

フローサイトメトリー法による白血球 5 分類算定法 (JSLH-Diff 法)

手順書 (Standard Operation Procedure, SOP)

機種別資料 : BD FACS CantoII™

整合規格

CLSI 評価法 : *Validation, Verification, and Quality Assurance of Automated Hematology Analyzers; Approved Standard—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, H26-A2 Vol.30 No.14, 2010.*

ICSH 評価法 : *ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting, INTERNATIONAL COUNCIL FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY, WRITING GROUP: C BRIGGS, N CULP, B DAVIS, G.D'ONOFRIO, G ZINI, S.J MACHIN, on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH), International Journal of Laboratory Hematology 36: 613–627, 2014*

JSLH 白血球分類参照法 : *Japanese Society for Laboratory Hematology flow cytometric reference method of determining the differential leukocyte count: external quality assurance using fresh blood sample, Y KAWAI, Y.NAGAI, E.OGAWA, H. KONDO on behalf of the Standardization Subcommittee for Blood Cell Counting of the Japanese Society for Laboratory Hematology (JSLH), International Journal of Laboratory Hematology 39: 202–222, 2017*

関連文献

CLSI 白血球分類参照法 : *Reference Leukocyte (WBC) Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods; Approved Standard—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, H20-A2 Vol.27 No.4. 2007*

ICSH 白血球分類参照法 : *Toward a Reference Method for Leukocyte Differential Counts in Blood: Comparison of Three Flow Cytometric Candidate Methods, Mikael Roussel,1* Bruce H. Davis,2 Thierry Fest,1,3,4 Brent L. Wood,5* on behalf of the International Council for Standardization in Hematology (ICSH), Cytometry Part A 81A: 973-982, 2012*

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	2017/10/17	近藤 弘	新規作成 : SOP 本文内に記載	
第 1.1 版	2018/1/16	近藤 弘	SOP 本文内に記載	委員会の決定事項による不足事項の追記修正 開催日 : 2017/12/05
第 1.2 版	2018/ 6/20	近藤 弘	SOP 本文内に記載	ワーキングメンバーによる検討結果の反映
第 1.3 版	2018/ 9/26	近藤 弘	SOP 本文内に記載	ワーキングメンバーによる検討結果の反映
第 1.4 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	ワーキングメンバーによる検討結果の反映

1.1 JSLH 抗体（6color パネル）

測定前に、使用する抗体試薬の性能確認を行う（図 1 参照）。

チェックリストで各分布が範囲内であることを確認する（表 1 参照）

1. 【3】 白血球プロット

CD45 陽性白血球の好中球～リンパ球が CD45 APC-H7 1000–40000 範囲にあること

2. 【4】 好中球・好酸球プロット

好中球分布の下限が CD3/16/56 FITC 300 以上であり、好中球分布が好酸球分布より高い位置であること。

3. 【5】 好酸球プロット

好酸球分布の下限が CD19/294 APC 2000 以上であり、好酸球分布が好中球分布より高い位置であること

4. 【6】 単球プロット

単球分布の下限が CD14/33 PE-Cy7 300 以上であり、単球分布が好中球分布より高い位置であること。

5. 【7】 好塩基球プロット

好塩基球が CD123 PE 1000–30000 範囲内にあること

6. 【9】 T/NK・B リンパ球プロット

B リンパ球が CD19/294 APC 1000–40000 範囲内にあること

7. 【9】 T/NK・B リンパ球プロット

T/NK が CD3/16/56 FITC 200–20000 範囲内にあること

表 1：JSLH-Diff™ 抗体試薬のチェックリスト（FACS CantoII™）

No.	確認内容：プロットと分布		判定基準：分布範囲									
	プロット (評価軸)	分布	CantoII (アドレス) Sample 1		判定 結果	CantoII (アドレス) Sample 2		判定 結果	CantoII (アドレス) Sample 3		判定 結果	
			下限	上限		下限	上限		下限	上限		
1	【3】	白血球 (CD45 APC-H7)	好中球～リンパ球	1000	40000	Pass /Fail	1000	40000	Pass /Fail	1000	40000	Pass /Fail
				Input	Input		Input	Input		Input	Input	
2	【4】	好中球・好酸球 (CD3/16/56 FITC)	好中球	300	---	Pass /Fail	300	---	Pass /Fail	300	---	Pass /Fail
				Input	Input		Input	Input		Input	Input	
			好中球、好酸球	好中球分布 ≥好酸球分布			好中球分布 ≥好酸球分布			好中球分布 ≥好酸球分布		
3	【5】	好酸球 (CD19/294 APC)	好酸球	2000	---	Pass /Fail	2000	---	Pass /Fail	2000	---	Pass /Fail
				Input	Input		Input	Input		Input	Input	
				好酸球分布 ≥好中球分布			好酸球分布 ≥好中球分布			好酸球分布 ≥好中球分布		
4	【6】	単球 (CD14/33 PE-Cy7)	単球	300	---	Pass /Fail	300	---	Pass /Fail	300	---	Pass /Fail
				Input	Input		Input	Input		Input	Input	
			単球、好中球	単球分布の下限 ≥好中球分布			単球分布の下限 ≥好中球分布			単球分布の下限 ≥好中球分布		
5	【7】	好塩基球 (CD123 PE)	好塩基球	1000	30000	Pass /Fail	1000	30000	Pass /Fail	1000	30000	Pass /Fail
				Input	Input		Input	Input		Input	Input	
6	【9】	T/NK・Bリンパ球 (CD19/294 APC)	Bリンパ球	1000	40000	Pass /Fail	1000	40000	Pass /Fail	1000	40000	Pass /Fail
				Input	Input		Input	Input		Input	Input	
7	【9】	T/NK・Bリンパ球 CD3/16/56 FITC	T/NKリンパ球	200	20000	Pass /Fail	200	20000	Pass /Fail	200	20000	Pass /Fail
				Input	Input		Input	Input		Input	Input	

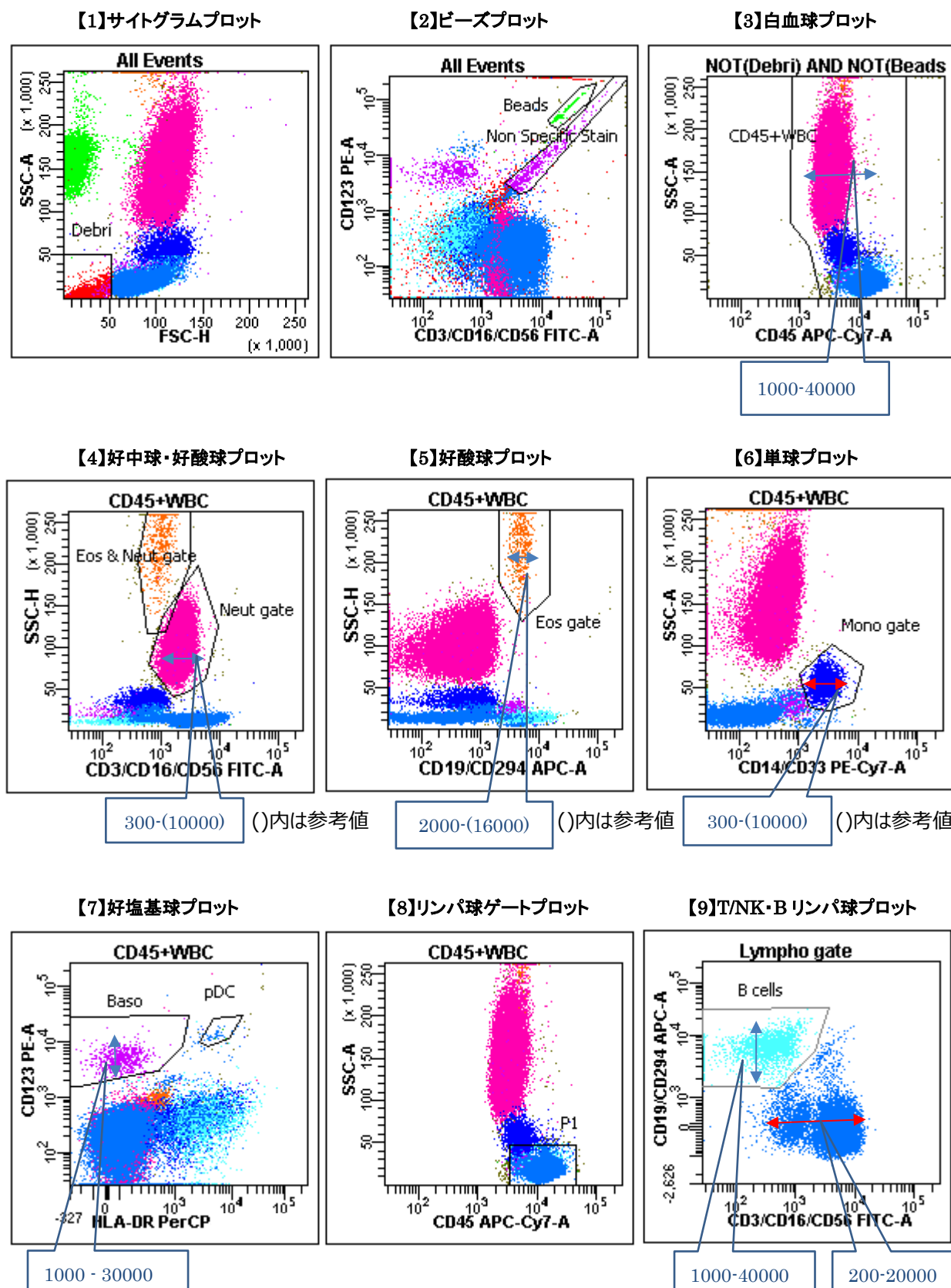


図1：JSLH-Diff™による正常白血球5分類の2次元プロット（FACS CantoII™）

1.2 溶血固定液（室温保存、用時調製）

BD FACS™ Lysing Solution を脱イオン水で 10 倍希釈して使用する。

調製に使用する器具/試薬

- ・目盛付きチューブ
- ・溶血固定液（BD FACS™ Lysing Solution、BD バイオサイエンス社、Cat.349202）
- ・脱イオン水（蒸留水）

操作：溶血固定液：脱イオン水 = 1：9 になるように必要量の溶血固定液と脱イオン水を目盛付きチューブに分注混和する。

3.測定

3.1 測定サンプル

- ・2.3 で調製した試料を測定サンプルとして使用する。

3.2.1 機器調整に使用する試薬

- ・BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads Kit (Cat.641319,642412 または 655050,655051)
- ・BD™ 7-Color Setup Beads (Cat.335775)

3.2.2 機器調整方法

3.2.2.1 機器の立ち上げ

- 1) フローサイトメーターを起動させ、Diva ソフトウェアを立ち上げ、機器のスタートアップ操作を行う。
- 2) 引き続き、Diva ソフトウェアの CST プログラムで機器の性能確認 (精度管理) を行う。
- 3) Canto クリニカルソフトウェアを立ち上げ、Setup プログラムで BD-7-color setup beads による蛍光検出器 PMT 電圧および蛍光補正值の設定を行う。
- 4) Canto クリニカルソフトウェアを閉じ、再度 Diva ソフトウェアを立ち上げ、メニューバーの“Experiment”の“New Experiment”より、白血球 5 分類算定のための JSLH 5Diff 用 Experiment Template を選択し、測定のための Experiment を作成する。

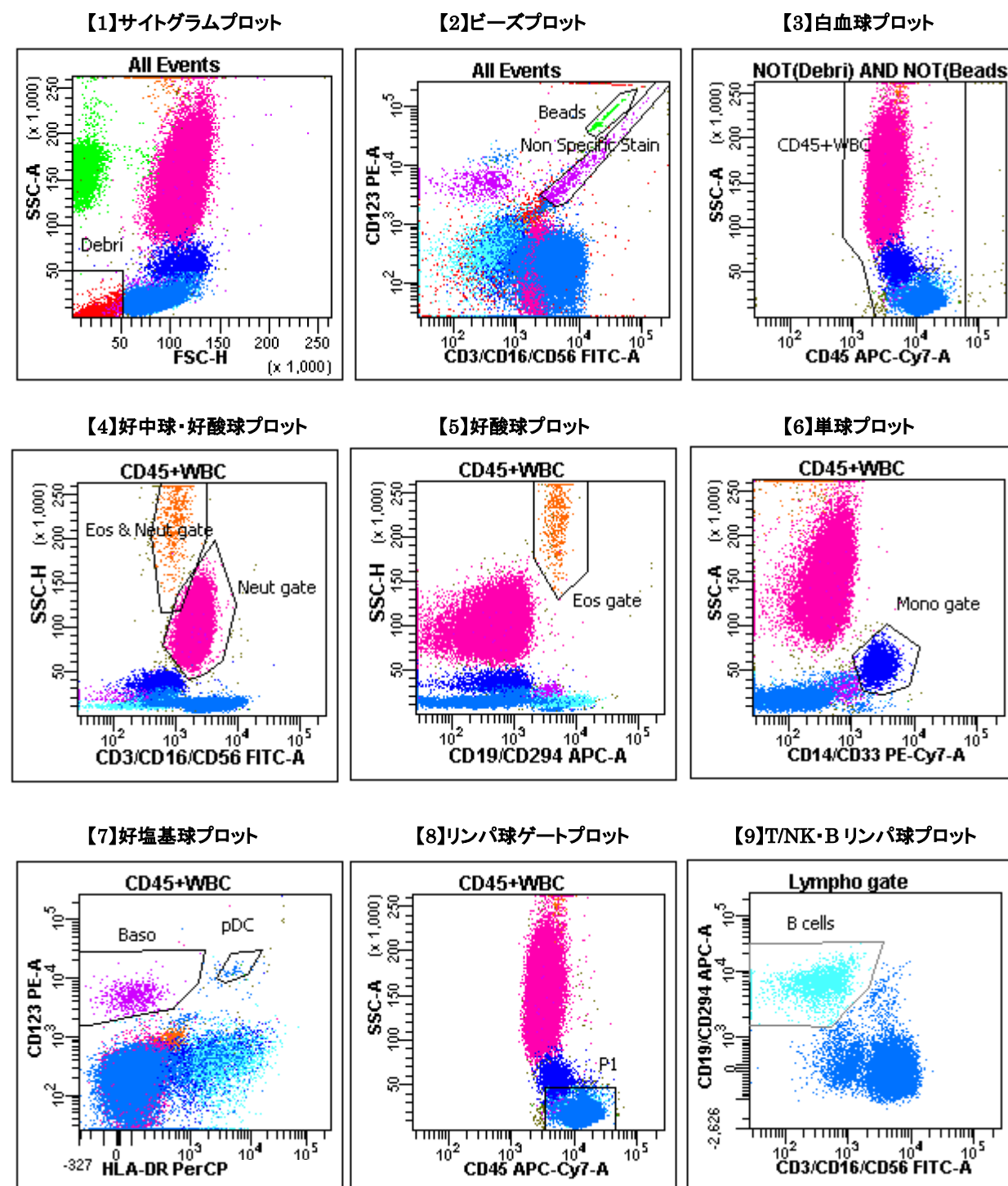
3.2.2.2 測定機器条件の設定

- 1) 作成した Experiment を開き、Experiment アイコン (本が開いている) の下の Cytometer Settings を右クリックし、Link Setup より『Lyse No Wash』を選択する。再度 Cytometer Settings を右クリックし、『Unlink from Lyse No Wash』をクリックする。これにより、6 カラー解析用に最新の蛍光検出器 PMT 電圧および蛍光補正值が設定される。
- 2) Cytometer Settings をクリックしアクティブにし、Cytometer ウィンドウの Threshold タブを開き、Threshold が APC-Cy7 または APC-H7 に設定されていて、値が“1,200”に設定されていることを確認する。
- 3) Cytometer Settings をクリックしアクティブにし、Cytometer ウィンドウの Parameter タブを開き、FSC,SSC パラメーターに、FSC-H, SSC-H が追加設定されていることを確認する。
- 4) FSC, SSC 検出器 PMT 電圧の調整 :
溶血固定した全血サンプルを流し、リンパ球集団が FSC-H ; 50000-150000, SSC-A; 10- 40000 にピーズの中心が SSC-A 160000 くらいになるように FSC, SSC 検出器の PMT 電圧値を調整する。
*3.4 ゲート設定の項【3】白血球プロットを参照し、白血球全体がプロット内に表示されていることで調整の確認をおこなう (特に SSC-A) 。
- 5) ストップカウント: 50,000 イベント (全イベント) にセットする。

3.3 測定用試料の測定

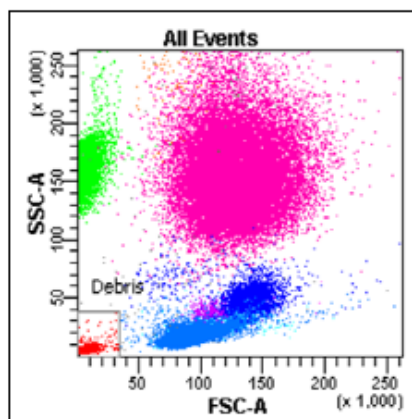
- 1) 測定用試料の Trucount™ チューブを 1 秒間 3 回攪拌後、フローサイトメーターにセットする。
- 2) 注射器マークの左、+マークをクリックし、下層の Tube アイコンを表示させ、チューブアイコンの左にあるポイントをクリックして、緑 (アクティブ) にする。
- 3) Acquisition Dashboard 内の Acquire Data ボタンをクリックし、測定を開始する。
- 4) 必要に応じて、Acquisition Dashboard 内の Threshold Rate が 2000 events/sec 以下になるように、Flow Rate (流速) を High か Medium に設定変更する。
- 5) イベント表示が安定したら、Record ボタンをクリックしデータの取り込みを行う。

3.4 ゲート設定

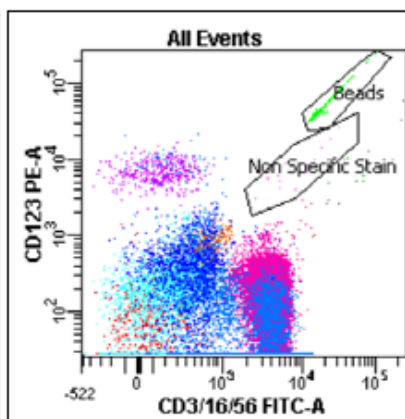


[JSLH-Diff™ オリジナルカクテル抗体による正常白血球5分類の2次元プロット]

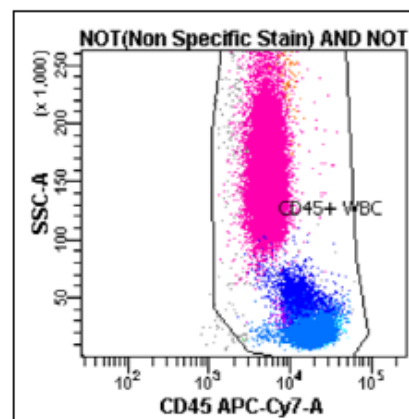
【1】サイトグラムプロット



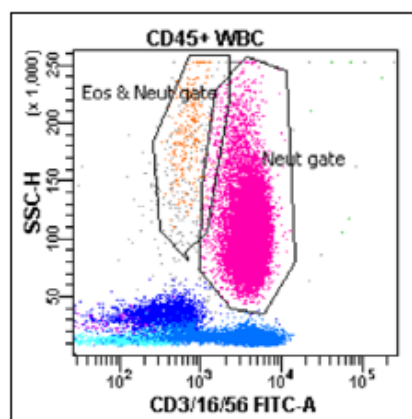
【2】ビーズプロット



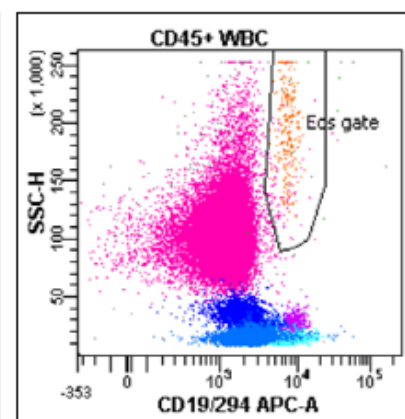
【3】白血球プロット



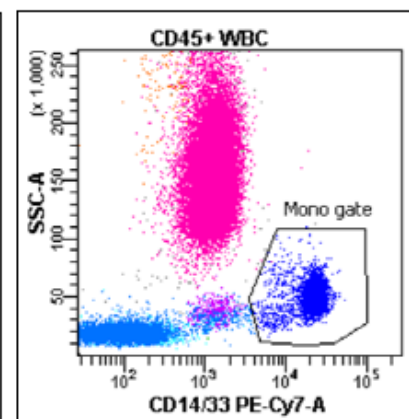
【4】好中球・好酸球プロット



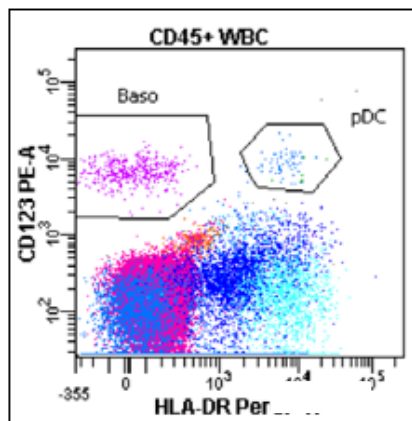
【5】好酸球プロット



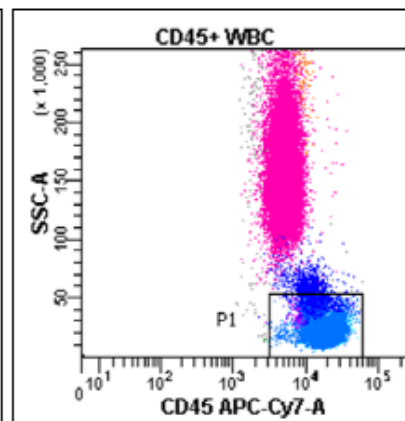
【6】単球プロット



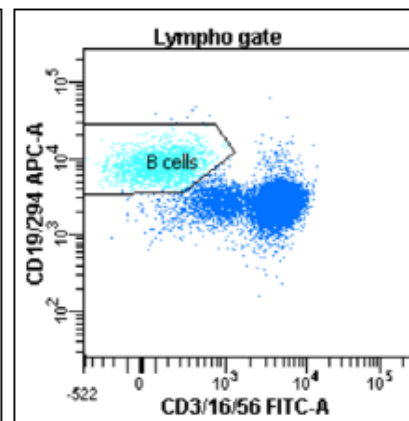
【7】好塩基球プロット



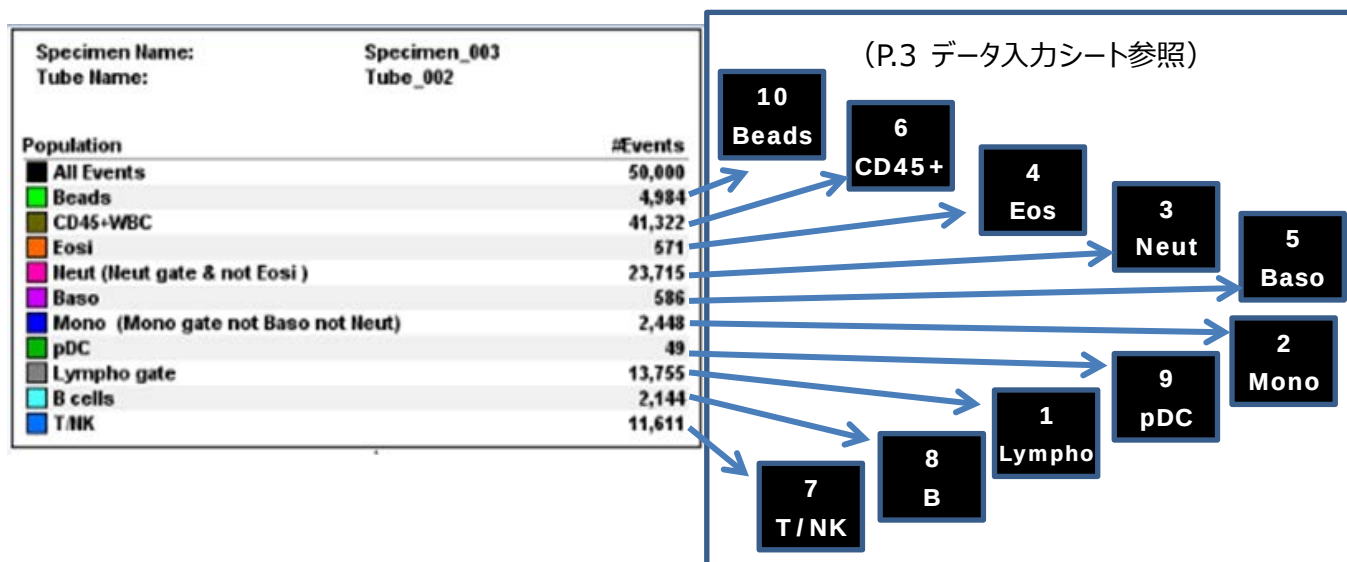
【8】リンパ球ゲートプロット



【9】T/NK・B リンパ球プロット

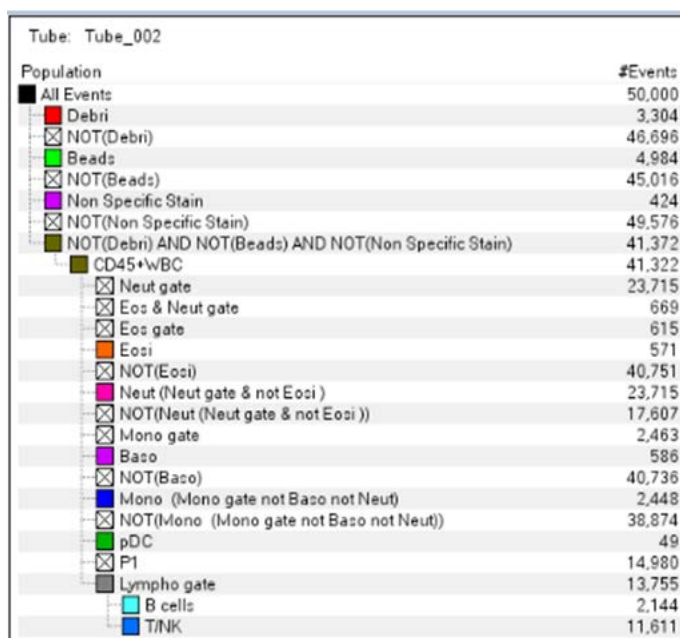
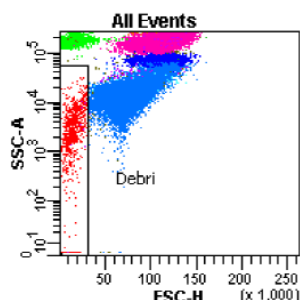


[CD14/33 PC7, CD45 APC-Alexa Fluor 750 変更カクテル抗体による正常白血球 5 分類の 2 次元プロット]



【1】サイトグラムプロット

- 1) FCS_H-SSC_A(サイトグラムプロット、Gate：All Events) で、デブリゲート（Debris）を設定する。デブリゲートのFSC上限は、ビーズ分布（4μm相当）の上限を目安としてリンパ球を含まないように、ゲート設定をする。『not』デブリゲートを設定する。
※SSC-AパラメータY軸について、Bi Exponential設定（プロットをアクティブにし、InspectorのPlotタグを開き、DisplayのY Axisにチェックを入れる）を行い、ゼロ以下のデブリを表示させデブリゲートの確認をするといふ。



【2】ビーズプロット

- 2) CD3/16/56 FITC-CD123 PE（ビーズプロット、Gate：All Events）で、ビーズゲート（Beads）を設定する。『not』ビーズゲートを設定する。
- 3) CD3/16/56 FITC-CD123 PE（ビーズプロット、Gate：All Events）で、死細胞等による非特異染色細胞ゲート（Non Specific Stain）を設定する。『not』非特異染色細胞ゲートを設定する。以降、『not』ビーズゲート（Beads）と『not』デブリゲート（Debris）と『not』非特異染色細胞ゲート（Non Specific Stain）の『and』ゲートの二次元プロットを設定する。

【3】白血球プロット

- 4) CD45 APC H7-SSC_A（白血球プロット、Gate：Not Beads and Not Debris and Non Specific Stain）で、白血球ゲート（CD45+ WBC）を設定する。CD45ゲートは大きめに取り、最終的に好塩基球分布を確認し、CD45ゲートの最適化を行う。以降、白血球ゲート（CD45+ WBC）にて二次元プロットを設定する。

【4】好中球・好酸球プロット

- 5) CD3/CD16/CD56 FITC-SSC-H (好中球/好酸球プロット、Gate : CD45+ WBC) で、CD16+/SSC high の集団に好中球ゲート (Neut gate)、CD16dim/SSC high の集団に好酸球(一部好中球を含む)ゲート (Eos & Neut gate1) を設定する。SSC 軸は “SSC-H” で設定する。好酸球(一部好中球を含む)ゲートラインの上限は、プロット上限を越えてはみ出るようにゲートをかける。

【5】好酸球プロット

- 6) CD19/CD294 APC-SSC-H (好酸球プロット、Gate : CD45+ WBC) で、CD294+/SSC Very high の集団に好酸球ゲート (Eos gate) を設定する。SSC 軸 “SSC-H” で設定する。好酸球ゲートラインの上限は、プロット上限を越えてはみ出るようにゲートをかける。

【4】好中球・好酸球プロット、【5】好酸球プロット

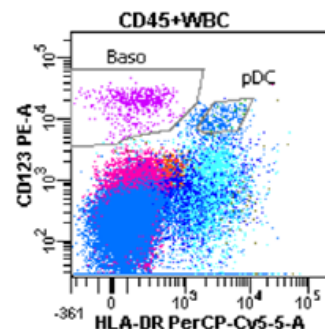
- 7) 好酸球(一部好中球を含む)ゲート (Eos & Neut gate) と好酸球ゲート (Eos gate) の『and』で、好酸球イベントとする。続けて、『not』好酸球イベントを作成する。
- 8) 好中球ゲート (Neut gate) と『not』好酸球イベントの『and』で、好中球イベントとする。続けて『not』好中球イベントを作成する。
- ※好酸球 CD294 と好中球 CD16 発現量の個体差が大きいため、必ず【4】【5】プロットの両方を確認し、好中球分布と好酸球分布のどちらか分離の良い分布を元に、両プロットの共通縦軸である SSC-H 軸上の好酸球ゲート下限および好中球ゲート上限のアドレスを決めて、分離の悪いプロット側を良い方のアドレスに揃えることが望ましい。

【6】単球プロット

- 9) CD14/CD33 PE Cy7-SSC_A (単球プロット、Gate : CD45+ WBC) で、CD14+ CD33+/SSC low の集団に単球ゲート (Mono gate) を設定する。

【7】好塩基球プロット

- 10) HLA-DR PerCP -CD123 PE (好塩基球プロット、Gate : CD45+ WBC) で、HLA-DR-/CD123+ の集団に好塩基球ゲート (Baso) を設定し、好塩基球イベントとする。好塩基球ゲート左側のラインは、プロット左端 (X 軸) を越えてはみ出るようにゲートをかける。『not』好塩基球イベントを設定する。
- ※HLA-DR PerCP パラメーター X 軸について、Bi Exponential 設定 (プロットをアクティブにし、Inspector の Plot タグを開き、Display の X Axis にチェックを入れる) を行い、ゼロ以下の好塩基球を表示させ CD123 PE 陽性細胞の全ての好塩基球が含まれていることを確認するとよい。HLA-DR+/CD123+ の集団に形質細胞様樹状細胞ゲート (pDC) を設定し、樹状細胞イベントとする。



- 11) 9)の単球ゲート (Mono gate) and 『not』好中球イベント and 『not』好塩基球ゲートを単球イベントとする。『not』単球イベントを作成する。

【8】リンパ球ゲートプロット

- 12) CD45 APC H7-SSC_A (リンパ球ゲートプロット、Gate : CD45+ WBC) で、リンパ球ゲート (P1) を設定する【8】。SSC は単球の半分ぐらいまで拡張し、CD45 APC Cy7 は好塩基球の 1/3 ぐらいまで拡張してゲート設定をする。P1 and 『not』単球イベント and 『not』好塩基球イベントのリンパ球ゲート (Lympho gate) を作成する。

【9】T/NK・B リンパ球プロット

- 13) CD3/CD16/CD56 FITC-CD19/CD294 APC (T/NK,B リンパ球プロット、Gate : Lympho gate) で、CD19 陽性細胞の集団に B リンパ球ゲート (B cells) を設定する。続けて、『not』B cells を作成する。
- 14) リンパ球ゲート (Lympho gate) and 『not』B cells を T/NK リンパ球イベントとする。