

T-Select HLA class I human Tetramer

HLA-A*11:01 EBV EBNA3B 416-424

Tetramer-IVTDFSVIK-PE

使用は研究用に限り、診断目的には使用しないでください。

背景

T 細胞は、T 細胞受容体(TCR)を介して、抗原提示細胞、ウイルス感染細胞やがん細胞に発現する MHC 分子と抗原ペプチドの複合体(MHC/peptide complex)に結合することにより、自己・非自己を識別し、状況に応じて活性化してさまざまな免疫応答を惹起します。MHC class I 分子に提示された抗原ペプチドを認識する CD8 陽性 T 細胞は、細胞傷害性 T 細胞(CTL)と呼ばれ、ウイルス感染細胞やがん細胞の殺傷に重要な役割を担っています。一方 MHC class II 分子に提示された抗原ペプチドを認識する CD4 陽性 T 細胞は、ヘルパー T 細胞と呼ばれ、さまざまなサイトカインを産生して細胞性免疫を調節するだけでなく、液性免疫も賦活化します。

従来、抗原特異的 T 細胞を検出・定量化することは非常に困難でしたが、1996 年 Altman らによって開発された MHC-Tetramer 試薬は、抗原特異的な TCR を有する T 細胞集団をフローサイトメーターによって簡単に可視化し定量することを可能にしました。MHC-Tetramer 試薬は、ビオチン化した MHC 分子と抗原ペプチドの複合体(モノマー)を蛍光標識したストレプトアビジンで4量体化(テトラマー)した試薬です。さまざまな分化マーカーや、機能アッセイと組み合わせることで、特異的 T 細胞の分化状態や、機能を同時に解析することが可能です。

EBV(Epstein-Barr virus)は、乳幼児期に初感染し、世界中で95%以上の成人が感染しているといわれています。Bリンパ球に持続感染しますが、CTLを中心とした免疫監視機構により感染 Bリンパ球は傷害され、多くは不顕性感染になります。しかしながら、移植や AIDS などの免疫不全状態において顕在化し、リンパ腫を起こします。またパーキットリンパ腫、ホジキン病、鼻咽頭がん、胃がんなどの発がんにも関連している事が報告されています。EBV 特異的 CTL を用いた細胞免疫療法は、移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)に対する治療法として期待されています。

本試薬は、MHC に HLA-A*11:01 を、抗原ペプチドに EBV EBNA3B (EBNA4 とも呼ばれる) タンパク質由来のペプチドを用いて合成しており、これに特異的な CTL 集団を検出定量することが可能です。EBNA3 はウイルスゲノム上にタンデムにコードされる 3A, 3B, 3C の3つの核蛋白質からなります。宿主 DNA 結合蛋白質 RBP-Jκ/CBF1 と結合し、同じく RBP-Jκ と結合する EBNA2 と競合的に作用して転写活性を制御します。B 細胞の不死化には、3A

と3Cが必須で、3Bは必須ではないことが報告されています。EBV 特異的 CTL エピトープの研究は1990年代から盛んに行われています¹⁾⁻⁵⁾。

MHC-Tetramer 陽性細胞の有無を判定する際、ネガティブ Tetramer 試薬を対照に用いる事をお勧めします。製品情報に関しましては、関連製品欄をご覧ください。

EBV CTL エピトープの参考文献

- 1) Gavioli R, *et al. J. Virol.* **67**: 1572-1578 (1993)
- 2) Rickinson AB and Moss DJ, *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 405-431 (1997)
- 3) Khanna R, *et al. Eur. J. Immunol.* **28**: 451-458 (1998)
- 4) Tomiyama H, *et al. J. Immunol.* **168**: 5538-5550 (2002)
- 5) Savoldo B, *et al. Blood* **108**: 2942-2949 (2006)

T-Select HLA class I human Tetramer の特徴

T-Select HLA class I human Tetramer は特定の HLA アリルと抗原ペプチドとの複合体に特異的に結合するヒト CD8 陽性 T 細胞集団を検出できます。CD8 分子は HLA class I 分子に結合し、TCR と HLA class I/抗原ペプチド複合体との結合をサポートしています。この CD8 分子による HLA 分子への結合が、非特異的な CTL 検出の原因でした。本試薬では HLA class I 分子の $\alpha 3$ 領域のアミノ酸配列に変異を入れることにより CD8 分子との非特異的結合を最小限に抑えたことで、特異性が飛躍的に向上しています。

French Application Number; FR9911133

HLA 拘束性: HLA-A*11:01

抗原ペプチドの由来と配列:

EBV EBNA3B (416-424 aa, IVTDFSVIK)

標識物: PE

励起波長; 486-580 nm

蛍光波長; 586-590 nm

性状: 容量 500 μ L, 10 μ L/test

10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.09% Na₂S₂O₃, 0.2% BSA にテトラマー試薬としてモノマーが 100 μ g/mL の濃度で含まれています。

*当試薬に含まれる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。

保存法: 2-8°Cで遮光保存してください。凍結は絶対に行わないでください。製品有効期限は、チューブに貼られているラベルをご確認ください。

試薬の劣化について: 試薬に沈殿物などの物理的な変化が観察された場合(通常は透明でわずかにピンク色の液体)は、劣化している可能性がありますので使わないでください。

染色方法:

1) 全血を用いる場合

1. 適切な抗凝固剤を使用して、静脈血を採取します。
2. 10 μ L の T-Select HLA class I human Tetramer-PE を各試験管に加えます。
3. 各試験管に 200 μ L の全血を添加します。
4. ゆっくりとボルテックスをかけます。
5. 2-8°Cまたは室温(15-25°C)で 20~60 分間インキュベーションします。
6. OptiLyse C (Beckman Coulter 社製分析機器用)、もしくは OptiLyse B (BD Biosciences 社製分析機器用)を用いて溶血・固定処理します。各々の説明書にて推奨の手順に従ってください。
7. 溶血・固定プロトコルの最終ステップ後、適量の PBS を加えて再懸濁します。
8. 400 x g で 5 分間遠心します。
9. 上澄みをアスピレートします。
10. ペレットを 500 μ L の PBS に再懸濁します。
11. サンプルは暗室にて 2-8°C で保管し、24 時間以内に分析してください。

染色の注意点:

- A. 細胞培養を行う場合は、必ずヘパリンナトリウムを抗凝固剤として選択してください。
- B. CD8 等の抗体を追加する場合は、ステップ 2. で同時染色するか、ステップ 5. 終了時に追加染色してください。抗 CD8 抗体(クローン T8)は、Tetramer 試薬の染色性を阻害しませんので同時染色する事が可能です。
- C. 溶血処理が不十分な場合、赤血球の乱反射による非特異的染色像が観察されることがあります。CD45 を同時染色してリンパ球ゲートで解析してください。

2) 末梢血単核球(PBMC)を用いる場合

1. 定法に従って PBMC を調製し、 2×10^7 cells/mL の濃度にて、細胞を再懸濁します。
2. 50 μ L (1×10^6 cells)の細胞懸濁液に 10 μ L の Clear Back (human FcR blocking reagent, MBL code no. MTG-001)を加え、5 分間室温にて反応させてください。
3. 10 μ L の T-Select HLA class I human Tetramer-PE

を加えます。

4. 2-8°Cまたは室温(15-25°C)で 20~60 分間インキュベーションします。
5. CD8 抗体等を加え、2-8°Cで 20 分間インキュベーションします。
6. 適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN₃/PBS]を加え 400 x g で 5 分間遠心します。
7. 上澄みを注意深く捨てます。
8. 細胞を 500 μ L の 0.5% パラフォルムアルデヒド/PBS に再懸濁します。
9. サンプルは暗室にて 2-8°Cで保管し、24 時間以内に分析してください。

染色の注意点:

- A. PBMC を分離後、赤血球が残っている場合は、溶血処理を行ってください。溶血処理後も赤血球の混入が認められる場合は CD45 を同時染色し、リンパ球ゲートにて解析してください。
- B. Clear Back を用いることで、マクロファージなどのエンドサイトーシスによる非特異的染色を抑制する効果が期待されます。
- C. CD8 抗体はクローンによっては Tetramer 試薬と TCR の結合を阻害することが報告されています。クローン T8 に阻害作用はありません。
- D. 培養したリンパ球を染色する場合は、7-AAD を用いて死細胞を染色し、解析ゲート内から除去してください。
- E. 染色後、数時間以内に解析する予定でしたら、パラフォルムアルデヒドによる固定処理は必要ありません。

一般的な注意事項:

1. 検体、サンプル、およびそれらと接触する全ての材料は感染の可能性を持つものとして、取り扱いには十分注意してください。
2. 保管もしくは反応中、試薬に光をあてないようご注意ください。
3. 全血にて最適な結果を得るため、検体は採血管にて室温で保存し、染色操作直前にも倒立攪拌してください。冷蔵検体では異常な結果が出る場合がありますので使用しないでください。
4. 静脈血液検体の推奨細胞生存率は $\geq 90\%$ です。
5. 細胞を溶血試薬と長時間反応させないでください。白血球の破壊や目的細胞損失の原因となります。
6. 有核赤血球、異常タンパク濃度を有する検体、もしくは異常血色素症では、必ずしも全ての赤血球が溶血されないことがあります。こうした場合、溶血されない赤血球が白血球としてカウントされることで、陽性率の低下をもたらすことがあります。

Tetramer 試薬の参考文献

- 1) Altman JD, *et al. Science* **274**: 94-96 (1996)
- 2) Mcmichael AJ, *et al. J. Exp. Med.* **187**: 1367-1371 (1998)
- 3) Bodinier M, *et al. Nat. Med.* **6**: 707-710 (2000)
- 4) 村上昭弘, 鈴木進 *臨床免疫* **42**: 134-138 (2004)

関連製品:

T-Select Human Tetramers

EBV

TB-0011-1	HLA-A*02:01	EBV	BMLF1 Tetramer-GLCTLVAML-PE
TS-M006-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP1 Tetramer-YLQGNWWTL-PE
TB-0146-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP1 Tetramer-YLLEMLWRL-PE
TS-M030-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 Tetramer-TVCGGITMFL-PE
TS-M161-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 I6M Tetramer-TVCGGMMFL-PE
TS-M159-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 Tetramer-QLSPLLGAIV-PE
TS-M160-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 Tetramer-GLGTLGAAL-PE
TS-M031-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 Tetramer-LLWTLVLL-PE
TS-M069-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 Tetramer-FLYALALL-PE
TS-M157-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 Y3C Tetramer-FLCALALL-PE
TS-M032-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 Tetramer-CLGGLITMFL-PE
TS-M155-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 C1S Tetramer-SLGGLLTMV-PE
TS-M156-1	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 L6I Tetramer-CLGGLITMFL-PE
TB-0131-1	HLA-A*02:01	EBV	BALF4 Tetramer-FLDKGTYTL-PE
TS-M124-1	HLA-A*03:01	EBV	BRLF1 Tetramer-RVRAYTYSK-PE
TS-M033-1	HLA-A*03:01	EBV	EBNA3A ₆₀₃₋₆₁₁ Tetramer-RLRAEAQVK-PE
TS-M028-1	HLA-A*11:01	EBV	EBNA3B ₃₉₉₋₄₀₈ Tetramer-AVFDKSDAK-PE
TS-M029-1	HLA-A*11:01	EBV	EBNA3B ₄₁₆₋₄₂₄ Tetramer-IVTDFSVIK-PE
TS-M111-1	HLA-A*11:01	EBV	LMP2 Tetramer-SSCSCPLSK-PE
TS-M135-1	HLA-A*11:01	EBV	LMP2 S9T Tetramer-SSCSCPLTK-PE
TS-M003-1	HLA-A*24:02	EBV	BMLF1 Tetramer-DYNFVKQLF-PE
TS-M002-1	HLA-A*24:02	EBV	BRLF1 Tetramer-TYPVLEEMF-PE
TS-M004-1	HLA-A*24:02	EBV	EBNA3A Tetramer-RYSIFFDYM-PE
TS-M005-1	HLA-A*24:02	EBV	EBNA3B Tetramer-TYSAGIVQI-PE
TS-M034-1	HLA-A*24:02	EBV	LMP2 Tetramer-PYLFWLAAI-PE
TS-M001-1	HLA-A*24:02	EBV	LMP2 Tetramer-IYVLVMLVL-PE
TS-M154-1	HLA-A*24:02	EBV	LMP2 Tetramer-TYGPVFMCL-PE
TS-M035-1	HLA-A*24:02	EBV	LMP2 C8S Tetramer-TYGPVFMCL-PE
TS-M009-1	HLA-A*24:02	EBV	Mix Tetramer-PE
TS-M142-1	HLA-B*07:02	EBV	EBNA3A Tetramer-RPPIFIRRL-PE
TB-0123-1	HLA-B*07:02	EBV	EBNA6 Tetramer-QPRAPIRPI-PE
TS-M036-1	HLA-B*08:01	EBV	BZLF1 ₁₉₀₋₁₉₇ Tetramer-RAKFKQLL-PE
TS-M123-1	HLA-B*08:01	EBV	EBNA3A Tetramer-FLRGRAYGL-PE
TB-0101-1	HLA-B*15:01	EBV	EBNA4 Tetramer-GGGGSPAM-PE
TS-M037-1	HLA-B*35:01	EBV	BZLF1 ₅₄₋₆₄ Tetramer-EPLPQGLTAY-PE
TB-0168-1	HLA-B*35:01	EBV	EBNA1 Tetramer-HPVGEADYFEY-PE
TB-M038-1	HLA-B*35:01	EBV	LMP2 ₁₋₉ Tetramer-MGSLEMVPM-PE
TS-M150-1	HLA-C*03:03	EBV	EBNA1 Tetramer-FVYGGSKTSL-PE

CMV

TS-0024-1C	HLA-A*01:01	CMV	pp50 Tetramer-VTEHDTLLY-PE
TS-0010-1C	HLA-A*02:01	CMV	pp65 Tetramer-NLVPVATV-PE
TS-M057-1	HLA-A*02:01	CMV	IE1 ₃₁₆₋₃₂₄ Tetramer-VLEETSVMFL-PE
TS-M100-1	HLA-A*03:01	CMV	IE1 ₁₈₄₋₁₉₂ Tetramer-KLGGALQAK-PE
TS-M012-1	HLA-A*11:01	CMV	pp65 Tetramer-ATVQGNLQK-PE
TS-0020-1C	HLA-A*24:02	CMV	pp65 Tetramer-QYDPVAALF-PE
TB-M099-1	HLA-B*07:02	CMV	pp65 Tetramer-RPHERNGFTVL-PE
TS-0025-1C	HLA-B*07:02	CMV	pp65 Tetramer-TPRVTTGGAM-PE
TS-0026-1C	HLA-B*08:01	CMV	IE1 Tetramer-ELRRKMMYM-PE
TB-0147-1	HLA-B*08:01	CMV	IE1 Tetramer-QIKVRVDMV-PE
TS-M013-1	HLA-B*15:01	CMV	pp65 Tetramer-KMQVIGDQY-PE
TB-0027-1	HLA-B*35:01	CMV	pp65 Tetramer-IPSINVHHY-PE

T-Select PEPTIDES

TS-0011-P	HLA-A*02:01	EBV	BMLF1 peptide, GLCTLVAML
TS-M003-P	HLA-A*24:02	EBV	BMLF1 peptide, DYNFVKQLF
TS-M002-P	HLA-A*24:02	EBV	BRLF1 peptide, TYPVLEEMF
TS-M004-P	HLA-A*24:02	EBV	EBNA3A peptide, RYSIFFDYM
TS-M005-P	HLA-A*24:02	EBV	EBNA3B peptide, TYSAGIVQI
TS-M069-P	HLA-A*02:01	EBV	LMP2 peptide, FLYALALL
TS-M001-P	HLA-A*24:02	EBV	LMP2 peptide, IYVLVMLVL
TS-M035-P	HLA-A*24:02	EBV	LMP2 C8S peptide, TYGPVFMCL
TS-M111-P	HLA-A*11:01	EBV	LMP2 peptide, SSCSCPLSK

TS-M135-P	HLA-A*11:01	EBV	LMP2 S9T peptide, SSCSCPLTK
TS-M803-P	HLA-DRB1*01:01	EBV	EBNA1 ₅₁₅₋₅₂₇ peptide

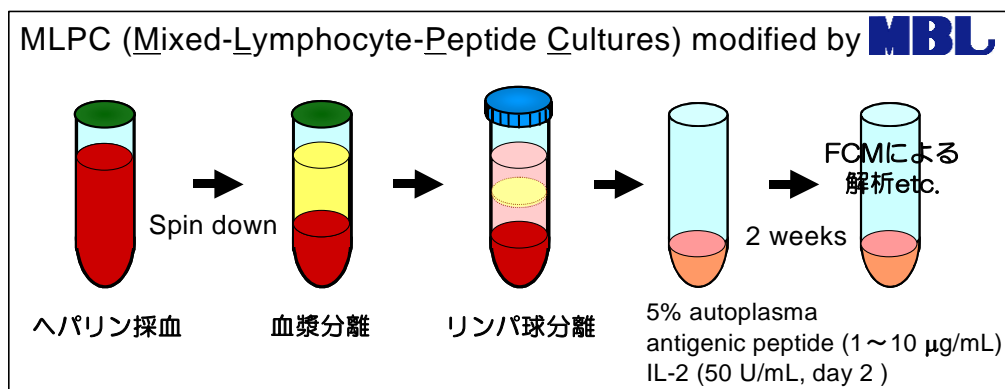
Kits

4844	IMMUNOCYTO	CD107a Detection Kit
AM-1005M	IMMUNOCYTO	Cytotoxicity Detection Kit
TB-7300-K1	QuickSwitch™	Quant HLA-A*02:01 Tetramer Kit-PE
TB-7301-K1	QuickSwitch™	HLA-A*02:01 Tetramer Kit-PE
TB-7302-K1	QuickSwitch™	Quant HLA-A*24:02 Tetramer Kit-PE
TB-7303-K1	QuickSwitch™	HLA-A*24:02 Tetramer Kit-PE

Others

6603861	CD8-FITC (T8)
6607011	CD8-PC5 (T8)
A07750	Anti-CD4 (Human) mAb-FITC
A07704	7-AAD Viability Dye
MTG-001	Clear Back (Human FcR blocking reagent)

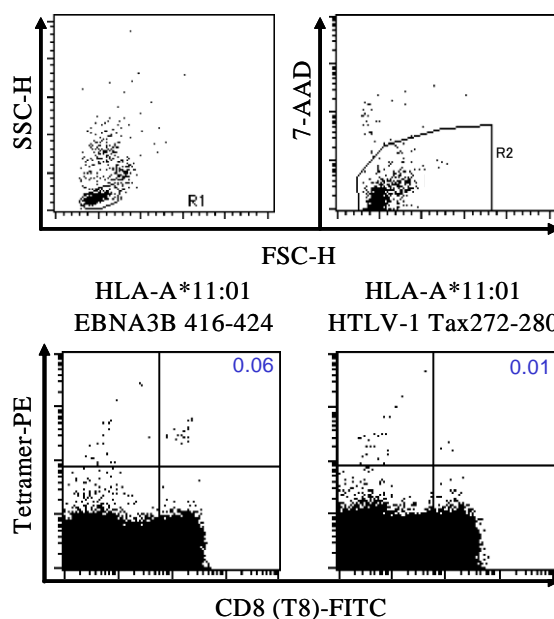
MHC Tetramer 試薬、誘導用ペプチド等の製品ラインナップ、MHC Tetramer 試薬のカスタム作製に関しましては、弊社ホームページ (<http://ruo.mbl.co.jp>) より最新情報をご確認ください。



染色例

HLA-A*11:01を保持する健康人末梢血よりPBMCを調製し、その一部を Tetramer 試薬にて染色した(day 0)。残りの PBMC は、HLA-A*11:01 拘束性 EBNA3B 由来の抗原ペプチド (IVTDFSVIK, 10 µg/mL) を用いて CTL を誘導し、約 2 週間培養して Tetramer 試薬を用いて染色した (day 15)。特異的 CTL の誘導方法は、PBMC と抗原ペプチドを混合して培養する MLPC 法を用いた。

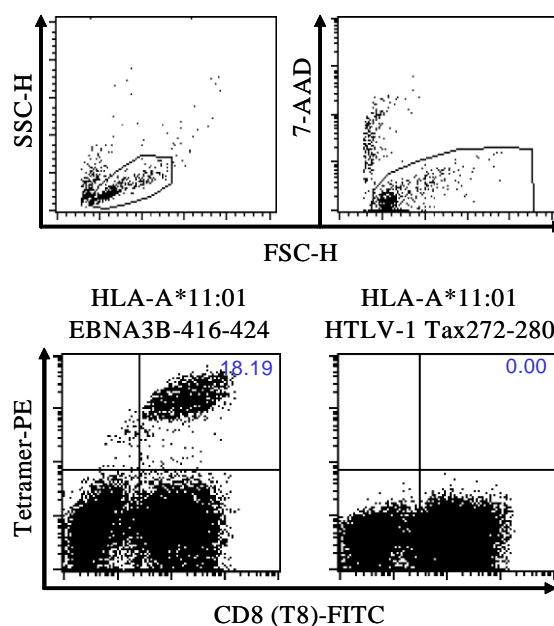
Day 0



染色方法

- ヘパリン採血後直ちに分離した PBMC (1×10^6 cells)、あるいは PBMC に抗原ペプチドを加えて培養したリンパ球を適量の FCM buffer [2% FCS/0.05% NaN_3 /PBS]にて 1 回洗ったものをそれぞれ 2 本用意した。
- 10 µL の Clear Back (Human FcR blocking reagent, MBL code no. MTG-001) と 20 µL の FCM buffer を加え、室温にて 5 分間反応させた。
- 10 µL の HLA-A*11:01 HTLV-1 Tax272-280 Tetramer-PE (MBL code no. TS-M024-1, Negative Tetramer として使用)、あるいは 10 µL の HLA-A*11:01 EBV EBNA3B 416-424 Tetramer-PE (MBL code no. TS-M029-1) をそれぞれ加え、4°Cで 20 分間反応させた。
- 10 µL の CD8-FITC (clone T8, MBL code no. 6603861)を加え、4°Cで 20 分間反応させた。
- 適量の FCM buffer を加え 400 x g で 5 分間遠心した。
- 上澄みを注意深く捨て、400 µL の FCM buffer を加えて細胞を懸濁した。
- FCM にて解析した。

Day 15



染色像:

FSC/SSC 展開にて T 細胞領域を R1 とし、7-AAD 陰性細胞領域を R2 とした。この R1 かつ R2 領域にて解析を行った。ドットプロット展開図右上の数字は、CD8 陽性細胞中の MHC Tetramer 陽性細胞の割合を示す。

染色結果

MLPC 法にて特異的 CTL を誘導した結果、day 15 において 18.19%の HLA-A*11:01 EBV EBNA3B 416-424 Tetramer 陽性細胞が検出された。Negative Tetramer (HLA-A*11:01 HTLV-1 Tax272-280 Tetramer)では陽性細胞は検出されなかった。