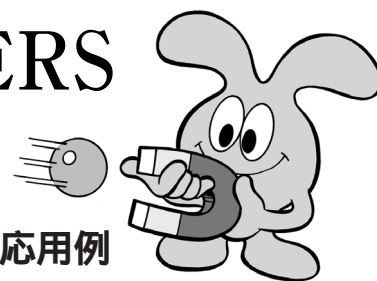


DYNABEADS LETTERS



Dynabeads を用いたネガティブセレクションの応用例 --- 胸腺未熟 CD4⁺8⁻ T 細胞の分離 ---

東海大学医学部 免疫学教室
西村 孝司

1. 目的

胸腺細胞のほとんどは CD 4⁺8⁺ T細胞から構成されているが、その他に、CD 4⁺T細胞、CD 8⁺ T細胞さらにはCD 4⁺8⁻ T細胞等が少ない頻度で含まれている。CD 4⁺8⁻ T細胞は胸腺中で最も未熟な細胞であり、試験管内でのT細胞分化の研究をする際には必ず必要となる細胞である。しかし、含有率が少なくかつポジティブセレクションをするための特定の細胞表面マーカーを有しないため分離が難しい。これまでは、抗体と補体処理による方法か FACStar を用いた分離が行われてきたが純度や所要時間に問題があった。ここでは、抗体と補体処理とDynabeads を組み合わせた簡単で純度の良い CD 4⁺8⁻ T細胞の分離法を紹介する。

2. 原理および利点

胸腺細胞を抗 CD 4 抗体と補体で処理することによって、CD 4⁺8⁺T 細胞の大部分を除去する。次に、残存した胸腺細胞を PE ラベル 抗 CD 4 抗体とFITC ラベル抗 CD 8 抗体で染色し、混在するCD 4⁺、CD 8⁺ 陽性細胞を抗ラット抗体結合 Dynabeads を用いて除く。この方法は混在する細胞の割合をチェックしながらCD 4⁺8⁻ T細胞の分離ができる点に利点がある。また、純度も 95 - 98 % まであげることができ FACStar を用いた場合と同等で時間的には本法のほうが早い。

3. 方法

- 1) 胸腺細胞に 0.5 μg/ml の濃度で抗 CD 4 モノクローナル抗体 (RL 172.4 : GK1.5 と異なったエピトープを認識) を加え、氷上で 15 分間インキュベートする。次に、10 倍希釈したウサギ補体を加え、37 °C で 45 分間インキュベートする。
- 2) PBS で洗浄後、PE 結合抗 CD 4 抗体 (GK 1.5) および FITC 結合抗 CD 8 抗体 (53 - 6 - 72) を加え、氷上で 15 分間インキュベートする。PBS で 2 回洗浄後、FACScan で CD 4⁺8⁺、CD 4⁺、CD 8⁺ T 細胞の混在率を確かめる。
- 3) Dynabeads M - 450 Sheep anti Rat IgG 液を必要量 (10 μl / 10⁶ cells) 取り出し、PBSで 2 回洗浄後、胸腺細胞に加え室温で 20 分間インキュベートする。この際、胸腺細胞は 0.5 ml の 10 % FCS 加RPMI1640 培地に懸濁し、反応中は頻りに攪拌する。ただし、ピペッティングしてはいけない。
- 4) 反応終了後、15 ml のチューブに 10 % FCS 加RPMI1640 培地 5 ml を壁面から静かに加え、DynaI MPC (Magnetic Particle Concentrator) - 1 を用いてビーズに結合した混在する CD 4⁺8⁺、CD 4⁺、CD 8⁺ T細胞を集める。MPC - 1 に結合しない細胞浮遊液中に目的とするCD 4⁺8⁻ T細胞が含まれる。上清を静かに回収し、再度 MPC - 1でビーズを完全に除く。
- 5) 得られたCD 4⁺8⁻ T画分の純度を再度 FACScan で確認し、もし、不必要な細胞がまだ混在していたならば、再び 3) - 5) の操作を繰り返す。通常は 2 回繰り返せば十分な純度の CD 4⁺8⁻ T細胞が得られる。

4. 応用

末梢に存在するCD4⁺8⁻T細胞中にはCD4⁺8⁻TCR⁻ T細胞、NK細胞さらに T細胞も含まれるので、この方法でまずCD4⁺8⁻T細胞を濃縮して、次にそれぞれの細胞と反応性を示す抗体とDynabeadsを用いてポジティブセレクションを行うことによって含有率の低いCD4⁺8⁻TCR⁻ T細胞、NK細胞、 T細胞等を分離することができる。

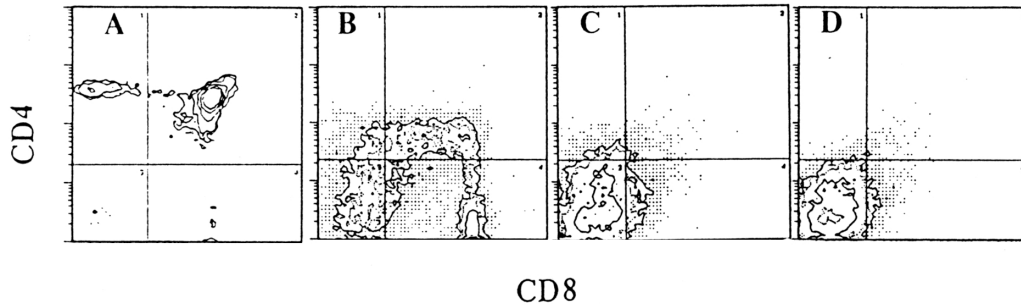


図 1

Dynabeadsを用いたマウス胸腺細胞からのCD4⁺8⁻T細胞の分離。(A)分画前の胸腺細胞、(B)抗CD4抗体と補体で処理後の胸腺細胞をPE結合抗CD4抗体とFITC結合抗CD8抗体で染色(1)、(2)の操作後)、(C)抗ラット IgG 結合Dynabeads で1度 CD 4、CD 8陽性細胞を除去した後のパターン(3)- (5)の操作後)、(D)抗ラット IgG 結合Dynabeads でもう1度混在するCD 4、CD 8 陽性細胞を除去した後のパターン。

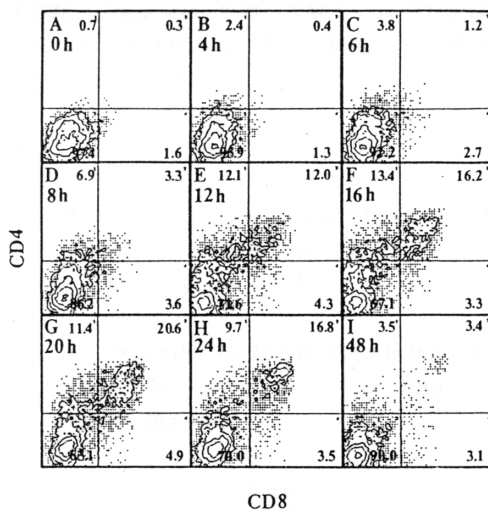


図 2

Dynabeadsで分離した胸腺CD4⁺8⁻T細胞の分化能
Dynabeadsで分離したCD4⁺8⁻T細胞(A)を胸腺ナース細胞TNC-R3.1とIL-7の存在下で培養した。培養開始 12時間後(E)から顕著なCD4⁺8⁺T細胞の分化誘導が認められ、20時間後(G)にピークに達した。

参考文献

- 1) Gao, X., Nishimura, T., Takeuchi, Y., Sudo, T., and Habu, S., Thymic nurse cell clone supports the differentiation of CD 4⁺8⁻ thymocytes into CD 4⁺8⁺ thymocytes in vitro. *Immunol. letters*, **35**, 169, (1993)
- 2) Nishimura, T., Takeuchi, Y., Ichimura, Y., Gao, X., Akatsuka, A., Tamaoki, K., Yagita, H., Okumura, K., and Habu, S., Thymic stromal cell clone with nursing activity supports the growth and differentiation of murine CD 4⁺8⁺ thymocytes in vitro. *J. Immunol.*, **145**, 4012, (1990)

お問合せは 日本総代理店

株式会社

ベリタス

〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-7-14 八洲ビル
TEL 03 3593-3211(代) FAX 03 3593-3216