

ヒト赤血球および白血球の補体制御膜蛋白発現の フローサイトメトリーによる検討

佐藤晶子

筑波大学人間総合等教育研究支援室 (医学系)

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

赤血球および白血球の補体制御膜蛋白 (CD55、CD59) の発現について、健常人・骨髄異形成症候群 (MDS) ・発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) においてフローサイトメトリー (FCM) による測定を試みた。

PNH においては、健常人や MDS と異なり、赤血球・好中球・単球・リンパ球の補体制御膜蛋白の欠損を検出することができた。また、グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) アンカー膜蛋白に属する CD16b や CD14、CD24 についても分析を行い、PNH においては同様に発現量低下の異常細胞を検出し得た。

この FCM による測定法は、PNH の総合的病態診断法の 1 つになると考えられた。

1. はじめに

筑波大学血液内科では、PNH の赤血球補体制御膜蛋白の解析を、「FCM の two-color 分析」により行っており、筑波大学付属病院は高度先進医療の認定を受けている。今回はこれを発展させ、赤血球だけでなく白血球の補体制御膜蛋白 (CD55、CD59) の発現について、健常人・MDS・PNH において FCM による測定を行い比較検討した。

PNH は、多能性造血幹細胞レベルにおける遺伝子 (PIG-A 遺伝子) 異常により発症する後天性のクローナル疾患^[1,2]、各種血球の GPI アンカー蛋白の膜上での発現が障害され、多彩な臨床症状を呈することが知られている^[1,3]。PNH は、骨髄不全症候群の側面^[4]と慢性溶血性貧血の病態^[1]を持ち、正常赤血球では、補体制御膜蛋白を発現することにより、補体活性化による溶血を防御しているが、PNH 赤血球では、この欠損のため補体感受性が亢進し血管内溶血がおきる。

CD55 や CD59 などの補体制御膜蛋白は、GPI アンカー膜蛋白に属しており、今回は、赤血球と白血球における補体制御膜蛋白測定に加え、GPI アンカー膜蛋白の CD16b や CD14、CD24 についても分析を試み、末梢血による異常細胞の検出を試みた。

2. 対象および測定方法

EDTA またはクエン酸ナトリウム採血による末梢血液を用いて、健常人 (n=5)、MDS (n=4)、PNH (n=2) の測定を試みた。測定は、FACSsort (Becton Dickinson) で行い、CELL Quest で解析した。

2.1 使用抗体

- ・抗 CD55-FITC 標識抗体 (JS11KSC2.3 (IgG1); Immunotech)
- ・抗 CD59-FITC 標識抗体 (p 282 (H19) (IgG2a); BD Biosciences)
- ・抗 CD3-PE 標識抗体 (PC3/188A (IgG1); Dako Cytomation)
- ・抗 CD13-PE 標識抗体 (WM-47 (IgG1); Dako Cytomation)
- ・抗 CD14-FITC 標識抗体 (TUK4 (IgG2a); Dako Cytomation)
- ・抗 CD16b-FITC 標識抗体 (1D3 (IgM); Immunotech)
- ・抗 CD19-PE 標識抗体 (HD37 (IgG1); Dako Cytomation)
- ・抗 CD24 抗体 (ML5 (IgG2a); Phar Mingen)

2.2 赤血球 (RBC) による測定

1. 小試験管に末梢血液 500 μ l を入れ、ステイニング メディウム (SM) (phosphate-buffered saline (ph7.2) (PBS: 日本製薬), 0.1% bovine serum albumin (sigma), 0.1% NaN₃) 4ml を加え 1000 rpm, 5 分間遠心し 1 回洗浄。沈渣に SM を加えて、RBC 浮遊液を調整。
2. フィッシャーチューブに 50 μ l ずつ (1×10^6 個 RBC) 細胞を分注し抗体を加え、室温で 30 分間遮光して反応。
3. SM 300 μ l で 2 回洗浄し、SM 300 μ l に再浮遊させ、小試験管に移し FCS で測定、解析。

2.3 白血球 (WBC) による測定

1. 末梢血液 5ml を 1000 rpm, 5 分間遠心し、buffy coat を回収。赤血球除去のために蔭酸アンモニウム溶液を加えて溶血させ、SM で 1 回洗浄。沈渣に SM を加えて、WBC 浮遊液を調整。
2. フィッシャーチューブに、50 μ l ずつ (2.5×10^5 WBC) 細胞を分注し、抗体を混ぜて 4°C で 30 分間遮光して反応。
3. SM 300 μ l で 2 回洗浄し、SM 300 μ l に再浮遊し、小試験管に移し FCS で測定。細胞識別のため、FSC/SSC の解析と好中球・単球では抗 CD13 抗体、B リンパ球では抗 CD19 抗体、T リンパ球では抗 CD3 抗体との二重染色を行い解析を試みた。また、各細胞の陽性率は、アイソタイプコントロール抗体により陰性対照を求め、陽性領域のカットオフ値を設定した。

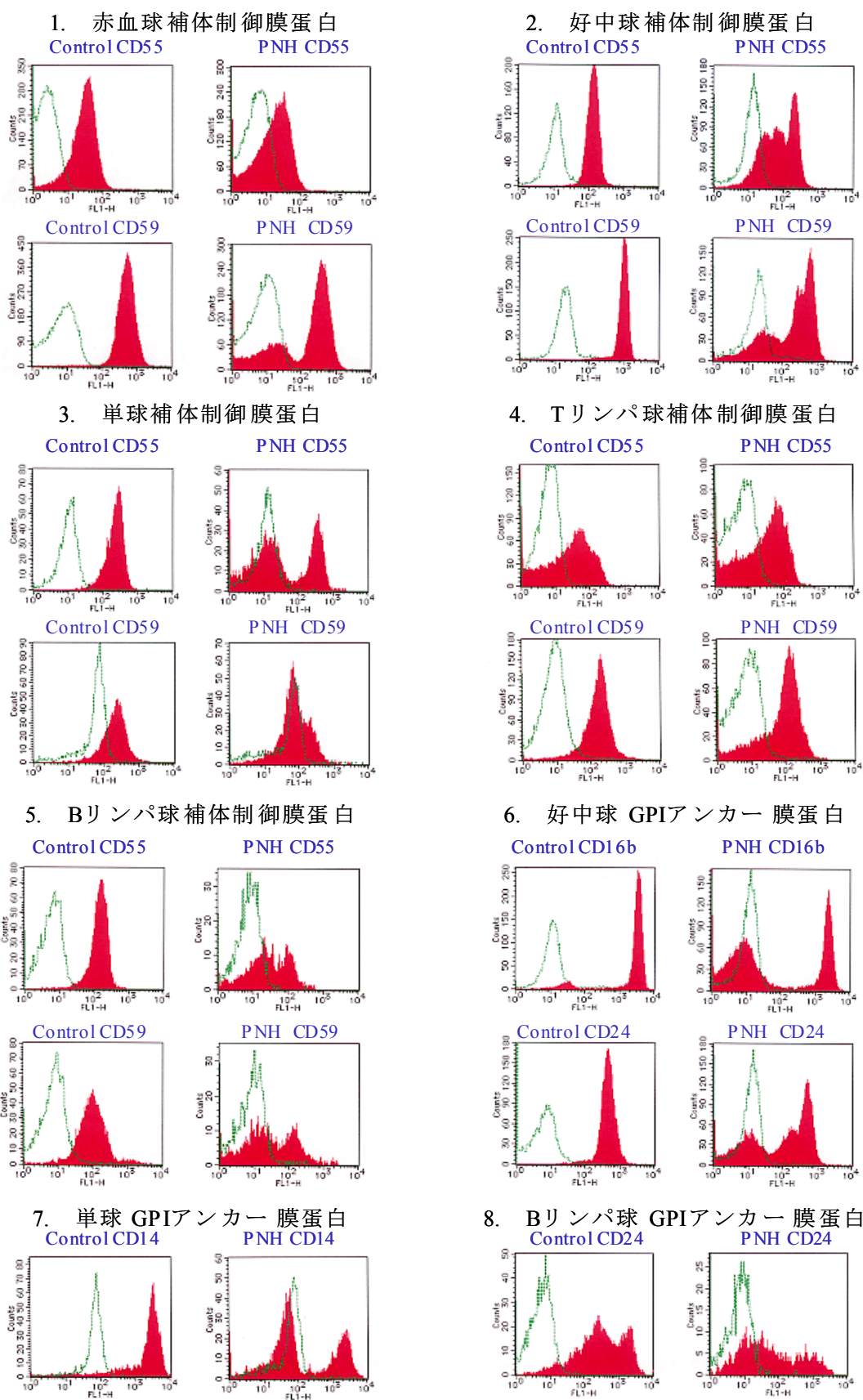


図1. 健常人とPNHにおけるFCMによるGPIアンカー膜蛋白測定の一症例（点線：陰性対照）

3. 測定結果

3.1 赤血球補体制御膜蛋白測定

健常人赤血球 CD59 では、平均陽性率は $99.9 \pm 0.1\%$ で、陰性対照と比較し平均発現蛍光量は高値を示した。一方、赤血球 CD55 では、平均陽性率 $86.9 \pm 8.2\%$ となり、蛍光強度は CD59 より低く一部陰性対照と重なるパターンであった (図 1)。

MDS における平均陽性率は、CD55 = $89.0 \pm 3.1\%$ および CD59 = $99.9 \pm 0.1\%$ であり (図 2)、蛍光強度も健常人赤血球とほぼ同様であった。

PNH においては、CD55 および CD59 ともに健常人と同等の発現量をもつ赤血球のほかに、発現欠損の異常赤血球を認め (図 1)、健常人や MDS に比べて陽性率は低値であった (図 2)。

3.2 好中球補体制御膜蛋白測定

健常人好中球 CD55 の平均陽性率は $99.8 \pm 0.2\%$ 、CD59 は $99.9 \pm 0.2\%$ であった。また、平均蛍光強度は、CD55 と CD59 共に高値を示したが、CD59 の方がやや高い蛍光値であった (図 1)。

MDS における平均陽性率は、CD55 = $100.0 \pm 0.1\%$ および CD59 = $99.9 \pm 0.3\%$ であり (図 2)、蛍光強度も健常人と同様に高値であった。

PNH においては、CD55 および CD59 ともに健常人と同等の発現量をもつ血球のほかに、発現量の低下および完全欠損の異常血球群を認め (図 1)、健常人や MDS に比べて陽性率は低値を示した (図 2)。

3.3 単球補体制御膜蛋白測定

健常人単球 CD55 の平均陽性率は $99.0 \pm 0.8\%$ で、発現蛍光量も高値を示した。一方、単球 CD59 の発現量は高いものの陰性対照の蛍光量が強く、一部陰性対照の蛍光と重なるパターンになり (図 1)、その平均陽性率は $69.7 \pm 16.1\%$ であった。

MDS における単球 CD55 の平均陽性率は $99.1 \pm 0.8\%$ で蛍光強度も高値を示し、CD59 の発現パターンは健常人と同じように一部陰性対照と重なり平均陽性率 $77.5 \pm 7.0\%$ 、発現量も健常人範囲内であった (図 2)。

PNH においては、CD55 および CD59 ともに、健常人と同様の発現血球のほかに完全欠損血球が検出され (図 1)、健常人や MDS と異なり多数の異常細胞を認めた (図 2)。

3.4 T リンパ球補体制御膜蛋白測定

健常人 T リンパ球 CD59 の平均陽性率は $95.9 \pm 2.3\%$ 、平均発現蛍光量も高値を示した。一方 CD55 では、CD59 より平均蛍光強度が低く陰性から陽性まで広く分布するパターンを呈し (図 1)、発現率は $52.9 \pm 12.2\%$ であった。

MDS における T リンパ球の平均陽性率は、CD55 = $62.0 \pm 2.4\%$ および CD59 = $97.0 \pm 2.1\%$ であり、蛍光強度も健常人と同様に健常人の範囲内であった (図 2)。

PNH においては、CD55 は健常人パターンに相似しており (図 1)、発現低下血球は著明ではなかった (図 2)。また CD59 は、健常人と同様の発現量を持つ血球とともに発現欠損の異常血球が検出され (図 1)、健常人や MDS に比べて陽性率は低値であった (図 2)。

3.5 B リンパ球補体制御膜蛋白測定

健常人 B リンパ球 CD55 の平均陽性率は $99.5 \pm 0.4\%$ 、CD59 の平均陽性率は $95.5 \pm 3.4\%$ と共に高値であり (図 1)、平均発現蛍光量もほぼ同じ位の蛍光値であった。

MDS における B リンパ球の平均陽性率は、CD55 = $98.8 \pm 0.8\%$ および CD59 = $97.6 \pm 0.9\%$ であり (図 2)、蛍光強度も健常人と同様のパターンであった。

PNH においては、CD55 および CD59 ともに健常人と同等の発現量を持つ血球のほかに、発現欠損の異常血球を多数認め (図 1)、陽性率は健常人や MDS に比べ低値を示した (図 2)。

3.6 好中球 (CD16b) の測定

健常人好中球の CD16b は、高い蛍光強度を示し (図 1)、平均陽性率は $96.5 \pm 3.8\%$ であった。

MDS における好中球 CD16b の平均陽性率は、 $99.5 \pm 0.3\%$ であり (図 2)、蛍光強度も健常人と同様に高値であった。

PNH においては、健常人と同等の CD16b 発現血球のほかに、多数の発現欠損の異常血球を認め (図 1)、健常人や MDS に比べて陽性率は低値を示した (図 2)。

3.7 好中球 (CD24) の測定

健常人好中球 CD24 は、CD16b よりも蛍光強度は低いものの CD59 と同等の蛍光量を持ち (図 1)、平均陽性率は $99.8 \pm 0.1\%$ と高値であった。

MDS における好中球 CD24 の平均陽性率は $99.3 \pm 1.0\%$ であり (図 2)、健常人とほぼ同様のパターンであった。

PNH においては、健常人と同等の CD24 発現量を持つ血球のほかに、発現量の低下および完全欠損の異常血球群を認め (図 1)、陽性率は健常人や MDS に比べて低値を示した。

3.8 単球 (CD14) の測定

健常人単球 CD14 は、平均陽性率 $85.2 \pm 9.5\%$ で、陰性対照の蛍光強度が高いものであったが、それ以上に高い発現量を持つ細胞が観察され、解析上問題を認めなかった (図 1)。

MDS における単球 CD14 の平均陽性率は $86.8 \pm 7.8\%$ で健常人の範囲内であった (図 2)。

PNH においては、健常人と同様の高発現血球のほかに発現欠損の異常血球を多数認め (図 1)、陽性率は健常人や MDS に比べて低値を示した (図 2)。

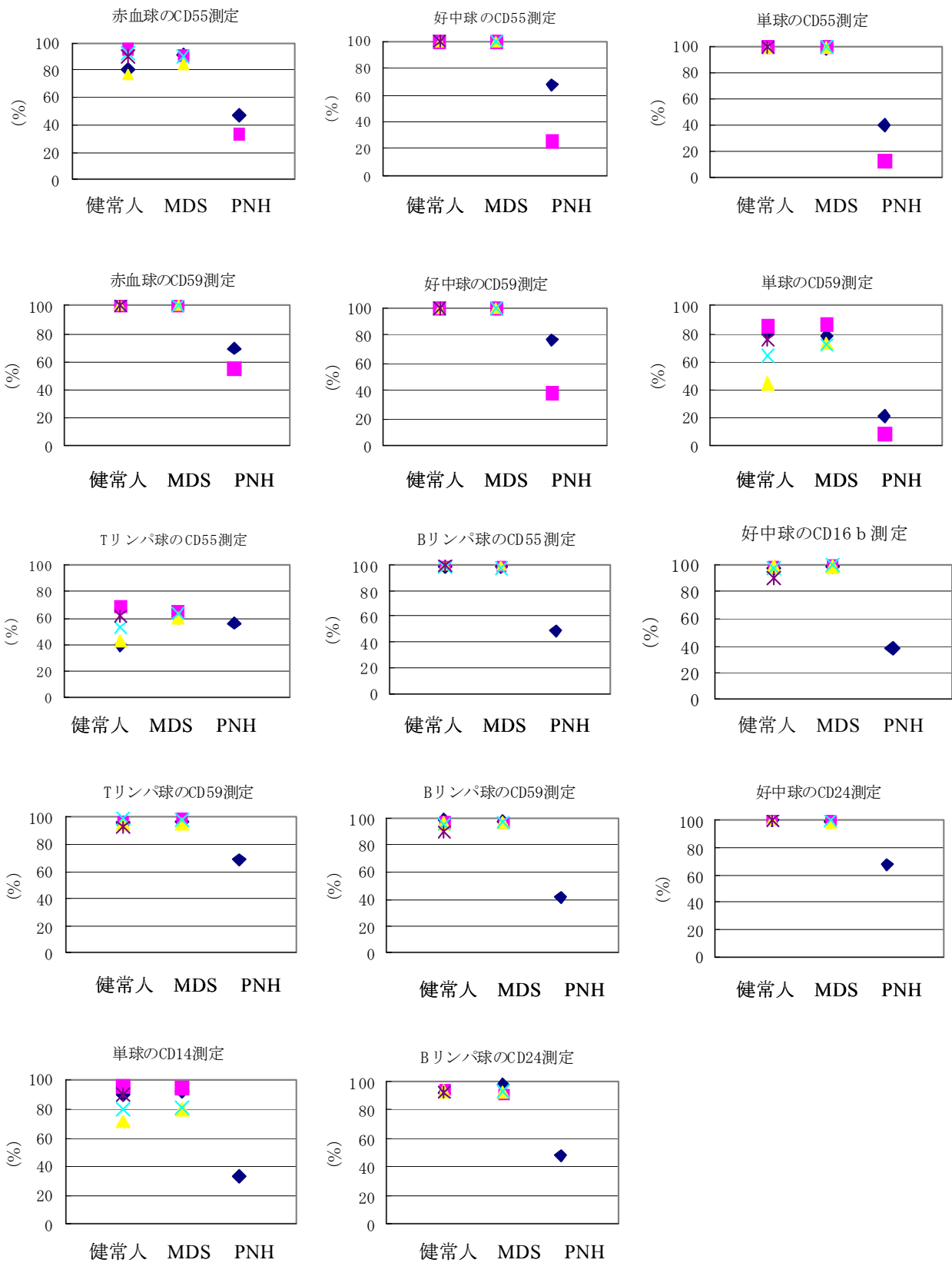


図2. FCM による健常人、MDS、PNH におけるG P I アンカー膜蛋白の発現量の比較

3.9 B リンパ球 (CD24) の測定

健常人 B リンパ球 CD24 の平均陽性率は、93.4±0.8%、発現蛍光量については蛍光強度の範囲が広いパターンを示した(図1)。

MDS においては、健常人と同等であり平均陽性率は93.8±3.0%であった(図2)。

PNH においては、健常人と同様の発現量の血球から発現低下血球および完全欠損血球群に続くパターンを認め(図1)、健常人や MDS と異なり多数の異常細胞を認めた(図2)。

4. 考察

FCM を用いて CD55 および CD59 の補体制御膜蛋白および GPI アンカー膜蛋白の CD16b や CD14、CD24 について分析し、末梢血による異常細胞の検出を試みた。

PNH において補体制御膜蛋白の測定は重要であり、CD55 は、補体活性経路の C3 および C5 変換酵素を阻害し、CD59 は C5b-9 複合体の形成および C9 重合化を阻害して補体防御作用を示している^[1]。両者を測定することは臨床的意義が高いものであるが、今回の結果から、測定に使用する抗体によって信頼性(再現性・正確性)が異なる場合があり、注意すべきであると思われた。

赤血球では、健常人 CD55 は、蛍光強度が CD59 より低く陰性対照と一部重なる測定パターンのため、カットオフ値のとり方で陽性率が変動する可能性があった。一方、健常人 CD59 の発現蛍光量は強く、陽性率も高く安定しており異常細胞の検出に適していると思われた。

健常人好中球では、健常人 CD55 と CD59 とともに同等の蛍光強度であり陽性率も高く、CD16b が最も蛍光強度が高いものであったが、CD24 についても高値であり、いずれも陽性率が高く安定しており異常細胞の検出に適していた。

単球では、今回使用した CD59 抗体が MsIgG2a による抗体のためか、陰性対照の蛍光強度が強く、一部健常人単球 CD59 の蛍光と重なるパターンに測定され、陽性率が変動する要因になると考えられ、CD55 や CD14 の方が陰性対照より蛍光強度の分離が高く、正確な分析が可能と思われた。

T リンパ球では、健常人 CD55 のパターンは、陽性から陰性までの幅広い分布を示すことがわかった。また、カットオフ値のとり方で陽性率が変動する可能性が高く、解析には陰性対照が重要であると思われた。CD59 は平均発現率や蛍光強度も高く測定に適していた。

B リンパ球は、健常人 CD55 と CD59 はほぼ同等の蛍光量を示し、平均発現率も高値であり、検出に適していた。また、CD24 も同様に高発現率であったが、発現蛍光範囲が広いパターンを示し、弱い欠損細胞の検出には注意を要すると思われた。

MDS 症例における末梢血球の CD55 および CD59 の補体制御膜蛋白の発現量測定では、赤血球および白血球ともほぼ同等で低活性の細胞は認められなかった。また、CD16b や CD14、CD24 についても健常人の範囲内に計測された。

PNH 症例においては、赤血球および白血球とも健常人に比較し CD55 および CD59 の補体制御膜蛋白発現欠損の異常細胞を認めた。今回の症例では、赤血球および特に単球・B リンパ球での発現欠損細胞を多数認め、好中球では健常人と同様の発現量を持つ血球とともに、発現低下の異常血球や完全欠損細胞の3相性のパターンが観察され、FCM による方法は感度および特異性においても PNH の確定診断に有用と思われた。

5. 結論

健常人と異なり PNH においては、赤血球・好中球・単球・リンパ球の補体制御膜蛋白 (CD55, CD59) や CD16b、CD14、CD24 の発現低下の異常細胞を FCM による測定で検出することができた。

補体制御膜蛋白 CD55 や CD59 の解析は重要であり異常細胞のクローン測定の意義も高いものであるが、測定に用いる抗体により再現性や正確性が異なる場合があり注意すべきである。好中球および B リンパ球では、どちらの抗体を用いても同等であるが、赤血球や T リンパ球では抗 CD59 抗体を、単球では抗 CD55 抗体を指標にした方が、より高い信頼性が得られると考えられた。

赤血球および白血球の GPI アンカー膜蛋白測定は、PNH の総合的な病態診断の1つの指標になると思われた。

参考文献

- [1] 藤岡成徳. 発作性夜間ヘモグロビン尿症, 血液病学第2版, 三輪史朗編, 分光堂, 東京, (1995) 482-501.
- [2] 堀川健太郎. 発作性夜間血色素尿症(PNH)における変異発生の造血環境, *Annual Review 血液*, (2003) 50-57.
- [3] 七島勉. 発作性夜間血色素尿症: その本質と臨床像の多様性, *臨床血液*, 43 (2002) 68-75.
- [4] 中尾眞二. 再生不良性貧血の病態と治療: 免疫病態を診断するためのマーカー, *臨床血液*, 44 (2003) 121-128.