

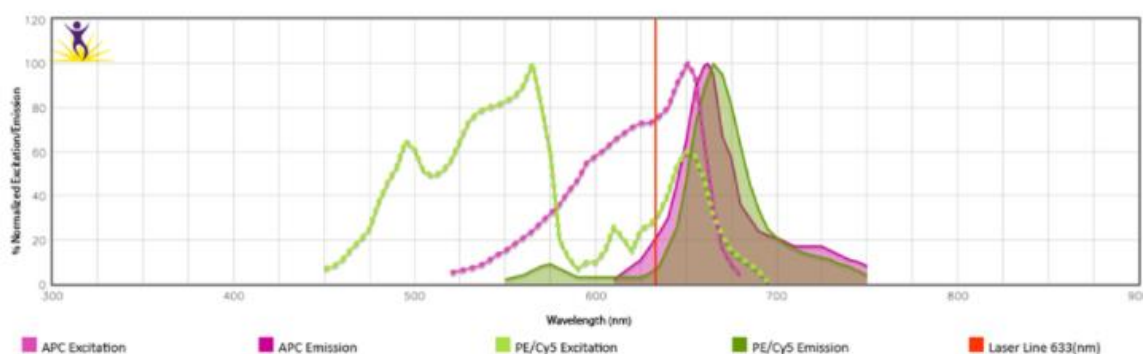
【今更聞けない、、、 コンペーションコントロールを作成するときのルールとは？】

前回【[第 30 回：今更聞けない、、、FCM で多重染色するときの抗体の選び方とは？](#)】では抗体パネル作成の基本的なルールについて説明しました。

しかし、フローサイトメトリー実験では、多重染色したサンプル 1 本を用意しただけでは正しく測定することができません。複数の蛍光色素を同時に測定すると、どうしても「蛍光の漏れ込み（Spill over）」が発生してしまいます。この漏れ込みを数学的に修正する方法が「コンペーション」です。

今回は、コンペーションを正しく計算するために準備するコントロールサンプルである、コンペーションコントロールについてお話ししたいと思います。

（コンペーションの原理については、【[第 24 回：今更聞けない、、、コンペーションって何？](#)】をご参照ください）



Using a [Spectra Analyzer](#), you can see that the PE/Cy5 can be excited by the 633 nm laser, making it difficult to compensate the spillover into APC.

■コンペーションコントロール作成の時の基本的なルール

1. サンプルと同じ蛍光色素を使用すること

当たり前と思われると思いますが、例えば、実際のサンプルは GFP 陽性である場合に FITC をコンペーションコントロールとしてお使いになる方がいらっしゃいます。

同じチャンネルで測定される色素であったとしても、色素が異なれば波長も異なり、当然他の色素への漏れ込み量も異なります。したがって、同一色素のみを使用してください。

2. サンプルと同じかそれ以上の蛍光強度を有すること

コンペーションコントロールは、きちんと陽性分画がゲーティングできて、サンプルと同じかそれ以上の蛍光強度を有している必要があります。

測定サンプルで使用した蛍光色素標識抗体では、コンペンセーション用の細胞がほとんど光らない（＝陽性細胞が居ないと考えられる）場合は、例えば、CD4 や CD8 など高い発現強度を示し、かつ陽性分画がゲーティングできる同じ蛍光色素が標識された抗体を使います。ただし、タンデム色素の場合は例外です。タンデム色素の場合には Lot により漏れこみ方が異なるため、利用する抗体の単染色でコンペンセーションを行う必要があります。

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

簡単に言うと、FCS と SSC の展開で同じゲート内の細胞であれば問題ありません。

4.サンプルと同じ処理をすること

例えば、細胞内染色を行う際などは、実際のサンプルと同様、コンペンセーションサンプルにも固定処理を行います。

5.十分なイベント数であること

正確な補正値を算出するために、すべてのコンペンセーションコントロールは十分なイベント数が必要です。

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

前回のコンペンセーションの値が、今回も適正とは限りません。測定ごとに適切なコントロールを測定し、補正値を計算させる必要があります。

上記のルールは基本的に、蛍光の補正値を正しく算出するためのデータ測定を目的にしたものです。

もちろん実際の実験では、すべてをクリアするのは難しいこともあります。

しかし、基本的なルールとそれが必要な背景を知っておくことは大切だと思います。

コンペンセーション用ビーズなども利用し、正しくデータ測定を行い、実験データを解析していただければと思います。

FCM におけるコントロールについて（BioLegend 社）

<https://www.biolegend.com/en-us/flow-controls>

コンペンセーション用ビーズ（Spherotech 社）

<https://www.digital-biology.co.jp/allianced/products/spherotech/spherotech04/>

■「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。