

マルチ自家蛍光除去による正確なフローサイトメトリー解析

がん、自己免疫性疾患などの疾患状態においては、様々な細胞が正常な相互作用を逸脱していることが疾患状態の原因となっていることが多い。このため、正確な病態の解釈には疾患の微小環境に存在する細胞全体のダイナミクスを解析することが重要となる。

フローサイトメトリー(FCM)解析では、あらかじめ蛍光標識抗体などで染色した複数種類のタンパク質の発現情報を細胞ごとに紐づけされたデータとして取得することが可能で、かつ1秒間に最大10,000細胞程度の速度でのデータ取り込みが可能である。このため、微小環境に含まれる細胞の全体像を把握するためにはFCM解析は極めて有効な手法といえる。

しかし、特に組織から取得されるサンプルはコラーゲンやNADH, リボフラビンといった蛍光性のあるタンパク質や代謝物が豊富に含まれていることがあり、このような物質は内在性の蛍光である自家蛍光を細胞に存在させることとなる。この自家蛍光の存在は蛍光を使った検出系であるFCM解析では目的のepitopeの正確な定量解析に於いて大きな支障となっていた。

2012年にソニーが世界で初めてFCM解析に導入したSpectral Unmixingを利用した分光法は、(1)古典的なコンペーンション不要の解析と、(2)自家蛍光除去を可能としており、後者の特性は自家蛍光性の細胞を多く含む組織由来の細胞の解析において革命を起こした技術といえる。

このようなFCM解析におけるSpectral Unmixingの意義は近年認知されつつあり、他社からもSpectral Unmixingを導入しているFCM機器が発売されつつある。それらの装置に於いても、上記(1)及び(2)の機能を実施はできるものの、(2)の自家蛍光除去に関しては原理的な観点から、サンプルに複数の異なる自家蛍光集団が存在する場合に、自家蛍光除去が不十分なまま解析を強いられる場合が多い。

本稿ではソニーのスペクトル型フローサイトメトリーで可能な“複数(マルチ)”自家蛍光除去機能を紹介し、サンプルに複数の自家蛍光集団が存在する時に、どのようにして正確な定量値を得ることができるかを紹介する。

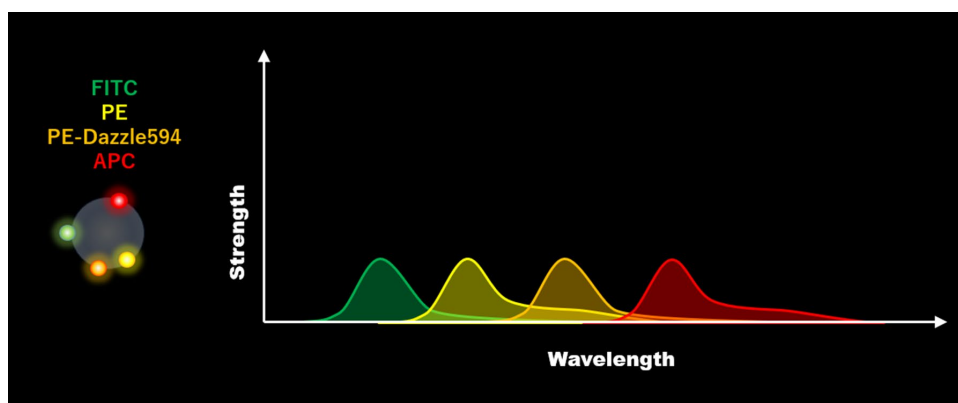


Figure 1

蛍光色素はそれぞれ特異的な蛍光のフィンガープリントを有している。この蛍光分布を横軸を波長、縦軸を信号強度にしてプロット描くとスペクトルを描くことができる。蛍光色素の量が変化した時、スペクトルは形を変えずに高さが増える。この時、蛍光色素の量と高さの比例関係は維持される。

■スペクトル方式の定量原理

蛍光色素は波長方向に各蛍光色素特有の蛍光のフィンガープリントを持っている(Figure 1)。このフィンガープリントの事を一般には蛍光スペクトルと呼んでいる。蛍光スペクトルは蛍光色素の量に対して形を変えずに高さが線形的に変化する。

細胞を蛍光標識抗体などで染色することにより、細胞表面に複数の蛍光色素が接着する。これらの細胞サンプルをフローサイトメーターに供すると、個々の細胞情報が独立にレーザースポットでスキャンされていく(Figure 2A)。この時、一つの細胞から発せられる蛍光スペクトルは、その細胞上に接着しているすべての蛍光色素の発する蛍光スペクトルが合算されたもの(観察値)である。

一方で、システム上ではあらかじめ各蛍光色素のスペクトルを取り込んでおく(Figure 2B)と、あらゆる蛍光色素の配合パターンに対応した合算スペクトル(シミュレーション値)を算出することができる(Figure 2C)。これを背景として、サンプルを実際に計測し、事前にサンプル解析で取得した個々の細胞の観察値と合致するシミュレーション値をシステム側が見つけ出す。この時に該当するシミュレーション値を出すために配合された各蛍光スペクトルの量はシミュレーション値を出した時点で既知であるので、この配合量が各蛍光色素の相対定量値(Figure 2D)として入力される。ここから得られた定量値を古典的な2次元プロットに展開することで従来の感覚と齟齬の無いFCM解析のデータとして使用することが可能となる。一連の庫の計算の事をSpectral Unmixingと言い、この際には古典的なコンペーンションは一切発生しない。

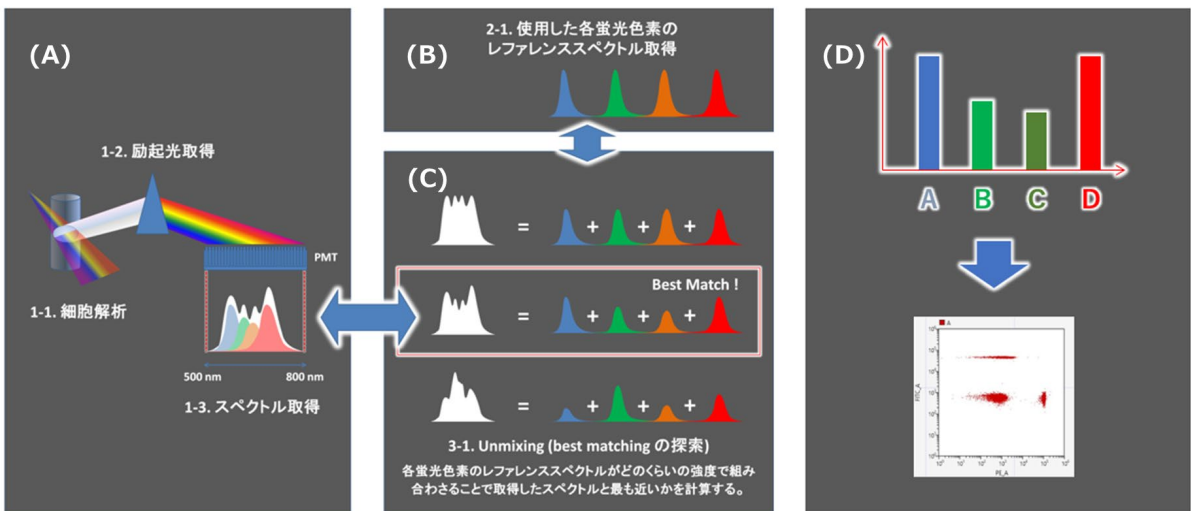


Figure 2

- (A) 染色されたサンプルをスペクトル型FCM機器に流すと、1つ1つの細胞で複数の蛍光色素から構成される合算スペクトルが取り込まれる。
- (B) 使用した蛍光色素のレファレンススペクトルはデータベース上に存在する。
- (C) レファレンススペクトル情報を用いることで、配合を様々に変えた合算値をシミュレーションで作成することができる。そして、観察値と高い相同性を持つシミュレーションされた合算値をコンピュータが見出す。この合算値を出すために使用された、各スペクトルの配合量が相対定量値として算出される。
- (D) 各パラメータの定量値より、該当する1つの細胞のデータが決定される。この中から任意の2つのパラメータを使用して2次元プロットを展開すると、これが一般的なFCM解析で使用される2D-Plotとして表現される。

■自家蛍光除去の原理

次に3色染色の場合を例に挙げて自家蛍光除去の原理を説明する。仮に細胞に自家蛍光がない場合は細胞から観察されるスペクトルは前章で述べた通り、細胞上に接着している蛍光色素の合算値となる。古典的なバンドパスフィルターを使用したFCM解析に於いては、各スペクトルの極大付近のみを抽出するフィルターが設定されており、それに対応する検出器の信号を読み込むことで定量解析をしている。この古典的な方法論でも、自家蛍光がない場合においては問題なく定量解析は可能ではある。

しかし、細胞に自家蛍光がある場合には自家蛍光のスペクトルが観察値に加算される。この自家蛍光のレベルは同じ自家蛍光細胞集団であっても、自家蛍光の強度が変わるため、データからの一律な値の引き算だけでは特異的な蛍光色素の定量結果を正しく得ることはできない。このため、特定の波長領域だけを抽出する古典的なフィルター方式によるFCM解析では定量性が保たれない (Figure 3A)。

一方、スペクトル方式における定量に於いては、自家蛍光のスペクトルの“形”を抽出し、追加的な蛍光色素として新たに加えてSpectral unmixingを実行することで、自家蛍光由来の成分は新たに生じた自家蛍光パラメータに集約され、各特異的パラメータからは自家蛍光成分の混入が除かれる結果となる (Figure 3B)。

この方法論により、古典的なFCM解析では得ることができなかった高い定量性を担保することが可能となる。なお、この自家蛍光スペクトルは未染色のサンプルより抽出することとなる。

(A)

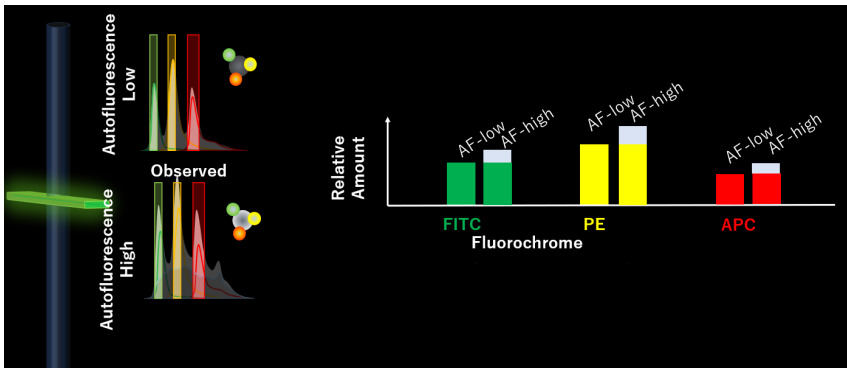
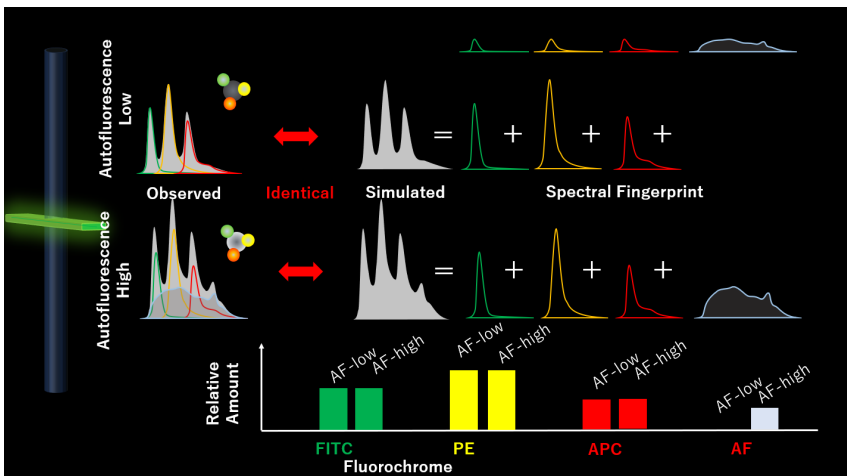


Figure 3

(A) 自家蛍光を持っている細胞を3種類の蛍光で染色し、古典的なFCM機器で計測した際は、各パラメータに自家蛍光分のコンタミ信号が混入し、かつ、除く事が困難である。

(B)



(B) 3種類の蛍光色素とは別に自家蛍光スペクトルを追加的な蛍光色素としてUnmixing計算に加えることで、自家蛍光由来の信号は自家蛍光パラメータに集約され、各種特異的的信号からは自家蛍光由来のコンタミ信号が除かれる。

■複数(マルチ)自家蛍光除去の方法論

前章に於いて自家蛍光除去が高い定量性を担保する原理を説明したが、特に組織などから得られたサンプルには複数の自家蛍光集団が存在することが多く、どのように複数の自家蛍光集団を検出した上で、別々の“色素”として定義するかが課題となる。スペクトル方式の有用性は近年認知されており、他社からもスペクトル方式を採用したFCM装置が販売されてきている。しかし、それらの多くの装置においては未染色のサンプルから1種類の自家蛍光集団しか定義ができない。一方でソニーのスペクトル型FCM装置では複数の自家蛍光集団を定義し、マルチ自家蛍光除去が可能である。この原理について下記に説明する。

まず2種類の自家蛍光集団が混ざっているサンプルがあると仮定する。Figure 4に示すように、(1)短波長側に偏重した自家蛍光スペクトルを持つ集団と(2)長波長側に偏重した自家蛍光スペクトルを持つ集団の2種類が混在したサンプルがあったと仮定する。この時、スペクトル方式は全波長領域をスキャンする能力があるため、一部の波長帯の信号強度情報だけを取り出す“仮想”バンドパスフィルターを設定することができる。この機能を利用して、短波長側と長波長側にそれぞれ1つずつ仮想フィルターを設定したとする。自家蛍光は同じ自家蛍光性細胞の集団内に於いて「自家蛍光スペクトルの形が変わらずに強度だけが変わる」性質を持っていることが多い。例えば短波長偏重の自家蛍光集団のスペクトルが形を変えずに強度だけが変わるとすると、仮想フィルターの短波長側及び長波長側のそれぞれに入りこむ自家蛍光スペクトルの侵入比は自家蛍光の強度が変化しても一定に保たれることとなる。これは長波長偏重の自家蛍光でも同じことが言え、短波長偏重と長波長偏重の侵入比は固有の値として存在することになる。これを前提として、これらの2種類の自家蛍光集団をまとめて解析した場合、短波長側及び長波長側にそれぞれに設定された仮想フィルターからの定量情報をx, y軸に展開した2次元プロット上にデータを展開するとFigure 4に示すように異なるスロープ上にそれぞれの自家蛍光集団由来の細胞がプロットされることとなる。

これらの観点から“適切な”仮想フィルターを2つ設定できた時に、サンプルに含まれる異なる自家蛍光集団を定義できることとなる。なお、この“適切な”仮想フィルターの組み合わせはマニュアルで行う必要があるが、この設定はソニーのスペクトル型FCMシステムでは簡単に行う事ができるサポートツールが存在している。このツールの使用方法に関してはソニーに直接お問い合わせいただきたい。

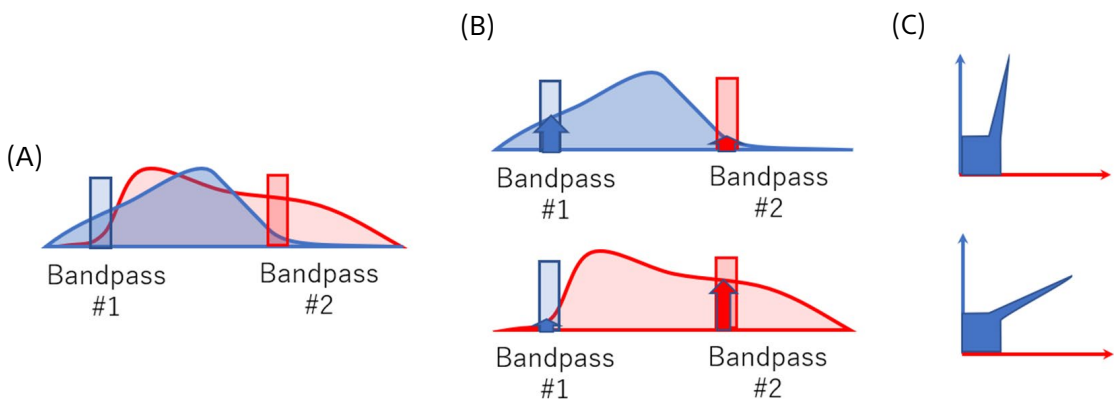


Figure 4

- (A) 2種類のパターンの異なる自家蛍光集団をそれぞれ青・赤の形状のスペクトルだと仮定する。
 (B) 仮想のBandpass filter (#1, #2)を波長に対して独立に2つ設定すると、そこから抽出される蛍光強度の比率は、自家蛍光スペクトルごとに異なる。
 (C) この結果、2つの仮想Bandpass filterから得られる信号でPlotを作ると、傾きの違う“角”が観察される。

■マルチ自家蛍光除去の重要性

実際のサンプルに於いてマルチ自家蛍光除去の結果をしてみる。

Figure 5Aにおいては(1)自家蛍光除去なし、(2)単一自家蛍光除去、(3)マルチ自家蛍光除去の3条件を同一サンプル由来のデータを利用して評価をするため、3つの条件での自家蛍光スペクトルの抽出を行った。なお、使用したサンプルには測定時点ではどのような自家蛍光集団が含まれているかは事前情報としては不明であった。

しかし、実際の測定を行ったところ、各特異的パラメータに於いて複数の“角”が見えたため、自家蛍光除去を実行した。この時(1)~(3)までの条件で自家蛍光除去の条件を変えたところ、(2)の単一自家蛍光除去の実行では単染色サンプルであるにもかかわらず、本来陰性であるはずのカウンターのパラメータ側にも擬陽性が残っていることが分かる。一方で(3)のマルチ自家蛍光除去ではそれらの擬陽性集団がほぼなくなり、正しく定量解析ができる土台ができていることが確認できる(Figure 5B)。

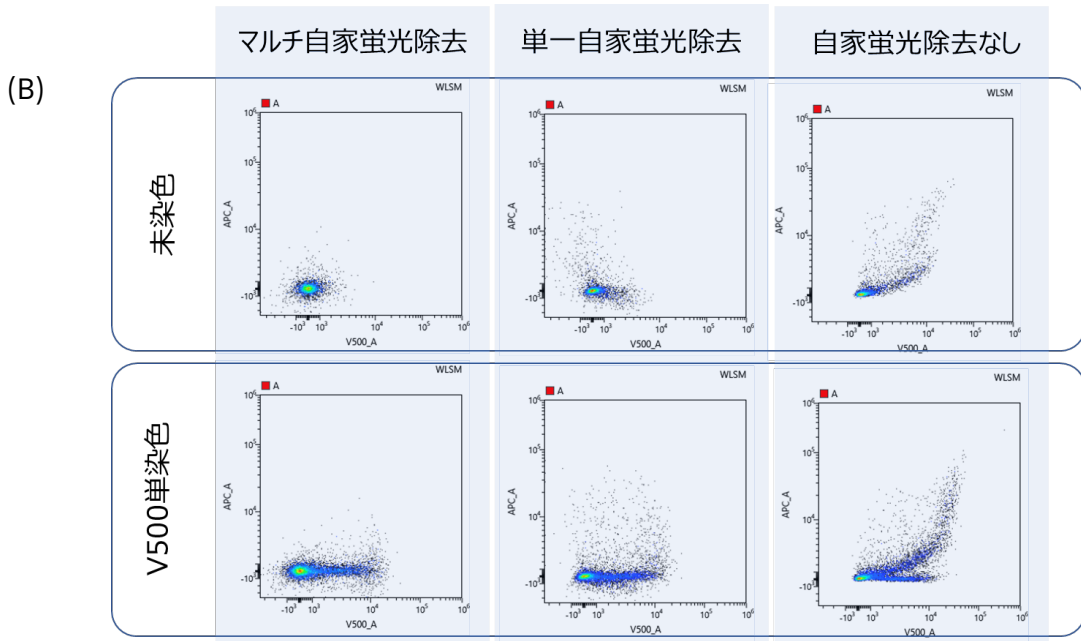


Figure 5

(A) 自家蛍光除去に使用する自家蛍光スペクトルを3条件で設定

(B) 未染色、V500単染色を見た時の3条件の自家蛍光除去実行時のPlot

■まとめ

スペクトル型のFCM解析はコンペンセーション不要に伴う簡便性だけではなく、自家蛍光除去による高い正確性を実現できるため、FCM解析の究極の形態といえる。それに加え、ソニーのスペクトル型FCM装置はマルチ自家蛍光除去も可能であるため、他社装置では実現できない究極の正確性を担保した定量解析が可能となっている。今後、複数の細胞の相互作用を前提とした解析が生体現象の解明に於いて重要となっていく中で、スペクトル型FCMはスタンダードとなっていくことが予想される。

スペクトル型セルアナライザー ID7000



スペクトル型セルソーター FP7000



発行元

ソニー株式会社
ライフサイエンス事業部 ライフサイエンス営業部

〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1

Tel: 0120-667-010

Fax: 0120-388-060

E-mail: cytometry@sony.com

URL: <https://www.sony.co.jp/Products/LifeScience/>

