

フローサイトメーターの測定原理

田口 雄亮 (TAGUCHI Yusuke, Ph.D)
日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
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



© 2022 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.

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。



フローサイトメーター (FCM) とは

FCMとは・・・

レーザー光を照射した流体中の細胞、粒子から発生した光シグナルに基づいてその特性を解析する技術

ヘテロな集団から
目的細胞を同定

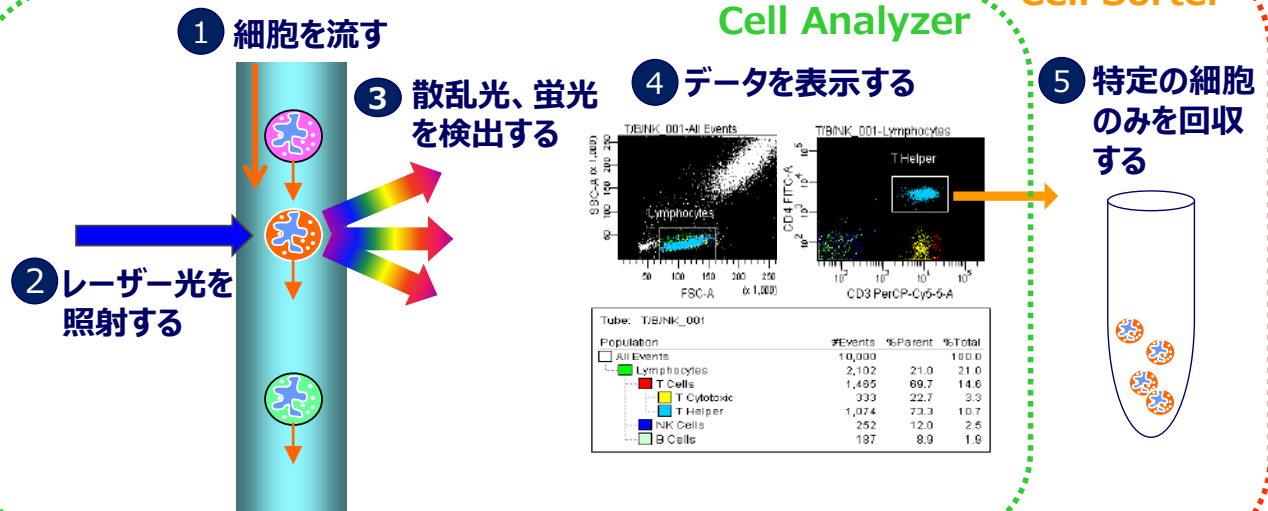
Cell Analyzer
目的細胞の
性質を解析

Cell Sorter
目的細胞を
分取



FCMとは

FCMとは・・・



BD FACS™ セルアナライザー、セルソーターシリーズの変遷



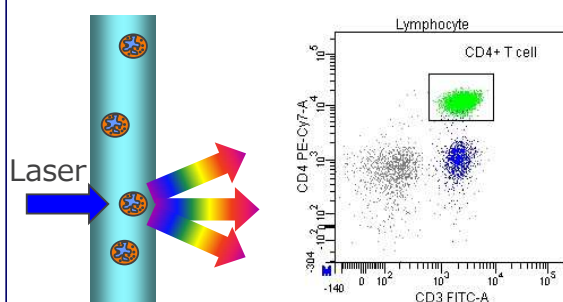
FCMの特徴

蛍光顕微鏡



- ✓ 画像 (3D)
- ✓ 細胞内局在
- ✓ タイムラプス

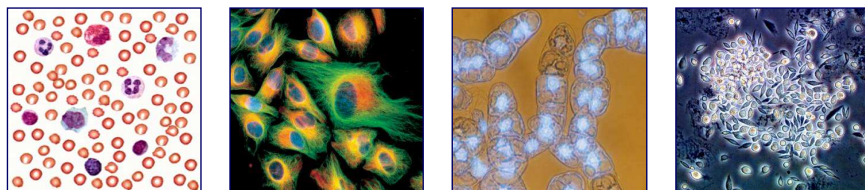
FCM



- ✓ 大量の細胞データ処理
- ✓ マルチカラー
- ✓ 客観性
- ✓ 細胞分取 (セルソーター使用の場合)



FCMで測定可能なサンプル



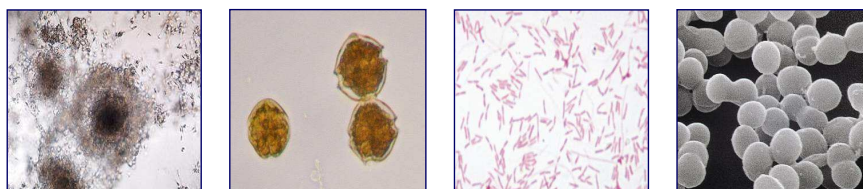
・測定可能サンプル例

血球細胞
接着細胞 (剥離したもの)
幹細胞
植物細胞
昆虫細胞

精子
プランクトン
大腸菌
球菌

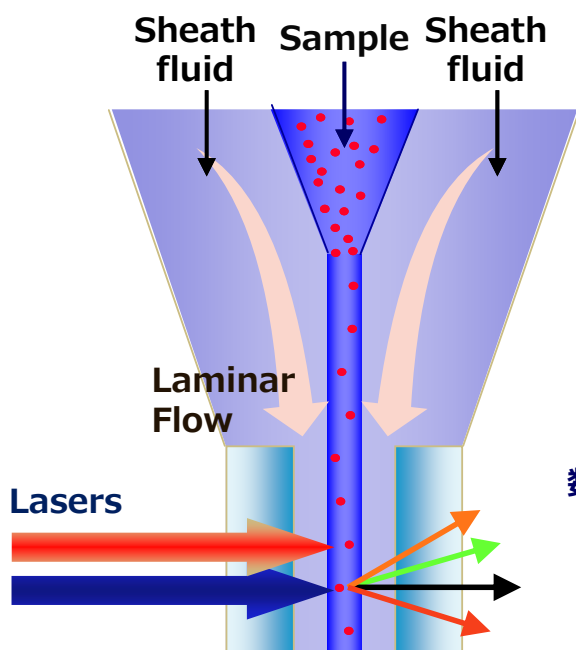
・サンプル条件

細胞が一つ一つ単離状態であること
均一な細胞浮遊液であること
直径 $0.5\mu\text{m} \sim 40\mu\text{m}$ (機種による)



FCMにおける検出

ラミナフロー形成 / レーザー照射 / 検出



流路の絞り込みとラミナフローの形成によって
細胞が1つ1つ流れ、レーザー光を通過する

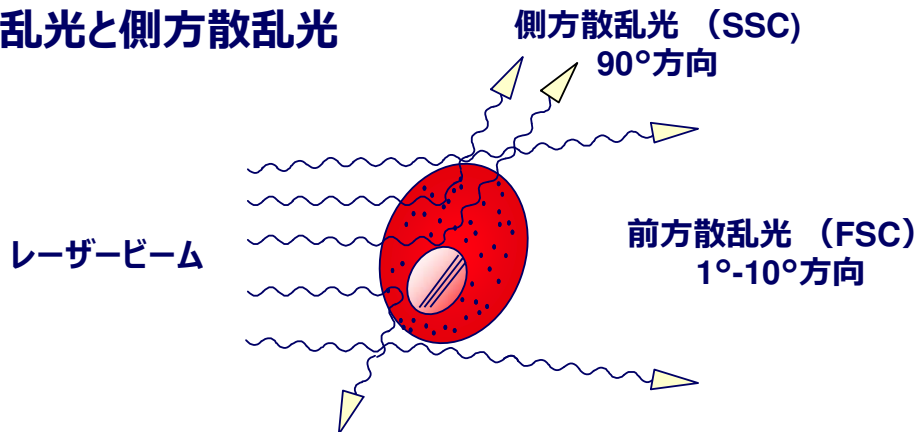


散乱光、蛍光を検出
数百～数万cells/sec以上の速度での解析が可能



散乱光 (Scatter) の特性

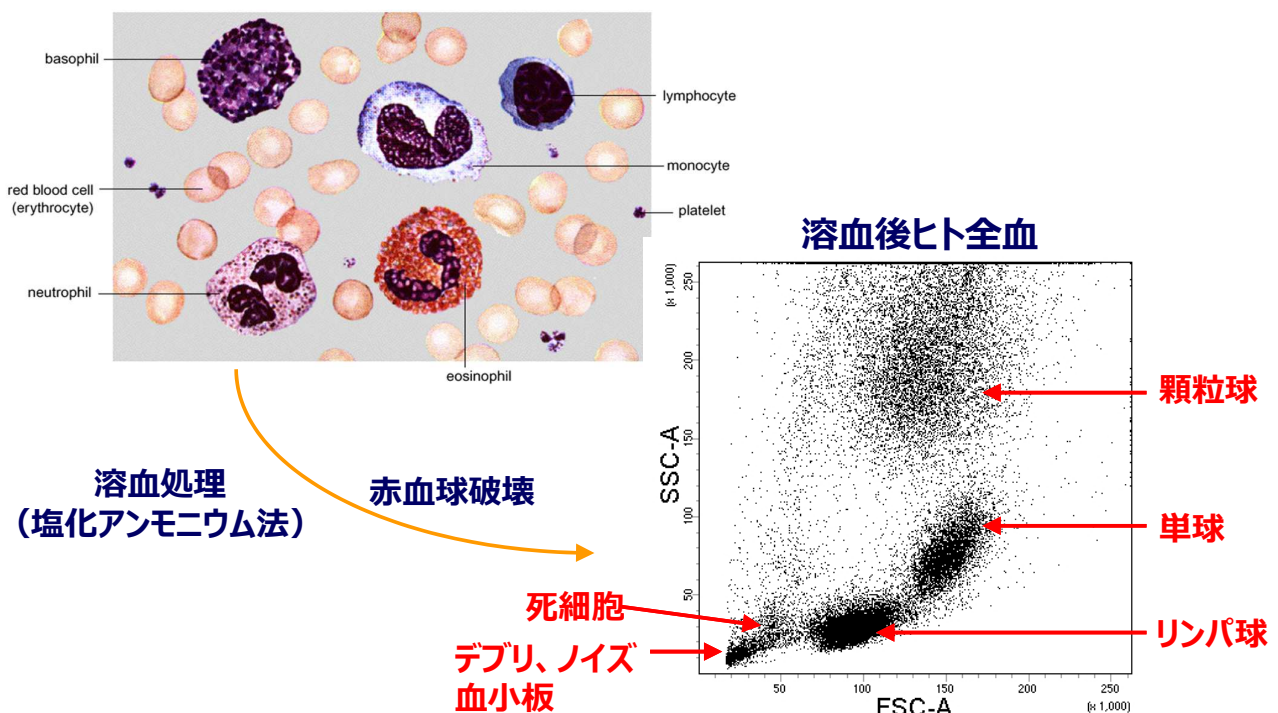
前方散乱光と側方散乱光



- 前方散乱光 (Forward Scatter)
細胞の大きさや表面積を反映する
- 側方散乱光 (Side Scatter)
内部構造の複雑さ、細胞内顆粒などを反映する



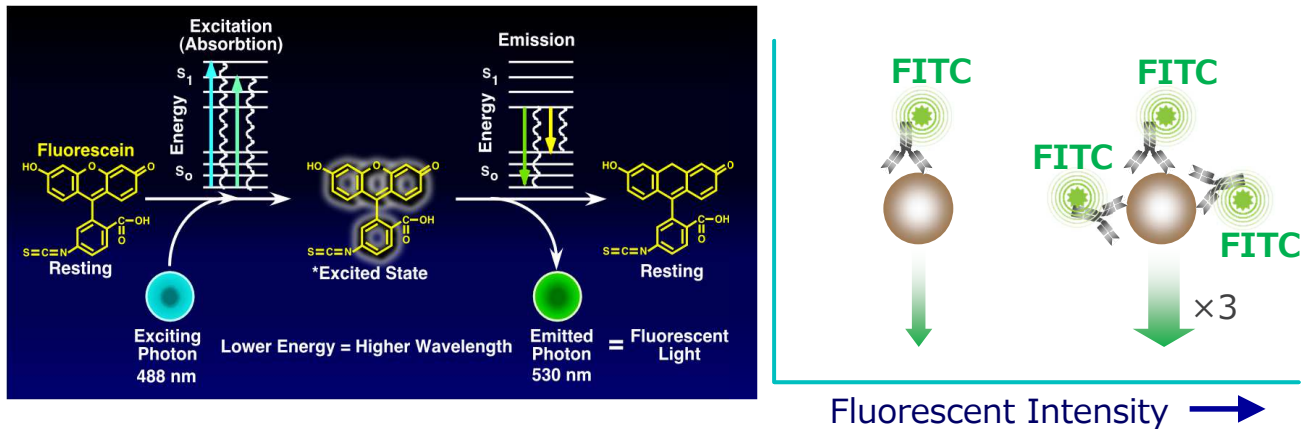
散乱光による血液細胞の解析



蛍光について

蛍光物質に励起光を照射すると蛍光が放出されます

フローサイトメーターでは粒子ごとの蛍光物質質量を見分けられます※



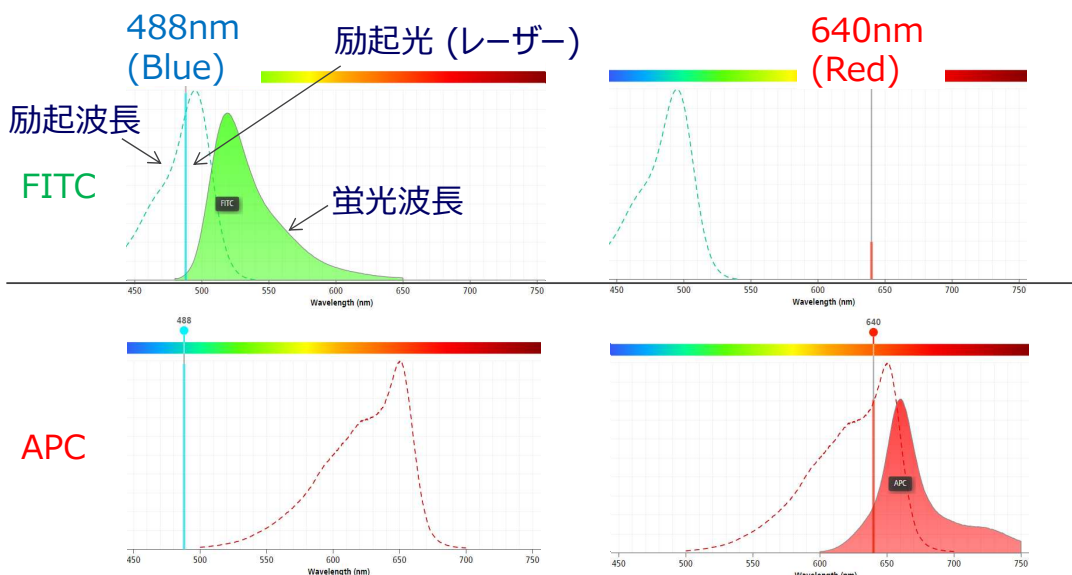
※フローサイトメーターで得られるシグナルの値は絶対値ではなく、同条件で測定した際の相対的な違いを示します



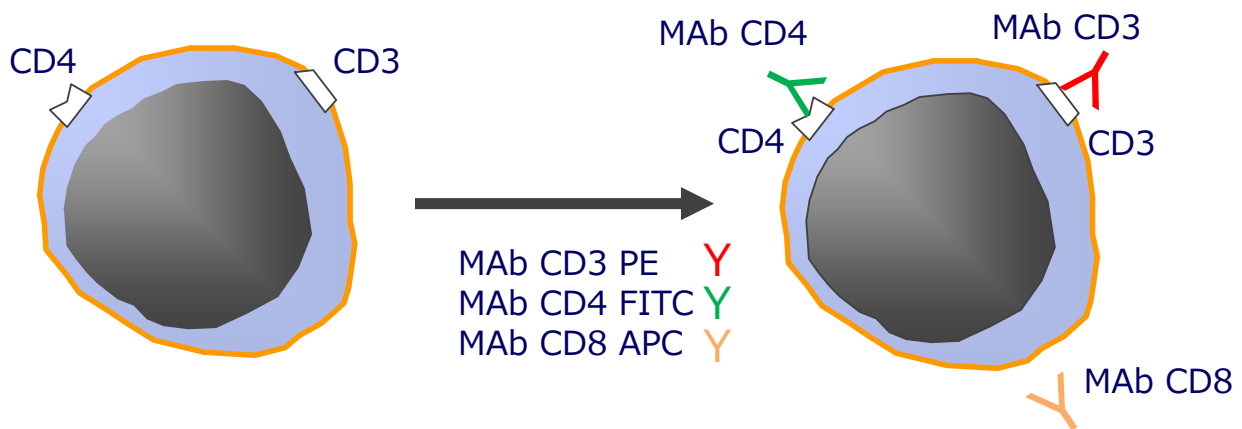
蛍光波長

蛍光は、蛍光色素の励起波長に適した励起光（レーザー）を当てることで発生します

フローサイトメーターでは、搭載されているレーザーや蛍光検出器の種類によって測定できる蛍光色素が異なります



細胞の蛍光標識：Ex. 抗原抗体反応

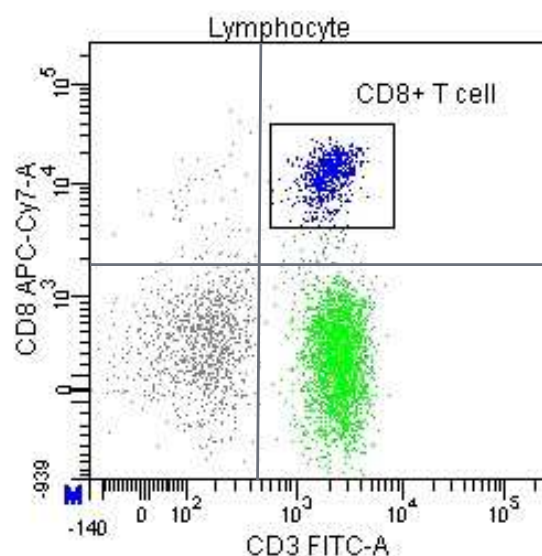
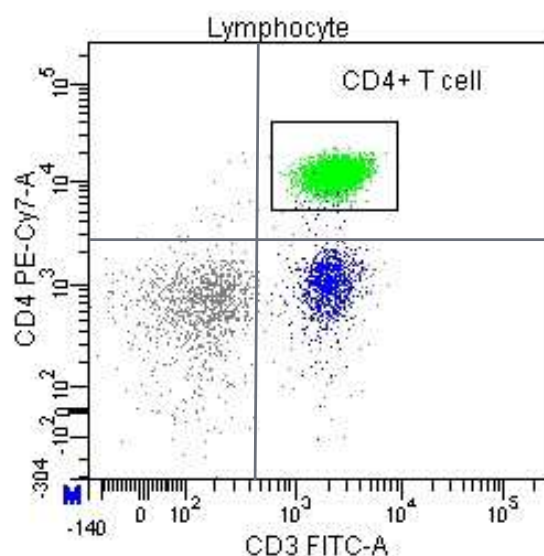


CD # = Cluster of Differentiation
MAb = Monoclonal Antibody

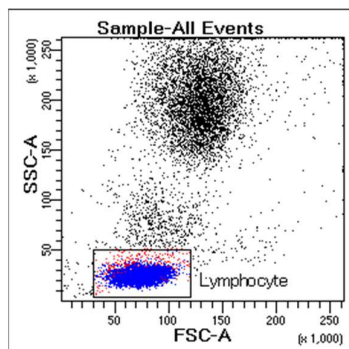


蛍光シグナル解析例

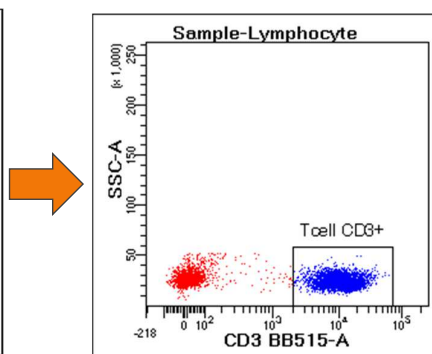
リンパ球の表面抗原解析



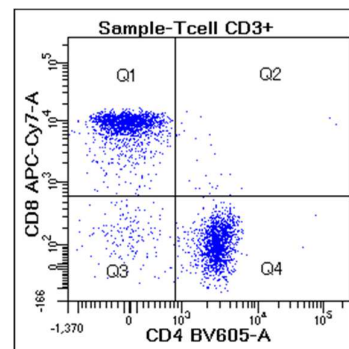
FCMの解析例



① 散乱光で目的集団に囲いをかける



② 目的の蛍光集団に囲いをかける



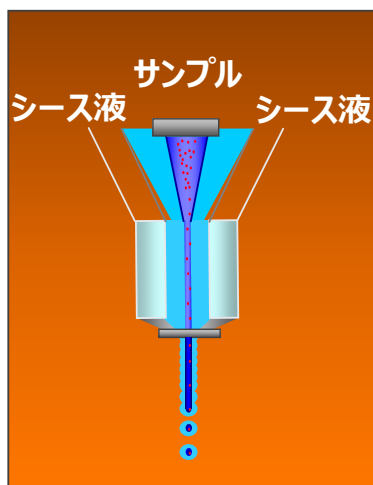
③ 蛍光ポジティブ、ネガティブを4分画マーカーで分ける

Tube: Sample			
Population	#Events	%Parent	%Total
■ All Events	11,023	####	100.0
■ Lymphocyte	5,083	46.1	46.1
■ Tcell CD3+	3,570	70.2	32.4
☒ Q1	1,813	50.8	16.4
☒ Q2	27	0.8	0.2
☒ Q3	152	4.3	1.4
☒ Q4	1,578	44.2	14.3

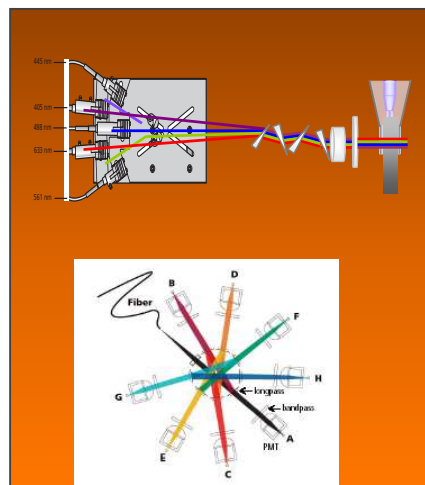
④ 各集団の割合 (%) を表示させる



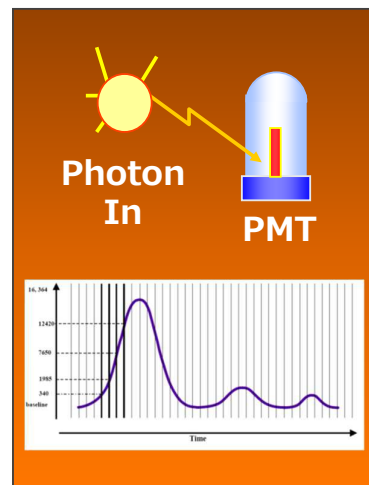
測定原理



流路系



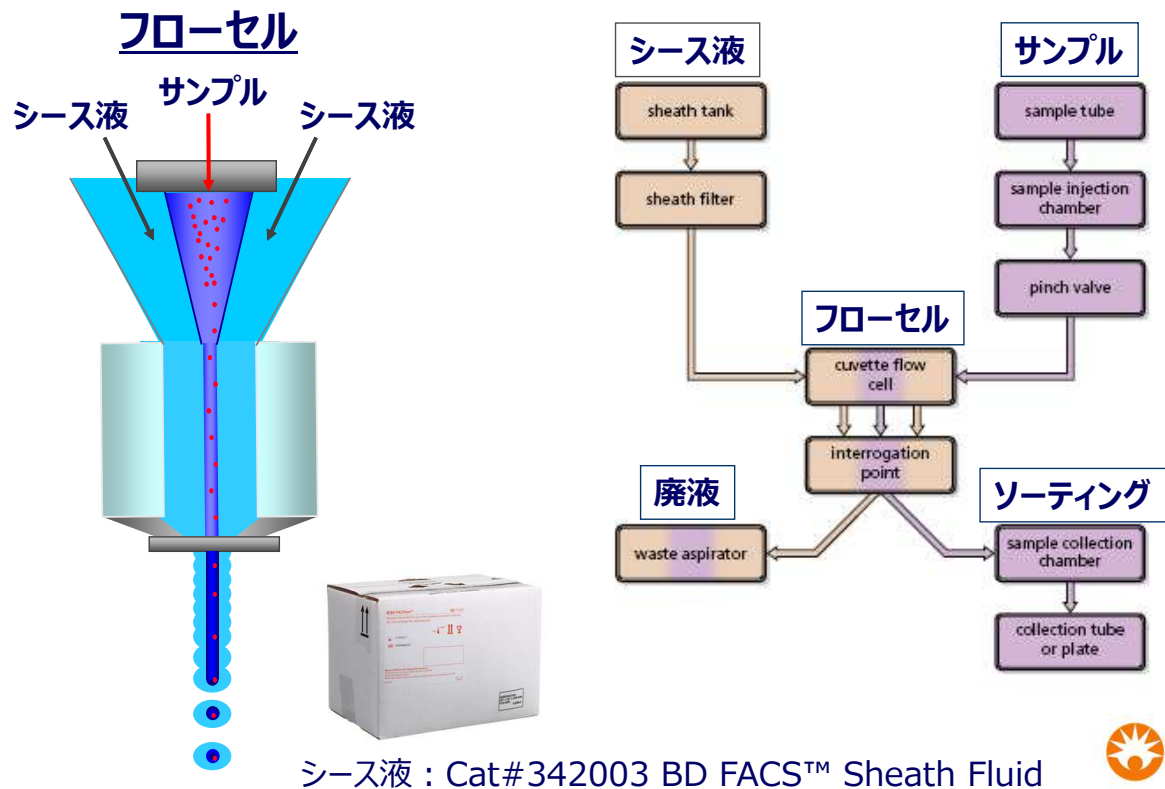
光学系



信号処理系

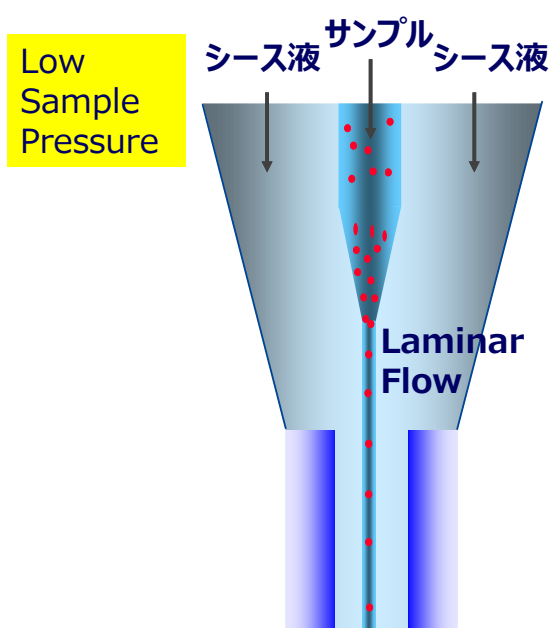


FCMの流路系

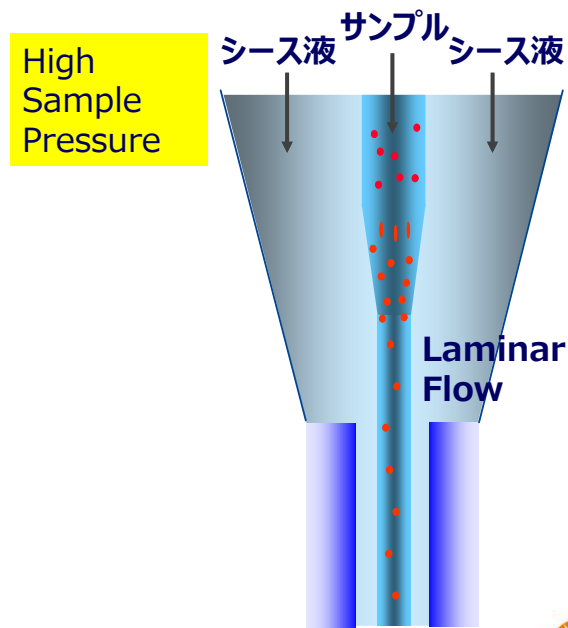


サンプル流量の調節

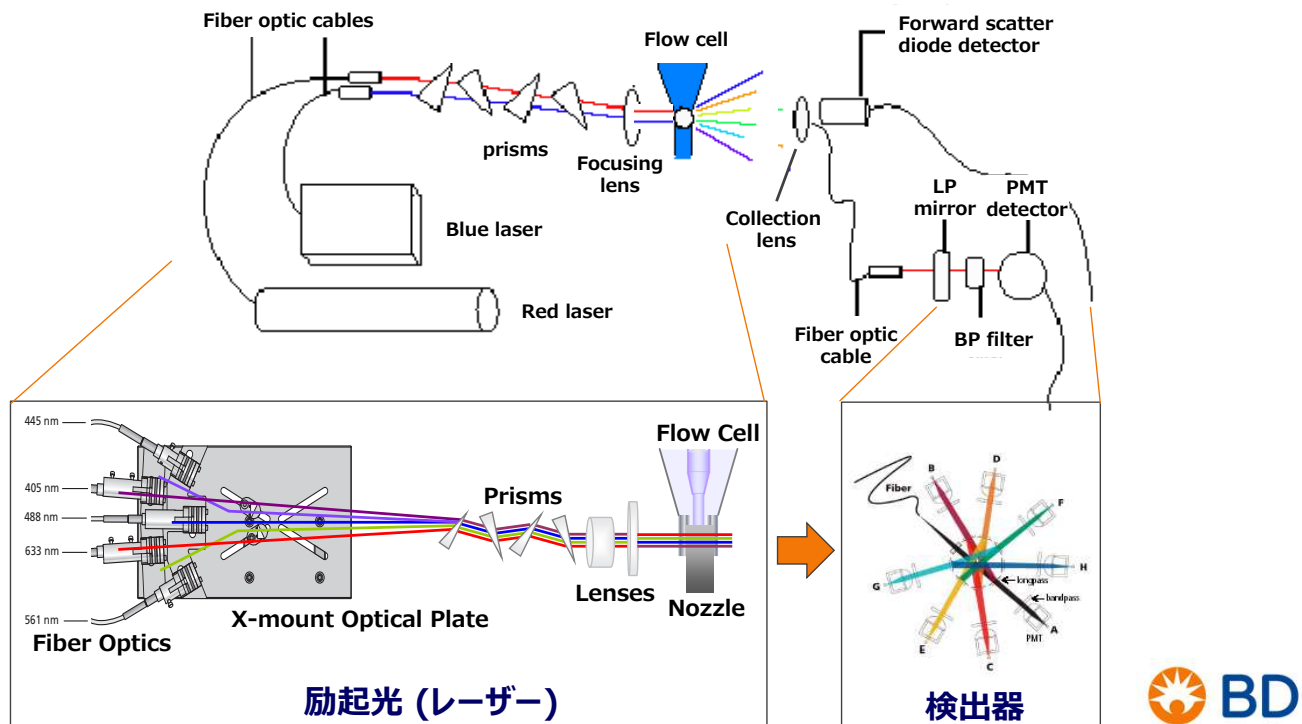
Low Differential Pressure



High Differential Pressure



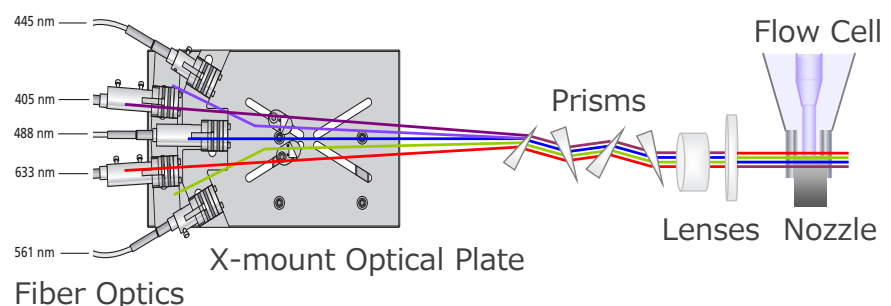
FCMの光学系



FCMの光学系：励起光 (レーザー)

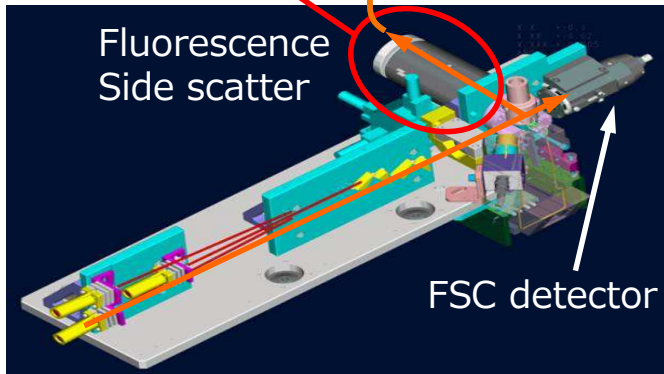
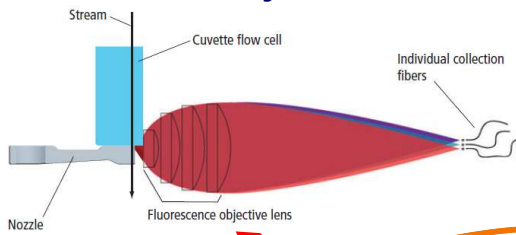
< FCMで使用されるレーザー >

Laser	Wavelength (nm)
Blue	488
Red	633 (640)
Violet	405
UV	355
Yellow-Green	561
Green	532
Blue-Violet	445
NUV	375

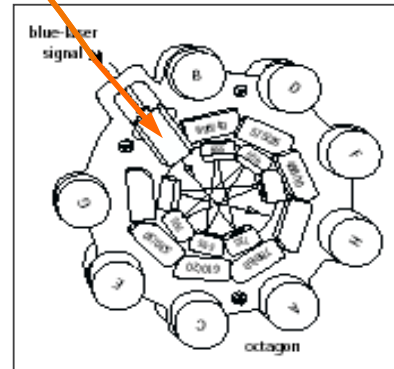


FCMの光学系：集光系

Fluorescence Objective Lens



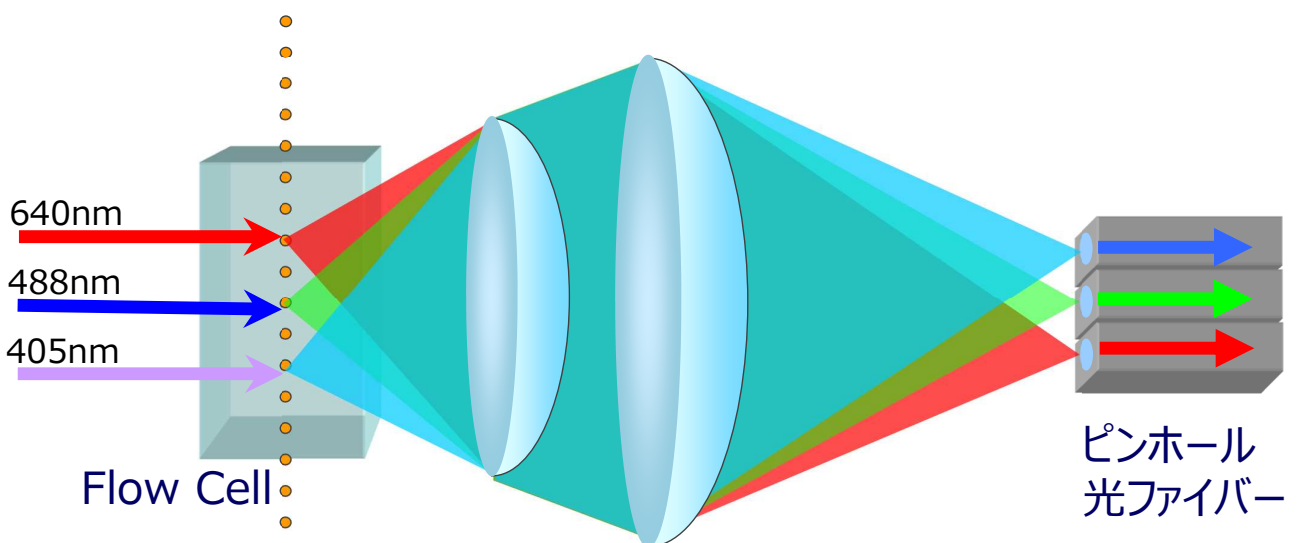
Fiber



Octagon Detector
for 488nm Blue Laser



FCMの光学系：異軸Multi Laserとピンホール方式



Fluorescence Objective Lens

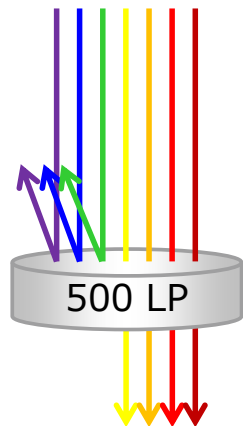


FCMの光学系：光学フィルター

各蛍光色素を識別するためのフィルター

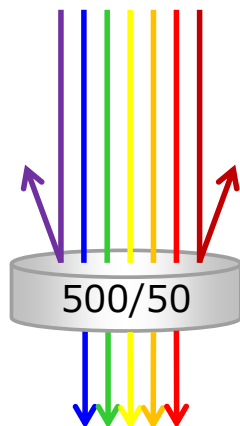
Long Pass Filter

460 500 540



Band Pass Filter

460 500 540



単位: nm

Long Pass (LP) Filter :

フィルター記載の数値より長波長の蛍光を透過させ、数値以下の短波長の蛍光は透過できません。

フィルター表面がダイクロイックミラー加工されていることにより、透過しなかった光信号は一定方向に反射されます。

Band Pass (BP) Filter :

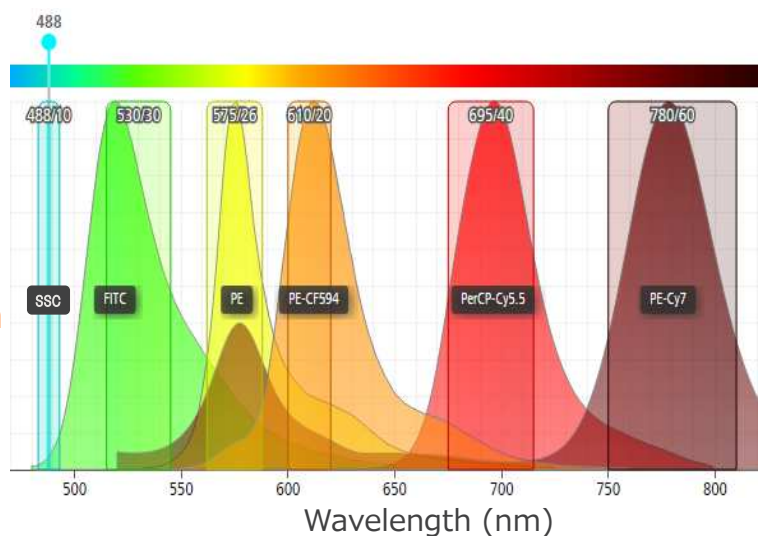
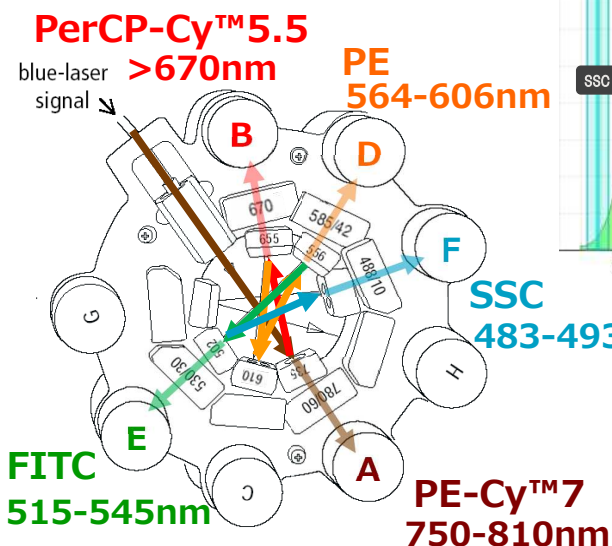
フィルター記載の数値の範囲の蛍光波長のみを通過させます。

Ex.) 500/50 : 500±25nmの蛍光のみを透過します。

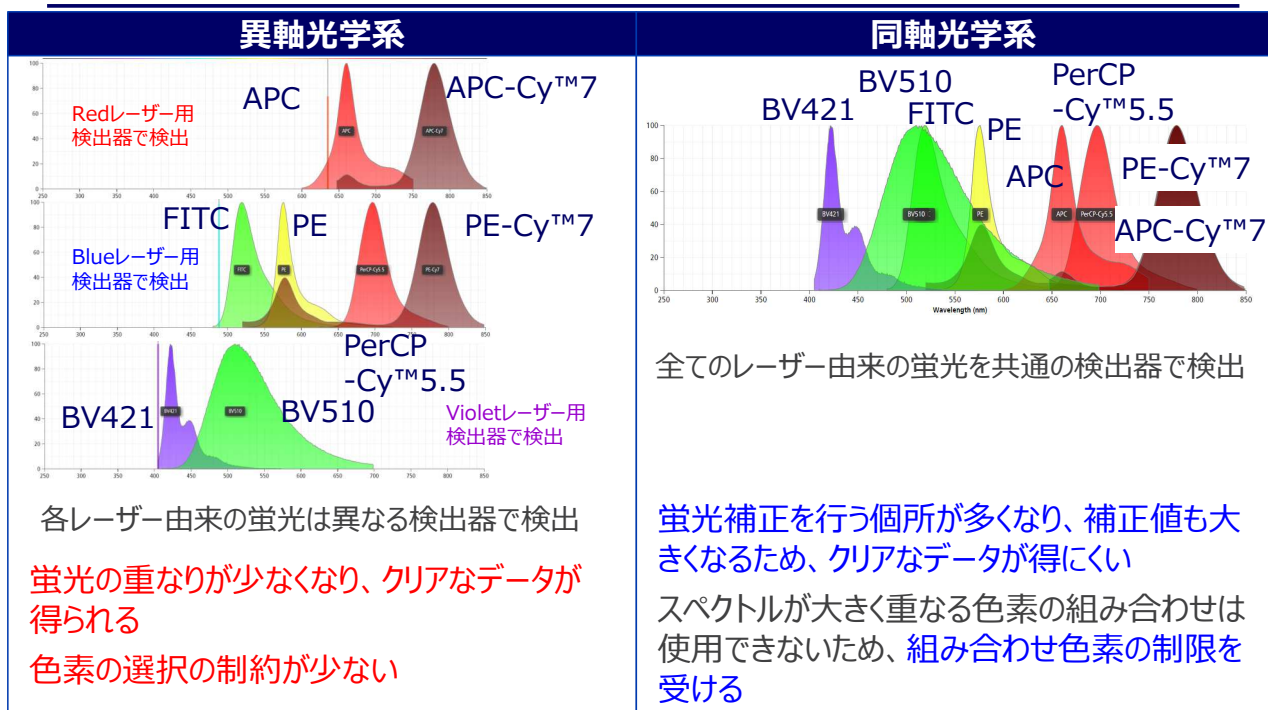


FCMの光学系：検出器 (Blueの場合)

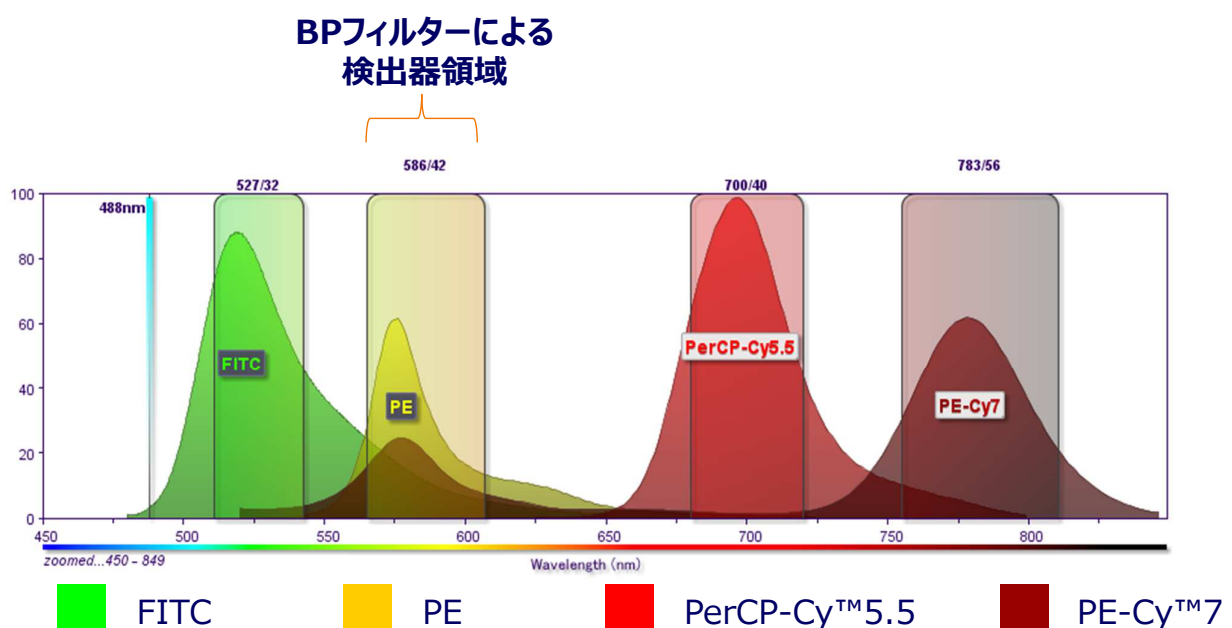
Ex.) BD FACSCanto™ II フローサイトメーター



マルチカラー解析における異軸光学系のベネフィット

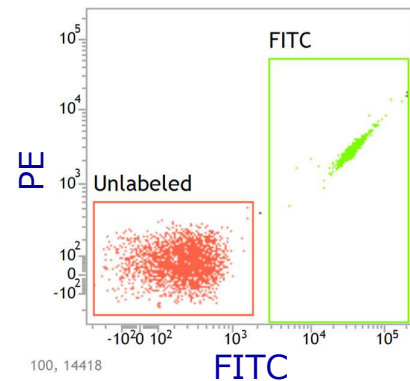
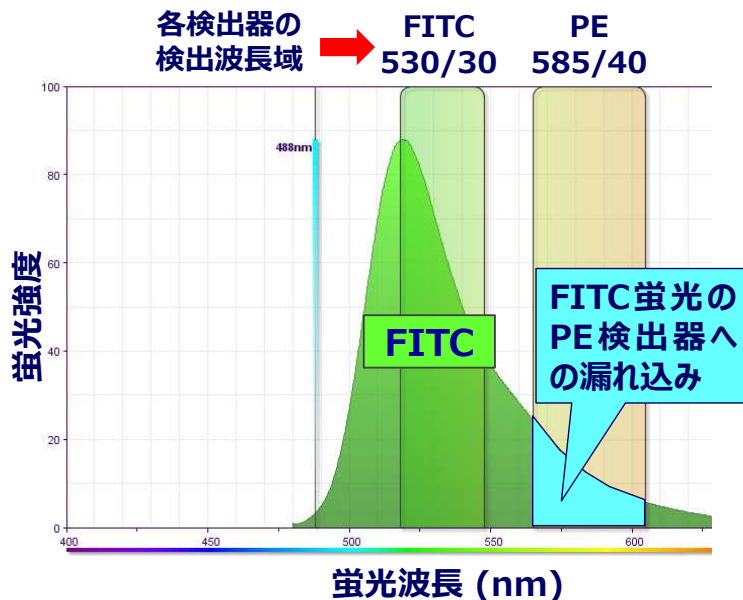


FCMの光学系：蛍光波長のオーバーラップ



FCMの光学系：蛍光補正 (Compensation)

蛍光補正 (コンペンセーション)

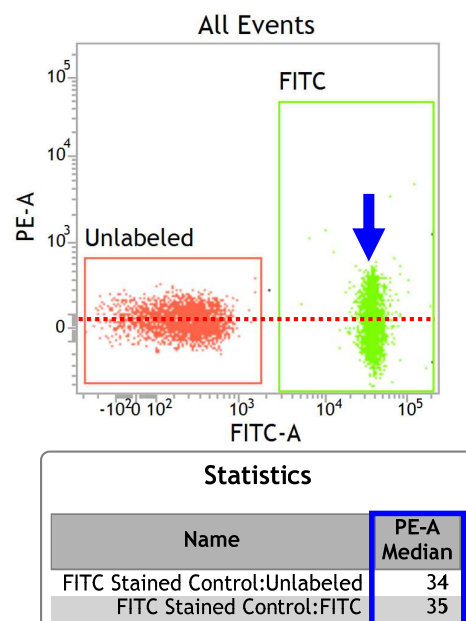
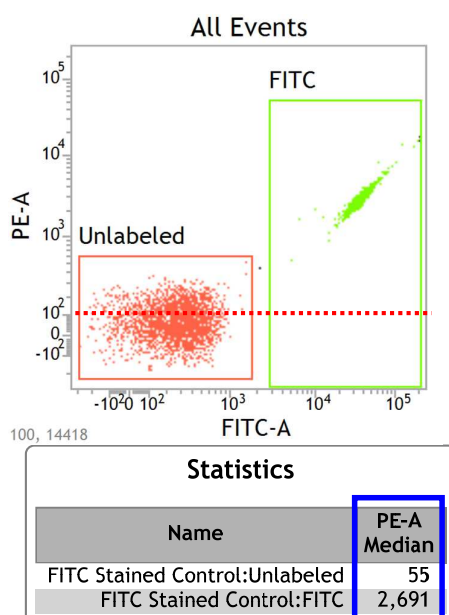


例えばFITCの蛍光はPE検出器に漏れ込みがあるため、FITCとPEの2色で測定すると、FITCポジティブ集団がPEポジティブ領域にも表示されてしまいます。

この場合、蛍光補正を行う必要があります。



FCMの光学系：蛍光補正 (Compensation)

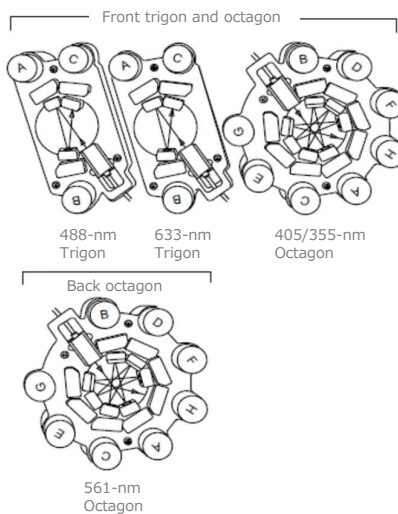


蛍光補正はポジティブ集団の平均値 (MedianあるいはMean) がネガティブ集団の平均値と同じ値になるように行います。



FCMの光学系：検出器と蛍光色素

(Ex. BD FACS Aria™ III セルソーター)

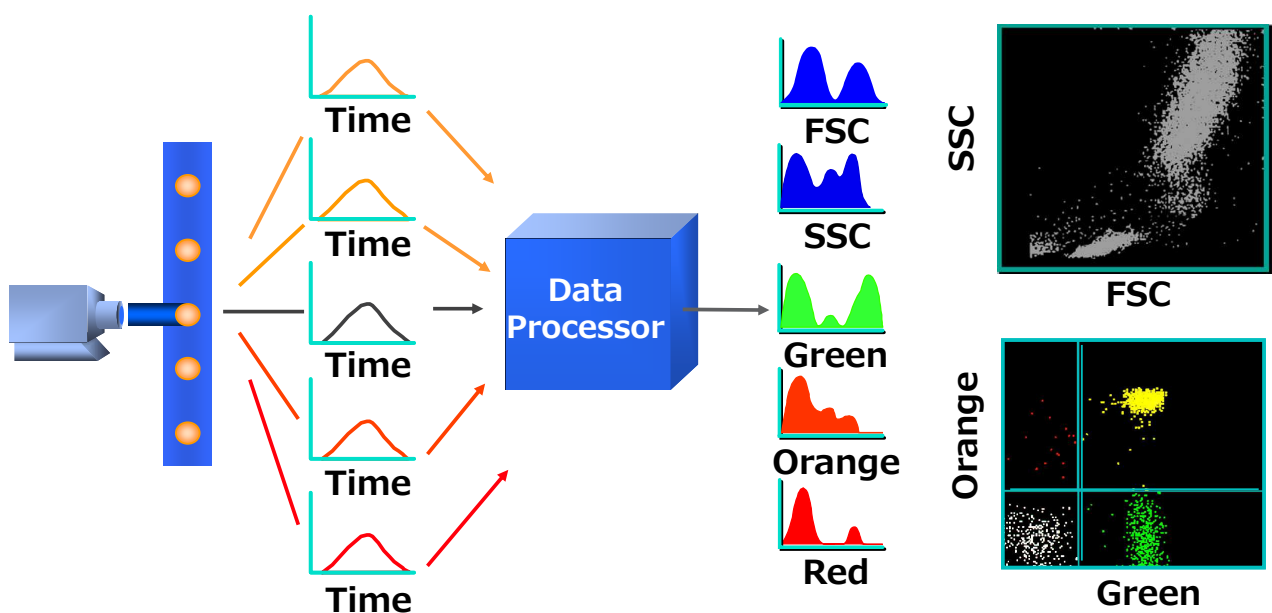


Laser	Slot	BP Filter	LP Filter	Detector
355nm (UV)	A	740/35	690	BUV737
	B	379/28	n/a	BUV395
405nm (Violet)	A	780/60	750	BV786
	B	710/50	690	BV711
	C	660/20	630	BV650
	D	610/20	595	BV605
	E	510/50	505	BV480, BV510, V500
	F	450/40	n/a	BV421, V450
488nm (Blue)	A	695/40	655	PerCP-Cy™5.5, PerCP
	B	530/30	502	BB515, FITC
	C	488/10	n/a	SSC
561nm (Yellow-Green)	A	780/60	735	PE-Cy™7
	B	710/50	685	PE-Cy™5.5
	C	670/14	630	PE-Cy™5
	D	610/20	600	PE-CF594
	E	582/15	n/a	PE
633nm (Red)	A	780/60	735	APC-Cy™7, APC-H7
	B	730/45	690	Alexa Fluor® 700, APC-R700
	C	660/20	n/a	APC

※機種によってレーザーおよび検出器の数、フィルターの数値が異なる場合があります



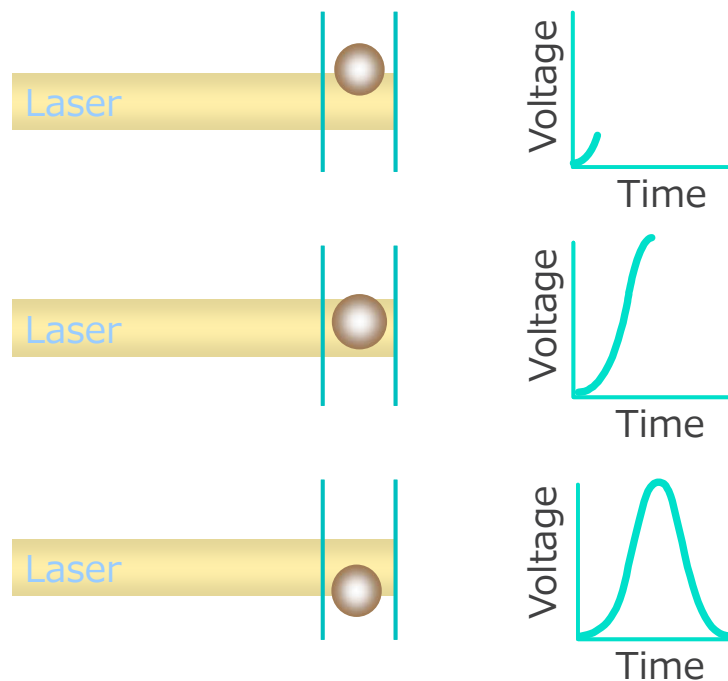
FCMの信号処理系



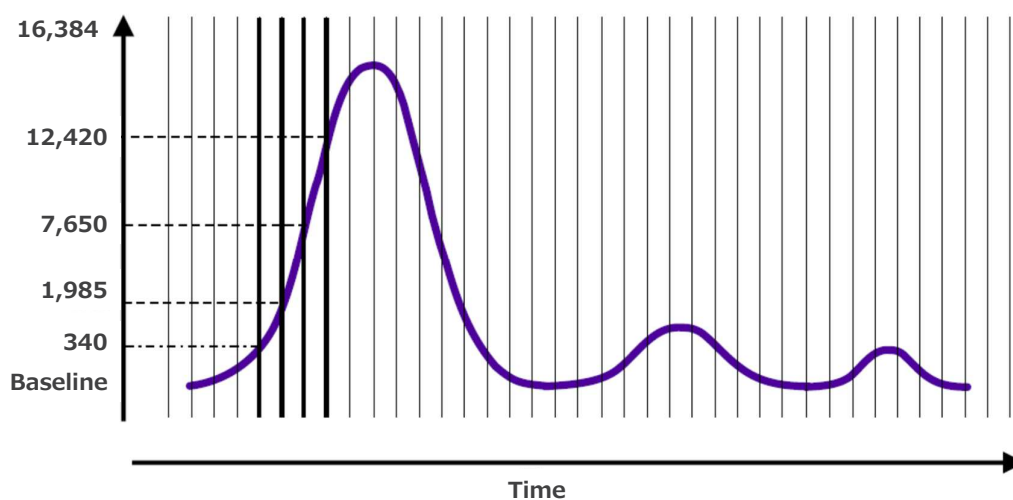
各パラメーターごとにパルスデータを処理



FCMの信号処理系：パルス形成



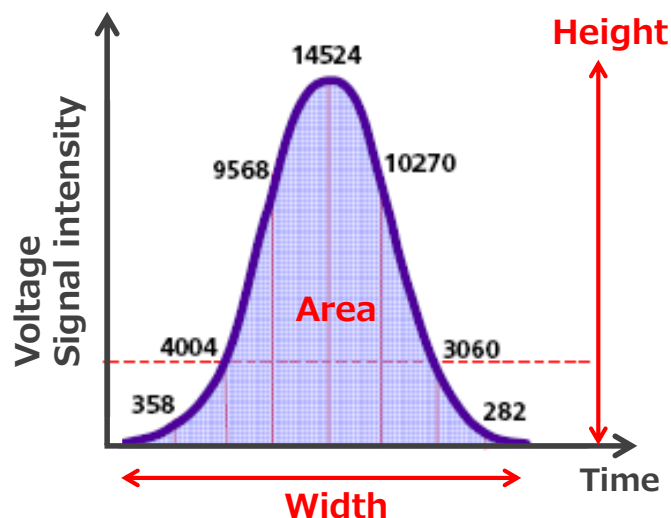
FCMの信号処理系：アナログ-デジタル変換



Sampled 10 Million Times Per Second
Digitize in 16,384 (14bit) Levels



FCMの信号処理系：電圧パルス処理



Height（高さ）：散乱光や蛍光の最大強度（最初にデジタル化される値）

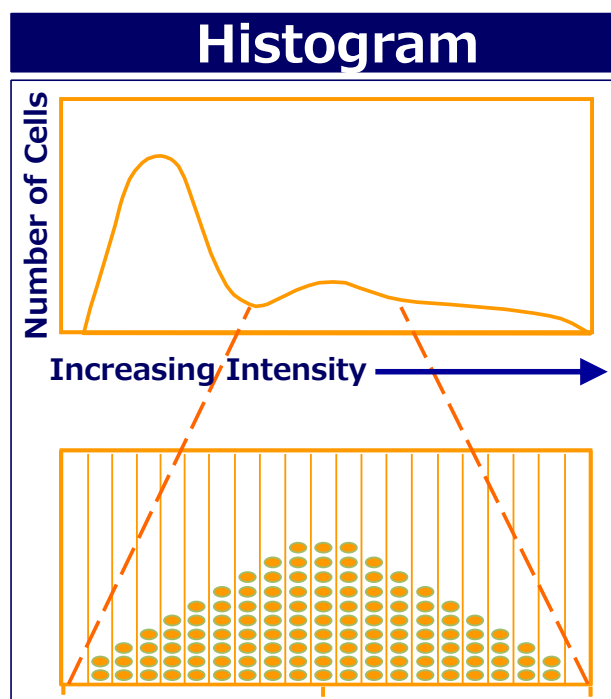
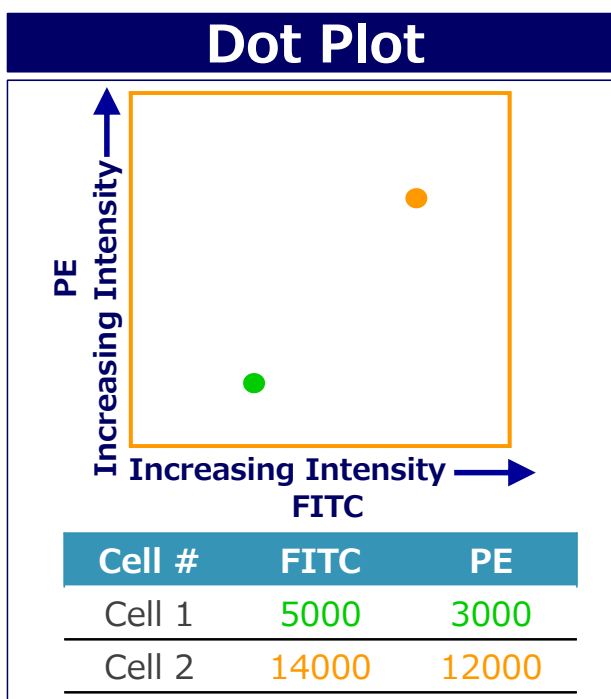
Area（面積）：散乱光や蛍光のトータル量（高さの積分値）

Width（幅）：細胞の大きさや通過時間（面積/高さ x 64K）

Digital data is displayed on 262,144 scale



データの表示：Dot PlotとHistogram



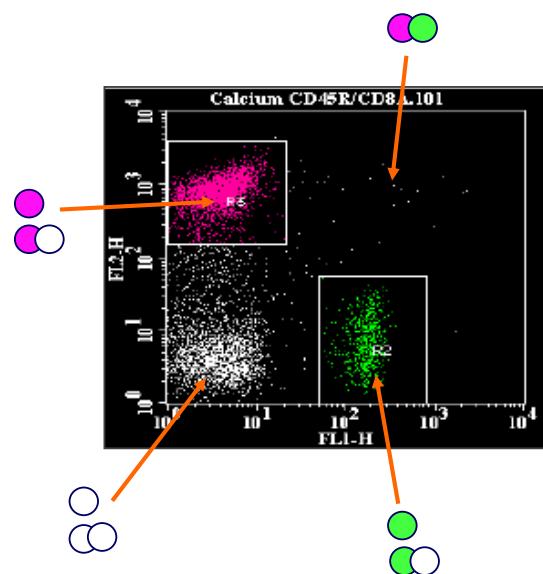
ダブレットのソーティングへの影響

ダブレット：

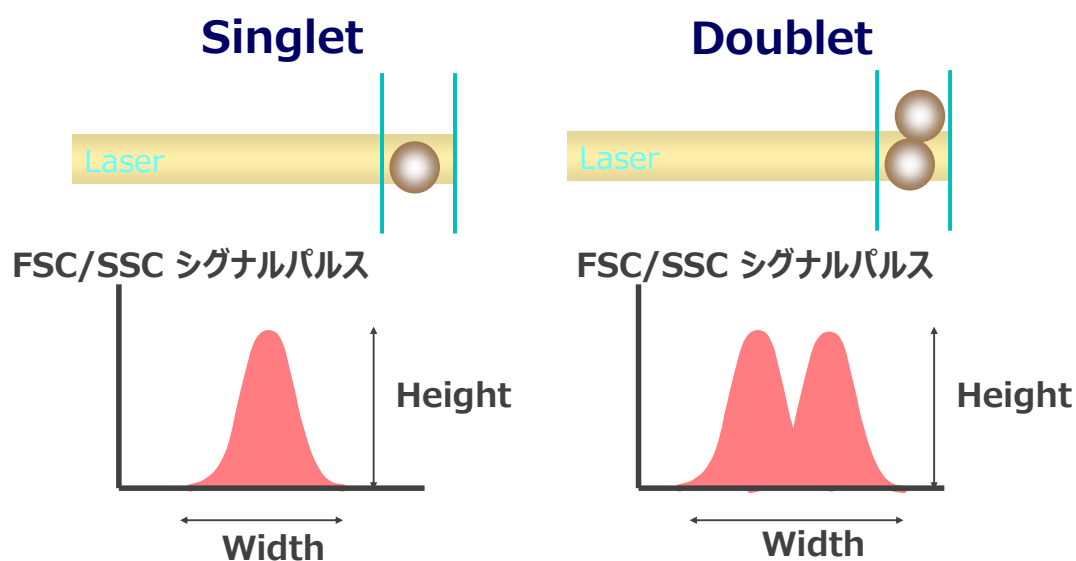
2つの細胞が同時に検出器を通過し、1つの細胞として認識されてしまうイベント。

高速ソーティングなど流路における細胞密度が高くなると、ダブレットの検出確率が高くなります。

※ソーティングの純度を低下させる主な原因となります



ダブレット除去：HeightとWidthの利用



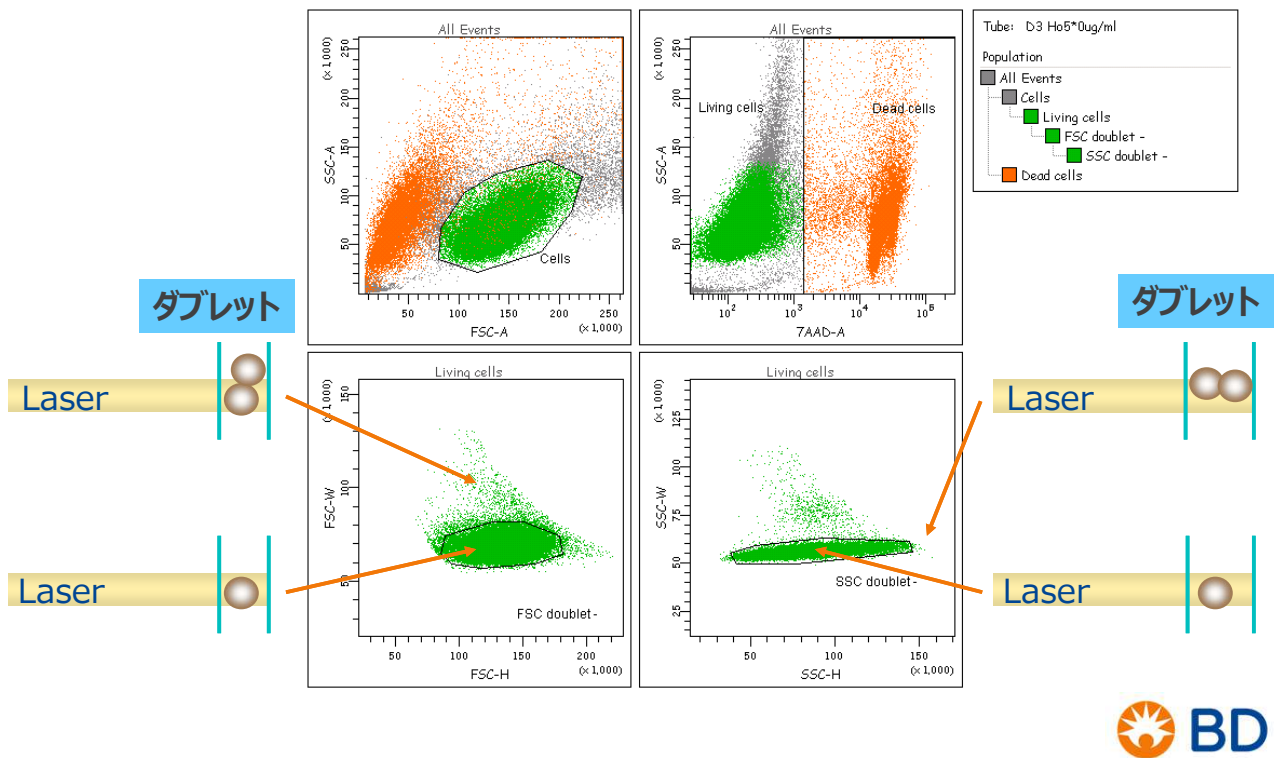
Parameter

Height Singlet : Doublet = 1:1

Width Singlet : Doublet $\approx$ 1:2

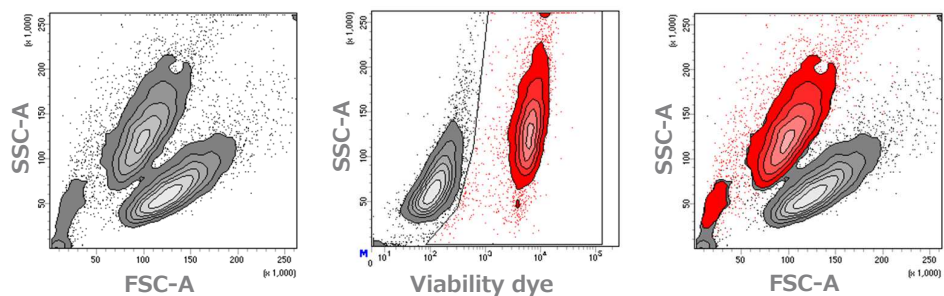


ダブレット除去

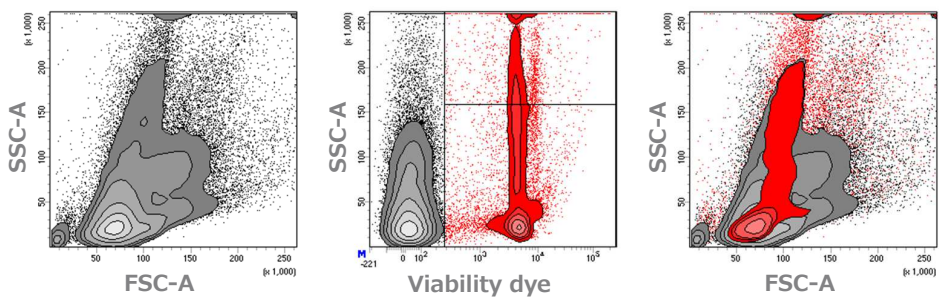


死細胞除去

生細胞と熱処理
による死細胞
(HeLa 細胞)



マウス骨髓細胞



- 熱処理によるHela細胞の死細胞は、散乱光により分離することが可能
- 生死判別色素は死細胞を検出し、ゲーティングにより排除することができる

色素名	非固定細胞	固定細胞	検出器	レーザー
DAPI	√	X	BV421	UV/Violet
Via-Probe Green	√	X	FITC	Blue
PI	√	X	PE	Blue/YG
7-AAD	√	X	PerCP-Cy™5.5	Blue/YG
DRAQ7™	√	X	APC	Red
Via-Probe Red	√	X	APC	Red
FVS450	√	√	BV421	Violet
FVS510	√	√	BV510	Violet
FVS575V	√	√	BV605	Violet
FVS520	√	√	FITC	Blue
FVS570	√	√	PE	Blue/YG
FVS620	√	√	PE-CF594	Blue/YG
FVS660	√	√	APC	Red
FVS700	√	√	AF700	Red
FVS780	√	√	APC-H7	Red

生死判定色素

- 核染色剤は核酸と非共有結合的に結合する
- 洗浄手順は不要
- 非固定サンプルのソートに推奨される
- BD Horizon™ Fixable Viability Stain (FVS) は細胞のあらゆるアミンと共有結合するため、固定サンプルも測定可能
- 染色後の洗浄操作が必要



お問合せ

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)



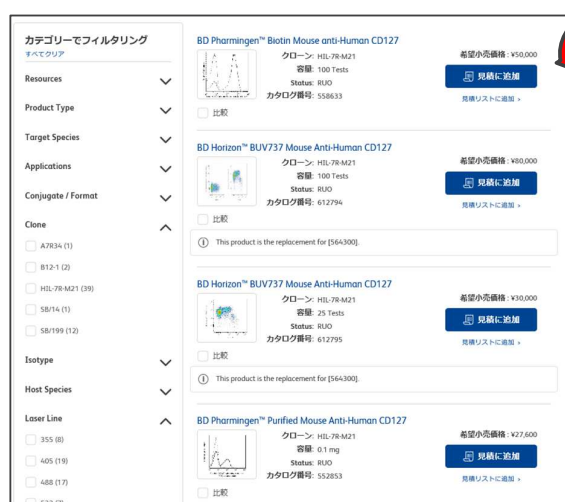
BD製品の検索

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悩みを解決します!!

解析マーカー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

低発現マーカーの検出に最適

- ・ 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

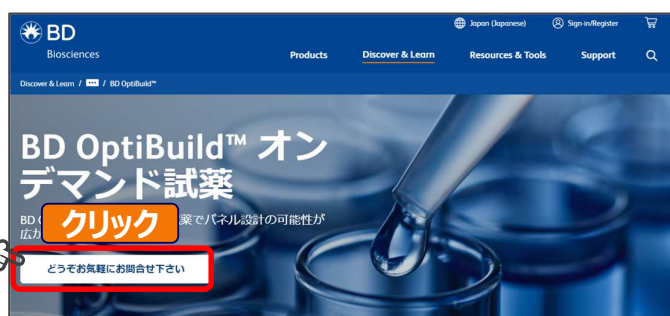
(マルチカラー解析でのパネルに手軽に組み込んでいただけます)



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



© 2022 BD. BD, the BD Logo and all other trademarks are property of Becton, Dickinson and Company.