

# 免疫系の遺伝的制御 — ⑩

## Two-Color FACS解析に基づいたB細胞分画 〈訳〉 早川 京子

Leonore A. Herzenberg, Kyoko Hayakawa and Richard R. Hardy (Stanford University)

当シリーズは、83年1月(第3週木曜日号)へ継続します。  
企画：ヘキストジャパン株式会社

### はじめに

免疫系がどのようにして機能しているか、また病気が正常免疫能をどのように乱すのかを知るためには、免疫能を担っているリンパ球集団を同定し、分画する方法の開発は、ひとつの鍵となる。ところが、どのリンパ球も、大きさや物理学的性質がかなり似かよっているため、リンパ球分離の進歩のほとんどが、特異的な細胞表面分子を認識する免疫試薬(抗血清やモノクローナル抗体)の開発、あるいは、それらの抗体を用いて視覚化したり、除去、濃縮化させたりする手段の開発に基づいてきた。

蛍光標識した抗体がこれらの目的に有用であることはよく知られている。1960年代初期に、マウスの脾臓リンパ球の半数が蛍光標識抗免疫グロブリン抗体で“染色”されることがわかり、蛍光免疫学の端緒となった。そして抗体産生細胞が細

胞表面免疫グロブリン陽性細胞(B細胞)に属していることが判明した。さらに、免疫グロブリン陰性細胞は、細胞性免疫や各種の免疫統御に携わる細胞であるT細胞であることもあきらかになった。

T細胞群の分画には、蛍光標識抗体を用いた解析と抗体と補体による細胞障害試験が長い間用いられてきた。これによって、T細胞はおもに二つ(ヘルパー機能やインデューサー機能をもつものと、細胞障害や抑制性機能をもつもの)に分けられ、異なった機能的役割や特殊な細胞表面マーカー、あるいは、マーカーの特定の組み合わせをもつ細胞をもとに、さらに細分されている。ところが、B細胞に対する同様の解析はそれほど進歩していないのが現状である。おおむね、B細胞は、同一の細胞表面マーカー(マウスではIgM、IgD、Ia、TnB等)をもっている。したがって、T細胞とは異なり、B細胞は、抗原刺激によって分化(初期記憶、

成熟時記憶)した細胞も含めて、比較的均一な集団であるとされてきた。

ところが、我々は最近、マウスのB細胞が少なくとも三つに分画されることをあきらかにした。個々の細胞に同時に表現されている細胞表面マーカーの量を測る免疫蛍光法を用いて、特定の一对のマーカー(IgMとIgD)の量的発現をもとにB細胞は分画される。また、週齢の異なる正常あるいは免疫不全マウスの脾臓やリンパ節からの細胞を調べることによって、各分画が遺伝的な支配をうけたり、加齢にともなって変化することもわかった。

### 新しいFACS解析システム

こうした研究は、最近の免疫蛍光技術の発展に依っている。蛍光抗体で染色された各細胞を、定量的に正確にかつ多角的に解析する蛍光活性化細胞分離装置(FACS)は、二つの独立したレーザー励起

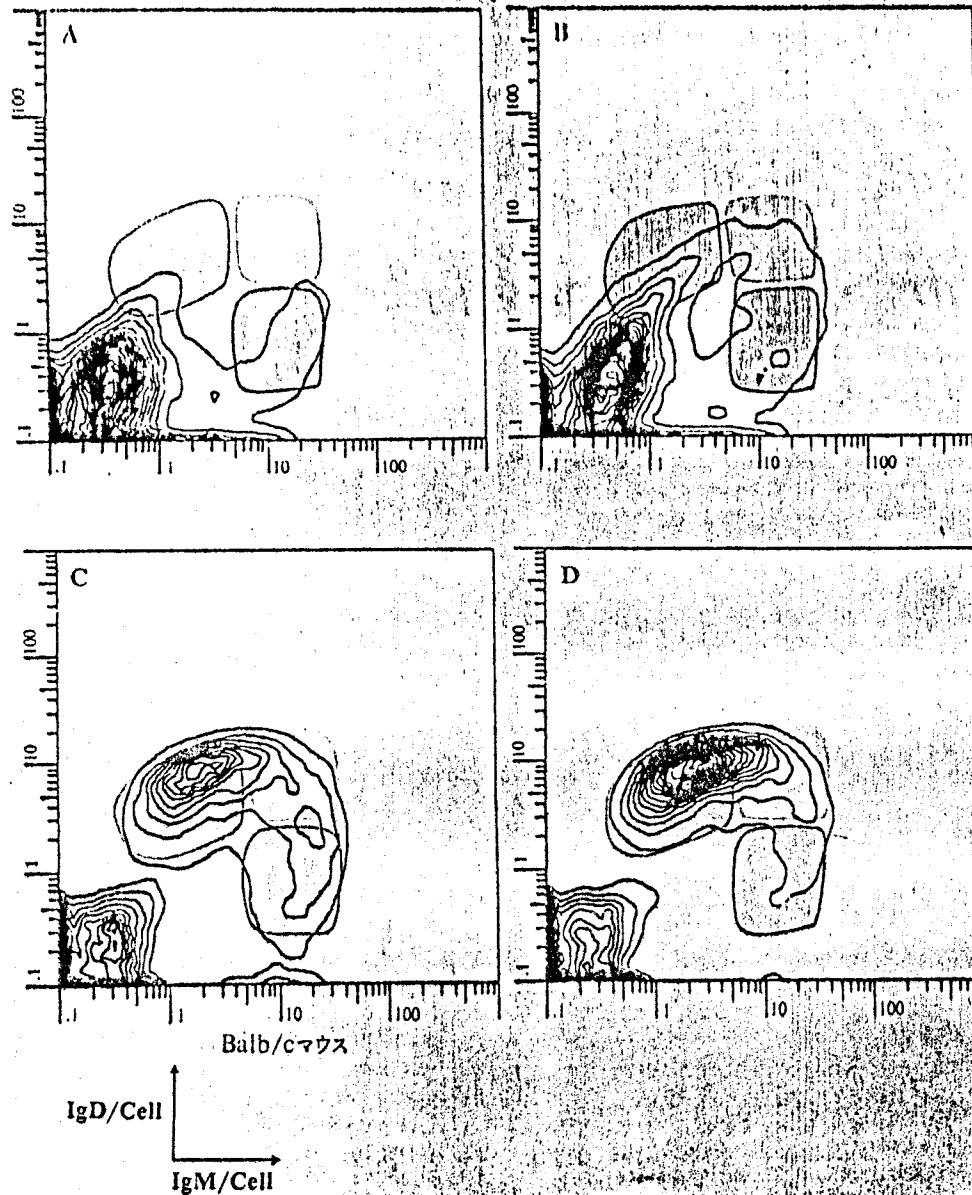
装置と、蛍光度を対数的に検出する装置をもち、ひとつは緑色蛍光度を測り、他方は、同一細胞上の赤色蛍光度を測る。同時に違う角度のスクーター検出系では細胞の大きさが反映され、さらに別の検出系は、ヨード化プロピディウム(PI)で特異的に染色された死細胞を分離除外して分析することが可能である。VAXコンピュータシステムは、FACSデータの集積保存にあたり、後述するような解析に用いられる(図①)。通常、我々は、三万個の生細胞(PI不反応性)を、蛍光度と細胞の大きさに基づいて収集し、各細胞解析用にひとつのデータ単位としコンピュータに記憶させている。この方法により、本来の情報構成を保存し、それに由来するさまざまなデータ(解析された全細胞、あるいは特定の蛍光範囲にある細胞の頻度、ヒストグラム、コントロールプロット(等分布線))をコンピュータでひきだすことができる(図①)。モノクローナル抗体は、フルオレセイン結合による緑色蛍光試薬、またはビオチンと結合させ、Texas-red 結合化アビジンとの反応による間接赤色蛍光試薬として用いられる。

図① Two-Color FACS解析システム(簡略化)

(細胞流)



図9 個体発生にみるB細胞免疫グロブリン表現の変化



の抗原を分泌している点で特徴的である。しかしこの細胞分画は、羊赤血球を免疫した際に生じる抗原抗体産生細胞を含まない。これは、NZBマウスに発生する自己免疫病の発生の関連から興味深い。

### ヒトB細胞分画

ヒトB細胞もマウスのB細胞と同様の特徴を示した二つの亜集団に分類されるようである。ヒトの細胞に対する我々のデータはまだ不完全で、また、主に末梢血のデータにたよっている点にも問題がある。それでも、図9に示されるように、ヒトのIgM、IgDに対するモノクローナル抗体を用いて得たコントロールプロットをみるかぎり、殆どのケースはマウスと区別し難いことがわかった。

### おわりに

このプロジェクトの先達であり、CBA/Nマウスを提供して下さった協同研究者の J. Haaijman 博士、モノクローナル抗IgM抗体を供給して下さった P. Kincade 博士のご厚意に感謝します。また、二重レーザーFACSの開発に貢献した D. Parks博士、VAXコンピューターのデータ解析プログラミングに携わった W. Moore 氏に謝意を表します。

### REFERENCES

1. Parks, D. R., R. R. Hardy and L. A. Herzenberg. 1982. Dual Immunofluorescence-New frontiers in cell analysis and sorting. Immunol. Today.(in press)
2. Hardy, R. R., K. Hayakawa., J. Haaijman and L. A. Herzenberg. 1982. B cell subpopulations identified by 2-color fluorescence analysis. Nature, 297:589
3. Hardy, R. R., K. Hayakawa., J. Haaijman and L. A. Herzenberg. 1982. B cell subpopulations identifiable by two-color fluorescence analysis using a dual-laser FACS. New York Academy of Science.(in press)

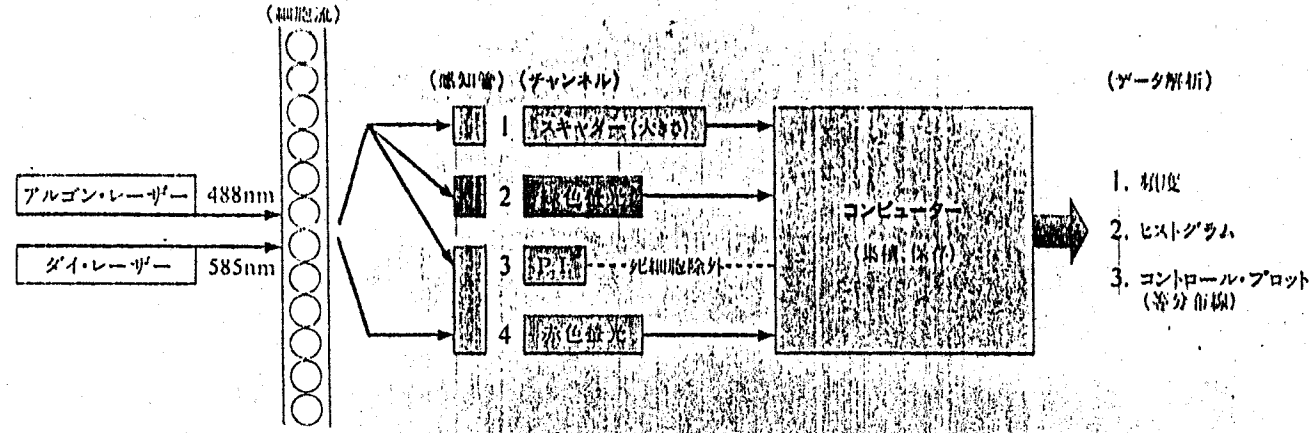
※当シリーズ6月17日号の一部を次のように訂正しお詫び申し上げます。  
P.34 \*ヒトNK細胞の分化\* 8行目

誤:「HNK<sup>+</sup>T3<sup>-</sup>細胞分画」→正:「HNK<sup>+</sup>T3<sup>+</sup>細胞分画」

Texas red 結合化アビジンとの反応による間接赤色蛍光試薬として用いられる。

### FACS解析に基づくB細胞分画

ここに示したデータは、リンパ球の大きさの範囲に含まれる細胞（大部分のモノサイトと、非常に大きな細胞は除外してある）に関するものである。我々の定義するB細胞分画は、マウスの脾細胞やリンパ節細胞のうち、モノクローナル抗IgM(緑色)と抗原D(赤色)抗体で同時染色されるものという定義に基づく。細胞表



## SUBPOPULATIONS OF B LYMPHOCYTES

Leonore A. Herzenberg, Kyoko Hayakawa,  
and Richard R. Hardy

Genetics Department Stanford University Medical School  
Stanford, California 94305  
< Translator: Dr. Kyoko Hayakawa >

The key to a better understanding of how the normal immune system functions, and how disease interferes with normal function, lies in the development of methods for identifying, isolating and studying the various lymphocyte subpopulations that mediate and regulate immune responses. Lymphocytes, however, tend to be quite similar in size and physical characteristics. Therefore most of the progress in this area has been due to the development of immunospecific reagents (antisera and monoclonal antibodies) that detect cell surface molecules unique to a given lymphocyte subpopulation and of methods with which these reagents can be used to visualize, deplete or enrich such subpopulations.

Fluorescent-labelled antibodies have proven particularly useful for these purposes. Studies in the early 1960's showed that half of the lymphocytes in mouse spleen are can be "stained" with fluorescein-conjugated antibodies to immunoglobulins. These pioneering immunofluorescence studies defined the immunoglobulin-bearing lymphocyte (B cell) population that we now know contains the precursors of antibody producing cells. In addition, they revealed the existence of an immunoglobulin-negative lymphocyte population now recognizable as the T cells responsible for cell-mediated immunity and a variety of immunoregulatory functions.

Over the years, immunofluorescence and cytotoxic depletion studies have dissected the T cell population, first into two major subpopulations (helper/inducer and cytotoxic/suppressor) and subsequently into a series of smaller subpopulations that perform different functions and carry unique surface markers or combinations of surface markers. Similar studies with B cells, however, have been much less successful. By and large, B cells have been found to carry the same surface markers (e.g., IgM, IgD, Ia and ThB in the mouse). Thus, unlike T cells, B cells have appeared to constitute a relatively homogeneous population containing a small number of cells at later stages of antigen-stimulated differentiation (early memory, mature memory).

Nevertheless, we have recently been able to define at least three well-represented B cell subpopulations present in normal animals. Using immunofluorescence methods to measure the amounts of various surface markers co-expressed on individual B cells, we have shown that the quantitative expression of certain pairs of markers (e.g., IgM and IgD) identifies B cells as belonging to one or another of these subpopulations. Furthermore, by examining cells taken from spleens or lymph nodes in mice of different ages in a variety of normal and immunodeficient mouse strains, we have shown that each population has a characteristic distribution that is genetically controlled and changes as the animal matures.

### Multiparameter FACS Analysis

These studies rely on recently developed immunofluorescence technology that permits quantitatively-precise multiparameter analyses on individual cells stained with fluorescent-labelled antibodies specific for cell surface molecules. Specifically, we employ a Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS) fitted with two independent laser-illumination and (logarithmic) fluorescence-detection systems, one

for measuring the green fluorescence and one for measuring the red fluorescence associated with an individual cell; a small-angle light scatter detection system that reveals cell size; a separate detector system that allows dead cells stained with propidium iodide to be "gated out" of the analysis; and a VAX computer system that collects, stores and displays FACS measurements (see fig. 1). The staining reagents are all monoclonal antibodies labelled either with fluorescein to yield green-fluorescent reagents or with biotin and Texas-Red Avidin to yield red-fluorescent reagents.

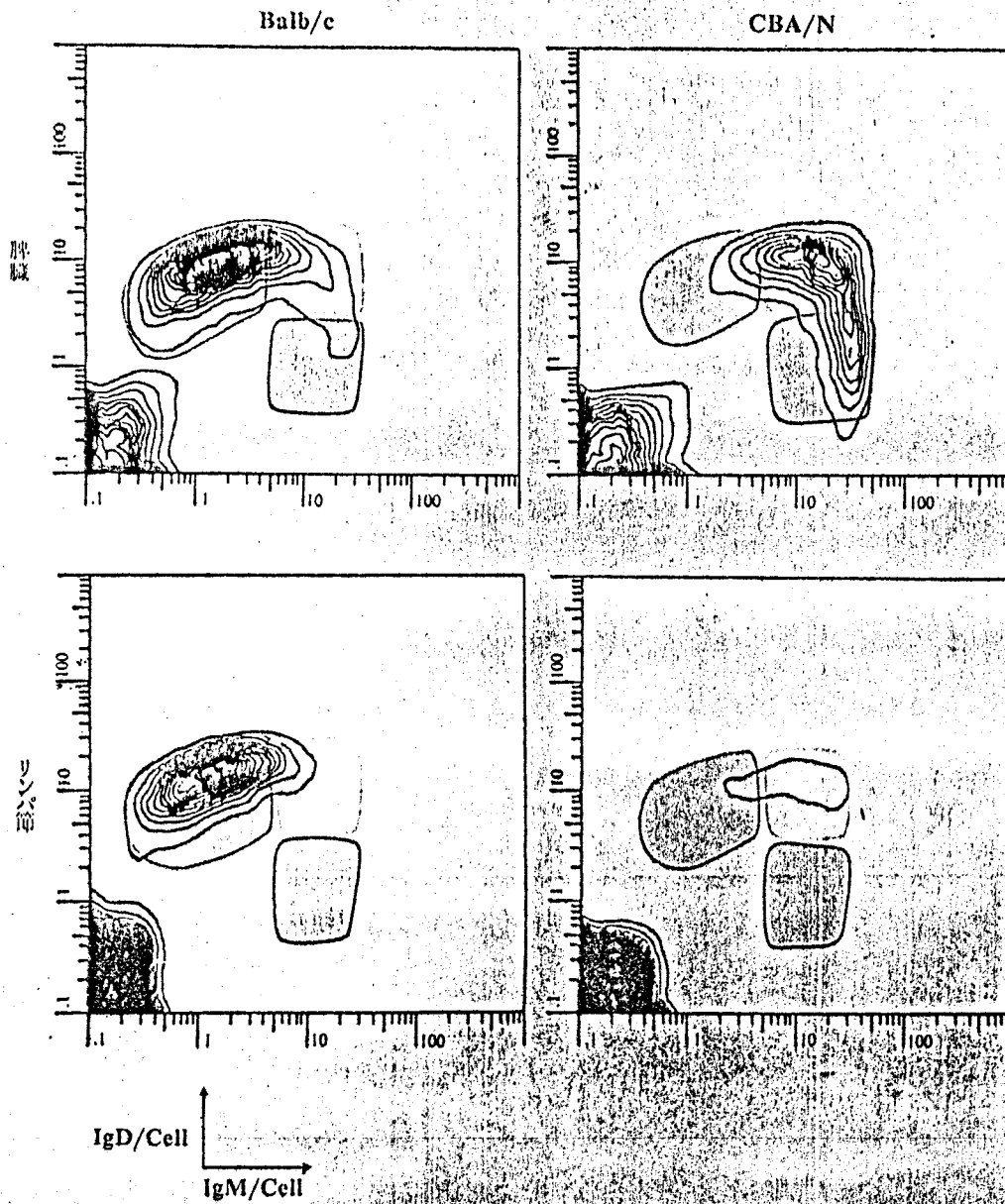
In a typical analysis, we collect the fluorescence and scatter measurements for 30,000 live cells (propidium-iodide negative) and store the set of measurements for each individual cell as a unit. This preserves the original information structure and allows us to extract derived data (frequencies, histograms and "contour plots" for all cells or for cells that fit within a specified size or fluorescence-brightness range). The data shown here are for cells that fall within the standard size range for lymphocytes (i.e., the majority of monocytes and some other quite large cells have been excluded from consideration).

### FACS-Defined B Cell Subpopulations

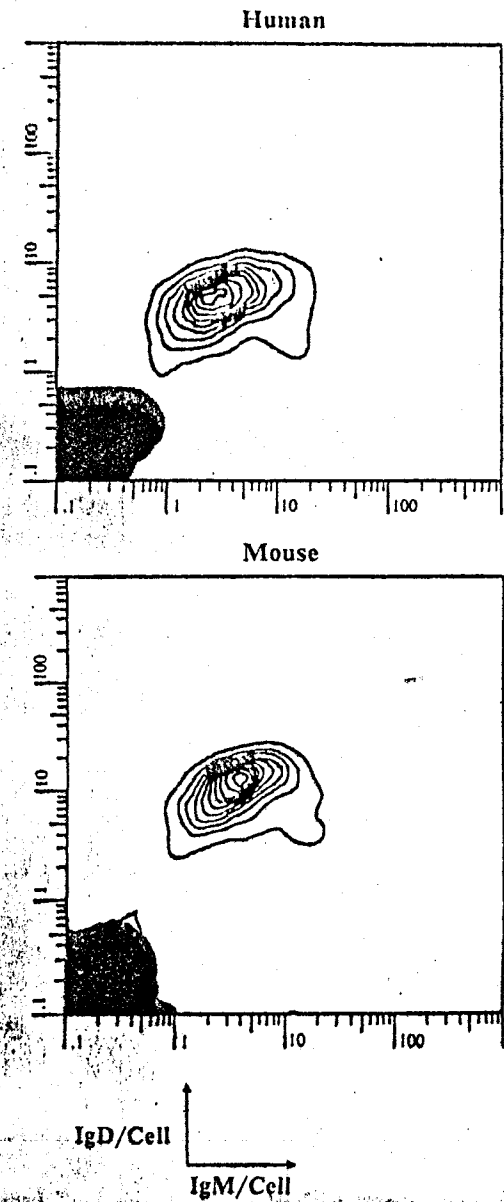
The B cell subpopulations we have defined are visible when analyses are performed on mouse spleen or lymph node cells stained simultaneously with monoclonal anti-IgM (green) and monoclonal anti-IgD (red) antibodies. Measured individually, these surface markers (IgM and IgD) show only that B cells are broadly heterogeneous with respect to the amount of surface Ig expressed (see histogram in fig. 2); however, measured together they clearly define at least two B cell subsets resolvable according to the amount of IgM expressed (see contour plots shown in fig. 2).

The predominant B cell subpopulation (labelled I in the

図⑧ Balb/c, CBA/Nマウスにおける脾臓、リンパ節細胞の比較



図⑨ マウスに類似したヒト末梢血細胞

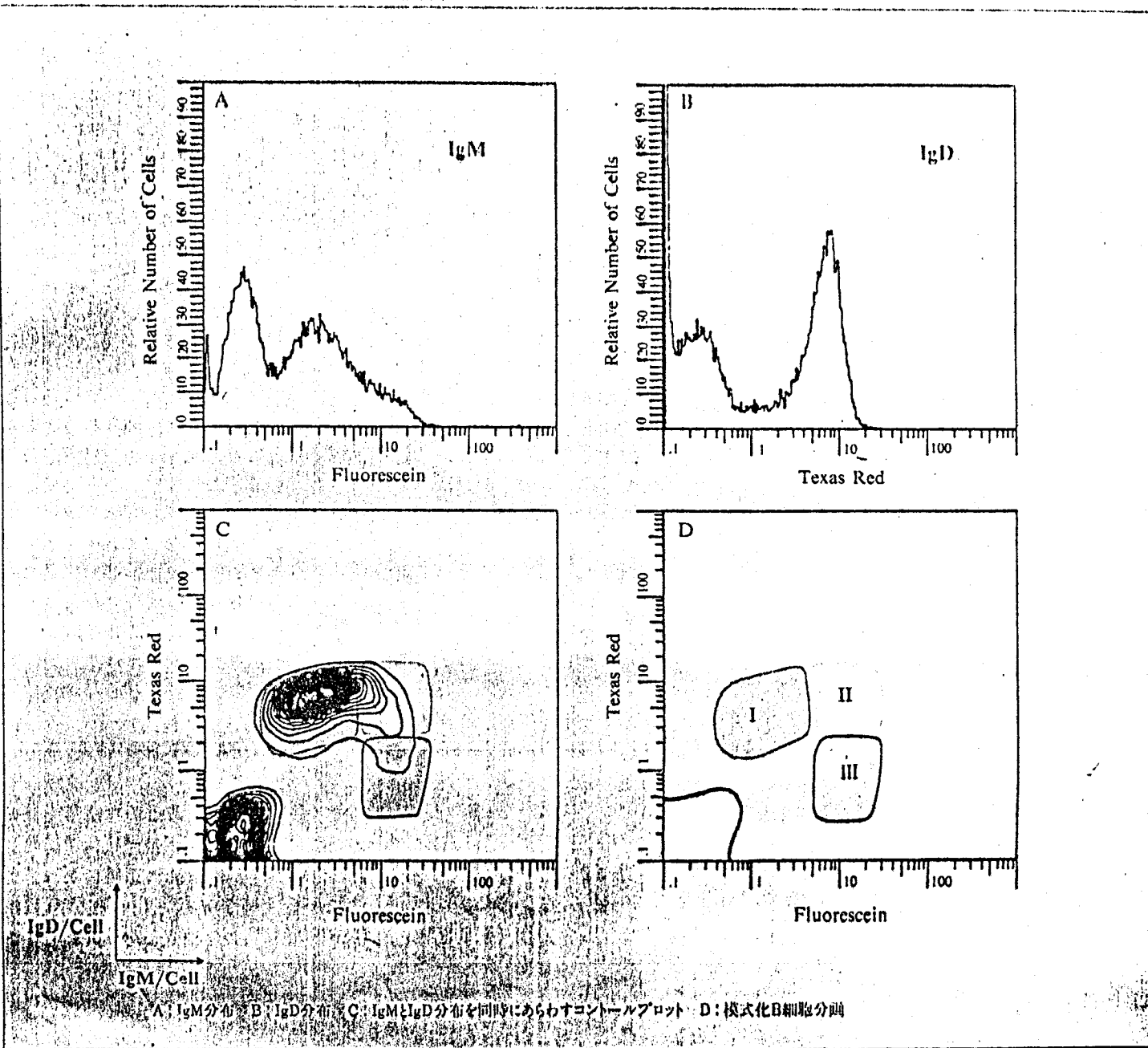


面マーカー (IgM, IgD) をそれぞれに測定した場合、B細胞は、表面免疫グロブリン量が広範囲に分布しているということしかわからない。しかし、同時解析では、IgMの量によって少なくとも二つのはっきりとしたB細胞分画があることがわかった(図②)。

最も大きなB細胞分画(図②DのI)は、比較的表面IgMが少なく、IgDは、中等量から多く、脾性B細胞の80%を占める。この分画はBalb/cマウスリンパ節において最も顕著で、B細胞の95%以上を構成している。残りのB細胞は10~100倍量のIgMを表現し、IgDの量と器官分布の差によりさらに二分される(図②DのIIとIII)。IgD、IgMともに多い分画(II)は、脾臓のB細胞の約15%を構成し、リンパ節の細胞群では4%にすぎない。IgDの量が少ない分画(III)は、リンパ節においては完全に欠落している(後記)。細胞の大きさを反映するスキャター解析でもこれらの分画を区別することができる。分画Iは小細胞の大部分を占め、分画IIは、ほとんどが大きい細胞で、分画IIIは中細胞の範囲に属している。このスキャターの違いは、リンパ球群の機能的解析の際、これらの分画を分離精製するのに役立つ。

CBA/Nマウスを用いた解析では、このようなB細胞分画の検学の意義が極めて有用であることが明確になった。このマウスは、X染色体に連鎖した免疫不全を示し、特定の抗原(T細胞非依存性)に対して反応することができない。図③に示されるように、CBA/Nマウスは、リンパ節や脾臓で基本的に分画Iが欠けている。すなわち、脾臓由来のB細胞のほとんどが高IgM分画よりなり、Balb/cマウスの分画IIとIIIに相当する細胞で構成されて

図② マウス脾臓リンパ球表面のIgM、IgD分布とB細胞分画



いる。さらに、リンパ節において脾陽性細胞が非常に少なく、それらはすべて分画Iに属している。このように、分画Iがないために通常は少ない数で構成されるB細胞分画の解析がたやすくなり、分画IIとIIIが明確に区別されるようになった。

他のB細胞表面マーカー(IaやThB)に対するモノクローナル抗体も用いて、同様に多角的に解析をした結果、上記の分画間で特徴的な違いがあることがわかった。たとえば、分画IIとIIIは、IよりもThB

抗原量が多く、分画IIは、他に比してThB抗原量が少ない。こうして各種のマウスからの脾臓とリンパ節に対するTwo-color FACS解析のデータを総合することにより、B細胞集団は、3つ(あるいはそれ以上)の亜集団よりなるものであり、それぞれが、特徴的な細胞表面Igや他のマーカーの量的表現をしていることがわかった。

### B細胞発生と機能

個体発生学上、前駆細胞と子孫細胞の関係において、これらの細胞分画間の関係はいまのところ明確ではない。動物の成長過程での細胞分画の出現順序をみると、分画Iは分画II、IIIに属する細胞に由来しているように見える。しかし、この発生学的順序は、特定の分画の出現をコントロールする時期を反映していることも十分に考えられる。ただ、少なくとも、分画Iは、成熟期(頻度は2カ月齢以後安定する)に達して発現される最後の分画である(図4)。

B細胞分画の免疫学的機能の役割の相違も今後の解析を要する点であるが、最近、我々は、NZBマウス(ヒトのSLEに類似した自己免疫病を示す)において分画IIが異常に増加し、しかもT細胞の表面マーカーとして知られていたLyt-1抗原を同時に表現していることを発見した。このマーカーは、通常のマウスの分画IIに相当するほとんどの細胞にもある。しかし、NZBマウスのLyt-1保有分画のIII細胞は、自発的に(外来抗原なしに)in vitroで大量

diagram in fig. 2), which has relatively little surface IgM, expresses intermediate to high levels of surface IgD and constitute roughly 80 percent of the splenic B cells. This population is even more predominant in BALB/C lymph nodes where it constitutes greater than 95 percent of the B cells (see fig. 3). The remaining splenic B cells, which express 10 to 100 times more IgM, are further subdivided according to the amount of surface IgD expressed (labelled II and III) and the organ localization of the cells. The "high-IgD, high-IgM" population (II) constitutes roughly 15 percent of the B cells in spleen but only 4 percent of the B cells in lymph node. The "low-IgD" population (III) is distinguishable more by its apparent complete absence from lymph node (see fig. 3) than by any clearcut demarcation in the staining pattern.

Small-angle light scatter measurements in the FACS, which provide an index of cell size, further distinguish these populations. Population I is the major stained component of the smaller (by scatter) cells; population II is found predominantly among the larger cells; and population III is found amongst cells in an intermediate size range. This scatter difference is another parameter which should help in isolating these subpopulations for use in functional assays.

Studies with CBA/N mice improve the resolution of the B cell subpopulations (see fig. 3). These mice have been shown to have an X-linked immunodeficiency that interferes with their ability to respond to certain (T-independent) antigens. Furthermore, as our data show, they have essentially no detectable population I cells in lymph nodes or spleen. That is, their splenic B cells consist entirely of "high IgM" populations and are divided between cells comparable to the cells in populations II and III in BALB/C spleen. In addition, they have only a few Ig positive cells in their lymph nodes and these cells are exclusively in the region of population II. Thus, when population I is absent from lymph node and consequently does not obscure the analysis of the minor B cell populations

present, population II and III are clearly distinguishable on the basis of their locations in the IgM, IgD fluorescence plots.

Similar multiparameter analyses with pairs of monoclonal reagents detecting other B cell surface markers (e.g., Ia and ThB) also demonstrate characteristic differences amongst the subpopulations. Populations II and III, for example have more ThB than population I while population III tends to have less Ia than the other populations. These differences occur in all mouse strains, including BALB/C and CBA/N.

The combined data from two color FACS analyses of spleens and lymph nodes from a variety of mouse strains thus demonstrate that the heterogeneous expression of IgM and IgD on the whole B cell population reflects the orderly subdivision of these cells into three (or more) subpopulations, each with its own characteristic levels of surface immunoglobulins and other surface markers.

### Ontogeny and Function

The ontogenic (precursor-progeny) relationships of these subpopulations have yet to be defined. The order of appearance of the subpopulations in developing animals appears to suggest that population I derives from cells in population II or III; however, this ontological sequence can equally well represent developmental control over when particular subpopulations are permitted to emerge. At present we can state only that population I is the last subpopulation to reach mature levels (frequency stabilizes in 2 month old animals) (see fig. 4).

The functional roles of the B cell subpopulations also remains largely to be discovered. In recent studies, we have shown that NZB mice (which have an autoimmune defect akin to Lupus erythematosus in humans) have a large number of population III cells that also carry a cell surface marker (Lyt-1) present on all mouse T cells. This marker is also present on

most of the population III cells in normal mice; however, the Lyt-1 bearing population III cells from NZB are unique in that they secrete large amounts of IgM when cultured in vitro in the absence of exogenously-added antigen. This cell population does not contain the IgM-secreting antibody producing cells stimulated by in vivo immunization with sheep erythrocytes. Thus we are intrigued by the possibility that it represents a manifestation of the autoimmune disease that occurs in NZB animals.

### Human B Cell Subpopulations

Human B cells also appear to be subdivided into three subpopulations with similar characteristics to those found for the mouse B cell populations. Our data on human cells are far less complete and have mainly been gathered from peripheral blood samples. Nonetheless, as figure 5 shows, staining with monoclonal antibodies to (human) IgM and IgD yields contour plots that in many cases are indistinguishable from those obtained with mouse cells.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the collaboration of Dr. Joost Haaijman, Institute of Experimental Gerontology, Health Organization TNO, The Netherlands, in the early phases of this project and thank the Institute for providing the CBA/N mice used in these studies. We thank Dr. P. Kincaid for the monoclonal rat anti-IgM, Dr. D. Parks for invaluable assistance with the dual-laser FACS and Mr. W. Moore for writing the VAX data handling programs. This work was supported in part by NIH grants CA-04681 and GM-17367.