

Q&A No.18

今回のテーマ:

フローサイトメトリーによるヒト乳癌凍結保存組織の異数体の検索 について

質問:

解析の現状について

解析方法の概略は、凍結切片からの細胞単離は、ハサミによる物理的細切法に加え、BD社の酵素法を用いたTTDRキットを用いています（添付資料1）。分散は血球計算盤での確認で、良好と考えています。新鮮材料が得られた症例の解析において、新鮮な未凍結検体のデータと凍結検体のデータとで再現性が疑われる結果でした（添付資料2：凍結検体でノイズのような細胞集団が重なって各ピークの分離が不良）。
～中略～

質問内容

- ①添付資料2で示した結果のうち、そもそもノイズの出ていない新鮮材料のデータは有意な結果か
- ②現行のプロトコールで改善・確認が必要な点がないか。特に試薬の選択や濃度、遠沈条件などについて
- ③裸核法プロトコールで推奨する方法が存在するか。界面活性剤に替わる方法や追加する方法、トリプシン処理などを施行する際の試薬、濃度、条件などについて

質問者への現状の確認事項

- ①解析の目的：異数体の有無であり、同時に解析するその他の項目はない。
- ②対象材料：ヒト乳癌の未固定および凍結保存組織（2002-2020年は液体窒素、2021年は-80°Cディープフリーザー）。2-5mm平方程度の組織片、厚み1mm程度の大きさで、RNAの採取などを考慮した汎用性のある保存方法としている。
- ③使用機器の熟練度：Canto IIを使用していたが、メッシュ利用の有無や不慣れな操作でツマリを生じたこと、共同利用機器における高いPI濃度の悪影響を考慮してCaliburに変更し実施しているが、機器の操作に不安がある。

④ガイドラインに添った方法での実施経験およびTTDRキットを選択した理由：FCMによるDNA

Aneuploidy検索のガイドラインや三村先生の論文（Cytometry Research 27（2）：1～7，2017）を参考に実施したが、実際のデータ取りで上手くいかず、TTDRの使用を勧められた。

回答

DNA-aneuploidy 解析を実施するにあたり、処理が容易な末梢血や骨髄血などの造血細胞を対象に、界面活性剤による裸核化法をガイドラインに添って実施し、機器の設定や解析プロトコル作製、ゲート設定の確認を十分に行った後に、様々な新鮮組織を対象とした Triton X-100 法で経験を積まれることが重要と思われます。酵素カクテル法やトリプシン処理法は、新鮮材料の細胞単離や FFPE 材料の細胞分散に利用されますが、凍結生検体では全て消化され核の崩壊や DNA の状態の変化とともに PI の染色性も変わってしまう恐れがあります。なお、TTDR の利用については、新鮮組織のみの適用のようです。パラフィン包埋についてはテストしていないとの記載があり、凍結切片については記載がありません（BD 社）。最も簡便で精度の高い、界面活性剤を用いた方法の習熟に取り組んで頂くことが近道と考えます。以下に、経験豊富な研究者の回答がありますので、参考にして下さいますようお願い致します。

回答 1

- 1) Debris について：TTDR 反応後に TritonX-100 処理を行うと細胞へのダメージが強すぎるため Debris が生じやすくなることが推察されます。TTDR 処理を行わないで従来の方法のみで細胞分散を行った方が良いかと思えます。TTDR はトリプシンを主な成分としているとのことですが、日本サイトメトリー学会発行のフローサイトメトリー入門(天神美夫監修)19 ページ～ 野村和弘先生「2 固形腫瘍、1」新鮮材料、c) 酵素による分散法」が参考にできるかと思えます。こちらでは、トリプシン処理後に 70% エタノール固定を行って保存する（染色液が核膜を通過できるよう処理する）ようになっています。
- 2) Doublet 除去について：DNA 測定では、Gate は FL2A-FL2W でかけるのが一般的です。組織から細胞単離を行うとどうしても全てが単離細胞とはなりませんので、骨髄血の場合と状況が少し異なります。がん細胞は何らかの理由で DNA 量が増えている、またはクロマチン分布が変化しているために DNA 二重鎖に対するインターカラーターである Propidium Iodide との結合量(性)が正常細胞とは異なる結果、DNA aneuploidy ピークとして検出されます。
- 3) 裸核法(TritonX-10)が原因なりうる PI の染色不良の可能性について：Propidium Iodide はご存知の通り DNA 二重鎖に対するインターカラーターです。非常に特異性が高く、ヒストンタンパクへの結合

の報告はありますが、それ以外の物質に結合することはほとんどないと言われています。また、細胞内に残っている二重鎖 RNA にも結合しますが、そちらは RNase 処理によってバックグラウンドが出ない染色法です。PI の染色不良というよりも、細胞核 DNA の保存状態が悪いことが原因と考えて検討を行った方が良くと思います。

4) 追加データを拝見して：全てのヒストグラムを見せていただきましたが、サイトメトリー学会ガイドラインに照らし合わせると、G0/G1 ピークの CV が基準に達していないことから、残念ながら評価不能となります。

結果から予想される問題としては、

- ①保存する前、手術標本をどのような状態で置いておいたか？（今となっては不明のものも多いかとおもいます。今後は採取後なるべく速くクライオチューブに入れて密封して保存することをお勧めします）
- ②組織の保存状態が悪い。冷凍庫で乾燥してしまったことが考えられます。溶かした時の状態はどんな感じでしたか？表面が乾燥していた、変色していたということはありませんでしたか？
- ③乳がんの多くは硬くて細切の際に手間取ることが多いので、細切する前に PBS 1~2 滴で湿らせてから始めてみてください。また、乾燥を防ぐためになるべく表面積を減らす方が良くと思います。50ml ではなく 15ml ファルコンチューブで行うことをお勧めします。
- ④TritonX100/PBS 液を加えてパスツールピペットで 5 回ほどピペッティングしますが、その時泡を立てないように気をつけてください。
- ⑤適切な PMT Voltage や Flow Rate、Gate 設定などを確認するために、フィコール分離したリンパ球やがん細胞の培養細胞株(HeLa 細胞、MCF7 細胞など)を単独および混合したサンプルを作り、TritonX-100/PBS 処理後、RNase 処理、Propidium Iodide 染色を行い、測定してみてください。これは、測定毎にする必要はありません。測定方法が間違っているかも？または FACS の調子が悪いかも？と思った時に G0/G1 ピークの形や位置を確認する上で一番簡単な方法です。管理の行き届いた FACS Calibur でしたらリンパ球の G0/G1 ピーク CV は 2%前後になります。
この方法で測定してもやはりうまくいかないようでしたら、フローセル内が汚れている(詰まっている、またはゴミがぐるぐる回っている)、または光軸調整が必要かと思しますので、エンジニアの方に来ていただいた方がいいかもしれません。また、一旦この方法で PMT voltage などの機器調整ができれば、組織標本を TritonX-100 法で細胞調製したものを測定する限り、ほとんど同じ条件で同じ位置に 2C ピークが来ると思います。
- ⑥もし、まだ手に入るようでしたら、日本サイトメトリー学会発行の「フローサイトメトリー入門」天神美夫監修（平成 5 年発行）をお読みください。基本的な技術論が丁寧に書かれています。

最後に 5 年間凍結保存（2016 年）した肺癌組織を、今回 DNA-aneuploidy を測定し、当時の Calibur と

比較したデータを添付致しますので、参考にしてください（添付資料 3-1,2）。また、測定手技と解析プロトコルの確認方法についても添付いたします（添付資料 3-3）。

回答 2

- 1) CV 値と aneuploidy の出現感度について：ご存知のように CV 値と aneuploidy の出現感度はかなり関係します。例えば、CV 値が良好であれば、染色体数が 2-3 本の増減でも aneuploidy の検出が可能です。今回の新鮮標本では 2.04%(G0/G1)、凍結標本 5.29%(G0/G1)となっていますが、後者の実際の CV 値は評価できず解析は困難です。
- 2) TTDR を信じて凍結検体を解析することについて：凍結検体のピークは新鮮標本とは aneuploidy のチャンネルが一致しているようですが、精度が悪く僅かな aneuploidy の検出は難しいです。方法として、TTDR を使わない細胞処理として、凍結および新鮮ともにごくシンプルな、①ハサミで細切、②TRitonX、③メッシュ(45 μ)、④RNase、⑤PI、⑥測定、でも細胞を集めることはできるはずですが、シンプルで細胞へのダメージの少ないガイドラインに添った方法で比較してみることをお勧めします。
- 3) 回収細胞量について：ロスや細胞変性を考慮した保存・細胞処理方法を見直してください。僅かなサンプルに対して大きなサイズの試験管は、遠心洗浄時のロスに繋がります。ミンスは 5-15mL のチューブでも可能です。なお、イベント数については、少なくとも 3000-5000 個以上の解析が必要です。

回答 3

- 1) 新鮮材料の評価について：新鮮材料の解析のデータはきれいで評価可能と思います。
- 2) TTDRを使用する方法について：上記コメントとほぼ同じになりますが、新鮮・凍結固定検体処理に TTDRを使用しない、従来法の Triton-X100法（三村先生の文献）でサンプル調製していただき測定されるとよいかと思われます。
- 3) 凍結保存処理について：新鮮材料で良好なデータが得られているので、問題は凍結・解凍の部分にあると考えられますが、凍結組織の解析データからはおそらく細胞凍結時（もしくは解凍時）の組織のダメージが疑われます。サンプルによってデータの良否がある（凍結検体の中でも症例によってノイズが出ないものもある）とのことなので、解凍手順ではなく、凍結時の要素が強いのではないかと推測します。

凍結保存の問題点を探るのであれば、ガイドラインにありますように凍結保存時の注意点として、①組織を細胞分散化してエタノール固定後に -20°C で保存する、もしくは②セルバンカー等の保存液を用いるなどして、組織をできるだけ良好な状態で保存する（細胞・組織凍結保存液セルバンカーシリーズ；タカラバイオ株式会社）、などの方法で新鮮組織を凍結保存して、それらのサンプルのデータがきれいに出るかどうかを確認される方法もあると思います。残念ながら、いったん組織（細胞）そのものにダメージが加わってしまったサンプルについては、きれいな結果を得るのは困難であると考えられます。

追加質問

FCM の解析プロトコールの作製および測定技術の確認のための正常細胞の単離方法について確認させてください（前回の回答 1 - 4）。

「フィコール分離」について具体的な疑問点としては、ヒト末梢血リンパ球を用いた G0/G1 ピークの確認について Lymphoprep™を用いて分離をした単核球を計画しているのですが、「リンパ球の分離」との記載がありましたので、単球が含まれていても問題ないでしょうか？ また、分離法において Lymphoprep™と異なる場合は、適切な試薬のご紹介をお願い致します。

回答

末梢血リンパ球は、最も CV が良好で細胞調整が容易であることから、解析プロトコールの作製および機器の設定の確認のために利用されます。ご存知の通り末梢血からのリンパ球分離には、比重液（ $d=1.077$ ）を用いた遠心法が用いられます。比重遠心分離法は、末梢血を生理食塩水もしくは D'PBS(-)で 2-3 倍希釈した血液を、比重液 1 容量に対し 2-3 容量を静かに重層し、遠心は 400-450G（Lymphoprep™は能書に従ってください）・ 20-25 分行い分離後の単核球層は速やかに回収します。この単核球分画（PBMNC）には、 $d=1.077$ ではリンパ球以外に単球と一部の好塩基球が含まれます。また、フィコール液は自家調整することもできますが、国産ではリンパ球分離液として nacalai tesque（code：20828）があります。

前回回答の先生からのコメント

比重液は Lymphoprep で大丈夫です。いつもお使いになっているものでやっていただけたらと思います。単球はリンパ球に比べて圧倒的に数が少ないので問題ありません。あくまで私の経験ですが、調子の良い FACSCalibur で測定した場合、全血を 0.2% TritonX-100/PBS で裸核化し、RNase 処理、PI 染色したサンプルでは 2C ピークの CV 値が 4%くらい、フィコール分離後、同様に処理したサンプル

では 1.5~2%程度です。機器と技術の管理に参考として下さい。