

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原理
- **解析の実際について**
モノクローナル抗体、蛍光漏れ込み補正、偽陽性の除去など
- **フローサイトメトリーの活用法**
基礎研究や臨床検査での使用例

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
- **解析の実際について**
モノクローナル抗体、蛍光漏れ込み補正、偽陽性の除去など
- **フローサイトメトリーの活用法**
基礎研究や臨床検査での使用例

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

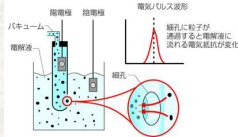
<フローサイトメーター>

- ▶ **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。



1949 Coulter - Particle counting by Coulter systems



Wallace H. Coulter (1913~1998)

1953年 コールターカウンター

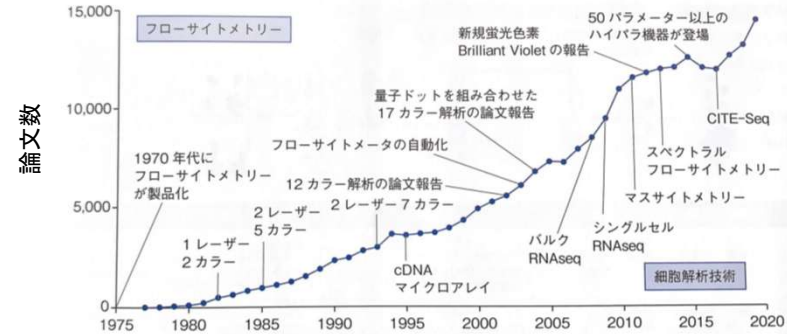
フローサイトメーターのルーツは、1956年のWallace Coulterの開発によるコールターカウンター A型の登場が挙げられる。1948年シカゴの自宅の裏の地下室で発明したCoulter原理は、細胞1個ずつの大きさを正確に測定することができる。この技術は現在でも大活躍し、世界中のほぼすべての自動血球測定装置で使用されている。細胞を1個ずつ正確に測定するコールターカウンターは、ソーティング機能の開発や蛍光パラメーターの取得については、長い年月を要した。



コールターカウンターA型

<https://www.bc-cytometry.com/>
<https://www.nissineng.co.jp/>

フローサイトメトリーの進歩と論文数の推移



新世代フローサイトメトリー活用スタンダードより

フローサイトメーター

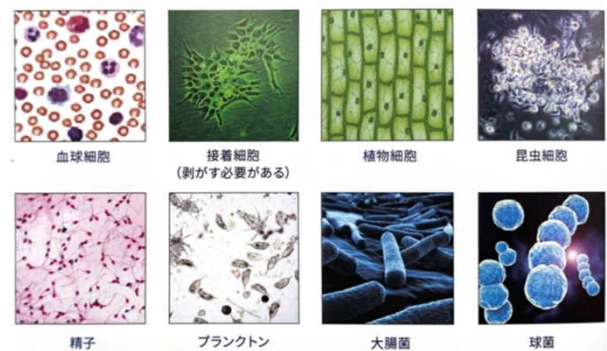
【アナライザー】

【セルソーター】

<https://wwwbdbiosciences.com/>



どんな細胞が解析できるのか？

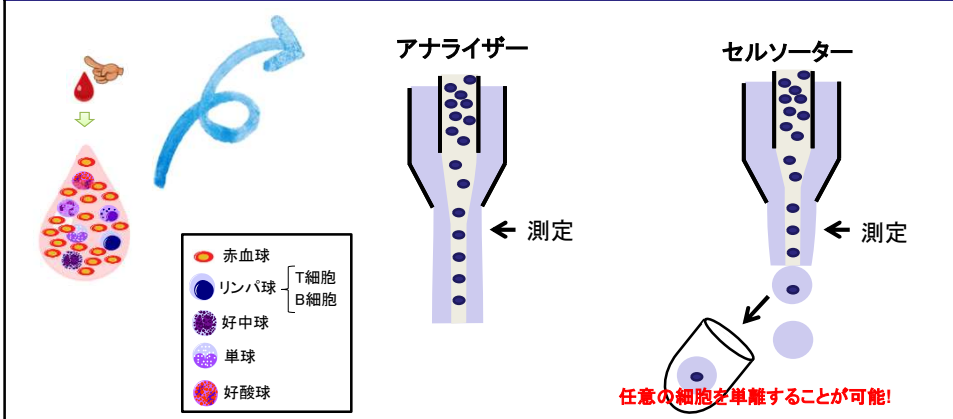


サンプル条件

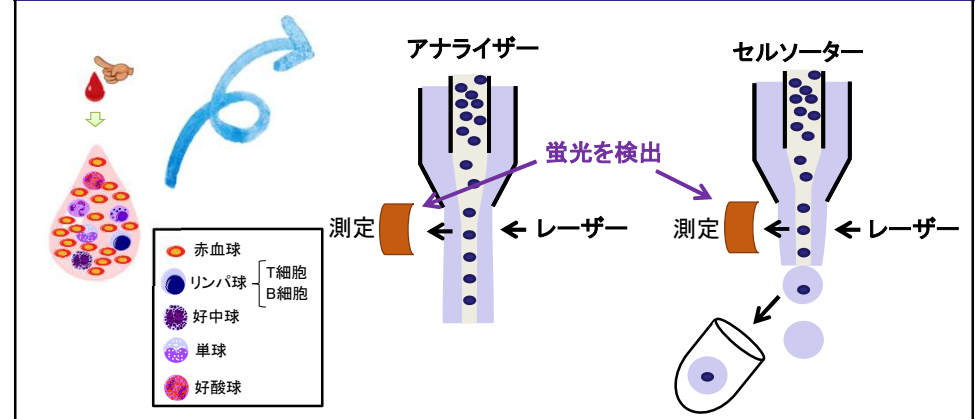
- 細胞が一つ一つ単離されていること
- 均一な細胞浮遊液であること
- 直径0.2~40 μmの大きさであること

BD FACSFローサイトメーターパンフレットより改変

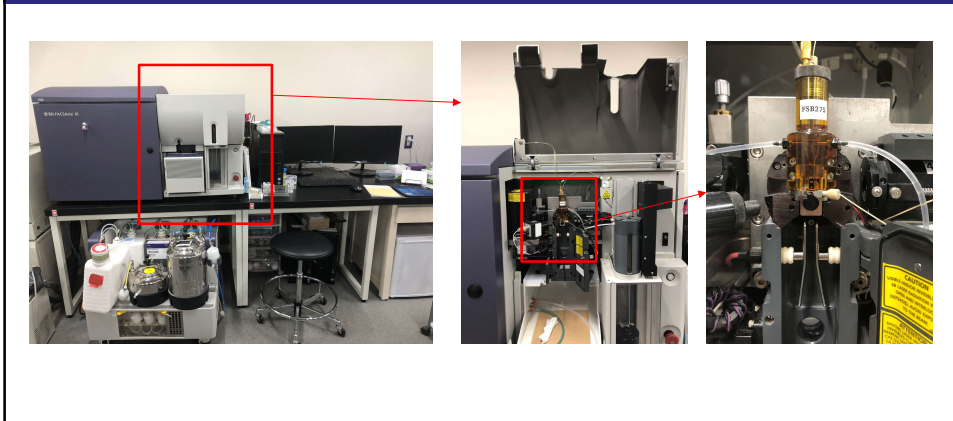
フローサイトメトリーって何？



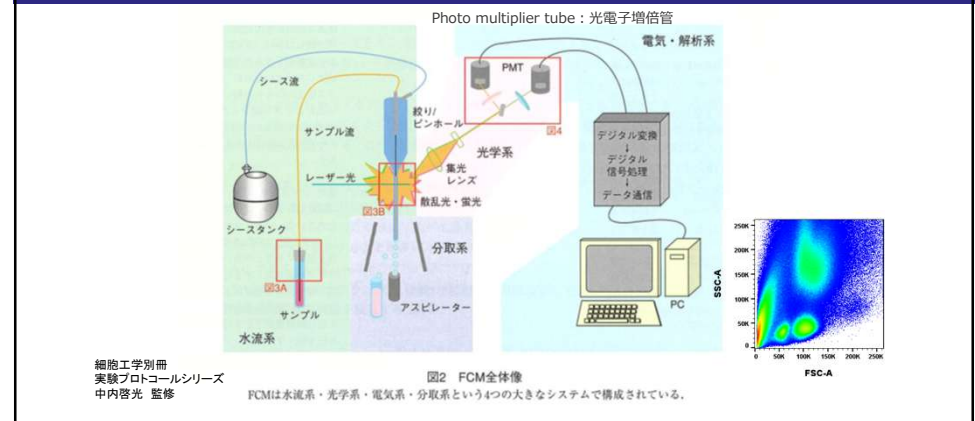
フローサイトメトリーって何？



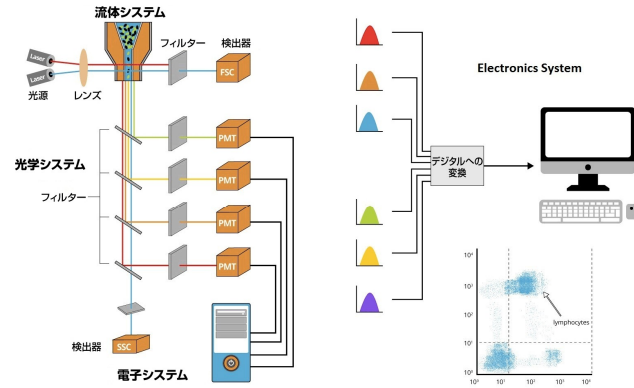
セルソーター



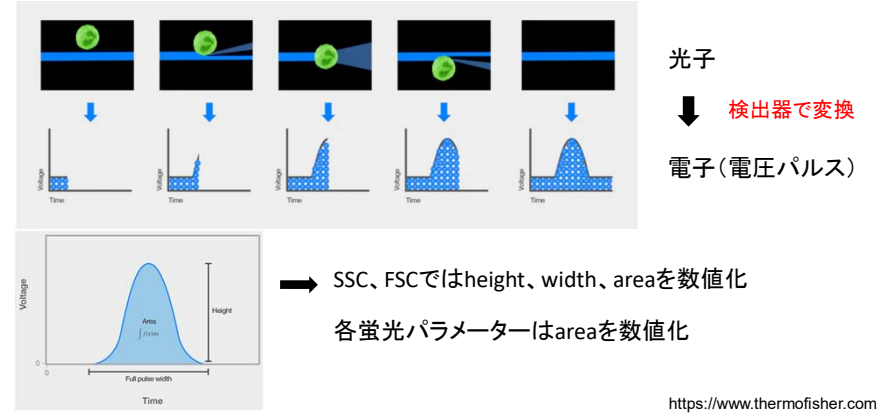
フローサイトメトリーの原理



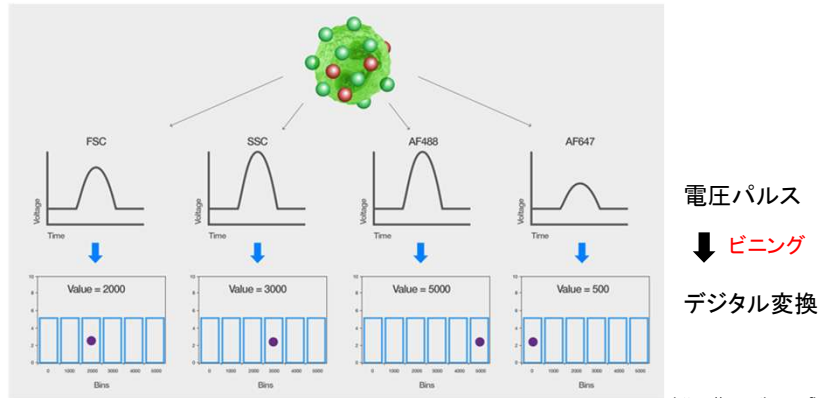
フローサイトメトリーの原理



フローサイトメトリーの原理



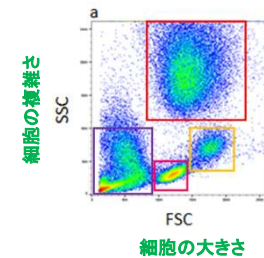
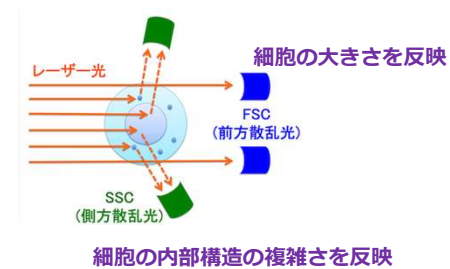
フローサイトメトリーの原理



フローサイトメトリーの原理

FSC (forward scatter 前方散乱光)

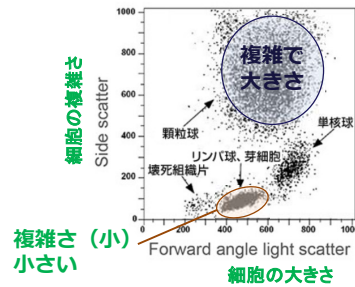
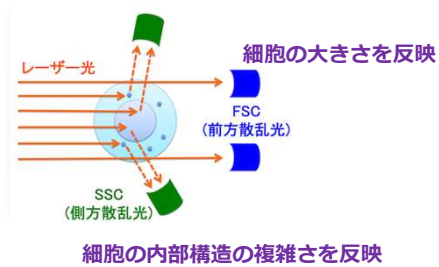
SSC (side scatter 側方散乱光)



フローサイトメトリーの原理

FSC (forward scatter 前方散乱光)

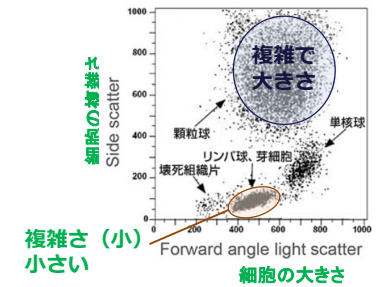
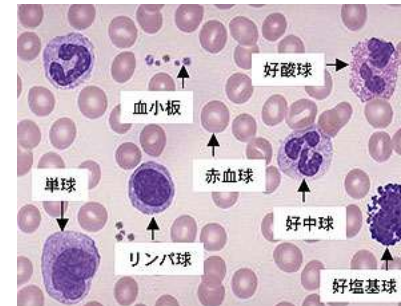
SSC (side scatter 側方散乱光)



フローサイトメトリーの原理

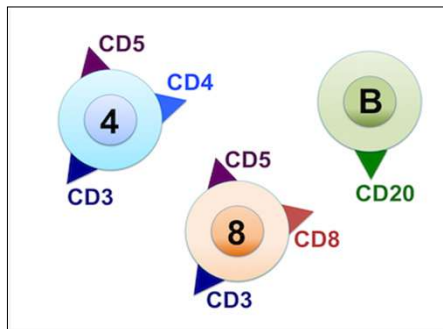
FSC (forward scatter 前方散乱光)

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



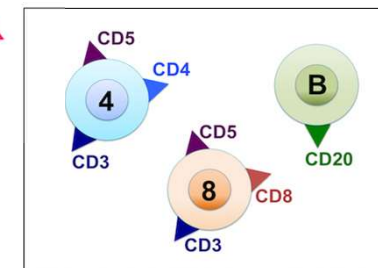
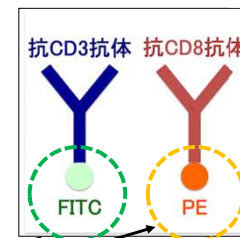
CD4T細胞(ヘルパーT細胞) : CD3、CD4、CD5
 CD8T細胞(キラーT細胞) : CD3、CD8、CD5
 B細胞 : CD20

<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

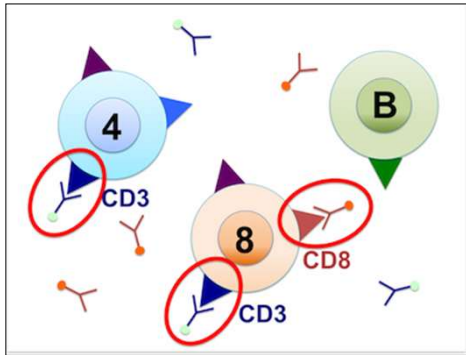


蛍光色素
 特定の波長のレーザー光で励起すると、特定の波長の蛍光を発する。よく使われる蛍光色素でも30種類以上存在する。

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

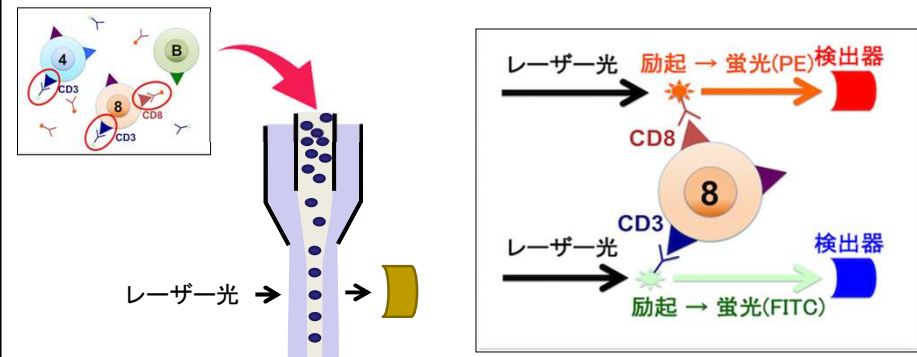
フローサイトメトリーの原理

蛍光標識抗体を用いた染色



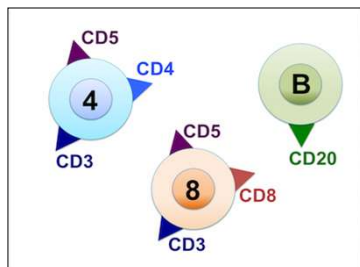
<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

フローサイトメトリーの原理

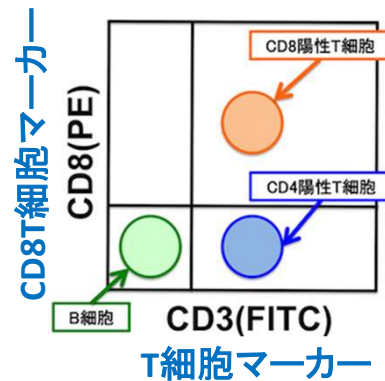


<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

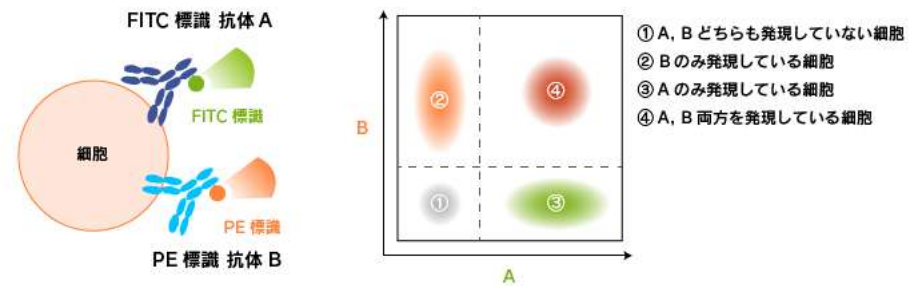
フローサイトメトリーの原理



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

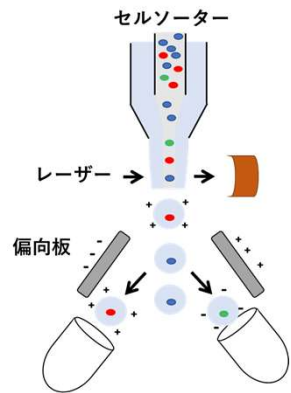


フローサイトメトリーの原理

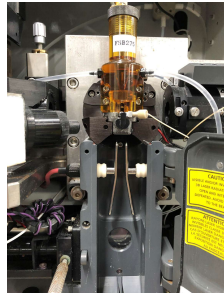


- ① A, B どちらも発現していない細胞
- ② Bのみ発現している細胞
- ③ Aのみ発現している細胞
- ④ A, B 両方を発現している細胞

セルソーティング



フローセル:ノズルを超音波振動させることによって液滴を形成させ、目的の細胞が含まれる液滴だけを荷電することによって液滴はサンプル回収チューブへと進路を変える。



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

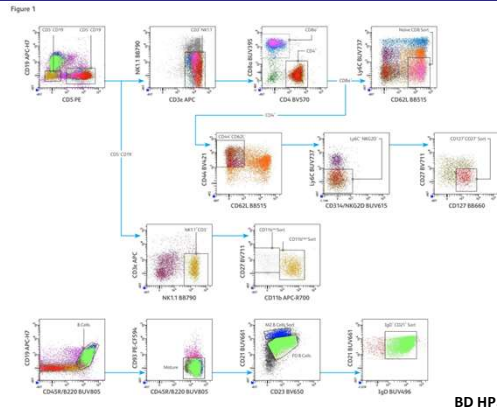
30色のパラメーターを使用し、より詳細な細胞集団を検出、単離することが可能

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)

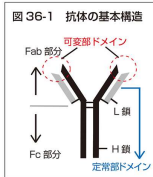


BD HPより

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
- 解析の実際について
モノクローナル抗体、蛍光漏れ込み補正、偽陽性の除去など
- 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。

【モノクローナル抗体】

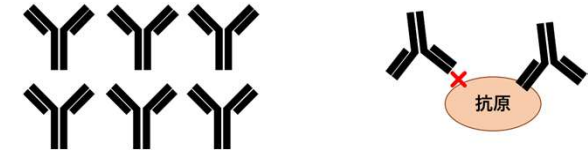
モノクローナル抗体は単一の抗体産生細胞に由来するクローンから作られている抗体のことで、単一の抗原決定基を有している。

【ポリクローナル抗体】

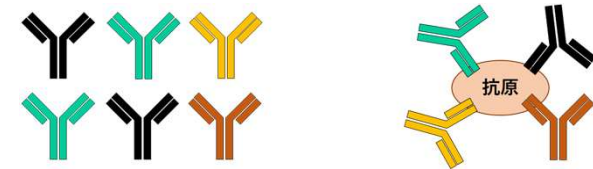
抗原の異なるエピトープに対して産生された複数の抗体のクローンを含む抗体の集合

モノクローナル・ポリクローナル抗体

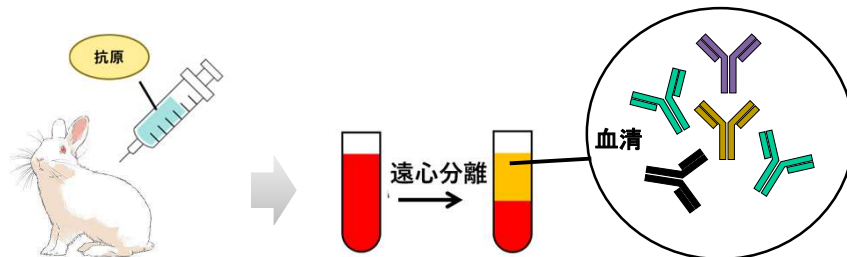
【モノクローナル抗体】



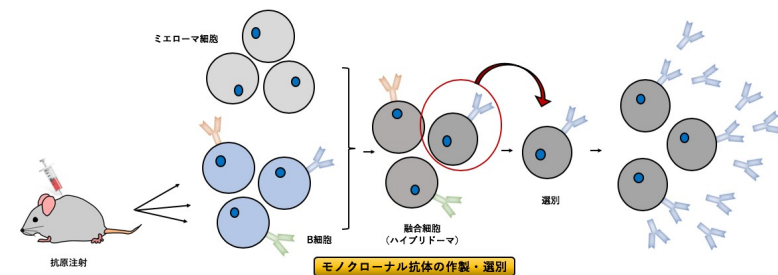
【ポリクローナル抗体】



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



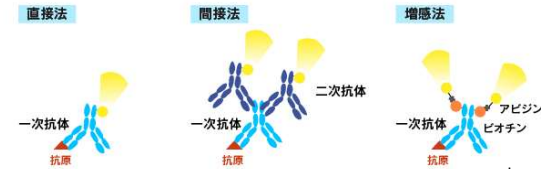
モノクローナル抗体への蛍光標識

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の反応方法



<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
Ultraviolet (355 nm)		BD Horizon™ BUV737	BD Horizon™ BUV395	
Violet (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
Blue (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
Yellow/Green (561 nm)	PE BD Horizon™ PE-CF594 PE-Cy5 PE-Cy7			
Red (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

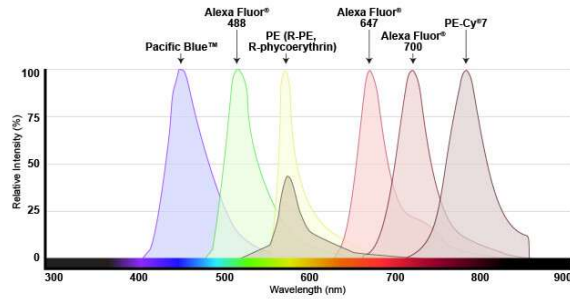
✓レーザーの本数、種類
⇒ 何色の蛍光が使用可能か

✓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

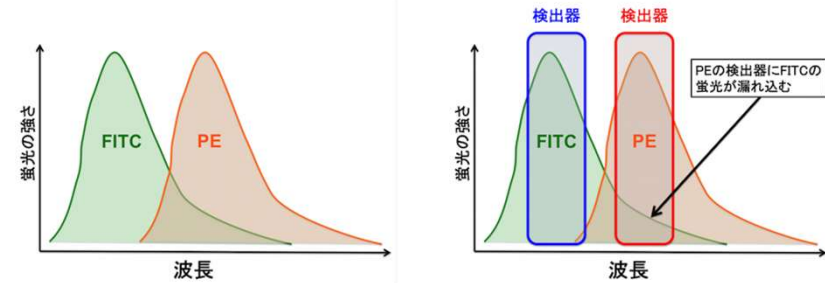
【蛍光スペクトル】



< 蛍光波長の確認ツール > **BD Spectrum Viewer**
<https://wwwbdbiosciences.com/ja-jp/resources/bd-spectrum-viewer-classic>

蛍光色素の選択

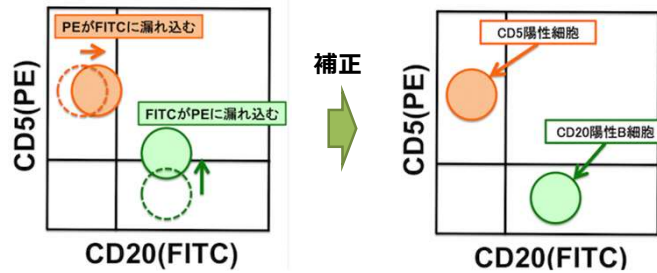
【蛍光の漏れ込み】



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

蛍光補正 (コンペンセーション)

【蛍光の漏れ込み】

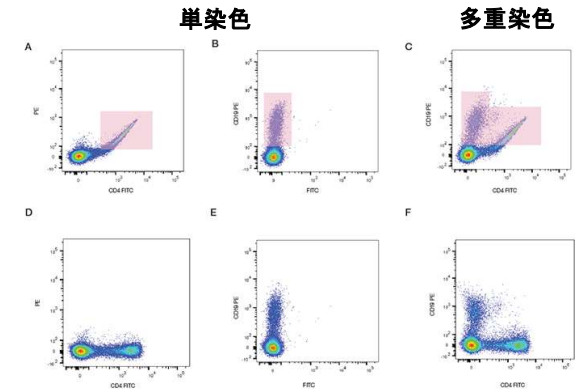


<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

蛍光補正 (コンペンセーション)

【蛍光の漏れ込み】

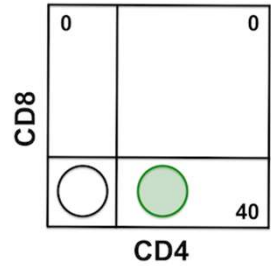
【補正前】



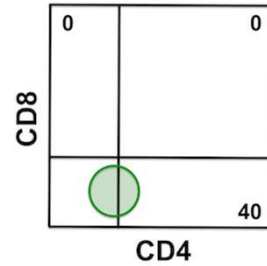
【補正後】

<http://pdu-support.bio-rad.co.jp/fcguide/0205.html>

偽陽性



CD4陽性細胞が40%



CD4陽性細胞が40% ?

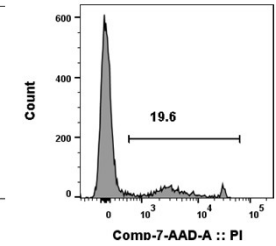
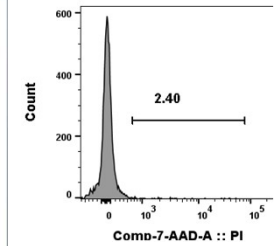
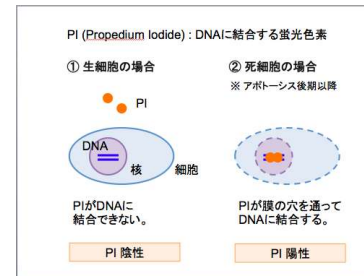
死細胞の除去、アイソタイプコントロールが必要!

死細胞の除去

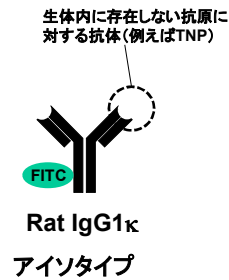
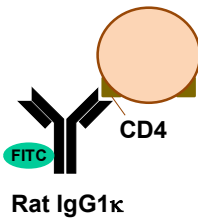
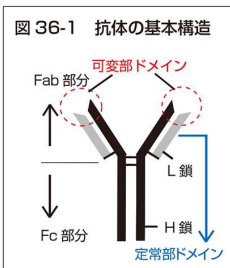
【死細胞の除去】

Propidium Iodide (PI) よう化プロピジウム 7-AAD

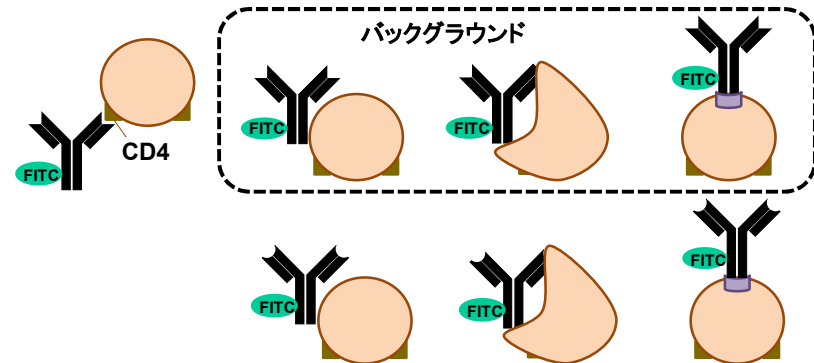
二本鎖核酸に結合すると蛍光を発する。

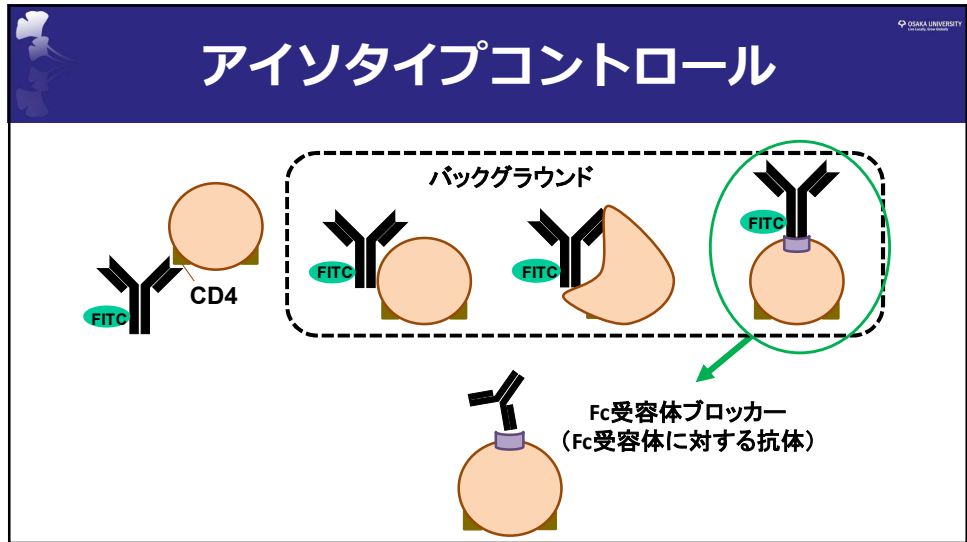
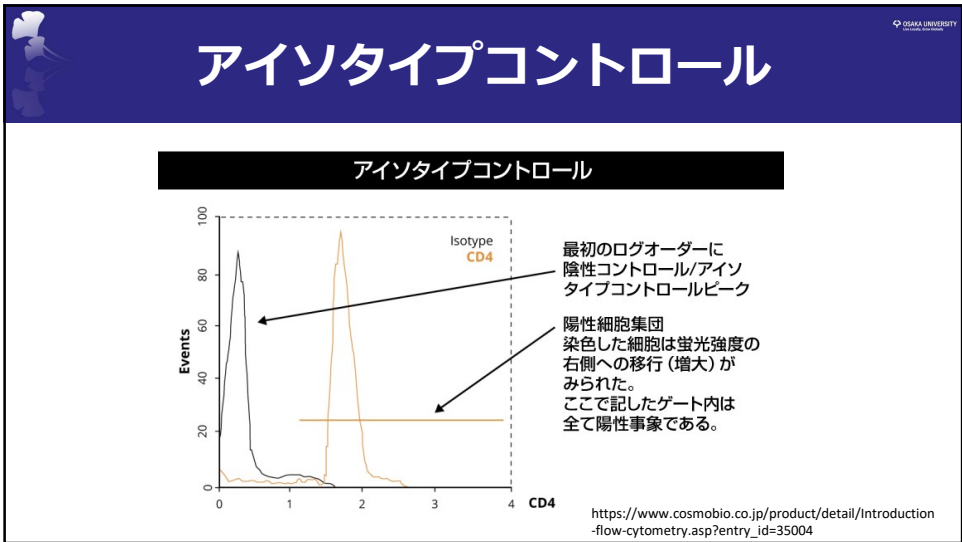


アイソタイプコントロール

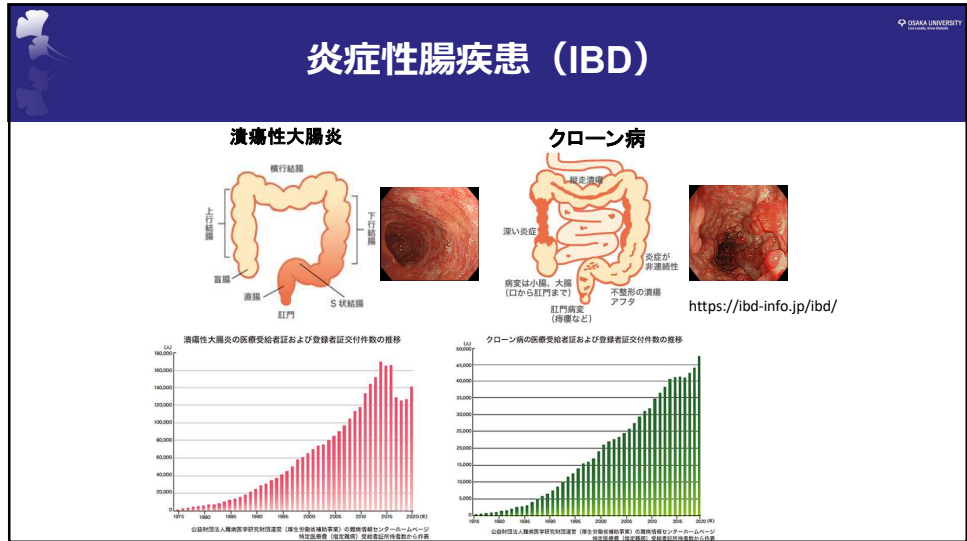


アイソタイプコントロール

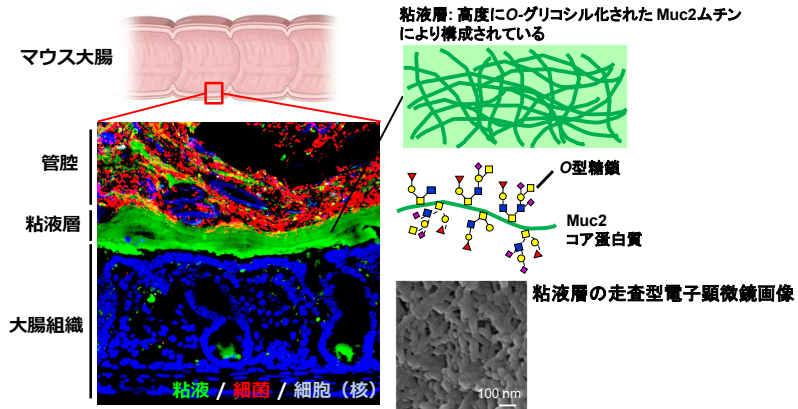




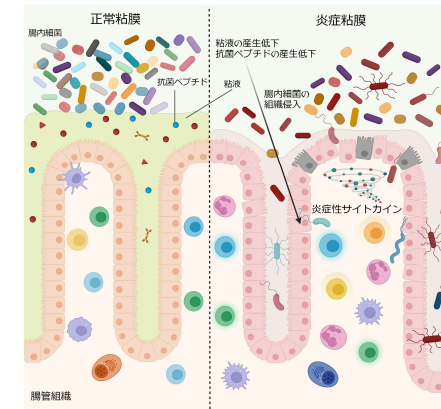
- ## アウトライン
- フローサイトメーターって何？
フローサイトメトリーの歴史、原理
 - モノクローナル抗体
モノクローナル抗体、蛍光漏れ込み補正、偽陽性の除去など
 - フローサイトメトリーの活用法
フローサイトメーターの活用法 (研究編、臨床編)



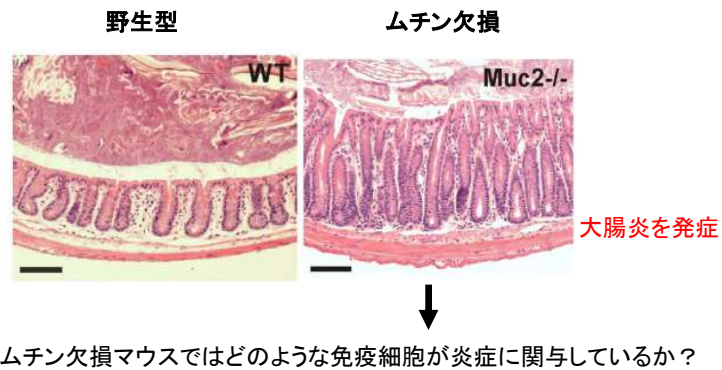
腸粘膜は粘液によって保護されている



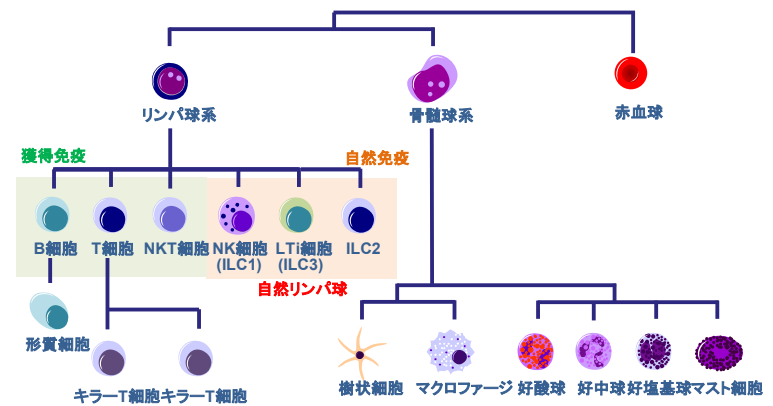
上皮バリアの破綻によるIBD病態モデル



IBDマウスモデル



免疫細胞サブセット



フローサイトメーターを用いた解析例 (研究編)

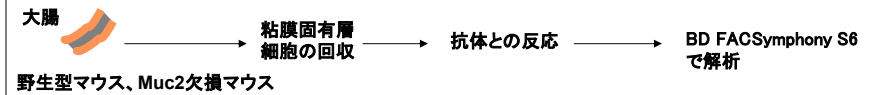
BD FACSymphony S6



レーザー	蛍光色素
355nm	・ ・ ・ BUV395, DAPI, BUV496, BUV563, BUV615, BUV661, BUV737, BUV805
405nm	・ ・ ・ BV421, BV480, BV605, BV650, BV711, BV750, BV786
488nm	・ ・ ・ BB515, BB700
561nm	・ ・ ・ PE, PE-CF594, PE-Cy7
633nm	・ ・ ・ APC, R718, APC-Cy7

FSC, SSC
<合計25パラメーター>

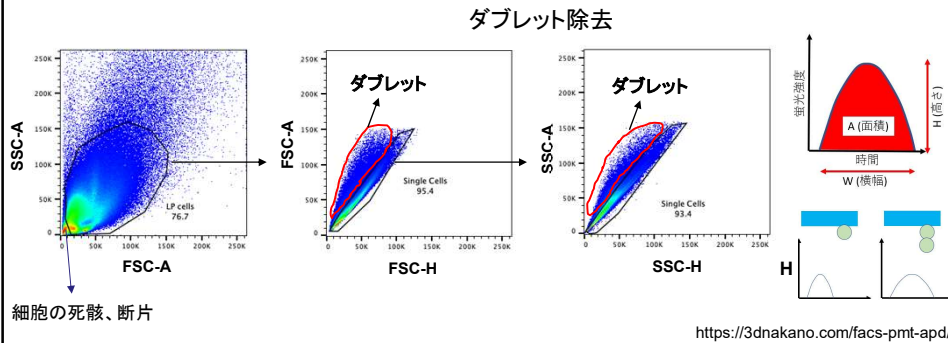
フローサイトメーターを用いた解析例 (研究編)



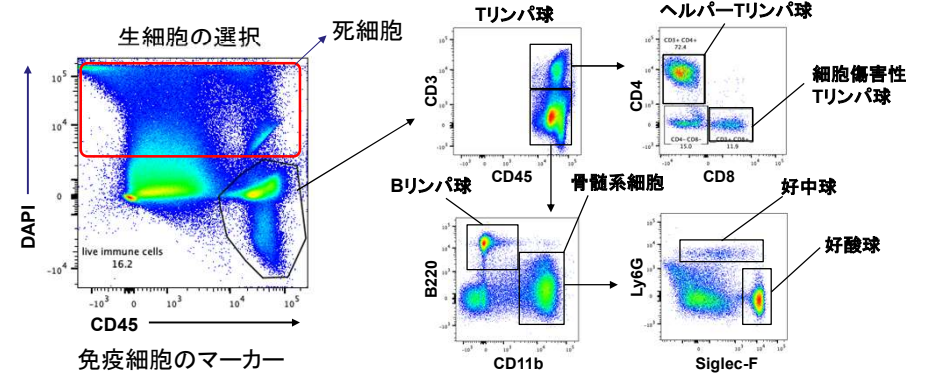
各免疫細胞マーカー分子の抗体と蛍光色素の組み合わせ

レーザー	抗体	蛍光色素
355nm	BUV395 CD45, DAPI, BUV496 IL-4ra, BUV563 Ly6G, BUV615 CD3, BUV661 B220	BUV737 KLRG1, BUV805 SiglecH
405nm	BV421 CX3CR1, BV480 Thy1.2, BV570, BV605, BV650, BV711, BV750, BV786	CD8a, CCR6, CD4, NKp46, CCR5
488nm	BB515, BB630, BB660, BB700, BB755, RB780	CD11c, CD49b
561nm	PE, PE-CF594, PE-Cy5, PE-Cy5.5, PE-Cy7	CXCR5, SiglecF, CD25, APC-Cy7
633nm	APC, R718, CD64, Ly6C	CD11b

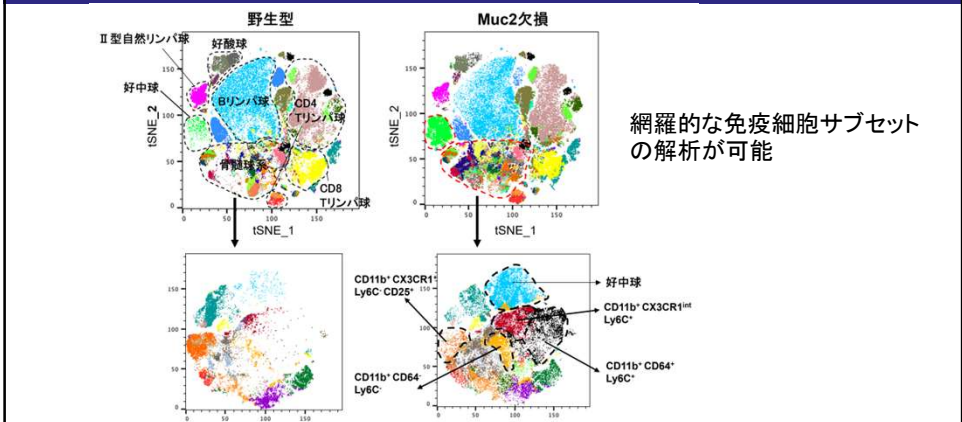
FlowJo® (解析用ソフトウェア) を用いた解析



FlowJo® (解析用ソフトウェア) を用いた解析



FlowJo® (解析用ソフトウェア) を用いた解析



フローサイトメーターを用いた解析 (臨床編)

現在、保険診療として実施の可能なフローサイトメーターを用いられる臨床検査項目を以下に示します。

検査項目	項目別点数	その他関連
造血器腫瘍細胞抗原検査 (一運につき)	2000	血液学的検査判断科: 125
B細胞表面免疫グロブリン検査	161	免疫学的検査判断科: 144
T細胞・B細胞百分率検査	204	免疫学的検査判断科: 144
T細胞サブセット検査 (一運につき)	194	免疫学的検査判断科: 144
赤血球表面抗原検査	270	免疫学的検査判断科: 144
CCR4タンパク (フローサイトメトリー法)	10,000	血液学的検査判断科: 125

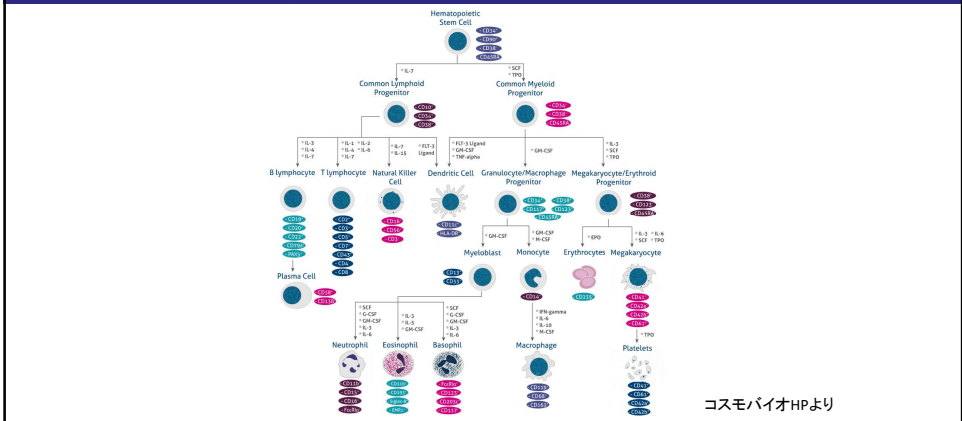
2018年度診療報酬点数

また、手術 (造血幹細胞移植) の一連のプロセスとして、フローサイトメトリーを用いた検査が実施されるケースがあります。

手術	移植の種類	件数	検査項目
骨髄移植	同種移植の場合	66,450	CD34陽性細胞数測定
	自家移植の場合	25,850	CD34陽性細胞数測定
	同種移植の場合	66,450	CD34陽性細胞数測定
	自家移植の場合	30,850	CD34陽性細胞数測定
末梢血幹細胞移植	同種移植の場合	66,450	CD34陽性細胞数測定
	自家移植の場合	30,850	CD34陽性細胞数測定
臍帯血移植		66,450	CD34陽性細胞数測定

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

免疫細胞表面マーカー (ヒト)

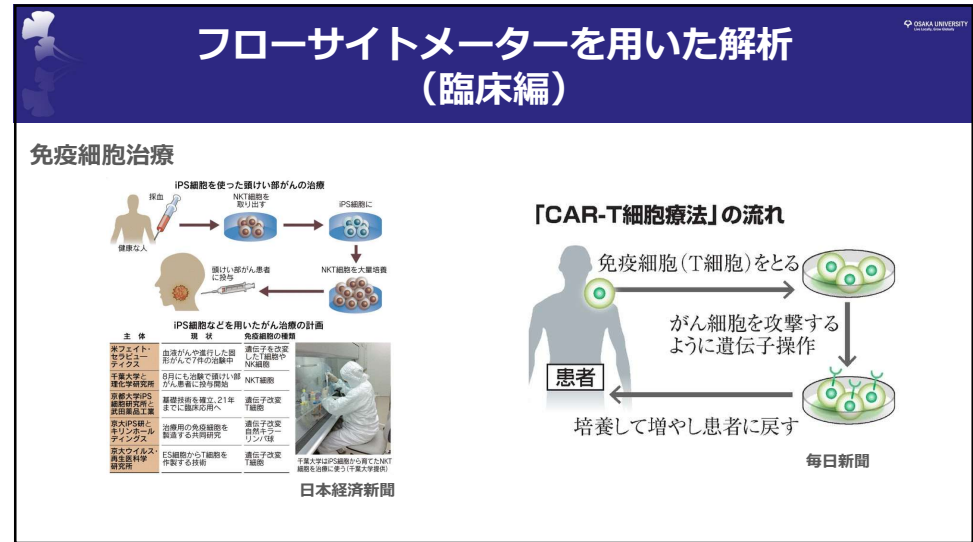
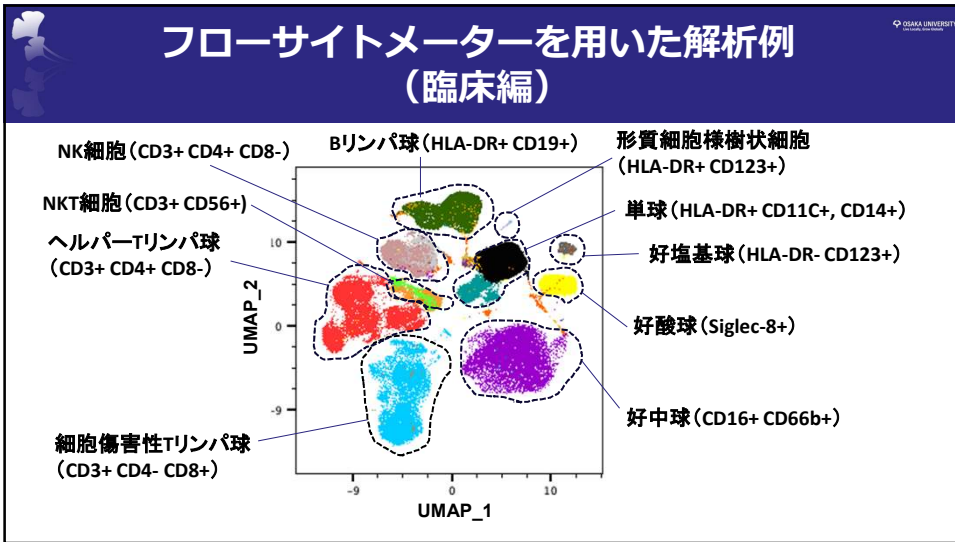


フローサイトメーターを用いた解析例 (臨床編)

末梢血 → 白血球画分の回収 → 抗体との反応 → BD FACSymphony S6 で解析

レーザー 各免疫細胞マーカー分子の抗体と蛍光色素の組み合わせ

レーザー	抗体	蛍光色素
355nm	BUV395 DAPI	BUV496, BUV563, BUV615, BUV661, BUV737, BUV805
	CD45	CD16, CD14, Siglec-8, CD163, CD161, CD86
405nm	BV421 DAPI	BV480, BV570, BV605, BV650, BV711, BV750, BV786
	CD3	CD4, CD19, CD8, CD123, CD88, CD11C, CCR7
488nm	BB515	BB630, BB660, BB700, BB755, BB790
	CD45RA	CD66b, CD103
561nm	PE	PE-Cy5, PE-Cy7
	CD207, CD206	PE-CF594, PE-Cy5.5, PE-Cy7
633nm	APC	APC-Cy7
	R718, XCR1, CD127	CD25, CD56, HLA-DR



共同研パネル抗体の利用

共同研パネル

標準的な抗体セットを学費から共同研で購入いただけます。実験スタート時の設備費を大幅に削減することができます。セーブです。

抗体購入価格の変更に伴い、予定より金額が増えることがあります。

ご利用の流れ

- 実際に使用する抗体の種類、量を決定します。 関与の会社、授業の進捗、パネルの選定についてBOアドバイザースタッフからお問い合わせいただけます。 日本ペタン・デジタルソリューションズ株式会社サポート Tel:0120-4890-77 e-mail: tech_aid@bd.com ※共同研の抗体は21日以内でメールにてお問い合わせください。 e-mail: fom@cfmlab.med.osaka-u.ac.jp
- 名称の読み込みから、必要となる抗体のデータをダウンロードしてください。申し込み画面に進みます。
- 申し込み画面から、必要事項を入力してください。 使用量の最小単位は0.1gになります。
- 内容を確認後発注をお願いします。 スターアップが開始し届きます。
- 発注完了後在庫を確認してください。 ※発注した抗体は在庫切れになりますので、申請書も併せてご確認ください。 チューブの取り回しはオンラインヘルプ内で詳細情報にてご確認ください。
- 納品日決定まで、遅くとも1週間前までに発注をご確認ください。 使用量に余裕があれば発注量の拡大も可能です。 発注が特別価格の適用対象の申請にご確認ください。

抗体名	2024年04月	2024年05月
1	0	0
2	0	0
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	0	0
19	0	0
20	0	0
21	0	0
22	0	0
23	0	0
24	0	0
25	0	0
26	0	0
27	0	0
28	0	0
29	0	0
30	0	0
31	0	0
32	0	0
33	0	0
34	0	0
35	0	0
36	0	0
37	0	0
38	0	0
39	0	0
40	0	0
41	0	0
42	0	0
43	0	0
44	0	0
45	0	0
46	0	0
47	0	0
48	0	0
49	0	0
50	0	0
51	0	0
52	0	0
53	0	0
54	0	0
55	0	0
56	0	0
57	0	0
58	0	0
59	0	0
60	0	0
61	0	0
62	0	0
63	0	0
64	0	0
65	0	0
66	0	0
67	0	0
68	0	0
69	0	0
70	0	0
71	0	0
72	0	0
73	0	0
74	0	0
75	0	0
76	0	0
77	0	0
78	0	0
79	0	0
80	0	0
81	0	0
82	0	0
83	0	0
84	0	0
85	0	0
86	0	0
87	0	0
88	0	0
89	0	0
90	0	0
91	0	0
92	0	0
93	0	0
94	0	0
95	0	0
96	0	0
97	0	0
98	0	0
99	0	0
100	0	0

最後に

大阪大学共同研
共通機器アドバイザーボード
フローサイトメーター関連チーム

使用法、解析などフローサイトメータ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。

Enjoy your research !