



マルチカラーパネル設定の7つのポイント

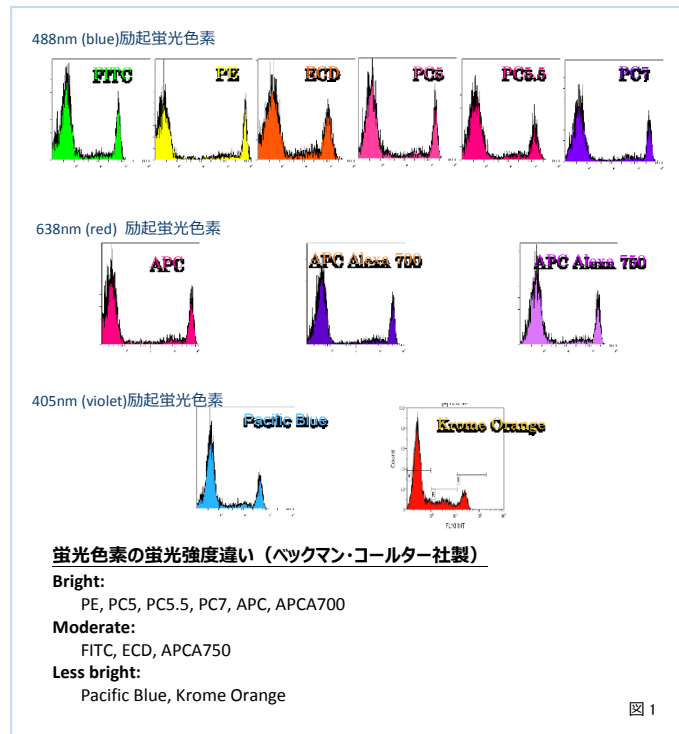
Introduction

高品質な試薬と良く考えられたパネルによるマルチカラーフローサイトメトリーは、同時に複数のパラメーターの検出やモニタリングができる優れたツールとなります。しかし、そのデータの品質は、パネルのデザインとフローサイトメーターの設定に依存します。ここで紹介する7つのポイントは、フローサイトメーターのデータの品質の改善と一般的なマルチカラーフローサイトメーターのピットフォール（落とし穴）を防ぐことに役立ちます。

はじめに

1. 蛍光色素と蛍光強度

全ての蛍光色素が同じではありません。ある種の蛍光色素は非常に明るく、一方、他の蛍光色素では比較すると非常に暗いことがあります。例えば、同じマーカで比較した場合、蛍光色素により蛍光強度が異なります。(図1)



その蛍光強度は、シグナル - ノイズ比 (S/N 比) や Staining Index として表されます (図2)。

一般的に、より蛍光強度の強い蛍光色素ほど、抗原の検出感度が高くなります。

シグナル-ノイズ比:

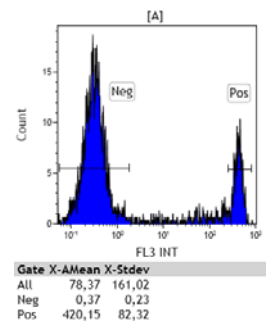
$MFI(pos) / MFI(neg)$,

例 $420.15/0.37 = 1136$

Staining Index:

$(MFI(pos)-MFI(neg))/2*SD(neg)$,

例 $(420.15-0.37)/2*0.23 = 913$



- MFI : Mean Fluorescence Intensity (平均蛍光強度)
- 低いスケールでの分解能 (分解のビット数) は機器によってベースラインは異なる
- バックグラウンドの蛍光強度は、漏れ込みのパターンによっても異なる

図2

2. 蛍光強度と蛍光の漏れ込み

蛍光色素には波長分布幅があるため、ある色素の蛍光波長が、別の蛍光色素の検出器で検出される“蛍光の漏れ込み”が起きます。この“蛍光の漏れ込み”を補正することを蛍光補正（コンペンセーション）といいます。蛍光補正には、同一のレーザーで励起される蛍光と検出器間でおきる“レーザー内”と、異軸に配置された異なるレーザーで励起される蛍光と検出器間でおきる“レーザー間”があります。レーザー間コンペンセーションは、蛍光色素が複数のレーザーで励起されるときに起きます（例：タンデム色素）。

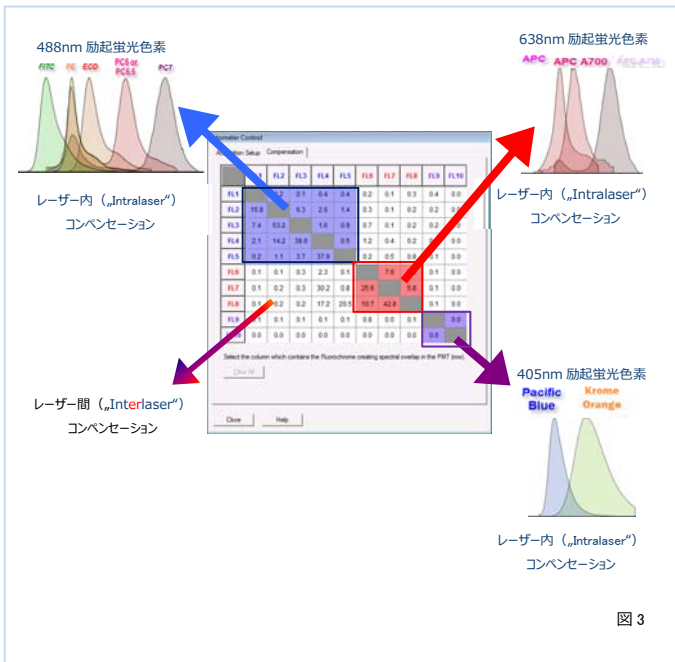


図 3

一般的に、蛍光の漏れ込みの補正（コンペンセーション）は、漏れこまれている蛍光チャンネルのポジティブ細胞集団の MFI（平均蛍光強度）とネガティブ細胞集団の MFI の値が同じになるようにします。

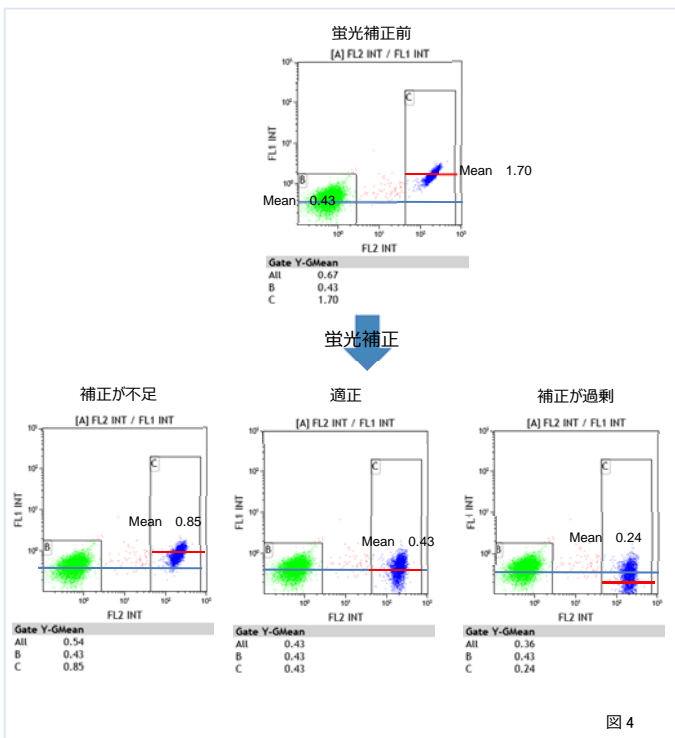


図 4

マルチカラーパネル設定における 7つのポイント

ポイント 1. 蛍光色素の選択

蛍光色素を選択する場合、最も明るい蛍光色素を選択することが、必ずしも最も良い方法とは言えません。また、比較的弱い蛍光色素の選択を避けることが、必ずしも賢明な選択でもありません。下図のように、CD25 の抗原発現量は少ないため、明るい蛍光色素を選択することで、弱陽性の細胞を検出することができます。一方、抗原発現量が多い場合は、蛍光色素の選択は結果に影響を及ぼしません（図 3）。

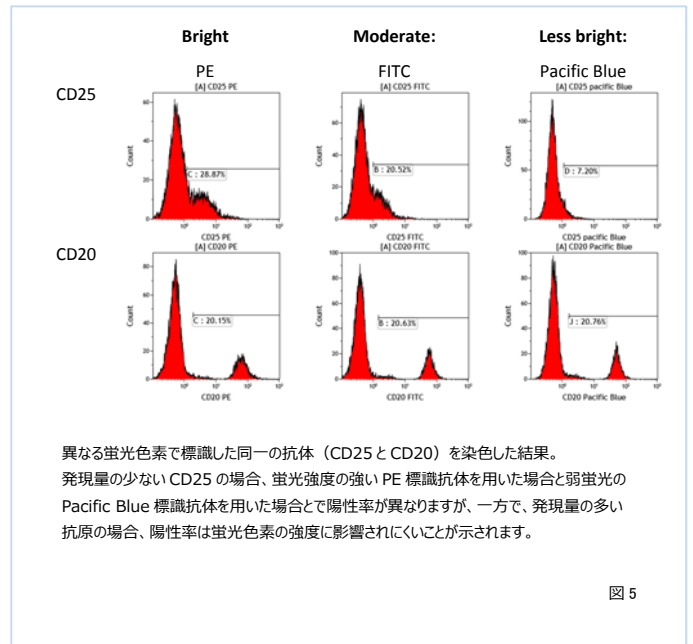
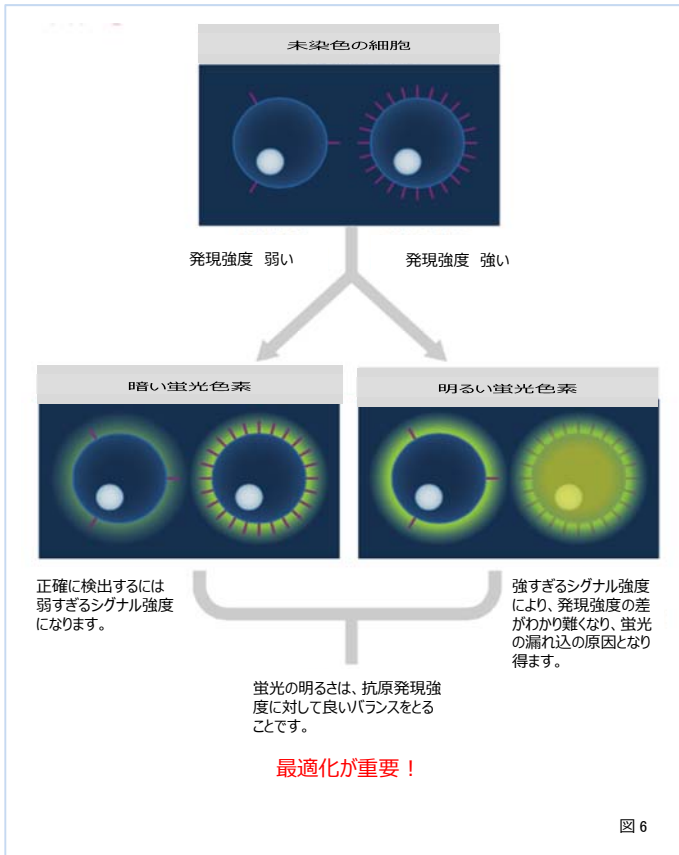


図 5

蛍光色素が明るいほど、漏れ込みの可能性増大と、データの広がりが大きくなることになり、その結果、解像度が低下の原因となることがあります。この現象を避けるため、発現の弱い抗原に対して、より明るい蛍光色素を用い、逆に、発現の強い抗原に対して、弱い蛍光色素を用います。

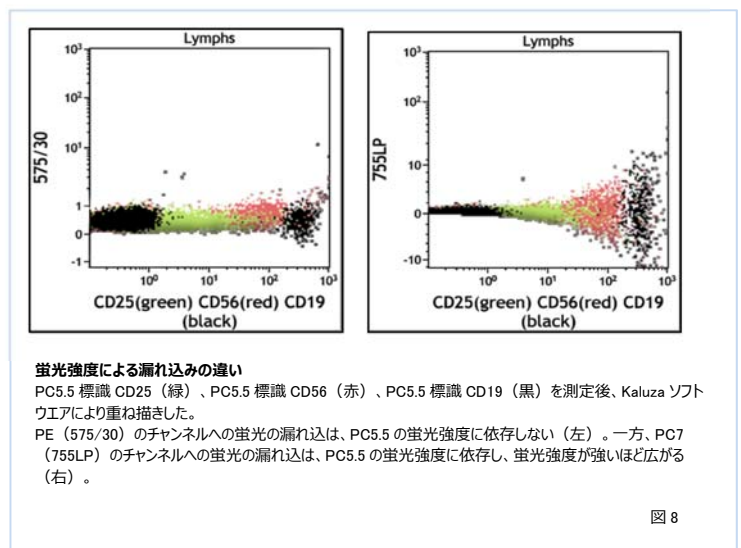
つまり、目的の抗原を検出できる十分な蛍光強度の明るさと同時に、他の検出器への蛍光の漏れ込みが最小であるような蛍光色素を用いることが、望ましいと言えます。このルールに従うと、様々な蛍光色素を適切に使用できるようになります。



Channels	Dyes									
	Pac Blue	KrO	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC A700	APC A750
450/40										
540/40										
525/40										
575/30										
620/30										
695/30										
755LP										
660/20										
720/20										
755LP										

他の蛍光色素からの影響が、ない/少ない
 他のチャンネルに与える影響が、ない/少ない

図 7



ポイント 2. チャンネル（蛍光検出器）の選択

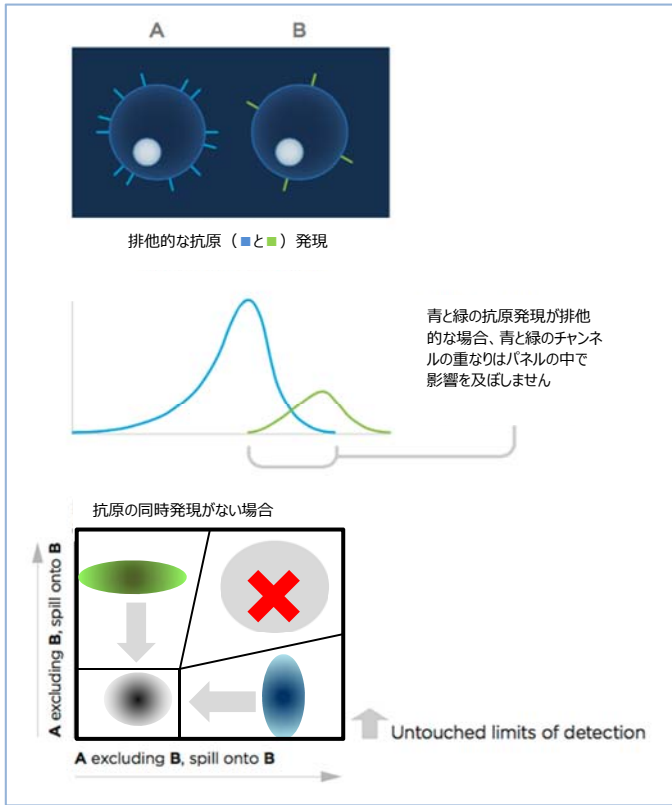
蛍光色素の漏れ込みが起きる場合も、パネルの蛍光色素の選択を最適化することにより対応できます。強発現の抗原に関しては、他のチャンネルへの影響が少ない蛍光色素を選択します（緑色縦列）。
一方、弱発現の抗原に関しては、他の蛍光色素からの蛍光色素の漏れ込みの影響の少ない蛍光色素を選択します（黄色横列）。

蛍光色素が上記のカテゴリーの 1 つに入るかどうかは、機器の構成、蛍光色素の選択に依存します。最適な製品を見つけるには、必ず、蛍光色素とチャンネルの組み合わせを確認してください。

全てのチャンネルを使用する実験をデザインする場合、漏れ込みを避けることは困難があるかもしれません。しかし、これらのポイントは、蛍光の漏れ込みが、パネルと測定結果に与える影響を最小化することに役立つでしょう。

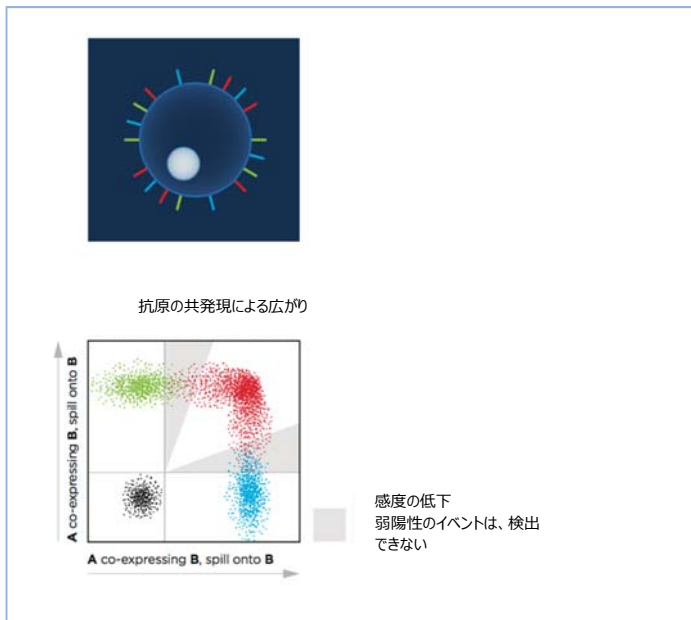
ポイント 3. 排他的な抗原

互いに排他的な抗原の間のわずかな蛍光の漏れ込みは、何でしょうか。ゲート内の細胞で、同じ細胞に抗原が共発現していない場合、2つの抗原の互いの蛍光漏れ込みは、パネルに影響を及ぼしません。



ポイント 4. 共発現する抗原

マーカーの発現強度が弱陽性であったり、典型的に発現強度の変化が起きたりすることが確認されている場合や、発現強度の変化が起きる可能性がある場合、蛍光の漏れ込みにより発現強度変化や弱陽性データが検出できなくならないよう、このマーカーのチャンネルでは共発現する抗原の蛍光色素からの漏れ込みを最小化するようにしなければなりません。

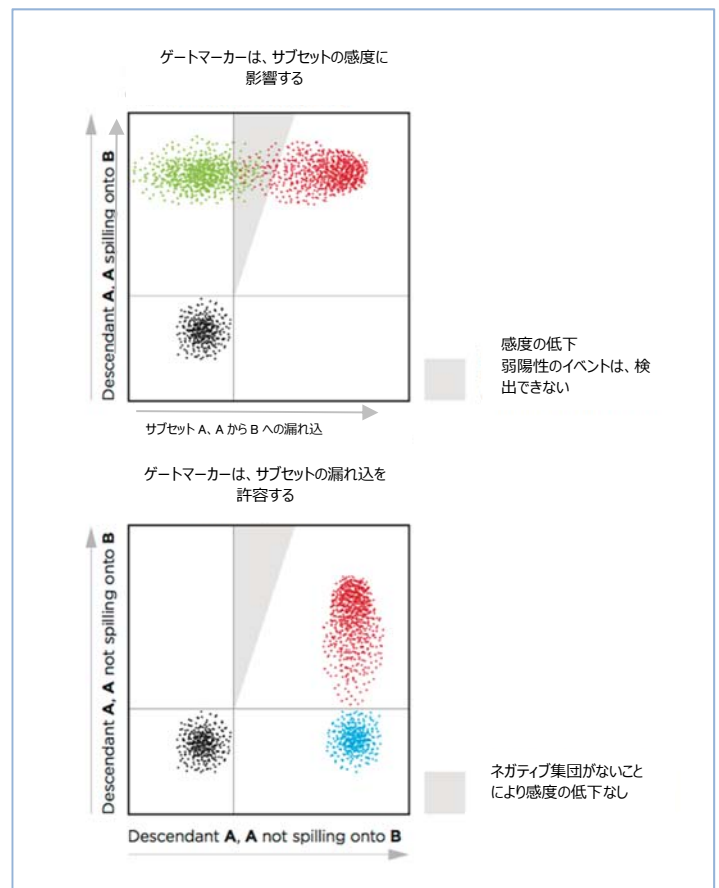


共発現していない抗原の蛍光色素からの蛍光の漏れ込みは問題にならず、発現強度の変化や弱い発現の抗原における感度や分解能に影響を与えません。

ポイント 5. 親—子

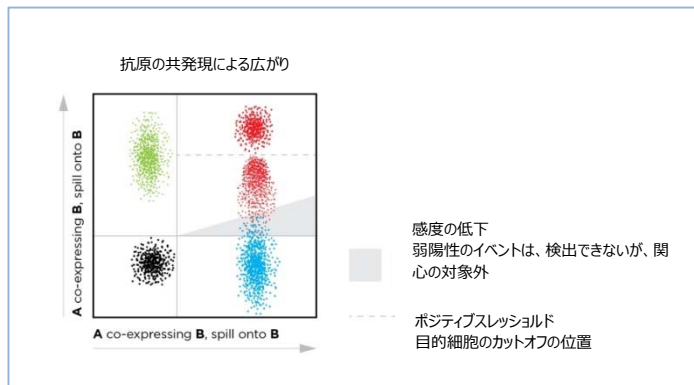
サブセットまたはサブポピュレーション (子孫) のマーカーがゲートマーカー (親) に対して漏れこむ、または、ゲートマーカーとクロストークすることは、許容することができます。サブポピュレーション (子) は、ゲートマーカーに対して陽性であるので、ゲートマーカー (親) は、この漏れ込みを許容します。たとえば、CD4 はリンパ球ゲート内の CD3 チャンネルに強く漏れ込みを示したとしても、CD4+T 細胞は、CD3+であるので、バックグラウンドの広がり、CD3 チャンネルのバックグラウンドの広がりを引き起こしません。

逆の例を確認すると、ゲートマーカー (親) からの漏れ込みは、サブポピュレーション (子) のバックグラウンドへ影響するので、ゲートマーカー (親) から、サブポピュレーション (子) へクロストークする逆の例は注意してください。



ポイント 6. ポジティブスレッシュホールド

発現強度の強い陽性細胞の検出のみ、または、強陽性と陽性/弱陽性を区別することが目的であれば、共発現の抗原に対する蛍光の漏れ込みは、許容されます。しかし、陰性と弱陽性を区別することが目的の場合、蛍光の漏れ込みはデータを不明瞭にし、偽陽性の結果を示すため、蛍光の漏れ込みは許容できません。

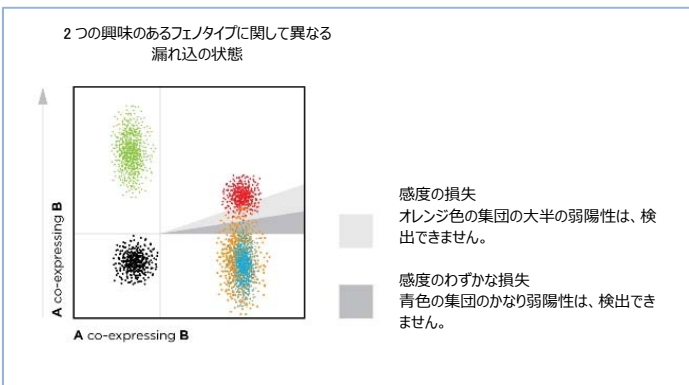


Conclusion

7つのポイントに気を付けて、マルチカラーフローサイトメトリーアッセイを行うと、最適なシグナルの検出でパネルは最適化され、複雑さの減少で結果の正確性が上がるでしょう。さらに、マルチカラーフローサイトメトリーをうまく行うには、規制に則った高い品質と再現性のある試薬を用いることです。試薬の信頼性は、データの信頼性となります。

ポイント 7. 蛍光の漏れ込みの複雑さ

漏れ込みのパターンを単純化するようにし、フェノタイプに依存した検出限界が起きないようにできるだけ簡単になるようにします。しかしながら、ドットプロットに示されない蛍光の漏れ込みと蛍光色素の広がりがあり得ることを覚えておいてください。そして、「単



純に保つ」ことは、非常に難しくなるかもしれません。蛍光補正をできるだけ簡単にし、複雑さを最小限に抑えるよう常に努力すべきです。

