

MA900による希少ポピュレーションの高純度/高効率分取

背景

近年、フローサイトメーターによる解析の多色化が進むにつれ、ソーティングの対象となるターゲット細胞の割合も希少化が進んでいる。これに伴い、少ないターゲットを高純度かつ無駄なく回収するニーズが高まっている一方、ソーターはその動作原理から、希少なターゲットになればなるほど純度と効率を両立させるには注意が必要になることが知られている。

このアプリケーションノートでは、実例と共に、MA900の能力を活かした、希少ターゲットの高純度/高効率ソーティングの実際を示す。

装置とサンプル

MA900は、ソニー独自のCore Finderテクノロジーによる自動調整で、極めて安定した液滴生成と高精度のDelayキャリブレーションを実現している。さらに、自動調整後のBreak Off Controlテクノロジーにより、安定した高精度ソーティングの基盤を提供する。

今回は、管理細胞として提供されている全血コントロール検体を6色の蛍光パネルで染色し、希少ターゲットであるCD4+CCR4+、CD16-CD56+(CD16-NK)、CD16+CD56-、CD16+CD56+(CD16+NK)の4つの分画を4Wayソートにて5mLラウンドチューブにソート、リアナリシにより純度を確認した。

結果

4つのターゲット全てでソート効率90%以上(Abort率10%以下)、リアナリシにて高純度を確認した。

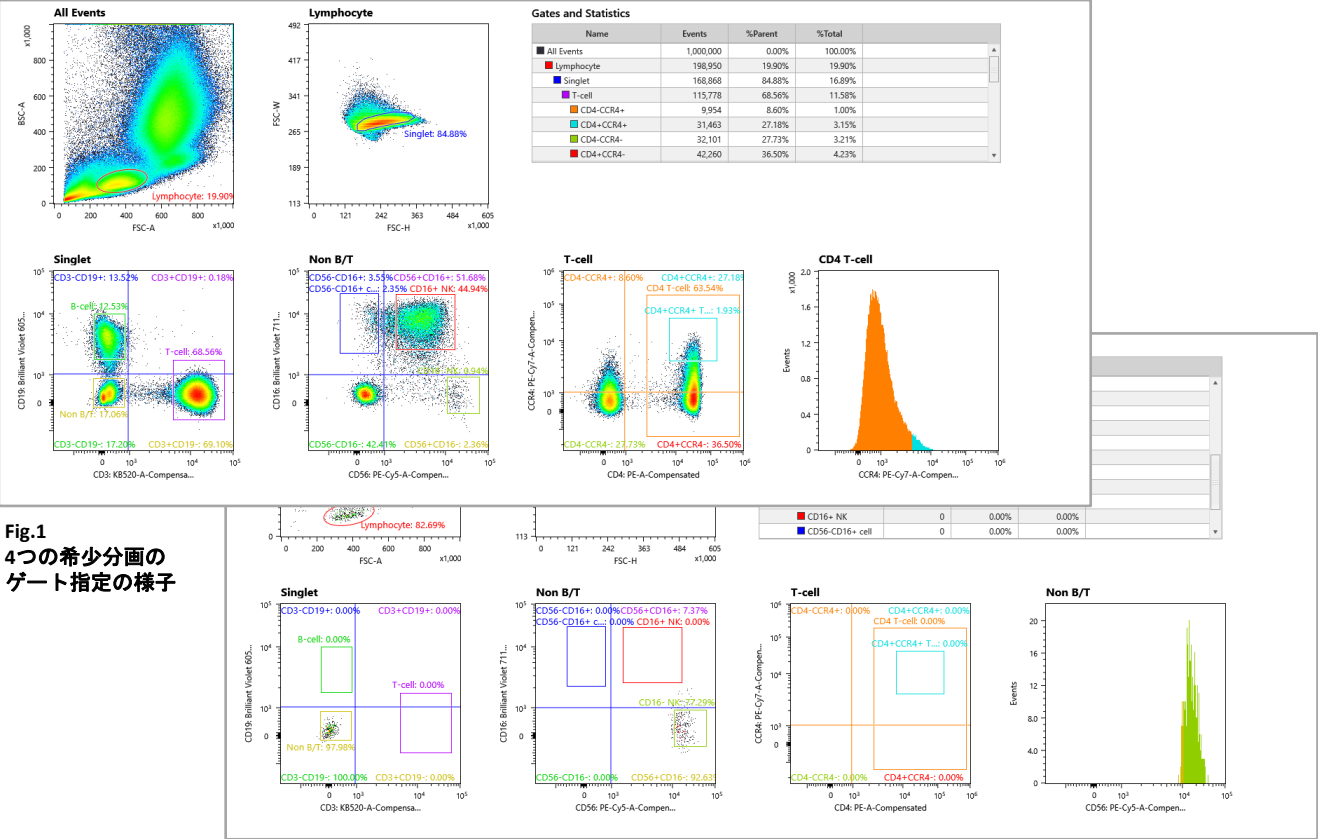


Fig.1
4つの希少分画の
ゲート指定の様子

Fig.2. 希少分画CD16-NKのリアナリシ 高純度分取が確認できる

ソーティング

全血コントロール検体: IMMUNO-TROL(Beckman Coulter 6607077)を以下の蛍光パネルで染色し、解析/ソーティングサンプルとした。

- CD3/Kiravia Blue 520
- CD4/PE
- CD16/Brilliant Violet 711
- CD19/Brilliant Violet 605
- CD56/PE-Cy5
- CCR4/PE-Cy7

解析と希少分画のゲート指定の様子をFig.1(1ページ)に示す。
また、Table.1に解析におけるプロット上の各分画とその割合を示す。

ソーティング対象とした希少な割合の4分画を、Table.2に示すようにFar Left/Left/Right/Far Lightに割り当てたがこの順番自体には特に意味はなく、順番を入れ替えても同様の純度、Efficiencyが実現される。

ソーティングは、100umチップStandardモード、Sample Pressure=6で平均イベントレートが1,500eps(毎秒液滴生成数の約1/20)程度になるよう、サンプル濃度を調整し、高純度モード(Purity)にて実施した。
また、ソーティングに際しては、ソート後の細胞の内壁付着を防ぐためポリプロピレン製の5mLラウンドチューブを用い、リアナリシス時の純度確認を確実にするため、コレクションバッファとして0.1umフィルタで濾過して不純物を除去したPBSを1mLずつ使用した。

Fraction	Events	Parent[%]	Total[%]
All Events	1,000,000	0	100
Lymphocyte	198,950	19.90	19.90
Singlet	168,868	84.88	16.89
T-cell	115,778	68.56	11.58
CD4 T-cell	73,569	63.54	7.36
CD4+CCR4+ T-cell	2,238	1.93	0.22
B-cell	21,155	12.53	2.12
Non B/T-cell	28,801	17.06	2.88
CD16- NK	272	0.94	0.03
CD16+ NK	12,944	44.94	1.29
CD16+CD56-	676	2.35	0.07

Table.1 ソーティング対象とした希少分画(赤文字)

Collection Tube	Sort Gate	Sort Mode	Elapsed Time	Total Event	Target Ratio[%]	Sorted Count	Sort Rate[eps]	Sort Efficiency[%]	Aborted Count	Abort Rate[eps]
Far Left	CD4+CCR4+ T-cell	Purity	18:43.6	1585327	0.21	3002	2.67	91.50	279	0.25
Left	CD16- NK	Purity	18:43.6	1585327	0.03	374	0.33	91.22	36	0.03
Right	CD16+CD56-	Purity	18:43.6	1585327	0.09	1309	1.17	90.09	144	0.13
Far Right	CD16+ NK	Purity	18:43.6	1585327	1.23	17818	15.86	91.28	1702	1.51

Table.2 100um Standardモード/イベントレート約1,500eps.でのソーティング結果 高いEfficiencyで細胞ロスを抑えている

リアナリシス

ソーティング後のリアナリシスに際しては、解析前にMilliQ水など不純物を除去したDI水を流し、死細胞など、サンプル起因の残滓などによるイベントが出ないことを確認の上、データのばらつきのレベル(CV)を揃えるため、ソーティング時と同一のSample Pressure=6にて解析を行った。

Fig.3に示すCD4+CCR4+のソーティング結果を考察する。
ソーティング対象のFig.1(1ページ)のCD4/CCR4プロットのように、ネガティブからポジティブに向かって連続的に広がる分布は、複数の正規分布が重なり合って連続的な分布が構成されていると考えられる。その解釈の一例をFig.4-a.に示す。
一方、統計学の基本定理である中心極限定理(サンプリング定理)の教えるところによれば、任意の分布の一部をサンプルとして取り出した場合、その取り出した一部サンプルの分布は、サンプル数の増大に従って、元の分布と同じ平均値の正規分布に収束する、ということが知られている。

今回のソーティングは、Fig.4-a.に赤線で示した分布の右側の裾部分を取り出していると考えられる。そのリアナリシス結果(Fig.4-b.)は、ソーティングゲートから漏れ出してしまっているのが、一見、ソーティング不首尾に見えるが、実は、赤線の分布の一部を取り出した場合における、中心極限定理の教えを反映した合理的な結果である(Fig.4-c.)。
この事実は、こうした複数の分布が連続的に連なる分布のソーティングにおいては、目的に応じてソーティングゲートの範囲を慎重に検討する必要があることを示唆している。

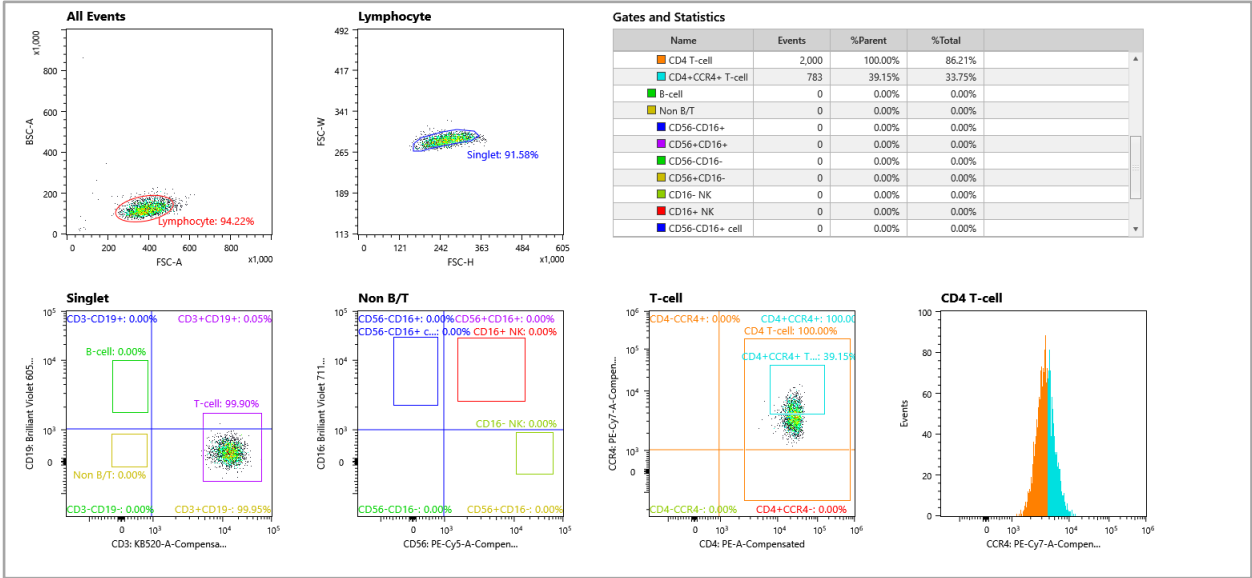


Fig.3 CD4+CCR4+のリアナリシス 連続的な分布特有のソーティング特性が見てとれる

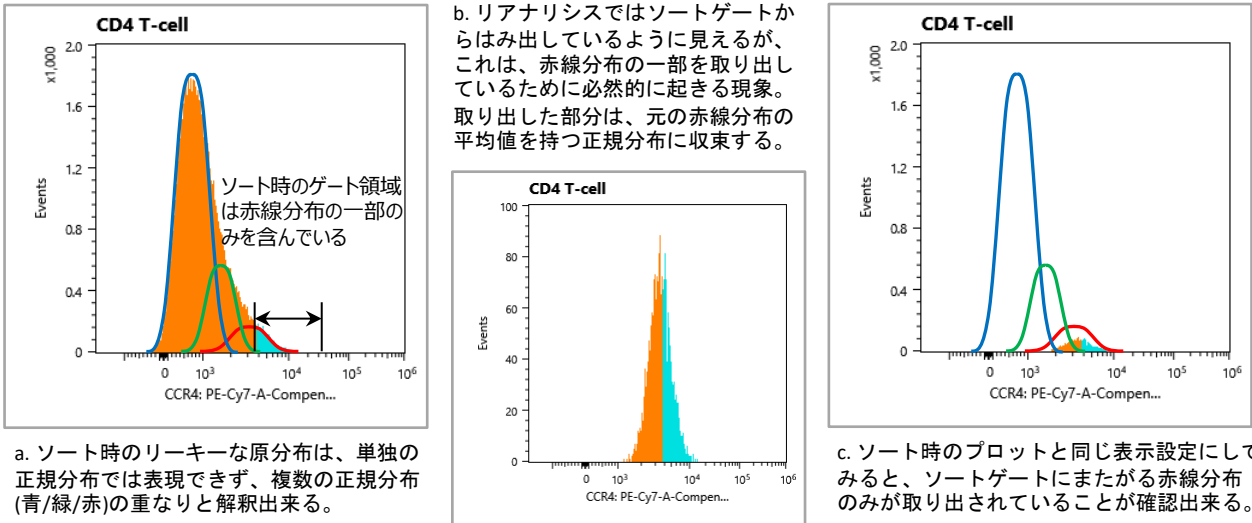


Fig.4 CD4+CCR4+のリアナリシス考察

リアナリシス

CD16/CD56で分類される3つの分画のリアナリシス結果を、Fig.2(1ページ)、Fig.5、Fig.6に示す。これらは、それぞれ独立した一つの集団を構成しているため、リアナリシスも綺麗に分離した結果になっている。

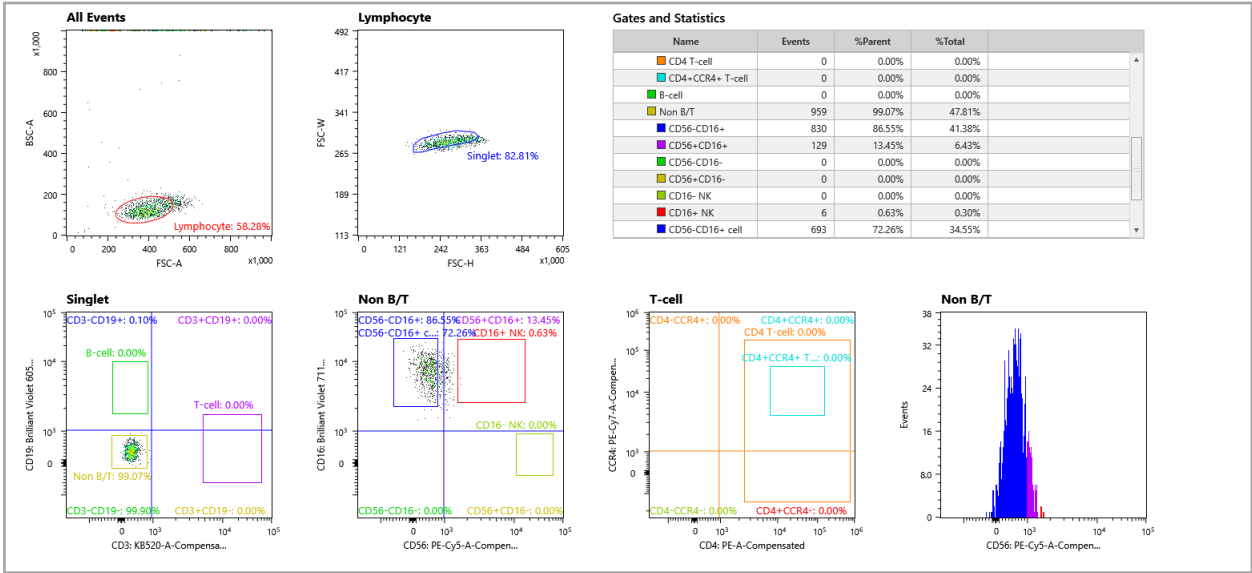


Fig.5 CD16+CD56のリアナリシス

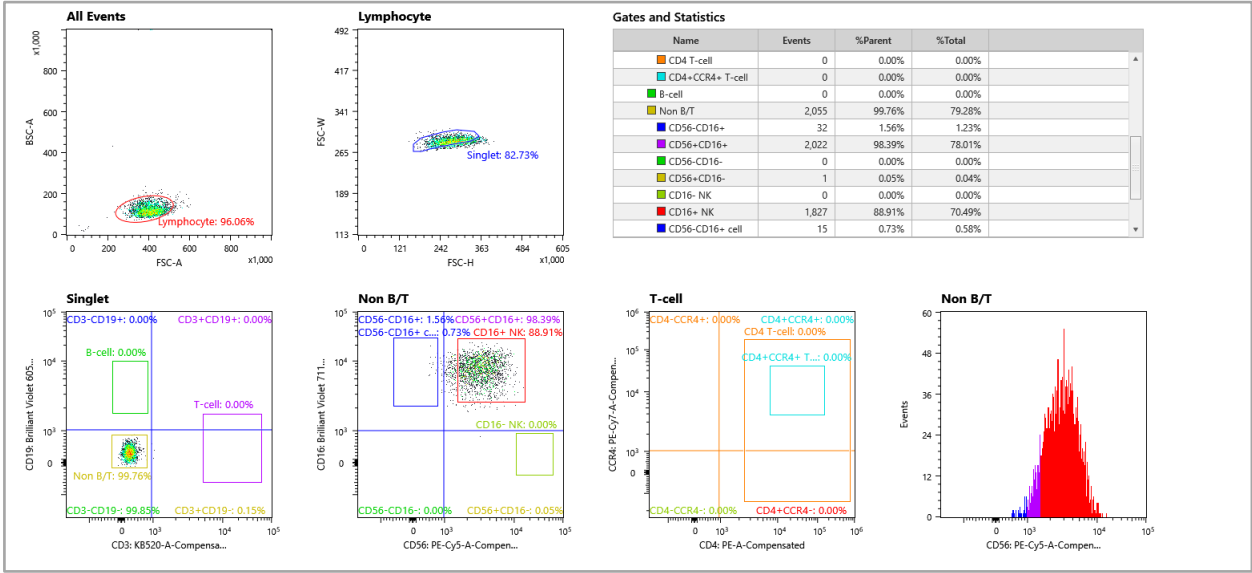


Fig.6 CD16+ NKのリアナリシス

セルソーターMA900
簡単セットアップ・小型化を実現した“日本発”セルソーター

- ・ 96/384シングルセルソート（Pモデル）
- ・ 目的に応じてオリフィスサイズを選択できるディスポーザブルソーティングチップ
- ・ 直感に訴えるユーザーフレンドリーなソフトウェア

発行元
ソニー株式会社
ライフサイエンス&テクノロジー事業部
ライフサイエンス事業部門
〒220-8750 神奈川県横浜市西区みなとみらい5-1-1
Tel: 0120-667-010
URL: <https://www.sony.co.jp/Products/LifeScience/>

