

## 第26回 シスメックス血液学セミナー / 質疑応答

### 2. 免疫学的マーカー診断の有用性 - 形態学的診断とどこまで一致するか -

川合 陽子

**【司会・中原】**川合先生，私から少しお伺いしたいのですが，先生の解析のSOMマップは，たくさんの抗体のパネルを作っておいて，それで分析した結果が自動的にマップの中に表示されて，どこに位置するかということがわかるというお話ですが，簡単に言うと，横軸・縦軸はどういうかたちで理解すればよろしいのでしょうか。

**【川合】**お見せしたSOMマップは，多次元のデータをマップ化したので二次元になっていますが，左端と右端は実はくっついていて，下と上もくっついていて，トーラス状というものなので，本当は球状や円盤状に表現して，どこに位置するかをお見せしたほうが実際にはわかりやすいとは思いますが，一応，二次元に展開したというかたちです。

このSOMマップは，造血器腫瘍にゲートをかけて，そのゲート内の抗原陽性率を例えば90%というふうに書いてありますので，そのデータを用いてSOMマップを使っていますので，例えばオンコマークのようなパーセントがなかなか出にくい検査結果だと問題がありますし，ゲートをうまくかけられなくて全体を解析して腫瘍細胞が少ない場合は非常に難しいという欠点があります。その辺を今後検討していきたいと思っています。

**【司会】**名古屋会場の高本先生のところでご質問があるようです。高本先生，お願いできますでしょうか。

**【名古屋会場・高本】**川合先生，非常にわかりやすい，また明瞭なご講演をありがとうございました。名古屋会場から二つご質問があります。フロアの技師のかたから一つと，私から一つお伺いしたいと思えます。

(質問) 血液標本からAMLが考えられますが，骨髓穿刺が困難な場合，末梢血でCD41，CD42の高発現を認めればM7を強く疑ってもよいのでしょうか。この場合，正常血小板による発現の可能性も考慮する必要性はあるのでしょうか。

**【川合】**その質問の答えは朝長先生のほうが明解かと

も思いますが，私どもも実際，末血に白血病細胞が多数出ていて，骨髓穿刺がうまく引けなくて，つまりドライタップになってしまって，免疫学的マーカー分類ができない症例は時々あります。その時は，末血の検体を用いてその造血器腫瘍マーカーを決定するわけですが，M7の診断には非常に慎重でなければならないと思います。

白血病細胞の周りに血小板が付着しやすい場合が多々あります。ヘパリンを使った検体等では付着しやすい場合もありますので，必ず付着した血小板を測り込んでいないかを考える必要があります。末血の検体で行ってかまわないのですが，その最終診断には慎重を要します。場合によっては塗抹標本を用いた免疫学的な染色を併用することも必要かと思えます。

**【名古屋会場・高本】**ありがとうございました。もう一つは私からです。

(質問) フローサイトメトリーで白血病の表現型を決定するには，白血病細胞，いわゆるblastのgatingが極めて大事だと考えます。先生のご発表の中で，SOMマップでもblastの比率が低い症例には困難さが伴ったというお話を伺いました。

先生はルーチンとしてCD45の弱陽性の細胞集団をgatingしていらっしゃるようですが，特に白血病細胞の割合が低い症例，例えば20～30%のような症例でCD45だけでgatingが困難な症例等はありませんでしょうか。また，ありましたらどのような方法が解決策として考えられるのでしょうか。

フロアの中にはフローサイトメトリーを使って白血病の診断に日夜努めておられる方もいらっしゃると思いますのでご回答をお願いしたいと思います。

**【川合】**説明が少し足りなかったかと思いますが，私たちの施設ではCD45のgatingは使用していません。古い方法ですが，FSC，SSCのスクアットグラムを用いて腫瘍細胞と思われる部分にゲートをか

けるようにしています。

その理由は、CD45を使いますとすべての試験管にCD45を入れなくてははいけませんので非常に経費がかかります。従来よりも経費が上がると、病院になかなか認めていただけないので私どもはCD45は使用していません。試しに使用したのですが、CD45を使わなくてもFSC, SSCで現在のところ一応診断は可能となっています。形態学と免疫マーカーを同時に行っているのがそれが可能だと思えるのですが、そういう意味では検査センター等では必ずCD45を併用しています。CD45を併用しないと、一度提出された貴重な検体で診断を逃すことがあるからだと思いますので、現在のところでは形態を併用できない施設ではCD45を必ず併用すべきと考えています。

では、私どもでは、CD45は何もしていないかということ、一応CD45でどの領域に細胞がくるかということ、いつもチェックしています。CD45dimの集団になる白血病細胞は決して100%ではありません。陰性のものもありますし、逆にリンパ球と同じ輝度の場合もあります。その時はFSC, SSCを使ったり、すべての情報を再確認して解析をするように努力しています。

**【名古屋会場・高本】**ありがとうございます。

**【司会】**福岡会場から質問があるようですが、いかがでしょうか。

**【福岡会場】**一つ質問をいただいています。

(質問)抗体KOR-SAの有用性はありますか。

特にオールサブセット症例ではルーチンに使用するべきでしょうか。

**【川合】**研究室レベルで用いている抗体かと思います。

私どもはそれを用いていませんので、機会があったら検討してみたいと思います。

**【司会】**続きまして東京会場、よろしくお願ひします。

**【東京会場・米山】**東京会場でもいくつか、医師の方、技師の方から質問をいただいています。似たようなものもありますのでまとめてまず一つご質問します。

(質問)FCM所見と形態とで一致率が高いということがよくわかりましたが、一致しないケースはどういう疾患が代表的で、どういう治療をしなくて

はいけないでしょうか。それから、多系統の異形成のからむ急性白血病で、特に形態とマーカーの一致しにくい症例があるように思いますが、先生のご経験はいかがでしょう。

**【川合】**先ほどお示しましたように、リンパ系腫瘍の場合はかなり免疫学的マーカー診断が有用だと思いますが、従来言われていたCD5, CD10, CD23を併用するCD19, CD20, CD22のB-cell系のものでも、やはりCD5とCD10のダブルポジティブという両発現をするものが最近43例まとめて報告されています。それらをよく見ますと、形態と併用すればいいというのがよくわかりました。また、場合によっては遺伝子解析に頼らざるを得ないかとも思います。

一方、AMLの方は免疫学的マーカー診断での一致率は実際にはそんなに高くはないと思います。有効なものもあります。例えば先ほどお示したt(8; 21)の転座型のM2は、私どもはマーカーだけでt(8; 21)を疑うほどで、その正解率は100%です。しかし、例えばM3がDRを欠損しているのが特徴的ですが、CD34陰性、CD13, CD33が陽性、CD34, DRが陰性のAMLのM2やM1も最近認められます。ということで、やはり形態学と一緒に見なければいけないと思います。また、特にM4, M2, M1の鑑別が、形態学とエステラーゼやペルオキシターゼ染色を用いても結構難しい症例を最近経験しますが、それらはマーカーを用いてもかなり難しいと感じています。また、異形成を伴った場合のAMLに関しては、blastだけを解析する場合には、blast領域がうまくゲートできる場合はミエロイドマーカー、ミエロモノ系のマーカーを発現するものが結構多くて、うまく解析できるものとできないものが出てくると思います。しかし、典型的なもの以外にも、必ず例外が存在するというのを念頭に置いて、できるだけ自分たちで症例を蓄積して何度も経験を積んでいきますと、今まで少し不明だったところがさらに明確になる可能性もありますし、今後は新しい抗体がさらに開発されると思いますので、それらを追加してやることでその不得意なところを克服していきたいと思っています。

**【東京会場・米山】**ありがとうございました。もう一つ質問がございます。

(質問) 非特異反応のためにマーカーの陽性・陰性が判定できない症例の頻度はどのくらいあるのでしょうか。また、そういう場合はどうしたらよろしいのでしょうか。

**【川合】**非特異反応のためにマーカーの判定ができない症例といたしますと、大変難しい質問なのですが、いろいろな抗体の組み合わせによってケースバイケースで判断する必要があると思います。

私たちが非特異反応としてよく経験するのは、多発性骨髄腫の細胞でCD38とsurface IgGをダブルポジティブで検討しようとする時、スキヤッタがおかしな方向にシフトして陽性率が検討できないという経験をしています。

また、単球系のいろいろな細胞で、CD5、CD10、CD22等が弱陽性に発現するのはよく知られている事実ですが、それを非特異とするのか弱陽性とするのかというところが問題かと思えます。

あまり的確なお答えではなかったかと思いますが、一応そのように感じています。

**【東京会場・米山】**ありがとうございました。まだありますがこのくらいにさせていただきます。

**【司会】**神戸会場から二つ質問をいただいています。

(質問) blast gatingで例えばM0の時にフローサイトメトリーにおけるMPOの陰性、弱陽性、陽性の判定は何パーセントを目安にすればいいのでしょうか。

**【川合】**サイトゾールMPOを染めることが最近よく行われるようになってきていると思います。私どもはまだそれをルーチンとして取り入れていないので、検討中なのですが、サイトゾールMPOを取り入ると陰性から弱陽性くらいまでにだらだら型のスキヤッタを描きますので、何パーセントから陽性というようにクリアカットにはできません。逆に、クリアカットにはできない陰性から陽性までまたがった結果を見ればMPO陽性と考えていいかと思えます。

**【司会】**ありがとうございました。もう一つお願いします。

(質問) SOMマップの4カラー解析の有用性がよく

わかりました。一つの抗体に対して陽性・陰性の境界パーセントは何パーセントと設定されていますでしょうか。blastのパーセントの高い・低いで変えられるのでしょうか。

**【川合】**抗体の蛍光輝度が陽性が陰性かという判断は、先ほどもMPOのところでお話ししましたように、白血病細胞によっていろいろなパターンがあると思います。割と均一な集団として陽性集団がとらえられる場合と、白血病の中でも未分化から分化までの微妙なところの分化段階の違うものが混じっている症例が多いかと思いますが、そういう場合には陰性から陽性までだらだら型に出てくるわけです。その時に、私どもはどこをカットしてどこを陽性にするかというのを今までも大変迷いました。一時は集団の切れるところをカッティングラインとして置いたほうがいいのではないかと考えましたが、今は一律、ネガコン(ネガティブコントロール)を置いて、ネガコンの示すところ、例えば10の0乗や10の1乗のような蛍光輝度のところをカッティングラインとして無理やりにカットしています。そのカットから右が陽性、もしくはカットから上が陽性というふうにしてはいますが、その判定法には必ず問題がありますので、私どもはコメントとして「視覚的に見ると微弱陽性から弱陽性である」というようなコメントをつけることで、臨床側にその結果の判定をいただいています。

**【司会】**ありがとうございました。福岡会場で質問があるようです。

**【福岡会場】**一つ質問をお願いいたします。

(質問) 形態学的診断と免疫学的マーカー診断は一致するという結論でしたが、形態学的に分類した細胞比率とマーカーでの腫瘍細胞の比率はどの程度まで合致するのでしょうか。ATL等のリンパ系腫瘍では、形態学的には異常細胞と判定し難いものでもマーカーでは異常集団に入っていることが多いと思いますが、先日、経験したHCLではよく合致していました。疾患ごとに特性がありますでしょうか。

**【川合】**大変いい質問だと思います。そのとおりだと思います。形態診断として異常細胞と同定するか

どうかという、その形態診断の標準化の問題も一方ではあります。また、マーカー的なものとして診断したものが絶対的かどうかという問題もあるわけですが、特に今の質問にありましたATLLでは、核膜の切れ込みやクローバー状等の異常な形態を呈したいわゆるATL細胞というものを別にカウントしますと、一見正常そうに見えるリンパ球が、実はATLと同じマーカーを発現するということはよく経験することだと思います。

そのような場合は、逆にマーカーから、その一見正常に見えるものをATL細胞に加えるべきなのか、それともやはり形態的に正常と見えるものは正常とすべきものなのかという問題にまで発展するかと思います。おっしゃるとおりケースバイケースで、白血病細胞等はかなり免疫学的マーカー診断の比率と形態学的診断の比率は一致すると思います。CLL、いわゆるリンパ性白血病の類縁疾患は一致しないものと一致するものがあると思います。

**【司会】**ありがとうございました。東京会場の米山先生、ご質問をお願いします。

**【東京会場・米山】**医師の方からのご質問です。

(質問) 検査センターに委託しており、摘出リンパ節の表面マーカー、染色体解析をしたいと思いますが、いつも量が足りないと言われる。どのくらいの量があれば表面マーカー、染色体解析ができるのでしょうか。また、切除後どのように処理して提出したらよいか教えてください。

**【川合】**リンパ節のサンプリングは、本当に難しいと思います。サンプリングによって染色体解析やマーカー解析が出るか出ないかがかなり異なりますので、なるべく解析できるようなサンプリングが重要かと思います。

私どもは血液内科の先生たちにお任せしていますが、リンパ節を採り、約半分を病理に、4分の1をマーカーに、4分の1を染色体に、分割して出すケースが多いようです。マーカー解析には、先生方に生理食塩水に入れてもらって、できるだけほぐしてもらいます。染色体はヘパリンが入った培養液に入れるようにしています。マーカー分析の場合、私どものところはすぐ持ってきますので、

私たちのほうで培養液に入れてなるべく生細胞を保つようにしています。

検査センターにリンパ節の依頼を出すときは、なるべくヘパリン入り培養液に入れ、そしてなるべく早い時間に測定していただくことが大切かと思えます。

**【東京会場・米山】**一つは、小さなリンパ節しか採れなかった場合に、染色体も表面マーカーも検査しようとして提出した。そうすると表面マーカーの解析ができなかったというようなことを多分経験されているのではないかと思います。具体的な量というのは難しいかと思いますが、こういったお答えになりますでしょうか。

**【川合】**私どもは絶対数として10の6乗個を提出していただければ、解析ができるとお答えしています。すなわち、1本のチューブが10の5乗個、1万個の細胞に分けて、大体10種類ぐらいまで抗体をセレクトして、細胞が少ない場合は行います。

ただ、それがリンパ節の大きさとしてどのくらいと言われるとケースバイケースだと思いますが、一応そのようにお答えしています。

**【東京会場・米山】**ありがとうございました。

**【司会】**神戸会場から先ほどのCD45のgatingに関連する質問があります。

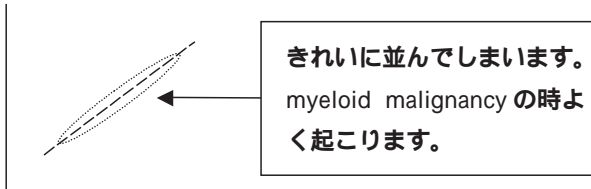
(質問) CD45弱陽性をgatingする場合に、成熟型のleukemia等でもこの方法でよろしいのでしょうか。

**【川合】**成熟型のリンパ系の造血器腫瘍は、CD45が弱陽性ではなくて強陽性であることもかなり多いと思います。多くのセンターではCD45弱陽性の群と強陽性の群と両方を解析しているケースが多いので、解析者がその細胞集団を見ながら、細胞集団のあるところにゲートをかけるべきと思います。場合によっては、多発性骨髄腫ではCD45ほぼ陰性というものもありえますので、そのあたりは細胞集団を見ながら、場合によっては3種類のゲートをかけて報告をすることも必要かと思えます。

**【司会】**それでは、時間が来ましたのでこの辺で午前中の講演を終わらせていただきたいと思います。川合先生、ありがとうございました。

## 【後日ご回答をいただいた質問】

**【質問】** 当院では、コールター-EPICS XL, DAKO社の抗 , 抗 を使っていますが、( + ), ( + ) がよく出ます。nonspecific だと思うのですが、何か理由があるのでしょうか？



**【回答】** / の two color 解析を行うとスキヤッタグラムの45度線にご指摘のようなスキヤッタがしばしば見られます。非特異的の反応と呼ばれておりますが、通常下記のような理由が考えられます。

- 1) 末梢血や骨髄血などのサンプル中には、イムノグロブリンが一定濃度で存在するので、細胞表面にはイムノグロブリンが一定量付着しているはずですが、洗浄の方法や細胞の特徴によってその付着の程度は異なるようであります。DAKO社の抗 , 抗 抗体は、または 抗原をウサギに免役して作成したポリクローナル抗体を酵素処理して、F(ab')<sub>2</sub>にした精製品ですが、このような理由で、45度線上に非特異的なスキヤッタが出現すると考えられます。マウスのモノクローナル抗体を用いても同じ理由が考えられます。
- 2) 酵素処理していない whole のイムノグロブリンを用いると、細胞表面に存在するFcレセプターに、抗 , 抗 抗体のFc部分が結合するため、日常ルチーンでは、補体を非働化したウサギ血清や非標識の正常イムノグロブリンをあらかじめ反応させ、Fcレセプターを飽和させておいてから標識抗体を

反応させ、非特異反応をブロックさせます。この処理が不十分だと45度線上に非特異的なスキヤッタが出現すると云われております。

- 3) 死細胞には非特異的に結合し、45度線上に非特異的なスキヤッタが出現すると云われているので、死細胞の多い検体では、良く出現します。

### 【参考文献】

- 1) フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関するガイドライン (JCCLS H2-P V1.0) 日本臨床検査標準協議会・血液検査標準化検討委員会フローサイトメトリーワーキンググループ 日本臨床検査標準協議会会誌第18巻2号(66号) 2003, 69pp ~ 107pp

**【質問】** SOM法の有用性についてお尋ねします。

SOM法での判別が不正解となった症例の数が増え、解析が進み誤診断となる可能性の高い基準が明確になれば、実際の診断ツールとして普及するかと考えてよろしいでしょうか？

**【回答】** そのように考えております。

すなわち、SOMに入力されていない疾患のデータが入力されたときに、既存の分類に無理矢理分類を当てはめることなく、「その他疾患群」に分類するプログラムが完成すれば、SOMはかなり有用な診療支援ツールになると考えております。しかし、入力した症例データがまだまだ少数であるので、皆さんの協力を仰ぎながらデータの蓄積をした後に、実践・実用化したいと考えております。

**川合先生からのお願い：** 血液疾患の症例データを提供していただける施設の方は是非ご連絡ください。共同研究が可能かどうか話し合いたいと考えております。