

2024年10月6日(日)  
第56回日本医療検査科学会学術集会  
第14回血液検査機器技術セミナー

ここまで進歩したフローサイトメトリー検査

# FCM検査マルチカラー解析



滋賀医科大学医学部附属病院  
SHIGA UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCE HOSPITAL

検査部 中西 良太

# 第56回日本医療検査科学会学術集会

## 第14回血液検査機器技術セミナー

COI（利益相反）の開示

筆頭発表者名： 中西 良太

本発表演題に関連して

開示すべきCOI関係にある企業等はありません。

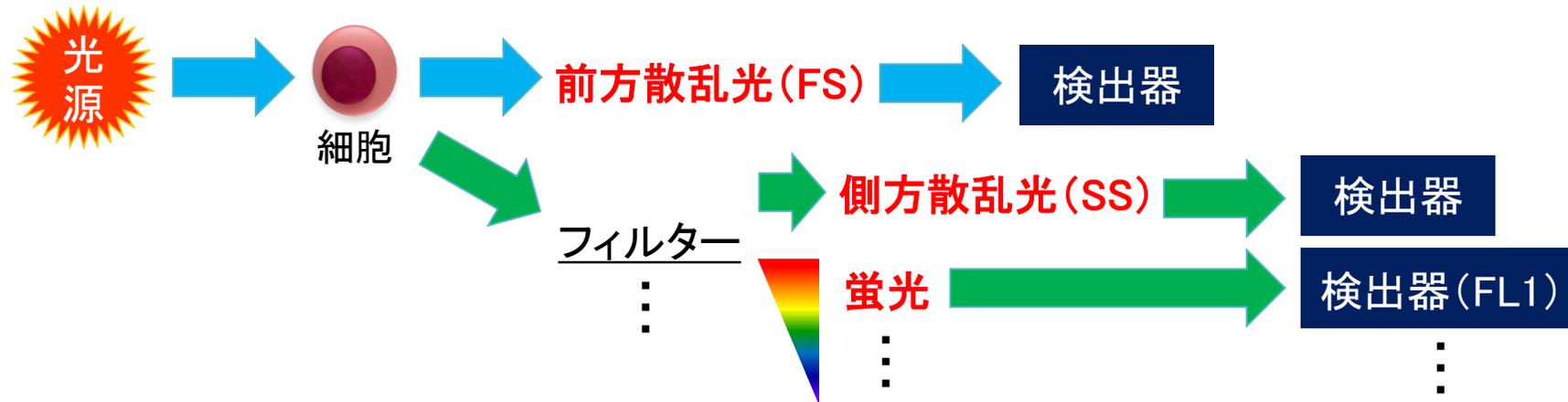
# はじめに

～ マルチカラー解析を行う前に知っておくこと ～

# フローサイトメトリー(FCM)の原理

## ● 光学系(光学検出系)

細胞などの粒子に的確にレーザー光を照射し、レーザー光がヒットした細胞から発せられる散乱光や蛍光強度を粒子単位で検出する



1つのレーザー光(488nm)では5種類の蛍光色素を検出可能とされる。  
レーザー数が増えることで、測定可能な蛍光色素の数も増加する。

# マルチカラーFCM測定を行うために必要なもの

- フローサイトメーター

搭載レーザー数と検出器数で、測定可能な蛍光色素数が決まる

(臨床用)

搭載レーザー数	検出器数	蛍光色素数
1レーザー	~5 カラー	1~5 カラー
2レーザー	~8 カラー	1~8 カラー
3レーザー	~13 カラー	1~13 カラー

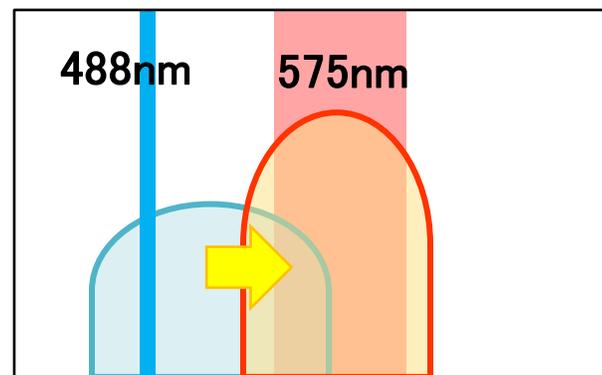
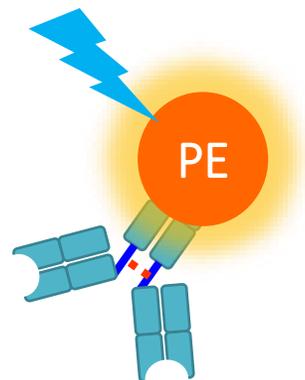
# マルチカラーFCM測定を行うために必要なもの

- 抗体試薬

  - 蛍光色素

    - 励起光を吸収し、蛍光を発する

    - FITC**, **PE**, **APC** etc.

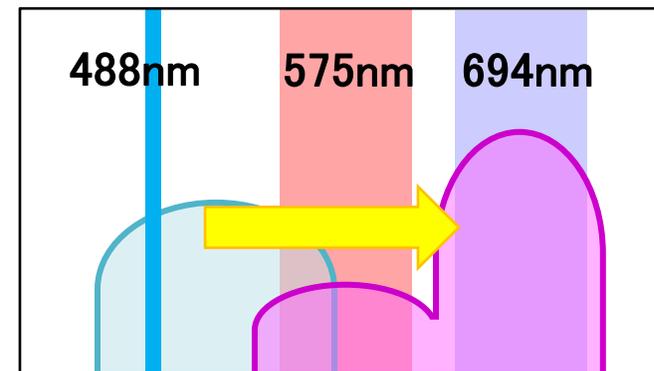
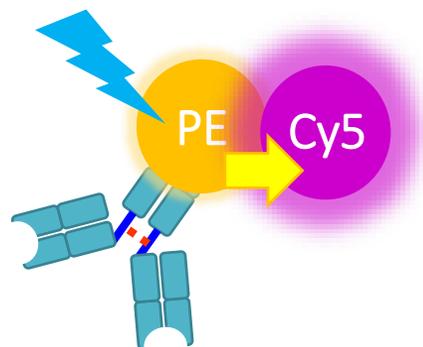




  - タンデム蛍光色素

    - 蛍光色素が励起光を吸収し、結合したタンデム色素が蛍光を発する

    - ECD** (PE - TexasRed), **PC5** (PE - Cy5) etc.



# 血液疾患におけるFCM検査の位置づけ

## ● 白血病における造血器悪性腫瘍検査

- ① 芽球の免疫学的形質を調べ、**病型分類および診断**の一助とする。
- ② 治療のモニタリングとしての**残存腫瘍の有無**を調べる。

## 白血病の発見および診断に必要な検査等



# 血液疾患におけるFCM検査の位置づけ

## ● 悪性リンパ腫における造血器悪性腫瘍検査

- ① 腫瘍の組織を直接採取し、**腫瘍性の有無**を判断する。
- ② 悪性リンパ腫細胞の形質を調べて**分類および診断**の一助とする。
- ③ 骨髄や末梢血などへの**浸潤の有無**を調べる。

## 悪性リンパ腫におけるFCM検査の特徴

得意	苦手
腫瘍性の判断	組織構造
細胞の免疫形質	分布領域
浸潤の有無	浸潤範囲
細胞割合（※注）	細胞の内部構造

※注: 正確な絶対数はビーズ等が必要

# 悪性リンパ腫の診断に必要な検査

- スクリーニング検査

診察所見、尿検査、血液検査

- 病型診断および悪性度評価のための検査

細胞形態：血液・骨髄塗抹標本、病理組織学検査

免疫形質：フローサイトメリー検査、免疫染色

染色体・遺伝子：サザンブロット、PCR、染色体分析、FISH

- 病型分類のための検査

骨髄穿刺、画像検査（MRI、超音波、内視鏡、PET-CT etc.）

- 治療・再発のモニタリング検査

血液検査、画像検査 etc.

# マルチカラーFCMの実際

～ なぜマルチカラーFCMにするのか？ ～

# マルチカラーFCMの利点

- 検査所要時間の短縮と効率化

  - 検体処理 & 測定時間の短縮

  - ランニングコストの削減(?)

- FCMの精度向上

  - 解析方法の多様化

  - 腫瘍細胞の特定が容易に可能

# 検査所要時間の短縮と効率化

## 急性白血病を疑う場合

(当院の例)

3 color FCM

検体最低必要量

1,800  $\mu$ L

検査可能な抗原数

37 抗原

本数

21 tube

測定所要時間

105 分  
(5分/tube)

消耗品

Tube数分必要

Tube	抗体パネル		
1	IgG1	IgG1	CD45
2	-	CD14	CD45
3	CD3	CD19	CD45
4	CD4	CD8	CD45
5	CD57	CD16	CD45
6	CD3	CD56	CD45
7	CD15	CD11b	CD45
8	CD20	CD38	CD45
9	CD10	HLA-DR	CD45
10	CD7	CD2	CD45
11	CD5	CD25	CD45
12	CD64	CD13	CD45
13	CD34	CD33	CD45
14	CD22	CD23	CD45
15	CD61	CD117	CD45
16	CD36	CD235a	CD45
17	CD41	-	CD45
18	MPO	cyCD3	CD45
19	TdT	CD19	CD45
20	cyCD22	cyCD79a	CD45
21	cyIgM	CD19	CD45

# 検査所要時間の短縮と効率化

Tube	抗体パネル									
1	TdT	MPO	cyCD3	cyCD79a	CD34	cyIgM	cyCD22	CD19	-	CD45
2	CD7	CD11b	CD3	CD14	CD34	CD13	CD4	CD19	CD8	CD45
3	CD2	CD10	HLA-DR	CD33	CD34	CD123	CD56	CD19	CD16	CD45
4	CD41	NG2	CD117	CD15	CD34	-	CD36	CD64	CD38	CD45
5	CD235a	CD105	-	CD61	CD34	CD25	CD36	CD71	-	CD45
6	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	CD45

(当院の例)

3 color FCM

10 color FCM

検体最低必要量

1,800  $\mu$ L

550  $\mu$ L

検査可能な抗原数

37 抗原

35 抗原

本数

21 tube

6 tube

測定所要時間

105 分  
(5分/tube)

30 分  
(5分/tube)

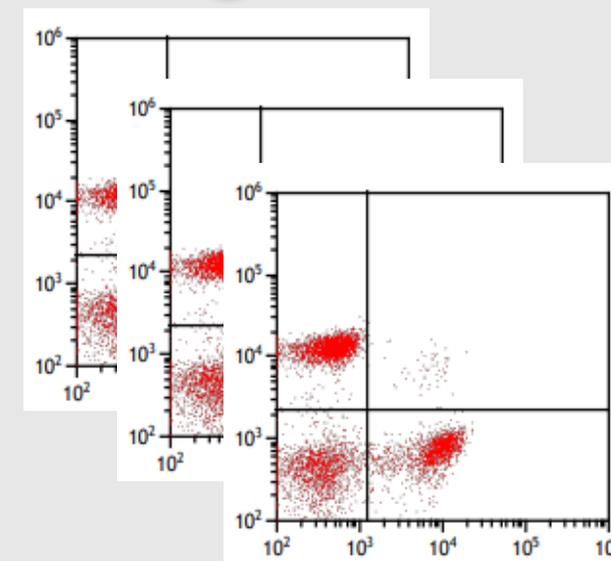
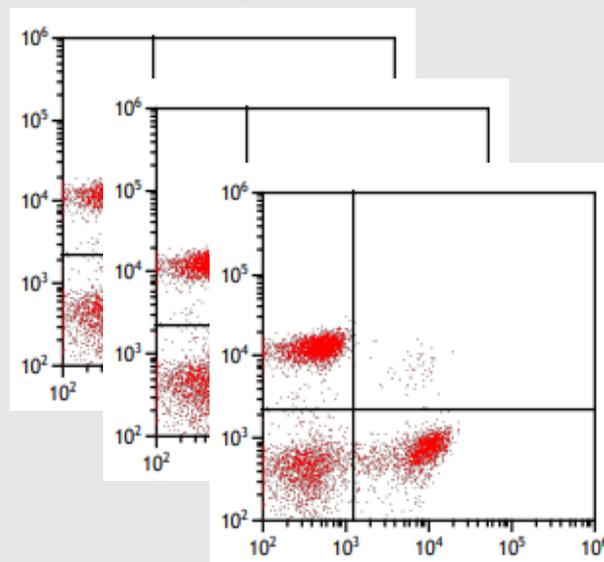
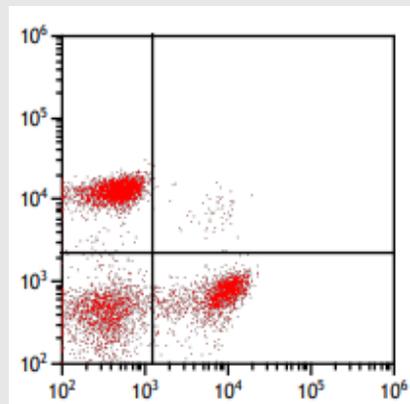
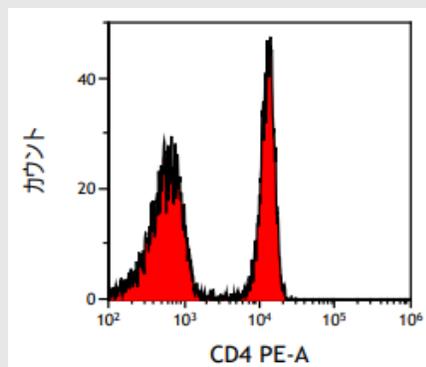
消耗品

Tube数分必要

同程度の抗原数を、  
検体量も少なく  
測定時間も短く  
検査できる！

# マルチカラーになると

	Single color	2 color	3 color	5 color	10 color
最大抗体数	1 種類	2 種類	3 種類	5 種類	10 種類
解析パターン数	1 通り	1 通り	3 通り	10 通り	45 通り



■  
■  
■

# 解析パネルの必要性

「パネル」 = 目的とする抗原と検出器(蛍光色素)をあらかじめ決めておくこと  
疾患毎に設定することで、測定や解析を効率化できる

レーザー光	青色(488 nm)					赤色(638 nm)			紫色(405 nm)	
検出器	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
蛍光色素の例	FITC	PE	PE-TexasRed (ECD)	PE-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-AlexaFluor 700	APC-AlexaFluor 750	Pacific Blue	Krome Orange
抗体										

色素と抗体試薬の組み合わせは自由

蛍光色素、抗原、描出したい組み合わせ・・・ など考えることは沢山！

# 急性白血病の系統決定に必要なマーカー

## ● BCP-ALL

cy : cytoplasmic  
sm : surface membrane

	TdT	CD34	HLA-DR	cyCD79a	CD19	CD10	cyIgM	smIgM	CD20
Early B-precursor ALL	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Common ALL	+	-	+	+	+	+	-	-	+/-
Pre-B-ALL	+	-	+	+	+	+	+	-	+
Mature B-ALL	-	-	+	+	+	+/-	+/-	+	+

## ● T-ALL

	TdT	CD34	CD7	cyCD3	CD5	CD1a	smCD3	CD2	CD4	CD8
Early T-precursor ALL	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Pre T-ALL	+	-	+	+	+	-	-	+/-	-	+/-
Cortical T-ALL	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Mature T-ALL	-	-	+	+	+	-	+	+	+/-	+/-

# 急性白血病の系統決定に必要なマーカー

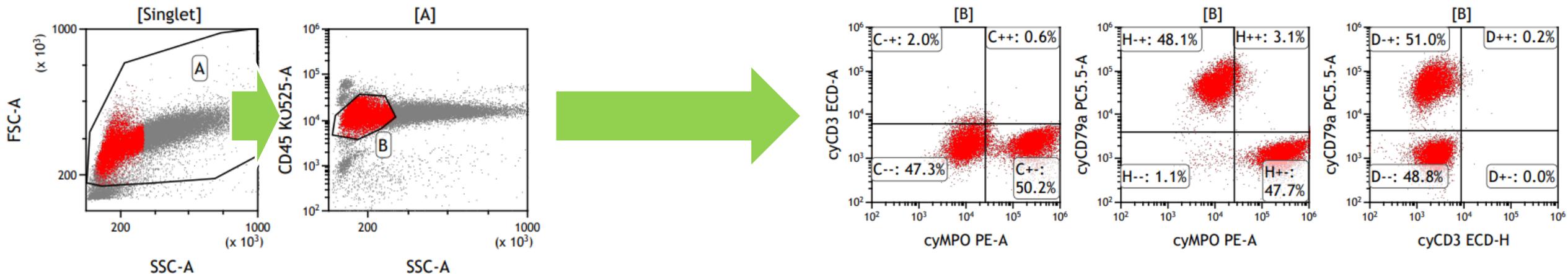
- AML

分化・成熟段階	細胞表面または細胞質内マーカー	FAB分類
骨髓前駆細胞	CD34, CD117, HLA-DR	<b>M0</b> , M1, M3, M4
骨髓系細胞	CD33, CD13	M1, M2, M3, M4
顆粒球系細胞	CD65, MPO	
単球系細胞 共通 成熟	CD36, CD64 CD11b, CD14	<b>M5a</b> , M5b <b>M5b</b>
巨核球系細胞	CD41, CD61	<b>M7</b>
赤芽球系細胞	CD235a, CD36	<b>M6</b>

MPO : myeloperoxidase

# 腫瘍細胞を特定して解析することが可能

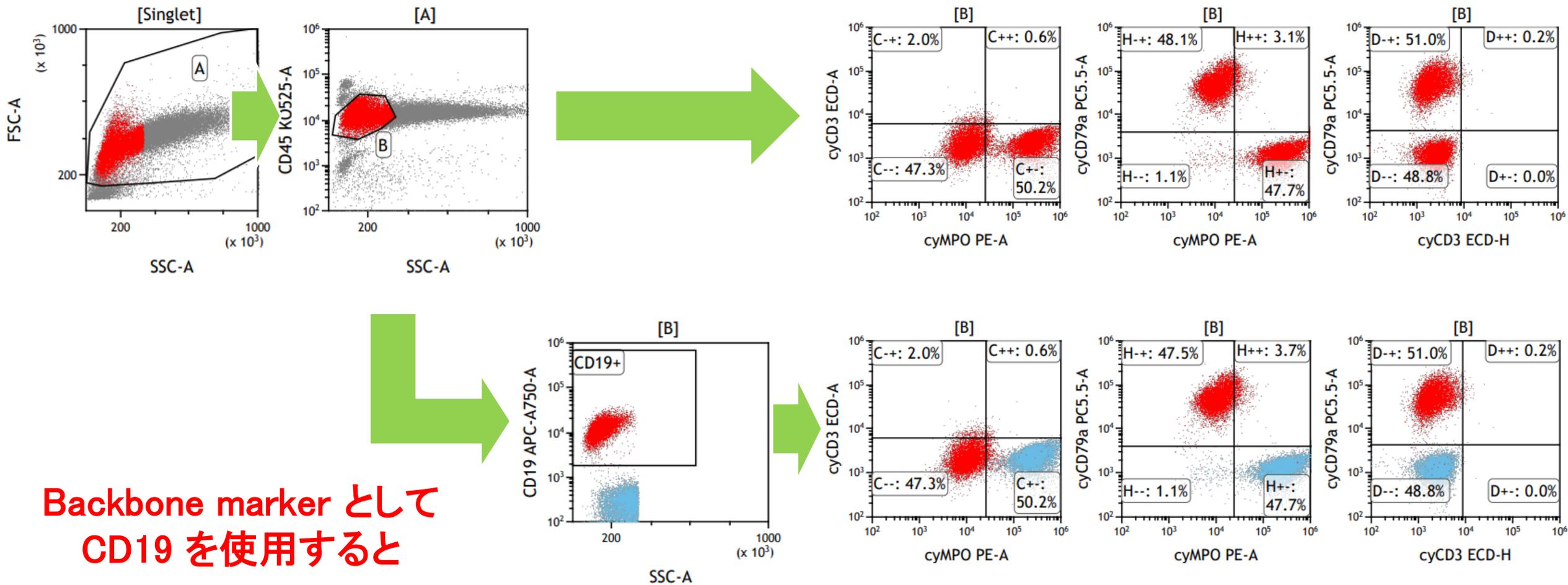
## ● BCP-ALL



腫瘍細胞はどっち？

# 腫瘍細胞を特定して解析することが可能

## ● BCP-ALL



Backbone marker として  
CD19 を使用すると

腫瘍細胞の形質が一目でわかる！

# 白血病の遺伝子異常に関連したマーカー

病型	遺伝子変異	細胞表面または細胞質内マーカー
AML	<i>RUNX1::RUNX1T1</i>	CD19, cyCD79a, ( <i>KIT</i> 遺伝子変異あり ; CD56 <sup>+</sup> )
	<i>CBFB::MYH11</i>	CD2
	<i>PML::RARA</i>	CD34 <sup>-</sup> , HLA-DR <sup>-</sup> , (microgranular type ; CD2 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> )
	<i>KMT2A(MLL)</i> 遺伝子	NG2
BCP-ALL	<i>BCR::ABL1</i>	CD13, CD33, CD25, CD66c
	<i>BCR::ABL1</i> (Ph)-like	CRLF2
	<i>KMT2A(MLL)</i> 遺伝子	CD15, NG2

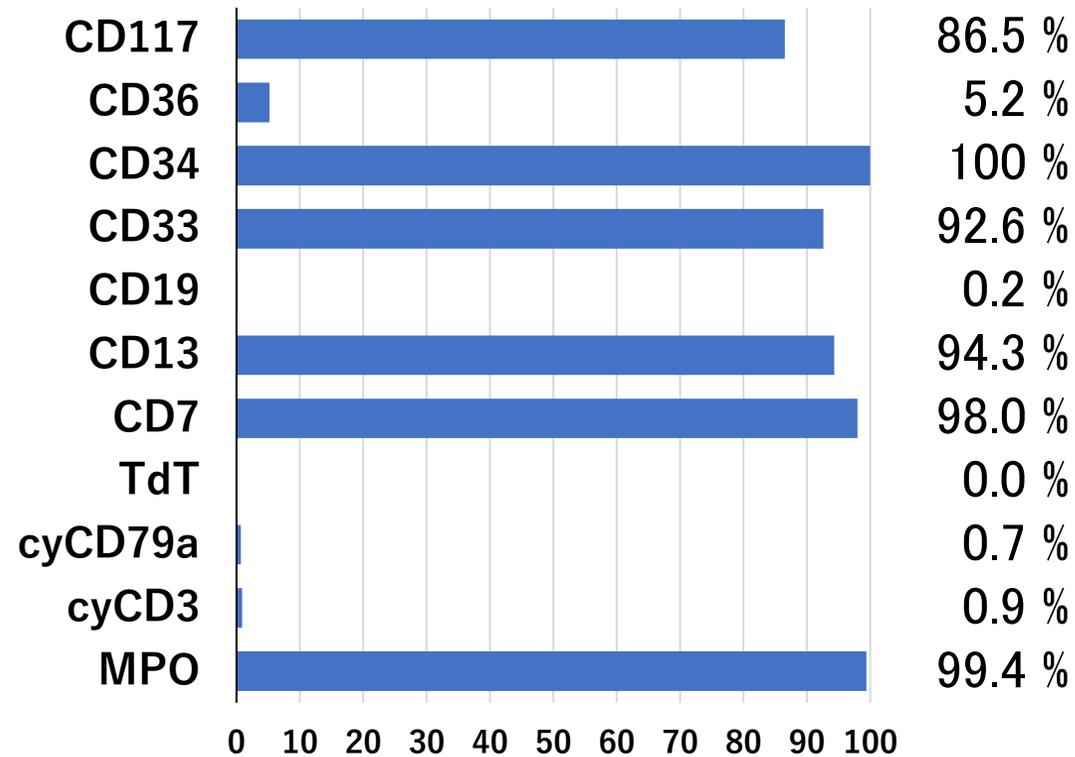
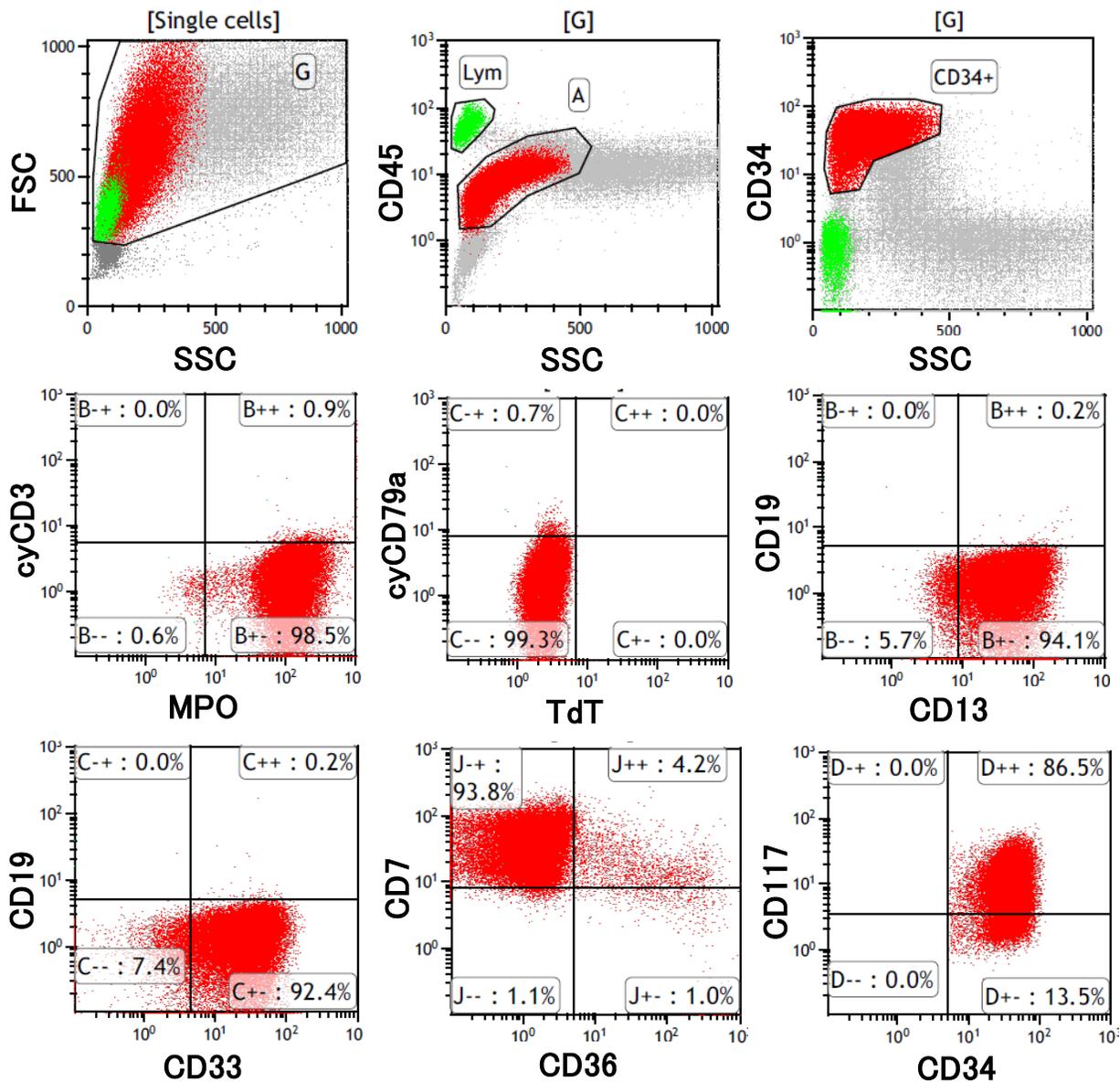
参考および一部改変: WHO血液腫瘍分類 改訂版~WHO分類2017をうまく活用するために~  
株式会社 医薬ジャーナル社, 2018年

マルチカラーFCMで芽球様細胞にゲートを絞ることで、より精度が高くなる  
フローサイトメトリー検査結果から、遺伝子変異の予測が可能となる

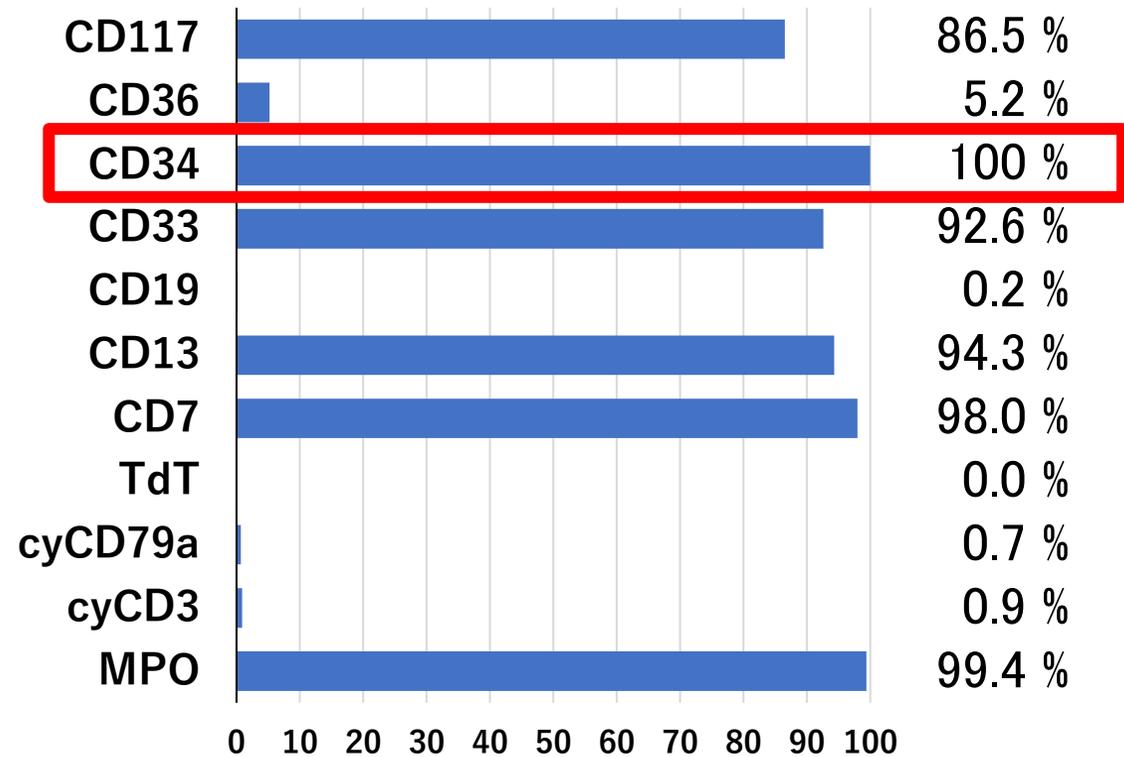
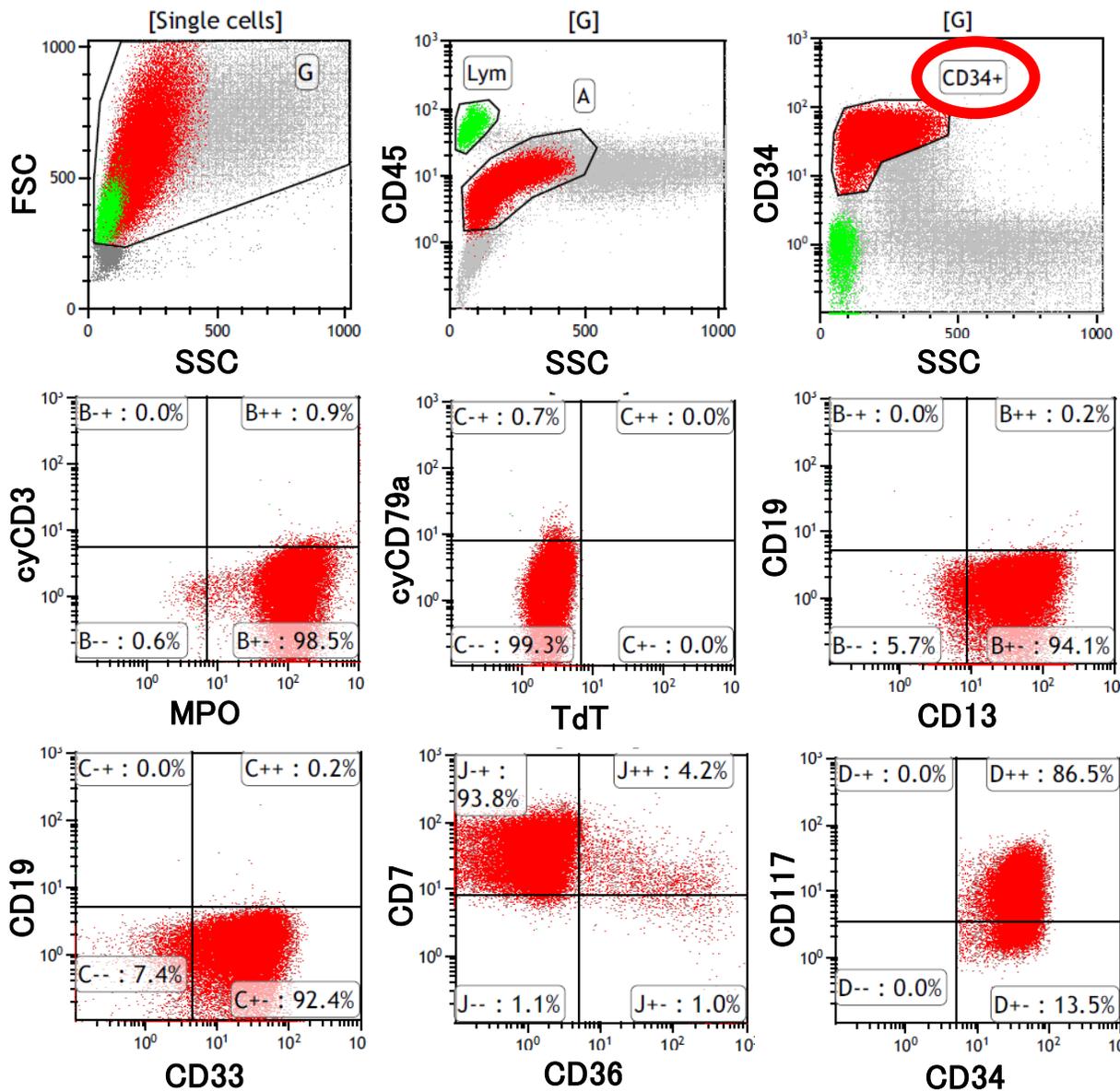
# 解析の実際

～ マルチカラー解析を行う前に ～

# これからマルチカラーFCMを始める皆さんへ



# これからマルチカラーFCMを始める皆さんへ



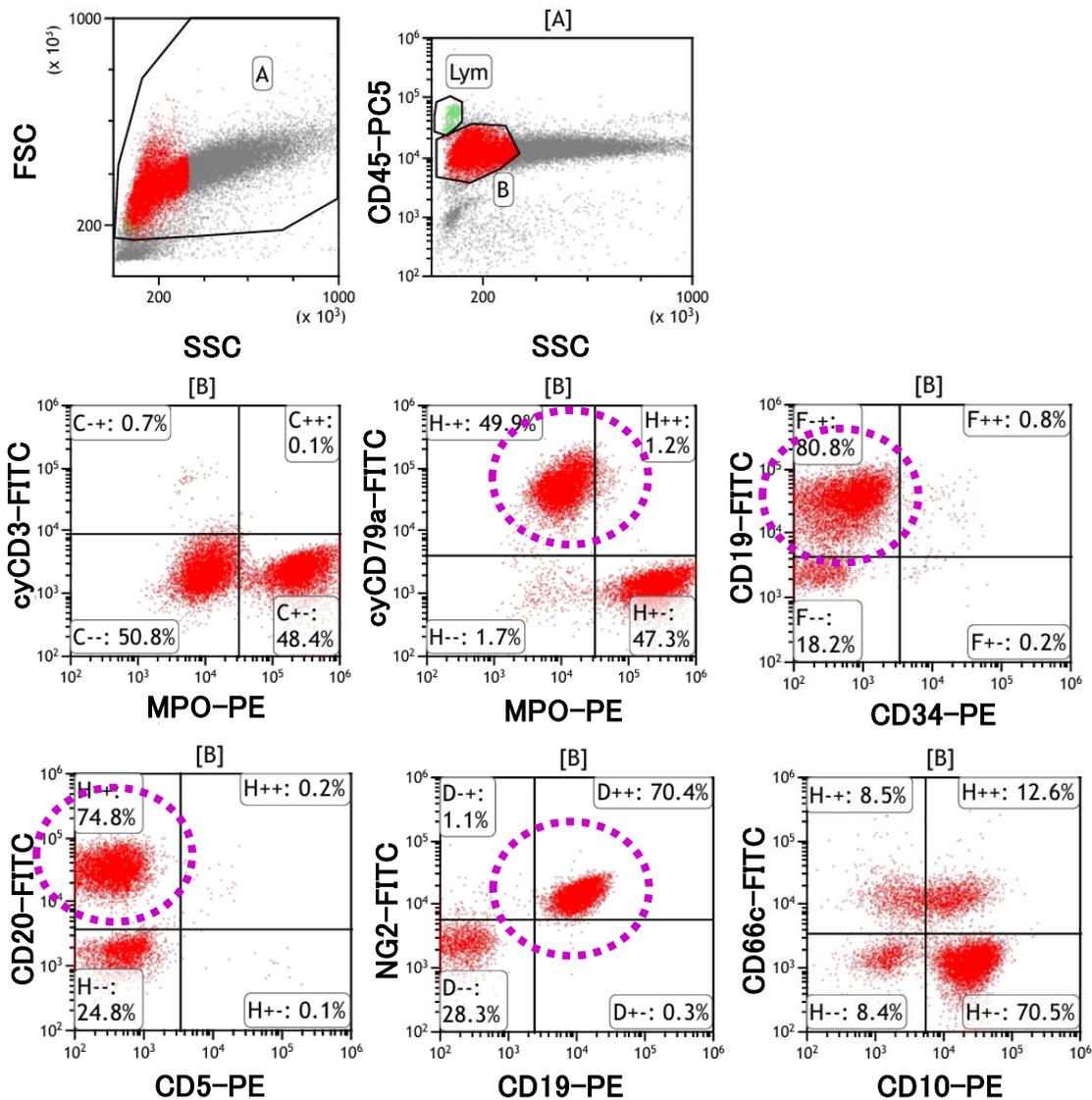
どの細胞を見ているのか？  
 全体の割合なのか、特定の集団内での割合なのか？  
 発現量はどのぐらいか？

# 解析の実際

～ マルチカラー解析の有用性～

# BCP-ALL

## 3 color 解析(風)



CD45dim+領域にB細胞性の異常細胞が増加

→ B細胞性ALL

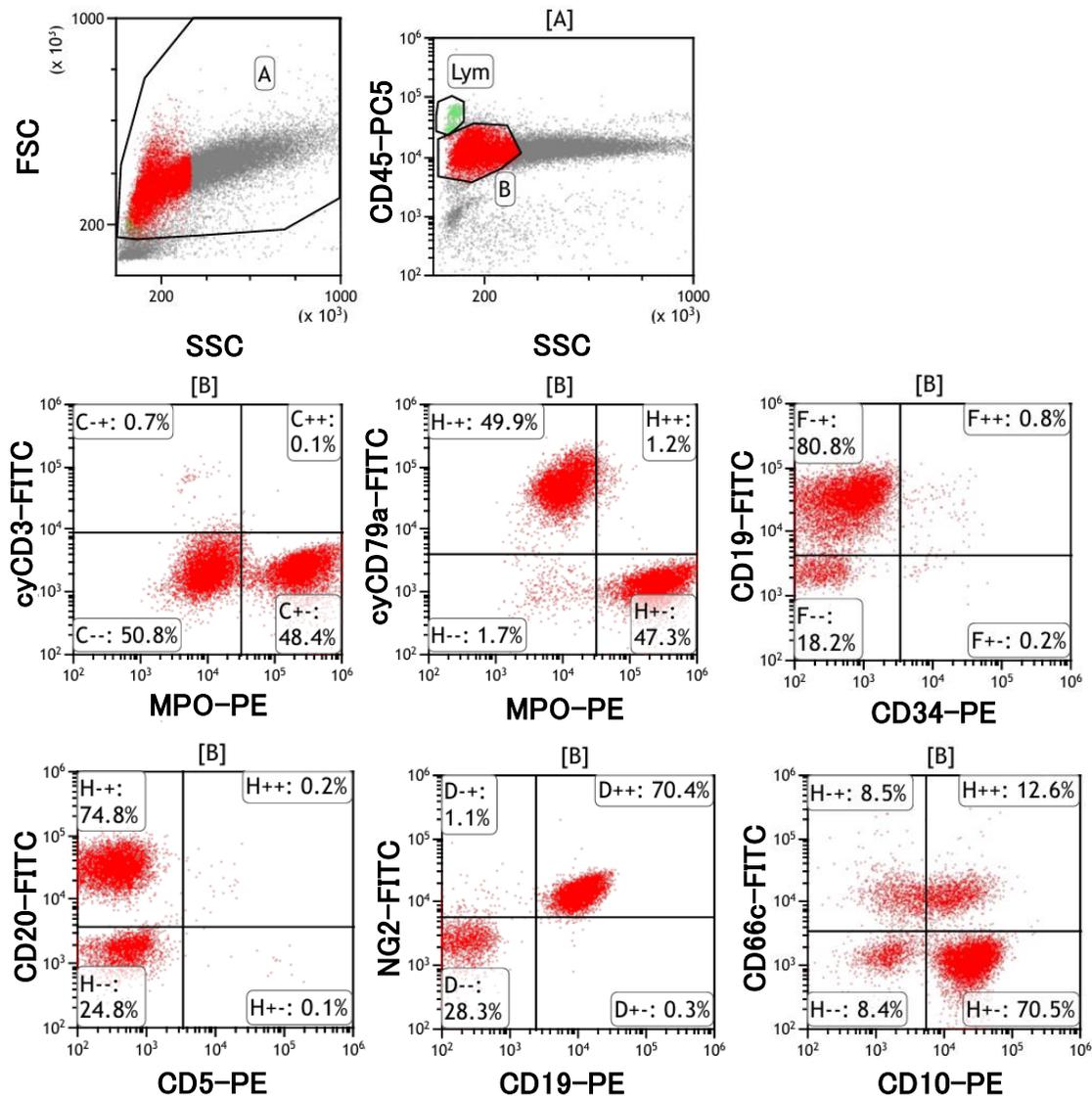
CD10, CD19, CD20, NG2 陽性の集団は陽性率が70%以上 (足すと100%を超える)

→ 同一細胞集団が“存在する”

----- ここまでは 3 colorでも可能 -----

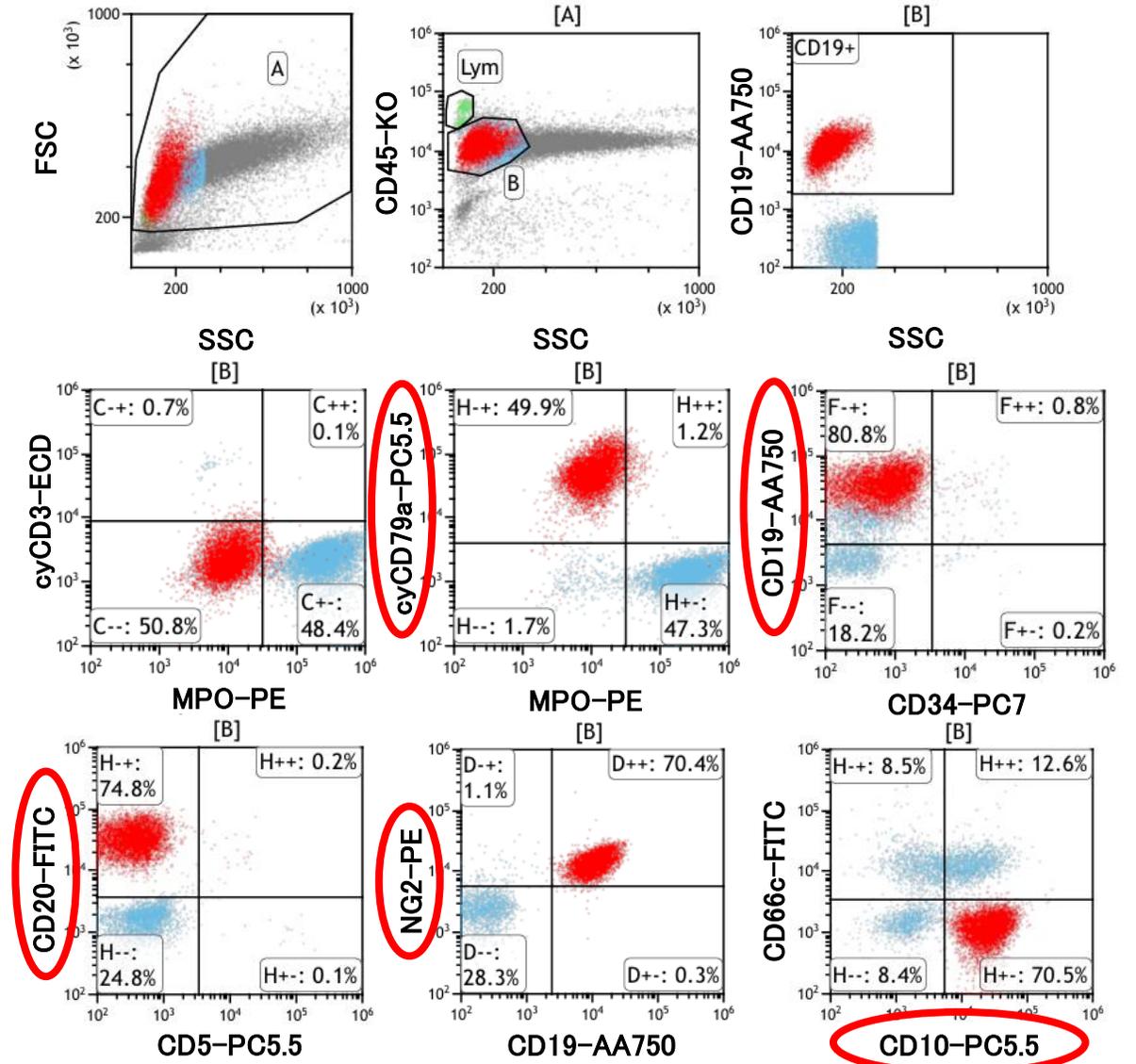
# BCP-ALL

## 3 color 解析(風)



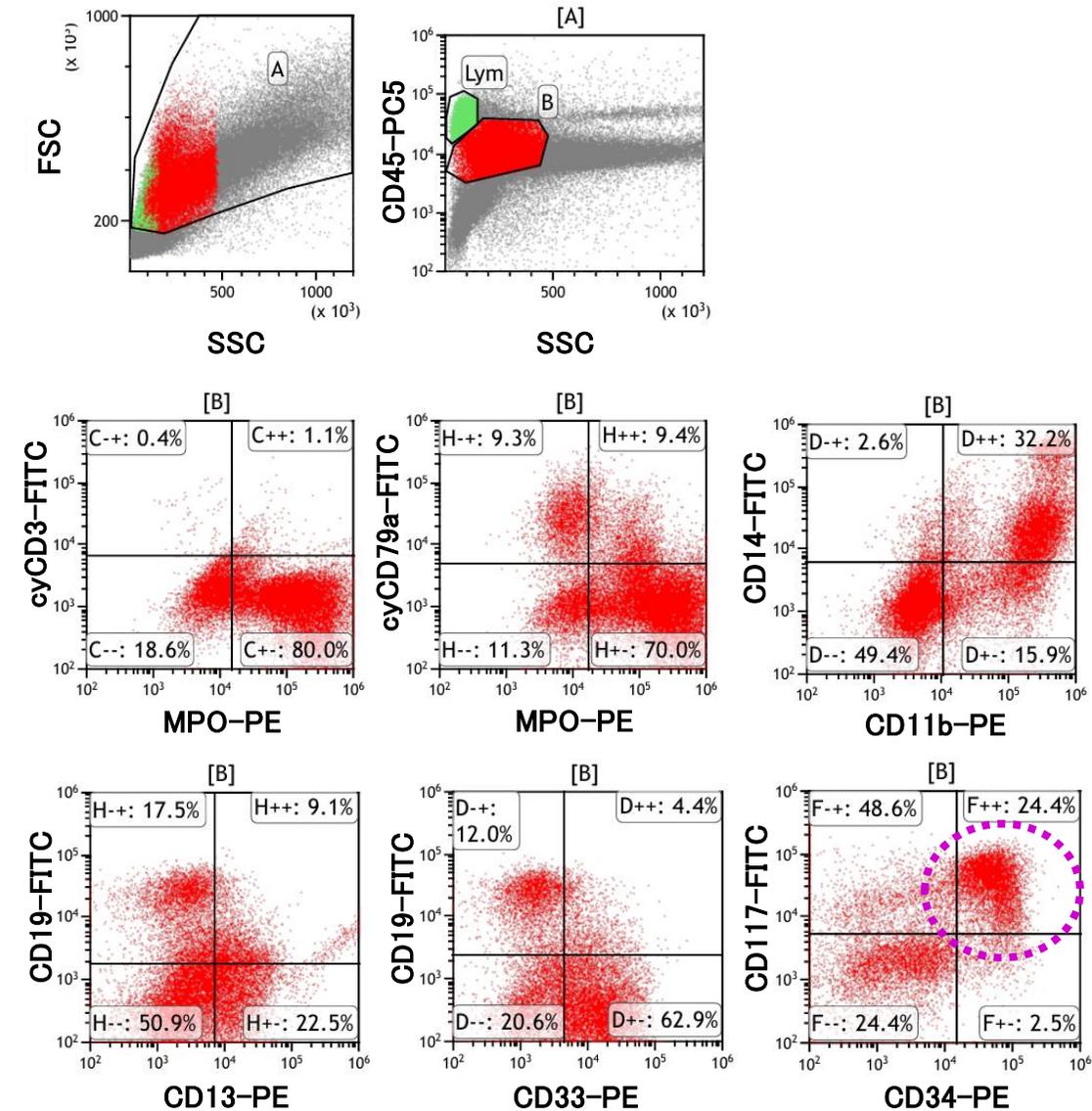
## CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD20<sup>+</sup>, cyCD79a<sup>+</sup>, NG2<sup>+</sup>

## 10 color 解析



# AML 芽球割合が少ない場合

## 3 color 解析(風)



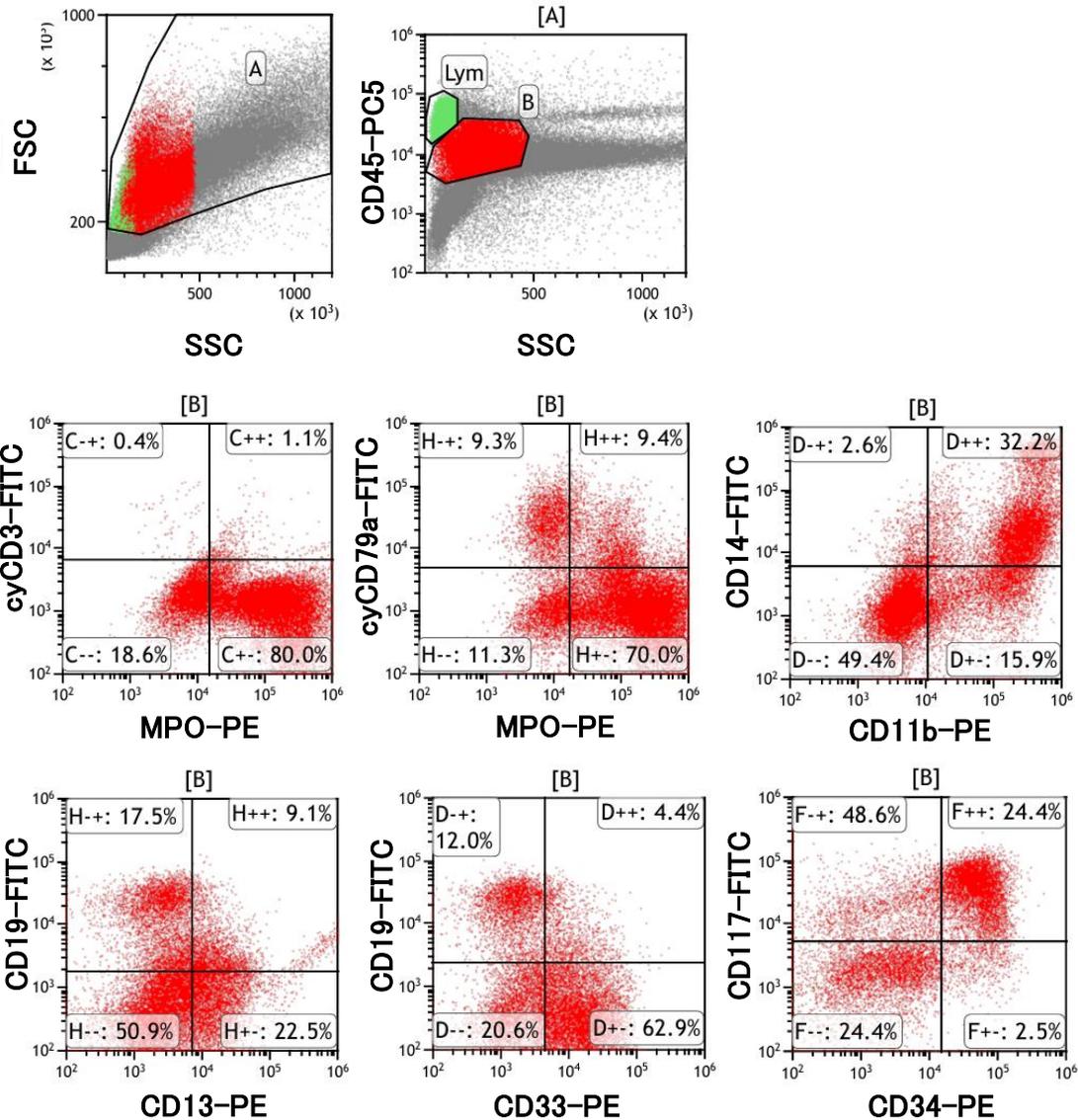
CD45dim+領域にB細胞性の異常細胞が増加  
 → CD34+, CD117+ の細胞集団あり(やや増加)

----- ここまでは3 colorでも可能 -----

# AML

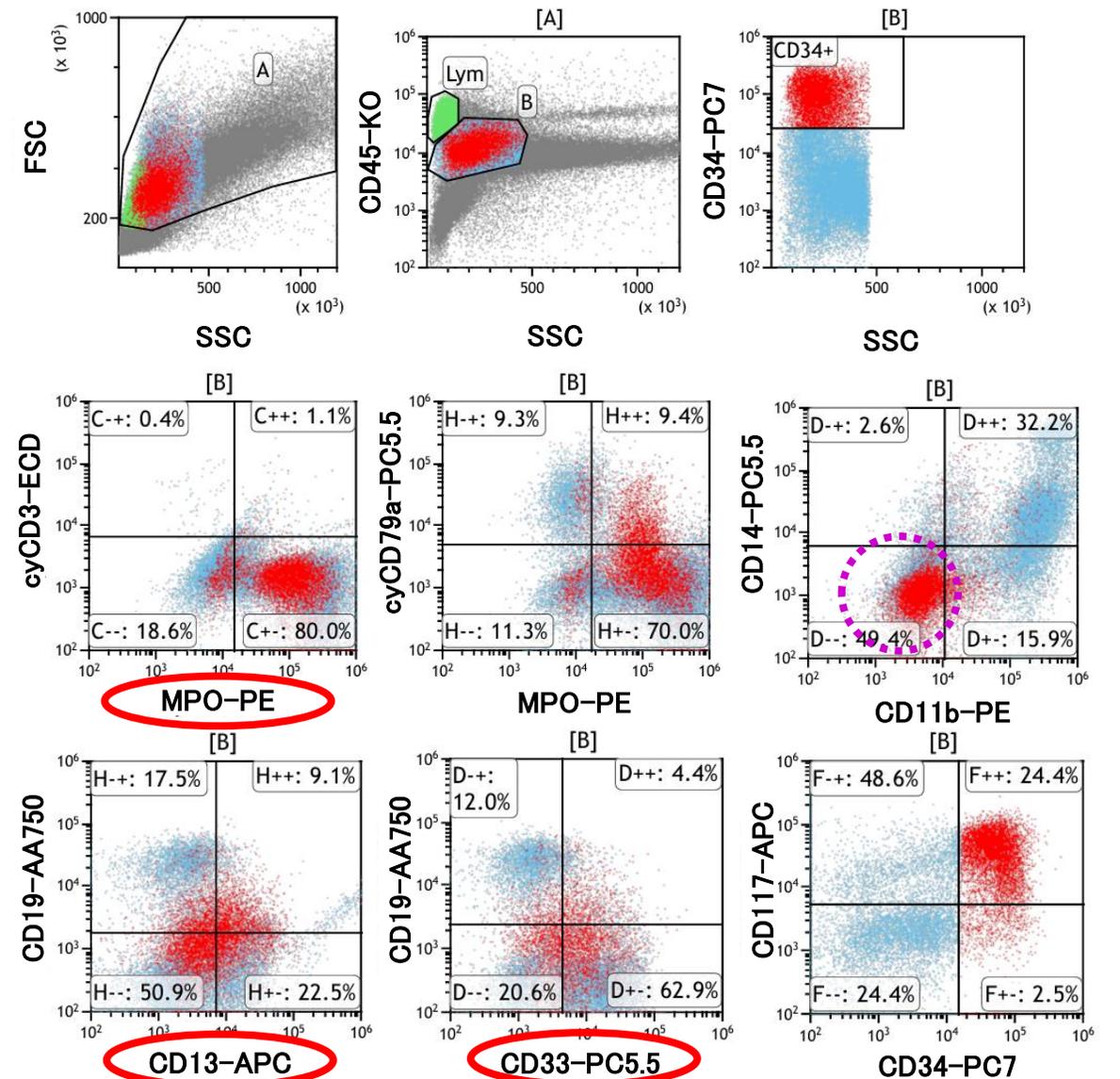
## 芽球割合が少ない場合

### 3 color 解析(風)



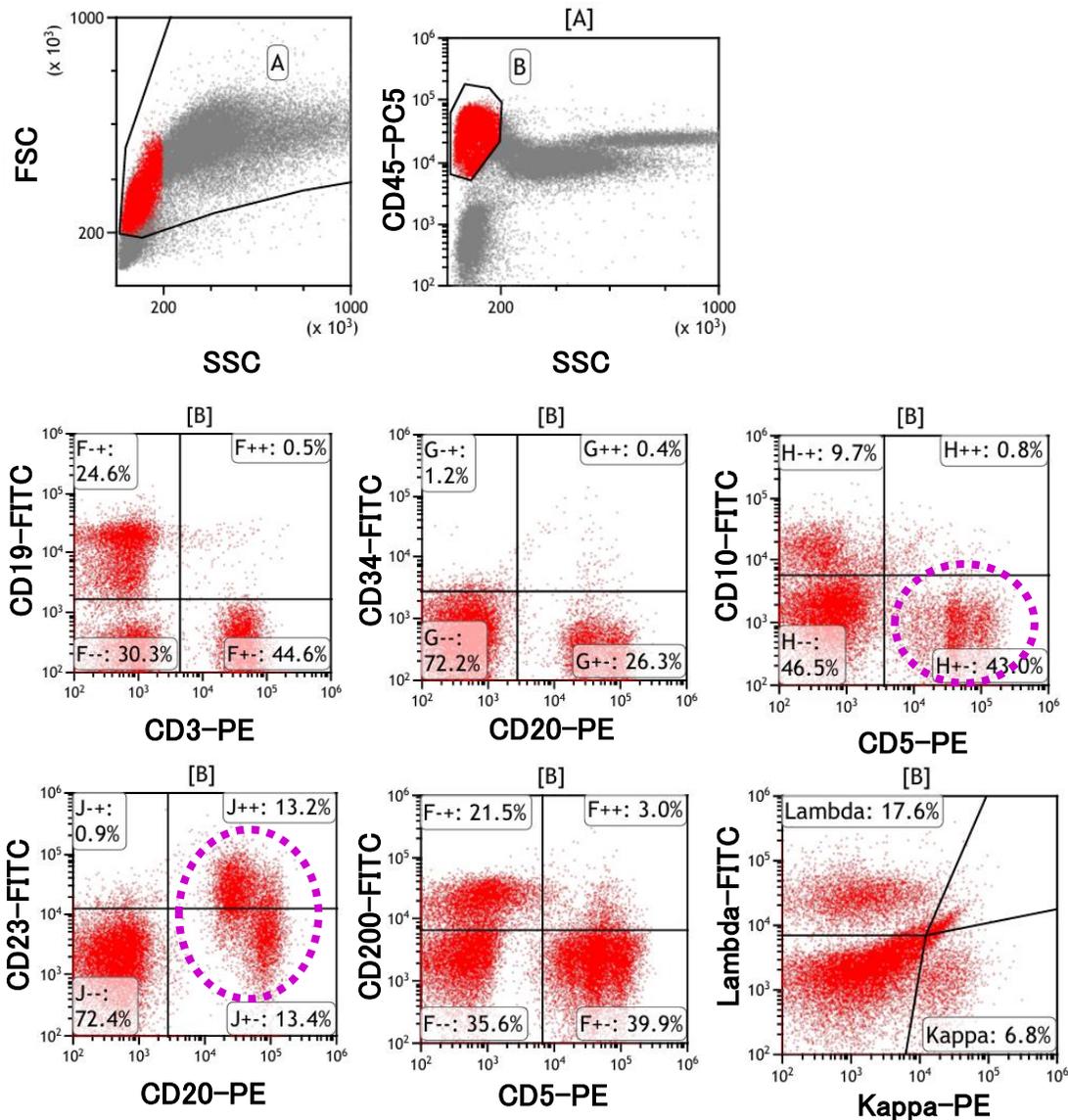
CD13<sup>dim+</sup>, CD19<sup>dim+</sup>, CD33<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD117<sup>+</sup>,  
MPO<sup>+</sup>, cyCD79a<sup>dim+</sup>

### 10 color 解析



# 末梢血に異常細胞あり

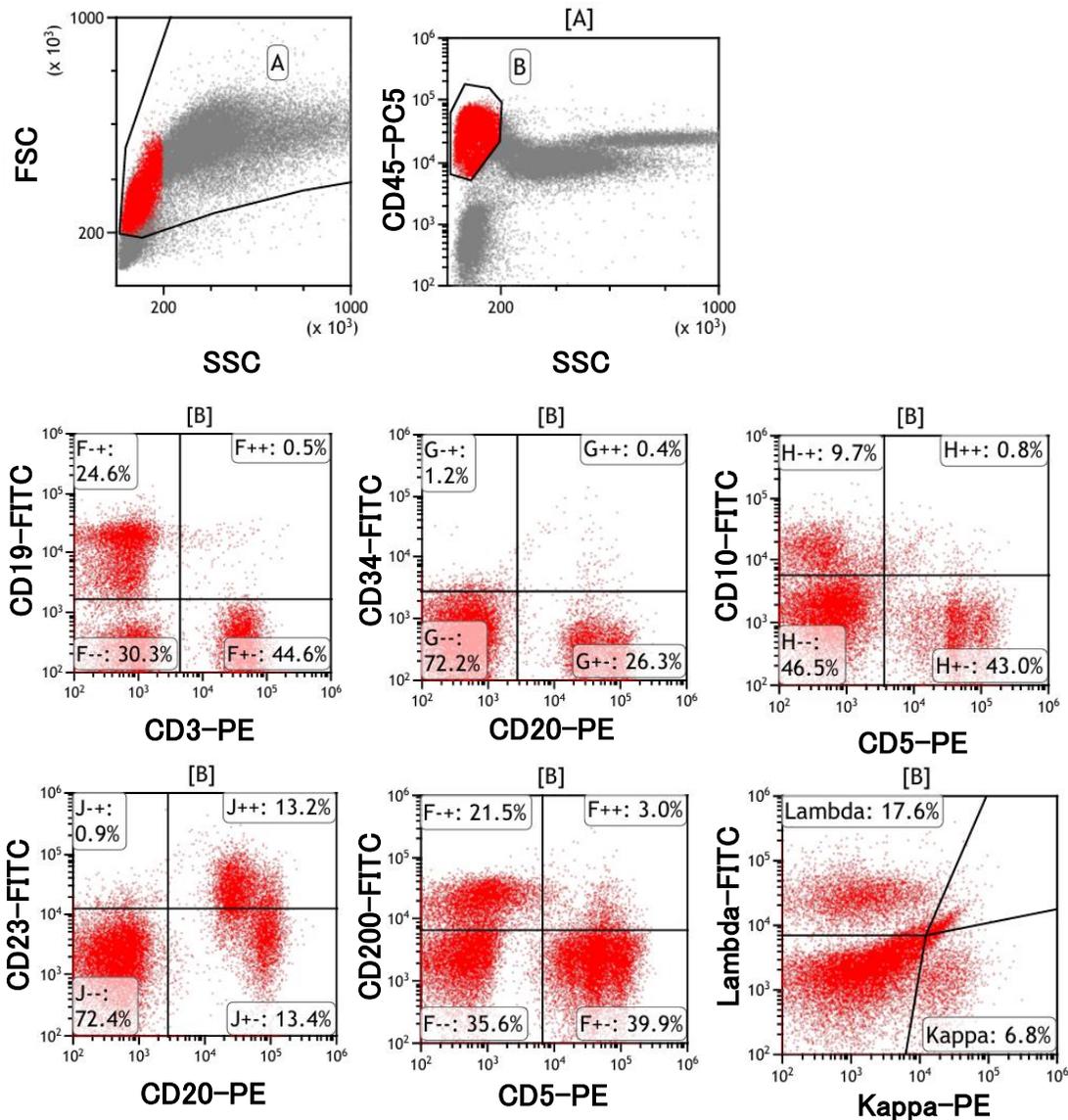
## 3 color 解析(風)



リンパ球領域にて、CD5とCD20陽性細胞が2集団  
 → ただし、免疫グロブリン軽鎖制限は不明  
 腫瘍性の判断は困難

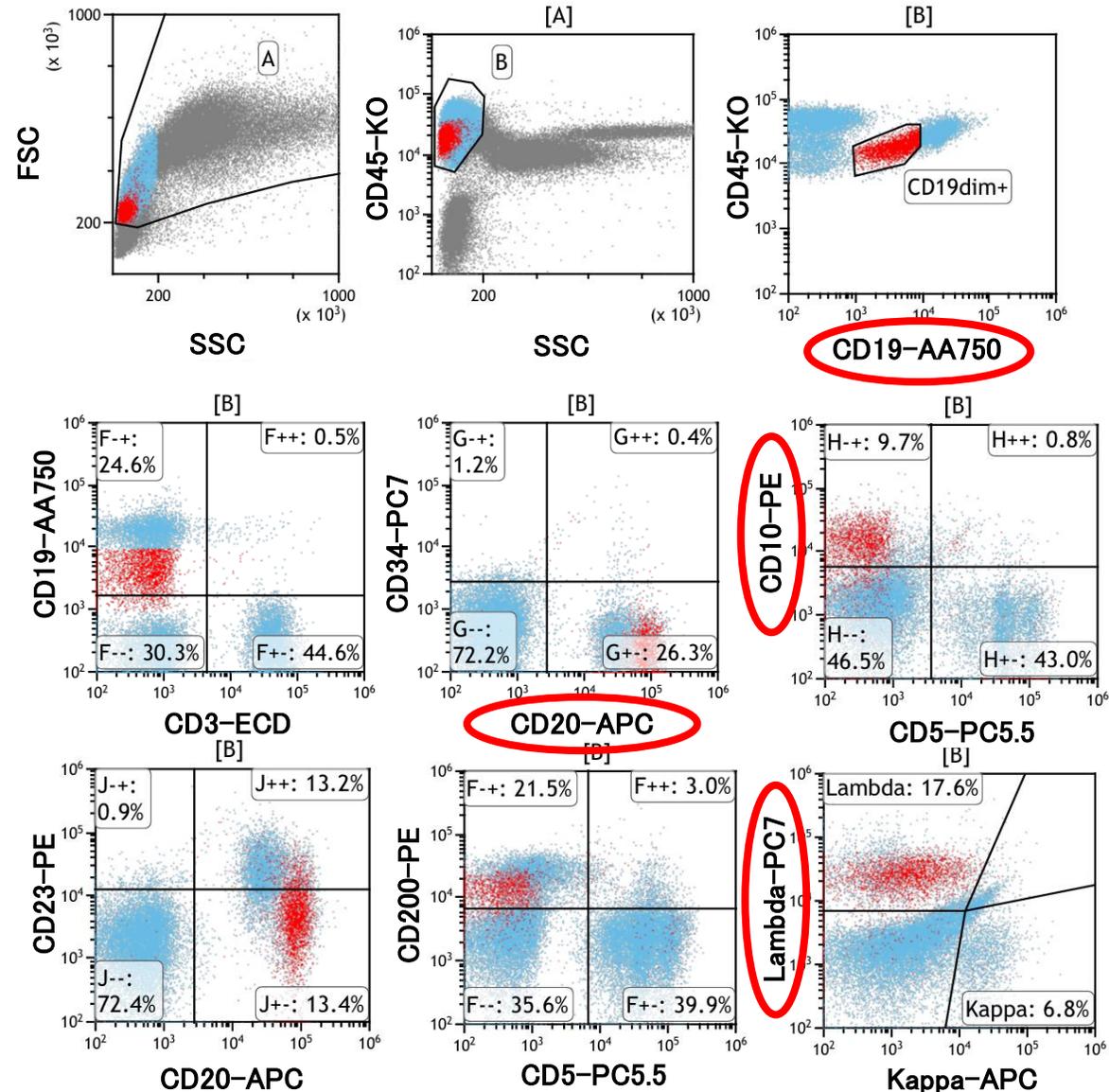
# 末梢血に異常細胞あり

## 3 color 解析(風)



## CD10<sup>+</sup>, CD19<sup>dim+</sup>, CD20<sup>+</sup>, CD200<sup>+</sup>, λ<sup>+</sup>

## 10 color 解析



# 最後に

- マルチカラー解析を行うために習得しなければならない知識と技術は多いが、造血器悪性腫瘍の診断、病期の予測、治療効果の判定などで非常に有用である  
必ず、ヒストグラムを見る習慣をつけましょう
- 本講演が明日からのFCM検査に活用できれば幸いです  
マルチカラーFCMを導入してみたいまたは興味のある方が増えることを期待しています