

単核細胞の直接免疫蛍光染色

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、末梢血単核細胞（PBMC）に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。次に、染色されたサンプルを洗浄して過剰の抗体とデブリを除き、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

1. バキュティナリンパ球分離用採血管（CPT）（BDカタログ番号 362753）またはFicoll-Paque分離液。必要な材料と試薬についてはFicoll-Paqueの取扱説明書をご覧ください。
2. FALCON 15-mLコニカルチューブ（BDカタログ番号 352099）または同等品。
3. 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。
4. オプション：FALCON 96ウェルU底マイクロタイタープレート（BDカタログ番号 353918）または同等品。
5. マイクロピペット
6. 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。
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、またはフェノールレッドを含まないDulbeccoの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. 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℃で保存します。

10. 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。

11. 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}によりヘパリンナトリウムを含むバキュテナ CPT (BD カタログ番号 362753) 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。保存する前に、CPTを遠心分離し、各採血管を穏やかに数回転倒混和し、採血管内の血漿中にPBMCを再懸濁します。CPTは室温(20~25℃)で保存し、採取してから24時間以内に使用します。PBMCはFicoll-Paque密度勾配遠心分離により全血からも分離することができます。

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。

1. 細胞懸濁液を15mLのコニカルチューブに移し、洗浄緩衝液で洗浄します。
2. 細胞を染色緩衝液中に懸濁し、細胞懸濁液の濃度を 2×10^7 細胞/mLに調整します。細胞は90%以上が生細胞である様にして下さい。
3. マイクロタイタープレートの各ウェルまたは12×75mmチューブに細胞懸濁液50 μ L (1×10^6 細胞)を分注します。
4. 適切な量の蛍光標識モノクローナル抗体を加えます。

-
5. マイクロタイタープレート内での染色：細胞と蛍光標識モノクローナル抗体の混合液を氷上で30～45分間反応させます。2～8℃で200x gで3分間遠心分離し、上清を除きます。冷やした洗浄緩衝液100 μLで2回洗浄します。洗浄ごとに、200x gで3分間遠心分離します。上清を除いた後、細胞を200 μLの1%パラホルムアルデヒド溶液に再懸濁し、300 μLの1%パラホルムアルデヒド溶液を含む12×75mmチューブに移します。

チューブ内での染色：混合液を氷上で30～45分間反応させます。2mLの冷やした洗浄緩衝液を加え、300x gで2～8℃で5分間遠心分離します。上清を取り除き、細胞を0.5mLの1%パラホルムアルデヒドPBS溶液に再懸濁し、約 1×10^6 細胞/mLに調整します。

6. 解析するまで2～8℃で保存します。
 7. 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。
-

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.