

院内フローサイトメトリーによる造血器腫瘍診断の取り組み

(地方独立行政法人京都市立病院機構京都市立病院 血液内科)

宮原 裕子

(地方独立行政法人京都市立病院機構京都市立病院 臨床検査技術科)

前田 雅子 村上 典子

(地方独立行政法人京都市立病院機構京都市立病院 小児科)

石田 宏之

(地方独立行政法人京都市立病院機構京都市立病院 血液内科輸血・造血幹細胞移植科)

伊藤 満

要 旨

京都市立病院血液内科及び小児科において、当院に設置されているベクトン・ディッキンソン (Becton Dickinson : BD) FACSLyric フローサイトメーターを用いた白血病、悪性リンパ腫を中心とした造血器腫瘍の免疫表現型診断を開始した。これは、一刻を争う疾患に対する根拠に基づいた治療の迅速な開始に大きく寄与した。今後は診断のみならず、治療後の微小残存病変同定の目的も含め検査範囲を拡大していきたい。

(京市病紀 2021 ; 41 : 1-4)

Key words : 造血器腫瘍, フローサイトメトリー

緒 言

当院は京都府で唯一小児、成人ともに造血幹細胞移植が可能な一般病院であるため、ベクトン・ディッキンソン (Becton Dickinson : BD) FACSLyric フローサイトメーターが設置されている。これは通常、末梢血幹細胞採取における CD34 陽性細胞の計測に使用しているが、これに加えて同時に 6 色までの蛍光色素を判別することが出来ることから、一度に多数の染色を必要とする造血器腫瘍の診断に極めて有効な装置である。造血器腫瘍は、待ったなしである。速やかに診断し治療を開始する必要があるが、1 日の違いで命に関わることも少なくない。この度、これまで外注検査のみであったことから、結果報告まで 24 時間を要した細胞表面抗原検査 (フローサイトメトリー) を BD FACSLyric フローサイトメーターを用いた院内検査で施行することにより 2 時間程度で結果を得ることが可能となった。

フローサイトメトリー法とは何か

フローサイトメトリー法は造血器腫瘍の診断時に腫瘍細胞の免疫表現型を細胞単位で解析する方法である¹⁾。免疫表現型の指標は細胞表面形質であるが、細胞表面形質とは細胞の表面に存在する抗原の中で細胞の機能や活性化に関連し細胞帰属や分化段階の同定、細胞特性の指標となるものである。細胞形質として、細胞表面上にエピトープが露出している細胞外成分、細胞内成分の細胞膜、細胞質に存在する内在性成分があるが、フローサイトメトリーは主に細胞外成分を検索する方法である。ただし急性白血病などのように細胞内抗原の解析が欠かせ

ない疾患については、細胞内成分の解析を同時に行う必要がある。

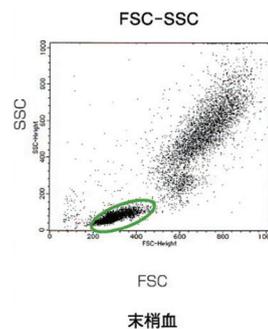
1. 方法

末梢血、骨髓液、リンパ節生検検体、体腔液などの腫瘍細胞から作成した腫瘍細胞浮遊液を蛍光色素で標識し各抗原に対するモノクローナル抗体と反応させる。細管内を通過させる間にレーザー光を照射し、一細胞ずつの散乱光と表面抗原に反応した抗体の蛍光を検出する。サイトグラム上に展開し腫瘍細胞集団を判別、セルソーターで選択 (ゲーティング) 後に抗原特異性を解析する²⁾。基本的な健常人末梢血と骨髓中芽球の解析のためのサイトグラムを図 1 に示す³⁾。

2. 細胞の帰属

抗原は cluster of differentiation (CD) と表記される

A.



B.

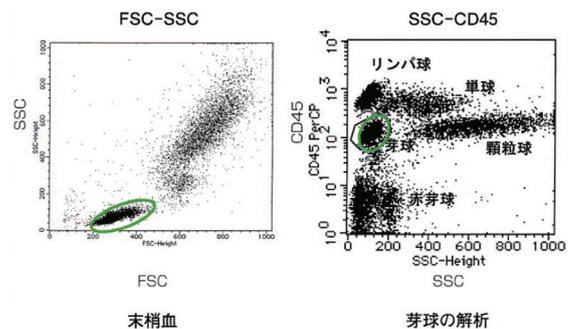


図 1 A. 末梢血 FSC-SSC スキャットグラム

B. 骨髓 SSC-CD45 スキャットグラムにおける芽球解析 (FSC : forward scatter SSC : side scatter)

が、造血細胞はまずCD45陽性細胞で振り分ける。CD45は、造血細胞に広く発現し血液細胞の同定に用いられる。免疫学的な表面抗原解析を行う時には正常造血細胞の発現を知っておく必要がある。例えば、T細胞はCD2, 3, 4, 5, 7, 8, TCR $\alpha\beta$, B細胞はCD19, 20, 21, HLA-DR, sIg, CD5, 形質細胞はCD19, 38, 138, NK細胞は2, 7, 16, 57, 8などが代表抗原である²⁾。

3. 異常細胞の同定

標準的な抗体パネルとして決まったものはないが、正

常細胞の発現を基準にして各施設で決定している。主に造血器腫瘍の解析に用いられる抗体を表1に示す³⁾。当院ではまだ全ての症例ではなく、緊急の診断を要する白血病、悪性リンパ腫の主にB細胞性のものに限定しているため抗体数は限られている。当院での抗体パネルを表2に示す。FITC, PE, PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, APC, APC-H7は蛍光色素を示している⁴⁾。異常細胞の特徴としては、たとえば免疫グロブリン軽鎖発現の偏りはB細胞のクロナリティの目安となる。また本来発現すべき抗原の欠失、強弱、逸脱、通常では発現しない表現型、例

表1 造血器腫瘍マーカー検査に用いるCD分類（文献3より改変）

	リンパ球系				骨髄系	
	T1/NK細胞系	B細胞系	顆粒球系	単球系	赤芽球系	巨核球系
汎系統	2 5 7	19 24	45 34 HLA-DR MPO	13 33		
系統特異	TcR 3	10 TdT	cdg cCD79	36 14	36	61 41 36
	cCD3	22 20				
分化・機能	1a 4 8	sIg 21 23	38 25		117	
	45RA 45RO	38 138	45RA 45RO	11b c 2 66c	15 64 65 4	235a 42a 42b 36
その他	21 25 122 16	5 11c 15 25	11b c 66c 56	56	11b	
	56 57 28 30 11b	28 56 103 30	203c			
		58 66c				

表2 当院の抗体パネル A. 白血病 B. 悪性リンパ腫

A.

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tube 1	HLA-DR	CD13	CD34	CD19	CD33	CD45
Tube 2	CD3	CD56	CD34	CD19	CD10	CD45
Tube 3	CD41a	Gly-A	CD34	CD16	CD117	CD45
Tube 4	CD14	CD64	CD34	CD16	CD11 c	CD45
Tube 5	CD5	CD7	CD20	CD19	CD10	CD45
Tube 6	CD3	CD8	CD4	CD19	CD25	CD45
Tube 7	TdT	MPO	cyCD79a		cyCD3	CD45

B.

	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tube 1	Kappa	Lambda	CD20	CD19	CD10	CD45
Tube 2	CD5	CD23	CD20	CD19	CD22	CD45
Tube 3	CD3	CD8	CD4	CD19	CD25	CD45
Tube 4	Sm Kappa	Sm Lambda		CD19		CD45
Tube 5	Sm-IgA	Sm-IgD	Sm-IgM	CD19	Sm-IgG	CD45

えば骨髄系とリンパ系の表現型が同時に発現している、などの異常な抗原発現を呈する集団の有無を判断する。

当院での解析例

2020年6月より開始し、2020年度は12例施行、2021年度は10月現在までで9例施行している。疾患は急性白血病が8例、悪性リンパ腫が8例、多発性骨髄腫2例、炎症性疾患3例である。診断目的は緊急の診断が多数を占める。

代表的症例

1. 急性骨髄単球性白血病

初診時 WBC 49690/ μ l と著増し末梢血中に芽球を26.8%、単球を60%認め、骨髄検体よりフローサイトメトリーを施行。結果を図2に示す。CD13、CD56、HLA-

DR 部分陽性、CD33、CD11c、CD64、CD117、MPO 陽性、CD34、CD41、CD14 陰性であり鏡検上診断と矛盾しないことを確認、急性骨髄単球性白血病と診断した。

2. Burkitt リンパ腫／白血病

初診時 WBC 30980/ μ l と著増し末梢血中に異常リンパ球を27.5%認めた。

骨髄検査にて鏡検上はリンパ芽球様であったが、フローサイトメトリーにてCD10、CD19、CD20、CD79a、HLA-DR 陽性、TdT、CD3、CD4、CD25 陰性であり成熟B細胞由来と診断しステロイド療法を開始した。後に FISH 法にて Myc-IgH 転座陽性であったため Burkitt lymphoma/leukemia と診断した。結果を図3に示す。

今後におけるフローサイトメトリーの応用と展望

以上のように当院ではまず緊急の診断が必要な症例を

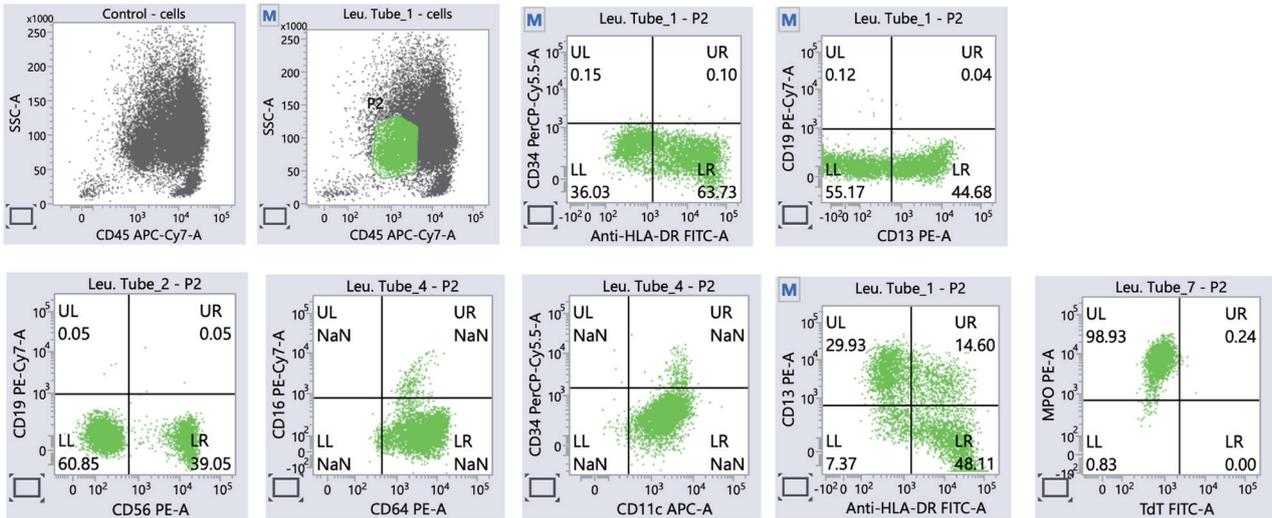


図2 急性骨髄単球性白血病

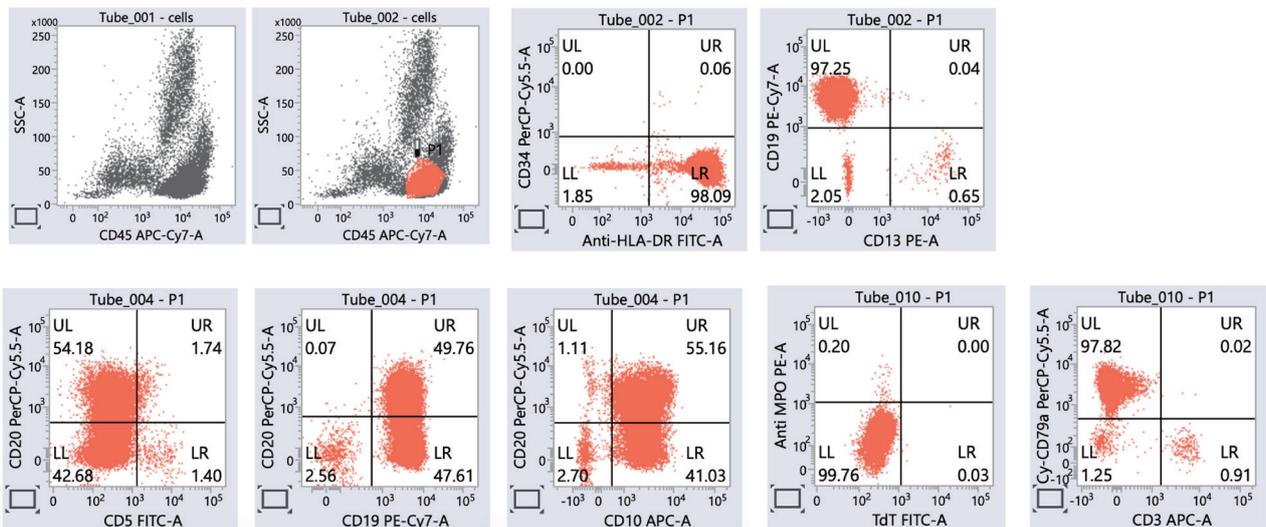


図3 Burkitt リンパ腫

中心に開始したが、現在白血病領域においては微小残存病変の同定が診断のみならず治療効果判定に大変重要となっている。血液学的寛解が得られたあと、微小残存病変と称する骨髓中に残存するごくわずかな白血病細胞、これを同定する方法の一つがフローサイトメトリーである。また、この微小残存病変同定は多発性骨髓腫においても極めて重要である。多発性骨髓腫では、近年多数の分子標的薬が登場し予後が改善し、慢性疾患のように捉えることが可能となってきたが、経過の中で長く安定した状態を維持するには、深い奏功状態をできるだけ長く継続する必要がある。その病態把握にフローサイトメトリーでの精査が大変有効となる⁵⁾。

当院においても今後初診時診断のみならず、血液疾患治療における寛解、再発の評価も含め院内検査数の拡大を目指していきたい。

引用文献

- 1) 日本リンパ網内系学会教育委員会：レベルアップのためのリンパ腫セミナー，南江堂，2014，p14-21.
- 2) 新津望編著：悪性リンパ腫診療スキルアップ，中外医学社，2012，p15-18.
- 3) 日本サイトメトリー技術者認定協議会編：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，2017，p7-97.
- 4) 室井一男，小沢敬也：フローサイトメトリーを用いた造血器腫瘍の診断，医薬ジャーナル社，2006，p9-44.
- 5) 松村 到：急性白血病診療テキスト，中外医学社，2020，p243-256.

Abstract

Initiation of a Flow Cytometry System for the Diagnosis of Hematological Malignancies

Yasuko Miyahara

Department of Hematology, Kyoto City Hospital

Masako Maeda and Noriko Murakami

Department of Clinical Laboratory, Kyoto City Hospital

Hiroyuki Ishida

Department of Pediatrics, Kyoto City Hospital

Mitsuru Itoh

Department of Hematology and Blood and Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Kyoto City Hospital

An attempt to diagnose hematological malignancies using a BD FACSLyric flow cytometry system was started in our departments of hematology and pediatrics. Cell analysis using this system substantially contributed to the prompt initiation of therapy of hematological malignancies. We would like to expand the indication of this system to not only diagnose but also to detect minimum residual disease in the near future.

(J Kyoto City Hosp 2021; 41:1-4)

Key words: Hematologic malignancies, Flow cytometry