

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 : Navios™ Navios EX™ (8color, 10color モデル)

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 3.0 – 210 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 2.0 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 2.5 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 0.4 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 4.0 – 130 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 2.0 – 25.0 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 0.4 – 45.0 範囲内にあること

表 1：JSLH-Diff™ 抗体試薬のチェックリスト (Navios™)

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	Navios (アドレス) Sample 1		判定 結果	Navios (アドレス) Sample 2		判定 結果	Navios (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	3.0 <i>Input</i>	210.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail	3.0 <i>Input</i>	210.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail	3.0 <i>Input</i>	210.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail
2	【4】	好中球・好酸球 (CD3/16/56 FITC)	好中球	2.0 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail	2.0 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail	2.0 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail
			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	2.5 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail	2.5 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail	2.5 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail
				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		
				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	0.4 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail	0.4 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail	0.4 <i>Input</i>	---	<i>Pass</i> /Fail
			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	4.0 <i>Input</i>	130.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail	4.0 <i>Input</i>	130.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail	4.0 <i>Input</i>	130.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail
6	【9】	T/NK・Bリンパ球 (CD19/294 APC)	Bリンパ球	2.0 <i>Input</i>	25.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail	2.0 <i>Input</i>	25.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail	2.0 <i>Input</i>	25.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail
7	【9】	T/NK・Bリンパ球 CD3/16/56 FITC	T/NKリンパ球	0.4 <i>Input</i>	45.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail	0.4 <i>Input</i>	45.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail	0.4 <i>Input</i>	45.0 <i>Input</i>	<i>Pass</i> /Fail

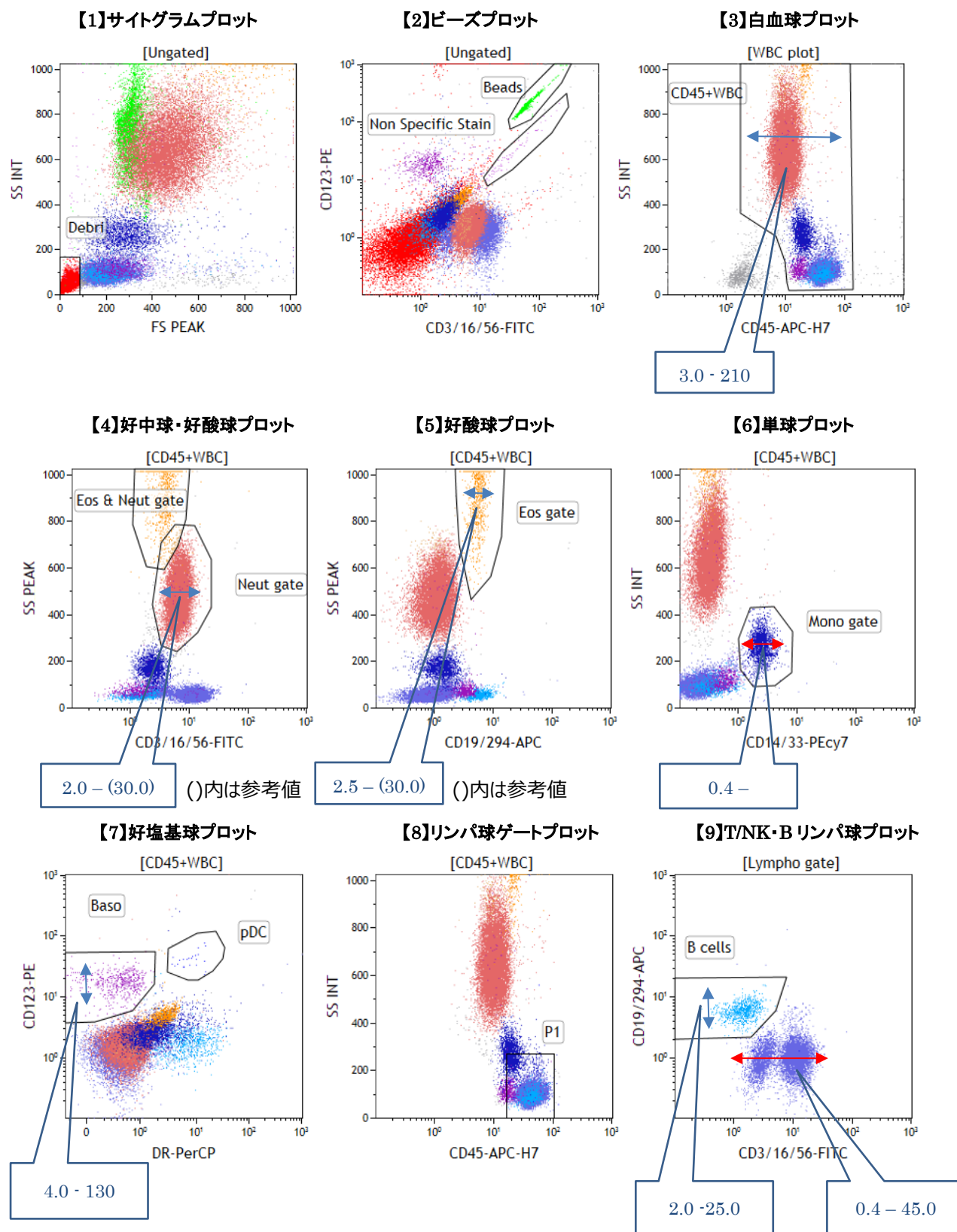


図 2：JSLH-Diff™ による正常白血球 5 分類の 2 次元プロット (Navios™)

1.2 溶血固定液 (用事調整)

溶血剤と固定液を準備して混合する。

調製に使用する器具/試薬

- 目盛付きチューブ
- 溶血液 (VersaLyse 溶血試薬, ベックマン・コールター株式会社; Cat. A09777)
- 固定液 (IOtest3 固定液, ベックマン・コールター株式会社; Cat. A07800)

操作 : VersaLyse 溶血液 1mL に対し、25μL の IOtest3 固定液を加えて混和する。

混和した Fix-and Lyse 混和物を 1 チューブあたり、1mL 添加する。

2 測定

2.1 測定サンプル

・「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」の 2.3 で調整した、JSLH 抗体で染色、溶血、固定した全血試料を測定サンプルとして使用する。

測定チューブは、Trucount™ tubes のまま測定に用いると下部のステンレススチールリテーナが吸引部に接触し、吸引不良となることがある。そのため Trucount™ tubes を用いて染色を行い、測定直前に 1 秒間 3 回攪拌後、FCM 用チューブに移しかえて測定を行う。

2.2 機器調整に使用する試薬

- ・Flow-Check™ pro Fluorospheres (ベックマン・コールター社; Cat. A63493)
- ・Flow-Set™ pro Fluorospheres (ベックマン・コールター社; Cat. A63492)
- ・CYTO-COMP™ cell Kit (ベックマン・コールター社; Cat. 6607023)
- ・QuickCOMP2 Kit (CD45-FITC, CD45-PE) (ベックマン・コールター社; Cat. 177018)
- ・CD45-APC (ベックマン・コールター社; Cat.IM2473)
- ・Versacomp Antibody Capture Kit (ベックマン・コールター社; B22804)
- ・HLA-DR-PerCP (BD バイオサイエンス社, Cat.347364)
- ・CD14-PE-Cy7* (BD バイオサイエンス社, JSLH カクテル試薬カスタム 蛍光評価用パーツ番号 ; 625339)
- ・CD45-APC-H7* (BD バイオサイエンス社, JSLH カクテル試薬カスタム 蛍光評価用パーツ番号 ; 625340)

* : 5Diff パネル抗体に CD14-PC7 (ベックマン・コールター社; Cat. A22331)、CD33-PC7 (ベックマン・コールター社; Cat. A54824)、CD45-APC Alexa Fluor750 (ベックマン・コールター社; Cat.A71119)を使用する場合は、下記試薬を使用する。

- ・CD45-PC7 (ベックマン・コールター社; Cat.IM3548)
- ・CD45-APC Alexa Fluor750 (ベックマン・コールター社; Cat.A71119)

2.3 機器調整方法

機器設定用サンプルの調整

- 1) FCM 用チューブを 7 本準備 (別途確認用に「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」の 2-3 で調整した JSLH 測定用試料 1 本も準備)。
- 2) それぞれのチューブを識別できるよう①～⑧まで番号を振る。
- 3) CYTO COMP CELL キットの青いキャップのバイアルの溶液を、黒または赤キャップのバイアルに全て添加する。沈殿物が拡散するようによく攪拌し、15 分間放置する。
- 4) Quick COMP 試薬の CD45-FITC を FCM 用チューブ②へ、CD45-PE を FCM 用チューブ③へ、HLA-DR-PerCP を④へ、CD14-PE-cy7*を FCM 用チューブ⑤へ、CD45-APC を FCM 用チューブ⑥へ、CD45-APC-H7*を⑦へ添加する(CD45-APC は 10μL、それ以外は 20μL を分注)。

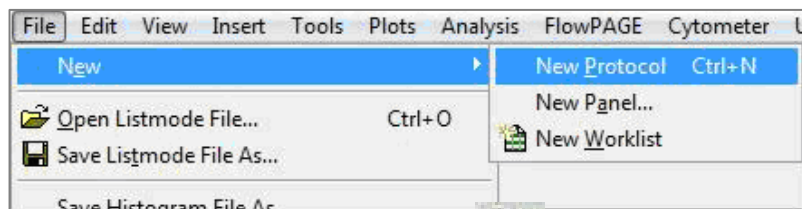
*5Diff パネル抗体に CD14-PC7, CD33-PC7, CD45-APC AlexaFluor750 を使用する場合は、CD45-PC7 を FCM 用チューブ⑤へ、CD45-APC AlexaFluor750 を FCM 用チューブ⑦へ添加する (どちらも 10μL 分注)。

- 5) ④(HLA-DR-PerCP)と⑤(CD14-PE-cy7)のチューブ*に Versacomp Antibody Capture Beads の positive Beads を 1 滴（50μL）添加する。
* 5Diff パネル抗体に CD14-PC7, CD33-PC7, CD45-APC AlexaFluor750 を使用する場合は、④ HLA-DR-PerCP のチューブのみに添加する。
- 6) 3) で調整した懸濁液を FCM 用チューブ②～⑦へ 100μL ずつ添加し、よく混和する。
- 7) 室温・暗所で 15 分間インキュベート。
- 8) FCM 用チューブ②～⑦に PBS を 1mL 添加する。
- 9) ①のチューブに混和した Flow SET PRO ビーズを 15 滴（500μL）添加する。
- 10) カローセルに①～⑦の順でセットする。
- 11) JSLH 測定用試料の Trucount™ tubes を 1 秒間 3 回攪拌後、FCM 用チューブに移しかえ 8 本目にセットする。

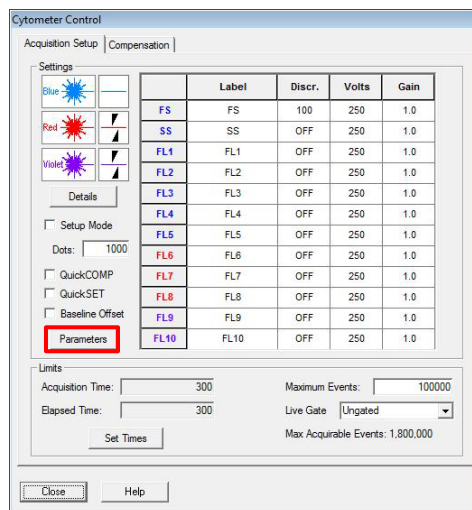
2.4 機器設定

I. パラメーターの設定

- ①新規プロトコルを開く。
- ②File から New-New Protocol を開く。
- ③パラメータ選択

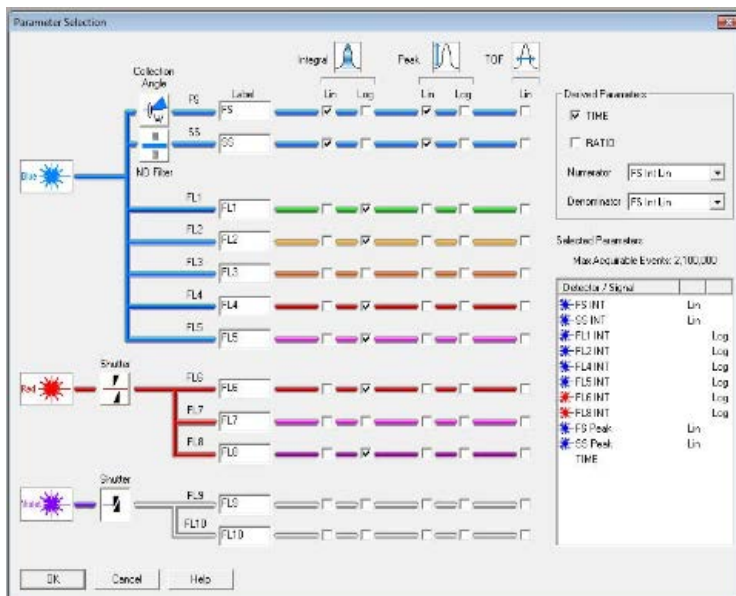


- a) Cytometer Control アイコンをクリックして Cytometer Control を開く。
- b)「Parameter」をクリック。



- ④下記のパラメータにチェックを入れて選択する。

FS Lin (Wide、Integral、Peak)
 SS Lin (Integral、Peak)
 FL1 Log (Integral)
 FL2 Log (Integral)
 FL4 Log (Integral)
 FL5 Log (Integral)
 FL6 Log (Integral)
 FL8 Log (Integral)
 TIME



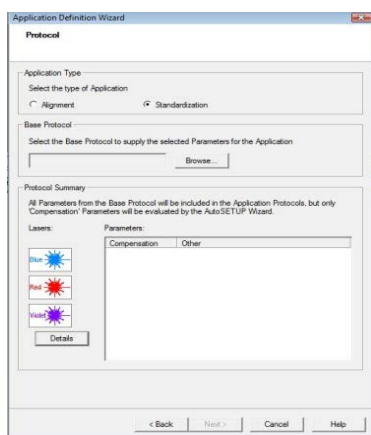
- ⑤「OK」をクリックしてプロトコルに名前をつけて保存する(例 5Diff Base)。
- ⑥Cytometer Control の Maximum Events に 50000 を入力し、Flow Rate を High にしてから、Save Protocol



をクリックして上書き保存する。

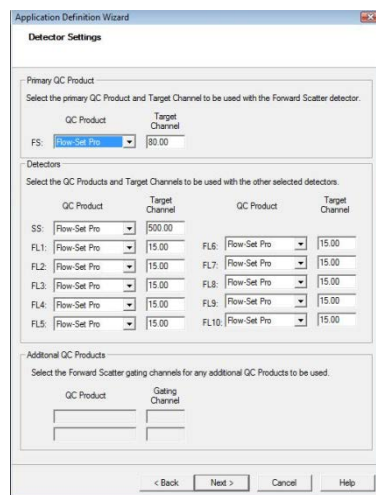
II.ADC 用アプリケーションの作成

- ① Auto Setup Application Definition ウィンドウを開く。
Tools > Auto Setup Application Definition
- ② Application Availability で All user(Common)あるいは Current user only のどちらかを選択し、Next をクリックする (通常は All user を選択)。
- ③ Brows をクリックして Base Protocol を選択し、OPEN をクリックする。

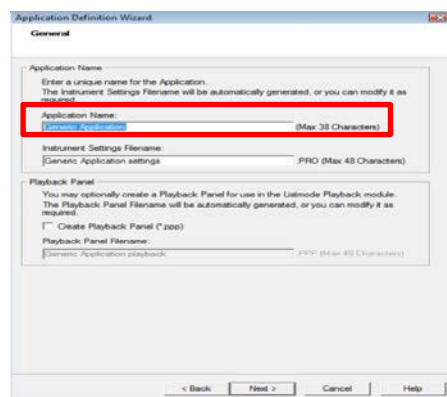


ここで「5Diff Base」を選択。

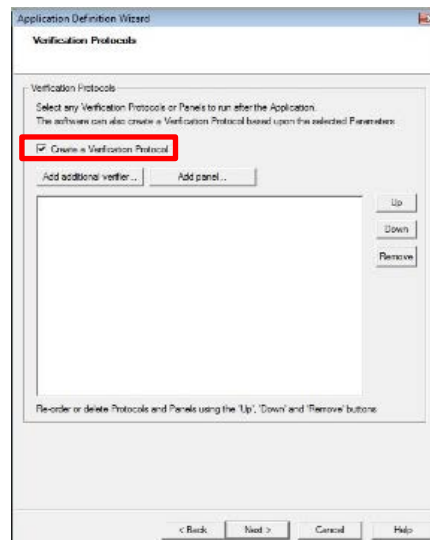
- ④ Next をクリックし、フィルタ設定を確認してから、Next をクリックする。
- ⑤ 必要があれば、各検出器の色素名を選択し、Next をクリックする。
- ⑥ ターゲットチャンネルは変更せずに、そのまま Next をクリックする。



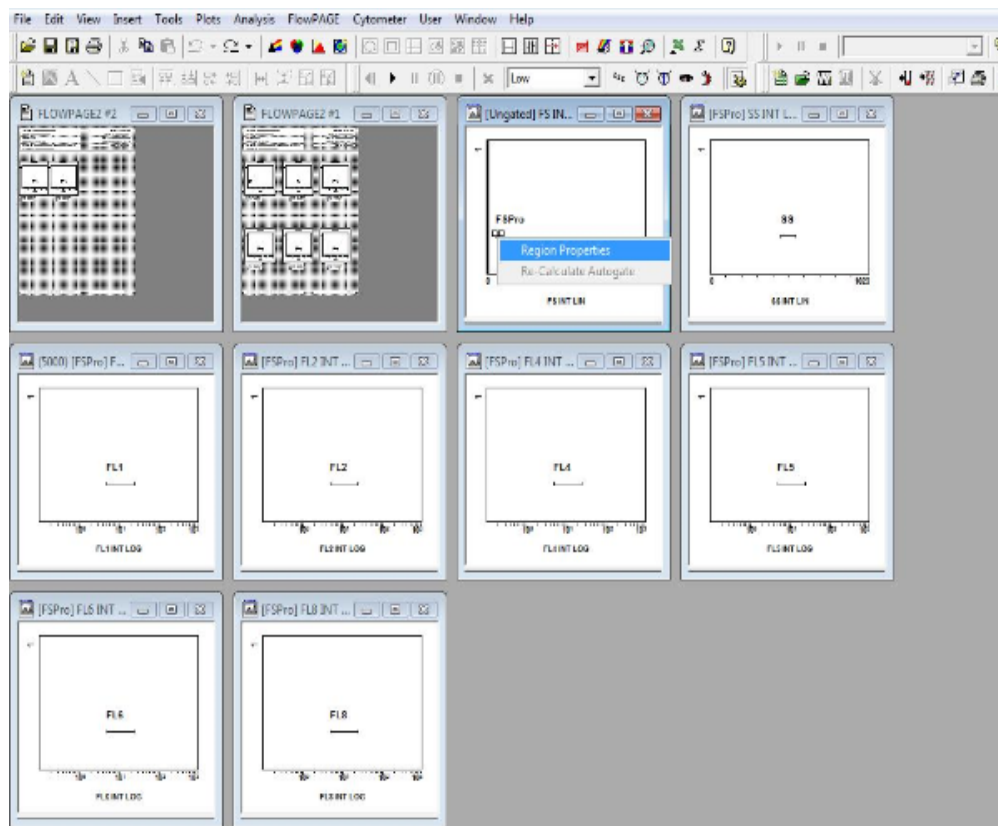
- ⑦ Application Name (5Diff-S など) を入力して、Next をクリックする。(Setting プロトコル名も自動設定される)



- ⑧ Create Verification Protocol にチェックを入れて、Next をクリック。



- ⑨ アプリケーションの内容を確認し、Finish をクリックすると、必要なプロトコルが自動作成され、フォルダに保存される。
- ⑩ Flow Set Pro ビーズ用のプロトコル (⑦で入力したアプリケーション名 + _STAND.pro) を呼び出す (例：5Diff-S_STAND.pro)。
 * ②で All users を選択した場合はプロトコルの Common(Acquisition)フォルダに、Current users only を選択した場合は使用中 User ID の Acquisition フォルダに作成されている。
- ⑪ 各リージョンを選択し、右クリックで Region Properties を選ぶ。



- ⑫ 全てのリージョンで lower limit と upper limit に次の表の数値を入力し、OK をクリック。

Region Properties

Region Name: FSPro

Lower limit: 126 Upper limit: 166

☐ Prime ☒ Target region for automatic setup

☒ Automatic region name positioning

☐ Region statistics exported for Quality Control

QC Product: [Dropdown]

Positives Analysis

☐ Active Percent Positive: [Field]

Minimum Count

☐ Active Count: [Field]

Linked Region

☐ Linked Region linked to: [Dropdown]

OK Cancel Help

Flow-set pro ターゲット値

FS Pro	126 - 166
SS	313 - 393
FL1	24.3 - 44.3
FL2	90 - 140
FL4	48.9 - 68.9
FL5	10.15 - 15.62
FL6	1.26 - 2.26
FL8	20.2 - 30.2

- ⑬ Save Protocol をクリックして上書き保存する。

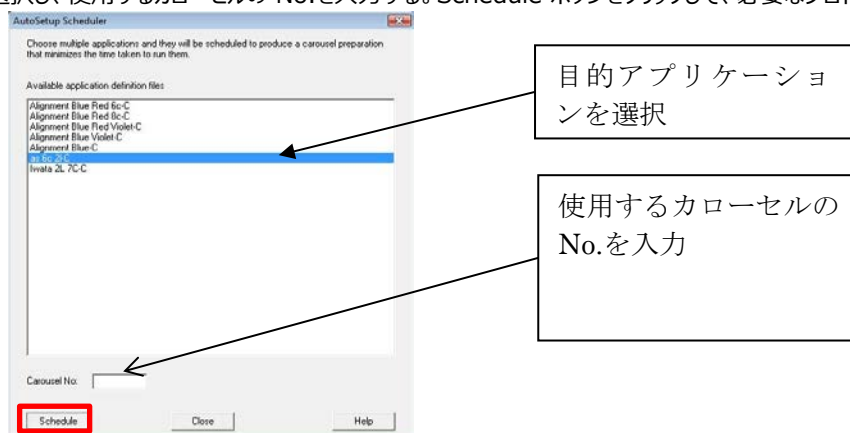


III. オートセッティングを使用した感度・蛍光補正の設定

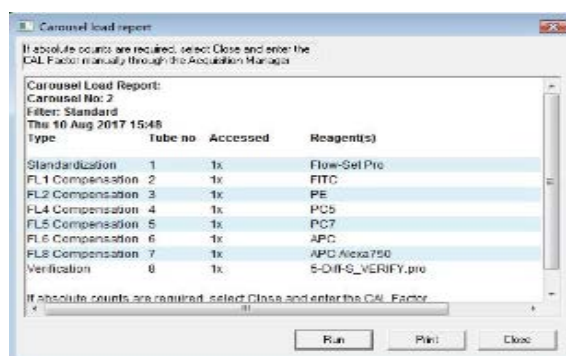
- ① Auto Setup Scheduler ウィンドウを開く。

Tool -> Auto Setup Scheduler

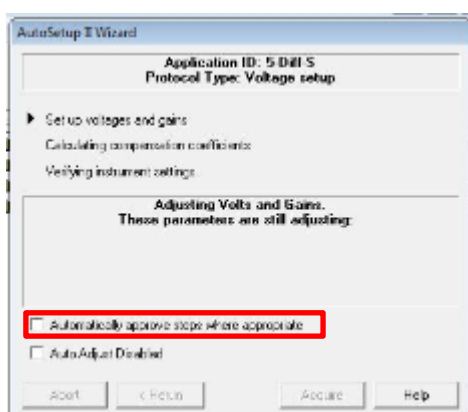
- ② 目的のアプリケーションを選択し、使用するカローセルの No.を入力する。Schedule ボタンをクリックして、必要なプロトコルを読み込む。



- ③ Carousel Load Report に示された順番でカローセルに各チューブをセットする。必要なら、Carousel Load Report を印刷する。



- ④ Close ボタンをクリックして Carousel Load Report ウィンドウを閉じる。
- ⑤ スタートボタンをクリックして測定を開始する。測定開始後すぐに AutoSetup II Wizard ウィンドウの Automatically approve steps where appropriate のチェックを外す。

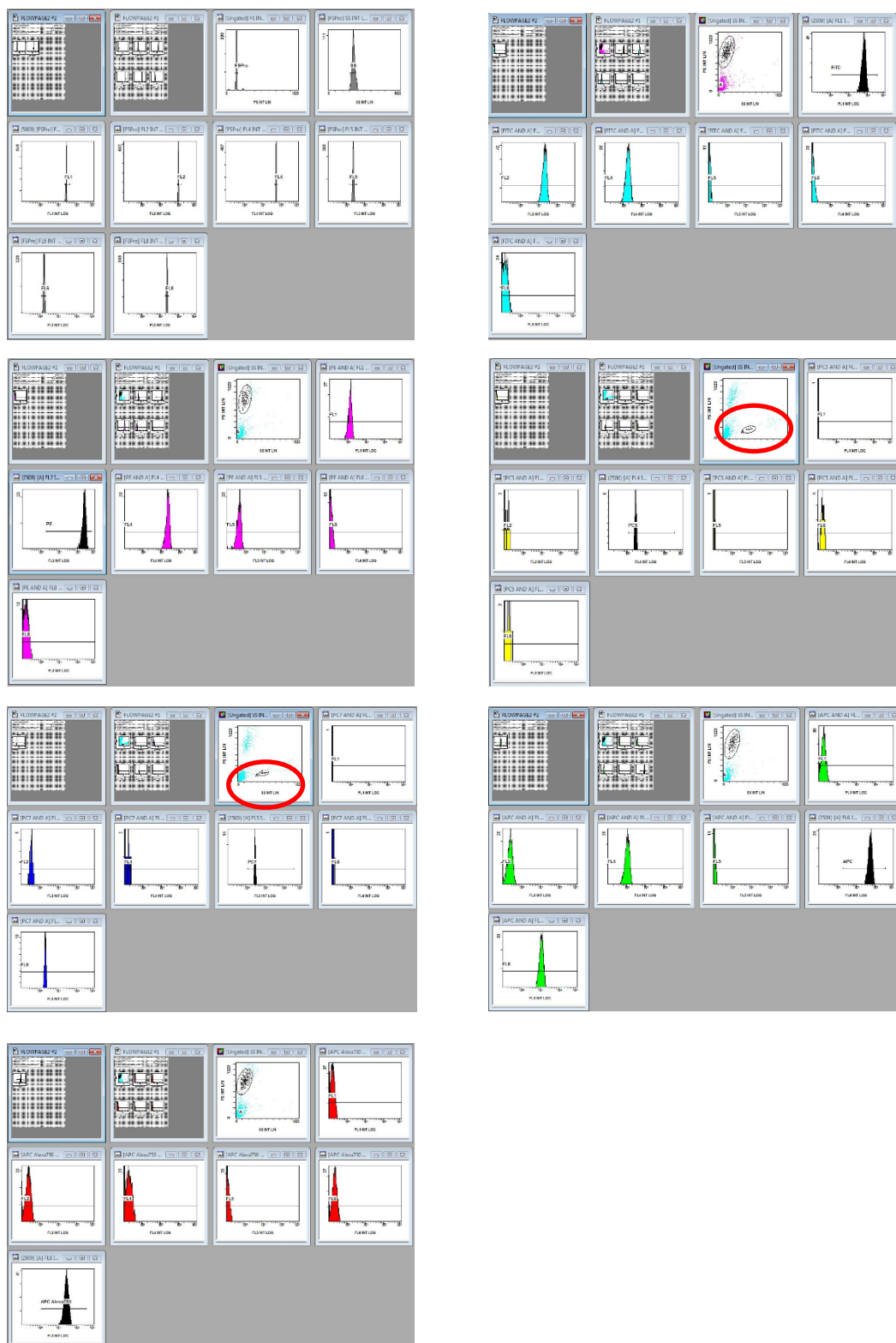


- ⑥ Flow Set Pro チューブで自動感度調整が実行される。必要があれば各ピークがターゲットのリージョン範囲に入るようにマニュアルで感度調整を行う。
- ⑦ 測定終了後、Next をクリックすると、次のチューブの測定が開始される。
- ⑧ 蛍光補正用チューブ（チューブ②～⑦）では、測定終了後にゲート位置とヒストグラムのリージョン位置を確認し、必要に応じて修正してから next ボタンで次のチューブを測定する（図参照）。

ゲート位置：Cyto Comp cell の細胞集団をゲーティング

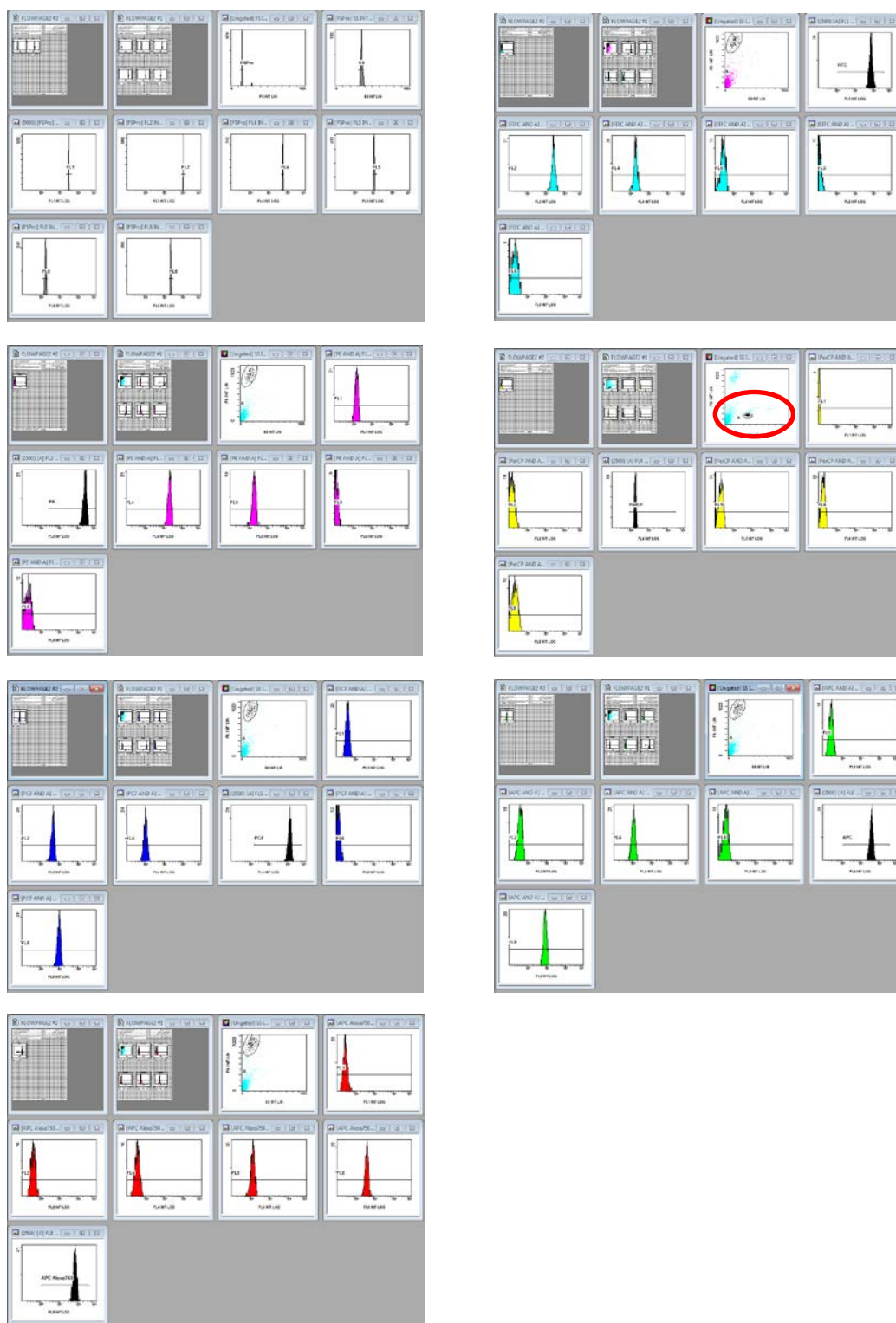
Versacomp ビーズを添加したチューブ④(HLA-DR-PerCP)と⑤(CD14-PEcy7)はビーズ集団をゲーティングする。

リージョン位置：各チューブで染色した蛍光の陽性集団がリージョン内に入っていること。

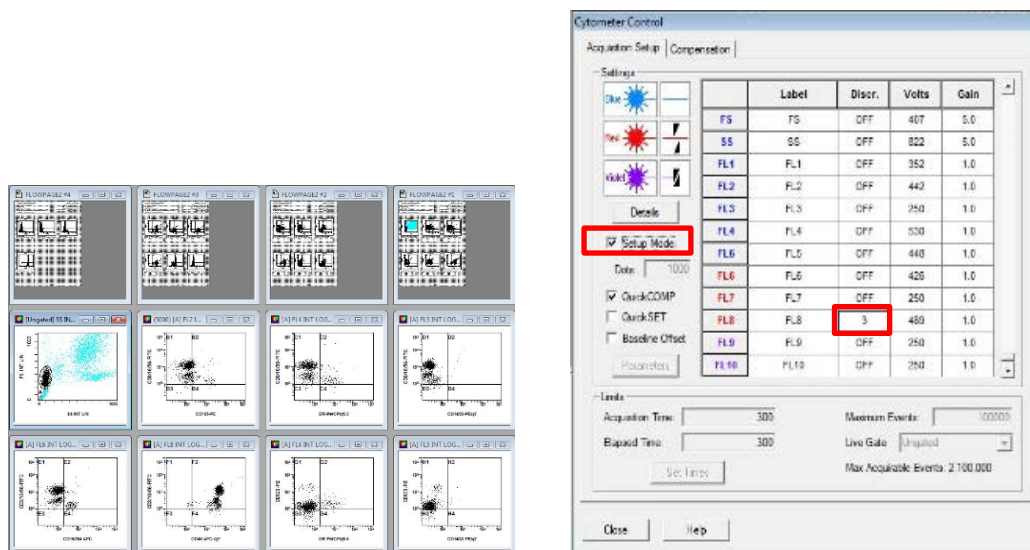


5Diff パネル抗体に CD14-PC7, CD33-PC7, CD45-APC Alexa Fluor750 使用の場合

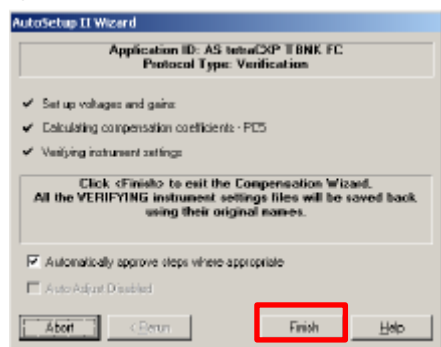
Versacomp ビーズを添加したチューブ④(HLA-DR-PerCP)はビーズ集団をゲーティングする。



- ⑨ 8 本目の Verification チューブ (JSLH 調整試料) の測定が開始されたら、Discr を FL8 の 3 に変更してから、set up モードのチェックを外してデータ取得を行う。

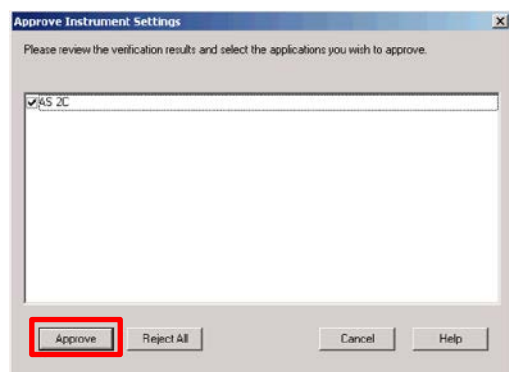


- ⑩ 全てのチューブの測定が終了したら、Approve ボタンをクリックする。次の画面で Finish ボタンをクリックする。



- ⑪ Approve ボタンをクリックして、サイトセッティングを保存する。

* セッティングをやり直す必要がある場合は、Reject All をクリックする。この場合、サイトセッティングは保存されない。



* 次回以降、機器の感度設定と蛍光補正を再設定する場合は、「Ⅲ. オートセッティングを使用した感度・蛍光補正の設定」以降のみを実施する。

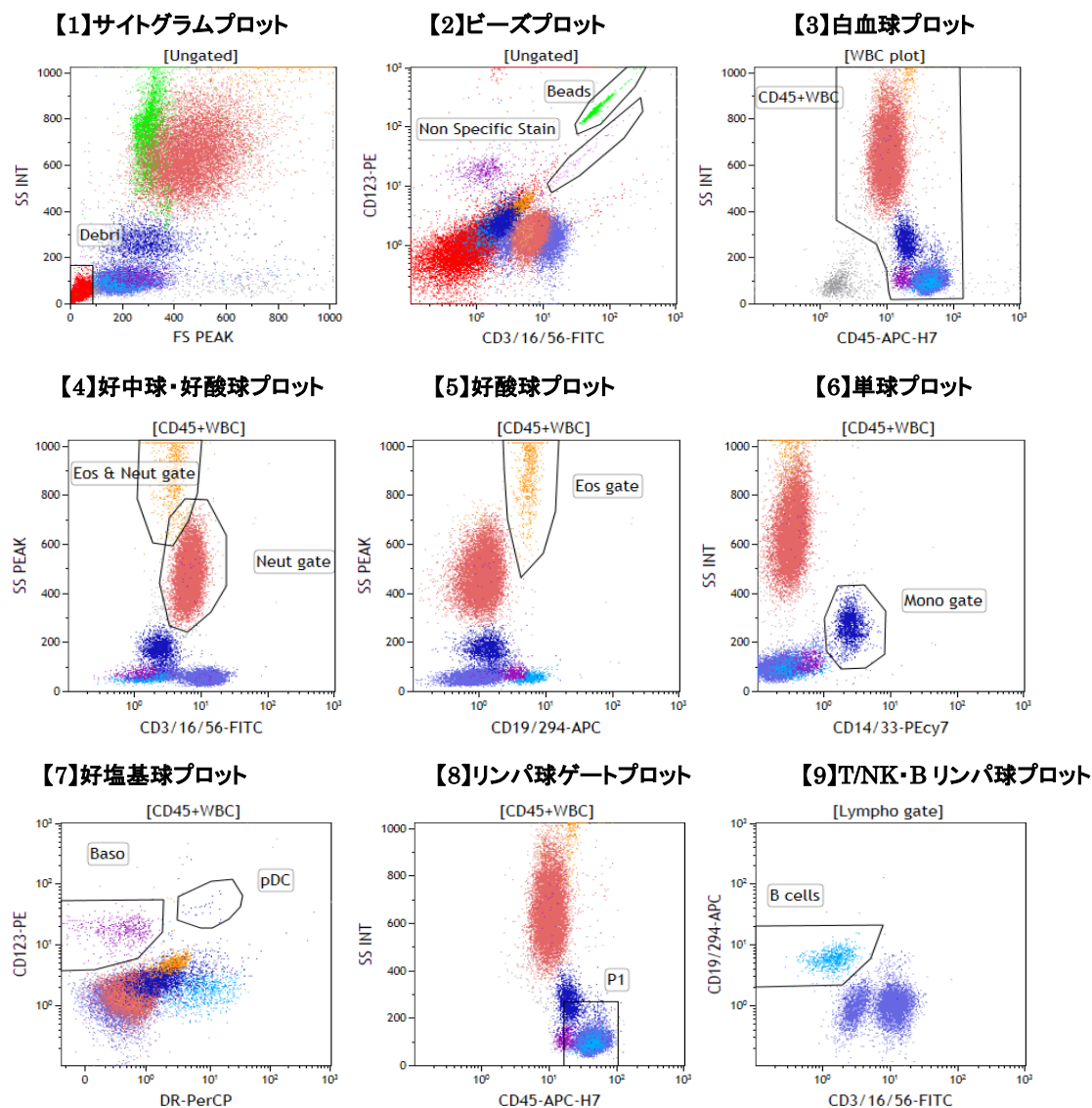
IV.測定用プロトコルの作成

- ① オートセッティングで保存されたセッティングファイル (アプリケーション名 + setting.pro) を呼び出す (プロット図なし)。
- ② 下記のプロット図を作成する。
FS PEAK vs SS INT, FL-1 vs SS INT, FL-2 vs SS INT, FL-4 vs SS INT,
FL-5 vs SS INT, FL-6 vs SS INT, FL-8 vs SS INT
- ③ 各パラメーターに抗体名と蛍光色素名を入力する。
- ④ File -> Save Protocol as にて名前をつけて、プロトコルを別名保存する。
- ⑤ 別名保存したプロトコルで JSLH 測定用試料を測定する。
- ⑥ FL8/SS-INT プロット図にて Discr.の位置を確認し、CD45 陽性の白血球 (特に好中球) が Discr.以下になっていないかを確認する。必要があれば、Discr.の位置を変更し、データ取得を行う。
- ⑦ 3.4ゲート設定の項【1】サイトグラムプロットおよび【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散乱光の感度を確認する。(FS PEAKと SS INT。必要に応じて微調整を行う。)
- ⑧ File -> Save Protocol をクリックして、上書き保存する。

3.3 測定用試料の測定

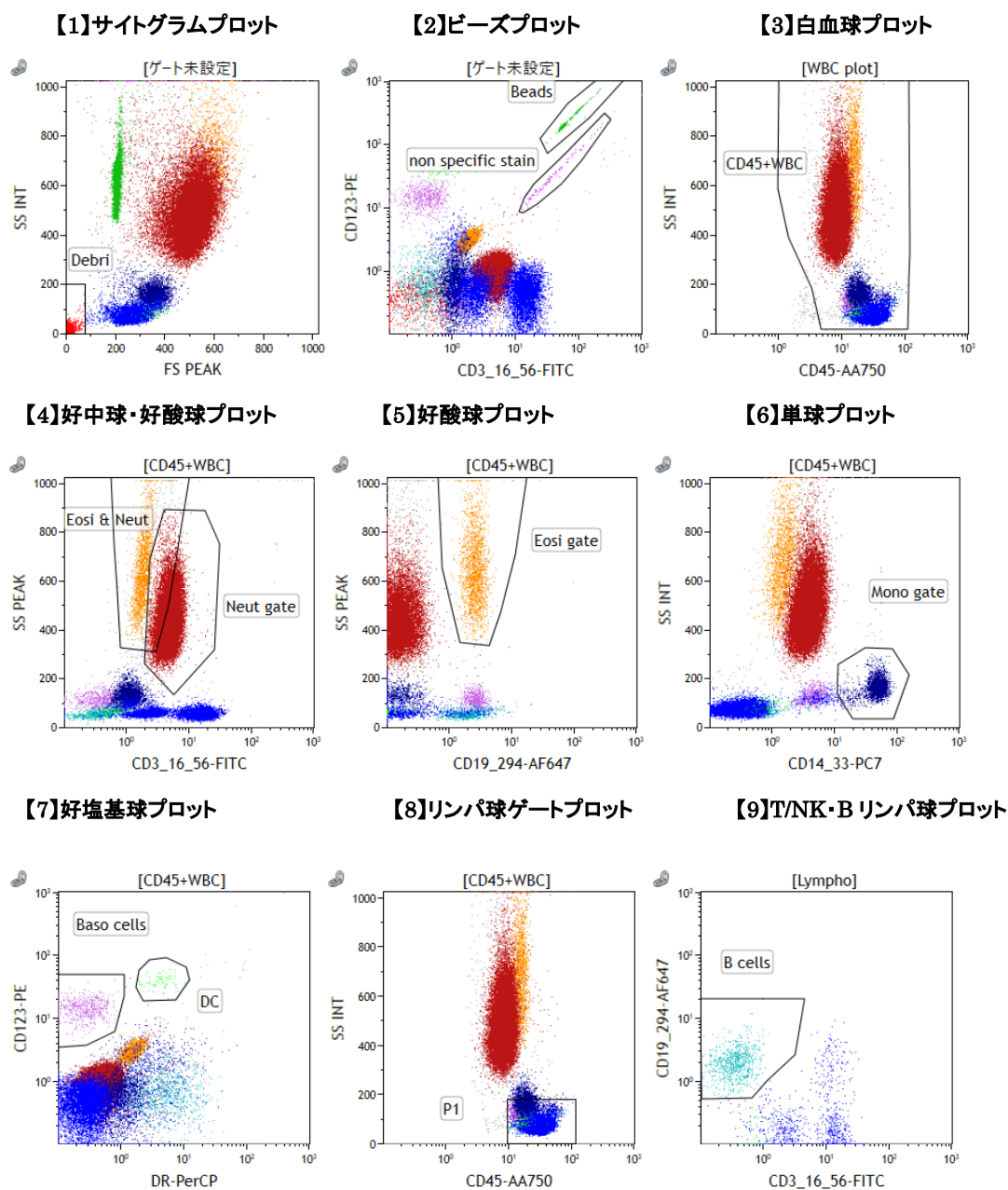
- ① New Worklist をクリックして、Acquisition Manager をクリアする。
- ② 上記で作成したプロトコルを Resource Explorer より選択し、Drag & Drop で Acquisition Manager へ必要本数分呼び出す。
- ③ 使用するカローセルのカローセル番号と Sample ID を入力する。
- ④ 1 秒間 3 回攪拌したサンプルチューブ (Trucount tube から FCM 用チューブへ移し替えたもの) をカローセルに並べる。
- ⑤ Automatic mode になっていることを確認し、スタートボタンをクリックして、測定を開始する。

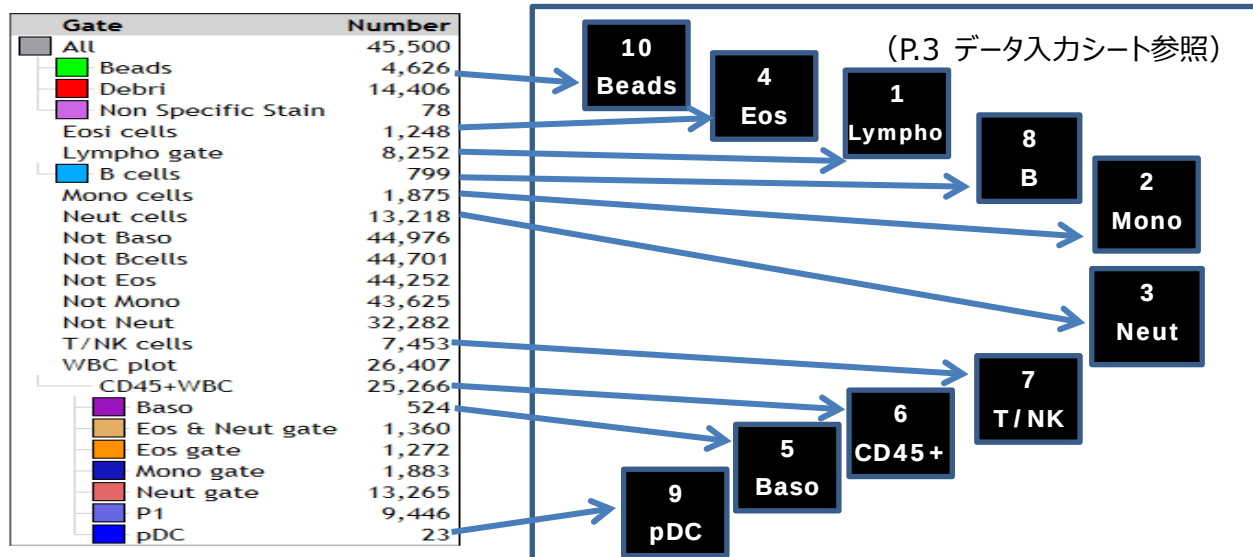
3.4 ゲート設定



Name	Logic
Eosi cells	= "Eos & Neut gate" AND "Eos gate"
Lympho gate	= (P1 AND "Not Mono") AND "Not Baso"
Mono cells	= ("Mono gate" AND "Not Neut") AND "Not Baso"
Neut cells	= "Neut gate" AND "Not Eos"
Not Baso	= NOT Baso
Not Bcells	= NOT "B cells"
Not Eos	= NOT "Eosi cells"
Not Mono	= NOT "Mono cells"
Not Neut	= NOT "Neut cells"
T/NK cells	= "Lympho gate" AND "Not Bcells"
WBC plot	= ((NOT Debris) AND (NOT Beads)) AND (NOT "Non Specific Stain")

5Diff パネル抗体に CD14-PC7, CD33-PC7, CD45-APC Alexa750, VersaLyse 溶血剤を使用した場合の例





- 1) JSLH 測定資料の測定結果（LMD）を Kaluza 解析ソフトで開く。
*kaluza ver1.5 以降を用いる場合は、プロットスケールがレガシーモードであることを確認する。
- 2) Edit→ Select all で全てのプロット図を選択し、Delete キーで削除する。

【1】サイトグラムプロット

- 3) FS_PEAK vs SS INT（サイトグラムプロット、Gate：ungated）で、デブリゲート（Debri）を設定する。デブリゲートの FS はリンパ球を含まないように、ゲート設定をする。

【2】ビーズプロット

- 4) CD3/CD16/CD56-FITC vs CD123-PE（ビーズプロット、Gate：ungated）で、ビーズゲート（Beads）と Non Specific Stain ゲートを設定する。
- 5) Boolean で、WBC plot ゲート[(((Not Debri) AND (Not Beads)) AND (Not"Non Specific Stain"))]を作成する。

【3】白血球プロット

- 6) CD45-APC H7 vs SS INT（白血球プロット、Gate：WBC plot）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

- 7) CD3/CD16/CD56 FITC vs SS PEAK（好中球・好酸球プロット、Gate：CD45+ WBC）で、CD16+/SS high の集団に好中球ゲート（Neut gate）、CD16dim/SS very high の集団に好酸球（一部好中球を含む）ゲート（Eos & Neut gate）を設定する。SS 軸は“SS PEAK”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、プロットの線(SS PEAK 最大値)までゲートをかける。

【5】好酸球プロット

- 8) CD19/CD294 APC vs SS PEAK（好酸球プロット、Gate：CD45+ WBC）で、CD294+/SS Very High の集団に好酸球ゲート（Eos gate）を設定する。SS 軸は、“SS PEAK”で設定する。好酸球ゲートラインの上限は、プロットの線(SS PEAK 最大値)までゲートをかける。

【4】好中球・好酸球プロット、【5】好酸球プロット

- 9) Boolean にて、好酸球（一部好中球を含む）ゲート（Eos & Neut gate）かつ好酸球ゲート（Eos gate）を、好酸球イベントとする(Eosi cells：“Eos&Neut gate” and “Eos gate”)。続けて、「not」好酸球イベントを作成する（Not Eos：Not"Eosi cells”）。

- 10) 好中球ゲート (Neut gate) と not 好酸球イベントで、好中球イベントとする (Neut cells : "Neut gate" AND "Not Eos")。続けて「not」好中球イベントを作成する (Not Neut : NOT "Neut cells")。

※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

- 11) CD14/CD33 PE Cy7 vs SS INT (単球プロット、Gate : CD45+ WBC) で、CD14+ CD33+/SS 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

- 12) HLA-DR PerCP vs 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。好塩基球ゲートラインの下限は線上までゲートをかける。not 好塩基球イベント (Not Baso : NOT Baso) を設定する。※HLA-DR PerCP パラメータ X 軸について、Bi Exponential 設定(Logicle)を行い、ゼロ以下のデブリを表示させ CD123 PE 陽性細胞の確認をしないとよい。HLA-DR+/CD123+の集団に形質細胞様樹状細胞ゲート (pDC) を設定し、形質細胞様樹状細胞イベントとする。

- 13) 11)の単球ゲート (Mono gate) と not 好中球イベントおよび not 好塩基球ゲートを単球イベントとする (Mono cells : ("Mono gate" AND "Not Neut") AND "Not Baso")。not 単球イベント (Not Mono : NOT "Mono cells") を作成する。

【8】リンパ球ゲートプロット

- 14) CD45 APC H7 vs SS INT (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。SS は単球の半分ぐらいまで拡張し、CD45 APC H7 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 と not 単球イベント、not 好塩基球イベントのリンパ球ゲート (Lympho gate : (P1 AND "Not Mono") AND "Not Baso") を作成する。

【9】T/NK・B リンパ球プロット

- 15) CD3/CD16/CD56 FITC vs CD19/CD294 APC (T/NK・B リンパ球プロット、Gate : Lympho gate) で、CD19+/FITC-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 (Not B cells : NOT "B cells") を作成する。
- 16) リンパ球ゲート (Lympho gate) と not B cells を T/NK リンパ球イベント (T/NK cells : "Lympho gate" AND "Not B cells") とする。
- 17) Plots&Table → Gate Statistics でゲート統計を表示する。Data → Add All Gates で各ゲートの Number を表示させる。