

活性化単球の細胞内サイトカインの検出

材料

細胞

全血細胞または末梢血単核細胞（PBMC）。全血活性化アッセイ用に、血液をヘパリンナトリウム入りバキュテナチューブに採取します。FastImmuneアッセイでは、ヘパリンリチウム、EDTA、ACD抗凝血剤は使用できません。

試薬

1. Brefeldin A (BFA、Sigmaカタログ番号 B7651) または同等品。DMSOを用いて5mg/mLに調製します。小分けして-20°Cで保存します。
2. リポポリサッカライド (LPS、Sigmaカタログ番号 L2654)。DMSO（またはPBS）を用いて0.5mg/mLに調製します。小分けして-20°Cで保存します。
3. リンパ球と単球フェノタイピング用BD蛍光標識モノクローナル抗体。単球の同定にはCD33またはCD14が利用できます。
留意：CD14はLPSレセプターであり、ドナーからの血液の中にはLPS治療によりダウンレギュレーションを受けるものがあります。
4. FACS Lysing Solution (10X)、脱イオン水で10倍に希釈します。詳細はパッケージ内の取り扱い説明書をご参照下さい。
5. FACS Permeabilizing Solution (10X)、脱イオン水で10倍に希釈します。詳細は取り扱い説明書をご参照下さい。
6. 洗浄緩衝液：0.5%ウシ血清アルブミン (BSA) と0.1%NaN₃を含むPBS。
7. FastImmune抗サイトカインモノクローナル抗体とコントロールモノクローナル抗体
8. 1%パラホルムアルデヒドPBS溶液

装置

1. ディスポーザブル12×75mmキャップ付きFALCONポリプロピレン試験管 (BDカタログ番号 352063) または同等品。
2. ディスポーザブル12×75mmキャップ付きFALCONポリスチレン試験管 (BDカタログ番号 352058) または同等品。
3. 5~7%CO₂の37°C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
6. 遠心分離装置
7. マイクロピペット

方法

活性化

活性化は細胞内の蛋白輸送を阻害するBFA存在下で行うため、活性化の際に生じた抗原やサイトカインは細胞内部に留まります。刺激を加えていないコントロールのサンプルにもBFAを加えます。

1. 2本の12×75mmのポリプロピレンチューブ*（キャップ付き）それぞれに未刺激と活性化の表示をします。
2. 未刺激のチューブに10 μ gのBFAを加えます。
3. 活性化のチューブに10 μ gのBFAと1 μ gのLPSを加えます。
4. 全血1mL（ヘパリンナトリウム入り）、または自己血漿中のPBMC1mL（ヘパリンナトリウムを含むBDバキュテイナ細胞調製用チューブ（CPT）[BDカタログ番号 362753] で調製します）、またはPBMCを含む組織培養液1mL（2×10⁶）を各チューブに加えます。
留意：この操作により、50 μ L/テストの場合、20サンプルを染色するのに十分な細胞が調製されます。
5. チューブに緩めにキャップをして、攪拌します。
6. 37℃、5～7%のCO₂環境で4時間培養します。

*長期間のインキュベーション中に単球が管壁につまりやすいためポリプロピレンチューブをご使用下さい。

染色

1. 12×75mmのポリスチレンチューブにラベルを貼ります。
2. ラベルの表記に合わせて、表面抗原特異的蛍光標識モノクローナル抗体を加えます。
3. チューブに活性化した血液50 μ L、または未刺激の血液50 μ Lを加えます。良く攪拌して、15～30分間、室温、暗所で反応させます。
4. 1×FACS Lysing Solution 2mLを加えて赤血球を溶血します（同時に白血球は固定されます）。緩やかに攪拌し、室温・暗所で10分間反応させます。
5. 500xgで5分間遠心分離します。沈殿物を乱さないように上清を取り除きます。
留意：この時点で、サンプルは1%BSAと10%DMSO入りPBS中で凍結保存できます。
6. 1×FACS Permeabilizing Solution 500 μ Lを加えます。よく混合して沈殿を再懸濁します。室温・暗所で10分間反応させます。
7. 2～4mLの洗浄緩衝液を加えます。500xgで5分間、遠心分離します。沈殿物を乱さない様に上清を取り除きます。
8. 細胞内抗原特異的蛍光標識モノクローナル抗体を加えます。よく混合し、室温・暗所で30分間反応させます。
9. ステップ7を繰り返します。
10. 細胞を1%パラホルムアルデヒドPBS溶液500 μ Lに再懸濁します。
11. FACSブランドのフローサイトメーターで解析します。サンプルは解析するまで、冷暗所で24時間まで保存できます。

データの収集と解析

1. CaliBRITEビーズと適切なソフトウェア (Lyse/No Washではバージョン1.1以降のFACSCComp、またはAutoCOMPバージョン3.0.2) を用いて、使用前に光電子増倍管 (PMT)の電圧設定と蛍光補正を行い、装置の感度を確認します。
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、正しく装置をセットアップすることが重要です。古いバージョンをお持ちの方は日本BDにご連絡下さい。
2. 調整したサンプルをFACSブランドのフローサイトメーターで解析します。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。SSC単球マーカードットプロットのCD14⁺またはCD33⁺単球にゲートを設定して、最低1,000個の単球のデータをすべて取り込みます。
3. 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測定します。データはCellQuest、LYSYS II、PAINT-A-GATE^{PRO}、あるいはAttractorsソフトウェアで解析できます。

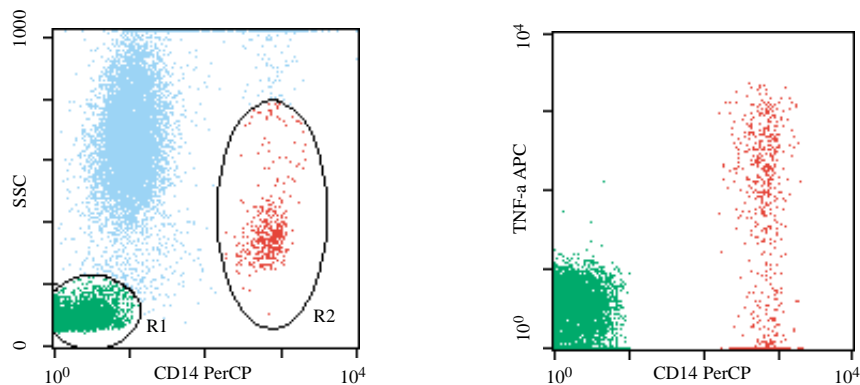


図1 全血のLPS刺激

LPSは単球に特異的な刺激物質です。図1は、LPSで4時間刺激した全血をCD14⁻リンパ球 (R1) とCD14⁺単球 (R2) にゲート設定したものです。単球だけが活性化され、サイトカインTNF- α を産生しています。