

CD71 陽性網赤血球における シスメックス網赤血球測定試薬 RET SEARCH (II) の染色動態 — ニューメチレンブルーとの比較 —

河野 麻理, 高木 由里, 河内 佐和子, 近藤 民章, 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

末梢血中の網赤血球数は造血機能の指標となるため、網赤血球数の計数は臨床的に重要である。網赤血球の計数は、CLSI の推奨するニューメチレンブルー染色後に顕微鏡下で計数する手法、CD71 (トランスフェリンレセプター) を発現している赤血球を抗 CD71 蛍光抗体とフローサイトメーターで検出する方法、そして自動血球分析装置による方法が広く利用されている。しかし、それぞれの方法により検出される「網赤血球」が同じものかどうかの比較検討はこれまで報告されていなかった。そこで今回我々は、ニューメチレンブルー・抗 CD71 蛍光抗体・シスメックス製自動血液分析装置の網赤血球測定専用試薬 RET SEARCH (II) の 3 手法による染色像を比較することで、それぞれの手法で検出する網赤血球が同じものかどうかを検討した。さらに CD71 陽性赤血球の電子顕微鏡観察を行い、形態学的な特徴についても考察を加えた。その結果、ニューメチレンブルーと RET SEARCH (II) の網赤血球染色動態は類似しており、ほぼ同様の網赤血球を認識していること、CD71 陽性網赤血球はニューメチレンブルーや RET SEARCH (II) により染色される網赤血球の中でもより幼若なものであること、が強く示唆される結果を得た。

Key Words 網赤血球, CD71 (トランスフェリン受容体), ニューメチレンブルー, RET SEARCH (II), 自動血液分析装置, フローサイトメトリー

はじめに

網赤血球とは末梢血中の幼若な赤血球のことで、脱核のために生じた深い皺を持つ球状細胞であり、内部にはミトコンドリアや小胞体といった構造が残存している¹⁾。脱核は末梢血中へ放出される前の赤芽球の段階で起こるが、放出後の早い時期には RNA が残存しており、放出後 24 ~ 36 時間で徐々に消失することが知られている^{2,3)}。

全赤血球中の網赤血球の比率変化は、骨髄産生や赤血球新生の増減を反映しているため、臨床的に重要であり、鉄欠乏性貧血や骨髄抑制からの回復の指標として広く用いられている^{1,4-7)}。また、網赤血球の中でもとりわけ幼若な細胞の増加が骨髄移植の生着の指標として有用であるとも報告されている^{8,9)}。

幼若な赤血球を検出する方法として CD71 (トランスフェリン受容体) の発現が利用されている。

CD71 は、鉄輸送タンパク質トランスフェリンとの結合により、鉄代謝を調節する膜結合型タンパク質で、幼若な赤血球に発現し、成熟に伴い細胞表面から消失していく¹⁰⁻¹²⁾。それ故、幼若な赤血球のマーカーとして広く知られている。

また、CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) で推奨されている網赤血球の測定方法には、ニューメチレンブルー¹³⁾を用いた超生体染色が用いられている¹⁴⁾。網赤血球をニューメチレンブルーで染色すると、網状の残存構造が確認できる。この網状構造は主に rRNA が凝集したものと考えられており¹⁵⁾、成熟するに従って減少することが知られている。そのためハイルマイヤーはこの網状構造の形態と量を指標として、網赤血球を I~IV の成熟段階に応じた 4 つのグループに分類している¹⁶⁾。

さらに近年では、各メーカーから網赤血球測定システムを搭載した自動血液分析装置が開発されている。自動血液分析装置では、幼若な網赤血球に残存している核酸を CD4K 530 やオーラミン O、チアゾールオレンジなどの核酸と親和性の高い蛍光色素で染色し、フローサイトメトリーの原理で網赤血球の検出、解析を行う¹⁷⁾。シスメックス社の自動血液分析装置 XE-2100, XE-5000, XT-2000i, XT-4000i などに搭載された網赤血球測定機能 RET チャンネルでは、ポリメチレン系の核酸親和性蛍光色素を含む RET SEARCH (II) が用いられ、赤血球を RET SEARCH (II) の染色性により HFR (High-Fluorescence Ratio; 高蛍光網赤血球比率), MFR (Middle-Fluorescence Ratio; 中蛍光網赤血球比率), LFR (Low-Fluorescence Ratio; 低蛍光網赤血球比率), RBC (Red Blood Cell; 成熟赤血球) の、成熟段階に応じた 4 つのグループに分画している¹⁸⁻²⁰⁾。

上に挙げた 3 つの網赤血球検出方法、すなわち、CD71 発現を利用する方法、ニューメチレンブルーを利用する方法、核酸親和性蛍光色素を利用する方法は、臨床および研究の分野で広く利用されている¹⁾。近年の自動血液分析装置の普及に伴い、従来法との整合性の検証が重要になると思われるが、筆者らの知る限り、これまでそれぞれの方法で検出された網赤血球が同じのものであるかどうかについて、具体的に比較・検証した報告はなかった。

そこで本論文では、CD71 陽性網赤血球のニューメチレンブルーまたは核酸親和性蛍光色素 RET SEARCH (II) による染色態度から、3 つの方法において定義される網赤血球の成熟レベルを比較した。

材料および方法

1. 材料

DNA 分子量マーカーは 1 Kb Plus DNA Ladder (ライフテクノロジーズ社)、RNA 分子量マーカーは 0.5 ~ 10 Kb RNA Ladder (ライフテクノロジーズ社) を用い、電気泳動後のゲルの検出には CCD イメージャー、ImageQuant LAS 4010 (GE ヘルスケア社) を用いた。

健常者ボランティアから静脈採血 (EDTA 2K) により得た末梢血を試料として用いた。

自動血球分析装置は XE-2100 (シスメックス社)、汎用フローサイトメトリーは FACSCalibur (ベクトン・ディッキンソン社)、共焦点レーザー顕微鏡は IX81 (オリンパス社)、CSU-X1 (横河電機社) および ImagEM (浜松ホトニクス社)、透過型電子顕微鏡は H-7500 (日立ハイテクノロジーズ社)、電解放出形走査型電子顕微鏡は JSM-7500 (日本電子社) を用いた。ビオチン標識した抗ヒト CD71 モノクローナル抗体は Clone DF-1513 (アンセル社) を用い、陰性コントロールとして、ビオチン標識抗マウス CD71 モノクローナル抗体 (BMA バイオケミカルズ社) を用いた。

2. 方法

1) 電気泳動による RET SEARCH (II) と核酸の親和性の検討

DNA 分子量マーカー (1g/L) を電気泳動した 1% アガロースゲルを、1mg/L 臭化エチジウム溶液中、リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH7.4) で 10,000 倍希釈した RET SEARCH (II) (シスメックス社) 溶液中、または両者を含む溶液中で一晩振とうして染色した。RNA については、市販の RNA 分子量マーカー (1g/L) 5 μ L または 10 μ L と RET SEARCH (II) (シスメックス社) 2 μ L を予め混合し、全量を 15 μ L とした検体を臭化エチジウム (ナカライテスク社) を含む 1% アガロースゲルで電気泳動し、

312 nm で励起して 605 nm の臭化エチジウムを、630 nm で励起して 670 nm の RET SEARCH (II) 蛍光を、それぞれ CCD イメージャーを用いて検出した。

2) 血液

3名の健常者末梢血(女性2名, 男性1名: インフォームド・コンセント確認済み)をEDTA採血管(テルモ社)に回収した。2種類のリンパ球分離液 $d=1.077$ および $d=1.119$ (ナカライテック社)を用いた比重遠心(700g, 20min)により, 網赤血球増多血液を作製した²⁾。

3) 共焦点レーザー顕微鏡による観察

網赤血球増多血液をPBSで50倍に希釈し, ウシ血清アルブミン(シグマ社)を1%濃度に溶解したPBS(1%BSA(PBS))で4℃, 30分間ブロッキングを行った。PBSで洗浄後, ビオチン標識した抗ヒトCD71モノクローナル抗体を1%BSA(PBS)で50倍希釈して作製した抗体溶液中(抗体最終濃度20mg/L)に懸濁し, 4℃で30分間反応させた。反応させた細胞を, PBSで洗浄後, Alexa488標識ストレプトアビジン(ライフテクノロジーズ社)で4℃, 30分間反応させた後に, PBSで洗浄した。さらに自動血液分析装置XE-2100と同じ方法(全血: 4.5 μ L, RET SEARCH Dilution buffer (シスメックス社): 895.5 μ L, RET SEARCH (II): 18 μ Lを混合し, 40℃, 30秒間インキュベートする)で, RET SEARCH (II)により染色した細胞を, 直ちにポリ-L-リジンコートしたスライドガラスに貼り付け, 共焦点レーザー顕微鏡(Alexa488検出波長: 500~540nm, RET SEARCH (II)検出波長: >660nm)で観察した。

4) FACS 解析

網赤血球増多血液を共焦点レーザー顕微鏡と同じ手順で染色し, FACSCaliburで解析した。

5) CD71 陽性網赤血球の磁気ビーズ分離 (Magnetic Cell Sorting, 以下 MACS)

網赤血球増多血液をPBSで50倍に希釈し, 1%BSA(PBS)で4℃, 30分間ブロッキングを行った。

PBSで洗浄後, ビオチン標識した抗ヒトCD71モノクローナル抗体を1%BSA(PBS)で50倍希釈して作製した抗体溶液中(抗体最終濃度20mg/L)に懸濁し, 4℃で30分間反応させた。続いてビオチンセレクションキット(ステム・セル・テクノロジーズ社)を用いて磁気ビーズを付着させ, 強力磁石(ステム・セル・テクノロジーズ社)で陽性網赤血球を分離した。

分離した細胞懸濁液をXE-2100と同じ方法でRET SEARCH (II)により染色し, 共焦点レーザー顕微鏡(RET SEARCH (II)検出波長: >660nm)観察およびFACS解析を行った。

同様の分離細胞をニューメチレンブルーで超生体染色し, 光学顕微鏡で観察を行った。

6) 網赤血球増多血液の免疫電子顕微鏡法による解析

6-1) 免疫反応

ビオチン標識抗CD71抗体で4℃, 30分間反応させた網赤血球増多血液をPBSで洗浄後, 10nmコロイド金標識ストレプトアビジン溶液(BBインターナショナル社)中で4℃, 30分間反応させた。さらにこの細胞を1%グルタルアルデヒド(PBS)で4℃, 16時間固定した。

6-2) 透過型電子顕微鏡試料作製

シランコートのスライドガラスにサイトスピン(シャンドン社)を使用して6-1で作製したサンプルを貼り付け(120g, 10分間), 1%四酸化オスミウム(PBS)で4℃, 30分間固定後, エタノール系列で脱水を行い, Quetol 812(日新EM社)で倒立包埋を行った。80~100nmの超薄切片をウルトラミクロトーム(ライカ社)で作製し, 透過型電子顕微鏡で観察した。

6-3) 走査型電子顕微鏡試料作製

ポリ-L-リジンコートしたガラス片に6-1で作製したサンプルを貼り付け, 1%四酸化オスミウム(PBS)で4℃, 30分間固定後, エタノール系列で脱水を行い, t-ブチルアルコールに置換した。凍結乾燥装置(日立ハイテクノロジーズ社)にてサンプルを乾燥し, 無蒸着で電解放出形走査型電子顕微鏡による観察を行った。

結果

1. CD71 の発現と RET SEARCH (II) 染色性の比較

RET SEARCH (II) が核酸を染色することを、電気泳動した DNA または RNA を染色することで確認した。DNA については、DNA 分子量マーカーをアガロースゲルで電気泳動した後、臭化エチジウム溶液、RET SEARCH (II) 溶液、または両者を含む溶液で染色した (図 1-A)。RNA については、泳動後のアガロースゲルを染色することが難しかったので、臭化エチジウムを含む 1% アガロースゲル中で、予め RET SEARCH (II) と混合した RNA 分子量マーカーを電気泳動した (図 1-B)。どちらの実験でも、紫外線による励起では臭化エチジウムで染色したバンドが検出された (図 1-A, B 左)。635 nm の赤色光による励起では、RET SEARCH (II) で染色したゲルのみでバンドが検出された (図 1-A, B 右)。以上の実験結果は、RET SEARCH (II) が核酸を染色することを示していた。

なお、ニューメチレンブルーによるアガロースゲルの染色も試みたが、ゲル全体が青く染まってしまい核酸のバンドを検出することはできなかった (Data not shown)。

次に、広く利用されている 3 つの網赤血球検出方法を比較するために、まず、抗 CD71 モノクローナル抗体と RET SEARCH (II) の比較を行った。比重遠心により、健常者末梢血から分画した網赤血球増多血液を、抗 CD71 モノクローナル抗体と RET SEARCH (II) で二重染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。図 2-A に 4 段階の成熟段階の典型的な赤血球を示した。成熟した赤血球は CD71 モノクローナル抗体にも RET SEARCH (II) にも染色されなかった (図 2-A 左)。細胞小器官を残存している円盤形の未成熟赤血球は RET SEARCH (II) によって染色されたが、抗 CD71 モノクローナル抗体には染色されなかった (図 2-A 左から 2 列目)。

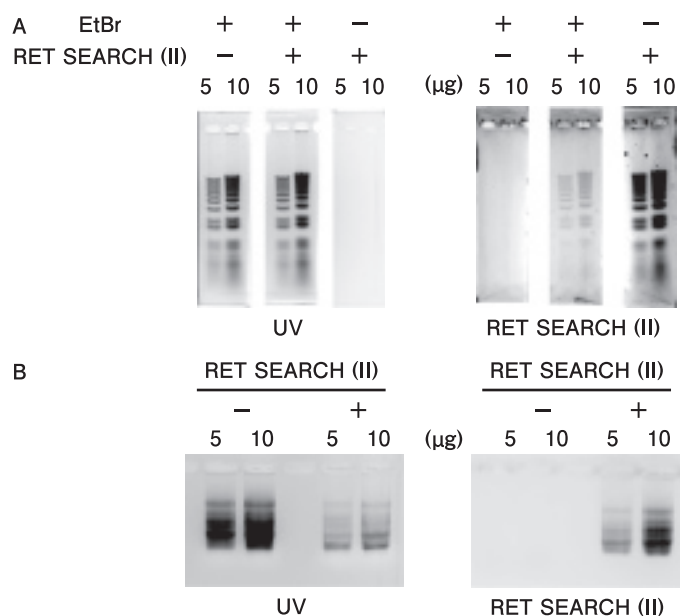


図 1. RET SEARCH (II) は DNA, RNA を染色する

(A) DNA 分子量マーカーを 1% アガロースゲルで泳動し、1mg/L 臭化エチジウム溶液、PBS で 10,000 倍希釈した RET SEARCH (II) 溶液または両方を含む溶液で染色した。

(B) RNA 分子量マーカー (1g/L) 5 μ L または 10 μ L を RET SEARCH (II) 2 μ L と混合し、臭化エチジウムを含む 1% アガロースゲルで電気泳動した。(A), (B) とも、左は UV (波長 312 nm) で励起し核酸と結合した臭化エチジウムを波長 605nm の蛍光で検出し、右は同じゲルを赤色光 (波長 630 nm) で励起し、RET SEARCH (II) を波長 670 nm の蛍光で検出した。

このことから、やや成熟の進んだ網赤血球（以後、SE (semimature erythrocytes) と表記）の検出には、CD71 モノクローナル抗体よりも RET SEARCH (II) の方が適している可能性が示唆された。一方、CD71 陽性網赤血球は RET SEARCH (II) でも良く染色され、CD71による染色性が高いほどRET SEARCH (II) の染色性も高くなった (図2-A 左から3, 4列目)。

CD71 発現レベルと RET SEARCH (II) による残存核酸の染色を定量的に比較するため、フローサイトメトリー法を用いて解析した (図2-B)。まず全血を用いて、XE-2100 の RET チャンネルのスキヤッタグラムを元に前方散乱光 (FSC) および RET SEARCH (II) 蛍光強度の感度を調整し、汎用フローサイトメーター上で RET チャンネルスキヤッタグラムを再現した (Data not shown)。次に、健常者末梢血から比重遠心法で分画した網赤血球増多血液について、縦軸を抗 CD71 モノクローナル抗体蛍光強度、横軸

を RET SEARCH (II) 蛍光強度とし、CD71 陽性細胞を青色、CD71 陰性細胞を赤色のドットとしたスキヤッタグラムを作成した (図2-B 左)。さらに図2-B、左の縦軸を感度調整した FSC に変更し、XE-2100 の RET スキヤッタグラムを再現した (図2-B 右)。このスキヤッタグラムを細胞の密度が高くなる領域 RBC (成熟赤血球)、CD71 陽性細胞が増加する領域 IR (immature reticulocytes, 未成熟赤血球)、両者の間の領域 SE (XE-2100 では LFR および MFR に相当) に分割したところ、XE-2100 の RET スキヤッタグラムで HFR に相当する領域は IR の一部であり、CD71 陽性の細胞が半数以上出現する領域であることがわかった。これらの結果は、RET SEARCH (II) に染色される残存核酸は IR から SE、RBC へと成熟が進むにつれて緩やかに減少するが、CD71 の発現は IR から SE へ移行する段階で急速に消失することを示している。

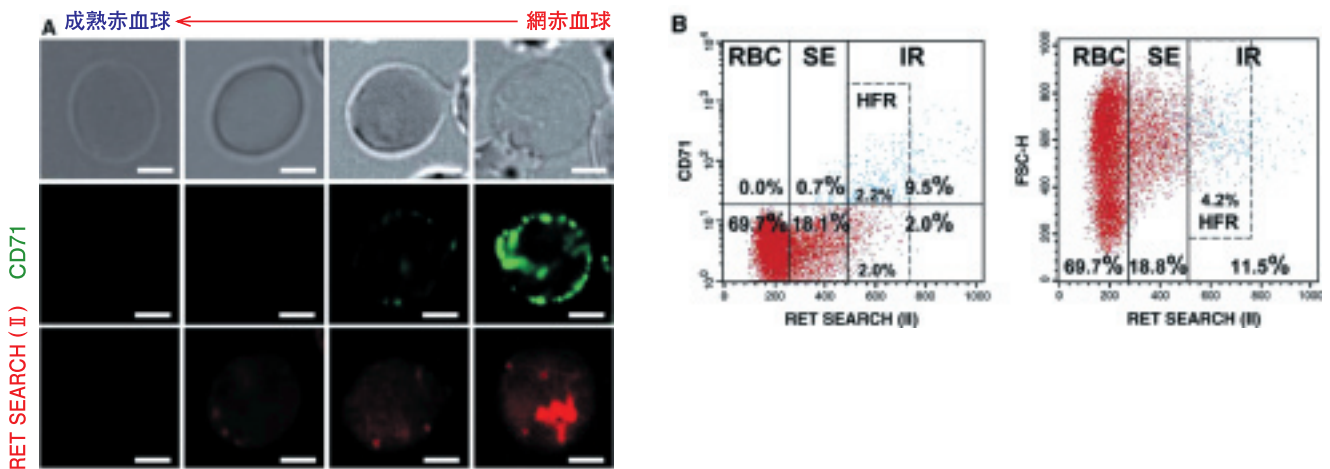


図2. CD71 はより核酸含量の多い網赤血球のみを染色する

- (A) 共焦点レーザー顕微鏡による CD71 発現レベルと残存核酸の比較
網赤血球増多血液について、Alexa Fluor 488 で CD71 発現部位を、RET SEARCH (II) で残存核酸を染色することで、4段階の代表的な成熟過程の赤血球について、CD71 の発現と RET SEARCH (II) に染色される核酸残存の比較を行った。各列が同一細胞の像で、上段は明視野像、中段は CD71 発現、下段は RET SEARCH (II) の染色動向を示している。陰性コントロールには、抗マウスモノクローナル抗体を用いた (データは掲載しない)。Bar=1μm
- (B) フローサイトメトリー解析による CD71 発現と RETSEARCH (II) 染色性の比較 (左) 縦軸に CD71 発現強度を、横軸に RET SEARCH (II) 蛍光強度を取り、陰性コントロールのデータ (Data not shown) と比較し、CD71 陽性細胞と陰性細胞の位置 (水平方向ライン) を決定した。CD71 陰性細胞を赤色、陽性細胞を青色のドットで示した。(右) 縦軸に前方散乱光 (FSC) を、横軸に RET SEARCH (II) 蛍光強度を取り、XE-2100 の RET スキヤッタグラムを再現した。細胞の密度が高くなるエリアを成熟赤血球 (RBC)、CD71 陽性細胞が陰性細胞より多く認められるエリアを幼若な網赤血球 (IR)、その間の領域をやや成熟の進んだ網赤血球 (SE) として分割した (垂直方向ライン)。さらに XE-2100 の RET チャンネルで HFR としてカウントされる領域を予測した (破線の長方形)。

さらに、XE-2100のRETスキヤッタグラム(図3-B)に白血球が混入していないことを確認するために、図2-B左のRET SEARCH(II)蛍光強度をより広いレンジで捉えたスキヤッタグラムを作成した(図3-A)。白血球は核を持つため赤血球よりも核酸の含有量が格段に多く、また鉄を取り込む必要がないためCD71を発現しないことが知られている。このような特徴から、図3-Aのスキヤッタグラム右側に位置するCD71陰性の細胞集団(図3-A“WBC”)が白血球であると考えられた。XE-2100のRETチャンネルで表示される範囲は図3-Aの赤線までなので、RETスキヤッタグラム(図3-B)には白血球の混入がないことが確認できた。

CD71陽性網赤血球の特徴を確認するため、MACS法によりCD71陽性網赤血球を網赤血球増多血液から分離したもの、および図2の網赤血球増多血液に

ついて、汎用フローサイトメーターを用いて図2-B右と同じ条件で解析した(図4-A)。網赤血球増多血液(図4-A右)がスキヤッタグラムの広い範囲に分布したのに対し、CD71陽性網赤血球(図4-A左)は主にRET SEARCH(II)蛍光強度の高い、IRの領域に分布した。この結果は、CD71抗原がより幼若な網赤血球に発現していて、IRからSEへ成熟する段階で消失していくことを支持するものと考えられた。

同様に調製した試料を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、網赤血球増多血液ではRET SEARCH(II)で強く染色された細胞が10%以下だったのに対し(図4-B右)、CD71陽性網赤血球では、視野内のすべての細胞が強く染色された(図4-B左)。

以上の結果から、抗CD71抗体による染色は、RET SEARCH(II)で染色されるものの中でもより幼若な網赤血球のみを検出していることが示された。

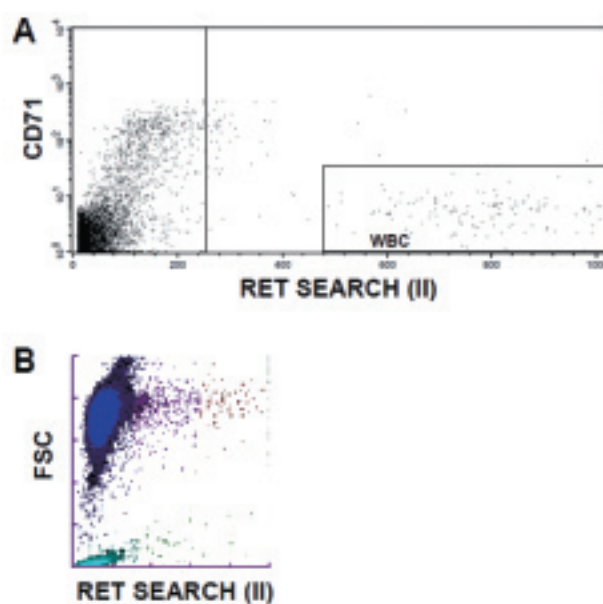


図3. RETスキヤッタグラムは白血球を誤認しない

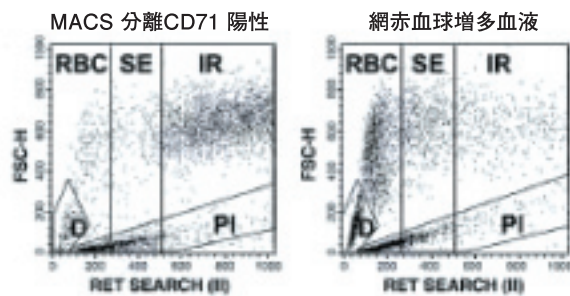
- (A) 広いレンジでRET SEARCH(II)蛍光強度の感度を捉えた。CD71とRETSEARCH(II)のスキヤッタグラムでは、白血球がCD71陰性でRET SEARCH(II)蛍光の非常に高い位置に出現した。WBC:白血球
 (B) シスメックスの多項目自動血液分析装置XEシリーズのRETスキヤッタグラム

2. CD71 発現とニューメチレンブルー染色性の比較

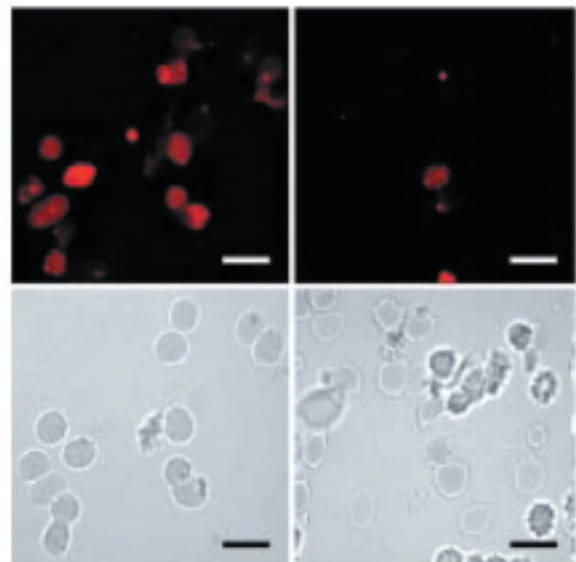
CD71 の発現とニューメチレンブルーの染色態度を比較するために、MACS 法で分離した CD71 陽性網赤血球および、図 2 と同じ網赤血球増多血液をニューメチレンブルーで染色し、光学顕微鏡で観察した。網赤血球増多血液では成熟赤血球に加え、ハイルマイヤーが定義する全ステージ (I ~ IV) の網

赤血球が観察できた (図 4-C 右)。一方、CD71 陽性網赤血球では、ハイルマイヤーの定義で I ~ III に分類される、より幼若な網赤血球しか観察できなかった (図 4-C 左)。これらの結果から、抗 CD71 抗体による染色は、ハイルマイヤーの定義で I ~ III に分類されるより幼若な網赤血球のみを検出していることが示された。

A スキャッタグラム



B RET SEARCH (II) 染色



C ニューメチレンブルー染色

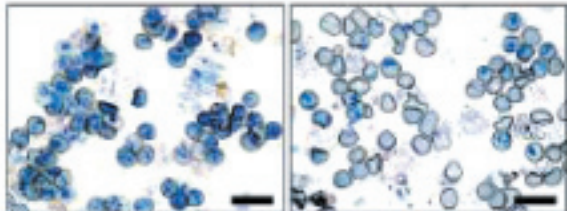


図 4. CD71 陽性網赤血球はより未成熟な網赤血球で発現する

- (A) 網赤血球増多血液から MACS により CD71 陽性細胞を分離したもの (左) と網赤血球増多血液 (右) を RETSEARCH (II) で染色し、フローサイトメトリーで解析した。感度およびゲートは図 2B 右と同様である。大部分の CD71 陽性網赤血球は IR エリアに出現した (左)。RBC: 成熟赤血球, SE: やや成熟が進んだ網赤血球, IR: 幼若な網赤血球, D: デブリス, PI: 血小板
- (B) CD71 陽性網赤血球 (左) の及び網赤血球増多血液 (右) の共焦点レーザー顕微鏡観察。上段が RETSEARCH (II) 染色の様子で、下段が明視野像。大部分の CD71 陽性網赤血球が RET SEARCH (II) に強く染色された (左) のに対し、網赤血球増多血液で強く染色された細胞は、10%以下だった (右)。Bar=5 μ m
- (C) CD71 陽性網赤血球 (左) 及び網赤血球増多血液 (右) のニューメチレンブルー染色像大部分の CD71 陽性網赤血球が、ハイルマイヤーの定義で I ~ III に分類される大変幼若な網赤血球であった (左)。一方、網赤血球増多血液では、ハイルマイヤーが定義する全ステージの網赤血球が観察された (右)。Bar=10 μ m

3. CD71 陽性網赤血球の電子顕微鏡観察

CD 71 陽性網赤血球がより幼若な網赤血球であることを形態学的にも確認するために、CD71 陽性網赤血球の電子顕微鏡観察を試みた。網赤血球増多血液に金コロイドで標識した抗 CD71 モノクローナル抗体を感作させ、走査型および透過型電子顕微鏡で観察した(図5)。CD71 陽性網赤血球の走査型電子顕微鏡像(図5-A)では、脱核時にできたと思われる深い皺を持つ球状の表面構造が観察された。また

透過型電子顕微鏡像(図5-C)では、変性したミトコンドリアや小胞などの構造が残存していた。一方、成熟した赤血球は中央の凹んだ円盤状の形状を持ち(図5-B)、細胞内小器官などの構造物は見られなかった(図5-D)。これらの観察結果は、CD71 陽性網赤血球が分化初期段階の形態³⁾を有するより幼若な網赤血球であるという考えを、形態学的にも強く支持していた。

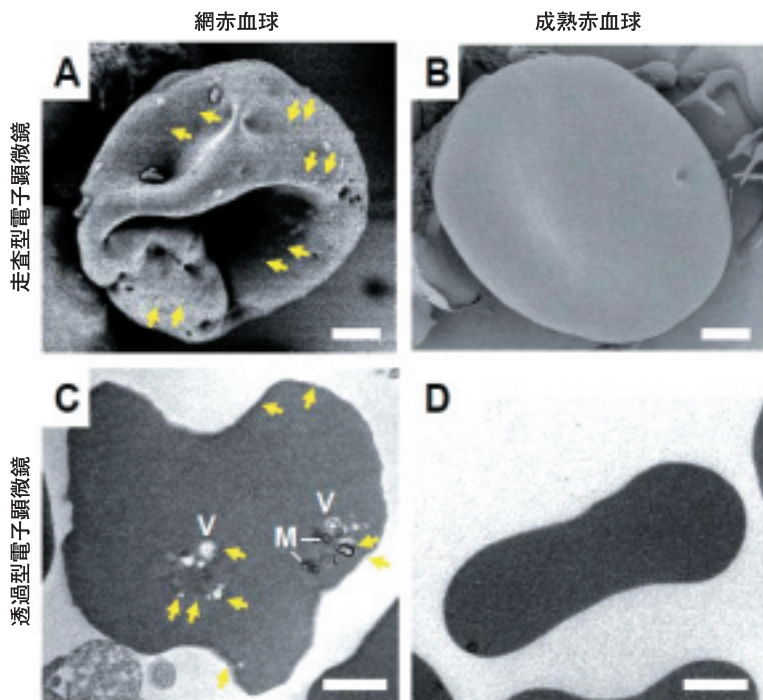


図5. CD71 陽性網赤血球の免疫電子顕微鏡解析

網赤血球増多血液を 10nm の金コロイドを結合した抗 CD71 抗体で感作し、金コロイド(黄色矢印)が結合した CD71 陽性網赤血球(A, C)と結合していない典型的な成熟赤血球(B, D)について、走査型電子顕微鏡(A, B)及び透過型電子顕微鏡(C, D)で観察した。CD71 陽性細胞の金コロイドは、細胞内部の空胞にも観察された(C)。成熟赤血球に特徴的な中央がくぼんだ円盤状の赤血球は、CD71 陰性であった。V:細胞内空胞, M:変性ミトコンドリア, Bar=1 μ m

考 察

網赤血球に特徴的な表面抗原として、CD71 抗原 (トランスフェリン受容体) がよく知られている。CD71 抗原は、鉄輸送タンパク質トランスフェリンとの結合により細胞内への鉄の取り込みを担っている。網赤血球のトランスフェリンに対する結合能力は成熟に伴い消失していくことが知られているが、これは CD71 の発現量が低下していくことと一致する^{10, 11, 22, 23)}。また、CLSI で推奨されている網赤血球の測定方法ではニューメチレンブルーで網赤血球の残存リボソームを染色出し、目視により幼若度合いを判断している^{1, 14)}。さらに、シスメックスの自動血液分析装置 XE-2100, XE-5000, XT-2000i, XT-4000i などに搭載されている網赤血球解析機能 RET チャンネルでは、専用蛍光色素 RET SEARCH (II) で残存核酸を染色し、その蛍光強度により幼若度合いを判断している¹⁸⁻²⁰⁾。RET SEARCH (II) が核酸を染色していることは、今回の実験結果からも明らかである (図 1)。さらに、RET SEARCH (II) がニューメチレンブルーのようにアガロースのゲル全体を染色せず、核酸のラダーのみを特異的に染色したことは、RET SEARCH (II) がニューメチレンブルーに比較してより核酸との結合特異性が高いことを示している。

今回我々は、3つの網赤血球検出方法である、抗 CD71 抗体を利用する方法、核酸親和性蛍光色素を利用する方法、ニューメチレンブルーを利用する方法について、それぞれの方法で検出された網赤血球の成熟レベルについて比較を行った。その結果、ヒト末梢血において CD71 陽性網赤血球が主に XE-2100 では HFR より右のエリアである IR に出現すること (図 2-B)、CD71 の発現が主に IR から SE へ成熟が進む段階で消失するのに対し、核酸親和性蛍光色素である RET SEARCH (II) の染色強度は網赤血球の成熟に伴い連続的に緩やかに消失していくことを明らかにした (図 2-A, B)。抗 CD71 モノクローナル抗体で染色される網赤血球については、抗 CD71 抗体と RET SEARCH (II) の染色態度が一致したことから、この二つの染色法はいずれも網赤血球の成熟過程を良く反映することを強く示唆しており、未成熟な赤血球の検出指標として有用であると

推察された。CD71 陽性網赤血球は RET SEARCH (II) で強く染色され、シスメックスの自動血液分析装置では最も蛍光強度の高い HFR に分画された (図 2-B, 図 4-A, B)。HFR に白血球は含まれず、目視法と同様、網赤血球を精度良く検出していた (図 3)。ニューメチレンブルー染色でも CD71 陽性網赤血球はよく染色され、ハイルマイヤーの定義では I~III と判定された (図 4-C)。一方、CD71 陰性細胞であっても、RET チャンネルで LFR, MFR に分画され、またニューメチレンブルー染色ではハイルマイヤー定義 III~IV と判定される網赤血球が存在することが新たに判明した。これらの結果は、残存核酸は徐々に消失するが CD71 抗原はある成熟段階で急速に消失した、というチアゾールオレンジを用いた過去の報告とも一致していた¹²⁾。さらに電子顕微鏡による形態観察からは、CD71 陽性網赤血球が初期の網赤血球に特徴的な形態を有していることが確認できた (図 5)。

RET チャンネルには、全網赤血球 (HFR, MFR, LFR) に対する HFR と MFR の合計比率を示す IRF (Immature Red cell Fraction) というパラメーターが搭載されており、骨髄移植後の生着を早い時期に判定できる指標として有用性が報告されている^{8, 9, 24)}。同様に、CD71 陽性網赤血球も、骨髄産生能の変化の指標として放射線照射やエリスロポエチン投与などの治療に利用されている^{25, 26)}。本論文の結果から、CD71 陽性網赤血球は HFR に分画される細胞の割合が非常に高く、IRF (HFR, MFR) を指標とする場合は、CD71 陽性網赤血球だけではなく、CD71 陰性網赤血球の一部を含み判断することになる。このように、自動血液分析装置の分画区分の細胞の特徴を知ること、臨床評価の目的により主な CD71 陽性網赤血球の出現分画 (HFR) を指標にするか、それよりやや成熟が進んだ MFR までを含む IRF にするか、あるいは網赤血球と成熟赤血球の境目である LFR までを考慮に入れるかというような、選択肢が可能であると考えられる。また各種研究において解釈を行う場合には、大部分の CD71 陽性網赤血球が網赤血球の中でも HFR 以上に幼若な網赤血球であり、ハイルマイヤーの定義で I~III と判定されるものであることに注意する必要がある。

また、CD71 陽性網赤血球の透過型電子顕微鏡による形態観察では CD71 抗原が小胞内で観察された (図 5-C)。この現象は、細胞表面の CD71 抗原が細胞内部に移行する様子を反映しており、過去の報告とよく一致している²⁷⁻³⁴⁾。網赤血球の成熟過程における研究の多くは網赤血球を培養後に解析したもので、生体から採取直後の観察例は少ない。本検証では、採取直後の CD71 陽性網赤血球においてミトコンドリアの変性、オートファジー構造などを多数観察することができた。

本論文では、核酸親和性蛍光色素 RET SEARCH (II) およびニューメチレンブルーの染色動向を CD71 抗原の発現動向と比較し、フローサイトメトリー法を用いた定性・定量解析と光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いた形態解析を行い、CD71 抗原の発現と核酸染色試薬による網赤血球判定法の類似点と相違点を明らかにした。この論文の結果は今後、それぞれの方法により検出される網赤血球の特徴を理解し、適切に使い分けていくために、臨床と研究の双方において有用であると考えられる。

参考文献

- 1) Bessman JD. Chapter 156 : Reticulocytes. Clinical Methods. Third Edition. Boston : 1990. 735-738.
- 2) BALDINI M, PANNACCIULLI I. The maturation rate of reticulocytes. Blood. 1960 ; 15 : 614-629.
- 3) Stryckmans PA et al. The maturation and fate of reticulocytes after in vitro labeling with tritiated amino acids. Blood. 1968 ; 31 (1) : 33-43.
- 4) Riley RS et al. Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques. Hematol Oncol Clin North Am. 2002 ; 16 (2) : 373-420, vii.
- 5) Davis BH, Bigelow NC. Automated reticulocyte analysis. Clinical practice and associated new parameters. Hematol Oncol Clin North Am. 1994 ; 8 (4) : 617-630.
- 6) Brugnara C. Reticulocyte cellular indices : a new approach in the diagnosis of anemias and monitoring of erythropoietic function. Crit Rev Clin Lab Sci. 2000 ; 37 (2) : 93-130.
- 7) Cavill I. The rejected reticulocyte. Br J Haematol. 1993 ; 84 (4) : 563-565.
- 8) 影岡武士 他. 自動血球分析の進歩と病態解析 (5) : 自動網赤血球測定装置 Sysmex R-3000 による末梢血および骨髓血の網赤血球分画と造血状態との関連性. 臨床病理. 1992 ; 40 (6) : 595-601.
- 9) Griggs JJ, Blumberg N. Recombinant erythropoietin and blood transfusions in cancer chemotherapy-induced anemia. Anticancer Drugs. 1998 ; 9 (10) : 925-932.
- 10) Dertinger SD et al. Enumeration of micronucleated CD71-positive human reticulocytes with a single-laser flow cytometer. Mutat Res. 2002 ; 515 (1-2) : 3-14.
- 11) Woolley IJ et al. Expression of Duffy antigen receptor for chemokines during reticulocyte maturation : using a CD71 flow cytometric technique to identify reticulocytes. Immunohematology. 2005 ; 21 (1) : 15-20.
- 12) Serke S, Huhn D. Identification of CD71 (transferrin receptor) expressing erythrocytes by multiparameter-flow-cytometry (MP-FCM) : correlation to the quantitation of reticulocytes as determined by conventional microscopy and by MP-FCM using a RNA-staining dye. Br J Haematol. 1992 ; 81 (3) : 432-439.
- 13) BRECHER G. New methylene blue as a reticulocyte stain. Am J Clin Pathol. 1949 ; 19 (9) : 895.
- 14) Arkin CF et al. Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes) ; Approved Guideline-second Edition. NCCLS. Volume 24 Number 8. 2004. 7p.
- 15) Mel HC, Prenant M, Mohandas N. Reticulocyte motility and form : studies on maturation and classification. Blood. 1977 ; 49 (6) : 1001-1009.
- 16) Heilmeyer L. Blutfarbstoffwechselstudien. Dtsch Arch Klin Med. 1931 ; 171 : 123-153.
- 17) Buttarello M et al. Flow Cytometric Reticulocyte Counting. Parallel evaluation of five fully automated analyzers : an NCLLS-ICSH approach. Am J Clin Pathol. 2001 ; 115 (1) : 100-111.
- 18) Fujimoto K. Principles of Measurement in Hematology Analyzers Manufactured by Sysmex Corporation. Sysmex J Int. 1999 ; 9 (1) : 31-44.
- 19) シスメックス株式会社開発本部. 多項目自動血球分析装置 XE-2100 の概要. Sysmex J. 1999 ; 22 (1) : 76-84.
- 20) Kono M et al. Reticulocyte Maturation Process-Experimental

- Demonstration of RET Channel Using Anemic Mice-.
 Sysmex J Int. 2007 ; 17 (1) : 35-41.
- 21) Rushing D, Vengelen-Tyler V. Evaluation and comparison of four reticulocyte enrichment procedures. Transfusion. 1987 ; 27 (1) : 86-89.
- 22) Dautry-Varsat A, Ciechanover A, Lodish HF. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1983 ; 80 (8) : 2258-2262.
- 23) Gronowicz G, Swift H, Steck TL. Maturation of the reticulocyte in vitro. J Cell Sci. 1984 ; 71 : 177-197.
- 24) Molina JR et al. Reticulocyte maturation parameters are reliable early predictors of hematopoietic engraftment after allogeneic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2007 ; 13 (2) : 172-182.
- 25) Dertinger SD et al. Reticulocyte and micronucleated reticulocyte responses to gamma irradiation : dose-response and time-course profiles measured by flow cytometry. Mutat Res. 2007 ; 634 (1-2) : 119-125.
- 26) Bugelski PJ et al. Pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in murine bone marrow. Pharm Res. 2008 ; 25 (2) : 369-378.
- 27) Johnstone RM, Bianchini A, Teng K. Reticulocyte maturation and exosome release : transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. Blood. 1989 ; 74 (5) : 1844-1851.
- 28) Nagao A et al. Application of the R-1000 Automated Reticulocyte Analyzer to Research on In Vitro Reticulocyte Maturation. Sysmex J. 1990 ; 13 (3) : 407-415.
- 29) Geminard C, de Gassart A, Vidal M. Reticulocyte maturation : mitoptosis and exosome release. Biocell. 2002 ; 26 (2) : 205-215.
- 30) Koury MJ et al. In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. Blood. 2005 ; 105 (5) : 2168-2174.
- 31) Ganzoni A, Hillman RS, Finch CA. Maturation of the macroreticulocyte. Br J Haematol. 1969 ; 16 (1) : 119-135.
- 32) Noble NA, Xu QP, Ward JH. Reticulocytes. I. Isolation and in vitro maturation of synchronized populations. Blood. 1989 ; 74 (1) : 475-481.
- 33) Geminard C, de Gassart A, Vidal M. Reticulocyte maturation : mitoptosis and exosome release. Biocell. 2002 ; 26 (2) : 205-215.
- 34) Skadberg O, Brun A, Sandberg S. Human reticulocytes isolated from peripheral blood : maturation time and hemoglobin synthesis. Lab Hematol. 2003 ; 9 (4) : 198-206.

Staining Dynamics of Sysmex Reticulocyte Measurement Reagent, RET SEARCH (II), in CD71-Positive Reticulocytes - Comparison with New Methylene Blue -

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

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

SUMMARY

Reticulocyte counting is of critical importance because the ratio of reticulocytes in peripheral blood is an indicator for hemopoietic function. For reticulocyte count, a technique for counting reticulocytes under a microscope after staining with new methylene blue recommended by the CLSI, a technique to detect CD71 (transferrin receptor) -expressing red blood cells using fluorescent anti-CD71 antibody and a flowcytometer, and a technique using an automated hematology analyzer are put to wide practices. However, it has not been reported until now whether or not these method are counting equivalent "reticulocytes". Thus, in this study, we compared staining images obtained by the 3 techniques using new methylene blue staining, fluorescent anti-CD71 antibody and reticulocyte-specific reagent, RET SEARCH (II) for Sysmex automated hematology analyzer to examine whether the reticulocytes detected by these techniques were equivalent. In addition, we observed CD71-positive red blood cells under an electron microscope and discussed morphological characteristics. The results strongly suggested that new methylene blue and RET SEARCH (II) exhibited resembling staining dynamics of reticulocytes and recognized almost equivalent reticulocytes and CD71-positive reticulocytes were remarkably immature reticulocytes among those stained with new methylene blue and RET SEARCH (II) .

Key Words Reticulocyte, CD71 (Transferrin Receptor), New Methylene Blue, RET SEARCH (II), Automated Hematology Analyzer, Flowcytometer
