

【今更聞けない、、、フローサイトメトリー実験するときに、 どんなコントロールをおけばいいの？】

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、今回は改めて、フローサイトメトリー実験でデータ解析に必要なコントロールについて考えていきたいと思います。

そもそも、フローサイトメトリー(FCM)実験では、他の免疫アッセイに比べ、より多くのコントロールが必要になります。測定により数値化される「蛍光強度」は絶対的な明るさではなく、相対的な指標であるため、特異性の検証やアッセイの一貫性の担保に実験コントロールが必須です。測定機器の設定によっても値は変動するため、それらに対処するためのコントロールも必要になります。

臨床の現場でも一般的に FCM 測定が行われるようになった今、測定値を正しく理解するためにどのようにコントロールが必要なのか、今一度確認しておきましょう。

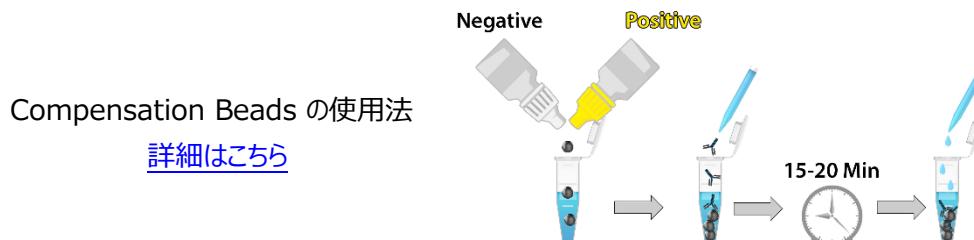
1. コンペナセーションコントロール（単染色コントロール）

フローサイトメトリー実験ではおなじみの、蛍光補正用のコントロールです。多重染色しているサンプルで使用された蛍光色素をそれぞれ一色ずつ使用し、細胞もしくはコンペナセーション用ビーズを染色し作成します。それぞれの蛍光色素がほかのどのフィルターにどれだけ漏れこむかを確認し、補正值を計算します。

(詳細)

第 31 回：[今更聞けない、、、コンペナセーションコントロールを作成するときのルールとは？](#)

第 38 回：[今更聞けない、、、 Compensation Beads を使ったコンペナセーションって正しいの？](#)



2. 未染色コントロール

蛍光標識されていないサンプルのバックグラウンド（自家蛍光など）を確認し、測定機器のボルテージ設定に使用されます。

3. アイソタイプコントロール

抗体のアイソタイプによって、細胞の Fc レセプターへの結合具合は異なります。アイソタイプコントロールは抗体の非特異的結合により、蛍光強度がどのくらい上昇するかを確認するためのコントロールですが、多重染色の場合には、他の蛍光色素からの漏れこみの方が値としては大きくなるため、あまり用いられることが無くなりました。

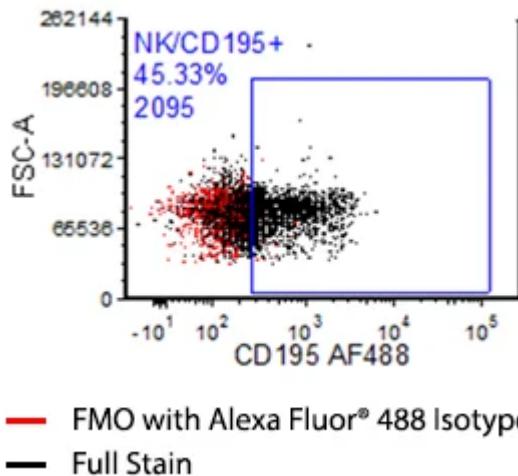
(詳細)

第 13 回：[今更聞けない、、、アイソタイプって何？](#)

4. FMO (Fluorescence Minus One) コントロール

サンプルで測定する予定の蛍光色素から、一つを除くすべての蛍光色素で染色されたコントロールで、ゲート位置を決めるのに使用されます。特に希少細胞集団や発現がわからない抗原を測定する際に必要なコントロールです。

(詳細) [第 11 回：今更聞けない、FMO コントロールってなに？？？](#)



FMO コントロールで位置決めをしたゲート例

抜いた蛍光標識抗体の代わりにアイソタイプコントロールを入れることで、抗体の非特異的な結合分も加味したゲート位置の設置が可能になる。

【参照】 BioLegend > Flow Cytometry Controls >
> Fluorophore/Instrument Controls > Fluorescence Minus One

5. 生物学的コントロール

コントロールと言って、最初に思い浮かべる方も多いかと思いますが、ポジティブコントロールとネガティブコントロールのことです。測定したい抗原が発現、もしくは欠損していることがわかっている細胞のことを指します。ポジティブコントロールとしては、特定の抗原が発現することが知られている細胞株や、発現するよう処理をされた細胞、強制発現するような細胞株などが挙げられます。ネガティブコントロールとしては、発現しないことが確認されている細胞株やノックアウト細胞株などが挙げられます。蛋白質の発現に関しては、抗体のデータシートの記載や以下のサイトがご参照いただけます。

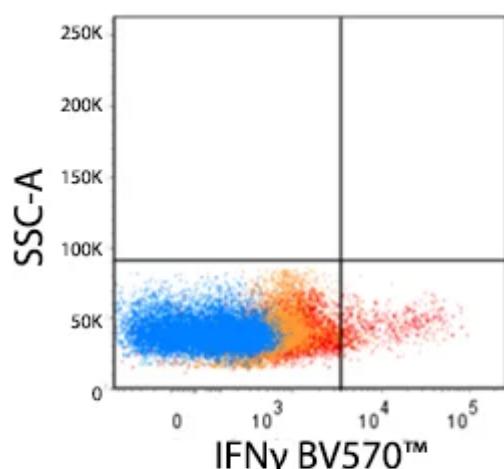
<https://pax-db.org/>

<https://www.proteinatlas.org/>

(詳細)

[第 36 回：今更聞けない、フローサイトメトリー実験における
ネガティブ/ポジティブコントロールの重要性](#)

刺激無しサンプル（Unstimulated）でゲート位置を決めた例



【参照】 BioLegend > Flow Cytometry Controls >
Biological Controls > Stimulations

— FMO for IFNγ BV570™
— Full Stain, Unstimulated
— Full Stain

6. 試薬のコントロール

フローサイトメトリー実験で使用される蛍光標識付きモノクローナル抗体が適切に機能しているかを確認することは非常に重要です。疑わしい時には、同クローニーの非標識抗体存在下で、標識抗体が染色されなくなることを確認する、というコントロール（アイソクローナルコントロール）を置くことで、抗体の特異性を確認することができます。

【参照】 <https://expertcytometry.com/optimizing-flow-cytometry-experiments-part2-how-to-block-samples-sample-blocking/>

7. バイアビリティコントロール（死細胞染色）

死細胞は抗体を非特異的に吸着するため、データ解析時には、死細胞を特定の色素で染色しておき、その色素陽性分画をゲートアウトする必要があります。使われる試薬としては、PI や 7-AAD など固定しないサンプル限定で使用できる色素から、BioLegend 社の Zombie 色素 (<https://www.biologend.com/ja-jp/live-dead>) のように染色後に固定するサンプルでも使用できる色素もあります。

【参照】 第 6 回：今更聞けない、、、Viability Dye(死細胞標識試薬)の重要性

8. 精度管理コントロール

測定機器が安定しているかを確認するためのコントロールです。測定機器によって、精度管理法は異なります。リファレンスコントロールも精度管理コントロールに含まれます。これは、抗体などの試薬や染色時の手技に問題がないことを確認するためのコントロールです。長期間、定期的にモニタリングするような実験系で使用されます。BioLegend 社では、より手軽にリファレンスコントロールを作成できるように、凍結乾燥 PBMC である Veri Cell をご用意しています。

【参照】 BioLegend > Flow Cytometry Controls > Veri-Cells™ Controls

研究者皆様のフローサイトメトリー実験がブレる要因を抽出し、必要なコントロールを選択する際の参考にしていただければ幸いです。

【参照】 Flow Cytometry Controls : <https://www.biologend.com/ja-jp/flow-controls>

連載記事 「今更聞けない、、、」シリーズ 記事まとめページは[こちら](#)