

抗体－蛍光色素コンビネーションの選択

フローサイトメトリーで解析を行う場合、解析の正否を決める重要なファクターは抗体と蛍光色素との最適な組み合わせです。最適な組み合わせは数多くあり、その組み合わせを選択する時に考慮しなければならない点が幾つかあります。

蛍光色素標識モノクローナル抗体の蛍光強度（輝度）

蛍光色素のもつ相対蛍光強度は様々です。抗体の染色度は、使用する蛍光色素により異なります。図1には同一モノクローナル抗体に5種類の蛍光色素を標識した時の染色パターンの例を示してあります。

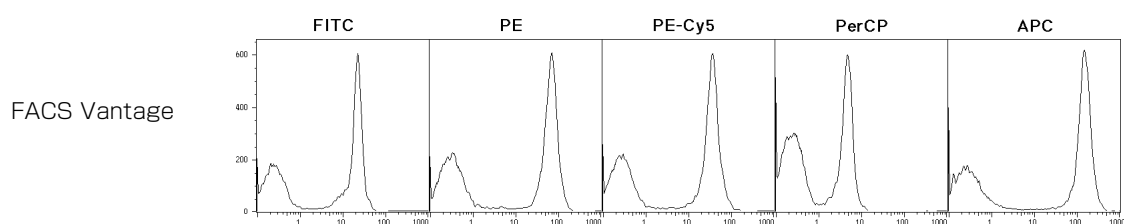


図1 同一モノクローナル抗体に5種類の蛍光色素を標識したときの、FACS Vantageに於けるシグナル／ノイズ比（S/N比）

次の点に注意してください：

- ・ 同じ種類のモノクローナル抗体でも、使用する蛍光色素によって陽性と陰性のS/N比が4～6倍違うことがあります。
- ・ 相対蛍光強度は装置によっても違います（データ未提示）。この違いは、装置ごとに使用しているレーザーとフィルターの組み合わせが異なることによります。

各種蛍光色素の相対強度に関する一般的なガイドラインを次の表にまとめました。この表は一般的なパターンであることにご注意下さい。またモノクローナル抗体によっても違いがあります。

装置	相対蛍光色素強度 (明るい→暗い)
180 mWのEnterprise IIC レーザーと35 mW HeNe レーザー 装備のFACS Vantage	APC > PE > PE-Cy5 > FITC >> PerCP

F/P比

抗体上に存在する蛍光色素の数（F/P比）もまた蛍光の相対的強度に影響します。FITCとPerCP標識抗体では抗体1分子当たり数個（2～9個、抗体の種類に拠る）の蛍光色素が標識されますが、一方APCとPE標識抗体では抗体1分子当たりおよそ1個の蛍光色素しか標識されません。FITCは小さな分子ですが、PE、PerCPやAPCは巨大な蛍光蛋白です。蛍光色素と抗体の結合部位の制約のため、IgM抗体は通常FITCやテキサスレッド、Cy3やCy5の様な小分子蛍光色素でのみ標識されます。

抗原密度

抗原の発現が強い細胞には、どの蛍光色素を利用しても解析可能です。抗原の発現密度が低い細胞は、染色された細胞と染色されていない細胞を分離するためには、PEやAPCの様なS/N比の高い蛍光色素を用いることが必要となります。

自家蛍光

個々の細胞集団にはそれぞれ特徴的な自家蛍光があります（細胞自身が発する蛍光シグナル）。自家蛍光はどの蛍光チャンネルでも観察されますが、波長が長い(>600nm)ほど弱くなります。

- ・自家蛍光が強い細胞には蛍光波長が長い色素（例えばAPC）を用いると、良好なS/N比を得ることができます。
- ・自家蛍光が強くないタイプの細胞の場合、長波長の励起光を用いても、あまり分離の改善はみられません。FITC標識抗体が利用できます。

非特異的結合

多くの標識抗体は、低いレベルの非特異的結合を示し、陰性の細胞が自家蛍光以上に発光します。この非特異的結合は次の原因により起こります：

- ・モノクローナル抗体のアイソタイプ
IgGアイソタイプのなかには、ある種の細胞のFcレセプターに結合しやすいものがあります。
- ・使用している蛍光物質
カルボシアニン（Cy3、Cy5、PE-Cy5）やテキサスレッド標識抗体は、ある細胞サブセットへの結合が強くなる傾向を示すことがあります。Cy5の場合、この現象はFcレセプターと色素の極わずかな親和性によるものであることが示されています。