

フローサイトメーターのアプリケーション

田口 雄亮 (TAGUCHI Yusuke, Ph.D)
日本ベクトン・ディキンソン株式会社
BDライフサイエンス-バイオサイエンス事業部
アプリケーションサポートグループ



BD, the BD Logo and all other trademarks are trademarks of Becton, Dickinson and Company or its affiliates. © 2022 BD. All rights reserved.

機器および試薬使用上の注意

医療機器及び体外診断用医薬品については、

事前に添付文書及び製品に添付の取扱説明書（マニュアル）を必ず読み、本製品の注意事項等を守り使用方法に従って正しくご使用ください。

研究用機器及び研究用試薬については、

使用前に製品添付のマニュアル、またはテクニカルデータシートを必ず読み、製品の注意事項等を守り、記載方法にしたがって正しくご使用ください。



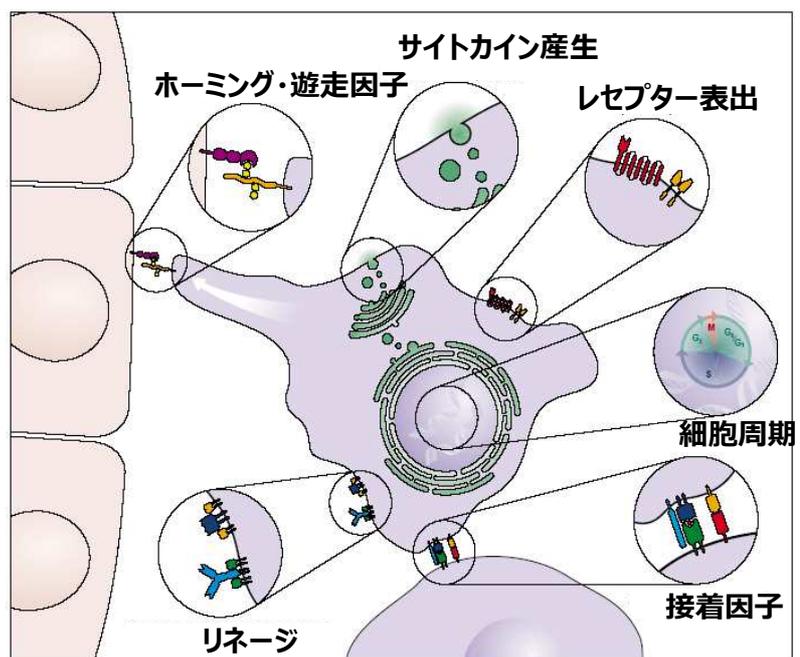
FCMの利用

ヘテロな細胞集団から、特定の性質を持っている細胞集団を同定し、その機能を解析することができます



FCMのアプリケーションの代表例

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

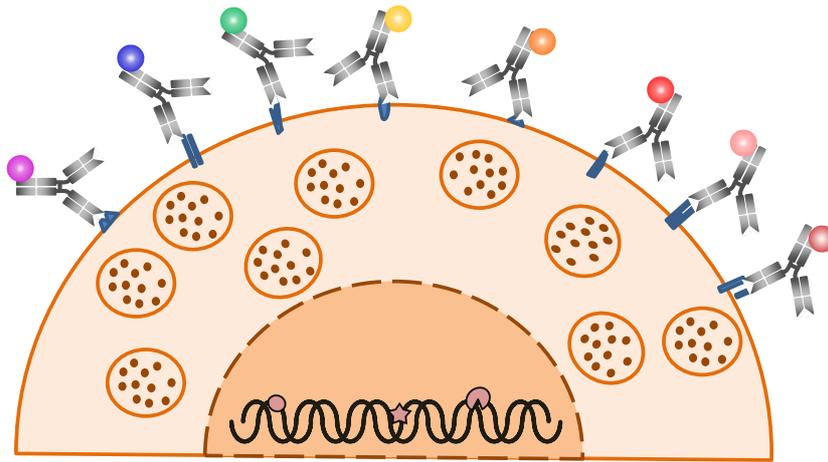
① 細胞表面抗原の解析

主な細胞表面抗原

- ✓ 細胞膜構成タンパク
- ✓ レセプター
- ✓ 接着因子
- ✓ トランスポーター

Cluster of Differentiation (CD分類)

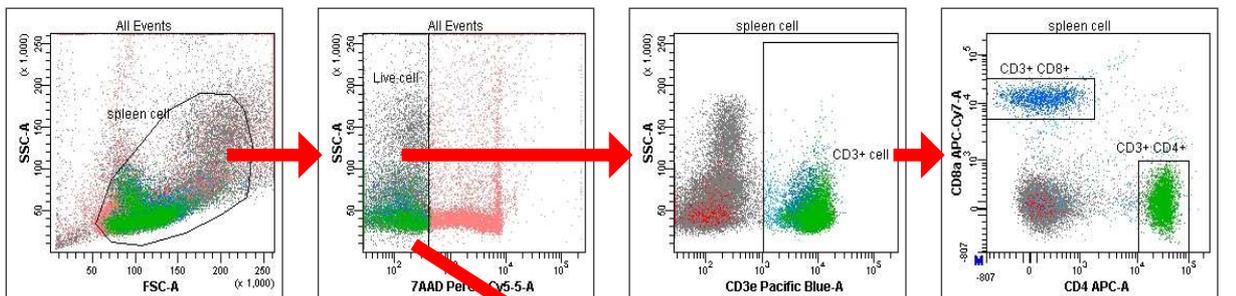
細胞表面抗原解析に多用されるモノクローナル抗体の国際分類。同一抗原に対する複数の抗体クローンが存在するため、現在では多くの場合分類名をそのまま抗原名として使用する。HLDAおよびHCDMワークショップ (1982年～) により決定された。



細胞表面抗原の解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

リンパ球サブセットの解析例



散乱光で目的細胞をゲートング

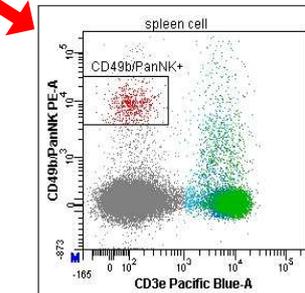
死細胞除去

CD3陽性 T細胞

CD4、CD8陽性 T細胞

Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	50,000		100.0
Spleen cell	35,450	70.9	70.9
Live cell	32,597	92.0	65.2
CD3+ cell	10,201	31.3	20.4
CD3+ CD8+	2,988	29.3	6.0
CD3+ CD4+	6,261	61.4	12.5
CD49b/PanNK+	492	1.5	1.0
Dead cell	14,550	29.1	29.1

サンプル中の割合を数値化



CD49b陽性 PanNK細胞

C57BL/6J ♂ 6-wk Splenocytes
 CD3e-Pacific Blue™
 CD4-APC
 CD8a-APC-Cy™7
 CD49b/Pan-NK-PE
 7-AAD



表面抗原染色後のソーティング

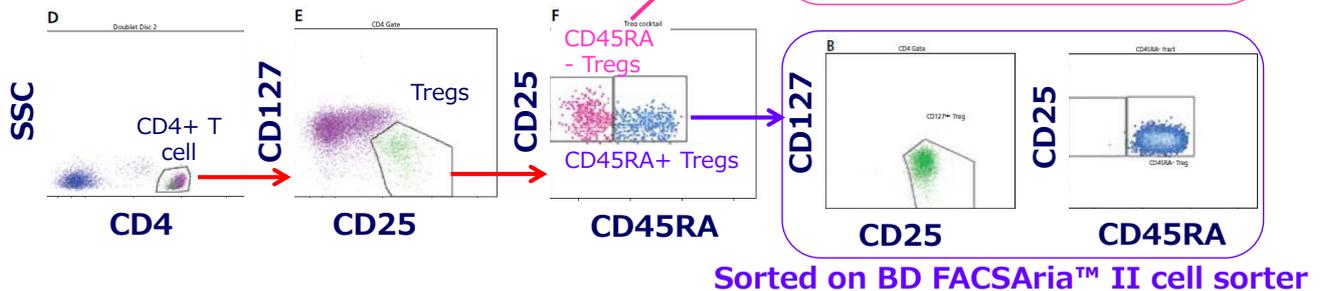
- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

Human Tregの解析・ソーティング

Application Note

Human Regulatory T-Cell Isolation and Measurement of Function

Christopher Boyce, BS,* Cynthia Lane, PhD,*
 Ravi Hingorani, PhD,* Catherine McIntyre, PhD,**
 Joyce Ruitenberg, BS,** Smita Ghanekar, PhD**
*BD Pharmingen, San Diego, **BD Biosciences, San Jose



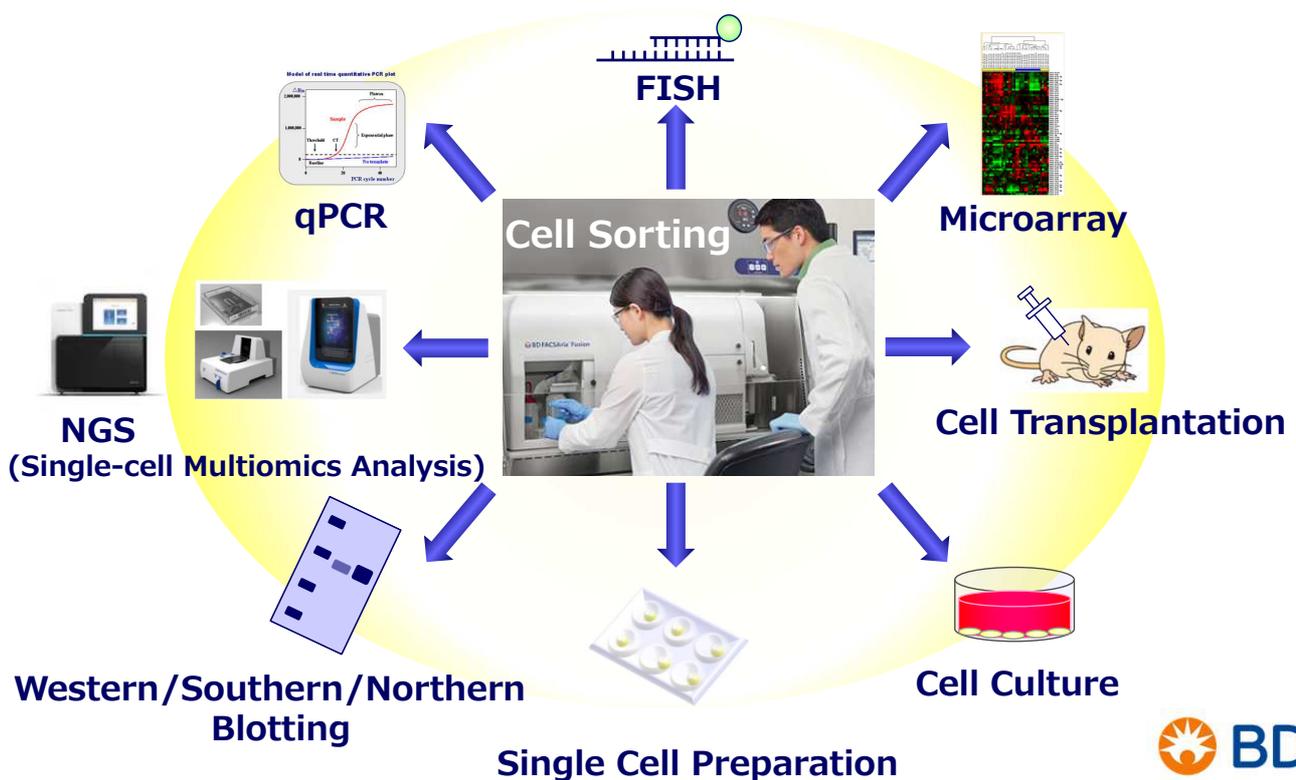
※このApplication Noteは以下のURLで入手できます

https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/Human_Reg_Tcell_Isolation_Measurement.pdf



ソーティング後の細胞の利用例

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



蛍光色素の種類

現在多くの蛍光色素がフローサイトメーターで使用できます
 蛍光色素によって励起特性、蛍光特性、**輝度**が異なります

Laser	Fluorochrome			
	Very Bright	Bright	Moderate	Dim
Ultraviolet (355 nm)		BD Horizon™ BUV563 BD Horizon™ BUV661 BD Horizon™ BUV737	BD Horizon™ BUV395 BD Horizon™ BUV496	BD Horizon™ BUV805
Violet (405 nm)	BD Horizon™ BV421 BD Horizon™ BV650 BD Horizon™ BV711	BD Horizon™ BV480 BD Horizon™ BV605 BD Horizon™ BV786	BD Horizon™ BV510	BD Horizon™ V450 BD Horizon™ V500
Blue (488 nm)	BD Horizon™ BB515 BD Horizon™ BB700 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 BD Horizon™ APC-R700		Alexa Fluor® 700 APC-H7 APC-Cy7

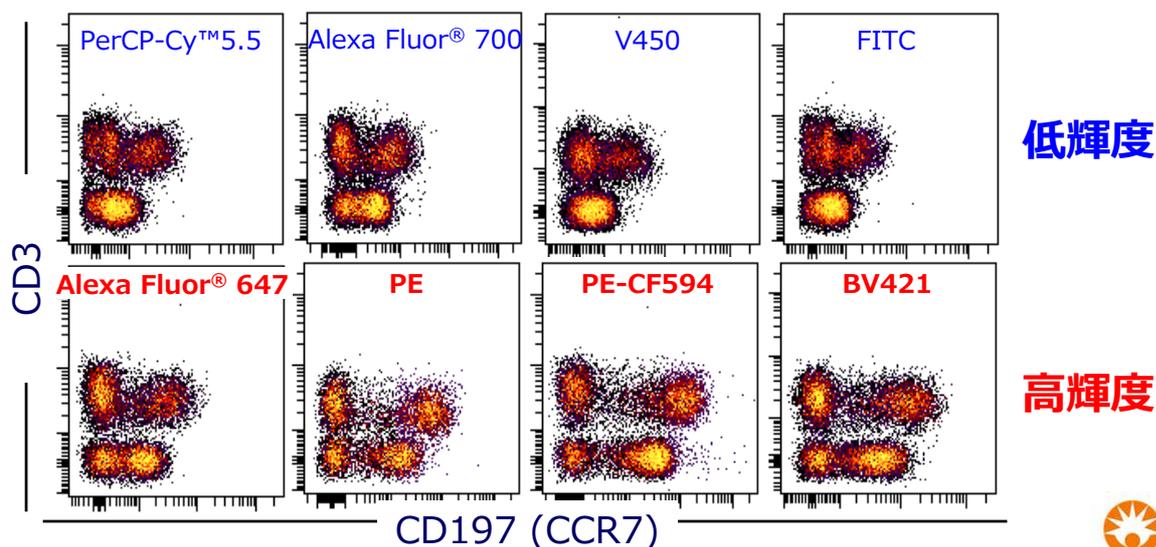
参照 : <https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/Fluorochrome-Chart-Relative-Brightness.pdf>



蛍光色素の選択によって分離度が変わる

特に低発現の抗原を測定する際に、色素の選択によっては明確な結果が得られない場合があります

低発現の抗原には高輝度の蛍光色素を使用します



①	細胞表面抗原の解析
②	細胞内抗原の解析
③	蛍光タンパク質の発現
④	細胞周期解析
⑤	細胞増殖解析
⑥	アポトーシス解析
⑦	サイトカイン定量

② 細胞内抗原の解析

細胞内抗原の種類

- サイトカイン
- 転写因子
- リン酸化タンパク質 など

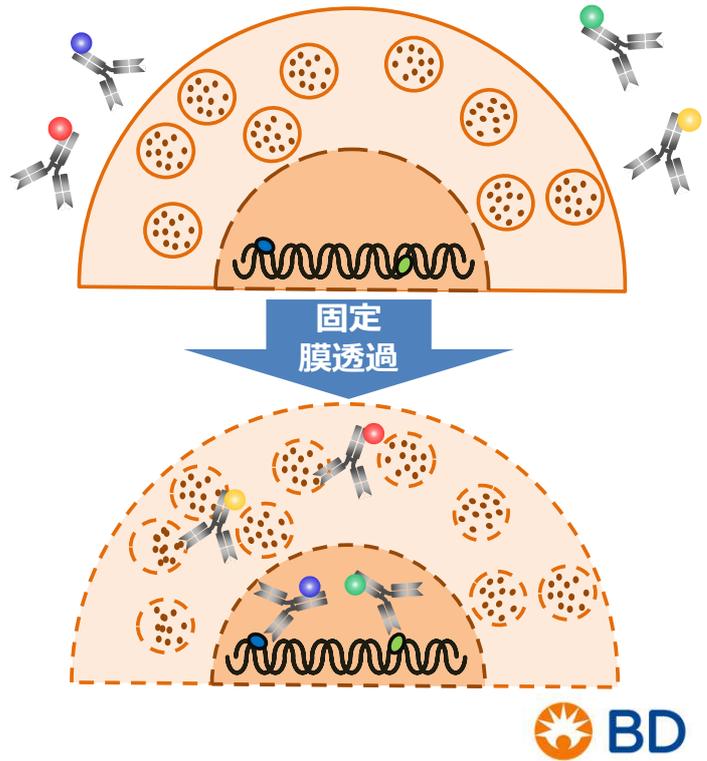
細胞を固定し、細胞膜透過処理によって、抗体や核染色剤が細胞内抗原にアクセスできるようになります

固定剤

- エタノール
- メタノール
- パラホルムアルデヒドなど

膜透過剤

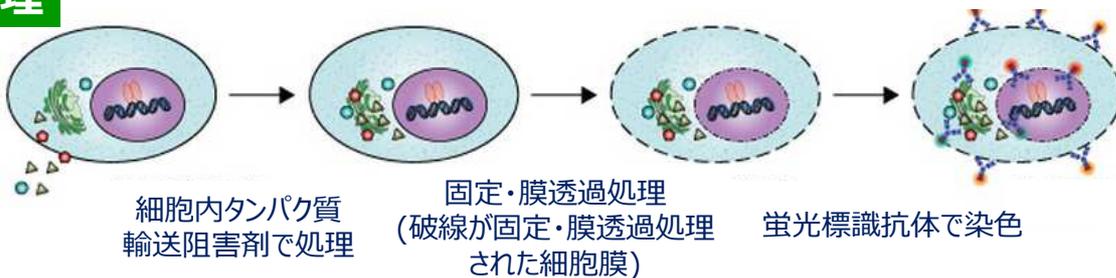
- サポニン
- Triton-X など



細胞内サイトカイン

①	細胞表面抗原の解析
②	細胞内抗原の解析
③	蛍光タンパク質の発現
④	細胞周期解析
⑤	細胞増殖解析
⑥	アポトーシス解析
⑦	サイトカイン定量

原理



動物種	サイトカイン	細胞内タンパク輸送阻害剤
ヒト	IL-1α, IL-6, IL-8, TNF-α	BD GolgiStop™ Protein Transport Inhibitor (Containing Monensin) (Cat#554724)
ヒト	IFN-γ, IL-2, IL-10, IL-12, MCP-1, MCP-3, MIG, MIP-1α, RANTES	Monensinまたは BD GolgiPlug™ Protein Transport Inhibitor (Containing Brefeldin A) (Cat#555029)
マウス	IL-6, IL-12, TNF-α	Brefeldin A
マウス	GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-5, IL-10	Monensin
マウス	IFN-γ, IL-2	Monensin またはBrefeldin A

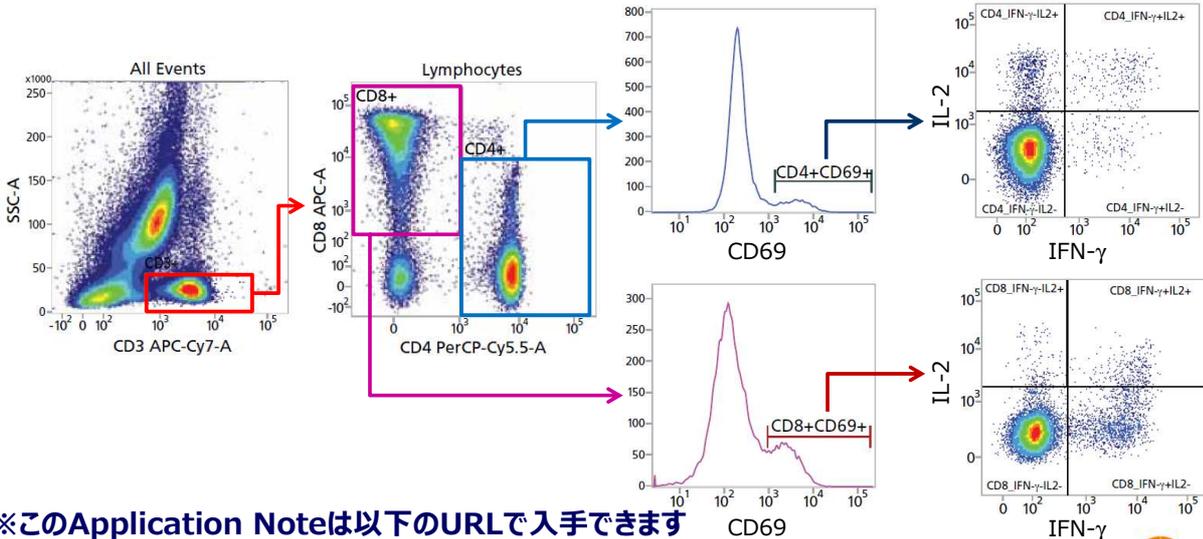


サイトカイン産生細胞解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

細胞表面抗原染色との併用により、サイトカイン産生細胞のPhenotypeを解析することができます

細胞が希少な場合でもサイトカイン産生を検出できます



※このApplication Noteは以下のURLで入手できます

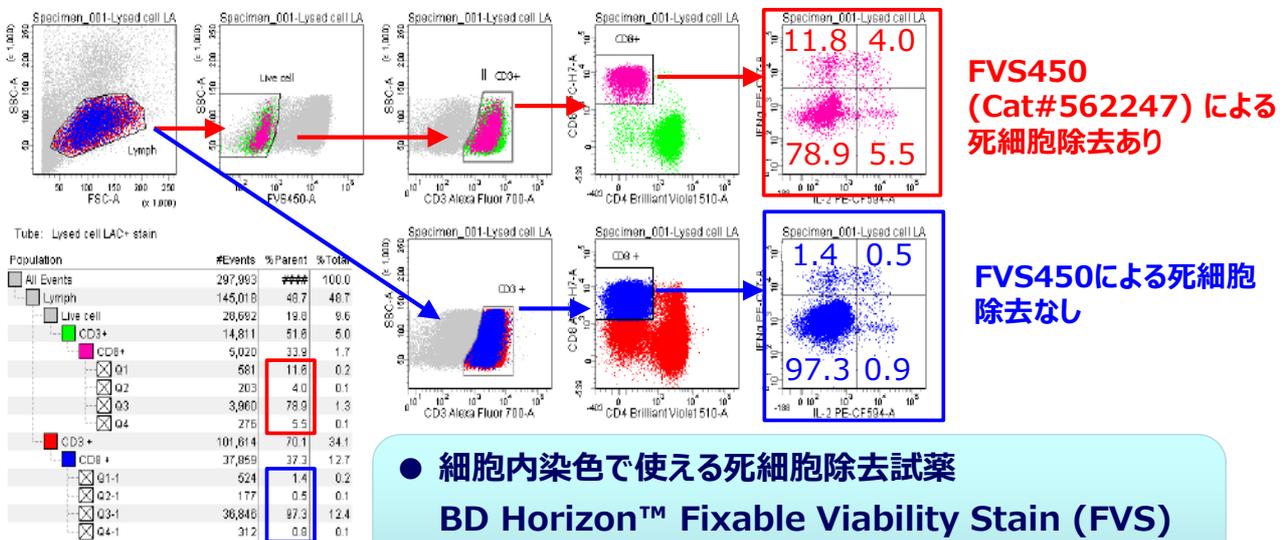
https://www.bdbiosciences.com/content/dam/bdb/marketing-documents/BD_FACSVerse_IntracellularCytokines_Detection_T_Lymphocytes_AppNote.pdf



死細胞除去 + 細胞内サイトカイン

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

アミン結合性の死細胞除去試薬は固定サンプルでも使用可能です。死細胞への抗体の非特異結合による分離低下を回避できます。



- 細胞内染色で使える死細胞除去試薬
BD Horizon™ Fixable Viability Stain (FVS)
- その他、豊富なFVS製品ラインナップがあります



転写因子、サイトカイン 関連製品

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

FoxP3、ROR γ t、T-betをはじめとする転写因子検出の改善

BD Pharmingen™ Transcription Factor Buffer Setは、制御性T細胞のマスター制御因子FoxP3 (ヒトおよびマウス) やROR γ t (マウス)、Bcl-6 (マウス) などの測定に適しています。また、INF- γ やIL-4、IL17-Aといったような多くのサイトカインにも使用することができます。

検体処理が簡便・迅速

本試薬は、4x transcription factor (TF) fixation/permeabilization bufferとTF 0.75x diluent、TF 5x permeabilization/wash bufferで構成されています。**検体処理は簡便で、インキュベーションを2ステップで行うだけ**です。細胞表面染色のあと、40分の固定・細胞膜透過処理をして洗浄し、40分細胞内染色します。膜透過の追加処理は不要です。

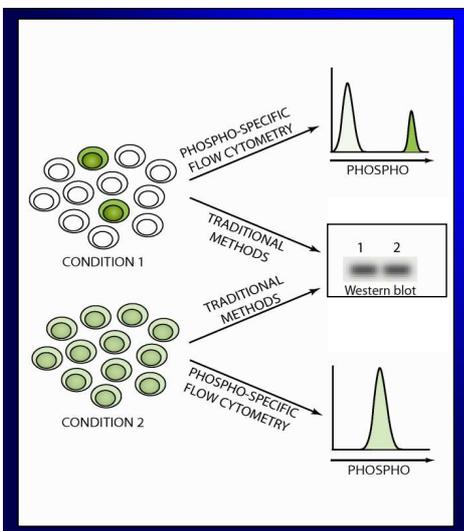
名称	カタログ番号	名称	カタログ番号	名称	カタログ番号	名称	カタログ番号
Bcl-2	556357, 556535 560637	FoxP3	560403, 560408	IL-17A	560666	ROR γ t	562607
Bcl-6	561524, 561525	GATA3	560074	Ki-67	561165, 558616 556003, 556027	SATB1	562378
FoxP3	560047, 560889 560046, 560459 561181, 561184 560852, 561493	H2AX (pS139)	560445, 560447	Nanog	560277	Sox1	561592, 561549
		IFN- γ	554700, 554411 554413	Nestin	560393	Sox2	560294, 561506
		IL-4	561233	Oct3/4	560794	T-Bet	561264, 561262 561268
		IL-17A	560487, 560486	Pax-6	561664	THEMIS	562588



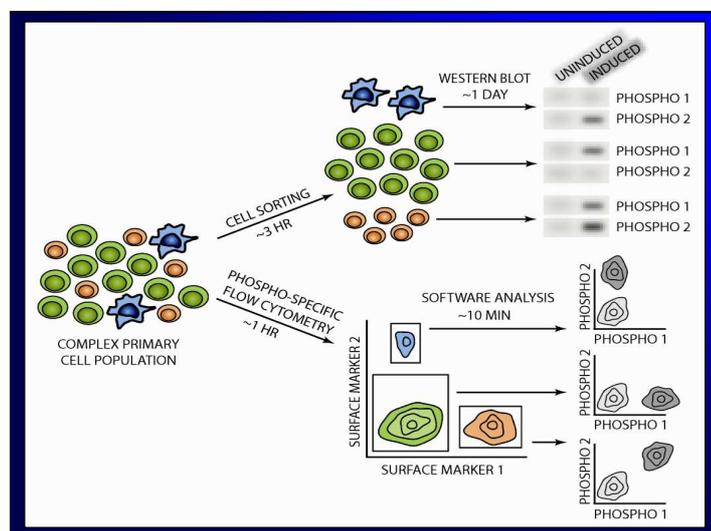
BD Phosflow™ テクノロジーによる細胞内リン酸化タンパク質の解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

- 単一細胞レベルでのリン酸化タンパク質解析が可能です。表面マーカーと組み合わせ、目的の細胞集団中のリン酸化タンパク質解析ができます。
- Western Blot法よりも簡便で短時間、かつ少数の細胞で測定可能です。



SINGLE-CELL RESOLUTION



MULTIPARAMETRIC DATA ANALYSIS

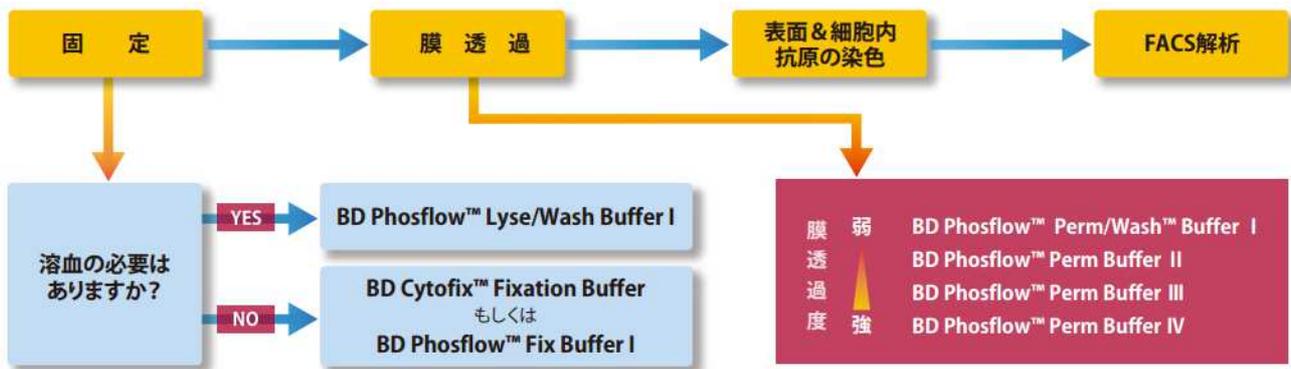


リン酸化タンパク質解析の標準プロトコル

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

標準プロトコルでは表面抗原および細胞内抗原の染色を同時に行います※1

2種類の固定剤と4種類の膜透過剤があり、目的の解析対象に基づいて選択します※2



※1 抗原によっては、固定、膜透過、染色のタイミングが異なるプロトコルを使用する必要があります。詳細は弊社までお問い合わせください。

※2 製品データシートに推奨バッファの記載があります



固定剤と膜透過バッファ

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

サンプルの種類と推奨固定剤

サンプルの種類	固定剤
全血、脾臓細胞、その他の赤血球を含むサンプル	BD Phosflow™ Lyse/Fix Buffer 5x (Cat#558049)
PBMC、細胞株	BD Cytofix™ Fixation Buffer (Cat#554655)

膜透過バッファの種類と性質

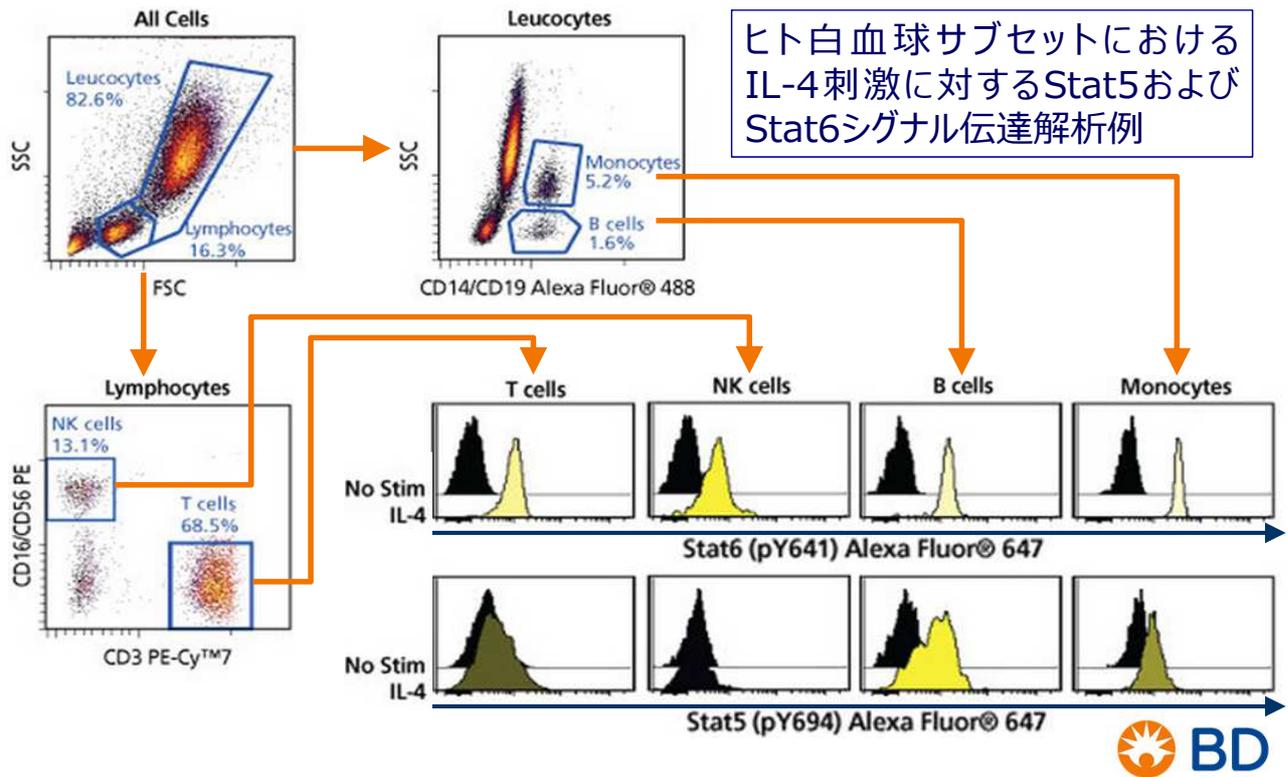
BD Phosflow™ Perm Buffers			
Perm/Wash Buffer I	Perm Buffer II	Perm Buffer III	Perm Buffer IV
<ul style="list-style-type: none"> •マイルドな界面活性剤 (Saponin) •細胞表面マーカーに最適 •Stat pYの検出には不向き 	<ul style="list-style-type: none"> •低濃度メタノール •一部の細胞表面マーカーは検出不可 	<ul style="list-style-type: none"> •高濃度メタノール •いくつかの細胞表面マーカーは検出不可 •Nolan Lab. Method同様 •推奨プロトコル (多くの細胞内マーカーに最適) 	<ul style="list-style-type: none"> •強い界面活性剤 •いくつかの細胞表面マーカーは検出不可 •Stat pY、または特定の細胞内マーカーに最適 •サンプルの損失



細胞ポピュレーションごとのリン酸化状態の違い

BD Phosflow™ Monocyte/NK Cell Activation Kit (Cat#562089)

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



③ 蛍光タンパク質の発現

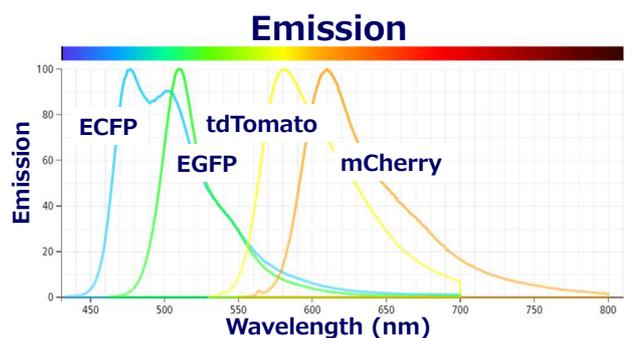
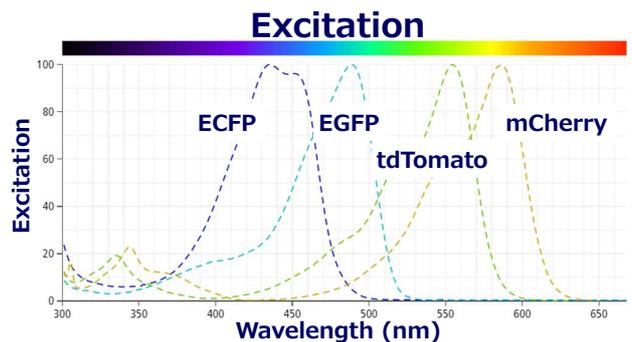
- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

用途

- 導入遺伝子発現の確認
- 移植細胞の残存確認
- 導入遺伝子間相互作用 (FRET) の確認など

蛍光タンパク質の種類

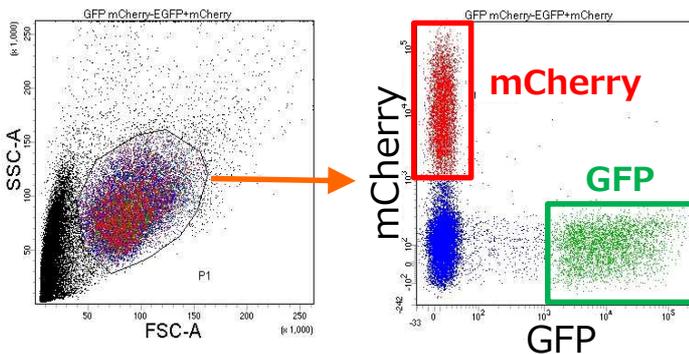
- **GFP系蛍光タンパク質**
 - GFP, YFP, CFP, RFP, BFP など
- **フルーツ系蛍光タンパク質**
 - mCherry, tdTomato, mPlum, mStrawberry, mBanana など
- **CoralHue系蛍光タンパク質**
 - Midoriishi-Cyan, Kusabira-Orange, Azami-Green, Keima-Red, Kaede, Doronpa-Green など



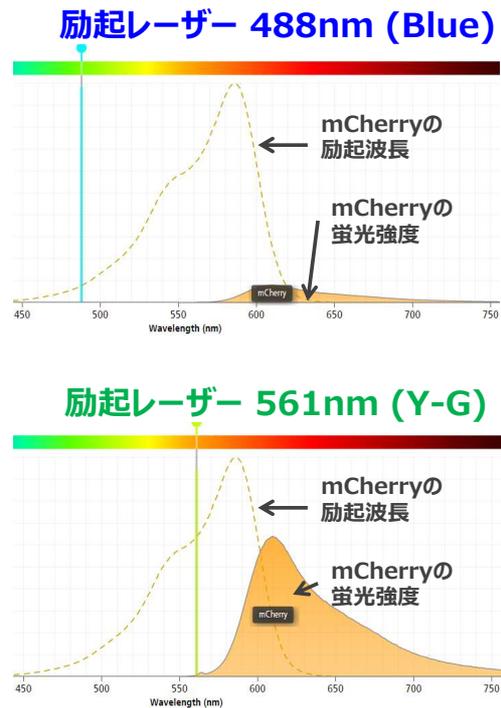
Yellow-Green (Y-G) レーザーを用いた GFP/mCherryの同時解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

BlueレーザーでGFPを、Y-GレーザーでmCherryを測定することで、二種の蛍光タンパク質を同時に解析できる



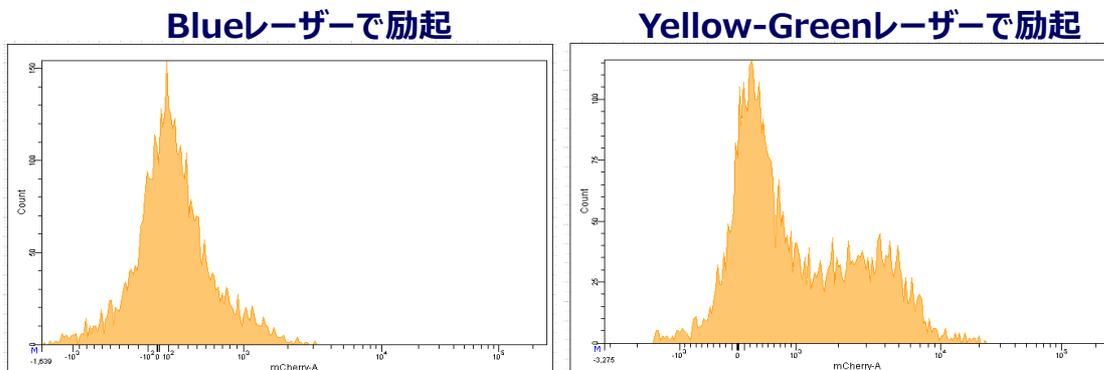
※mCherryの測定にはY-Gレーザー搭載機種が望ましい



Yellow-Greenレーザーを用いた解析例: mCherryの解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

Yellow-Greenレーザーを用いると、mCherryをはじめとしたフルーツ系蛍光タンパク質を効率よく励起できます



Sample; Mouse splenocytes

左図: BD FACSAria™ II セルソーター (488-, 405- and 633-nm lasers 搭載機器)

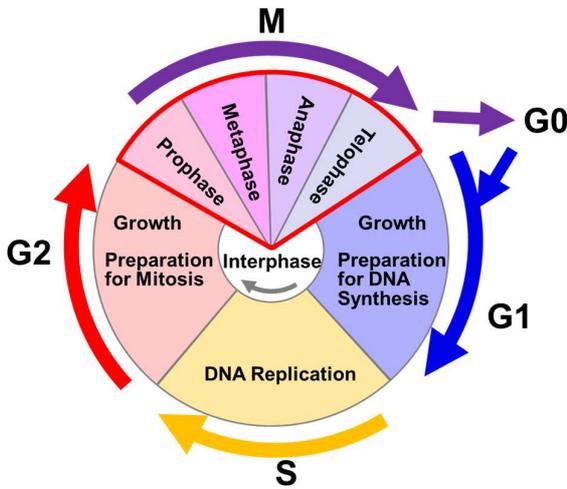
右図: BD FACSAria™ III セルソーター (488-, 405-, 633- and 561-nm lasers 搭載機器)

※Dim mCherryを測定した場合、488nmレーザー励起では明確には検出できませんでしたが、561nmレーザーで励起した場合は検出することができました。



④ 細胞周期解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



G0 : 分裂停止、休止期
G1 : DNA合成準備期
S : DNA合成期
G2 : 分裂準備期
M : 分裂期

マーカー	細胞周期
核酸染色剤 (DNA)	全体
Pyronin Y (RNA)	G0/G1
BrdUの取り込み	S
Under Phosphorylated-Rb	G0/G1
Cyclin A	S-G2/M (G2で最大、Mで減少)
Cyclin B	G2/M
Cyclin D	G0/G1
Cyclin E	G0/G1-S
Phospho-Histone H3	M

各周期を分けて解析することが可能

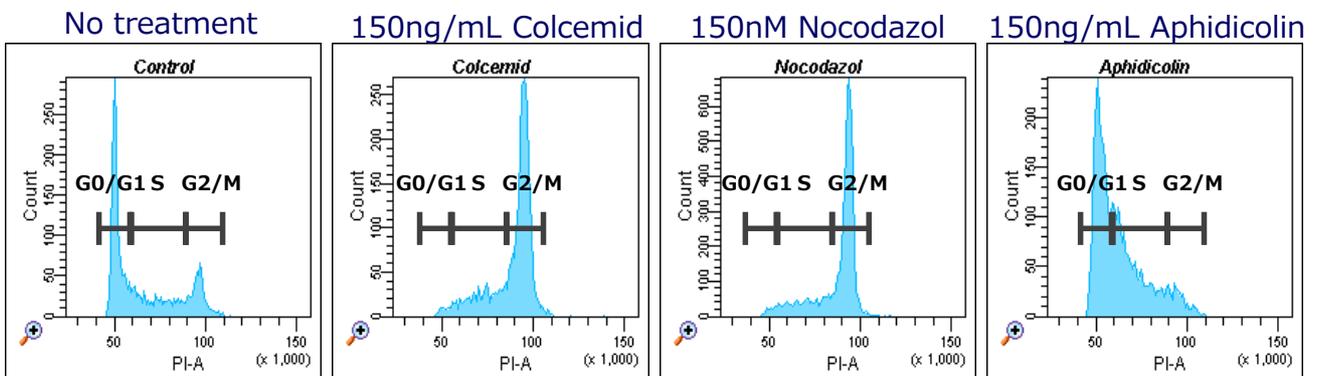


PIによる細胞周期解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

PI染色により細胞周期全体を解析できます

- **BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (Cat#340242) 使用**



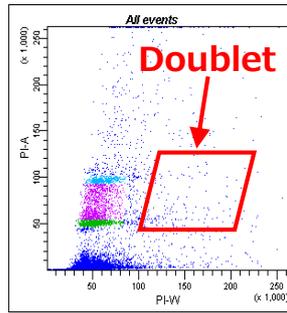
0.5%FCS-DMEM中でPre-incubation (48時間) したHeLa細胞に種々の薬剤を添加し、Incubation (16時間) 後に細胞周期を解析



細胞周期解析の注意点

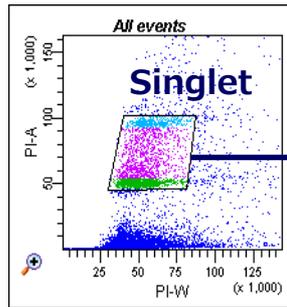
- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

- 核酸染色剤を測定するパラメーター（この例ではPI）の表示スケールをLinearに設定して感度調整を行います
- 解析プロット上でDoublet（凝集した細胞）の除去を行います
 - PIをArea (A)、Width (W) のDot Plotで表示します
 - Singlet gateに入る集団をヒストグラムに展開します

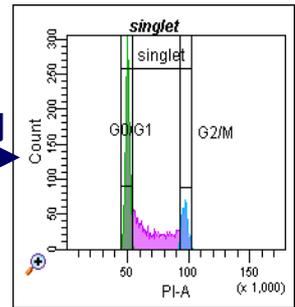


Doublet:

凝集した細胞。
解析プロット上では、Areaシグナルは同じでWidthシグナルが大きい細胞。



展開



Areaシグナルが等しくWidthのシグナルが大きい集団をゲートアウト

ヒストグラムに展開



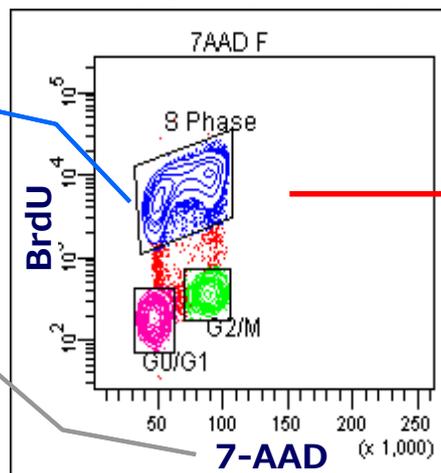
BrdU/7-AADによるS期解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

BrdUによりS期、7-AADにより細胞周期全体を解析できます

- BD Pharmingen™ FITC BrdU Flow Kit (Cat#559619) 使用

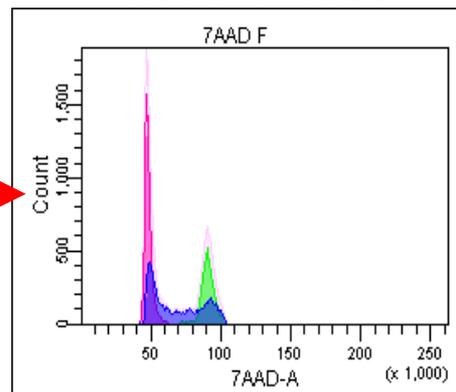
BrdU取り込み細胞の解析



- S期の細胞のDNAにBrdUが取り込まれる
- 抗BrdU抗体で検出

- 総DNA量を7-AADで検出

ヒストグラムへの展開



Sample : Jurkat 細胞



BrdU/7-AADによるS期解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

in vitro, *in vivo*のサンプルをBrdUラベルすることが可能です

BrdU Flow Kitは細胞表面・細胞内抗原染色との併用が可能です

各細胞周期に発現する特定のサイトカインの解析も可能です

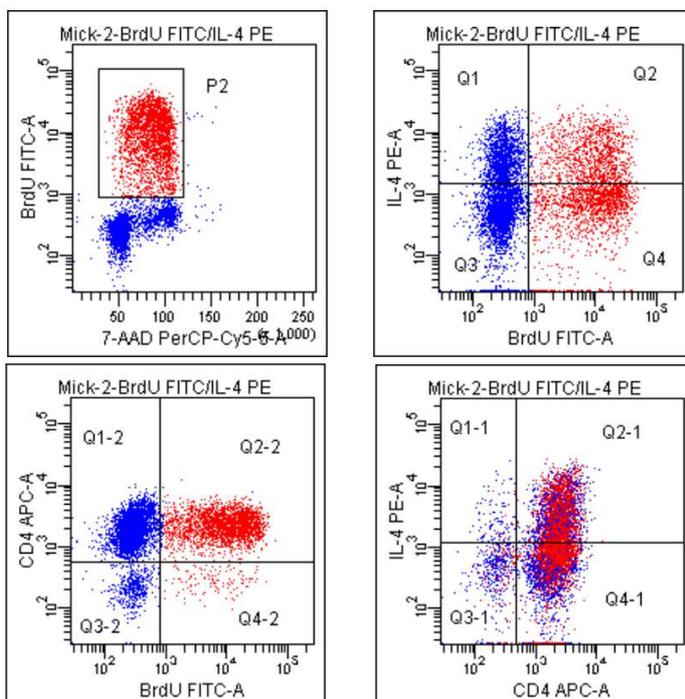
休止期の細胞集団をマイトジェンで刺激後、細胞分裂過程を継時的に解析することもできます



BrdU/7-AADによるS期解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

細胞周期と細胞表面抗原・細胞内サイトカインの同時解析例



Sample : Mouse Splenocytes

- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、Ionomycin、Brefeldin A 添加培地で培養
- 培養の最後の1時間にBrdU添加
- 細胞を回収後、各種抗体および7-AADで染色しフローサイトメーターで測定

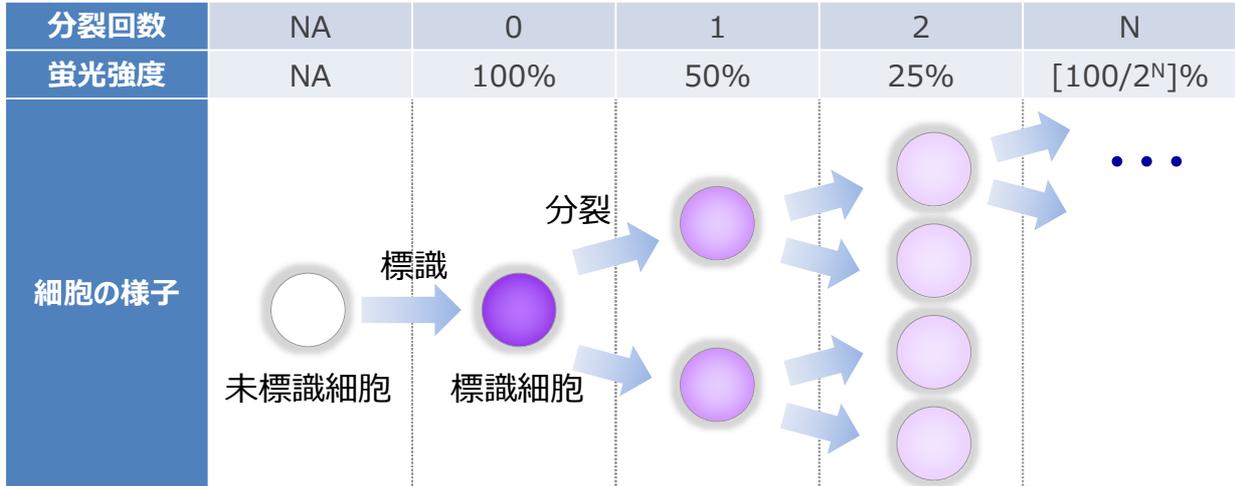


- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ フロトランス解析
- ⑦ サイトカイン定量

⑤ 細胞増殖解析

細胞内にとどまる蛍光色素で細胞をラベルし、細胞増殖に伴う蛍光強度の変化から細胞の分裂回数を測定できます

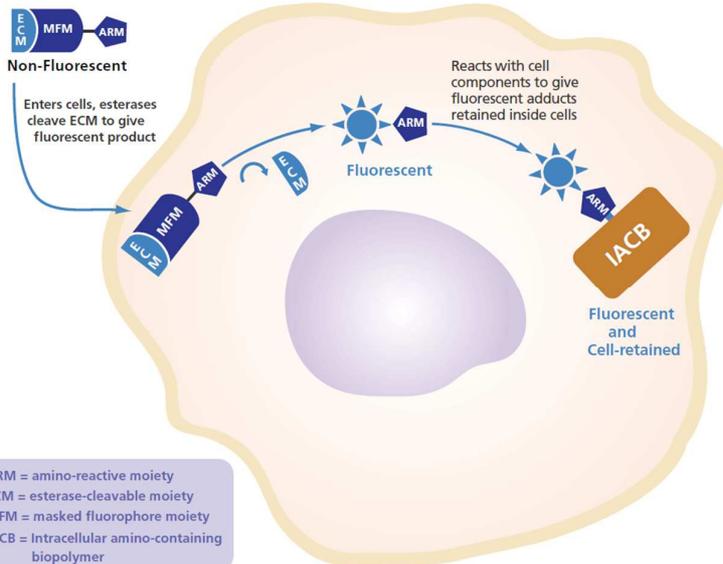
細胞特異的マーカーとの併用も可能です



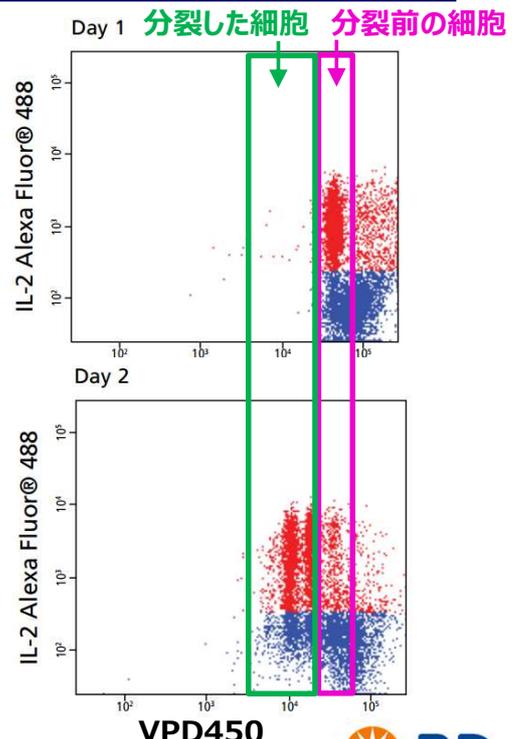
VPD450による細胞増殖解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ フロトランス解析
- ⑦ サイトカイン定量

VPD450 Dye



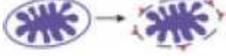
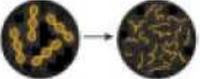
BD Horizon™ Violet Proliferation Dye450 (VPD450: Cat#562158) はVioletレーザーで使用でき、FITC標識抗体などとの併用も可能です



- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ **アポトーシス解析**
- ⑦ サイトカイン定量

⑥ アポトーシス解析

様々なアポトーシス解析が可能です

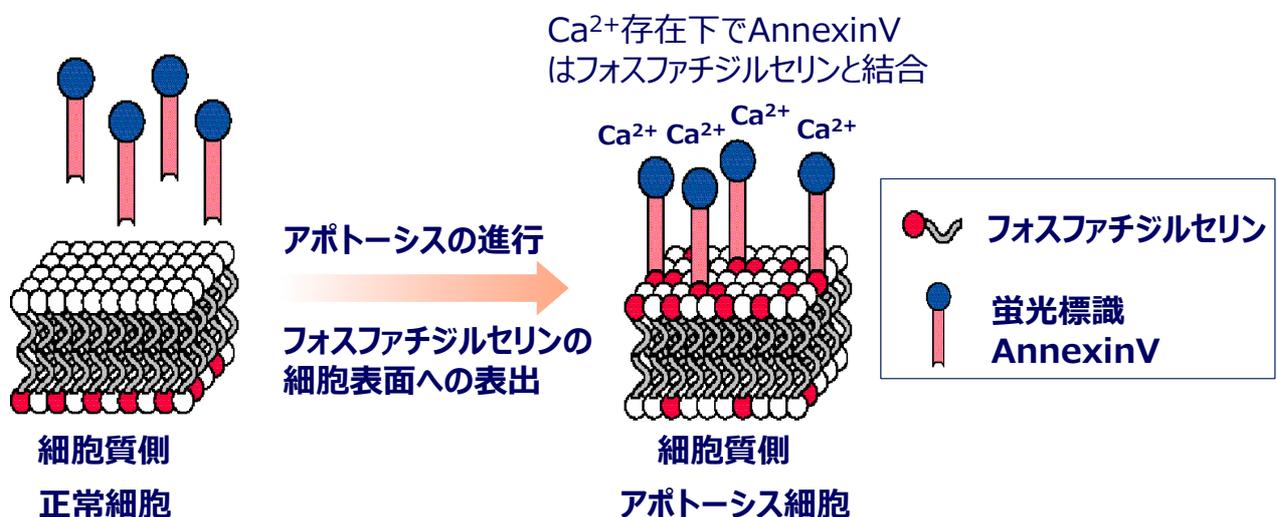
測定対象	アッセイ	製品の特徴
フォスファチジルセリンの露出 	Annexin V binding assay • 標識抗体(シングルターゲット) • Annexinキット	• アポトーシス初期のマーカーを検出 迅速、簡易 • フローサイトメトリーまたは 蛍光顕微鏡に適用
ミトコンドリアの変化 	• BD Mitoscreenキット	• 迅速、簡易、フローサイトメトリー または蛍光顕微鏡による単細胞解析
Caspaseの活性化 	• Caspase Activityアッセイ キット および試薬	• 迅速、簡易、蛍光分光分析
	• Active Caspase-3 イムノアッセイ (ELISA)	• ELISAに適用
DNAの断片化 	• APO-BrdUTM TUNELアッセイ • APO-DIRECT™ TUNELアッセイ	• 接着細胞への適用、 フローサイトメトリーでの 細胞周期解析との併用による 単細胞解析



AnnexinVを用いたアポトーシス解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ **アポトーシス解析**
- ⑦ サイトカイン定量

アポトーシスの初期には細胞表面にフォスファチジルセリンが出現します
AnnexinVはフォスファチジルセリンに特異的に結合します

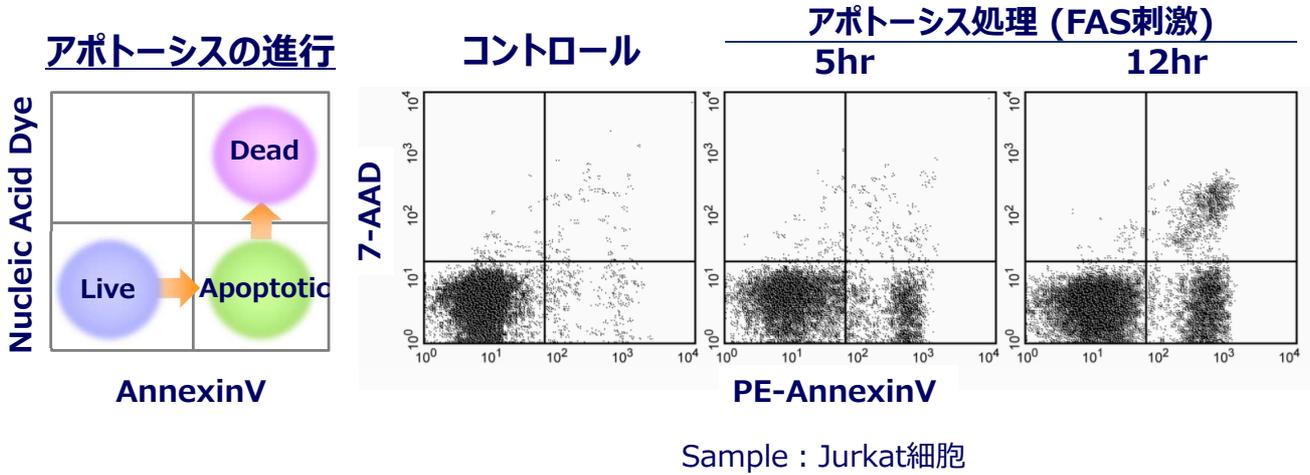


※AnnexinVの付着細胞での使用は推奨いたしません



AnnexinVを用いたアポトーシス解析

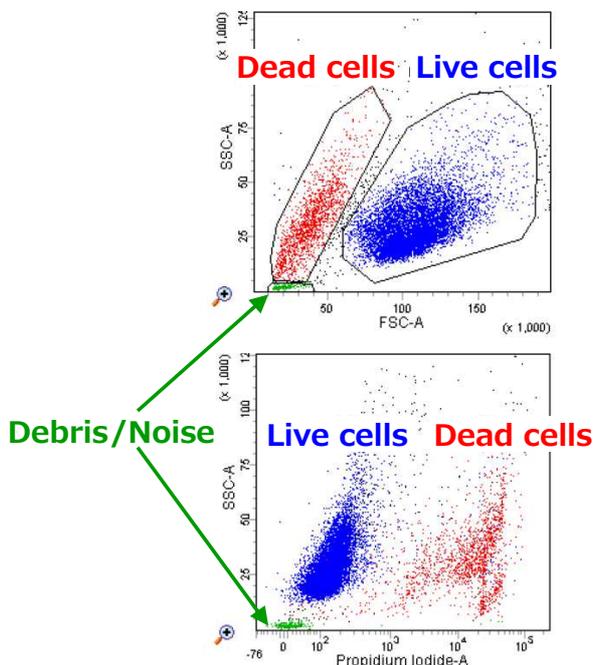
- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



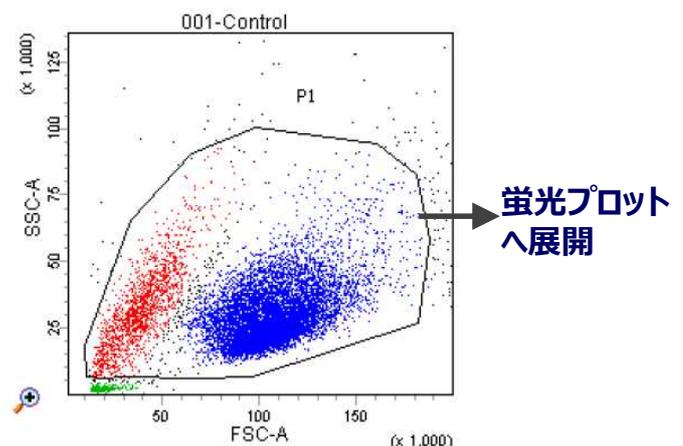
アポトーシス解析の留意点

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

アポトーシス解析では、FSC/SSCのゲーティングが生細胞の解析とは異なります



散乱光プロットでは、Debris/Noiseを除いた死細胞・生細胞全体にゲートをかけて蛍光のプロットへ展開します

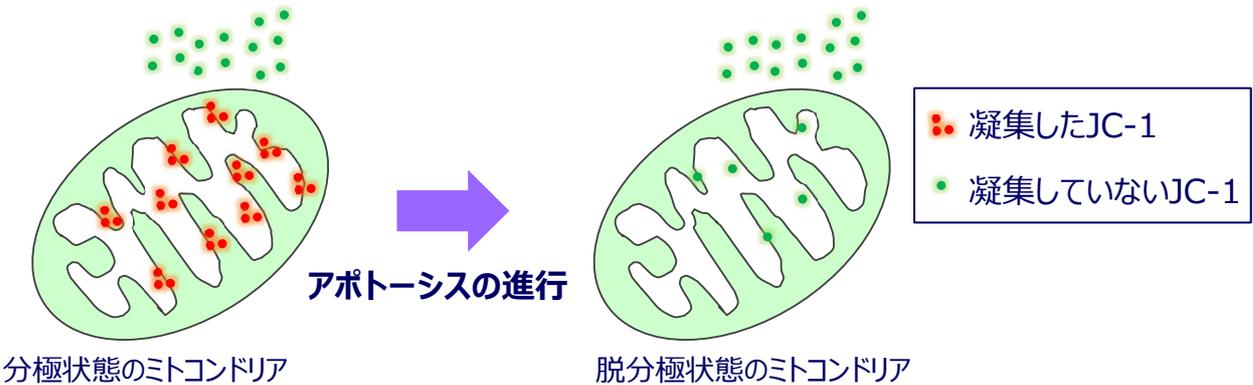


- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

JC-1を用いたアポトーシス解析

ミトコンドリアはアポトーシスの過程で重要な役割を持ちます

ミトコンドリア依存性アポトーシスの指標であるミトコンドリア膜電位の変化をJC-1を用いて検出できます



正常細胞：JC-1はミトコンドリア中に凝集塊として蓄積し、赤色の蛍光を発します

アポトーシス細胞：ミトコンドリアが脱分極をおこすと、JC-1は単量体として細胞質内に分散し赤色蛍光強度が低下します



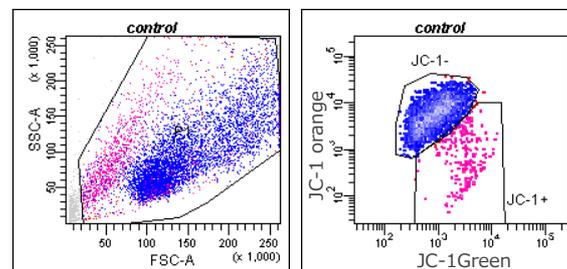
JC-1を用いたアポトーシス解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

BD Pharmingen™ MitoScreen (Cat#551302) を用いると、ミトコンドリアが変化しアポトーシスを起こしている細胞を特異的に検出できます

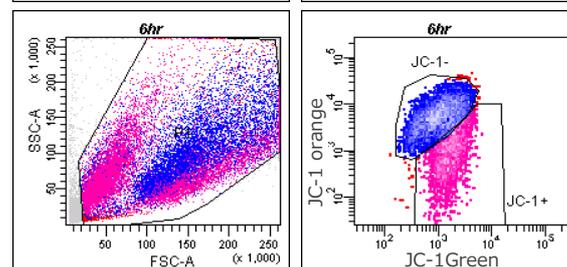
Control 細胞

ほとんどの細胞がPEと同様の蛍光波長（縦軸）に陽性の集団として検出されています。



Camptothecin処理後6時間

アポトーシスを起こした細胞ではPEのパラメーター（縦軸）で検出される蛍光シグナルが低下しています。

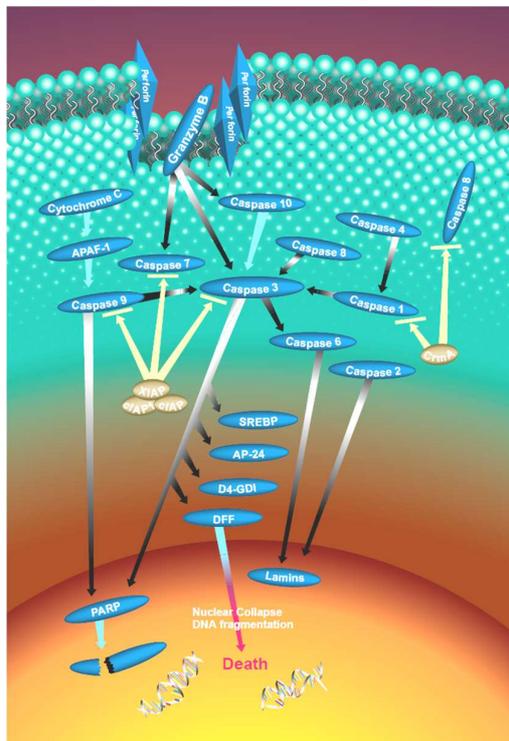


Sample : Jurkat 細胞



アポトーシス解析 : Active Caspase-3

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



Caspase-3はアポトーシスの初期段階で活性化されます

活性化されたCaspase-3は他のCaspaseの活性化と細胞内・核内の標的タンパク質を切断してアポトーシスの最終段階へと導きます

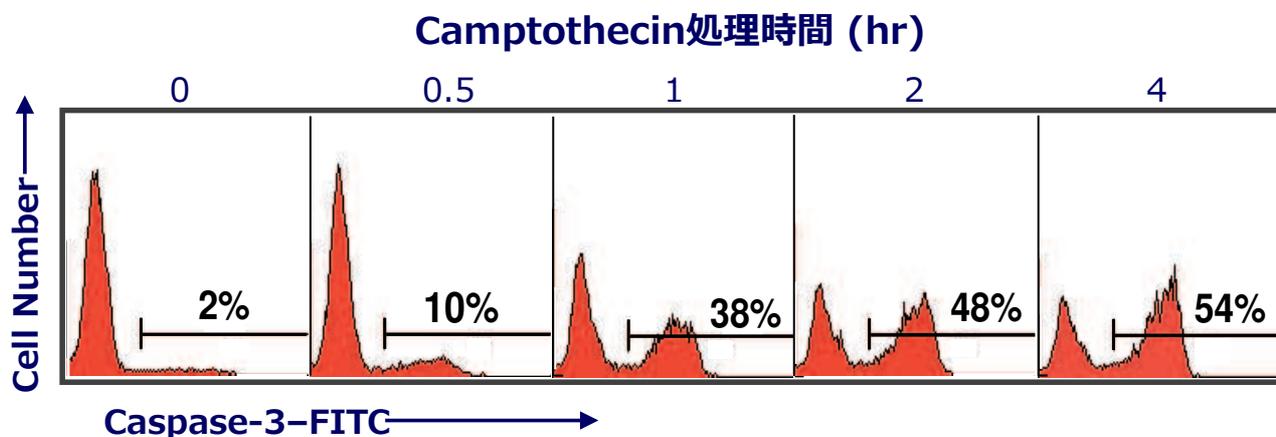
Caspase-3はアポトーシス発生のマーカーの一つとして用いられています



抗Caspase-3抗体を用いたアポトーシス解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

抗Caspase-3抗体を用いたアポトーシス解析例



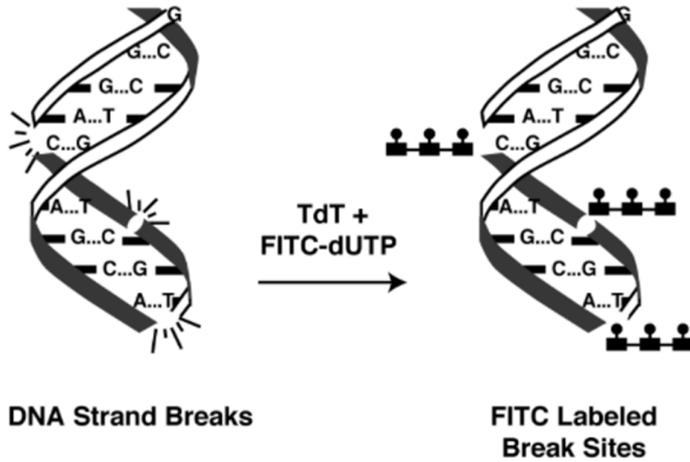
5μM Camptothecinを表記の時間処理したJurkat細胞中のApoptosis細胞の割合を抗Active Caspase-3抗体を用いて測定した。



- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

DNA損傷の検出によるアポトーシス解析

アポトーシス細胞におけるDNAの損傷をBD Pharmingen™ APO-DIRECT™ Kit (Cat#556381) を用いて検出できます



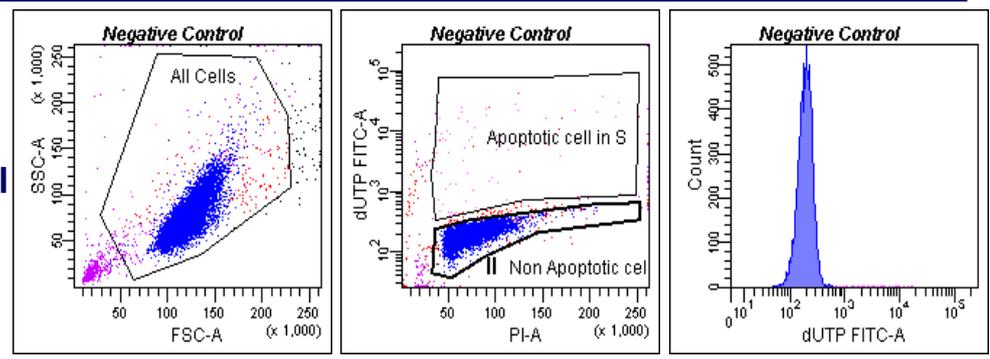
- 固定した細胞にTdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) とFITCで標識したdUTPを加えるとDNA切断部位の3'-OH末端にdUTPが付加されます
- DNAの損傷に応じてFITC標識dUTPの結合量が増加します
- この方法はTUNNEL法に準ずるものです



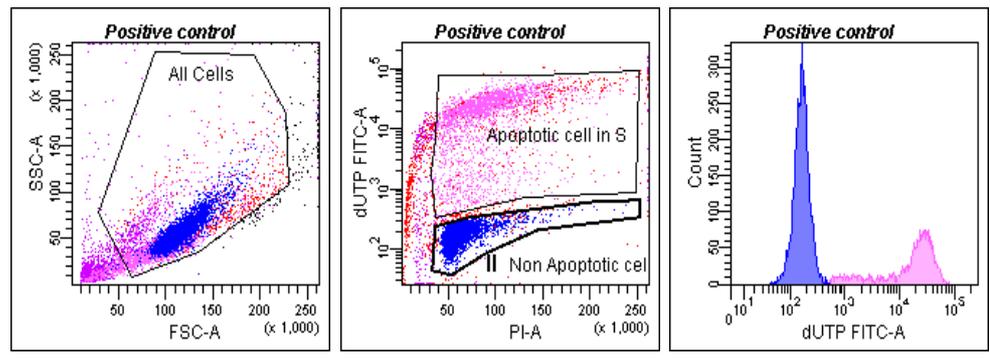
DNA損傷の検出によるアポトーシス解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

Negative Control

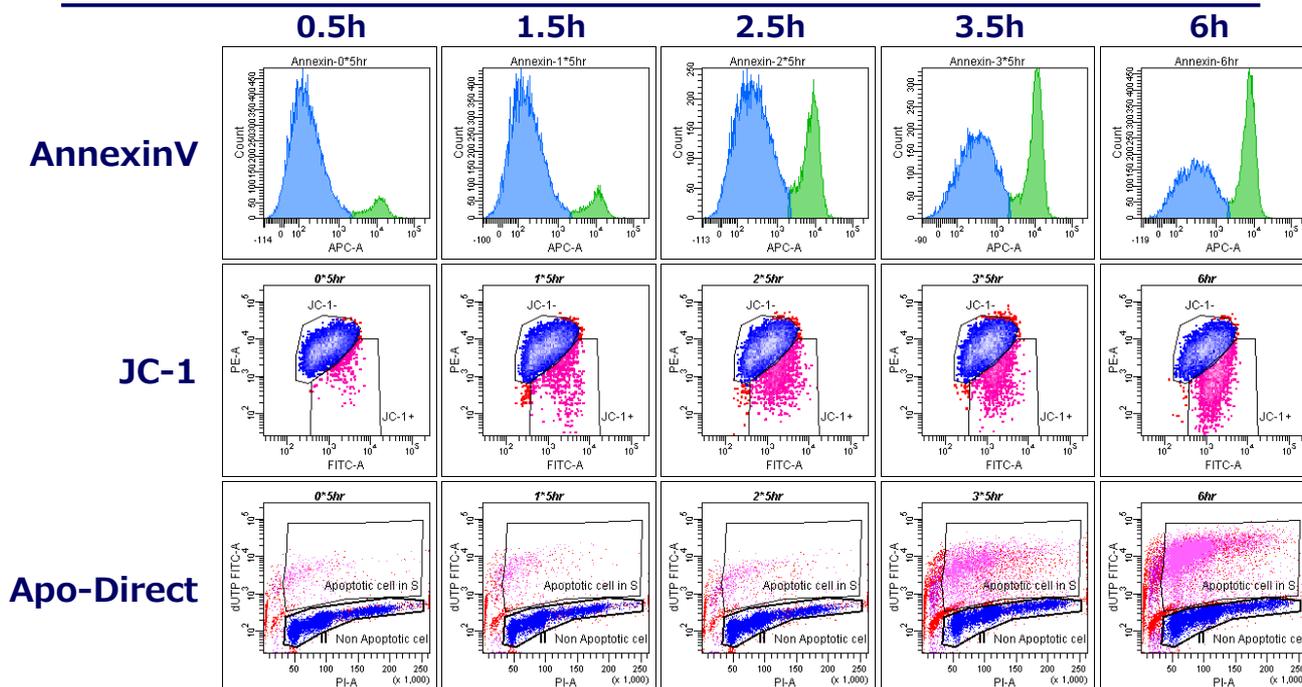


Positive Control



様々な手法によるアポトーシス解析

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



Jurkat細胞をCamptothecin (Final 5 μ M) で処理し、Apoptosisをおこした細胞集団の処理時間依存的な割合の変化を各Kitを用いて測定した。



⑦ サイトカイン定量

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

サンプル中のサイトカイン濃度をFCMで定量することができます

サイトカイン産生・分泌細胞の測定

手法	測定対象	検出方法	検出機器
Intracellular Cytokine	刺激条件下で細胞内で産生されたサイトカイン	細胞内を抗サイトカイン抗体で染色	FCM
ELISPOT	サイトカインを分泌している細胞	専用の96-well plateを用いた抗原抗体反応と酵素反応で発色させサイトカインを分泌した細胞を検出	目視、顕微鏡などの画像取得・処理する機器



- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

⑦ サイトカイン定量

サンプル中のサイトカイン濃度をFCMで定量することができます

溶液中のサイトカインの濃度の定量

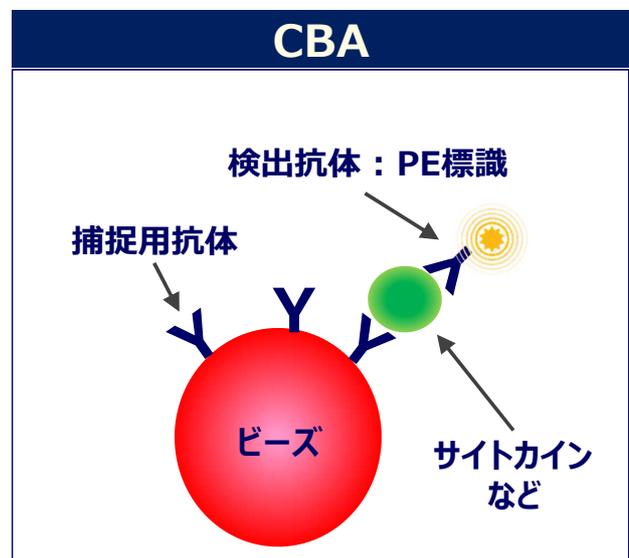
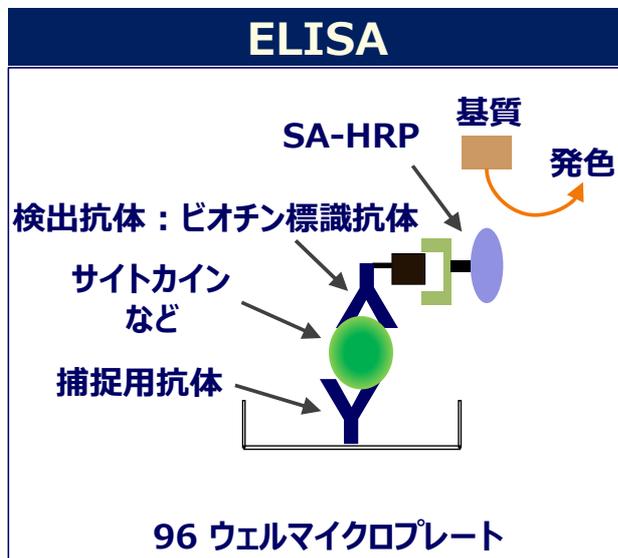
手法	測定対象	検出方法	検出機器
ELISA (OptEIA)	溶液中のサイトカイン濃度	専用の96-well plateを用いた抗原抗体反応と酵素反応で発色させサイトカイン分泌量を定量	分光光度計
Cytometric Beads Array (CBA)	溶液中のサイトカイン濃度	サイトカイン検出用ビーズを用いてサイトカイン分泌量を定量 複数のサイトカインの同時定量も可能	FCM



BD[®] Cytometric Bead Array (CBA)

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

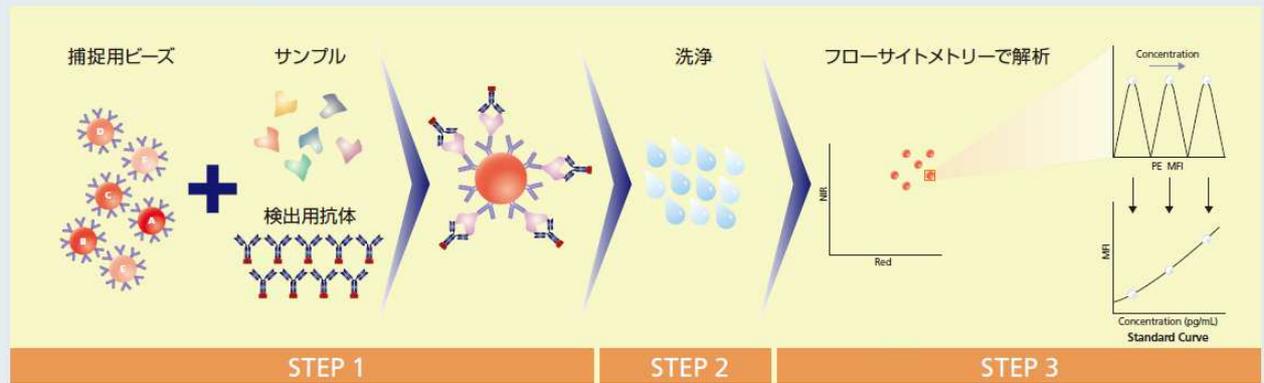
BD[®] CBAは、FCMを用いてサンプル溶液中の多種類のタンパク質を同時に測定・定量解析するための製品です



BD® Cytometric Bead Array (CBA)

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

BD® CBAの原理

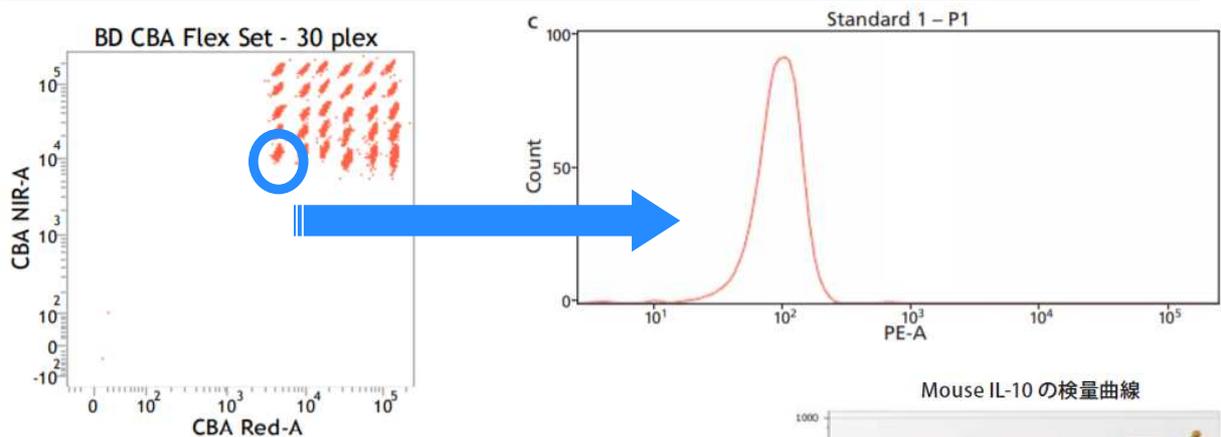


	BD® CBA	ELISA
同時測定項目数	約30種類/サンプル	1種類/サンプル
操作	洗浄1回	洗浄約10回以上
サンプル量	50μL	100μL程度
測定形式	試験管1本から測定可能	96 ウェルプレート
測定機器	フローサイトメーター	プレートリーダー



BD® Cytometric Bead Array (CBA)

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

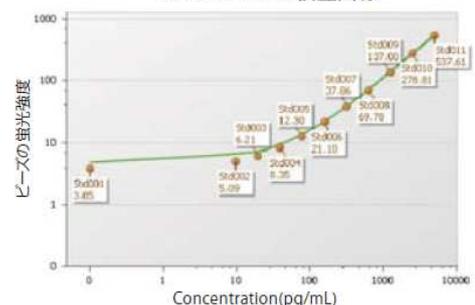


複数のサイトカインを同時測定し、各サイトカインの検量線作成してサンプル中の各サイトカイン濃度をpg/mL単位で算出

※データ解析には専用のソフトウェアを 사용합니다。

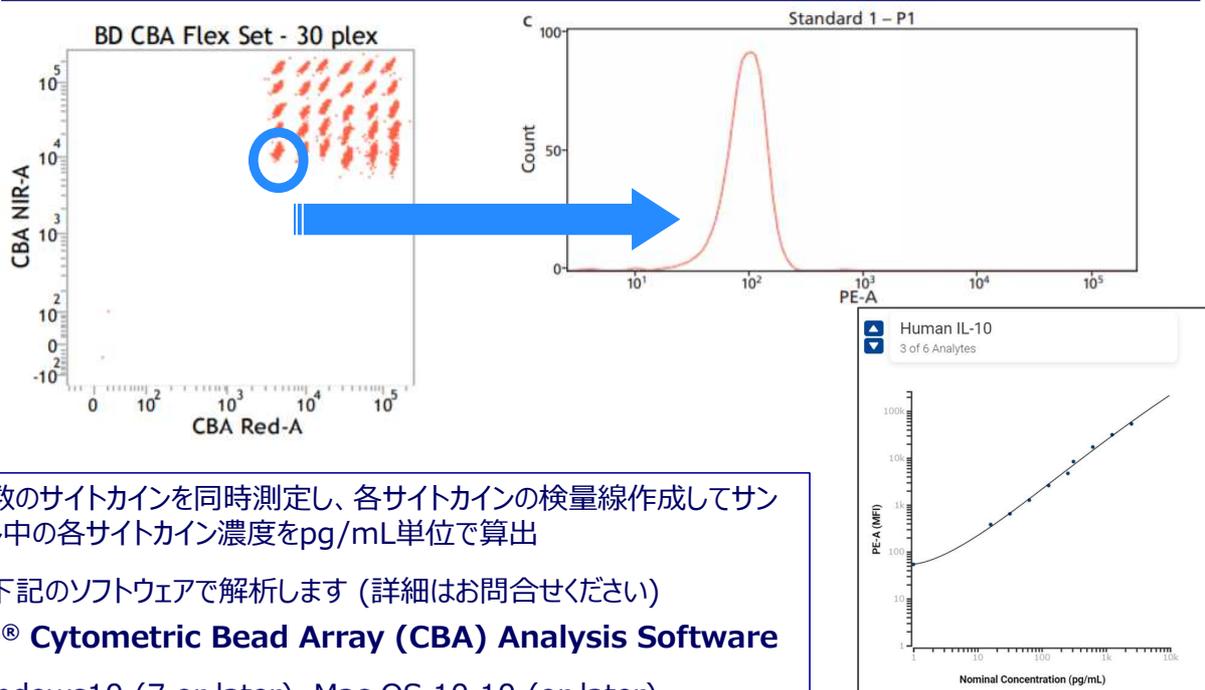
FCAP Array™ v3.0 ソフトウェア (Cat#652099)

Windows7、FCS v2.0/3.0に対応



BD[®] Cytometric Bead Array (CBA)

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量



複数のサイトカインを同時測定し、各サイトカインの検量線作成してサンプル中の各サイトカイン濃度をpg/mL単位で算出

※下記のソフトウェアで解析します (詳細はお問合せください)

BD[®] Cytometric Bead Array (CBA) Analysis Software

Windows10 (7 or later)、Mac OS 10.10 (or later)
FCS v2.0/3.0/3.1に対応



BD[®] CBA : 製品ラインナップ

- ① 細胞表面抗原の解析
- ② 細胞内抗原の解析
- ③ 蛍光タンパク質の発現
- ④ 細胞周期解析
- ⑤ 細胞増殖解析
- ⑥ アポトーシス解析
- ⑦ サイトカイン定量

BD[®] CBA Kit

- Ready to Use の決まった組み合わせの項目ですぐに測定することができます (目的に応じた3~7項目のセット)
- サンプル調製に必要な試薬が全て含まれています

BD[®] CBA Flex Set (サンプル調製には専用のバッファー製品が別途必要です)

- 自由に測定項目を組み合わせることができます

BD[®] CBA 高感度 Flex Set (サンプル調製には専用のバッファー製品が別途必要です)

- 0.274 pg/mL の低濃度領域が測定可能です
- 自由に測定項目を組み合わせることができます

その他各種製品を取り揃えております

- 詳細は製品カタログをご参照下さい



まとめ

- フローサイトメーターの代表的なアプリケーションについて紹介いたしました
 - ✓ 細胞表面抗原の解析
 - ✓ 細胞内抗原の解析
 - ✓ 蛍光タンパク質の発現
 - ✓ 細胞周期解析
 - ✓ 細胞増殖解析
 - ✓ アポトーシス解析
 - ✓ サイトカイン定量
- その他にも豊富にアプリケーションがございますので、ご不明な点がございましたらお気軽にお問い合わせください



お問い合わせ

製品関連・資料請求 カスタマーサービス

電話 : 0120-8555-90

日本BDウェブサイト

<https://www.bd.com/ja-jp>

機器・試薬の使用方法について

電話 : 0120-4890-77 (平日9:00~17:00)

E-mail : tech.cell@bd.com

機器のメンテナンス・トラブルに関して

電話 : 0120-7099-12 平日9:00~18:00)



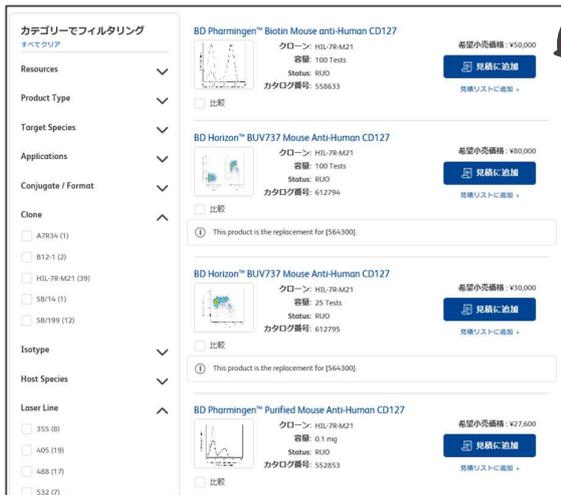
BD製品の検索

ウェブサイトよりBDバイオサイエンス試薬の検索が可能です

・ウェブサイトへアクセス

→ <https://www.bd.com/ja-jp>

→ <https://www.bdbiosciences.com/ja-jp>



- ✓ 製品名をクリックすると詳細情報が表示されます
- ✓ テクニカルデータシートのダウンロードもOK!
- ✓ 希望小売価格も表示され、見積の作成も可能です
※見積作成にはウェブサイト用のアカウント作成が必要です

その他パネルデザインのポスターや実験
プロトコルのダウンロード等も可能です



試薬トレーニングのご案内

試薬の使用方法に不安はありませんか？

新規パネルの提案からサンプル調製、測定、解析まで学術スタッフがサポートします

トレーニングの詳細は下記までお問合せください

BDバイオサイエンス アプリケーションサポートグループ

TEL : 0120-4890-77

E-mail : customer.training@bd.com

(トレーニング専用メールボックス)

こんな方にお勧めです

- ・ 新規で試薬を購入するが、調製～解析まで不安がある方
- ・ マルチカラーを行うお客様でパネル提案を希望される方 など

実施例

- ・ 細胞内サイトカイン解析
- ・ 細胞表面抗原マルチカラー解析・ソーティング
- ・ BD® Cytometric Bead Array (CBA) を用いた液体試料中のサイトカイン定量 など



BD Horizon Brilliant™ 高輝度色素シリーズ

BD Horizon Brilliant™ 高輝度色素抗体はこんなお悩みを解決します!!

解析マーカの発現量が低くて困っている

高輝度色素を探している

BD Horizon Brilliant™ 高輝度色素シリーズの特長

これまでにない高輝度色素

- ・ 顕著に輝度が改善
- ・ PEなど常用される色素とも組み合わせ可能

低発現マーカの検出に最適

- ・ 高輝度で漏れこみが少なく弱陽性細胞集団を明瞭に分離

多様な製品ラインナップ

- ・ 色素、抗原、容量のラインナップが増え幅広い製品群をご用意
- ・ マルチカラー解析でのパネルに手軽に組み込んでいただけます

色素安定性

- ・ 固定、膜透過剤などへの安定性が高く、EDTAなどにも対応
- ・ 細胞内、細胞表面の様々なアプリケーションに最適



BD OptiBuild™ オンデマンド試薬

BD OptiBuild™ オンデマンド試薬はこんなお悩みを解決します!!

抗体と色素の組み合わせがなくて困っている

色素の組み合わせが増え続けておりご希望の標識抗体を容易に作成することが可能です

BD OptiBuild™ オンデマンド試薬によりパネル作成の可能性が広がります

(マルチカラー解析でのパネルに手軽に組み込んでいただけます)



製品のお問合せ・ご注文はウェブサイトから

海外拠点において72時間以内に製造・出荷を開始し、国内へは2-3週間でお届けします。

※原材料・輸送の状況により変動することもありますのであらかじめご了承ください。



ご清聴ありがとうございました



BD, the BD Logo and all other trademarks are trademarks of Becton, Dickinson and Company or its affiliates. © 2022 BD. All rights reserved.