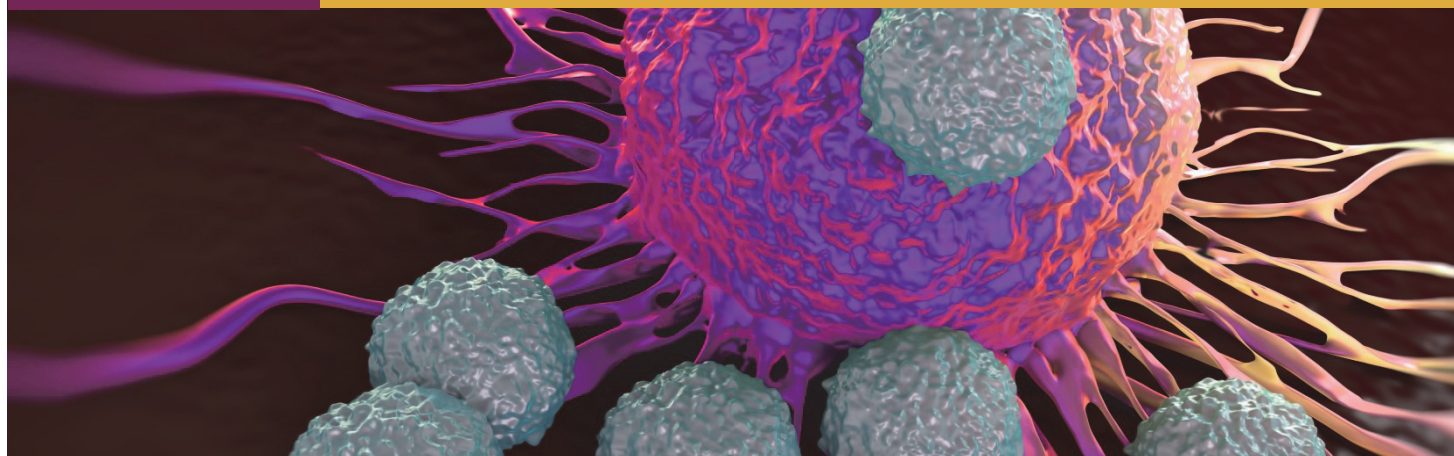


# マイクロプレートで行う 51-クロムリリースアッセイ



## イントロダクション

### 51クロミウムを用いた細胞障害アッセイ

細胞障害性T細胞 (CTL) は標的細胞が提示した抗原を認識することによって標的細胞を攻撃する。さらに本方法ではナチュラルキラー細胞 (NK) の殺傷も同様に評価することができる。標的細胞をあらかじめクロミウムを用いて標識し、これにCTLやNKを添加して数時間培養を行う。破壊された標的細胞は培養液中にクロミウムを放出するため、このクロミウム由来の放射線量は殺傷された標的細胞数と正比例の関係となる。本方法は原理が非常に単純であるだけでなく、放射線を用いるために感度が非常に高くバックも低く1000個以下のT細胞で良好な結果を得ることができる。

本レポートでは、マイクロプレートを使用した簡便な51クロミウムリリースアッセイ法として、シンチラントコーティングされたマイクロプレートであるLumaPlateを使用し、マイクロプレート対応シンチレーションカウンターTopCountによって計測を行う方法について述べる。

### LumaPlate –シンチラントコーティング マイクロプレート

LumaPlate は、ポリスチレン製の96ウェル白色マイクロプレートのウェル底面に、青色発光する固体シンチレーター(ケイ酸イットリウム)がコーティングされている。このため、シンチレーションカクテル剤を必要とせず、ウェル内のサンプルを乾燥させることによってシンチレーション計測が可能となる。

### TopCount/ MicroBeta<sup>2</sup> –マイクロプレート対応 シンチレーションカウンター

TopCountあるいはMicroBeta<sup>2</sup> は、マイクロプレートの簡便性と、液体シンチレーションカウンターの信頼性を兼ね備えており、放射性廃棄物の低減、試薬・消耗品コストの削減、サンプル調製・測定時間の削減にも有効である。

シンチレーション計測においては、光電子増倍管(PMT)が検出器として使用され、通常の液体シンチレーションカウンターは、2本のPMTを用いた同時計数法によって計測を行う。TopCount/ MicroBeta<sup>2</sup>は、サンプルの上方に位置するPMTのみを使用した「TR-LCS法(特許)」によって、不透明なマイクロプレートや フィルタープレートのシンチレーション測定を可能にし、さらに、低バックグラウンドの測定も可能となっている。

また、このカウンターは、ベータ線・ガンマ線(オージェ電子)核種、発光サンプルなど、多様な検体の測定に柔軟に対応できる計測器である。

執筆者

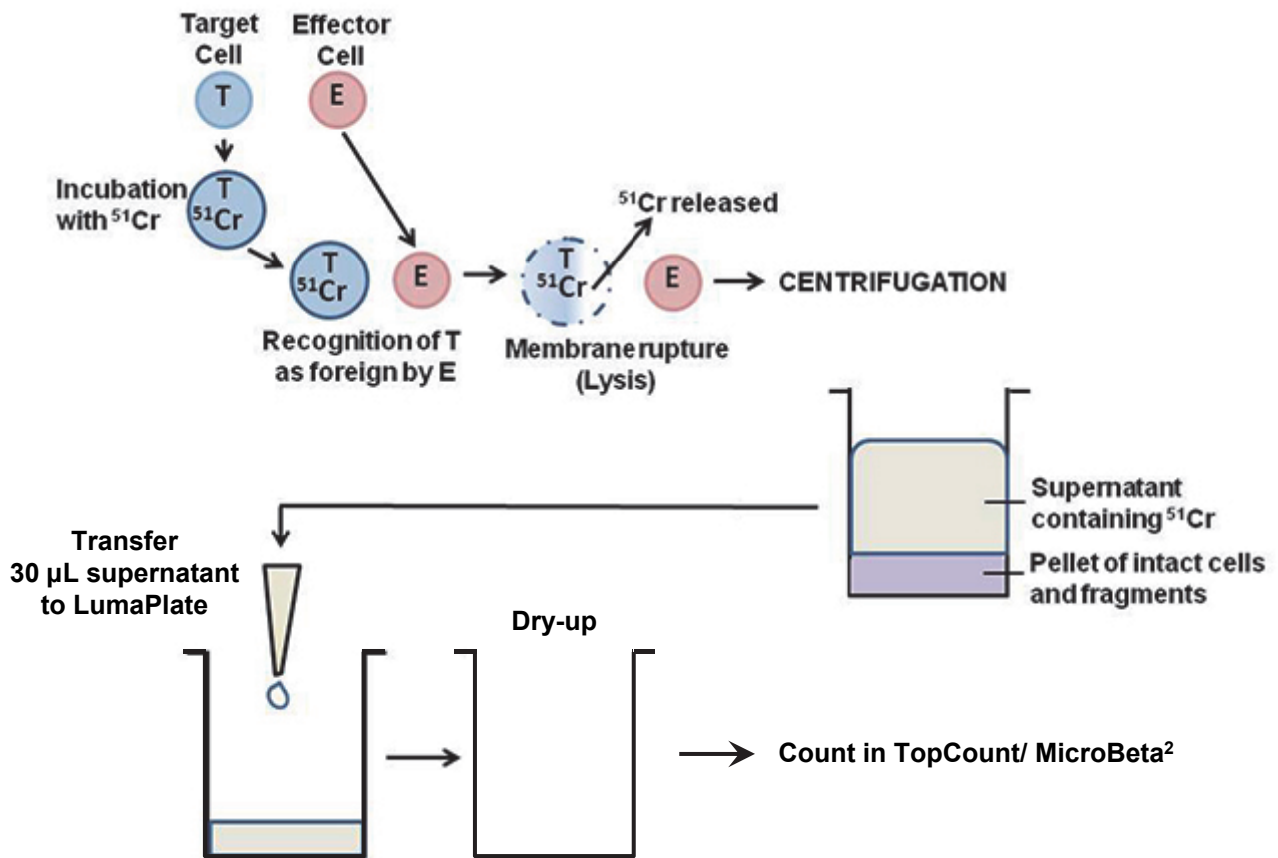
堀江 正信

京都大学環境安全保健機構附属  
放射性同位元素総合センター  
生物化学システム工学分野  
[horie.masanobu.4z@kyoto-u.ac.jp](mailto:horie.masanobu.4z@kyoto-u.ac.jp)

RIを用いた本アッセイは、非常に簡便であり蛍光に比べて高い感度と精度を誇る歴史ある方法です。当センターでは学外の方でも共同研究という形でご利用可能です。合わせて技術指導もできますのでお気軽にご連絡ください。

## アッセイ概要

アッセイは、標的細胞の $^{51}\text{Cr}$ 標識、細胞障害による $^{51}\text{Cr}$ の遊離、遊離した $^{51}\text{Cr}$ のシンチレーション測定から成る(下図)。



## 材料・測定機

- Chromium-51 (ParkinElmer, Cat#NEZ030, 74 MBq)
- 96 well V-bottom plate (SUMILON)
- Lumaplate (ParkinElmaer, Cat#6006633)
- Permanent sealing tape (PerkinElmer, Cat#1450-461)
- RPMI1640
- Fetal bovine serum
- 1~2% Triton X-100 水溶液/PBS  
(もしくは1%NP40水溶液などの界面活性剤)
- TopCount あるいはMicroBeta<sup>2</sup>



TopCount



MicroBeta2



LumaPlate

## 手順

1. 標的細胞 ( $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cells) ※<sup>1</sup> を15 mlチューブに入れて10~50  $\mu$ l の培地に懸濁しておく
2. 手順1のチューブへ5  $\mu$ l (0.925 MBq)を添加 ※<sup>2</sup>
3. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>で1時間 ※<sup>2</sup>インキュベート
4. 培養培地で2回遠心洗浄 ※<sup>3</sup>
5. 標的細胞を  $1 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$  cells/ml に再懸濁し100  $\mu$ l ずつ96 well-plateへ播種 ※<sup>4, 5</sup>
6. エフェクター細胞の希釈系列を作成し100  $\mu$ l ずつ96 well-plateへ播種 (図1)
7. *N*のウェルに培地を100  $\mu$ l, *Mx*のウェルに界面活性剤 (例: 1% Triton-X) を100  $\mu$ l添加
8. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>で5時間インキュベート ※<sup>2</sup>
9. プレートを送心してペレットダウン
10. 培養液を30  $\mu$ lずつLumaplate-96へ添加
11. ドライヤーで乾燥
12. Permanent sealing tapeを貼付
13. 励起を防ぐために遮光してTOPcount でカウント

細胞障害活性(% lysis) は下記の計算式を用いて算出する。

$$\% \text{ lysis} = \frac{(E - N)}{(Mx - N)} \times 100$$

- T*: 標的細胞とエフェクター細胞を共培養後の培地中に含まれるクロミウム由来放射活性  
*N*: 標的細胞のみの培養中に含まれるクロミウム由来放射活性  
*Mx*: 標的細胞を全て殺傷した時の培地中に含まれるクロミウム由来放射活性

※<sup>1</sup> 標的細胞種によって異なる

※<sup>2</sup> 標的細胞種によってクロミウム量および標識時間は異なる (最大取込条件検討)

※<sup>3</sup> 1回目の洗浄の際にセルカウントしておく

※<sup>4</sup> エフェクター細胞を添加するウェルに加えて、*N*と*Mx*用に3ウェルずつ用意

※<sup>5</sup> 標的細胞に抗原ペプチドを添加する場合はここで添加する

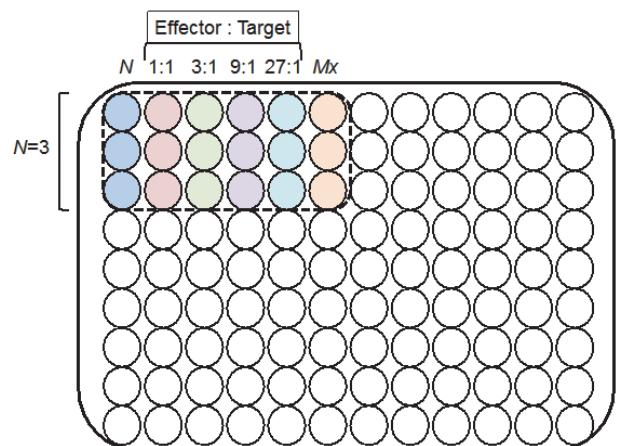


図1 実験例

## 参考文献

- 岡田誠治他 (2007), 「RIの逆襲~アイソトープを活用した簡単・安全バイオ実験~」
- Biddison W.E. et al.(2001), Measurement of polyclonal and antigen-specific cytotoxic T cell function.
- Whiteside T.L. (2001), Measurement of cytotoxic activity of NK/LAK cells.

## 謝辞

本アプリケーションノート作成にあたりプロトコルを参考とさせていただいた、京都大学再生医科学研究所 再生免疫学分野 河本研究室に心より感謝いたします。

# 製品情報

## MicroBeta2

製品名	検出器数	プレートフォーマット	スタッカー枚数	インジェクタ	システム品番
MicroBeta <sup>2</sup>	1	96 / 24	16	—	2450-0010J
	2	96 / 24	16	—	2450-0020J
	6	384 / 96	16	—	2450-0060J
	12	384 / 96	16	—	2450-0120J
MicroBeta <sup>2</sup> LumiJET	1	96 / 24	16	2 試薬×検出器数	2460-0010J
	2	96 / 24	16		2460-0020J
	6	384 / 96	16		2460-0060J
	12	384 / 96	16		2460-0120J

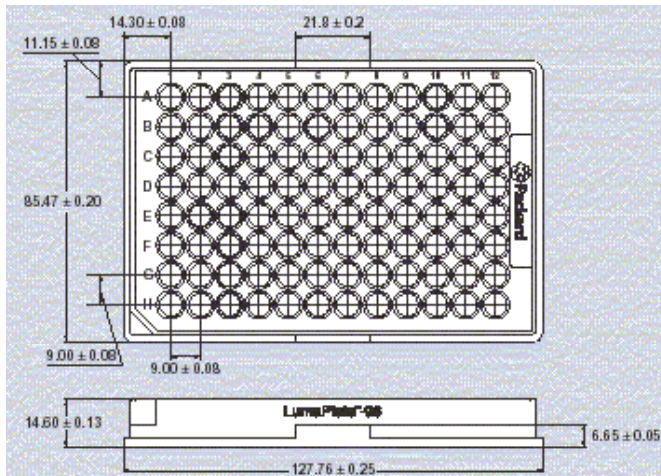
## 仕様

機種	サイズ	重量	電源
MicroBeta <sup>2</sup>	433 (幅) × 609 (高さ) × 653 (奥行) mm	85 kg <sup>注1)</sup>	100 V, 50 / 60 Hz, 360 VA
MicroBeta <sup>2</sup> LumiJET	700 (幅) × 630 (高さ) × 660 (奥行) mm	90 kg	100 V, 50 / 60 Hz, 360 VA

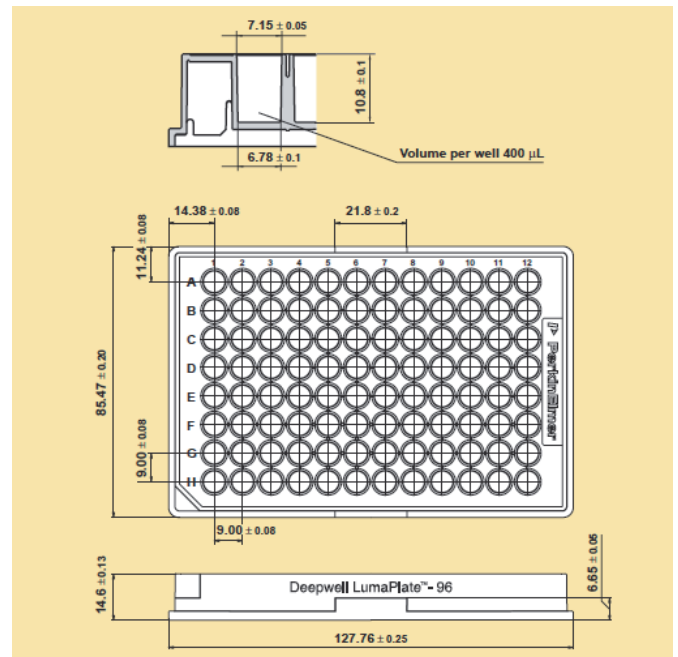
## LumaPlate ーシンチラントコーティング マイクロプレート

製品名	品番	数量	価格 (円)
LumaPlate-96, 白 非滅菌 フタなし	6006633	100	150,000
Deepwell LumaPlate-96, 白 非滅菌 フタなし	6005630	50	107,000
Deepwell LumaPlate-384, 白 非滅菌 フタなし	6007630	50	300,000

### LumaPlate-96



### Deepwell LumaPlate-96



株式会社 パーキンエルマー・ジャパン  
www.perkinelmer.co.jp

ディスカバリー・アナリティカル・ソリューションズ事業部  
ライフサイエンス営業本部

本社 〒240-0005 横浜市保土ヶ谷区神戸町 134 横浜ビジネスパーク テクニカルセンター 4F  
TEL. (045) 339-5862 FAX. (045) 339-5872



弊社所在地 (支社・営業所含む) については  
こちらをご参照ください。