

## フローサイトメトリーによる末梢血樹状細胞の検出

## 概要

樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) は、抗原の取り込み、プロセッシング、およびT細胞への抗原提示を行なっている<sup>1</sup>。このような機能は、B細胞や単球のような抗原提示細胞と共通するものであるが、樹状細胞に特徴的なことは一次免疫応答を誘導する(例えば、ナイーブT細胞の活性化)ことである。樹状細胞は末梢免疫組織<sup>1</sup>に分布しているが、樹状細胞的特徴を有する様々な細胞群は血液やリンパ系組織以外の組織にもみられる。これらの細胞はリンパ系組織における樹状細胞の前駆細胞と考えられている<sup>2-4</sup>(参考文献1, 5, 6を参照)

樹状細胞は血液や組織における分布が少なく、また樹状細胞に特異的なマーカーがないためにその研究は進まなかった。樹状細胞に関する知識は主に密度勾配遠心分離により細胞密度を高めて研究するか、培養、またはnegative selectionなどの研究から得られたものであった<sup>7-11</sup>。これらの方法は、細胞密度や吸着性などの樹状細胞の特徴を利用するか、または数種のサイトカインの組み合わせによる樹状細胞の選択的培養や樹状細胞に存在しないマーカー(樹状細胞はリンパ球、単球、顆粒球にみられる細胞系マーカー(lineage marker: lin)を発現しない)を利用するものである。しかし、このような方法では、樹状細胞の収率や純度が低く時間がかかるうえ、操作中に細胞の機能を損ねることもあり、樹状細胞数の定量は不可能である。

血液やリンパ組織から得られた樹状細胞を活性化または培養すると、樹状細胞のマーカーとしてCD83、CMRF-44が高レベルに発現されることが最近報告された<sup>12-15</sup>。しかし、これらのマーカーは活性化状態の樹状細胞マーカーとしては優れていても、生体内では存在しないか、または低レベルでしか発現していないためマーカーとしては使用できない。分離された新鮮樹状細胞に結合する抗体を検索した結果、最近になって初めてリンパ器官における樹状細胞サブクラスの特異マーカーとして、抗IL-3レセプター $\alpha$ 鎖(IL-3R $\alpha$ )が同定された<sup>16</sup>。ヒト末梢リンパ組織から単核細胞を調製すると、樹状細胞の大部分がこれら樹状細胞サブクラスであった。さらに、IL-3R $\alpha$ (CD123)に対する抗体は特異性が高く、positive immuno-magnetic selectionを1回行なっただけで末梢リンパ組織からの単核細胞調製物中のCD123<sup>+</sup> DC細胞密度を200倍高めることができた<sup>16</sup>。また、この抗体は免疫組織化学で染色された組織片の細胞同定にも使用でき、さらにリンパ小節外のT細胞密度の高い領域のCD123<sup>+</sup>樹状細胞を選択的に認識できた<sup>16</sup>。この樹状細胞はHartらが記載した扁桃腺樹状細胞や、Grouardらが記載したプラズマ細胞様T細胞樹状細胞と同一である<sup>18</sup>。CD123<sup>+</sup>樹状細胞は、末梢血中にも見られ、これは以前にその特徴が解明されたCD11c<sup>-</sup>DC<sup>19</sup>およびCD33<sup>dim</sup>CD14<sup>-</sup>CD16<sup>-</sup>DC<sup>20</sup>と同一である。



PBMCから分離直後のCD123<sup>+</sup>樹状細胞

樹状細胞には特異マーカーがないので、樹状細胞が別の細胞系を構成しているのかどうかについては今だに不明である。問題をさらに複雑にしているのは、GM-CSFおよびTNF- $\alpha$ の存在下で培養した場合、末梢血成熟単核細胞および未分離CD34<sup>+</sup>前駆細胞からも樹状細胞が生じるという事実である<sup>7, 10, 13, 21, 22</sup>。CD123抗体を用い、樹状細胞に分化するCD34<sup>+</sup>前駆細胞群が同定されている<sup>16</sup>。この細胞は、ランゲルハンス細胞型樹状細胞となるCD34<sup>+</sup>前駆細胞とは明らかに異なる<sup>16</sup>。従って、高レベルのCD123染色により、別の細胞系に属するヒト樹状細胞が同定される可能性があり、さらに様々な組織における樹状細胞相互の関連性を確立できる可能性もある。

CD123<sup>+</sup>樹状細胞とは異なる表現型を有する別の樹状細胞が末梢リンパ組織に同定され、CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>lin<sup>dim/negative</sup>細胞と定義されている。これらの樹状細胞はCD123<sup>+</sup>樹状細胞とは異なり、胚中心に局在している<sup>23</sup>。CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>lin<sup>dim/negative</sup>樹状細胞も血液中に存在し<sup>19</sup>、CD33<sup>bright</sup>CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>-</sup>樹状細胞と同一である<sup>20</sup>。

このような結果から、樹状細胞系が異なる発生過程をたどる複数の細胞型から構成されていることは明らかである。しかし、これらの細胞型の機能やその役割については不明であるし、また樹状細胞数が通常の生理学的状態あるいは疾患状態でどのように調節されているかも不明である。免疫表現型が異なることや各リンパ器官に別々に局在していることなどは、CD123<sup>+</sup>樹状細胞とCD11c<sup>+</sup>樹状細胞が本質的に異なる機能的役割を果たしていることを示唆している<sup>16, 19, 23</sup>。このような研究の重要性は、樹状細胞を利用して腫瘍や感染性因子に対する治療法の開発が考えられていることから明らかである。様々な報告によれば、このようなアプローチは腫瘍の増殖を阻止したり、あるいは腫瘍の縮小にも有望であることが示されている<sup>24-26</sup>。

新たに同定された樹状細胞マーカーを使用することにより、現在のシステム\*を使用して、新鮮末梢血から樹状細胞サブセットの検出、定量、分離が初めて同時にできる。この方法は3カラー解析または4カラー解析に基づくものであり、迅速にしかも少量の試料で行なうことができる。従って、フローサイトメトリーによる樹状細胞の解析は、通常の生理学的状態だけでなく疾患状態における免疫調節上の樹状細胞の役割を詳細に説明するための研究促進に役立つと考える。

\* 研究用のみに使用、診断・治療用には使用できません。

## 材料および方法

### 解析方法

この解析では末梢血樹状細胞(DC)の2種類のサブセット、CD123<sup>+</sup>(抗IL-3R $\alpha$ )<sup>+</sup>樹状細胞とCD11c<sup>+</sup>樹状細胞が検出できるようにデザインされている。CD123樹状細胞およびCD11c樹状細胞は、複数のマーカーを組み合わせるにより同定できる。これら樹状細胞サブセットはどちらもHLA-DRを高レベルに発現するが、単球、リンパ球、NK細胞の細胞系マーカーは低レベルにしか発現しない。従って、樹状細胞は、個々の抗体で選別することなく発現レベルの低い細胞系マーカーで検出できるので、細胞系マーカーを単一の蛍光色素で標識し、検出する<sup>16, 19</sup>。本書の解析では、細胞系マーカーの標識抗体試薬として複数の抗体(CD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56)を含むLineage Cocktail 1(lin 1) FITCを使用した。

さらに、この解析により好塩基性顆粒球も同定できる。好塩基球は細胞系マーカー陰性であるが樹状細胞のサブセットCD123<sup>+</sup>細胞と同じレベルのCD123を発現する。しかし、HLA-DRの発現がないことによりCD123<sup>+</sup>樹状細胞から区別できる<sup>16, 27-31</sup>。

### 細胞

この解析は、全血(EDTA、ACDまたはヘパリンナトリウム添加採血管に採取)および末梢血単核球細胞(PBMC)用にデザインされている。最適な結果が得られるのは、採血後24時間以内の血液である。

### 試薬

1. 樹状細胞検出用BD蛍光標識モノクローナル抗体

#### 4カラー解析

Lineage Cocktail 1(lin 1) FITC( BD カタログ番号: 340546 )( lin 1はCD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56に対する抗体を含む )

CD123( 抗IL-3R $\alpha$  ) PE( BD カタログ番号: 340545 )

抗HLA-DR PerCP( BD カタログ番号: 347364 )

CD11c APC( BD カタログ番号: 340544 )

マウスIgG<sub>1</sub> PE( BD カタログ番号: 349043 )

マウスIgG<sub>2a</sub> APC( BD カタログ番号: 340473 )

#### 3カラー解析

Lineage Cocktail 1( lin 1 ) FITC( カタログ番号: 340546 ) ( lin 1はCD3、CD14、CD16、CD19、CD20、CD56に対する抗体を含む )

CD123( 抗IL-3R $\alpha$  ) PE( BD カタログ番号: 340545 )

CD11c PE( BD カタログ番号: 347637 )

抗HLA-DR PerCP( BD カタログ番号: 347364 )

マウスIgG<sub>1</sub> PE( BD カタログ番号: 349043 )

マウスIgG<sub>2a</sub> PE( BD カタログ番号: 349053 )

2. BD FACS Lysing Solution( 10X )( BD カタログ番号: 349202 )

脱イオン水で10倍に希釈する。詳細についてはパッケージの使用説明書を参照。

3. 洗浄用緩衝液: リン酸緩衝食塩水( PBS )

Dulbeccoリン酸緩衝食塩水( 10X )( GIBCO カタログ番号: 14200-075 ) 脱イオン水で10倍に希釈

4. 1%パラホルムアルデヒドPBS溶液( 1X )

### 器材

1. ヘパリンナトリウム( BD Vacutainer カタログ番号: 367673 ) EDTA( BD Vacutainer カタログ番号: 367661 ) Vacutainer 採血管
2. ファルコン 5 mLラウンド チューブ( 外径12×75 mm ) ポリスチレン ツーポジション キャップ付き( BD カタログ番号: 352058 )
3. Vortexミキサー
4. BD FACSTM フローサイトメーター
5. 遠心器
6. アスピレーター
7. マイクロピペット( ピペットマン、Rainin Instrument Co、または同等品 )

表1 末梢血樹状細胞の3カラー解析、4カラー解析

		FITC	PE		PerCP	APC
4カラー解析	試験管1	lin 1 20 μL	CD123	全血に対し5 μL PBMCに対し10 μL	抗HLA-DR 10 μL	CD11c 5 μL
	試験管2	lin 1 20 μL	マウスIgG <sub>1</sub>		抗HLA-DR 10 μL	マウスIgG <sub>2a</sub>
3カラー解析	試験管1	lin 1 20 μL	CD123	全血に対し5 μL PBMCに対し10 μL	抗HLA-DR 10 μL	
	試験管2	lin 1 20 μL	マウスIgG <sub>1</sub>		抗HLA-DR 10 μL	
	試験管3	lin 1 20 μL	CD11c 5 μL		抗HLA-DR 10 μL	
	試験管4	lin 1 20 μL	マウスIgG <sub>2a</sub>		抗HLA-DR 10 μL	

全血の直接免疫蛍光染色

- モノクローナル抗体を適切な試験管に入れる。(表1参照)  
注意：テスト毎に、CD11c PEは5 μL、CD11c APCは5 μL、抗HLA-DR PerCPは10 μL、CD123 PEは5 μL使用すること。
- 各試験管に全血100 μLを加える。Vortexで混和し、暗室、室温で15分インキュベートする。
- BD FACS Lysing Solution 2 mLを加える。Vortexで混和し、暗室、室温で10分間インキュベートする。
- 300 gで5分間遠心する。上清を吸引除去する。
- Vortexで静かに混和し、洗浄緩衝液1 mLを加える。
- 300 gで5分間遠心する。
- 上清を吸引除去する。Vortexで静かに混和し、1%パラホルムアルデヒドPBS溶液300 μLに浮遊させる。
- BD FACSフローサイトメーターで解析する。検体をすぐに解析できない場合、暗室、2 ~ 8 で24時間まで保存できる。

PBMCの直接免疫蛍光染色

- 適切な試験管にモノクローナル抗体を入れる(表1参照)  
注意：テスト毎に、CD11c PEは5 μL、CD11c APCは5 μL、抗HLA-DR PerCPは10 μL、CD123 PEは10 μL使用すること。
- 各試験管にはPBMC 50 μL(1×10<sup>6</sup>細胞)を加える。Vortexで混和し、暗室、氷中で25分間インキュベートする。
- Vortexで静かに混和し、洗浄緩衝液1 mLを加える。

- 300 gで5分間遠心する。
- 上清を吸引除去する。Vortexで静かに混和し、1%パラホルムアルデヒドPBS溶液300 μLに浮遊させる。
- BD FACSフローサイトメーターで解析する。検体をすぐに解析できない場合、暗室、2 ~ 8 で24時間まで保存できる。

データ収集と解析

- BD CaliBRITE™ ビーズおよびソフトウェアBD FACSComp™ を用いて光電子増倍管(PMT)電圧、蛍光compensationを調整し装置の感度をチェックする。
- 3カラー解析にはBD FACSComp( version 2.0以上 )を使用する。4カラー解析にはdual laserのフローサイトメーターとBD FACSComp( version 4.0以上 )を使用する。前方散乱光(FSC)増幅器は手動で調整できる。

注意：適切な結果を得るには、正しいバージョンのBD FACSCompを使用し装置のセットアップを適切に行なう必要がある。

- フローサイトメーター用に調製したサンプルを用意する。データ収集には、BD CellQuestを用いて、ThresholdをFSCに設定し、debrisを取り除く。

注意：末梢血中では樹状細胞の頻度が低いので、少なくとも50,000 eventsを得る必要がある。

- データ解析にはBD CellQuest、BD Attractors™、BD PAINT-A-GATE<sup>PRO</sup>™などのソフトウェアを使用する。BD CellQuestとBD Attractorsのゲーティング法を以下に述べる。

**BD CellQuest( 3カラー解析、4カラー解析 )**

1. 細胞とdebrisを区別する。側方散乱( SSC )と前方散乱(FSC) によるドットプロットを表示する( ゲート設定はされていない )。 R1領域を設定し、debrisと死細胞を除外する。図1参照。

2. lin 1 dimおよびnegative eventsを同定する。

R1領域にゲート設定し抗HLA-DR/linドットプロットを表示する。lin 1 dimとネガティブ細胞が含まれるようにR2領域を設定する。図2参照。

3. 末梢血DCサブセットと好塩基球を同定する。

注意：4カラー解析の場合、試験管1ではDCサブセットと好塩基球が染色され、試験管2はコントロール染色できる。3カラー解析の場合、試験管1と試験管3ではDCサブセットと好塩基球が染色され、試験管2と試験管4がコントロールとなる。コントロール試験管は非特異的染色細胞を同定するために用いる。

ゲートリストを開き、R1 and R2をG3と定義する。G3にゲートを設定し抗HLA-DR/CD123ドットプロットおよび抗HLA-DR/CD11cドットプロットを表示する。図3Aおよび3B参照。これらのドットプロットはlin 1 dim/negative 細胞だけを表示する。R3領域を設定して、好塩基球( 抗HLA-DR-/CD123+ ) を選別する。R4領域を設定して、CD123+ DC( 抗HLA-DR+/CD123+ ) を選別する。R5領域を設定して、CD11c+ DC( 抗HLA-DR+/CD11c+ ) を選別する。

4. 図4aに示すゲートリストを表示する。

5. 細胞群の解像度を確認する。

すべてのパラメーターを用いて、個々の細胞クラスターの解像度を解析する。図4bは、全血試料のCD123+ DC、CD11c+ DC、および好塩基球のクラスター解像度を4カラーで示す。測定する目的の細胞だけを表示したい場合、表2のロジカルゲートを用いる。図4bのプロットをフォーマットする場合、マルチカラーゲーティングオプションを選択する。細胞群の詳しい説明については、'解析上のヒント'を参照。

6. 細胞頻度を測定する

測定する目的の細胞群をゲートリスト( 図4A )から選別したらR1にゲート設定されたドットプロットから統計データを得る。

- CD123+ DC            R1 and R2 and R4
- CD11c+ DC           R1 and R2 and R5
- 好塩基球            R1 and R2 and R3

注意：3カラー解析を行なう場合、2種類の異なるドットプロットから適切な統計データが得られる。CD11c+ DCの統計データ

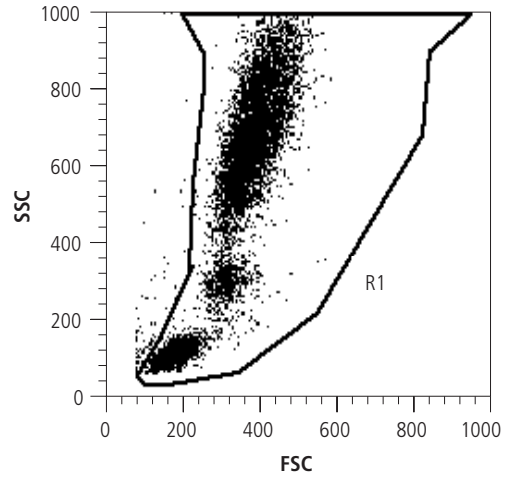
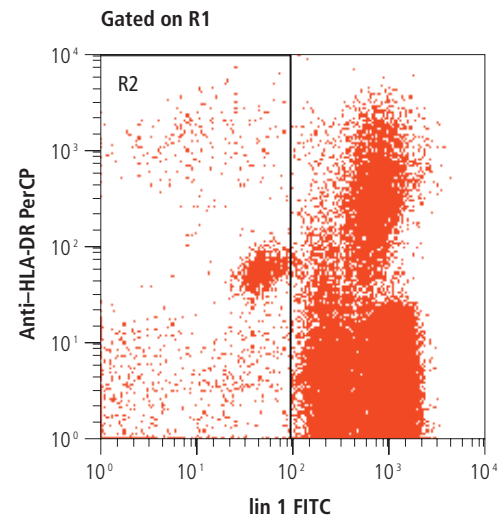


図1 全血、4カラー測定。ゲートなしのSSC/FSCドットプロット。全イベント中、20%が表示されている。



Gate: Events excl. debris (R1)			
Total Events: 50000			
Gate	Events	% Gated	% Total
Events excl. debris (R1)	49659	100.00	99.32
lin 1 dim/-events (R2)	1962	3.95	3.92
G3	1962	3.95	3.92
Basophils	515	1.04	1.03
CD123+ DCs	69	0.14	0.14
CD11c+ DCs	102	0.21	0.20
G7	686	1.38	1.37

図2 全血、4カラー測定。R2領域には、樹状細胞群、好塩基球および好酸球などの、lin 1 dimおよび陰性イベントが含まれている。R1イベントはすべて表示されている。

々はCD11c PEと抗HLA-DR PerCPドットプロットから得られる。CD123+ DCおよび好塩基球の統計データはCD123 PEと抗HLA-DR PerCPドットプロットから得られる。

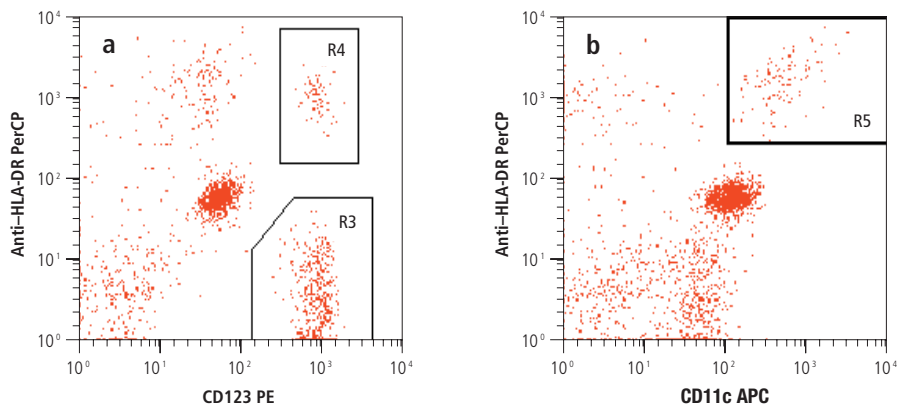


図3 全血の4カラー解析。debrisを除く eventsにゲート設定し、ロジカルゲートG3 (図4a)に定義されたlin 1 dimとnegative eventsにゲート設定する。(図3a)R3領域には、好塩基球が選別され、R4領域にはCD123<sup>+</sup> DCが選別される。(図3b)R5領域にはCD11c<sup>+</sup> DCが選別される。G3(R1 and R2) eventsすべてが表示される。

Multi color	Color	Label	Definition
		Events excl. debris (R1)	R1
		lin 1 dim/- events (R2)	R2
		G3	R1 and R2
		Basophils	R1 and R2 and R3
		CD123 <sup>+</sup> DCs	R1 and R2 and R4
		CD11c <sup>+</sup> DCs	R1 and R2 and R5
		G7	R1 and R2 and (R3 or R4 or R5)

図4a CellQuest Gate List

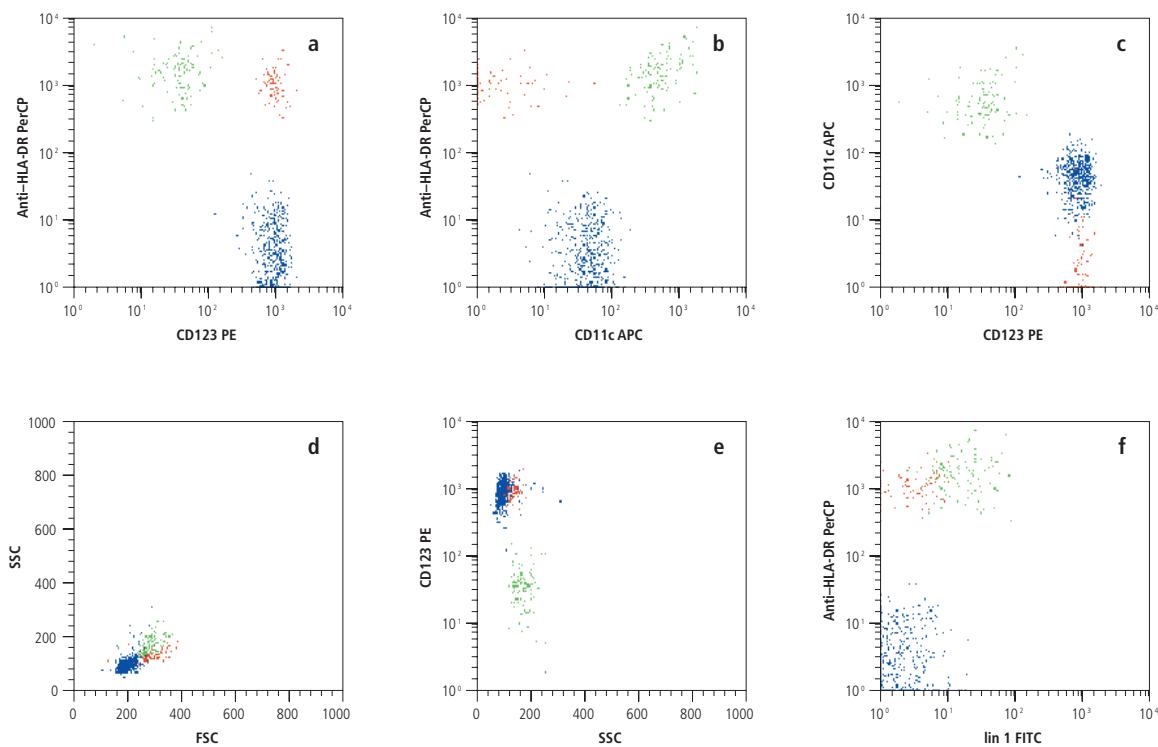


図4b 全血4カラー解析。ゲートG7を表示。G7はR1 and R2 and (R3 or R4 or R5)で定義されている。ロジカルゲートにより、測定目的のポピュレーションのみ表示される。赤 = CD123<sup>+</sup> DC、緑 = CD11c<sup>+</sup> DC、青 = 好塩基球

表2 末梢血樹状細胞および好塩基球の3カラー解析、4カラー解析用ロジカルゲーティング

解析	標的細胞	ロジカルゲーティング
4カラー	好塩基球、CD123 <sup>+</sup> DC, CD11c <sup>+</sup> DC	R1 and R2 and ( R3 or R4 or R5 )
3カラー	好塩基球、CD123 <sup>+</sup> DC	R1 and R2 and ( R3 or R4 )
3カラー	CD11c <sup>+</sup> DC	R1 and R2 and R5

### BD Attractors\*(3カラー解析、4カラー解析)

この解析を行なうためには、BD Attractorsソフトの使い方を十分に知っている必要がある。初歩的な使用説明についてはBD Attractorsソフトウェアマニュアルを参照。

ステップ1から4はCD123<sup>+</sup>、CD11c<sup>+</sup>末梢血DCおよび好塩基球の同定用に4カラーBD Attractorsテンプレートの作り方を記載している。このテンプレートはBD CellQuest分析の項に記載したものと同じ原理を応用している。

3カラー解析には2種類のBD Attractors解析ドキュメントをデザインする必要がある。CD11c<sup>+</sup> DC群を検出するにはステップ3cと3d以外のすべてのステップに従いドキュメント1を作成する。CD123<sup>+</sup> DCと好塩基球を区別するにはステップ3c以外のすべてのステップに従いドキュメント2を作成する。

#### 1. 細胞とdebrisを区別する。

- SSC/FSCドットプロットを表示し、固定ブラックホールアトラクターを用いてdebris、死細胞を除去する。図5aのアトラクターdebris1および2を参照。
- 抗HLA-DR/lin 1ドットプロットを表示し、固定アトラクターですべてのeventsをカバーする。アトラクターの色をグレイに調整する。図5bのAll eventsアトラクターを参照。

注意：すべてのプロットをアトラクターでカバーしていることを確認する。

#### 2. lin 1 dimとnegative細胞を同定する。

- 抗HLA-DR/lin 1ドットプロットのAll eventsアトラクターを選択する。lin 1 dimとnegative eventsに固定サブアトラクターを載せる。アトラクターの色をグレイに調整する。図5cのアトラクターlin 1 dimとnegative eventsを参照。

#### 3. 末梢血DCと好塩基球を同定する。

- 抗HLA-DR/CD123と抗HLA-DR/CD11cドットプロットを表示する。図5dと5cを参照。
- 抗HLA-DR/lin 1ドットプロットのlin 1 dimとnegative eventsアトラクターを選択する。アップルメニューからDisplayを選択し、次にSelected Populatoion Only、Classify dataを選択する。図5cのlin 1 dimとnegative eventsアトラクターを参照。
- 抗HLA-DR/CD123ドットプロットでCD123<sup>+</sup> DC群を選別する。抗HLA-DR<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup>活性が高いevents上にサブアトラクターを載せる。サブアトラクターの色を赤に調整する。図5dのCD123<sup>+</sup> DCアトラクター参照。
- 抗HLA-DR/lin 1ドットプロットのlin 1 dimとnegative eventsアトラクターを選択する。抗HLA-DR/CD123ドットプロットで好塩基球を選別する。抗HLA-DR<sup>+</sup>/CD123<sup>+</sup> eventに対しては、X軸に対して傾いたサブアトラクターを載せる。サブアトラクターの色をブルーに調整する。図5dの好塩基球アトラクターを参照。
- 抗HLA-DR/lin 1ドットプロットのlin 1 dimとnegative eventsアトラクターを選択する。抗HLA-DR/CD11cドットプロットでCD11c<sup>+</sup> DC群を選別する。抗HLA-DR<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> eventsにサブアトラクターを載せる。サブアトラクターの色をグリーンに調整する。図5eのCD11c<sup>+</sup> DCアトラクターを参照。
- Selected Populatoion Only、Classify dataをoffにする。

\* 米国特許 No. 5,627,040; 5,739,000; 5,795,727

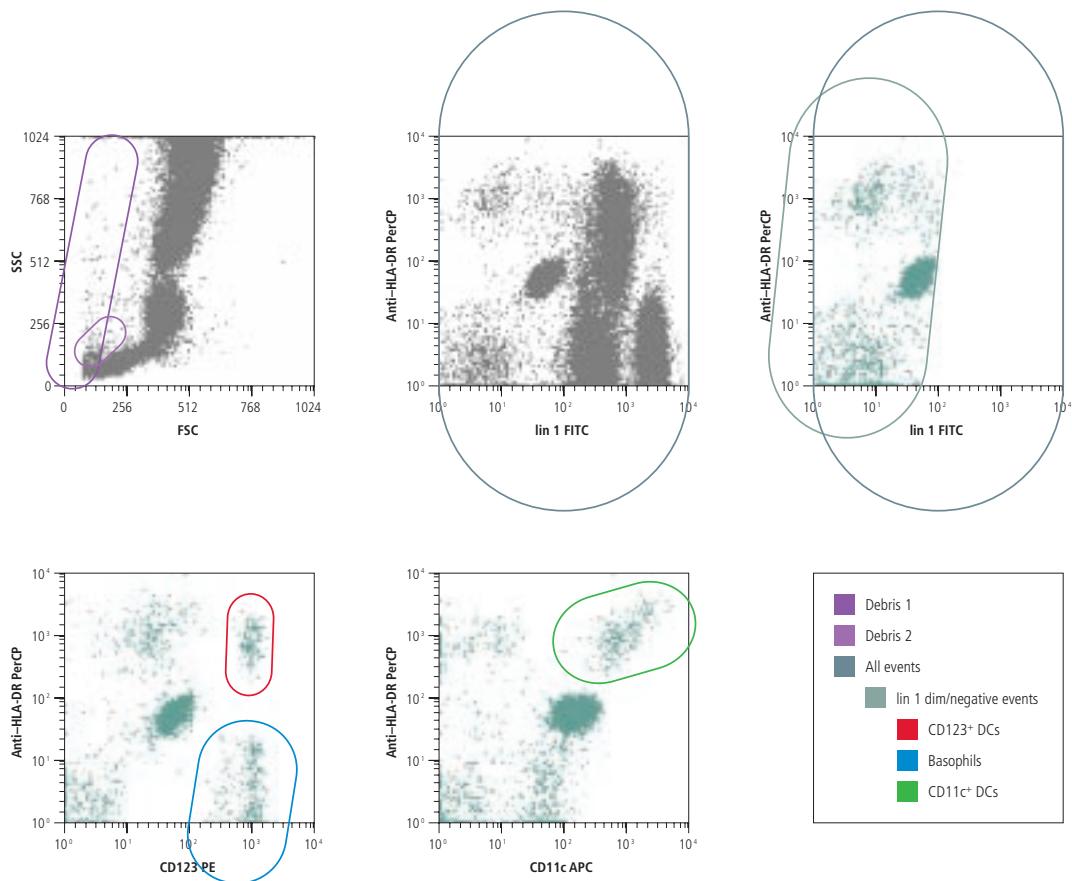


図5 アトラクターテンプレートを用いた、全血中のCD123<sup>+</sup>およびCD11c<sup>+</sup> DC細胞群、好塩基球の4カラー解析。図5a-5eは2パラメータドットプロット。図5dおよび5eはlin 1 dim/negative eventsアトラクターだけを選別したeventsを示す。図5fはアトラクターの分類組織図

#### 4. 細胞群の解像度をチェックする。

表示したいアトラクターをハイライトし、アップルメニューからDisplayを選択し、Selected Population Onlyを選択する。末梢血DCおよび好塩基球細胞群の頻度、細胞数は、BD Attractorsソフトウェアの結果のページに示される。

#### BD PAINT-A-GATE<sup>PRO</sup>

図4bに示すようなドットプロットを表示する。SSC/FSCドットプロット中のdebris、死細胞をpaintし、除去する。BD CellQuestの手順と同じ解析手順で解析を行なう。

表3 CD11c<sup>+</sup>、CD123<sup>+</sup>DC、および好塩基球の免疫表現型(蛍光強度)

パラメータ	CD123 <sup>+</sup> DC	CD11c <sup>+</sup> DC	好塩基球	参照図
lin 1	-	-/+	-	4b(f)
抗HLA-DR	++	+++	-	4b(a, b, f)
CD123	+++	+	+++	4b(a, c, e)
CD11c	-	+++	+	4b(b, c)

### BD CellQuest解析の結果

DCは、末梢血には低頻度にしかみられない。図2は、4カラー解析を用いた、正常な全血試料からの統計データを示している。このデータは50000 eventsの収集が必要であることを示している。

表3には標的細胞群の免疫表現型をまとめた。

### 解析上のヒント

本解析では、健康人からの新鮮末梢血を用いて最適な結果が得られた。健康人以外からの試料については解析されていない。新鮮血は24時間以内に使用する必要がある。解析を行なう場合、下記の事項に注意する。

- CD11c<sup>+</sup> DCの不完全分離

試料の保存時間が長い場合、または、試料にストレスがかかる場合、細胞の活性化または分化を生じることがある。活性化されると、DCサブセットの細胞系マーカーがアップレギュレーションされCD11c<sup>+</sup> DCとCD11c<sup>+</sup> lin1<sup>+</sup> non-DC白血球の分離が不完全になる。

- CD11c<sup>+</sup> DCは、新鮮末梢血から分離された場合、CD14を低レベルに発現する<sup>20</sup>。

- CD123<sup>+</sup> DCのクラスター解像度

CD123<sup>+</sup> DC細胞を選別するためにはLineage Cocktailを使用する。ゲート設定していない抗HLA-DR/CD123分布では、CD123<sup>+</sup> DCを他のCD123発現白血球から常に分離できるとは限らない。Lineage Cocktailを用いてlin<sup>dim/negative</sup>細胞にゲート設定すれば、CD123<sup>+</sup> DC細胞が完全に分離できる。

- SSCが高い細胞

CD123<sup>+</sup> DC、CD11c<sup>+</sup> DC、および好塩基球のFSC/SSCドットプロットは、リンパ球と単球の中間的特徴のドットプロットとなる(図4b、d参照)。細胞群の解像度を測定する場合、SSCが高い細胞がFSC/SSCドットプロットに観察されたら(BD CellQuest解析のステップ5)擬陽性eventsを除外するために、散乱光の低い別の領域にゲート設定する。

- CD11cとCD123に両陽性の細胞

CD11cとCD123の両方に陽性の細胞が、頻度としては低いが観察される。これらの細胞については依然として解明されていない。4カラー解析では、このような両陽性細胞は、CD11c APCとCD123 PEドットプロットにゲート設定することにより除外できる。

- 細胞の凝集

細胞の活性化は、時間経過(24時間以上)した試料、試料の培養、または試料へのストレス負荷によりみられる。活性化DCは吸着性が増し、相互に接合したり、他の細胞型に接合する傾向がある。DCの凝集は細胞頻度の測定に影響を与える。

- 抗HLA-DRのコントロール

抗HLA-DR PerCPに対するコントロール試薬としてマウスIgG<sub>2a</sub> PerCPを使用する。

## 参考文献

1. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-296.
2. Hart D, Fabre J. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med.* 1981;153:347-361.
3. Schuler G, Steinman R. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med.* 1985;161:526-546.
4. Austyn JM, Hankins DF, Larsen CP, Morris PJ, Rao AS, Roake JA. Isolation and characterization of dendritic cells from mouse heart and kidney. *J Immunol.* 1994;152:2401-2410.
5. Fossum S. The life history of dendritic leukocytes (DL). *Curr Top Pathol.* 1989;79:101-124.
6. Austyn JM. New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells [comment]. *J Exp Med.* 1996;183:1287-1292.
7. Peters J, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today.* 1996;17:27-278.
8. Freudenthal PS, Steinman RM. The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:7698-7702.
9. Cameron PU, Lowe MG, Sotzik F, Coughlan AF, Crowe SM, Shortman K. The interaction of macrophage and non-macrophage tropic isolates of HIV-1 with thymic and tonsillar dendritic cells in vitro. *J Exp Med.* 1996;183:1851-1856.
10. Caux C, Dezutter DC, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 1992;360:258-261.
11. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 1994;180:83-93.
12. Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995;154:3821-3835.
13. Zhou LJ, Tedder TF. CD14<sup>+</sup> blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83<sup>+</sup> dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:2588-2592.
14. Hock BD, Starling GC, Daniel PB, Hart DN. Characterization of CMRF-44, a novel monoclonal antibody to an activation antigen expressed by the allostimulatory cells within peripheral blood, including dendritic cells. *Immunology.* 1994;83:573-581.
15. Fearnley DB, McLellan AD, Mannering SI, Hock BD, Hart DNJ. Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood.* 1997;89:3708-3716.
16. Olweus J, BitMansour A, Warnke R, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:12551-12556.
17. Hart DNJ, McKenzie JL. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med.* 1988;168:157-170.
18. Grouard G, Risoan M, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin-3 (IL-3) and CD40 ligand. *J Exp Med.* 1997;185:1101-1111.
19. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, et al. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology.* 1994;82:487-493.
20. Thomas R, Lipsky PE. Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1994;153:4016-4027.
21. Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J. Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34<sup>+</sup> progenitors in human bone marrow. *J Immunol.* 1992;149:2681-2688.
22. Young JW, Szabolcs P, Moore MA. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34<sup>+</sup> bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1995;182:1111-1120.
23. Grouard G, Durand I, Filgueira L, Banchereau J, Liu Y. Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres. *Nature.* 1996;384:364-367.
24. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, et al. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1996;2:52-58.
25. Grabbe S, Beissert S, Schwarz T, Granstein RD. Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy? *Immunol Today.* 1995;16:117-121.
26. Girolomoni G, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today.* 1997;18:102-104.
27. Agis H, Fureder W, Bankl HC, et al. Comparative immunophenotypic analysis of human mast cells, blood basophils and monocytes. *Immunology.* 1996;87:535-543.

BD社はこの操作法を研究者のための

サービスとして出版しております。

この操作法のフローサイトリー法

以外の見解に対しては、

BD社から詳細なサポートを

提供できないことがあります。

28. Agis H, Beil WJ, Bankl HC, et al. Mast cell-lineage versus basophil lineage involvement in myeloproliferative and myelodysplastic syndromes: diagnostic role of cell-immunophenotyping. *Leukemia and Lymphoma*. 1996;22:187-204.
29. Valent P, Besemer J, Muhm M, Majdic O, Lechner K, Bettelheim P. Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86:5542-5546.
30. Valent P. Immunophenotypic characterization of human basophils and mast cells. *Chem Immunol*. 1995;61:34-48.
31. Stain C, Stockinger H, Scharf M, et al. Human blood basophils display a unique phenotype including activation linked membrane structures. *Blood*. 1987;70:1872-1879.

## Contributors

Kerstin Willmann and Johanna Olweus  
Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA USA

FACSComp, AutoCOMP, PAINT-A-GATE<sup>PRO</sup>, Attractors, CellQuest はBecton, Dickinson and Companyの商標、FACS, Vacutainer, FALCONは登録商標です。

64-082-00  
R0-0212-000.5-996

日本ベクトン・ディッキンソン株式会社  
東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052  
ホームページアドレス: [www.bdj.co.jp](http://www.bdj.co.jp)

お問い合わせは下記までご連絡ください。  
製造関連・資料請求(お客様情報センター):  
☎ 0120-8555-90 Fax 024-593-5761  
機器・メンテナンス(Life Science Support):  
☎ 0120-7752-77  
アプリケーション(技術研修室ホットライン):  
Tel 03-5805-9960

**BD Biosciences**  
Clontech  
Discovery Labware  
Immunocytometry Systems  
Pharmingen

