

日本医療検査科学会 56回大会
第14回血液検査機器技術セミナー
2024.10.6



FCM検査用検体の前処理や細胞浮遊液作製の実際と 注意すべきポイント

東京大学医学部附属病院 検査部
高橋 千由紀

一般社団法人日本医療検査科学会
COI (利益相反)開示
筆頭発表者名: 高橋 千由紀

**演題発表に関連し、開示すべきCOI関係に
ある企業等はありません。**

本日の内容

- **FCMの実際**
- **当院の検体処理方法**

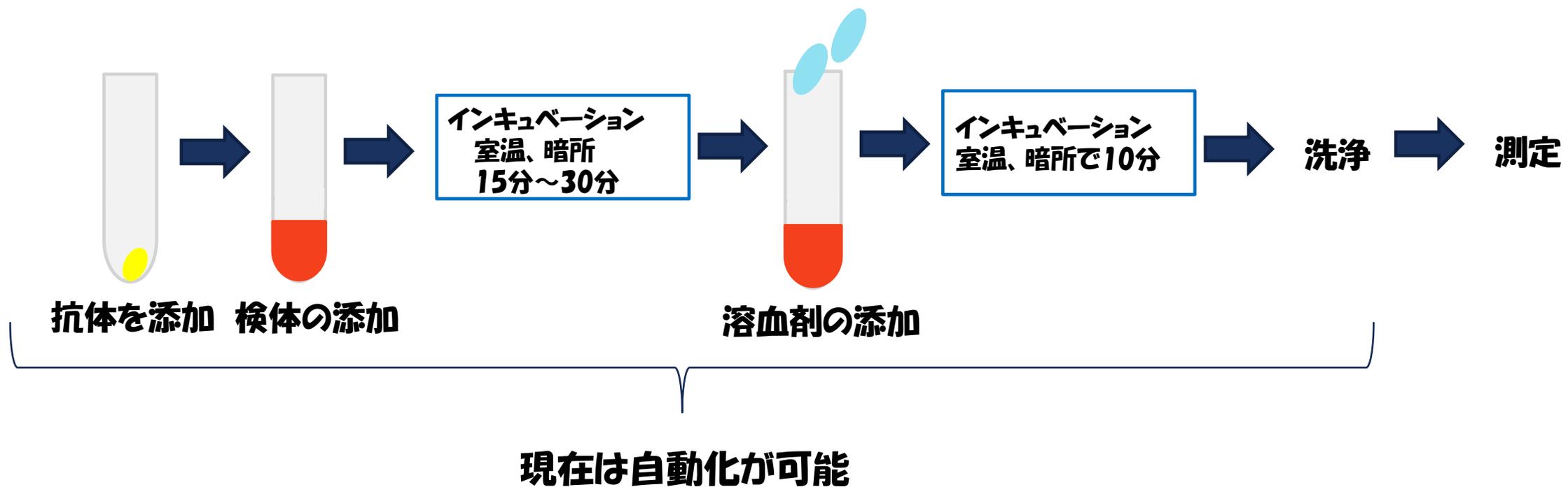
FCM検査に提出される検査材料

- 末梢血液
- 骨髓液
- リンパ節・組織片
- 体腔液(胸水、腹水、心嚢液など)
- 気管支肺胞洗淨液
- 硝子体液
- 脳脊髄液

FCM検査に提出される検査材料と抗凝固剤・保存法

検体	抗凝固剤	保存法など
末梢血液	EDTA ヘパリン ACD-A	・細胞内サイトカイン測定など細胞の機能解析ではヘパリンを使用
骨髓血	EDTA ヘパリン ACD-A	・同時に染色体分析が行われる場合にはヘパリンを使用 ・同時にPCR法による遺伝子検査を行う場合にはEDTAを使用 ・RPMI1640などの培養液も使用
リンパ節・組織片		・RPMI1640などの培養液で細胞浮遊液として保存
体腔液	ヘパリン	・遠心後上清を取り除きRPMI1640などの培養液で浮遊させて保存
気管支肺胞洗浄液 硝子体液		・末梢血が多量に混入しなければ抗凝固剤は不要 ・遠心後上清を取り除きRPMI1640などの培養液で浮遊させて保存
脳脊髄液		・末梢血が多量に混入しなければ抗凝固剤は不要 ・採取後、細胞変性が起こるためできるだけ速やかに測定

FCM検査の実際

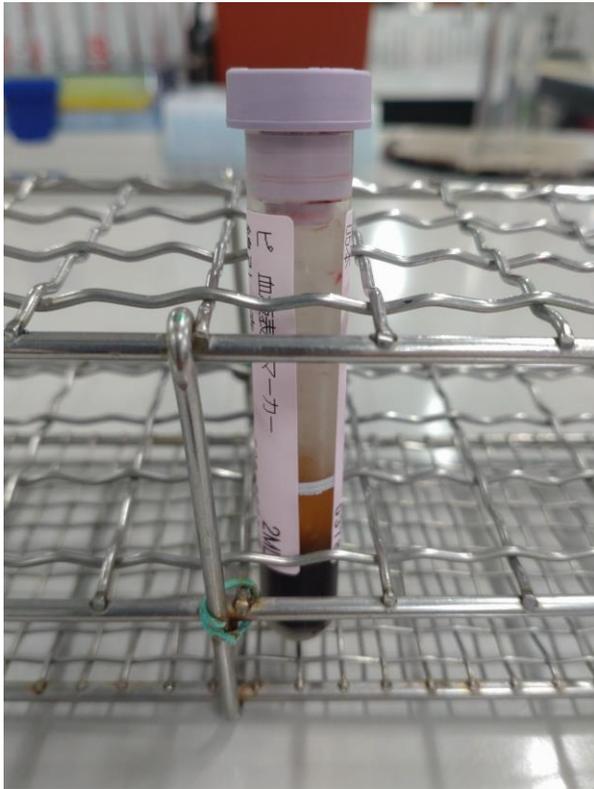


本日の内容

➤ FCMの実際

➤ **当院の検体処理方法**

検体の処理方法①-1(末梢血液)



- EDTA-2K加血を使用
- 市販の抗体は $100\mu\text{L}$ の血液を染色するのに適した濃度
⇒ おおよその細胞数が **$10,000/\mu\text{L}$** になるように調整
- 白血球数が $1,000\sim 10,000/\mu\text{L}$ 程度であればそのまま使用
⇒ 上記以上の場合にはPBSなどで希釈し細胞数を調整

【濃度勾配比重遠心細胞分離法(比重遠心分離法)】

- ・リンパ球比重分離液(比重1.077)を使用して単核球層を分離する方法
- ・正確な比率や絶対数の測定が求められる検査においてはあまり推奨されない

検体の処理方法①-2(末梢血液)

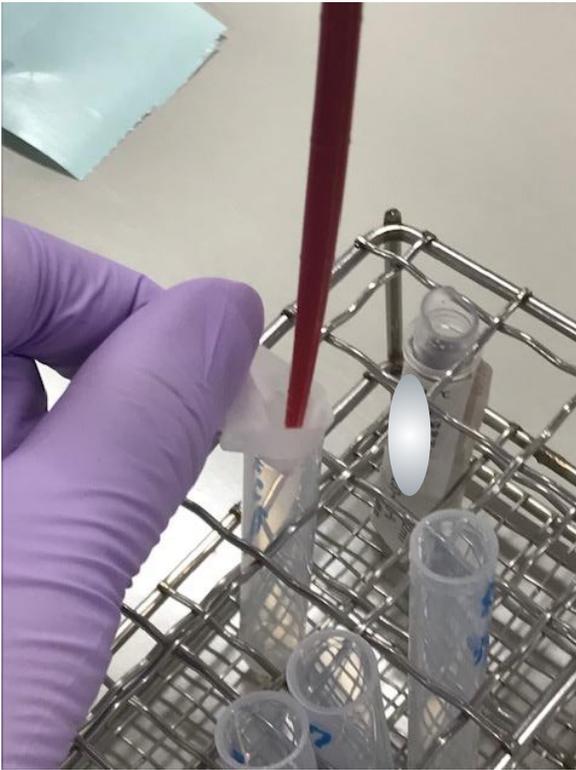
➤ リンパ球サブセット解析を目的とした場合、

18℃～22℃で保存し、24時間以内に測定することが望ましい

(JCCLSのリンパ球サブセット検査に関するガイドラインより)

⇒ 当院での保存方法:4℃にて保存(RPMIなどを添加して保存するのが望ましい)

検体の処理方法②(骨髓液)



ナイロンメッシュを折いたたんで
漏斗状にして使用

①有核細胞数を確認

②骨髓液をPBSで希釈

③40～50 μm のナイロンメッシュでろ過

④PBSで1回洗浄後、細胞数を5,000～10,000/ μL に調整

検体の処理方法③-1(組織片)

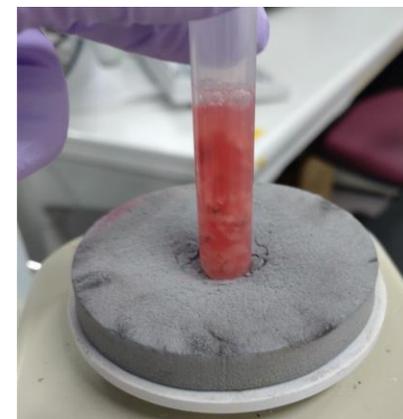
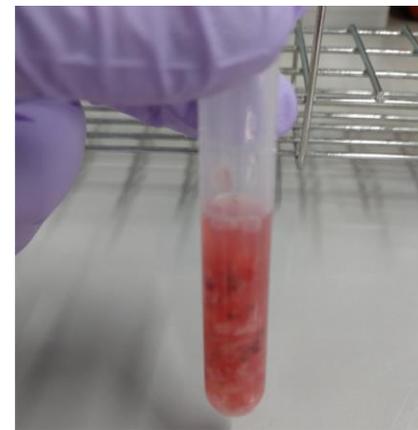


使用器具

- ・ピンセット
- ・シャーレ
- ・メス



①組織片をメスで切り刻み細かくする

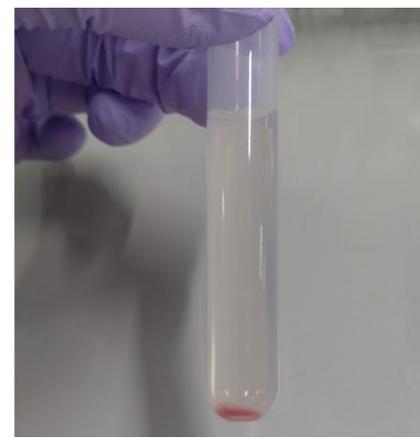
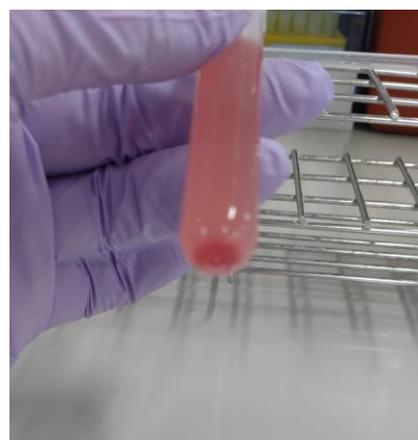
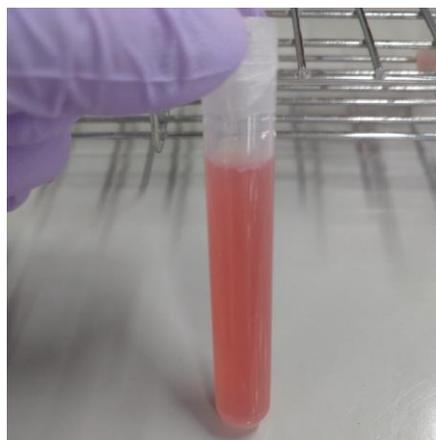


②チューブに入れPBSを加え、ボルテックスで攪拌

検体の処理方法③-2(組織片)

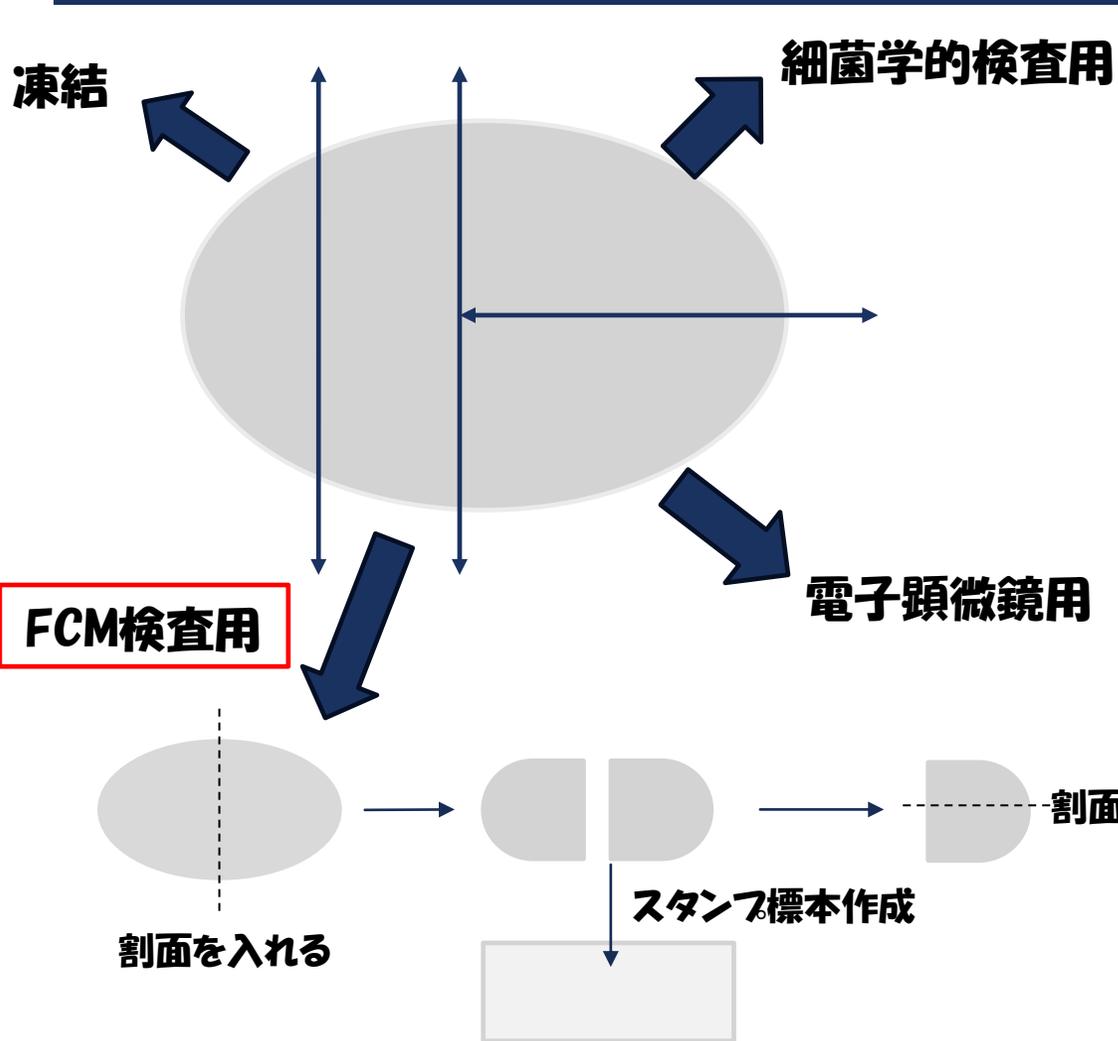


③ナイロンメッシュでろ過



④PBSを加えて2回洗浄し、細胞数を5,000~10,000/ μ Lに調整
(細胞数が少ない場合は担当医に連絡をして検査項目を相談)

検体の処理方法③-3(組織片)



提出された組織片は細胞浮遊液にする前に
スタンプ標本作製しMG染色

⇒ 組織の細胞数や細胞形態を観察し、
gatingの参考とする



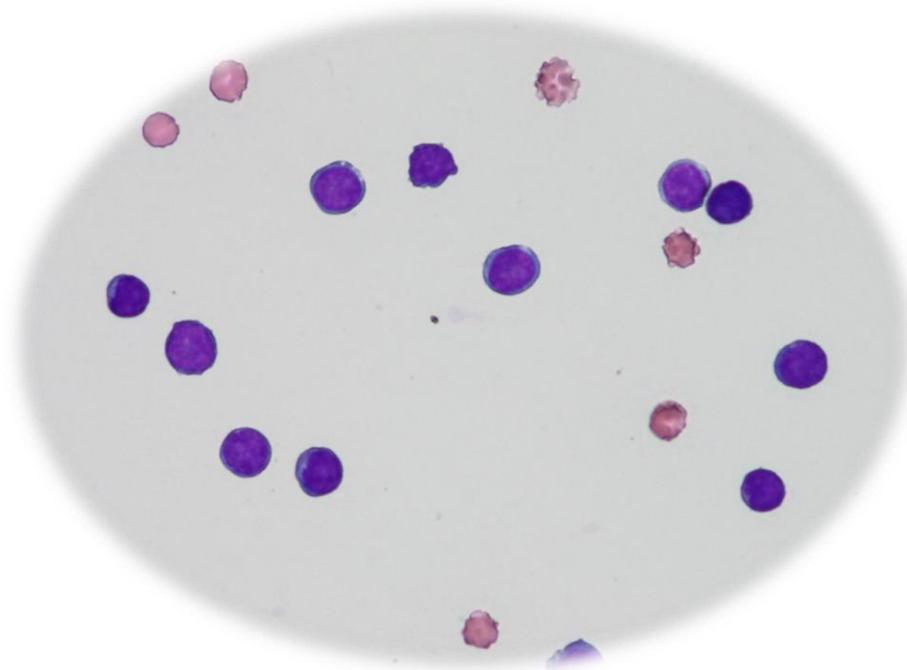
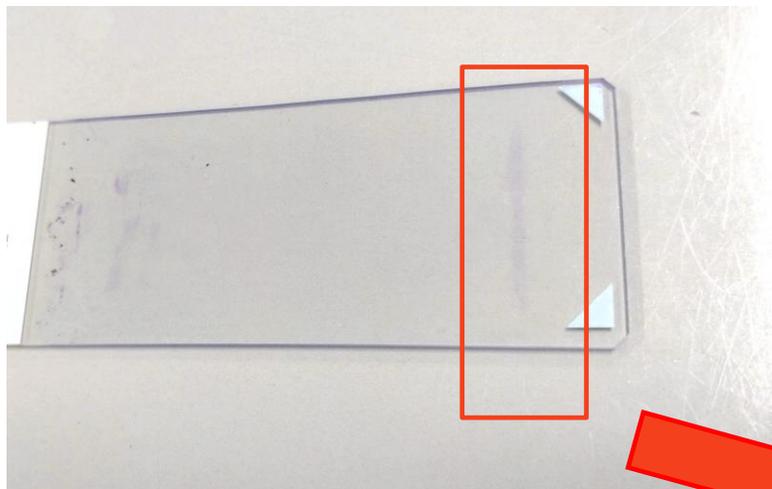
検体の処理方法④-1(体腔液)



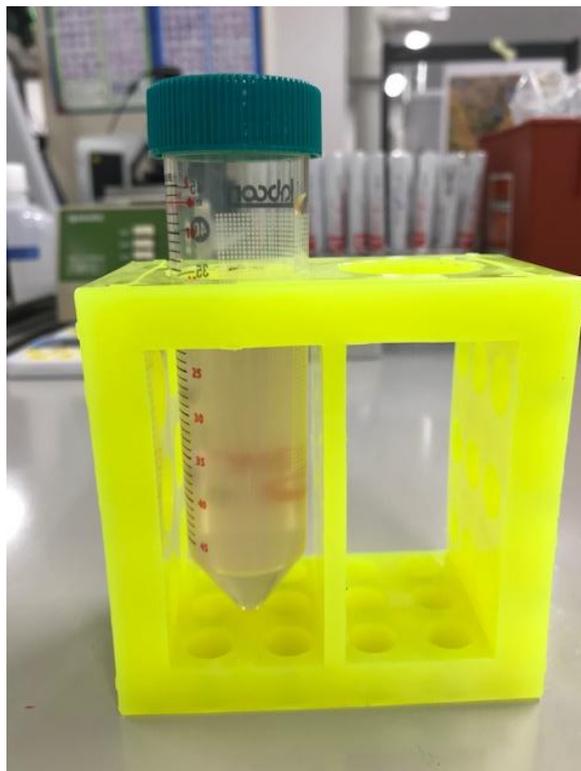
- ① ナイロンメッシュでろ過
- ② 1500rpm、5分遠心
- ③ 上清を吸引後PBSで再浮遊し、細胞数を確認
- ④ リンパ腫が疑われる場合は、PBSで2回洗浄

検体の処理方法④-2(体腔液)

細胞形態観察のため、
ウエッジ標本(またはサイトスピン標本)を作製しMG染色

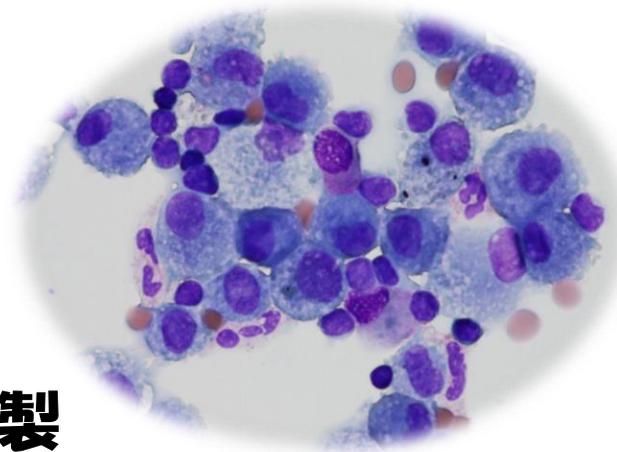


検体の処理方法⑤-1(気管支肺胞洗浄液)



【呼吸器内科の場合】

- ①全量確認後、2枚重ねのガーゼでろ過
- ②1500rpm、5分遠心
- ③培養液で5mLに浮遊する
- ④細胞数の測定、サイトスピン標本の作製



【呼吸器内科以外の診療科の場合】

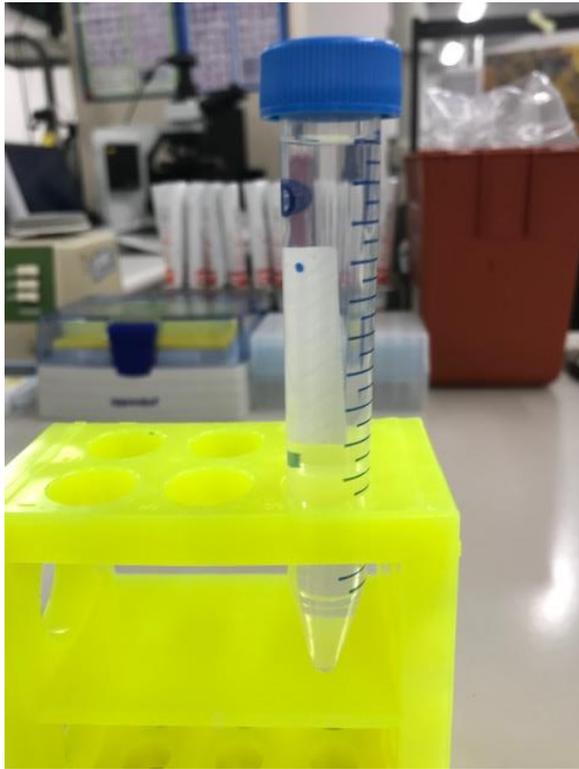
体腔液と同様の検体処理をおこなう

検体の処理方法⑤-2(気管支肺胞洗浄液)



- BALFのFCMでは肺炎やサルコイドーシスなどの鑑別を目的としてリンパ球サブセット(CD3/CD4、CD3/CD8)のみ依頼されることが多い
- 胸部異常陰影の精査目的の場合、悪性リンパ腫(特にMALTリンパ腫が多い)も鑑別にあがるため、必要に応じてB細胞系マーカーも測定するのが望ましい
 - ⇒ 当院ではCD3/CD19も一緒に検査
 - (BALFにBリンパ球が多く存在することが異常所見であるため)

検体の処理方法⑥(硝子体液)



- ① ナイロンメッシュでろ過
- ② 1500rpm、5分遠心
- ③ 上清を吸引後、PBSで500 μ Lに再浮遊

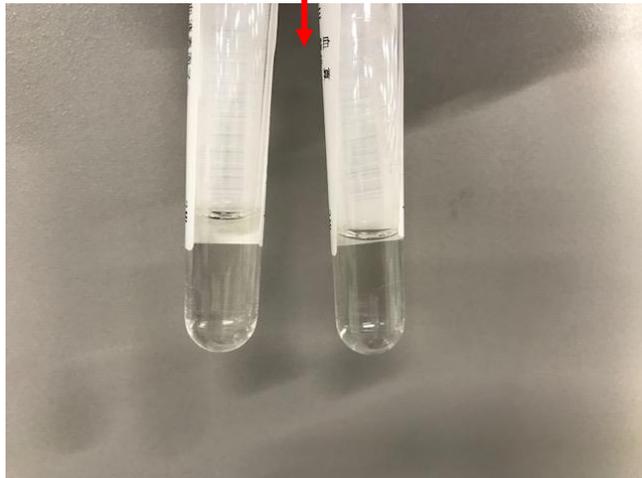


硝子体液は提出される量も少なく(約10mL)、細胞数も少ないため、眼科との取り決めで **CD3/CD19、CD4/CD8、CD19/CD20、Kappa/Lambda**のみとしている
特殊な検査材料で検査をおこなう場合には、あらかじめ診療科と取り決めをおこなっておくことも必要である

検体の処理方法⑦(脳脊髄液)



遠心



①脳脊髄液の細胞数を確認

⇒細胞数と検体量からどこまで検査をおこなうか

担当医に確認

(詳細は次ページスライド)

②細胞数が少ない場合や検体量が多い場合は
1500rpm、5分遠心

③上清を吸引して沈査を使用

検体の処理方法⑦(脳脊髄液)

髄液細胞数・髄液生化学

5個/ μ L以上

5個/ μ L以下

一部サイトスピンへ

全量を濃縮しサイトスピンへ

細胞の鑑別

細胞の鑑別

鑑別可能

鑑別不能

報告

病型に応じてFCM
遺伝子検査、FISH検査

報告



細胞数が少なければ、担当医と相談しFCMを中止しサイトスピン標本の作製のみとすることもある
細胞数が少なくてもFCMを実施することもあるため、担当医の指示を確認することも重要

まとめ

- 細胞表面抗原解析(FCM)検査は主に末梢血液、骨髄液、リンパ節を用いることが多い
- その他には胸水・腹水・心嚢液などの体腔液、気管支肺胞洗浄液、硝子体液、脳脊髄液などを用いることもある
- 特に脳脊髄液や硝子体液などは採取量や細胞数が少ない場合が多く、限られた細胞に対して使用する抗体の選択が重要である
- 検体の処理を正確におこなうことによって十分な細胞数を得ることができ、正確な測定をおこなうことができる