

## シングルビームスポットが実現する高精度な蛍光検出

### 背景

フローサイトメトリーの実験において、細胞の表面抗原の発現量や蛍光たんぱく質の発現量などを正確に定量的な評価するためには、Positive/Negative サンプルのシグナルを明確に分離することが重要である。Positive/Negative サンプルが明確に分離されていない場合、マクロファージなど自家蛍光を持つ細胞を測定する場合などは、弱陽性のシグナルと自家蛍光の区別が困難になり、精度の高い結果が得られにくい。このような状況を避けるためには、まず蛍光強度の強い蛍光物質を選択することが重要であり、特に近年開発された非常に明るい新規蛍光物質は、フローサイトメトリーの実験で重宝されている。そして、これら蛍光物質の特徴を活用するため、励起効率を最大限に引き出すことができる機器システムが重要である。セルソーターSH800Sは、Positive/Negative サンプルの明確な分離がされている精度の高いデータを取得するために488nmレーザーと561nmレーザーの2つを同軸照射によるシングルビームスポット方式を採用しており、セパレートビームスポット方式のフローサイトメトリーと比較してより高い精度を実現している。本テクニカルノートにおいて、その結果を紹介する。

### サンプル・装置

凍結乾燥ヒトリンパ球(COULTER CYTO-TROL Control Cells Kit, Beckman Coulter社)、セルソーターSH800S

### 方法

セルソーターSH800Sの488nm励起及び、488/561nm励起パターンにおける、CYTO-TROLコントロール細胞に発現する、CD2、CD4、CD19のStain Indexを算出する。尚、検出対象は何れもPEとした。

### 結果

フローサイトメトリーでよく使用される蛍光物質の一つにPE(Phycoerythrin)がある。PEは輝度が高い特性を有しており、検出が困難な、発現が低い分子に対して効率的な標識をすることができる。図1で示すように、PEの励起波長は、488nmレーザーと561nmレーザーの両方の領域で励起されるような分布を示している。

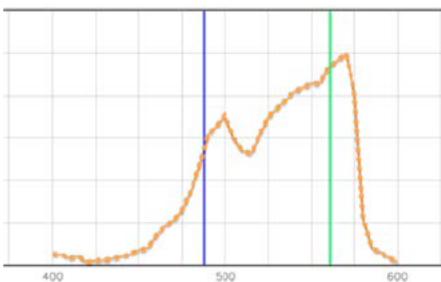
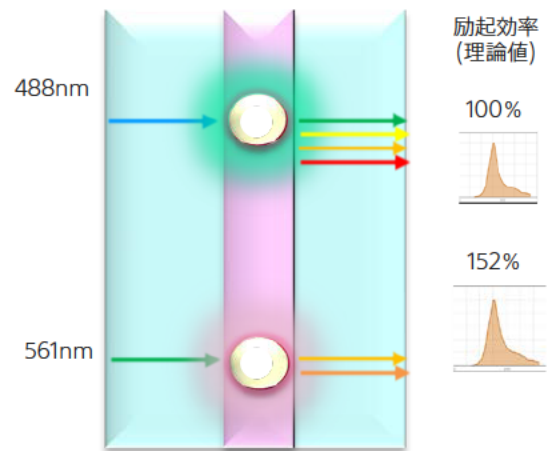


図1. 蛍光物質PEの励起波長分布  
(BioLegend社 Spectra Analyzerより引用)  
488nm レーザー(青色)と561nmレーザー(緑色)の2つのレーザーにより励起される波長分布を持つ。

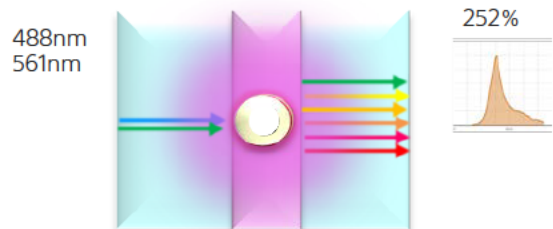
図2では488nmレーザー励起、561nmレーザー励起、488+561nmレーザーによる同時励起における励起効率の理論値を示した。尚PEを測定する際に一般的によく使用される488nmを照射した際の励起効率を100%とした。図2Aのセパレートビームスポット方式では、一つのビームスポットに一つのレーザーしか照射されないため、PEの励起効率が悪い。図2Bのようなシングルビームスポット方式では、一つのスポットに対し、同時に2レーザーが同軸照射されるため、PEが両方のレーザーによって励起されるため、相対的に蛍光強度が高くなる。

#### A. 異軸照射(セパレートビームスポット)方式



一本のレーザーでしか励起されないため励起効率が悪い

#### B. 同軸照射(シングルビームスポット)方式



複数のレーザーで同時に励起されないため励起効率が良い

#### 図2. レーザー方式の違いによる励起効率の差

- A. セパレートビームスポット方式
- B. シングルビームスポット方式

図3のように、リンパ球分画にゲーティング後ダブルレット除去し、PEのNegative/PositiveのMFI(平均蛍光強度)から図3Dの通りの計算式で算出したStain Indexをまとめたものが図4になる。

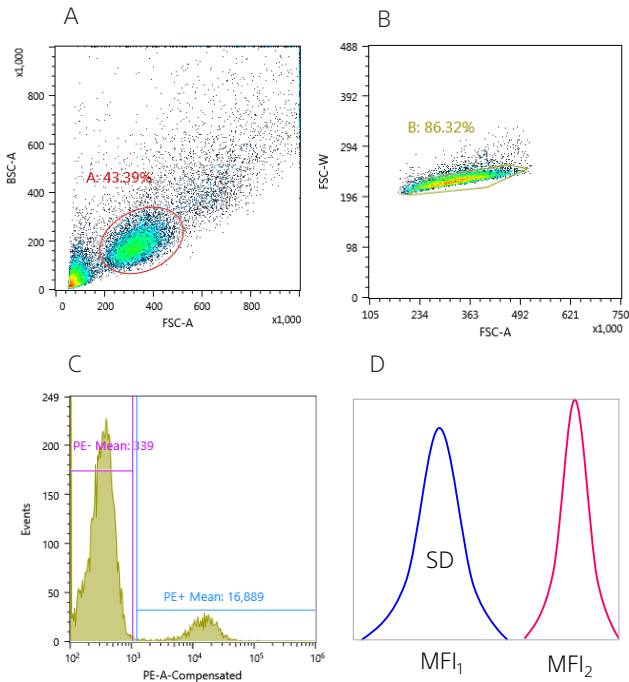


図3. Stain Index評価法

- A. FSC/SSCプロットでリンパ球分画をゲーティング
- B. SC-A/FSC-WプロットでSinglet分画をゲーティング
- C. PEのヒストグラムプロットで陰性分画と陽性分画をゲーティング
- D. Stain Index計算法 
$$\text{Stain Index} = \frac{(MFI_2 - MFI_1)}{2 \times SD^{**}}$$

MFI<sub>1</sub>: PE陰性平均蛍光強度 MFI<sub>2</sub>: PE陽性平均蛍光強度  
 \*MFI: Mean Fluorescence Intensity(平均蛍光強度)  
 \*\*SD: Standard Deviation(標準偏差)

図4のように、何れのマーカーにおいても488nmの単独レーザー照射よりも、488/561の2レーザー同時照射で検出した際のStain Indexの方が高い値が得られた。

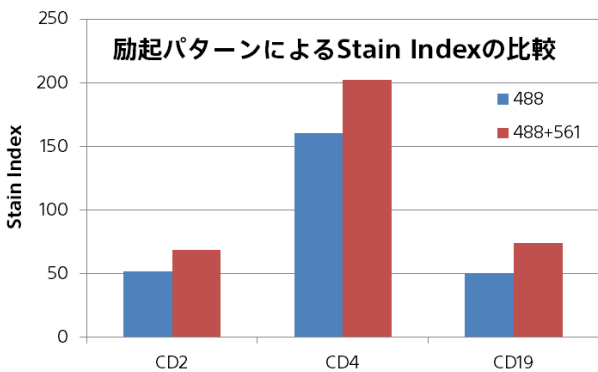


図4. 励起パターンによるStain Indexの比較  
 CD2, CD4, CD19の3種類のマーカーにおいて、488nm単独照射よりも、488+561nmの2レーザー同時励起の方が、Stain Index値が高い結果となった。

### 考察

蛍光物質の励起効率を高めることで、異軸照射形式と比較して飛躍的に良好な結果が得られたことにより、より定量的な分子マーカーの解析を実施することが可能と考えられる。

PEなどを効率的に検出可能な488、561nm同軸照射方式が搭載されているフローサイトメーターについて紹介する。

#### ・セルソーターSH800S/FX500/MA900

ソニーは、細胞の分取が可能であるセルソーター3機種を有しており何れの装置においても容易なメンテナンス性、全自動セットアップ、高性能・高精度なソーティング技術が実現されている。セルソーターSH800S、流路セルソーターFX500の2機種が完全にシングルビームスポット(全レーザー同軸)方式であるのに対し、セルソーターMA900では二つのビームスポットを有している。それぞれのスポットに対応するレーザーについては、下記表の通り、1スポット目2スポットには488nmと561nmレーザーが同時に照射され、目には、405nmと638nmレーザーが同時に照射できる構造となっているため、PEの感度を最大限に高めるテクニックは、セルソーターMA900においても問題なく適用できる。

#### ・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・簡便に解析するのに有用なセルアナライザーにおいても、スペクトル型セルアナライザーSA3800ではシングルビームスポット方式を採用している。スペクトル型セルアナライザーSA3800では、500-800nmの波長検出において32個のPMT検出器で網羅的に検出しており、煩雑な多色解析においても、常にどの色素を用いても、最も高感度な条件で結果を得ることが可能である。

機種	蛍光検出数	レーザー照射方式
セルソーターSH800	6色	405/488/561/638nmレーザーが1スポットに照射
流路セルソーターFX500	6色	488/561/638nmレーザーが1スポットに照射
セルソーターMA900	12色	488/561nmレーザーが1スポット、405/638nmレーザーが1スポット、の2スポット照射
スペクトル型セルアナライザーSA3800	8色以上	405/488/561/638nmレーザーが1スポットに照射

## セルソーターMA900

12色の蛍光同時検出と4方向ソーティング機能を兼ね備え、多くの研究目的・アプリケーションに対応可能な最新型セルソーター

- ・ **Compact Size** - 小型 & 4レーザー、最大12色の蛍光同時検出  
小型ながら最大4レーザー搭載可能で、前方散乱光、後方散乱光と合計12種類の蛍光を検出可能
- ・ **Automatic Setup** - オペレーター不要の全自動設定  
光軸調整、液滴形成、サイドストリーム調整、ディレイタイム決定を自動化し、手間のかかる設定作業が不要
- ・ **Sorting Chip** - コンタミフリー&メンテナンスフリー  
細胞の種類やアプリケーション(生存率、速度)に合わせて最適なチップを3種類のオリフィスサイズ(70/100/130 $\mu$ m)から選択可能



## 流路セルソーターFX500

微生物の混入を徹底して抑えることで、移植などを想定した微生物/細胞治療の研究に最適なモデル

- ・ **Compact Size** - 小型&3レーザー、最大6色の蛍光同時検出  
小型ながら最大3レーザー搭載可能で、前方散乱光、後方散乱光と合計6種類の蛍光を検出可能
- ・ **ウィザード形式による全流路交換**  
SH800やMA900でもできるソーティングチップ、サンプルラインの交換に加えシースライン、廃液ライン系も全て都度交換が可能
- ・ **Sorting Chip** - コンタミフリー&メンテナンスフリー  
細胞の種類やアプリケーション(生存率、速度)に合わせて最適なチップを2種類のオリフィスサイズ(70/100 $\mu$ m)から選択可能



## セルソーターSH800S

全自動セットアップ・小型化を実現した“日本発”セルソーター

- ・ **Compact Size** - 小型 & 4レーザー  
小型ながら最大4レーザー搭載可能で、前方散乱光、後方散乱光と合計6種類の蛍光を検出可能
- ・ **Automatic Setup** - オペレーター不要の全自動設定  
光軸調整、液滴形成、サイドストリーム調整、ディレイタイム決定を自動化し、手間のかかる設定作業が不要
- ・ **Sorting Chip** - コンタミフリー&メンテナンスフリー  
細胞の種類やアプリケーション(生存率、速度)に合わせて最適なチップを3種類のオリフィスサイズ(70/100/130 $\mu$ m)から選択可能



## スペクトル型セルアナライザーSA3800

多数の検体を高速・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

- ・ **Spectral Technology**  
ソニー独自の「スペクトル解析」を採用。細胞一つ一つから得られる蛍光スペクトルを検出し、アンミキシング計算により客観性の高い解析を実現。細胞由来の自家蛍光も測定・分離ができ、高精度解析が可能
- ・ **Smooth workflow**  
機器管理から解析までの快適なワークフローを実現。シングルステイン・フリーと長時間自動測定機能の充実により大幅に作業効率を改善
- ・ **Easy to use integration**  
直感的かつ効率的に作業が行える、分かりやすいユーザーインターフェース



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

〒243-0014 神奈川県厚木市旭町 4-14-1

Tel: 0120-667-010

Fax: 0120-388-060

E-mail: [cytometry@sony.com](mailto:cytometry@sony.com)

URL: <http://www.sony.co.jp/LS>

