

問題 1 フローサイトメトリー（以下、FCM）の原理や特徴について誤りはどれか。

1. フローサイトメーターは個々バラバラの細胞や粒子を流路に流し、1つずつに光を当て、それから放出される光の強さを測定する機械である。
 2. FCM では細胞集団における特定の細胞内物質の平均量を迅速に測定することができるが、個々の細胞についてその量を知ることはできない。
 3. FCM ではかならず細胞に何らかの蛍光染色を施さねばならない。
 4. 細胞スマアを直接測定できるフローサイトメーターはない。
 5. 迅速性、客観性（数量的解析）、マルチパラメータ測定、ソーティングがすべてのフローサイトメーターに共通の特徴である。
- a. 1, 3, 4 b. 2, 3, 4 c. 2, 3, 5
d. 2, 4, 5 e. 3, 4, 5

問題 2 以下の測定項目のうち、FCM の対象でないものはどれか。

- a. 細胞の大きさや細胞内部構造の粗さ
- b. 細胞物質（抗原、蛋白、核酸、酵素など）の量
- c. 細胞内 pH や細胞内カルシウムイオン濃度
- d. 細胞の貪食能や細胞内酵素活性
- e. 細胞の DNA 合成能やアポトーシス細胞の同定
- f. 液状検体中の物質（サイトカインなど）の濃度
- g. 細胞像や物質の細胞内分布画像

問題 3 フローサイトメーターの流路について誤りはどれか。

1. 励起光が細胞に当たる付近では、層流という乱れのない流れが形成されている。
 2. 励起光が細胞に当たる付近では、シース液が細胞を含むサンプル液を円筒状に包んでいる。
 3. シース液の目的は、サンプル液中の夾雑物でフローセルやノズルが汚れたり、目詰まりするのを防ぐことである。
 4. サンプル圧が高いほど測定精度は高い。
 5. ソーティングのためにはかならず、液体を空中に噴出させる必要がある。
- a. 1, 3, 4 b. 1, 2, 5 c. 2, 3, 4
d. 2, 3, 5 e. 3, 4, 5

問題 4 ソーティングのメカニズムについて誤りはどれか。

1. ジェット・イン・エア方式では、液体はノズルから空中に出た瞬間から層流でなくなる。
 2. ノズルに上下振動を与えると、ノズルから落下する水柱はある地点から水滴になり、その位置は振動数と振幅に依存する。
 3. フローサイトメーターは、目的の細胞が励起光を横切ると delay time を待って帯電用電極に信号を送り、その細胞を含む水滴を陽性、あるいは陰性に帯電させる。
 4. 帯電水滴は電場のかかった空間を通過する際に落下方向が曲げられ、回収容器の中に落下する。
 5. フローセルのおもな役割は、大きさの揃った水滴を作ることである。
- a. 1, 2 b. 2, 3 c. 3, 4
d. 4, 5 e. 1, 5

問題 5 フローサイトメーターの光学系について誤りはどれか。

1. 励起光はレーザー光でなければならない。
 2. フローサイトメーターにもっとも多く使用されているレーザーはアルゴン（Ar）レーザーで、波長は 630 nm である。
 3. 互いに蛍光波長の異なる色素で重染色した細胞を同時測定する場合、レーザーを複数搭載した機種でなければならない。
 4. フィルターは一定の波長の光のみを通過させ、他の波長の光を反射する。
 5. 散乱光も蛍光もすべて光電子倍增管（PMT）で検出される。
- a. 1, 2, 5 b. 1, 3, 4 c. 2, 3, 4
d. 2, 3, 5 e. 1, 2, 3, 5 f. すべて

問題 6 蛍光色素について正しいのはどれか。

1. 蛍光色素はある波長帯の光をエネルギーとして吸収し、それよりも短い波長の光を蛍光として放射する。
2. 蛍光色素はそれぞれ固有の吸収波長分布と蛍光波長帯分布を有している。
3. 核酸の染色に用いられる色素としては、PI, EB, 7-AAD, AO, DAPI, Hoechst 33342 などがある。このうち PI, EB, 7-AAD の励起には紫外線が用

- いられる。
4. 抗体の標識に用いられる色素のうち、488 nm の励起が適している色素は FITC, PE, Cy3, Cy5, PE-Cy5, PerCP である。
5. APC は 635 nm の励起が適した色素であり、抗体の標識などに用いられる。
- a. 1, 3 b. 1, 5 c. 2, 3
d. 2, 5 e. 3, 4 f. 3, 5

6 回にわたり以下の内容に関する疑似問題の出題・解答・解説を行う。

- 1, 2 回目：FCM の特徴，機械の構造とメカニズム，測定の原理，色素の特徴
3, 4 回目：細胞 DNA 量の測定，DNA と抗原の 2 重測定
5, 6 回目：血液細胞・造血器腫瘍細胞の表面抗原の測定

なお，本シリーズでのキーワードは掲載しない。日本サイトメトリー学会の学会誌に受験のための到達目標が掲載されているので参考にされたい。

問題 1 c

×2：FCM は細胞 1 コずつのデータを記憶してゆく。ホモジナイズした細胞集団の電気泳動などとは異なる。もちろん，FCM では平均量や分散などの統計値も簡単に算出できる。

×3：励起光の一部は色素に吸収され，蛍光発生のエネルギーとなるが，大部分は細胞に当たって散乱する。この散乱光も測定の対象であり，蛍光染色の有無に関係ない。前方散乱光は細胞の大きさを，側方散乱光は細胞内部の粗さを表す。

○4：細胞を浮遊状態で流して（フロー）測定するのがフローサイトメーター。スマアを測定するのはレーザースキャンサイトメーター（LSC）である。LSC は細胞像やその座標も同時に記憶できるが，FCM はできない。

×5：ソーティングのできる機種を（セル・）ソーターとよぶ。測定・解析のみの機種を（セル・）アナライザーとよぶ。

問題 2 g

FCM の欠点は，細胞形態を直接に観察・記憶できないことである。細胞をソーティングし，顕微鏡でみるしかない。LSC では可能。f はビーズを利用した新しい FCM の技術。

問題 3 e

○1：層流（ラミナフロー）とは，どの点も平行に同じ向きに流れる水流のこと。

○2：細胞を含むサンプル液をシース液が円筒状に包む。どちらも層流なので混ざらない。細くなった流路（フローセルやノズル）を両者が通る時，流体力学的絞り込みという現象が起こり，サンプル流が細くなって細胞は 1 列に並ぶ。

×3：シース液の役割は，流体力学的絞り込みへの寄与である。

×4：シース液やサンプル液は，コンプレッサ圧でシースタンクやサンプルチューブから流路に押し出される。サンプル圧が高すぎると流体力学的絞り込みが弱くなるため，細胞の同時通過が多くなり，測定の精度が下がる。

×5：枝分かれた流路から細胞を抜き取る方式などもある。ただし，空中に噴出する方式が一般的。

問題 4 e

×1：ノズルから空中に噴出した水柱はしばらく層流を保つ。この間に励起光の照射と蛍光の測定が行われる。これをジェット・イン・エア方式という。

○2：水滴になる地点（時点）を break of point とよぶ。

○3：細胞が励起光を横切る時（すなわち，モニター画面に設定した領域に細胞が出現した時点）か

ら水滴に切り離されるまでの時間を delay time とよぶ。

○4：回収容器は試験管やスライドガラスである。マイクロプレートに細胞を振り分ける機種もある。不要の水滴（細胞）は帯電していないので真下に落ちる。

×5：フローセルの役割は流体力学的絞り込みの場であることと、石英ガラスの壁を通して感度の高い光検出を可能にすること。フローセルを用いたソーターではフローセルの下側がノズルとなっており、フローセルで光の照射・測定を、ノズル部で水滴形成を行う。このタイプでは、ノズル部を合わせてフローセルとよぶことも多い。なお、1の説明はフローセルのないクラシックタイプの場合であり、光の照射・測定位置が異なる。また、アナライザーでは水滴形成の必要がないので、フローセルにノズル部はない。

問題5 f

×1：レーザーとは、波長と方向が単一で、位相の揃った光のこと。励起可能な色素は限られるが、出力が強く安定である。最近の機種はほとんどレーザー励起。しかし、連続的な波長域の光を出す水銀アークランプを用いた機種もある。さまざまな吸収波長の色素に対応できるが、出力が弱い。

×2：Ar レーザーがもっとも使用されているが、波長は 488 nm で用いられる。その理由は、488 nm の励起で強い蛍光を発する色素が多いことと、Ar レーザーはこの波長の時に出力が大きいことである。630 nm もよく利用される励起波長であるが、ヘリウム・ネオンレーザーが適している。

×3：励起波長が異なる色素ならば複数のレーザーが必要だが、励起波長が同じであれば1台でよい。

×4：問題文はダイクロックミラーのこと。フィルターは一定の波長を通過させ、他の波長を吸収するものである。両者をうまく組み合わせると、異なる色素からの蛍光を別々の光検出器に導くことができる。

×5：前方散乱光だけは強い光なので PMT は不適當。フォトダイオードを使用。なお、前方とはいつでもこれはレーザーの進入方向に対してわずかにズレた位置におかれているので注意（1°～19°程度）。

問題6 d

×1：吸収した光の波長よりも長い波長の光を放射する（ストークスの法則）。なお、励起光とは大ざっぱにいうと蛍光を放射させるために細胞（色素）に当てる光のことであり、吸収波長域の光である。

○2：なお、励起する波長を変えても、蛍光波長分布は変わらない。

×3：第1文は正しい。PI (propidium iodide), EB (ethidium bromide), 7-AAD (7-amino-actinomycin D), AO (acridine orange) の励起には 488 nm が、DAPI と Hoechst 33342 の励起には紫外線（400 nm 未満）が用いられる。

×4：Cy5 だけが 635 nm 励起である。なお、PE と Cy5 を結合させた色素 PE-Cy5 は、488 nm で励起された PE の蛍光が Cy5 の励起光として Cy5 に吸収され、Cy5 が蛍光を発する。このような色素複合体をタンデム色素という。

○5：635 nm 近辺の励起はヘリウム・ネオンレーザーが適している。

（国立療養所山陽病院 臨床研究部 村上知之）

問題 1 固形組織の細胞分散処理について誤った記述はどれか。

1. 採取直後に測定できない場合は、組織をアルコールやホルマリンで固定して保存し、後で細胞分散を行えばよい。
 2. 界面活性剤を用いた新鮮組織の分散法には、簡便、迅速、高分散力という利点があるが、細胞質内抗原の測定や長期の細胞保存には不適當である。
 3. 細胞質内抗原の測定には、ハサミやメスによる機械的分散に組み合わせて、トリプシンやコラゲナーゼなどの酵素を用いた細胞分散を行うことが多い。
 4. 分散後の細胞数を計測したり、形態を観察する必要がまったくないのが FCM の長所である。
 5. 最近の FCM には細胞集塊を単一細胞から識別する機能があるため、ナイロンフィルターによる細胞集塊除去は不要となった。
- a. 1, 2, 3 b. 2, 3, 4 c. 3, 4, 5
d. 1, 4, 5 e. すべて

問題 2 細胞核 DNA 量の FCM 測定から得られる情報は何か。

1. 細胞集団における G₀ 期, G₁ 期, S 期, G₂ 期, M 期それぞれの細胞数 (比率)
 2. 細胞の増殖状態
 3. ploidy の異常
 4. アポトーシス
 5. 癌遺伝子の増幅・欠失
- a. 1, 2, 3 b. 2, 3, 4 c. 3, 4, 5
d. 1, 2, 5 e. すべて

問題 3 細胞核 DNA 量を FCM で測定する際に使用される色素についての記述で誤りはどれか。

1. PI を用いた DNA 量測定では細胞を固定するか、界面活性剤などで細胞膜の透過性を亢進させなければならない。
2. Hoechst 33342 は生細胞で染色できるが、488 nm のアルゴンレーザーでの励起には適さない。
3. DAPI は高い測定精度 (小さい CV) の得られる DNA 染色色素であり、しかも 488 nm アルゴンレーザーの励起が適しているため、最近では

DNA 量測定にもっとも頻繁に使用されている。

4. PI による DNA 量測定では RNase 処理はかならずしも必要でない。
 5. AO は DNA にも RNA にも結合し、DNA に結合した AO は緑色蛍光を、RNA に結合した AO は赤色蛍光を発するので、DNA と RNA の同時測定に適している。
- a. 1, 2 b. 2, 3 c. 3, 4 d. 4, 5
e. 1, 5

問題 4 ヒトなどのホ乳類体細胞の細胞周期について誤った記述はどれか。

1. 細胞周期を 1 回転 (G₁→S→G₂→M→G₁) する時間の長さ (細胞周期時間) は、同じ個体でも細胞の種類によって大きく異なり、数時間から数百時間までさまざまである。
 2. 細胞集団 (組織や臓器) の成長速度は、細胞周期時間にのみ依存する。
 3. 休止期細胞の多くは G₀ 期である場合が多く、その DNA 量は G₁ 期と同じである。
 4. 一般に G₁ 期の時間をもっとも長く、M 期をもっとも短い。
 5. DNA が障害されると、p53 蛋白などによるチェックポイント機能が働くことにより、細胞周期は G₁ 期で停止する場合がある。
- a. 1, 2 b. 2, 3 c. 3, 4 d. 4, 5
e. 1, 5

問題 5 ヒトなどのホ乳類体細胞の DNA ヒストグラムについて、正しい記述はどれか。

1. 増殖細胞の多い正常組織 (胃粘膜, 表皮, 再生肝組織, 肉芽組織など) の DNA ヒストグラムは、一般的に 2 峰性である。
2. 正常 2 倍体細胞の G₀/G₁ 期の DNA 量を 2C と表記するのが一般的である。
3. G₂/M ピークのチャンネル数は、G₀/G₁ ピークのそれのおよそ 2 倍となる。
4. 機械や染色条件が同じであっても、S 期細胞 (とくに S 期初期) の多い細胞集団の G₀/G₁ ピークは、S 期のない細胞集団のそれよりも幅が広くなり、ピークチャンネルがやや大きくなったり

することがある。

5. 試料調整（細胞分散や DNA 染色など）がうまくいっているかどうかの指標として、検体と同様に調整した正常 2 倍体休止期細胞（末梢血リンパ球など）の G0/G1 ピークの CV 値が用いられる。
- a. 1, 2, 3 b. 2, 3, 4 c. 3, 4, 5
d. 1, 4, 5 e. すべて

問題 6 FCM 結果の解釈や評価について、誤りのあるのはどれか。

1. DNA ヒストグラムの S 期比率が高いことは、その細胞集団の成長速度が速いことをかならず意味する。
2. DNA ヒストグラムが G0/G1 ピークのみで、S 期

と G2/M 期がまったく存在しないパターンの場合、すべての細胞が G0 であるという以外には考えられない。

3. ある抗原の発現量と細胞周期との関係を知りたい場合、FITC 標識抗体と PI で細胞を二重に染色し、FCM で同時測定すればよい。
4. DNA と BrdU の同時測定の結果、S 期比率が BrdU 陽性率よりも小さくなるということは、生物学的には考えにくい。
5. DNA と Ki-67 反応性抗原の同時測定を行えば、休止期細胞の比率を詳しく求めることができる。
- a. 1, 2 b. 2, 3 c. 3, 4 d. 4, 5
e. 1, 5

問題 1 d

× 1：組織は固定されると細胞分散がむずかしくなる。組織を凍結保存し後で細胞分散するか、あるいは細胞分散した細胞を固定保存するのがよい。

○ 2：Triton-X 100 などの界面活性剤は、核 DNA 量の測定には大変有効である。しかし、細胞膜・細胞質を破壊するので、そこに存在する物質の測定には不向きといえる。また、界面活性剤で分散した細胞は長く放置できないし、固定保存もできない。

○ 3：この方法で分散した細胞は、細胞膜や細胞質の破壊が少ない。固定保存も可能である。ただし、膜表面の蛋白は消化される可能性があるので要注意。

× 4：形態観察できないのが FCM の欠点である。実験によっては、どのような細胞が含まれているか、適切な細胞数が得られたか、細胞集塊や変性の状況はどうか、などを顕微鏡で調べる必要も出てくるであろう。

× 5：大きな細胞集塊や夾雑物は流路を詰まらせるおそれがあるので、ナイロンメッシュでそれらを除く必要がある。

問題 2 b

× 1：G0 期と G1 期、G2 期と M 期はそれぞれ DNA 量が等しいので、DNA 量のみでは識別できない。G0 期と G1 期を区別するには、DNA と Ki-67 の二重測定が必要（**問題 6** 参照）。

○ 2：DNA ヒストグラムのパターンの時間変化をみると、細胞周期の進行状況が読みとれる。

○ 3：正常細胞と DNA 量の異なる細胞集団は異数倍体（aneuploidy）の場合が多い。癌細胞の多くは aneuploidy である。

○ 4：アポトーシス細胞は DNA が断片化されている。細胞膜透過性亢進処理を施すとアポトーシス細胞は DNA 断片を失うので、DNA 量の少ない細胞群（Sub-G1）として FCM で同定することができる。

× 5：単なる DNA 量の測定では増加・欠失した遺伝子そのものを同定できない。FISH 法が必要である。

問題 3 c

○ 1：生細胞には PI などの一部の色素を細胞外に汲み出す働きがあるので、生細胞の核を PI で染めることはできない。生死判定に利用できる。

○2：紫外線 (UV) 励起が適している。

×3：DAPI 染色は正確な DNA 量測定を可能にするが、UV 励起が必要なので、PI ほどは使用されていない。

×4：PI は二重鎖ヌクレオチドに結合するので、二重鎖部分のある RNA 分子 (tRNA など) にも結合する。そのため、正確な DNA 量の測定には RNA 消化は必須である。

問題4 a

×1：細胞はいったん細胞周期に入ると、回転に要する時間は細胞種によらず、また癌細胞であってもあまり変わらない。20~30 時間が多い。

×2：細胞周期時間はあまり差がないので依存度は低い。増殖分率(全細胞における増殖細胞の割合)やアポトーシス指数(どのくらいの頻度で細胞が死ぬか)が、細胞集団の成長や退縮のスピードに大きく依存する。

○3：まれであるが、G2, S, M 期でも一時的に休止状態になることがある。

○5：異常な DNA を複製させないために細胞周期を停止し、DNA を修復する。

修復が終われば S 期に入る。修復できなければアポトーシス。この機構を G1 チェックポイントという。その他、M 期直前の G2 チェックポイントや、染色体が紡錘糸に結合した時点での metaphase checkpoint など知られている。

問題5 e

○1：G0/G1 (2C) ピークと G2/M (4C) ピークがあり、その谷間が S 期領域。ただし、骨髄細胞には種々の多倍数体からなる巨核球が存在するので、2C, 4C, 8C, 16C, 32C, 64C, 128C にもピークのあるヒストグラムとなる。

○2：細胞遺伝学分野では正常 2 倍体の染色体数を 2N と表記するが、FCM では DNA の「量」に注目しているので N は用いず、「C」を単位とする。

○3：およそ 2 倍である。論理的には、G2/M 期細胞の DNA 量は G0/G1 期細胞のちょうど 2 倍である。ただし、実際の測定結果は 2 倍よりやや小さい。G0/G1 ピークの位置は S 期初期細胞の影響で本来の位置よりもやや右寄りになり、G2/M ピークは S 期末期細胞の影響でやや左に寄るからである。

○4：S 期初期と G0/G1 期とでは DNA 量が近似しているためである。

○5：機器の調整については市販の標準粒子でよい。

問題6 a

×1：確かに高い S 期比率はさかんな増殖能を反映する場合が多い。しかし、薬剤などを用いて S 期の途中や G2 期の入り口で細胞周期の進行を止め、細胞を S 期に集積させることもできる。

×2：確かに G0/G1 ピークのみの場合、すべての細胞が G0 であることが多い (正常の末梢リンパ球や神経細胞)。しかし、薬剤などを用いてほとんどの細胞を特定の細胞周期に集積させ、そのまま増殖を再開させることも可能である。たとえば、経時的に DNA ヒストグラムを測定し、単一ピークが G0/G1 から S 期、G2/M 期へ移動することが観測されれば、増殖していることになる。

○3：横軸を DNA 量 (細胞周期)、縦軸を抗原量のドットプロット表示にすると両者の関係は一目瞭然である。

○4：BrdU は複製中の DNA に取り込まれるので、DNA 合成中の細胞のみが陽性となる。S 期の細胞であっても DNA 合成を休止しているものもあるので、BrdU の陽性率は S 期比率をこえないはずである。

○5：Ki-67 反応性抗原 (MIB-1) は増殖中の細胞に発現される。DNA との同時測定により、各細胞周期での非増殖細胞の比率も解析できる。 (国立病院機構山陽病院 臨床研究部 村上知之)

問題 1 DNA ploidy に関連する以下の記述のうち、正しいものはどれか。

1. DNA ploidy は、G₀/G₁ 期細胞の DNA 量が基本 DNA 量(染色体 1 セット分の DNA 量: 単位「C」)に対して何倍か(倍数性)を表す用語である。
 2. DNA diploidy (DD) とは、G₀/G₁ 期において基本 DNA 量 (1C) の 2 倍の DNA 量 (2C) を有する細胞のことであり、通常、多くの正常体細胞が DD である。
 3. 正常精子細胞は染色体を 1 セットしかもっていないので DNA haploidy であり、その G₀/G₁ 期細胞の DNA 量は 1C である。
 4. DD の G₂/M 期の DNA 量は 4C である。
 5. G₀/G₁ 期細胞の DNA 量が C の整数倍であることを DNA polyploidy といい、とくに 4C の細胞を DNA tetraploidy という。
- a. 1, 2, 3 b. 2, 3, 4 c. 3, 4, 5
d. 1, 4, 5 e. すべて

問題 2 DNA aneuploidy (DA) についての記述のうち、誤りはどれか。

1. DNA ヒストグラム上、正常 2 倍体細胞の G₀/G₁ ピークとは明らかに異なる(深い谷で隔てられた) G₀/G₁ ピークを有する細胞集団はすべて DA と判定する。
 2. DNA ヒストグラム上、2C ピークに「肩」が形成された場合、「肩」を DA と判定してはならない。
 3. DNA ヒストグラムから試料細胞の DNA Index (DI) を求めるには、試料細胞の G₀/G₁ ピークチャンネル数を正常 2 倍体細胞の G₀/G₁ ピークチャンネル数で除せばよい。
 4. DI が 0.75, 1.02, 1.55, 2.00, 3.00, 4.73 の細胞集団はいずれも DA である。
 5. 腫瘍組織から DA を検出する際、組織中の非腫瘍細胞が内部標準となるため、標準試料(正常 2 倍体細胞)を利用する必要はまったくない。
- a. 1, 2, 3 b. 2, 3, 4 c. 3, 4, 5
d. 1, 4, 5 e. すべて

問題 3 ヒトや動物の組織(腫瘍・非腫瘍)の DNA ヒストグラムのパターンについて、正しい記述はどれか。

1. 癌細胞はすべて DA であり、良性腫瘍はすべて DD である。
 2. 癌細胞は正常細胞に比べて S 期や G₂/M 期の比率の高い傾向にある。
 3. 癌細胞は正常細胞に比べて G₀/G₁ ピークの CV が大きい傾向にある。
 4. 1 つの癌では 1 種類の DA しかみられない。
 5. 正常組織や反応性病変の DNA ヒストグラムは、かならず DD パターンである。
- a. 1, 2 b. 2, 3 c. 3, 4 d. 4, 5
e. 1, 5

問題 4 DA の細胞学的、あるいは臨床的な意義について正しいものはどれか。

1. DA は、染色体の数や構造の異常を反映している。
 2. 成人では、DA の癌が DD の癌に比べて予後の悪い傾向にある。
 3. 小児では、DA の癌が DD の癌に比べて予後の悪い傾向にある。
 4. あるヒト組織の DI が 1.4 以上の場合、機器や試料が正しく調整され、壊死・変性のない組織であっても、悪性の可能性が高いとはいえない。
 5. 悪性リンパ腫症例のほとんど(90%以上)は DA である。
- a. 1, 2 b. 2, 3 c. 3, 4 d. 4, 5
e. 1, 5

問題 5 DNA 量の測定・解析に関する以下の文章のうち、誤っているのはどれか。

1. DA 測定のための理想的な標準試料とは、検体と同一個体の、同一組織からの正常 2 倍体細胞である。
2. 新鮮な組織を Triton-X 100 などの界面活性剤処理で分散・染色するよりも、ホルマリン固定パラフィン包埋組織を酵素分散・染色した方が CV が小さい。
3. 新鮮組織を凍結保存するよりも、パラフィン包埋して保存した方が CV がよい。

4. 固形癌組織の DA の有無や DI を調べるには、腫瘍の中心部から 1 カ所採取すれば十分である。
5. 癌組織の DNA ヒストグラムが DD パターンである場合、ヒストグラムから単純に解析された各細胞周期の割合を癌細胞のそれと判断してはならない。
- a. 1, 2, 3 b. 2, 3, 4 c. 3, 4, 5
d. 1, 4, 5 e. すべて

問題 6 以下は FCM を用いたさまざまな測定についての記述である。誤った記述はどれか。

1. アポトーシス細胞を生きている細胞よりも DNA 量の少ない細胞として同定する方法は、TUNEL 法とよばれている。
2. 細胞の貪食能を FCM で測定することができる。
3. ある抗原の発現と細胞周期との関係を FCM で調べるためには、核 DNA を PI で、抗原を FITC 標識抗体で二重染色し、両者を同時測定するのが一般的である。
4. Rhodamin 123 は細胞のミトコンドリア活性を調べる際に用いられる色素である。
5. BCECF は細胞内カルシウム測定に用いられる色素である。
- a. 1, 2 b. 2, 3 c. 3, 4 d. 4, 5
e. 1, 5

問題 1 e

- 1 : 単に「ploidy」という場合は、染色体の「数」の倍数性に関する用語である。基本染色体数は「N」で表す。ヒトの場合、N は 23 (22+性染色体 X, あるいは Y) である。
- 2 : 単に「diploidy (2 倍体)」という場合は、染色体の「数」が 2N の細胞をいう。多くの体細胞は 2N であり、その G₀/G₁ 期の DNA 量が 2C である。
- 3 : 未受精卵も DNA haploidy である。受精すると染色体数は 2N となり、その G₀/G₁ 期細胞の DNA 量は 2C である。
- 4 : 増殖している DD の DNA 量は、 $2C \leq \text{DNA 量} \leq 4C$ に分布する。
- 5 : DNA tetraploidy は正常の骨髄巨核球や再生の盛んな肝細胞などにみられる。巨核球にはその他に G₀/G₁ 期細胞 DNA 量が 8C, 16C, 32C, 64C…などの DNA polyploidy が存在する。

問題 2 d

- × 1 : すべてではない。DNA tetraploidy の場合は DA としないことになっている。DA と判定するのは G₀/G₁ ピークの DNA 量が C の非整数倍、もしくは 2^k 以外の整数倍 (3C, 5C, 6C, 7C, 9C, …) の時である。 $2^k C$ の DNA polyploidy は DA としない (k : 自然数)。
- × 4 : DI=2.00 (DNA tetraploidy) は DA として取り扱わない。
- × 5 : DNA Index が 1 に近い DA で、しかも正常細胞が少ない場合は、DD と誤認される可能性がある。このような場合、コントロール細胞 (正常 2 倍体細胞) を加えると、異常ピークであることが明らかになることがある。

問題 3 b

- × 1 : ヒト癌における DA の頻度は 50~80% である。一方、良性腫瘍でも DA の場合がまれにある。ただし、良性腫瘍の DI は小さく、ほとんどが 1.3 未満である。1.4 以上はほとんど癌と考えてよい。
- 2 : 癌組織では、多くの正常組織に比べて増殖細胞の割合が高い。したがって、S 期や G₂/M 期の比率が高い。
- 3 : 癌細胞は染色体構成が変化しやすい、すなわち基本 DNA 量 (DNA ploidy) が変化しやすいという特性がある。変化量が大きければ、異なる DNA 量を有する集団 (DD と DA, あるいは複数の DA) として検出できるが、変化量が小さい場合は幅の広い (CV の大きい) 1 つの G₀/G₁ ピークとなる。
- × 4 : 癌組織にはしばしば DA が複数みられる。このことを DA の heterogeneity という。CV は変動

係数 (coefficient of variation) の略語で、データ分布の幅の広さを示す。CV (%) = 標準偏差 ÷ 平均値 × 100 で表される。FCM では解析ソフトが算出してくれる。CV は FCM 測定が正しく行われたかどうかの指標としても役立つ。たとえば、正常 G1 期細胞の DNA ヒストグラムは理想的には 2C の位置に 1 本棒が立つ形 (CV=0%) になるべきだが、実際の測定では誤差が生じ、幅のあるピークを形成する。この幅が狭いほど、すなわち CV の値が小さいほど正しい細胞調整、機器設定、測定が行われたことになる。G1 ピーク CV が 1% 台は excellent, 2% 台は good, 3% 台は fair, 4% は poor. 5% 以上はデータとして採用しがたい。

× 5: 正常組織や非腫瘍組織においても、まれに DA と区別できない異常ピークが検出されることがある。これは DNA ploidy の違いに起因するものではなく、細胞調整に基づく細胞の物理化学的变化により、色素との結合性の異なる細胞群が生じるためと推定されている。これを pseudo-DNA aneuploidy などよんでいる。

問題 4 a

○ 1: ただし、染色体数の変化が小さい (DNA 量の差が小さい) 時は、DA として検出できない。大きな染色体 1 コ分以上の DNA 量の変化が必要である。さらに、検出能は機器や試料の調整の良し悪し (CV) にも関係する。

○ 2: ただし、DA の予後因子としての有用性はいまだ確立されているとはいえない。

× 3: 成人とは逆である。DD の方が予後不良の傾向が報告されている。

× 4: きわめて高い可能性をもって悪性といえる。

× 5: 血液腫瘍では、他の臓器・組織の癌に比べて DA の頻度が低い。悪性リンパ腫では 30% 前後という報告が多い。

問題 5 b

○ 1: 実際に、理想的な標準試料の採取が困難な場合は、末梢血リンパ球や DI のわかっている培養細胞を用いることもある。

× 2: ホルマリン固定パラフィン包埋組織の DNA ヒストグラムの CV はきわめて大きいのが欠点である。

× 3: 組織を保存する場合は、凍結する方がパラフィン包埋して保存するよりも CV が小さい。

× 4: **問題 3** の 3 で解説した通り、癌には DA の heterogeneity の頻度が高い。また、癌細胞が十分に含まれているかどうかは採取時にはわからない。したがって、できるだけ多くの箇所からサンプリングすべきである。

○ 5: DD の癌組織の場合、正常細胞と癌細胞は DNA 量だけでは区別できない。

問題 6 e

× 1: DNA 量の少ない細胞 (sub-G1 細胞) として同定する方法は TUNEL 法ではない。sub-G1 測定法などの呼称がある。TUNEL 法とは、アポトーシス細胞に発生する断片化 DNA を標識する方法である。

○ 2: 蛍光ビーズを細胞に貪食させてその蛍光量を測定する方法が有名。

○ 3: 横軸を DNA 量 (細胞周期)、縦軸を抗原量のドットプロット表示にすると、両者の関係は一目瞭然である。

○ 4: 生きた細胞にのみ取り込まれるので、細胞の生死判定に利用できる。

× 5: BCECF は細胞内 pH の測定に用いられる色素である。カルシウム測定に用いる色素は Fluo-3 や Fura Red など。

(国立病院機構山陽病院 臨床研究部 村上知之)

問題 1 フローサイトメトリーによる末梢血細胞表面抗原検査で、一般的に使用される抗凝固剤はどれか。

- a ヘパリン
- b EDTA-2K
- c クエン酸ナトリウム
- d フッ化ナトリウム
- e ACD 液

1. a, b, c 2. a, b, e 3. a, d, e
4. b, c, d 5. c, d, e

問題 2 フローサイトメトリーによる末梢血細胞表面抗原検査の検体保存で、正しいのはどれか。

- a 全血冷凍保存
- b 全血室温保存
- c 全血冷蔵保存
- d 白血球分離後冷凍保存
- e 白血球分離後室温保存

1. a, b 2. a, e 3. b, c 4. c, d
5. d, e

問題 3 フローサイトメトリーによる健常者末梢血リンパ球表面抗原検査で、リンパ球領域をゲーティングした時、細胞分析結果の合計がほぼ90%以上となるのはどれか。

- a CD3
- b CD4
- c CD8
- d CD19
- e CD16+CD56

1. a, b, c 2. a, b, e 3. a, d, e
4. b, c, d 5. c, d, e

問題 4 フローサイトメトリーによるリンパ球細胞表面抗原検査の分析手技の記述で、正しいのはどれか。

1. 検体を全血で使用し染色することを直接法という。
2. 検体の染色時間は室温 30 分以上必要である。
3. 検体で溶血が必要な場合、通常、蒸留水が使用される。
4. 直接法と間接法では、前者の方が検出感度はよい。
5. 直接法と間接法では、後者の方に非特異的反応が出やすい。

問題 5 伝染性単核球症で、末梢血に多数出現した異型リンパ球の細胞表面形質で正しいのはどれか。

1. CD3, CD4, HLA-DR 陽性
2. CD3, CD8, HLA-DR 陽性
3. CD3, CD4, CD25 陽性
4. CD3, CD8, CD25 陽性
5. CD19, CD10, HLA-DR 陽性

問題 6 フローサイトメトリーに関する記述で正しいのはどれか。

1. 分析試料は単離浮遊細胞であることが条件である。
2. 細胞は、蛍光染色が施されていないならばシグナルは得られない。
3. 前方散乱光 (FSC) は細胞内容構造を反映している。
4. 側方散乱光 (SSC) は細胞の大きさを反映している。
5. FSC と SSC を二次元描写したものをスクエーターグラムという。

× 3, 4 : 前方散乱光 (FSC) は細胞の大きさを、側方散乱光 (SSC) は細胞内容構造を反映している。

× 5 : FSC と SSC を二次元描写したものはサイトグラムといわれる。

(東大病院 検査部 東 克巳)

問題 1 2

末梢血でもっともよく使用される抗凝固剤は EDTA-2K である。血小板凝集や白血球の凝集が少ないためである。ヘパリンでは、患者検体により血小板凝集が強く起こる場合や、冷蔵保存で cold insoluble globulin (冷却不溶性グロブリン) が出て検体処理に苦慮する場合がある。クエン酸ナトリウムやフッ化ナトリウムは細胞の破壊が強く、検体としては使用できない。

問題 2 3

× a, d : 冷凍保存では、細胞保護剤である DMSO などを使用しないと、解凍時に細胞が破壊されるため使用できない。

○ b : 通常行われている方法で、細胞表面抗原検査のガイドラインで推奨されている方法である。

○ c : この方法も推奨される。ただし、抗凝固剤にヘパリンを使用した場合、冷蔵保存で cold insoluble globulin が出て検体処理に苦慮する場合がある。

× e : 通常、検体が末梢血や骨髓血の場合は全血法が主流で、リンパ球を分離する方法は行われていない。末梢血をリンパ球分離法で分析した場合、B 細胞の損失などがみられることがある。

問題 3 3

健常者では、リンパ球サブセットはおおよそ $CD3=CD4+CD8$ の関係にある。また、全血のリンパ球表面抗原検査が正しく分析されているかの検証方法の一つに、 $CD3+CD19+CD16+CD56$ が 90~100% になることが推奨されている。

問題 4 5

× 1 : 直接法とは、検出抗体に蛍光色素が標識してあり、検体と標識抗体が 1 段階反応で終了できることである。これに比較し、間接法とは 2 段階の反応を必要とする。すなわち、間接法では検出抗体に蛍光色素が標識されておらず、検出抗体に対する 2 次抗体に蛍光色素が標識してある。したがって、まず検出抗体を反応させ、1 回洗浄後、蛍光標識した 2 次抗体を反応させ、終了となる。

× 2 : 染色時間は室温暗所 15 分で十分であり、30 分は必要ない。

× 3 : 全血を使用する場合、溶血操作が必要となる。フローサイトメトリーでは、この溶血操作の如何により結果の再現性や精度に影響を及ぼす。現在は、抗体の販売元が自社の抗体に相性のよい界面活性剤入りの溶血剤を販売しているので、それを使用するのが推奨される。自施設で作製する場合は、0.84% 塩化アンモニウム液が一般的である。

× 4 : 直接法は抗体 1 に対して蛍光色素 1 が結合することになるが、間接法では抗体 1 に対して蛍光色素 1 以上を結合させることができる。したがって、検出感度をあげることができる。

○ 5 : 直接法は検出抗体に直接蛍光色素が結合しているために非特異的反応はほとんど起こらないが、間接法の場合は 2 段階反応なので、非特異的反応が生じやすくなる。

問題 5 2

伝染性単核球症は EB ウイルス感染で発症する。EB ウイルスは B 細胞に寄生し、無制限に増殖するとバーキットリンパ腫になるといわれている。通常、免疫能が正常であれば、EB ウイルスが寄生した B 細胞を攻撃、殺傷するために、細胞傷害性サプレッサー T 細胞 (CD8) が増加する。この細胞分裂を起こしたての細胞は細胞が大きく、核は粗剛、細胞質は塩基性に富み、いわゆる異型リンパ球の形態となる。また、細胞が活性化すると細胞表面形質では活性化マーカーである HLA-DR が発現する。

問題 6 1

○ 1 : フローサイトメトリーの最低条件は、分析する細胞や粒子の 1 コ 1 コが単離していることである。個々の細胞や粒子の情報を得るためのものであるから、細胞や粒子が複数結合していると、精度や正確度の信頼性がまったくなくなる。

× 2 : 細胞や粒子は、無蛍光でもレーザー光がヒットするとシグナルが得られる。これは、前方散乱光、側方散乱光として情報が得られ、二次元表示で描写するとサイトグラムが得られる。

問題 1 正しいのはどれか。

1. 免疫記憶細胞はマクロファージである。
2. 成熟リンパ球の増殖にはサイトカイン IFN- γ が関与している。
3. B リンパ球は抗原提示細胞の一つである。
4. 成熟ヘルパー T 細胞は CD8 抗原陽性である。
5. 好中球は細胞性免疫に関与している。

問題 2 リンパ球に関する記述で正しいのはどれか。

1. 成熟 B 細胞表面には数種類の免疫グロブリンが存在する。
2. ツベルクリン反応には B 細胞が関与している。
3. ヘルパー T 細胞は抗体産生に関与する。
4. ヘルパー T 細胞はサプレッサー T 細胞の増殖を促進する。
5. サプレッサー T 細胞は Th1, Th2 のサイトカインを産生する。

問題 3 細胞化学的検査のペルオキシダーゼ反応が陰性の急性白血病細胞で、フローサイトメトリーによる細胞抗原検索の結果、表面抗原検索では CD10, 13, 19, 22, 33, 34 が陽性であった。また、細胞質内 MPO と CD22 が陽性であった。この白血病のタイプはどれか。

1. FAB 分類 M0
2. FAB 分類 L1
3. 骨髄性ザルコーマ
4. B 細胞悪性リンパ腫
5. biphenotypic acute leukemia

問題 4 フローサイトメトリーで末梢血の表面抗原検索を行った結果でクロナリティーが推察可能なものはどれか。

- a ゲートした領域の細胞のほとんどすべてが TCR γ δ 陽性であった。
 - b ゲートした領域の細胞のほとんどすべてが CD3 陽性であった。
 - c ゲートした領域の細胞のほとんどすべてが CD8 陽性であった。
 - d ゲートした領域の細胞がほとんどすべて CD19 陽性であった。
 - e ゲートした領域の細胞がほとんどすべて L 鎖の κ 陽性であった。
1. a, b 2. a, e 3. b, c 4. c, d
 5. d, e

問題 5 CD45 ゲーティング法で、その蛍光強度がもっとも強い細胞はどれか。

1. リンパ球
2. 単球
3. 好酸球
4. 好中球
5. 好塩基球

問題 6 細胞帰属を決定する細胞質内抗原検索に使用される抗体はどれか。

- a CD3
 - b CD4
 - c CD10
 - d CD22
 - e MPO
1. a, b, c 2. a, b, e 3. a, d, e
 4. b, c, d 5. c, d, e

問題 1 3

- × 1 : 免疫記憶細胞はメモリー T 細胞である。
- × 2 : 成熟リンパ球の分化・増殖に必要なサイトカインはインターロイキン (interleukin, IL) 1, 2, 4, 5 である。IFN- γ はリンパ球の増殖には関与しない。
- 3 : 抗原提示細胞は、主要組織適合性抗原複合体 (major histocompatibility antigen complex, MHC) のクラス II 抗原を有する細胞である。クラス II 抗原は樹状細胞、マクロファージ、B 細胞に存在し、好中球や T 細胞は MHC クラス I 抗原が存在する。
- × 4 : ヘルパー T 細胞は CD4 抗原が陽性である。
- × 5 : 好中球は非免疫的に生体防御に関与している。たとえば、細菌感染の場合、その排除には抗体が関与しなくても処理することができる。

問題 2 3

- × 1 : 健常者の血球で細胞表面に免疫グロブリンをもつ細胞は B リンパ球だけである。しかし、1 コの B 細胞表面上には 1 種類の免疫グロブリン、たとえば、IgG λ (ラムダ) であればそれだけしか存在しない。数種類存在する場合は、自己抗体が付着していることが考えられる。
- × 2 : ツベルクリン反応は遅延型アレルギー反応の代表である。遅延型アレルギー反応は T 細胞が関与する細胞性アレルギーである。
- 3 : ヘルパー T 細胞は、抗原提示細胞から抗体産生の情報をもらおうと B 細胞にその情報を伝達する。B 細胞はその情報をもらおうと活性化し、形質細胞に分化し、免疫グロブリンを産生する。したがって、T 細胞は抗体産生に関与している。
- × 4 : ヘルパー T 細胞はサブプレッサー T 細胞の増殖には関与していない。サブプレッサー T 細胞は抗原提示細胞から情報をもらおうと種々の IL で活性化し、増殖する。
- × 5 : ヘルパー T 細胞には産生するサイトカインパターンから Th1 細胞、Th2 細胞がある。Th1 細胞からはインターフェロン (IFN)- γ 、TNF、GM-CSF などが、Th2 細胞からは IL-4, 5, 6, 10 などが産生される。

問題 3 5

急性白血病の場合、まず細胞化学的検査であるペルオキシダーゼ (POD) 反応を行う。POD 反応陽性であれば骨髄性白血病と診断できる。しかし、POD 陰性の場合、リンパ系だけでなく骨髄系の可能性もある。

- × 1 : FAB 分類 M0 は POD 反応陰性であるので条件に合う。しかし、M0 の表面抗原の規定では CD13, 33 は陽性、CD10, 19 は陰性である。したがって、この白血病では両者とも陽性なので M0 は否定される。
- × 2 : FAB 分類 L1 は POD 反応陰性であるので条件に合う。しかし、表面抗原の規定では CD13, 33 は陰性なので否定される。
- × 3 : 骨髄性ザルコーマは POD 反応陽性である。この白血病では POD 反応陰性なので否定される。
- × 4 : B 細胞悪性リンパ腫は POD 反応陰性である。しかし、リンパ腫の場合、細胞成熟段階は末梢血とほぼ同じ程度なので、造血幹細胞付近で発現するとされる CD34 は陰性である。したがって、この症例は白血病であり、リンパ腫は否定される。
- 5 : biphenotypic acute leukemia (BAL) は、ヨーロッパの FCM グループが骨髄系とリンパ系の両方の性質をもった白血病を一つのカテゴリーとして分類した白血病の一つである。次頁の表 1 に示すようなスコアリングシステムを構築し、この条件で分類することを提唱した。リンパ系のいずれかと骨髄系のそれぞれの点数が 2 点をこえるものを BAL と定義した。この白血病の場合、骨髄系 3 点、B リンパ系 3 点であることより BAL である。

表 1 BAL のスコアリングシステム

点数	B 細胞系	T 細胞系	骨髄系
2	CD79a (c/m)	CD3 (c/m)	cMPO
	cIgM	anti-TcR α/β	
	cCD22	anti-TcR γ/δ	
1	CD19	CD2	CD13
	CD10	CD5	CD33
	CD20	CD8	CDw65
		CD10	
0.5	TdT	TdT	CD14
	CD24	CD7	CD15
		CD1a	CD64
			CD117

c/m：細胞質内抗原/表面膜抗原。

骨髄系およびリンパ系 (T または B) いずれかの点数がそれぞれ 2 点をこえる場合を BAL と定義する。

(Bene, M.C., Castold, G., Knapp, W., et al.: Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia*, 10: 1783~1786, 1995.)

問題 4 2

○ a：T 細胞は、未熟な細胞から成熟するにしたがって TCR は γ/δ から α/β に移行する。したがって、末梢血の T 細胞レベルでは TCR は α/β が 100% である。末梢血 TCR が γ/δ であればもちろんクロナリティーがあるとみてよい。腸管の悪性リンパ腫の白血化が疑える。

× b：CD3 がほとんど陽性だけではクロナリティーの証明にはならない。

× c：CD8 が T 細胞の中のほとんど陽性は、たとえば、サイトメガロウイルスや EV ウイルス感染でもある。しかし、この場合、クロナリティーはみられない。

× d：CD19 がほとんど陽性であることは通常だと考えられないが、CD19 だけではクロナリティーの証明にはならない。やはり免疫グロブリン IgH の再構成の証明が必要である。しかし、たとえば、CD19 と CD5 がダブルポジティブであれば正常な B 細胞には CD5 は発現していないため、クロナリティーの証明になる。

○ e：免疫グロブリン L 鎖の場合、正常であれば κ と λ はほぼ同じ割合である。 κ だけに偏りがあることはクロナリティーの証明になる。

問題 5 1

CD45 ゲーティング法は、幼若白血球の CD45 の蛍光強度が弱いことを利用して、芽球などを正確にとらえようと考案されたものである。その強度は、好塩基球<好中球<好酸球<単球<リンパ球の順に強い蛍光を示す。好塩基球は幼若白血球と同じくらいの蛍光強度を示すので、CD45 ゲーティングでは注意が必要である。

問題 6 3

系統特異性が高く、その細胞固有の機能に関連する白血球抗原は、幼若で機能的に未熟な多くの細胞の細胞表面に発現していない。しかし、このような抗原も細胞質内には未熟な成熟段階から存在している。したがって、細胞質内抗原を検索することは、白血病細胞の細胞系統を決定するうえからも重要である。

現在、造血器腫瘍関連の細胞質抗原検索に使用されているものは、CD3, 22, 79a, 骨髄ペルオキシダーゼ (MPO), ターミナルデオキシトランスフェラーゼ (TdT) などがある。

(東大病院 検査部 東 克巳)