

蛍光標識抗体の組み合わせによる測定値への影響

ーフローサイトメトリー測定による赤血球 CD59 発現の偽陰性化ー

佐藤 晶子、加藤 奈津子、福井 智津子、櫻井 秀子

筑波大学医学系技術室

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

細胞表面抗原の分析には、フローサイトメトリーによる測定が広く用いられている。今回、赤血球膜蛋白に特有な CD235a と補体制御膜蛋白 CD59 との 2 カラー分析において、FITC 標識抗体と PE 標識抗体の組み合わせの違いで、赤血球 CD59 の測定値が著しく乖離し、CD59 発現の低下を経験した。

PE 標識 CD59 (CD59-PE) 抗体と FITC 標識 CD235a (CD235a-FITC) 抗体の 2 カラー測定では、健康人も含めて、赤血球 CD59 の平均蛍光強度が減少し陽性率の低下が認められた。また、抗体の反応順に関わらず CD59-PE 抗体を先に反応させた条件においても、CD59 陰性赤血球の増加を認めた。これは、CD235a-FITC 抗体との組み合わせが、CD59-PE 抗体の特異的結合に対して阻害的要因となり、赤血球 CD59 発現の偽陰性化になったと推察された。

2 カラー分析には、CD59-PE 抗体と CD235a-FITC 抗体の二重染色より CD59-FITC 抗体と CD235a-PE 抗体の組み合わせを選択すべきと思われた。

多重染色によるフローサイトメトリー測定では、稀ではあるが、今回のように標識抗体の組み合わせの影響で負の誤差を及ぼす場合があることを考慮しながら、蛍光標識試薬の組み合わせは慎重に選択すべきと思われた。

キーワード：FITC、PE、CD59、CD235a

1. はじめに

フローサイトメトリーによる分析は、溶液中に浮遊した細胞や粒状物質を対象として、フローセルの中を通る 1 個 1 個の細胞にレーザー光が照射され、多種類の検出器による測定で、目的の細胞を絞り込み、精密な解析を行うことができる特徴がある^[1]。

一般的に細胞表面抗原の分析には、蛍光を発する物質で標識した抗体等を用いて、単一染色や多種類の抗体による多重染色が行われる。蛍光物質には多くの種類があり、それぞれに特有の励起波長と蛍光波長を持ち、光のエネルギーを吸収して励起され基底状態へ遷移する時に励起波長よりも長い蛍光を発する。488 nm のレーザー光で励起され、519 nm にピーク蛍光波長の FITC (fluorescein isothiocyanate) や 578 nm にピーク蛍光波長の PE (phycoerythrin) の蛍光色素等がある。蛍光標識抗体は、反応する抗原量に比例して特異的に結合し、標識蛍光色素の量

に比例して蛍光を発するため、その蛍光を検出して、蛍光 (抗原量) の定量的分析が行われる。

2. 目的および測定法

赤血球の識別には、CD235a 抗体が一般的に用いられている。今回我々は、補体制御膜蛋白の 1 つである CD59 抗体^[1-4]と CD235a 抗体との 2 カラー測定において、FITC 標識抗体と PE 標識抗体の組み合わせの違いで、赤血球 CD59 の測定値が著しく乖離し CD59 発現の低下を経験した。

FITC 標識抗体と PE 標識抗体による 2 カラー測定は通常行われており、稀な蛍光標識抗体の組み合わせによる阻害的反応と考え、シングルカラー分析結果と対比しながら検討を試みた。

2.1 対象

健康人 3 名、CD59 陰性血球を僅かに認める症例 1 名、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) 1 名を対象者とした。測定には、EDTA 採血の末梢血液を用いた。

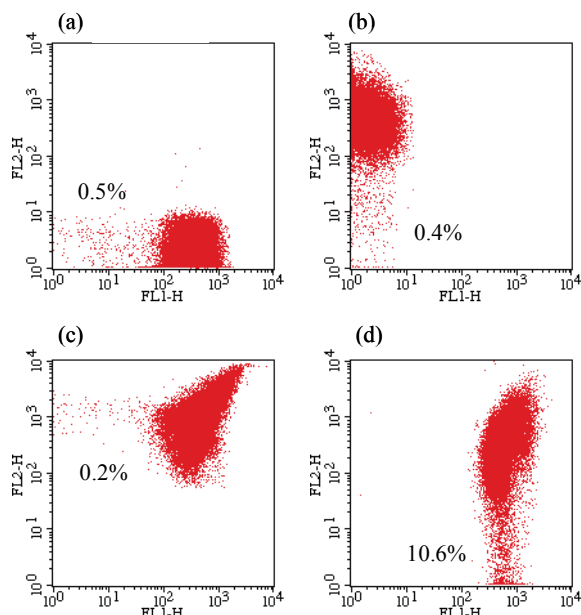


図 1. フローサイトメトリーによる赤血球 CD59 測定例. CD59 陰性血球を僅かに認める症例. (% = CD59⁺赤血球) (a) CD59-FITC 分析. (b) CD59-PE 分析. (c) CD59-FITC / CD235a-PE 分析. (d) CD59-PE / CD235a-FITC 分析

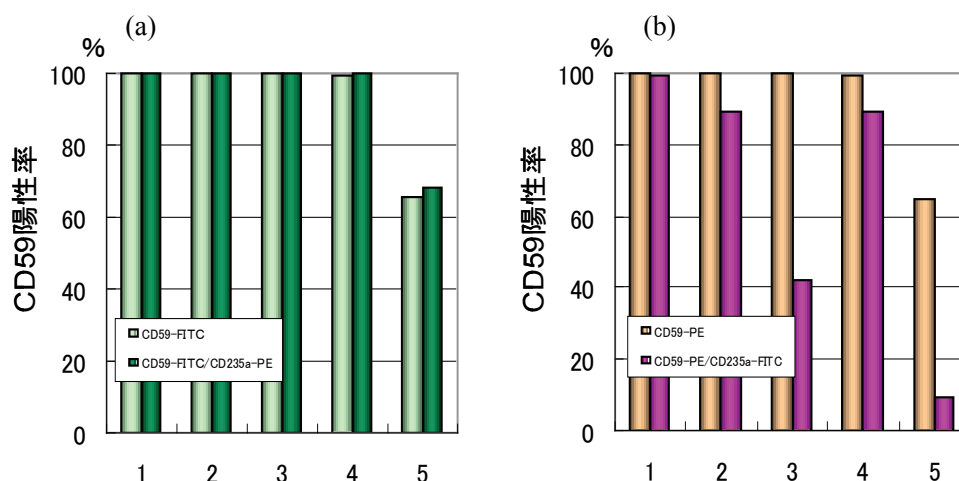


図 2. フローサイトメトリー測定による赤血球 CD59 陽性率の比較. (a) 左 CD59-FITC 分析, 右 CD59-FITC/CD235a-PE 分析. (b) 左 CD59-PE 分析, 右 CD59-PE/CD235a-FITC 分析.
1. 2. 3.: 健康人. 4: CD59 陰性血球を僅かに認める症例. 5: PNH 症例

2.2 測定試薬

1. FITC 標識抗ヒト CD59 抗体 (clone : p282 [H19], BD Phamingen)
2. PE 標識抗ヒト CD59 抗体 (clone : p282 [H19], BD Phamingen)
3. FITC 標識抗ヒト CD235a 抗体 (clone : JC159, DAKO)
4. PE 標識抗ヒト CD235a 抗体 (clone : JC159, DAKO)
5. staining medium (SM) : 0.1%BSA (sigma) , 0.1% NaN₃ 含有 pH7.2 PBS 溶液

2.3 測定

1. EDTA 採血した血液を SM に浮遊させ 1 回遠心し洗浄する。
2. 赤血球浮遊液 50 μ l を試験管にとり、それに FITC 標識抗体および PE 標識抗体を加えて、室温、暗所で 30 分間反応した。
なお、二重染色において蛍光標識抗体は、一度に加えて反応させるが、今回はその外に、標識抗体の反応順による測定値への影響を検討するために、標識抗体を 1 種類ずつ 30 分間反応させ、SM を加えて 1 回遠心洗浄し、また片方の標識抗体を加え 30 分間反応した。
3. 反応後は、赤血球を 1 回遠心洗浄し、沈査はかくく解し SM に浮遊した。
4. 測定は、FACSsort (BD Biosciences) で 3×10^4 個の血球を計測 (FL1: BP 530/30 nm , FL2 : BP 585/42 nm) した。
5. 解析は Cell Quest を用いて、赤血球の CD59 の陽性率および平均蛍光強度を分析した。まず、前方散乱光 (forward scatter, FSC) と側方散乱光 (side scatter, SSC) のパラメーターにより赤血球分面を選択 (ゲーティング) して、単一染色による解析をした (図 1. a, b)。また、2 カラー

分析では、赤血球分面のゲーティングに加えて、CD235a 陽性分面の解析をした (図 1. c, d)。

3. 測定結果

3.1 FITC 標識 CD59 抗体と PE 標識 CD59 抗体の単一染色による赤血球 CD59 陽性率の比較

FITC 標識 CD59 (CD59-FITC) 抗体と PE 標識 CD59 (CD59-PE) 抗体を単一染色し、シングルカラー分析を行った。

赤血球 CD59 の陽性率は、図 2 に示す通りであった。FITC と PE との蛍光色素の違いによる陽性率の相違は認められなかった。

また、健康人の赤血球 CD59 の陽性率は、ともに 100%であった。

シングルカラー分析では、FCS と SSC のパラメーターを用いた赤血球分面の解析のため、CD235a の単一染色を行い、赤血球分面中の CD235a 陽性率を測定した。赤血球分面中の CD235a 陽性率は、ともに 99.7~99.8%であった。

3.2 FITC 標識 CD59 抗体と PE 標識 CD235a 抗体の組み合わせによる二重染色の赤血球 CD59 陽性率の比較

CD59-FITC 抗体と PE 標識 CD235a (CD235a-PE) 抗体の二重染色を行い、2 カラー分析をした。

赤血球 CD59 陽性率は、図 2 に示す通りであった。また、健康人の赤血球 CD59 陽性率はともに 100%であった。

この標識抗体の組み合わせによる 2 カラー分析の結果は、CD59-FITC 抗体の単一染色測定値と比較し、陽性率低下の影響は認められなかった。

3.3 PE 標識 CD59 抗体と FITC 標識 CD235a 抗体の組み合わせによる二重染色の赤血球 CD59 陽性率の比較

PE 標識 CD59 (CD59-PE) 抗体と FITC 標識 CD235a (CD235a-FITC) 抗体の二重染色を行い、2 カラー分析をした。

赤血球 CD59 測定値は、図 2 に示す通りであった。

この分析結果は、CD59-FITC 抗体と CD235a-PE 抗体による 2 カラー分析や FITC 標識 CD59 抗体または PE 標識 CD59 抗体のシングルカラー分析の 3 方法と比較し、赤血球 CD59 陽性率はすべて低下を示した。CD59 陰性血球は、0.5~57.9%の範囲で増加した。

また、健常人の赤血球 CD59 陽性率は 100%以下であり 42.5~99.5%であった。

3.4 蛍光標識抗体の反応順による CD59 陽性率への影響

通常、蛍光標識抗体による二重染色は、赤血球浮遊液に 2 抗体を一度に加えて反応させるが、今回は健常人 (図 2, No.3) の赤血球浮遊液を用いて 1 抗体ずつ標識抗体を染色させて、抗体の反応 (結合) 順による測定値へ影響を比較検討した。

CD59-FITC 抗体による赤血球 CD59 の陽性率では、シングルカラー分析は 100%であり (図 3, 1 左)、また 2 カラー分析においては、CD59-FITC 抗体と CD235a-PE 抗体を同時に添加 (図 3, 2 左)、CD59-FITC 抗体を反応後 CD235a-PE 抗体を反応 (図 3, 3 左)、CD235a-PE 抗体を反応後 CD59-FITC 抗体を反応 (図 3, 4 左) における CD59 陽性率は 99.8~100%であり、この 2 抗体の反応順の違いによる結果に相違は認められなかった。

また、CD59-PE 抗体による赤血球 CD59 の陽性率では、シングルカラー分析は 100%であったが (図 3, 1 右)、それに比較し、2 カラー分析においては CD59-PE 抗体と CD235a-FITC 抗体を同時に添加 (図 3, 2 右)、CD59-PE 抗体を反応後 CD235a-FITC 抗体を反応 (図 3, 3 右)、CD235a-FITC 抗体を反応後 CD59-PE 抗体を反応 (図 3, 4 右) では、CD59-PE 抗体ほどの反応順においても、すべてにおいて陽性率が低下した。CD59 陰性赤血球は 57.9~78.2%に増加した。

3.5 単染色 (CD59-PE) と二重染色 (CD59-PE / CD235a-FITC) における赤血球 CD59 平均蛍光強度の比較および蛍光標識抗体の反応順による赤血球 CD59 平均蛍光強度への影響

CD59-PE 抗体の単一染色によるシングルカラー分析の赤血球 CD59 の平均蛍光強度 (FL2 検出器) を 100%として、CD59-PE 抗体と CD235a-FITC 抗体の組み合わせによる 2 カラー分析の赤血球 CD59 平均蛍光強度を比較した。

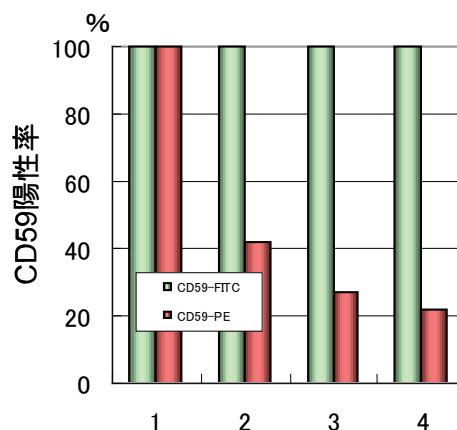


図 3. フローサイトメトリー分析による健常人赤血球 CD59 陽性率の比較. FITC 蛍光標識抗体と PE 蛍光標識抗体の反応順における検討.

1: 単一染色 (左 CD59-FITC 分析, 右 CD59-PE 分析) 2, 3, 4: 二重染色 (左 CD59-FITC / CD235a-PE 分析, 右 CD59-PE / CD235a-FITC 分析). 2: 両蛍光標識抗体を同時添加. 3: CD59 抗体染色後 CD235a 抗体を染色. 4: CD235a 抗体染色後 CD59 抗体を染色.

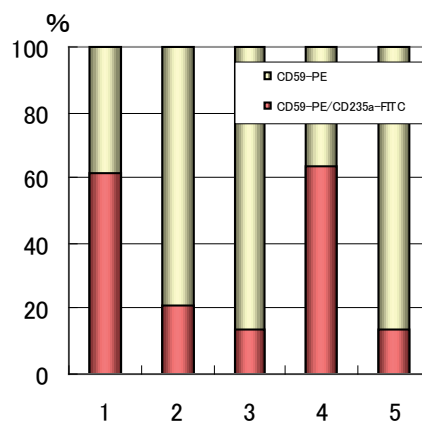


図 4. フローサイトメトリーによる単一染色 (CD59-PE 分析) と二重染色 (CD59-PE / CD235a-FITC 分析) における赤血球 CD59 平均蛍光強度の比較. 単一染色赤血球 CD59 の平均蛍光強度を 100%とする.

1,2,3: 健常人. 4: CD59 陰性血球を僅かに認める症例. 5: PNH 症例

2 カラー分析の赤血球 CD59 平均蛍光強度は、シングルカラー分析の平均蛍光強度に比較してすべて低値を示し (図 4)、それぞれのシングルカラー分析の 13.5~61.5%の蛍光強度であり、蛍光量の減弱が認められた。

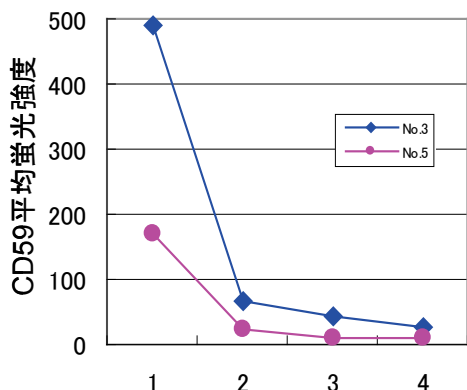


図 5. フローサイトメトリー分析による赤血球 CD59 平均蛍光強度. 蛍光標識抗体の反応順における比較. No.3: 健康人. No5: PNH 症例
1: CD59-PE 分析. 2, 3, 4.: CD59-PE / CD235a-FITC 分析. 2: 両蛍光標識抗体を同時反応. 3: CD59-PE 抗体反応後 CD235a-FITC 抗体反応. 4: CD235a-FITC 抗体反応後 CD59-PE 抗体反応

また、健康人 (図 2, No.3) および PNH 症例 (図 2, No.5) を用いて、CD59-PE 抗体と CD235a-FITC 抗体の組み合わせによる 2 カラー分析の蛍光標識抗体の反応順による平均蛍光強度への影響を検討した。赤血球 CD59 平均蛍光強度は、図 5 に示す通り、CD59-PE 抗体シングルカラー分析の赤血球平均蛍光強度に比較し、2 カラー分析では蛍光標識抗体の反応順に関わらず、すべてにおいて赤血球 CD59 平均蛍光強度の低下を認めた。

4. 考察

今回のサンプルは、赤血球の純度 (CD235a=99.7~99.8%) が高く、単一染色によるフローサイトメトリー解析の結果で充分であると思われるが、ヘテロな細胞集団の時は目的の細胞を絞り込む必要性や、より詳細な分析あるいは多抗原の同時測定等の分析には、蛍光標識抗体等を組み合わせた多重染色による測定が必要となる。

GPI アンカー型膜蛋白の 1 つである CD59 は、健康人の血球膜に発現しており^[1-4]、自己の補体活性化反応から自己血球を防御する補体制御膜蛋白として重要な役割を担っており、フローサイトメトリー測定では健康人赤血球 CD59 発現率は 100% である。しかし、健康人においてフローサイトメトリー高感度測定では、わずかながら CD59 欠損の形質を持つ血球が検出され、この微少の CD59 陰性血球を検索することは臨床的に有用とされ、近年 0.001% の測定

感度を要求する精密な解析が臨床上求められる傾向が高くなってきている。

今回、赤血球 CD59 の測定において、単一染色による FITC 標識抗体と PE 標識抗体を用いた標識蛍光の違いによる陽性率の相違は認められなかったが、CD59-FITC 抗体と CD235a-PE 抗体の 2 カラー分析に比較し、CD59-PE 抗体と CD235a-FITC 抗体と組み合わせによる 2 カラー分析では、健康者も含めて陽性率の低下や平均蛍光強度の減少が認められた。

また、赤血球の浮遊液に、CD59 抗体を反応させてから CD235a 抗体を加える。または、その標識抗体の反応順を逆にして、測定値へ影響を検討したが、CD59-FITC 抗体と CD235a-PE 抗体との組み合わせでは、CD59 発現に偽性低下は認められなかった。一方 CD59-PE 抗体と CD235a-FITC 抗体の組み合わせでは、標識抗体の反応 (結合) 順に関わらず、すべて赤血球 CD59 測定値の低下が認められ、先に CD59-PE 抗体を反応させ、その後 CD235a-FITC 抗体を加えた条件でも CD59 測定値の低下が認められた。これらのことにより、CD235a-FITC 抗体との組み合わせが、CD59-PE 抗体の特異的結合に対して、阻害的要因となり赤血球 CD59 測定値の偽陰性化になったと推察された。

FITC は、蛍光物質にアミノ基と反応するイソチオシアネート基を結合させた低分子量 (389.4) の蛍光色素で、抗体に 3~5 分子が結合されているのに対して、PE は、巨大分子のために抗体に平均 1 分子 (34 個のフィコエリスロブリン色素) が結合されている。多重染色の分析において、低密度の細胞表面抗原の方には、高い相対蛍光強度 (例えば PE>FITC) の蛍光色素による標識抗体を用いた方が良いとされている。しかし、今回の様に、蛍光標識抗体の組み合わせにより、稀に負の誤差を及ぼす場合があることを考慮しながら、測定結果の成否に影響する蛍光標識試薬の組み合わせについては、慎重に選択すべきと思われた。

参考文献

- [1] 佐藤晶子, 長澤俊郎, 二宮治彦, 赤血球膜蛋白異常の検出法としてのフローサイトメトリー: 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) の病態解析の基礎と応用, 日本膜学会誌 32 (2007) 147-154.
- [2] 佐藤晶子, 櫻井秀子, ヒト赤血球および白血球の補体制御膜蛋白発現のフローサイトメトリーによる検討, 第 3 回筑波大学技術職員技術発表会報告集 (2004) 10-14.
- [3] Sato S, Hasegawa Y, Nagasawa T, Ninomiya H, Reticulocyte-gated flow cytometric analysis of red blood cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Lab. Hematol. 12 (2006) 82-85.
- [4] Sato S, Kozuma Y, Hasegawa Y, Kojima S, Chiba S, Ninomiya H, Enhanced expression of CD71, transferrin receptor, on immature reticulocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Int. Jnl. Lab. Hematol. 2010 in press.

Effects of combinations of fluorochrome-conjugated antibodies on flow cytometry measurements : False negatives for CD59 expression on red blood cells in flow cytometric analysis

Shoko Sato, Natsuko Kato, Chizuko Fukui, Hideko Sakurai

Technical Service Office for Medical Sciences, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

This work involved 2-color analysis of CD59 and CD235a expression using flow cytometry (FCM), which revealed an increase in false-negative results for CD59 antigens on red blood cells (RBCs). Two-color analysis of FITC-conjugated anti-CD59 MoAb and PE-conjugated anti-CD235a MoAb provided satisfactory results. In comparison, 2-color analysis of PE-conjugated anti-CD59 MoAb and FITC-conjugated anti-CD235a MoAb revealed that the mean fluorescence intensity of CD59 antigens on RBCs decreased and that population of RBCs that were falsely negative for CD59 increased ($n = 5$). During multi-color staining for flow cytometric analysis, the combinations of fluorochrome-conjugated antibodies used should be carefully selected.

Keywords: FITC, PE, CD59, CD235a