

2024年9月13日(金)

日本臨床検査専門学院第49期(令和6年度)免疫血清学コース

「白血球表面マーカー検査」

国立がん研究センター中央病院

臨床検査科 血液検査室

池田 千秋

1.検査の目的

① 造血器腫瘍の疾患検索・病型分類

なぜ、病型分類が重要か？

- ・治療開始時期、使用薬剤などが異なる
- ・予後が異なり、治療法の選択が変わる

疾患同定や病型分類の決定は非常に重要！

② 造血器腫瘍の治療効果判定（微小残存病変）

③ リンパ球サブセットの定量

④ その他

血液腫瘍の病型分類法

FAB分類

- 細胞形態
- 特殊染色
- 造血器腫瘍抗原検査

WHO分類

- 細胞形態
- 特殊染色
- 造血器腫瘍抗原検査
- 遺伝子染色体検査

2.フローサイトメトリーの概要

フローサイトメトリー (flow cytometry) とは微細な粒子（細胞）を流体中に分散させ、その流体を細く流して、個々の粒子を光学的に分析する手法

血液検査分野での応用

- 自動血球計数装置

- 表面抗原の検索

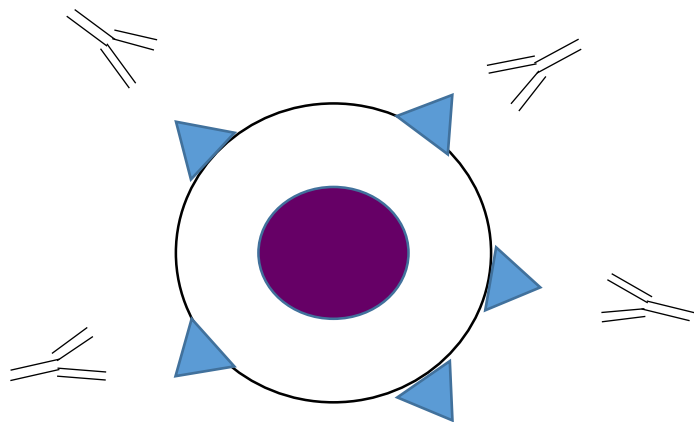


リンパ球サブセット
造血器腫瘍細胞
表面抗原検査 など

CD (Cluster of differentiation) 番号

造血系細胞に対する細胞表面に存在する分子(表面抗原)に結合するモノクローナル抗体の国際分類。

ヒト白血球分化抗原に関する国際ワークショップ(HLDA)が、WHO(世界保健機構)の監修のもとで分類している。



CD分類されていないものは、non-CD分子(抗体の場合はnon-CD抗体)

3. フローサイトメトリーを用いた表面抗原の検索方法

試料と保存方法:

抗凝固剤: EDTA、ACD-A、ヘパリンが用途に応じて用いられる

基本的に、**採取直後**に検査。それが難しい場合は

末梢血: 18~22℃で保存し24時間以内に測定(リンパ球サブセット)

骨髄: ヘパリン添加RPMIなどの培養液中で冷蔵保存

体腔液・リンパ節: RPMIなどの培養液に細胞浮遊液として冷蔵保存

脳脊髄液: 細胞変性が早いため、速やかに検査

末梢血や骨髄穿刺液検体を分離した試料やその他の体液は
10%FCS加培養液に細胞を浮遊した後、4℃、24時間以内に測定するのが望ましい。
(JCCLS H2-PV1.0)

時間経過に伴い、細胞の状態が変化し測定結果
に影響する可能性があるため追加検査は難しい

・凍結*注、ホルマリン固定したものは、検査不能
・変性・溶血・凝固・採取量・検体の確認は重要

*注 凍結保護剤入りの培養液に
浮遊させ最適条件で凍結させることは可能

測定手順

試料の前処理

- ・組織など固形物は、細胞をほぐす



- ・ナイロンメッシュのフィルターで濾し、混在する脂肪組織などを取り除く(骨髓液・体腔液・ほぐした組織)



- ・計算板や血球算定装置で有核細胞数を算定し、必要に応じて細胞数を培養液やbufferで調整する
- ・細胞数が少ない場合は、遠心して集細胞し、培養液やbufferで調整する



基本的な測定手順

試料の調整
(細胞数の調整 約 $<10000/\mu\text{L}$)



染色(抗体反応)

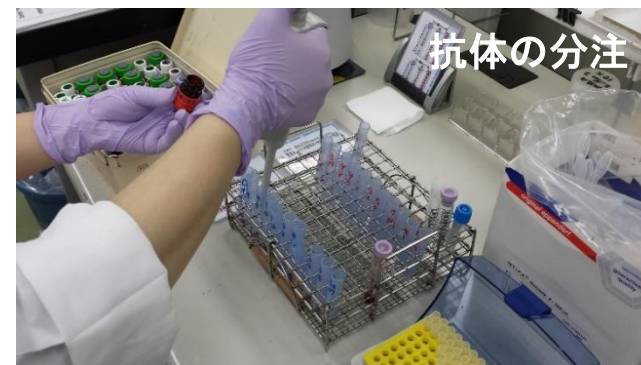
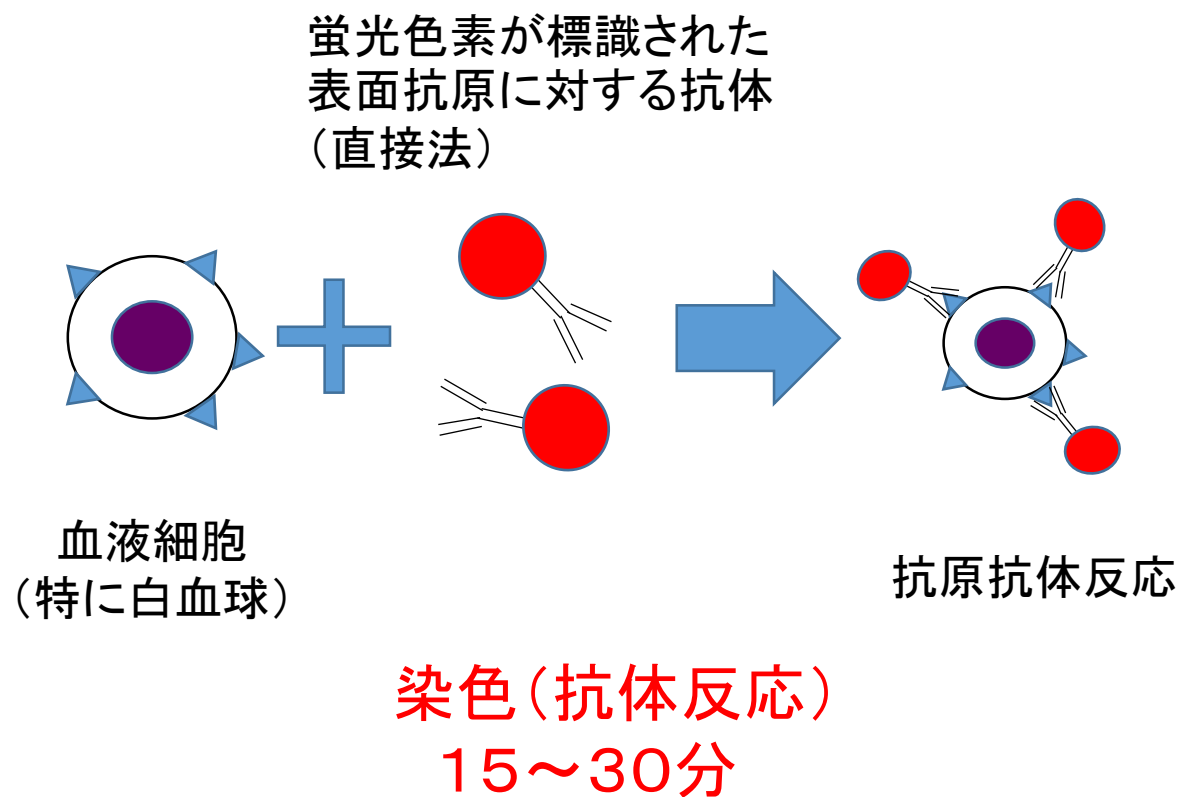


溶血・再浮遊

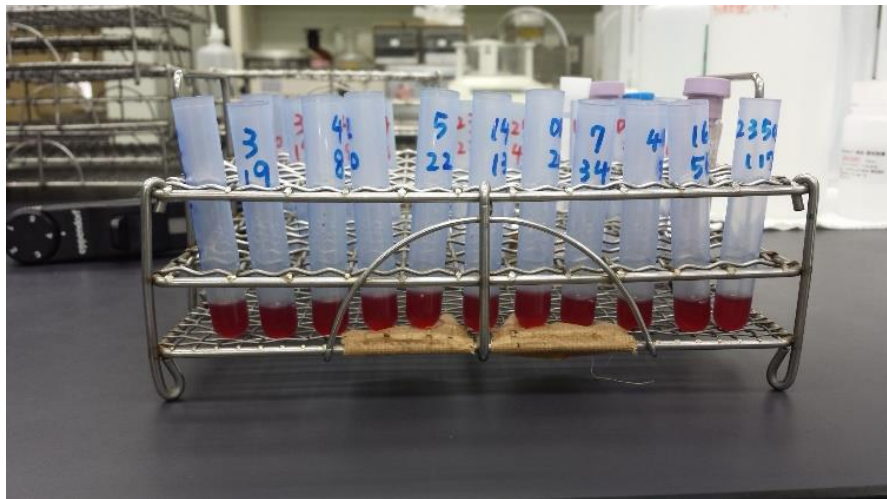


測定

蛍光標識抗体の反応



溶血/固定・洗浄



・溶血処理(赤血球除去/固定目的) 10分程度



・緩衝液の添加(溶血/固定の停止)



・遠心(400g, 5min, 室温)、上清除去



・緩衝液の添加(洗浄)



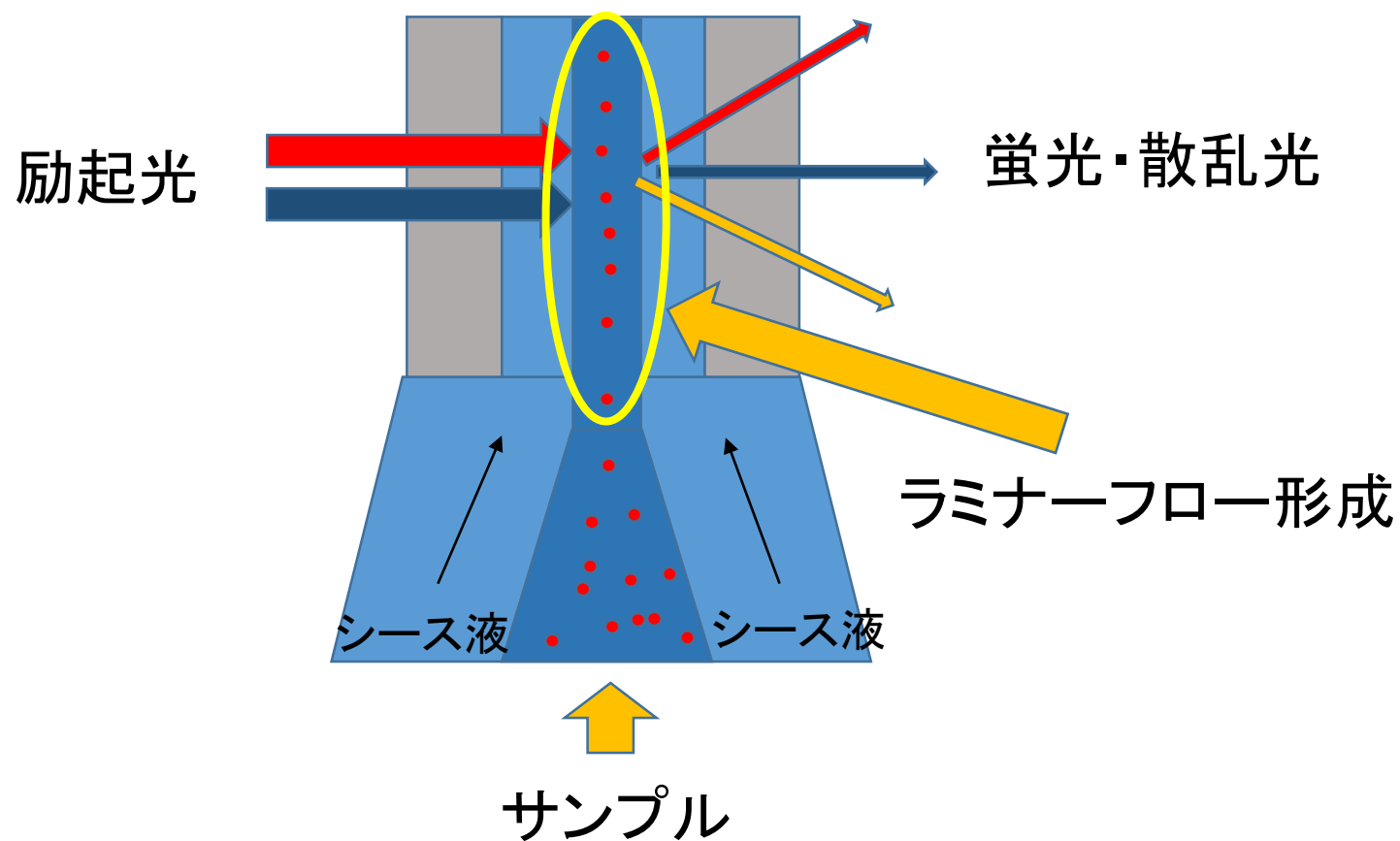
・遠心(400g, 5min, 室温)、上清除去



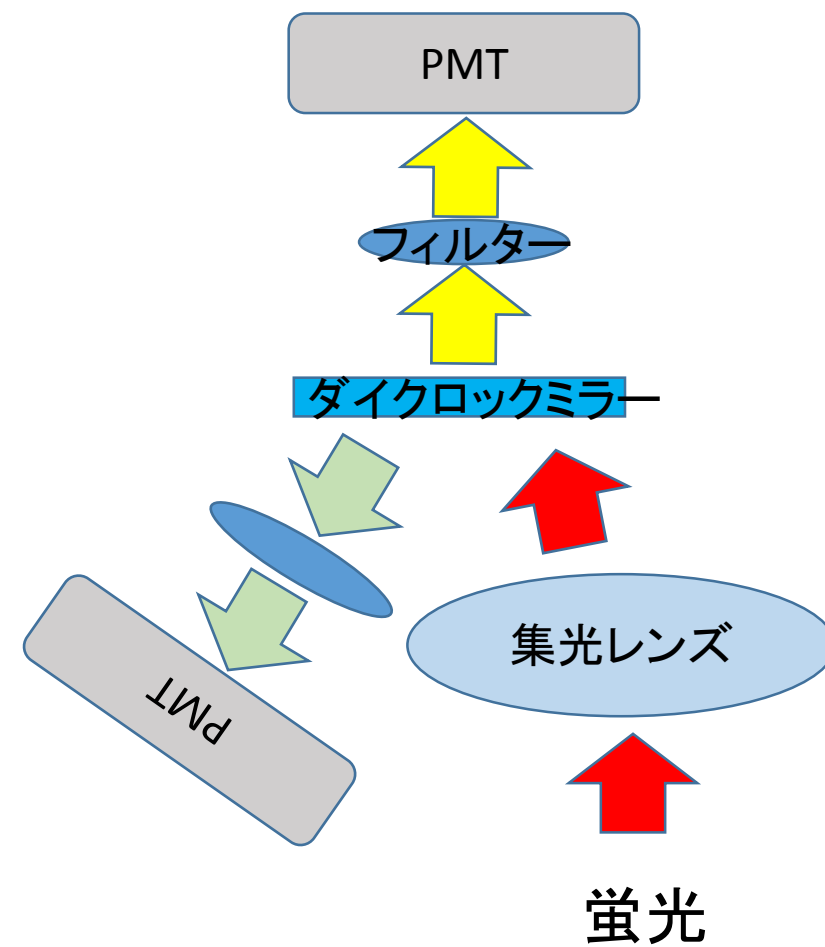
・緩衝液の添加(再浮遊)

4.フローサイトメトリーの測定原理

フローサイトメーターによる検出

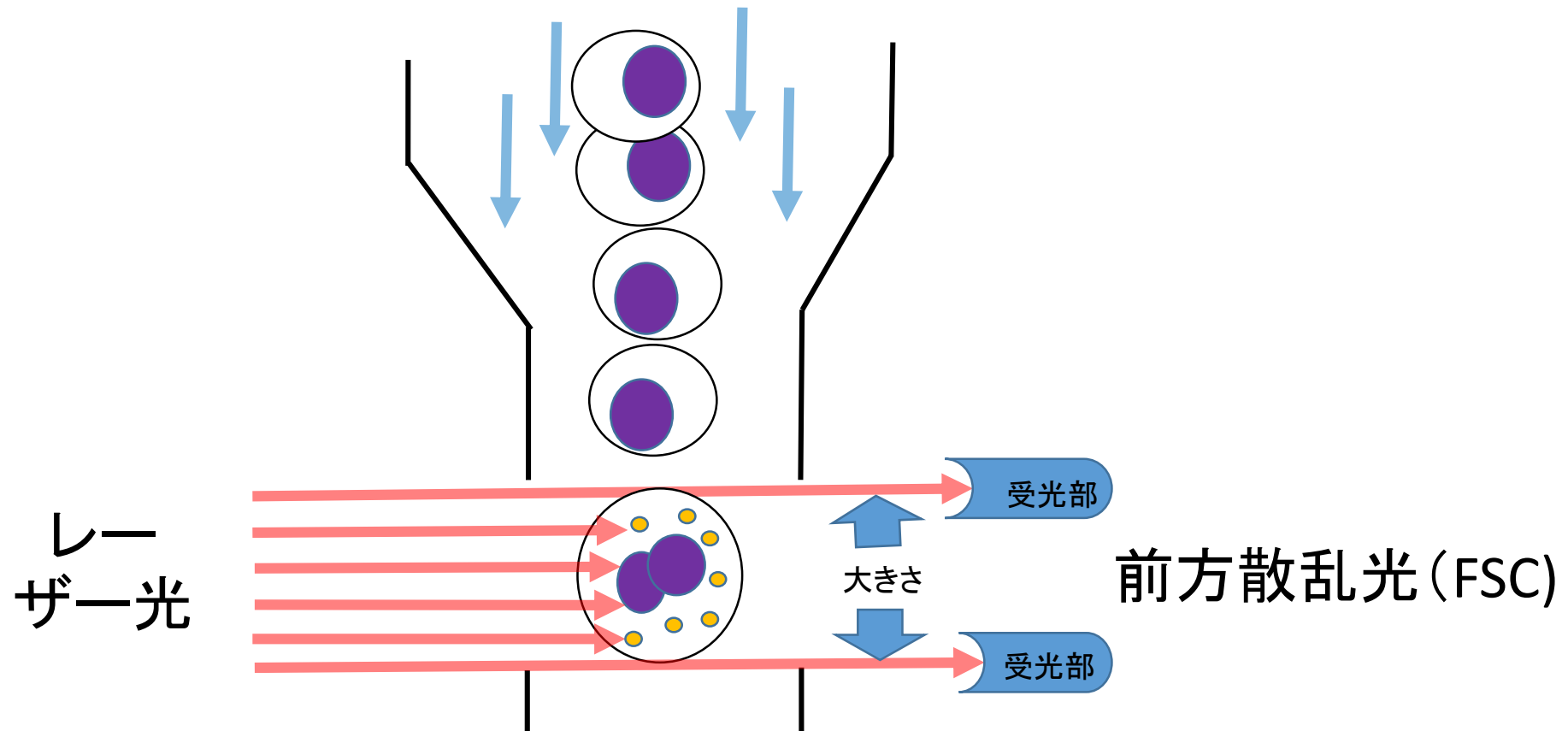


蛍光検出器



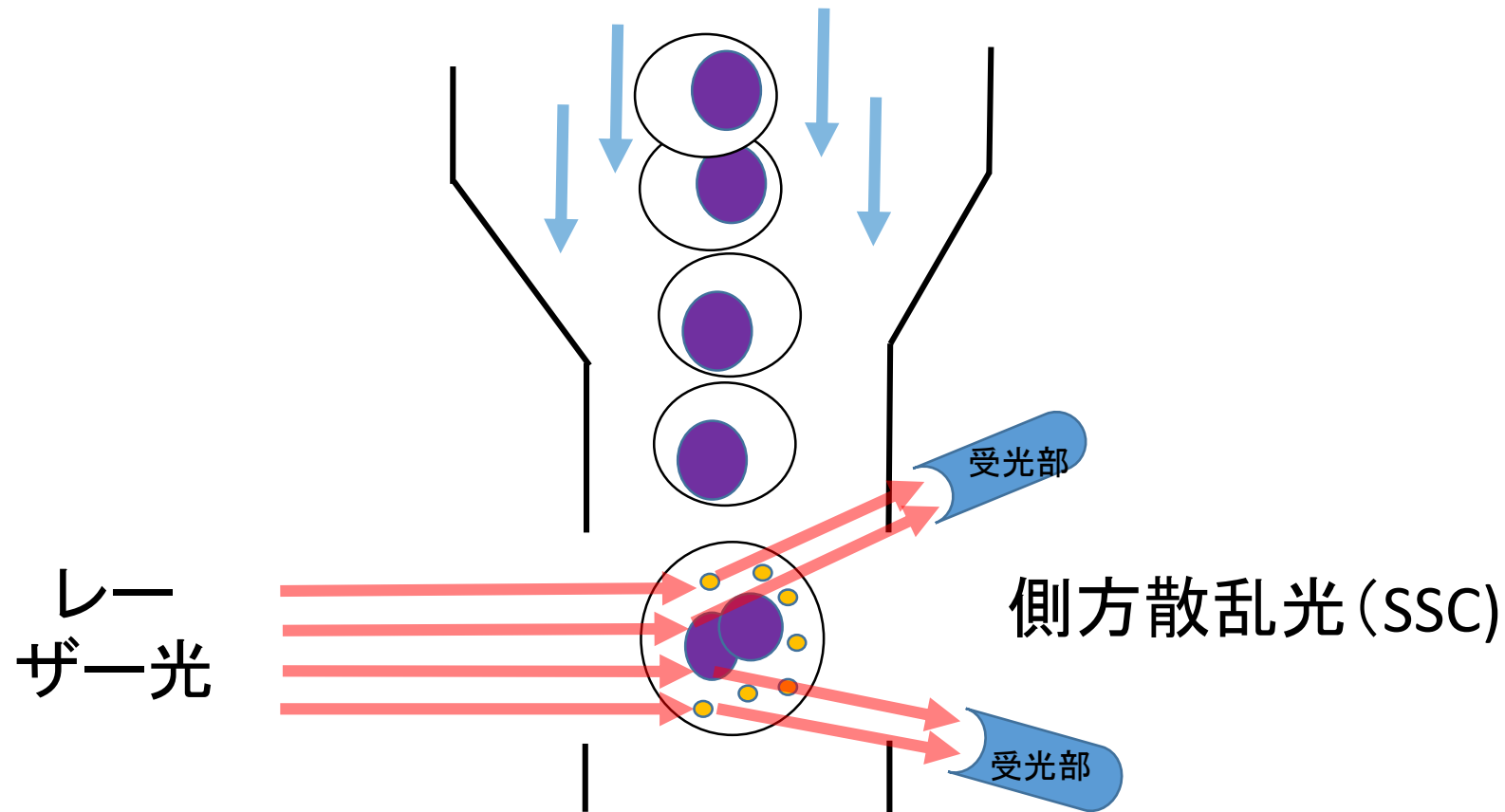
フローサイトメトリーの重要なパラメータ

前方散乱光 (FSC): 細胞の大きさを反映する



フローサイトメトリーの重要なパラメータ

側方散乱光 (SSC): 細胞の複雑さ(核・顆粒など)を反映する



ゲーティング (gating)

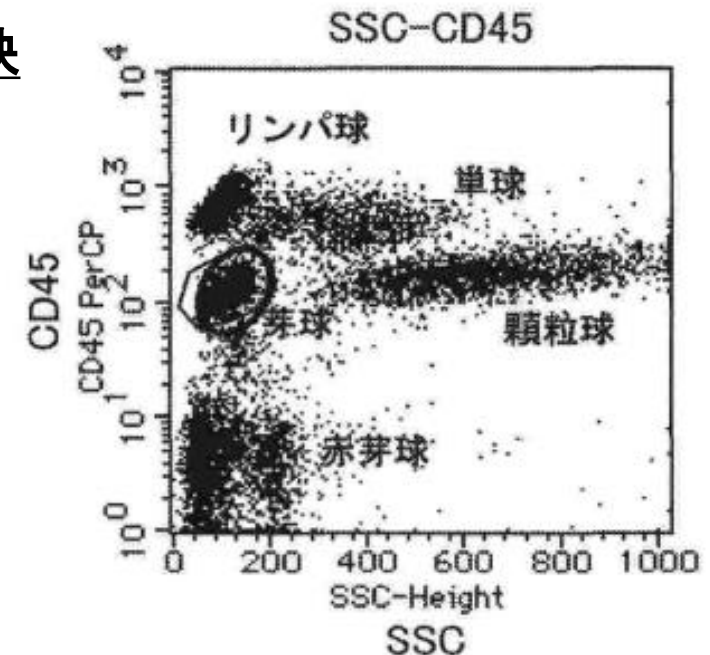
サンプル中のdebris(破片、ゴミ)や、複数のpopulation(細胞集団)から、解析したい細胞集団を絞り込むこと

側方散乱光(SSC):細胞の複雑さ(核・顆粒など)を反映

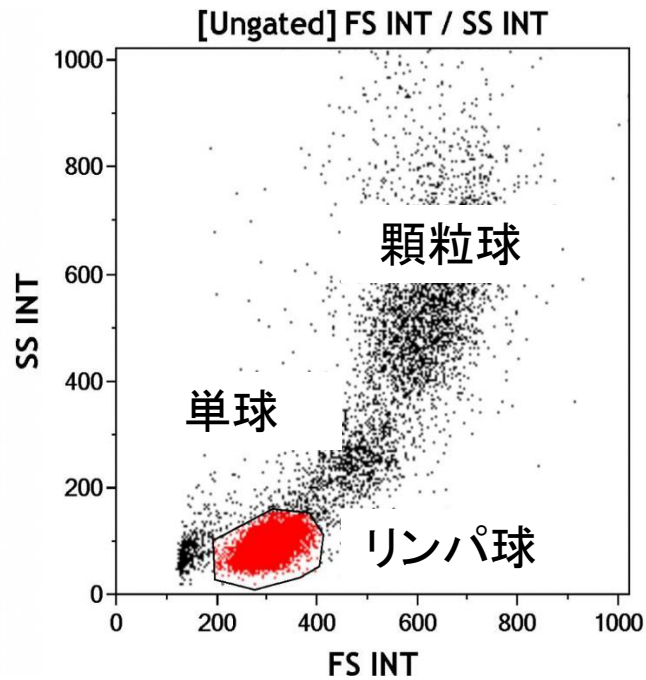
前方散乱光(FSC):細胞の大きさを反映

CD45の発現(白血球共通抗原)

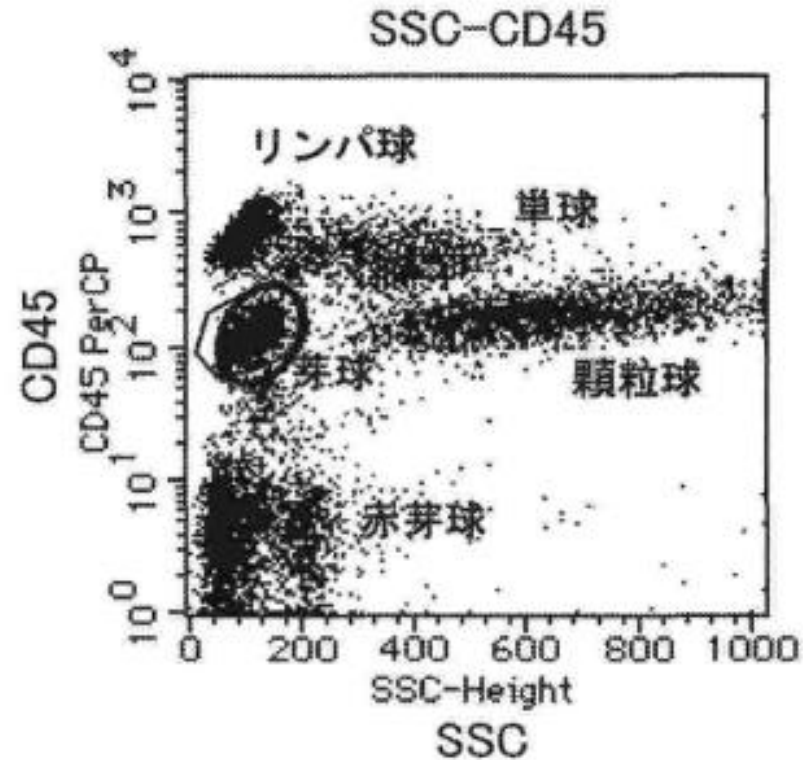
- 成熟リンパ球、単球・・・**強陽性**
- 顆粒球・芽球・・・**弱陽性**
- 赤芽球・血小板・・・**陰性**



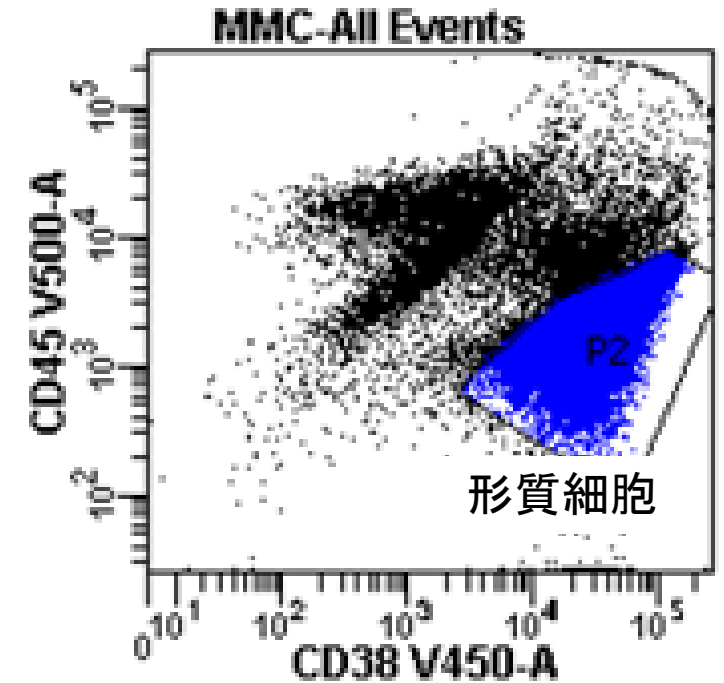
目的による様々なGating



FSC-SSC ゲーティング



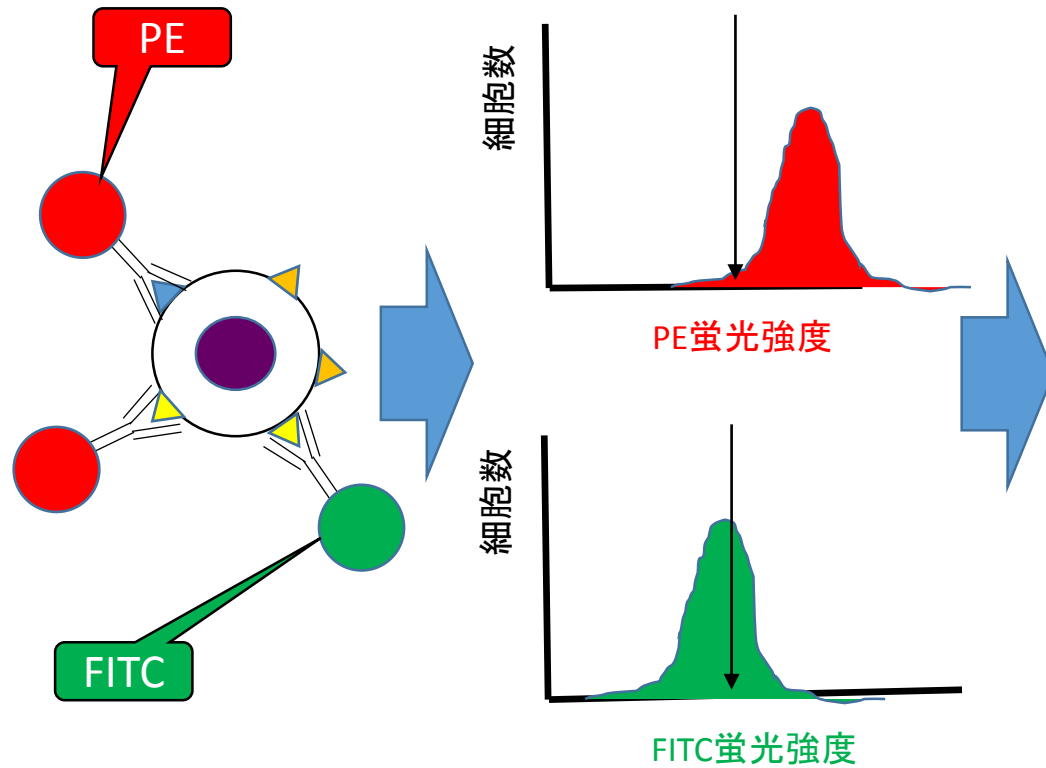
SSC-CD45 ゲーティング



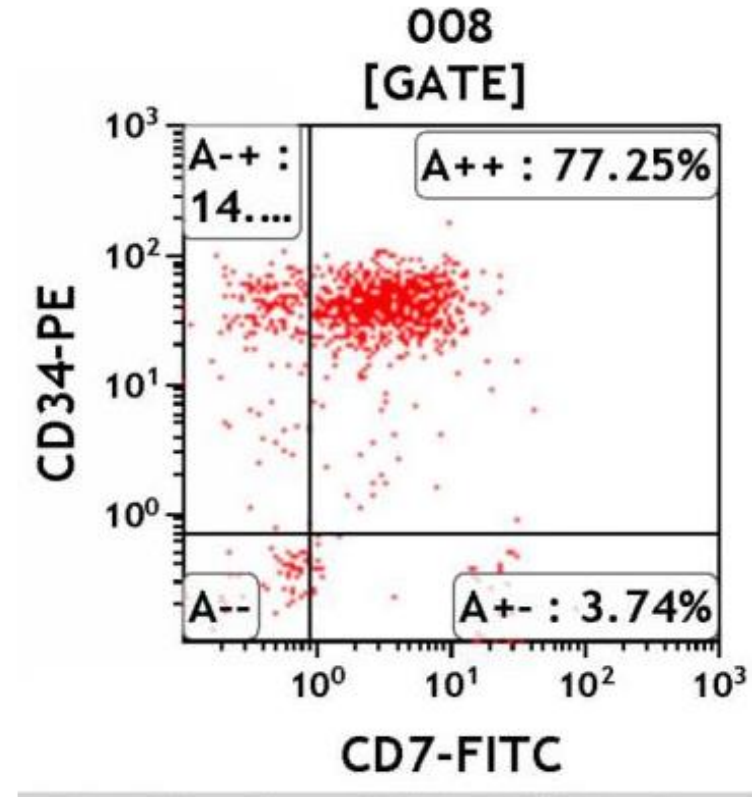
CD38 ゲーティング

2カラードットプロットによる解析

注: PE・FITC・・・抗体に結合している蛍光色素



1パラメーター蛍光ヒストグラム



2カラードットプロット

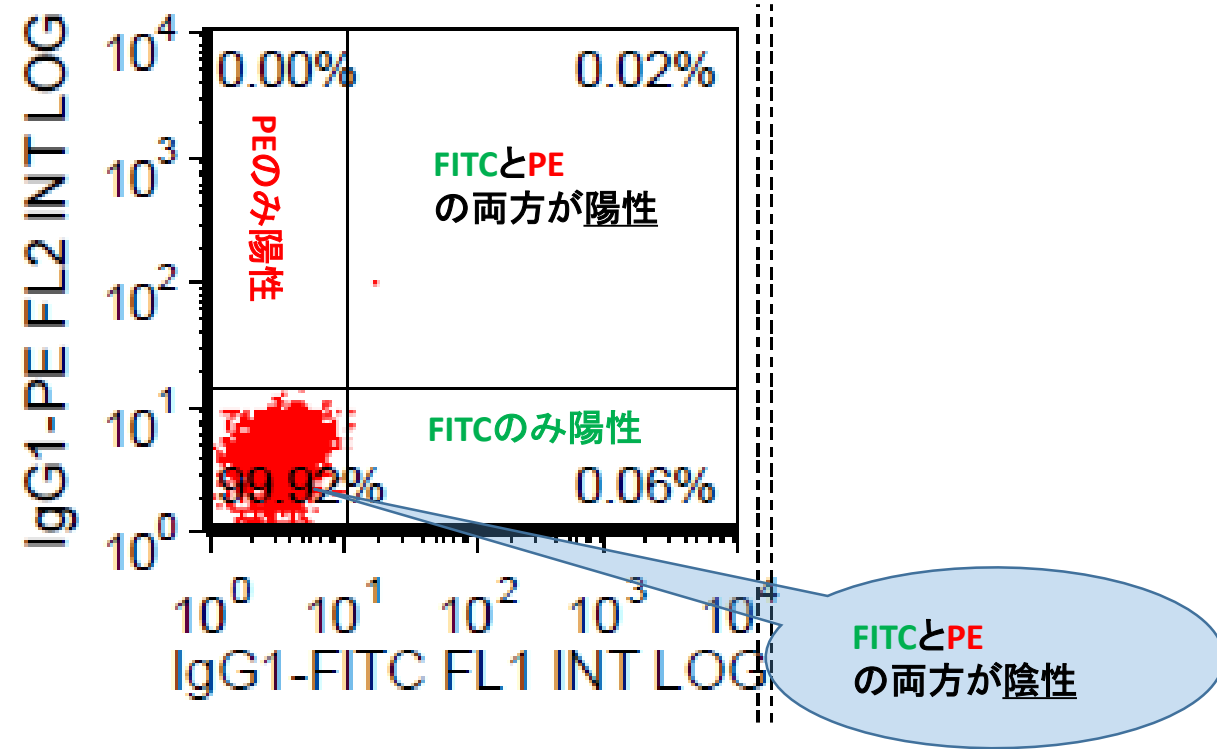
蛍光陽性領域の設定

陰性領域

- ・細胞の自家発光
- ・非特異的結合
(抗体が表面抗原でないのに結合したもの)

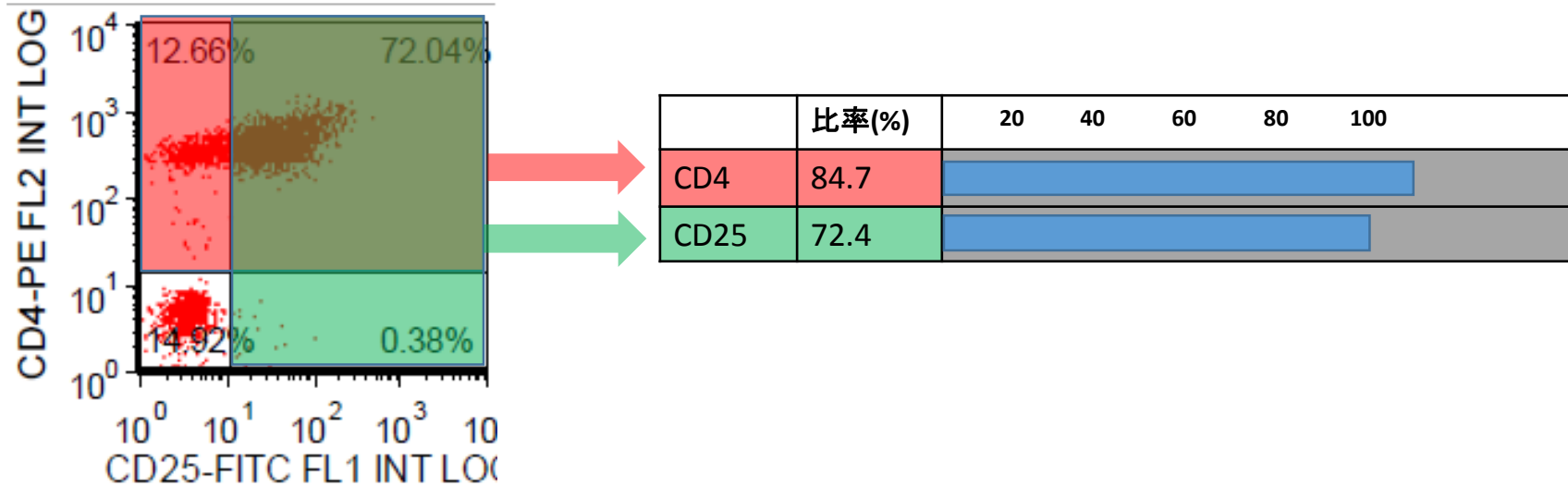


表面抗原に反応しない蛍光標識抗体
を試料に反応させたものを対照として
用いる(陰性コントロール)



クオドラント(4分割)の設定

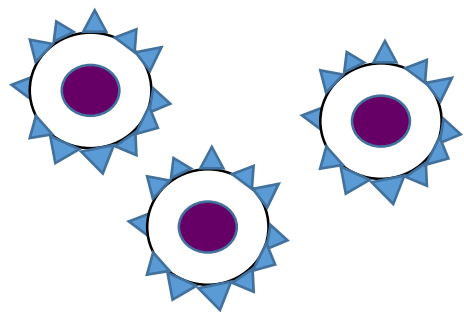
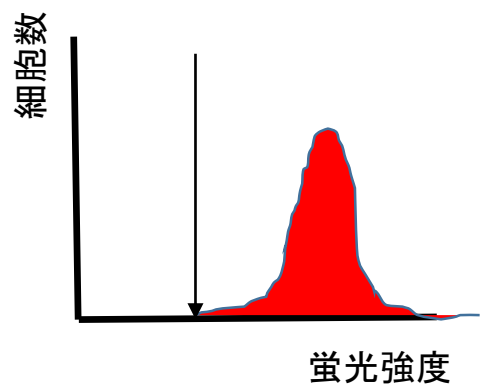
陽性比率の算出



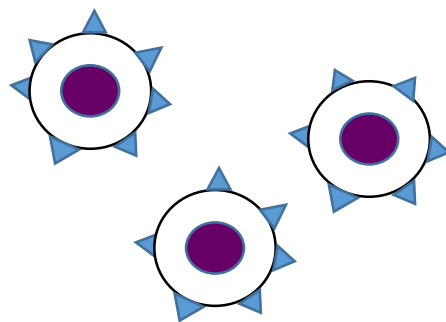
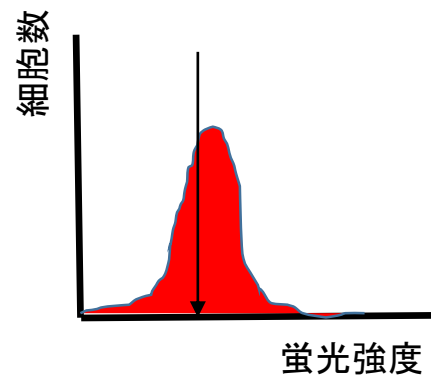
各標識抗体の組合わせのサイトグラムに
陰性コントロールのクオドラントを設定し
その領域の細胞比率を算出

弱陽性と一部陽性

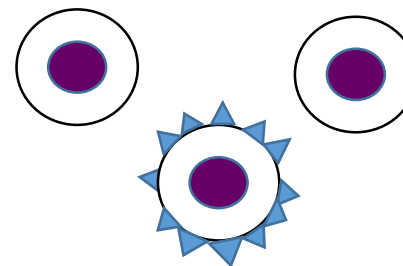
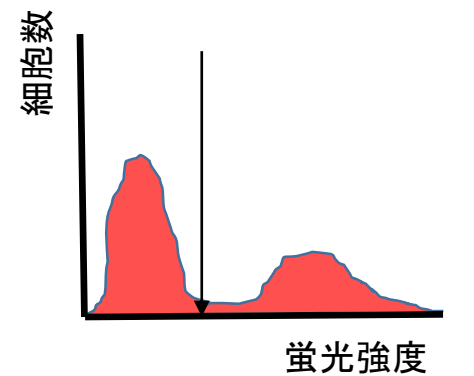
陽性



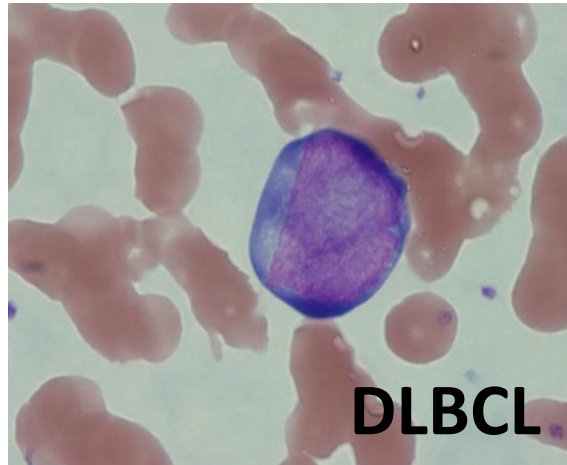
弱陽性(dim+)



一部陽性



Gatingと細胞形態

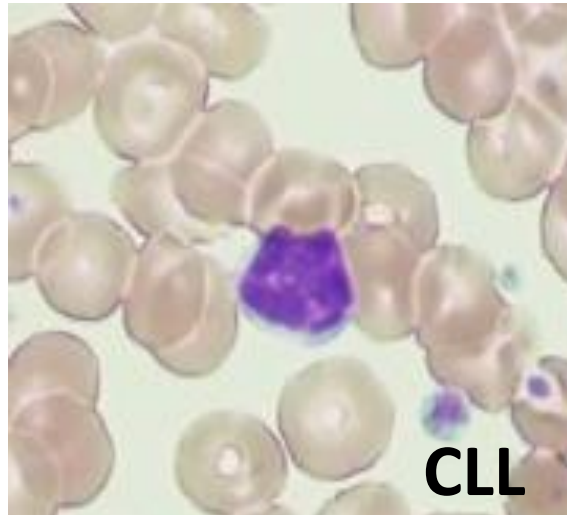


細胞の特徴

- ・大型
- ・核型不正
- ・成熟細胞

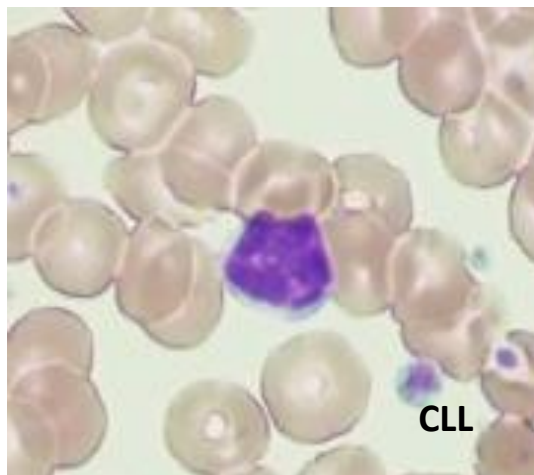
FCMの特徴

- ・FSC 大
- ・SSC 大
- ・CD45 強陽性



- ・小型
- ・核型均一
- ・顆粒なし
- ・成熟細胞

- ・FSC 小
- ・SSC 小
- ・CD45 強陽性



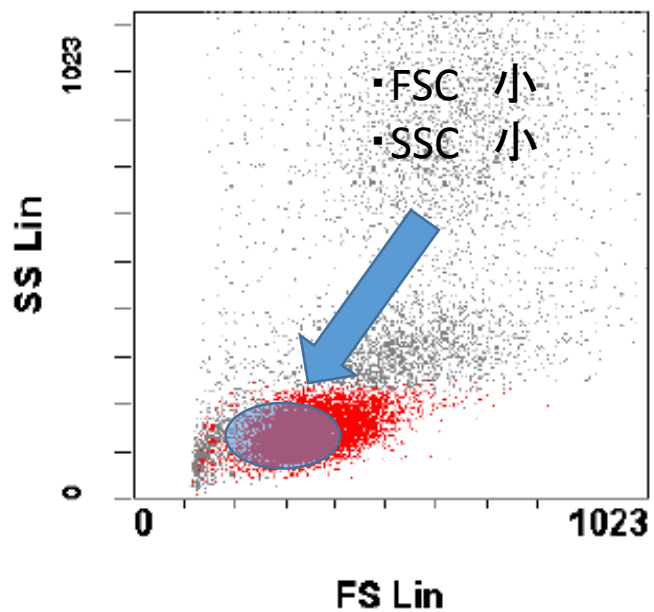
細胞の特徴

- ・小型
- ・核型均一
- ・顆粒なし
- ・成熟細胞

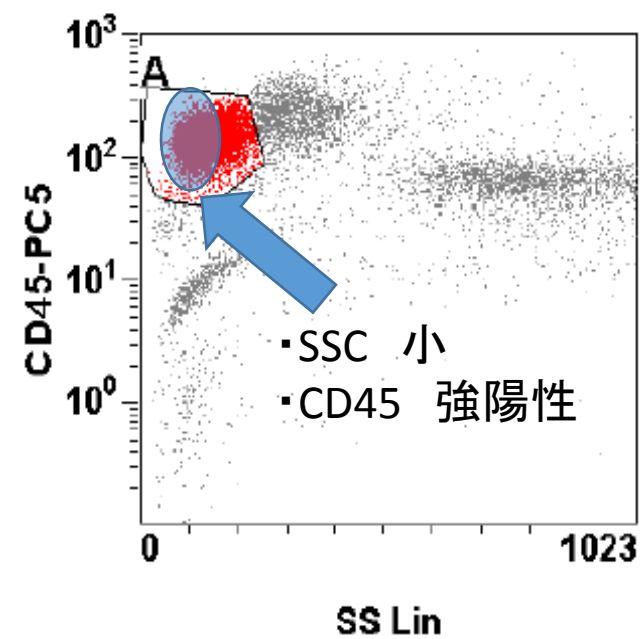
FCMの特徴



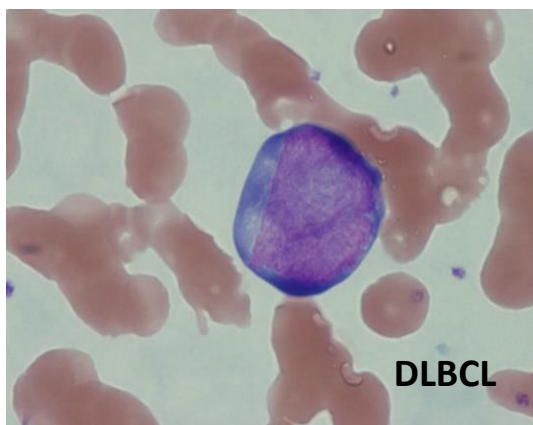
- ・FSC 小
- ・SSC 小
- ・CD45 強陽性



FSC-SSC gating

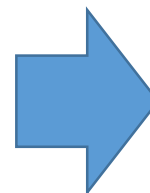


SSC-CD45 gating



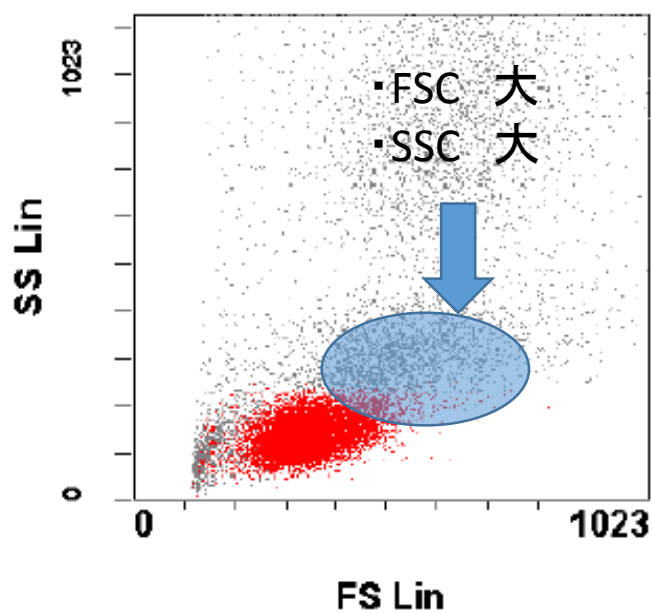
細胞の特徴

- ・大型
- ・核型不正
- ・成熟細胞

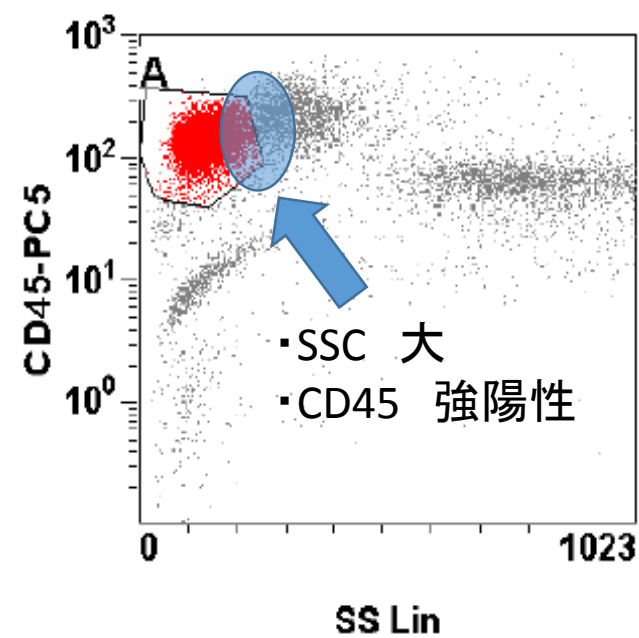


FCMの特徴

- ・FSC 大
- ・SSC 大
- ・CD45 強陽性

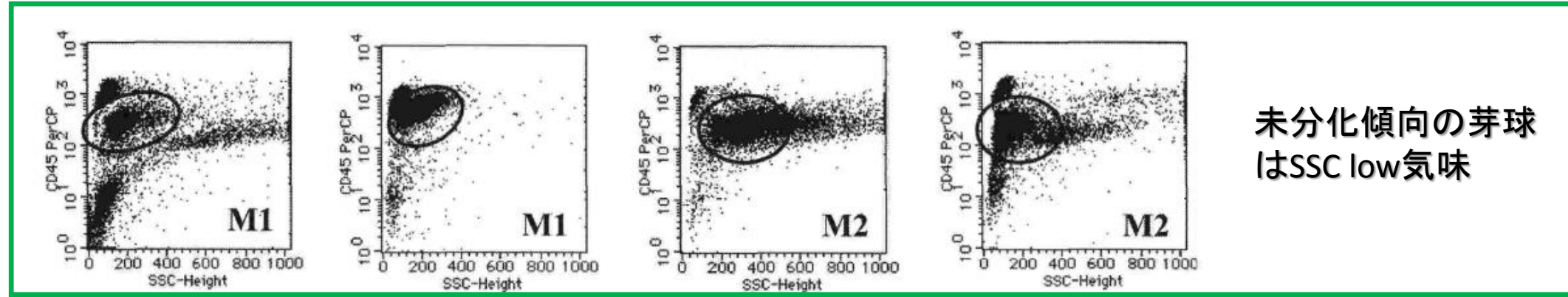


FSC-SSC gating

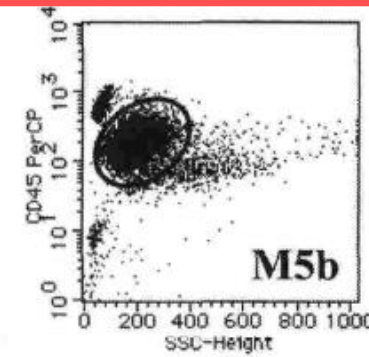
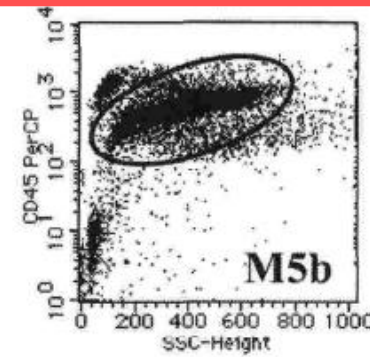
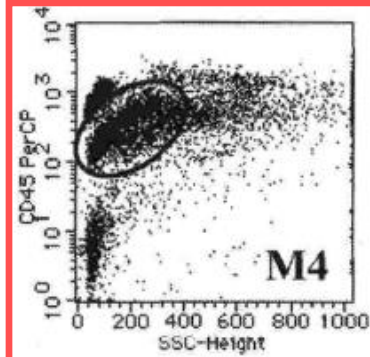
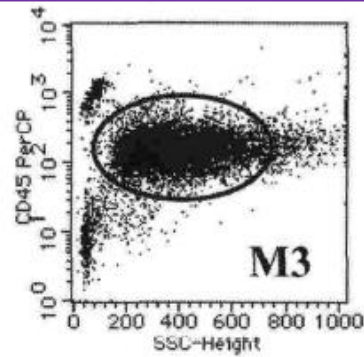


SSC-CD45 gating

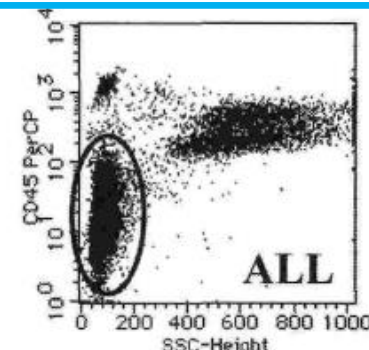
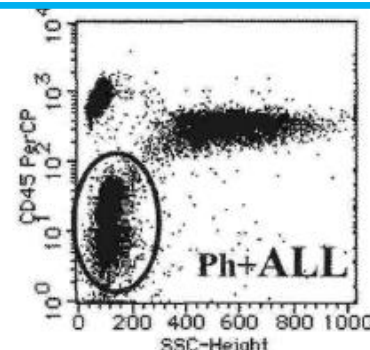
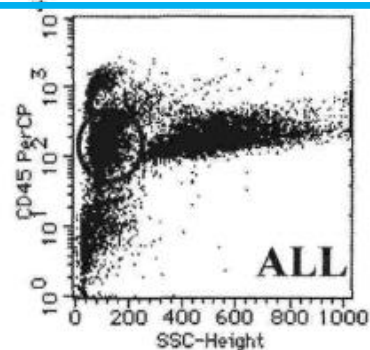
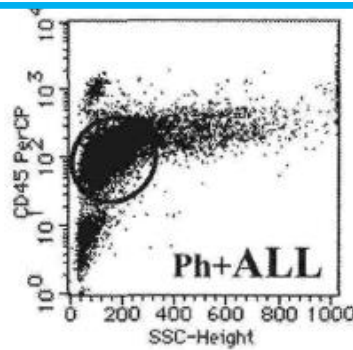
白血病患者のSSC-CD45スキットグラム



成熟傾向の芽球は顆粒球に連続して分布する傾向



単球系の芽球は単球に連続して分布する傾向



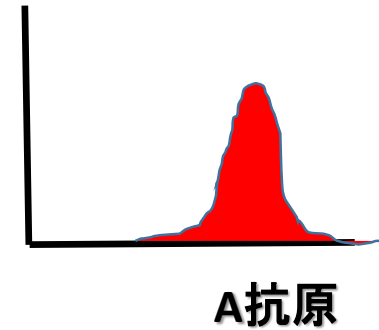
ALLの芽球はCD45の発現がさまざま

赤芽球と間違えないように

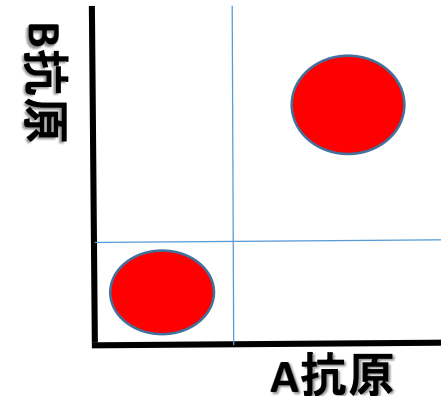
病型や症例により芽球の位置はさまざまである！

マルチカラーFCM

Single color・・・蛍光色素を一種類しか使わない解析。
蛍光補正の必要がない。

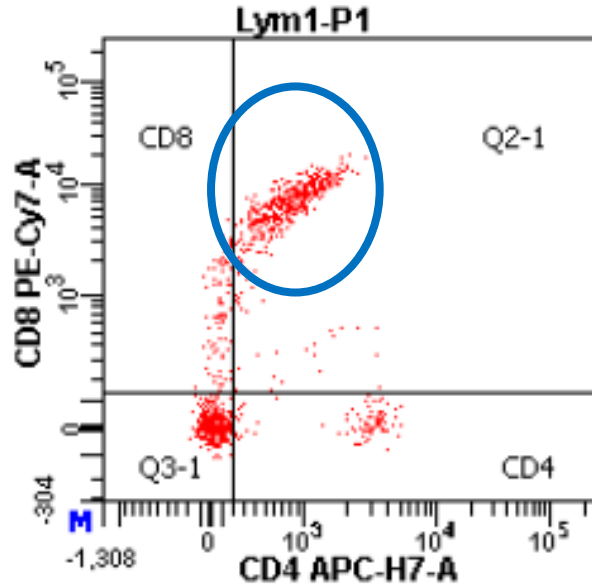


Multi color・・・複数の蛍光色素を使用した解析。
使用する蛍光標識抗体の数が増える
ほど、情報が得られ易いが
高性能な装置と蛍光補正が必要になる。
3colorは、gatingのためにCD45を入れる
必要があり、実質的にmulti colorは
4color以上を指すことが多い。

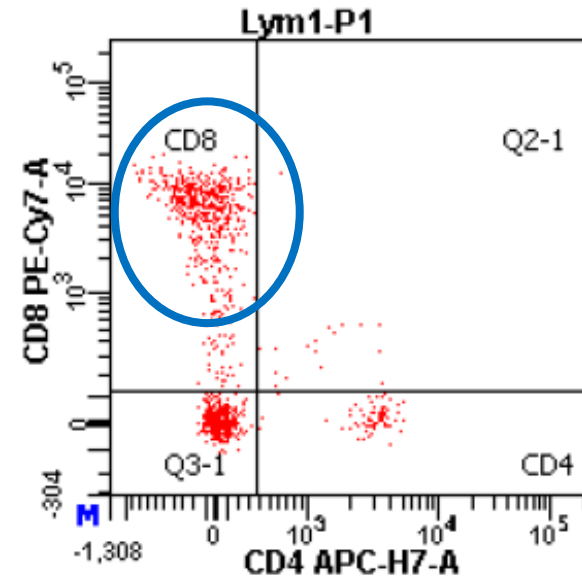


- ・装置に搭載されるLaserと蛍光検出器により、使用可能な色素数が決まる
- ・蛍光は波長分布があるため他の蛍光色素に漏れ込みが生じる

蛍光の漏れ込みと補正



補正前



補正後

蛍光補正が正しくされていないと、結果の解釈に誤りが生じる可能性がある

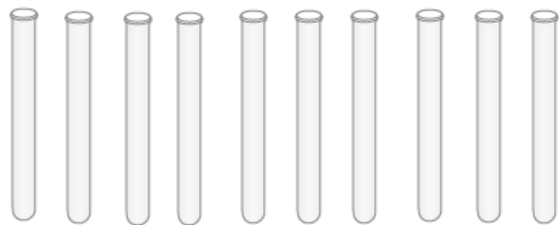
マルチカラーFCM検査の利点①

少ないチューブ数で多くの表面抗原を検査可能

例：白血病解析パネル（CD45 gate）

CD3/CD19/CD20/CD4/CD8/CD2/CD10/CD5/CD7/CD22/CD13/CD14/CD33/
CD41/HLA-DR/CD16/CD56/CD34/CD235a/CD117/CD45・・・21抗体

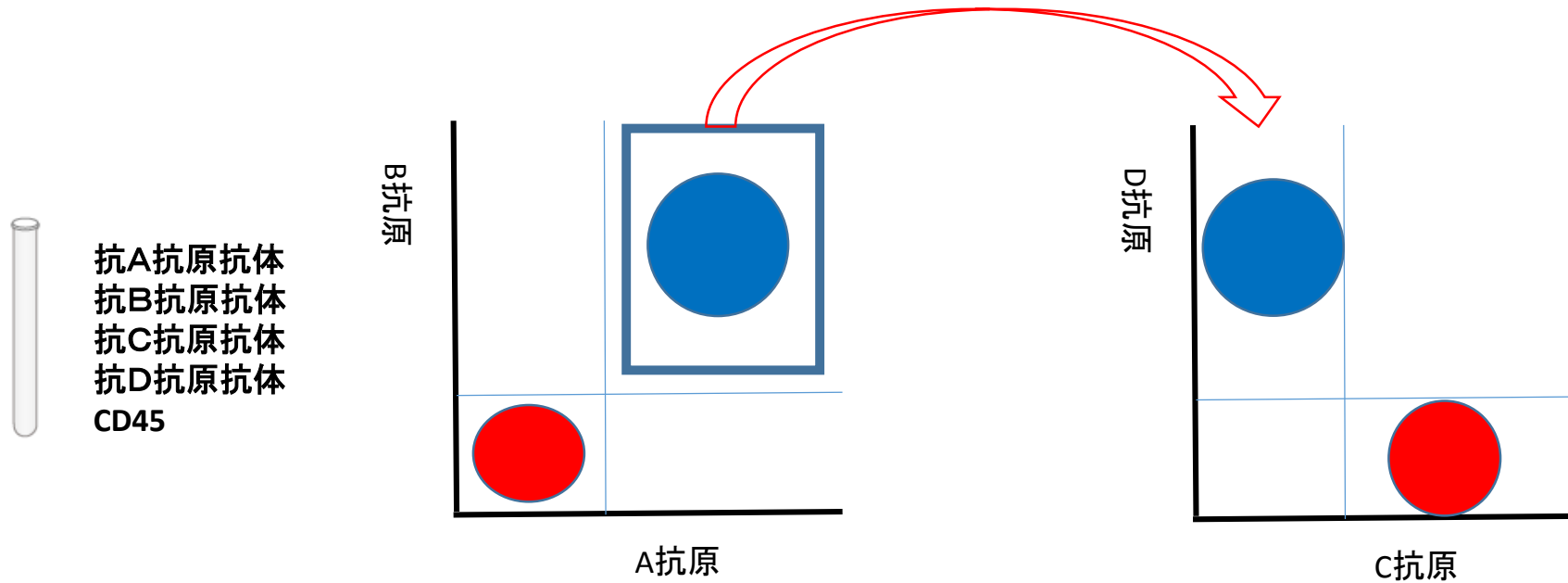
3colorの場合・・・10本



8colorの場合・・・3本



マルチカラーFCM検査の利点②



同じtube内の表面抗原であれば、階層解析が可能

5.表面抗原の選択

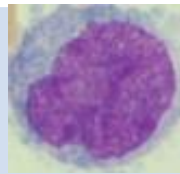
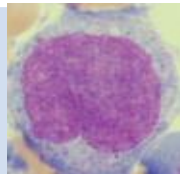
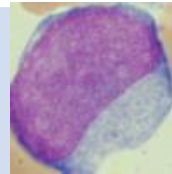
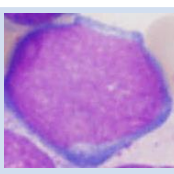
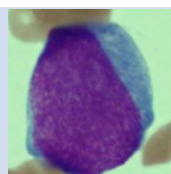
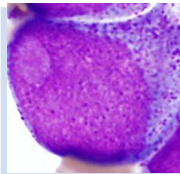
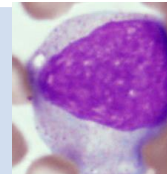
抗体パネルとは？

疾患ごとに適当な表面抗原に対する抗体を選択したセット項目のこと

抗体パネルの例

- リンパ球サブセット（T細胞・CD4/CD8・B細胞・NK細胞）
- 急性白血病解析セット
- 悪性リンパ腫解析セット
- MM（多発性骨髄腫）セット

顆粒球・単球系細胞の分化過程と表面抗原の変化

	単球	前単球	単芽球	顆粒球 単球前 駆細胞	骨髓芽 球	前骨髓 球	骨髓球 ～成熟 好中球
							
CD13							
CD14							
CD33							
CD34							
CD117							
HLA-DR							
MPO							

(JCCLS H2-P V1.0より改変)

血液検査で用いられる主な表面抗原

顆粒球・単球・巨核球・赤芽球系

細胞系統	発現抗原
顆粒球	MPO,CD13, CD33
単球	CD13, CD14, CD33, CD64
巨核球	CD41,CD42,CD61
赤芽球	CD235a (Glycophorin A)

異所性マーカー(abberant marker)はMRD (微小残存病変:minimal residual disease)の検出に有用

治療前の腫瘍細胞(芽球)が、正常の発現に近い場合

→少数の芽球は、腫瘍性かどうか判別が困難

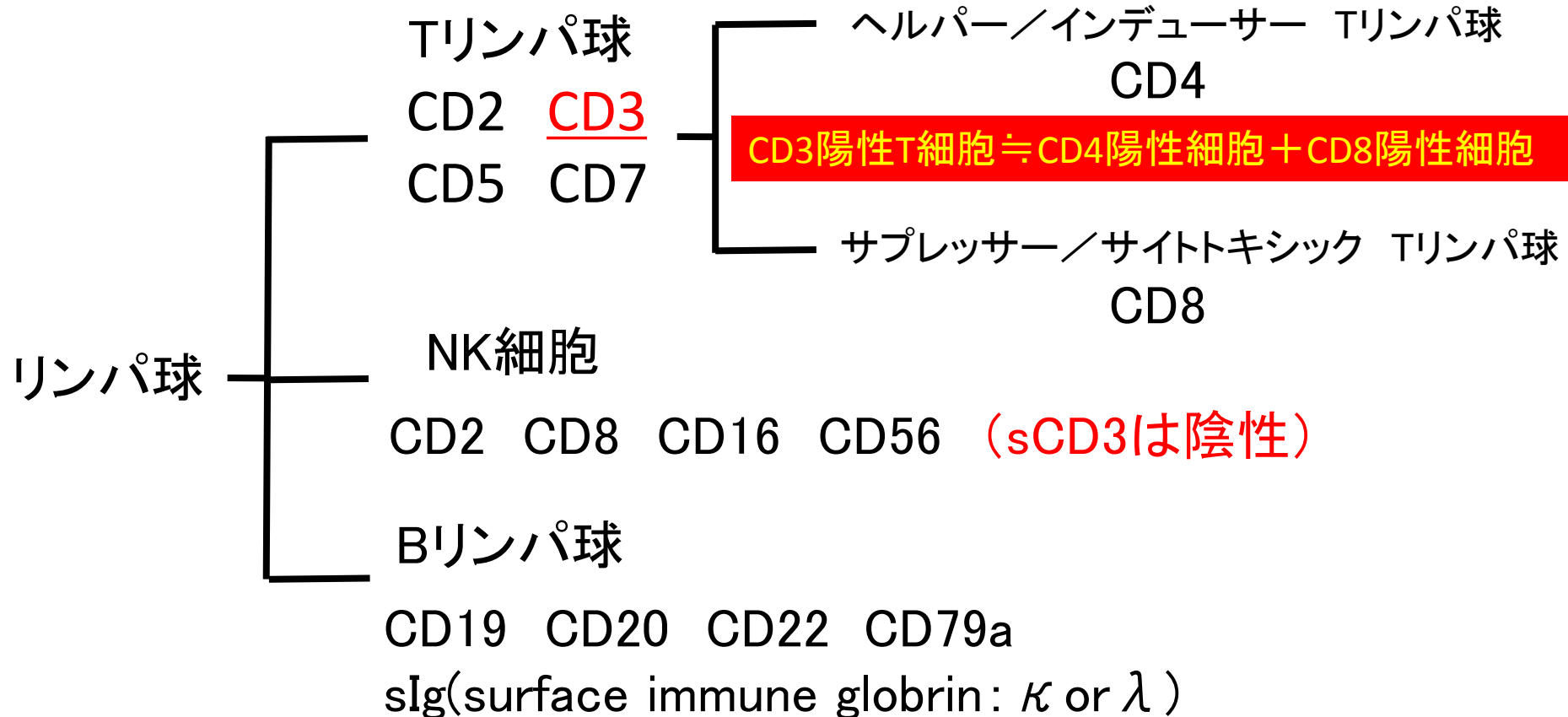
異所性マーカーがある場合

→少数の芽球でも、腫瘍性かどうか判別が可能

- ・腫瘍性の骨髄芽球に頻度が多いのが、
CD7(通常Tリンパ球で発現)
CD56(通常NK細胞に発現)
- ・ALL芽球にもCD13・CD33などの骨髄球マーカーが発現することがある

リンパ球の分類

リンパ球 ≡ CD3陽性Tリンパ球 + Bリンパ球 + NK細胞



リンパ球サブセット検査

(検査の目的)

末梢血中のT細胞・
B細胞比率、
T細胞中のサブセットの
比率を求めること

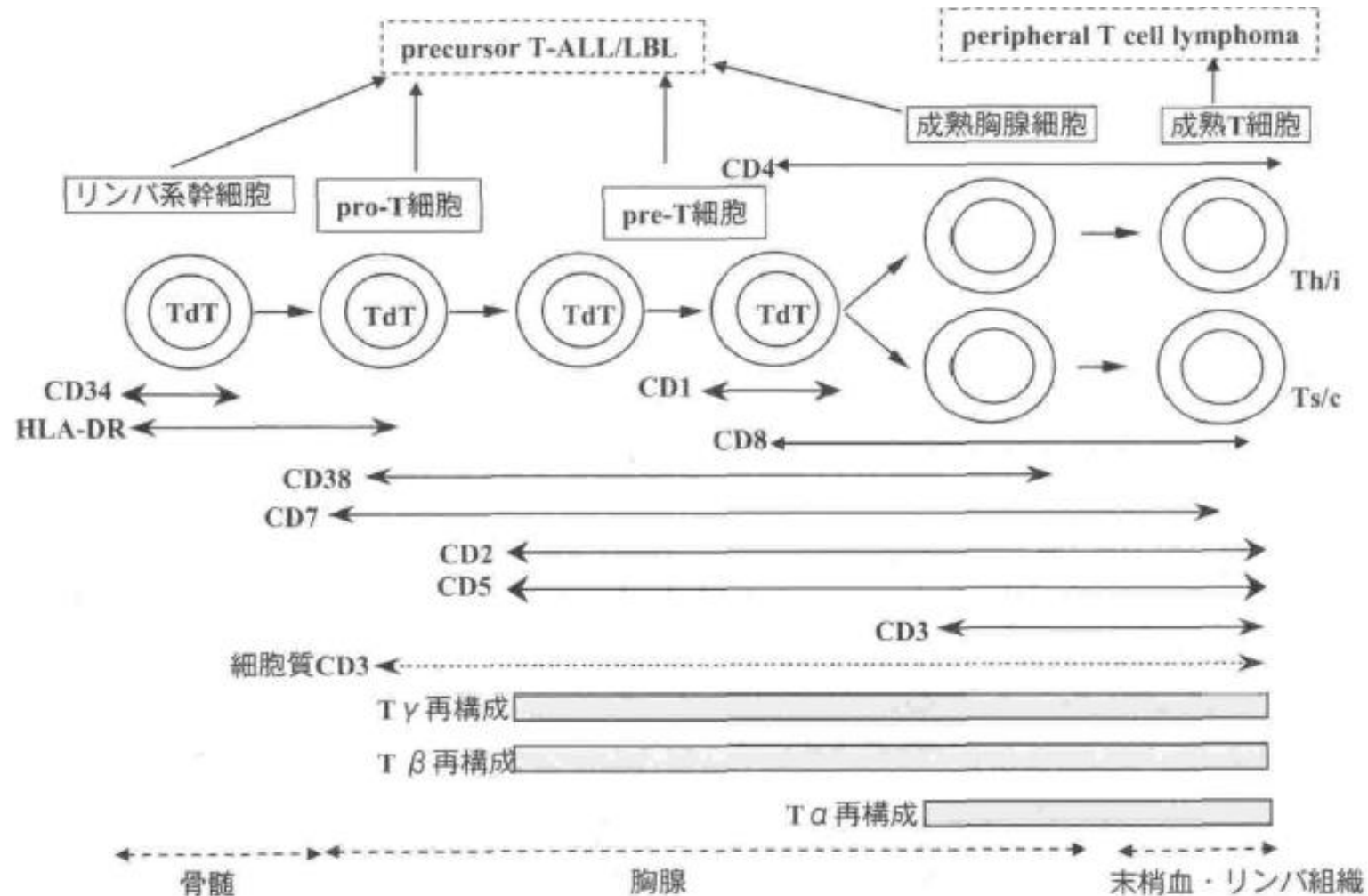
サブセット: 全体に
対する一部のこと

T・Bリンパ球の増減を示す疾患(スタンダード検査血液学 第3版より)

	増加	減少
Tリンパ球	・T細胞性白血病・リンパ腫 ・伝染性単核症 ・単核球症様症候群	・先天性免疫不全症候群 ・自己免疫疾患 ・担がん状態 ・AIDS(CD4/CD8↓) ・免疫抑制剤・副腎皮質ステロイド
Bリンパ球	・B細胞性白血病・リンパ腫 ・反応性高γグロブリン血症	・重症複合免疫不全症 ・無γグロブリン血症

血液検査で用いられる主な表面抗原

T細胞の分化と表面抗原の変化

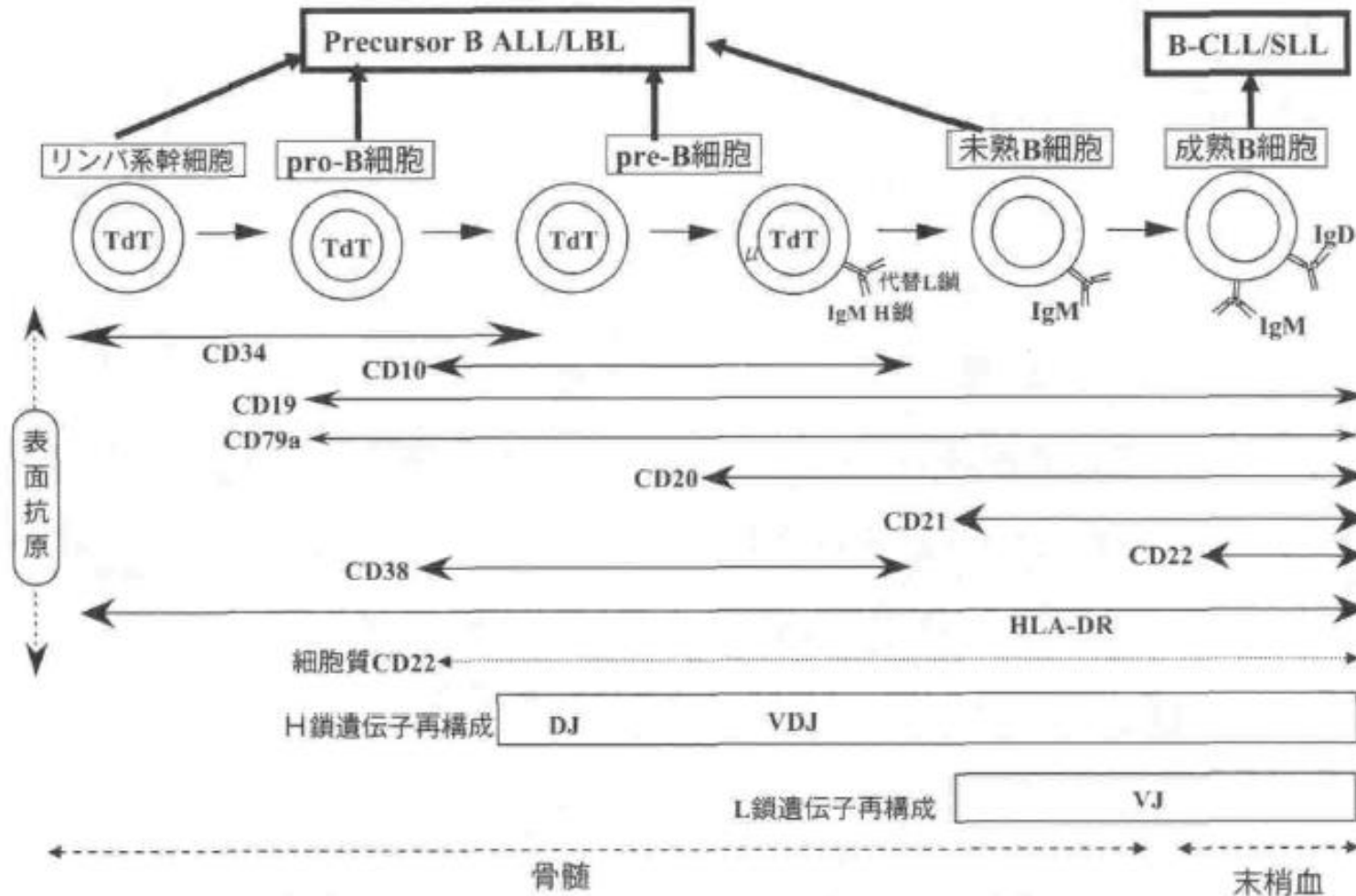


T/NK細胞性リンパ腫の表面形質

疾患	表面抗原
Precursor T-cell neoplasms	
T lymphoblastic leukemia/lymphoma	TdT+/CD7+/cytoplasmic CD3+/CD1a+
Mature T-cell neoplasms	
T-cell large granular lymphocytic leukemia	CD3+/CD56/CD57がしばしば陽性。
Aggressive NK-cell leukemia	CD2+/CD3-/CD3 ε +/CD56+/CD57-
Adult T-cell leukemia/lymphoma	CD2+/CD3dim/CD5+/CD7-/CD25+/CD4+/CD8-
Mycosis fungoides	CD2+/CD3+/CD5+/CD4+/CD8-/CD7-
Sezary syndrome	CD2+/CD3+/CD5+/CD4+/CD8-/CD7±
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma	CD4+/CD10+
Anaplastic large cell lymphoma	CD30+/D25+/CD4+が多い

血液検査で用いられる主な表面抗原

B細胞の分化と表面抗原の変化

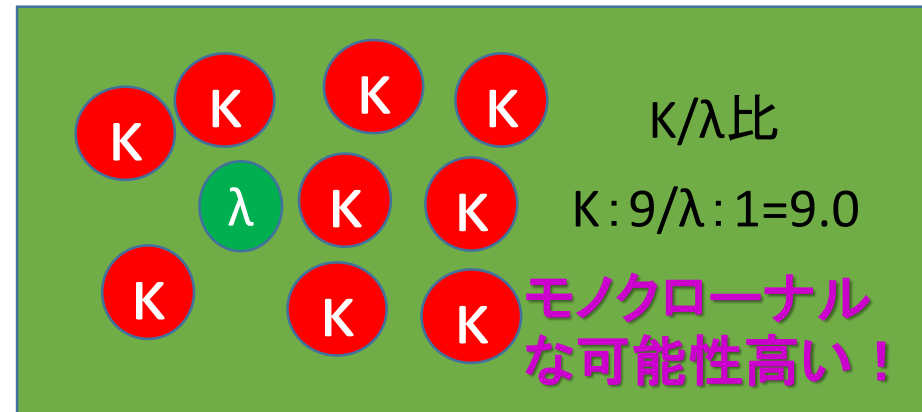
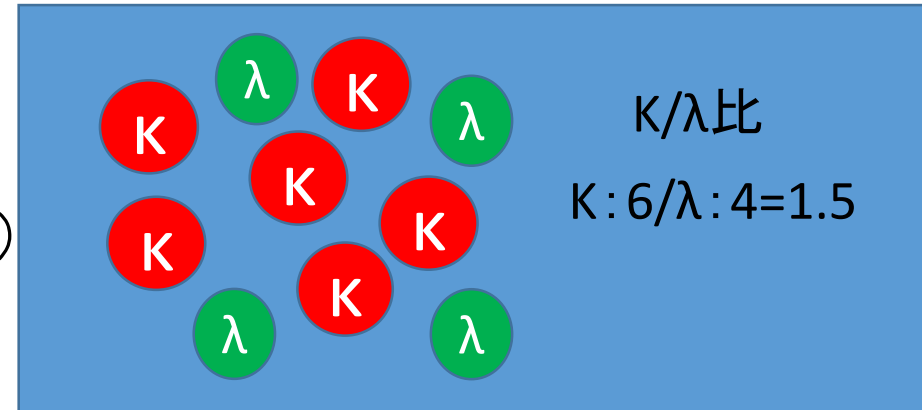
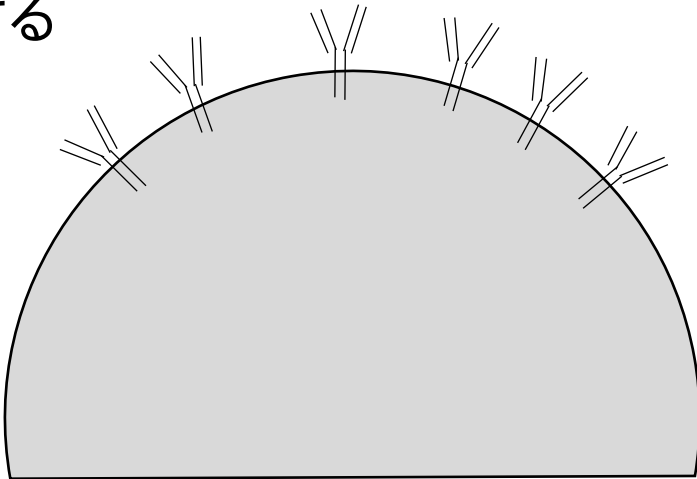


主な成熟B細胞腫瘍と表面抗原

	頻度	CD5	CD10	CD11c	CD19	CD20	CD22	CD23	clg	slg	その他
DLBCL	30%以上	-/+	-/+	-/+	+	+	+	-/+	-	-/+	
濾胞性リンパ腫	約15～20%	-	+/-	-	+	+	+	-/+	-	+	BCL-2
MALTリンパ腫	約9%	-	-	+/-	+	+	+	-	-	+	
マントル細胞リンパ腫	約3%	+	-	-	+	+	+	-/+	-	+	cyclin D1
CLL/SLL	約1%	+	-	-/+	+	+	+	+	-	+	
バーキットリンパ腫	約1%(成人)	-	+	-	+	+	+	-/+	-	+	c-MYC
リンパ形質細胞性リンパ腫	<1%	-	-	-/+	+	+	+	-/+	+	+	
有毛細胞白血病(HCL)	<1%	-	-	+	+	+	+	-/+	-	+	CD103,CD25
形質細胞腫	-	-	-	-	-/+	-/+	-/+	-/+	+	-	CD38(++)

細胞表面(内)免疫グロブリン

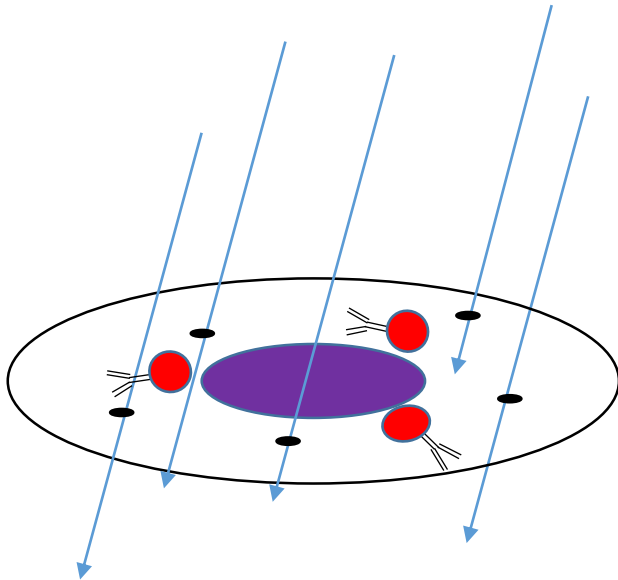
- ・B細胞1つにつき、発現しているL鎖は、 κ か λ かどちらか一方
- ・形質細胞は、細胞内に発現
- ・明確な基準は無いが
通常はK優位で1.5程度(1.0～3.0程度)
- ・非特異的結合による影響を
起こしやすいので、血漿中の
免疫グロブリンを洗浄してから検査
する



細胞内染色

細胞内に発現している抗原を染色する。
細胞膜透過処理をした後、蛍光色素標識抗体を反応させる。

血液検査領域で用いられる細胞内染色



- ・MPO (ミエロペルオキシダーゼ)
- ・cytCD3
- ・cytCD79a
- ・cytCD22
- ・TDT (Terminal deoxynucleotidyl transferase)
- ・細胞内免疫グロブリン軽鎖 (κ, λ)

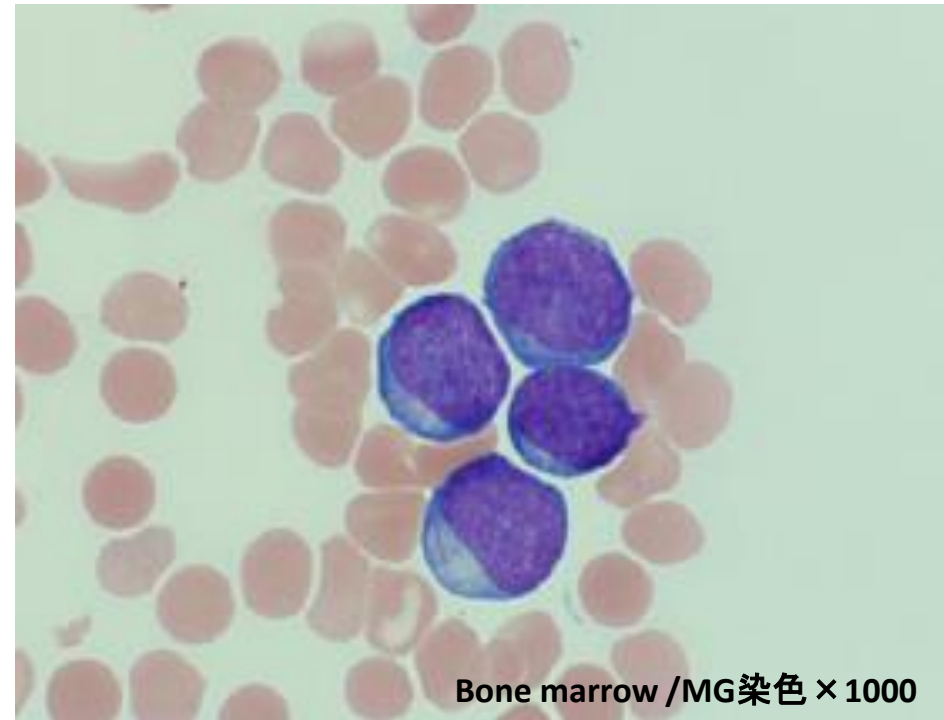
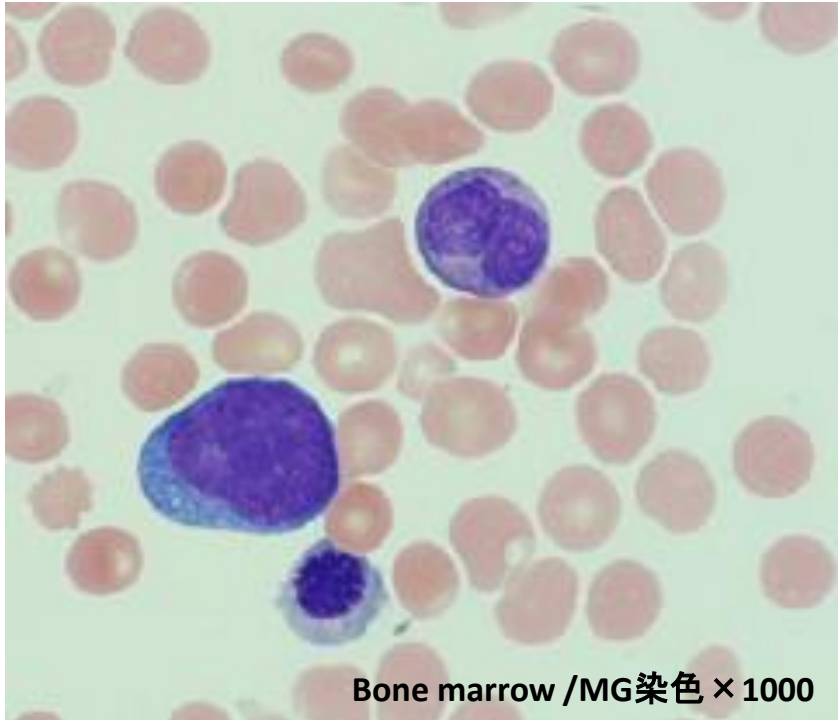
Mixed phenotype acute leukemia(MPAL) の判定に用いる各lineageの条件

lineage	条件
Myeloid lineage	MPO(FCM,免疫組織化学、細胞化学)陽性 か 単球系への分化(NSE,CD11c,CD14,CD64,lysozymeのうち少なくとも2つ)
T lineage	cytCD3(CD3εに対する抗体を用いたFCM)かsurfaceCD3
B lineage	CD19強陽性+CD79a,cytCD22,CD10の1つ以上が強陽性 CD19弱陽性+CD79a,cytCD22,CD10の2つ以上が強陽性

WHO分類2017「MPALの細胞系統同定のための基準」より

症例紹介①

主訴： 白血球増多で来院



選択すべきパネルは
どれか？

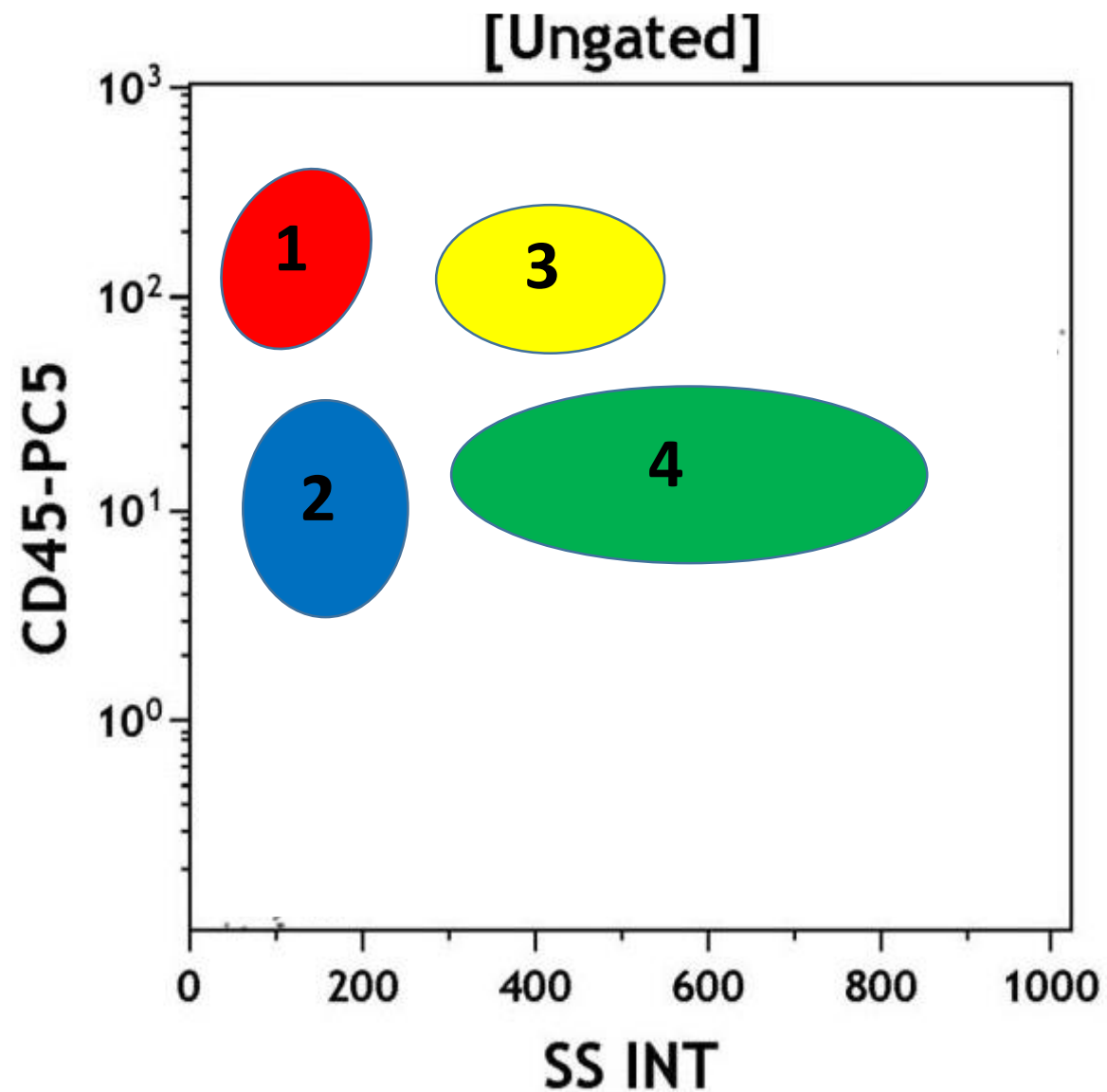
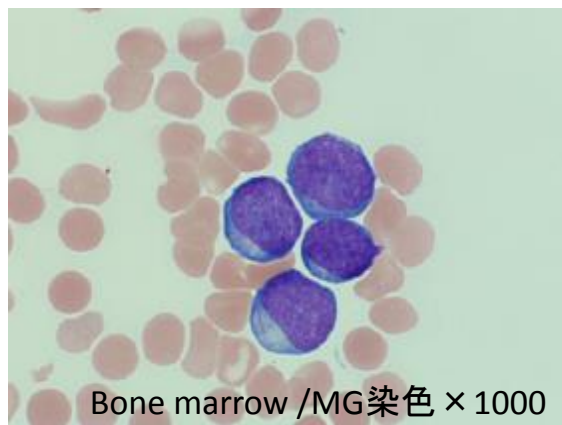
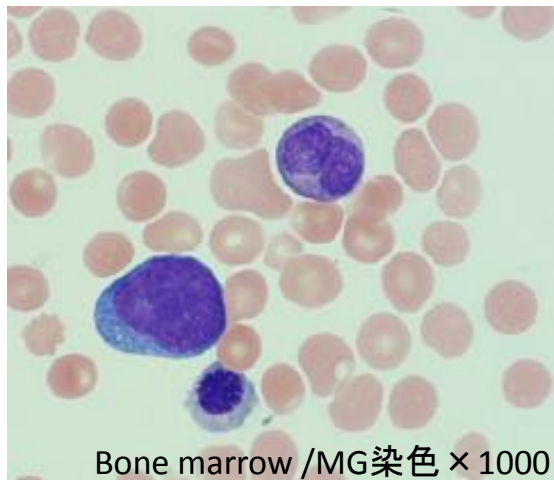
悪性リンパ腫パネル

急性白血病パネル

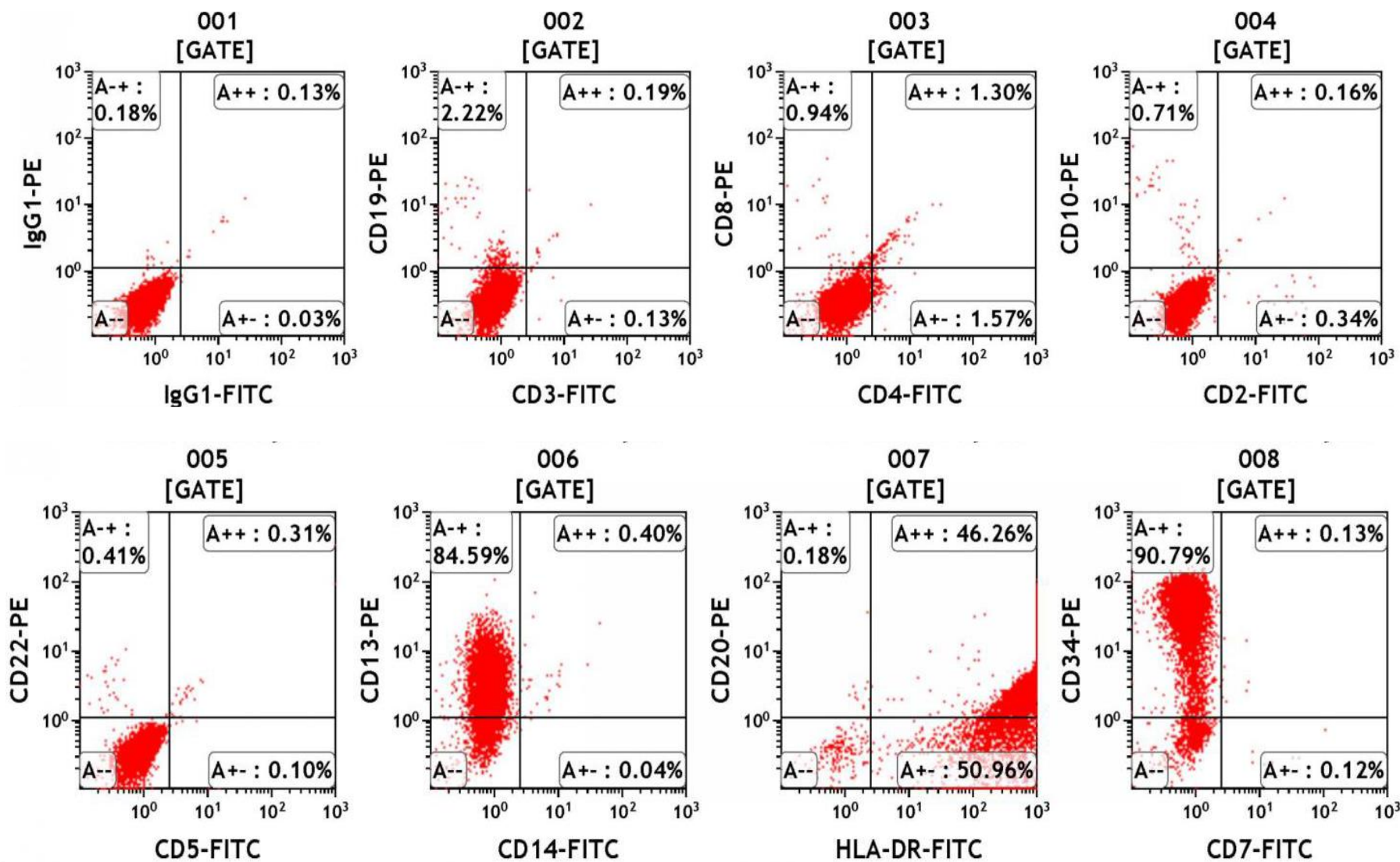
リンパ球サブセット

骨髄腫パネル

Gating位置は？



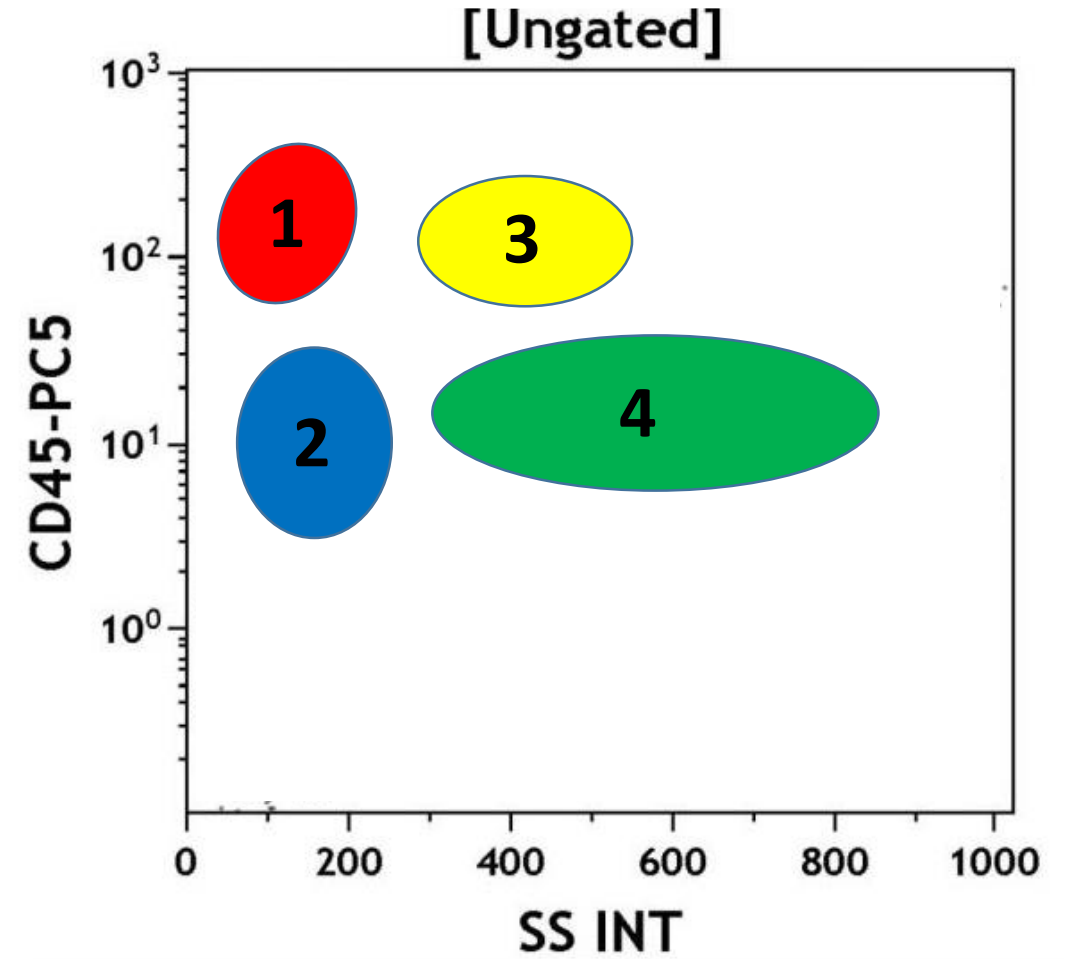
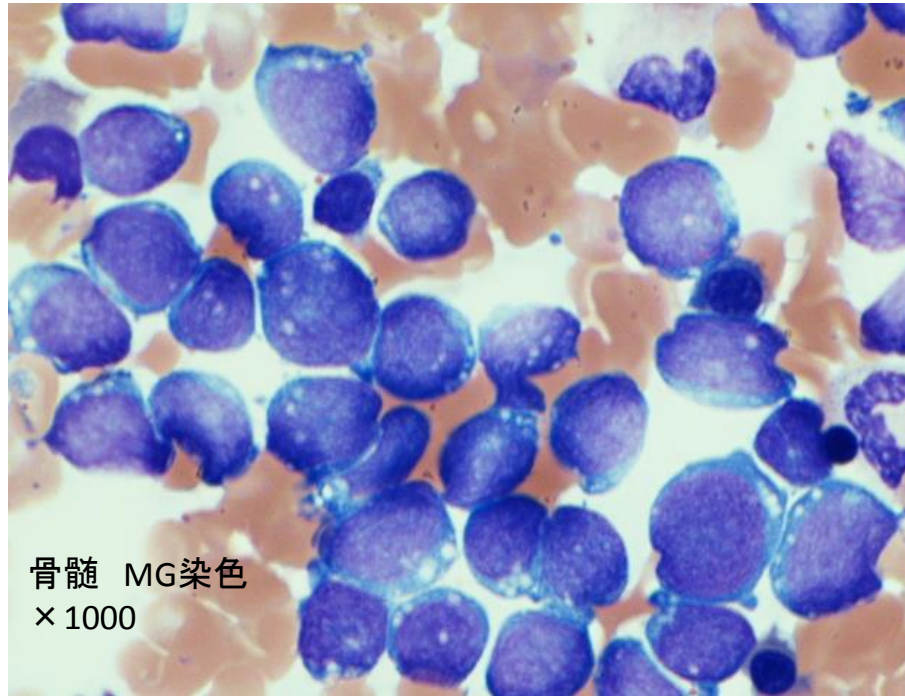
陽性抗原は？ 系統は？



CD3:	CD13:
CD4:	CD33:
CD8:	CD14:
CD2:	CD41a:
CD5:	CD235a:
CD7:	
CD19:	CD34:
CD20:	CD117:
CD22:	HLA-DR:
CD56:	
CD16:	

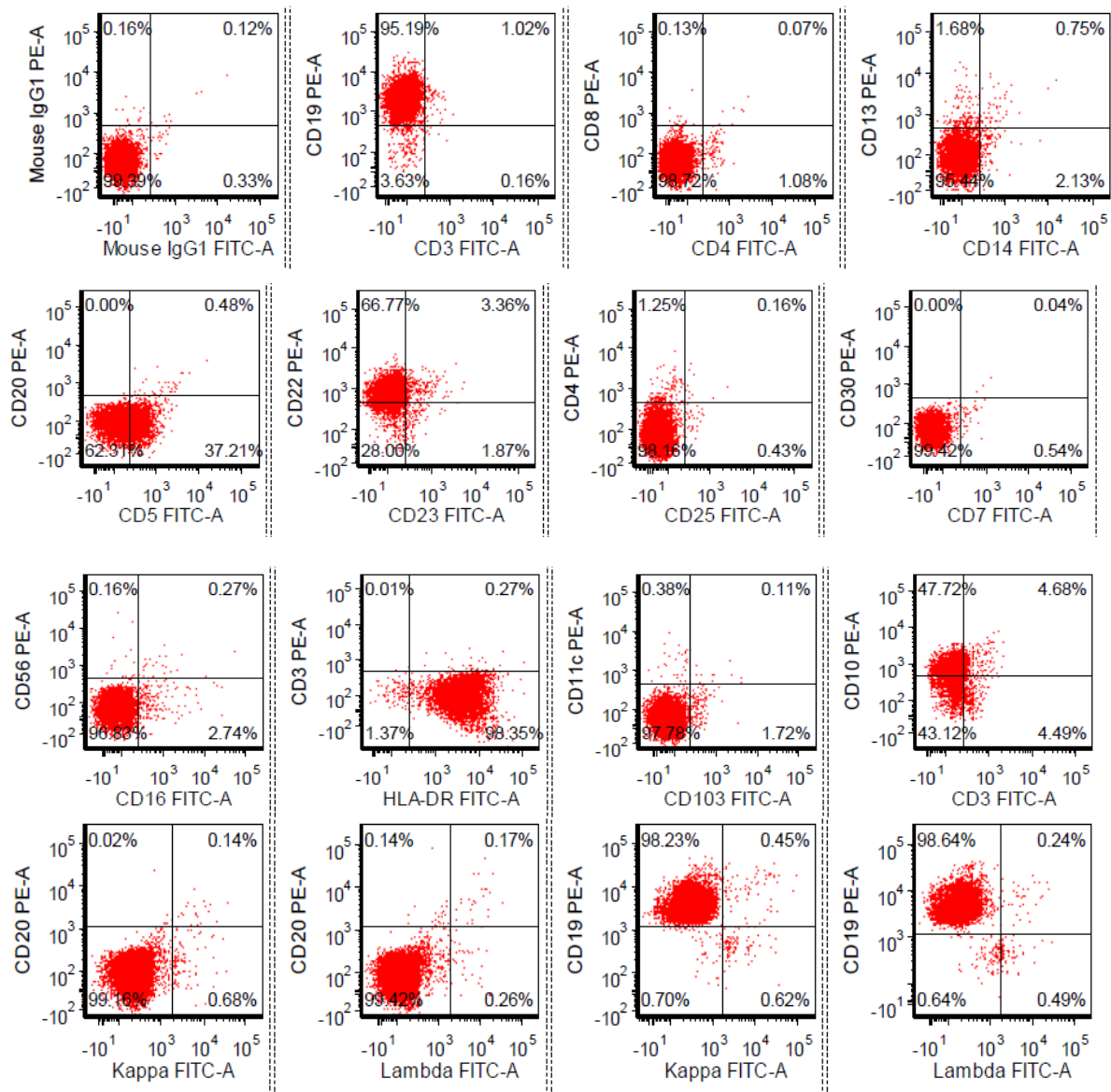
症例紹介②

主訴： 疲労・腹部膨満感



- ・選択すべきパネルは？
- ・Gating位置は？

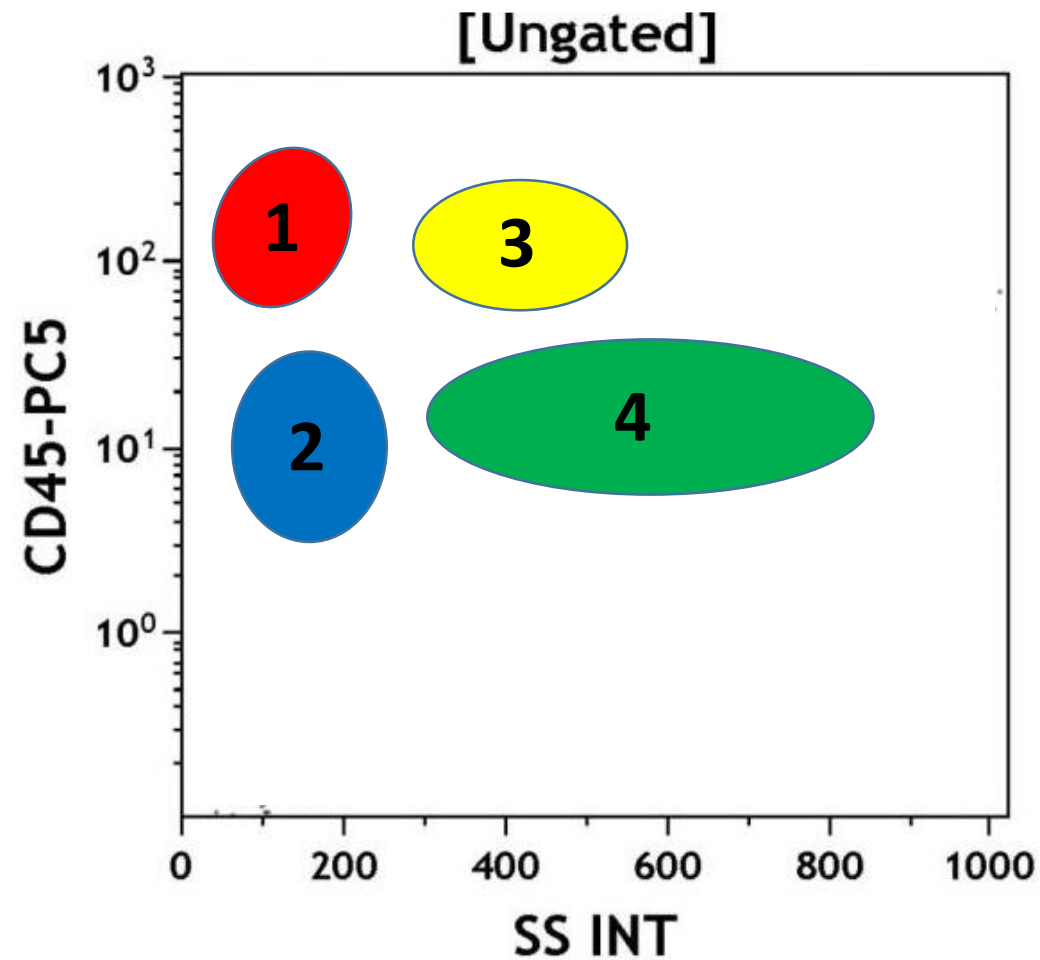
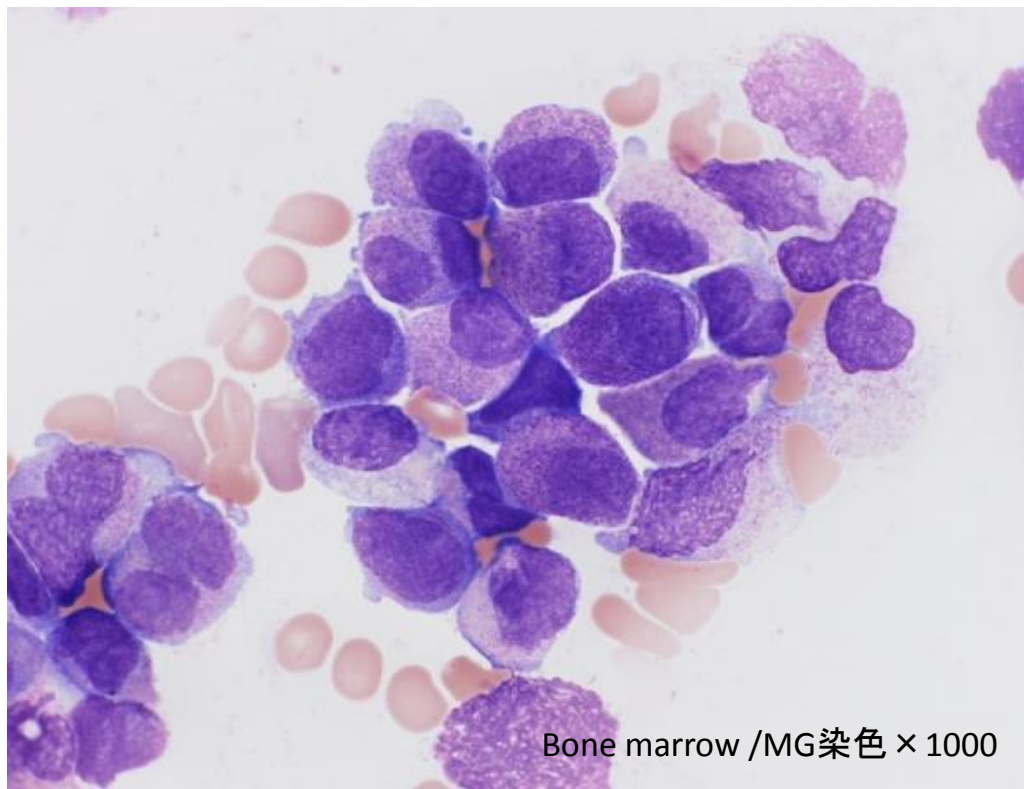
解析実習①: 2カラードットパターン



- ・陽性抗原は？
- ・系統は？
- ・分化段階は？
- ・推定される病型は？

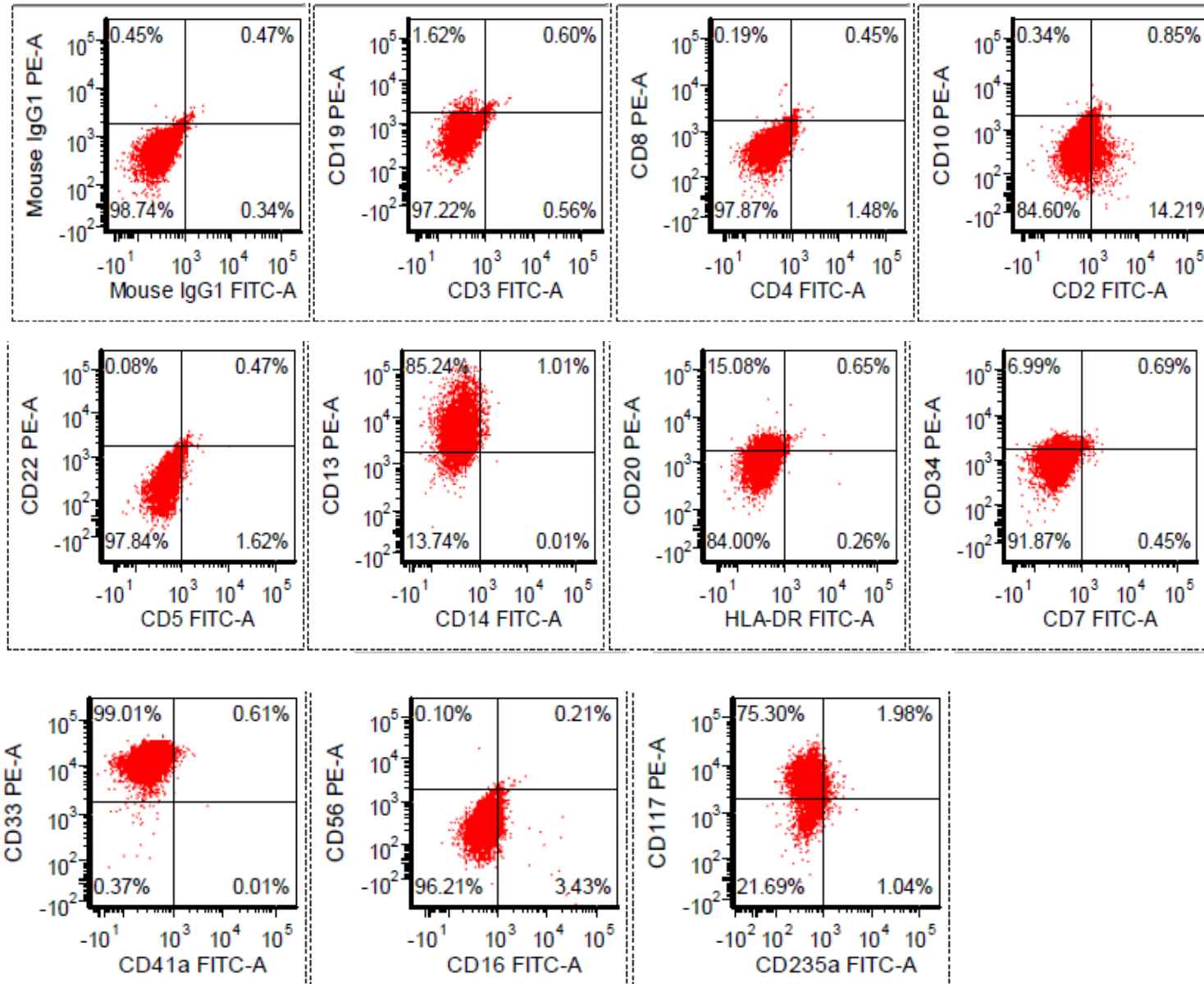
症例紹介③

主訴： 出血傾向



- ・選択すべきパネルは？
- ・Gating位置は？

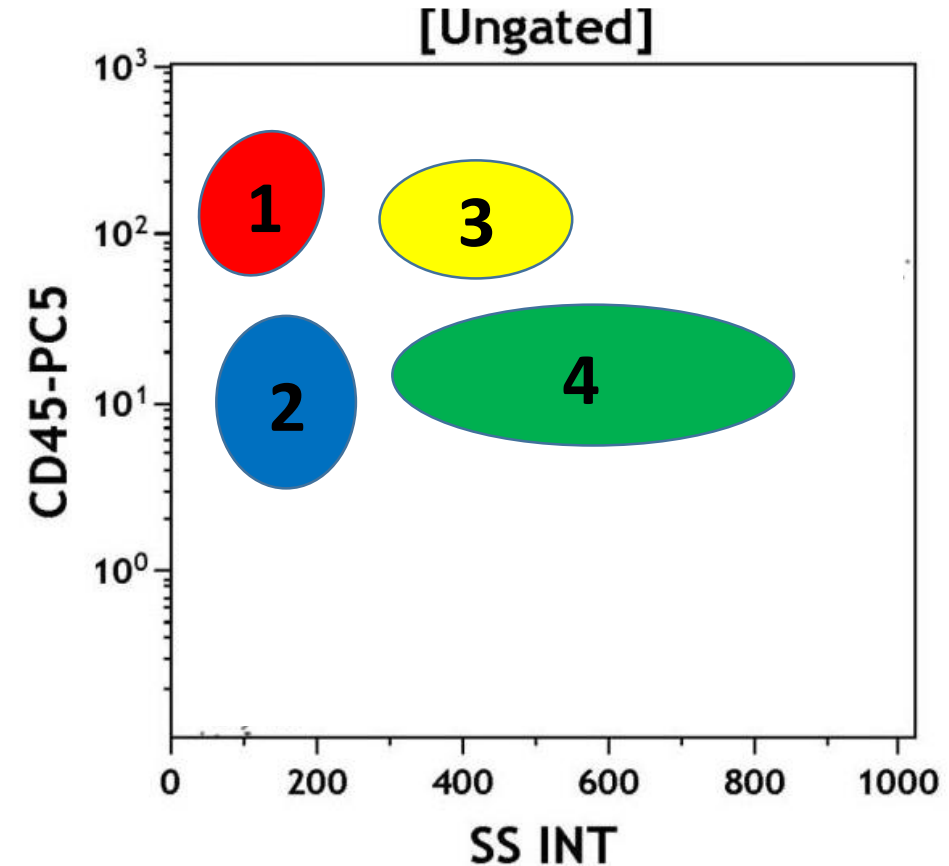
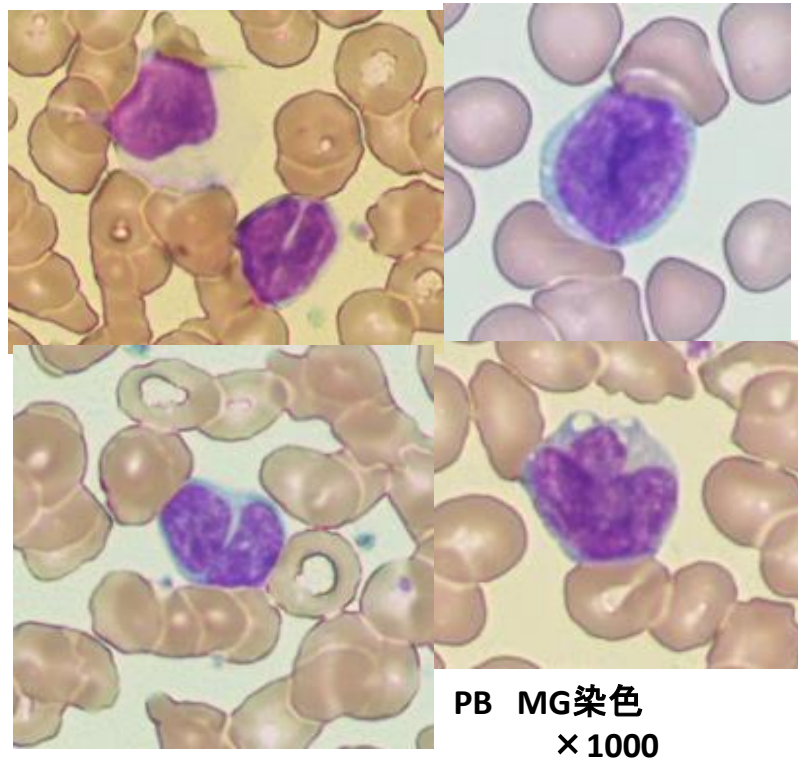
解析実習②: 2カラードットパターン



- ・陽性抗原は？
- ・系統は？
- ・分化段階は？
- ・推定される病型は？

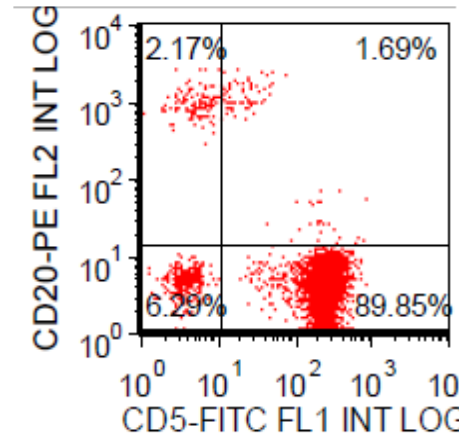
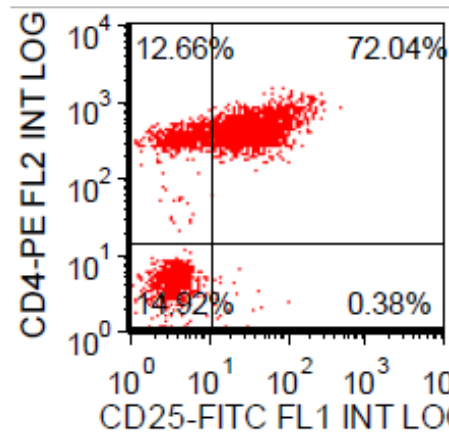
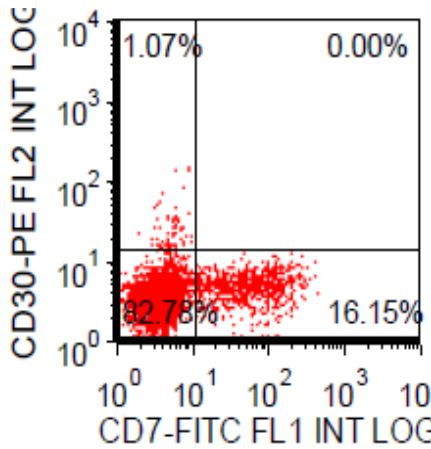
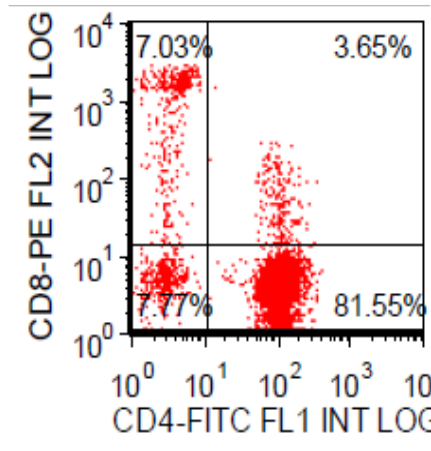
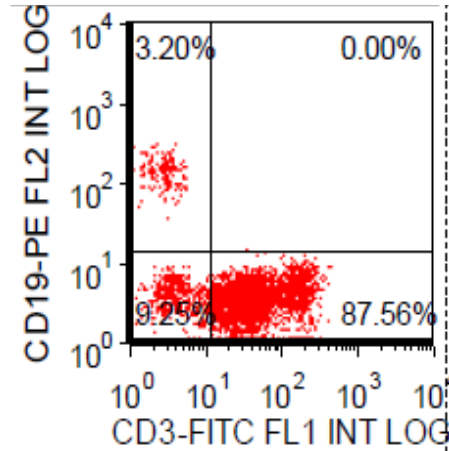
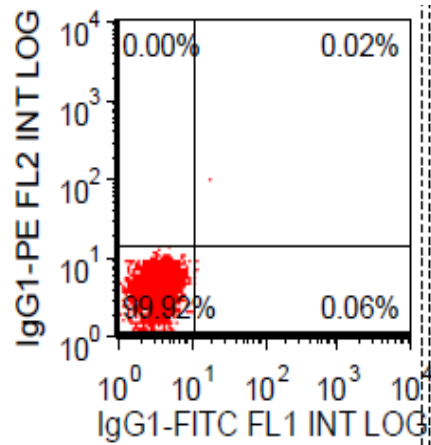
症例紹介④

主訴： 健診にてsIL2R高値、 異常リンパ球指摘



- ・選択すべきパネルは？
- ・Gating位置は？

解析実習③: 2カラードットパターン



- ・陽性抗原は？
- ・系統は？
- ・発現の異常は？
- ・推定される病型は？

まとめ

- ① 白血球表面マーカー検査は、造血器腫瘍の診断、経過観察の補助に有用である。
- ② 白血球表面マーカー検査は、迅速で客観性に優れた検査である。
- ③ 白血球表面マーカー検査を有効に活用するには、病型や細胞形態に関しても広い知識が必要である。