

# LEGENDplex™

クラウドベースの解析ソフトウェアマニュアル

## 目次

プログラム概要:	2
はじめに	2
アカウント作成	2
システム必要要件	2
データの安全性	2
プログラムへのログイン	3
パスワードを忘れた場合	3
テーブルの説明	3
Experimentの新規作成	4
Analysisタブによる解析パラメーターの設定:	4
Beads タブ	4
Standards タブ	6
Samples タブ	7
レプリケートの設定	7
Review Gating タブ	8
ゲートの修正	10
修正済みゲートを他のサンプルに適用	10
Results タブ	11
スタンダードカーブプロット	11
検量線グラフ画面の表示について	12
その他のスタンダードカーブプロットツール	12
定量結果一覧	12
Concentration Table	13
Count Table	13
MFI Table	13
CV Table	13
その他の解析ツール:	13
データを解析から除外する	13
ゲート位置を素早く確認するためには	13
レポートの作成:	14
データの管理と保存:	15
Experimentの共有	15
Experimentのコピー	16
Experimentのエクスポート/インポート	17

# プログラム概要:

## はじめに

クラウドベースのLEGENDplex™データ解析ソフトウェアは、BioLegendのマルチプレックスアッセイ製品、LEGENDplex™のデータ解析用ソフトウェアです。BioLegendとQognit社が共同で開発いたしました。

アカウント作成後は、インターネットに接続された任意のパソコン上でLEGENDplex™ 測定データを解析することができます。

クラウドベースのLEGENDplex™ データ解析ソフトウェアの主な特徴：

- シンプルで直感的なユーザーインターフェースとワークフローを備えています。
- Pre-definedパネルとmix and matchパネル製品の場合、ビーズIDが既に登録されており、入力が不要です。
- 洗練されたゲーティングとカーブフィッティングアルゴリズムにより各FCMファイルが個別に解析されるため、正確な結果が得られます。
- FCSファイルのアップロード後は、いつでも解析ワークスペースへ戻ることができます。
- 共同研究者やテクニカルサポートと、簡単に解析ワークスペースを共有できます。
- 各アカウントに2 GB までデータを保存できます。
- 簡単に結果をダウンロードすることができます。

## アカウント作成

クラウドベースのLEGENDplex™解析ソフトウェアのアカウント作成をご希望の場合は、BioLegend テクニカルサービスチームにメールでご連絡ください。

- Email 宛先: tech@biolegend.com
- メール件名: LEGENDplex™ Cloud Software Account Setup
- メール本文: アカウント作成希望であることをご記載ください。

注意: アカウントのユーザーネームとして使用を希望するメールアドレスをお知らせください。

通常は1営業日以内に、アカウントが作成されたことをお知らせする確認メールが、ユーザーネームとして使用するメールアドレス宛に送信されます。そのメールに記載されている指示に従ってください。

## システム必要要件

クラウドベースのLEGENDplex™ 解析ソフトウェアのご使用にはインターネット環境が必要です。動作は、下記ウェブブラウザに対応しています。

- Google Chrome (version 74 以降)
- Mozilla Firefox (version 66 以降)
- Apple Safari (version 12 以降)
- Microsoft Edge (version 44 以降)

注意: Microsoft Internet Explorerには対応しておりません。

クラウドベースのLEGENDplex™データ解析ソフトウェアは下記のフローサイトメトリーファイル形式に対応しています：

- FCS 2.0
- FCS 3.0
- FCS 3.1
- LMD ファイル

## データの安全性

アカウント登録済みのユーザーは、クラウドサーバーへアップロードしたデータに関するすべての権限を保持しています。アカウント所有者のみ、データの削除や追加を行う権限があります。データ所有者がソフトウェアの共有機能を使用して許可しない限り、他のユーザーはそのデータにアクセスすることができません。アクセス許可はいつでも取り消すことができます。

Qognit社は本ソフトウェアの仮想化サーバーを、Amazon EC2, Google Cloud, and Digital Oceanのような世界でも主要なクラウドシステムを用いて構築しています。

Qognit社は、SOC2に認定され、少なくとも以下のようなセキュリティが保証された、物理的セキュリティセーフガードのあるクラウドサーバーのみを利用しています。

- 24時間/365日の物理的セキュリティとモニタリング
- 施設への物理的な入場制限
- 二要素認証を備えた生体認証装置
- CCTV監視システムによる施設の監視

LEGENDplex™ソフトウェアへのすべてのデータ入力、あるいはソフトウェアからのデータ出力の際には、最新で安全なTLS (HTTPS) 暗号プロトコルによりデータが暗号化されています。

アクセスログ記録: Qognit社とユーザーによるサーバーとアプリケーションへのアクセスは中央ログシステムにより記録されています。記録を監視し、通常と異なる、あるいは悪意のある可能性が考えられる行為を検出した場合、Qognit社または指定したセキュリティベンダーが調査します。

侵入テストと脆弱性管理: Qognit社は定期的に内外からLEGENDplex™ ソフトウェアに対する侵入テストを行い、問題を発見した場合はその重大性によって適切に対応します。また、Qognit社はsecurity@qognit.comへ届いたメールを積極的に監視し、報告されたすべての潜在的な脆弱性やバグを調査します。

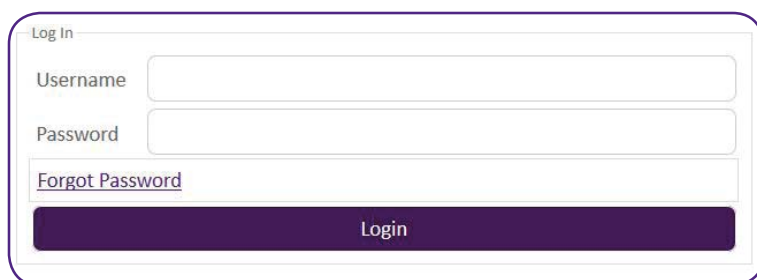
不正アクセス通知: 電子データの送信や保存に関する完全なセキュリティは確立されていません。そのため、Qognit社はデータが絶対に安全であると完全に保証することはできません。Qognit社がセキュリティ侵害を検知した場合、不正アクセスされた恐れのあるユーザーに通知し、適切な対応を行えるように取ります。通知手順は、少なくとも関連する法令と業界基準を順守しています。

## プログラムへのログイン

アカウント作成完了後、ソフトウェアにアクセスするために以下の作業を行ってください：

- システム必要要件を満たしたウェブブラウザでlegendplex.qognit.comにアクセスします。
- もしくはLEGENDplex™ ウェブページ (biolegend.com/en-us/legendplex)下部にある‘Cloud-based Program’ をクリックしてプログラムにアクセスします。
- Username (登録に用いたメールアドレス) とパスワードを入力します (Figure 1)。
- 紫色のLoginボタンをクリックします。

Figure 1. ログイン画面



The screenshot shows a login form with the following elements: a title 'Log In', a text input field for 'Username', a text input field for 'Password', a link for 'Forgot Password', and a prominent purple button labeled 'Login'.

## パスワードを忘れた場合

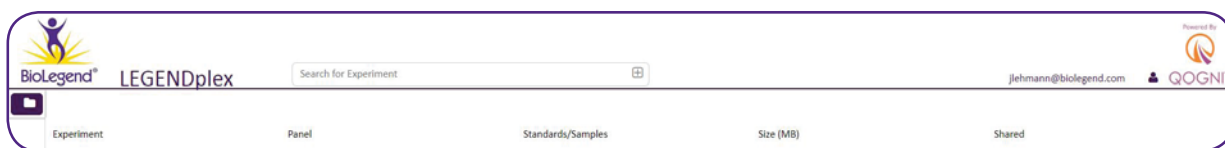
パスワードを忘れた場合は、‘Forgot Password’ をクリックして指示に従いパスワードをリセットしてください。

## ソフトウェアの開始ページ:

開始ページでは、過去にアップロードされたデータセットの概要がテーブル(Figure 2) に表示されます。初回ログイン時には、テーブルは空欄になっています。

- 過去に解析したデータセットを表示したい場合には、Experimentをクリックしてください。
- 開始ページに戻りたい場合には、画面左上のBioLegendロゴをクリックしてください。

Figure 2. ソフトウェアの開始ページ



The screenshot displays the top navigation bar of the software interface. It includes the BioLegend and LEGENDplex logos, a search bar with the placeholder text 'Search for Experiment', and the user's email 'jlehmann@biolegend.com' and the QOGNIT logo. Below the navigation bar is a table with the following columns: Experiment, Panel, Standards/Samples, Size (MB), and Shared.

## テーブルの説明

**Experiment:** ユーザーが入力した実験 (Experiment) 名

**Panel:** 実験で使用したLEGENDplex™ パネル名

**Standards/Samples:** スタンダードもしくはサンプルのFCSファイル数

**Size:** アッセイで使用されるサーバーのハードドライブ容量

注意: デフォルト設定では、各アカウントにつき 2 GBまでのデータを保存することができます。

詳細はデータの管理と保存の項目をご参照ください。

**Shared:** 解析ワークスペースを他のアカウントユーザーと共有している場合は、この欄にそのユーザーのメールアドレスが表示されます。

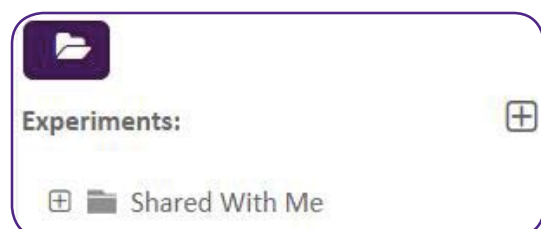
## Experimentの新規作成

- 画面左上部の紫色のフォルダアイコン (Figure 3)をクリックします。

上記動作によって、画面左側の表示メニューが開き、アップロードされたアッセイデータ（共有中のデータも含む）が表示されます。

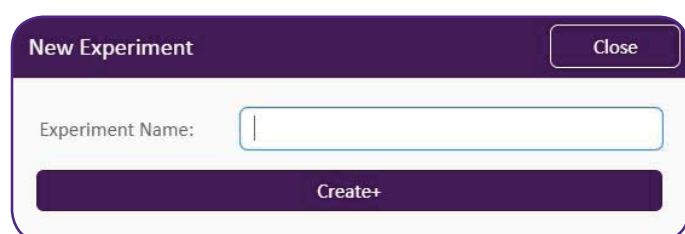
- 「+」アイコンをクリックして、新規解析セッションを開始します。

Figure 3. フォルダアイコン



「New Experiment」ポップアップウィンドウが開きます (Figure 4)。

Figure 4. New Experiment ウィンドウ



- Experiment name欄に実験名を入力します。
- 「Create+」ボタンをクリックします。

## Analysisタブによる解析パラメーターの設定:

解析画面にはBeads, Standards, Samples, Review Gating, Resultsの5つのタブがあります。これらのタブを順番に使うことで、LEGENDplex™アッセイ用のFCSファイルのアップロードと解析を行います。タブはページ上部にあります。設定を完了した段階のタブは、クリックして簡単に各タブ間を移動することができます。現在選択されているタブは紫色の下線で表示されます。

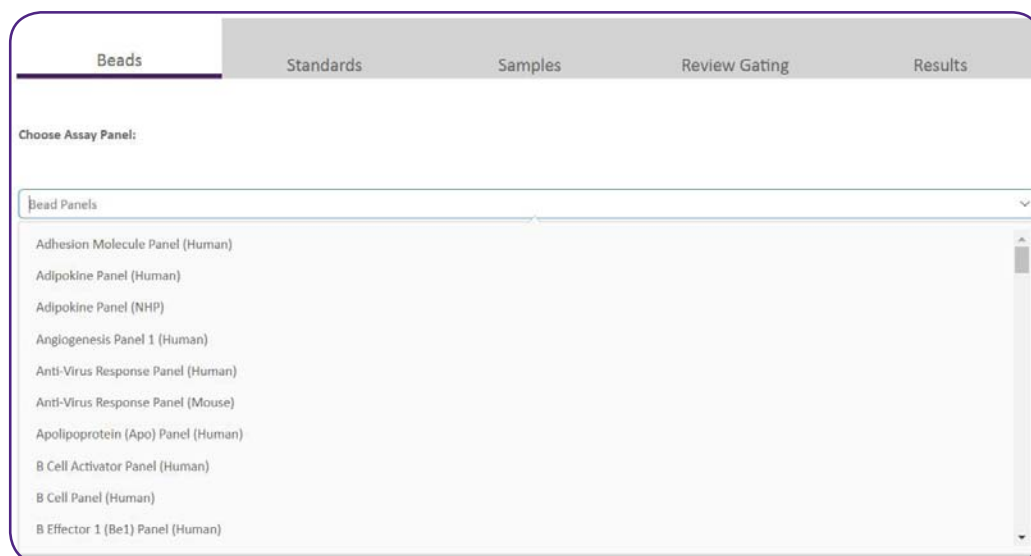
各タブの詳細は下記のとおりです:

### Beads タブ

Experimentを新規作成後、自動的にBeadsタブが表示されます。このタブでは、使用したLEGENDplex™ パネル名を選択し、各Bead IDのトップスタンダード濃度を設定します。

- 「Bead Panels」のプルダウンメニューより使用したパネル名を選択します (Figure 5)。

Figure 5. Beads Panelsのプルダウンメニュー



選択したパネルのBead IDが表示されます (Figure 6)。

注意: 選択したpre-defined パネルに含まれている全てのBead IDが表示されます。mix & matchパネルのデータ解析を行う場合は、不必要なBead IDのゴミ箱アイコンをクリックし、該当するBead IDを消去してください。

カスタムLEGENDplex™ パネルの場合は、プルダウンメニューより、「Custom Panel」を選択してください。その後、手動で各Bead IDに該当する測定因子名を入力する必要があります。Beads IDと対応する測定因子名はマニュアルをご確認ください。また、不必要なBead IDはゴミ箱アイコンをクリックし、消去してください。

- 「Max」の欄に各測定因子のトップスタンダード濃度を入力します。

スタンダード濃度は製品に同梱されているロット毎のCoAでご確認いただけます。

注意: キーボードのtabボタンを押すと、直前に入力した濃度情報が次の因子の濃度欄にペーストされます。濃度入力の際にお役立てください。

- 必要な情報を入力後、Bead IDテーブルの下の「Save」ボタンをクリックすると、次のStandardタブの段階に進みます。

Figure 6. Bead IDテーブル

A Beads:				B Beads:			
Bead ID	Analyte	Max	Units	Bead ID	Analyte	Max	Units
A4	IL-5	10000	pg/ml	B2	IFN-γ	10000	pg/ml
A5	IL-13	10000	pg/ml	B3	TNF-α	10000	pg/ml
A6	IL-2	10000	pg/ml	B4	IL-17A	10000	pg/ml
A7	IL-6	10000	pg/ml	B5	IL-17F	10000	pg/ml
A8	IL-9	10000	pg/ml	B6	IL-4	10000	pg/ml
A10	IL-10	10000	pg/ml	B7	IL-21	10000	pg/ml
				B9	IL-22	10000	pg/ml

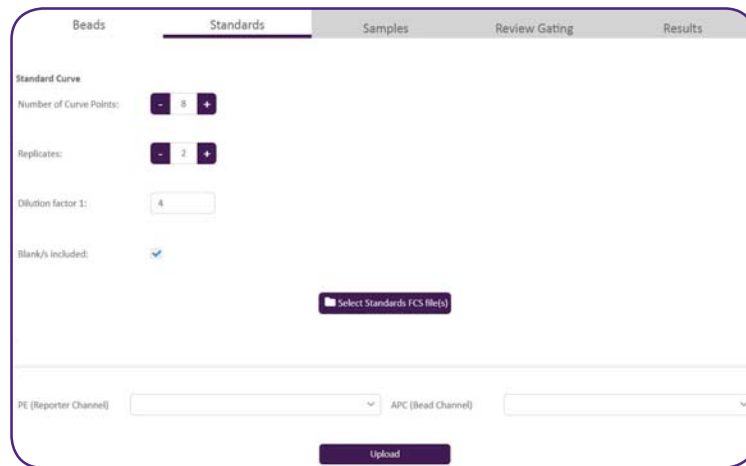
## Standards タブ

Standards タブはスタンダードカーブの設定に使用します。スタンダードカーブの検量点数、各点のレプリケート情報と段階希釈の倍率を入力します。

注意: Standardタブの初期設定は、LEGENDplex™マニュアルに記載されている初期設定と同一の値が表示されています。マニュアルに従い実験を行った場合には、設定値の変更は必要ありません。ブランクウェルを測定していない場合は、「Blank/s included」横のチェックボックスのチェックを外してください。

- (任意) 必要に応じて、スタンダードカーブの検量点数、各点のレプリケート数と希釈倍率を入力します。
- 紫色の「Select Standards FCS file(s)」ボタンをクリックします。
- ポップアップウィンドウ内でスタンダードカーブ用のFCSファイルをすべて選択し、「Open」ボタンをクリックします。Standardタブにファイルリストが表示されます。
- ファイルリスト下のプルダウンメニューより、PEとAPCの測定に使用したチャンネル名を選択します。
- 紫色の「Upload」ボタンをクリックします。

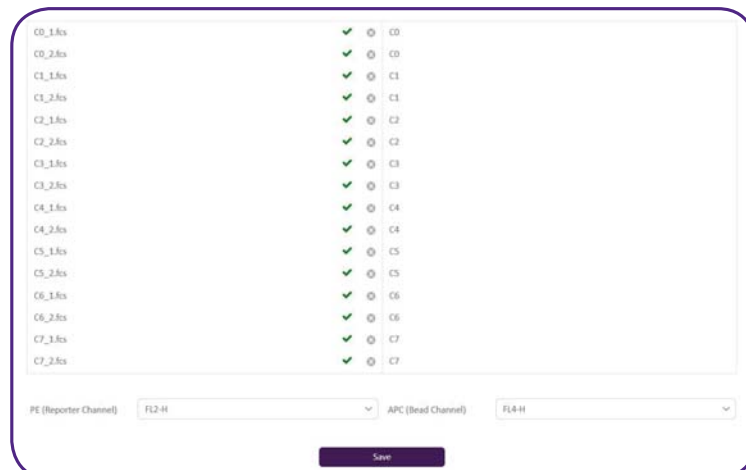
Figure 7. Standardsタブ



上記で設定したPEチャンネルのMFI値を基に、ソフトウェアがスタンダードカーブ用FCSファイルをC7からC0まで並べ替えます。

- スタンダードカーブの各検量点 (C0-C7) にファイルが間違っ割り当てられた場合、適切な順序になるようFCSファイルをドラッグして修正してください。(Figure 8)。
- 全てのスタンダードカーブ用FCSファイルが各点に正しく関連付けられたことを確認後、「Save」ボタンをクリックします。次のSampleタブの段階に進みます。

Figure 8. 適切に順序付けられたスタンダードカーブ用FCSファイル



## Samples タブ

Samples タブは、LEGENDplex™で測定したサンプルのFCSファイルのアップロードに使用します。これらのファイルのレプリケートと希釈情報もこのタブで入力します。

注意: もし、スタンダードカーブのみを解析したい場合は、Uploadボタン右下の「Run Gating」ボタンをクリックし、前の段階でアップロードしたスタンダードカーブのFCSファイルのみで解析を進めてください。

- 紫色の「Select Samples FCS file(s)」ボタンをクリックします。
- ポップアップウィンドウ内でサンプルのFCSファイルをすべて選択し、「Open」ボタンをクリックします。FCSファイルリストが表示されます(Figure 9)。

注意: ソフトウェアは、同一サンプルのレプリケートが連続してフローサイトメーターで測定されたと仮定し、データ取得日時を基にFCSファイルを順序付けます。

他の情報によってサンプルファイルを並べ替えたい場合、「Order by Keyword」プルダウンメニューを使用してください。また、サンプルファイルはクリック&ドラッグにより個別に並び順を変更することもできます。

Figure 9. FCSファイルリスト

Files	Sample Name	Dilution	SBTIM (Acquisition Time)
sample 1_1.fcs	sample 1_1	1	15:43:45
sample 1_2.fcs	sample 1_2	1	15:44:12
sample 2_1.fcs	sample 2_1	1	15:45:41
sample 2_2.fcs	sample 2_2	1	15:46:03
sample 3_1.fcs	sample 3_1	1	15:58:39
sample 3_2.fcs	sample 3_2	1	15:59:00
sample 4_1.fcs	sample 4_1	1	16:00:59
sample 4_2.fcs	sample 4_2	1	16:01:16

## レプリケートの設定

Replicate Controls Boxでレプリケートの設定を行うことができます(Figure 10)。

- 実験条件に一致するようレプリケート数を設定してください。
- プルダウンメニューよりレプリケートパターンを設定してください。
  - AABBCC: レプリケートFCSファイルが連続して並んでいる場合を選択します。
  - ABCABC: 全てのサンプルの1番目のレプリケートFCSファイルが順番に並び、その後、全てのサンプルの2番目のレプリケートFCSファイルが順番に並んでいる場合を選択します。
- Replicate Controls boxにある紫色の「Apply」ボタンをクリックします

上記操作により、ファイルリストのSample名が、Sample<sub>1</sub>…Sample<sub>n</sub> のように入力されます。

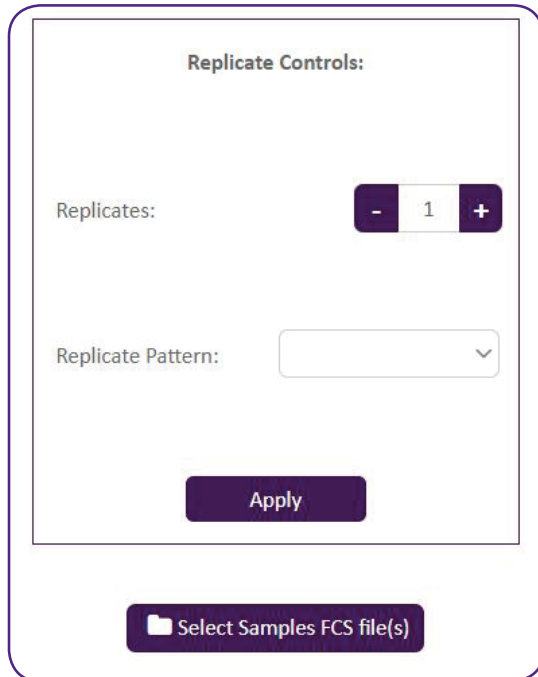
FCS file名が同じサンプルの場合は自動的にレプリケートとして扱われます。

注意: 手動でサンプル名を入力することもできます。

サンプル名が同じFCSファイルは全て自動的にレプリケートとして扱われます。



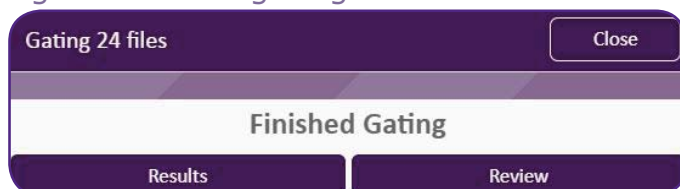
Figure 10. Replicate Controls Box



- FCSファイルリストの下にある紫色の「Upload」をクリックします。

FCSファイルがアップロードされ、全てのスタンダードとサンプルファイルへのゲーティングが開始されます。プログレスバーに現在の状況が表示されます。

Figure 11. Gating Progress Window



ゲーティングが終了後、アッセイ結果の確認またはゲート位置の確認のどちらかを選択することを求められます(Figure 11)。

- (強く推奨) ゲート位置を確認する場合、「Review」をクリックしてください。
- ゲート位置の確認をせず結果を見る場合は、紫色の「Results」をクリックしてください。

注意: ゲーティングには強力なアルゴリズムを使用していますが、定量性の精度を確実なものとするため、ゲート位置を確認することを強く推奨します。

## Review Gating タブ

このタブでは、アップロードしたFCSファイルのゲートの確認を行います。

ファイル名の横にあるチェックボックスにチェックを入れて、ゲート位置確認を行うファイルを選択します。

注意: デフォルト設定では、すべてのファイルが選択されています。

- ゲート位置を確認したいファイルのすべてにチェックが入っていることを確認してください。
- リスト上部の「Review」ボタンをクリックします (Figure 12)。




Figure 12. ゲート確認のためファイルを選択

Review		
File	Sample	Reviewed
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	C0_1.fcs	C0
<input checked="" type="checkbox"/>	C0_2.fcs	C0
<input checked="" type="checkbox"/>	C1_1.fcs	C1
<input checked="" type="checkbox"/>	C1_2.fcs	C1
<input checked="" type="checkbox"/>	C2_1.fcs	C2
<input checked="" type="checkbox"/>	C2_2.fcs	C2
<input checked="" type="checkbox"/>	C3_1.fcs	C3
<input checked="" type="checkbox"/>	C3_2.fcs	C3

選択された一番上のファイルのゲート結果が表示されます。ファイル名は上部の紫色のバーに表示されます。

### 3種類のゲート図が表示されます:

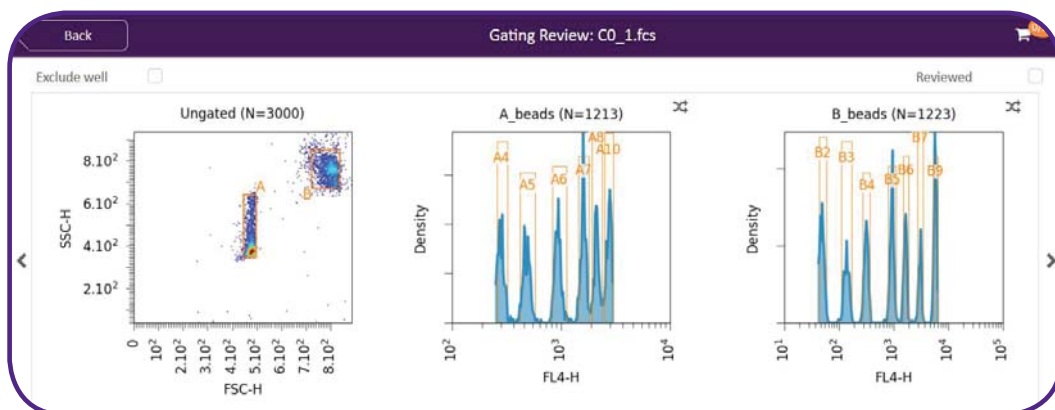
1. Forward scatter vs. side scatter: Bead AとBead Bを識別するために使用します。
2. Bead Aのヒストグラム: Bead Aの各Bead IDを識別するために使用します。
3. Bead Bのヒストグラム: Bead Bの各Bead IDを識別するために使用します。

注意: ヒストグラムを PE vs APCのドットプロットに変更したい場合は、ヒストグラム図上部にある  ボタンをクリックします。ドットプロット表示は、ダブルレットビーズの確認などトラブルシューティングに有用です。

各ゲート内のビーズ数は、プロット図の下のCount欄に表示されます。

- ゲート位置の確認・修正後、プロット図の右上にある「Reviewed」横のチェックボックスにチェックを入れます。カートアイコンには、確認済みのファイル数が自動的に表示されます (Figure 13)。
- プロット図の左右にある「<」または「>」マークをクリックすると次のFCSファイルが表示されます (Figure 13)。

Figure 13. ゲート確認用プロット図



## ゲートの修正

### ゲートの修正が必要な場合は:

- ゲート位置の修正が必要なプロット図をクリックすると、「Edit Gating」ウインドウが表示されます (Figure 14)。
- ゲート位置を修正します。
- 修正後、「Save」ボタンをクリックして修正後のゲート位置を保存します。  
もしくは「Close」をクリックしてそのままウインドウを閉じます。

Figure 14. Edit Gating ウインドウ

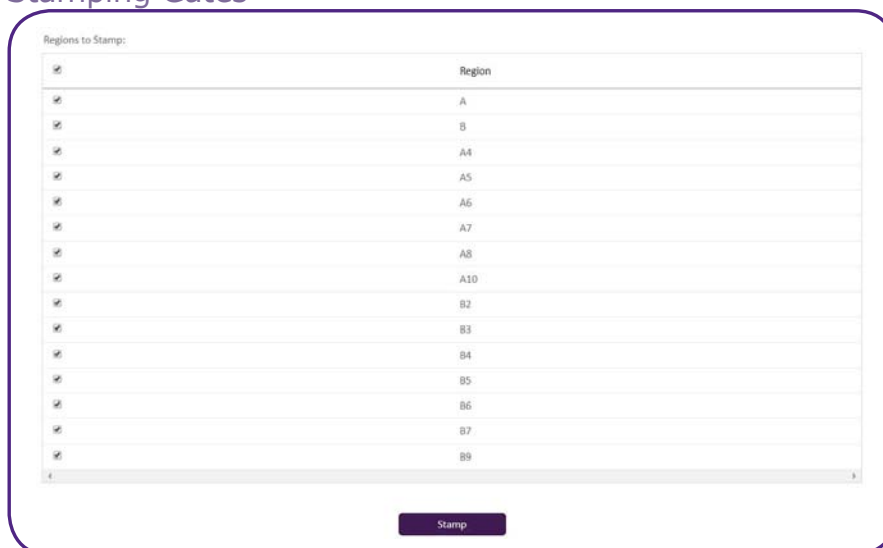


## 修正済みゲートを他のサンプルに適用

### 修正したゲート位置を他のFCSファイルに適用するには、以下の操作を行います:

- Count欄の下にある「Apply Gating」をクリックします。
- 表示されたリストの中から、他のファイルに適用したいゲートを選択してください (Figure 15)。
- 「Stamp」ボタンをクリックすると、選択したゲートが他のすべてのファイルに適用されます。

Figure 15. Stamping Gates



- すべてのファイルのゲート位置を確認後、Resultタブをクリックして定量結果を表示させます。

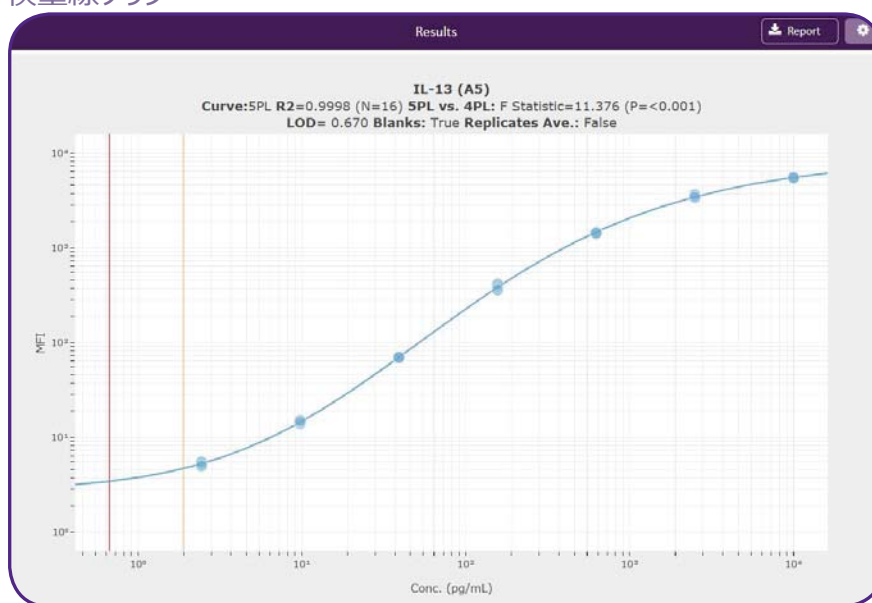
## Resultsタブ

LEGENDplex™ 解析結果がこのタブに表示されます。定量結果一覧表の上部に、検量線（スタンダードカーブ）と結果が表示されます。

### スタンダードカーブプロット

LEGENDplex™で測定した各因子について、ロジスティック回帰カーブフィッティングアルゴリズムを用いて、スタンダードFCSファイルに5パラメータ平行線ロジスティック回帰が適用され、検量線が作成されます。この検量線を基に各サンプルの測定因子の濃度が計算されます。


Figure 16. 検量線グラフ



- 検量線の下にある、定量結果一覧表上部の測定因子名をクリックすることで、その因子の検量線表示に切り替えることができます。注意：検量線が表示されている因子の欄は薄い紫色になります。

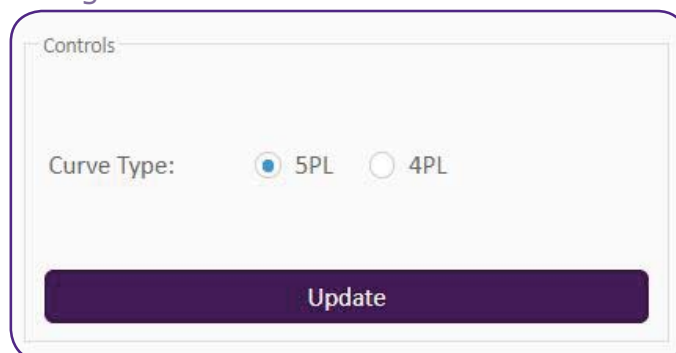
表示されている検量線の測定因子名は、検量線上部に表示されます。また、因子名の下に表示されている情報は以下のとおりです。

**Curve:** 検量線の作成に使用されたカーブフィッティングアルゴリズムが表示されます。デフォルト設定では、5パラメータ平行線ロジスティック回帰 (5PL)が選択されています。4パラメータ平行線ロジスティック回帰 (4PL)カーブフィッティングアルゴリズムを選択することも可能です。

 歯車アイコンをクリックするとCurve Fitting Controlsウィンドウが表示され、アルゴリズムを変更することができます (Figure 17)。

注意： 定量結果一覧表の各因子名の右上にも同じアイコンがあります。このアイコンをクリックすることでも各因子のカーブフィッティングアルゴリズムを変更できます。

Figure 17. Curve Fitting Controlsウィンドウ



**R2:** 決定係数のこと。回帰曲線が検量線の各検量点とどの程度近似しているかを表します。

**5PL vs. 4PL:** 一般的に5 PLアルゴリズムを用いると、測定データに最適な検量線が作成されます。本ソフトウェアでは、5 PLと4 PLそれぞれのアルゴリズムを用いて検量線を作成し、2つの回帰曲線の適合度を統計的に比較し評価します（各アルゴリズムにおける各検量点の残差比較のF検定）。表示されるP値が< 0.05の場合、5 PLアルゴリズムの使用を推奨します。P値が有意でない場合は、どちらのアルゴリズムを使用しても構いません。

**LOD:** 測定因子の検出限界。バックグラウンド(C0)と統計的に区別できる濃度の下限値を示します。

### 検量線グラフ画面の表示について

検量線グラフには次のような要素が表示されます。

**スタンダードカーブの各検量点:** C0以外 (C1-C7) の各点は、グラフ上の青い点で表示されます。

- 各点にカーソルを合わせると、PEのMFIとビーズ数が表示されます。

**回帰曲線:** カーブフィッティングアルゴリズムを用いて作成されたロジスティック回帰曲線は青の実線で表示されます。

**LOD/LOQ Limits:** 理論的に予測される検出限界 (LOD) は赤い垂直線で、定量下限 (LOQ) はオレンジの垂直線で表示されます。

- 各線にカーソルを合わせると、各線の詳細が表示されます。

### その他のスタンダードカーブプロットツール

検量線プロットの右上にカーソルを合わせると、通常は非表示の3つのアイコンが表示されます。これらのアイコンツールは下記のとおりです：

**Download Plot:** 現在表示されている検量線グラフの画像をダウンロードします。

**Zoom:** このアイコンをクリック後に検量線の一部を選択すると、選択した部分が拡大表示されます。

**Reset Axes:** 拡大した検量線を元の表示に戻します。

### 定量結果一覧

定量結果一覧には、以下の情報が表示されます：

- 各因子の濃度 (Concentration)
  - 各Bead IDゲート内のイベント数 (Count)
  - PEの蛍光強度の中央値 (MFI)
  - 各レプリケートの%CV (CV)
- 一覧上部の「Color By」横のボタンで、表示するカテゴリーを選択できます (Figure 18)。

Figure 18. 定量結果一覧表

Color By: <input checked="" type="radio"/> Concentration <input type="radio"/> Count <input type="radio"/> MFI <input type="radio"/> CV																	
Sample	Replicate	Well	IL-5 (A4)	IL-23 (A5)	IL-2 (A6)	IL-6 (A7)	IL-9 (A8)	IL-10 (A10)	IFN-γ (B2)	TNF-α (B3)	IL-17A (B4)	IL-17F (B5)	IL-6 (B6)	IL-21 (B7)	IL-22 (B9)		
C0	1	C0_1.fcs	<0.586	<0.646	<0.363	<0.985	<2.474	<0.409	<5.945	<0.886	<0.441	<0.664	<1.727	<11.433	<0.393		
	2	C0_2.fcs	<0.586	<0.646	<0.363	<0.985	<2.474	<0.409	<5.945	<0.886	<0.441	<0.664	<1.727	<11.433	<0.393		
C1	1	C1_1.fcs	2.41	2.88	2.50	2.68	<2.474	2.66	<5.945	1.94	3.11	3.42	2.16	<11.433	2.47		
	2	C1_2.fcs	2.41	2.26	2.50	2.03	<2.474	2.34	<5.945	1.94	3.11	2.03	<1.727	<11.433	2.47		
C2	1	C2_1.fcs	10.37	9.58	9.83	10.76	9.71	10.03	10.24	10.53	10.16	9.86	7.36	19.25	9.80		
	2	C2_2.fcs	9.59	9.29	9.18	9.44	9.71	9.24	10.24	10.53	10.42	8.43	19.82	<11.433	9.55		
C3	1	C3_1.fcs	39.65	41.22	41.12	41.77	42.71	40.31	44.73	44.88	37.09	40.46	36.24	35.40	41.88		
	2	C3_2.fcs	36.96	37.85	38.29	35.43	41.79	35.77	41.03	42.37	34.62	37.81	35.28	35.40	36.63		
C4	1	C4_1.fcs	164.65	165.83	158.59	171.11	162.55	173.62	159.81	147.20	145.48	172.79	162.89	152.60	163.51		
	2	C4_2.fcs	148.62	154.90	157.15	141.84	138.70	158.49	135.35	143.99	133.15	154.97	149.63	164.45	149.79		
C5	1	C5_1.fcs	675.41	565.29	636.75	654.90	626.74	621.81	621.29	567.00	563.83	633.59	666.39	617.95	680.51		
	2	C5_2.fcs	623.25	596.30	539.66	622.14	573.52	613.31	580.73	548.87	645.65	588.87	625.37	626.22	581.45		

- 特定のサンプルが現在選択中の検量線のどこに位置するかを確認する場合、サンプル名の左横にあるチェックボックスにチェックを入れます。選択したサンプルのデータがオレンジ色のドットとして検量線中に表示されます。

注意: すべてのサンプルデータを表示させたい場合、一覧左上のチェックボックスにチェックを入れます。

## Concentration Table

各測定因子の濃度計算結果が表示されます。相対的な濃度の違いによって、青色（低濃度）から赤色（高濃度）で示されます。

## Count Table

各Bead IDゲート内のビーズ数が表示されます。統計学的に信頼できるPEシグナル値を確実に得るために、各Bead IDごとに300イベント数のデータを取得することを推奨します。

Bead ID内のイベント数が100未満の場合は、データの解釈に注意が必要です。

イベント数が100未満の場合、その欄が淡黄色で表示されます。

注意：一覧の右上部にあるスライダーで、イベント数のカットオフ値の変更ができます。

## MFI Table

各Bead IDのPE蛍光強度の中央値（MFI）が表示されます。

相対的な強度の違いによって、青色（低MFI）から赤色（高MFI）で示されます。

## CV Table

レプリケートとして指定されたFCSファイルについて、データの変動係数が%として表示されます。CV値が30%を超える場合、定量結果が不正確である可能性があるため、データの解釈に注意が必要です。CV値が30%を超える欄は、淡黄色で表示されます。

注意：一覧の右上部にあるスライダーで、CV値のカットオフ値の変更ができます。

# その他の解析ツール:

## データを解析から除外する

必要に応じて、ソフトウェア上で特定のデータを解析から除外することができます。FCSファイル全体を解析から除外することも、特定の測定因子のみ解析から除外することも可能です。方法は2通りあります：

### 定量結果一覧から除外する場合

- 1つのFCSファイル全体を解析から除外したい場合、定量結果一覧の「Well」の欄で除外したいFCSファイル名を右クリックし、「Exclude」を選択します。
- 1つのFCSファイル中の特定の測定因子のみ解析から除外したい場合、削除したい因子の欄を右クリックし「Exclude」を選択します。

Exclude選択後に、データは自動的に再計算されます。解析から外されたデータには取り消し線が表示され、そのデータの欄が薄いグレー色になります。

- Excludeを取り消すには、その欄にカーソルを合わせ右クリックしてUnexcludeを選択します。

### 検量線のグラフから除外する場合

- 検量線に表示されている、除外したいデータの点を右クリックし、Excludeを選択します。

Exclude選択後に、データは自動的に再計算されます。解析から外されたデータには取り消し線が表示され、そのデータの欄が薄いグレー色になります。また、除外されたデータの点が青い×マークへ変わります。

- Excludeを取り消すには、青い×にカーソルを合わせ右クリックしてUnexcludeを選択します。

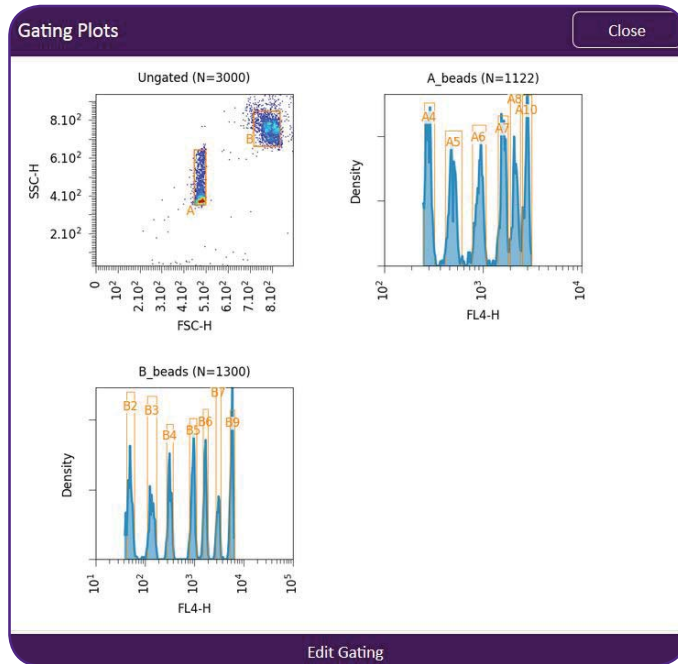
## ゲート位置を素早く確認するためには

定量結果一覧表で、任意のFCSファイルのゲート位置を確認することができます。

- 確認したいFCSファイルの行（どの欄でも構いません）をクリックすると、そのFCSファイルに設定されたゲート位置を確認することができます。（Figure 19）。

注意 検量線グラフの点をクリックすることで同様にゲートの位置を確認することができます。

Figure 19. Gating Plots ウィンドウ



- ゲート位置の修正が必要な場合、紫色の「Edit Gating」ボタンをクリックしてください。

「Edit Gating」をクリックすることで、Reviewing Gateタブに移動します。Reviewing Gateタブの「ゲートの修正」セクションの内容に従って、ゲート位置の修正を行ってください。

## レポートの作成:

解析結果は、関連するすべての解析情報をまとめたExcelファイルとして出力することができます。なお、レポートに含めるパラメーターを自分で選択することが可能です。

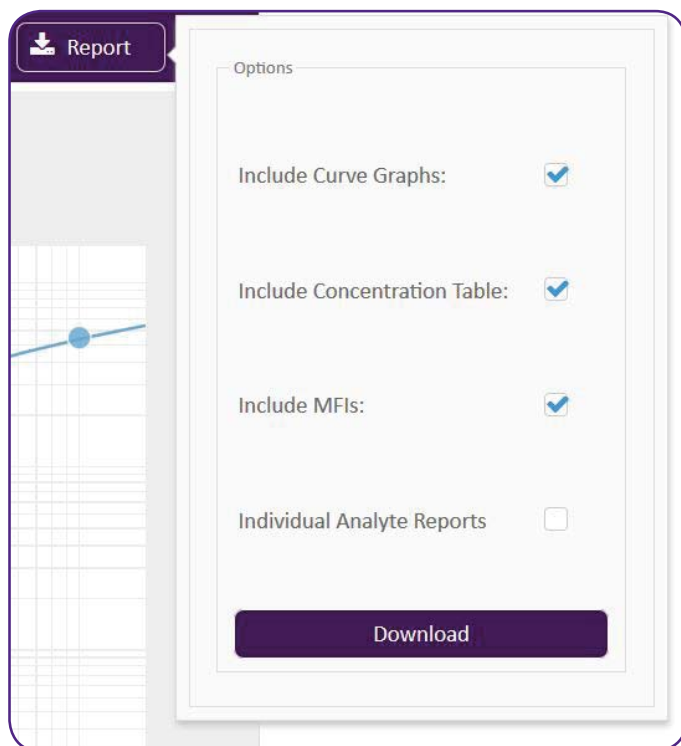
デフォルト設定では、検量線図、各測定因子の濃度の表、PEのMFIが選択されていますが、選択を解除することもできます。上記に加え、測定因子ごとに選択することも可能です。これにより、各測定因子の濃度やMFI、ビーズ数、CV値などを、測定因子ごとに同一ページにまとめた表を出力することもできます。

レポートの出力方法は以下のとおりです:

- 検量線図の右上にある「Report」をクリックします (Figure 20)。
- 出力したいデータセットにチェックを入れます。
- オプションウィンドウの下部にある「Download」ボタンをクリックします。



Figure 20. Reportボタン



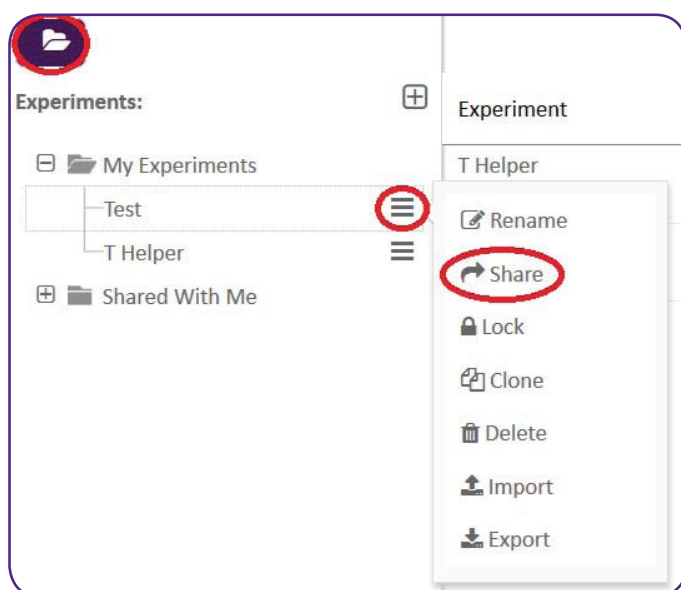
## データの管理と保存:

### Experimentの共有

このソフトウェアを使うと、他の登録ユーザーとExperimentを共有することができます。共有相手もExperimentの確認や編集をできるので、マウスを数回クリックするだけで共同研究が可能となります。

注意: 必要に応じて、データを共有する前に、相手がデータを編集できないようにExperimentをロックすることができます。これにより、共有相手はワークスペースを見ることはできますが、結果を編集することができなくなります。

Figure 21. フォルダアイコンメニューとデータの共有



Experimentを共有したい場合、Figure 21に記載された手順に従ってください:

- 画面左上のフォルダアイコンをクリックします。

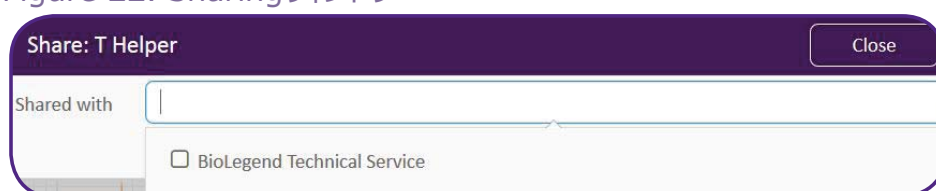


- 「My Experiments」のExperimentリストが開きます。
- 共有したいExperimentのメニューボタンをクリックします。
- (任意)「Lock」を選択すると、共有相手はデータ編集ができなくなります。(ロックを解除する場合、同様の手順で「Unlock」を選択してください)
- メニューより「Share」を選択すると、Sharing ウィンドウが表示されます (Figure 22)。
- 「Shared with」欄に共有したい登録ユーザーのメールアドレスを入力します。

上記の操作後、即座に指定した登録ユーザーのアカウントとExperimentが共有されます。共有相手の画面には、Experimentアイコンの下に「Shared with Me」フォルダが作成されます (Figure 21) 。また、自分のアカウントと共有されているExperimentも同様のフォルダに表示されます。

注意: Experimentを共有するためには、その共有相手がアカウント作成時に使用したメールアドレスを入力する必要があります。プライバシー保護のため、このソフトウェアには検索可能なユーザーリストなどはありません。なお、例外として、BioLegendテクニカルサービスは共有相手として表示されます。BioLegendテクニカルサービスと共有を希望する場合、入力欄をクリックすると表示されるチェックボックスにチェックを入れてください。

Figure 22. Sharingウィンドウ



## Experimentのコピー

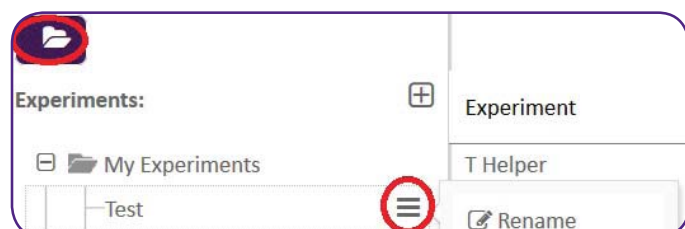
アップロード済みのExperimentはコピー (Clone) することができます。コピーしたExperimentは、名前は変更されませんが、全く同一のデータと解析結果を保持しています。

この機能は、共同研究者と編集可能なExperimentを共有したいが、編集されていない元のExperimentも残しておきたい場合に有用です。この場合、ロックされていないExperimentのコピーを作成および共有し、一方で、元のExperimentは共有しない状態にします。

Experimentをコピーする場合、Figure 23に記載された手順に従ってください:

- 画面左上のフォルダアイコンをクリックします。
- 「My Experiments」のExperimentリストが開きます
- コピーしたいExperimentのメニューボタンをクリックします。
- メニューより「Clone」を選択すると、Cloneウィンドウが表示されます
- Experiment Name欄に、Experimentのコピーの名前を入力します。
- 名前を入力後、「Clone」ボタンをクリックします。

Figure 23. Experimentのコピー



## Experimentのエクスポート/インポート

自分のアカウントのストレージ量を確保するために、Experimentを丸ごと圧縮（.lpx形式）し、ダウンロードして保存することができます。この形式で保存しておけば、後日簡単に、Experimentを本ソフトウェアに再度インポートすることが可能です。Experimentをエクスポートすると、解析結果はサーバーから削除されます。

圧縮ファイルには、すべてのFCSファイルと解析結果が含まれており、ソフトウェアのインポート機能を用いてデータを再読み込みすることで、簡単に解析画面へ再度アクセスすることができます。

Experimentのエクスポート方法:

- 画面左上のフォルダアイコンをクリックします。
- 「My Experiments」のExperimentリストが開きます
- エクスポートしたいExperimentの右側のメニューボタンをクリックします。
- メニューより「Export」を選択します。
- ソフトウェアの指示に従って操作します。
- コンピュータのローカルハードドライブに圧縮フォルダ（.lpx）を保存します。

Experimentのインポート方法:

- Experimentを新規作成します。
- Experiment Nameに任意の名前を入力します。
- 「Create+」をクリックします。
- 画面左上のフォルダアイコンをクリックします。
- 「My Experiments」のExperimentリストが開きます。
- 新規Experimentの右側のメニューボタンをクリックします。
- メニューより「Import」を選択します。
- 「Select .lpx File」ボタンをクリックします。
- インポートしたい.lpx形式のフォルダを選択します。
- Openをクリックします。
- Import ウィンドウ下部の「Import」ボタンをクリックします。

Contact BioLegend

### Technical Service:

US & Canada Toll-Free: 1.877.273.3103

International: 1.858.768.5801

email: [tech@biolegend.com](mailto:tech@biolegend.com)

### Customer Service:

US & Canada Toll-Free: 1.877.246.5343 (877-BIOLEGEND)

International: 1.858.768.5800

Fax: 1.877.455.9587

email: [cs@biolegend.com](mailto:cs@biolegend.com)

ご不明点などございましたら、下記にご連絡ください。  
輸入販売元



**Digital Biology®**

**トミーデジタルバイオロジー株式会社**

TEL. 03-6240-0451 /

FAX.03-6240-0461

E-mail: [support@digital-biology.co.jp](mailto:support@digital-biology.co.jp)

BioLegend products are manufactured in an ISO 13485:2016 certified facility following GMP compliant procedures, ensuring the highest quality and stability.

[biolegend.com](http://biolegend.com)

02-0022-00