

フローサイトメーター新規利用者ガイド

(参考:「FCMの原理入門講座 サイトメトリードットコム/ベックマンコールター」
<http://www.bc-cytometry.com/FCM/fcmprinciple.html>)

「フローサイトメーター」とは、蛍光標識した細胞浮遊液を特殊な流路に高速で流し、レーザーを当てることで発生した散乱光や蛍光の強度を測定し、それによって個々の細胞の性質を迅速かつ高感度に解析する装置です。

蛍光を測定する標準的な方法の蛍光顕微鏡と比べて、次のような特徴があります。

- ・短時間に多くの細胞数を客観的に測定できる。(高速性、正確性)
- ・微弱な光でも測定できる。(高感度、定量性)
- ・同一条件での測定が可能である。(高再現性)
- ・1回の測定で多くの情報(マルチパラメータ)を取得できる。
- ・目的の細胞集団によるクラスター分析が可能である。
- ・細胞の分取が可能である。

当部門に設置されているフローサイトメーターは「Cytomics FC 500」と「MoFlo」の2種類があり、それぞれ次のような違いがあります。

| FC500 セルアナライザー | MoFlo セルソーター |
|-----------------------|---------------------------|
| 細胞の分取が行えない | 細胞の分取が行える |
| Ar, HeNe レーザーが搭載されている | Ar, HeNe, UV レーザーが搭載されている |
| 高精度蛍光補正(ADC)機能がついている | |

フローサイトメーターで測定可能なサンプルは、一個ずつの状態の細胞や粒子などの浮遊液であることが必要です。この条件を満たし、また個々の大きさが40 μ m程度までの範囲であれば、様々なものの測定が可能です。

- ・血球細胞(白血球、赤血球、血小板など)
- ・動物細胞(培養細胞、単離組織など)
- ・植物細胞
- ・微生物(細菌、原虫など)
- ・海洋生物(プランクトンなど)
- ・精子、酵母など
- ・ラテックスビーズ(マルチプレックスによるサイトカイン定量解析など)

フローサイトメトリー解析のおおまかな流れ

細胞の調製（蛍光標識、細胞の遊離、メッシュでの濾過等。）



測定用プロトコルファイルの作成

（ネガコン、各単染色、重染色のサンプルを用いて、測定条件を設定します。
同種のサンプルであれば、次回から設定は不要になります。）

ディスクリミネーション（余分なデブリのカット）



感度調整



ゲートリージョンの作成（グラフ上で測定したい細胞集団の領域を選択）



蛍光補正（コンペンセーション）の設定

（蛍光の漏れ込みを補正する）



測定とリアルタイム解析（測定し解析します。）



必要ならば再解析（測定データを用いて、あらためて解析する事ができます。）

フローサイトメーターのしくみ

フローサイトメトリーシステムは、一点に集められたレーザー光をフローセルの中心を通過する細胞に照射し、そこから生じる散乱光と、蛍光を同時に測定します。測定結果は、相関ヒストグラムとして示されます。これらのヒストグラムを解析することによりサンプルの特性を明らかにできます。

そして、これらの特性に基づいて細胞集団を試験管やマルチウェルプレートに分取することもできます。

フローサイトメーターの測定原理は、以下の5つに分けることができます。

フロー系 : シースフローを利用して細胞1個ずつの流れを作る。

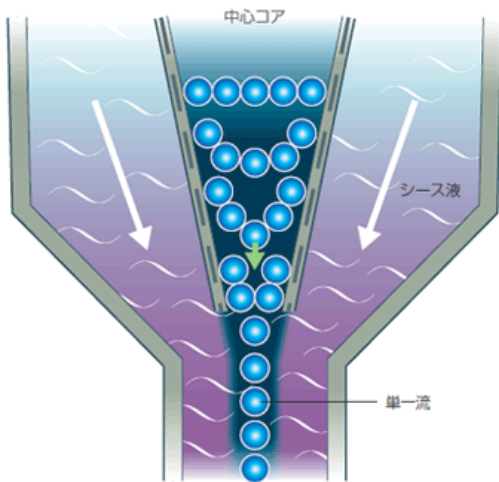
光学検出系 : 流れる細胞へレーザー照射し、発生した散乱光や蛍光を検出する。

電気パルス処理系 : 検出された電気パルスを回路で数値化する。

データ処理系 : 各種ヒストグラムを作成し、解析する。

ソーティング系 : 目的細胞の分取をする。

フロー系



機械にセットされた細胞浮遊液はポンプによって吸われ、機器のチューブを流れます。その後、細胞は内側に細胞浮遊液、外側にシース液といった二層に分かれた特殊な水流により絞り込まれ、縦一列に分離されます。

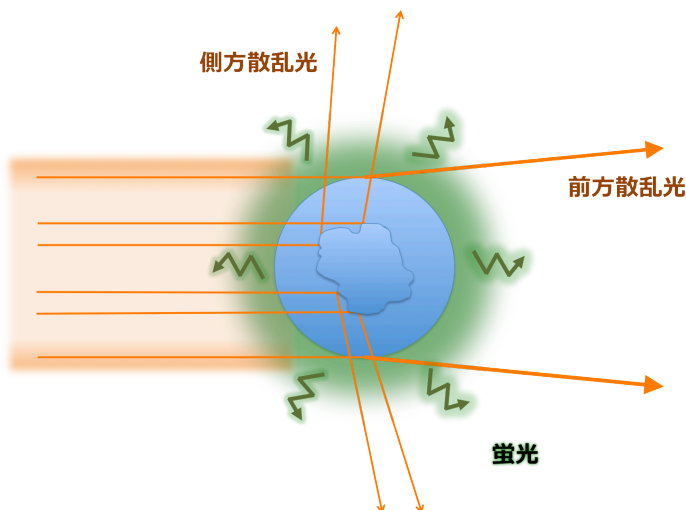
光学検出系

チューブを流れる中で細胞ひとつひとつに順番にレーザーが当てられて、個々の細胞の情報が測定されていきます。

使用するレーザーは使用する蛍光試薬の励起波長に応じて、選択する必要があります。

(散乱光と蛍光)

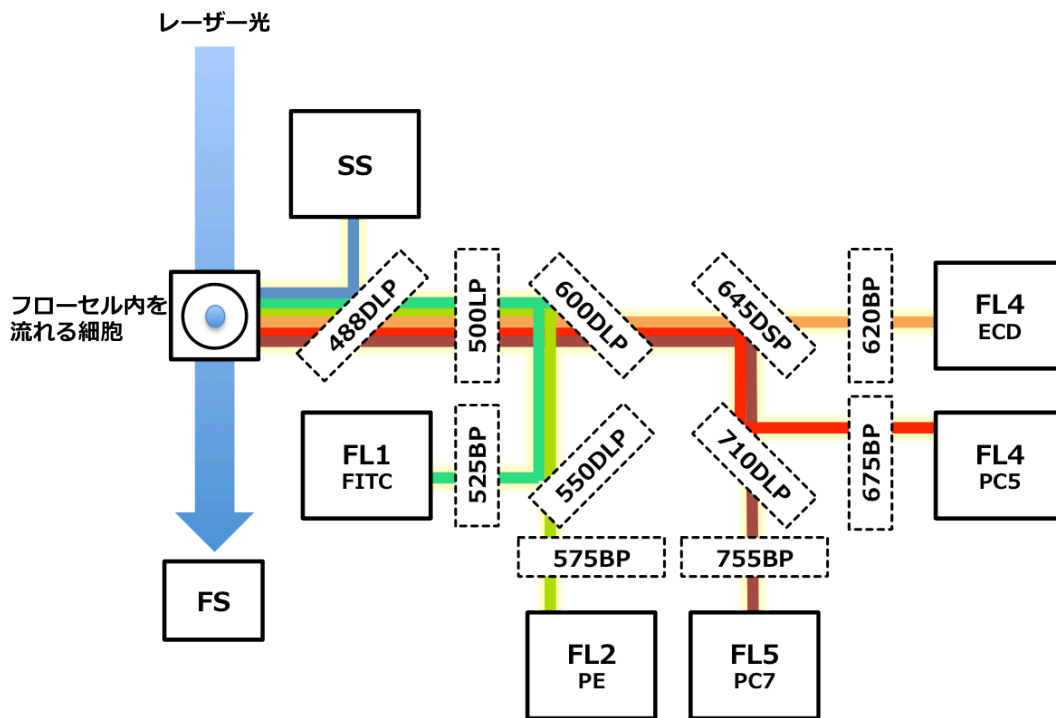
細胞にレーザーが当たると「側方散乱光」「前方散乱光」「蛍光」の三種類の光が発生します。それらの光を測定する事によってデータを収集します。



- ・側方散乱光 (SS) は細胞の内部で散乱される光で内部構造の複雑さを反映しています。
- ・前方散乱光 (FS) は細胞の周縁で散乱される光で細胞のサイズを反映しています。
- ・蛍光 (FL) は標識に使われた蛍光色素に応じた特定のスペクトルが発生します。

(フィルタと検出器)

レーザーによって発生した散乱光と蛍光は、特定の範囲の波長の光のみを通す特殊なフィルタによって分解され、個々の検出機で検出されます。



LP:ロングパスフィルタ (ある波長よりも長い波長の光を透過させる)
DLP: ダイクロイックロングパスフィルタ (ある波長以下は反射し、それ以上の波長は透過させる)
SP:ショートパスフィルタ (ある波長よりも短い波長の光を透過させる)
DSP:ダイクロイックショートパスフィルタ (ある波長以上は反射し、それ以下の波長は透過させる)
BP:バンドパスフィルタ (指定した波長を中心に $\pm 15\sim 20\text{nm}$ の光のみを透過させる)
FS:前方散乱光検出器
SS:側方散乱光検出器
FL:蛍光検出器

例としてFC500にはFL1~5までの5種類の蛍光検出器が搭載されており、通常は上図のように、それぞれ [525] [575] [620] [675] [755]nmの波長の光が届く様にフィルタが設定されています。(※実際には $\pm 15\sim 20\text{nm}$ 程度の波長も通します)

フィルタの設定は、使用する蛍光試薬に応じて最適な物にしてある事が望ましいです。

これによりFC500では最大で同時に5カラーまでの多重染色した蛍光の解析を行う事ができます。

(検出感度)

検出器に入った光は、光電子増倍管(PMT)で電子に変換され、電圧をかけて増幅されます。PMT電圧の大きさを変える事で検出器の感度を調製します。

PMT電圧(検出感度)はサンプルに応じて調製する必要があります。

パルス処理系

検出器からの電流は電圧パルスに変換されます。

この電圧パルスは検出器が受け取った光の強度と PMT に加えた電圧に比例します。

(パルスの増幅)

検出器から発生する電圧パルスが小さいとき、増幅しなければならないことがあります。その場合、**Lin** と **Log** の 2 つの増幅する方法があります。

Lin : 全てのパルスを設定した **Gain** に基づき、一定の割合に増幅します。

Log : 小さなパルスはより多く、大きなパルスは少しだけ増幅する対数増幅を行います。

免疫蛍光のような強度差の大きな情報を取得する場合は Log を使用し、細胞サイズや DNA 量の解析のような強度差が小さく直線性のある情報を取得する場合は Lin を使用します。

(ディスクリミネーション)

ディスクリミネーションとは、検出された電圧パルスと、ある電圧レベルを比較し、それ以下の電圧パルスをすべてカットするプロセスのことです。

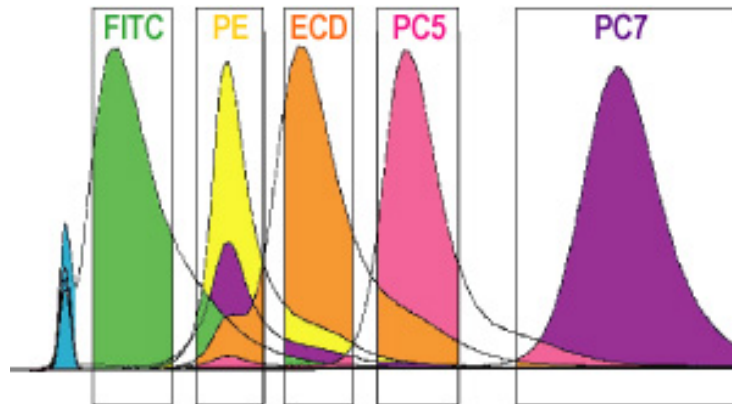
これは実際の測定結果からノイズあるいはデブリ(細胞片)を除外するのに使われます。

通常は、前方散乱光 (FS) だけでディスクリミネータレベルを設定し、残りのディスクリミネータはオフにします。

こうすることにより、ある細胞サイズで足切りをかけ、それより大きい細胞に関してだけデータを取ることになります。

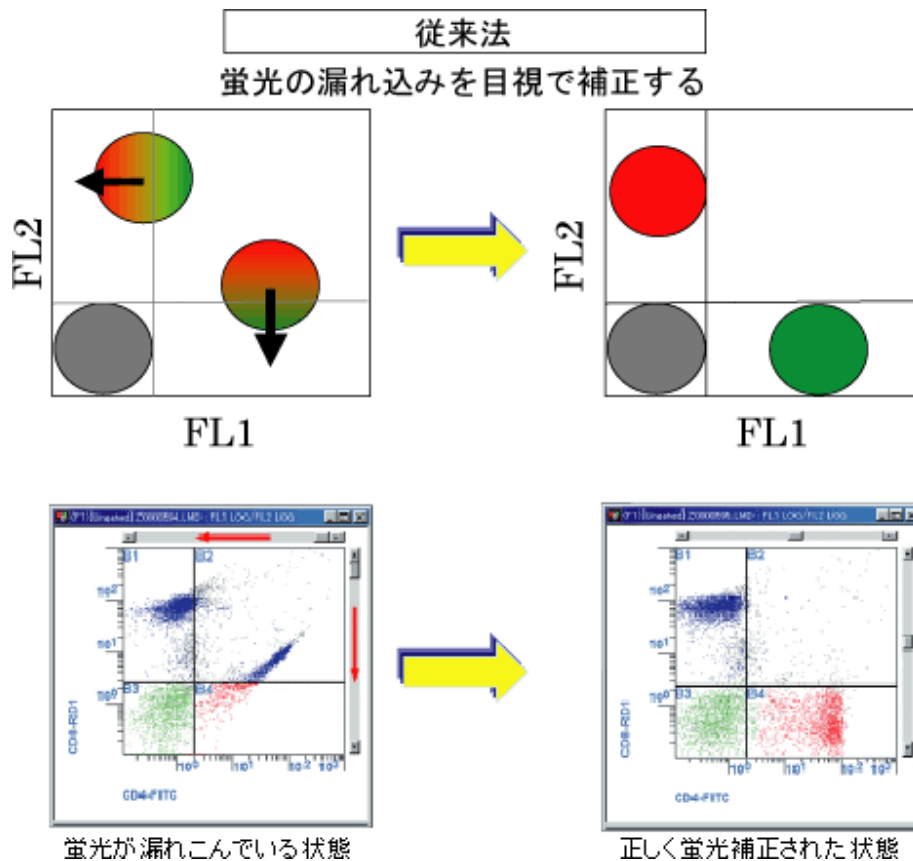
(蛍光補正)

蛍光色素は、長分布 (スペクトル) を持つため、光学フィルタで波長域別に分離しても、各検出器には目的以外の蛍光色素からの蛍光が漏れ込むことがあります。



サンプルを多重染色し、複数の蛍光のマルチカラー測定を行う際には、この漏れ込みがデータに影響するため、漏れ込んだ分を差し引いて、目的の蛍光色素からのみのデータになるよう補正を加える必要があります。これを**蛍光補正** (コンペンセーション) と呼びます。

具体的には、あらかじめ単染色したサンプルを流し、グラフを見ながら一つ一つ手動で調製を行い、一定以下の強度の蛍光をカットできる様に調製していきます。

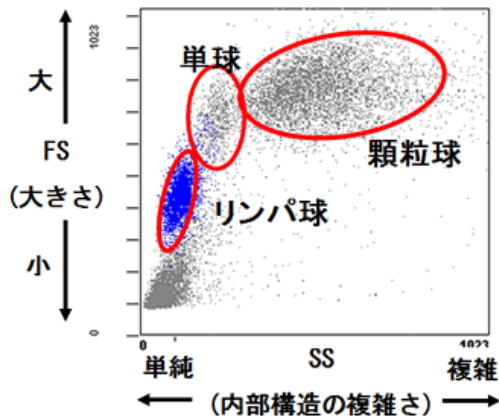


データ処理系

(ヒストグラム)

個々の細胞の測定パラメータをチャンネル値に従ってチャンネル軸上にプロットしてゆくと、細胞数頻度分布が形成されます。このようなグラフをドットプロットと呼びます。

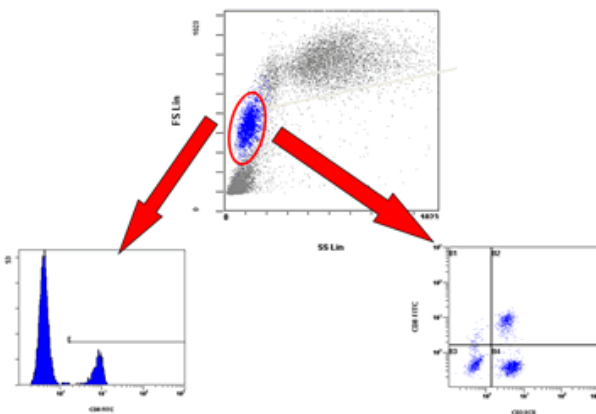
例として FS と SS の 2 パラメータのドットプロットをとると、大きさと内部の複雑さ (顆粒) からヒト末梢血白血球をリンパ球、単球、顆粒球の集団に分けることができます。



パラメータ軸にはログスケール (Log、対数) とリニアスケール (Linear、線形) が選択できます。免疫蛍光のような強度差の大きな情報を取得する場合はログスケールを使用し、細胞周期の解析のような強度差が小さく直線性のある情報を取得する場合はリニアスケールを使用します。

(ゲーティング)

実際にデータを取得するサンプルの中にはデータに必要な細胞やデブリが入っていることがあります。その中の目的とする細胞集団に着目した解析 (クラスター分析) を行うためには、データを絞り込む必要があります。



このデータの絞り込みをゲート解析と呼びます。絞り込み条件は、ゲートリージョン (Gate Region) と呼ばれる領域指定を用いた条件式のような形で設定します。ゲート条件が設定されたヒストグラムには、目的の細胞だけがプロットされます。

また、1 つのグラフに複数のゲートをかけたり、一度ゲートで絞り込んだものをさらにゲートで絞り込む階層的ゲーティングという手法をとることもできます。

(アナリシス)

ヒストグラム上にリージョンを作成すると、そのリージョン内にある細胞に関する統計データを得ることができます。ヒストグラム上にある全細胞の何%がリージョンの中に含まれるか、リージョン内の細胞の数・平均値・CV 値（ばらつき）等を表示します。

測定細胞数(目的細胞集団)が多いと、ばらつきの少ない高い精度の統計データを得ることが出来ます。また、精度は陽性率により異なります。陽性率が 2%の場合、CV 値で 5%の精度が必要ならば、目的細胞を少なくとも 8,000 個は測定する必要があります。

(リストモードデータ (LMD))

測定された情報はリストモードデータ（拡張子 .LMD）として保存されます。

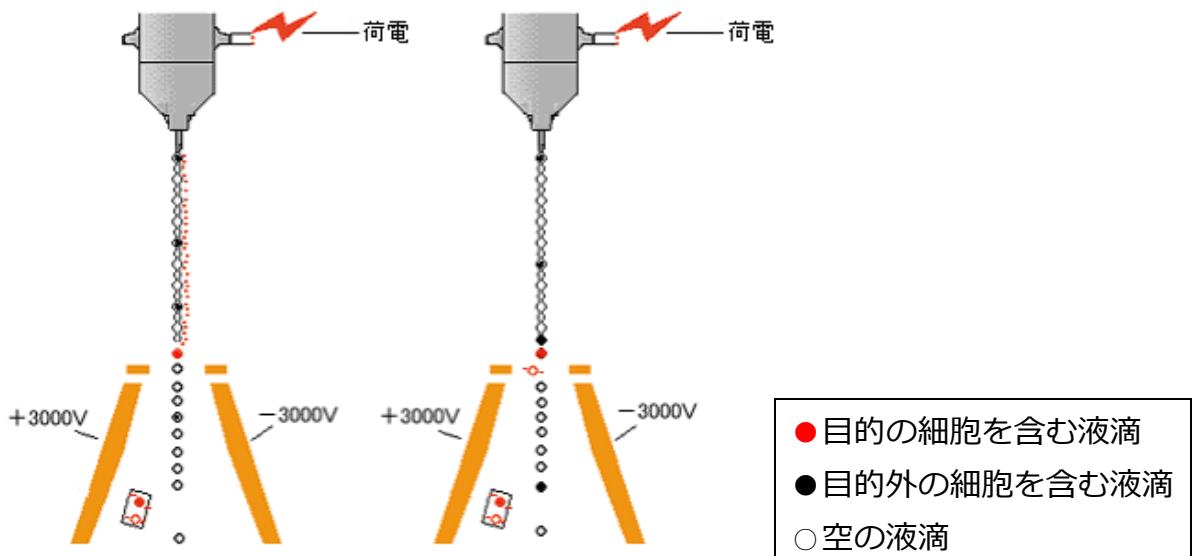
リストモードデータとは、『1 つ 1 つの細胞について、取得したすべてのパラメータの各々の値』を示すデータです。初期のフローサイトメーターは、この方法でデータを取得し、後から解析を行っていました。

コンピュータの進歩と共に、データ解析は測定終了後ではなく、測定中にも行えるようになりました。しかし現在でもリストモードデータは再解析をするのに用いられています。

すでに測定し取得されているリストモードデータを用いれば、各軸のパラメータの組み合わせの変更や、ゲートの領域の変更を自由に何度も行い、測定時とは異なった角度から検討したヒストグラムを得る事が可能です。

ソーティング系

フローサイトメーターには、細胞を分取する機能（ソーティング系）を有したセルソーターと呼ばれる装置もあり、当部門では MoFlo がそれに該当します。

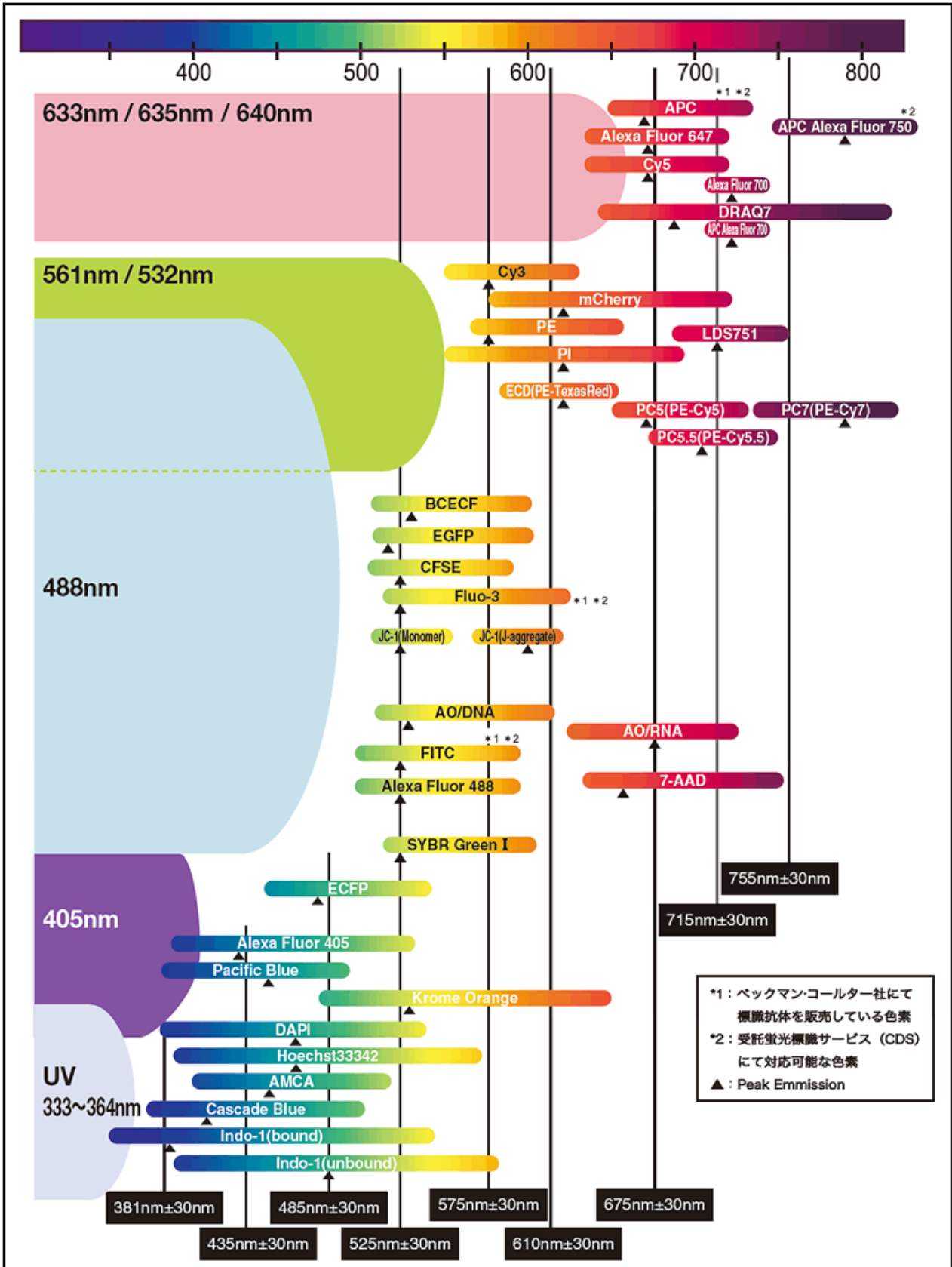


セルソーティングの基本原理は、まず細胞が含まれる液滴を生成して、解析結果に基づいて目的の細胞が含まれる液滴を選択的に荷電します。

これに電場をかけることで目的の液滴を偏向落下させ、目的の細胞を分取します。

<付録>

(蛍光試薬、励起レーザー、蛍光波長 対応一覧表)



一般的なマルチカラー解析の蛍光色素 組み合わせ例

(FC500)

| レーザー | 検出器 | 検出波長 | 蛍光色素 (例) |
|------------------------|-----|------------|-----------------------|
| アルゴンレーザー (488nm) | FL1 | 525nm (BP) | FITC, EGFP, Alexa488 |
| | FL2 | 575nm (BP) | PE |
| | FL3 | 620nm (BP) | ECD, PI |
| | FL4 | 675nm (BP) | PC5 (PE-Cy5), 7AAD |
| | FL5 | 755nm (BP) | PC7 (PE-Cy7) |
| ヘリウムネオンレーザー (633nm) | FL4 | 675nm (BP) | APC, Cy5 |
| | FL5 | 755nm (BP) | APC-Cy7 |

(MoFlo)

| レーザー | 検出器 | 検出波長 | 蛍光色素 (例) |
|------------------------|-----|-------------|----------------------|
| アルゴンレーザー (488nm) | FL1 | 530nm (BP) | FITC, EGFP, Alexa488 |
| | FL2 | 580nm (BP) | PE |
| | FL3 | 670nm (BP) | PC5 (PE-Cy5) |
| | FL4 | 740nm~ (LP) | PC7 (PE-Cy7) |
| UV レーザー (333~364nm) | FL5 | 630nm (BP) | |
| | FL6 | 405nm (BP) | Indo-1 |
| ヘリウムネオンレーザー (633nm) | FL7 | 670nm (BP) | APC, Cy5 |
| | FL8 | 740nm~ (LP) | APC-Cy7 |