

網赤血球の成熟過程

- 貧血マウスを用いたRETチャンネルの実験的検証 -

河野 麻理, 高木 由里, 近藤 民章, 藤本 敬二

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

RETチャンネルとは、シスメックス社製の多項目自動血球分析装置XT-2000i, XE-2100およびXE-5000などに搭載されている網赤血球測定機能である。網赤血球の残存RNAを、蛍光色素を含む染色試薬RETSEARCHで染色し、その蛍光強度によりLFR (Low-Fluorescence Ratio), MFR (Middle-Fluorescence Ratio), HFR (High-Fluorescence Ratio)の3分画に分けて網赤血球をカウントしている。RETチャンネルのカウント値は赤血球新生の状態把握や、貧血や骨髄抑制などの診断に広く利用されている。LFR, MFR, HFRそれぞれに分画される細胞は、初期の未成熟な網赤血球 (HFR) から、最も成熟に近い網赤血球 (LFR) へと、異なる成熟ステージを反映していると言われているが、これまでに各分画の細胞について特徴づけを行った報告はない。

今回我々は、異なる成熟ステージの細胞について特徴づけを行うことを目的とし、形態およびRETSEARCH染色パターンについて解析を行った。さらに、それぞれのRETSEARCH染色パターンについて、よく知られている網赤血球の表面マーカーCD71抗原 (トランスフェリン受容体) の発現パターン、およびニューメチレンブルー染色パターンとの比較を行った。

フェニルヒドラジンを腹腔内投与して5日目の貧血誘導マウスの血液を用い、セルソーティングシステムによりRETチャンネルスキャッタグラムを再現し、LFR, MFR, HFRそれぞれの分画の細胞をソーティング後、固定し、透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察を行った。さらに同様の血液について、RETSEARCHとCD71-Alexa488の二重染色後、FACSで解析を行う一方、共焦点レーザー顕微鏡 (CLMS) での観察を行った。

TEMとCLMSの解析から、CD71抗原の発現消失の様子、および残存オルガネラなどの内部構造がHFRからLFR, 成熟赤血球RBC (Red Blood Cell) へと成熟が進むにつれて消失していく様子が観察できた。また、FACS解析から、CD71の発現がより幼若な細胞に分布していて、HFRからMFRの間で急速に消失することがわかった。同様の結果がコロイド金標識CD71抗体を用いた免疫電子顕微鏡法でも確認できた。

特記すべきことは、TEMにより、全ての未成熟細胞分画 (LFR, MFR, HFR) で残存リボソームが確認できた一方、成熟赤血球分画RBCでは観察されなかったことである。網赤血球解析の標準法であるニューメチレンブルーによる超生体染色では、残存リボソームが染色され、この有無によって網赤血球の判定を行っている¹⁾。このことから、RETチャンネルによる網赤血球判定が、ニューメチレンブルー超生体染色による判定と形態的に一致することが証明できた。

さらに、本検証は、網赤血球の成熟過程に関する多数の*in vitro*の報告に対し、非常に稀な*in vivo*での解析報告であるが、得られた結果はこれまでの*in vitro*の検証を裏付けるものであった。

Key Words RETチャンネル, 網赤血球, 成熟, CD71 (トランスフェリン受容体), 形態

はじめに

網赤血球とは骨髄から末梢血中に放出された後の幼若な赤血球のことで、最終ステージである成熟赤血球の次に成熟が進んだ赤血球系細胞である。脱核は末梢血放出前の赤芽球の段階で起こるが、末梢血放出後の早い時期にはRNAが残存している。この残存RNAは放出後24～36時間で徐々に消失する^{2,3)}。

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。最近の研究では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⁴⁾。

臨床検査室での網赤血球の一般的な測定方法は、ニューメチレンブルーで超生体染色を行い、目視によりカウントするというものである⁵⁾。ニューメチレンブルーは細胞内のRNAを染色するが、残存RNAの大部分がリボソームに局在することから、凝集したりリボソームを染色していると解釈されている⁶⁾。

1988年に、初めての自動網赤血球解析装置R-1000(シスメックス社)が開発されて以後、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球計数装置が開発されている。それぞれのモデルで多少の違いはあるが、全ての装置が残存RNAを特異的に染色する蛍光色素を用い、フローサイトメトリーの技術で解析する、同様の原理に基づいている。網赤血球の測定は、自動化を行うことで簡便、正確になり、加えて目視のカウントでは難しかった、網赤血球の中でもとりわけ幼若な細胞を選択的にカウントすることも容易にできるようになった。

RETチャンネルはシスメックスの多項目自動血球分析装置XT-2000i、XE-2100およびXE-5000などに搭載された網赤血球測定機能である。RETチャンネルでは網赤血球をRETSEARCHの染色性により、LFR (Low-Fluorescence Ratio)、MFR (Middle-Fluorescence Ratio)、HFR (High-Fluorescence Ratio)の3つに分画しているが、これまで各分画の細胞を特徴づけた報告はほとんどない。

本検証では、RETチャンネルにより、LFR、MFR、

HFRに分画される網赤血球の形態を観察し、特徴づけを行った⁷⁾。

幼若な赤血球の指標として2つの膜結合型抗原、CD36およびCD71が報告されている。CD36(グリコプロテイン、トロンボスポンジン-R)は、赤芽球に発現している^{8,9)}。一方、CD71(トランスフェリン受容体)は、網赤血球に発現し、成熟に伴い細胞表面から消失していくことが知られている^{10,11)}。網赤血球を*in vitro*で培養してCD71の発現パターンを確認したところ、ある成熟段階で急速に発現が消失したという報告もある¹²⁾。本検証では網赤血球の成熟過程におけるCD71の発現パターンを*in vivo*で明らかにし、CD71発現に定義される“網赤血球”とRETSEARCHを用いたRETチャンネルで定義される“網赤血球”の比較を行った。

材料および方法

1. マウス網赤血球増多血液の作製

体重20gのICR系マウス、雌(オリエンタル酵母社より購入)を20～25に保った無菌的な動物室内で市販のげっ歯類用固形試料(CRF-1、オリエンタル酵母社)と水を自由給餌させ、飼育した。網赤血球増多血液を得るために、G.N.Zyuz'kov¹³⁻¹⁵⁾らの方法に基づき、PBSに溶解したフェニルヒドラジン塩酸塩(P-6926、シグマ社)を150mg/kg腹腔内投与して貧血を誘導した。投与後5日目に網赤血球増多血液を尾静脈から採取し、EDTAを適量含んだ容器に回収した。また、フェニルヒドラジン溶液の代わりにPBSを投与したマウスの血液を回収し、対照とした。

2. フローサイトメトリーによるRETチャンネルスキヤッタグラムの再現

マウスから採取した全血サンプルを多項目自動血球分析装置XT-2000i(以下XT-2000i)で測定することでRETチャンネルスキヤッタグラムを得た。一方、同様の血液をRETSEARCH希釈液とRETSEARCH染色液でXT-2000iと同様の方法(全血4μL、希釈液996μL、染色液2μLを混合)で染色し、FACSCaliburまたはFACSAria(日本ベクトン・ディッキンソン社)で解析を行った。横軸にRETSEARCH染色強度、

縦軸にFSC（前方散乱光）を採り，2次元のRETチャンネルスキャッタグラムを再現した。

3．セルソーティングと観察

RETチャンネルのRBC，LFR，MFR，HFRにあたる細胞を，FACSAriaのセルソーティングシステムを用いて，それぞれ別の容器に回収した。これらの細胞を1%グルタルアルデヒド（PBS）で4℃，16時間固定し，シランコートのスライドガラスにサイトスピン（Cytospin3，SHANDON社）で貼り付けた（1000rpm 10分）。さらに1%四酸化オスミウム（PBS）で4℃，30分間固定し，エタノール系列で脱水後，Quetol 812（日新EM社）で倒立包埋を行った。80～100nm（シルバーからゴールド）の超薄切片をウルトラミクロトーム（35578，ULTRACUT UCT，ライカ社）で作製し，透過型電子顕微鏡（H-7500，日立製作所社）で観察した。

4．免疫染色と観察

マウスから採取した血液をPBSで50倍に希釈し，1%ウシ血清アルブミン（BSA，A-3294，シグマ社）で4℃，30分間ブロッキングを行った。PBSで洗浄後，ビオチンでラベルした抗マウスCD71モノクローナル抗体（Clone ER-MP21，prod. no. T-2114，BMA BIOCHEMICALS社）を1%BSA（PBS）で50倍希釈して作製した抗体溶液中に懸濁し，4℃で30分間反応させた。続いてPBSで洗浄後，細胞をストレプトアビジン-Alexa488（S-11223，INVITROGEN社）で4℃，30分間反応後，洗浄した。さらに細胞をRETSEARCHで40℃，30秒間染色し，直ちにFACSCaliburでの解析および共焦点レーザー顕微鏡での観察を行った。

免疫電子顕微鏡法のためにビオチン標識抗CD71でラベルした細胞をPBSで洗浄後，ストレプトアビジン-20nmコロイド金溶液（EMSTP20，BB International社）中で4℃，30分間インキュベートした。さらにこの細胞を1%グルタルアルデヒド（PBS）で4℃，16時間固定後，シランコートのスライドガラスにサイトスピんで貼り付けた（1000rpm，10分）。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で倒立包埋を行った。80～100nmの超薄切片を作製し，透過型電子顕

微鏡で観察した。

これらの免疫反応の陰性コントロールとしてビオチン標識抗ヒトCD42bモノクローナル抗体（clone MM2/174，prod. no. CBL480B，CHEMICON社）を用いた。

5．ER Tracker greenとRETSEARCH の二重染色

マウスから採取した血液をPBSで50倍に希釈し，ER Tracker green（prod. no. E-34251，INVITROGEN社）を最終濃度が1μmol/Lになるように加え，37℃で30分間インキュベート後，100μLの細胞懸濁液に0.1μLのRETSEARCH 染色液を加えた。二重染色を施した細胞を，共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

結果

フェニルヒドラジンを腹腔内投与することで赤血球を溶血させ，貧血を誘導したマウスは，引き続いて赤血球新生を活発に行ったとみられ，赤血球新生を反映する網赤血球の比率は，投与後24時間以内に急激な増加を始め，4日目から7日目には60%以上にまで到達した（データ掲載なし）。この結果から，投与後5日目のマウス血を本検証の材料として用いることにした。

網赤血球増多血液と対照血液をXT-2000iで測定し，得られたRETチャンネルスキャッタグラムを図1に示す。RETスキャッタグラムの横軸はRETSEARCH 蛍光強度，縦軸は前方散乱光であり，成熟した細胞ほど，RETSEARCH の蛍光強度は低く，左にプロットされる。対照血液と比較して，網赤血球増多血液では，未成熟分画であるLFR，MFR，HFRのプロット数が増加していた。

図2は，抗CD71-Alexa488およびRETSEARCH で二重染色した網赤血球増多血液についてFACS解析を行い，網赤血球の成熟過程におけるCD71の発現動態を調べたものである。FACSCaliburを用いて横軸にRETSEARCH 蛍光強度，縦軸に前方散乱光を取り，図1の実際のRETチャンネルスキャッタグラムのデータを模倣し，RETSEARCH の蛍光強度により，RBC，LFR，MFR，HFRそれぞれの分画位置

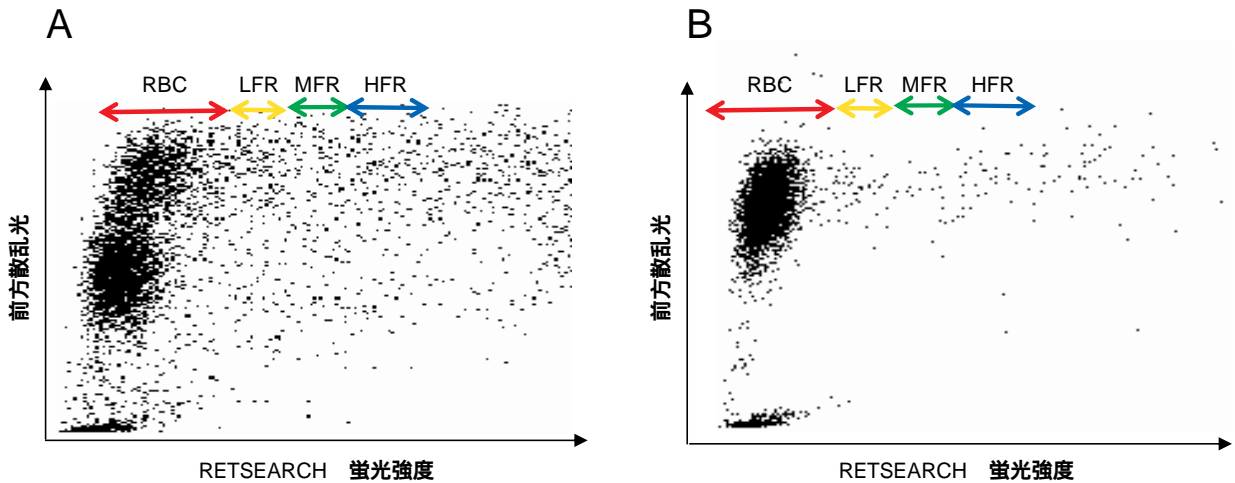


図1．網赤血球増多血液と対照血液のXT2000i RETチャンネルスキャッタグラム
対照血液 (B) と比較して、網赤血球増多血液 (A) では、未成熟分画であるLFR，MFR，HFRの細胞が顕著に増加した。

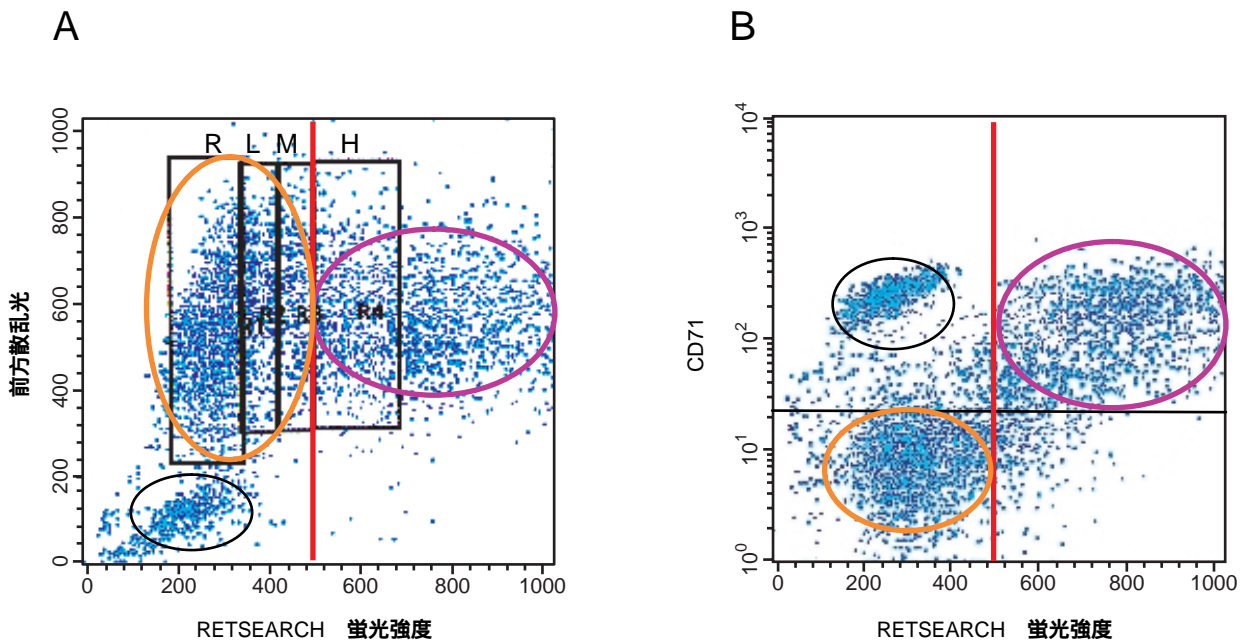


図2．CD71-Alexa488 およびRETSEARCH で二重染色した網赤血球増多血液のFACSCalibur解析
(A) FACSCaliburを用いて横軸にRETSEARCH 蛍光強度，縦軸に前方散乱光を取り，RETチャンネルスキャッタグラムを再現した。実際のRETスキャッタグラム (図1-A) をもとに，RETSEARCH 蛍光強度により，RBC：“R”，LFR：“L”，MFR：“M”，HFR：“H”の分画位置を決定した。
(B) (A)と同一のデータについて横軸にRETSEARCH 蛍光強度，縦軸にCD71-Alexa488強度を取り，スキャッタグラムを作成した。CD71陽性細胞 (ピンクの円で囲んだ細胞) はRETSEARCH の蛍光強度が強く，HFR以上に未成熟な分画に，CD71陰性細胞 (オレンジの円で囲んだ細胞) は，RETSEARCH 蛍光強度が弱く，MFR以上に成熟した分画に出現した。
* 黒い円で囲んだ細胞は血小板である。

を決定した(図2-A)。このRETチャンネル再現スキッタグラム縦軸を前方散乱光からCD71の発現強度に変換したものが図2-Bである。2つのスキッタグラム図2-Aと図2-Bのピンクの円で囲んだ細胞は、そのRETSEARCH 蛍光強度から、HFR以上に未成熟な細胞であると推察される。CD71の発現は、RETSEARCH 蛍光強度が減少、すなわち網赤血球が成熟するに従い低下したが、特にHFRからMFRへ成熟が進む段階で著しく低下することがわかった。さらに成熟が進んだ、MFR、LFR、RBCと

推測される細胞(オレンジの円で囲んだ細胞)では、CD71はほとんど発現していなかった。このことから、HFR以上に未成熟である細胞と、より成熟が進んだMFR、LFR、RBCの細胞は、CD71の発現により、区別できることがわかった。

異なる成熟ステージの細胞の形態的、構造的比較を行うため、RBC、LFR、MFR、HFRそれぞれの分画をFACSAriaでソーティングし、透過型電子顕微鏡で観察したものが図3である。HFRでは変性のため膨張または収縮したミトコンドリアなどの内部構造

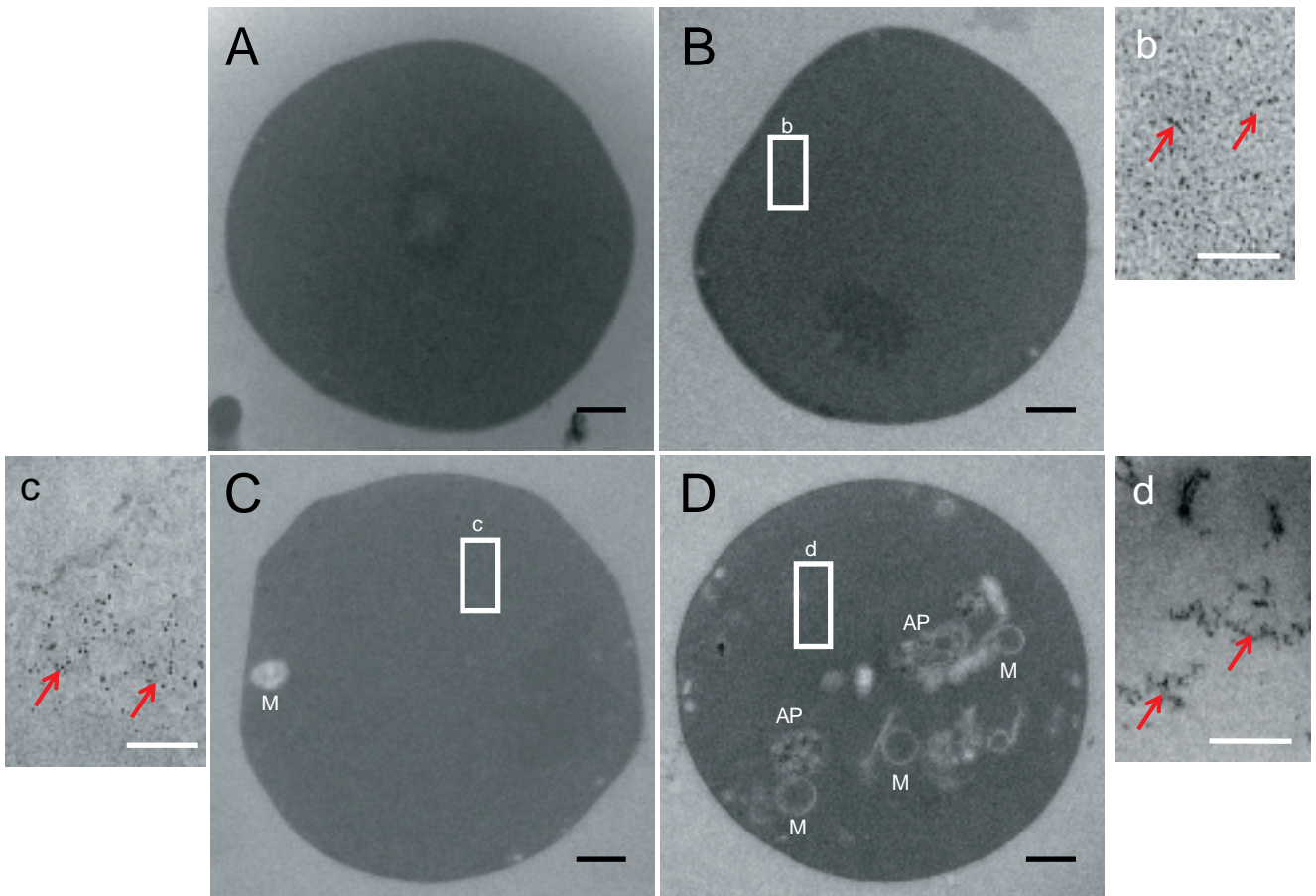


図3 . RBC , LFR , MFR , HFR に分画される細胞の透過型電子顕微鏡像

FACSAriaのセルソーティングシステムを用いてそれぞれの分画の細胞を分取、固定し、透過型電子顕微鏡で観察した。写真は、各分画の代表的な細胞で、RBCの細胞全体像(A)、LFR(B)とその拡大像(b)、MFR(C)と拡大像(c)、HFR(D)と拡大像(d)である。内部構造は成熟に従い徐々に消失し、残存リボソーム(赤矢印)はLFRまで、変性ミトコンドリア(M)はMFRまで、オートファジー構造(AP)はHFRのみで観察された。Black bar=500nm, White bar=50nm

が残存していた。これらの内部構造は細胞の成熟に従って徐々に消失していき、リボソーム以外の構造はMFRまで、リボソームはLFRまで残存していた。成熟赤血球分画RBCでは全ての構造が完全に消失していた。HFRの細胞でオートファジー構造が、全ての網赤血球（LFR，MFR，HFR）で開口放出が観察でき、細胞外に内部構造を放出する過程が確認できた（開口放出の写真掲載なし）。

ミトコンドリア，小胞およびライソソームなどの残存内部構造は，CD71-20nmコロイド金を用いた免疫電子顕微鏡法でもCD71陽性細胞，すなわちHFRに分画されると推測される細胞に観察された（図4）。

さらに詳しく，CD71の発現とRETSEARCH染色強度を比較するため，CD71-Alexa488およびRETSEARCHで二重染色した細胞について，共焦

点レーザー顕微鏡で解析を行った。図5は同一の細胞を異なる検出波長（RETSEARCH 検出波長 > 660nm，図5-A～D；Alexa488検出波長 500-540nm，図5-a～d）で観察したもので，CD71-Alexa488検出波長（図5-a～d）での観察結果，および各ステージの細胞について電子顕微鏡で確認した内部構造の残存度合い（図3）を参考に，様々なタイプに染色された細胞がRBC，LFR，MFR，HFRのどのステージに分画される細胞であるかを推測し，表示したものである。CD71が網赤血球の中でもとりわけ幼若な細胞に発現しているという結果（図2）から，CD71陽性細胞（図5-D，d）はHFRに，CD71のシグナルがほとんど消失した細胞（図5-C，c）はMFRに分画されると推察した。また，CD71陰性細胞には，染色される内部構造がわずかに認められるもの（図5-B）

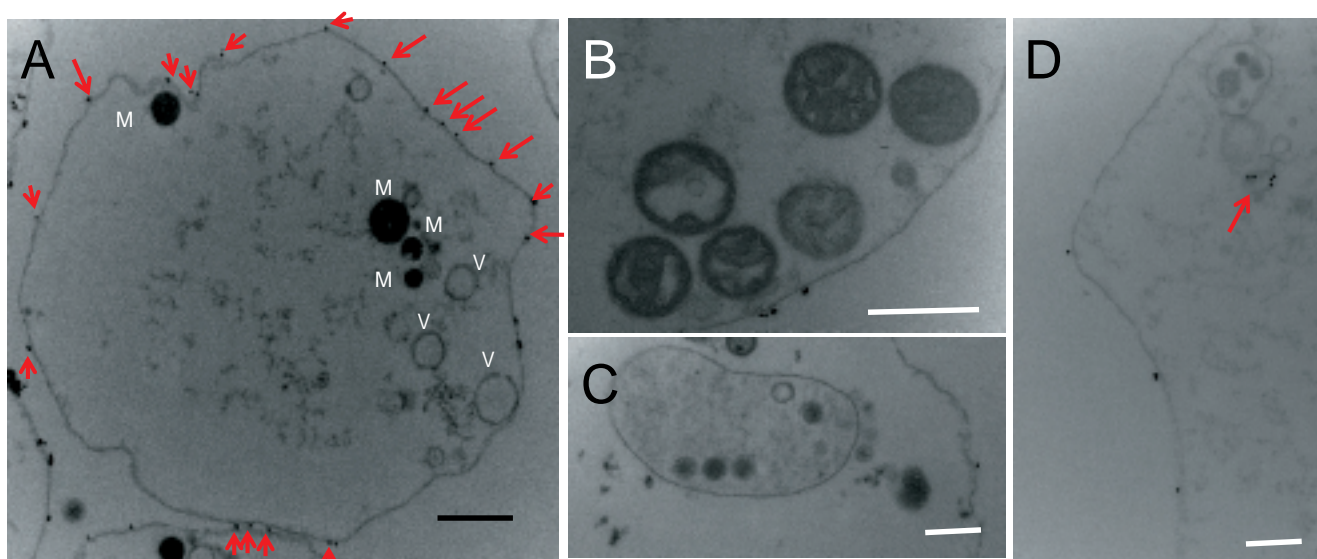


図4．CD71-20nmコロイド金を用いた網赤血球増多血液の免疫電子顕微鏡像

写真はコロイド金粒子（赤矢印）が細胞表面に付着したCD71陽性細胞の透過型電子顕微鏡像である。(A)は細胞全体像で，内部に変性ミトコンドリア(M)，小胞(V)および残存粗面小胞体が確認できた。(B)は変性ミトコンドリアを観察したもので，(C)は変性ミトコンドリアを内部に取り込んだオートファジー構造である。(D)は，金コロイド粒子（赤矢印）が付着したCD71タンパク分子が，小胞に隔離され，多胞体エンドソームに取り込まれていく様子である。これらの現象は，これまでに*in vitro*の研究で報告されている内容とよく一致している。

Black bar=500nm，White bar=100nm

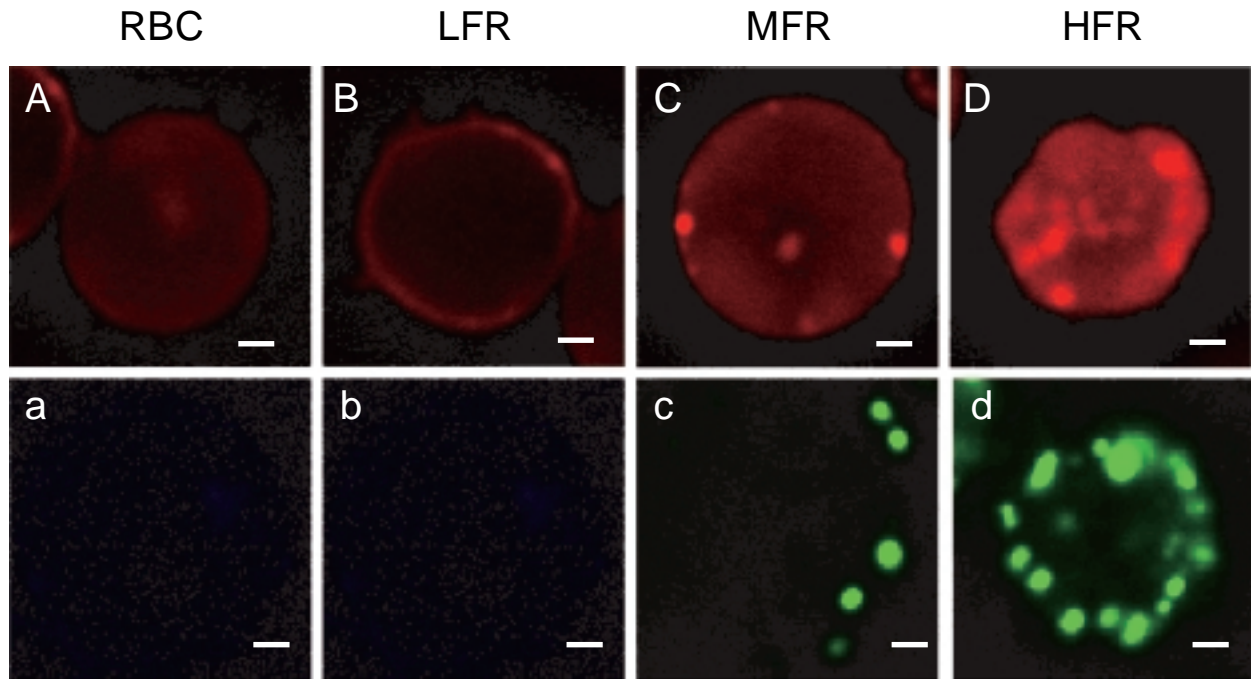


図5 . CD71-Alexa488 およびRETSEARCH で二重染色した網赤血球増多血液の共焦点レーザー顕微鏡像
 写真は、4つの異なる成熟ステージの代表的な細胞について、2つの異なる波長、RETSEARCH 検出波長
 (>660nm, A~D) およびAlexa488検出波長 (500-540nm, a~d) を用い同視野を撮像したものである。
 RETSEARCH の蛍光強度は網赤血球の成熟に伴い、徐々に低下していく (D~A)。Bar=500nm

と、全く認められないもの(図5-A)の2タイプが観察された。RBCには電子顕微鏡の観察から内部構造が全く残存しないことを考慮し、わずかに内部構造が残存していてCD71陰性である細胞(図5-B, b)をLFR、内部構造もCD71発現も完全に消失している細胞(図5-A, a)をRBCであると推測した。RETSEARCH の染色強度は網赤血球の成熟に伴い、連続的にゆるやかに低下した(図5-A~D)。HFRでは内部構造がRETSEARCH で強く染色されている様子が確認できるが(図5-D)、それらの構造は成熟に伴い細胞膜の方向へ移動し(図5-B, C)、最終的に排出されて消失した(図5-A)。この結果は、これまで *in vitro* の実験で証明されている網赤血球におけるオルガネラ排出の様子とよく一致している。

図6は、RETSEARCH (検出波長 > 660nm, 図6-A~D) およびER Tracker green (検出波長 550-540nm, 図6-a~d) で二重染色した細胞の写真と、

ER Tracker green 染色像から予想されるニューメチレンブルー染色像(二重線枠内)である。まずRETSEARCH 検出波長での観察結果から、それぞれの細胞がRETチャンネルのRBC, LFR, MFR, HFRのうち、どの成熟過程であるかを分類した(図6-A~D)。ER Tracker greenは小胞体を染色する色素として知られており、ニューメチレンブルーは網赤血球に残存するリボソームが凝集したものを染色すると報告されていることから、リボソームが小胞体に付着した粗面小胞体の形で残存していれば、ニューメチレンブルー染色像およびER Tracker green 染色像は同様の傾向を示すと考えられる。そこで、ER Tracker green 染色像から、ニューメチレンブルー染色像を予測し、それぞれについてハイルマイヤーのステージ分類⁵⁾を行った。これら3種の染色方法による形態的特徴づけから、HFRがハイルマイヤー分類のステージおよび、MFRおよびLFRがステージおよびの

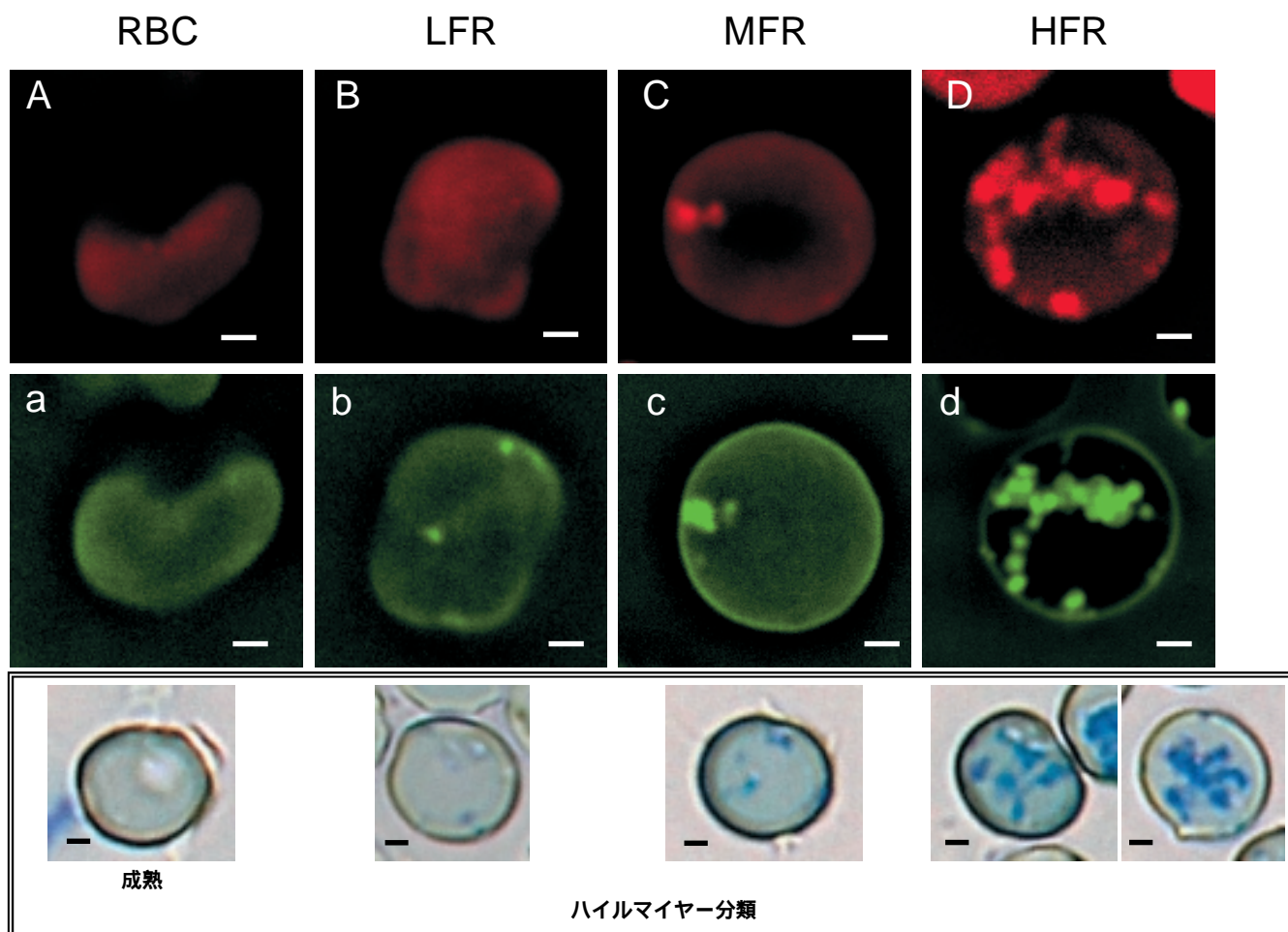


図6 . ER Tracker greenおよびRETSEARCH で二重染色した網赤血球増多血液の共焦点レーザー顕微鏡像写真は、4つの異なる成熟ステージの代表的な細胞について、2つの異なる波長、RETSEARCH 検出波長 (>660nm, A~D) およびER Tracker green検出波長 (500-540nm, a~d) で同視野を撮像したものである。まず各細胞の成熟段階 (RBC, LFR, MFR, HFR) をRETSEARCH 染色パターンから、A-Dのように推察した。続いて、各成熟段階の細胞のER Tracker green染色パターン (a~d) からニューメチレンブルー染色態度を予測し、ハイルマイヤーのステージ分類を行った (二重線枠内)。Bar=500nm

網赤血球に相当していることが推測された。この結果から、RETチャンネルで網赤血球と分画される細胞と、ニューメチレンブルーによる超生体染色で判定される細胞との一致が形態的に証明された。さらに、RETSEARCH およびER Tracker greenの染色部位が、ほぼ一致していたことから、RETSEARCH が主にリボソームに局在する残存RNAに強く結合することが推察された。

考 察

シスメックス社の多項目自動血球分析装置に搭載されているRETチャンネルは、網赤血球の残存RNA含量の違いを蛍光色素RETSEARCH の染色強度により認識し、網赤血球をLFR, MFR, HFRの3分画に分けている。しかし、それぞれの分画の細胞について特徴づけた報告はこれまでになかった。

本検証では、まずそれぞれの分画の網赤血球について、形態や表面抗原の発現動態といった点からこれらの成熟段階を推察することで、特徴づけを行った。膜結合タンパク質CD71（トランスフェリン受容体）は、研究領域でよく知られている網赤血球のマーカーである。このマーカーは、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調節している。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^{16, 17)}。成熟過程でCD71は小胞内に隔離され、分解されて細胞外へ放出されることにより¹⁸⁾、その発現は細胞表面から消失する¹⁰⁾。我々はこれらの現象がRETチャンネルのHFRからMFRの成熟過程で起こることを確認した。それゆえ、各種研究において解釈を行う場合に、CD71陽性細胞が網赤血球の中でもとりわけ幼若な、すなわちHFR以上に幼若な網赤血球であり、やや成熟の進んだMFRおよびLFRに分画される細胞ではないことに注意する必要がある。加えて、HFR細胞の形態観察では、CD71が小胞内で観察された（図4-D）。この現象は、細胞表面のCD71の断片が細胞内部に移行し、多胞体のエンドソームに取り込まれるか、再利用される様子が反映されており、*in vitro*の報告とよく一致している。網赤血球の成熟過程における研究の多くは、網赤血球を*in vitro*培養して解析したもので、*in vivo*での報告は少ない。我々は、ミトコンドリアの変性、開口放出、オートファジー構造および残存RNAの減少していく様子を*in vivo*で捉えることに成功した。これらの結果は全て過去の*in vitro*の報告とよく一致していた¹⁹⁻²¹⁾。

本検証ではさらに、形態的に特徴づけられたLFR、MFR、およびHFR分画の細胞が、ハイルマイヤー分類⁵⁾のどのステージに相当しているかを推察した。その結果、RETチャンネルでカウントされる網赤血球の形態が、CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) で推奨されている標準法⁴⁾である、ニューメチレンブルーによる超生体染色で網赤血球と判断される細胞と一致していることが推測できた。これまでそれぞれの方法で同一の血液検体をカウントし、その数値の相関により、両者の一致を説明してきたが、本検証では初めて形態的にこれを証明した。

加えて、XEシリーズには、全分画の網赤血球(LFR、MFR、HFR)に対するMFRおよびHFRの比率を示すIRF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であると報告されている²²⁾。我々の今回の検討から、熟練した技術者であれば、全網赤血球数に対するハイルマイヤー分類ステージ ~ の比率を計算することで、ニューメチレンブルー超生体染色による判定からIRF値算出が可能である。

本検証は、網赤血球の成熟過程を反映するRETチャンネルの3分画について、特徴づけを行った初めての報告であり、今後RETチャンネルを用いた赤血球系細胞についての細胞学的、臨床的研究に有用な情報であると考えられる。

参考文献

- 1) Arkin CF, et al. Methods for Reticulocyte Counting (Automated Blood Cell Counters, Flow Cytometry, and Supravital Dyes); Approved Guideline-Second Edition. NCCLS. 2004; 24 (8) : 7.
- 2) Baldini M and Pammacciullii I. The Maturation Rate of Reticulocytes. Blood. 1960; 15 (5) : 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) Bessman JD. Reticulocytes. Clinical Methods Third Edition. 1990; 156 : 735-738.
- 5) Heilmeyer L. Blutfarbstoffwechselstudien. Dtsch Arch Klin Med. 1931; 171 : 123-153.
- 6) Mel HC, et al. Reticulocyte Motility and Form : Studies on Maturation and Classification. Blood. 1977; 49 (6) : 1001-1009.
- 7) Product Development Division, Sysmex Corporation. Overview of Automated Hematology Analyzer XE-2100. Sysmex J. 1999; 22 (1) : 76-84.
- 8) Edelman P, et al. Developmentally regulated expression of a 78 kDa erythroblast membrane glycoprotein immunologically related to the platelet thrombospondin receptor. Biochem J. 1989; 262 (3) : 835-42.
- 9) Lee K, et al. The nonexpression of CD36 on reticulocytes and

- mature red blood cells does not modify the clinical course of patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2001 ; 98 (4) : 966-971.
- 10) Stephan D, et al. Enumeration of micronucleated CD71-positive human reticulocytes with a single-laser flow cytometer. *Mutation Research*. 2002 ; 515 : 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. *British Journal of Haematology*. 1992 ; 81 : 432-439.
 - 13) Cooper DM and Jagus R. Impaired Adenylate Cyclase Activity of Phenylhydrazine-induced Reticulocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982 ; 257 (9) : 4684-4687.
 - 14) 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.
 - 15) Zyuz' kov GN, et al. Mechanisms of Regulation of Erythropoiesis during Hemolytic Anemia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2004 ; 10 : 334-337.
 - 16) Seligman PA, et al. Automated analysis of reticulocytes using fluorescent staining with both acridine orange and an immunofluorescence technique. *Am J Hematol*. 1983 ; 14 (1) : 57-66.
 - 17) Dautry-Varsat A, et al. pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 80 (8) : 2258-62, 1983.
 - 18) Johnstone RM, et al. Reticulocyte maturation and exosome release : transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood*. 1989 ; 74 (5) : 1844-51.
 - 19) Gronowicz G, et al. Maturation of the Reticulocyte in vitro. *J. cell Sci*. 1984 ; 71 :177-197.
 - 20) Geminard C, de Gassart A, Vidal M. Reticulocyte maturation : mitoptosis and exosome release. *BIOCELL Review*. 2002 ; 26 (2) : 205-215.
 - 21) Koury MJ, et al. In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes. *Blood*. 2005 ; 105 (5) : 2168-2174.
 - 22) 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) : 172-82.

Reticulocyte Maturation Process - Experimental Demonstration of RET Channel Using Anemic Mice-

Mari KONO, Yuri TAKAGI, Tamiaki KONDO and Keiji FUJIMOTO

Cell analysis center, Scientific Affairs, Sysmex Corporation,
4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe 651-2271

SUMMARY

The RET channel on the XT-2000i, XE-2100 and XE-5000 of Sysmex automated hematology analyzers is a reticulocyte measurement channel. By staining the residual RNA with the fluorescent dye "RETSEARCH" it divides reticulocytes into three fractions, high-, medium- and low- fluorescence intensity reticulocytes (HFR, MFR, LFR respectively). Counting the cells is a useful tool for understanding the status of erythropoiesis and is widely used in the diagnosis of for example anemia and bone marrow suppression. It is believed that these fractions represent reticulocytes of different maturation stages, ranging from very early and immature (HFR) to more mature reticulocytes (LFR), but individual features of the different subpopulations have not been characterized to date.

Our objectives were to isolate cells of the different stages and to analyze them for differences in morphology and RETSEARCH staining pattern. Furthermore, we want to compare this to the expression of the well known reticulocyte marker CD71 and the new methylene blue staining and classification system.

We induced anemia in mice through intraperitoneal phenylhydrazine injection, which leads to severe reticulocytosis in the animals after five days. Anemic murine blood was collected and fractionated into reticulocyte subpopulations by a cell sorting system. The cells were fixed and examined by transmission electron microscopy (TEM) or stained and examined for specific morphology and antigen expression.

By double labeling with RETSEARCH and CD71-Alexa488 and subsequent FACS analysis we created a simulated Ret channel scattergram. We found that transferrin receptor (CD71) was expressed only on the more immature cells and rapidly disappeared at the differentiation step from HFR to MFR. Through TEM and confocal microscopy we confirmed that immature reticulocytes lose CD71 antigen expression at the stage of MFR. Moreover we were able to show that intracellular structures such as residual organelles disappear as the cells mature towards an RBC. This result was supported by immunoelectron microscopic analysis using CD71-gold colloid conjugate.

By electron microscopy we detected residual ribosomes in all of the immature cell fractions (LFR, MFR and HFR), albeit strongly decreasing towards the more mature stages. Since new methylene blue supravital staining, the standard method in reticulocyte analysis, targets residual ribosomes, we can conclude that reticulocytes identified by this staining corresponded to those sorted by FACS using simulated RET-channel. Moreover, this demonstrates that reticulocyte counting by the RET-channel is in accordance with that by new methylene blue supravital staining.

Many observations of the reticulocyte *in vitro* maturation process have been reported. This is one of the very few *in vivo* reports and we believe that our observations accurately reflect the *in vivo* maturation process.

Key Words RET Channel, Reticulocyte, Maturation, CD71 (Transferrin Receptor), Morphological
