

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 (H1-A V2.0)

Guidelines for Performing Surface Antigen Analysis on Peripheral Lymphocytes using Flow Cytometry (H1-A V2.0)

日本臨床検査標準協議会
(Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards; JCCLS)

血液検査標準化検討委員会
(Area Committee on Hematology)

フローサイトメトリーワーキンググループ
(Subcommittee on Flow Cytometry)

目次

はじめに

1. 目的

2. 機器調整

- 2-1. 光学系および流体系の調整と確認
- 2-2. 測定条件の最適化 (オプティマイゼーション)
 - 2-2-1. 標準試料による散乱光感度および蛍光感度の最適化と閾値 (threshold; ノイズのカットオフ値)の設定
 - 2-2-2. 蛍光補正 (compensation)の最適化
 - 2-2-3. 最適化された測定条件の確認
- 2-3. リンパ球領域の設定 (ゲーティング)
- 2-4. 蛍光陽性領域 (カットオフチャンネル)の設定

3. 検体採取と保存

- 3-1. 患者情報
- 3-2. 抗凝固剤の選択
- 3-3. 検体ラベル
- 3-4. 検体の保存

4. 試料調製

- 4-1. 試料調製方法の選択
 - 4-1-1. 全血溶血法と濃度勾配遠心細胞分離法との比較
 - 4-1-2. 溶血剤の選択
- 4-2. 全血溶血法の確認
 - 4-2-1. 保存条件
 - 4-2-2. リンパ球数
- 4-3. 洗浄
- 4-4. 陰性コントロール抗体
- 4-5. 陽性コントロール
 - 4-5-1. 陽性血球コントロール
 - 4-5-2. 手技の適切さを判断するコントロール

5. リンパ球表面抗原の免疫蛍光染色

- 5-1. 抗体
 - 5-1-1. リンパ球表面抗原タイピングのための抗体
 - 5-1-2. リンパ球領域の設定 (ゲーティング) とそのモニターのために必要な抗体
- 5-2. 染色手技の適正化
 - 5-2-1. 容量
 - 5-2-2. 温度

- 5-2-3. 抗体との反応時間
- 5-2-4. 細胞数
- 5-2-5. 生細胞率
- 5-3. 抗体濃度の適正化
- 6. 分析と報告
 - 6-1. 装置の基本的構成
 - 6-2. 分析
 - 6-2-1. 精度管理用試料の分析
 - 6-2-2. 患者試料の分析
 - 6-3. リンパ球光散乱ゲートの確立とモニタリング
 - 6-3-1. リンパ球領域の設定
 - 6-3-2. 改善策
 - 6-4. サブセット算定試料の分析
 - 6-5. 蛍光陽性領域の設定
 - 6-6. 報告
- 7. 分析後の作業
 - 7-1. 機器の洗浄とシャットダウン
 - 7-2. 廃液及び使用済み検体と器具の廃棄
- 8. 試薬と機器の保守管理
 - 8-1. 試薬の管理
 - 8-1-1. 抗体試薬の管理
 - 8-1-2. 溶血剤、その他の試薬の管理
 - 8-1-3. 試薬のロット管理
 - 8-2. 機器の保守管理
 - 8-2-1. シース液の保守管理
 - 8-2-2. 日常の機器保守管理
 - 8-2-3. 定期的な機器保守管理

- 9. 精度管理
 - 9-1. 内部精度管理
 - 9-1-1. \bar{X} -R 管理図 (Levey-Jennings チャート) による日常の機器管理
 - 9-1-1-1. 機器の光学系、流体系の確認
 - 9-1-1-2. 散乱光検出器および蛍光検出器の感度の確認
 - 9-1-2. 陽性コントロール試料による分析系全体の確認
 - 9-1-3. 機器管理台帳の活用
 - 9-2. 外部精度管理
- 10. 文献

附録

- I. 塩化アンモニウムを用いた溶血法
- II. 洗浄操作に関する注意点
- III. 語彙概要
- IV. 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名簿

はじめに

免疫学の急速な進歩に伴い、フローサイトメトリーを用いた細胞表面抗原分析、とりわけリンパ球を中心とした血液細胞の表面形質検索は、既に実際の臨床の場に広く取り入れられ、疾患の診断や治療、さらには種々の病態解析に広く利用されている。ヒトの血液細胞に対するモノクローナル抗体も数多く作られ、第7回までの国際ワークショップで未公認のものまで含めると CD247 まで統一・整理されている。一方、フローサイトメトリーの開発に伴い、従来の蛍光顕微鏡を用いる検索と比較して、短時間のうちに、客観的にかつ詳細な細胞分析が可能となり、フローサイトメトリーはま

たたくまに医学・生物学の分野において広く利用されるようになった。この、モノクローナル抗体とフローサイトメトリー両者の開発が車の両輪となり、細胞表面抗原分析は急速に臨床の場に普及し、今や欠くことの出来ないものとなっている。

多くの施設でフローサイトメトリーによる表面形質検索が普及する一方、その標準化は大きく遅れることとなった。一日も早い標準化が望まれているものの、抗体の種類多様さ、染色手技の不統一、分析機器の差による解析法の違いなど、標準化に至る道は決して容易ではない。日本臨床検査標準協議会では血液検査標準化検討委員会のもと 1996 年よりワーキンググループを結成し、フ

ローサイトメトリーの標準化について検討を加えてきた。本報告はそのまとめであり、恐らく我が国で最初のフローサイトメトリーの標準化に関するガイドラインであろう。近年、米国の National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) により、フローサイトメトリーの標準化のための approved guideline が発刊された。われわれのガイドラインは NCCLS ガイドラインも視点に置きながら、かつ、なるべく基本的な点を簡便にまとめることを旨とした。本ガイドラインはあくまで出発点であり、今後多くの施設で試用していただき、必要な点はさらに改定を加えていきたいと考えている。

1. 目的

このガイドラインは、臨床検査室におけるフローサイトメトリーを用いた検査の精度と正確性を保証するため、すなわち内部精度管理に際して実行すべき事柄を示したものである。同様に、異なった機器・システム・抗体を使用する異なった検査室間で対比性のある結果を獲得できるような、すなわち外部精度管理にも必要な基本的事項について示してある。

具体的には免疫蛍光抗体法を用いて、ヒトの末梢血液中のリンパ球サブセット測定のためのガイドラインであり、造血器腫瘍細胞の解析は前提としていない。また、末梢血液以外の検体、たとえば骨髄血、腹水・胸水、髄液、肺胞洗浄液なども対象から除外している。これらは、細胞濃度、共存物質、細胞の抗原性など多くの点において末梢血液のリンパ球の解析とは異なるので、本ガイドラインの記載が適切でない場合が多い。

目的とするリンパ球サブセットとしては、最も一般的に測定されている T 細胞 (CD3)、B 細胞 (CD19 あるいは CD20)、ヘルパー T 細胞 (CD4)、サブレッサー/細胞障害性 T 細胞 (CD8)、ならびにナチュラルキラー (NK) 細胞 (CD56 など) を前提とした。これ以外のリンパ球サブセットの解析については、このガイドラインの記載の多くは共通していると考えられるが、一部、当てはま

らない点があるかもしれない。

現状では、正確性、精密性、検査室間対比性を保証しうる絶対的な標準は存在しない。したがって、本ガイドラインの妥当性は日々の内部精度管理と、種々の機関で行われるサーベイを通じた外部精度管理において検討されるべきであり、その結果として本ガイドラインがより適切な形に改定されることを願う。

2. 機器調整

正確な分析結果を得るには、検体と試薬を正しく取り扱い、適切な方法によって試料調製を行うだけでなく、使用するフローサイトメーターが正しく調整され、測定条件が最適化されていること。

2-1. 光学系および流体系の調整と確認

機器の立ち上げは、取り扱い説明書に従って正しく行う。シース流を安定させるため、シース液容器のキャップは圧力の漏れがないように確実に閉め、送液ライン中の気泡をできるだけ除去する。

シース液は、フローサイトメーター用に調製されたものを使用すること。市販のシース液を使用する場合は、その保存・使用方法はメーカーの指示に従うこと。

使用者自身が光学系の調整を行う場合は、機器取り扱い説明書に従って正しく行う。光学系の調整と確認には専用の蛍光標準粒子（粒径と蛍光量が一定の蛍光ラテックスビーズなど）を用い、取扱説明書に従って調整、使用する。

光学系の調整が不要の場合も、機器立ち上げ時には毎回蛍光標準粒子を測定し、各パラメーターのピーク位置あるいは CV 値（変動係数）を確認する。ピーク位置あるいは CV 値が蛍光標準粒子に設定された許容範囲を超えている場合は、再度測定を行う。繰り返し許容範囲を超える場合は、試料に異常（粒子の変質や誤調整）がないかどうか、光学系や流体系に異常がないかどうかを確かめる。異常の原因を除去した後、改めて蛍光標準粒子を測定してピーク位置あるいは CV 値を確認する。

2-2. 測定条件の最適化（オブティマイゼーション）

2-2-1. 標準試料による散乱光感度および蛍光感度の最適化と閾値(threshold; ノイズのカットオフ値)の設定

各散乱光および蛍光の感度の最適化には、適切な標準試料（市販の専用標準試料または CD4 等のモノクローナル抗体で染色した正常末梢血検体など）を用いる。市販の標準試料を用いる場合は、取扱説明書に従って調製、使用する。実際の検体分析で、蛍光パラメーターに対数目盛を用いる場合は、蛍光感度の最適化も対数目盛で行う。

前方散乱光の閾値は、正常末梢血検体などを用い、リンパ球など、必要な細胞集団の取りこぼしがない範囲で、ノイズや溶血残渣ができるだけ少なくなるように設定する。

2-2-2. 蛍光補正 (compensation)の最適化

2種類以上の蛍光色素を同時に使用する（多重染色分析）場合には、蛍光補正（異なる蛍光色素間のスペクトルの重複による蛍光漏れ込みの補正）の調整を行う。蛍光補正の最適化は適切な標準試料（市販の専用標準試料または CD4/CD8 等のモノクローナル抗体で染色した正常検体など）を用いて行う。市販の標準試料を用いる場合は、取扱説明書に従って調製、使用する。蛍光の漏れ込み量は、各々の蛍光検出器の感度設定にも依存するので、蛍光補正の調整は、蛍光感度が最適化された後に行う。

2-2-3. 最適化された測定条件の確認

過去に最適化された測定条件を用いて分析を行う場合は、感度および蛍光補正が最適であるかどうかを必ず確認し、必要があれば再調整する。機器のソフトウェアにより感度や蛍光補正を自動調整した場合も、念のため CD4/CD8 等のモノクローナル抗体で染色した正常検体などを用いて、測定条件が最適化されているかどうかを確認することが望ましい。

2-3. リンパ球領域の設定（ゲーティング）

フローサイトメトリーにおいて、ゲーティングは正確な分析のための最も重要な点であり、検

体毎に確実に行われなければならない。リンパ球集団の特定には、散乱光の他、CD45/SSC ドットプロットパターンなどを用いてもよい。散乱光のみでリンパ球ゲーティングを行う場合は、CD45/CD14 などのリンパ球ゲーティングコントロール試薬（5-1-2 参照）を用いて、リンパ球領域のゲート設定が適正であること（リンパ球回収率およびゲート内リンパ球純度）の確認を行うことが望ましい。

2-4. 蛍光陽性領域（カットオフチャンネル）の設定

正しい陽性率を求めるために、蛍光陽性領域は検体毎に適切に設定すること。蛍光陽性領域は、陰性コントロール抗体の蛍光強度ヒストグラムを基準として設定されるのが一般的である。この場合に用いる陰性コントロール抗体は、分析に用いる抗体試薬と免疫グロブリンサブクラスが一致したものをを用いることが望ましい（5-1 参照）。細胞の自家蛍光や抗体の非特異的結合の強さが検体毎に異なるため、陰性コントロール抗体による蛍光陽性領域の設定は患者検体毎に行う。

3. 検体採取と保存

検体は既知ないし未知の病原体を含む可能性があるものとみなし、その取り扱いについては、検体取り扱い時に手袋・眼鏡を着用するなど、十分な安全性を考慮すること。

3-1. 患者情報

患者 ID、年齢、性、指示した医師あるいは診療科名、推定診断、細胞分離・染色・分析に影響を与える薬剤投与などの背景情報を検体と共に獲得すること。

3-2. 抗凝固剤の選択

抗凝固剤により多少検体安定性が異なるが EDTA、ACD-A、ヘパリンが使用可能である。白血球数、白血球分画を同じ検体で求めたい場合には、EDTA が勧められる。

3-3. 検体ラベル

検体ラベルには、ID、検体採取日、ならびに採取時間、受付時間を明記すること。

3-4. 検体の保存

血液検体からのリンパ球の回収は種々の因子が関係する。検体は採血後すぐに処理するのが理想的であるが、それが不可能な場合は各施設において使用抗凝固剤、保存温度、試料調整法などについて新鮮検体と比較検討しなければならない。この検討は正常と異常検体の試料に付いて実施すること。通常、18 - 22℃で保存し、24時間以内に測定するのが望ましい。

3-5. 試料の固定

染色後あるいは感染の可能性のある材料を不活化した後の測定が望まれる時には、試料の固定安定化後の測定も可能である。方法は、染色操作段階での最終遠心後、試料をpH 7.0 - 7.4緩衝化パラフォルムアルデヒドあるいはフォルムアルデヒド（通常0.1 - 2.0%）溶液に再浮遊し、4℃で分析前まで保存する。溶血剤、固定液の種類や濃度により分析可能な時間は異なるので、固定液中での保存可能な最長時間は各施設で検討すること。

4. 試料調製

分析に最適な試料調製の目標は、リンパ球系の全ての細胞とその表面の抗原性が維持されていることである。分析に関係のない細胞（赤血球など）は抗原抗体反応を遅くしたり妨害したりするので除去すべきであり、また、リンパ球亜分画が不均等に喪失するとその後の解析に重大な誤差を招くこととなる。通常、処理段階が多ければ多いほど、細胞の喪失は大きくなるので、操作が最も少ない全血法は推奨できる方法のひとつである。

4-1. 試料調製方法の選択

4-1-1. 全血溶血法と濃度勾配遠心細胞分離法との比較

全血溶血法は、濃度勾配遠心細胞分離法に比べ特定の亜分画を喪失しないことから、一般的に推奨されている。

4-1-2. 溶血剤の選択

多くの種類の溶血剤が使用可能である。緩衝塩化アンモニウム法（附録I参照）、低張緩衝液法

等もこれに含まれる。メーカーから本目的に合う溶血剤が入手可能である。これらの市販製品を利用する際には、メーカーの指示に従うこと。

4-2. 全血溶血法の確認

4-2-1. 保存条件

検体は新鮮な状態で操作することを勧めるが、もし検体を保存する場合は、18 - 22℃が勧められる。各施設において保存検体でも新鮮検体と同じ温度・溶血剤を用いて同等の結果を得ることを確認すること。

4-2-2. リンパ球数

各施設において検体中のリンパ球数（白血球数と分画）を直接計測するか、検体を採取した検査室に結果を問い合わせるべきである。リンパ球数が極端に多い場合や少ない場合は最適な染色性が得られるように細胞濃度を調整すること。

4-3. 洗浄

市販溶血剤を用いる場合、洗浄はできる限り少ないことが勧められ、遠心操作は400 × g程度が望ましい。なお、洗浄回数が多すぎるとB細胞の回収が悪くなるおそれがある（附録II参照）。

4-4. 陰性コントロール抗体

蛍光標識陰性コントロール抗体は対象検体に生ずる自家蛍光と抗体の非特異的結合の両者を総合的に推定するために用いられる。これは解析を実施するにあたり最小限必要の陰性コントロールとなるものである。

陰性コントロール抗体は抗体濃度および蛍光色素タンパク比がほぼ同じものがよい。この蛍光標識陰性コントロール抗体を検査しようとする試薬と同じ方法で細胞に添加する。

マウス・モノクローナル抗体試薬への最良の陰性試薬コントロールは、ヒト細胞に反応しない被検試薬と同じサブクラスのマウスのモノクローナル抗体である。

4-5. 陽性コントロール

陽性コントロールは、試薬・試料調製・染色過

程の良否を検証するのに役立つものであり、また機器精度管理としても利用しうる。以下の二つの異なった陽性コントロールが必要である。

4-5-1. 陽性血球コントロール

分離新鮮リンパ球、凍結リンパ球、適切に保存された単核球、健常人の全血試料あるいは市販の血球コントロールなどが陽性血球コントロールに使用される。これらを用いることによって試薬・染色過程の良否を検証することができる。

4-5-2. 手技の適切さを判断するコントロール

試料調製と染色過程が適切か否かを患者検体の場合と同様の手技で、健常人の試料を作成し評価すべきである。このコントロールを測定日ごとに立てることが望ましい。

5. リンパ球表面抗原の免疫蛍光染色

5-1. 抗体

5-1-1. リンパ球表面抗原タイピングのための抗体

このガイドラインは、リンパ球サブセットのうち大きな亜分画（T細胞、B細胞、NK細胞など）を同定する抗体を用いることを想定している。これらの抗体は必ずしも亜分画に特異的ではなく、場合によっては2つ以上のサブセットを、例えばCD8⁺細胞はいわゆるNK細胞を表現することもあるので、正確な計測には2カラー同時分析をする必要がある。特にCD4⁺T細胞およびCD8⁺T細胞の測定はCD3抗体との2カラー解析を行い、NK細胞については、CD2抗体あるいはCD3抗体とCD16抗体あるいはCD56抗体との2カラー解析を行うことが望ましく、1種類の抗体のみを用いての分析（いわゆるシングルカラー解析）は望ましくない。

5-1-2. リンパ球領域の設定（ゲーティング）とそのモニターのために必要な抗体

リンパ球領域の設定は極めて重要であり、すべての結果に重大な影響を及ぼす。リンパ球として偽陰性ないし偽陽性を導くような混在細胞の数や、リンパ球ゲート内に含まれる真のリンパ球の比率を推定することは非常に大切である。

細胞の大きさを表す前方散乱光（forward scatter）と細胞の内部構造を表す側方散乱光（side scatter）は通常、リンパ球の識別に利用され非常に有用であるが、試料の古さ、溶血剤の選択、試料の調整手技、機器の光学系などにより影響される。

抗体を用いたリンパ球領域の設定も広く用いられる。リンパ球は通常、CD45^{bright}・CD14⁻として同定され、リンパ球領域の設定には優れている。混在する赤血球はCD45⁻で、顆粒球はCD45^{dull}ある。

5-2. 染色手技の適正化

市販抗体はそれぞれ細かい染色法が定められている。この方法は厳守すべきである。以下の変動因子は、原則としてメーカーで予め検討され、抗体の添付文書に説明されている。

5-2-1. 容量

試料と試薬の反応容量が0.2mlを越えた場合、反応の際の攪拌や、反応時間の延長が必要かもしれない。濃度勾配遠心細胞分離法による精製細胞試料では最低1%の蛋白成分を含む染色・緩衝液（pH7.2）の使用が推奨される。

5-2-2. 温度

全血溶血法による試料では18-22℃が、濃度勾配遠心細胞分離法による試料では4℃が染色に適した温度である。

5-2-3. 抗体との反応時間

通常推奨するのは10-30分である。染色が飽和状態に到達する時間は、検体量や抗体に結合している蛍光色素の種類などが関係する。概してPE標識抗体は、FITC標識抗体に比しより長い反応時間が必要である。

5-2-4. 細胞数

多くの市販抗体の染色に対応する至適試薬量は100μlの血液を染めるのに充分な量とされている。正常では白血球数は4-8×10³/μl、単核球数は0.5-2×10³/μl含まれ、これより多くの白血球を含む検体についても、試薬量は充分な量でなければならない。その白血球数の上限は、試料中のリンパ球比率、多核球などのリンパ球以

外の血球成分とモノクローナル抗体の反応性、使用抗体量などで決定される。

5-2-5. 生細胞率

死細胞が偽陽性染色を示す大きな原因になるので、各検査室は試料調製・染色前後のバイアピリティ（生細胞率）の評価法を定めておくべきである。プロピディウム・アイオダイド（PI）あるいは7-アミノアクチノマイシンD（7-AAD）などの蛍光染色や、トリパン青などが細胞の生死の判定に用いられる。最低85%の生細胞率が推奨される。

5-3. 抗体濃度の適正化

多くの市販抗体は、一定量の血液（あるいは一定の分離細胞数）を染色するための使用量が定められている。この使用量は、陰性細胞と陽性細胞との分離が最大になり、陽性細胞の蛍光強度が最大になるように決定されている。抗体の新しいロットを使用する際は、従来のものと同様の陰性/陽性分解度と陽性強度が得られるかどうかを各施設において検証しなければならない。

試料作成の条件（時間、容量、温度、細胞数）が変更された場合も同様に、各検査室は、最適な試薬量を決定しなければならない。

過剰量の試薬は、非特異反応を誘導し、陰性/陽性分解度を劣化させる結果を起こしたり、染色強度の減少や陽性細胞比率（%）の減少を起こすことがある。

6. 分析と報告

6-1. 装置の基本的構成

分析実施にあたっては、機器操作者に対する装置や感染性廃棄物などの危険性が最小限となるよう操作状況および操作条件に配慮する必要がある。

6-2. 分析

6-2-1. 精度管理用試料の分析

精度管理に関するコントロール試料は以下の順で分析する。

リンパ球領域設定用コントロール

蛍光陽性領域設定用陰性コントロール

染色法および試料調製法検定用陽性コントロール
6-2-2. 患者試料の分析

患者試料の分析にあたっては5項に従って処理した試料を以下の順で測定する。

リンパ球領域設定試料

蛍光陽性領域設定用陰性コントロール(抗体試薬と免疫グロブリンのサブクラスが一致したもの)

モノクローナル抗体試薬で染色された患者試料。

分析8時間以前に採取された患者試料については生細胞率の確認を5-2-5に従って行う。もし生細胞率が検査室の設定規準以下であればその計測結果を報告書に付記する。

6-3. リンパ球光散乱ゲートの確立とモニタリング

フローサイトメトリーにおいてゲーティングは正確な分析のために最も重要な作業の一つであり、検体ごとに確実に行う必要がある。また細胞沈降速度の差で生じる不正確な分析を避けるために機器に試料をかける前にはよく攪拌する。

6-3-1. リンパ球領域の設定

リンパ球集団の設定には現在理想的な方法は無いが、散乱光のほかCD45などのリンパ球ゲーティング用抗体を用いてゲート領域の設定およびリンパ球以外の細胞集団の混入の確認を行うことが望ましい。分析するすべての試料にCD45抗体を加え3カラーで分析する方法もある。

6-3-2. 改善策

1) リンパ球以外の細胞の混入が施設で定めた値以上にリンパ球集団内にあるときはゲーティング調整、データ取り込み、蛍光感度の再検討などの改善策をとる。

2) 陽性コントロール(6-2-1の3))検体で基準内の値が得られなかった場合、適当なコントロール物質を用いて機器性能の再評価を含む改善策をとる。

3) 機器性能表示値が基準内であるが、リンパ球以外の細胞の取り込みやリンパ球回収が施設内基準値範囲外の場合は検体のリンパ球分画が「基準値外」であることを記録し、試料の再調製あるいは他の試薬を用いてその原因を可能な限り検討す

る。

6-4. サブセット算定試料の分析

算定誤差をできる限り小さくするため少なくとも数千個以上のリンパ球数を分析する必要がある。

6-5. 蛍光陽性領域の設定

正しい陽性率を求めるには蛍光陽性領域を検体ごとに適切に設定する。蛍光陽性領域は、陰性コントロール抗体の蛍光強度ヒストグラムを基準として設定するのが一般的である。この場合に用いる陰性コントロールは、分析に用いる抗体試薬と免疫グロブリンサブクラスが一致したものをを用いることが望ましい(5-1参照)。細胞の自家蛍光や抗体の非特異的結合の強さは検体ごとに異なるため、陰性コントロール抗体による蛍光陽性領域の設定は検体ごとに行う。

6-6. 報告

各表面抗原に対する陽性率はクラスター分類(CD)で報告する。各表面抗原に対する商品名、クローン名、ロット番号あるいは解析パターンについては必要に応じて報告できるようにしておくこと。またデータの説明は各検査室の基準値をもとに行う。結果保存は5年間とする。

7. 分析後の作業

今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の廃棄は、適切に行わねばならない。

7-1. 機器の洗浄とシャットダウン

分析終了後は、次亜塩素酸溶液および界面活性剤溶液などでサンプルラインを洗浄する。また、サンプルラインに詰まりが生じた場合、直前に溶血の悪い試料や他の蛍光色素(細胞周期解析や網赤血球試料など)を分析した場合もサンプルラインを洗浄する。洗浄液の調製や洗浄の手順は、機器の取り扱い説明書に従って正しく行う。洗浄液は身体や衣服に付かないように注意して取り扱う。

自家調製の洗浄液は、使用の都度新しいものを調製する。

機器のシャットダウンは、必要な洗浄手順を全て終了した後に行う。シャットダウンの手順は取り扱い説明書に従って正しく行う。冷却水や高圧電源が必要な機器では、使用後に水道や電源をオフにするのを忘れないように注意する。

7-2. 廃液及び使用済み検体と器具の廃棄

分析後のフローサイトメーター廃液は、施設定める廃液処理方法に従って処理する。廃液を棄てた後の廃液ボトルには、次亜塩素酸などの消毒剤を適当量(おおむね1/10容相当)入れておく。不要になった検体や使用済みの試験管、ピペットチップ等は、感染性医療廃棄物として処理する。

8. 試薬と機器の保守管理

8-1. 試薬の管理

8-1-1. 抗体試薬の管理

抗体試薬は、とくに指示がない限り2~8℃で遮光保存する。使用後は直ちに保管場所に戻す。凍結保存不可の抗体試薬(蛍光標識抗体試薬の多くは「凍結不可」である)を誤って凍結しないように十分注意する。抗体試薬を凍結保存(-20℃または-70℃)する場合は、できるだけ小分けして凍結する。融解後は2~8℃で保存し、再凍結はしない。

劣化を防ぐため、抗体試薬は清潔な環境下で清浄なピペットチップを用いて分取し、分取後はすぐに蓋を閉める。劣化の兆候は、試薬の外観の変化(変色や濁り)、正常検体あるいは陽性血球コントロール(4-5-1)の蛍光ヒストグラムパターンの異常から判断できる。

検査に使用するモノクローナル抗体試薬には防腐剤としてアジ化ナトリウムを含有しているものが多いので、試薬を廃棄する際は、排水管内にアジ化物が蓄積することのないように、多量の流水で希釈する。防腐剤としてチメロサルを含有している場合は、施設の定める水銀化合物の廃棄手順に従う。

8-1-2. 溶血剤、その他の試薬の管理

市販溶血試薬の調製および保存は、取り扱い説明書に従う。自家調製の溶血剤の保存については、各施設で予め保存条件と保存期間を検討しておく。劣化の兆候は、正常検体あるいは陽性血球手技コントロール（4-5-2）の溶血後の目視確認あるいは散乱光サイトグラムの異常からも判断できる。

洗浄に用いる緩衝液の保存条件と保存期間は各施設で設定する。劣化の兆候として、外観の変化（沈殿の形成など）、pHの低下のほか、正常検体あるいは陽性手技コントロール（4-5-2）の散乱光サイトグラムまたは蛍光ヒストグラムパターンの異常などがあるが、抗体試薬や溶血剤の場合に比べてわかりにくい。

8-1-3. 試薬のロット管理

抗体試薬、溶血試薬、緩衝液とも、試薬管理台帳を作成し、購入または調製した日付とロット番号、有効期限を記入しておく。とくに抗体試薬については、検査で使用した試薬のロット番号が必要となきにすぐわかるようにしておく。新しいロットを最初に使用する際には、新旧それぞれのロットで同一検体を処理し、ロット間差が問題ないことを確認しておくことが望ましい。

8-2. 機器の保守管理

8-2-1. シース液の保守管理

シース液は、フィルター等により不純物を除去した液を使用する。開栓後は、空気中の微粒子の混入にも注意を払うこと。

8-2-2. 日常の機器保守管理

日常の機器保守管理には機器の取り扱い説明書に従った保守管理が重要である。さらに、内部精度管理（9-1）を日常的に行うことで、機器の異常を早期に察知したり、故障の原因の特定が容易になる。機器毎に機器管理台帳（9-1-3）を作成し、使用状況等を記録しておくことよ。

8-2-3. 定期的な機器保守管理

シース液タンクの洗浄やシース液フィルターの交換等、一定期間の使用毎に行う作業は欠かさずに行う。フローサイトメーターに装着されているレーザー光源や送液系のチューブ類は、使用に伴

い徐々に劣化していく。必要な保守点検を定期的実施することが望ましい。

9. 精度管理

9-1. 内部精度管理

9-1-1. \bar{X} -R 管理図（Levey - Jennings チャート）による日常の機器管理

9-1-1-1. 機器の光学系、流体系の確認

光学系の調整および確認に使用する蛍光標準粒子（2-1参照）を光学系があらかじめ調整された条件下で繰り返し測定する。各散乱光および蛍光のピーク位置あるいはピークのCV（変動係数）値を記録し、平均値と標準偏差を求め、その機器の基準値とする。基準値の設定のための測定は様々な時間間隔で、数日に渡って行うのが望ましい。基準値を用いて \bar{X} -R管理図を作成し、測定値をプロットする。

機器立ち上げ時には、必ず蛍光標準粒子を測定し、各散乱光および蛍光のピーク位置とCV値を確認する。ピーク位置が基準値と同じになるように感度調整したときのCV値を記録する。各々のCV値を \bar{X} -R管理図にプロットしていく。毎日の測定値は、95%の確率で基準値 ± 2 標準偏差の範囲内に入る。この範囲を超えている場合は、蛍光標準粒子の変質や誤調製あるいは光学系や流体系に何らかの異常があった可能性が高い。この状態が持続する場合は、蛍光標準粒子の交換もしくは機器の調整などの対処をする。

\bar{X} -R管理図にシフトまたはトレンドが認められるときは、その原因を分析することで、機器トラブルの早期発見に役立つことがある。

蛍光標準粒子のロットが新しくなった場合、もしくは機器の修理やメンテナンス後には、改めて基準値を取る。

9-1-1-2. 散乱光検出器および蛍光検出器の感度の確認

散乱光または蛍光の検出器の感度についても、感度設定用の標準試料（2-2-1参照）を用いて、9-1-1-1と同様の手順で各パラメーターのピーク位置および検出器（PMT）の電圧

値について基準値を設定し、 \bar{X} -R 管理図を作成することで、モニターすることができる。

感度最適化のための標準試料として、感度最適化用の蛍光標準粒子（散乱光強度および蛍光強度が一定かつ実際の免疫染色試料と同程度に調節された蛍光ラテックスビーズ）を用いる場合は、蛍光標準粒子のピーク位置が基準値に一致するように感度が最適化されるので、その時の PMT 電圧値を \bar{X} -R 管理図にプロットしていく。

感度最適化のための標準試料として、免疫染色した正常末梢血等を用いる場合は、あらかじめ最適化された条件下で、散乱光強度および蛍光強度が一定かつ実際の分析試料と同じ感度設定で測定可能な標準物質（蛍光ラテックスビーズ等）を測定し、そのピーク位置を \bar{X} -R 管理図にプロットしていく。

感度最適化のための標準試料として、2 種類以上の蛍光の異なる標準ビーズを用いる場合は、予め初期設定された分離度（平均蛍光チャンネル値の差）を測定し、その値を \bar{X} -R 管理図にプロットしていく。

測定値が基準値 $\pm 2SD$ の範囲を繰り返し超えたとき、あるいは \bar{X} -R 管理図にシフトまたはトレンドの傾向が認められるときは、その原因を分析することで、機器トラブルの早期発見に役立つことがある。標準試料の変質が疑われるときは、新しい試料に換えて再測定する。

標準試料のロットが新しくなった場合、もしくは機器の修理やメンテナンス後には、改めて基準値を取る。

9-1-2. 陽性コントロール試料による分析系全体の確認

陽性コントロール試料（4-5 参照）を用いて、機器の設定条件のみならず、抗体試薬の活性や染色手技を含めた分析系全体の確認を行うことができる。陽性コントロール試料として、正常末梢血や自家調製の保存リンパ球などを用いる場合は、試料のロット毎に、試料の特性を考慮した妥当な基準値範囲を設定する。市販の精度管理用コント

ロール細胞を用いるに場合は、製品に添付されている参考値を利用してよい。

機器が正しく調整され、測定条件が最適化されているにもかかわらず、陽性コントロール試料の測定結果（陽性率やヒストグラムのパターン）が通常と異なるときは、試薬もしくは試料調製方法に原因がある場合が多い。陽性コントロール試料の変質が疑われる場合は、新しい試料に換えて分析をやり直す。

9-1-3. 機器管理台帳の活用

蛍光標準粒子や感度調整用標準試料、陽性コントロール試料の測定結果や機器の作動状態、使用状況等を記載した機器管理台帳を作成、記録しておくことは、分析系に異常が発生した際の原因の特定に有用である。

9-2. 外部精度管理

施設間精度管理プログラムに参加することによって、自施設の測定値と他の施設の測定値（の平均）との間に解離がないかどうかを確認することができる。現時点では、国内にはリンパ球表面抗原検査のための施設間精度管理プログラムはなく、外部精度管理サーベイの定期的な実施が望まれている。海外では、College of American Pathologists (CAP) などの学会運営の定期サーベイの他、機器および試薬メーカーが運営する施設間精度管理プログラムがある。

8. 文献

1. 日本臨床病理学会・標準委員会血液小委員会：血液検査標準化のための単位、用語の定義臨床病理 44:994,1996.
2. NCCLS H42 - P. Quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes. 1989.
3. NCCLS H42 - A. Clinical Application of flow cytometry: Quality assurance and immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes. 1997.
4. Anonymous: U. S. - Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic

- analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry. *Cytometry* 30:213,1997
5. Stelzer GT, Marti G, Hurley A, McCoy P Jr, Lovett EJ, Schwartz A: U. S. — Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures. *Cytometry* 30:214,1997
 6. Stewart CC, Behm FG, Carey JL, Cornbleet J, Duque RE, Hudnall SD, Hurtubise PE, Loken M, Tubbs RR, Wormsley S: U. S. — Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry : selection of antibody combinations. *Cytometry* 30(5):231 — 5,1997
 7. Borowitz MJ, Bray R, Gascoyne R, Melnick S, Parker JW, Picker L, Stetler Stevenson M: U. S. — Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: data analysis and interpretation. *Cytometry* 30(5):236 — 44,1997.
 8. Braylan RC, Atwater SK, Diamond L, Hassett JM, Johnson M, Kidd PG, Leith C, Nguyen D: U. S. — Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: data reporting. *Cytometry* 30(5): 245 — 8,1997
 9. Davis BH, Foucar K, Szczarkowski W, Ball E, Witzig T, Foon KA, Wells D, Kotylo P, Johnson R, Hanson C, Bessman D: U. S. — Canadian Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: medical indications, *Cytometry* 30(5):249 — 63, 1997
 10. Rothe G, Schmitz G: Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. Working Group on Flow Cytometry and Image Analysis, *Leukemia* 10:877,1996
 11. Schwartz A, Fernandez Repollet E, Vogt R, Gratama JW: Standardizing flow cytometry: construction of a standardized fluorescence calibration plot using matching spectral calibrators. *Cytometry* 26:22 — 31,1996
 12. D'hautcourt JL: Quality control procedures for flow cytometric applications in the hematology laboratory. *Hematology & Cell Therapy* 38(6):467 — 70,1996
 13. Landay AL, Brambilla D, Pitt J, Hillyer G, Golenbock D, Moyer J, Landesman S, Kagan J : Interlaboratory variability of CD8 subset measurements by flow cytometry and its applications to multicenter clinical trials. NAID/NICHHD Women and Infants Transmission Study Group. *Clinical & Diagnostic Laboratory Immunology* 2:462,1995
 14. McCoy JP Jr, Overton WR: A survey of current practices in clinical flow cytometry. *American Journal of Clinical Pathology* 106: 82 — 6,1996
 15. Koepke JA: Survey of quality assurance/ quality control practices for CD4⁺ lymphocyte counting. *Cytometry* 26(2):178 — 80,1996
 16. Gratama JW, Kraan J, Adriaansen H, Hooibrink B, Levering W, Reinders P, Van den Beemd MW, Van der Holt B, Bolhuis RL : Reduction of interlaboratory variability in flow cytometric immunophenotyping by standardization of instrument set-up and calibration, and standard list mode data analysis. *Cytometry* 30(1):10 — 22,1997
 17. Lanza F: Towards standardization in immunophenotyping hematological malignancies, How can we improve the reproducibility and comparability of flow cytometric results? Working Group on Leukemia Immunophenotyping. *European Journal of Histochemistry* 40 Suppl 1:7 — 14,1996
 18. Lape'-Nixon ML, Prince HE: How many gat-

- ed lymphocytes are needed for accurate assessment of T - subset percentages by flow cytometry? *Cytometry* 26(3):223 - 6,1996
19. Nicholson JK: Quality control in immunophenotyping: U. S. efforts to establish common methodology and their impact. *American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. European Journal of Histochemistry* 38 Suppl 1:7 - 12,1994
 20. Strauss K, Hannel I, Engels S, Shiba A, Ward DM, Ullery S, Jinguji MG, Valinsky J, Barnett D, Orfao A, Kestens L: Performance evaluation of the FACSCount System: a dedicated system for clinical cellular analysis. *Cytometry* 26:52 - 9,1996
 21. Gratama JW, Kraan J, Van den Beemd R, Hooibrink B, Van Bockstaele DR, Hooijkaas H: Analysis of variation in results of flow cytometric lymphocyte immunophenotyping in a multicenter study. *Cytometry* 30(4): 166 - 77,1997
 22. Barnett D, Granger V, Mayr P, Storie I, Wilson GA, Reilly JT: Evaluation of a novel stable whole blood quality control material for lymphocyte subset analysis: results from the UK NEQAS immune monitoring scheme. *Cytometry* 26(3):216 - 22,1996
 23. Howard RR, Fasano CS, Frey L, Miller CH: Reference intervals of CD3, CD4, CD8, CD4/CD8, and absolute CD4 values in Asian and Non - Asian populations, *Cytometry* 26(3): 231 - 2,1996
 24. Rosner E, Willis V, Lambert R, Latzanich G, Ponsell P: CD4⁺ T-cell testing practices as implications for training. *Cytometry* 30 (4): 181 - 5,1997
 25. Rosner E, Siragusa M, Schalla W, Cross D, Cohn R, Hearn T: Assessment of the impact of a CD4⁺ T-cell testing laboratory improvement program. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 122(6):512 - 9,1998
 26. Anonymous: 1997 revised guidelines for performing CD4⁺ T-cell determinations in persons infected with human immunodeficiency virus (HIV), Centers for Disease Control and Prevention, *MMWR Morbidity & Mortality Weekly Report* 46(RR 2):1 - 29, 1997

附録

I. 塩化アンモニウムを用いた溶血法

I-1. 溶血剤組成

- 1) 塩化アンモニウム 8. 26 g
- 2) 炭酸水素カリウム 1. 00 g
- 3) EDTA 37mg

蒸留水 1000ml で溶解し、pH 7. 2 に調整

I-2. 操作方法

- 1) 必要本数の試験管に 100 μ l ずつ全血をとる。
- 2) 使用する抗体を必要量加える。
- 3) 静かに混和し室温にて染色する
ここまでは染色法 5-2 に準ずる。
- 4) 染色時間終了後、溶血剤を 2ml ずつ加える。
- 5) ミキサーで攪拌する。
- 6) 室温に 10 - 15 分間放置する。
- 7) 400 \times g、5 分間 2 - 6 $^{\circ}$ C で遠心分離。
- 8) 上清を捨て、冷 PBS 1ml に再浮遊させる。

溶血が完全でなければ 4)、5)、7) を繰り返す。

9) フローサイトメーターで測定。

II. 洗浄操作に関する注意点

リンパ球、特に B 細胞は洗浄操作によって喪失されやすいため、洗浄操作の回数にはできる限り少なくする必要がある。また適切な遠心回数や遠心時間は、使用する器具や溶血剤の種類により異なるので、各検査室の責任において最適な条件が設定されなければならない。

表 1 に、塩化アンモニウム溶液で溶血後、高さ 35mm 試験管を用い、416 \times g で 5 分間遠心操作を行った時のリンパ球サブセット比率の変化を示す。(委員会検討事項より)

表 2 は、塩化アンモニウム溶液で溶血後、高さ 35mm 試験管を用いて遠心操作を行った時の B 細胞比率の変化を示す。B 細胞は低比重のため、遠心回転数が低い程喪失されやすく、この条件下では、最低 473 \times g 以上の遠心力が必要である。

(表 1)

リンパ球サブセット (n = 10)	溶血のみ行い測定した場合 (%)	溶血後、洗浄を 2 回行った後に測定した場合 (%)
T 細胞 (CD45 ⁺ CD3 ⁺)	70.5 \pm 5.7	72.7 \pm 5.3 (p<0.01)
B 細胞 (CD45 ⁺ CD20 ⁺)	24.5 \pm 5.4	21.4 \pm 5.6 (p<0.01)
CD4 ⁺ T 細胞 (CD45 ⁺ CD4 ^{bright})	45.5 \pm 6.5	47.7 \pm 7.3 (p<0.05)
CD8 ⁺ T 細胞(CD45 ⁺ CD8 ^{bright})	25.0 \pm 5.8	25.5 \pm 5.8 (NS)
NK 細胞(DC45 ⁺ CD3 ⁻ 13 ⁻ 20 ⁻ 33 ⁻)	16.4 \pm 5.0	16.5 \pm 5.3 (NS)

(mean \pm S.D.)
NS;有意差なし

(表 2)

遠心回転数および洗浄回数	B 細胞比率 (CD45 ⁺ CD20 ⁺) (%)
溶血のみ行い、洗浄操作を行わなかった場合	9.8 \pm 5.6
362 \times g, 5 min \times 2 回	8.9 \pm 5.1 (p<0.01)
416 \times g, 5 min \times 2 回	9.4 \pm 5.7 (NS)
473 \times g, 5 min \times 2 回	9.5 \pm 5.8 (NS)

(mean \pm S.D.)
NS;有意差なし

なお遠心回転数の影響は、溶血のみを行い洗浄操作を行なわなかった場合と比較されている。

III. 語彙概要

閾値；threshold (スレッシュホールド)

ノイズのカットオフ値。フローサイトメーターによるリンパ球表面抗原検査においては、リンパ球領域ゲーティングの妨げになりやすい、赤血球のデブリスなどのノイズをカットするように通常前方散乱光パラメーターに閾値を設定する。

蛍光補正；compensation (コンペンセーション)

フローサイトメーターのレーザー光線で励起される各蛍光色素の蛍光波長間では互いに重なる部分があり、FITC のシグナルの一部が FL2 の検出器に検出されたり、PE のシグナルの一部が FL1 (および FL3) の検出器に検出されることがある。多重染色解析の場合、この蛍光色素間のスペクトルの重複を電氣的に補正する調整を行なう。

リンパ球領域の設定；lymphocyte gating (リンパ球ゲーティング)

フローサイトメーターによるリンパ球表面抗原検査において、検体中のリンパ球のみを測定の対象とし、全リンパ球中の各リンパ球サブセットの比 (%) を算出するために、分析時にリンパ球集団を識別し分析対象領域として特定しなければならない。実際には、分析画面上のリンパ球集団に囲いをする (gating) 操作を行なうので、リンパ球領域を設定することをゲーティングという。

パラメーター

フローサイトメーターで検出されるシグナルのこと。細胞等の大きさを反映する前方散乱光 (forward scatter)、細胞等の内部構造を反映する側方散乱光 (side scatter) および特定の蛍光波長幅を検出する検出器 (FL1, FL2 等) による蛍光パラメーターがある。

生細胞率；viability (バイアピリティー)

分析試料中で、目的とする細胞がどのくらい生存しているかを表す指標。

$$\text{生存率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{死亡細胞数}}{\text{計測細胞数}}\right) \times 100$$

死亡細胞数は、色素排除試験で調べることができる。死細胞では細胞膜の完全性が失われるため、分子量の比較的大きな各染色用色素を用いると、死細胞のみが染色され、生細胞は染色されない。通常は、検体採取後、時間の経過とともに生存率が減少していくため、とくに保存検体では生存率が充分でない場合がある。

IV. 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
名簿

三輪史朗 (座長)

池本敏行

北村 聖

巽 典之

中原一彦

東 克巳

渡辺清明

(五十音順)