

Attune NxT Flow Cytometer を用いた溶血・洗浄操作を伴わない末梢血液のフローサイトメトリー解析

小川 峰太郎 氏 熊本大学 発生医学研究所
組織幹細胞分野 教授

古賀 沙緒里 氏 同大学 助教



我々の研究室では、造血幹細胞の個体発生に関する研究を行っている。造血幹細胞は、全ての血液細胞へと分化できる「多分化能」と、分裂しても娘細胞の少なくとも一方は親細胞と同じ幹細胞としての性質を保持する「自己複製能」を併せ持つ。造血幹細胞を放射線照射したマウスに経静脈的に移植すると骨髄に到達し、放射線により停止した造血が再構築される。この骨髄造血再構築は、造血幹細胞を検出するための最も信頼できる標準的な解析法である。ドナーとレシピエントを区別する適当なマーカーがあれば、レシピエントの末梢血中でドナー由来の血液細胞を検出し、その割合（キメリズム）を決定することができる。そのドナーとレシピエントを区別するマーカーとして、一般的に用いられるのが、白血球共通抗原として知られる CD45 である。

マウスの系統の違いにより、CD45.1 (Ly5.1) と CD45.2 (Ly5.2) の二つのアロタイプが存在する。それぞれのアロタイプに特異的な抗体を利用することで、ドナーの白血球とレシピエントの白血球をフローサイトメトリー解析により区別することが可能となる。レシピエントの末梢血を採取して、Bリンパ球、Tリンパ球、顆粒球、単球などの系列特異的な抗体と Ly5.1 抗体および Ly5.2 抗体で染色してフローサイトメトリー解析が行われる。

この方法の難点は、血液細胞の大半を占める赤血球がフローサイトメトリー解析の際に邪魔になることである。赤血球を除去するために溶血と洗浄を行った後に抗体染色を行う必要がある。

さらに、抗体染色後の洗浄も必要である。このため操作が煩雑になり、多数のサンプルを同時に解析することが難しい。また、溶血・洗浄操作により細胞が失われるため、1回の解析に 50~100 μ L 程度の血液が必要となる。

造血幹細胞が「多分化能」だけでなく「自己複製能」も持つことを証明するためには、移植後に再構築された造血が一過性ではなく、4カ月以上の長期にわたって維持されることを示さなければならぬ。

そのためには、同じレシピエントの末梢血解析を経時的に繰り返し行う必要がある。実際、我々が移植実験を行う際には、末梢血のキメリズム解析を月に1回、6カ月にわたって実施する。そのため、毎月レシピエントマウスの尾静脈から 50~100 μ L ずつ採血を行うが、マウスへの負担が大きい。マウスの場合、100 μ L の採血を行った場合の回復期間はおよそ1週間とされる。繰り返しの採血がレシピエントの造血に影響を与えないとは言えない。したがって、少量の血液からキメリズムを解析できる手法の確立が望まれている。

そこで、今回我々は Invitrogen™ Attune™ NxT Flow Cytometer を用いて、少量の血液から溶血操作および洗浄操作なしで血液細胞の同定およびキメリズムの解析ができるか検討を行った。



Attune NxT Flow Cytometer with Invitrogen™ CytKick™ Autosampler

目的

本検討では、50 μ Lのマウス末梢血を通常どおり溶血・洗浄を行った後に抗体染色・洗浄を行う場合と、10 μ L程度の少量の末梢血を溶血なしに抗体染色し、その後の洗浄も行わない場合で、Attune NxT Flow Cytometerによる白血球の検出感度と白血球中のキメリズムの測定感度を比較することを目的とした。

方法

C57BL/6 (Ly5.2) マウスとC57BL/6 (Ly5.1) マウスの尾静脈から末梢血を採取した。採血時には血液凝固を防ぐために採血量の1/5 程度の100 mM EDTA 溶液を混合した。C57BL/6 (Ly5.2) マウスとC57BL/6 (Ly5.1) マウスの末梢血を1:1もしくは1:100で混合した後、2つのサンプルに分けて抗体染色を実施した。プロトコルの概略を図1に示す。

(1) 血液量 50 μ L、溶血操作・洗浄操作あり

(2) 血液量 10 μ L、溶血操作・洗浄操作なし

「溶血・洗浄操作あり」サンプルのみ、溶血のためにTris-NH₄Cl 溶液を混合し、37°Cで5分間振とうした。

その後、溶血剤の残存を減らすため血清入りメディアムを約3倍量添加し、1,200 rpm、4°Cの条件で5分間遠心した。上清を除去した後、抗体染色を行った。「溶血・洗浄操作なし」サンプルは、そのまま抗体染色を行った。

抗体染色は、Bリンパ球 (B220)、Tリンパ (CD4/8)、単球 (CD11b⁺ Gr-1⁻)、顆粒球 (CD11b⁺ Gr-1⁺)、Ly5.1 陽性細胞 (CD45.1)、Ly5.2 陽性細胞 (CD45.2) を同定するため、表1に示す抗体を用いて、氷上で20分間抗体反応を行った。

抗体反応後に、「溶血・洗浄操作あり」サンプルのみに170 μ Lの1% BSA/HBSS 溶液を添加し、1,200 rpm、4°Cの条件で3分間遠心する洗浄操作を2回行った。「溶血・洗浄操作なし」サンプルは、洗浄操作を行わなかった。

最終的に、全サンプルを1% BSA/PBS (-) /Propidium Iodide (PI) 溶液2 mLに懸濁して、Attune NxT Flow Cytometerを用いた解析を実施した。各蛍光チャンネル間の漏れ込みの補正は、単染色した血液サンプルを用いて行った。

Attune NxT Flow Cytometerは一般のセルアナライザーと異なり、violet レーザーの側方散乱光 (SSC) を検出する検出器を有する。赤血球と白血球は通常のblue レーザーのSSC では分離できないが、violet レーザーのSSCの違いにより分離できるため、溶血操作をしないサンプルの測定が可能となる。

しかしそれに伴い、サンプル中に大量の赤血球が存在するため、一般のセルアナライザーであればサンプル流速を下げるために測定に膨大な時間が必要となる。

Attune NxT Flow Cytometer はこの点にも解決策を持っており、アコースティックフォーカシング技術によってサンプルを1分間に1 mL 程度の高速で流してもキャピラリーの中心に細胞を整列させることができる。そのため、赤血球存在下であっても短時間での測定が期待できる。

大きい容量のサンプルを短時間で流せるという特長は、抗体反応後にサンプルをバッファーで希釈して抗体濃度を十分に薄めるだけで、細胞を再濃縮するための遠心操作が要らないというメリットももたらす。

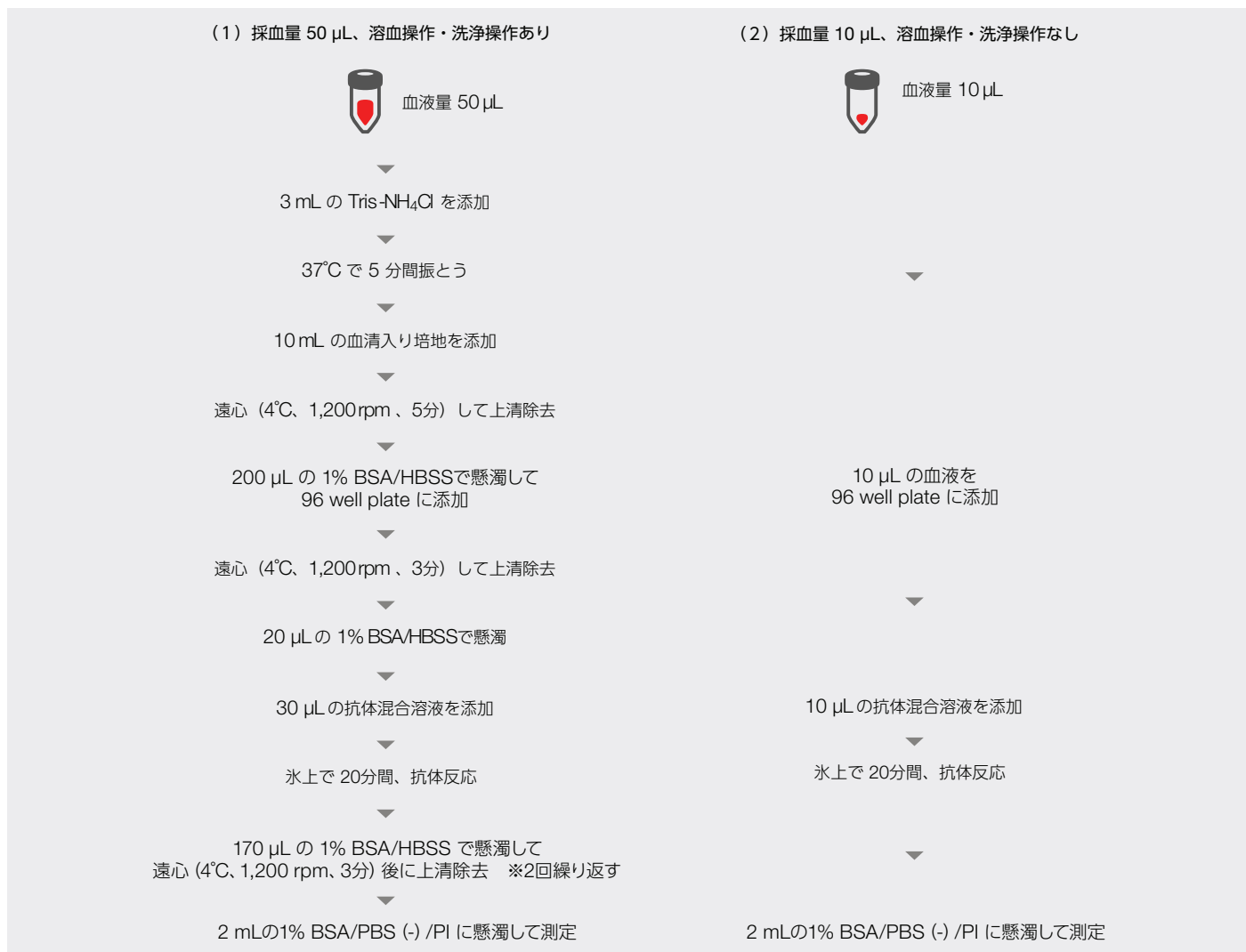


図1. 実験プロトコル

表1. 抗体リスト

抗原 (クローン)	色素	μL / sample
B220 (RA3-6B2)	Brilliant Violet (BV) 421	0.5
CD11b (M1/70)	FITC	0.5
CD45.2 (104)	PE	1
CD45.1 (A20)	APC	1
Gr-1 (RB6-8C5)	PerCP-Cy 5.5	0.5
CD4 (GK1.5)	PE-Cy7	1.2
CD8 (53-6.7)	PE-Cy7	2.5

結果

はじめに、violet レーザーのSSCによる、赤血球と白血球の分離性能について検討した。図2のviolet-SSCとblue-SSCのプロファイルに示すように、通常の「溶血・洗浄操作あり」サンプルでは、単純なリンパ球 (SSC が低い) から複雑な顆粒球 (SSC が高い) まで十分に検出された。一方、「溶血・洗浄操作なし」サンプルでは、赤血球とリンパ球が一部重複するため良好な分離が得られなかった。顆粒球は、赤血球との分離が良いため十分に検出された。(データ容量を削減するために白血球ゲートのみを記録したため、赤血球集団の大部分は表示されていない。白血球ゲートの下半に赤血球集団の一部が見える。)

PI 染色による生存率の検討では、「溶血・洗浄操作あり」サンプルは、溶血操作および洗浄操作を実施したため60%程度の生存率であったが、「溶血・洗浄操作なし」サンプルでは、細胞にダメージを与えるような操作を行っていないため、90%程度の細胞が生存していた。溶血・洗浄操作を行わないことで、高い生存率を保ち、細胞の消失も防げるため、わずかに10 μ Lの血液を用いた「溶血・洗浄操作なし」サンプルは、50 μ Lの血液を用いた「溶血・洗浄操作あり」サンプルより多くの白血球 (約40,000個) を検出することが可能であった。

白血球中の各血液細胞系列を確認したところ、上述のように「溶血・洗浄操作なし」サンプルではリンパ球と赤血球の分離が悪いため、「溶血・洗浄操作あり」サンプルに比べてリンパ球の検出効率がやや低かった。しかし、単球の分離が若干悪いものの顆粒球は良好に検出され、「溶血・洗浄操作なし」サンプルにおいても主な血液細胞を全て同定することができた。Ly5.1 (CD45.1) 陽性細胞とLy5.2 (CD45.2) 陽性細胞も同程度の頻度で検出され、分離は良好であった。

次に、キメリズムが低い場合でも正しく検出できるか検証するために、Ly5.2マウスとLy5.1マウスの末梢血を1:100の割合で混合して、「溶血・洗浄操作なし」の条件で上記と同様に抗体染色して解析した。図3 (A) に示すように、全白血球のうち1.4%がLy5.2 (CD45.2) 陽性として検出され、理論値に近い値を示した。定量的なキメリズム解析が可能であることが示唆される

最後に、実際にLy5.2マウス由来の造血幹細胞を含む試料をLy5.1マウスに移植し、1か月以上経過したレシピエントマウスの末梢血を「溶血・洗浄操作なし」の条件で解析した。図3 (B) に示すように、Bリンパ球、Tリンパ球、単球、顆粒球の全てが検出され、ドナー (Ly5.2) 由来の細胞も確認することができた。10 μ Lの血液から溶血・洗浄操作なしでキメリズムを解析する本方法は実用可能であることが示された。

(1) 採血量 50 μ L
溶血操作・洗浄操作あり

(2) 採血量 10 μ L
溶血操作・洗浄操作なし

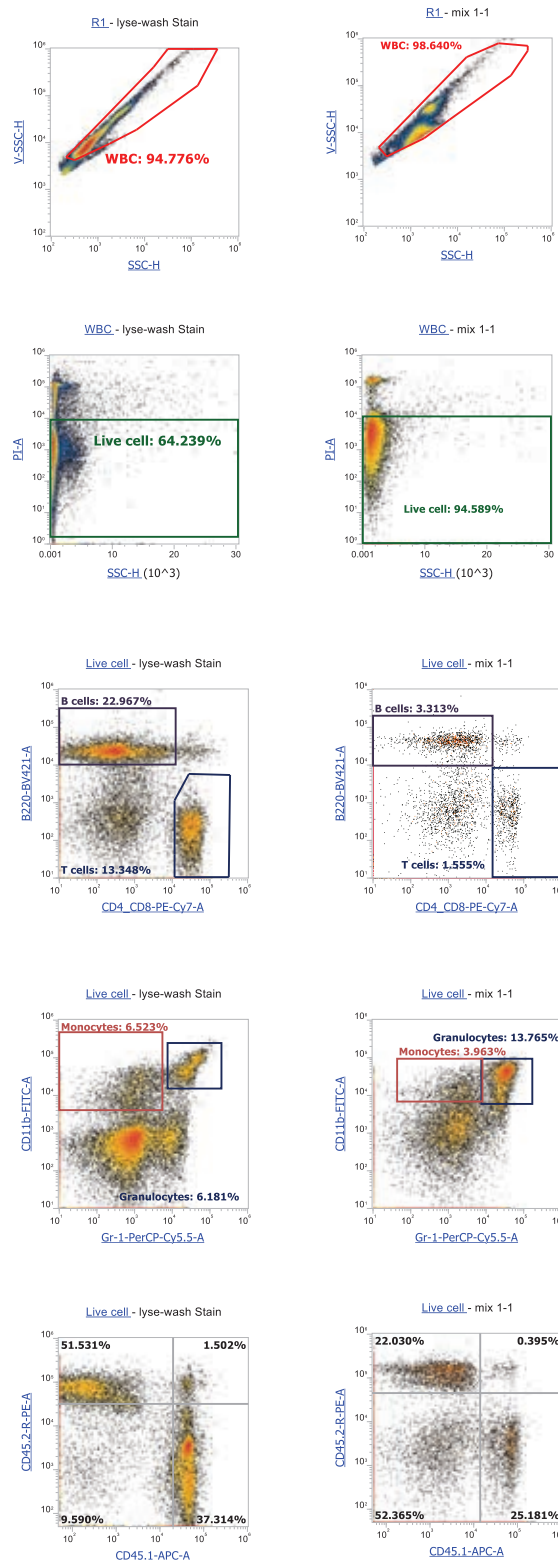


図2. 溶血・洗浄操作の有無による解析結果の違い

考察

末梢血液中の白血球をフローサイトメトリーを用いて検出する際には、白血球と比べて赤血球が数百倍も多く存在することから、溶血処理により赤血球を除去した後、白血球の抗体染色を行う。溶血処理後には、溶血剤の残存を減らすため洗浄操作も必要となることから、溶血・洗浄操作により消失する白血球は少なくない。したがって、解析には多くの血液量を必要としていた。

今回、Attune NxT Flow Cytometerを用いることで、溶血・洗浄操作を行わずに、わずか10 μ L程度の血液からBリンパ球、Tリンパ球、単球、顆粒球の細胞集団を検出することが可能であった。これは、Violet レーザーのSSCにより赤血球と白血球を分離できるため、溶血操作が不要であるAttune NxT Flow Cytometerの利点である。また、アコースティックフォーカシングの技術により、サンプルを高速で流してもキャピラリーの中心に整列させることができるため、短時間で高容量のサンプルを処理できる。すなわち、抗体反応後の洗浄操作を行わなくても、バッファーで十分に抗体を希釈するだけで、そのまま解析することができる。実際、本検討では0.5 mL/minの速度で1.5 mLのサンプルを測定し、わずか3分で解析できた。Attune NxT Flow Cytometerでは、通常必要とされる量の1/5程度の血液量から十分な数の白血球を検出することができるため、採血の困難な疾患モデルマウス等の末梢血解析にも有利であると考えられる。さらに、溶血・洗浄操作が要らないのでサンプル処理を簡略化でき、オートサンプラー等を利用すれば、スクリーニング研究や検査施設等での多数検体の解析にも対応できる。

Attune NxT Flow Cytometerはレーザー全てが異軸であるため、蛍光チャンネル間の漏れ込みを回避しつつ、多数の蛍光色素を同時に使用することができる。本検討では、6色の蛍光抗体と死細胞除去のために添加したPIの合わせて7色の蛍光色素を使用して解析することができた。多色解析を行う場合は、使用したい蛍光色素に応じて光学フィルターの特性や蛍光の組み合わせを最適化することが必要である。また、Attune NxT Flow Cytometerはシリンダーによる送液を行うため、サンプルを測定する前に、測定する液量と流速をあらかじめ設定する。この方式の利点として、単位容量あたりの細胞の絶対数が計測できる点が挙げられる。しかし一方で、事前に細胞濃度をある程度把握する必要があるため、細胞数にばらつきの多いサンプルを測定する場合は注意が必要である。

結論

Attune NxT Flow Cytometer を使用することで、溶血および洗浄操作なしで少量の血液から白血球を解析することが可能であり、通常末梢血解析のみならず、採血量が限られる希少なサンプルを解析する場合や、多数のサンプルをルーチンで解析する場合などにおいて、その有用性は非常に高い。

(A) Ly5.2 : Ly5.1 = 1:100で混合

(B) Ly5.2 細胞を Ly5.1マウスに移植

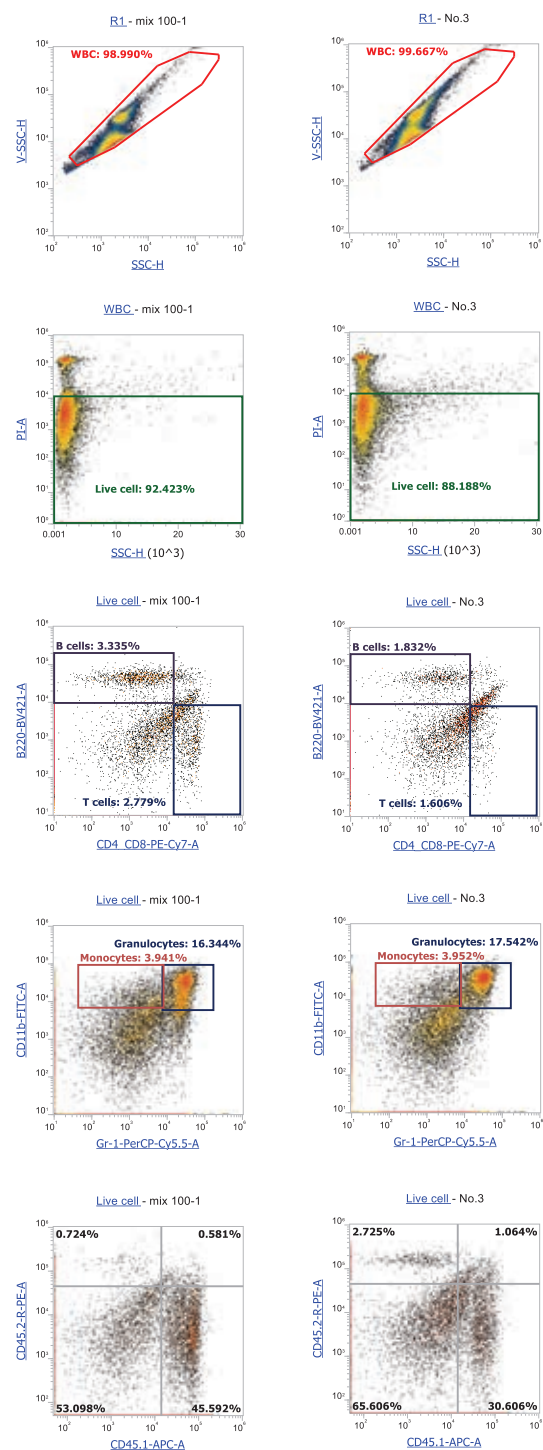


図3. 溶血・洗浄操作なしでの解析

Attune NxT Flow Cytometerの詳細はこちらをご覧ください thermofisher.com/attune

研究用에만使用できます。診断目的およびその手続き上での使用はできません。

記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。

For Research Use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2020 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.

All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.

実際の販売価格は、弊社販売代理店までお問い合わせください。

価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますのであらかじめご了承ください。

標準販売条件はこちらをご覧ください。 thermofisher.com/jp-tc

販売店

FPL060-A20070B

サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ jptech@thermofisher.com

オーダーサポート TEL: 03-6832-6980 FAX: 03-6832-9584

営業部 TEL: 03-6832-9300 FAX: 03-6832-9580

 facebook.com/ThermoFisherJapan

 [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

thermofisher.com

ThermoFisher
SCIENTIFIC