

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：Navios™, Navios EX™

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>

Discriminator は FSC の最少レベル: 1 以上

フローレート(μL/分)： High 60

流量フローレート(events/s)： 25000 以下

<プロトコル作成>

- ① File から New-New Protocol を選択し、新規プロトコルを開く。
- ② Cytometer control を開き、Parameters ボタンをクリックし、全てのチェックを外す。
- ③ 下記の順番で、チェックを入れる Integral の FS-Log, SS-Log, FL-1-Log, Peak の FS-Log, SS-Log, Time
(Selected Parameters で順番を確認する)。
- ④ FS の Collection Angle を N(Narrow mode)へ変更する。
- ⑤ OK, Yes の順でボタンをクリックし、プロトコル名称 (例 JSLH PLT.pro) を入力して、Save ボタンをクリックする。
- ⑥ 画面上の SS vs FS プロットのリージョン A を選択し、Delete キーで削除する。
- ⑦ プロット内で右クリックし、Format Plot を選択する。X parameter を FS-PEAK LOG, Y parameter を SS INT LOG に変更して、OK ボタンをクリックする。
- ⑧ Color dot plot をクリックし、X parameter を FS-PEAK LOG, Y parameter を FL1 INT LOG に変更して、OK ボタンをクリックする。
- ⑨ 3.4 【2】の図を参照して、FS-PEAK LOG/FL-1 プロットに Rectangular Region を 3 個作成し、各リージョン名を変更する。
- ⑩ Histogram plot をクリックし、Parameter を FS Peak LOG へ、Gate を PLT(ALL)に変更し、OK をクリックする。Single Linear Region を作成し、リージョン名を PLT(1um)へ変更する。
- ⑪ FS-PEAK LOG/SS INT LOG プロットの X,Y 軸の 2ch あたりに Rectangular Region を作成する (リージョン A)。
- ⑫ Histogram plot をクリックし、Parameter を FS Peak LOG へ、Gate を A に変更し、OK をクリックする。
- ⑬ Cytometer control ボックスで、FS の Discr1 を 100→1 へ変更し、Acquisition Time と Elapse Time を 300→30 (秒) へ変更する。また、Flow Rate を High に変更する。
- ⑭ Save protocol ボタンをクリックして、プロトコルを上書き保存する。

<サンプル測定のための機器セッティング>

- ① 上記で作成したプロトコル (例：JSLH PLT.pro) を呼び出し、0.75μm ビーズを測定する。FS と SS の感度を変更し、A リージョン内に入るように調整する (0.75μm ビーズ集団が Discr1 以下にならず、Discr1 近辺にあることを確認する)。
- ② Save protocol をクリックして、上書き保存を行う。
- ③ 再度、プロトコル (例：JSLH PLT.pro) を呼び出し、FL1 パラメーターに CD41+CD61-FITC を入力し、測定を開始する。3.4 【2】の図を参考に FL-1 の感度を調整する (必要があれば SS も調整する。FITC のみの single color 測定の為、蛍光補正は不要)。
- ④ Save protocol をクリックして、上書き保存を行う。
- ⑤ 1μm ビーズを測定し、FS Peak LOG におけるピーク分布の下限值チャンネルを記録する (3.2.3(3)の図を参照)。

<サンプル測定・データ解析>

1. サンプル測定

- ① New Worklist をクリックして、Acquisition Manager をクリアする。
- ② 上記で作成したプロトコルを Resource Explorer より選択し、Drag & Drop で Acquisition Manager へ必要本数分呼び出す。
- ③ 使用するカローセルのカローセル番号と Sample ID を入力する。
- ④ 1 秒間 3 回攪拌したサンプルチューブ（FCM 用チューブ）をカローセルに並べる。
- ⑤ Automatic mode になっていることを確認し、スタートボタンをクリックして、測定を開始する。
- ⑥ 必要に応じて、FS-PEAK LOG/FL-1 プロット内の PLT(ALL), RBC, RBC+PLT のリージョンを調整し、PLT(ALL)内の血小板カウント数が 1000 イベントに達していない場合は、同一チューブを再度測定する。

2. データ解析

- ① 測定した LMD ファイルを Kaluza ソフトに展開する。PLT(ALL)にゲートされた FS Peak LOG ヒストグラムのリニアリージョン(PLT(1um))の左端チャンネル数を 1um ビーズの Median 値に設定し、必要に応じて FS-PEAK LOG /FL-1 プロット内の PLT(ALL), RBC, RBC+PLT のリージョンを調整する。
- ② Kaluza 上のプロトコルのみ次のデータセットへコピー（Drag & Drop）することにより、同一リージョン位置にて解析することができる。
- ③ PLT(ALL)内のイベント数が 1,000 個に達せず、2 回測定を実施したデータは、両データを選択し、「データセットの結合」をクリックすることにより、一つのデータとして結合（Merge）されるので、結合されたデータセットを用いて解析を行う。