

# マルチカラーフローサイトメトリーを用いた B 型肝炎ワクチンの有効性に寄与する 免疫細胞の解析

新百合ヶ丘総合病院 消化器内科 部長  
土肥 弘義

国立研究開発法人 国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 肝疾患研究部 肝疾患先端治療研究室長  
由雄 祥代

## Abstract

2019年、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の発生が確認されると、瞬く間に世界中に蔓延した。有効な治療が確立していなかったこの新たな感染症に対して、数ヶ月のうちにワクチンが開発されたのを契機に COVID-19 の感染拡大をくい止めることが可能になった。1970年代、B型肝炎ウイルス（HBV）が認知され、以後多くの治療や予防の方法が開発されてきた。その中でも B型肝炎（HB）ワクチンは新規感染を予防し、世界中に存在していた HBV 感染者の減少に大きく貢献した。HB ワクチンは 1981年に初めて米国で承認され、その後現在に至るまで改良

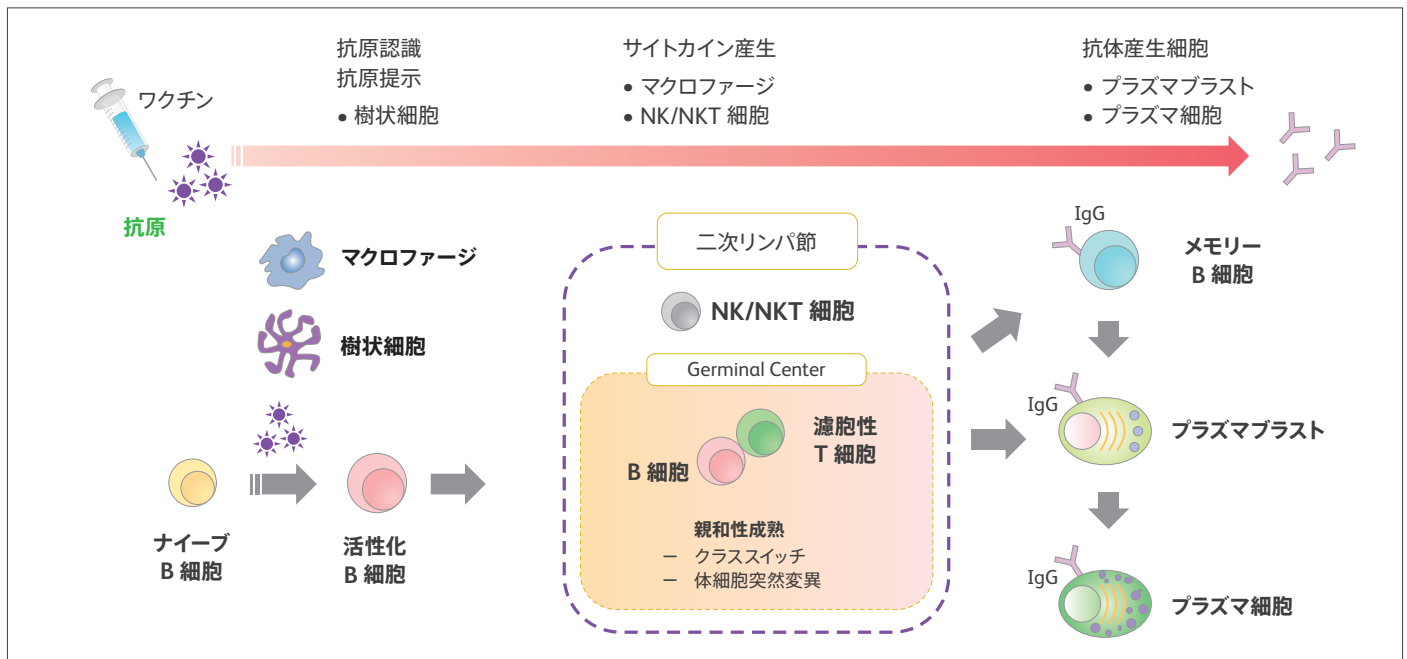
が重ねられているワクチンである。HB ワクチンはその有効性と安全性により非常に優れたワクチンとされているが、抗体獲得ができない症例（不応答）や抗体が自然消失する症例も少なからず存在しており、ワクチンの有効性に寄与する因子を解析することは極めて重要である。今回の研究では、免疫学的な見地から、健康成人における HB ワクチンによる抗体獲得や維持のメカニズムを説き明かすことを目的とし、臨床への応用を期待して実験を行った。

# Background

ワクチンの接種から特異抗体の獲得に至るまで、そしてそれを維持するには多くの免疫細胞が関与している (Figure 1)。ワクチン接種後、抗原提示細胞により抗原が捕捉され、ナイーブ細胞に提示される。活性化された B 細胞はリンパ節に移動し、抗原特異的な細胞が誘導され特異抗体の産生が可能となる。抗体産生細胞の誘導には、サイトカインなどを介して B 細胞以外の細胞

の助けが必要とされており、本研究では、メモリー T 細胞、濾胞性 T 細胞、B 細胞、プラズマブラスト、形質細胞、NK 細胞、NKT 細胞、樹状細胞、単球・樹状細胞と多岐にわたる免疫細胞を同一検体から包括的に解析した。

Figure 1 ワクチン接種に寄与する免疫細胞



# Material & Methods

初めて HB ワクチンを接種した学生 46 人のワクチン接種前(Pre) および接種完了約 1 ヶ月後 (Post) の末梢血から単核球細胞 (PBMC) を分離し、BD LSRFortessa™ フローサイトメーターで免疫細胞解析を行った (Figure 2)。Figure 1 に示したワクチン抗体獲得に関連する多くの免疫細胞を同定するために、それぞれの検体に対して Table 1 に示した Staining Panel の抗体カクテル

で染色した。フローサイトメリーは、Figure 3 に示した Gating strategy で細胞集団を同定した。それぞれの細胞集団が、抗体獲得の可否によって差異があるかを統計学的に解析した。また、同時に分離した血清中の HBs 抗体価を測定し、抗体獲得の可否および抗体価との関連を解析した。

Figure 2 サンプル回収、解析の流れ

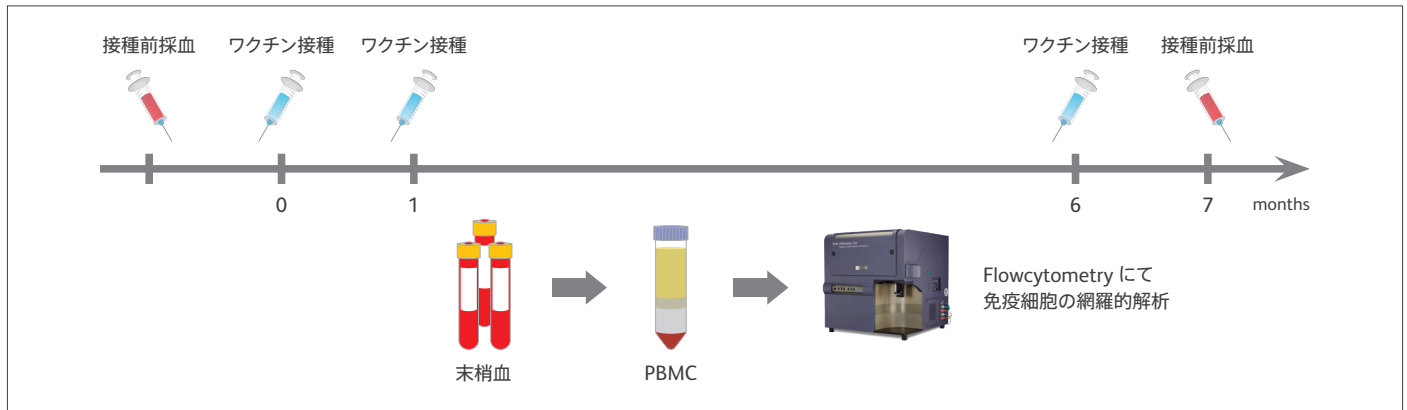


Table 1 FACS staining Panels

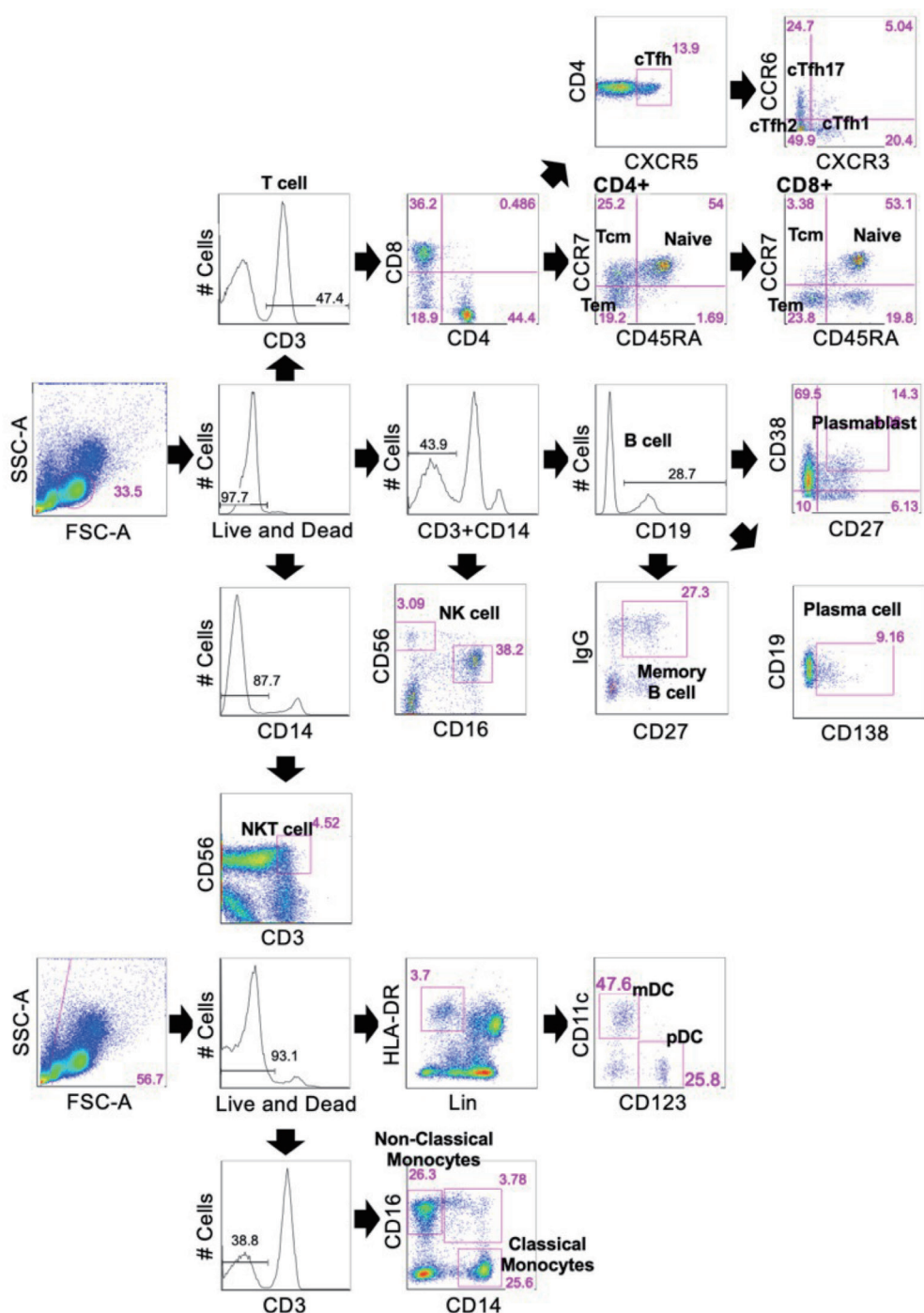
Target Cell	T Cell	Follicular Helper T-cell	Memory B-cell Plasma Cells	B-cell Activation	DC	NK/NKT cell Monocyte
FITC	CCR7	PD-1	HLA-DR	CD38	Lin-1	HLA-DR
PE	CD28	CD45RO	CD138	CD27	CD86	CD69
PE-Cy7	CD45RA	CCR6	IgG	IgG	CD123	CD16
PerCP	CD3	CD3	CD3+CD14	CD3+CD14	CD80	CD3
PE Dazzle 594	CD57	CXCR3	CD38	CD138	CD40	CD57
APC	CD40L	CXCR5	CD21	CD71	BDCA3	CD56
APC-Cy7	CD8	CD40L	CD19	CD20	HLA-DR	NKG2D (CD314)
V450/Pacific Blue	CD4	CD4	CD27	IgD	CD11c	CD14
Amcyan			Live/Dead Cell Staining			

## 使用している機器の Configuration

Detector Array	Detection Filter	Fluorochrome
Octagon (488 nm Blue Laser)	780/60	PE-Cy7
	695/40	PerCP-Cy5.5
	575/26	PE
	530/30	FITC
	488/10	SSC
Trigon (640 nm Red Laser)	780/60	APC-Cy7
	670/14	APC
Trigon (405 nm Violet Laser)	525/50	BV510
	450/50	BV421
Trigon (355 nm UV Laser)	740/35	BUV737
	379/28	BUV395
Trigon (561 nm Yellow-Green Laser)	610/20	PE
	582/15	PE-CF594

Figure 3 Gating Strategy

免疫細胞は下記のようなゲートをかけて同定した。表面マーカーは以下の通り。



T cells (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>)

naive T cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>)

central memory T cells (Tcm; CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>)

effector memory T cells (Tem; CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>)

circulating follicular T cells (cTfh; CXCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)

cTfh1 (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup> cTfh cells)

cTfh2 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup> cTfh cells)

cTfh17 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup> cTfh cells)

B cells (CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>)

naive B cells (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>)

memory B cells (Bmem; IgG<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>)

plasmablasts (CD38<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>)

plasma cells (CD138<sup>+</sup>)

natural killer cells (NK; CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>/CD3<sup>-</sup>CD14<sup>-</sup>)

natural killer T cells (NKT; CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>)

blood myeloid DCs (mDC; CD123<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>)

plasmacytoid DCs (pDC; CD123<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, Lin<sup>-</sup>)

classical monocytes (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>)

nonclassical monocytes (CD14<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>)

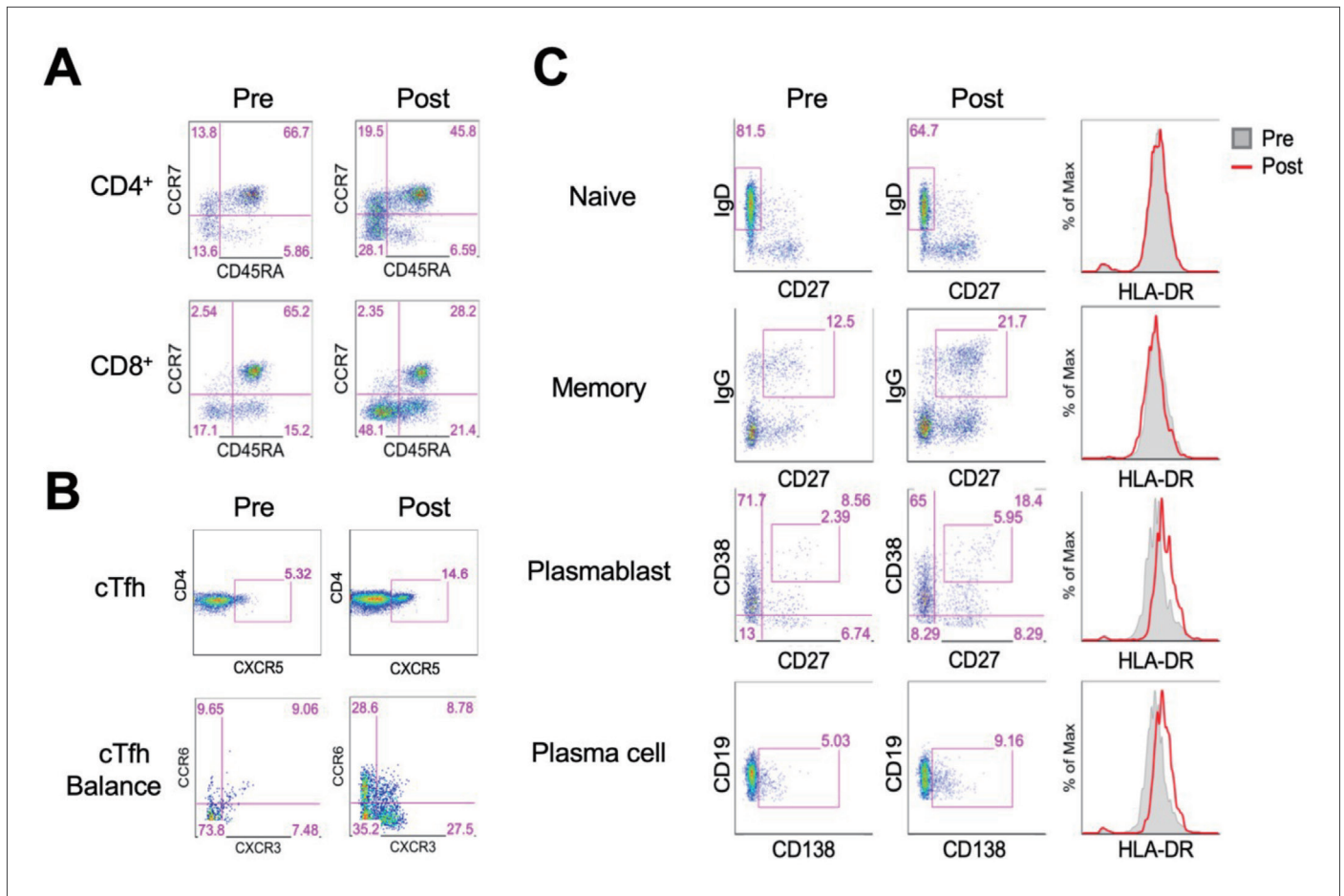
# Result

## 1. ワクチン接種により誘導された末梢血中の免疫細胞が同定された。(Figure 4)

同一被験者のワクチンの接種による末梢血中免疫細胞の変化をフローサイトメトリーで解析し、免疫細胞と抗体獲得の可否の関連を検討した。同一被験者のワクチン接種前 (Pre) と接種後 (Post) の代表的な免疫細胞の蛍光プロットを以下に示す。ワクチン接種後、T細胞のうちセントラルメモリーT細胞やエフェクターメモリーT細胞が誘導されていた (Figure 4A)。また、CD4<sup>+</sup>T細胞のうち抗原特異的抗体反応に重要な chemokine (C-X-C motif) receptor 5 (CXCR5)<sup>+</sup> 濾胞性T細胞 (Tfh:follicular

helper T cell) の増加が観察された (Figure 4B)。さらに、末梢血中濾胞性T細胞 (cTfh) の中で cTfh1 (CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>)、cTfh17 (CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup>) が増加していた (Figure 4B)。一方、B細胞ではナイーブB細胞 (IgD<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>) が減少して、抗原特異的なメモリーB細胞 (Bmems) (IgG<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>)、プラズマ細胞 (CD27<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>)、形質細胞 (CD138<sup>+</sup>) の増加が観察された (Figure 4C)。

Figure 4 ワクチン接種による免疫細胞の誘導

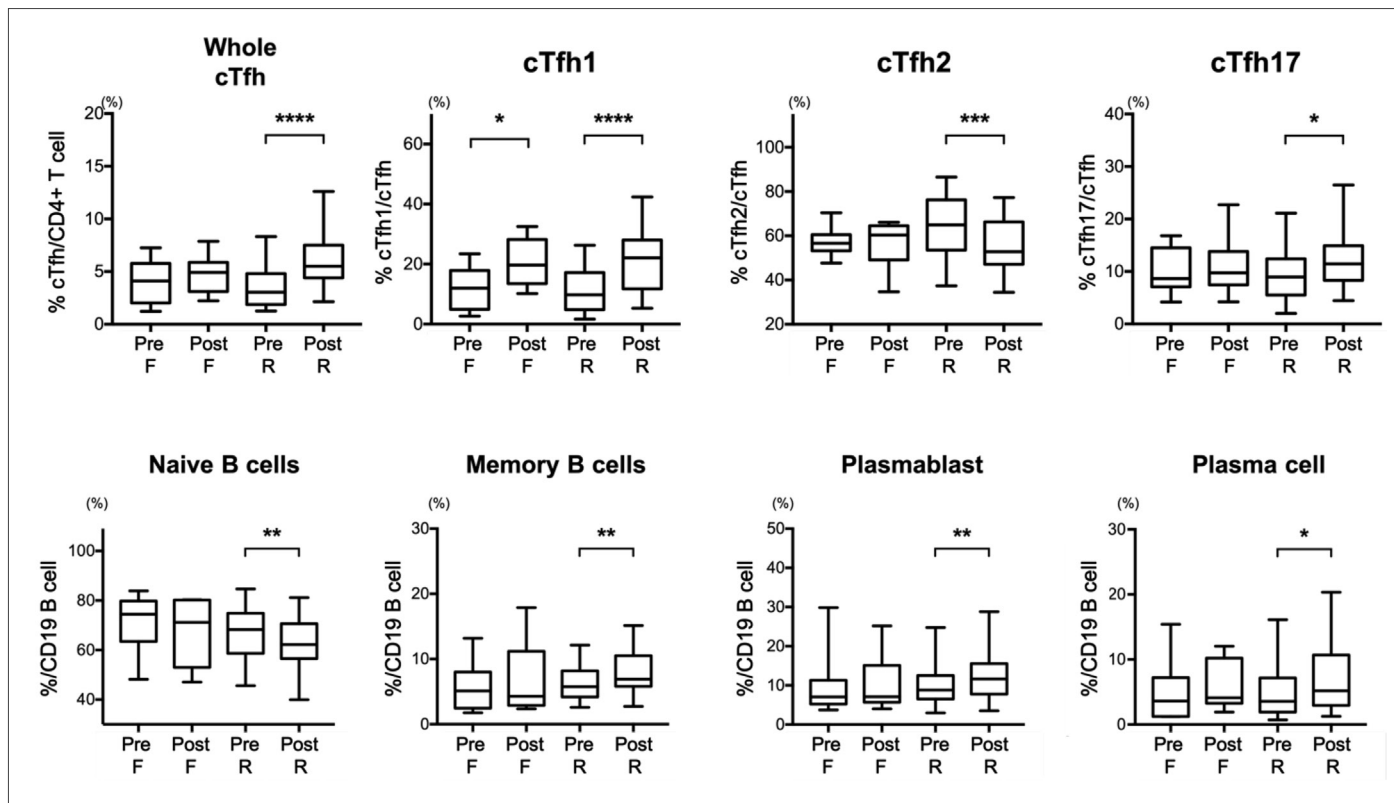


## 2. 抗体獲得者では抗体獲得に必要な免疫細胞が有意に増加していた。

ワクチンの初回接種により、非獲得群 (F:failure) と抗体獲得群 (R:responder) でそれぞれの免疫細胞の変化を解析した (Figure 5)。獲得群では Figure 4 で示した免疫細胞の変化がより顕著であり、濾胞性 T 細胞、特に cTfh1, cTfh17 の有意な

増加が見られた。B 細胞ではナイーブな細胞が減少し、抗原特異性を持ったメモリー B 細胞、プラズマブラスト、形質細胞の有意な増加が観察された。

Figure 5 抗体獲得者と非獲得者



## Conclusion

今回の B 型肝炎ワクチンの接種による免疫応答解析では、ワクチン応答者において濾胞性 T 細胞や抗体産性能を持つ分化した B 細胞の増加が末梢血中에서도確認できた。同時に解析した

Table 1 に示したその他の免疫細胞は抗体獲得の可否による差異は見られず、これらの免疫細胞が抗体獲得に重要であると考えられた。

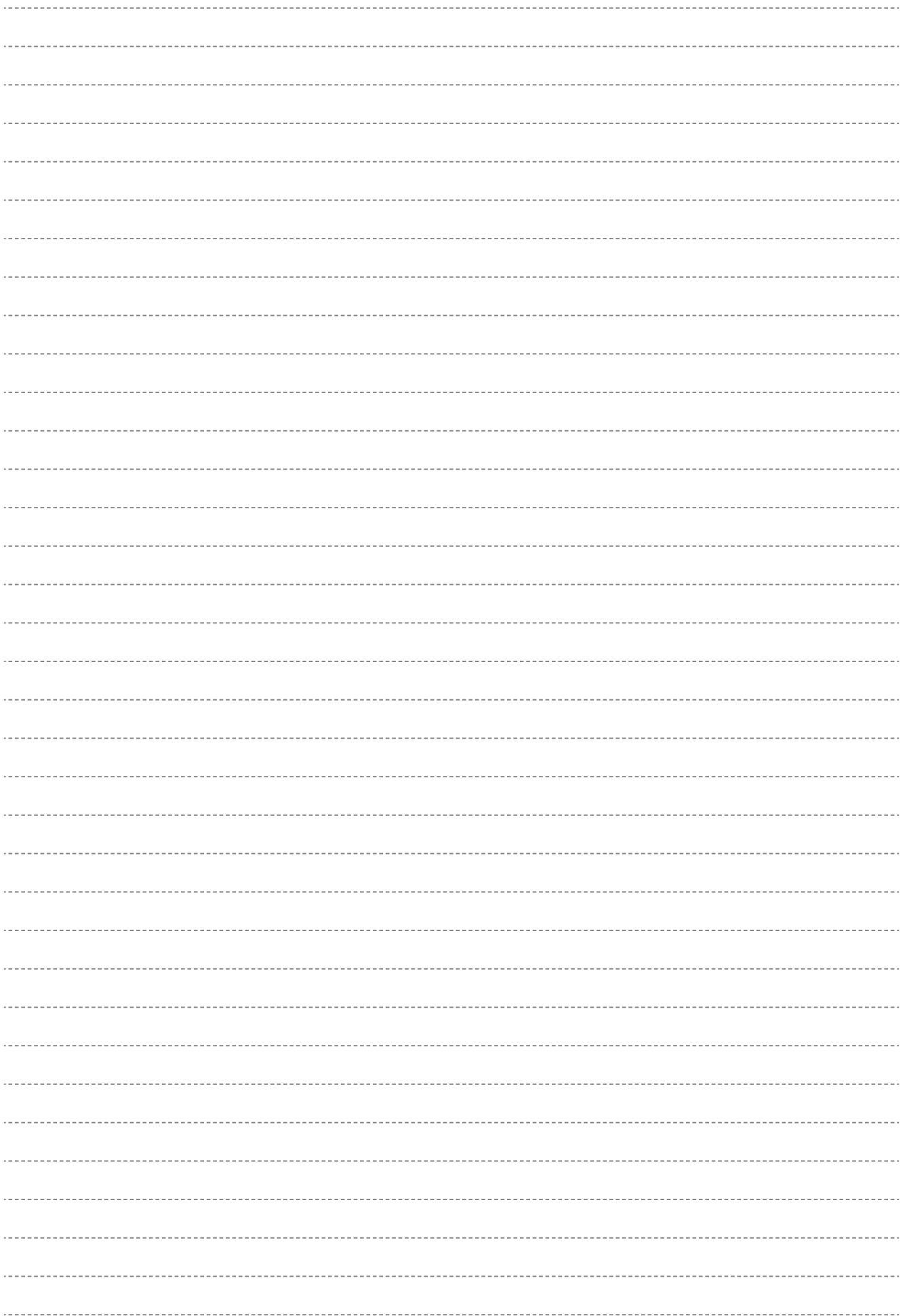
## マルチパラメーター解析に対するご意見

Flowcytometry を用いたマルチパラメーター解析は、1つの検体を用いて多くの事を解析できる非常にパワフルなツールです。限られた大切な臨床検体を用いる場合には、失敗したからまたやり直すということが難しく、実際に検体を使って解析をする以前のプランニングや予備実験が非常に重要になります。

今回の研究においても、1つの血液検体から実際にどの程度の PBMC が確保できるかを考慮した上で、FACS 染色パネルの考案を行いました。ワクチンによる抗体誘導には Figure 1 に示したような多くの免疫細胞の関与が知られており、多くの既報を参考にして表面マーカーを決定しました。ワクチンの種類により重要な細胞が異なっていたり、研究グループによって解析している細胞表面マーカーが異なることもあります。また、実際にサンプルを

染色・解析してみるとうまく細胞を同定できないこともあり、多くの予備実験をへて最終的に染色パネルを決定しています。

今回の解析では取り直すことが難しいサンプルを使用しており、なるべく多くの細胞の解析を一度に行いたいと考えました。Flowcytometry を用いたマルチパラメーター解析は、その目的を叶えるのに非常に適しています。現在、数多くの細胞表面マーカーの特異抗体が市販されており、希望する細胞の解析が可能になっています。また、Flowcytometry では表面マーカー以外にもサイトカインや細胞内シグナル、機能解析なども行うことが可能で、今後も臨床研究にとっては欠かすことのできない重要な手段になると考えられます。



## PROFILE

### 由雄 祥代

国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター 肝疾患研究部  
肝疾患先端治療研究室長

2003年大阪大学医学部卒業、大阪大学医学部附属病院、同消化器内科学関連病院にて勤務、'11年大阪大学大学院医学系研究科博士課程消化器内科学専攻入学、'13年同修了（医学博士）、'13年国立国際医療研究センター 肝疾患研究部 研究員、'16年同 上級研究員、'17年より同 肝疾患先端治療研究室長。

肝臓病において臨床問題となっている疾患をテーマに据えて、主に肝免疫の観点からその解決を目指した研究に取り組んでいる。大学院生時代初めて行った研究がフローサイトメトリーを用いた、C型慢性肝炎患者と健康成人における樹状細胞（mDC2）頻度の比較であった。BDのテクニカルサポートの方にご指導いただき、自分の目で細胞たちを視認したときの感動は忘れられない。



※医療機器及び体外診断薬以外は、研究用です。治療・診断には利用できません。

### 日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

本社：〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ  
カスタマーサービス ☎ 0120-8555-90 FAX: 024-593-3281  
(ご注文・納期・資料請求)

[bd.com/jp/](https://bd.com/jp/)

機器・試薬の使用方法および学術に関するサポート  
☎ 0120-4890-77 E-Mail: [tech.cell@bd.com](mailto:tech.cell@bd.com)

機器のトラブルに関するサポート  
☎ 0120-7099-12

