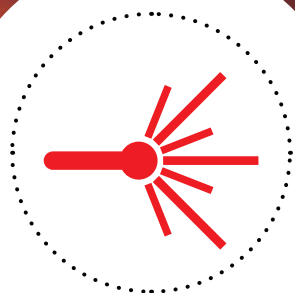


# フローサイト基礎の基礎

～ 今さら聞けないフローサイトメトリーの基礎～



**EVERY**  
*event matters.*

 **BECKMAN  
COULTER**  
*Life Sciences*



# フローサイト基礎の基礎 ～ 今さら聞けないフローサイトメトリーの基礎～

本資料は、2017年8月26日、「第7回関西FCMユーザー会 午前の部」内にて催されました、ベックマン・コールター株式会社 ライフサイエンス事業部 高野邦彦による講演の抜粋です。

## Introduction

本講演では、フローサイトメーターをこれから使っていただく方をお考えの方を対象に、「今さら聞けないフローサイトメトリーの基礎」と題し、基礎的な内容をお話しさせていただこうと思います。まずは、「フローサイトメトリーの特徴と原理」、続けて、ルーチン検査で使用される「サンプル処理」と「解析作業」。大きく分けてこの3つについてお話しいたします。

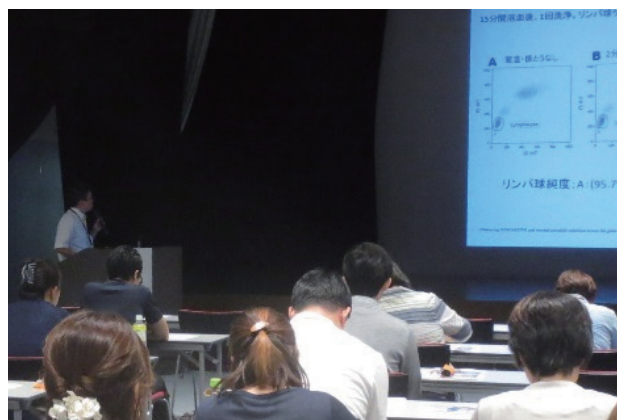
## フローサイトの特徴と原理

- フローサイトメトリーとは -

フローサイトメトリーとは、「フロー」と「サイトメトリー」からなっています。つまり「細胞を流して解析する技術」という造語です。フローサイトの機器であるフローサイトメーターは、レーザーを細胞などに当て、そこから出る光の強さをデータ化し、解析を行います。大きく分けると、**細胞などに当たったレーザーの散乱光の形態的特徴を得て、そして、あらかじめ蛍光物質で染めおいた細胞などを、その蛍光の強さから判断し、様々な抗原量やDNA量などの情報を得ます。**

血液検査分野では、血球計数機にて各細胞の比率などから算出を行っていきませんが、フローサイトメトリーは細胞の抗原など、様々な検索を行い、各細胞の性質を測定していきます。

主なアプリケーションとしては「リンパ球のサブセット」、「CD34陽性造血幹細胞数測定」、それから「造血器腫瘍の検索」などが、病院検査にて主に行われています(スライド1)。



スライド 1

フローサイトメトリーとは？

- "Flow" Cytometry=細胞を「流して」解析する技術
  - 光(レーザー)を当てた時に細胞から出る光の強さ(明るさ)をデータ化して統計的に解析
    - 散乱光: 形態的特徴(大きさや内部構造など)の情報を得る
    - 蛍光: 蛍光強度から抗原量やDNA量などの情報を得る
- 血液検査分野
  - 自動血球計数装置 ...各細胞の比率
  - FCM → 細胞表面(内部)の抗原検索 ...各細胞の性質、性格
    - リンパ球サブセット
    - CD34陽性造血幹細胞数測定
    - 造血器腫瘍抗原検索 (細胞系統や成熟段階の検索)
      - 白血病・リンパ腫等の診断や治療効果の判定

Delivering INNOVATIVE and trusted scientific solutions across the globe

**BECKMAN**  
Coulter Life Sciences

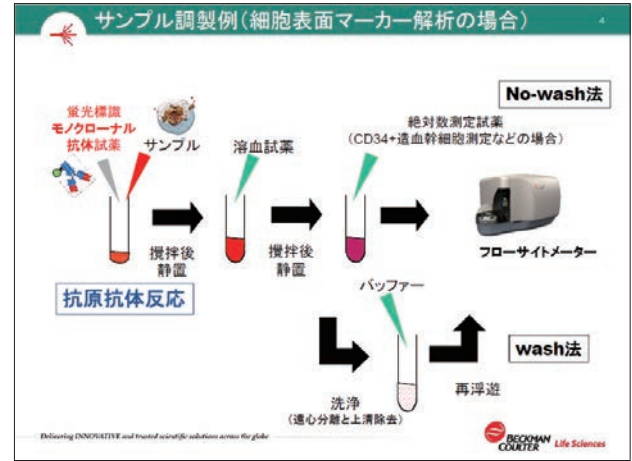
**- サンプル調製例 Wash法とNo-Wash法 -**

実際のサンプル調製を模式的に示したスライドです(スライド2)。蛍光標識されたモノクローナル抗体と細胞を含むサンプルを混ぜ、抗原抗体反応を行います。それから、赤血球が解析の時に邪魔になるため、溶血試薬で赤血球を壊します。一般的には、これを遠心洗浄し、PBSなどのバッファーで再浮遊して機械で測定します。このサンプル調製法は、サンプルを洗いますので、よく「Wash法」と呼ばれています。

これに対してHIV患者のCD4絶対数や、C34陽性造血幹細胞数測定など、絶対数の測定が重視される測定に関しては、遠心洗浄すると細胞濃度が変わってしまうため、溶血してそのまま機械で測ります。このサンプル調製法は、「No-wash法」と呼ばれています。サンプル調製法は、この2つに大別することができます。

「No-Wash法」の方が簡便なため、こちらの方法で全サンプルの調製が行えればいいのですが、「No-Wash法」の場合、細胞に反応しなかった蛍光物質がついている抗体がサンプル液中に多く残り、このようなサンプルにレーザーを当てると、バックグラウンドが上がってしまいます。そのため、「No-wash法」は、陰性、陽性が非常にはっきりしていて、多少バックグラウンド

が上がっても陽性細胞を明確に捕らえられる測定抗原に関して使います。しかし、非常に弱い抗原発現を見る必要がある場合、例えば、白血病などではバックグラウンドが上がると偽陰性化してしまいます。その場合は、「Wash法」が主流になります。このように、「Wash法」と「No-wash法」は、使い分けられています(スライド2)。

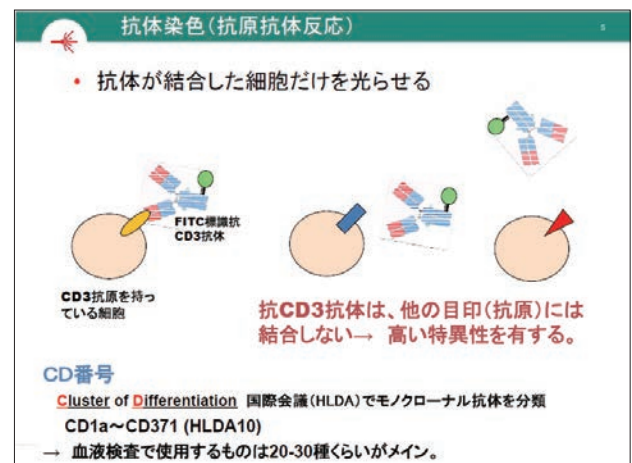


スライド 2

**- 抗原抗体反応 -**

抗体は、非常に高い特異性を持っているのが1つの特徴です。例えば、CD3を持っている細胞には、CD3に対する抗体が特異的に結合し、それ以外の抗原には結合しません。検査で使用する蛍光標識抗体は、抗体が結合した細胞を蛍光物質で光らせることで、検出が可能となります。

主な抗体には、CD番号という識別番号が割り振られています。cluster of differentiationの略でCDと言われています。大体、4年に一度HLDAという会議でこのCDが決められ、前回のオーストラリア第10回では、CD371まで決まっています。「371個も覚えなきゃいけないのか」と思われる方もおられるかと思いますが、実際には、血液検査で使用している抗体は、20種類程度です。もう少し詳細な検査を行う場合でも30種類程度ですので、この中でよく使うものだけ、こういった特性を持っているのかだけ覚えていただければと思います(スライド3)。



スライド 3

**- ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体 -**

検査に用いる抗体は、大きく分けると2種類あります。1つは特定の抗原をもとに動物を免疫し、そこからできた血清で作った「ポリクローナル抗体」です。細胞表面上の抗原には、抗体が結合できるエピトープと呼ばれるアミノ酸配列が複数あります(スライド4では、丸、四角、三角で表示)。**ポリクローナル抗体は、これらのエピトープにそれぞれに結合しうる抗体が、ある意味、ミックスされたものです。**

それに対して、「モノクローナル抗体」は、**単一の抗体産生細胞から作られており、同じ抗原のエピトープにしか結合しません。**スライド4の例では、丸であれば丸だけに結合し、四角や三角のエピトープには結合しません。

ポリクローナル抗体もモノクローナル抗体も同じ抗原を認識しますが、そのエピトープを複数見るか、あるいは1つだけしか見ないかといった違いがあります。今は、特異性の高さから、モノクローナル抗体が主に使われています(スライド4)。

ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体

- 特定の抗原だけに結合する性質

<試薬としての抗体には2種類ある>

- **ポリクローナル抗体(免疫した動物の血清から精製)**  
→ 複数のエピトープに対する抗体の混合物
- **モノクローナル抗体(単一の抗体産生細胞に由来)**  
→ 一つのエピトープに対する抗体

抗原は複数のエピトープ(抗原決定基)を持つ

BECKMAN COULTER Life Sciences

スライド 4

**- 直接法と間接法 -**

表面抗原を調べる時の抗体の使い方も、大きく分けると2つに分かれます。スライド5の上段は「**直接法**」と呼ばれている方法です。**抗原を持った細胞に、蛍光が標識された抗体を結合させ、直接染めること**により、陽性細胞がどれぐらいあるかが分かります。

下段は、「**間接法**」と呼ばれている方法です。幾つか染色手順はありますが、この例では、**細胞に対して蛍光物質の付着していない一次抗体を反応させます。その後二次抗体として、蛍光物質の付着した抗体を用いて一次抗体に反応させます。**一次抗体に複数の二次抗体が付着するので蛍光が明るく光りますが、抗原抗体反応を2回繰り返すこともあり、やや非特異反応が多い傾向にあります。

現在は、どちらかといえば、直接法の方が主流として使われています。間接法には、抗体同士でなく、streptavidinとかビオチンを使った系もあります。抗原を間接的に見るか、直接的に見るかということで、抗体の使い方が分かります(スライド5)。

表面抗原の調べ方は? ... 直接法と間接法

直接法 ☺

間接法

BECKMAN COULTER Life Sciences

スライド 5

**- フローサイトメーター原理 ~ 散乱光と蛍光 ~ -**

スライド2のように蛍光標識抗体で染めた細胞は、フローサイトメーターにより、大きく分けると散乱光と蛍光が測定されます。フローセルと呼ばれる部分に細胞が流れてきて、そこにレーザーが照射されます。細胞にレーザーが当たり、その**前方方向(レーザーの直進方向)に散乱する光が、前方散乱光(Forward Scatter)**、あるいはFSと呼ばれているもので、**細胞の大きさを反映しています。**

細胞の中の顆粒などにこのレーザーが当たって反射したものは側方で検出されるため、側方散乱光(Side Scatter)あるいはSSと呼ばれています。**側方散乱光(SS)は、何かにぶつかって反射している光ですから、「顆粒が多い」とか「細胞の複雑さ」といったものを反映しています(スライド6)。**

どのような光成分を測定しているか (散乱光 & 蛍光)

前方散乱光: 細胞の大きさを反映  
側方散乱光: 細胞の複雑さを反映

散乱光 & 蛍光

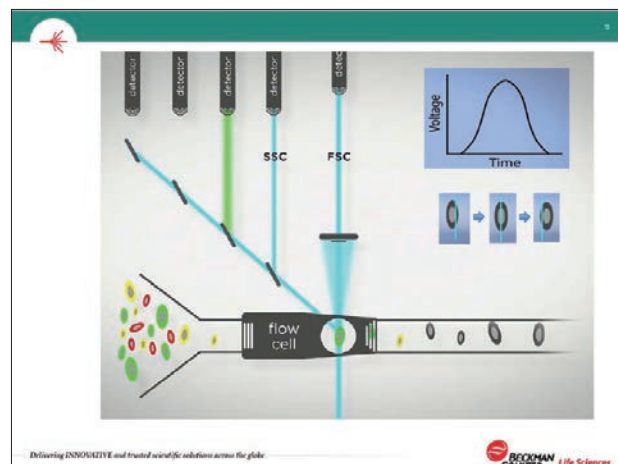
側方散乱光(SS) Side Scatter  
前方散乱光(FS) Forward Scatter  
レーザー光  
Flow Cell

蛍光:  
光源(レーザー光) = 青(488nm)の場合  
FL1(525nm) = 緑(FITC など)  
FL2(575nm) = 黄~橙(PE など)  
FL3(620nm) = 橙~赤(ECD など)  
FL4(675nm) = 濃赤(PC5 など)  
FL5(755nm) = 赤外(PC7 など)

BECKMAN COULTER Life Sciences

スライド 6

現在、多くの検査室では、シングルカラーではなく、3カラー、6カラーなどのマルチカラー法を行っていると思います。マルチカラー法の場合、フローセル内を細胞が通過するたび、細胞1つ1つについて前方散乱光と側方散乱光、そして、細胞を染め分けた蛍光色素、例えばFITCの緑、PEの黄色、PC5の赤などの蛍光が出ます。蛍光は、光学フィルターによって、例えば緑のFITCはFL1の検出器に導かれます。このように、光学フィルターによって、各検出器に一定の波長の蛍光だけが入るようにします。細胞がレーザーの中を通過する際の信号の強さは、スライド7の右上の図のような形になります。一般的には、この面積(時間 vs 強度)で蛍光の強さをデータとして取ります。これ以外に、高さ、幅などのデータを取ることも可能です(スライド7)。

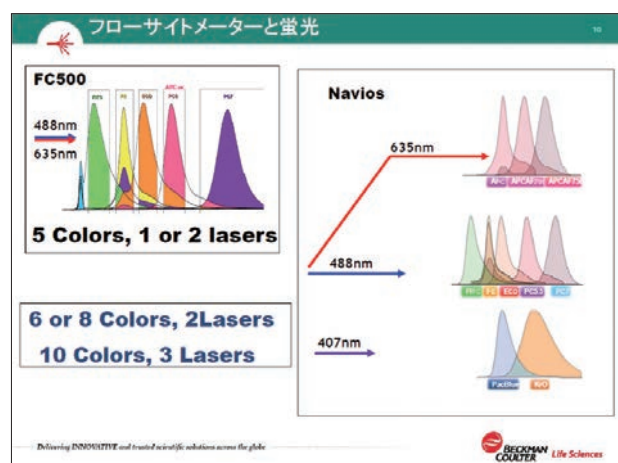


スライド 7

### - フローサイトメーターと蛍光 -

「どのような蛍光が測れるか」は、フローサイトメーターの機種によって変わってきます。ベックマン・コールター社のFC500とNaviosの場合では、FC500は、青レーザー 1本、またはオプションで赤レーザーを積むことができます。しかしFC500の検出器は、どちらの場合でも5つです。つまり、1レーザーでも2レーザーでも5カラーです。レーザー数の違いは、蛍光色素として、青レーザーで光るPC5を使うか、あるいは赤レーザーを使うAPCを使うかの違いです。それに対してNaviosは、2レーザーの6または8カラーモデル、そして、3レーザーの10カラーモデルがあります。6と8カラーでは、青と赤のレーザーが必ず搭載されており、6カラーモデルは青で5色、赤で1色となります。8カラーモデルでは、赤で更に2色足され8カラーとなります。10カラーモデルでは、バイオレットのレーザーも搭載され、ここで2色検出でき、全部合わせて10カラーという形になります。

どのような蛍光がいくつ測れるのかも、フローサイトメーターの機種によって変わってきます(スライド8)



スライド 8

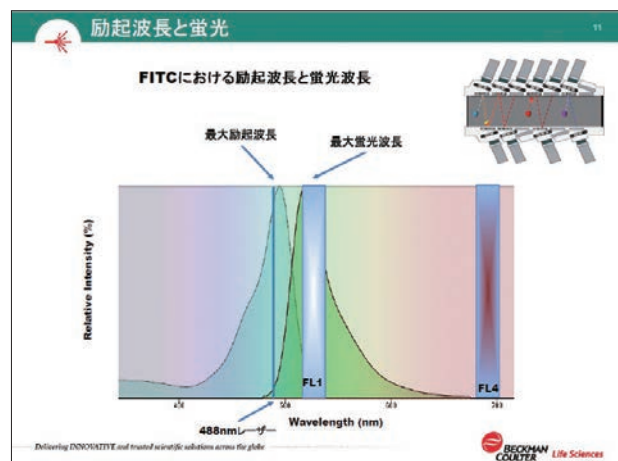
### - 励起波長と蛍光 -

フローサイトメーターの蛍光の測定では、「励起波長」、「蛍光波長」、「最大励起波長」などの言葉が出てきます。スライド9に示す波長図は、FITCの励起波長と、蛍光波長の図になります。蛍光物質には、エネルギーを吸収する励起波長帯(スライド9左波長)と、エネルギーを吸収した後、発する蛍光の蛍光波長帯(スライド9右波長)の2つがあります。励起波長帯の一番高いところを「最大励起波長」、蛍光波長帯の一番高いところを「最大蛍光波長」といいます。

スライド9の例では、488 nmレーザーはFITCが吸収できる励起波長帯の最大励起波長付近となり、FITCは効率よく青レーザーのエネルギーを吸収して、励起波長よりも少し波長の長い蛍光を出します。

一般的に蛍光波長を表現する場合、一番強いところの値を表示します。蛍光波長自体には幅があるので、蛍光のピークの辺りで検出をします。この例では、FL1という検出器が一番効率よくこの蛍光を検出します。一方、PC5の蛍光を検出するFL4のところ

には、FITCの蛍光はほとんど出ていないため、ここで検出するのは効率が悪い、あるいは、検出ができないということになります。このように、蛍光色素は、どの波長のレーザーで光り、どの検出器で検出できるかが決まっています(スライド9)。



スライド 9

一般的にスライド10のような表を用いて、どの波長の蛍光物質が使用できるかを確認します。この表は、蛍光色素がどのような蛍光波長のピークを持ち、その蛍光の波長付近を効率よく検出できる検出器との関係を示した表になります。

例えば、青色レーザーの場合は、FITCは525 nm 辺りにピークがあり、その付近の一定の蛍光だけを取り込むのは、FL1ということになります。PEはFL2、PC5、PC5.5はFL4、PC7はFL5となります(スライド10)。

Naviosの蛍光検出器と蛍光色素(1)

488nmレーザー(青色)

検出器	波長	色素
FL1	525nm BP	FITC/GFP
FL2	575nm BP	PE
FL3	620nm BP	ECD/PI
FL4	695nm BP	PC5/PC5.5 /7-AAD
FL5	755nm LP	PC7

Delivering INNOVATIVE and trusted scientific solutions across the globe

BECKMAN COUNTER Life Sciences

スライド 10

同じように赤レーザー、バイオレットレーザーの表は、スライド11です。どの色素をどの検出器で検出するかは、検出器と適合する蛍光色素の表を見ていただくと分かりやすいと思います。

Naviosの蛍光検出器と蛍光色素(2)

638nmレーザー(赤色)

検出器	波長	色素
FL6	660nm BP	APC
FL7	725nm BP	APC-Alexa Fluor700
FL8	755nm LP	APC-Alexa Fluor750

405nmレーザー(紫色)

検出器	波長	色素
FL9	450nm BP	Pacific Blue/DAPI
FL10	550nm BP	Cascade Yellow Krome Orange

Delivering INNOVATIVE and trusted scientific solutions across the globe

BECKMAN COUNTER Life Sciences

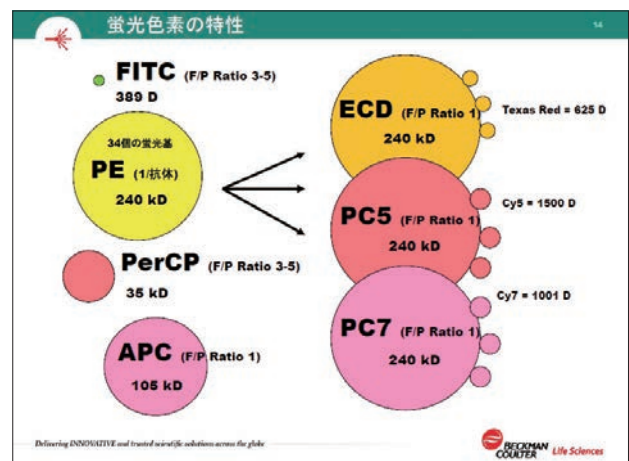
スライド 11

### - 蛍光色素の特性 -

蛍光色素には、それぞれ特性があります。FITCは一般的な蛍光色素で、分子量は389D(ダルトン)の非常に小さな分子です。一つの抗体には、3~5個のFITCが付きます。もう一つの一般的な蛍光色素のPEは、240kD(キロダルトン)です。FITCに比較し、非常に大きなタンパクとなり、この中に34個の蛍光を発する蛍光基(発色団)があります。PEは大きなタンパクであるため、抗体には1個しか付きませんが、FITCに比べ、より明るく光ることができます。これだけで蛍光の明るさが決まる訳ではありませんが、例えば、FITCが3個結合した抗体に対して、PEが1個ついた抗体は10倍程度の強い光を発します(スライド12左)。

ベックマン・コールター社の製品でECD、PC5、PC7と呼ばれる蛍光色素があります。これらの蛍光色素は、**ドナーとしてPEを用い、そこにECDではTexas Red、PC5ではCy5、PC7ではCy7というアクセプターとなる蛍光物質を結合します**。本来、Texas Red、Cy5、Cy7は、青レーザーでは光らない蛍光物質ですが、ドナーとなるPEにレーザーが当た

り、そのエネルギーが蛍光として外に出る前にアクセプターの蛍光色素に取り込まれて、アクセプターが励起され、より長い波長の蛍光を出します。これらは、**タンデム色素と呼ばれています**。タンデム色素は、本来ならば、青色レーザーで使えなかった蛍光波長を使用できるようにした技術です(スライド12右)。



スライド 12

### - 蛍光色素の比較 -

蛍光物質はその大きさや構造も違うため、蛍光物質によって蛍光の強さ、明るさが異なります。スライド13は、同一クローンのCD8抗体に結合している蛍光物質だけを変えた結果です。青レーザーで光る蛍光物質(スライド13上段)、赤レーザーで光る蛍光物質(スライド13中段)、バイオレットレーザーで光る蛍光物質(スライド13下段)です。

CD8のサイトキニックT細胞がよく出るピークの高いところを見ると、FITCに比較して、PEはより高いところに出ています。ECDはFITCとほぼ変わらない程度、PC7も高いところに出ています。APCなども蛍光が高いところにあります。バイオレットレーザーで励起されるPacific Blue(パシフィックブルー)、Krome Orange(クロムオレンジ)というのは、ほかの蛍光色素への漏れ込みが少なく非常に使いやすいのですが、蛍光強度が弱めの特徴があります。

このように、**同じ抗体でも蛍光色素を変えると、出てくるヒストグラム**

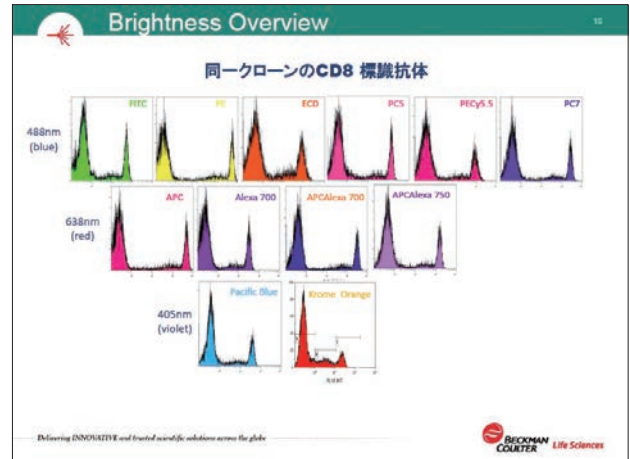
スライド14では、スライド13の結果を、視覚的に分かりやすいよう機種別に表にしています。**FITCに比べて、PEは、何倍も強く光っています。PC7、APCもかなり明るい蛍光物質であることが、見て取れます(スライド14)。**

### - 蛍光色素の選択 -

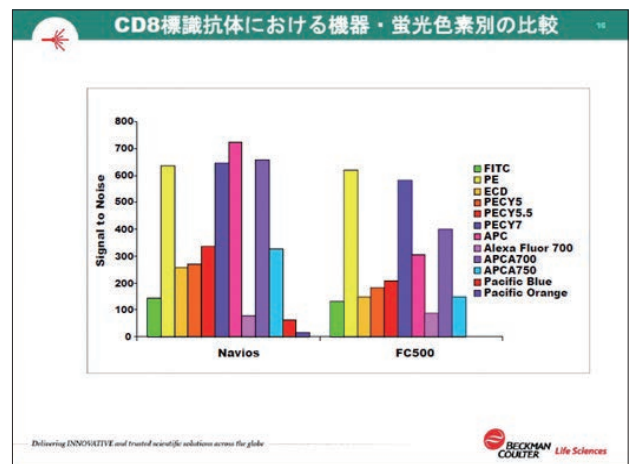
蛍光物質や抗原の違いが、実際の検査で、どのように影響するかを示したスライドです。スライド15の上段がCD25、下段がCD20です。どちらも、同じクローンの抗体で、蛍光色素をそれぞれ非常に明るいPE、それから中間のFITC、暗めのパシフィックブルーに変えてあります。

下の段のCD20は、成熟B細胞のマーカーでB細胞の表面上に非常に高密度に発現します。CD20では、蛍光色素によって、若干20陽性のピーク位置は変わりますが、CD20の発現が非常にはっきりとしているので、どの蛍光色素を使っても陽性率には、ほぼ影響がありません。それに対して、非常に低密度に発現しているIL2レセプターの**CD25では、明るいPEの蛍光色素の場合だと、陰性のピークとCD25陽性のピークが、近いながら2つ見えます。**しかし、FITCでは、そのピークが分かりにくくなり、陽性率も少し下がります。**この弱いIL2R(CD25)の発現に対して、暗い蛍光物質のPacific Blue(パシフィックブルー)を使用すると、ほとんど検出ができなくなります。**このように、抗原の発現と蛍光色素の関係を鑑みてパネルを作ります。その場合、まず、発現が少ない抗原に明るい蛍光色素を割り当て

のピークの位置、つまり蛍光の強さは変わってきます(スライド13)。

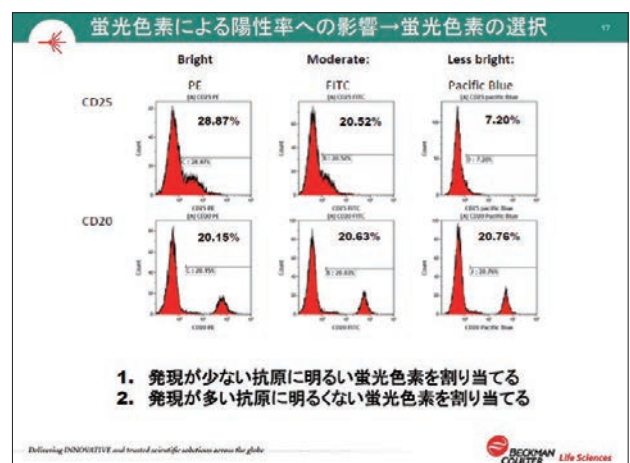


スライド 13



スライド 14

ます。そうしないと偽陰性化する恐れがあります。パネル全体を明るい色素で作成するのはなかなか難しいので、発現の多い抗原に対する抗体は、蛍光色素の影響が少ないため、明るくない蛍光色素を割り当てます。一般的に、このようなルールで蛍光色素を割り当て、パネルの組み合わせを考えていきます(スライド15)。



スライド 15

## ■ サンプル処理

### - 検査材料と抗凝固剤 -

スライド16は、検体の種類と抗凝固剤の関係を示しています。一番上は、基本的な末梢血で、抗凝固剤としてEDTAやヘパリン、ACDがあり、一応、検査にはどの凝固剤も使えます。その下には、骨髓(マルク)があり、こちらも末梢血と同じように、いろんな種類の抗凝固剤が使えます。**骨髓液の場合、保存性を上げるため、ヘパリンやFCSを加えたRPMI1640といった培養液を使うこともあります。**

注意が必要なのは、ここで採取した同じサンプルで染色体検査もやりたいという場合には、EDTAによる染色体の分裂阻害を避けるため、一般的にはヘパリンを使います。また、PCRを使った検査に回したいという場合には、ヘパリンがPCR反応を阻害しますので、EDTA採血したものを共通で使うことになります。それから、リンパ節や体腔液は、末梢血の混入がない限りは、抗凝固剤を使わなくても大丈夫だと言われています。ただ、腹水、胸水、特に胸水は、抗凝固剤を入れないとフィブリンが出て、固

まったような状態になってしまうので、ヘパリンなどを入れる必要があります(スライド16)。

検査材料と抗凝固剤		
検体	抗凝固剤	備考
末梢血	EDTA ヘパリン ACD	細胞内サイトカイン等、細胞機能解析ではヘパリン使用。
骨髓液	EDTA ヘパリン ヘパリン培養液 (RPMI1640) ACD	同時に染色体分析 → ヘパリン (※EDTA) 同時にPCR → EDTA (※ヘパリン)
リンパ節	-	死細胞が増加するので、できるだけすみやかに測定。培養液(RPMI1640)等も使用。
体腔液 腹水、胸水	ヘパリン	胸水は特に凝固しやすい。
脳脊髄液	-	末梢血の多量混入以外は抗凝固剤は不要。細胞変性が起こる為、できるだけすみやかに測定。
気管支肺胞洗浄液	-	末梢血の多量混入以外は抗凝固剤は不要。

スライド 16

### - 検体処理(末梢血) -

抗凝固剤を入れたサンプルを採り、その後、抗体による抗原抗体反応を行う染色操作をします。

スライド17の左上がフローサイト用の12×75ミリ程度がよく使われるチューブです。この底に抗体と細胞を含むサンプルを入れます。この際に、「**チューブの底に入れる**」ことが重要です。この後、ボルテックスなどで混和しますが、一般的に添加する抗体20 μLに検体100 μLを入れた場合、図(上段左中央)の青色括弧にて示したラインまでしか検体が上がってきません。つまり、これより上の壁面に抗体やサンプルが付着していると、それらは混和されないで、反応ができない状態になってしまいます。そのため、チューブの底に確実に抗体とサンプルを入れる必要があります。

抗原抗体反応後に、溶血剤を添加して赤血球を壊します。溶血剤を入れた後にボルテックスを行います。溶血剤は、1 mLまたは2 mLといった量なので、基本的には、何らかの蓋をした方が、ボルテックスの際、こぼすリスクを防げると思います。しかし、ボルテックスの際に、しっかり指で保持すると、このボルテックスは渦巻き状の回転なので、保持した点を支点として回転し、しっかりと持った場合には保持した点より上には上がってきません(上段右)。基本的には、しっかりと、図(上段右)の位置を持っていれば、溶液が外に出てくることはありませんが、慣れないうちはパラフィルムなどで蓋をすると安心です。

溶血のところでは必ず行っていただきたいのが、**目視による確認**です。下段左図は溶血剤を添加した直後です。赤血球がまだ溶血されていませので、非常に濁った色をしています。溶血が進んでくると、赤血球が溶血されて壊れていき、**透明感が上が**

**てくることをチェック**します。この目視チェックをせずに、その後の作業を行い、フローサイトメーターで測った際に「何かおかしい」と気付くことがあるので、ここで、ぜひ目視での確認をお勧めします。目視確認することで、「**気付き**」がある場合があります。例えば、「蒸留水で10倍希釈しなければならない塩化アンモニウム系の溶血剤を原液で入れてしまった」などです。溶血剤の濃度が濃いので、溶血しそうな気がするのですが、実際は、溶血はほとんどしません。「しまった、希釈するのを忘れたな」といったように、早めに原因に気付けるかと思えますので、このタイミングで目視にて確認していただきたいと思います。溶血後、PBSなどでメスアップして、遠心・洗浄し、上清をアスピレーション後、PBSで再浮遊して機械にかけるとというのが基本的な流れになります(スライド17)。



スライド 17



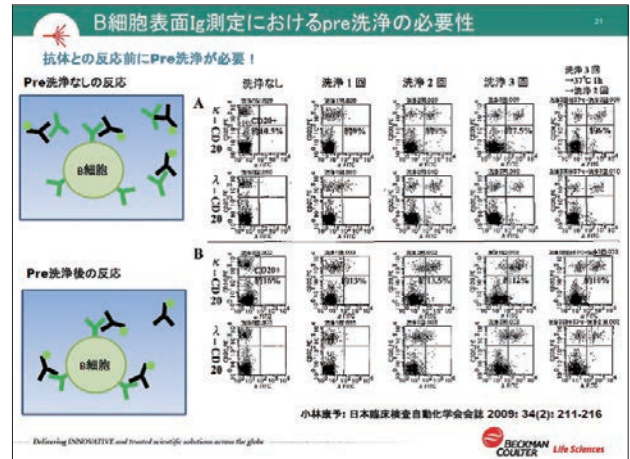
**- B細胞表面Ig測定におけるpre洗浄の必要性 -**

通常、スライド17の方法でサンプル処理ができますが、B細胞表面のイムノグロブリン測定では、事前に洗浄(プレ洗浄)が必要になります。B細胞表面Ig測定ではB細胞内で作られ発現してきたB細胞の表面イムノグロブリンを測定します。しかし、血漿中にもイムノグロブリンは多量に含まれているため、血漿がある状態でサンプルを処理してしまうと、検査用の抗体が血漿中のイムノグロブリンにも結合し、細胞表面のイムノグロブリンに付く量が不足してしまいます。抗体反応の前に、血漿中のイムノグロブリンをプレ洗浄で取り除けば、十分量の抗体でB細胞表面Igの検査ができます。

スライド18は、文献からの例ですが、縦軸がB細胞のマーカーのCD20、横軸にイムノグロブリン・ライトチェーンのκ(カッパー)とλ(ラムダ)です。洗浄なしだとκ、λが反応していないことが分かります。洗浄の回数を、1回、2回、3回と増やしていくと、2回ほどでほぼ検出できてきます。更に、**3回洗浄**を行うとκ、λが、CD20陽性のところで明確に陰性・陽性が分かります(右2例目)。検体にもよりますが、1回洗浄だけで3回洗浄のようにきれいに検出できる場合もあり、また、イムノグロブリンが血漿中

に多量に含まれる場合、3回ほど洗浄しないとならない場合もあります。

**B細胞の表面のイムノグロブリンを測る時には、必ずプレ洗浄をしてから、抗体反応・溶血の操作をしていただく必要があります(スライド18)。**



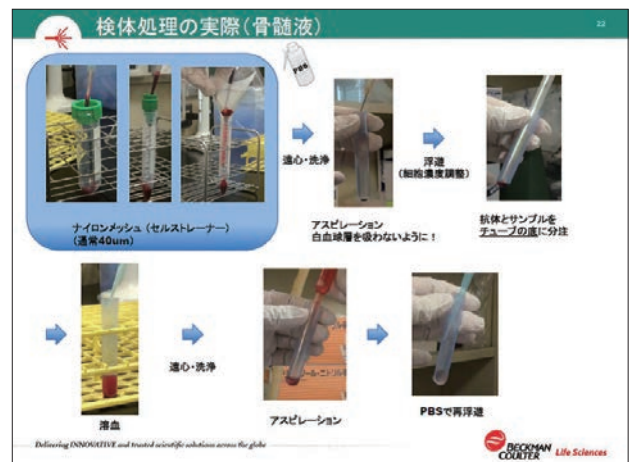
スライド 18

**- 検体処理(骨髓液) -**

骨髓液(マルク)の検体処理方法です。骨髓液は中に脂肪の塊があったり、脂が浮いていたりします。前処理として、通常は**40 μm程度の粗さのナイロンメッシュで、検体をろ過します。**

ナイロンメッシュを折り畳んで漏斗状にしたものや、各サイズのチューブに合ったセルストレーナーと呼ばれるメッシュが張ってあるもの(青枠内)で、骨髓液を1回通し、ろ過して、脂肪の塊などを取ります。その後、PBSなどを上からかけることで、メッシュについていたマルクも全部チューブ内に落とすことができます。次いで、遠心洗浄し、上清をアスピレータで吸います。アスピレーションせずに、デカントで上清を除去すると、白血球がなくなります。これは、赤血球の上に白血球層があり、デカンテーションで上清除去を行ってしまうと、白血球が全部流れていってしまうためなので、先にアスピレーションで除去しておきます。アスピレーションは、赤血球の上に白血球層があるので、あまりぎりぎりまで吸引すると白血球まで吸ってしまうこともあり、少し余裕を持ったところで吸引を終わりにします(上段中)。

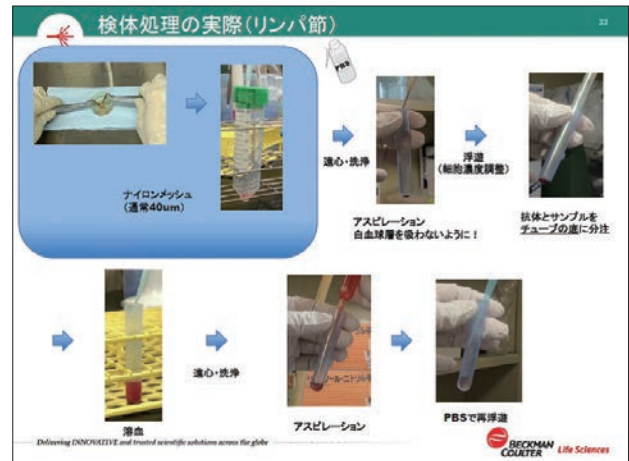
その後、再浮遊したもので細胞濃度を調整していくのが良い方法でしょう。その後に行うサンプル処理では、末梢血と同じように、抗体反応・溶血し、機械にかけます(スライド19)。



スライド 19

- 検体処理(リンパ節) -

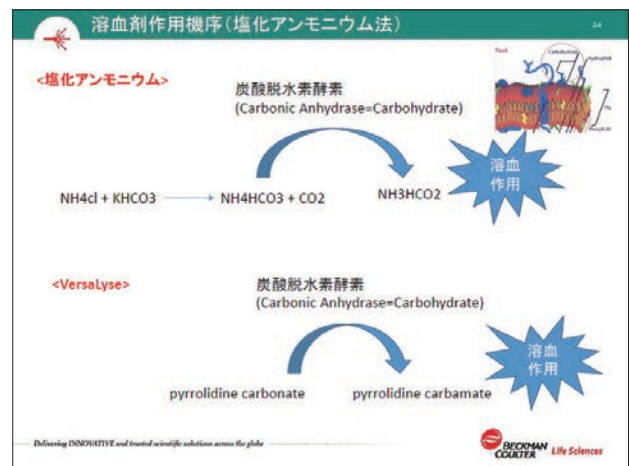
スライド20は、リンパ節の例です。リンパ節は組織ですが、リンパ球の塊なので、溶液中で物理的にほぐすと、簡単にリンパ球を取り出せます。この溶液には、組織の塊等がまだ残っていますので、このまま機械にかけると詰まってしまう。骨髄液と同じように40 μmのメッシュを通します。その後は、マルクの時と同じように洗浄し、抗体反応、溶血、遠心洗浄して、機械にかけます(スライド20)。



スライド 20

- 溶血作用機序(塩化アンモニウム) -

スライド17、検体処理(末梢血)の溶血のところ、希釈すべき塩化アンモニウム溶血剤が濃い状態(原液)だと、溶血が進まないという話をさせていただきました。塩化アンモニウムの溶血剤として自家調製や市販のもの、また、化学物質は違いますが、VersaLyseなどは同じような仕組みで溶血作用を示します。塩化アンモニウムの溶血剤は、塩化アンモニウムと炭酸水素カリウム、EDTAから作りますが、これら自体には溶血作用はありません。この溶血剤は、二酸化炭素などを使い、赤血球の表面にある炭酸脱水素酵素によって溶血作用のある物質に変わります。これが赤血球の表面で行われるので、赤血球を壊すこととなります。白血球では、この作用は起きません。そのため、塩化アンモニウムの溶血剤は、白血球をあまり刺激しません(スライド21)。



スライド 21

VersaLyseは、塩化アンモニウムではありませんが、同じように炭酸脱水素酵素で溶血作用のある物質に変わる機構で作用します。VersaLyseは、塩化アンモニウムとは異なり、アンモニアを発生させないことで、より細胞に対するストレスが少なくなります。

スライド22は、VersaLyseで「15分間溶血、1回洗浄」で測った健康人末梢血の例です。Aは、最初にボルテックスで末梢血とVersaLyseを混ぜて、その後、室温で15分放置したものです。この時のリンパ球ゲート中のリンパ球純度は96%ぐらいです。これに対し、Bは、2分ごとにボルテックスでしっかりと混ぜた場合です。ボルテックスすることで、せっかく赤血球の表面にあった溶血作用を持った物質が離れてしまい、赤血球が溶血不良となっています。その結果、リンパ球の純度は80%に落ちてしまっています。また、Cは、冷蔵庫からVersaLyseを出してきて、そのまま使った例です。VersaLyseは酵素反応で溶血を行っていますので、冷たい溶血剤では、赤血球の溶血不良が起き、リンパ球の純度が81%となります。これはVersaLyseの例ですが、塩化アンモニウムの溶血剤だと、もっと溶血が悪い状況に

### - 洗浄操作の遠心条件 -

「遠心洗浄の際の遠心条件は、どういったものがいいのか」というご質問もよくいただきます。最適な遠心条件の値は、アプリケーションにより若干変わってきます。1つの例として、リンパ球サブセットの遠心条件をJCCLSのガイドラインから紹介します。

スライド23の表1で、「溶血後、遠心洗浄せず、できるだけ生体内に近いような状態」と、「遠心洗浄2回行ったもの」を比べると、有意な差をもってT細胞が増えて、B細胞が減っています。遠心洗浄した場合のB細胞は、どちらかという、少しロスされ減ってくる傾向があります。表2は、できるだけロスを増やさないための遠心条件を示しています。「溶血のみ行い遠心洗浄を行わなかった場合」と、「362 × g 5分を2回」、「416 × g 5分を2回」、「473 × g 5分を2回」の比較をしています。「362 × g 5分」の場合、有意差をもってB細胞が減っていますが、「416 × g」以上の遠心ですと、特に有意差がない結果です。このことから、**遠心は416 × g程度はかけた方が、B細胞の口**

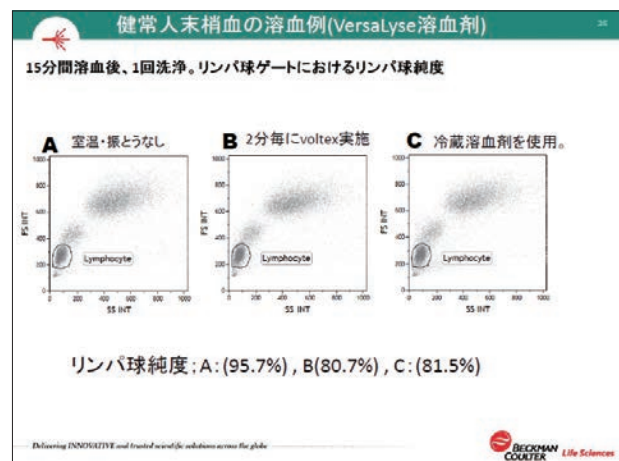
### - 細胞内抗原検索 -

このサンプル処理で最後にご説明することは、細胞内抗原の検索についてです。細胞表面と同時に細胞内の抗原の両方を見たい場合、一般的には、細胞表面を抗体で染めて、それから遠心洗浄し、その抗体を取り除きます。次いで、固定・膜透過処理をして、細胞内抗原を抗体で染色し、遠心洗浄して測定するのが、一般的な流れです(スライド24右)。

基本的には、サンプルは生きた細胞なので、**生きた細胞の細胞膜は抗体を通過しません**。そのため、抗体が結合できるのは細

なります。

**塩化アンモニウムやVersaLyseのような溶血に酵素を使った反応では、最初にしっかりと混ぜた後、15から20分間ほどそのまま触れずに置いておく方が、溶血はよりうまく進みます。**溶血操作の際にはご注意ください(スライド22)。



スライド 22

**スガが少ない結果となります。**わずかな差ではありますが、遠心条件で有意差が出ています。遠心力に対する回転数は、遠心機の径で変わりますので、使われている遠心機で確認してください(スライド23)。



スライド 23

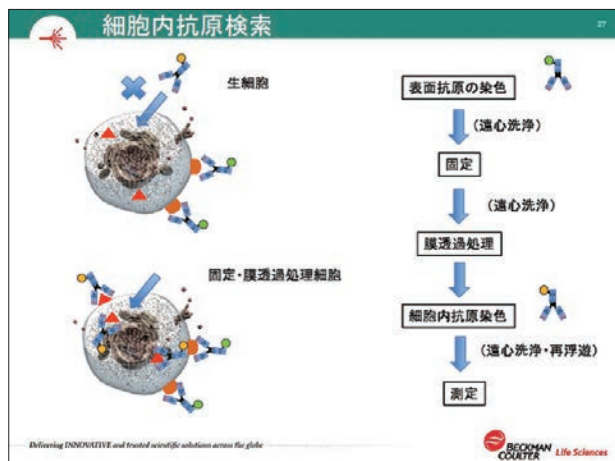
胞表面にある抗原だけです。この**細胞を固定・膜透過処理すると、細胞膜の透過性が上がり、抗体が細胞の中に入れるようになります。**

この染色方法で、1つだけ気をつけたいのが、「細胞内で測りたい抗原と同じものが細胞表面にあった場合」です。固定・膜透過処理で細胞膜が透過されていますが、細胞表面にある抗原を壊したり、ブロッキングしたりしているわけではないので、細胞表面に細胞内と同じ抗原がある場合には、細胞表面にも細胞

内用の抗体は結合します。一例としては、CD3は、成熟T細胞の細胞表面と細胞内の両方にあります。細胞表面を染めずに固定・膜透過処理し、細胞内用ということでCD3抗体を反応させてしまうと、細胞内が染まっているか、細胞外が染まっているかが分からなくなってしまいます。

病理の場合、免疫組織化学で形態的に見て、「膜が染まっている」、「中が染まっている」などが分かります。フローサイトの場合は、細胞の表面の染色では出なかったが、固定・透過処理して細胞内染色では出るとなれば、細胞内の抗原であろうと推測できます。

細胞膜透過後に抗体染色した場合、抗体が細胞内だけではなく、「細胞表面と細胞内の両方」、あるいは「細胞表面」だけ染めているということがあり得ますので、この点を、ご注意くださいいただければと思います(スライド24)。



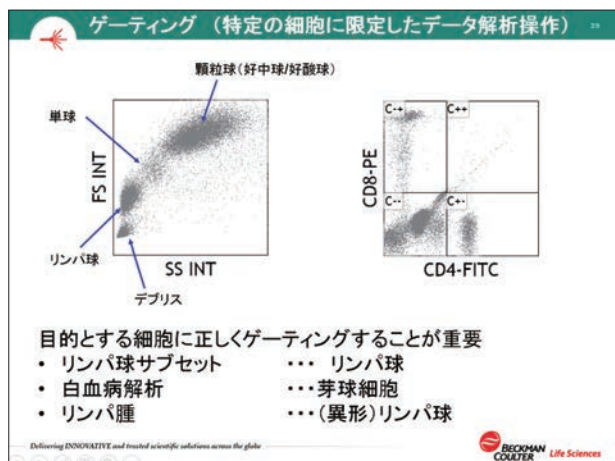
スライド 24

## ■ 解析作業

### - ゲーティング -

一般的な解析作業と、リンパ球のサブセット、それから造血器腫瘍の解析についてお話しさせていただこうと思います。

まず解析のところで重要なのは、「**ゲーティング**」です。スライド25の左図は、リンパ球、単球、顆粒球のプロットです。Y軸が大きさを表す前方散乱光(FS)、X軸が複雑さを表す側方散乱光(SS)のプロットです。スライド25のゲートがかかっていない状態で、ヘルパー T細胞マーカーのCD4とサイトキニンT細胞マーカーのCD8を測定すると、スライド25右図(CD4vsCD8図)のような形になります。細胞集団全体のCD4とCD8のプロット図において、「単球はCD4を弱く発現」、「顆粒球は顆粒の中にある酵素2種類ぐらいが青色のレーザーに反応して、FITCからPEぐらいの幅広い波長の自家蛍光を発生し、ネガティブ部分の高めのところ」などと考えることはできますが、細胞を分別して捉えることは難しくなります(スライド25)。



スライド 25

フローサイトではコンピューター上で、例えばリンパ球を解析したい場合は、リンパ球を囲い(スライド26 FS vs SSプロット 赤エリア)、その中のデータだけを取り出します。そうすると、リンパ球の中にCD4陽性CD8陽性がどれぐらいあるかが分かります。(スライド26)。

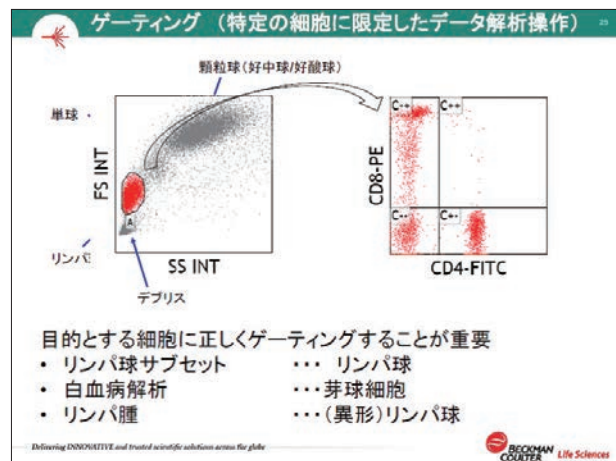
フローサイトメーターでは、目的とする細胞を正しくゲーティングすることが重要になっています。つまり、「リンパ球のサブセットであればリンパ球」、「白血病の解析であれば芽球細胞」、「リンパ腫であれば異形リンパ球」をゲーティングすることが重要になってきます。芽球細胞がどこにあるかをFS vs SSのプロットだけで判別するのは難しいので、今、広く行われているのが、CD45ゲーティングです。

### - CD45ゲーティング -

スライド27 上段が健常人末梢血で、下段は急性白血病の検体です。上段左のFS vs SSプロットでは、図のようにリンパ、単球、顆粒球が分別されています。顆粒球には、厳密にいうと好中球と好酸球が含まれています。好塩基球はどこにあるかというと、分かりにくいのですが、緑のドットが示しています。スライド27 上段右のCD45ゲーティングのプロットでは、リンパ球、単球、顆粒球が分別され、リンパ球下の緑の部分に好塩基球が出てきます。これについては、後のスライド57でデータをお見せしたいと思います。急性白血病の場合は、散乱光プロットのリンパ球から単球にかけての単核球領域(上段 青丸)に、芽球細胞が高頻度に出てきます。

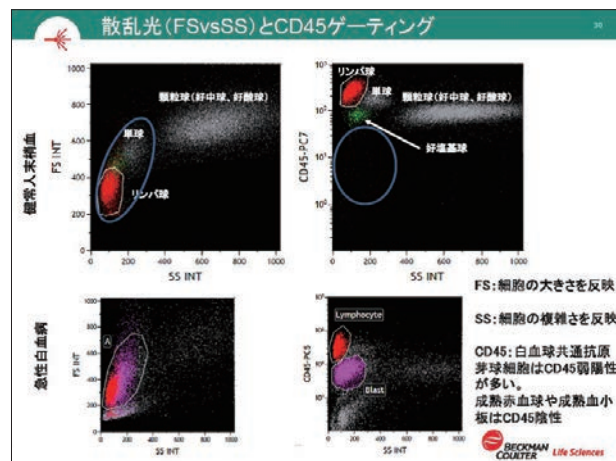
下段は、実際の急性白血病の例です。下段の図の紫が芽球細胞、赤が成熟リンパ球ですが、FS vs SSプロットでは同じ位置に重なって出てしまいます。FS vs SSプロットでゲーティングすると、抗体染色を行ったデータの内、どれが成熟リンパ球に出ていて、どれが芽球細胞に出ているのかを自分で判別するには、知識と経験がかなり必要となります。

そこで、CD45ゲーティングを使います。FSの代わりに、白血球の共通抗原であるCD45の蛍光の強さを表示します。白血球共通抗原のCD45は、リンパ球、単球、顆粒球で強く発現しています。一方、成熟赤血球や成熟血小板は、CD45が陰性で



スライド 26

あり、更に、一番重要なのは、**芽球細胞のような幼弱な細胞は、CD45の発現量が少なく、弱陽性**ということ。上段の青い丸で囲ってある部分のCD45の弱陽性のところに、芽球細胞がよく出てきます。そうすると、成熟リンパ球と芽球が分けられますので、ここをゲーティングすれば芽球細胞だけが解析できます。下段の実際の症例でも、芽球(紫)と成熟リンパ球(赤)を、CD45で分離できています。また、赤血球や血小板、溶血剤で溶血がしづらい赤芽球などは、弱陽性の更に下の領域に出てきます(スライド27)。



スライド 27

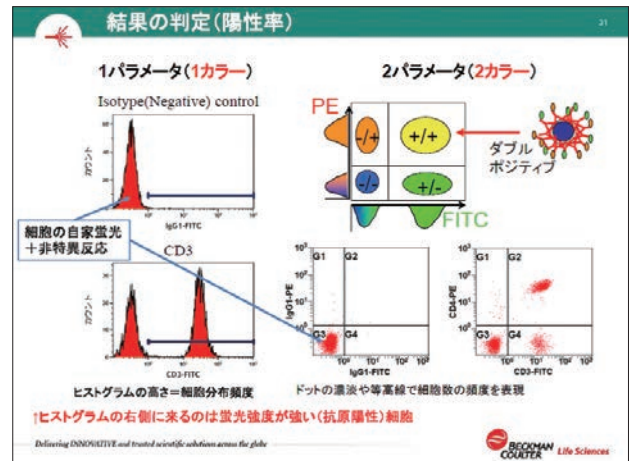
- 結果の判定(陽性率) -

ゲーティングした後のマーカーの結果は、一般的には陽性率で表します。最近、海外では陽性率ではなくパターンで見ることが多いのですが、日本では、まだ陽性率が重視されています。リンパ球の中のCD3などであれば、B細胞などはCD3抗原を発現せず、T細胞はCD3抗原を持つこともあり、陰性と陽性がはっきり分かります。しかし、スライド15で示したCD25の例のように陰性、陽性が近く、明確に分離できない場合、「どこからが陽性か」というのは、なかなか分かり難いです。そういった時に、リージョンを引くために参考にするのは、「アイソタイプ・コントロール」あるいは「ネガティブ・コントロール」と呼ばれているモノクローナル抗体です。これはモノクローナル抗体ですが、ヒトの細胞には反応しないクローンなので、この抗体で処理したサンプルは、陰性細胞の集団のみが出てきます。陽性細胞は、この陰性の集団よりも強い蛍光を示すところに出てくるので(スライド28ヒストグラム内青リージョン)、「ゲーティングしたリンパ球全体に対して、陽性細胞が何%あるか」ということが分かります。

「アイソタイプ・コントロールは、本来ヒトには反応しない抗体なのに陰性のピークが出てくるのは何故か」という質問をされることがあります。先ほど(スライド25)の顆粒球の例と同じで、リンパ球であってもレーザーを当てると、細胞自体が「自家蛍光」というのを生じます。本来ヒトには反応しないアイソタイプ・コントロール抗体にも蛍光物質が付いていますので、もし、非特異反応を起こした場合は、更に細胞が光ることになります。つまり、陰性集団の蛍光は、細胞の自家蛍光と非特異反応を含んでおり、その蛍光以上に強い部分に陽性細胞が出ることになります。

実際には、2カラー等で検査を行うことが多いと思います。FITCとPEの2カラーの場合でも、それぞれのアイソタイプ・コントロール抗体を反応させ、FITCとPEの陽性のカットオフを決めます。2カラーの場合は、実際に、「CD3陽性T細胞の中

のCD4陽性ヘルパーT細胞(下段右図のダブルポジティブエリア)は、何%である」など、より詳細なデータ確認ができます。アイソタイプ・コントロール抗体に関して注意いただきたいのは、動物種や抗体の濃度、蛍光物質、抗体同士のアイソタイプなどをマーカー抗体と合わせるのですが、**アイソタイプ・コントロールとマーカー抗体は別なクローンの抗体なので、全く同じ動きをするという保証は、実はありません。**ほぼ同じような陰性のピークの形になるのですが、アイソタイプ・コントロールのピークの形に比べ、マーカー抗体で染色したサンプルの陰性ピークが少し強く出ることが、実際にはあります。海外のガイドライン等を見ると、例えば、「CD3を染色したサンプルの陰性ピークは、CD3抗体自体が反応していないピークなので、実は最も良いネガティブ・コントロールである」といった表記が、最近、だんだん増えてきました。つまり、**アイソタイプ・コントロールは、あくまで参考にして、実際のマーカー抗体を反応させた際の陰性のピークをしっかりと見ながら、カットオフの位置を決めていくというのが、現在、推奨されています(スライド28)。**

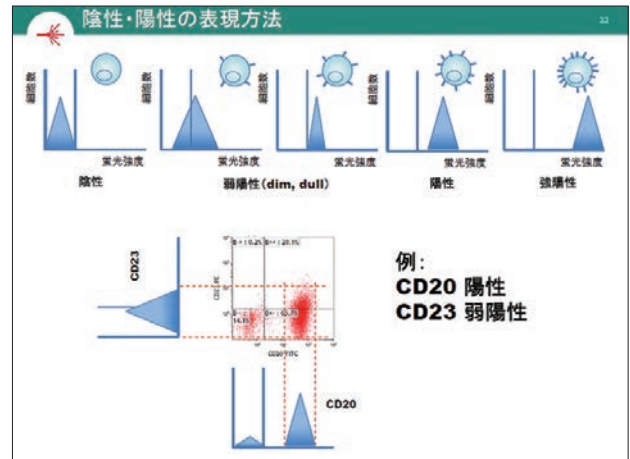


スライド 28

**- 陽性の表現方法 -**

陽性についても、「弱陽性」とか「強陽性」といった表現があります。スライド29に、そのイメージを示しました。アイソタイプ・コントロール等も参考にし、「カットオフにまたがる」、「カットオフよりも陽性側ではあるが蛍光が非常に弱い(抗原量が少ない)」といったものをよく弱陽性と言います(上段左2と3番目図)。これらは、「暗い」という意味で「Dim(ディム)」、「Dull(ダル)」といった言い方もされています。そして、上段左から4番目は「陽性」、上段左から5番目は非常に強く出ているので「強陽性」と呼ばれます。

2カラーのプロット図(スライド29下段)でも同じような考え方をします。このCD20とCD23の2カラーの例では、CD20に関してはヒストグラムで見ると陰性と陽性が明確に分かれています。CD23のヒストグラムを見ると、弱陽性となっています。このプロット図の場合は、「CD20が陽性でCD23が弱陽性」といった表現をすることが多いかと思えます(スライド29)



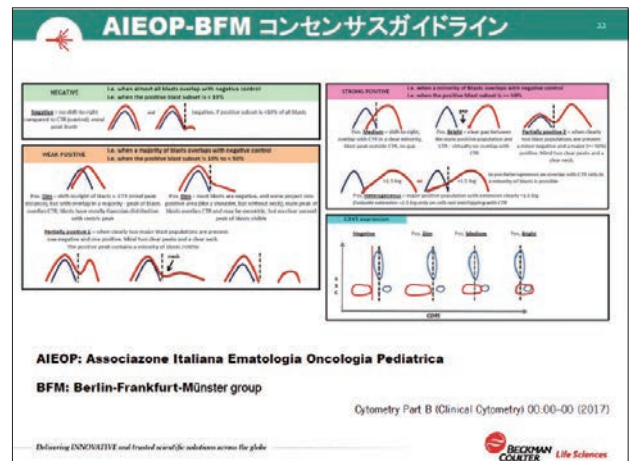
スライド 29

では、「この弱陽性や陽性を、どこで見分けるのか」というと、スライド13～15で示したように、蛍光物質によって蛍光の強さが変わってきますので、かなり感覚的なところが多くなります。例えば蛍光強度の目盛対数が4個ある4対数だった場合、1個目が陰性(ネガ)、2個目は弱陽性(Dim:ディム)、3個目が陽性(ポジ)で、4個目まで行ったら強陽性(ブライト)にしようといった話もありますが、蛍光色素を変えると、その蛍光強度の基準も動いてしまいますので、難しい部分ではあります。

例えば、今年、ヨーロッパで出たガイドラインでは、陰性(ネガティブ:緑枠)、弱陽性(ウイークポジ:オレンジ枠)と強陽性(ストロングポジ:赤枠)をスライド30のように分けています。例えば、このガイドラインでは、陰性(ネガティブ:緑枠)の場合、左のパターンだけではなく、少し陽性(ポジ)があっても10%以下であれば陰性(ネガ)に含めています。また、弱陽性(ウイークポジ:オレンジ枠)では、陽性率が50%以下で、スライドに示されたようなパターンの場合は、弱陽性(ウイークポジ)に含めています。強陽性(ストロングポジ:赤枠)の場合は、ログスケールで1.5～1.6以上はピークが離れていることを示し、弱陽性(ウイークポジ)と強陽性(ストロングポジ)を分けています。このように判定基準をすり合わせていこうという動きも出てきています。更に、

CD45に関しては(水色枠)、CD45抗体を陰性、陽性というマーカーとして使用するわけではなくゲーティング用に使っているので、成熟リンパ球や好中球の位置を参考にし、それよりも低いかどうかを比較して、ネガ、ディム、ミディアム、ブライトといったように表現することも、今、提唱されつつあります。

国内でよく使われている弱陽性、陽性というのは、感覚的なところがありますが、イメージ的にはスライド29のような表現です。先の例を参考にさせていただければと思います。



スライド 30

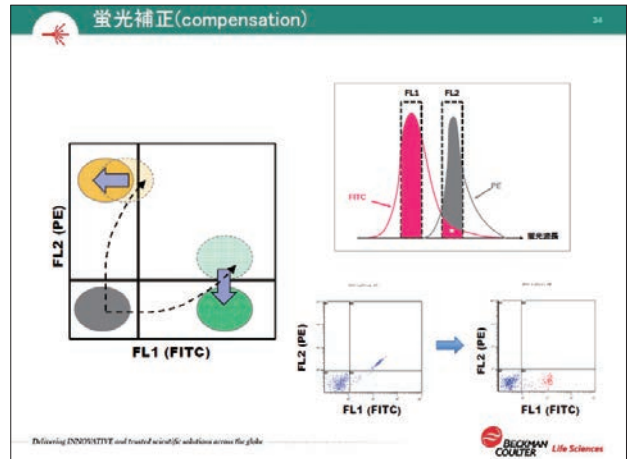
**- 蛍光補正 -**

蛍光補正(Compensation)は、解析に直接関係するわけではありませんが、結果に影響しますので、解析する際に蛍光補正が正しくできているかも着目します。

蛍光の波長図(スライド31右上)では、横軸が蛍光の波長で、右に行くほど波長が長くなっています。この波長図は、FITCとPEと2つの蛍光波長を表示しています。原理のところ(スライド9)で示したように、FITCの蛍光は、525 nm付近だけではなく、もう少し長い波長も出ています(スライド31右上 ピンクの線)。このFITCのピークの部分を効率よく検出できるように、検出器では最大蛍光波長付近の一定の波長だけを取りだしてFL1の検出器に導きます。PEも同様(スライド31右上 灰色の線)に、PEのピークの部分をFL2の検出器に導きます。ここで、FITCの波長(ピンク)を見ると、FITCは長い波長の光も出しているため、PEを本来測ろうとしているFL2の検出器にもFITCの光が入り込んでしまいます。これが、**蛍光の漏れ込み**と呼ばれるものです。

FITCでしか染色していないサンプルを、「蛍光の漏れこみの補正なし」で、FL1(FITC)とFL2(PE)のプロット(スライド31 右下)を見ると、PE側にも少し光が見えており、ダブルポジティブ

の部分に漏れ込んでしまっています。これでは、PEの蛍光を正確に測れないので、FITCの高さ(FL1ピンク塗りつぶし)に対するFL2に入っている余分な高さ(FL2ピンク塗りつぶし)の割合(パーセンテージ)で、FITCからPEへ漏れ込んでいる蛍光を差し引きます。この**蛍光の差し引きが蛍光補正**と言われ、蛍光補正を行うと、正しいプロット(スライド31右下)になります(スライド31)。



スライド 31

実際に測定した際に見られる蛍光補正の状態をスライド32に示しました。この例では、CD45-PC5でCD45ゲーティングをかけ、FITCとPEでいろいろなマーカーを見る、3カラーを行っています。

上段aのデータは、感度と蛍光補正のバランスが正しく設定されている例です。右上の波長図は、この時の蛍光の漏れ込みです。このスライドでは、PC5からPEへの漏れ込みを示しており、PC5の検出器の蛍光(星2つ)と、PC5がPEに漏れ込んだ蛍光(星1つ)で、漏れ込みの割合が決まります。大ざっぱに説明すると、**蛍光補正值としては、「星2つ分の星1つ×100」**といった式で、何%差し引くかが決まっています。

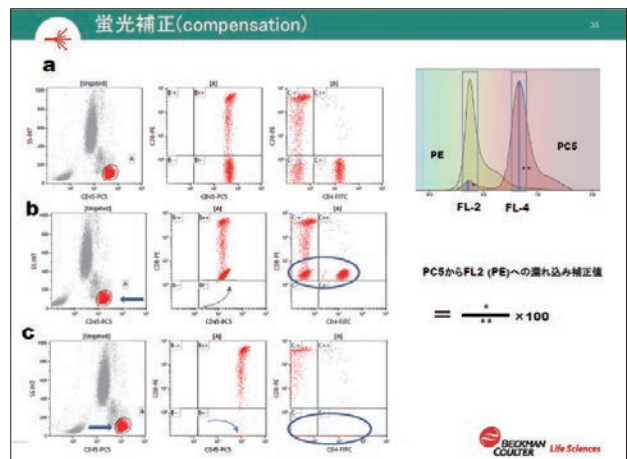
フローサイトメーターでは、蛍光の光を検出器で取り込む際に、その強度を簡単に電氣的に上げたり下げたりする「感度調整」ができます。もし、感度がすべて一定であれば、蛍光補正を設定後に変更する必要はありませんが、もともとフローサイトメーターは研究用の機械であり、様々なアプリケーションに対応するために電氣的に感度を簡単に変えることができます。そのため、感度と蛍光補正が関連し、複雑になります。

aの状態からCD45-PC5の検出感度を下げた場合が、2段目のbです。この場合、FITC、PEの感度は変更していませんが、CD45-PC5の感度だけをわずかに下げています(矢印)。ここで、**蛍光補正值**を考えると、PC5の蛍光量が減り、分母の値(星2つ)が小さくなるため、**蛍光補正值は数値的には大きくなります**。つまり、aの時よりも、大きな補正值が最適ということになります。しかし、**蛍光補正值を変更しないと、補正が足りなくなり、CD8-PEのネガティブの集団が上がってしまいます(青丸)。**

実際のルーチン検査の際、「何らかのネガの集団がいつも上へ上がってきってしまう」といった場合がこの例になります。

次にaの状態から、逆にCD45-PC5の検出器の感度だけを上げた場合が3段目のcです。この場合、PC5の蛍光量が上がるので、分母(星2つ)の数字が大きくなり、必要な補正值は、aの場合よりも小さな補正值となります。しかし、補正值の調整を行わないと、補正をかけすぎた状態(オーバーコンペンセーション)となり、CD8-PE ネガティブの集団が下に張り付きます(青丸)。ルーチン検査において、「FITC、PEのプロットで、PEのネガティブが下に張り付き、陽性率は正しいけれど、点々が見えなくなった」といった場合は、この例になります。

**蛍光補正值は、お互いの蛍光同士の感度のバランスで決まっているので、感度を動かしたのであれば、必ず蛍光補正を見直す必要があります(スライド32)。**



スライド 32



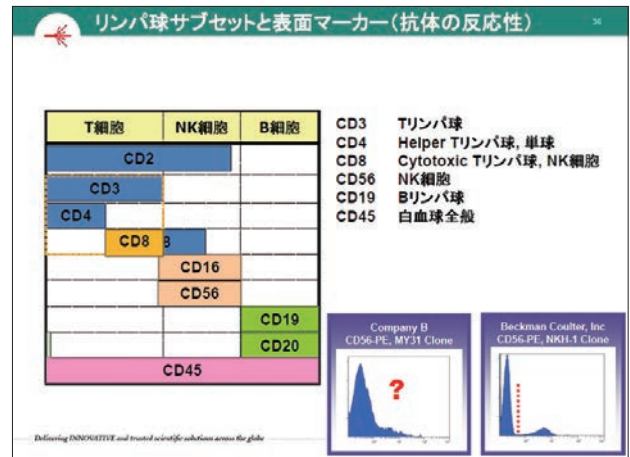
- リンパ球サブセットと表面マーカー (抗体の反応性) -

ここからは、リンパ球サブセットと白血病について、少しお話しさせていただきます。

まず、リンパ球サブセットです。T・B・NK、それからT細胞の中のサブセットの検査です。T細胞のマーカーとしては、**CD3**が一番特異性が高く、**CD2**はT細胞とNK細胞に反応することが分かっているので、現在は、リンパ球サブセットのT細胞マーカーとしては、使われていません。**CD4**は、ヘルパーT細胞と単球にも発現していますが、正確にゲーティングをリンパ球にかければ問題はありません。**CD8**は、サイトキニックT細胞のほかにNK細胞の一部にも反応します。これは、どちらもリンパ球ですので、ゲーティングによって分離することができません。そして、**NK細胞を検出するCD16やCD56もT細胞にも少し発現しています**。**CD20**は、T細胞の一部に発現しています(これは、後のスライドでデータを示します)。

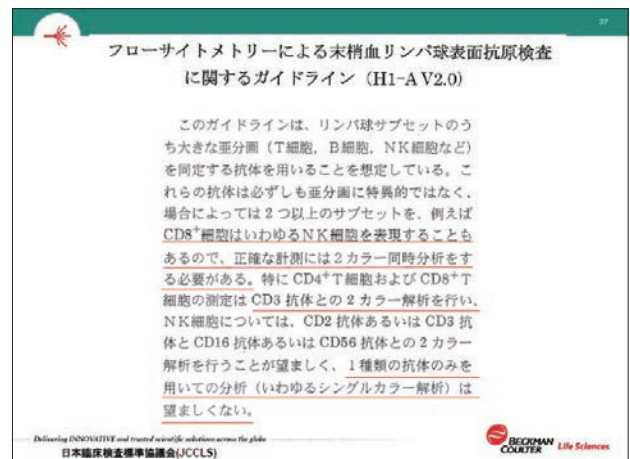
このように、CD4のみ、CD8のみを測定するだけでは、正確に測定することができません。そのため、現在は、**CD3陽性**

**でT細胞を測定し、かつCD8も陽性の状態、つまり、両方陽性(CD3+CD8+)を測定することによってNK細胞を除外し、サイトキニックT細胞を正確に測る手順が推奨されています(スライド33)。**



スライド 33

JCCLSのガイドラインでも「CD8はNK細胞を表現することもあるので、正確な計測には～」と記述されており、**CD3抗体との組み合わせがガイドラインとして示されています**。更に、NK細胞のCD16、CD56についても同様に、「**1種類の抗体のみを用いる分析、いわゆるシングルカラー解析は望ましくない**」と記述されています(スライド34)。



スライド 34

**- リンパ球サブセット検査データの見方 -**

スライド35は、実際のデータです。このデータでは、NK細胞が多い人間をわざと選んで測定しています。X軸がCD3(T細胞)、Y軸をB細胞マーカーのCD19、NK細胞マーカーのCD56、それからヘルパーT細胞マーカーのCD4、サイトキニックT細胞マーカーのCD8といったように、Y軸だけ抗体を変えています。

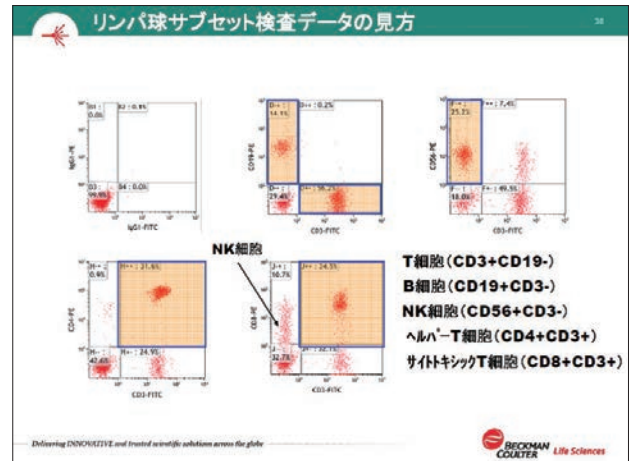
例えば、**T細胞は、CD3+CD19-**です(上段真中)。そして、**B細胞はCD19+CD3-**です(上段真中)。

**NK細胞の場合は、CD56+CD3-**です(上段右)。CD56陽性のT細胞は、通常健康人では3%ぐらいの方が多いのですが、この例ですと7.4%がCD56陽性のT細胞です。この例だと、NK細胞として、CD56陽性細胞のみで報告すると、実際のNK細胞よりも7.4%高い報告になってしまいます。

下段左のヘルパーT細胞のデータで、CD3-CD4+(弱陽性)に0.9%程度出ていますが、これは、ゲーティング内に単球がほんのわずかに入っているためです。**CD3陽性かつCD4陽性のヘルパーT細胞**を解析することで、わずかな単球の影響も取り除くことができます。

一番問題になるのは、サイトキニックT細胞の場合です。**サ**

**イトキシックT細胞は、CD3陽性かつCD8陽性**です(下段右)。この例ですと、25%程度NKがあり、そのうちの約10%にCD8が弱く発現しているので、**CD8陽性のみで報告すると、実際よりも10%高い値となり、「CD3陽性かつCD8陽性を解析する」ことが、JCCLSのガイドラインに記載されている意味合いとなります**(スライド35)。

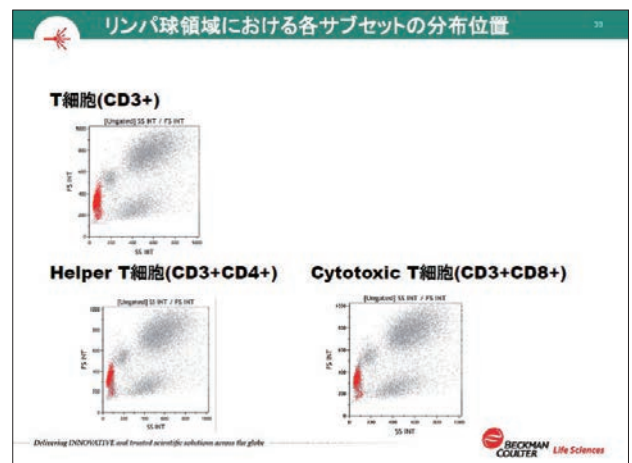


スライド 35

**- リンパ球領域における各サブセットの分布位置 -**

単球などの混入を避けるため、リンパ球を正確にゲーティングしなければならないわけですが、非常に小さなゲーティングでも問題があります。スライド36にリンパ球領域の中の各サブセットの分布を示します。

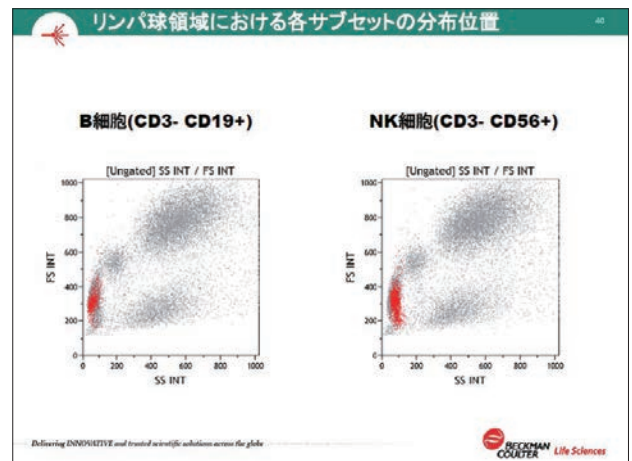
スライド36は、CD3陽性、CD4陽性、CD8陽性の分布データです。データの、ほぼ均一に分布していますが、よく見ると**FSの低い箇所は少しまばらになっており、T細胞は少なく見えます**。



スライド 36

スライド37の**B細胞を見ると、リンパ球の集団中にはあるのですが、どちらかといえばFSの下方に不均一に分布しています**(スライド37左図)。NK細胞は、顆粒を若干持っているので、SSも少し高い方向です(スライド37右図)。**NK細胞は、わずかに右側に偏っています**。

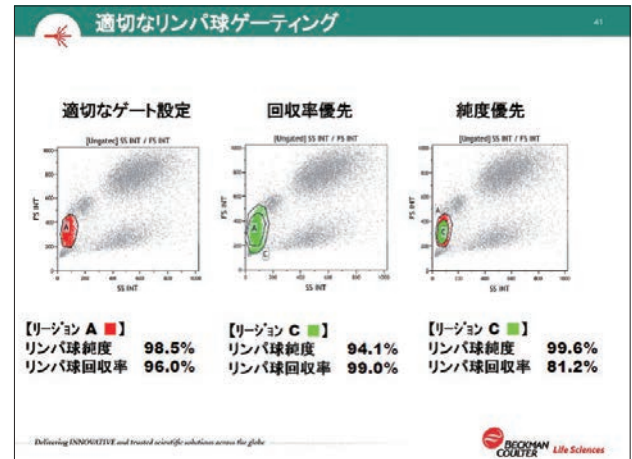
このように、**リンパ球領域の中でもT細胞、B細胞、NK細胞それぞれ、わずかではありますが、分布が偏っている**ので、ゲーティングにより、リンパ球のサブセットの頻度に影響を与えてしまうことになります。そのため、**過不足なく適切にリンパ球をゲートにかけていただきたい**と思います(スライド36、37)。



スライド 37

- 適切なリンパ球ゲーティング -

リンパ球を見逃したくないために大きくゲーティングを囲むと、単球やデブリスが入り込み、リンパ球の純度が下がります。あるいは、小さくゲーティングを囲むと、純度は良いのですが、回収率が悪くなり、更に、スライド36、37のように、T細胞、B細胞などが、多少、不均一に分布しているため、リンパ球サブセットの比率が変わってしまう可能性があります。リンパ球全体を過不足なく囲うことが大切です(スライド38)。



スライド 38

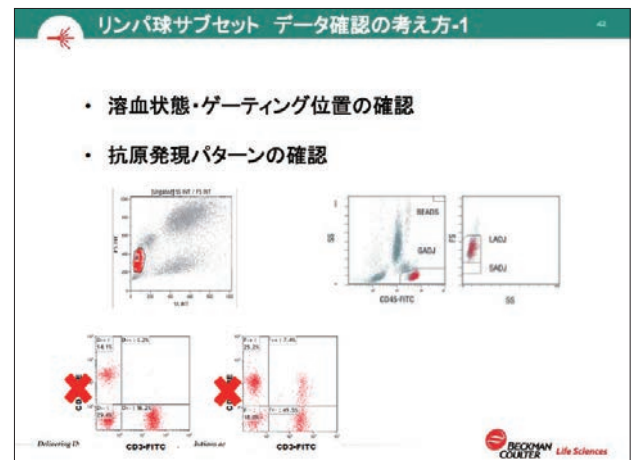
- リンパ球サブセット データの確認の考え方 -

最初に、リンパ球サブセットのデータ確認の際に注意すべき点は、溶血ができていないか、そして、スライド38で示したように、ゲーティングの位置が正しいかどうかです。溶血が悪い場合、赤血球やデブリスがリンパ球のゲートの中に入ってきて、全体の陽性率を下げます。そういった場合は、先のCD45ゲーティングが有効です。成熟の赤血球や血小板ではCD45が陰性になるため、もし、溶血不足があった場合でもCD45ゲーティングを組み合わせることで、ゲート内に赤血球やデブリスが混入するリスクを回避できます。CD45ゲーティングは、芽球細胞の解析によく使われていますが、今日、リンパ球サブセットでもCD45ゲーティングはかなり一般的に使われています。

次に、抗原発現パターンは大丈夫かといった点を確認します。スライド39下図のCD3とCD56、CD3とCD19と表記されている発現パターンを見てください。下段左図のCD3とCD56の抗原発現パターンは、あり得るかもしれませんが、しかし、下段右図のCD3とCD19の抗原発現パターンは、T細胞とB細胞の両方の発現がある集団があり、「これは、何かおかしいのではないか」と考えます。この例では、抗体の分注間違え、あるいは、測定の順番間違えではないかと考えられます。実際は、CD56

と記載された方がCD19の結果であり、CD19がCD56の結果でした。

標準的な抗原発現パターンを目の前に見本として置いておくことで、「測定した際のデータパターンはおかしくないか」ということを確認し、間違いの見逃しを防げるのではないかと思います(スライド39)。



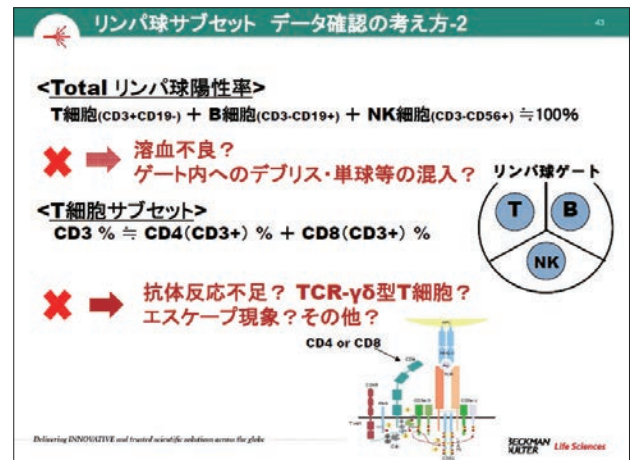
スライド 39

次に、陽性率を確認します。

まず、リンパ球はT細胞、B細胞、NK細胞から成っていますので、当然**T細胞とB細胞とNK細胞を足すと、大体100%ぐらい**になります。もし、100%にならないのであれば、溶血不良などによりゲート内に赤血球などが入り込んでいないかを確認します。もし、100%を超えるのであれば、変な細胞がいるのか、非特異的なものがあるかどうかという点を確認します。

次に、T細胞の中のバランスを確認します。T細胞は、CD3とTセルリセプターの複合体を作っていて、その横にコリセプターとしてCD4かCD8のどちらかが基本的に出ています。CD3陽性の細胞中においてはCD4とCD8は、足してCD3とほぼ大体イコール、または若干少ないぐらいの値です。ここで、CD3陽性を入れずに、ただCD8陽性だけで陽性率を確認すると、NK細胞に反応しているCD8細胞が入るため、CD4とCD8を足すとCD3を超えてしまうことになります。CD3陽性の中のCD4とCD8と見れば、**基本的に、[CD3≒CD4+CD8]の**

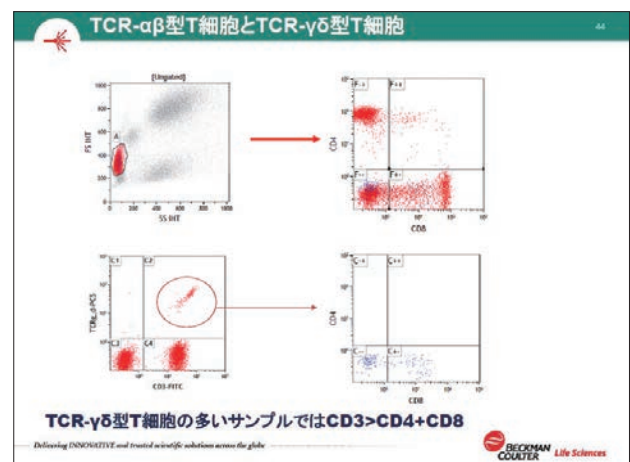
**関係**が成り立ちます。もし、CD4とCD8を足してCD3に足りない場合は、抗体反応の不足があったり、ガンマ・デルタ型のT細胞が増えたりしてはいないか、エスケープ現象が起きたりしてはいないか等を確認します(スライド40)。



スライド 40

### - TCR-αβ型T細胞とTCR-γδ型T細胞 -

ガンマ・デルタT細胞をご紹介したいと思います。Tセルリセプターには、いろいろなレパトワがありますが、大きく分けるとアルファ・ベータ型とガンマ・デルタ型に分かれます。健常人の場合、T細胞の95～98%程がアルファ・ベータ型ですので、通常のようにリンパ球にゲートを囲いCD4、CD8を見ると、上段右のようにCD4とCD8のどちらかに分かります。リンパ球ゲートの中で、CD3陽性TCRγδ型T細胞陽性にゲートをかけて、CD4とCD8の発現を見ると、**TCRγδ型T細胞の大部分は、CD4とCD8が陰性で、わずかにCD8を弱く発現しているものがあります。**そのため、TCRγδ型T細胞が増えてくると、CD4とCD8を足してCD3に足りないという現象になります。CD4とCD8を足してCD3に足りない場合は、TCRγδ型T細胞が増えているのではないかと考えます(スライド41)。

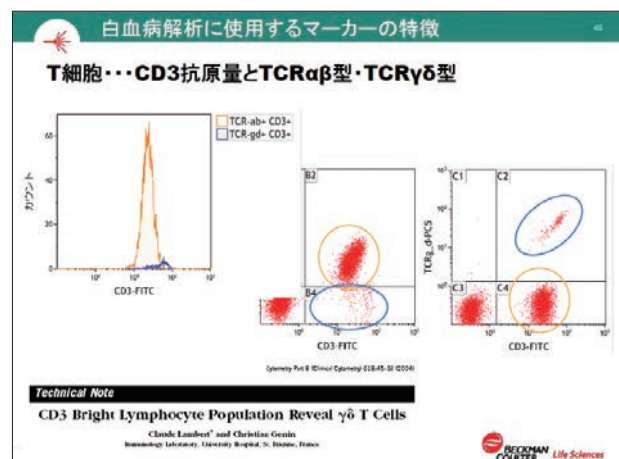


スライド 41

TCR $\gamma\delta$ 型T細胞の増加を確認するには、もし、TCR $\gamma\delta$ に対する抗体が手元にあるようでしたら、サンプルを測って確認を取るのが一番いい方法です。しかし、TCR $\gamma\delta$ に対する抗体を持っていない場合は、参考になるのが、CD3の抗原量です。スライド42の図は、健常人のCD3、TCR $\alpha\beta$ 、TCR $\gamma\delta$ の測定結果です。大部分がTCR $\alpha\beta$ (黄色丸)で、わずかにTCR $\gamma\delta$ (青色丸)です。よく見ると、CD3の抗原量がTCR $\alpha\beta$ とTCR $\gamma\delta$ とで、微妙に違うことがわかります。TCR $\alpha\beta$ とTCR $\gamma\delta$ 陽性細胞におけるCD3のヒストグラムを重ねると、左上の図のような形になります(TCR $\alpha\beta$ :黄色、TCR $\gamma\delta$ :青)。わずかですが、TCR $\gamma\delta$ のCD3の抗原量が、TCR $\alpha\beta$ よりも多いと文献でも示されています。

もし、CD4とCD8を足してCD3に足りない場合、CD3のヒストグラムの山の形を見て、通常あるピーク位置よりもほんのわずかに蛍光強度が高い位置に山があれば、TCR $\gamma\delta$ 型T細胞が増えている可能性が高いと思われます。実際の証明には、TCR

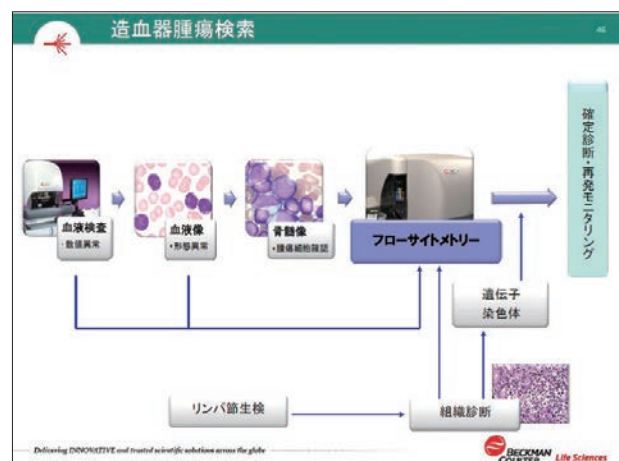
$\gamma\delta$ に対する抗体で測定を行う必要がありますが、**CD3のヒストグラムでTCR $\gamma\delta$ 型T細胞が予想できる**ことを覚えておいていただければと思います(スライド42)。



スライド 42

### - 造血器腫瘍検索 -

造血器腫瘍の検索について、最後にお話しさせていただきます。血液検査、血液像など、いろいろな検査で異常があったということで、フローサイトを確認しようという場合や、リンパ節の腫脹があって生検を取ったので病理組織診断とともにフローサイトで確認しようという場合、また、確定診断とか再発のモニタリングなど、フローサイトは幅広く使われています(スライド43)。



スライド 43

### - 造血器腫瘍解析の操作手順 -

サンプル処理の手順はスライド17-20において写真で説明したように、末梢血、骨髓液、リンパ節でも、抗原抗体反応・遠心洗浄・測定については一緒です。前処理の際、末梢血は不要ですが、骨髓液やリンパ節では**メッシュを通す**などの処理が必要になることが違いとなります(スライド44)。

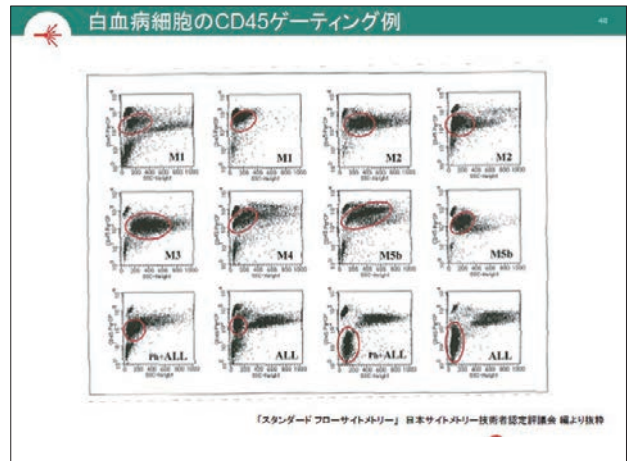


スライド 44

- 白血病細胞のCD45ゲーティング例 -

スライド45は、「スタンダードフローサイトメトリー」から抜粋したものです。CD45とSSのプロットで、リンパ球、単球の少し下の辺り(赤丸)によく芽球細胞が出てくるので、ブラスト領域とも呼ばれています。

**CD45の非常に弱い、例えば陰性に近いところにも、芽球細胞が出る場合があります**ので、気をつけてゲートをする必要があります(スライド45)。

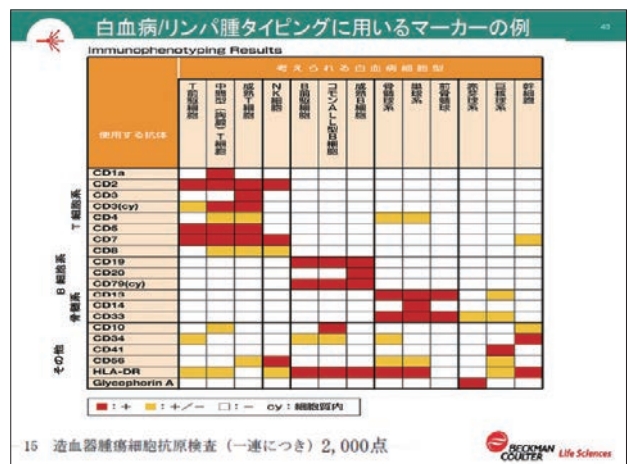


スライド 45

- 白血病/リンパ腫タイプングに用いるマーカーの例 -

スライド45のようにCD45ゲーティングし、いろいろなマーカー(スライド46)を検索します。スライド46にあるような表で、測定した結果において、どのマーカーが出て、どのマーカーが出ていないかを確認し、どの段階の白血病であるかを判定します。

スライド33で示したように、**CD2はT細胞のほかにNK細胞に発現**していますし、**CD7もT細胞のほかにNK細胞に発現**しています。**CD8も同じ**です。この表だけを見ると、**CD5はT細胞にのみ発現しているように見えますが、実際には、B細胞の一部にも発現**しています。そのような情報をまとめて示している資料はなかなかないので、今日はそのような情報をお示ししたいと思います(スライド46)。



スライド 46

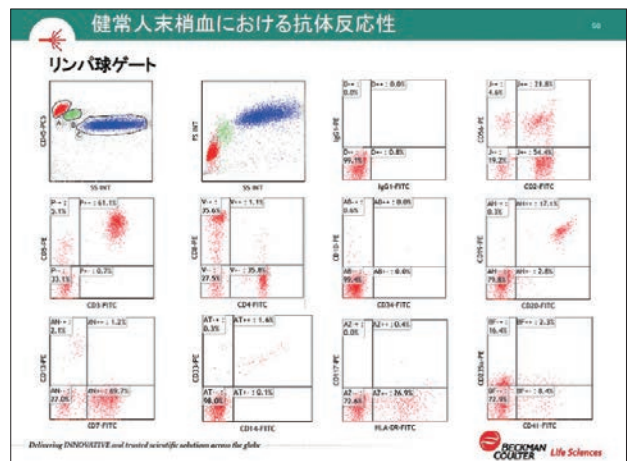
- 健常人末梢血における抗体反応性 -

白血病用のパネルを用い、健常人末梢血におけるリンパ球、単球、顆粒球が、どういった特徴を持っているかを大まかに示したのがこのスライドになります。

リンパ球(赤)をゲートしたマーカーのデータです。上段右の図では、CD2とCD56プロットから、NK細胞にCD2が反応していることがわかります。中段左のプロットは、CD3とCD5の組み合わせになっています。T細胞はCD3もCD5も陽性ですが、よく見ると**CD3-でCD5+の細胞**が少しいます(ここでは約5%)。中段右は、B細胞のマーカーであるCD19とCD20のプロットです。B細胞は、CD19、CD20両方ともに陽性ですが、わずかに**CD20弱陽性、CD19陰性**の細胞がいます(ここでは2.8%)。CD3-CD5+の細胞、CD20+CD19-の細胞が何であるのかはスライド52、54で示します。

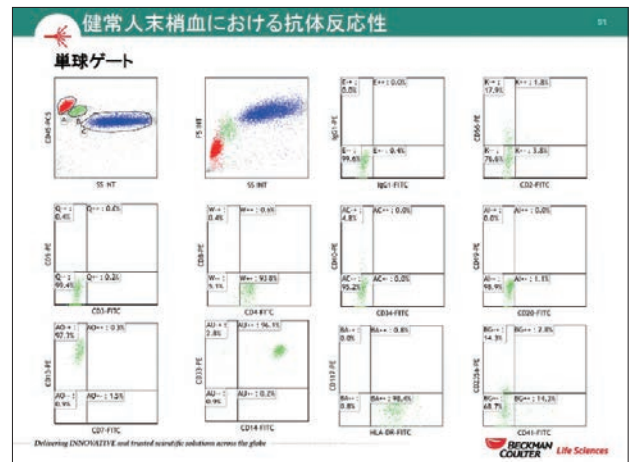
下段では、CD13陽性、CD33とCD14陽性の細胞がわずか

にいますが、これはゲーティング内に単球が入ってきたためです(スライド47)。



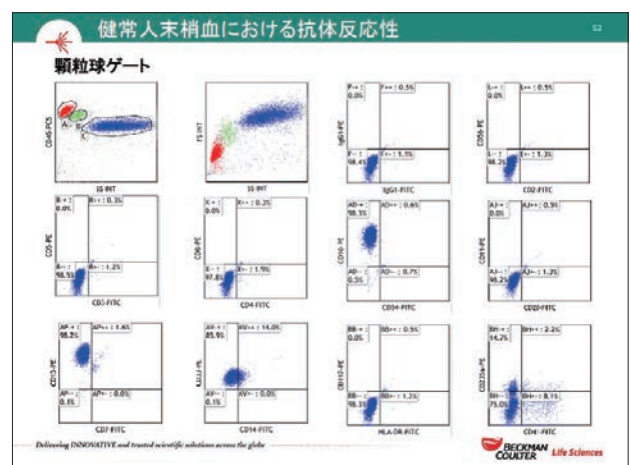
スライド 47

次のスライドは単球(緑)の解析結果です。単球の特徴としては、**CD4を弱く発現**しています。そして、骨髄系マーカーのCD13やCD33が陽性で、成熟単球マーカーのCD14も陽性です。更にHLA-DRが陽性であることが、単球の大きな特徴になっています(スライド48)。



スライド 48

このスライドは、顆粒球領域の解析結果(青)です。CD10はB-ALLで陽性になることが知られていますが、実は**成熟好中球でもCD10陽性**となります。顆粒球の大きな特徴としては、CD13陽性、CD33陽性、CD14は陰性、あるいはわずかに出ています。単球と最も違う特徴は、HLA-DRが陰性です。先ほどの単球と比較してCD13とCD33の抗原量を見ると、CD13はあまり変わらないですが、単球ではCD33が強く発現しているのに対し、顆粒球ではCD33の発現が弱いことも、違いの一つです(スライド49)。

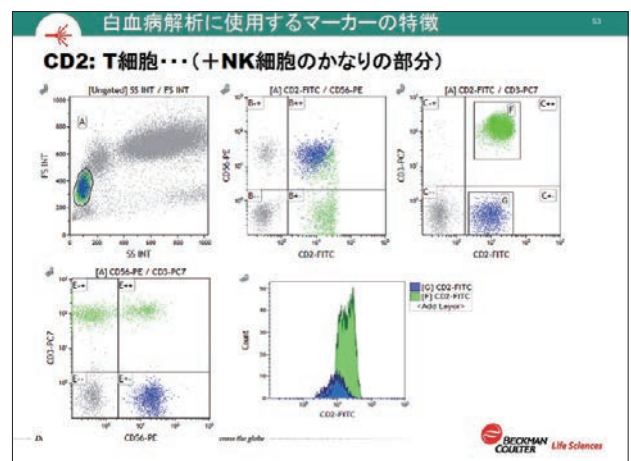


スライド 49

- CD2 -

スライド47で「これは何か」と言っていたデータです。このデータは、私の血液なのでNKが健康人に比べてちょっと多めですが、一応それ以外健康人と思っていますので、NKが多いことについてはご容赦ください。

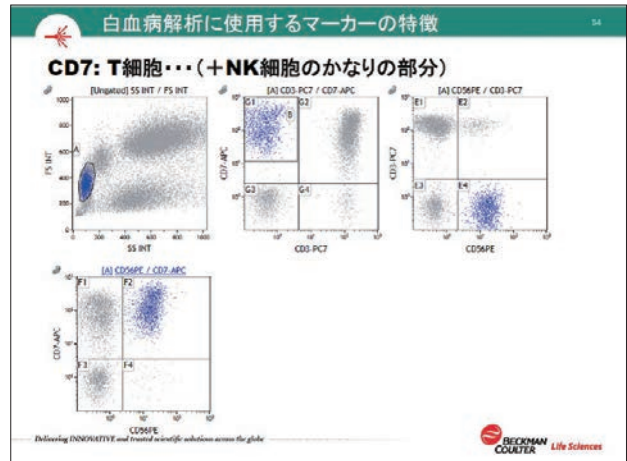
**CD2は、T細胞マーカーと言われていますが、NK細胞にも反応**します(上段中)。CD2陽性の大部分はCD3陽性ですが、CD2陽性かつCD3陰性の集団(ゲートG 青色)は、CD3-CD56+なので、NK細胞です。CD2のヒストグラム(下段右)で、NKに反応している部分(青)は、比較的CD2の発現の弱い箇所に集中しています(スライド50)。



スライド 50

- CD7 -

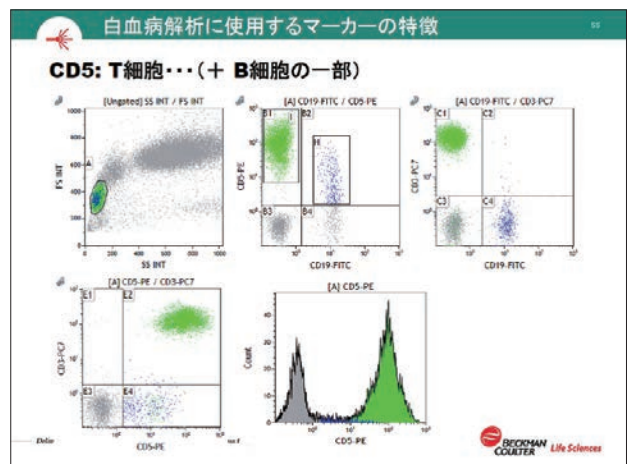
CD7はT細胞マーカーなので、CD3陽性、CD7陽性の細胞がほとんどです。しかし、ここでもCD3陰性、CD7陽性の集団があります(ゲートB 青)。この細胞集団は、CD3-CD56+なので、やはり**CD7もT細胞以外にNK細胞のかなりの部分に反応**することが分かります(上段右)。健康人でも、CD7+CD3-といったNK細胞に反応している集団があることが分かります(スライド51)。



スライド 51

- CD5 -

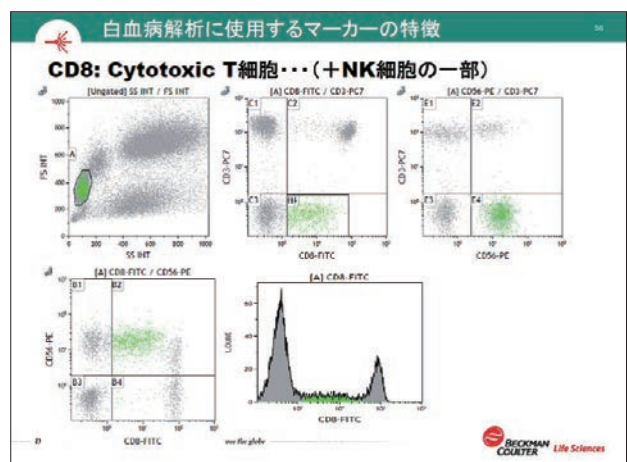
CD5もT細胞マーカーです。CD5陽性かつCD3陽性のT細胞と、CD5の発現が少し弱くCD3陰性の細胞があります(下段左 青)。上段中 青は、CD19陽性でB細胞です。**健康人のリンパ球でもCD5陽性のB細胞はわずかに存在**します。CD5のヒストグラム(下段右)では、少し発現の弱いところにB細胞がいます。CD5陽性かつCD19陽性ですと、B-CLLなどを思い浮かべますが、健康人の場合でもわずかに存在しています(スライド52)。



スライド 52

- CD8 -

**CD8の発現の強い部分はサイトキックT細胞が大部分**なので、CD3も陽性ですが、CD8のDullまたはDimと呼ばれるような弱陽性の部分は、CD3-です(上段中 緑)。この**CD3-CD8+**の集団は、**CD3-56+**のNK細胞です。CD8は、サイトキックT細胞とNK細胞に反応することが分かります(スライド53)。

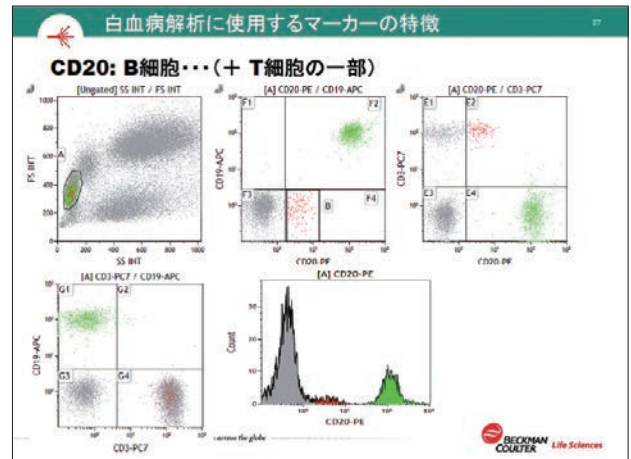


スライド 53



- CD20 -

CD20はB細胞マーカーですが、CD19+CD20+のB細胞とは別に、CD19陰性でCD20が非常に弱く発現する細胞集団がわずかいます(上段中 赤)。この細胞集団(赤)は、CD3が陽性のT細胞です。CD19-CD3+にプロットされています(下段左)。CD20のヒストグラム(下段右)のCD19-CD3+の集団は赤色で示された位置です。健康人でもCD20を弱く発現しているT細胞がわずかにいることは、既に本などにも載っています(スライド54)。



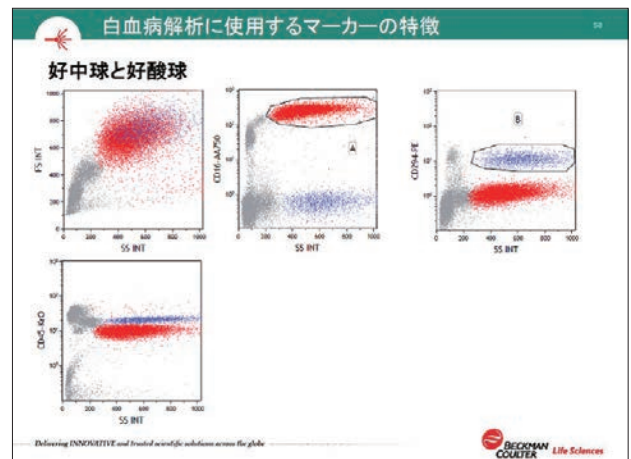
スライド 54

- 好中球と好酸球 -

顆粒球領域には、好中球と好酸球がいます。CD16はNKマーカーで知られていますが、非常に良い好中球のマーカーで、成熟好中球はCD16陽性です(上段中 赤)。では、「顆粒球領域でCD16陰性の集団(上段中 青)は何か」といって、好酸球のマーカーであるCD294(CRTH2)陽性になり、好酸球であることが分かります(上段右 青)。顆粒球領域には、好中球と好酸球がいることが分かります。

CD45ゲーティングの際に、顆粒球部分が2段に分かれることがあります(下段左)。下段左のプロットでは、赤が好中球、青が好酸球で、一般的に、好中球よりも好酸球の方がCD45の発現量がわずかに多くなっています。更に、若干、好酸球の方が、SSが高くなっています。好酸球の増えているサンプルの場合、CD45ゲーティングのプロットでは、2つに分かれた好酸球の集団が目立って見えることがあります。もし、CD45ゲーティングのプロットで顆粒球集団が2つに分かれた際には、「好酸球の割合はどうだったか」を見ていただくと判断がつけやすいのでは

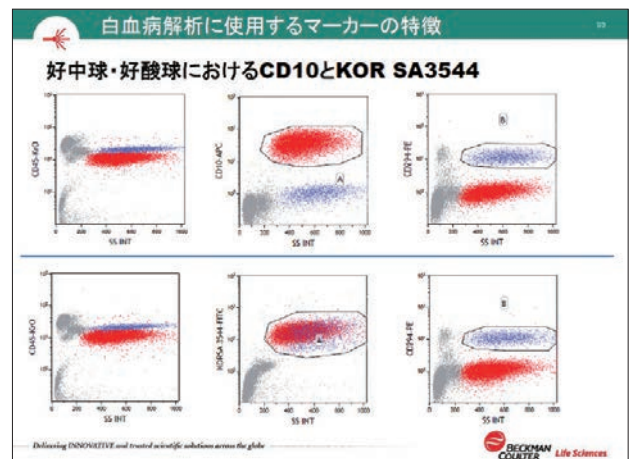
ないでしょうか。CD16抗体がある場合には測定すれば確認が取れますが、CD16はかなり成熟した好中球で発現します。骨髓(マルク)などの少し未熟型の好中球の場合はCD16が発現していないことがあるので、注意してください(スライド55)。



スライド 55

- 好中球・好酸球におけるCD10とKOR SA3544 -

スライド49でCD10が好中球に出ていることを示しましたが、実際のデータはスライド56になります(上段中)。CD10陽性が好中球で、CD10陰性の部分は、CD294陽性の好酸球です。下段はKOR SA3544(よく「コルサ」とも呼ばれています)のデータです。KOR SA3544は、フィラデルフィア染色体(Ph1)陽性のALLで見られるため、代替マーカーとしても使用されています。KOR SA3544は、顆粒球にも発現します。CD10の場合とは違い、好酸球、好中球ともに発現しています(下段中)(スライド56)。



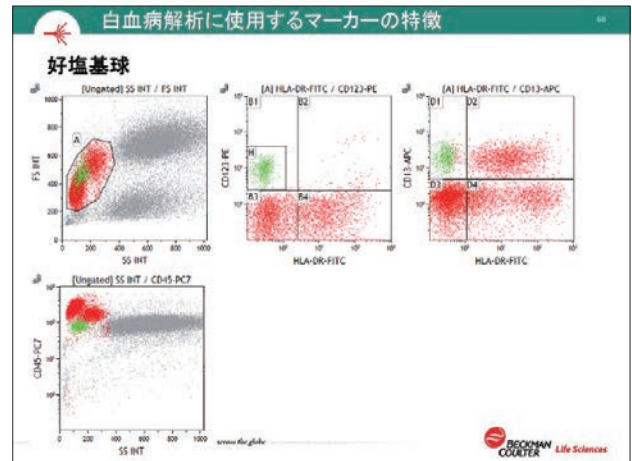
スライド 56

- 好塩基球 -

好中球、好酸球に続き、好塩基球のマーカーを示したスライドです。

好塩基球の特徴の一つは、**CD123+HLA-DR-**です(上段中 ゲートH 緑)。そして、**CD13も陽性**です。**FS、SSの散乱光**では、リンパと単球の間に出ています(上段左)。**CD45ゲーティング**の場合は、リンパ球や単球よりやや低い位置です(下段左)。好塩基球は、好中球、好酸球とほぼ同じぐらいのCD45の発現を示します(下段左)。

ベックマン・コールターのStem-KitなどでCD34を測定する時に、CD45ゲーティングのプロットにおいて、幹細胞と重なるような集団ですが、CD34陰性の場合、好塩基球である可能性があります(スライド57)。



スライド 57

スライド46～56で示しました内容をまとめたものです。データを見る時に、参考にでもしていただければと思います(スライド58)。

CD番号	発現細胞	CD番号	発現細胞
CD1a	胸腺段階T細胞	CD16	NK細胞、好中球
CD2	T細胞 (NK細胞の一部)	CD56	NK細胞、T細胞の一部
CD3	T細胞	CD13	骨髄系細胞
CD4	Helper T細胞、単球 (弱陽性)	CD14	成熟単球
CD5	T細胞 (B細胞の一部)	CD33	骨髄系細胞
CD7	T細胞 (NK細胞の一部)	CD117	骨髄系幼若細胞
CD8	Cytotoxic T細胞 (NK細胞の一部)	CD41	巨核球、血小板
CD10	Pre-B細胞、好中球	CD81	巨核球、血小板
CD19	B細胞 (より若い段階より)	CD34	造血幹細胞
CD20	B細胞 (やや成熟段階から) 正常T細胞にもわずかに発現	CD235a	赤血球細胞
		HLA-DR	B細胞、単球、活性化T細胞

スライド 58

- 症例 -

最後に白血病のまとめということで、症例を一例だけお示します。

Blastが末梢血で99%、骨髓像で94.8%認められています(スライド59)。

こちらは、メイギムザ、ペルオキシダーゼ、エステラーゼ二重染

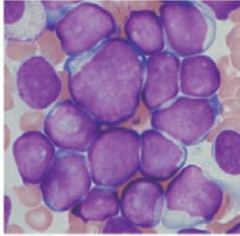
色の結果です(スライド60)。ペルオキシダーゼが13%で3%以上、芽球比率が90%を超え、アウエル小体も認める症例で、まずはFAB分類のM1を考えた症例です。外注ですが、フローサイトも実施されています(スライド61)。

症例 24才 女性

末梢血				生化学							
WBC	3657	$\times 10^3/\mu l$	RBC	370	$\times 10^4/\mu l$	T-bil	0.2	mg/dl	Na	142	mEq/L
Seg	1	%	Hb	11.2	g/dl	GOT	44	IU/L	K	3.1	mEq/L
Ly		%	Hct	33.5	%	GPT	65	IU/L	Cl	104	mEq/L
Mo		%	PLT	6.6	$\times 10^4/\mu l$	LDH	942	IU/L	BUN	12.1	mg/dl
Blast	99	%				ALP	300	IU/L	Cre	0.7	mg/dl
						TP	6.9	g/dl	CRP	1.7	mg/dl

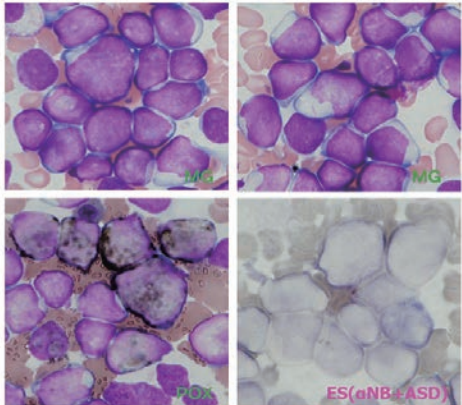
  

骨髓像	
NCC	684,000 / $\mu l$
Mpk	31 / $\mu l$
blast	94.8 %
myelo	0.2 %
stab	0.2 %
seg	0.2 %
Eo	0.2 %
E-bi	1.0 %
retl	0.8 %
M/E	95.6



スライド 59

形態的な所見



スライド 60


形態的な所見

- 大小不同、NC比大の織細網状のクロマチン構造を有する芽球様細胞を多数認め、1~数個の核小体を有している。
- 芽球比率94.8%(ANC)
- 芽球のPOX染色陽性率は1.3%(200count)
- エステラーゼ染色(±)、PAS染色(-)
- アウエル小体(+)

ANC: all nucleated bone marrow cells| 全骨髓有核細胞  
NEC: non-erythroid cells| 非赤芽球系有核細胞

- FAB分類で検討するとPOX陽性率からM0は否定できる。また骨髓系細胞が示唆される。
- 形態所見・芽球比率からFAB:M1が考えられる。

FAB:M1 形態的な基準  
POX:3% ↑  
芽球比率:90% ↑(NEC)  
アウエル小体:(+)



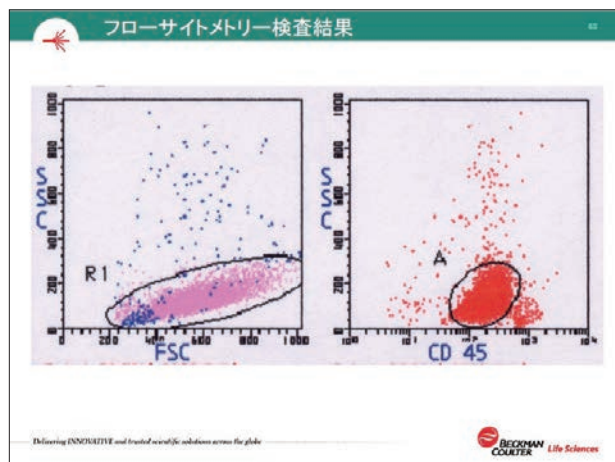
スライド 61

形態情報から、大小不同であるということは分かっているので、フローサイトの測定では大きさを表すFSが広がります。大きい細胞から小さい細胞までが存在していることから、スライド62左のような形で出てくることが、大方予測できます。もし、顆粒を多く含んでいるといった形態情報があれば、その分、側方散乱光の高い箇所にプロットされることが予測されます。昨今はCD45ゲーティングがメインとなり、散乱光のFS・SSでのプロットを見る機会は少ないかもしれませんが、このプロットは、形態情報を含んでいますので、形態情報と照らし合わせるにより、「自分が今見ているものは本来見たい細胞なのかどうか」を考えていただければと思います。

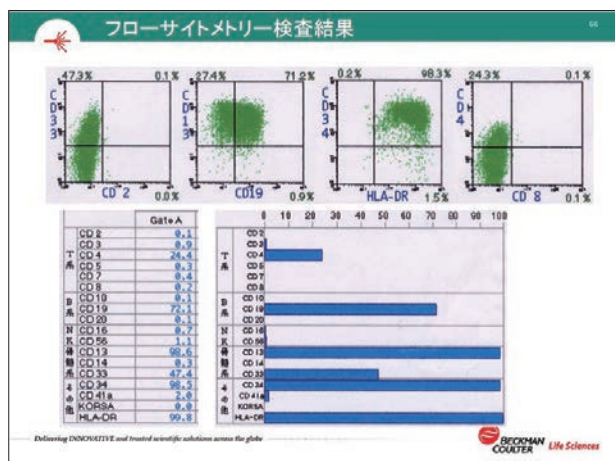
M1で少し若い細胞と考えると、当然、CD45は少し弱いところに出てきます(スライド62右)。この部分(ゲートA)を解析すると、スライド63のような結果が出てきます。M1と考えられていますので、骨髄系のCD13、CD33が出るのは問題ありません。CD14は成熟単球マーカーですから出ていません。M1でかなり若い細胞と考えられていますので、幹細胞のCD34、それからHLA-DRも陽性です。

T細胞系、B細胞系を見ると、CD4と、特にCD19が出ているのが非常に気になります。NK系はネガティブです。このデータではCD45のほかにCD19とCD13などの3カラーで測定されています。このCD19に関してはCD13と同じチューブで抗体反応されており、CD19、CD13 双方にプラスのダブルポジがあります(上段左2番目)。CD13陽性細胞が、CD19、共に発現していることがわかります。もう一つ気になったCD4に関しては、CD8との組み合わせなので、CD13陽性細胞がCD4を発現しているかどうかは分かりませんが、百分率で見ていることもあり、CD13の98.6%とCD4の24.4%の合算結果が100%を超えることから、同じ細胞表面上に発現していること

は予測できます。これらの結果から、先ほどの気になっておりましたアバラントのように思えるCD4とCD19、そのどちらもCD13陽性細胞が共発現して同じ細胞表面上にあることがわかります。



スライド 62

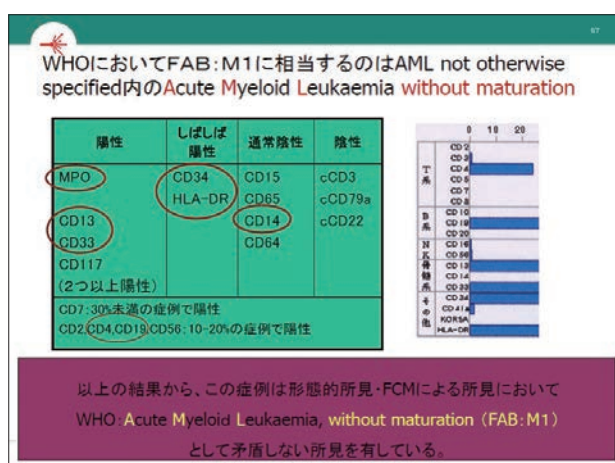


スライド 63

WHOの基準に当てはめられたスライドですが、陽性となるべきマーカーは、陽性となっており、陰性であるべきマーカーは陰性となっています。そして、CD4、CD19も10~20%の頻度で、陽性になることがあり得ると示されており、「WHO分類のAML without maturation, FAB分類のM1として矛盾しない」と診断された例となります。

最近は、「CD45ゲーティングを重視して、散乱光プロットはあまり見ていない」と言われる場合がありますが、散乱光のデータは形態情報と照らし合わせることができまので、ぜひ散乱光データもしっかり見ていただければと思っています。

ご清聴ありがとうございました。



スライド 64