

第23回シスメックス血液学セミナー / 東京会場での質疑応答

2. 白血球・リンパ球分野 - その発見から臨床応用まで -

中原 一彦

【司会】 同じような質問が2つきておりますので、まとめて紹介します。

(質問) EDTAによる偽血小板減少症にカナマイシンなどを添加するとよいとのことですが、どのくらいの濃度で加えたらよいのでしょうか。カナマイシン、コリマイシンの添加量を教えてください。例えば、EDTA3mL採血に対してどれくらいの量を添加するのか。また、添加すれば全ての症例で凝集が起こらないのでしょうか。

【中原】 確か、カナマイシン1mgだったと思います。それぞれのEDTA採血管の中に入れてパウダー状にして、試験管を作っておきます。中には非常に稀に血小板減少でカナマイシンでも抑えきれないものもありますが、不思議なことに殆どが抑えられます。それに加えまして、1回凝集したのに後でカナマイシンを加えると、凝集したのをディスパース、つまり凝集をまたバラバラにするというのがあります。非常にそういう意味では偽血小板減少を防ぐ、また、誤診を防ぐ意味でも非常に有効な方法であろうと思っております。

これはBr J Haematolに発表いたしましたので、それを見ていただければと思うのですが、いくつかのところで追試験もして頂いております。大阪市大の巽先生のところでもして頂いたのですが、偽血小板減少を抑えるためにいくつかの薬剤が使われましたが、カナマイシンが非常に有効であったというお話を頂いております。ただそれはどういう機序で起こっているかは残念ながら分かりません。例えば、抗体反応的な物を何かブロックするのか、あるいはその便宜的な物を何か中和するのか、それは分かりませんが、これから検索していかなければいけないところなんです。もし皆さん方の中で興味のある方は1

回試して頂けるといいのではと思います。

(質問) フローサイトメトリーで、表面マーカーを調べたい細胞の数が少ない場合、結果を得るのが困難に思うのですが、何かポイントなどがありましたら教えて下さい。スメアの免疫染色はどうでしょうか。

【中原】 このフローサイトメトリーは、非常に有効な方法であることは間違いないのですが、必ずしも万能ではないことがありまして、お話の、細胞数が非常に少ない場合とか、あるいは本来全体の数はあるんだけども分析すべき細胞数が少ない、つまり、白血病細胞の%が少ないとか、そういう場合には分析しづらい、あるいは出来ないことが1つの大きな欠点であろうと思います。細胞が少ない時には、なるべく浮遊液の量を少なくし、それでも本当に少ない場合には無理をしないことだと思っております。それから、白血病細胞の比率が少なくて分析しなければならない時で他の細胞が多い時には、最近では白血病細胞のCD45という、これは普通の正常細胞に比べて白血球細胞が暗く、その蛍光の光り方が弱いので、それを一緒に染色時に応用しますと正常の細胞と白血病細胞をうまく分離できることが時々あります。

スメアはどうでしょうかというお話ですが、どうしても細胞が少ない時にはむしろスメアの方がいいと思います。スメアの利点は、細胞が少ない時に分析が可能であるということですが、スメアの場合、細胞の中まで染まってしまうので、細胞の表面だけを分析したい時には、よほどその細胞の膜の表面の抗原量が多くないと中の抗原と一緒に染まってしまう。非常に判定しにくいことがあります。したがって、スメアで染色する場合にはむしろ細胞の表面よりも細胞の中を染めると

いう時に非常に有効であろうと思います。

(質問) M2やMDS系のミエロプラストについて、WHOが提唱したタイプ、タイプ、タイプの特徴を教えてください。

【中原】今のお話は最近、新しい分類法ということでWHOの分類法が提唱されていると思いますが、そのことでしょうか。

私自身もWHO分類をまだよく理解していないところがあります。従来よりも、例えば遺伝子学的なものとかあるいは予後を随分考えに入れて分類をしているということがありますが、まだ十分浸透しておりませんし、これからどんなふうに使っていきけるかということが、まだ私自身分かりません。かなり従来のFAB分類に比べると複雑になっておりますので、果たしてこれがどれくらい実際の臨床に有効かどうかということをもう少し待たないと分からないんじゃないかなと思います。

(質問) 成人T-ALLのうちpreT-ALLが15~20%発生しているということは、成人で胸腺がほぼ完成していても胸腺に向かうpreTというのは生涯にわたって造られていると考えて良いでしょうか。

【中原】確かに、リンパ球のTリンパ球は胸腺の中で造られる、分化成熟することは分かっております。それと同時に、その胸腺組織そのものは加齢とともにだんだん小さくなっていて、年寄りになるともう殆ど脂肪組織と同じになって分からなくなってくる。とはいえTリンパ球は依然としてお年寄りでもある訳です。そうしますとTリンパ球というのが果たして胸腺だけの問題か、というのが実はあるわけで、やはり1つには胸腺以外のところでのTリンパ球の分化成熟もあり得るだろう、といっている方もあります。

もう一つは寿命の問題があると思います。リンパ球というのは中には非常に寿命が長いものもありますので、そういったものが結構体の中に残っているということもあるかも知

れません。それと、いわゆる先程のTリンパ球ALLの中でも、昔は確かに子供が多かったんですが、最近は成人でもALLが結構増えて来ておりますし、あまりお年寄りにならないかもしれませんが絶対ないという訳ではありませんで、そうした意味で、何らかの形で残っているTリンパ球系の細胞が腫瘍化したというように考えざるを得ないと思うのです。Tリンパ球の分化成熟が完全にまだ分かっていない、と考えられるのではないかなと私は思っております。

(質問) 表面マーカーを調べる時に一体いくつくらい(例えばAML, ALLで調べたのがいいのか)、どのくらいの抗体で調べたらいいのでしょうか。AML M5などでT細胞系、B細胞系に発現が見られた場合、非特異的反応と思われる、そのような場合にいくつやって結論を出すのがよいでしょうか。

【中原】これは、各施設によっていろんなやり方をされていると思います。恐らく、多くは全くタイプがまだ分からないようなものを分析する場合と、それからある程度、形態学等で予測がつく場合とで変わってくると思うのですが、一般的には非常に典型的な物を、最初スクリーニングとして入れることが多いのではないかなと思います。そうしますと、例えばTリンパ球系でいいますとCD3と4と8と、それからBリンパ球でいきますと、CD19、骨髄単球系ではCD13、14、33等。あるいはHADR、それから先程の白血球防止細胞により分けたCD45とか、その辺のところを最初のスクリーニングとして入れてもらうのが多いと思います。逆に言いますと、それぐらいのところですと、だいたいの予測がつくのだと思います。ALLなのかAMLLなのか、あるいはTなのかBなのか、という予測がつくと思います。そしてもっとある程度あたりがついて細かい診断をする時には次のステップとしてもう1回抗体をセレクトしてやる、というようなことが恐らく多くの方がされてるか

と思うのですが、実はそれに関係いたしました、白血病診断の作業の標準化ということを是非やらやらなければいけない、と思っております。

これは白血病を診断していく時に、特にフローサイトメーターを使って診断していく時に今のお話でどんな抗体がいいのかとか、あるいはどんな抗体をどんなふうに使っていくのかという様なことを、標準化しないと行けないと思うのですが、まずその前に正常の細胞の、いわゆるフローサイトメーターを使った標準化が必要になる訳であります。実はご存じの方も多いかも知れませんが、日本臨床病理標準評議会の中でフローサイトメーターの標準化のワーキンググループが作られております。そのワーキンググループが中心となりまして、正常のリンパ球のフローサイトメーターを使った標準化、その中でも抗体をセレクトいたしました、CD3と4と8とCD19など、主な抗体だけに対するフローサイトメーターの標準化という物を提唱しております。これは、提唱していくつかのところでご意見を頂いて、その意見を取り入れた形でもう1回再度訂正版を出しているところです。その訂正版で再度ご意見を頂いた上で、最終的な正常の細胞に対する標準化ということをまず確立したい。続きまして、白血病診断の時のフローサイトメーターの標準化ということをやはりやっていく必要があると思っております。そういうことを考えていきますと、なかなか標準化ということもまだまだで先が長い。特に実際の正常細胞のフローサイトメーターの標準化を見ても、なかなか実は難しいところがあります。本来の標準化と言いますと、生化学的な標準化、例えばGOTの標準化ということになりますと、このGOTを検索する場合はどこの、どんなタイプの試薬で、どんな検査がよくて、そして標準物質を出していく、ということになる訳ですが、それがなかなかフローサイトメーターの場合出来にくいところが

あるのです。今、正常細胞の標準化はスタートしたばかりであります、将来的には白血病、あるいは悪性リンパ腫等の血液造器腫瘍に対する標準化もやられると思います。そうしますと、例えば、抗体のどの種類を使ったらいいのかということまでいかも知れませんが、現時点においては、なかなか統一されていない状態だろうと思います。

(質問) 先程の白血病の場合、殆ど遺伝子の変異が起こってキメラ蛋白ができてそれが白血化に関与しているということですが、部位は単に確率的に起こったのか、あるいはその遺伝子の中で特定の変異しやすい部位があるのか。もし、変異しやすい部位があるとすれば、なぜそういうところに起こりやすいのでしょうか。

【中原】これは変異しやすい理由があります。変異しやすい部位があって、例えば、CMLの転座の場合等ではBCLという部分と、ABLという部分が非常に染色体の9番と22番にもって行って、それが本来別々のところで、非常に切れやすく、そしてそこが転座しやすいという性質があるわけです。したがって、変異しやすい部位がそれぞれあり、例えばCMLの場合に9、22の転座があって、BCL、ABLのいわゆるキメラ遺伝子ができる、それによってABLとBCLが一緒になることによって、いわゆるそのチロシンキナーゼという細胞が活性化する。従って細胞がどんどん増えてしまう、ということまで分かってきている訳なのですが・・・今既に分かっているキメラ遺伝子、例えば、いくつかの白血病に対しての非常に高率を示すキメラ遺伝子のパターンは大体分かっている訳でありますから、そういう意味ではそのところは変異しやすいからそう言っている方が出てくるんだと思います。ただ、じゃあなぜそこが変異しやすいとかということは、いくつか報告があり、ある程度の予測がついているかも知れませんが、私自身はそこまでは分かりません。現実的にはそうい

うことがあると。それでは全部のCMLが同じように変異するかというところでもないし、CML以外の白血病でも全くその変異が分かっていない物もありますし、まだまだキメラ遺伝子自体混沌としているところもあるのです。ただ、やはり何らかの形でいくつか方向性が見えてきたってということは、やはり一定の変異しやすい部位があるからだと思います。

【質問】非常に色のきれいなカラフルな染色体のスライドがありますが、色が付いているということはどのような利点があるのか、役に立つのでしょうか。

【中原】おそらくSKY法と言われるものだと思いますが、これはいわゆる本来5色の色をベースにしまして、それをうまく組み合わせてコンピューター処理をすることによって染色体、46本の染色体を色分けしていく。相同染色体がありますから23対色分けしていきま

す。従来の染色体分析というのは以前は色分けはもちろんされてませんので、形だけから、あるいは分染法というシマのパターンから第何染色体と判定していた訳ですね。これは非常に熟練がいるため、マスターするまでかなり時間がかかった訳ですが、これが今のSKY法等によって色分けをされることによって、第何染色体が何の色に染まるということがわかりますと、これは非常に分析しやすくなるわけです。これをまたコンピューター処理をして分析していくわけでありますので、そういう意味では従来の形だけ、あるいは分染法などに比べると、判定しやすくなっているということになると言えると思います。

【司会】それでは丁度時間となりました。中原先生、本当に長時間、わかり易くお話し頂いてありがとうございました。(拍手)

[後日ご回答をいただいた質問]

【質問】会場での質問と重なりますが、カナマイシンによる血小板数の保存についてお伺いします。以前の文献にフェノバルビタールやフェニトイン等の薬剤によっても血算値の安定化がはかれるとの報告があったように思いますが、カナマイシン以外の薬剤についてのデータがあればお教えてください。また、カナマイシンでは血液像への影響は無いのでしょうか。

【回答】カナマイシン以外の薬剤としては下記のもの報告されています。一部文献も併せて記載します。

- 1) ヘパリンと可溶性テオフィリンの混合
J. Clin Pathol 41 : 915 ~ 917, 1988.
- 2) ACD(acid citrate dextrose)
Am J. Clin Pathol 89: 634 ~ 639, 1988.
- 3) ヘパリンNa, Citrate
臨床病理, 35 : 309 ~ 315, 1987.
- 4) MgSO4

臨床病理, 34 : 167 ~ 173, 1986.

- 5) グリコセーブ(速効性解糖阻剤)

臨床病理, 抄録 : 168, 1987.

- 6) ユノベット(血球計数用試薬)

- 7) アンチクロット(ヘパリン加抗凝固剤)

- 8) クロルプロマジン(抗血小板薬)

臨床病理地方会

- 9) ACAP

日本臨床検査自動化学会誌, 第32回大会予講集, 350 ~ 351, 2000.

- 10) その他アミノグリコシド系抗生物質の多くはカナマイシンに近い作用があります。

尚、カナマイシンは血液像への影響はほとんどありません。

【質問】人工血液がどこまで開発されているのか具体的に教えていただけますでしょうか。

【回答】人工血液としては赤血球代替物(人工赤血球)の研究が最も進んでいるようです。

血小板代替物(人工血小板)の研究も多少行われています。ちなみに、人工血液に関する学会として「人工血液代替物学会」があります。

【質問】 当院ではある程度の白血病の疾患においてマルクを行うかどうかpitの減少等により決めています。それ以外の検査としてはライト・ギムザ、特殊染色等に頼るしかないのですか。

モノクローナル抗体、遺伝子等の検査には日数がかかるため、もっと有用性で早く結果が出る検査があれば教えてください。

【回答】 骨髓穿刺をするかどうかを判断するのはやはり血算と血液像の結果が一番多いと思います。その意味ではやはり従来からの基本的な技術を大切に血算の判定や血液像の判読に精通しておくことが肝腎です。血算と血液像は簡便で比較的早く結果の得る検査で、これに勝る迅速な検査はありません。

フローサイトメトリーや遺伝子検査は、診断をより確実に、そして、さらに細かい分析を行う時に使用するものです。

【質問】 現在は形態を中心としたFAB分類によりleukemiaを分けている病院が多いと思いますが、新WHO分類では遺伝子まで含めて(予後因子)分類するとお話がありましたが、染色体検査(G-Banding)にて転座等の異常が見られた場合、当院ではその先の遺伝子検査を行っておりません。遺伝子検査における確認は必要なのでしょうか。また、学会発表等を行う場合は、必ず検査すべきでしょうか。

【回答】 通常の染色体検査で転座が認められたらさらに遺伝子検査を行ってキメラ遺伝子等を検索した方が良いと思います。

学会発表の場合にも、絶対必要という訳ではありませんが、やはり出来れば検索して

おくことが望まれます。

【質問】 先日、B系マーカー、M系マーカー両方を持った白血病を経験しました。分類としては何になるのでしょうか。

44歳、女性、発熱(+),リンパ腫張(+), WBC 6600/ μ L, Hgb 約10g/dL, PLT 11.7×10^4 / μ L, 末梢血にリンパプラスト様細胞70%, BMにリンパプラスト様細胞90%, ペルオキシダーゼ染色, PAS染色 PB, BMともに(-), FCM結果 CD19(85%), CD33(85%), CD20(50%), CD13(65%), CD21(-), CD34(85%), 他のT cell系マーカーは全て(-)

【回答】 この症例はBリンパ球系のマーカーと骨髓系のマーカーの両方のマーカーを持つmixed leukemia(mixed lineage leukemiaとも言う)と思われれます。

mixed leukemiaとは2系統異常の細胞の白血病化を同時に認める血液病で、種類としては、
骨髓系とTリンパ球系の同時発現
骨髓系とBリンパ球系の同時発現
Tリンパ球系とBリンパ球系の同時発現
等に分類されます。このケースは にあたり
ます。

また、2系統以上の細胞の白血病化には、
a) 1つの細胞の上にこれらの異なる系統の抗原が同時に発現している場合
b) それらの異なる抗原が別々の細胞の上に発現しており、それらが混在している場合
の2通りがあり、本例はBリンパ球系、骨髓系の細胞比率よりa)である可能性が考えられます。

mixed leukemiaはleukemia全体の20~30%程度と言われており、多くの骨髓球系とリンパ球系の両方の形質を有するa)のタイプと言われていています。予後に関しては不良とする報告が多いようです。