

CD45 FITC/CD34 PE & 7-AADによる CD34陽性細胞絶対数測定

はじめに

国際血液療法・移植学会(The International Society of Hematotherapy and Graft Engineering; ISHAGE)は1996年、末梢血およびアフェレ - シス産物中のCD34陽性細胞のフロ - サイトメ - ターによる迅速かつ高感度な方法を評価するためにStem Cell Enumeration Committeeを編成し、同年ガイドラインを作成しました。¹ その後更新されたガイドラインが1999年Current Protocol in Cytometryに投稿されています。² このガイドラインでは、CD34抗体の非特異染色の影響をできるだけ少なくするために、CD45との同時染色を行ない、CD45強陽性のCD34非特異染色細胞とCD45弱陽性のCD34陽性造血前駆細胞とを識別し解析しています。また7-AAD等の核染色剤により死細胞を検出し解析から除外することを推奨しています。

このプロトコールでは、ISHAGEのガイドラインに準じた解析方法によるBD Trucountチューブを用いたCD34陽性細胞の絶対数測定方法を示します。

特に、死細胞の混入が多い検体の測定に有効な方法です。

試薬および器材

CD45 FITC/CD34 PE Combination(カタログ番号: 341071)

BD Via-Probe™ 7-AAD Staining Solution(カタログ番号: 555816)

赤血球溶血剤 塩化アンモニアベースのもの)

BD PharmLyse Reagent(カタログ番号: 555899)

用時、精製水で10倍希釈して使用する

BD Trucount™ チューブ(カタログ番号: 340334)

BD Calibrite™ 3 (カタログ番号: 340486)

Vortexミキサー

ピペットおよびピペットチップ

操作方法

検体

測定に必要なサンプル量は、1検体あたり50 µLです。採血容器製造元のガイドラインに従って検体を採取します。

白血球数が 5×10^4 cells/µL以上の場合は、2%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウム加PB(-) 溶液で検体を希釈して使用します。希釈率は、CD34陽性細胞絶対数の算出の際に使用するため、記録しておきます。

染色方法

1. 各検体ごとにBD Trucountチューブ1本を用意し、検体名、検体番号などをラベルします。
2. CD45 FITC/CD34 PE Combination試薬 20 µL、BD ViaProve(7-AAD)20 µLを、Trucountチューブのビーズペレットに触れないようにチューブに添加します。
3. 検体50 µLをピペットで正確に加え、緩やかにvortexで攪拌します。
リバーズ式ピペッティングを推奨しています。
4. 室温、暗所で15分間インキュベーションします。
5. 赤血球溶血剤を1mL加え、緩やかにvortexで攪拌します。
6. 室温、暗所で3～5分間インキュベーションします。
7. 染色サンプルは2時間以内に測定します。

機器セットアップ **BD FACSCalibur™**

1. 機器のスタートアップを実行します。
2. BD FACSCComp™ソフトウェア(Assay mode: Lyse/No Wash)を実行します。
BD Calibrite™ 3 ビーズ調製方法
2-1) チューブを2本用意し、Unlabel beads(U) Mixed beads(M)とラベルします。
2-2) FACSFlow(シース液)をUnlabel beadsチューブに1mL、Mixed beadsチューブに3mL 分注します。
2-3) Unlabel beadsチューブにUnlabel beads 1滴、Mixed beadsチューブにUnlabel beads、FITC beads、PE beads、PerCP beads を各1滴ずつ、添加します。
3. BD CellQuestソフトウェアを立ち上げます。CD34測定取り込み用のプレート(Experiment document)が保存されている場合は、この専用プレートをダブルクリックして立ち上げます。
4. Acquireメニューより、Connect to Cytometer を選択し、機器とソフトウェアを連動させます。
5. Cytometerメニューより、Detectors/Amps、Threshold を選択し、画面に表示させます。
FACSCComp Lyse /No Washの機器セッティングになっていることを確認します。異なる場合は、Cytometer メニューより、Instrument Settings を開き、Openボタンをクリック、BD Files フォルダ内、Instrument Settings フォルダ内にあるCalibFile LNW を選択し、Setボタンをクリック、続いてDoneボタンをクリックします。(図1、2)
6. Thresholdの設定を、FL3からFL1に変更し、Value を300 にします。(図3)

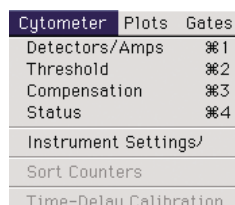


図1

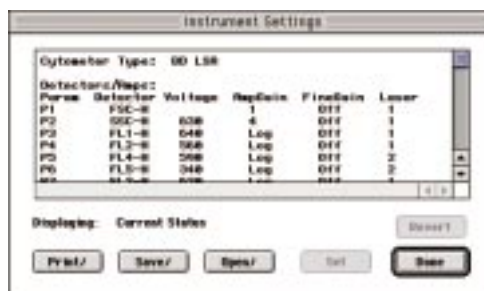


図2

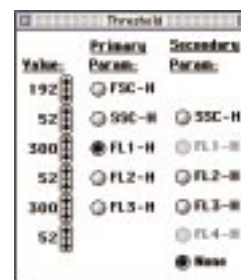


図3

- Acquisition Control パネルのSetupボタンにチェックマークを入れた状態で、サンプルチューブをセットし、Acquireボタンをクリックします。(図4)



図4

- FSC/SSCプロットのドットを確認しながら、必要に応じて、FSCのAmp gain、SSCのPMT voltageを微調整します。
- FL1/SSCプロットのドットを確認しながら、必要に応じて、Threshold FL1の値を微調整します。(CD45dim+ であるCD34陽性細胞を削除しないように、CD45陰性のデブリが少し確認できる程度にします。)
- サンプルチューブを取り外し、精製水入りチューブをセットします。

データ取り込み

- 取り込みイベント数の設定および確認

AcquireメニューのAcquisition & Storageを開き、取り込み最終条件が、CD45+ cells のGate で75000以上(あるいはCD34+ cells のGateで100)になっていることを確認します。(図5、6)

測定の精度は、検出対象イベントであるCD34陽性細胞の取り込みカウント数により決定します。

$$\text{理論変動係数 (CV\%)} = n / n \times 100$$

- リストモードデータファイルの保存フォルダ、ファイル名の入力

AcquireメニューのParameter Descriptionを開き、Folderボタンをクリックし、リストモードデータファイルの保存先フォルダを設定します。同様にFileボタンをクリックし、リストモードデータファイルのファイル名を入力し、Counter を001にリセットします。

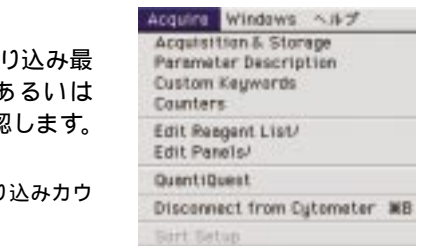


図5

- パラメータへのラベル入力

2と同様に、AcquireメニューよりParameter Descriptionを開き、Panel ボタンをクリックし、予め作成されているCD34測定用の試薬パネルを選択します。

試薬パネル作成方法

- AcquireメニューのEdit Reagent Panelを開き、PanelのカラムのAddボタンをクリックします。
 - パネル名を入力し、左◆マークをクリックし、そのパネルをアクティブにします。
 - TubeカラムのAdd ボタンを必要なチューブ数分クリックし、Tubeを作成します。
 - Tube欄に必要に応じてチューブ名を入力し、左◆マークをクリックし、そのチューブをアクティブにします。
 - Labelのパラメータ欄の右◆マークをドラッグし、ラベルしたい試薬名をリストから選択します。リストにない場合は、直接試薬名を入力します。
 - 各チューブについて、3-5を繰り返し、ラベルを設定します。
- Acquisition Control Panel のSetup のチェックを外し、サンプルチューブをセットします。
 - Acquireボタンをクリックし、データ取り込みを行います。

5分以上経過しても、最終取り込み数にならない場合は、Acquisition Control Panel のPauseボタンをクリックし、サンプルチューブを外して、vortexで攪拌し、再度チューブをセットします。Acquisition Control Panel のResumeボタンをクリックして、データ取り込みを続けます。

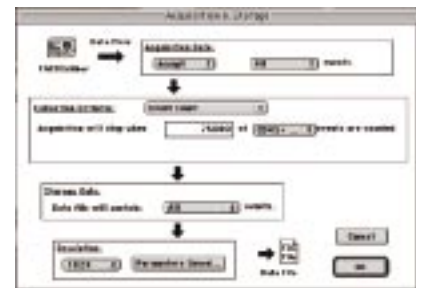


図6



図7

データ解析

1. CD34測定取り込み用テンプレートを閉じ、解析用テンプレート（Experiment Document）を開きます。
2. Editメニューより、Select ALLをクリックし、全プロットを選択します。
3. PlotメニューのChange Data Fileをクリックし、解析したいリストモードデータを選択します。
4. 各プロットに設定されているResionが適切な集団を囲っているかどうか確認し、必要に応じてResionを調整します。
5. Fileメニューより、Save asをクリックし、ファイル名と同じ名称などの名称を入力し、新たに解析エクスペリメントファイルを作成します。
6. FileメニューのPrintをクリックし、解析画面を印刷します。

【CD34細胞絶対数の算出】

下記の計算式より、1 μL当たりのCD34細胞絶対数を算出します。

$$\text{CD34 cells}/\mu\text{L} = \frac{\text{CD34 cellsカウント数}}{\text{beadsカウント数}} \times \frac{\text{beads per test}^*}{\text{検体量}} \times \text{希釈倍率}$$

(例) $\text{CD34 cells}/\mu\text{L} = \frac{529}{7074} \times \frac{51700^*}{50} \times 1 = 77 \text{ cells}/\mu\text{L}$

* アルミホイルポーチのラベルに記載されているビーズ数。ロットにより異なる。

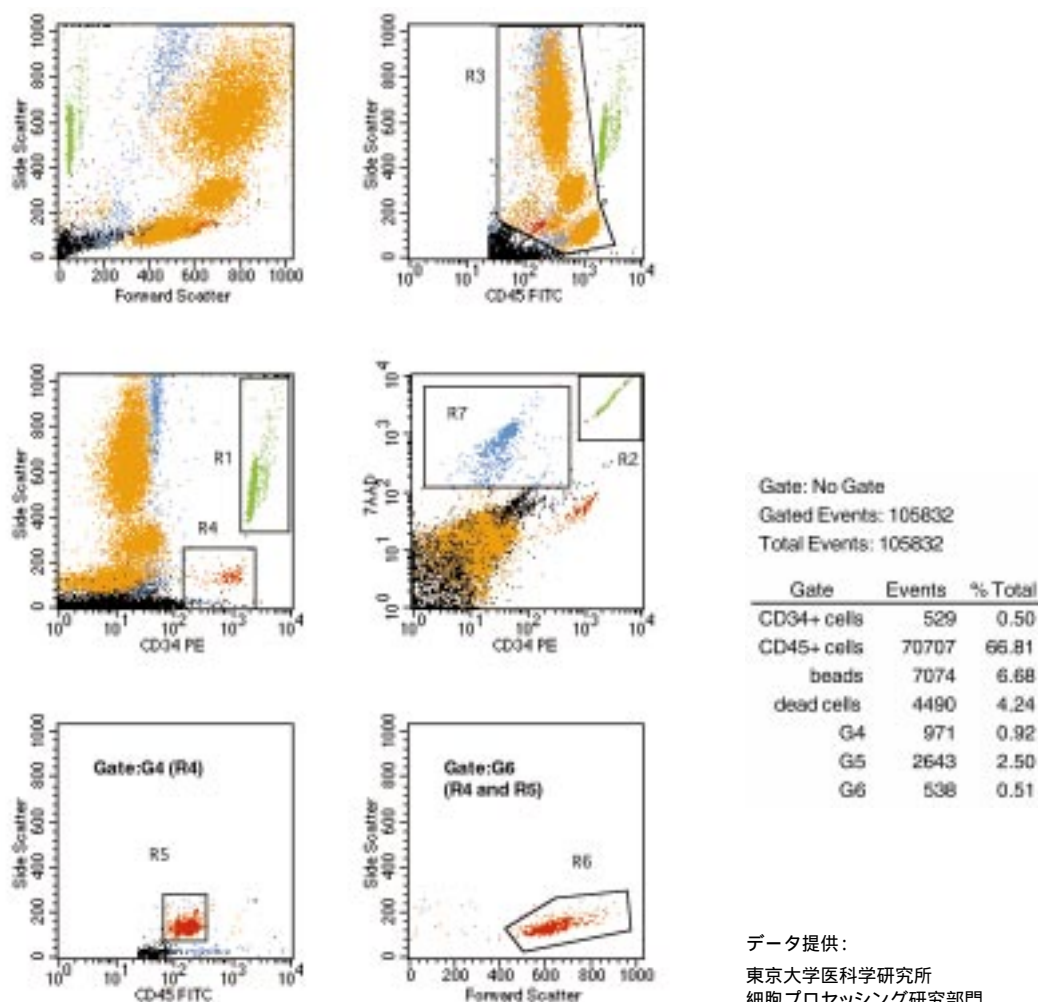


図8

データ提供:
 東京大学医科学研究所
 細胞プロセッシング研究部門
 (東京脐帯血バンク細胞処理保存施設)

BD CellQuest™解析用テンプレート 作成方法
 <BD ISHAGE法>

データ取り込み用テンプレートの作成については、解析用テンプレートの各プロットを選択し、PlotメニューよりFormat Dot Plotをクリックし、Plot SourceをAcquisitionに変更することにより作成することができます。

1. 次のドットプロット(Plot Source : Analysis、Select fileで解析するリストモードデータを選択)を作成します。その際、全てのドットプロットについて、format dot plotで、Multi color gaingにチェックマークを設定しておきます。

- 1) FSC / SSC
- 2) FL1 / SSC
- 3) FL2 / SSC
- 4) FL2 / FL3
- 5) FL1 / SSC
- 6) FSC / SSC

2. 3)のプロットのTrucountピーズ集団にRegionのR1を設定します。

SSCパラメータはスケール最終チャンネルまでセットします。(図9)

3. 4)のプロットのTrucountピーズ集団にR2を設定します。(図10)

ピーズがスケールオーバーしていないことを確認し、FL2、FL3パラメータともスケール最終チャンネルを含まないようにセットします。

4. 2)のプロットのCD45陽性白血球集団にR3を設定します。(図11)

5. 3)プロットのCD34陽性細胞集団にR4を広めに設定します。(図12)

6. 5)のプロットを選択、アクティブにし、PlotメニューよりFormat Dot Plotを開き、GateをNo GateからG4(R4)に変更します。

7. 6)のプロットのCD45 bright+(非特異染色されたCD34陽性細胞)細胞を除いたCD45 dim細胞集団にR5を設定します。(図13)

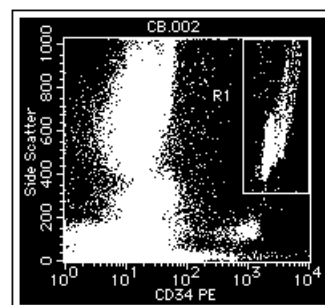


図9. 3) FL2 / SSC

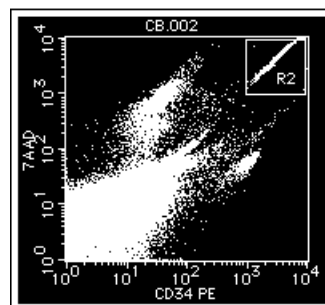


図10. 4) FL2 / FL3

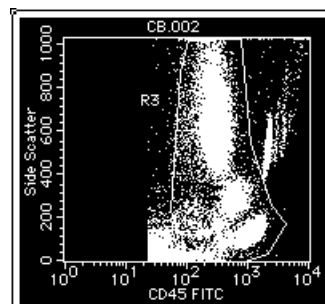


図11. 2) FL1 / SSC

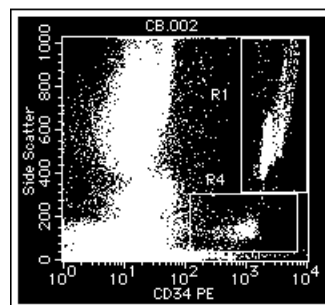


図12. 3) FL2 / SSC

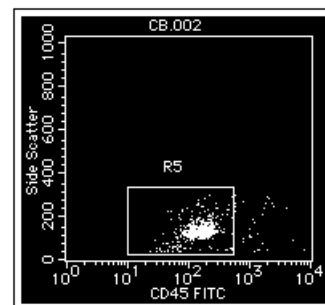


図13. 2) FL1 / SSC

8. Gate メニューよりGate Listを開き、イタリック体になっているG6のDefinitionカラムに半角でR4 and R5 R4半角スペースand半角スペースR5)を入力します。(図14)

Gateの作成に成功するとイタリック体から標準になります。



図14

9. 6)のプロットを選択、アクティブにし、PlotメニューよりFormat Dot Plotを開き、GateをNo GateからG6(R4 and R5)に変更します。

10. 9)のプロットのリンパ球から単球に分布している細胞集団にR6を設定し、デブリの非特異染色イベントを除外します。(図15)

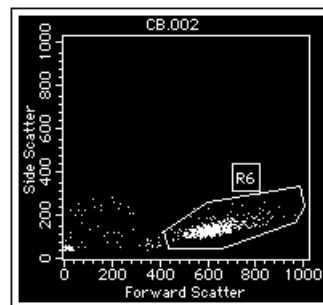


図15. 6)FSC / SSC

11. 4)のプロットの7-AAD陽性死細胞集団にR7を設定します。(図16)

12. GateメニューよりGate Listを開き、G1からG7までのMulti colorのチェックマークを外します。

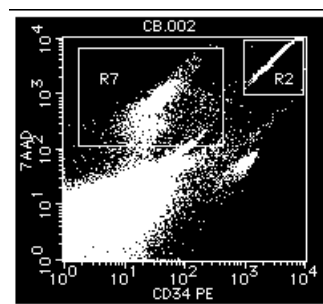


図16. 7)FL2 / FL3

13. 続いてイタリック体になっているG8のDefinitionカラムに8半角でR4 and R5 and R6 and not R7 R4半角スペースand半角スペースR5半角スペースand半角スペースR6半角スペースand半角スペースnot半角スペースR7)を入力し、Colorを赤に変更します。(図17)



図17

14. Gate ListのG9のDefinitionカラムにR1 and R2と入力し、GateのLabelをG9からbeadsにします。Colorを緑色に変更します。(図18)

15. Gate ListのG10のDefinitionカラムにR3 and not " beads " and not R7と入力し、Labelを G10からCD45+ cells に変更し、Colorをオレンジ色にします。



図18

16. Gate List のG7のLabelをG7からdead cellsにします。Color をブルーに変更し、チェックマークを再セットします。(図18)

17. Gate ListのGateの順番を、優先順位が CD34+ cells、beads、CD45+ cells、dead cellsの順になるように、左にあるプルダウンキーを使用して上に持っていきます。(図19)

18. No Gateのプロット(例: 2)FL1/SSC)をアクティブにして選択し、Statsメニューより Gate Statesをクリックして、統計データを表示します。

19. 上記、R3等のRegionを設定しやすくするために、必要に応じて、プロット1)FSC/SSC、2)FL1/SSCのプロットを選択し、PlotメニューのFormat Dot Plotでプロット表示を100%から33%くらいまでに変更します。



図18



図19

【参考文献】

1. Sutherland, et al. The ISHAGE Guidelines for CD34⁺ Cells Determination by Flow Cytometry. Journal of Hematotherapy, 1996; 5: 213-226
2. Gratama J.W., Keeney M., Sutherland R.D.; Enumeration of CD34⁺ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells, Current Protocol in Cytometry, 1999, 6.4.1-6.4.22
3. Chia Huei Chen, Wendy Lin, Shou Shye, Ruth Kibler, Kathy Grenier, Diether Rechtenwald and Leon W.M.M. Terstappen, Automated Enumeration of CD34⁺ Cells in Pheriferal Blood and Bone Marrow, Journal of Hematotherapy 3;3-13 (1994)
4. Barnett D, Janossy A, et al. Guideline for the flow cytometric enumeration of 34CD⁺ haematopoietic stem cells. Clin. Lab. Haem, 1999, 21, 301-308
5. 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：フリ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）

*BD、BDロゴおよびその他の商標はBecton, Dickinson and Companyが保有します。©2008 BD



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

www.bd.com/jp/

お客様情報センター

製品関連・資料請求／納期・在庫

0120-8555-90

Fax: 024-593-5761

BD Biosciencesに関する技術的、学術的なお問い合わせ先
セルアナリシス学術カスタマーサポート

0120-4890-77

E-Mail: tech_cell@bd.com

インストルメンツサポートホットライン

0120-7099-12