

フローサイトメトリーによる血小板内 RNA 量検出法

手順書

(Standard Operation Procedure, SOP)

改訂記録

版数	作成日	作成者	変更内容	変更理由等
第 0.1 版	2023/7/24	竹田 知広	新規作成	
第 0.2 版	2023/8/8	竹田 知広 永井 豊	誤記など追記訂正 RNase ロット間差解消のための 手順追加	20230801 パイロット運用での検証による
第 0.3 版	2023/10/5	竹田 知広 永井 豊	ゲーティング手順の最適化 手順標準化追記	ゲーティング手順レビューによる 2023/8/18,22, 2023/9/2,5,12,13,28 2023/10/02,04,19
第 1.0 版	2023/11/22	竹田 知広 永井 豊	ゲートダブルット除去サイトグラム を FSC から SSC へ変更し、ドット プロットを等高線表示へ変更 (関連プロット図入れ替え) ・Total Count を Plt へ変更 ・RP ドットサイズ変更 (他のドット と同じ大きさへ)	ゲーティング精度向上 (臨床検体)
第 1.1 版	2024/6/1	竹田 知広	固定試薬・RNase 試薬の変更	Debris の低減 (臨床検体)
第 1.2 版	2024/6/24	竹田 知広	染色液・RNase 試薬量の変更	試料調製の最適化 (臨床検体)

Reference

竹田知広, 上北宏美, 羽田梨沙, 永井豊 (関西医療大学 網血小板標準法検討チーム). 新規血小板内 RNA 検出法の基礎的検討. 日本検査血液学会雑誌. 2024;25(Suppl): S200.

1. 試薬および器材

1.1 試薬

- ・ APC Mouse Anti-Human CD41a : BD Biosciences (カタログ番号: 559777)
- ・ APC Mouse Anti-Human CD61 : BD Biosciences (カタログ番号: 564174)
- ・ PE-Cy7 anti-human HLA-A,B,C Antibody : BioLegend (カタログ番号:311430)
※ 使用機器が3レーザーの場合、BV510 標識抗HLA-ABC抗体 (BD Biosciences カatalog番:568005) を使用
- ・ Triton™-X : Merck (カタログ番号:T8787-250ML)
- ・ True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set : Biolegend (カタログ番号:424401)
- ・ RNase A, DNase and protease-free : Thermo Scientific (カタログ番号: EN0531)
- ・ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) : 富士フイルム和光純薬 (カタログ番号 : 049-07213)
- ・ Nucleolus Bright Green (NBG) : 同人化学 (カタログ番号 : N511)
- ・ PBS(-) : 富士フイルム和光純薬 (カタログ番号 : 166-23555)

1.2 器具

- ・ マイクロピペット A (2-20 μ L)
- ・ マイクロピペット B (10-100 μ L)
- ・ マイクロピペット C (100-1,000 μ L)
- ・ マイクロピペット D (10mL)
- ・ マイクロピペット用チップ (A; 20 μ L用、B; 100 μ L用、C; 1,000 μ L、D; 10mL)
- ・ 試薬調製用チューブ (1.5mL マイクロチューブ、15mL コニカルチューブ、50mL コニカルチューブ)
- ・ 測定サンプル用チューブ (FCM 専用ラウンドチューブ)
- ・ 0.2 μ m シリンジフィルター
- ・ シリンジ
- ・ 試験管立て
- ・ キムワイブ
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ タイマー
- ・ 遠心機
- ・ 加温器
- ・ 振とう攪拌機 (試薬が混和の際に泡立たないように、回転タイプが望ましい)
- ・ 自動血球分析装置 (試料調製前に血小板数の情報が無かった場合)

1.3 使用機器

- ・ 汎用フローサイトメーター FACS Lyric (2レーザー仕様 または 3レーザー仕様)

2. 試薬準備

2.1 固定処理試薬（1X Fix Concentrate）

※ 1 検体必要量：700 μ L（200 μ L/1 チューブ \times 3 チューブ）

調製に使用する器具/試薬

- ・ 4X Fix Concentrate
- ・ Fix Diluent
- ・ マイクロピペットC（100-1,000 μ L）
- ・ 試薬調整用チューブ（1.5mL マイクロチューブ等）

用時操作

- 1) 試薬調整用チューブに 4X Fix Concentrate 175 μ L と Fix Diluent 525 μ L を添加して混和し、固定処理試薬とする。

2.2 透過処理試薬（1% Triton-X）

※ 1 検体必要量：200 μ L（62.5 μ L/1 チューブ \times 3 チューブ）

調製に使用する器具/試薬

- ・ Triton-X
- ・ PBS(-)
- ・ マイクロピペットC（100-1,000 μ L）
- ・ マイクロピペットD（10mL）
- ・ 試薬調整用チューブ 2本（15mL ラウンドチューブ等）

用時操作

- 1) 試薬調整用チューブに、Triton-X 100 μ L と PBS 9,900 μ L を添加して混和し、1% Triton-X を作製し、完全に溶解するまで振とう攪拌器で 30 分程度混和する。
(Triton-X は粘性が強いいため、チップの先端を切断するなど工夫し秤量する。)

2.3 RNA 除去試薬（RNase 溶液 1mg/mL）

※ 1 検体必要量：700 μ L（312.5 μ L/1 チューブ）

調製に使用する器具/試薬

- ・ RNase A
- ・ PBS(-)
- ・ マイクロピペットB（10-100 μ L）
- ・ マイクロピペットC（100-1,000 μ L）
- ・ マイクロピペットD（10mL）
- ・ 試薬調整用チューブ（1.5mL マイクロチューブ、15mL コニカルチューブ等）

操作

用時操作

- 1) 試薬調整用チューブに 20mg/mL RNase 35 μ L と PBS 665 μ L を添加して混和し、20 倍希釈し、

1mg/mL RNase 希釈液を作製し、RNA 除去試薬とする。

2.4 核酸染色試薬（1000倍 NBG 溶液）

※ 1 検体必要量：2,000 μ L（800 μ L/1 チューブ \times 2 チューブ）

調製に使用する器具/試薬

- ・ NBG
- ・ DMSO
- ・ PBS(-)
- ・ マイクロピペット A（2-20 μ L）
- ・ マイクロピペット B（10-100 μ L）
- ・ マイクロピペット C（100-1,000 μ L）
- ・ 試薬調整用チューブ（15mL コニカルチューブ等）

操作

1) NBG（粉末）に DMSO 60 μ L を添加して、複数回のピペッティングで溶解させる。

※溶解後の NBG は遮光冷凍で 1 か月保存可能。

用時操作

2) 1)の溶解 NBG 2 μ L と PBS 2,998 μ L を試薬調整用チューブに入れて混和し、2000 倍 NBG 溶液を作製し、核酸染色試薬とする。

3. 試料の調製

- ※ 通常の場合は、血液 5 μ L および抗体量 5 μ L (2 レーザー仕様) または 3 μ L (3 レーザー仕様) を使用して、PBS で液量を調整し、試料全量を 50 μ L とする。
- ※ ただし、血液試料の血小板数が 10 万/ μ L に満たない場合は、1 チューブ当たり 50 万個の血小板数が含まれるよう添加血液量を調整し、PBS で試料全量の調製をする。また、計算上、添加する血液量が整数にならなかった場合、繰り上げた値を血液量として添加する。なお、血小板数が 50 万個に満たなくても、血液量は最大 40 μ L までとする。 ※計算式： $V_{\text{blood}} = 10(\text{万}/\mu\text{L})/\text{Plt}(\text{万}/\mu\text{L}) \times 5\mu\text{L}$

- 1) PBS および各抗体試薬を室温に 15 分以上放置し、室温に戻す。
- 2) 1 検体につき、FCM 専用ラウンドチューブを 3 本準備し、PBS (未染色サンプル) , RNA (核酸染色サンプル) , Neg-RNA (RNA 除去サンプル) とラベルする。
- 3) 下表の血小板数で決定した血液量 (V_{blood}) および抗体試薬量 (V_{ab}) に応じて、試薬総量 (Total) が 50 μ L となるように添加する PBS 量 (V_{PBS}) を決めて、3 チューブに抗体試薬と PBS をチューブの管底に加える。 ※計算式： $V_{\text{PBS}} = 50 - V_{\text{ab}} - V_{\text{blood}}$

<2 レーザー仕様>

血液量 V_{blood} (/チューブ)	抗体量 V_{ab} (μ L)			V_{PBS} (μ L)	Total (μ L)
	CD41a	CD61	HLA-I		
5~14 μ L	1	1	3	31 ~ 40	50
15~29 μ L	1	1	5	14 ~ 28	50
30~40 μ L	1	1	8	0 ~ 10	50

<3 レーザー仕様>

血液量 V_{blood} (/チューブ)	抗体量 V_{ab} (μ L)			V_{PBS} (μ L)	Total (μ L)
	CD41a	CD61	HLA-I		
5~19 μ L	1	1	1	28 ~ 42	50
20~40 μ L	1	1	2	6 ~ 26	50

- 4) 血液を採取し、チップの表面をキムワイプで拭き取り、3)の抗体試薬および PBS が入っているチューブに入れ (リンス法)、分注した直後に試料をボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 5) 室温(18-22 $^{\circ}$ C)、暗所にて 20 分間静置する。
- 6) 各チューブをボルテックスで攪拌後に**固定処理試薬**を 200 μ L 加え、分注した直後にボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。
- 7) 室温(18-22 $^{\circ}$ C)、暗所にて 20 分間静置する。
- 8) 各チューブをボルテックスで攪拌後に**透過処理試薬 (1%Triton-X)**を 62.5 μ L 加え、分注した直後にボルテックスで 1 秒間 3 回攪拌する。 ※各静置工程後の調製した試料の攪拌は、RNA 除去サンプルのデブリやダブレット低減につながり、試料に赤みがなく透明度が高いかどうかを目安として活用できる。
- 9) 室温(18-22 $^{\circ}$ C)、暗所にて 10 分間静置する。
- 10) **RNA 除去サンプル** (Neg-RNA) 1 チューブのみ、洗浄し、RNase 処理を行う。PBS, RNA のチューブはスキップし、11) に進む。

- ① PBSをチューブ全体の8割程度まで加える。
 - ② 900xgで5分間遠心する。
 - ③ 遠心後、デカント（容器をさっと傾けて上清だけを流す）により上清のみ除去してチューブ底に溜まったペレットを回収する。※沈殿量が少ないためペレットは目視では確認できない場合が多い。
 - ④ **RNA除去試薬（RNase（1mg/mL）312.5μL）**を加え、分注した直後にボルテックスで1秒間3回攪拌する。
 - ⑤ 37℃、暗所で10分間放置する。
- 11) 各チューブをボルテックスで攪拌後、**未染色サンプル**（PBS）のチューブにPBS 800μL、**核酸染色サンプル**（RNA）のチューブおよび**RNA除去サンプル**（Neg-RNA）のチューブに**核酸染色試薬** 800μLを加え、分注した直後にボルテックスで1秒間3回攪拌する。
 - 12) 37℃、暗所にて15分間放置する。
 - 13) フローサイトメーターで測定する。※機器ごとの操作説明書 FACS Lyricを参照

4. 測定

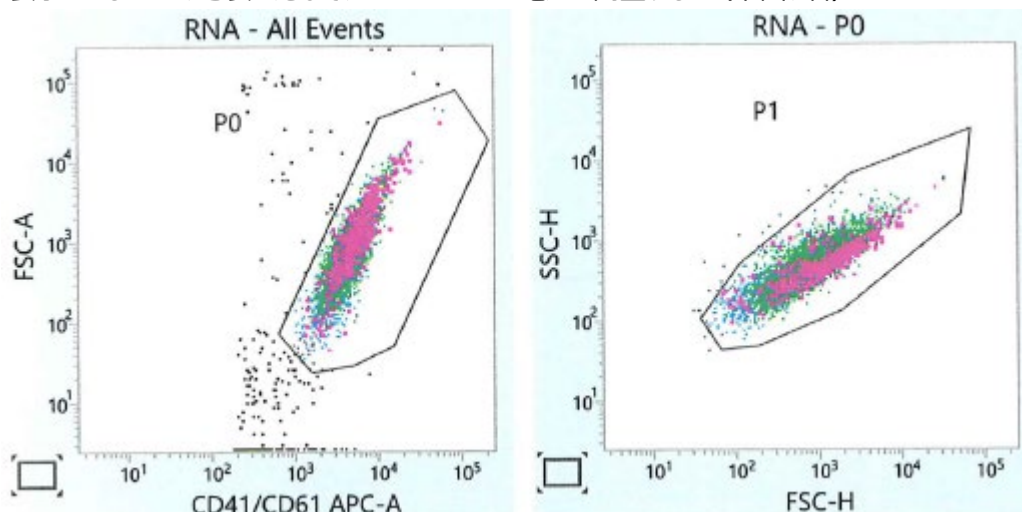
4.1 フローサイトメーター測定条件および機器調整

4.1.1 検出パラメーター

- ① FSC-A
- ② FSC-H
- ③ SSC-H
- ④ FITC (NBG)
- ⑤ PE-Cy7 (HLA-ABC) ※3レーザー仕様の場合、BV510
- ⑥ APC (CD41a,CD61)

4.1.2 前方散乱光 (FSC/FS) ,側方散乱光 (SSC/SS) パラメーターの調整

- ・ 前方散乱光取得角度が 0°-10°前後であることを確認する。
- ・ FSC、SSC パラメーターを Log モードに設定する。
- ・ Threshold/Discriminator は APC (CD41a/CD61) の最少レベルに設定する。(下図、左)
- ・ 試料を流しながら、(FSC/FS)-Hight(H)/(SSC/SS)-Hight(H)スキャッタグラム内に下図、右のように血小板が表示されるように、必要に応じて、FSCとSSCの電圧を調整する。(下図、右)



4.1.3 測定流速：FACS Lyric の場合 LOW

4.1.4 データ取り込み条件：Plt イベント 10,000

4.2 データの取り込み

※ 各チューブ、機器にチューブをセットする直前にボルテックスを 1 秒間 3 回行う。

- 1) 未染色サンプル (PBS チューブ) を機器にセットし、データ取り込みを行う。
- 2) 核酸染色サンプル (RNA チューブ) を機器にセットし、データ取り込みを行う。
- 3) RNA 除去サンプル (Neg-RNA チューブ) を機器にセットし、データ取り込みを行う。

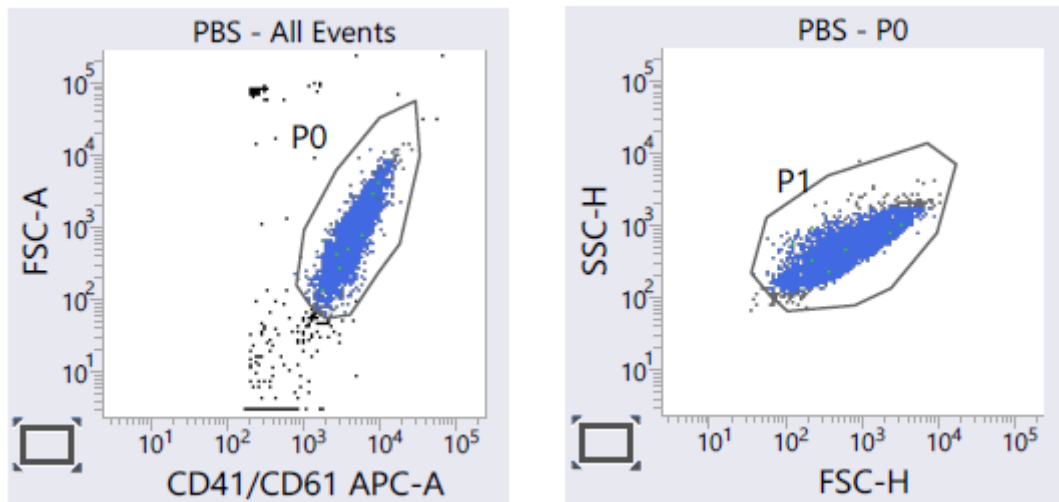
4.3 解析プロット（ゲーティング）

【1】血小板プロット：CD41a/CD61-APC vs FSC-A（ゲート：ALL イベント）

- 血小板集団（CD41a/CD61 陽性）に P0 ゲート（灰色ドット, BD_Gray）を設定する。
- 血小板集団の APC 軸下限が Threshold 設定により削除されていないかどうかを確認する。
- 血小板集団の FSC-A 軸上限は、白血球などの大型細胞が含まれないように設定する。

【2】デブリス除去サイトグラム：FSC-H vs SSC-H（ゲート：P0 イベント）

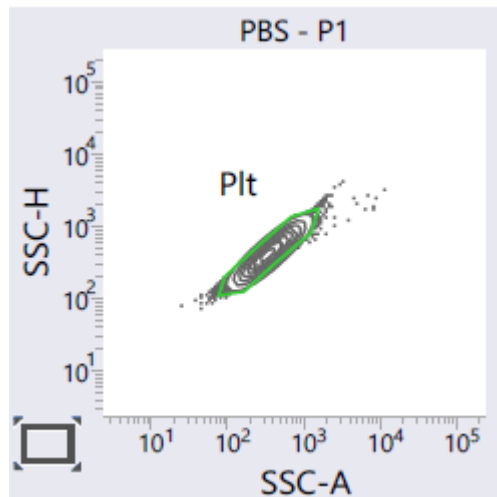
PBS チューブで P0 血小板集団に P1 ゲート（灰色ドット, BD_Gray）を設定し、デブリス等のイベントを除去する。



【3】ダブルット除去サイトグラム：FSC-A vs FSC-H（ゲート：P1 イベント）

Plt ゲートの設定；

PBS チューブで P1 血小板集団の右上がりの直線に沿った集団の右下側に出現するイベント（FSC-A 側が高値傾向）を厳密に除外した Plt ゲート（Plt イベント、緑ドット, LimeGreen）を設定し、等高線プロットを利用してダブルットを除去する。

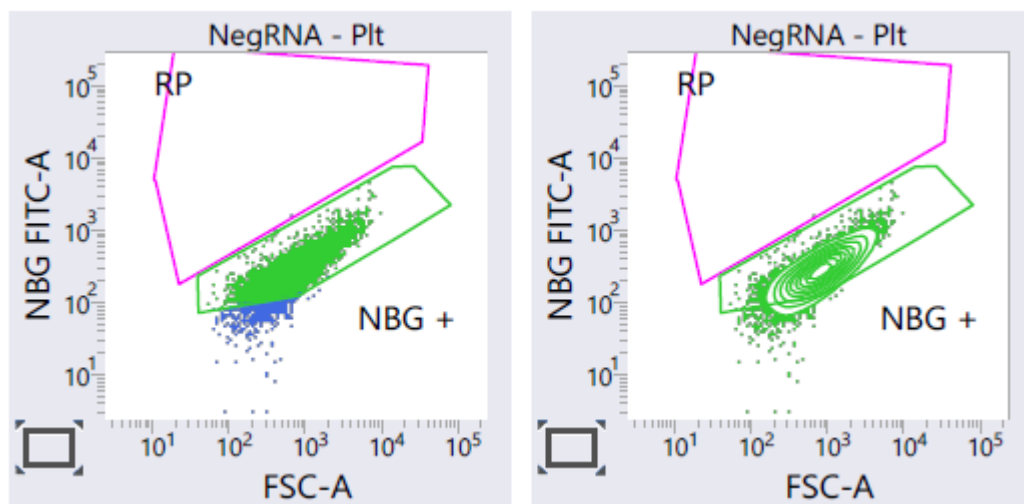


【4】 RP ドットプロット：FSC-A vs NBG-FITC (ゲート：Plt イベント)

【5】 RP 等高線プロット：FSC-A vs NBG-FITC (ゲート：Plt イベント)

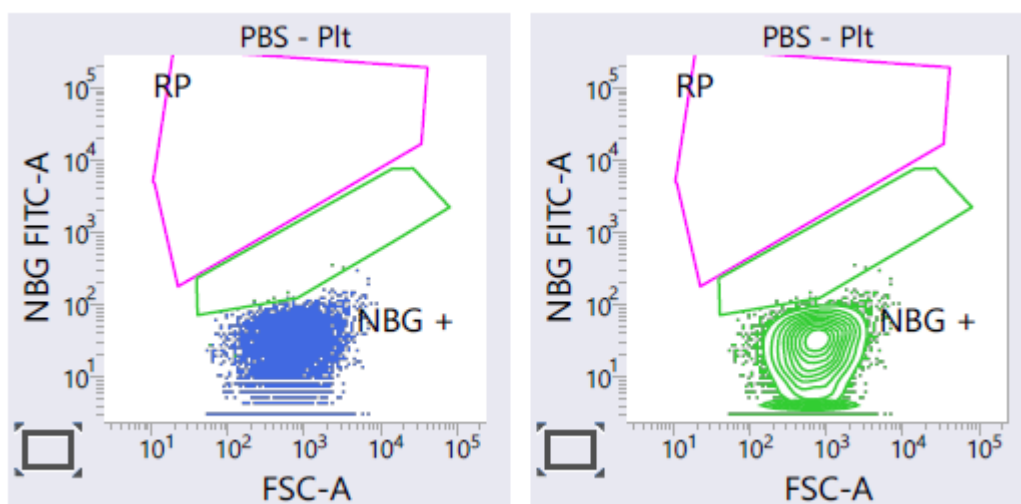
a) RP ゲートの設定；

RNA チューブおよび Neg-RNA チューブで、NBG 陽性網血小板集団に RP ゲート (RP イベント、ピンクドット, Fuchsia) を設定する。※RP ゲートの右上がりの下側ゲートは、Neg-RNA チューブのプロットを用いて、多角形ゲートの一边を用いる。その際、辺の傾きは、NBG+ 等高線プロットの等高線の頂点から両側の尾根に向かって引いた直線に平行となるようにする。(Appendix 1)



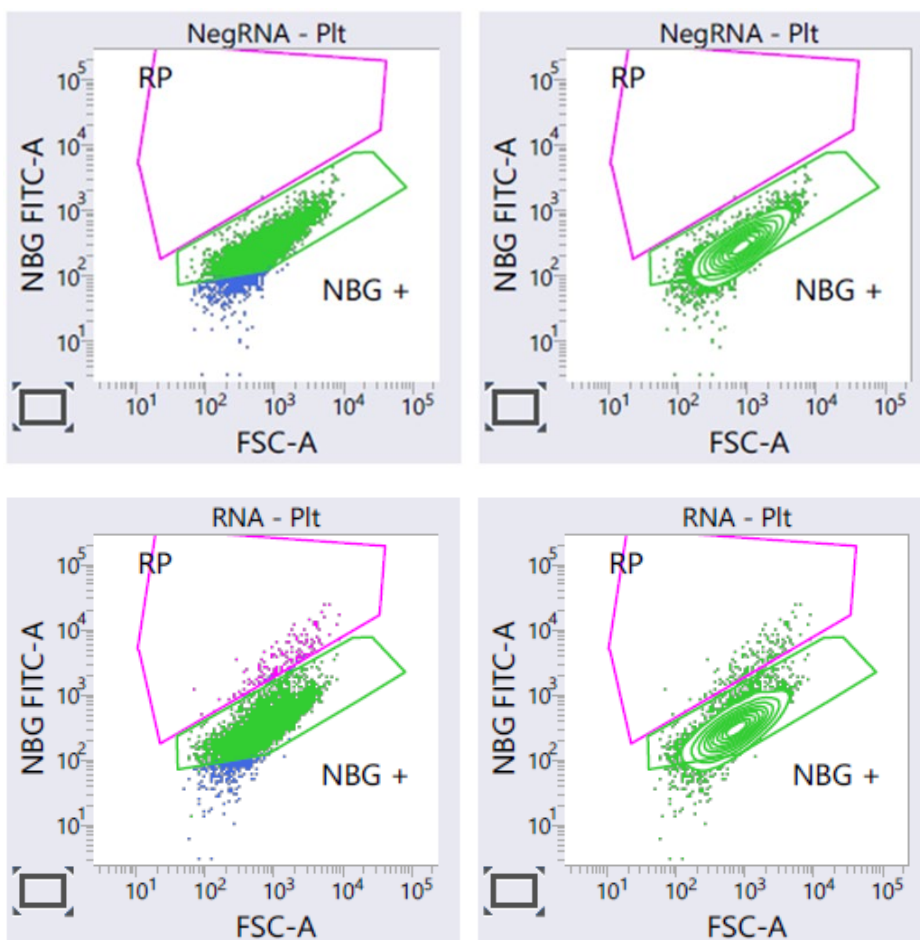
b) NBG+ゲートの設定；

Neg-RNA チューブおよび PBS チューブで NBG 陽性集団の RP ゲートより下側の RNA 陰性集団 (RP よりも核酸量の少ない細胞) に NBG+ゲート (NBG 陽性イベント、緑ドット, Lime Green) を設定する。※NBG+ゲートの下限は、PBS チューブのプロットを用いて、多角形ゲートの一边を用いる。その際、辺の傾きは、PBS チューブの等高線プロットの等高線に平行となるように設定する。



c) RP ゲートの微調整；

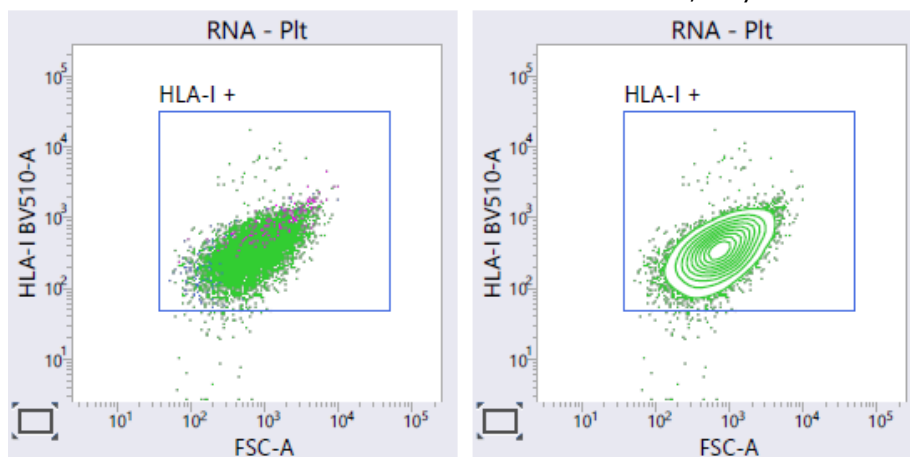
設定した RP ゲートを上下に微調整して、Neg-RNA チューブのプロットでの RP 比率が 0.4~0.6%となるようにする。※RP ゲートは設定者がどの集団までを陽性とするかによって RP%の変動につながるため、常に Neg-RNA チューブでの RP%を一定値にすることで、測定のバラツキを最小限にする。



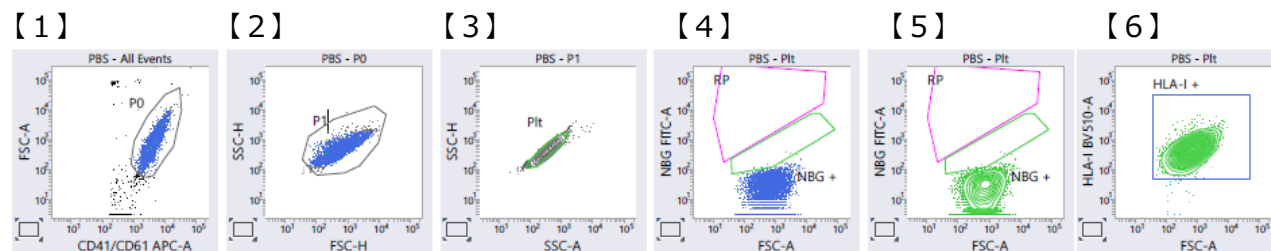
[6] HLA-I ドットプロット：FSC-A vs [HLA-I]-[PE-Cy7] (BV510) (ゲート：Plt イベント)

[7] HLA-I 等高線プロット：FSC-A vs [HLA-I]-[PE-Cy7] (BV510) (ゲート：Plt イベント)

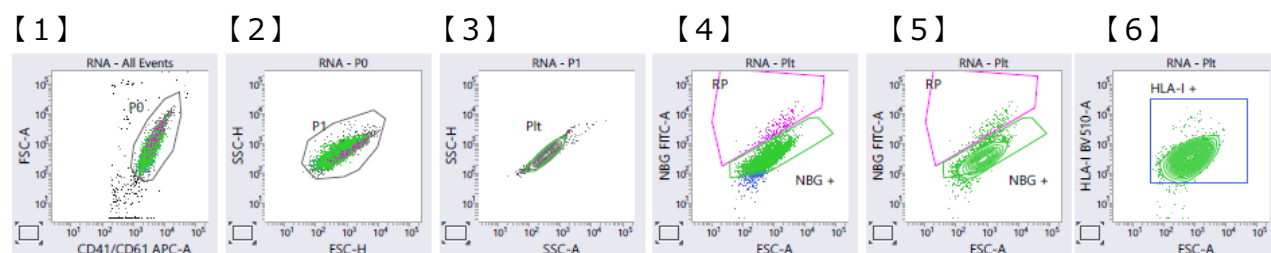
PE-Cy7 (BV510) 陽性の HLA-I+ゲート (HLA-I 陽性イベント、水色, RoyalBlue) を設定する。



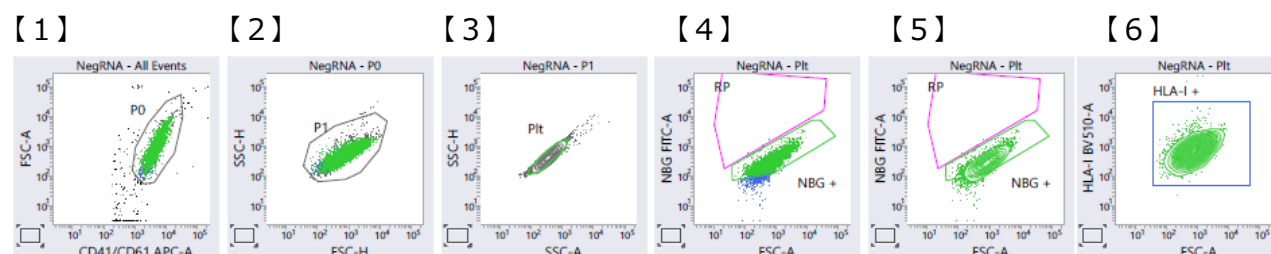
未染色サンプル



核酸染色サンプル



RNA 除去サンプル



5. 網血小板の算定

全血小板（Pltゲート内イベント数）中の網血小板（RPゲート内のイベント数）の割合（%）を算出して求める。

$$\text{網血小板率 (\%)} = \text{RPゲート内イベント数} / \text{Pltゲート内イベント数} \times 100$$

参考：NBG 陽性率 (%) = NBG+ゲート内イベント数 / Pltゲート内イベント数 × 100

$$\text{NBG 陰性率 (\%)} = 100 - (\text{網血小板率} + \text{NBG 陽性率})$$

Appendix 1

-RP ゲートと NBG ゲートの境界ライン設定方法-

RP ゲートの右上がりの下側ゲートは、Neg-RNA チューブのプロットを用いて、多角形ゲートの一边を用いる。その際、辺の傾きは、NGB+等高線プロットの頂点から両側の尾根に向かって引いた直線（青点線）に平行となるように設定する。青点線の傾きは、RNA 除去サンプルの血小板の大きさ指標である FSC-A との染色性が線形であることを示している。

一方、RNA チューブプロットでは、RNA 陰性集団とは異なる染色性を持つ RNA 優位血小板の集団が現れる。その集団の染色性は、右図の等高線プロットでは、ピンク点線で示される尾根が現れます。

