

赤血球膜蛋白異常の検出法としてのフローサイトメトリー： 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) の病態解析の基礎と応用

佐藤晶子¹⁾・長澤俊郎²⁾・二宮治彦²⁾*

1) 筑波大学人間総合科学等支援室

2) 筑波大学人間総合科学研究科血液病態制御医学

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1 筑波大学臨床医学系

Flow Cytometry as a Tool to Detect Defects in Red Blood Cell Membrane Proteins—Basis and Application for Analysis of Pathophysiology of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria

Shoko Sato¹⁾, Toshiro Nagasawa²⁾, and Haruhiko Ninomiya²⁾*

1) Academic Service Office for Comprehensive Human Science, University of Tsukuba

2) Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

Tennodai 1-1-1, Tsukuba 305-8575, Japan

Flow cytometry (FCM) is a useful tool to detect phenotypes of blood cells. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), an acquired hematopoietic stem cell disorder, is characterized by its affected blood cells defective in the expression of glycosyl phosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. GPI-anchored membrane proteins on the red blood cells (RBC) include two major complement-regulatory membrane proteins, CD55 and CD59. The most characteristic clinical feature of PNH, intravascular hemolysis of PNH-affected RBC, is induced by the complement-mediated lysis of CD55- and CD59-negative PNH-RBC. In addition to the RBC membrane defects, leukocytes and platelets are also defective in the expression of GPI-anchored proteins, because of the PNH mutations occurred in the pluripotential hematopoietic stem cells. The GPI-anchored proteins with cell-lineage specificity, CD16b in neutrophils and CD14 in monocytes, are also shown to be deficient in PNH by FCM. We recently applied FCM to the demonstration of CD59-deficient populations in reticulocytes. FCM is also useful to demonstrate RBC membrane alteration in the aspects of lipids associated with the procoagulant pathophysiology in PNH.

Key words : flow cytometry / CD55 / CD59 / PNH / GPI

1. はじめに

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) は、後天性の赤血球膜異常に起因して補体感受性の亢進した PNH 赤血球

(PNH-RBC) が、発作的・慢性的に血管内溶血することを最大の臨床的特徴とする溶血性疾患である¹⁾。PNH の溶血病態が、補体感受性赤血球の存在による補体起因性溶血であることが明らかにされた後、それを説明する PNH 赤血球の膜分子異常が解明されるまでには長期間を必要とした²⁾。健常人の (正常) 赤血球膜には、自己補体の活性化反応から自己赤血球を防衛する補体制御活性を有する蛋白が発現している。今日では、このうちの一部の補体制御膜蛋白は

* Corresponding Author

Tel : 029-853-3455

E-mail : ninomiya@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

PNH 赤血球で欠損し、この欠損がPNH赤血球の補体性溶血の原因である、と説明されるようになってきている²⁾。赤血球の補体制御膜蛋白には、細胞膜とグリコシルホスファチジルイノシトール（glycosylphosphatidylinositol, GPI）を介して結合し、細胞表面に発現しているものが含まれている。PNHでは、このGPIの生合成に異常があり、補体制御蛋白が正常に生成されても細胞膜上に発現することができず、結果的に自己の補体活性化を制御できず、血管内溶血を起こすことになる³⁾。

GPI生合成の障害は血液細胞にのみ検出され、多能性造血幹細胞におけるX染色体p22.1のPIG-A（phosphatidylinositol glycan class-A）遺伝子の後天的点突然変異に由来すると考えられている。そのため、赤血球だけでなく各系統の血球においてGPIアンカー型膜蛋白のすべてで発現が欠損することになり⁴⁾、PNHでは溶血所見だけでなく易感染症や血栓症等の多彩な病態を伴うのはこのためである⁵⁾。

またPNHは、再生不良性貧血（aplastic anemia, AA）や骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndrome, MDS）と共に骨髄不全症候群（bone marrow failure syndrome）と総称され、経過中に、相互に病型移行や合併が認められる。PNHクローンの非腫瘍性増殖（オリゴクローナルな拡大）の変化に対しても、経時的なPNHクローンの解析が必要となる⁶⁾。フローサイトメトリー（flow cytometry, FCM）を用いた血球の解析は、個々の血球についてGPIアンカー型膜蛋白の抗原量（蛍光強度）を高感度に分析し、各血球におけるPNHクローンを定量的に把握することができるので、FCM測定はPNHの病態評価や早期診断にとって必須の検査方法の1つとなっている⁷⁾。

2. PNH赤血球の膜(蛋白)異常と補体性溶血

PNHにおける臨床的な溶血病態の特徴は、「血管内溶血」である。自己免疫性溶血性貧血（温式抗体）や遺伝性球状赤血球症などは、「血管外溶血（溶血の場は主に脾臓）」であり、PNHとは対比的に分類される。「血管内溶血」を特徴とする疾患や病態には、PNHの他に、先天性の赤血球異常、抗体による免疫機序（異型輸血など）、補体の活性化による影響、化学物質、物理的な破壊などがある。PNHでは補体系の活性化に伴ってPNH赤血球（補体感受性赤血球）は血管内で破壊される。補体系活性化反応による殺菌反応や細胞溶解反応は生体防御において重要であるが、自己細胞は補体系による攻撃の標的とならないように複数の補体抑制蛋白（C1 inhibitor, C4bp, factor H, factor I）が血漿中に存在し、細胞膜上には

CR1（CD35）、MCP（CD46）、CD55、CD59を発現し、補体成分の複合体の解離や酵素的な分解によって補体系を抑制している。また、この補体制御膜蛋白は種特異性を持っているため、ヒトの補体に対しては作用するものの、異種に対する補体活性反応には作用せず、補体系は非自己（異種）に対しては効果的に作用する。

体内循環中では（正常）赤血球は自己の補体系の活性化による溶血を回避して、平均120日の赤血球寿命を維持している。一方、PNHでは、正常赤血球と混在して、症例毎に様々な比率でPNH赤血球が存在する。このPNH赤血球が補体が活性化される体内環境においては補体性溶血をするため、平均赤血球寿命が短縮すると考えられる。*In vitro*では、PNH赤血球は正常赤血球に比較し少ない補体量での溶血や、赤血球膜に補体C3b成分が過剰に蓄積し、少数のC5b-8(9)n膜侵襲複合体（membrane attack complex, MAC）の形成で容易に溶血することなどが観察されている。補体溶血感受性曲線の分析により、PNH赤血球における補体感受性はI型（正常とほぼ同等）、II型（3～5倍の感受性）、III型（15～25倍の感受性）の3型に分類することができる⁸⁾。

補体感受性赤血球の検出は、血清中の補体を試験管内で活性化させて実施するHam試験（acidified-serum lysis test）やシヨ糖水試験（sucrose hemolysis test）などの検査法が臨床検査として普及している。少なくともPNH赤血球比率の高い症例では、診断特異性を有している。補体系活性化経路には、抗原抗体反応による古典的経路（classical pathway）、マンノース結合レクチンやフィコリンが微生物などの糖蛋白や糖鎖に結合しておこるレクチン経路（lectin pathway）、抗体や糖鎖非依存性の補体C3の自発的な加水分解による第二経路（alternative pathway）の3つの経路が知られている。Ham試験は、新鮮血清に塩酸を加えて弱酸性（pH 6.5～7）にすることにより補体の第二経路を活性化し、またシヨ糖水試験の検査条件である低いイオン強度ではIgGの非特異的な赤血球結合がおり、古典的経路および第二経路が活性化しPNH赤血球は試験管内で溶血する。健康人赤血球は、これらの試験条件ではほとんど溶血を起こさない。しかし、これらの溶血試験の溶血率による判定では、異常赤血球の割合が少ない症例では、結果の判定が困難である。

1983年に、赤血球膜上の補体制御蛋白の1つであるdecay-accelerating factor（DAF, CD55）蛋白の欠損がPNHで発見された⁹⁾。その後、20-kDa homologous-restriction factor（HRF20, CD59）のPNHにおける欠損も確認され、PNHにおける補体性溶血の原

因は補体活性化を抑制する GPI 膜蛋白の発現低下 (欠損) によることが確認された. DAF (CD55) は, 補体 C3 転換酵素 (C4bC2a) および C5 転換酵素 (C4bC2aC3b または C3bBb) を抑制し C4b および C3b に結合し, 補体成分複合体を崩壊させる. また CD59 は, 補体の MAC の形成を抑制する. すなわち, C5b-8 複体内の C8 への C9 結合を抑制し, さらには, C9 の重合による MAC の完成を阻止し, 強力に補体系活性化を抑制する役割を担っている. PNH では赤血球だけでなく, 好中球, 単球, リンパ球等の白血球や造血幹細胞においても, CD55 や CD59 以外に複数の GPI アンカー型膜蛋白の欠損の異常が認められ, PNH は「後天性の GPI アンカー型膜蛋白欠損症」として理解されるようになった²⁾.

PNH の診断では, 細胞上に発現する GPI アンカー型膜蛋白に対して, これに結合する蛍光標識モノクローナル抗体を反応させた後, FCM を用いて個々の血球膜上の抗原発現量 (抗原量に比例し増加する蛍光強度) を解析する. 正常血球は高い蛍光を示し, それよりも低い蛍光を示す赤血球を異常 PNH 血球として検出することが可能である. 従来法の溶血試験よりも, 感度および特異性に優れた分析が行われ, 1% 以下の各血球系の微小な PNH クローンの解析が可能である.

3. フローサイトメトリーの原理^{10, 11)}

FCM による解析は, 溶液中に浮遊している細胞・粒状物質 (直径 0.5 ~ 35 μm 程度) を対象とし, 多量のサンプルを比較的短時間に処理することができる高い処理能力とヘテロな細胞集団の中から目的の細胞を絞り込むゲート設定 (gating) や多重染色を行うことにより, 再現性および感度に優れた分析結果が比較的迅速に得られる特徴がある.

測定機器は, 各社からそれぞれに特色のある高性能なフローサイトメーター (flow cytometer) が製造されており, 性能的には主に以下の 2 つに分けることができる. 目的の生細胞を高速で分取することができる機能を持つセルソーター (cell sorter) と, 細胞解析が主のセルアナライザー (cell analyzer) である.

セルアナライザーは, 一般的には, フローセルのシース液の中を試料の粒子 (細胞) が一列に並び通過することにより, 光学系のレーザー (light amplification by stimulated emission of radiation, LASER) 光による照射を精度よく受けることができるラミナーフロー (laminar flow) の原理に基づく流路系と, 多種類の検出器を備えて 1 回の測定で同時に多数の電気的情報 (マルチパラメーター) を得ることができ

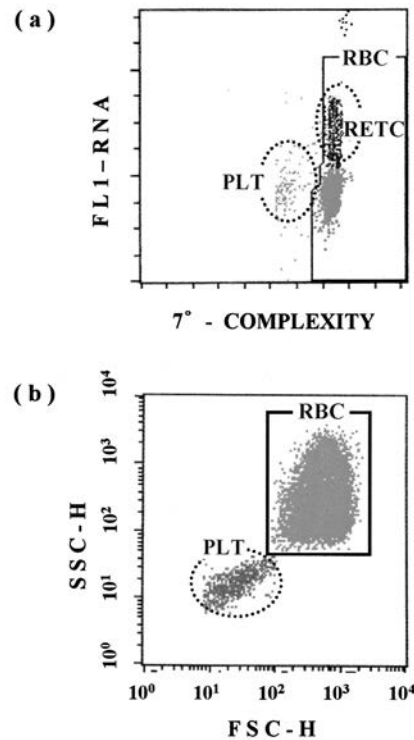


Fig. 1 Scattergram of RBC on FCM: (a) CELL-DYN4000 (automated hematology analyzer, Abbott): RBC (zone of red blood cells), RETC (zone of reticulocytes), PLT (zone of platelets); (b) FACSORT (Becton Dickinson): RBC (zone of red blood cells), PLT (zone of platelets).

る測定・分析系を備えている.

実際的には, 検出された測定光は増幅され, 散乱光および蛍光の分析が行われる. 散乱光では, レーザー光軸に対して同方向の前方散乱光 (forward scatter, FSC) は細胞の大きさの指標となり, 90度で散乱する側方散乱光 (side scatter, SSC) は細胞内の複雑さの指標となる. この 2 つのパラメーターによる 2 次元座標のサイトグラムは, サンプルの形態的情報として有用であり, 分析する細胞を選択できる利点がある (Fig. 1).

蛍光物質にはそれぞれ特有の励起波長と蛍光波長があり, 光のエネルギーを吸収して励起され, 元の状態に戻るときに励起波長よりも長い蛍光波長を発する. 目的とする細胞の形質を分析するには, FCM に備えられたレーザー光で励起され蛍光を発するような蛍光物質で標識された抗体などと反応させれば, その蛍光を分析・測定することにより, 陽性率や個数 (存在比率) の算定, 平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) 等を定量的に分析することができる. 蛍光試薬は標識する物質の量に比例して特異的に結合し, その蛍光色素の量に比例して蛍光を発するという stoichiometry の理論が FCM 定量分析

の基本になっている。

検出系には光学フィルターを有し、一定幅の蛍光波長を感知するようになっている。それにより多種類の光学フィルターが掲載された機器では、FITC (fluorescein isothiocyanate), PE (phycoerythrin), APC (allophycocyanin), タンデム色素 (例えば PE-Cy5, APC-Cy7) などの複数の蛍光色素の掛け合わせによる2カラー, 3カラーなどの多重染色の測定が可能であり, また, 複数のレーザー光 (例えば 488 nm 青色レーザー, 633 nm の赤色レーザー, UV レーザー等) を掲載した機種では, 励起波長が異なる多種類の蛍光色素を掛け合わせた測定系が構築され, 4 カラー以上のさらに緻密なマルチカラーの能力を発揮した分析が行えるようになる。PNH 血球の検査では, CD55 や CD59 等のシングルカラー解析, CD55-PE と CD59-FITC との組み合わせによる2カラー解析, 各細胞の発現を測定するための血球特異的な膜蛋白抗体 (赤血球 CD235a, 好中球・単球 CD11b あるいは CD13, T リンパ球 CD3, B リンパ球 CD19, 造血幹細胞 CD34) と CD55 や CD59 等の2カラー解析が行われている。

4. 造血器疾患の診断におけるフローサイトメトリーの意義¹²⁾

FCM では, 末梢血, 骨髓液, 胸水, 腹水, 髄液, 肺胞洗浄液などの細胞や, 培養細胞, またリンパ節, 脾臓, 固型腫瘍などは細切した組織細胞浮遊液が測定試料となる。蛍光標識試薬には, 生細胞の細胞膜を透過できるもの (例えば Hoechst33342) と, 透過できないもの (例えば propidium iodide, PI) があり, PI は非透過のため生細胞と死細胞の分別としても利用されるが, 非透過性色素の場合は, 固定および浸透性を高めるための膜透過試薬の処理を行えば細胞内の物質を測定することが可能である。そのため FCM 測定は, 白血病やリンパ腫などの造血器腫瘍の DNA や RNA 量の定量解析, 細胞表面・細胞内・核内の抗原量分析, 正常細胞との発現量 (蛍光強度) の比較, 腫瘍細胞特有な膜蛋白発現を利用した病型分類, 白血球膜共通抗原の CD45 ゲーティングによる造血幹細胞測定, 治療後や再発による微小残存病変 (minimal residual disease, MRD) の 10^{-3} ~ 10^{-4} 感度での検出, biphenotypic 型 (1細胞中に2系統以上の分化抗原を発現) か bilineage 型 (2系統以上違う白血病細胞が混在) の白血病かの鑑別, 免疫グロブリン軽鎖を利用したリンパ球 B 細胞のモノクロナリティの証明, アポトーシス細胞検索, 染色体異常に関連した細胞膜抗原検査, 活性化血小板の測定, HIV

Table 1 CD antigens on RBC membranes

CD antigens	Other names
CD55	DAF,
CD59	HRF20, MACIF, MIRL, 1F5
CD35	CR1
CD36	GP IV
CD44	Pgp-1
CD47R	IAP
CD58	LFA-3
CD71	TfR
CD99	E2
CD108	GR2, JMh antigen
CD173	H2 antigen
CD176	Tf blood type
CD233	SLC4A1, band 3
CD234	Fy-glycoprotein, Duffy antigen
CD235a	Glycophorin A
CD235b	Glycophorin B
CD236	Glycophorin C/D
CD236R	Glycophorin C
CD238	Kell
CD239	B-CAM, Lu
CD240CE	Rh30CE
CD240D	Rh30D
CD240DCE	Rh30D/CE
CD241	RhAg
CD242	ICAM-4

感染症等における CD4 リンパ球数やリンパ球のサブセットの測定, 細胞内やビーズを使用した可溶性サイトカイン測定, 細胞内 pH の測定など, 多岐にわたって広く活用されている。

測定する際には, どのモノクローナル抗体を組み合わせるかで結果が異なる場合があり, FCM の機種によって異なるが, 特有の蛍光波長を発する各蛍光色素は相対蛍光強度差 (APC > PE > PE-Cy5 > FITC > PerCP, FACS Vantage) があり, 細胞の抗原密度も考慮して標識抗体を選択する必要がある。低密度の抗原細胞の検出には高い相対蛍光強度の標識抗体を用いたほうがよい。

5. PNH における GPI アンカー膜蛋白欠損

血球の細胞膜表面には各分化や成熟段階に相当して抗原, 接着分子, サイトカインリセプター等が存在している。リセプターと特異的なモノクローナル抗体との反応は, FCM による測定に不可欠であるが, 複数開発されるモノクローナル抗体に対して, 1982 年に第1回国際ワークショップが開催され, 反応性が一致するモノクローナル抗体は CD (cluster of differentiation) 分類として統一・整理されることとなった。国際的な複数の研究グループによる検討で, 反応性が一致する2以上の複数のモノクローナル抗体を1つ

Table 2 GPI-anchored proteins deficient on PNH cells

GPI-anchored proteins	Other names
CD55*	
CD59*	
CD14	LPS-R
CD16b	FC γ R IIIb
CD24	HSA
CD48	Blast-1
CD52	Campath-1
CD58*	LFA-3
CD66b	CGM-6
CD66c	NCA-95
CD66e	CEA
CD73	nucleotidase
CD87	uPA-R
CD90	Thy-1
CD108*	JMH
CD109	8A3
CD157	BST-1
CD160	BY-55
CD177	NB1
CD228	MT
CD230	prion protein

* GPI-proteins deficient on PNH RBC

のクラスターとして整理分類され、CD番号は年々増加し続けている¹³⁾。

赤血球の補体制御膜蛋白であるCD55には、DAF (decay accelerating factor), complement control protein, エコーウイルスリセプター, コクサッキーウイルスB3リセプターなどがあり、CD59にはHRF20 (homologous restriction factor 20kDa), MIP (membrane attack complex inhibiting protein), MACIF (membrane attack complex inhibitory factor), MIRL (membrane inhibitor of reactive lysis), complement protectin, IF5 antigen, gp18などの別名もある。

このCD分類はヒト白血球に対する反応性より分類が始まったが、赤血球では補体制御膜蛋白CD55, CD59のほかTable 1に挙げたような抗原は赤血球上に発現するCD抗原として分類されている。補体制御膜蛋白の1つであるCD46は赤血球には発現していない。また、CD番号に含まれていないものも多くあり、赤血球固有のエリスロポエチン・リセプターもその1つである。

膜蛋白の細胞膜への結合様式には膜貫通型と非貫通型があり、膜貫通型では1本鎖の膜蛋白のC末端(COOH)が細胞質内にありN末端(NH2)が細胞外のI型、逆のII型、テトラスパン型(TM4)のように何回か貫通した構造のIII型がある。非貫通型には、細胞膜ペプチドのC末端(COOH)と抗原分子のGPI部が結合することで細胞膜に蛋白が結合するGPIアンカー型がある。GPIアンカー型では、細胞膜

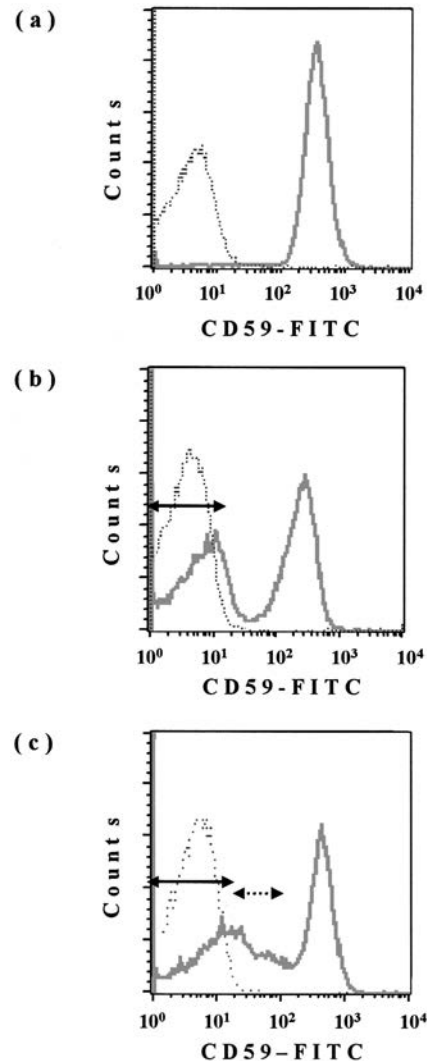


Fig. 2 Deficiency of CD59 on RBC analyzed by FACS. (a) normal individual ; (b), (c) PNH patients. Dotted lines denote negative control. CD59-negative (PNH-affected) RBC population is shown in PNH (solid-line arrows). In some PNH patients, RBC subpopulation partially defective in CD59-expression is demonstrated (dotted-line arrow).

への付着が膜貫通型より浅いので膜蛋白の横方向への移動が容易(迅速に対応)と考えられている。PNH血球の場合、全症例でPIG-A遺伝子の変異を認め、GPI生合成の最初のステップのPIとN-acetylglycosamine付加反応に障害を来し、GPI合成が中等度あるいは完全に抑制される。赤血球の場合ではCD55, CD59のほかCD58とCD108がGPIアンカー型膜蛋白である。

Table 2に列挙した膜蛋白もGPI膜蛋白であり、白血球を解析することによってPNHの診断にも有用である。PNHでは異常血球比率が、赤血球(Fig. 2)よりも、白血球系(Fig. 3)でより高い症例も多くあり¹⁴⁾、FCMによる白血球上のGPIアンカー型膜蛋白

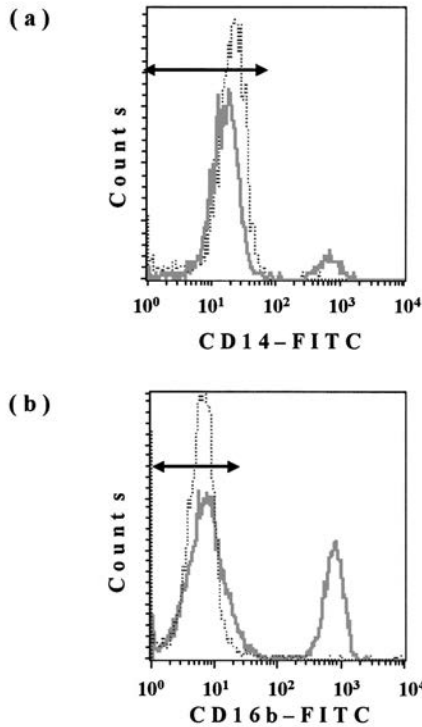


Fig. 3 Deficiency of GPI-anchored proteins on PNH-affected leukocytes. (a) deficiency of CD14 on PNH-monocytes, (b) deficiency of CD16b on PNH-neutrophils. Solid-line arrows denote PNH-affected leukocytes. Dotted lines denote negative controls.

の解析には臨床的意義がある。

6. フローサイトメトリー上での赤血球

FCMは一般的には、PNHのCD55やCD59発現解析の他に、未熟な細胞の赤芽球系細胞の同定、赤血球や網赤血球の分別などに用いられている。Fig. 1 (a)には自動血球計数装置（アボット社、CELL-DYN 4000）の血球解析画面を示している。赤血球・白血球・血小板の分別にとどまらず網赤血球の計数なども自動解析できる装置が臨床導入されている。また、赤血球凝集法による赤血球膜抗原（血液型抗原）解析に代わって、FCMによる血液型の抗原量の比較やキメラ解析等も行われている。また、赤血球表面結合抗体の検出についても、従来の凝集法によるCoombs（抗グロブリン）試験での測定感度は、赤血球結合IgG分子が200～250分子/赤血球存在しなければ陽性とならないが、体内では100～150分子/赤血球で溶血が起こるとされており、自己免疫性溶血性貧血の5%程度にCoombs陰性の症例があるといわれている。FCM測定ではCoombs試験陰性の症例でも陽性になる症例があるとの報告がある。この他、赤血球のFCMの活用として、我々は、Howell-Jolly

小体やヘム喪失に起因した変性ヘモグロビンの同定や定量分析をFCMでも行っている^{15, 16)}。

7. PNH赤血球のFCMによる解析

実際的なFCM解析において、血球と抗体の反応には直接法と間接法がある。直接法は、FITCやPEなどで蛍光標識している抗体を用いて対象とする細胞と反応させる方法であり、反応時間が短時間でできる。未標識抗体を用いる間接法の場合は、特異抗体を反応させた後にFITCやPE標識等の2次抗体と反応させるため、反応時間は直接法より長くなるが蛍光強度が高くなる利点がある。

赤血球と反応する抗体は各社から販売されており、至適細胞数と抗体濃度を指示通りに行えば問題ないと思われる。赤血球と抗体との反応は、洗浄赤血球を用いる場合と、そのまま全血で抗体を反応させる2通りの方法がある。PNH血球の判定には、膜蛋白陰性細胞を検出することが必要となるため、陽性と陰性を識別するcut-off値を定めることがFCM測定で重要である。使用する抗体と同種の同一免疫グロブリンサブクラス（陰性コントロール）を用いて自家蛍光や非特異的反応による蛍光の影響を除き、cut-off値を定める。

FCMによる蛍光分析では、細胞の膜蛋白の発現量が多いほど強い蛍光を発し、cut-off値との分離が良い方が測定上の信頼性が高くなる。CD55とCD59の赤血球における発現量を比較した場合、CD55は膜上の分子密度が低いため（約3000分子/細胞）、直接法によるFCM解析では、健常人においても100%の赤血球が陽性と分析できないことがある。その点CD59は膜蛋白の発現が多く（CD55の約10倍）、強い蛍光強度の検出ができ、健常人による直接法でも100%陽性となりCVも低い。そのため測定の信頼度が高く、微小なPNHクローンの比率の識別もしやすいと思われる。CDD59単独欠損（遺伝性）症も知られていることから¹⁷⁾、PNHの診断時にはCD55をCD59と同時に分析することは意義があるものの、PNHと診断された症例のフォローアップなどにおいてはCD59陰性血球分画をPNH異常血球分画とするのがよいと考えられる。

PNHにおける中心病態である血管内溶血を反映する指標として、上記のように補体感受性赤血球（＝CD59陰性赤血球）をFCMで証明することには意義がある。PNHはしばしば血栓症を合併しやすいという病像も知られている。この臨床像を白血球上に発現するGPI型膜蛋白uPAR（CD87）の発現低下で説明しようとする報告¹⁸⁾もなされている。一方では、

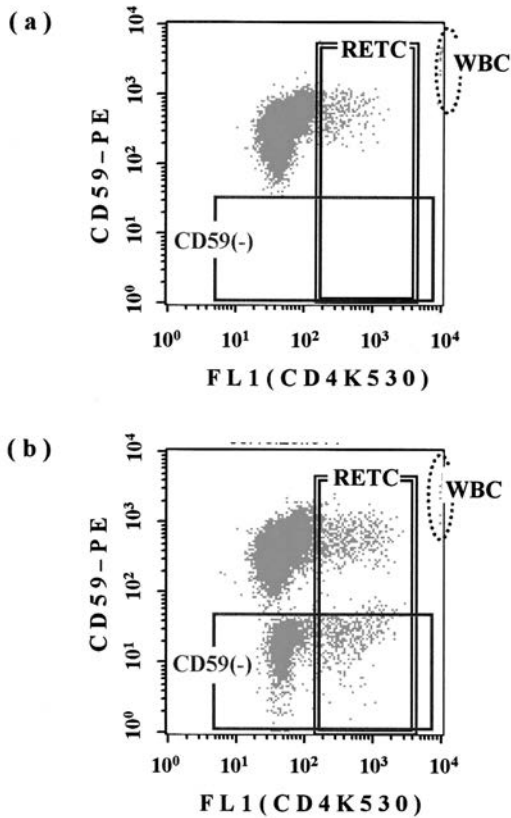


Fig. 4 Gating of reticulocytes on flow cytometry. (a), a normal individual; (b), a PNH patient. Membrane permeable RNA-binding fluorescent dye, CD4K530, stains reticulocytes (RETC). In PNH patients, the ratio of CD59-negative reticulocytes is shown higher than CD59-negative whole RBC.

補体活性化に伴って赤血球はFCM上で観察できる形質変化を来すことも知られ、これが易血栓性にも影響を与えていることも示唆されている¹⁹⁾。

FCMでは、測定条件に応じて検出器からの測定値をLogとLinearのスケールで測定でき、通常は、白血球はFSCとSSCをLinearで、赤血球は白血球よりも小さいためFSCとSSCはLogで、蛍光量(蛍光強度)はLogスケールでの検出が多い。赤血球によるFSCとSSCのサイトグラムでは、Fig. 1 (b) のようになり、赤血球の絞り込みを行うゲート設定(gating)を行い解析する。PNH赤血球は補体溶血感受性曲線の分析と同じようにFCM測定でも、健常人と同じ発現量、完全欠損、その中間の発現量、の3型の赤血球が認められる (Fig. 2 (c) ではtype IIに相当する中間的な抗原発現がみられる)。

PNHの異常赤血球の割合を、type IIIのみで判定する場合とtype II + IIIの合計をとる場合の考え方があり、基本的には健常人の発現量よりも低い血球を異常にとると思われるが、type IIの血球は補体制御活性を弱いながら発現しており、完全欠損のtype IIIの

血球の方が臨床的な溶血の関連を考える上では重要であるので、type IIIの血球の割合を異常血球の割合として重点的に評価した方がよいのではないと思われる。

また、全血による測定では、比較的簡単に精密な測定ができる利点がある。溶血発作等による血管内溶血などは補体感受性の高いPNH赤血球のみが影響を受け溶血する一方、正常赤血球は120日間の寿命を維持するため、全血による測定ではPNHクローンが低く検出されてしまうという問題点がある。

8. PNH赤血球の網赤血球ゲート法によるFCM測定

通常行われているFCMにおいて赤血球(全血)を用いてPNH形質を解析すると、PNHクローンが低率にしか検出されない(体内循環中で溶血するため)問題点を解決するため、骨髓からの赤血球産生をより反映した測定方法として網赤血球によるPNH赤血球測定を開発した (Fig. 4)²⁰⁾。

網赤血球は赤芽球が脱核して間もない赤血球で3~4日間は細胞内にRNAを残存し、この間はヘモグロビン合成が持続されていると考えられている。網赤血球は骨髓中に2日~3日留まり骨髓静脈洞壁を通過して末梢循環へ入り、末梢血では約1日程度で成熟赤血球になる。赤血球産生亢進時には、網赤血球は骨髓から末梢血へ早めに放出され2~3日間は網赤血球のまま循環する。成人の網赤血球の基準値は0.5~1.5% (24~84 × 10¹²/l) で、赤血球は絶えず崩壊(古い赤血球は脾臓で処理され崩壊される)と新生赤血球の産生によって恒常性が維持されている。

通常、PNHでは、網赤血球比率(%)の増加が認められる症例が多く、貧血が強い症例の方が網赤血球の産生率が高いといわれている。網赤血球と赤血球の識別は、日常診療的には自動血球測定装置で計測が行われており、我々は、CELL-DYN4000の自動血球測定装置の網赤血球試薬(CD4K530試薬)を使い網赤血球の鑑別を行いCD59との2カラー解析を行っている。我々のPNH症例(n=6)の検討では、全血による異常PNH赤血球比率と比較し、網赤血球ゲート法による異常血球比率は常に高く、高感度でPNHクローンの検出が可能であった。また、このギャップを用いて異常PNH赤血球(CD59陰性赤血球)の平均赤血球寿命を推定する計算式を提唱している²¹⁾。異常PNH赤血球の平均赤血球寿命は症例毎に異なるだけでなく(16~45日)、同一症例においても変動することが推定されて、PNH病態における溶血の変化を解析する上で有用な方法と考えている。

網赤血球におけるPNH赤血球のFCM解析は、異常クローンと正常クローンの比率をよりの確に評価できる優れた検査方法と思われる。

9. まとめ

PNHは、PNHの国際基準、本邦の診断基準の改定が行われ、溶血所見が明らかなclassical PNH、PNH/AAあるいはPNH/不応性貧血-MDSの骨髄不全疾患と溶血所見がないが微小なPNH細胞が見られるPNH-subclinicalの病型に分類されている。PNHはPIG-A遺伝子異常を伴うことが解明されたが、FCM測定により、健常人においてもわずかながらPNH型細胞が検出され、顕在的なPNH発症へと繋がる病的クローンの拡大についての研究がさらに深まっている。FCM測定による細胞形質解析が臨床診断や病態解明に果たす役割は大きい。赤血球解析において網赤血球分画をFCMで解析することは、PNHをはじめとした造血不全と総称される疾患群において、造血病態の定量的・定性的解析に有用な方法として今後さらに発展が期待される。

文 献

- 1) Parker CJ : *Br. J. Haematol.*, **117**, 3-22 (2002)
- 2) Rosse WF : *Medicine (Baltimore)*, **76**, 69-93 (1997)
- 3) Nakakuma H : *Am. J. Hematol.*, **53**, 22-29 (1996)
- 4) Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T, Kinoshita T : *Cell*, **73**, 703-711 (1993)
- 5) Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru A, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rosse WF : *Medicine (Baltimore)*, **83**, 193-207 (2004)
- 6) Young NS : in *Bone Marrow Failure Syndrome* (Young NS, ed), pp. 1-46, WB Saunders, Philadelphia (2000)
- 7) Parker CJ, Ware RE : in *Wintrobe's Clinical Hematology* 11th ed, vol 1 (Greer JP, Foerster J, Lukens JN *et al*, eds.), pp. 1203-1221 (2004)
- 8) Rosse WF : *Br. J. Haematol.*, **24**, 327-342 (1973)
- 9) Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, Austen KF : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5066-5070 (1983)
- 10) 米山彰子 : 検査と技術, **28**, 911-914 (2000)
- 11) 河本圭司, 井上勝一, 中内啓光 : 応用サイトメトリー, 医学書院, 東京 (2000)
- 12) Nguyen D, Diamond LW, Braylan RC : *Flow Cytometry in Hematopathology*, Human Press, New Jersey (2003)
- 13) 右田俊介, 高橋信弘 : CD抗原ハンドブック (別冊・医学のあゆみ), 医歯薬出版, 東京 (1999)
- 14) Shibuya K, Ninomiya H, Muraki Y, Nagasawa T, Abe T : *Int. J. Hematol.*, **58**, 15-20 (1993)
- 15) Sato S, Hirayama K, Harano T, Nagasawa T, Ninomiya H : *Lab. Hematol.*, **10**, 65-67 (2004)
- 16) 佐藤晶子, 二宮治彦, 長澤敏郎 : 日本検査血液学会雑誌, **4**, 360-367 (2003)
- 17) Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, Takami T, Ojima A, Ono H, Tanaka H, Kondo N, Orii T, Okada N, Okada H, Inoue K, Kitani T : *N. Eng. J. Med.*, **323**, 1184-1189 (1990)
- 18) Ninomiya H, Hasegawa Y, Nagasawa T, Abe T : *Int. J. Hematol.*, **65**, 285-291 (1997)
- 19) Ninomiya H, Kawashima Y, Hasegawa Y, Nagasawa T : *Br. J. Haematol.*, **106**, 224-231 (1999)
- 20) Sato S, Hasegawa Y, Nagasawa T, Ninomiya H : *Lab. Hematol.*, **12**, 82-85 (2006)
- 21) Ninomiya H, Sato S, Hasegawa Y, Nagasawa T : *Int. J. Lab. Haematol.*, in press (2007)

(Received 2 February 2007 ;

Accepted 2 April 2007)

著者略歴

佐藤 晶子 (さとう しょうこ)

1977年 3月 福島県立総合衛生学院
臨床検査科卒業

1977年 4月 筑波大学 技術職員

1992年 7月 筑波大学 技術専門
職員



長澤 俊郎 (ながさわ としろう)

1969年 3月 東京医科歯科大学医学
部卒業

1970年 4月 東京医科歯科大学第一
内科 医員

1973年 4月 東京医科歯科大学
助手

1978年 4月 筑波大学臨床医学系
(血液内科) 講師

1992年 4月 筑波大学臨床医学系
助教授

1999年 11月 筑波大学臨床医学系
教授



二宮 治彦 (にのみや はるひこ)

1981年 3月 筑波大学医学専門学群
卒業

1981年 6月 筑波大学附属病院
医員 (研修医)

1983年 4月 筑波大学附属病院
医員

1987年 5月 筑波大学臨床医学系
講師

1999年 7月 筑波大学医療技術短期
大学部 教授

2002年10月 筑波大学臨床医学系
教授

