

**フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン  
(JCCLS H3-A V2.0 )**

**Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow cytometry  
(JCCLS H3-A V2.0 )**

**日本臨床検査標準協議会  
血液検査標準化検討委員会  
フローサイトメトリーワーキンググループ  
Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards ; JCCLS  
Area Committee on Hematology  
Subcommittee on Flow Cytometry**

---

## 目 次

### 【はじめに】

1. 目的と意義
  2. 検査材料の取り扱い
    - 2-1. 検体取り扱い
      - 2-1-1. 検体のサンプリングと検査に用いる検体の種類
      - 2-1-2. 検体情報の取得
      - 2-1-3. 検体ラベルの確認
    - 2-2. 検体の保存
    - 2-3. 凍結保存検体の融解
      - 2-3-1. 凍結融解後の処理
  3. 試薬
    - 3-1. 抗体試薬の使用方法
    - 3-2. CD34 抗体の選択
    - 3-3. CD45 抗体の利用
    - 3-4. 死細胞検出試薬
    - 3-5. 陰性コントロール抗体
    - 3-6. 溶血試薬
    - 3-7. その他の試薬
  4. 試料調製
    - 4-1. 検査材料の評価
    - 4-2. 白血球数の調整
    - 4-3. 測定手技の適正化
      - 4-3-1. 抗体試薬の反応
      - 4-3-2. 溶血処理
      - 4-3-3. 洗 浄
      - 4-3-4. 試料の固定
  5. 測定
    - 5-1. 使用機器の条件
    - 5-2. 使用機器の調整および確認
-

- 5-3. CD34 陽性細胞数の測定法
    - 5-3-1. シングルプラットフォーム法
    - 5-3-2. シングルプラットフォーム法の試薬と操作上の留意点
    - 5-3-3. デュアルプラットフォーム法
  - 5-4. ドットプロットの設定
    - 5-4-1. 基本ドットプロット
    - 5-4-2. 死細胞検出用試薬を用いる場合の追加ドットプロット
    - 5-4-3. シングルプラットフォーム法における追加ドットプロット
  - 5-5. 陽性コントロール試料による機器設定等の検証
    - 5-5-1. 閾値 (Threshold または Noise Discrimination) の確認
    - 5-5-2. 蛍光感度の確認
    - 5-5-3. 蛍光コンペンセーションの確認
    - 5-5-4. 陽性コントロールによる CD34 測定値の確認
  - 5-6. 試料の測定
    - 5-6-1. 測定までの試料の保存方法
    - 5-6-2. 測定の順序
    - 5-6-3. 測定細胞数
    - 5-6-4. 試料の吸引 (サンプリング)
    - 5-6-5. 試料のゲーティング
  - 6. データ解析と分析結果の解釈と報告
    - 6-1. CD34bright 細胞と CD34dim 細胞
    - 6-2. 解析の安定性確認と再検基準
    - 6-3. CD34 陽性のコントロールの測定値
    - 6-4. 分析結果の報告
    - 6-5. 分析結果の保存
  - 7. 分析後の作業
  - 8. 文献
  - 9. 追補
  - 10. 基本用語の説明
-

**【はじめに】**

20 世紀の後半、免疫学の急速な発展に伴い白血病などの造血器腫瘍の診断・治療にもその技術が導入されるようになった。特に細胞融合法を駆使したモノクローナル抗体と先端機器技術の粋を集めたフローサイトメトリーの開発は、それまでの形態学を中心とした造血器腫瘍の診断法を飛躍的に進展させた。今では、フローサイトメトリーを用いた血液細胞の同定・解析は造血器腫瘍の診断にはなくてはならないものとなっている。

しかしながら、実際の臨床現場への導入が急速であったこともありフローサイトメトリーの標準化については大きく遅れることとなった。以前われわれが実施した調査でも、各施設が独自の方法で解析するため、代表的な表面抗原においてさえ各施設で分析結果に大きな開きがあった。日本臨床検査標準協議会(JCCLS : Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards)では、フローサイトメトリーの標準化を推進するために先に 3 つのガイドラインを作成した。

1 つは、ヒト末梢血を解析するためのガイドラインとして「フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球表面抗原検査に関するガイドライン(JCCLS H1-A)」を策定し、すでに承認 (approve) されている。ついで、造血器腫瘍細胞を分析するためのガイドラインとして「フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関するガイドライン(JCCLS H2-P)」および幹細胞移植のためのガイドラインとして「フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLS H3-P V1.0 )」を作成した。以上の 2 つについてはパブリックコメントを聴取するも未完成であり、2007 年にパブリックコメントを聴取開始してから 8 年が経過した。

今回は、そのうちの「フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLS H3-P V1.0 )」をパブリックコメントおよびフローサイトメトリーの試薬や機器や技術の進歩も踏まえ、「フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLS H3-P V2.0 )」として大幅に改訂した。その後、再度パブリックコメントを求めた後、各関連学会のパブリックコメントを反映し、「フローサイトメトリーによる CD34 陽性細胞検出に関するガイドライン (JCCLS H3-A V2.0 )」として承認された。本ガイドラインによって幹細胞移植がより効率良く推進されることを願うものである。

**1 . 目的と意義**

白血病など造血器腫瘍の治療は、その診断法の進歩とともに、近年急速な発展を遂げている。中でも、造血幹細胞移植は、造血器腫瘍を完治させる治療法のひとつとして、多くの施設で施行されている。

造血幹細胞移植の中でも、末梢血幹細胞移植や臍帯血幹細胞移植が、多施設で実施されるようになり、移植の成否を決定する大きな要因として移植片中の幹細胞数の多寡が上げられる。したがって、移植片中の幹細胞の算定は大変重要な課題である。

一般に、ヒトの幹細胞の指標として「CD34 陽性細胞」を用いる。しかし、CD34 陽性細胞は血液中にごくわずかしか存在しないため、その解析には困難が伴い、より一層の注意が必要である。本ガイドラインは、検体中にごくわずかしか存在しないが、幹細胞移植の成否を握る重要な CD34 陽性細胞の解析を、精確かつ円滑に行うための標準化を目的として作成した。

現在、世界的に標準法とされている ISHAGE (International Society for Hematotherapy and Graft Engineering) ガイドライン<sup>1)</sup>に準拠した、シングルプラットフォーム (single platform) 法<sup>2)3)4)</sup> [5-3-1,2 参照]が広く用いられているため、本ガイドラインでは、この方法を中心に解説するが、デュアルプラットフォーム (Dual platform) 法 [5-3-3 参照]についても記述する。

## 2.検査材料の取り扱い

### 2-1 検体取り扱い

検体は、無菌的に保存されているが未知の病原体を含む可能性があるものとみなし、その取扱いについては検体取扱い時に手袋・眼鏡を着用するなど十分な安全性を考慮すること。

#### 2-1-1 検体のサンプリングと検査に用いる検体の種類

分析対象となる材料は、G-CSF で造血幹細胞を動員した末梢血や採取産物 (PBSCH : Peripheral Blood Stem Cell Harvest 検体)、骨髄穿刺液あるいは臍帯血である。通常は、新鮮検体であるが、凍結保存後に融解した検体の場合もある。

#### 2-1-2 検体情報の取得

被験者氏名および ID、年齢、性、採取担当医師および検体採取日、採取時間などの背景情報を検体と共に獲得すること。

#### 2-1-3 検体ラベルの確認

検体ラベルには、被験者氏名および ID、検体材料名、検体採取日が明記されているのを確認すること。

---

## 2-2 検体の保存<sup>5)6)</sup>

検体は採取後直ちに分析することが望ましい。もし、一時的に保管する場合は4℃で保存した方が生細胞率や細胞回収率が良いとされる。ただし、室温（22℃）でも保存可能である。

その他の取扱い方については、末梢血リンパ球表面抗原検査に関するガイドライン（JCCLS H1-A）を参照すること。

## 2-3 凍結保存検体の融解

検体の入ったパイロットチューブが凍結状態で提出された場合は、37～40℃の恒温槽で急速に融解する。2～3分程度で解凍を終了することが目安となる。

### 2-3-1. 凍結融解後の処理

凍結融解後には直ちに分析することが望ましい。凍結融解後、細胞の凝集塊がある場合は、概ね孔径が40μmのナイロンメッシュで濾過し測定することが可能であるが、凝集塊にCD34陽性細胞が含まれ正確に測定できていない可能性があるため報告書の特記事項として凝集塊があったことを記載すること。

## 3. 試薬

CD34陽性細胞測定では、検体中の目的細胞数を可能な限り精確かつ精密に測定することが重要である。このため、以下に示すCD34抗体とCD45抗体を組み合わせた2カラー分析、もしくは、死細胞検出用試薬や絶対数測定用の内部標準粒子試薬を組み合わせた3～4カラー分析を行うことが推奨される。各々の試薬を個別にそろえるほか、ISHAGEガイドライン等<sup>1)2)3)4)</sup>の推奨測定項目に準じた測定キットも市販されておりそれらを使用してもよい。

### 3-1. 抗体試薬の使用法

原則として、抗体試薬は添付の取扱説明書の指示にしたがって使用する。ただし、抗体試薬の反応後に洗浄せずに測定する場合（4-3-3参照）は、使用する全ての抗体試薬について未洗浄で測定するための使用条件（抗体試薬の添加量、至適細胞数および反応条件）を確認しておく必要がある。単染色用の抗体試薬を組み合わせる場合は、各抗体試薬の混合比率についても施設内で事前に検証しておくことが望ましい。

### 3-2. CD34抗体の選択

CD34抗原分子は、多型性に富み陰性荷電した糖鎖を多く含んでいる。そのためCD34モノクローナル抗体は、ノイラミニダーゼと*Pasteurella haemolytica*由来O-グリコプロテア

ーゼ処理後の CD34 抗原への反応性などから少なくとも次の 3 種類のエピトープ・クラスに細分化される<sup>78)</sup>。

- ・クラス I 抗体

多型性に富む糖鎖末端部を認識する。CD34 抗原への反応性は、細胞間のバラツキや抗体（クローン）の違いによる差異が大きい。

主な抗体：My10, Immu-133, Immu-409, BI-3C5 など

- ・クラス II 抗体

糖鎖部分を認識するが、クラス I 抗体よりも反応性のバラツキや抗体間差は少ない。しかしながら、陰性荷電の強い領域を認識するため FITC 標識抗体（陰性に荷電）では抗原への結合力が弱まる恐れがある。

主な抗体：QBEnd-10, ICH3, NU-4A1, CLB-MD34.2 など

- ・クラス III 抗体

糖鎖に依存しないエピトープを認識する。反応性のバラツキや抗体間差が少なく蛍光標識の有無や種類によらず良好な抗原結合力を示す。

主な抗体：8G12, 581, 563, BIRMA-K3 など

以上の特性から、CD34 陽性細胞の測定にはクラス I 抗体は推奨できない。クラス III 抗体もしくは、PE 標識のクラス II 抗体を使用すべきである。クラス III 抗体の場合は様々な蛍光標識抗体を選択可能だが、できるだけシグナルとノイズの分離が明瞭な抗体を用いることが望ましい。このことから、488nm 波長のアルゴンレーザーで励起するフローサイトメーターで測定する場合、PE 標識抗体が用いられることが多い。

### 3-3. CD45 抗体の利用

CD45 抗体は、急性白血病検体において芽球の識別に利用されているが CD45 抗体を CD34 抗体と組み合わせて 2 カラーで分析することによって CD34 陽性細胞の解析精度を高めることができる。CD45 抗原の分化段階初期の幼若細胞における発現レベルは、成熟リンパ球や単球よりも低く、正常な CD34 陽性細胞においても CD45 抗原発現レベルは低～中程度である。したがって、CD34 と CD45 を組み合わせることによって CD34 陽性 CD45dim 細胞（造血幹細胞／前駆細胞）と CD34 陽性 CD45bright 細胞（CD34 抗体が非特異的に結合したリンパ球または単球）の識別が可能となる。

また、CD45/SSC プロットにより CD45 陽性の白血球と溶血後の赤血球残渣や CD34 抗体の非特異的染色の原因となりうる血小板、血小板凝集、その他の残渣との識別が容易となる。

CD45 抗体は、CD45 ゲーティング用として推奨されているクローンを選択する<sup>3)</sup>。蛍光標識は、CD34 抗体や死細胞検出試薬（3-4 参照）との組み合わせを考慮して選択すること。

### 3-4. 死細胞検出試薬

試料採取直後に測定できない場合や凍結融解後の検体など死細胞の混入率が高いと考えられる検体を測定する場合には、死細胞検出試薬の使用が推奨される。

3 カラー以上のマルチカラー解析が可能な測定機器では、細胞膜透過性のない核染色試薬を用いて CD34 陽性細胞の測定ゲートから死細胞を除外することが可能である。

死細胞検出試薬としては、ヨウ化プロピディウム (PI) や 7-アミノ-アクチノマイシン-D (7-AAD) が通常用いられる。FITC 標識 CD45 抗体/PE 標識 CD34 抗体と組み合わせる場合には、PE 蛍光の検出器 (FL2) への蛍光漏れこみの少ない 7-AAD が最適である (蛍光漏れこみ補正については JCCLS H2-P 補遺を参照)。自家調製の試薬を用いる場合は、蛍光色素のロット毎に至適最終濃度等の確認が必要である。

細胞膜に透過性のある DNA 蛍光色素 (LDS-751、SY-III-8 等) は、死細胞と生細胞の識別が困難なため死細胞検出試薬としては使用できない。

トリパンプルー法は、分析にあたって検体の生細胞率 (viability) を確認する目的でよく用いられている。しかし、CD34 陽性細胞測定においては、試料中の CD34 陽性細胞の割合が極めて小さいこと、検体中の各細胞集団の生細胞率が一律ではないことから CD34 陽性細胞の測定値をトリパンプルー法による生細胞率で補正することは適当ではない。

### 3-5. 陰性コントロール抗体

CD34 陽性細胞の測定では、陰性コントロール試料は CD34 陽性領域の設定よりはむしろ抗体試薬の非特異的結合の確認に用いられているが本測定が省略される場合もある<sup>9)</sup>。

数が非常に少ない CD34 陽性細胞を未洗浄の試料で確実に測定するためには、陰性コントロール抗体は CD34 抗体とアイソタイプを揃えるだけでなくバックグラウンドの蛍光強度レベルも同等にする必要がある。測定キット等の専用コントロール抗体を使用しない場合は、予め正常末梢血等で陰性コントロール抗体の蛍光強度分布が CD34 陰性集団の蛍光強度分布と同様であることを確認しておくことが望ましい。

CD45 抗体については、用途が CD34 陽性細胞 (CD45dim) のゲーティングであるため陰性コントロール抗体は不要である。



### 3-6. 溶血試薬

CD34 陽性細胞の測定では、以下の点から塩化アンモニウム溶血剤など白血球への作用が比較的弱い溶血試薬の使用が推奨される。

1) PBSCH 検体の場合、採取の過程で赤血球が大幅に除去されているので溶血力の比較的弱い塩化アンモニウム溶血試薬でも十分に溶血できる。

2) PBSCH 検体は、白血球数が多いので検体をさらに希釈して測定することが多い。この場合、赤血球や血漿成分が希釈されるために溶血試薬によってはその作用が相対的に強くなり白血球が壊れる恐れがある。

3) 塩化アンモニウム溶血剤は、白血球への作用と同時に溶血力そのものも比較的弱いが、CD45 ゲーティングを行うことで未溶血の赤血球や血小板の影響を最小限に抑えることが可能である。

4) CD34 陽性細胞数が非常に少なく、かつ検体によっては陽性細胞の蛍光強度が弱いこともあるため固定による白血球の非特異的蛍光を避けるとともに散乱光に影響の少ない溶血試薬が望ましい。

固定剤を含む溶血試薬を使用すると細胞膜の変性により死細胞検出のための核染色剤 7-AAD などが浸透し、生細胞と死細胞の識別が不可能となる。

測定キットや市販の溶血試薬を用いる場合は、添付取扱説明書にしたがって調製、保管、使用する。自家調製の溶血試薬を用いる場合は、性能や保存条件と安定性などについて事前に検証する。

### 3-7. その他の試薬

検体の希釈や洗浄には、Ca イオン、Mg イオン不含のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) もしくはハンクス液 (Hank's BSS) を用いる。いずれもウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清等の血清タンパクを 0.5~2%程度添加することが望ましい。

シングルプラットフォーム法で CD34 陽性細胞数を直接測定する場合の絶対数測定用試薬については、5-3-2 で述べる。

測定機器の設定等に用いる試薬については、第 5 章 (測定) で述べる。

## 4. 試料調製

CD34 陽性細胞の測定では、できるだけ試料に傷害を与えない調製方法を選択する必要がある。また、未洗浄での測定やシングルプラットフォーム法 (5-3-1,2 参照) による CD34

陽性細胞数の直接測定など CD34 陽性細胞の「絶対数」の測定誤差を低減するための方法論を積極的に取り入れる必要がある。CD34 測定キット等を用いる場合は、添付の取扱説明書にしたがって操作する。

#### 4-1. 検査材料の評価

検体を検査材料として受け入れるための基準については、他のガイドライン (JCCLS H1-A および JCCLS H2-P) を参照すること<sup>10)11)</sup>。

測定に死細胞検出試薬を用いない場合は、トリパンブルー法など施設が通常用いている方法によって検体中の生細胞率 (viability) を別途確認、記録しておくことが望ましい。ただし、この方法では CD34 陽性細胞における死細胞の検出は不可能である (3-4 参照)。

#### 4-2. 白血球数の調整

染色を開始する前に検体中の白血球数 (WBC) を測定し、分析に用いる抗体試薬の推奨反応条件 (一般に、1 テストあたり白血球 2000~20000 個/ $\mu$ L 程度であることが多い) の範囲内にあるかどうかを確認する。必要があれば白血球数が至適範囲内になるように検体を希釈または濃縮する。検体の希釈を行った場合は、その希釈倍数を記録し測定結果を補正する。

白血球数が多い場合の検体の希釈には、Ca イオン、Mg イオン不含のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) またはハンクス液を用いる。この際、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清等の血清タンパクを添加 (0.5~2%程度) した方が望ましい。白血球数を再度測定し至適範囲内にあることを確認する。

分析に必要な検体量は、抗体試薬の取扱説明書に従う。通常は、試験管 1 本あたり検体 100  $\mu$ L が目安だが、測定する細胞数によっては検体量の調整が必要となる場合もある。

#### 4-3. 測定手技の適正化

##### 4-3-1. 抗体試薬の反応

抗体試薬の使用量は、試薬の取扱説明書に従う。ただし、単染色用抗体試薬を組み合わせる場合や未洗浄で測定する場合は、試薬の至適使用量等について事前に検討しその結果に基づいて使用する (3-1 参照)。抗体試薬の反応は、通常は 18~25°C で 15~30 分間行うことが多い。検体が分離細胞浮遊液である等の理由により 2~8°C で抗体試薬を反応させる場合は、反応時間について予め検討しておく。

死細胞検出試薬を用いる場合は、試薬の取扱説明書にしたがって使用する。ヨウ化プロ

ピディウム (PI) を用いる場合は、測定の前直前に添加する。

#### 4-3-2. 溶血処理

CD34 陽性細胞の測定では、通常は、抗体試薬の反応後に溶血処理を行う。

溶血試薬の添加量、溶血に必要な時間や至適温度は、溶血試薬によって異なるため使用する溶血試薬の取扱説明書にしたがって操作する。過剰な溶血処理は、白血球の破壊や喪失、非特異的蛍光の増大を招くため溶血の温度と時間は厳密に守る。自家調製の溶血試薬を用いる場合は、至適反応条件について事前に検討しておく。

末梢血から分離した単核細胞分画や分離濃縮した CD34 陽性細胞浮遊液など赤血球をほとんど含まない検体の場合には、溶血処理を行わずに次のステップに進んでよい。

#### 4-3-3. 洗浄

シングルプラットフォーム法 (5-3-1,2 参照) の場合は、洗浄に伴う細胞の喪失が測定結果に直接影響するため、洗浄を行わずに測定する。デュアルプラットフォーム法 (血球計数による白血球数と CD34 陽性率から CD34 陽性細胞数を算定する場合) も、洗浄で全ての白血球亜分画が均等に回収される保証がないためできるだけ洗浄を行うべきではない。

洗浄を行う場合の遠心分離の条件については、予め施設で検討しておくことが望ましい。

#### 4-3-4. 試料の固定

一般にフローサイトメトリーでは、調製した試料をホルムアルデヒド (パラホルムアルデヒド) 等の固定剤により固定した後に測定する (JCCLS H1-A, H2-P 参照)。しかし、CD34 陽性細胞の測定においては、試料の固定によって CD34 の蛍光強度の低下やバックグラウンド蛍光の増強がみられることがあるので注意が必要である。試料を固定する場合は、CD34 陽性細胞測定に影響のないことを予め確認しておくことが望ましい。

死細胞検出試薬を使用する場合は、固定剤は使用しない。市販の溶血試薬には、固定剤を含むものがあるので注意する。

## 5. 測定

CD34 陽性細胞の測定は、ごく少ない CD34 陽性細胞をできるだけ精度良く測定するため、ゲーティング方法等に様々な工夫を凝らした方法論が提案されている。実際に使用されている代表的な方法として国際細胞療法学会 (ISCT) が推奨する ISHAGE ガイドライン<sup>19)12)</sup>があり、この他にも様々な CD34 測定法が報告されかつ使用されている<sup>2)</sup>。

本ガイドラインでは、ISHAGE ガイドラインを基本として測定手順の概要や測定上注意すべき点等について説明する。

#### 5-1. 使用機器の条件

使用するフローサイトメーターは、前方散乱光 (FSC)、側方散乱光 (SSC)、CD45 蛍光、CD34 蛍光の最低 4 パラメータ (2 カラー) を測定できることが必須である。また、死細胞検出用試薬の蛍光も含めた 5 パラメータ (3 カラー) 以上の機器の使用が望ましい。パラメータとして時間軸が取れるとなお良い (5-6-4 参照)。

測定およびデータ解析に用いるソフトウェアは、論理式にしたがった複数の解析ゲートの組み合わせ (例えば、「ゲート A 且つ ゲート B」) が可能であることが望ましい。

CD34 測定キット等や専用に用意された測定・解析ソフトウェアを用いる場合は、機器、ソフトウェアおよび試薬の取扱説明書にしたがって機器調整、試料調製および測定、データ解析等を行う。

#### 5-2. 使用機器の調整および確認

使用機器の光学系および流体系の調整や散乱光/蛍光検出器の性能等については、機器の取扱説明書にしたがって使用前に正しく調整、確認しておく (詳細は JCCLS H2-P を参照)。

#### 5-3. CD34 陽性細胞数の測定法

##### 5-3-1. シングルプラットフォーム法

粒子濃度あるいは総粒子数が既知の蛍光標識ポリスチレンラテックス粒子を「内部標準」として試料に加えて測定し、目的細胞の測定イベント数と内部標準粒子の測定イベント数の比例計算を行うことでフローサイトメーターのみで CD34 陽性細胞の絶対数を求めることができる (図 5-3-1)。

CD34 陽性細胞絶対数 (／ $\mu\text{L}$ )

={CD34 陽性イベント数／内部標準イベント数}×内部標準濃度 (／ $\mu\text{L}$ ) ×検体希釈倍率

この方法は、精確性に乏しい「CD45 陽性細胞」の解析領域の結果を必要としないので、より信頼性の高い CD34 陽性細胞数の測定方法として推奨できる。

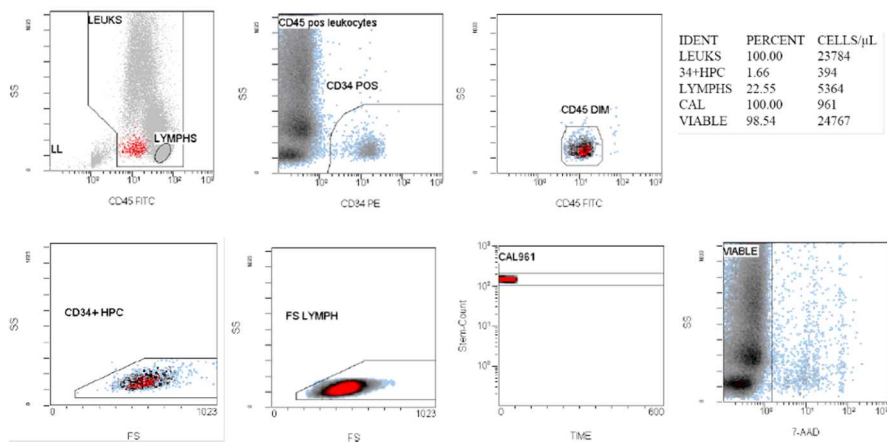
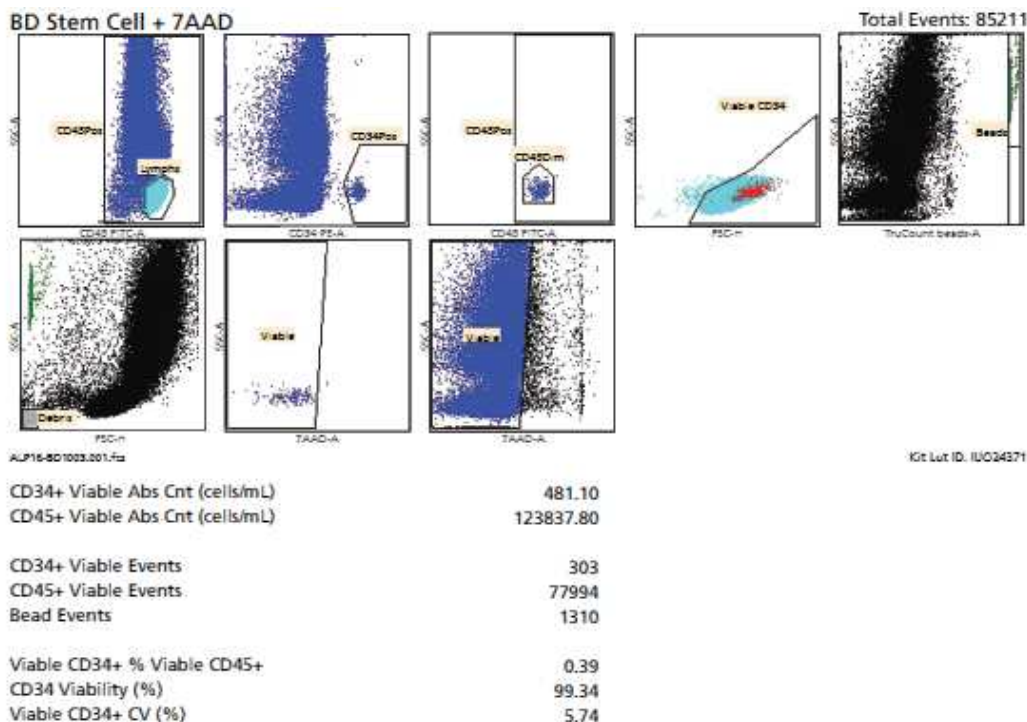


図 5-3-1 内部標準粒子を用いたシングルプラットフォーム法解析例 (上段)

BD FACSCanto™ クリニカルソフトウェア (医療機器) の BD Stem Cell+7AAD パネルによる自動解析結果。予め入力した TruCount ビーズ数 (ロット毎に異なる)、希釈倍率と目的細胞および取り込まれたビーズのカウント数および検体量(100 μ L)より、CD34 陽性細胞絶対数 (/μL) が算出される。

(下段)

Beckman Coulter StemCXP ソフトウェアによる Stem-Kit 解析結果。予め入力した Stem-count ビーズ濃度 (ロット毎に異なる) を基に、目的細胞および取り込まれたビーズのカウント数から CD34 陽性細胞絶対数 (/μL) が算出される。

### 5-3-2. シングルプラットフォーム法の試薬と操作上の留意点

シングルプラットフォーム法では、絶対数測定用の内部標準粒子試薬が必要となる。濃度既知の標準粒子懸濁液を測定直前に一定量（通常は検体と等量）添加するタイプと、予め一定個数の標準粒子が試験管に封入されているタイプの2種類が市販されており、いずれも、試薬の製造時に標準粒子の濃度もしくは個数が厳密に検定されている。

シングルプラットフォーム法では、測定試料中の標準粒子濃度の精確性が重要となる。したがって、前者（懸濁液添加タイプ）では、標準粒子試薬の分注精度が、後者（試験管封入タイプ）では標準粒子の分散が検体分注量の精確性ととも測定精度上の鍵となる。このため、標準粒子試薬の取扱説明書にしたがった正しい取り扱いを行うことが重要である。シングルプラットフォーム法では、正確な検体量の添加が、絶対数計測の精度に影響を与える。特に粘性の高い末梢血検体においてはピペットチップの内側に血液が付着して残り、分注量が設定量よりも少なくなりやすい。従って、検体分注の際には、リバースピペティング法（分注する量よりも多めに吸引し、設定容量のみ排出）により分注精度を高めることが重要である。また、一定量の標準粒子を測定試料に添加するタイプにおいては、同様にリバースピペティング法により標準粒子浮遊液を正確に添加する必要がある。さらに、使用するピペットは正しくキャリブレーションされている必要がある。なお、標準粒子を添加するタイプの試料の安定性は比較的短いため、試料調製後は、できるだけ速やかに測定する。各市販キットを使用する場合は、取扱説明書に従う。

標準粒子は、一般的なフローサイトメーター（488nm 励起）で測定可能な広範な蛍光波長特性を有しているため抗体試薬や死細胞検出試薬で使用しない蛍光チャンネルを利用して測定することができる。なお、2カラーないし3カラー分析のみ対応している機器の場合でも、標準粒子の蛍光強度がCD45やCD34の蛍光強度に比してはるかに強いことを利用して蛍光標識抗体と標準粒子を同じ蛍光チャンネルで同時に測定することが可能である。しかしながら、標準粒子を細胞数としてカウントしないように注意する。

### 5-3-3. デュアルプラットフォーム法

検体中のCD34陽性細胞の濃度（絶対数）は、フローサイトメトリーによって得られる白血球（CD45陽性細胞）に占めるCD34陽性細胞の割合（CD34陽性率）と別途白血球計数検査で得られた白血球数（WBC）から次式で求めることができる。

$$\begin{aligned} \text{CD34 絶対数 (}/\mu\text{L)} &= \text{CD34 陽性率 (\%)} \times \text{WBC (}/\mu\text{L)} \times \text{検体希釈倍率} \\ &= \{\text{CD34 陽性イベント数} / \text{CD45 陽性イベント数}\} \times \text{WBC (}/\mu\text{L)} \times \text{検体希釈倍率} \end{aligned}$$

この方法は簡便だが、フローサイトメーターの他に血球計数装置が必要である。また、CD34 陽性率を求める際に分母となる「CD45 陽性細胞」の解析領域は、精確性に乏しい。

この方法を用いて CD34 陽性細胞を正確に定量するためには、CD45 や側方散乱光 (SSC) などと CD34 の二次元スキャタグラム上で CD34 陽性細胞群が明確に認識できていることが必要である。また、健常成人の平常時末梢血等の陰性コントロール検体の同時測定など、精度を向上しうる方法を併用することも必要である。各施設で CD34 陽性細胞測定プロトコールを作成する際は、シングルプラットフォーム法による同時測定を行い、十分な精度が得られることを検証することを強く推奨する。さらに、十分な測定精度が維持されていることを、定期的に確認されることを推奨する。

#### 5-4. ドットプロットの設定

測定に用いる試薬、機器、解析ソフトウェア等の条件にしたがって各施設で適宜設定する。CD34 測定キットやプレミックス試薬を使用する場合など、設定条件が規定されている場合はそれに従う。

##### 5-4-1. 基本ドットプロット<sup>1)</sup>

FSC、SSC、CD45 蛍光、CD34 蛍光を用いて、次の順序による階層化論理ゲーティング (logical gating) で CD34 陽性造血幹細胞を検出・同定する (図 5-4-1 a~d)。

- ① SSC/CD45 プロット上で、白血球集団 (CD45 陽性細胞) をゲートする (図 5-4-1 a)。
- ② 白血球集団の SSC /CD34 プロット上で、CD34 陽性集団をゲートする (図 5-4-1 b)。
- ③ CD34 陽性細胞集団の SSC /CD45 プロット上で、SSC が低く CD45dim の集団をゲートする (図 5-4-1 c)。
- ④ CD34 陽性 CD45dim 集団の SSC /FSC プロット上で、造血幹細胞集団を解析する (図 5-4-1 d)。

造血幹細胞の SSC /FSC プロット上の特徴は、「SSC は低く、FSC は低から中程度」である。

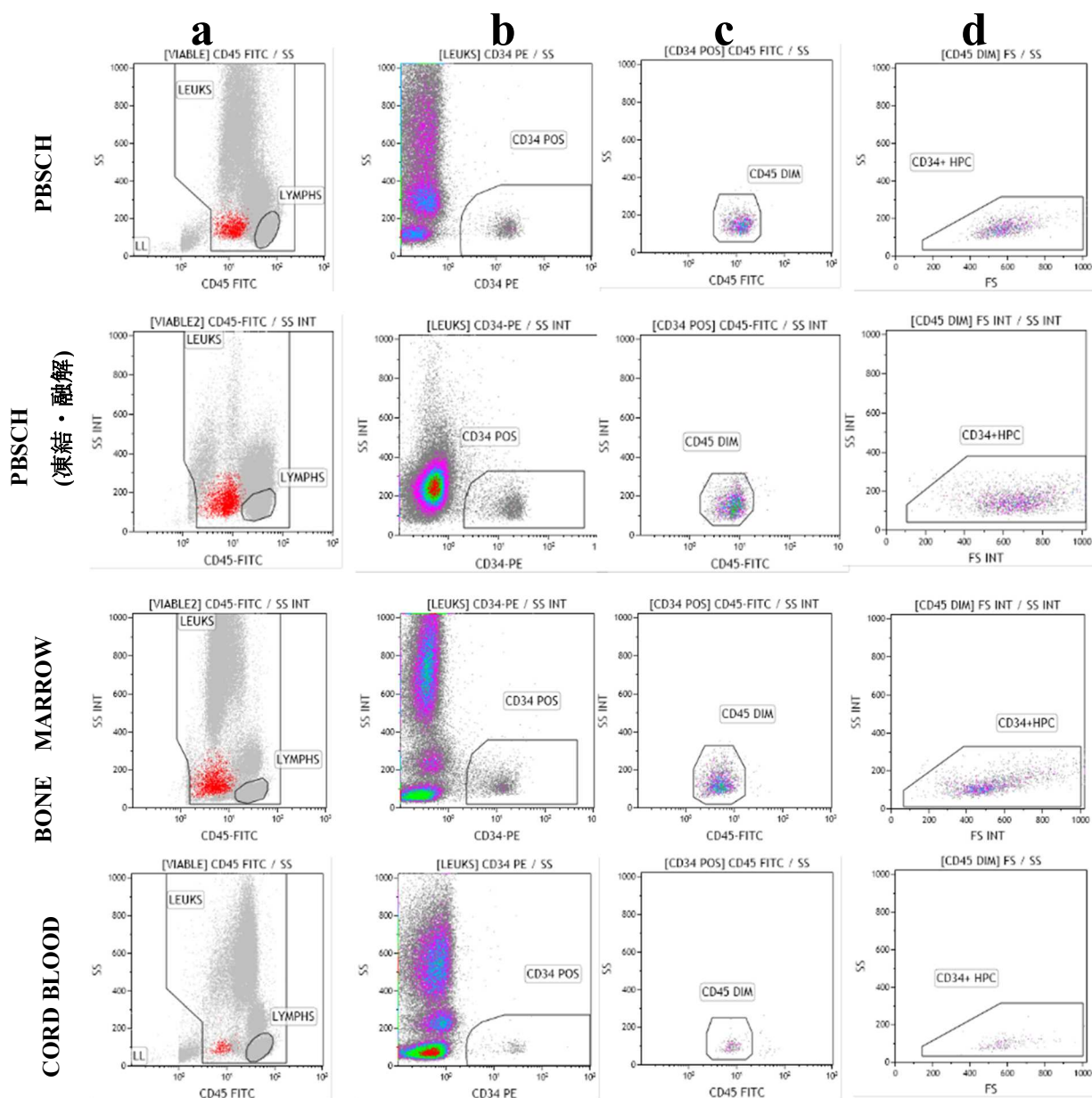


図 5-4-1 基本ドットプロットの例

末梢血アフェレーシス検体 (PBSCH)、骨髓検体 (BONE MARROW)、臍帯血検体 (CORD BLOOD) について、a : SSC/CD45 プロット (縦軸が SSC=以下同様)、b : SSC/CD34 プロット (CD45+ゲート)、c : SSC/CD45 プロット (CD45+CD34+ゲート)、d : FSC/SSC プロット (CD34+CD45dim ゲート)の例を示す。

5-4-2. 死細胞検出用試薬を用いる場合の追加ドットプロット <sup>2)3)12)</sup>

死細胞検出用試薬 (PI または 7-AAD) を用いる場合には、別に SSC/死細胞検出用試薬のプロットを作り、死細胞検出用試薬が陰性の集団全て (生細胞)、もしくは陽性の集団 (死



細胞)に解析領域ゲートを設定する(図5-4-2)。市販の死細胞検出用試薬を用いる場合は、取扱説明書を参考にプロットとゲートを設定する。

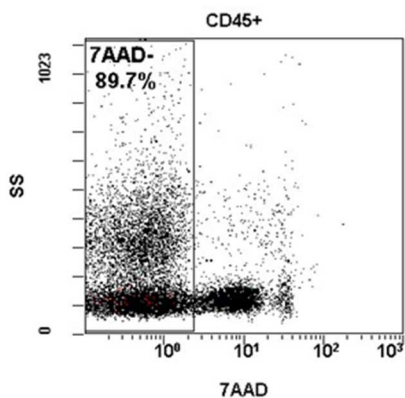


図 5-4-2 死細胞検出用試薬を用いる場合の追加プロットの例

5-4-3. シングルプラットフォーム法における追加ドットプロット<sup>3)</sup>

内部標準粒子試薬を用いたシングルプラットフォーム法で CD34 陽性細胞数を直接測定する場合の設定は、使用する機器や試薬の組み合わせにより異なる。内部標準粒子試薬の取扱説明書を参考にプロットとゲートを設定する。時間軸を組み合わせたプロットを作成しておく、試料測定中の機器の状態も確認できる(図5-4-3)。

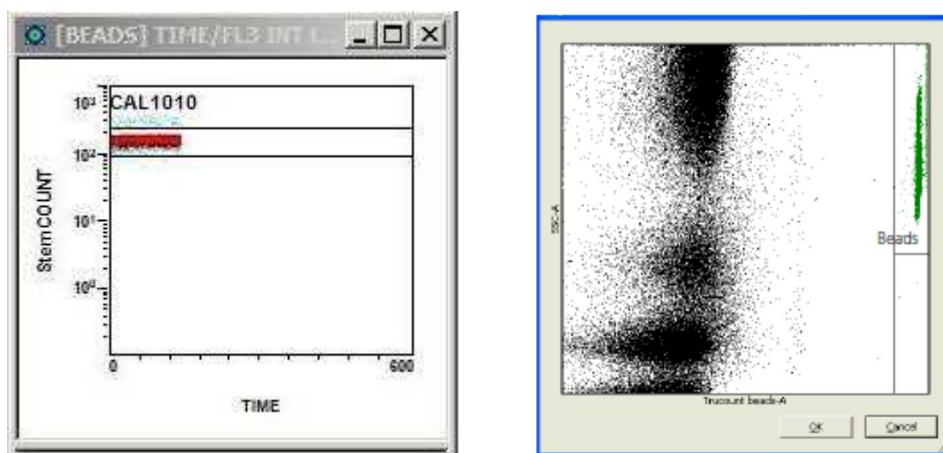


図 5-4-3 シングルプラットフォーム法の追加プロットの例

内部標準粒子と時間軸のドットプロット(左図)、FL4(APC等検出) 蛍光パラメーター/SSCプロットによる内部標準粒子(Truocount ビーズ) 解析ゲート(右図)の例を示す。

### 5-5. 陽性コントロール試料による機器設定等の検証

試料測定の前に適切な陽性コントロール試料で各ゲートの大まかな位置を把握するとともに、FSC、SSC、蛍光の感度や閾値（ThresholdまたはNoise Discrimination）、蛍光コンペンセーションなどが適切かどうかを確認することが望ましい。

#### 5-5-1. 閾値（ThresholdまたはNoise Discrimination）の確認

CD34 陽性細胞は、リンパ球と同程度かやや大きい FSC 強度を有する。FSC 閾値は、FSC / SSC プロット等を参照してリンパ球集団がカットされることのない位置に設定する。これは、FSC 閾値の設定によって CD34 陽性細胞をカットしてしまわないようにするためである。

シングルプラットフォーム法で内部標準粒子を測定する場合は、キットによっては粒子の径がリンパ球より小さい場合がある。この場合、閾値を FSC に設定すると粒子が正確に計測できなくなる。従って、閾値は FSC ではなく CD45 蛍光パラメータで設定する必要がある。CD45 蛍光パラメータに閾値を設定する場合は、CD45dim の CD34 陽性細胞がカットされないように注意し、低めに設定するようにする。

#### 5-5-2. 蛍光感度の確認

CD34 陽性細胞の初回測定時および測定条件が大きく変わり得る場合には、適当な陽性コントロール試料を測定して CD34 陽性細胞の CD34 および CD45 の蛍光強度分布が適切な位置にあることを確認する。さらにシングルプラットフォーム法の場合には、細胞の CD34 蛍光および CD45 蛍光と内部標準粒子の蛍光が明瞭に区別できることを確認する。

測定条件が大きく変わり得るのは、主に以下の場合である。

- ① 機器の使用頻度が少ない場合（例えば、週 1 回未満）
- ② 測定機器の修理・メンテナンス実施後
- ③ 抗体試薬のロット更新後

また、測定条件は、経時的にも変化し得るため定期的に同様の確認を行うことが望ましい。

#### 5-5-3. 蛍光コンペンセーションの確認

5-5-2 で蛍光感度を再調整した場合は、蛍光コンペンセーションについても必ず再調整する。

#### 5-5-4. 陽性コントロールによる CD34 測定値の確認

5-5-1 から 5-5-3 の確認・調整が終わった後、CD34 陽性細胞数が既知の陽性コントロール試料の測定値から回収率（CD34 陽性細胞数の実測値と期待値の比率）を計算することによって試料調製も含めた測定システム全体を検証することができる。回収率の許容範囲は、陽性コントロール試料の特性等に応じて施設で設定する。陽性コントロール試料は、市販 CD34 陽性コントロール細胞を添加した健常人末梢血や凍結保存した CD34 陽性細胞数既知の検体などを、試料と同様に試料調製したものを用いるとよい。

#### 5-6. 試料の測定

##### 5-6-1. 測定までの試料の保存方法

調製後の試料は、測定まで遮光下で保存する。また、調製後直ぐに測定しない場合は、測定まで 2-8℃で保存することが望ましい。溶血後未洗浄で測定する試料については、調製済みの状態で長時間保存することは難しい。調製済み試料を保存する温度条件と保存可能な期間について試薬の取扱説明書もしくは施設内の予備検討で確認する。

##### 5-6-2. 測定の順序

測定の精密性を高めるため同一検体で CD34/CD45 を 2 回測定し、その平均値を報告値とすることが ISHAGE ガイドライン<sup>1)</sup>で推奨されている。市販の測定キットを使用する場合は、取扱い説明書に従って使用する。

###### ① CD34/CD45 染色試料の測定。

CD34 陽性、CD45 弱陽性の細胞集団を特定し、その集団を含む領域に解析ゲートを設定して、CD34 陽性細胞数を求める。

###### ② 同一患者検体の陰性コントロール試料の測定。

解析ゲート中にプロットされる非特異的染色細胞数を確認し、先に求めた CD34 陽性細胞数から差し引く。

陰性コントロール試料については、リンパ球サブセット検査等と異なり解析ゲートの設定が主な目的でない点に注意が必要である。外国のガイドラインでは、陰性コントロールを不要としているものもある<sup>9)</sup>。陰性コントロールについては、各施設で選定し必要に応じて測定すること。

### 5-6-3. 測定細胞数<sup>3)4)13)</sup>

CD34 陽性細胞測定では、目的細胞の数はリンパ球サブセット検査や造血器悪性腫瘍細胞検査に比べて著しく少ない（検体の種類により異なるが、白血球の 0.01%から数%程度とされる）。したがって、精度の高い測定には、より多くの測定細胞数を必要とする。精度を保持するために、少なくとも CD45 陽性細胞を 75000 個以上測定すること、なおかつ、目的細胞である CD34 陽性細胞が 100 個以上カウントされるまで測定することが推奨される。ISHAGE ガイドラインでは、CD34 陽性細胞カウントのばらつきが 2 回測定の平均値から 10% 以内となることを推奨している<sup>19)</sup>。

### 5-6-4. 試料の吸引（サンプリング）

細胞の大きさや比重の違いにより細胞の沈降速度に差が見られるので、測定の直前に試料をよく攪拌する。特にシングルプラットフォーム法では、細胞や内部標準粒子が沈降して試料内の分布が不均一になると測定値に直接影響する。これを回避するため測定直前に試料を十分に攪拌する必要がある。測定時間が著しく長いと測定中に細胞や内部標準粒子が沈降する恐れがあるので、時間軸ヒストグラムで細胞、内部標準粒子の取り込み速度を確認するとよい。また、測定時間が著しく長引く場合は、取り込みを中断し試験管を再度攪拌した後に再び取り込みを継続することが可能である。1 回の測定で長時間に渡り多量の細胞を測定するよりも 2 試料作成し、それぞれ測定した結果を蓄積あるいは平均する方が最終的には精確性が高まる可能性がある。

### 5-6-5. 試料のゲーティング

ドットプロット上の CD34 陽性細胞の分布は検体によって異なるため、ゲーティングは、試料毎に行う。検体によっては SSC /CD34 プロットの CD34 陽性細胞領域にほとんど細胞集団が認められない場合や複数の CD34 陽性細胞集団が存在する場合がある。このような場合、他のドットプロットの細胞分布や陰性コントロール試料の結果を参考にゲートを設定するとよい。

## 6. データ解析および分析結果の解釈と報告

### 6-1. CD34bright 細胞と CD34dim 細胞

CD34bright 細胞は、既に造血幹細胞の指標として利用されている。CD34dim 細胞については赤芽球系や顆粒球系細胞に方向付けられた細胞と考えられているが、非特異反応の産

物とされることもあるため注意が必要である。非特異的な産物であるかどうかについては、CD45 の蛍光強度や FSC/SSC プロットを利用した細胞情報を参考に判断する必要がある。

#### 6-2. 解析の安定性確認と再検基準

精確性を高めるためにできる限り多くの CD34 陽性細胞を測り込む必要がある。そのため、目標細胞数に達するまでに時間を要することがある。解析に時間を要すると試料中の細胞分布にバラツキを生じる恐れがあるため、時間軸ヒストグラムで細胞分布のバラツキと流体系の安定性を確認することが必要である（5-6-4 参照）。多重測定を行った結果にバラツキが認められる場合は、原因の追求が必要であり解析データが不良であると判断される場合は再検する。再検基準は、各施設で予め定めておかなければならない。

#### 6-3. CD34 陽性コントロールの測定

染色や溶血操作を含む解析方法が適切であることを保証するため、CD34 陽性細胞を陽性コントロールとして用いることが望ましい（5-5-4 参照）。CD34 陽性コントロールの測定結果が不良となった場合は、試料と共に再検する。

#### 6-4. 分析結果の報告

分析結果は、CD34 陽性細胞を個/ $\mu$ L で表記する。分析結果を報告する際には、解析ゲートをどの細胞集団に設定したかが分かるようにプロットを添付するか、もしくは適切なコメントを付記する。また、解析した総細胞数についても明記する。CD34 陽性細胞の生細胞率の測定を行った場合には、その値についても報告する。

#### 6-5. 分析結果の保存

個人情報保護に十分配慮し分析結果を保存する。保存期間は、原則として5年間とする。保存すべき分析データは、CD34 陽性細胞測定値を保存する。また、CD34 陽性コントロールを測定した場合は、その値も保存する。保存方法については、測定後に解析ゲートを変えて再解析できるようにリストモードデータとして保存することが望ましい。

### 7. 分析後の作業

次回の分析に支障がないように、また安全確保のために機器の洗浄とシャットダウン、廃液や使用済みの検体と器具などの廃棄は適切に行わねばならない。

---

## 8. 文献

1. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, et al: The ISHAGE guidelines for CD34+ cells determination by flow cytometry. *J Hematotherapy*. 5: 213-226, 1996
  2. Gratama JW, Orfao A, Barnett D, et al.: Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry*. 34: 128-142, 1998
  3. 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
  4. CLSI. Enumeration of Immunologically Defined Cell Populations by Flow Cytometry; Approved Guideline-2nd Edition. H42-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007
  5. 神前昌敏ほか： ヒト造血幹細胞の液状保存. *医学のあゆみ*. 161: 410-412, 1992
  6. 牧野茂義ほか： 骨髄及び末梢血幹細胞の簡便凍結保存法. *医学のあゆみ*. 151: 65-66, 1989
  7. Schlossman SF, et al (Ed.): *Leukocyte typing V*, Oxford University Press, (London) 1995
  8. Kishimoto T, et al (Ed.): *Leukocyte typing VI*, Garland Publishing, In. (New York & London) 1997
  9. Barnett D, Janossy G, Lubenko A, et al.: Guideline for the flow cytometric enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells. Prepared by the CD34+ haematopoietic stem cell working party. General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. *Clin Lab Haematology*. 21: 301-308, 1999
  10. JCCLS 血液検査標準化検討委員会フローサイトメトリーワーキンググループ: フローサイトメトリーによる末梢血リンパ球表面抗原検査に関するガイドライン (JCCLS H1-A V2.0) .*日本臨床検査標準協議会会誌*. 15: 123-136, 2000
  11. JCCLS 血液検査標準化検討委員会フローサイトメトリーワーキンググループ: フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関するガイドライン (JCCLS H2-P V1.0) . *日本臨床検査標準協議会会誌*. 18: 69-107, 2003
  12. Brocklebank AM and Sparrow RL: Enumeration of CD34+ cells in cord blood: a variation on a single-platform flow cytometric method based on the ISHAGE gating strategy. *Cytometry*. 46: 254-261, 2001
-

【作成委員会委員一覧】 Subcommittee on Flow Cytometry

FCMによるCD34陽性細胞検出ガイドライン作成委員会委員（2014年～）

委員長	川合	陽子	日本検査血液学会（国際医療福祉大学・山王病院）
副委員長	東	克己	日本サイトメトリー学会（杏林大学）
委員	池本	敏行	日本サイトメトリー学会（大阪医科大学）
	小川	恵津子	日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
	高野	邦彦	ベックマン・コールター株式会社
	田野崎	隆二	日本輸血・細胞治療学会（慶應義塾大学）
	原口	京子	日本輸血・細胞治療学会（都立駒込病院）
	政氏	伸夫	日本造血細胞移植学会（北海道大学）

（旧）FCMによるCD34陽性細胞検出ガイドライン作成委員会委員（2007年度以前）

委員長	中原	一彦
委員	池本	敏行
	小川	恵津子
	北村	聖
	巽	典之
	橋本	互
	東	克己
	渡辺	清明

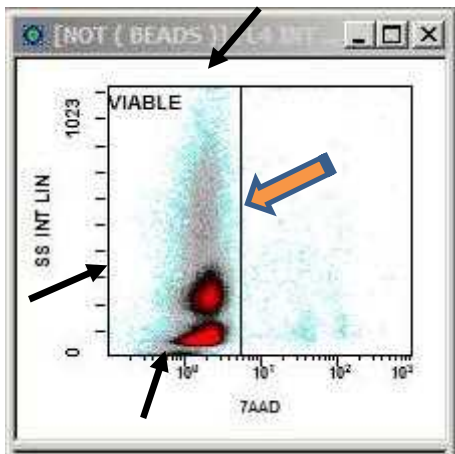
## 9. 追補

- A) 解析時におけるゲート位置設定と解析のポイント<Beckman Coulter社>
- B) 血小板凝集解析例<Beckman Coulter社>
- C) BD FACSCanto™ Clinical ソフトウェア自動解析プロット解説および解析のポイント<Becton Dickinson社>

A) 解析時におけるゲート位置設定と解析のポイント <Beckman Coulter社>

ISHAGEガイドラインの考え方にに基づき、多重ゲートをかけることによって、造血幹細胞解析の精度を上げる。下記のステップ順に各ゲート(リージョン)位置の確認と必要に応じた修正を行う。

<Step 1>

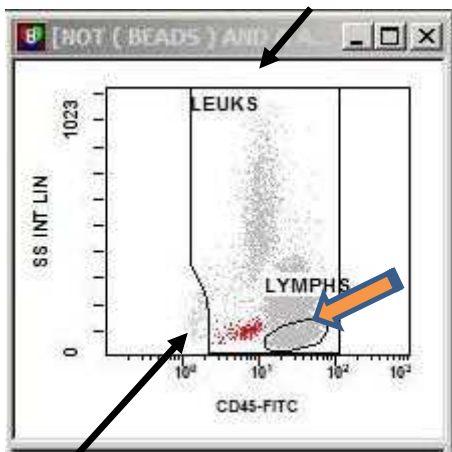


7AAD/SSC(SS)プロット。

7-AAD 陰性領域 (生きた細胞) の集団に VIABLE ゲートをセットする。左端 (7-AAD 陰性側) や上下端を枠いっぱいまで囲むこと。

設定ゲート名: VIABLE

<Step 2>



デブリス、血小板 等

CD45/SSC プロット (Step1 の生きた細胞を表示)。

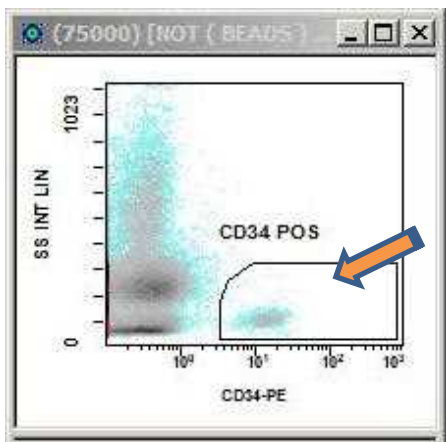
デブリスや血小板を含まないように LEUKS ゲートの CD45 下限側をセットし、CD45 陽性の白血球全体を囲む。上端 (SSC 高値側) は枠いっぱいまで囲む。このプロット図はドットプロットになっており、CD34 陽性細胞が赤く表示されているので、LEUKS ゲート内に含まれていることを確認する。

LYMPHS ゲートをリンパ球領域にセットする (Step5 で利用)。

設定ゲート名: LEUKS, LYMPHS



<Step 3>



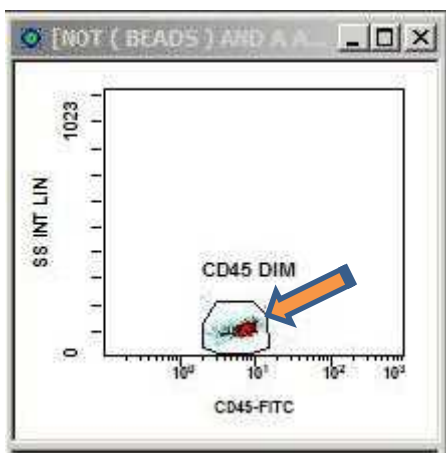
CD34/SSC プロット (Step2 の CD45 陽性細胞を表示)。

CD34 陽性細胞集団に CD34 POS ゲートをセットする。CD34 の下限を下げ過ぎると、成熟リンパ球や成熟単球の混入が増えるので注意する。

(Step4 の例) を参照。

設定ゲート名：CD34 POS

<Step 4>

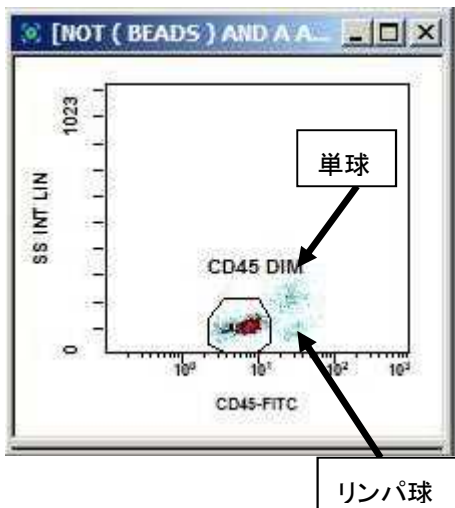


CD45/SSC プロット (Step3 の CD34 陽性細胞を表示)。

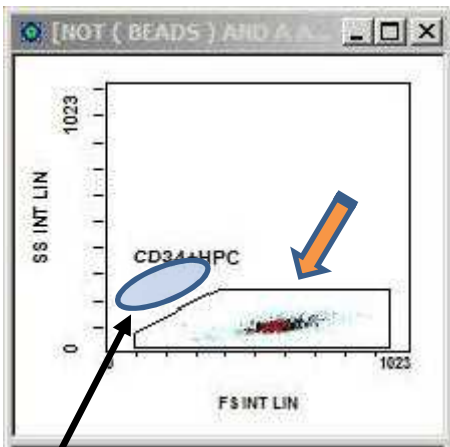
CD45 弱陽性(Dim)の集団に CD45 DIM ゲートをセットする。Step3 の CD34 POS ゲートで CD34 下限値を下げ過ぎると成熟細胞の混入が増えるので、Step3 のゲート位置を変更するか、成熟細胞を含まないように CD45 DIM ゲートをセットする (例を参照)。

設定ゲート名：CD45 DIM

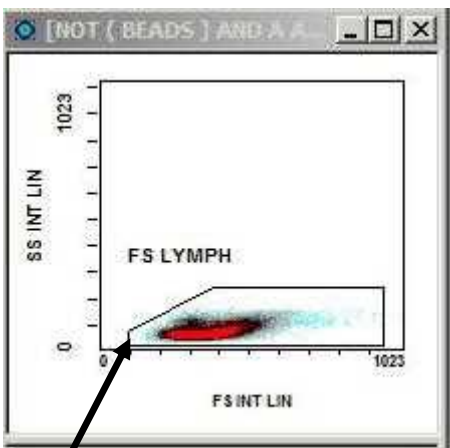
(例)



<Step 5>



血小板凝集がある場合の出現領域



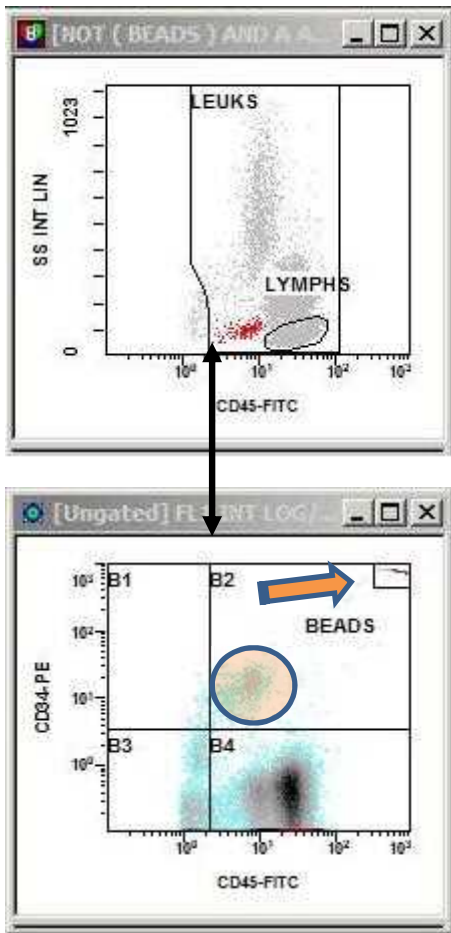
FSC(FS)/SSC プロット図 (Step4 の CD45dim 陽性細胞を表示)。

形態的な特徴から造血幹細胞に CD34+HPC(Hematopoietic Progenitor Cells)ゲートをセットする。まれに出現するデブリスや血小板凝集集団を除外しやすいように、ゲートの左上端は斜めになっている。

また、別な FS/SS プロット図に Step2 で LYMPHS ゲートをセットした成熟リンパ球が描写されている。FS LYMPH ゲートは上記の CD34+HPC ゲートとリンクされており、同じ形を形成することから、FS 下限値側を上げすぎて、成熟リンパ球をカットしていないか等の確認を行う。

設定ゲート名：CD34+HPC, FS LYMPH

<Step 6>



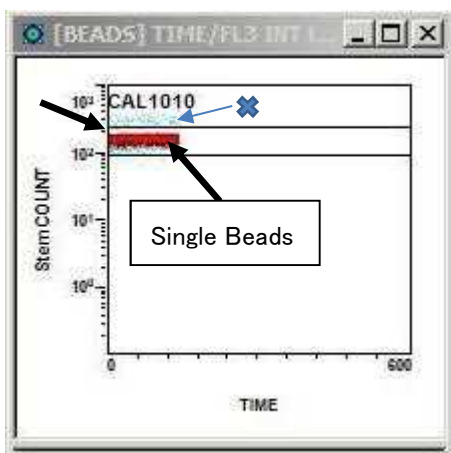
CD45/CD34 プロット図。

CD45/CD34 プロット図右上の内部標準ビーズ (Stem-Count Beads) に BEADS ゲートをセットする。

4 分割はゲーティングに利用しないが、CD34 陽性細胞 (円の集団) の CD45 側の下限値と Step2 の CD45/SS プロット図における LEUKS リージョンの CD45 側下限値を比較することにより、LEUKS ゲートにおいて CD45 弱陽性の CD34 陽性細胞集団 (CD45/SS の赤表示集団) をカットしていないかの確認に利用できる。

設定ゲート名：BEADS

<Step 7>



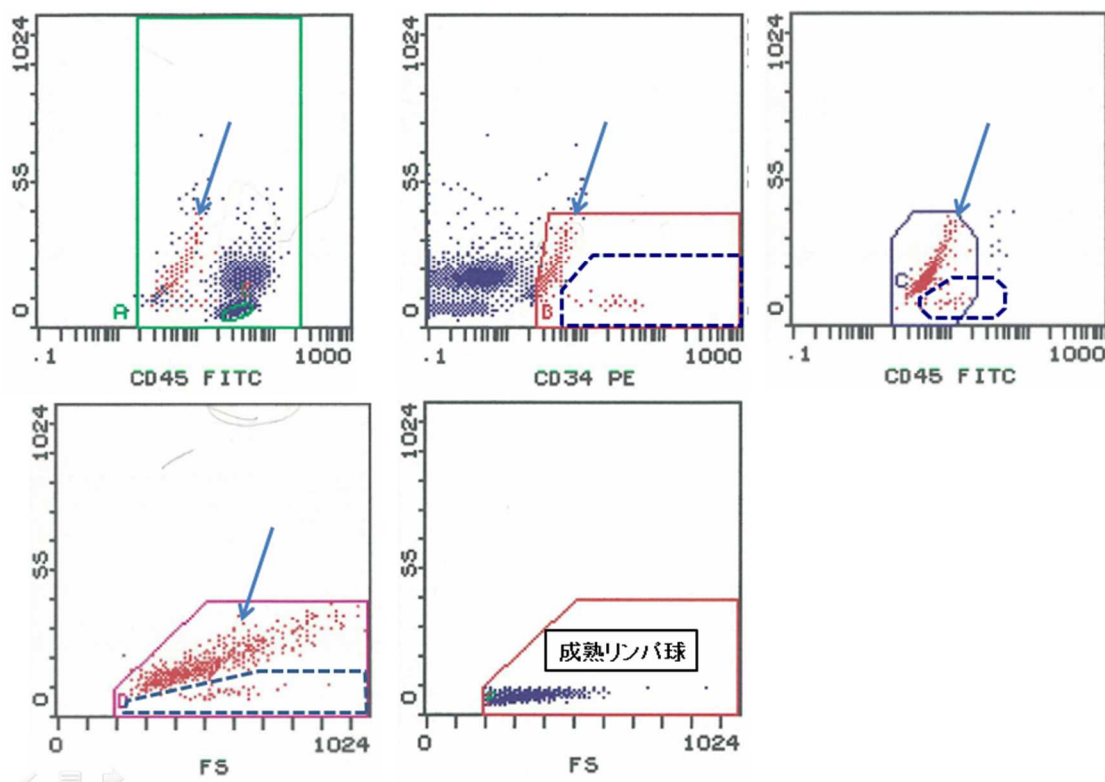
TIME/StemCOUNT プロット図 (step6 の内部標準ビーズ集団を表示)。

時間/蛍光のプロット図に Step6 で BEADS ゲートをセットした蛍光ビーズが表示されている。Single Beads 集団のみに CAL ゲートをセットする。この際、ゲートの左端が一番左側 (TIME の 0 チャンネル) になるようにセットする。

Y 軸側でやや高い位置にわずかに認められるダブレットのビーズ集団 (x 印) は、ゲートに含めない。

設定ゲート名：CAL(絶対数計算用のゲート名)

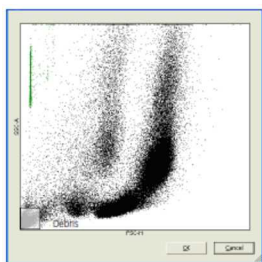
B) 血小板凝集解析例 <Beckman Coulter 社>



矢印の部分が血小板凝集と考えられる非特異反応。側方散乱光(SS)と蛍光強度(CD45, CD34)の組み合わせプロットで、弧を描くような特徴的な分布を示す。破線が正しい CD34 陽性細胞リージョンの設定位置。FS/SS のプロット図で、正常リンパ球と同等からやや大きい位置を示す末梢血幹細胞の特徴を示すか否かで判別が可能。血小板凝集集団は正常リンパ球よりも SS の高い位置で FS の値が増加しており、末梢血幹細胞の特徴を示していない。

C) BD FACSCanto™ Clinical ソフトウェア自動解析プロット解説および解析のポイント <Becton Dickinson 社>

Step1, Plot6

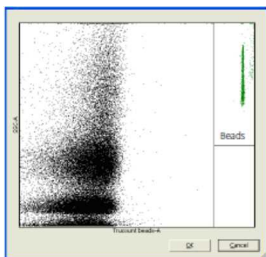


FSC/SSC プロット (全イベント表示)

リンパ球集団より FSC 強度が低いデブリスにゲートが設定され、同時にデブリゲート以外のゲート (Not Debris) が作成される。  
 <注意>このゲートにより、抗体による非特異染色の原因となるデブリスをできるだけ解析から除去することができる。ビーズを入れないように注意し、できるだけ大きく設定する。

設定ゲート名: Debris

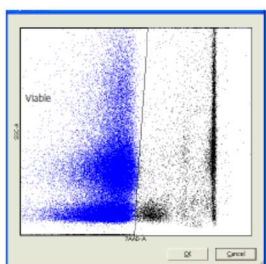
## Step2, Plot 5



FL4 (APC 等検出) 蛍光パラメータ/SSC プロット。(全イベント表示)

内部標準粒子 (Trucount ビーズ) の集団にゲートを設定する。  
設定ゲート名: Beads

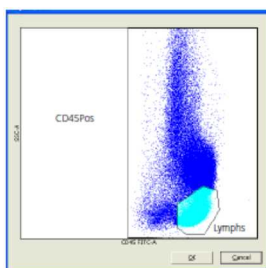
## Step 3, Plot 8



7-AAD/SSC プロット。(デブリスとビーズを含まないイベント表示)

7-AAD 陰性領域にゲートを設定する。  
このゲート内のイベントが生きた (Viable) 細胞。  
設定ゲート名: Viable

## Step 4, Plot 1



CD45/SSC プロット (Step 3 Plot 8 の生きた細胞のみ表示)  
CD45 陽性白血球領域にゲートを設定する。

また Plot 4 の FSC/SSC プロットでリンパ球集団を表示するために  
CD45 強陽性 SSC low のリンパ球集団にゲートを設定する。

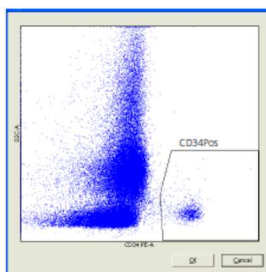
<注意> 血小板凝集など、不明な集団がある場合は、リストモード  
データ (F C S ファイル) を用いて、FACS Diva ソフトウェアなど  
の汎用解析ソフトウェアで再解析すると良い。

設定ゲート名: CD45Posi

設定ゲート名: Lymphs

設定ゲート: CD45 Posi および Lymphocyte

## Step 5, Plot 2



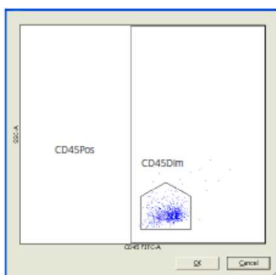
CD34/SSC プロット (Step 4 Plot 1 の CD45 陽性白血球を表示)

CD34 陽性細胞領域にゲートを設定する。

<注意> 通常の CD34 陽性細胞集団とは異なる位置に集団があっ  
た場合は、ゲートから外す。

設定ゲート名: CD34Pos

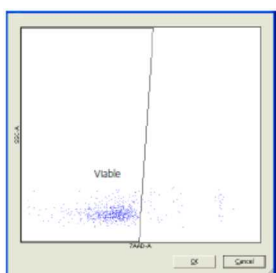
## Step 6, Plot 3



CD45/SSC プロット (Step 5 Plot 2 の CD34 陽性細胞を表示)  
CD45 弱陽性集団にゲートを設定する。

CD45 強陽性のリンパ球、単球による非特異染色細胞を解析から除去する。  
設定ゲート名：CD45Dim

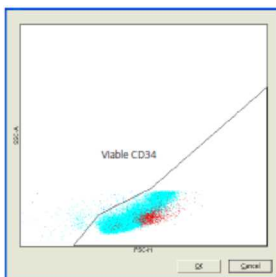
## Step 7, Plot 7



7-AAD/SSC プロット (Step 6 Plot 3 の CD45 dim CD34 陽性細胞を表示)

Step 3 Plot 8 で設定した 7-AAD 陰性の生きた細胞集団ゲート内の生きた CD34 陽性細胞を確定する。

## Step 8, Plot 4



FSC/SSC プロット。(Step 4 Plot 1 の生きたリンパ球集団 (青) と生きた CD34 陽性細胞 (赤) を表示)

CD34 陽性集団はリンパ球集団と比較して SSC が低い位置に表示される。リンパ球集団からリンパ球より大きい FSC の領域にゲートを設定する。

設定名：Viable CD34

## &lt;ロジカルゲート&gt;

- 生きた CD34 陽性細胞カウント： Not Debris & Not Beads & CD34Pos & CD45Dim & Viable CD34 & Viable
- CD34 陽性細胞カウント： Not Debris & Not Beads & CD34Pos & CD45Dim & Viable
- 生きた CD45 陽性細胞カウント： Not Debris & Not Beads & CD45Pos & Viable
- CD45 陽性細胞カウント： Not Debris & Not Beads & CD45Pos

## 10. 基本用語の説明

## 1) CD : Cluster of Differentiation

国際ワークショップ (HLDA: Human Leukocyte Differentiation Antigens ) にてヒト細胞への同一反応パターンを示すモノクローナル抗体を分類した番号体系。例) CD34

## 2) G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor(顆粒球コロニー刺激因子)

サイトカインの一種で、顆粒球産出の促進と好中球の作用を促進する作用があり、末梢血への造血幹細胞動員に用いられている。

3) CD45 dim

白血球共通抗原である、CD45 の発現が弱い (diminish) ことを示す呼び方。幼若な白血球細胞は成熟白血球に比べて CD45 の発現量が少ないため、造血器腫瘍解析における芽球細胞の検索や CD34 陽性幹細胞測定において、幼若細胞と成熟細胞の鑑別に利用される。

4) FSC (FS) : Forward Scatter (前方散乱光)

フローサイトメーターでレーザーが細胞等のサンプルにあたった際に直進方向 (前方) に散乱する光。細胞の大きさを反映する。

5) SSC (SS) : Side Scatter (側方散乱光)

フローサイトメーターでレーザーが細胞等のサンプルにあたった際に直角方向 (側方) に散乱する光。内部構造など細胞の複雑さを反映する。

6) Scattergram (スキャッタグラム)

フローサイトメーターの散乱光や蛍光情報をもとに生成されたグラフ。細胞の分布や蛍光の強さから抗原量を調べるために使用される。

7) Trypanblue (トリパンブルー)

蛋白質に結合する深青色の色素。細胞膜の透過性が上昇している死細胞では、細胞質を青く染色する為、細胞の生死判定に利用される。

8) ノイラミニダーゼ: Neuraminidase

糖鎖の末端に結合したシアル酸を切断する作用をもつ酵素。

9) Pasteurella haemolytica 由来 O-グリコプロテアーゼ

Pasteurella haemolytica に由来するユニークなグリコプロテアーゼで、O-結合型グリカンに富む糖タンパク質のみを切断する。

10) エピトープ: epitope

モノクローナル抗体が抗原に結合する際に認識する抗原の特定部分。抗体は抗原の全体を認識するのではなく、抗原の一部であるエピトープを認識して結合する。

11) FITC : fluorescein isothiocyanate

フローサイトメトリーで一般的に使用される蛍光色素。アルゴンレーザー等の青色レーザー (488nm) で励起され、530nm 前後の蛍光を発する。

12) PE : phycoerythrin

フローサイトメトリーで一般的に使用される蛍光色素。アルゴンレーザー等の青色レーザー (488nm) で励起され、575nm 前後の蛍光を発する。

13) リバースピペッティング (リバースピペット法)

ピペットで分注する際に、プッシュボタンを第2ストップまで押し下げて、ゆっくりと戻し、第一ストップまでプッシュボタンを押し下げて液を排出するピペッ

ト法。粘性や揮発性の高い液体の分注に適しており、微量分注の精度が高いとされる。