

1. 血液細胞の免疫蛍光染色とフローサイトメトリー解析

1-1. フローサイトメトリー (Flow Cytometry) とは

細胞浮遊液をフローセル内を高速で流し、個々の細胞の形質等についてレーザー光を用いて解析する研究手法。

- ・ フローサイトメーター (Flow Cytometer)
 - フローサイトメトリーにおいて使用する細胞解析用の装置
今回は BD Accuri™ C6 を使用する。



デスクトップ型フローサイトメーター

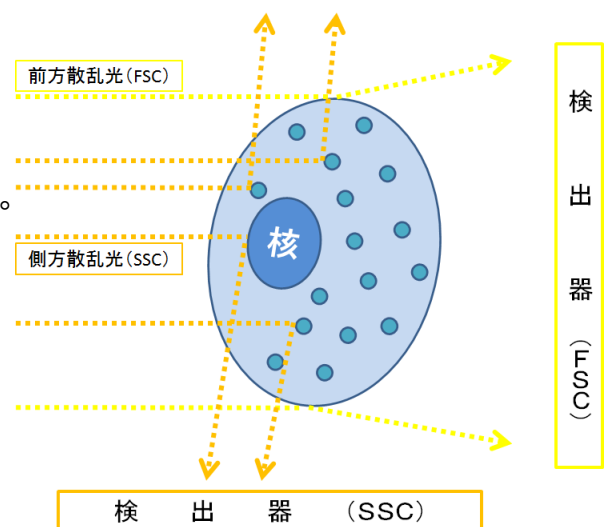
1-2. フローサイトメーターで何ができるか？

1. 細胞の相対的大きさや内部構造の違いを解析する。
2. 細胞が持つ分子を免疫蛍光染色法で染色後、蛍光強度や蛍光の種類を測定することで細胞が持つ分子の種類や量を解析する。これにより細胞種や分化段階、活性化レベルなどの様々な性質を解析できる。
3. DNA を定量的に染色する蛍光色素 (PI など) を用いることによって、細胞周期を解析することができる。さらにアポトーシスに関連する物質の解析と組み合わせることにより、アポトーシス誘導の各ステージを解析することも可能である。

1-3. フローサイトメーターの原理

BD Accuri™ C6 フローサイトメーターではフローセル内を流れる細胞にレーザー光をあて、細胞からの前方散乱光 (FSC/180° SC)、側方散乱光 (SSC/90° SC)、4 つの蛍光の 6 つのパラメータを測定することができる。

- ・ FSC (Forward scatter / 180° scatter = 前方散乱光) = 細胞の大きさを示す。
 - 細胞の表面積に散乱強度が比例する。
 - レーザー光軸に対し 180 度の角度で検出する。
- ・ SSC (Side scatter / 90° scatter = 側方散乱光) = 顆粒または細胞内構造を示す。
 - 細胞の顆粒や構造状態に散乱光強度が比例する。
 - レーザー光軸に対し 90 度の角度で検出する。
- ・ FL1、FL2、FL3、FL4 (Fluorecence = 蛍光)
 - 特定の波長に対応したフィルターを用いることで波長の異なる 4 種類の蛍光を測定することができる。



【 今回使用するフローサイトメーター 】

BD Accuri™ C6

BD Accuri™ C6 は小型のフローサイトメーターでありながら、2 レーザーを搭載しさまざまな解析を可能にしている。

1-4. 免疫抗体染色

抗体とは何か

リンパ球(B細胞)が作る物質。特定の(タンパク質)分子に結合する。
体の中に侵入してきた病原菌や毒素に結合して、破壊したり、無毒化したりする作用を持っている。

例：抗血清 馬などに蛇毒を注射し、蛇毒に対する抗体を作らせたもの。
マムシなどの毒蛇にかまれたときに使用する。これを注射すると抗体が結合し毒蛇の毒を中和し、毒の作用を失わせることができる。

ワクチン あらかじめウイルスや菌の死がいなどを注射し、体に抵抗力をつける。
ワクチンを注射すると体の中でウイルスや菌に対する抗体が作られ、発症を防いだり、発症しても症状を緩和したりすることができる。

免疫抗体染色とは

抗体が特定の物質に結合する性質を利用し、細胞が持っている分子の解析を行うことができる。
あらかじめ解析したい分子A(抗原)を細胞から抽出・分離し、ネズミなどの動物に注射し、その体内で抗体を作らせる。このようにして動物の体内で作られた抗体分子は抗原Aに結合する性質を持つ。

この抗体を動物の血液中などより取り出し、精製したものに蛍光物質を結合させる。

この蛍光標識抗体を細胞や組織に反応させると、抗体は抗原として使われた物質Aに結合する。
すると、抗原Aを持つ細胞は抗体に結合した蛍光色素により光を放つようになる。この光を蛍光顕微鏡や今回使用するフローサイトメーターにより解析することで、抗原Aの分布や、細胞の特徴などを解析することができる。

1-5. タンパク質に結合させて使える蛍光色素

FITC : フルオレセインイソシアネート

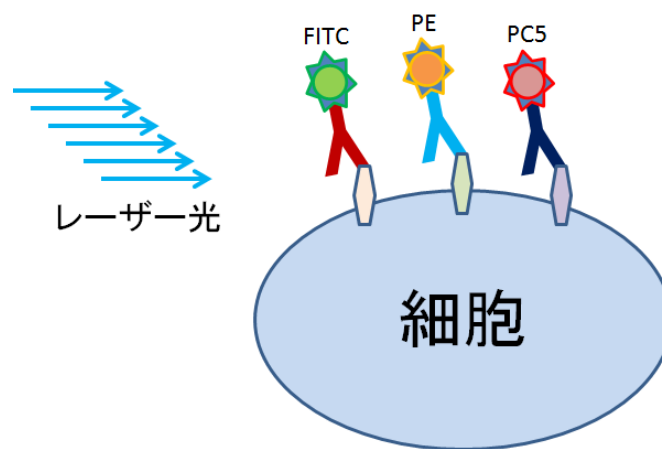
励起光 488nm → 蛍光は緑色 (530nm) — FL1 で検出

PE : フィコエリスリン

励起光 488nm → 蛍光はオレンジ色 (585nm) — FL2 で検出

PC5 : フィコエリスリン・インドジカルボシアニン

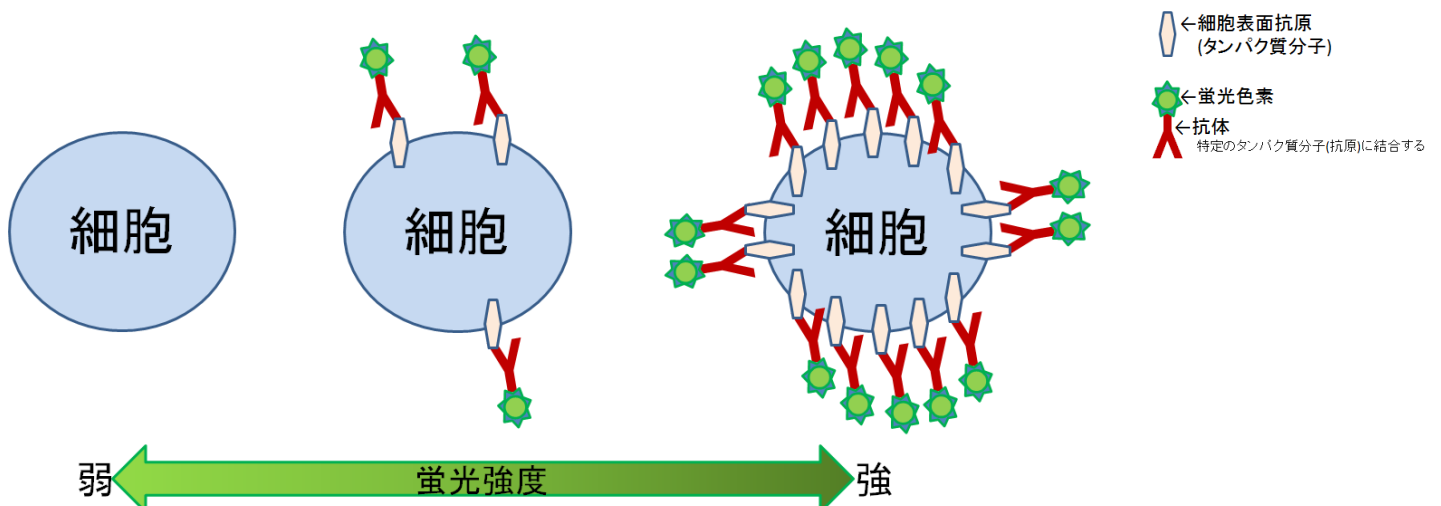
励起光 488nm → 蛍光は赤色 (670nm) — FL3 で検出



1-6. 蛍光強度

一つの細胞に結合する蛍光標識抗体は、その細胞の表面抗原(※)の量と比例することから、蛍光強度と表面抗原の量が比例する。

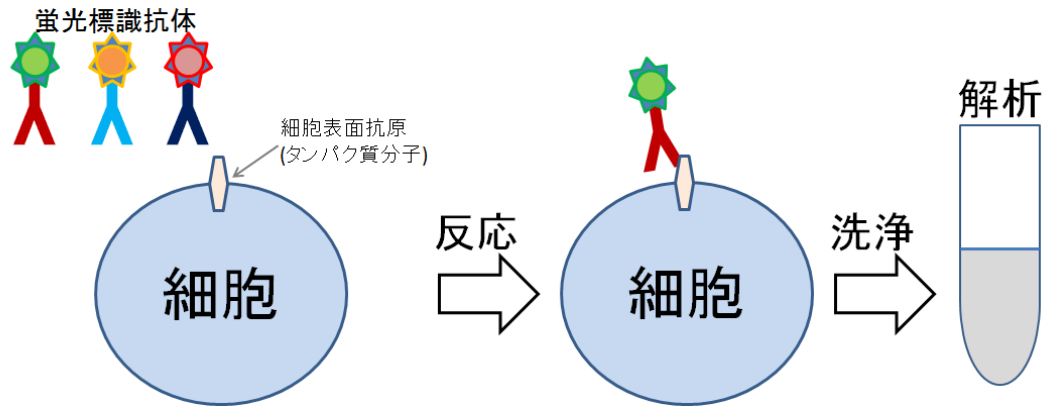
(※) 私たちの体は 200 種類以上の細胞でできている。細胞はその種類や分化段階により持っている分子が異なっている。この分子のうち細胞表面に表れるものが、今回の実験でも細胞表面抗原として使われている。



2. 抗体による細胞表面抗原の染色

直接免疫蛍光染色

蛍光色素 FITC や PE と結合している抗体を用いて細胞集団を処理し、細胞表面の特異的な抗原を持つ細胞を検出する方法。

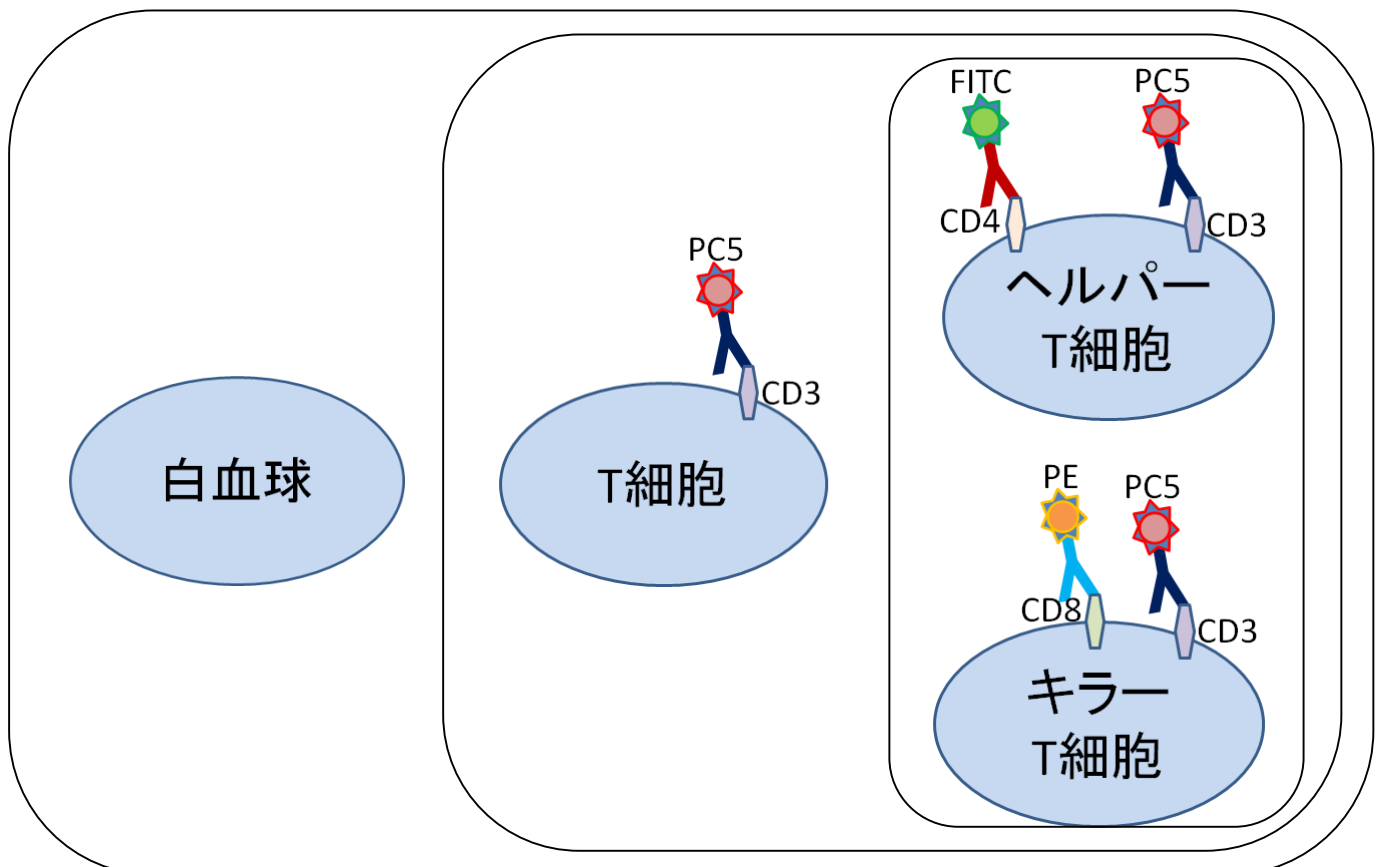


今回使用する抗体と蛍光物質の組み合わせ

FITC + 抗 CD4 抗体 → ヘルパーT 細胞に発現する分子

PE + 抗 CD8 分子 → キラーT 細胞に発現する分子

PC5 + 抗 CD3 分子 → ヘルパーおよびキラー2 つの T 細胞に共通して発現する分子



3. MACS システムによる細胞分離の仕組み

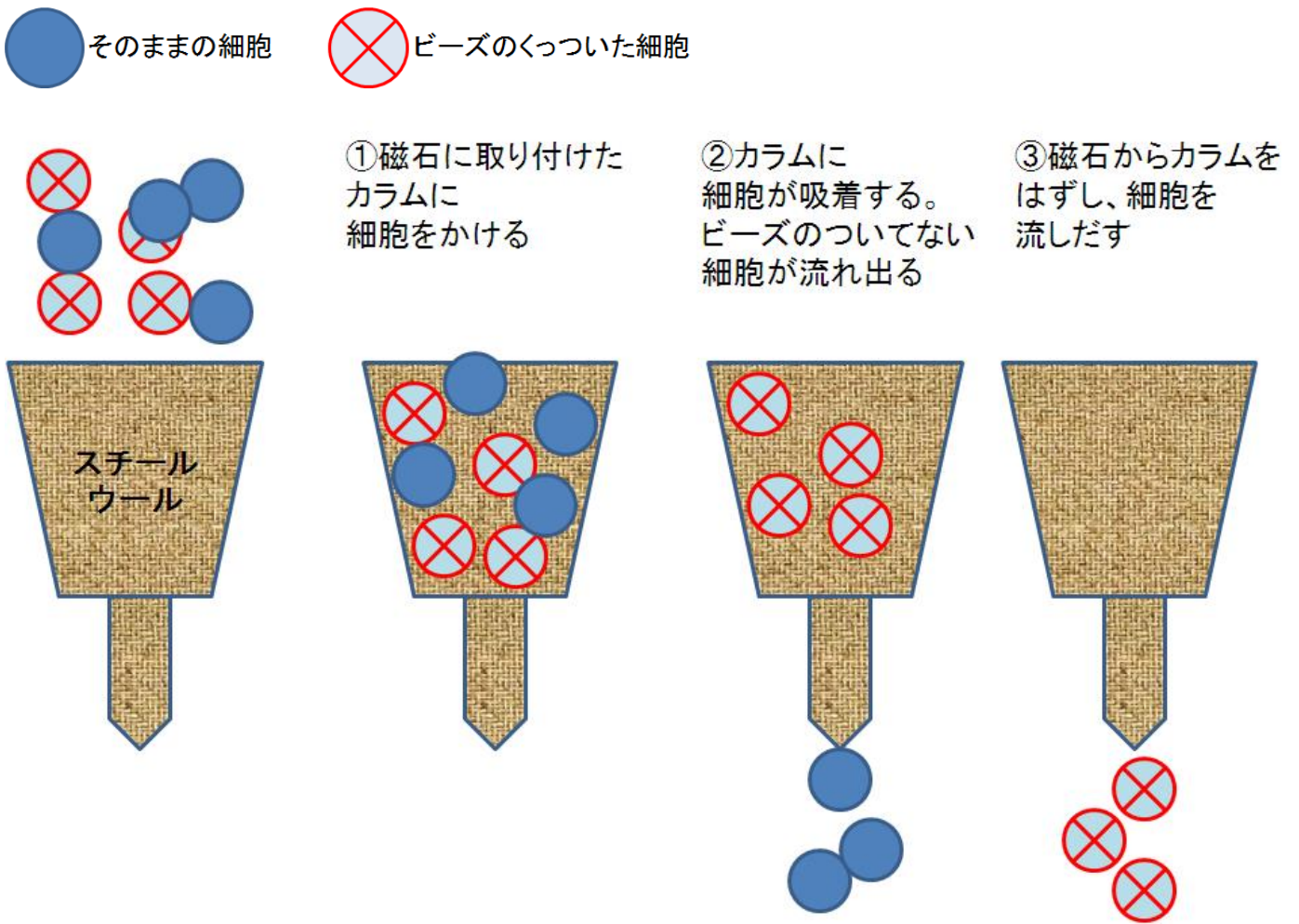
MACS システム

磁気ビーズをとスチール(鉄)ウールカラムを用いた細胞分離の技術である。

集めたい、もしくは取り除きたい細胞に磁気ビーズを標識(くっつける)し、これをスチールウールに吸着させることにより、選択的に分離することができる。

ビーズを結合した抗体を用いることで細胞表面抗原に選択的にビーズをくっつけることができる。

今回は、CD4 または CD8 細胞に磁気ビーズを結合し、分離を試みる。



実習 血液細胞の免疫蛍光染色とフローサイトメトリー解析

<器材>

- マイクロピペット □チップ □チップ捨て
- 15ml チューブ □1.5ml チューブ □遠心分離機
- アイスポックス □タイマー □シリンジ
- MACS 細胞分離装置(カラム、セパレーター) □フローサイトメーターBD Accuri™ C6

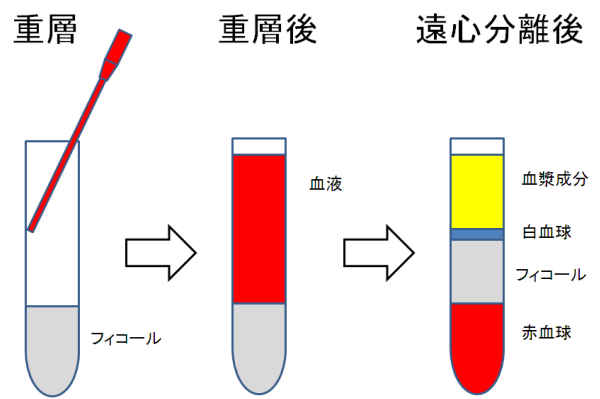
<試薬>

- ヘパリン血 □フィコール □PBS
- 蛍光標識抗体 (抗 CD3 抗体-PC5、抗 CD4 抗体-FITC、抗 CD8 抗体-PE)

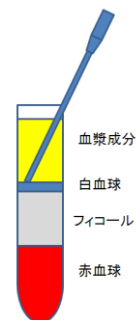
血液細胞の分離 (白血球分画の分離)

<手順>

- 1 ヘパリン血を PBS で 2 倍希釈する。
- 2 フィコールの上に血液を静かに重層する。
- 3 回転速度 400G、30 分(室温)で遠心分離する。
- 4 白血球層をパスツールピペットで採取する。
- 5 回収した細胞液を新しいチューブに移す。
- 6 PBS を 5ml 加える。
- 7 回転速度 400G 10 分(室温)で遠心分離する。
- 8 上清捨てて、細胞ほぐす。
- 9 PBS を 100 μ l 加える。



白血球層を回収



蛍光抗体法による白血球細胞の染色

<手順>

- 1 調整した細胞液 50 μ l を抗体液の入ったチューブ①~③に加える。

- 抗体入りチューブ
- ①抗体なし
 - ②抗 CD3 抗体-PC5、抗 CD4 抗体-FITC、抗 CD8 抗体-PE
 - ③抗 CD8 抗体-PE

- 2 タッピングして混ぜる。
- 3 氷上に置き 15 分待つ (ふたを閉め、光が当たらないようにする)。
- 4 PBS 500 μ l 加え、4,000rpm、1 分間遠心する。
- 5 上清を捨てる。細胞を吸わないように気をつける。
- 6 タッピングして細胞をほぐす。
- 7 チューブ①~③に PBS 500 μ l 加える。

MACS システムによる細胞の分離とサンプルのフローサイトメトリー解析

<手順>

- 8 チューブ②と③を 4,000rpm、1 分間遠心する。（チューブ①はそのままにしておく）
- 9 上清を捨てる。細胞を吸わないように気をつける。
- 10 タッピングして細胞をほぐす。
- 11 チューブ②に PBS 500 μ l 加える。
- 12 チューブ③に Macs ビーズ 20 μ l 加える。
- 13 チューブ③を氷上に置き 15 分待つ（ふたを閉め、光が当たらないようにする）。
- 14 チューブ③を PBS 500 μ l 加え、4,000rpm、1 分間遠心する。
（チューブ②はそのままにしておく）
- 15 上清を捨てる。細胞を吸わないように気をつける。
- 16 タッピングして細胞をほぐす。
- 17 チューブに PBS 500 μ l 加える。
- 18 Macs カラムにチューブ③の液を入れる。
- 19 Macs カラムから落ちてくる液をチューブ④に集める。
- 20 Macs カラムを磁石から外し、チューブ⑤の上に立てる
- 21 PBS 1ml をカラムに加え、残りの液をシリンジで押し出しチューブ⑤に集める。
- 22 チューブ①②④⑤内の細胞をフローサイトメトリー解析する。

参考文献・資料等

- 1 フローサイトメトリー実践プロトコール M. G. Ormerod 監修、大熊勝治監訳 平成 6 年
廣川書店
- 2 ベックマンコルター社 FCM の原理入門講座
<https://www.bc-cytometry.com/FCM/fcmprinciple.html>
- 3 ベクトンデッキンソン社 フローサイトメーターの原理
http://www.bdbiosciences.com/jp/services/training/elearning/flow_principle/intro.jsp
- 4 滋賀医科大学 医学部附属実験実習機器センター平成 9 年度「特別講習会」原稿
<http://www6.tok2.com/home/yukiso/kyo3/facs/facsmaid/FAgaid.html>
- 5 Miltenyi Biotec 社 マニュアル