

## ヒト末梢単核細胞中の主要な白血球細胞 サブセットの詳細な特性解析

45 色フルスペクトル Agilent NovoCyte Opteon スペクトル  
フローサイトメータの利用

### 著者

Ming Lei,  
Laurissa Ouaguia,  
Garret Guenther,  
Peifang Ye,  
Nancy Li,  
Agilent Technologies, Inc.

### 概要

フローサイトメトリーは、免疫細胞のさまざまな細胞サブポピュレーションを詳細に分析し、免疫システムの包括的な評価を行う強力な手法です。スペクトルフローサイトメトリーにより性能が向上し、より多くのマーカー、より高い柔軟性、より優れたデータ分解能をサポートできるようになりました。このアプリケーションノートでは、末梢血単核細胞（PBMC）サンプル内の免疫細胞の分布を分析する Agilent NovoCyte Opteon スペクトルフローサイトメータ用に設計された 45 色スペクトルフローサイトメトリーパネルについてご紹介します。

## はじめに

免疫システムは、非常に複雑な細胞ネットワークを用いて、死んだ細胞や不完全な細胞を認識して除去すると同時に、病原体から身体を守ることができます。末梢血細胞は、免疫システムの主要な促進因子として、活性化、増殖、および一連の特定のマーカー発現と働きによって特徴付けられるさまざまなサブセットへの分化を起こします。末梢血は収集が簡単で非侵襲性であるため、末梢血単核細胞 (PBMC) の供給源として広く入手可能で、基礎研究、トランスレーショナルリサーチ、臨床応用に広く使用されています<sup>1-3</sup>。健康なドナーの場合、PBMC は、リンパ球 (T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、自然リンパ球 (ILC) を含む)、単球、好塩基球、樹状細胞 (DC) など、いくつかの免疫細胞タイプで構成された異種細胞集団となります<sup>1,3,4</sup>。

末梢血中のリンパ球の多くは、CD3+ を発現する T 細胞 (PBMC の 45 ~ 70 %) で構成されています。 $\alpha\beta$ TCR または  $\gamma\delta$ TCR の発現に基づいて、2 種類の T 細胞を区別できます<sup>5</sup>。 $\alpha\beta$ TCR を発現する T 細胞は、さらに従来の CD4+ T ヘルパー細胞 (25 ~ 60 %) と CD8+ T 細胞傷害性細胞 (5 ~ 30 %) に細分化できます。健康なドナー PBMC の CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の比率は約 2:1 です<sup>3,6</sup>。CD4+ T ヘルパーは免疫恒常性と炎症の重要なメディエーターです。特定の表面マーカー/タンパク質、サイトカイン、ケモカイン受容体、特定の転写因子の発現プロファイルに基づいて、CD4+ T 細胞はさらに Th1、Th2、Th17、Th9、Th22、濾胞ヘルパー (Tfh) 細胞、胸腺から新たに移出された T 細胞 (RTE)、および制御性 T 細胞 (Treg) サブセットに分類されます<sup>7-10</sup>。さらに、抗原提示細胞は、ナイーブ T 細胞に抗原を提示した後に活性化され、エフェクター T 細胞とメモリー細胞に分化します。エフェクター細胞は感染部位に移動して病原体を排除します。これらのエフェクター細胞は短命ですが、形成されたメモリー細胞サブセットは長期間生存する可能性があります<sup>7,11</sup>。従来の CD8+ T 細胞傷害性細胞は、細胞内感染や腫瘍細胞と戦う適応免疫システムの重要な構成要素です。CD4+ T 細胞と同様に、ナイーブ CD8+ T 細胞の活性化は、増殖と分化に関するほぼ自律的なプログラムを誘導し、エフェクター細胞とメモリー細胞の両方を生成します<sup>7</sup>。免疫記憶は感染からの長期的な免疫と保護に非常に重要であるため、メモリー T 細胞は免疫の重要な促進因子です<sup>7</sup>。相互に排他的な CD4-CD8 パラダイムにもかかわらず、 $\alpha\beta$ T 細胞のごく一部は非従来型 T 細胞で構成されています。これらの非従来型 T 細胞は、二重陰性 CD4-CD8- T 細胞<sup>5,12</sup>と二重陽性 CD4+CD8+ T 細胞<sup>13</sup>で構成されています。非従来型 T 細胞は、最も研究が進んでいない代表的な T 細胞サブセットであり、細胞傷害機能 (慢性ウイルス感染) または制御作用 (悪性腫瘍) のいずれかを示すさまざまな状態において重要な役割を果たすことが確認されています。従来の T 細胞と同様に、非従来型

T 細胞も活性化マーカーを発現し、メモリー T 細胞のような特徴を示します<sup>13-15</sup>。CD3+ T 細胞は制御性 T 細胞 (Treg) からも構成されており、健康な PBMC 中の CD4+ T 細胞の 3 ~ 5 % を占めます<sup>16</sup>。Treg は、CD3、CD4、CD25、CD127 マーカーの相対的発現など、さまざまなアプローチを使って同定されています。Treg 細胞は、胸腺で生成されるナチュラル Treg (nTreg) と末梢誘導性 Treg (iTreg) に細分化されます<sup>17,18</sup>。Treg 細胞は多くの活性化および記憶特性を示し、自己抗原に対する免疫反応を抑制し、末梢性免疫寛容維持に作用することが知られています<sup>7,18</sup>。末梢 CD3+ T 細胞の別のサブセットは CD56+ NKT 細胞 (リンパ球の 0.04 ~ 1.3 %) であり、自然免疫応答と適応免疫応答の状態に影響を与えます<sup>19</sup>。CD16 および CD56 マーカーの発現レベルに基づいて、NKT 細胞はさらにサブセットに類別され、T 細胞と同様に、副刺激分子の関与が NKT 細胞の活性化と働きに影響を与えます<sup>19,20</sup>。

その他の非従来型 T 細胞には、自然免疫と適応免疫の両方に似た特性を持ち、自然免疫と適応免疫の橋渡しとなる  $\gamma\delta$ T リンパ球があります<sup>21</sup>。これらの能力により、 $\gamma\delta$ T 細胞は、そのユニークな生物学的特性により、養子細胞免疫療法の魅力的な候補物質となります。特定の因子とタンパク質の発現レベルに基づいて、 $\gamma\delta$ T 細胞はさまざまなサブタイプに細分化されます<sup>22</sup>。

末梢リンパ球には、B 細胞、NK 細胞、ILC などの非 T 細胞も含まれます<sup>3,23</sup>。B 細胞は抗体を分泌する CD19+ 発現細胞です。そのため、これらの細胞は液性免疫の中心的な要素であり、適応免疫システムの一部としてほぼすべての各種病原体から保護します。B 細胞は PBMC の約 15 % を占め、成熟して形質芽球、形質細胞、移行性 B 細胞、メモリー B 細胞、濾胞性 B 細胞、辺縁帯 B 細胞、制御性 B 細胞、および B-1 細胞に分化することができます。各 B 細胞サブセットは、CD27、IgM、IgG、IgD、CD38 などのタンパク質と因子のセットの発現に基づいて特徴付けられます<sup>24</sup>。PBMC の構成には、病原体に感染した細胞を直接破壊することで自然免疫システムの重要な構成要素となる細胞傷害性ナチュラルキラー細胞である NK 細胞 (約 10 %) も含まれます。CD16 と CD56 マーカーの相対的発現に基づいて、NK 細胞はさらに異なるサブセットに類別することができます<sup>3,20</sup>。PBMC はまた、系統マーカーと抗原特異的受容体の発現を欠く ILC で構成されます。これらの特性にもかかわらず、ILC はサイトカインと分泌タンパク質を生成し、感染した場合の免疫反応の改善につながります。一部の ILC には、CD4+ T 細胞サブセットと多くの類似点があることが示されています。したがって、ILC は特定のマーカー発現とサイトカイン産生に基づいてさらに特定のサブセットに類別できます<sup>25,26</sup>。

PBMC には DC 細胞 (1 ~ 2 %) も含まれており、これは、ナイーブ CD4+ および CD8+ T 細胞のプライミングと分化をヘルパー T 細胞、細胞傷害性エフェクター T 細胞、およびメモリー T 細胞に誘導するという独自の特性を持つ専門的な抗原提示細胞として働きます。DC はさらに、そのオントロジー、局在、表面マーカー発現、サイトカイン産生、抗原処理、および提示能力に基づいて、骨髄樹状細胞または従来の樹状細胞 (CD1c/cDC2 および CD141/cDC1) と形質細胞様樹状細胞 (CD123/pDC) に類別されます<sup>27,28</sup>。PBMC にはまた、単球 (10 ~ 20 %) も含まれ、これは末梢で著しい異質性を示す非常に可塑性の高い自然免疫細胞タイプです。表面マーカーの相対発現における明確なパターン (CD16、CD14) が、非古典的・中間的・古典的単球という3つの単球サブセットを区別する基準として認められるようになりました<sup>3,29</sup>。PBMC はまた、PBMC 分離法に基づいて、好塩基球と呼ばれる細胞の小さな分画 (< 1 %) でも構成されています。これらの好塩基球は、HLA-DR と CD123 マーカーの相対的発現に基づいて特徴付けられます<sup>30</sup>。

血液中の各免疫細胞サブセットの複雑な作用を解明することにより、それらがどのように免疫反応を形成し、がんや病気の進行、および薬の効能に影響を与えるかを評価することへの関心が高まっています。この課題を解決するために、単一細胞レベルおよびサブセットレベルで免疫システムのハイスループットかつ詳細な分析を行える方法論と機器が強く求められています。アジレントは、健康な PBMC における主要な自然免疫細胞と適応免疫細胞の種類で発現する末梢免疫サブセットの頻度、タンパク質発現、活性化マーカー、疲弊マーカー、および分化マーカーを定量化するために、45 色スペクトルフローサイトメトリー免疫表現型パネルを開発しました。各集団で発現される共通の表面マーカーを使用して集団頻度を決定し、細胞活性化および増殖 (CD69、HLA-DR、CD38)、細胞疲弊および老化 (PD1、CD223、CD57)、細胞分化 (CCR7、CD27、CD28、CD45RA、CD45RO、CD127)、細胞可塑性または泳動電位 (CXCR3、CCR6、CCR5、CXCR5) に関連するマーカーを使用して各集団のさらなる特性解析を行いました。この詳細な分析は、Agilent NovoCyte Opteon スペクトルフローサイトメータを使用することで可能になりました。

従来のフローサイトメトリーでは得られる蛍光体のピーク発光が検出器の数に制限されるが、スペクトルサイトメトリーでは多数の検出器を用いて、すべてのレーザーラインにわたるすべての蛍光体の完全な蛍光スペクトルを捕捉します。そうすることで、スペクトルサイトメトリーでは、一回の実験で蛍光色素ごとにより多くのパラメータを用いることが可能になります<sup>1,31,32</sup>。

## 実験方法

### 試料調製

表 1 は、45 色サンプルを調製するために使用された試薬についての説明です。

表 1. 使用した試薬

| 試薬                            | 部品番号       | メーカー                        |
|-------------------------------|------------|-----------------------------|
| True-Stain Monocyte Blocker   | 426102     | BioLegend                   |
| Brilliant Stain Buffer Plus   | 566385     | BD                          |
| CellBlox Blocking Buffer      | B001T02F01 | Thermo Fisher Scientific    |
| Phosphate Buffer Saline (PBS) | GNM-14190  | Genom Biomedical Technology |
| Fetal Bovine Serum (FBS)      | 10091148   | Thermo Fisher Scientific    |

### 染色手順

サンプル前処理法は次のプロトコルに従います。

### PBMC の調製

- RPMI 1640 完全培養培地を 37 °C で少なくとも 30 分間予熱します。
- PBMC クライオチューブ (約 15 x 10<sup>6</sup> 個の細胞) を 37 °C のウォーターバスで小さな氷片だけが残るまで解凍します。
- クライオチューブの内容物を 50 mL コニカルチューブに移します。
- 予熱した 1 mL の RPMI 1640 完全培養培地をクライオチューブに追加します。ステップ g で使用します。
- 50 mL チューブ内の細胞に 5 mL の RPMI 1640 完全培養培地を一滴ずつ加えます。添加する際は、50 mL チューブを静かに混ぜます (片手にピペットを持ち、もう一方の手に 50 mL チューブを持ち、RPMI 1640 完全培養培地を添加しながらチューブを静かに攪拌します)。
- 最初のバッチの 5 mL RPMI 1640 完全培養培地を加えた後は、次の 5 mL を少し速く (毎回数滴ずつ) 加えます。
- 10 mL を加えたら、クライオチューブの内容物を 50 mL チューブに移します。

- h. 50 mL チューブに RPMI 1640 完全培養培地を追加して 20 mL にします。
- i. 400 g で 8 分間、遠心分離します。
- j. ペレットが動かないように注意して、上澄みを慎重に注ぎ出します。
- k. ペレットを、予熱した RPMI 1640 完全培養培地 2 mL に静かに懸濁し、20 mL にします。
- l. ステップ i と j を繰り返します。
- m. 後で使用するために、細胞沈殿物を一定量の RPMI 1640 完全培養培地に懸濁します。

### 生死判定色素と抗体の混合物の調製

- a. Zombie NIR の生死判定色素を解凍し、0.25  $\mu$ L をより大きなエッペンドルフチューブに移し、1000  $\mu$ L の 1x PBS (最終希釈 1:4000) を加えます。使用するまで光に当てないようにします。
- b. 4 本の 1.5 mL エッペンドルフチューブに抗体混合物 A、B、C、D とマークします。優れた染色を行うには、細胞を 4 段階で染色する必要があります。
- c. 各抗体混合チューブに 10  $\mu$ L の Brilliant Stain Buffer と 5  $\mu$ L の True-Stain Monocyte Blocker を加えます。抗体混合チューブ A にのみ 5  $\mu$ L の CellBlox Blocking Buffer を加えます。
- d. 抗体リスト (表 2) に従って抗体混合物を調製し、A とラベルしたチューブにグループ A の抗体を加え、B とラベルしたチューブにグループ B の抗体を加える、というように繰り返します。
- e. 混合物チューブを 16,000 g ~ 18,000 g で 5 分間遠心分離します。抗体を使用する場合は、液体の上部から混合物を吸引し、チューブの底に触れないようにしてください。抗体の凝集体が底に残ります。

表 2. 抗体染色グループ (CD45RO SBUV445 抗体を除く)

|          | 特異性                   | 蛍光色素                    | 添加量 ( $\mu$ L) |
|----------|-----------------------|-------------------------|----------------|
| 染色グループ A |                       |                         |                |
| 1        | CCR6                  | BV711                   | 2.5            |
| 2        | CCR5                  | BUV563                  | 2.5            |
| 3        | TCR $\gamma$ $\delta$ | PerCP-eFluor 710        | 0.63           |
| 4        | CXCR5                 | BV750                   | 0.63           |
| 5        | IgG                   | BV605                   | 0.63           |
| 6        | CXCR3                 | PE-Cy7                  | 1.25           |
| 7        | CD223 (LAG-3)         | NovaFluor Blue 660/120S | 1.25           |
| 8        | CD69                  | StarBright Blue 765     | 1.25           |
| 9        | CCR7                  | BV421                   | 2.5            |
| 染色グループ B |                       |                         |                |
| 1        | CD20                  | Spark YG 593            | 1.25           |
| 2        | CD1c                  | Alexa Fluor 647         | 2.5            |
| 3        | CD28                  | BV650                   | 5              |
| 4        | PD-1                  | BV785                   | 5              |
| 5        | CD159c                | PE                      | 10             |
| 染色グループ C |                       |                         |                |
| 1        | CD127                 | Spark Red 718           | 1.25           |
| 2        | CD2                   | PerCP-Cy5.5             | 2.5            |
| 3        | CD337                 | PE-Dazzle 594           | 2.5            |
| 4        | CD3                   | BV510                   | 2.5            |
| 5        | CD27                  | APC-H7                  | 2.5            |
| 6        | CD25                  | PE-Alexa Fluor 700      | 5              |
| 7        | CD11c                 | eFluor 450              | 5              |
| 染色グループ D |                       |                         |                |
| 1        | CD45RA                | BUV395                  | 0.32           |
| 2        | IgD                   | BV480                   | 0.32           |
| 3        | CD4                   | CF594                   | 0.32           |
| 4        | CD14                  | Spark Blue 550          | 0.32           |
| 5        | HLA-DR                | PE-Fire 810             | 0.32           |
| 6        | CD33                  | StarBright Blue 580     | 0.32           |
| 7        | CD16                  | BUV496                  | 0.63           |
| 8        | CD57                  | FITC                    | 0.63           |
| 9        | CD24                  | PE-Alexa Fluor 610      | 0.63           |
| 10       | CD95                  | PE-Cy5                  | 0.63           |
| 11       | CD38                  | APC-Fire 810            | 0.63           |
| 12       | CD31                  | StarBright Blue 810     | 0.63           |
| 13       | CD141                 | BB515                   | 1.25           |
| 14       | CD19                  | Spark NIR 685           | 1.25           |
| 15       | CD8                   | BUV805                  | 1.25           |
| 16       | CD159a                | APC                     | 2              |
| 17       | CD314                 | BUV615                  | 2.5            |
| 18       | CD56                  | BUV737                  | 2.5            |
| 19       | CD45                  | PerCP                   | 2.5            |
| 20       | IgM                   | BV570                   | 2.5            |
| 21       | CD39                  | BUV661                  | 2.5            |
| 22       | CD123                 | Super Bright 436        | 2.5            |

## 染色

- a. FACS チューブをマークします。未染色の対照群チューブ、単一染色チューブ、およびマルチカラーチューブをマークします。
- b. 各マルチカラーチューブに細胞懸濁液 100  $\mu$ L (約  $3 \times 10^6$  個の細胞) を加え、各未染色の対照群チューブと単一染色チューブに細胞懸濁液 10  $\mu$ L (約  $3 \times 10^5$  個の細胞) を加えます。
- c. マルチカラーチューブと生死判定用単一染色チューブを PBS で洗浄し、その他の単一染色チューブと未染色の対照群チューブを洗浄バッファ (PBS + 2 % FBS) でチューブあたり 3 mL で洗浄します。
- d. 500 g で 5 分間遠心分離し、上澄みを慎重に注ぎ出します。
- e. 100  $\mu$ L の Zombie NIR 希釈液をマルチカラーチューブと生死判定用単一染色チューブに加え、よくボルテックスし、暗所で 30 分間氷上に置きます。
- f. 同時に、他の単一染色チューブを表 2 に示す最適な抗体レベルで染色し、暗所で 30 分間氷上に置きます。anti- CD223 NovaFluor Blue 660/120S シングル染色チューブに CellBlox Blocking Buffer を追加します。
- g. 30 分間インキュベーションした後、マルチカラーチューブ、生死判定用単一染色チューブ、およびその他の単一染色チューブを 3 mL の洗浄バッファで洗浄します。
- h. ステップ d を繰り返します。
- i. 洗浄バッファ 200  $\mu$ L を生死判定用単一染色チューブ、未染色の対照群チューブ、およびその他の単一染色チューブに追加し、ボルテックスで混合して氷上で保存します。
- j. すべてのマルチカラーチューブに anti-CD45RO SBUV445 を加え、ボルテックスし、暗所で 30 分間氷上に置きます。
- k. 洗浄せずに、抗体混合物 A をすべてのマルチカラーチューブに加えてボルテックスし、暗所で 30 分間氷上に置き、その後室温 (RT) で 20 分間置きます (これにより、CCR および CXCR マーカーの染色が改善されます)。
- l. すべてのマルチカラーチューブを洗浄バッファ 3 mL で 1 回洗浄します。
- m. ステップ d を繰り返します。

- n. すべてのマルチカラーチューブに抗体を加えてボルテックスし、暗所で 40 分間氷上に置きます。
- o. すべてのマルチカラーチューブを洗浄バッファ 3 mL で 1 回洗浄します。
- p. ステップ d を繰り返します。
- q. マルチカラーチューブに抗体混合物 C を加えてボルテックスし、暗所で 40 分間氷上に置きます。
- r. すべてのマルチカラーチューブを洗浄バッファ 3 mL で 1 回洗浄します。
- s. ステップ d を繰り返します。
- t. マルチカラーチューブに抗体混合物 D を加えてボルテックスし、暗所で 40 分間氷上に置きます。
- u. すべてのマルチカラーチューブを洗浄バッファ 3 mL で 2 回洗浄します。
- v. ステップ d を繰り返します。
- w. 洗浄バッファ 300  $\mu$ L をマルチカラーチューブに加えてボルテックスし、氷上で保存します。

## 結果と考察

### 抗体価測定

このアプリケーションノートでは、この 45 色パネル (表 3 に概要を示します) で提案されているすべてのマーカーと蛍光色素の組み合わせが、抗体価測定分析によって評価されています。図 1 に示す各抗体の必要量は、次のように計算される Stain index から決定されます。(MFI (陽性) - MFI (陰性)) / (2xSD (陰性))、ここで MFI は平均蛍光強度です。最適な抗体濃度は、Stain index が最大または最大に近い濃度か、あるいはは拡散誤差がより低くなるような、最低濃度が選択されます。

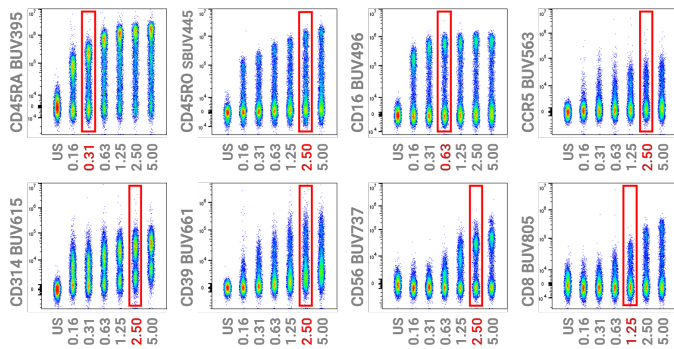
このパネル設計の主な目的は、以前に公開された 40 マーカーパネルである OMIP-069 を元に、さらに高性能なものを構築することでした。OMIP-069 パネルに加えて、さらに CD45RO、CD33、CD233 (LAG-3)、CD69、CD31 の 5 つのマーカーも含めました。抗体と蛍光色素の全パネルを表 3 に示します。立体障害によって誘発されるこのような大きなパネルでの染色は複雑な性質となるため、抗体-抗原結合を最適化して 4 つの染色グループを特定し、サンプルとともに連続パターンでインキュベートしました (表 2)。

表 3. 抗体情報

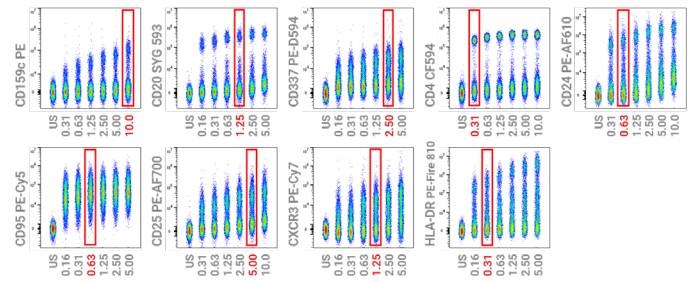
|    | マーカー           | 蛍光色素                       | クローン      | メーカー                     | 部品番号           |
|----|----------------|----------------------------|-----------|--------------------------|----------------|
| 1  | CD45RA         | BUV395                     | 5H9       | BD Biosciences           | 740315         |
| 2  | CD45RO         | StarBright UltraViolet 445 | UCHL1     | Bio-RAD                  | MCA461SBUV445  |
| 3  | CD16           | BUV496                     | 3G8       | BD Biosciences           | 612945         |
| 4  | CCR5 (CD195)   | BUV563                     | 2D7/CCR5  | BD Biosciences           | 741401         |
| 5  | CD314 (NKG2D)  | BUV615                     | 1D11      | BD Biosciences           | 751232         |
| 6  | CD39           | BUV661                     | TU66      | BD Biosciences           | 749967         |
| 7  | CD56           | BUV737                     | NCAM16.2  | BD Biosciences           | 612766         |
| 8  | CD8            | BUV805                     | SK1       | BD Biosciences           | 612889         |
| 9  | CCR7 (CD197)   | BV421                      | G043H7    | BioLegend                | 353208         |
| 10 | CD123          | Super Bright 436           | 6H6       | Thermo Fisher Scientific | 62-1239-42     |
| 11 | CD11c          | eFluor 450                 | 3.9       | Thermo Fisher Scientific | 48-0116-42     |
| 12 | IgD            | BV480                      | IA6-2     | BD Biosciences           | 566187         |
| 13 | CD3            | BV510                      | SK7       | BioLegend                | 344827         |
| 14 | IgM            | BV570                      | MHM-88    | BioLegend                | 314517         |
| 15 | IgG            | BV605                      | G18-145   | BD Biosciences           | 563246         |
| 16 | CD28           | BV650                      | CD28.2    | BioLegend                | 302945         |
| 17 | CCR6 (CD196)   | BV711                      | G034E3    | BioLegend                | 353435         |
| 18 | CXCR5 (CD185)  | BV750                      | RF8B2     | BD Biosciences           | 747111         |
| 19 | PD-1 (CD279)   | BV785                      | EH12.2H7  | BioLegend                | 329929         |
| 20 | CD141          | BB515                      | 1A4       | BD Biosciences           | 565084         |
| 21 | CD57           | FITC                       | NK-1      | BD Biosciences           | 555619         |
| 22 | CD14           | Spark Blue 550             | 63D3      | BioLegend                | 367148         |
| 23 | CD33           | StarBright Blue 580        | WM53      | Bio-RAD                  | MCA1271SBB580  |
| 24 | CD223 (LAG-3)  | NovaFluor Blue 660/120S    | 3DS223H   | Thermo Fisher Scientific | H048T02B08     |
| 25 | CD45           | PerCP                      | HI30      | Agilent Technologies     | 8931017        |
| 26 | CD2            | PerCP-Cy5.5                | TS1/8     | BioLegend                | 309225         |
| 27 | TCRγδ          | PerCP-eFluor 710           | B1.1      | Thermo Fisher Scientific | 46-9959-41     |
| 28 | CD69           | StarBright Blue 765        | FN50      | Bio-RAD                  | MCA2806SBB765  |
| 29 | CD31           | StarBright Blue 810        | WM59      | Bio-RAD                  | MCA1738SBB810  |
| 30 | CD159c (NKG2C) | PE                         | 134591    | R&D Systems              | FAB138P-100    |
| 31 | CD20           | Spark YG 593               | 2H7       | BioLegend                | 302367         |
| 32 | CD337 (Nkp30)  | PE-Dazzle 594              | P30-15    | BioLegend                | 325231         |
| 33 | CD4            | CF594                      | C4/206    | Biotium                  | #BNC940206-500 |
| 34 | CD24           | PE-Alexa Fluor 610         | SN3       | Thermo Fisher Scientific | MHCD2422       |
| 35 | CD95 (FAS)     | PE-Cy5                     | DX2       | BioLegend                | 305610         |
| 36 | CD25           | PE-Alexa Fluor 700         | CD25-3G10 | Thermo Fisher Scientific | MHCD2524       |
| 37 | CXCR3 (CD183)  | PE-Cy7                     | G025H7    | BioLegend                | 353720         |
| 38 | HLA-DR         | PE-Fire 810                | L243      | BioLegend                | 307683         |
| 39 | CD159a (NKG2A) | APC                        | REA110    | Miltenyi                 | 130-113-563    |
| 40 | CD1c           | Alexa Fluor 647            | L161      | BioLegend                | 331510         |
| 41 | CD19           | Spark NIR 685              | H1B19     | BioLegend                | 302269         |
| 42 | CD127          | Spark Red 718              | A019D5    | BioLegend                | 351376         |
| 43 | Viability      | Zombie NIR                 | N/A       | BioLegend                | 423105         |
| 44 | CD27           | APC-H7                     | M-T271    | BD Biosciences           | 560223         |
| 45 | CD38           | APC-Fire 810               | HB-7      | BioLegend                | 356643         |



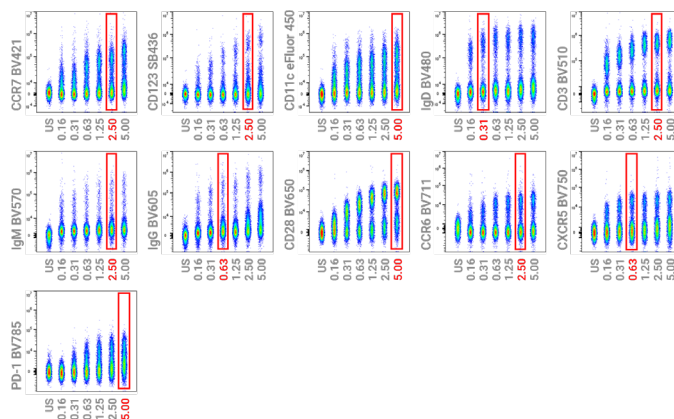
A. UV レーザー (349 nm)



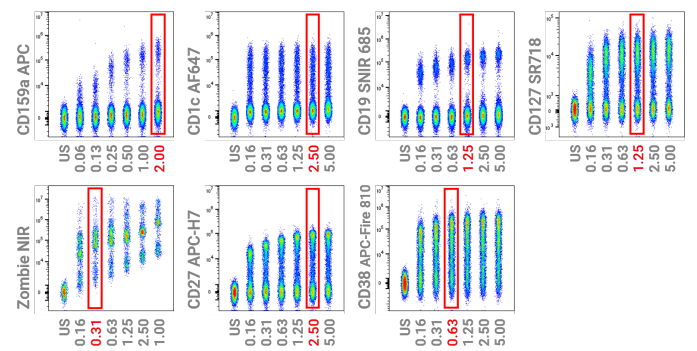
D. 黄レーザー (561 nm)



B. 紫レーザー (405 nm)



E. 赤レーザー (637 nm)



C. 青レーザー (488 nm)

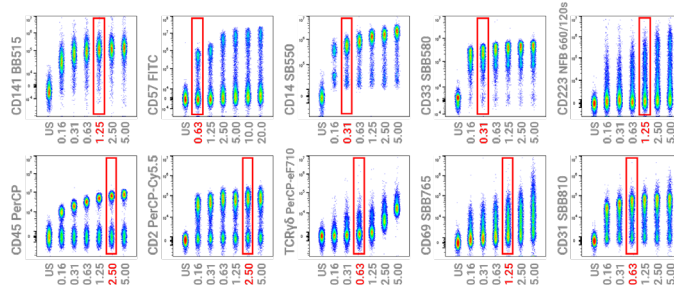
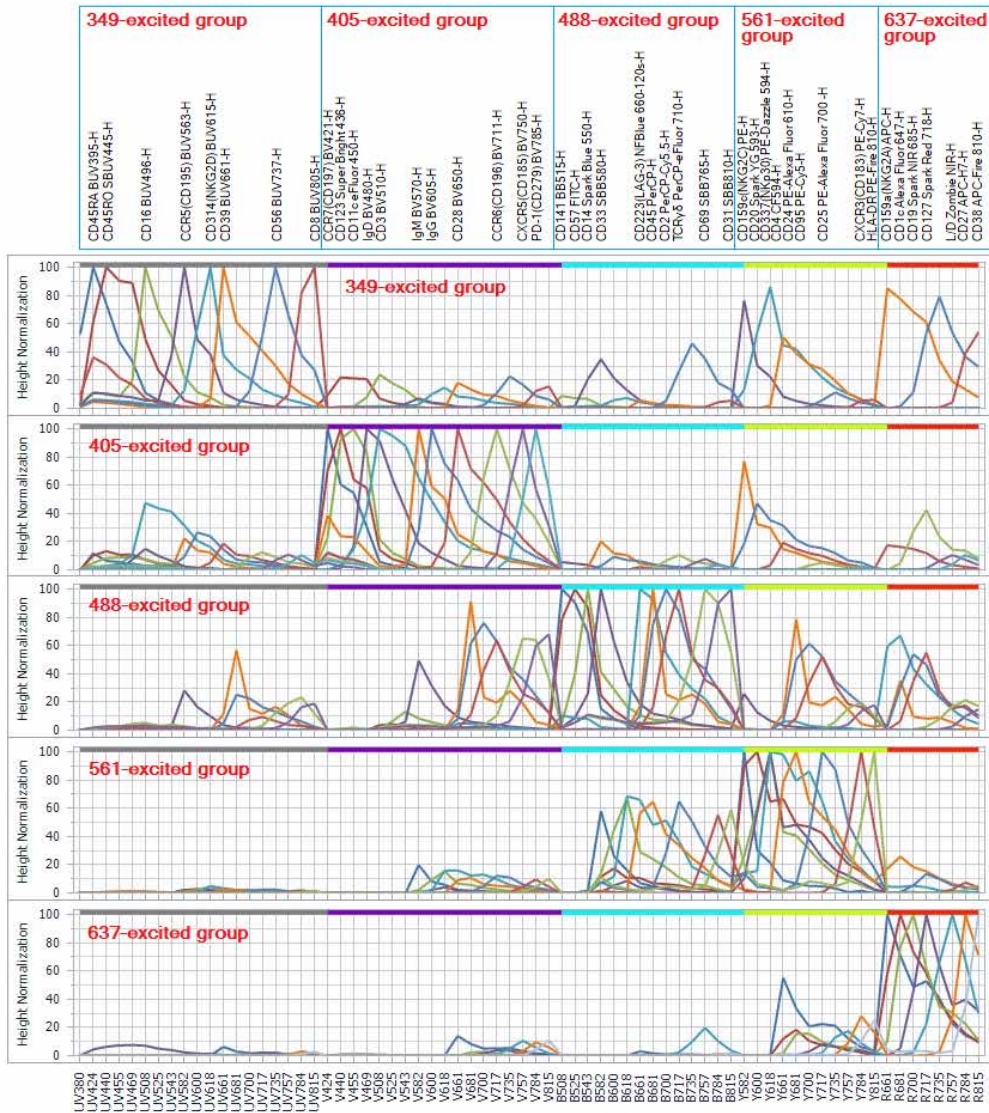


図 1. 45 色パネルの抗体価測定。すべての抗体は、健康な個人から採取した白血球バックから分離凍結保存された PBMC を使用して、染色量 100  $\mu$ L あたり 1 ~ 20  $\mu$ L の範囲の開始濃度で 6 段階の濃度で滴定されます。X 軸は希釈系列を示し、6 つの希釈サンプルはすべて同じプロットに表示されています。赤い四角は、パネルに使用される最終的に選択された抗体濃度を強調表示したものです。最適な抗体濃度は Stain index (Stain index が最大または最大に近い濃度か、あるいは拡散誤差がより低くなるような最低濃度) に基づいて選択され、赤いボックスで示されています。測定データはすべて、Agilent NovoExpress 2.0.0 ソフトウェアによって分離されました。デブリとダブルレットは除外され、ファイルは FlowJo v10.10.0 を使用して連結されました。(A) 349 nm レーザー励起蛍光色素、(B) 405 nm レーザー励起蛍光色素、(C) 488 nm レーザー励起蛍光色素、(D) 561 nm レーザー励起蛍光色素、(E) 637 nm レーザー励起蛍光色素。Stain index の計算は次のとおりです。(MFI (陽性) - MFI (陰性)) / (2xSD (陰性))、ここで MFI は平均蛍光強度です。

図 2 に示されているように、自己蛍光 (AF) 減算用の 2 つの集団と共に、使用したマーカーごとにリファレンスペクトルコントロールが実行されました。

A. 45 種類の蛍光色素のスペクトルシグネチャ



B. 2 つの自己蛍光のスペクトルシグネチャ

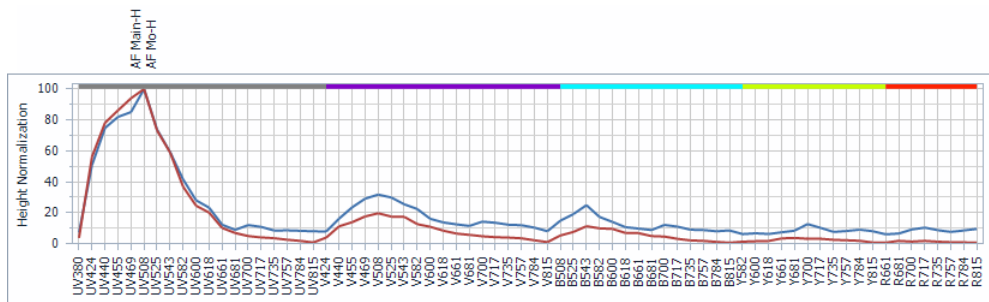


図 2. 45 色のパネルデータをアンミックスするために使用されたスペクトルシグネチャ (45 + 2 AF)。単一染色の対照群は、Agilent NovoCyte Opteon スペクトルフローサイトメータを用いてデフォルトのゲイン設定で取得されたものです。蛍光色素のスペクトルシグネチャ (正規化された発光スペクトル) は、一次レーザーと自己蛍光によってグループ化されたスペクトルプロットとして表示されています。(A) 45 個の蛍光色素、(B) 2 つの自己蛍光シグネチャ







免疫細胞のタイプとサブタイプの分布はマーカー発現に基づいて同定され、図 5 に示すように階層ゲーティングを使用してそれぞれを特定した。異なる細胞タイプに分類された分離データを図 5 に示します。

複雑で広がりのある多くのサブタイプの特徴付けがこのパネルで可能であることがよくわかります。

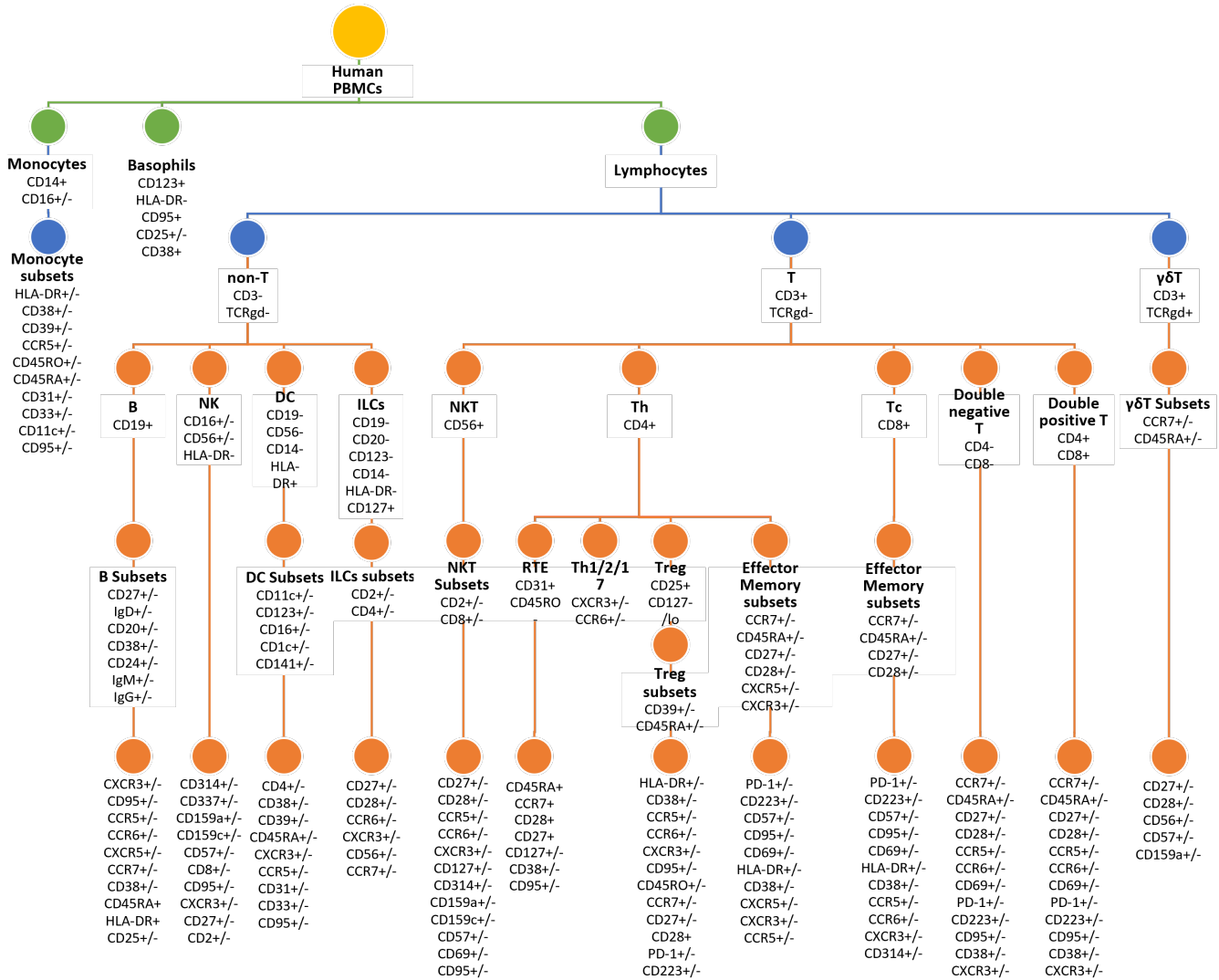


図 5. 同定されたすべての細胞サブセットの概略図

## 主要な免疫細胞サブセットを同定するために使用される 手動ゲーティング戦略

PBMC は、図 6 に示すように、一連の染色手順に基づいたプロトコルに従って処理されます。血小板、デブリ、ダブルット、死細胞を除外した後、生きた CD45<sup>+</sup> 集団内で好塩基球 (1) が CD45+CD123+HLA-DR<sup>-</sup> として分類されました。リンパ球と単球 (2) は FSC-H/BSSC-H 特性に基づいてゲーティングされました。単球 (3) は CD14 と CD16 の発現によって非古典的単球 (CD14-CD16<sup>+</sup>)、中間単球 (CD14+CD16<sup>+</sup>/低)、古典的単球 (CD14+CD16<sup>-</sup>) に分類されました。リンパ球ゲート (2) からは、次の集団が同定されました。CD3-TCR $\gamma\delta$ -、CD3+TCR $\gamma\delta$ +、CD3+TCR $\gamma\delta$ - (4)。CD3+TCR $\gamma\delta$ + 集団 (5) は CD45RA と CCR7 の発現に基づいて特徴付けられました。CD3+TCR $\gamma\delta$ - 集団は CD3+CD56+ (NKT 様) サブセットと CD3+CD56- サブセットに類別されました (6)。CD2 と CD8 を加えることで NKT 様細胞のさらなる分類が可能になり、CD69 と CD57 は NKT 様細胞の早期活性化と細胞毒性を検出するために使用されました (7)。CD3+CD56- ゲートから CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4+CD8<sup>+</sup>、および CD4-CD8<sup>-</sup> T 細胞が同定されました (8)。Treg 細胞は CD4<sup>+</sup> 集団から CD127 と CD25 の発現 (CD127<sup>lo</sup>/-CD25<sup>hi</sup>) を用いて同定され、これらの細胞は CD39 と CD45RA を用いてさらに分類されました (9)。CCR7、CD45RA、CD27、CD28 により、メモリー/エフェクター CD4 および CD8 T 細胞サブセットのさらなる分類が可能になり、CXCR3 および CCR6 により Th 集団のさらなる分類が可能になりました。CD45RO および CD31 は CD4 T 細胞内の RTE 細胞の検出に使用され、PD-1 および CD223 は CD4 および CD8 T 細胞の疲弊状態の検出に使用されました (10、11)。

CD19<sup>+</sup> および/または CD20<sup>+</sup> 細胞 (B 細胞) は CD3-TCR $\gamma\delta$ - 集団から排除されました (12)。CD19+CD20<sup>+</sup>/- 細胞はさらに IgD+CD27<sup>-</sup>、IgD+CD27<sup>+</sup>、または IgD-CD27<sup>+</sup>/- にゲーティングされ、IgD-CD27<sup>+</sup>/- サブセットは CD20 発現に基づいて形質芽球または IgD<sup>-</sup> メモリー B 細胞に類別され、IgD<sup>-</sup> メモリー B 細胞内で IgG および IgM 発現が評価されました。IgD+CD27<sup>-</sup> 集団はさらに移行性 B 細胞に類別され、IgD<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> 集団はさらに MZ および IgD<sup>-</sup> メモリーのみ B 細胞に類別されました (13)。NK 細胞は CD3-TCR $\gamma\delta$ -HLA-DR<sup>-</sup> と定義され、初期 NK (CD56+CD16<sup>-</sup>)、成熟NK (CD56+CD16<sup>+</sup>)、終末NK (CD56-CD16<sup>+</sup>) 細胞に分類されました (14)。樹状細胞 (DC、15) は、最初に CD3-CD19-CD56-CD14-HLA-DR<sup>+</sup> でゲーティングすることによって同定され、そこから CD123<sup>+</sup> (pDC) と CD11c+DC が同定されました。CD11c+DC はさらに CD16<sup>-</sup> と CD16<sup>+</sup> に類別されました。次に CD1c と CD141 を使用して、CD11c+CD16<sup>-</sup> と CD11c+CD16<sup>+</sup>DC がさらに分類されました。最後に、自然リンパ球 (ILC、16) が CD3-CD19-CD20-CD14-CD123-CD127<sup>+</sup> として同定され、CD2 および CD4 の発現に基づいてさらに分類されました。提示されたすべてのデータは、1 人の健康なドナーの凍結 PBMC から得られたものです。

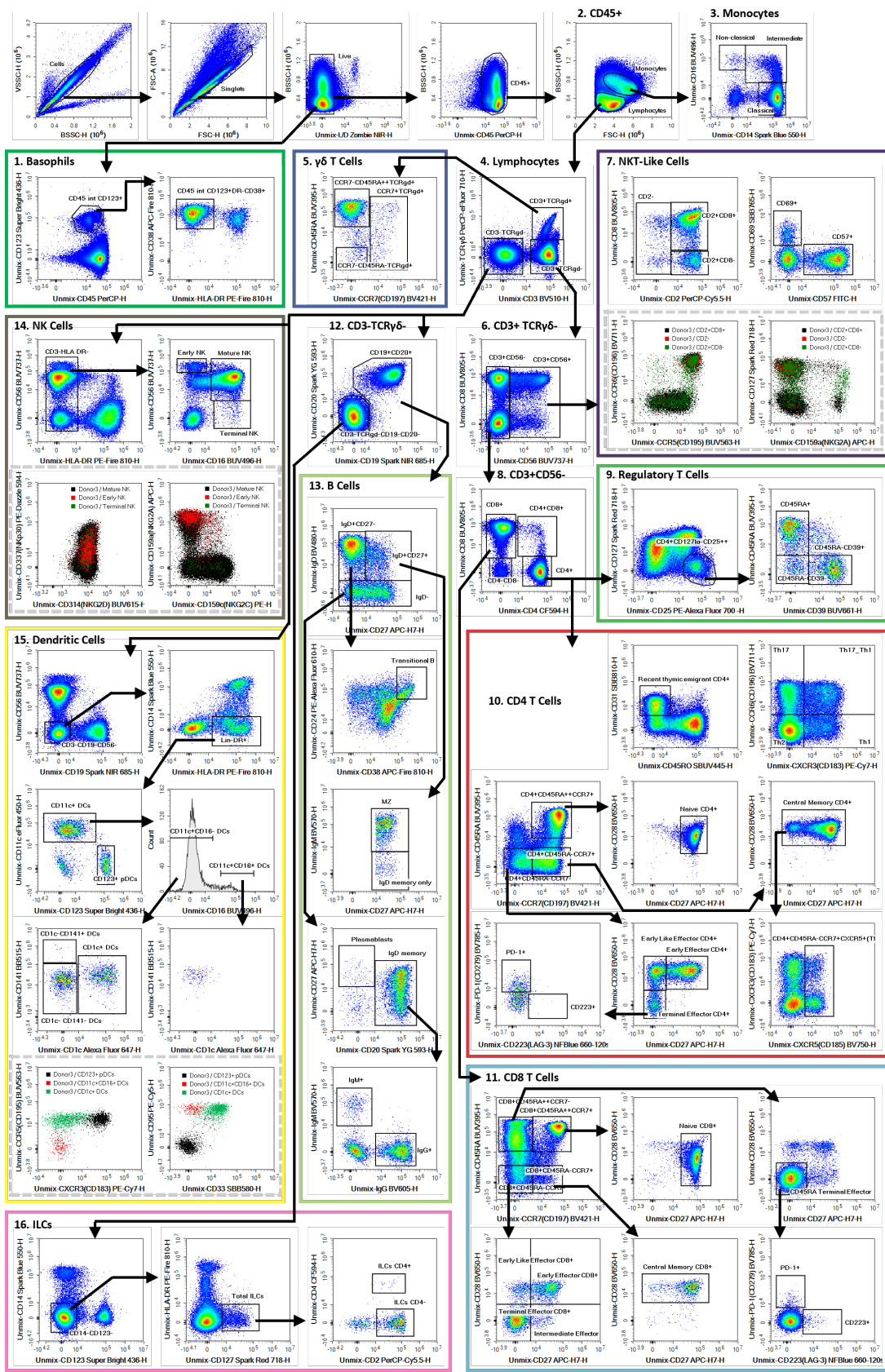


図 6. 血小板、デブリ、ダブルット、および死細胞を除去した後に正常なヒト PBMC サンプルで特徴付けられる細胞タイプは、単球、好塩基球、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、自然リンパ球、B リンパ球、T リンパ球、NKT 様リンパ球、Treg リンパ球、および TCRγδ リンパ球です。分化・疲弊・活性化の状態を評価するための他のマーカーも含まれていました。



## 結論

スペクトルフローサイトメトリーは、データ分解能とパネル設計の柔軟性を向上させ、より多くのマーカーを同時に分析する機能を提供します。この検討で使用された Agilent NovoCyte Opteon は、使いやすい Agilent NovoExpress データ取り込みおよび解析ソフトウェアとともに、これらの利点を実現します。NovoCyte Opteon は、5 つのレーザー (UV、V、B、Y、R) と合計 73 個の光検出器を備え、さらに高度化する実験パネル要件を満たすことが可能で、従来のフローサイトメトリーでは見出せなかった分析結果を明らかにする効率的なワークフローを実現します。

## 参考文献

1. Sen, P.; Kempainen, E.; Oresic, M. Perspectives on Systems Modeling of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Front Mol Biosci* **2017**, *4*, 96.
2. Corkum, C.P.; Ings, D.P.; Burgess, C.; Karwowska, S.; Kroll, W.; Michalak, T.I. Immune Cell Subsets and Their Gene Expression Profiles From Human PBMC Isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and Standard Density Gradient. *BMC Immunol* **2015**, *16*, 48.
3. Kleiveland, C.R. Peripheral Blood Mononuclear Cells. In: The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. Edited by Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. *Cham (CH)*; **2015**, 161–167.
4. Lozano-Ojalvo, D.; Lopez-Fandino, R.; Lopez-Exposito, I. PBMC-Derived T Cells. In: The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models. Edited by Verhoeckx K, Cotter P, Lopez-Exposito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H. *Cham (CH)*; **2015**, 169–180.
5. Morath, A.; Schamel, W.W. Alphabeta and Gammadelta T Cell Receptors: Similar but Different. *J Leukoc Biol* **2020**, *107*(6):1045–1055.
6. McBride, J.A.; Striker, R. Imbalance in the Game of T Cells: What Can the CD4/CD8 T-Cell Ratio Tell Us About HIV and Health? *PLoS Pathog* **2017**, *13*(11):e1006624.
7. Golubovskaya, V.; Wu, L. Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **2016**, *8*(3).
8. Sakaguchi, S.; Yamaguchi, T.; Nomura, T.; Ono, M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. *Cell* **2008**, *133*(5):775–787.
9. Raphael, I.; Nalawade, S.; Eagar, T.N.; Forsthuber, T.G. T Cell Subsets and Their Signature Cytokines in Autoimmune and Inflammatory Diseases. *Cytokine* **2015**, *74*(1):5-17.
10. Pido-Lopez, J.; Imami, N.; Aspinall, R. Both Age and Gender Affect Thymic Output: More Recent Thymic Migrants in Females Than Males as They Age. *Clin Exp Immunol* **2001**, *125*(3):409–413.
11. Gatinoni, L.; Speiser, D.E.; Lichterfeld, M.; Bonini, C. T Memory Stem Cells in Health and Disease. *Nat Med* **2017**, *23*(1):18–27.
12. Li, H.; Tsokos, G.C. Double-Negative T Cells in Autoimmune Diseases. *Curr Opin Rheumatol* **2021**, *33*(2):163–172.
13. Desfrancois, J.; Moreau-Aubry, A.; Vignard, V.; Godet, Y.; Khammari, A.; Dreno, B.; Jotereau, F.; Gervois, N. Double Positive CD4CD8 Alphabeta T Cells: A New Tumor-Reactive Population in Human Melanomas. *PLoS One* **2010**, *5*(1):e8437.
14. Gonzalez-Mancera, M.S.; Bolanos, N.I.; Salamanca, M.; Orjuela, G.A.; Rodriguez, A.N.; Gonzalez, J.M. Percentages of CD4+CD8+ Double-Positive T Lymphocytes in the Peripheral Blood of Adults from a Blood Bank in Bogota, Colombia. *Turk J Haematol* **2020**, *37*(1):36–41.
15. Kitchen, S.G.; Whitmire, J.K.; Jones, N.R.; Galic, Z.; Kitchen, C.M.; Ahmed, R.; Zack, J.A. The CD4 Molecule on CD8+ T Lymphocytes Directly Enhances the Immune Response to Viral and Cellular Antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*(10):3794–3799.
16. Santegoets, S.J.; Dijkgraaf, E.M.; Bataglia, A.; Beckhove, P.; Briten, C.M.; Gallimore, A.; Godkin, A.; Goutefangeas, C.; de Gruijl, T.D.; Koenen, H.J.; et al Monitoring Regulatory T Cells in Clinical Samples: Consensus on an Essential Marker Set and Gating Strategy for Regulatory T Cell Analysis by Flow Cytometry. *Cancer Immunol Immunother* **2015**, *64*(10):1271–1286.
17. Ouaguia, L.; Morales, O.; Mrizak, D.; Ghazal, K.; Boleslawski, E.; Auriault, C.; Pancre, V.; De Launoit, Y.; Conti, F.; Delhem, N. Overexpression of Regulatory T Cells Type 1 (Tr1) Specific Markers in a Patient with HCV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *ISRN Hepatol* **2013**, 2013:928485. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4890904/>
18. Ouaguia, L.; Mrizak, D.; Renaud, S.; Morales, O.; Delhem, N. Control of the Inflammatory Response Mechanisms Mediated by Natural and Induced Regulatory T-Cells in HCV-, HTLV-1-, and EBV-Associated Cancers. *Mediators Inflamm* **2014**, 2014:564296.
19. Khan, M.A.; Khan, A. Role of NKT Cells during Viral Infection and the Development of NKT Cell-Based Nanovaccines. *Vaccines (Basel)* **2021**, *9*(9).

20. Poli, A.; Michel, T.; Theresine, M.; Andres, E.; Hentges, F.; Zimmer, J. CD56 Bright Natural Killer (NK) Cells: an Important NK Cell Subset. *Immunology* **2009**, *126*(4):458–465.
21. Melandri, D.; Zlatareva, I.; Chaleil, R.A.G.; Dart, R.J.; Chancellor, A.; Nussbaumer, O.; Polyakova, O.; Roberts, N.A.; Wesch, D.; Kabelitz, D.; et al. The  $\gamma\delta$ TCR Combines Innate Immunity with Adaptive Immunity by Utilizing Spatially Distinct Regions for Agonist Selection and Antigen Responsiveness. *Nat Immunol* **2018**, *19*(12):1352–1365. <https://www.nature.com/articles/s41590-018-0253-5>
22. Yazdanifar, M.; Barbarito, G.; Bertaina, A.; Airoidi, I. Gammadelta T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy. *Cells* **2020**, *9*(5).
23. Lunt, S.Y.; Vander Heiden, M.G. Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2011**, *27*:441–464.
24. Pieper, K.; Grimbacher, B.; Eibel, H. B-Cell Biology and Development. *J Allergy Clin Immunol* **2013**, *131*(4): 959–971.
25. Jacquelot, N.; Seillet, C.; Vivier, E.; Belz, G.T. Innate Lymphoid Cells and Cancer. *Nat Immunol* **2022**, *23*(3):371–379.
26. Chung, D.C.; Jacquelot, N.; Ghaedi, M.; Warner, K.; Ohashi, P.S. Innate Lymphoid Cells: Role in Immune Regulation and Cancer. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*(9).
27. Sosa Cuevas, E.; Ouaguia, L.; Mouret, S.; Charles, J.; De Fraipont, F.; Manches, O.; Valladeau-Guilemond, J.; Bendriss-Vermare, N.; Chaperot, L.; Aspod, C. BDCA1(+) cDC2s, BDCA2(+) pDCs and BDCA3(+) cDC1s Reveal Distinct Pathophysiologic Features and Impact on Clinical Outcomes in Melanoma Patients. *Clin Transl Immunology* **2020**, *9*(11):e1190.
28. Ouaguia, L.; Leroy, V.; Dufeu-Duchesne, T.; Durantel, D.; Decaens, T.; Hubert, M.; Valladeau-Guilemond, J.; Bendriss-Vermare, N.; Chaperot, L.; Aspod, C. Circulating and Hepatic BDCA1+, BDCA2+, and BDCA3+ Dendritic Cells Are Differentially Subverted in Patients With Chronic HBV Infection. *Front Immunol* **2019**, *10*:112.
29. Cormican, S.; Griffin, M.D. Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis. *Front Immunol* **2020**, *11*:1070.
30. Voskamp, A.L.; Prickett, S.R.; Mackay, F.; Rolland, J.M.; O'Hehir, R.E. MHC Class II Expression in Human Basophils: Induction and Lack of Functional Significance. *PLoS One* **2013**, *8*(12):e81777.
31. Park, L.M.; Lannigan, J.; Jaimes, M.C. OMIP-069: Forty-Color Full Spectrum Flow Cytometry Panel for Deep Immunophenotyping of Major Cell Subsets in Human Peripheral Blood. *Cytometry A* **2020**, *97*(10):1044-1051.
32. Shevchenko, Y.; Lurje, I.; Tacke, F.; Hammerich, L. Fluorochrome-Dependent Specific Changes in Spectral Profiles Using Different Compensation Beads or Primary Cells in Full Spectrum Cytometry. *Cytometry A* **2024**.

[www.agilent.com/lifesciences/cellanalysis](http://www.agilent.com/lifesciences/cellanalysis)

ホームページ

[www.agilent.com/chem/jp](http://www.agilent.com/chem/jp)

カスタムコンタクトセンター

**0120-477-111**

[email\\_japan@agilent.com](mailto:email_japan@agilent.com)

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、  
医薬品医療機器等法に基づく登録を行っていません。  
本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに  
変更されることがあります。

RA45406.3860069444

アジレント・テクノロジー株式会社  
© Agilent Technologies, Inc. 2024  
Printed in Japan, May 30, 2024  
5994-7397JAJP

