

細胞周期解析試行錯誤

吉田 貴子

佐賀大学 総合分析実験センター 機器分析部門

1. はじめに

フローサイトメーターは、分析のみを行うセルアナライザーと、分析と目的細胞の分取を行うセルソーターの二種類がある。筆者はフローサイトメーターの管理を担当することになったが、セルソーターの使用経験はない。そこでセルソーターの取扱習熟を目指し、セルソーターを用いた簡易な細胞周期解析技術を身につけることにした。今回はその取り組みについて報告したい。

2. フローサイトメーターによる細胞周期解析の原理

1つの細胞が分裂して2つの細胞になる一連の過程を細胞周期と呼ぶ。細胞周期は、細胞成長のG1期、DNAを複製するS期、分裂の準備をするG2期、細胞分裂が起こるM期に分けられる。「G1期→S期→G2期→M期」が細胞周期1サイクル分に当たる。DNAの量はDNAの複製が始まるS期で徐々に増加し、G2期とM期では2倍量となる。すなわち、G1期のDNA量を2とすると、G2期およびM期のDNA量は4となる。(図1)

また細胞中のDNAと選択的に結合する蛍光色素で細胞を染色すると、細胞はDNA含量に比例した蛍光を発する。

この蛍光強度をフローサイトメーターで測定することで細胞周期の各期の割合の解析が可能となる。

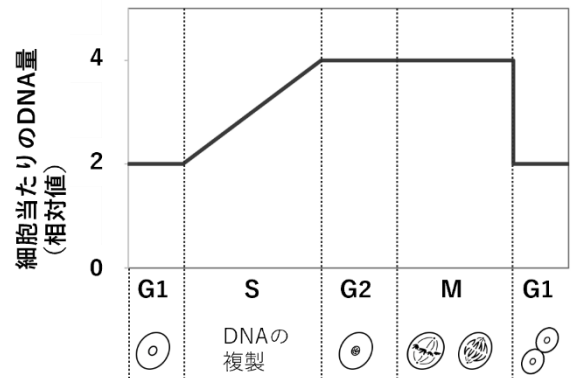


図1. 細胞周期とDNA量の変化 (体細胞分裂)

3. 使用した機器と細胞と試薬

セルソーター SONY MA900

細胞 チャイニーズハムスター卵巣細胞 (AAS)

蛍光色素 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride)

4. 解析ができるようになるまで

4-1 情報収集と実行

サンプル調製法について調査したところ、アルコール等で細胞膜に穴をあける固定法と、浸透圧を利用して細胞膜を破壊する低張処理法があることが判明した。両方法を試した結果、長期保存が可能である固定法を採用することにした。ただ、調査した方法に則り調製・測定を行ったが、洗浄後の細胞収率が悪く解析に必要な量の確保ができなかったり、予想通りのヒストグラムを得られなかったり、うまくいかなかった。

4-2 学内専門家の助言

4-1 の結果をふまえ、学内のフローサイトメーターをよく利用する教員に助言をもらった。ヒストグラムの軸表記、細胞洗浄時の遠心条件、液量について指摘を受けた。指摘事項を改善したところ、洗浄後の細胞収率が上がり、予想通りのヒストグラムも得られるようになった。

4-3 解析の試行錯誤

4-2 の助言によりセルソーターでデータの取得はできるようになり、ほぼ理想的なヒストグラムは得られた。一方で、目的細胞の分取がうまくいかなかった。ヒストグラム中の分裂期に相当するピークを分取したサンプルを顕微鏡で確認したところ、細胞らしきものを見つけることができなかった。数回試行したが細胞が分取できなかったため、今度はセルソーターのメーカーサポートに尋ねた。

4-4 簡易解析法の確立

メーカーサポートに問い合わせた結果、装置の設定が正しくないため、分取する液滴にうまく細胞が乗らないという「乗り遅れ現象」が生じている可能性を指摘された。また、回収チューブについても分取した細胞の付着を防ぐ工夫を施した方がよいという助言を得た。これらをもとに方法を見直し再解析したところ、分裂期ピークを分取したチューブに目的の細胞が存在していることを確認できた。(図 2)

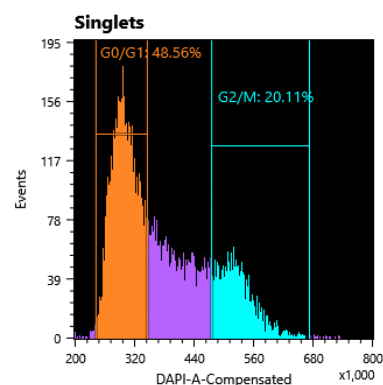


図 2. 細胞周期解析結果

4. 所感および今後について

測定中の画面ではデータの取得もできており一見解析が成功しているかのように見えても、実際に分取した細胞は目的のものではない、という事象も起き得るのだと痛感した。また、「乗り遅れ現象」というセルソーターならではの現象があるということを学習した。

今後は別の細胞や蛍光色素を使用した方法や、抗体を使った解析法についても試みたい。

またセルソーターに限らず、フローサイトメーター全般に精通できるよう研鑽に励もうと思う。

謝辞

解析に当たり助言をいただきました、佐賀大学医学部分子生命科学講座免疫学分野、三宅靖延准教授に感謝申し上げます。

参考

- ・ベックマン・コールター, Application Note 細胞周期解析
https://ls.beckmancoulter.co.jp/files/appli_note/A2_CellCycle.pdf
- ・SONY ライフサイエンス&テクノロジー事業部
<https://www.sony.co.jp/Products/LifeScience>
- ・江島洋介 著, これだけは知っておきたい 図解 細胞周期, オーム社, 2007 年, 212p
- ・戸村道夫 編集, 実験医学別冊 ラボ必携 フローサイトメトリーQ&A
正しいデータを出すための 100 箇条, 羊土社, 2017 年, 312p