

FCM による DNA Aneuploidy 検索のガイドライン

日本サイトメトリー学会 標準化委員会

*高本 滋¹⁾、鶴澤正仁²⁾、中内啓光³⁾、中原一彦⁴⁾、東 克巳⁵⁾、藤川孝三郎⁶⁾、
村上知之⁷⁾、渡辺 卓⁸⁾(*:委員長)

Guidelines for flow cytometric analysis of DNA aneuploidy

Shigeru Takamoto M.D.,Ph.D.,C.C.¹⁾, Masahito Tsurusawa M.D.,Ph.D.,C.C.²⁾,
Hiromitsu Nakauchi M.D.,Ph.D.,C.C.³⁾, Kazuhiko Nakahara M.D.,Ph.D.,C.C.⁴⁾,
Katsumi Higashi M.T.,Ph.D.,C.C.⁵⁾, Kohzaburo Fujikawa Ph.D.,C.C.⁶⁾,
Tomoyuki Murakami M.D.,Ph.D.,C.C.⁷⁾, Takashi Watanabe M.D.,Ph.D.,C.C.⁸⁾

¹⁾Dept.of Transfusion Medicine, Cell Therapy Center, Aichi Medical Univ. School of Medicine

²⁾Dept.of Pediatrics, Aichi Medical Univ. School of Medicine

³⁾Centre for Stem Cell and Regenerative Medicine, Institute of Medical Science Univ. of Tokyo

⁴⁾ National Institution for Academic Degrees and University Evaluation

⁵⁾Dept.of Medical Technology, Division of Clinical Hematology, Kyorin Univ. Faculty of Health Sciences

⁶⁾Div.Cell Medicine, Research Institute of Medical Science, Kanazawa Medical Univ.,

⁷⁾Dept. of Pathology, National Hospital Organization Kanmon Medical Center

⁸⁾Dept. of Laboratory Medicine, Kyorin University School of Medicine

Abstract

Almost forty years have passed since flow cytometry was developed in the late 1960s. It has been used in cell biology, particularly the two major fields of cell surface antigens and cellular DNA content. Its rapid analysis of the latter led to the detection of quantitative chromosomal abnormality, which would otherwise require much time, experience, and especially mitotic cells. It was adopted initially for haematological disorders, but its use expanded to solid tumours, and even fixed tissues for retrospective analysis. Although DNA aneuploidy was proven to be a prognostic factor for limited tumours, its clinical significance has not been established yet for most tumours. Inappropriate sampling and flow cytometry determining procedures might have generated confusing evaluations.

The advantages of flow cytometric analysis of DNA aneuploidy include: 1) removal of the requirement for mitotic cells, 2) rapid determination (a rate of thousands per second), 3) qualitative determination (more than five thousand cells per sample), 4) labour-saving determination, and 5) objective determination by an instrument. Conversely, disadvantages might include: 1) impossibility of detecting qualitative chromosomal abnormality, 2) difficulty with detecting subtle quantitative abnormalities, and 3) impossibility of identifying relevant specific chromosomes. However, the advantages clearly outweigh the disadvantages.

The Standardization Committee of the Japan Cytometry Society has recently finished creating the guidelines for flow cytometric analysis of DNA aneuploidy. These include sampling, providing free cell suspension, staining with fluorochromes, determining by flow cytometry, evaluating, and outlining the terminology of DNA aneuploidy. It is hoped that all researchers will adopt and comply with these guidelines whenever they analyse DNA aneuploidy with flow cytometry, and that they will find the appropriate clinical significance of DNA aneuploidy with its strict determination and definition.

Key words : guidelines, flow cytometry, DNA aneuploidy, standardization committee

はじめに

1960年代の後半、Flow cytometry (FCM)が画期的な研究用機器としてデビューし^{6, 14, 31)}、既に40年余が経過する。この間、FCMは細胞生物学の分野、特に細胞表面抗原¹⁰⁾および細胞のDNA量測定⁸⁾の二大分野で大いに活用され、科学の発展に貢献してきた^{19, 21, 27)}。

細胞のDNA量測定分野では、当初、ラディオ・オートグラフ法に代わる画期的な細胞周期の解析法^{5, 15, 28)}として注目されたが、1970年代の後半から、DNA aneuploidy (DA)検索^{2, 29)}にも応用可能なことが明らかになり、腫瘍マーカーの簡便な検索機器として一気に臨床研究分野で脚光を浴びるようになった。当初は試料として扱いやすい造血器腫瘍^{1, 3, 16)}が中心であったが、やがて固形腫瘍^{12, 18, 26, 32)}に拡大され、さらにはパラフィン包埋組織^{9, 23)}を用いた後方視的な研究にも使用されるようになり、応用範囲は格段に拡大した。この結果、一部の腫瘍では、DAと予後との間に明らかな相関^{17, 24, 30)}が認められるようになったものの、多くの腫瘍では未だ明確な結論が得られていない状況である。一因として、不適切な手技、測定により判定されたDAが本来の臨床的意義を混乱させている可能性が挙げられる^{4, 7, 22, 25, 33)}。DAの真の臨床的意義を追求するためにも、適切な手技、測定に基づいたDAの判定が必須と考えられる。

FCMによるDA検索の長所は、従来の染色体分析と比べ、1)分裂期細胞を要しないこと、2)1秒間に細胞数千個という測定の迅速性、3)1検体当たり数千～数万個測定による高い定量性、4)経験、長時間を要しない測定の省力性、さらに5)機械測定による客観性などにある。一方、短所としては1)染色体の構造異常は検出不能であること、2)微量な量的異常は検出不能であること、3)染色体の同定は不能であること、などが挙げられる。しかしながら、FCMによるDA検索については、明らかに長所が短所を凌駕しており、短所を補っても十分余りがあると判断される。

著書所属施設

¹⁾愛知医科大学医学部 輸血部、細胞治療センター

²⁾愛知医科大学医学部 小児科

³⁾東京大学医科学研究所 ヒト疾患モデル研究センター
幹細胞治療研究分野

⁴⁾独立行政法人 大学評価・学位授与機構

⁵⁾杏林大学保健学部 臨床血液学

⁶⁾金沢医科大学総合医学研究所 細胞医学研究部門

⁷⁾独立行政法人 国立病院機構 関門医療センター 病理

⁸⁾杏林大学医学部 臨床検査医学

本法によるDA検索の基本は、原則として、対象細胞を一個一個分かれた浮遊状態とし、DNAと特異的に結合する蛍光色素により細胞を染色した後、光を当てて発する蛍光量にて相対的DNA量を測定するものである。本法を実施するに当たっては、試料作製時、染色時、測定時、および判定時など各々に注意すべき点、問題点などが指摘される^{11, 20)}。

本ガイドラインは、FCMによるDA検索が、注意深く、厳密な基準に基づいた手法により検索され、しかも諸種注意点、問題点を考慮に入れた上で判定された結果であるよう、期待して作成されたものである。不適正な方法で検索されたDAが一人歩きをする形で、本来のDAの臨床的意義を損なうことのないよう、本ガイドラインが遵守されることを強く望むものである。

1. 目的

本ガイドラインは、Flow cytometry (FCM)により、DNA aneuploidy (DA)が正しく測定され、適切に判定されることを目的とし、DA検索における留意点や問題点を明かにし、DA検索の手技・方法の基準を示したものである。今後、本ガイドラインが測定者個人のテキストとして使用されるにとどまらず、施設内や施設間での精度管理を行う上での基礎となり、DAの臨床的意義の真摯な評価につながることを望むものである。

尚、FCMによるDA検索については、一部の国では医療保険の適用となっているものの、残念ながら我が国では保険適用外である。現時点ではDA検索については研究的意味合いに留まるが、近い将来、保険適用となることを期待するものである。

本ガイドラインでは、DA検索の過程を「機器調整」「検体採取と保存」「染色」「FCMによる測定」「測定結果の判定」の各段階に分け、各々について順に記述する。

2. 機器調整

DA検索にとって、FCMの機器調整は極めて重要であり、調整の不足はDAの検出率低下に直結する。特に、検出率に大きな影響を及ぼすCV値については極力良好な状態で検索を進める必要がある。測定機器の調整用としては、蛍光ビーズなどの非生物学的標準試料が有用である。

2-1. 光学系

FCMの光学系は、光源(レーザー光、水銀アークランプなど)、光軸の方向を変える反射ミラー、試料流に焦点を合わせるための集光レンズ、さらに試料に当たった後の光を集める直進、直角方向のレンズ、フィルターなどから構成されている。これら光学系全体の調整は光軸調整と呼ばれる。光学系、流体系の調整は共にCV値の向

上に重要であるが、特に光学系の調整、すなわち光軸調整が直接測定に影響を与えるため、慎重かつ厳密に行う必要がある。

光軸調整は取扱説明書に準じて厳密に行う。一部の分析機器では光学系の部品が固定されており、光軸調整が不要の場合もあるが、セル・ソーター付きの多くの機器では光軸調整を行う必要がある。光軸の調整には専用の標準蛍光ビーズ(粒径と蛍光量が一定の蛍光ラテックスビーズなど)を用い、取扱説明書に従って調整する。

機器の立ち上げに際しては、いずれの機器の場合でも、毎回常用の蛍光ビーズを測定し、各パラメーターのピーク位置あるいは CV 値を確認し、記録しておく。ピーク位置あるいは CV 値が蛍光ビーズの設定範囲を超える場合は、再度調整を行う。再三の調整にもかかわらず設定範囲を超える場合は、つまり、層流の乱れなど流体系に異常がないか、さらには光源(レーザー光など)、蛍光ビーズに異常(粒子の変質など)がないかどうか、確認し、再度調整を行う。これらにても調整が困難な場合には機器メーカーに調整を依頼する。

2-2. 流体系

FCM の流体系は、試料液(sample fluid)、鞘液(sheath fluid)、測定部となるフローセル(flow cell)および2種の液を流す陽圧ないしは陰圧を供給する圧力系からなる。2種の流れは初めは独立してチューブ内を流れるが、フローセルの円錐部で合流する。しかし、laminar flow(層流)原理により、鞘液はフローセル内腔の外側、すなわち管腔壁側を、試料液はその中央、言い換えれば鞘液の水のトンネルを通過する形となる。流体系におけるつまり、層流の乱れは測定の大きな障害となり、CV 値悪化の原因となる。

原則として鞘液(シース液)はFCM用に調整されたものを使用し、その保存・使用方法はメーカーの指示に従うこと。ソーティングで生理食塩水などを使用した際は、析出する塩でつまりが生ずる場合もあるので、使用後必ず蒸留水で洗浄を行うこと。また往々にして圧力系の漏れが層流の乱れの原因となり得るため、試料液、鞘液などの圧力系のキャップに漏れないよう確認すると共に、送液ライン中の気泡をできるだけ除去しておくこと。また、測定時間は多少延長するが、試料液の圧はできるだけ低く抑え、鞘液との圧差を大きくすることにより、層流の乱れを抑え、CV 値を向上するよう心がける。

2-3. 電気系

感知器に達した光学的信号は光電子二極管(photodiode:主に錯乱光)、光電子倍增管(photomultiplier, PMT:主に蛍光)により電氣的信号に変換され、増幅される。電気系の調整は、測定者が

直接行うことは困難であり、原則として機器メーカーに委ねる。電気信号の波形の処理については、高さ、幅および面積による3種類の処理が可能であるが、通常面積による処理が頻用されている。尚、メーカーによる調整後、直線性(linearity)のチェックは常に行い、記録しておく必要がある。因みに、DA 検索では生じた蛍光量により相対的に DNA 量を測定し、さらに相対的 DNA 量をピークチャンネル数から算定し、DNA index(DI:DNA 指数)として表現するため、蛍光量とチャンネル数の間に直線性が保たれる必要がある。これには、蛍光量が倍数性に異なる数種のビーズが混入された標準蛍光ビーズを準備し、各ビーズの蛍光量が何チャンネルにピークとして描出されるか、さらにそのチャンネル間に直線性が保たれているか、チェックを行い、記録しておく必要がある。

3. 検体採取と保存

対象細胞としては、新鮮なものとパラフィンなどで固定されたものがあり、また、血液細胞、胸腔、腹腔内浮遊細胞などのように初めから遊離している細胞と組織あるいは臓器を形成している細胞がある。基本的には、新鮮かつ遊離している細胞が理想であるが、検索する条件により各々事情が異なるため、浮遊細胞作成の過程において、DA 検索にどのようなリスクが加わるのか、注意点あるいは問題点は何かを把握しておく必要がある。特に、重要なことは、作成した浮遊細胞液中にいかなる細胞が含まれているかを把握することである。具体的には、正常細胞は含まれているか、正常と腫瘍細胞の割合は、腫瘍細胞には複数のクローンの存在する可能性があるか、などが把握できれば、測定後の DA 判定に大きな助けとなる。このため、元の組織標本、塗抹標本、出来れば作製した浮遊液の塗抹標本を保存しておくことが望まれる。さらに、染色体分析が可能であれば検索をしておく。また、殆どの場合対象となるのは臨床試料であり、感染性病原体を含む可能性も考慮に入れて、試料作製に際しては手袋・眼鏡を着用するなど、十分な安全性を確保する必要がある。

3-1. 検体採取

検体は血液、手術材料が中心と考えられるが、基本的には元となる検体の塗抹標本、組織標本を確保しておく必要がある。摘出された組織、臓器の場合は、自己融解などの影響を極力避けるため、可及的速やかに(遅くとも3時間以内に)細胞調整することが望まれる。また、組織、臓器の場合は試料作製に際し、1)極力、正常組織を含む部位を対象とすること、2)部位により腫瘍クローンが異なる可能性もあるため、最低2カ所を対象とすること、が重要である。また、血液を対象とする場合、抗凝固剤として EDTA、ACD-A、ヘパリンが使用可能であるが、検体安定性の面から、また白血球数、白血

球分画を同じ検体で検索できるという面から EDTA が勧められる。

なお、検体採取に当たっては、検体検索後の情報交錯がないよう、患者 ID、年齢、性、診療科名、主治医名、推定診断などの必要情報を確保し、さらに採取年月日、採取時間、受付時間を明記しておく。

3-2. 浮遊細胞化(細胞分散)

浮遊細胞化に際しては、組織、臓器により難易度が異なる。ハサミでの細切りやピペッティングなどの物理的(機械的)分散法でかなり多くの組織を分散できる組織もある。しかし、多くの固形組織では、機械的分散に加えて蛋白分解酵素や界面活性剤などの処理を要する。その代表的な方法には、酵素カクテル法^{12, 18)}、ビンデレフ法³²⁾、Triton X-100 法²⁶⁾などがある。細胞培養の際に用いられるトリプシン溶液も利用できる。ただし、これら処理が染色性に影響を与える場合もあるため、DA 検索に当たっては、対象とする組織、臓器に最適な細胞分散法を事前に検討しておく必要がある。

3-3. 標準試料

標準試料は染色法、機器調整のチェック、および DA 判定のため、原則的に必須である。理想的な標準試料とは検体と同一個人の、同一組織からの正常 2 倍体細胞である。ただし、実施上標準試料の設定が困難な場合、正常ヒト末梢血単核球あるいは、脾細胞で代用することが可能であり、凍結保存したものも有用である。

3-4. 測定検体の作製

特定対象としては、検体 1 件に対し、検体単独および標準試料を混合した検体の 2 種類を準備し、以降の染色、測定に供することが望ましい。なお、検体については出来る限り細胞数を計算し、可能であれば、検体と標準試料の細胞数が 1:1 となるようにするのが理想的である。

3-5. 検体の保存、固定

検体は採取後、新鮮な状態で細胞分散し、染色・測定するのが理想的であるが、事情により実施が不可能な場合は、各施設において検索対象とする組織、臓器に関して保存方法、細胞調整法などについて新鮮検体と比較検討し、新鮮検体に最も近似した結果の得られる方法を定めなければならない。

組織のまま保存する場合、固定液による保存は避け、凍結保存する。大きな組織は、大きなかたまりのままでの凍結保存は避け、小さく分割(5-10mm 角)し、凍結保存用チューブなどに入れて-20℃で保存する。また、解凍・凍結の繰り返しは CV 悪化の原因となるので極力避ける。

固定液で保存する場合は、細胞分散後に固定液に浮遊させる。固定液としては、表面抗原検索用に使用されるフォルムアルデヒド系の場合、CV 値が悪化する。DA 検索にはアルコール系の方が適しており、70~90%のエタノールで-20℃保存が一般的である。ただし、この方法では数カ月の保存は可能であるが、保存期間が長くなると CV が大きくなるため、できるだけ早期に測定を行なう。組織や細胞の種類によっても違いがあるため、固定液の濃度・温度・保存期間の詳細については各施設で事前に最適な条件を検討しておく。

3-6. パラフィン包埋組織への対応

DA の有無と予後との相関を検討する目的で、一時期、既に予後の明らかとなっている症例を対象として、既存のパラフィン包埋組織などが盛んに検索された。しかしながら、パラフィン包埋組織については、包埋期間により染色性が異なる場合があること、同じように包埋された標準試料を手に入れることが困難であることなどにより、その検索結果の信頼性に欠けることが分かっている。今後は極力新鮮検体による検索が望まれる。

万が一、パラフィン包埋組織を使用する場合は、正常組織を 3 割以上含む検体を準備すること、正常 2 倍体のピークの CV 値=4.0 以内で、慎重に測定、判断することが望まれる。

4. 染色

4-1. 蛍光色素

蛍光色素の選択に際しては、使用する FCM の光源の励起波長により励起可能な蛍光色素を選ぶ必要がある。通常、DNA 染色には phenanthridium 系の propidium iodide (PI)、ethidium bromide (EB) の 2 種類、特に前者が頻用される。その理由としては、これらの蛍光色素の励起スペクトラムが、FCM に一般的に常備されるアルゴン・イオン・レーザーの励起波長に適合するからである。その他、高価ではなく、蛍光量も強く、より良い CV 値の得られることも理由としてあげられる。

ただし、phenanthridium 系は核酸の二重鎖に架橋するため、厳密には DNA 量だけを測定するためには二重鎖 RNA を除去する必要がある。具体的には、ribonuclease (RNase)を加え、二重鎖 RNA を除去する。その他、アルゴン・イオン・レーザーの励起波長に適合する蛍光色素として、chromomycinone 系抗生剤である、chromomycin A3、mithramycin などが挙げられる。これらは選択的に DNA と結合するため、RNase 処理は不要であるが、CV 値は PI などに比べ劣る傾向にある。その他、DNA の生体染色色素として、Hoechst 33258、Hoechst 33342、DAPI (4'-6-diamidinino-2-phenylindole)などがあるが、励起波長が短く、UV レ

ーザーが必要となる。DAPIはPIよりもCVが小さいのが利点である。HoechstはCV値が劣るため、生体染色など特殊な目的を除いては余り使用されない。

4-2. 染色法

DNA染色に際し、PIなどのphenanthridium系では、細胞膜が正常の場合、色素が細胞内、さらには核内に入ることができず、DNA二重鎖と架橋できない。このため、染色液は低張とするか、界面活性剤(TritonX、Nonidet P-40など)を加えるか、或いは細胞をエタノールなどで固定するなど、細胞膜を傷つけておく必要がある。

一般的なPI染色液の例としては、PI50ug/ml of 0.1% sodium citrate+0.1% Nonidet P-40+RNase (1mg/ml)が挙げられる。エタノール固定細胞ではPI 50ug/ml of PBS+RNase (1mg/ml)もしばしば用いられている。尚、%は全て最終濃度である。

染色法としては、対象細胞 $2\sim 3\times 10^6$ 個を試験管にて遠心後、上清を棄却し、pelletの状態に再浮遊させる。その後、上記染色液を1~2ml加え、よく攪拌した後、冷蔵庫にて30分以上静置し、その後、FCMにて測定を行う。具体例を挙げれば、検索対象を生理食塩水などで 50×10^6 個/mlとなるよう浮遊させる。試験管を2本準備し、A)には細胞浮遊液 1ml、B)には 0.5ml 分注する。さらに B)には 50×10^6 個/mlとなるよう調整した標準試料(正常2倍体リンパ球など)を同様に 0.5ml 加えた後、共に、遠心し、上清を棄却した後、pelletの状態に再浮遊させる。その後、上記染色液を1~2ml加え、よく攪拌し、冷蔵庫にて30分以上静置した後、測定に供する。

尚、蛍光は光により退色(quenching)する性質を持っているため、廃棄用以外の試料は極力冷蔵庫内、あるいは銀紙などで遮光して保存しておく。

5. FCMによる測定

5-1. 機器調整

FCMによる試料測定に先んじて、蛍光ビーズなどを用いて事前に機器調整を行い、CV値、直線性を確認し、記録しておく必要がある。特に、蛍光ビーズについては、前方散乱光、側方散乱光そして蛍光の3つについて、ピークチャンネル、CV値、測定条件を記録しておく。DNA測定量に当たっては、表示はすべて常数表示とし、信号処理についても、高さ、幅、面積のうちどれを選択したかを記載しておく。

5-2. 標準試料の測定

対象検体の測定に先だつて、染色法のチェックを行う意味からも、正常ヒト末梢血単核球あるいは脾細胞を標準試料として測定することが望まれる。出来るだけ、毎回同じ標準試料を用いて染色、測定

し、前方散乱光、側方散乱光そして蛍光の3つの光について、ピークチャンネル、測定条件を記録しておく。表示は常数表示とし、信号処理は面積で行うことが勧められる。また、測定の結果、標準試料のCV値(フル・スケールによる)が3.0以上の場合は、染色法、機器調整を再度チェックした後、改めて測定する必要がある。

測定に際してはCV値がDAの検出率に大きく影響することから、事前の機器調整を厳密に行うこと、試料液の速度を出来るだけ緩やかにし、鞘液との速度差(圧力差)を最大にすることによりCV値の改善を図れることから、試料液の細胞濃度はある程度濃く調整した方がよい。

また、4倍体細胞と、2倍体細胞の2個同時通過を鑑別するため、上記の電気信号の処理の仕方による差(細胞集塊除去機能)を利用し、同時通過の可能性を排除しておく。

5-3. 対象検体の測定

5-3-1. 標準試料との比較

標準試料と同様の測定条件で、前方、側方錯乱光、および蛍光のcytogram(サイトグラム)により、標準試料と同様な所に出現するかどうかを確認すると共に、感知器の感度を拡大、縮小させて、スケールアウトした細胞集団がないかどうかを確認しておく必要がある。

5-3-2. ゲーティング

原則として、DNA量測定に際しては、ゲーティングは行わない。ゲーティング範囲外の細胞集団を排除しないためである。このため、ヒストグラム描出時にはスケールアウトしたのも最大チャンネル(例:1024チャンネル)で拾い、集積するよう設定しておく必要がある。

ただし、固形組織からの検体で、明らかにdebris(細胞破片)と判断されるものの混入が過剰な場合は、低2倍体細胞がないことを確認しながら、ゲーティングを行う。

5-3-3. データ保存

データの保存方法としては、後から再検、確認などができるよう、できるだけリスト・モードでの保存が望まれる。

5-3-4. 諸条件によるDA検出率の差(Fig.1, Fig.2参照)

DA検出率の差は、Fig.1に示す如く、測定時のCV値のみならず、正常2倍体細胞とDA細胞との比率DNA Indexにより影響を受ける(Fig.1では実線より下の条件で、DAが検出される)。DNA量測定に際しては、これら条件を十分に考慮に入れ、DAを見逃すことのないよう注意深い測定を行う必要がある。Fig.2にCV値、細胞比率によるDA検出率の差の具体例を示した。

(細胞比率、DI値、CV値による差)

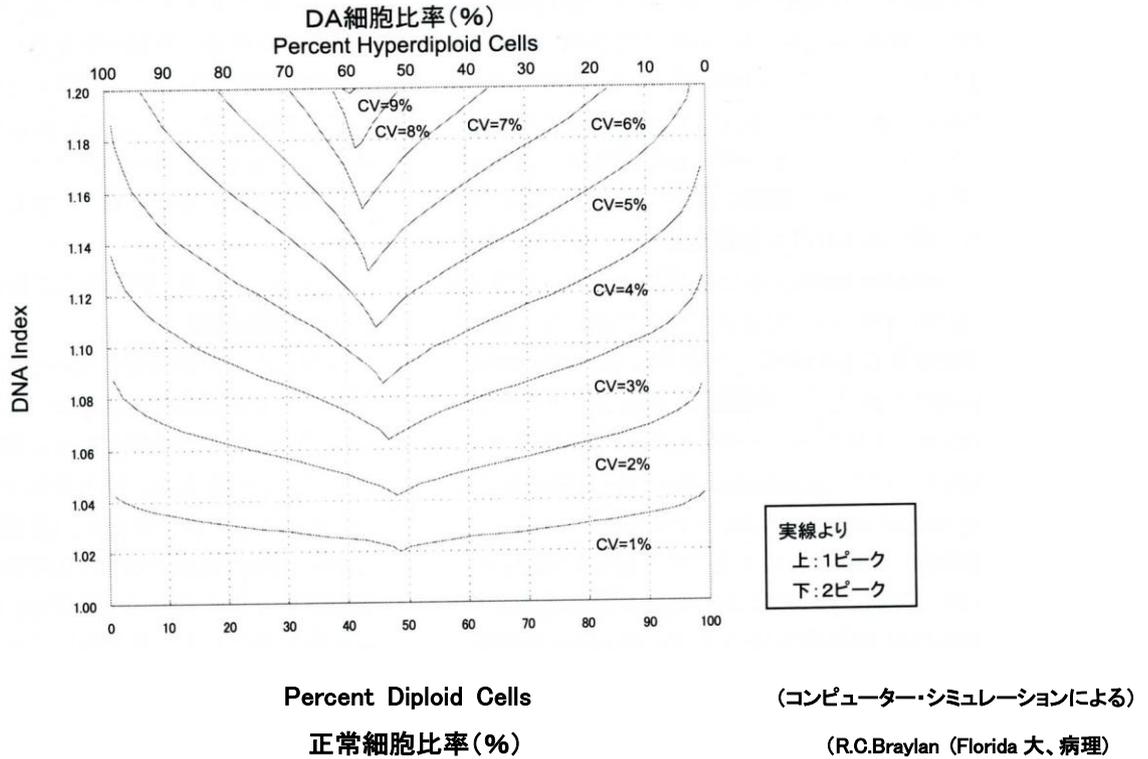


Fig.1 各種条件によるDA検出率の差(コンピューター・シミュレーションによる)

DNA aneuploidy (DA) detection rates change by three factors, namely percent diploid cells, DNA indexes, and CV values (based on computer simulation). In the figure, above each solid line, one peak appears, which indicates DA as undetectable, while below each solid line, two peaks appear, which reveal DA as detectable. Therefore, the higher the DNA indexes, the lower the CV values, and the more frequently DNA aneuploidy detectable.

6. 測定結果の判定(Fig.3 参照)

DA判定に際しては、標準試料(あるいは正常2倍体細胞)10%以上の混入が確認できる検体で、少なくとも二つ以上の独立したG0/1ピークが検出されねばならない。このため、ピークが非対称、あるいは肩を持つというだけではDAと判定されない。ただし、これらの場合はDAの可能性が大きいと考えられ、標準試料の追加、あるいは測定感度の増幅により、明らかな二つのピークが検出されればDAと判定される。事前の機器調整が上手く行われており、CV値も良好であれば、5%以上のDNA量(平均的サイズの染色体2本以上)の異常は検出可能である。

6-1. DNA index (DI) (Fig. 3参照)

DNA量の異常の程度は、DNA index (DI)で表現する。具体的には、DIは検体のG0/1細胞のピーク・チャンネル数を、対照の正常2倍体細胞のG0/1細胞のピーク・チャンネル数で割ったものである。

6-2. 呼称

FCMによるDA検索では、あくまでも細胞一個当たりの相対的DNA量を測定しているものであるため、その判定結果は必ず冒頭にDNAを付記し、従来の染色体分析の結果とは明らかに区別を行なう。例えば、異数体(aneuploidy)が検出された場合は、DNA異数体(DNA aneuploidy (DA)、abnormal DNA stem line)などと称する¹¹⁾。このためDI値が例え1.0、2.0と算定されてもDNA2倍体(DNA diploidy, DNA diploid cell line)あるいはDNA4倍体(DNA tetraploidy, DNA tetraploidy cell line)と称する。

6-3. 正常組織・非腫瘍組織のDA^{20, 13)}

一部の臓器や組織、あるいは細胞調整法によっては、正常組織や非腫瘍組織でありながら、DAが検出される場合がある。内分泌臓器(甲状腺など)、尿路系臓器、重層扁平上皮、消化管粘膜、肉芽組織や脂肪壊死組織、塩化アンモニウム法で溶血処理した白血球などである。これらには、実際のDNA量に異常はなく、細胞調整の過程で何等かの理由により、特定の細胞集団に物理的・化学的変化が生じ、色素の結合性が変化した可能性が示唆されている。このようなDAを

染色体異常を示すDaudi細胞株
(48, XY, 2mar) (右ピーク)に正常
末梢血リンパ球(46, XY)(左ピーク)
を表示の割合だけ加え(横軸)、
ラテックス粒子測定時のCV値(縦軸)
と同条件にて測定した結果を示す。
CV値=2.08では細胞比率による
影響が少なく、すべての比率において
DA が検出されるが、CV 値が高くなる
に従い、DA は検出されにくくなる。

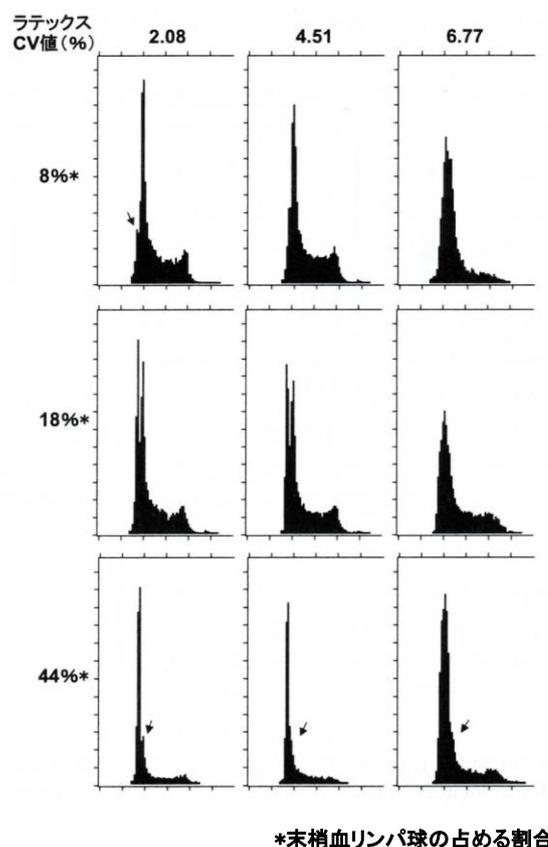


Fig.2 CV 値, 細胞比率による DA 検出率の差(具体例)

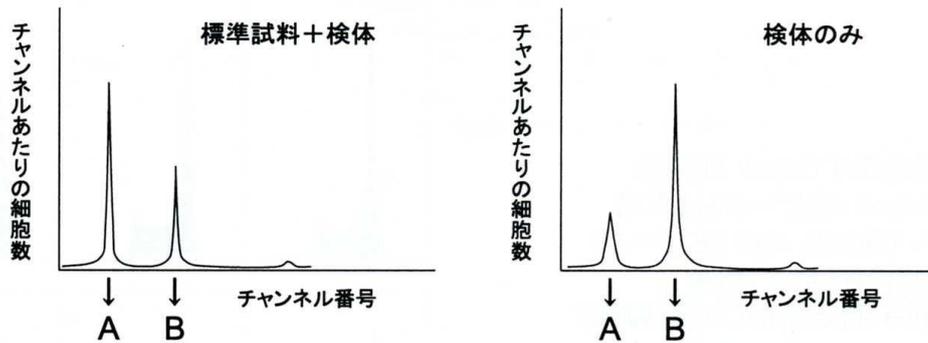
Difference in detection rates of DNA aneuploidy according to CV values and percent normal mononuclear cells. Human Daudi cells, which have chromosomal abnormality (48, XY, 2mar, right peak in each figure) were mixed with normal mononuclear cells (46, XY, left peak in each figure) at the percentages shown on the left of the figure. Samples were determined at the conditions of CV values shown at the top of the figure and displayed as DNA histograms. DNA aneuploidy (two peaks apparent) is easily detectable at the CV value of 2.08; however, it becomes undetectable at higher CV values.

Pseudo-DA、或いは False-DA と呼ぶ場合がある。これらのヒストグラムの特徴は、DI が小さいことである(1.3 以下)が、DI の小さなもの全てが Pseudo DA ではないので、「真」の DA との鑑別は困難である。したがって、測定者はこのような DA があることを念頭において DA の研究を進める必要がある。また、この点においても検体の病理組織標本を作製することの重要性がある。

参考文献

- 1) Andreeff M, Darzynkiewicz Z, Sharapless TK: Discrimination of human leukemia subtypes by flow cytometric analysis of cellular DNA and RNA. *Blood* 55 : 282-293,1980.
- 2) Barlogie B, Hittelman W, Spitzer G, et al:Correlation of DNA distribution abnormalities with cytogenetic findings in human adult leukemia and lymphoma. *Cancer Res* 37 : 4400-4407, 1977.
- 3) Braylan RC, Diamond LW : Flow analysis of hairy cell leukemia. *Leukemia Res* 4 : 177-183, 1980.
- 4) Coon JS, Deitch AD, de Vere White RW, et al : Interinstitutional variability in DNA flow cytometric analysis of tumors. *Cancer* 61 : 126-130, 1988.
- 5) Crissman HA, Tobey RA : Cell cycle analysis in 20 minutes. *Science* 184 : 1297-1298, 1974.
- 6) Dittrich W, Goehde W : Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen. *Z Naturforsch* 24b : 360-361, 1969.
- 7) Esteban JM, Sheibani K, Owens M, et al : Effects of various fixatives and fixation conditions on DNA ploidy analysis, A need for stric internal DNA standards. *Am J Clin Pathol* 95 : 460-466, 1991.
- 8) Goehde W, Dittrich W : Simultane impulsfluorimetrie des DNS- und proteingehaltes von tumorzellen. *Z Anal Chem* 252 : 328-330, 1970.

1) DAの判定(二つ以上の独立したG_{0/1}ピークの検出)



2) DNA Index = B / A

3) 下記の場合は, DAとは判定しない。機器調整・試料調整後, 再測定が望ましい。

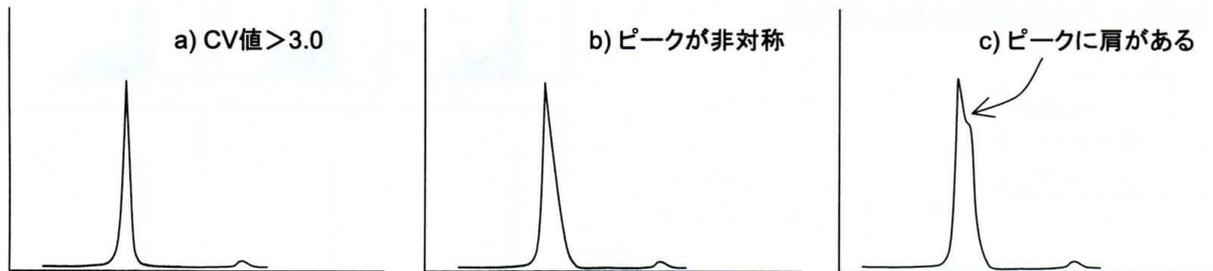


Fig. 3 測定結果の判定

Evaluation of the results. 1) DNA aneuploidy should be evaluated when at least two definite, separate G_{0/1} peaks are demonstrated. In order to identify normal G_{0/1} peaks, determination of samples with normal diploid standards (normal mononuclear cells) is recommended. 2) DNA Index (DI) is the ratio of the mean channel of the relative DNA contents of the G_{0/1} cells of the sample divided by the mean channel of the relative DNA contents of the diploid G_{0/1} reference cells. 3) The samples provided should not be evaluated as DNA aneuploidy. These samples are recommended to be determined again after readjustment of the instrument and/or the sample.

- 9) Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW : Method for analysis of cellular DNA content of paraffin-embed-ded pathological material using flow cytometry. J.Histochem Cytochem 31 : 1333-1335, 1983.
- 10) Herzenberg LA, Sweet G, Herzenberg LA : Fluorescence activated cell sorting. Scientific American, 234(3) : 108, 1976
- 11) Hiddemann W, Schuman J, Andreeff M, et al : Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry 5 : 445-446, 1984.
- 12) Hoshino T, Knebel KD, Rosenblum ML, et al : Clonogenicity of multiple populations of human glioma cells in vitro sorted by DNA content. Cancer 50 : 997-1002, 1982.
- 13) Joensuu H, Alanen KA, Klemi PJ, et al : Evidence for false aneuploid peaks in flow cytometric analysis of paraffin-embedded tissue. Cytometry 11 : 431-437, 1990.
- 14) Kamensky LA, Melamed MR, Derman H : Spectrophotometer; New instrument for ultrarapid cell analysis, Science, 150 : 630-631, 1965.
- 15) Krishan A : Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J Cell Biol 66 : 188-193, 1975
- 16) Latreille J, Barlogie B, Dosik G, et al : Cellular DNA content as a marker of human multiple myeloma. Blood 55 : 403-408, 1980.
- 17) Look LA, Roberson PK, Williams DL, et al : Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 65 : 1079-1086, 1985.
- 18) Madden RE, Burk D : Production of viable single cell suspension from solid tumor. J Natl Cancer Inst 27 : 841-861, 1961.
- 19) Melamed MR, Mullaney PF, Mendelsohn ML (editors) : Flow cytometry and sorting, Wiley-Liss, N.Y., 1990.
- 20) 小賀厚徳、村上知之、近藤智子、他 : Flow Cytometer による DNA 量測定—PI 染色、DNA ヒストグラム解析、coefficient variation を中心として、Cytometry Research14(2) : 15-21, 2004.

- 21) 大田和義、監修:フローサイトメトリー、手技と実際、蟹書房、東京、1988.
- 22) Sasaki K, Hashimoto T, Kawachino K, et al : Intratumoral regional differences in DNA ploidy of gastrointestinal carcinomas. *Cancer* 62 : 2569-2575, 1988.
- 23) Scutte B, Reynders MM, Bosman FT, et al : Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. *Cytometry* 6 : 26-30, 1985.
- 24) 高本滋、加藤栄史:腫瘍マーカーとしての DNA 異数体の解析、臨床血液、31:729-735, 1990.
- 25) 高本滋:各施設における DNA 量測定の現状について、*Cytometry Research*, 1:77-84, 1991.
- 26) Taylor IW : A rapid single step staining technique for DNA analysis by flow microfluorimetry. *J Histochem Cytochem* 28 : 1021-1024, 1980.
- 27) 天神美夫、監修:応用サイトメトリー、医学書院、東京、2000.
- 28) Trujillo TT, Van Dilla MA : Adaptation of the fluorescent feulgen reaction to cell in suspension for flow microfluorometry. *Acta Cytol* 16 : 26-30, 1972.
- 29) Trujillo JM, Cork A, Hart JS, et al : Clinical implications of aneuploid cytogenetic profiles in adult acute leukemia. *Cancer* 33 : 824-834, 1974.
- 30) 鶴澤正仁、片野直之、青山真理、他:小児急性リンパ球白血病における DNA aneuploidy の臨床的意義の検討。臨床血液、27:158-164, 1986.
- 31) Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, et al : Cell microfluorometry : A method for rapid fluorescence measurement. *Science* 163 : 1213-1214, 1969.
- 32) Vindeloev LL : Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions. *Virchows Arch Cell Pathol* 24 : 227-242, 1977.
- 33) Wheelles LL, Coon JS, Deitch AD, et al : Measurement variability in DNA flow cytometry of replicate samples, *Cytometry* 10 : 731-738, 1989.