

フローサイトメトリーによるリンパ球サブセットの解析

CS-20 (昭和電工社製) と ORTHO-SPECTRUM III

による測定値の比較試験

京都大学結核胸部疾患研究所臨床検査部

富田由美子, 木津 啓, 木野 稔也

関西医学検査センター

荒 谷 信 一

(昭和61年4月15日受付)

緒 言

近年各種細胞の表面抗原に特異的なモノクローナル抗体が市販され, さらにフローサイトメトリー (以下 FCM と略す) のめざましい進歩と普及によりこれらを用いたリンパ球サブセットの解析が容易になり, 各種疾患における免疫状態の把握のために利用されてきた^{1~3)}。

胸部疾患の中では, 主にびまん性肺疾患における末梢血や気管支肺胞洗浄液中のリンパ球サブセットの定量に用いられ成果が上っている^{4~6)}。基礎研究分野においても, 各種細胞の表面マーカーの検索, たとえばTリンパ球およびBリンパ球の機能的サブセットの解析や幹細胞からのリンパ球分化過程の解析⁷⁾, その他腫瘍細胞の表面マーカーの解析など^{8,9)} 多方面に用いられている。

今回当研究所臨床検査部門に昭和電工社製セルソーターアナライザー CS-20 (以下 CS-20 と略す) が昭和60年3月に導入され, 臨床検査 (リンパ球サブセットの解析) に供すべく検討を重ねてきた。現在日本に導入されている機種は, 基本的には同一の原理に基づいている¹⁰⁾ が, 各施設で測定されて得られるヒストグラムなどは必ずしも同一ではなく, FCM の結果が同一の基盤で論じられるためにも各機種間の比較検討が必要と考えられる。従来当研究所ではリンパ球サブセットの解析は, 他施設の主に ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS 社の ORTHO SPECTRUM III (以下 ORTHO と略す) によっていた。そこで我々は CS-20 と ORTHO

の双方で同一の検体を測定し, その測定値の比較検討を行うとともに, あわせてサンプルを室温および 4°C に保存した時の測定値の経時的変化の観察を行ったので, 今後の基礎資料に供するために報告する。

実験材料および実験方法

実験には, 肺疾患患者10例と健常者のべ38例の肘静脈より EDTA 加採血管に採血した血液を用いた。抗体は表1に示した FITC (Fluorescein Isothiocyanate) で標識された ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS 社製のモノクローナル抗体 OK シリーズを用いた。

上記のリンパ球サブセットの測定にあたって次の操作を行った。

1. EDTA 加血液 3 ml に Phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS) を 3 ml 加え希釈。
2. Ficoll-Paque (リンパ球分離用, フェルマシア社) 3 ml に1の液 6 ml を重層し, 400 xg, 30分, 遠心分離。
3. リンパ球を含む層を毛細管ピペットで採取 (約 2×10^6 個とれる) し, PBS で1回洗浄後 1.4 ml の PBS で浮遊させる。
4. 200 μ l づつ7本の試験管に分注し, 各々にモノクローナル抗体 (OK コントロール, OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKIa 1, OKDR) を 10 μ l (OKIa 1 のみ 5 μ l: 注) を参照) 加え, 残り1本は OKIa 1 のコントロールとする。混和後 4°C 30分間インキュベートする (この間10分おきに混和)。

表1. 各種モノクローナル抗体とその特異性

モノクローナル抗体	反応する細胞の分布	臨床応用分野	免疫グロブリンサブクラス	健常者陽性率 (末梢血リンパ球)
OK-コントロール		モノクローナル抗体のための陰性コントロール	IgG 2a	
OKT 3 (直接法)	末梢Tリンパ球 >95% 胸腺細胞 20% 脾臓細胞 30%	ヒト末梢Tリンパ球の同定	IgG 2a	75±7%
OKT 4 (直接法)	末梢Tリンパ球 65% 胸腺細胞 75% 脾臓細胞 15%	ヒトインデューサー/ヘルパーTリンパ球サブクラスの同定	IgG 2b	45±10%
OKT 8 (直接法)	末梢Tリンパ球 35% 胸腺細胞 80% 脾臓細胞 15%	ヒトサプレッサー/細胞障害性Tリンパ球サブクラスの同定	IgG 2	28±8%
OKIa 1 (間接法)	Bリンパ球 90% 単球 90% null細胞 20% 活性化Tリンパ球	Bリンパ球, 活性化Tリンパ球, 単球の同定	IgG 2	10±5%
OKDR* (直接法)	Bリンパ球 90% 単球 90% null細胞 20% 活性化Tリンパ球	Bリンパ球, 活性化Tリンパ球, 単球の同定	IgG 2a	10±5%

*OKDR は OKIa 1 と同じ分子上の異なったエピトープを識別するもので、間接法 OKIa 1 の直接法として昭和60年7月22日付にて発売されたので以後は OKDR を主に用いた。

5. 各試験管に Lysing reagent (ORTHO 社) 2 ml を加え混入した赤血球を溶血させる。
6. PBS で2回洗浄後 1 ml の PBS に浮遊させ 4°C に保存。
7. 関西医学検査センターの ORTHO で測定後当研究所の CS-20 で測定。時間差は約1時間である。

結 果

1. CS-20 および ORTHO での測定値の再現性の検討

2人の健常者の末梢血を用いて検討した。検体をよく混和したのち5等分し、それぞれについて両機種で OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKDR を測定し、測定値の再現性をみた(表2)。

再現性の指標には、変動係数(CV): 標準偏差×100/平均を用いた。

両機種ともに、測定値の低い OKDR で CV が高めであった (CS-20: (検体1) 11.4%,

(検体2) 6.7%, ORTHO: (検体1) 6.4%, (検体2) 2.9%) が, OKT 3, OKT 4, OKT 8 に関してはすべて5%以下の CV が得られ、測定値の再現性は満足すべきものであった。

2. CS-20 および ORTHO による各サブセット測定値の比較

各サブセットの同一検体をまず ORTHO で測定し次に CS-20 で測定して、測定値の相関関係をみた(両機種での測定の時間的誤差は約1時間であった)。

図1に示すごとく、両機種による OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKT 4/OKT 8 値はよく相関し(それぞれ $r > 0.925$), ばらつきも少なかった。一方 OKIa 1 および OKDR は(図2), それぞれ $r = 0.840, 0.894$ とまずまず良好な相関関係がみられたが、測定値にややばらつきがみられた。

3. 室温および 4°C 保存による測定値の経時的变化の検討

CS-20 を用い、検体を室温または 4°C に保存した場合の24時間後および48時間後の測定値の平均(6検体を測定した)を、採血時の測定値の平均と比較した(図3)。

検体を室温保存した場合の経時的变化では、

注) OKIa 1 の測定は間接法で行わねばならないために、更に FITC 標識ヒツジ抗マウス IgG の100倍希釈を二次抗体として 100 μ l 加え 4°C 30分間インキュベートする。OKIa 1 のコントロールとして、上記の二次抗体のみを加えたものを用いた。後の処理は他と同様である。

表2. CS-20, ORTHO による再現性試験

		CS-20			ORTHO		
		平均	標準偏差	変動係数	平均	標準偏差	変動係数
検体 1	OKT 3	72.0	0.939	1.3(%)	68.1	1.251	1.8(%)
	OKT 4	49.3	2.507	5.0(%)	44.3	0.789	1.8(%)
	OKT 8	25.7	0.612	2.4(%)	25.6	0.676	2.6(%)
	OKDR	14.5	1.647	11.4(%)	16.5	1.062	6.4(%)
検体 2	OKT 3	65.3	1.184	1.8(%)	65.4	0.456	0.7(%)
	OKT 4	35.0	0.753	2.2(%)	34.0	0.888	2.6(%)
	OKT 8	26.0	0.725	2.8(%)	26.2	0.204	0.8(%)
	OKDR	20.3	1.353	6.7(%)	23.0	0.657	2.9(%)

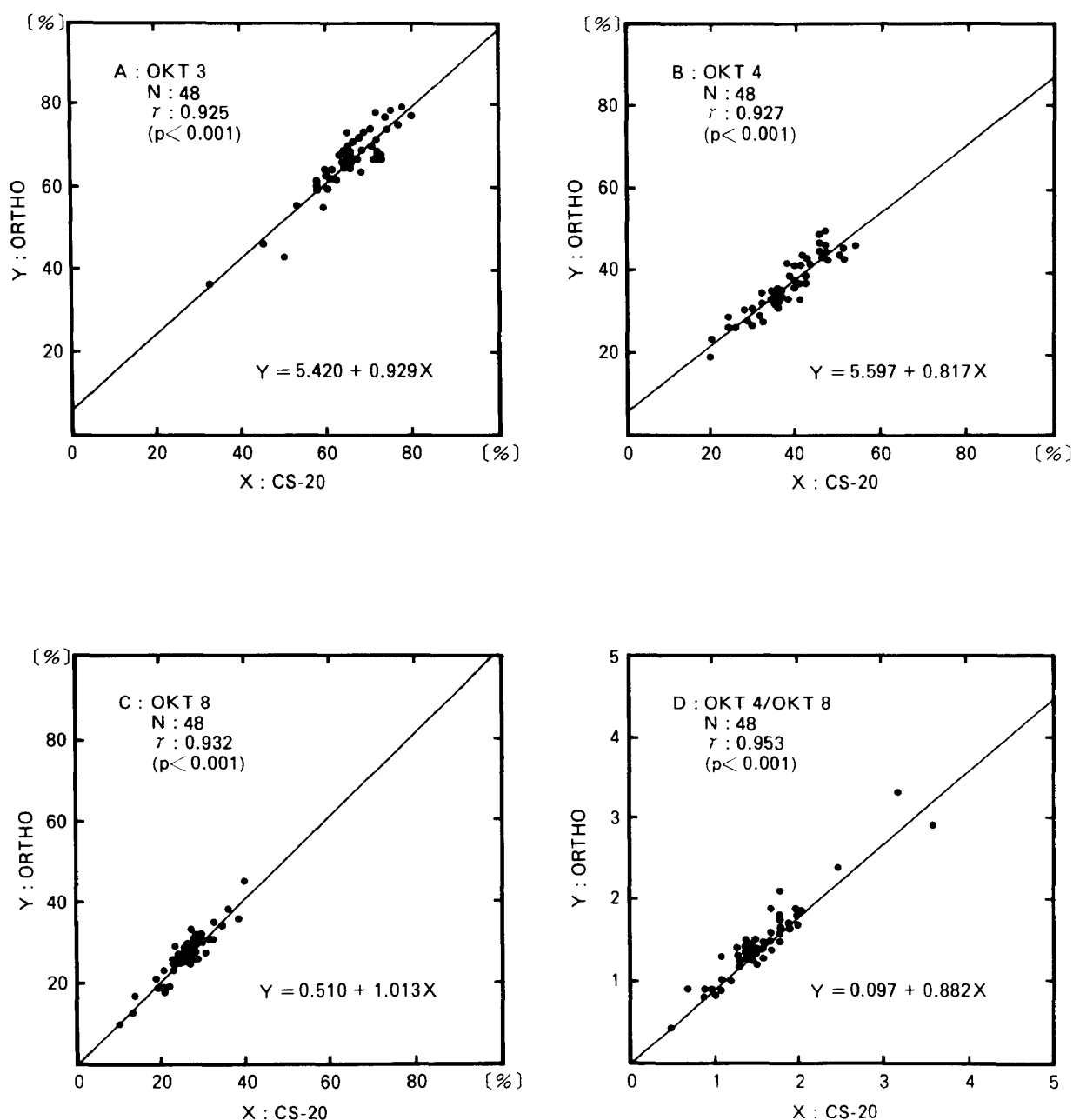


図1 リンパ球サブセットの ORTHO, CS-20 による相関 (その1)

A: OKT3 B: OKT4 C: OKT8 D: OKT4/OKT8

各グラフの右下の式は1次回帰式、直線はそれによって求めた直線を示す。

N: サンプル数 r : 相関係数 p : 危険率

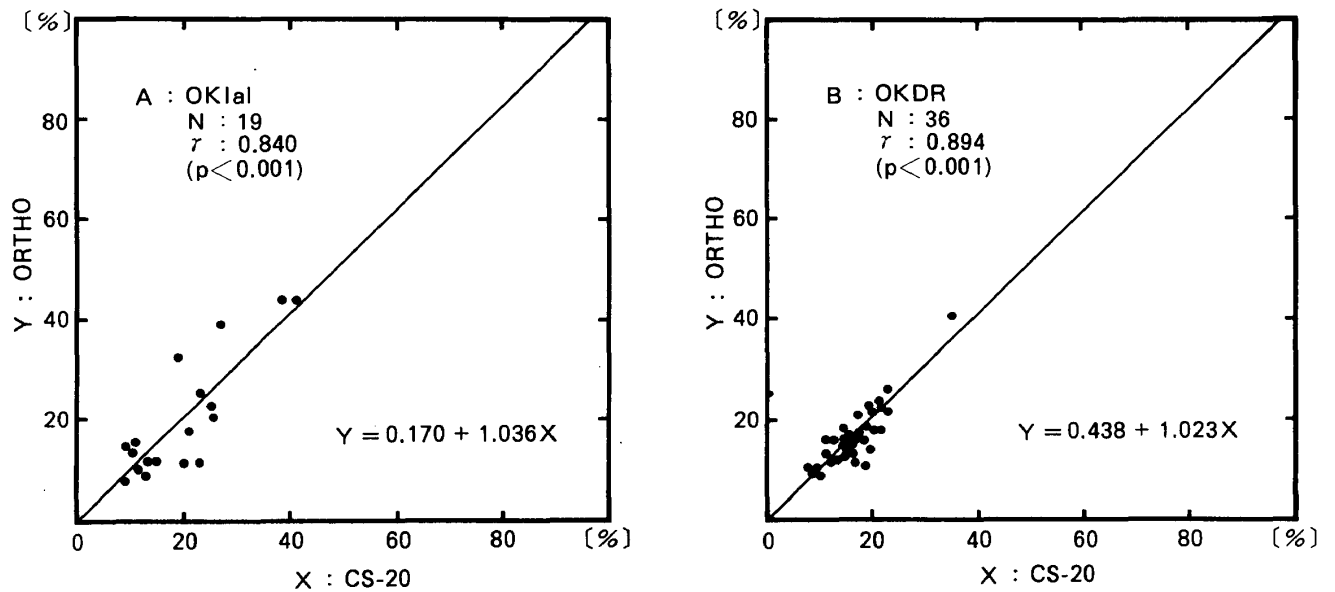


図2 リンパ球サブセットの ORTHO, CS-20 による相関 (その2)

A: OKIal B: OKDR

各グラフの右下の式は1次回帰式, 直線はそれによって求めた直線を示す。

N: サンプル数 r : 相関係数 p : 危険率

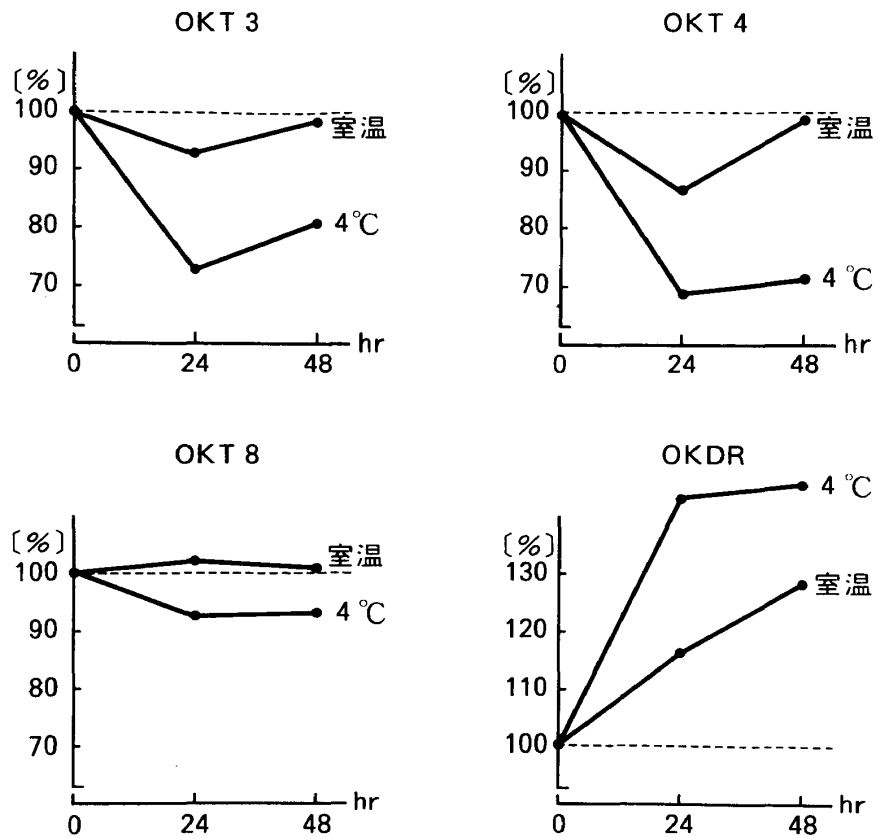


図3 保存温度の違いによるリンパ球サブセットの経時的変化。

採血当日の値を100%として経時的変化を示す。

OKT 3, OKT 4 が24時間後にやや低下したが, OKT 8 は48時間後まで変化を示さなかった。OKDR は漸増傾向を示し, 24時間後には15.5%, 48時間後には28%の増加がみられた。

一方 4°C に検体を保存して経時変化をみると, 室温保存検体よりも変化は著明であった。すなわち, OKT 3, OKT 4 は24時間後にはそれぞれ27.5%, 31.5%低下し, 48時間後にはそれぞれ19%, 29%の低下がみられた。OKT 8 は変化が少なかったが, それでも室温保存より低下傾向がみとめられた。また OKDR は室温保存より著明に増加していた (24時間後43.5%, 48時間後45.5%増加)。

考 察

同時再現性については, ORTHO による結果に比して CS-20 による測定値にややばらつきがみられたが, このことは細胞処理などによるばらつき以上に CS-20 の機械自体が ORTHO のように自動化されていないところに大きな要因があると思われる。

各リンパ球サブセットの両機種による測定結果の比較では, OKT 3, OKT 4, OKT 8, すなわちTリンパ球の測定値が良い相関を示した。一方 OKla 1, OKDR はばらつきが大きかったが, これはBリンパ球以外の活性化Tリンパ球やNull細胞とも反応するためと考えられた。しかし, OKDR は OKla 1 よりもかなり安定した結果が得られたので, 今後Bリンパ球測定には OKDR を使用していくつもりである。

血液の保存状態(温度)の違いによる経時変化では, helper/inducer Tリンパ球細胞膜上でこれらの抗体が認識するエピトープが温度によっ

て変化を受け, 抗体との結合性が阻害, あるいは増強する¹¹⁾と言われているが, 我々が行なった測定結果でも, 4°C 保存では, OKT 4 リンパ球百分率の著明な低下がみられ, OKT 3, OKT 8 もやや低下を示した。一方室温保存でも OKT 3, OKT 4 が24時間後にやや低下を示し, 48時間後では, 平均値は採血直後と変わらないが, 検体間の値はかなりばらつきがみられた。OKDR は室温保存, 4°C 保存とも採血時より高い百分率を示した。以上のことから, リンパ球サブセットの解析は採血直後に行うのが最良の方法であるが, やむをえない場合は 37°C¹¹⁾, 又は室温保存が望ましく, 4°C 保存はさけた方がよいと思われた。

検体処理における Ficoll 分離の必要性の有無であるが, Ficoll 分離をしないで全血を使用した場合は測定に要する時間が約30分間短縮されるが, 溶血操作が不十分になりやすく, また顆粒球が含まれ, 死細胞も多くなるため, 測定に時間がかかり, ノズルのつまりも生じやすくなった。従って Ficoll 分離した方が安定した結果が得られると思われた。

最後に CS-20 と ORTHO による蛍光強度と細胞数のヒストグラムの標示方法の違いについて述べる。

FCM は原理的には個々の細胞の蛍光色素のレーザ光による励起光の強度を電気信号に変換し, その分布を示すものである。ラベルされていないコントロール細胞 (negative cell) の場合, 細胞自身のもつ自然蛍光によるヒストグラムが得られ (40 mV 以下), ラベルされた細胞 (positive cell) が加わるとより強い電圧の部分にヒストグラムパターンが表われる。ただし CS-20

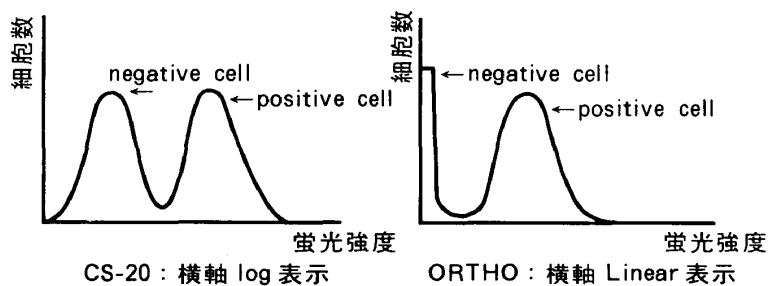


図4 CS-20 と ORTHO におけるヒストグラムの違い

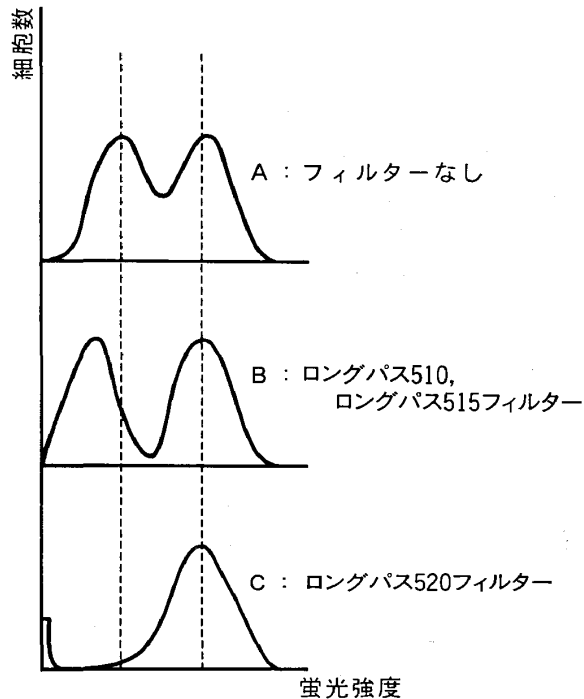


図5 CS-20における各種フィルターによるヒストグラムパターンの違い

が横軸を log 表示するのに対し、ORTHO は横軸が Linear 表示であるので、自然蛍光の程度では ORTHO ではほとんど 0 チャンネルに入り、negative パターンが表われない (図4)。CS-20 においては、positive 蛍光の強い場合は negative パターンから、negative と positive の境界を決定すると positive cell の比率が算出されるが、蛍光の弱い場合は negative と positive のパターンが重なり合うため各種のフィルターを適宜使い分けることが必要となる。この場合に波長を制限するフィルター (ロングパス510, ロングパス515) によって positive パターンを動かさずに negative パターンを左方移動させ、両者の境界を明確にすることができる。さらにロングパス520 フィルターに変えると negative パターンは 0 チャンネルに入れることができ、コントロールの値は ORTHO と同様にほとんど 0 となり陽性率のみがヒストグラムに表れる (図5)。ヒストグラムにおける negative パターンの表示は視覚的に negative cell と positive cell の比率や、negative cell に対する positive cell の蛍光強度がわかることが利点であるが、蛍光の弱い場合は境界設定が曖昧になりやすく、

正確な陽性率の算出のためには CS-20 におけるごとく ロングパス520 フィルターで negative をカットした方が簡便で实际的であると思われる。

結 語

以上の比較データから OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKT 4/OKT 8 および OKDR については、両機種 of 測定値は比較的良い相関を示し、従来の ORTHO のデータとの比較などには差しつかえがないと思われ、臨床検査に十分利用できると考えられた。ただし CS-20 は、電圧、サンプル圧、その他測定毎に調製が必要な項目が多く、自動化された ORTHO に比較してデータのばらつきが生じやすい原因の一つになっていると思われた。また CS-20 には測定にやや時間がかかるという欠点もあり、臨床検査用アナライザーとしては劣る面もあるが、Sorter 機能を持つという点が特徴であり、今後この機能を発揮させるよう努力したい。

文 献

- 1) Talle M. A., et al: Classification of Human Lymphocytes and Monocytes with OK series of Monoclonal Antibodies. *Diagnostic Immunology*, 1: 129-135, 1983.
- 2) 関 秀俊, 多賀千之: フローサイトメトリーによる免疫不全症の診断と病態の解析. *Jpn. J. Clin. Immunol.*, 8(5): 257-259, 1985.
- 3) Steen, H. B., et al, Flow cytometry: a high-resolution instrument for everyone. *Science* 204: 403-404, 1979.
- 4) Stephen, H. Ip., et al: Rapid Enumeration of T-lymphocytes by Flow-cytometric Immunofluorescence Method. *Clinical Chemistry* 28: 1905-1909, 1982.
- 5) 横山三男, 大久保慶二: モノクローナル抗体によるリンパ球膜マーカーの検査とその臨床的意義, *日本臨床*, 1985年秋季増刊 (通巻第535号) 下巻 356頁.
- 6) 大久保慶二, 他: フローサイトメトリーによる細胞膜の解析と臨床応用, *関西フローサイトメトリー研究会機関誌*, 1: 58-61, 1984.
- 7) Katura, Y., et al: Two subpopulations of stem cells for T cell lineage, *J. Immunol*, 135, 3021-3027, 1985.
- 8) 河本圭司, 松村 浩: Flow cytometry (FCM) による脳腫瘍の悪性度の評価, *癌臨床*, 27, 1516-1522, 1981.

- 9) 齊藤幸人：胸部疾患領域における Flow cytometry—固型腫瘍の細胞分離と解析結果—関西フローサイトメトリー研究会機関誌, 1, 38-42, 1984.
 10) 河本圭司, 他：フローサイトメトリーにおける CV 値に及ぼす因子の検討, 関西フローサイトメ

トリー研究会機関誌1, 10-15, 1984.

- 11) 大久保慶二, 他：T₄ 抗原の動態, Proceeding of the first Monoclonal Antibody Conference, 31-36, 1985.

付

昭和60年3月に導入された昭和電工社製セルソーターアナライザー CS-20 に変わり, 昭和61年6月に同社製 ABCAS-100 が交換, 導入された。

ABCAS100 は CS-20 よりもジェット流に照射されるレーザ出力が高くなったことにより光学系の感度が良くなったために, コントロール, OKT3, OKT4, OKT8, OKDR の各ヒストグラムにおける negative 細胞と positive 細胞の分布が明確になった (図1)。

又 ABCAS-100, ORTHO SPECTRUM III による各リンパ球サブセット測定値の相関 (図2), およびサンプル測定時間も CS-20 に比べはるかに良好で, 機械操作も簡便になった。

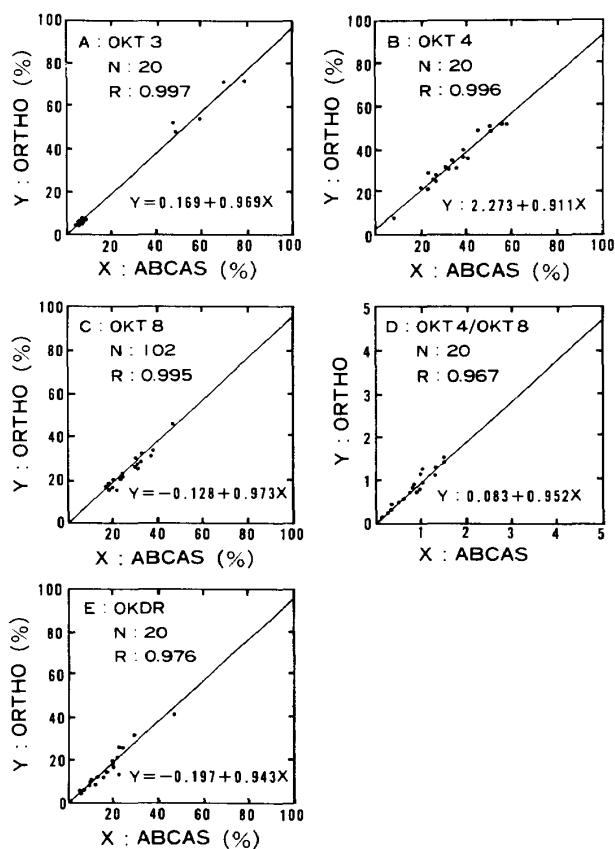


図2 リンパ球サブセットの ORTHO, ABCAS-100 による相関
 A: OKT 3 B: OKT 4 C: OKT 8 D: OKT 4/OKT 8
 E: OKDR 各グラフの右下の式は1次回帰式, 直線はそれによって求めた直線を示す。
 N: サンプル数 R: 相関係数

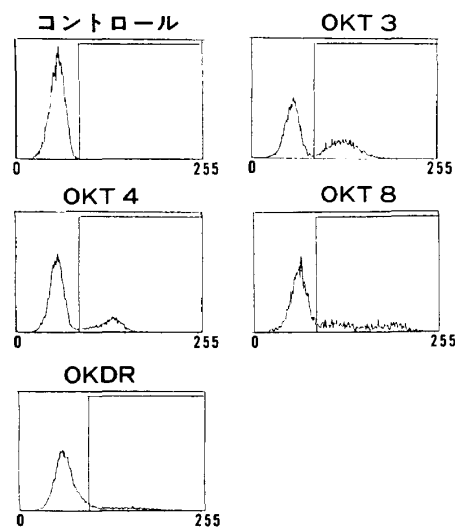


図1. ABCAS-100 におけるリンパ球サブセットの各ヒストグラムパターン

横軸: 蛍光強度, 縦軸: 細胞数