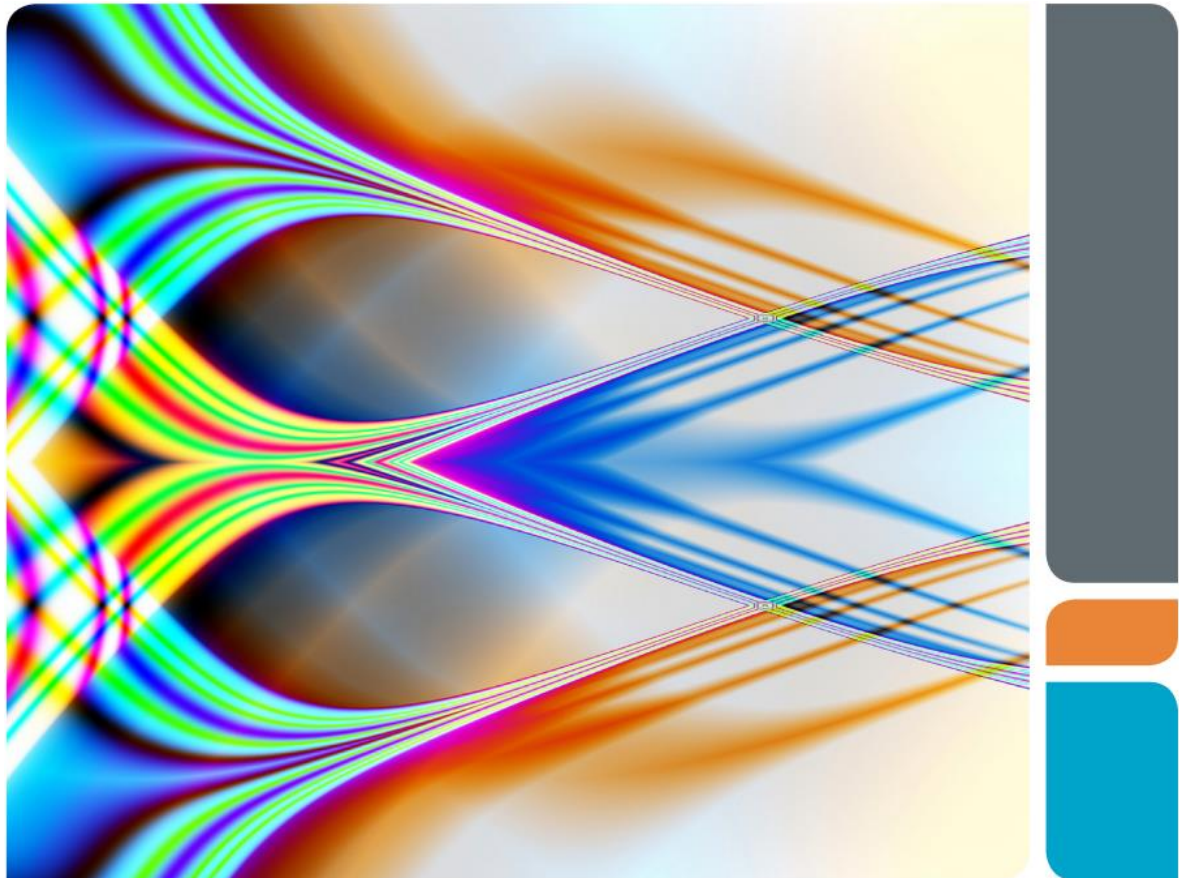


フローサイトメトリー



フローサイトメトリー 基礎ガイド

BIO-RAD

はじめに

本書は Bio-Rad Laboratories 社発行の”Flow Cytometry Basic Guide”の日本語翻訳版です。より理解を深めるため本書には原本にない章や記載が日本語版のみで追加されています。

このフローサイトメトリー基礎ガイドは、背景にある複雑な数式や物理学について深くは掘り下げることなく、フローサイトメトリーの重要な基本的概要を紹介しています。

フローサイトメトリーの詳細を記述する代わりに、フローサイトメトリー初心者にとって役に立つガイドとなることを目的としています。また、フローサイトメトリーの利点について他の方に教える必要がある方のためにフローサイトメトリーの概要紹介用の資料としてもお使い頂けます。

さらに理解を深めるために、巻末にフローサイトメトリー用語集を掲載してあります。

Trademarks and Legal Notices

Accutase is a trademark of Innovative Cell Technologies Corporation.

Alexa Fluor, [Pacific](#) Blue, and Texas Red are trademarks of Life Technologies Corporation.

Cy is a trademark of GE Healthcare group companies.

DyLight™ is a trademark of Thermo Fisher [Scientific](#) Inc.

Ficoll is a trademark of Pharmacia Fine Chemicals, Inc.

BD FACS is a trademark of Becton, Dickinson and Company

Triton is a trademark of Dow Chemical Company.

Tween is a trademark of ICI Americas, Inc.

FLICA is a trademark of Immunochemistry Technologies, LLC.

pSIVA™ is a trademark of Novus Biologicals and is protected under patent no. 8,541,549.

Histopaque is a trademark of Sigma Chemical Company Corporation.

Leucoperm is made for Bio-Rad by AN DER GRUB BioResearch GmbH.

FlowJo is a trademark of FLOWJO, LLC

FCS Express is a trademark of De Novo Software

その他、本書に記載された社名および商品名は、各社の商標または登録商標です。

Copyright

Copyright©2018 Bio-Rad Laboratories, Inc. 本書の内容は、印刷または電子形態などのいかなる形式によっても、バイオ・ラッド・ラボラトリー株式会社の書面による許可なしに複製することを禁じます。

本書の内容は予告なしに変更されることがあります。また、本書に誤記や不正確な記述があった場合、バイオ・ラッド・ラボラトリーズはいかなる責任も負いません。

目次

第0章 フローサイトメトリーとは何か？	1
サイトメトリーとは？(What is Cytometry?)	1
フローサイトメーターとは？(What is Flow Cytometer?)	1
セルアナライザーとセルソーターの違い	2
フローサイトメーターの構造による分類	3
フローサイトメーターの構造(Structure of flow cytometer)	5
第1章 フローサイトメーターの原理	7
流路系(Fluidics System)	7
光学系と検出系(Optics and Detection)	8
電子処理系: シグナルとパルスの処理(Signal and Pulse Processing)	11
分取系(Cell Sorting System)	13
液滴荷電セルソーティング(Electrostatic Cell Sorting)	13
第2章 蛍光の原理	15
蛍光色素と光(Fluorochromes and Light)	15
蛍光(Fluorescence)	16
なぜ蛍光マーカースを使用するのか？(Why Use a Fluorescent Marker?)	17
フローサイトメトリーにはどの蛍光色素が適しているのか？	18
蛍光補正(コンペンセーション: Fluorescence Compensation)	20
第3章 データ解析	23
ゲートとリージョン(Gates and Regions)	23
シングルパラメーター, 単変量ヒストグラム(Single-Parameter or Univariate Histograms)	25
2パラメーター, 二変量ヒストグラム(Two-Parameter or Bivariate Histograms)	26
バックゲーティングによるゲート戦略の確認(Backgating to Confirm Gating Strategies)	28
第4章 フローサイトメトリーのコントロール	29
未染色コントロール(Unstained Controls)	29
アイソタイプコントロール(Isotype Controls)	30
単一染色とコンペンセーション・コントロール(Single Staining and Compensation Controls)	32
Fc ブロッキングコントロール(Fc Blocking Controls)	33
FMO コントロール(Fluorescence Minus One Controls)	34
細胞内染色コントロール(Intracellular Staining Controls)	35
生物学的コントロール(Biological Controls)	35
第5章 実験の最適化	37
サンプル調製(Sample Preparation)	37
自家蛍光(Autofluorescence)	38
死細胞除去(Live/Dead Exclusion)	39
ダブルレット除去(Doublet Discrimination)	41
データ収集(Cell Collection)	42
細胞の透過処理と固定(Permeabilization and Fixation)	42
第6章 マルチカラーパネル構築	45
シグナルの解像度(Resolution of Signal)	45
設計上の基本ルール(Basic Design Rules)	46
第7章 フローサイトメトリーの用途	49
免疫表現型解析(Immunophenotyping)	49
アポトーシス(Apoptosis)	50
細胞増殖と細胞周期(Proliferation and Cell Cycle)	52
シグナル伝達(Signaling and Phosphoflow)	53
微小粒子の検出(Small Particle Detection)	53
その他の使用例(Other Common Uses)	54
フローサイトメトリーのイノベーション(Innovations in Flow Cytometry)	55

第 8 章 一般的なプロトコール	57
サンプル調製プロトコール(Sample Preparation Protocol)	57
フローサイトメトリー用の細胞染色方法	62
第 9 章 トラブルシューティング	71
トラブルシューティングガイド	71
推奨文献(Recommended Reading)	73
用語集(Glossary)	74

第0章 フローサイトメトリーとは何か？

この章ではフローサイトメトリーの初学者向けに、以降の章で紹介されるフローサイトメトリー並びにフローサイトメーターの基本的事項について記載します。

サイトメトリーとは？(What is Cytometry?)

フローサイトメトリーとはサイトメトリー(Cytometry)の一種です。サイトメトリーとはその名の通りに Cyto(細胞) + metry(解析):細胞を解析すること(技術)です。つまりサイトメトリーは細胞の様々なパラメーターを測定する方法です。
サイトメトリーにはフローサイトメトリーとイメージングサイトメトリーがあります。

分類	装置例
フローサイトメトリー (Flow Cytometry: FCM)	セルアナライザー (Cell Analyzer)
	セルソーター (Cell Sorter)
イメージングサイトメトリー (Imaging Cytometry: ICM)	レーザー走査サイトメトリー (Laser Scanning Cytometry: LSC)
	共焦点レーザー顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)

フローサイトメトリーは液中に多数の細胞を流し、フローサイトメトリーの特徴であるハイドロダイナミックフォーカシング(流体力学的絞り込み)を用いて、細胞をひとつひとつ整列させて、個々の細胞をレーザービームにより検出します。形態学的な情報は得られませんが、迅速に個々の細胞を分析することができます。また細胞を分取することができるシステムもあります。

一方、イメージングサイトメトリーは蛍光顕微鏡技術を用いて細胞を形態学的に分析します。そのため、細胞内タンパク質の局在や生細胞では時系列分析も可能であり、フローサイトメトリーのように細胞の懸濁が必要ないため、付着細胞も容易に分析することができます。しかし、処理速度はフローサイトメトリーより低く、大量の細胞を分析するのは不向きです。

フローサイトメーターとは？(What is Flow Cytometer?)

フローサイトメーター(Flow Cytometer)とはフローサイトメトリーを行う装置のことです。フローサイトメーターには用途に合わせて、「セルアナライザー」と「セルソーター」の2種類があります。

種類	説明	分析	分取	製品例
セルアナライザー (Cell Analyzer)	分析のみを行う装置	◎	×	 ZE5™ Cell Analyzer
セルソーター (Cell Sorter)	分析と目的細胞の分取を行う装置	○	◎	 S3e™ セルソーター

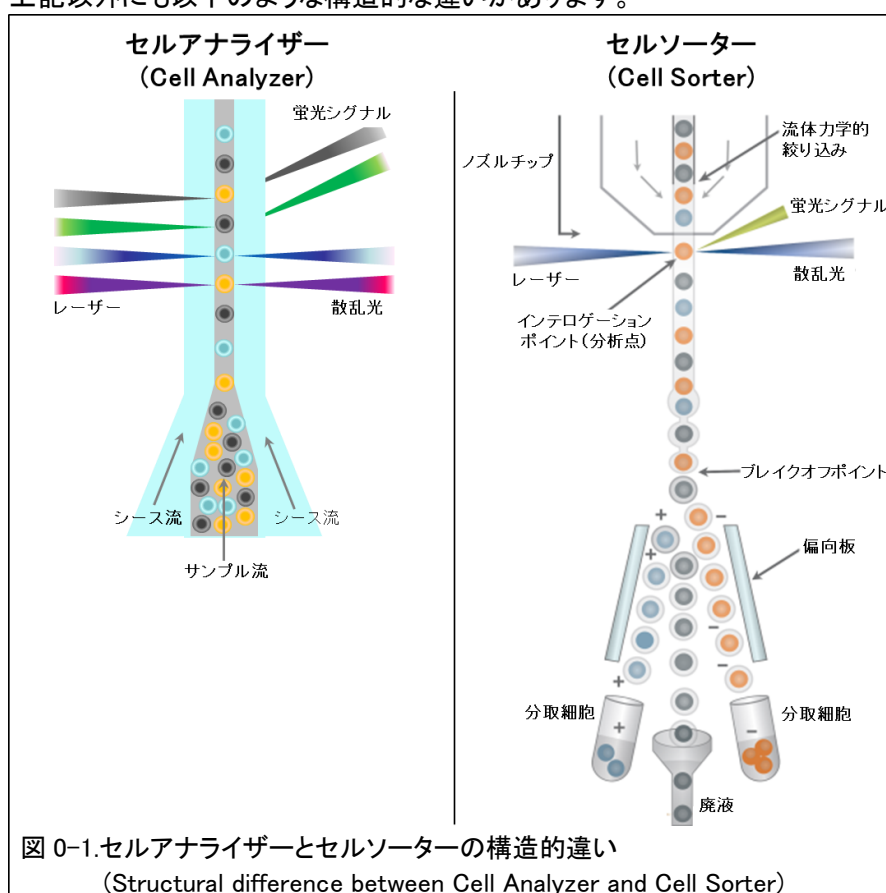
(*)洋書では Flow Cytometer と Cell Sorter と記載されている書物もあります。その場合の Flow Cytometer はセルアナライザーのことを指しています。
(*)フローサイトメトリーを指す別の用語として”FACS”がありますが、この言葉は Fluorescence Activated Cell Sorter の略語で、現在では Becton, Dickinson and Company (BD 社) の登録商標となっています。

セルアナライザーとセルソーターの違い(Difference between Cell Analyzer and Cell Sorter)

セルアナライザー(Cell **Analyzer**)は細胞分取機能がないため、分取系(ソーティング系)と呼ばれる偏向板や細胞回収用チューブを収めるコレクションポートなどはありません。分析に特化しているため、サンプルを注入する側はチューブだけでなくマイクロプレートにも対応したスルーポットの高い機種もあります。また、一般にセルソーターよりも検出チャンネルが多く、より多種類の蛍光色素を用いた測定することが可能です。

セルソーター(Cell Sorter)は、サンプル注入側は5ml チューブのみに対応する機種が一般的ですが、分取系は複数の回収容器(5ml チューブ、1.5ml チューブ、マイクロプレート等)に対応します。しかし、セルアナライザーに比べて検出チャンネル数は少なく、使用できる蛍光色素の数は限定されます。また、回収容器へ飛ぶ細胞の位置合わせなどセルアナライザーよりも操作は複雑です。

上記以外にも以下のような構造的な違いがあります。



上左図のように、セルアナライザーではサンプルが検出部を下から上に流れるのが一般的です。この向きに流すことで、流路に混入した気泡が抜けやすくなるメリットがあります。セルアナライザーでは細胞の分析のみを行い、細胞を回収しないため、検出部を通過したサンプルを液滴にする必要はなく、全て廃液タンクへ流します。

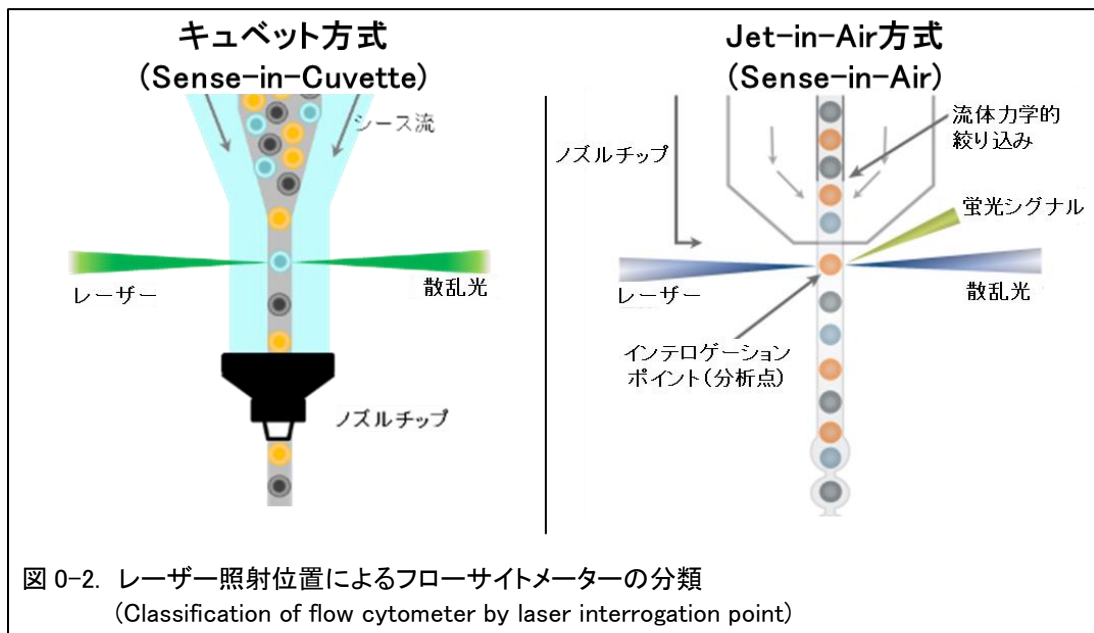
一方、セルソーターでは検出部の下に設置した容器に細胞を回収するため、サンプルは上から下に流れます。検出部を通過した細胞は液滴に包まれた状態で荷電され、偏向板によって飛ぶ向きを変えられて、左右の容器に回収されます。

フローサイトメーターの構造による分類(Classification by structure of flow cytometer)

フローサイトメーター（セルアナライザーとセルソーター）には、レーザー（光学系）に関する違いによって分類されることがあります。一つはレーザー照射点の位置の違いによる分類、もう一つは励起光源であるレーザー軸による分類です。

1. レーザー照射点の位置による分類

フローサイトメーターはサンプル（細胞）にレーザーを照射する位置の違いにより 2 つに分けられます。一つはレーザーをキューベット内で照射するキューベット方式(Sense-in-Cuvette)。もう一つはサンプル（細胞）がノズルから出て空気中で流束（ストリーム）になっている位置で照射する Jet-in-Air 方式(Sense-in-Air)方式です。

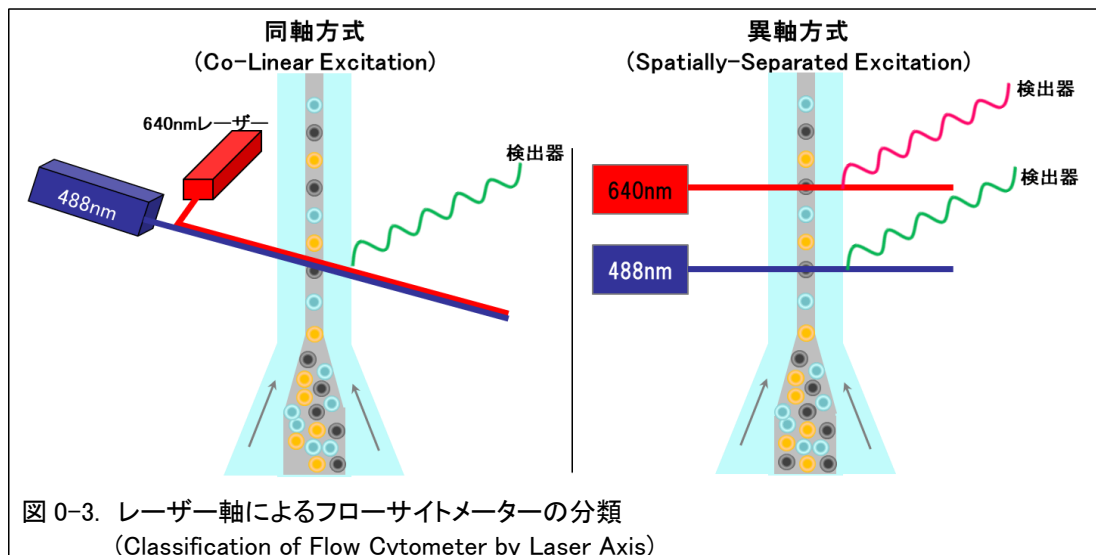


キューベット方式では透明なキューベット内で、サンプル（細胞）にレーザー照射するため、散乱による減衰が少なく、高感度な検出が可能です。このため、ほとんどのセルアナライザーと一部のセルソーターはキューベット方式を採用しています。しかし、サンプルの流束断面の形状が一定ではなく、キューベット内では四角形で、ノズルを通過する際には液滴形成のため、円形に変化します。この変化によって乱流が生じるため、細胞によっては生存率や機能が低下し、セルソーティング（細胞分取）の際には問題になる場合があります。

一方で Jet-in-Air 方式では、円筒形の流束（ストリーム）に対して空気中でレーザーを照射するため、流束の表面で散乱が起こり、検出感度は低下する傾向にあります。しかし、流束の断面形状は円形のまま変化しないため乱流の発生が少なく、細胞の生存率や機能が低下しにくいという特徴があります。これはセルソーティングの際に利点となるため、一部のセルソーターでは Jet-in-Air 方式を積極的に採用しています。

2. レーザー軸の方式による分類

レーザー照射点の位置とは別にレーザー軸によってフローサイトメーターが分類されることがあります。一つは複数のレーザーが同じレーザー軸となってサンプル(細胞)に照射される同軸方式(Co-Linear Excitation)。もう一つは複数のレーザーが別々のレーザー軸でサンプルに照射される異軸方式(Spatially-Separated Excitation)です。



同軸方式(Co-Linear Excitation)では、複数のレーザーを単一の光軸に統合してサンプル(細胞)に照射します。蛍光を検出する光学系(検出系)も複数のレーザーで共有するため、異軸方式で問題になるレーザーディレイは生じません。しかし、サンプル(細胞)を複数のレーザーで同時に励起し、その蛍光を単一の検出系で検出するため、検出チャンネル間での蛍光の漏れ込みが大きくなりやすく、検出チャンネル数はあまり多くできません。

一方、異軸方式(Spatially-Separated Excitation)では、レーザー毎に照射点の位置が異なるため、ひとつの細胞に各レーザーが照射される時刻が異なります(レーザーディレイ)。しかし、レーザー毎に独立した検出系を持つため、蛍光の漏れ込みが低減され、検出チャンネル数を多くすることが容易になります。このため、多くのセルアナライザーでは異軸方式を採用しています。

バイオ・ラッド社の S3e™ セルソーターは Jet-in-Air 方式で同軸システム(Collinear System)のセルソーターです。また ZE5™ Cell Analyzer はキューベット方式で異軸システム(Spatially-Separated System)のセルアナライザーです。

フローサイトメーターの構造(Structure of flow cytometer)

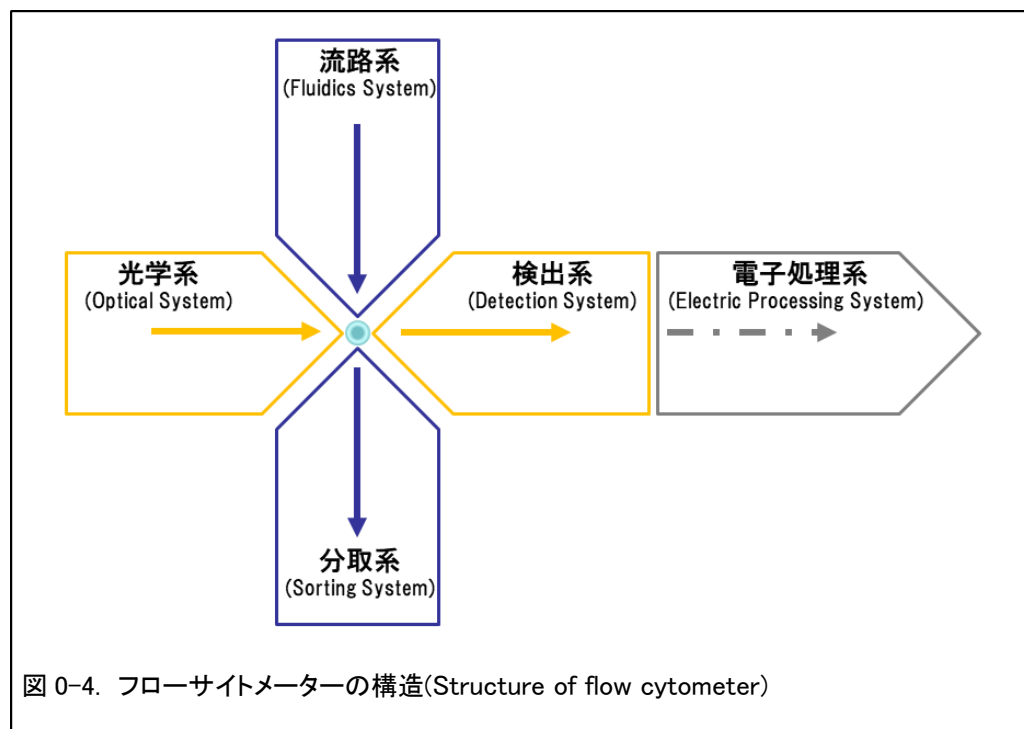
ここでは、第1章への導入として、フローサイトメーターを構成する5つのシステムについて概説します。詳細は第1章を参照してください。

フローサイトメーターは大きく分けるとサンプルが流れる水系(流路系+分取系)と主に光学系からなる測定系があります。それぞれをさらに分割すると流路系(Fluidics System)、光学系(Optical System)、検出系(Detection System)、電子処理系(Electric Processing System)、分取系(Sorting System)の5つに分けられます。

流路系ではサンプル中の粒子を整列して流します。光学系は励起光源としてレーザーが照射されます。またサンプルからの散乱光や蛍光は検出系の光学フィルターを通り光電子増倍管(PMT: Photomultiplier tube)により検出されます。

検出されたシグナルは、電子処理系によりデジタルデータに変換され、コンピューター上で解析します。また、セルソーターではどのようなシグナルを持つ細胞が分取されるべきか、その条件設定もコンピューター上で行います。そして条件に合う細胞を含む液滴が分取系によって荷電され、回収容器に分取されます。

セルアナライザーでは分取は行わないため、流路系、光学系、検出系、電子処理系の4つを備えています。セルソーターはそれに分取系を加えた計5つの要素を備えています。



次章では上記の5つについてさらに詳しく説明しています。

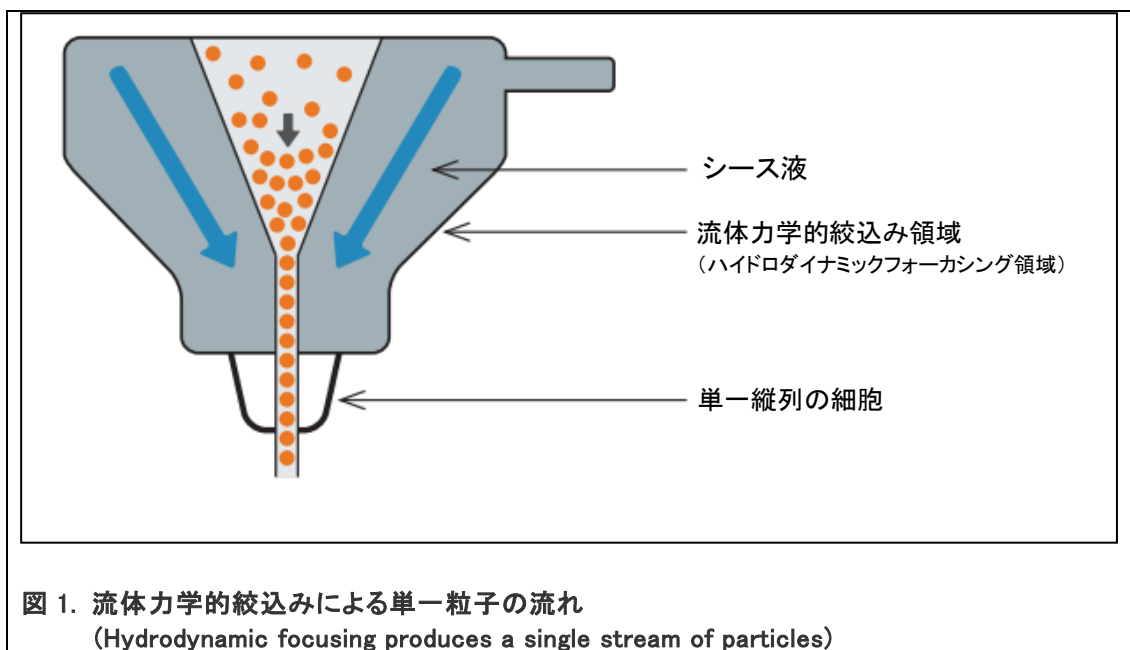
第 1 章 フローサイトメーターの原理

この章では、フローサイトメーターの働きについて説明します。細胞が機器をどのように通過するか、光がどのように検出され測定されるか、さらに、セルソーティングの基本原理を学びます。

流路系(Fluidics System)

フローサイトメーターの基本能力の 1 つとして、個々の粒子の性質を解析できることが挙げられます。サンプルがフローサイトメーターに入ると、サンプル中の粒子はサンプルラインの 3 次元空間にランダムに分布します。サンプルラインの直径はほとんどの細胞の直径よりも何倍も大きいので、それぞれの粒子を機器の検出系で解析できるような単一縦列の流れにする必要があります。このプロセスは流路系によって制御されます。

流路系はサンプルが注入される中心コアと、その外側を包むシース液によって形成されます。(ノズルまたはキューベット内で)シース液が細くなることにより流速が増します。サンプルはその中央に導入され、ベルヌーイ効果によって集束されます(図 1)。これにより、粒子が一列に並んだ流れを形成することができ、これを流体力学的絞込み(hydrodynamic focusing)と呼びます。最適条件下(Laminar flow, 層流と呼びます)では、中央のサンプル液とシース液は混ざり合いません。



流体力学的絞込みがなければ、キューベット(通常、 $250 \times 250 \mu\text{m}$ または $180 \times 480 \mu\text{m}$)またはノズル(通常、 $70\text{--}130 \mu\text{m}$)内で集束した細胞の流れが形成されず、単一細胞での解析は不可能です。流体力学的絞込みにより、細胞は一列に並んだ流れとなり、インテロゲーションポイント(interrogation point; レーザー照射点)と呼ばれる光路との交点を通過することで、1 細胞単位での解析が可能となります。

光学系と検出系(Optics and Detection)

流体力学的絞込みの後、各粒子は集束された 1 つ以上の光束(ビーム)を通過します。光の散乱(Light scattering)または蛍光発光(自家蛍光を保つ場合、もしくは粒子が蛍光標識されている場合)から粒子の特性に関する情報を得ることができます。

レーザーはフローサイトメトリーで最も一般的に使用される光源です。レーザーは特定の周波数で単一の波長の光(レーザーライン)を生成します。それらは紫外から遠赤までのさまざまな波長で利用でき、レーザー出力を調整することができます。(光子の単位時間あたりの出力は通常 mW で示されます)

前方散乱(Forward Scatter)

光が粒子と当たると、レーザービームの光軸から前方向に通常 20 度以内の角度で散乱され、それが光電子増倍管(PMT)またはフォトダイオード(PD)によって検出されます。これは前方散乱(Forward scatter, FSC)チャンネルと呼びます。この角度は機器によって異なる場合があります、異なる機種間では FSC 信号の強度が異なります。小さな粒子より大きな粒子のほうが多くの光を屈折させるため(FSC シグナルが強くなる)、この FSC 測定により粒子サイズを推定することができます。ただし、サンプル、レーザーの波長、散乱光の検出角度およびサンプルとシース液の屈折率、シース液にも依存します。その良い例は小さな粒子の検出です。粒子が光源の波長よりも小さい場合、例えば、488nm レーザーを使用する 200nm のエクソソーム検出では、光が必ずしも前方に散乱されるわけではありません。

側方散乱(Side Scatter)

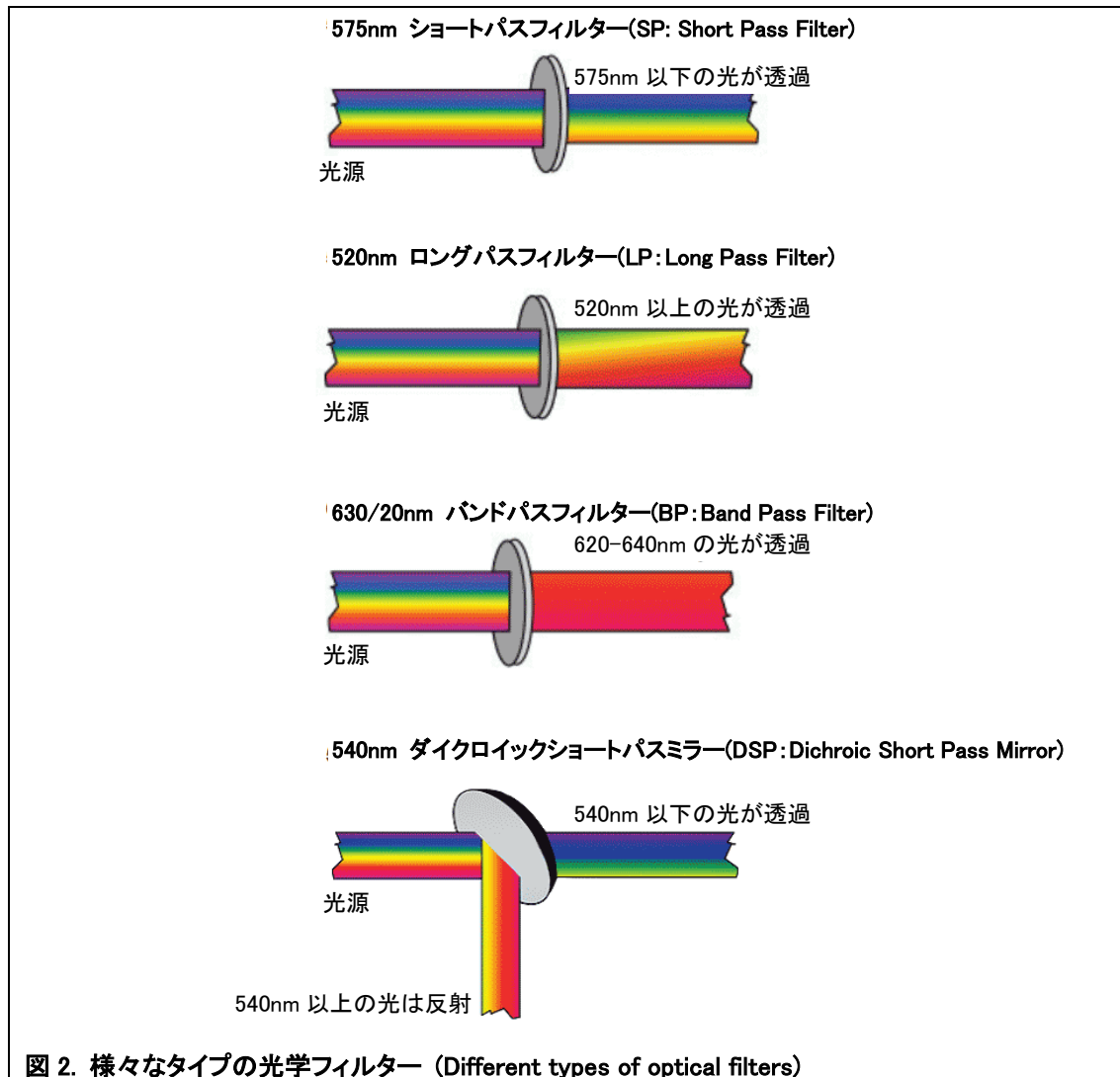
励起光に対して直角方向で測定される光は、側方散乱(side scatter, SSC)といいます。この SSC チャンネルからは、細胞または粒子の相対的な複雑さ(例えば、粒度や内部構造)に関する情報が得られます。前方散乱の場合と同様に様々な要因に依存します。

FSC および SSC はいずれも粒子ごとに固有であるため、これらの 2 つの組み合わせを用いて、血液など不均一なサンプル中に含まれる細胞をおおまかに区別することができます。ただし、これはサンプルの種類とサンプル調製の質に依存するので、より詳細な情報を得るためには一般的には蛍光による標識が必要です。

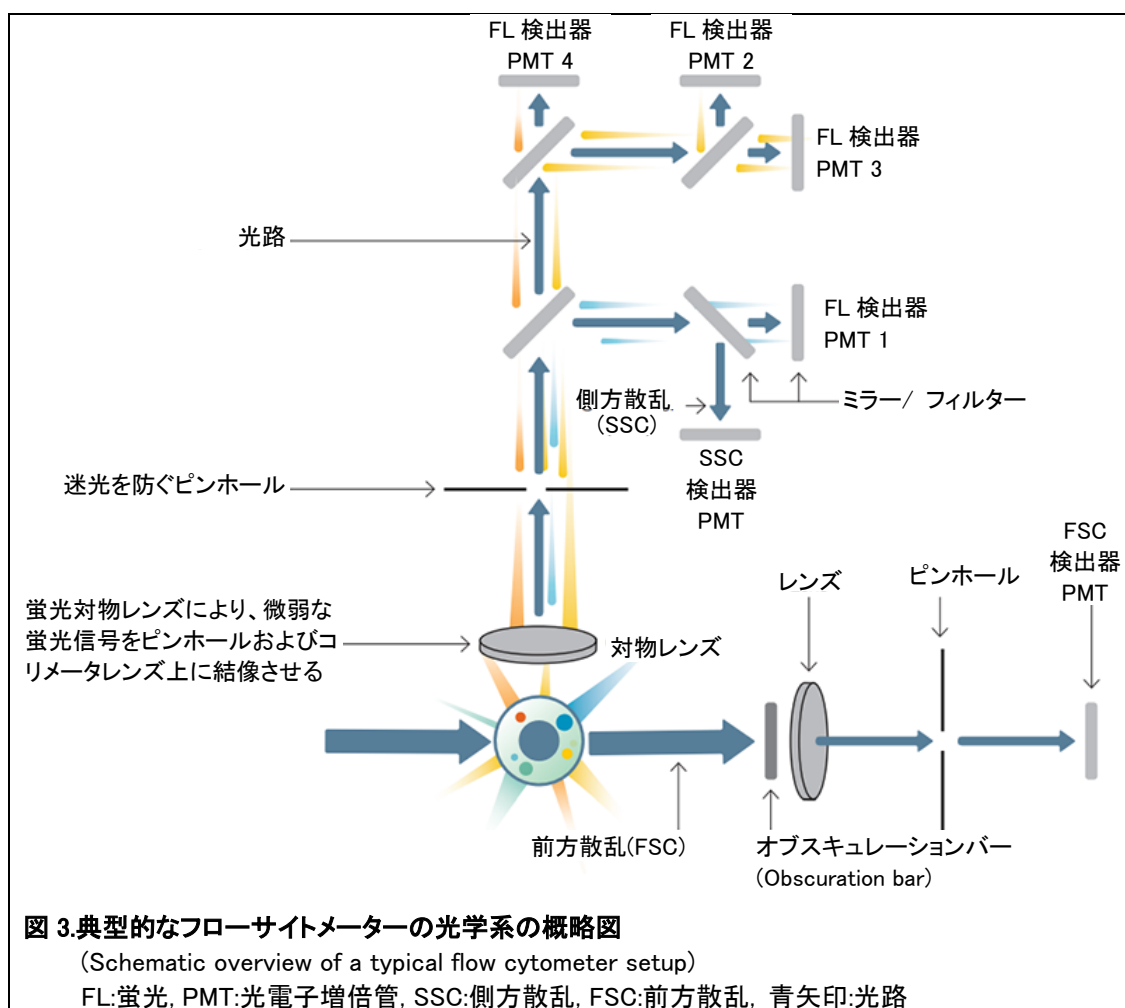
検出器とフィルター(Detectors and Filters)

様々な波長で蛍光測定を行うことにより、蛍光色素で標識した細胞表面受容体(タンパク質など)または DNA およびサイトカインなどの細胞内分子に関する定量的および定性的データが得られます。ほとんどのフローサイトメーターでは蛍光を検出するために、個別のチャンネルおよび検出器を用いており、その数は機器およびメーカーによって異なります。検出器は PMT(光電子増倍管, photomultiplier tubes)またはアバランシェフォトダイオード(avalanche photodiodes, APD)です。PMT が最も一般的に使用されています。

検出の特異性は光学フィルターに依存します。特定の波長を透過(通過)させつつ、他の波長をブロックします。光学フィルターには大きく 3 つの種類があります。ロングパスフィルター(LP)はカットオフ波長以上の光を通過させます。ショートパスフィルター(SP)は特定の波長以下の光を通し、バンドパスフィルター(BP)は特定の狭い波長範囲(バンド幅と呼びます)内の光を透過させます。これらのダイクロイックフィルター(もしくはミラー)は、位相差反射によって光を遮断し、特定の光を通過させ、他の波長を干渉します。(図 2)。



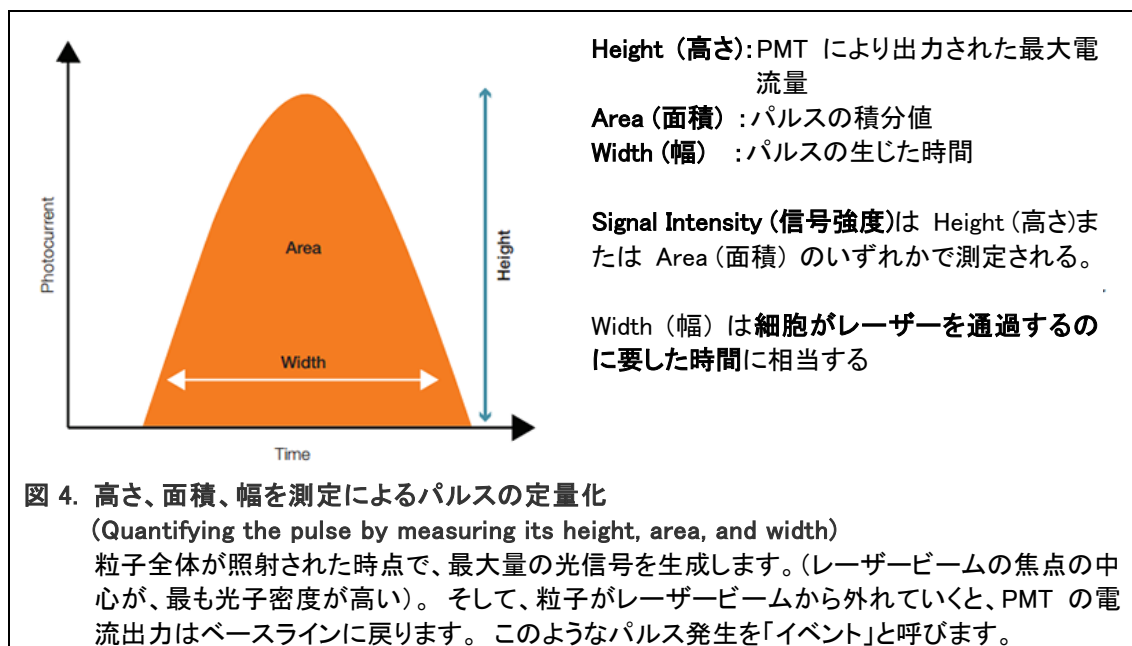
ダイクロイックフィルターは入射光に対して一定の角度で設置したミラーです。このタイプのフィルターは 2 つの機能があります。一つめは特定の波長を順方向に通過させること、二つ目に、非透過光を直角方向に反射することです。これにより、適切な波長の光を適切なフィルターに通すことができます。図 2 のダイクロイックショートパスミラー(DSP)やダイクロイックロングパスミラー(DLP)などを巧みに用いてフローサイトメーターの光学系は形成されています。光学フィルターを正しく選択して適切な順序に配置することで、複数の信号を同時に検出ことができます(図 3)。



電子処理系: シグナルとパルスの処理(Signal and Pulse Processing)

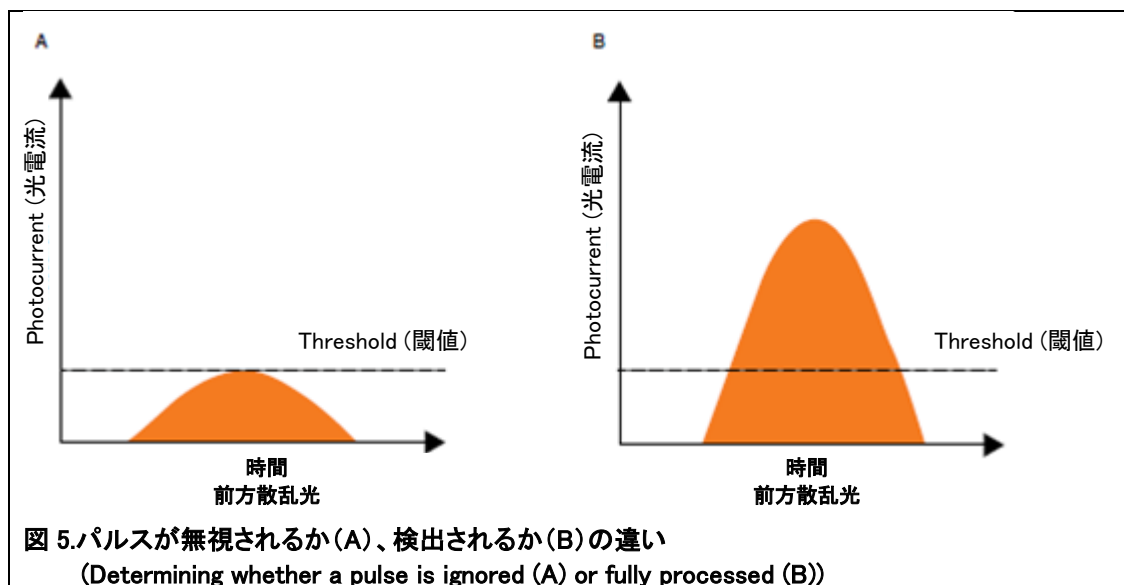
粒子がインターロゲーションポイント(interrogation point: レーザー照射点)を通過するたびに、信号が発生し、すべての検出器でパルスが生成されます。これらのパルスは、粒子が1つないし複数のレーザービームを通過し、通過した経路内の各点で生成された信号を反映します。パルスの波形は時間の関数として信号をプロットすることによって描くことができます。

粒子がレーザービームスポットに入ると、散乱光および蛍光信号を生成し、最終的には PMT の陽極からの電流(電子の流れ)として検出されます。電流の大きさは PMT の光電陰極に当たった光子の数に比例するため、電流値は粒子による散乱または蛍光信号の強度にも比例します。粒子がレーザービームスポットに入ると、PMT の出力が上昇し始め、粒子がレーザービームの中央に位置するときに最大に達します(図 4)。



閾値の設定(Threshold Setting)

ただし、発生したすべてのシグナルが目的の粒子に対応するわけではありません。必要のない信号処理を避けるために、トリガーチャンネル(Trigger Channel)と呼ぶ専用の検出器において、特定の信号強度(閾値)を設定します。トリガーパラメーターにおける閾値に基づいて不要なシグナルを除外します。PMT は極めて敏感であり、迷光、ほこり、非常に小さな粒子および細胞片(debris)など、実験データとは無関係の様々なモノからの信号を検出します。これらのパルスは、実験対象粒子のパルス数よりも数桁多く検出される可能性があります。これらの信号も解析対象に含めると、バックグラウンドレベルが上昇し、必要とするデータを実質的にマスクし、また、信号を処理する回路をオーバーロードすることになります。そのため、取得不要なデータが検出されないような閾値を設定することが必要です。それにはイベントを記録するためのトリガーパラメーターを選び(通常は前方散乱:FSC)、そのパラメーターにおいて閾値を設定します。閾値レベルを超えないパルスは、すべての検出器で無視されます(図 5A)。閾値レベルを超えたパルスはすべて電子回路で処理されます(図 5B)



パルスを検出した際、蛍光シグナルをプロット上に表示して、解析したり、解釈するためには、それらの定量化が必要です。これはシグナル処理回路で行われます。フローサイトメーターの大部分は現在デジタルシステムです。PMTからのアナログ電流は、まずアナログ - デジタルコンバータ(ADC)によってデジタル化され、非常に小さなスライスの信号に分解されます。このプロセスは「サンプリング」と呼ばれます。各パルスは非常に短い時間間隔でサンプリングされ、各々サンプルはデジタル値として保存されます。これらの値を統合することで、元のパルスが再現されます。

電子回路は、その Height (高さ)、Area (面積) および Width (幅) を計算することによってパルス全体を定量化します。高さ(と面積(最大値と積分値))は PMT で検出された光子の数に比例するため、信号強度を測定するのに使用されます。一方、幅は粒子がレーザー中を通過するのに要した時間に比例するため、単一粒子とダブルット(Doublet: 接着した2個の細胞)などを区別するのに使用されます。(第5章 実験の最適化→ダブルット除去 参照)。

[Tips]: 一般には分析(Cell Analyzer)では Threshold は高めに設定し、目的外のシグナルが表示されないようにします。一方、セルソーティングでは目的外のコンタミネーションが起らないように Threshold は低めに設定します。

データの表示(Displaying the Data)

データはリニアスケール(Linear)で取得されますが、通常、蛍光強度はログスケール(Log)で表示します。これにより、弱い信号を拡大し、強い信号を圧縮して、ヒストグラムに表示しやすい分布にするためです。リニアスケール表示は、例えば、蛍光量が2倍しか増加しないDNA解析など、蛍光シグナルの非常に小さな違いを評価する場合に必要です。

また、散乱光(FSC,SSC)は通常リニアスケールで表示し、細菌等小さな粒子を分析する時のみログスケールを使用します。

各検出器からの測定値をパラメーターと呼びます。各パラメーターはフローサイトメトリソフトウェアのヒストグラムおよびドットプロット上の高さ、面積および幅の値として表示することができます。これらは蛍光強度を測定したり、集団を比較したり、分取する細胞集団を決定するのに使用されます。

分取系(Cell Sorting System)

セルソーターにはセルアナライザーにはない、分取系と呼ばれる細胞分取のシステムがあります。分取系には液滴荷電ソーティング(Electrostatic Sorting)、機械式ソーティング(Mechanical Sorting)、重力ソーティング(Gravity Sorting)、磁気ビーズソーティング(Magnetic Bead Sorting)など様々な方式がありますが、ここでは最も一般的な液滴荷電ソーティングについて説明します。

液滴荷電セルソーティング(Electrostatic Cell Sorting)

バイオ・ラッドの S3e などのセルソーターは、フローサイトメトリーによって同定した細胞を分取することができます。液滴ベースのセルソーターではまず粒子の検出・分析を行います。加えて、液滴を形成する機構と、目的の粒子を回収チューブに偏向する機構も有します。液滴を形成するため、ノズル内には最適な振幅(V)と高い周波数(cycles/second、Hz)をもった振動が、安定的に与えられます。振動の発生源としては、多くの場合は圧電性結晶(ピエゾ素子)が使われます。

セルソーターの種類(Types of Cell Sorters)

液滴荷電ソーターには 2 つのタイプがありますが、違いは粒子にレーザーが照射されるポイント(場所)です。Jet-in-Air 方式ソーターは、粒子がノズルを出て流束(ストリーム)に入るときにレーザーが当たります。キューベット方式ソーターでは、粒子が流束に入る前の石英キューベット内でレーザーが当たります。粒子にレーザーが照射される場所をインテロゲーションポイント(interrogation point)と呼びますが、照射後も、粒子はさらに流束を下っていきます。粒子がインテロゲーションポイントを通過した際に得られたデータはコンピューターに送られ、それが目的の粒子としての条件を満たすかどうかを判断します。粒子が流束を下って進むにつれて、流束は最終的には液滴に分割(ブレイクオフ: break off)し、目的の粒子は液滴内に捉えられます。ノズルからランダムな距離にブレイクオフポイントが発生するのを防ぎ、一定の液滴サイズを維持するため、ノズル内には高い周波数で安定した振動が与えられます。

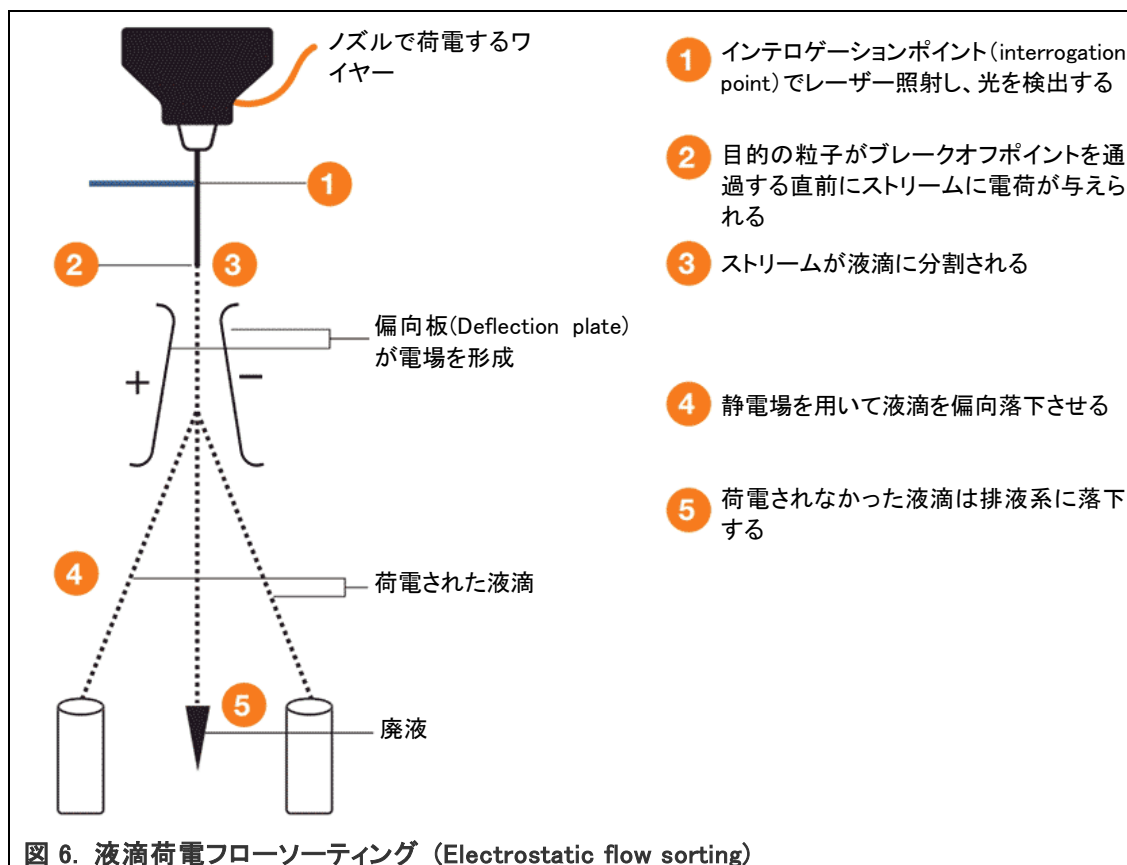
ドロップディレイ(Drop Delay)

ソーティングにおいて、最も重要なパラメーターの 1 つは、粒子がインテロゲーションポイントを通過してから、流束が液滴に分離する位置(ブレイク・オフ・ポイント)に達するまでの正確な時間です。この時間と距離はドロップディレイと呼ばれます。粒子が末端につながっている液滴に到達する時点で、流束全体がノズル内の電極によって荷電されます。目的の粒子を含む液滴へと分離すると、帯電した液滴が形成されます。次いで、液滴は偏向板(Deflection Plate)により形成された電場を通過し、チューブまたはプレートに偏向されます。荷電されていない粒子は廃液タンクに流れます(図 6)。

セルソーティングの速度は、粒子サイズおよび液滴形成速度を含むいくつかの因子に依存します。ノズルは、通常直径が 70~130 μm であり、毎秒 10,000~90,000 滴を生成することができます。またソーティングの正確さは、ブレイク・オフ・ポイントの安定性に依存します。

一般的な使用法(Common Usage)

一般的なセルソーターの用途としては、同定した細胞集団やシングルセルを分取し、その DNA やタンパク質、細胞機能を解析することなどがあります。また、造血幹細胞における CD34 のようなマーカーや、細胞生存率などを指標として細胞を選別し、特定の細胞集団のみを分取したり、シングルセルとした後に、さらにそれらを培養することもよく行われます。



第2章 蛍光の原理

蛍光色素(フルオロフォア)は、特定の波長を吸収し、それより長い波長の光を発する分子です。この章では、どのように蛍光色素が機能するか、フローサイトメトリーで蛍光標識がいかに重要であるか、また、蛍光チャンネル間の補正(コンペンセーション)の方法について説明します。

蛍光色素と光(Fluorochromes and Light)

蛍光色素は、タンパク質や核酸などの生体分子の発現を検出するための標識としてしばしば用いられます。特定の波長で(レーザーなどから)光エネルギーを受け取り、それより長い波長の光を再放出します。これらの2つのプロセスは励起と発光と呼ばれます。発光は励起の後、非常に迅速に、通常ナノ秒以内に起こります。これがいわゆる蛍光です。フローサイトメトリーに利用できるさまざまなタイプの蛍光色素を検討するには、光の吸収と蛍光の原理を理解する必要があります。

光は電磁波の一種で、波として進みます。この波には周波数と波長があり、波長により光の色が決まります。人の目に見える光(可視光)は、紫外線(UV)と赤外線(IR)の間の狭い波長帯域(380–700nm)のことを指します(図7)。例えば、太陽光は紫外線と赤外線を含みます。これらは目には見えませんが皮膚で温かみを感じ、光検出器を用いて科学的に測定できます。可視スペクトルは、さらにその色に従い、赤色、オレンジ色、黄色、緑色、青色および紫色に細分化することができます。赤色光はより長い波長と低いエネルギーをもち、一方、紫色光はより短い波長と高いエネルギーをもちます。

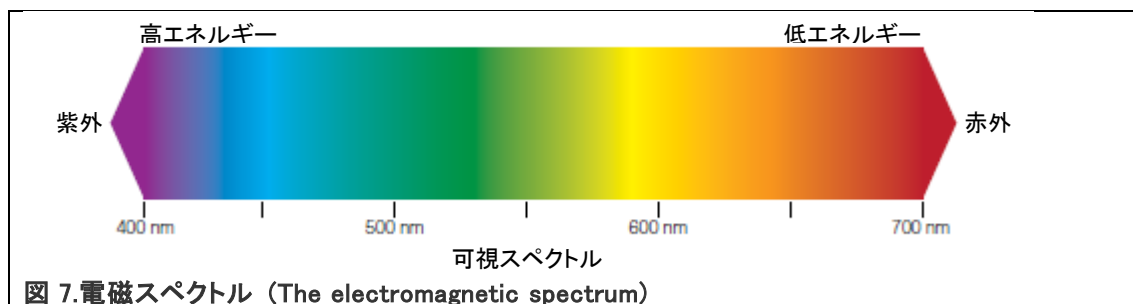
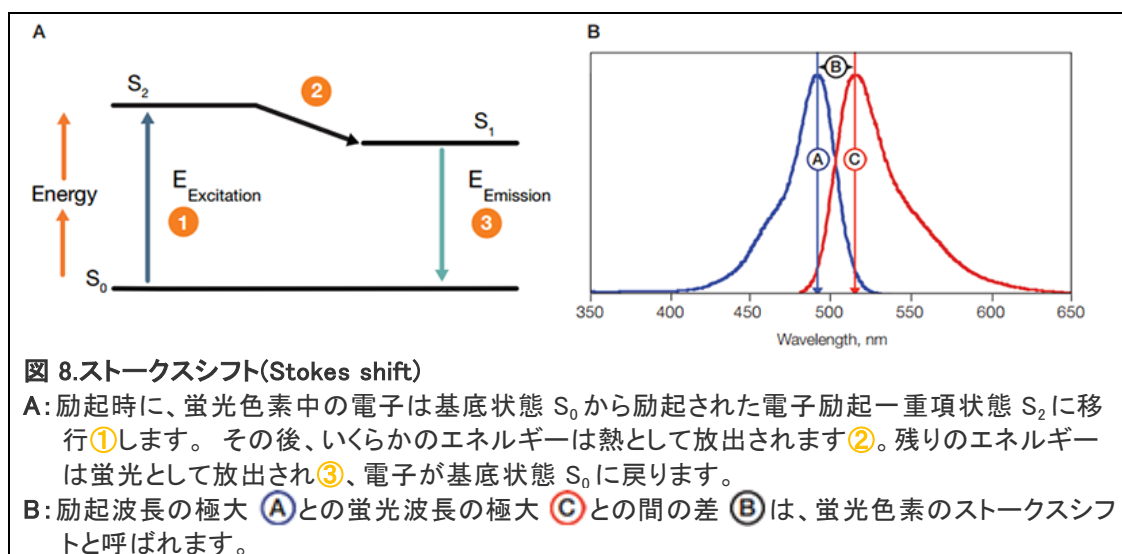


図7.電磁スペクトル (The electromagnetic spectrum)

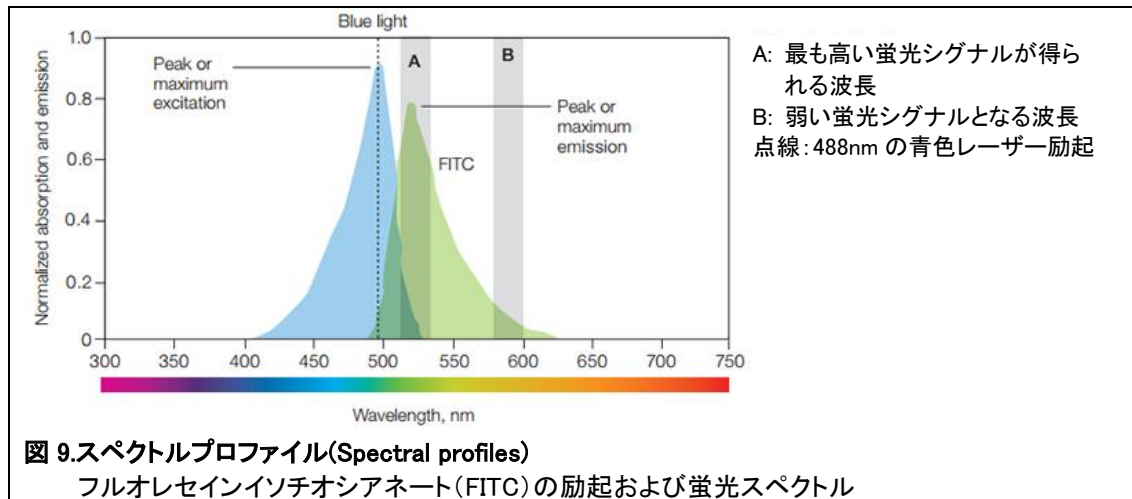
蛍光(Fluorescence)

蛍光色素が光を吸収すると、その電子が励起され、基底状態(図 8A の S_0)から電子励起一重項状態(S_2 , excited electronic singlet state)①と呼ばれる最大エネルギーレベルに遷移します。この遷移に必要なエネルギーの量は、蛍光色素ごとに異なります。この励起状態の寿命は蛍光色素に依存し、通常1~10ナノ秒持続します。次いで、蛍光色素は構造変化を起こし、電子が電子緩和一重項状態(S_1 , electronic singlet state)と呼ばれる、より安定なエネルギーレベルに低下し、吸収したエネルギーの一部は熱として放出されます②。その後、電子は残りのエネルギー(E_{Emission})を蛍光③として放出して、基底状態(S_0)に戻ります。このサイクルは蛍光色素の分子一つ当たり数千回繰り返すことが可能あり、結果としてシグナルを増幅することができます。また、励起極大と蛍光極大の波長の差はストークスシフトと呼ばれます(図 8B)。



蛍光は、励起光よりも低いエネルギーを持ちます。したがって、どのような蛍光色素であってもその蛍光波長は、励起波長よりも長波長となり、そのため異なる色となります。これらの波長によって蛍光測定における蛍光色素の有用性が決まります。蛍光測定では蛍光に対する励起光の漏れ込みをできるだけ抑制する必要がありますが、ストークスシフトの大きな蛍光色素ほど漏れ込みを抑制しやすくなります。

励起光の波長は、とても重要です。例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)は、400~530nm の光を吸収しますが、最も効率的に吸収するのは波長のピークまたは最大吸収である 490nm です。より多くの光子が吸収されるほど、蛍光がより強くなるので、吸収の最大値で蛍光色素を励起することが望まれます。最大の吸収および蛍光の波長は、極大吸収波長(maximal absorbance wavelengths)および極大蛍光波長(maximal emission wavelengths)と呼ばれます。



蛍光色素の最大吸光波長により、どのレーザー光源を励起に使用するのが最適であるかを判断します。FITC の場合、その最大吸光度は青色スペクトル内にあります。そのため、一般的に FITC の励起には 490nm の FITC の吸光度ピークに近い青色の 488nm レーザーが使用されます。FITC は 475～650nm の蛍光を発し、緑色スペクトル内の 525nm にピークがあります。どのようにフローサイトメーターをセットアップするかによって、蛍光色素がどのように検出されるかが決まります。フィルターを使用してチャンネル A(図 9)を介して、極大蛍光波長以外の光をすべてブロックした場合、FITC は緑色に見えます。

機器の設定で見え方が決まる(Setup Determines Perception)

FITC 蛍光がチャンネル B(図 9)でだけ検出された場合、強度がはるかに弱いオレンジ色として観察されます。このように、発せられた光をどのように測定するかにより、蛍光色素がどのような色として観察されるかが最終的に決まります。励起光と蛍光の色は異なるので、光学フィルターを使用して色を分離することができます。

なぜ蛍光マーカーを使用するのか？(Why Use a Fluorescent Marker?)

蛍光色素標識抗体などの蛍光マーカーを用いることで、目的の抗原を標識し、その生物学的特性および生化学的特性を測定することができます。

蛍光マーカーは、細胞や細胞表面タンパク質(受容体など)、細胞内タンパク質などを染色することにより個々の細胞集団を同定および定量するなど、広範な用途に利用できます。例えば、セルソーティング、免疫表現型分類、カルシウム流出実験、核酸含量の定量、酵素活性の測定、アポトーシス実験など。ひとつのレーザーで複数種類の蛍光色素を励起でき、またフィルターを用いてそれぞれの蛍光を別々に検出できます。これがマルチカラー(多色)蛍光実験の基本的な考え方です。

フローサイトメトリーにはどの蛍光色素が適しているのか？ (Which Fluorophores are Useful for Flow Cytometry?)

フローサイトメトリーで使用可能な蛍光色素はたくさんあります。その数は増え続けており、このガイドではそのすべてを取り扱いません。 [バイオ・ラッドの抗体 Web サイト\(英語版:bio-rad-antibodies.com\)](http://bio-rad-antibodies.com)で取り扱っている蛍光色素を、表1 および2に示しました。新しい蛍光色素は次々に追加されますので、最新のフローサイトメトリー製品を Web でご確認ください。

単一色素(Single Dyes)

単一色素には、FITC、PE、APC、PerCP など長年使用されているものの他に、Alexa Fluor 色素など比較的最近開発された、より光安定性が高く、より明るい蛍光を発するものなどがあります。さらに近年では、短波長のレーザーが以前よりも安価になったため、355nm や 405nm レーザーで励起される色素が開発され、マルチカラー実験の選択肢が増えています。

表1. フローサイトメトリーで使用される単一色素

蛍光色素	蛍光色	極大吸収波長 (nm)	極大蛍光波長 (nm)	相対的な明るさ
DyLight 405		400	420	3
Alexa Fluor 405		401	421	3
Pacific Blue		410	455	1
Alexa Fluor 488		495	519	3
FITC		490	525	3
DyLight 549		562	576	4
PE*		490; 565	578	5
Texas Red		596	615	2
APC		650	661	4
Alexa Fluor 647		650	665	4
DyLight 650		654	673	4
PerCP		490	675	2
DyLight 680		692	712	4
Alexa Fluor 700	赤外光	702	723	2

* PE は R-フィコエリスリンと同じ

APC、アロフィコシアニン; FITC、フルオレセインイソチオシアネート; PE、フィコエリスリン; PerCP、ペリジニクロロフィルタンパク質

タンデム蛍光色素(Tandem Dyes)

タンデム蛍光色素は、特定の蛍光色素に別の小さな蛍光色素を共有結合したものです。第一の蛍光色素(ドナー分子)が励起されると、そのエネルギーが第二の蛍光色素(アクセプター分子)に移動します。これにより、第二の蛍光色素が励起され、蛍光を発します。このプロセスは、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET:Förster resonance energy transfer*)と呼ばれます。これは、より大きなストークスシフトを得るための巧妙な方法であり、これにより、一つのレーザー波長から解析できる色の数を増やすことができます。

*FRET は以前蛍光共鳴エネルギー移動(Fluorescence resonance energy transfer)の略称とされていたが、IUPAC より FRET ではドナーとアクセプター間で蛍光が伴わないため、正しい名称とは言えず、発見者の Theodor Förster の名を取って略称とすることが推奨されている。(<https://goldbook.iupac.org/html/F/FT07381.html>)

タンデム蛍光色素の大部分は、多くのフローサイトメーターで搭載されている 488nm および 640nm レーザー用に開発されています。タンデム蛍光色素は、マルチカラー蛍光実験、特に単一色素との組み合わせにおいて非常に有用です。例えば、Alexa Fluor 488、フィコエリスリン(PE)、ペリジニクロロフィルタンパク質(PerCP)-Cy5.5 および PE-Texas Red は、いずれも 488nm で励起されますが、それぞれ緑色、黄色、赤色および赤外線光を発しますので、別々の検出器で測定できます。

表 2. フローサイトメトリーで使用されるタンデム色素

蛍光色素	蛍光色	極大吸収波長 (nm)	極大蛍光波長 (nm)	相対的な明るさ
PE-Alexa Fluor 647*		496, 546	667	4
PE-Cy5		496, 546	667	5
PerCP-Cy5.5		490	695	3
PE-Cy5.5		496, 546	695	4
APC-Alexa Fluor 750	赤外光	650	779	4
PE-Cy7	赤外光	496, 546	785	2
APC-Cy7	赤外光	650	785	2

* PE は R-フィコエリスリンと同じ

APC、アロフィコシアニン; PE、フィコエリスリン; PerCP、ペリジニン-クロロフィル-タンパク質

蛍光タンパク質(Fluorescent Proteins)

GFP (Green Fluorescent Protein) のような蛍光タンパク質は、多くの科学分野においてタンパク質機能解析のための不可欠なツールです。mCherry や YFP (Yellow Fluorescent Protein) などの他の蛍光タンパク質もまた、フローサイトメトリー解析およびセルソーティングに広く使用されています。蛍光タンパク質は、多くの場合、目的のタンパク質と共発現させるか、融合タンパク質として発現させます。これらの蛍光タンパク質の利点は、細胞膜の透過処理を必要とせずに、生きた細胞内の分子を解析できることです。一般的な蛍光タンパク質を表 3 に示します。

表 3. フローサイトメトリーで使用される蛍光タンパク質

蛍光色素	蛍光色	極大吸収波長 (nm)	極大蛍光波長 (nm)	相対的な明るさ
EBFP		383	445	2
CFP		439	476	2
EGFP		484	509	4
YFP		514	527	5
RFP		558	583	4
mCherry		587	610	3

蛍光補正(コンペンセーション: [Fluorescence Compensation](#))

複数の蛍光色素を用いるマルチカラー実験の課題の一つとして、蛍光の「漏れ込み」の問題があります。フローサイトメトリーで使用される蛍光色素はさまざまな波長の蛍光を発します。例えば FITC は、緑色の他に、黄色やオレンジ色の蛍光も発するため、FITC だけで染色されたサンプルの蛍光が、PE チャンネルや PerCP チェンネルでも検出されます(図 10)。この問題に対処するため、コンペンセーションと呼ばれる補正方法が用いられます。

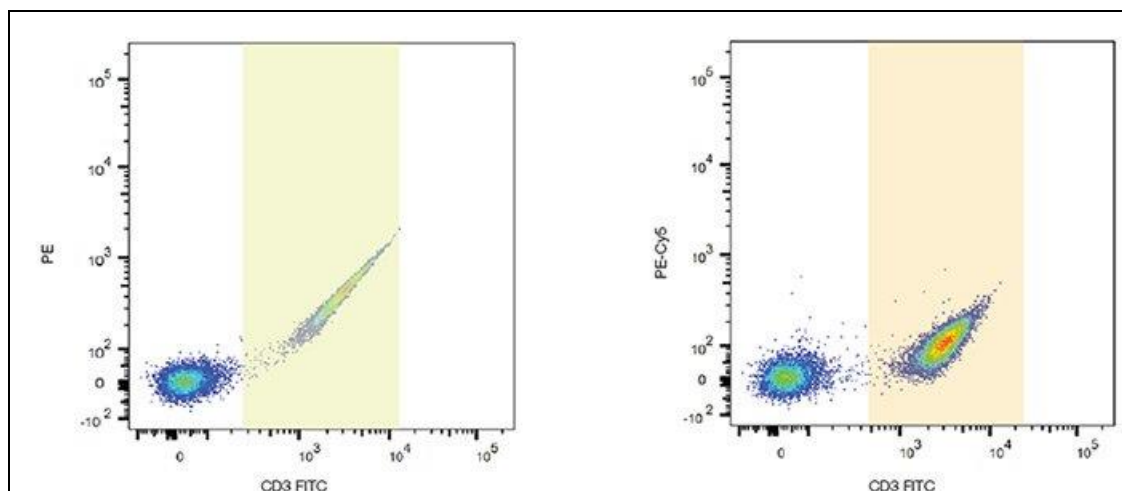


図 10. FITC の他のチャンネルへの漏れ込み (FITC spill over into other channels)

FITC だけで染色したリンパ球は、PE 検出器(左図)および PE-Cy5 検出器(右図)への漏れ込みがある。ゲートは FITC 陽性細胞とそれらの漏れ込みを示す。

相対的寄与(Relative Contribution)

実験によっては、FITC は、黄色およびオレンジ色を発する他の色素、例えば PE と組み合わせることがあります。そのような場合、それぞれの検出器で得られたシグナルについて、各蛍光色素の相対的な寄与の割合を決定する必要があります(図 11)。

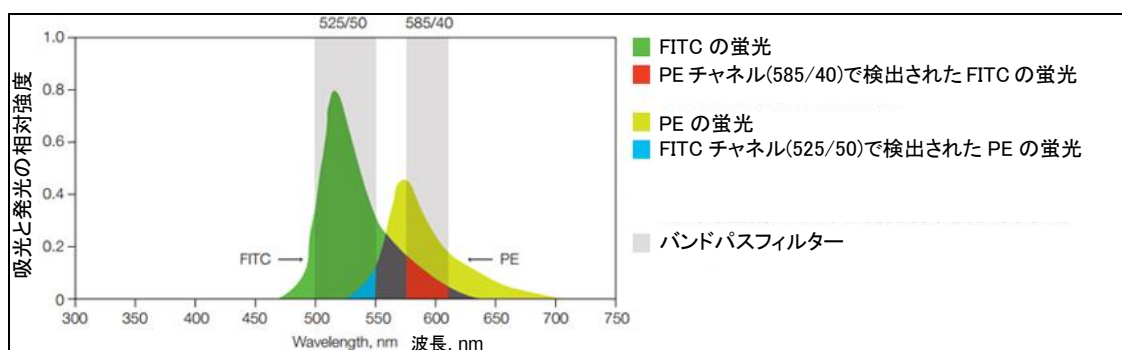
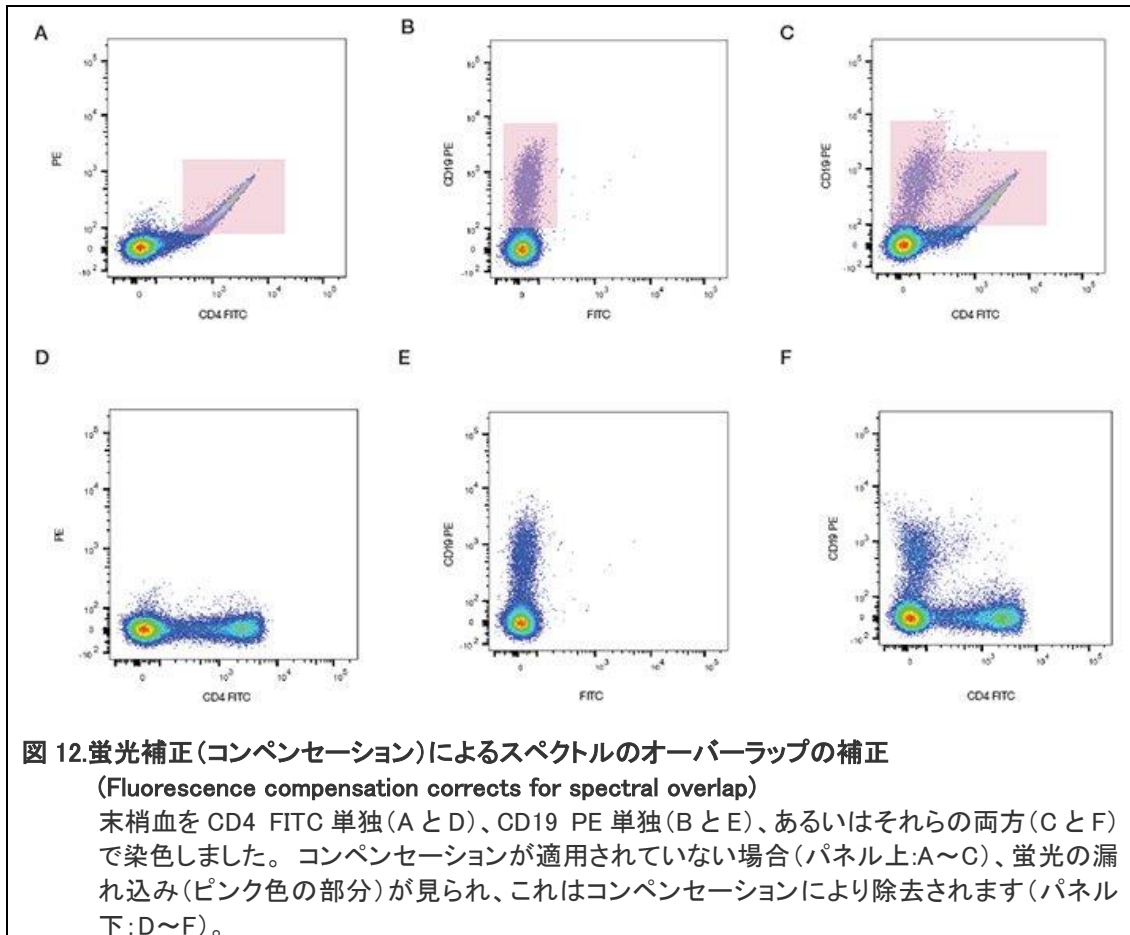


図 11. 蛍光補正(コンペンセーション, Fluorescence compensation)

一般的に使用される 2 つの蛍光色素である FITC および PE の蛍光スペクトルを示します。これらの蛍光を検出するために一般的に使用される 2 つのフィルター、525/50 および 585/40 のグラフ表示も示しています。赤で示したのは PE 検出器(585/40)で検出される FITC の蛍光スペクトルで、コンペンセーションにより PE チャンネルのシグナルから差し引く必要があります。こうしたプロセスは、3つ以上の蛍光色素を用いる場合には、さらに複雑になります。

コンペンセーションの適用(Applying Compensation)

図 12 で、FITC および PE 染色したサンプルにどのようにコンペンセーションを適用するかを示します。単一染色したサンプルは、スペクトルのオーバーラップ量を明確にします。サンプルを両蛍光色素で染色し、コンペンセーションをせずに測定された場合、ダブルポジティブな集団が観察されます。しかし、ソフトウェアを使用して適切なレベルの補正をすると、本来の染色レベルがわかります。ソフトウェアは漏れ込みの数値を計算し、これをデータに適用して正しく補正されたデータを表示します。コンペンセーション後、相互に排他的なマーカーでは起こり得ないダブルポジティブ細胞は実際には存在しないことがわかります。



スペクトルが重ならない蛍光色素の組み合わせを使用することで、コンペンセーションの必要性を低減するためには、異軸方式 (4 ページ参照) のフローサイトメーターを用いて、特定のレーザーでのみ励起される蛍光色素の組み合わせで細胞を染色する方法が考えられます。しかし、この方法では蛍光色素の数をあまり増やせず、かつ使用可能なレーザーの種類に応じて蛍光色素を変える必要もあります。そこでバイオ・ラッドでは、スペクトルの重複が少ない4つの蛍光色素の組み合わせを採用し、コンペンセーションが不要な汎用の免疫表現型 (Immunophenotyping) パネルを開発しました。一般的な血球分類に使用でき、より複雑なパネルを構築するためのスタートラインとしても活用できます。B 細胞、T 細胞、NK 細胞および骨髄系のパネルについての詳細は、[No Compensation パネルウェブページ](#)をご覧ください。

コンペンセーションコントロール(Compensation Controls)

コンペンセーションコントロールを設計する際に覚えておくべきいくつかの基本原則があります。コンペンセーションコントロールは、実験に使用するマーカーに対して陽性あるいは陰性であるかを判断するのに重要であるため、実験を成功させるためには絶対的に重要です。コンペンセーションコントロールの定義は簡単です。実験で使用した各蛍光色素について、単染色細胞あるいはビーズサンプルも準備する必要があります。フローサイトメトリーにおけるコントロー

ルの重要なルールについて第 4 章で詳しく説明します。

第 3 章 データ解析

フローサイトメリーのデータは、さまざまな方法で解析することができます。ここでは、ゲーティング戦略の一般的な例とデータの表示方法を紹介します。

ゲートとリージョン([Gates and Regions](#))

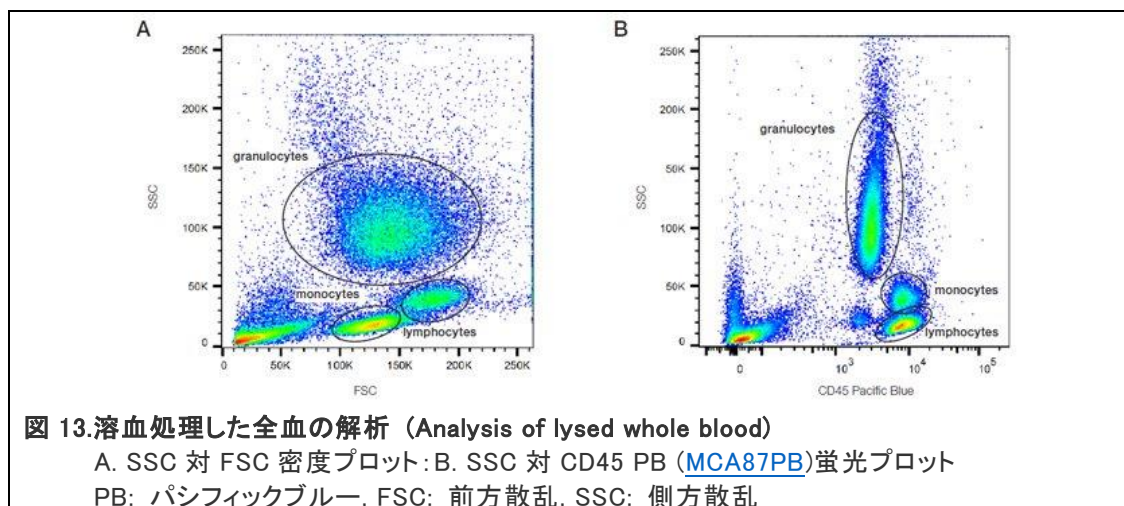
フローサイトメリーのデータ解析は、基本的にゲーティングによって行います。ゲート(Gate)および領域(Region)は、共通の特徴(通常、前方散乱、側方散乱およびマーカー分子の発現量)を有する細胞集団の周囲をバー(Bar)、丸・楕円(Ellipse)、四角(Rectangle)、多角形(Polygon)、4 象限(Quadrants)などのツールを用いて囲み、その集団の解析や定量を行います。ここでは、一般的なフローサイトメリーのグラフ出力がどのように見えるか、および蛍光色素標識抗体で染色された異なる細胞集団を簡単な手順で確認する方法を示します。本書に加えて、簡単な解説として[“Gates, Plots and Regions”](#)を別途用意しています。

ゲーティングの方法(How to Gate)

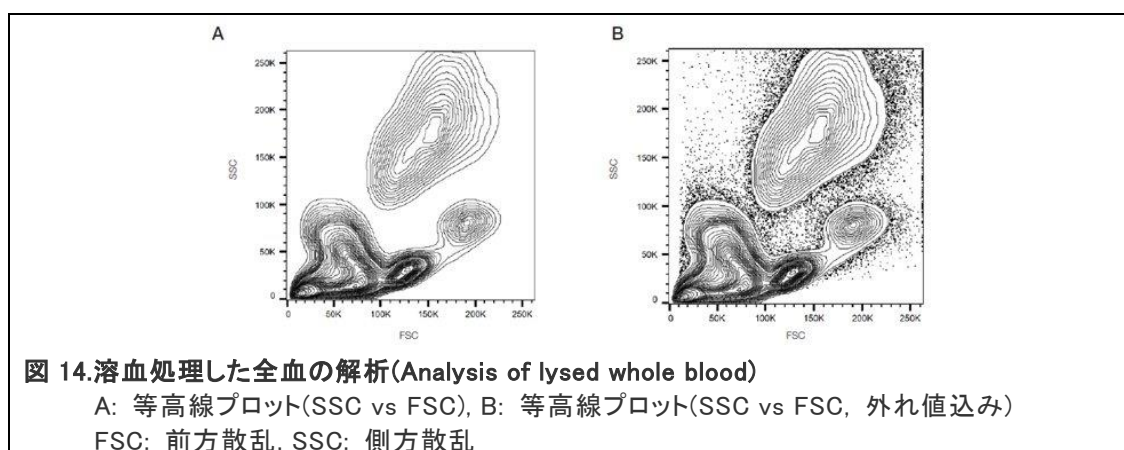
ゲーティングでは、通常、始めに細胞の前方散乱(FSC)および側方散乱(SSC)特性に基づいて細胞の集団を区別します。前方散乱および側方散乱は、サンプル、レーザーの波長、サンプルおよびシース流体の収集角度および屈折率などのいくつかの要因に依存しますが、細胞のサイズおよび粒度を見積もることができます。細胞の集団を区別することは、細胞の種類が 1 種類しかない細胞株では比較的単純ですが、複数の細胞種が混在するサンプルではより複雑になることがあります。

図 13 のデンシティープロット(ドットプロット)に見られるように、溶血処理した全血にはいくつかの異なる集団があります。赤～黄色～緑～青で示したホットスポットは、それぞれの細胞集団に由来して増えるイベント数を示しています。散乱光パターンから、顆粒球、単球およびリンパ球を、細胞破片および死細胞から区別することができます。細胞片(debris: デブリ)や死細胞はしばしば前方散乱のレベルが低く、密度プロットの左下隅にあります。これらの不要なイベントは、前方散乱の閾値を高く設定したり、または目的の細胞集団をゲーティングすることによって除去できます(図 13A)。図 13B の CD45 Pacific Blue に示すように、蛍光と前方散乱または側方散乱の組み合わせとしてデータをプロットすることもできます。前方散乱および側方散乱ゲーティングは、自家蛍光(38 ページ)および抗体の非特異的結合を増加させた死細胞を除去するためにしばしば使用されますが、細胞生存率試薬(viability dye; 39 ページ)を使用する方がより確かな方法です。フローサイトメリーのデータ解析はゲーティングの原理を基本としています。目的とする細胞集団のみを選び出すため、蛍光・散乱光プロットやヒストグラムにゲート、ないしはリージョン(領域)を設定します。そして、このようなゲートを特定の細胞集団を視覚化し、解析するために利用することができます。

通常、ゲーティングで最初に行うのは、細胞の光散乱特性を利用した細胞の識別です。たとえば、前方散乱により推定される相対的な大きさから、細胞片(debris)と個々の細胞を区別することができます。また、死細胞は生細胞よりも前方散乱が低く、側方散乱が高い傾向にあります。溶血した全血サンプルの細胞解析はゲーティングの最も一般的な応用例です。図 13 は大量の細胞を SSC と FSC で解析した代表的なグラフです。顆粒球、単球およびリンパ球の異なる光散乱シグナルをもとに、各細胞集団に分けたり、デブリ(細胞片)と区別したりすることが可能です。



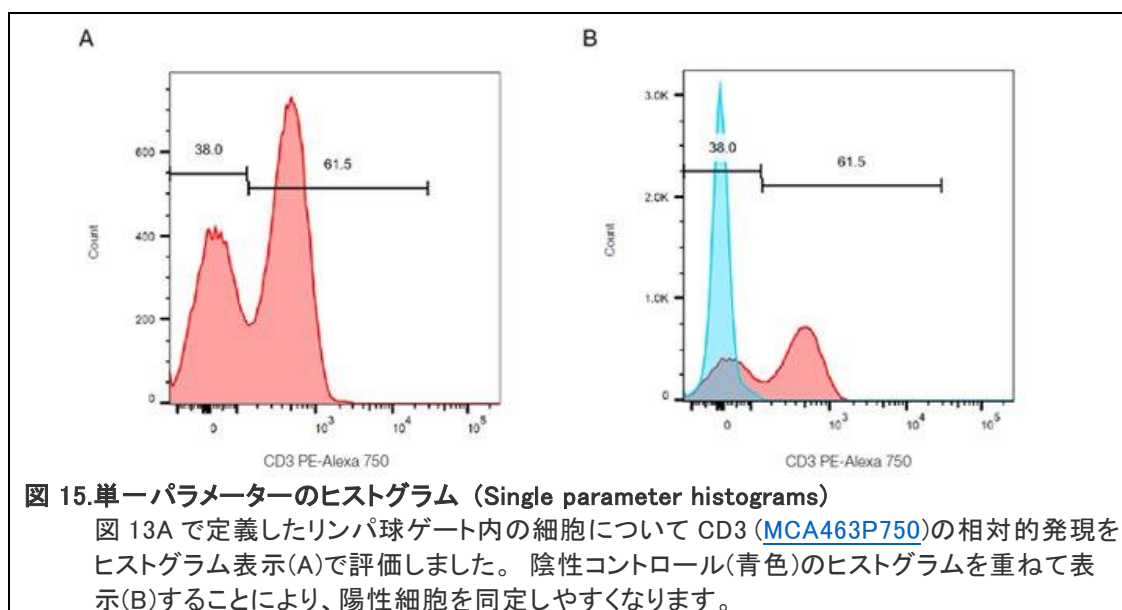
ソフトウェアによっては、イベントを密度情報が示されていないドットプロットとして、またはイベントの密度の相対強度を示す等高線プロット(Contour Plot)として表示することもできます。等高線プロットの例を図 14 に示します。



どのような表示方法が望ましいかは、ユーザの好みにもよりますが、等高線プロット(Contour Plot)の方が、個々の細胞集団の視覚化に適している場合があります。

シングルパラメーター，単変量ヒストグラム (Single-Parameter or Univariate Histograms)

X 軸に一つの測定パラメーター（蛍光または散乱強度）を、Y 軸にイベント数（細胞数）を示したものをヒストグラム(Histogram)と呼びます。データは、収集されたすべてのデータ、または選択された（ゲーティングされた）集団として表示されます。これはサンプル中の特定の物理的性質を有する細胞の総数や、目的とするマーカー分子の発現量を評価するのに便利です。目的の特性を有する細胞を陽性データセットと呼びます。一例を図 15 に示します。まず前方散乱および側方散乱を用いてリンパ球をゲーティングし、その集団の CD3 発現量をヒストグラムで表示しています。CD3 の陽性と陰性のデータセットとして解釈できる 2 つのピークがあります。この例では、CD3 陽性 T 細胞は、リンパ球ゲート内の細胞の約 61% を占めます。



正確さの向上(Gaining Accuracy)

陽性データセットを正確に同定するためには、適切なコントロール(第 4 章参照)を用いてフローサイトメトリーを繰り返す必要があります。これは、単一のピークが観察される場合に特に必要ですが、フローサイトメトリーでは、サンプルに複数の細胞集団が混在しているため、しばしば複数のピークが観察されます。図 15B で示したように、染色された陽性データセット(赤)上に、青色のコントロールヒストグラム(この場合はアイソタイプコントロール)を重ねて示すことで、バックグラウンド染色レベルを正確に定義することができます。

解析ソフトウェアを使用することで、細胞数とゲート内の細胞の割合に加えて、多くのパラメーターについて測定値と統計値を取得することができます。統計値には、蛍光のわずかな増加または減少がある場合にしばしば使用される中央値や平均蛍光強度 (MFI) などがあります。

2 パラメーター、二変量プロット(Two-Parameter or Bivariate Plot)

これらのグラフは、X 軸と Y 軸にそれぞれ異なる測定パラメーターをとり、イベントを密度(またはドット)プロットとして表示します。パラメーターは、表示する内容に応じて蛍光、FSC または SSC にすることができます。図 16 では、前方および側方散乱によって決定されたリンパ球(図 16A)を CD3 および CD19 で染色し、T および B 細胞集団を同定しています。その後、B 細胞および T 細胞の相対的な割合を、異なる集団の周囲にゲートまたは 4 分割線(Quadrants)を設定することで定量化しています(図 16B、C)。

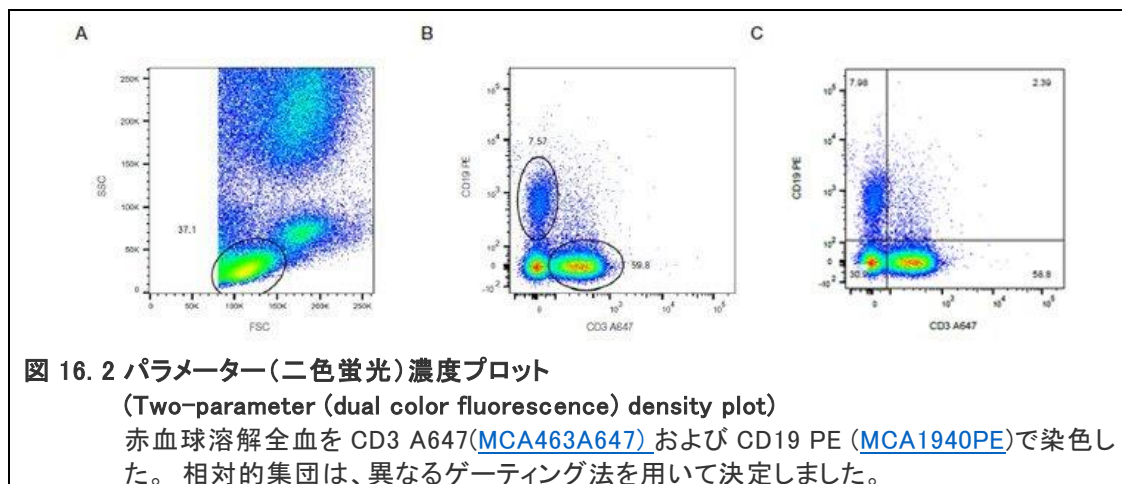


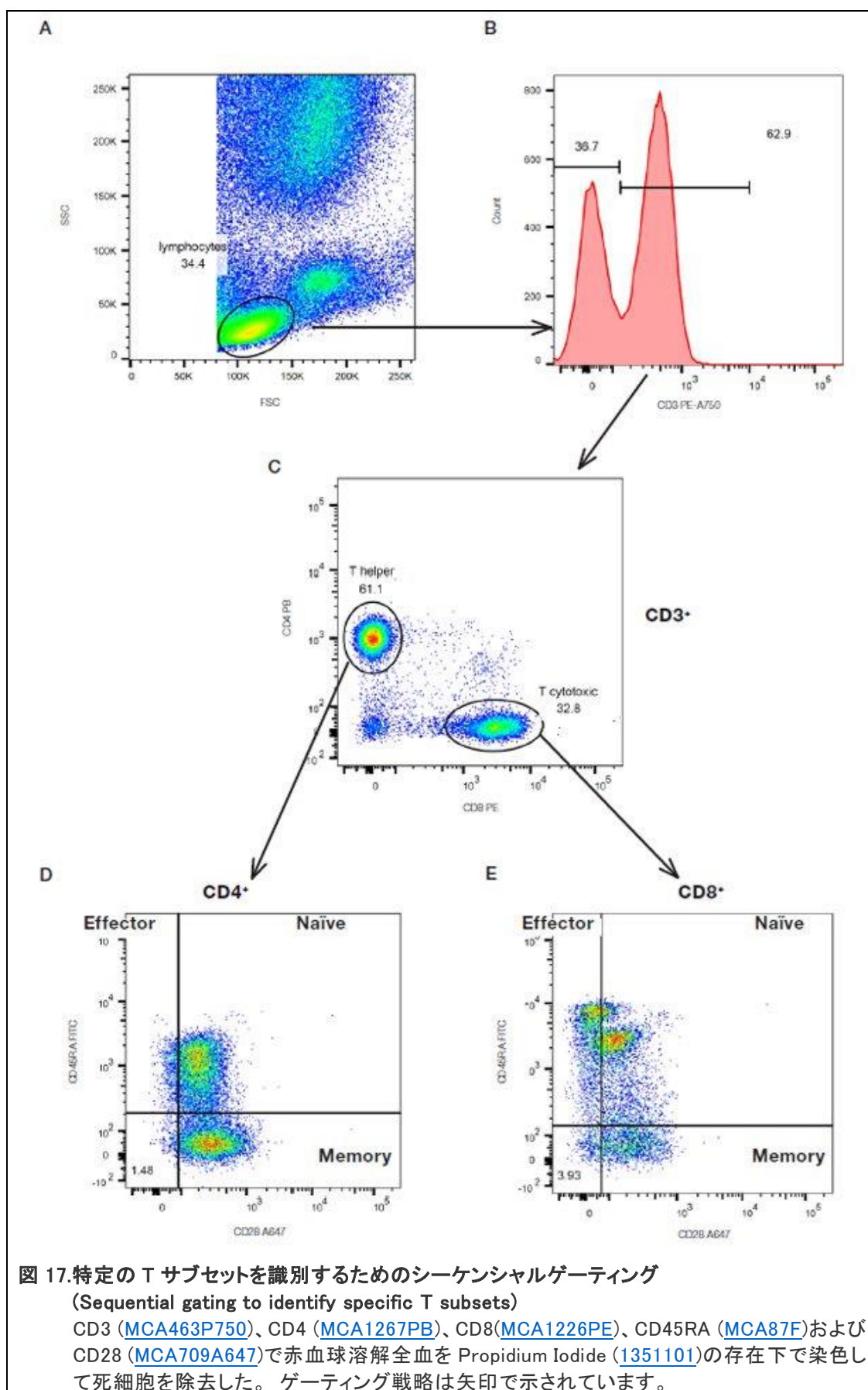
図 16 に示した実験の場合、7.5%の B 細胞および 59.8%の T 細胞が存在します(図 16B)。このデータは、密度プロットを 4 象限に分割することでも視覚化でき、各マーカーに対して 1 つの単独陽性(Single Positive)および、二重陰性(Double Negative)と二重陽性(Double Positive)を判定することができます(図 16C)。発現レベルが明確な集団とならない場合や、相互に排他的でない場合、適切なコントロールは、陽性および陰性の集団を決定するのに役立ちます。

ゲーティング(Gating)

ゲーティングは、目的とする細胞集団を絞り込むために、データセット上で複数回使用する強力なフローサイトメトリーツールです。単純なシーケンシャルゲーティングを繰り返し適用して、特定の細胞型の発現パターンを決定することができます。これは、一回の実験で得られるマーカーや蛍光色素の数が増加するにつれ、特に有用です。現在、フローサイトメトリーでは、17 以上の蛍光マーカーで同時標識されたサンプルを分析することができますが、パイオ・ラッドの ZE5™ Cell Analyzer などの最大 27 色を検出することができるサイトメーターが利用可能です。したがって、単一の実験では、解析のために大きなデータセットが得られます。例えば、17 色のパネルでは、二変量プロットが 136 個生成されます。

シーケンシャルゲーティングの例(Sequential Gating Example)

特定の細胞集団を同定するために単純なシーケンシャルゲーティングが使用されているマルチカラー実験の例を図 17 に示します。まず、リンパ球を前方散乱および側方散乱によって同定し、ゲーティングします(図 17A)。次いで、CD3 陽性の T 細胞を同定し(図 17B)、さらに CD4 および CD8 の発現でゲーティングします(図 17C)。CD45RA⁺CD28⁺ナイーブ細胞、CD45RA⁺CD28⁺メモリー T 細胞および CD45RA⁺CD28⁻エフェクター T 細胞を同定するための CD28 および CD45RA の相対的発現量を、CD4⁺および CD8⁺集団の両方で決定しました(図 17D および E)。このような原理で、さらにマーカーを追加して続けることができますが、細胞集団がより詳細になるにつれて、各ゲート内にイベントが少なくなるため、実験目的に対して十分な数の細胞を収集することが重要です。



バックゲーティングによるゲート戦略の確認 (Backgating to Confirm Gating Strategies)

バックゲーティングは、染色パターンおよびゲーティング方法を確認することにより、細胞を同定する便利な方法です。一般的には①FSC vs SSCプロットで細胞をゲートし、②FSCによるダブルレット除去(第5章実験の最適化 ダブルレット除去参照)し、③蛍光により目的細胞をゲートする順番で行いますが、バックゲーティングではあるゲートで同定した細胞を、異なるパラメーターでのドットプロット上に表示することで解析することができます。目的の細胞や死んだ細胞の存在を特定できているか、あるいは細胞を同定するために追加情報が必要かどうか、ゲート設定や発現レベル、非特異的結合が不明な場合に役立ちます。図18に例を示しました。

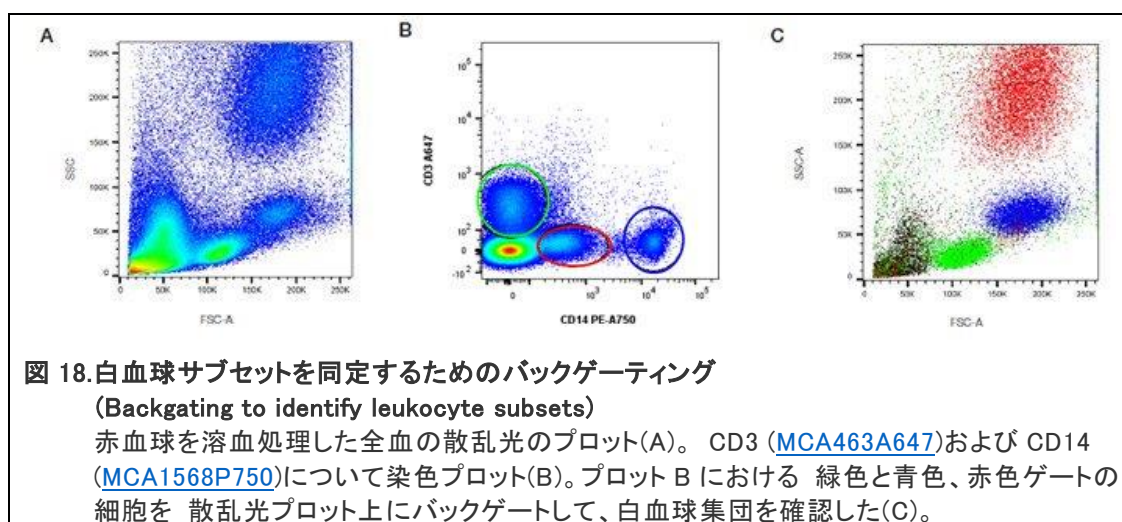


図 18.白血球サブセットを同定するためのバックゲーティング
(Backgating to identify leukocyte subsets)

赤血球を溶血処理した全血の散乱光のプロット(A)。CD3 ([MCA463A647](#))および CD14 ([MCA1568P750](#))について染色プロット(B)。プロットBにおける 緑色と青色、赤色ゲートの細胞を 散乱光プロット上にバックゲートして、白血球集団を確認した(C)。

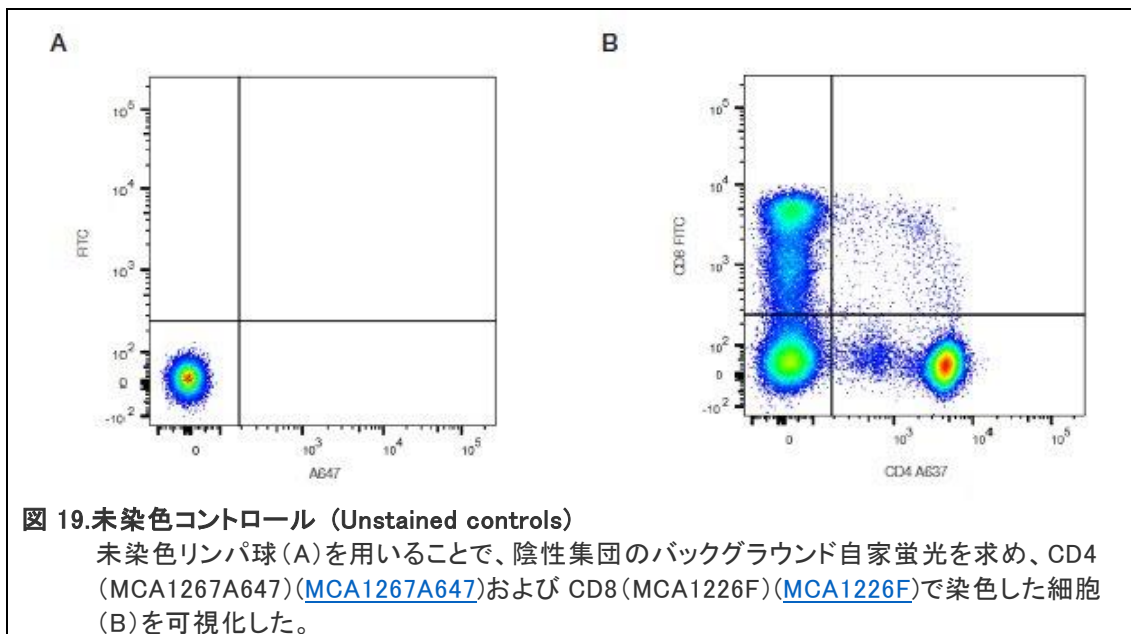
ゲーティングには面倒な操作をする必要はなく、簡単な手順をいくつか実行するだけで、特定の細胞集団を迅速に解析することができます。使用する蛍光色素を増やすことで、より特異的な細胞集団を特定することができます。しかしながら、蛍光色素を増やすと、バックグラウンドと非特異的な結合が増え、データを解析しづらくなるため、適切なコントロール実験を行い、適切な初期細胞数を用意するようにしてください。

第 4 章 フローサイトメトリのコントロール

コントロールは、バックグラウンドのシグナルや非特異的なシグナルから目的のデータを区別するために、あらゆる実験において重要です。ここでは、フローサイトメトリのためのいくつかの必須なコントロールについて議論します。

未染色コントロール(Unstained Controls)

フローサイトメトリでは、最初に同定するのは目的とする細胞集団です。前方散乱光および側方散乱光の特性、さらに側方散乱に加えて、CD45 などのマーカーを用いて細胞集団を同定します。その後で、陰性集団の場所も特定する必要があります。これを行うには、染色されていないサンプルを使用する必要があります。これにより、バックグラウンド蛍光または自家蛍光のレベルが分かり、適切に PMT 検出器の電圧とネガティブゲートを設定することができます。



アイソタイプコントロール(Isotype Controls)

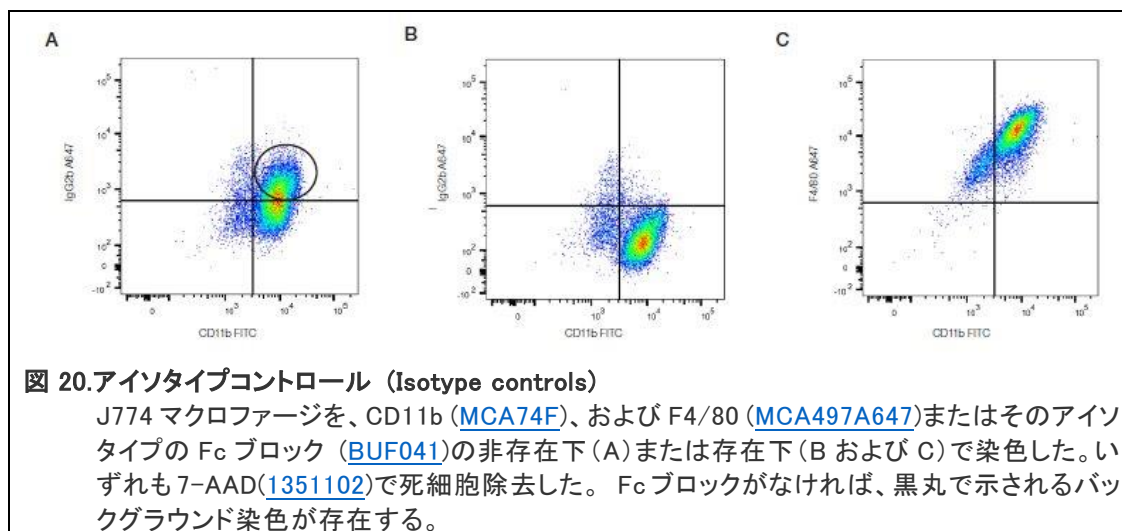
フローサイトメトリーにおいて、アイソタイプコントロールを使用するかどうかは、論争的であり、研究者を二分しています (Herzenberg L ら、Maecker HT および Trotter J)。アイソタイプコントロールを使用しないこともできますが、使用する場合には、適切に使用するための、そして他のコントロールと一緒に使用するためのいくつかの簡単なルールがあります。

アイソタイプコントロールとは何か？(What are Isotype Controls?)

フローサイトメトリーでは、存在比率の少ない細胞集団や発現レベルの低い細胞を検出する場合、あるいはマルチカラーパネルを構築する場合に、染色のバックグラウンドレベルが特に問題となります。アイソタイプコントロールは、解析対象の細胞またはサンプルには存在しない抗原に対して産生された抗体です。観察された染色がアーティファクトではなく目的抗原への特異的な結合によるものであることを確認にすることが目的です。陽性と陰性細胞を区別するためや、ゲートを決定するために使用すべきではなく、また、細胞内の染色には適していません。

アイソタイプコントロールは：

- 単球、マクロファージ、樹状細胞および B 細胞の表面上に見出される Fc 受容体に対する抗体の非特異的結合量の評価に用いられます。
- 観察された染色がアーティファクトではなく特異的結合によるものであることの確認に用いられます。
- 抗体または蛍光色素の細胞成分への他の非特異的結合を明らかにします (例えば、RPE および FITC、[Takizawa ら、1993](#)、[Hulspas ら、2009](#))。



最も適切なアイソタイプコントロールは以下を一致させます。

- 免疫生物種
- Ig サブクラス
- 一次抗体の蛍光色素

もし FITC に結合したマウス IgG1 モノクローナル抗体を使用する場合には、FITC に結合したマウス IgG1 アイソタイプコントロールを選択する必要があります。

抗体への蛍光色素の結合比 (F/P Ratio*と呼ばれます) は試薬メーカーによって異なることがあるので、目的の抗体と同じメーカーからアイソタイプを購入することが推奨されます。可能であれば、一次抗体と同じ濃度で使用してください。

(*)F/P 比: Calculated dye: protein molar ratios: 溶液中の抗体に結合した色素分子の平均数の比率

4 つの簡単なステップで抗体の F/P 比を計算する方法

(How to Calculate the F/P ratio of Your Antibodies in Four Easy Steps)

F/P Ratio (蛍光色素:タンパク質比)を決定するには、分光光度計で既知の波長での吸光度に基づいて蛍光色素とタンパク質の両方のモル濃度を計算し、比率としてこれを示します。この比率は、溶液中の抗体に結合した色素分子の平均個数を示します。

1. 過剰な蛍光色素の除去

過剰な蛍光色素は、吸光度測定を妨げます。

2. タンパク質の濃度の決定

A280 nm でのタンパク質の吸光度を測定します。この値をタンパク質のモル吸光係数で割ります。(例えば、マウス IgG は、 $203,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ のモル吸光係数を有する)。

3. 蛍光色素濃度の決定

最大励起波長(例えば FITC では 495nm 波長)で蛍光色素の吸光度を測定します。この値を色素分子のモル吸光係数で割る。(例えば FITC は $75,000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の吸光係数を有する)。

4. F/P 比の決定

ステップ 2 で決定した蛍光色素濃度をステップ 3 で決定したタンパク質濃度で割って F/P 比を計算します。

アイソタイプコントロールは細胞表面染色の際の使用に適していますが、細胞内染色の場合には注意が必要です。細胞内分子を染色する場合、抗体だけでなく蛍光色素も細胞内成分に非特異的に結合することがあり、そのため蛍光色素の選択に注意する必要があります。また、細胞表面染色の際とは異なるコントロールが必要になる場合もあります。アイソタイプコントロールを使用して、コンペンセーションレベルまたは負の母集団を決定することはできません。

非特異的な抗体結合は次のようにして減らすことが可能です。

- Fc レセプターをブロックする
- バッファーに BSA などのタンパク質を加える
- 抗体価を測定しておく(Antibody titration)
- Live/dead マーカーを使って死んだ細胞を除外(ゲートアウト)する

アイソクロニックコントロール(Isoclonic Controls)

アイソタイプコントロールの代替法の一つは、アイソクロニックコントロールです。これは過剰量の同一の非標識抗体で染色した細胞です。非標識抗体はすべての結合部位を占め、標識抗体が特異的に結合するのを妨げます。従って、アイソクロニックコントロールの存在下で検出される任意のシグナルは、非特異的結合に由来します。

単一染色とコンペンセーションコントロール([Single Staining and Compensation Controls](#))

第 2 章で述べたように、マルチカラーフローサイトメトリーを行う際、補正(コンペンセーション)量を決めるためには、それぞれの色素を単独で染色したサンプルが必要です。単一色素染色サンプルは、異なる蛍光色素間でのスペクトルのオーバーラップの程度を明らかにし、このオーバーラップの除去あるいは補正(コンペンセーション)を可能にします(第 2 章、図 12)。図 12A では、FITC の蛍光が PE チャネルにおいて検出されることが分かります。図 12D は、適切にコンペンセーションされたときのデータ表示を示しています。こうしたスペクトルのオーバーラップについて、使用する全ての蛍光色素に対してコンペンセーションをする必要があります。

染色のポイント(Staining Rules)

コンペンセーション用の単一染色サンプルを使用する際の重要なポイントは次のとおりです。

1. コンペンセーションコントロールは、サンプルと同等レベルか、サンプルよりも明るく染まっている必要があります。コントロールとして測定する蛍光が明るい場合であれば、蛍光標識抗体については、表面抗原を有する細胞の代わりとして、抗体キャプチャービーズで置き換えることもできます。しかし、タンデム蛍光色素の場合はキャプチャービーズで、置き換えることはできません。

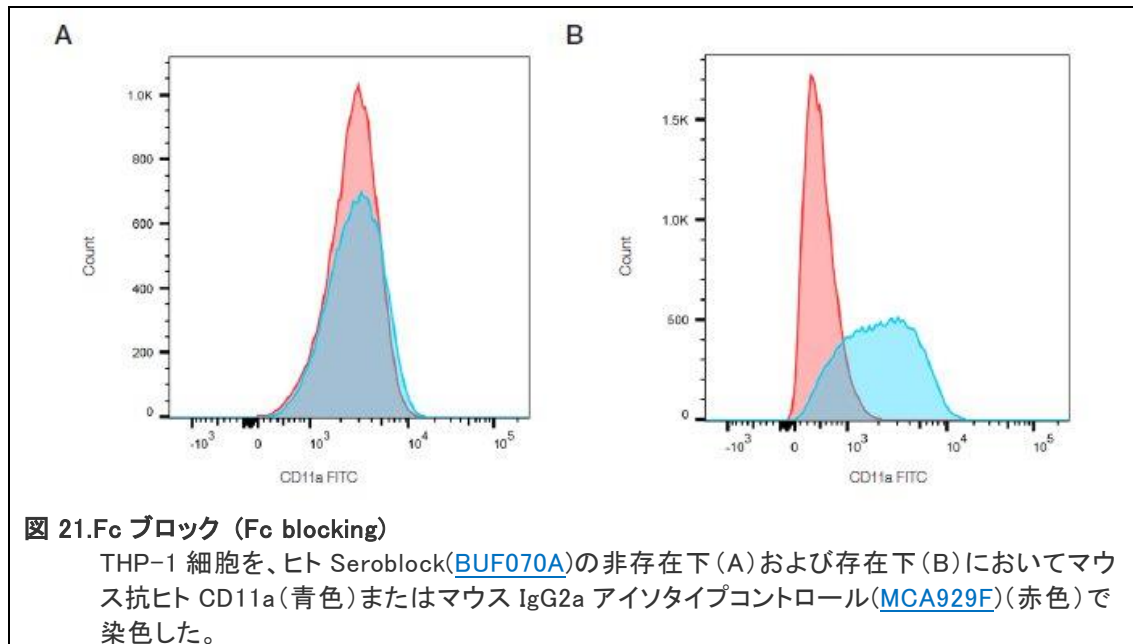
注: 同じドナーとアクセプターで作成されたタンデム蛍光色素であれば、同じ蛍光を持つように思うかもしれませんが、そうではありません。異なるメーカーやロット(Lot)が異なる場合、タンデム蛍光色素は、異なる蛍光色素として扱うべきであり、これらの蛍光色素のそれぞれについて漏れ込みの量が異なる可能性があるため、別々の単一の色素で染色したコントロールを使用する必要があります。

2. コンペンセーションは、陽性集団および陰性集団を用いて実施する必要があります。個々のコンペンセーションコントロールがビーズであったり、実験で使用された細胞、または異なる細胞であったとしても、コントロール自体には、同等なレベルの自家蛍光を持っている必要があります。コンペンセーションコントロールのセット全体としては、ビーズまたは細胞の個々のサンプルを含むことができますが、個々のサンプルは、蛍光色素と同じキャリア粒子を有しなければなりません。
3. コンペンセーションコントロールはサンプルと同じ蛍光色素を使用する必要があります。例えば、GFP および FITC の両方は、ほとんど緑色の光を発しますが、発光スペクトルは大きく異なります。それゆえ、一方をサンプルとして使い、コンペンセーションコントロールに他方を使うということとはできません。
4. ソフトウェアが統計的に有意な漏れ込みとして判断するには、十分なイベント数を収集する必要があります。陽性集団と陰性集団の両方について約 5,000 イベントが理想的ですが、必要に応じてより少ないイベントが使用できます。

Fc ブロッキングコントロール([Fc Blocking Controls](#))

Fc 受容体は、単球やマクロファージ、樹状細胞、B 細胞表面上に存在します。名前からわかるように、それらは抗原特異的な Fab ドメインではなく、それらの定常 Fc ドメインを介して抗体に結合します。

こうした Fc 受容体への抗体の結合は、偽陽性や無意味なデータの生成につながる可能性があります。このような非特異的結合を防ぐために、染色プロトコールに追加して抗原特異的結合のみが確実に観察されようにする Fc ブロッキング試薬(例えば、[ヒト Fc Seroblock](#) および [マウス Fc Seroblock](#))が開発されています。



FMO コントロール([Fluorescence Minus One Controls](#))

FMO (Fluorescence minus one) コントロールは、マルチカラーフローサイトメリーパネルを構築する際に重要です。これらのパネルは、ゲートの設定箇所を決めるのに役立ちます。これは、陰性集団と陽性集団を同定する場合や発現量が低い場合に特に重要です。データを取得する際、特により明るい蛍光色素で蛍光が広がり、これは、特にコンペンセーションおよび複数のレーザー光源による励起の後に顕著です。慎重に実験をデザインし、大きく広がって漏れ込むチャンネルを避けることは、こうした影響を減らすことに役立ちますが、それでも FMO のコントロールは重要です。

FMO コントロールは、すべての蛍光色素から 1 つの蛍光色素を除いて染色された実験細胞です。

FMO の例(FMO Examples)

FMO マトリックスの例を下の表 4 に示します。図 22 は、他のチャンネルからの蛍光の広がりがどのようにデータに影響を与え、蛍光の広がりを考慮してゲートを配置できるかを示しています。

FMO コントロールは、新しいマルチカラー実験を始めるときに、パネル内のすべての蛍光色素に対して行う必要があります。これにより、蛍光色素を除いたチャンネルに他の蛍光色素が広がっているかどうかを評価し、それに応じてゲートを設定することができます。

表 4. FMO Matrix

Tube	FITC	PE	PE-Cy5	PE-A750
Unstained	–	–	–	–
FITC – FMO	–	+	+	+
PE – FMO	+	–	+	+
PE-Cy5 – FMO	+	+	–	+
PE-A750 – FMO	+	+	+	–

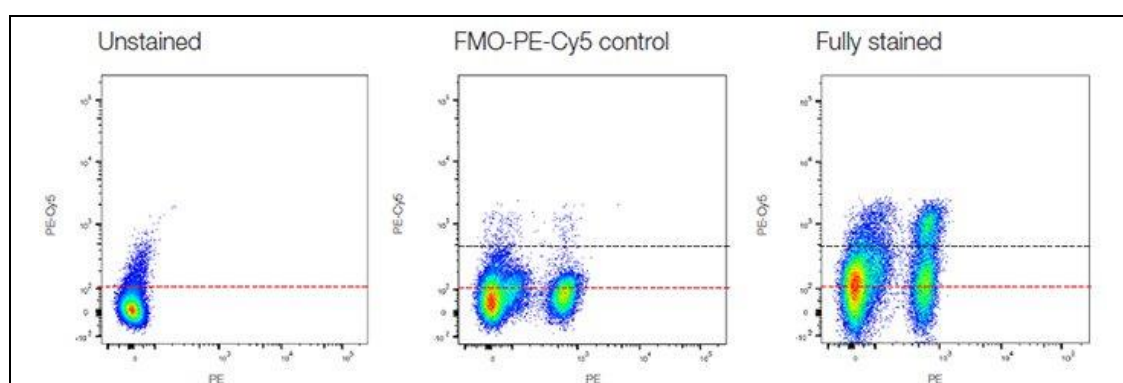


図 22. FMO コントロールによる蛍光の広がりの測定

(FMO controls to determine fluorescence spread)

未染色コントロールと比較して FMO コントロールによって示される PE-Cy5 チャンネルへの蛍光の広がりを示すマルチカラーフローサイトメリーのドットプロット。黒い点線は、赤色の染色されていない境界と比較した FMO ゲーティング境界を表す。

細胞内染色コントロール([Intracellular Staining Controls](#))

細胞内の染色の場合は、固定化および透過処理を必要としますが、そうした処理は、抗原検出、自家蛍光、蛍光色素の明るさおよび細胞形態に影響を与えることがあります。このため、細胞内染色のコントロールには、刺激/ブロック実験および陰性/陽性コントロールなどといった生物学的コントロールとなりますが、詳細は後述します。

細胞内染色を最適化する方法については、[細胞内染色のヒントページ](#)をご覧ください。Tip and Tricks の PDF をご参照ください。

[Tips and Tricks Intracellular flow cytometry](#)

(<https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2015/flow-protocol/tips-and-tricks-for-intracellular-flow-cytometry.pdf>)

生物学的コントロール([Biological Controls](#))

染色およびアイソタイプコントロールに加えて、染色特異性および実験的限界を決定するための生物学的コントロールも検討する必要があります。どのような染色でも重要ですが、より高いバックグラウンド蛍光があることがある細胞内染色では重要です。コントロールとしては、他にも既知の陰性サンプルおよび既知の陽性サンプルがあります。

次のような例があります：

- 文献から既知の目的の抗原の発現を発現するかまたは発現を欠く細胞
- RNAi または CRISPR 技術を用いて、抗原がノックダウンまたはアウトされた細胞でネガティブ細胞を産生する
- トランスフェクションによって目的タンパク質を過剰発現した細胞は陽性コントロールとして使用されます。
- サイトカイン放出測定などのいくつかの実験では、刺激なし、および完全に刺激されたサンプルは、陽性結果および蛍光染色のダイナミックレンジの両方を決定するために重要です。

第 5 章 実験の最適化

フローサイトメトリーの利点の 1 つは、レーザーを通過する際に単一の粒子を測定できることです。サンプルの質が悪い場合は測定したデータの質も悪くなる可能性があります。この章では、生存率が高い細胞懸濁液を確実に得るためのサンプルの調製と処理方法について記載します。

サンプル調製([Sample Preparation](#))

フローサイトメトリーを最適化するためのサンプル調製については、多くの注意すべき点があります。最初に出発材料(サンプルソース)が挙げられます。例えば、凍結保存しておいた細胞は、培養容器から回収した直後の細胞とは異なる方法で処理する必要があるなどです。それでも、ほとんどのサンプルには実験を最適化するのに役立ついくつかの基本的なルールがあります。

1. 細胞を凍結保存していた場合は、可能な限り迅速に細胞を解凍し、BSA または FCS (Fetal Calf Serum:牛胎児血清)を含む大量の低温培地または PBS に再懸濁することによって DMSO を除去する。抗原の発現を回復するために、解凍後に細胞を培養する必要がある場合もあります。
2. 接着細胞は、継代の際よりも穏やかな処理が必要な場合があります。トリプシンはしばしば細胞を破壊し、細胞片(debris)をたくさん作り、抗原を破壊する厳しい処理です。単細胞浮遊液を作製するには、さらに穏やかな方法が必要とされることもあります。
3. 脾臓やリンパ節などの組織を機械的に分散する際、過度に強くしないように注意してください。サンプルをフィルター処理することで、不要な細胞の塊を取り除くことができます。
4. 二次リンパ組織から、F4/80 陽性マクロファージや濾胞性樹状細胞などを抽出する場合は、コラゲナーゼやリペラーゼのような酵素の添加が必要です。しかしながら、抗原が除去されてしまうこともあるので、最適化が必要な場合があります。
5. 不要物は除去します。例えば骨から骨髓を洗い出すときは、できるだけ多くの筋肉を除去してください。再度フィルター処理することで、不要な骨や筋肉を取り除くことができます。
6. 末梢血に添加する適切な抗凝固剤を選びます。細胞内サイトカインやインテグリンのような Ca^{2+} イオンを必要とするいくつかの表面マーカーを検出する場合には、EDTA は使用しないでください。
7. 末梢血サンプルからの赤血球の除去は、赤血球溶解緩衝液([BUF04B](#))を用いた低張溶解を使用によって行うことができます。サンプルをバッファー中で長時間放置しないように注意してください。あるいは、密度勾配遠心分離を使用することができます。遠心分離後、白血球は高密度液体の界面に捕捉され、赤血球は通過します。ただし、顆粒球も界面を通過するので、そうした細胞を目的とする場合には、この方法は適していません。
8. ボルテックスや過剰な遠心分離を避け、沈殿した細胞を乾燥させないように注意してください。再懸濁する際の過剰の泡立ちや、高濃度での懸濁は、細胞死を増加させます。細胞を氷上に保つことは、壊死や細胞代謝が低下するため、生存率を高めます。
9. 細胞を調製するのにかかる時間が細胞の生存率に大きな影響をおよぼすことがあるため、すべてのサンプル調製はできるだけ手早くする必要があります。

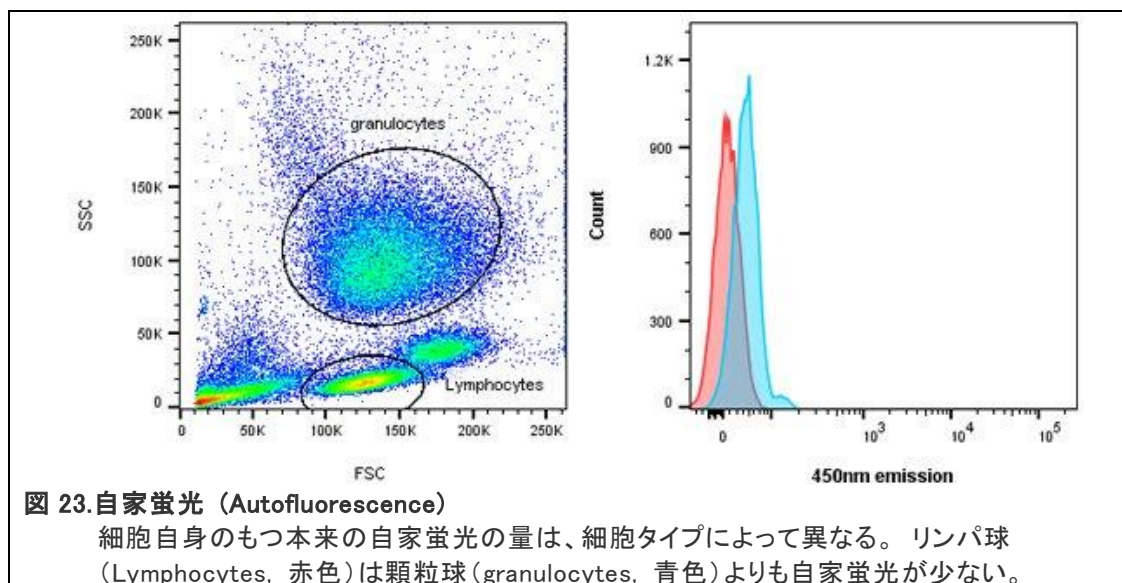
自家蛍光(Autofluorescence)

細胞は自家蛍光と呼ばれる自然なレベルの蛍光を有し、これはフローサイトメリーデータ解析において問題となることがあります。細胞の自家蛍光は、コラーゲンおよびエラスチン、NADPH およびリボフラビンなどの環状化合物、芳香族アミノ酸、およびミトコンドリアやリソソームなどの細胞オルガネラの存在に起因します。細胞内の蛍光レベルは、蛍光を生じるこれらの細胞性化合物および細胞小器官のレベルの変動のために変化することがあります。一般に、より大きな細胞およびより顆粒状の細胞は、蛍光化合物がより多く含まれるため、自家蛍光が増加します。

自家蛍光波長(Autofluorescence Wavelengths)

大部分の自家蛍光は、より短い波長である最大吸収 350～500nm で励起され、350～550nm で蛍光を発します。これは、488nm レーザーで励起され、FITC 同様の範囲で蛍光を発する多くの化合物を含む哺乳動物細胞に特に顕著です。シグナル/ノイズ比(SNR: Signal to noise ratio)が低下して感度が低下し、偽陽性が検出されやすくなるため、これらの波長領域では自家蛍光が問題となることがあります。さらに、他のチャンネルへの自家蛍光の漏れ込みは発現量の低いものを隠してしまうことがあります。

自家蛍光のレベルは、未染色コントロールを用いて決定することができます。より長い波長側では自家蛍光が少なくなるので、600nm を超える蛍光を発する蛍光色素は自家蛍光の干渉が少なくなります。非常に明るい蛍光色素を使用することでも自家蛍光の影響を低減することができます。

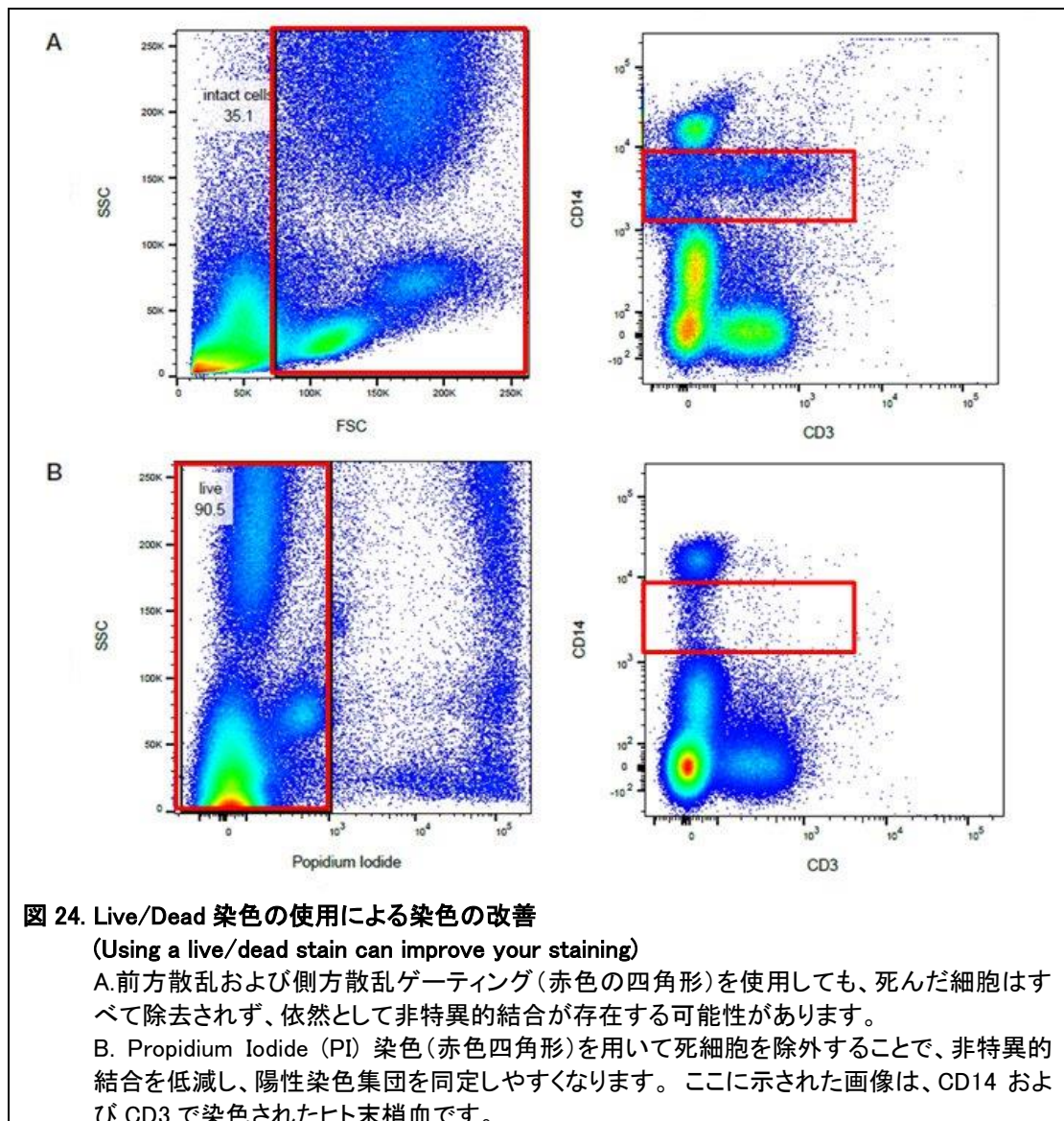


死細胞除去(Live/Dead Exclusion)

サンプル中の死細胞の存在は染色性に大きく影響し、さらにはデータの品質にも影響します。これは、死細胞がより強い自家蛍光を発し、非特異的な抗体結合も多いため、偽陽性(False Positive)の原因となり、ダイナミックレンジ(Dynamic Range)を減少させるためです。そのため、弱陽性のサンプルや存在比率の少ない集団の同定を困難にします。前方散乱光(FSC)と側方散乱光(SSC)に基づいたゲートを使用することで、細胞片(debris)や死細胞を取り除くこともできますが、すべてを除去はできません。このため、死細胞と生細胞を区別するための色素が開発されています。

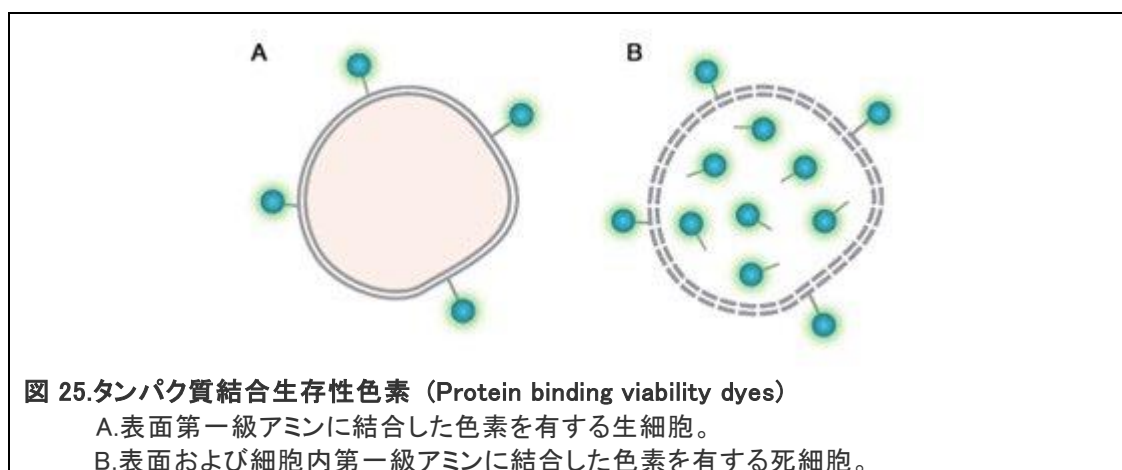
核酸結合色素(Nucleic Acid Binding Dyes)

生存率試薬のグループの一つは、核酸結合色素です。このグループには 488nm および 561nm レーザーの両方によって励起可能な Propidium Iodide (PI) および 7-AAD が含まれます。それらは二本鎖核酸に結合すると蛍光を発します。これらの色素は膜透過性ではないため、生細胞では排除されます。抗体での染色後、サンプルに直接添加し、簡単にインキュベートすることで細胞に取り込まれます。次いで、染色されていない集団(生細胞)をゲーティングすることで、死んだ細胞は解析対象から除去されます。この方法は、生きた細胞の細胞膜が色素を通さないことによるため、固定処理をしたサンプルには使えません。



タンパク質結合色素(Protein Binding Dyes)

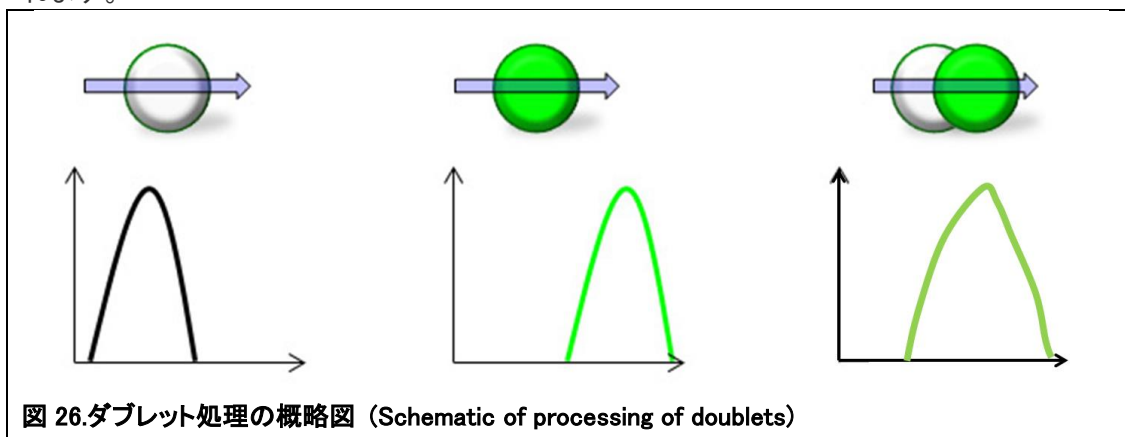
サンプルから死細胞を区別するために利用可能な生存性色素(Viability Dye)の 2 つめのグループは、DNA 結合色素ではなくタンパク質に共有結合する色素です。これらの色素は、生細胞と死細胞の両方に結合します(図 25)。しかし、死細胞や死にかけている細胞は細胞膜が傷ついているため、色素が細胞内に浸透してより多くの量のタンパク質と結合するため、より高い蛍光を発します。DNA 結合色素と同様に、染色されていない集団(生細胞)をゲーティングすることによって、死細胞を除去することができます。



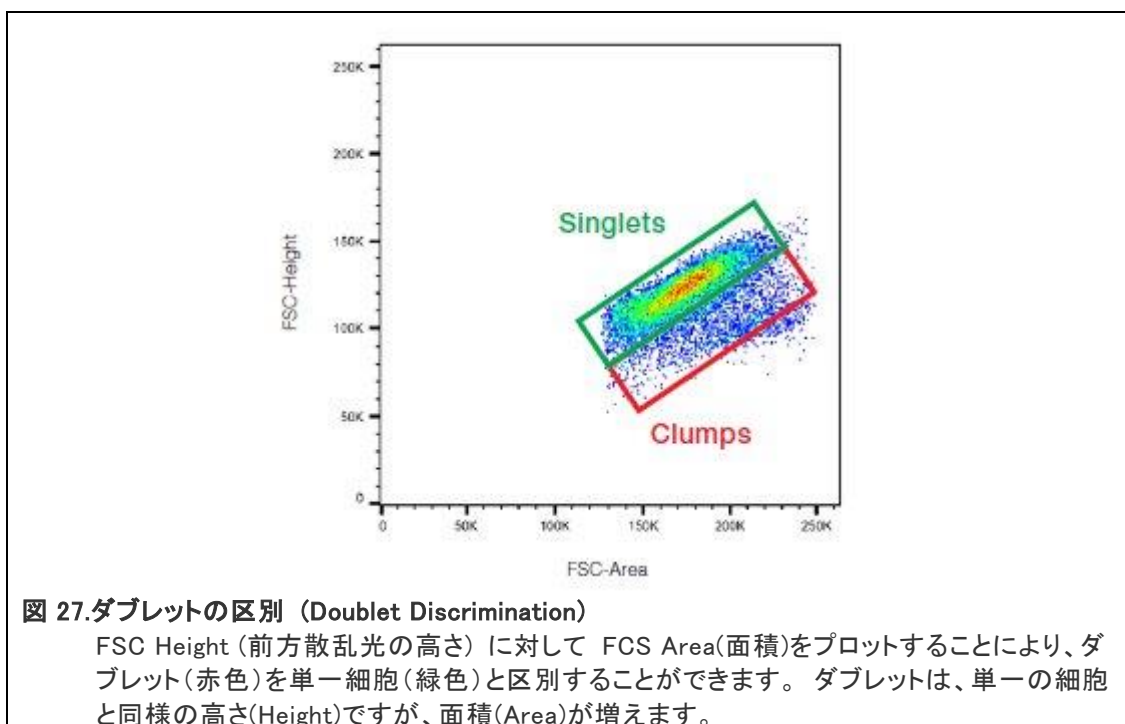
これらの色素の利点は、色素がタンパク質に共有結合するため、生細胞と死細胞との間の分解能を低下させることなく染色後の細胞の固定や洗浄を行うことができます(細胞を固定処理しないで使用することもできます。)。さらに、DNA 結合色素よりも幅広い励起および蛍光スペクトルの製品を選択できるため、マルチカラーフローサイトメトリーパネルへ組み込み易いことも挙げられます。

ダブレット除去(Doublet Discrimination)

名前からもわかるように、ダブレット (Doublet) の除外は、単一の細胞を数え、解析から凝集細胞 (ダブレット) を除外することです。これは、セルソーティング、細胞周期および DNA 解析において重要です。蛍光陽性および陰性細胞を含むダブレットがレーザーを通過すると (図 26)、解析とセルソーティング実験の両方で偽陽性につながる陽性パルスが検出されます。



ダブレット除去は、前方散乱または側方散乱の領域に対して高さ(Height)または幅(Wide)をプロットすることによって行われます (図 27)。ダブレットは、単一細胞(single cell)の面積と幅の値は 2 倍になりますが、高さはほぼ同じです。したがって、高さに対して幅もしくは面積(Area)をプロットすることでダブレットを識別することができます。



ダブレット除去は、細胞周期解析においても重要です。Propidium Iodide(PI)のような DNA 色素で DNA 量を評価するため、DNA 量が 2 倍になっている細胞とダブレットを区別することが重要になるのです。幸いにも、高さまたは幅を面積に対してプロットすると、4n 量の DNA を含む単一細胞からダブレットを区別することができます。4n 量の DNA を含む細胞は、面積と高さの値が 2 倍ですが、その幅は 2n 量の DNA を含む細胞とほぼ同じです。

データ収集([Cell Collection](#))

統計的に有意な結果を得るために解析時にデータ収集すべき細胞数は、目的細胞のサンプル中の存在比率によって大きく異なります。ヒト末梢血で全単核細胞の約 20%を占める T 細胞などの豊富な細胞型のサンプルの場合は、存在比率が低い NK 細胞(約 5%)を解析する場合よりも少ない細胞数で染色する必要があります。下表は、サンプル中の細胞の存在比率がデータ収集された細胞数にどのように影響するかの例を示しています。

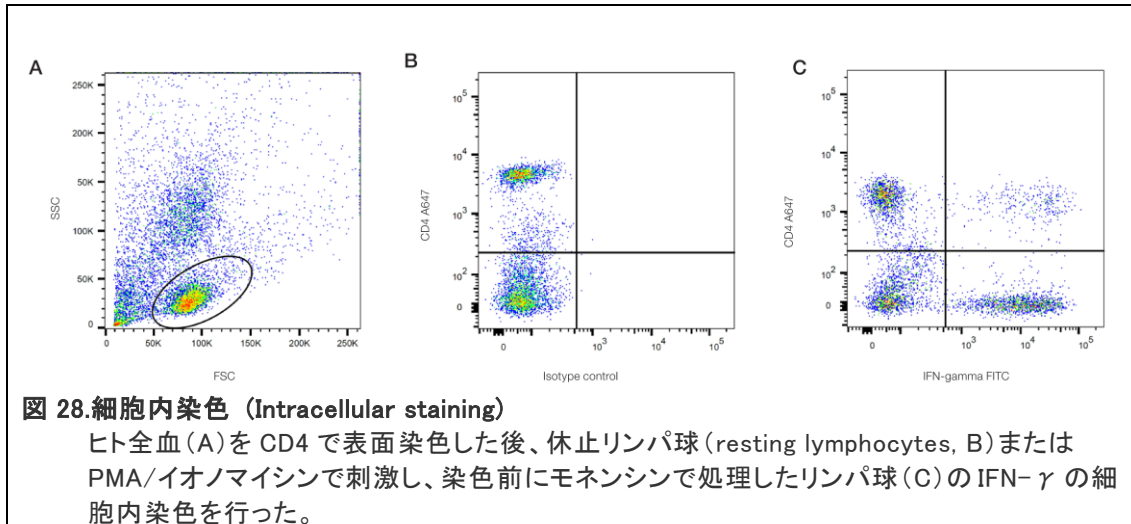
表 5. :細胞存在比率(Cell Frequency)

サンプル中の総細胞数	存在比率	データ収集される細胞数
1,000,000 (1×10^6)	10%	100,000
1,000,000 (1×10^6)	1%	10,000
1,000,000 (1×10^6)	0.1%	1,000

細胞の存在比率に加えて、細胞サブセットを見るために使用されるマーカーの数は、検出される必要がある細胞数に影響し得ます。同時検出するマーカーが増えると、より多くの細胞が必要となります。最後に、正しいコントロールを分析して、バラツキの程度を確認し、陽性または陰性を設定することも非常に重要です。十分なイベントを収集するためのより詳細な情報は、M Roederer の Cytometry Part A の記事([Roederer M \(2008\). How many events is enough? Are you positive? Cytometry, 73A:384–385](#))に記載されています。

細胞の透過処理と固定([Permeabilization and Fixation](#))

標識抗体のような大きな分子は細胞膜を通過して、細胞内部に入ることができないため、サイトカインなどの細胞内抗原には固定化・透過処理が必要になります。細胞内抗原の染色にはまず、細胞を懸濁液中で固定し、次に抗体を添加する前に透過処理を行う必要があります。固定液の選択は重要なステップです。ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドはリジン残基間を結合することで、タンパク質を架橋します。ただし、グルタルアルデヒドは自家蛍光を増加させます。サンプルにより異なりますが、通常 PBS 中に 0.5~4%の濃度で使用されます。長期間サンプルを保管する場合は 1-2 時間後には固定液から細胞を取り出す必要があります。ホルムアルデヒド固定処理ではサンプルの透過性は上がらないため、透過処理を別に行う必要があります。透過処理により、標識抗体などのプローブは、細胞の形態学的な特性を損なわずに細胞内構造にアクセスすることが可能になります。Triton やジギトニン、サポニン、細胞膜を破壊することによって作用する透過化試薬です。透過処理の度合いは重要で、例えば、細胞質と核内のように抗原の局在性によって異なるレベルの透過処理が必要ですし、また、結合しなかった抗体が細胞から十分に洗い流される必要があります。[Leucoperm™](#)(図 28)のように、固定化と透過化の両方を行うための試薬も市販されています。



固定剤としてのアルコール (Alcohols as Fixatives)

アルコールもまた固定剤としても使用されます。通常、冷 70% 溶液で用いて、タンパク質を変性させることによって固定します。利点としては、細胞膜も透過性になり、4°C や -20°C での長期保存に適していることです。しかしながら、アルコール固定による変性プロセスによって、抗原のエピトープがマスクされることがあるので、実験条件の最適化が必要なことがあります。DNA 解析では、アルコールは最も一般的に使用される固定剤です。

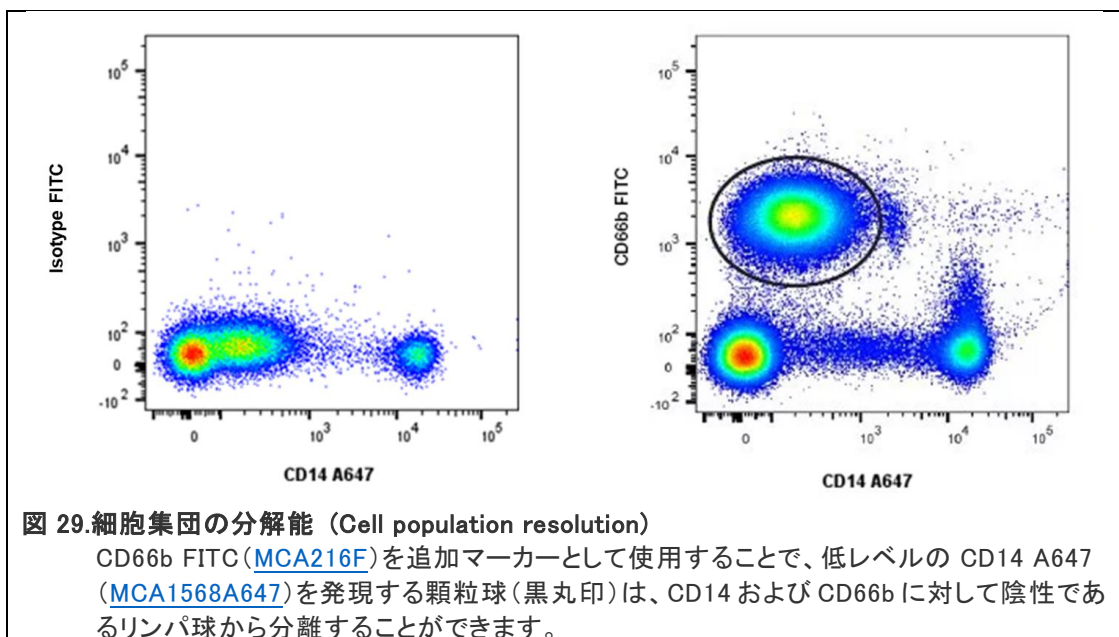
第 6 章 マルチカラーパネル構築

複雑なマルチカラーパネルを構築するのは困難です。この章では、マルチカラーパネル実験を設計・構築するために従わなければならない基本的な規則をいくつか示します。

シグナルの分解能 ([Resolution of Signal](#))

マルチカラーフローサイトメトリーとは、1 つのサンプルに対し、複数の蛍光パラメーターを用いて分析することを言います。細胞表面マーカーや細胞内マーカー、DNA あるいは、それらすべてを組み合わせる場合もあります。意味のある結果を得るためには、適切なコントロール(第 4 章参照)を設定し、実験手順の最適化(第 5 章参照)し、慎重にサンプル準備をすることに加え、考慮すべき事項があります。パネルに追加した蛍光色素が別の蛍光色素に影響する可能性があるためです。その結果、追加のチャンネルによる余分な蛍光を補正(コンペンセーション, 第 2 章参照)することが必要となり、また、分解能が低下します。非特異的な染色や高いバックグラウンド染色、細胞の自家蛍光や漏れ込みによる高レベルのノイズは、感度および分解能の低下を引き起こします。

分解能とは、機器の性能であるとともに、陽性集団と陰性集団とを区別するための蛍光色素の組み合わせのこととも言えます。最適な分解能を得るためには、すべてのパネルデザインの基本を形成するのに役立つ簡単なルールがいくつかあります。必ずしも完璧なパネルが構築できない場合もありますが、これらのベストプラクティスルールに従うことで、不適切な組み合わせの蛍光色素を選んでしまうという誤りを減らし、確実なサンプルが得られます。



機器の構成 (Instrument configuration)

パネルの構築を始めるには、まず機器のシステム構成(Configuration)を理解することが重要です。理論的に最適であるかどうかに関わらず、装置が測定できない蛍光色素は使用できません。装置の構成とは、フローサイトメーターに搭載されているレーザー、光学系およびフィルターの構成です。これはサイトメーターによって大きく異なる可能性があります。例えば、バイオ・ラッドの S3e™ Cell Sorter は最大で 2 本のレーザーと 4 つの蛍光検出器を搭載できますが、ZE5™ Cell Analyzer は最大 5 本のレーザーと、27 個の蛍光検出器を搭載する拡張性があります。

設計上の基本ルール(Basic Design Rules)

パネルを構築するには、目的とする細胞集団を同定するために必要な情報をできるだけ限り明確にしておくことが非常に重要です。例えば、特定の細胞型を対象とするのか、あるいはサブセットであるのか、また、活性化マーカーや細胞存在比率の変化を見るのか、複数のマーカーが共発現しているのか、あるいは発現パターンがわかっているのかなどです。

蛍光色素分離(Fluorophore Separation)

マルチカラーパネルを構築する場合、理想的には複数のレーザーによって励起される蛍光色素がないよう、また可能であれば、複数の検出器にまたがって検出される蛍光を発するような色素がないように分離することが最善です。そうすることにより、漏れ込みやそれに伴い必要となるコンペンセーションが最小限に抑えられます。また、蛍光の広がりデータにおよぼす影響を減らします。しかし、パネルの蛍光色素の数を増やしてゆくと、こうしたことは必ずしも可能ではありません。したがって、パネルのデザインにおいては、他にも考慮する必要があります。

抗原密度(Antigen Density)

相対的な抗原密度は、蛍光色素を選ぶ際に非常に重要です。一般的なガイドラインとして、明るい蛍光色素(例えばPE)を低発現マーカーに割当て、暗い蛍光色素(例えばパシフィックブルー:PB)を高発現マーカーに割り当てるのが最良です。明るい色素からの蛍光の広がり、近くのチャネルの低発現の蛍光シグナルを隠してしまいます。蛍光色素を適切に選択することは、見たい細胞集団を分離することに役立ちます。

蛍光特性(Fluorophore Properties)

色素の蛍光特性も考慮が必要です。特に、複数レーザーによる励起に注意する必要があります。例えば、APC は 405 nm レーザーと 640 nm レーザーの両方で励起されます。蛍光色素の相対的な明るさに加えて、それらの蛍光スペクトルが重要です。一般に、明るい蛍光色素はより大きな広がりを持ち、より長い波長でより顕著です。またタンデム蛍光色素は複数のレーザーに対して柔軟なマルチプレックス(多色)化を可能にしますが、特別な注意を払う必要があります。ドナー色素からの発光の可能性も考慮する必要があります。例えば、PE を用いたタンデム蛍光色素の場合、578nm に PE からのある程度の発光があるかもしれません。アクセプターの励起と発光も考慮する必要があります。またタンデム色素は、光と固定処理に敏感なため、注意深く分解を避けるように取り扱うことが推奨されます。さらに、ドナー分子に対するアクセプター色素の割合の違いに起因するロット間のバラツキがあり得ます。タンデム色素は細胞内染色には適していない可能性があります。そのため、マルチプレックスパネルに細胞内分子が含まれている場合は、可能であれば他の蛍光色素を使用することをお勧めします。

マーカー発現パターン(Marker Expression Patterns)

蛍光の漏れ込み(Spillover)や広がりの効果を減らす一般的な方法の 1 つは、抗原の発現パターンに基づいて蛍光色素を慎重に選択することです。これは、相互に排他的なマーカー(例えば、CD3 および CD19)上に漏れ込みを有する蛍光色素を割り当てることで行うことができます。この場合、漏れ込みの影響は簡単に補正(コンペンセーション)することができます。反対に、同時発現するマーカーについては、漏れ込みが最小となるような蛍光色素の組み合わせを選択すべきです。これは、活性化マーカーに見られるような発現パターンが連続している抗原の場合にも当てはまるはずです。漏れ込みの影響を最小限に抑える別の方法は、親子孫ルール(parent descendant rule)を使用することです。これは、マーカーが発現したとしても、相対的な量が重要ではない場合や、漏れ込みがあったとしても重要ではない場合です。例えば、T 細胞の CD3 チャネルへの CD4 蛍光の漏れ込みがあります。すべての T 細胞は CD3 を発現しているので、CD4(ヘルパーT 細胞マーカー)の蛍光が漏れ込むことは重要ではありません。

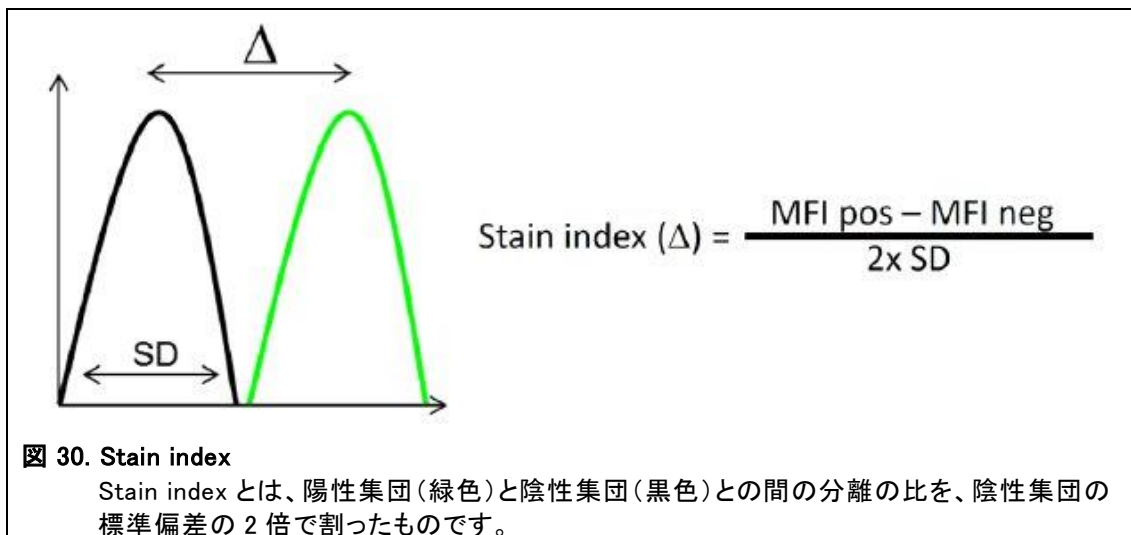
ダンプチャンネル(Dump Channels)

特定の細胞集団に特に興味がない場合は、ダンプチャンネルを作成することができます。ダンプチャンネルは、その名前が示唆するように、不要なサンプルを無視されるチャンネルに配置することによって除去します。これは、必要でない細胞がすべての細胞を1つの蛍光色素で標識することによって除外することができるので、造血幹細胞のような存在比率の少ない細胞を見る場合に特に有用です。これを行う最も簡単な方法は、ビオチン化された一次抗体と、ダンプチャンネルに使用されている色素が結合したstreptavidinを使用することです。生存率染色も、ネガティブが生存細胞となるため、このチャンネルに含めることもできます。不要な細胞集団を除去するもう一つの方法は、捕捉後のゲーティングを注意深く行うことです。前方散乱または側方散乱、またはマーカーの発現に基づいて、細胞が出現すべき場所がわかっている場合、細胞を除外することができます。不要な細胞を取り除くことで、それらの細胞に起因する望ましくない結合や蛍光の漏れ込みや広がりも除去されます。これは、骨髓細胞を見るときに特に有用です。しかし、目的とする細胞が除去されないように注意して実行する必要があります。

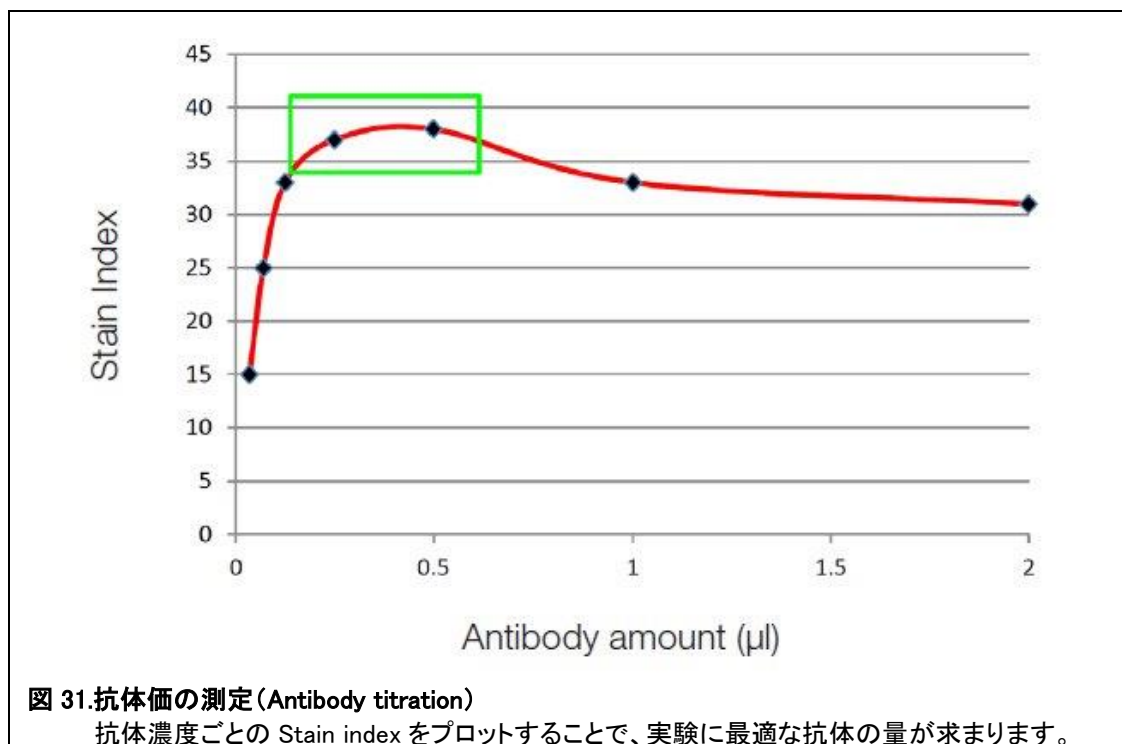
抗体価の測定(Antibody Titration)

マルチカラーパネルを構築する際のもう一つの重要な考慮すべき事項は、抗体価の測定(Antibody titration)です。過剰な抗体は、低親和性であっても結合し、分解能を低下させるバックグラウンドシグナルとなり、結果があいまいになります。加えて、大過剰な抗体は、偽陰性プロゾーン効果(False Negative Prozone Effect)を生ずることがあります。したがって、特定のサンプルに必要な抗体量を決定することが重要です。アイソタイプコントロールを使用する場合は、必ず同じ濃度で使用してください。最良の抗体濃度を決定するために、陰性集団の標準偏差の2倍で割った陽性集団と陰性集団との間の分離の比として定義される染色指標(Stain index: SI)を目安として使用することができます。

(*)：プロゾーン効果(現象)：抗体または抗原のいずれかが過剰な時、特異抗原と抗体の反応が起こらなくなる現象およびそれによる偽陰性の効果



抗体価の測定(Antibody Titration)では、同じ数の細胞を同じ容量で染色するまで抗体を希釈します。最良の Stain index を表す希釈は、使用するための希釈です。以下のグラフでは、緑色のボックス(図 31)内の点は、最小量のバックグラウンドで特定の染色が可能な最良の濃度を表しています。したがって、抗体価の測定により、実験を改善することができ、メーカーの指示書に記載されている濃度より少ない抗体濃度を使用することでコスト削減にもなります。



パネル構築用ツール (Panel Building Tool)

パネル設計に役立つ便利なツールがあります。スペクトルビューアは、各レーザーの漏れ込みと励起の量を調べるのに役立ちます。[相対輝度テーブル](#)は、蛍光色素とターゲットの組み合わせに関する情報を提供し、マーカー発現データは発現パターンを決定するのに役立ちます。パネル構築のウェブサイトはパネル設計に役立ち、最適化されたマルチカラー免疫蛍光パネル (OMIPS, Optimized multicolor immunofluorescence panels) の例も公開されており、パネルデザインにも役立ちます。

最後に、蛍光色素の利用可能性、使用するサイトメーター、使用している細胞、および利用可能な抗体のために妥協せざるをえない場合があることを覚えておいてください。複数のパネルを組み合わせることが必要な場合がありますが、これらのルールに従えば、必要な時間と労力を削減できます。

<Web 上の参考資料>

- Multicolor Panel Builder (Bio-Rad)
<https://www.bio-rad-antibodies.com/multicolor-flow-panel-designer.html>
- Cell Marker (Bio-Rad)
Human <https://www.bio-rad-antibodies.com/human-immune-cell-markers-selection-tool.html>
Mouse <https://www.bio-rad-antibodies.com/mouse-immune-cell-markers-selection-tool.html>
- 蛍光相対輝度
Antibodies Conjugated to Fluorophores
<https://www.bio-rad-antibodies.com/static/2015/dylight-dyes/antibodiesconjugatedtofluorochromes.pdf>

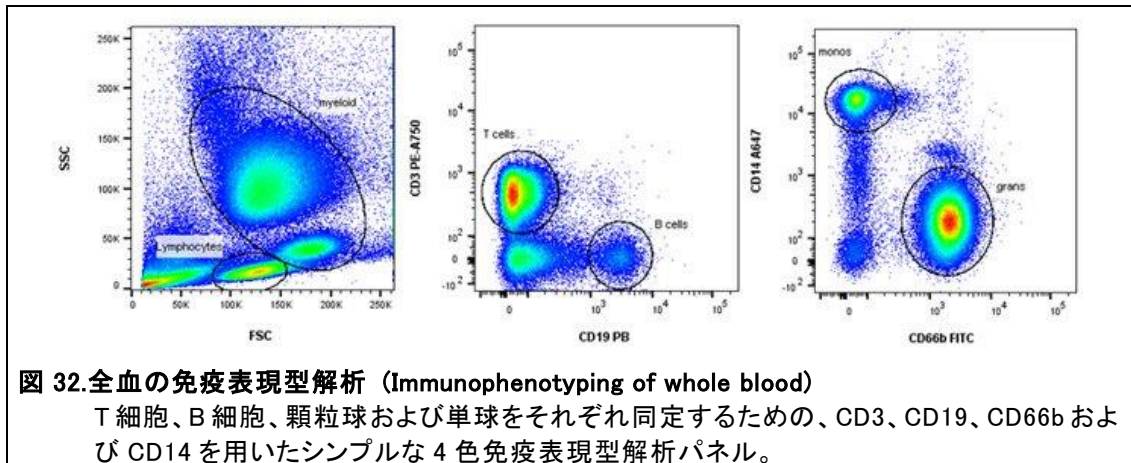
第 7 章 フローサイトメトリーの用途

フローサイトメトリーには様々な用途があります。本章では、フローサイトメトリーで現在使用されている一般的な技術について、粒子同士を区別するものから、いくつかの最近の技術までを簡単に説明します。

免疫表現型解析(Immunophenotyping)

フローサイトメトリーの最も一般的な用途は、細胞マーカーの同定、特に免疫系や免疫表現型解析(Immunophenotyping)です。免疫系の多数の細胞サブセットを検出することが求められており、そのことが、マルチカラーフローサイトメトリーの普及につながりました。

免疫表現型解析(図 32)では、単一マーカーによる細胞の単純な同定から、ホーミングプロファイル(homing profile)や、活性化状態およびサイトカイン放出を 1 つのパネルに用いるような複雑な同定手法を用います。結果として、細胞の表面および細胞内染色の組み合わせた実験プロトコールが多く使われます。免疫表現型解析は、基礎研究に加え、現在、臨床診断においても、疾患を診断したり、治療予後をモニタして評価するために日常的に使用されています。表面染色を用いた免疫表現型解析の簡単な例を以下に示しました。シンプルな 4 色染色パネルは、コンペンセーションを必要としないマーカーにより、ヒト末梢血中の 4 つの主要な細胞サブセットを同定するのに便利です。より複雑なパネルを用いることで、T 細胞のサブセットの情報が得られます。例えば、ヘルパー T 細胞(Th)、細胞傷害性 T 細胞(CTL)および制御性 T 細胞(Treg)には、CD4、CD8、CD25、CD127 といったマーカーを使います。また、それらが、ナイーブであるのか、メモリーまたは活性化されているかは、CD45RA、CD45L、CD62L、CD69 および HLA-DR などのマーカー、あるいは、IFN- γ 、IL-2、IL-17、IL-9 などのサイトカインプロファイルを使います。どのようにして 18 色のパネルを構築するのか、マルチカラーパネル構築については、第 6 章を参照してください。

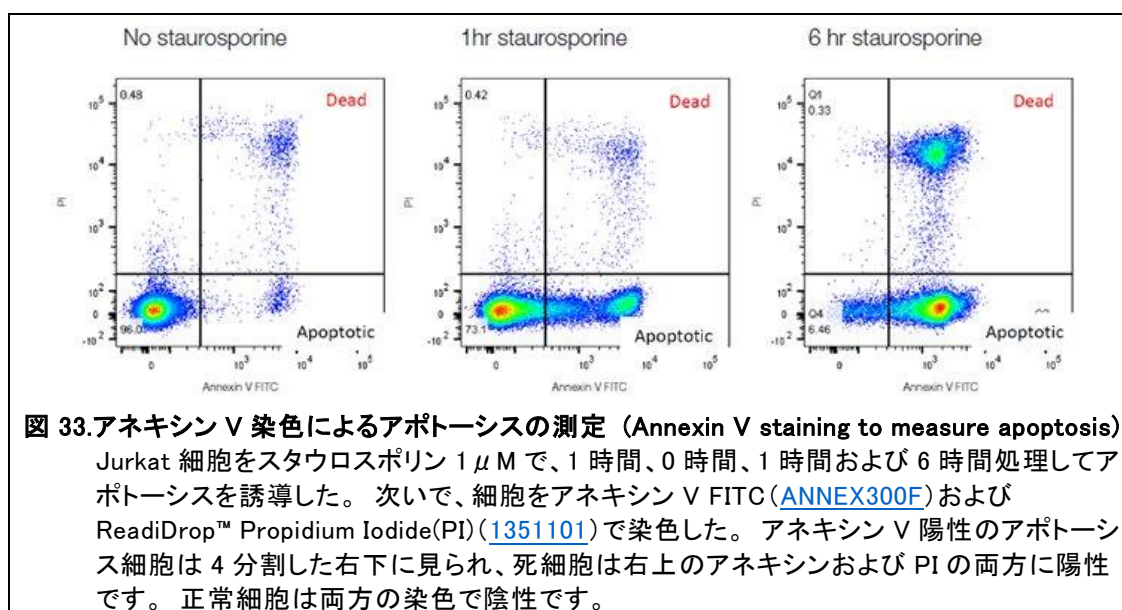


アポトーシス(Apoptosis)

アポトーシスは、形態学的および生物学的変化を伴う、高度に調節されたプログラムされた細胞死のプロセスです。このプロセスは胚発生や生物の大きさの維持、損傷細胞や異常細胞の排除に重要な役割があります。異常なアポトーシスによって引き起こされる疾患も多く、ヒトの健康においても、アポトーシスの重要性が注目されています。アポトーシスの調節不全は、様々な癌や神経疾患、心臓血管障害、自己免疫疾患に関係しています。

アポトーシスの測定 (Measuring Apoptosis)

フローサイトメトリーで測定できるアポトーシスの最も一般的な特徴の1つは、正常細胞では細胞膜の内膜に見出されるリン脂質ホスファチジルセリン(PS)の、外膜への露出です。アネキシン V はホスファチジルセリンに結合するため、蛍光色素で標識したアネキシン V (Annexin V) で評価することができます。その際、アポトーシス細胞とネクローシス(壊死)細胞を区別するため、Propidium Iodide(PI)などの生存率判別色素と組み合わせ使用します。正常細胞は両方のマーカーで陰性であり、アポトーシス細胞はアネキシン V に対して陽性、ネクローシス細胞は両方のマーカーに対して陽性です。Jurkat T 細胞をスタウロスポリン(Staurosporine)で処理すると、アポトーシスが起こり、続いてネクローシスが起こります。図 33 のタイムコース実験では、アポトーシス処理して1時間後にアネキシン V の染色が増加し、続いて6時間後のネクローシス細胞が増加することを示しています。



細胞がミトコンドリア外膜透過化 (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization) 後のアポトーシスの段階に至るまでは、ホスファチジルセリンの露出は動的で可逆的なプロセスであるため、アネキシン V 結合による方法では早期アポトーシスと後期アポトーシスと区別することができません。[pSIVA](#) (Polarity-sensitive indicator of viability and apoptosis) プローブは、ホスファチジルセリン(PS)に可逆的に結合し、PS が外膜から内膜にフリップするのに伴って、蛍光をオンオフするバイオセンサーです。処理条件の違いに応答するアポトーシス段階の違いをリアルタイムに比較できます。

その他の方法(Alternative Methods)

アポトーシスの後期に起こる DNA の断片化は、フローサイトメトリーによる Sub-G1 アッセイにより測定できます。アポトーシスの間に生じた約 180bp の小さな DNA 断片は細胞から漏出し、アポトーシス細胞の総 DNA 含量を減少させます。Propidium Iodide(PI)で DNA を染色すること

により、低二倍体アポトーシス細胞(hypodiploid apoptotic cells)を PI ヒストグラムにおける Sub-G1 ピークとして計測することができます。また、DNA マーカーによる染色は前方散乱シグナルが減少することと組み合わせることで細胞収縮の測定を可能とします。

初期のアポトーシスは、細胞のミトコンドリアの電位勾配の低下を評価する電位差感受性色素によっても測定することができます。これらの例には、テトラメチルローダミンメチルエステル (TMRE) テトラメチルローダミンエチルエステル (TMRM)、および JC-1 があります。これらの脂溶性色素は、非アポトーシス細胞のミトコンドリア内では凝集して、明るく蛍光を発します。ミトコンドリア膜電位が崩壊すると、色素はモノマー状態で細胞質に分散し、蛍光の低下と色調の変化をもたらします。これらの色素は、活性型カスパーゼの存在により蛍光を発する試薬、FLICA([fluorophore labeled inhibitor of caspase assays](#))や特定のカスパーゼに対する抗体のような他のアポトーシスマーカーと組み合わせることができます。

関連資料と製品(Resources and Products)

バイオ・ラッドでは、フローサイトメトリーやその他の一般的な抗体のアプリケーションに最適化した多くのリソースと製品を用意しています。アポトーシスとアポトーシス関連試薬について詳しく解説しています。

- Assessing Cell Health :Apoptosis (BioRadiations)
<http://www.bioradiations.com/assessing-cell-health-apoptosis/>
- Apoptosis
<https://www.bio-rad-antibodies.com/apoptosis-autophagy-antibodies-kits.html>

細胞増殖と細胞周期(Proliferation and Cell Cycle)

いくつかの手法を用いることで、フローサイトメトリーで細胞増殖を測定することができます。細胞の周期によって前方散乱と側方散乱に違いが表れますが、さらに正確な方法があります。その1つは、Ki67、MCM2 または PCNA のような増殖マーカーに対する抗体で染色することです。あるいは、細胞周期の S 期に DNA に取り込まれる BrdU で細胞をインキュベートすることもできます。組み込まれた BrdU は、蛍光標識抗 BrdU 抗体を用いて検出することができます。PI または DAPI などの DNA 染色と組み合わせると、S 期における細胞の相対的な割合を決定することができます。

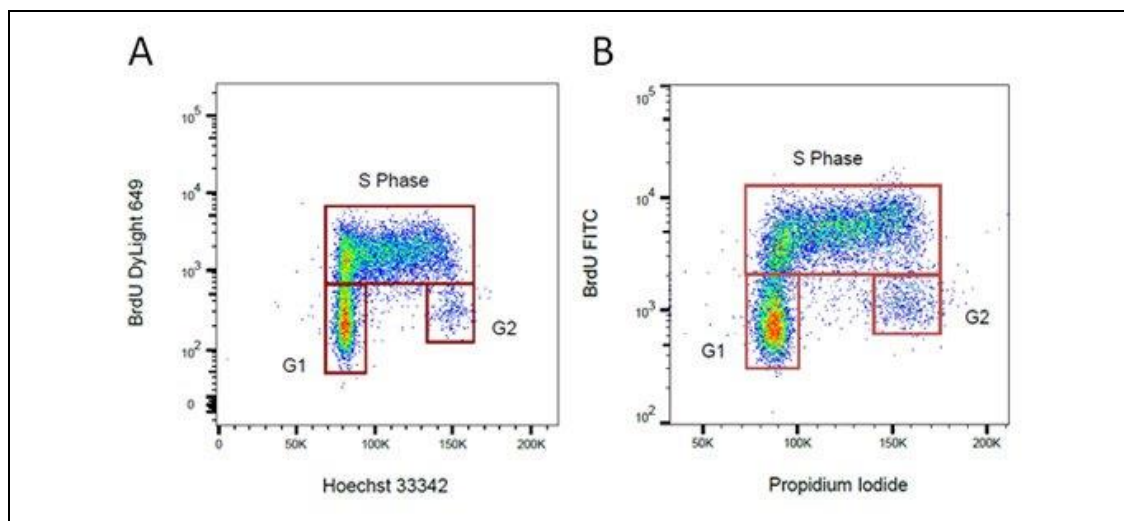


図 34. 増殖による BrdU 染色 (BrdU staining for proliferation)

増殖中の細胞を Hoechst(A)または Propidium Iodide(B)を用いた総 DNA 含量に対して、取り込まれた BrdU について染色した。BrdU は、マウスの抗 BrdU 抗体 (MCA2483)と、蛍光標識二次抗体で検出した。

抗体を使用することに加えて、[CFDA-SE](#) のような細胞質色素を用いて増殖を測定することができます。細胞をタンパク質結合色素と共にインキュベートすると、標識された細胞が分裂するにつれて色素の濃度が半分になります。次の世代で蛍光レベルが低下することを利用して、増殖を測定します。これらの色素の利点は、毒性がないことに加え、多様な色が利用できることであり、サンプルを固定処理せずとも免疫表現型解析と組み合わせることができます。

細胞周期の決定(Cell Cycle Determination)

細胞周期の各段階内の細胞の割合は、DNA 量に応じて結合する PI、7-AAD、Hoechst 33342 および DAPI のような DNA 結合色素を用いて決定することができます。つまり、G1 の細胞の2倍の DNA を有する G2 の細胞は2倍の蛍光を発します。良好な染色を得るためには、細胞を冷 70%エタノール中に固定する必要があります。ただ、これは他の染色プロトコールに影響をおよぼす可能性があるため、プロトコールの章を参照してください。細胞周期解析は対数スケールを使用するほとんどのフローサイトメトリーとは異なり、蛍光の差異が通常より小さいため、通常はリニアスケールで測定されます。データからダブレットを取り除くことが重要であり、サイトメーターの流速を下げることによってデータを改善することができます。[FlowJo](#) や [FCS Express](#) といった多くのフローサイトメトリーソフトウェアプログラムは、細胞周期の各期を正確に推定するアルゴリズムを備えています。

シグナル伝達(Signaling and Phosphoflow)

細胞表面分子の発現に加えて、細胞の活性化状態やシグナル伝達カスケードの測定は重要です。フローサイトメトリーを用いて、個々の細胞の特定の時点でシグナル伝達を迅速かつ効果的に測定することができます。

シグナル伝達分子やリン酸化タンパク質を検出するための染色方法は、通常の細胞内染色とは異なり、特定のコントロールが必要です。通常、脱リン酸化を避けるために細胞を迅速に固定する必要があり、核膜の透過性を確実にするため、より強い透過処理が必要とされます。細胞周期の染色と同様に、固定と透過処理は細胞表面分子の染色性が変化する可能性があります。例えば EDTA のように、シグナル伝達を妨害する可能性があるため使用される試薬にも注意が必要です。

シグナル伝達は、カルシウムの変化に応答して蛍光を発する色素を用いて測定することができます。通常、細胞に indo-1 のような色素を添加してシグナル伝達のベースラインレベルを確認し、その後刺激します。蛍光の変化は、細胞内カルシウムレベルの変化を示します。

微小粒子の検出(Small Particle Detection)

フローサイトメトリーによって検出され分析されている微小粒子の種類が増えています。微小粒子としては、直径 $2\sim3\mu\text{m}$ の血小板や $0.3\mu\text{m}\sim5\mu\text{m}$ の範囲の細菌および細胞外小胞 (Extravesicles: EVs) があります。細胞外小胞は、さらにアポトーシス小体 (Apoptotic bodies)、微小胞体 (Microvesicles: MV) およびエクソソーム (Exosome) に分けられますが、最も小さいのはエクソソームで直径がわずか $20\sim100\text{nm}$ です。エクソソームは、大部分が細胞骨格タンパク質、mRNA、マイクロ RNA およびアクチン受容体からなります。それらは細胞間でタンパク質や RNA を輸送することにより、細胞のクロストークや機能制御に重要であると考えられています。粒子は前方散乱および側方散乱によって同定することができますが、スケールを対数にすることで、同定と分離が良くなります。

光の散乱は以下に挙げるような要因に依存するため、微小粒子の検出は困難であることがあります。粒子の直径、照射光の波長 (波長よりも小さい粒子を検出することは困難です)、粒子屈折率、収集角度、およびレーザーの強度。こうしたことを考慮して、前方散乱用の追加の PMT 検出器を備え、また、データ収集のためのトリガーを蛍光シグナルまたは複数の蛍光マーカーに変更したフローサイトメーター (例えば バイオ・ラッド社の ZE5™ Cell Analyzer) が開発されています。

別の方法 (Alternative methods)

より短い光波長を使うといった検出方法では、一般に散乱が増えてしまい、例えば、抗体ビーズ粒子はサイズが大きく検出されます。シース液をろ過し、慎重に閾値レベルを設定することによってノイズを低減するように注意する必要があります。あらゆるサイトメトリー実験と同様、良好な結果を得るためには、サンプル調製は重要です。しかしながら、粒子のサイズが減少するにつれて、利用可能な抗原も減少して感度または分解能が低下することに注意する必要があります。

その他の使用例(Other Common Uses)

遺伝子発現とトランスフェクション(Gene Expression and Transfection)

生存細胞および固定細胞の両方における遺伝子発現およびトランスフェクション効率を求めるためには、蛍光タンパク質がフローサイトメトリーで広く使用されており、セルソーティング実験を行う場合に特に有用です。それらは、転写因子、プロモーター活性および細胞発現パターンのレポーターとして、またフローサイトメトリーの高い処理能力を活かして RNAi および CRISPR 活性のスクリーニングに利用することができます。また、蛍光タンパク質によっては、光活性化(Photoactivate)が可能であったり、光スイッチ(Photoswitch)可能であったり、FRET 実験において使用されることがあります。当初、GFP だけしか知られていませんでしたが、今では様々な波長で励起発光する 100 種類以上の蛍光タンパク質があり、マルチカラーフローサイトメトリーに最適です。

絶対定量(Absolute Quantification)

フローサイトメトリーは、細胞表面上あるいは細胞内の両方におけるマーカーの発現を定量化することができますが、細胞の濃度や、絶対定量化に関する情報は必ずしも得られません。これを行うためには、蛍光ビーズを添加して、それを計数します。既知濃度で既知量のビーズをサンプルに添加して、データを得られた場合、そのビーズの数は細胞の数に比例します。サイトメーターによっては、採取したサンプルの液量を測定することにより正確な細胞数を与えることができますので、1ml あたりの細胞数を測定することができます。

粒子内部移行(Particle Internalization)

種々の細胞プロセス、例えば、食作用において、粒子や細胞表面マーカー、抗原の内在化が起きます。それらを定量化するには、内在化される粒子を蛍光標識して、フローサイトメトリーで定量化するのが有効であることが示されています。内在化されたときにその蛍光特性を変えるか、または表面結合では蛍光を発していたものが消光することで、表面と内在化された粒子の間の違いを測定できます。

蛍光 in situ ハイブリダイゼーションおよび RNA 検出

(Fluorescence in situ Hybridization and RNA Detection)

1990 年代後半に、フローサイトメトリーでの蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)が最初に行われたのは、テロメアの長さを求めるためでした。蛍光核酸プローブを用いて特定の反復配列を標識し、次いでソフトウェアを用いて蛍光を測定します。以来、mRNA のレベルの定量化を可能にする RNA 発現プロトコルが開発されています。定量的 RTPCR は非常に敏感ですが、ある細胞集団についての情報だけしかわからないのに対し、フローサイトメトリーを用いる方法は、表面染色と組み合わせることで、特定の細胞あるいはサブセットごとに解析できますので、強力なツールです。

フローサイトメトリーのイノベーション([Innovations in Flow Cytometry](#))

機器の設定の複雑さの低減、自動化や感度の向上、ユーザーフレンドリーなソフトウェアにより、研究者はフローサイトメトリーをより利用しやすくなっています。利用できる蛍光色素や抗体の増加、さらにプロトコルの改善によって、ますます多くの研究者に利用されています。蛍光マーカを用いたマルチカラーフローサイトメトリーは研究において最も強力なツールの 1 つですが、いくつかの新しいイノベーションがあります。

イメージングフローサイトメトリー(Imaging Flow Cytometry)

イメージングフローサイトメトリーでは、粒子がレーザーを通過する際に CCD カメラで撮影します。スペクトルが異なる複数の画像を同時に捉えることができるため、そうした画像を統合することで抗原の局在性の解析が可能です。

マスサイトメトリー(Mass Cytometry)

もう 1 つのイノベーションはマスサイトメトリーです。例えば、バイオ・ラッドの ZE5™ Cell Analyzer のように、複数のレーザーを導入することにより、前方および側方散乱に加えて、27 ものパラメーターを検出することができるフローサイトメーターでは、蛍光フローサイトメトリー実験の情報量を大幅に増加させました。それでも、マスサイトメトリーは 135 チャンネルで検出する能力を有し、マルチプレックスパネルを構築することが可能で、現在、細胞あたり 40 個を超えるマーカを測定することができます。

マスサイトメトリーは、金属同位体に結合した抗体でサンプルを標識しますが、検出器に向かって電場を飛行する時間を計測することにより、それぞれの同位体を区別できることを利用しています。大きな同位体ほど時間がかかります。マスサイトメトリーではデータの取得に時間がかかり、細胞が気化する場合にのみ解析が行えますが、蛍光の漏れ込みや補正(コンペンセーション)に関する問題は少なくなります。しかしながら、1 つのセル上に収集することができるパラメーターの数のために、サンプルの解析には特別なソフトウェアを必要とするので、時間がかかり問題となる可能性があります。

第 8 章 一般的なプロトコール(Common Protocols)

フローサイトメトリーによる品質データは、使用した細胞の健康状態と染色プロトコールの両方によって影響を受ける可能性があります。ここでは、表面マーカー、細胞内マーカーおよび DNA のための一般的に使用される細胞調製技術および染色プロトコールの例を紹介します。

サンプル調製プロトコール(Sample Preparation Protocol)

フローサイトメーターの細いノズルやチューブが詰まるのを防ぐために、単一の細胞を 10^5 – 10^7 cells/ml の濃度で懸濁する必要があります。濃度はまた、ソーティングの速度にも影響します。通常、2,000–20,000 細胞/秒で行われます。ソート速度が速くなると、収量(Yield)や回収率(Recovery)が低下する可能性があります。

リン酸緩衝液(PBS, Phosphate buffered saline)は、一般的な懸濁バッファーです。フローサイトメトリーの最も簡単なサンプルとしては、培養した非接着性細胞、水中微生物、細菌、および酵母などがあります。全血も扱いやすいサンプルの一つです。通常、赤血球を簡単な溶解処理により除去した後、FSC および SSC 特性によってリンパ球、顆粒球および単球を迅速に同定できます(図 13 参照)。

ただし、肝臓や腫瘍といった固形組織からの細胞を解析したい場合には、固形組織を分散させて、単一の細胞にする必要があります。それには、機械的な方法または酵素処理により行います。機械的な分散処理は、培養、骨髓、およびリンパ組織由来の付着細胞のような緩く結合した構造に適しています。これは細断した組織の懸濁液を細いニードルに数回通し、必要に応じて再処理を行います。

酵素処理は、細胞どうしを結合するタンパク質 – タンパク質相互作用や細胞外マトリックスを破壊するために使用されます。それらの作用は pH、温度、補因子などの因子に依存するため、酵素の選択には注意が必要です。例えば、ペプシンは pH1.5 と 2.5 の間で最適に作用しますが、中和しないまま酸性条件に長時間放置すると細胞を損傷し、目的の細胞表面抗原が失われる可能性があります。エチレンジアミン四酢酸(EDTA)およびエチレンジアミン四酢酸(EGTA)のようなキレート剤は、細胞機能および完全性の維持に関与する二価カチオンを除去しますが、特定の酵素を阻害します。例えば、コラゲナーゼは活性のために Ca^{2+} を必要とします。酵素的または機械的な方法によって細胞分散する場合、抗原の単離の最適化には試行錯誤が必要な場合があります。

フローサイトメトリーを用いて、サイトカインなどの細胞内成分を解析するためには、細胞の全体的な完全性を保持したまま、細胞膜の透過性を高めて、蛍光色素や抗体分子を浸透させる必要があります。それには、サポニン(Saponin)のような低濃度(最大 0.1%)の非イオン性界面活性剤が適しています。端的に言えば、サンプル調製は、出発材料(サンプルソース)と対象とする抗原エピトープの性質に依存します。ここではすべての手法を取り上げることはできませんが、この章ではいくつか標準的なプロトコールをご紹介します。

フローサイトメトリー用細胞の調製(Preparation of Cells for Flow Cytometry)

フローサイトメトリーの最も簡単なサンプルは組織細胞培養の非接着性細胞です。ここでは、懸濁培養および接着性培養で増やした細胞株の両方についてのプロトコールも紹介します。そうした細胞以外の解析が必要な場合があります。ヒト末梢血単核細胞の調製方法(プロトコール FC4)、および腹腔マクロファージ、骨髄、胸腺および脾臓細胞の調製のためのプロトコール(プロトコール FC5)を示します。

ヒトの血液や細胞に接触した容器はすべて、有害廃棄物とみなし、適切に処分してください。

以下の点についても、フローサイトメトリー実験をデザインする上で考慮すべきです。

1. 脾臓細胞などの細胞種での実験の場合には、FcレセプターをFcRブロッキング試薬(例えば、Mouse Seroblock FcR Reagent, BUF041 など)で、ブロックしておく必要があります。
2. 適切なコントロール実験についてもいつも実施すべきです。
 - 染色の特異性の決定のためのアイソタイプコントロール (Isotype controls)
 - 自家蛍光のモニタするための、未染色の細胞

全てのマルチカラーフローサイトメトリー実験では、ゲーティングの境界線を特定するのに役立つため、蛍光補正コントロールおよび FMO(Fluorescence minus one, 蛍光色素を一つ除いた)コントロールについても含めておくことが推奨されます。

注記:これらの方法はあくまで一般的な手順です。試薬メーカーから提供された製品情報やロット固有の情報と合わせて使用する必要があります。

また、これらの技術において、デザインが成功し、実験がうまくいくためには、一定レベルの技術スキルと免疫学の知識が必要です。これらはあくまでガイドラインであり、それぞれの用途に合わせて調整する必要があります。

FC1: 液体窒素中に保存された細胞

本法は液体窒素中に保存された培養細胞を用いるための一般的な方法です。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phospahte buffered saline, BUF036A\)](#)

手順

1. PBS/BSA を調製します。
2. 液体窒素から細胞を慎重に取り出します。
3. 37°Cの水浴中で細胞を速やかに解凍します。
4. 冷却した PBS/BSA 緩衝液に細胞を懸濁し、15 ml コニカル遠心チューブ移します。
5. 4°Cにて 300–400 g で 5 分間遠心します。
6. 上清を除去し、 10^7 cell/ml 程度になるよう適量の 4°Cに冷却した PBS/BSA にペレットを再懸濁します。

注記:細胞を培地中でオーバーナイトにて回復させることで高い生存率が得られます。

FC2: 懸濁培養された細胞株の調製

本法は懸濁培養された細胞を用いるための一般的な方法です。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [Phospahte buffered saline \(BUF036A\)](#)
- PBS

手順

1. PBS/BSA を調製します。
2. 組織培養フラスコ中の細胞を 15 ml コニカル遠心チューブにデカントします。
3. 室温にて 300–400 g で 5 分間遠心します。
4. 上清を除去し、PBS/BSA 10 ml にペレットを再懸濁します。
5. 室温にて 300–400 g で 5 分間遠心します。
6. 上清を除去し、最少濃度で 10^7 cell/ml になるよう適量の 4°Cに冷却した PBS/BSA にペレットを再懸濁します。

FC3: 接着培養された細胞株

本法では接着培養された細胞を用いるための一般的な方法を示します。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphate buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- 1x Accutase solution
- 0.25% トリプシン

手順

1. PBS/BSA を調製します。
2. 1x Accutase solution ないし 0.25%トリプシンを含む溶液で酵素処理して細胞を分離後、血清含有培養液でトリプシン活性をクエンチし、細胞を採取します。
 - i. 培養液を除去し、滅菌済み PBS(室温)で細胞単層を洗浄して余分な血清成分を取り除きます。
 - ii. ゆっくりと 1x Accutase solution ないし、0.25%トリプシン-EDTA 溶液を添加し、細胞単層を覆います。
 - iii. 37°Cで最大 10 分間インキュベートします。
 - iv. インキュベート後、フラスコを軽く叩くと、細胞が 1 枚のシートとしてフラスコの底面より剥がれてきます。
 - v. 増殖培地を添加し、ピペットで軽く細胞を懸濁します。
3. 室温にて 300–400 g で 5 分間遠心します。
4. 上清を除去し、用事調製した室温の PBS/BSA にペレットを再懸濁し、細胞片やタンパク質成分を洗浄します。
5. 室温にて 300–400 g で 5 分間遠心します。
6. 上清を除去し、適量の室温の PBS/BSA にペレットを再懸濁します。
7. 血球計算盤や [TC20 全自動セルカウンター\(カタログ番号 1450101J1\)](#)などのセルカウンターで細胞数をカウントします。
8. カウント後、最少濃度 10^7 cell/ml になるよう適量の 4°Cに冷却した PBS/BSA にペレットを再懸濁します。

FC4: ヒト末梢血単核球細胞(PBMC)の調製

本法では末梢血単核球細胞を用いるための一般的な方法を示します。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphate buffered saline, BUF036A\)](#)
- Histopaque ないし Ficoll

手順

1. Histopaque ないし Ficoll のような分離剤を室温に戻します。
2. 血液を等量の PBS/BSA(室温)で希釈します。(例えば、3 ml の血液に 3 ml の PBS/BSA を添加します。)
3. 15 ml コニカル遠心チューブで、分離剤に対して等量の全血を重層します。
4. 20℃定温にて、減速ブレーキは使用せずに 300–400 g で 30 分間遠心します。注意: 4℃での遠心や、ブレーキを使用すると細胞の回収率が落ちます。
5. ピペットを用いて、分離剤の界面から細胞を回収します。
6. 回収した細胞は 15 ml コニカル遠心チューブに移します。
7. 室温の PBS/BSA で液量を 10 ml に合わせます。
8. 室温で 300–400 g で 5 分間遠心します。
9. 上清を除去し、少なくとも 10^7 cell/ml になるよう適量の 4℃に冷却した PBS/BSA にペレットを再懸濁します。

FC5: 腹腔マクロファージ、骨髓、胸腺および脾臓細胞の調製

本法では腹膜(peritoneum)や骨髓(bone marrow)、胸腺(thymus)、脾臓(spleen)からの懸濁細胞を用いるための一般的な方法を示します。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphate buffered saline, BUF036A\)](#)
- Ammonium chloride lysis buffer : 0.16M ammonium chloride, 0.17M Tris, pH7.2
- オプション: 細胞凝集を減らすための 25 μ g/ml DNase I ないし 5mM EDTA を含む PBS/BSA

手順

1. 当該組織から単一細胞懸濁液を調製します。細胞死を最小限にするためには細胞を氷上に保つこと。細胞死が起こると細胞の凝集を引き起こします。DNase I ないし EDTA の添加でも、細胞凝集を減らします。大きな凝集塊は、細胞懸濁液を 40 μ m の Cell Strainer を通すことでも除くことができます。
2. 4℃にて、300–400 g で 5 分間遠心します。
3. 上清を除去し、10 ml の Ammonium chloride lysis buffer にペレットを再懸濁します。
4. 混合し、2分間インキュベートします。ただし、2分を超えないようにしてください。
5. 4℃にて、300–400 g で 5 分間遠心します。
6. 上清を除去し、10 ml の冷 PBS/BSA(4℃)にペレットを再懸濁します。
7. 4℃にて、300–400 g で 5 分間遠心します。
8. 上清を除去し、10 ml の冷 PBS/BSA(4℃)にペレットを再懸濁します。
9. 血球計算盤や [TC20 全自動セルカウンター\(カタログ番号: 1450101J1\)](#) などのようなセルカウンターで細胞数をカウントします。
10. 必要に応じて、最終細胞数が $0.7\text{--}1.2 \times 10^7$ 個/ml になるように調整します。

フローサイトメリー用の細胞染色方法

FC6: 細胞および血球の表面抗原の直接蛍光標識法

本法は、RPE や FITC、Alexa Fluor などの蛍光色素で一次抗体が直接標識されている場合に適用できます。RPE 標識抗体は暗所で取り扱う必要があります。

注記: 血液サンプルを対象とした操作方法は[]内に記載しています。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphahte buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- [Erythrolyse Red blood cell lysis buffer \(BUF04\)](#)
- 抗凝固剤(注記: ヘパリンや EDTA、クエン酸などの抗凝固剤が使用可能ですが、特定の凝固剤が必要であることもあります)
- オプション: 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド in PBS(注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します。)

手順

1. 適切な方法で細胞を調製します(細胞の調製の項を参照)。細胞濃度 1×10^6 個/ml となるように冷 PBS/BSA (4°C) で合わせます。

[白血病検体のように細胞数が過剰でなければ、全血サンプルの希釈は不要です。適切な抗凝固剤を使用してください。]

2. 細胞懸濁液[全血]100 μ l を必要な本数の試験管に分注します。
3. 抗体メーカー推奨の濃度で抗体を添加します。よく混合し、遮光して 4°C で少なくとも 30 分間インキュベートします。
4. 2 ml の冷 PBS/BSA (4°C) で細胞を洗浄します。その後、4°C にて 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。
5. [血液懸濁液には、用時調製した Erythrolyse 溶血試薬 2 ml を添加し、よく混合します。室温で 10 分間インキュベートします。室温で 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。2 ml の PBS/BSA (室温) で細胞を洗浄します。その後、室温で 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。Step 5 に進みます。]
6. 200 μ l の冷 PBS/BSA (4°C) または 200 μ l の 0.5% パラホルムアルデヒド/PBS に細胞を再懸濁します。
7. フローサイトメリーにより解析し、データを取得します。固定した細胞は 24 時間以内に解析してください。

FC7: 細胞および血球の表面抗原の間接蛍光標識法

本法は、細胞表面抗原を認識する一次抗体が、未標識またはビオチン標識されているモノクローナル抗体やポリクローナル抗体である場合に適用します。一次抗体の可視化のための、標識された二次試薬（例えば、ビオチンの場合はストレプトアビジン）を使用する必要があります。

注記: 血液サンプルを対象とした操作方法は[]内に記載しています。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphahte buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- [Erythrolyse red blood cell lysis buffer \(BUF04\)](#)
- 抗凝固剤(注記: ヘパリンや EDTA、クエン酸などの抗凝固剤が使用可能ですが、特定の凝固剤が必要であることもあります)
- オプション: 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド in PBS(注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します。)

手順

1. 適切な方法で細胞を調製します(細胞の調製の項を参照)。細胞濃度 1×10^7 個/ml となるように冷 PBS/BSA(4°C) で合わせます。

[白血病検体のように細胞数が過剰でなければ、全血サンプルの希釈は不要です。適切な抗凝固剤を使用してください。]

2. 細胞懸濁液[全血]100 μ l を必要な本数の試験管に分注します。
3. 抗体メーカー推奨の濃度で一次抗体を添加します。よく混合し、遮光して 4°C で少なくとも 30 分間インキュベートします。
4. 2 ml の冷 PBS/BSA(4°C) で細胞を洗浄します。その後、4°C にて 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。

[血液懸濁液には、用時調製した Erythrolyse 溶血試薬 2 ml を添加し、よく混合します。室温で 10 分間インキュベートします。室温で 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。2 ml の PBS/BSA(室温) で細胞を洗浄します。その後、室温で 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。Step 5 に進みます。]

5. メーカー推奨の濃度で二次試薬を添加します。よく混合し、遮光して 4°C で少なくとも 30 分間インキュベートします。
6. 室温で 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。
7. 200 μ l の冷 PBS/BSA(4°C) または 200 μ l の 0.5% パラホルムアルデヒド/PBS に細胞を再懸濁します。
8. フローサイトメトリーにより解析し、データを取得します。固定した細胞は 24 時間以内に解析してください。

FC8: 全血サンプル中の B リンパ球上の免疫グロブリン L 鎖の直接蛍光標識法

本法は、ヒト免疫グロブリン L 鎖 (κ および λ) を認識する標識抗体を使用します。

注記: 全血サンプル中の B リンパ球上の免疫グロブリン L 鎖の免疫蛍光染色では、免疫グロブリン特異抗体による染色が阻害されるため、血清由来の免疫グロブリンを除去する必要があります。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphahte buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- [Erythrolyse red blood cell lysis buffer \(BUF04\)](#)
- 抗凝固剤(注記: ヘパリンや EDTA、クエン酸などの抗凝固剤が使用可能ですが、特定の凝固剤が必要であることもあります)
- オプション: 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド in PBS(注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します。)

手順

1. 適切な抗凝固剤(EDTA やヘパリン, クエン酸など)を使用して、全血を採取します。
2. 50 ml 遠心管に、2-3 ml の全血を分注します。
3. あらかじめ 37°C に温めておいた PBS/BSA を 20-25 ml 添加し、よく混合します。
4. 37°C で 300-400 g で 5 分間遠心します。細胞ペレットを壊さないよう慎重に上清を吸引除去します。残った上清にペレットを再懸濁します。
5. Step 3 と 4 をさらに 2 回、計 3 回の洗浄を行います。
6. 2-3 ml の冷 PBS/BSA (4°C) に再懸濁します。洗浄した血液サンプル 100 μ l を必要な本数の試験管に分注します。抗体メーカー推奨の濃度で抗体を添加し、遮光して 4°C で少なくとも 30 分間インキュベートします。
7. 用時調製した Erythrolyse 溶血試薬 2 ml を添加し、よく混合します。
8. 室温で 10 分間インキュベートします。
9. 室温で 300-400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。
10. 2 ml の PBS/BSA (室温) で細胞を洗浄します。その後、室温で 300-400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。
11. 200 μ l の冷 PBS/BSA (4°C) または 200 μ l の 0.5% パラホルムアルデヒド/PBS に細胞を再懸濁します。
12. フローサイトメトリーにより解析し、データを取得します。固定した細胞は 24 時間以内に解析してください。

上述の細胞洗浄方法はその他の細胞表面抗原にも影響しません。また、個々の細胞集団の回収率にも影響しないことが示されています。

参考文献: Reynolds WM *et al.* (1992). A simple technique for the determination of kappa and lambda immunoglobulin light chain expression by B cells in whole blood. J Immunol Methods 151, 123-129

FC9: 細胞内抗原とサイトカインの直接染色: Leucoperm™ 法

本法は、細胞内染色前に必要な細胞透過処理に Leucoperm™ 試薬を用いるものです。細胞内抗原の検出では染色前に細胞透過処理を行う必要があります。PCNA や BrdU といった細胞周期抗原の検出には、Methanol を用いた変法(FC10)を推奨します。

注記: 血液サンプルを対象とした操作方法は[]内に記載しています。

試薬

- [Leucoperm™ Accessory Reagent \(BUF09\)](#)
試薬 A (細胞固定試薬)と試薬 B (細胞透過処理試薬)を含みます。
- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphate buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- [Erythrolyse red blood cell lysis buffer \(BUF04\)](#)
- 抗凝固剤(注記: ヘパリンや EDTA、クエン酸などの抗凝固剤が使用可能ですが、特定の凝固剤が必要であることもあります)
- オプション: 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド in PBS(注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します。)

手順

1. 適切な方法で細胞を回収し、細胞数を確認します。細胞濃度 1×10^7 個/ml となるように冷 PBS/BSA(4°C)で合わせます。
[白血病検体のように細胞数が過剰でなければ、全血サンプルの希釈は不要です。適切な抗凝固剤を使用してください。]
2. 細胞懸濁液[全血]100 μ l を必要な本数の試験管に分注します。
3. 必要に応じて、直接蛍光標識したモノクローナル抗体を用いて細胞表面抗原を染色します。遮光し、4°Cで実施してください。
4. 2 ml の冷 PBS/BSA(4°C)で細胞を 1 回洗浄し、上清を除去します。
5. 2-8°C の冷 Leucoperm™ 試薬 A(細胞固定液)細胞濃度 1×10^6 個/ml あたり 100 μ l に細胞を再懸濁します。2-8°C で 10 分間インキュベートします。
6. 3ml の PBS/BSA(室温)を加え、室温で 300-400 g で 5 分間遠心します。
7. 上清を除去し、Leucoperm™ 試薬 B(細胞透過処理液;細胞濃度 1×10^6 個/ml あたり 100 μ l とする)を加えます。直接標識した抗体をメーカー推奨濃度で加え、遮光し、4°C で少なくとも 30 分間インキュベートします。
8. [血液懸濁液には、用時調製した Erythrolyse 溶血試薬 2 ml を添加し、よく混合します。室温で 10 分間インキュベートします。室温で 300-400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。2 ml の PBS/BSA(室温)で細胞を洗浄します。その後、室温で 300-400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。Step 8 に進みます。]
- 9.
10. PBS で細胞を1回洗浄します。すぐに解析をする場合には、200 μ l の冷 PBS/BSA(4°C)で、あるいは必要に応じて、200 μ l の 0.5%パラホルムアルデヒド/PBS に細胞を再懸濁します。
11. フローサイトメトリーによりデータを取得します。固定した細胞は 24 時間以内に解析してください。

FC10: 細胞内抗原の直接染色: メタノール+ Leucoperm™ 法

本法は、細胞内染色前に必要な細胞透過処理に Leucoperm™ 試薬を用いる方法の変法です。

細胞内抗原の検出では染色前に細胞透過処理を行う必要があります。本法は、FC9(細胞内抗原とサイトカインの直接染色: Leucoperm™ 法)では期待される結果が得られなかった場合の別法を示します。本法は増殖細胞核抗原(PCNA)や Ki-67 などの一部の核抗原の検出に特に適しています。

注記: RPE が低温でダメージを受けるため、フィコエリスリン標識は本法を用いた細胞表面抗原検出には適しません。

注記: 血液サンプルを対象とした操作方法は[]内に記載しています。

試薬

- [Leucoperm™ Accessory Reagent \(BUF09\)](#)
試薬 A (細胞固定試薬)と試薬 B (細胞透過処理試薬)を含みます。
- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphahte buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- [Erythrolyse red blood cell lysis buffer \(BUF04\)](#)
- 抗凝固剤(注記: ヘパリンや EDTA、クエン酸などの抗凝固剤が使用可能ですが、特定の凝固剤が必要であることもあります)
- オプション: 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド in PBS(注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します。)

手順

1. 適切な方法で細胞を回収し、細胞数を確認します。細胞濃度 1×10^7 個/ml となるように冷 PBS/BSA (4°C) で合わせます。
[白血球検体のように細胞数が過剰でなければ、全血サンプルの希釈は不要です。適切な抗凝固剤を使用してください。]
2. 細胞懸濁液[全血]100 μ l を必要な本数の試験管に分注します。
3. 必要に応じて、直接蛍光標識したモノクローナル抗体を用いて細胞表面抗原を染色します。遮光し、4°C で実施してください。
4. 2 ml の冷 PBS/BSA (4°C) で細胞を 1 回洗浄し、上清を除去します。
5. 2-8°C の冷 Leucoperm™ 試薬 A (細胞固定液) 細胞濃度 1×10^6 個/ml あたり 100 μ l に細胞を再懸濁します。2-8°C で 10 分間インキュベートします。
6. 500 μ l の氷冷した無水メタノールを加え、ボルテックス後、2-8°C で 10 分間インキュベートします。
7. 3ml の PBS/BSA (室温) を加え、室温で 300-400 g で 5 分間遠心します。
8. 上清を除去し、Leucoperm™ 試薬 B (細胞透過処理液; 細胞濃度 1×10^6 個/ml あたり 100 μ l とする) を加えます。直接標識した抗体をメーカー推奨濃度で加え、遮光し、4°C で少なくとも 30 分間インキュベートします。
9. [血液懸濁液には、用時調製した Erythrolyse 溶血試薬 2 ml を添加し、よく混合します。室温で 10 分間インキュベートします。室温で 300-400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。2 ml の PBS/BSA (室温) で細胞を洗浄します。その後、室温で 300-400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。Step 8 に進みます。]
10. PBS で細胞を 1 回洗浄します。すぐに解析をする場合には、200 μ l の冷 PBS/BSA (4°C) で、あるいは必要に応じて、200 μ l の 0.5% パラホルムアルデヒド/PBS に細胞を再懸濁します。
11. フローサイトメトリーによりデータを取得します。固定した細胞は 24 時間以内に解析してください。

FC11: 細胞内抗原の直接染色: ジギトニン法

本法は、細胞内染色前に必要な細胞透過処理に Leucoperm™ 試薬を用いずに行う方法です。

細胞内抗原の検出では染色前に細胞透過処理を行う必要があります。本法は、FC9(細胞内抗原とサイトカインの直接染色: Leucoperm™ 法)では期待される結果が得られなかった場合の別法を示します。本法は、MCA1297 を用いた T 細胞抗原レセプター-Zeta chain の検出に特に適しています。

注記:本法では、Forward Scatter(FSC)シグナルが弱まるため、フローサイトメーターを補正の調整のセットアップが必要になることがあります。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphate buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド を含む PBS (注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します。)
- 0.05% (v/v) Tween 20 を含む PBS
- 10 μ g/ml ジギトニンを含む PBS

手順

1. 細胞の調製法の項を参照して、適切な方法で細胞を回収します。細胞濃度 1×10^7 個/ml となるように冷 PBS/BSA (4°C) で合わせます。
2. 細胞懸濁液 100 μ l を必要な本数の試験管に分注します。
3. 必要に応じて、直接蛍光標識したモノクローナル抗体を用いて細胞表面抗原を染色します。遮光し、4°C で実施してください。
4. 2 ml の冷 PBS/BSA (4°C) で細胞を 2 回洗浄し、4°C にて 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。
5. 50 μ l の PBS/BSA を加え、次いで 100 μ l の 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド を含む PBS を加えます。
6. 室温で 20 分間インキュベートします。
7. 2 ml の冷 PBS/BSA (4°C) で細胞を 2 回洗浄し、4°C にて 300–400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。
8. 上清を除去し、100 μ l の冷ジギトニン (10 μ g/ml) を加えます。直接標識した抗体をメーカー推奨濃度で加え、遮光し、4°C で少なくとも 30 分間インキュベートします。
9. 3ml の 0.05% Tween/PBS で 3 回洗浄します。各ステップで 4°C にて 300–400 g で 5 分間遠心します。
10. 200 μ l の PBS に再懸濁します。
11. フローサイトメトリーによりデータを取得します。固定した細胞は 24 時間以内に解析してください。

FC12: 血液サンプルの細胞内サイトカインの直接染色

本法は、直接標識抗体を用いて全血サンプルの細胞内抗原を染色する方法です。

この方法は、フローサイトメトリーで全血の細胞内サイトカインを解析するための、迅速かつシンプルな方法です。少量のサンプルの解析を行うことができ、密度勾配遠心による末梢血の分離の際のアーティファクトが発生することをさけることができます。すべての血液サンプルは抗凝固剤としてヘパリンを用いる必要があります。EDTA は細胞刺激を阻害するため、避ける必要があります。

細胞内抗原の検出では染色前に細胞透過処理を行う必要があります。ここで示す方法は弊社では良好な結果が得られることを検証済みです。ただし、これ以外の細胞透過処理法も報告されており、本アプリケーションに適したものもあります。

注記: 未活性細胞は細胞内サイトカインの検出のためには、in vitro で刺激する必要がしばしばあります。

試薬

- [Leucoperm™ Accesory Reagent \(BUF09\)](#)
試薬 A (細胞固定試薬) と試薬 B (細胞透過処理試薬) を含みます。
- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phospahte buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- [Erythrolyse red blood cell lysis buffer \(BUF04\)](#)
- 培地
- Monensin
- Ionomycin
- PMA
- オプション: 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド in PBS (注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します。)

手順

1. 血液サンプルを 500 μ l を、コントロールのための 2 本を含め、必要な本数の試験管に分注します。各サンプルに培養用の培地 (何も添加せずに) 500 μ l 加えます。
2. 試験管の一つ (活性化処理なしの細胞コントロール) に、Monensin を終濃度 3 μ M とするよう加えます。
3. 別の試験管 (活性化細胞コントロール) に、終濃度として、PMA を 10 ng/ml, Ionomycin を 2 μ M, Monensin を 3 μ M とするよう添加します。
4. 残りの試験管 (実験群) に、Monensin を終濃度 3 μ M と、実験に必要な処理をします。
5. 5% CO₂、37°C の環境下で 2-4 時間インキュベートします。
6. 必要に応じて、直接蛍光標識したモノクローナル抗体を用いて細胞表面抗原を染色します。遮光し、4°C で実施してください。
7. PBS/BSA で細胞を 1 回洗浄し、上清を除去します。
8. 100 μ l の Leucoperm™ 試薬 A (細胞固定液) を加え、2-8°C で 10 分間インキュベートします。
9. 2ml の冷 PBS/BSA (4°C) を加え、室温で 300-400 g で 5 分間遠心します。
10. 上清を除去し、細胞 1 x 10⁶ 個あたり 100 μ l の Leucoperm™ 試薬 B を加えます。直接標識した抗体をメーカー推奨濃度で加え、遮光し、4°C で少なくとも 30 分間インキュベートします。
11. 用時調製した Erythrolyse 溶血試薬 2 ml を添加し、よく混合します。
12. 室温で 10 分間インキュベートします。
13. 300-400 g で 5 分間遠心し、上清を除去します。
14. フローサイトメトリーによりデータを取得します。固定した細胞は 24 時間以内に解析してください。

FC13: 細胞内抗原の直接染色: パラホルムアルデヒド/サポニン法

本法は、細胞内染色前に必要な細胞透過処理に Leucoperm™ 試薬を用いずに行う方法です。

細胞内抗原の検出では染色前に細胞透過処理を行う必要があります。本法は、FC9(細胞内抗原とサイトカインの直接染色: Leucoperm™ 法)では期待される結果が得られなかった場合の別法を示します。本法は、FITC で直接標識したモノクローナル抗体を使用する場合に特に適しています。

試薬

- PBS/BSA: 1% BSA を含む [PBS\(Phosphahte buffered saline, BUF036A\)](#)
- PBS
- 4% (w/v) パラホルムアルデヒド in PBS(注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します)
- 0.1% Saponin in PBS
- オプション: 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒド in PBS(注記: ヒートスターラーで溶解し、使用前に冷却します。)

手順

1. 細胞の調製法の項を参照して、適切な方法で細胞を回収します。細胞濃度 1×10^7 個/ml となるように冷 PBS/BSA(4°C)で合わせます。
2. 必要に応じて、直接蛍光標識したモノクローナル抗体を用いて細胞表面抗原を染色します。遮光し、4°Cで実施してください。
3. 染色に続き、3 ml の冷 PBS/BSA(4°C)で細胞を1回洗浄し、4°Cにて 300–400 g で5分間遠心し、上清を除去します。
4. 細胞 1×10^6 個あたりに 100 μ l の 4% (w/v) パラホルムアルデヒドを含む PBS を加えます。室温で 20 分間インキュベートします。3 ml の PBS/BSA で細胞を1回洗浄します。
5. 細胞 1×10^6 個あたりに 100 μ l の 0.1% Saponin を含む PBS を加えます。室温で 15 分間インキュベートします。
6. 必要な本数の試験管に、直接標識した抗体をメーカー推奨濃度となるように加えておき、細胞懸濁液 100 μ l を分注します。遮光して、4°Cで少なくとも 30 分間インキュベートします。
7. 3 ml の 0.1% Saponin in PBS で細胞を1回洗浄し、200 μ l の 0.5% (w/v) パラホルムアルデヒドに再懸濁します。
8. フローサイトメトリーによりデータを取得します。固定した細胞は 24 時間以内に解析してください

参考文献: Sewell WA *et al.* (1997) Determination of intracellular cytokines by flow cytometry following whole blood culture. J Immunol Methods 209, 67–74.

第9章 トラブルシューティング

結果が悪い理由はたくさんあります。ここでは、より多くの情報が必要な場合に推奨される参考書と一緒に、最良の染色を可能にするアドバイスの一般的な問題のいくつかを挙げます。

トラブルシューティングガイド

何らかの問題が発生した場合には、以下に記載する対処方法を参考に問題を特定し、解決してください。本書に記載の方法で解決できなければ、バイオ・ラッドの試薬をご使用の方は、弊社テクニカルサービス部門までご相談ください。

問題	対処方法
染色できない	1. 抗体がメーカーの指示どおりに適切に保存されていたことを確認してください。 2. ご使用の抗体が有効期限切れでないことを確認してください。 3. 適切な一次または二次抗体を使用していることを確認してください。 4. 抗体が蛍光色素で標識されていることを確認してください。標識されない場合は、適切な蛍光色素標識二次抗体が用いられていることを確認してください。 5. 二次抗体の活性が低下していないことを確認してください。他の一次抗体に対しては、正常に反応しましたか？ 6. その一次抗体を特異的に認識する二次抗体が用いられていることを確認してください。 7. 使用している蛍光色素がフィコエリスリンまたはアロフィコシアニンの場合、製品が凍結保存されていなかったことを確認してください。 8. それは測定したい細胞表面に存在する標的抗原ですか？抗原発現に関する文献を確認し、ポジティブコントロールとして抗原発現がわかっているサンプルを並行して使用してください。 9. 抗体はサンプル中の細胞種の抗原を認識していますか？使用する細胞種に対する交差反応性を確認してください。すべての抗体があらゆる種類の細胞と反応を示すわけではありません。 10. 蛍光色素の励起に正しいレーザーが使用され、蛍光の解析に正しいチャンネルが使用されていることを確認してください。
PE 標識抗体では染色されないが、FITC 標識抗体では良好な結果が得られる。	1. PE 標識抗体が使用前に凍結されていた可能性があります。その場合は新たに抗体を購入し、ご利用ください。 2. パラホルムアルデヒド(PFA)の劣化が考えられます。PFAの分解によりメタノールが放出されると染色に影響します。PFA は使用ごとに用時調製してください。固定処理なしで細胞をすぐに解析することができます。

非特異的な染色	1. 原因として自家蛍光が考えられます。解決策: 現在の設定で細胞のみを入れた試験管(抗体なし)を用いて自家蛍光レベルを測定します。 2. ある種の細胞は低親和性 Fc 受容体 CD16/CD32 を発現しており、Fc 領域を介して抗体全体に結合します。マウス細胞では、Mouse SeroBlock FcR (カタログ番号 BUF041A/B) を用いて抗体を希釈します。 3. 二次抗体が原因となる場合があります。目的の組織との交差反応性がない二次抗体を選択します。 4. 洗浄ステップが十分であることを確認してください。 5. 使用する抗体を滴定してみて(濃度を下げてゆき)至適濃度を求めます。抗体濃度を下げると非特異的な染色が低減する可能性があります。
十分な染色性が得られない	1. 抗体の過剰希釈が原因となることがあります。使用前に抗体の力価を測定し、適正濃度の抗体が使用されていることを確認してください。 2. 直接染色法を用いていて染色が弱い場合は、抗体濃度が高すぎる場合に染色性が減弱することがある「プロゾーン現象」が原因と思われます。滴定し、抗体の至適濃度を綿密に検討してください。 3. 細胞数が過剰であることが原因となることがあります。推奨される細胞密度に調整してください。 4. ターゲット抗原の発現量が少ないことが原因ではないでしょうか。関連文献にて期待される発現レベルを確認してください。 5. 抗原の発現レベルが低い場合は、より明るい蛍光色素で標識された抗体を選択してください。 6. 目的の細胞種に対して特異的な抗体ではなく、交差反応性を示す抗体を使用すると、染色性が低下する場合があります。 7. 一次または二次抗体との最適な反応時間および温度条件を検討してください。
異常な散乱光プロファイルが示される	1. できるだけ新鮮な細胞を使用します。死細胞や細胞片(debris)の存在を示すプロファイルになっていないか確認してください。 2. 細胞の活性化方法が細胞の散乱性に影響を及ぼしている可能性があります。 3. 溶血剤を用いる場合は用時調製され、組成が適切であることを確認してください。
予想とは異なる染色結果が得られる	1. 試薬によっては特定の抗原に影響を及ぼすものがあり、場合によっては見直しが必要です。たとえば、EDTA は一部の血小板マーカーに影響を与えることがあります。 2. 溶血剤が特定の抗原に影響を及ぼす場合があります。抗原検出を妨害しない方法を選択してください。 3. 抗原のなかには細胞内で発現するものもあり、したがって細胞透過処理が必要となる場合があります。メーカーのデータシートで適切な透過処理試薬を確認の上、ご使用ください。

推奨文献(Recommended Reading)

Givan AL (2001) . Flow Cytometry: First Principles, 2nd Edition (New York: Wiley-Liss, Inc.).

Haugland RP (2005). The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th Edition (Invitrogen – Molecular Probes) .

Macey MG (1994). Flow Cytometry: Clinical Applications (Oxford, United Kingdom: Blackwell Scientific Publications) .

Ormerod MG, ed. (2000). Flow Cytometry: A Practical Approach, 3rd Edition (Oxford, United Kingdom: Oxford University Press).

Perfetto SP et al. (2004). Seventeen-colour flow cytometry: unravelling the immune system. Nat Rev Immunol 4, 648–655.

Shapiro HM (2003). Practical Flow Cytometry, 4th Edition (New York: Wiley-Liss, Inc. .).

Stewart CC and Nicholson JKA, eds. (2000). Immunophenotyping (New York: Wiley-Liss, Inc.).

Watson JV (2004). Introduction to Flow Cytometry (Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press).

用語集(Glossary)

用語(英語)	邦訳 (参考ページ)	意味
Apoptosis	アポトーシス (p50)	様々な厳密に制御された生物学的経路を介したプログラムされた細胞死。
Antibody	抗体	抗原と呼ばれる特定の標的を同定し、中和することができる免疫系の特殊タンパク質。
Area	面積値 (p11)	パルスの積分値。
Autofluorescence	自家蛍光 (p38)	蛍光化合物の存在により、細胞内に見出される自然な蛍光レベル。
Backgating	バックゲーティング (p28)	従来のゲーティングを使用して適切な細胞集団を確認したことを確認するために有用なゲーティングコントロール。
Band pass filter(BP)	バンドパスフィルター (p9)	指定された狭い波長範囲のみの光を通過させるフィルター。
Cell sorting	セルソーティング (p2)	特定の表面抗原などの特性によって識別された細胞を、液滴に封じ込め、液滴に電荷を用いて分離すること。またセルソーティングを行う装置をセルソーターと呼ぶ。
Compensation	コンペンセーション (蛍光補正) (p20)	1 つの蛍光物質の複数の検出器への蛍光漏れ込みを取り除くための数学的アルゴリズム
Doublets	ダブルレット (p41)	インターロゲーションポイント(レーザー照射点)通過時に2つの粒子がくっしていること
Drop Delay (Time)	ドロップディレイ (時間) (p13)	セルソーティング時にインターロゲーションポイント(レーザー照射点)から流束(ストリーム)が液滴に分離するまでの時間
Event	イベント (p11)	レーザーを通過するときに十分なシグナルやパルスを生じする粒子。
Fc receptors	Fc レセプター (受容体)	免疫応答を誘発するために定常領域を介して抗体に結合する特定の細胞上の抗体受容体。
Fixation	固定処理	細胞の崩壊を防ぎ、細胞内容物および細胞内染色の構造を失うことなく透過性を可能にするための細胞タンパク質の架橋。
Forward scatter	前方散乱 (p8)	粒子に照射された後、前方向(最大 20°)に散乱する光。
Flow cytometer	フローサイトメーター (p2)	流れを用いてレーザーを通過する際の個々の粒子の特性の測定を可能にする装置。
Fluorescence minus one control(FMO)	蛍光数-1 のコントロール (FMO) (p34)	多蛍光から1つの蛍光を除いたコントロール(対照) - 蛍光の漏れ込みを評価するために、染色パネルから1つの蛍光色素を除去した特異的コントロール。
Fluorescent protein	蛍光タンパク質 (p19)	光エネルギーにより励起され、より長い波長で発光(蛍光)し、生細胞マーキングのために細胞内で発現することができるタンパク質。
Fluorophore	蛍光色素分子 (p15)	特定の波長の光エネルギーで励起され、より長い波長で発光する蛍光マーカー。
Gating	ゲーティング (p26)	共通の特徴を定量化したり、より詳細に調べたりするために細胞の集団の周りに領域(region)を配置する。
Height	高さ (p11)	PMT 検出されたパルスの最大電流出力。
Histograms	ヒストグラム (p25)	単一の測定パラメーターを表示するプロット。縦軸に細胞数としたグラフ。

用語(英語)	邦訳 (参考ページ)	意味
Hydrodynamic focusing	流体力学的絞り込み (p7)	サンプル流より速い外側シース流体により、流束の狭窄を可能にして、単一細胞の流れを生成する。
Immunophenotyping	免疫表現型解析 (p49)	特定マーカーの染色および同定による集団内の細胞の同定。
Instrument configuration	機器の構成	サイトメーターに含まれる流路系、レーザー等光学系およびフィルター等の構成。
Isotype controls	アイソタイプコントロール (p30)	特異的抗体結合を決定するのに役立つ分析される細胞上に見つからない抗原に対して産生された抗体。
Laser	レーザー (p8)	単一波長で光増幅された光を発する装置。Laser は Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (輻射の誘導放出による光増幅) の頭字語。
Long pass filter	ロングパスフィルター (p9)	特定の波長以上の光を通過させるフィルター。
Maximal emission	最大発光 (p16)	蛍光色素分子が最も光子を放出する波長。
Maximal excitation	最大励起 (p16)	蛍光色素分子が最も光子によって励起される波長。
Parameter	パラメーター (p11)	高さ(Height)、面積(Area)または幅(Width)で表示できる任意の検出器からの測定。
Photo multiplier tube (PMT)	光電子増倍管 (p8)	光子の吸収が電子の放出をもたらす光電子検出装置。フォトマルとも呼ばれる。
Permeabilization	透過処理 (p42)	大分子(抗体など)が細胞内染色のために細胞に入ることを可能にするために界面活性剤を用いて細胞膜に穴を作る処理。
Resolution	分解能 (p45)	陽性を陰性母集団から分離する能力。
Short pass filter(SP)	ショートパスフィルター (p9)	特定の波長以下の光を通過させるフィルター。
Side scatter	側方散乱 (p8)	粒子に照射後に 90° 方向に散乱する光。
Spillover	漏れ込み (p20)	1 つの蛍光色素分子の放出(蛍光)スペクトルと他の蛍光色素分子の放出スペクトルとの重複。
Spread	広がり (p20)	コンペンセーション(蛍光補正)後の他チャネルへの集団の蛍光の増加。
Stain index(SI)	ステインインデックス (染色指数) (p47)	染色標本上の陽性集団と陰性集団との間の最大の分離が存在する点。
Stokes Shift	ストークスシフト (p16)	蛍光分子の最大励起波長と発光波長の差。
Tandem dye	タンデム(蛍光)色素 (p18)	共有結合した 2 分子の蛍光色素。
Threshold	閾値 (p12)	フローサイトメーターがイベントを記録しないシグナル強度。
Titration	滴定 (p47)	最適なステインインデックス(SI:染色指数)濃度への抗体の希釈。
Viability dye	生存率色素 (p39)	細胞膜の完全性を低下によって死細胞の同定を可能にする色素。
Width	幅 (p11)	パルスが発生している時間幅。



バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社

ライフサイエンス <http://www.bio-rad.com>

本社	〒140-0002	東京都品川区東品川 2-2-24	Tel : 03-6361-7000	Fax : 03-5463-8480
大阪	〒532-0025	大阪市淀川区新北野 1-14-11	Tel : 06-6308-6568	Fax : 06-6308-3064
福岡	〒812-0013	福岡市博多区博多駅東 2-5-28	Tel : 092-475-4856	Fax : 092-474-5580

製品の学術的なお問い合わせは

Mail : life_ps_jp@bio-rad.com Tel : 03-6404-0331 Fax : 03-6404-0334

Z11587L 1806a