

活性化リンパ球のフローサイトメトリーによる評価

概要

*In vitro*でのリンパ球活性化は、各種刺激物質（例えば、ポリクローナルマイトジェン、抗体、特異抗原やサイトカインを含む）に対する細胞媒介性反応を評価するための標準的アプローチです。しかし、活性化リンパ球細胞の定量方法の多くは測定に時間がかかり、また特定の刺激に反応する特定リンパ球細胞サブセットに関する情報を得ることはできません。

FastImmuneアッセイシステムは各種マイトジェンまたは抗原で刺激した後に全血中に現れる初期活性化マーカー（CD69）の発現をモニターします。リンパ球の反応は、3カラーlyse/no-washアッセイで刺激物質と反応させ、4時間後にフローサイトメーターで測定します。CD69は全ての活性化リンパ球の細胞表面に発現しているため、誘発刺激に対する個々のサブセットの反応をモニターするためのマーカーになります¹。このアッセイを利用することで、特異的なTリンパ球サブセット、Bリンパ球サブセット、ナチュラルキラー（NK）サブセット（CD56+）の活性化を研究することができます²。

細胞

全血をヘパリンナトリウム入りバキュティナ採血管に採取します。

試薬

T-リンパ球系

1. モノクローナル抗体のマイトジェンペア
・陽性活性化コントロールCD2/CD2R（BDカタログ番号 340366）
2. 免疫蛍光染色用FastImmune試薬カクテル
・ γ_1 FITC/ γ_1 PE/CD3 PerCP（BDカタログ番号 340369）
・CD4 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP（BDカタログ番号 340365）
・CD8 FITC/CD69 PE/CD3 PerCP（BDカタログ番号 340367）
・CD69 PE/CD3 PerCP（BDカタログ番号 340368）

B-リンパ球系

1. γ_1 PE/CD45 PerCPアイソタイプコントロール（BDカタログ番号 340416）*
2. 免疫蛍光染色用FastImmune試薬カクテル
・CD19 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP（BDカタログ番号 340418）

* γ_1 FITC（BDカタログ番号 349041）またはCD19 FITC（BDカタログ番号 340409）と γ_1 PE/CD45 PerCPをご利用下さい。

NK- (CD56+) リンパ球系

1. γ_1 PE/CD45 PerCPアイソタイプコントロール (BDカタログ番号 340416) *
2. 免疫蛍光染色用FastImmune試薬カクテル
・ CD56 FITC/CD69 PE/CD45 PerCP (BDカタログ番号 340417)

留意：FastImmune γ_1 /CD45はFastImmuneシステムの共通試薬で、BおよびNK-リンパ球試薬専用の陰性コントロールになります。この2カラー試薬に適切なFITC標識抗体を加えると、白血球集団の非特異的染色を調べることができます。FastImmune B-リンパ球試薬 (CD19/CD69/CD45、BDカタログ番号 340418) を利用する場合のFITC標識抗体の濃度は0.06 μ g/テストです。FastImmune NK-リンパ球試薬 (CD56/CD69/CD45、BDカタログ番号 340417) を利用する場合のFITC標識抗体の濃度は0.03 μ g/テストです。

上記すべての系に共通する試薬

1. FACS Lysing Solution (10 \times) (BDカタログ番号 349202)。
希釈法や注意事項については、FACS Lysing Solutionの取扱説明書をご覧ください。
2. 推奨するマイトジェン
T-リンパ球系
・ ポークウィードマイトジェン (PWM)
・ フィトヘマグルチニン (PHA)
・ ブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB)
・ カンジダルビカンズ

留意：T-リンパ球システムについてBDではCD2/CD2R (BDカタログ番号 340366) を活性化の陽性コントロールに使用することを推奨します。

B-リンパ球系については、PWMを推奨します。

NK-リンパ球系については、IL-2を推奨します。

3. CaliBRITEビーズ (BDカタログ番号 349502)。使用の詳細についてはCaliBRITEビーズの取扱説明書をご覧ください。

* γ_{2a} FITC (BDカタログ番号 349051) と γ_1 PE/CD45 PerCPをご利用下さい。

装置

1. 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。
2. マイクロピペット
3. 37℃の水槽またはインキュベーター
4. ボルテックスミキサー
5. 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。
6. 装置セットアップ用ソフトウェアFACSCCompとデータ収集・解析用のソフトウェアCellQuest。詳細はソフトウェアのユーザーズガイドをご覧ください。

方法

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。

全血を活性化する場合

1. 染色するサンプル数を決めます。必要量の血液（50 μ L/テストを基本に）を12×75mmチューブ（キャップ付き）に加えます。
留意：チューブ当たりの血液量は200 μ L以上、1mL以下をお勧めします。
2. 選択した刺激物質を加えます。マイトジェンや抗原の力価を調べ、適切な刺激濃度を決めます。T-リンパ球系の場合、陽性活性化コントロールにはCD2/CD2R（BDカタログ番号 340366）を血液1mL当たり20 μ L加えます。活性化しないコントロールも入れます。
3. チューブにキャップをして攪拌します。
4. 37℃で4時間反応させます。

染色

1. 20 μ Lの試薬カクテルを12×75mmチューブに加えます。
留意：BまたはNK-リンパ球系については、 γ_1 PE/CD45 PerCPアイソタイプコントロール（BDカタログ番号 340416）を使用する場合、FITC試薬から選んで加えて下さい。T-リンパ球系については、CD69 PE/CD3 PerCP（BDカタログ番号 340368）を使用する場合、FITC試薬から選んで加えて下さい。
2. 各血液サンプルから50 μ Lを取り、各チューブに加え攪拌します。
3. 暗所、室温（20～25℃）で15～30分間反応させます。
4. 各チューブに450 μ Lの1×FACS Lysing Solutionを加えます。ゆっくりと攪拌し、室温で最低15分間反応させます。

サンプルは、調製後すぐに解析しない場合でも、暗所で2～8℃に置けば24時間まで保存できます。解析前によく混合します。

データの収集と解析

1. CaliBRITEビーズと適切なソフトウェア（FACSCComp、バージョン1.1以降、またはAutoCOMPバージョン3.0.2）を使用して、使用前に光電子増倍管（PMT）の電圧調整と蛍光補正を行い、装置の感度を確認します。FACSCCompではLyse/No Washのアッセイモードを設定し実行します。
留意：FastImmuneアッセイで正確な結果を得るためには、正しいバージョンのFACSCCompまたはAutoCOMPを用いて、装置を正しくセットアップすることが重要です。
2. 調製したサンプルをFACSブランドのフローサイトメーターで解析します。CD3⁺またはCD45⁺リンパ球集団にゲートを設定し、FL3チャンネルで検出される蛍光（T-リンパ球系はCD3 PerCP、BまたはNK-リンパ球系はCD45 PerCP）のデータをCellQuestまたはLYSYS IIソフトウェアで取り込みます。
留意：活性化処理の後では、デブリによりCD3の解像度が妨げられることがあります。正確なCD3⁺イベントを収集するには、ゲートマーカを調節するか、ライブゲートを設定するとよいでしょう。
3. データを2カラードットプロット（FL1対FL2）で表示し、CD69を発現している活性化リンパ球サブセットの割合を測定します。データはCellQuest、LYSYS II、あるいはAttractorsソフトウェアで解析できます。

参考文献

1. Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: A multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today*. 1994;15:479-483.
2. Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry*. 1995;20:127-133.