

49. EdU 蛍光多重免疫染色法 による新たな免疫応答解 析

解剖学 (マクロ)

北沢祐介, 松野健二郎

私たちは以前に, 免疫応答の解析のためにチミジンアナログである BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) を用いた酵素 3 重免疫染色法を用いてきた. 今回は, さらなる高度な免疫応答解析を目的とし, 蛍光 4 重染色法による細胞のフェノタイプの同定およびクラスター解析を試みた.

本実験では, 蛍光多重染色法における BrdU の検出法の欠点を補うため, 新たにチミジンアナログとして EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) を用いて増殖細胞を標識し, 同一個体での蛍光多重染色法による免疫組織染色 (IHC: Immunohistochemistry) とフローサイトメトリー (FCM: Flow cytometry) による定量解析をおこなった. 実験 1 では, 免疫応答を制御する制御性 T 細胞 (Treg: Regulatory T cell) の増殖応答を解析するため, この細胞を優位に *in vivo* で増殖することのできる Superagonist CD28 抗体を投与したラットの脾臓を用いて検討した. 実験 2 では, One-way GvHR モデルの脾臓を用い, ドナーリンパ球特異的抗体を含めた蛍光多重染色法を行いドナー増殖 T 細胞 - 宿主 樹状細胞 (DC: Dendritic cell) のクラスター形成とその細胞のフェノタイプ解析をおこなった.

結果として, 実験群の同一ラットの脾臓において, 蛍光多重染色法は FCM と IHS の並行解析により特定のフェノタイプを有する増殖細胞を検出した (実験 1, 2). また EdU を含む蛍光 4 重染色法による IHS は, ドナー増殖 T 細胞 - 宿主 DC のクラスター形成 (direct-pathway 免疫応答) を検出した (実験 2). よって, EdU を含む蛍光多重染色法は, *in situ* での免疫応答の細胞相互作用を客観的かつ正確に定量定性解析するための新たなツールである.