

樹状細胞のフェノタイプと免疫染色法

[Organ Biology 7(1): 21-30, 2000 を一部改変]

獨協医科大学解剖学マクロ講座 松野健二郎 kenjiro Matsuno

Key Words : 樹状細胞、フェノタイプ、酵素抗体法、多重免疫染色法、免疫組織学

Summary

樹状細胞 (DC) は、リンパ造血系の細胞であり、免疫応答を引き起こす見張り番の機能を果たすプロフェッショナルな抗原提示細胞として知られており、臓器移植においてきわめて重要な役割を担っている。本稿では、この DC のフェノタイプについて、動物種、成熟段階、亜集団による違いを解説する。そして、スミアや切片上に DC を特異的に染め出すやり方、さらに、DC と免疫応答を組織学的に同時に解析できる実用的な方法を述べる。

1. はじめに

樹状細胞 (Dendritic cell、以下 DC) は、リンパ造血系の細胞であり、免疫応答を引き起こす見張り番の機能を果たすプロフェッショナルな抗原提示細胞として知られている。DC はいくつかの成熟段階を持ち、各段階で存在部位と機能、さらにはそのフェノタイプをも異にするというダイナミックな細胞集団である¹⁾。DC の抗原提示細胞たる由縁は、抗原提示能力があるとされる他のマクロファージや B 細胞と比較して、少数で強い免疫応答を惹起出来ること、さらには DC のみが未感作のナイーブ T 細胞を活性化しうる事にある。この差は、DC の命名の由来となった四方八方に伸びた細胞突起が、抗原や T 細胞との効率的な接触機会を高めているのと同時に、その膜表面に主要組織適合抗原 (major histocompatibility complex) I 型と II 型分子 (MHC I, MHC II)、B7-1/B7-2 などの costimulatory 分子、そして ICAM-1 などの接着分子を豊富に発現している為である²⁾。まさに、免疫応答の「起爆剤」といってもよいであろう。本稿では、まず、この DC のフェノタイプについて解説し、動物種、成熟段階、亜集団による違いを述べる。そして、スミアや切片上に DC を免疫染色により特異的に染め出す方法、さらに多重染色により、他の機能分子や周辺の細胞との相互位置関係を同時に解析する方法を、おもに移植免疫の研究でよく使われるラットの細胞・組織について述べたい。

2. 樹状細胞のフェノタイプ

1) 主に発現する分子と種差 (表 1)

表 1 のように、DC は、MHC I、MHC II、ICAM1、CD86 等を強く発現するが、いずれにも DC に特異的な分子ではない²⁾。したがって、それに対する抗体で陽性に染まっても DC であることの直接の証明にならない。一方、動物によっては、比較的特異的なモノクローナル抗体が作成されており、それで染色されれば DC である可能性が高くなる。例えば、ヒトでは抗 CD83、抗 fascin、抗 CD1a 等が、ラットでは OX62 が、マウスでは 抗 CD11c、NLDC145、MIDC8、M342 などが主に DC、または DC の一部を認識するという³⁾。

表 1. 樹状細胞 (DC) のフェノタイプ[#]

カテゴリー	マーカー	特徴、分布
共通に保有する分子	class I *および class II * MHC 抗原 CD45* CD54 (ICAM1)*; ICAM3, CD11a (LFA1)*; LFA-2; LFA-3 CD86 (B7-2)*; CD80 (B7-1) CD40 CD68* Fc 受容体、補体受容体 chemokine receptors (CCR6, 7 など) CLA (cutaneous lymphocyte antigen) E-cadherin	主要組織適合抗原 白血球共通抗原 接着分子 接着分子 Costimulatory 分子 TNF 受容体ファミリー 貪食能と関連、核のそばに少量発現 未熟 DC で発現 成熟段階で発現変わる Langerhans 細胞に発現 接着分子、Langerhans 細胞に発現
共通に保有しない分子	マクロファージマーカー CD5*, TcR $\alpha\beta$ *, TcR $\gamma\delta$ *	未熟 DC 等で一部発現あり T 細胞マーカー
ヒトの DC	S100 CD83* fascin (p55)* CD1a* CMRF44 DC LAMP (lysosome-associated membrane glycoprotein)	グリア細胞 他にも発現 成熟 DC に発現、B 細胞にも発現 未熟・成熟 DC に発現 Langerhans 細胞に発現 比較的成熟 DC に発現 成熟 DC に発現
ラットの DC	OX62 ($\alpha_E\beta_7$ Integrin?)* ED1*	一部上皮内 T 細胞にも発現 CD68?, 核のそばに少量発現
マウスの DC	CD11c (N418)* DEC205 (NLDC145)* MIDC8* M342* FA11* CD8 α	一部マクロファージにも発現 マンノース受容体、胸腺上皮細胞にも発現 細胞質抗原、かなり DC 特異的 細胞質抗原 CD68、核のそばに少量発現 lymphoid DC に発現

[#]文献 1、2、3 をまとめたもの

* 酵素抗体法による免疫染色に使用可能のもの(筆者確認分)

2) 成熟段階による違い

DC は、未熟なステージでは抗原の取り込みを、成熟期には抗原提示を主な機能として持つ。したがって、未熟なほど Fc レセプター、補体レセプター、ライソゾーム酵素、CD11a、CD11b、CD68 等のマクロファージが通常持つ分子を発現するが、成熟するほどにそれらの分子は down regulation され、代わりに MHC I、MHC II、Costimulatory 分子などが強く発現してくる²⁾。

3. 原理

本稿では、主に酵素抗体間接法とその応用⁴⁾⁻⁸⁾について述べる。ターゲットの細胞分化抗原 (CD 抗原) や機能分子は、加熱やアルデヒド系の固定で抗原性が失活するものが多く、パラフィン切片ではうまくいかない事が多い。したがって、ターゲットには新鮮凍結切片や新鮮塗抹標本を用いる。凍結切片は形態学的にパラフィン切片に劣るし、染色操作で切片が傷みやすい。そこで我々は、染色過程で切片をアルデヒド系固定液でマイルドに処理する事により、抗原性を保ちながら良好な形態を得る方法を開発した⁴⁾。⁵⁾。また、2 で述べたように DC に特異的な抗体は少ないので、予めマクロファージと B 細胞を染色し、次に MHC II を染める 2 重免疫染色法を行うとよい^{1), 5)}。これにより、マクロファージと B 細胞は 2 重陽性となり、一方 DC は MHC II 単陽性となるので特異的に染め出すことが可能となる。移植免疫学で重要なパラメータである増殖細胞を検出するためには、サイミジンアナログであるプロモデオキシウリジン (BrdU, Sigma) を予めラットに投与して取り込んだ細胞を免疫染色すればよい^{6), 7)}。また IV 型コラーゲンを免疫染色すれば、基底膜や肝類洞裏打ちなどが染色され、組織構築の骨組みが見えてくる^{1), 5)}ので結果を解析する助けになる。

4. 実際

1) 抗体・薬品

DC に対する一次抗体としては、マウスのモノクローナル抗体が数多く作成されており、ほとんどが複数の試薬会社から入手可能である。マウスの DC に対するものはラットやハムスターのモノクローナル抗体がある。また、酵素標識二次抗体も簡単に入手できる。いずれも異種の動物の抗体が望ましいが、同種のものしか入手できない場合はビオチン化した抗体を使い、酵素標識ストレプトアビジンで染色すればよい。我々が使用している抗体のリストを表 2 に示す。溶液類は PBS (リン酸緩衝食塩水、pH 7.4)、TBS (トリス緩衝食塩水、pH 7.4)、PBT (PBS+0.05% Tween 20、ガラス表面を親水化するので反応液がきれいに広がることできる)、Blocking solution (ブロックエース、大日本製薬) などである。固定液は、特級アセトン、ホルモールカルシウム液 (4% paraformaldehyde+1% 塩化カルシウム水溶液)、1% グルタルアルデヒド液 (電頭用グルタル PBS 水溶液) を使用する。発色基質としては、ペルオキシダーゼはジアミノベンチジン (DAB, 5mg/40 ml PBS + 30% H₂O₂ 10 μ l、和光)、テトラメチルベンチジン^{1), 4)} (True Blue, フナコシ) と増感剤として 0.02% 塩化コバルト水溶液、アルカリホスファターゼは発色基質キットの New Fuchsin (赤, DAKO)、キット III (Vector Blue, 青, Vector Laboratories- フナコシ)、キット II (Vector Black, 黒) などを使用する。発色剤は脱水封入出来ないものが多いので、水溶性の硬化性封入剤 (アクアテックス、Merck) を用いる。

表 2. DC に関連した一次抗体および二次抗体のリスト

カテゴリー	クローンまたは カタログ名	アイソタイプ	抗原	入手 先
ラット樹状細胞	OX62	mouse IgG ₁	$\alpha_E\beta_7$ インテグリン	1
ラット組織適合抗原	OX18	mouse IgG ₁	MHC class I	1
	MN4-91-6	mouse IgG ₁	MHC class I アロタイプ (RT1A ^a)	1
	OX6	mouse IgG ₁	MHC class II	1
	OX76	mouse IgG _{2a}	MHC class II アロタイプ (RT1B ^a)	1
	OX3	mouse IgG ₁	MHC class II アロタイプ (RT1B ^b)	1
ラットマクロファージ	ED1	mouse IgG ₁	CD68? (食食能に関連)	1
	ED2	mouse IgG ₁	組織在住マクロファージ	1
ラット B 細胞	HIS24	mouse IgG _{2b}	再循環・濾胞 B 細胞	1
ラット T 細胞	OX19	mouse IgG _{2a}	CD5	1
マウス樹状細胞	N418	hamster Ig	CD11c	1
	NLDC145	Rat Ig _{2a}	DEC205 (マンノース受容体)	1
	MIDC8	Rat Ig _{2a}	50kD or 66kD cytoplasmic antigen	1
ヒト樹状細胞	HB15c	mouse IgG ₁	CD83	2
	K-2	mouse IgG ₁	fascin (p55)	2
増殖細胞	85-2C8	mouse IgG ₁	5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	3
	BU1/75	Rat Ig _{2a}	BrdU	4
基底膜・組織骨組み	LB-1403	rabbit IgG	IV 型コラーゲン	4
ペルオキシダーゼ 標識二次抗体	P0161	rabbit IgG	mouse IgG	5
	287615	donkey IgG	rat IgG	6
	284155	goat IgG	hamster IgG	6
	55693	goat F (ab') ₂	rabbit IgG	3
アルカリホスファ ターゼ標識二次抗体	A9816	sheep IgG	mouse IgG	7
	287617	donkey IgG	rat IgG	6
	284157	goat IgG	hamster IgG	6
	286757	donkey IgG	rabbit IgG	6

1. 大日本製薬ほか 2. Immunotech ほか 3. ダイアマトロンほか 4. コスモバイオほか 5. ダコほか 6. Jackson Labほか 7. Sigma ほか

2) 器具

クリオモルド (TissueTek, 図1)、OCT コンパウンド (TissueTek)、シランコートスライドガラス (DAKO)、撥水性ペン (ダコペン, DAKO, 図2または PAP pen)、ガラスドーズ (Coplín jar, 図2)、湿潤箱 (図2)、ピペットマン、試験管、エッペンドルフ遠心管、フラスコ、ビーカーなどである。

3) 凍結切片作成法

(1) ラットを麻酔下に瀉血屠殺後、組織を切り出し可及的に脂肪組織を取り除く。BrdU については、生食に溶解し、ラットに屠殺1時間前に静脈内または腹腔内投与 (6 mg/ml/300 g 体重) しておく。

(2) 複数の組織片を OCT コンパウンドを満たしたクリオモルドの中に一緒に包埋し、液体窒素、またはドライアイス上で速やかに凍結する (図1)。凍結組織・切片は多くの抗原について、密閉状態で -20°C で1年間、 -80°C で数年間保存可能である。

(3) クリオスタットで $4\sim 6\ \mu\text{m}$ の凍結切片を作成し、上記のスライドガラスに貼り付け、数時間から一晩室温風乾する。

(4) 特級アセトンで室温で10分間固定し、1分間風乾する。撥水性ペンで、OCT の糊代の外周を囲むように書きつけ、10分間風乾する (図2)。

(5) 染色の前処置として、ドーズ に入れ10分間 TBS で水和した後、ホルモールカルシウム液に浸漬し1分間だけ固定する。

(6) PBS で2分間ずつ3回洗う。

(7) PBT にリンスした後 湿潤箱内 (図2) でブロックエースを載せ10分間ブロッキングを行う。以上のことを塗抹標本についても同様におこなう。

4) 抗 DC モノクローナル抗体による単染色法

(1) ブロックエースをデカントした後、湿潤箱内で1番目のモノクローナル抗体 ($50\sim 200\ \mu\text{l}$) を載せ室温で1時間、または 4°C で1晩反応させる。

(2) ドーズ にスライドを入れ、PBS で2分間ずつ3回洗う。

(3) PBT に1分間リンスした後、湿潤箱内でペルオキシダーゼ標識二次抗体を載せ室温で1時間、または 4°C で1晩反応させる。

(4) PBS で洗う。

(5) 1% グルタルアルデヒド液で3分固定し、蒸留水で3回以上洗う。

(6) DAB 基質液に切片を浸漬し、顕微鏡でモニターしながら十分茶色になるまで $5\sim 15$ 分間発色させる。基質液は廃液処理し、切片を蒸留水で洗う。

(8) ホルモールカルシウム液で10分間固定し、水洗後さらに1% グルタルアルデヒド液で7分間固定する。水洗する。

(9) ヘマトキシリンで薄めにカウンター染色を行い、5分間水洗し蒸留水で洗ったのちアクアテックスで封入する。

5) 2種のマウスモノクローナル抗体と抗 IV 型コラーゲン抗体で行う3重染色法^{1), 5)} (図3)

(1)~(4) 4) に同じ。

(5) 1% グルタルアルデヒド液で30秒固定し蒸留水で3回以上洗う。

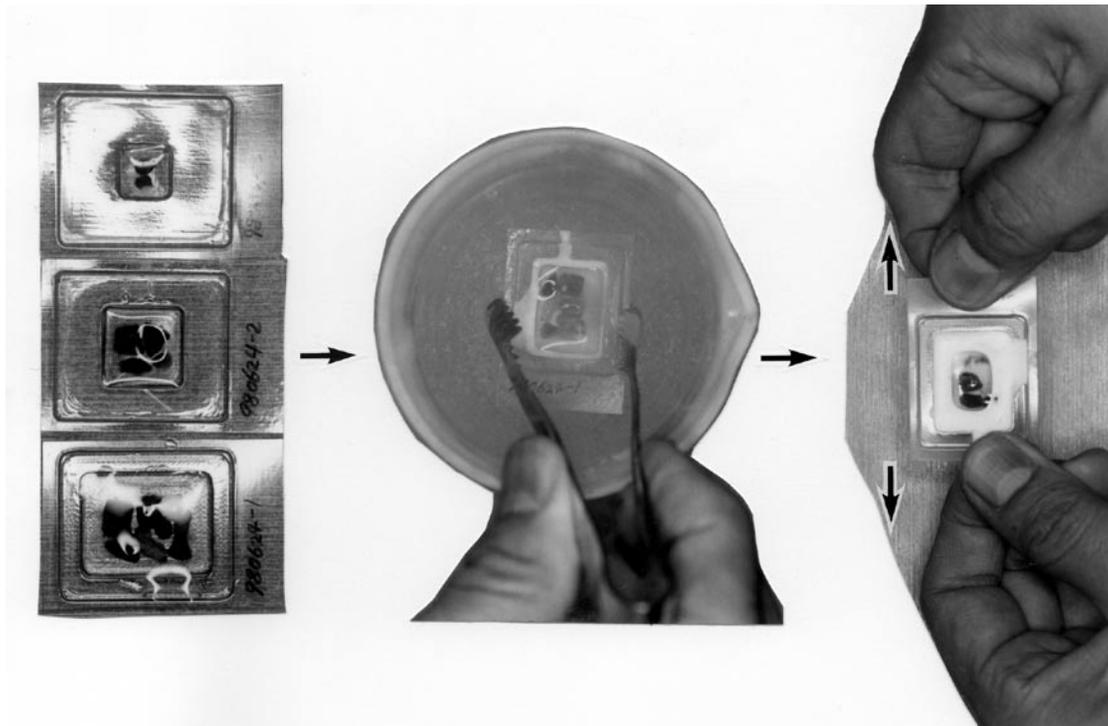


図1. 複数の組織片を OCT コンパウンドを満したクリオモルドの中に一緒に包埋する（一度に多数の試料を検索できる）。液体窒素の水面にクリオモルドの底面を接触させ急速凍結する。80% ほど凍った所で引き上げ、両手でクリオモルドを広げるように引っ張る（ブロックが割れるのを防ぐため）。



図2. スライドガラスに貼り付けた凍結切片を、DAKO ペンで、OCT の糊代の外周を囲むように書きつけたもの（試薬がスライド全体に広がるのを防ぐ）。湿潤箱（手製、栄研滅菌 1 号角シャーレにプラスチック角棒を貼り付け濾紙を敷いたもの）とガラスドレーゼ（Coplin jar、スライドが 9 枚入る）を示す。

- (6) PBT に 1 分間リンスした後、湿潤箱内で TMB 基質キットを載せ、顕微鏡でモニターしながら十分青くなるまで 3～5 分間発色させる。基質液は廃液処理し、切片を蒸留水で洗う。
- (7) 塩化コバルト水溶液を加えた DAB 基質液に切片を浸漬し、顕微鏡でモニターしながら十分黒くなるまで 3～5 分間発色させる。基質液は廃液処理し、切片を蒸留水で洗う。
- (8) ブロッキングを行う。
- (9) 2 番目のモノクローナル抗体を反応させる。
- (10) PBS で洗う。
- (11) アルカリホスファターゼ標識二次抗体を反応させる。
- (12) PBS で洗う。
- (13) 湿潤箱内でアルカリホスファターゼ基質 New Fuchsin キットを載せ、顕微鏡でモニターしながら 20～30 分間発色させる。基質液は廃液処理し、切片を 20 分以上水洗する。New Fuchsin の発色（赤）が弱い場合は、軽く洗った後基質反応を繰り返すと増感できる。
- (14) 10 分間ブロッキングを行う。
- (16) 抗 IV 型コラーゲン抗体を載せ室温で 2～3 時間、または 4℃で一晩反応させる。
- (17) ペルオキシダーゼ標識二次抗体（抗ウサギ免疫グロブリン）を反応させる。
- (18) DAB 基質液に浸漬し 10～15 分間発色させる。基質液は廃液処理し、切片を蒸留水で洗う。
- (19) ホルモールカルシウム液で 10 分間固定し、水洗後さらに 1% グルタルアルデヒド液で 10 分間固定する。水洗する。
- (20) ヘマトキシリンで薄めにカウンター染色を行い、5 分間水洗し蒸留水で洗ったのちアクアテックで封入する。

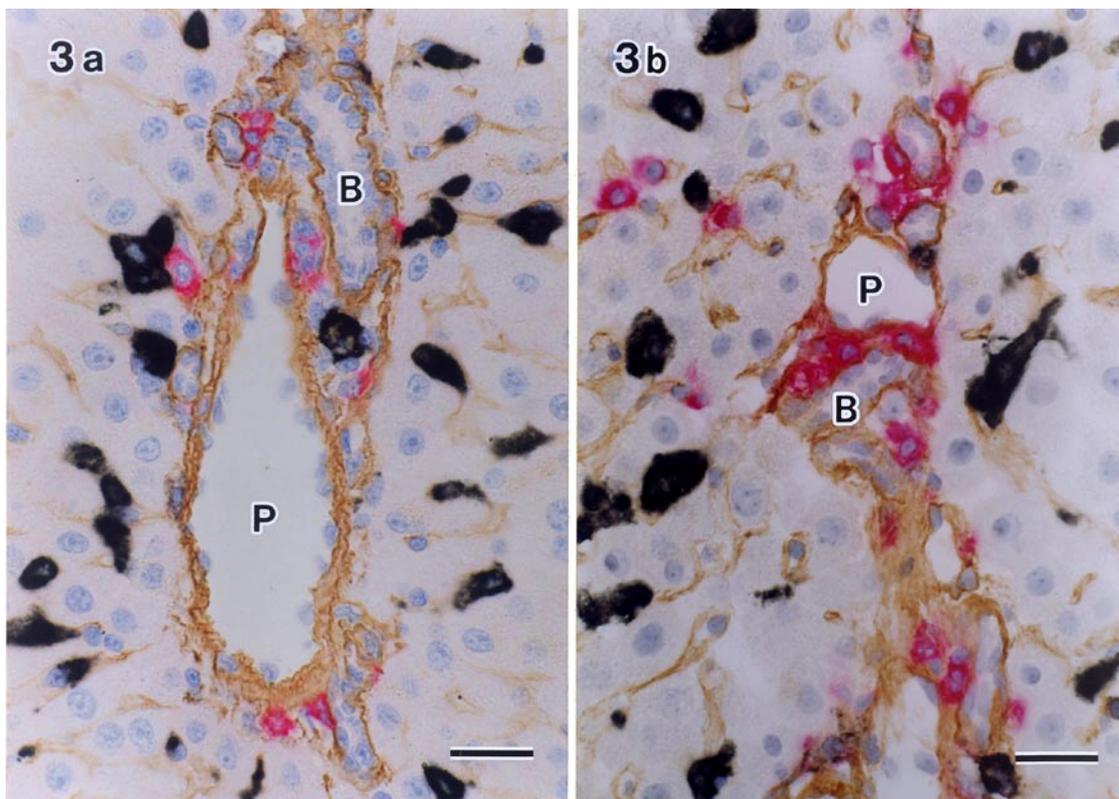


図 3. 正常ラット肝臓の間質性 DC の分布。3a: 肝凍結切片をクッパー細胞と B 細胞を黒、DC (OX62) を赤、そして IV 型コラーゲン（組織骨組み）を茶色で 3 重免疫染色したもの⁵⁾。3b: 3a の OX62 の代わりに MHCII を赤で 3 重免疫染色したもので赤い細胞が DC である¹⁾。P: 門脈、B: 胆管 (Bar = 25 μ m)。

6) 1種のマウスモノクローナル抗体と増殖細胞 (BrdU) の2重染色^{6), 7)}

- (1) 5の(1)～(5)と同様にして二次抗体をアルカリホスファターゼでおこない、基質キット III (Vector Blue) で青に発色する。
- (2) 1% グルタルアルデヒド液で10分間固定し蒸留水で洗う。
- (3) 切片をペプシン水溶液 (0.006%, Sigma P7012) に浸漬し 37°Cで 10分間消化する (クロマチン周囲の蛋白を取り除くため)。
- (4) 水洗後、切片を4N HCl に浸漬し室温で 30分間処理する (DNA が単鎖化され、BrdU 抗原が露出し抗体と結合できるようになる)。
- (5) 5分間水洗後蒸留水で洗い、ホウ酸バッファー (0.1M, pH 8.5) で3分間中和する。
- (6) PBT で2回洗った後、10分間ブロッキングを行う。
- (7) 抗 BrdU 抗体を載せ室温で1時間、または4°Cで1晩反応させる。
- (8) PBS で洗う。
- (9) アルカリホスファターゼ標識二次抗体を載せ室温で1時間、または4°Cで1晩反応させる。
- (10) PBS で洗う。
- (11) アルカリホスファターゼ基質 New Fuchsin キットを載せ、顕微鏡でモニターしながら 20～30分間発色させる。
- (12) ホルモールカルシウム液で 10分間固定し、水洗する。
- (13) ヘマトキシリンで薄めにカウンター染色を行い、アクアテックスで封入する。

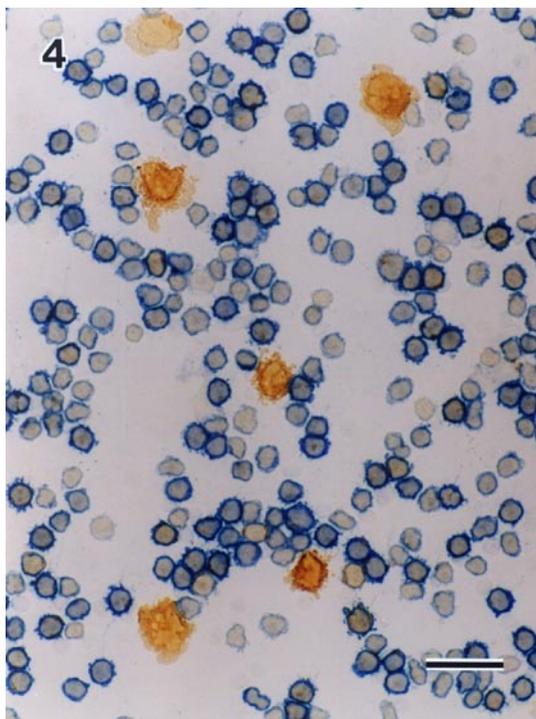


図 4. ラット胸管リンパの塗抹標本。T+B細胞 (青) と MHCII⁺ (茶) の二重免疫染色。樹状細胞は Non T, Non B の MHCII⁺ 単陽性で茶色の大型の細胞としてはっきりわかる⁸⁾ (Bar = 25 μ m)。

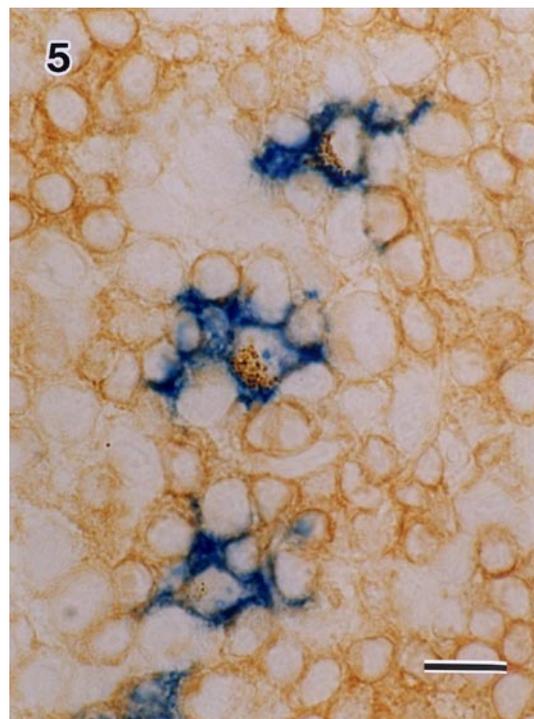


図 5. ラットリンパ節における樹状細胞 (MHCII⁺ アロタイプ陽性、青) と T細胞 (茶) のクラスター形成。このクラスターの中で抗原呈示が行われる⁷⁾ (Bar = 10 μ m)。

7) 2種のマウスモノクローナル抗体で行う2重染色^{7), 8)}

5と同様にして、1番目をアルカリホスファターゼで青色に、2番目をペルオキシダーゼで茶色に発色させればよい(図4、5)。

8) コントロール染色とキーポイント

(1) 抗体の至適濃度：一次抗体は通常、5～50 μ g/ml位の濃度で十分発色するが、薄すぎても濃すぎてもうまく発色しなくなる。予め、5, 15, 50 μ g/mlの3点で Titration し、個別に至適濃度を決めておく事が大事である。一次、二次抗体ともに 0.2% BSA (ウシ血清アルブミン) 入り PBS で希釈する。二次抗体はターゲット動物の免疫グロブリンに交差する場合があるので、ターゲット動物の血清蛋白で吸収したものを使用し、さらに、56°Cで30分処理したターゲット動物の正常血清を1%の割合で加える。テトラメチルベンチジン基質を使用する場合は、感度が通常のDAB基質より数十倍高いので、一次、二次抗体ともに、通常のさらに5倍に希釈して反応させないと切片全体が黒くなってしまう。また、テトラメチルベンチジンの黒い染色は1日で褪色するので、顕微鏡写真撮影をできるだけ早く行わなければならない。

(2) ネガコン：一次抗体か、二次抗体の代わりにPBSを載せ反応させた場合、特異染色が消失すること、多重染色の場合は2番目のモノクローナル抗体をオミットした時1番目の発色に2番目の発色がカブってこないこと、抗原を含まない組織切片で特異染色が消失すること、を満たしていることが必要である。

(3) 酵素活性と、基質活性の検定：酵素標識二次抗体の反応が終わった後、抗体液をデカントして濾紙に吸い取らせる。その濾紙に基質液を数滴たらしめて、発色してくるなら酵素、基質ともオーケーである。

(4) 本法は2種の抗原が、核と細胞膜や別々の細胞に発現している場合に適しており、同じ部位が2重陽性であることを証明することは難しい。なぜなら、マウス一次抗体を複数使用するので、どうしても交差反応で1番目の発色に2番目の発色がカブってくることがあるからである。2重陽性は蛍光抗体法直接法を2度おこない、共焦点レーザー顕微鏡で証明した方がより確実である。また、本法でもカブリを避けるため、1番目の発色に濃い色の基質を使用している。

(5) 酵素抗体間接法の代わりに、ABC法を用いてもかまわない。しかし、肝臓など内因性ビオチンのためうまく行かない場合も考えられるし、個別に条件を調整する事が必要となろう。

終わりに

DCは臓器移植において、きわめて重要な役割を担っている。本稿で述べた多重免疫染色法により、*in vivo*におけるDCの動態や細胞間相互作用を研究することが可能になる。免疫組織学が読者諸氏にとって身近な方法となり、移植免疫における拒絶反応のメカニズムと意義の解明に少しでも役に立つようになれば、筆者の喜びとするところである。

文献

1) Matsuno K, Ezaki T : Dendritic cell dynamics in the liver and hepatic lymph. *Int Rev Cytol* 197: 83-135, 2000.

- 2) Bell D, Young JW, Banchereau J : Dendritic cells. *Adv Immunol* 72: 255-324, 1999.
- 3) Leenen PJM, Kraal G, Dijkstra CD : Markers of rodent myeloid cells. In: *Handbook of Experimental Immunology*, 5th edition. (Herzenberg LA, Weir D, Herzenberg LA, Blackwell C, eds.). Blackwell Science, Inc., Malden, MA, pp. 174.1-174.25, 1997.
- 4) Matsuno K, Ezaki T : In-vivo migration of dendritic cells. In Robinson S, Stagg A (eds) : *Methods in Molecular Medicine*. Humana Press, Totowa.
- 5) Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y : A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: Their terminal division, active phagocytosis and translocation from the liver to the draining lymph. *J. Exp. Med.* 183: 1865-1878, 1996.
- 6) Matsuno K, Ezaki T, Kotani M : Splenic outer periarterial lymphoid sheath (PALS). *Cell Tissue Res* 257: 459-470, 1989.
- 7) Kudo S, Matsuno K, Ezaki T, Ogawa M : A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: Hepatic sinusoids-lymph translocation. *J. Exp. Med.* 185: 777-784, 1997.
- 8) Matsuno K, Kudo S, Ezaki T, Miyakawa K: Isolation of dendritic cells in the rat liver