

Q&A No.12

今回のテーマ：

遠心洗浄操作による B 細胞のロスについて

質問：

B 細胞の表面免疫グロブリン (smlg) の測定におきまして、血漿中の Ig を除去する目的でサンプルを洗浄してから抗体と反応させる必要があるかと思えます。

この洗浄の条件について、これまで当院では 1 回洗浄をかけて行ってきました。しかし、Ig の発現においては、少なくとも 2 回から 3 回は Wash する必要があるということを知りました。そのため、洗浄を増やして測定するようになったのですが、B 細胞のロスが目立ってしまいます。

先日、EuroFlow の前処理の SOP を読んで、その通り実施してみたのですが、Wash しない Tube の B 細胞の比率と、Wash した Tube の B 細胞の比率が 3 倍ほど違う、という結果となってしまいました。

これまで、自分なりにさまざまな条件で検討をしてきました。上清の除去方法においても、デカント or スポイト、遠心条件もいろいろ試してきました。洗浄回数についても、1 回だと Ig の検出に問題が出てくることが多く、2 回以上の洗浄は必須かなと。

EuroFlow においても、smlg を測定しない tube においては、洗浄はしないようなので、そうすると、例えば、10 本測定のうち、Ig を測定する tube においてのみ B 細胞の比率が異なるため、バランスがおかしくなってしまいます。

実際にどのように洗浄が行われているのか（遠心条件や洗浄回数、上清の除去方法、Ig 測定 tube のみの洗浄であるのか）、そして Wash している Tube と Wash しない Tube で B 細胞に気になるような差は見られないか、などご教示いただけますと幸いです。

回答：

洗浄操作による細胞の損失は各施設で苦労しているところと思います。

Smlg や Cylg の測定は血漿成分の混入量により 1 回～3 回の洗浄が必要であり、細胞損失を極力抑え、各測定チューブをどのように整合性を取るかが問題とされています。洗浄による損失を軽減する工夫は、buffer 量、添加物としてのアルブミン量、遠心条件の遠心力と遠心時間などがあり、buffer においては細胞のロスを極力抑える市販品も存在します。

回答 1

Smlg 測定のための前洗浄方法については（添付資料あり）、EuroFlow コンソーシアム標準化プロトコールでは、全血 300 μ L に対して 10mL の洗浄液（0.2%BSA, 0.09%NaN₃, 20mM EDTA 加 PBS）を添加し 540xg 5 分の遠心条件による洗浄を 3 回繰り返して行うようになっており、前洗浄に使用する洗浄液は検体量の 100 倍量になっています。質問者様の条件は明記されてませんが、遠心力に関しては、一般に 300xg が使われていますが、EuroFlow では 540xg になっており、B 細胞のロスが少なくなっているのではないかと思います。上記の EuroFlow の条件で、全血 100 μ L にすれば、10mL の洗浄液を添加、540xg 5 分の遠心条件による洗浄を 1 回にすることができるのではないかと思います。一度ご検討ください。

前洗浄ありの Smlg のサンプルと無しのサンプルで B 細胞の割合に差異ができる件については、できるだけ B 細胞のロスを少なくする前洗浄を行うしかありませんが、乖離があった場合は、コメント欄に、『洗浄の有無により B 細胞の割合に乖離がある』旨、記載するとよいと思います。また、EuroFlow ではチューブに含まれるマーカー（Smlg, 細胞内抗原など）により異なるサンプル調製プロトコールが作成されていますが、同一パネルに異なるサンプル調製のチューブがある場合は、サンプル調製過程が多い方法に統一しています。前洗浄による B 細胞のロスは否めませんが、散乱光プロットのパターンなど、測定結果にチューブ間差を無くすことができるので、パネルの全チューブに前洗浄を行うサンプル調製にすると良いかと思われます。

回答 2

回答 1 に補足して回答

1) Wash している Tube となしの Tube で B 細胞に気になるような差は見られないか。

- ・確かに、気になる差が見られることが多く、苦労しています。

・検体の種類、個々の検体の状態による影響もあると思われます。

理想的には、回答1での説明のように前処理すべきと思いますが、これまで検討した限りでは、遠心する以上は、どんなに良い状態でB細胞のロスを少なくできたとしても、それをゼロにするのは難しいと考えており、どこかで妥協が必要と思います。

2) 実際にどのように洗浄を行われているのか。

bufferを多めに(検体量の最低でも100倍以上に希釈)、BSA等タンパクは添加した方がロスは少なくなる。

3) 遠心の回数は極力少なくする。

余裕があれば、洗浄を1回行ってから、一度予備染色を行って、洗浄が十分か、B細胞の割合が極端に低くなっていないか等確認をしており、問題なければ、そのまま本染色を、洗浄が不足している場合は、追加でもう1回か2回洗浄しています(個々の検体でbestが異なるため)。検体によりませんが、bufferを多くすることで洗浄1回でも可能な場合が少なくありません。

4) 遠心によるB細胞が許容されない範囲でロスする場合がある。

4a) 遠心せずに抗体を過剰量加えて染色する(No Wash法)、あるいは4b)どうしても遠心が必要な場合は、報告書に、前処理によってB細胞の割合が低くなっていることを断った上でそれぞれの測定値を報告する。

ただし、3) 4a) は手間とコストがかかるので、現実的には何回か検討して、各施設で許容される条件を決めておく、ということになるかと思います。

5) 細胞内抗原マーカー染色の場合、抗体との反応の前に細胞固定と洗浄が入るので、B細胞のロスは均一で結果の報告にほぼ問題はないと感じています。使っている細胞膜透過試薬により、どんなにしても細胞表面と散乱光プロットのパターンが同じにならないので、解析領域を統一できない問題点はあります。