

スペクトル型セルアナライザーSA3800による細胞外小胞の測定

背景

近年、マイクロパーティクルやエクソソームを含む細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EV) は、再生医療分野、疾患診断分野などで大きな注目を集めており、免疫学等で使用されている汎用性の高いフローサイトメーターでの測定・検出に期待が高まっている。本稿では、スペクトル型セルアナライザーSA3800を使用して、ウイルスやEV測定などの微粒子を測定するためのポイントについて紹介する。

機器設定の最適化

微粒子を解析する際の最大のポイントは、しきい値 (Threshold) の設定である。一般的にフローサイトメーターでは測定の際の電気ノイズなどを相殺するために、主にFSCをトリガーとしてThreshold値が入力されている。汎用的なThresholdの設定は、10 μ m前後の細胞の解析に最適化されていることが多くこの条件下ではノイズや細菌やEVなどの微粒子はデータとして表示されない。したがって、微粒子を測定する際にはThresholdの調整が必須となる。

まず、EVをSA3800で測定するための適切なThreshold設定を模索するため、フローサイトメーター用標準蛍光ナノビーズを利用して、装置設定の調整を実施した。通常の細胞などを測定する際には、大きさを表す指標として、FSCをパラメーターとして利用するが、1 μ m未満の微粒子に関しては、SSCをThresholdのトリガーとして解析することが、感度の観点で適切である。これらの条件を使用し、市販の蛍光ビーズ100nm~900nmのサイズビーズの混合物をSA3800で測定した結果を図1で示している。この結果、蛍光ナノ粒子がサイズに応じて散乱光 (FSC/SSC) プロットで分画できていることが観察された。

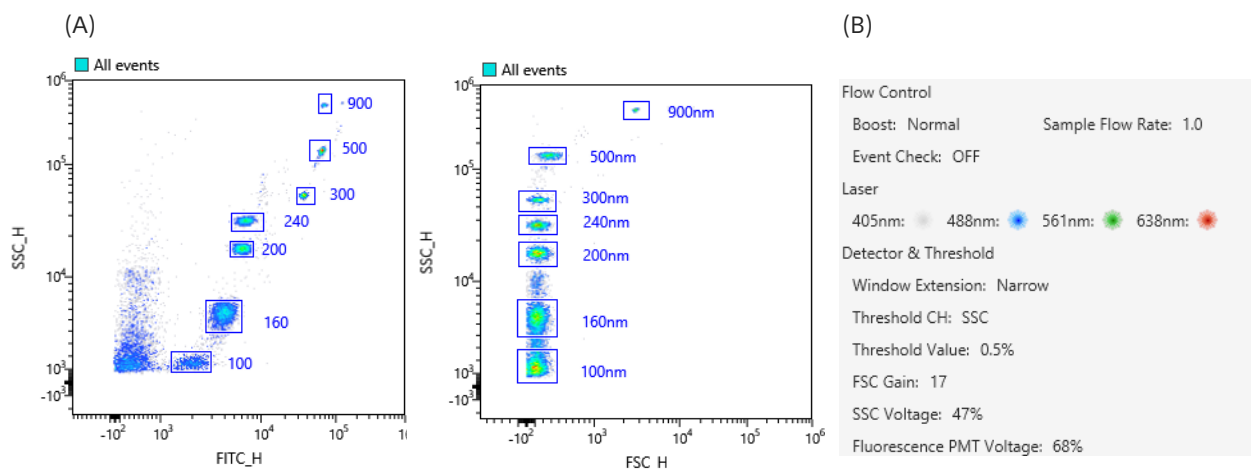


図1. 蛍光ナノ粒子の測定結果と装置設定条件

(A) Megamix Plus FSC (BioCytex社#7802) と Megamix Plus SSC (BioCytex社#7803) を1:1で混合させた試料の測定結果
(B) SA3800における測定条件

EV測定結果

次に、超遠心法を用いて精製した非染色の大腸線維芽培養細胞由来エクソソーム (CCD-18Co exo) を図1の設定条件で測定した散乱光プロットを図2Aに示した。100nmのナノビーズが検出されるSSCのシグナル値と同等のSSC値近くでエクソソームと考えられる大半の集団が検出された (図2A)。更に検出系の確かさを検証するため、NanoSight (Malvern Panalytical社) で測定した粒子濃度を指標に段階希釈し、単位時間あたりに検出されるイベント数をグラフ化した (図2B)。相関係数R2は0.99であり、濃度依存的に検出されたことから、非染色でも高い精度で検出できていることが推察できる。以上の観点から図1に示される機器設定がエクソソーム測定にも使用できることが示唆された。

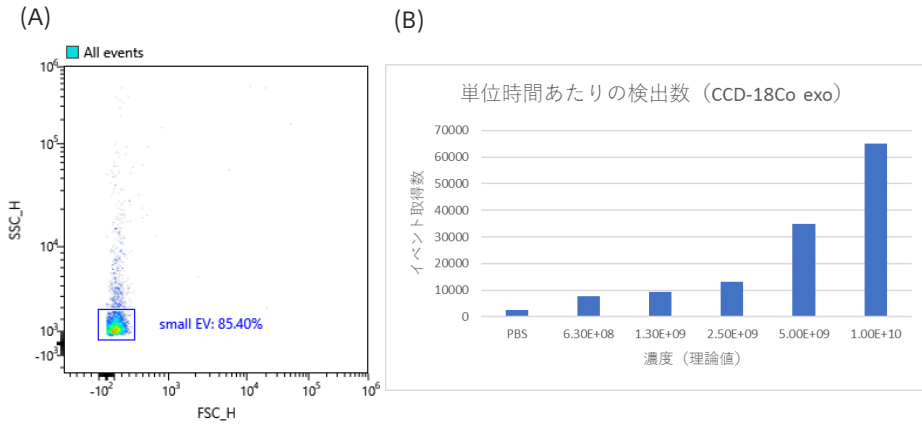


図2.大腸がん由来エクソソーム (CCD-18Co exo) の測定結果

(A) 散乱光プロット
(B) 単位時間 (10秒間) 当たりに検出される イベント数

洗浄工程の重要性

細胞をフローサイトメトリー解析を目的に抗体染色する際は、染色後に遠心処理で洗浄を実施し遊離抗体を除去することが一般的である。一方でEV解析の際は洗浄を行う場合、超遠心を実施する必要があり、時間的制約や精製効率の懸念などの理由から、洗浄を実施せずに測定したいというニーズが多い。

図3は、染色処理した大腸がん細胞由来エクソソーム (HCD116 exo) の測定結果を示している。洗浄を実施しないで測定した場合、図3左のように、特異的染色において、Isotypeコントロールとの差異がほとんど観察されなかった。一方で、洗浄を施して測定すると、これらのサンプル間で差異が明白に確認できた。この結果の違いは、未反応の色素の凝集体などの残存の程度に由来しているものと考えられる。なお、図3ではエクソソーム由来マーカーとして汎用的に利用されているCD9と大腸がん細胞由来エクソソームに多く存在しているCD147をマーカーとして使用しており、洗浄したサンプルにおいては、CD147とCD9共陽性のエクソソームが検出できていることを確認した。これらの結果から、エクソソーム解析を目的とした染色過程では洗浄工程が必須であることが示唆された。

本稿では洗浄工程を300KDaMWの限外ろ過膜を使用した。EVの洗浄工程ではEVのロスが懸念されており、今後EV測定に適した様々な洗浄工程の開発が期待される。

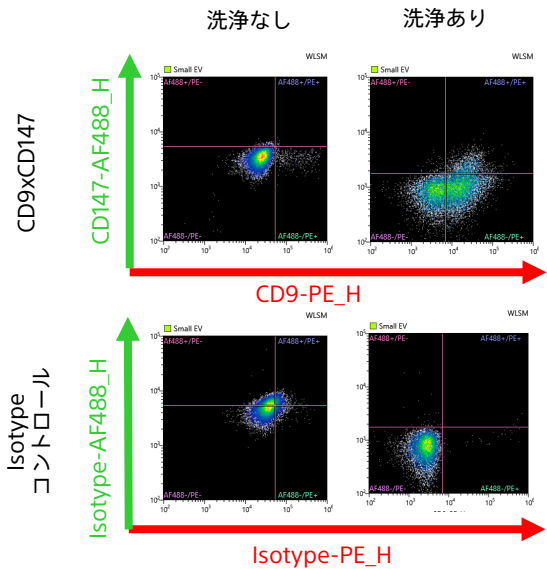


図3. 大腸がん由来エクソソーム (HCD116 exo) の CD9とCD147の染色測定結果

参考書類

1. 実験医学別冊 決定版エクソソーム実験ガイド P122-135, 羊土社
2. Yoshioka Y. et al, Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen, Nat Commun, 2014

謝辞

本稿を執筆するにあたり、サンプル提供や実験の助言を下さいました、東京医科大学吉岡祐亮先生に感謝申し上げます。

発行元

ソニーイメージングプロダクツ&ソリューションズ(株)
ライフサイエンス営業部
〒220-8750 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 : <http://www.sony.co.jp/LS>



スペクトル型セルアナライザー-SA3800

多数のサンプルを高速・簡便に解析できる
全自動スペクトル型セルアナライザー

- ・先進のスペクトル光学技術による高精度かつ安定した解析
- ・機器管理から解析までの快適なワークフローを実現
- ・日々の実験をより効率的にする384対応3Dオートローダーとシンプルで直感的な操作/設定

