

## ヒトPBMCにおける細胞内サイトカイン検出

T細胞により産生されるサイトカインは細胞間情報伝達物質として機能し、細胞の分化や増殖、活性化、炎症の制御など多様な領域において重要な役割を果たしています。フローサイトメーターを用いた細胞内サイトカイン解析では、細胞膜抗原 (CD3, CD4, CD8a) を用いた細胞サブセットの解析やCD69の発現増加による細胞活性化の評価もシングルセルレベルで同時に測定することが可能です。ここでは、CyFlowシリーズのフローサイトメーターを用いた細胞内サイトカイン検出の例をご紹介します。

### 試薬・装置

- ・ Anti-human IFN $\gamma$  抗体 eFluor<sup>®</sup> 450 (Affymetrix eBioscience; clone 4S.B3)
- ・ Anti-human TNF $\alpha$  抗体 PE (Affymetrix eBioscience; clone MAb11)
- ・ Anti-human IL-2 抗体 Brilliant Violet 510<sup>™</sup> (BioLegend; clone MQ1-17H12)
- ・ Anti-human CD69 抗体 FITC (Affymetrix eBioscience; clone FN50)
- ・ Anti-human CD4 抗体 APC (Affymetrix eBioscience; clone SK3)
- ・ Anti-human CD8a 抗体 PE-Cy7 (Affymetrix eBioscience; clone SK1)
- ・ Anti-human CD3 抗体 Alexa Fluor<sup>®</sup> 700 (Affymetrix eBioscience; clone UCHT1)
- ・ Fixable Viability Dye eFluor<sup>®</sup> 780 (Affymetrix eBioscience)
- ・ Human BD Fc Block (BD Biosciences)
- ・ Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set (Affymetrix eBioscience)
- ・ Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma)
- ・ Ionomycin (Sigma)
- ・ Brefeldin A solution (Affymetrix eBioscience)
- ・ フローサイトメーター (対応可能機種): CyFlow Space  
(上記以外の蛍光色素の組合せによってはCyFlow Cube8でも対応可)

### サンプル調製・測定

採取したヒト全血から抽出した末梢血単核球 (PBMC) を PMA および Ionomycin で刺激して 12 時間培養し、その後 Brefeldin A を添加して 4 時間培養しました (培地: RPMI-1640, 10% FBS)。PBMC を再度回収して Human BD Fc Block を用いて定常領域レセプター (FcR) をブロックした後、Fixable Viability Dye および表面抗原 (CD3, CD4, CD8a, CD69) に対する蛍光標識抗体で染色しました。その後、Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set により固定・膜透過処理を行い、サイトカイン (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2) 認識抗体にて染色し、フローサイトメーター CyFlow Space で測定を行いました。

結果

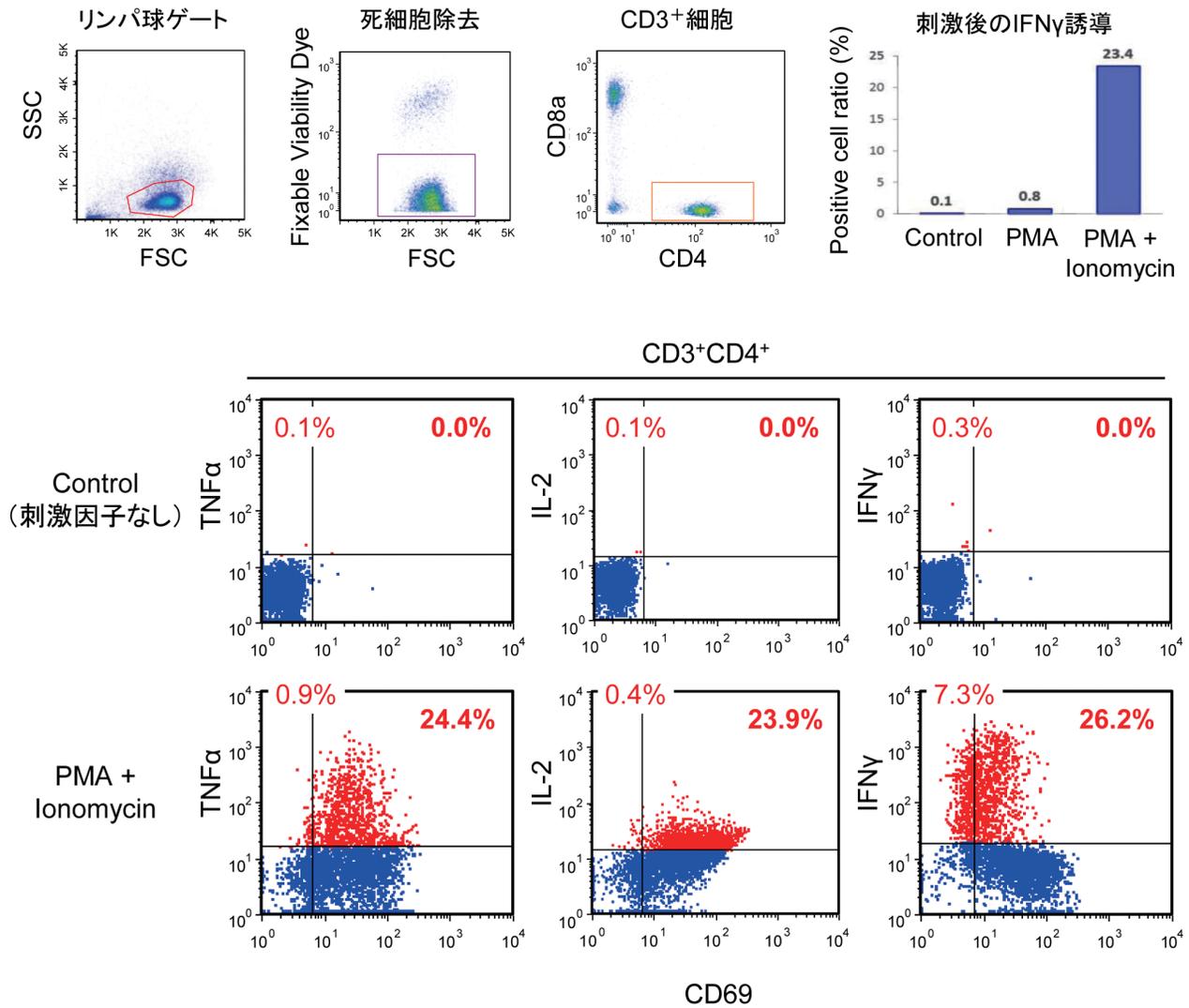


図1 ヒトリンパ球のサブセット解析とPMAおよびIonomycinによる刺激で誘導されたサイトカインの検出

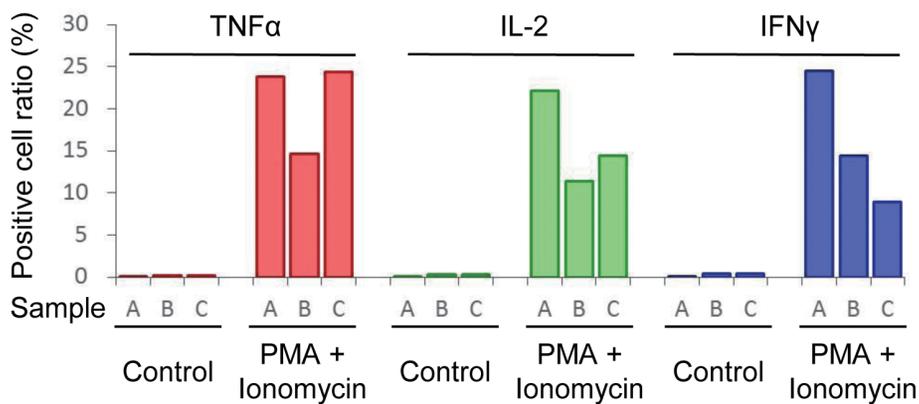


図2 PMAおよびIonomycinによる刺激で誘導されたサイトカイン産生のサンプル間比較

発行：シスメックス株式会社 R&I事業本部 事業企画部 細胞計測事業推進課

リレーションセンター 神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241 Tel 078-992-6272 Fax 078-991-2317  
 東京支社 東京都品川区大崎1-2-2 〒141-0032 Tel 03-5434-8556 Fax 03-5434-8557

<http://www.systemex-fcm.jp>

本誌の内容を無断で複写・複製・転写すると、著作権・出版権の侵害となることがありますのでご注意ください。