

## 塩化アンモニウム溶血剤を用いた直接免疫蛍光染色法

### 概要

塩化アンモニウム溶血剤を用いた全血の直接免疫蛍光染色法を利用すると、特定の膜抗原を持った細胞を検出することができます。まず全血を塩化アンモニウム溶血剤で処理し、赤血球を溶血します。次にサンプルを洗浄し、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を加えます。最後に再び洗浄して過剰の抗体とデブリを除いた後、フローサイトメーターを用いて細胞を解析します。

**留意：**この方法では細胞が凝集する可能性があります。“エスケイプー現象”テクニカルアップデート（後述）をご参照下さい。

### 必要な試薬と装置

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. マイクロピペッター
3. FALCON 15mLコニカルチューブ（BDカタログ番号 352099）または同等品。
4. 塩化アンモニウム溶血剤

**留意：**この液はFACS Lysing Solutionではありません。

10X塩化アンモニウム溶血剤を調製するには、1Lの蒸留水に次のものを溶解して下さい。

NH <sub>4</sub> Cl	89.9g
KHCO <sub>3</sub>	10.0g
EDTA4Na	370.0mg

pHを7.3に調整し、ボトルに入れて2～8℃で保存する。

1X塩化アンモニウム溶血剤を調製するには、10mLの10X塩化アンモニウム溶血剤を90mLの蒸留水に加え、よく混和する。室温（20～25℃）で保存する。1週間以上経ったものは廃棄する。

5. 遠心分離装置
6. Vortexミキサー
7. 洗浄緩衝液：0.1%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水（PBS<sup>-</sup>）（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のPBS、pH7.2±0.2）。使用する前に、PBS<sup>-</sup>を0.2μmフィルターで濾過し、2～8℃に保存して下さい。

**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と手袋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。アジ化合物を廃棄するときに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。

8. 染色緩衝液：0.1%アジ化ナトリウムと2%ウシ胎児血清（FBS）を含むPBS。2～8℃に保存します。

9. 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。
10. ヒト細胞表面抗原に対するBD社製蛍光標識モノクローナル抗体。詳細は試薬の取扱説明書をご覧ください。
11. 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。褐色ガラス容器の中に入れ2~8℃で1週間まで保存できます。

**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。
12. 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<sup>1,2</sup>により無菌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。

## 溶解

1. 室温（20～25℃）保存の1X塩化アンモニウム溶血剤14mLの入った15mLのチューブに血液1mLを加えます。チューブにキャップをし、すぐに転倒混合します。  
この操作にはFACS Lysing Solutionは使用しないで下さい。FACS Lysing Solutionの試薬の使用方法についてはパッケージ内の取扱説明書をご覧ください。
2. 混合液を室温に3～5分放置します。これ以上放置し、反応を長引かせないで下さい。
3. 300xg、5分間、室温で遠心分離します。
4. 上清を取り除きます。
5. 冷やした洗浄緩衝液を5mL加えます。緩やかに混合し、300xgで5分間、2～8℃で遠心分離します。
6. 上清を取り除きます。1mLの染色緩衝液中にペレットを再懸濁します。
7. 生細胞数を調べます。検体には90%以上の生細胞が含まれる様にして下さい。死細胞の細胞質は標識抗体により非特異的に染色されます（特にFITCで顕著）。

## 染色

1. 12×75mmチューブそれぞれに調製した細胞50μLを加えます。白血球数が正常値以上または以下の場合は、量を調整して下さい。全量が100μLを超えない様にして下さい。
2. 適切な量の蛍光標識モノクローナル抗体を加えます。
3. 冷暗所で30分間、反応させます。
4. 洗浄緩衝液を2～3mL加え、穏やかに混合します。
5. 200xg、5分間、遠心分離します。
6. 上清を取り除きます。
7. 1%のパラホルムアルデヒドPBS溶液を0.5mL加え、良く混合します。解析するまで2～8℃で保存します。
8. FACSブランドのフローサイトメーターで解析します。解析前にサンプルを良く混合します。

## 推奨事項

1. 各研究室はそれぞれの研究条件に合わせて正常値を設定して下さい。
  2. 遠心分離のスピードを上げすぎたり、過度に混合しないで下さい。細胞に傷害を与えますと、非特異的染色、細胞凝集や過度のデブリ発生の原因になります。
  3. 推奨される使用抗体の量は、健常人の血液を用いた研究に基づいています。
  4. 顆粒球と反応するモノクローナル抗体（例えばCD11bやCD16）の場合、全ての結合部位を飽和するには抗体量の追加が必要になることがあります。
  5. 有核赤血球を持つ検体では、赤血球の溶血が不完全になることがあります。
- 

## 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.