



初心者のためのFCM入門



サイトメリーの夢、追いかけて

ベックマン・コールター株式会社

サイトメトリードットコム

<http://www.bc-cytometry.com>

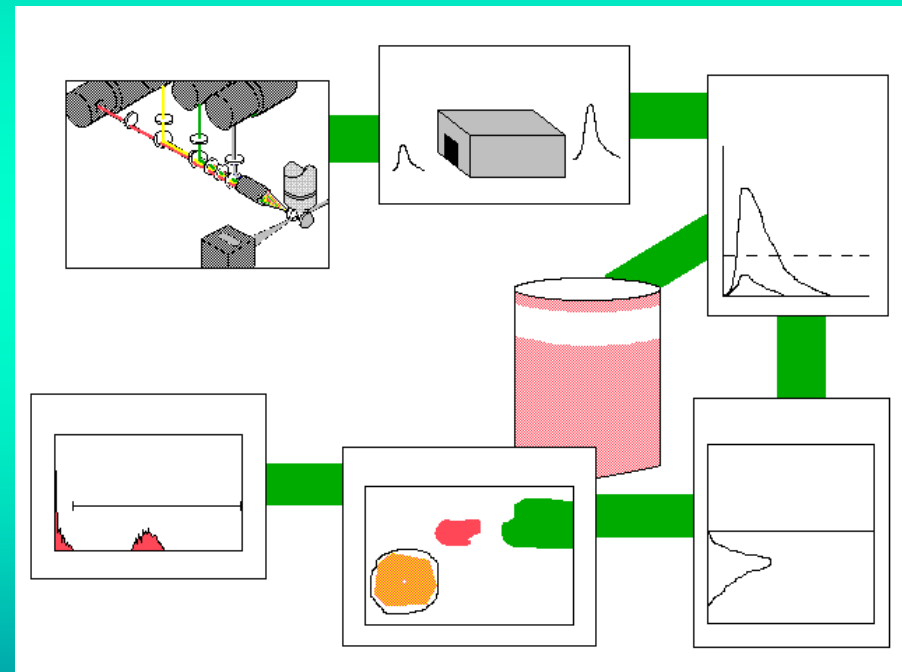
目次

はじめに

FCMの流れ

1. サンプル
2. フロー系
3. 光学検出系
4. データ解析
5. 機器設定操作

アプリケーション



フローサイトメトリーと フローサイトメーター

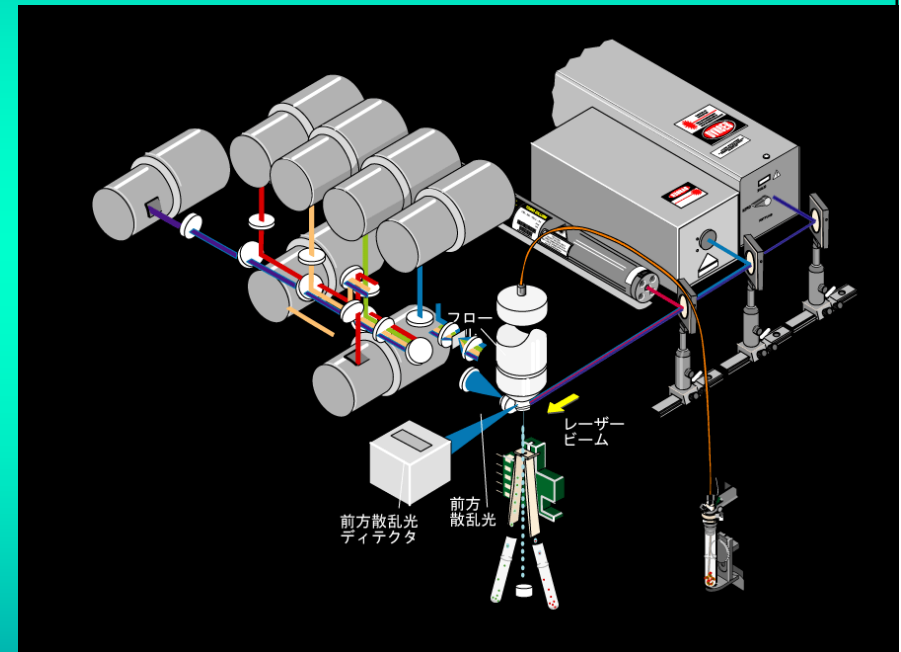
Flow CytoMetry

(流れ) (細胞) (測定法)

Flow CytoMeter

(流れ) (細胞) (測定装置)

- ・セルアナライザー
- ・セルソーター



フローサイトメーター

蛍光顕微鏡と比較して・・・

	蛍光顕微鏡	フローサイトメーター
測定細胞数	100個/分 程度	数千個/秒 以上
検出	人間の目	複数の各種検出器
蛍光	1カラー	マルチカラー
細胞の解析 (クラスター分析)	主観的	定量 客観的 (ゲート解析可能)
特定の細胞の分取	手動 (マニピレーター)	自動 高速 (ソーティング)
光源	ランプ (広波長)	レーザ ランプ (単一波長)

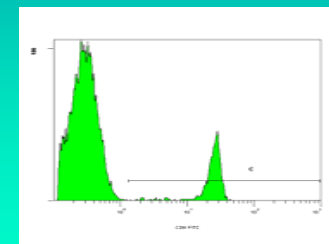
サンプル測定から解析までの概要

- 細胞が**1個ずつ**、集光されたレーザー光の中を通過するようにサンプルを流す。
- 細胞がレーザー光の中を通過する時に発生する、各種の**散乱光と蛍光**などを同時に測定。
- 散乱光と蛍光の強さを**数値データ化**し、複数の**ヒストグラム**を作って統計解析する。

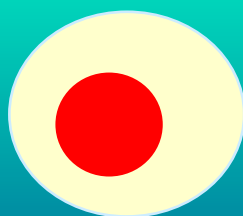
蛍光？

フローサイトメーターで測定するときの蛍光とは・・・

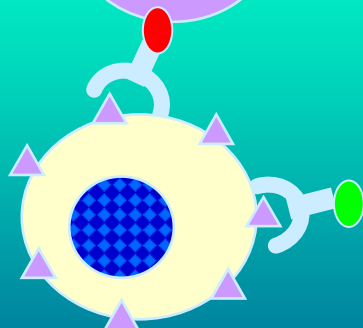
蛍光ラベル=例えば、蛍光標識
モノクローナル抗体



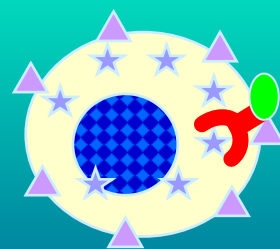
フローサイトメーター



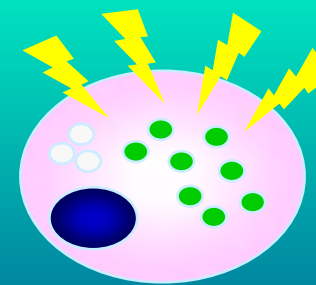
核DNA量



細胞表面抗原



細胞内抗原



酵素活性

etc...



FCMの流れ

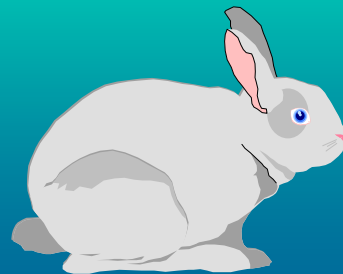
1. サンプル

フローサイトメーターで 測定可能なサンプルは？

■ 細胞(粒子)などの懸濁液

－ 個々の細胞(粒子)がバラバラに浮遊している

- － 血液細胞
- － 動物および植物の細胞
- － 微生物、酵母、細菌
- － 海洋生物、プランクトン
- － ビーズ
- － 花粉
など

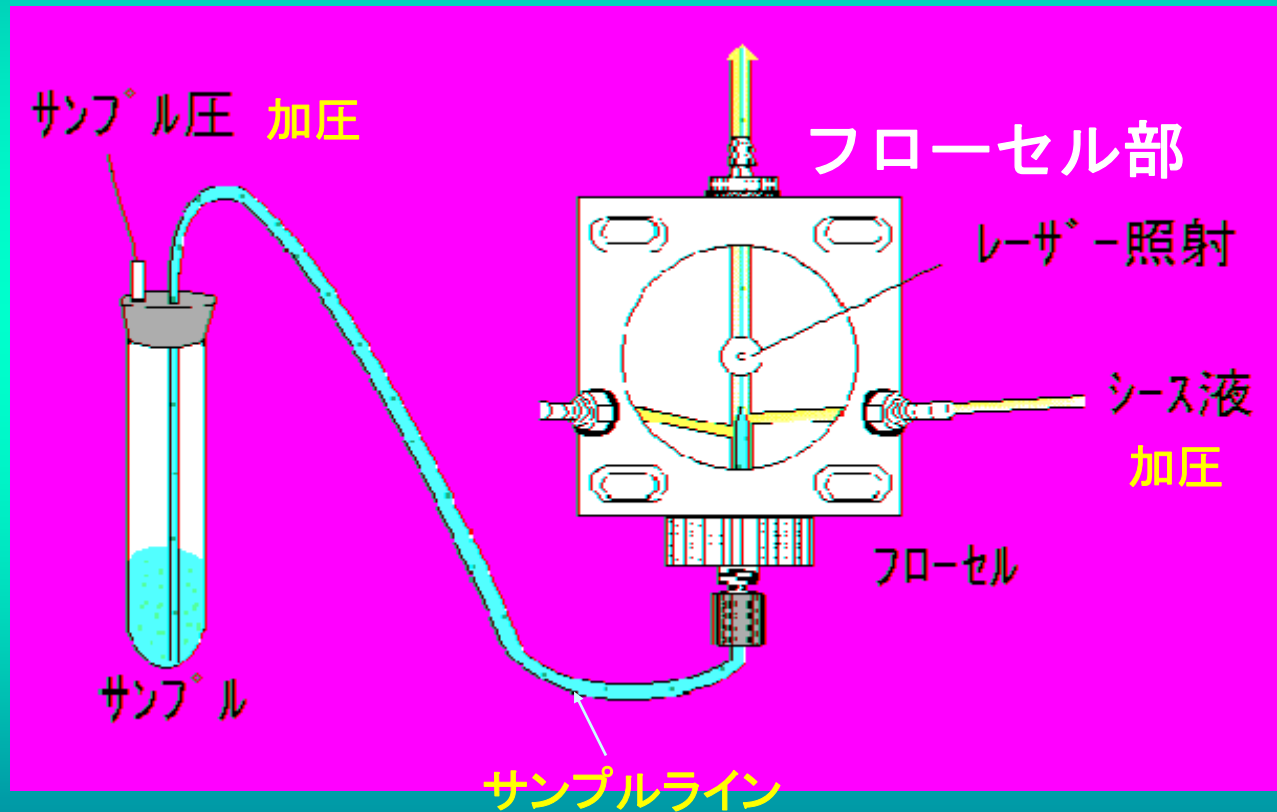


サンプルの条件

- サイズ：約0.5～50 μm 程度
- 至適濃度：約 $1\sim 5 \times 10^6$ 個 / mL
- サンプル量：約200 μL 以上
- 通常、蛍光があるもの（蛍光ラベル）

2. フロー系

フロー系がキーポイント

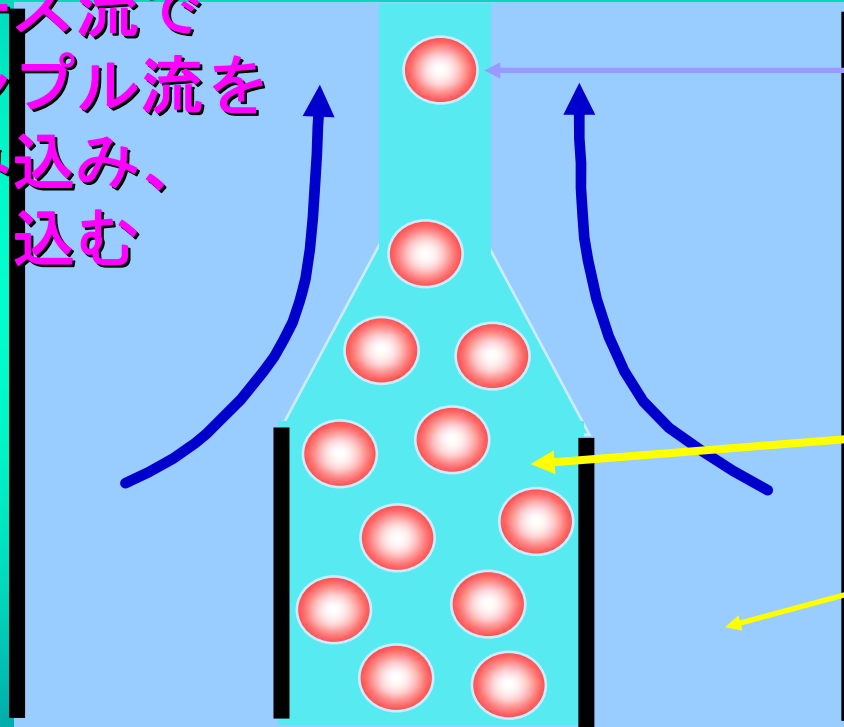


サンプル液とシース液を押し出す

サンプル流を絞り込む

測定分解能のキーポイント

シース流で
サンプル流を
包み込み、
絞り込む



細胞が1個ずつ一列に
まっすぐ流れる（層流）

サンプル液（サンプル流）

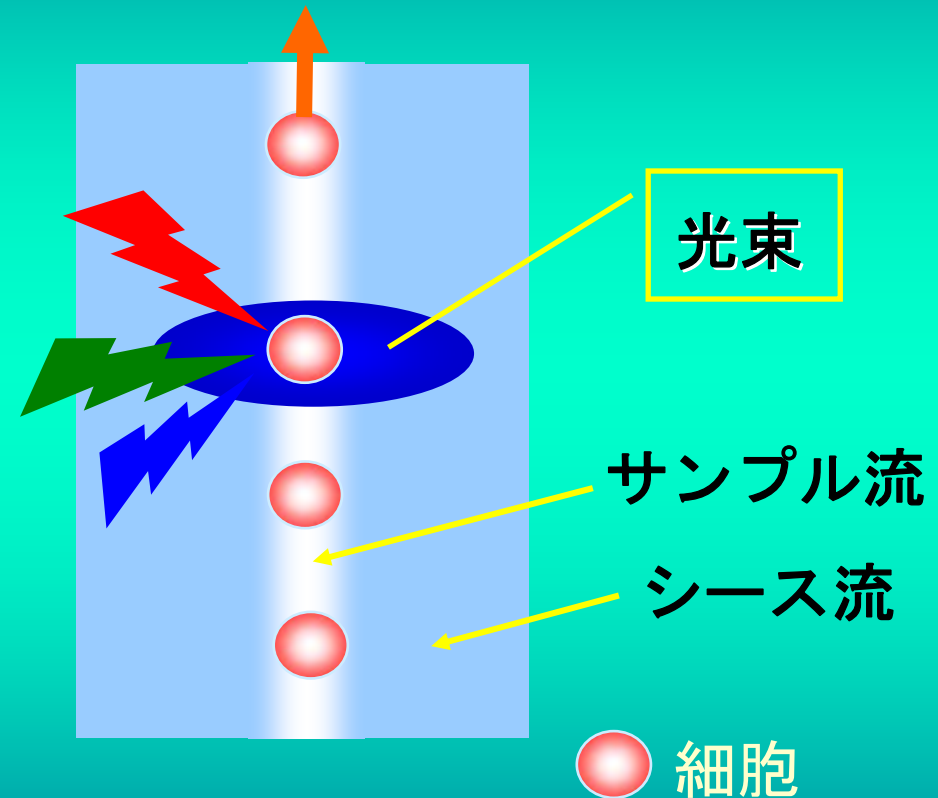
シース液（シース流）

● 細胞

シース圧とサンプル圧の差
を利用して絞り込む
流体力学的絞り込み

レーザーを照射

- レーザー光の中を1個ずつ細胞が通過する。
- 細胞の特性に応じた散乱光と蛍光が生じる。



3. 光学検出系

光源、通常はレーザー

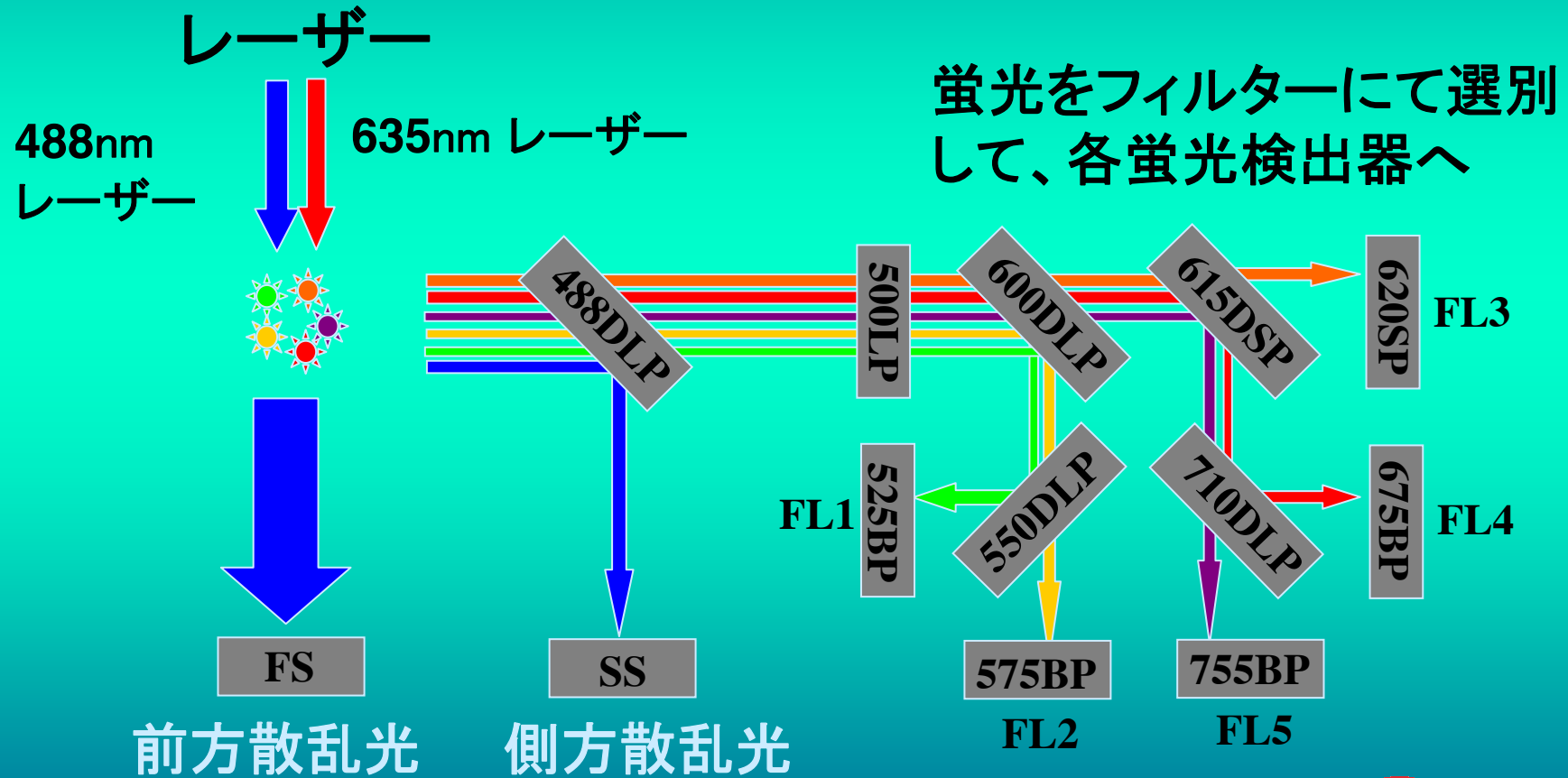
波長が単一で、強度、位相を一定にし、
絞り込むことができる

FCMで使用している主なレーザーと波長

Arイオンまたは固体	青(488nm)
He-Neまたは半導体	赤(633nm)
半導体	青紫(405nm)
Arイオンまたは固体	UV(355nm)

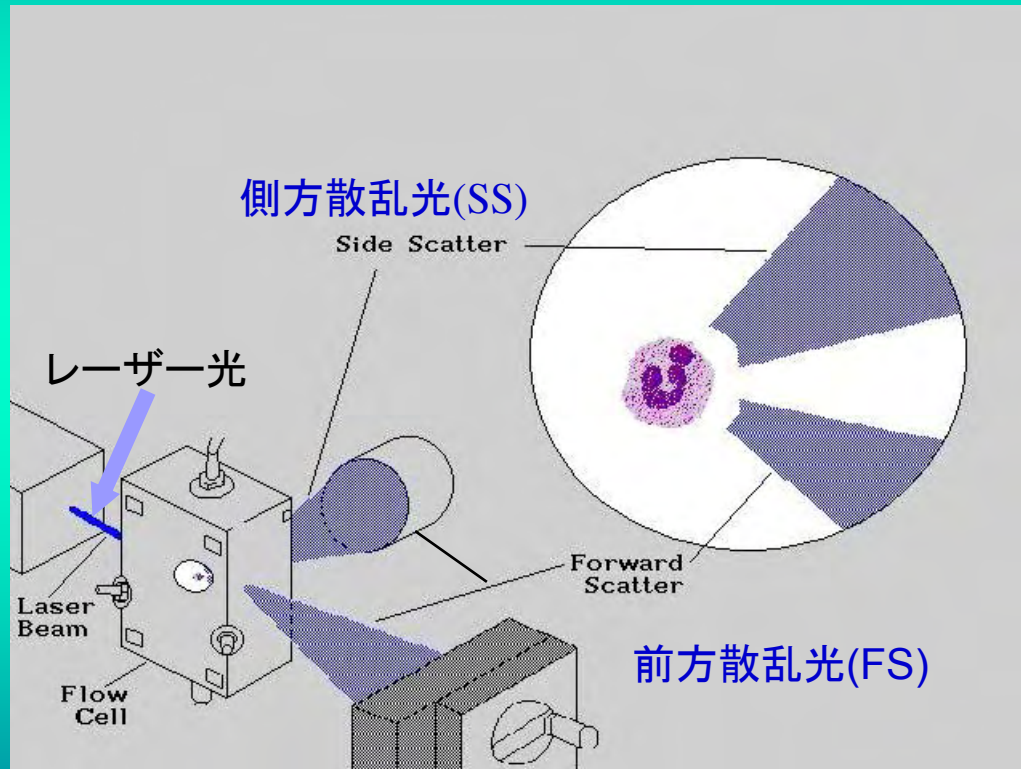
光学検出系

Cytomics FC 500 の場合の光学フィルター例



サンプルの何が測定されているか

1. 散乱光は形態情報



•前方散乱光:FS

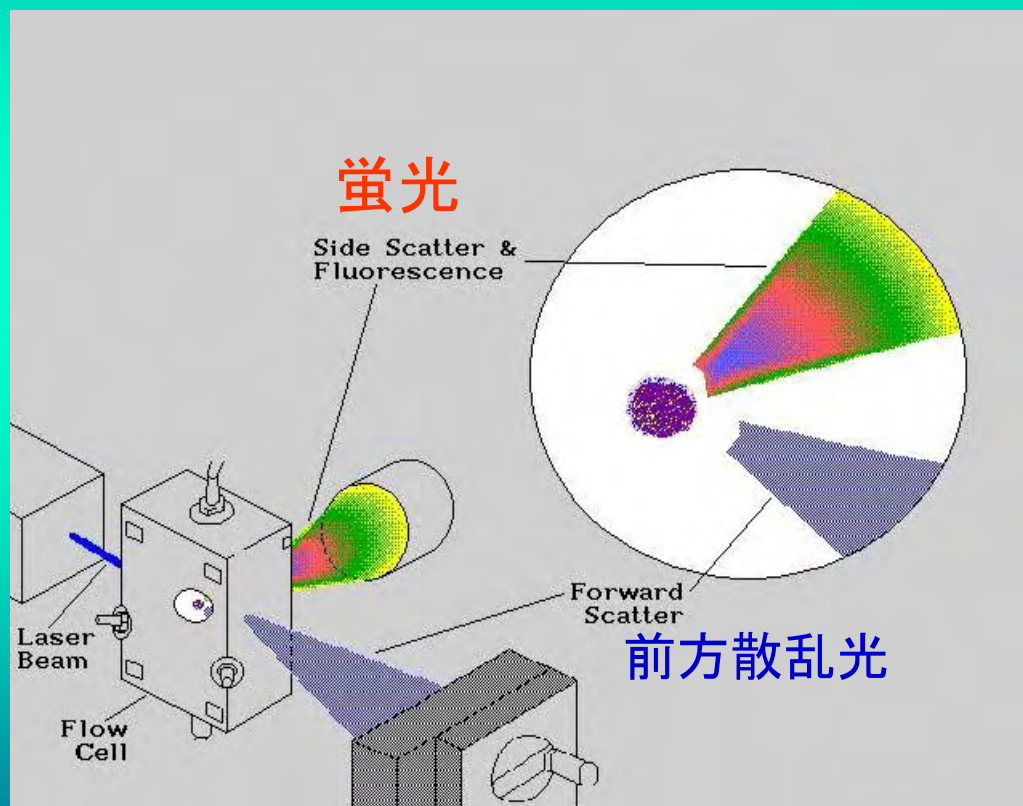
→ 大きさの目安

•側方散乱光:SS

→ 内部構造の複雑さ

サンプルの何が測定されているか

2. 蛍光は蛍光色素



- 蛍光色素が結合した細胞を検出
- 蛍光強度は各細胞が持つ蛍光色素の分子数に比例

蛍光波長は各蛍光色素の特性による。

励起波長も同上。

検出器と主な蛍光色素

Cytomics FC 500 の場合

		Arレーザー(青)		レーザー(赤)
検出	波長	抗体	DNA	抗体
FL1	525	FITC		
FL2	575	PE/RD1		
FL3	620	ECD	PI	
FL4	675	PC5	7-AAD	APC/Cy5
FL5	755	PC7		

光学フィルターは、自由に換えることが可能

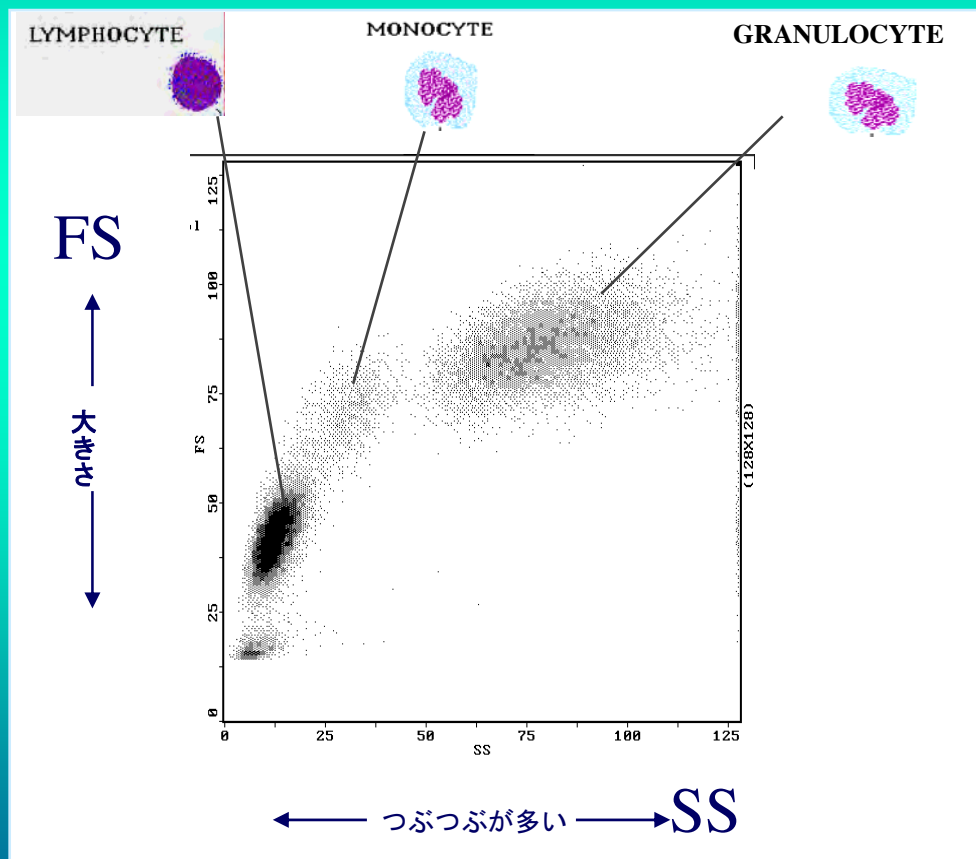
4. データ解析

-2カラー表面抗原解析の場合-

細胞の散乱光データ

目的細胞集団の把握

FSとSSで形態を区別



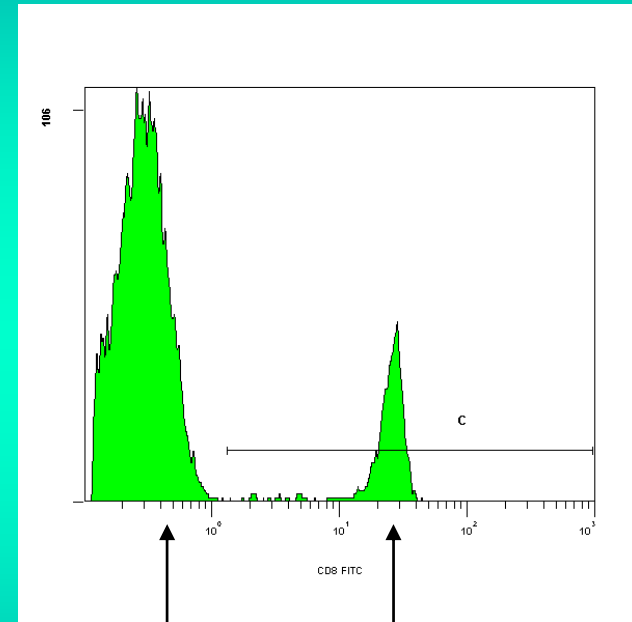
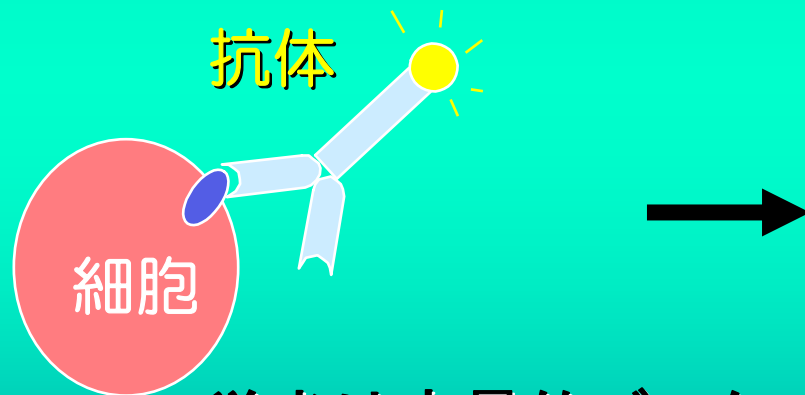
ヒト末梢血散乱光データ

- 前方散乱光: FS
細胞の大きさの目安
- 側方散乱光: SS
細胞の内部構造の複雑さの目安
- 散乱光は定性的データ
- 大きさを定量できるFCMがある(ハイレゾFCM)

目的細胞の蛍光データ

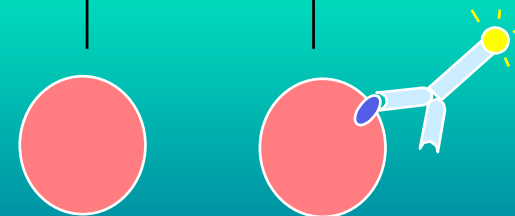
蛍光標識モノクローナル抗体

蛍光色素を抗体で
細胞に付ける



蛍光は定量的データ

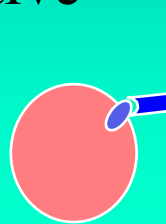
同時に測定できる蛍光の
種類は、機種に依る



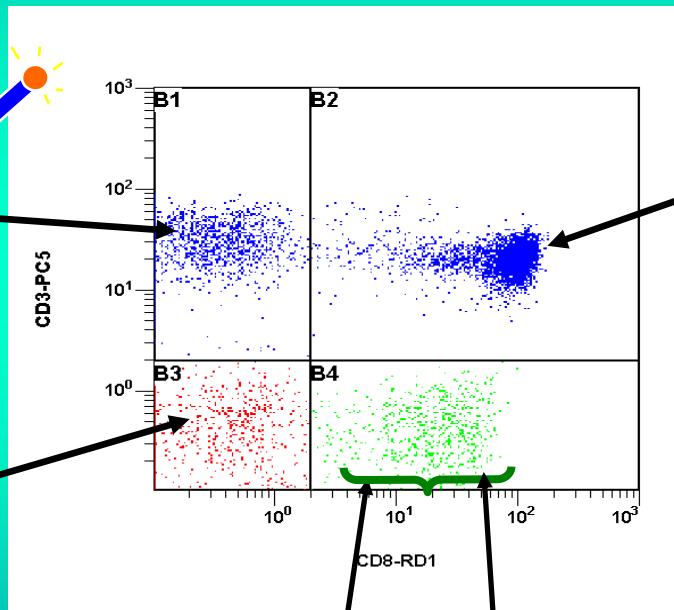
2カラー表面抗原解析データ

蛍光標識モノクローナル抗体を2種類使用

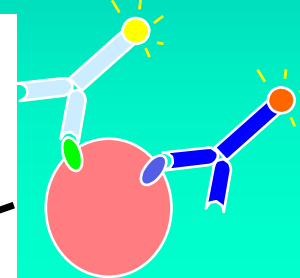
Single Positive



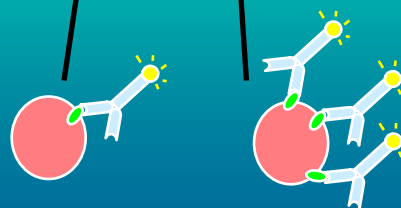
Double Negative



Double Positive



Single Positive

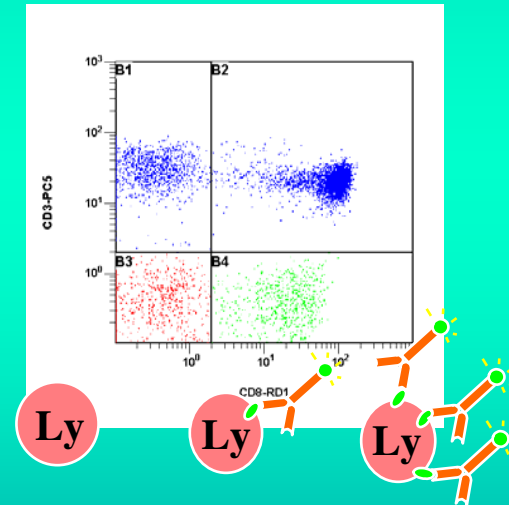
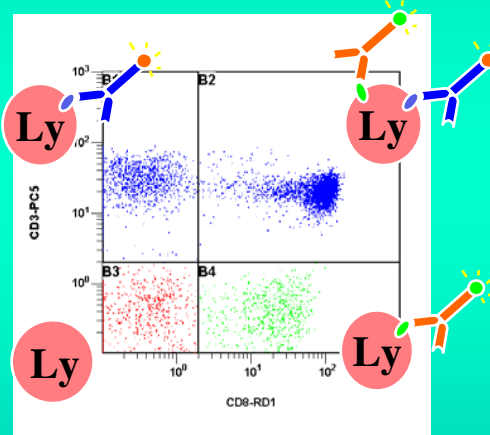
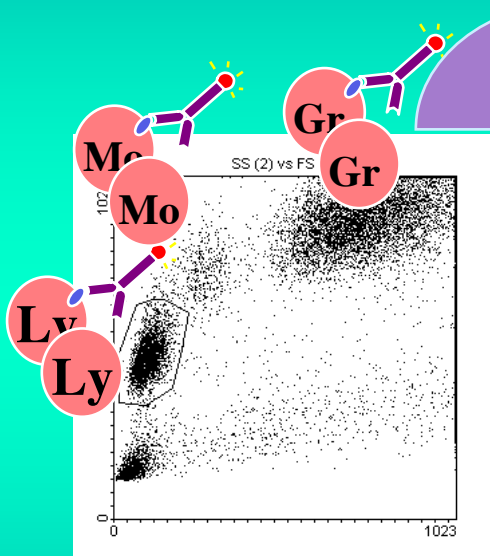


データ解析のまとめ

2カラー表面抗原解析の場合

ゲーティング

リンパ球集団



どういう形態の
細胞

特定集団の細胞で
どういう
表面抗原

どのくらい
発現しているか

5. 機器設定操作

-2カラー表面抗原解析の場合-

機器設定操作手順

ネガティブコントロール測定

- ・散乱光・蛍光の感度調整
- ・ディスクリミネータの設定
- ・ゲートの設定
- ・蛍光の感度微調整

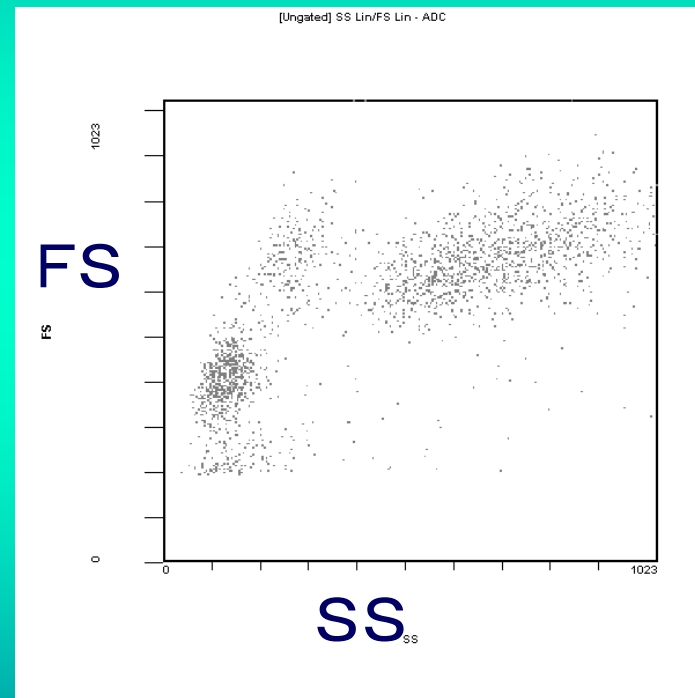
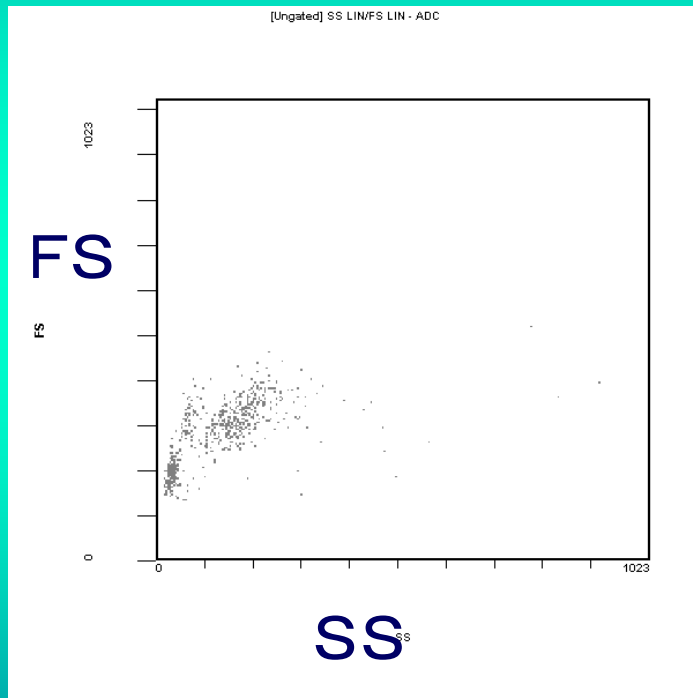
単染色サンプル測定

- ・コンペンセーション

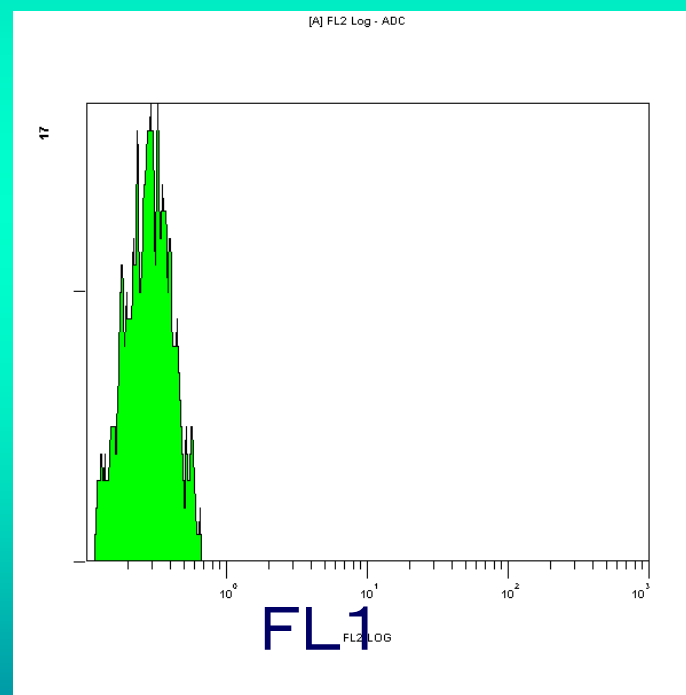
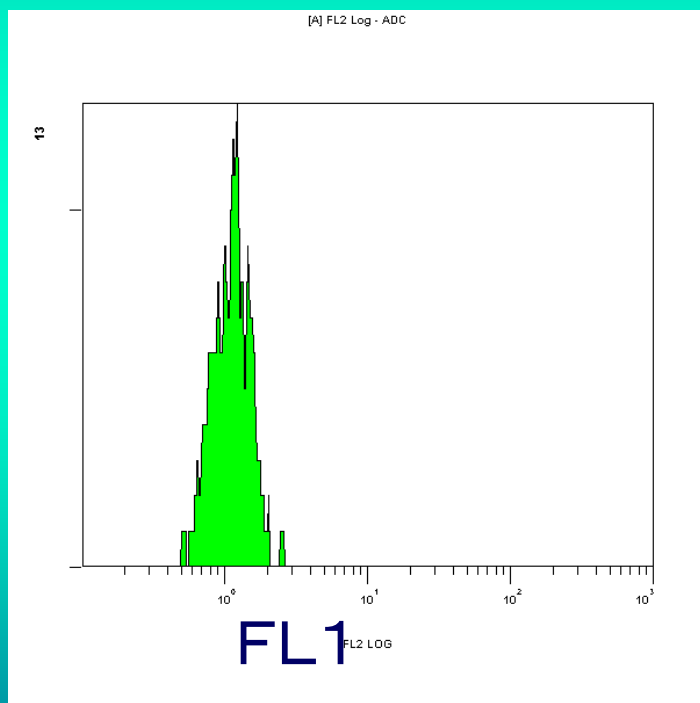
多重染色サンプル

この前に、サンプル調製、機器調整、精度管理が必要です。

感度調整 -散乱光-



感度調整 - 蛍光 -



ディスクリミネータとは

■ ディスクリミネータとは

- デブリなどから発生した取得不要なシグナルは切り捨てて、細胞から発生した取得が必要なシグナルをA/Dコンバータへ送る
- その閾値を設定する

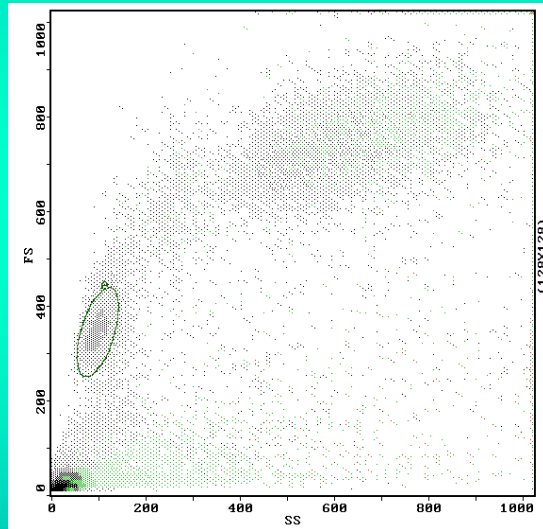
■ 調整の必要性と目的

- ノイズを除去し、回路が検出できるようにする
- データの容量を節約する

ディスクリミネータの設定

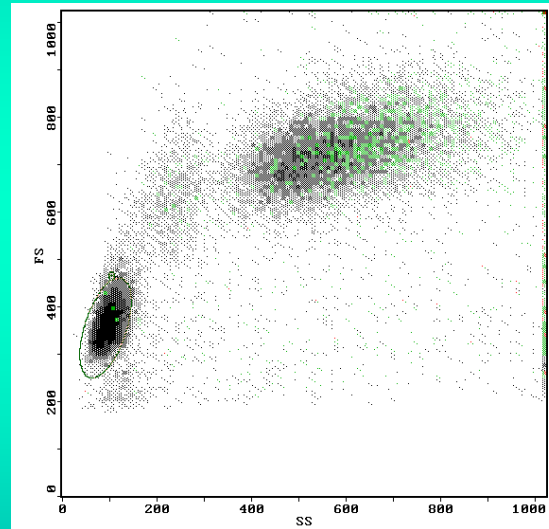
通常、前方散乱光でレベル設定

縦軸:FS 横軸:SS

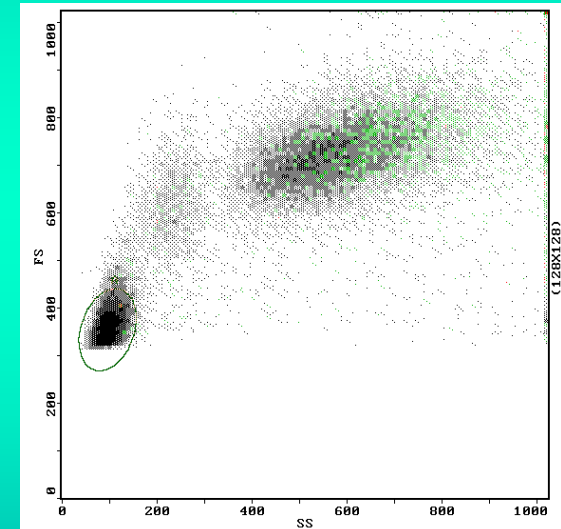


FS:10

低すぎる



FS:150

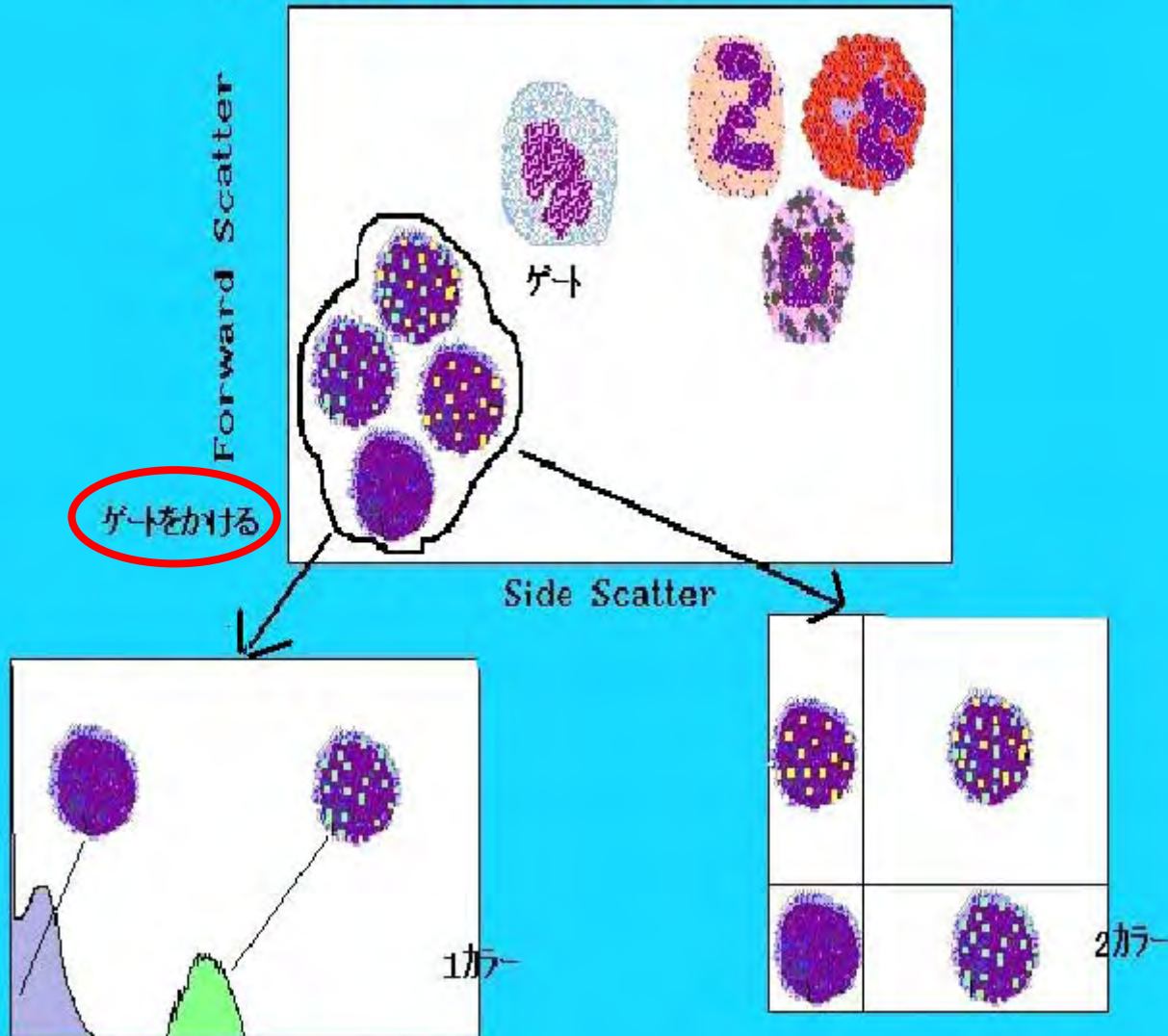


FS:250

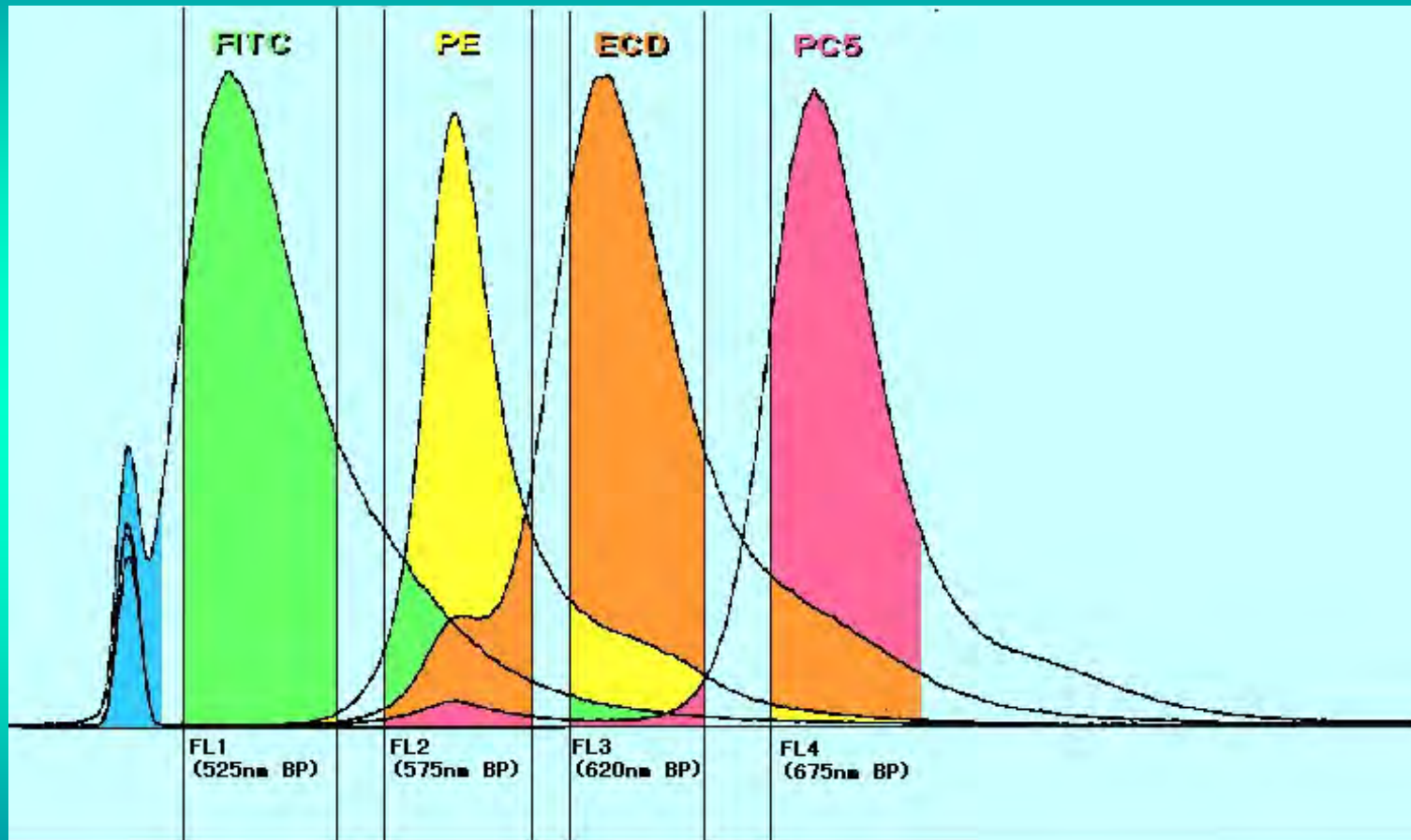
高すぎる

ゲート解析

散乱光の2パラメーターヒストグラム



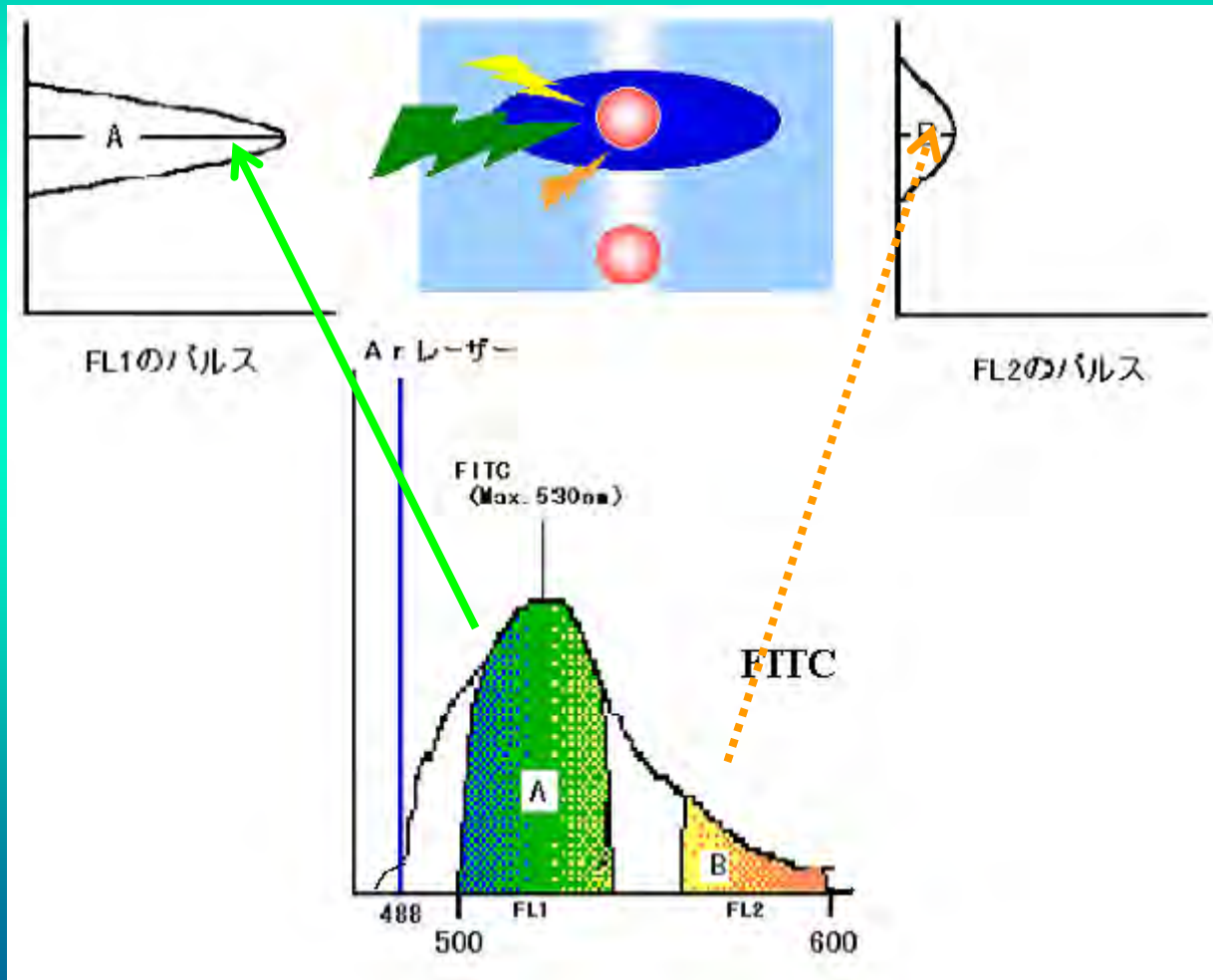
蛍光の漏れ込みとは



漏れ込みが起こる理由： 蛍光色素の広い蛍光分布

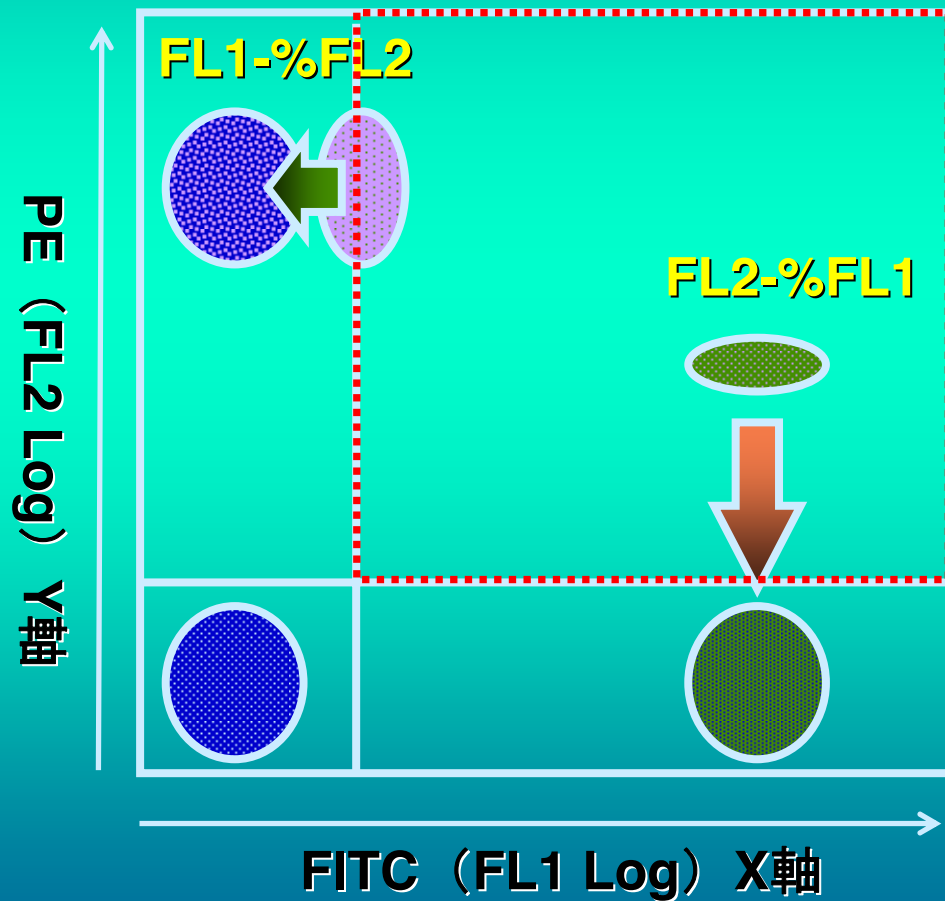
蛍光の漏れ込みとは

目的外の蛍光検出器への入光




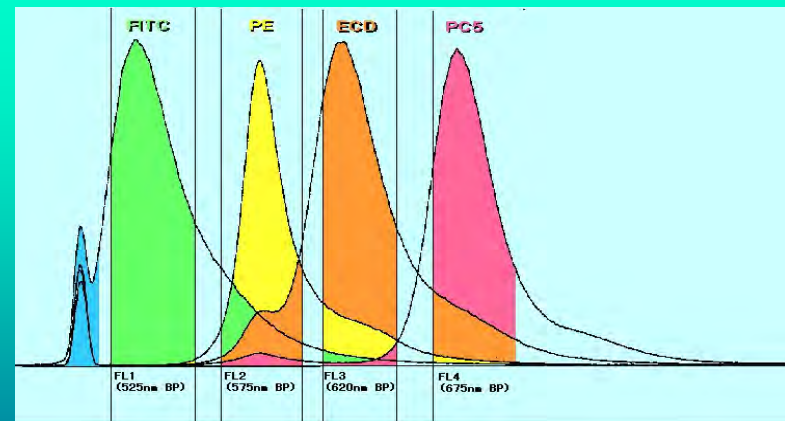
コンペンセーション (1)

マニュアル法



蛍光補正值調整の目安

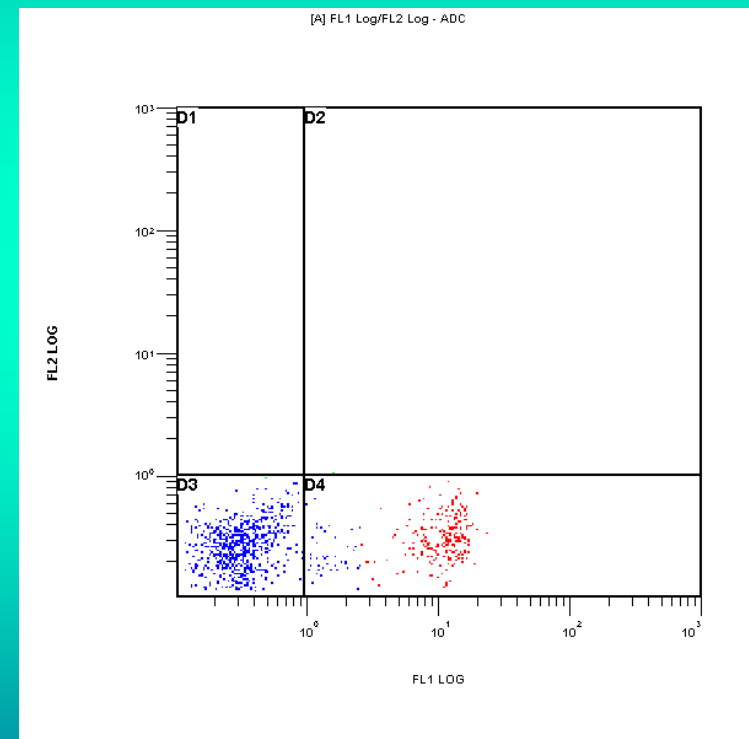
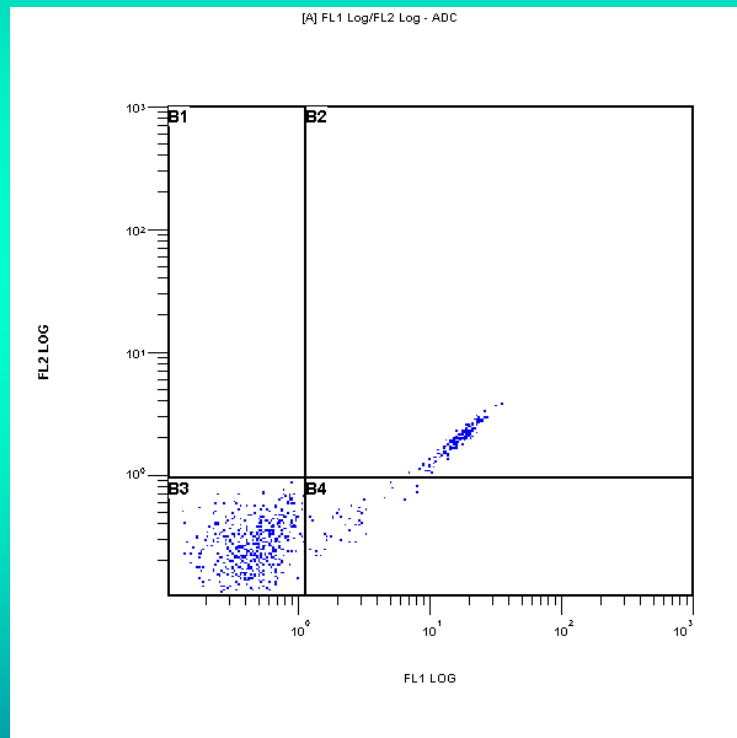
- ① +/+領域  内に入らない
- ② 平均蛍光強度 (Mean Yまたは Mean X)
- ③ ポピュレーションの見た目のバランス



コンペンセーション (2)

マニュアル法

1. FITCの単染色細胞でFL2への漏れこみを補正

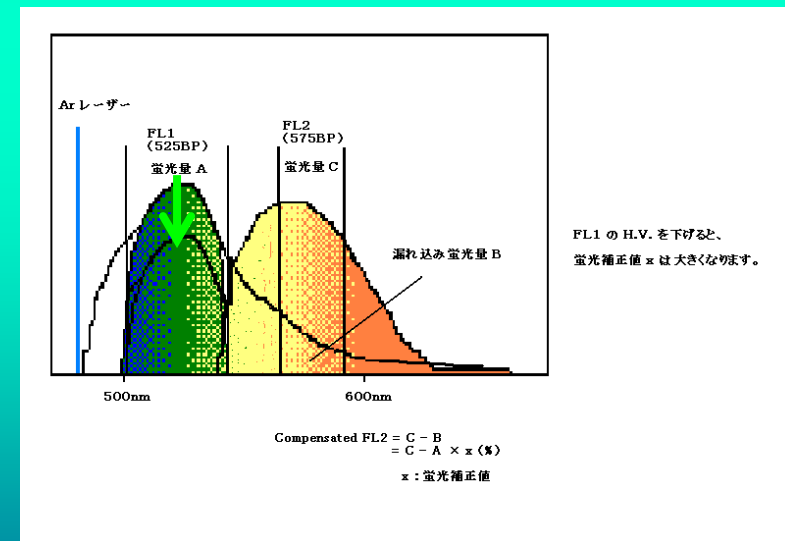
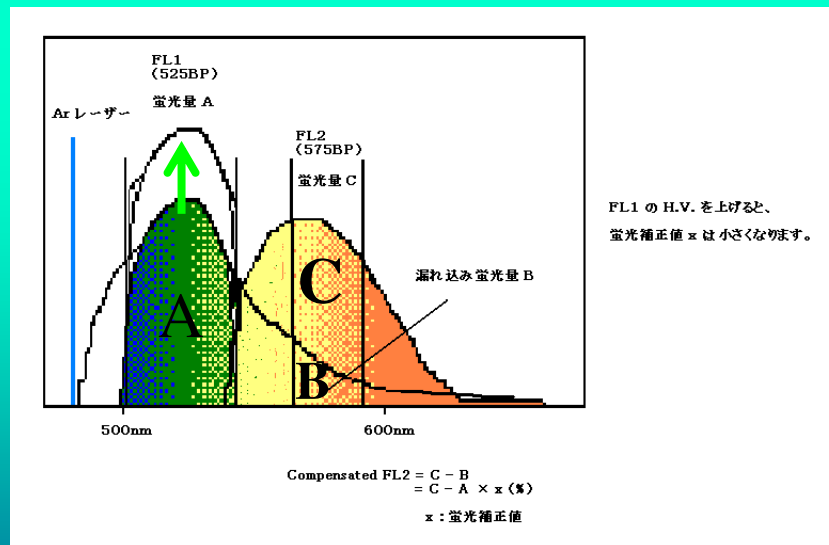


2. 同様にPE単染色細胞でFL1への漏れこみを補正

コンペンセーション (3)

正確な調整を行うためのポイント

- 蛍光の感度設定をあらかじめ正しく調整しておくこと
- コンペンセーション後に蛍光感度を変更した場合は、再度コンペンセーションをやり直さなければならない
- できれば、高精度自動蛍光補正ADCを使用

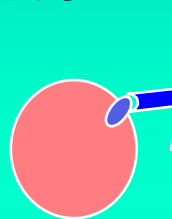


http://www.bc-cytometry.com/FCM/ADC_compensation.html

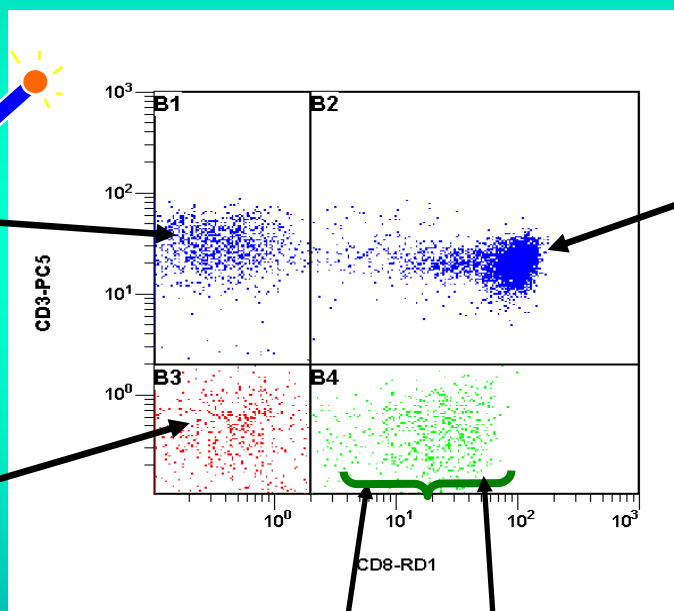
2カラー表面抗原解析データ

4つの区分の陽性率%を求める

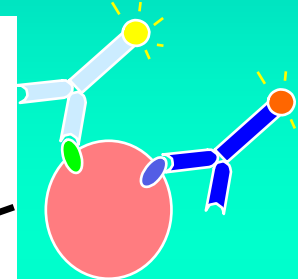
Single Positive



Double Negative



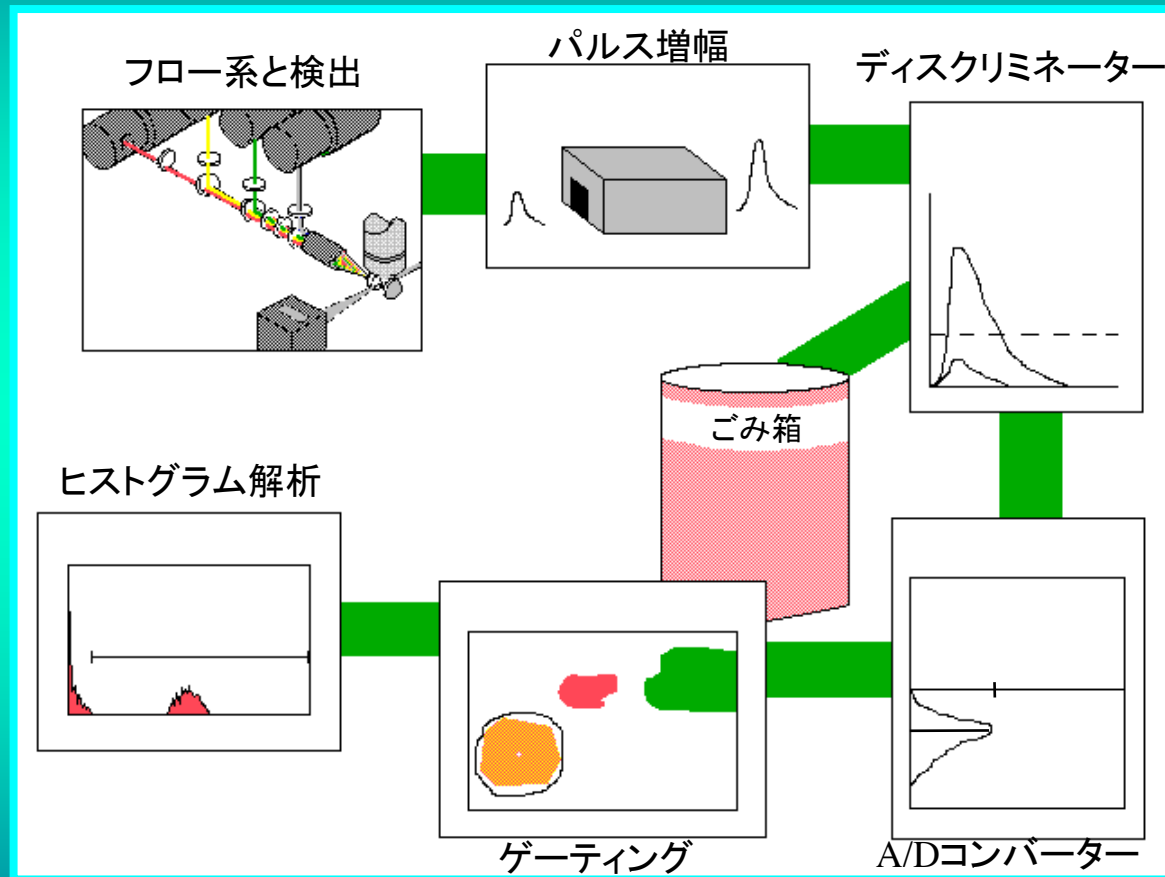
Double Positive



Single Positive



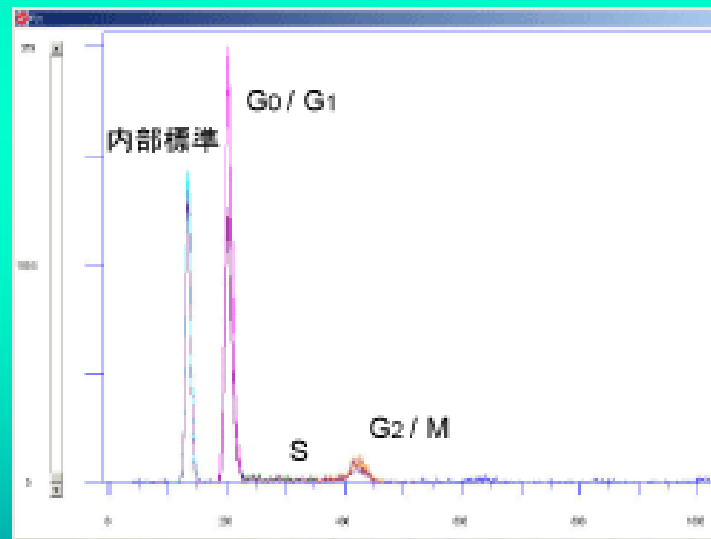
FCMの流れ



<http://www.bc-cytometry.com/FCM/fcmprinciple.html>

FCMのアプリケーション

高分解能 細胞周期

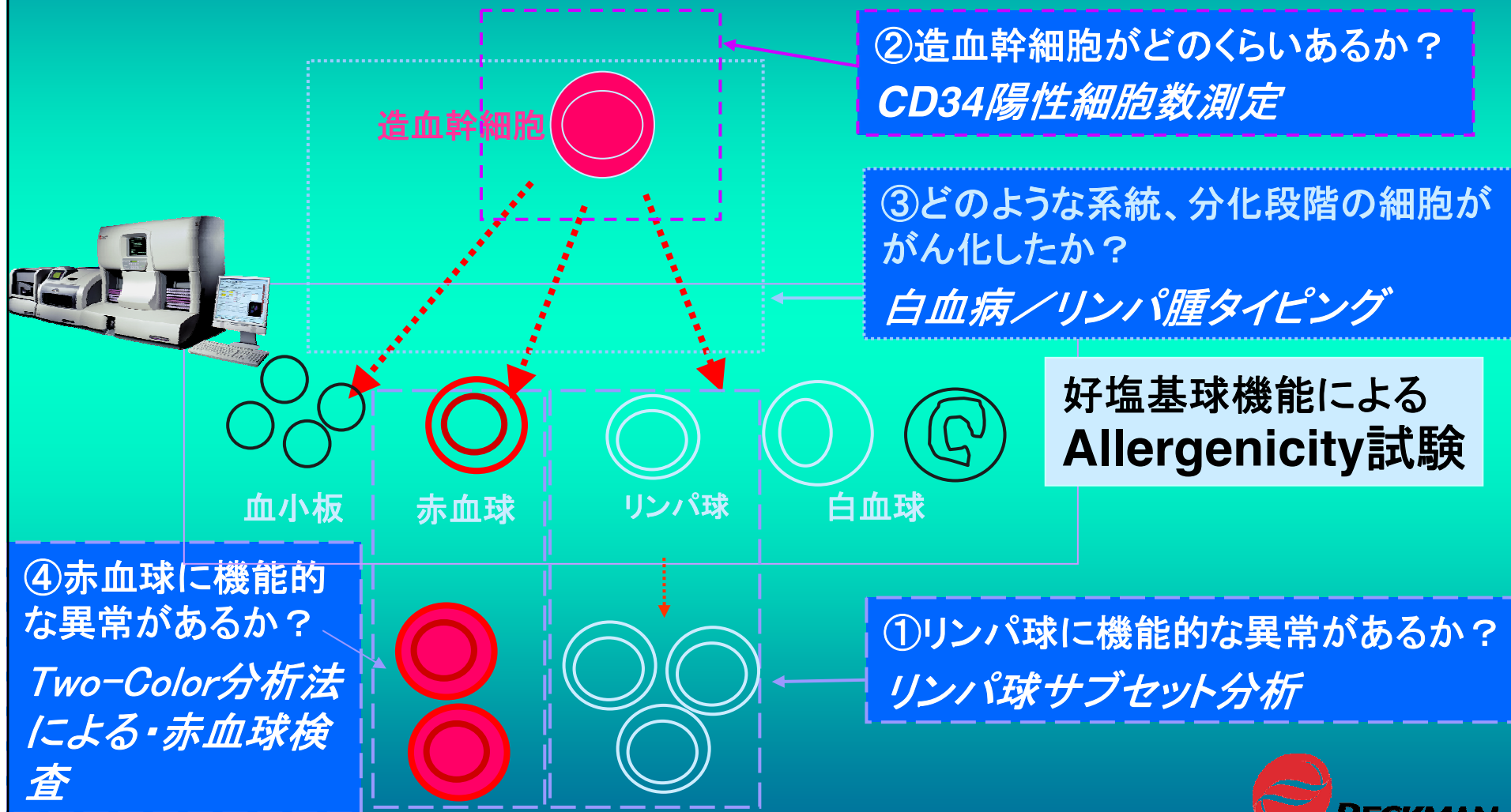


主なアプリケーション

- 表面マーカー解析（細胞表面抗原）
- 細胞内マーカー解析
- 細胞内サイトカイン解析
- 細胞周期解析
- アポトーシス解析
- 細胞・細菌の生死数解析
- フロービーズアレイ
- その他

クリニカルアプリケーション

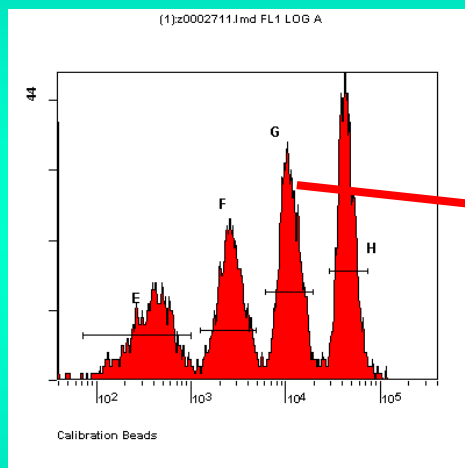
細胞表面抗原 陽性率解析



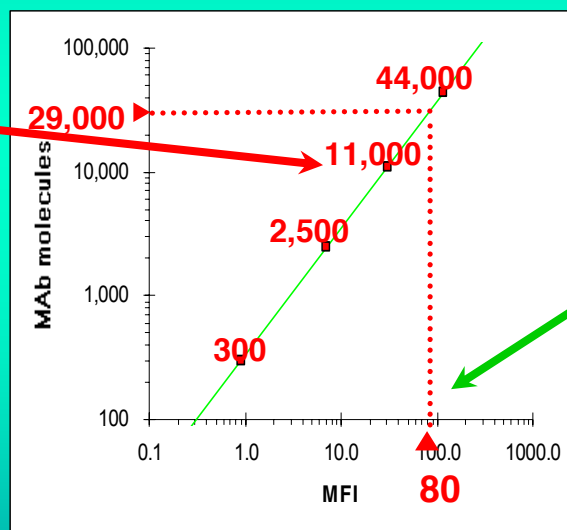
細胞表面抗原の定量測定

陽性率から抗原定量へ

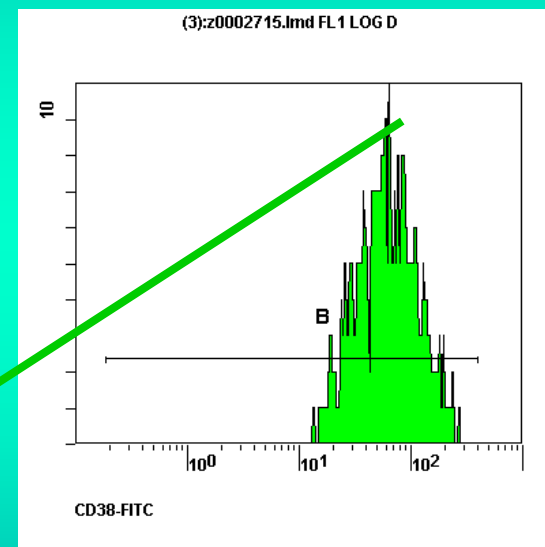
標準物質



検量線作成



サンプル



*Molecule And Receptor Quantitation
Using Immunofluorescence Standardization*

細胞表面抗原解析以外にも 多くのアプリケーションがあります

<http://www.bc-cytometry.com/application/appli-Topics-thumbnaill.html>

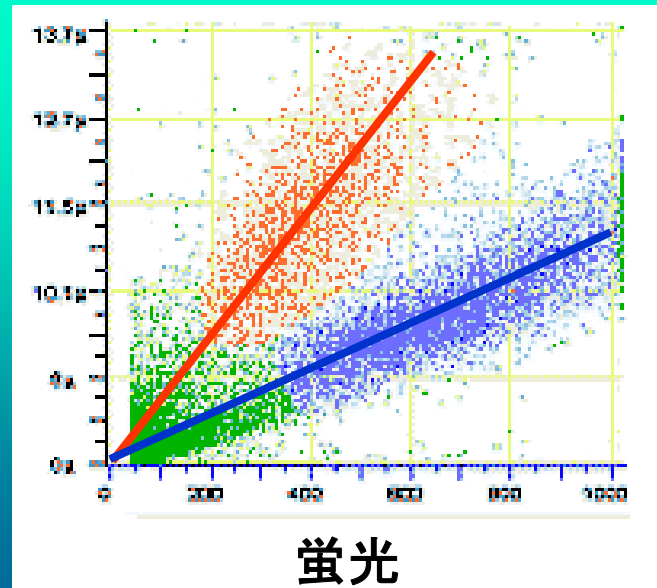
<http://www.bc-cytometry.com/application.html>

「挑戦と進歩」



細胞径

生細胞内イオン濃度解析





サイトメトリーの夢、追いかけて

ベックマン・コールター Webマスター
cytometry@beckmancoulter.co.jp