

高精度フローサイトメトリー法の確立

金沢大学附属病院高密度無菌治療部

金沢大学医薬保健研究域医学系血液・呼吸器内科教授

細川 晃平
中尾 眞二

研究の背景

再生不良性貧血や骨髄異形成症候群のような骨髄不全においては、グリコシルフォスファチジルイノシトールアンカー蛋白(GPI-AP)の欠失した血球(PNH型血球)が末梢血中で増加しているかどうかを明らかにすることが、病態や予後を判断する上で重要である。われわれは、0.003%以上のPNH型顆粒球および0.005%以上のPNH型赤血球を正確に定量できる高精度フローサイトメトリー法(OPTIMA法)を確立し、多数の骨髄不全患者の血液を検索してきた。OPTIMA法は、金沢大学で開発されたFLAER/(CD45)/CD11b/7AADを用いる方法を一般社団法人日本PNH研究会(JPSG)FCM部会で改良したもので、gating方法と、GPI-AP陽性・陰性の境界線の位置決めで工夫を凝らすことにより、顆粒球の検査閾値0.003%、赤血球の検査閾値0.005%を実現している。今回、OPTIMA法に関する技術論文が国際誌である『Annals of Hematology』誌に採択されたため、その概要を説明する¹⁾。

高精度フローサイトメトリー法の特徴

OPTIMA法の特徴は以下の3点にまとめられる。

- ①顆粒球・赤血球において、それぞれの細胞系マーカーであるCD11b, グリコフォリンA (GP-A)を高発現している細胞集団をゲーティングする。
- ②縦軸に細胞系マーカー、横軸にGPI-AP発現(顆

粒球:FLAER, 赤血球:CD55とCD59)を用いてヒストグラムを展開し、左上(Upper left quadrant[ULQ])領域に検出される細胞集団をPNH型血球と定義する。

- ③PNH型血球陽性・陰性の判定は定性ライン(qualitative line)で行い、完全欠損であるType IIIと部分欠損であるType IIを含むPNH型血球の正確な定量は定量ライン(quantitative line)で行う。

図1AにOPTIMA法の概念図, 図1B, CにPNH型顆粒球・赤血球を検出するためのゲーティング法を示した。定性ラインは図1Aにおけるline aに相当するが、この定性ラインはそれぞれの測定施設において、最低30例以上の健常者の検体を用いることによって設定された。すなわち、「健常者の顆粒球を10万個解析した場合に、定性ラインの左側に来る細胞(dot)は多くても2個以内」となるように設定された。

高精度フローサイトメトリー法の解析例

OPTIMA法におけるPNH型顆粒球, 赤血球の解析例を図2に示した。図2Aでは健常人における解析例(顆粒球・赤血球いずれも陰性)を示している。一方, 図2Bでは骨髄不全患者における解析例を示しているが、非常に少数(10万個あたり3個~10個[顆粒球], 5個~10個[赤血球])のPNH型顆粒球(赤血球)が検出可能であることが分かる。