

|||||  
 総 説  
 |||||

## 免疫応答解析のための新しい多重免疫組織染色法

獨協医科大学 解剖学 (マクロ)

北沢 祐介    上田 祐司    沢登 祥史    於 恩橋  
 刈屋 太郎    佐々木 優    内田 知見    刈屋 顕  
 作本 順子    佐々木敬子    山田 容子    松野健二郎

**Key Words** : EdU, BrdU, 免疫性増殖応答, クラスター, 多重免疫組織染色法

### 緒 言

免疫応答では、抗原特異的なリンパ球と抗原提示細胞 (APC : antigen presenting cell), 主に樹状細胞 (DC : dendritic cell) との相互作用により抗原提示がなされ、抗原特異的リンパ球のクローン増殖とヘルパー T 細胞やキラー T 細胞などのエフェクター細胞への分化 (免疫性増殖応答) が起こるとされる。この応答に関する一般的な解析方法は、精製した両者の機能遺伝子・分子の定量であるが、リンパ臓器内では両者は細胞集塊 (クラスター) を形成し、その中で抗原提示が起こっているため、そのクラスターを直接解析したものでなければ、真の相互作用を見たことにならない。このためには、in situ (組織切片上) でクラスターを形成している両者のフェノタイプ (細胞特異的分子マーカー) や機能分子を多重免疫染色するアプローチがもっとも適切である。そこで、本総説では、チミジンアナログで増殖細胞を標識した組織を用い、これまでの多重酵素免疫染色法と新たな多重蛍光免疫染色法による免疫性増殖応答の組織および細胞レベルの解析方法の例を示す。そして具体的なレシピを紹介する。

本総説の図 3, 5 (一部), 図 6-9, 表 1 は、著者らが発表した *Histochem Cell Biol.* Kitazawa Y, 他 2015 Sep ; 144 (3) : 195-208. doi : 10.1007 から引用・改変したものである。この原著は the Creative Commons license を取得した Open Access content であり、著者らが発表内容を自由に引用することが可能な資料である。

### これまでの免疫性増殖応答解析

著者らの研究室では、チミジンアナログである BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) と細胞膜表面または細胞内部の抗原を染め分ける多重染色法を用い、これまで、免疫応答の研究をしてきた<sup>1-4)</sup>。しかしながら、酵素抗体法による多重染色法では、2つ以上の異なる分子マーカーを同一細胞上に検出 (2重陽性) することは、偽陽性や偽陰性染色がおこりやすく非常に困難であった。一方、蛍光抗体法は、酵素法に比べ高感度、高 S/N 比 (signal/noise 比) であり、複数の分子を同時に検出・可視化できる利点がある。近年では蛍光色素を励起するレーザー、多種類の蛍光フィルター、光安定性をもつ多種類の蛍光色素などの開発により、多重蛍光染色を用いた蛍光顕微鏡による形態学的解析ができるようになった。また、フローサイトメトリー (FCM) などの蛍光検出器の開発により、蛍光標識細胞の定量定性解析もできるようになっている<sup>5)</sup>。

ただし、この多重蛍光染色においても、BrdU を用いる場合には、依然として問題点があった。それは BrdU の抗体による検出には、DNA 開環処理に必要な強酸または加熱処理をするため、抗原性の低下や蛍光色素の抑制が起こり、他のパラメーターに偽陰性染色がおこるリスクがある。抗体は、DNA 2重螺旋間距離より大きい分子サイズであり、また DNA 2重螺旋内に取り込まれた BrdU のプロモ基が螺旋構造に隣接しているため、その狭い空間に入り込むことができない。故に検出前には必ず開環処理が必要となる。

そこで著者らは、近年、細胞周期の解析に用いられているチミジンアナログの EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) に着目した。その違いは、BrdU, IdU (5-iodo-2'-deoxyuridine), CldU (5-chloro-2'-deoxyuridine) などの他のチミジンアナログの検出では抗体による免疫学的検出法を用いるのに対し<sup>6)</sup>、EdU の検出にはクリッ

平成 27 年 11 月 26 日受付, 平成 27 年 12 月 10 日受理  
 別刷請求先 : 北沢祐介

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880  
 獨協医科大学 解剖学 (マクロ)



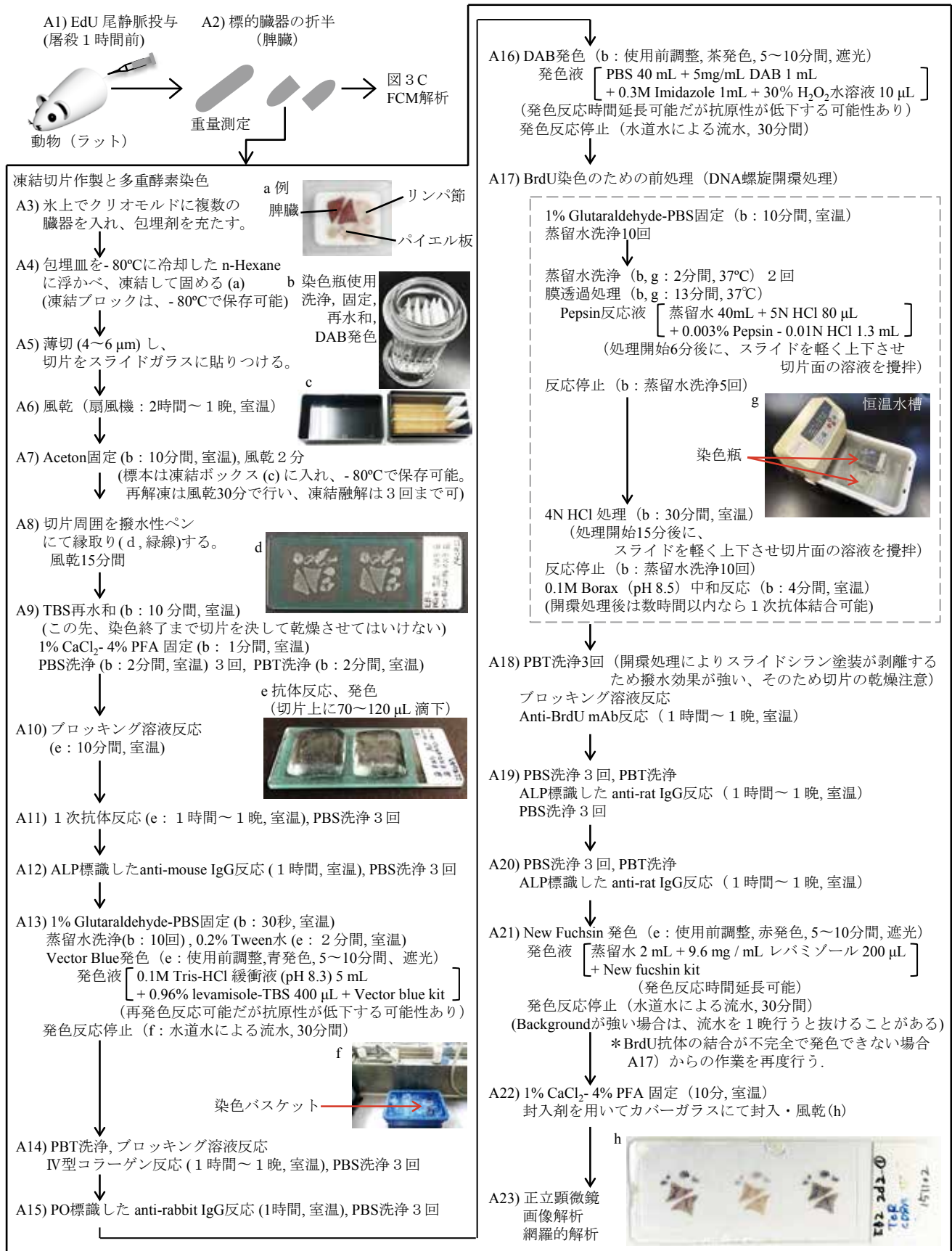
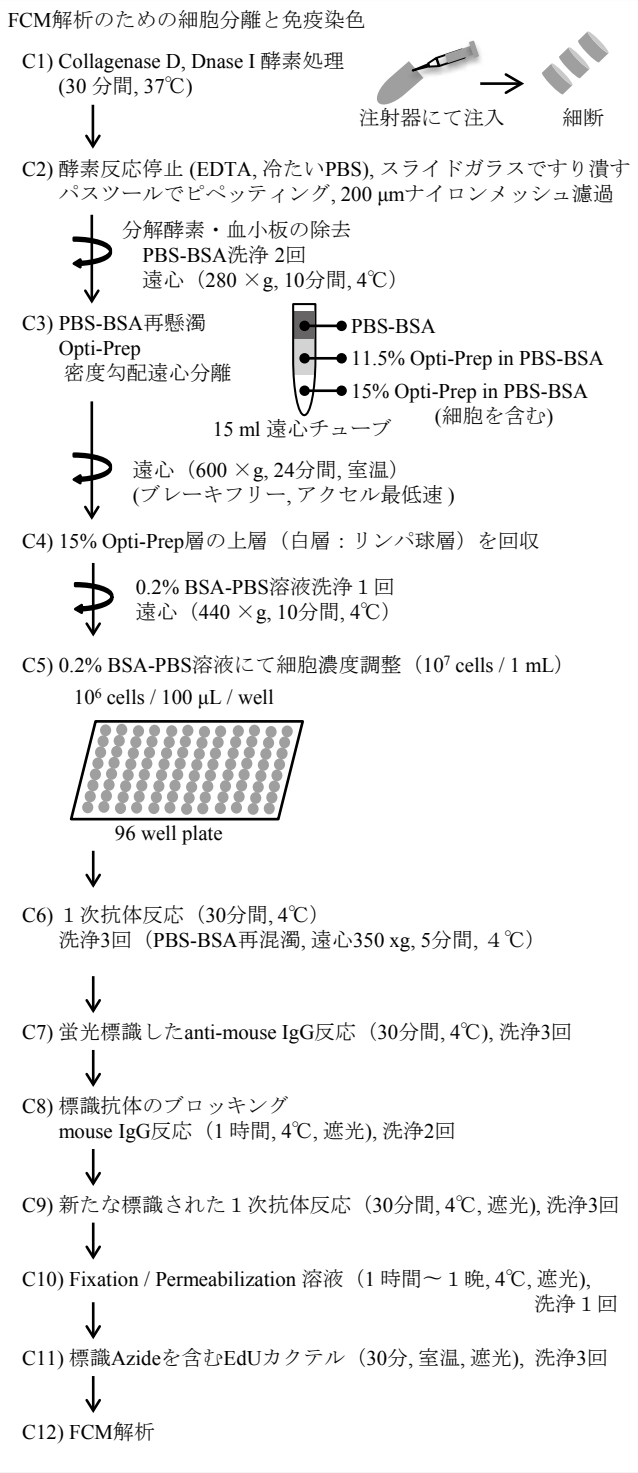
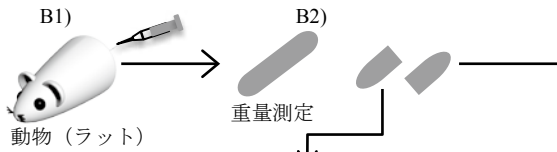


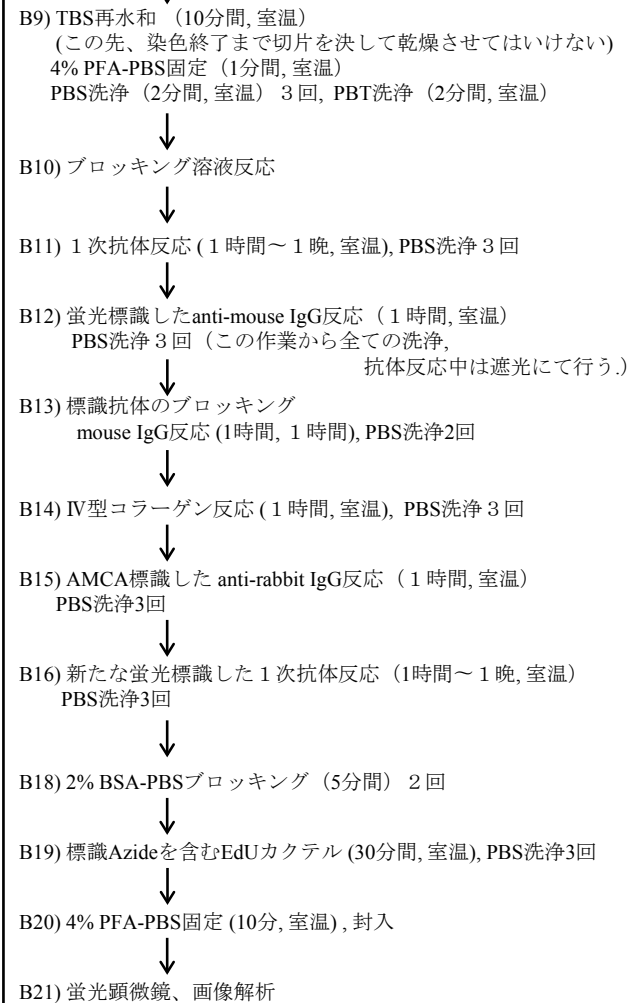
図 2 酵素多重染色法プロトコール

B1-B2) 図2 A1-A2と同じ作業のため、参照しておこなう。



**凍結切片作製と多重蛍光染色**

B3-B8) 図2 A3-A8)と同じ作業のため、参照しておこなう。  
 (以下、洗浄・抗体反応形式は図6を参照)



**免疫染色で使用する主な製品情報 (製品名: 販売社名)**

- 包埋皿 (クリオモルド1,2,3号: Sakura Finetek Japan)
- 包埋剤 (O.C.T compound: Sakura Finetek Japan)
- 撥水性ペン (Super-Liquid Blocker: Cosmo Bio)
- スライドガラス (Silanized Slides: DAKO)
- カバーガラス (NEO cover glass: Matsunami glass)
- ブロッキング溶液 (Block Ace: DS Pharma Biomedical)
  
- 封入剤: 酵素用: 図6 (Aquatex: Merck)  
 蛍光用: 図7 (Fluorescent Mounting Medium: KPL)
  
- 発色基質剤: ALP用: 青色 (Vector blue kit: Vector Laboratories)  
 ALP用: 赤色 (New fuchsin kit: DAKO)  
 PO用: 茶色 (DAB: Dojindo Molecular Technologies)
  
- 内因性酵素ブロック剤 (Levamisole: Wako, 分注保存可 -80°C)  
 DAB発色増強剤 (Imidazole: SIGMA, 分注保存可 -80°C)  
 細胞膜・核膜分解酵素 (Pepsin: SIGMA, 分注保存可 -80°C)

図3 蛍光多重染色法プロトコール



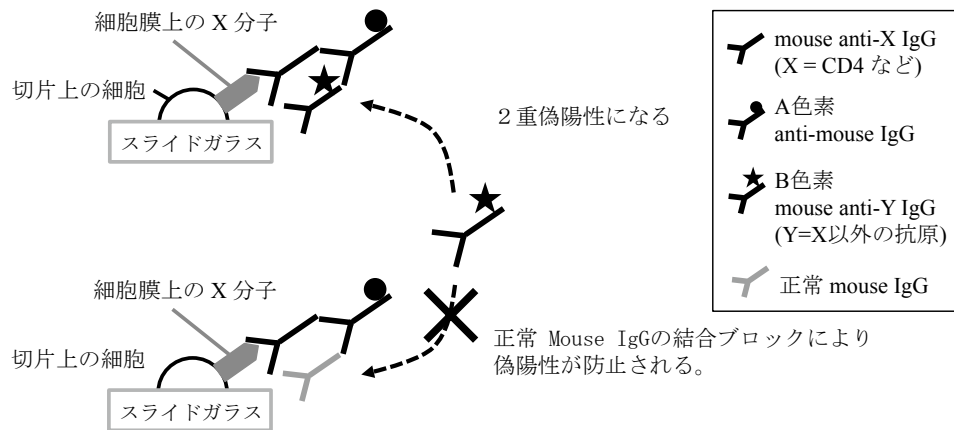


図4 正常 mouse IgG による2重陽性の防止法

は、常にあらかじめ酵素免疫組織染色を行い、その結果を蛍光染色のものと比較して判定するようにしている。具体的には、以下のようなものである。

- 1) 網羅的解析：大まかな種々の免疫担当細胞特異的分子マーカー (CD4, CD8 $\beta$ , T細胞受容体 $\alpha\beta$  (TcR $\alpha\beta$ ) など), IV型コラーゲン, BrdUを含めた3重酵素染色を行い、その所見を比較分析することにより、免疫担当細胞の分化・増殖の大まかな全体像を捉えた上で、多重蛍光染色により詳細を明確にする。また、IV型コラーゲン染色は基底膜を染めるため、血管や組織構築の全体像を捉えることができる。
- 2) 非特異的染色：蛍光染色では、蛍光のCV (変動係数: coefficient of variation) 幅による隣接フィルターへの漏れ混みやマクロファージなどの貪食細胞の強い自家蛍光によりしばしば偽陽性反応を生じる。一方、FCM解析は、蛍光補正可能なため、非特異的染色を除外できる。これらから多重酵素組織染色とFCMを多重蛍光組織染色に先行しておこなえば非特異的染色 (偽陽性反応や自家蛍光) のリスクを減らすことが可能になる。

#### 移植に伴う免疫応答 (アロ免疫応答) の解析

- 1) ドナー細胞と宿主細胞の識別：移植に伴うアロ免疫応答には、宿主の細胞が臓器片 (ドナー臓器) を異物として認識し攻撃するHvGR (宿主対移植片反応 = 移植拒絶反応) と移植片由来のリンパ球が宿主を異物として認識し攻撃するGvHR (移植片対宿主反応) がある<sup>10)</sup>。2つのアロ免疫応答への誘導は、ドナーもしくは宿主のリンパ球のどちらかが優位になることで発症する。リンパ球の由来を鑑別するためにはドナーまたは宿主の主要組織適合抗原

(MHC, アロ抗原: ラットではRT1.AB) またはコンジュニックマーカーを染色すれば良い。

- 2) 細胞のフェノタイプ (細胞特異的分子マーカー)：免疫応答は、細胞性免疫、液性免疫等に分かれるが、それぞれが関与している免疫担当細胞は様々である。それ故、免疫応答の解明には、どのタイプの細胞が反応しているのかを染め分けて区別することが必要である。これにより、いつ、どこで、どのような免疫担当細胞が増殖・分化するかが明らかになり、免疫応答のメカニズム解明が可能になってくる。
- 3) 細胞集塊 (クラスター)：免疫応答は、抗原を提示するDCとその情報を受け取るナイーブT細胞の相互作用により誘導される。この現場が、DCとT細胞の細胞集塊 (クラスター) の形成であり、アロ免疫応答においても不可欠な構造である。

#### 組織標本作製のステップ

実験処置をした動物の細胞増殖解析を行うため、免疫性増殖応答期間において屠殺1時間前にBrdU (6 mg/体重 200 g, Sigma-Aldrich Japan, Tokyo) とEdU (5 mg/体重 200 g, Thermo Fisher Scientific) の混合溶液を尾静脈内投与 (1 mL/rat) する (図2 A1)。屠殺した動物から目的のリンパ臓器 (脾臓など) を取り出し、半分に切断後 (A2)、一方は組織標本作製用として凍結ブロックを作製し、もう一方はFCM用に細胞懸濁液を作製する。また、標的臓器は、包埋皿 (クリオモルド) に入れ (A3)、包埋剤を充たして急速新鮮凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  超低温槽に保存する (A4)。要時、凍結切片を4~6 $\mu\text{m}$  で薄切し (A5)、すぐに風乾 (扇風機: 2時間~1晩, 室温) する (A6)。その後の処理は、図2 A7-A9 (酵素染色の場合) または図3 B7-B9 (蛍光染色の場合) のよう

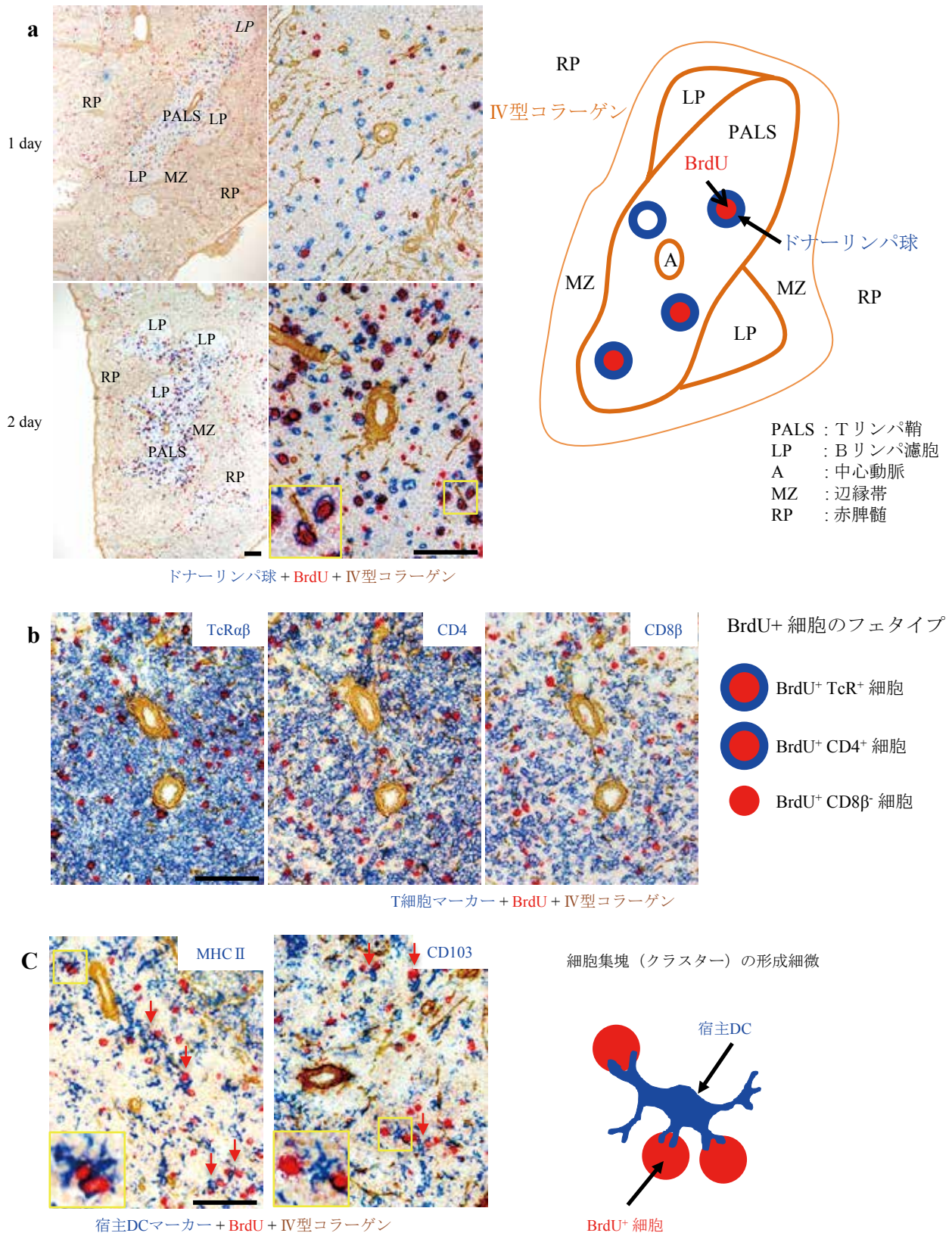


図5 BrdU3重酵素染色による増殖細胞のフェノタイプとクラスターの解析  
**A.B.** 宿主脾臓の組織切片を、ドナーリンパ球、 $TCR\alpha\beta$ 、 $CD4$ または $CD8\beta$ （細胞膜、青）、IV型コラーゲン（茶）、BrdU（核、赤）についての酵素3重染色（Scale bar  $100\mu m$ ）。投与後2日目の脾臓PALSにドナーリンパ球、 $TCR\alpha\beta$ 、 $CD4$ 細胞に一部BrdU+細胞が確認できる。**C.** 同じ組織切片を、宿主MHCIIまたは $CD103$ （青）、IV型コラーゲン（茶）、BrdU（赤）についての3重酵素染色（Scale bar  $100\mu m$ ）。宿主MHCII+DCまたは宿主 $CD103$ +DCと増殖細胞のクラスターの形成を確認できる。

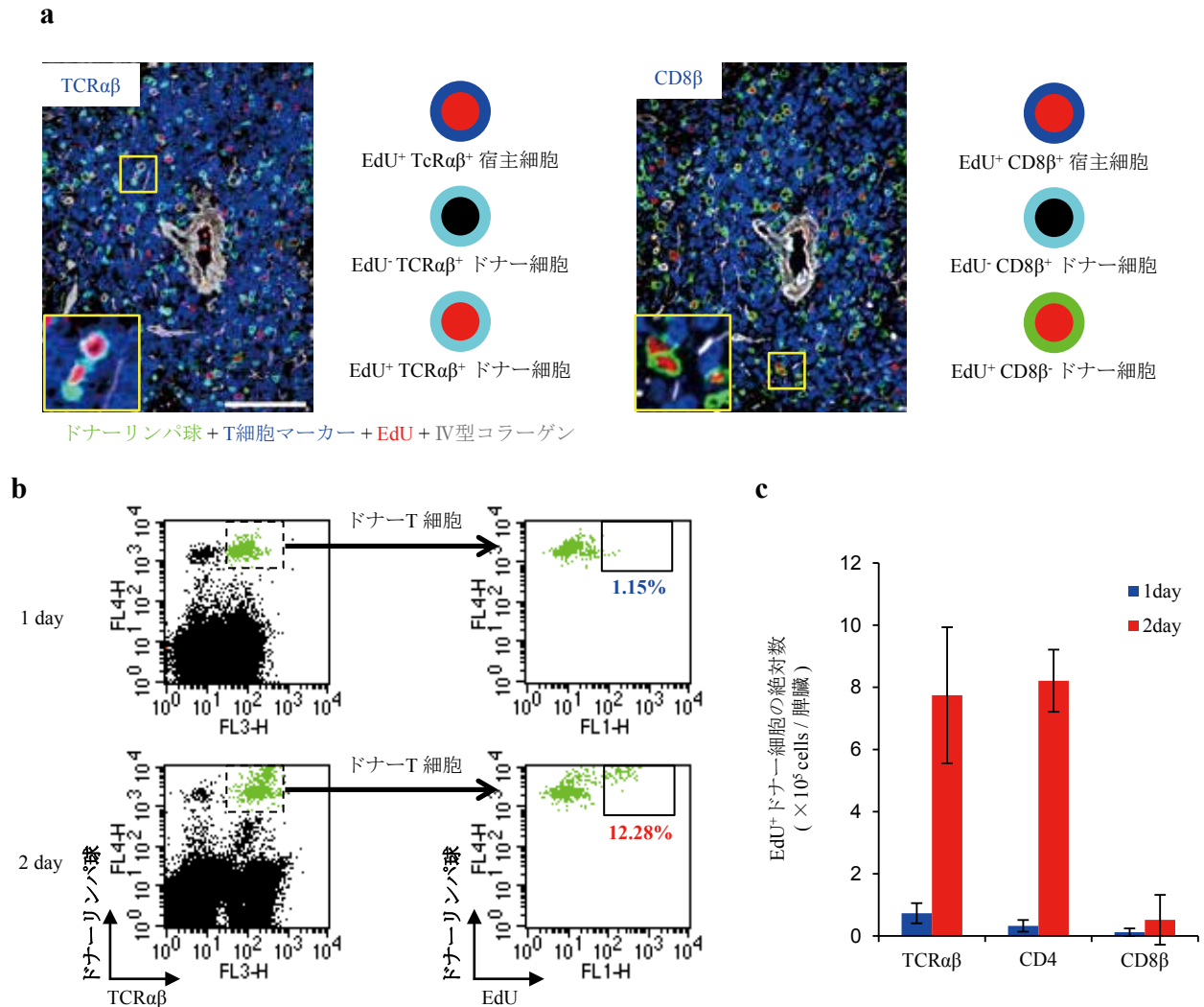


図6 GvHRにおけるドナーリンパ球の遊走と増殖応答

A. 投与後2日目の宿主脾臓の組織切片を  $\text{TCR}\alpha\beta$  または  $\text{CD8}\beta$  (Alexa-647, 青), ドナーリンパ球 (Alexa-488, 緑), IV型コラーゲン (AMCA, 白), EdU (Alexa-594, 赤) についての4重蛍光染色 (Scale bar 100  $\mu\text{m}$ ). EdU<sup>+</sup>増殖細胞において,  $\text{TCR}\alpha\beta^+$  RT7<sup>b+</sup>ドナー T細胞 (細胞膜: 水色) が多数みられたが, RT7<sup>b+</sup>  $\text{CD8}\beta^+$ ドナー T細胞 (細胞膜: 水色) はほとんど確認できない. B. FCMによる定量解析により, ドナー T細胞が, 投与後2日目に増殖応答を示した. ドナー T細胞をフェノタイプ毎に FCM 解析すると,  $\text{TCR}\alpha\beta^+$   $\text{CD4}^+$ ドナー T細胞が投与後2日目に増殖応答を示していた.

に進める. 固定液・発色剤などの化学系廃液は, 回収し適切な処理にて廃棄すること.

#### BrdUを用いた多重酵素免疫染色法

3重酵素染色は, 脾臓の凍結切片を T細胞マーカー ( $\text{TCR}\alpha\beta$ ,  $\text{CD4}$ ,  $\text{CD8}\beta$ ), ドナーリンパ球 (コンジュニックマーカー (RT7<sup>b</sup>)) または宿主 DCマーカー (MHCII,  $\text{CD103}$ ) を青, 組織構築 (IV型コラーゲン) を茶, 増殖細胞 (BrdU) を赤にそれぞれ発色する (プロトコール (図 2A10-A23, 表 1) を参照).

#### EdUを用いた多重蛍光免疫染色による解析

3重または4重蛍光染色は, 標的臓器の凍結切片をドナー特異的リンパ球 (RT7<sup>b</sup>), 細胞フェノタイプ ( $\text{TCR}\alpha\beta$ ,  $\text{CD8}\beta$ , MHCII), 組織構築 (IV型コラーゲン), 増殖細胞 (EdU), DCマーカー ( $\text{CD103}$ ,  $\text{CD11c}$ ,  $\text{CD205}$ ) を目的に応じて組合せて行う (プロトコール (図 3B10-B21, 表 1) を参照).

#### FCMによるドナー T細胞の免疫応答とフェノタイプ解析

脾臓から生細胞を分離するために, 臓器に Collagenase D と DNase I を含む HBSS (Hank's buffered salt



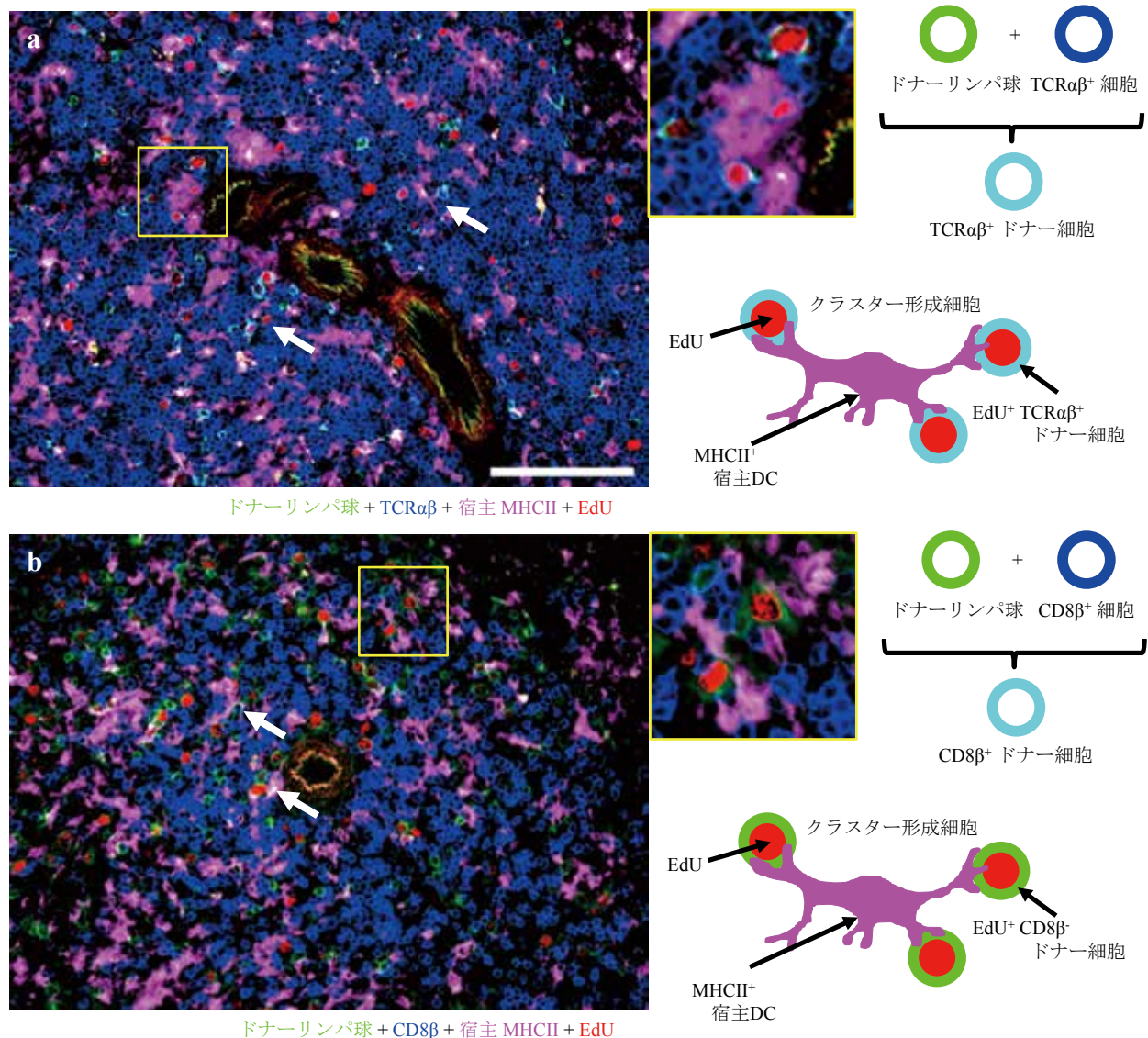


図7 宿主 MHC II 陽性の DC と推定される細胞と細胞間結合し増殖しているドナーリンパ球のフェノタイプ解析  
 A. 投与後2日目の宿主脾臓 PALS を、 $TCR\alpha\beta$  または  $CD8\beta$  (Alexa-647, 青), ドナーリンパ球 (Alexa-488, 緑), 宿主 MHCII (Alexa-350, マゼンタ), EdU (Alexa-594, 赤) についての4重蛍光染色 (Scale bar 100  $\mu$ m). 宿主 MHCII<sup>+</sup> 細胞と細胞間結合している EdU<sup>+</sup> 細胞において、 $TcR\alpha\beta^+$   $RT7^{b+}$  ドナー T 細胞 (細胞膜: 水色) が多数みられるが、 $RT7^{b+}$   $CD8\beta^+$  ドナー T 細胞 (細胞膜: 水色) はほとんど確認できない。

solution) を注射器にて注入した後、組織を細かく切断し、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにて30分間、酵素消化する (図3 C1)。処理後、酵素反応を停止させるために、ごく少量の0.5M EDTA 溶液 (pH 7.2) と冷たいPBS 溶液 (C2) を加えた後、組織を軽くつぶし、細胞懸濁液を作製する (C3-C5)。リンパ球 (10<sup>6</sup> cells/100  $\mu$ L 0.2% BSA-PBS 溶液) を T 細胞特異的分子マーカー ( $TcR\alpha\beta$ , CD4, CD8 $\beta$ ) に対する抗体にて反応 (C6) させた後、各細胞を遠心 (350 xg, 4°C, 5分) によって0.2% BSA-PBS 溶液で3回洗浄する。それらの1次抗体は、PerCP-Cy5.5 標識した anti-mouse IgG 抗体にて

再度反応させ検出する (C7)。さらに同じ mouse 抗体 (mouse で作られた抗体) にて多重蛍光染色を行うために、mouse IgG 抗体を用い、T 細胞特異的分子マーカーにすでに結合している anti-mouse IgG 抗体の空いている抗原結合部位 (IgG 抗体は抗原結合部位が対照的に2カ所存在) との結合をブロックしておく (図4) (C8)。細胞を PBS 溶液にて洗浄後、ドナー細胞と宿主細胞を区別するために Alexa Fluor 647 (Alexa-647) 標識の抗ドナーリンパ球抗体 ( $RT7^b$ ) を反応させ (C9)、多重蛍光染色を行う。最後に増殖細胞を Alexa-488 標識した azide で検出するために、Fixation/Permeabilization 溶



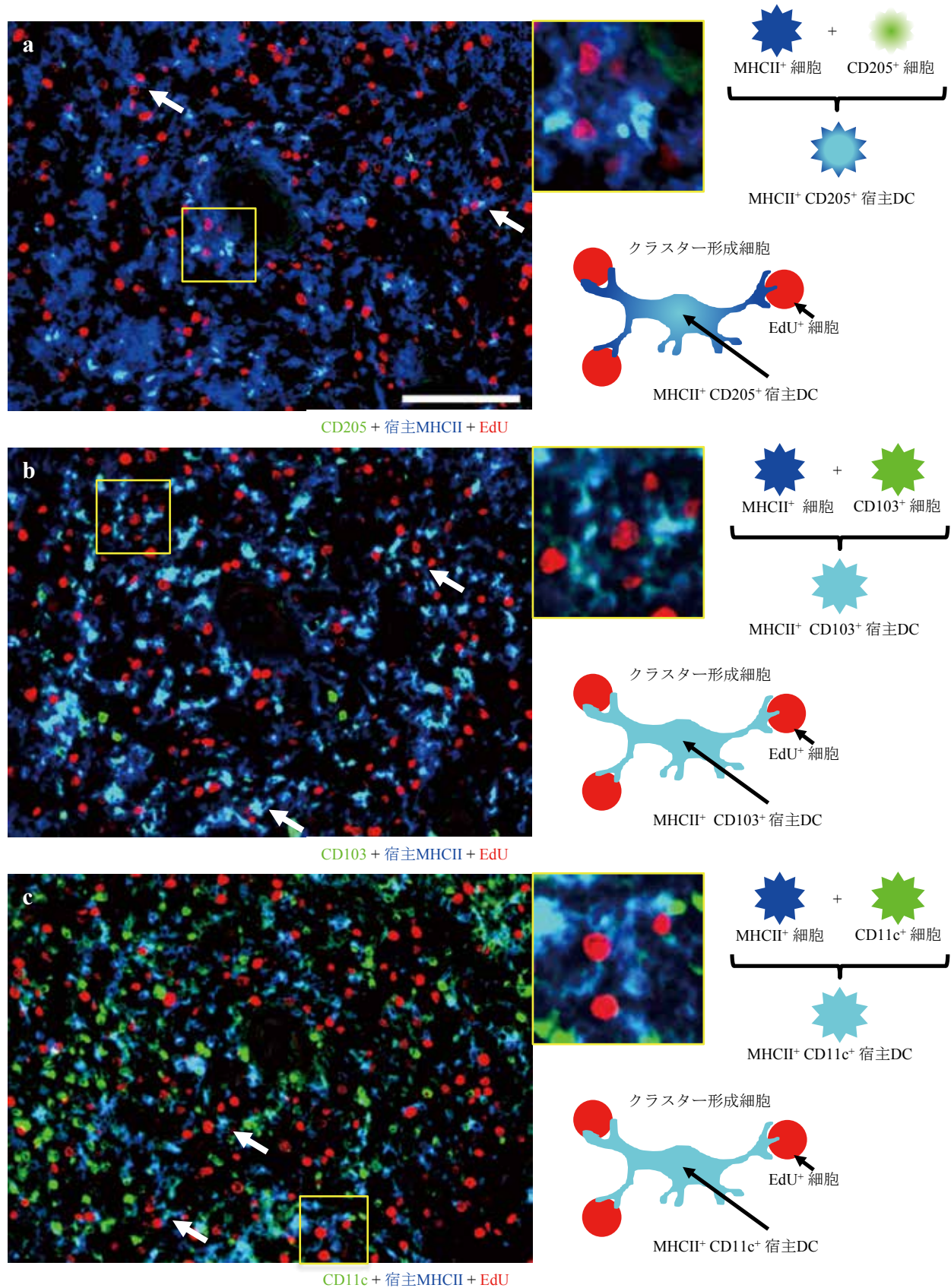


図8 増殖細胞と細胞間結合している宿主 MHCII<sup>+</sup>と推定される DC のフェノタイプ解析

A. 投与後2日目の宿主脾臓 PALS において、EdU (Alexa-488, 赤), 宿主 MHCII (Alexa-350, 青), DC マーカー (CD205, CD103, CD11c : Alexa-594, 緑) についての3重蛍光染色 (Scale bar 100  $\mu$ m). 増殖細胞と細胞間結合している宿主 MHCII<sup>+</sup>細胞が, それぞれ DC マーカーである CD205<sup>+</sup> (a), CD103<sup>+</sup> (b) または CD11c<sup>+</sup> (c) を発現し, 宿主 DC (水色) であることが確認できる.

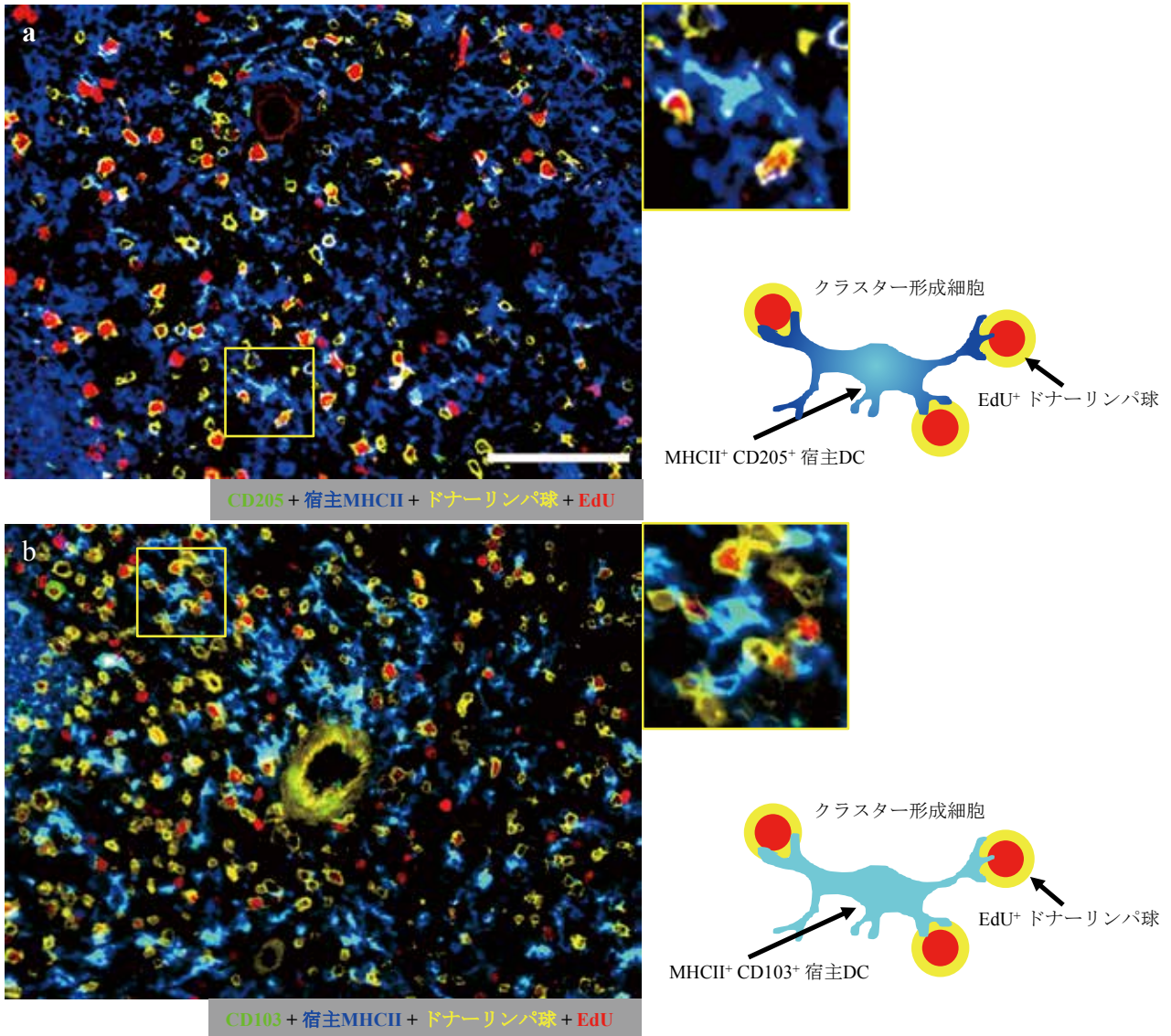


図9 増殖したドナー細胞と宿主DCのクラスター

A. 投与後2日目の宿主脾臓 PALS において、宿主 MHCII (Alexa-647, 青), DC マーカー (CD205, CD103: Alexa-594, 緑), ドナーリンパ球 (Alexa-350, 黄), EdU (Alexa-488, 赤) についての4重蛍光染色 (Scale bar 100  $\mu$ m). 宿主 DC (MHCII<sup>+</sup> CD205<sup>+</sup>, MHCII<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup>: 水色) と EdU<sup>+</sup> ドナー増殖細胞 (黄色) がクラスターを形成し、直接感作による免疫性増殖応答が確認できる。

液 (affymetrix) で処理 (C10) を行い、細胞膜および核膜の分子浸透性を向上させる。洗浄後、EdU を Click-iT<sup>®</sup> kit for FCM を用い、既存のプロトコールにて染色する (C11)。染色した細胞は、FCM (FACSCalibur, BD Biosciences) を用い CellQuest Pro ソフト (BD Biosciences) にて定量定性解析する (C12)。

#### ドナー由来増殖細胞の変動

著者らは、GvHR モデルを用い、EdU で免疫応答におけるドナー増殖細胞の検出ができるかを検討した。始めに、確立されている3重酵素染色法を用い in situ (組

織切片上) にて確認染色した<sup>2,11)</sup>。投与したドナー T 細胞は、ドナーリンパ球 (RT7<sup>b</sup>)<sup>12)</sup>、IV型コラーゲン、BrdU による染色により形態学的に検出することができた。投与後1日目では、BrdU<sup>-</sup> RT7<sup>b+</sup> ドナー T 細胞が宿主の脾臓 PALS (T 細胞) 領域に遊走し (図 5a)、2日目では、BrdU<sup>+</sup> RT7<sup>b+</sup> ドナー T 細胞が多数検出された (図 5a)。これは、GvHR を受けて活性化したドナー T 細胞が増殖応答していることを表している。また、増殖したドナー T 細胞のフェノタイプを網羅的に解析するために T 細胞マーカー (TcR $\alpha\beta$ , CD4 または CD8 $\beta$ ) を含む3重酵素染色をした。増殖したドナー細胞が多数存



在する投与後2日目では、BrdU陽性細胞のほとんどがTcR $\alpha\beta$ 陽性かつCD4陽性であり、CD8 $\beta$ 陰性であった(図5b)。これは、増殖しているドナー細胞が、主にCD4<sup>+</sup>T細胞であることを示す。次に、同じ脾臓切片にて、4重蛍光染色を行った。するとEdU<sup>+</sup>ドナーT細胞のほとんどが、やはりTcR $\alpha\beta$ 陽性かつCD4陽性(未表示)で、CD8 $\beta$ 陽性は少なかった(図6a)。

同一ラットの同じ組織の脾臓リンパ球を用いたフローサイトメトリー解析では、TcR $\alpha\beta$ 陽性かつCD4陽性ドナーT細胞が、投与後1日目ではEdU陰性であったが、2日目ではいくつかのEdU陽性細胞が検出され、EdU陽性のCD8 $\beta$ 陽性ドナー細胞についてはごく少数で、免疫染色と同じ結果が得られた(図6b)。これにより以上の3つの方法の結果が一致し、多重蛍光染色の結果を人工産物でない正しい所見と見なすことができた。

#### 直接感作による細胞間相互作用とフェノタイプの解析

脾臓組織での直接感作による免疫応答を解析するためには、クラスターを形成している2種の細胞(ドナー細胞と宿主APC、主にDC)を確定し、ドナーT細胞が宿主DCにより増殖応答していることを検出することが重要である。本研究では、ドナーT細胞投与後2日目の脾臓組織にて4重蛍光染色をおこない、クラスターを形成しているDCもしくはS期に入った細胞(EdU<sup>+</sup>細胞)のいずれかのフェノタイプを解明し、免疫応答のメカニズムを明らかにした。初めに、投与後2日目の宿主脾臓組織について、宿主DCマーカー(MHCII, CD103), IV型コラーゲン, BrdUの3重酵素染色にてクラスターの形成を確認した(図5c)。クラスターを形成しているドナーT細胞のフェノタイプについては、宿主脾臓PALS内にて宿主MHCII陽性のDCと思われる細胞と結合したEdU陽性のRT7<sup>b+</sup> TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>ドナーT細胞が多数確認でき(図7a)、やはりCD4陽性が主でCD8 $\beta$ 陽性のドナーT細胞は少なかった(図7b)。一方、宿主MHCII陽性のDCと思われる細胞については、DCマーカーであるCD205(図8a)、CD103(図8b)またはCD11c(図8c)を発現していた。さらにドナー細胞マーカーを含む4重蛍光染色により宿主MHCII<sup>+</sup>CD205<sup>+</sup>(図9a)またはCD103<sup>+</sup>DC(図9b)がEdU<sup>+</sup>RT7<sup>b+</sup>CD4<sup>+</sup>ドナーT細胞とクラスターを形成していることが証明された。以上から、EdUを含めた多重蛍光染色法は、EdU<sup>+</sup>細胞もしくは間質細胞の異なる分子マーカーの同時可視化により、組織上での細胞間相互作用の解析を可能にしたことになる。

#### FCMと免疫組織学の並行解析

FCM解析は、EdU<sup>+</sup>細胞を一般的な抗原抗体反応による検出を必要とするBrdU染色よりも、クリック反応<sup>9)</sup>による高S/N比のEdU染色によって検出できることを示した。EdU染色は、動物1個体の同じリンパ臓器由来の組織切片の免疫組織学と細胞のFCMの両方法により、活性化した細胞の増殖応答の並行解析を可能とした。さらに、免疫性増殖応答について組織切片の免疫組織学による定性解析とFCMによる定量解析ができた。

#### おわりに

今日まで、EdUを用いた免疫組織での4重蛍光染色、FCMでの3カラー解析両方を同じターゲット組織から行う方法は、著者らの他には報告されていない。本研究において、著者らは、EdUの優れた特徴を生かし、1匹の実験動物から同じ組織上にてin situとin vitroでのリンパ球の増殖と免疫応答を解析する新しい方法を解説した。

**謝 辞** 本研究は、JSPS科研費(若手B Grant Number 24790200)と獨協医科大学助成(個人研究 Grant Number 2010-1-5)を受けている。抗体を譲渡いただいた佐渡義一博士、Frans Kroese博士に感謝します。また、本研究を側面から支えていただいた解剖学(マクロ)スタッフの皆様にご心から感謝申し上げます。尚、本論文に関する著者らの利益相反は存在しない。

#### 文 献

- 1) Matsuno K, Ezaki T, Kotani M: Splenic outer periarterial lymphoid sheath (PALS): an immunoproliferative microenvironment constituted by antigen-laden marginal metallophils and ED2-positive macrophages in the rat. *Cell and tissue research* **257**: 459-470, 1989.
- 2) Matsuno K, Ueta H, Shu Z, et al: The microstructure of secondary lymphoid organs that support immune cell trafficking. *Archives of histology and cytology* **73**: 1-21, 2010.
- 3) Saiki T, Ezaki T, Ogawa M, et al: In vivo roles of donor and host dendritic cells in allogeneic immune response: cluster formation with host proliferating T cells. *Journal of leukocyte biology* **69**: 705-712, 2001.
- 4) Ueta H, Shi C, Miyanari N, et al: Systemic transmigration of allosensitizing donor dendritic cells to host secondary lymphoid organs after rat liver transplan-



- tation. *Hepatology* **47** : 1352-1362, 2008.
- 5) Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, et al : Cell microfluorometry : a method for rapid fluorescence measurement. *Science* **163** : 1213-1214, 1969.
  - 6) Tuttle AH, Rankin MM, Teta M, et al : Immunofluorescent detection of two thymidine analogues (CldU and IdU) in primary tissue. *J Vis Exp*, 2010.
  - 7) Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB : Click Chemistry : Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **40** : 2004-2021, 2001.
  - 8) Diermeier-Daucher S, Clarke ST, Hill D, et al : Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **75** : 535-546, 2009.
  - 9) Salic A, Mitchison TJ : A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** : 2415-2420, 2008.
  - 10) Lechler R, Ng WF, Steinman RM : Dendritic cells in transplantation--friend or foe? *Immunity* **14** : 357-368, 2001.
  - 11) Zhou S, Ueta H, Xu XD, et al : Predominant donor CD103+CD8+ T cell infiltration into the gut epithelium during acute GvHD : a role of gut lymph nodes. *International immunology* **20** : 385-394, 2008.
  - 12) Kampinga J, Kroese FG, Pol GH, et al : RT7-defined alloantigens in rats are part of the leucocyte common antigen family. *Scandinavian journal of immunology* **31** : 699-710, 1990.

**A New Multicolor Immunostaining Method for analysis of Immunoproliferative Response**

Yusuke Kitazawa, Hisashi Ueta, Yasushi Sawanobori, Enqiao Yu, Taro Kariya, Masaru Sasaki,  
Tomomi Uchida, Ken Kariya, Junko Sakumoto, Keiko Sasaki, Yoko Yamada, Kenjiro Matsuno

*Department of Anatomy (Macro), Dokkyo Medical University*

**Key Words** : EdU, BrdU, Immunoproliferative response,  
cluster, Multicolor immunostaining