



Printed: April 2015 ver. 1

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

*non-R1 method*  
*for the sensitive detection and quantification*  
*of cell-mediated cytotoxicity*

# **IMMUNOCYTO**

## **Cytotoxicity Detection Kit**

CODE No. AM-1005M



MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.  
URL <http://ruo.mbl.co.jp>  
e-mail [support@mbi.co.jp](mailto:support@mbi.co.jp), TEL 052-238-1904

## はじめに

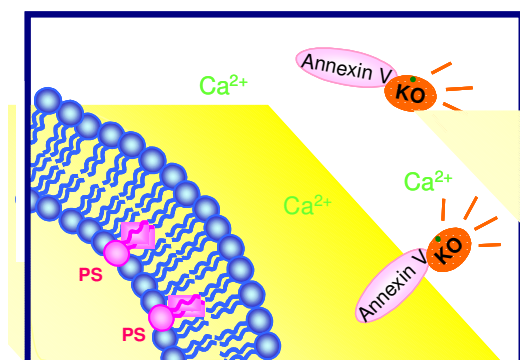
ウイルス感染細胞や腫瘍細胞などの細胞(target 細胞)は、細胞傷害性活性を持つ T 細胞や NK 細胞(effector 細胞)により直接認識され、傷害が起こります。この細胞傷害性活性を測定する方法として、一般的には  $^{51}\text{Cr}$  遊離試験(クロムリリースアッセイ)が広く利用されています。しかし、放射性同位元素(RI)を使用するため、使用には一定の制限があります。そこで、**RI を用いないで、細胞傷害性活性を測定するための方法(Non-RI 法)**が考案されています。

IMMUNOCYTO Cytotoxicity Detection Kit は、target 細胞を CFSE と Kusabira-Orange 標識 Annexin V で二重染色し、フローサイトメリーによって細胞傷害性活性を測定する試薬です。CFSE 染色された target 細胞のうち、Annexin V 染色された細胞の割合、つまり死細胞の割合で、effector 細胞の細胞傷害性活性を測定します。effector 細胞は CFSE で染色されていないため、フローサイトメリーにより簡単に区別して解析することができます。この方法は、クロムリリースアッセイと高い相関性が報告されており、RI を使用せずに細胞傷害性活性を測定できる方法として利用されています。

## Annexin V とは

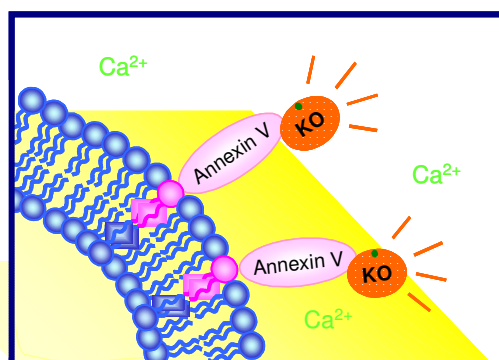
脂質二重層の内側に存在している phosphatidylserine (PS)は、アポトーシスをおこした細胞では、膜構造の変化により細胞表面に露出します(下図)。Annexin V は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で PS に対して強い親和性をもつため、アポトーシス細胞に結合します。蛍光標識した Annexin V を用いる事で、effector 細胞により傷害された target 細胞をフローサイトメリーにて検出することが可能です。

生細胞



生細胞のPSは細胞表面に露出していないので、Annexin Vとは結合しません。

アポトーシス初期の細胞



アポトーシスを起こした細胞では、膜構造が壊れ、PSが細胞表面に露出して、Annexin Vと結合します。

### Kusabira-Orange とは

クサビライシサンゴよりクローニングされた蛍光蛋白質で、以下に示した蛍光特性があります。

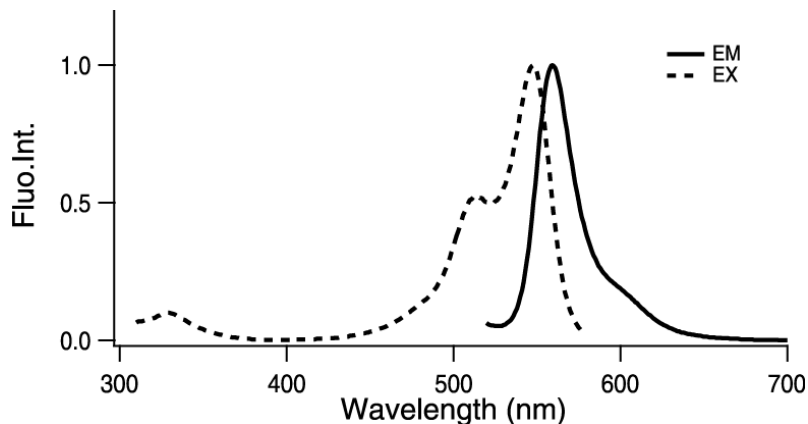
励起極大波長 548 nm, 蛍光極大波長 559 nm

(参考:PE 励起極大波長 564 nm, 蛍光極大波長 575 nm)

Extinction Coefficient ( $M^{-1} cm^{-1}$ ); 51,600 (548 nm)

Fluorescence Quantum Yield; 0.6

pH sensitivity; pKa=5.0



本キットに用いられている蛍光タンパク質単量体 Kusabira-Orange は、独立行政法人 理化学研究所 脳科学総合研究センター 細胞機能探索技術開発チーム(宮脇敦史チームリーダー)との共同研究で開発されたものであり、MBL が実施権を有しています。

### CFSE とは

CFSE: 5(and 6)-carboxy fluorescein diacetate succinimidyl ester

蛍光色素として長時間細胞内にとどまるので、動的挙動を長期的に観察するトレーサーとして用いられます。CFSE 自身は蛍光性を持ちませんが、細胞に取り込まれた CFSE は細胞内のエステラーゼ活性によってアセチル基が加水分解され、フルオレセインが持つ強い蛍光を示すようになります。この性質を利用して target 細胞を標識します。

標識後の蛍光特性: 励起極大波長 496 nm, 蛍光極大波長 516 nm

## キット構成

CODE No. AM-1005M 50 tests

Materials	Quantity
Annexin V-Kusabira-Orange (Kusabira-Orange 標識アネキシン V)	120 $\mu$ L x 1 vial
CaCl <sub>2</sub> (100 mM) (塩化カルシウム)	1 mL x 1 vial
Binding buffer	25 mL x 2 bottles

**\*本製品には CFSE は含まれておりません。**

## 保存法

2~8°Cで遮光保存してください。

製品有効期限は、キットに貼られているラベルをご確認下さい。

## 使用上または取扱上の注意

1. 本品は研究用試薬です。ヒトの体内に用いたり、診断目的に使用しないで下さい。
2. Annexin V-Kusabira-Orange には、0.09%アジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは、酸性条件下でアジ化水素酸という強力な毒性化合物を産生します。また金属配管に堆積されますと爆発性のアジ化合物が産生されることがありますので流水でよく洗い流して廃棄してください。皮膚や目に入った場合には十分量の水で洗い流してください。

## 準備するもの

- CFSE
- PBS
- 試験管(フローサイトメトリー用)
- 卓上遠心機
- マイクロピペット、使い捨てチップ
- 96-well 丸底マイクロプレート
- 15 mL と 50 mL の培養用遠心チューブ
- 牛胎児血清 (FCS)
- 培地 (10% FCS/50 IU/mL IL-2/RPMI-1640 など)
- Wash buffer (2% FCS/PBS)
- フローサイトメーター

## CFSE の調製

CFSE は水溶液中での安定性が低いため、キットには含まれておりません。

市販品をご用意下さい。

例) 株同仁化学研究所 1 mg Cat. No. 341-07401

1 mM になるように DMSO で溶解後、凍結融解の繰り返しを極力避けるため、少量ずつ分注して-20℃にて保存して下さい。

1 mM CFSE は、PBS で 100 倍希釈(10 μM)して使用します。

(用時調製、例: 1 mM CFSE 10 μL に 990 μL の滅菌 PBS を加えて下さい。)

## target 細胞の調製例(ヒト由来 target 細胞のペプチドパルス処理)

- 1) target 細胞(～10<sup>7</sup> 個)を 50 mL 培養用遠心チューブに分取して適量の Wash buffer (2% FCS/PBS)を加え、400 x g で5分間遠心して上清を除去します。
- 2) チューブを指で弾いてよく細胞をほぐし、Wash buffer を 40～50 mL 加えて 400 x g で 5 分間遠心して上清を除去します。
- 3) 再度 400 x g で 1 分間程度遠心し、残った Wash buffer をマイクロピペットを使って注意深く取り除きます。

**注意:** 血清成分が残存しているとペプチドパルスの効率が低下する恐れがあります。

- 4) 1 mL のペプチドパルス用培地(50 μM 2-ME/RPMI-1640)を加え穏やかに細胞をほぐします。
- 5) 10～20 mg/mL の濃度で DMSO に溶解したペプチド溶液を、RPMI-1640 等で 1 mg/mL に濃度調整し、これを 10 μL 加えます(最終ペプチド濃度 10 μg/mL)。至適濃度は、MHC 型とペプチドの種類によって異なりますので、条件検討を実施される事をお勧めします。
- 6) 室温で 40～60 分間培養します。10 分毎に手でチューブを軽く振盪させます。
- 7) Wash buffer あるいは培地を過剰量(40～50 mL)加え、倒立攪拌します。
- 8) 400 x g で 5 分間遠心して上清を除去します。チューブを指で弾いてよく細胞をほぐします。
- 9) step 7)～8) を最低 4 回以上繰り返します。  
**注意:** MHC に結合しなかったフリーのペプチドが溶液中に残存した場合、正確な結果が得られない可能性があります。
- 10) 適量の培地に懸濁し、細胞数を数えます。

## 操作法

### CFSE による target 細胞の標識

1. target 細胞(あるいはペプチドパルスした target 細胞)を PBS で 3 回洗浄し、 $2.5 \times 10^6$  個/mL となるように PBS に懸濁します。
2. 1 mL の target 細胞を 15 mL 培養用遠心チューブに移します。
3. PBS で希釈調整した 10  $\mu$ M CFSE を 10  $\mu$ L 添加して(最終濃度 0.1  $\mu$ M) 攪拌後、室温で 10 分間反応します。
4. 牛胎児血清(FCS)を 1 mL 加えて攪拌し、PBS を 10 mL 加えます。
5. 400 x g で 5 分間遠心して上清を除去し、細胞をよくほぐした後、PBS を 10 mL 加えて洗います。
6. 400 x g で 5 分間遠心して上清を除去します。

### target 細胞と effector 細胞の共培養

7. target 細胞を  $10^6$  個/mL となるように培地に懸濁し、96-well 丸底マイクロプレート 1 well あたり 100  $\mu$ L 加えます。effector 細胞を target 細胞に対して一定の割合となるように調製し、1 well あたり 100  $\mu$ L 加えます。  
\*effector 細胞集団の検出が可能な MHC tetramer 試薬が存在する場合は、予め MHC tetramer 試薬を用いて陽性率を算出し、target 細胞との混合比率を調整することをお勧めします。
8. よくピペッティングして、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて 37°C で 5 時間培養します。

### Annexin V-Kusabira-Orange による染色

9. 適量の FCM buffer (2% FCS/0.05% NaN<sub>3</sub>/PBS)にて細胞を洗います。  
\*培養後、細胞の洗浄を行わない場合は well から細胞をフローサイトメリー用の試験管に移し、塩化カルシウム溶液(100 mM)を 2  $\mu$ L を加え、続けて Annexin V-Kusabira-Orange を 2  $\mu$ L 加えて室温で 20 分間反応して、すぐにフローサイトメリーにて解析を行います。
10. 400 x g で 5 分間遠心して上清を除去し、200  $\mu$ L の Binding buffer に細胞を懸濁します。
11. Annexin V-Kusabira-Orange を 2  $\mu$ L 加えます。
12. 室温で 20 分間反応して、すぐにフローサイトメリーにて解析を行います。  
\*反応後は Binding buffer にて液量を調整して下さい。

## データの解析

測定機器の使用法に従い適切なパラメーター設定を行って下さい。

13. フローサイトメーターに取り込んだ細胞集団を FSC-H 及び CFSE (FL1-H) でドットプロット展開します。
14. 【測定例】の取り込みデータを参考に CFSE 陽性の生細胞集団にゲート (R1) を設定します。R1 ゲートで取込み細胞数を一定にする設定での取込みをお勧めします。
15. R1 ゲートの細胞集団を、Annexin V-Kusabira-Orange (FL2-H) 及び CFSE (FL1-H) でドットプロット展開します。
16. 適切な位置にクワドラントを設定し、Annexin V-Kusabira-Orange 陽性かつ CFSE 陽性の細胞割合 (%) を算出します。

細胞傷害性活性は以下の計算式によって求めます。

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = [ (ET - T_0) / (100 - T_0) ] \times 100$$

ET = target 細胞と effector 細胞を共培養したときの、  
CFSE 陽性細胞集団中の Annexin V 陽性細胞率

T<sub>0</sub> = target 細胞のみを培養したときの、  
CFSE 陽性細胞集団中の Annexin V 陽性細胞率

## 参考文献

- 1) Tanaka, Y. *et al.*, *Immunol. Lett.* **158**, 120-125 (2014)
- 2) Tanaka, Y., *et al.*, *Cancer Res.* **70**, 6171-6192 (2010)
- 3) Aubry, J.P., *et al.*, *Cytometry* **37**, 197-204 (1999)

## 関連製品

4844	IMMUNOCYTO CD107a Detection Kit	50 tests
8223	IMMUNOCYTO IFN- $\gamma$ ELISPOT Kit	for 96-well x 2 plates

T-Select MHC Tetramer 試薬、CTL誘導用ペプチド等の製品ラインナップ、MHC Tetramer 試薬のカスタム合成に関しましては、弊社ホームページ (<http://ruo.mbl.co.jp>) よりご確認下さい。

## 発売元

株式会社 医学生物学研究所

愛知県名古屋市中区栄4丁目5番3号 KDX 名古屋栄ビル 10階

**【測定例】**

HLA-A\*2402 拘束性 EBV BRLF1 特異的な CTL ラインを用いた細胞傷害性活性の測定例

effector 細胞 : HLA-A\*2402 拘束性 EBV BRLF1 ペプチド(TYPVLEEMF)を用いて社内健康人末梢血から誘導した CTL ライン。

(①, ③)に添加)

target 細胞 1 : HLA-A\*2402 を保持する LCL に、EBV BRLF1 ペプチド(TYPVLEEMF)をパルス後 CFSE 標識した細胞。

(①, ②)に添加)

target 細胞 2 : HLA-A\*2402 を保持しない LCL に、EBV BRLF1 ペプチド(TYPVLEEMF)をパルス後 CFSE 標識した細胞。

(③, ④)に添加)

target 細胞 1 を用いた実験結果

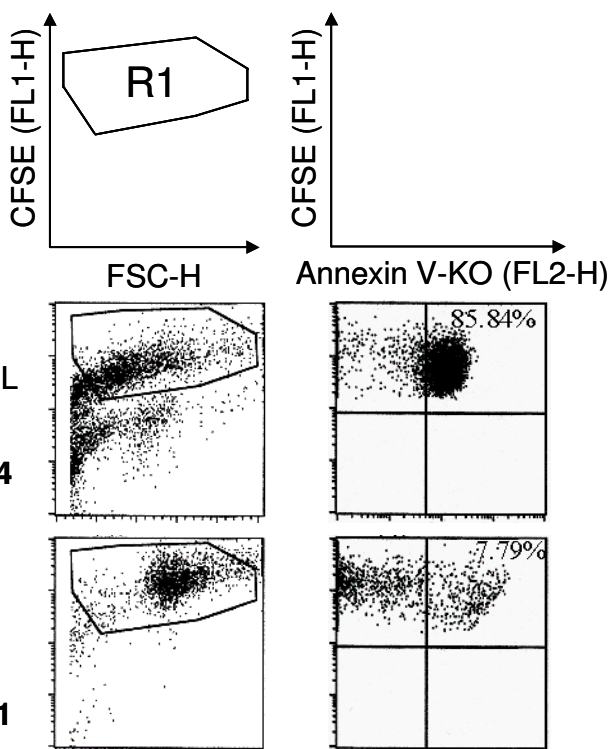
HLA-A\*2402 拘束性 EBV BRLF1 ペプチド特異的 CTL は、HLA-A\*2402 を保持する target 細胞 1 に対して細胞傷害性活性を示した。

**Cytotoxicity: 84.64%**

E: A\*2402 EBV BRLF1 CTL line  
T: BRLF1 peptide pulsed HLA-A24 LCL

① E:T = 1:4

② E:T = 0:1



細胞傷害性活性は以下の計算式に従って計算した。

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{[ET - T_0]}{[100 - T_0]} \times 100 = \frac{[85.84 - 7.79]}{[100 - 7.79]} \times 100 = 84.64$$



target 細胞 2 を用いた実験結果

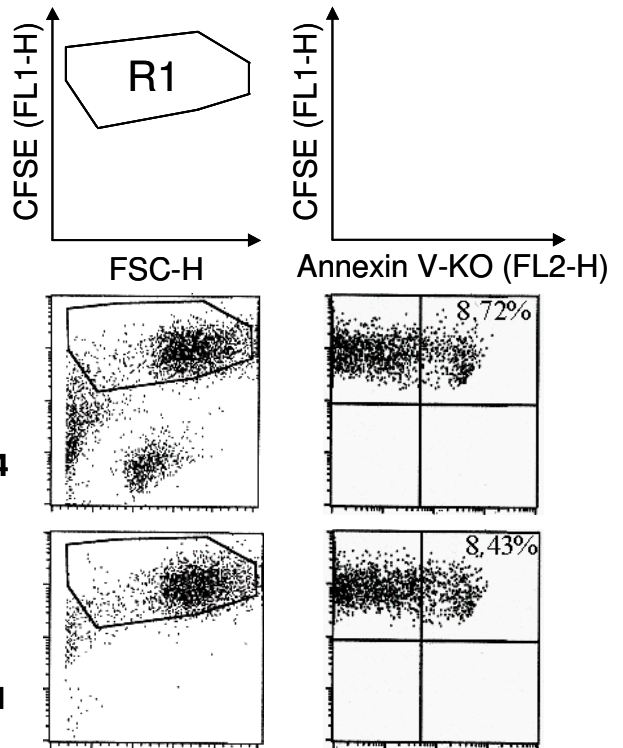
HLA-A\*2402 拘束性 EBV BRLF1 ペプチド特異的 CTL は、HLA-A\*2402 を保持しない target 細胞 2 に対して細胞傷害性活性を示さなかった。

**Cytotoxicity: 0.32%**

E: A\*2402 EBV BRLF1 CTL line  
T: BRLF1 peptide pulsed HLA-A2 LCL

③ E : T = 1 : 4

④ E : T = 0 : 1



細胞傷害性活性は以下の計算式に従って計算した。

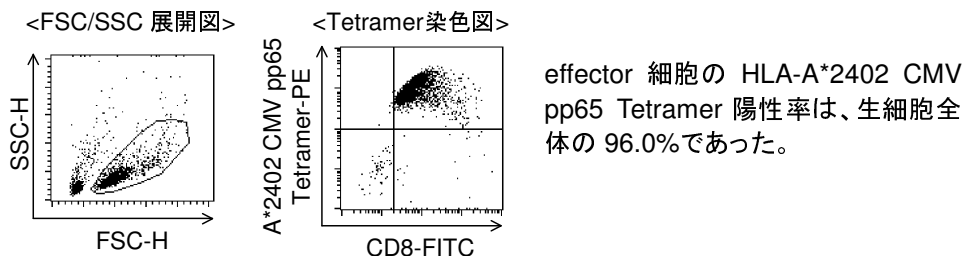
$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{[(ET-T_0)/(100-T_0)] \times 100}{100} = \frac{(8.72 - 8.43)}{(100 - 8.43)} \times 100 = 0.32$$

**【解析例 1】**

HLA-A\*2402 拘束性 CMV pp65(QYDPVAALF) 特異的な CTL ラインを用いた細胞傷害性活性の解析

\*データの測定は、【測定例】に示したように行った。

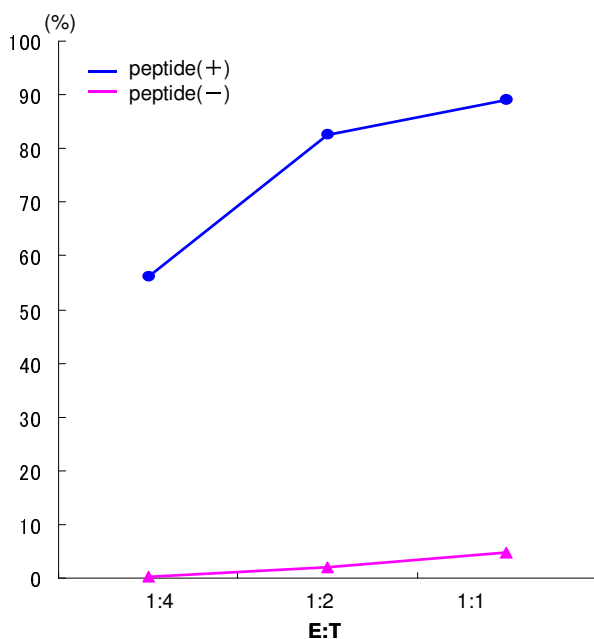
effector 細胞 : HLA-A\*2402 拘束性 CMV pp65 ペプチド(QYDPVAALF)を用いて社内健康人(A)末梢血から誘導した CTL ラインより、特異的 CTL を分離、増殖させた細胞を使用した。抗原特異性は HLA-A\*2402 CMV pp65 Tetramer を用いて確認し(下図)、陽性率を算出して混合比を決定した。



target 細胞 : HLA-A\*2402 を保持する以下の auto PBMC を CFSE 標識して使用した。

peptide(+): CMV pp65 ペプチド(QYDPVAALF)をパルスした細胞

peptide(-): ペプチドパルスしていない細胞



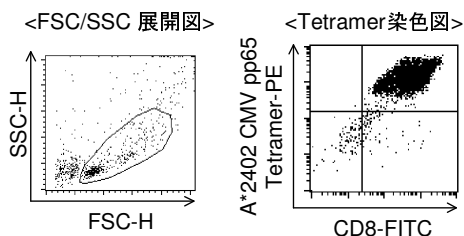
HLA-A\*2402 拘束性 CMV pp65 ペプチド特異的 CTL は、ペプチドパルスした target 細胞に対して、特異的に細胞傷害性活性を示した。

**【解析例 2】**

HLA-A\*2402 拘束性 CMV pp65(QYDPVAALF) 特異的な CTL ラインを用いた細胞傷害性活性の解析

\*データの測定は、【測定例】に示したように行った。

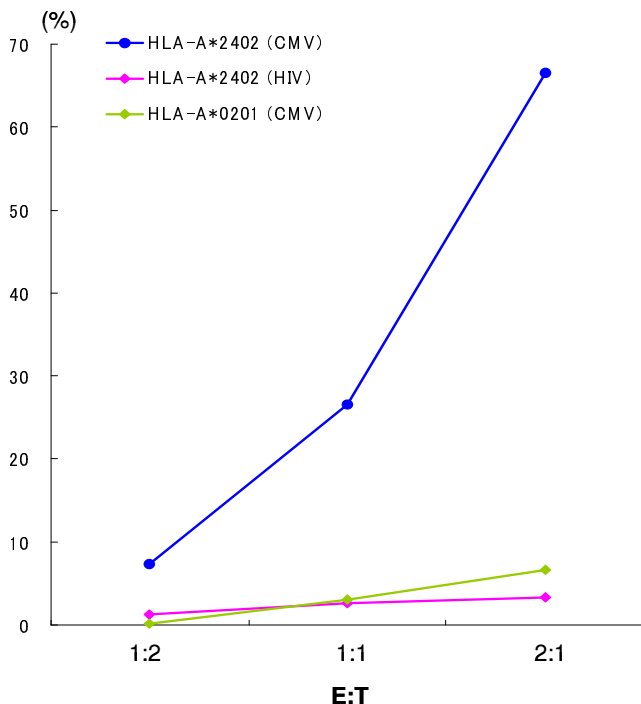
effector 細胞：HLA-A\*2402 拘束性 CMV pp65 ペプチド(QYDPVAALF)を用いて社内健康人(B)末梢血から誘導した CTL ラインより、特異的 CTL を分離、増殖させた細胞を使用した。抗原特異性は HLA-A\*2402 CMV pp65 Tetramer を用いて確認し(下図)、陽性率を算出して混合比を決定した。



effector 細胞の HLA-A\*2402 CMV pp65 Tetramer 陽性率は、生細胞全体の 96.1%であった。

target 細胞：以下の LCL を CFSE 標識して使用した。

- ・ HLA-A\*2402 保持 LCL に、CMV pp65 ペプチドをパルスした細胞
- ・ HLA-A\*2402 保持 LCL に、HIV env ペプチドをパルスした細胞
- ・ HLA-A\*0201 保持 LCL に、CMV pp65 ペプチドをパルスした細胞



HLA-A\*2402 拘束性 CMV pp65 ペプチド特異的 CTL は、HLA-A\*2402 保持 LCL に CMV pp65 ペプチドパルスした target 細胞に対してのみ、特異的に細胞傷害性活性を示した。

抗原(epitope 配列)が異なる場合、および allele が異なる場合は、細胞傷害性活性をほとんど示さなかった。