

Lyse/Washを用いた全血の直接蛍光染色

概要

この方法を利用すると特異的膜抗原を持つ細胞を検出することができます。まず、細胞表面抗原に特異的に結合する蛍光標識モノクローナル抗体に全血を加えます。次に、染色されたサンプルをFACS Lysing Solutionで処理し、緩やかな低張条件下で白血球をそのまま保ちながら赤血球を溶血します。つぎにサンプルを洗浄して過剰の抗体とデブリを除きます。最後に、フローサイトメーターで細胞を解析します。

必要な試薬と装置

使用目的と注意に関する製品表示をご参照下さい。

1. EDTA3K バキュティナ採血管 (BDカタログ番号 367660) または同等品
2. FALCON ディスポーザブル12×75mmキャップ付きポリスチレン試験管 (BDカタログ番号 352058) または同等品。
3. チップ付きマイクロピペット (BD電動ピペット、BDカタログ番号 34013290または同等品)
4. ヒト細胞表面抗原に対するBD社製蛍光色素標識モノクローナル抗体 (例えば、サイマルテスト試薬)。詳細は試薬の取扱説明書をご覧ください。
5. Vortexミキサー
6. FACS Lysing Solution (10×) (BDカタログ番号 349202)。希釈と注意事項については、FACS試薬の取扱説明書をご覧ください。
7. 遠心分離装置
8. 洗浄緩衝液：0.1%アジ化ナトリウム入りリン酸緩衝生理食塩水 (PBS⁻) (カルシウム、マグネシウム、およびフェノールレッドを含まない Dulbecco's PBS、pH7.2±0.2)。PBSは使用前に0.2μmフィルターで濾過する。2~8℃で保存する。

警告：アジ化ナトリウムは、万一飲み込んだりしますと有害です。食べ物、飲み物、動物の飼料などの近くに置かないでください。取り扱いには適切な保護衣を着用してください。万一飲み込んだ場合、ただちに医師に連絡をとり、容器やラベルを見せてください。酸に触れますと毒性のガスを発生します。アジ化化合物を廃棄するときは大量の水で洗い流し、鉛または銅製水道管内に貯留しないようにしてください。貯留しますと、爆発の危険があります。

9. 0.1%アジ化ナトリウムを含むPBSで調製した1%パラホルムアルデヒド溶液。遮光ガラス容器に入れ、2~8℃で最長1週間まで保存可能。

警告：ホルムアルデヒドは吸い込んだり、皮膚に触れたり、または万一飲み込んだりしますと危険です。目や皮膚を刺激します。暴露されると癌を引き起こすことがあります。生体に不可逆的な作用を及ぼす可能性もあります。皮膚への接触により過敏症になることがあります。食べ物、飲み物、動物の飼料の近くには置かないでください。取り扱いには適切な保護服と手袋を着用して下さい。万一飲み込んだ場合、ただちに医師に連絡をとり、容器またはラベルを見せて下さい。廃棄に際しては、国、地方などの規則に従い行って下さい。

10. FACSブランドのフローサイトメーター。詳細は装置それぞれのユーザーズガイドをご覧ください。

操作手順

検体採取と調製

血液は無菌的静脈穿刺^{1,2}により滅菌EDTA3K バキュティナ採血管に採取します。最低採血量については、採血管メーカーの説明書に従って下さい。抗凝固処理済み血液は、染色と溶血の準備ができるまで室温（20~25℃）に保存します。染色前の保存条件についてはパッケージ内の取扱説明書をご覧ください。

警告：作業中に接触する全ての生物検体と材料については感染の危険があるものとして取り扱い、国、地方などの規則に従い適切に廃棄する必要があります。**口でのピペット操作は絶対にしないで下さい。**検体が皮膚や粘膜に触れないようにして下さい。

溶血と染色

1. 全血100μLが入った12×75mmのチューブに適切な量の蛍光標識モノクローナル抗体を加えます。
2. 穏やかに攪拌し、暗所、室温（20~25℃）で15~30分間反応させます。
3. 10倍に希釈したFACS Lysing Solution 2mLを加えます。
4. 穏やかに攪拌し、暗所、室温で10分間反応させます。
5. 500xgで5分間遠心分離し、上清を除きます。
6. 洗浄緩衝液を2~3mL加えて、500xgで5分間遠心分離します。
7. 1%パラホルムアルデヒドPBS溶液を0.5mL加えてよく混合します。解析するまで2℃~8℃に保存します。
8. FACSブランドのフローサイトメーターで解析します。使用する前にサンプルをよく混合します。解析前の保存条件については取扱説明書をご覧ください。

推奨事項

1. 抗凝固剤にはEDTAをご使用下さい。BDでは、ヘパリンおよびその他の抗凝固剤を用いての十分な検討をしていないため、これ等に関して提供できる資料はありません。
2. FACS Lysing SolutionはBD社FACSブランドフローサイトメーターでの使用に適するように調製されています。
3. FACS Lysing Solutionは有核赤血球を溶血しないため、有核赤血球を含むサンプルの溶血は不十分になることがあります。また、同様の現象は骨髓線維症、鎌形赤血球貧血、サラセミア、球状赤血球症の様な赤血球の溶血が困難な一部の血液疾患の患者サンプルでも起こることがあります³。
4. 血清免疫グロブリンと反応するモノクローナル抗体を利用するときは、血液サンプルを染色溶血する前に1×PBSか生理食塩水で洗浄すると良いでしょう⁴。
5. 血漿中に放出される細胞表面抗原あるいはレセプター（例えばIL-2レセプター）、または血漿成分により占拠される細胞表面抗原あるいはレセプター（例えば、補体レセプター）に対するモノクローナル抗体は、溶血した全血サンプルの場合、染色性が低下することがあります。

参考文献

1. Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Peripheral Blood Lymphocytes; Tentative Guideline. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1992. NCCLS document H42-T.
2. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture: Approved Standard. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document H3-A3.
3. Landay AL, Muirhead KA. Procedural guidelines for performing immunophenotyping by flow cytometry. Clin Immunol Immunopath. 1989;52:48-60.
4. Nicholson JKA, Rao PE, Calvelli T, et al. Artifactual staining of monoclonal antibodies in two-color combinations is due to an immunoglobulin in the serum and plasma. Cytometry. 1994;18:140146.