

抗原により活性化したCD8、CD4T細胞における サイトカインの検出

はじめに

抗原特異的T細胞の定量的および定性的測定は、罹病時の免疫状態のモニタリングやワクチンの有効性の評価に重要です。抗原特異的T細胞の反応を特定するために様々な方法が開発されてきました。伝統的なアッセイは、増殖(³H-チミン取り込みアッセイ)または細胞傷害性(⁵¹Cr放出アッセイ)によりT細胞を集団で解析していました。これらの方法は、解析に時間がかかり、作業も大変で、通常、結果を定量的に比較できないという短所があります。最近、抗原特異的T細胞の単一細胞アッセイが利用できるようになりました。これらのアッセイにはMHC-ペプチド・テトラマー染色法^{1, 2}、Enzyme-Linked Immunospot (ELISPOT) アッセイ^{3, 4}そして細胞内サイトカインアッセイ⁵⁻⁷などがあります。これらのアッセイは増殖、アポトーシスまたは両方を誘導するような長時間の*in vitro*の再刺激がなくても抗原特異的細胞を測定できることから、真の定量的な測定値を提供できます。上記3種類のアッセイのうちELISPOTアッセイと細胞内サイトカインアッセイは機能情報(サイトカイン産生)を測定するのに対し、テトラマー染色法は機能とは関係なく抗原特異性を測定するものです。一部の疾患状態はアレルギー性(非機能的)T細胞集団を誘導することから^{8, 9}、機能的アッセイと組合せたテトラマー法の利用が有効と考えられます。また、サイトカインアッセイは特定のタンパク質または病原体に対するT細胞の応答の総量を決定することができるのに対し、テトラマー法は、単一ペプチド/MHC特異性を持ったT細胞だけを同定します。

ELISPOTと比較して細胞内サイトカイン染色の主な利点は、細胞に関する複数のパラメータを解析できることです。すなわち同一サンプルのCD4とCD8反応の両方を解析すること、または目的とする細胞の表現形マーカーの発現を調べることができます。より多くの情報が得られる可能性に加え、対象となる細胞をCD4またはCD8、および例えばCD69の様な独立した活性化マーカーで同時に染色できることから、サイトカイン陽性細胞として特定されたイベントが目的細胞であることがより確信を持てます。更に、細胞内サイトカインアッセイは、末梢血単核細胞(PBMC)分離やCD4またはCD8細胞分離の必要が無く、全血を利用し6時間以下という短い刺激時間で実施することができます。最近、様々なアッセイ方法が開発され、細胞内サイトカインアッセイの簡便化をもたらしました。このような開発例として、適時冷却を利用しアッセイを中断できるようになったこと⁶、および活性化細胞を凍結することでサンプルをバッチ処理できるようになったこと^{5, 6}などがあります。

細胞内サイトカイン染色は、高親和性抗サイトカイン抗体、至適な細胞固定法や細胞膜透過処理法、およびBrefeldin A (BFA)の様な分泌阻害剤の登場により可能となりました。この技術によって、メモリーT細胞の中で特定の可溶性抗原に対し反応する機能な集団を短時間で再刺激アッセイにより検出できるようになりました^{5, 6, 9-18}。これらアッセイにより抗原特異的反応を特定するためには、非常に低頻度のイベント(0.1%以下)も陽性と読みとることができる程の極めてクリーンなバックグラウンドが必要とされます。BD Biosciencesはウイルス溶解物、リコンビナントウイルスタンパク質やペプチドを含む数多くの各種抗原を利用し、このようなアッセイを開発しました。本プロトコールには、陽性コントロールとして使用されるスーパー抗原であるStaphylococcal Enterotoxin B (SEB)を含め我々が実験したいくつかの抗原の調製と使用方法を記載しています。原理的には、本技術は他の抗原にも同様に応用することができます。しかし、至適抗原力価を決定する必要があります。更に、ある抗原に免疫を持つ個体の血液中に存在する、その抗原に反応するT細胞の頻度は、抗原の種類によって様々です。

抗原特異的な活性化は様々な組織、環境で起こります。このシンプルな方法は、全血を使用しており、極めて*in vivo*に近い環境を提供しています。PBMCでも、次のように手順を若干変更することによって使用することができます^{16, 18}。

全血を、分泌阻害剤であるBrefeldin A (BFA)の存在下で、抗原および共刺激用抗体 (CD28およびCD49d)により刺激します。阻害剤は37°Cでサンプルをインキュベーションしている間に新たに産生されたタンパク質 (サイトカイン) を細胞内に蓄積させます。6時間の刺激後、EDTAをサンプルに添加し、活性を停止させ、活性化に使用した容器から接着細胞を取り除きます。続いてBD FACSTM Lysing Solution*を利用し赤血球の溶血と白血球の固定を同時に行いません。次に細胞を洗浄し、BD FACS Permeabilizing Solution 2で細胞膜の浸透化を行いません²。洗浄後、表面および細胞内染色抗体を1回のステップで加えて染色します。最後に、細胞を洗浄し、フローサイトメリー解析用に固定します (図1)。

本法は、3カラー染色システム (抗サイトカインFITC、CD69 PE⁺およびCD4 PerCP⁺-Cy5.5⁺⁺) または4カラー染色システム (抗サイトカインFITC、CD69 PEおよびCD8 PerCP-Cy5.5、CD3 APC⁺) を使用した4カラー染色システムを採用しています。最も頻繁にみられるサイトカイン反応 (BDがこれまで試験した抗原に対する) はCD4 T細胞の場合IFN- γ 、IL-2、およびTNF- α 、CD8 T細胞の場合IFN- γ です。CD69は*in vitro*における抗原刺激中にその発現が誘導される初期活性化抗原です。CD69抗体はサイトカイン陽性細胞のクラスティングを向上させるため、および、抗原反応性であると定義される細胞が刺激を受け本活性マーカーを発現することを確認するために使用します。CD4抗体は、取り込みゲートを設定するために使用します。それにより、CD4⁺リンパ球だけが、解析のために取り込まれます。刺激抗原としてClass-I 結合性ペプチドを使用する場合には、CD8 PerCP-Cy5.5とCD3 APCが取り込みゲートの設定に使用されます。「BD FastImmune CD8 anti-Hu-IFN- γ Detection Kit」には、刺激抗原においてCD8と反応するNK細胞 (CD8 弱陽性) を誤ってゲート内にとりこむことを避けるためCD3 APCが、含まれています。

マテリアル

サンプル

ヘパリンNa採血された全血。他の抗凝固剤はこの方法には適しません。

抗体およびキット内容

本法はBD FastImmune™ CD8またはCD4 Cytokine Detection Kitを使用しています。これらのキットにはサイトカイン特異的なマルチカラー抗体試薬、サブクラスが一致したマルチカラーアインタイプコントロール試薬、および抗原特異的T細胞反応を測定するための前処理試薬が含まれています。一般的な、または特異的な活性化抗原は、このキットには含まれていません。表1には、BD Biosciences R&Dにおいて本アッセイに使用している試薬の概要を示します。

このシステムは、最新の、行ないやすい手順に最適化されており、数時間で再現性のよいFunctional Responsesを得ることができます。

BD FastImmune CD8 Cytokine four-color kit :

Anti-Hu-IFN γ Kit (製品番号 BD-346049⁺)

- Anti-Hu-IFN γ FITC/CD69 PE/CD8 PerCP-Cy5.5/CD3 APC
- IgG_{2a} FITC/IgG₁ PE/CD8 PerCP-Cy5.5/CD3 APC
- 活性化補助試薬および前処理試薬

BD FastImmune CD4 Cytokine three-color kit :

Anti-Hu-IFN γ Kit (製品番号 BD-340970⁺)

- Anti-Hu-IFN γ FITC/CD69 PE/CD4 PerCP-Cy5.5
- IgG_{2a} FITC/IgG₁ PE/CD4 PerCP-Cy5.5
- 活性化補助試薬および前処理試薬

BD FastImmune CD4 Cytokine three-color kit :

Anti-Hu-IL-2 Kit (製品番号 BD-340971⁺)

- Anti-Hu-IL-2 FITC/CD69 PE/CD4 PerCP-Cy5.5
- IgG_{2a} FITC/IgG₁ PE/CD4 PerCP-Cy5.5
- 活性化補助試薬および前処理試薬

Anti-Hu-TNF- γ Kit (製品番号 BD-340972⁺)

- Anti-Hu-TNF- γ FITC/CD69 PE/CD4 PerCP-Cy5.5
- IgG_{2a} FITC/IgG₁ PE/CD4 PerCP-Cy5.5
- 活性化補助試薬および前処理試薬

活性化補助試薬および前処理試薬はCD4キット、CD8キットのどちらにも含まれています。

活性化補助試薬

- BD FastImmune CD28/CD49d共刺激試薬
- BD FastImmune Brefeldin A (BFA) Solution

活性化後、前処理に使用する試薬

- BD FastImmune EDTA Solution
- BD FACS Lysing Solution(10×)
- BD FACS Permeabilizing Solution 2(10×)

Kit内試薬のWorking Solution

- BD FastImmune Brefeldin A(BFA)Solution
受領後、解かし10 µLずつ小分けし、-20°Cで保存してください。
- BD FACS Lysing Solution
蒸留水で10倍希釈してください。希釈した溶液は室温で保存してください。
- BD FACS Permeabilizing Solution 2
蒸留水で10倍希釈してください。希釈した溶液は室温で保存してください。
警告：BD FACS Lysing Solution(10×)およびBD FACS Permeabilizing Solution 2(10×)はそれぞれジエチレングリコールとホルムアルデヒドを含んでいます。ホルムアルデヒドは吸い込んだり皮膚に付いたり、または飲み込んだりすると危険です。眼や皮膚を刺激します。曝露されると癌の原因になる可能性があります。不可逆的作用のリスクがあります。皮膚への接触により感作が起こることがあります。子供の手の届かないところに保管してください。食物、飲み物、動物用飼料からは隔離してください。適当な保護服と手袋を着用してください。ジエチレングリコールは少量でも致死的になることがあります。万が一飲み込んだ場合にはすぐに医療機関に行き本製品容器またはラベルを提示してください。規則に従い廃棄してください。

機器および機器のセットアップ

- BD FACS フローサイトメーター
BD FastImmune CD8 Cytokine kitの場合、488 nmと635 nmの2つのレーザーが搭載された機器が必要です。詳しくは適切な機器のユーザーズ・ガイドを参照してください。
- BD CaliBRITETM bead(BD カタログ番号：349502/無標識、FITC、PE標識ビーズ入り) BD CaliBRITETM PerCP-Cy5.5 Beads(BD カタログ番号：345036) BD CaliBRITETM APC Beads(BD カタログ番号：340487)
BD CaliBRITETM APC BeadsはBD FastImmune CD8 kitの場合にのみ必要です。詳しくはBD CaliBRITETM beadsの添付文書を参照してください。
- ソフトウェア
機器設定のためにBD FACSCOMP™ ソフトウェア version 4.2、データ取り込みと解析のためにBD CellQuest™ ProまたはBD CellQuest ソフトウェアを使用してください。詳しくは適切なソフトウェアのユーザーズ・ガイドを参照してください。

必要なその他の材料

- Wash Buffer：0.5%牛血清アルブミン(BSA) 0.1% NaN₃ 加PBS(4°Cで保存してください。)
- 1%パラホルムアルデヒド加PBS(4°Cで保存してください。)取り扱いの注意についてはパラホルムアルデヒドの添付文書を参照してください。
- 15 mLポリプロピレンチューブ(BD カタログ番号：352096)
- 5 mLポリプロピレンチューブ(BD カタログ番号：352058)
- チップ付きマイクロピペッター
- ボルテックスミキサー
- 37°C恒温槽またはインキュベータ
- 遠心分離器

表1 本アッセイに使用されている抗原

活性化試薬	供給元	保存液	アッセイでの使用方法
SEB陽性コントロール	シグマ カタログ番号： S4881(1mg)	SEBの1 mgバイアルに滅菌PBS 2 mLを直接加えます。バイアルにキャップし、粉末がすべて溶解するまで振盪します。液を別容器に取り出し、PBSで20 mLまで希釈し50 µg/mLの保存液を調製します。本保存液を4°Cに保管します。	最終濃度1 µg/mLで1 mLの血液の刺激する場合、保存液を20 µL使用します。
CMV溶解物	Advanced Biotechnologies(ABI) カタログ番号： 10-144-00Q(1 mg) カタログ番号： 10-144-10Q(0.1 mg)	材料を製品能書記載のタンパク質濃度に基づき滅菌PBSにて最終濃度1 mg/20 mL(50 µg/mL)に希釈します。20 µLずつに小分けし-80°Cで凍結します。 注意：本製品については、ロット変更時には力価測定し、最適濃度を決定する必要があります。	最終濃度1 µg/mLで1 mLの血液の刺激する場合、保存液を20 µL使用します。
CMVpp65タンパク質	Austral Biotechnologies カタログ番号： CMA-1420-4(50 µg)	50 µgを滅菌PBS(最終濃度25 µg/mL)で希釈し2 mLにします。20 µLずつ小分けし、-80°Cに凍結します。	最終濃度0.5 µg/mLで1 mLの血液の刺激する場合、保存液を20 µL使用します。
ペプチド		大部分のペプチドはDMSOを使い、最終濃度2 mg/mLに希釈することができます。5 µLずつ小分けし、-80°Cに凍結します。	最終濃度10 µg/mLで1 mLの血液の刺激場合、保存液を5 µL使用します。

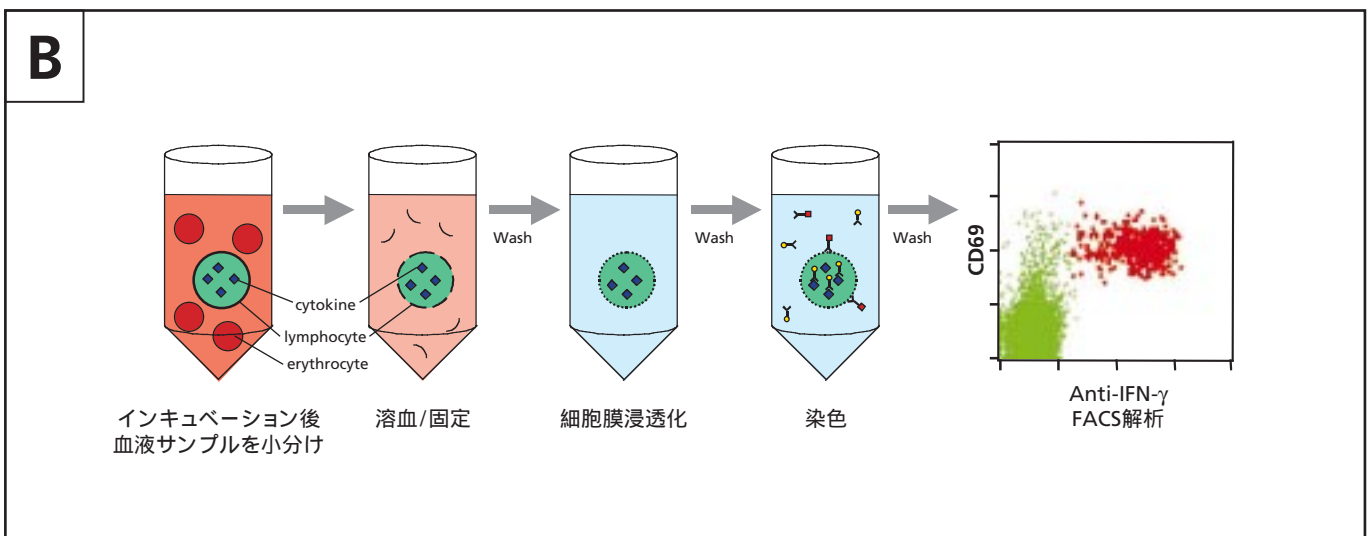
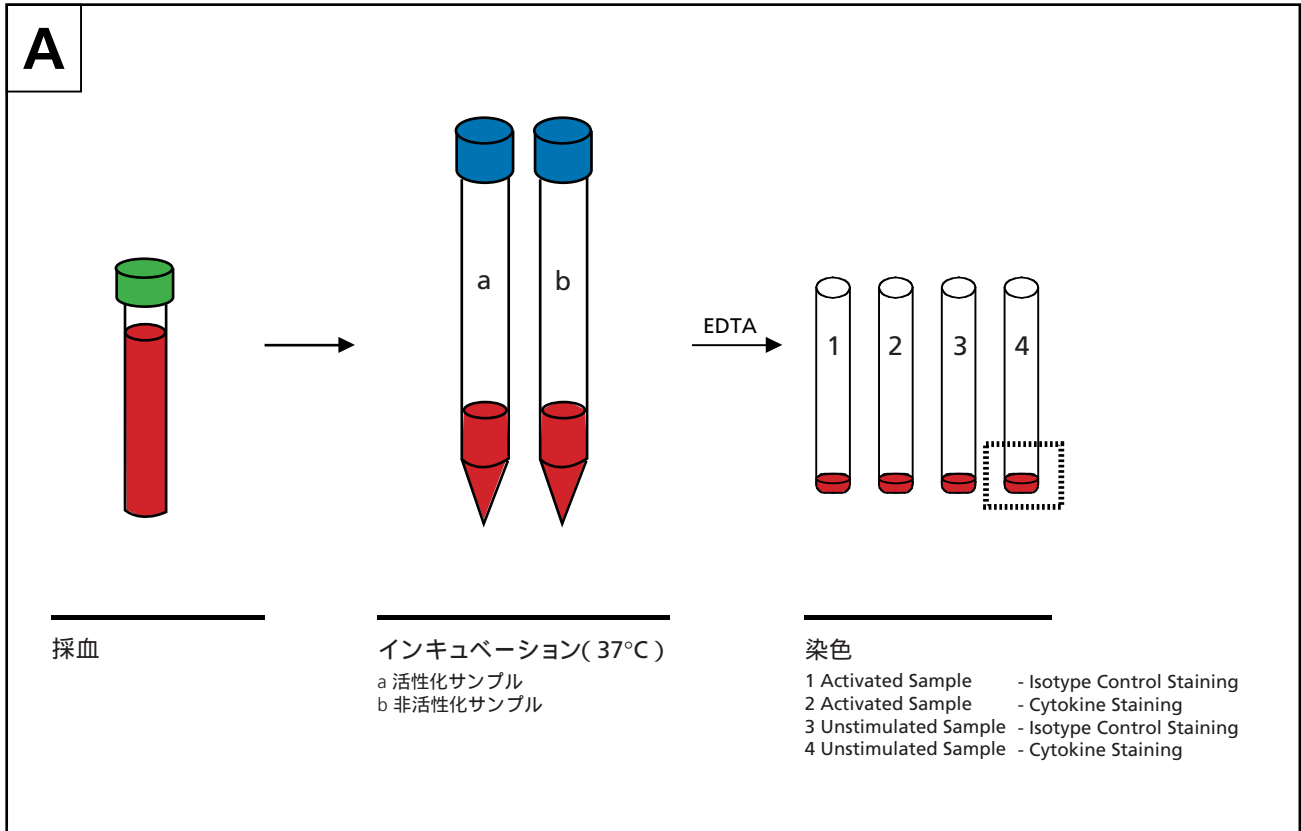


図1 全血によるBD FastImmune抗原特異的アッセイ: Part Aは採血から染色までの流れを示し、Part BではFACS解析のためのサンプルの染色手順を示している。

方法

BD FastImmune CD8 Kit (Anti- $\text{INF-}\gamma$) ペプチドまたはペプチドミックスによる刺激

1. 冷凍庫から小分けしたBD FastImmune Brefeldin A (BFA) Solutionを取り出し、滅菌PBSで10倍に希釈します。
2. 活性化サンプル：
ヘパリン加全血0.5 mL、5 μL のBD FastImmune CD28/CD49d共刺激試薬、10 μL のBFA solution、および濃度調製された抗原（またはその他の活性化物質）を15 mLポリプロピレンチューブに加えます。
非活性化サンプル：
ヘパリン加全血0.5 mL、5 μL のBD FastImmune CD28/CD49d共刺激試薬、10 μL のBFA solutionを15 mLポリプロピレンチューブに加えます。抗原は加えません。
軽くボルテックスしてから37°Cにて6時間インキュベーションします。
留意：15 mLのコニカルボトムポリプロピレンチューブは我々の実験では多くの活性化物質に適しています。
3. 50 μL のEDTA溶液を各チューブに加えます。強くボルテックスし、室温で15分間インキュベーションします。再度強く、10秒間ボルテックスします。
4. 細胞を新たに染色する場合、Step 4aに進みます。細胞を凍結して後日染色する場合、Step 4bに進みます。
4a
 - 5 mLポリスチレンチューブ4本に次のラベルを貼る：
チューブ1：活性化アインタイプコントロール (AIC)
チューブ2：非活性化アインタイプコントロール (UIC)
チューブ3：活性化サンプル (AS)
チューブ4：非活性化サンプル (US)
 - 各活性化血液100 μL をAICチューブとASチューブに加える。
 - 各非活性化血液100 μL をUICチューブとUSチューブに加える。
 - ステップ5に進みます。
4b
 - 各活性化、非活性化サンプル0.5 mLに5 mLの1×BD FACS Lysing Solution(10×溶液を蒸留水で10倍希釈したもの)を加える。
 - ボルテックス後室温で10分間インキュベーションし、-80°Cの冷凍庫内に直接チューブを置きます。
 - 染色時には、37°Cの恒温槽にて短時間で細胞を解凍し、7 mLのWash Bufferを加え、500×g、室温で10分間遠心します。
 - 上清をデカントし、0.5 mLのWash Bufferでペレットを再浮遊します。

染色の準備が完了後：

- 5 mLのポリスチレンチューブ4本にラベルを貼り、フレッシュな細胞の場合と同様に各100 μL ずつ細胞を小分けします。
 - ステップ7に進みます。
5. 各チューブに1 mLの1×BD FACS Lysing Solution (10×溶液を蒸留水で10倍希釈したもの)を加え、軽く混合し、室温で10分間インキュベーションします。
 6. 各チューブに2 mLのWash Bufferを加え、500×g、室温で10分間遠心します。上清をデカントします。
 7. 各チューブに0.5 mLのBD FACS Permeabilizing Solution 2 (10×溶液を蒸留水で10倍希釈したもの)を加えます。ボルテックスし、ペレットを再浮遊します。室温で10分間インキュベーションします。
 8. 各チューブに2 mLのWash Bufferを加え、500×g、室温で10分間遠心します。
 9. 上清をデカントし、20 μL のBD FastImmune Cytokine-Specific Mutilcolor抗体試薬(例えば20 μL のAnti-Hu- $\text{INF}\gamma$ FITC/CD69 PE/CD4 PerCP-Cy5.5試薬)を、ASチューブとUSチューブに加えます。また、20 μL のBD FastImmune Mutilcolor アインタイプ コントロール試薬(例えば20 μL のIgG_{2a} FITC/IgG₁ PE/CD4 PerCP-Cy5.5試薬)を、AISチューブとUISチューブに加えます。軽くボルテックスします。室温暗所で30分間インキュベーションします。
 10. 各チューブに2 mLのWash Bufferを加え、500 X g、室温で10分間遠心します。
 11. 上清をデカントし、200 μL の1%パラホルムアルデヒド加PBSを加えます。ボルテックスし、ペレットを再浮遊します。フローサイトメーターで解析するまでは4°C、暗所で保存してください。24時間以内に解析してください。
留意：固定、細胞膜浸透化処理をした細胞は生細胞に比べ浮上しやすくなります。従って高い遠心力で遠心分離することが必要です。細胞のロスを防ぐためには、アスピレートするより、上清をデカントして除去することをお勧めします。

BD FastImmune CD4 Kit (Anti- $\text{INF-}\gamma$, Anti-IL-2, Anti-TNF- γ) whole proteinまたはペプチドミックスによる刺激

1. 活性化サンプル：
ヘパリン加全血0.5 mL、5 μL のBD FastImmune CD28/CD49d共刺激試薬、および濃度調製された抗原（またはその他の活性化物質）を15 mLポリプロピレンチューブに加えます。
非活性化サンプル：
ヘパリン加全血0.5 mL、5 μL のBD FastImmune CD28/CD49d共刺激試薬を15 mLポリプロピレンチューブに加えます。抗原は加えません。
軽くボルテックスしてから37°Cにて2時間インキュベーションします。

2. 冷凍庫から小分けしたBD FastImmune Brefeldin A(BFA) Solutionを取り出し、滅菌PBSで10倍に希釈します。10 μ Lの希釈したBFA solution各チューブに加えます。軽くボルテックスしてから37°Cにて4時間インキュベートします。
3. BD FastImmune CD8 Kitの手順のステップ3から11に従い調製します。

注意点、染色を成功させるためのTips、および方法の理解のために

サンプルの取り扱いについて

ヘパリンNa入りの採血管に採取します。その他抗凝固剤はリンパ球の機能を大きく障害します。血小板が活性化することを避けるために、使用前は室温にて保管し、採血後8時間以内に使用します。長期間保管すると抗原提示細胞の機能に悪影響を及ぼし、輸送によりさらに悪化させて機能が失われることがあります。すべての検体、およびそれらが接触した材料はバイオハザードと考えられ、伝染性の感染症を引き起こすものとして取り扱わなければなりません¹⁹。これらの材料を廃棄する場合には、適切に措置してください。ピペットを口で吸わないでください。検体を皮膚や粘膜に接触させない様にしてください。

活性化コントロール

特定の抗原を使用している場合、0.5 mLの血液をSEB(最終濃度: 1 μ g/mL)のような他の強力な活性化試薬で刺激し、ポジティブコントロールとします。この試験管はポジティブコントロールおよびゲーティングの簡素化に使用します。図2および表1を参照してください。

インキュベーション時間

可溶性タンパク質抗原に対するCD4反応については、一般には6時間以内のインキュベーションに最適な結果が観察されます(BFAは最後の4時間のみ添加)。一部のサイトカインは最長20時間までの間、高い細胞反応率を示します(例えばTNF- α やIFN- γ)。しかし、この場合には極度の蛍光強度の損失を伴います。IL-2の反応は、インキュベーションが長くなるほど大きく低下します⁶。

ペプチド抗原に対するCD8の反応も約6時間のインキュベーション時間が最適です。ペプチドミックスには抗原提示のプロセスは必要ないため、BFAは抗原と同時に添加することができます。

必要に応じてBFAインキュベーションを12時間まで延長することができます。これに伴って反応細胞の数も僅かに増加します⁶。しかし12時間を超えるインキュベーション時間は細胞毒性を生じます。

EDTAによる接着細胞のリカバリー

BD FastImmune EDTAによる処理と強いボルテックスは、活性化細胞の試験管壁への接着を避けるために重要です。同様の理由により活性化にポリプロピレン試験管を使用することは絶対条件です。

活性化サンプルの自動冷却

血液サンプルの採取がその日遅くに実施された場合には、アッセイ全体だけでなくBD FACS Lysing Solution処理後の細胞凍結段階まで作業を進めることができるとは限りません。代替法として細胞を18°Cに冷却して、そのまま一晩維持することができます。この方法では、活性化後機能を失うことなく、バックグラウンドノイズも高くなりません。サーモサイクラーやプログラム式水槽によりこの工程は自動化できます。

活性化後、固定細胞の凍結方法

活性化し、EDTA処理をした後BD FACS Lysing Solutionで固定した細胞は直接に-80 で凍結でき、機能の低下やバックグラウンドの上昇を招きません。フリージングメディウム(10% DMSO、1% FBS入りPBS)を使用する必要はありません。凍結することにより異なるステージのサンプルを、その後の染色や測定において同時にバッチ処理できます。

溶血および細胞膜浸透化処理後の細胞の遠心について

BD FACS Lysing Solutionで処理すると、細胞は生細胞に比べ浮上しやすくなります。この影響は、更に細胞膜浸透化処理をした後は強くなります。従って、より高い遠心力で遠心分離することが必要です(500 \times g)。凍結融解操作中、10 mL以上の容積を遠心分離する場合には、遠心時間を10分に延長すると良好なペレットを得ることができます。

上清の除去

遠心力を増強したとしても、固定し細胞膜浸透化処理をした細胞はタイトなペレットを形成しません。そのため、上清のアスピレーションは、十分に気をつけないと細胞のロスを引き起こします。従って、BDは試験管を1本ずつ上清をデカントすることを推奨しています。試験管の上部に付着した水滴は軽く振り取り除きます。

染色に使用する血液量について

HIV感染に関する研究の場合にはCD4数を受容せざるを得ず、全血100 μ LはCD4⁺ T細胞の応答をみるためには十分ではないでしょう。このような場合、200 μ L以上の全血が必要になります。多くの経験があるわけではありませんが、BD Biosciencesでは現在のプロトコルは1000 μ Lの全血でも染色できることを調べました。その場合は、BD FACS Lysing Solutionの量もサンプル量の増加に従って、増やす必要があります。その他の試薬は必ずしもそうではありません。このプロトコルの変更は測定性能が確保されることをユーザーが確認した上で行なってください。

染色モノクローナル抗体の選択

細胞内染色に使用する抗体は、あるエピトープに対し高い親和性と特異性を有し、そのエピトープは実際に使用した固定および細胞膜浸透化処理の条件下で失なわれてはいけません。他の抗体をBD FastImmune kitに加える場合は、それらの抗体をBD FACS Lysing Solutionによる処理の前に加える必要があります。

CD4およびCD8はCD4およびCD8の弱陽性細胞を陰性集団からよりよく見分けられるように、PerCP-Cy5.5標識しています。

データ取り込みと解析

BD FACS フローサイトメーターで解析します。以下代表的なデータを示している図は、全血を対象とし488 nmと635 nmのデュアルレーザー励起を利用したBD FACS フローサイトメーターで解析したものです。

使用する前にBD CaliBRITEビーズと適切なソフトウェア(BD FACSComp、バージョン4.2以上)を使って光電子倍增管(PMT)電圧および蛍光補正のセッティング、および装置の感度チェックを行ないます。フローサイトメーターのセットアップ、取り込み、解析については、BD CaliBRITEビーズ使用説明書およびソフトウェア・ユーザーズガイドを参照してください。

BD FACSCompを使用する場合に、lyse/no-wash(LNW)セットアップを使用すると、細胞内サイトカイン染色にほぼ適切なセッティングを可能にします。機器のセットアップをマニュアルで実施することもできます。その場合は、アインタイプコントロールで染色したサンプルおよび陽性サンプルを使用します。FL1、2、3および4の蛍光強度が強い場合は、PMT電圧を調整してください。単一の蛍光色素で染色された個別のサンプル(例えばCD8 FITC、CD8 PE、CD8 PerCP-Cy5.5 およびCD8 APC)を使って、蛍光コンペーンションをセッティングすることもできます。PMT電圧を変更した場合には必ず蛍光コンペーンションの再調整をする必要があります。これは、PMT電圧の調整を常に必ず最初に行なわなければならないということです。実験に合わせ適切に調整したら、セッティングファイルを保存し、その後の実験の際には、ファイルを呼び出し微調節するだけで使用できます。

BD FastImmune CD8 Kit

(Anti- $\text{INF-}\gamma$)(図2参照)

1. 前方散乱光(FSC)Thresholdを利用して、BD CellQuest Pro™ ソフトウェア、またはBD CellQuest ソフトウェアによりデータを取り込みます。取り込みの時にCD3 vs CD8ドットプロットを作成します(図2)。CD3⁺ CD8⁺ リンパ球にリージョンを作成します(R1)。更に、FSC vs SSCドットプロットを作成し、リンパ球周辺にリージョン(R2)を作成します。GatesメニューのGate Listを使用してロジカルゲートG3(G3 = R1 and R2)を作成します。G3に入る最低20,000イベントを取り込みます。
2. BD CellQuest Proソフトウェア、BD CellQuestソフトウェアによりデータを解析します。右のデータはAnti-Hu- $\text{INF-}\gamma$ vs CD69ドットプロットにより、サイトカイン産生細胞を決定しています。ドットプロットはははすべて、データ取り込みで使用したCD3⁺ CD8⁺と散乱光で定義されたG3でゲートされたイベントです。
3. 統計計算値を得るには、陽性コントロール(SEB等)のCD69およびAnti-Hu- $\text{INF-}\gamma$ のダブルポジティブ・イベントにリージョンを設定し、そのリージョンを被検サンプルに適用します。% Gatedの値はCD3⁺ CD8⁺細胞におけるサイトカイン産生細胞の割合を示します。
留意: CD3^{dim} CD8^{dim}細胞を解析ゲートに含ませることは、サイトカイン産生細胞の検出に重要です。

BD FastImmune CD4 Kit

(Anti- $\text{INF-}\gamma$ 、Anti-IL-2、Anti-TNF- α)(図3参照)

1. 蛍光または前方散乱(FSC)Thresholdを利用して、BD CellQuest Proソフトウェア、またはBD CellQuest ソフトウェアによりデータを取り込みます。最低20,000イベントのCD4⁺リンパ球を取り込みます。取り込みの時にCD4 vs SSCドットプロットを作成します。CD4⁺リンパ球にリージョンを作成します(R1)。更に、FSC vs SSCドットプロットを作成し、リンパ球周辺にリージョン(R2)を作成します。R1 and R2に入る最低20,000イベントを取り込みます。
2. BD CellQuest Proソフトウェア、BD CellQuest ソフトウェアによりデータを解析します。サイトカイン vs CD69ドットプロットにより、サイトカイン産生細胞を決定します。
3. 統計計算値を得るには、陽性コントロール(SEB等)のCD69およびサイトカインのダブルポジティブ・イベントにリージョンを設定し、そのリージョンを被検サンプルに適用します。サイトカイン毎に、リージョンが異なることがあります。% Gatedの値はCD4⁺細胞におけるサイトカイン産生細胞の割合を示します。

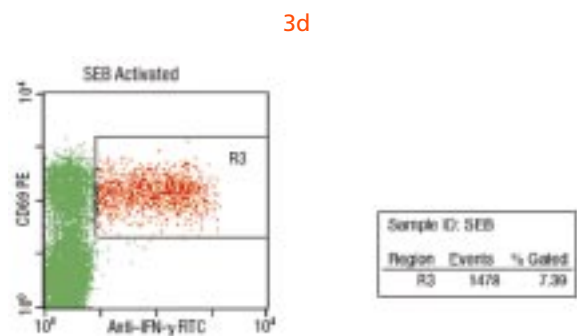
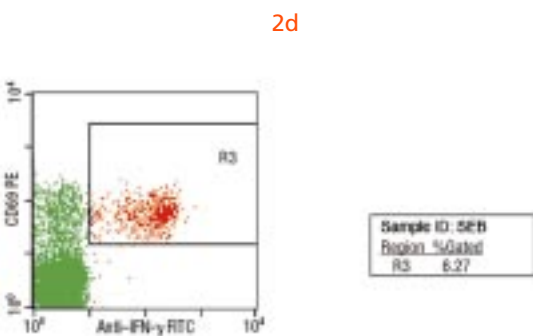
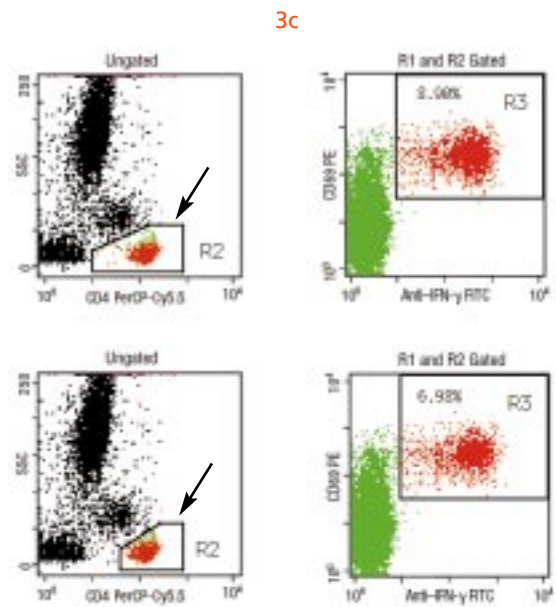
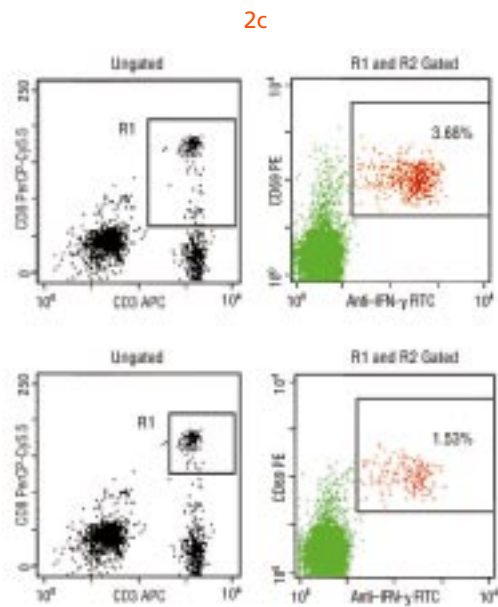
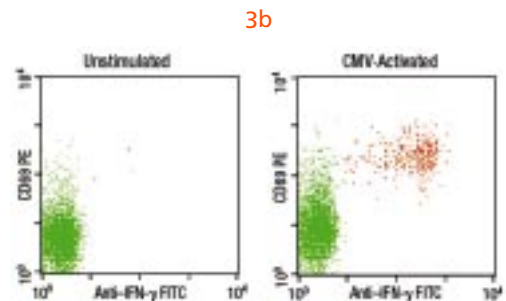
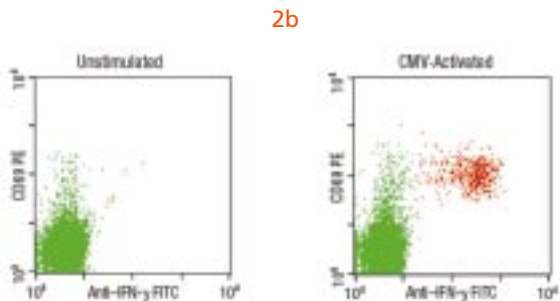
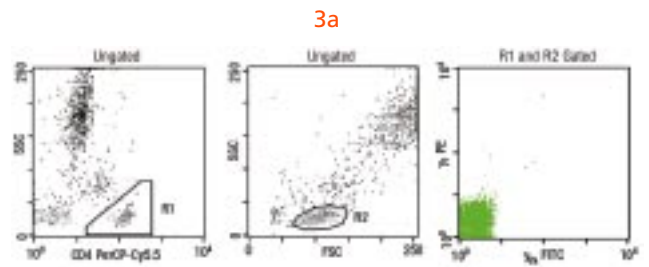
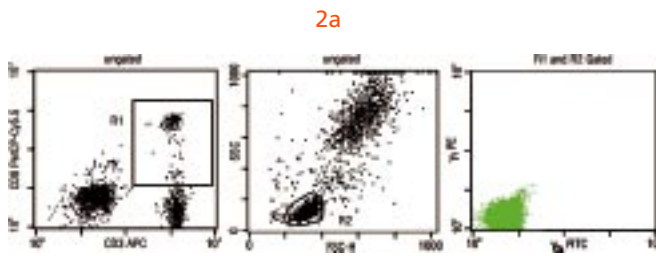


図2
BD FastImmune CD8 Kit
図2a ゲーティング方法とアイソタイプコントロール
図2b 非刺激およびCMV-刺激サイトカインFITC vs CD69ドットプロット
図2c サイトカイン産生細胞の検出にCD3^{dim} CD8^{dim}細胞を含めることの重要性
図2d SEB-活性化陽性コントロール

図3
BD FastImmune CD4 Kit
図3a ゲーティング方法とアイソタイプコントロール
図3b 非刺激およびCMV-刺激サイトカインFITC vs CD69ドットプロット
図3c SEB-活性化陽性コントロール
図3d サイトカイン産生細胞の検出にCD4^{dim} SSC^{high} CD3^{dim} CD8^{dim}細胞を含めることの重要性

データ解析のためのTips

ゲーティングは結果に影響を与え、特に稀なイベントのアッセイ結果に影響を与えます。BD FastImmune CD8 Kitの場合、CD3^{dim} CD8^{dim} 細胞をCD3 APC vs CD8 PerCP-Cy5.5プロットのゲートに含めることは、被検サンプル中の最適なサイトカイン産生イベントを検出するために重要です(図2)同様に、BD FastImmune CD4 Kitの場合、CD4 PerCP-Cy5.5 vs SSCプロットのゲートにCD4 dimリンパ球(SSC^{low})を含めることが重要です(図3)。活性化Tリンパ球はCD4やCD8をダウンモジュレートします。主要細胞集団からスメア状に分離されるこれら細胞は、活性化サンプル中の反応性リンパ球の多くを含んでいる可能性があります。

BD FastImmune CD4 Kitでは、CD4^{dim}であるがSSC^{high}である単球を除外することも重要です。単球と活性化血小板は非特異的に蛍光標識抗体に結合し、バックグラウンドノイズを生じることがあります。サンプルによっては、これらを取り除くためのパラメーターを設定することで非特異的バックグラウンドノイズを下げるができます。この場合には、解析から排除する必要のある細胞サブセットに対する抗体の染色カクテルを利用します。取り込み時、ゲートは排除チャンネル試薬に対し陰性である細胞に合わせてセットします。これは取り込みに関する理論ゲートの一部として取り込まれます。免疫機能アッセイにおけるバックグラウンドで特に重要なものは活性化血小板と単球です。本アッセイでは、単球についてはCD33 APC(BD カタログ番号: 340474)、活性化血小板についてはCD62P APC(BD カスタム標識プログラムを通し入手できる)を使用し、バックグラウンドノイズを取り除いています。

ここでは陽性細胞のイベント領域の特定には四分画蛍光マーカーではなく、リージョンを使用していますが、同じような結果は、四分画蛍光マーカーから得ることもできます。陽性細胞のイベント領域は、陰性またはアインタイプコントロールのみを使用して定義するのではなく、むしろ陽性コントロールサンプル中の陽性細胞集団が観察される位置に従って設定することをお勧めします。

Calculating Specific Responses

刺激に対する細胞の特異反応は、活性化サンプル中の陽性イベント%から非刺激サンプルの陽性イベント%を差し引くことで得られます。特異反応は、通常、被検者ごと、サイトカインごとに異なります。

正常ドナー間でも同一抗原に対する反応に幅が見られます。図4は3例のCMV-血清陽性例のCMVに対する反応を示しています。TNF- α 、IFN- γ とIL-2に関するサイトカイン産生細胞は常に階層構造であることに注目してください。TNF- α 産生細胞が最も多く、次いでIFN- γ が僅差で続き、これに比べIL-2産生細胞は遙かに少なくなります¹²。IL-4、IL-5そしてIL-10を含むその他サイトカインを産生する細胞の頻度は多くありません。

このことは、CMV、HIV、ムンプスウイルスやTBおよびKLHの様な、私達が試験したすべての抗原について当てはまります。階層性は各種抗原に対する相対的な反応についても認められます。図5は3種類のウイルスに対し血清陽性な個人のIFN- γ 産生細胞の典型的な頻度を示しています。CMVに対する反応性はHIV(長期非進行型)に対するものより高く、そしていずれの反応性もムンプスウイルスに対する反応性に比べると高くなります。各種ヘルペスウイルスに関する相対細胞数の詳しい情報については参考文献10をご覧ください。HIVに対する反応性の詳しい情報については、参考文献17と21をご覧ください。

図4 CMV-血清陽性間のCMV抗原に対する反応性の違い

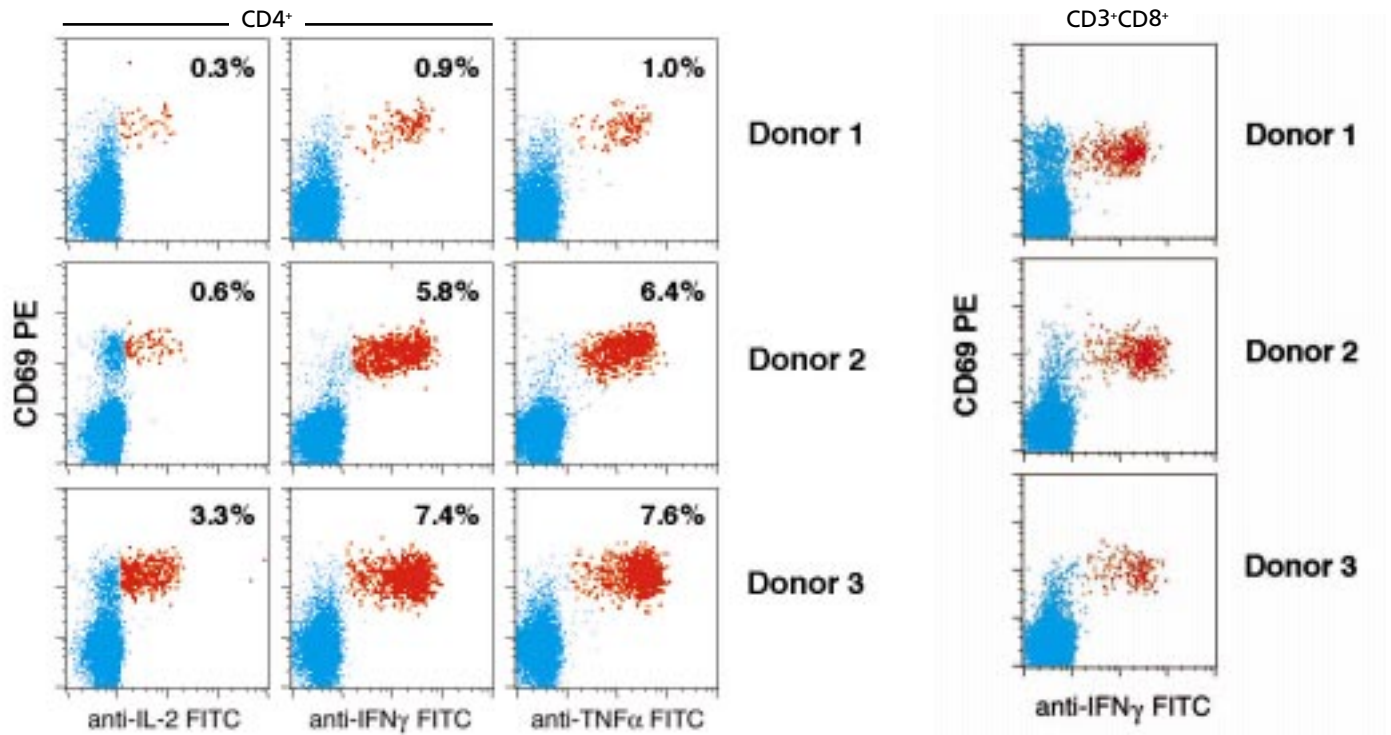
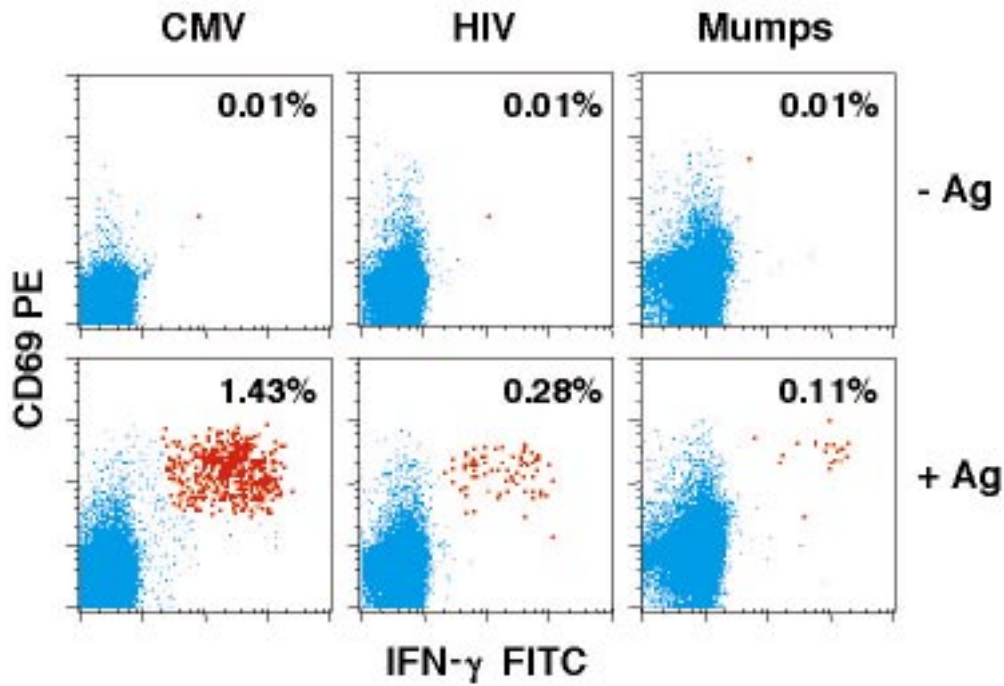


図5 異なる抗原に対するIFN- γ 産生CD4⁺細胞の割合



トラブルシューティング

次のトラブルシューティングは、本アッセイに関する問題について起こりえる原因の特定に役立ててください。

問題	考え得る原因	解決策	コメント
細胞回収率が低い	遠心分離が不適当	500 x gで最低5分間遠心する。	固定、透過処理した細胞は生細胞に比べ浮きやすいため、これら細胞についてはより強い遠心分離が必要。
	吸引による沈殿の損失	上清をデカントする。	細胞の沈殿は吸引により軟化し、容易にほぐれる。
	低CD4数 (例えばHIV感染サンプル)	サンプル血液当たり200 ~ 400 µLを染色する。	これに合わせてBD FACS Lysing Solutionの量を増やす。その他試薬については量調節は必要ない。
サイトカイン陽性細胞が無い	不適切な活性化、透過処理および/または染色、	この表の“サイトカイン陽性細胞数が低い”と“サイトカイン染色の強度が低い”の項を参照。	これらステップの陽性コントロールとして正常被験者についてSEB活性化を行なう。
	被験者の免疫能欠如	SEB活性化の様な陽性コントロールをつかって問題のドナーに免疫能があるか調べる。	
	不適切な採血時の抗凝固剤使用	ヘパリンナトリウム抗凝固剤のみを使用すること。ヘパリンリチウムは使用しない。ACD、EDTAまたはその他カルシウムキレート抗凝固剤は使用しない。	リンパ球の活性化にはカルシウムが必要；カルシウムキレート型抗凝固剤は活性化を妨害する。
サイトカイン陽性細胞数が少ない	不適切な活性化	抗原のカパシメーター測定を行い刺激に最適な量を見つける。	抗原カパシメーター測定と活性化のカイネティクスの詳細情報については参考文献7を参照。本表中の“サイトカイン染色の強度が低い”の項も参照。
		新しい小分けBFA希釈体を使用し、小分けBFAは-20°Cに保存する。	抗原が可溶フォームで使用される場合、複雑な抗原の処理、およびホストのClass I-MHC分子上の適切なペプチド・エピトープの提示は非能率的です。最適なClass I 拘束性CD8T細胞の反応は、全血またはPBMCへの外因性のペプチドあるいはペプチドの追加によって得られます。
サイトカイン染色の強度が低い	透過処理および/または染色が不適切	BD FACS Lysing SolutionおよびBD FACS Permeabilizing Solution 2を蒸留水にて10倍に希釈し、室温で使用する。	BD FACS Lysing SolutionまたはBD FACS Permeabilizing Solution 2をPBSまたはその他緩衝液で希釈しない。
		上清デカント後にチューブを1~2回振って、洗浄後の残存液量を最小にする。	BD FACS Permeabilizing Solution 2または染色mAbの過剰希釈を防ぐためには残存液量を約100 µL以下にする必要がある。
		500 µL/サンプルのBD FACS Permeabilizing Solution 2を使用し、室温10分間処理する。	BD FACS Lysing SolutionおよびBD FACS Permeabilizing Solution 2は室温で使用しなければならず、すべての反応は室温でおこなわなければならない。
		よくボルテックスし細胞をBD FACS Permeabilizing Solution 2に再懸濁する。	
非染色サンプルのバックグラウンドが高い	補正の不良	FACSCompソフトウェアを利用してセットアップするか、LNWを利用するか、または各蛍光色素で個別染色した細胞を使いマニュアル補正を行なう。	補正が不良な場合、実際には特定マーカーについて単独陽性である細胞が二重陽性として表現されることがある。
		不正確なゲーティング	小リンパ球集団のみを含む様に注意深くFSC対SSCゲート調整を行なう。
	CD4 vs SSCドットプロットで、CD4 ^{dim} リンパ球を含めるが、多給、血小板、死リンパ球は排除する様に注意深くゲート設定を行なう。	活性化リンパ球はCD4をCD4 ^{dim} にダウンモジュレーションする。単球はCD4 ^{dim} であるがリンパ球に比べ高いSSCを持つ。非特異的染色を防ぐために、単球や血小板を除く必要がある。	
	CD8 vs CD3ドットプロットで、CD8 ^{dim} CD3 ^{dim} リンパ球に注意深くゲート設定を行なう。	活性化リンパ球はCD8をCD8 ^{dim} にダウンモジュレーションする。	
	CD33 APC + CD62P APCを利用し、単球や活性化血小板の排除を簡便化する(BD FastImmune CD4 kitの場合のみ)	活性化血小板はリンパ球に結合できるので、これを区別するためには追加マーカーが必要である。排除チャンネルに関する情報については参考文献6を参照のこと(BD FastImmune CD4 kitの場合のみ)	
十分なCD4 ⁺ イベントの取り込みに長時間かかる。	取り込み前固定ステップでのサンプル希釈が過剰	取り込み前の細胞希釈は最小量(200 µL以下)で行なう。	サンプルを測定する時の細胞損失を防ぐために、サイトメーターをスタンバイにセットしてからサンプルをかけ、すばやく取り込みをクリックしてサイトメーターをRunに戻す。
	細胞回収率が不良であるか、またはサンプル中のCD4 ⁺ 細胞数が限定されている	本表の“細胞回収率が低い”の項を参照。	

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。

抗原特異的細胞への細胞内サイトカイン染色の応用は、BD アプリケーションノート Detection of Intracellular Cytokines in Activated Lymphocytesに概要が示されている一般的な方法を発展させたものです。このアプリケーションノートには酢酸12-ミリスチン酸ホルポール(PMA)+オノマイシン(PMA+I)やSEBの様なポリクローナルな活性化剤を利用する場合の条件が記載されており、また本技術に関する有益な背景情報が提供されています。

BrdU染色との適合性

分離PBMCと長時間インキュベートすることで、増殖をサイトカイン産生から調べることができます。この作業はBrdU取り込みと抗-BrdU抗体による染色を利用し実施されます。BDは抗-BrdUモノクローナル抗体とDNaseを組み合わせた、そしてPBMCでの作業に最適なユニークな製品を提供しております(BD カタログ番号: 340649)BD アプリケーションノート、Simultaneous Detection of Proliferation and Cytokine Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cellsならびに参考文献18を参照してください。

* 米国特許第4,654,312号; 第4,902,613号; および第5,098,849号

† 特許—PEおよびAPC: 米国特許第4,520,110号; 第4,859,582号; 第5,055,556号; 欧州特許第76,695号; カナダ特許第1,179,942号; PerCP: 米国特許第4,876,190号; Cy: 米国特許第5,268,486号; 第5,486,616号; 第5,569,587号; 第5,569,766号; 第5,627,027号

‡ 免疫制御状態をモニタリングすることを目的とした、単核球サブセット上に発現された活性化抗原を測定することへのこれら製品の利用は以下の特許の1以上のクレームに基づき実施される: 米国特許第5,445,939号、5,656,446号、第5,834,689号; 欧州特許第319,543号; カナダ特許第1,296,622号; オーストラリア特許第615,5880号; および日本国特許第2,769,156号。

§ 米国特許第5,224,058号

参考文献

1. Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*. 1996;274:94-96.
2. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998;8:177-187.
3. Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*. 1983;65:109-121.
4. Hutchings PR, Cambridge G, Tite JP, Meager T, Cooke A. The detection and enumeration of cytokine-secreting cells in mice and man and the clinical application of these assays. *J Immunol Methods*. 1989;120:1-8.
5. Suni MA, Picker LJ, Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1998;212:89-98.
6. Nomura LE, Walker JM, Maecker HT. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4+ T cells. *Cytometry*. 2000;40:60-68.
7. Ghanekar SA, Nomura LE, Suni MA, Picker LJ, Maecker HT, Maino VC. Gamma interferon expression in CD8+ T cells is a marker for circulating cytotoxic T lymphocytes that recognize an HLA A2-restricted epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein pp65. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2001;8:628-631.
8. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998;188:2205-2213.
9. Lee PP, Yee C, Savage PA, et al. Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nat Med*. 1999;5:677-685.
10. Asanuma H, Sharp M, Maecker HT, Maino VC, Arvin AM. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis*. 2000;181:859-866.
11. He X-S, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, et al. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:5692-5697.
12. Komanduri KV, Viswanathan MN, Wieder ED, et al. Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat Med*. 1998;4:953-956.
13. Maino VC, Picker LJ. Identification of functional subsets by flow cytometry: intracellular detection of cytokine expression. *Cytometry*. 1998;34:207-215.
14. Maino VC. Rapid assessment of antigen induced cytokine expression in memory T cells by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol*. 1998;63:199-207.
15. Maino VC, Suni MA, Wormsley SB, Carlo DJ, Wallace MR, Moss RB. Enhancement of HIV type 1 antigen-specific CD4+ T-cell memory in subjects with chronic HIV type 1 infection receiving an HIV type 1 immunogen. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2000;16:539-547.
16. Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, Picker LJ. Normal human CD4+ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol*. 1998;161:5284-5295.
17. Pitcher CJ, Quittner C, Peterson DM, et al. HIV-1-specific CD4+ T cells are detectable in most individuals with active HIV-1 infection, but decline with prolonged viral suppression. *Nat Med*. 1999;5:518-525.
18. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T-cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest*. 1997;99:1739-1750.
19. *Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue: Tentative Guideline*. Villanova, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1991. NCCLS document M29-T2.
20. *Clinical Applications of Flow Cytometry: Quality Assurance and Immunophenotyping of Lymphocytes; Approved Guideline*. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 1998. NCCLS document H42-A.
21. Suni MA, Ghanekar SA, Houck DW, et al. CD4+ CD8dim T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. *Eur J Immunol*. 2001;31:2512-2520.
22. Maecker HT, Dunn HS, Suni MA et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2001;255:27-40.
23. Maecker HT, Ghanekar SA, Suni MA, He X-S, Picker LJ, and Maino VC. Factors affecting the efficiency of CD8+ T cell cross-priming with exogenous antigens. *J Immunol*. 2001;166:7268-7275.
24. Mehta BA, Maino VC. Simultaneous detection of DNA synthesis and cytokine production in staphylococcal enterotoxin B activated CD4+ T lymphocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1997;208:49-59.

64-081-00
R0-0211-001-996

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

