

トライテスト3カラー用解析試薬とTruCOUNT Tubesを使用したリンパ球サブセット絶対数測定

はじめに

フローサイトメーターによるリンパ球サブセット検査では、モノクローナル抗体陽性細胞はリンパ球集団に対する比率(%陽性率)で求められています。その一方で、検体中の実際の細胞数(絶対数)の把握が臨床研究や患者のモニタリングに必要であり、正確な絶対数測定のニーズが高まっています。トライテスト3カラー解析用試薬と絶対数測定用試験管TruCOUNT Tubesを組み合わせることにより高精度かつ簡便にリンパ球サブセットの絶対数測定ができます。

トライテスト試薬は洗浄をしない染色プロトコルを採用しています。検体が全血の場合、従来は、解析への影響を考慮して赤血球溶血後の過剰な抗体や赤血球膜等のデブリを除去するために洗浄操作が必要とされてきました。トライテスト試薬は、抗体が適切な濃度に調製済みで、さらにリンパ球ゲート解析にデブリの影響を受けないCD45 PerCP標識抗体を用いているため、溶血後の洗浄が不要です。リンパ球は細胞表面にCD45抗原を強く発現しているため、図1のようにCD45 PerCP vs SSCドットプロットでリンパ球をゲーティングすることができます。

このTechnical Protocolではトライテスト試薬とTruCOUNT Tubesを使用したサンプル調製と専用のMultiSETソフトウェアによる測定および解析について説明しています。この方法では、リンパ球とその周辺のイベントの分布から細胞集団の間にある谷(細胞の分布の少ない領域)を探して、ゲート設定する領域を決定しています。このゲート設定によりデブリ、赤血球、および好塩基球のゲートへの混入を避けることができます。

ゲーティングされたリンパ球はFL1 vs FL2ドットプロットで4分画蛍光マーカーではなく、アトラクターと呼ばれるだ円で各サブセット解析を行ないます。アトラクターにはあらかじめ、その囲む細胞の特徴に基づいて中心となる位置等が定義されています。

最後に精度管理として使用するTriTEST TruCOUNT ControlsとMult-Check Controlの使用方法についてもご紹介します。

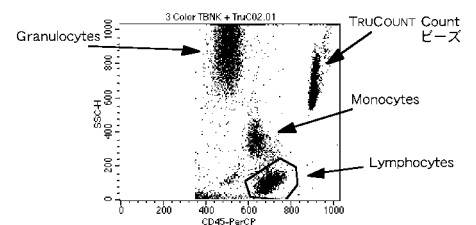


図1. CD45 PerCP vs SSCドットプロットによるリンパ球ゲーティング

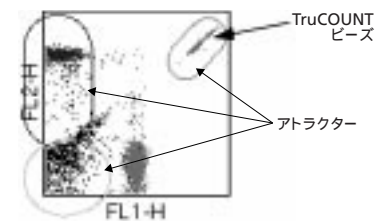


図2. MultiSETソフトウェアのアトラクターによるサブセット解析

BD Biosciences

Clontech
Discovery Labware
Immunocytometry Systems
Pharmingen

機器およびソフトウェア

1. FACS フローサイトメーター
2. FACSComp ソフトウェア：機器調整用ソフトウェア
3. MultiSET ソフトウェア：TruCOUNT Tubesを使用して、自動的に絶対数を測定するソフトウェア

試薬および器具

1. トライテスト試薬
トライテスト CD3/CD4/CD45*(BD カタログ番号: 340383)
トライテスト CD3/CD8/CD45*(BD カタログ番号: 340344)
トライテスト CD3/CD19/CD45*(BD カタログ番号: 340381)
トライテスト CD3/CD16+CD56/CD45*(BD カタログ番号: 340300)
2. TruCOUNT Tubes(BD カタログ番号: 340334)
3. TruCOUNT Control(BD カタログ番号: 340335)
4. Multi-Check Control(BD カタログ番号: 340911)^{a)}
5. FACS Lysing Solution(10X)(BD カタログ番号: 349202)
使用に際して、蒸留水で10倍希釈します。
6. CaliBRITE 3(BD カタログ番号: 340486)
7. FACSCFlow(BD カタログ番号: 340398)
8. 蒸留水または、イオン交換水
9. Vortexミキサー
10. チップ付きマイクロピペッター(20 µL、50 µL用)
11. チップ付きマイクロピペッター(450 µL用)
a) Multi-Check Controlは包装バイアル数によりいくつかのカタログ番号があります。詳しくはアプリケーション ホットラインまでお問い合わせください。
* 体外診断用医薬品

血液採取

EDTA入り採血管(K3 EDTA BD Vacutainer採血管; BD カタログ番号: 366457)または同等の採血管を使用して血液を採取します。

留意：血液検体は、染色前に白血球数と白血球分画を測定し、白血球数が測定限界範囲内であることを確認してください。

留意：血液検体の保存については各能書を参照してください。

染色

1. 1検体あたりTruCOUNT Tubes4本を用意し、試験管番号をラベルします。
2. 表1のように20 μ Lのトライテスト試薬をTruCOUNT Tubesに加えます。ステンレスのすぐ上に分注してください。ピーズにチップの先が触れないようにしてください。

留意：トライテスト試薬をMultiSETソフトウェアで解析する場合は4分画蛍光マーカ―を使用せずに解析しますので、アイソタイプコントロールのトライテスト IgG1/IgG1/CD45(BD カタログ番号：340385)は不要です。

試験管名(例)	試薬
Sample A tube #1	トライテスト CD3/CD4/CD45
Sample A tube #2	トライテスト CD3/CD8/CD45
Sample A tube #3	トライテスト CD3/CD19/CD45
Sample A tube #4	トライテスト CD3/CD16+CD56/CD45

表1. 試薬の添加

3. 抗凝固剤入り全血を正確に50 μ L加えます。

留意：全血は図2のようにTruCOUNT Tubes底部に入れ、試験管壁に付けないようにステンレスのすぐ上に分注してください。試験管壁に着いた血液は試薬により染色されません。

全血を正確に入れることは絶対数測定において重要ですので、リバースモード^{b)}を使用し、分注してください。あらかじめチップの外側をティッシュで拭き取ってから、分注してください。^{c)}



図2. サンプルのピペッティング

4. 試験管にキャップをし、Vortexミキサーで緩やかに混和後、20～25°C、暗所で15分インキュベートします。
5. 1X FACSLysing Solutionを450 μ L加えます。
6. 試験管にキャップをし、Vortexミキサーで緩やかに混和後、20～25°C、暗所で15分インキュベートします。
7. 6時間以内にフローサイトメーターで測定します。すぐに測定できない場合は20～25°C、暗所で保存してください。

b) リバースモード

1. プッシュボタンを第2ストップ(最初に停止する位置より更に押し下げた位置)までスムーズに押し下げます。
2. ピペットのチップをサンプルに浸します。プッシュボタンをゆっくり戻します。チップの中にサンプルが完全に吸引されるように、ここで約1秒ほど待ちます。
3. TruCOUNT Tubesのステンレスのすぐ上にチップの先端を沿わせ、プッシュボタンを第1ストップまでスムーズに押し下げ、サンプルを吐出します。
4. 同じサンプルにチップを再使用する場合は、次の分注サイクルのためにプッシュボタンを第1ストップにとどめておき、操作2～3を繰り返します。

c) チップの拭き取り

必要に応じて、チップの外側を実験用ティッシュで拭いてください。このとき、チップの先端開口部には触れない様、気を付けてください。毛羽立ちがないティッシュを使用してください。使用したティッシュは、安全かつ衛生的な方法で処分してください。

出典：「ギルソン マニュアルリキッドハンドリングガイド 2nd Edition」エムエス機器株式会社発行

機器条件設定

FACSCompを行いません。FACSCompについての詳細はTechnical Information Vol.2「FACSComp 4.2 Quick Reference」を参照してください。

- 2本の3カラーFACSComp用のCaliBRITE Beads浮遊液を用意します(表2)

	FACSFlow	CaliBRITE Beads
試験管A	1 mL	無標識ビーズのみ
試験管B	3 mL	無標識、FITC、PE、PerCPビーズ

表2. CaliBRITE Beadsの準備

- アップルメニューからFACSCompを立ち上げます。
- Sign In画面でオペレータ名を入力します。
- Set Up画面のAssay TypeでLyse/No-Wash(LNW)にチェックを入れます。
- CaliBRITE BeadsロットIDを入力します。
- インストラクションに従い、FACSComp Sensitivity testを終了します。



図3. FACSComp画面Summary Test画面

- Sensitivity test終了後表示されるSummary Test画面(図3)下部のOptimization、または上部のOptimizationアイコンをクリックします。



図4. FACSComp画面Optimization画面(1)

- Optimization画面(図4)左下の選択ボタンをクリックし、Optimization 2:Save File Name=TriTEST.optを選択します。

9. いずれかのサンプル(どの染色試薬でも構いません)をVortexミキサーで緩やかに混和後、フローサイトメーターに取り付け、Startをクリックします。

必要な機器調整ウィンドウが自動的に表示されます(図5)。

この時の機器設定は終了したばかりのFACSComp Lyse/No-Wash(LNW)の設定になっています。ThresholdはFL3 = 300に設定されています。

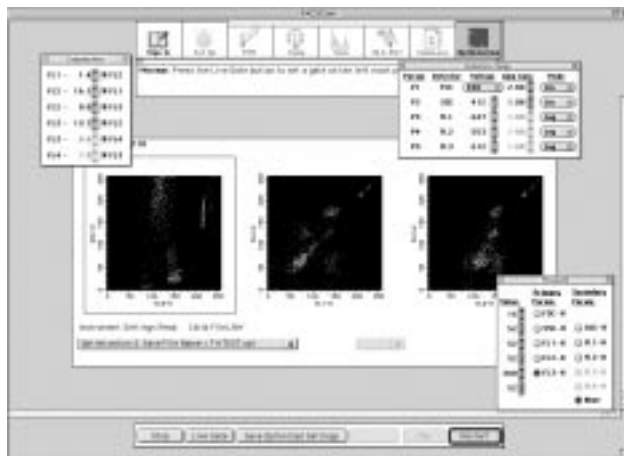


図5. FACSComp画面Optimization画面(2)

10. 必要であれば、FL3 Thresholdを調整します。

FL3 Thresholdはデブリを削除しリンパ球がすべて表示されるように設定しますが、過度にデブリを削除してしまうとMultiSETソフトウェアがリンパ球集団を確認することができません。1ページの図1のドットプロットの様少量のデブリが表示されるように設定してください。

MultiSETソフトウェアを使用する場合、FACSComp設定から更に、蛍光Voltageの調整、Compensationの調整は必要ありません。

11. Save Optimized Settingsをクリックします。

機器設定はTriTEST.optという名称で、FACStation HD:BD Files:Instrument Setting Files内に保存されます。

データ取り込みと解析

MultiSETソフトウェアを使用して解析します。MultiSETについての詳細はユーザーズガイドまたはFACSCalibur Training Manual Section 9 MultiSETを参照してください。

サンプルは、測定前にVortexミキサーで緩やかに混和してください。

1. アップルメニューからMultiSETを選択し、オペレータ名、施設名、責任者名を入力します。
2. Acceptをクリックします。



図6. MultiSET Set Up画面

3. Set Up画面(図6)の"From Cytometer: Acquisition with Analysis"のラジオボタンをクリックします。

フローサイトメーターからデータを取り込んだ後、解析が自動的に行なわれるモードです。

Automatic Saving Option欄はデータファイルやレポートの保存の有無や、保存場所を指定する欄です。初期設定はFACStation HD:BD Files:MultiSET Files内の日付けのフォルダ(DDMMYY)に保存されます。このフォルダはMultiSET立ち上げ時に自動的に作成されますので、初期設定のまま使用することが便利です。

4. Acceptをクリックします。

FACSComp 画面が表示されます。この時点でFACSComp を実行することも可能です。すでに実行している場合はSkip FACSCompをクリックしてください。いずれの場合も、次のステップとしてTest Prefs画面(図7)が表示されます。



図7. MultiSET Test Prefs画面

5. Test Prefs画面に必要な情報を入力します。

留意：ここで、必ず入力しなければならないのはTruCOUNT Beadsのビーズ数です。この値はデータファイルに保存され、後から変更することができません。

- 1)画面下部のLot IDsをクリックする。
- 2)Absolute Count Beadsのアイコンをクリックする。
- 3)Lot ID を入力し、Beads/Pellet欄にそのロットのビーズ数を入力する。

ビーズ数はTruCOUNT Tubesのパッケージ袋に記載されています。

留意：絶対数測定を行なう場合には、正しいTruCOUNT Tubesのlot IDとビーズ数を入力してください。lot IDとビーズ数はスケジュールドキュメント(後に作成するワークシートのようなもの)に附随します。TruCOUNT Tubesのロットが変わり、ビーズ数が変わる場合は、スケジュールドキュメントを新しく作成し、測定を分けてください。

Physician Report Choices、Laboratory Report Choices、Summary Report ID、および画面下部のSubset Ranges、Panel Tools、Reagent ToolsについてはMultiSETユーザーズガイドまたはMultiSETトレーニングマニュアルを参照してください。

6. Accept をクリックします。

Samples画面(図8)が表示されます。この表がスケジュールドキュメントファイルに相当します。

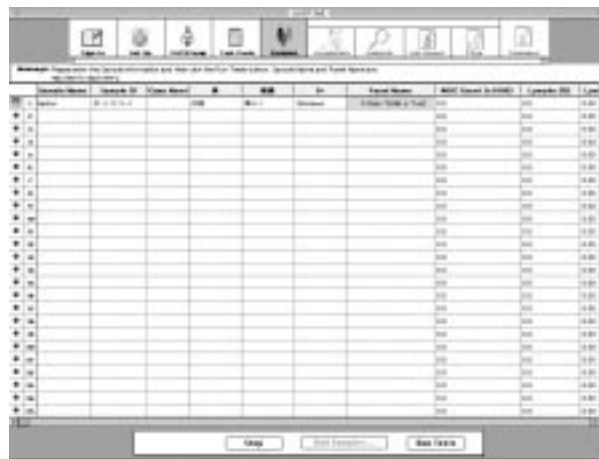
The image shows a screenshot of the MultiSET software interface. At the top, there is a menu bar with icons for File, Edit, View, and Help. Below the menu bar is a toolbar with various icons. The main area is a large table with multiple columns and rows. The columns are labeled with various parameters and sample information. The table is currently empty, showing only the column headers. At the bottom of the window, there are several buttons, including 'Accept', 'Cancel', and 'OK'.

図8. MultiSET Samples画面

7. 1列めの Sample Name欄をクリックし、サンプルの名前を入力します。
8. Panel Name欄をクリック&ホールドし、ポップアップメニューから"3 Color TBNK + TruC Panel"を選択します。
9. 他のサンプルがあれば、同様にSample Name欄をクリックし、サンプルの名前を入力します。

留意：TruCOUNT Tubesを使用する時、WBC、およびLymphs欄に情報を入力しないでください。

10. CytometerメニューのInstrument SettingsよりTriTEST.optの機器設定ファイルをフローサイトメーターにダウンロードします。

留意：「機器条件設定」の手順に従ったFACSComp Optimization画面での調整直後であれば、フローサイトメーターの機器設定はTriTEST.optになっています。一度電源を切ったり、他のアプリケーションのために使用した場合はこの手順を行なってください。

TriTEST.optはFACStation HD:BD Files:Instrument Settings Filesに入っています。

11. FileメニューからSaveを選択し、スケジュールドキュメントを一時保存します。

- Run Testsをクリックします。
データ取り込み画面(図9)が表示されます。



図9. MultiSET データ取り込み画面

- サンプルAの1本目の試験管(トライテストCD3/CD4/CD45)を混和し、フローサイトメーターにセットし、Acquireをクリックします。

データ取り込みが開始されます。

- 取り込みが終了し、Lab Report 画面(図10)が表示されたら、フローサイトメーターからサンプルを取り外します。

Analyzing dataのメッセージが表示され、解析された後に計算結果がLaboratory Report画面に表示されます。



図10. MultiSET Lab Report画面

- Continueをクリックします。
ソフトウェアは次の試験管のデータ取り込みと解析を引き続き行ないます。
- ステップ13から15を残りの試験管について繰り返してください。

- 最後のピース入り試験管の取り込みが終了した後、Laboratory Report画面でContinueをクリックします。

ソフトウェアはこのサンプルの Physician Report 画面(図11)を表示します。



図11. MultiSET Physician Report画面

- Physician Report画面のNextをクリックする。

続けてサンプルがあれば、ソフトウェアはスケジュールドキュメントのサンプル2の1本目の試験管のデータ取り込みを行なう画面になります。

このサンプルがスケジュールドキュメントの最後であれば、Summary Report画面(図12)が表示されます。



図12. MultiSET Summary Report画面

留意： Laboratory Report、Physician Reportの保存、プリントの有無は設定できます。詳しくはMultiSETソフトウェア ユーザーガイドを参照していただくか、アプリケーション ホットラインへお問い合わせください。

- Quitをクリックし、MultiSETソフトウェアを終了します。

Laboratory Reportの見方

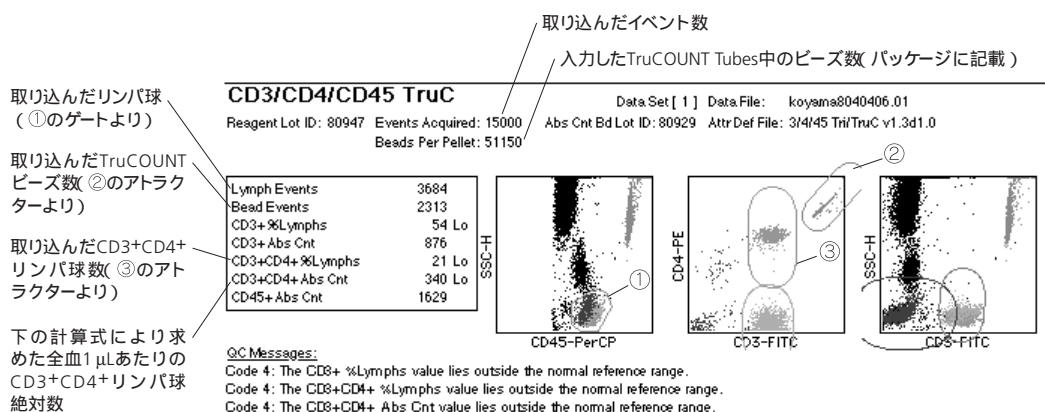


図13. Laboratory Report

絶対数測定計算式

$$\text{絶対数}/\mu\text{L} = \frac{\text{測定されたリンパ球サブセットイベント数}}{\text{測定されたビーズのイベント数}} \times \frac{\text{TruCOUNT Tubes中のビーズ数}}{\text{サンプル量}}$$

精度管理

TruCOUNT Controls (BD カタログ番号: 340335)

TruCOUNT Controlsは、TruCOUNT Tubesを用いたリンパ球サブセット絶対数測定法で測定される細胞数の直線性をチェックするために使用します。

KitにはLow、Medium、Highの3つの濃度のビーズが各2バイアルずつ入っています。各ビーズは15テスト入りです。測定されたビーズ数は箱に記載されている表示値と比較します。

【染色】

3ページの通常の染色の手順6の後、試験管を30秒穏やかにVortexし、Low、MediumまたはHighのビーズをリバースモードで50 μL分注し、緩やかにVortexします。

【機器条件設定】

通常の機器設定と同じです。

【データ取り込みと解析】

MultiSETのSamples画面で、TruCOUNT Controlsが含まれるパネルを選択します。

例) MultiReagent Control

測定順序	パネル内試薬名
1	CD4/CD8/CD3 TruC Ctrl L
2	CD3/CD19/CD45 TruC Ctrl M
3	CD3/CD16+56/CD45 TruC Ctrl H

パネルはあらたに作成することができます。他の組み合わせが必要な場合はアプリケーション ホットラインへお問い合わせください。

【プリントの見方】

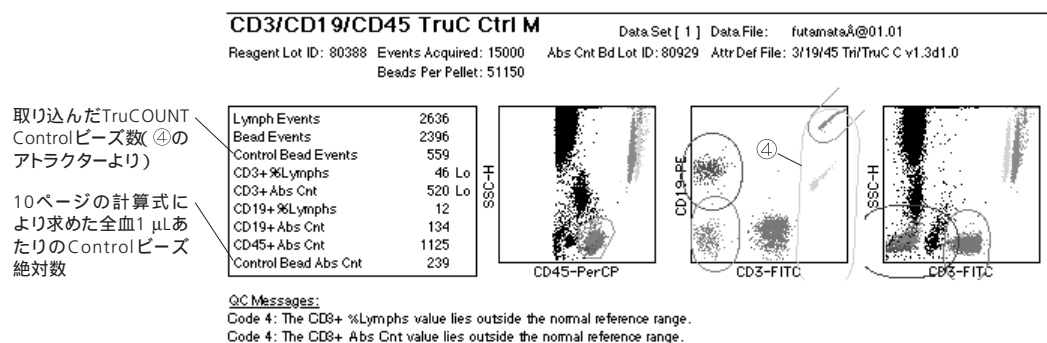


図14. Laboratory Report (TruCOUNT Control Beadを使用した場合)

Multi Check Control

Multi Check Controlには、安定化したヒトリンパ球および赤血球が保存液中に含まれています。包装の中に含まれるアッセイ バリュースシートにアッセイレンジが記載されています。フローサイトメトリーによる表面抗原染色、赤血球の溶血、機器設定および機器性能、および解析の日々の精度管理のためにご使用ください。詳しくはBD Multi-Check Control能書をご覧ください。

測定性能

【再現性】

TruCOUNT Control Beadをそれぞれ同時に10回繰り返して測定しました。

TruCOUNT Controls	Low	Medium	High
表示値 (平均値)	49	249	997
表示値 (S.D.)	7.9	21.7	64.8
1	47	239	946
2	41	265	963
3	46	228	971
4	48	233	964
5	42	248	1016
6	50	233	1036
7	45	251	991
8	53	226	956
9	50	238	1000
10	57	247	923
平均値	47.9	240.8	976.6
S.D.	4.9	12.0	34.1
C.V.%	10.15	4.98	3.49

(社内データ)

表3. 同時再現性

【SimulTEST試薬との比較】

TruCOUNT Tubesとトライテスト CD3/CD4/CD45試薬を使用してサンプル調製し、MultiSETソフトウェアで解析したCD3⁺ CD4⁺ 細胞絶対数測定結果について従来法による結果との相関関係を確認しました。従来法は、サイマルテスト IMK-Lymphocyteの CD3/CD4試薬でサンプル調製しSimulSETソフトウェアで解析したCD3⁺ CD4⁺ 細胞パーセンテージを、血球計数機"Sysmex SE-9000/RAM 1"で測定した白血球数とリンパ球パーセンテージを使用して、計算によりCD3⁺ CD4⁺ 細胞絶対数を求めています。

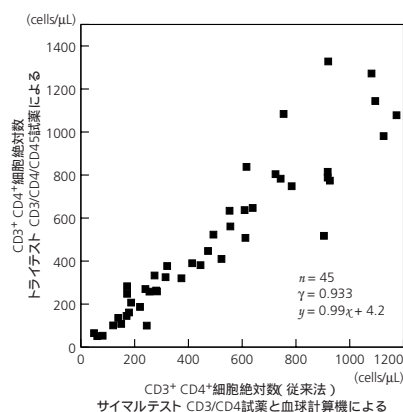


図16. 従来法との相関



輸入元
 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
 東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052
 ホームページアドレス: www.bdj.co.jp
 製造元
 BD Biosciences

お問い合わせは下記までご連絡ください。
 製造関連・資料請求(お客様情報センター):
 ☎ 0120-8555-90 Fax 024-593-5761
 機器・メンテナンス(Life Science Support):
 ☎ 0120-7752-77
 アプリケーション(技術研修室ホットライン):
 Tel 03-5805-9960

販売元



藤沢薬品工業株式会社

医療関連事業部 東日本営業所
 〒101-0043 東京都千代田区神田富山町10-2
 アセント神田ビル
 TEL: 03-5256-5311 FAX: 03-5256-5370
 医療関連事業部 西日本営業所
 〒541-8514 大阪府大阪市中央区道修町3-4-7
 TEL: 06-6206-7890 FAX: 06-6206-7934
 ホームページアドレス:
<http://www.fujisawa.co.jp/reagent/>