

Q&A No. 8

今回のテーマ：

FACS の解析方法

質問：

下記細胞の全血中安定性を見ようと考えているのですが、ゲートを固定しますと安定性が上手く取れません。

使用機器：FACS Canto II (2 レーザー, 6 カラー)

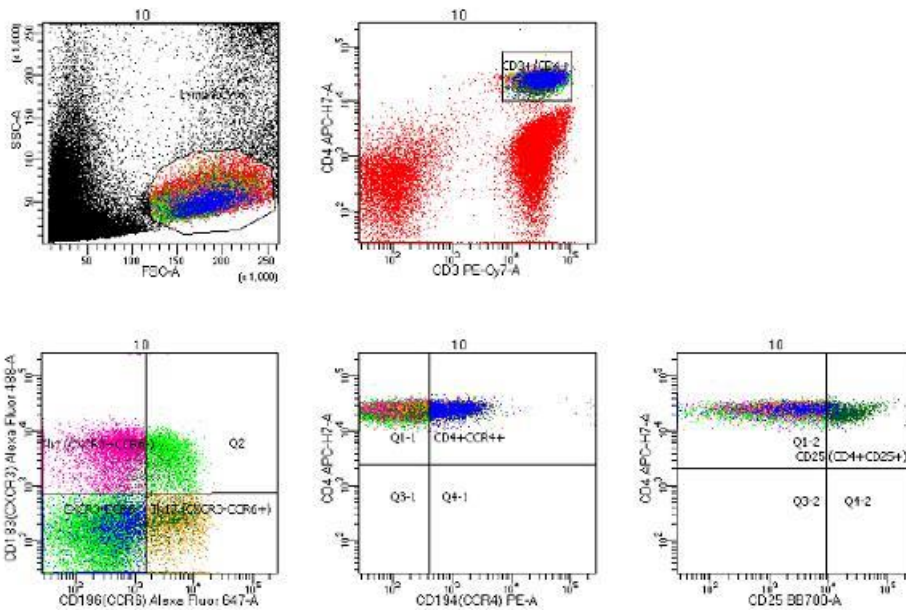
Th1 : CXCR3+/CCR6-

Th2 : CXCR3-/CCR6-/CCR4+

Th17 : CXCR3-/CCR6+

Treg : CD25

ゲートのかけ方としては、添付図の通りです。



Experiment Name:	20180717-MZ
Specimen Name:	Specimen_001
Tube Name:	10
Record Date:	Jul 17, 2018 4:51:04 PM

Population	#Events	%Parent
All Events	342,590	####
Lymphocyte	70,264	8.3
CD3+CD4+	27,154	38.6
Th1 (CXCR3+CCR6-)	4,982	18.3
Th2 (CXCR3-CCR6- AND CD4+CCR4+)	2,001	7.4
Th17 (CXCR3-CCR6+)	2,751	10.1
CD25 (CD4+CD25+)	1,795	6.6

CD3/CD4/CXCR3/CCR6/CCR4/CD25
 CD3+/CD4+
 > Th1: CD183(CXCR3+)/CD196(CCR6-)
 > Th2: CD183(CXCR3-)/CD196(CCR6-)/CD194(CCR4+)
 > Th17: CD183(CXCR3-)/CD196(CCR6+)
 > Treg: CD25

ご質問させて頂きたい内容と致しましては、

1. 細胞の動きに合わせてゲートを動かすことは一般的なのでしょうか。
2. これを臨床試験で行う場合、恣意的に揃えたデータになってしまいますが問題はないでしょうか。
3. マルチカラーで複数の細胞の動きを見る際に%Parent が用いられていることが多いですが、蛍光強度との使い分けをご教授頂けませんでしょうか。

回答：

1. 細胞の動きに合わせてゲートを動かすことは一般的なのか。

一般的に、ヒト白血球の FSC/SSC プロットでの表示パターンについては、同じ機器セッティングで大きく変動することはなく、若干の検体の違いによる微調整のみの機器セッティングとなります。

但し、お問い合わせの市販のコントロール血球の場合、実際の全血検体とは大きさが異なり、FSC/SSC プロットのリンパ球ゲートから外れることがあるので、その場合はゲートを動かす必要があります。

2. これを臨床試験で行う場合、恣意的に揃えたデータになってしまいますが問題はないでしょうか。

リンパ球ゲートに関しては上記のとおりですが、抗体染色に関しては陰性、陽性集団の分離が良い検出感度（PMT 電圧値）に調整する必要があります。

ご使用の BB700（励起光：488nm、蛍光波長：700）を検出する検出器は、通常 PerCP, PerCP-Cy5.5, PE-Cy5 を検出するため、BD 7-color setup beads による蛍光検出器の電圧調整については、ご使用の BB700 ではなく蛍光強度の低い PerCP-Cy5.5 用に設定されているので、BB700 染色細胞の検出に適切な PMT 電圧値を下げる調整を行うと CD25 の陰性陽性の分離が良くなると思われます。

3. マルチカラーで複数の細胞の動きを見る際に%Parent が用いられていることが多いですが、蛍光強度との使い分けをご教授頂けませんでしょうか。

%Parent はヘテロな集団より、特定のポピュレーションを検出する場合に算出します。蛍光強度 (Stats, Medium 中央値) は、特定のマーカーの細胞表面上の発現量の強弱を比較するアプリケーションに使用されています。

マルチカラー測定における蛍光色素の選択については、蛍光強度が強い蛍光色素 (PE, BB700 など) は抗原発現量の少ないマーカーに対する抗体に使用することが推奨されています。逆に蛍光強度が弱い蛍光色素 (FITC, PerCP など) は、形質細胞の CD38 のような抗原発現量が多いマーカーに対する抗体に使用します。