

# 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)

## 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 analyzers 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	
第 1.1 版	2018/1/16	近藤 弘	SOP 検証結果による追記修正	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 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
第 1.3 版	2018/ 9/26	近藤 弘	プロット 4/5 のゲーティング方法の追記	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	パネルの改善	ワーキングメンバーによる検討結果の反映
第 1.41 版	2019/10/16	鶴田 一人	誤記訂正：図 8 の染色時間 追記：2019 年サーベイの抗体パネル	ワーキングメンバーによる検討結果の反映

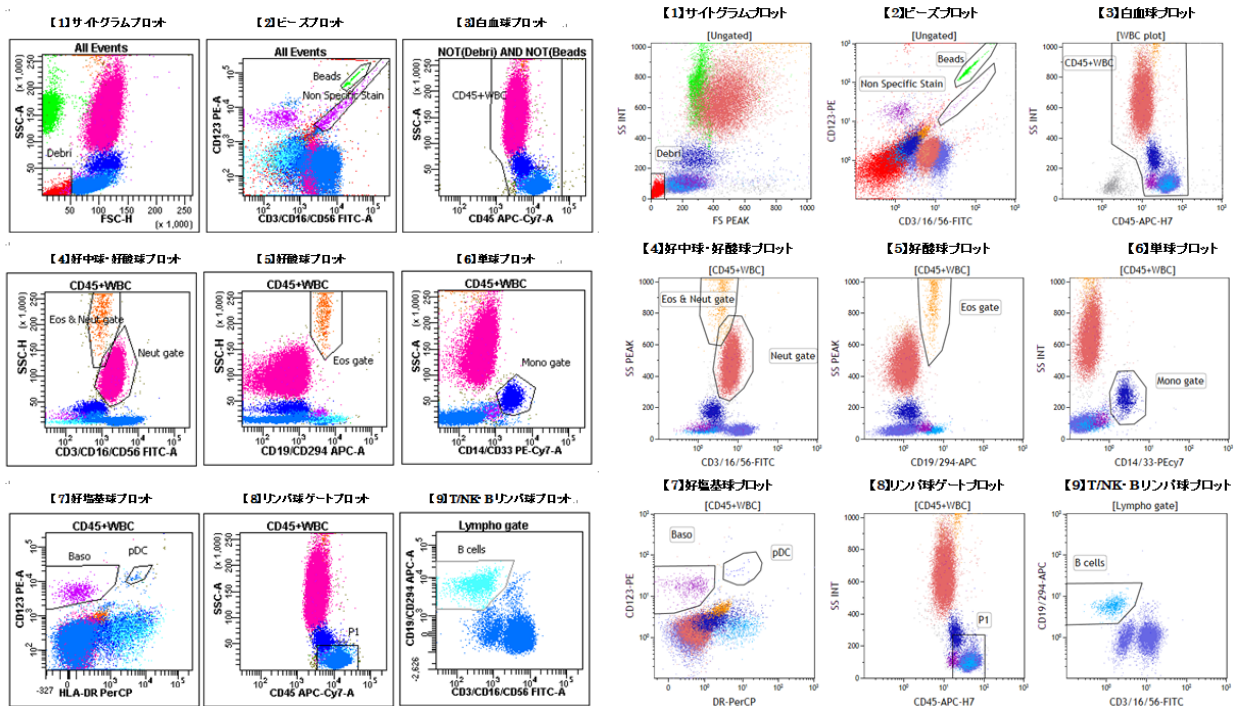
[JSLH-Diff™ による正常白血球5分類の抗体パネルと蛍光標識]

Panels of antibodies and dyes: .									
Antibody cocktail reagents provided by the Japanese Society for Laboratory Hematology (JSLH)									
Marking target cell	CD16	CD3/CD56	CD19	CD14	CD33	CD294	HLA-DR	CD123	CD45
Neutrophils	+	-	-	-	-*	-	-	-	+(Dim)
Lymphocytes	NK cell	T cell, NK cell	B cell	-	-	Th2	B cell	-	+(Bright)
Monocytes	Inflammatory Monocyte	-	-	+	+	-	+	-	+(Medium)
Eosinophils	-	-	-	-	-*	+	-	-	+(Dim)
Basophils	-	-	-	-	-*	+	-	+	+(Dim)
Fluorescentdyes	FITC	FITC	APC	PE-Cy7	PE-Cy7	Alexa Fluor647	PerCP	PE	APC-H7 APC-AF750

\*ノンウォッシュ法であるため、発現強度が低いものは(-\*)と表記

[JSLH-Diff™ による正常白血球5分類の2次元プロット]

- (1) Cytogram ( FSC-H / SSC-A )
- (2) ● Bead Plot ( CD3・CD16・CD56 FITC / CD123 PE )
- (3) □ Leukocyte Plot ( CD45 APC-H7 / SSC-A )
- (4) ● Neutrophil Plot ( CD3・CD16・CD56 FITC / SSC-H )
- (5) ● Eosinophil Plot ( CD19 APC・CD294 Alexa Fluor 647 / SSC-H )
- (6) ● Monocyte Plot ( CD14・CD33 PE-Cy7 / SSC-A )
- (7) ● Basophil Plot ( HLA-DR PerCP- / CD123 PE )
- (8) □ Lym gating Plot ( CD45 APC-H7 / SSC-A )
- (9) ● Lymphocyte Plot ( CD3・CD16・CD56 FITC / CD19 APC・CD294 Alexa Fluor 647 )



[白血球5分類百分率、絶対数、および識別率の算出]

1) 百分率

- CD45+ WBC ゲート内のイベント数を用いて、各白血球 (好中球 Neut cells、リンパ球 Lympho cells、単球 Mono cells、好酸球 Eos cells、好塩基球 Baso cells、T/NK リンパ球 T/NK cells、B リンパ球 B cells、形質細胞様樹状細胞 plasmacytoid dendritic cells ; pDCs) の百分率を算出する。

<計算式> 各白血球比率 (%) = 各白血球イベント数 / CD45 陽性白血球イベント数【CD45+ WBC】 × 100

2) 絶対数

- 白血球数 = CD45 陽性イベント数
- 各白血球 (好中球 Neut cells、リンパ球 Lymph cells、単球 Mono cells、好酸球 Eos cells、好塩基球 Baso cells、T/NK リンパ球 T/NK cells、B リンパ球 B cells、形質細胞様樹状細胞 pDCs) イベント数に対して【2】ビーズプロットのビーズイベントを用いて算出する。

<計算式> 各白血球比率 = 各白血球イベント数 / ビーズイベント数

各白血球絶対数 (/μL) = 各白血球比率 × (Trucount Tube 記載ビーズカウント / 検体量 50μL)

3) 識別率

- 各白血球 (好中球 Neut cells、リンパ球 Lympho cells、単球 Mono cells、好酸球 Eos cells、好塩基球 Baso cells) の総和を CD45 陽性細胞 (CD45+WBC ゲート内のイベント数) で割った値を識別率として定義する。
- 本法では pDCs を参考値として提示している。このイベントはリンパ球として算定しているため、識別率に pDCs を加算する必要はない。また、骨髓系樹状細胞 myeloid dendritic cell ; mDC もリンパ球 (T/NK ゲート内にプロットされる) として算定しているので、補正をする必要はない。
- 本法では、造血幹細胞 (CD34 陽性細胞) はリンパ球 (T/NK ゲート内にプロットされる) として算定している。
- CD45+ WBC ゲート内のイベントで、白血球として識別されないイベントは、主に死細胞およびデブリスなどとなる。

日本検査血液学会 白血球5分類算定 (JSLH-Diff法) データ入力シート

施設名/所属部門/測定者													
測定日時													
測定機種/装置番号		(装置番号: )											
抗体カクテル		Lot.			有効期間								
絶対値ビーズ		Lot.			有効期間								参照値 49000
<b>サンプル識別</b>			<b>イベント数</b> ■にイベント数を入力すると、比率と絶対数は自動計算されます。										
Date	Tube ID	No.	白血球5分類カウント					5diff	イベント数				
			1 Lympo	2 Mono	3 Neut	4 Eos	5 Baso		6 CD45+	7 T/NK	8 B	9 pDC	10 Beads
20171201	E12345678	1	8252	1883	13265	1272	524	25196	25266	7453	799	23	4626

<b>百分率 (%)</b>											
			白血球5分類カウント					イベント数			
10 Beads	%Lympo	%Mono	%Neut	%Eos	%Baso	%5diff	%CD45+	%T/NK	%B	%pDC	#
4626	32.7	7.5	52.5	5.0	2.1	99.7	100.0	29.5	3.2	0.1	

<b>絶対数 (x10<sup>6</sup>/L)</b>										
			白血球5分類カウント					イベント数		
#	#Lympo	#Mono	#Neut	#Eos	#Baso	#5diff	#CD45+	#T/NK	#B	#pDC
	1748	399	2810	269	111	5338	5353	1579	169	5

## 【留意事項】

### 1. 正常白血球分画（5分類）以外の白血球による影響

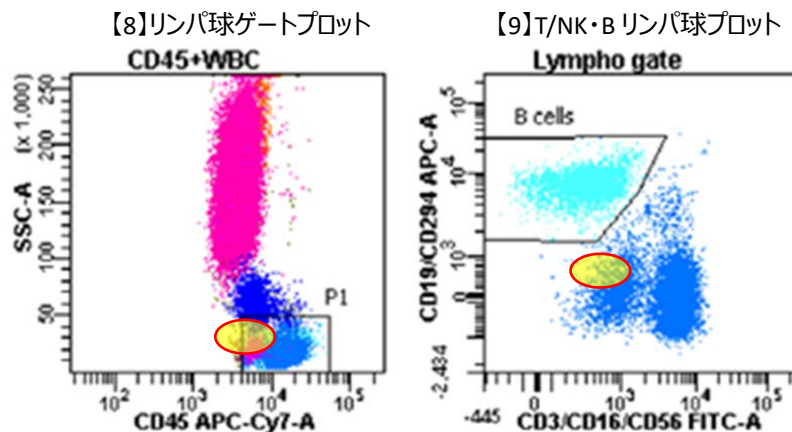
健康人の末梢血液中に存在している正常白血球分画（5分類）以外に含まれるものとしては、樹状細胞（pDC, mDC）、造血幹細胞（CD34陽性細胞）などがある。末梢血単核球における両細胞の比率は小さいが、白血球分類比率に若干の影響を与える可能性がある（a～c）。

- 健康成人末梢血液中の樹状細胞出現率は0.16-0.68%（mean±2SD；N=27）<sup>1)</sup>
- 健康成人末梢血液中のpDCの出現率は0.2～0.4%<sup>2),3)</sup>
- 末梢血単核球におけるCD34陽性細胞の出現率は0.1～数%<sup>4)-6)</sup>

### 2. 正常白血球分画（5分類）以外の白血球数による算定への影響

本法では樹状細胞およびCD34陽性細胞はリンパ球として算定される。pDCについては、参考値として算定する。下記のd)～e)に配慮して、必要に応じて正常白血球分類値が妥当かどうかを判断する。

- 本法ではDC分画のうち、CD123+HLA-DR+のpDCの検出が可能である。識別されないイベントには、健康人の末梢血液中に存在しているpDCゲート外の樹状細胞、CD34陽性細胞、死細胞およびデブリスなどが含まれる。
- 樹状細胞およびCD34陽性細胞<sup>4)</sup>（下図の黄色で示す領域）は、【8】リンパ球ゲートプロットでは、リンパ球のCD45発現強度より低めで、SSCではリンパ球と単球の間くらいに出現する。この領域は、大半がP1プロット内に含まれるため、【9】T/NK・Bリンパ球プロットに展開される。従って、本法では両細胞の大半はリンパ球として算定される。



### 3. 本法は健康人末梢血液を測定した場合には、正常白血球識別率の識別率が高い方法である

識別されないイベントには、健康人の末梢血液中に存在している樹状細胞、造血幹細胞、死細胞およびデブリスなどが含まれる。樹状細胞、造血幹細胞などはリンパ球（T/NKゲート内にプロットされる）として算定されるため、各白血球の百分率の合計が99.0%未満となった場合には、死細胞、デブリス、ゲーティング不良、試薬不良、検体不良などが考えられる。

### 4. 目視分類法との比較

本法はフローサイトメトリー法であることから、f)～h)を配慮して、目視分類法との比較をする必要がある。

- ウェッジ法を採用していると、大型細胞が標本の引き終わりに分布してしまう傾向があることから、目視分類法の単球比率はフローサイトメトリー法よりも10-20%低値を示す<sup>7),8)</sup>。この傾向はフローサイトメトリー法を採用している自動血球分析装置から得られる測定値と同様である。（この差を補正する目的で、装置設定時に目視法と合うように校正する場合もあるが、その場合には他の細胞比率が上がることとなる）
- 目視分類法ではsmudge cellsは百分率には入れずに算定しているため、本法と比較する場合には配慮する必要がある。
- 本法はICSHから公開されている国際標準測定操作法で検証済みである<sup>8),9)</sup>。

## References

- 1) Haller Hasskamp J, Zapas JL, Elias EG. Dendritic cell counts in the peripheral blood of healthy adults. *Am J Hematol* 2005;78:314–5.
- 2) Tavakoli S, Mederacke I, Herzog-Hauff S et al. Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection. *Clin Exp Immunol.* 151(1):61-70, 2008
- 3) Nizzoli G, Krietsch J, Weick A et al. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood*, 122(6): 932-42, 2013 Aug 8
- 4) Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow cytometry (JCCLS H3-A V2.0); Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards ; JCCLS, Area Committee on Hematology, Subcommittee on Flow Cytometry, *Journal of Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards* 32(1):51-74, 2017
- 5) Keeney M, Chin-Yee I, Weir K, et al.: Single platform flow cytometric absolute CD34+ cell counts based on the ISHAGE guidelines. *Cytometry.* 34: 61-70, 1998
- 6) CLSI. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline-2nd Edition. H42-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007
- 7) 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
- 8) JILH 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 the Standardization Subcommittee for Blood Cell Counting of the Japanese Society for Laboratory Hematology (JSLH), *International Journal of Laboratory Hematology* 39: 202–222, 2017
- 9) ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting: 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

## 1. 試薬の準備 <共通>

### 1.1 JSLH 抗体（6color パネル）

JSLH 5Diff パネル抗体試薬（以下の内容）を使用する。

※使用する抗体試薬の性能確認については、機種別資料に従って測定前に行う。

Marker	Fluorochrome	Clone	Source	Catalogue Number	( $\mu$ L/test)	Remarks
CD16	FITC	NKP15	BD Biosciences	347523	5.00	
CD3	FITC	SK7	BD Biosciences	349201	2.50	
CD56	FITC	NCAM16.2	BD Biosciences	340410	5.00	
CD19	APC	SJ25C1	BD Biosciences	340437	5.00	原液30倍希釈※
CD14	PE-Cy7	M5E2	BD Biosciences	557742	5.00	原液8倍希釈※
	PC7	RMO52	Beckman coulter	A22331	0.50	
CD33	PE-Cy7	P67.6	BD Biosciences	333946	2.50	原液15倍希釈※
	PC7	D3HL60.251	Beckman coulter	A54824	0.50	
CD294	Alexa Fluor 647	BM16	BD Biosciences	558042	2.50	原液3倍希釈※
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	L243	BD Biosciences	347364	10.00	
CD123	PE	9F5	BD Biosciences	340545	5.00	
CD45	APC-H7	2D1	BD Biosciences	641399	1.25	
	APC-Alexa Fluor 750	J.33	Beckman coulter	A71119	1.25	

※ロットにより希釈率が変動する可能性あり。

### 1.2 溶血固定液（室温保存、用時調製）

機種別資料に従って、溶血固定液を準備する。

### 1.3 BD Trucount™ tubes（BD バイオサイエンス社, Cat.340334）

サンプル調製時に開封したら、速やかにチューブを取り出し、封を注意深く閉じる。

1 時間以内にサンプル調製を行う。

※Trucount™ tubes は開封後 1 か月以内のものを使用すること。チューブ内のビーズペレットに破損やサイズの縮小がないか確認すること。

※測定時、使用機種により Trucount™ tubes を用いての測定に注意が必要であるため、機種別測定法を参照のこと。

## 2. 測定試料の調製＜共通＞

### 2.1 使用する器具

- ・マイクロピペット A（エッペンドルフ）10-100 $\mu$ L
- ・マイクロピペット B（エッペンドルフ）100-1,000 $\mu$ L
- ・マイクロピペット用チップ（200 $\mu$ L用、1mL用）
- ・試験管立て
- ・キムワイブ
- ・ボルテックスミキサ
- ・タイマ
- ・汎用フローサイトメータ（FCM）

### 2.2 試料調製に使用する試薬

- ・溶血固定液

BD FACS™ Lysing Solution または、VersaLyse 溶血液。調整方法については機種別 SOP を参照のこと。

- ・JSLH 抗体（BD Biosciences カクテルカスタム抗体品 最低 200 テストより受注）

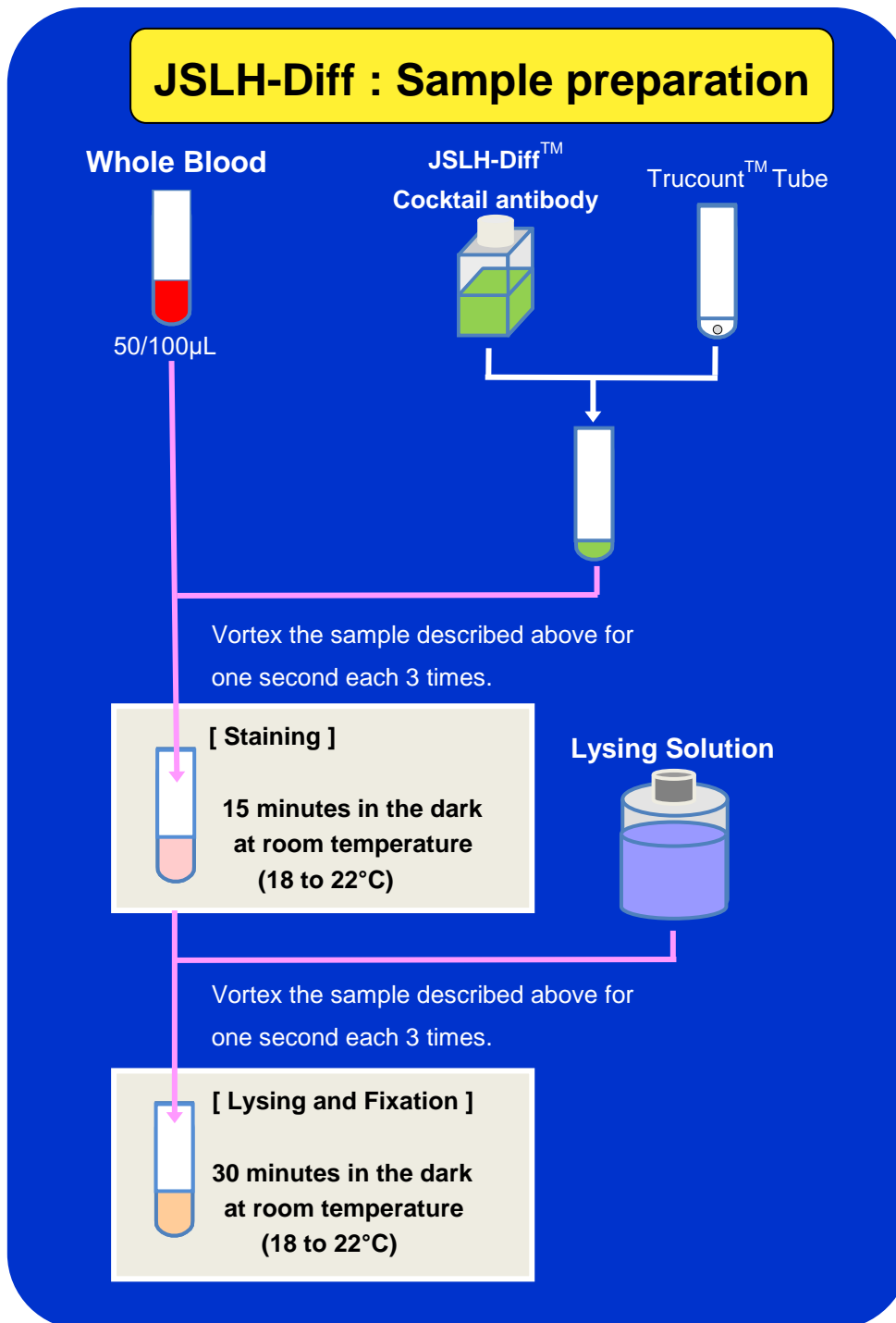
### 2.3 操作（BD Biosciences カクテルカスタム抗体、BD FACS™ Lysing Solution の使用例）

※自家調整抗体カクテルを使用の場合は、添加量に注意すること。

※VersaLyse 溶血液を使用の場合は、血液 100 $\mu$ L、溶血剤 1mL 使用を推奨する。

- 1) EDTA-2K 加血液を使用し、採血後、4 時間以内に試料調製を開始する。
- 2) 使用する JSLH 抗体を室温に 15 分以上放置し、室温に戻す。
- 3) Trucount チューブ内のステンレススチールリテーナ下にある小さな試薬（ビーズペレット）が球状になっていることを目視により確認する。袋から取り出してから 1 時間以内に試料調製を終える。
- 4) マイクロピペット A にチップを装着し、チップ内壁を JSLH 抗体で 3 回馴染ませた後、20 $\mu$ L 採取し、フォワード法で Trucount チューブに入れる。この時、Trucount チューブの底にあるビーズに抗体が触れないように、ステンレススチールリテーナ上部の管壁からフォワード法で入れ<sup>\*2)</sup>、ビーズペレットが溶けていることを目視により確認する。
- 5) マイクロピペット A にチップを装着し、リバース法<sup>\*3)</sup>で全血液を 50 $\mu$ L 採取し、チップの表面をキムワイブで綺麗に拭き取り、JSLH 抗体の入った Trucount チューブに入れる。チップの先がチューブに入っている抗体に触れないように注意する。
- 6) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 7) 室温（18-22℃）、暗所にて 15 分間静置する。
- 8) マイクロピペット B チップを装着し、チップ内壁を溶血固定液で 3 回馴染ませた後、450 $\mu$ L 採取し、フォワード法で染色試料に加える。
- 9) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 10) 室温（18-22℃）、暗所にて 30 分間静置する。

[試料調製の手順]





### 3. 測定

機種別の資料に従って測定を行う。

※検体ごとにゲート設定を行うときの注意

**検体ごとに二次元プロット上の各血球の分布状況が多少変化するので、検体ごとに全プロットのゲート設定の微調整を行う。微調整の詳細は以下のとおり。**

#### 【3】白血球プロット

白血球ゲートは、not Debris になっているが、明らかにデブリスと判断できるイベントは CD45+WBC ゲートから外す。

#### 【4】好中球・好酸球プロット

好中球イベントおよび好酸球イベントが重なる時は、【4】を参考にして2つのゲートが重なっても構わないので、取りこぼしがないようにゲートを設定する。9),10)で「and」および「not」の設定をしているため、2つのゲートが重なってもそれぞれのイベント数は重複せずに表示される。

#### 【8】リンパ球ゲートプロット

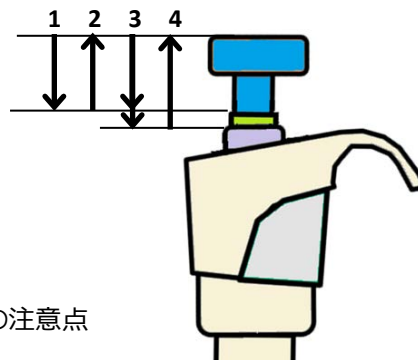
リンパ球集団より大きめに取るようにして、単球集団および好塩基球集団にいるリンパ球などの取りこぼしがないようにゲートを設定する。12)で「and」および「not」の設定をしているため、単球および好塩基球に該当するイベントは重複せずにイベント数に表示される。

#### 4. 補足説明

##### \*1) フォワード法

試薬の分注に使用します。

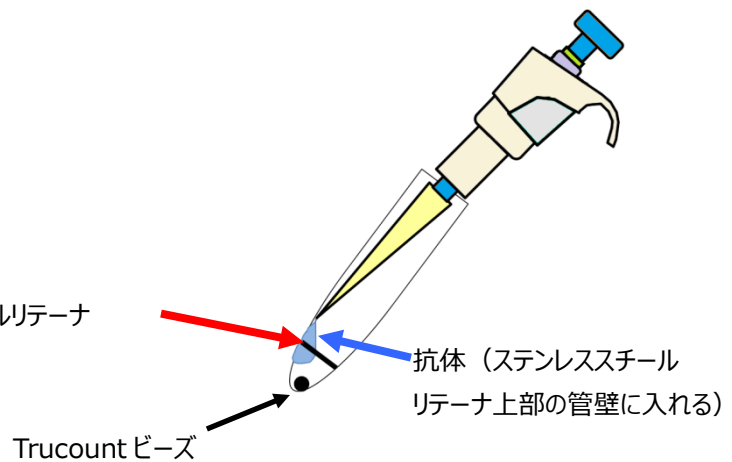
1. プッシュボタンを1段目まで押し下げます。
2. チップを分注液の液面から約1cm下まで浸し、プッシュボタンをゆっくり離します。チップを溶液から引き上げ、容器の縁に先端を軽く触れて外側についた余分な溶液を除きます。
3. プッシュボタンを1段目まで静かに押し上げ、溶液を分注します。約1秒間後にプッシュボタンをさらに2段目まで押し下げ、チップの中を空にします。



##### \*2) Trucount チューブへの分注での注意点



ステンレススチールリテーナ



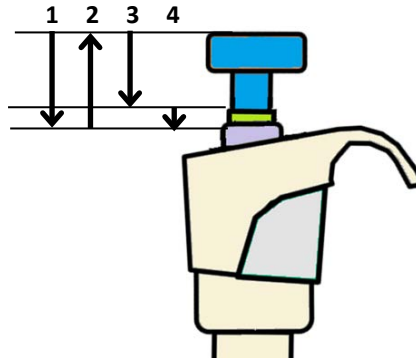
Trucount ビーズ

抗体（ステンレススチールリテーナ上部の管壁に入れる）

\*3) リバーズ法

血液の分注（Trucount チューブ）に使用します。粘性の高い液体や泡立ちやすい液体、微量の分注に適しています。

1. プッシュボタンを2段目まで押し下げます。
2. チップを分注液の液面から約1cm下まで浸し、プッシュボタンをゆっくりと離します、チップが溶液で満たされます。チップを溶液から引き上げ、容器の縁に先端を軽く触れて外側についた余分な溶液を除きます。
3. プッシュボタンを1段目まで静かに押し下げ、設定した容量の溶液を分注します。プッシュボタンは、必ず1段目までで止めてください。チップの中に少量の溶液が残りますが、これは分注しません。
4. チップ内の残った溶液を、廃棄するか元の容器に戻します。



## 5. 新鮮血液を用いた国際常用標準測定操作法の外部精度管理調査

## 5.1 実施方法（2019年11月7日）

## 5.1.1

・JSLH 5Diff パネル抗体試薬：下表のように調製する。

Marker	Fluorochrome	Clone	Source	Catalogue Number	( $\mu\text{L}/\text{test}$ )	Remarks
CD16	FITC	NKP15	BD Biosciences	347523	5.00	
CD3	FITC	SK7	BD Biosciences	349201	2.50	
CD56	FITC	NCAM16.2	BD Biosciences	340410	5.00	
CD19	APC	SJ25C1	BD Biosciences	340437	5.00	原液30倍希釈※
CD14	PC7	RM052	Beckman coulter	A22331	0.50	
CD33	PC7	D3HL60.251	Beckman coulter	A54824	0.50	
CD294	Alexa Fluor 647	BM16	BD Biosciences	558042	2.50	原液2倍希釈※
HLA-DR	PerCP-Cy5.5	L243	BD Biosciences	347364	10.00	
CD123	PE	9F5	BD Biosciences	340545	5.00	
CD45	APC-Alexa Fluor 750	J.33	Beckman coulter	A71119	1.25	
D-PBS(-)			WAKO	045-29795	12.75	
All					50.0	

※ロットにより希釈率が変動する可能性あり。

## ・溶血固定液

VersaLyse 溶血液 1mL に対し、25 $\mu\text{L}$  の IOTest3 固定液を加えて混和液を溶血固定液とする。

## 5.1.2 操作

- 1) EDTA-2K 加血液を使用し、採血後、4 時間以内に試料調製を開始する。
- 2) 使用する JSLH 抗体を室温に 15 分以上放置し、室温に戻す。
- 3) Trucount チューブ内のステンレススチールリテーナ下にある小さな試薬（ビーズペレット）が球状になっていることを目視により確認する。袋から取り出してから 1 時間以内に試料調製を終える。
- 4) マイクロピペット A にチップを装着し、チップ内壁を JSLH 抗体で 3 回馴染ませた後、50 $\mu\text{L}$  採取し、フォワード法で Trucount チューブに入れる。この時、Trucount チューブの底にあるビーズに抗体が触れないように、ステンレススチールリテーナ上部の管壁からフォワード法で入れ<sup>\*2)</sup>、ビーズペレットが溶けていることを目視により確認する。
- 5) マイクロピペット A にチップを装着し、リバース法<sup>\*3)</sup> で全血液を 100 $\mu\text{L}$  採取し、チップの表面をキムワイプで綺麗に拭き取り、JSLH 抗体の入った Trucount チューブに入れる。チップの先がチューブに入っている抗体に触れないように注意する。
- 6) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 7) 室温（18-22 $^{\circ}\text{C}$ ）、暗所にて 15 分間静置する。
- 8) マイクロピペット B チップを装着し、チップ内壁を溶血固定液で 3 回馴染ませた後、1000 $\mu\text{L}$  採取し、フォワード法で染色試料に加える。
- 9) 上記の試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 10) 室温（18-22 $^{\circ}\text{C}$ ）、暗所にて 30 分間静置する。