

活性化リンパ球の細胞内サイトカインの検出

装置

1. 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. 5~7%CO₂の37°Cインキュベーター
3. ボルテックスミキサー
4. 遠心分離装置
5. ピペットマンまたは同等のピペッター
6. FACSブランドのフローサイトメーター

細胞

全血

全血活性化アッセイ用の血液はヘパリンナトリウム・バキュテナチューブ（BDカタログ番号 367673）に採取します。FastImmuneアッセイにはヘパリンリチウム、EDTA、ACD抗凝血剤は適合しません。最善の結果を得るためには、採血後8時間以内にアッセイして下さい。8時間以内にアッセイできない場合には、バキュテナチューブを水平にして室温で保管します。

自己血漿中の末梢血単核球（PBMC）

ヘパリンナトリウムを含むバキュテナ細胞調整チューブ（CPT）（BDカタログ番号 362753）でPBMCを調整します。詳細はバキュテナ CPT製品取扱説明書をご覧ください。チューブを緩やかに転倒混和し、白血球を血漿中に再懸濁し、全血の場合同様に活性化します。保存する前に、CPTを遠心分離してから各チューブをそれぞれ数回緩やかに転倒混和して、血漿中にPBMCを再懸濁します。各CPTを室温にそのまま置いて保存します。採血後24時間以内に解析します。

組織培養液中のPBMC

PBMCはFicoll-Paque密度勾配遠心法でも分離することができます。標準的方法を用いて、加熱し不活化した10%ウシ胎児血清（FBS）を含むRPMI-1640（BioWhittakerカタログ番号 12-167F）で 2×10^6 細胞/mLに細胞を再懸濁して活性化します。

細胞株とT-リンパ球クローン

活性化するために、細胞を細胞増殖に用いる新鮮な培養液に 2×10^6 細胞/mLになるように再懸濁します。

留意：熱でFBSを不活性化しますと、補体が変性します。

凍結活性化全血とPBMC

1×FACS Lysing Solutionを用いて、活性化した全血またはPBMCを溶血し固定します。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄し、1%ウシ血清アルブミン（BSA）と10%DMSOを含むPBS中に-70℃で凍結します。融解後、細胞を染色チューブに分注します。2~3mLの洗浄緩衝液を加えて細胞を洗い、5分間500×gで遠心分離します。その後、FACS Permeabilizing Solutionで透過処理し染色します。

試薬

以下の操作と試薬はBDの研究所で使用し、良好な結果が得られたものです。

活性化に使用する試薬（BDより供給されるものではありません）

1. Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)(Sigmaカタログ番号 P-8139)
 - a. DMSOで0.1mg/mLに調製します。
 - b. 少量に分けて（例えば20μL）-20℃で保管します。融解後は再凍結しないで下さい。
 - c. 滅菌したPBSで融解したPMAを1:100に希釈し、各実験に使用します。
 - d. 細胞懸濁液中のPMAの最終濃度が25ng/mLになるようにPMAを使用します。
2. Ionomycin (Sigmaカタログ番号 I-0634)
 - a. エタノールで0.5mg/mLに調製します。
 - b. -20℃で保管します。
 - c. 滅菌したPBS（アジ化ナトリウムを含まない）で1:10に希釈し、各実験に使用します。
 - d. 細胞懸濁液中のIonomycinの最終濃度が1μg/mLになるようにIonomycinを使用します。
3. Staphylococcal enterotoxin B (SEB) (Sigmaカタログ番号 S-4881)
 - a. 滅菌PBS（アジ化ナトリウムを含まない）で0.5mg/mLに調製します。
 - b. 4℃に保管します。
 - c. 細胞懸濁液中のSEBの最終濃度が10μg/mLになるようにSEBを使用します。
4. Brefeldin A (BFA) (Sigmaカタログ番号 B-7651)
 - a. DMSOで5mg/mLに調製します。
 - b. 少量に分けて（例えば20μL）-20℃で保管します。融解後は再凍結しないこと。
 - c. 滅菌したPBS（アジ化ナトリウムを含まない）で1:10に希釈し、各実験に使用します。
 - d. 細胞懸濁液中のBFAの濃度が10μg/mLになるように、活性化後半の少なくとも4~5時間反応させます。

留意：BFAによるインキュベーションが長すぎると、細胞の生存率を低下させます。
5. RPMI-1640 (BioWhittakerカタログ番号 12-167F) または同等品
6. アジ化ナトリウムを含まないPBS、滅菌濾過
7. DMSO (Sigmaカタログ番号 D-8779)
8. エタノール
9. 洗浄緩衝液、0.5%BSAと0.1%NaN₃を含むPBS。4℃保存。
10. 1%パラホルムアルデヒドPBS溶液。4℃保存。

免疫フェノタイピング用の試薬 (BD試薬)

1. 表面抗原染色用モノクローナル抗体
2. FACS Lysing Solution
FACS Lysing Solutionは10倍濃縮液として提供されます。使用前に脱イオン水で希釈して下さい。操作については製品取扱説明書をご覧ください。
PBSまたは他の緩衝液では希釈しないで下さい。
3. FACS Permeabilizing Solution
FACS Permeabilizing Solutionは10倍濃縮液として供給されます。使用前に脱イオン水で10倍に希釈して下さい。操作については製品取扱説明書をご覧ください。
PBSまたは他の緩衝液では希釈しないで下さい。
4. 細胞内染色用BD社製標識モノクローナル抗体

活性化

活性化を細胞内の蛋白輸送を阻害するBFA存在下で行うことにより^{1,2,3}、活性化の際に生じる抗原やサイトカインを細胞内部に留めます。刺激を加えていないコントロールのサンプルにもBFAを使用します。(本操作のアッセイコントロールのセクションをご覧ください。) 活性化の作業は全て12×75mmのキャップ付きポリスチレン試験管 (BDカタログ番号 352058) の中で行います。記載されている試薬濃度は、上記のように調製した試薬の活性化混合液中の最終濃度です。

1. PMA+Ionomycin (PMA+I)
 - a. 全血または血漿中のPBMCを、血清を含まないRPMI-1640で1:1に希釈します (この希釈操作はPMA+I による活性化についてのみ必要です。すでに培養液で 2×10^6 細胞/mLに懸濁されている細胞については、RPMIでさらに希釈する必要はありません)。
 - b. 10 μ g/mLのBFA(上記のように調製したBFAを血液1mL当たり20 μ L)存在下に25ng/mLのPMA (上記のように調製したPMAを血液1mL当たり25 μ L) と1 μ g/mLのIonomycin (上記のように調製したIonomycinを血液1mL当たり20 μ L) で活性化します。
 - c. 37 $^{\circ}$ C、5~7%CO₂環境下で、緩くキャップをしCO₂を含む空気が入る様にしたチューブで4時間反応させます (pHを適切に保つためにはCO₂インキュベーターの使用が好ましいが、チューブのキャップをかたく締めれば、水槽内でも可能です)。
2. SEB
 - a. 未希釈血液を10 μ g/mLのBFA存在下で、10 μ g/mLのSEBにより活性化します。
 - b. 4~6時間、37 $^{\circ}$ Cで反応させます。
3. CD2/CD2R (BDカタログ番号 340366)
 - a. BFA存在下で血液1mL当たり20 μ LのCD2/CD2Rにより未希釈血液を活性化します。
 - b. 4~6時間、37 $^{\circ}$ Cで活性化させます。

4. CD3

- a. 未希釈の血液をBFA存在下でCD3⁴により活性化します。
- b. 4~6時間、37℃で反応させます。CD3抗原はCD3の交叉結合により変化するため、FL3で蛍光信号を検出するにはCD5PerCP（BDカスタム標識）またはCD45PerCP（BDカタログ番号 347464）をお勧めします。

留意：アジ化ナトリウム濃度の低い高濃度CD3はBDのカスタム製品として入手いただけます。

5. CD28

- 1~10 μg/mLのCD28（BDカタログ番号 348040）を使用しますと、SEB、CD3やCD2/CD2Rを含む各種刺激剤による活性化を強化できます。

アッセイコントロール

未刺激コントロール

未刺激コントロールを利用して *in vivo* 活性化による残存サイトカイン合成レベルを調べます。サンプル測定には、すべてこのコントロールを使用します。名前から判るように、未刺激コントロールは、活性化のステップで刺激物質を加えず10 μg/mLのBFAを血液に加えて調製します。

アイソタイプコントロール

サンプルの濃度と一致させた蛍光標識アイソタイプコントロール抗体は、マウスモノクローナル抗体のクラスによる細胞への非特異的結合を検出します。FastImmuneサイトカインシステムでは、細胞内サイトカイン検出システム専用に調整した標準抗KLHアイソタイプコントロールを使用しています。

活性化コントロール

活性化コントロールは、細胞表面のCD69発現の有無により、活性化が行われたか否かを確認します。期待されるレベルのCD69発現がみられない場合、活性化ステップに問題があることとなります。具体的には、活性化ステップに使用した試薬のどれかが細胞を活性化するだけの力価を有しないか、有効期限を過ぎている、調製が不適切、または溶媒が汚染されている可能性があります。新たに刺激物質を調製してやり直して下さい。

1. BFAを添加していない、血液の一部をPMA+ Iで活性化します（前記に従う）。
留意：BFAの様な抗分泌剤はCD69の表面への発現を阻害するので、CD69を発現させるにはBFAを加えずに活性化します。

2. CD69 PE/CD3 PerCP (BDカタログ番号 340368) だけで細胞表面を染色します。透過処理や細胞内染色は行いません。
3. FL2およびFL3で蛍光を検出し、CD3ゲートイベント内のCD69染色を調べます。CD69の表面染色は陽性が90%以上でなければなりません (図1)

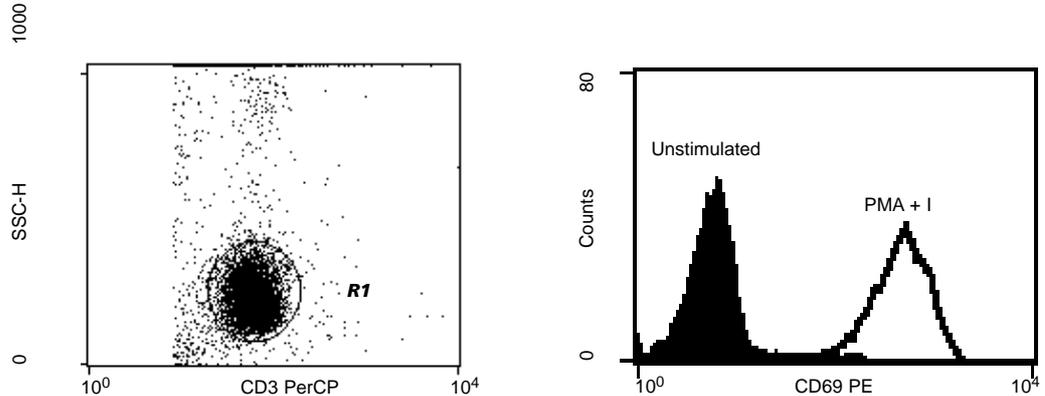


図1 活性化コントロール

細胞内染色コントロール

細胞内染色コントロールでは、活性化が行われたか否かと同時にCD69の細胞内染色を調べることにより、透過処理と細胞内染色が適切に行われているか否かを確認します。活性化コントロールでは90%以上が陽性であるのに対し、細胞内染色でCD69レベルがこれに相当するだけ検出できない場合、アッセイの透過処理または細胞内染色段階に問題があります。手順通り正確に作業したか確認し、再度行って下さい。

1. 血液の一部をBFA存在下でPMAとIonomycinで活性化します。
2. 表面染色段階を省きます。CD69 PE/CD3 PerCP (BDカタログ番号 340368) だけで細胞内染色を行います。
3. 結果の評価は、FL3で蛍光を検出し、CD3ゲートイベントのCD69染色を調べます。CD69の細胞内染色は陽性が90%以上でなければなりません (図2)。

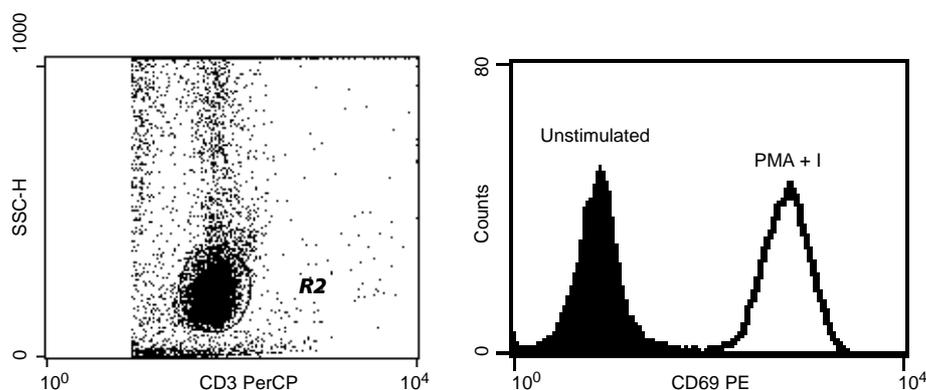


図2 細胞内染色コントロール

細胞表面染色

1. 各BD表面抗原染色試薬を20 μ Lずつ12 \times 75mmチューブに加えます。
2. 希釈されたPMA+I 活性化血液100 μ Lまたは未希釈の全血50 μ L（他の活性化物質により活性化されたもの）を、表面抗原染色試薬に加えます。（全血または血漿中のPBMCのRPMI希釈は、PMA+ I 活性化の時だけ必要です。細胞が培養液で既に2 \times 10⁶に懸濁されている場合には、RPMI による希釈は必要ありません。）
3. よく混和し、室温、暗所で15分間反応させます。

透過処理と細胞内染色

1. パッケージ内の取扱説明書に従い調製した1 \times FACS Lysing Solutionを2mL加えます。室温で10分間反応させます。PBMCまたは培養細胞を染色する場合でも、FACS Lysing Solutionを加えて、表面エピトープを固定し透過性を高めます。
留意：PMAで活性化した全血は、完全に溶血しないことがあります。
2. 500 \times g、5分間遠心分離し、上清を除きます。沈殿が舞い上がらないようにして下さい。取扱説明書に従い調製した1 \times FACS Permeabilizing Solutionを500 μ L加え、良く混和します。室温・暗所で10分間反応させます。
3. 洗浄緩衝液を2 \sim 3mL加え、500 \times g、5分間、遠心分離します。上清を取り除きます。
4. 蛍光標識抗サイトカインモノクローナル抗体を加えます。良く混和し、室温・暗所で30分間、反応させます。
5. 2 \sim 3mLの洗浄緩衝液を加えて、500 \times g、5分間、遠心分離します。上清を取り除いてから、500 μ Lの1%パラホルムアルデヒドPBS溶液を加えます。
留意：サンプルは解析まで、冷暗所で24時間までは保存できます。

解析

1. FACSブランドのフローサイトメーターで解析します。
2. CaliBRITEビーズと適切なソフトウェア（バージョン1.1以降のFACSComp、またはバージョン3.0.2のAutoCOMP）を用いて、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。FACSComp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FACSCompまたはAutoCOMPを用いて、正しく装置をセットアップすることが重要です。ご使用のFACSCompまたはAutoCOMPのバージョンが古い場合には、日本BDにご連絡下さい。
3. 蛍光または前方散乱光（FSC）を検出し、CellQuestまたはLYSYS IIソフトウェアでデータを取り込みます。
4. FL3陽性細胞にゲートを設定します。データを2カラードットプロットで表示し、サイトカインの発現を調べます。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。PMAで活性化すると、血小板はFL3陽性ゲートに入ります。この場合、FSC/SSCにゲートを設定します。CD4を検出して解析を行う場合、ゲートをFSC/SSCに設定して単球を除きます。

特異反応の計算

刺激物質に対する細胞の特異的反応は、抗サイトカイン抗体染色サンプルの陽性イベントの%からアイソタイプコントロールサンプルの陽性イベントの%を引いて求めます。次に、刺激したサンプルのアイソタイプ補正したイベントの%から、刺激をしていないサンプルのアイソタイプ補正したイベントの%を引きます。これを式で示すと、次のようになります。

$$\text{式：} (AS - AIC) - (US - UIC)$$

式中の

AS = 活性化サンプル

AIC = 活性化アイソタイプコントロール

US = 未刺激サンプル

UIC = 未刺激アイソタイプコントロール

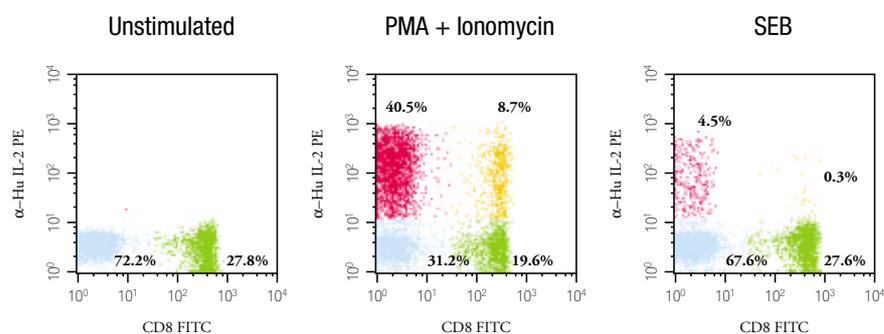


図3 CD8⁺T細胞の機能サブセット

FastImmuneサイトカインシステムを使用しますと、機能的に異なるCD8⁺T細胞のサブセットを解析できます。図3の2カラードットプロットでは、PMAとIonomycinによるごく一般的な活性化の結果と、スーパー抗原であるStaphylococcal enterotoxin B (SEB)によるより特異的な活性化の結果の比較を示しています。PMA+Iによる活性化は、CD8⁺とCD8⁻（即ちCD4⁺）細胞にIL-2の発現を促します。これに対し、SEBによる活性化では、IL-2を発現する細胞数は少なく、CD8⁻細胞で発現が多く見られます。バルクアッセイでは、この様にサブセットに特異的な結果を観察することはできません。

参考文献

1. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood*. 1995;86:1408-1419.
2. Openshaw P, Murphy EE, Hosken NA, et al. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J Exp Med*. 1995;182:1357-1367.
3. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-g and interleukin-4 in response to TH1- and TH2-stimulating pathogens by g/d T cells in vivo. *Nature*. 1995;373:255-257.
4. Cherwinski HM, Semenuk GT, Ransom JT. Stimulation of a T helper cell class 2 clone with immobilized anti-T cell receptor antibody activates a Ca²⁺ and protein kinase C-independent lethal signal pathway. *J Immunol*. 1992;148:2996-3003.