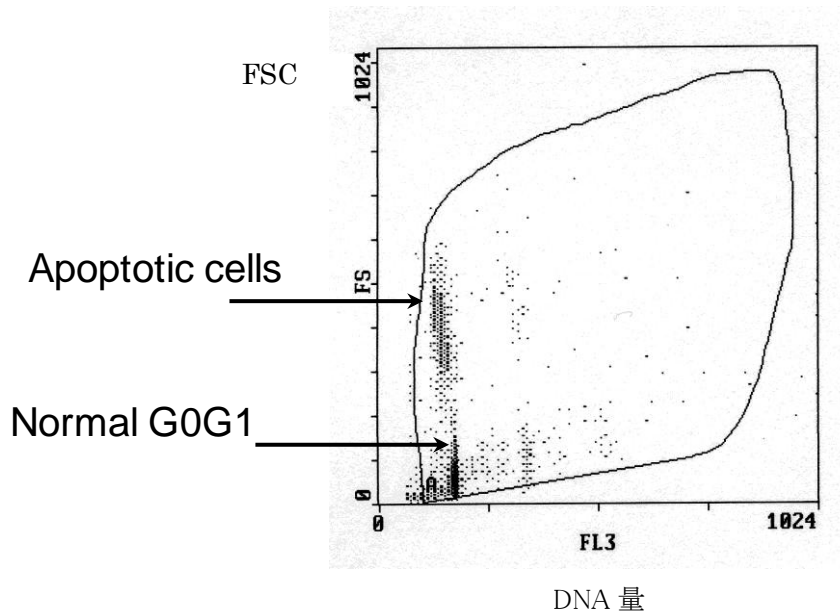


Q&A No.2

質問：アポトーシス細胞の前方錯乱(FSC)について

培養細胞にアポトーシスを誘導し、DNA 量(FL3)と前方散乱(FSC)のサイトグラムを測定したところ、下図のようにアポトーシス細胞のFSC分布位置が正常細胞より大きいところに出現しました。アポトーシス細胞は正常細胞に較べて小さくなるので、細胞容積をFSCは低くなるべきと思うのですが、何故なのでしょう？



回答：

FSCは確かに細胞容積(表面積)を最も強く反映します。アポトーシス細胞は正常よりも小さくなりますので、FSCも小さくなるのが通常です。しかし、測定者がアポトーシスと考えているにもかかわらず、その細胞のFSCが大きくなることも時にあります。その大きな理由は以下の3つあります。

第一の理由:後期ネクローシス細胞

あなたが測定した細胞はアポトーシス細胞ではなく、時間の経過したネクローシス細胞の可能性はないでしょうか。ネクローシス細胞は膨化しますのでFSCは大きくなります。ネクローシスの初期はDNA量に変化はありませんが、時間が経つと核は変性し、DNAを失い、Sub-G1領域で検出されます。但し、この場合、200bp単位の断片ではないので、電気泳動ではラダーはできません。DNAの電気泳動や他の有用なアポトーシスマーカーの測定などで、アポトーシスと言えるかどうか、確認が望まれます。

第二の理由:非典型的アポトーシス

細胞の種類や細胞死の誘導の仕方によっては、必ずしも典型的なアポトーシスの形態変化をとらない場合があります。例えば、核の濃縮やDNAの200bp単位の断片化はあっても、細胞質が膨化して全体としては大きくなることがあります。非定型的なアポトーシスです。私の経験では肝細胞癌のある培養細胞株にサイコサポニンを処理すると、このようになった経験があります。したがって、細胞の形態変化がアポトーシスとしては非定型的でないか、顕微鏡で確認してみてください。もちろん、第一の理由で述べたように、アポトーシスと言えるだけの証拠は必要です。

第三の理由:FSCの限界

FSCは細胞容積(表面積)を厳密に表しているわけではありません。細胞の形状も影響しますし、側方散乱(SSC)に強く影響することで知られている細胞内構造の粗さもある程度はFSCに影響します。これらの変化が特に強い場合は細胞容積の減少分を越えてFSCが増加する可能性も否定はできません。細胞の容積をより正確に反映するのはコールターボリュームです。このパラメーターが測定できるFCMは限れており、市販されているのはベックマン・コールター社のCell Lab Quanta SC / Quanta SC MPLのみです。また、ベクトン・ディッキンソン社のFACS Analyzerもコールターボリュームが測定できるFCMですが、すでに販売は中止されています。これらの機種が利用できるならば、測ってみると良いかもしれません。