

## 1 フローサイトメトリー 〈G3-16-182〉

2 フローサイトメトリーは、液中に分散させた細胞や粒子を  
3 流路系によって整列させ、個々の光学的特性を分析する測定手  
4 法である。散乱光を用いた細胞の大きさや内部構造の複雑性に  
5 関する形態パラメーターのほか、蛍光標識した抗体や蛍光色素  
6 などを用いて細胞を染色することにより、細胞表面や細胞内の  
7 タンパク質発現、核酸量等に関する情報を、単一細胞レベルで  
8 定量的に取得することが可能である。また、異なる蛍光プローブ  
9 を組み合わせることで同時に複数のパラメーターに関する情  
10 報を取得することができる。生物薬品(バイオテクノロジー応  
11 用医薬品/生物起原由来医薬品)の特性解析や規格及び試験方  
12 法においては、目的物質の標的細胞への結合活性の評価や、細  
13 胞応答の評価、生物活性試験に用いる培養細胞の適格性評価等  
14 に用いられる。

### 1. 装置と測定の原理

16 フローサイトメトリーに使用される装置(フローサイトメ  
17 ター)は一般に、流路系、光源、光学検出系、電子処理系(電気  
18 パルス処理系)、データ処理系からなる(図1)。

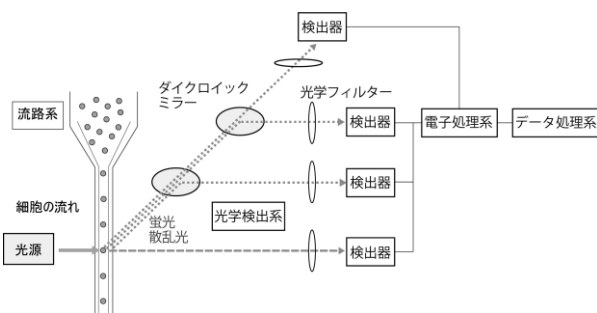


図1 フローサイトメーターの構成

21 多くのフローサイトメーターでは、細胞懸濁液は流路系によ  
22 ってフローセルまで運ばれ、シース液による流体力学的絞り込  
23 み(ハイドロダイナミックフォーカシング)によって細胞が一列  
24 に並んだ細い流束が形成され、細胞が1個ずつ観察ポイント(レ  
25 ーザー照射点)を通過する。光源としては、アルゴンレーザー  
26 (488 nm)、ヘリウム-ネオンレーザー(633 nm)のほか、種々  
27 の波長のダイオードレーザー等が複数組み合わせられて搭載さ  
28 れることが一般的であり、検出しようとする蛍光に適した光源が選  
29 択される。細胞がレーザー照射点を通過すると細胞の物理的構  
30 造によって様々な方向への散乱光が生じるほか、蛍光色素が励  
31 起されることで固有の蛍光が放出される。

32 レーザーの光軸の前方(通常は20°以内の角度)への散乱は前  
33 方散乱光(FSC: Forward Scatter)と呼ばれ、細胞が大きいか  
34 ど強くなるため、FSCを測定することにより細胞の相対的な  
35 大きさを推定することができる。レーザーの光軸に対して  
36 90°方向への散乱を側方散乱光(SSC: Side Scatter)と呼ぶ。  
37 SSCの強度は細胞内の顆粒の量や種類、核や細胞膜の形態等の  
38 影響を受けるため、細胞構造の複雑性の指標となる(細胞の内  
39 部構造の複雑性が高いほどSSC強度は高くなる)。

40 蛍光信号は光源の種類に依存して、細胞内に含まれる蛍  
41 光物質や特定の解析を目的として使用した蛍光プローブ(蛍光  
42 色素、蛍光標識タンパク質、蛍光タンパク質等)から生じる。  
43 細胞から放出された蛍光は、光学系によって分離されて個別の

44 チャンネルで検出される。光学フィルターには、特定の波長以上  
45 を通過させるロングパスフィルター、特定の波長以下を通過さ  
46 せるショートパスフィルター、特定の狭い波長範囲のみを通過  
47 させるバンドパスフィルターがあり、入射光に対して一定の角  
48 度で設置したダイクロイックミラーと組み合わせることで、特  
49 定の波長をもつ蛍光が目的のチャンネルに振り分けられる。検出  
50 の特異性は光学系の設定に依存するため、検出しようとする蛍  
51 光に適した組み合わせとすることが必要である。

52 光学フィルターによって振り分けられた散乱光及び蛍光は光  
53 電子増倍管(PMT: Photomultiplier Tube)やフォトダイオード  
54 によって検出され、電圧パルスに変換される。PMTで検出さ  
55 れる電圧パルスは検出器に電圧を加えることで増幅することが  
56 できる。増幅の方法には線形(Linear)と対数(Log)の2種類があ  
57 り、一般に細胞の散乱光(FSC, SSC)には線形増幅が、蛍光の  
58 測定には対数増幅が使用されることが多い。試料に含まれる微  
59 粒子(細胞片等の夾雑物)に由来する信号などの実験データ  
60 とは無関係なデータの取得を防ぐため、通常はFSCに閾値を  
61 設定する。閾値を超えない信号は全ての検出器で無視され  
62 る。電圧パルスはアナログ値であり、現在使用されるフローサ  
63 イトメーターの多くでは、アナログ-デジタル変換によりコン  
64 ピュータ上での処理が可能なデジタル値に変換される。

65 細胞の染色に2種類以上の蛍光色素を同時に使用する場合、  
66 各色素の蛍光スペクトルの一部が重なることがあり、この場合、  
67 各蛍光検出器は意図した蛍光色素に由来する特異的な蛍光に加  
68 えて他の色素が発した蛍光を検出する。このような蛍光の漏れ  
69 込みの問題を解決するため、蛍光補正(コンペンセーション)を  
70 実施する。試験に使用するそれぞれの蛍光色素について単独で  
71 染色した試料などを用いることで、各蛍光色素の他の検出器へ  
72 の漏れ込みを計算し、干渉する信号を選択的に差し引いた  
73 データを取得することができる。上記のプロセスを経て個々の  
74 細胞について得られた増幅・補正済みの各パラメーター(FSC,  
75 SSC, 蛍光)に関するデータが解析に使用される。

## 2. データ解析

### 2.1. データの表示

78 フローサイトメトリーで得られたデータは様々な方法で表  
79 示・解析することができる(図2)。一般的な表示方法の一つが  
80 ヒストグラムであり、X軸に一つの測定パラメーターのシグナル  
81 強度を、Y軸に細胞数を表示する。ヒストグラムは特定のマ  
82ーカー分子の発現量や発現割合の評価に有用である。また、X  
83 軸とY軸にそれぞれ異なるパラメーターのシグナル強度をプロ  
84 ットしたドットプロットは2種類の細胞表面マーカーを組み合  
85 わせた細胞集団の特定や、その割合の評価等に用いられる。

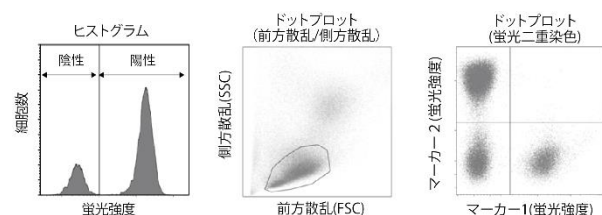


図2 データ表示の例

### 2.2. ゲーティング

88 取得したデータの中には解析に不要な死細胞や細胞片などの  
89 夾雑物、解析対象ではない細胞集団由来のシグナルが含まれる  
90

91 ことがあり、目的とする細胞集団に限定した解析を行うために  
92 ゲーティングを行う。通常、最初にFSCとSSCによる細胞の  
93 形態学的特性に基づいたゲーティングを実施する。例えば、生  
94 細胞よりもFSCが小さくSSCが大きい死細胞や細胞片は、  
95 FSC/SSCプロットにおけるゲーティングにより解析対象から除  
96 外することができる。また、血液サンプルの解析では、細胞の  
97 大きさと複雑性の違いに基づき、FSC/SSCプロットを用いて  
98 リンパ球と顆粒球を区別してゲーティングすることができる。  
99 細胞表面マーカーに対する蛍光標識抗体を用いた測定では、特  
100 定のマーカー分子(例えば、T細胞におけるCD3、B細胞におけ  
101 るCD19など)を発現する細胞集団をゲーティングして解析する  
102 ことができる。解析ソフトウェアを用いて、段階的な複数のゲ  
103 ーティングを設定することが可能である。ゲーティングにより  
104 絞り込まれた解析対象とする細胞集団について、試験に用いた  
105 蛍光標識物質が結合する細胞の割合(例えば、蛍光標識抗体が  
106 認識するマーカー分子が発現する細胞の割合)、結合量の指標  
107 となる平均蛍光強度などを算出する。

### 108 3. 測定時の留意事項

#### 109 3.1. 装置の校正

110 信頼性と再現性の高いデータ取得のため、定期的に装置の校  
111 正を実施する。多くのフローサイトメーターでは、装置の製造  
112 業者から機器校正用のソフトウェアと試薬(通常は蛍光ビーズ)  
113 が提供されており、これを用いて装置の校正を実施し、機器の  
114 性能のモニタリング状況(標準ビーズから得られる蛍光強度の  
115 ばらつき、検出感度の設定など)を記録する。

#### 116 3.2. コントロールサンプルの使用

117 バックグラウンドシグナルや非特異的なシグナルの特定と適  
118 切な測定条件の設定のためにコントロールサンプルを使用する。  
119 また、コントロールサンプルは日常的な試験の適格性評価(シ  
120 ステム適合性の判定など)にも用いられる。

121 未染色コントロール：解析対象とする細胞集団のゲーティ  
122 ング、細胞の自家蛍光によるバックグラウンドを踏まえた検出器  
123 の調整と陰性領域の設定のため、未染色のサンプルを使用する。

124 アイソタイプコントロール：蛍光標識抗体を用いる場合、観  
125 察された染色が目的抗原への特異的な結合によるものであるこ  
126 とを確認するため、使用する抗体と同一のイムノグロブリンサ  
127 ブクラスで、解析対象とする細胞には存在しない抗原に対する  
128 抗体で染色したコントロールを用いる。アイソタイプコント  
129 ールに用いる抗体は試験に用いる抗体と同じ蛍光色素が同程度  
130 の割合で標識されていることが求められる。アイソタイプコン  
131 トロールは抗体や蛍光色素の細胞への非特異的結合や、単球や  
132 マクロファージ等の免疫細胞上に存在するFc受容体への抗体  
133 結合のようなバックグラウンドの評価に用いられる。

134 単一染色コントロール：複数種類の蛍光色素を用いた試験を  
135 実施する際には、異なる蛍光色素間の漏れ込みを評価して蛍光  
136 補正を行うため、試験に用いる各蛍光色素について、単独で染  
137 色したコントロールを使用する。

138 FMO (Fluorescence minus one)コントロール：FMOコン  
139 トロールは、染色に用いる全ての蛍光色素から一つの蛍光色素だ  
140 けを除いたコントロールである。欠けている蛍光色素のチャ  
141 ネルへの他の蛍光色素の漏れ込みから、蛍光補正が正しく行わ  
142 れていることを確認する。陰性/陽性画分を判定するゲーティ  
143 ングの設定にも使用できる。

144 生物学的コントロール(アッセイコントロール)：上記の染色

145 に関するコントロールとは別に、実施する試験に対応する陽性  
146 コントロール及び陰性コントロールとなる試薬を調製する。例  
147 えば、細胞応答に伴うマーカー分子の発現量の変化を測定する  
148 試験では、未処理/未刺激のサンプルや確実に細胞応答が生じ  
149 ることが既知の処理を施したサンプルをコントロールとして使  
150 用する。これらのアッセイコントロールの測定データはシステ  
151 ム適合性の判定に用いることができる。

#### 152 3.3. 測定条件の設定

153 試料測定の際には、検出しようとする蛍光に適した光学系を  
154 選択し、コントロールサンプルを用いて検出器の感度、ゲー  
155 ティング、蛍光補正を設定する。通常、最初にFSC/SSCプロ  
156 ットにおいて解析対象とする細胞集団が適切に表示されるよう  
157 にFSCとSSCの検出感度を調整し、解析対象の細胞集団をゲ  
158 ーティングする。次に検出しようとする蛍光パラメーターにつ  
159 てヒストグラムやドットプロットを展開し、未染色コントロ  
160 ールや陽性・陰性コントロールにおいて検出される蛍光が測定範  
161 囲内に含まれるように検出器の感度を調整する。検出される蛍  
162 光強度の値はレーザーの出力等によって変動する相対的な値で  
163 あり、コントロールサンプルの蛍光強度があらかじめ定めた一  
164 定の範囲内になるように検出器の感度を設定することは、再現  
165 性を担保する上で有用である。複数の蛍光色素を用いた多重染  
166 色サンプルを分析する場合は、単一染色コントロールやFMO  
167 コントロールを用いてそれぞれの蛍光の他の検出器への漏れ込  
168 みを評価し、解析結果に影響しないように蛍光補正を設定する。  
169 陽性画分の割合(マーカー分子の発現割合等)を算出する場合に  
170 は、コントロールサンプルの蛍光強度を指標として、陽性・陰  
171 性画分を区別できるようにゲーティングを設定する。アッセイ  
172 コントロール等を用いたシステム適合性を設定し、日常的な試  
173 験における測定条件が適切であることを確認する。

#### 174 3.4. 細胞と試薬の管理

175 使用する細胞や染色に用いる蛍光標識抗体などは試験の性能  
176 や結果に影響を及ぼす重要試薬であるため、適格性を評価す  
177 るための項目と判定基準を定め、適切な方法で管理する。細胞は  
178 培養経過により形質の変化が生じる可能性があるため、セルバ  
179 ンクシステムを構築し、培養方法や継代回数の上限、試験時の  
180 細胞の状態に関する規定(細胞生存率など)を定めて使用する。  
181 特定の受容体等を標的とする試験に用いる場合には、標的受容  
182 体の発現量を規格として定めて管理する。試験実施時には、ア  
183 ッセイコントロールを用いて、使用した細胞が期待される細胞  
184 応答を示すことを試験ごとに確認することも重要である。染色  
185 に用いる蛍光標識抗体や細胞の刺激に用いるサイトカイン等は  
186 用途への適合性を確認した上で使用する。タンパク質試薬は市  
187 販品であつてもロットごとに比活性が異なることがあるため、  
188 ロット更新時には新旧ロットの比較を行い、必要に応じて添加  
189 濃度を調整して試験に使用する。

### 190 4. 生物薬品の試験における使用例

#### 191 4.1. 目的物質の標的細胞への結合活性の評価

192 目的物質が細胞表面に存在する標的タンパク質と結合して薬  
193 理作用を発揮する場合(細胞膜タンパク質を標的とする抗体、  
194 ホルモン・サイトカイン類など)、フローサイトメトリーによ  
195 り標的分子を発現する細胞に対する目的物質の結合活性を評価  
196 することができる。細胞を用いた結合試験は、より生理的な条  
197 件下で細胞膜上に存在する標的タンパク質に対する結合活性を  
198 評価できるという利点を有しており、組換えタンパク質の精製

199 が困難な複数回膜貫通タンパク質に対する結合試験にも有用で  
200 ある。一方で、試験に用いた細胞に存在する本来の標的以外の  
201 分子への非特異的結合が生じる可能性もあり、検出される結合  
202 の特異性について留意する必要がある。

203 測定方法としては、他の原理の結合試験と同様に非競合法あ  
204 るいは競合法が使用される。非競合法では、目的物質に対する  
205 蛍光標識抗体(例えば、抗体医薬品に対する蛍光標識抗ヒト  
206 IgG抗体)を用いて、標的細胞への目的物質の結合を検出する。  
207 競合法では、蛍光標識した標準物質等と試料を混合して標的細  
208 胞に添加し、蛍光標識体の標的細胞への結合に対する試料の阻  
209 害活性を測定する。適切な希釈倍数で調製した試料の希釈系列  
210 について試験を行って得られたシグナル(平均蛍光強度)から用  
211 量反応曲線を作成し、最大反応の50%に相当するシグナルを与  
212 える用量(非競合法ではEC<sub>50</sub>、競合法ではIC<sub>50</sub>)を算出する。標  
213 準物質に対する相対活性を求める場合には、標準物質と試料に  
214 ついてそれぞれ用量反応曲線を作成し、EC<sub>50</sub>あるいはIC<sub>50</sub>の比  
215 を算出する。

#### 216 4.2. 細胞応答の評価

217 細胞刺激に伴う細胞応答として細胞表面マーカー分子の発現  
218 量の増加や減少が認められる場合、フローサイトメトリーによ  
219 って定量的に発現変動を解析することができる。受容体を介し  
220 た細胞応答を誘導するホルモン・サイトカイン類のほか、細胞  
221 応答を促す液性因子やその受容体を標的とする中和抗体の生物  
222 活性評価にも使用される。試料を添加して一定時間培養する等  
223 の処理を施した細胞をマーカー分子に対する蛍光標識抗体を用  
224 いて染色し、マーカー分子の発現する細胞の割合や、発現量を  
225 測定する。

#### 226 4.3. 生物活性試験に用いる培養細胞の適格性評価

227 フローサイトメトリーは、生物活性試験に用いる細胞におけ  
228 る受容体などの標的タンパク質の発現確認のための有用な手法  
229 の一つである。培養細胞はクローン化された株化細胞であって  
230 も不均一な遺伝子発現パターンを示すことがあり、培養期間の  
231 経過により形質が変化する可能性がある。また、標的タンパク  
232 質を発現させるために遺伝子導入により作製した細胞株では、  
233 導入遺伝子の欠落やサイレンシングによる標的タンパク質の発  
234 現の消失や低下が生じる可能性について考慮する必要がある。  
235 標的タンパク質に対する蛍光標識抗体を用いた染色により、標  
236 的タンパク質の発現割合や発現量を測定し、あらかじめ定めた  
237 基準に適合することを確認する。

238

239

240