

【今更聞けない、、 Compensation Beads を使ったコンペンセーションって正しいの？】

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ーターのコンペンセーション調整時に細胞ではなく Compensation Beads を使用して正しいコンペンセーションが行えるのか、ということをお話ししたいと思います。

「コンペンセーション」という概念は理解しづらい、もしくはなんとなくはわかっているけど実際に何が行われているのかわからない、という方は実は多いのではないのでしょうか？過去にコンペンセーションコントロールについてお話しさせていただきました（[第 31 回：今更聞けない、、コンペンセーションコントロールを作成するときのルールとは？](#)）が、あれは細胞の使用を前提としています。

使用する細胞が希少でかつ代替となる細胞を用意できない場合や、使用する抗体が細胞では陽性にならないなどの場合は Compensation Beads の使用を検討することになります。Compensation Beads を使っても、細胞使用時と同様、正しい Compensation の値を得ることができるのでしょうか？

■コンペンセーションコントロールの必要条件（第 31 回より）

1. サンプルと同じ蛍光色素を使用すること
2. サンプルと同じかそれ以上の蛍光強度を有すること
3. 陽性分画と陰性分画の自家蛍光の量が同じであること
4. サンプルと同じ処理をすること
5. 十分なイベント数であること
6. 測定時には、毎回コンペンセーションサンプルを測定すること

Compensation beads にはいくつかの種類がありますが、ここでは、蛍光標識抗体をキャプチャーして使用するタイプのビーズ（例：BioLegend 社製品 品番 [424601/2](#)）について考えます。このビーズキットには陰性ビーズと陽性ビーズが含まれています。陽性ビーズには抗マウス/ラットの抗体定常部に対する抗体でコーティングされており、実サンプルの細胞染色に使用した抗体がキャプチャーされます。

このビーズが上記の必要条件を満たせるかを検討すると、、

1. ←満たしている（サンプルと同じ抗体を使用できる）
2. ←満たしている（キャプチャービーズに抗体が結合するため、蛍光強度は実サンプルと同等以上である）
3. ←満たしている（陽性ビーズと陰性ビーズのサイズは同じ）
4. ←固定などを行うことはできないが、そもそもビーズなので問題にはならない
5. ←満たしている
6. ←満たしている（ビーズなので、同じものをいつも測定可能で安定性がある）

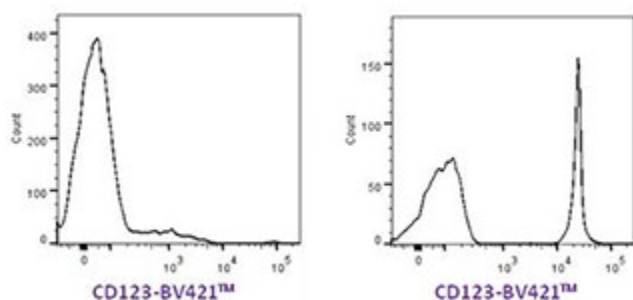
ということで、4 以外のすべての条件を満たしています（4 はそもそも満たす必要が無い）。

したがって、Compensation Beads を使用した場合も細胞を使ったコンペンセーションと同様、正しく蛍光補正を行うことができますと考えられます。

とくにタンデム色素の場合には Compensation beads を使用してサンプルと同じ蛍光標識抗体を使えることは大きなメリットです。タンデム色素は経時的にどうしても劣化していくため、同じ色素名であっても厳密にはロットごとに補正值が異なるためです。低発現もしくは要請が少ない抗原を当てている場合、細胞よりも Compensation beads を使う方が正しい補正值を得ることができていると考えられます。

注意としては、樹状細胞やマクロファージ、脂肪細胞など大きな細胞を測定したい場合は、ビーズと細胞の大きさが違いすぎるため、蛍光補正をしきれないことがあります。

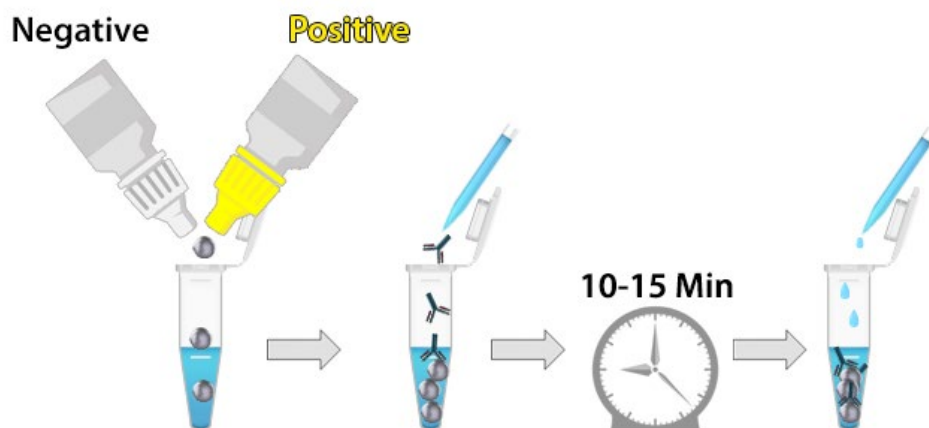
また、死細胞除去試薬等を染色することができない（できるものもあります）ため、そのような試薬を使う場合には、細胞で蛍光補正を行う必要があります。



（例）左図は PBMC を用いた BV421 標識の CD123 抗体のコンペンセーションコントロール、
右図はビーズを使用したコンペンセーションコントロールのヒストグラムプロットを示す。
左図だと陽性分画の発現が低く、数も少ないため、正しい補正值が得られない可能性がある。

Compensation Beads の詳細はこちら

<https://www.biolegend.com/ja-jp/compensation-beads>



■「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。

TDB News 9.2022
トミーデジタルバイオロジー株式会社
Phone 03-6240-0843
Fax 03-6240-0461