

義する。

髄液細胞数が $5/\mu\text{l}$ 以上で芽球を認める場合(CNS-3に該当)を中枢神経系(CNS)再発と定義し、その他の臓器、例えば性腺などでは組織生検により浸潤芽球を認めた場合、髄外再発と定義する。

2. 悪性リンパ腫

2.1 効果判定方法

全ての測定可能病変に対して最も適切な測定方法を用いて腫瘍縮小効果判定を行う。これにはメジャー測定、単純X線写真、超音波、CTもしくはMRIが含まれる。骨髄と中枢神経浸潤の判定には骨髄穿刺と腰椎穿刺を実施する。

2.2 効果判定基準

以下の効果判定基準はNCIワークショップのNHL判定基準¹⁾およびLMB96/CCG-5961/UKCCSG NHL 9600共同プロトコル²⁾に準じて作成されたものである。

腫瘍の縮小効果がエンドポイントであり腫瘍量の厳密な変化を評価する必要がある場合、あるいは腫瘍細胞が消失していても、腫瘍としては残存することがある疾患の場合など、プロトコルの内容に応じて適宜変更すべきである。残存腫瘍がある場合、生検の必要の有無についても言及する。

1)完全寛解 complete remission (CR):

全ての計測または評価可能な腫瘍病変の消失。ただし、骨病変は除外する。

骨髄と脳脊髄液中の腫瘍細胞の消失、または染色体分析や分子生物学的検査の正常化(初診時に陽性であった場合)。

2)不確定完全寛解 unconfirmed CR (CRu):

(1) X線上の骨病変部の所見が正常化していないが、他の全ての腫瘍病変が消失している場合。

(2) 残存腫瘍の生検にて腫瘍細胞が認められず、他の全ての腫瘍病変は消失している場合。

(3) 生検不可能な部位に少量の残存腫瘍が認められるが、他の全ての腫瘍病変は消失している場合。

* (3)を含めるかどうかは、プロトコルごとに規定される。

3)部分奏効 partial response (PR):

(1) 50%以上の腫瘍の縮小が認められる場合。腫瘍サイズは単一腫瘍病変では最大径、複数腫瘍病変では、計測可能な個々の病変(腫瘍)の直角2方向の最大系の積の和(sum of the products of the greatest diameters:SPD、 cm^2)で算定する。

(2) 骨髄または脳脊髄液中で腫瘍細胞が50%以上減少した場合。

* Cheson等の判定基準では骨髄の効果判定は評価困難で無関係とされ、脳脊髄液は基準項目に挙げられていない。しかしながら小児のリンパ腫では両者の評価は重要と思われる。ただし、具体的な評価の方法(50%以上減少、等)はプロトコルごとに規定される。

4)無効 non response (NR):

PR未達の効果、あるいはPD未達の増悪

5)進行あるいは増悪 progressive disease (PD) (前回の判定がPRかNRの場合):

(1) それまでに最小の腫瘍サイズ(SPD)に比較して50%以上の増加を認める場合。

(2) 新病変の出現。

(3) 骨髄または脳脊髄液中で腫瘍細胞の増加または出現。

6)再発 Relapse (前回の判定がCRかCRuの場合):

- (1) 新病変の出現
- (2) 旧病変が50%以上の増加を認める場合。
- (3) 骨髄または脳脊髄液で腫瘍細胞の出現。

【文献】

- 1) Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B et al: Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. J Clin Oncol 17; 1244-1253, 1999
- 2) Cairo M, Gerrard M, Spoto R et al. Poor response to initial reduction therapy(COP) and combined bone marrow and CNS disease are poor prognostic factor in children with advanced (BM+/-CNS)B-NHL treated on the international study FAB/LMB96. Proceedings of ASH (2003) 102: 143a abstract 492

Ⅲ. 病理組織診断

はじめに

現在の悪性リンパ腫病理診断は基本的には 2001 年に刊行された WHO 分類に従っており大部分の症例は満足の行く診断が下せる。染色技術の進歩で、WHO 分類に従った診断を行う際に必要な免疫染色はパラフィン切片で実施可能となってきた。ただし、正確な診断を下すためには必要十分な臨床情報とともに、質の高い標本が必要である。

病理診断は、手術後すみやかにホルマリン液で適切に固定された組織から作成されたパラフィン切片におけるヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を使用して行うことを原則としている。検体採取、搬送、肉眼的観察、切り出し、固定、パラフィンブロック作成、薄切、染色のすべての過程で何らかの不具合があれば、質の高い標本を作製することが出来ないため、病理診断も不可能となる。

1. 病理診断

病理診断の対象は、初発時治療開始前の生検を原則とし、できるだけ細胞診断と組織診断を併せて行ない、生検組織から可能な限りの情報を得て診断する。細胞診断には、捺印(スタンプ)細胞診(ギムザ染色、パニコロー染色)、表面マーカー解析、染色体検査、捺印標本を用いた FISH 法による遺伝子解析を用いる。組織診断には、凍結切片による表面マーカー検査、HE 染色、免疫染色、in situ hybridization 法などを用いる。

細胞診断は、腫瘍細胞のある骨髓血、末梢血、胸水、腹水でも可能であるが、WHO 分類に従った病理組織診断の代用にはならない。また、Burkitt lymphoma と precursor B lymphoblastic lymphoma との鑑別や Burkitt lymphoma と Diffuse large B-cell lymphoma との鑑別を正確に行うためには、組織診断が必要となる。

胸水、腹水の表面マーカー解析を行う場合には、搬送中に細胞の viability が落ちる事が多いため、中央診断施設とともに自施設(あるいは検査業者)で実施することが望ましい。その際に検査すべきマーカーは可能な限り広範であることが望ましいが、「免疫学的診断の実際」が必須項目決定の参考になる。

2. 生検の方針および検体の取扱い

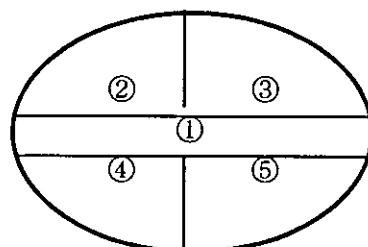
- 1) 生検する時は、外科医と密接に連絡をとり、できるだけ手術に立ち会う。検体処理(後述)については小児科医自身で行う、あるいは外科医、病理医に希望をきちんと伝えておく。外科医、病理医との連絡が不十分であると、すべてホルマリン固定されてしまうこともある。
- 2) 病理組織診断、表面マーカー解析などの細胞診断には、十分な組織を得ることがきわめて重要である。経皮的針生検は、採取される組織量が少ないばかりでなく、挫滅により組織診断ができない、肝心の腫瘍細胞が含まれていない、腫瘍細胞が多数あっても Viability が悪いなどの問題が多いため極力避けるべきである。
- 3) 表在リンパ節の腫脹がない場合には開胸、開腹生検も必要となる場合もある。
- 4) リンパ節生検に際しては、最も大きなリンパ節を採取する。周囲の小さいリンパ節は単なる反応性のリンパ節腫脹であることが多く、このようなリンパ節を採取しても意味がない場合も多いため、手術前の外科医と入念に打合せしておく。
- 5) 採取されたリンパ節、腫瘍は、最大割面をただちにホルマリン固定し、組織診断用とする(詳細は後述)。採取してからホルマリン固定液に入れるまでの時間が長いと固定不良となり、腫瘍細胞の形態が変わってしまうだけでなく、免疫染色が染まらない原因となる。最大割面での組織標本でない場合には、検体不良となり、組織診断は得られない。小児のリンパ節腫脹はもともとリンパ組織

の反応性増殖が起こりやすい年齢的な背景があるため、不十分な組織標本による診断は、反応性増殖をリンパ腫と誤診したり、逆にリンパ節のごく一部に増殖するリンパ腫を見逃したりしてしまう危険をはらんでいることを充分認識しておく必要がある。

- 6) 他施設ですでに生検された場合も、治療方針決定のために特殊な抗体を用いた免疫染色が病理組織診断に不可欠であることをよく説明し、できるだけパラフィンブロック(または未染標本 10 枚を作成して頂く)を、中央病理診断施設に送付する。検査センターなどの検査会社に病理診断が委託されている場合は、費用の関係でパラフィンブロックを貸してもらい、中央病理診断施設で標本作製を行う方がよいこともあるので、とりあえずパラフィンブロックを貸してもらえるかどうか確認してみる。一般病院や検査センターの免疫染色は、B細胞マーカーとして CD20(L26)、T細胞マーカーとして CD45RO(UCHL-1)を使用し、CD3 ϵ 、CD79a、TdT といった小児リンパ腫に必須の染色が為されていないことが多い。これは大人ではリンパ芽球型リンパ腫がほとんどみられないため、成熟 T、Bリンパ球のマーカーのみで十分と考えられているからであると推測される。
- 7) この手引きでは、パラフィン切片による検討を基本として説明している。しかしながら、キメラ遺伝子検出や、より多くの細胞マーカー検査実施、さらには研究用検体保存を考慮した場合、未固定検体の意識的な保存は極めて重要であることを指摘しておく。

3. リンパ節あるいは腫瘍の切り出し方法

- ① ホルマリン固定用(最大割面)
- ② 表面マーカー解析(中央診断施設)用
- ③ 表面マーカー解析(自施設又は検査会社)用
- ④ 染色体検査用
- ⑤ 免疫染色(凍結切片)、遺伝子解析用



- ① ホルマリン固定用(組織診断用、最大割面)

リンパ節または腫瘍の最大割面を5mmの厚さにスライスし、捺印標本作成後ただちに*ホルマリン固定液(10%中性緩衝ホルマリン液)に入れて、各施設の病理検査室に提出する。提出時に中央診断のためにHE染色標本1枚、シランコート(MASコート)スライド未染標本(最低10枚、できれば20枚)を病理検査室に依頼しておく。

*あらかじめスライドガラス5枚程度と95%エタノール固定液を用意し、手際よく捺印していく。捺印した腫瘍組織はホルマリン固定液に入れる。切り出しから固定液に入れるまでは長くても5分以内にとどめる。捺印したスライドガラスはすぐに95%エタノール固定液に入れ、室温で1時間固定し、冷風ドライヤーで乾燥後-20℃で冷凍保存しておけばFISH法を用いた遺伝子解析に使用できる。

- ②③ 表面マーカー解析(中央診断施設、自施設又は検査会社)用
少なくとも8mm角程度の大きさの腫瘍組織をメディウム入りチューブに無菌的に入れて提出する。中央診断施設にはあらかじめFAX送信し、4℃クール宅急便で翌日午前中に到着するように送付する。
- ④ 染色体検査用
少なくとも5mm角程度の大きさの腫瘍組織をそのまま専用のメディウム入りチューブに無菌的に入れ、各施設から検査会社に依頼する。必ず4℃で送付すること。成功率は低い(異常核型がみられる確率は低く、多分30%以下)が、カルノア固定検体があれば、病理診断の結果からプローブを選択し間期核FISHにより有用な情報が得られる可能性がある。
- ⑤ 免疫染色(凍結切片)、遺伝子解析用

パラフィン切片用の抗体が充実してきたので必ずしも必要ではないが、できるだけ凍結組織を中央病理診断施設へ送付する。Anaplastic large cell lymphomaのキメラ遺伝子の解析にも利用できる。少なくとも5mm角程度の大きさの腫瘍組織をOCTコンパウンドに包埋、ドライアイスを入れたアセトン、イソペンタンなどで凍結し(病理検査室に術中迅速診断の時と同じように、OCTコンパウンドに包埋した凍結組織を

作ってくださいと丁重に依頼してみるとよい)、アルミホイルで包む。ドライアイスを入れた断熱容器(発砲スチロール容器)に入れて、中央診断施設にはあらかじめ FAX 送信し、-20℃冷凍クール宅急便で翌日午前中に到着するように送付する。週末などで翌日が休日の場合には、一旦自施設で冷凍保存し、休日明けに送付する。

4. 病型概説およびマーカー所見

4.1. 総論

リンパ芽球型リンパ腫(Lymphoblastic lymphoma, LBL)、バーキットリンパ腫(Burkitt lymphoma, BL)、びまん性大細胞型 B リンパ腫(Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)、未分化大細胞型リンパ腫(Anaplastic large cell lymphoma, ALCL)、の4病型で小児悪性リンパ腫の大半(おそらくは 90%以上)を占められる。従って、この4病型を正確に診断する方法に習熟していることが重要である。

JPLSG が実施する臨床試験も上記4病型をカバーするものであるが、各臨床試験に適合するか否かを担保する目的で中央診断の実施と複数の病理医によるコンセンサス診断確定が重要と考えている。この中央診断を円滑に進めるには免疫染色が必須であり、限られた枚数の標本に対して何を染色すればよいかの検討も重要である。表に現在実施中の臨床試験において病型診断の根拠とするマーカーの一覧を挙げる。診断のプロセスとしては、まずは HE 染色標本の観察で病型を絞り込み、次にどの免疫染色を実施するかを決定するという手順になる。例えば、成熟 B 細胞由来腫瘍が強く疑われる時には、ALCL 用パネルが使用されることはなく、LBL の除外、BL か DLBCL かの区別に力点を置いたマーカーパネルとなる、という具合である。

表 リンパ腫病型とその診断・鑑別診断に必要なマーカー

病型	必須マーカー	追加マーカー
成熟 B 細胞性リンパ腫 バーキットリンパ腫(BL) びまん性大細胞性 B リンパ腫(DLBCL)	CD20 CD79a CD3 TdT MIB1	CD10 BCL2 BCL6 Mum1 (IRF4) EBER1 (ISH)
リンパ芽球型リンパ腫(LBL)	CD20 CD79a CD3 CD43 TdT MPO	CD56
未分化大細胞型リンパ腫(ALCL)	CD30 ALK1 and/or ALKc CD2,3,5 CD43 EMA Perforin and/or Granzyme B	CD15 CD79a, CD20 CD45RO CD56 LMP-1 BCL-2 EBER1(ISH)

- ・必須マーカーは該当病型を疑った場合は必ず行うべきマーカーを指す。
- ・追加マーカーは病型により意味合いが異なる。成熟 B 細胞性リンパ腫の場合は、BL と DLBCL の鑑別、DLBCL の中での亜群識別、EB ウイルス感染関連腫瘍の除外等を目的としている。LBL の場合は NK 細胞由来腫瘍との鑑別を目的としている。ALCL の場合は、ホジキンリンパ腫との鑑別や DLBCL の未分化大細胞型との鑑別を目的としており、CD56 は ALCL 内の亜群識別を目的としている。

4. 2. リンパ芽球型リンパ腫 (Lymphoblastic lymphoma, LBL)

細胞系統により2型に分ける

- ①前駆 B 細胞性リンパ芽球型リンパ腫 (Precursor B LBL, B-LBL)
- ②前駆 T 細胞性リンパ芽球型リンパ腫 (Precursor T LBL, T-LBL)

1) 組織学的特徴

B-LBL と T-LBL の組織はともに、ALL の FAB 分類 L1 あるいは L2 に相当する芽球が増殖、浸潤することを特徴としている。多くの場合、組織がこのような芽球が充満しているが、時には既存構造を残しながら浸潤する像を呈することもある。FAB の L1 あるいは L2 芽球の HE 染色標本での見え方はかなり多様であり、間違いも起こしやすい。一般に細胞は裸核状で核網は繊細なことが多く、核小体は一般に認めがたい。形態学的に B-LBL と T-LBL を区別することは不可能である。T-LBL は縦隔腫瘤あるいは頸部リンパ節腫脹の場合が多く、また、胸水貯留や骨髄浸潤を伴うことが多いので誤診される可能性は低い。B-LBL は T-LBL よりもより広い臓器で発症することが多く、また骨や皮膚などの節外性発症も多いという特徴を持つ。従って、他のリンパ腫病型(特に、DLBCL)や非血液腫瘍(ユーイング肉腫や横紋筋肉腫等)との区別に注意する必要がある。

2) 細胞マーカー

典型例は以下のごとくである。

B-LBL: TdT 陽性, CD3 陰性, CD79a 陽性, CD20 陰性ないし陽性

T-LBL: TdT 陽性, CD3 陽性, CD79a 陰性ないし陽性, CD20 陰性

CD79a は B 細胞特異的ではなく、T-LBL の一部(20~30%程度と予想)に陽性となる。従って、CD79a 陽性所見のみで B-LBL と判断してはならない。CD43 は T 細胞マーカーとして利用されてきたが、最近では前駆 B 細胞にも陽性になることが判明しているため、CD43 陽性所見のみで判断してはならない。判断に迷う場合は、表には記載が無いが、CD7, CD2, CD5 等の T 細胞マーカーを実施すべきである。縦隔腫瘤の場合、いくつかの病型を念頭に置きながら診断する必要がある。形態上鑑別すべきものは顆粒球肉腫(Granulocytic sarcoma, tumor forming leukemia, 腫瘍形成性白血病)である。顆粒球肉腫は LBL 様に見えるものから DLBCL 様に見えるものまで様々なため、常に頭の片隅において置くべき疾患である。表では Myeloperoxidase(MPO)をスクリーニング用マーカーに加えたが、疑いが強い場合は alpha-1 antitrypsin, Lysozyme, CD68 等の骨髄球系マーカーを追加することが重要である。B-LBL の鑑別すべき疾患として DLBCL を挙げておく。近年、中央診断が実施されるにつれて、小児リンパ腫の中での B-LBL の頻度が高くなりつつある。おそらく過去には、DLBCL あるいは「非ホジキンリンパ腫、diffuse medium-size」という病名で診断されていたと思われる(現在でも DLBCL と診断されている場合はある)。実は B-LBL と DLBCL の形態学的な区別が難しい場合がかなりの頻度であるためであり、免疫染色は必須である。鑑別方法としては、DLBCL の場合は TdT 陰性、CD20 と CD45 が明瞭に陽性であること、B-LBL の場合は TdT 陽性、CD20 と CD45 は陰性のことが多く陽性の場合でも弱陽性のことが多い、という点を目安とする。なお、LBL の鑑別疾患に非血液腫瘍を挙げておく必要がある。鑑別すべきものは Ewing 肉腫、横紋筋肉腫、Wilm's 腫のうち肉腫型を示す病型などが挙げられる。特に Ewing 肉腫との鑑別はマーカー的にも紛らわしい場合が多い。Ewing 肉腫の診断に頻用される CD99(MIC2)は LBL でも高頻度に陽性となるマーカーであるため、他のマーカーとの組み合わせが重要になる。すなわち、TdT, CD79a および CD3 等の染色所見を参考として鑑別を行う。

4. 3. 成熟 B 細胞性腫瘍(Mature B-cell neoplasms)

ここでは以下の2病型をまとめて説明する。

- ①バーキットリンパ腫 (Burkitt lymphoma, BL)
- ②びまん性大細胞型 B リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)

1) 組織学的特徴

BL は myc 遺伝子の再構成を伴うのに対し、DLBCL は myc 遺伝子の関与はほとんどないなど疾患単位

が全く異なるにも関わらず、病理診断上は必ずしも明確な線を引くことができない場合もある。従って、ここではこの2病型を比較しながら説明する。BL および DLBCL はいずれも成熟 B 細胞由来の腫瘍であり、また、その発生母地も活性化 B 細胞である点で共通である。BL および DLBCL は各々典型例では診断は容易である。典型的な BL は、Starry Sky 像を示す青みがかった組織であり、びっしりと腫瘍細胞が詰まっている。腫瘍細胞がシート状に一層になっているのが特徴で、薄い切片でも細胞同士の重なり合いがほとんどない。細胞質はわずかで、核はおおむね円形でサイズの大小不同が少ない。核のクロマチンは LBL に比べると凝集傾向がある。小さな核小体を1〜3個程度みることもあるが不明瞭な場合もある。一方、DLBCL は典型例では核が大きく、明瞭で大きな核小体を持つ細胞を簡単に見つけることができる。また、核はクロマチンが抜けて無構造様に白く見える場合が多く水泡状(vesicular)と呼ぶ。時に多核となった細胞もある。細胞質は一般に広いと考えられるが HE 染色標本では細胞境界が明瞭ではないことが多い。このような典型例では問題なく BL と DLBCL の区別はつくが、BL と DLBCL の中間のような形態を示す場合が問題となる。すなわち、BL 様だが細胞のサイズに大小不同がやや強い場合や核形態が均一でない場合、BL 様だが核小体がかかなり明瞭である場合、などである。病理学的な鑑別は細胞マーカー所見で決めることが多く、次の項で説明する。

2) 細胞マーカー

成熟 B 細胞性腫瘍の共通したマーカー特徴は、TdT 陰性、CD79a 陽性、CD20 陽性、CD45 陽性である。BL と DLBCL の鑑別に役立つマーカーで整理すると、以下のごとくとなる。

BL: CD10 陽性、BCL-2 陰性、BCL-6 陽性、MIB-1 はほぼ 100%に陽性

DLBCL: CD10 陽性/陰性、MIB-1 陽性率は 90%以下、BCL-2 不明、BCL-6 不明

(注:小児 DLBCL での BCL-2 や BCL-6 の正確な情報はなため、不明と記載した。成人 DLBCL では 30〜50%が BCL-2 陽性となるが、これは濾胞性リンパ腫の進展したものとの考え方がある。BCL-6 は成人では高率に陽性になると報告されており小児でもおそらく類似のパターンと予想している。)

BLあるいはDLBCLで典型的な組織像を示す場合は、B細胞由来であることを証明するマーカー検査で十分と考える。CD79aあるいはCD20のいずれかのマーカー陽性所見で十分な場合もある。例えば、典型的なDLBCLの症例に対してあえてTdTの染色を行う必要性は少ないと考える。むしろ、DLBCLを亜群に分類できる可能性のあるマーカーの検索に力点を置くべきであろう。BLあるいはDLBCLでのマーカーの重要性はむしろこの両者の区別が難しい場合であろう。一般的には、BLあるいはDLBCLの区別が難しい場合、MIB-1陽性率が100%近い場合はBLとし、それ以下ならDLBCLとしている。なお、追加情報でmyc転座が証明されている場合はBLに分類することが暫定的には妥当と考えられる。形態学的にDLBCLに一致する症例の中にmyc転座が証明される場合があるらしいが、このような症例はごくまれと思われるため症例の蓄積とレビューが必要と思われる。LBLのところで記載したが、形態学的観察のみでDLBCLの判断が困難な場合はLBLの可能性も念頭においてTdTやCD45染色の実施が必要である。

3) 縦隔(胸腺)大細胞型 B リンパ腫(Mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma)

DLBCLの一亜型ともいえるが縦隔を主たる増殖の場として発症し、若い女性に多く独特の組織形態や細胞マーカーを示すため、WHO分類では独立病型として記載されている。組織学的には線維に富む腫瘍で、この線維によって腫瘍細胞が胞巣状もしくは結節状に分画されて存在することを特徴とする。腫瘍細胞は淡明で豊かな細胞質を持ち、核は分葉状になることが多いとされている。細胞マーカーはCD20、CD79aおよびCD45が陽性になるなど成熟B細胞性リンパ腫のそれに一致するが、CD30が弱く陽性になることが多いといわれている。

4. 4. 未分化大細胞型リンパ腫 (Anaplastic large cell lymphoma, ALCL)

1) 組織学的特徴

腫瘍細胞は大型で豊かな細胞質を持ち、核の多形性が目立つ。このような細胞が接着性を保ちながら、リンパ濾胞間やリンパ洞を好んで増殖する場合、診断は容易である。マーカーを調べなくとも十中八九 ALCL に間違いがないと言える場合もある。上記のような腫瘍細胞のことを”Hallmark cell”と言い、Hallmark cell が容易に見つかり特徴のある増殖様式を示す場合を Common type と呼ぶ。一方、Hallmark cell 以外の腫瘍細胞が種々の程度に混ざる亜型がいくつか知られている。Small cell variant は小型ないし中型の腫瘍細胞が Hallmark cell と共存しているものを指す。Lymphohistiocytic variant は小リンパ球とマクロファージが多数存在する中に少数の腫瘍細胞を認めるものである。

2) 細胞マーカー

CD30 が陽性であることが必須条件である。小児では ALK(anaplastic lymphoma kinase)遺伝子の再構成例が多いため ALK 蛋白が陽性となる場合が 90%以上である。最近では、ALK 陰性例の診断をより慎重にすべきであるとの機運が高まってきている。JPLSG が実施する ALCL 臨床研究では、ALK 陰性 ALCL と判断するためには3名の中央病理医のコンセンサス診断が必要であると取り決めている。大型の腫瘍細胞での ALK の染色態度で ALK 遺伝子の転座の相手が予想できるとされている。その他の細胞マーカーの特徴では EMA が高い頻度で陽性になること、各種の T 細胞マーカーが陽性になる場合が多いことなどである。ALCL の診断にあたっては可能な限り T 細胞系統である証拠を積み重ねる努力が求められている。T 細胞マーカーとしては、CD3, 2, 5, 7, 43 などの従来マーカー以外に細胞傷害性顆粒(Granzyme-B, TIA-1, Perforin 等)の存在を証明する方法が主流である。なお、ALK 染色は Small cell variant や Lymphohistiocytic variant の判定には必須となっている。

5. 今後の検討課題

1) FISH 等による分子診断法の確立

上述したごとく、BL と DLBCL の区別は必ずしも容易ではなく、より客観的な指標が必要である。そこで、パラフィン切片での FISH による myc 転座の証明法の確立を目指したいと考えている。また、未固定検体が保存されていれば、PCR 等の手法により myc 転座が証明できる可能性もある。このような方法をルーチン化するための体制整備も含めて今後の検討課題としたい。

2) スタンプ標本での免疫染色法の確立

今回の手引きには記載しなかったがスタンプ標本は補助情報として大変有用である。JPLSG が実施している臨床研究の実施計画書の中にもスタンプ標本作成を推奨している。しかしながら、スタンプ標本は簡便で細胞形態の観察に適しているものの、免疫染色用検体としての評価は定まっていない。組織を付着させる方法、乾燥方法、固定方法等の標準化が難しいことが原因と考えられる。今後、固定方法、染色方法などを検討し簡便で信頼性の高い方法として確立できるか否かを検討したい。

IV. 免疫学的診断の実際

はじめに

小児造血器腫瘍の標準的な治療方法の確立にあたっては、精度の高い標準的な診断法により、正確な診断を得ることができて初めて最も効果的な治療法を選択することができる。腫瘍細胞の細胞表面抗原の解析(マーカー検査)による免疫学的診断は、細胞形態学的診断、染色体あるいは遺伝子解析診断とともに、造血器腫瘍の臨床診断には必須のものとなっている。また、細胞表面抗原の解析により、腫瘍細胞の起源や分化段階を推定することや、細胞形態からだけでは幼若な正常細胞との区別が困難な腫瘍細胞を正確に同定することが可能となり、さらには、治療法の選択、予後の判定にも有用と考えられる。

1. 検査材料(末梢血、骨髓血、CSF、リンパ節等)の採取方法、および送付方法

1.1 検体取り扱いの注意

いかなる検体も既知および未知の病原体を含む可能性が常に存在するため、手袋を着用するなど、その取り扱いには十分な注意が必要である。また、検体の取り違えを避けるため、検体に適切な ID を明記することが重要である。

1.2 検体の種類と量

白血病のマーカー検査に用いる検体としては、骨髓液が最も一般的である。しかし、末梢血も、芽球が確実に含まれていることがわかっている場合には、十分に検査可能である。特に、白血球数が多くて芽球の割合が非常に高い末梢血の場合、検体が凝固する危険性を考えると、むしろ骨髓液よりも好ましい検体と言える。CSF 中に著しい芽球の増多を認める場合には、CSF を検査に用いることも可能である。また、悪性リンパ腫の症例では、リンパ節からマーカー検査用に細胞を分離することも可能であり、場合によって腫瘍細胞を多く含む胸水、腹水も検査の対象となり得る。

小児の場合には、いずれの検体でも多量に採取することが困難な場合が多いが、マーカー検査には他の検査よりも大量の細胞が必要となるため、極力多くの検体をマーカー検査に回すことが望ましい。ただし骨髓液の場合には、多量に吸引するとより多くの末梢血が混入する危険性があるため、その点に配慮が必要である。

1.3 抗凝固剤と検体の採取方法

抗凝固剤としては、多少検体安定性が異なるものの、日常的に用いられている EDTA、ヘパリンが使用可能である。末梢血の場合には、ヘパリン採血の他、採血後に抗凝固剤入りの容器に移すことも可能である。骨髓液の場合、末梢血よりも凝固しやすいため、あらかじめヘパリンを入れた注射器で採取するか、採取後すみやかにヘパリン加培養液を入れた容器に移すことが推奨される。特に骨髓液の場合には、採取時には凝固していないように見えても、輸送の過程でフィブリンが析出してきて凝固してしまい、検査が困難になる場合が多く、採取後ただちに、十分に、かつていねいに、抗凝固剤と混和することが非常に重要である。髄液、胸水、腹水の場合にも、ヘパリン等の抗凝固剤を添加することが推奨される。

リンパ節の場合には、輸送中の乾燥を避ける必要がある。検体を OCT ブロックや、パラフィン標本と共有する場合で、短時間の内に処理可能な場合には、生理食塩水で湿らせたガーゼにくるんだ状態で輸送することが望ましいが、翌日に処理する場合には、培養液(なければ生理食塩水)で十分満たした容器に入れて冷蔵で輸送する方が安全と考えられる。

1.4 検体の送付

採取した検体は、可及的すみやかに検査することが推奨される。しかし、本邦における現状では、採取翌日に検査される場合が多いと考えられるが、可能かぎり24時間以内に検査されることが望ましい。末梢血、あるいは骨髄血に関しては、腫瘍細胞の生存率の観点から室温(18〜22℃)での搬送の方が良いというデータも示されており、夏期を除いては常温での輸送で差し支えないと考えられる。しかし、夏期の場合には、輸送中の過度の温度上昇の可能性や、万一微生物が混入した場合のその繁殖の可能性を考慮して、クール便を使用し、冷蔵での搬送が望ましい。

2. 解析パネルの紹介と解説(図1)

2.1 Primary panel

2.1.1 B細胞系

CD19: B細胞に特異的な刺激伝達分子で、ほとんどの B-precursor ALL および mature B-ALL にその発現が見られ、時に B-precursor ALL で発現の弱い症例がある。B細胞系に特異性が高い抗原であるが、一部の AML も陽性を示す。

CD79a: B細胞抗原受容体関連の刺激伝達分子で、ほとんどの B細胞性腫瘍で陽性を示し、B-precursor ALL では基本的に細胞質のみに発現する。T-ALL や AML でも陽性例の報告がある。

κ/λ : 免疫グロブリンの軽鎖で、mature B-ALL にのみ陽性を示す。ただし、非成熟 B細胞に対する血清中免疫グロブリンの吸着による非特異的反応に注意が必要である。

2.1.2 T細胞系

CD3: T細胞抗原受容体関連の刺激伝達分子で、T-ALL の最も信頼性の高いマーカーであるが、小児 T-ALL では細胞質内のみの発現が多い。

CD7: 免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、T-ALL で最も高頻度に陽性となる。M7を含む一部の AML や NK細胞性腫瘍でも陽性を示す。

2.1.3 骨髄系

MPO(ミエロペルオキシダーゼ): AML M1, 2, 3, 4 で陽性を示す。使用する抗体によっては非特異反応が強く、染色条件の至適化が必要である。

CD13: 膜結合型酵素(アミノペプチダーゼ N)で、多くの AML で陽性を示すが、しばしば ALL にも発現が認められる。

CD33: 免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、大部分の AML で陽性を示す。しばしば ALL にも発現が認められる。

CD41: 血小板膜糖蛋白 IIb(α IIb インテグリン)で、AML M7 の特異的なマーカーである。

2.1.4 Non-lineage

CD10: 膜結合型酵素(中性エンドペプチダーゼ)で、Common-ALL 抗原として同定され、大部分の B-precursor ALL で陽性を示す。大部分の mature B-ALL(L3)、一部の T-ALL でも陽性で、成熟好中球や一部の神経芽細胞腫にも発現が見られる。

CD34: ムチン様の膜蛋白で、ヒト造血幹細胞の最も重要な細胞表面マーカーである。AML、B-precursor ALL、T-ALL のそれぞれ一部で陽性を示す。

CD45: 白血球に特異的な蛋白質チロシン脱リン酸化酵素で、B-precursor ALL 等では陰性〜弱陽性の場合が多く、白血病細胞のゲーティングに用いられる。

CD56: 神経細胞接着分子(N-CAM)で、最も代表的な NK細胞マーカーとして有用である。神経芽細胞腫も陽性を示す。

HLA-DR:MHC ClassII 分子で、B 細胞、単球、活性化 T 細胞に発現する。ほとんどの B 細胞系 ALL、多くの AML、一部の T-ALL において陽性を示す。ごくまれにはあるが、B-precursor ALL でも HLA-DR 陰性の場合がある。

TdT: 遺伝子断片に核酸を付加する酵素で、遺伝子再構成が進行中の未熟リンパ球に発現するため、T-ALL、B-precursor ALL の特異的なマーカーとして有用である。ただし、水溶性が強く、染色には注意が必要となる。また、AML でも陽性となる場合がある。

2. 2 Secondary panel

2. 2. 1 B 細胞系

CD20:B 細胞特異的なカルシウムイオンチャンネル分子で、CD19 に比較してやや成熟した段階から発現する。大部分の mature B-ALL で強陽性。一部の B-precursor ALL でも陽性を示す。抗 CD20 抗体は B リンパ腫の治療薬として臨床応用されている。

CD22:B 細胞特異的な免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、B 細胞性腫瘍で陽性。細胞質により強く発現する。

μ : 免疫グロブリン重鎖で、大部分の mature B-ALL で細胞表面に発現する(基本的に軽鎖も同時に発現する)。B-precursor ALL でも Pre-B タイプでは陽性(軽鎖は陰性)を示すが、ほとんどは細胞質内に限定した発現であり、ごくまれに細胞表面にも発現する場合もある。

2. 2. 2 T 細胞系

CD2:T 細胞特異的な免疫グロブリンスーパーファミリー分子(LFA-2)で、多くの T-ALL に陽性を示す。

CD4:MHC Class II 認識にかかわる免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、T 細胞と単球に発現。T-ALL の一部に陽性。AML M4,5の一部でも陽性を示す。CD4、CD8 両者陽性細胞は、正常の場合胸腺以外ではほとんど存在しないため、CD4、CD8 両者陽性所見は、腫瘍性を示す根拠となり得る。

CD5:膜蛋白で、多くの T-ALL に陽性で、一部の成人型 B 細胞性腫瘍でも発現を認める。

CD8:MHC Class I 認識にかかわる免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、正常 T 細胞と NK 細胞に発現し、T-ALL の一部に陽性を示す。

2. 2. 3 骨髄系

CD14:単球、顆粒球に発現する膜蛋白(GPI 結合型)で、単球系への分化傾向を示す。AML で陽性を示す。

CD65:顆粒球に発現するガングリオシドで、一部の AML で陽性を示す。B-precursor ALL でもまれに発現が認められる。

CD117:SCF 受容体で、一部の AML で発現する。ALL でも時に弱陽性を示す。

CD235a(Glycophorin A):赤血球、赤芽球特異的なシアロ糖タンパクで、AML M6 の有用なマーカーである。

CD15:Lewis X 糖鎖抗原決定基で、血球では顆粒球に発現し、分化傾向を示す AML で陽性を示す。ホジキン病の RS 細胞にも陽性である。

CD36:単球、赤芽球、巨核球・血小板に発現する細胞膜蛋白で、AML のうち M4, M5, M6, M7 で陽性を示す。

CD42b:血小板膜糖蛋白 Ib α (von Willebrand 因子受容体構成分子)で、巨核芽球性白血病の特異的なマーカーである。巨核球においては、CD41、CD61 に比較してより成熟した段階で発現する。

CD61:血小板膜糖蛋白 IIIa (β III インテグリン)で、CD41 と同様に AML M7 の特異的なマーカーである。

CD64:高親和性 IgG-Fc 受容体で、単球系への分化傾向を示す AML でしばしば陽性を示す。

2.3 追加パネル

2.3.1 B 細胞系

CD24:刺激伝達分子(GPI結合蛋白)で、ほとんどの B-precursor ALL、一部の mature B-ALL で陽性を示す。正常成熟顆粒球や、非血液腫瘍でも発現する。

CD58:細胞膜蛋白 LFA-3 で、白血球に広範に陽性となり、発現の特異性としては低いが、B-precursor ALL でより強く発現することから、正常の B 前駆細胞との鑑別に有用である。

2.3.2 T 細胞系

CD1a:胸腺皮質の T 細胞に特異的な膜糖蛋白で、胸腺以外で陽性の場合には T-ALL 診断の根拠になり得る。ランゲルハンス細胞にも発現し、ランゲルハンス細胞組織球症の最も信頼性の高いマーカーである。

TCR α/β :T 細胞抗原受容体で、T-ALL に特異的である。

TCR γ/δ :T 細胞抗原受容体で、T-ALL に特異的である。

3. FCM データの解析方法

3.1 FCM 測定で得られる情報

フローサイトメトリー(FCM)は、フローセル中を高速で流れる血液細胞などの細胞浮遊液にレーザー光などの励起光を照射し、細胞が通過する際に生じる励起光の散乱(散乱光;Scatter)や蛍光

図1. 急性白血病の免疫学的診断に有用なマーカー解析パネル

Primary panel			
B細胞系	T細胞系	骨髄系	non-lineage
CD19	細胞表面CD3	MPO	CD10
CD79a	細胞質内CD3	CD13	CD34
κ/λ	CD7	CD33	CD45
		CD41	CD56
			HLA-DR
			TdT
(16種類)			

Secondary panel			
B細胞系	T細胞系	骨髄系	
CD20	CD2	CD14	CD15
CD22	CD4	CD65	CD36
細胞表面IgM	CD5	CD117	CD42b
細胞質内 μ 鎖	CD8	Glycophorin A	CD61
			CD64
(17種類)			

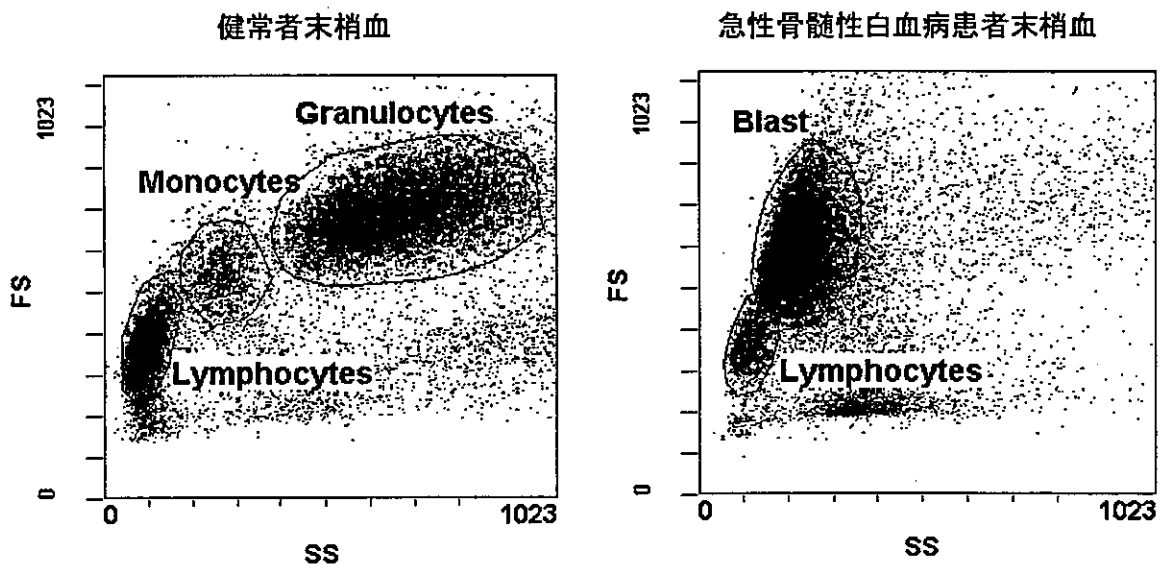
追加パネル	
B細胞系	T細胞系
CD24	CD1a
CD58	TCR α/β
	TCR γ/δ
(5種類)	

(Fluorescence; FL)を細胞毎に検出して、その強さを解析する。

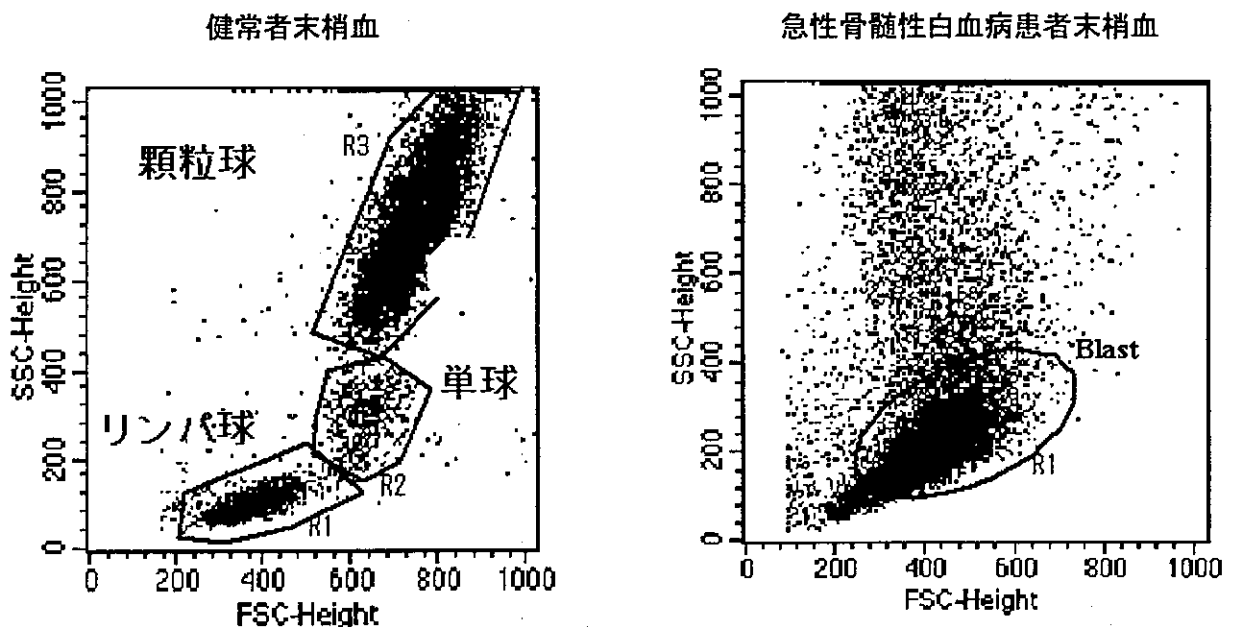
散乱光は、散乱する方向によって異なる情報を含んでいる。励起光の進行方向に生じる前方散乱(Forward Scatter; FS または FSC)は、細胞の大きさと相関性が強い。一方、励起光の進行方向と直角方向に生じる側方散乱(Side Scatter; SS または SSC)は、主に顆粒などの細胞内成分によって生じるため、細胞の“内部構造”の指標とされる。したがって、末梢血の白血球を FCM で測定すると、前方散乱と側方散乱のドットプロット(散乱光サイトグラム)上で、リンパ球、単球、顆粒球の3分画に分別できる。プロットの表示の仕方は測定機種の違いや測定施設の考えで異なるが、目的や得られる情報は同じである(図2a, b)。

図2. 散乱光サイトグラム

a. 測定例1(縦軸=前方散乱, 横軸=側方散乱)



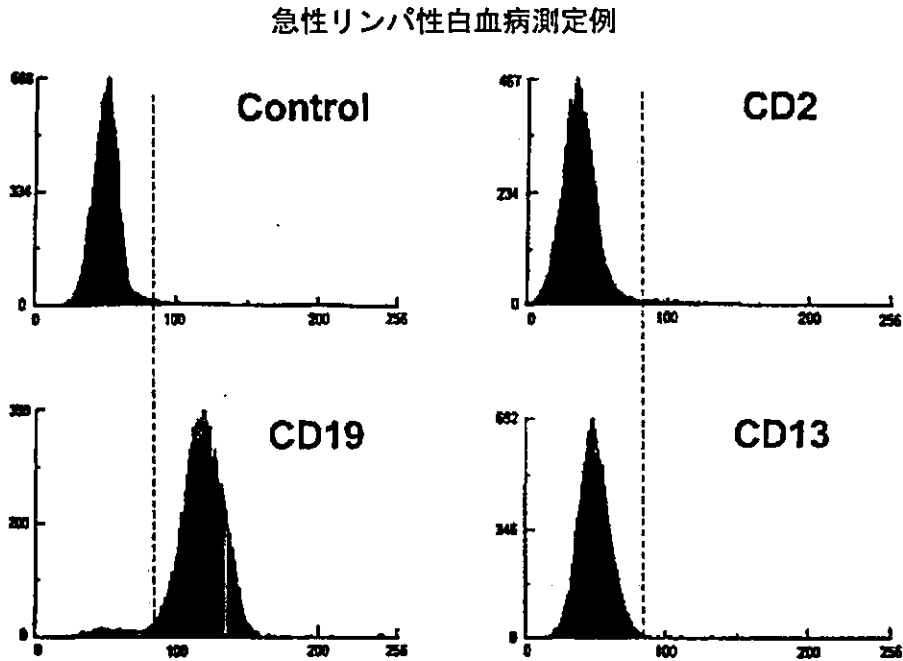
b. 測定例2(縦軸=側方散乱, 横軸=前方散乱)



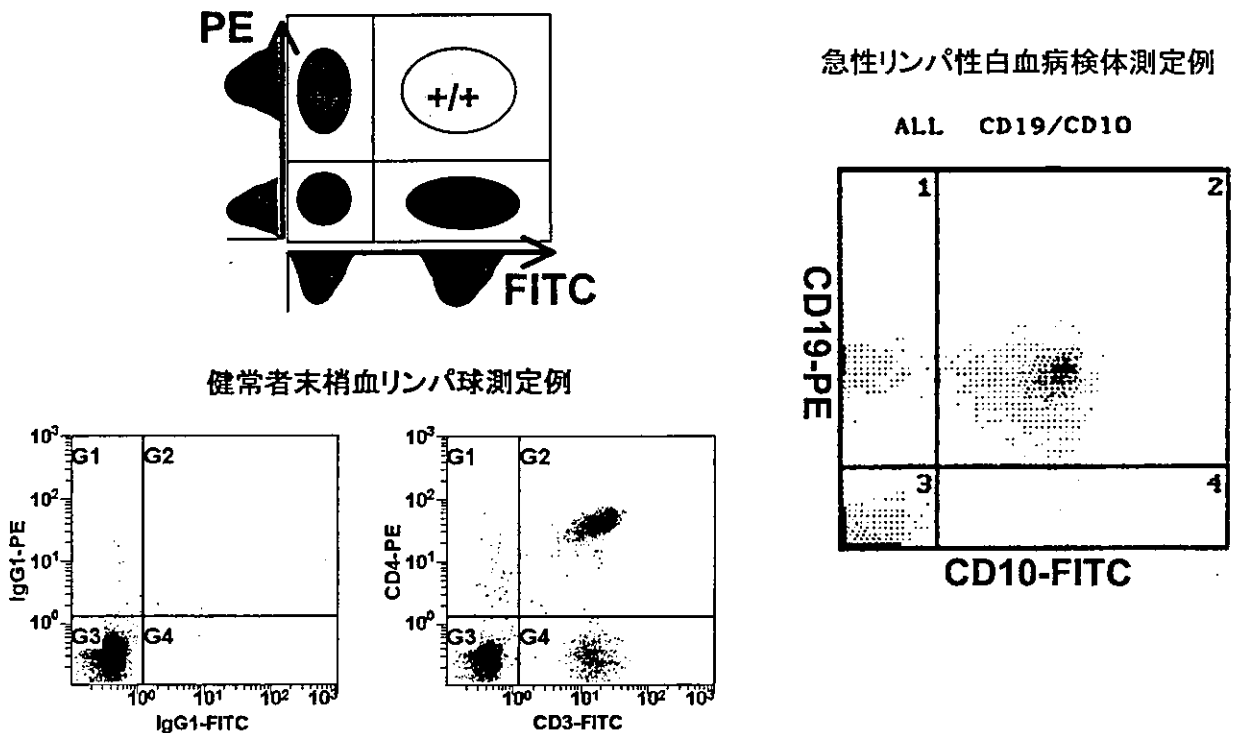
細胞を適当な蛍光標識抗体で免疫染色しておくことで、細胞の発する蛍光の強さから細胞表面抗原や細胞内抗原の発現の有無を測定できる。蛍光強度は、蛍光強度チャンネルを横軸にした蛍光ヒストグラム(図3a)で表示される。蛍光強度チャンネルは、細胞に結合したモノクローナル抗体の量、すなわち抗原の発現量の指標で、蛍光陰性の細胞はヒストグラムの左側に、蛍光陽性の細胞はヒストグラムの右側に、それぞれプロットされる。右にプロットされるほど抗原の発現が強い細胞であることを意味している。

図3. 蛍光ヒストグラムと蛍光ドットプロットの例

a. 蛍光ヒストグラムの例



b. 蛍光ドットプロットの例



蛍光波長の異なる複数の蛍光標識抗体を用いた多重染色試料の測定では、2種類の蛍光を組み合わせた蛍光ドットプロット(図3b)で結果を表示することができる。例えば、FITC 標識抗体とPE 標識抗体の2カラー蛍光ドットプロットでは、FITC のみ陽性、PE のみ陽性、FITC とPE の両方陽性、FITC とPE の両方陰性、の4種類の細胞集団が得られる。この場合は、それぞれ右側もしくは上側にプロットされるほど抗原の発現が強く、ドットの密度や等高線で分布のピークを表現している。3種類以上の蛍光標識抗体による白血病細胞のマルチカラー測定も、分析機器や試薬の進歩に伴い急速に発展している。

3.2 測定対象となる細胞の絞込み(散乱光ゲーティング)

白血病細胞の測定を行うには、散乱光サイトグラム上で白血病細胞と他の細胞集団を識別して、白血病細胞に限定した蛍光の分析を行わねばならない。この操作が“ゲーティング”であり、FCM で正しい測定結果を得るにあたって最も重要な手順の一つである(図4)。

散乱光サイトグラム上の白血病細胞の分布が患者検体毎に異なるため、ゲーティングも患者検体毎に行う必要がある。実際には、白血病細胞の分布と正常リンパ球や単球の分布は重なることが多く、白血球中に占める白血病細胞の割合が少ない検体では白血病細胞のみのゲーティングは難しい。特に、散乱光サイトグラム上で白血病細胞の分布が不明瞭な場合は、白血球集団全体をゲーティングせざるを得ない。蛍光ヒストグラムやドットプロット上で、白血病細胞が正常白血球で“希釈”されてしまうので、結果の解釈には十分な注意が必要である(「分析結果の解釈」の項を参照)。

白血病細胞の形態学的特徴や白血球中の割合を血球分画検査などで確認しておく、ゲーティングを行う際の参考となる。例えば、急性リンパ性白血病(ALL)の場合は、測定対象から顆粒球を除外できる。急性骨髄性白血病(AML)でも、前骨髄球性(AML-M3)の場合を除いて、正常顆粒球領域に白血病細胞が分布することは稀である。リンパ節を検体とする場合にも、凍結切片やスタンプ標本から得られる形態学的情報がゲーティングを行う際の参考になりうる。

3.3 測定細胞数

測定細胞数は、試料中の細胞数、白血病細胞の割合、データの解析方法、保存データの容量などを勘案して決める。通常は、ゲーティングした領域内の細胞数(gated events)で設定する。全細胞数(total events)で測定細胞数を設定した場合、白血病細胞の割合が非常に少ない検体では、解析に十分な細胞数が得られないこともある。

3.4 蛍光ヒストグラムの解析(陽性率の測定)

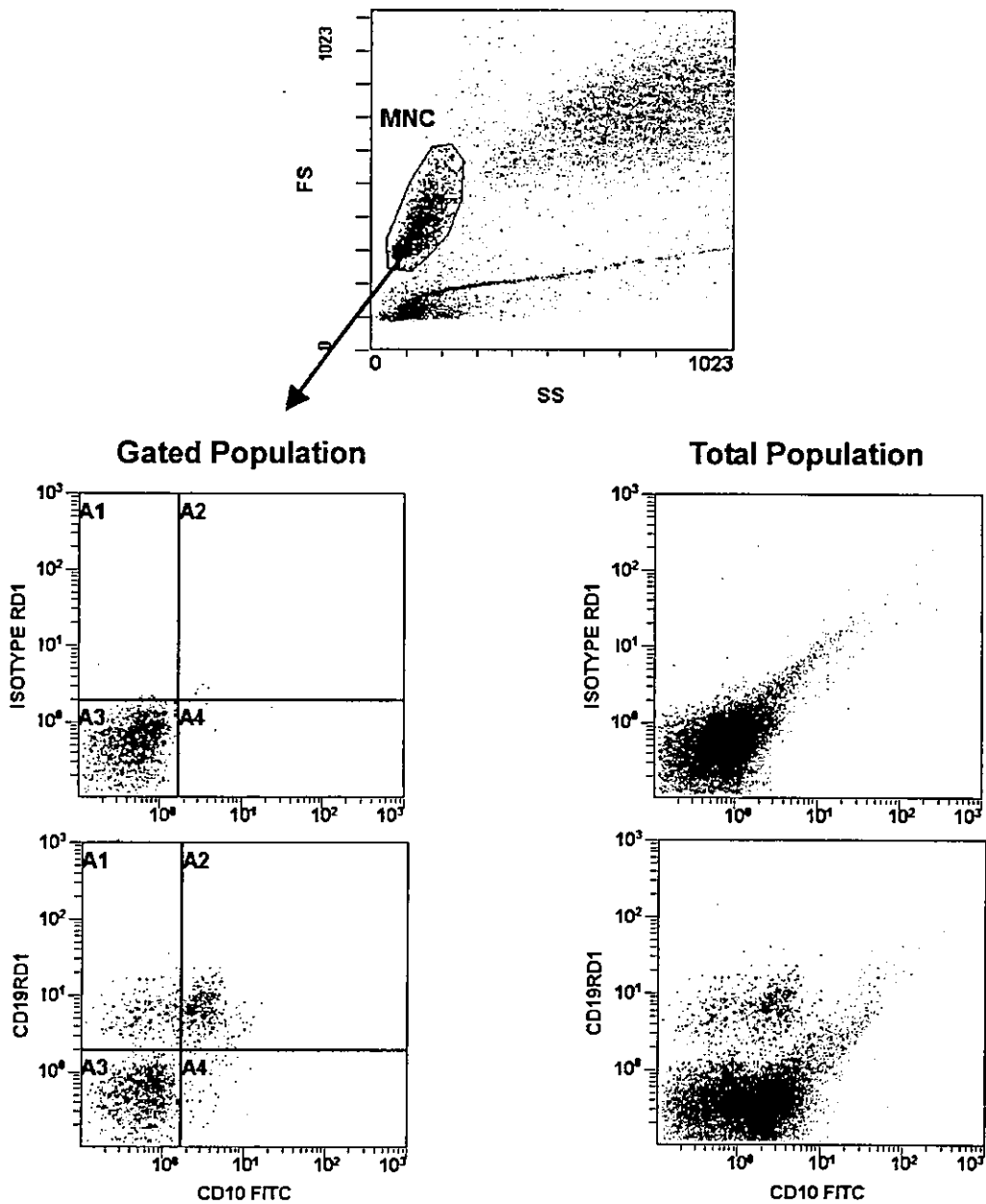
細胞表面抗原(または細胞内抗原)が陽性か陰性かを判定するために、通常は患者検体毎に適切な陰性対照試料を測定して蛍光ヒストグラム上で蛍光陽性領域を設定する。蛍光陽性領域にプロットされた細胞の割合が“陽性率”である。陰性対照として、ヒトの細胞や血漿成分には反応しない陰性コントロール抗体の蛍光強度を基準とするのが一般的である。白血病細胞の細胞内成分による自家蛍光は、抗体試薬で染色していない試料を測定することにより判断できる。薬剤などに起因する自家蛍光の場合は、特定の蛍光色素のみが影響を受けることが多い。ゲーティングされた細胞集団が全て白血病細胞である場合を除き、蛍光ヒストグラムは白血病細胞の蛍光と正常血液細胞の蛍光の両方を反映している。細胞の種類によって抗体試薬の非特異的反応や自家蛍光の強さが異なるので、白血病細胞の割合ができるだけ高くなるようにゲーティングした上で蛍光強度を分析する。

抗体試薬の非特異的反応の強さは抗体試薬の免疫グロブリンアイソタイプで異なり、通常マウス IgG2a はマウス IgG1 より非特異的反応が顕著である。そのため、分析に用いるモノクローナル抗体試薬のアイソタイプ毎に陰性コントロール抗体を測定するのが望ましい。ただし、血液量が少ない場合などでは、便宜的に各アイソタイプの陰性コントロール抗体を混合したプール陰性コントロール抗体などで代用することもある。特定のアイソタイプに限って強い非特異的反応がみられる検体では、非特異的反応のみられないアイソタイプの抗体試薬や明らかに“陰性”と思われる測定項目の蛍光ヒストグラムに基づいて蛍光陽性領域を判断するとともに、強い非特異的反応を示したアイソタイプの抗体試薬の測定結果は「参考値」として扱うとよい。蛍光ヒストグラムでは、抗原の発現量が多い細胞ほど右側にプロットされる。白血病

細胞の抗原発現が弱く十分な蛍光強度が得られない検体や抗体試薬の非特異的反応が強い検体、単球や顆粒球の混入が顕著な検体では、結果を判定する際に陰性コントロール抗体で設定した蛍光陽性領域を変更せねばならないことがある(図5)。

図4. 散乱光ゲーティングの例

急性リンパ性白血病(ALL)患者末梢血の分析例。白血病細胞が分布する単核細胞領域(MNC)をゲーティングした蛍光ドットプロット(左側:Gated population)と、同じ試料でゲーティングを行っていない蛍光ドットプロット(右側:Total population)を示した。ゲーティングを行わないデータでも CD10 陽性 CD19 陽性の白血病細胞が認められるが、その一方で好中球によるものと思われる非特異的な蛍光の増強と CD10 陽性 CD19 陰性の細胞成分の存在が結果の判定を難しくしている(右下図)。



3.5 蛍光／散乱光サイトグラムの活用

散乱光サイトグラム上で白血病細胞の分布の一部が正常リンパ球と重なる場合、蛍光と前方散乱のドットプロット(蛍光／散乱光サイトグラム)を作成すると、蛍光陽性の細胞集団が、正常リンパ球と白血病細胞のどちらによって構成されているかを視覚的に判断しやすい(図6a)。また、蛍光／散乱光サイトグラムを有効に活用するためには、散乱光サイトグラム上で顆粒球や死細胞、赤血球残渣などをできる限り含まないように細胞集団をゲーティングした上で、蛍光／散乱光サイトグラムを作る。また、白血病細胞

図5. 蛍光ヒストグラムにおける蛍光陽性領域

[日本臨床検査標準化協議会「フローサイトメ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)」より引用]

A 明らかに蛍光陽性の場合

この場合の陽性率には十分な信頼性がある。

B ピークが“ショルダー”もしくは“テールをひく”場合

ゲーティングが適切であるかどうかを必ず確認する。

カーブの変曲点が明らかな場合、カーソルを移動させて解析してもよい。

得られた陽性率には「一部陽性」等のコメントを付して報告する。

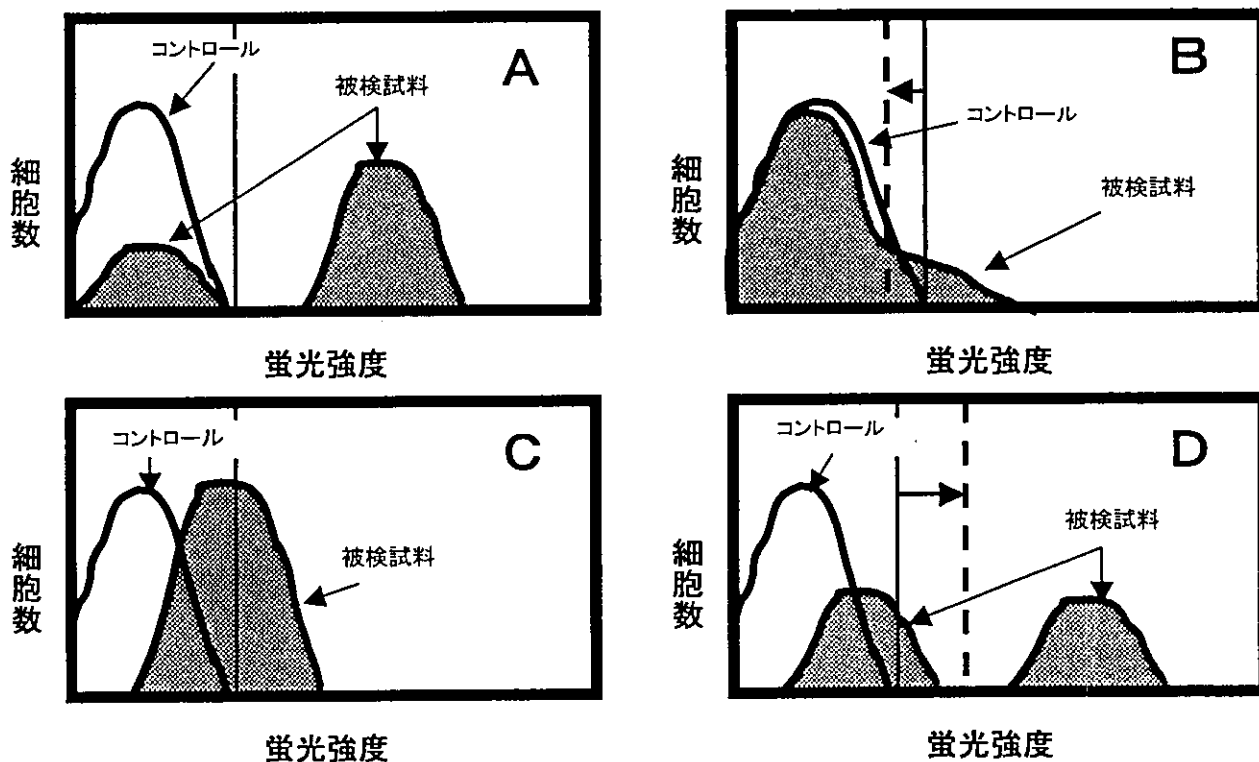
C ピークの蛍光強度が弱い場合

陽性率には「弱陽性」等のコメントを付して報告する。

D 蛍光強度が弱い集団と強蛍光の集団が混在する場合

ゲーティングが適切であるかどうかを必ず確認する。

強蛍光の細胞集団の陽性率を解析し、「他にも弱陽性の細胞集団が存在する」旨のコメントを付して報告する。

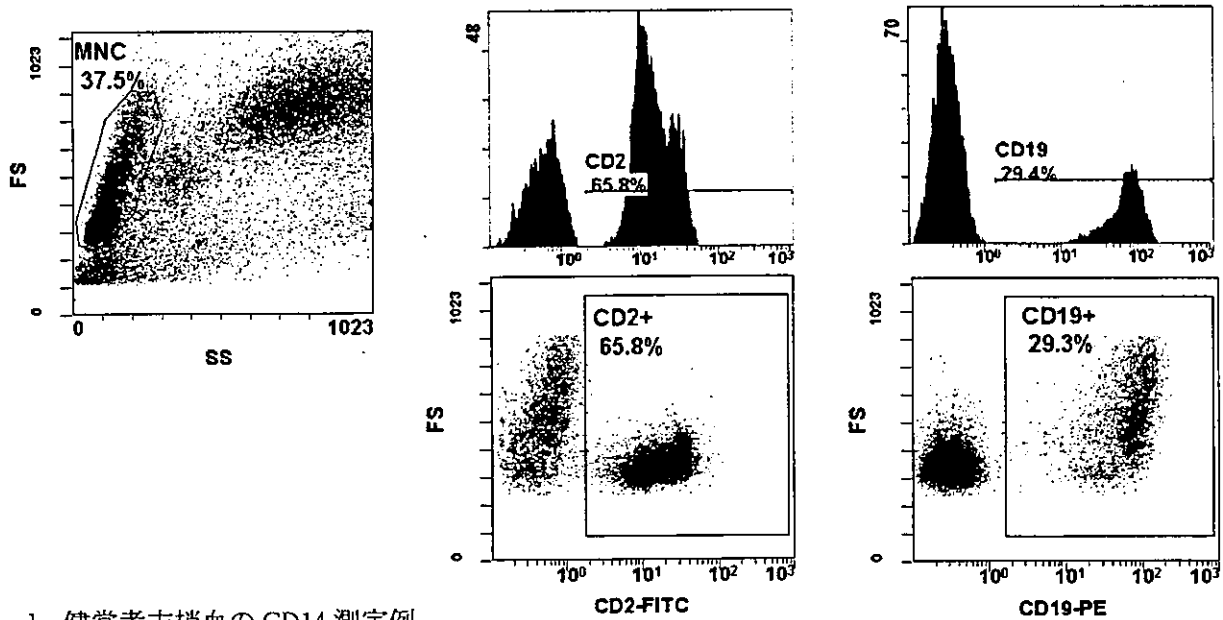


が散乱光サイトグラム上のどこに分布しているかわからない場合には、蛍光と側方散乱で蛍光／散乱光サイトグラムを作成するとよい(図6b)。

図6. 蛍光／散乱光サイトグラムの例

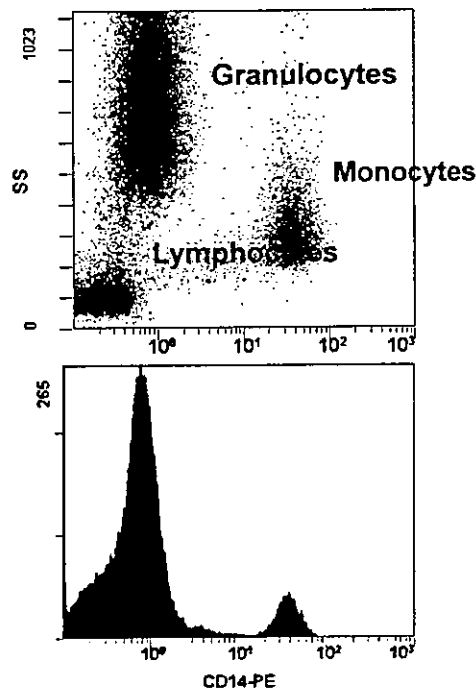
a. 健常者末梢血に Nalm-6 細胞 (CD2 陰性/CD19 陽性 Pre-B ALL 細胞) を添加した白血病モデル検体の測定例

蛍光／散乱光サイトグラムでは、CD2 は FS の小さい細胞集団 (正常リンパ球) のみ陽性だが、CD19 は FS の大きい細胞集団 (Nalm-6 細胞) も陽性であることが視覚的に判断できる。



b. 健常者末梢血の CD14 測定例

蛍光／側方散乱サイトグラムでは、リンパ球が CD14 陰性、単球が CD14 陽性、顆粒球が CD14 弱陽性であることが容易に判別できる。



3.6 蛍光ドットプロットの解析

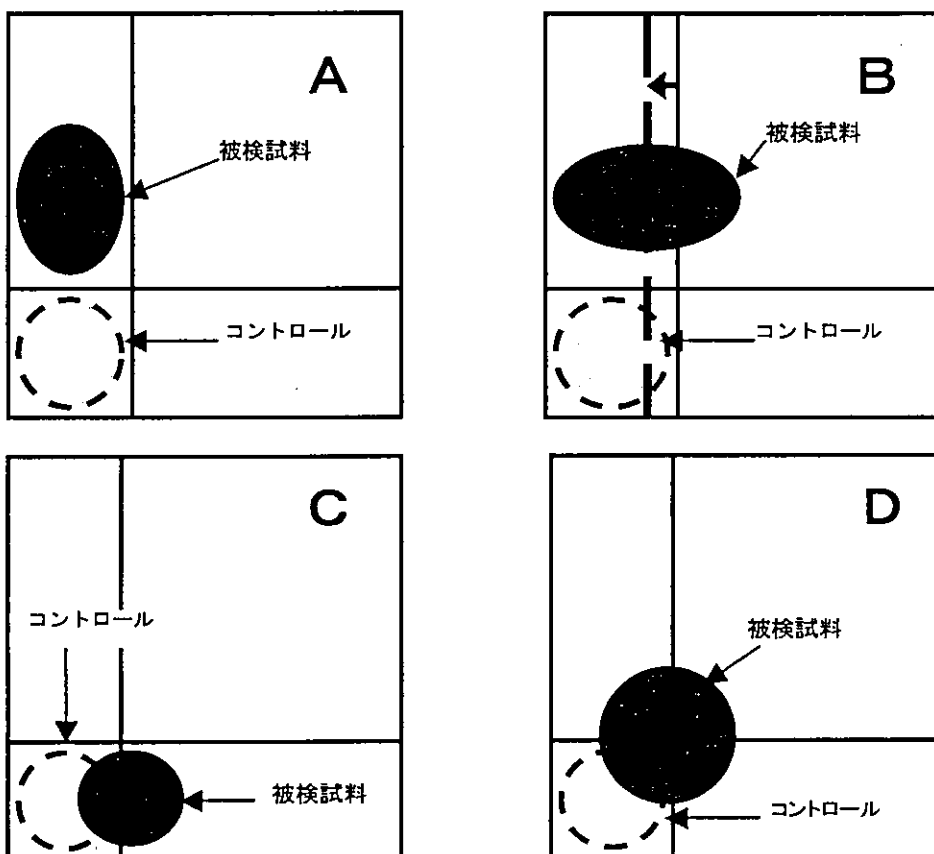
2カラー分析の場合も、患者検体毎に適切な陰性対照試料を測定して蛍光ドットプロット上で蛍光陽性領域を設定する。通常は、陰性コントロール抗体試料の蛍光強度分布に基づいてプロットを4分割する(図3b)。2カラー蛍光ドットプロットを正しく解析、判断するには、蛍光ヒストグラム解析時に留意すべき事項の他に、測定の際に蛍光コンペンセーション(蛍光色素間の蛍光スペクトル重複の補正)が正しく調整されていることが前提となる。とくに、組み合わせの片方の抗原発現量が非常に強く、もう片方の抗原発現量が非常に弱い場合は、コンペンセーション調整不良の影響が大きい。相対蛍光強度の強いPE標識抗体を発現量が低い抗原に用いると、解析がより容易になる。

蛍光ドットプロットでも、結果を判定する際に陰性コントロール抗体で設定した蛍光陽性領域を変更せねばならない場合がある(図7)。しかしながら、蛍光ドットプロットは、抗体試薬の組み合わせを工夫する

図7. 2カラー蛍光ドットプロットにおける蛍光陽性領域

[日本臨床検査標準化協議会「フローサイトメ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)」より引用]

- A 一方は明らかに蛍光陽性で、もう一方は蛍光陰性の場合
この場合の陽性率は十分な信頼性がある。
- B 一方は明らかに蛍光陽性だが、もう一方の蛍光強度が弱い場合
蛍光強度が弱い方のマーカーの陽性率は、「弱陽性」等のコメントを付して報告する。
ピークが明らかな2峰性を示す場合、谷間の部分にカーソルを移動させてもよい。
- C 一方は明らかに蛍光陰性で、もう一方の蛍光強度が弱い場合
- D 両方とも蛍光強度が弱い場合
いずれも、蛍光強度が弱い方のマーカーの陽性率は、「弱陽性」等のコメントを付して報告する。



ことにより、正常血液細胞と白血病細胞の判別が蛍光ヒストグラムより容易であることが多い。各々の蛍光の蛍光／散乱光サイトグラムを作成することにより、さらに分析結果の解釈が容易になる。

3.7 CD45 ゲーティング

散乱光サイトグラム上で白血病細胞の分布が明瞭でない場合、もしも白血病細胞の細胞表面抗原(または細胞内抗原)の発現がユニークであれば、その特徴を利用して白血病細胞をゲーティングできる。

“Leukocyte Common Antigen (LCA)”とも呼ばれる CD45 は、白血球に発現し、リンパ球と単球で発現が強く、好中球では比較的弱い。さらに、急性白血病細胞は CD45 の発現強度が正常リンパ球、単球に比べてしばしば低下している。このことを利用して、CD45 蛍光と側方散乱のドットプロット上で正常白血球と白血病細胞を区別する CD45 ゲーティング法が考案された。散乱光サイトグラムと同様に、プロットの表示の仕方は測定機種の違いや測定施設の考えで異なるが、目的や得られる情報は同じである(図8a, b)。ただし、CD45ゲーティング法は、測定する全ての試験管に蛍光標識 CD45 モノクローナル抗体試薬を添加する必要があるため、検査のコスト対効用の観点から全ての白血病検体のマーカー解析に必須とはなっていない。また、白血病患者検体が全て CD45 低発現とは限らないことにも留意する必要がある。例えば、成熟 T 細胞由来の白血病細胞などでは CD45 の発現が正常リンパ球とほとんど変わらないことが多い。しかしながら、少なくとも検体中の白血病細胞の割合が少ない場合には CD45 ゲーティング法が推奨できる。ただし、CD45 ゲーティングが有効であっても散乱光サイトグラムは必ず確認すべきである。

3.8 その他の蛍光ゲーティング

CD45 ゲーティング以外では、CD19 を用いた B 細胞のゲーティングなどがよく用いられている。また、7-Amino-actinomycin D (7-AAD)などの DNA に選択的に結合する蛍光色素を用いて生細胞のみをゲーティングする方法も用いられている。目的とする細胞の表現型や特徴が明らかな場合は、散乱光サイトグラムと複数の蛍光ドットプロットのそれぞれにゲートを設定し、段階的に測定対象を絞り込むことによって、検体中にごく少数存在する細胞を高感度に測定することができる。このような絞り込みゲーティングは、既に CD34 陽性細胞の精密測定などで実用化されており、急性白血病でも微小残存腫瘍検出への応用が期待されている。

4. 分析結果の報告とその解釈

4.1 分析結果の報告

分析結果を報告する際には、どの細胞集団をゲーティングしたかがわかるように、散乱光サイトグラムを添付するか、もしくは適切なコメントを付記する。CD45ゲーティング法を用いた場合は、散乱光サイトグラムと CD45/SS ドットプロットの両方を添付するか、もしくはコメントを付記する。

分析結果は各々の表面抗原の“陽性率”で報告するのが一般的だが、できるだけ蛍光ヒストグラムまたは蛍光ドットプロットを添付する。報告書には、蛍光陽性領域の設定方法の記載とともに、白血病細胞が陽性的場合、その蛍光強度の程度(dim, bright)や各測定項目の正常白血球に対する特異性なども加味した適切なコメントを付記するのが望ましい。また、後で別の細胞集団にゲーティングして再解析する場合に備えて、測定データをリストモードデータの形で保存しておくことが望ましい。とくに、測定を行う時点で形態学的情報が得られておらず、サイトグラム上で白血病細胞の分布が明瞭でない場合は、必要に応じて後で再解析を行うことができるように、全ての白血球集団を含むリストモードデータを保存しておく必要がある。