



血液検査(造血器腫瘍)における免疫染色

千葉大学医学部附属病院 検査部

仙波 利寿

はじめに

現在,造血器腫瘍全体の病型はWHO分類に統合されつつある.WHO分類は分子生物学的情報を重視しており,形態学的判断に加えて遺伝子検査や免疫染色による細胞系統・分化レベルの解析が必須の作業となっている¹⁾.造血器腫瘍における免疫染色は,骨髓組織切片を用いた免疫組織化学と,一般的に血液検査室で実施される末梢血や骨髓穿刺液を用いたフローサイトメトリー(flow cytometry, FCM)が取り入れられている.両者は解析のための検体や手法が異なる為,それぞれの長所短所を踏まえた上で,その結果を総合的に判断することが求められる(表1)²⁾.造血器腫瘍の中でも,緊急性が高い急性白血病においてはWHO分類の病型診断に必要な情報が入るまでに数日間の時間を要するため,臨床では最終診断より前に初期治療(寛解導入療法)を開始する必要性に迫られるのが現状である³⁾.急性白血病の寛解導入療法は3つに大別され,リンパ性か骨髓性か,骨髓性でも急性前骨髓球性白血病かを区別する必要がある,迅速性に優れたFCM(検体提出から3時間での解析結果報告が可能)による免疫学的な細胞系統の解析が不可欠である.本稿では,骨髓穿刺液を用いたFCMの手法と症例を紹介をする.

表1.フローサイトメトリーと免疫組織化学

| フローサイトメトリー | 項目 | 免疫組織化学 |
|--|---------------------|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ●血液や液状はそのまま解析 ●組織や固形腫瘍は細胞浮遊液を作製するため手間である ●常に未固定の新鮮材料でなければならない | 解析対象,材料の状態 | <ul style="list-style-type: none"> ●病理検体すべてが解析対象 ●ホルマリン固定やパラフィン包埋組織が使用できる |
| <ul style="list-style-type: none"> ●自施設での実施:検体採取後,数時間程度でコンピューターへデータが取り込まれる ●外注で実施:検体提出,翌日の夕方にはデータの取り込みが終了される | 所要時間 | <ul style="list-style-type: none"> ●ホルマリン固定後にHE染色を確認して免疫組織化学の指示を出し,それが完成するには最短でも4~5日必要である |
| <ul style="list-style-type: none"> ●1細胞について,電気信号に代えられた複数の情報がディスプレイ上で1つの点(ドット)として表現される ●読図はある程度の慣れが必要だが,病理医や血液内科専門医以外でも可能 | 陽性像の確認,判定方法 | <ul style="list-style-type: none"> ●陽性像を光学顕微鏡下で直接確認し,その周囲の組織構築との関連性を見ることが出来る ●HE標本上で腫瘍細胞を同定するためには病理診断学のトレーニングを要する |
| <ul style="list-style-type: none"> ●複数の抗原を同時に,同一細胞上でとらえることが出来る ●同一細胞に対して13カラーの対応が可能(日常業務では2重染色法が一般的) | 多重染色 | <ul style="list-style-type: none"> ●手技的に簡単ではない(日常業務では行わない) |
| <ul style="list-style-type: none"> ●B細胞性腫瘍(LCR有)の7~8割程度,反応性病変(LCR無)の大部分において評価可能 | 免疫グロブリン軽鎖の偏り(LCR)判定 | <ul style="list-style-type: none"> ●LCRの判定が可能な症例は概して低い(そのため実施することがあまりない) |
| <ul style="list-style-type: none"> ●腫瘍細胞が極端に少ない場合(特にHodgkinリンパ腫や未分化大細胞リンパ腫等)では陽性・陰性の確認は難しいことが多い | 細胞数上の感度 | <ul style="list-style-type: none"> ●腫瘍細胞が極端に少ない場合でも陽性・陰性の確認が可能である |



表2.当院におけるフローサイトメトリーの概略(細胞表面)

| 工程 | 操作 | 条件・時間等 |
|---|---|---|
| 【1】 サンプル調整 (EDTA2K加 末梢血,骨髓穿刺液) | 1) 非特異的結合予防処理 ① アルブミン加PBSにて遠心洗浄操作を3回 | 400G / 5min |
| | 2) 解析サンプル数を調整 希釈:アルブミン加PBSを加え希釈 濃縮:バフィーコート法で濃縮 | 10×10 ⁹ cells/Lに調整 (血算機で測定) |
| | 3) 異物除去(脂肪組織、骨片) 40μmナイロンメッシュで濾過 | |
| | 4) 非特異的結合予防処理 ② 正常ウサギ血清を添加 | 37℃ / 15min |
| 【2】 抗体の添加 | サンプルチューブに抗体を添加 | 表.3参照 |
| 【3】 検体の添加 | 【2】へ【1】を添加 | 100μL / tube |
| 【4】 インキュベーション | | 室温暗所 / 15min |
| 【5】 溶血剤の添加 | 塩化アンモニウムベースの溶血剤を添加し、ボルテックス混和 | 2 mL / tube |
| 【6】 インキュベーション | | 室温暗所 / 15min |
| 【7】 洗浄 | PBSにて遠心洗浄操作を2回 | 400G / 5min |
| 【8】 測定 | サンプルをPBSにて再浮遊後、フローサイトメトリー機にて測定 | 250μL / tube |

各工程のポイント・解説(表2)

【1】 サンプル調整

- 1)非特異的結合予防処理①：白血病やリンパ腫で見られる異常タンパクとモノクローナル抗体の非特異的結合を減らすために複数回洗浄作業を行う。
- 2)検査試薬(抗体)の至適濃度：100uLの血液を染色するのに適した濃度に調製されていることが多いため、10×10⁹cells/L程度になるようにサンプル数を調整する⁴⁾。
- 4)非特異的結合予防処理②：細胞表面のFcレセプターとモノクローナル抗体の非異結合を防ぐ目的で、ヒトγグロブリン(当院は正常ウサギ血清;最終濃度2%)を加える。白血病細胞の中にはFcレセプターを強く発現しているものもある為、ブロックングは重要となる⁵⁾。

【2,3,4】 抗体,検体の添加

染色漏れ防止：抗体,検体ともサンプルチューブの管底に丁寧に添加作業を行い,ボルテックスミキサー等でよく攪拌する。抗体には蛍光色素(FITC, PE, Krome Orangeなど)が標識されているので,光褪色を防ぐ目的で暗所にてインキュベーションする。

表3.主な使用抗体パネル 2022年9月現在

| Tube No. | FITC | PE | KO | 抗原分布 | 抗体名 |
|----------|--------------|--------------|------|------------|---|
| 1 | MslgG (cont) | MslgG (cont) | CD45 | 造血幹細胞/前駆細胞 | CD34,CD117,HLA-DR |
| 2 | CD34 | CD33 | | 骨髓系 | CD13,CD14,CD33 |
| 3 | CD2 | CD3 | | 単球系 | CD14,CD33,CD64,HLA-DR |
| 4 | CD16 | CD56 | | B細胞系 | CD10,CD19,CD20,CD22,HLA-DR,Kappa,Lambda |
| 5 | CD10 | CD22 | | T細胞系 | CD2,CD3,CD4,CD5,CD7,CD8 |
| 6 | CD20 | CD19 | | NK細胞 | CD2,CD7,CD16,CD56 |
| 7 | CD4 | CD8 | | 巨核球系 | CD41,CD61 |
| 8 | CD7 | CD5 | | 赤芽球系 | CD235a |
| 9 | CD13 | CD14 | | | |
| 10 | CD61 | CD41 | | | |
| 11 | HLA-DR | CD117 | | | |
| 12 | CD64 | CD235a | | | |
| 13 | Kappa | Lambda | | | |



【5,6,7】 溶血剤の添加

溶血剤の使用温度：塩化アンモニウムベースの溶血剤は酵素反応の為、室温（20-25℃）に戻してから使用する。温度が低いまま使用すると溶血不良の原因となる。

【8】 フローサイトメーターによる測定・解析

フローサイトメーター（測定機器）：サンプル溶液に含まれる細胞1個ずつにレーザー光を当て散乱光や蛍光を検出し、細胞の大きさ、内部構造の複雑さや抗原情報を取得する装置。

CD45ゲーティング解析：データ解析作業は、検査者がマニュアル操作で対象細胞集団をゲーティングする必要がある。造血器腫瘍のゲーティングにはCD45発現と側方散乱光（side scatter ;SS）を用いることが多い。CD45は汎白血球抗原であるが、造血器腫瘍（白血病細胞や一部のリンパ腫）はこの発現量が少ないことを利用して、腫瘍細胞集団を選択的に抽出することが出来る（図1-①）。

腫瘍細胞の形態学的な観察：CD45ゲーティング解析に用いるSSからは内部構造の複雑さ（細胞内顆粒等の有無や核形）の情報が得られる。一般的に造血器腫瘍は、核は類円形で細胞質内顆粒にも乏しく、SSは低位（≒複雑さは低い）に分布する。一方でびまん性大細胞型B細胞リンパ腫や急性前骨髄球性白血病などは、核形不整が強く、細胞質内に顆粒等を有するため、SSが中~高位置に分布される。塗抹標本における腫瘍細胞の形状や比率を確認し、SSの位置を予測することは誤ゲーティングを防ぐために重要である（図1-②）。

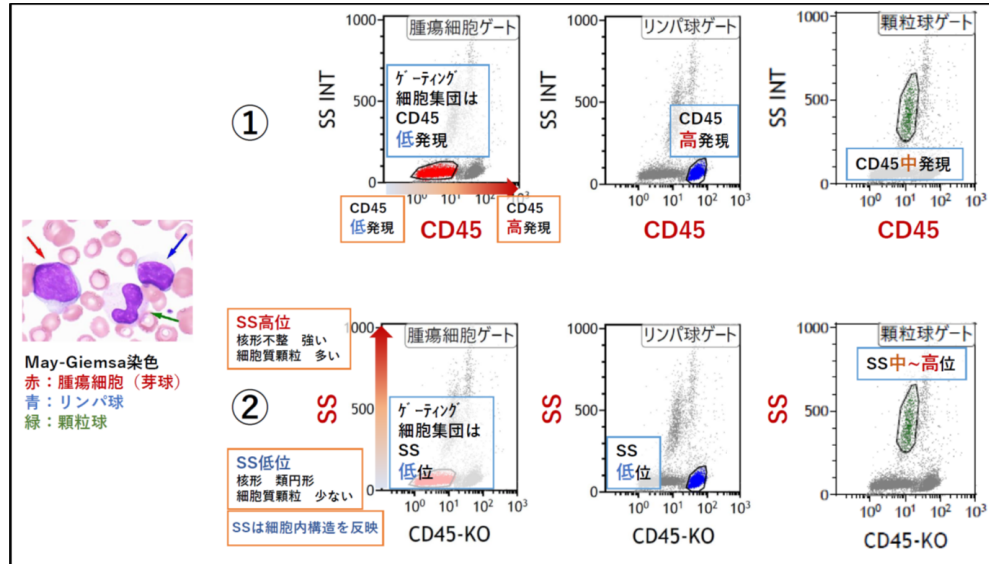


図.1 CD45-SSスキャッタグラムによる解析集団の細胞ゲーティング

塗抹標本にて目的細胞の形態と出現比率を確認し、適切にゲーティングする。

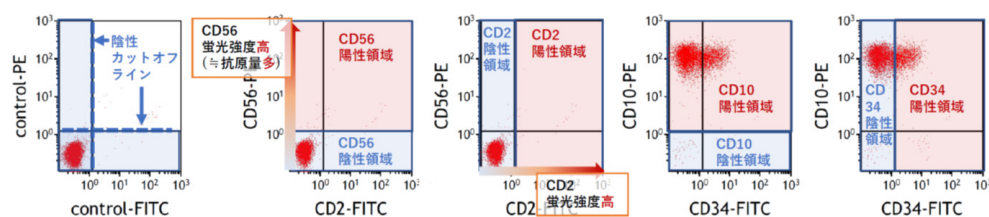
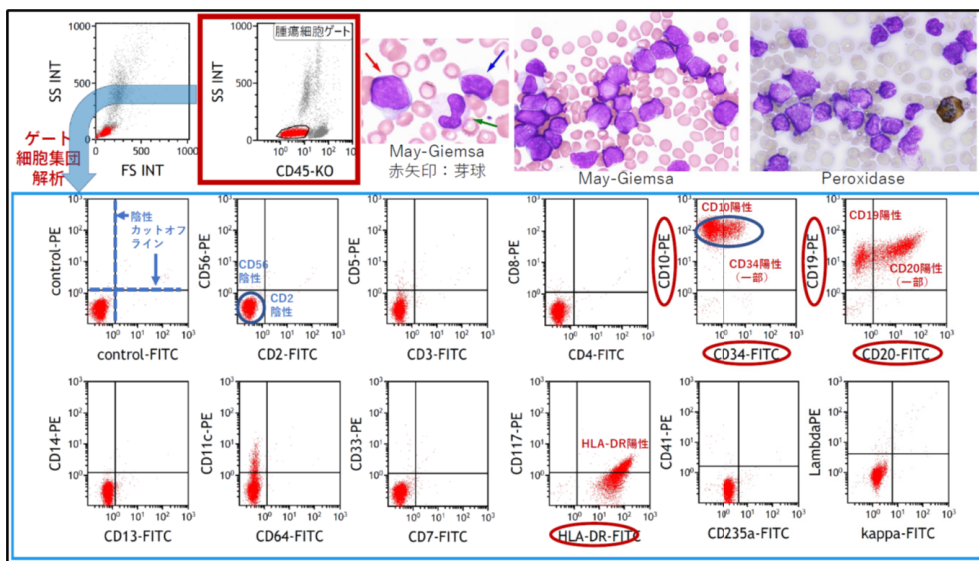


図.2ゲーティング細胞集団の発現解析

ゲーティングされた細胞の抗原量を反映し、ドットプロット（点）が展開される。FCM解析結果はCD56陰性,CD2陰性,CD10陽性,CD34陽性（一部の細胞）。



症例提示



症例1. 10代男性 B-lymphoblastic leukemia (B-ALL)

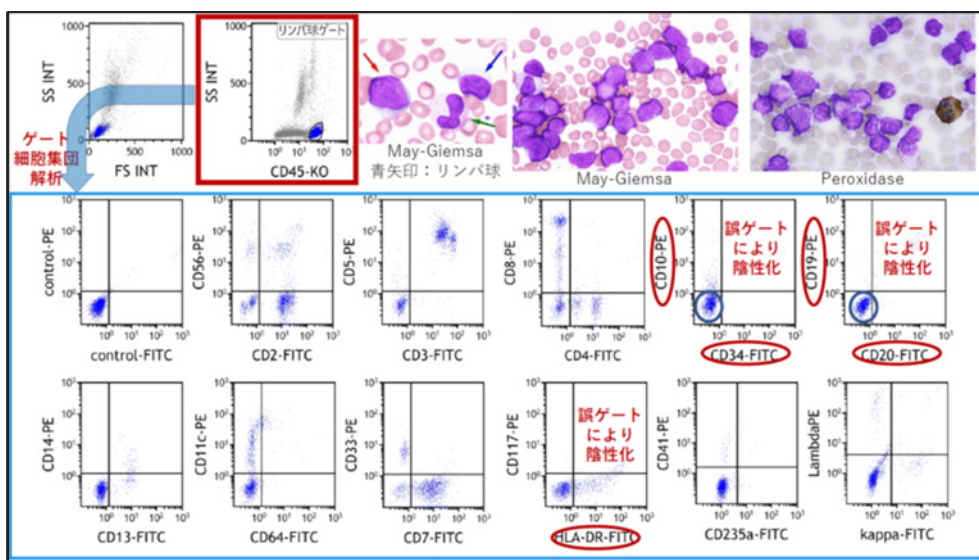
白血球数は 42×10^9 cells/L,末梢血液像Blast60%でperoxidase陰性（特殊染色）であった。

骨髓穿刺はdry tapで採取不良の為,末梢血液にてFCMを実施した。

CD45ゲーティング（図赤枠）：CD45低発現,SS低位。

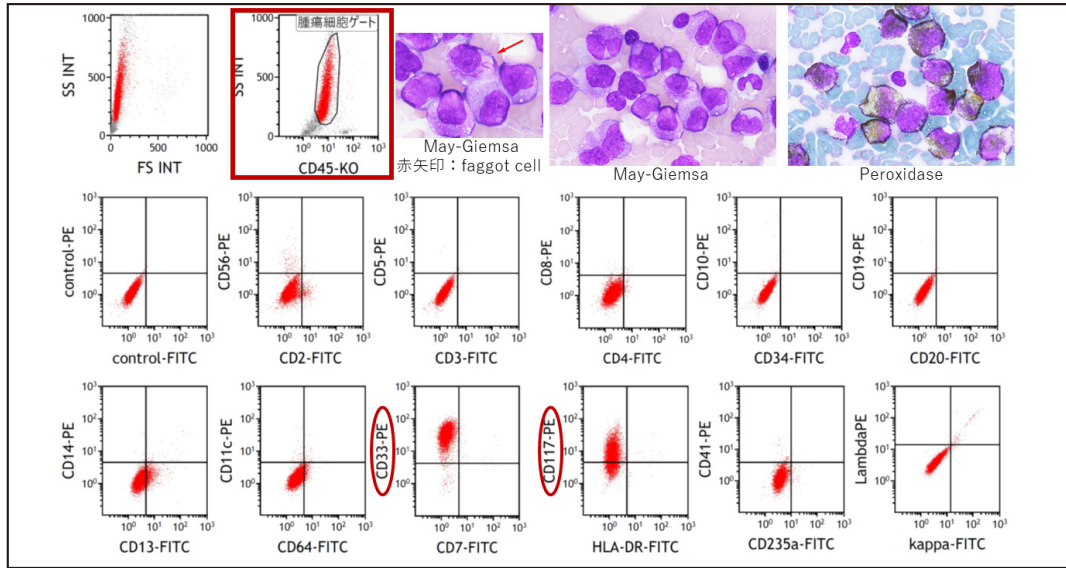
FCM陽性（図赤丸）：CD34,HLA-DR,CD10,CD19,CD20,(幼若,Bリンパ系)。

FCM陰性：Lambda,Kappa,CD3,CD13,CD33(軽鎖,Tリンパ系,骨髓系)。



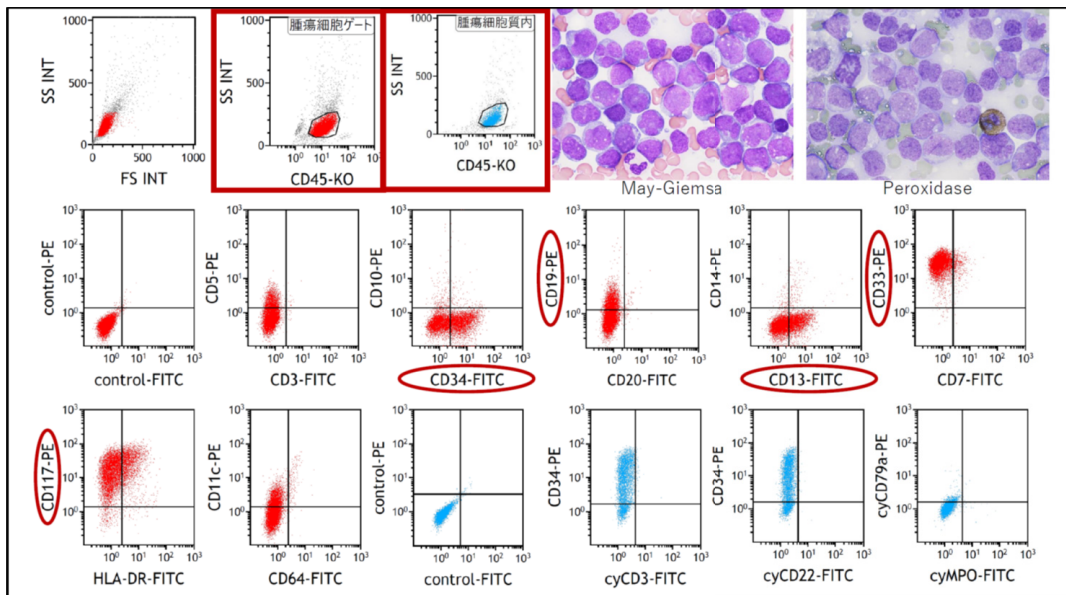
症例1. 誤ゲーティング例 ゲーティング位置をSS低位,CD45高発現の細胞集団へ設定

このゲーティングは検体中に混在する正常リンパ球集団の解析となり,本来の目的である腫瘍細胞解析と異なる結果となる。本症例の様に比較的多くの正常細胞が含まれる症例も存在する為,ゲーティング作業は塗抹標本結果（腫瘍細胞比率,細胞形態）を注視し慎重に行う。



症例 2.50代男性 Acute promyelocytic leukemia (AML-M3)

骨髓像にて形態異常を有する前骨髄球が84%観察され(Peroxidase 強陽性), Faggot cellも認められた. 骨髓穿刺液にてFCMを実施した. CD45ゲーティング: CD45中発現, SS中~高位(核形不整が強く, 細胞質内顆粒も豊富の為, SSが高位となる). FCM陽性: CD117, CD33 (骨髓系, 幼若) ※通常, 急性白血病はHLA-DR陽性を呈する. 一方でAML-M3はHLR-DR陰性が特徴である.



症例3. 40代女性 Acute myeloid leukemia with minimal differentiation (AML-M0)

N/Cが高く, 細胞質顆粒を有さない芽球(Peroxidase 陰性)が骨髓に92%出現し, 形態学的にリンパ芽球が疑われた. しかしながら, 骨髓穿刺液を用いたFCM結果は骨髓性白血病であった. CD45ゲーティング: CD45中発現, SS低位. FCM陽性: CD34(一部), CD13(一部), CD33 (幼若, 骨髓系) FCM陰性: CD3, cyCD3, cyCD22, cyCD79a (T,Bリンパ系), cyMPO. ※CD19弱陽性は他のBリンパ系CD10, cyCD22, cyCD79aが陰性の為, 異常発現と判断した.



おわりに

FCMは迅速で結果の客観性が高く、液状検体を用いた解析は他の手法と比べて容易であるゆえ、造血器腫瘍の病型診断に必須の検査となっている。一方で、その手技は煩雑で検査者の経験と技量が必要となる。本稿ではFCM解析の基本的な解説を中心に、その手技における注意事項も交えて紹介した。FCM解析における注意点や結果の解釈にお役立ていただければ幸いである。

文献

- 1) Swerdlow SH, et al (Editors) :WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon : IARC Press ; 2017
- 2) 一迫玲: 免疫学的表現型解析-免疫組織化学とフローサイトメトリー- :内科.102.2 ; 2008
- 3) 前田智也: 成人急性白血病の疫学と診断 :医学のあゆみ.268.1;2019
- 4) スタンダードフローサイトメトリー 第2版: 医歯薬出版株式会社.
- 5) 日本臨床検査標準協議会, 血液検査標準化検討委員会, フローサイトメトリーワーキンググループ : フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関するガイドライン (JCCLS H2-P V1.0) . 日臨検標準会誌 18 :69-107, 2003.