

6603857

サイトスタット NKH-1-RD1

開発の経緯および特徴

ヒト末梢血のリンパ球はT細胞、B細胞および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は区別できませんが、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細胞および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ー機能の発現や、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持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イ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、ウイルス感染の防御、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細胞数の変動がみ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い、フローサイトメトリーによる No-wash 全血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。

本質

1. 抗ヒト CD56 モノクローナル抗体(フィコエリスリン結合)

0.2~0.6 μg/テスト

2. 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%
スタビライザー	

対象抗原

CD56 (分子量 135~220kDa)

CD56 は末梢血中で TCR を介せ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+) の両方が含まれる。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ない。

また、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、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 の範囲になるが、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104kDaのアイソフォームが発現している。

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 マウスの脾臓細胞およびマウス NS-1 ミエローマ細胞の融合細胞より分離。

Ig 構造

マウス IgG1-H 鎖および κ-L 鎖

細胞毒性

なし

原料および精製法

融合細胞の培養上清よりアフィニティークロマトグラフィーにより精製。

標識

フィコエリスリン(RD1)/抗体タンパク比=0.5~1.5

効能・効果

全血中のリンパ球表面抗原の分析およびNK細胞の測定

測定方法

フローサイトメトリーによる直接免疫蛍光法。

励起波長 486~580nm, 蛍光波長 568~590nm

用法・用量

検体の採取と白血球数の調整

検体には、抗凝固剤に EDTA、ヘパリンなどを用いて採血した末梢血を使用する。

但し、白血球数が $3 \sim 10 \times 10^9$ 個/mm³ であることが染色を行う上で望ましい。検体中の白血球数がこの範囲を外れる場合には、希釈^{*)}またはパフィーコート法などにより濃縮して調整すること。

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が望ましい。

*) 溶血剤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うこと。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)で希釈すること。

試薬の調整

モノクローナル抗体はそのまま用いる(10 μL/テスト)。

サンプル調整および測定手順

溶血剤には、以下①～③のうちのいずれかを用いる。

- ① イムプレップ試薬システム (イムプレップA～C)
 - a) イムプレップA(溶血試薬)
 - b) イムプレップB(反応停止試薬)
 - c) イムプレップC(固定試薬)
- ② 塩化アンモニウム溶血剤
- ③ イムライズ(コールター全血ライジングキット中の溶血試薬)を用いて調製した溶血剤

注) なお、イムプレップやイムライズなどの市販の溶血試薬を用いる場合には、当該製品添付文書中の操作法およびその他の注意事項に従って操作すること。

測定には、575(268～590)nm の蛍光を検出できるフローサイトメーターを用いる。

操作手順

- A) 溶血剤にイム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 検体100 μ Lにモノクローナル抗体試薬10 μ Lを加え反応させる。なお、対照とするサンプルには陰性コントロール抗体試薬を添加する。
 - ② イムプレップA、B、Cを順に加え攪拌する。
 - ③ フローサイトメーターの励起光波長を488nmにセットし、検出器側のフィルターを575nmの蛍光が測定できるようにセットする。
 - ④ 陰性コントロール抗体試薬を添加したサンプルを対照として、前方散乱光(FSC)と側方散乱光(SSC)によるスクATTERサイトグラム中のリンパ球領域に含まれる任意の白血球集団の蛍光陽性率を計測する。
 - ⑤ 調製したサンプルは、24時間以内に測定すること。但し、調製後2時間までは室温で、2時間を超える場合には2～8℃で遮光保存すること。

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(FSCの検出角度が狭角な装置)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加えること。
- B) イムプレップ試薬システム以外の溶血剤を用いてサンプル処理を行う場合
 - ① 検体100 μ Lにモノクローナル抗体試薬10 μ Lを加え反応させる。なお、対照とするサンプルには陰性コントロール抗体試薬を添加する。
 - ② 溶血剤を溶血剤の製品添付文書の指示に従って調製した後に添加し、攪拌する。
 - ③ PBSを加え遠心分離を行う。
 - ④ 上清を除去し、さらにPBSを加える。
 - ⑤ 溶血剤にコールター・全血ライジングキットを用いる場合には、③、④を繰り返す。
 - ⑥ A) ③～④の操作に準じて任意の白血球集団の蛍光陽性率を計測する。
 - ⑦ 調製後のサンプルはアイスバス中で遮光保存し、速やかに測定を行う。

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る。

1) Flow-Count (細胞絶対数測定用試薬:別売)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参照のこと。

2) CD56 陽性率および白血球数算定の結果から算出する方法。
絶対数(個/mm³)=
総白血球数(個/mm³)×リンパ球%×陽性率%/10⁴

測定条件の確認

サイトロールまたはイムノロールなどのコントロール細胞(別売)を利用して、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が望ましい。

操作上の留意事項

- 1) 抗凝固剤としてEDTA、ヘパリン等を用いることができるが、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が望ましい。また、白血病細胞などは保存により急速に生存率の低下等を来す場合があるため、注意が必要である。
- 2) 白血球数が10,000 個/mm³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/mm³以内になるように希釈して用いること。
- 3) 全血法によるサンプル処理では、赤血球の溶血残渣や溶血されなかった赤血球が誤差要因となるので、溶血操作を確実にすること。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くこと。
- 4) 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る。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恐れがあるので十分に注意すること。
- 5) 抗体試薬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 MslgG1-RD1 などの陰性コントロール抗体試薬を使用すること。
- 6) 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 陽性率と CD56 の陽性率に CD19(B 細胞)の陽性率を合計した数値は100%を少し上回る。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る。

測定結果の判定方法

- 1) 本製品で測定した正常参考値は以下の通りである。
CD56 陽性率(リンパ球領域) $\pm 1SD$: 9.3 \pm 4.7% N=171
- 2) 但し、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、測定結果は臨床および他の診断データに十分注意して判定すること。

性能

特異性

NKH-1モノクローナル抗体は、第6回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る。

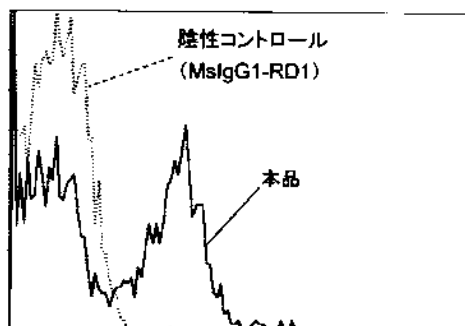
ヒストグラム例

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

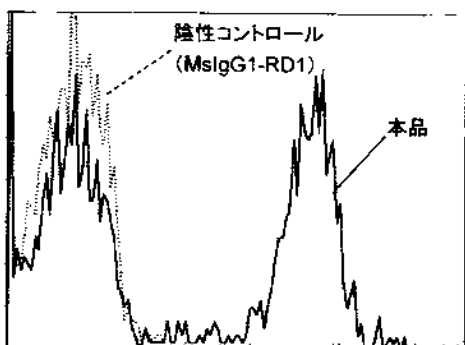
陰性コントロール抗体試薬:

サイトスタット/コーラークローン MslgG1-RD1
フローサイトメーター:EPICS XL

溶血剤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(用法・用量の操作手順 A)場合



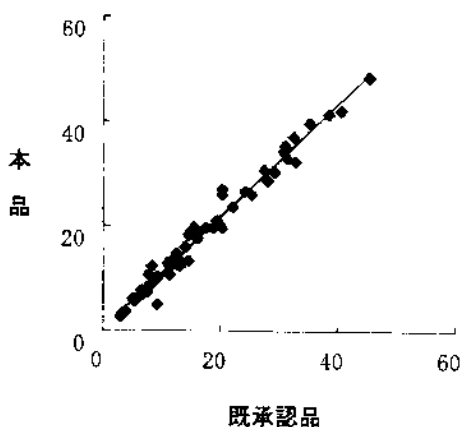
1) コーラークローン全血ライジングキットを用いてサンプル処理を行った(用法・用量の操作手順 B)場合



相関性

本品と既承認品との相関性は、以下の通り良好であった。

$$CD56 \text{ 陽性率}(\%) : y = 1.08x + 0.25 \quad r = 0.99$$



〈既承認品と本品の陽性率の相関〉

使用上または取り扱い上の注意

- 1) 本品はフローサイトメーター専用試薬であるので、蛍光顕微鏡には用いないこと。
- 2) 使用にあたっては、室温(20~25℃)に戻してから使用すること。

- 3) 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ない。
- 4) 溶血不良となる恐れがあるため、検体を試験管に分注する際には試験管の口や壁面に検体をつけないよう注意し、付着した血液は綿棒等で取り除くこと。
- 5) 溶血時間が長いと、白血球にもダメージが及ぶ場合がある。
- 6) フローサイトメーターのレーザー光軸の設定不良や不適切なゲート設定により、誤った結果の得られる場合がある。
- 7) 本品にはアジ化ナトリウムが含まれる。アジ化ナトリウムは酸性下で有毒なアジ化水素酸を産成するので、取り扱いには十分注意すること。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性物質生成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うこと。
- 8) 有効期限を過ぎた試薬を使用しないこと。
- 9) 検体およ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、処理の後に廃棄すること。
- 10) ピペットを口で吸引しないこと。また、皮膚や粘膜への検体の接触を避けること。
- 11) 保管およびインキュベーション中に試薬を強い光にさらさないこと。
- 12) 試薬が微生物に汚染されないよう注意すること。
- 13) 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こと。

本品は正常な状態では淡赤色の透明な液体である。

貯法、有効期間

- 1) 本品は冷蔵(2~8℃)で保存すること(凍結は不可)。
- 2) 長時間光にさらすことは避けること。
- 3) 有効期限は、各バイアルに明記されている。

包装単位

カタログ番号 6603857 容量 50テスト(0.5mL)

主要文献および文献請求先

- 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

● 文献請求先

ベックマン・コールター株式会社

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 3-5-1

臨床検査／サイトメトリー関連お問い合わせ ☎ 0120-705203

輸入販売元



BECKMAN
COULTER

ベックマン・コールター株式会社

本社／東京都港区虎ノ門 3-5-1 〒105-0001 ☎ 0120-705203