

エスケイピー現象

概要

本テクニカルアップデートでは、フローサイトメトリーのモノクローナル抗体に見られることがあるエスケイピー現象についてご紹介します。

定義

エスケイピーとはフローサイトメーターのゲートから除外されてしまう細胞の凝集（陽性に標識された細胞）であり、そのために解析の結果が変わってしまいます。

観察

エスケイピー現象が起こると、リンパ球ゲートが正しくセットされていても%T+%B+%NKの合計が95%以下になってしまいます。これは標準リンパ球細胞ゲートからエスケイピーが除外されたことに拠るものです。

ドットプロットでエスケイピー現象の例をご紹介します。健常ドナー由来の単核細胞をFicoll-Paqueで末梢血から分離しました。染色には2社のメーカーから入手したCD8 FITCのモノクローナル抗体を使用しました。前方散乱光（FSC）対 蛍光-1（FL1）のドットプロット表示では、リンパ球ゲートの外にCD8+凝集細胞集団が示されました。FSCシグナルの増加を示すこれらのイベントは、ソーティングすると、エスケイピー（凝集リンパ球）として同定されます。これらの細胞は標準のリンパ球解析ゲートから除外されるため、陽性細胞%は低くなってしまいます。

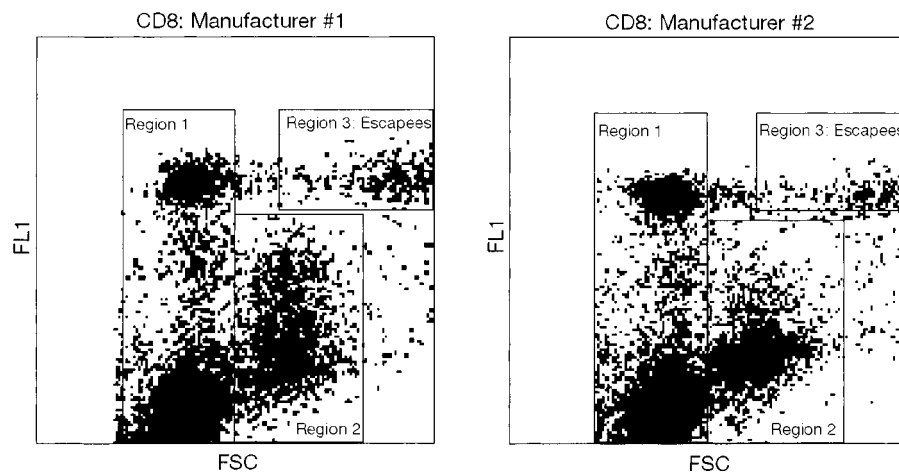


図1 Region1にはリンパ球細胞ゲート内にCD8陽性とCD8陰性のリンパ球細胞が含まれています。Region2には単核細胞集団が含まれています。標準のリンパ球細胞ゲートの外にある輝度の高いRegion3には、CD8+陽性の細胞集団が含まれます

CD8やCD41など様々なモノクローナル抗体を使いますと、免疫フェノタイプングアッセイで細胞凝集が起こり、検出対象の細胞の陽性%値が低くなります。凝集細胞の数は、使用しているモノクローナル抗体がFITC標識かPE標識かにより異なります。リンパ球細胞ゲートのCD8陽性細胞を解析する場合、同じドナーからのサンプルでもCD8 FITC標識の場合、CD8 PE標識を使用した場合に比べ、陽性率が低くなることが示されています¹。非標識精製モノクローナル抗体とヤギ抗マウス (GAM) Ig FITC (第二ステップ試薬) を用いた場合でもエスケイピー現象が見られます。エスケイピーの数は用いた細胞調製法によってもある程度違います。末梢血の単核細胞分離法は、全血細胞を染色してからFACS Lysing Solutionで溶血した場合に比べて検出されるエスケイピーの数が多くなります

推奨事項

1. エスケイピーの数を減らすために、BDでは全血サンプルをFACS Lysing Solutionで溶血してから、フローサイトメーターで解析することをお勧めします。詳しくはFACS Lysing Solutionの取扱説明書をご覧ください。
2. Ficoll-Paque分離で調製された細胞懸濁液の場合、蛋白含有率の高い溶液 (例えば、2%ウシ胎児血清と0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS)) の使用をお勧めします。
3. 細胞懸濁液は低速で攪拌しなければなりません。またサンプルは300 x g以上で遠心分離しないでください。過剰の洗浄や高速の攪拌のような乱暴な取り扱い、細胞凝集の増加につながります。
4. 貪食反応による単核細胞の減少を起こす試薬 (鉄カルボニル粒子) は使用しないこと。これらはエスケイピーを増加させます。
5. サンプル調製中にこの様な点に注意を払っても、エスケイピーは起こることがあります。

さらに詳しい情報については、日本ベクトン・ディッキンソン技術研修室ホットライン (Tel:03-5805-9960 Fax:03-5805-9955 E-mail:tech_cell@bdj.co.jp) にご連絡下さい。

参考文献

1. Jackson A. Basic phenotyping of lymphocytes: selection and testing of reagents and interpretation of data. Clin Immunol Newslett. 1990;10:43-55.