

細胞解析のためのフローサイトメトリー ~原理と応用~

令和8年共同研機器セミナー

医学系研究科 免疫制御学

奥村 龍

令和8年4月14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

- **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>

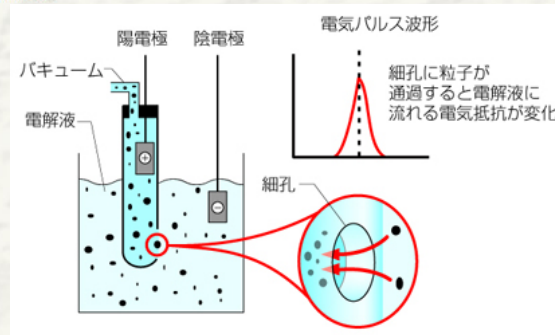
- ▶ **アナライザー**：解析のみを目的とする。
- ▶ **セルソーター**：解析した結果に基づき目的の細胞を
生きたまま分取する。

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。



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。

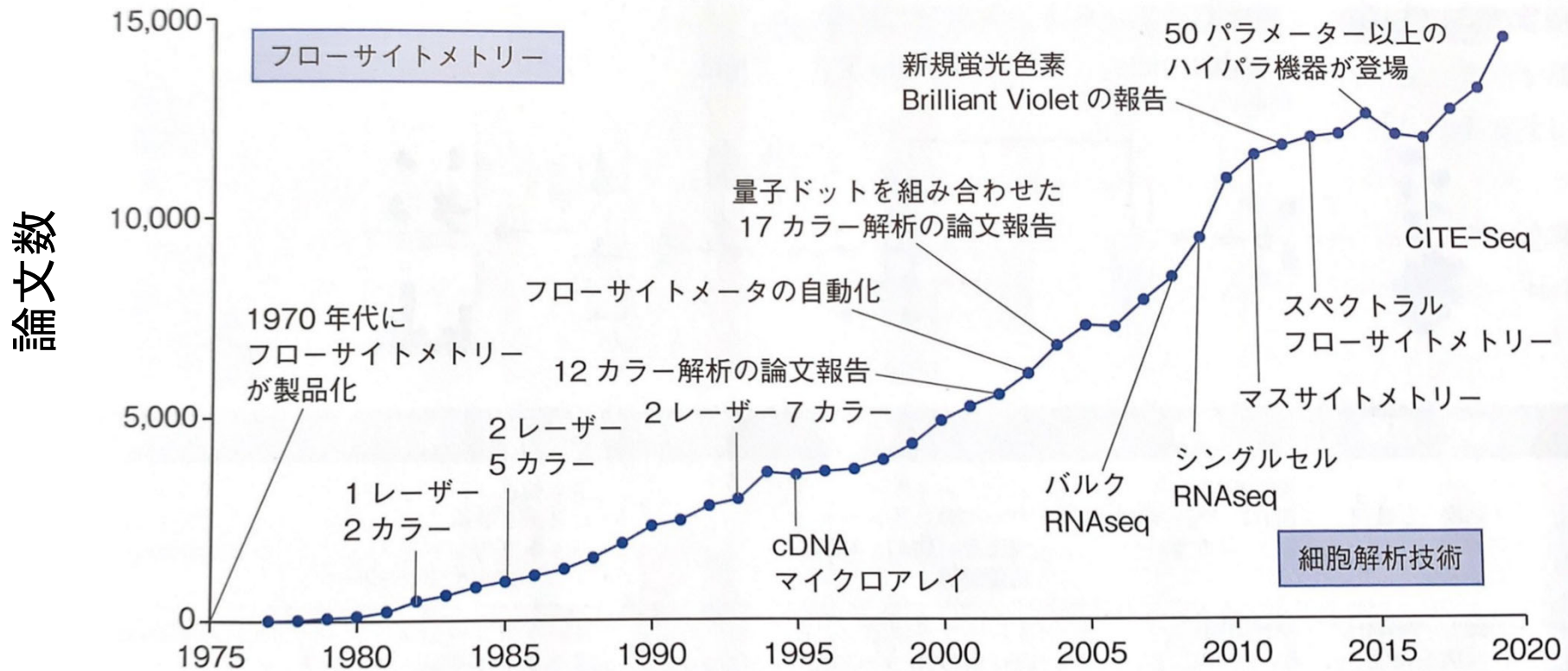


コールターカウンターA型

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

<https://www.nisshineng.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】

BD FACSCanto II

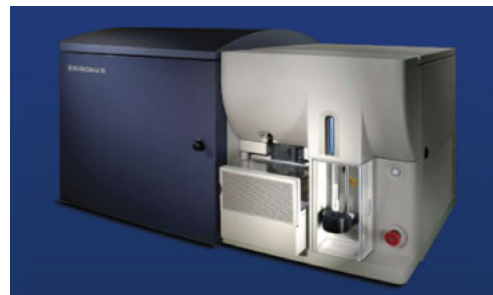


BD FACSVerse



【セルソーター】

BD FACSAria IIIu



BD FACSAria II



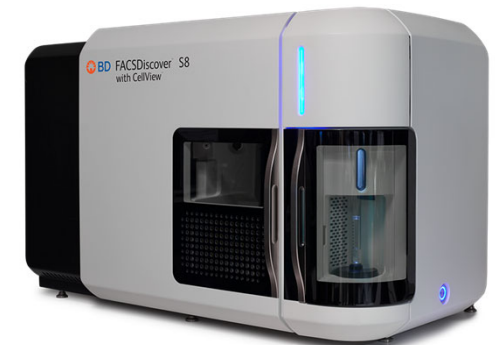
Sony SH800Z



BD FACSFusion



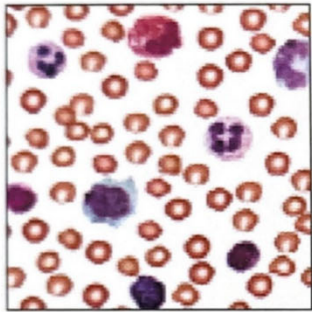
BD FACSymphony S6



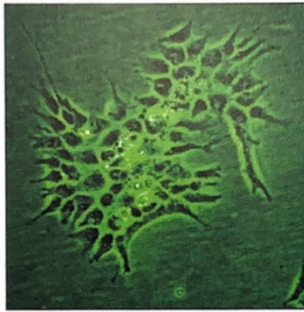
BD FACSDiscover S8

<https://www.bdbiosciences.com/>

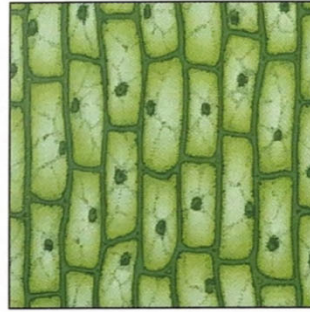
どんな細胞が解析できるのか？



血球細胞



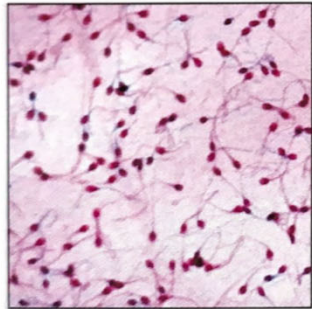
接着細胞
(剥がす必要がある)



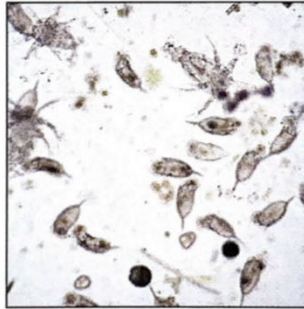
植物細胞



昆虫細胞



精子



プランクトン



大腸菌



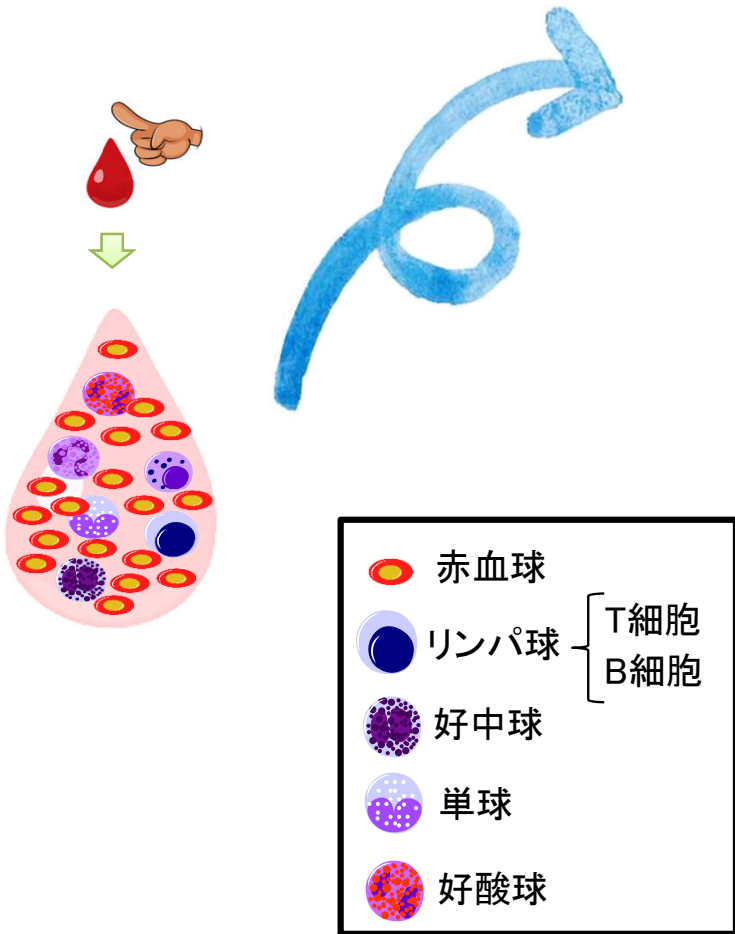
球菌

サンプル条件

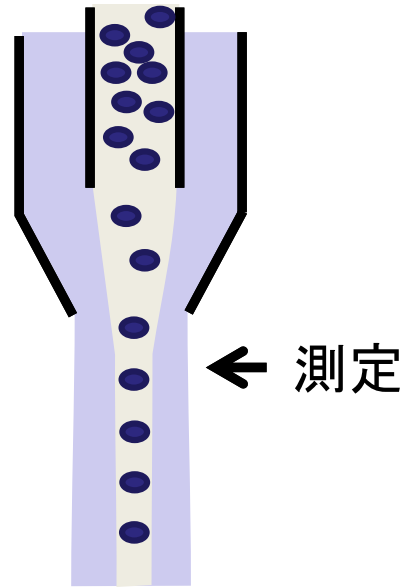
- ・細胞が一つ一つ単離されていること
- ・均一な細胞浮遊液であること
- ・直径0.2~40 μm の大きさであること

BD FACSフローサイトメーター
パンフレットより改変

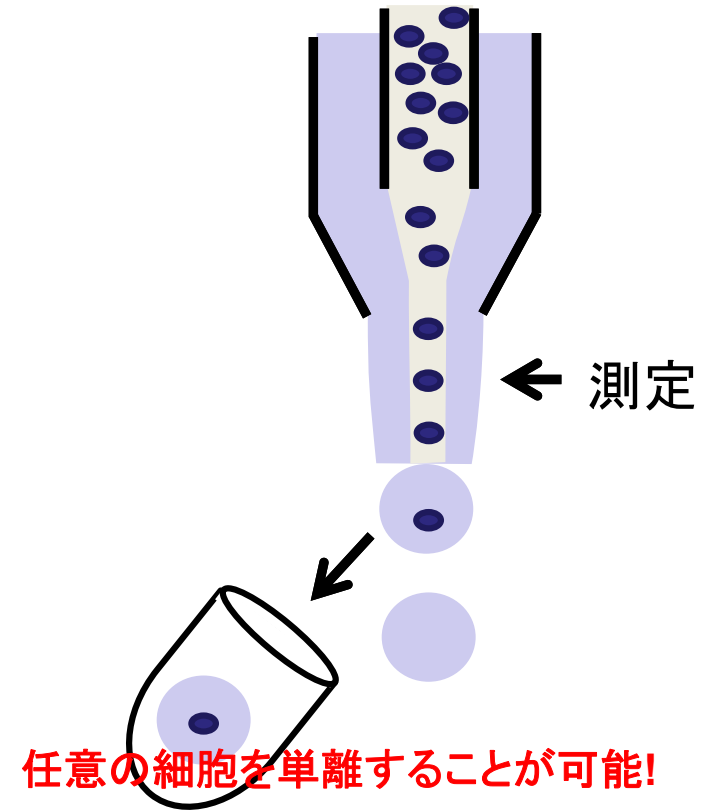
フローサイトメトリーって何？



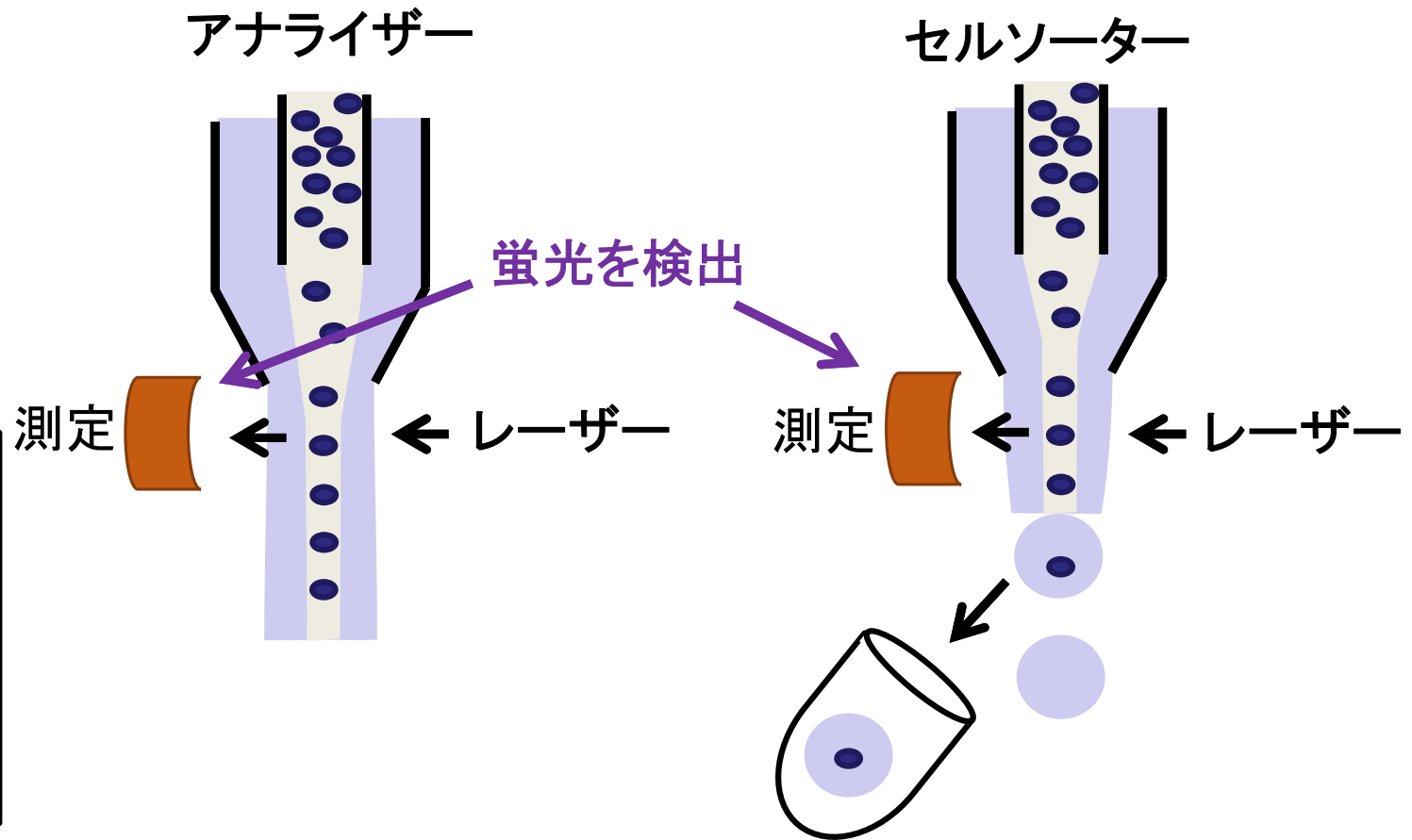
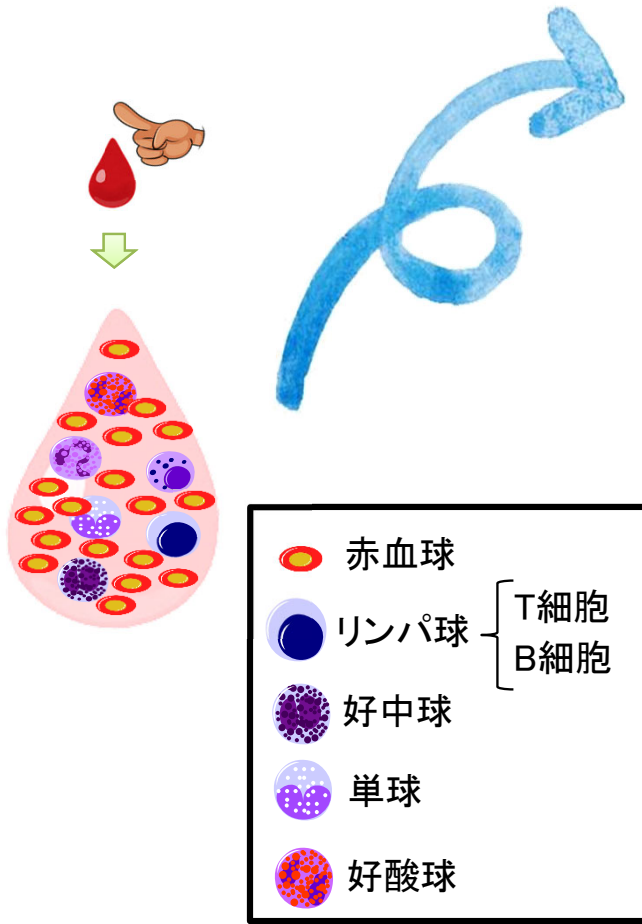
アナライザー



セルソーター

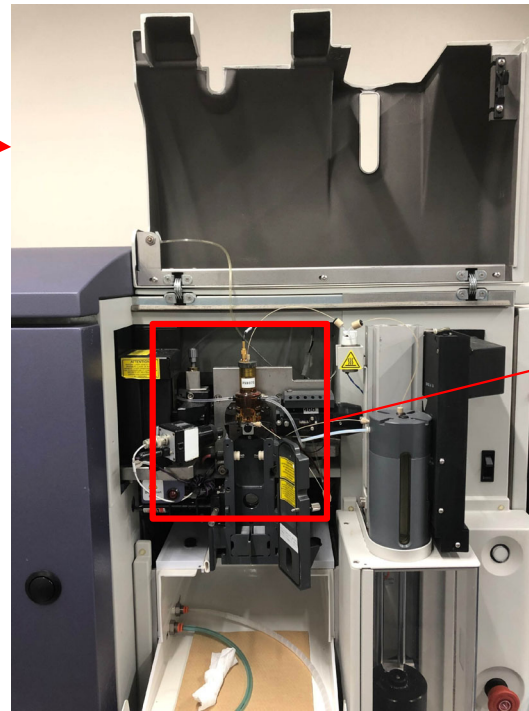


フローサイトメトリーって何？

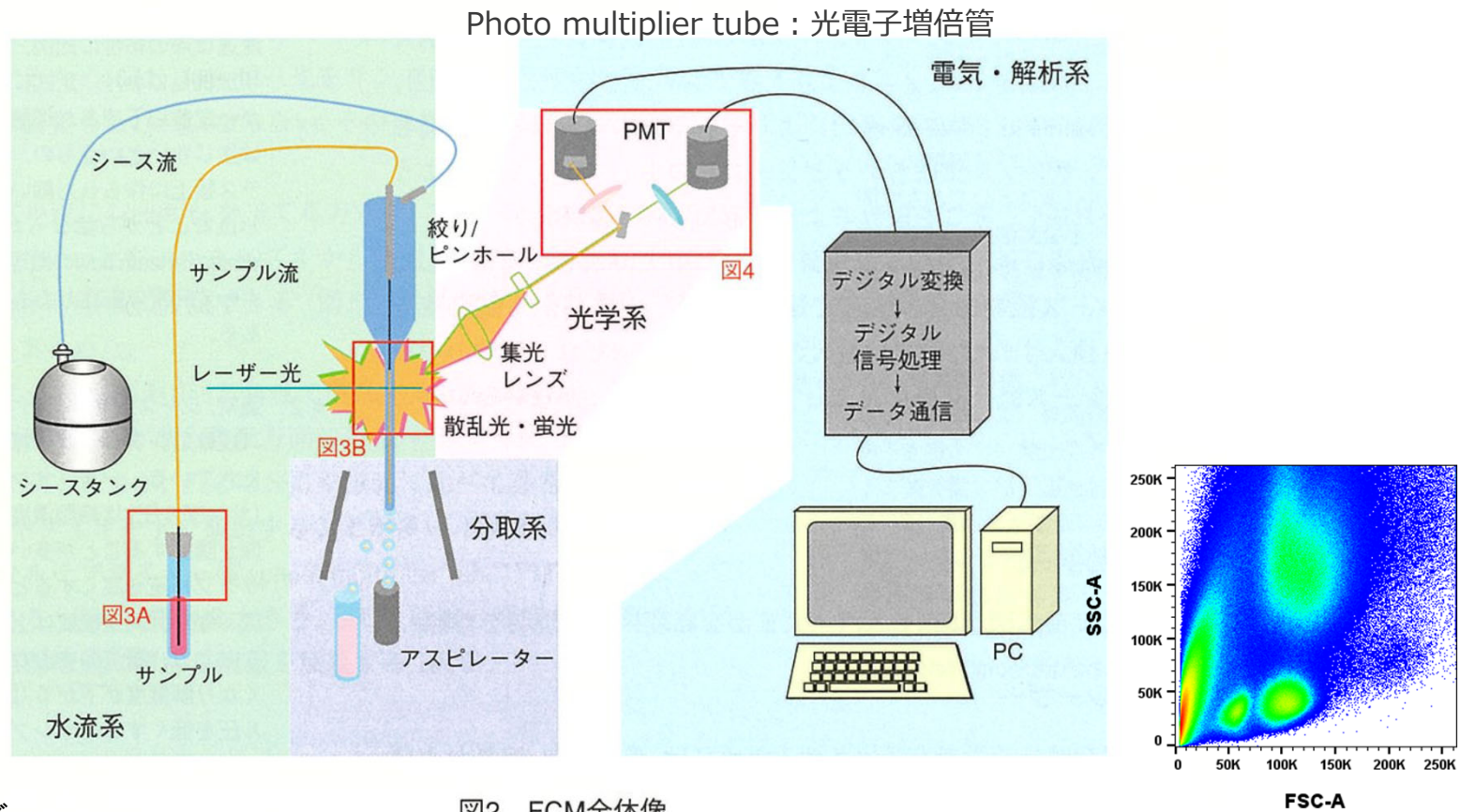




セルソーター

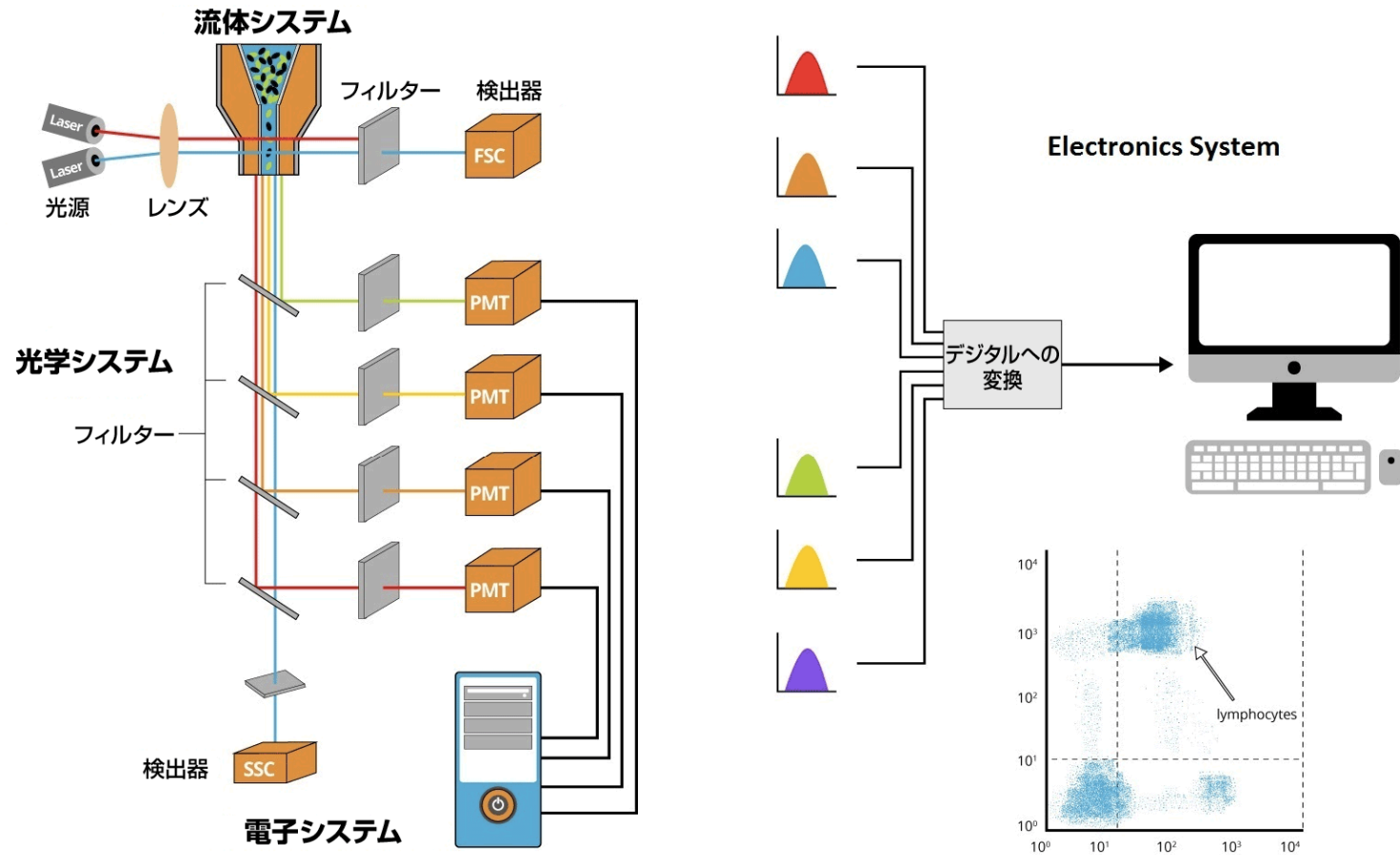


フローサイトメトリーの原理

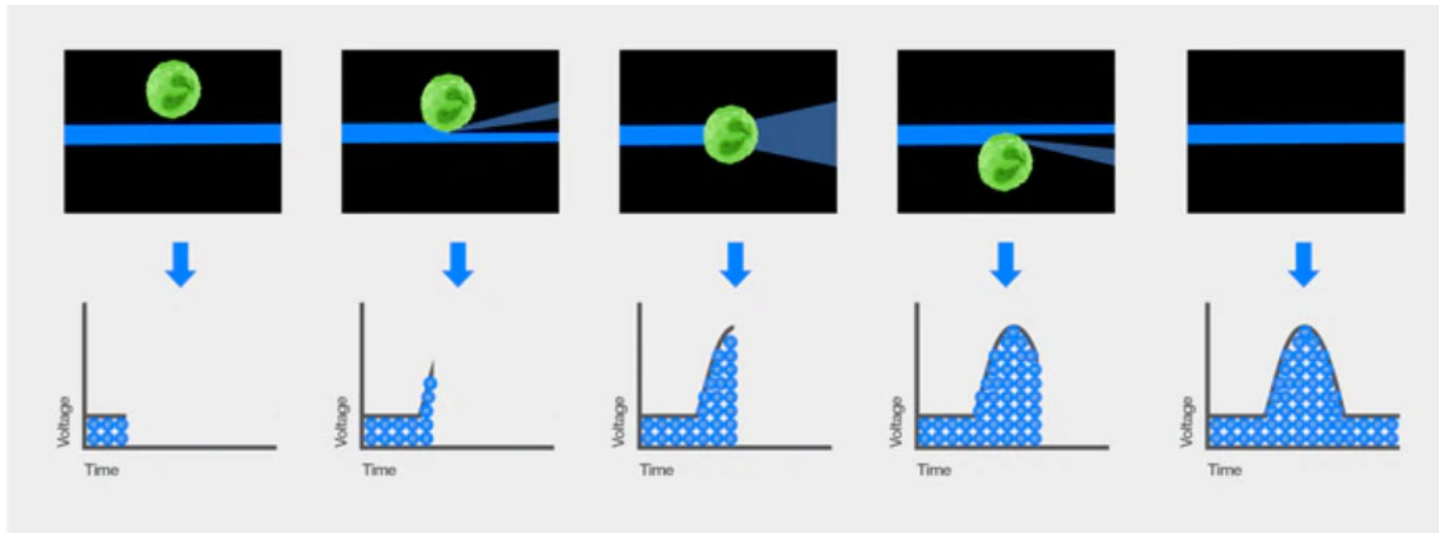


細胞工学別冊
実験プロトコルシリーズ
中内啓光 監修

フローサイトメトリーの原理



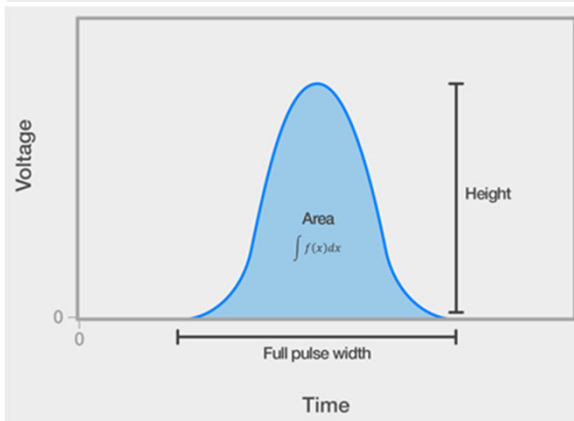
フローサイトメトリーの原理



光子

↓ 検出器で変換

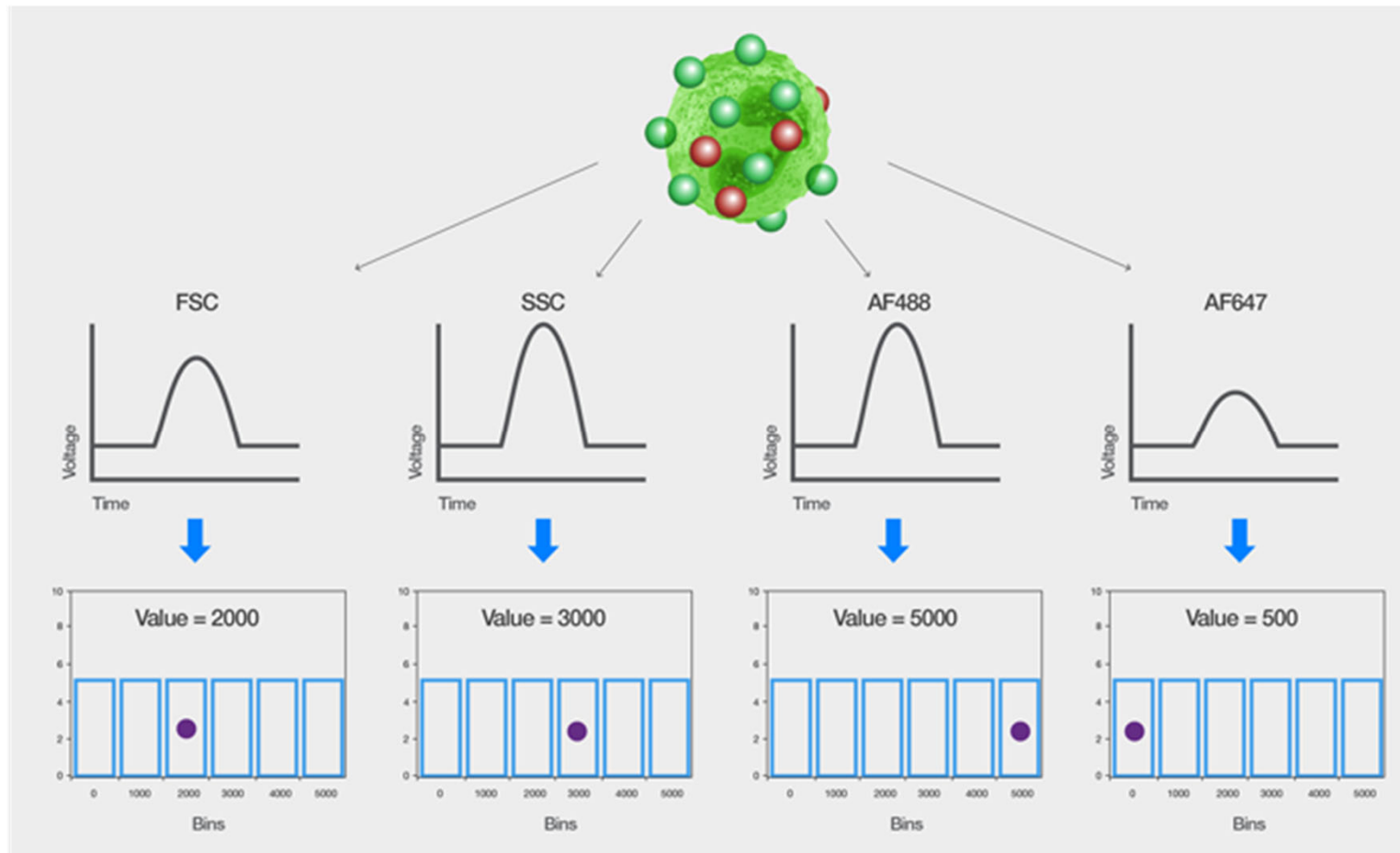
電子(電圧パルス)



➡ SSC、FSCではheight、width、areaを数値化

各蛍光パラメーターはareaを数値化

フローサイトメトリーの原理



電圧パルス

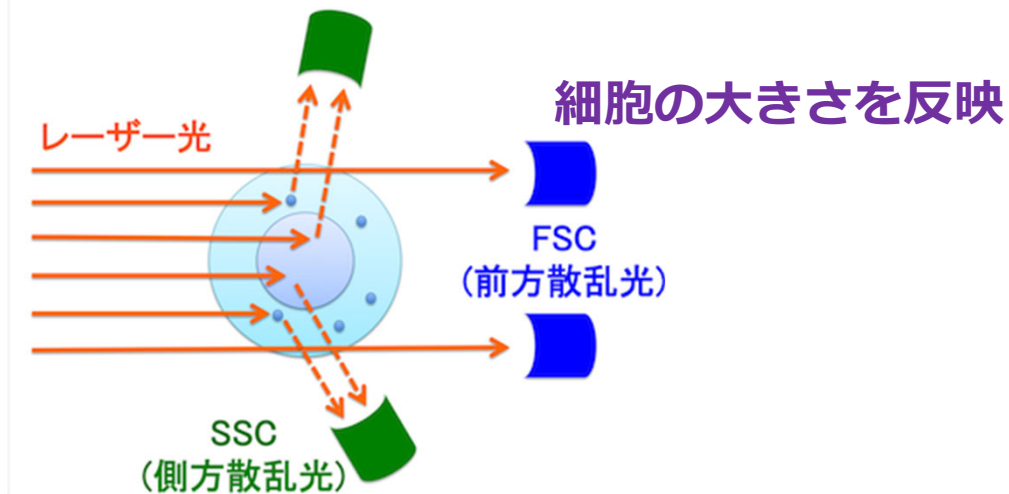
↓ **ビンング**

デジタル変換

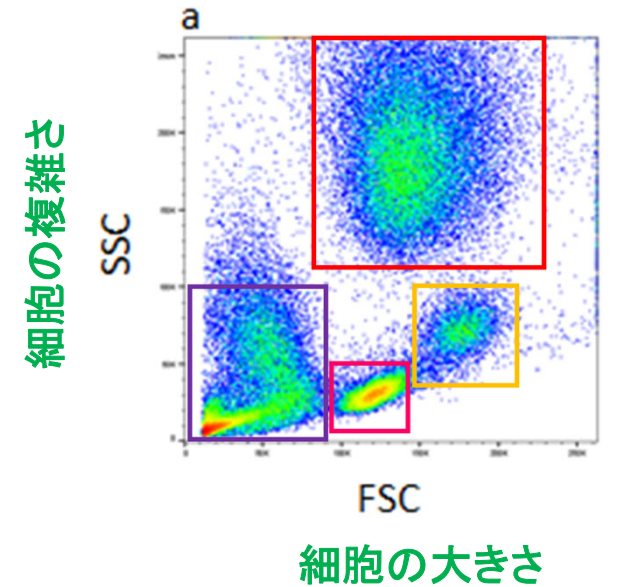
フローサイトメトリーの原理

FSC (forward scatter 前方散乱光)

SSC (side scatter 側方散乱光)



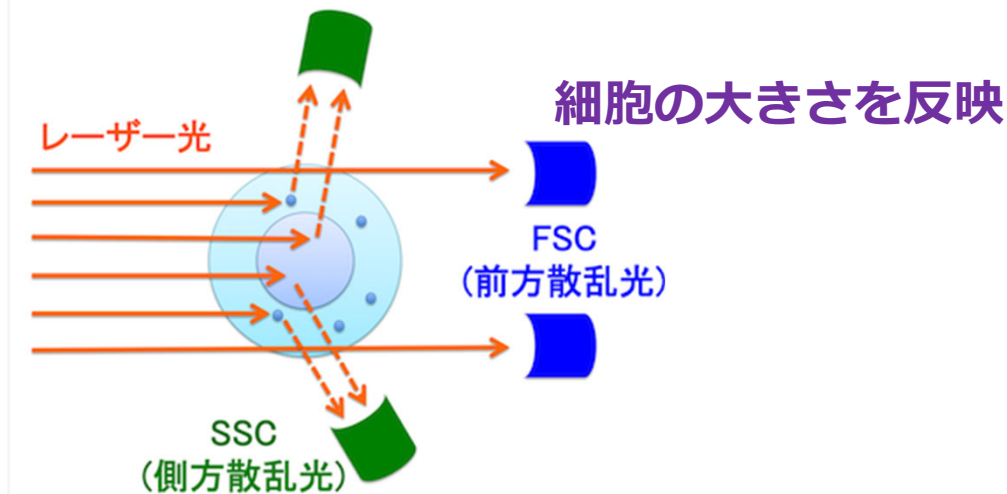
細胞の内部構造の複雑さを反映



フローサイトメトリーの原理

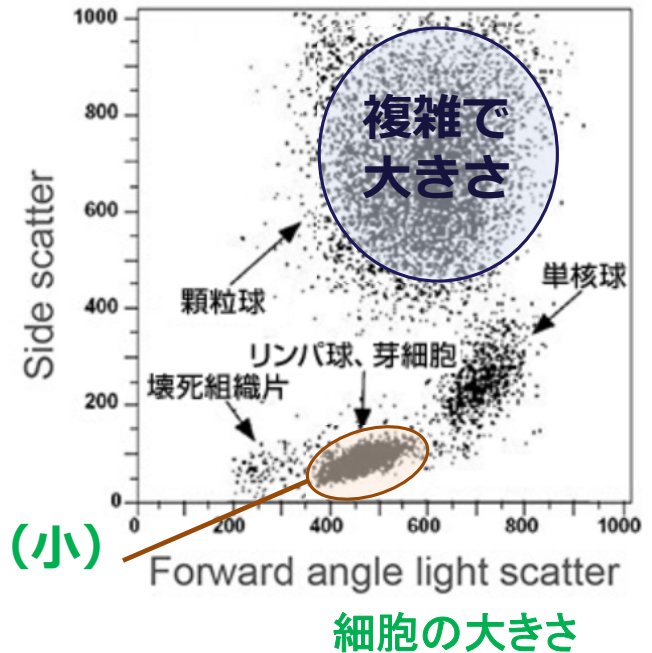
FSC (forward scatter 前方散乱光)

SSC (side scatter 側方散乱光)



細胞の複雑さ

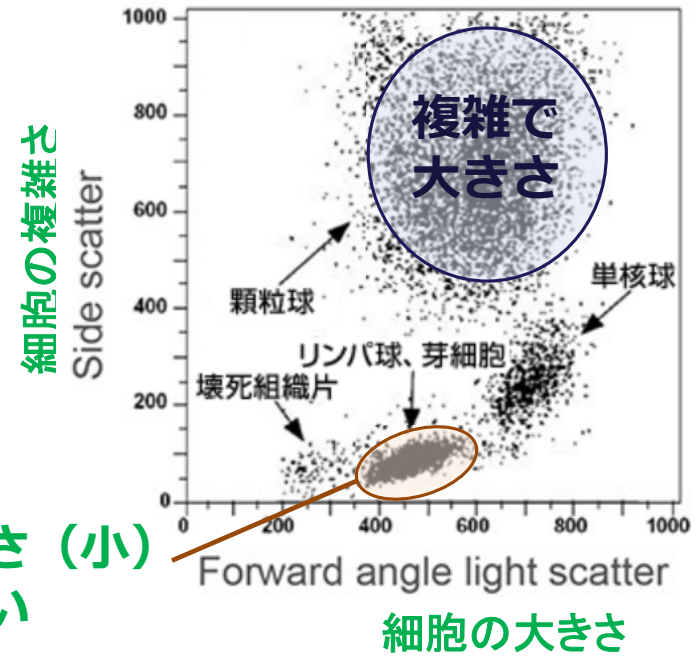
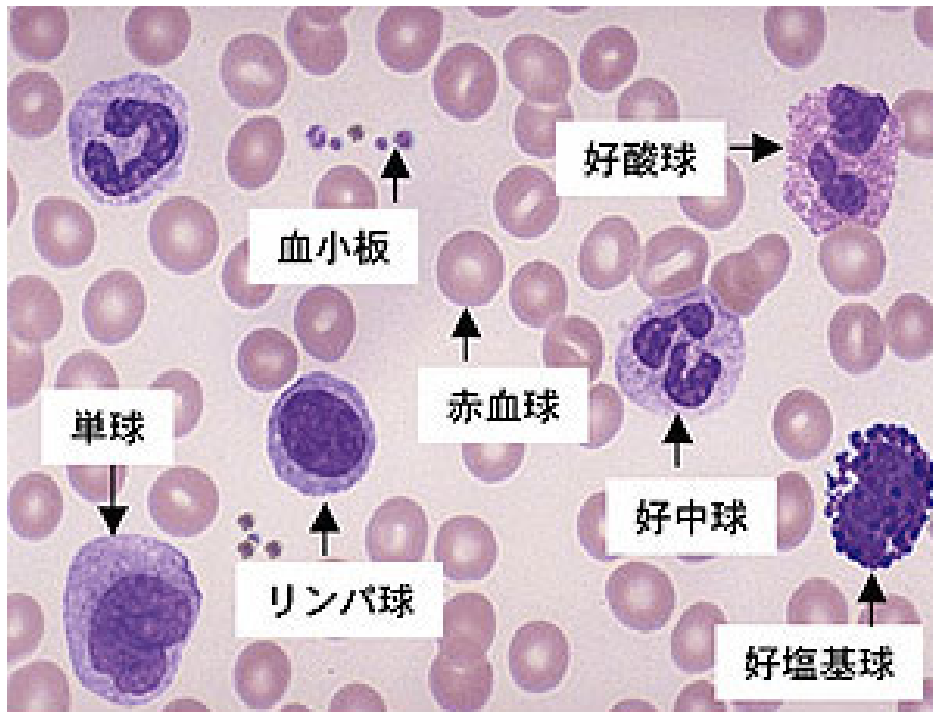
複雑さ (小)
小さい



フローサイトメトリーの原理

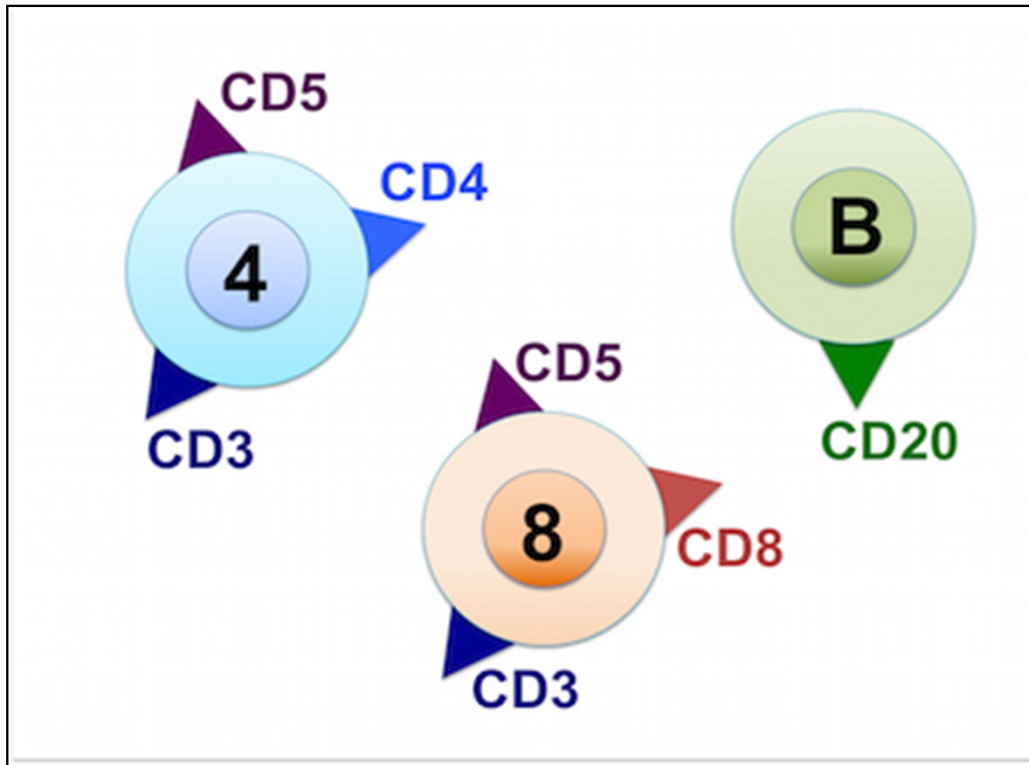
FSC (forward scatter 前方散乱光)

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

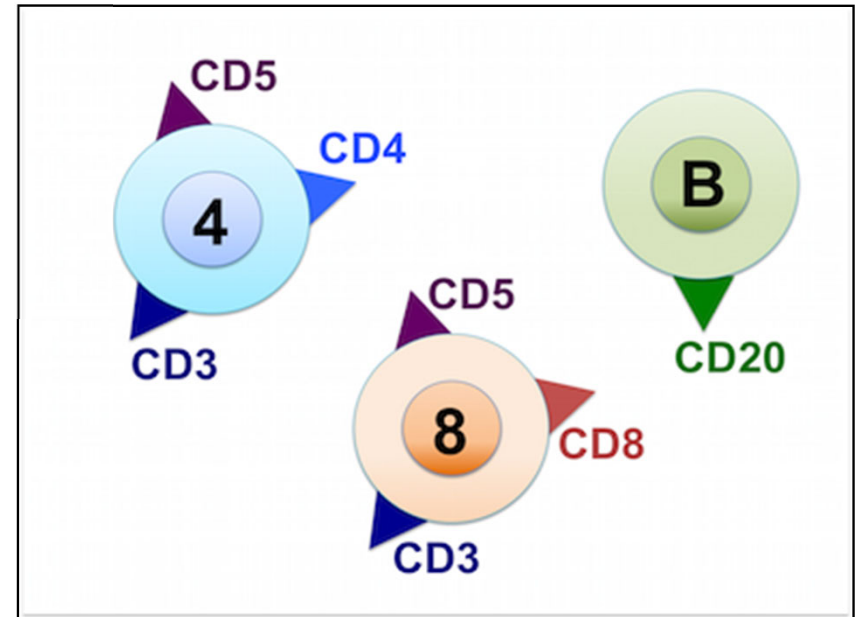
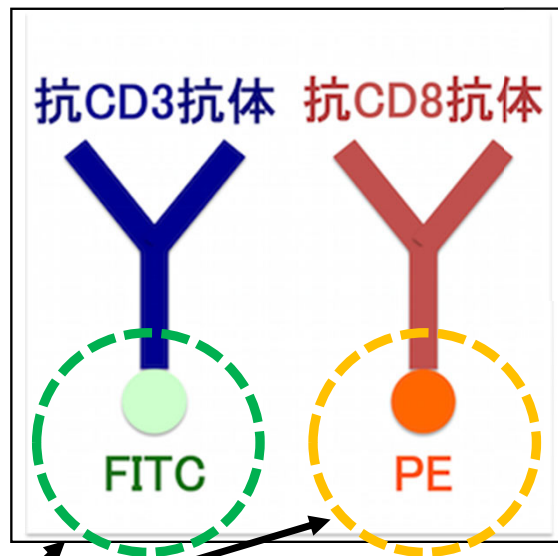
B細胞: CD20

<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



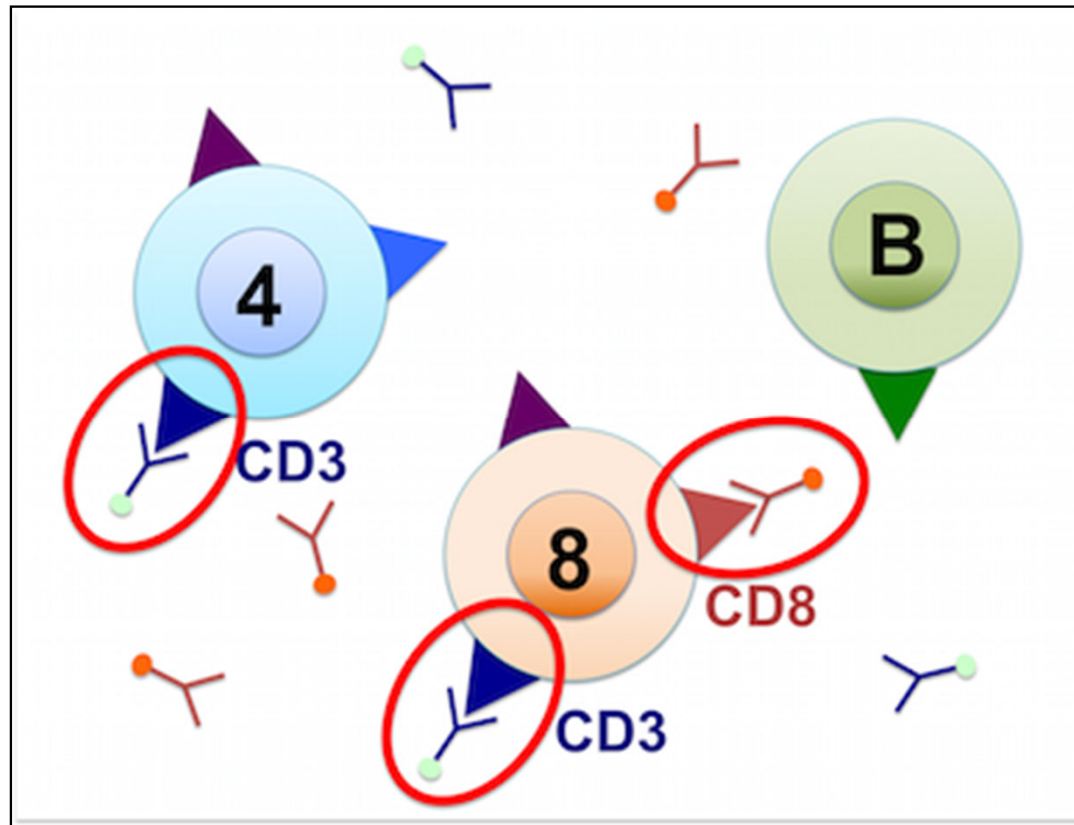
蛍光色素

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>

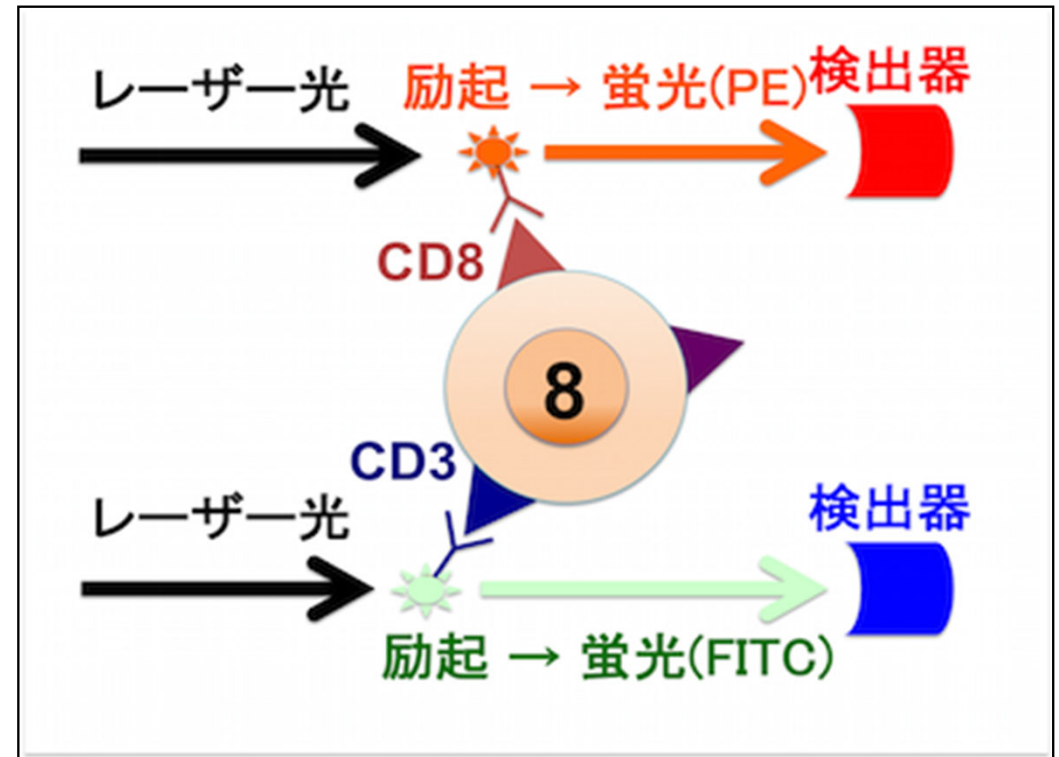
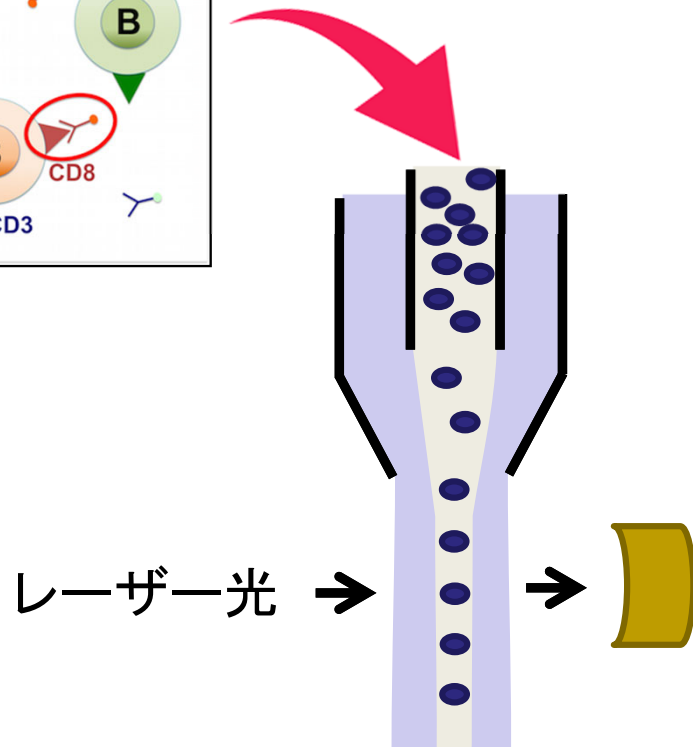
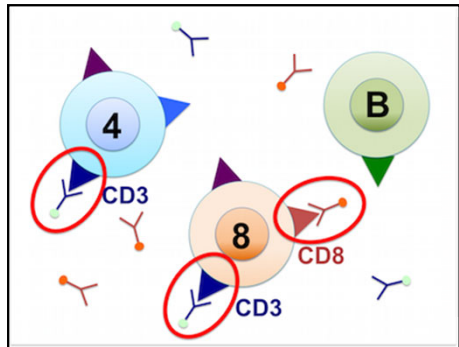
フローサイトメトリーの原理

蛍光標識抗体を用いた染色

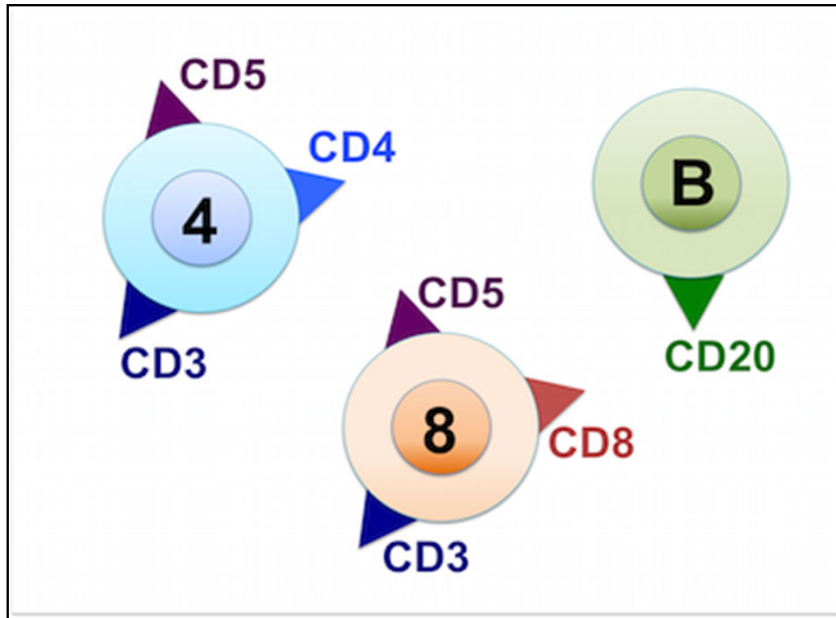


<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

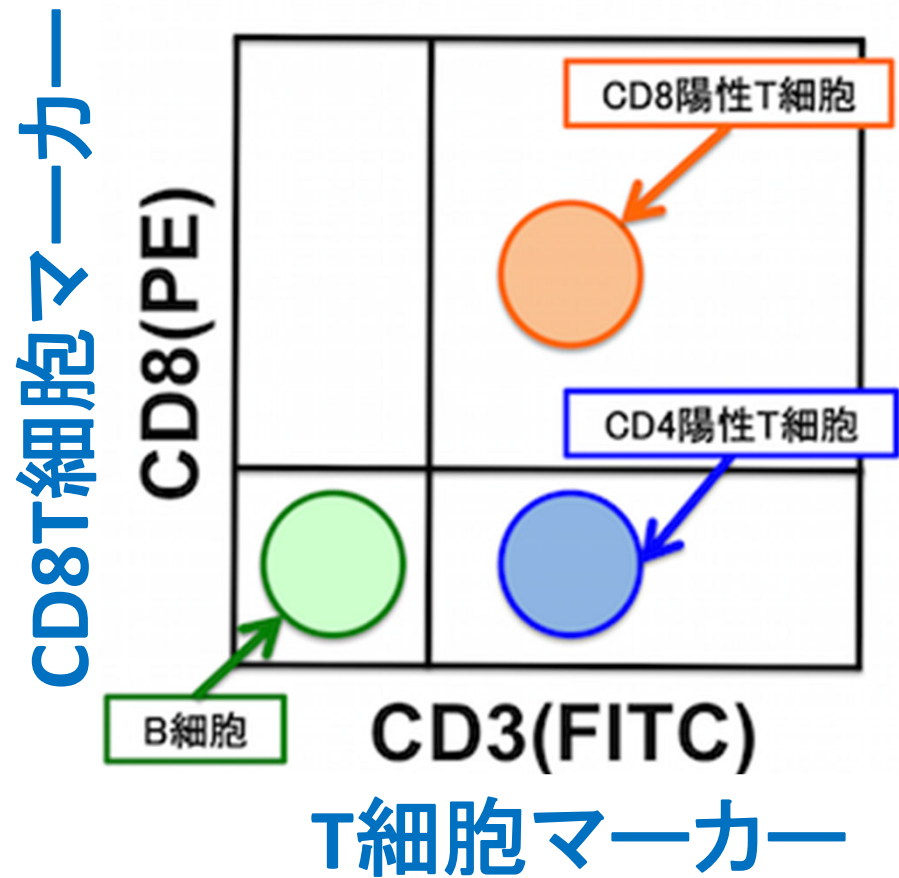
フローサイトメトリーの原理



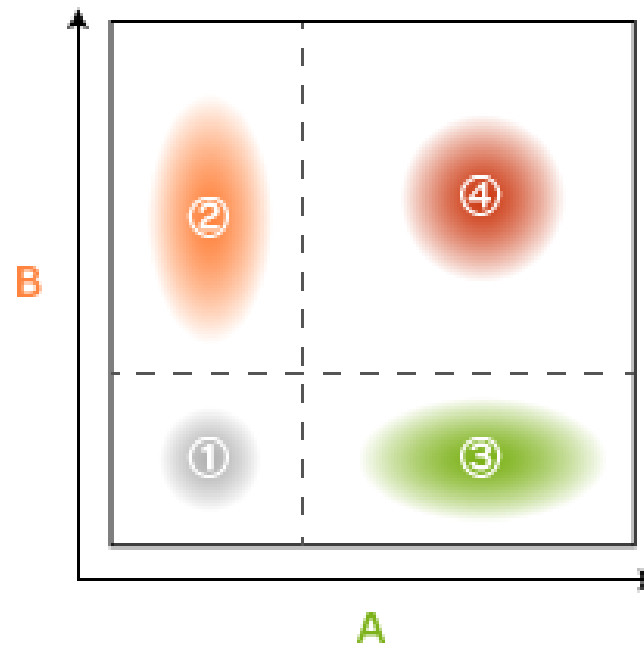
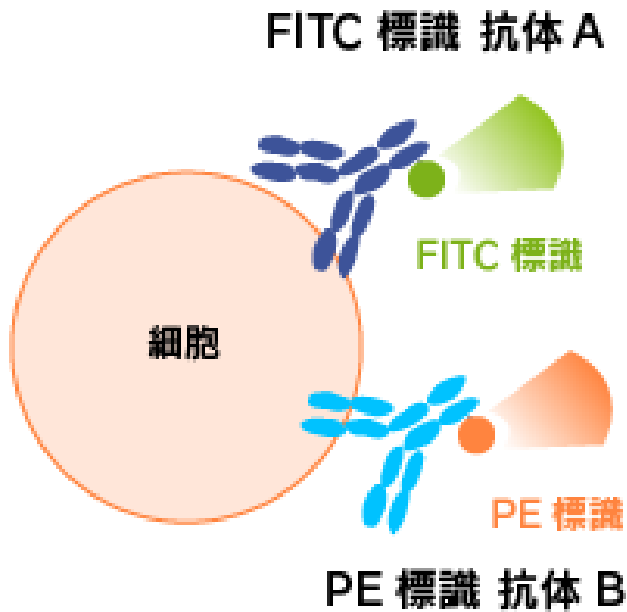
フローサイトメトリーの原理



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

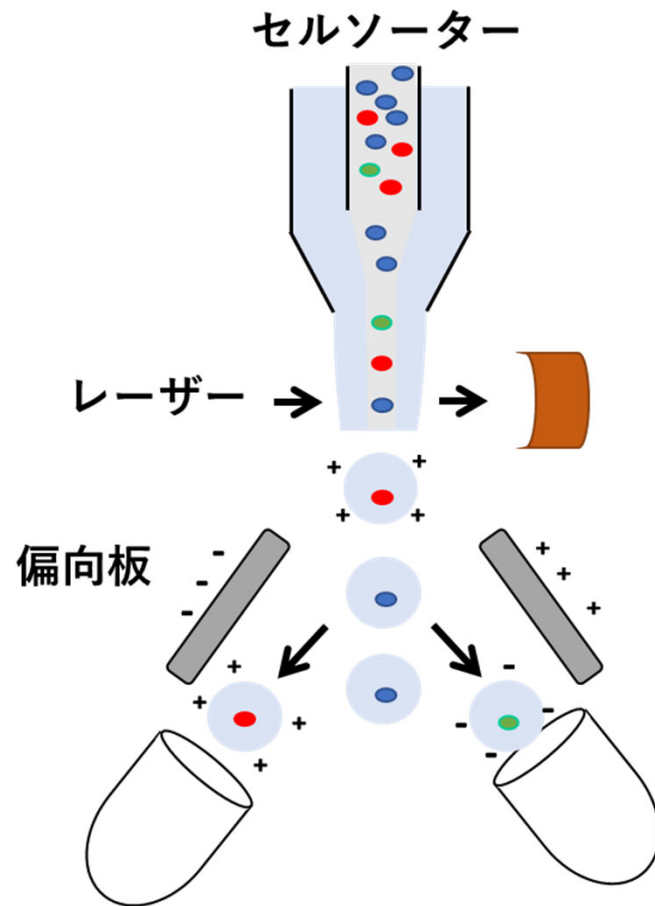


フローサイトメトリーの原理

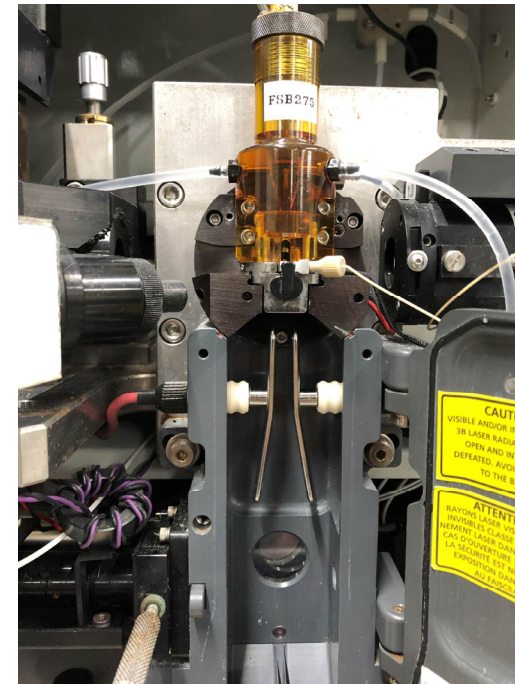


- ① A, B どちらも発現していない細胞
- ② B のみ発現している細胞
- ③ A のみ発現している細胞
- ④ A, B 両方を発現している細胞

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)

Figure 1

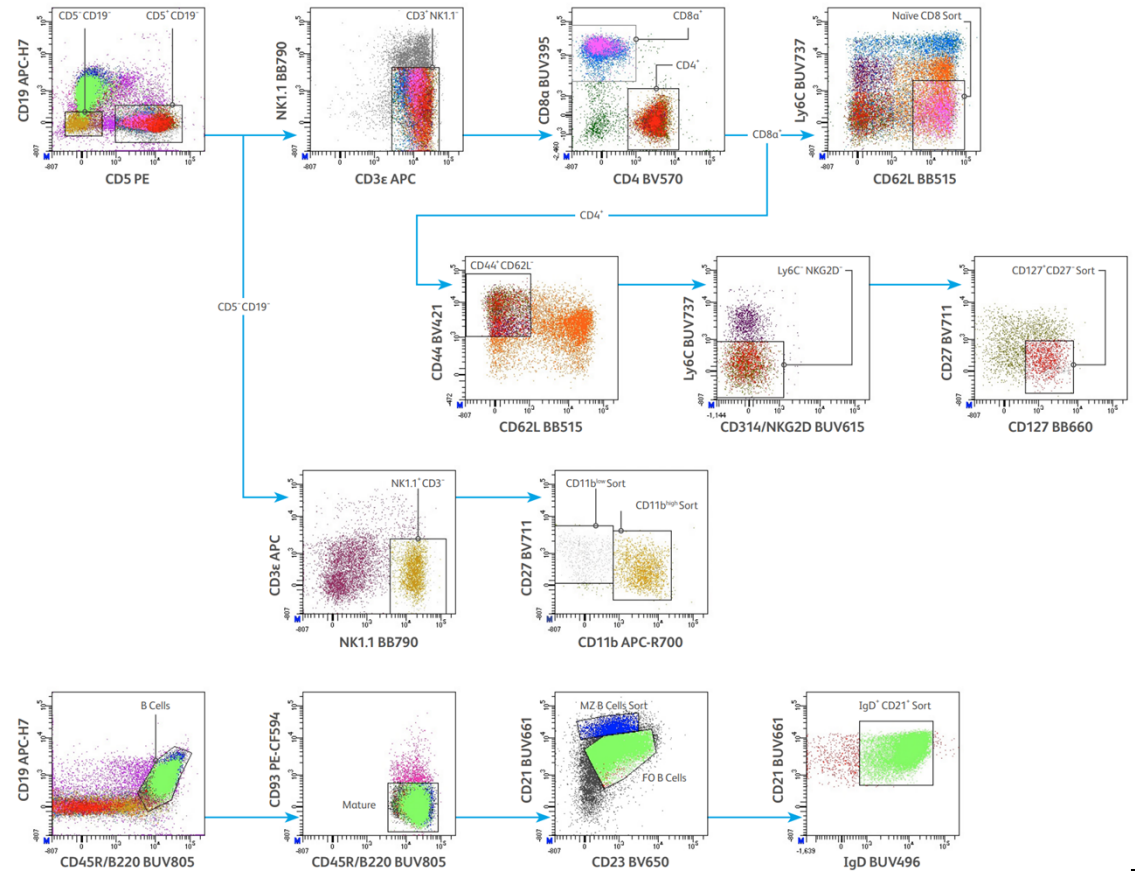


Figure 1: A 27-color panel for analysis of immune cell composition in mice

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

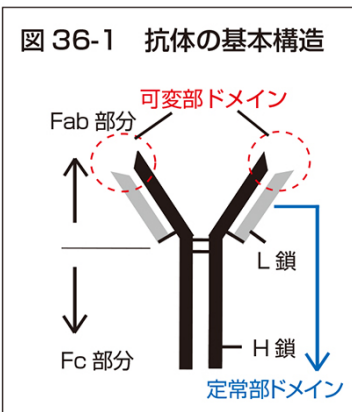
- **解析の実際について**

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】

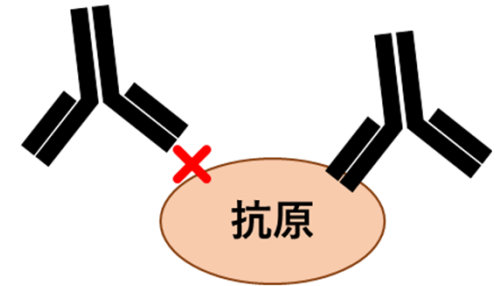
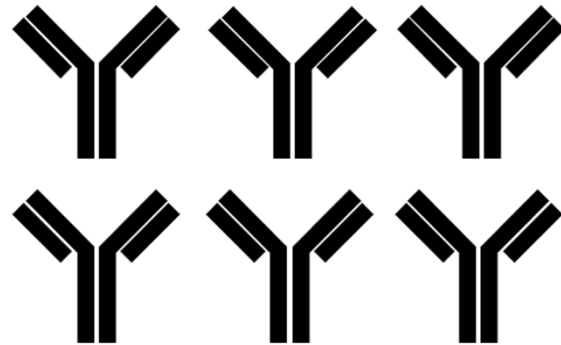
モノクローナル抗体は単一の抗体産生細胞に由来するクローンから作られている抗体のことで、単一の抗原決定基を有している。

【ポリクローナル抗体】

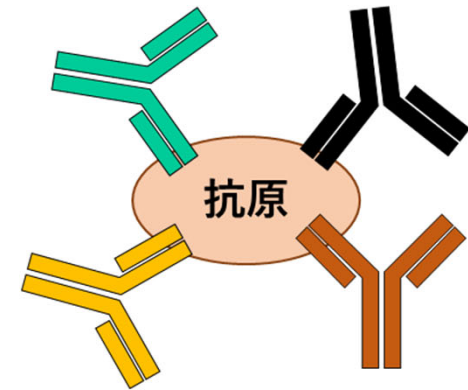
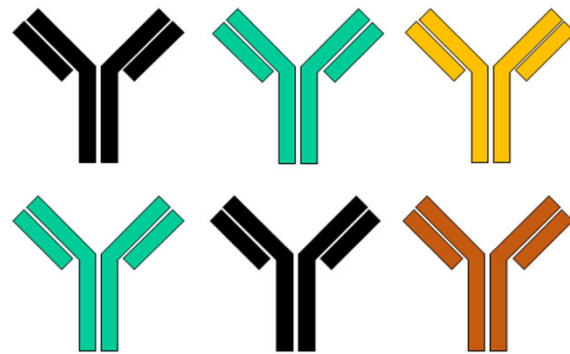
抗原の異なるエピトープに対して産生された複数の抗体のクローンを含む抗体の集合

モノクローナル・ポリクローナル抗体

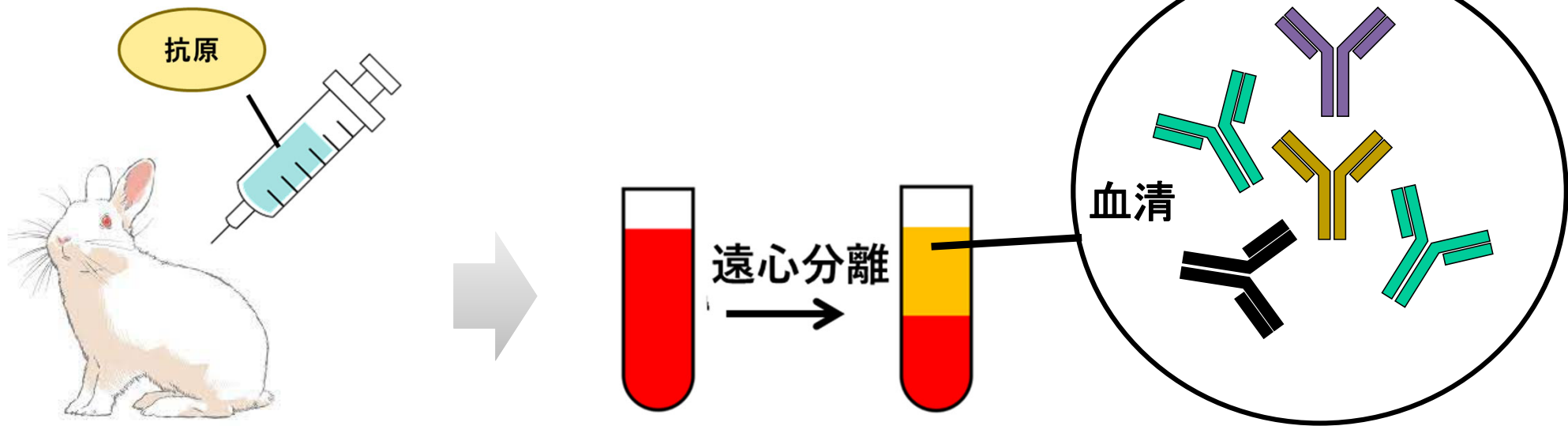
【モノクローナル抗体】



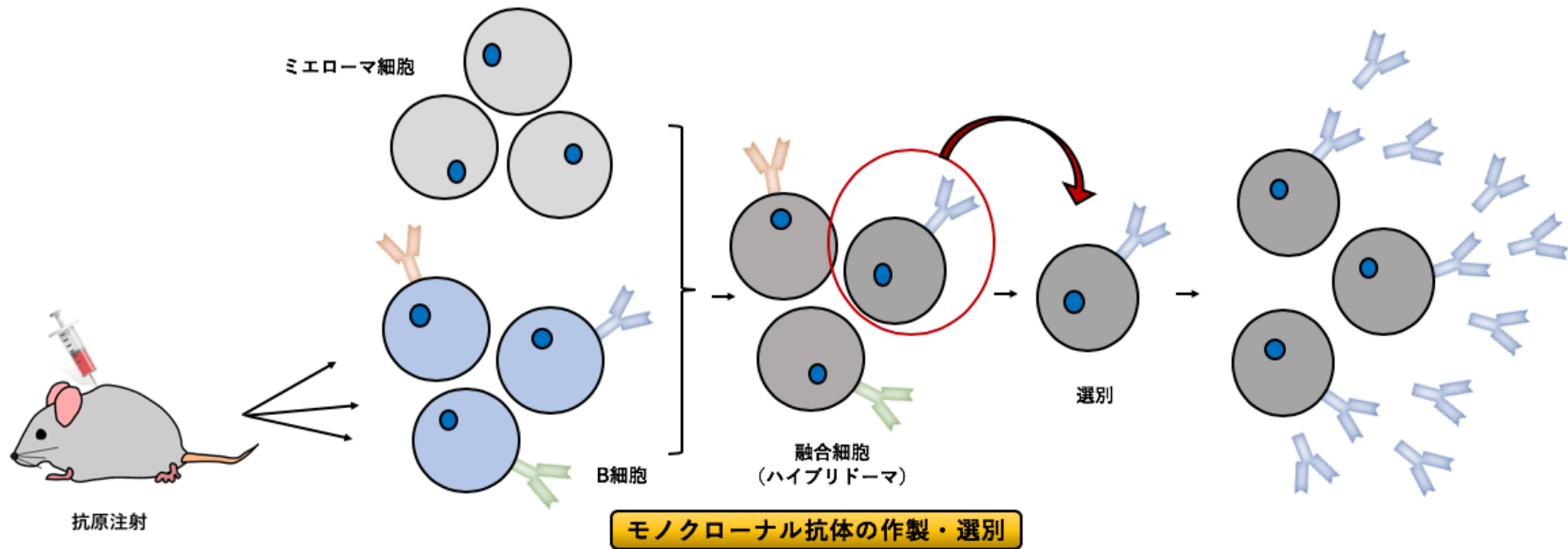
【ポリクローナル抗体】



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



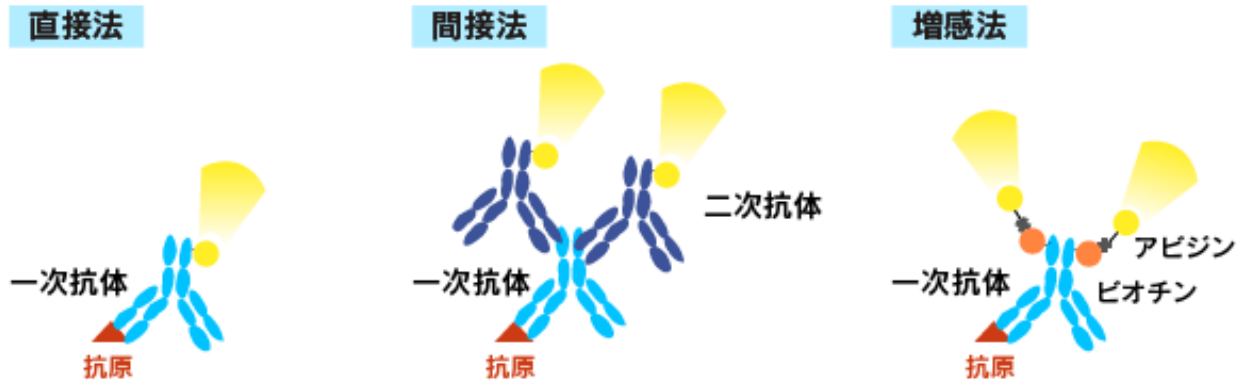
モノクローナル抗体への蛍光標識

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

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

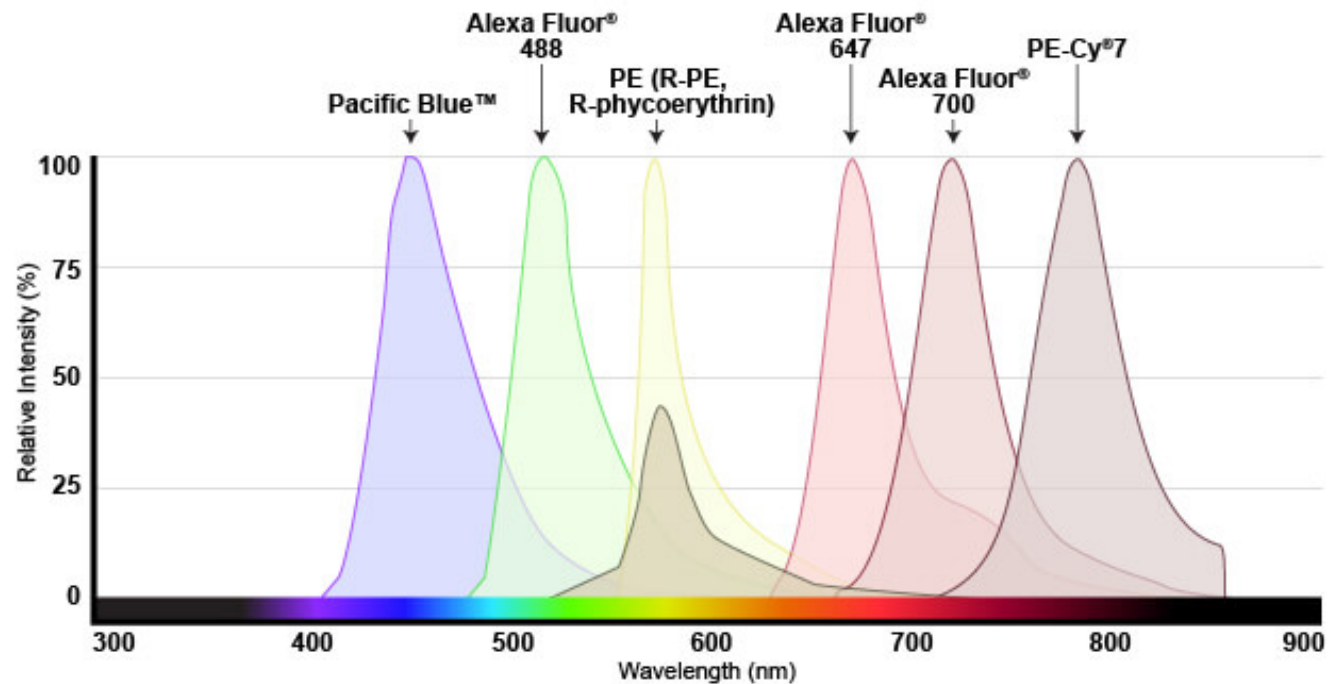
✓レーザーの本数、種類
⇒ 何色の蛍光が使用可能か

✓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

【蛍光スペクトル】

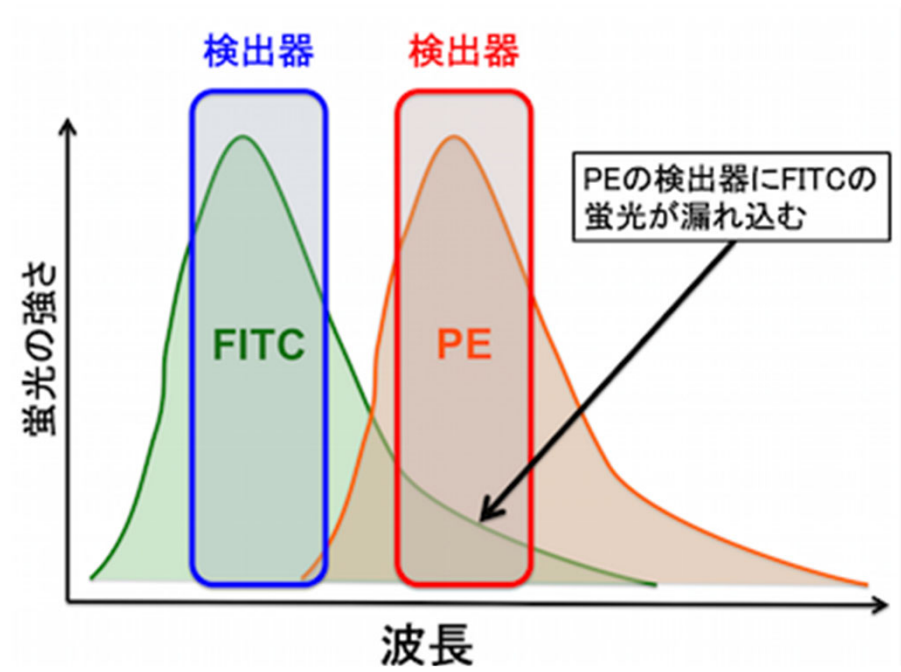
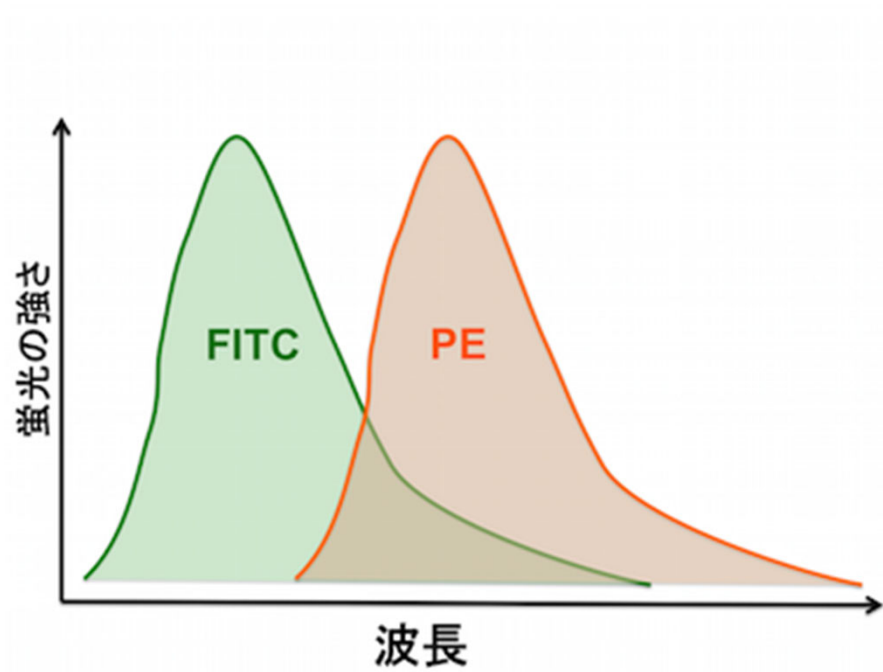


＜蛍光波長の確認ツール＞ **BD Spectrum Viewer**

(<https://www.bdbiosciences.com/ja-jp/resources/bd-spectrum-viewer-classic>)

蛍光色素の選択

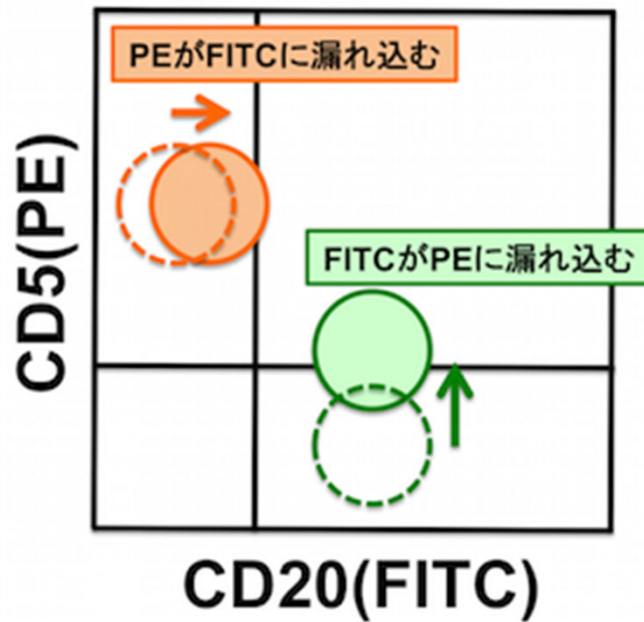
【蛍光の漏れ込み】



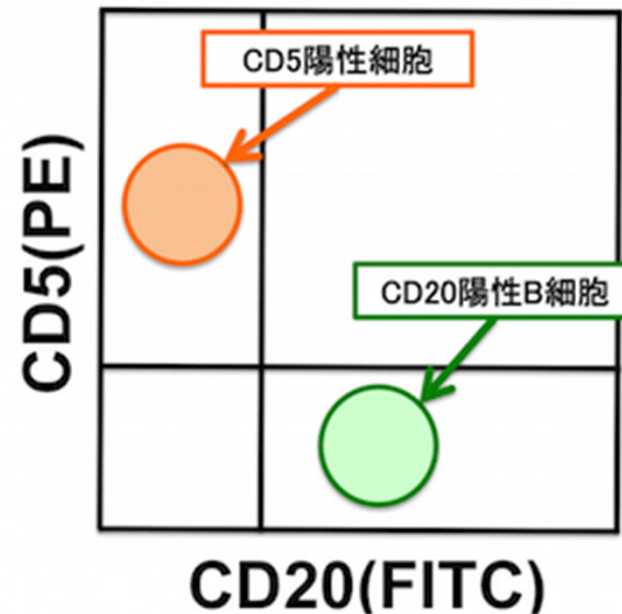
<http://fcm.blog.jp/archives/1039298858.html>

蛍光補正 (コンペンセーション)

【蛍光の漏れ込み】



補正



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

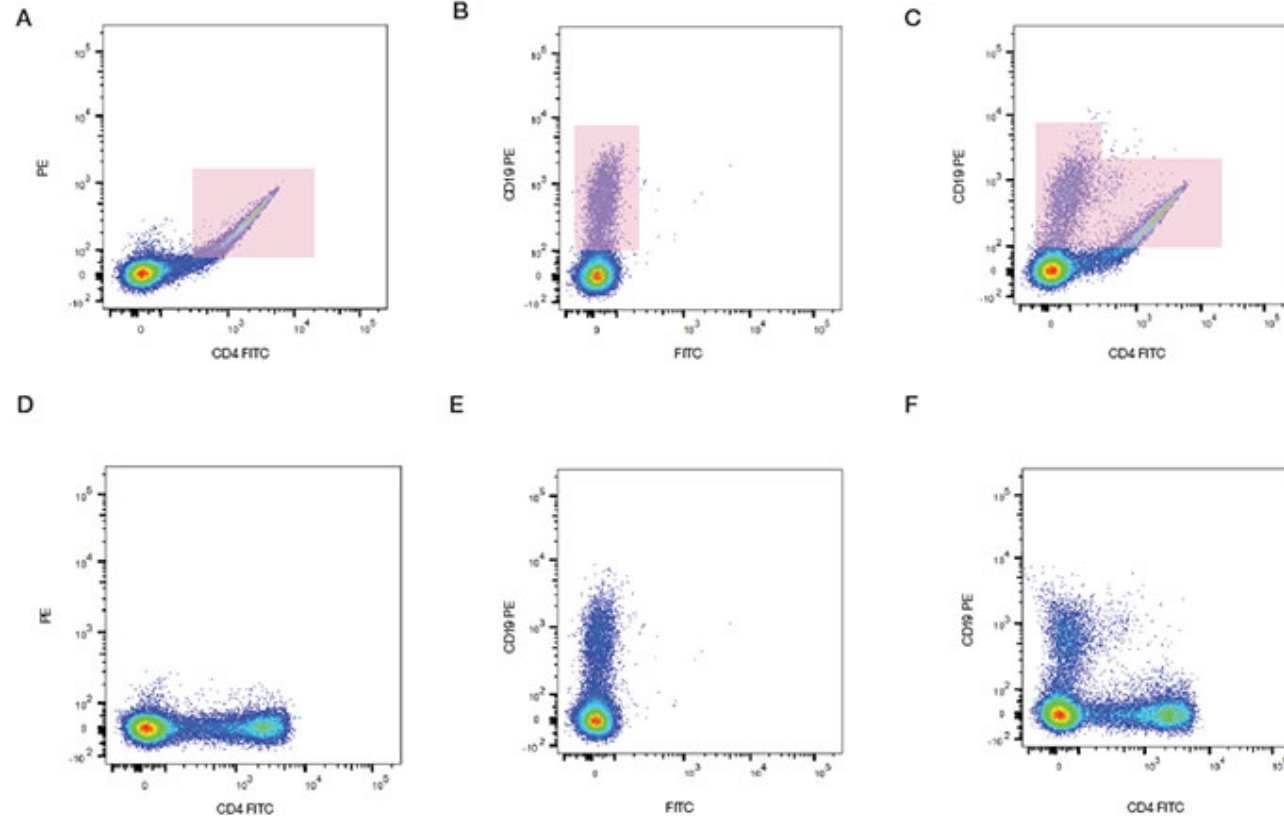
蛍光補正 (コンペンセーション)

【蛍光の漏れ込み】

単染色

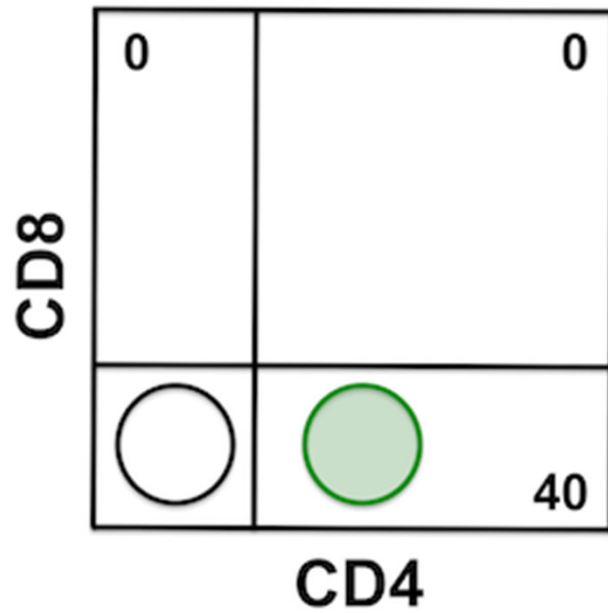
多重染色

【補正前】

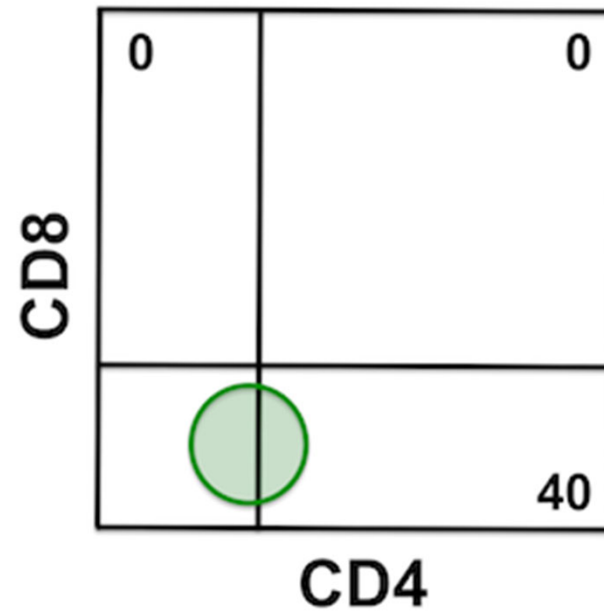


【補正後】

偽陽性



CD4陽性細胞が40%



CD4陽性細胞が40%?

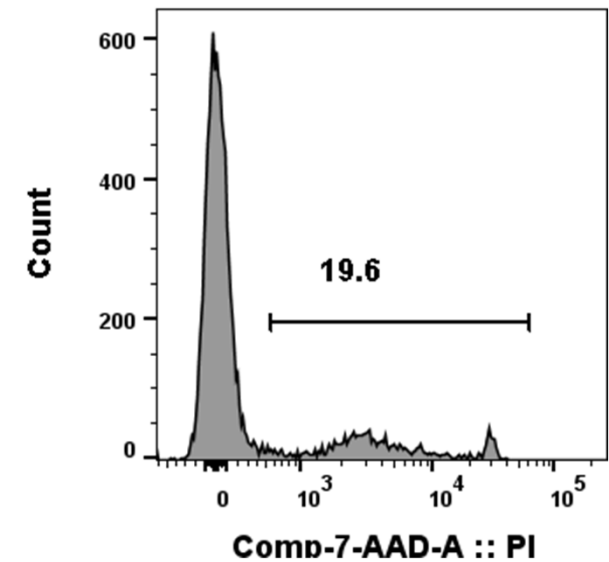
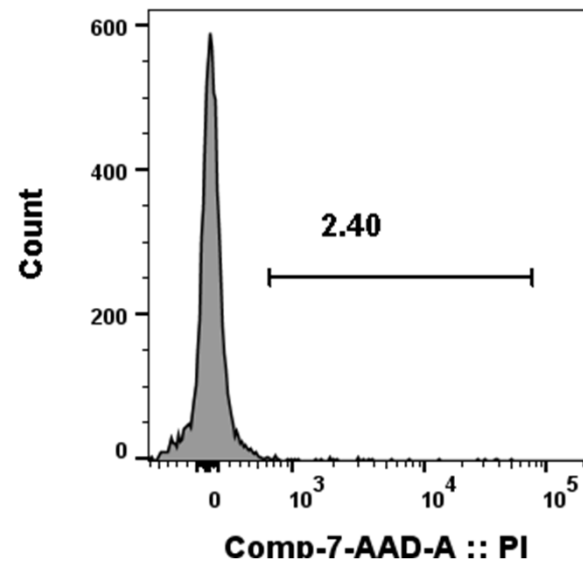
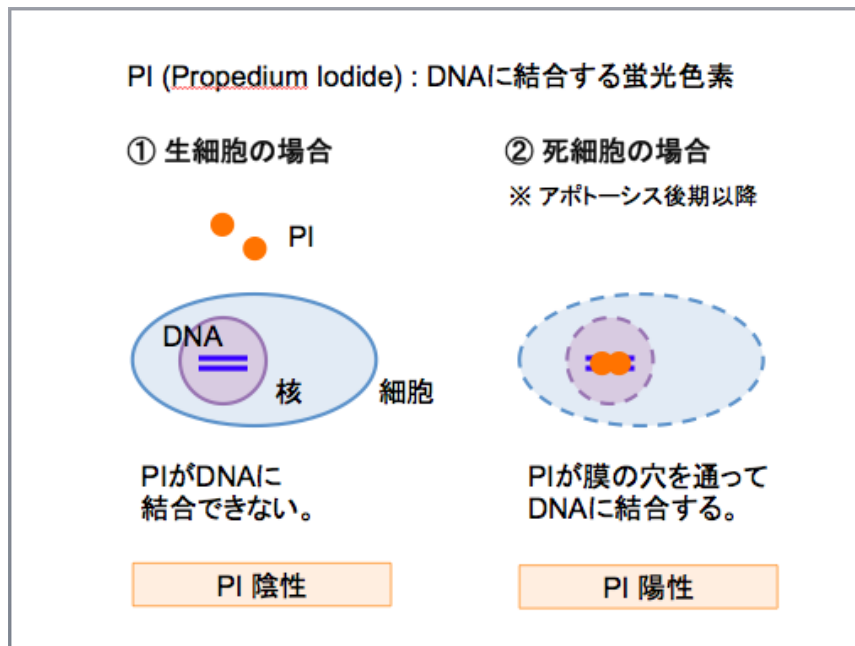
死細胞の除去、アイソタイプコントロールが必要!

死細胞の除去

【死細胞の除去】

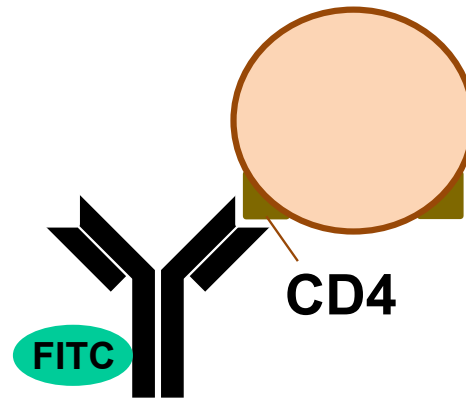
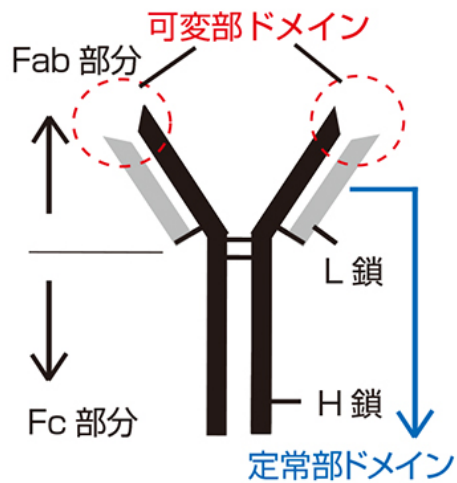
Propidium Iodide (PI) よう化プロピジウム 7-AAD

二本鎖核酸に結合すると蛍光を発する。



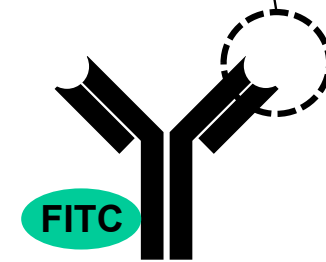
アイソタイプコントロール

図 36-1 抗体の基本構造



Rat IgG1κ

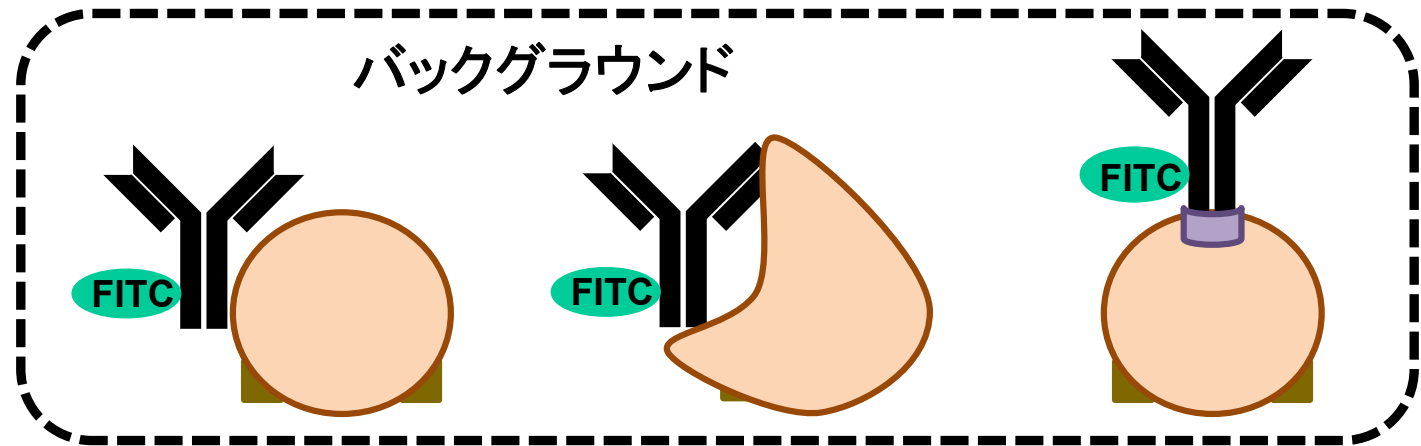
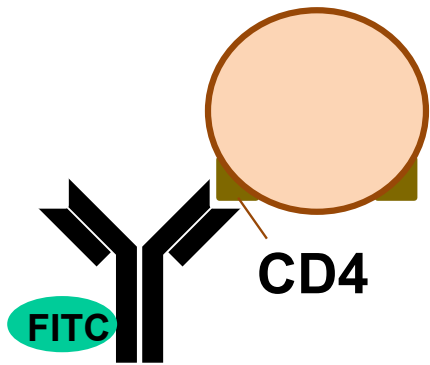
生体内に存在しない抗原に対する抗体(例えばTNP)



Rat IgG1κ

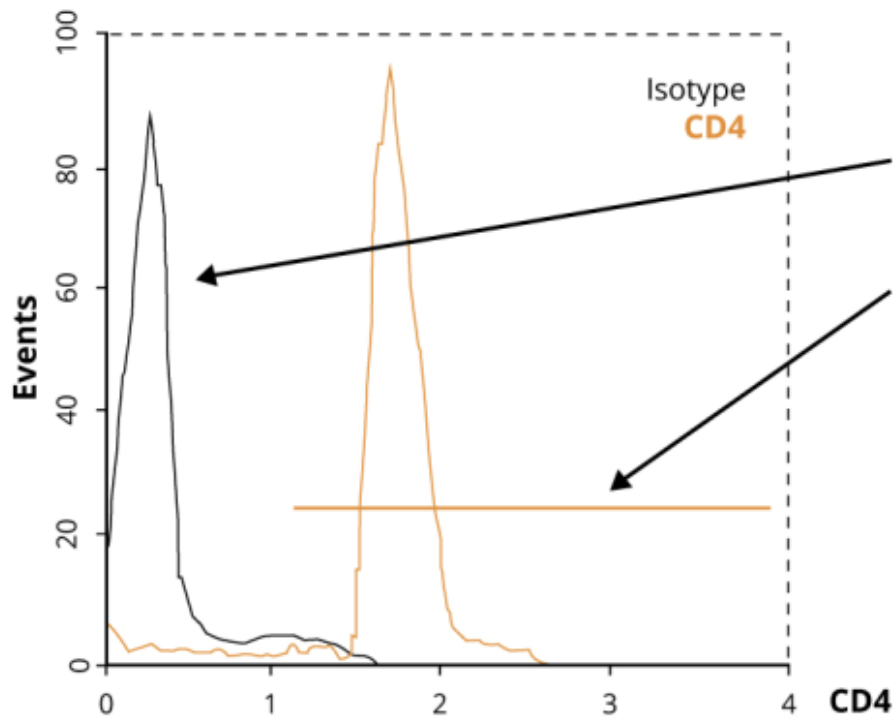
アイソタイプ

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



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

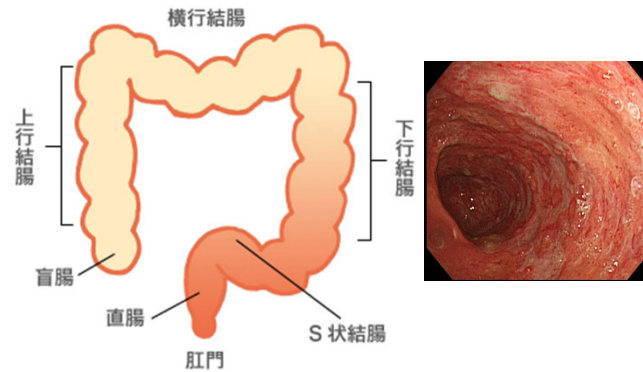
モノクローナル抗体、蛍光漏れ込み補正、偽陽性の除去など

- **フローサイトメトリーの活用法**

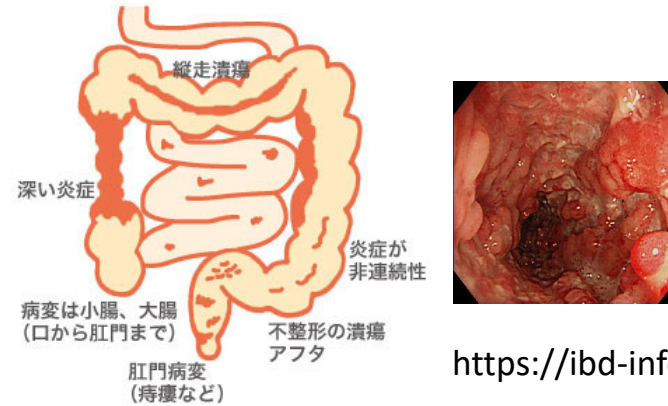
フローサイトメーターの活用法（研究編、臨床編）

炎症性腸疾患 (IBD)

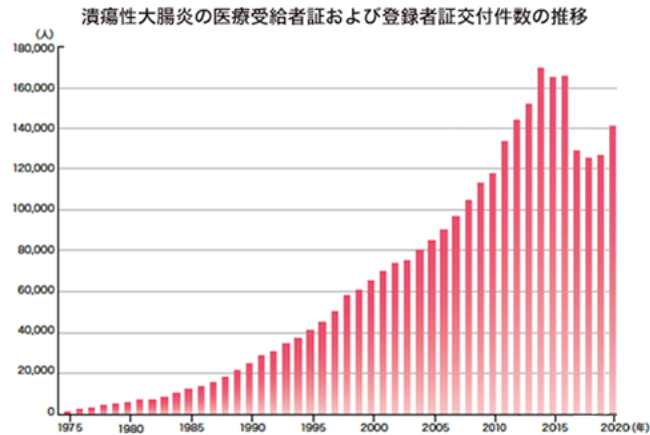
潰瘍性大腸炎



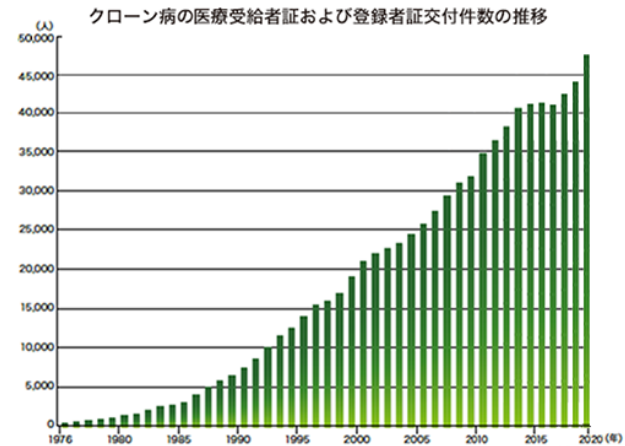
クローン病



<https://ibd-info.jp/ibd/>

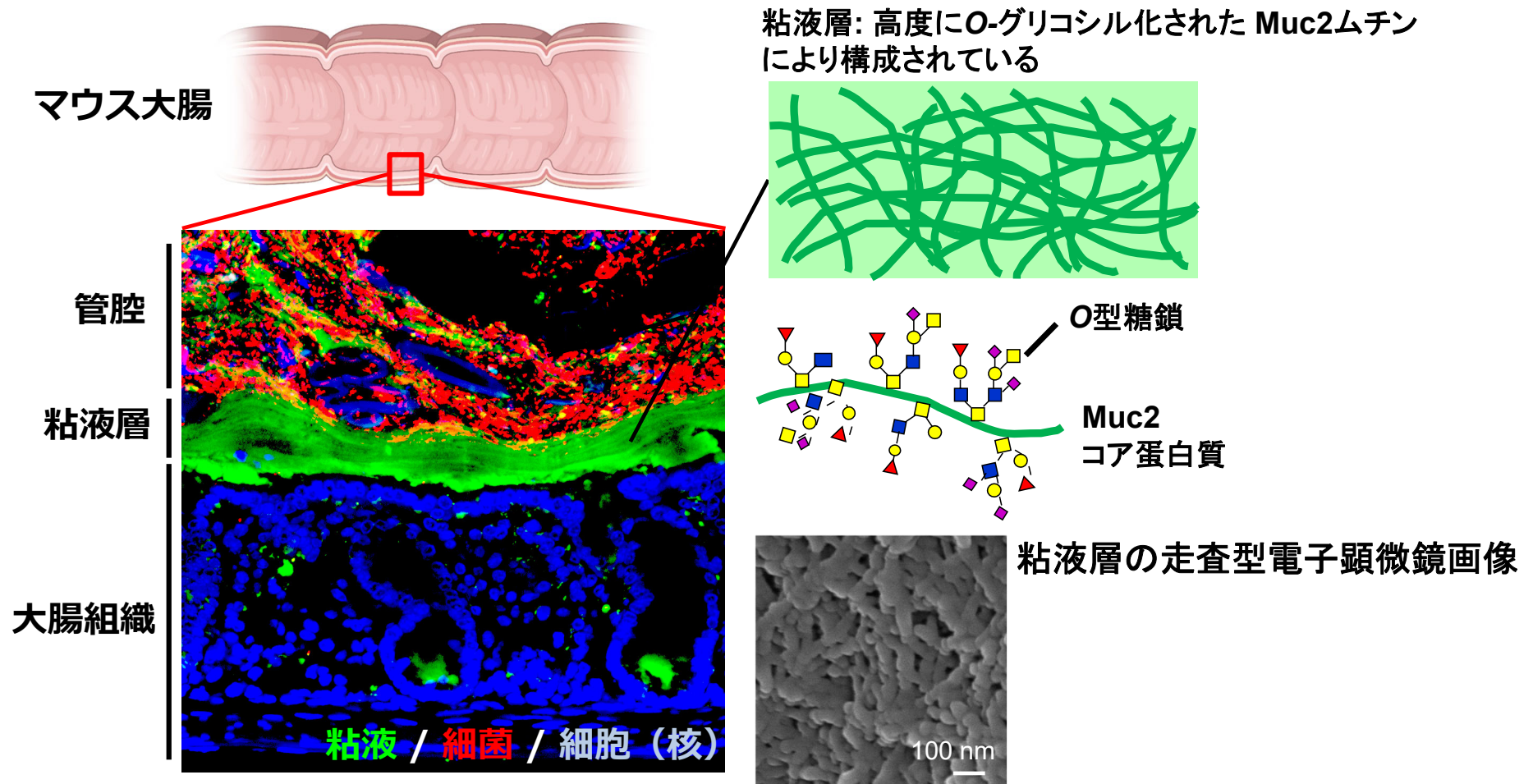


公益財団法人難病医学研究財団運営 (厚生労働省補助事業) の難病情報センターホームページ
特定医療費 (指定難病) 受給者証所持者数から作表

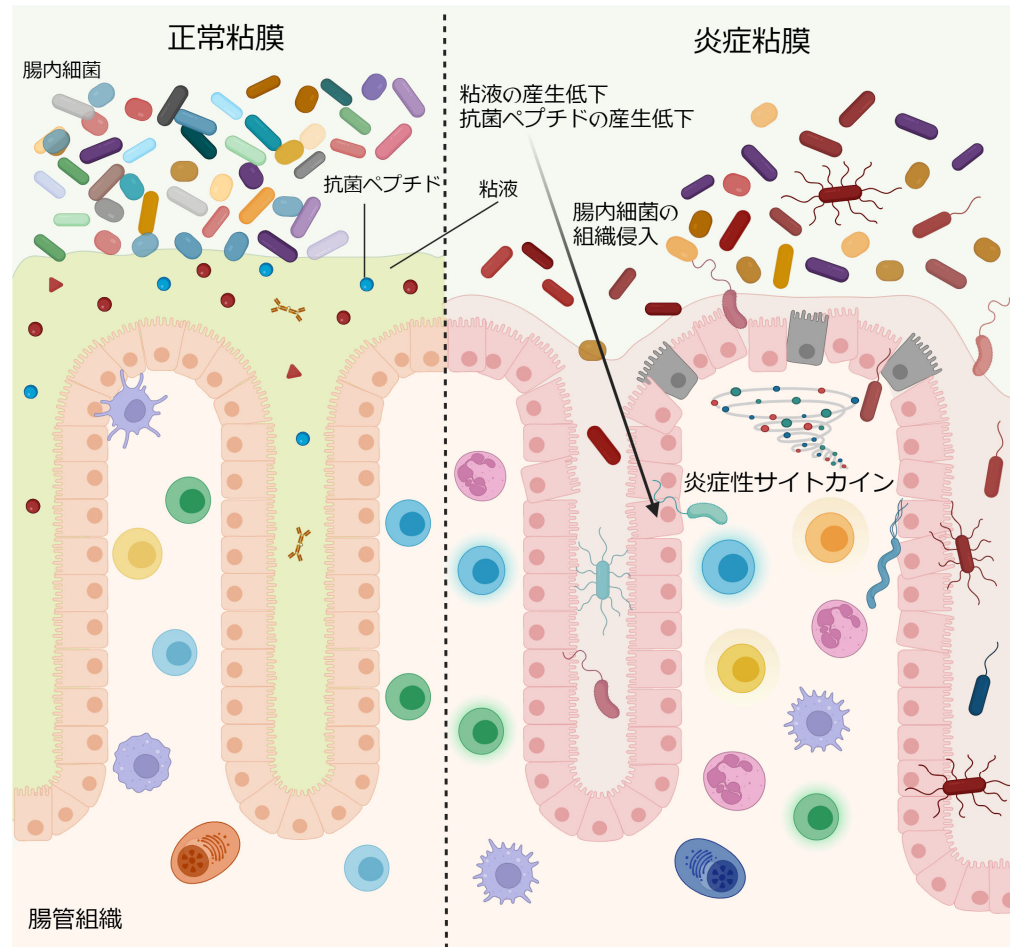


公益財団法人難病医学研究財団運営 (厚生労働省補助事業) の難病情報センターホームページ
特定医療費 (指定難病) 受給者証所持者数から作表

腸粘膜は粘液によって保護されている

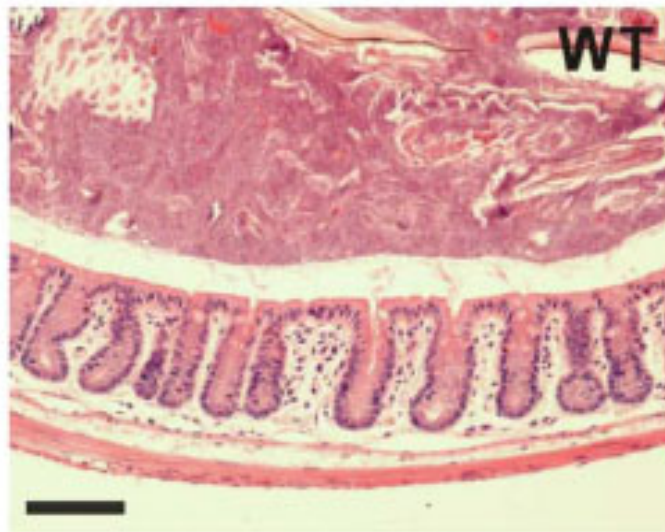


上皮バリアの破綻によるIBD病態モデル

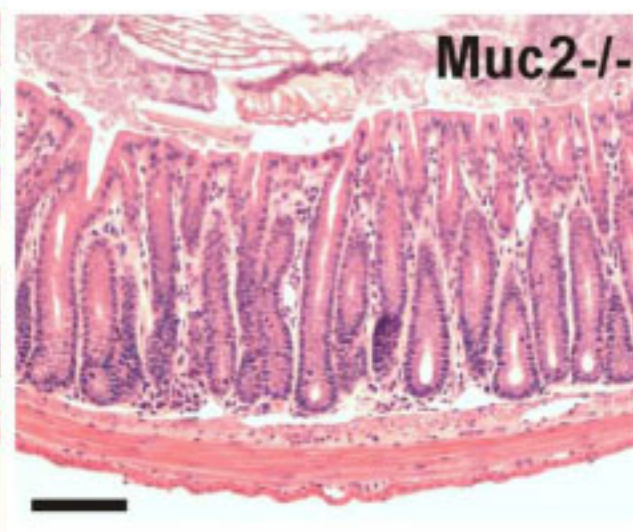


IBDマウスモデル

野生型



ムチン欠損

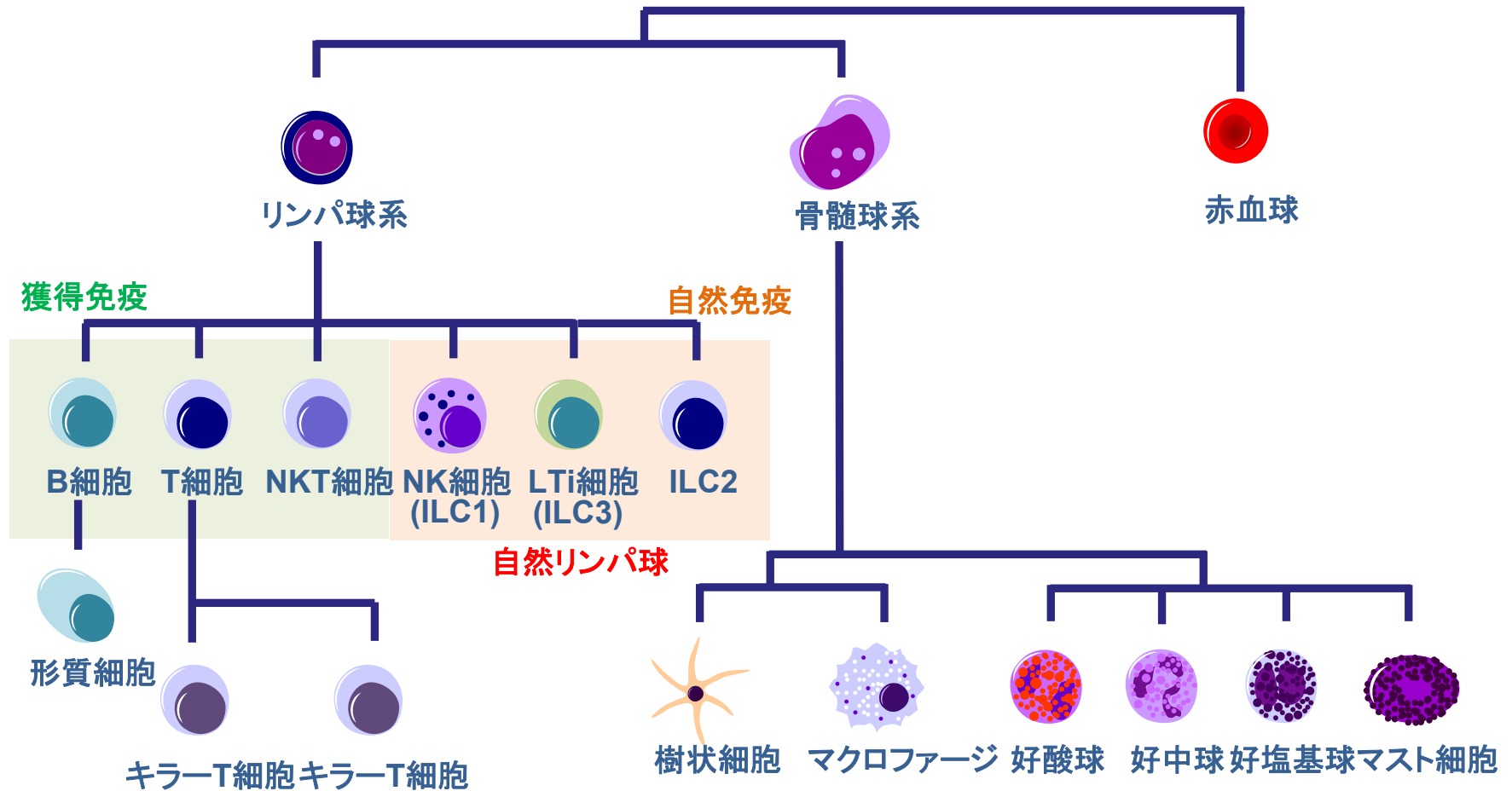


大腸炎を発症



ムチン欠損マウスではどのような免疫細胞が炎症に関与しているか？

免疫細胞サブセット



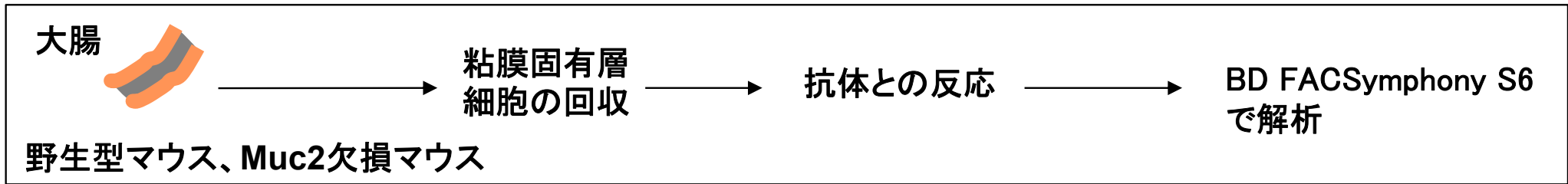
フローサイトメーターを用いた解析例

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 (マウス検体)



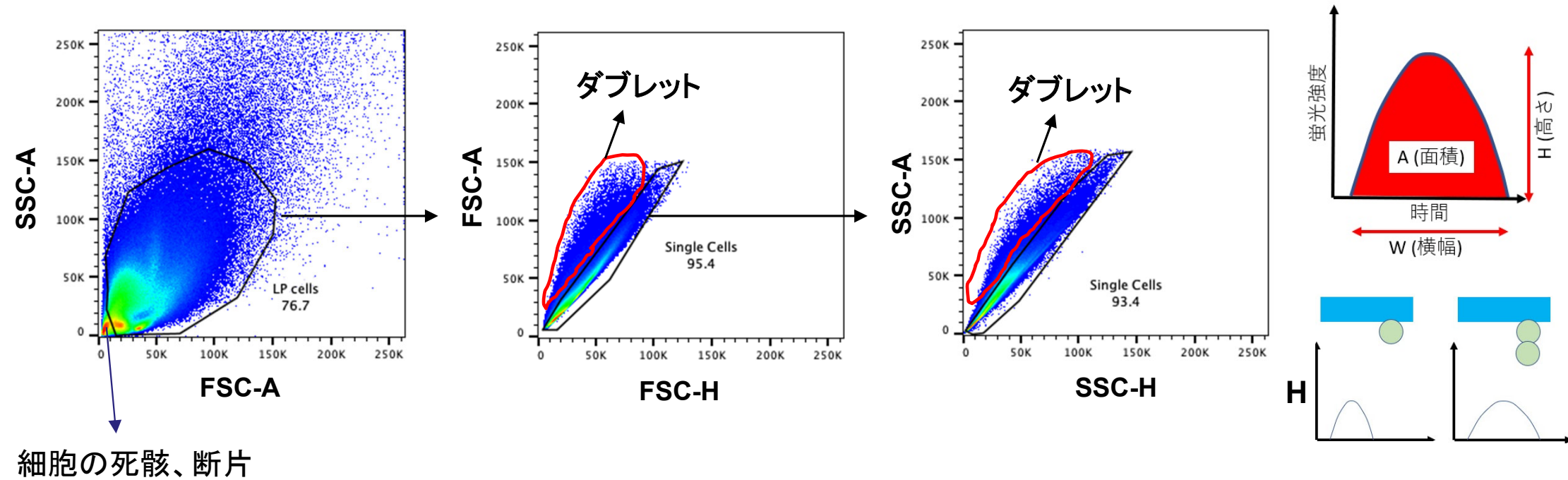
レーザー

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

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

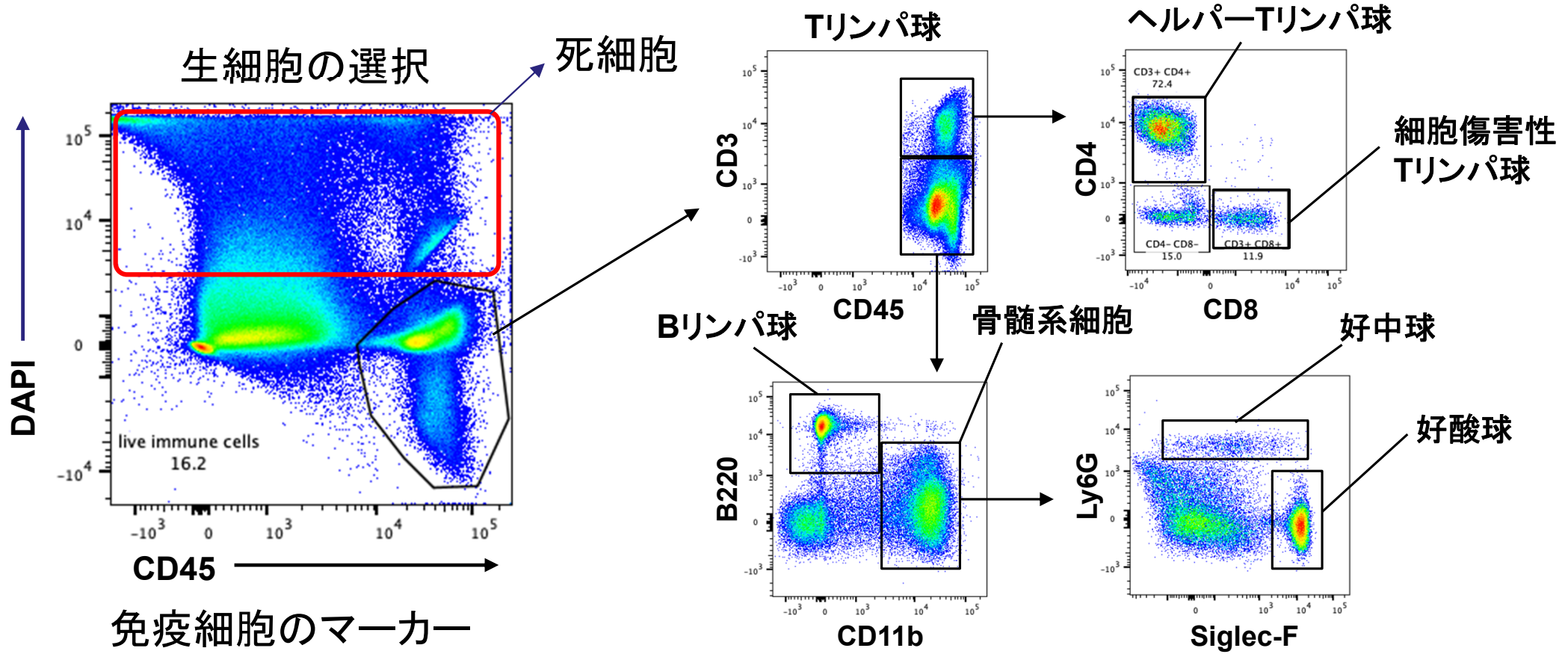
FlowJo® (解析用ソフトウェア) を用いた解析

ダブレット除去

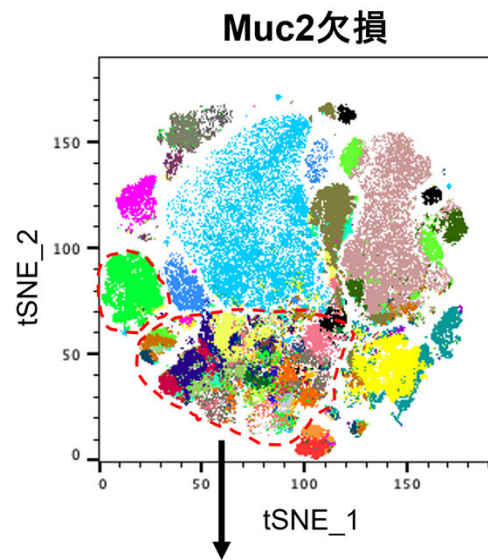
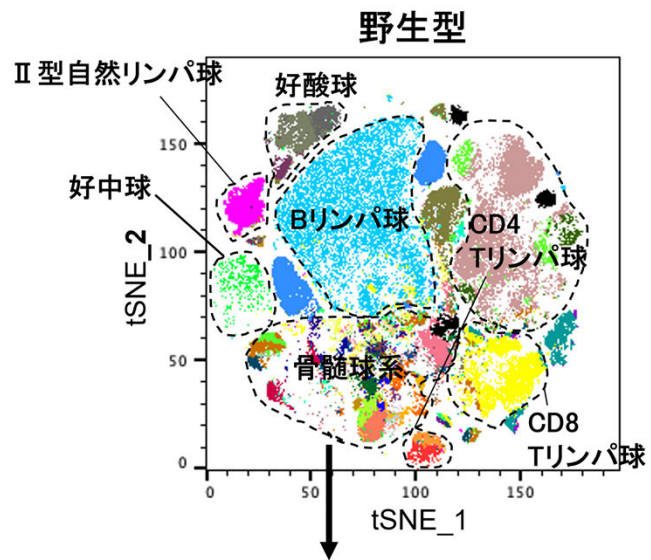


<https://3dnakano.com/facs-pmt-apd/>

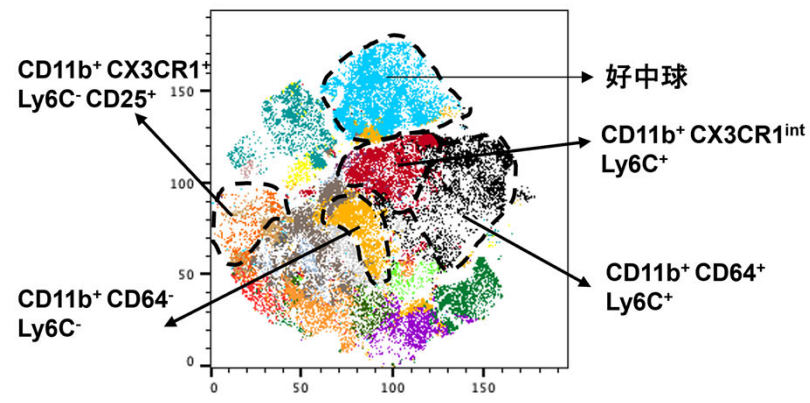
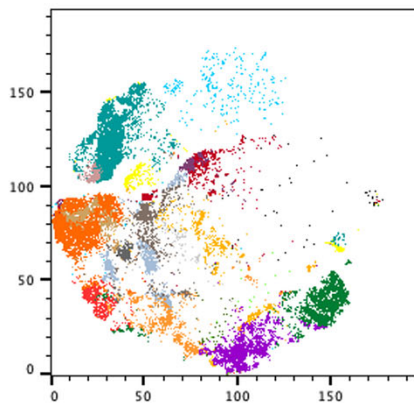
FlowJo® (解析用ソフトウェア) を用いた解析



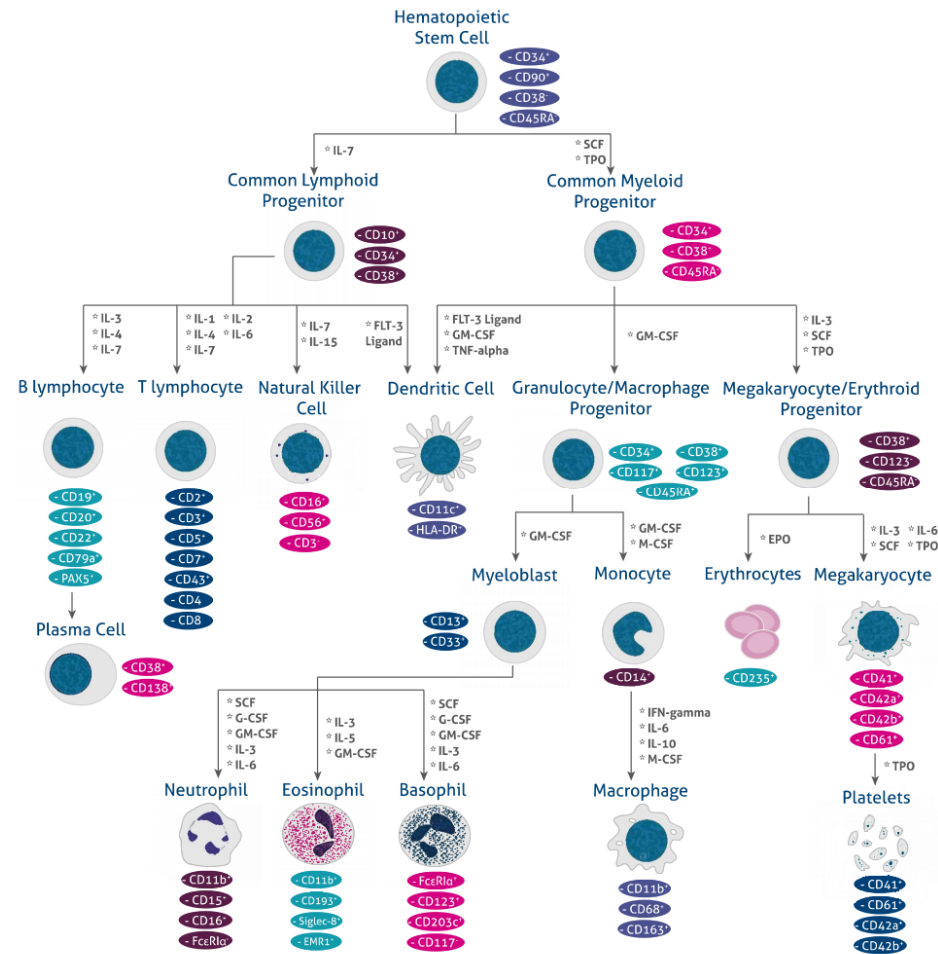
FlowJo® (解析用ソフトウェア) を用いた解析



網羅的な免疫細胞サブセットの解析が可能

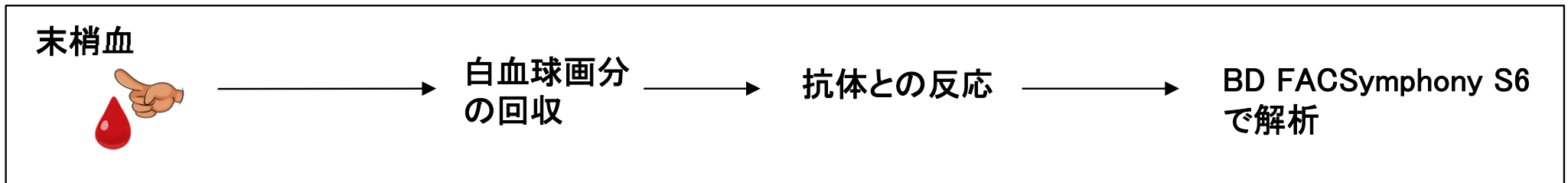


免疫細胞表面マーカー (ヒト)



コスモバイオHPより

フローサイトメーターを用いた解析例 (ヒト検体)

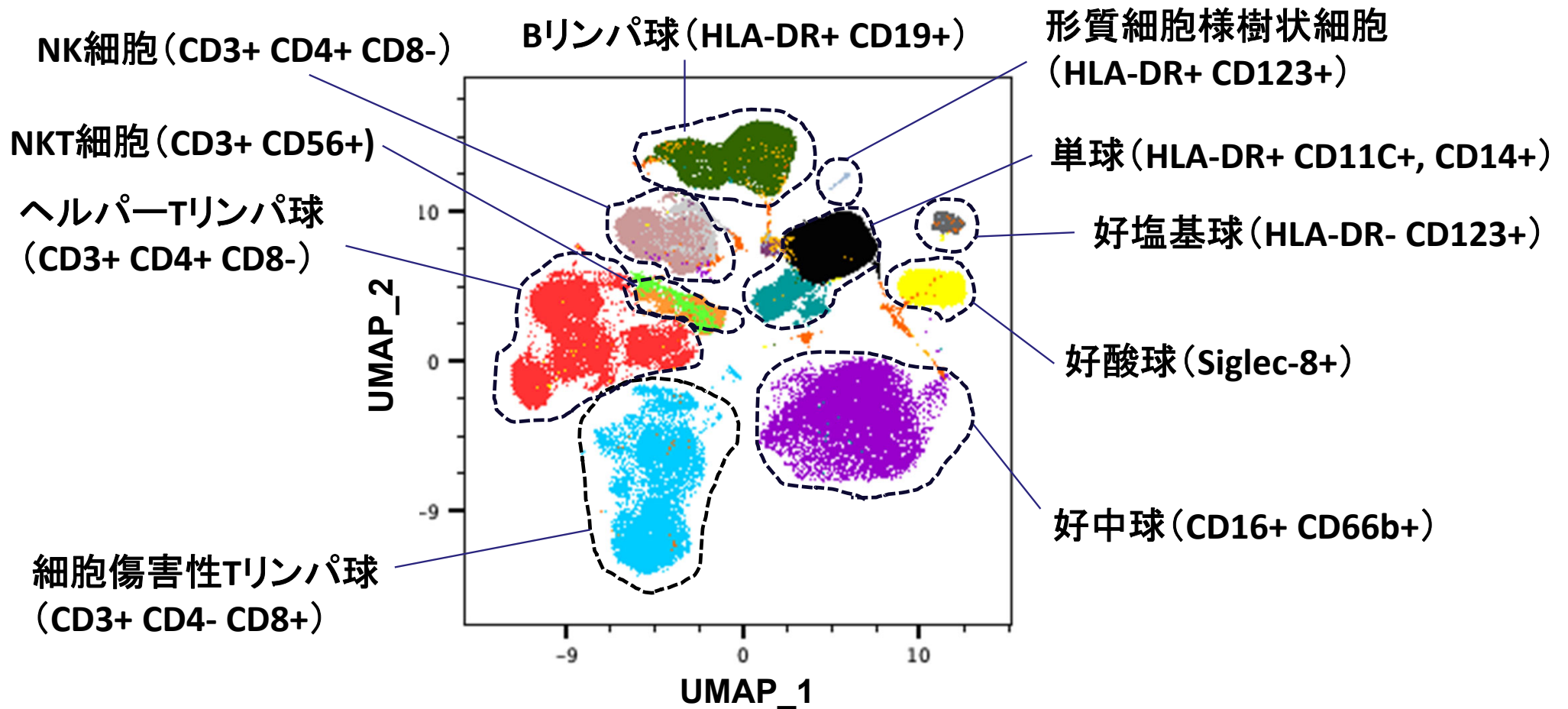


レーザー

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

355nm	BUV395 CD45	DAPI DAPI	BUV496 CD16	BUV563 CD14	BUV615 Siglec-8	BUV661 CD163	BUV737 CD161	BUV805 CD86	
405nm		BV421 CD3	BV480 CD4	BV570 CD19	BV605 CD8	BV650 CD123	BV711 CD88	BV750 CD11C	BV786 CCR7
488nm			BB515 CD45RA		BB630	BB660	BB700 CD66b	BB755 CD103	BB790
561nm			PE CD207	PE- CF594 CD206	PE-Cy5 CD25	PE- Cy5.5 CD56		PE-Cy7 CD27	
633nm					APC XCR1	R718 CD127		APC-Cy7 HLA-DR	

フローサイトメーターを用いた解析例 (ヒト検体)



フローサイトメーターを用いた解析例 (ヒト検体)

BD FACSDiscover S8



大阪大学 CiDER



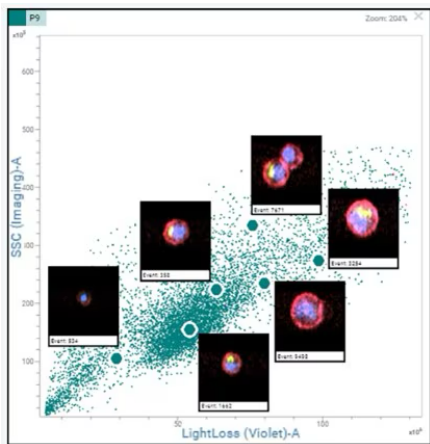
画像解析機能を備えた次世代の
スペクトルフローサイトメーター

リアルタイムのフローサイトメリー
解析データと、形態学的画像情報
の統合が可能

イメージングデータから10項目以上の
新規パラメーターが取得可能

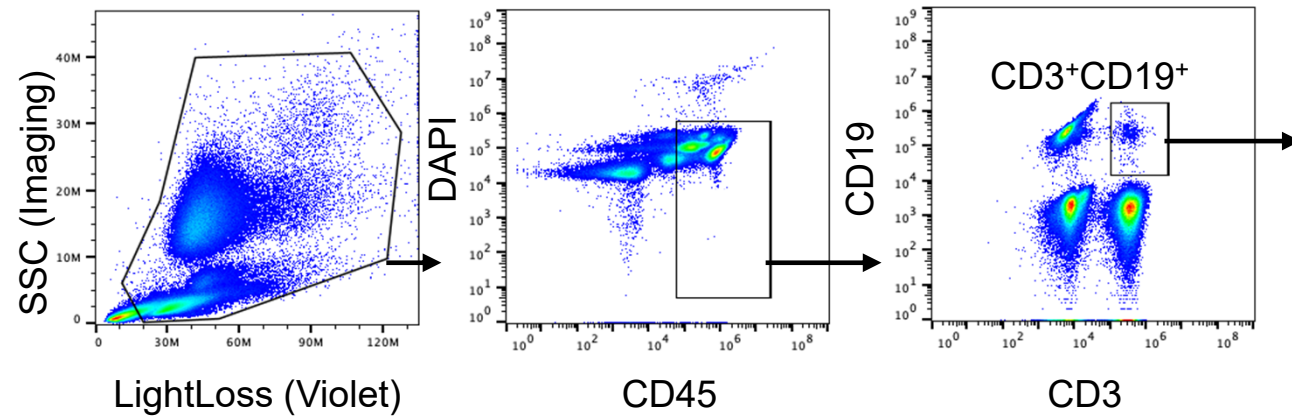


イメージングデータを統合したより
深い解析が可能



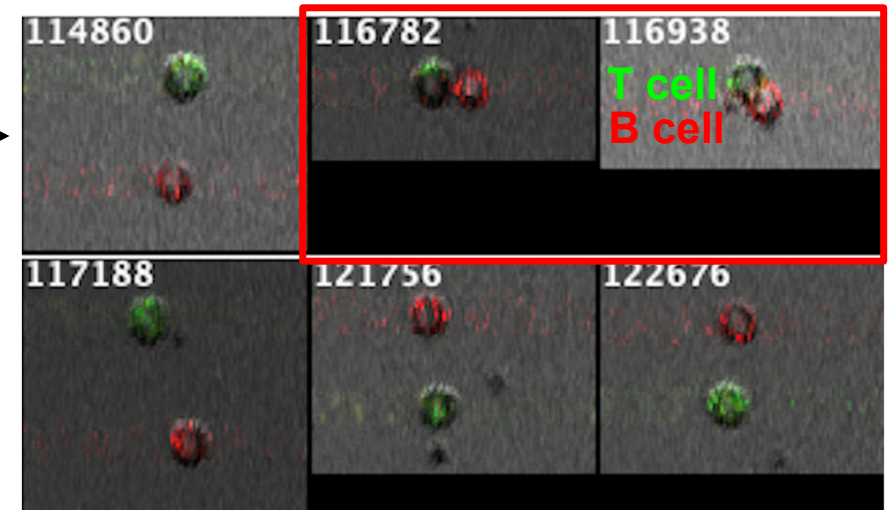
フローサイトメーターを用いた解析例 (ヒト検体)

健常者の末梢血サンプル



CD19 CD3

物理的接着複合体



偶発的ダブレット

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。

Enjoy your research !