

# フローサイトメトリー法を用いた細胞表面抗原解析及びアポトーシス解析

TN388

## Analysis of Cell Surface Markers and Apoptosis by Flow Cytometry

### [概要]

フローサイトメトリー法（FCM法）は、細胞や微小粒子などの粒子にレーザー・ビームを照射して得られる散乱光や蛍光を利用して、個々の粒子の特性を解析する技術です。主なアプリケーションとして、細胞表面抗原の発現量を解析することで細胞の特性を調べる細胞表面抗原解析や、細胞内のサイトカイン・リン酸化タンパク質などの存在量を解析する細胞内抗原解析、個々の細胞のDNA含量を調べることで各細胞周期の細胞の割合を解析する細胞周期解析などがあります。以下に、分析事例をご紹介します。

当社では、FCM法を用いたリンパ球サブセット解析や造血幹細胞の解析、各種疾患による表面マーカーの検索、アポトーシス解析などの細胞特性解析サービスを提供しております。

### [事例 1] マウス全血を用いたリンパ球サブセット解析

マウス全血を用い、CD3、CD4、CD8、CD45の4種の細胞表面抗原を解析し、CD8陽性細胞（細胞障害性T細胞）とCD4陽性T細胞（ヘルパーT細胞+制御性T細胞）の比率の算出を行いました。測定結果を図1及び表1に示します。

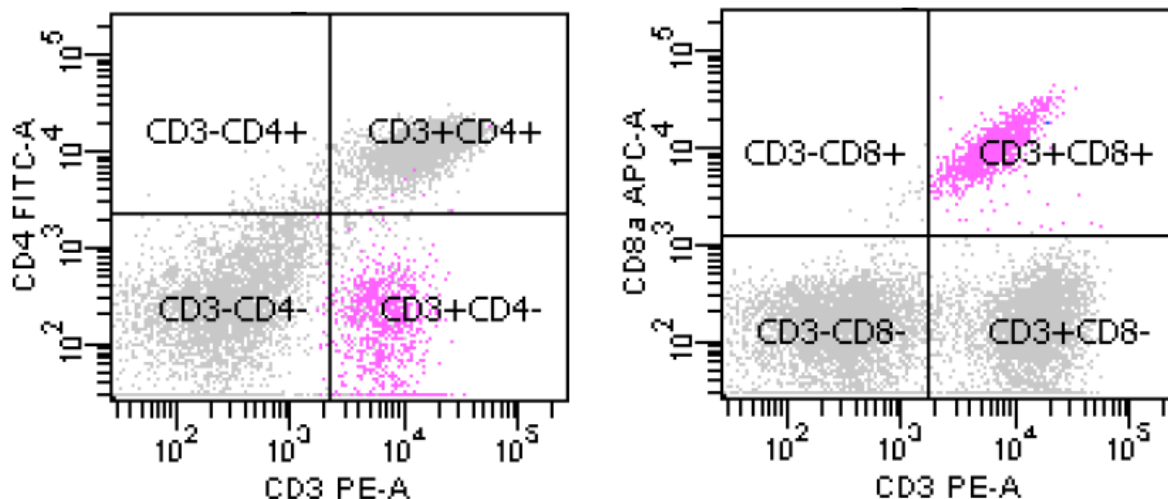


図1 ICR系雄性マウスの全血を用いたリンパ球サブセット解析のドットプロット図

表 1 ICR 系雄性マウスの全血を用いたリンパ球サブセット解析の日内再現性(6 回繰返し測定)

Animal		CD3+CD4+	CD3+CD8+
1	Ratio (%)	35.2	11.4
	SD(%)	0.8	0.3
	CD4/CD8	3.1	
2	Ratio (%)	32.3	10.1
	SD(%)	0.3	0.2
	CD4/CD8	3.2	
3	Ratio (%)	29.2	9.5
	SD(%)	1.1	0.3
	CD4/CD8	3.1	

図 1 は、散乱光と CD45 陽性集団から特定したリンパ球について、CD3、CD4、CD8 で解析を行ったドットプロット図です。マウス 3 個体のドットプロット図より、CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の比率 (CD4/CD8 比) (免疫活動性の指標) を算出した結果が表 1 です。CD4/CD8 比は  $3.1 \pm 0.1$  となり、文献報告値(1)と同等な結果でした。

#### [事例 2] 培養細胞を用いたアポトーシス解析

ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat cell に、抗がん剤のビンブラスチンを作用させることで誘導されるアポトーシスを、FCM によるアネキシン 法により解析しました。実験条件を表 2、解析結果を図 2 に示します。細胞はアポトーシスが誘導されると細胞膜構造が変化し、膜透過性の上昇を経て細胞の断片化に至ります。アポトーシス初期に細胞膜構造が変化すると、正常時は細胞膜内面に局在しているホスファチジルセリンが細胞膜外面にも出現します。そこで、アネキシン がカルシウムイオン存在下でホスファチジルセリンと結合する性質を利用し、ホスファチジルセリンの細胞膜外面局在の有無をアネキシン に FITC (フルオレセインイソチオシアネート) 標識したアネキシン -FITC を用いて検出しました。また、PI (ヨウ化プロピジウム) が DNA の二重らせん構造にインターカレートする性質を利用し、細胞核の染色の有無で膜透過性上昇を検出しました。

表 2 培養細胞を用いたアポトーシス誘導剤評価の実験条件

使用細胞	Jurkat cell
被験物質	ビンブラスチン (10 nmol/L)
暴露時間	24 時間
アポトーシス解析方法	アネキシン -FITC + ヨウ化プロピジウム (PI)

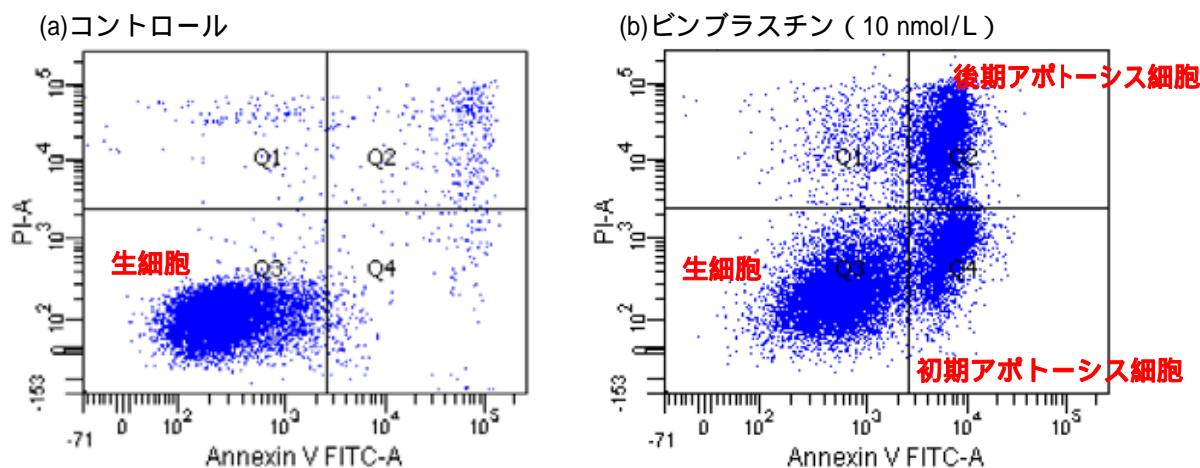


図2 フローサイトメトリーを用いたアネキシン 法によるアポトーシス解析

図2より、ピンブラスチンを作用させると、アネキシン -FITC のみで染まる細胞集団と、アネキシン -FITC 及び PI で染まる細胞集団の増加が確認されました。この結果から、Jurkat cell はピンブラスチンにより膜構造の変化を経て、細胞の断片化、細胞死に至る、アポトーシス作用を誘導されたことが確認されました。

#### [参考文献]

(1) Lee WH, Woodward BD J Nutr 126:849-859.

#### [関連技術リンク]

フローサイトメーターを用いたビーズアッセイ法による生体試料中のバイオマーカー濃度測定

<http://www.scas.co.jp/analysis/pdf/tn381.pdf>

作成:バイオ (YM1112) 3-M0-(23)