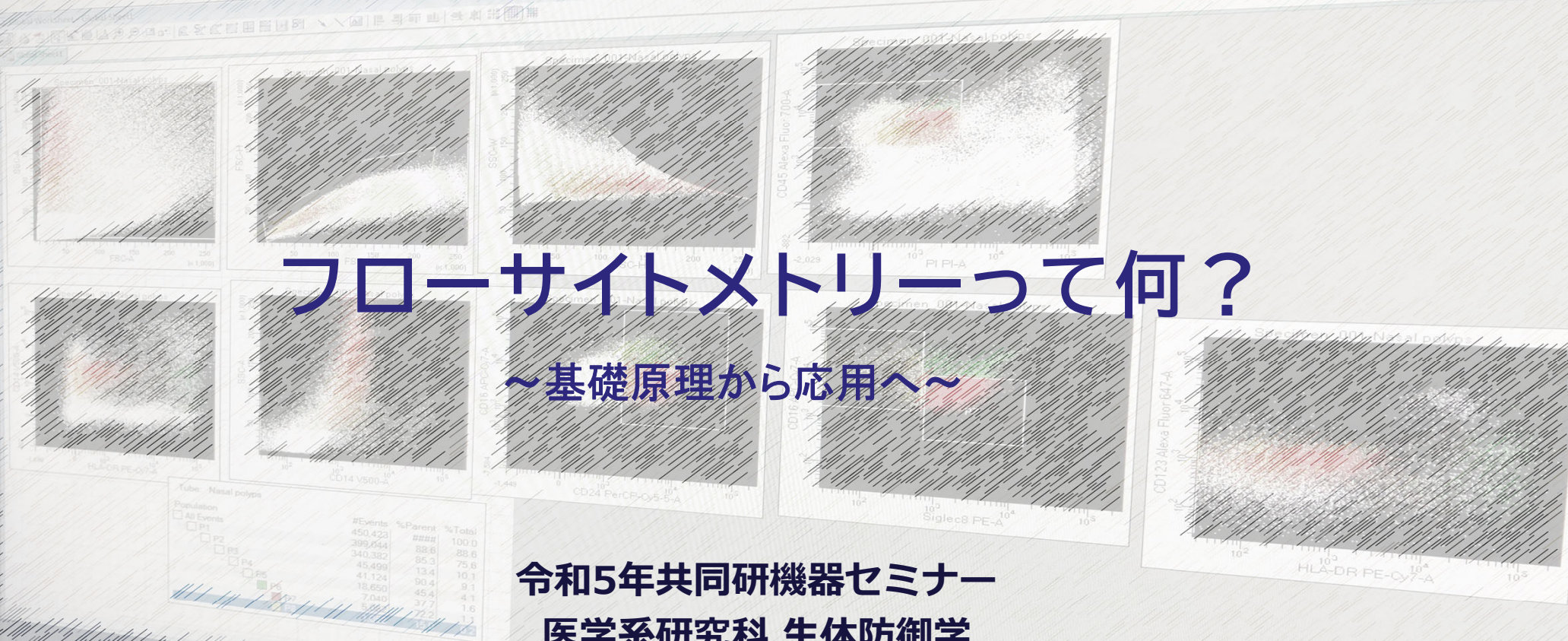


# フローサイトメトリーって何？

～基礎原理から応用へ～

令和5年共同研機器セミナー  
医学系研究科 生体防御学  
本村 泰隆

令和5年4月20日



# アウトライン

- **フローサイトメーターって何？**

フローサイトメトリーの歴史、原理

- **モノクローナル抗体**

モノクローナル抗体、その作り方

- **フローサイトメトリーの活用法**

フローサイトメーターの活用法（研究編、臨床編）

# フローサイトメトリーの歴史

1949年

## コールター原理

Wallace Coulterが世界で初めて細胞計測の自動化を可能にするコールター原理（細孔電気抵抗検出法）を発表。



1953年

## コールターカウンター

フローサイトメーターのルーツは、1956年のWallace Coulterの開発によるコールターカウンター A型の登場が挙げられる。1948年シカゴの自宅の裏の地下室で発明したCoulter原理は、細胞1個ずつの大きさを正確に測定することができる。この技術は現在でも大活躍し、世界中のほぼすべての自動血球測定装置で使用されている。細胞を1個ずつ正確に測定するコールターカウンターは、ソーティング機能の開発や蛍光パラメーターの取得については、長い年月を要した。



コールターカウンターA型

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

# フローサイトメトリーとは

フロー（水流）を巧みに利用することによって細胞を1つ1つ解析すること。

フローサイトメーター：フローサイトメトリーのための機器

## <フローサイトメーター>

- ▶ **アナライザー**：解析のみを目的とする。
- ▶ **セルソーター**：解析した結果に基づき目的の細胞を  
生きたまま分取する。

# フローサイトメーター

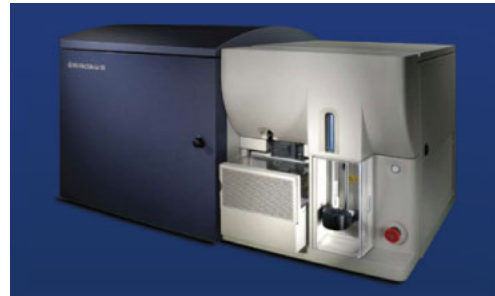
## 【アナライザー】

BD FACSCanto II

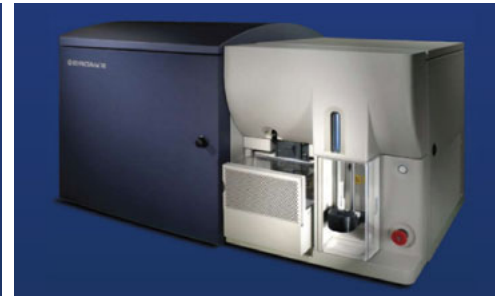


## 【セルソーター】

BD FACSAria III u



BD FACSAria II



## 【共同研HPより】

Sony SH800Z



BD FACSVerse



BD FACSFusion

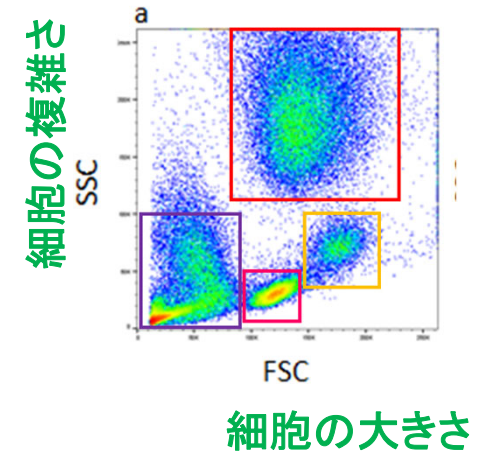
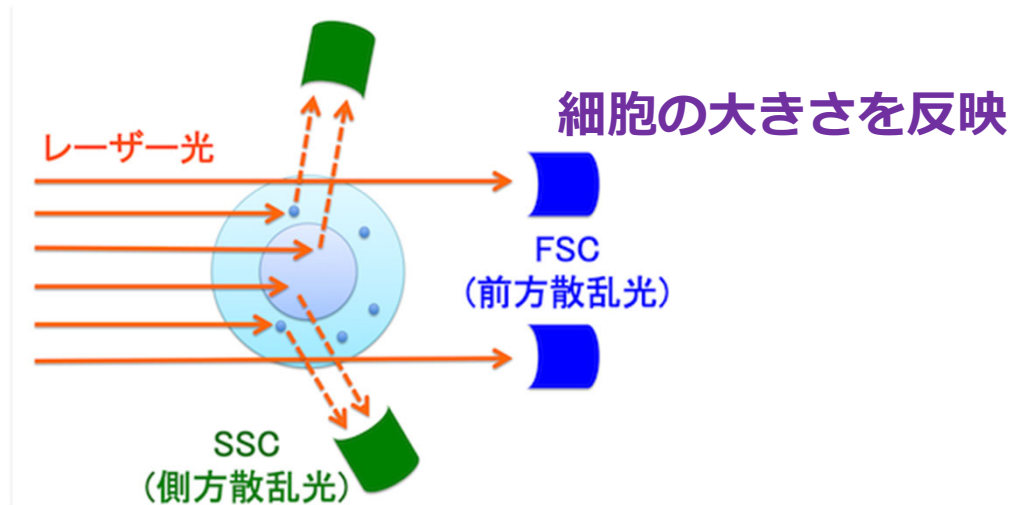


BD FACSymphony S6

# フローサイトメトリーの原理

FSC (forward scatter 前方散乱光)

SSC (side scatter 側方散乱光)



# フローサイトメトリーの原理

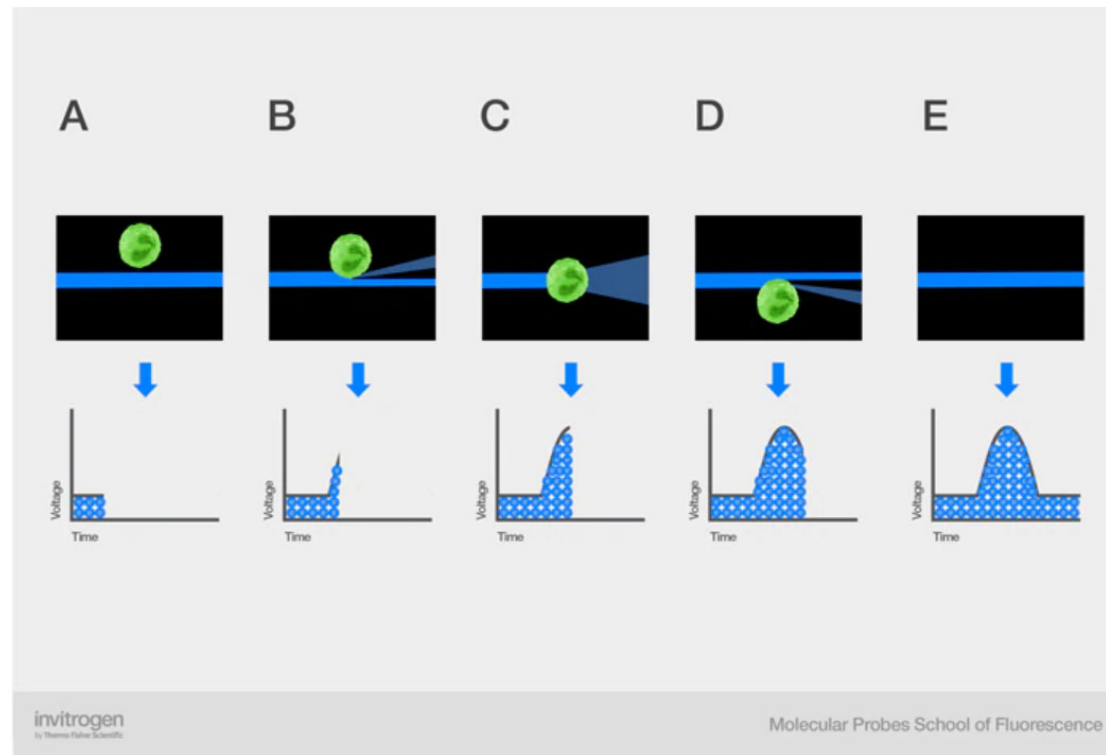


図 2：細胞がレーザーの光路を横切るときに電圧パルスが発生 (A) 粒子がレーザーの光路に到達する前は、ベースライン信号が表示されます。曲線は、放出される光子のレベルを表します。(B) 細胞がレーザーの光路に侵入を始めると、光子や散乱光が発生し、シグナルの増加が見られます。(C) 細胞がレーザーの光路を通過する中でもっとも強い光を発生すると、検出されるパルス信号の高さも最大になります。(D) 細胞がレーザーの光路から離れ始めると、シグナルは弱くなります。(E) 細胞がレーザーの光路を完全に通過すると、シグナルレベルはベースラインに戻ります。

# フローサイトメトリーの原理

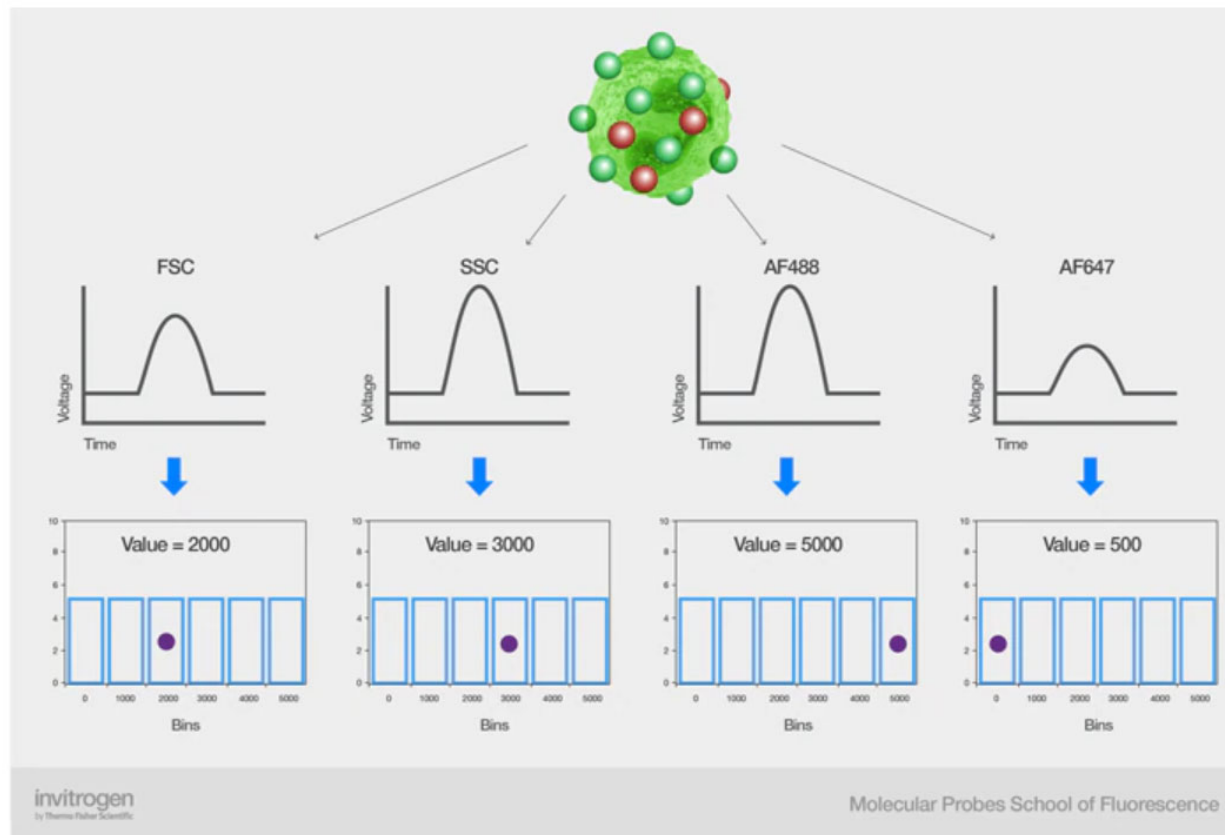


図 6 : ある1つの細胞に関連する各パラメーターの電圧パルスのビンニング

# フローサイトメトリーの原理

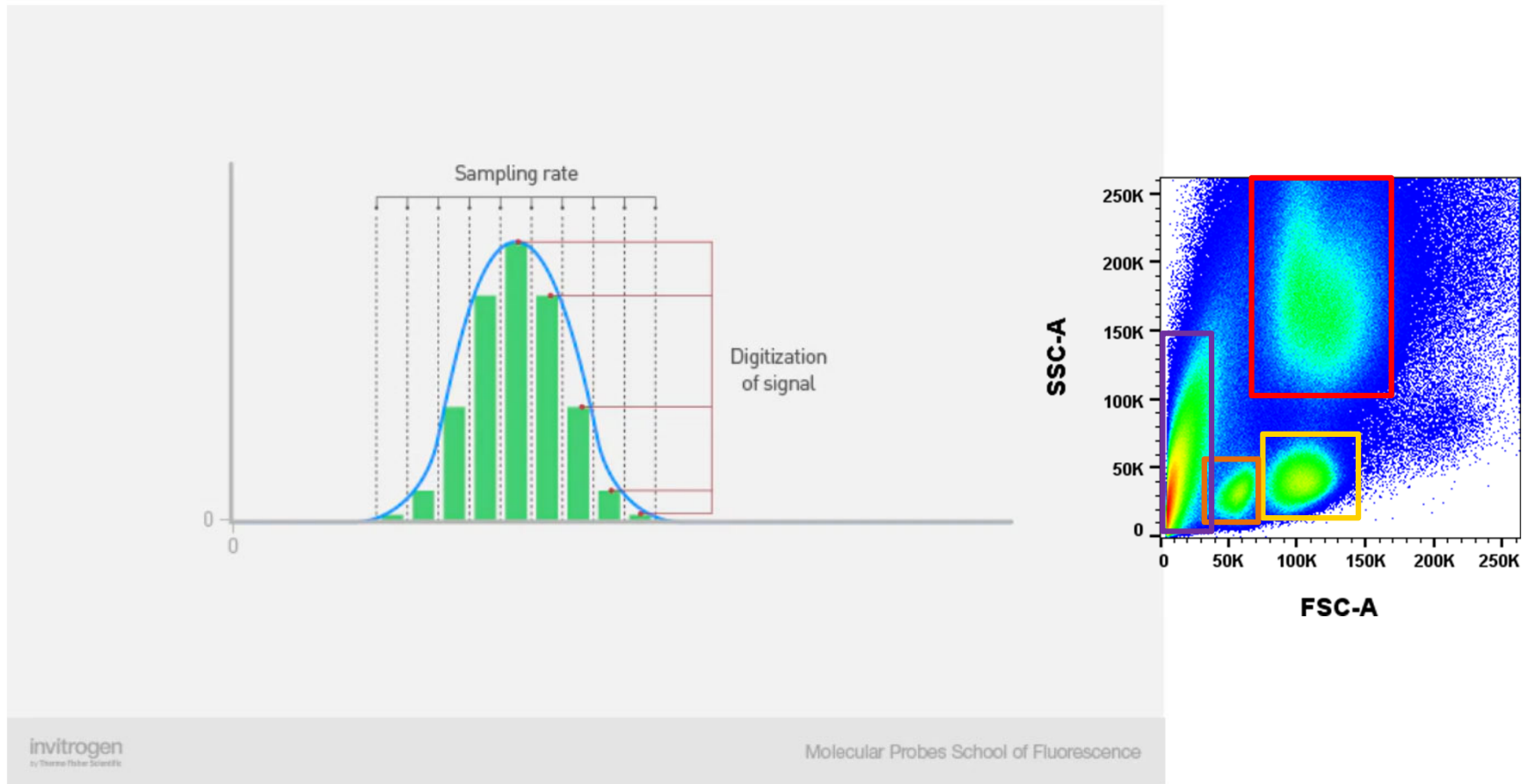
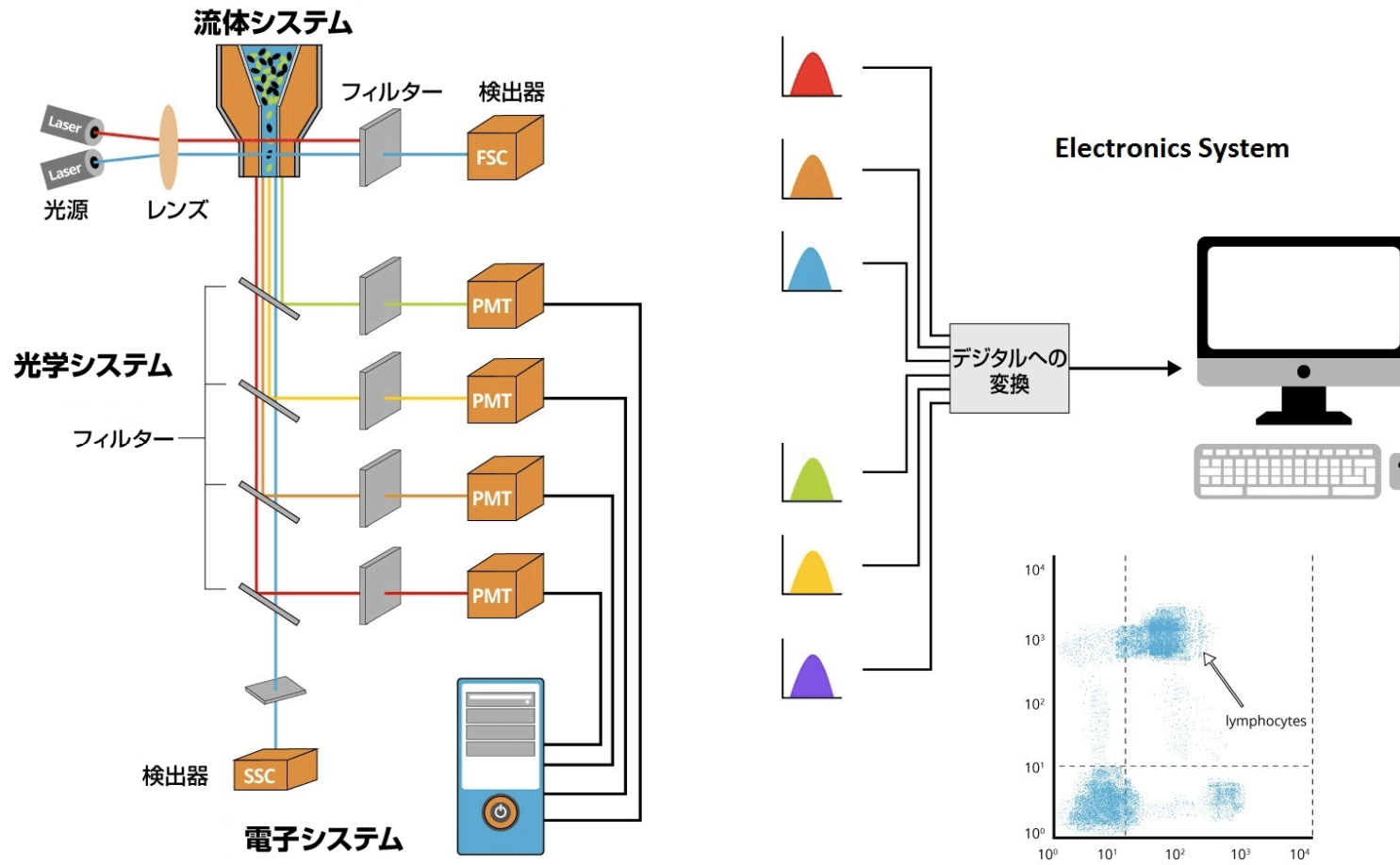


図 7: ピニングのプロセスにおける電圧パルスデータの分布

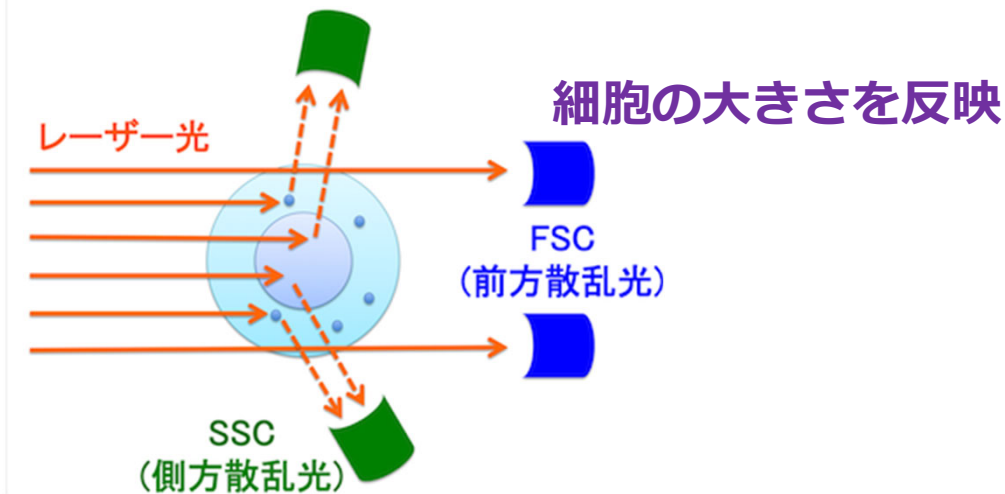
# フローサイトメトリーの原理



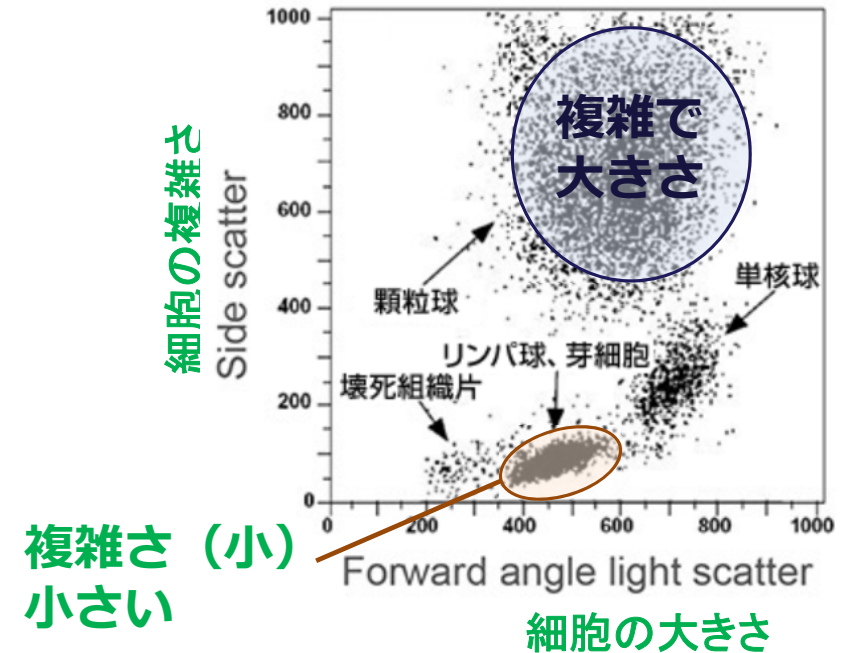
# フローサイトメトリーの原理

FSC (forward scatter 前方散乱光)

SSC (side scatter 側方散乱光)



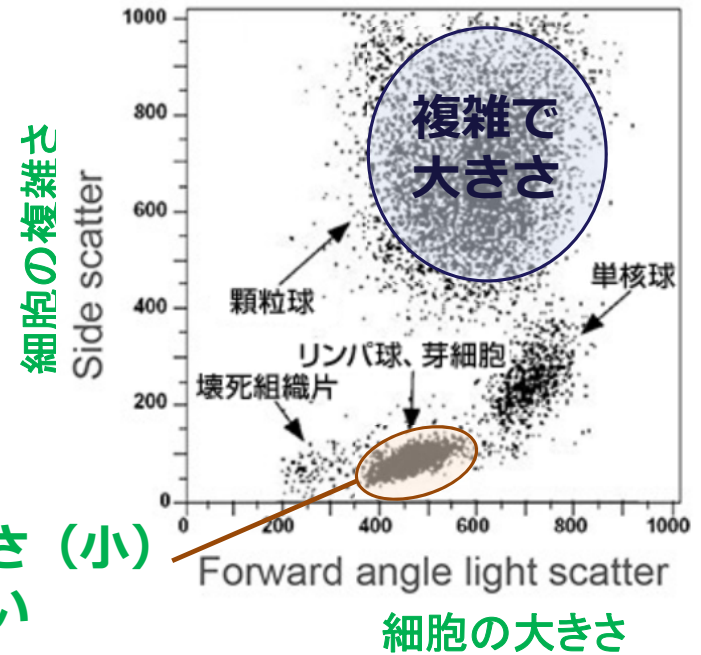
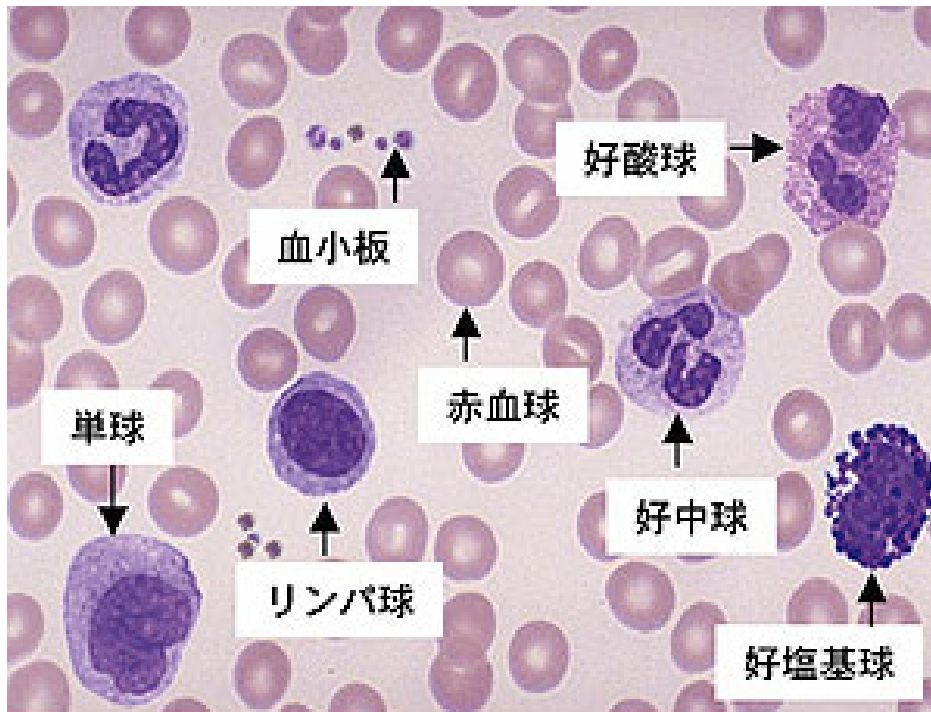
細胞の内部構造の複雑さを反映



# フローサイトメトリーの原理

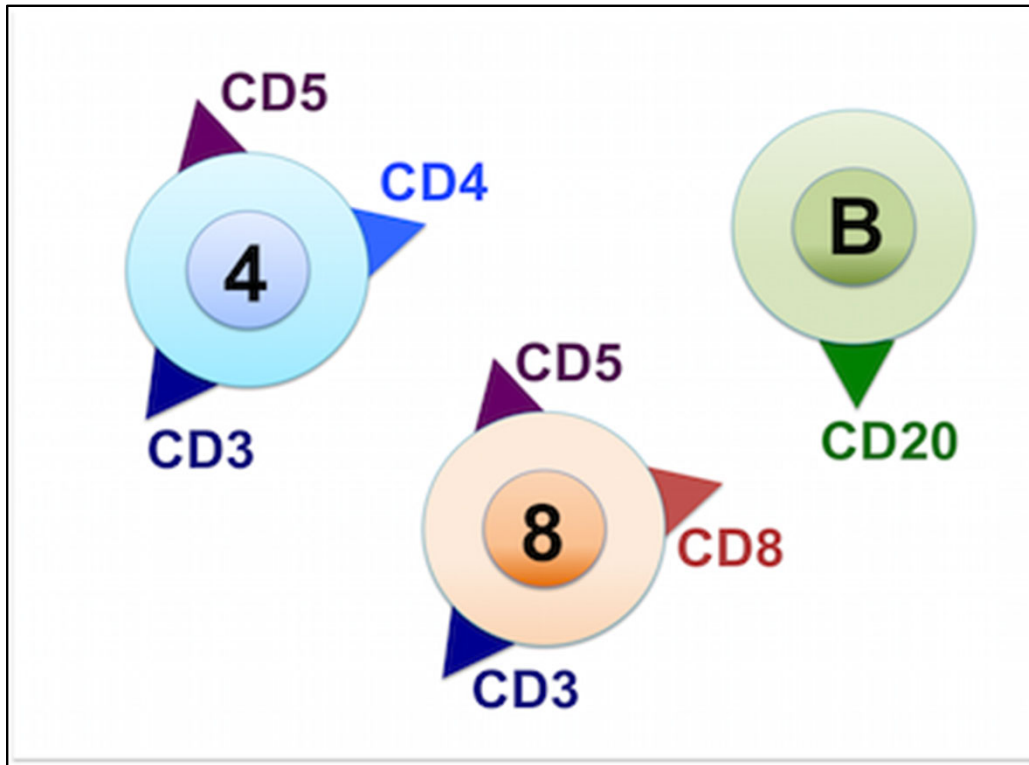
FSC (forward scatter 前方散乱光)

SSC (side scatter 側方散乱光)



# フローサイトメトリーの原理

## 蛍光標識抗体を用いた染色



CD4T細胞(ヘルパーT細胞): CD3、CD4、CD5

CD8T細胞(キラーT細胞): CD3、CD8、CD5

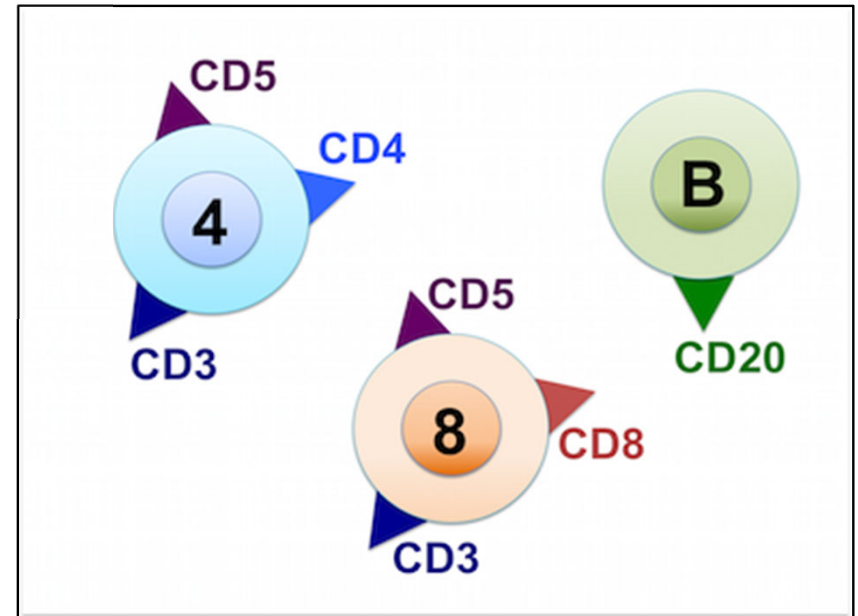
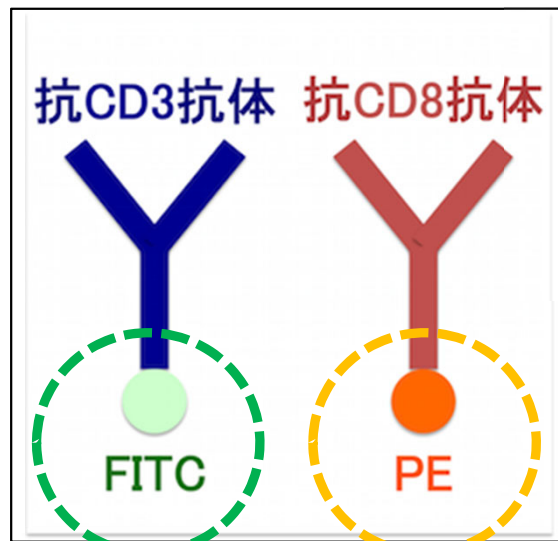
B細胞: CD20

<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

# フローサイトメトリーの原理

## 蛍光標識抗体を用いた染色

蛍光標識されたモノクローナル抗体



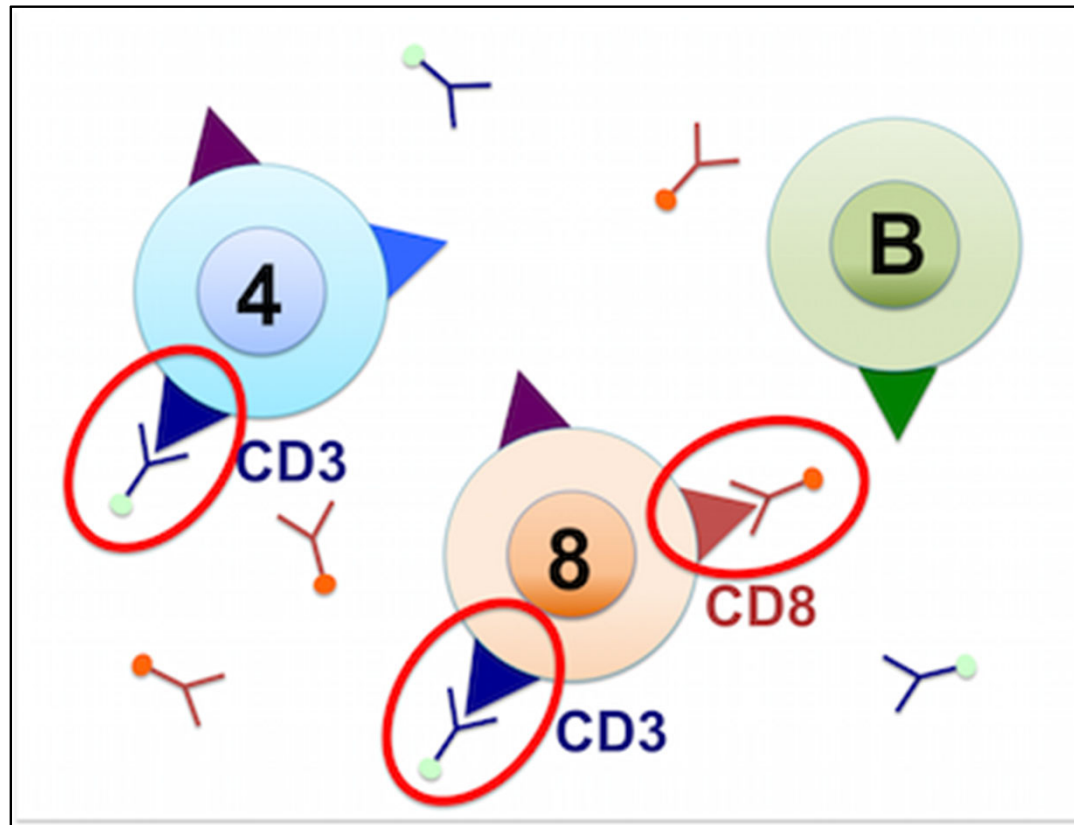
### 蛍光色素

特定の波長のレーザー光で励起すると、特定の波長の蛍光を発する。よく使われる蛍光色素でも30種類以上存在する。

<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

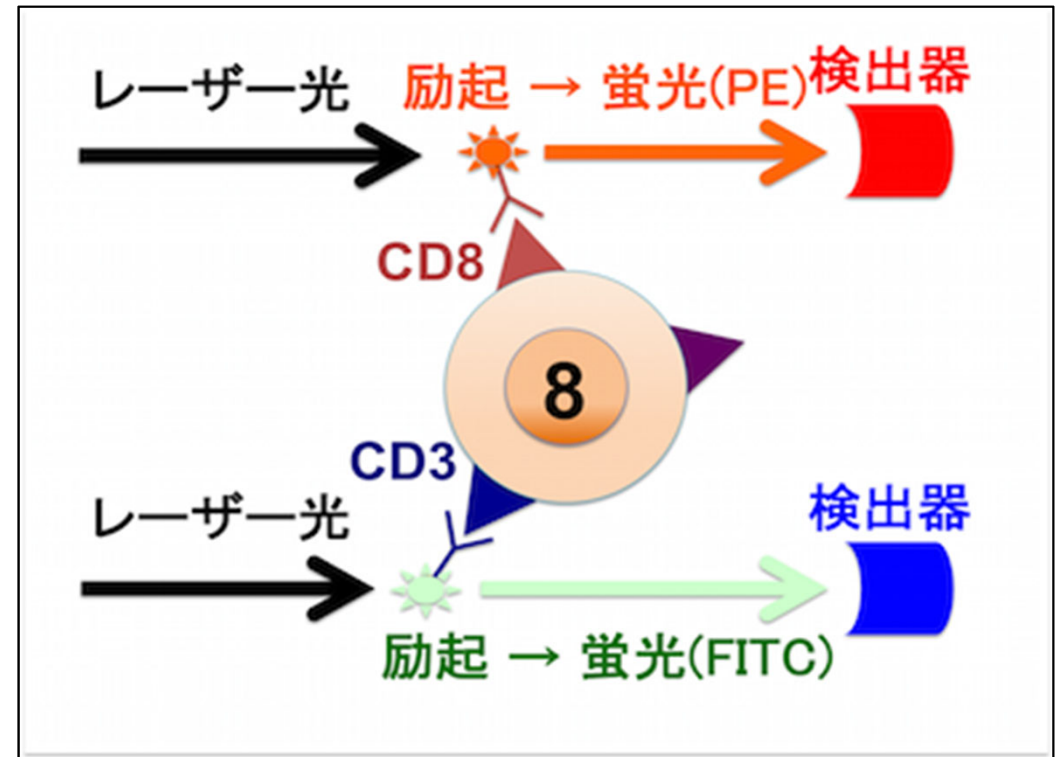
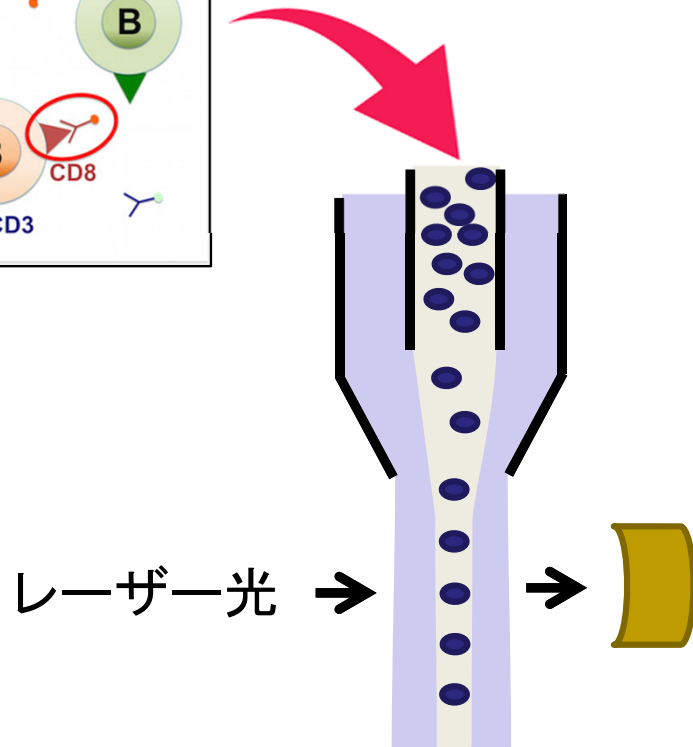
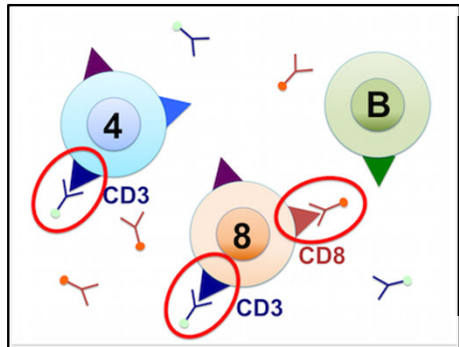
# フローサイトメトリーの原理

## 蛍光標識抗体を用いた染色

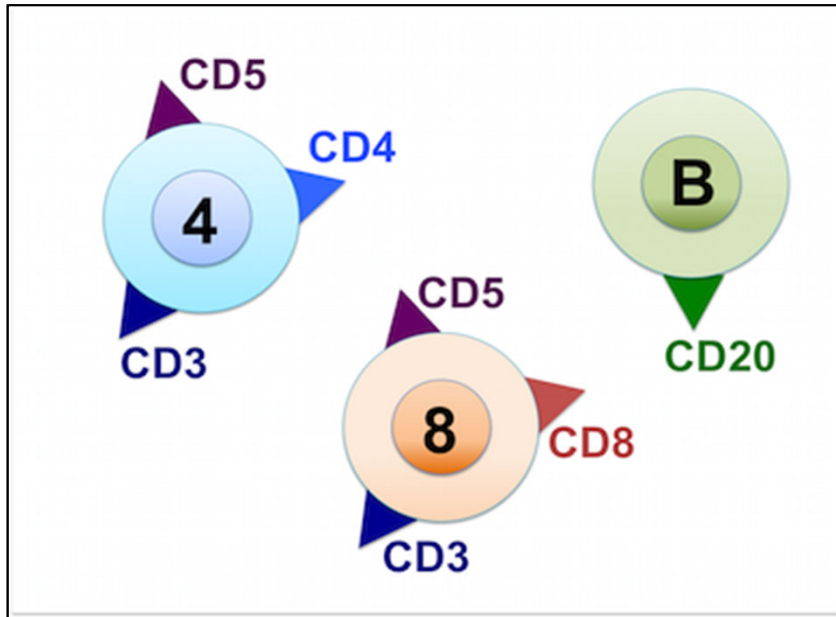


<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

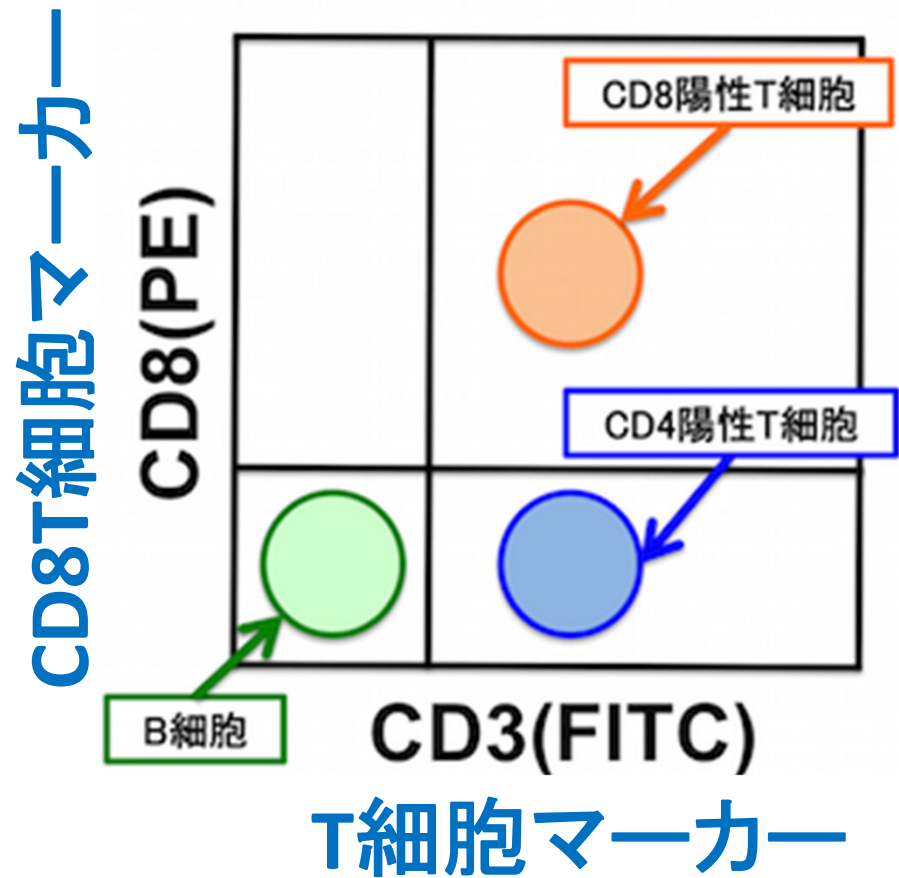
# フローサイトメトリーの原理



# フローサイトメトリーの原理

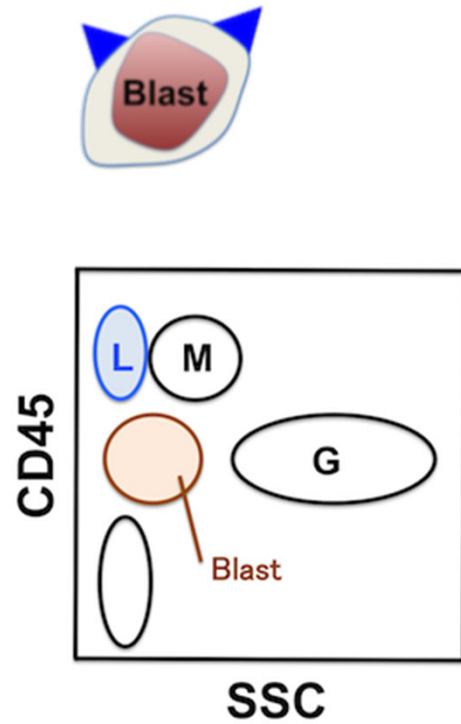
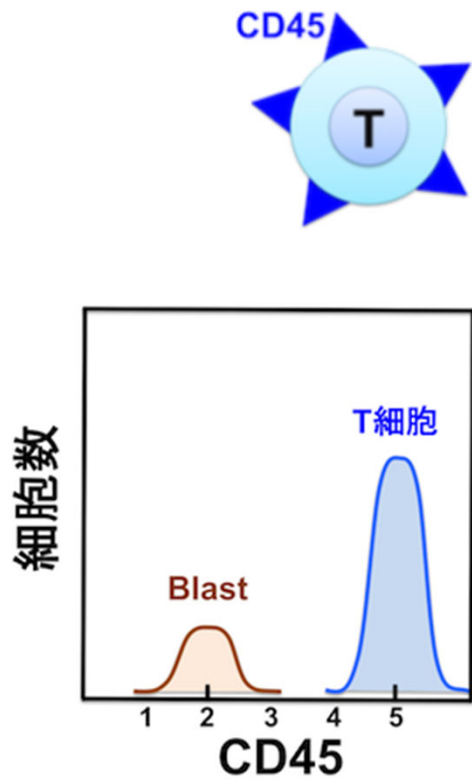


<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

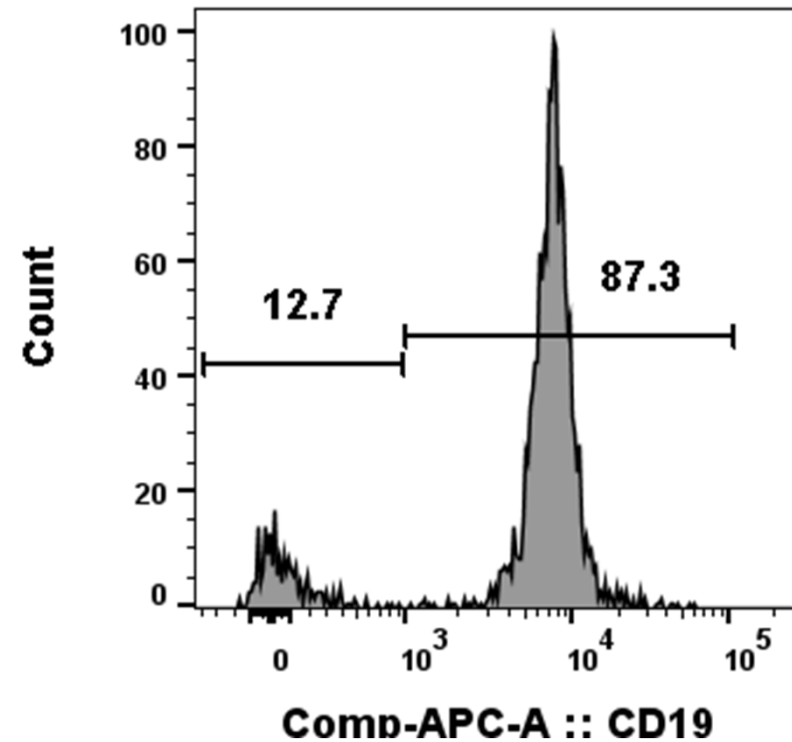


# フローサイトメトリーの原理

## 【ヒストグラム】



<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

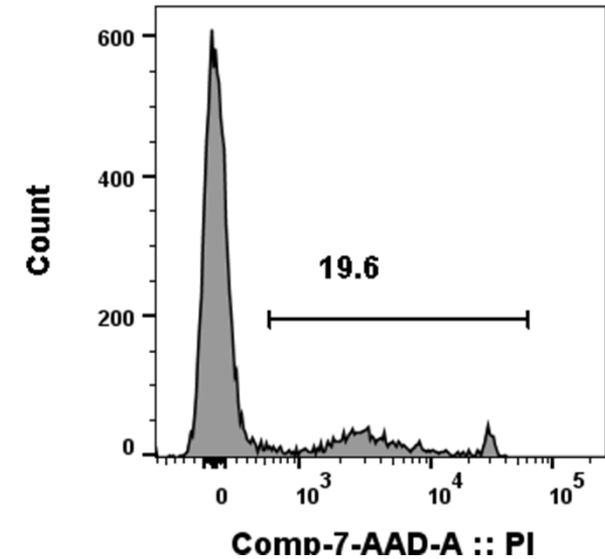
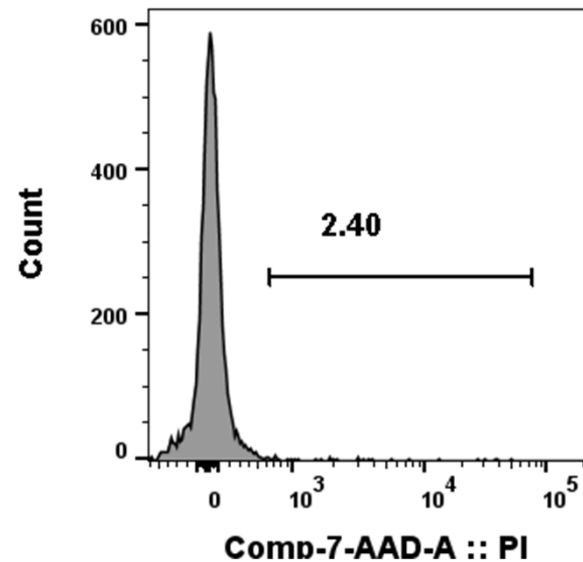
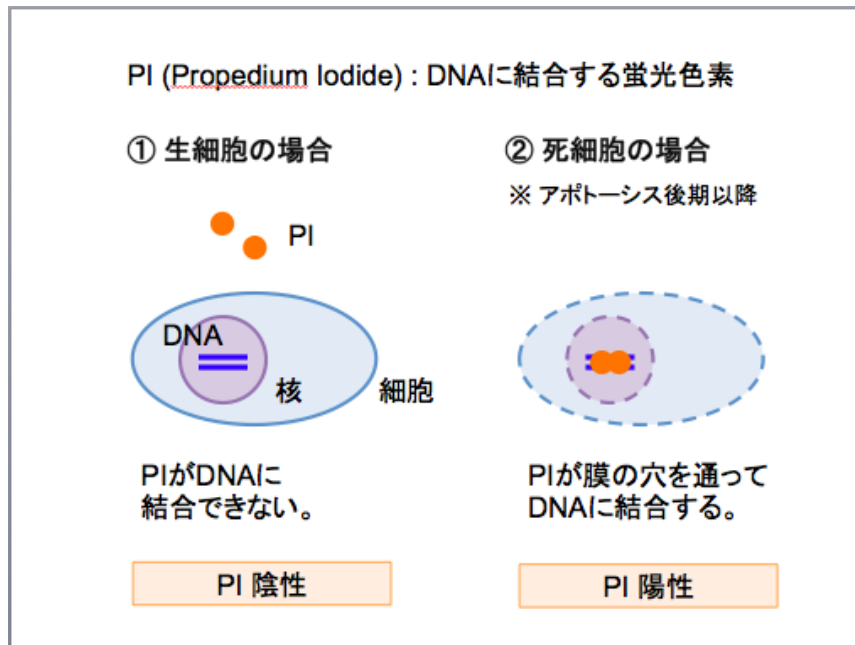


# フローサイトメトリーの原理

## 【死細胞の除去】

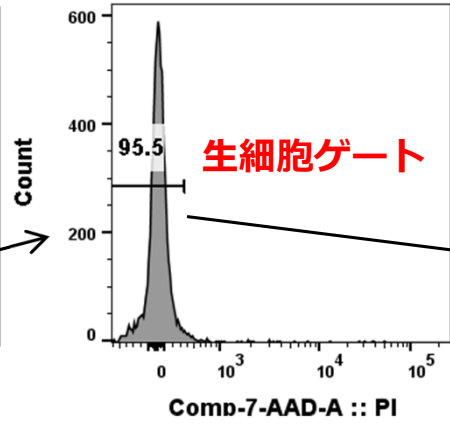
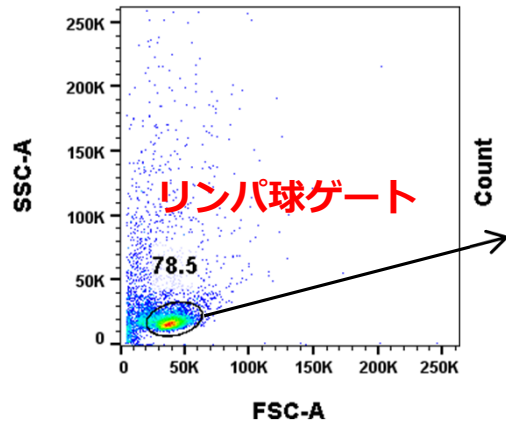
### Propidium Iodide (PI) よう化プロピジウム 7-AAD

二本鎖核酸に結合すると蛍光を発する。

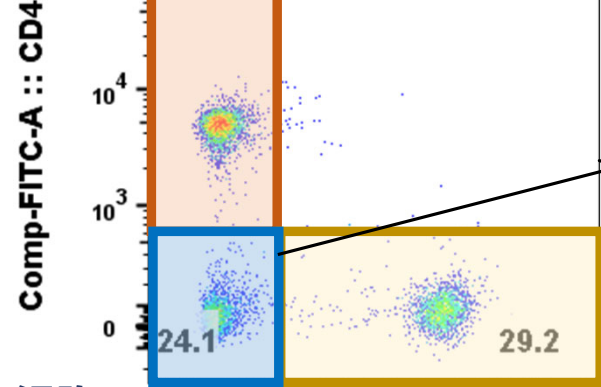


# フローサイトメトリー解析の実践

## マウス鼠経リンパ節



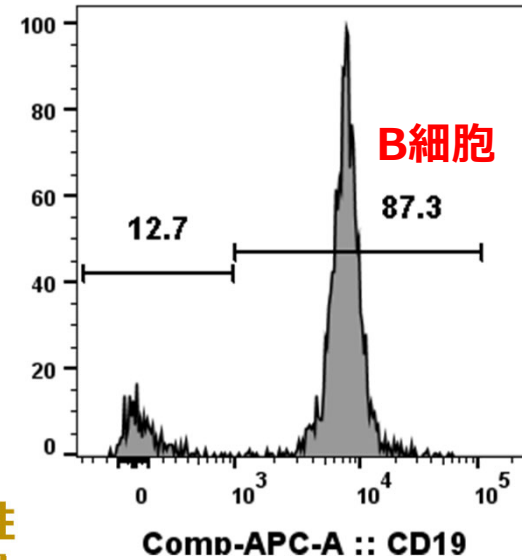
CD4陽性  
CD8陰性  
T細胞



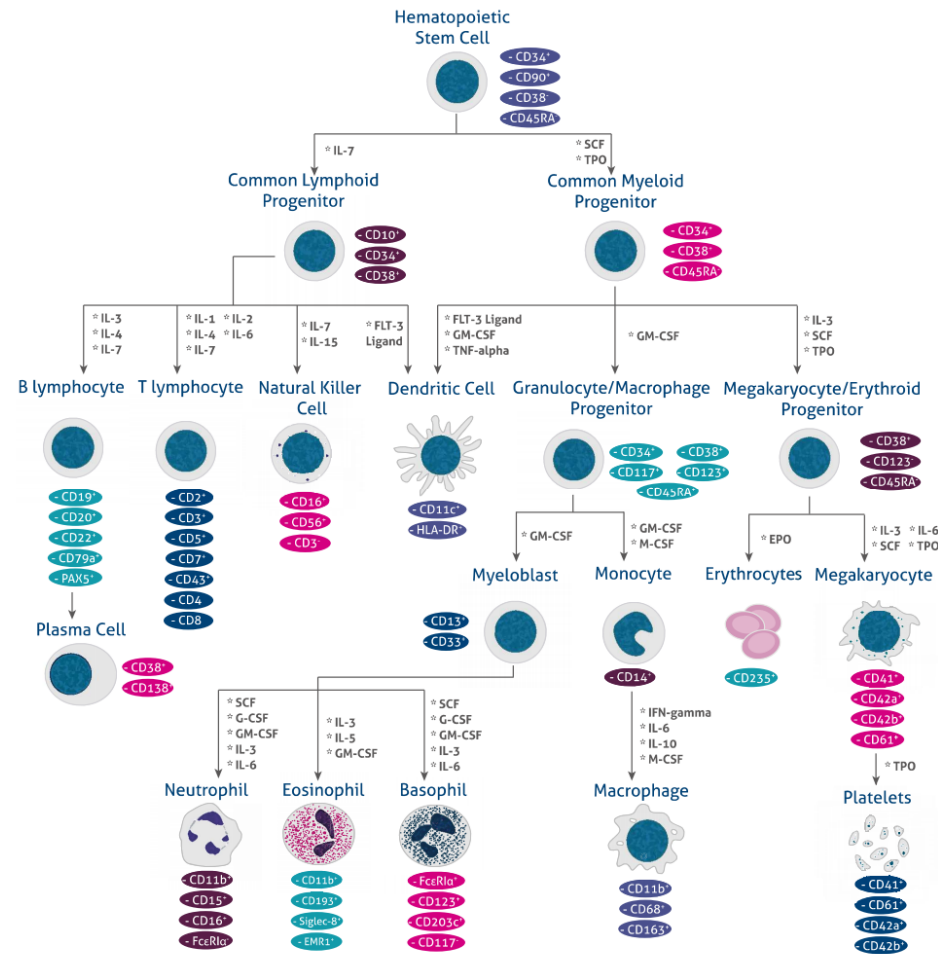
B細胞?

CD4陰性  
CD8陽性  
T細胞

## CD4陰性CD8陰性細胞



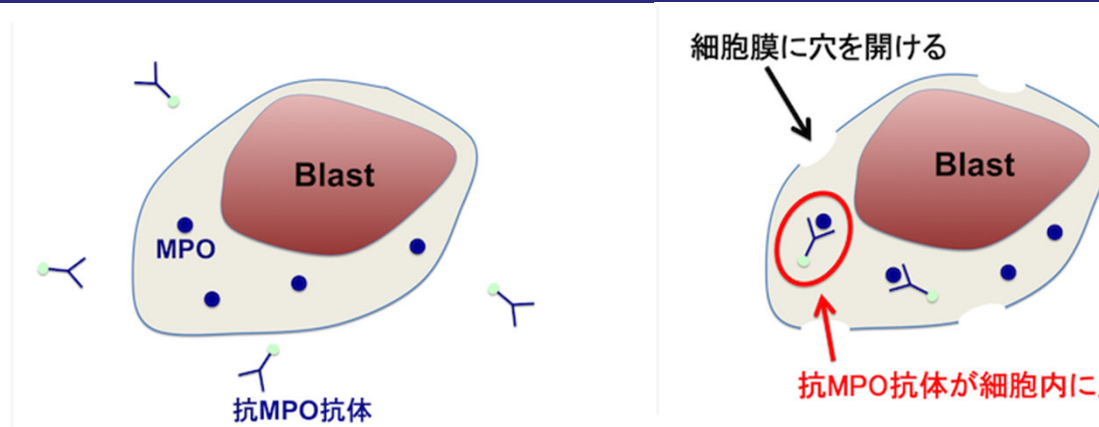
# 免疫細胞表面マーカー (ヒト)



コスモバイオHPより

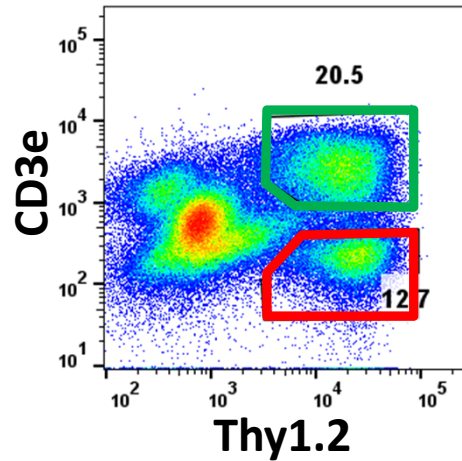
# フローサイトメトリーの実践(応用編)

## 【細胞内染色】

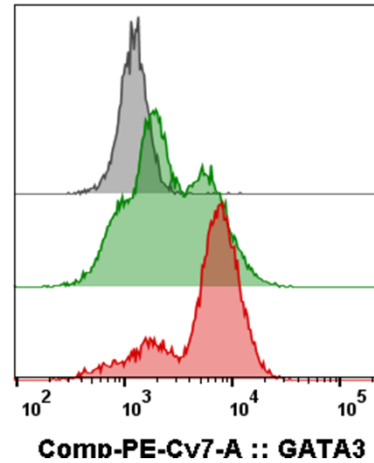


<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

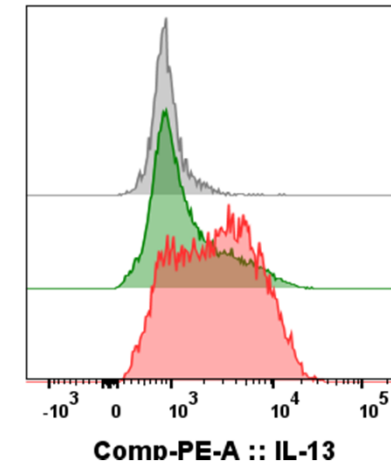
## マウスの肺 (喘息誘導)



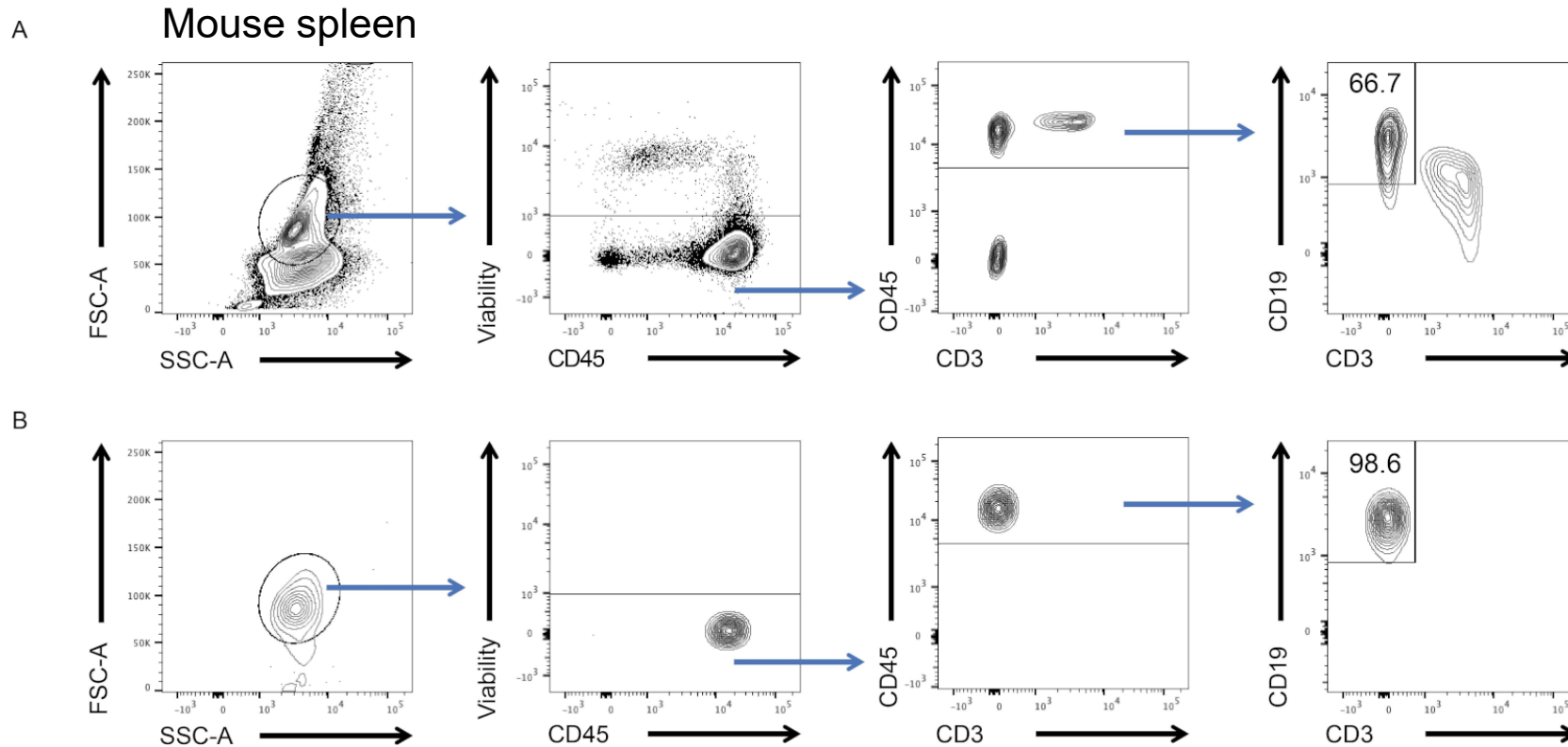
## 転写因子GATA3



## サイトカインIL-13



# セルソーティング



Thibaut et al., Jove 2019

# 共同研に新設されたセルソーター

BD FACSFusion



ソーティング機能とバイオセーフティーを融合。  
感染細胞を単離可能。

BD FACSymphony S6



BD HPより

30色のパラメーターを使用し、より詳細な細胞  
集団を検出、単離することが可能

# 共同研に新設されたセルソーター

## BD FACSymphony S6



- ▶ 355nm (UV)、405nm、488nm、561nm、637nmの5本のレーザー搭載で蛍光30カラーに対応。
- ▶ 6種類の細胞群を同時にソーティング可能 (これまでは最大4種類)

Figure 1

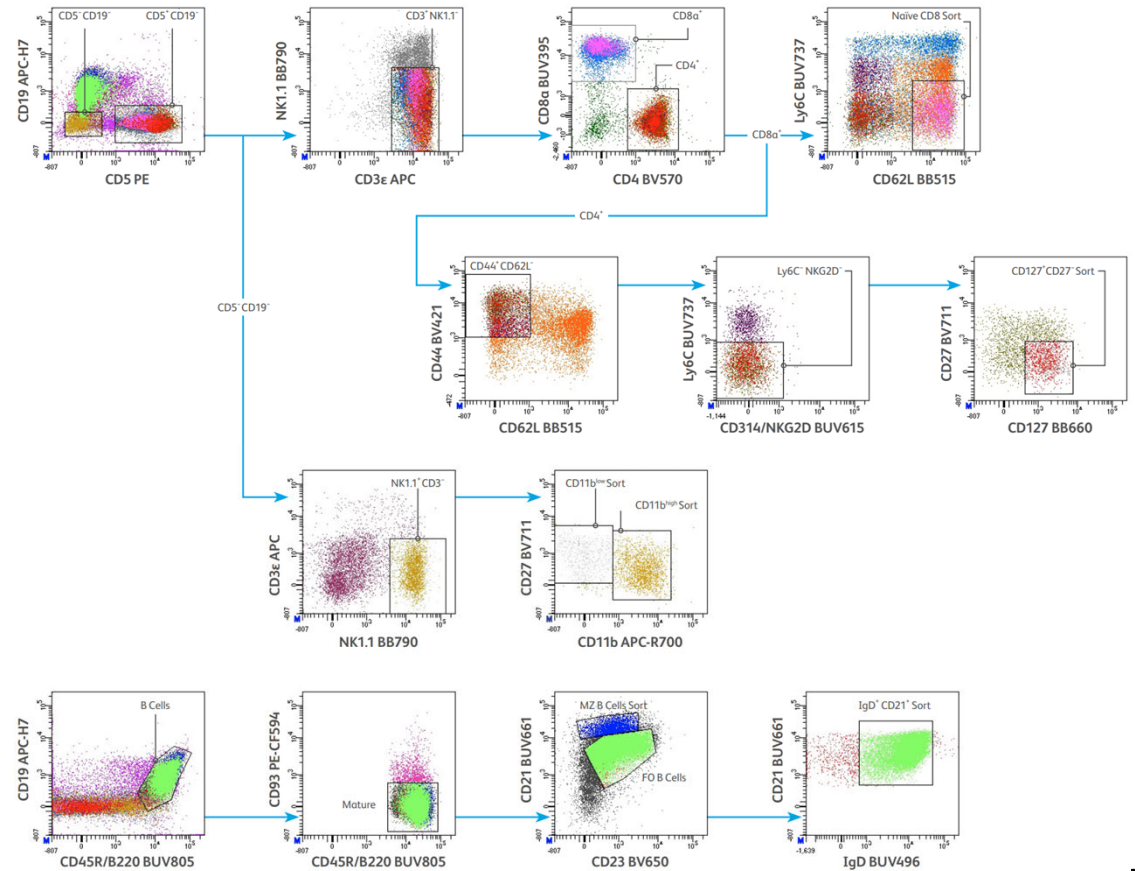


Figure 1: A 27-color panel for analysis of immune cell composition in mice

BD HPより

# アウトライン

- フローサイトメーターって何？

フローサイトメトリーの歴史、原理

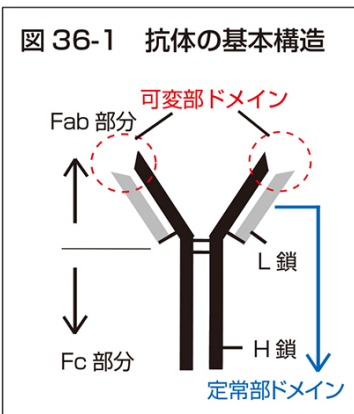
- **モノクローナル抗体**

モノクローナル抗体、その作り方

- フローサイトメトリーの活用法

フローサイトメーターの活用法（研究編、臨床編）

# モノクローナル抗体



抗体は、獲得免疫において極めて重要な役割を持ちます。しかも、抗体は北里柴三郎が発見し、そのメカニズムを利根川進が解明しました。二人ともノーベル賞を受賞しています。

## 【モノクローナル抗体】

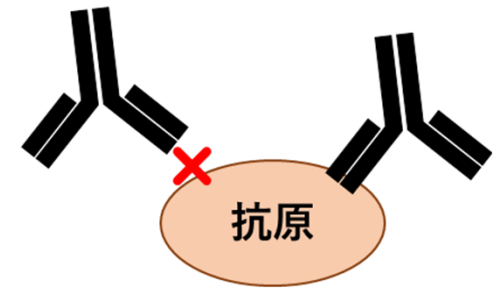
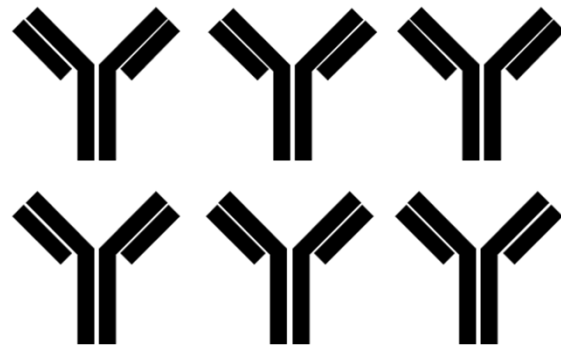
モノクローナル抗体は単一の抗体産生細胞に由来するクローンから作られている抗体のことで、単一の抗原決定基を有している。

## 【ポリクローナル抗体】

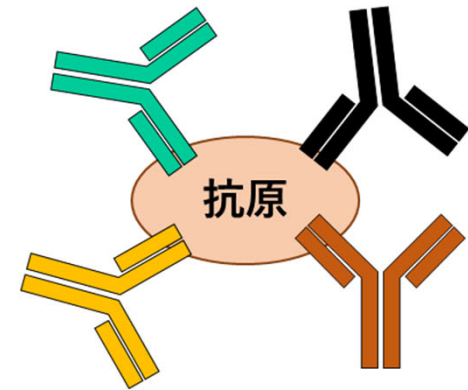
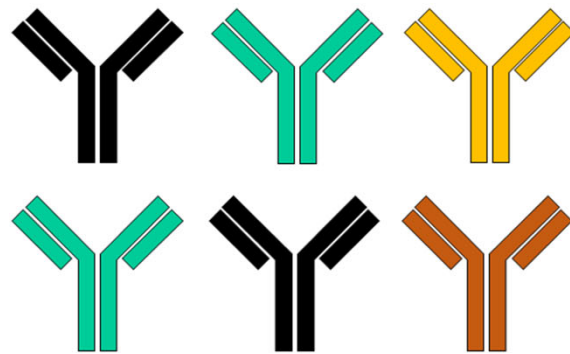
抗原の異なるエピトープに対して産生された複数の抗体のクローンを含む抗体の集合

# モノクローナル・ポリクローナル抗体

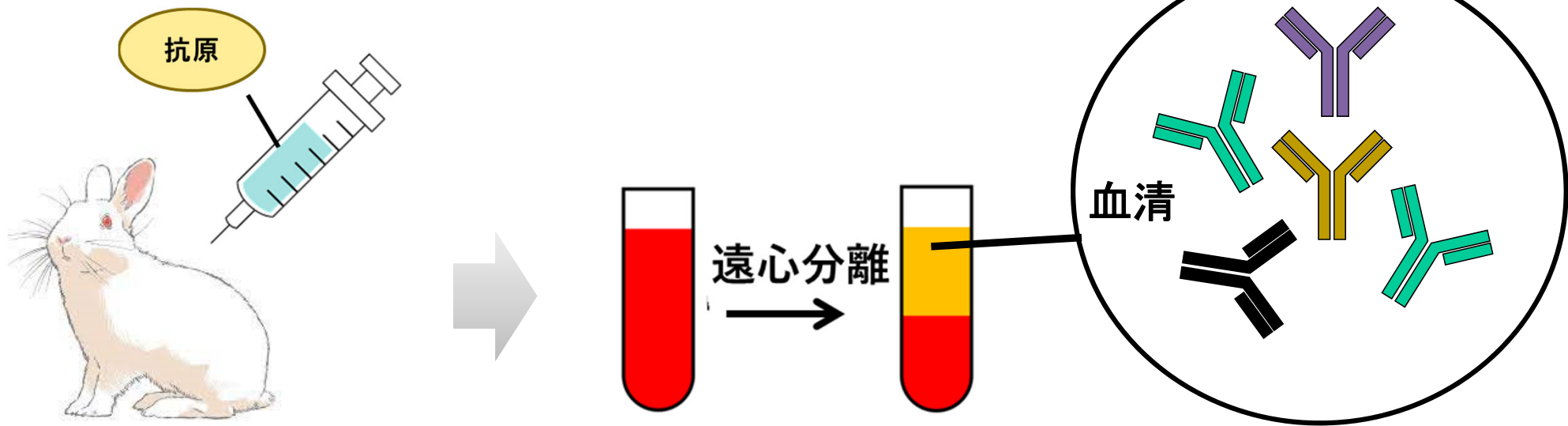
【モノクローナル抗体】



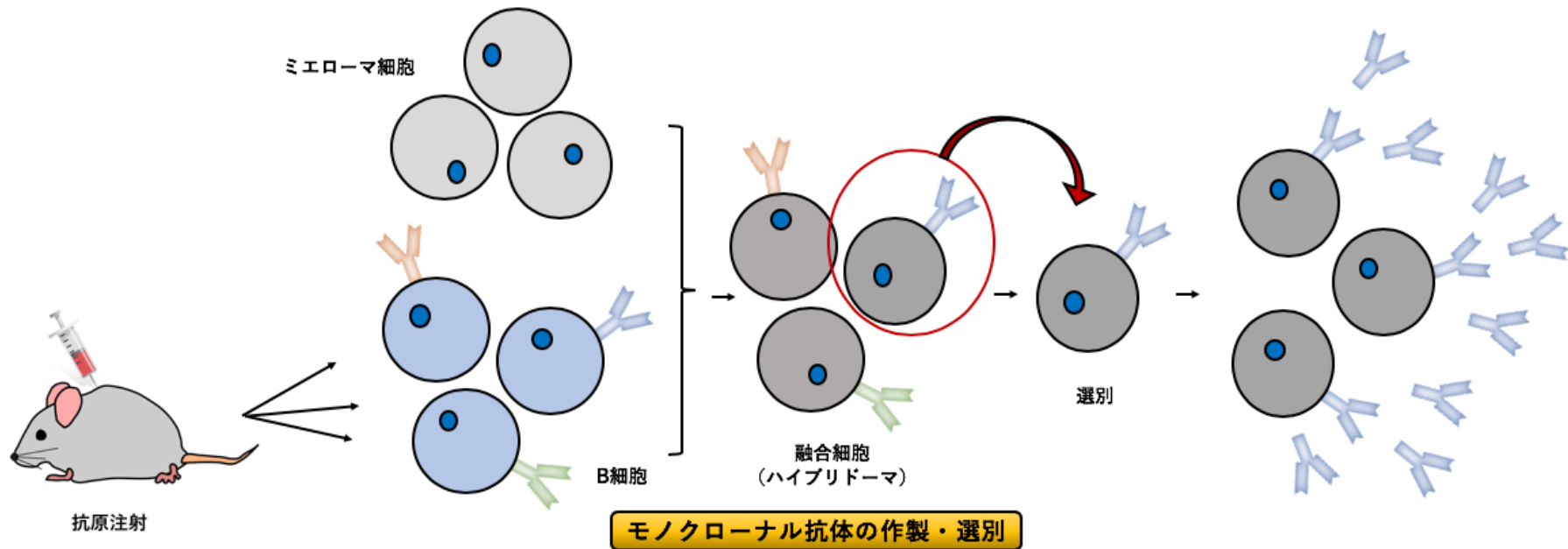
【ポリクローナル抗体】



# ポリクローナル抗体の作製方法

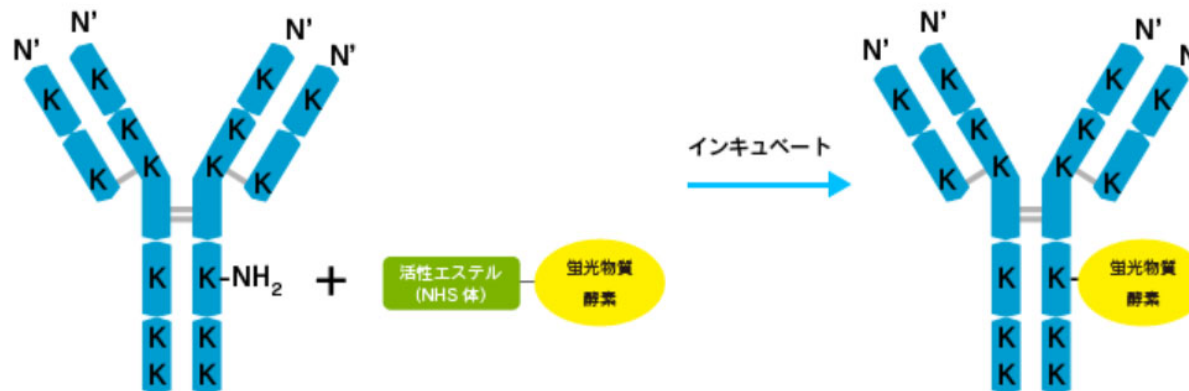


# モノクローナル抗体の作製方法



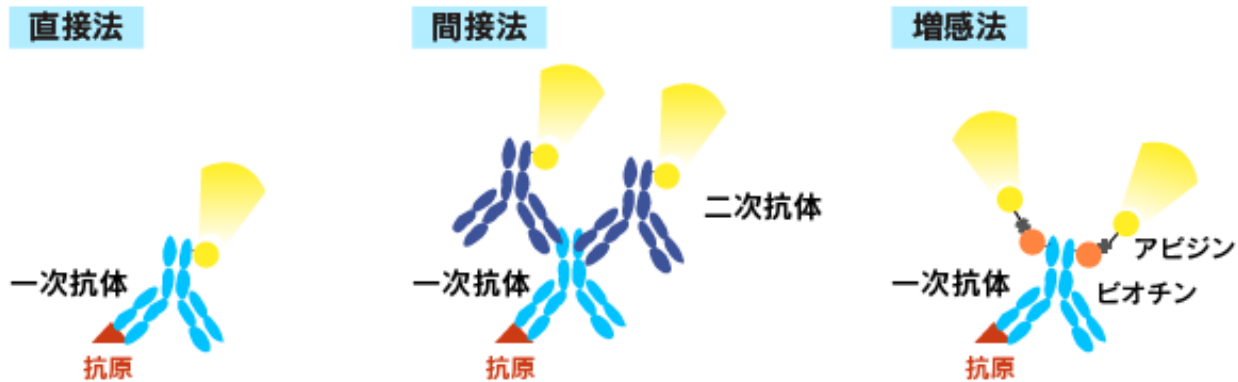
# モノクローナル抗体への蛍光標識

活性エステルがついた蛍光物質や酵素を抗体と一緒にインキュベートし、抗体に標識を結合させます。  
活性エステルが付いた蛍光物質や酵素は数多く市販されていますので、簡単に入手できます。



<https://ruo.mbl.co.jp/>

# モノクローナル抗体への蛍光標識



<https://ruo.mbl.co.jp/>

## 直接法

一次抗体に直接蛍光色素や酵素を標識して使用します。直接標識された一次抗体を用いると実験時間の短縮につながります。

## 間接法

蛍光物質や酵素を標識した二次抗体を使用して一次抗体を検出します。

## 増感法

一次抗体をビオチン化し、標識したアビジンで検出します(ビオチン-アビジン複合体)。

# 蛍光色素

## 【BD社から販売されている蛍光色素】

### 蛍光標識色素の明るさ

	Very Bright	Bright	Moderate	Dim
<b>Ultraviolet</b> (355 nm)		BD Horizon™ BUV737	BD Horizon™ BUV395	
<b>Violet</b> (405 nm)	BD Horizon™ BV421 BD Horizon™ BV650 BD Horizon™ BV711	BD Horizon™ BV605 BD Horizon™ BV786	BD Horizon™ BV510	BD Horizon™ V450 BD Horizon™ V500
<b>Blue</b> (488 nm)	BD Horizon™ BB515 BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy™ 5	PE PE-Cy™ 7	FITC Alexa Fluor® 488 PerCP-Cy™ 5.5	PerCP
<b>Yellow/Green</b> (561 nm)	PE BD Horizon PE-CF594 PE-Cy5 PE-Cy7			
<b>Red</b> (640 nm)		APC Alexa Fluor® 647		Alexa Fluor® 700 APC-H7 APC-Cy™ 7

BUV : Brilliant Ultraviolet、BV : Brilliant Violet、BB : Brilliant Blue

# 蛍光色素

## 紹介

戻る

488nm、561nm、633nm、375nm(near UV)の4本のレーザー搭載で蛍光10カラーに対応。プレートソーティング機能を備えています。



## 詳細

機器名(英名)	Cell Sorter
規格・型式	BD FACS AriaIIIu
メーカー名	Becton,Dickinson
設置場所	D61-09 [ 細胞分離分析室 ]
主担当者	山崎 [ 内線 : 3794 ]
副担当者	Toma [ 内線 : 3797 ]
医学科外利用	利用可
学外利用	利用不可
有償/無償	有償

## この機器について

本機器を使用するためには、使用者登録が必要です。

初めて機器を使用される方は、まず「セルソーターによるソーティング受託業務」に申し込んでください。スタッフが依頼者のサンプルを解析・ソーティングしながら機器の使用方法を説明し、その後「使用者登録」いたします。

### <励起レーザーと蛍光色素>

Blue Laser(488nm):蛍光Alexa Fluor 488(530/30),PerCP-Cy5.5(695/40)  
Yellow-Green Laser(561nm):蛍光PE(582/15),PE-CF594(610/20),PE-Cy5(670/14),PE-Cy7(780/60)  
Red Laser(633nm):Alexa Fluor 647(660/20),APC-Cy7(780/60)  
UV Laser(375nm):Hoechst Blue(450/20),Hoechst Red(670LP)

### <サンプルローディングチューブ>

5mlチューブ、15mlチューブ

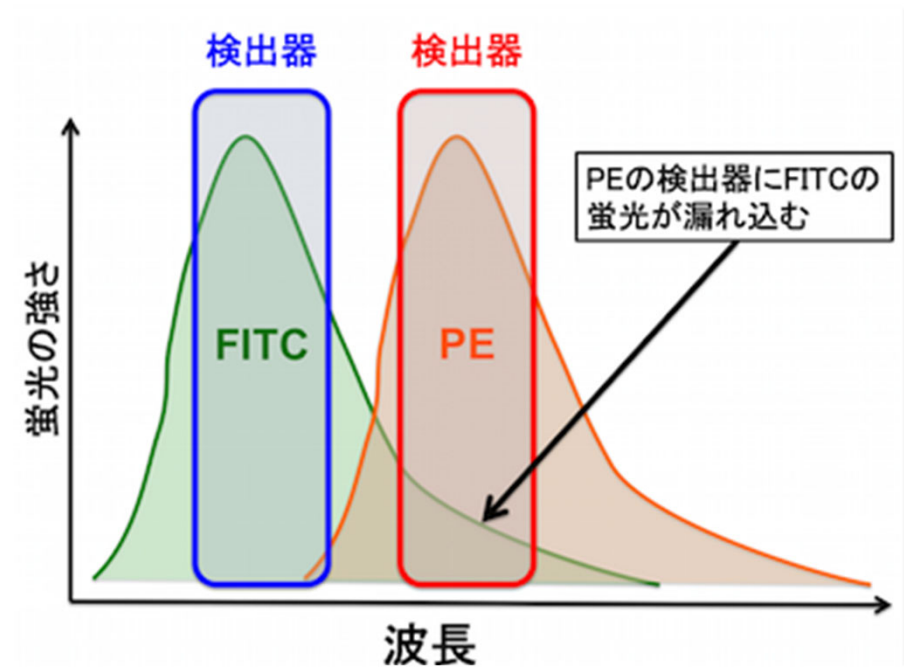
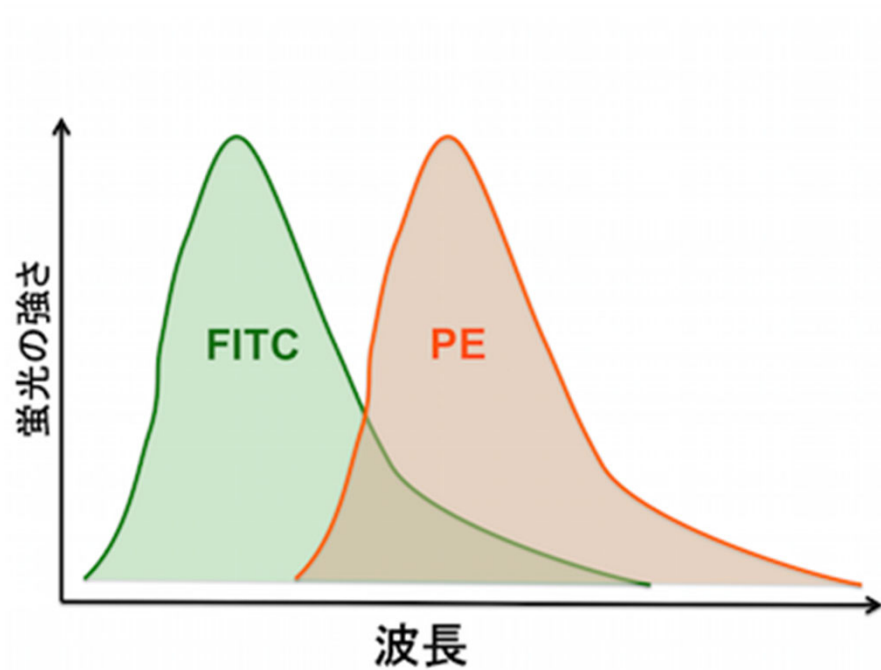
✓レーザーの本数、種類  
⇒ 何色の蛍光が使用可能か

✓フィルターの種類  
⇒ 使用可能な蛍光色素の種類

【共同研HPより】

# 蛍光色素の選択

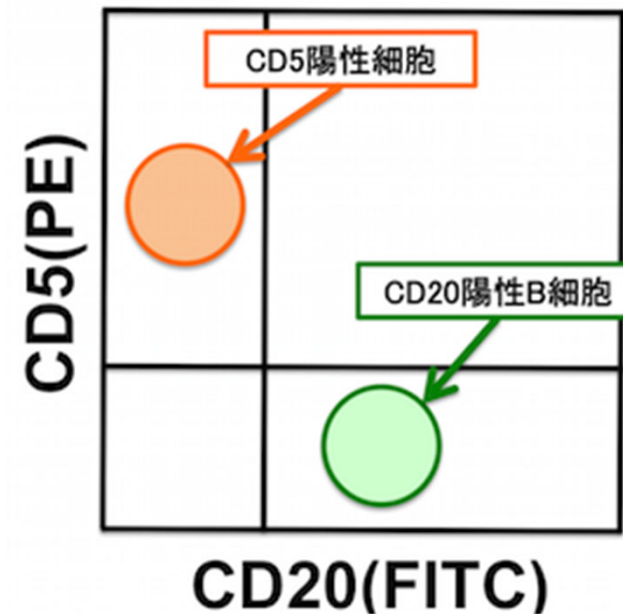
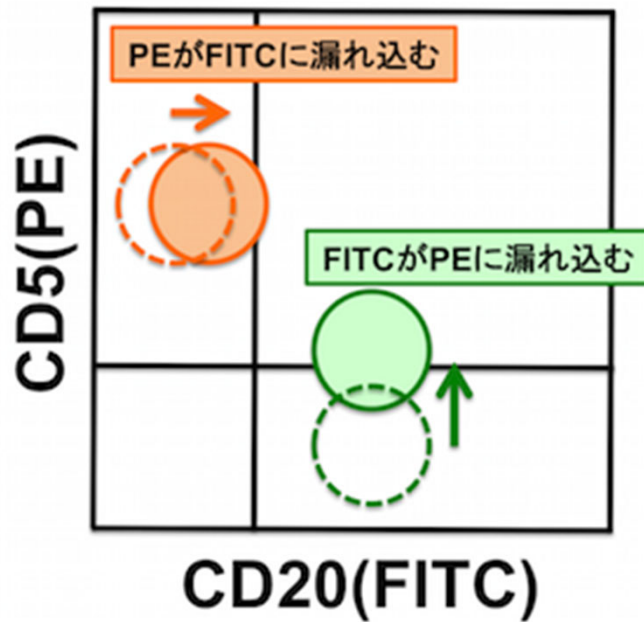
## 【蛍光の漏れ込み】



<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

# 蛍光色素の選択

## 【蛍光の漏れ込み】

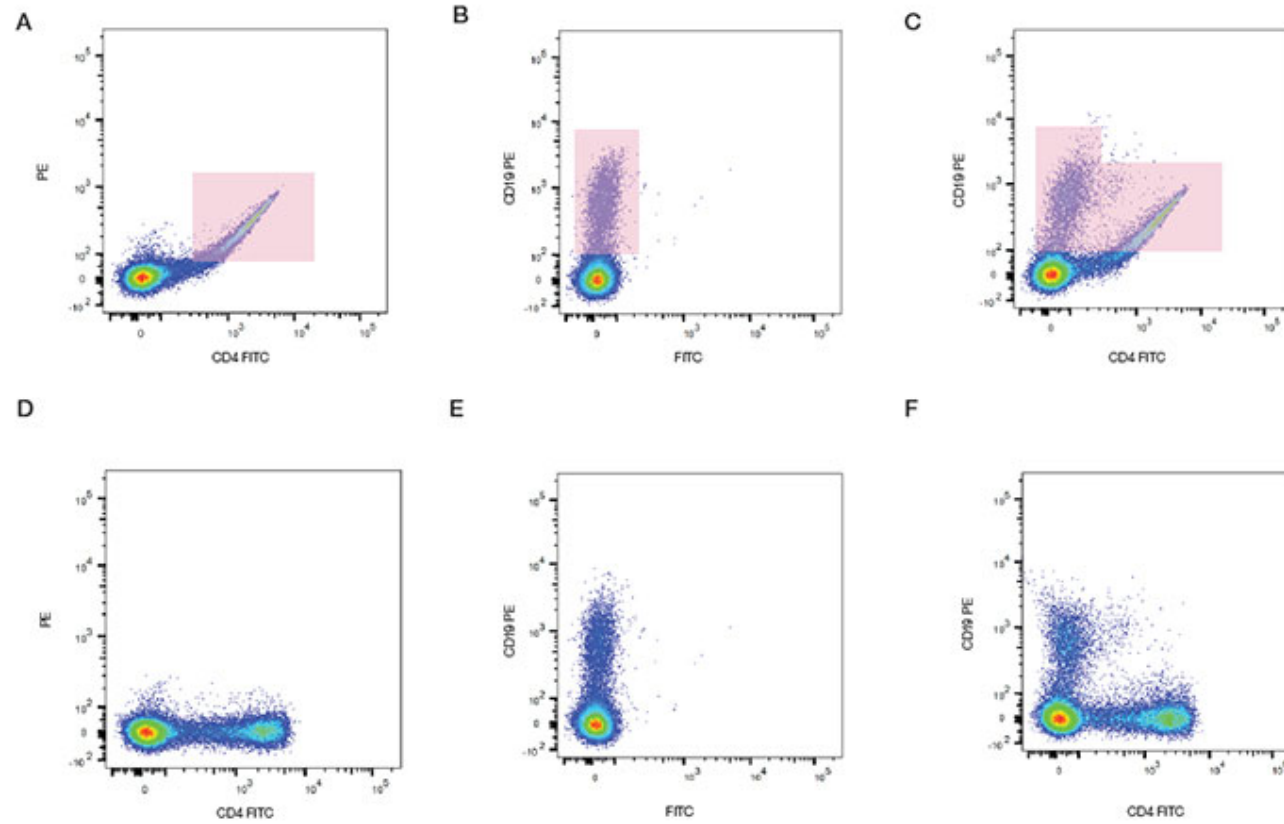


<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

# 蛍光色素の選択

## 【蛍光の漏れ込み】

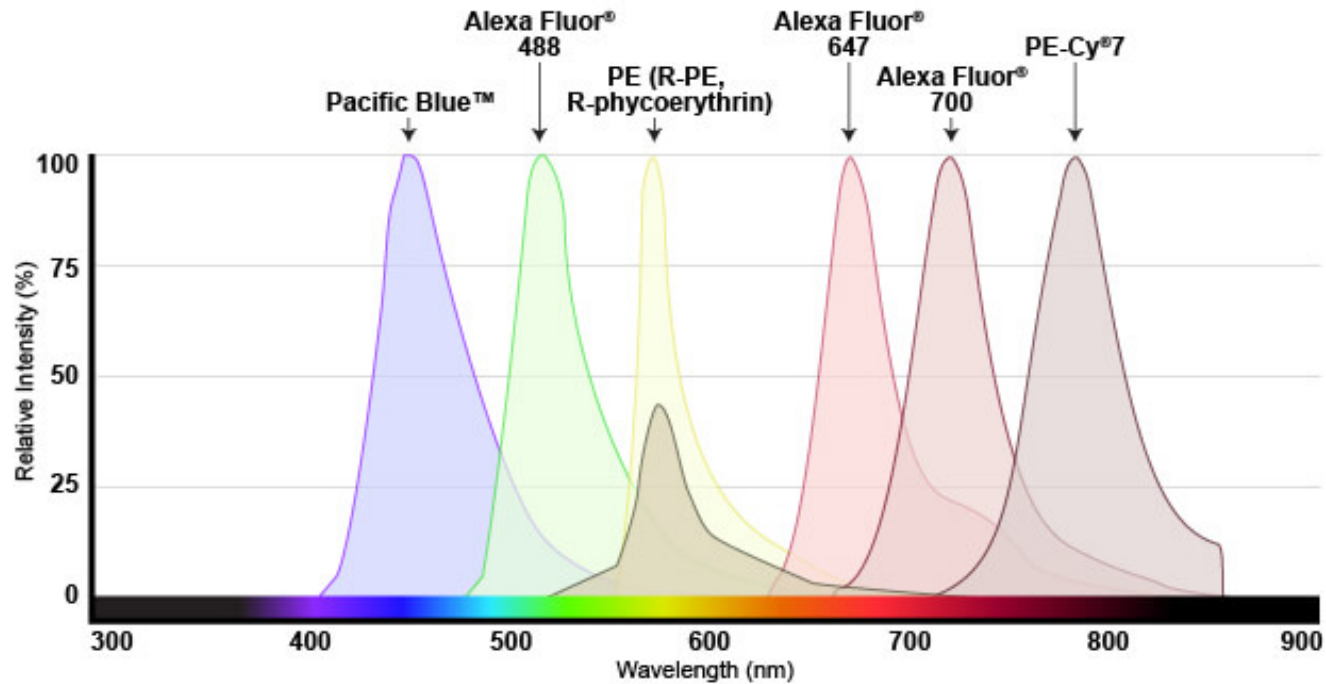
【補正前】



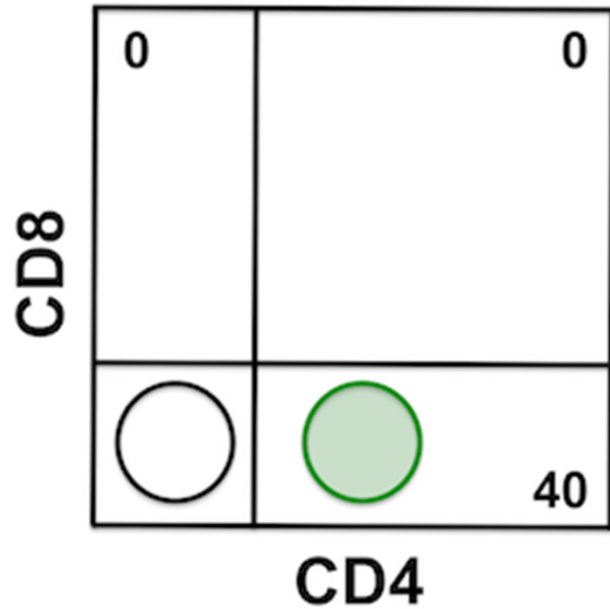
【補正後】

# 蛍光色素の選択

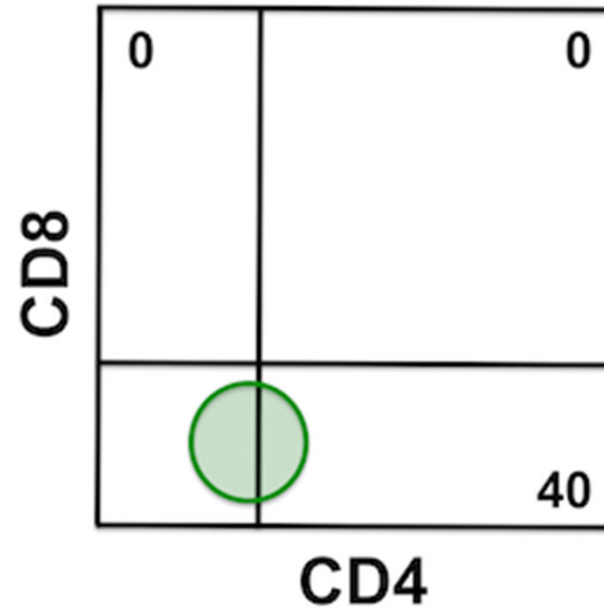
## 【蛍光スペクトル】



# アイソタイプコントロール



CD4陽性細胞が40%

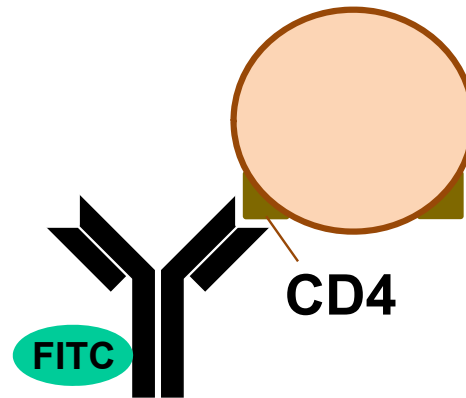
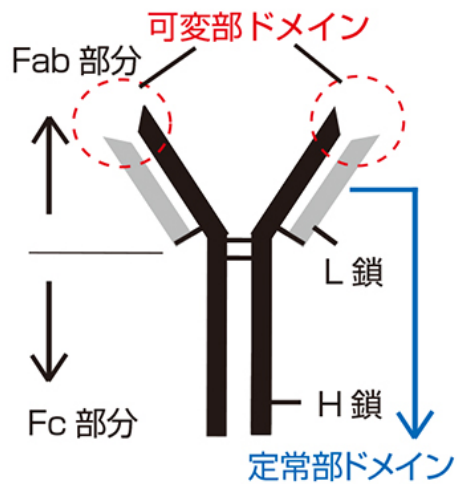


CD4陽性細胞が40%?

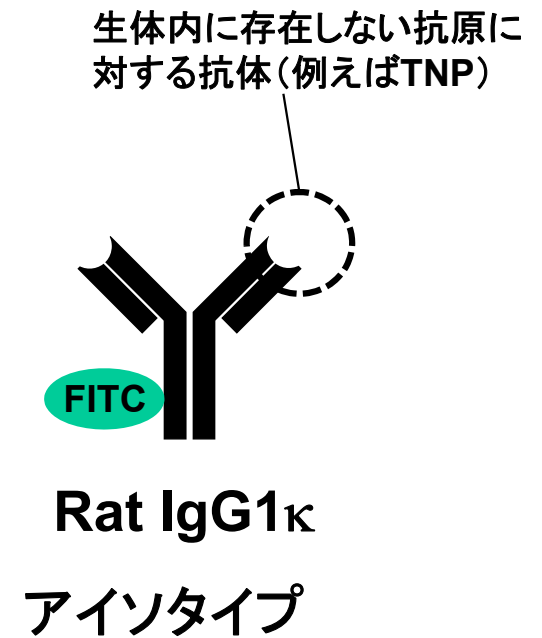
アイソタイプコントロールが必要!

# アイソタイプコントロール

図 36-1 抗体の基本構造

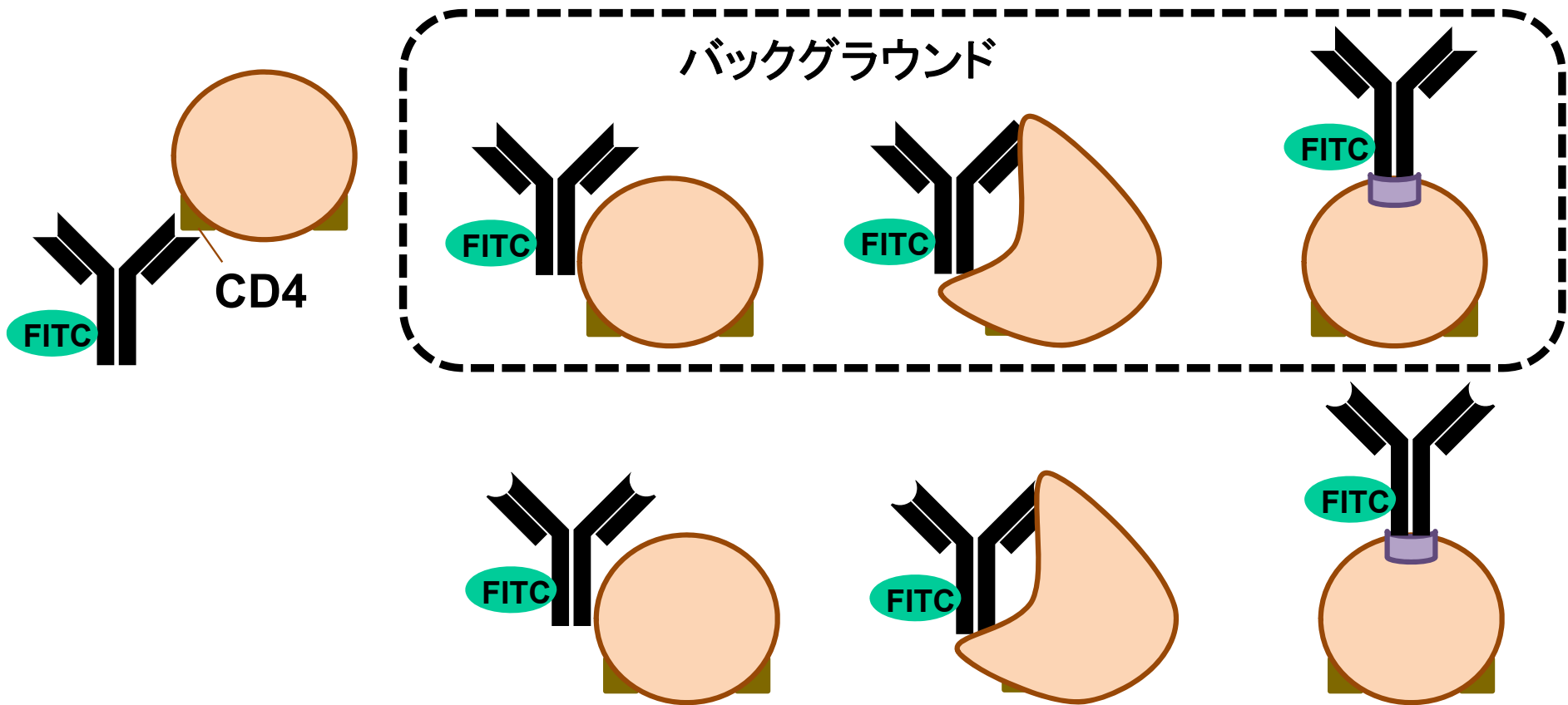


Rat IgG1κ



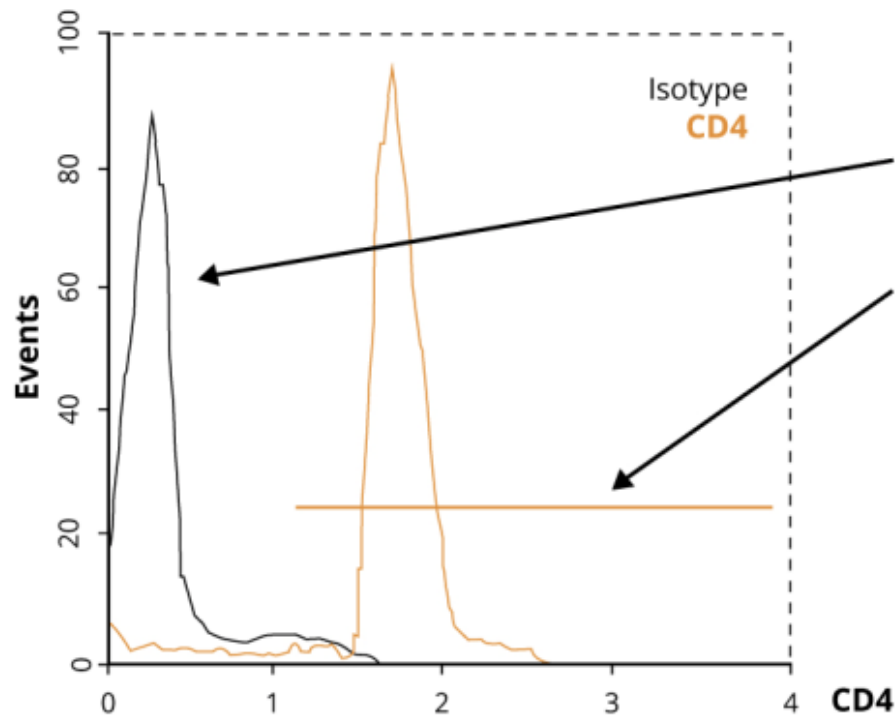
アイソタイプ

# アイソタイプコントロール



# アイソタイプコントロール

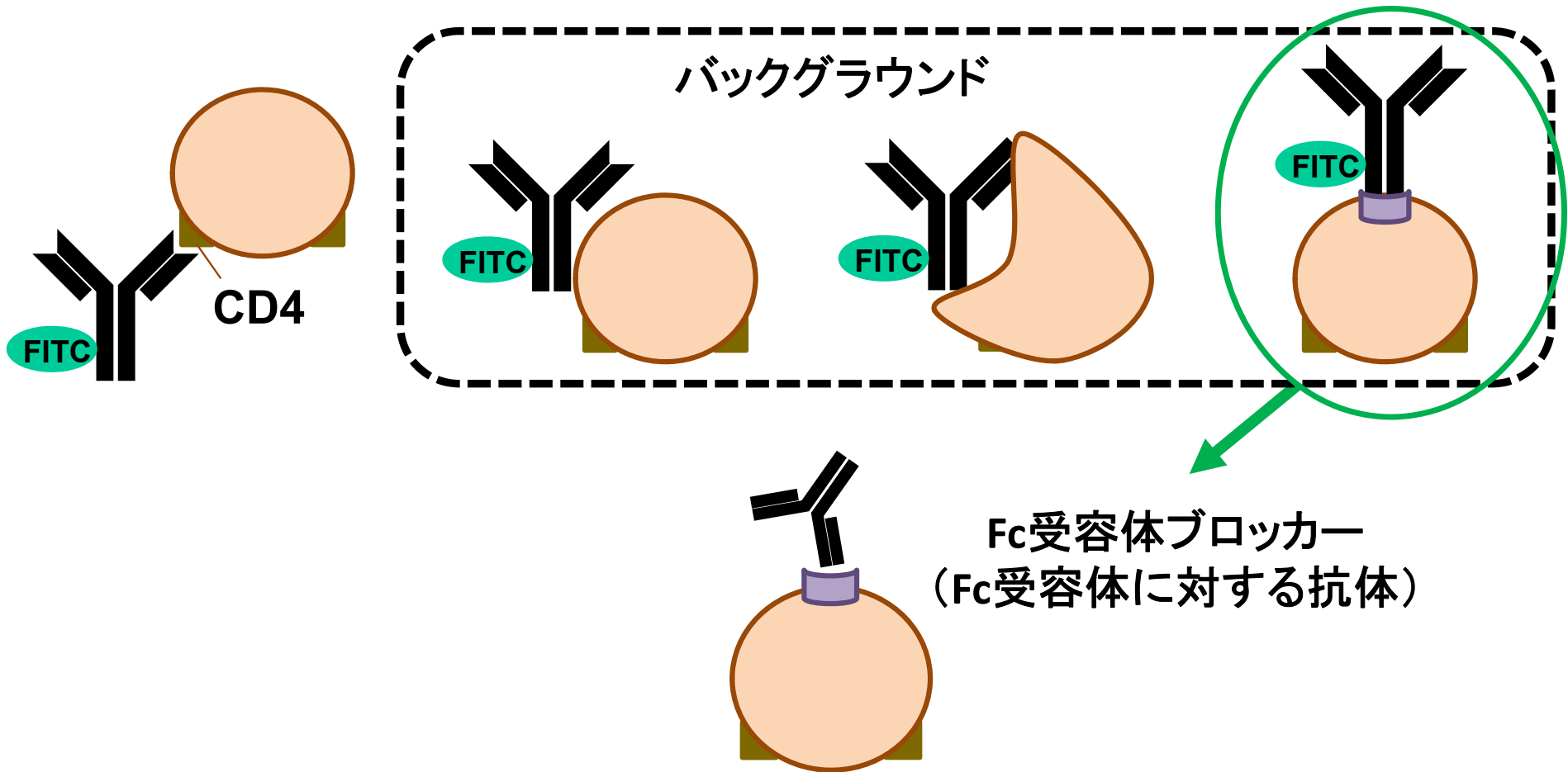
## アイソタイプコントロール



最初のログオーダーに  
陰性コントロール/アイソ  
タイプコントロールピーク

陽性細胞集団  
染色した細胞は蛍光強度の  
右側への移行 (増大) が  
みられた。  
ここで記したゲート内は  
全て陽性事象である。

# アイソタイプコントロール



# 進化するフローサイトメーター

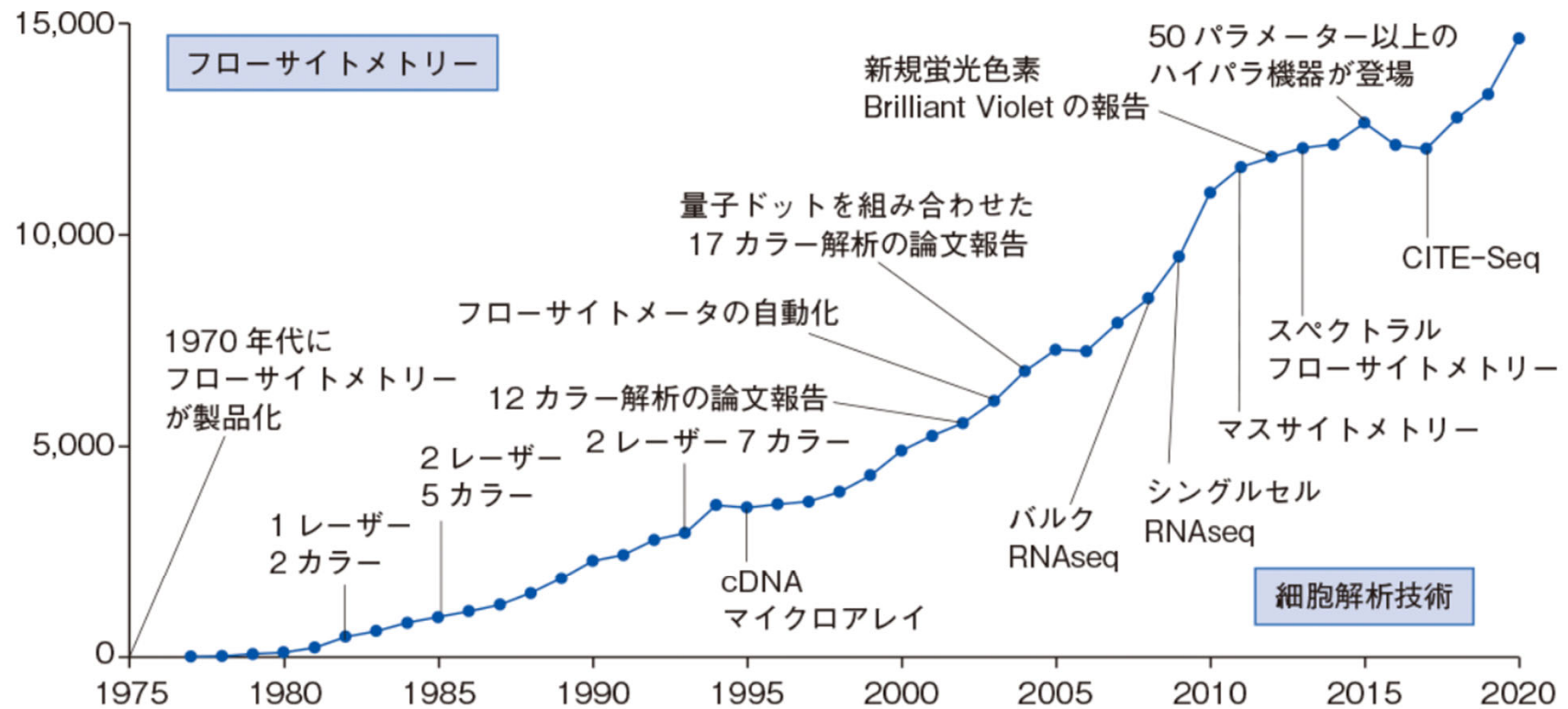


図1 “flow cytometry” で検索された論文数の変化 (PubMed) と技術開発

新世代フローサイトメトリー活用スタンダード

# 進化するフローサイトメーター

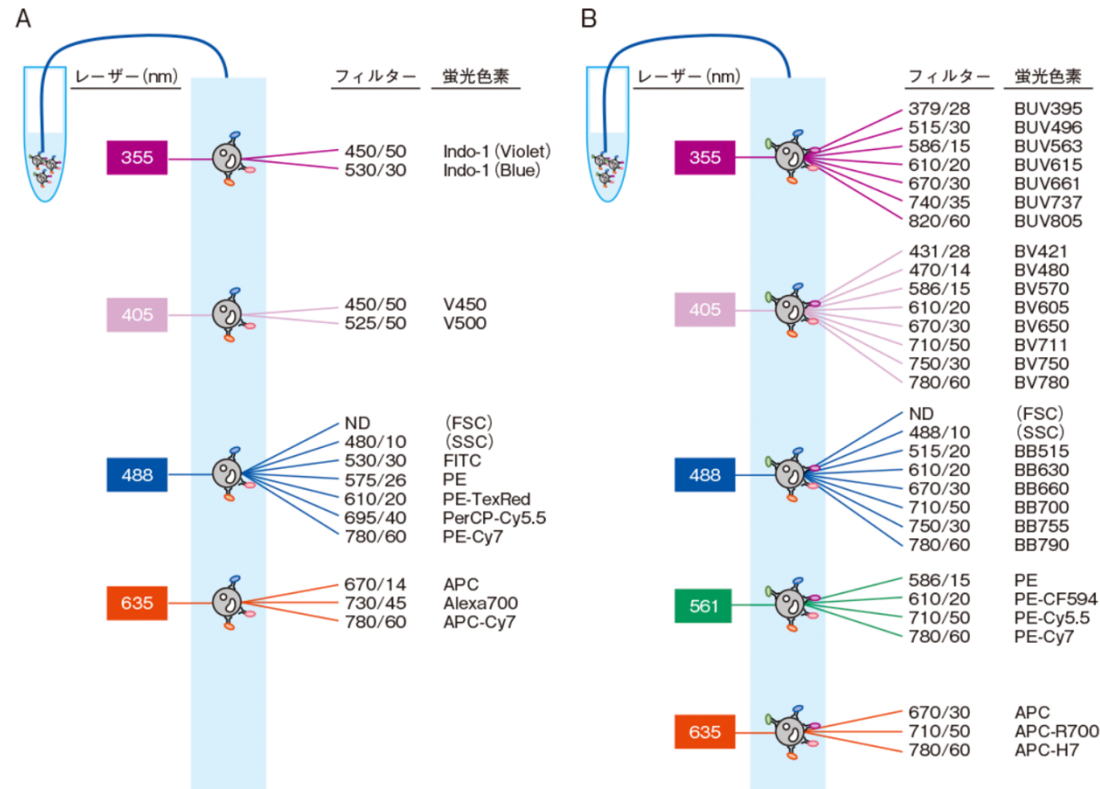


図4 新規蛍光色素の開発によるハイパラメーター化

新世代フローサイトメーター活用スタンダード

# 最後に

大阪大学共同研  
共通機器アドバイザーボード  
フローサイトメトリー関連チーム

使用法、解析などフローサイトメトリーを用いた実験にお困りでしたら  
共同研にご相談ください。

ご清聴ありがとうございました