

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)

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

1. 試薬の準備

1.1 使用試薬

- ・FITC 標識 CD41a 抗体（BD バイオサイエン社、Cat.340929）
- ・FITC 標識 CD61 抗体（BD バイオサイエン社、Cat.348093）
- ・30w/v%アルブミン溶液、ウシ血清由来、脂肪酸フリー（BSA 和光純薬、Cat.017-22231）
- ・直径 0.75 μ m 標準粒子
（Nanobead NIST Traceable Particle Size Standard, 750nm：ポリサイエンス社、Cat.64024-15）
- ・直径 1.0 μ m 標準粒子
（Microbead NIST Traceable Particle Size Standard, 1.00：ポリサイエンス社、Cat.64030-15）
- ・D-PBS(-)
- ・0.2 μ m滅菌フィルタ
- ・マイクロピペット A（2-20 μ L）
- ・マイクロピペット B（10-100 μ L）
- ・マイクロピペット C（100-1,000 μ L）
- ・マイクロピペット用チップ（A,20 μ L 用、B,100 μ L 用、C, 1,000 μ L）
- ・保存用チューブ
- ・シリンジ
- ・シース液
- ・フローサイトメーター測定チューブ（Falcon ラウンドチューブ等）
- ・汎用フローサイトメータ（FCM）
- ・試験管立て
- ・キムワイブ
- ・ボルテックスミキサー
- ・タイマー
- ・自動血球分析装置

2.試薬準備

2.1 0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)加リン酸緩衝食塩水（PBS）作製

調製に使用する器具/試薬

- ・1mL ピペット
- ・30w/v%アルブミン溶液、ウシ血清由来、脂肪酸フリー（BSA）
- ・D-PBS(-)
- ・保存用チューブ
- ・シリンジ
- ・0.2 μ m滅菌フィルタ

操作

- 1) ウシ血清アルブミンを 1.5mL 採取し、PBS 500mL に入れて混和し、0.1%BSA 加 PBS を作製する。
- 2) 用時、シリンジに 0.2 μ m滅菌フィルタをセットし、濾過滅菌する。
※BSA と PBS の混合および 0.1%BSA 加 PBS の分注はクリーンベンチで行う。

※0.1%BSA 加 PBS は冷蔵(4℃)で保存可能であるが、必ず用時、室温に戻し濾過滅菌後使用する。

2.2 標準粒子の調整（サイズマーカー用）

調製に使用する器具/試薬

- ・直径 0.75μm 標準粒子（ポリサイエンス社、Cat.64024-15）
- ・直径 1.0μm 標準粒子（ポリサイエンス社、Cat.64030-15）
- ・測定に用いる機器のシース液（BD FACSFlow または IsoFlow™シース液）
- ・保存用チューブ
- ・シリンジ
- ・0.2μm滅菌フィルタ

操作

- 1) シリンジに 0.2μm滅菌フィルタをセットし、シース液を滅菌濾過する。
- 2) 濾過滅菌済みシース液を用いて、各標準粒子を 1/10⁵%（100,000 倍）に調整する。

2. 測定試料の調製

2.1 使用する器具

- ・FITC 標識 CD41a 抗体（BD バイオサイエンス社、Cat.340929）
- ・FITC 標識 CD61 抗体（BD バイオサイエンス社、Cat.348093）
- ・0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)加リン酸緩衝食塩水（PBS）
- ・調整済み標準粒子
- ・マイクロピペット A（2-20μL）
- ・マイクロピペット B（10-100μL）
- ・マイクロピペット C（100-1,000μL）
- ・マイクロピペット用チップ（A.20μL 用、B.100μL 用、C.1,000μL）
- ・試験管立て
- ・キムワイプ

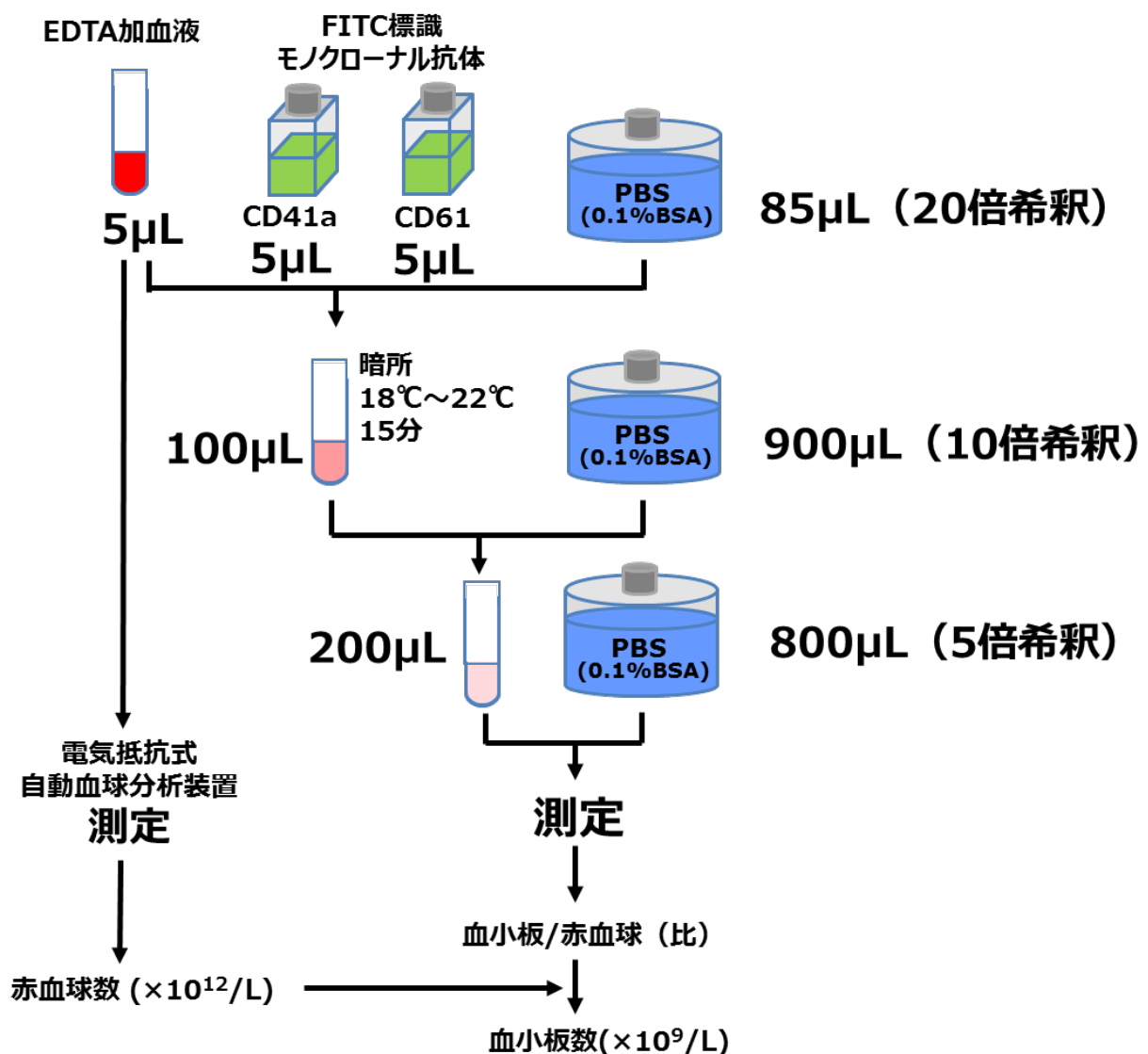
2.2 血小板絶対数算定用抗体染色試料の調製

- 1) EDTA-2K 加血液を使用し¹⁾、採血後、血小板凝集を認めないことを確認する。
- 2) 0.1%BSA 加 PBS および FITC 標識 CD41a,CD61 抗体試薬を室温に 15 分以上放置し、室温に戻す。
- 3) マイクロピペット A にチップを装着し、チップ内壁を FITC 標識 CD41a 抗体で 3 回程馴染ませた後、5μL 採取してフォワード法でチューブの管底に入れる。
- 4) チップを変えて、FITC 標識 CD61 抗体についても、同様に 5μL 採取し、フォワード法でチューブの管底に入れる。
- 5) マイクロピペット B で、0.1%BSA 加 PBS を 85μL 採取し、FITC 標識 CD41a,61 抗体の入っているチューブに入れる。（フォワード法）
- 6) 血液をよく混和する。
- 7) マイクロピペット A で血液を 5μL 採取し、チップの表面をキムワイプで拭き取り、FITC 標識 CD41,61 抗体および 0.1%BSA 加 PBS の入っているチューブに入れる（リンス法）。

- 8) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 9) 室温(18–22℃)¹⁾、暗所にて 15 分間静置する(染色試料)。室温は記録する。
- 10) マイクロピペット C で 0.1%BSA 加 PBS を 900μL 採取し、染色試料に加える(染色試料の希釈 1 回目)。
- 11) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 12) マイクロピペット C で 10)の試料を 200μL 採取し、別の空チューブに添加する。
- 13) マイクロピペット C で 0.1%BSA 加 PBS を 800μL 採取し、11)の試料に加える。(染色試料の希釈 2 回目)

※検体の最終希釈倍率は 1,000 倍になる。

[試料調製の手順]



3.測定

- ・自動血球分析装置
- ・フローサイトメーター測定チューブ（Falcon ラウンドチューブ等）
- ・汎用フローサイトメータ（FCM）
- ・試験管立て
- ・ボルテックスミキサー

3.1 自動血球分析装置による赤血球数算定

- 1) EDTA-2K 加血液を 8～10 回転倒混和する。
- 2) 自動血球分析装置で赤血球数を算出する。

3.2 フローサイトメーター機器調整方法および測定条件

※フローサイトメーターで得られたシグナル（電圧パルス）の高さを Height（Peak）、シグナルの面積を Area（Integral）と表記する。

※測定流速を約 60 μ L/分のモードに設定する。（FACSCanto II の場合 MED, Navios の場合 High）
（補足説明参照）

3.2.1 前方散乱光（FSC/FS）,側方散乱光（SSC/SS）パラメーターの調整

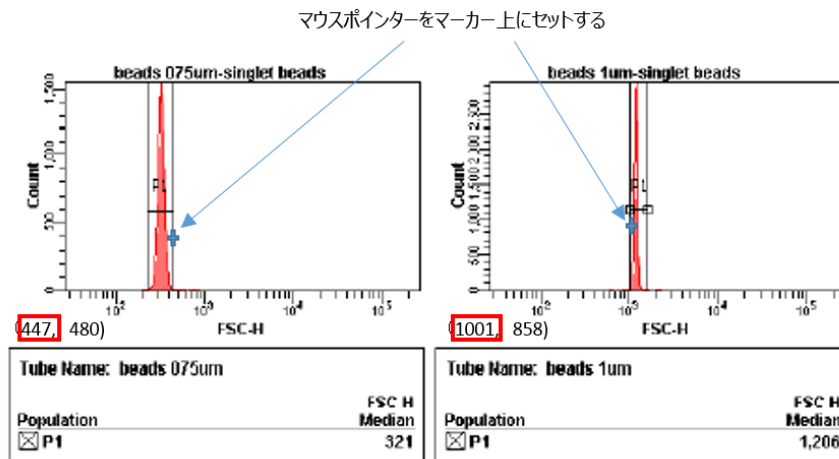
- 1) 前方散乱光取得角度が 0°-10°前後であることを確認する。
- 2) FSC/FS、SSC/SS パラメーターを Log モードに設定する。
- 3) Threshold/Discriminator は FSC/FS の最少レベルに設定する。
- 4) 希釈染色試料を流しながら、(FSC/FS)-Height(H)/(SSC/SS)-Area(A)スキャットグラム内に赤血球および血小板が収まるように、FSC と SSC の電圧を調整する。
※Threshold/Discriminator は、必ず最低レベルに設定する。最低レベルでもビーズのピークが検出できない場合は、電圧を調整し、3.2.1 から再度設定する。

3.2.2 FSC/FS Threshold/Discriminator の調整

- 1) 直径 0.75 μ m 標準粒子を total 5000 個取り込む。
- 2) (FSC/FS)-H/(SSC/SS)-A スキャットグラム内のシングルビーズ集団をゲートし、FSC/FS-H ヒストグラムに展開する。
- 3) FSC/FS-H ヒストグラムに表示されたビーズ分布の上限チャンネル値（下図、左のヒストグラム赤枠内の値）を FSC/FS Threshold/Discriminator の値に設定する。

3.2.3 FSC/FS-H 血小板下限チャンネル値の設定

- 1) 直径 1.0 μ m 標準粒子を total 約 5000 個取り込む。
- 2) (FSC/FS)-H/(SSC/SS)-A スキャットグラム内のシングルビーズ集団をゲートし、FSC/FS-H ヒストグラムに展開する。
- 3) FSC/FS-H ヒストグラムに表示されたビーズ分布の下限チャンネル値（下図、右のヒストグラム赤枠内の値）を FSC/FS)-H/(SSC/SS)-A スキャットグラム内の 1 μ m 以上血小板の FSC-H 下限値にする。



3.3 測定および測定条件

測定条件

- 1) 血小板数測定は、微小粒子の影響を受けるため、バックグラウンド測定し、測定への影響がないことを確認する。
※バックグラウンド測定には、微小粒子の影響がないシース液などを用いる。
- 2) 試料を攪拌し、フローサイトメーターで測定する。
※機器のカウントレート（速度）の安定性などを確認すること。
※激しい攪拌は、血小板が活性化・破壊するため、ボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌または同等程度の強さで行う。
- 3) 流速はフローレートが 60 μ L/min 程度にて測定する。
※必ず各機器のサンプル取り込み速度の上限を超えないこと。（補足説明参照）
- 4) 取り込み時間は、30 秒間であつ、血小板カウントが 1000 以上になっていることを確認する。
また、必ず試料混和から測定終了までを 45 秒以内に終えること。（補足説明参照）
※本条件では、理論上血小板数 35×10^9 /L 程度以上の検体において 1 回で測定が可能であるが、取り込み血小板イベントカウントが 1000 イベント以上にならなかった場合は、チューブをボルテックスで良く攪拌後、再度 30 秒の取り込み終了条件で追加測定し、累積イベントカウントが 1000 イベント以上になるようにデータを取り込む。（資料参照）

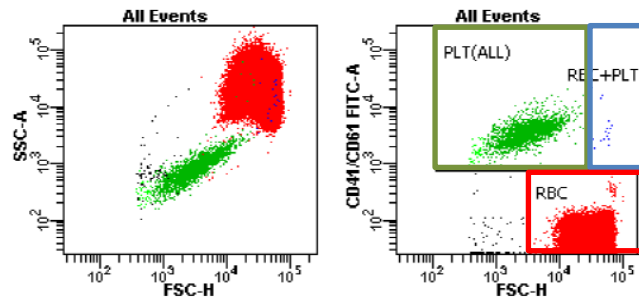
3.4 ゲート設定

【1】(FSC/FS)-H/(SSC/SS)-A プロット

血小板と赤血球の全体が表示されていることを確認する。(ゲートは設定しない)

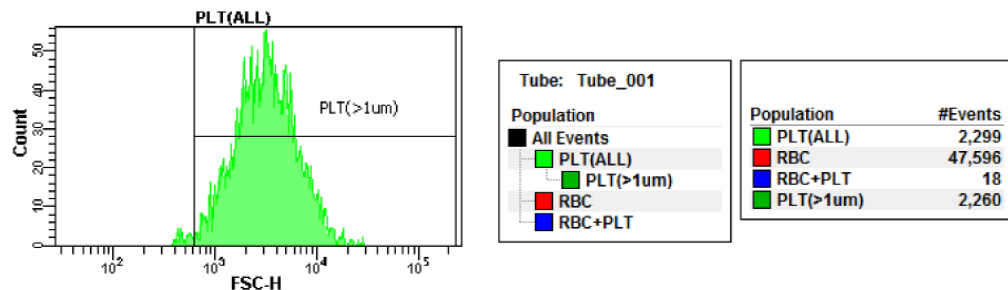
【2】(FSC/FS)-H/FITC(CD41+CD61) プロット

下図(右)のように CD41a,CD61 陽性の血小板集団、陰性の赤血球集団および同時通過にゲート PLT(ALL), RBC, PLT+RBC のゲートを設定する。



【3】 FSC/FS-H ヒストグラムプロット

【2】で設定した PLT(ALL)の FSC/FS-H ヒストグラムを作成し、直径 1.0μm 標準粒子で算出した血小板の FSC/FS-H 下限値(3.1.3 参照)による 1μm以上 PLT ゲート、PLT(>1um)を設定する。(補足説明参照)



4 血小板絶対数の算出

(FSC/FS)-H/FITC(CD41+CD61) ドットプロットと FSC/FS-H ヒストグラムより算出した血小板および赤血球、同時通過のイベント数と自動血球分析装置を用いて算出した赤血球数から以下の式を用いて算出する。

$$\text{PLT 数比率} = (\text{1}\mu\text{m以上 PLT イベント数} + \text{同時通過イベント数}) / (\text{RBC イベント数} + \text{同時通過イベント数})$$

$$\text{PLT 絶対数 (} \times 10^9 / \text{L)} = \text{PLT 数比率} \times \text{赤血球数 (} \times 10^{12} / \text{L, 自動血球分析装置)}$$

5 機器設定

各メーカーから提供される資料をご参照願います。該当機種がない場合には、各メーカーにお問い合わせください。

※以下、補足説明

1) 測定条件

・血小板サイズ下限閾値設定の条件

種々の刺激により活性化やアポトーシスにより細胞外小胞(EV)が細胞からリリースされる²⁾。血小板からは凝固活性を持つ膜小胞体が形成される。血小板膜小胞体は、血小板由来マイクロパーティクル(PDMP)と呼ばれており、血栓性疾患のみならず健常人でも出現することが知られている³⁾。血小板測定においては、血小板と PDMP を区別することが重要である。PDMP は、血小板表面マーカーが陽性で、かつ 0.1–1 μ m である^{2),4)}。国際血栓止血学会(ISTH)では、2010 年にフローサイトメーターのサイズ最小検出感度を配慮して、PDMP のサイズを 0.5–1 μ m と規定して、標準ビーズの前方散乱光によるサイズ設定方法が示された⁵⁾。PDMP 測定の標準化について検討が進み⁶⁾、血小板の大きさについては下限が 1 μ m となった。2001 年に提案された血小板数測定基準分析法（ICSH/ISLH.2001 法）⁷⁾では血小板サイズ下限閾値設定の記載はなかったが、当時のフローサイトメータを用いた場合には 1 μ m が大きさの最小検出感度となることが記述されていた。近年では、フローサイトメーターの粒径検出感度の向上が図られたことにより、ICSH/ISLH 法が検討された当時の状況^{8),9)}を再現するためには、1 μ m 未満のイベントを除去するための下限設定ゲートが必要となり、2013 年の JSLH 6 社サーベイにおいて設定の有用性が検証され、ISTH の定義を用いる有用性が明らかになった。

2013 年までの JSLH6 社サーベイ結果は収束傾向にあったが、2016 年の JSLH6 社サーベイではフローサイトメーターの機種間差や機器間差が大きくなり、標準法として値付けに使用できない程度に至り、機種および機器間差の原因を調査した結果、標準化のためには、次の 2 条件を配慮する必要があることが分かった。

・前方散乱光取得角度の条件

最新のフローサイトメーターでは粒径検出感度の向上を図る目的で前方散乱光取得角度が多様化したことにより、その設定よりプロットパターンが大きく異なっていた⁹⁾。そのため、基準分析法を測定する場合には、散乱角度に応じた標準ビーズと下限ゲート設定が必要な状況となっている¹⁰⁾。前方散乱光取得角度を標準化して測定する必要がある。本法では、フローサイトメータの各社で利用可能な前方散乱角度である 0～10°程度の設定で 1 μ m ゲート設定を行うことで、機器間差および機種間差が解消することが判明したため、それを採用した。

・測定チューブ内における細胞沈降の影響を排除するための条件

上述の原因に加えて、測定チューブ内における細胞沈降の影響も原因となっていた。そのため、流速とサンプル取り込み処理時間（フローレート／サンプルレート）について、細胞沈降による影響をうけない範囲で適切な設定にする必要がある。

本方法は、血小板/赤血球比率を基に血小板数を算出する間接法である。赤血球は、血小板に比して比重が高いため 45 秒以上放置すると沈降し、測定値に影響することが分かった。一方で、測定精度を確保するため血小板イベントカウントを 1000 個以上になるように測定することが推奨されている⁷⁾ ため、本法では、測定時間を 30 秒間とし、検体攪拌から測定データ取り込み開始までを 15 秒以下とする。

測定時間を短くした上で血小板イベントカウントを 1000 個以上確保するために、測定流速は、約 60 μ L/分で行い、1.0 μ m 標準粒子で、%CV が 5 程度であることを確認する。サンプル取り込み処理速度の上限は、測定機器の処理能力により異なっている。ICSH/ISLH.2001 法⁷⁾で検討に用いられた機器のサンプル取り込み処理速度の上限が機器測定性能 6000 個/秒（実質測定速度 3300 個/秒）であったことから、3,000/秒が推奨された⁸⁾が、機器の進歩により、そ

の値は飛躍的に向上したため、本法においては測定に使用する機器のサンプル取り込み処理時間の上限は、10000events/秒以上の機器を想定している。

この条件で、1000 倍で希釈した試料を流速 60 μ L/分（1.0 μ L/秒）で血小板算定を行う場合、フローレートの制限は主に赤血球数で決まる。赤血球数が 8.00(10^{12} /L)でも、フローレートは 8000 個/秒となり、10000 個/秒に対して余裕があるため、通常の検査検体においてはフローレートが問題になることはない。また、血小板イベント総数については、取り込み時間が 30 秒で制限されるため、低値血小板検体においては、下記の通り追加計測をする必要がある。1 回測定で測定可能な血小板数を概算すると、血小板数 35(10^9 /L)以上までは、30 秒で測定できる。それよりも血小板数が低い検体では 30 秒を越えてしまうため、2 回測定の結果を合わせて採用する。

【追加取り込みの条件】

30 秒間の血小板イベントカウントが 1000 個以下の場合は、再度攪拌し追加取り込みを行う。各測定機器の測定プロトコル作成方法および追加取り込み方法について資料として記載する。

【まとめ】

本血小板測定法においては、1 μ m 以上で CD41a、CD61 陽性細胞を血小板とする。データ取り込み条件を 30 秒間とし、試料の攪拌から、機器へのセットを含め 45 秒以内で測定する。血小板の低値においては、2 回測定の結果を加算して、血小板絶対数を算出する。

2) 固定化

試料作製後すぐに測定ができない場合は、固定化し保存できる。しかし、血小板サイズが変化することから本法による血小板絶対数には用いることはできない。但し、血小板比率を指標に多施設間で機器設定の確認用として固定化検体を用いることができる。

固定化は、2.2 血小板絶対数算定用抗体染色試料の調製の 0.1%BSA 加 PBS の代わりに 0.2 μ m フィルタ濾過滅菌済み 1%ホルムアルデヒド PBS を染色試料の希釈時に使用する。

3) 報告プロット図の例

