

#### 4 アネキシン V 法

**原理** アポトーシスの初期段階で細胞膜の反転が起こり、**フォスファチジルセリン**が細胞表面上に露出する。**アネキシン V**が、カルシウム存在下で**フォスファチジルセリン**と特異的に結合することを利用して、**FCM**を用いてアポトーシス細胞を検出する。以下に市販キットを用いた方法について記した。

**試薬** Annexin V-Cy5 Apoptosis Detection Kit (BioVision)

- 実施**
- ① 細胞沈渣 ( $1 \times 10^5$ ) に結合緩衝液  $500 \mu\text{l}$  を加え、細胞浮遊液を作製する。
  - ② アネキシン V-Cy5  $5 \mu\text{l}$  を加え、遮光して室温 5 分間反応させる。
  - ③ FCM で測定する。アネキシン V で染色される細胞には、アポトーシスおよび二次的ネクローシスによる細胞がある。

図 9-23 に B リンフォーマ細胞のアポトーシスの解析例を示した。

**注意**

- ① FITC, PE, APC, ビオチンなどで標識されたアネキシン V がコスモバイオ、ベックマンコールター、フナコシから市販されている。

- ② PI 染色を併用することでアポトーシス初期細胞を測定することができる。アネキシン染色 (+)/PI 染色 (-) が**初期段階アポトーシス細胞**、アネキシン染色 (+)/PI 染色

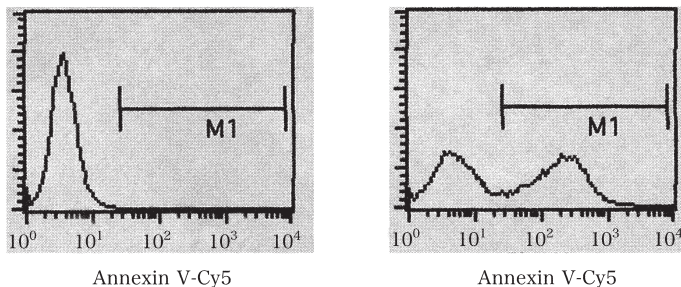


図 9-23 B リンフォーマ細胞の抗 IgM 抗体刺激後のアネキシン V 染色

左：コントロール 右：抗 IgM 抗体処理 (M1：アポトーシス細胞)

(+)が二次的ネクローシス細胞である。PI の代わりに 7-AAD を用いた ANNEXIN V-FITC/7-AAD kit が、ベックマンコールターから市販されている。