

「BD FACSAria™ セルソーターを使用したマルチカラー解析」 新規キメリズム解析法（HLA-FACS法）による臍帯血移植後の病態解析

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター 幹細胞治療部門 病態解析分野
渡辺 信和、石井 有実子、中内 啓光

Key words 臍帯血移植、HLA、キメリズム、マルチカラー解析

1 はじめに

造血細胞移植は、白血病などの造血器悪性腫瘍の治療法としてすでに確立した細胞療法である。当初は骨髄細胞がドナー細胞資源として利用されていたが、1988年に Eliane Glukmann らが Fanconi 貧血患者に妹の臍帯血を移植して成功して以来、臍帯血移植はその多くの利点から移植数が次第に増えて、現在では骨髄移植とほぼ同数になっている¹。

しかしながら、臍帯血移植では生着不全の頻度が 5~10% とやや高く、白血病の再発は骨髄移植と同様に 30% 前後の症例で起こり、患者の予後を大きく左右している。生着不全や再発ではレシピエント由来の血液細胞が残存もしくは増加し、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞が混在する混合キメリズム (mixed chimerism) 状態になるので、キメリズム動態の解析はこれらの病態の早期診断やメカニズムの解明に役立つと思われる。

我々は、ほとんどの臍帯血移植はドナーとレシピエントの HLA (human leukocyte antigen、ヒト白血球抗原) がミスマッチで行われることに着目し、抗 HLA 抗体とマルチカラー FACS (fluorescence activated cell sorter) 解析システムを使用した新規キメリズム解析法 (HLA-FACS法) を開発した。本法により可能になった臍帯血細胞の詳細な生着動態や、微小残存病変 (残存白血病細胞) の監視について紹介する。

2 フローサイトメトリーによるキメリズム解析が可能となった背景

造血細胞移植が普及した今日、移植後のキメリズム解析は、すでに臨床の場で広く行われている。異性間の移植では性染色体を fluorescence in situ hybridization (FISH) 法で解析する X/Y-FISH 法²、同性間の移植では個人で長さの異なる short tandem repeat (STR) を PCR で解析する STR-PCR 法³、保険適応を受けたルーチン検査として生着の確認などに利用されている。しかしながら、これらの方法は手技が煩雑で検査に時間がかかり、レシピエント由来細胞が検出されてもその種類まで直接調べることはできなかった。

もし、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞にそれぞれ特異的な表面マーカーが存在し、それらを蛍光標識抗体で染色してフローサイトメトリーで判別できれば、迅速、高感度かつ定量的なキメリズム解析が可能になると考えられる。また、レシピエント由来細胞が検出された場合、マルチカラー解析でそのフェノタイプを詳細に調べたり、悪性腫瘍が疑われる細胞集団が検出された場合、それらをソーティングして白血病細胞が確認することも可能である。したがって、フローサイトメーターを用いた移植後キメリズムの解析法は、移植に携わる一部の医師や研究者の間でその実用化が模索されていた。

今回、BD FACSAria セルソーターを使用した極めて有意義なキメリズム解析が可能になった背景には、(1) 臍帯血移植が普及して HLA 抗原ミスマッチ移植が増加したこと、および (2) HLA の血清学タイピングの目的で作製された抗 HLA モノクローナル抗体がフローサイトメーターでも利用可能であったこと、さらには (3) マルチカラー解析用のフローサイトメトリー機器や蛍光標識抗体がコマーシャルに入手することが可能になったことが挙げられる。



2.1. 臍帯血移植と HLA 抗原ミスマッチ

同種骨髄移植では、強力な同種免疫反応によって引き起こされる重症の急性 graft versus host disease (GVHD) の発症を防ぐため、原則として主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex; MHC) のうち HLA-A、B および DR の計 6 座 (A と B は血清学レベルあるいは遺伝子型レベル、DR は遺伝子型レベル) を一致させて移植が行われている。

一方、ほとんどの臍帯血移植は HLA 抗原が 1~2 座ミスマッチで行われているが、それにもかかわらず骨髄移植と比較して重症 GVHD の発症頻度が低いのが特徴である。HLA の許容度が大きいことは、臍帯血バンクに凍結保存する臍帯血数が比較的少数ですむことを可能にしている (現在、2 万 7 千個の保存臍帯血が 95% の移植をカバーしている)。

赤血球以外のすべての細胞表面に発現する MHC クラス I、すなわち HLA-A あるいは B に血清学レベルで 1 つ以上の不一致があると、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞にそれぞれ特異的な HLA が存在し、これらを抗 HLA 抗体で染め分けることができる可能性がある。我々は、HLA-A2 や HLA-B5 など HLA のサブタイプまで判別できる、フローサイトメトリーでも使用可能な抗 HLA 抗体を探していた。

2.2. 抗 HLA 抗体による HLA サブタイプの解析

臓器移植や骨髄移植では、ドナーとレシピエントの HLA の一致度が予後に大きく影響することから、HLA タイピングは極めて重要な検査である。HLA タイピングには、HLA-A および B の解析に用いられていた血清学タイプピングと、HLA-DR の解析に用いられる DNA タイピングがある。

血清学タイプピングでは、1964 年に UCLA の Paul I. Terasaki により確立されたリンパ球傷害試験 (lymphocyte cytotoxicity test; LCT) が用いられていた。被験者のリンパ球に抗血清 (胎児の HLA に対して産生された抗 HLA ポリクローナル抗体を含む経産婦血清) を添加し、そこにウサギ補体を添加して反応させる。リンパ球表面の HLA に抗 HLA 抗体が結合した場合、補体が活性化して細胞膜が傷害されるので、その細胞傷害パターンを顕微鏡下で観察して HLA を判定する。

LCT 法は、HLA-A、B のタイプピングが遺伝子解析による方法に移行した最近まで、広く行われていた。しかしながら、本法で使用される抗 HLA ポリクローナル抗体は、特定のヒトから得られる抗血清由来であることから、同質の抗体を大量かつ継続的に入手することは困難であった。また、HLA 間で複雑な交差反応を示し (cross-reactive group⁴ の存在)、抗原に対するアフィニティーも弱いことから、フローサイトメトリーで利用できる抗体ではなかった。

1975 年のハイブリドーマによるモノクローナル抗体作製法の開発を契機に、米国 One Lambda 社の Terasaki らは血清学タイプピングに利用可能な抗 HLA モノクローナル抗体の作製を試み、膨大な数のハイブリドーマのスクリーニングを行った。その結果、HLA のサブタイプまで判別できる多数の良質な抗 HLA 抗体の作製に成功したが、これらの抗体はフローサイトメトリーでも利用可能な『明るく染まる抗体』であることが報告されている^{5,6}。開発当時、抗 HLA 抗体のスクリーニングに用いられた HLA 抗原コーティングピースは、現在では移植患者の血中抗 HLA 抗体検出法に応用されている⁷。

2.3. マルチカラー解析用の機器と蛍光標識抗体の普及

フローサイトメーターは、1960 年代に米国および西独で開発がはじめられたが、1971 年に Stanford 大学の Leonald A. Herzenberg 教授を中心としたグループが FACS-I として最初に実用化に成功した。その後長い間 1~2 カラーの解析が中心であったが、1990 年代前半に Stanford FACS Facility でマルチカラー対応のフローサイトメトリー機器、ソフトウェア、および蛍光標識抗体の開発が進められ、1995 年には 8 カラー解析システムが完成した。

このシステムは、マルチカラー解析の有用性を認識させる画期的なものであったが、数社の部品を組み合わせた機器 (Pattern Sorter) を使用しており、ソーティング機能は完成していなかった。また、APC-Cy7 や PE-Cy7 などの新規タンデム色素も、研究者が思考錯誤しながら合成していた。したがって、一般の FACS ユーザーがこの様なマルチカラー解析システムを構築することは困難であった。

一方、Becton Dickinson (BD) 社ではマルチカラー解析が可能なセルソーターの実用化を進め、1995 年に BD FACSVantage™ SE セルソーターを、2003 年に BD FACSAria セルソーターを市場に投入した。その間、BD 社から多数の新規蛍光標識抗体が市販されたので、一般の研究室でもマルチカラー解析が普及し始めた。当研究室では、表 1 に示すような市販の蛍光標識抗体で細胞を染色し、BD FACSAria セルソーターを使って 9~10 カラー解析を日常的に行っている。

3 試薬・方法

3.1. 解析対象患者

東京大学医科学研究所附属病院で、標準的前処置後に臍帯血移植を受けた造血器悪性腫瘍の2症例を対象とした。研究計画書は同研究所・倫理委員会にて承認され、患者に研究の趣旨を説明し、文書で同意を得て採血を行った。

症例 1

[急性骨髄性白血病 acute myelogenous leukemia (AML) (M2)]

生着のモニタリングを目的として、移植後 1、2、3、4、および 8 週間目に末梢血 10 mL を採血して、lineage マーカーとともにキメリズムを解析した。また、微小残存病変の監視を目的として、移植後 159、281 および 320 日目に骨髓液 2 mL を採取して、腫瘍マーカーとともにキメリズムを解析した。白血病細胞の同定には、白血病特異的のマーカーである AML/ETO キメラ遺伝子を FISH 法で解析した (エス・アール・エル社)。

症例 2

[骨髄異形成症候群 myelodysplastic syndrome (MDS) (RAEB)]

本患者は、移植後早期に混合キメリズムが遷延した症例である。移植後 1 週間目以降、キメリズムが消失するまで、毎週 1 回末梢血 5~10 mL を採血して、lineage マーカーとともにキメリズムを解析した。この間、STR-PCR 法によるキメリズム解析も同時に行い (エス・アール・エル社)、HLA-FACS 法で得られたレシピエント細胞の頻度と比較した。また、骨髓中に残存するレシピエント由来細胞の解析を目的として、移植後 49 および 140 日目に骨髓細胞を採取して、造血幹・前駆細胞マーカーとともにキメリズムを解析した。

3.2. 蛍光標識抗体の組み合わせ

マルチカラーの組み合わせを表 1 に示す。抗 HLA 抗体は、すべて One Lambda 社より購入した。その他、Pacific Orange-CD14 を Invitrogen 社、それ以外の抗体は BD 社より購入した。

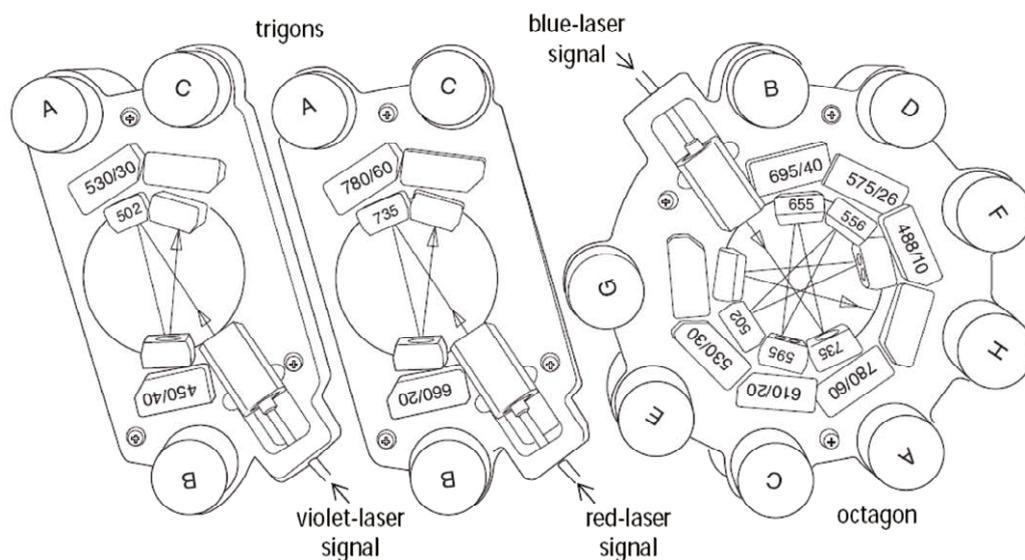
HLA-A11 は biotin 標識抗体を用い、他の蛍光標識抗体とともに細胞を染色した。細胞を 1 回洗浄した後、Stain 1 と Stain 3 では SA-PE で、Stain 2 では SA-APC で細胞を染色した。症例 2 の解析では、抗 HLA-A11 抗体の代わりに biotin 標識抗 HLA-A26 抗体を用いた。

1) 移植後早期の生着のモニタリング

ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞にそれぞれ特異的な一組の抗 HLA 抗体 (FITC あるいは PE で標識) に、白血球のサブポピュレーションを判別するための lineage 抗体を組み合わせ、末梢血単核細胞 (表 1、Stain 1) および顆粒球 (同、Stain 2) を染色した。

2) 移植後半年以降の再発の監視

キメリズム解析用の一組の抗 HLA 抗体に、造血幹・前駆細胞および腫瘍細胞に関連する表面マーカーの抗体を組み合わせ、骨髓単核細胞を染色した (表 1、Stain 3)。



蛍光色素	FITC	PE	PE-Texas Red®	PerCP-Cy™5.5	PE-Cy™7	APC	APC-Cy™7	Pacific Blue™	Pacific Orange™
Detector	Blue-E	Blue-D	Blue-C	Blue-B	Blue-A	Red-B	Red-A	Violet-B	Violet-A
Stain 1	HLA-A24	HLA-A11	PI	CD8	CD3	CD56	CD19	CD4	CD14
Stain 2	HLA-A24	CD11b	PI			HLA-A11			
Stain 3	HLA-A24	HLA-A11	PI	HLA-DR	CD33	CD34	CD56	CD45	CD14

表 1 9 カラー解析で使用した蛍光色素と抗体の組み合わせ

HLA-A11 は biotin 標識抗体を用い、他の蛍光標識抗体とともに細胞を染色した。細胞を 1 回洗浄した後、Stain 1 と Stain 3 では SA-PE で、Stain 2 では SA-APC で細胞を染色した。症例 2 の解析では、抗 HLA-A11 抗体の代わりに biotin 標識抗 HLA-A26 抗体を用いた。Alexa700 を追加した 10 カラー解析の場合には、Red Laser の検出器の設定を APC(Red-C)、Alexa700(Red-B)、APC-Cy7(Red-A)に変更した。Alexa700 の検出には、PMT の増設と 685LP、712/21BP フィルターを追加している。

3.3. 細胞の分離、染色および解析

- 1) 健康人（コンペーンション用）および患者から末梢血 5~10 mL をヘパリン採血した。
- 2) 50 mL チューブに Ficoll を 15 mL 入れ（骨髄液では 15 mL チューブに Ficoll を 4 mL）、その上に PBS(-) で 1.5 倍に希釈した血液を重層し、室温、2,000 rpm で 20 分間遠心した（ブレーキは OFF）。
- 3) 遠心後、血漿と Ficoll の中間にある単核細胞、および赤血球層表面のバフィーコート（顆粒球を含む）をピペットで吸引し、それぞれ 50 mL チューブに移した。
- 4) 単核細胞は冷 PBS(-) で 1 回洗浄した。バフィーコートは塩化アンモニウムなどの溶血試薬で赤血球を除いた後、冷 PBS(-) で 1 回洗浄した。
- 5) 単核細胞と顆粒球をそれぞれ 100 μ L の 5% マウス血清添加 PBS(-) に懸濁し、細胞数を数えた。
- 6) 抗体を分注したチューブに各細胞（ 2×10^6 個以下）を加え、4 $^{\circ}$ C で 20 分間染色した。
- 7) 冷 PBS(-) で 1 回洗浄し、200 μ L の PBS(-) に懸濁した後、1 μ g/mL の propidium iodide (PI) を添加して BD FACS Aria セルソーターで測定した（PI 陽性死細胞は PE-TR の検出器で検出して除外）。また、取込んだ FCS データは、FlowJo ソフトウェア（Treestar 社）で解析した。

4 結果と考察

4.1. 移植後早期における生着のモニタリング

症例 1 で、生着のモニタリングの目的で lineage ごとのキメリズムを解析したところ、移植後 1、2、および 3 週間目の T 細胞でレシピエント由来細胞が検出され、それらの頻度は次第に減少して 4 週目を以降消失した（図 1）。

これらレシピエント由来の T 細胞は、主に CD4 $^{+}$ T 細胞であった（図 2）。一方、B 細胞、NK 細胞、単球および顆粒球は、末梢血で初めて検出された時点で、ほぼすべてドナー由来細胞に置き換わっていた（図 1）。

症例 2 で、同様に早期のキメリズムを解析したところ、移植後 2 週間目でレシピエント由来細胞は全単核細胞の 1.5% まで減少したが、3 週目を以降頻度が増加し、6 週目まで 10% 前後存在した（図 3 上段、図 5）。

残存するレシピエント由来細胞は主に単球で、顆粒球と NK 細胞にもレシピエント由来細胞が少数存在した（図 3、下段）。これらのレシピエント由来細胞は最終分化型の分裂しない細胞で、末梢血での寿命が短いことから、レシピエント由来の前駆細胞が骨髄に残存していることが予想された。

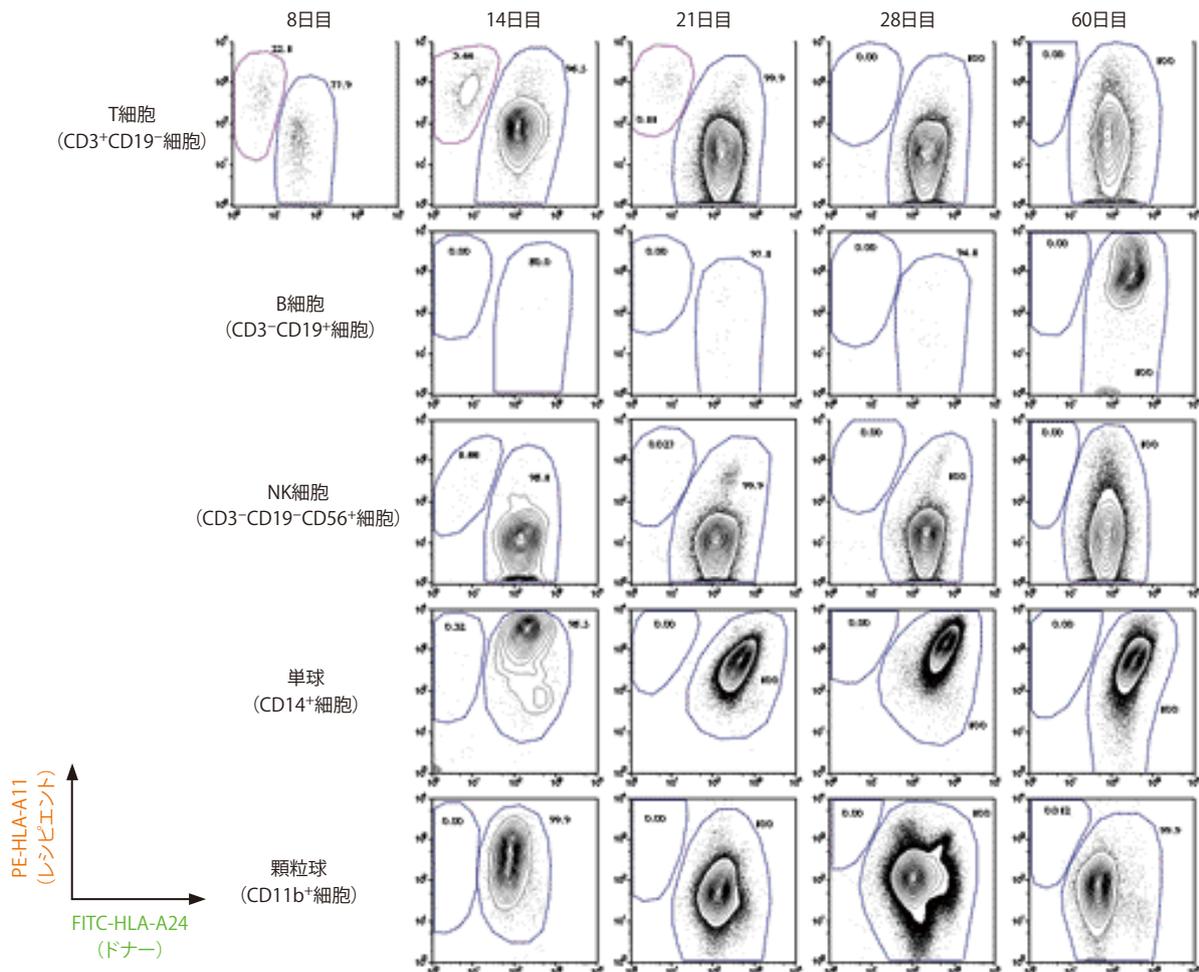


図 1 移植後早期の白血球サブポピュレーションごとのキメリズム解析

症例 1 で、ドナー細胞の生着をモニタリングする目的で、移植後 1、2、3、4 週間目、および 2 ヶ月目に末梢血 10 mL を採血し、単核細胞と顆粒球を分離して、それぞれ Stain 1 と Stain 2（表 1）で染色した。サンプルに PI を添加した後、BD FACS Aria セルソーターで測定して T 細胞、B 細胞、NK 細胞、単球、および顆粒球におけるキメリズムをそれぞれ解析した。移植後 1 週間目は T 細胞のみ検出されたため、T 細胞のキメリズム解析の結果のみを示した。白血球のサブポピュレーションごとにキメリズムを解析する場合のゲートのかけ方は、移植後 2 週間目を例にとり、図 2 に示した。

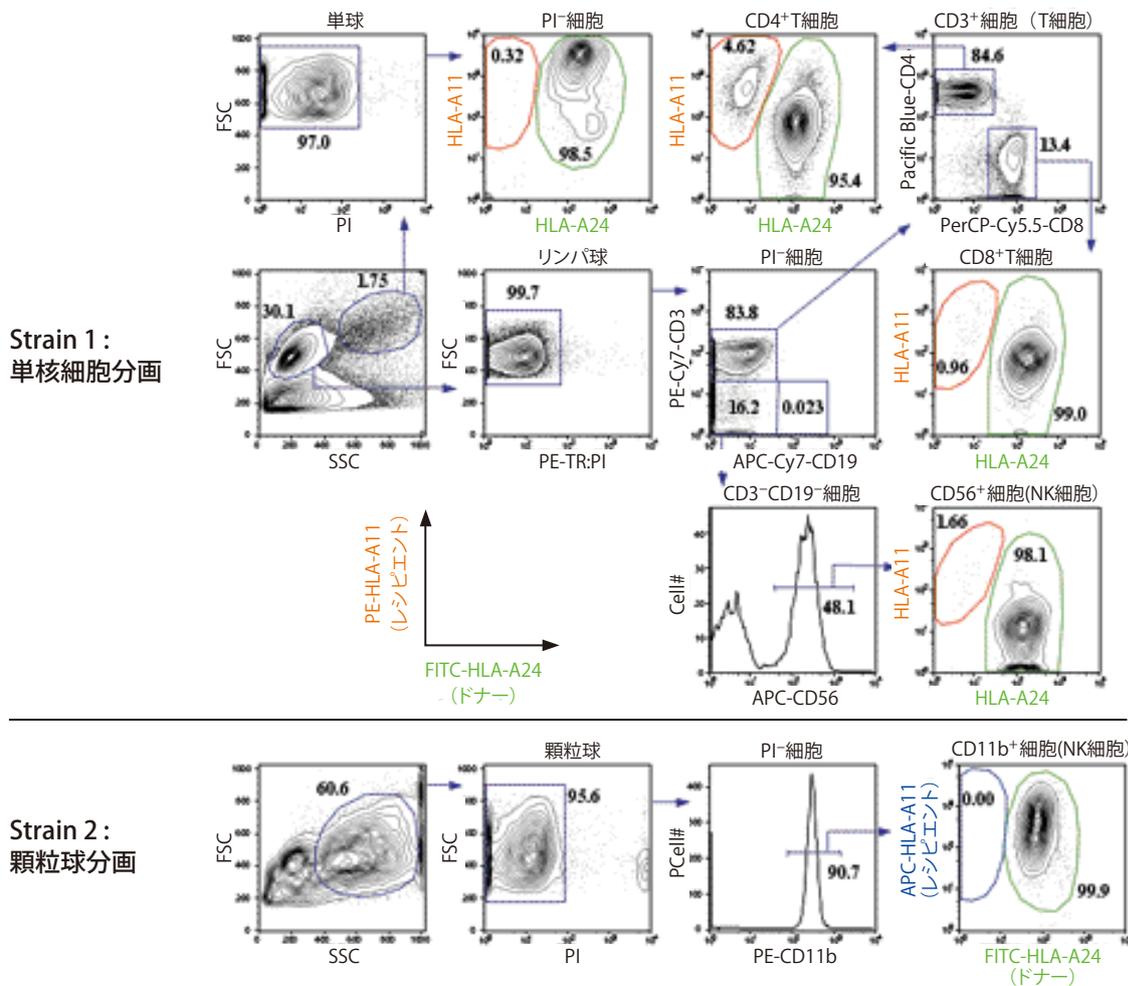


図2 移植後早期の単核細胞分画および顆粒球分画のキメリズム解析におけるゲートのかけ方

症例1で、移植後2週間に末梢血10mLを採血し、単核細胞と顆粒球を分離して、それぞれStain1とStain2(表1)で染色した。FSC-SSCプロットでリンパ球、単球、および顆粒球にゲートをかけた後、それぞれPI陽性の死細胞をゲートアウトした。単球はそのままキメリズムを解析し、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、B細胞、NK細胞、および顆粒球は、それぞれの特異的マーカーで陽性細胞にゲートをかけてからキメリズムを解析した。

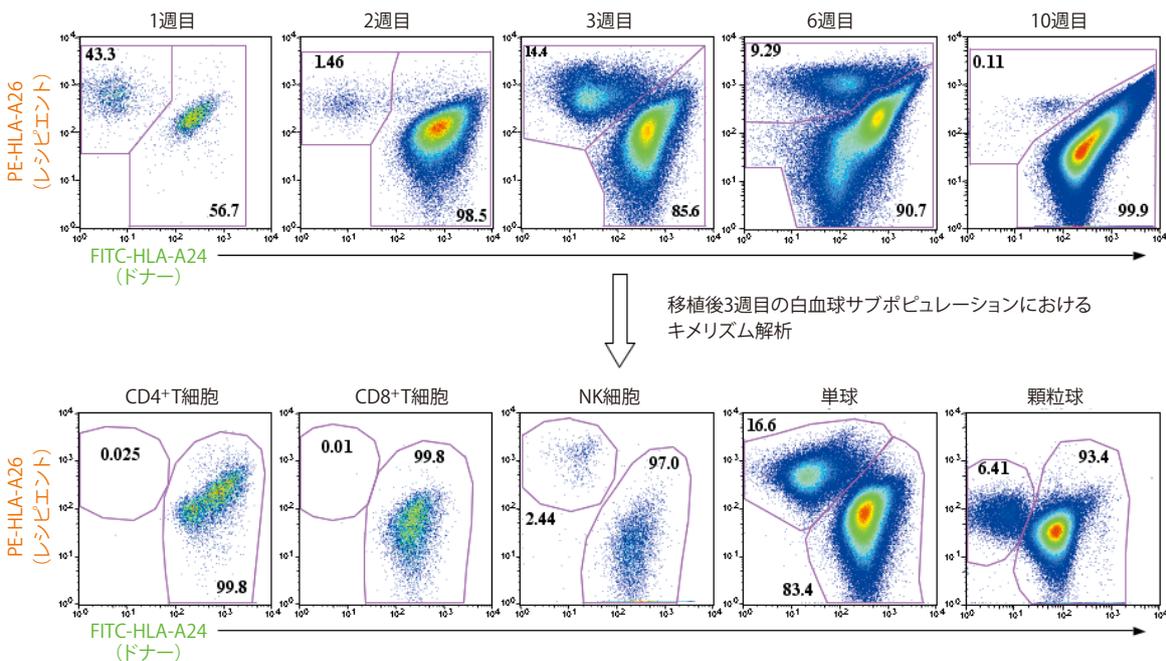


図3 移植後早期に混合キメリズムが遷延した症例

症例2では、移植後3週目に降に末梢血におけるレシビエント細胞の頻度が増加した。そこで、混合キメリズムがほとんど消失した15週目まで、連続して毎週1回末梢血5mLを採血し、単核細胞をStain1(表1)で染色してキメリズム解析を行った。上段には、移植後1、2、3、6、および10週間に、全単核細胞におけるキメリズムを解析した結果を示す。下段には、移植後3週目にどのようなレシビエント細胞が増加したのか調べるため、白血球のサブポピュレーションごとのキメリズムを解析した結果を示す。

4.2.CD34-CD45 ゲーティングを用いた骨髄細胞におけるキメリズム解析法

そこで、移植後 49 日目に骨髄細胞を採取して造血幹・前駆細胞のマーカーとともにキメリズム解析を行ったところ、成熟白血球分画 (CD34⁻CD45⁺) に加えて造血幹・前駆細胞分画 (CD34⁺CD45^{dim}) にもレシピエント由来細胞が検出された (図 4A、図 4B の左側)。これらレシピエント由来の造血幹・前駆細胞が、末梢血にレシピエント由来の単球などを供給していることが示唆された。

ところで、図 4A の造血幹・前駆細胞分画 (G2) と成熟白血球分画 (G8) のいずれにおいても、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞は明瞭に区別できるので、キメリズムの正確な定量的解析が可能である。しかしながら、これら 2 つの分画では、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞の位置 (蛍光強度) がそれぞれ大きく異なるため、G2 と G8 のキメリズム解析の図を重ねると、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞の位置はオーバーラップしてしまう。

このような蛍光強度の違いは他の分画でも認められることから、全骨髄単核細胞をそのままドナー特異的 HLA とレシピエント特異的 HLA で展開しても、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞の境界線を正確に引くのは不可能である。

そこで、図 4A に示すように、骨髄単核細胞を一旦 CD34-CD45 プロット上で G1~G8 のように分画し (これらの分画は細胞種の違いを反映している; G1 分画の CD34^{Bright} 細胞は血管内皮細胞、G6 は赤血球と間葉系細胞など)、それぞれの分画の中でキメリズムを解析し、それから各分画中のドナー由来細胞とレシピエント由来細胞をそれぞれ色の異なるドットで CD34-CD45 展開図上にプロットすると、より正確なキメリズムの様相を解析できる (図 4B)。

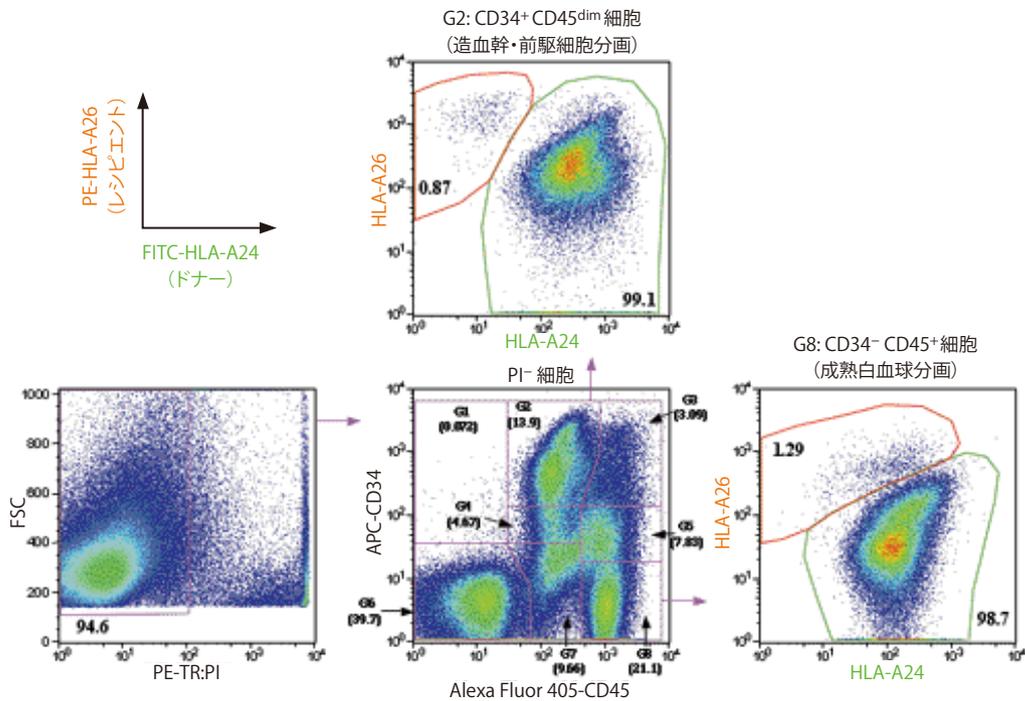


図 4A 移植後早期の骨髄細胞におけるキメリズム解析

症例 2 で、骨髄中にレシピエント由来の造血幹・前駆細胞が存在するか調べる目的で、移植後 49 日と 140 日目に骨髄穿刺を行い、単核細胞を分離して Stain 3 (表 1) で染色した。図 4A に、移植後 49 日目の骨髄単核細胞のゲーティングの手順を示す。まず、PI 陽性の死細胞を除いた後、PI⁻細胞を CD34 と CD45 で展開し、細胞集団を G1 から G8 の 8 つに分類した (括弧内は PI⁻細胞中の頻度)。つぎに、これらの細胞集団で、それぞれドナーとレシピエントに特異的な HLA で細胞を展開し、キメリズムを解析した。ここでは、G2 すなわち CD34⁺CD45^{dim} 細胞 (造血幹・前駆細胞分画) と、G8 すなわち CD34⁻CD45⁺ 細胞 (成熟白血球分画) のキメリズム解析を例にとり示す。

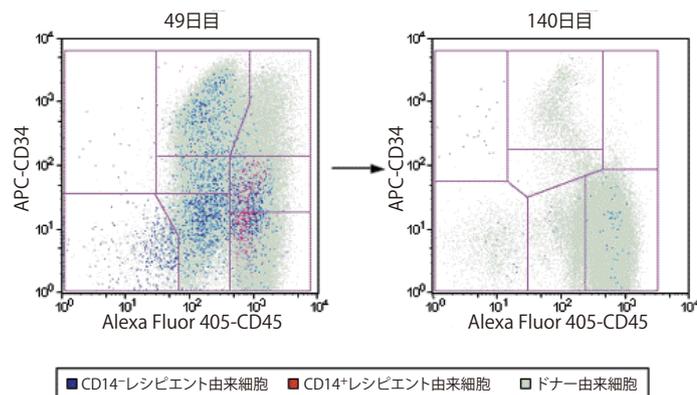


図 4B 移植後早期の骨髄細胞におけるキメリズム解析

G1 から G8 まで各細胞集団ごとにキメリズムを解析し、それぞれのドナー細胞 (うす緑色) とレシピエント細胞 (青色、CD14 陽性細胞は赤色) を CD34-CD45 プロット上に戻したドットプロットを図 4B の左側に示す。同様に解析した移植後 140 日目のドットプロットを、図 4B の右側に示す。

4.3. キメリズムをモニタリングしながら免疫抑制剤を減量

症例 2 では、レシピエント由来の造血幹・前駆細胞が残存していることから、臍帯血（ドナー）由来のエフェクター細胞の機能が弱いことが示唆されたため、移植後 GVHD 予防の目的で投与されていた免疫抑制剤（サイクロスポリン A、CsA）を 28 日目以降減量したところ、42 日目から 56 日目にかけて血中濃度が急速に減少した（図 5）。

この 2 週間の間に、CD8⁺T 細胞の機能を反映する IFN- γ 産生細胞の頻度が急速に増加し、それと対照的に末梢血単核細胞におけるキメリズムは急速に減少した（図 5）。

140 日目に行った骨髓細胞のキメリズム解析でも、レシピエント由来細胞は 49 日目に比べて著しく減少していた（図 4B の右側）。免疫抑制剤の減量が、ドナー由来のエフェクター細胞の機能を高め、残存するレシピエント由来細胞を駆逐したものと考えられる。

この症例では、HLA-FACS 法と同時に STR-PCR 法（エス・アール・エル社）でも末梢血細胞のキメリズム解析を行い、両方法で得られた結果を比較した。STR-PCR 法は、結果が出るまでに 3~7 日間を要するものの、全体的な動向では HLA-FACS 法とほぼ同じ結果を得ることができた（図 5）。STR-PCR 法はほとんどの症例で行うことが可能であることから、HLA-FACS 法と同様、キメリズム解析における極めて有用な検査法である。

4.4. 移植後 5 ヶ月目以降における微小残存病変（残存白血病細胞）の監視

症例 1 で、移植後 159 日目に骨髓単核細胞のキメリズム解析を行ったところ、CD34⁺CD45^{dim} 分画（正常造血幹・前駆細胞および白血細胞のフェノタイプ）にはレシピエント由来細胞はほとんど検出されなかった（0.22%）（図 6、上段左側）。ところが、281 日目になると、レシピエント由来細胞は同分画の 5.71% を占め、再発が強く疑われた（図 6、上段中央）。

このとき、全骨髓単核細胞中では、レシピエント由来の CD34⁺CD45^{dim} 細胞は 0.3% しか存在しておらず、光学顕微鏡による形態学的検査（感度 1%）や FISH 法による白血病特異マーカー AML1/ETO の検査（感度 5%）では、再発の診断はできなかった。すなわち、HLA-FACS 法によるキメリズム解析は、白血病再発の早期診断に役立つといえる。

その後、再入院前（320 日目）の解析で、CD34⁺CD45^{dim} 分画におけるレシピエント由来細胞は、約半数まで増加していた（図 6、上段右側）。同分画におけるドナー由来細胞とレシピエント由来細胞にゲートをかけ、それぞれ CD56 と HLA-DR の発現レベルを解析したところ、レシピエント由来細胞のみ異常発現マーカー CD56 が陽性であった（図 7、上端）。さらに、同分画におけるドナー由来細胞とレシピエント由来細胞をソーティングし、AML1/ETO キメラ遺伝子を解析したところ、陽性率はそれぞれ 0%（図 7、下段右側）と 100%（図 7、下段左側）であった。すなわち、レシピエント由来の CD34⁺CD45^{dim} 細胞は白血病細胞であることが示された。

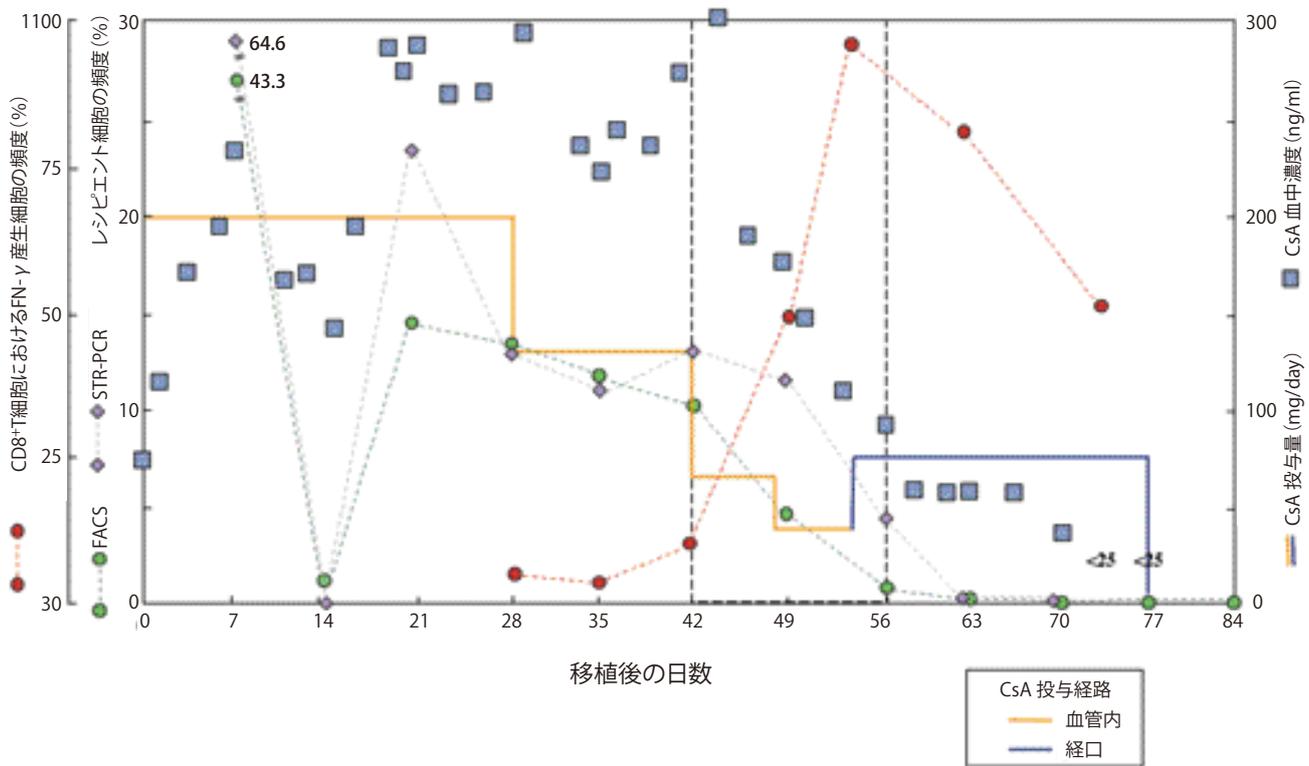


図 5 臍帯血移植後の免疫抑制剤投与とキメリズム動態の解析

症例 2 において、移植後 1 週目から 12 週目まで、末梢血におけるレシピエント細胞の頻度（FACS 法は緑の○、STR-PCR 法は紫の◇）、CsA の血中濃度（水色の□）、CD8⁺T 細胞における IFN- γ 産生細胞の頻度（赤色の○）、および CsA の投与量と投与経路（血管内投与はオレンジ色の線、経口投与は青色の線）を示す。CsA の血管内投与は、朝 10 時から夜 8 時まで 10 時間点滴で行い、CsA の血中濃度の測定は、朝の点滴開始直前の採血で行った。CD8⁺T 細胞における IFN- γ 産生の解析は、CsA の点滴開始直前に採血し、サイトカイン分泌阻害剤のモネニン存在下で血液を PMA とイオノマイシンで 4 時間刺激し、細胞外 CD8 と細胞内 IFN- γ を同時に染色して解析した（細胞内サイトカイン染色法の詳細は文献 8 を参照）。

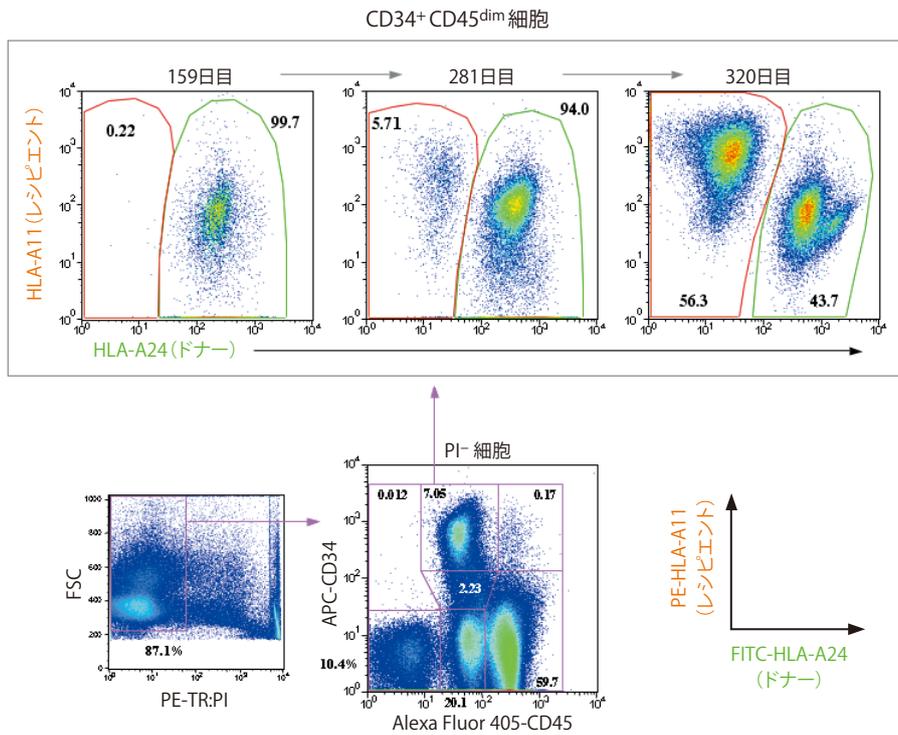


図6 移植後5ヶ月以降の骨髄細胞におけるキメリズムの経時的な解析

症例1で、白血病の再発を監視する目的で、移植後159日目、281日目、および320日目に骨髄液2mLを採取し、単核細胞を分離してStain 3(表1)で染色した。本症例の原疾患はAML-M2で、白血病細胞の表面マーカーはCD34+CD45^{dim}であるため、CD34-CD45プロット上のCD34+CD45^{dim}細胞にゲートをかけて、この分画内のキメリズムを上段に示すように経時的に解析した。

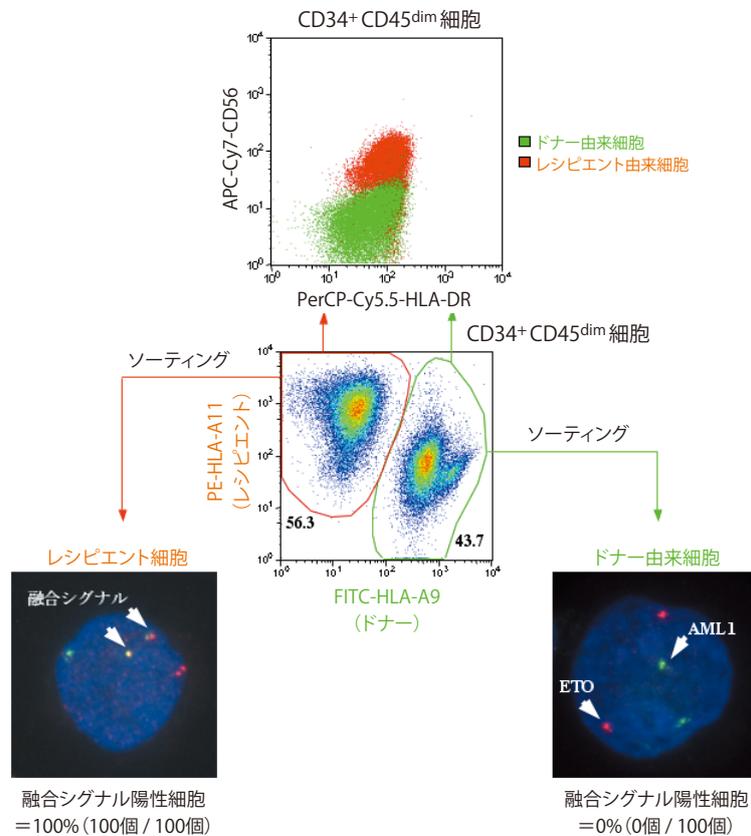


図7 レシピエント由来のCD34+CD45^{dim}細胞における異常発現マーカーおよび白血病特異的マーカーの解析

症例1で、移植後320日目に骨髄2mLを採取し、単核細胞を分離してStain 3(表1)で染色した。正常な造血幹・前駆細胞および本症例(AML-M2)における白血病細胞が存在するCD34+CD45^{dim}細胞分画にゲートをかけて、この分画内のキメリズムを解析した。中央の図のようにドナー由来細胞とレシピエント由来細胞が約半数ずつ検出されたため、これらにゲートをかけてそれぞれ緑と赤のドットにして表面マーカーHLA-DRとCD56(この患者の白血病細胞における異常発現マーカー)を解析した(上端)。また、ドナー由来細胞とレシピエント由来細胞をソーティングし、それぞれAML1/ETOキメラ遺伝子の存在をFISH法で解析した(下段)。

目 要

移植後早期の末梢血を用いた HLA-FACS 法によるキメリズム解析では、細胞数の少ないサンプルでも白血球のサブポピュレーションごとにキメリズムの詳細を解析することが可能であった。本法では、採血後 1~2 時間以内に結果を得ることが可能なので、生着不全の診断や免疫抑制剤減量時のモニタリングなど、臨床的に早急な判断が求められる場合にも、極めて有力な検査法である。

骨髓細胞を用いた解析では、白血病マーカー陽性分画でのキメリズム解析が可能で、レシピエント由来の白血病細胞の検出感度が大幅に向上するため、再発の早期診断が可能であった。また、白血病細胞と疑われる細胞集団の異常発現マーカーを調べたり、ソーティングして白血病特異的マーカーを解析することにより、再発の診断における信頼性が向上した。

HLA-FACS 法によるキメリズム解析は、生着不全と再発の早期診断に利用できるのみでなく、これらの病態メカニズムを解明する上でも極めて有力な手段になるものと期待される。

参考文献

1. Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, et al. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood*. 2007;109:1322-1330.
2. Turkiewicz D, Gorczyńska E, Toporski J, et al. Monitoring of hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) by dual-color FISH analysis of X and Y chromosomes. *Leuk Res*. 2003;27:993-998.
3. Thiede C, Florek M, Bornhauser M, et al. Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant*. 1999;23:1055-1060.
4. Sijpkens YW, Doxiadis II, De Fijter JW, et al. Sharing cross-reactive groups of MHC class I improves long-term graft survival. *Kidney Int*. 1999;56:1920-1927.
5. Pei R, Chen T, Orpilla J, Lee JH. A simultaneous negative and positive selection method that can detect chimerism at a frequency of 1 per 10,000 by flow cytometry. *Tissue Antigens*. 1997;50:197-201.
6. Metes D, Logar A, Rudert WA, et al. Four-color flow cytometric analysis of peripheral blood donor cell chimerism. *Hum Immunol*. 2003;64:787-795.
7. Piazza A, Poggi E, Ozzella G, et al. Public epitope specificity of HLA class I antibodies induced by a failed kidney transplant: alloantibody characterization by flow cytometric techniques. *Transplantation*. 2006;81:1298-1305.
8. Mascher B, Schlenke P, Seyfarth M. Expression and kinetics of cytokines determined by intracellular staining using flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1999;223:115-121

PROFILE



渡辺 信和

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター
幹細胞治療部門 病態解析分野 分野長

熊本大学医学部卒業後、第二内科（高月清教授）で血液内科の研修を行う。大学院修了後、大阪市大、スタンフォード大学（ヘルツェンバーグ教授）を経て、1998年から医科研に勤務。2004年から、FACS コアラボラトリー（室長：中内啓光教授）の管理者、2009年から病態解析分野の分野長を務める。『臨床の現場で出会う問題をテーマに、オリジナルなアイデアで研究を進め、結果として医療に貢献すること』を目指している。

補足：マルチカラー解析における蛍光色素の選択とコンペンセーションに関して

BD FACSAria セルソーターではレーザー光軸が固定されており、面倒な光軸調整の必要がない。また、機器の操作の大部分が Windows のモニター上で行われるため、フローサイトメトリーの原理や構造を熟知していなくても、マルチカラー解析やソーティングを比較的容易に行うことができる。一方、光学系、検出器およびソフトウェアに様々なアイデアが導入された結果、蛍光色素の検出感度が大幅に改善され、オートコンペンセーションやデータ取り込み後のアフターコンペンセーションも可能になった。

すなわち、BD FACSAria セルソーターは従来の機器と比べ、操作はより簡単に、解析力はより高度になったといえる。このような機能の向上は、細胞数が極めて少なく、表面抗原の発現レベルが低い移植後早期の検体においても、信頼性の高い解析結果を得ることを可能にしている。

ここでは、BD FACSAria セルソーターを使用してマルチカラーでキメリズム解析を行う場合に直面する問題点、すなわち (1) 蛍光色素と抗体の組み合わせ方、および (2) コンペンセーション調整法について、我々が工夫しているポイントを補足する。

1. マルチカラー解析に用いる蛍光色素と抗体の組み合わせ

当研究室では、BD FACSAria セルソーターを使用して最高で 10 カラー解析まで行っているが、使用する蛍光色素としては FITC (あるいは Alexa Fluor 488)、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、APC、Alexa Fluor 700、APC-Cy7、Pacific Blue (あるいは Alexa Fluor 405) および Pacific Orange が、最も使いやすい組み合わせである。これらの蛍光色素は長期の保存にも安定で、市販されている抗体の種類も多くなっている。

- a) 最もよく普及した明るい蛍光色素である FITC、PE および APC は、普段あまり使わない特殊な抗体の標識に用いる。HLA-FACS 法によるキメリズム解析では、抗 HLA 抗体を FITC、PE あるいは APC 標識で使用している。
- b) まだあまり普及していない新しい蛍光色素である PE-Cy7、Alexa Fluor 700、APC-Cy7、Pacific Blue、Alexa Fluor 405 および Pacific Orange は、使用頻度の高い抗体の標識に用いる (APC-Cy7-CD19 や Pacific Blue-CD4 など)。
- c) PE-TR は、FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、Pacific Orange など漏れ込む場所が多く、コンペンセーションが多重となる。そこで、この蛍光色素の検出器 (バンドパスフィルター: 610/20) は、PI で染色して陽性分画 (死細胞) をゲートアウトする目的で用いる。
- d) PerCP-Cy5.5、APC-Cy7 や PE-Cy7 など、いくつかの組み合わせでは陽性細胞集団が分布が広がる場合がある。その場合、X 軸・Y 軸の表示を Log 表示から Bi-exponential 表示法に変更して (Version 4.1 以上の BD FACSDiva ソフトウェアで可能。旧 PC では動作負荷が大きいため PC の更新を勧める)、軸上に埋まり込んだ部分を表示することにより、より正しくコンペンセーションおよび細胞の分布を確認することが可能になる。
- e) Pacific Blue (あるいは Alexa Fluor 405) は Pacific Orange 側に漏れ込みがあるだけで、他の蛍光色素とのコンペンセーションの必要がほとんどないため、使いやすい蛍光色素である。
- f) Pacific Orange は 488nm 側の検出器に漏れ込む場所が多いが、どれも比較的コンペンセーションが容易なため、使いやすい蛍光色素である。

2. コンペンセーション調整法

a) オートコンペンセーション

オートコンペンセーションは操作が簡便で、コンペンセーション用の細胞も少量で可能であるため、5 カラー、6 カラーを超えるようなマルチカラー解析には必須のシステムである。マルチカラー解析におけるオートコンペンセーションは、陰性サンプルと各陽性サンプル、または、BD™ CompBead Particles Setsのデータを保存することで、自動で蛍光補正値が計算され、機器設定に入力される。

臨床検体で十分なサンプル量が得られない場合には、健康人末梢血から調整した細胞でオートコンペンセーションを行なっても、実際のサンプルを測定するときの電圧およびコンペンセーションの最適条件とほぼ同様の条件設定が可能であった。または、BD™ CompBead Particles Setsを用いる場合は、細胞との大きさや自家蛍光レベルが異なるため、まず陰性サンプルの細胞を少し流して電圧調整を行い、その後、陽性サンプルとして抗体で標識したビーズを用いてオートコンペンセーションを行なった。

オートコンペンセーション自体は、マニュアルコンペンセーションで行っている手順の自動化であり、適切な陽性分画をソフトウェアに認識させることができれば、問題なく実行することが可能である（認識には最低 100 イベント以上の陽性集団が必要となる）。

注意点としては、自家蛍光や非特異反応などにより、ドットプロットにおいて対角線上にノイズが伸びているような場合、その集団を陽性細胞と認識する場合があるので、それら擬陽性の入らないようにゲートを設定する。また、タンデム色素の場合は抗体毎、および、同一抗体でもそのロット毎に蛍光補正量が変わるため、陽性コントロールの設定には同一の試薬を用いる（例えば、CD4 PE-Cy7 の代用として CD8 PE-Cy7 を用いたり、同一抗体でも異なるロットを混用したりしないこと）。

b) マニュアルコンペンセーション

一方、我々はこれまでの経験より、コンペンセーション用の細胞を順次流しマニュアルコンペンセーションも行なっているが、この方法でマルチカラーの調整を行なうためには、どの蛍光色素がどの検出器に漏れ込むのかを、あらかじめ知っておく方が良い。

以降に各蛍光色素の、他の蛍光検出器へのおおよその漏れこみを示す（コンペンセーションが比較的大きい部分には下線を引いてある）。

FITC or Alexa488: PE、PE-TR、Pacific Orange
PE: FITC、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、PE-TR
PerCP-Cy5.5: PE-Cy7、APC、Alexa700、APC-Cy7
PE-Cy7: PE、PerCP-Cy5.5、PE-TR、APC-Cy7
PI: FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-Cy7、APC

APC: PerCP-Cy5.5、Alexa700、APC-Cy7
Alexa700: APC、APC-Cy7
APC-Cy7: PE-Cy7、APC、Alexa700

Pacific Blue or Alexa Fluor 405: Pacific Orange
Pacific Orange: FITC、PE、PerCP-Cy5.5、PE-TR

従来のフローサイトメーターでは、コンペンセーションの調節は細胞を流しながら行っていた。BD FACSAriaセルソーターのBD FACSDivaソフトウェアでは、細胞を流してデータを表示後、一旦細胞を流すのを止めて、ソフトウェア上でコンペンセーションを行うことが可能である。これにより、マルチカラー解析におけるマニュアルコンペンセーションはかなり容易になり、コンペンセーション用に準備しなければならない細胞数も大幅に減らすことができるようになった。

このアフターコンペンセーションは、コンペンセーション時もデータ解析時のいずれの時点でも可能である。キメリズム解析では、FITC と PE で標識された抗 HLA 抗体でドナー由来細胞とレシピエント由来細胞を判別するが、コンペンセーション調整後にサンプルを流してみると、抗体の交叉反応や MHC クラス I の発現レベルが細胞種ごとに異なること、また細胞の大きさも異なることなどの理由から、ドナー由来とレシピエント由来の 2 つの細胞集団を明確に分離してゲートをかけるのが難しい場合がある。

その場合、データ取込み後に FITC-PE 間のコンペンセーションを確認し、それらが 2 つの異なる細胞集団であるのか判断する助けになる場合がある。しかしながら、本来どのようなパターンで染まるはずであるのかわかっていれば、サンプルのデータを取り込んだ後、コンペンセーションを調整することも可能であるが、移植後早期の検体や正常とは異なるマーカーを発現する腫瘍細胞では、正常のパターンを参考にアフターコンペンセーションで“形を整える”と間違いを起こす可能性があり、十分な注意が必要である。

* Pacific Blue™, Pacific Orange™, Texas Red® および Alexa Fluor® は Molecular Probes 社の登録商標です。
* Cy™ は Amersham Biosciences 社の登録商標です。
* BD、BD ロゴ および その他の商標 は Becton, Dickinson and Company が保有します。©2010 BD
* 本著作物に関する権利は全て日本ベクトン・ディッキンソン (株) が保有します。
本著作物の一部または全部を無断で複写、複製、転載、改変または流布することを禁じます。
©2010 Nippon Becton Dickinson Co., Ltd.



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社

〒107-0052 東京都港区赤坂4-15-1 赤坂ガーデンシティ

www.bd.com/jp/

お客様情報センター

製品関連・資料請求／納期・在庫

 0120-8555-90

Fax: 024-593-5761

BD Biosciencesに関する技術的、学術的なお問い合わせ先
セルアナリシス学術カスタマーサポート

 0120-4890-77

E-Mail: tech_cell@bd.com

インストゥルメンツサポートホットライン

 0120-7099-12