 試薬	8mL	1 本	
	3mL		1 本
	1mL		
DAB 基質 緩衝液	150mL	1 本	
	30mL		1 本
	5mL		
ヘマトキシリン 試薬	125mL		
	25mL		
	5mL		

2. 単品

構成試薬	コード番号	包装単位
ブロッッキング試薬	RE7101	1本
プロテインブロッグ試薬	RE7102	1本
ヘマトキシリン試薬	RE7107	1本

●主要文献

- 1) Kobayashi Z, Tsuchiya K, Takahashi M, et al. An autopsy case of chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV): distribution of central nervous system (CNS) lesions. Journal of the Neurological Sciences. 2008; 275:170-177.
- 2) Gurevich P, Elhayany A, Ben-Hur H, et al. An immunohistochemical study of the secretory immune system in human membranes and deciduas of the first trimester of pregnancy. American Journal of Reproductive Immunology. 2003; 50:13-19.
- 3) Gurevich P, Elhayany A, Ben-Hur H, et al. Secretory component, J chain and immunoglobulins in human embryos and fetuses of the first trimester of pregnancy: immunohistochemical study. Pediatric and Developmental Pathology. 2002;6:35-42.

●問い合わせ先

ライカマイクロシステムズ株式会社
〒169-0075 東京都新宿区高田馬場1-29-9
TEL : 03-6758-5690

●製造販売元



ライカマイクロシステムズ株式会社
〒169-0075 東京都新宿区高田馬場1-29-9
東亜 DKK 株式会社別館オフィスビル