

FlowPRA ユーザのための FCM 機器講座

測定条件設定のポイントと
機器の精度管理

測定条件設定のポイント for FlowPRA

1. FCM の特徴と測定 / 解析の原理
2. 測定条件設定と FlowPRA データ
 - Flow Rate
 - ディスクリミネータ
 - 感度
 - コンペンセーション

FCM の特徴と測定 / 解析の原理

FCM とは？

測定の仕組み

解析とデータの意味

FCMとは？

Flow Cytometry
(流れ) (細胞) (測定法)

Flow Cytometer
(流れ) (細胞) (測定装置)

フローサイトメトリー (FCM) (フローサイトメーター)



➤ “Flow” Cytometry=細胞を「流して」解析する技術

- 1953年 コールターカウンター誕生(血球計数機と共通の起源)。
- 1960年代 米国マンハッタン計画により、
放射能の人体への影響を調べる為に
NIH、NCIを通じロスアラモス研究所にて
機器開発研究を開始。
- 1972年 FASEBにてセルソーターのプロトタイプを発表。

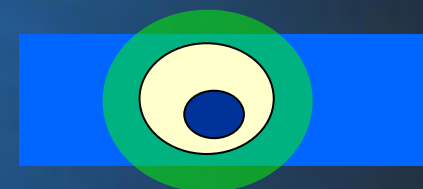


➤ 細胞や粒子の個々の特性を調べることができる

(光を当てた時に)細胞から出る光の強さ(明るさ)をデータ化して
(細胞集団としての)サンプルを統計学的に解析

散乱光 : 形態的特徴(大きさや内部構造など)の情報を得る

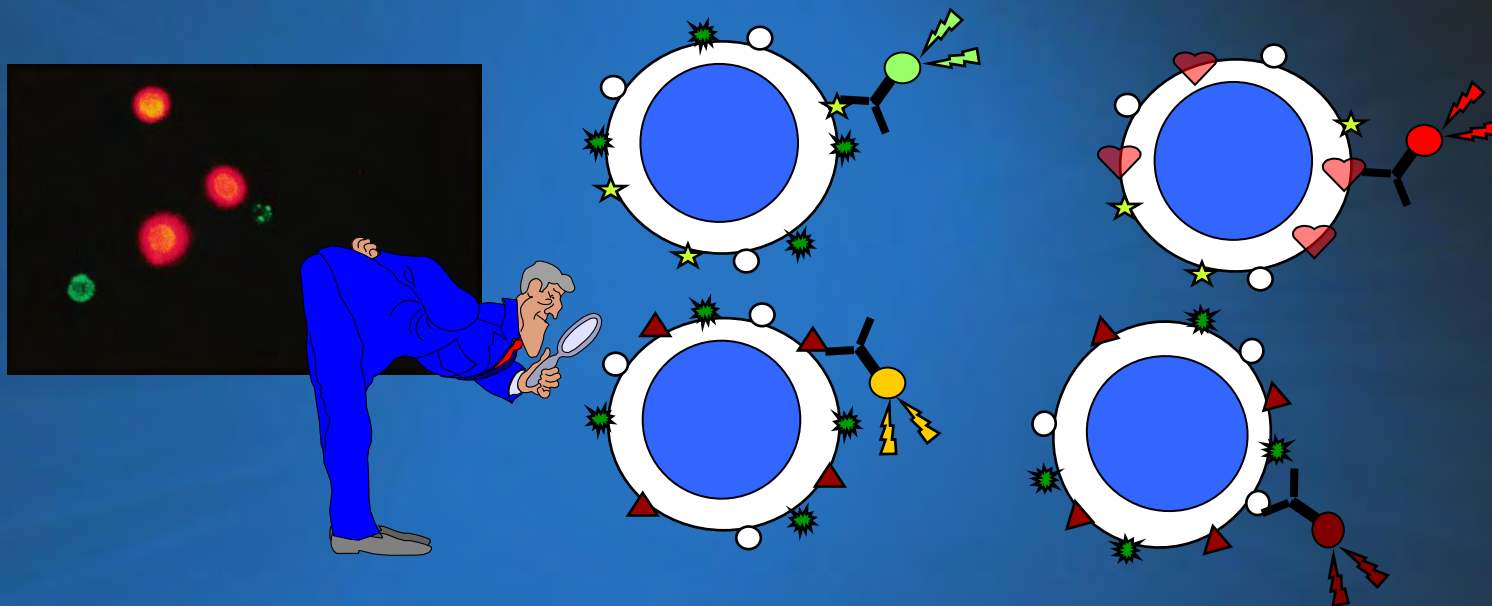
蛍光 : 蛍光強度から抗原量やDNA量などの情報を得る



細胞表面マーカー(表面抗原)分析

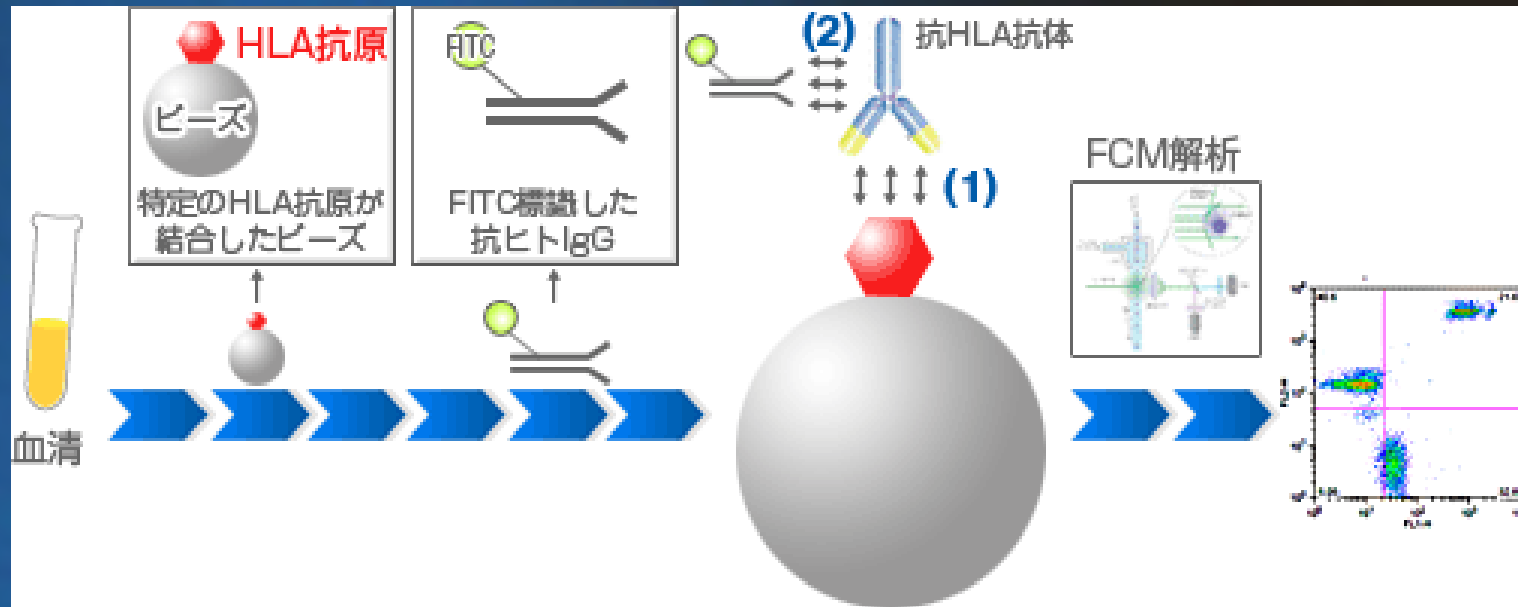
細胞に目印を付ける

細胞固有の目印となるタンパク(マーカー分子)に結合する蛍光標識モノクローナル抗体で細胞を光らせる



FlowPRA (既存抗体検査)

FlowPRA法



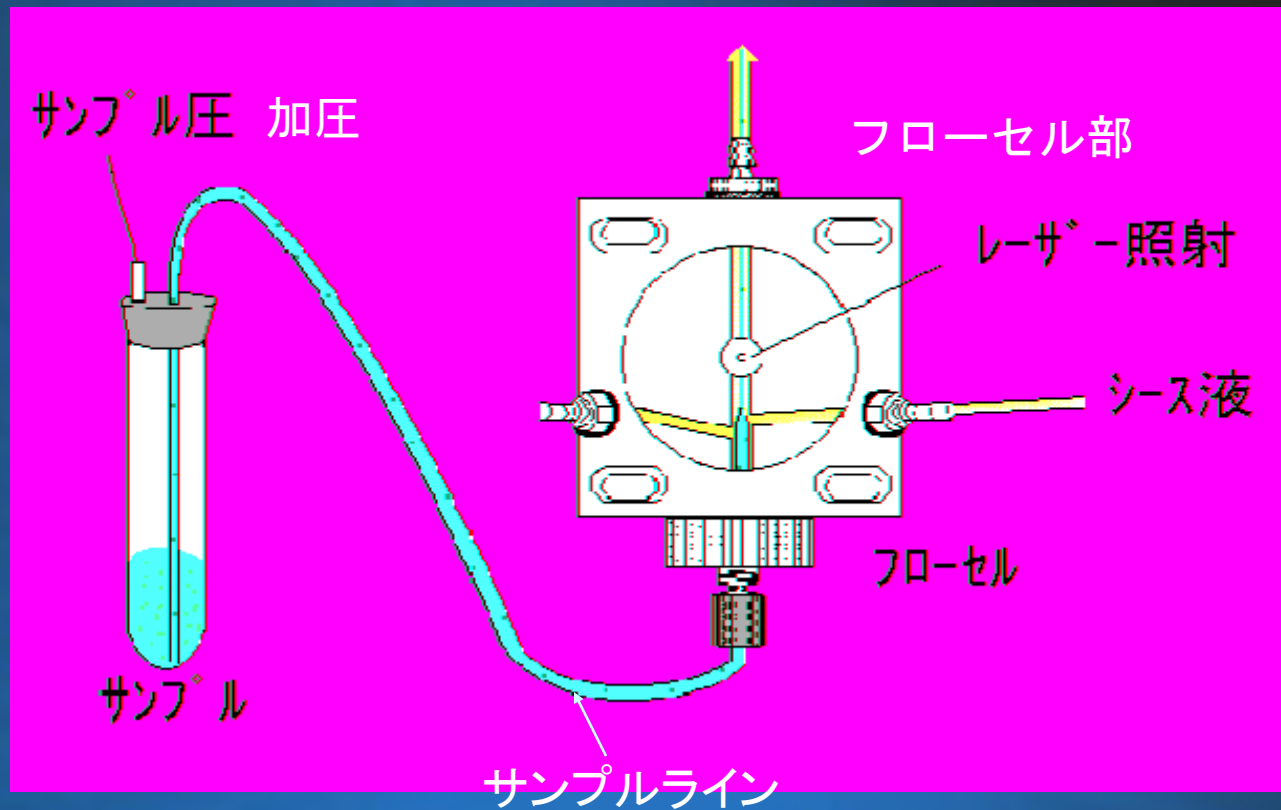
FCMを用いて陽性率で判定

- 一度に複数のHLAへの反応性がわかる
- 客観的
- 感度が高い

サンプル測定から解析までの概要

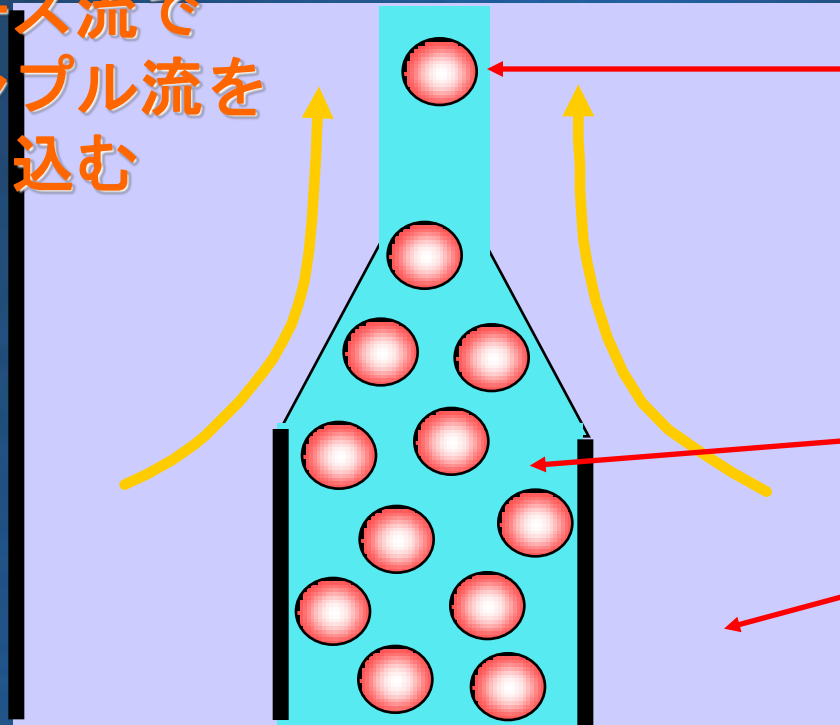
- 細胞（蛍光ビーズ）が1個ずつ集光されたレーザー光の中を通過するようにサンプルを流す。
- 細胞（蛍光ビーズ）がレーザー光の中を通過する時に発生する各種の散乱光と蛍光を集める。
- 散乱光と蛍光の強さをセンサーで検出しその度合いを数値化して記録する。
（リストモードデータ）
- リストモードデータを元に分布図（サイトグラム / ヒストグラム）を作って統計解析する。

フローセルを中心とする流体システム



サンプル流を細く絞り込む

シース流で
サンプル流を
絞り込む



細胞が1個ずつ一列に

サンプル

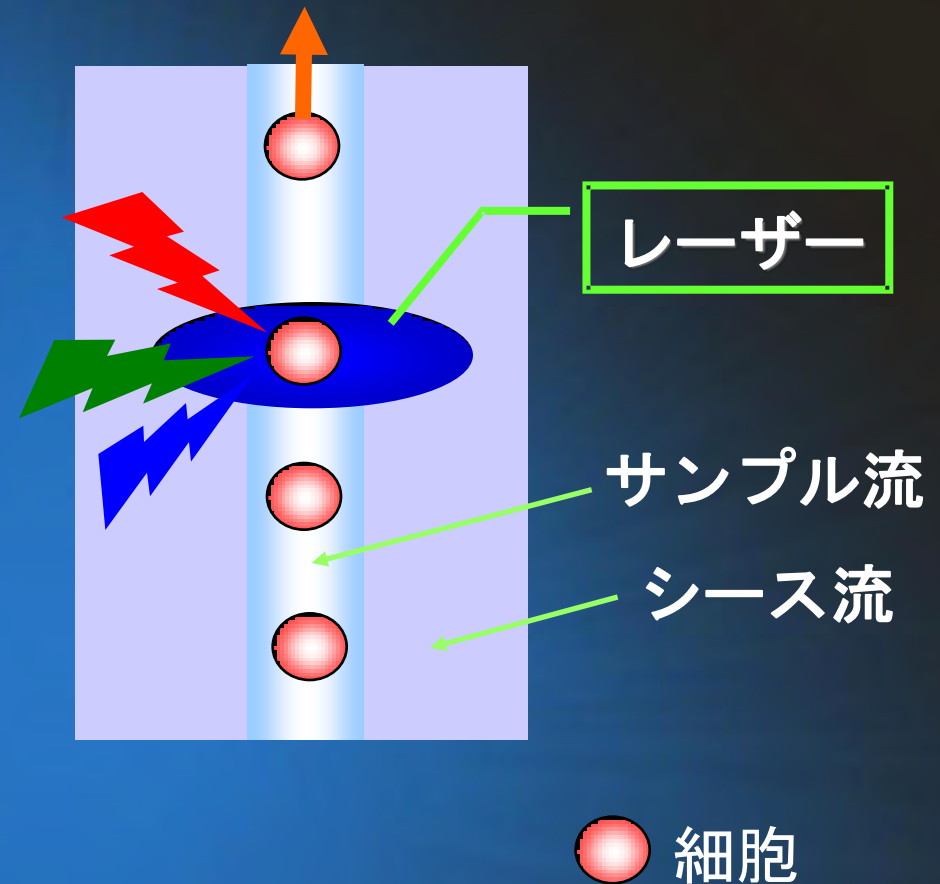
IsoFlowシース液

 細胞

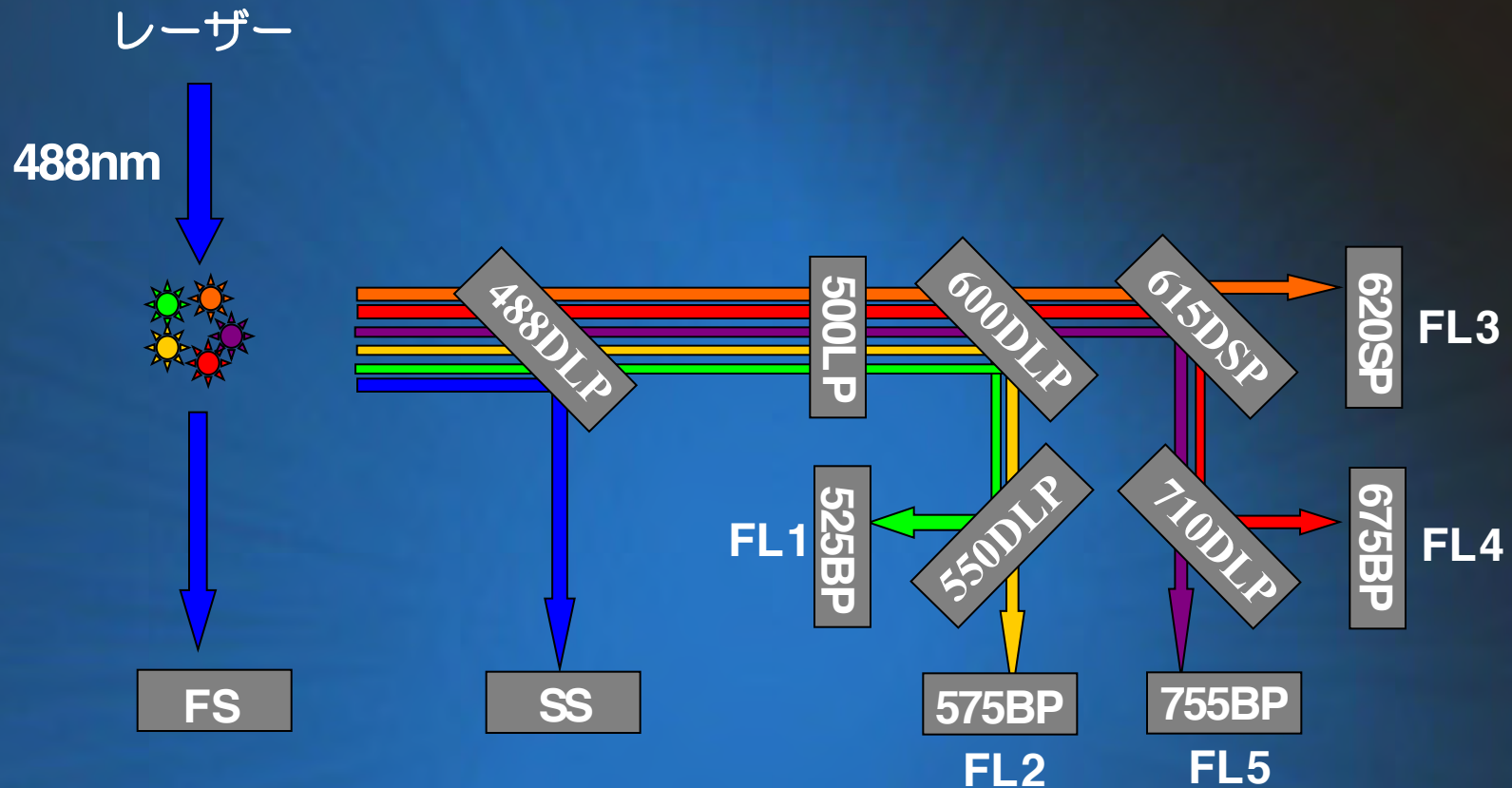
シース圧とサンプル圧の差
LOW:MIDIUM:HIGH

レーザーを照射

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



光学検出系(センサーと光学フィルタ設定) ～ Cytomics FC500 の場合 ～



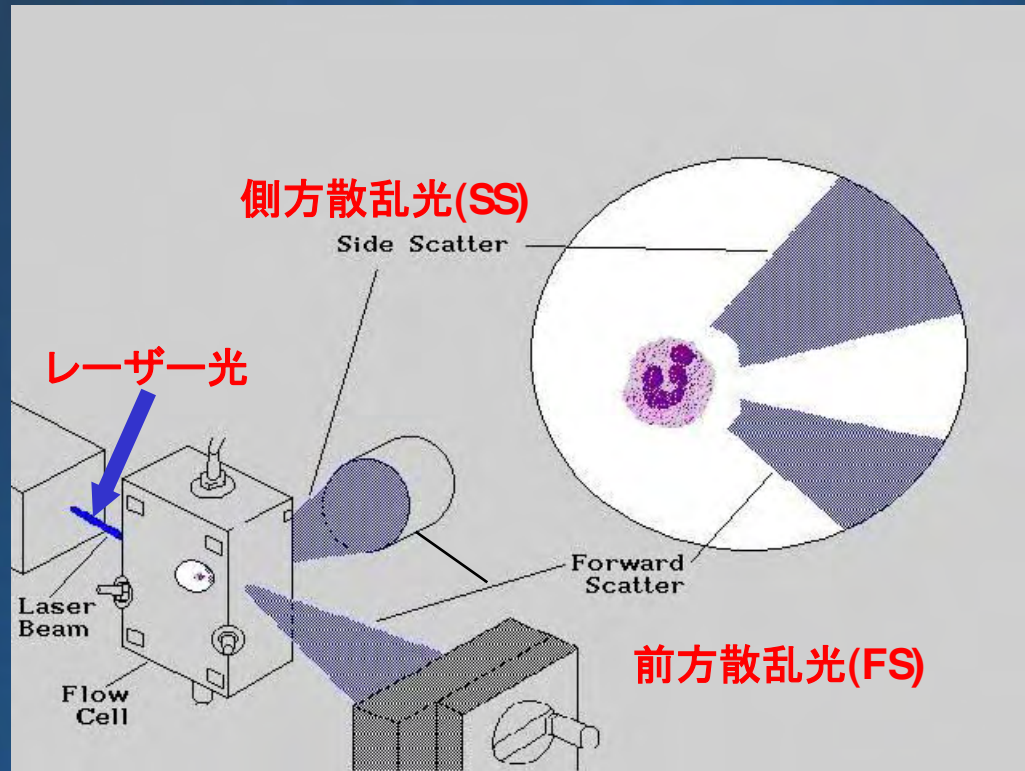
検出光の波長は光学フィルターにより決定

蛍光検出波長と蛍光色素 ～ Cytomics FC500 の場合 ～

検出器	波長	488
FL1	525	FITC
FL2	575	PE/RD1
FL3	620	ECD
FL4	675	PC5
FL5	755	PC7

サンプルの何が測定されているか

1. 散乱光



・前方散乱光：FS

➡ 大きさ（表面積）

・側方散乱光：SS

➡ 内部構造

（顆粒の多さ等）

サンプルの何が測定されているか

2. 蛍光



蛍光標識抗体の結合した
細胞を検出

強度は各細胞が持つ蛍光
色素の分子数に比例

カラー（波長）は
蛍光色素の特性

蛍光

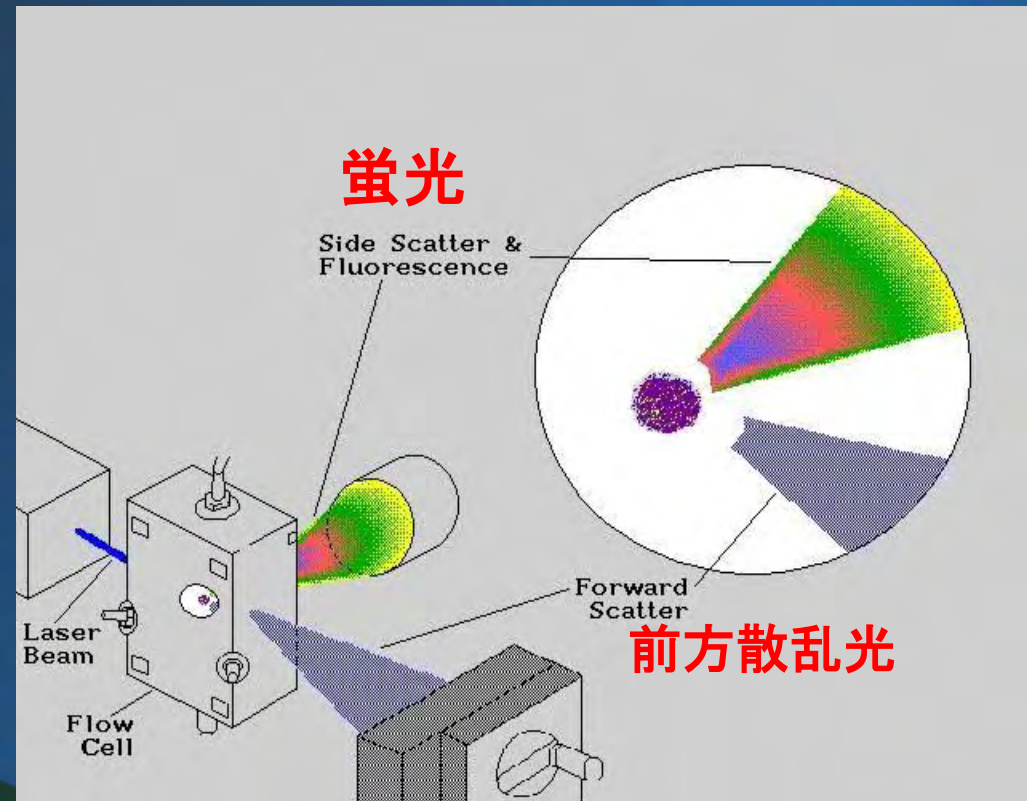
Side Scatter &
Fluorescence

Forward
Scatter

前方散乱光

Laser
Beam

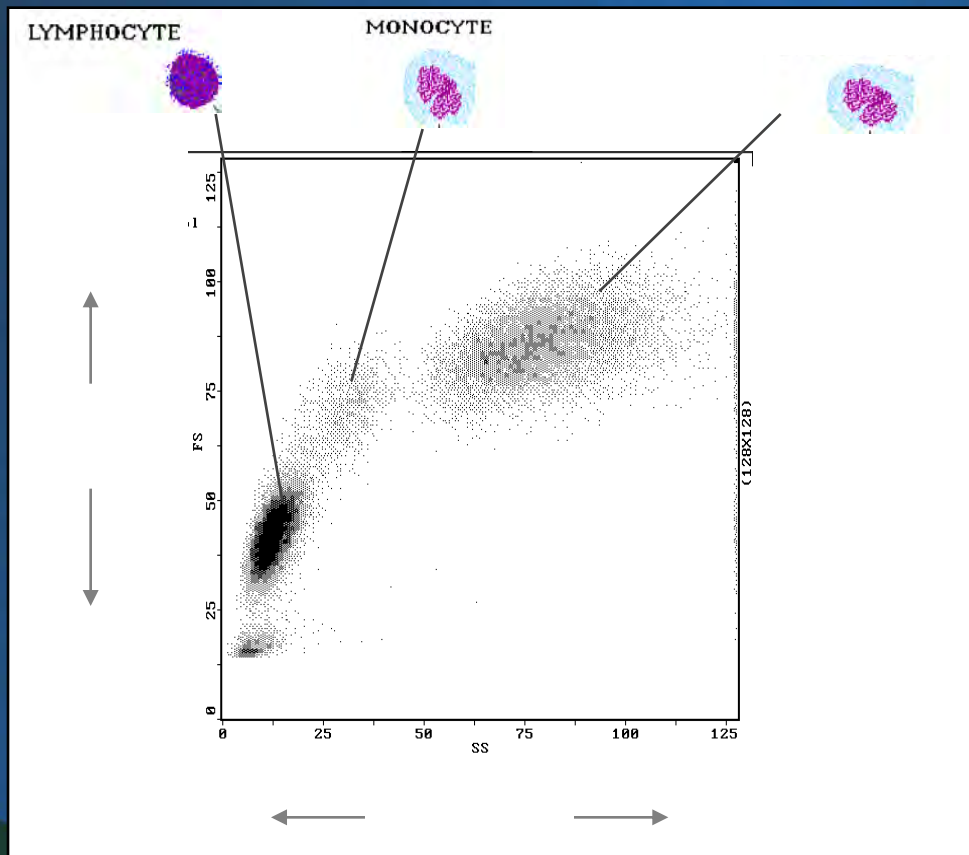
Flow
Cell



[illegible]

～ 散乱光データ ～ サイトグラム

大きさと内部構造で区別

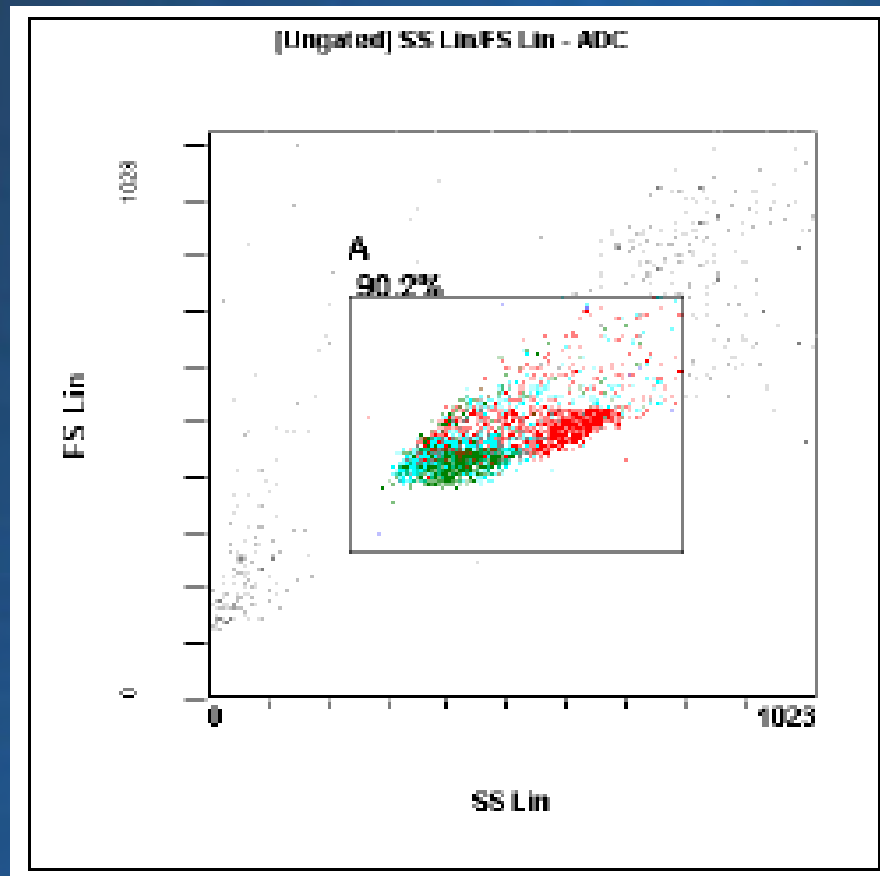


FS (Forward Scatter)
細胞の大きさ

SS (Side Scatter)
細胞の内部構造の複雑さ

ヒト末梢血散乱光データ

～ 散乱光データ～ サイトグラム

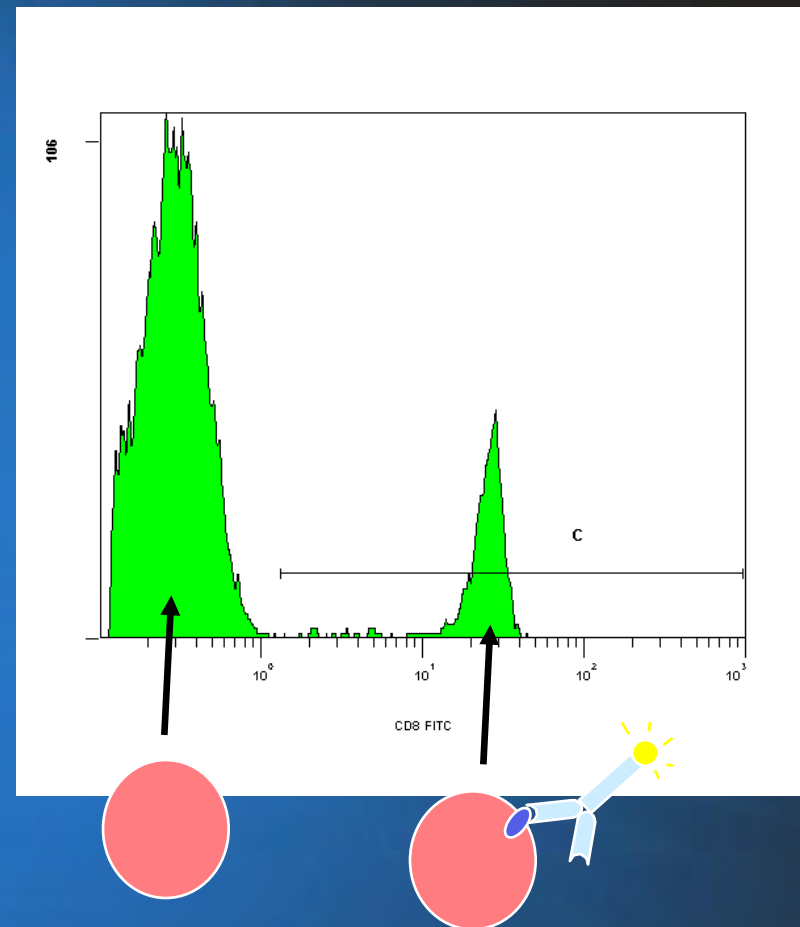
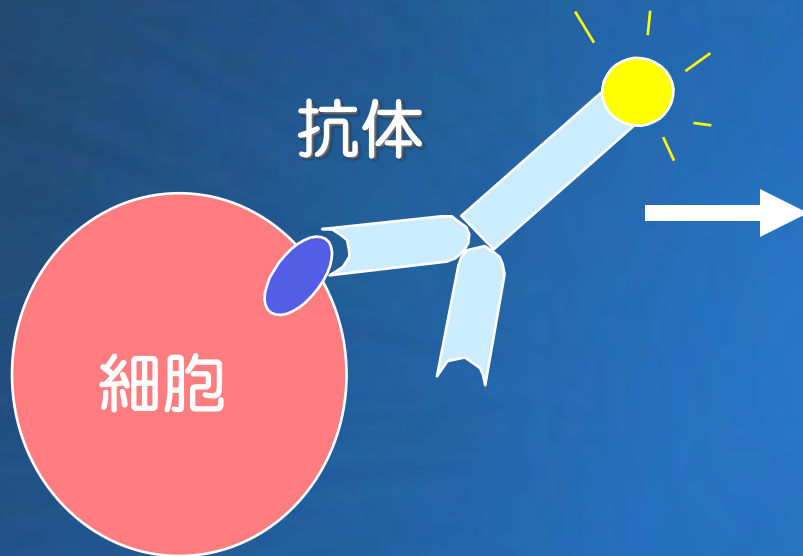


FS (Forward Scatter)
細胞の大きさ

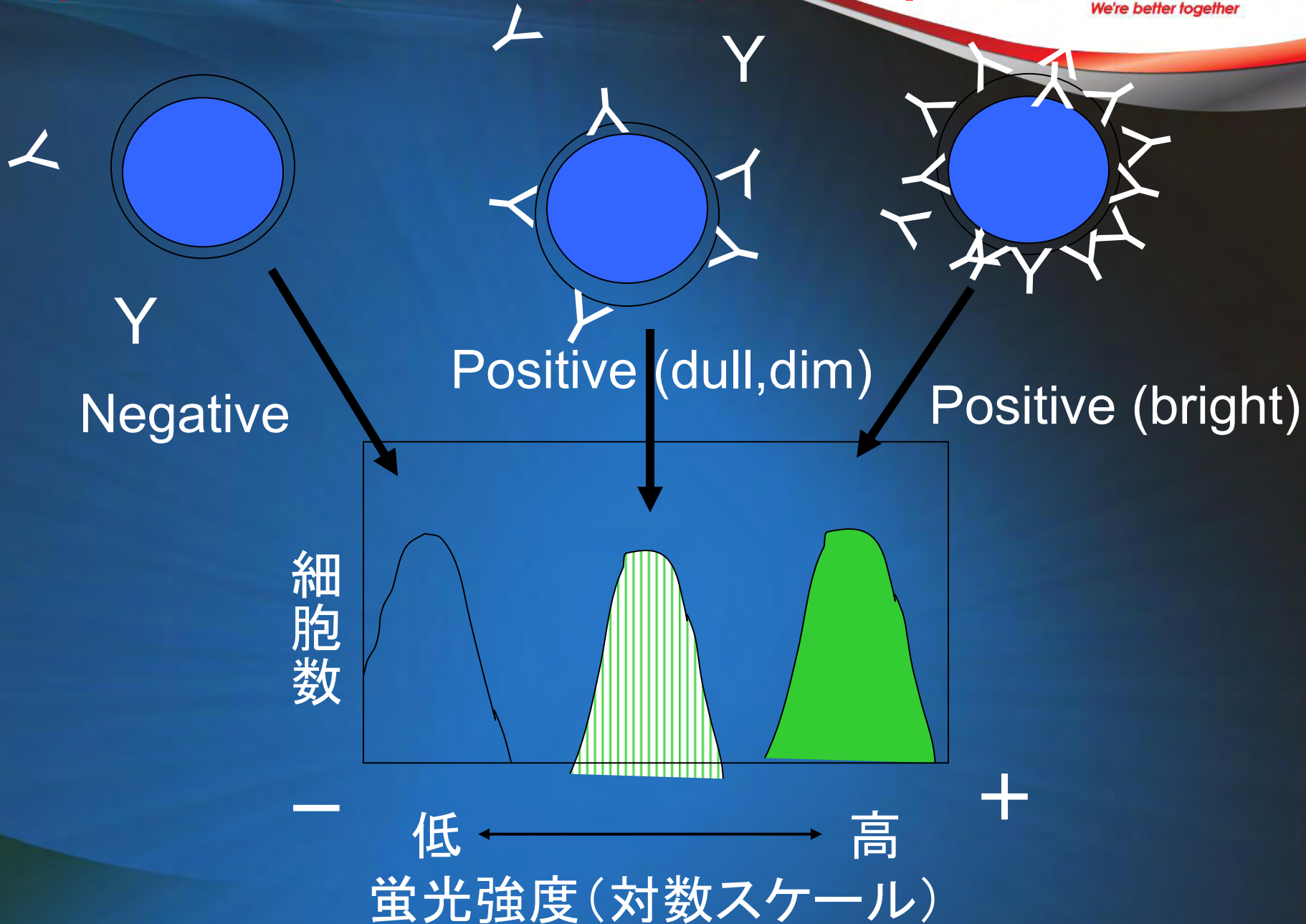
SS (Side Scatter)
細胞の内部構造の複雑さ

～ 蛍光データ ～ ヒストグラム

目印（抗体）を付ける



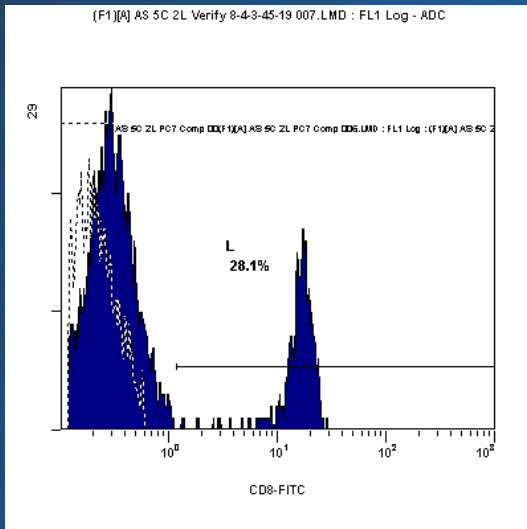
蛍光データ(ヒストグラム)の意味



陽性率と平均蛍光強度

陽性率

陰性コントロール(アイソタイプコントロール)のデータに対しリージョンを作成(陽性域を決定)し算出 → 陽性細胞の割合を反映。使用する抗体のクローン、蛍光標識の違いで差が出ることもある



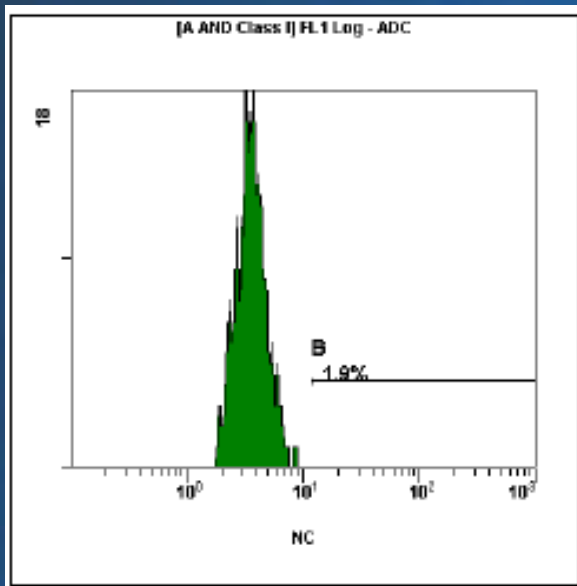
平均蛍光強度

(MFI, Mean Fluorescence Intensity)

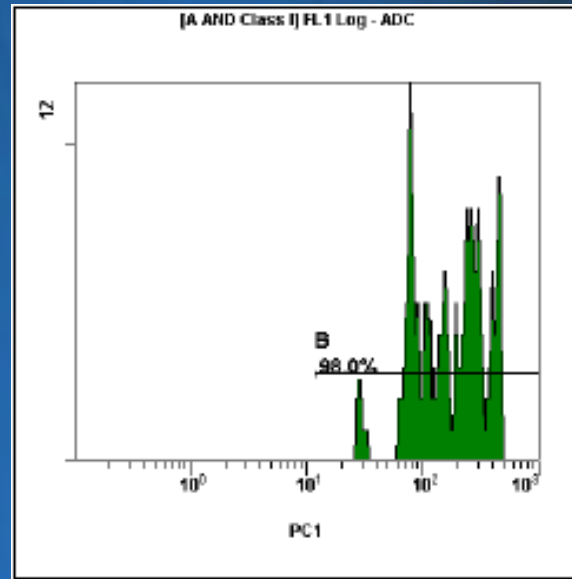
対象とする細胞集団全体にリージョンを作成し算出

～ 蛍光データ ～

ヒストグラム（FlowPRA Screening の場合）



検体（血清）が
抗HLA抗体を
持たない場合



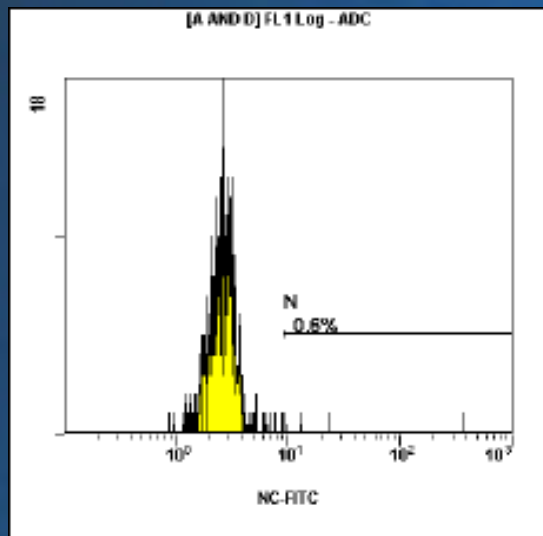
検体（血清）が
抗HLA抗体を
持つ場合

Screening Test の
場合、様々な HLA
（抗原）をコーティン
グしたビーズが存
在する。

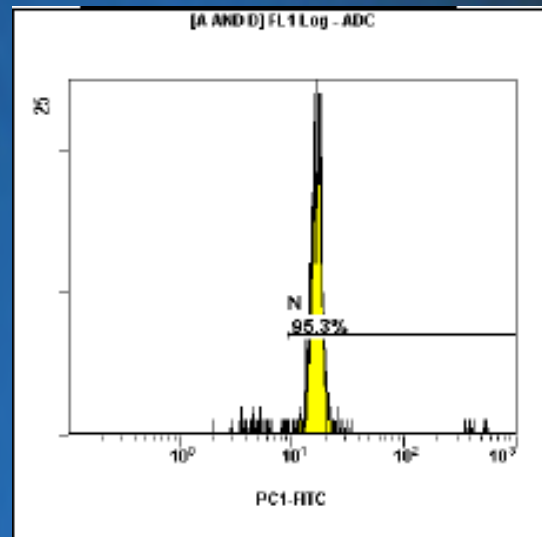
その種類（抗原）ご
とに反応する抗体
量が異なると陽性
ピークが複数にな
る。

～ 蛍光データ ～

ヒストグラム (FlowPRA Specific の場合)



検体(血清)が
抗HLA抗体を
持たない場合

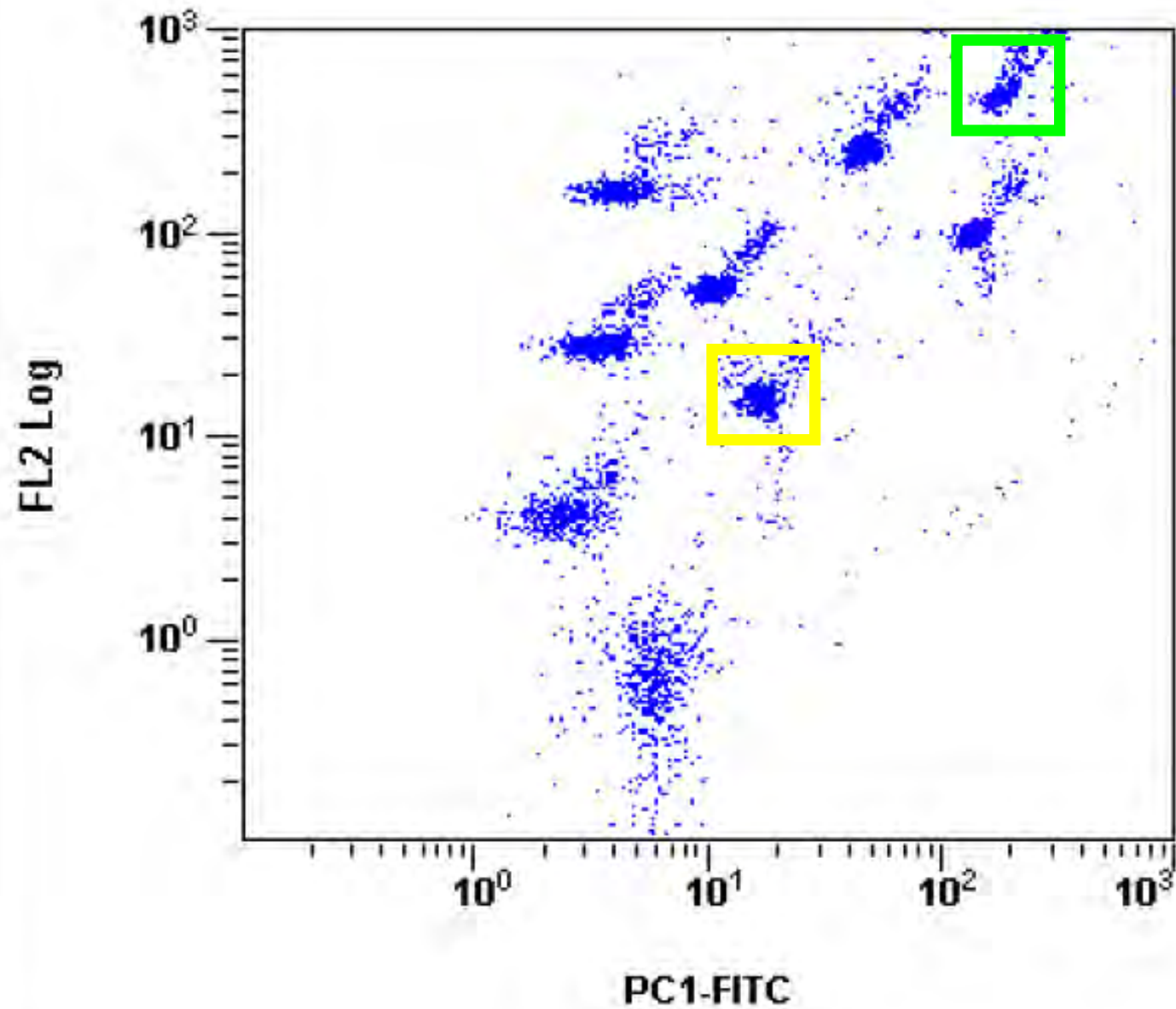


検体(血清)が
抗HLA抗体を
持つ場合

Specific Antibody
Test の場合、HLA
(抗原)別にビーズ
が同定できる。

ピークが右側(強
蛍光側)へシフトす
るかどうかで、その
HLA(抗原)に対す
る抗体が在るか無
いかが判る。

[A] FL1 Log/FL2 Log - ADC

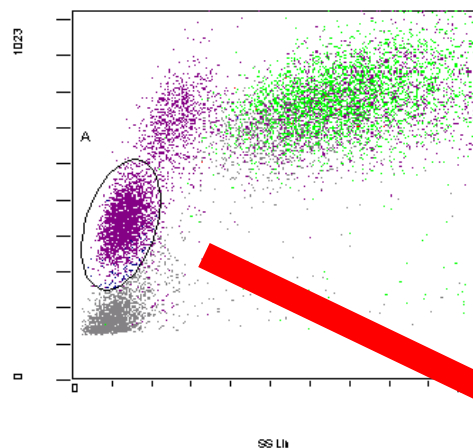


判定
Aご
が異
ーク
のネ
ある。
濃
をこ

解析におけるゲートの効果

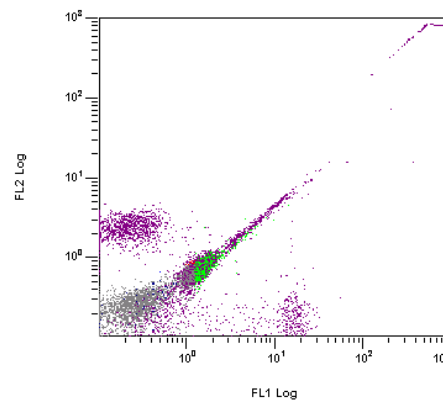
ゲートなし

(F1)[Ungated] AS 5C 2L Verify 8-4-3-45-19 007.LMD : SS Lin/FS Lin - ADC

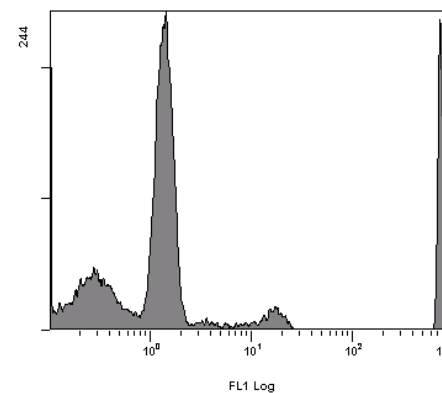


ゲートあり

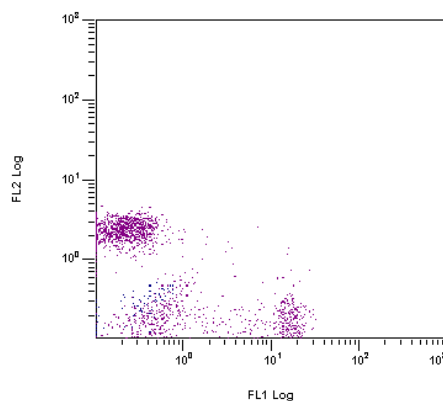
(F1)[Ungated] AS 5C 2L Verify 8-4-3-45-19 007.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



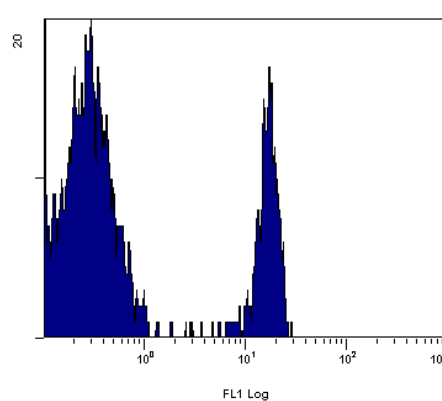
(F1)[Ungated] AS 5C 2L Verify 8-4-3-45-19 007.LMD : FL1 Log - ADC



(F1)[G] AS 5C 2L Verify 8-4-3-45-19 007.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC

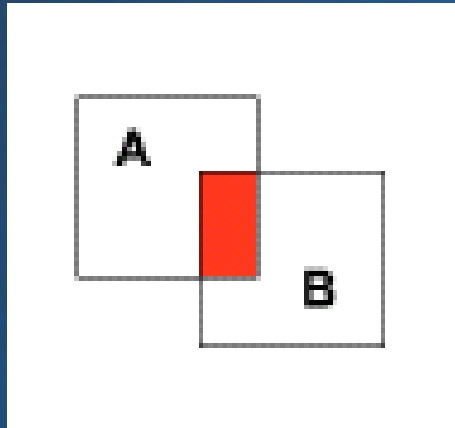


(F1)[G] AS 5C 2L Verify 8-4-3-45-19 007.LMD : FL1 Log - ADC

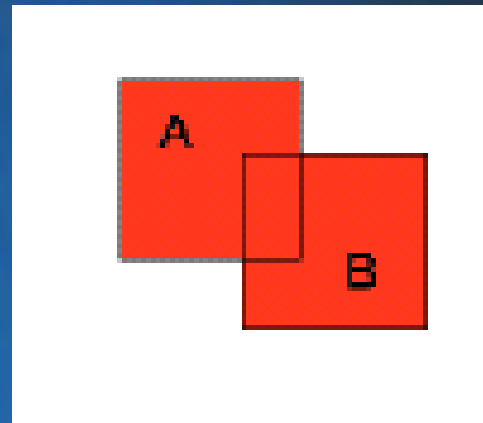


ゲート式

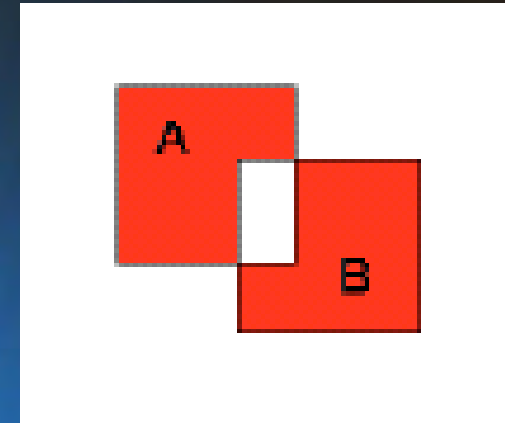
ゲートとは論理(条件)式



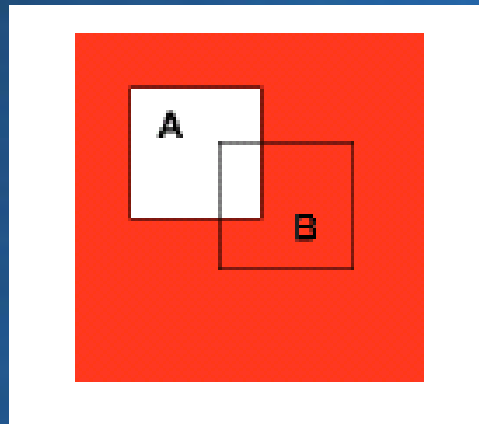
A AND B



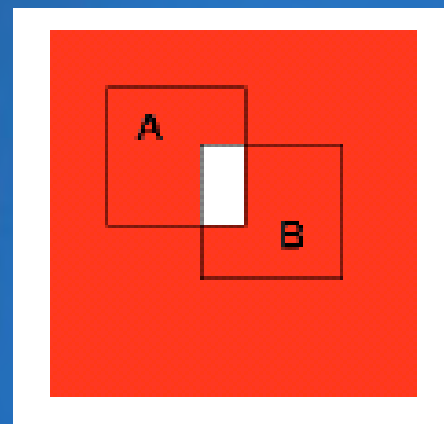
A OR B



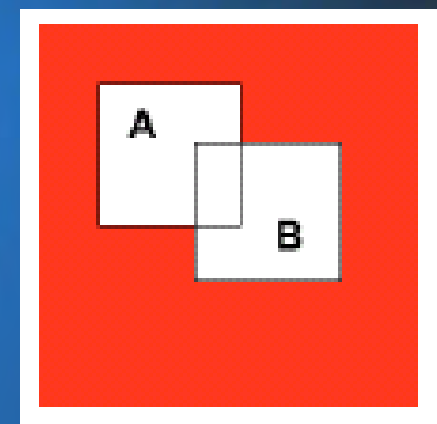
A XOR B



NOT (A)



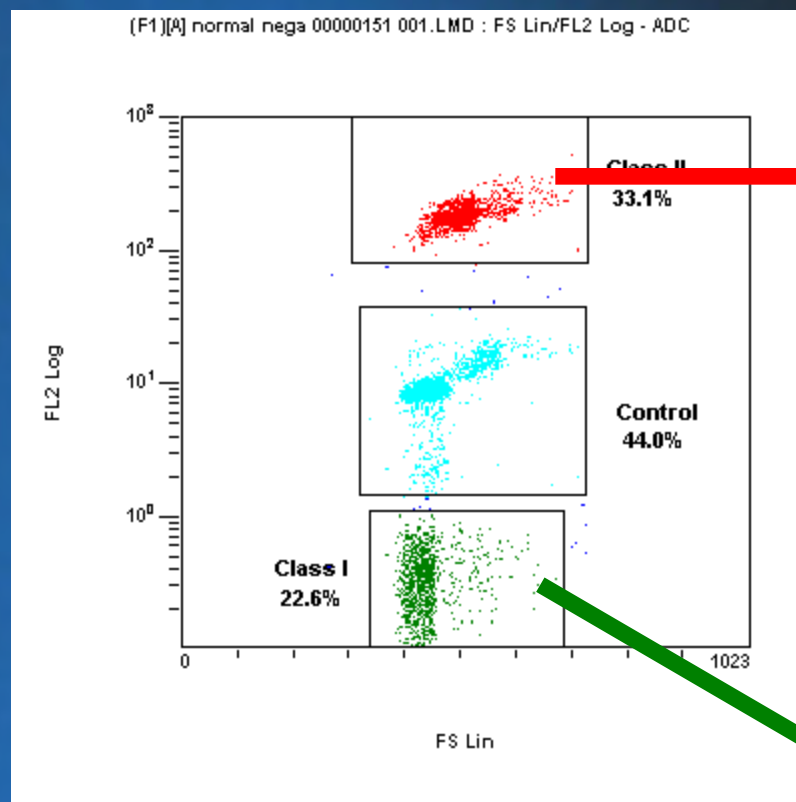
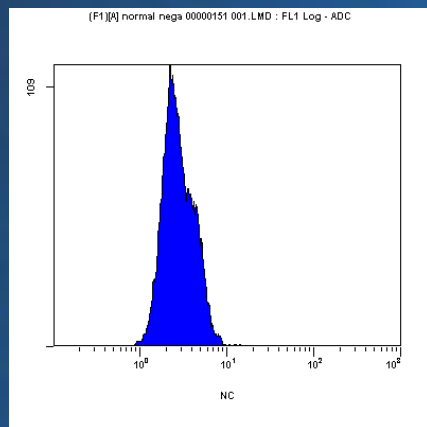
NOT (A AND B)



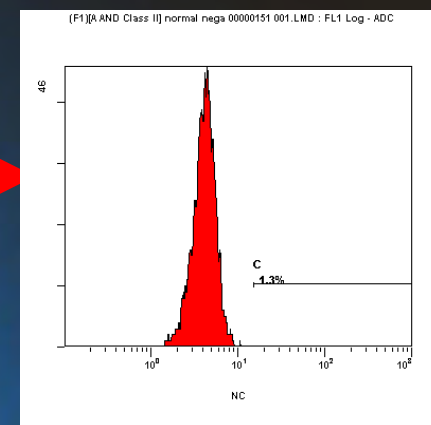
NOT (A OR B)

解析におけるゲートの効果 (FlowPRA Screening の場合)

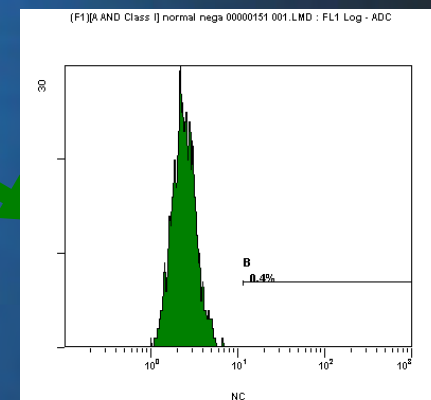
すべてのビーズ



Class I のみ



Class II のみ

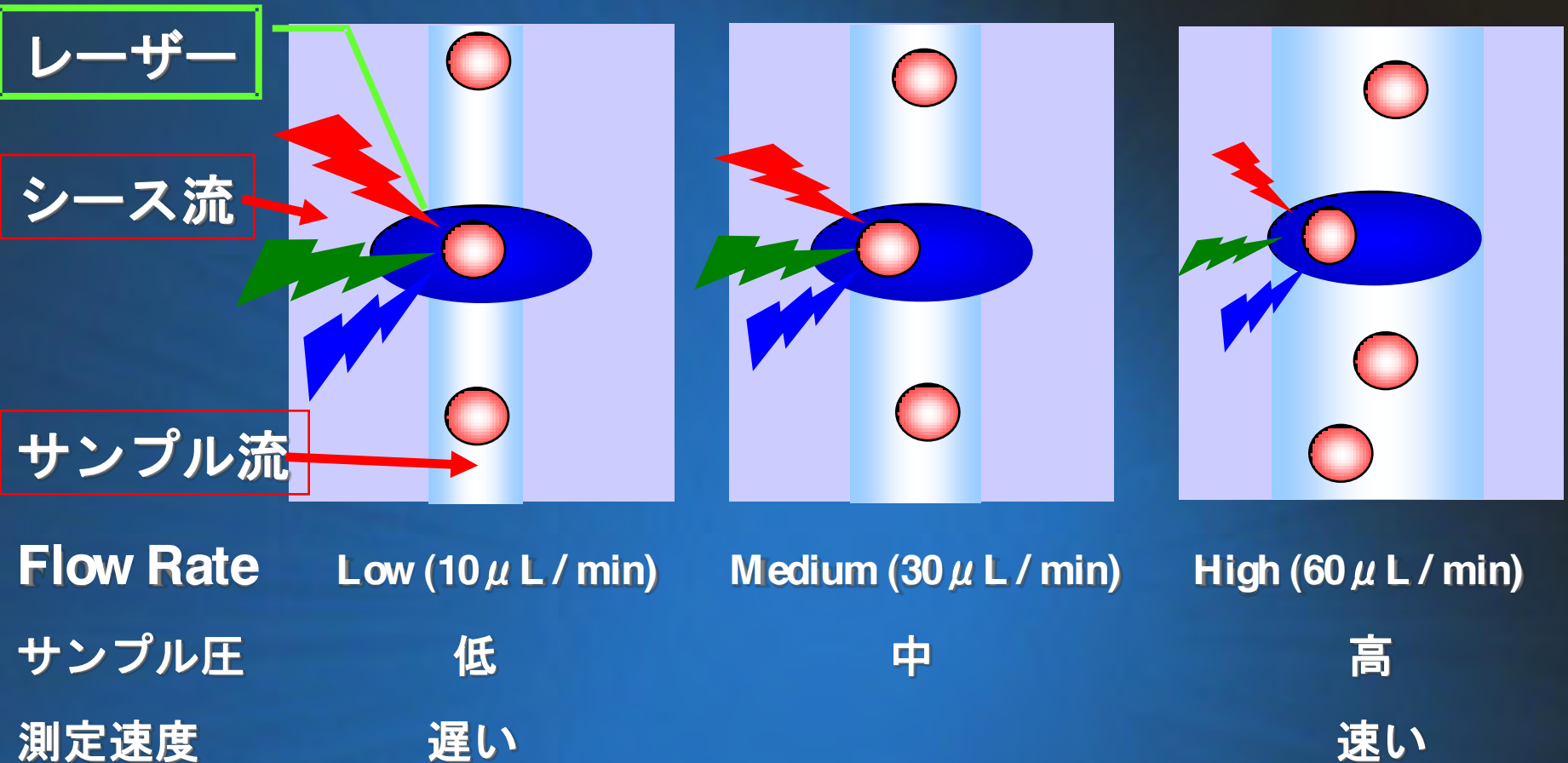


測定条件設定と FlowPRA データ

Flow Rate
ディスクリミネータ
感度
コンペンセーション

Flow Rate (流速設定)

 細胞



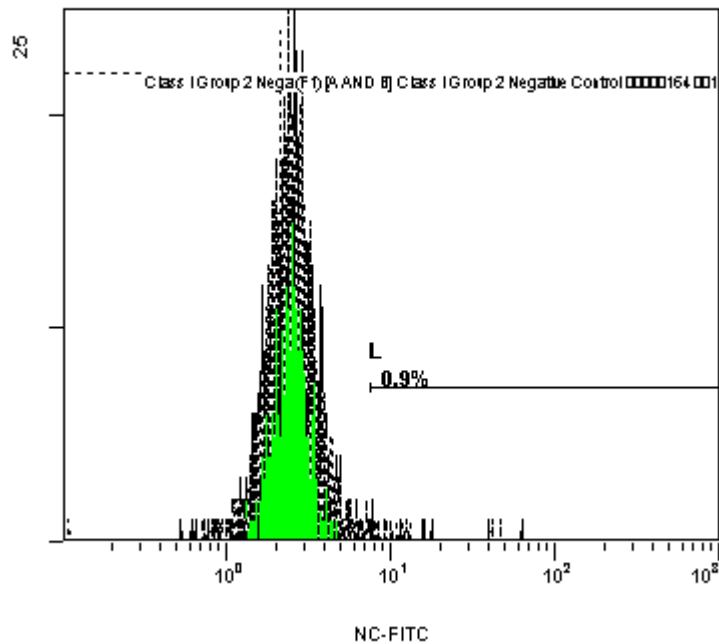
Flow Rate によるデータの違い

Medium v. s. High

Medium : 点線データ

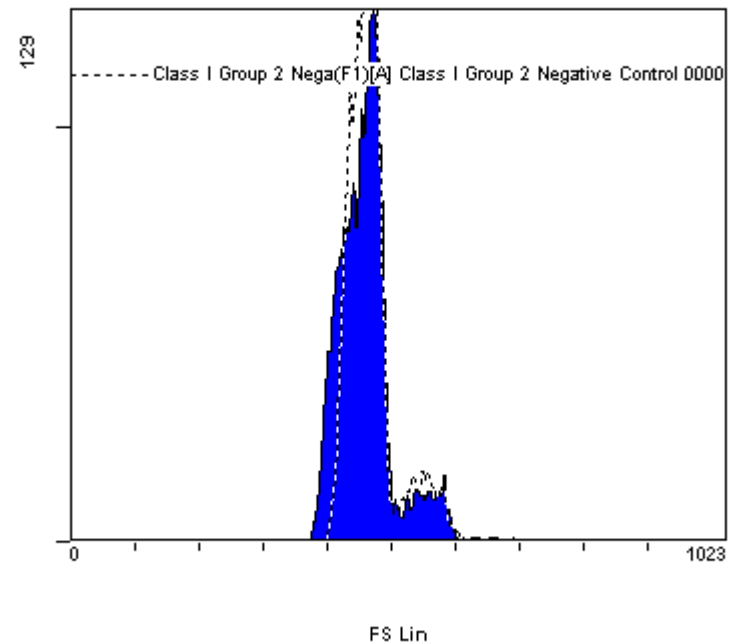
High : 実線データ

AND B] Class I Group 2 Negative Control Flow Rate High 00000167 001.LMD : FL1 Log -



蛍光(ログ)データ

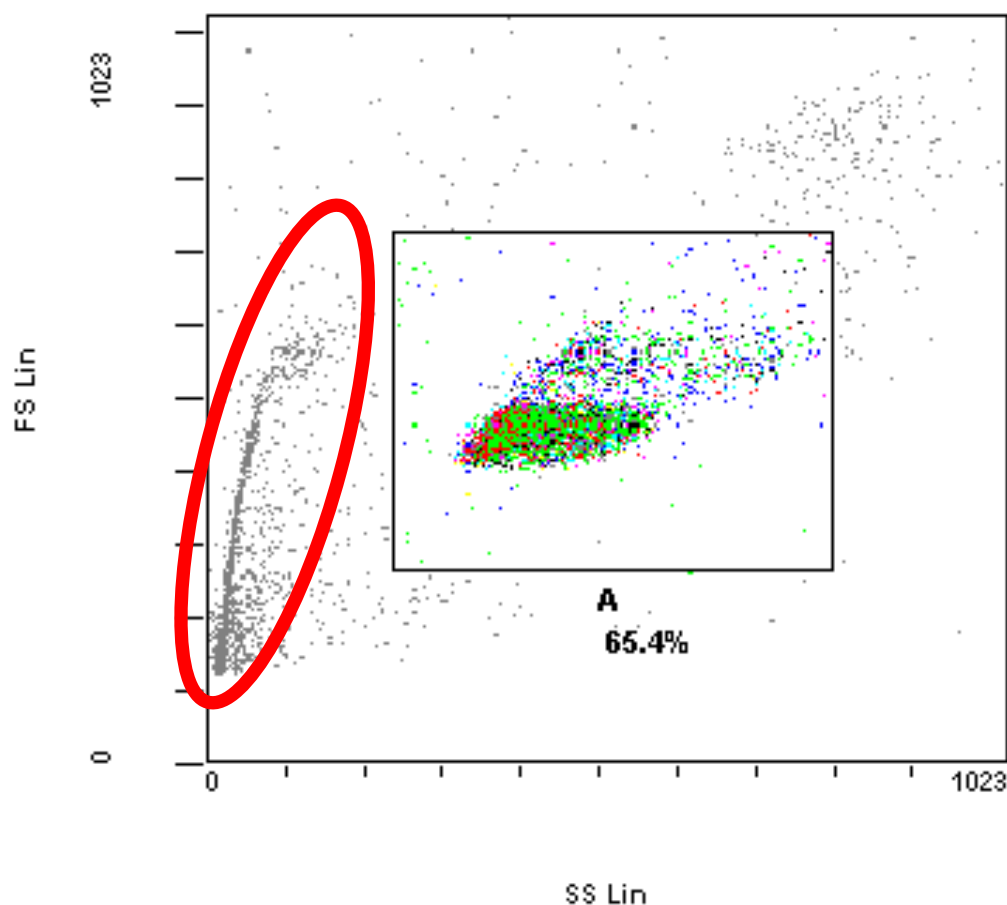
F1][A] Class I Group 2 Negative Control Flow Rate High 00000167 001.LMD : FS Lin - AD0



FS (リニア)データ

ディスクリミネータ

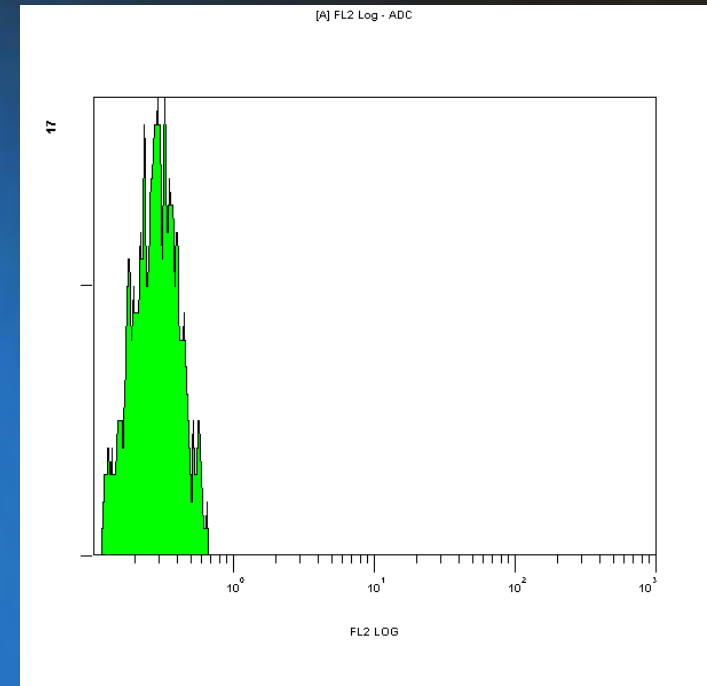
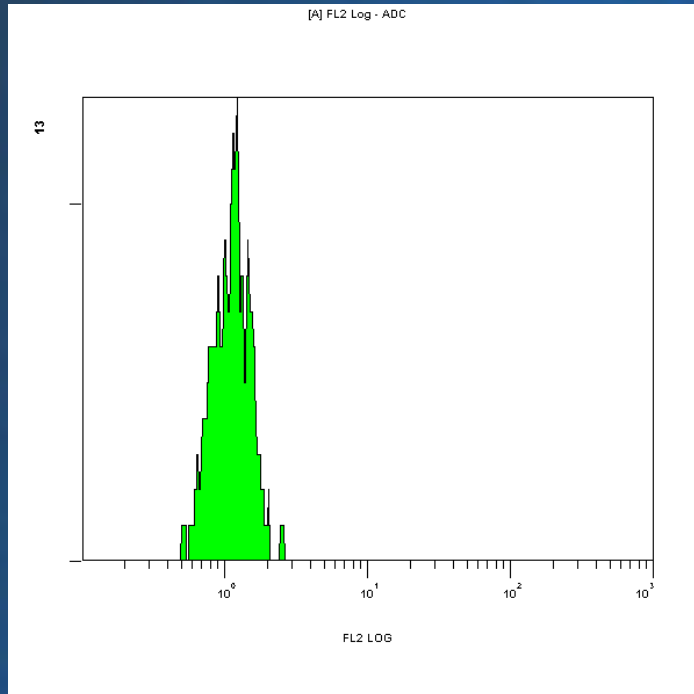
(F1)[Ungated] Class 1 Group 2 Negative Control 00000164 001.LMD : SS Lin/FS Lin - ADC



通常は FS 信号で
設定

ノイズが多いときは
SS 信号で設定する
方が有効な場合も

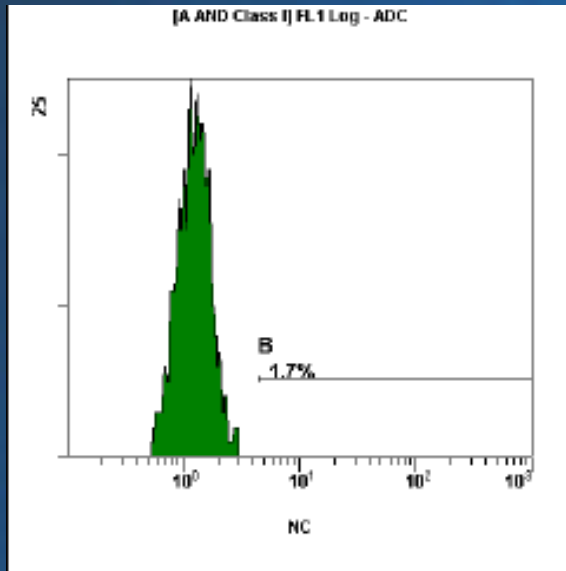
感度調整 蛍光 (FL1 Log)



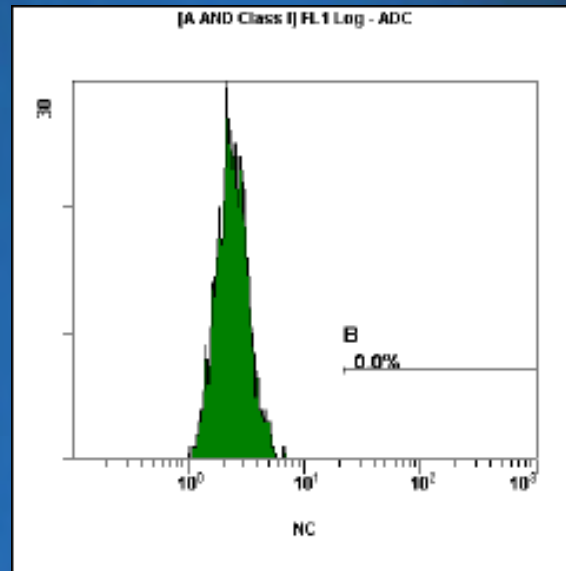
検出器電圧(ボルテージ)を上げるとピークは右へ
シフトし、下げると左へシフトする

感度設定によるデータの違い 蛍光 (FL1 Log)

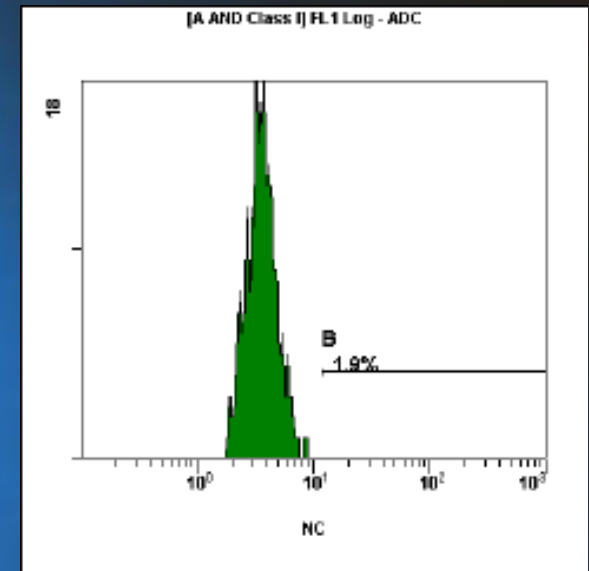
Screening Test Class I ビーズ (NC サンプル) の位置



やや低い



適正



やや高い

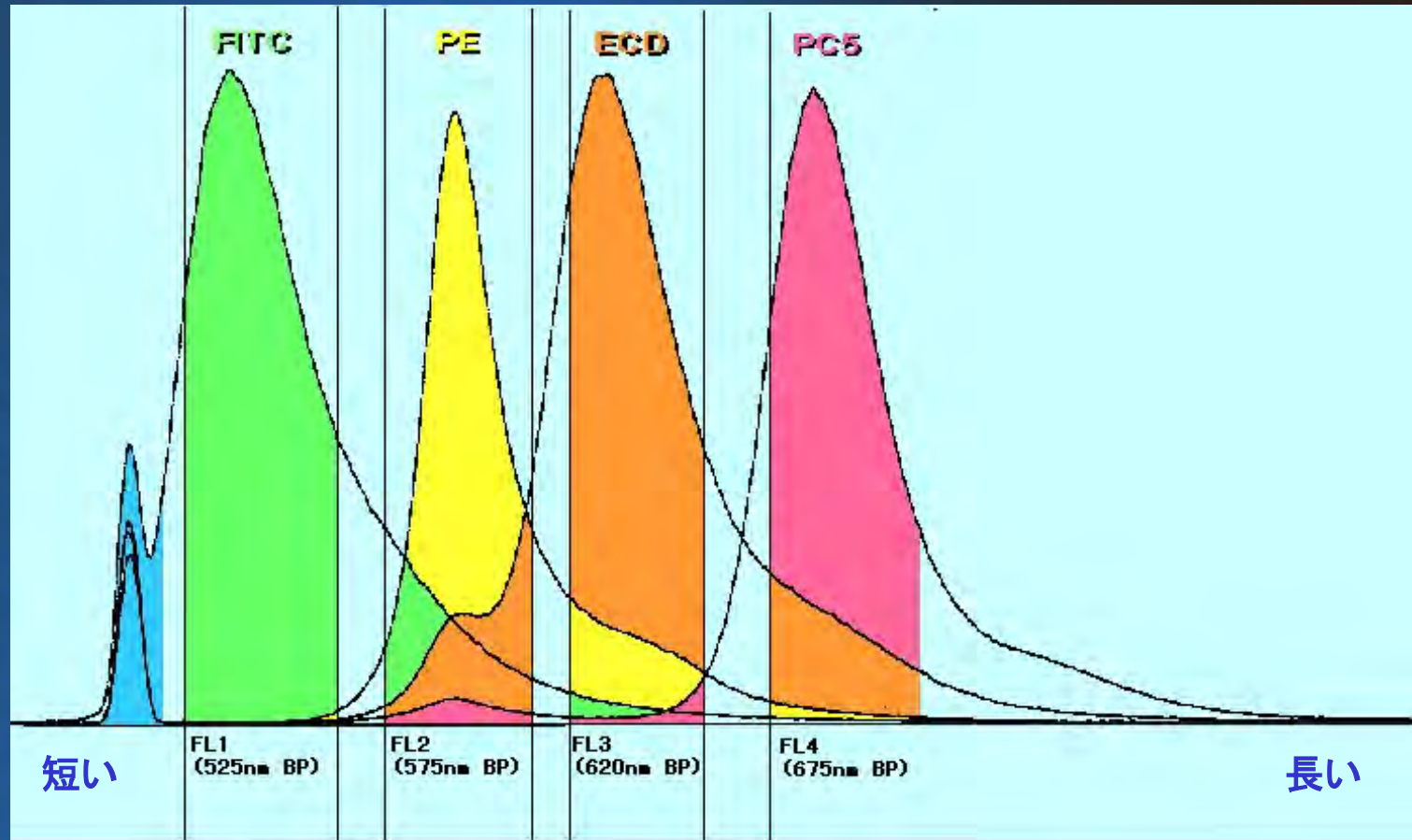
蛍光の漏れ込み(1)

漏れ込みが起こる理由： 蛍光波長の分布の広さ

強い

蛍光強度

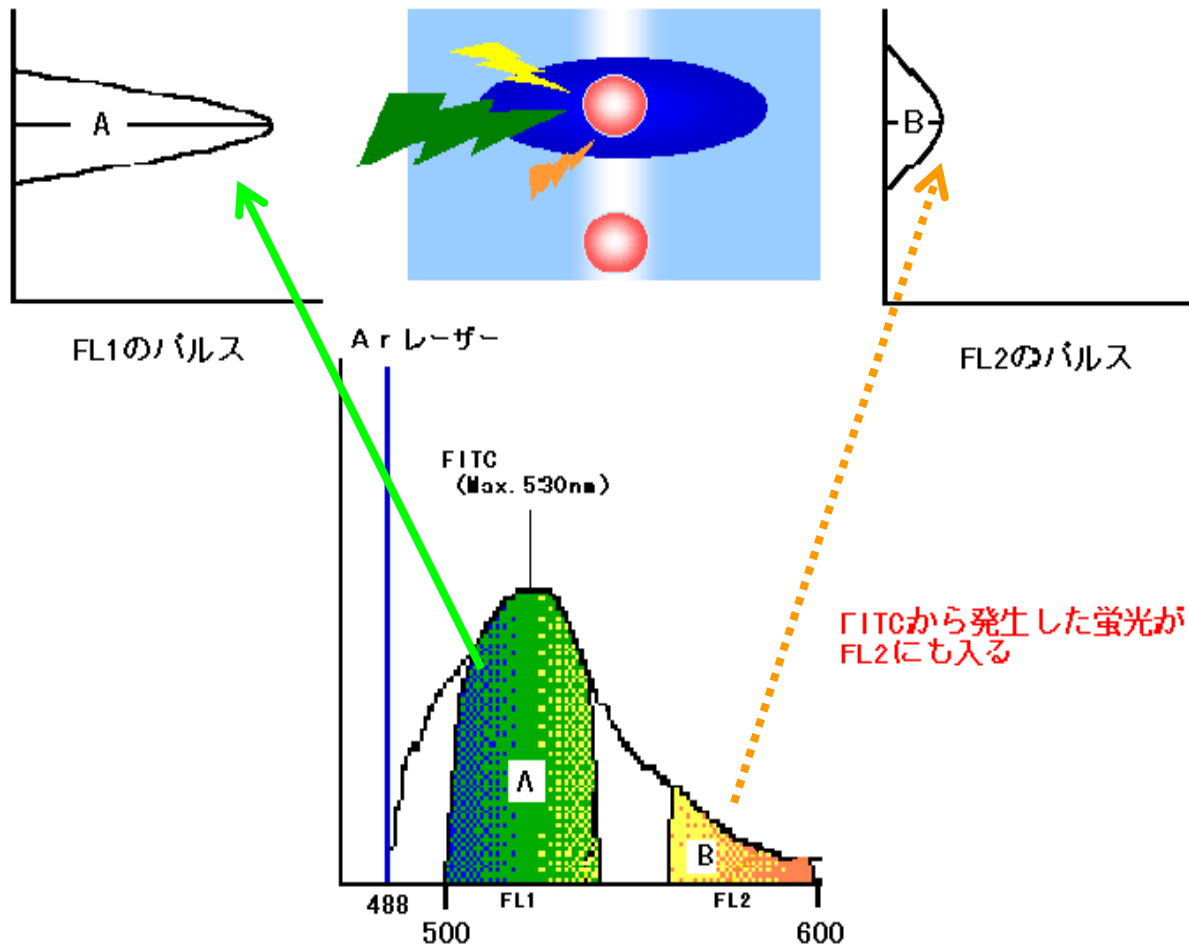
弱い



蛍光波長 (nm)

蛍光の漏れ込み(2)

目的外のセンサーへの入光

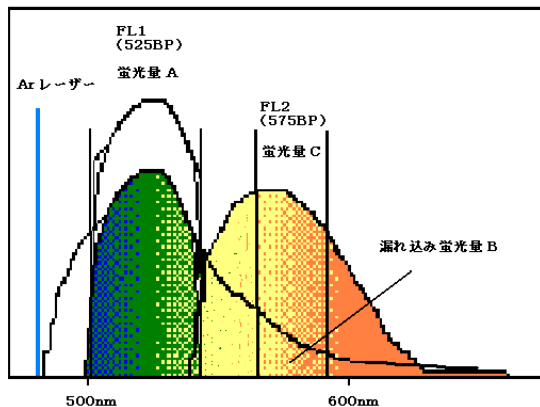


試薬のロット差で漏れ込み度合いが異なることがある。

試薬ロットが替わったときは、コンペンセーション設定の確認・微調整が必要。

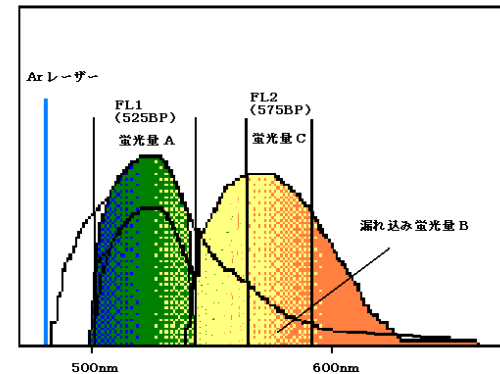
蛍光の漏れ込み(3)

- 漏れ込みのデータへの影響は感度のバランスによって変化する。
- 的確な調整を行うためには、蛍光センサーの感度をあらかじめ正しく調整しておく必要がある。



FL1 の H.V. を上げると、
蛍光補正値 x は小さくなります。

$$\begin{aligned}\text{Compensated FL2} &= C - B \\ &= C - A \times x (\%) \\ x &: \text{蛍光補正値}\end{aligned}$$

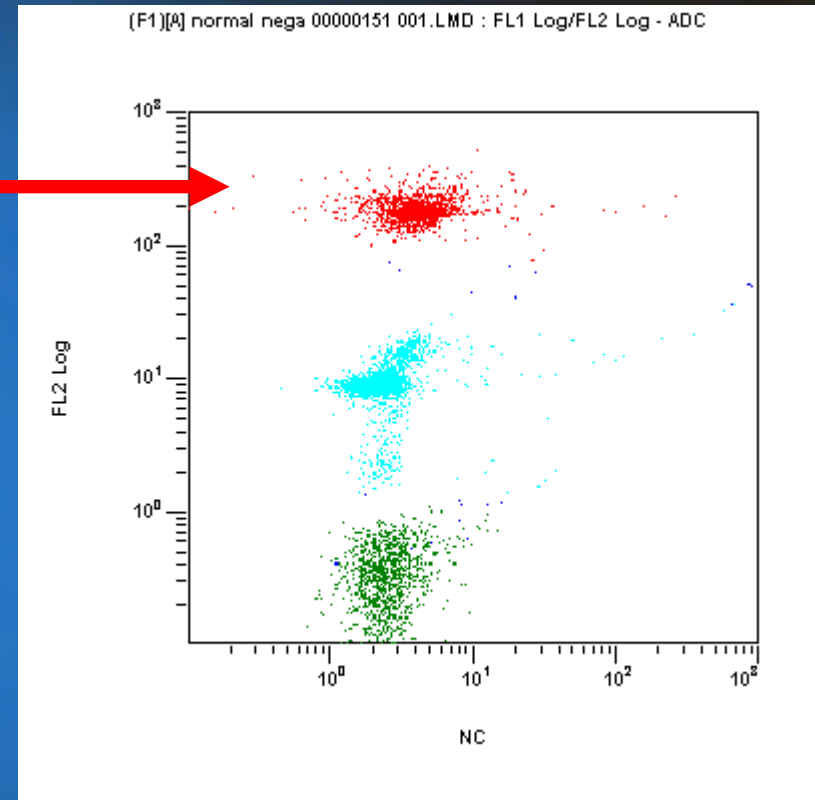
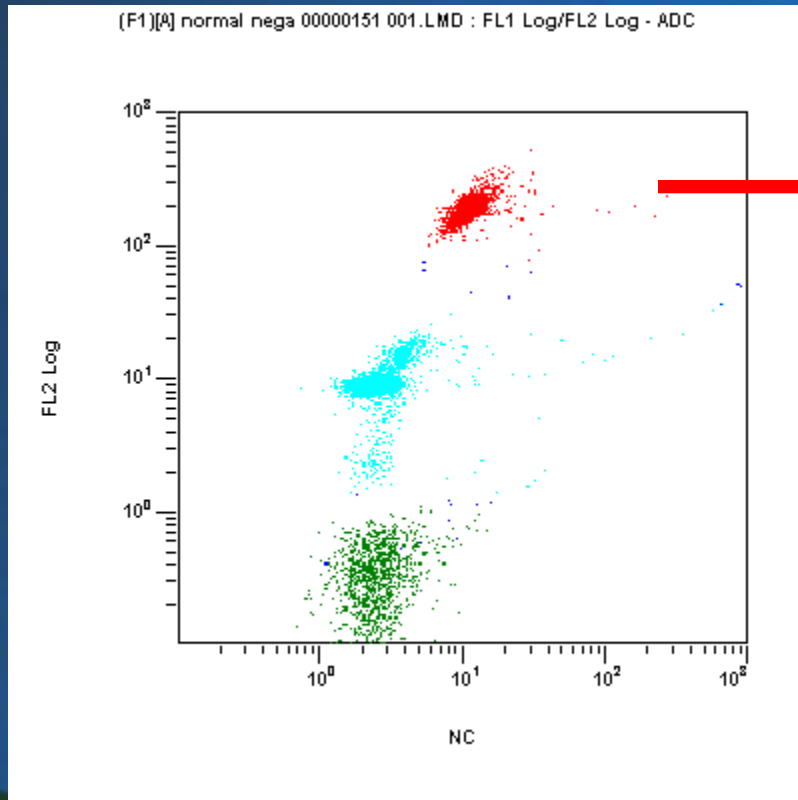


FL1 の H.V. を下げると、
蛍光補正値 x は大きくなります。

$$\begin{aligned}\text{Compensated FL2} &= C - B \\ &= C - A \times x (\%) \\ x &: \text{蛍光補正値}\end{aligned}$$

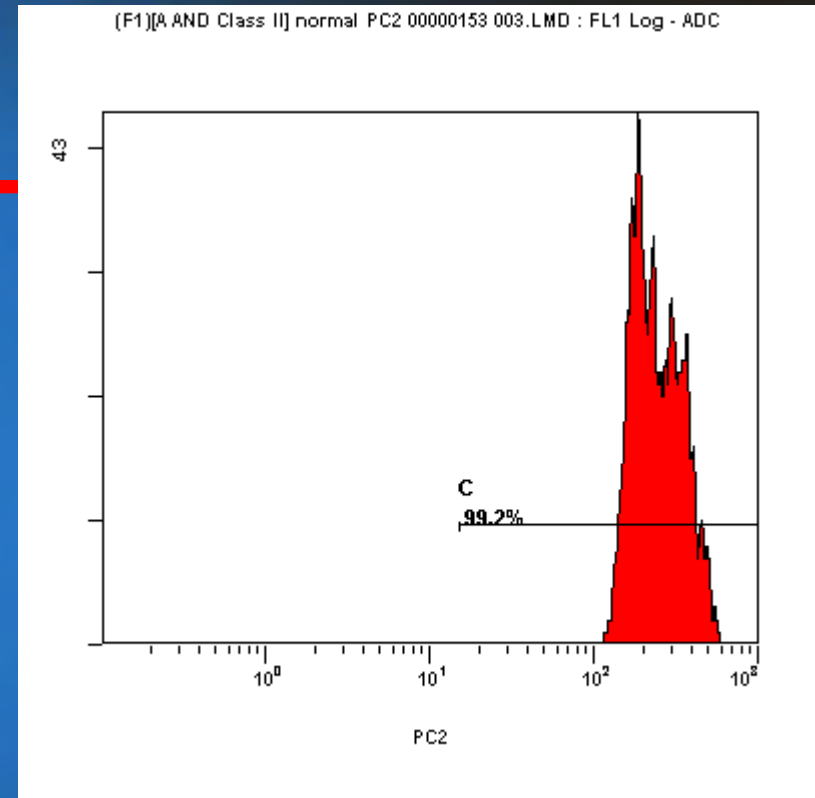
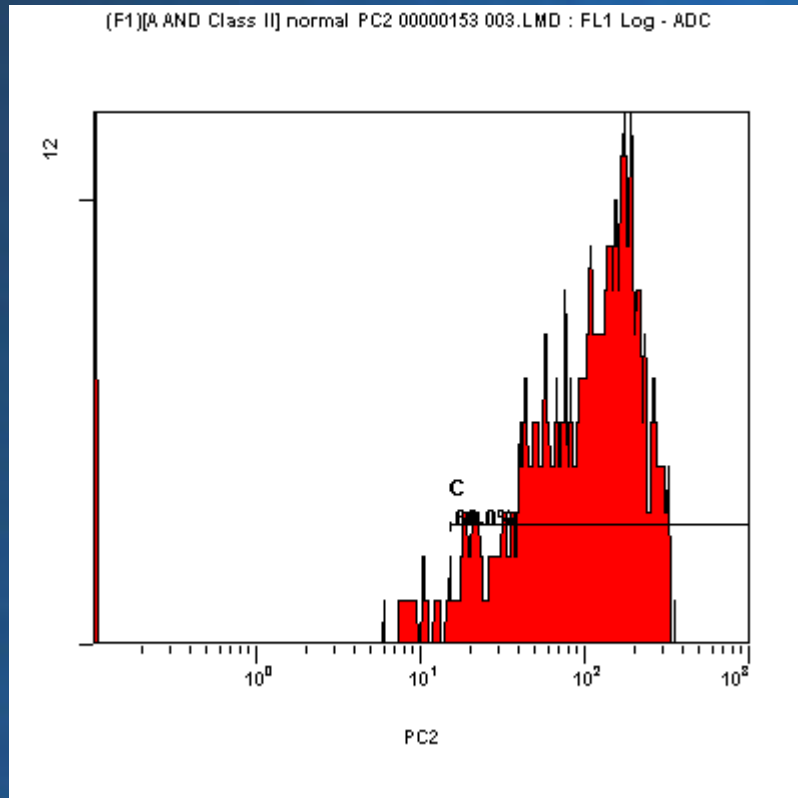
FlowPRA Screening における コンペンセーション (1-1)

FL1 - % FL2 を調整して、Class II ビーズの傾きを適正にする。



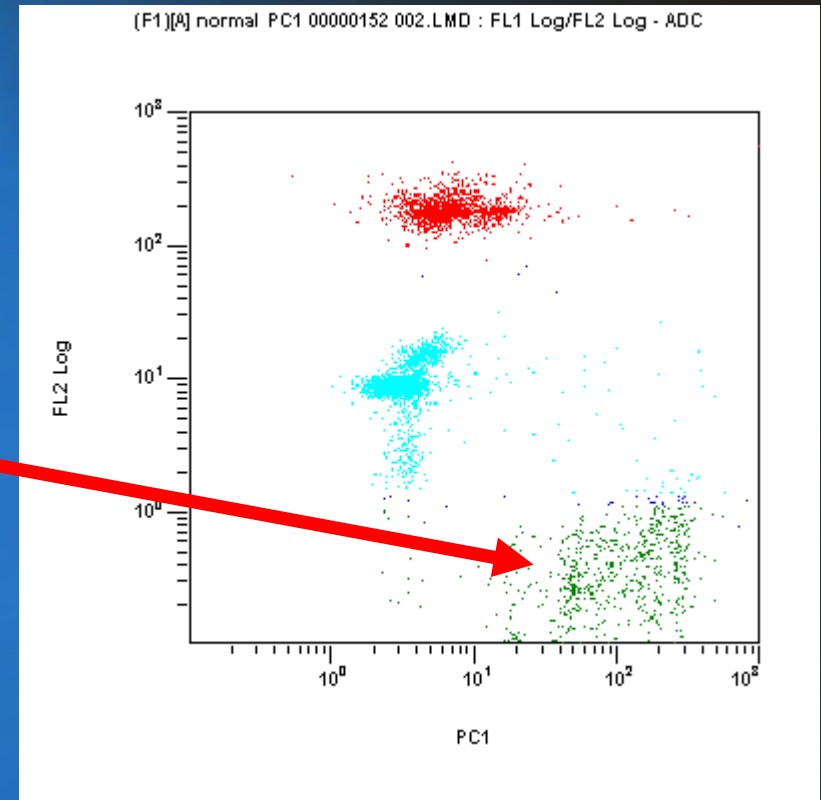
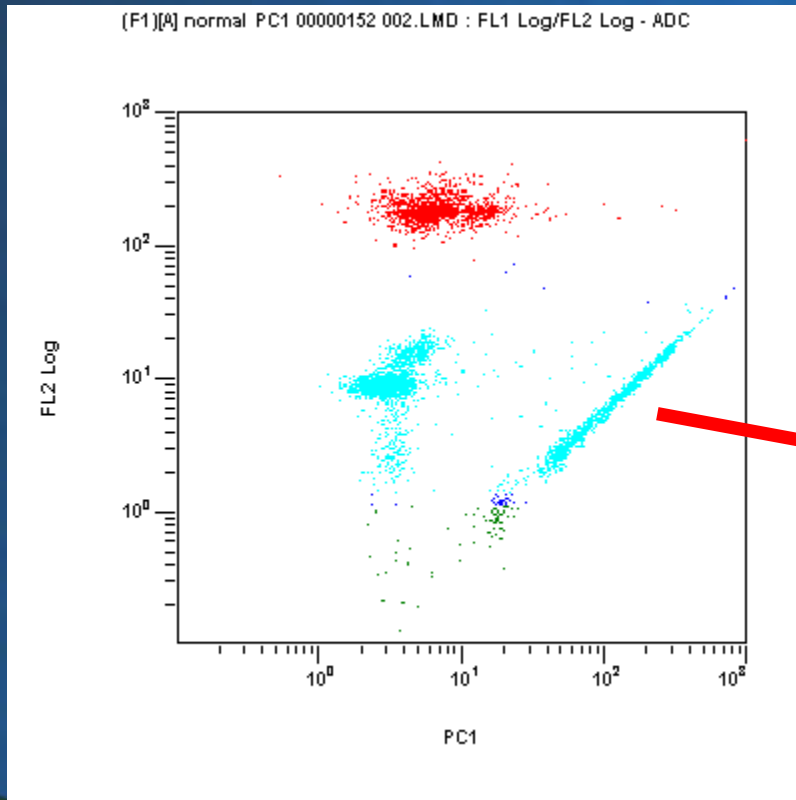
FlowPRA Screening における コンペンセーション (1-2)

過度のコンペンセーションはデータエラーの元になるので調整が必要。



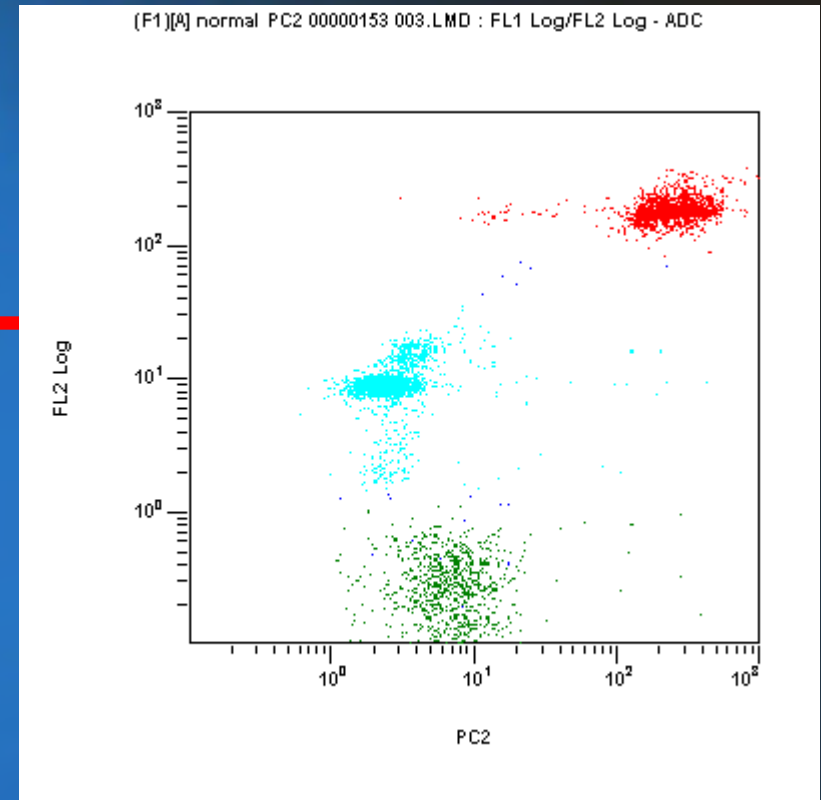
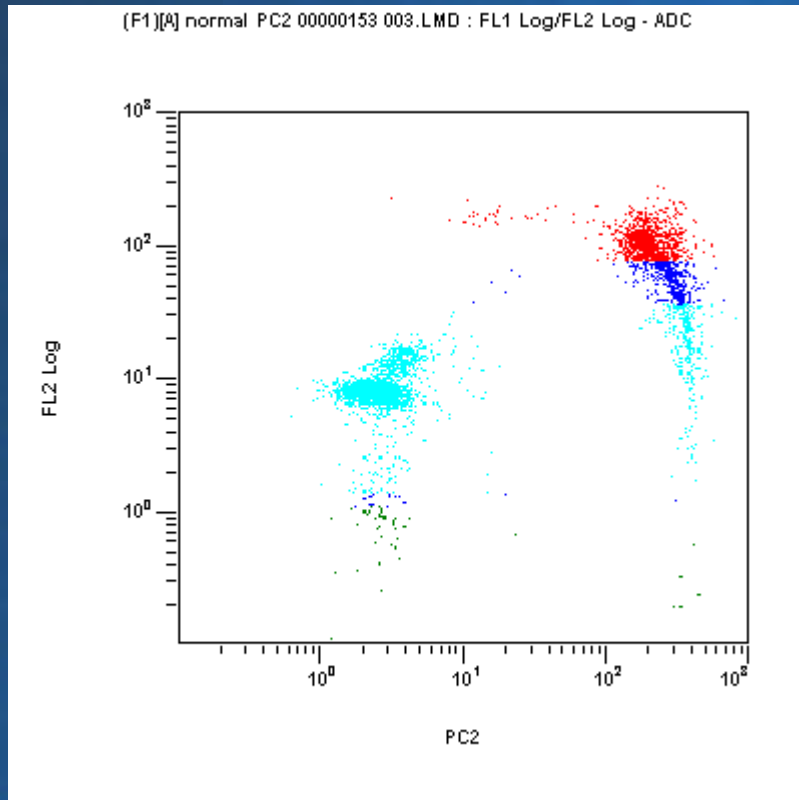
FlowPRA Screening における コンペンセーション (2-1)

FL2 - % FL1 を調整して、Class I Positive ビーズの傾きを適正にする。



FlowPRA Screening における コンペンセーション (2-2)

過度のコンペンセーションは Class I ビーズ集団が見えなくなる原因となるため調整が必要。

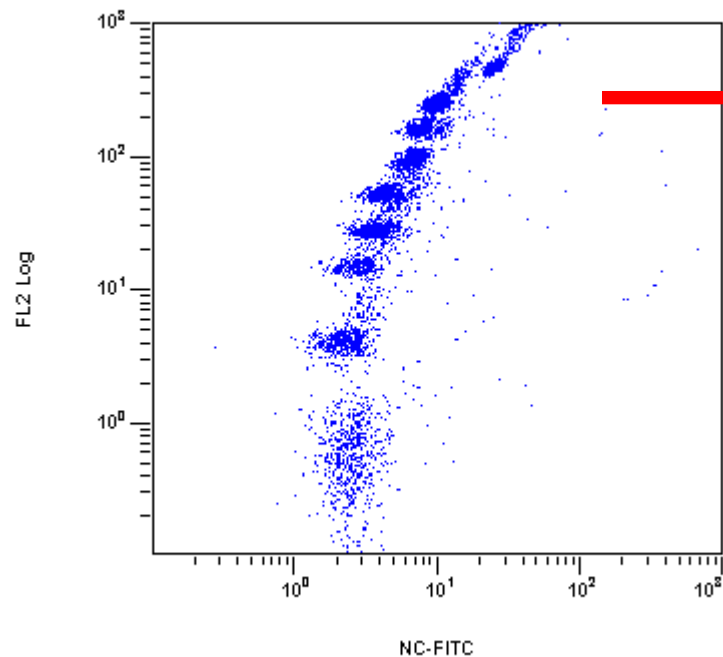


Class I ビーズ集団が見えなくなっている

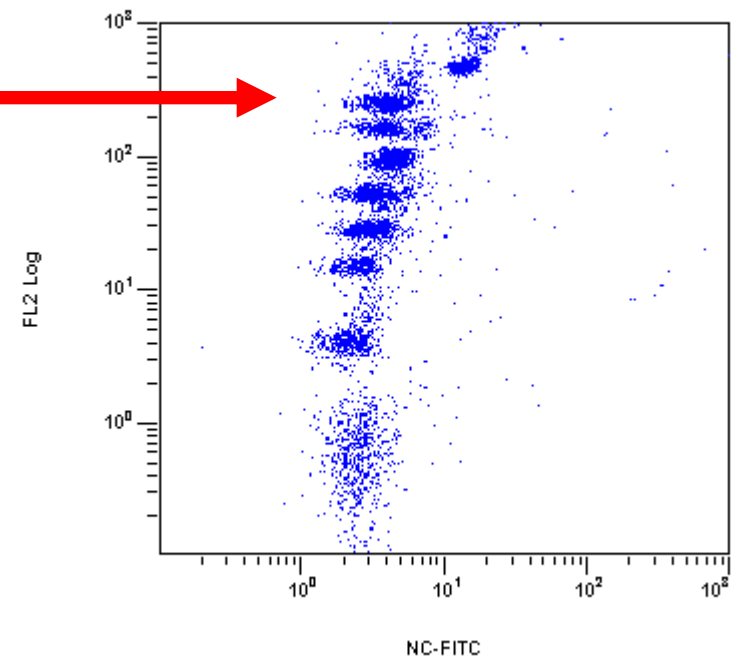
FlowPRA Specific における コンペンセーション (1-1)

FL1 - % FL2 を調整して、FL2 強蛍光ビーズの傾きを適正にする。

(F1)[A] Class 1 Group 2 Negative Control 00000164 001.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



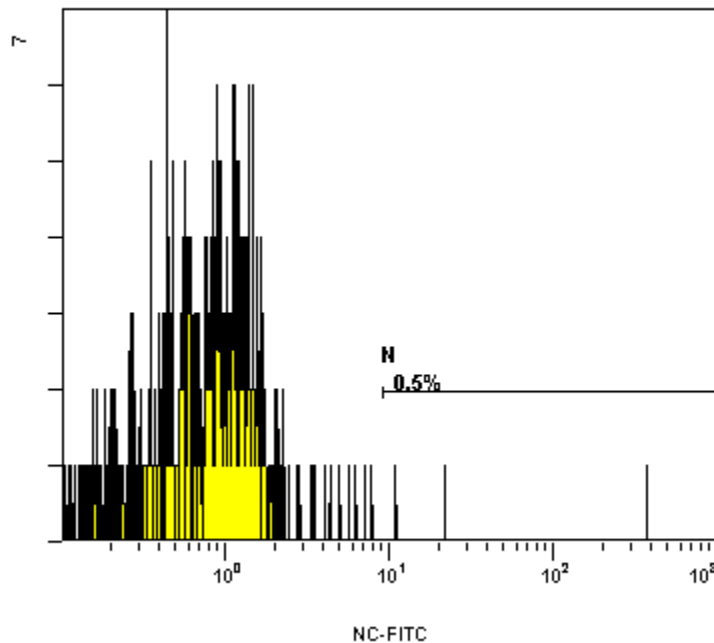
(F1)[A] Class 1 Group 2 Negative Control 00000164 001.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



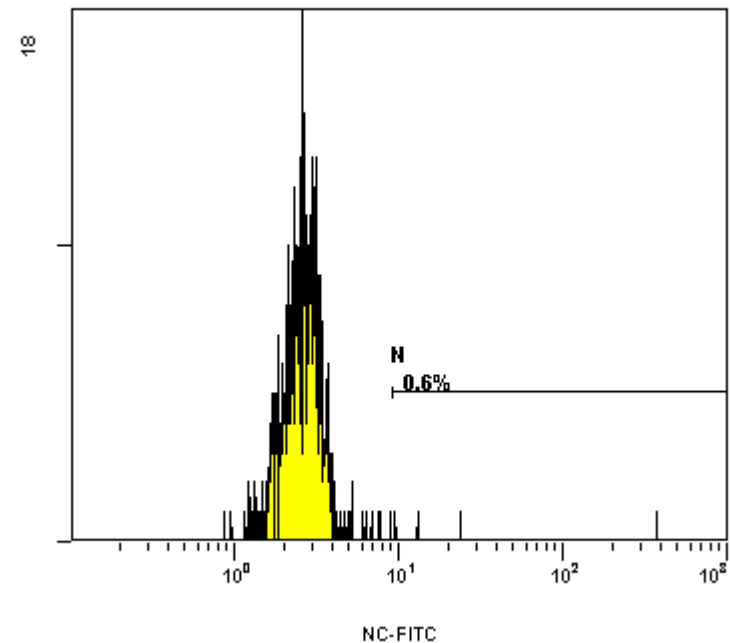
FlowPRA Specific における コンペンセーション (1-2)

過度のコンペンセーションはデータエラーの元になるので調整が必要。

(F1)[A AND D] Class I Group 2 Negative Control 00000164 001.LMD : FL1 Log - ADC



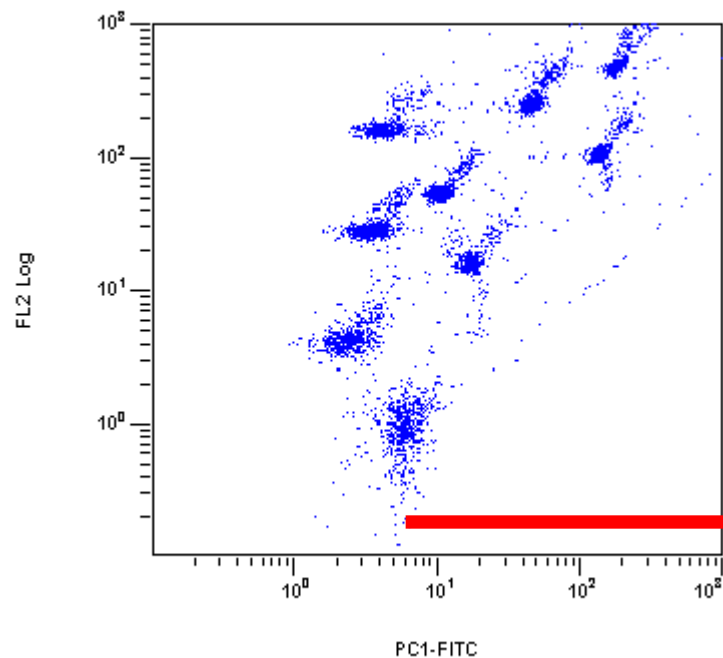
(F1)[A AND D] Class I Group 2 Negative Control 00000164 001.LMD : FL1 Log - ADC



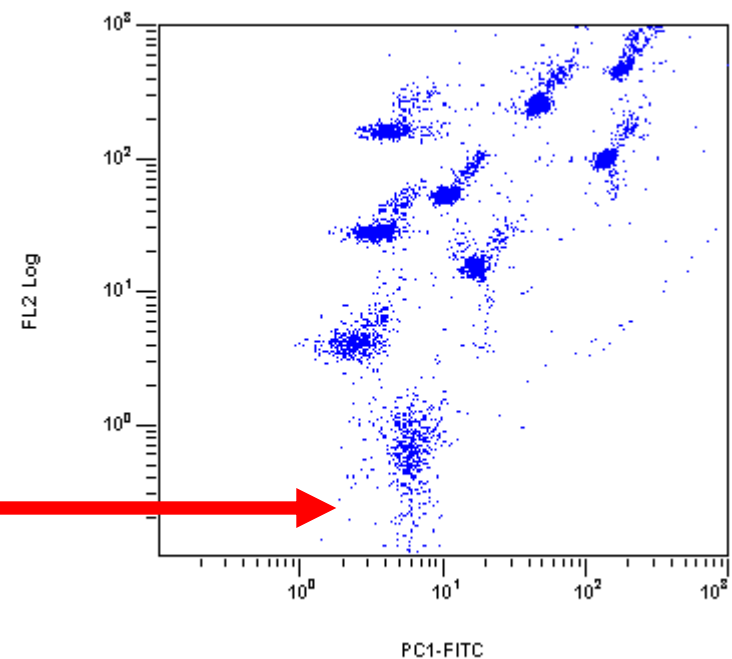
FlowPRA Specific における コンペンセーション (2-1)

FL2 - % FL1 を調整して、Positive ビーズの傾きを適正にする。

(F1)[A] Class I Group 2 Positive Control 1 00000165 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



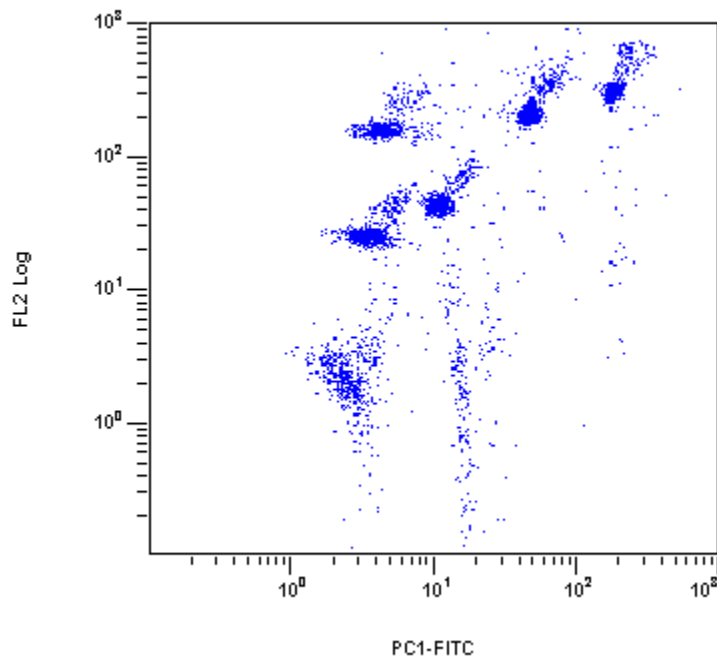
(F1)[A] Class I Group 2 Positive Control 1 00000165 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



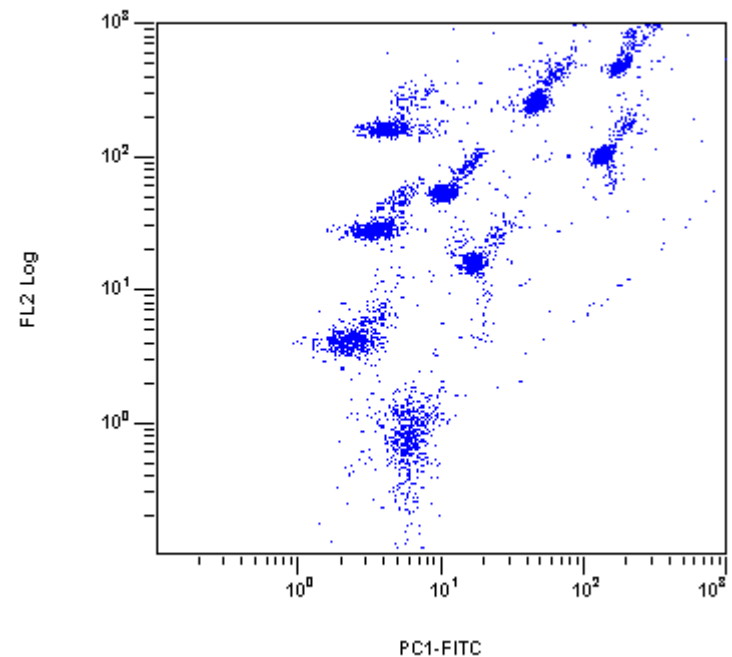
FlowPRA Specific における コンペンセーション (2-2)

過度のコンペンセーションは ビーズ集団が見えなくなる原因となるため調整が必要。

(F1)[A] Class 1 Group 2 Positive Control 1 00000165 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



(F1)[A] Class 1 Group 2 Positive Control 1 00000165 002.LMD : FL1 Log/FL2 Log - ADC



FL2 弱蛍光 ビーズ集団が見えなくなっている

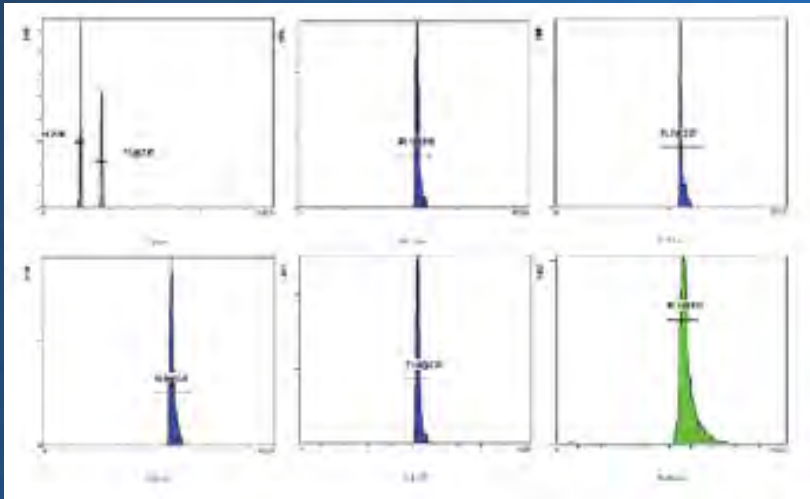
機器の精度管理

- アライメントの確認
～ 主に流路コンディション
- シグナル検出の精度
～ 線形性の確保
～ 感度 (SN 比) の確認
～ 分解能
- プロセスコントロール検体による確認
～ 試薬類、サンプル調製条件、etc.

アライメントの確認

精密度の評価

精密度は Flow-Check の CV 値 で評価



- サンプル流路のトラブル
 - 汚れ
 - 気泡
- 圧力系の異常
 - シース圧
 - サンプル圧

シグナル検出の精度

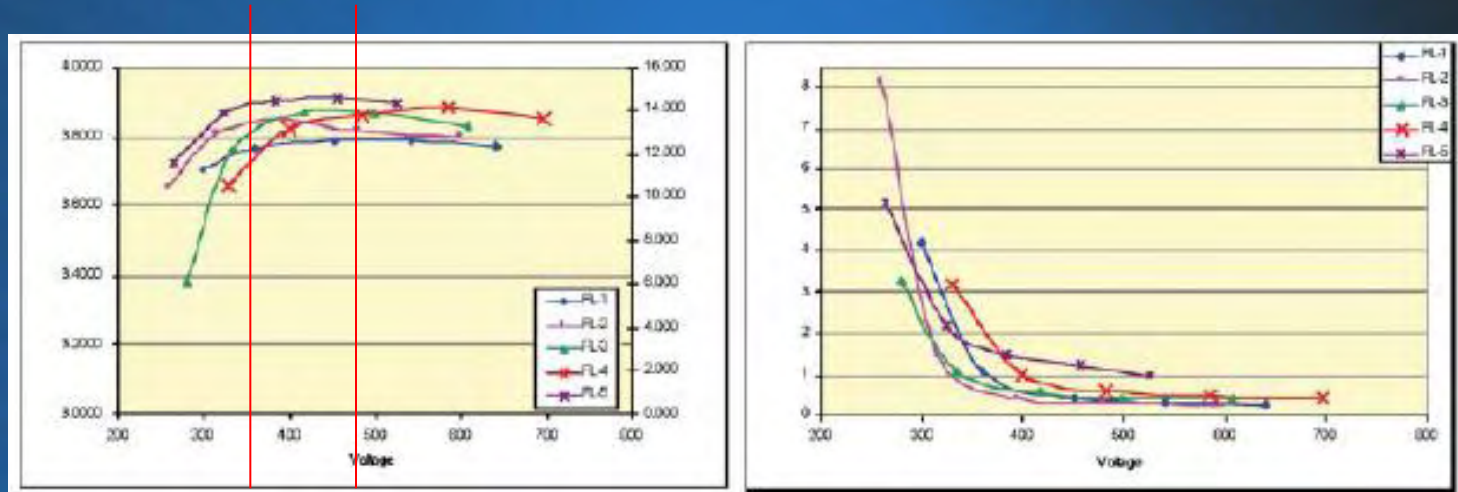
直線性(正確性)

感度 (SN 比)

分解能

線形性の得られる Volts 範囲で使用

- 2レベルの蛍光ビーズ (IMMUNO-BRITE の Level 4 と Level 5 など) の強度比を Volts を変更しながらプロットし、一定のレベルが担保される Volts 範囲を検索。
- アプリケーションにおけるサンプル測定時の Volts はその範囲で調整する。

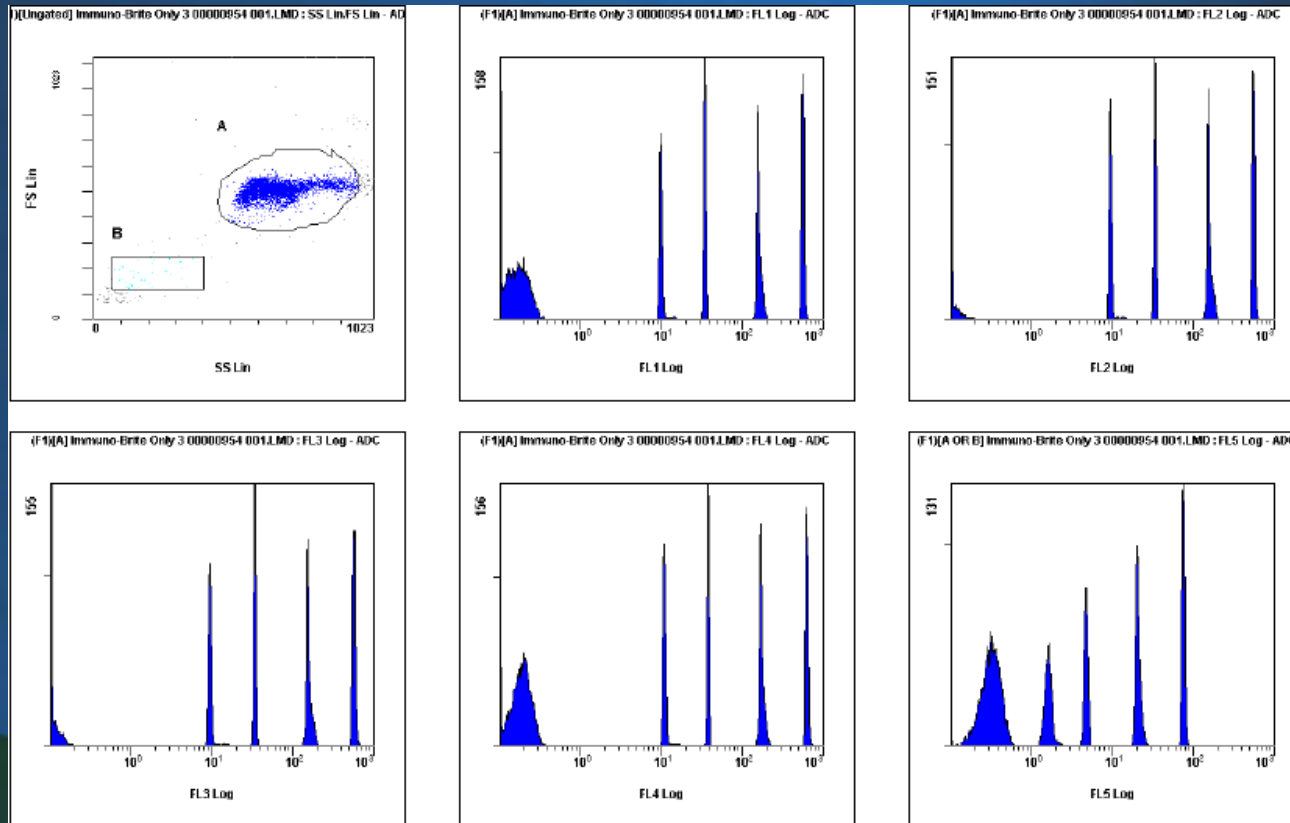


Volts v. s. Ratio

Volts v. s. CV

感度は SN 比 で評価

- 2レベルの蛍光ビーズ (IMMUNO-BRITE の Level 1 と Level 5 など) の強度比を定期的に確認する。

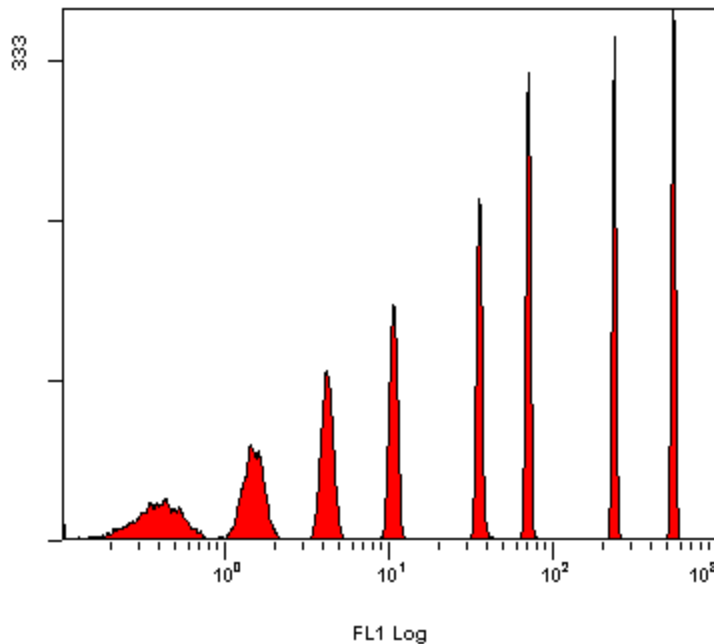


SN 比 が低下した場合は、サンプル流路系、光学系(センサー、光学フィルタ、など)を点検・調整・交換。

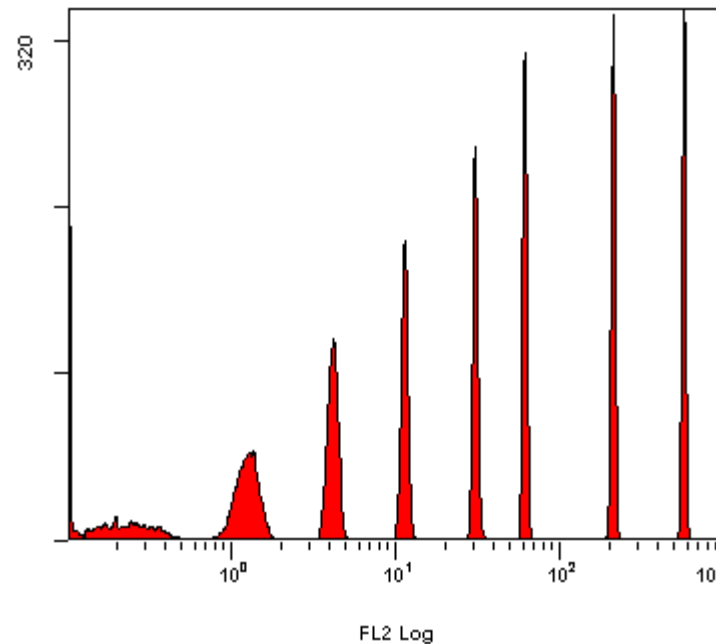
Log 分解能は全蛍光強度レベルで確認

- 蛍光強度が多レベルのビーズ混合液 (SPHERO Rainbow Calibration Particles など) を使用して、各レベル相互の切れ (分解能) を評価する。

(F1)[A] SPI Rainbow 8p 00000160 001.LMD : FL1 Log - ADC



(F1)[A] SPI Rainbow 8p 00000160 001.LMD : FL2 Log - ADC



プロセスコントロール検体による確認

分注

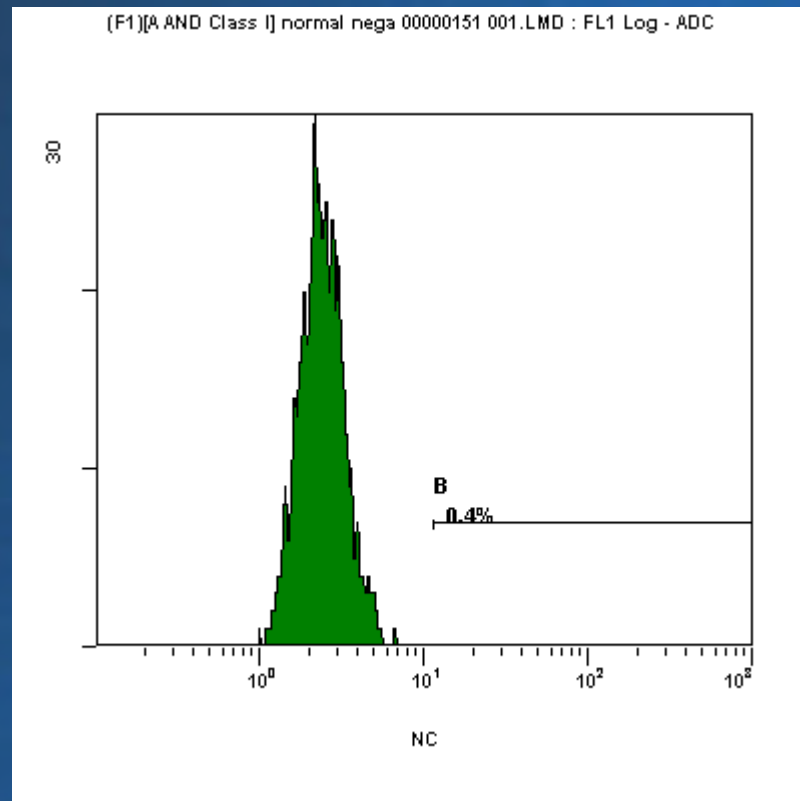
攪拌

反応条件(温度 & 時間)

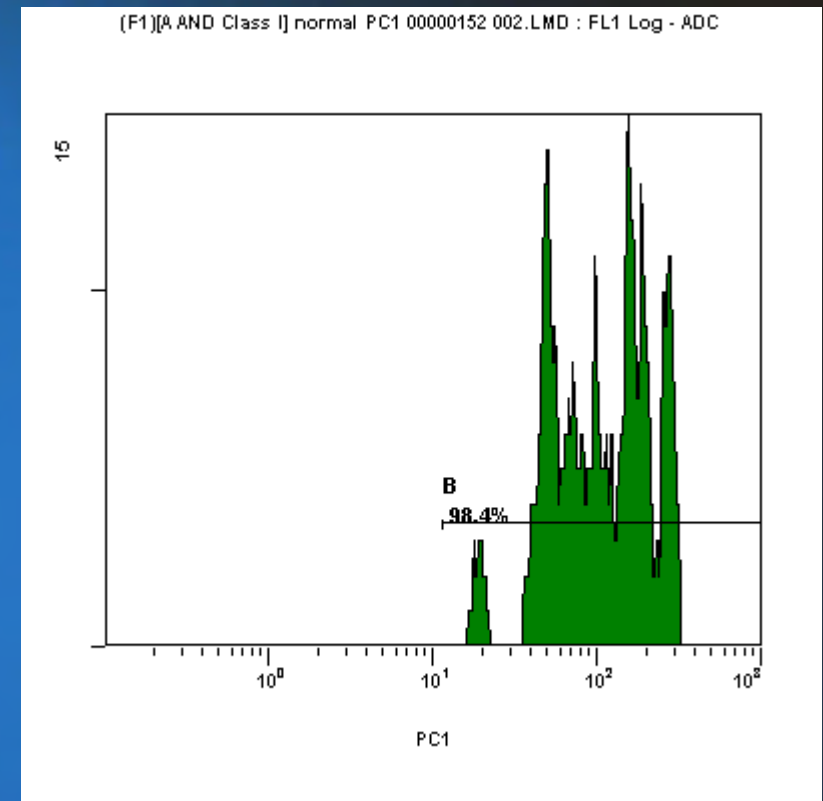
洗浄

ポジコン / ネガコン 血清で評価

NC でのデータ例



PC でのデータ例





**BECKMAN
COULTER**

We're better together