

フローサイトメトリー法による血小板絶対数算定法（間接法）

手順書 (Standard Operation Procedure, SOP)

機種別資料：BD FACSCanto™II

整合規格

International Council for Standardization in Haematology Expert Panel on Cytometry and International Society of Laboratory Hematology Task force on Platelet Counting. Platelet counting by RBC/platelet ratio method. A reference method. Am J Clin Pathol 115: 460-464, 2001 「ICSH/ISLH Plt 2001」

関連文献

- 1) International Council for Standardization in Haematology; Prepared by the expert on cytometry, Reference method for the enumeration of erythrocytes and leucocytes. Clin Lab Haemat, 1994; 16: 131-138
- 2) N. Shosaku, Extracellular vesicles and blood diseases, Int J Hemat, 2017; 105: 392-405
- 3) Herring JM et al, Microparticles in Health and Disease, J Vet Intern Med. 2013; 27: 1020-33.
- 4) S. Robet et al, Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop J Thromb Haemost, 2013; 11: 1190-1193
- 5) S. Robet et al, Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? J Thromb Haemost, 2008; 7: 190-197.
- 6) R. Lacroix et al, Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop Thromb Haemost, 2010; 8: 2571-2574
- 7) ICSH and ISLH Task Force on Platelet Counting, Platelet Counting by the RBC/Platelet Ratio Method - A Reference Method, Am J Clin Pathol 2001;115:460-464
- 8) Harrison P et al, An Interlaboratory Study of a Candidate Reference Method for Platelet Counting, Am J Clin Pathol, 2001; 115: 448-459
- 9) Harrison P, Horton A, Grant D, et al Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. Br J Haematol, 2000; 108: 228-235
- 10) Robert S et al, Arteriosclerosis, Thromb Vasc Biol, 2012; 32: 1054-1058
- 11) S.Cointe, et al, Standardization of microparticle enumeration across different flow cytometry platform: results of a multicenter collaborative workshop, J Thromb Haemost, 2017; 15: 187-93

改訂記録

版数	作成日	作成者	変更内容	変更理由等
第 1.0 版	2017/12/28	近藤 弘	新規作成	
第 1.1 版	2018/ 2/18	近藤 弘	SOP 検証結果による追記修正	2016 年サーベイ結果の反映
第 1.2 版	2018/ 6/20	近藤 弘	SOP 検証結果による追記修正	ワーキングメンバーによる検討結果の反映 (2018 ポストサーベイ結果の反映：前方散乱 角度サイズ下限設定など)
第 1.3 版	2018/ 7/30	近藤 弘	SOP 検証結果による追記修正	ワーキングメンバーによる検討結果の反映（攪 拌後の試料の均一状態の経時変化への対応、 フロー条件の違いによる標準ビーズ分解能へのサ イズ下限設定の対応）
第 1.4 版	2019/1/21	近藤 弘	SOP 検証結果による追記修正	ワーキングメンバーによる検討結果の反映（バツ クグラウンドの確認について）
第 1.5 版	2019/ 7/22	鶴田一人	フローサイメーター機種依存部分を SOP から分離、表紙とヘッダ訂正	ワーキングメンバーによる検討結果の反映

<測定設定>

Threshold は FSC の最少レベル: 200

流量(μL/分)：MED 60

流量フローレート(events/s)：10000 以下

<プロトコール作成>

1. 取り込み用 Global Sheet の作成

- ① メニューバーの Experiment より New Experiment をクリックし、Experiment Template リストより、Blank Experiment with tube を選択する。
- ② ①の Experiment アイコン(本マーク)が開いた状態になるので、右クリックし rename で名称を JSLH PLT Count 等にする。
- ③ Experiment アイコン(本マーク)の下層の **Cytometer Settings** をクリックし、Cytometer ウィンドウの **Parameter タグ**を開き、測定に必要なパラメーターとモード(FSC-H, FSC-A, SSC-H, SSC-A, FITC-A, FSC-Log モード, SSC-Log モード) にチェックマークを入れる。
- ④ ③の Cytometer Settings の下の Specimen_001 を右クリックし、rename で名称を Beads 等にし、左 + マークをクリックして下層の tube を表示する。
- ⑤ Browser 上部バーの tube アイコンをクリックし、tube を追加する。
- ⑥ 2 つの tube 名を 075um beads, 1um beads 等に右クリック rename で変更する。
- ⑦ Browser 上部バーの Specimen(注射器)アイコンをクリックし、測定サンプル用の Tube 付 Specimen を作成する。
- ⑧ Specimen(注射器)の左 + をクリックし、測定サンプル用の Tube を表示させる。
- ⑨ チューブ数を必要に応じて、Browser 上部バーの tube アイコンで追加する。
- ⑩ **Global Sheet 1** にビーズ測定に必要なプロット（FSC-H/SSC-A, FSC-H ヒストグラム）と FSC-H/SSC-A プロット内にビーズのシングレットをゲートするポピュレーション **P1** を作成する。プロット内を右クリックし、**show Population Hierarchy** パネルを表示し、パネル内の P1 をアクティブにして名称を P1 から singlet beads に Inspector で変更する。
- ⑪ FSC-H ヒストグラム内を右クリックし、**Show Population** より、singlet beads を選択する。
- ⑫ FSC-H ヒストグラム内をクリックし、引き続きマーカーのアイコンをクリックして、P1 マーカーを作成する。
- ⑬ 再度 FSC-H ヒストグラムを右クリックし、**Create Statistics** を選択し **Statistics** を表示する。引き続き Statistics を右クリックし、**Edit Statistics view** を選択し、Edit パレット内の **population タグ**より singlet beads と P1 にチェックマークを入れ、さらに **Statistics タグ**より FSC-H の Median, Min, Max にチェックマークを入れる。それ以外のチェックは外す。
- ⑭ Browser 上部バーの **Global Sheet アイコン**をクリックし、**Global Sheet 2**を追加し、サンプル測定に必要なプロット（FSC-H/SSC-A, FSC-H/FITC, FSC-H ヒストグラム）を作成する。

- ⑮ 作成した FSC-H/FITC プロットに□ゲートで CD41/CD61 FITC 陽性血小板ポピュレーション<PLT(ALL)>、CD41/CD61 FITC 陰性赤血球ポピュレーション（RBC） および同時通過イベント用ポピュレーション（RBC+PLT）を作成する。ポピュレーションの名称の変更は⑩と同様。
- ⑯ FSC-H ヒストグラムを右クリックし、**Show Population** より、**PLT(ALL)**を選択する。
- ⑰ 引き続き、右クリックし、**Show Population Hierarchy** を表示し、PLT(ALL)をクリックしアクティブにした状態で、FSC-H ヒストグラムに 1μ以上のマーカー；**PLT (>1um)** を作成する。ポピュレーションの名称の変更は⑩と同様。

2. 解析用 Normal Work Sheet の作成

- ① Global Sheet 画面の左上の Normal Work Sheet（解析用シート）への切り替えアイコンをクリックし **Sheet_001** を表示させる。
- ② Browser 内の Global Sheet 2 アイコンの下層の **Analysis** を右クリックし、**Copy** を選択する。
- ③ Browser 内の測定用サンプルのチューブアイコン(1-⑧)を右クリックし、**Paste** する。（Global Sheet2 と同じプロットが作成される）
- ④ プロットの一つをアクティブにし、右クリックで **Create Statistics** を選択する。
- ⑤ Statistics を右クリックし、**Edit Statistics view** を選択し、Statistics view の **population タグ**の population、PLT(ALL)、RBC、RBC+PLT、PLT(>1um) と Event にチェックマークを入れる。必要に応じて、Header タグで表示させたいサンプル名(Specimen)や測定日等にチェックマークを入れ、それら以外はチェックマークを外す。
- ⑥ 解析用シートのプロットや統計表示のレイアウトを調整する。（Tube アイコンの下に Analysis が作成されるので、必要に応じて、**Analysis** を右クリックし、Export より Save Analysis template で解析テンプレートを保存する）

3. ラベルおよび取り込み最終条件の設定

- ① メニューバーの Experiment より、**Experiment Layout** を選択し、**Label タグ**で測定サンプル用のチューブの FITC 蛍光パラメーターのカラムに **CD41/CD61** を入力する。
- ② **Acquisition タグ**を表示し、Beads の 075um beads と 1um beads のチューブに、**5000** event と入力する。
- ③ 測定用サンプルチューブについては、time カラムに **30sec**を入力し、イベントを 10,000 から 1000,000 に変更する
- ④ Experiment Layout を閉じる。

4. Experiment テンプレートの作成

- ① Browser 内の Experiment アイコンを右クリックし、Export より **Experiment Template** を選択する。
- ② JSLH PLT count 等の名称を入力し、専用テンプレートとして保存する。

<サンプル測定のための機器セッティング>

1. FSC, SSC 感度(PMT 電圧)の微調整および 0.75μビーズによる FSC-H Threshold 値の設定

- ① メニューバーの Experiment より **New Experiment** をクリックし、Experiment Template リストより、**専用テンプレート(JSLH PLT count 等)**を選択し、Experiment を作成する。
- ② ①の Experiment アイコン(本マーク)が開いた状態になるので、必要に応じて右クリックし rename で名称を変更する。
- ③ Experiment アイコン(本マーク)の下 **Cytometer Settings** を右クリックし、**Link Setup** より **Lyse Wash** の機器設定を選択し Apply をクリックする。
- ④ 引き続き、**Cytometer Settings** を右クリックし、**Unlink Lyse Wash** をクリックし、引き続き OK をクリックする。
- ⑤ Global Sheet 2 を表示し、測定用サンプルのチューブアイコンの左にあるポインターをクリックし緑にした状態で、測定用サンプルを機器にセットし、**Acquisition Dashboard 内の Acquire Data** ボタンをクリックしてサンプルを流す。
- ⑥ FSC-H/SSC-A プロット内の赤血球集団が全てプロット内に表示されるように、**Cytometer ウィンドウの Parameter タグ内**の FSC, SSC の voltage 値を調整する。
- ⑦ 引き続き、**Cytometer ウィンドウの Threshold タグ内**の FSC Threshold の値を **200** にする。
- ⑧ Global Sheet 1 を表示し、Beads Specimen (注射器マーク)の下層の 075um beads tube アイコン左のポインターをクリックして緑にする。
- ⑨ 0.75μビーズのチューブをセットする。
- ⑩ ビーズの取り込み速度が安定したら、**Record** ボタンをクリックしてデータを取り込む。
- ⑪ Singlet beads のゲートを調整し、FSC-H ヒストグラムの P1 マーカーをビーズヒストグラムに合わせて調整する。
- ⑫ P1 マーカーの上限を 0.75μビーズの分布の上限にセットし、Stats 表示の **Max 値**を書き出す。
- ⑬ Experiment アイコン(本マーク)の下 **Cytometer Settings** をアクティブにし、Cytometer ウィンドウ内の **Threshold タグ内、FSC Threshold 値**を 200 から ⑫0.75μビーズの上限(Max 値)に変更する。

2. 1μビーズによる FSC-H 1μ以上血小板領域の設定

- ① Beads Specimen (注射器マーク)の下層の 1um beads tube アイコン左のポインターをクリックして緑にする。
- ② 1μビーズのチューブをセットし、**Acquisition Dashboard 内の Acquire Data** ボタンをクリックして、ビーズの取り込み速度が安定したら、**Record** ボタンをクリックしてデータを取り込む。
- ③ Singlet beads のゲートを調整し、FSC-H ヒストグラムの P1 マーカーをビーズヒストグラムに合わせて調整する。
- ④ P1 マーカーの下限を 1μビーズの下限にセットし、Stats 表示の **Min 値**を書き出す。

- ⑤ Global Sheet 2 を表示し、FSC-H ヒストグラム内の 1 μ m 以上のマーカー；PLT (>1 μ m) の左端のチャンネル値を
④1 μ m ビーズの下限值(Min 値)に設定する。

<サンプル測定・データ解析>

- ① 測定サンプル用 Specimen の下層の Tube アイコンの左、ポインターをクリックし緑にする。
- ② Acquisition Dashboard 内の Flow Rate が MED になっていることを確認し、事前によく攪拌した測定サンプルのチューブを機器にセットする。
- ③ ただちに **Acquisition Dashboard 内の Acquire Data** ボタンをクリックして、Flow Rate が安定したら、直ぐに **Record** ボタンをクリックしてデータ取り込みを行う。※②、③は 15 秒以下で行う。
- ④ 30 秒間の取り込みが終了したら、チューブを外す。
- ⑤ ①～④を繰り返し、残りのサンプルチューブの取り込みを行う。
- ⑥ 取り込みが完了したら、Global Sheet 画面の左上の Normal Work Sheet (解析用シート)への**切り替えアイコン**をクリックし Sheet_001 を表示させる。
- ⑦ FSC-H/FITC プロット内の PLT(ALL), RBC, RBC+PLT ゲートを必要に応じて調整し、PLT(ALL)の血小板カウントが 1000 イベント以上になっていることを確認する。
※1000 イベントになっていない場合の対処方法：
 - a. 該当する測定サンプルのチューブをボルテックスでよく攪拌後、機器にセットする。
 - b. 再度該当サンプルのチューブアイコンをアクティブにし、左側のポインターを緑にして、ただちに **Acquisition Dashboard 内の Acquire Data** ボタンをクリックする。
 - c. フローレートが安定したら直ぐに **Record** ボタンをクリック、引き続き表示されるパレット内の **Append** ボタンをクリックする。さらに 30 秒間、データ取り込みが行われ FCS ファイルにイベント情報が追加される。※調整したゲートを他のチューブのプロットに反映する方法：
 - a. 調整したゲートをクリックしアクティブにし、さらに右クリックで **Apply gate coordinate** をクリックする。
 - b. 引き続き Current Experiment あるいは Current Specimen を選択する。
同じプロット内の同じゲートについて調整後のゲートになる。
- ⑧ 統計結果データより、血小板・赤血球の比率を算出し、換算式より血小板カウント（細胞数/ μ L）を算出する。