

補体制御膜蛋白欠損赤血球の高感度測定法

佐藤晶子、櫻井秀子

筑波大学人間総合科学等支援室（医学支援室）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria ; PNH) では、補体制御膜蛋白の欠損および低下のため赤血球の寿命の短縮が認められる。そのため、通常の全血による検査方法では、異常な PNH 赤血球の陽性率は低く計測されてしまう問題点がある。

今回、網赤血球ゲート法による補体制御膜蛋白欠損赤血球の測定を考案し、従来の全血による測定法よりも溶血の影響がより少なく高感度な測定ができるかどうか試みた。

抗ヒト CD59 抗体と CD4K530 網赤血球試薬を用いて、フローサイトメトリーによる 2 カラー測定を行った。健康人による網赤血球解析では、CD59 欠損赤血球は認められなかったが (<0.1%)、PNH 症例においては、従来の全赤血球による測定に比較し網赤血球による測定は、高率に CD59 欠損赤血球を検出し得た。

この網赤血球による補体制御膜蛋白欠損赤血球の測定は、骨髄の PNH 赤血球の産生状態をより高感度に反映していると推察され、この測定方法は PNH の病態を判別する有用な測定法の 1 つに成り得ると思われた。

1. はじめに

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) は、多能性造血幹細胞における後天性の変異に起因したクローナル疾患で、glycosyl phosphatidylinositol (GPI) アンカーの合成障害を生じ、各種の血球表面に多様な GPI 結合型膜蛋白の低下および欠損が起こることが知られている^[1]。

PNH 赤血球においては、GPI 結合型膜蛋白の 1 つである DAF や CD59 の補体制御膜蛋白の発現低下や欠損を認め、それにより補体感受性は亢進し血管内溶血をきたす特徴がある。通常、体内ではたえず赤血球の崩壊と新生赤血球の補充がなされ、恒常性が維持されている。一般に、健康人の赤血球寿命は約 120 日と言われているが、PNH 赤血球では、補体性溶血をきたすため寿命の短縮がおこる。そのため、従来行われている全血による検査では、異常 PNH 赤血球の比率は低く測定されてしまう問題点がある。

異常な赤血球クローンを検出することは診断上重要であり、筑波大学血液内科では、血球の補体制御膜蛋白の発現をフローサイトメトリーによる測定で定量的に行っている。また、この異常は赤血球だけでなく、好中球、単球、リンパ球などにも高率に認められることを以前に報告した^[2]。今回、CD4K530 試薬 (Cell-Dyn 4000 System ; Abbott Laboratories) を

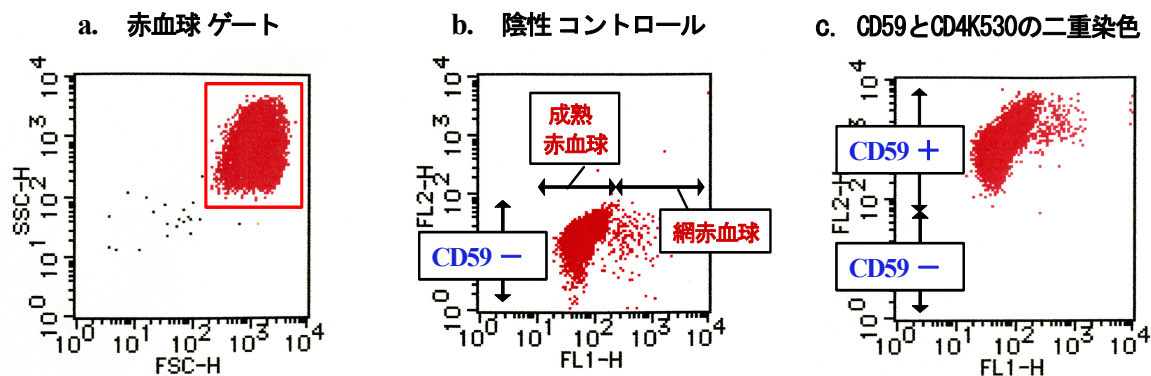


図 1. 健康人による網赤血球ゲート法による CD59 解析

a: FSC と SSC により赤血球を選択しゲートする. b: CD4K530 試薬と mouse IgG 2a κ -PE の二重染色により、成熟赤血球と網赤血球が識別され、また、アイソタイプコントロール抗体を用いて、ゲートした赤血球の CD59 陽性蛍光のカットオフ値を決める. c: CD59 抗体と CD4K530 試薬との二重染色において、健康人の網赤血球および成熟赤血球は、ともに高い CD59 の蛍光を認め、CD59 の陰性血球は認められない。

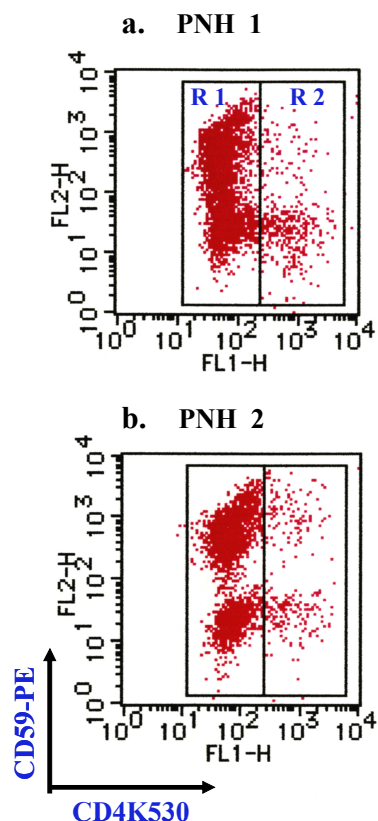


図2. PNH 症例における網赤血球ゲート法による2カラー解析図

PNH 患者の赤血球を CD59 抗体と CD4K530 試薬により二重染色し、フローサイトメトリーによる測定を行う。PNH 症例は、健常人と同様の高 CD59 蛍光を持つ血球から活性低下および完全欠損血球まで様々な発現量の赤血球を認めた。

成熟赤血球を R1 ゲート、網赤血球を R2 ゲートと設定する。2 症例ともに、R1 に比較し R2 による測定の方が、高い比率の CD59 陰性血球を検出した。

用いて、骨髄から産生された若い赤血球の網赤血球を成熟赤血球と区別し、赤血球の補体性制御因子のうち最も溶血の防御に強い CD59 の抗体を用いて染色を行い、2 カラーによるフローサイトメトリー測定を考案した。

従来の全血による測定法と比較し、網赤血球ゲート法が溶血の影響が少なく高感度な測定ができるか否か検討を試みた。

2. 対象及び試薬

2.1 対象

健常人 1 名 (網赤血球数 2.2%) および PNH 2 名 (PNH 1 : 網赤血球数 9.4% , PNH 2 : 網赤血球数 6.2%) の末梢血液を用いた。

2.2 試薬

1. CD4K530 試薬 (Cell-Dyn 4000 System ; Abbott Laboratories)
2. 抗ヒト CD59 抗体-PE (clone : p282 [H19]) (BD Phamingen)
3. mouse IgG 2a κ -PE (BD Phamingen) (陰性コントロール)
4. staining medium (SM) : 0.1%BSA (sigma) , 0.1% NaN₃ 含有 pH7.2 PBS 溶液

3. 網赤血球ゲート法による2カラー測定方法および解析

3.1 2 カラー測定

1. EDTA 採血した血液を SM に浮遊させ 1 回遠心洗浄する。
2. 赤血球を 1×10^8 /ml に調整し、赤血球浮遊液 $50 \mu\text{l}$ を試験管にとり、それに抗ヒト CD59 抗体-PE または mouse IgG 2a κ -PE (陰性コントロール) を、 $5 \mu\text{l}$ を加えて、室温、暗所で 30 分間反応させる。
3. 赤血球を 1 回遠心洗浄し、沈査はかるく解しておく。
4. 測定は FACS Sort (BD Biosciences) で行った。計測の直前に $300 \mu\text{l}$ の CD4K530 試薬を加え、ただちに 1×10^5 個の赤血球を 2 カラー測定 (FL1: BP 530/30nm , FL2 : BP 585/42nm) した。

3.2 解析

1. 解析は Cell Quest を用いて行った。前方散乱光 (FSC) と側方散乱光 (SSC) から、赤血球を選択しゲートする (図 1 a)。
2. 赤血球ゲートの血球は、CD4K530 試薬の FL1 測定において、より高い蛍光を示す血球を網赤血球とし、低い蛍光を示す血球を成熟赤血球と識別する (図 1 b)。図 2 のように、網赤血球ゲート (R2)、成熟赤血球ゲート (R1) を設定する。
3. ヒストグラムを用いて、陰性コントロール用の mouse IgG 2a κ -PE より CD59 陽性蛍光のカットオフ値を決める。全赤血球 (R1+R2)、網赤血球ゲート (R2)、成熟赤血球ゲート (R1) のそれぞれの血球の CD59 陽性率を算出する。

4. 結果

4.1 健常人の解析

健常人の赤血球解析では、図1のようにCD59は、100%陽性となり、網赤血球および成熟赤血球ともに高い蛍光を認めた。

網赤血球分画 (R2) において、CD59 陰性赤血球は検出されなかった (<0.1%)。

4.2 PNH 症例の解析

PNH 症例では、図2のように健常者赤血球と同等のCD59 高発現血球から活性低下および完全欠損血球まで、多様な発現量の赤血球が混在していた。

全赤血球 (R1+R2) による解析では、CD59 陰性赤血球はPNH 1 症例 41%、PNH 2 症例 35%と高い比率の異常赤血球を認めた。

成熟赤血球分画 (R1) では、全赤血球よりもやや低い比率になりPNH 1 症例 38%、PNH 2 症例 33%とCD59 陰性赤血球を検出した。

網赤血球分画 (R2) では、全赤血球測定よりもさらに高い割合の異常赤血球を検出し、PNH 1 症例 76%、PNH 2 症例 61%であった。全赤血球測定と比較し、PNH 1 症例では1.9 倍、PNH 2 症例では1.7 倍であった (図3)。

5. 考察

PNH の異常赤血球は、補体の活性化に伴い正常赤血球よりも溶血しやすい特徴を持つ。血管内容血が進行すれば、異常赤血球は見かけ上減少することと

なり、異常赤血球の割合は補体性溶血の程度に影響を受け、異常クローンの比率を知ることは難しい側面を持つ。しかし、正常細胞と異常クローンの割合をより正確に知ることは臨床上重要である。

今回、フローサイトメトリーによるCD4K530 網赤血球試薬と抗ヒトCD59-PE抗体の2カラー測定を行い、網赤血球によるCD59 陰性の異常血球の検出を試みた。健常人赤血球のCD59 は、高い蛍光量を示し、この高い蛍光量は陰性血球との識別をしやすくする利点があった。また、測定に使用した抗ヒトCD59-PEの抗体量を多くすると、測定中に溶血が起こるケースを経験し 5×10^6 個の赤血球に対して $5 \mu\text{l}$ の抗体量が適当と思われた。

CD4K530 試薬は、瞬時に網赤血球を染色することが可能であり簡便であった。網赤血球の測定は、骨髓の赤血球産生能をよく反映している検査の一つと言われているが、通常 網赤血球数は約1~2% (健常人血液) しかなく、PNH 症例では網赤血球の増加をみるにしても、網赤血球を対象とした場合、正確性や精密性のために多数の赤血球を計測する必要がある。しかし、フローサイトメトリーによる測定では、数多くの血球を短時間に計測することが可能であり、なおかつ迅速に解析できる利点があった。

今回のPNH 症例による検討により、従来の全血法では、体内の補体性溶血の影響を強く受けていることがわかった。この網赤血球ゲート法による2カラー測定は、PNH 血球の産生状態をよりの確に反映した高感度の検出法に成り得ると思われた。

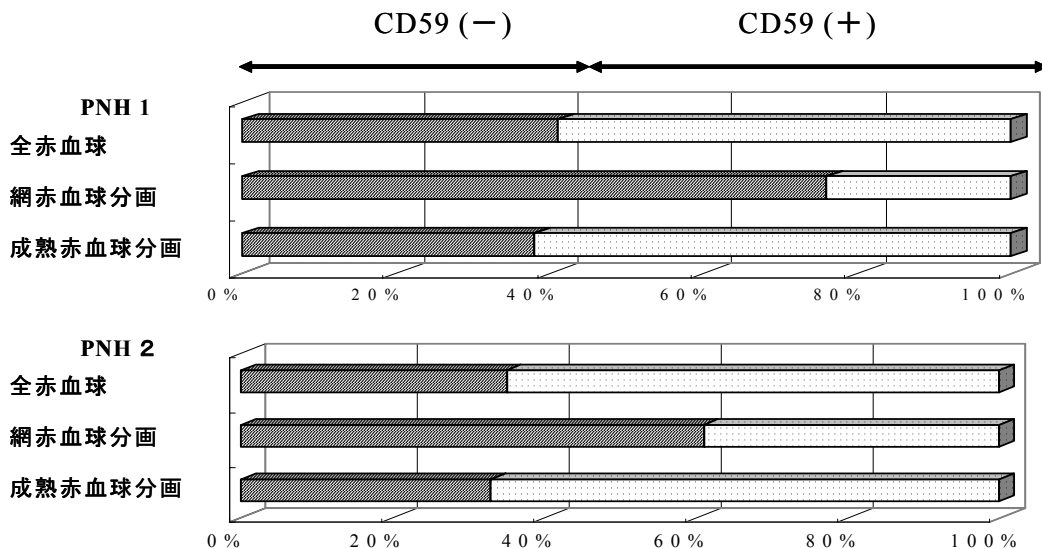


図3. PNH 症例における網赤血球ゲート法によるCD59 赤血球の陽性率

PNH2 症例において、共にCD59 陰性赤血球が各分画に認められ、CD59 陰性の異常赤血球は、全赤血球 (R1+R2) や成熟赤血球分画 (R1) に比較し、網赤血球分画 (R2) の方が高率に検出された。

6. 結語

PNHは、再生不良性貧血や骨髄異型性症候群と共に骨髄不全症候群と称され、相互に移行や合併を起こすことが知られており、経時的にPNH血球を検索することが必要となる^[3]。

今回のフローサイトメトリーによる網赤血球のCD59測定は、従来の末梢血による全血法よりも、高率に補体制御膜蛋白欠損赤血球を検出することができた。このことは、溶血の影響をより少なく、またわずかな異常クローンを早期に識別できる可能性が高まり、PNH病態を判別する上でこの網赤血球ゲート法は有用な測定に成り得ると思われた。

また我々は、この網赤血球ゲート法を用いて、PNHの末梢血幹細胞移植症例において、正常造血の生着の確認を、残存するPNH赤血球に影響されることなく早期に行うことができた^[4]。今後さらにフローサイトメトリーによる網赤血球ゲート法の有用性について検討していきたい。

参考文献

- [1] 中熊秀樹. 前白血病としての発作性夜間血色素尿症 (PNH) の分子病態, *Systemex Journal*. 27-1 (2004) 19-31.
- [2] 佐藤晶子. ヒト赤血球および白血球の補体制御膜蛋白のフローサイトメトリーによる検討, 第3回筑波大学技術職員技術発表会報告集 (2004) 10-14.
- [3] 中熊秀樹. 発作性夜間血色素尿症 (PNH) クローンの選択的拡大のしくみ, *医学のあゆみ・別冊* (2005) 210-217.
- [4] 佐藤晶子、長澤敏郎、二宮治彦. 網赤血球ゲート法によるPNH (GPI 膜蛋白欠損) 赤血球の検出の有用性, 第6巻日本検査血液学会雑誌 (2005) S65.