

活性化リンパ球における細胞内サイトカインの検出

概要

サイトカインは、リンパ球の免疫応答などの免疫機能制御に重要な役割を有する可溶性タンパクで^{1, 2}、主に種々の細胞の増殖、分化をはじめ広範囲な細胞機能を調節し、正常状態および病的状態における免疫応答を介在している。

サイトカインは、エフェクターであり、かつ活性を制御するユニークなタンパク分子であり、実際最近の研究では多機能性を有し、多種類の細胞サブセットより産生されることが示されている^{3, 4}。












以前より、クローン化した細胞ポピュレーションの機能をもとに、T細胞機能とサイトカイン産生との関連について研究が試みられてきた⁵。T細胞クローンを用いた、サイトカイン産生パターンの違いによる分類(例えば、T_H1 (IL-2、IFN- γ)とT_H2 (IL-4、IL-5、IL10)等)では、T細胞クローンの機能について反映しているものの、実際の生体内におけるT細胞の動態については分からないことが多く、解釈が難しい⁶。






最近、Jungら⁷およびPickerら⁸は、細胞内におけるゴルジ体からのタンパク輸送をブロックし、産生されたサイトカインを細胞内に蓄積させる薬剤(monensin; モネンシンまたはBrefeldin A; ブレフェルテインA)を反応させた後、フローサイトメトリーで細胞内サイトカインを検出する方法を取り入れている。この方法の特徴は、細胞レベルで数種のサイトカインを同時に検出し、細胞サブセット別に細胞内サイトカインを検出できるところにあり、特定の刺激に対する細胞サブセットごとのサイトカイン応答能の研究等に有効である。


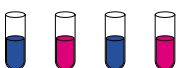


細胞レベルによるこの方法の一つのアプローチとして、マウスおよびヒトリンパ球系において異なるサイトカインを産生するType 1、Type 2の相補的な細胞の測定が挙げられる⁸⁻¹⁰。またこれらの研究より、刺激され活性化された細胞にはサイトカインが産生されるが、休止状態の健常人リンパ球 (T、B、NK)には通常、産生されていないことが判明している。

このアプリケーションノートに記載されているフローサイトメーターによる細胞内のアッセイ方法は、BD FastImmune™ サイトカインシステムによるものである。抗サイトカイン抗体と細胞表面抗原に対する抗体とのコンビネーションにより、特定の細胞タイプにおけるサイトカインの産生状態が把握できる⁸。

このアッセイ方法の特長としては、BD独自の技術と抗体の選択方法によって、休止状態あるいはサイトカインを産生しない細胞において最小限度の蛍光バックグラウンドとなることが確認されていることである。またBDの抗サイトカインモノクローナル抗体は、固定された産生初期の細胞内サイトカインのエピトープへの結合親和性が高いので、標識抗体の抗体濃度が低く抑えられている。

検体の調製			
全血  ヘパリンNa入り採血管で採血する。	自己血漿中の末梢単核細胞  ヘパリンNa入り採血管(BD Vacutainer™ Cell Preparation Tube)で採血する。  遠心する。  血漿中に白血球を再浮遊させる。	末梢血単核細胞浮遊液  採血する。  Ficoll-Paque上に血液を重層する。  遠心後、洗浄する。  白血球層を採取し、メディウム中に浮遊させる。	セルラインおよびT細胞クローン  培養した細胞を採取する。  遠心する。  2 × 10 ⁶ /mLの濃度でメディウム中に再浮遊させる。

活性化			
活性化  活性化させる検体を調製する + 刺激 + BFA	コントロール(刺激なし)  刺激を与えない検体を調製する 刺激なし +BFA		
細胞表面染色(オプション)			
染色  1. 染色用試験管に検体を分注する 2. 標識抗体20 μLを添加 3. よく混和する 4. 15分間インキュベートする†	アイソタイプコントロール  1. コントロール試験管に検体を分注する 2. 標識抗体20 μLを添加 3. よく混和する 4. 15分間インキュベートする†	染色  1. 染色用試験管に検体を分注する 2. 標識抗体20 μLを添加 3. よく混和する 4. 15分間インキュベートする†	アイソタイプコントロール  1. コントロール試験管に検体を分注する 2. 標識抗体20 μLを添加 3. よく混和する 4. 15分間インキュベートする†

溶血	
	1. 1 × BD FACS Lysing Solution 2 mLを加える 2. 10分間インキュベートする†
細胞膜透過(Permeabilize)	
	1. 500 × gで5分間遠心する 2. 上清を除去する 3. BD FACS Permeabilizing Solution 2 500 μLを加える 4. よく混和する 5. 10分間インキュベートする† 6. 2-3 mLの洗浄用緩衝液を加える 7. 遠心操作を繰り返す 8. 上清を除去する
細胞内染色	
	1. 蛍光標識抗サイトカインモノクローナル抗体を加える 2. よく混和する 3. 30分間インキュベートする† 4. 2-3 mLの洗浄用緩衝液を加える 5. 500 × gで5分間遠心する 6. 上清を除去する 7. 1% PFA 500 μLを加え、細胞を固定する
解析	
	3カラーLNWの操作手順に従ってセットアップする 蛍光染色ゲートまたは散乱光ゲート内に ~ 10,000 イベントを採取する 2カラープロットを表示し、サイトカインの発現を解析する

† 暗所で室温にて静置。
 †† BD Vacutainer™ Cell Preparation Tube(BD カタログ番号: 362753)

図1 BD FastImmune 細胞内サイトカインアッセイ フローチャート

方法

このアプリケーションノートは、考えられるトラブルを最小限におさえながら広範囲なアプリケーションに対応できる内容になっている。図1にこのアプリケーションのアウトラインを示した。

簡単に迅速な免疫機能測定ではあるが、免疫機能測定として活性化のステップや、活性化試薬の調製、保管方法、使用方法等についても十分な注意が必須となる。従ってこのアプリケーションノートには実際にBD Biosciencesの研究者の経験に基づき、活性化ステップについても推奨する方法をガイドラインとして含めた内容になっている。

信頼性のある測定結果を得る為に、活性化が成功したかどうか重要となる。そのために本来の活性化プロセスへ干渉することのない状態で、活性化させる細胞を採取し調製することも重要となる。

例えば、カルシウム依存性の活性化反応を制限しないよう、ACDやEDTAのようなカルシウムキレート抗凝固剤の使用は避けなければならない。また一方、細胞を活性化させるリポ多糖体(LPS)は生物学的試薬に混入している場合があり、紛らわしい結果の原因ともなりうるため注意を要する。

方法を変更したり、異常検体を測定する場合は、必ずその前に正常血液検体でこの方法に従った方法で試験してから行なうことを推奨する。

もし、実施にあたり、期待していた結果が得られなかったり問題が発生した場合は、後述の問題解決のセクションを参照のこと。

器材

1. ファルコン 5 mL ラウンド チューブ(外径12×75 mm)ポリスチレン ツーポジション キャップ付き(BD カタログ番号: 352058)
2. 37°C、7% CO₂ インキュベーター
3. Vortex ミキサー
4. 遠心器
5. ピペット
6. BD FACSTM CaliburまたはBD FACScan等のフローサイトメーター

細胞

全血

全血による活性化測定用の血液は、ヘパリンNa入りの採血管(BD Vacutainer™ カタログ番号: 367673)で採取したものを使用する。ヘパリンリチウム、EDTAおよびACDの抗凝固剤は使用しないこと。

最良の結果を得るためには、採血後8時間以内に測定すること。8時間以上経過すると活性化機能が少し低下し、通常サイトカイン陽性細胞率は約5%が減少する。8時間以内に使用できない場合は、室温で採血管のまま水平にした状態で保管する。

末梢血単核細胞(PBMCs) 組織培養用メディアウム浮遊液

PBMCsはFicoll-Hypaque比重遠心法によって、分離し採取することができる。標準的な方法を使用し、活性化のためにPBMC 2×10⁶/mLの濃度で10%熱処理不活化仔牛血清(FBS)入りのRPMI-1640にサスペンションさせる。

細胞株(Cell lines) およびT細胞クローン

細胞株の活性化には、典型的な細胞培養方法と同じように、細胞を2×10⁶ cells/mL濃度になるよう新鮮な培養液に再浮遊させる。

注意: 仔牛血清は熱により不活化処理し、補体を変性させたものを使用する。

凍結細胞(全血およびPBMCsより調製)

1倍濃度BD FACS Lysing Solutionにより溶血および固定した活性化全血あるいはPBMCs; PBSで洗浄し1%仔牛血清アルブミン(BSA)、10%DMSO入PBSに浮遊し-70°Cで凍結する。融解後、染色用試験管に分注する。洗浄用緩衝液2~3 mLを加え、500×gで5分間遠心し洗浄した後BD FACS Permeabilizing Solution 2で細胞膜を浸透化させ、細胞内抗原のみを染色する。

試薬の選択、調製および保存

下記の試薬調製法および試薬は、BDの研究室で実際に使用したものである。

活性化に使用する試薬(BDでは取扱いのない試薬)

1. Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA): (Sigmaカタログ番号: P-8139)
 - a. 0.1 mg/mL濃度になるよう、DMSOで溶解する。
 - b. 小分け(20 μ Lなど)にし、-20°Cで保存する。融解後の再凍結は不可。
 - c. 無菌処理したPBS(アジ化ナトリウムを含まない)で100倍に希釈する。
 - d. 最終濃度が10 ng/mLになるよう使用する。(この試薬の詳細な使用方法については、活性化のセクションを参照)
2. Ionomycin: (Sigmaカタログ番号: I-0634)
 - a. 0.5 mg/mL濃度になるよう、EtOHで溶解する。
 - b. -20°Cで保存する。
 - c. 無菌処理したPBS(アジ化ナトリウムを含まない)で10倍に希釈する。
 - d. 最終濃度が1 μ g/mLになるようIonomycinを使用する。
3. Staphylococcal enterotoxin B (SEB): (Sigmaカタログ番号: S-4881)
 - a. 0.5 mg/mL濃度になるように、無菌処理したPBS(アジ化ナトリウムを含まない)に溶解する。
 - b. 4°Cで保存する。
 - c. 最終濃度が1 μ g/mLになるようSEBを使用する。(この試薬の詳細な使用方法については、活性化のセクションを参照)
4. Brefeldin-A (BFA): (Sigmaカタログ番号B-7651)
 - a. 5 mg/mL濃度になるよう、DMSOで溶解する。
 - b. 小分け(20 μ Lなど)にし、-20°Cで保存する。融解後、再凍結は不可。
 - c. 無菌処理したPBS(アジ化ナトリウムを含まない)で10倍に希釈する。
 - d. 細胞浮遊液1 mLあたり10 μ gのBFAが、4~5時間の活性化反応に有効。

注意: BFA加の状態ではインキュベーションが長引くと、細胞の生存率低下の原因となる。

(この試薬の詳細な使用方法については、後の活性化のセクション6頁を参照)

5. L-グルタミンを含まないRPMI-1640: (BioWhittaker カタログ番号: 12-167F)
6. アジ化ナトリウムを含まないPBS-無菌フィルターを通したもの
7. DMSO-(Sigma カタログ番号: D-8779)
8. EtOH-特級エタノール(Gold Shield Ethyl Alcohol, 200 proof)
9. 洗浄用緩衝液-0.5% BSAおよび0.1% NaN_3 を含むPBS 4°Cで保存
10. 1% パラホルムアルデヒド(PFA)PBS溶液 4°Cで保存

イムノフェノタイプ染色用試薬(BD試薬)

11. 細胞表面抗原染色のための蛍光標識モノクローナル抗体

目的とする特定の細胞群に発現されているマーカーに対する抗体を選択、染色することにより特定の細胞群のみを捉え、その細胞内サイトカインを測定することができる。

例えば、蛍光染色陽性細胞群をゲーティングすることにより、CD45 PerCP (BD カタログ番号: 347464)であれば全リンパ球を、CD3 PerCP (BD カタログ番号: 347344)であればCD3陽性T細胞群を選択できる。同様にCD4 PerCP (BD カタログ番号: 347324)やCD8 PerCP (BD カタログ番号: 347314)は特定のT細胞サブセットへのゲートとして有効となる。CD19 PerCP (BD カタログ番号: 347544)あるいはCD20 PerCP (BD カタログ番号: 347674)はB細胞へのゲートに、その他にもNK細胞を選択するマーカーとしてCD56、単球を選択するマーカーとしてCD14等が有効となる。
12. BD FACS Lysing Solution

BD FACS Lysing Solution (BD カタログ番号: 349202)は、PBMCs、培養細胞および全血検体によるサンプル調製に必要な試薬である。このアッセイ法において次の3つの使用目的がある。
 - a. 全血をサンプルとする場合の赤血球の溶血
 - b. 細胞外エヒトープの固定
 - c. パーミアピライジング(細胞膜透過)の補助的作用
BD FACS Lysing Solutionは、10倍濃度液であるので、使用時に脱イオン水による希釈が必要である。希釈にPBSやその他の緩衝液を使用しないこと。

13. BD FACS Permeabilizing Solution 2

BD FACS Permeabilizing Solution 2 (BD カタログ番号: 347692)は安定した感度でかつ、バックグラウンド染色を低く抑えられる測定を実現させるためにBDが開発した試薬である。この試薬の特長としては、広範囲な細胞内染色方法で使用されているサポニンをベースとした細胞膜透過試薬における限界が改良されているところにある。サポニンは植物から合成されたものであり、成分が均一でないことが細胞内免疫染色におけるバラツキの主たる原因となっている。またBD FACS Permeabilizing Solution 2による方法では、他法で細胞膜透過の増加に推奨されている一昼夜にわたる細胞凍結の必要がない。

BD FACS Permeabilizing Solution 2は、10倍濃度液であるので、使用時に脱イオン水による希釈が必要である。希釈にPBSやその他の緩衝液を使用しないこと。

14. 細胞内染色用モノクローナル抗体

目的とする細胞群における特異的な細胞内マーカーに対する抗体を自由に選択することができる。例えば、2カラー試薬のIFN- γ FITC/IL-4 PE (BD カタログ番号: 340456)は免疫応答のType 1とType 2を同時に検出するのに適した試薬である。その際、CD3 PerCP等の免疫表面型マーカーに対する抗体で陽性染色される細胞(CD3陽性T細胞等)をゲーティングすることで、目的とする細胞群における免疫応答タイプを測定する。

細胞内抗原に特異的に反応する抗体を使用することが、細胞内抗原染色の成否を決める一要因となる。また細胞内アッセイは、細胞外へのタンパク分泌を阻害するBFA等の阻害剤を用いることにより、コレジ体内で合成されるタンパクを検出する。

細胞内タンパクは、立体構造的に分泌型のタンパクと異なるため、分泌型サイトカインに対する抗体では、細胞内サイトカインは十分に染色されないことを考慮し、BDでは実際に細胞内アッセイの条件下における各サイトカインに対する多くのモノクローナル抗体をスクリーニングしている。

活性化

このアッセイ系での活性化は、活性化により産生する抗原やサイトカインを細胞内に保っておく必要があるため、細胞内タンパクの細胞外への輸送を阻害する^{8,9,10} BFA存在下で行なう。このBFAは、したがって活性化させないコントロール試験管にも添加する(後述のアッセイコントロールのセクション参照)。下記のすべての活性化の系において、キャップ付きポリスチレン製12×75 mm試験管(BD カタログ番号: 352058またはそれに相当するもの)を使用する。下記に記載した活性化用試薬の濃度は最終濃度であり、試薬のセクションで調製した試薬を用いる。

1. PMA+Ionomycin (PMA+I)

- 全血を血清を含まないRPMI 1640で1:1に希釈する。(PMA+Iの活性化では、全血においてのみRPMIによる希釈が必要である。すでに 2×10^6 cells/mL濃度の細胞浮遊液になっている場合は、RPMIによる希釈の必要はない。)
- 10 μ g/mLのBFA (1 mLあたりBFA Working Solution 20 μ L)存在下で、10ng/mLのPMA (1 mLあたりPMA Working Solution 10 μ L)と1 μ g/mLのIonomycin (1 mLあたりIonomycin Working Solution 20 μ L)を添加し刺激する。
- CO₂を含む空気が入るようキャップをゆるめた状態で、CO₂ 7%、37°Cで4時間インキュベーションする。(適切なpHになっているCO₂ インキュベーターを使用することが望ましいが、試験管のキャップをしっかりと締めて、ウォーターバスでも可能である。)

2. SEB

- 希釈しない全血に1 μ g/mLのBFA存在下で、1 μ g/mLのSEBを添加する。
- 37°Cで4~6時間インキュベーションし、活性化させる。

3. CD2/CD2R (BD カタログ番号: 340366)

- 希釈しない全血に10 μ g/mLのBFA存在下で、20 μ LのCD2/CD2R抗体を添加する。
- 37°Cで4~6時間インキュベーションし、活性化させる。

4. CD3

BFA存在下で、希釈しない全血にimmobilized CD3抗体¹²を添加する。

5. CD28

CD28 (BD カタログ番号: 340975) は、SEB、CD3、CD2/CD2R等種々の刺激物の活性化を増強させるために10 μ g/mL濃度で使用する。

アッセイコントロール

アッセイのための適切なコントロールは、問題解決の一助となる。方法を一部変更する場合には、必ず事前に健常人検体による基本法を確立し、次にあげるすべてのコントロールを健常人検体で行なうことが推奨される。その結果が期待どおりであれば、活性化コントロールと細胞内染色コントロールは省くことができるが、無活性化コントロールとアインタイプ(陰性)コントロールは検体毎に必ず行なう。

1. 無活性化コントロール

無活性化コントロールは、生体内(*in vivo*)において既に産生されて残っているサイトカインレベルを知るために用いる。このコントロールは全ての検体毎に立てる必要がある。

無活性化コントロールの試験管には、活性化のステップに使用する刺激物は添加しないが、10 µg/mLのBFAは添加するようとする。

2. アインタイプコントロール

マウスモノクローナル抗体のサブクラスが同一で同程度の抗体濃度の蛍光標識アインタイプコントロールを、細胞への非特異染色を検出するために用いる。BD FastImmuneサイトカインシステムでは特に細胞内染色用に規格した抗KLHアインタイプコントロールを使用する。BD FastImmuneコントロールは、適切なアインタイプコントロールであるか、サイトカインとの交差反応をテストする必要がなく、経費および労力を省くことができる。

3. 活性化コントロール

活性化コントロールは、細胞表面抗原CD69が活性化により期待されるレベルで発現しているか測定することにより、活性化のステップに問題がないか確認するために行なう。特に、活性化に使用する試薬の一つでも有効期限切れあるいは試薬のコンタミや調製ミス等があった場合、実際に作用していないことがある。

このような場合は、再度新しい試薬を調製し活性化を行なう必要がある。

- 小分け血液検体にPMAとIonomycinを添加し、活性化させる。この場合、BFAは添加しない。

注意: BFA等の分泌抑制剤は、CD69の細胞膜上への発現を阻害する。表面抗原の発現を検出する場合は、使用しない。

- CD69 PE/CD3 PerCP (BD カタログ番号: 340368)で染色する。細胞膜透過および細胞内染色は省く。

- FL3による蛍光ゲートを設定し、CD3陽性細胞群におけるCD69陽性細胞率を測定する。

細胞表面CD69陽性細胞率が90%以上となる。(図2)

4. 細胞内染色コントロール

細胞内染色コントロールは、細胞内CD69抗原染色を行ない、細胞膜透過と細胞内染色が適切であるか確認するコントロールである。必ず上記活性化コントロールと共に実施し、活性化の確認も行なう。活性化コントロールの結果、CD69陽性細胞率が90%以上であるにも関わらず、細胞内染色コントロールでの結果が期待どおりでない場合は、細胞膜透過あるいは細胞内染色のステップに問題がある。このような問題の有無を、次の方法に従って実施し、確認する。

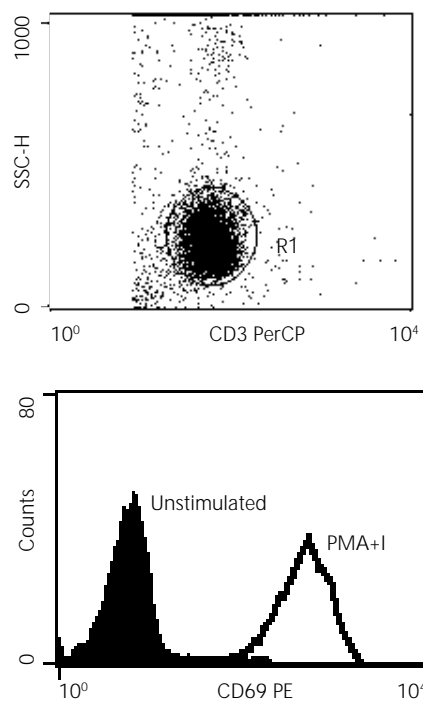


図2 活性化コントロール

- 小分け血液検体にBFA存在下で、PMAとIonomycinを添加し活性化させる。
- 細胞表面抗原の染色は省き、CD69 PE/CD3 PerCP (BD カタログ番号: 340368)で細胞内染色を行なう。
- FL3による蛍光ゲートを設定し、CD3陽性細胞群におけるCD69陽性細胞率を測定する。

CD69の細胞内染色率は90%以上となるはずである(図3)。

抗体染色

このアッセイ法における抗サイトカイン抗体は、細胞表面抗原に対する抗体と共に用い、特定のリンパ球サブセットにおける細胞内サイトカインを測定する。

BDの研究室では、細胞表面抗原に対する抗体としてCD4 PerCP、CD8 PerCPを用いる頻度が高い。

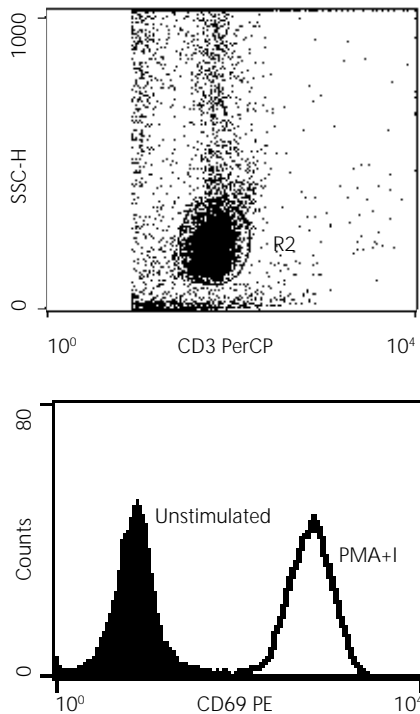


図3 細胞内染色コントロール

CD4、CD14、CD56抗原は、多くの患者検体においてPMAによる活性化で抗原のダウン モデュレーションが起こることに注意しなければならない。細胞膜透過処理 (permeabilizing)後は全エビトープが同時に染色されるよう、全蛍光標識抗体を一度に加える。もし細胞表面抗原用の試薬を細胞内マーカー染色用に使用する場合は、細胞内染色に適した最適濃度を定める必要がある。CD3、CD4、CD8の染色については、細胞内透過処理前の細胞表面抗原の染色であっても、後の細胞内染色でも両方が可能であるが、その他多くの抗原は細胞内抗原と細胞表面抗原の発現量が異なるので、すべての抗原染色には両方が可能とは言えない。

細胞表面抗原の染色

1. 細胞表面抗原染色用の抗体を、12×75 mm試験管に加える。
2. 抗体を添加した試験管にPMA+Iで活性化した希釈血液100 μL、あるいは希釈なしの全血(その他の刺激物で活性化した場合)50 μLを加える。(RPMIで希釈するものは、PMA+I刺激系の全血および血漿入りPBMCのみである。2×10⁶ cells/mLに調整されている細胞浮遊液は、希釈する必要はない。)
3. よく攪拌し室温暗所で15分間インキュベーションする。

細胞膜透過 (Permeabilization) および細胞内染色

1. 原液を10倍希釈したBD FACS Lysing Solution 2 mLを加え、室温で10分間インキュベーションする。

細胞浮遊液やPBMCの検体においても、細胞表面の固定や、次のステップの細胞膜透過処理前の調整のためにFACS Lysing Solutionのステップが必要である。

注意：PMAで刺激した全血検体は十分に溶血ができない場合がある。

2. 500×gで5分間遠心し上清を除去し、原液を10倍希釈したBD FACS Permeabilizing Solution 2 500 μLを加え、よく混和する。室温暗所で10分間インキュベーションする。
3. 2~3 mLの洗浄液を加え、500×gで5分間遠心し、上清を除去する。
4. 蛍光標識抗サイトカイン抗体を添加する。よく混和し室温暗所で30分間インキュベーションする。

(数種類の細胞内抗原を染色する場合は、すべての標識抗体を同時に添加し染色する。また細胞表面マーカー用の抗体を細胞内染色用に使用する場合は、最適な結果が検出できるように予め最適濃度を求める必要がある。)

5. 2~3 mLの洗浄液を加え、500×gで5分間遠心し、上清を除去後1%パラホルムアルデヒドPBS溶液500 mLを添加する。

注意：サンプルは解析まで4℃暗所で保存すれば、24時間まで保存可能。

解析

1. BD FACSブランドのフローサイトメーターで解析する。
2. BD CaliBRITE™ ビーズおよび、適切なソフトウェア (BD FACSCOMP™ version 2.0およびそれ以上あるいは AutoCOMP™ version 3.0.2)のソフトウェアを使用して、PMT電圧やコンペンセーションの設定と、機器の感度確認を行なう。TriTEST™ (Lyse No Wash 3 color analysis)用のフローサイトメーターのセットアップ、取り込みおよび解析方法を参照。

(注意: BD FACSCOMP、AutoCOMPが旧バージョンの場合は、弊社担当者に新バージョンをご請求ください。)

3. BD FACSシリーズのフローサイトメーターで解析する。BD CellQuest™ あるいはLYSYS™ IIのソフトウェアでデータを取り込む。取り込みの際には、蛍光または前方散乱光 (FSC) に threshold をかける。通常はゲートイベントが10000になるまで取り込む。
4. 通常FL3陽性細胞にゲートを設定する。サイトカイン陽性細胞を検出するために、2カラードットプロットを表示する。データ解析にはBD CellQuest、LYSYS II、BD Paint-A-Gate™ またはBD Attractors™ ソフトウェアを使用する。

PMAによる活性化で、血小板がFL3陽性細胞ゲートに混入することがあるので、このような場合はFSC/SSCドットプロットのゲートを採用する。あるいは2つのゲートによる論理ゲートでもよい。

またCD4陽性細胞ゲートによる測定の場合、単球を除外するためにFSC/SSCゲートを採用するか、あるいはロジカルゲートにする。

問題解決

この問題解決のマトリックスは、このアッセイ法で発生しうる問題の原因についてまとめており、その問題解決に役立つものである。問題の多くはサンプル調製および活性化ステップが原因となっている。図4は問題解決の一助となる活性化コントロールおよび細胞内染色コントロールの図説化したものである。

問題	考えられる原因	解決	コメント
細胞内にサイトカインもCD69も染色されない	細胞が活性化されていない。	活性化試薬が正しく調製されていない。操作法の項の「試薬の選択、調製および保存」を参照のこと。	4時間のPMA+I 活性化の後、>90% CD3 ⁺ Tリンパ球がCD69 ⁺ にならないければならない。
	採血において、正しい抗凝固剤が使用されていない。	採血ではヘパリンNa抗凝固剤を使用しなければならない。リチウムヘパリンは使用不可。ACD、EDTAまたは他のカルシウムキレート抗凝固剤も使用不可。	リンパ球の活性化にはカルシウムが必要となるため。カルシウムキレート抗凝固剤は活性化を妨げる。
	細胞膜が浸透化されていない。	BD FACS Lysing Solution で処理してからBD FACS Permeabilizing Solution 2で処理する。	BD FACS Lysing Solutionは細胞膜浸透化の前処理に用いる。
	BFAが不活化されているか適切に調製されていない。	指示通りにBFAを希釈。BFAストック液を分注し、-20°Cで保存する。	操作法の項の「BD製以外の試薬の調製法」を参照のこと。
細胞内染色が陽性であるが弱い	抗サイトカインモノクローナル抗体の濃度が不適當である。	BDの直接標識モノクローナル抗体を推奨された濃度で使用する。	正常活性化Tリンパ球におけるIL-4の発現は、通常2%以下である。
	細胞膜透過処理をされた細胞を細胞内染色の前に洗浄していない。	細胞膜透過処理をされた細胞は、染色の前に、プロトコルに従って洗浄する。	
バックグラウンドが高すぎる	標識の精製が不適當であるか抗体の標識がはずれて遊離した蛍光が非特異的に結合している。	BD FastImmune 試薬を使用する。	BDの試薬はバックグラウンド染色を最小限に抑えるよう、細心の注意を払ってデザインされている。BDの細胞内染色用のPE標識アソタイプコントロールは、このアプリケーション専用特別に組成されている。細胞表面染色用アソタイプコントロールの組成はこれと異なり、細胞内染色アプリケーションではバックグラウンドが高くなることもある。
	産生初期の細胞内抗原に対して親和性が低い抗体であるため、高い抗体濃度が必要とされている。	BD FastImmune 試薬を使用する。	
	誤ったアソタイプコントロール(コントロールIg)が高濃度で使用された。	細胞内染色にはBDの対応するアソタイプ試薬を推奨濃度で使用する(検査で使用する標識試薬の濃度に合わせる)。	
操作中に許容量以上の細胞を逸失	遠心洗浄操作において細胞を回収できない。	固定および細胞膜透過処理済の細胞を500×gで遠心する。	固定された細胞は生細胞より比重が低いため、ペレットの形成には高い遠心力が必要となる。
	吸引操作において細胞を回収できない。	吸引するかわりに、上清をデカルテーションで捨てる。	
赤血球の溶血が不完全	PMA+I活性化操作。	テプリおよび溶血していない細胞を解析から除去するため、FL3蛍光ゲート法に従って操作する。	PMA+I-活性化全血検体は溶血が困難である。PMAは赤血球膜を安定化させる傾向がある。
	BD FACS Permeabilization Solution 2またはFACS Lysing Solutionが蒸留水で10倍に希釈されていない。	BD FACS Permeabilization Solution 2またはBD FACS Lysing Solutionの希釈についてのプロトコルに従う。	これらの試薬は蒸留水で希釈しなければならない。PBSで希釈すると浸透圧の差による効果が低下する。他の浸透化剤についてはこの操作法は適当でない場合がある。
	室温で溶血操作が行なわれていない。	室温で溶血する。	

採血			
			
検体の分注と活性化			
活性化コントロール  +PMAおよびIonomycin No BFA		細胞内染色コントロール  +PMAおよびIonomycin +BFA	
細胞表面染色			
 CD69 PE/CD3 PerCP	 アイソタイプ コントロール	NO	
溶血			
YES	YES	YES	
細胞膜浸透化(Permeabilize)			
NO	NO	YES	
細胞内染色			
NO	NO	 CD69 PE/CD3 PerCP	 アイソタイプ コントロール
洗浄および固定			
YES	YES	YES	YES
解析			
 <p>>90%のCD3⁺細胞がCD69⁺でなければならない。 活性化コントロールが>90%でない場合は、活性化の方法または試薬に問題がある。 活性化コントロールは>90%でも細胞内染色コントロールが>90%でない場合は、細胞膜透過または染色に問題がある。</p>			

図4 BD FastImmune サイトカイン問題解決法

BD社はこの操作法を研究者のための

サービスとして出版しております。

この操作法のフローサイトリー法

以外の見解に対しては、

BD社から詳細なサポートを

提供できないことがあります。

参考文献

1. Aggarwal BB, Puri RK. Common and uncommon features of cytokines and cytokine receptors: An overview. In: *Human Cytokines: Their Role in Disease and Therapy*. Cambridge, MA: Blackwell Science; 1995:3-24.
2. Kroemer G, Alboran M, Gonzalo JA, Martinez C. Immunoregulation by cytokines. *Crit Rev Immunol*. 1993;13:163-191.
3. Street NE, Mosmann TR. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J*. 1991;5:171.
4. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*. 1994;76:241.
5. Mosmann RT, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;196:2348.
6. Sad S, Mosmann T. Single IL-2 secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol*. 1994;153:3514.
7. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *Immunol Methods*. 1993;159:197.
8. Picker LJ, Singh MK, Zdravski Z, et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood*. 1995;86:1408-1419.
9. 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.
10. Somasse T, Larenas PV, Davis KA, de Vries JE, Yssel H. Differentiation and stability of Th1 and Th2 cells derived from naive human neonatal CD4⁺ T cells, analyzed at the single-cell level. *J Exp Med*. 1996;84:473-483.
11. Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to T_H1- and T_H2-stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells in vivo. *Nature*. 1995;373:255-257.
12. 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.

特許

FACS Lysing Solution: US Patent Nos. 4,654,312; 4,902,613; and 5,098,849

Phycoerythrin (PE) Conjugates: US Patent No. 4,520,110; European Patent No. 76,695; Canadian Patent No. 1,179,942

Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP): US Patent No. 4,876,190

FACS, FastImmune, FACSCComp, PAINT-A-GATE, Attractors, TriTEST, CaliBRITE, Vacutainer, Falcon[®]はBecton, Dickinson and Companyの登録商標です。

© 1999 Becton, Dickinson and Company

64-064-01

R0-03 * *-000.5- * * *

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052
ホームページアドレス: www.bdj.co.jp

◆ お問い合わせは下記までご連絡ください。

製造関連・資料請求 (お客様情報センター):

☎ 0120-8555-90 Fax 024-593-5761

機器・メンテナンス (Life Science Support):

☎ 0120-7752-77

アプリケーション (技術研修室ホットライン):

Tel 03-5805-9960

BD Biosciences
Clontech
Discovery Labware
Immunocytometry Systems
Pharmingen

