

# CD 抗体を用いたシスメックス自動血液分析装置の白血球分類スキヤッタグラムにおける各白血球出現エリアの検証

河野 麻理, 近藤 民章, 高木 由里, 和田 淳, 船越 國宏

シスメックス株式会社 学術本部 セルアナリシスセンター：神戸市西区高塚台 4-4-4 (〒 651-2271)

## SUMMARY

シスメックス社製の自動血球計数装置に搭載されている白血球分類機能では、白血球を専用試薬で染色し、フローサイトメトリーの原理を用いてその染色強度と側方散乱光から2次元の白血球分類スキヤッタグラム (DIFF スキヤッタグラム) を描き、スキヤッタグラム上の出現位置の違いに基づき白血球の分類を行っている。一方、白血球のタイピングは、CD 抗原に対するモノクローナル抗体を用いることでも実施される。

今回我々は、CD 抗体によるタイピングと血液分析装置による分類の関係を CD 抗体と専用試薬の二重染色により検討した。

健常者末梢血から比重遠心と磁気ビーズ (MACS) 法のネガティブ分離により、顆粒球、T、B リンパ球、単球を分離した。分離した各細胞に FITC で標識した各種 CD 抗体を感作させ、さらに血球分析装置と同様の方法で専用試薬処理して、フローサイトメーター (FCM)、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) により解析した。

FCM 解析では、大部分の CD3 および CD19 陽性細胞が DIFF スキヤッタグラム上のリンパ球の位置に、CD14 陽性細胞が単球の位置に、CD16b 陽性細胞が好中球の位置に出現した。CLSM および TEM による観察でも、これらの細胞が、それぞれの白血球に特徴的な形態を呈していた。

DIFF スキヤッタグラム上で分類された白血球は CD 抗体染色によるタイピングと良く一致していた。

**Key Words** 自動血液分析装置, 白血球分類, CD 抗体, フローサイトメトリー, 二重染色

## はじめに

1891 年、Ehrlich らにより末梢血白血球に形態の異なる種々の細胞が混在していることが見いだされてから<sup>1)</sup> 100 年以上が経過した現在、白血球は、顆粒球である好中球、好酸球、好塩基球と単核球であるリンパ球および単球の 5 タイプに分類され<sup>2)</sup>、その比率は炎症、白血病、アレルギー反応などの状態把握において大変重要なものとなっている。

例えば、好中球は細菌の食作用を主な役割としているため、細菌性炎症では動員・増加が見られる。しかしながら、ウイルス性炎症では補体の活性化に伴う凝集や抗体による破壊により増加せず、むしろ減少する。単球は、細菌の食作用とリンパ球への抗原提示に加え、炎症反応に関わるため、各種感染症時に増加が見られる。リンパ球は、体液性免疫に重要な役割を果たしているため、減少

すると免疫不全を引き起こす。また、白血病やアレルギー反応では、どちらも白血球数が増加する<sup>2-8)</sup>。

このように白血球はタイプにより生体内における役割が異なるため、それぞれ特徴的な形質を発現している。すなわち、形態や発現しているタンパク質は、白血球のタイプに依存して特徴的である。特に白血球表面に特異的に発現する膜タンパク質 (CD 抗原) に対するモノクローナル抗体 (CD 抗体) は、白血球のタイピングによく利用されている<sup>9, 10)</sup>。

臨床検査室での CLSI の推奨法 (H20-A) では、形態の違いを利用する。具体的には、ウェッジ法によって作製した血液塗抹標本をメイギムザ染色し、各白血球の核や細胞質の形態および中性、塩基性、酸性色素への親和性により、顕微鏡下で分類するというものである。2名の熟練した技術者が各自 200 カウントを実施し、その平均値を真値とする<sup>11)</sup>。

加えて、1980年代からは、各メーカーにより白血球 5 分類機能を搭載した自動血液分析装置が開発され、広く活用されている。大部分がフローサイトメトリーの原理を利用し、各白血球を光学的、電気的、細胞化学的な性質により分類している<sup>12)</sup>。シスメックスの自動血液分析装置では、白血球を界面活性剤を含む専用試薬ストマトライザ-4DL (4DL) および蛍光染色液を含む専用試薬ストマトライザ-4DS (4DS) で処理し、これらが各白血球へ及ぼす影響の違いを、フローサイトメトリーの原理を用いて染色強度と側方散乱光の 2 次元散布図 (DIFF スキャッタグラム) で表現し、この 2 次元散布図上での出現位置の違いにより、分類している<sup>13, 14)</sup>。

これまで、自動血液分析装置の白血球分類機能における妥当性の検討は、同一の検体について、別々に血液塗抹標本による標準法または CD 抗体によるタイピングを実施し、血液分析装置による測定結果と比較するものが主流であった<sup>15-21)</sup>。今回我々は、同一の白血球を直接各種 CD 抗体および自動血液分析装置の専用試薬で二重染色し、汎用フローサイトメーター (FCM) を用いて再現した DIFF スキャッタグラム上で解析することで、CD 抗体によるタイピングと DIFF スキャッタグラムによる分類の関係を同一細胞レベルで直接的に明らかにした。さらに、

共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて同様の白血球を観察し、DIFF スキャッタグラム上の出現位置の違いが各白血球のどのような形態の違いに由来しているかについても検討を加えた。

## 材料および方法

### 1. 血液

5名の健常者 (女性 3 名, 男性 2 名: インフォームド・コンセント実施済み) の静脈から得た末梢血を、EDTA 採血管 (テルモ社) に採取した。単核球層および顆粒球層を、 $d=1.077$  と  $d=1.119$  の 2 種類のリンパ球分離液 (ナカライテスク社) でメーカーの説明書に従って比重遠心により分離し、PBS で洗浄した。

### 2. 磁気細胞分離 (MACS)

MACS システム (ステムセル・テクノロジーズ社) のネガティブセレクションを用いて、単核球層から、T リンパ球, B リンパ球, 単球を、メーカーの説明書に従い分離した。

### 3. 細胞の染色

顆粒球層, 分離した T リンパ球, B リンパ球および単球を、各々 FITC で標識した CD16b (好中球のマーカー), CD3 (T リンパ球のマーカー), CD19 (B リンパ球のマーカー) および CD14 (単球のマーカー) モノクローナル抗体 (ダコ社) 溶液 (20 mg/L in PBS) 中で 30 分間、4℃ でインキュベートした。FITC で標識したマウス IgG1 抗体 (ダコ社) を陰性コントロールとして用いた。PBS で洗浄後、各細胞を Sysmex XE-2100™ (以下、XE-2100; シスメックス社) と同様の手順 (細胞懸濁液: 18  $\mu$ L, ストマトライザ-4DL: 882  $\mu$ L, ストマトライザ-4DS: 18  $\mu$ L を混合) で、ストマトライザ-4DL (シスメックス社) とストマトライザ-4DS (シスメックス社) で処理した。

### 4. FCM による解析

染色した細胞を FACSCalibur™ (BD バイオサイエンス社) で解析した。

## 5. CLSM による観察

染色した細胞をポリ-L-リジン（シグマ社）コートしたカバースリップに接着し、共焦点レーザー顕微鏡（IX81；オリンパス社，CSU-X1；横河電機社，ImagEM；浜松フォトニクス社）で観察した。

## 6. TEM による観察

染色した細胞を1%グルタルアルデヒド（Electron Microscopy Sciences 社）／PBS で16時間，4℃で固定した。固定した細胞をCytospin®（サーモ・フィッシャー・サイエンティフィック社）を用いてシランコートしたスライドガラスに接着し，1%四酸化オスミウムで30分，4℃で後固定した。四酸化オスミウムによる固定後，エタノール系列で脱水し，クエトール812（日新EM社）で倒立包埋した。ウルトラミクロトーム，Ultracut UCT（ライカ・マイクロシステム社）で80～100 nmの超薄切片を作製し，透過型電子顕微鏡H-7500（日立ハイテクノロジーズ社）で観察した。

## 結 果

まず，CD抗体によるタイピングとDIFFスキヤッタグラムによる分類の関係を明らかにするため，FITCで標識したCD抗体による染色と専用試薬に

よる処理を施した顆粒球層，Tリンパ球，Bリンパ球および単球について，FCM解析を実施した（**図1**）。スキヤッタグラムは，同じ全血をXE-2100で測定して得たDIFFスキヤッタグラム（**図1-B**）に基づき，FACSCalibur™で縦軸に4DS赤色蛍光強度を，横軸に側方散乱光を取り，感度調整を実施して再現した（**図1-A**）。再現したDIFFスキヤッタグラムの縦軸をFITC緑色蛍光強度に変更し，CD16b-FITC（FITCで標識したCD16bモノクローナル抗体）で染色した顆粒球層を解析した（**図1-C**）。陰性コントロールで染色した顆粒球層（データは見せない）と比較してFITCで強く染色された細胞群にゲートをかけ（**図1-C**），スキヤッタグラムの縦軸を4DS赤色蛍光強度に戻し解析したところ（**図1-D**），CD16b-FITCで強く染色された細胞群，すなわちCD16b陽性細胞は，FACSCaliburで再現したDIFFスキヤッタグラム上，好中球の位置に出現した。さらに，CD3-FITCで染色したTリンパ球（**図1-E**），CD19-FITCで染色したBリンパ球（**図1-G**）およびCD14-FITCで染色した単球（**図1-I**）についても顆粒球層と同様に解析を行ったところ，CD3陽性細胞およびCD19陽性細胞はどちらもリンパ球の位置に（**図1-F，H**），CD14陽性細胞は単球の位置に（**図1-J**）出現した。

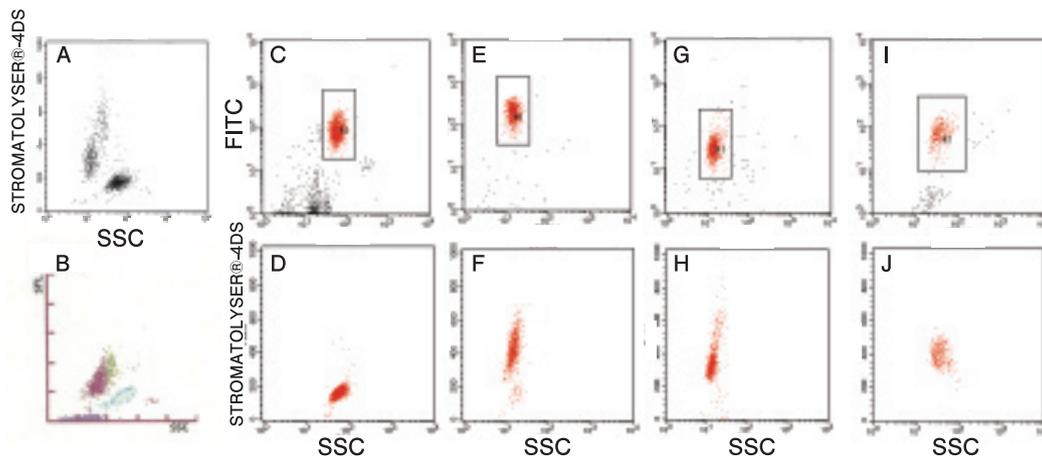


図1 FCMによる解析

FACSCalibur™を用いて，縦軸にストマトライザ-4DS蛍光強度を，横軸に側方散乱光をとり感度調整し，DIFFスキヤッタグラムを再現した（A）。同様の全血を用いてXE-2100測定によりDIFFスキヤッタグラムを得た（B）。CD16b-FITCで顆粒球層を染色し，再現したDIFFスキヤッタグラムの縦軸をFITC蛍光強度に変更したもので解析した（C）。陰性コントロール抗体で染色した細胞（データは掲載しない）に比べて，FITCで強く染色されたクラスターにゲートをかけ（C），縦軸をストマトライザ-4DS蛍光強度に戻し，再現したDIFFスキヤッタグラムで解析した（D）。CD3-FITCで染色したTリンパ球（E，F），CD19-FITCで染色したBリンパ球（G，H），CD14-FITCで染色した単球（I，J）を顆粒球層と同様に解析した。

続いて、CD16b-FITCで細胞表面が緑色に染色された好中球(図2-A)、CD3-FITCで染色されたTリンパ球(図2-B)、CD19-FITCで染色されたBリンパ球(図2-C)、CD14-FITCで染色された単球(図2-D)について、4DS(赤色)による染色の様子をCLSMを用いて観察した。好中球は、4DSにより特徴的に分葉した核の周辺、細胞質、細胞小器官が染色されていた(図2-A)。TおよびBリンパ球の染色の特徴はほぼ同じで、核小体と細胞質が染色された(図2-B, C)。単球では不規則な形状の核の周辺、細胞質、細胞小器官が染色され、細胞小器官の染色は好中球より強かった(図2-D)。このように、白血球のタイプに依存して、4DSの染色パターンには特徴があった。図2-Eに、陰性コントロール抗体-FITCと4DSで染色した顆粒球層の像を示すが、FITC(緑色)で細胞のタイプの確認ができなくても、

4DS(赤色)染色の特徴から十分に各白血球のタイプが推察できた。

最後に、TEMを用いて各白血球の超微形態を観察した。顆粒球層には、主に顆粒球と赤血球が認められた(図3-A)。また、分離したTリンパ球(図3-B)、Bリンパ球(図3-C)および単球(図3-D)についても、他の血球の混ざり込みが認められたが、それぞれの血球の割合が向上している様子が確認できた。図3-A~Dの高倍率の像を図3-E~Hに示した。また、専用試薬による処理を施した後の各血球の代表的な像を図3-I~Lに示した。これらの像から、単核球であるTリンパ球(図3-J)、Bリンパ球(図3-K)、単球(図3-L)では、顆粒球(図3-I)に比べ、細胞膜の損傷が著しいことがわかった。さらに、白血球のタイプにより、核の形の変化や細胞小器官の残存に特徴があることもわかった。

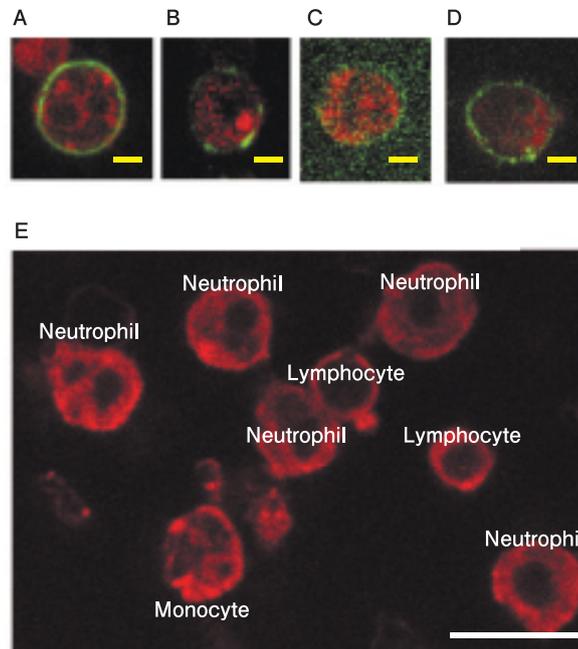


図2 二重染色のCLSMによる観察

好中球(A)、Tリンパ球(B)、Bリンパ球(C)または単球(D)の表面をCD16b-FITC、CD3-FITC、CD19-FITCまたはCD14-FITCで緑色に染色した上で、ストマトライザ-4DSで赤色に染色した。ストマトライザ-4DSの染色は白血球の種類により特徴的であった。顆粒球層を陰性コントロール抗体と専用試薬で染色した(E)。白い文字は、それらの染色動態から、白血球の種類を予測したものである。Yellow Bar=2 $\mu$ m, White Bar=10 $\mu$ m

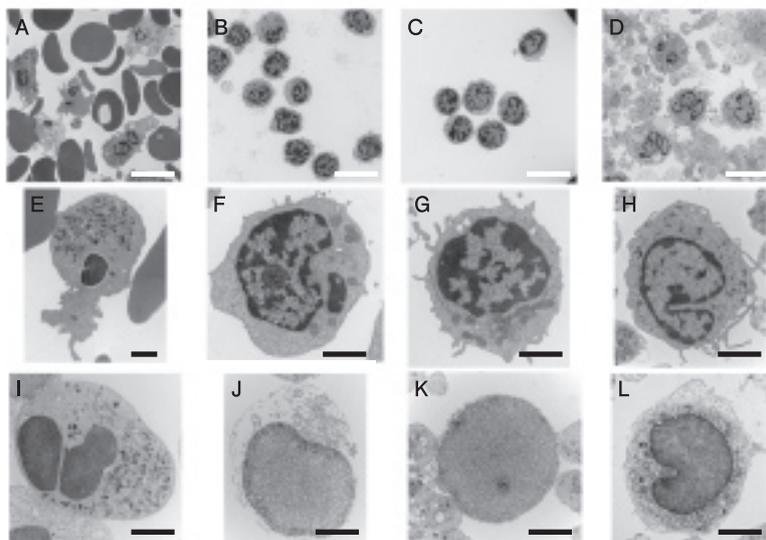


図3 TEMによる観察

顆粒球層 (A), Tリンパ球 (B), Bリンパ球 (C) および単球 (D) の高倍率像を (E) ~ (H) に示した。専用試薬処理後の代表的な白血球の像を (I) ~ (L) に示した。White Bar = 10  $\mu$ m, Black Bar = 2  $\mu$ m

## 考 察

自動血液分析装置は高価な抗体を用いず、安価な界面活性剤と染色液を用いて、迅速簡便な白血球分類を可能にした。これまでに、様々なメーカーからいろいろなタイプの自動血液分析装置が開発されてきたが、主にそれらの妥当性は、同一検体レベルで、血液塗抹標本を用いた形態観察による分類やCD抗体を用いたFCMによるタイピングなど、他の測定方法の結果と比較することで検証されてきた<sup>15-21)</sup>。

今回我々は、CD抗体と血液分析装置の専用試薬で二重染色した白血球を汎用FCMで解析し、各種表面マーカーが陽性の細胞が、白血球分類スキャッタグラム上の適切な位置に出現することを明らかにした。このことは、血液分析装置の白血球分類スキャッタグラムによる白血球分類が、1つ1つの細胞レベルで、CD抗体によるタイピングと良く一致していることを示唆している。

また、CLSMでの観察から、白血球のタイプに依存して専用試薬の染色パターンに特徴があることを明らかにした。専用試薬の染色パターンには、陰性コントロール抗体で染色した像(図2-E)であって

も、各白血球タイプが推察できるほどの差異があった。これが側方散乱光や側方蛍光の差に反映され、白血球分類スキャッタグラム上の白血球出現位置に違いを生じさせていることが推察される。

加えて、TEMによる各白血球の観察から、専用試薬処理後の細胞膜の損傷、核の形態および細胞小器官の残存などが、白血球の種類に依存して異なることが確認できた。特に単核球の細胞膜の損傷は顆粒球に比べて著しかった。これら超微形態の違いがCLSM観察により得られた細胞の染色パターンへ及ぼす影響については今後明らかにしていく必要があるが、専用試薬に含まれる界面活性剤が細胞膜へ及ぼす影響の度合いが染色液の導入の度合いに関連している可能性は高い。

細胞膜には、細胞シグナル伝達への関与が考えられているスフィンゴ糖脂質と、コレステロールに富む脂質ラフトと呼ばれる小領域があり、Triton X-100のような非イオン性界面活性剤に対し不溶性であることから、detergent-resistant membranes (DRM) と呼ばれている<sup>20, 24)</sup>。白血球は生体内における役割に応じて特徴的な形態を発現しているため、白血球の

種類により、脂質ラフトのような界面活性剤への抵抗性が高い領域の割合が異なっていることが推察でき、これがDIFFスキヤッタグラム上での白血球分類に貢献している可能性もある。

さらに、最近では、細胞の状態の変化が脂質ラフトに影響を及ぼし、界面活性剤への抵抗性を変化させるという報告もある。好中球の細胞骨格の変化に脂質ラフトが関与している<sup>22)</sup>、Tリンパ球と抗原提示細胞との細胞間接着部位においてT細胞抗原受容体(TCR)シグナルに続いて脂質ラフトの集合が起こる<sup>23, 24)</sup>、単球を薬剤で刺激すると無刺激の状態に比べ界面活性剤の影響を受けにくくなり表面抗原の流出の度合いに違いが生じる<sup>25-27)</sup>などがいわれている。界面活性剤の処理条件を適切に設定することで、免疫応答に惹起される細胞活性化や薬剤の刺激で血球が起こす変化を利用した、免疫応答や薬剤感受性のモニタリングの可能性が示唆される。

## 参考文献

- 1) RILEY J. The riddle of the mast cells ; a tribute to Paul Ehrlich. *Lancet*. 1954 ; 266 ( 6817 ) : 841-843.
- 2) Martin S. Blumenreich. The White Blood Cell and Differential Count. *Clinical Methods*. 1990 ; 153 : 724-727.
- 3) Graham GS. THE HEMIC BASOPHIL. *J Exp Med*. 1920 ; 31 ( 2 ) : 209-231.
- 4) GRAHAM HT, LOWRY OH, WHEELWRIGHT F et al. Distribution of histamine among leukocytes and platelets. *Blood*. 1955 ; 10 ( 5 ) : 467-481.
- 5) EHRICH WE. Histamine in mast cells. *Science*. 1953 ; 118 ( 3072 ) : 603.
- 6) VALENTINE WN. Quantitative biochemical studies on leukocytes in man : a review. *Blood*. 1951 ; 6 ( 9 ) : 845-854.
- 7) LAWRENCE JS. Physiology and functions of the white blood cells. *J Am Med Assoc*. 1955 ; 157 ( 14 ) : 1212-1218.
- 8) EHRICH WE. The functional significance of the various leukocytes in inflammation. *J Mt Sinai Hosp N Y*. 1949 ; 15 ( 6 ) : 337-342.
- 9) Foon KA, Schroff RW, Gale RP. Surface markers on leukemia and lymphoma cells : recent advances. *Blood*. 1982 ; 60 ( 1 ) : 1-19.
- 10) Kishimoto T ed. *Leucocyte Typing VI : White Cell Differentiation Antigens ( Hardcover )*. Leucocyte Typing. 1997 ; VI : 1376.
- 11) NCCLS. Reference leukocyte differential count ( proportional ) and evaluation of instrumental methods. *Approved standard*. NCCLS document. H20-A.
- 12) Tatsumi N. Study Group of Laboratory Hematology. *Teaching Book on Instrumentation Technology - Basic Principle of Automated Blood Cell Analyzers -*. Tokyo ; Uchu-do Yagi Publishing Co., Ltd ; 1991. 42-49.
- 13) Fujimoto K. Principles of Measurement in Hematology Analyzers Manufactured by Sysmex Corporation. *Sysmex J Int*. 1999 ; 9 ( 1 ) : 31-44.
- 14) Ruzicka K, Veitl M, Thalhammer-Scherrer R et al. The new hematology analyzer Sysmex XE-2100 : performance evaluation of a novel white blood cell differential technology. *Arch Pathol Lab Med*. 2001 ; 125 ( 3 ) : 391-396.
- 15) Hubl W, Tlustos L, Bayer PM. Use of precision profiles to evaluate precision of the automated leukocyte differential. *Clin Chem*. 1996 ; 42 ( 7 ) : 1068-1073.
- 16) Pierre RV. Peripheral blood film review. The demise of the eyecount leukocyte differential. *Clin Lab Med*. 2002 ; 22 ( 1 ) : 279-297.
- 17) Stamminger G, Auch D, Diem H et al. Performance of the XE-2100 leukocyte differential. *Clin Lab Haematol*. 2002 ; 24 ( 5 ) : 271-280.
- 18) Nakul-Aquaronne D, Sudaka-Sammarcelli I, Ferrero-Vacher C et al. Evaluation of the Sysmex XE-2100 hematology analyzer in hospital use. *J Clin Lab Anal*. 2003 ; 17 ( 4 ) : 113-123.
- 19) Linsen J, Jennissen V, Hildmann J et al. Identification and quantification of high fluorescence-stained lymphocytes as antibody synthesizing/secretory cells using the automated routine hematology analyzer XE-2100. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007 ; 72 ( 3 ) : 157-166.
- 20) Friis-Hansen L, Saelsen L, Abildstrom SZ et al. An algorithm for applying flagged Sysmex XE-2100 absolute neutrophil counts in clinical practice. *Eur J Haematol*. 2008 ; 81 ( 2 ) : 140-153.
- 21) Susic M, Kolevska T, Kopjar B et al. Accuracy of routine flow-cytometric bitmap selection for three leukocyte populations. *Cytometry*. 1989 ; 10 ( 4 ) : 442-447.
- 22) Nebl T, Pestonjamas KN, Leszyk JD et al. Proteomic analysis

- 
- of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes. *J Biol Chem.* 2002 ; **277** ( 45 ) : 43399-43409.
- 23) Kabouridis PS. Lipid rafts in T cell receptor signalling. *Mol Membr Biol.* 2006 ; **23** ( 1 ) : 49-57.
- 24) de Wet B, Harder T. Are rafts involved in T-cell receptor signalling? Introduction to the Talking Point on the involvement of lipid rafts in T-cell activation. *EMBO Rep.* 2008 ; **9** ( 6 ) : 523-524.
- 25) Wolf Z, Orso E, Werner T et al. Monocyte cholesterol homeostasis correlates with the presence of detergent resistant membrane microdomains. *Cytometry A.* 2007 ; **71** ( 7 ) : 486-494.
- 26) Wolf Z, Orso E, Werner T et al. A flow cytometric screening test for detergent-resistant surface antigens in monocytes. *Cytometry A.* 2006 ; **69** ( 3 ) : 192-195.
- 27) Zhou Y, Hancock JF, Lichtenberger LM. The nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin induces heterogeneity in lipid membranes : potential implication for its diverse biological action. *PLoS One.* 2010 ; **21** ; **5** ( 1 ) : e8811.

## Validation of Gating and Leukocyte Classification on Sysmex XE Series Automated Cell Counters

Mari KONO, Tamiaki KONDO, Yuri TAKAGI, Atsushi WADA and Kunihiro FUNAKOSHI

Cell Analysis Center, Scientific Affairs, Sysmex Corporation,  
4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe 651-2271

### SUMMARY

Leukocyte classification on Sysmex XE series hematology analyzers involves staining leukocytes with proprietary Polymethine Dye reagents that have affinity for nucleic acids. The outputs are two-dimensional scatter diagrams of side scatter and fluorescence intensity (DIFF scattergrams) subsequent to flow cytometric analysis of the stained cells. Leukocyte classification is based on the location of treated cells in the DIFF scattergram.

Comparative methods for leukocyte typing can be done using monoclonal antibodies to CD antigens expressed on the cell surfaces.

The present study investigates the relationship between cell-classification by means of CD antibodies versus cell classification on the Sysmex hematology analyzer. This was achieved by double staining cells with both CD antibodies and Sysmex cell counting reagents.

Granulocytes, T-, B-lymphocytes, and monocytes were prepared using density gradient centrifugation and negative selection using magnetic cell sorting methods. Samples were peripheral blood samples from healthy human subjects. Isolated cells were stained with suitable FITC-conjugated CD antibodies. Subsequently the same cells were incubated in Sysmex cell counting reagents in a way that mimics conditions used in the hematology cell counters. Post treatment, the cells were analyzed by flow cytometry (FCM), confocal laser scanning microscopy (CLSM), and transmission electron microscopy (TEM).

FCM analysis revealed that most CD3- and CD19-; CD14-; and CD16b-positive cells appeared in the lymphocyte; monocyte; and neutrophil gates on DIFF scattergrams, respectively. CLSM and TEM observation shows characteristic morphological changes for each type of leukocyte, related to the degree of membrane disruption and nucleic acid distribution within the various cell types.

This experimental approach appears to validate the method for classification of leukocytes on DIFF scattergrams versus classification on the basis of surface antigen labeling.

**Key Words** Hematology Analyzer, Leukocyte Classification, CD Antibody, Flow Cytometry, Double-staining

---