

# フローサイトメトリーによる健常人赤血球・網赤血球におけるトランスフェリン受容体(CD71)の分析およびPNH型幼若網赤血球検出への応用

佐藤 晶子

筑波大学医学系技術室

〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1

## 概要

細胞表面抗原の分析には、フローサイトメトリーによる測定が広く用いられている。

健常人末梢血液を用いて、赤血球および網赤血球のトランスフェリン受容体(transferrin receptor, TfR)(CD71)の発現について、フローサイトメトリーによる2カラー分析をした。健常人のCD71陽性率(mean ± SD)は、赤血球0.19 ± 0.11%、網赤血球14.9 ± 6.2%であった(n=30)。

また、トランスフェリン受容体(CD71)陽性赤血球は、末梢血液中に放出されて間もない幼若網赤血球である。この幼若網赤血球を用いて、発作性夜間ヘモグロビン尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)でみられるPNH型血球の検出についてフローサイトメトリーによる3カラー分析を考案した(TfR-RBC測定法, CD55+CD59/CD71/CD45)。

このTfR-RBC測定法は、微量なPNH型血球を定量的に検出することができ、また、PNH型血球の判定結果が、赤血球陰性/顆粒球陽性と乖離した症例において、陽性判定となり、赤血球系においても異常クローンの増加を検証することができた。

幼若網赤血球によるTfR-RBC測定法は、PNH型赤血球の産生状態を図れる高感度な分析方法であると思われた。

**キーワード:** トランスフェリン受容体(CD71)、補体制御膜蛋白(CD55, CD59)、発作性夜間ヘモグロビン尿症、再生不良性貧血

## 1. はじめに

細胞表面抗原の一つであるCD71は、血液中の主要な鉄イオン結合蛋白であるトランスフェリンの受容体(transferrin receptor, TfR)であり、鉄を大量に代謝する必要のある細胞に高発現をしている。骨髄中の赤芽球は、高いCD71発現を有し、活性化された血球系細胞全般にもCD71発現を認める<sup>[1]</sup>。その他、赤芽球が脱核して間もない末梢血液中の網赤血球にもCD71を発現しているものがあり、網赤血球の中でも、より骨髄から末梢血液へ放出されて間もない幼若網赤血球(CD71陽性赤血球)<sup>[2]</sup>である。

通常、網赤血球と赤血球の識別には、網赤血球のRNA量が赤血球に比較し高いことを利用して、RNA染色による方法が用いられている<sup>[3]</sup>。今回、この方法を用いてフローサイトメトリーによる2カラー測定を行い、健常人を対象に、赤血球(red blood cells, RBC)および網赤血球におけるトランスフェリン受容体(CD71)の発現率について分析を行った。

また、発作性夜間ヘモグロビン尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)は、グリコシルホスファチジルイノシトール(glycosylphosphatidylinositol, GPI)の生合成に異常があり、そのため、GPIアンカーを介して細胞膜に結合しているGPIアンカー型膜蛋白は、生成されても細胞膜上に発現することができず、血液細胞は、様々なGPIアンカー型膜蛋白の低下や欠損の異常をきたすことが報告されている<sup>[4]</sup>。

赤血球膜蛋白には、自己補体活性から防衛する補体制御膜蛋白があり、主な働きのCD55やCD59は、GPIアンカー型膜蛋白に属するため、このCD55やCD59の欠損や低下に起因して、補体による感受性が高くなり、PNH型赤血球は、体内循環中に発作的・慢性的に血管内容血を起こす病態が知られている。

このPNH型血球は、PNH疾患に認められるだけでなく、再生不良性貧血(aplastic anemia, AA)や骨髄異形成症候群(myelodysplastic syndrome, MDS)においても、わずかな増加が認められる症例があり<sup>[5][6][7]</sup>、また、健常人にも高感度測定により極々微量ではあるがPNH型血球が検出されている<sup>[5][7]</sup>。

今回、CD55とCD59のカクテル抗体を用いて、幼若網赤血球(CD71陽性赤血球)におけるPNH型血球検出のフローサイトメトリー分析を考案し(TfR-RBC測定法)、健常人における補体制御膜蛋白欠損PNH型血球(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup>)の保有率について分析をした。

近年、筑波大学血液内科では、PNH型血球検出に高感度の金沢大学測定法<sup>[5]</sup>を導入した。それに呼応して、このTfR-RBC測定法の改良を行ったので、合わせて報告をする。

## 2. トランスフェリン受容体(CD71)陽性赤血球および網赤血球の分析

### 2.1 対象および目的

健常人30名を対象に、EDTA採血末梢血液を用いて、トランスフェリン受容体(CD71)の赤血球および網赤血球の発現率について分析をする。

また、網赤血球の識別には、CD4K530試薬を用いて核酸染色をして、成熟赤血球と区別した。

なお、この健常人30名の血算値の平均(mean ± SD)は、赤血球数4.58 ± 0.46 × 10<sup>12</sup>/l、Hgb 14.1 ± 1.5 g/dl、Ht 40.7 ± 3.8%、網赤血球数1.3 ± 0.4%、白血球数5.6 ± 1.0 × 10<sup>9</sup>/l、血小板数25.2 ± 4.8 × 10<sup>10</sup>/lであった。

## 2.2 試薬

- 抗ヒト CD71-RPE 標識抗体(Beckman coulter)
- 陰性コントロール: RPE 標識マウスIgG<sub>1</sub> (Beckman coulter)
- CD4K530 試薬(Cell-Dyn4000System, ダイナボット)
- ステイニングメディウム(SM): phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS, 日水製薬), 0.1 %bovine serum albumin (シグマ), 0.1 %NaN<sub>3</sub>

## 2.3 測定方法 RNA/CD71<sup>[2]</sup>

- 1、小試験管に末梢血液を入れ、SM で 1 回遠心洗浄し、 $1 \times 10^8$ /ml 赤血球浮遊液に調整する。
- 2、この赤血球浮遊液 50  $\mu$ l に、CD71-RPE 標識抗体5  $\mu$ l を加えて、室温、暗所で 30 分間反応させる。
- 3、SM を加え 1 回遠心洗浄し、上清を除き、赤血球を軽く混和しておく。
- 4、CD4K530 試薬 300  $\mu$ l を加えて 15 秒後に、FACSsort(BD Biosciences)で測定する。
- 5、Cell Quest Pro ソフトウェアを用いて解析し CD71 の陽性率を算出した。

解析は、図 1 の通り、赤血球は、前方散乱光(forward scatter, FSC)と側方散乱光(side scatter, SSC)のサイトグラムから、赤血球分画(R1 ゲート)を選別する。網赤血球分画は、CD4K530 試薬に反応した高い FL1 蛍光強度(FL1, BP 530/30 nm)をもつ血球(R2 ゲート)を選択して解析した。また、赤血球中に混在している白血球は、CD4K530 試薬の反応で、網赤血球よりも FL1

の蛍光強度が高く、R2 ゲートやR3 ゲートを用いることにより除外した。

トランスフェリン受容体(CD71)陽性(R3 ゲート)は、アイソタイプコントロールを用いて CD71 蛍光強度(FL2, BP 585/42 nm)の cut-off 値を定め、陽性率を算出した。

## 2.4 測定結果

健康人30名の末梢血液を用いて、トランスフェリン受容体(CD71)の発現率について分析をした。

健康人のCD71 陽性率(mean  $\pm$  SD)は、赤血球 0.19  $\pm$  0.11 %であり、網赤血球では 14.9  $\pm$  6.2 %であった(n=30)。

## 3. 幼若網赤血球による PNH 型血球検出 (TfR-RBC 測定法)

### 3.1 対象および目的

健康人 30 名を対象に、EDTA 採血末梢血液を用いて、幼若網赤血球(CD71 陽性赤血球)における補体制御膜蛋白欠損 PNH 型血球(CD55<sup>-</sup> CD59<sup>-</sup>)の保有率について分析をする。

なお、この健康人における従来法の PNH 型血球測定は、赤血球(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup> CD235a<sup>+</sup>)平均値は 0.002 %、その内 0.001 %未満 8 名、陽性判定基準の 0.005 %以上は 0 名、顆粒球(CD55<sup>-</sup> CD59<sup>-</sup> CD13<sup>+</sup>)平均値は 0.0003 %、その内 0.001 %未満 24 名、陽性判定基準の 0.003 %以上は 0 名であった(n=30)。

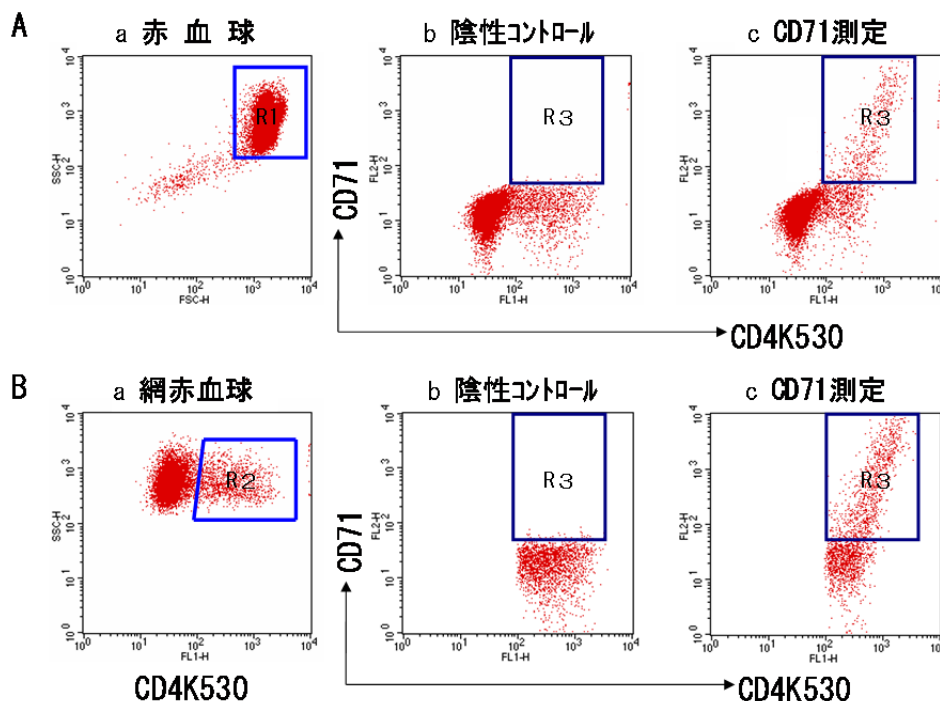


図 1. トランスフェリン受容体(CD71)のフローサイトメトリーによる 2 カラー測定 (RNA/CD71)

- A. 赤血球測定 a. FSC/SSC b. CD4K530/RPE-control IgG<sub>1</sub> c. CD4K530/RPE-CD71  
 B. 網赤血球測定 a. CD4K530/SSC b. CD4K530/PE-control IgG<sub>1</sub> c. CD4K530/RPE-CD71  
 赤血球ゲート(R1), 網赤血球ゲート(R2), CD71 陽性ゲート(R3)

(S.Sato. Int Lab Hem. 32 (2010) e137-e143.)

### 3.2 試薬

- 抗ヒト CD55-FITC 標識抗体(Beckman coulter)
- 抗ヒト CD59-FITC 標識抗体(BD Phamingen)
- 抗ヒト CD71-RPE 標識抗体(Beckman coulter)
- 抗ヒト CD45-RPE Cy5 標識抗体(Dako)
- 陰性コントロール：FITC 標識マウス IgG<sub>1</sub> (Beckman coulter)、FITC 標識マウス IgG<sub>2a</sub> (BD Phamingen)
- ステイニングメディウム(SM)：phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS, 日水製薬), 0.1 %bovine serum albumin (シグマ), 0.1 %NaN<sub>3</sub>

### 3.3 測定方法 CD55+CD59/CD71/CD45

- 1、小試験管に末梢血液を入れ、SM で 1 回遠心洗浄し、 $5 \times 10^8$ /ml 赤血球浮遊液に調整する。
- 2、この赤血球浮遊液  $50 \mu\text{l}$  にCD55-FITC 標識抗体  $10 \mu\text{l}$ 、CD59-FITC 標識抗体  $5 \mu\text{l}$ 、CD71-RPE 標識抗体  $3 \mu\text{l}$ 、CD45-RPE Cy5 標識抗体  $2.5 \mu\text{l}$  を加えて、室温、暗所で 30 分間反応させる。
- 3、SM を加えて 1 回遠心洗浄し、上清を除き、SM に浮遊させ、FACSsort(BD Biosciences)で 3 カラー測定を行った。
- 4、Cell Quest Pro ソフトウェアを用いて解析しPNH 型血球(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup>)の比率を算出した。

解析は、図 2の通り、赤血球は、FSC と SSC のサイトグラムから、赤血球分画(R1 ゲート) を選別し、また、混在している白血球は、FL3 蛍光強度(FL3, LP 650 nm)が高蛍光を示すため、R2 ゲートを用いることにより除外をした。

FL2 蛍光強度 (FL2, BP 585/42 nm) の高い蛍光をもつ CD71 陽性赤血球(R3 ゲート)を、幼若網赤血球として解析した。

補体制御膜蛋白欠損(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup>)血球については、陰性コントロールを用いて、FITC 蛍光強度 (FL1, BP 530 /30 nm)の cut-off 値を定め、PNH 型血球比率を算出した。

### 3.4 測定結果

健常人 30 名の末梢血を用いて、幼若網赤血球 (CD71 陽性赤血球)における補体制御膜蛋白欠損 PNH型血球(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup>)の保有率を分析した。

健常人の幼若網赤血球における PNH 型血球は、0.001 %未満 16 名、0.001 ~ 0.004 % 6名、0.005 ~ 0.009 % 8名となり、平均値 0.0026 %、最大値 0.009 %であった。

また、この TfR-RBC 測定における陽性判定の基準は、PNH型血球が 0.010 %以上検出された場合と推定した。

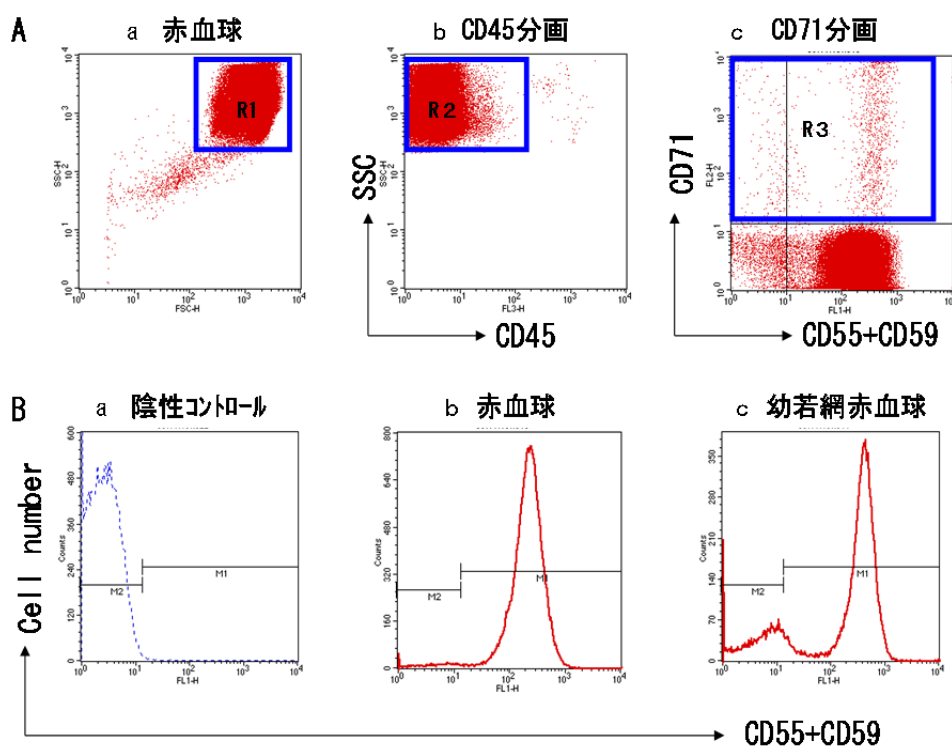


図 2. 幼若網赤血球(トランスフェリン受容体(CD71)陽性赤血球)による PNH 型血球(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup>)検出のフローサイトメトリーによる 3 カラー測定 (CD55+CD59/CD71/CD45)

A. a. FSC/SSC b. RPE Cy5-CD45/SSC (R1) c. FITC-CD55+CD59 /RPE-CD71 (R1+R2)

B. a. FITC-control IgG<sub>1</sub>+IgG<sub>2a</sub> (R1+R2) b. FITC-CD55+CD59 (R1+R2) c. FITC-CD55+ CD59 (R1+R2+R3)  
赤血球ゲート(R1), 白血球除去ゲート(R2), CD71 陽性ゲート(R3)

## 4. TfR-RBC 測定法の改良 (幼若網赤血球による PNH 型血球検出)

### 4.1 目的

本研究室では、PNH 型血球の検出方法に、金沢大学の高感度測定法<sup>[5]</sup>を導入した。それに伴い今までの TfR-RBC 測定法における血液サンプルの調整方法や抗体量による蛍光強度等の再検討を行う。

測定機器は、FACSCanto II (BD Biosciences)に変更した。

なお、この金沢大学高感度法を用いた健常人の PNH 型血球測定は、赤血球(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup>CD235a<sup>+</sup>)の平均値は 0.001 %、その内 0.001 %未満 14 名、陽性判定基準の 0.005 %以上は 0 名、顆粒球(FLAER<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>7AAD<sup>-</sup>)の平均値は 0.0003 %、その内 0.001 %未満 20 名、陽性判定基準の 0.003 %以上は 0 名であった(n=25)。

### 4.2 試薬

- ・抗ヒト CD55-FITC 標識抗体(Beckman coulter)
- ・抗ヒト CD59-FITC 標識抗体(BD Phamingen)
- ・抗ヒト CD71-RPE 標識抗体(Beckman coulter)
- ・抗ヒト CD45-RPE Cy5 標識抗体(Dako)
- ・陰性コントロール： FITC 標識マウス IgG<sub>1</sub> (Beckman coulter)、FITC 標識マウス IgG<sub>2a</sub> (BD Phamingen)
- ・ステイニングメディウム(SM)： phosphate buffered saline pH 7.2 (PBS, 日水製薬), 1.0 %fetal bovine serum, 0.1 %NaN<sub>3</sub>

### 4.3 改良 TfR-RBC 測定法

#### CD55+CD59/CD71/CD45

- 1、小試験管に、末梢血液を入れ遠心する。上清を除き、残りの赤血球層を混和し、その 50  $\mu$ l を SM 2ml に浮遊させ赤血球浮遊液とする。
- 2、この赤血球浮遊液 100  $\mu$ l に、CD55-FITC 標識抗体 5  $\mu$ l、CD59-FITC 標識抗体 5  $\mu$ l、CD71-RPE 標識抗体 3  $\mu$ l、CD45-RPE Cy5 標識抗体 2.5  $\mu$ l を加えて、4  $^{\circ}$ C、25 分間反応させる。
- 3、SM を加えて 1 回遠心洗浄し、上清を除き、SM 600  $\mu$ l に浮遊させ、FACSCanto II (BD Biosciences)で 3 カラー測定を行う。
- 4、FACSDiva ソフトウェアを用いて解析し、PNH 型血球(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup>)の比率を算出した。  
解析は、図 2と同様であり、赤血球は、FSC と SSC のサイトグラムから、赤血球分画(R1 ゲート)を選別し、また、混在している白血球は、FL3 蛍光強度(FL3, LP 650 nm)が高蛍光を示すため、R2 ゲートを用いることにより除外をした。FL2 蛍光強度 (FL2, BP 585/42 nm) の高い蛍光をもつ CD71 陽性赤血球(R3 ゲート)を幼若網赤血球として解析した。  
補体制御膜蛋白欠損(CD55<sup>-</sup>CD59<sup>-</sup>)血球については、アイソタイプコントロールを用いて、FITC 蛍光強度 (FL1, BP 530 /30 nm)の cut-off 値を定め、PNH 型血球比率を算出した。

## 5. PNH 型血球検出法による比較

### 5.1 対象および目的

PNH 型血球の保有率について、全血法による赤血球測定と顆粒球による測定の判定結果が乖離した 3 症例(AA)を対象とした。

この症例の末梢血液を用いて TfR-RBC 測定法による幼若網赤血球分画の測定を行い、3 方法による判定結果を比較検討する。

### 5.2 判定基準

PNH 型血球測定における判定基準は、従来通り PNH型血球が、赤血球は 0.005 %以上、顆粒球は 0.003 %以上保有している場合を陽性と判定した。幼若網赤血球を用いた TfR-RBC 測定法は、PNH型血球が 0.010 %以上を陽性と判定した。

### 5.3 抗体

- ・幼若網赤血球測定 CD55+CD59/CD71/CD45 (症例 1, 2, 3)  
抗ヒト CD55-FITC 標識抗体(Beckman coulter)  
抗ヒト CD59-FITC 標識抗体(BD Phamingen)  
抗ヒト CD71-RPE 標識抗体(Beckman coulter)  
抗ヒト CD45-RPE Cy5 標識抗体(Dako)  
陰性コントロール： FITC 標識マウス IgG<sub>1</sub> (Beckman coulter)、FITC 標識マウス IgG<sub>2a</sub> (BD Phamingen)
- ・赤血球測定 CD55+CD59/CD235a (症例 1, 2)  
抗ヒト CD55-FITC 標識抗体(Beckman coulter)  
抗ヒト CD59-FITC 標識抗体(BD Phamingen)  
抗ヒト CD235a-RPE 標識抗体(DAKO)  
陰性コントロール： FITC 標識マウス IgG<sub>1</sub> (Beckman coulter)、FITC 標識マウス IgG<sub>2a</sub> (BD Phamingen)
- ・赤血球測定 CD55+CD59/CD235a (症例 3)  
抗ヒト CD55-FITC 標識抗体(BD Phamingen)  
抗ヒト CD59-FITC 標識抗体(BD Phamingen)  
抗ヒト CD235a-RPE 標識抗体(DAKO)  
陰性コントロール： FITC 標識マウス IgG<sub>2a</sub> (BD Phamingen)
- ・好中球測定 CD55+CD59/CD13 (症例 1, 2)  
抗ヒト CD55-FITC 標識抗体(Beckman coulter)  
抗ヒト CD59-FITC 標識抗体(BD Phamingen)  
抗ヒト CD13-RPE 標識抗体(DAKO)  
陰性コントロール： FITC 標識マウス IgG<sub>1</sub> (Beckman coulter)、FITC 標識マウス IgG<sub>2a</sub> (BD Phamingen)
- ・好中球測定 FLAER/CD11b/7AAD (症例 3)  
FLAER-Alexa fluor488 標識試薬(Cedarlane)  
抗ヒト CD11b-RPE 標識抗体(BD Phamingen)  
7AAD 試薬(BD Phamingen)

### 5.4 結果

症例 1 の PNH 型血球分析は、赤血球は陰性判定(0.003 %)、顆粒球は陽性判定(0.026 %)であり、幼若網赤血球は陽性判定(0.035 %)であった。

症例 2 の PNH 型血球分析は、赤血球は陰性判定 (0.004 %)、顆粒球は陽性判定(0.045 %)であり、幼若網赤血球は陽性判定 0.056 %)であった。

症例 3 の PNH 型血球分析は、赤血球は陰性判定 (0.002 %)、顆粒球は陽性判定 (0.071 %)であり、幼若網赤血球は陽性判定(0.027 %)であった。

## 6. 考察

健常人の末梢血液では、赤血球寿命は約 120 日間と言われ、赤血球は、絶えず崩壊(古い赤血球の脾臓等による処理)と新生赤血球の供給(骨髄による造血)によって恒常性が維持されている<sup>[4]</sup>。

一般的な全血法による PNH 型赤血球検出では、正常赤血球(120 日寿命)に対して、PNH 型血球は、体内循環中の溶血(寿命短縮)や輸血などの影響を受け低く計測されてしまう問題点がある<sup>[2][6][7][10]</sup>。

以前我々は、PNH 症例のフローサイトメトリー分析の網赤血球分画と赤血球分画の PNH 型血球比率の差から、PNH 型赤血球の平均寿命の推定を行った。この平均寿命は、症例ごとに異なり、また、同一症例でも変動があり、約 10 日～45 日と推定され、寿命の短縮が認められた<sup>[8][9]</sup>。

また、同症例<sup>[8]</sup>において、溶血の指標とされる血清 LD 値は、PNH 型血球数と短縮された平均赤血球寿命の値(= PNH 型赤血球数/ $\mu$ l  $\times$  (120 日 - 平均赤血球寿命の日数))と高い正の相関を示していた(データ示さず)。

今回、健常人による測定では、幼若網赤血球(CD71 陽性赤血球)は、全血中で平均 0.19 %と微量であったが、この幼若網赤血球は、骨髄から末梢血液中に放出されて間もない血球のため、溶血等による影響が少ないものと考え、幼若網赤血球を用いた PNH 型赤血球検出のフローサイトメトリーによる 3 カラー分析を考案した(TfR-RBC 測定法)。

また、PNH 疾患で認められる PNH 型血球は、AA や MDS の骨髄不全症候群の一部で、わずかな増加を認める症例があり、免疫抑制療法の効果や無病生存率等との関連性等で PNH 型血球を検出し、その保有率が重要視されるようになってきている。しかし、その PNH 型血球の測定値は、PNH 疾患よりもかなり低く、高感度な測定方法が求められる。以前は、GPI アンカー型膜蛋白の CD55 や CD59 などの単独抗体による測定であったが<sup>[2][10][11]</sup>、今回は、CD55 と CD59 のカクテル抗体を用いて、たとえば 0.003 %や 0.005 %のような微小な血球の検出ができるように精度を高めた。

今回、「赤血球陰性判定・顆粒球陽性判定」と乖離した症例において、TfR-RBC 測定法を行い、微量な PNH クローンを検出することができ、また、今回の検討で陽性判定の基準値を設定したことにより、白血球判定結果と同様に、赤血球系においても異常クローンの陽性判定を検証することができた。

これらのことにより、この幼若網赤血球による TfR-RBC 方法は、微量な PNH 型血球の産生状態を図ることができる優れた分析方法であると思われた。

## 7. まとめ

1、健常人末梢血におけるトランスフェリン受容体 (CD71)の発現についてフローサイトメトリーによ

表 1. PNH 型血球検出の乖離症例における赤血球・顆粒球・幼若網赤血球測定と比較

	赤血球	顆粒球	幼若網赤血球
症例 1	(-) 0.003%	(+) 0.026%	(+) 0.035%
症例 2	(-) 0.004%	(+) 0.045%	(+) 0.056%
症例 3	(-) 0.002%	(+) 0.071%	(+) 0.027%

る 2 カラー分析を行った。赤血球の CD71 陽性率は、0.19  $\pm$  0.11 %、網赤血球の CD71 陽性率は、14.9  $\pm$  6.2 %であった(n=30)。

2、幼若網赤血球(CD71陽性赤血球)における補体制御膜蛋白欠損 (CD55<sup>+</sup>CD59<sup>-</sup>) の PNH 型血球の検出について、フローサイトメトリーによる 3 カラー分析を考案した(TfR-RBC 測定法, CD55+CD59/CD71/CD45)。

また、この TfR-RBC 測定の陽性判定基準は、PNH 型血球が0.010 %以上と推定した。

3、PNH 型血球の判定結果が、全血法による赤血球測定(陰性)、顆粒球測定(陽性)と乖離した 3 症例(AA)について、TfR-RBC 測定法で PNH クローンの検出を行った。幼若網赤血球(CD71陽性赤血球)分析では、全例ともわずかな増加が検出され、陽性判定であった。この3症例は、赤血球系においても顆粒球測定と同様に異常クローンの増加が検証された。

## 謝辞

本報告の作成にあたり、筑波大学医学医療系 二宮治彦教授、千葉 滋教授、小原 直准教授をはじめ、ご指導を賜りました血液内科の皆様へ深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- [1] 右田俊介ら, CD71, CD 抗原ハンドブック 別冊医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社 (1999) 387-390.
- [2] S.Sato et al, Enhanced expression of CD71, transferrin receptor, on immature reticulocytes in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, *Int Jnl Lab Hem.* 32 (2010) e137-e143.
- [3] 佐藤晶子ら, 網赤血球検出のための蛍光試薬の比較検討, 筑波大学技術報告 28 (2008) 58-61.
- [4] 佐藤晶子ら, 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, *日本膜学会誌* 32(2007)147-154.
- [5] Sugimori C et al, Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia, *Blood* 107 (2006)1308-1314.
- [6] 佐藤晶子ら, 微量 PNH 型血球を保有する症例の病態解析—トランスフェリン CD71 陽性赤血球分析の有用性, *日本サイトメトリー学会機関誌* 25(suppl.) (2015) 43.

- [7] 佐藤晶子ら, トランスフェリン受容体(CD71)を用いたフローサイトメトリー測定による骨髓不全症候群のPNH赤血球産生率の推定, 日本検査血液学会雑誌 13(2012) s111.
- [8] 佐藤晶子ら, 網赤血球ゲーティングフローサイトメトリーによるPNH赤血球平均寿命の推定, 日本検査血液学会雑誌 8(2007) s58
- [9] H.Ninomiya et al, Shortened lifespan paroxysmal nocturnal haemoglobinuria-affected RBC estimated from differences in ratio of CD59-negative populations between reticulocytes and whole RBC, Int Jnl Lab Hem. 29 (2007) 1-6.
- [10] Shoko Sato et al, Reticulocyte-gated flow cytometric analysis of red blood cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Lab Hem. 12 (2006) 82-85.
- [11] 佐藤晶子, 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, 筑波大学技術報告 24 (2004) 10-14.

## Flow cytometric analysis of transferrin receptor (CD71) expression on healthy human red blood cells and reticulocytes, and detection of PNH type immature reticulocytes

Shoko Sato

Technical Service Office for Medical Sciences, University of Tsukuba,  
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

Two-color flow cytometric analysis was carried out on transferrin receptor (TfR,CD71) expression on healthy human red blood cells (RBC) and reticulocytes. The CD71-positive rate in RBC was  $0.19 \pm 0.11\%$ , and the CD71 positive rate in reticulocytes was  $14.9 \pm 6.2\%$  (n=30).

Moreover, in order to detect PNH type cells (CD55<sup>-</sup> CD59<sup>-</sup>), three-color flow cytometric analysis using CD71-positive RBC (immature reticulocytes) was designed (TfR-RBC measurement method, CD55+CD59/CD71/CD45).

In three aplastic anemia patients studied, RBC measurement (CD55+CD59/CD235a) could not detect PNH type cells, but this TfR-RBC measurement could detect slight increases in PNH type immature reticulocytes. This result was agreed with obtained by granulocytes measurement.

This TfR-RBC measurement method is considered to have high sensitivity detection of PNH type cells.

**Keywords:** Transferrin receptor (CD71), Complement-regulatory membrane proteins (CD55,CD59), Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH), Aplastic anemia (AA)