

【今更聞けない、、死細胞除去しなければいけないの？】

フローサイトメトリー実験に関する、今更聞けない質問にお答えする「今更聞けない、、」ですが、今回はフローサイトメトリー実験における死細胞について考えてみたいと思います。

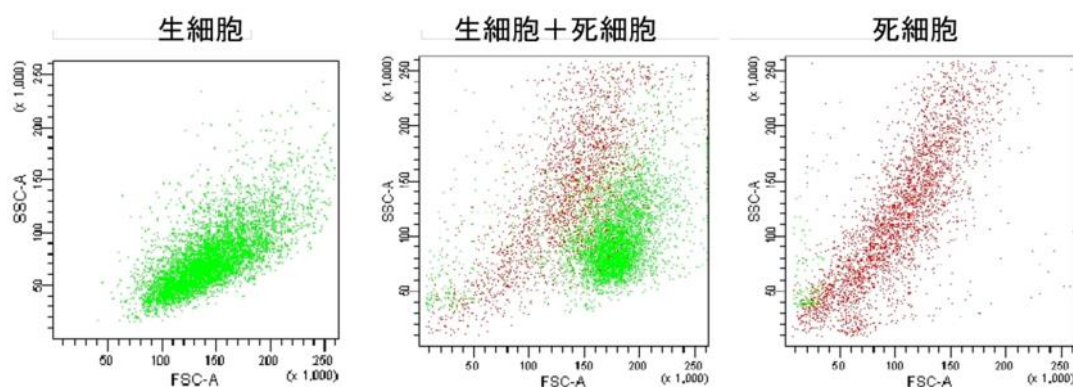
フローサイトメトリー実験で測定予定のサンプルではしばしば、死細胞染色用の PI や 7-AAD などの試薬での染色を行います。同時測定数に制限がある中で、そのうちのひとつをつぶしてでもわざわざ死細胞を染色しなければいけないのか？という疑問を持ったことのある方、抗体パネルの都合上死細胞染色を行っていない方もいらっしゃると思います。今回は、①なぜ死細胞を区別しなければいけないのかと、②死細胞をデータから除くための実験のヒントをお話しできればと思います。

■ なぜ死細胞を区別しなければいけないのか

死細胞は生細胞よりも自家蛍光を発する傾向があります。また、膜構造が壊れているため、抗体の非特異的結合が増えます。これにより、擬陽性が発生し、正しいゲーティングが難しくなります。

また、前方散乱光（FSC）および側方散乱光（SSC）のドットプロット時に死細胞と生細胞を区別できるといわれたこともありましたが、これは正しくありません。下図では PI によって死細胞（右図、赤色）と生細胞（左図、緑色）とに分画し、FSC と SSC の展開図でそれらを同時に示した図（中央）になりますが、死細胞と生細胞は混じりあっていることがわかります。したがって死細胞の染色無しに、ゲートアウトすることは不可能です。

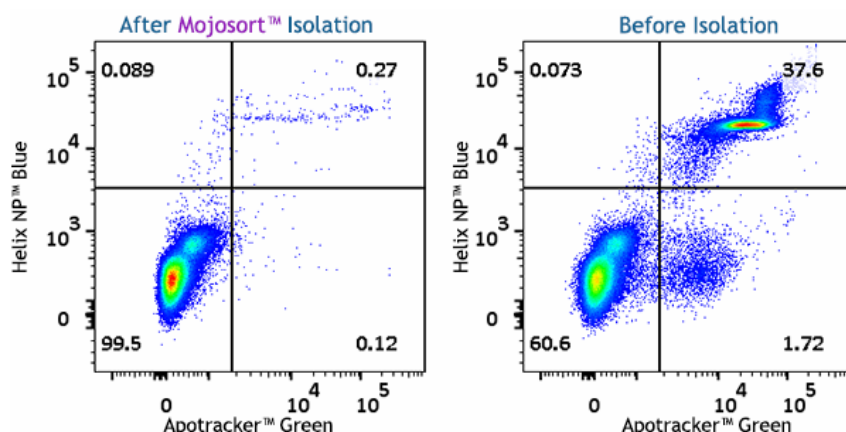
データ解析時の正確性の問題だけでなく、細胞溶液中に死細胞が多く存在すると、凝集しやすくなることもあります。ダブレットが多く生じ、測定イベント数を圧迫することもあるため、できるだけサンプル中の死細胞を生じさせないように実験操作することが重要です。



■ 死細胞をデータから除くための実験のヒント

上記のように、まず細胞を殺さないような実験操作が必要です。サンプルの温度管理、バッファの種類、Wash 時の遠心速度や時間などの最適化が有効です。特に遠心時には、壁についた細胞にさらに遠心力が加わることで細胞が死ぬことがわかっています。細胞の種類によっては、最近、遠心機を使用せず、層流による細胞洗浄を行うことのできる装置：[Curiox 社 Laminar Wash™システム](#)の販売が開始されましたので、その使用もご検討いただいてもよいかもしれません。

死細胞が生じてしまった場合は、サンプルから除去できるキットの使用を検討すべきです。特に細胞ソートの予定があるサンプルでは、ダブレットの割合低減のためにも、検討が必要です。BioLegend 社の [MojoSort™ Dead Cell Removal Kit](#) はアポトーシスおよびネクローシスを起こした細胞の細胞表面に露出したホスファチジルセリン残基に結合するアポモノマーを使用したマグネットソート試薬です。ネガティブセレクションのため、残った細胞に磁気ビーズが残らないのも利点の一つです。



Gated on CD45+ cells. A single cell suspension from human PBMCs was prepared and heat killed to isolate live cells using the MojoSort™ Human Dead Cell Removal Kit. Cells were stained with anti-human CD45 (Clone 2D1) APC, Helix NP™ Blue and Apotracker™ Green.

死細胞を物理的に除去できない場合には、PI, 7-AAD などの死細胞標識試薬の使用を推奨します。固定する細胞にも使用できる Zombie 試薬の詳細は第 6 回「[今更聞けない、、、Viability Dye\(死細胞標識試薬\)の重要性](#)」をご参照ください。

■「今更聞けない、、、」シリーズ お題大募集中■

フローサイトメトリー実験についての「今更聞けない、、、」なことを大募集しています。
TDB News に採用された方にはオリジナル USB メモリーをプレゼントします。
お題お申込み、過去の記事は[こちら](#)からご確認ください。