

Q&A No.11

今回のテーマ:

PNH 型血球（赤血球）の検出について

質問:

CD235a/CD55、CD235a/CD59 の組み合わせで PNH 型赤血球の測定を検討しています。CD235a を使用すると赤血球の凝集が起こるため、凝集を回避できる方法やサンプル調製のポイントなどがありましたらご教授ください。

CD235a とサンプルを反応させたあとに遠心洗浄操作を行うと凝集するという情報があるため、遠心洗浄操作の手順を変えて検討したサンプル調製のプロトコールと画像データを添付させていただきます。

抗体は現在所持しているものを使用したため、限定されていますが、推奨される組み合わせなどがありましたら教えていただけますでしょうか。

検討内容

サンプル濃度

① EDTA 加全血 1%浮遊液

No wash（画像 1 枚目）

- ① CD55 10 μ L、CD59 10 μ L とサンプル 100 μ L を反応させた後、4 $^{\circ}$ C、30 分インキュベーション
- ② 血球洗浄機(3000rpm, 5 分)にて 2 サイクル洗浄
- ③ 沈渣に CD235a 2 μ L 添加
- ④ 室温にて 15 分インキュベーション
- ⑤ PBS に浮遊させ測定

Wash（画像 2 枚目）

- ① CD55 10 μ L、CD59 10 μ L、CD235a 5 μ L とサンプル 100 μ L を反応させた後、4 $^{\circ}$ C、30 分インキュベーション
- ② 血球洗浄機(3000rpm, 5 分)にて 2 サイクル洗浄
- ③ PBS に浮遊させ測定

回答：

測定法の基本は、ご施設で可能でしたらガイドラインに添った方法が良いと思います。コメント A,B を参考にしてください。サイトグラムのスケールの設定は、凝集の鑑別や細胞サイズの把握、細胞集団把握の容易性など、目的に応じて使い分けてゲートの領域やテクニックの確認を行ってください。なお、CD235a による赤血球凝集を避けるために no wash 法が有効ではありますが、初めの GPI 関連抗体との反応がムラなくできていることが前提です。その点、プレミックスはその偽陽性の問題を回避できます。ただし、遠心洗浄による凝集が問題となるため、CD235a の蛍光標識や抗体力価を適切に設定し、遠心後の細胞の分散を丁寧に行う必要があります。また、洗浄および細胞浮遊のための buffer による非特異シグナルが見られる場合には、特徴的なシグナル分布を示すため鑑別は可能ですが、それらの分布を細胞分布から遠ざけるために、抗体の蛍光色素の変更や抗体力価の調節が有効ですが、buffer のフィルター濾過が最も簡単と思います。高感度な PNH クローン解析では、極く僅かな細胞の検出となるため、フラグメント赤血球を除いて幼若な赤血球を対象とすることで確認できますので、コメント B,C を参考にしてください。最後に、経時的に評価可能な定量的解析を目的とするのか、高感度な検出のみを目的にするのかにより測定方法が異なりますので、両方を評価できるようにアプリケーションの設定を行うと良いでしょう。

回答 1

The Clinical & Laboratory Standards Institute(CLSI)のガイドラインで推奨されているのは、CD59-PE (clone MEM43)と CD235a-FITC の組合せとなります。国内では GPI アンカー蛋白の検出には CD55/CD59 をミックスして用いられますが、CLSI では CD55 の使用は記載されていません。検討されたように CD55 単独では CD55 陰性が多くなってしまいます。CD235a は標識物によって凝集態度が異なり、回答者が同じクローンの抗体で用いて検討したところ、FITC 標識<PE 表紙<APC 標識の順に凝集は強くなりました。

お送りくださったパターンでは No wash、wash サンプルともに赤血球が凝集していると思われます。従って、CD59 抗体や CD235a 抗体によって赤血球が凝集せず、かつ十分な蛍光強度が維持される抗体を選択および抗体量を決定する必要があります。その方法を以下に記します。

1. CD59 抗体、CD235a 抗体をそれぞれ×2、×4、×8、×16 希釈する。
2. 1%赤血球浮遊液 50 μ L と抗体をそれぞれ室温暗所で 20 分間程度反応させ、2 回洗浄する。(注) 4°Cでは赤血球が凝集しやすくなります。また回答者は血球洗浄機の使用経験

がないので、水分がどれくらい残るのかわかりませんが、アスピレートした時くらいに少し水分が残るのが良いと思います。

3. チューブの上部をしっかり掴み、試験管立てで“激しく”攪拌し、PBS 1mL に浮遊させ FCM で測定する。

(注) 激しく攪拌することで凝集が解離しますが、浮遊した状態で放置すると再度凝集するので、浮遊後は速やかに測定するのが良いと思います。(注) 再浮遊に使用する PBS はフィルターを通すと良いとされています。

4. シングル ヒストグラムで表示をすると、凝集があれば正規分布せず右肩に山が出来ます。(注) 凝集がなく、蛍光強度が保たれる濃度が理想です。回答者の経験では CD59-PE (clone MEM43) の場合 10 倍希釈 20 μ L が最適でした。CD235a-FITC も 10 倍で使用しています。回答者は、規定の抗体添加量が 20 μ L であれば原液を 2 μ L 添加すれば良いこととなりますが、ある程度の液量があった方が検体と混ざりやすいという考えで行っています。

その他の注意点

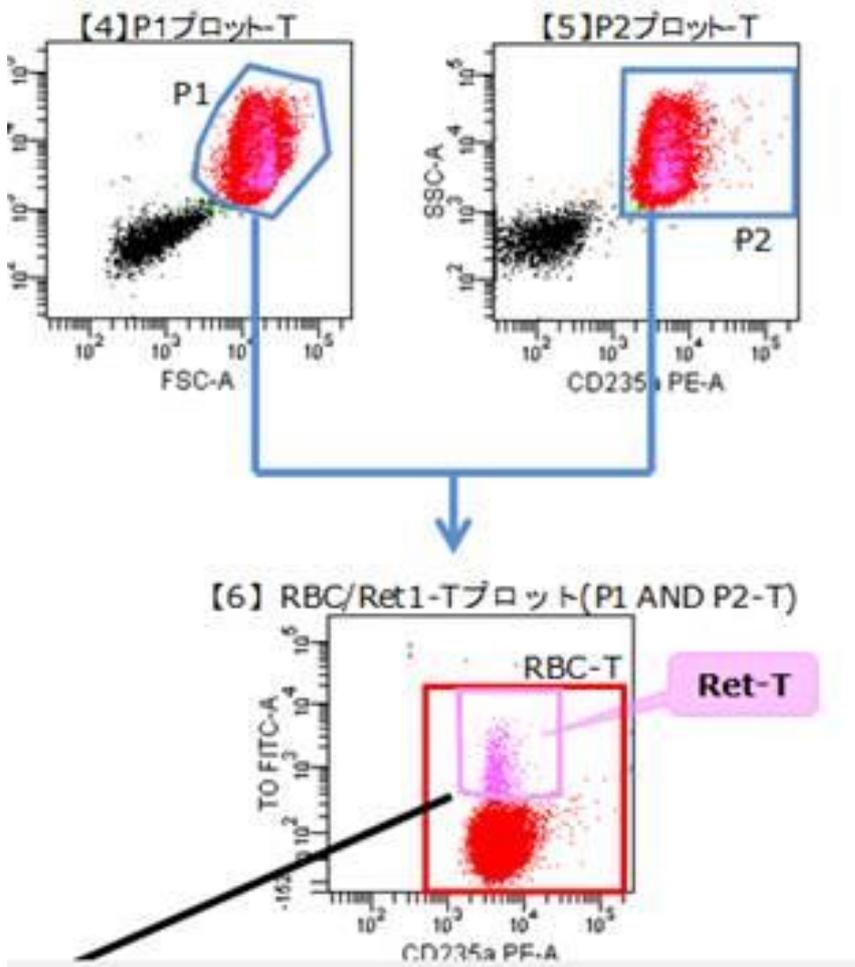
- CD59 抗体と CD235a 抗体はプレミックスしてから検体と反応させます。別々に反応させると CD235a(+)CD59(-) というような偽 PNH 血球を生じる可能性があります。
- control を IgG1-FITC/IgG1-PE で設定されていますが、IgG1-PE/CD235a-FITC とする方がカットオフを設定しやすいと思います。
- 測定は、PBS を流してバックグラウンドを確認した後、IgG1-PE/CD235a-FITC を測定、カットオフを決定する。再度 PBS を流し CD59(-)CD235a(+) の部分にドッドが出ないことを確認し、CD59-PE/CD235a-FITC のサンプルを測定する。測定は 10 万個以上測定する。
- CD235a のカットオフはフラグメント化した赤血球を除外するため、CD235a 陽性集団の少し下に設定する。
- お送りいただいた FS/SS スキャッタグラムは、FS の感度を少し下げ、SS の感度をもう少し上げても良いと思います。血小板がゲート内に混入しても CD235a (-) として除外できます。
- CLSI ガイドラインでは no wash ではなく、2 回洗浄するとされています。

回答 2

日本検査血液学会 血球計数標準化小委員会の『フローサイトメトリ法による』網赤血球算定(Ret-FCM 法)』プロトコルの網赤血球を含む赤血球解析のための機器セッティング方法をお示し致します。また、BectonDickinson 社からはユーザ向け PNH 測定資料がありますので参考にして下さい。

1. FS, SS パラメーターを通常の Lin モードから Log モードに変更する。
2. Discriminator を FS Lin モードで設定されている値では高すぎるので、血小板が検出できるまで下げる。
3. CD235a PE はできるだけ抗体濃度を低くし、凝集しないようにする。(全血 5 μ L に 2.5 μ L 添加)

※現在、さらに凝集を減らすため、CD41,CD61,CD45 APC カクテルを反応させ、ネガティブ領域をゲートする方法に改訂する予定です。



回答 3

PNH血球検査において赤血球凝集は良く遭遇すると考えられます。原因としては、冷蔵することによる個人が保有する冷式抗体が反応したり、CD235a などの赤血球抗体が赤血球に比し過剰に入った場合に起こることがあります。

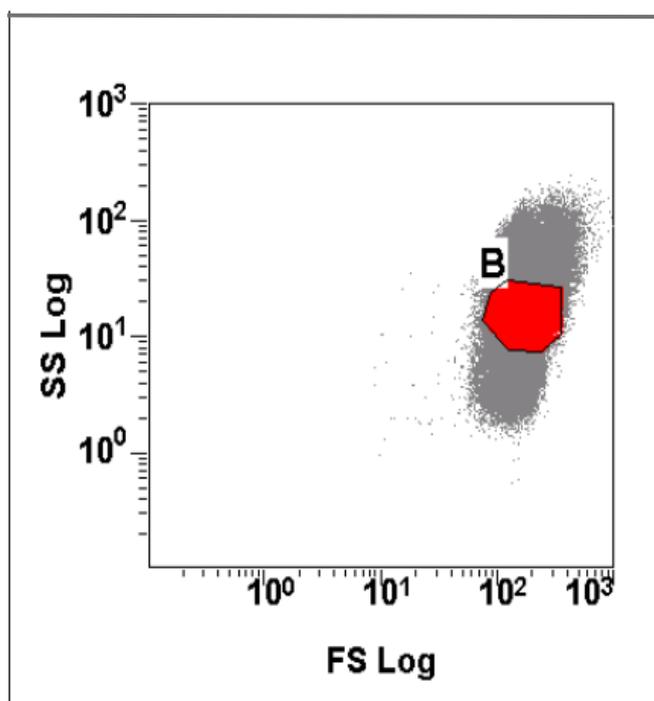
今回のケースでは CD235a の抗体量は適切な量と考えられました。

反応条件、遠心条件を変更しましたので参考にいただければと思います。

また、FSC-SSC の粒度分布の設定を調整していただけますでしょうか（資料 2）。

No wash について確認の検討です。

1. CD55 10 μ L、CD59 10 μ L とサンプル 100 μ L を反応させた後、暗所で室温、15～30 分インキュベーション
2. 血球洗浄機(1500rpm, 5 分)にて 1 サイクル洗浄
3. 沈渣に CD235a 2～3 μ L 添加
4. 暗所で室温にて 15 分インキュベーション
5. PBS に浮遊させ測定



中心よりやや右側に分布が来るように調整、Gate は中心部の一部を解析