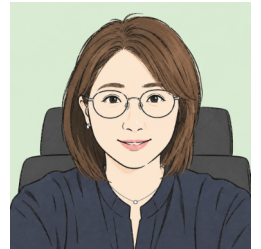


TOPICS: フローサイトメトリー解析の基本

本号では、弊社で受託しておりますフローサイトメトリー解析について、検査委託先である東京大学の後藤裕子先生に、その適応や具体的な解析例を交えながらご解説いただきます。



東京大学附属動物医療センター
病理・遺伝子検査部
特任准教授 後藤 裕子先生
DVM, Ph.D

■ はじめに

造血器腫瘍の分類においては、形態学的な評価に加えて免疫表現型の解析が重要であり、近年では免疫表現型と診断や予後との関連についての研究も進められています。免疫表現型は、細胞に発現するタンパク質を抗体によって検出することで評価されます。フローサイトメトリーはその代表的な解析法の一つであり、複数のタンパク質発現を同時に評価できるという特徴があります。そのため、近年は獣医学領域においても造血器腫瘍の診断や分類に広く利用されるようになっていきます。本稿では、フローサイトメトリーの基本原理を概説するとともに、犬の症例を中心に実際の解析例を紹介します。

● フローサイトメトリーの原理と適用

フローサイトメトリー解析では、検体中の細胞を一つずつ分離した状態で解析します。細胞を蛍光標識抗体と反応させた後、フローサイトメーターに導入すると、水流によって一列に整列し、レーザー光の前を1個ずつ通過します。レーザーが細胞に照射されると、細胞の大きさや内部構造を反映する散乱光と、抗体に結合した蛍光色素から発せられる蛍光が生じます。これらの情報は細胞ごとに記録されますが、フローサイトメーターには通常、複数のレーザーと検出器が搭載されているため、複数のマーカーを同時に評価することができます。この点はフローサイトメトリーの大きな特徴であり、細胞集団の性質を詳細に把握できる理由となっています(図1)。

フローサイトメトリーは、細胞が一つずつ分離された状態で存在し、その細胞を認識する特異的抗体が利用可能であれば解析を実施することができます。そのため、理論上はさまざまな細胞を対象とした解析が可能です。一方で、犬や猫では血液細胞、とくにリンパ系細胞を対象とする抗体が比較的充実しています。また、末梢血、骨髓、リンパ節針吸引生検サンプルは、細胞が元々遊離した状態で存在しているため、フローサイトメトリーに適した検体といえます。そのため、獣医臨床におけるフローサイトメトリーは主にリンパ系腫瘍やリンパ増殖性疾患の診断に利用されています。

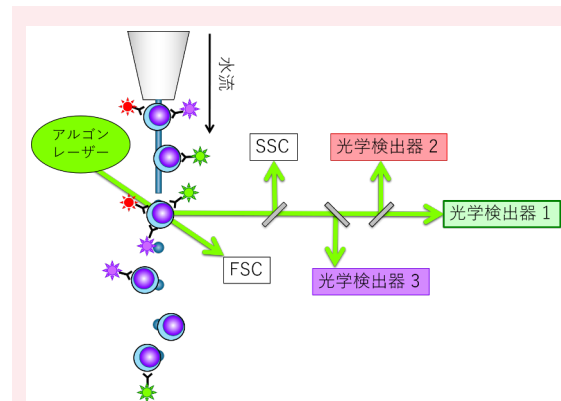


図1. 1レーザーを用いた3カラー解析の模式図。

細胞がレーザー光を通過するたびに散乱光および蛍光が発せられ、それぞれの光学検出器によって測定されます。本図では、3種類の蛍光色素を用いた解析例を示しています。FSC：前方散乱光，SSC：側方散乱光。

● フローサイトメトリーに使用できる検体

フローサイトメトリーでは、検体の質が解析の成否を大きく左右します。依頼前には、特に以下の3点を確認することが重要です。

① 細胞が単離されていること

フローサイトメーターでは細胞を1個ずつ解析するため、大きな細胞塊は測定できません。末梢血、骨髓、リンパ節針吸引生検サンプルは一般的に適した検体です。一方、消化管や皮膚などの組織では、解析対象となるリンパ球を単離するために酵素処理などが必要となることが多く、日常診療での適用は容易ではありません。胸水や腹水も解析可能ですが、死細胞や変性細胞が多い場合には十分な結果が得られないことがあります。

② 生細胞であること

フローサイトメトリーでは通常、未固定の生細胞を用いて解析を行います。死細胞では抗体の非特異的結合が増加し、正確な解析が困難となるため、採材後はできるだけ速やかに冷蔵状態で提出し、高い生細胞率を維持する必要があります。なお、凍結により細胞の生存率は著しく低下するため、凍結は禁忌です。

③ 解析対象となる細胞集団を認識できること

フローサイトメトリーでは多数の細胞を解析できますが、細胞診のように個々の細胞の形態を直接観察しながら解析対象を選択することはできません。そのため、解析対象となる細胞集団は、細胞の大きさや抗原発現などの特徴をもとに認識する必要があります。ただし、検体中の大部分を異常細胞が占める場合には、解析対象の細胞集団が明瞭であるため、こうした識別が問題となることはほとんどありません。また、ごく少数の異常細胞であっても、特徴的な大きさや抗原発現を示す場合には解析可能な場合があります。一方、異常細胞が少数しか含まれておらず、他の細胞集団と明確に区別できない場合には、フローサイトメトリーによる評価が困難となります。そのため、フローサイトメトリー解析を依頼する際には、あらかじめ細胞診所見とあわせて検討することが推奨されます。

●犬におけるフローサイトメトリ解析例

解析例 1

腫大リンパ節の針吸引生検サンプルを用いた犬の解析例を示します（図2）。検体に含まれていた有核細胞（FSC vs SSCプロットで囲まれた青色のドット）を対象として解析を実施したところ、これらの細胞の大部分が同一の免疫表現型を示していました。正常リンパ節にはさまざまなリンパ球が混在していますが、単一の免疫表現型を示す細胞が大部分を占める場合には、腫瘍性増殖が強く疑われます。

これらの細胞はCD21陽性かつCD25陽性であったことから、B細胞性リンパ腫が疑われました。CD25はIL-2受容体の一部を構成する分子であり、活性化リンパ球マーカーとして知られています。犬のB細胞性リンパ腫の多くでCD25発現が認められることが報告されており、予後との関連についても検討が進められています。しかし、CD25高発現が予後不良と関連するとする報告と、良好な予後あるいは生存期間延長と関連するとする報告の両方があり、今後の検討が待たれます(Sheng et al., 2023; Wolf-Ringwall et al., 2020; Mizutani et al., 2016)。

なお、本症例では末梢血中にも同一の免疫表現型を示す細胞集団が認められました。さらに、リンパ系細胞クローン性解析（PCR for antigen receptor gene rearrangement, PARR）により、リンパ節および末梢血の細胞が同一のIgH遺伝子再構成を有することが確認されました。これらの所見から、リンパ節および末梢血で認められた細胞集団は同一クローン由来であることが確認されました。

解析例 2

著しいリンパ球増多症を呈した犬末梢血の解析例を示します（図3）。リンパ球様細胞を対象として解析を実施したところ、大部分の細胞が同一の免疫表現型を示していました。これらの細胞はCD3陽性かつCD5陽性であり、Tリンパ球系細胞と考えられました。一方で、CD4およびCD8の発現はいずれも認められませんでした。

末梢血中の成熟Tリンパ球は通常、CD4またはCD8のいずれかを発現しています。そのため、この症例のようなCD4-CD8-のTリンパ球はdouble negative Tリンパ球と呼ばれ、異常な免疫表現型を示すTリンパ球集団と考えられます。犬の慢性リンパ性白血病（chronic lymphocytic leukemia, CLL）では免疫表現型と予後との関連が報告されています。本症例のようなdouble negative T-CLLは、予後不良な非定型CLLに分類されます(Comazzi et al., 2011)。

● おわりに

近年、造血管腫瘍における免疫表現型の重要性はますます高まっています。これまでは免疫組織化学が主要な評価法として用いられてきましたが、とくに造血管腫瘍では複数のマーカー発現を組み合わせる必要があることから、フローサイトメトリ解析の有用性が注目されています。一方で、フローサイトメトリでは未固定の生細胞を用いる必要があるため、検体の取り扱いが結果に大きく影響します。このことが普及の妨げとなり、これまで国内でフローサイトメトリ解析を受託する施設は限られていました。最近、サンリツセルコバ社の協力によりフローサイトメトリ解析の受託を開始することができました。造血管腫瘍の診断における選択肢の一つとして、積極的に活用していただければ幸いです。

ただし、フローサイトメトリは有用な検査である一方、単独ですべての診断が完結するわけではありません。実際の診断では、細胞診、病理組織学的検査、免疫組織化学、PARRなどの検査結果と併せて総合的に解釈することが重要です。次稿では、免疫組織化学やPARRとの違い、それぞれの検査の特徴や使い分けについて解説します。

【参考文献】

- Comazzi, S., Gelain, M.E., Martini, V., Riondato, F., Miniscalco, B., Marconato, L., Stefanello, D., Mortarino, M., 2011. Immunophenotype predicts survival time in dogs with chronic lymphocytic leukemia. J. Vet. Intern. Med. 25, 100–106. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0640.x>
- Mizutani, N., Goto-Koshino, Y., Tsuboi, M., Kagawa, Y., Ohno, K., Uchida, K., Tsujimoto, H., 2016. Evaluation of CD25-positive cells in relation to the subtypes and prognoses in various lymphoid tumours in dogs. Vet. Immunol. Immunopathol. 173, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.03.018>
- Sheng, R., Clarke, D., Laver, T., Meichner, K., Northrup, N., Tarigo, J., 2023. Prognostic significance of CD25 expression in dogs with a noninvasive diagnosis of B-cell lymphoma treated with CHOP chemotherapy. Vet. Comp. Oncol. 21, 28–35. <https://doi.org/10.1111/vco.12857>
- Wolf-Ringwall, A., Lopez, L., Elmslie, R., Fowler, B., Lori, J., Sfiligoi, G., Skope, A., Arnold, E., Hughes, K.L., Thamm, D.H., Ehrhart, E.J., Avery, A.C., Lana, S.E., 2020. Prospective evaluation of flow cytometric characteristics, histopathologic diagnosis and clinical outcome in dogs with naïve B-cell lymphoma treated with a 19-week CHOP protocol. Vet. Comp. Oncol. 18, 342–352. <https://doi.org/10.1111/VCO.12553>

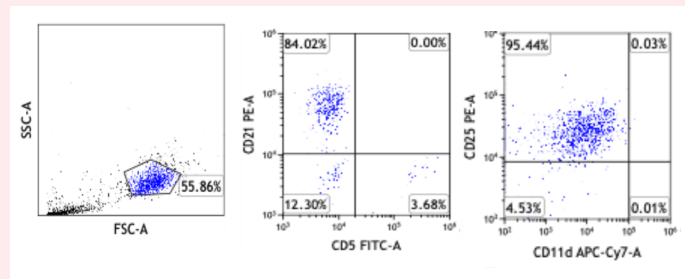


図2. 犬リンパ節針吸引生検サンプルのフローサイトメトリ解析例。
FSC vs SSCプロット（左）でゲートした細胞集団（青色ドット）を対象として解析を実施しました。これらの細胞の約90%は、Bリンパ球マーカーであるCD21および活性化リンパ球マーカーであるCD25を発現しており、比較的均一な免疫表現型を示していました。

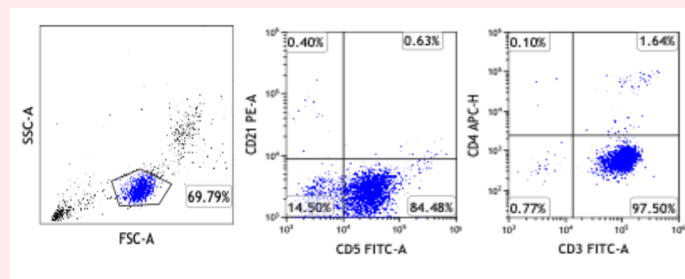


図3. 犬末梢血のフローサイトメトリ解析例
FSC vs SSCプロット（左）でゲートした細胞集団（青色ドット）を対象として解析を実施しました。これらの細胞の約90%は、Tリンパ球マーカーであるCD3およびCD5を発現していました。一方、CD4およびCD8の発現はいずれも認められませんでした。