

高感度 IFN- γ ELISpot アッセイによる 過去のウイルス感染に対する細胞性免疫応答の定量化の検討

著者：Cindy Chen, Ph.D. (メルク)、Jun Park, Ph.D. (メルク)

はじめに

ELISpot (Enzyme Linked Immuno-Spot) アッセイは、1983 年に開発された免疫細胞の抗体またはサイトカイン産生を単一細胞レベルで測定できる効果的な手法です^{1,2}。近年、免疫記憶の研究やワクチン開発を含むさまざまなアプリケーションにおいて免疫応答に関する理解向上が試みられており、このアッセイが再び注目を集めています³。

本稿では、サイトメガロウイルス (CMV) 感染歴のあるドナーより得られた末梢血単核細胞 (PBMC) サンプルから既存の抗原反応性 T 細胞の数を定量する一般的な ELISpot アッセイの例を示します。PBMC は CMV 抗体の血清状態に基づいて得ることができますので、CMV 血清陽性集団と CMV 血清陰性集団との間で T 細胞インターフェロン- γ (IFN- γ) 免疫応答の比較が可能であり、前者の集団では、ウイルス特異的なメモリー T 細胞が産生されていると予想されます。今回は、IFN- γ の分泌に基づいて、CMV 曝露歴のあるドナーは、曝露歴のないドナー由来の PBMC と比較して、ウイルス特異的 T 細胞が有意に存在していることを示します。

現在、ほとんどの ELISpot アッセイはポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンフィルタープレートを用いて実施されています。これは、標準的なポリスチレン表面と比較して多細孔膜は結合性が大幅に向上するためです。ELISpot は「1 ウェルあたりのスポット数」を測定しますので、白色の PVDF メンブレンはスポットの検出および解析のためのバックグラウンドとして最適です。さらに、このフィルタープレートフォーマットは、スループット性が高く、自動化にも適しており、1 枚のプレートで、異なる実験条件を用いて、より多くのサンプルを処理することが可能です。

標準的な ELISpot アッセイ (図 1) では、サイトカイン特異的抗体を 96 ウェルメンブレンフィルタープレートに固相化します。次に、刺激因子の存在下または非存在下で細胞を播種します。活性化された細胞はサイトカインを分泌し始め、これが発現細胞のすぐ近くの捕捉抗体に結合します。次いで、細胞を洗い流し、ワンステップ (サイトカイン特異的な酵素標識抗体) またはツーステップ (ビオチン標識抗体 / ストレプトアビジン - 酵素) 抗体結合プロセスのいずれかを行った後、基質の沈殿によるスポット検出を行います。シグナルが生成された後は、マニュアルまたは画像ベースのスポットリーダーと解析ソフトウェアを使用することでスポット数を集計することができます。

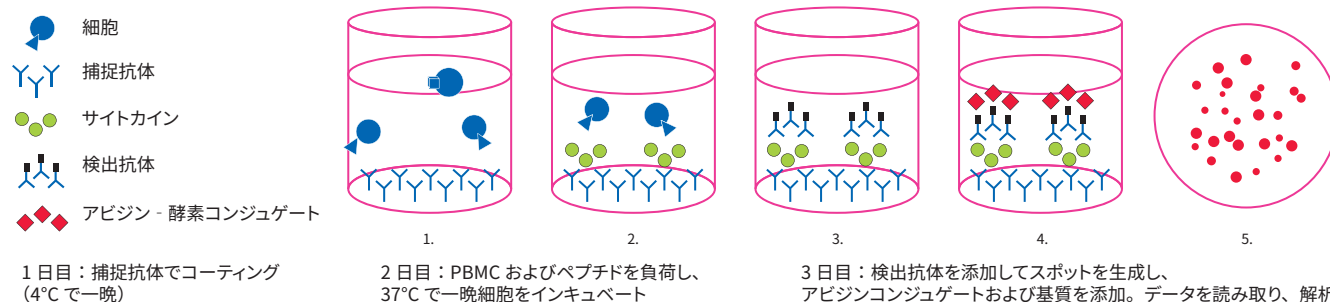


図 1 ELISpot のワークフロー

ここでは、MultiScreen® HTS-IP フィルタープレートを用いて ELISpot アッセイを行い、単離した PBMC からサイトカインを分泌する CMV 反応性細胞を同定・計数しました。CMV 血清陽性ドナーより得られた PBMC を CMV 粒子または CMV ペプチドプールで *in vitro* 刺激することにより、炎症性サイトカインの放出が生じることが明らかとなっています^{4,5}。ELISpot アッセイにより、CMV ペプチドによる刺激を受けて IFN- γ を分泌する個々の細胞を計数することが可能になりました。このアッセイは高感度で、単一細胞レベルでの検出が可能です。このモデルは、抗ウイルスワクチンの開発に応用できる可能性があり、ワクチン接種前および接種後の臨床サンプルの細胞応答を比較することでワクチンの有効性を評価することができます。

材料および方法

試薬

- 単一ドナー末梢血単核細胞 (PBMC) (20 ~ 30 歳の CMV 血清陽性および CMV 血清陰性ドナー、AllCells)
- MultiScreen® HTS-IP フィルタープレート (カタログ番号 : MSIPS4510)
- 抗ヒト IFN- γ (Mabtech 製品番号 : 3420-3-250)
- ビオチン標識抗ヒト IFN- γ (MabTech、#3420-6-250)
- ストレプトアビジン-HRP (MabTech、#3310-9-1000)
- TMB 基質 (MabTech、#3651-10)
- ヒト CD4・CD8 T 細胞用 CMV ペプチドプール (Mabtech、#3619-1)
- RPMI 1640 + 10% FBS
- PMA (メルク、#5005820001)
- イオノマイシン (メルク、#I3909)
- 35% エタノール
- 滅菌水
- 1X PBS

プレートの準備

1. 1 日目に、35% エタノール 15 μ L を用いてウェルをあらかじめ湿らせ (1 分未満)、次に、液溜まりを避けるため、軽く振ってエタノールを払い落としました。
2. ウェルを滅菌水 200 μ L で 4 回洗浄しました。
3. 捕捉抗体 100 μ L (1X PBS 中の最終濃度として 10 μ g/mL) を各ウェルに添加し、4°C で一晩インキュベートしました。

アッセイ

1. 2 日目に、プレートを 1X PBS (200 μ L/ウェル) で 3 回洗浄しました。
2. プレートを RPMI 1640 + 10% FBS 培地 (200 μ L/ウェル) でコンディショニングしました (室温で 30 分間)。

3. 以下のように細胞をウェルに播種し、組織培養インキュベーター (37°C、5% CO₂) で一晩 (16 ~ 20 時間) 静かにインキュベートしました。
 - CMV 血清陽性ドナーおよび CMV 血清陰性ドナー由来 PBMC : CMV ペプチド (最終濃度 2 μ g/mL) を含有する完全培地中に 1 ウェルあたり 50,000、25,000、12,500 個の細胞を含む 100 μ L の液
 - ポジティブコントロール : イオノマイシン (0.3 μ M) および PMA (0.2 μ M) で活性化した PBMC 100 μ L
 - ネガティブコントロール (血清陽性ドナー由来 PBMC、CMV ペプチド刺激なし) : 完全培地中に 1 ウェルあたり 50,000 個の細胞を含む 100 μ L の液
4. 3 日目にプレートを吸引して細胞を除去し、ウェルを 1X PBS (200 μ L/ウェル) で 4 回洗浄しました。
5. プレートをビオチン標識検出抗体 (1X PBS + 0.5% FBS 中 0.25 μ g/mL、100 μ L/ウェル) でインキュベートしました (室温で 2 時間)。
6. プレートを 1X PBS (200 μ L/ウェル) で 5 回洗浄しました。
7. 1:1000 のストレプトアビジン-HRP (1X PBS + 0.5% FBS 溶液) 100 μ L を各ウェルに添加し、プレートを室温で 1 時間インキュベートしました。
8. ウェルを 1X PBS (200 μ L/ウェル) で 5 回洗浄しました。
9. TMB 基質 (100 μ L/ウェル) を添加し、スポットが現れるまで (約 5 分間) 反応させました。
10. ddH₂O でウェルを洗浄して発色を停止させました。
11. メンブレンの下側を ddH₂O でリンスした後、メンブレンを乾燥させました。
12. Keyence® VHX-2000 直立顕微鏡を用いて各ウェルを観察しました。デジタル画像を取得し、これを用いてスポットを手動で計数しました。

結果

今回は、20 ~ 30 歳のドナー 7 例から得られた CMV 血清陽性サンプル (4 個) と CMV 血清陰性サンプル (3 個) の両方で構成される PBMC を使用しました。ポジティブコントロールとして、IFN- γ 応答の検出を確認するため、PBMC を PMA- イオノマイシンで活性化しました (図 2)。IFN- γ 応答が明らかに観察され、多数のスポットが視覚的に検出されたことから、播種した PBMC 集団が PMA- イオノマイシンによって有意に刺激されていることが示唆されました。スポットは多数観察され、均等に分散していました。これは、MultiScreen® HTS-IP PVDF メンブレン表面が抗体で均一かつ高度にコーティングされていることを示しています。PBMC 細胞数が減少すると、それに伴って観察されるスポット数が減少しました。CMV 血清陽性ドナー由来の非刺激 PBMC をネガティブコントロールとして用いました。予想されるとおり、これらのサンプルでは、ELISpot アッセイで識別可能な IFN- γ サイトカイン応答は認められませんでした (データ省略)。

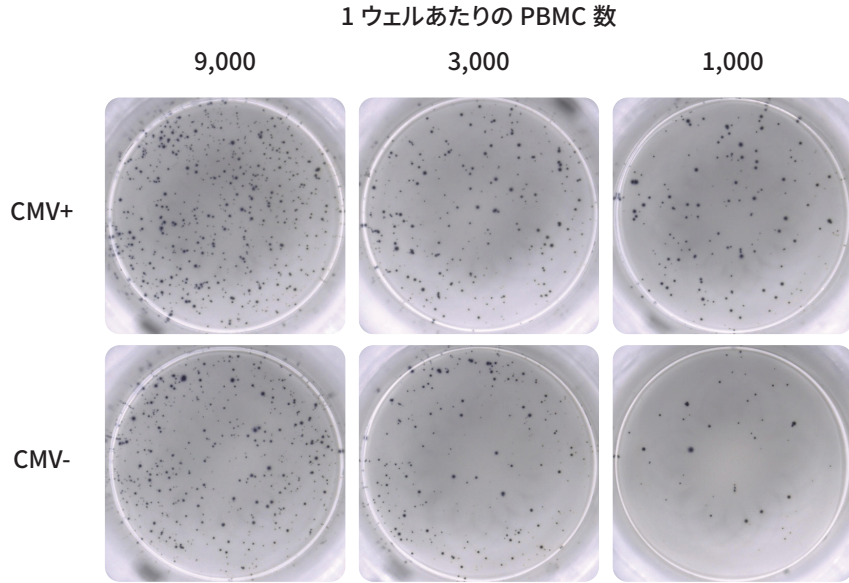


図2 0.3 μM イオノマイシン+ 0.2 μM PMA を用いて PBMC からの IFN-γ 分泌を刺激した ELISpot アッセイ。CMV 血清陽性ドナー (CMV+、上パネル) および CMV 血清陰性ドナー (CMV-、下パネル) の結果を示しました。ここに示したとおり、3 段階の細胞密度 (9,000、3,000 および 1,000 個 / ウェル) で MultiScreen® HTS-IP フィルタープレートに PBMC を播種しました。血清陽性ドナー由来の未処理 PBMC (陰性対照) は 0 ~ 3 個のスポットが観察されました (データ省略)。

次に、CMV 血清陽性ドナーおよび CMV 血清陰性ドナー由来 PBMC のウイルス特異的 IFN-γ 応答を比較しました。ヒト CMV 由来タンパク質である pp50、pp65、IE1、IE2 およびエンベロープ糖タンパク質 B を代表するペプチドプールを用いて、CMV 特異的 T 細胞応答を誘導しました。免疫細胞を抗原性 CMV ペプチドプールで *in vitro* 処理すると、IFN-γ などのサイトカインの産生が刺激されることはよく知られています⁵。予想されるとおり、CMV 血清陽性ドナー由来 PBMC を CMV ペプチドプールで処理したところ、

IFN-γ が細胞内で分泌されました (図3)。スポットは明確であったことから、MultiScreen® HTS-IP PVDF メンブレン表面が抗体で均一かつ高度にコーティングされていることが示唆されました。対照的に、CMV 血清陰性ドナー由来 PBMC を CMV ペプチドプールで刺激しても、検出可能な細胞内 IFN-γ の分泌が認められなかったことから、非曝露集団由来の PBMC には CMV 特異的 T 細胞が存在しないか、存在したとしても極めて低頻度であることが示されました。

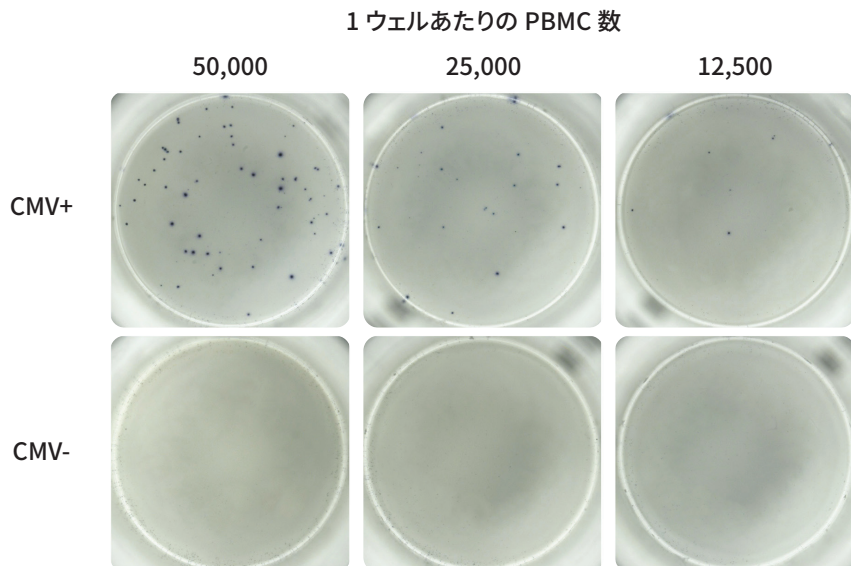


図3 CMV 由来ペプチドを用いて IFN-γ 分泌を刺激した ELISpot アッセイ。CMV 血清陽性ドナー (上パネル) および CMV 血清陰性ドナー (下パネル) 由来 PBMC を用いて、CMV ペプチド刺激を受けて IFN-γ を分泌できる CMV 抗原特異的 T 細胞の有無を調べました。CMV 感染歴のあるドナー由来のサンプル (CMV+) は、CMV ペプチドプールで刺激後、IFN-γ 分泌 T 細胞に対応する多数の明確なスポットが認められました。感染歴のないドナー由来のサンプル (CMV-) は、CMV ペプチドプールで刺激しても検出可能なスポットは認められませんでした。ここに示したように、細胞はさまざまな濃度で MultiScreen® HTS-IP フィルタープレートの各ウェルに播種しました。

集計した結果を図4に示します。全体として、IFN- γ を分泌する抗原特異的T細胞の数は、CMV血清陽性ドナー由来のサンプルから播種したPBMCの総数と相関していました。50,000個のPBMCを播種したウェルでは、CMV血清陽性サンプルとCMV血

清陰性サンプルを比較すると、スポット数に60倍の差が認められました(CMV血清陽性サンプルの 66 ± 13 個に対してCMV血清陰性サンプルは 1 ± 1 個、図4B参照)。

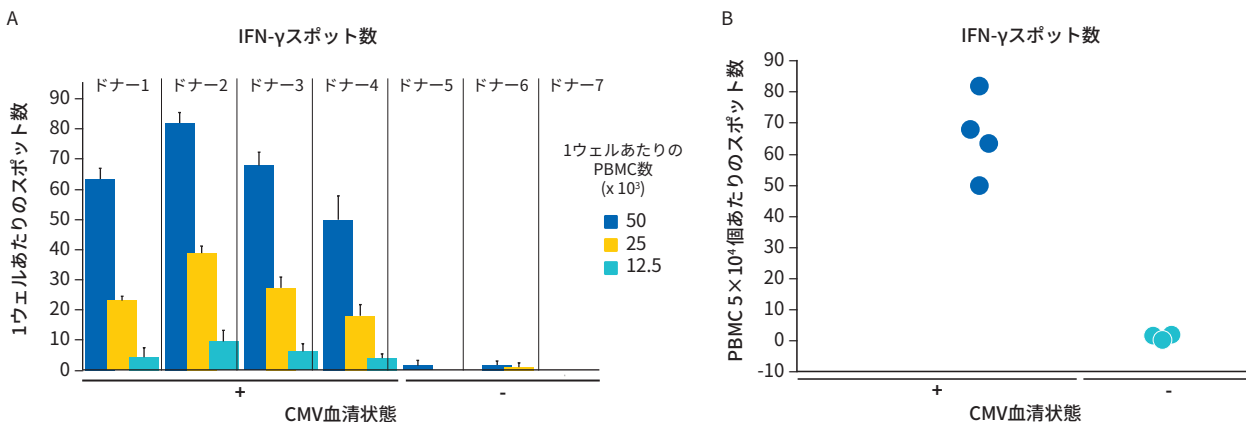


図4 A) ELISpotの結果の定量化。B) 50,000個のPBMCを播種したウェルのスポット数の直接比較。ドナー間でバラつきが認められましたが、CMV血清陽性ドナー由来のPBMCは、CMV血清陰性ドナー由来のPBMCと比較して、CMVペプチド刺激後に観察されたスポット数が有意に増加($p < 0.01$)しました。

結論

ELISpotアッセイを用いて、CMVペプチドプールで刺激したCMV血清陽性ドナーおよびCMV血清陰性ドナー由来PBMCによるサイトカイン産生を単一細胞レベルで評価しました。両集団間のIFN- γ スポット形成には有意差が認められ、サイトメガロウイルスに対するドナーの曝露歴とCMV抗原特異的T細胞数の増加との間に相関関係が認められました。このELISpotアッセイでは、細胞の識別および可視化のために、PVDFメンブレンを備えたMultiScreen® HTS-IPフィルタープレートを使用しました。データから明確なスポットの均一な分布およびスポットと播種細胞数との直線関係が示されたことから、強力な膜結合特性、優れた光学特性およびアッセイの頑健性が示されました。ELISpotアッセイは使いやすく、自動化可能なマイクロプレートベースのフォーマットにより、スループット性を向上できる可能性があります。

参考文献

- Czerkinsky, C., Nilsson, L., Nygren, H., Ouchterlony, O., and Tarkowski, A. (1983). A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 65 (1-2): 109-121.
- Sedgewick, J. and Holt, P. (1983) A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody secreting cells. *J. Immunol. Methods*. 57:301-309.
- Sahin, U., Muik, A., Derhovanessian, E. et al. (2020) COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses. *Nature*. 586:594-599.
- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, et al. (2003) Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol*. 77(8):4588-4596.
- Yang, F., Patton, K., Kasprzyk, T. et al. (2021) Validation of an IFN-gamma ELISpot assay to measure cellular immune responses against viral antigens in non-human primates. *Gene Ther*. Jan 11;1-14.



本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。掲載価格は希望販売価格(税別)です。実際の価格は弊社製品取扱販売店へご確認ください。なお、品目、製品情報、価格等は予告なく変更される場合がございます。予めご了承ください。記載内容は2023年3月時点の情報です。Merck, the vibrant M, and Millipore are trademarks of Merck KGaA, Darmstadt, Germany or its affiliates. All other trademarks are the property of their respective owners. Detailed information on trademarks is available via publicly accessible resources. ©2023 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved. Original is Lit. No. MK_AN8259EN Ver. 1.0 37173 09/2021

メルク株式会社

ライフサイエンス サイエンス & ラボソリューションズ事業本部

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.com/bio

E-mail: jpts@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140