

I. 原 著

I. 3 6カラーフローサイトメトリーによる造血器腫瘍の免疫フェノタイピング

神戸市立医療センター中央市民病院 臨床検査技術部 歯科口腔外科

	丸 岡 隼 人	江 藤 正 明
	那 須 浩 二	老 田 達 雄
小児科	岸 本 健 治	宇佐美 郁 哉
免疫血液内科	青 木 一 成	小 野 祐 一 郎
	加 藤 愛 子	有 馬 浩 史
	瀧 内 曜 子	永 野 誠 治
	田 端 淑 恵	柳 田 宗 之
	松 下 章 子	高 橋 隆 幸
	石 川 隆 之	

要 旨

造血器腫瘍の診断、予後分類および微小残存病変 (MRD) や他部位への浸潤などの微小腫瘍細胞の検出において、フローサイトメトリー (FCM) による免疫フェノタイピングは今や必須の検査となっている。近年、次世代型マルチカラーフローサイトメーターの登場および診断時における異常抗原発現に基づく微小腫瘍細胞の検出の進歩により、FCMによる免疫フェノタイピングには、より洗練されたアプローチが必要とされている。今回、我々は造血器腫瘍患者 107 症例を対象とし、6 カラー FCM による免疫フェノタイピングの診断的有用性を評価した。その結果、全例において腫瘍細胞の細胞系統および分化度を同定することが可能であり、1 例を除く全ての症例において 1 つ以上の異常抗原発現を検出した。また、30 症例 51 サンプルについては、診断時の異常抗原発現に基づく患者特異的抗体パネルを用いた微小腫瘍細胞の検出を試み、PCR 法との結果比較を行った。6 カラー FCM の最小検出感度は 0.01% であり、PCR 法との一致率は 92% (47/51) であった。6 カラー FCM による免疫フェノタイピングは造血器腫瘍の診断のみならず、微小腫瘍細胞の高感度検出において優れたパフォーマンスを有していた。

[キーワード]

- 1) 造血器腫瘍、2) 6 カラーフローサイトメトリー、3) 免疫フェノタイピング、4) 異常抗原発現、5) 微小腫瘍細胞

6-color flow cytometric immunophenotyping for hematological malignancies.

Hayato Maruoka¹, Masaaki Eto¹, Koji Nasu¹, Tatsuo Oita¹, Kenji Kishimoto², Ikuya Usami², Kazunari Aoki³,
Yuichiro Ono³, Aiko Kato³, Hiroshi Arima³, Yoko Takiuchi³, Seiji Nagano³, Sumie Tabata³, Soshi Yanagita³,
Akiko Matsushita³, Takayuki Takahashi³, Takayuki Ishikawa³

¹Department of Clinical Laboratory, ²Department of Pediatrics,

³Department of Hematology and Clinical Immunology, Kobe City Medical Center General Hospital

Abstract

Flow cytometric immunophenotyping is an essential methodology for establishing the diagnosis and prognostic classification and for detecting small malignant populations such as minimal residual disease (MRD) and occult involvement to other areas in patients with hematological malignancies. Recently, more sophisticated approaches have been needed in flow cytometry (FCM), owing to the development of a novel multi-color flow cytometer and the improved ability to detect small malignant populations based on aberrant antigen expression at diagnosis. We studied 107 patients with newly diagnosed hematological malignancies and assessed the diagnostic usefulness of 6-color FCM. Our approach was capable of determining cell lineages and the differentiation status of malignant

cells in all cases, and further, at least one aberrant antigen expression on malignant cells was detected in all cases but one. We evaluated the ability to detect small malignant populations by using a patient-specific antibody panel based on aberrant antigen expression at diagnosis and compared the results between 6-color FCM and polymerase chain reaction (PCR) in 51 samples from 30 cases. The minimum detection sensitivity of 6-color FCM was 10⁻⁴ and the coincidence rate with PCR was 92% (47/51). In conclusion, 6-color flow cytometric immunophenotyping showed excellent performance, not only for establishing the diagnosis but for detecting small malignant populations with high sensitivity in hematological malignancies.

[Keyword]

- 1) hematological malignancies, 2) 6-color flow cytometry, 3) immunophenotyping,
- 4) aberrant antigen expression, 5) small malignant populations

【はじめに】

造血器腫瘍の診断、微小残存病変 (minimal residual disease: MRD) および他部位への微小浸潤の評価方法として、光学顕微鏡による標本の観察、染色体分析、fluorescence in situ hybridization (FISH)、フローサイトメトリー (FCM) による免疫フェノタイピング、polymerase chain reaction (PCR) などがあり、各々の検出感度 (検出できる腫瘍細胞の最小量) は、5%、1~5%、0.1~5%、0.01~1%、0.0001~0.1%程度である¹⁾。白血病の予後因子として寛導導入療法後の骨髄におけるMRDがあり、臨床的再発との関連について多くの研究報告がなされている²⁻⁴⁾。また、悪性リンパ腫においては、骨髄などの他部位への浸潤の有無が予後因子の1つである臨床病期 (Ann Arbor分類) を決定する。つまり、微小な腫瘍細胞を高感度かつ正確に検出することは、造血器腫瘍患者の治療効果の判定および予後を推定する上で極めて重要である。

FCMによる免疫フェノタイピングとは、フローサイトメーターを用いて1個の細胞における抗原の発現パターンを網羅的に解析する方法であり、①迅速な結果報告、②細胞の起源、分化レベルおよび病型分類の確定、③予後予測や遺伝子変異との関連の評価、④微小腫瘍細胞の検出 (MRD および他部位への浸潤評価)、⑤定量的評価が可能、など多くのメリットがある。解析精度を向上させるファクターとしては、①フローサイトメーターと解析ソフトウェアの性能、②マルチカラー FCM の実施、③最適な抗体の選択と最適な抗体パネルの作成、などが挙げられる。特に③は多種類かつ多様な分化レベルの正常細胞群と腫瘍細胞群との鑑別に必須となる抗原の異常発現を高感度に検出できるように考慮する必要がある。欧米では Euro Flow⁵⁾、Leukemia Net⁶⁾ などの多施設共同研究グルー

プからマルチカラー FCM に対応した解析法、抗体の種類や抗体パネルの提唱がなされている。一方、国内においては依然として3カラー FCM による解析が主流であり、また標準法の提唱もなされていないため、抗体の種類、抗体パネルや解析法は各施設独自のものであり、検出感度および精度の施設間差が著しいのが現状である。3カラー FCM と比較した場合、6カラー FCM の実施により得られる情報量は5倍となり、免疫フェノタイピングの解析精度を大幅に向上させることが可能となる。今回、我々は次世代型フローサイトメーター FACSCant II を導入し、6カラー FCM による造血器腫瘍の免疫フェノタイピングを構築したので報告する。

I. 対象と方法

急性骨髄性白血病 (AML) / 骨髄異形成症候群 (MDS) 29 例、急性リンパ性白血病 (ALL) 9 例、形質細胞性腫瘍 (PCN) 19 例、慢性リンパ増殖性疾患 (CLPD) 50 例の計 107 例を対象とした。各試薬メーカーから入手したモノクローナル抗体の affinity および蛍光色素との組み合わせを検討した後、①抗原欠失、②非同期性発現、③系統不全、④過剰発現、⑤発現低下の5つの異常抗原発現の評価が可能な抗体パネルの作成を行った (Table. 1)。

初発症例においては、抗体パネルによる異常抗原発現の検出の有用性を評価した。その内、MRD あるいは他部位への浸潤評価目的で提出された 30 症例 (AML 3 例、ALL 6 例、PCN 2 例、CLPD 19 例) 51 サンプルについては、患者特異的抗体パネルの作成による微小腫瘍細胞の検出を試み、PCR 法との結果比較を行った。

Table.1 6-color flow cytometric antibody panels for hematological malignancies.

Acute myeloid leukemia (AML)/Myelodysplastic syndromes (MDS)						
Tube	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
1	HLA-DR	CD133 (AC141)	CD34	CD117	CD133 (AC133)	CD45
2	CD9	CD96	CD34	CD38	CD90	CD45
3	CD7	CD33	CD34	CD19	CD56	CD45
4	CD65	NG2	CD34	CD25	CD15	CD45
5	CD2	CD64	CD34	CD14	CD36	CD45
6	CD16	CD11b	CD34	CD13	CD10	CD45
7	CD86	CD200	CD34	CD4	CD123	CD45
additional panels						
8	CD36	Gly-A	CD34	CD117	CD71	CD45
9	CD41	CD61	CD34	CD117	CD9	CD45
Acute lymphoblastic leukemia (ALL)						
Tube	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
1	CD38	CD10	CD34	CD19	CD20	CD45
2	CD58	CD66c	CD34	CD25	CD123	CD45
3	CD81	CD21	CD34	CD13	CD22	CD45
4	CD24	NG2	CD34	CD33	CD15	CD45
5	CD9	CD133 (AC141)	CD34	CD117	CD133 (AC133)	CD45
6	CD44	CD200	CD34	CD5	CD27	CD45
7	CD26	CD99	CD34	CD3	CD4	CD45
8	CD8	CD7	CD34	CD56	CD2	CD45
Plasma cell neoplasm (PCN)						
Tube	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
1	CD20	CD56	CD19	CD38	CD138	CD45
2	cy κ	cy λ	CD19	CD38	CD138	CD45
Chronic lymphoproliferative diseases (CLPD)						
Tube	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-Cy7
1	CD38	CD200	CD5	CD19	CD23	CD45
2	κ	λ	CD20	CD19	CD25	CD45
3	CD44	CD10	CD34	CD19	CD43	CD45
4	CD22	CD21	HLA-DR	CD19	CD40	CD45
5	CD2	CD7	CD8	CD19	CD56	CD45
6	CD26	CD3	CD4	CD19	CD5	CD45
additional panels						
7	CD103	CD11c	CD20	CD19	CD25	CD45
8	CD26	CD7	CD4	CD3	CD25	CD45
9	CD103	TCR γ δ	CD8	CD3	CD56	CD45

II. 結果

6-color FCM 用抗体パネルを用いた造血器腫瘍患者の診断時における異常抗原発現の全データは Appendix.1 に示した。全例において、腫瘍細胞の細胞系統および分化度の評価が可能であり、99% (106/107) の症例において、少なくとも1つ以上の異常抗原発現の存在が確認された (Table. 2)。

Figure. 1 に異常抗原発現の代表例を示した。No96 (血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫: AITL) においては、正常 T 細胞に発現している CD7 の抗原欠失 (Figure. 1A)、No15 (好酸球増多を伴う急性骨髄単球性白血病: AML-M4eo) においては、正常骨髄芽球には発現しない成熟顆粒球マ

ーカー CD65 の非同期性発現が顕著に認められた (Figure. 1B)。また、No53 (多発性骨髄腫: MM) では正常形質細胞には発現しない NK 細胞マーカー CD56 の系統不全 (Figure. 1C)、No32 (B-ALL) においては、hematogone (正常 B 前駆細胞) ではわずかに発現の認められる CD26、CD99 の過剰発現 (Figure. 1D)、No62 (びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫: DLBCL) においては、正常成熟 B 細胞に比して CD22 の発現低下が認められた (Figure. 1E)。

107 症例の内、30 症例 51 サンプルについては診断時の異常抗原発現の結果を基に患者特異的抗体パネルを作成し、MRD あるいは他部位への微小浸潤の評価を行い、PCR 法との結果比較を行った (Table. 3)。

Table.2 The frequency of aberrant antigen expression in hematological malignancies

	AML/MDS	ALL	PCN	CLPD
Antigenic absence	24% (7/29)	33% (3/9)	95% (18/19)	38% (19/50)
Asynchronous expression	28% (8/29)	0% (0/9)	26% (5/19)	22% (11/50)
Lineage infidelity	72% (21/29)	56% (5/9)	63% (12/19)	16% (8/50)
Overexpression	7% (2/29)	78% (7/9)	0% (0/19)	30% (15/50)
Underexpression	31% (9/29)	89% (8/9)	74% (14/19)	72% (36/50)

Table.3 Comparison of the results with 6-color flow cytometry and polymerase chain reaction

Acute myeloid leukemia (AML)/Myelodysplastic syndromes (MDS)					
No	Dx	specimen	days after Dx	malignant cells (%)	PCR
5	AML-M2	BM	40	0.25	AML1/ETO(+)
		BM	65	0.26	AML1/ETO(+)
		BM	109	0.08	AML1/ETO(+)
		BM	163	0.04	AML1/ETO(+)
		BM	226	0.01	AML1/ETO(+)
		BM	287	0.1	AML1/ETO(+)
6	AML-M2	BM	34	0.02	AML1/ETO(+)
		BM	66	(-)	AML1/ETO(+)
13	AML-M4	BM	30	10	NPM1 Mutation(+)
		BM	43	(-)	NPM1 Mutation(+)
		BM	64	(-)	NPM1 Mutation(+)
		BM	102	(-)	NPM1 Mutation(+)

Acute lymphoblastic leukemia (ALL)					
No	Dx	specimen	days after Dx	malignant cells (%)	PCR
31	B-ALL	BM	27	0.4	m-bcr/abl(+)
		BM	58	0.04	m-bcr/abl(+)
32	B-ALL	BM	23	(-)	IgH-R(-)
		BM	44	(-)	IgH-R(-)
		BM	92	(-)	IgH-R(-)
33	B-ALL	BM	26	0.5	IgH-R(+)
		BM	35	0.03	IgH-R(+)
		BM	58	(-)	IgH-R(-)
		BM	97	(-)	IgH-R(-)
34	B-ALL	BM	44	17	IgH-R(+)
		BM	65	12	IgH-R(+)
35	B-ALL	BM	52	4	IgH-R(+)
		BM	83	5	IgH-R(+)
36	B-ALL	BM	45	(-)	IgH-R(-)

Plasma cell neoplasm(PCN)					
No	Dx	specimen	days after Dx	malignant cells (%)	PCR
49	MM	BM	70	(-)	IgH-R(-)
55	MM	BM	37	0.05	IgH-R(+)

Chronic lymphoproliferative diseases (CLPD)					
No	Dx	specimen	days after Dx	malignant cells (%)	PCR
60	BL	BM	11	(-)	IgH-R(-)
62	DLBCL	BM	12	(-)	IgH-R(-)
63	DLBCL	ascites	18	14	IgH-R(+)
65	DLBCL	BM	9	(-)	IgH-R(-)
67	DLBCL	BM	1	2	IgH-R(+)
68	DLBCL	BM	13	5	IgH-R(+)
70	DLBCL	BM	17	(-)	IgH-R(-)
72	DLBCL	BM	3	(-)	IgH-R(-)
77	FL	BM	8	0.5	IgH-R(+)
		ascites	8	1	IgH-R(+)
80	FL	BM	12	0.4	IgH-R(+)
82	IVL	BM	1	(-)	IgH-R(-)
89	MCL	BM	65	20	IgH-R(+)
92	MZL	BM	6	4	IgH-R(+)
94	PLL	PB	1	0.05	IgH-R(+)
		BM	48	(-)	IgH-R(-)
95	SMZL	ascites	1	8	IgH-R(+)
99	ALCL	BM	13	3	TCR γ -R(+)
100	EATCL	BM	3	(-)	TCR γ -R(-)
		intestine	6	33	TCR γ -R(+)
101	EATCL	BM	6	(-)	TCR γ -R(-)
102	PTCL	BM	7	0.7	TCR γ -R(+)
		PB	27	19	TCR γ -R(+)

Dx, diagnosis; +, positive; -, negative; PCR, polymerase chain reaction; IgH-R, immunoglobulin heavy chain rearrangement; TCR-R, T-cell receptor gamma rearrangement; AML1/ETO, acute leukemia 1 / eight twenty one; NPM1, nucleophosmin 1; m-bcr/abl, minor-breakpoint cluster region / abelson leukemia virus oncogene; AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; RAEB, refractory anemia with excess blasts; ALL, acute lymphoblastic leukemia; MM, multiple myeloma; BL, Burkitt lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; IVL, intravascular large B-cell lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; MZL, nodal marginal zone B-cell lymphoma; PLL, prolymphocytic leukemia; SMZL, splenic marginal zone B-cell lymphoma; AITL, angioimmunoblastic T-cell lymphoma; ALCL, anaplastic large cell lymphoma, EATCL, enteropathy-associated T-cell lymphoma; PTCL, peripheral T-cell lymphoma

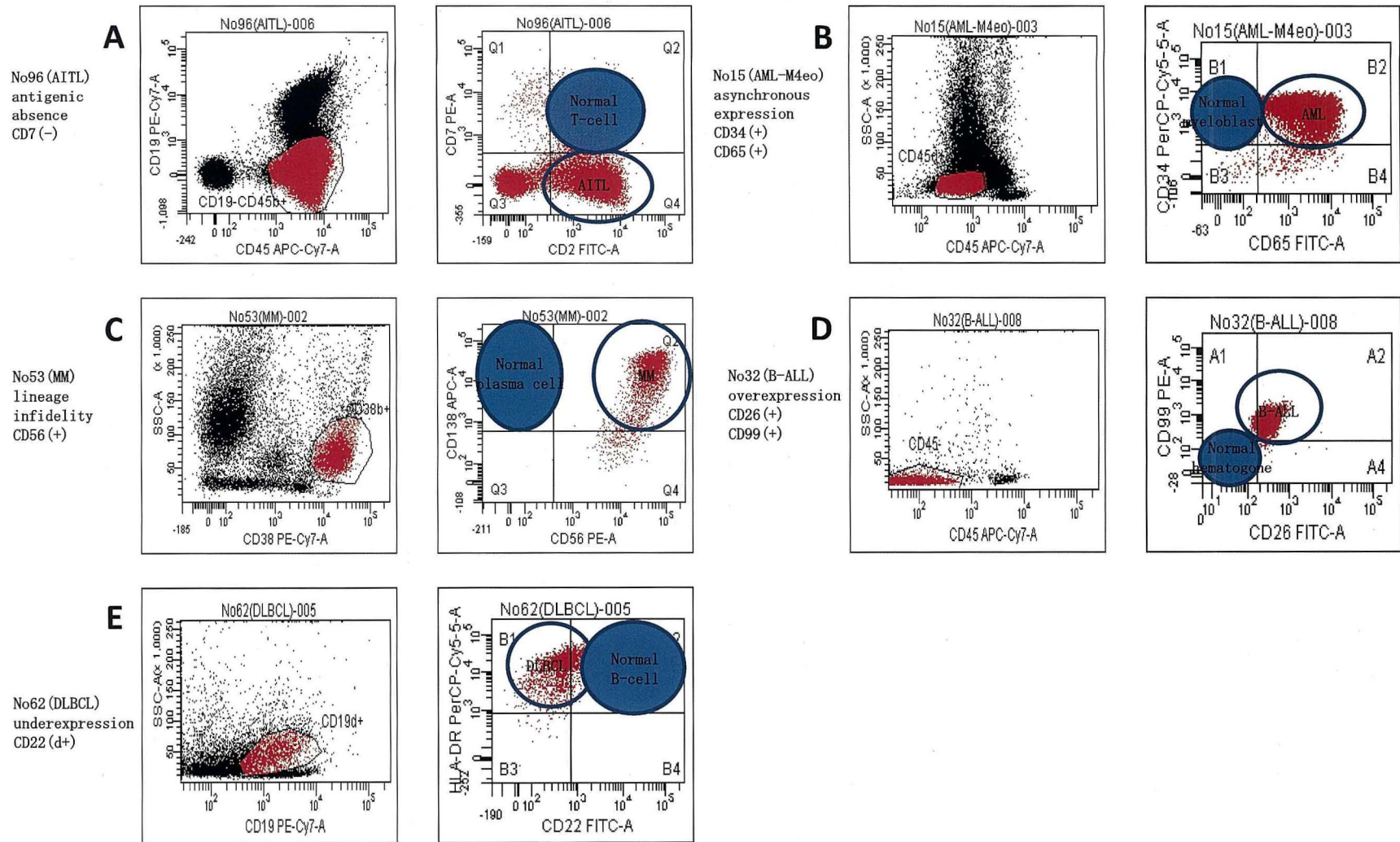


Figure.1 Examples of aberrant antigen expressions in hematological malignancies. (A) Antigenic absence of CD7 on angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) cells. (B) Asynchronous expression of CD65 on acute myeloid leukemia M4 with bone marrow eosinophilia (AML-M4eo) cells. (C) Lineage infidelity of CD56 on multiple myeloma (MM) cells. (D) Overexpression of CD26 and CD99 on B-lymphoblastic leukemia (B-ALL) cells. (E) Underexpression of CD22 on diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) cells. Malignant populations and normal populations are indicated by open circles and filled circles, respectively.

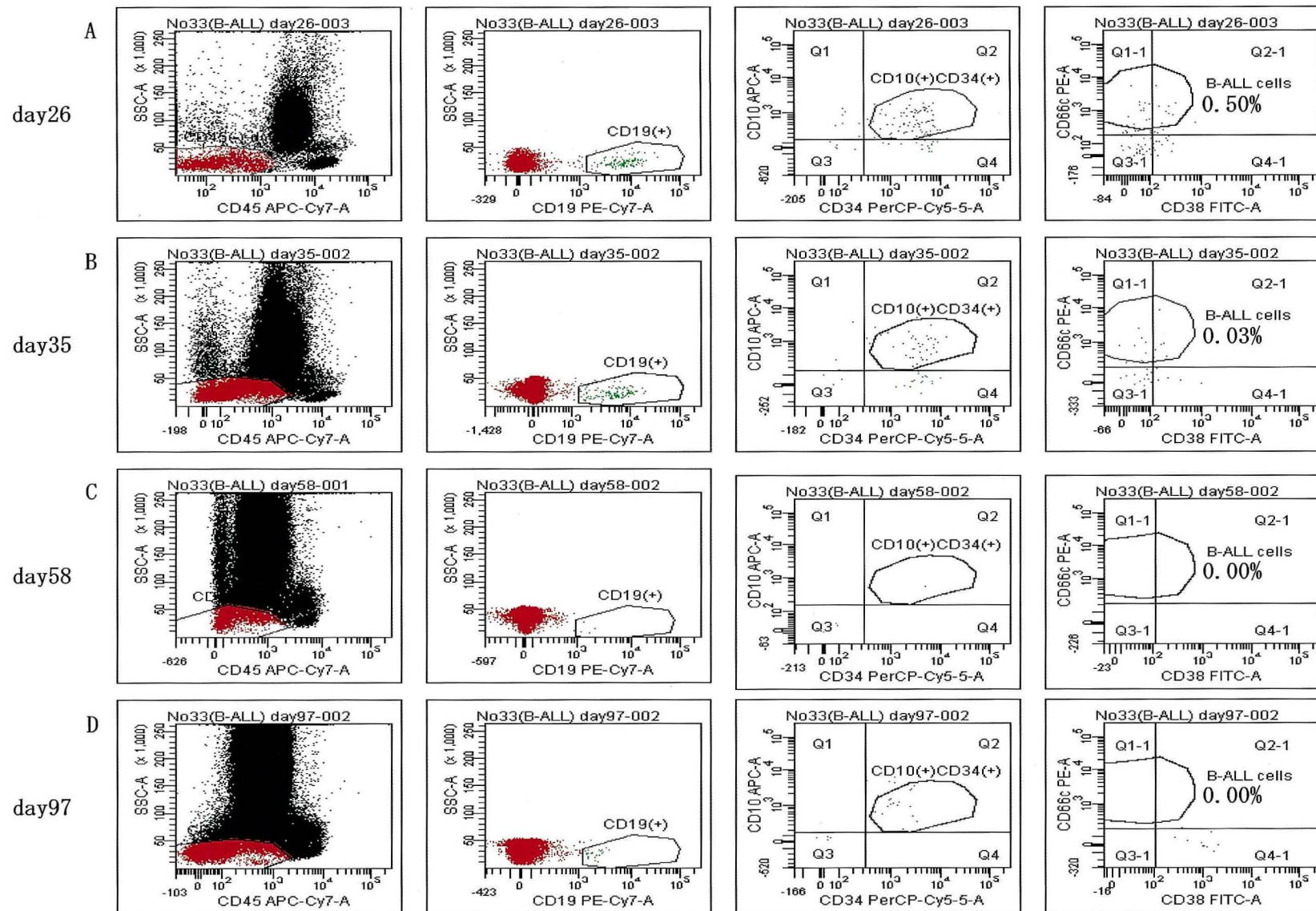


Figure.2 The detection of minimal residual disease (MRD) by using 6-color flow cytometry (6-color FCM) and the patient-specific antibody panel in a patient with B-ALL. The cell population with CD10⁺CD19⁺CD34⁺CD38^{dim}CD45⁻CD66c⁺ aberrant phenotype was identified as B-ALL cells (violet). The percentages of residual malignant cells were 0.50% at day26 (A), 0.03% at day35(B), 0.00% at day58 (C), and 0.00% at day97 (D) after diagnosis.

FCMでの最小検出感度は0.01% (1万個に1個)程度であり、PCR法で陽性であった36サンプルにおける陽性率は91% (32/36)、PCR法で陰性であった15サンプルにおける陰性率は100% (15/15)であり、両法の一致率は92% (47/51)であった。

Figure. 2にNo33 (B-ALL)のMRD解析の一例を示した。診断時のフェノタイプはCD10^{bright+}CD19⁺CD34⁺CD38^{dim+}CD45⁻CD58^{bright+}CD66c⁺CD99^{bright+}であり、CD10、CD58、CD99の過剰発現、CD38、CD45の発現低下やCD66cの系統不全などの異常抗原発現が認められた。FITC-CD38、PE-CD66c、PerCP-Cy5.5-CD34、PE-Cy7-CD19、APC-CD10、APC-Cy7-CD45を用いて患者特異的抗体パネルとし、多段階階層化ゲーティングを用いてMRD解析を行った。治療開始後のday26とday35においては、MRDがそれぞれ0.50%、0.03%認められ (Figure. 2A, B)、PCR法を用いたIgH再構成も共に陽性であった。一方、day58とday97においてはMRDは検出されず (Figure. 2C, D)、IgH再構成も共に陰性であった。

III. 考察

FCMによる免疫フェノタイプリングは、造血器腫瘍の診断のみならず、MRDや他部位への浸潤などの微小腫瘍細胞の検出において非常に有力な検査である。一般的に、検出感度の面ではPCR法に劣るとされているが、特にAMLにおいては診断時に遺伝子異常の認められない症例が60%程度存在するため、PCR法によるMRDの評価が不可能なケースが多く存在する。一方、免疫フェノタイプリングによるAMLにおける異常抗原発現の検出率は80%以上であり^{3,7)}、多くの症例においてMRDの評価が可能である。近年、造血器腫瘍における異常抗原発現に関する研究が盛んに行われており、診断精度の向上が図られている。EuroFlow⁵⁾からは8カラーFCMを用いた各疾患群毎の診断およびMRD用の抗体パネルが提唱されており、現時点では最も先進的なメソッドとして注目されている。しかしながら、8カラーFCMに対応したフローサイトメーターを所有している医療機関は皆無であること、測定用チューブ間の抗体の重複によるコストパフォーマンスの低さ、などの理由から広く普及するのは大きな課題がある。また、LeukemiaNet⁶⁾、Craigら⁸⁾やde Tute⁹⁾は各疾患群におけるフェノタイプを、Hrusakら¹⁰⁾は急性白血病の遺伝子異常とフェノタイプの関連に

ついて報告しており、今後の抗体パネルの標準化において有力な情報を提供している。抗体パネルの作成において最も重要なポイントは、①AML/MDS細胞と正常骨髄芽球、②B-ALL細胞と正常B前駆細胞、③T-ALL細胞と正常T細胞、④PCN細胞と正常形質細胞、⑤B-CLPD細胞と正常B細胞、⑥T/NK-CLPD細胞と正常T/NK細胞、など腫瘍細胞と正常細胞の鑑別が可能な抗体の選択と組み合わせである。

従来、AML/MDSにおける異常抗原発現の検出は、比較的頻度の高いCD7、CD19、CD56による系統不全に限定することが一般的であったが、CD15、CD65などの非同期性発現の検出率の高さが報告されており¹¹⁻¹³⁾、我々の結果でもCD34 (+)細胞におけるCD15、CD65の発現は29例中5例 (17%)と比較的高頻度に認められた。また、顆粒球におけるCD123の非同期性発現は急性前骨髄球性白血病 (APL)細胞と正常前骨髄球との鑑別に有用であり、Wangら¹⁴⁾の報告を支持するものであった。さらに、CD25、CD96、CD200などの系統不全を追加することにより、1例を除いて1つ以上の異常抗原発現が検出され、その後のMRD解析が可能となった。CD25およびCD200は正常リンパ球に発現が限定されるが、34% (10/29)の症例において発現が認められた。Terwijnら¹⁵⁾やTonksら¹⁶⁾はAMLにおけるCD25あるいはCD200の発現を予後不良因子として報告しており、今後MRDマーカーのみでなく予後を推定する上で重要なマーカーとなる可能性がある。また、Hosenら¹⁷⁾はCD96を白血病幹細胞 (LSC)の特異的マーカーとして報告しており、21% (6/29)の症例において発現が認められた。現時点で、CD96のMRDマーカーとしての有用性を示した報告はなく、今後の症例の蓄積と長期フォローが必要である。

B-ALLのMRD評価においては、しばしば異常リンパ芽球と正常B前駆細胞との鑑別が問題となる。両者のフェノタイプは共にCD10⁺CD19⁺CD34⁺CD45^{dim+}であることが多く、共通点が多い。一般的には骨髄系のマーカーであるCD13、CD33の系統不全やCD10の過剰発現を異常抗原発現として評価するが、適用される症例が限定される。最近では、B-ALLのMRD解析プロトコールが提唱されており¹⁸⁻¹⁹⁾、その中でCD38の発現低下、CD58の過剰発現やCD66cの系統不全が注目されている。我々の結果では、それぞれ63% (5/8)、63% (5/8)、

38% (3/8) であり、いずれか1つを認める症例は88% (7/8) であった。また、CD9とCD81の抗原欠失/発現低下²⁰⁻²¹⁾は38% (3/8)、CD27とCD44の過剰発現²²⁾は38% (3/8)、さらにT-ALLにおけるMRDマーカーとして報告されているCD99の過剰発現²³⁾が50% (4/8)と高頻度に認められた。今後、CD99の過剰発現はB-ALLにおける新規MRDマーカーとなる可能性がある。今回、T-ALLは1例のみであったが、CD3、CD4、CD8などのT-cellマーカーの抗原に加え、骨髄系マーカーであるCD13、CD33の系統不全が認められた。

PCNにおいては、異常単クローン性形質細胞と正常形質細胞の鑑別が重要である。正常形質細胞はCD19⁺CD20⁻CD38^{bright+}CD45^{dim+}CD56⁻CD138⁺のフェノタイプであり、かつcy κ /cy λ の発現の偏りを認めないが、MMおよび意義不明の単クローン性 γ グロブリン血症(MGUS)においては、CD19の抗原欠失あるいは発現低下が100% (19/19)、CD20の非同期性発現が26% (5/19)、CD56の系統不全が63% (12/19)、cy κ あるいはcy λ の発現の偏りが100% (19/19)、CD38、CD45の発現低下がそれぞれ26% (5/19)、68% (13/19)であった。他の異常抗原発現として、Batailleら²⁴⁾はCD28の系統不全とCD27の抗原欠失を、またCraigら⁸⁾はCD117の系統不全を報告している。我々の結果ではMM細胞と正常形質細胞の鑑別は100% (19/19)可能であったが、鑑別困難なケースにおいてはこれらのマーカーが有用となる可能性がある。

B-CLPDのクロナリティーの評価において、 κ / λ の発現の偏りの評価は必須であり、38例中37例(97%)において κ あるいは λ の優位な発現の偏りが認められた。残り1例は κ および λ の欠損したDLBCLであったが、CD21の発現低下が顕著であり、正常B細胞との鑑別は可能であった。また、CD21あるいはCD22の抗原欠失および発現低下は71% (27/38)と高頻度に認められ、 κ / λ の発現の偏りとの組み合わせにより、骨髄などの他部位への微小浸潤の検出に有用であると考えられる。さらに、病型分類においては、濾胞性リンパ腫(FL)に特異的なフェノタイプであるCD10⁺CD43^{8,9)}、B細胞性慢性リンパ性白血病(B-CLL)とマンツル細胞リンパ腫(MCL)の鑑別に有用なCD200の発現の有無^{9,25)}、バーキットリンパ腫(BL)とBL様DLBCLの鑑別に有用なCD44の発現の有無²⁶⁾などが報告されており、我々も同様の結果を得ている。

B-CLPDにおけるフェノタイプと予後との関係については、DLBCLにおけるCD5の発現が予後不良因子として広く知られている²⁷⁾。また、Rydströmら²⁸⁾は免疫化学染色においてCD40陽性細胞比率の低下が予後と関連していることを報告している。今回、17例のDLBCL中2例において、CD40の発現低下が確認されたが、FCMを用いたCD40の発現の評価はこれまでに報告がなく、今後DLBCLにおけるCD40の発現低下が予後因子となりえるかを検証してゆく必要がある。

T-CLPDにおいては、pan-TマーカーであるCD2、CD3、CD4、CD5、CD7、CD8の中で1つ以上の異常抗原発現が12例全例で認められた。その他のマーカーでは、CD26の発現低下がT-CLPDで高頻度に認められることが報告されており^{29,30)}、我々の結果でも42% (5/12)の症例で認められた。病型分類においては、AITLにおけるCD4、CD10の発現⁸⁾や腸管症型T細胞リンパ腫(EATCL)におけるCD8、CD56、CD103の発現⁸⁾が確定診断に有用であった。

6カラーFCMと多種類の抗体の導入により、解析対象のほぼ全例において異常抗原発現を検出することができ、その後のMRDあるいは他部位への微小浸潤の評価を高感度(0.01%)に実施することが可能となった。ただし、初発時と再発時、あるいは治療の前後でフェノタイプが変化するケースが存在することが知られており、AMLにおけるCD7、CD13、CD33、CD34³¹⁾の発現の変化、ALLにおけるCD10、CD13、CD33、CD34の発現の変化^{20,32)}やリツキサンの使用によるB-CLPDにおけるCD20の発現低下あるいは抗原欠失³³⁾は比較的高頻度に見られる現象であり、解析結果の解釈には細心の注意を払う必要がある。欧米に比して、マルチカラーFCMによる免疫フェノタイプングのわが国での報告は少なく、今後日本臨床検査医学会や日本サイトメトリー学会を中心として、解析法の標準化が推進されることが望まれる。

【謝辞】

本研究は笠原ガン治療研究事業の研究助成を受けて行われた。記して謝意を表します。

【文献】

- 1) Chung NG, Buxhofer-Ausch V, Radish JP. The detection and significance of minimal residual

- disease in acute and chronic leukemia. *Tissue Antigens*. 2006 ; 68 : 371-385.
- 2) Adhra AM, et al. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2009 ; 131 : 16-26.
 - 3) Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Monitoring of minimal residual disease in acute leukemia. *Cancer*. 2008 ; 112 : 4-16.
 - 4) van der Velden VHJ, van der Sluijs-Geling A, Gibson BES. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol. *Leukemia*. 2010 ; 24 : 1599-1606.
 - 5) Van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher S, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. EuroFlow antibody panels Handout at 14th EHA Congress, Berling. 2009 ; 1-18.
 - 6) Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011 Jan 21 ; [Epub ahead of print]
 - 7) Campara D. Determination of minimal residual disease in leukemia patients. *Br J Haematol*. 2003 ; 121 : 823-838.
 - 8) Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008 ; 111 : 3941-3967.
 - 9) De Tute RM. Flow cytometry and its use in the diagnosis and management of mature lymphoid malignancies. *Histopathology*. 2011 ; 58 : 90-105.
 - 10) Hrusak O, Porwit-MacDonald A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia*. 2002 ; 16 : 1233-1258.
 - 11) Oлару D, Campos L, Flandrin P, et al. Multiparametric analysis of normal and postchemotherapy bone marrow: Implication for the detection of leukemia-associated immunophenotypes. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008 ; 74 : 17-24.
 - 12) Al-Mawali A, Gillis D, Hissaria P, et al. Incidence, sensitivity, and specificity of leukemia-associated phenotypes in acute myeloid leukemia using specific five-color multiparameter flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. 2008 ; 129 : 934-945.
 - 13) Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol*. 2009 ; 131 : 16-26.
 - 14) Wang YZ, Chang Y, Zhu HH, et al. Application of CD123 in detection of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2006 ; 14 : 427-432.
 - 15) Terwijn M, Feller N, van Rhenen A, et al. Interleukin-2 receptor alpha-chain expression on leukaemic blasts is predictive for outcome and level of residual disease in AML. *Eur J Cancer*. 2009 ; 45 : 1692-1699.
 - 16) Tonks A, Hills R, White P, et al. CD200 as a prognostic factor in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2007 ; 21 : 566-568.
 - 17) Hosen N, Park CY, Tatsumi N, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007 ; 104 : 11008-11013.
 - 18) Krampera M, Perbellini O, Zampieri F, et al. Methodological approach to minimal residual disease detection by flow cytometry in adult B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2006 ; 91 : 1109-1112.
 - 19) Irving J, Jesson J, Virgo P, et al. Establishment and validation of a standard protocol for the detection of minimal residual disease in B lineage childhood acute lymphoblastic leukemia by flow cytometry in a multi-center setting. *Haematologica*. 2009 ; 94 : 870-874.
 - 20) Borowitz MJ, Pullen DJ, Winick N, et al. Comparison of diagnostic and relapse flow cytometry phenotypes in childhood acute lymphoblastic leukemia: Implications for residual disease detection: A report from the childrens' oncology group. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005 ;

- 68 : 18-24.
- 21) Muzzafer T, Medeiros LJ, Wang SA, et al. Aberrant underexpression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2009 ; 132 : 692-698.
 - 22) Vaskova M, Mejstrikova E, Kalina T, et al. Transfer of genomics information to flow cytometry: expression of CD27 and CD44 discriminates subtypes of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2005 ; 19 : 876-878.
 - 23) Dworzak MN, Froschl G, Printz D, et al. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia.* 2004 ; 18 : 703-708.
 - 24) Bataille R, Jego G, Robillard N, et al. The phenotype of normal, reactive and malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica.* 2006 ; 91 : 1234-1240.
 - 25) Palumbo GA, Parinello N, Fargione G, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res.* 2009 ; 33 : 1212-1216.
 - 26) Schniederjan SD, Li S, Saxe DF, et al. A novel flow cytometric antibody panel for distinguishing Burkitt lymphoma from CD10+ diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2010 ; 133 : 718-726.
 - 27) Ennishi D, Takeuchi K, Yokoyama M, et al. CD5 expression is potentially predictive of poor outcome among biomarkers in patients with diffuse large B-cell lymphoma receiving rituximab plus CHOP therapy. *Ann Oncol.* 2008 ; 19 : 1921-1926.
 - 28) Rydström K, Linderöth J, Nyman H, et al. CD40 is a potential marker of favorable prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with immunochemotherapy. *Leuk Lymphoma.* 2010 ; 51 : 1643-1648.
 - 29) Pierson DM, Jones D, Muzzafer T, et al. Utility of CD26 in flow cytometric immunophenotyping of T-cell lymphomas in tissue and body fluid specimens. *Cytometry B Clin Cytom.* 2008 ; 74 : 341-348.
 - 30) Shao H, Yuan CM, Xi L, et al. Minimal residual disease detection by flow cytometry in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 2010 ; 133 : 592-601.
 - 31) Langebrake C, Brinkmann I, Teigler-Schlegel A, et al. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005 ; 63 : 1-9.
 - 32) Guglielmi C, Cordone I, Boecklin F, et al. Immunophenotype of adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: changes at first relapse and clinico-prognostic implications. *Leukemia.* 1997 ; 11 : 1501-1507.
 - 33) Hiraga J, Tomita A, Sugimoto T, et al. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood.* 2009 ; 113 : 4885-4893.

Appendix.1 Summary of aberrant antigen expressions in hematological malignancies at diagnosis

Acute myeloid leukemia(AML)/Myelodysplastic syndromes(MDS)

No	Dx	specimen	aberrant phenotype
1	AML-M0	BM	CD65 (+) CD200 (+) HLA-DR (-)
2	AML-M2	BM	CD65 (+) CD96 (+)
3	AML-M2	BM	CD25 (+)
4	AML-M2	BM	CD7 (+) CD38 (d+)
5	AML-M2	BM	CD19 (+) CD56 (+)
6	AML-M2	BM	CD19 (+) CD96 (+)
7	AML-M2	BM	CD19 (+) CD56 (+) CD96 (+) CD200 (+)
8	AML-M2	BM	CD13 (d+) CD34 (-) HLA-DR (-)
9	AML-M2	BM	CD7 (+) CD56 (+)
10	APL	BM	CD123 (+)
11	APL	PB	CD123 (+)
12	AML-M4	BM	CD86 (+) HLA-DR (d+)
13	AML-M4	PB	CD9 (+) CD34 (-)
14	AML-M4	BM	CD7 (+) CD96 (+) CD200 (+)
15	AML-M4eo	BM	CD65 (+) CD96 (+) CD200 (+)
16	AML-M5a	BM	None
17	MDS/AML	BM	CD9 (+) CD13 (-) CD56 (+)
18	MDS/AML	BM	CD4 (b+) CD7 (+) HLA-DR (d+)
19	MDS/AML	BM	CD7 (+) CD13 (d+) CD96 (+) CD200 (+)
20	MDS/AML	BM	CD33 (d+) CD38 (-)
21	MDS/AML	BM	CD56 (+) CD200 (+)
22	MDS (RAEB)	BM	CD56 (+)
23	MDS (RAEB)	BM	CD15 (+) CD25 (+) CD65 (+)
24	MDS (RAEB)	BM	CD33 (-) CD200 (+) HLA-DR (d+)
25	MDS (RAEB)	BM	CD34 (d+) CD86 (+)
26	MDS (RAEB)	BM	CD4 (b+) CD200 (+)
27	MDS (RAEB)	BM	CD9 (+) CD13 (d+) CD33 (d+)
28	MDS (RAEB)	BM	CD15 (+)
29	CML BC	BM	CD7 (+) CD13 (-)

Acute lymphoblastic leukemia(ALL)

No	Dx	specimen	aberrant phenotype
30	B-ALL	BM	CD9 (d+) CD10 (b+) CD27 (b+) CD38 (d+) CD44 (b+) CD66c (+)
31	B-ALL	BM	CD10 (b+) CD25 (b+) CD27 (b+) CD33 (+) CD38 (d+) CD44 (b+)
			CD45 (d+) CD58 (b+) CD66c (+) CD81 (d+) CD99 (b+)
32	B-ALL	BM	CD26 (b+) CD45 (d+) CD58 (b+) CD99 (b+)
33	B-ALL	BM	CD10 (b+) CD38 (d+) CD45 (d+) CD58 (b+) CD66c (+) CD99 (b+)
34	B-ALL	BM	CD10 (b+) CD24 (d+) CD33 (+) CD38 (d+) CD45 (d+) CD81 (d+)
35	B-ALL	BM	CD10 (-) CD24 (d+) CD44 (b+) CD58 (b+) CD99 (b+)
36	B-ALL	BM	CD9 (-) CD15 (+)
37	B-ALL	BM	CD38 (d+) CD58 (b+)
38	T-ALL	BM	CD3 (-) CD4 (-) CD8 (-) CD13 (+) CD33 (+) CD45 (d+)

Plasma cell neoplasm(PCN)

No	Dx	specimen	aberrant phenotype
39	MM	BM	CD19 (-) CD38 (d+) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
40	MM	BM	CD19 (-) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
41	MM	PB	CD19 (-) CD45 (d+) $\text{cy}\kappa$ (+)
42	MM	BM	CD19 (-) CD45 (d+) $\text{cy}\kappa$ (+)
43	MM	BM	CD19 (-) CD56 (+) $\text{cy}\lambda$ (+)
44	MM	BM	CD19 (-) CD45 (d+) $\text{cy}\lambda$ (+)
45	MM	BM	CD19 (-) CD20 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
46	MM	BM	CD19 (-) CD20 (+) CD38 (d+) $\text{cy}\kappa$ (+)
47	MM	BM	CD19 (-) CD45 (d+) $\text{cy}\kappa$ (+)
48	MM	BM	CD19 (-) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
49	MM	BM	CD19 (-) CD38 (d+) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
50	MM	BM	CD19 (-) CD38 (d+) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\lambda$ (+)
51	MM	BM	CD19 (d+) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
52	MM	BM	CD19 (-) CD20 (+) $\text{cy}\lambda$ (+)
53	MM	BM	CD19 (-) CD20 (+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
54	MM	BM	CD19 (-) CD38 (d+) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
55	MM	BM	CD19 (-) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
56	MGUS	BM	CD19 (-) CD38 (d+) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)
57	MGUS	BM	CD19 (-) CD20 (+) CD45 (d+) CD56 (+) $\text{cy}\kappa$ (+)

Chronic lymphoproliferative diseases (CLPD)

No	Dx	specimen	aberrant phenotype
58	B-CLL	BM	CD5(+) CD20(d+) CD22(-) CD25(+) λ(+)
59	B-CLL	PB	CD25(+) λ(+)
60	DLBCL	Nose	CD10(+) CD21(d+) CD22(d+) κ(+)
61	DLBCL	Tonsil	CD5(+) CD22(d+) CD25(+) κ(+)
62	DLBCL	LN	CD21(d+) CD22(d+) κ(+)
63	DLBCL	intestine	CD10(+) CD21(d+) CD22(d+) κ(+)
64	DLBCL	LN	HLA-DR(d+) λ(+)
65	DLBCL	Colon	CD10(+) λ(+)
66	DLBCL	Stomach	CD40(d+) κ(+)
67	DLBCL	intestine	CD19(d+) CD20(d+) κ(+)
68	DLBCL	LN	CD5(+) CD20(d+) CD21(-) CD22(d+) λ(+)
69	DLBCL	Tongue	CD22(d+) κ(+)
70	DLBCL	Nose	CD21(d+) CD25(+) λ(+)
71	DLBCL	LN	CD5(+) CD10(+) CD20(b+) CD21(d+) CD22(d+) CD25(+) λ(+)
72	DLBCL	Liver	CD10(+) CD21(-) κ(+)
73	DLBCL	BM	CD22(d+) κ(+)
74	DLBCL	Pharynx	CD21(d+) κ(-) λ(-)
75	DLBCL	Nose	CD20(d+) CD25(+) κ(+)
76	DLBCL	Ethmoid sinus	CD21(d+) CD22(d+) CD40(d+) λ(+)
77	FL	LN	CD10(+) CD21(d+) CD22(d+) κ(+)
78	FL	BM	CD10(+) CD22(d+) κ(+)
79	FL	BM	CD10(+) κ(+)
80	FL	LN	CD10(+) CD21(-) CD22(d+) κ(+)
81	FL	BM	CD10(+) CD22(-) κ(+)
82	IVL	Brain	CD5(+) κ(+)
83	IVL	BM	CD5(+) CD20(d+) CD21(-) CD22(d+) κ(+)
84	LPL	BM	CD21(-) CD22(d+) HLA-DR(d+) κ(+)
85	LPL	BM	CD38(b+) κ(+)
86	LPL	BM	CD21(d+) CD25(+) κ(+)
87	LPL	BM	CD21(-) CD22(d+) HLA-DR(d+) κ(+)
88	MALToma	BAL	CD21(d+) CD22(d+) κ(+)
89	MCL	LN	CD5(+) λ(+)
90	MZL	BM	CD19(d+) CD40(d+) λ(+)

Chronic lymphoproliferative diseases (CLPD)

No	Dx	specimen	aberrant phenotype
91	MZL	LN	CD22(d+) CD25(+) λ(+)
92	MZL	LN	CD22(d+) κ(+)
93	MZL	LN	CD19(d+) CD20(d+) CD21(d+) CD22(d+) CD40(d+) κ(+)
94	PLL	BM	CD20(d+) CD21(d+) CD22(d+) CD25(+) κ(+)
95	SMZL	BM	CD21(d+) CD40(d+) λ(+)
96	AITL	LN	CD3(-) CD7(-) CD10(+) CD26(d+)
97	AITL	LN	CD3(d+) CD5(b+) CD26(d+)
98	AITL	LN	CD3(-) CD5(d+) CD26(d+)
99	ALCL	LN	CD4(-) CD7(-) CD8(-)
100	EATCL	intestine	CD2(-) CD5(-) CD56(+) CD103(+)
101	EATCL	CSF	CD2(-) CD56(+) CD103(+)
102	PTCL	LN	CD2(-) CD4(d+) CD5(b+) CD26(d+)
103	PTCL	BM	CD8(d+)
104	PTCL	Pharynx	CD3(-)
105	PTCL	LN	CD3(-) CD4(-) CD7(-) CD8(-)
106	PTCL	PB	CD5(-) CD7(-) CD25(b+) CD26(d+)
107	PTCL	PB	CD4(-) CD7(-) CD8(-)

Dx, diagnosis; +, positive; d+, dim positive; b+, bright positive; -, negative; None, no aberrant antigen expression; BM, bone marrow; CSF, cerebrospinal fluid; LN, lymph node; PB, peripheral blood; AML, acute myeloid leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; RAEB, refractory anemia with excess blasts; MM, multiple myeloma; MGUS, monoclonal gammopathy of undetermined significance; CLL, chronic lymphocytic leukemia; BL, Burkitt lymphoma; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; IVL, intravascular large B-cell lymphoma; LPL, lymphoplasmacytic lymphoma, MALToma, extranodal marginal zone B-cell lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; MZL, nodal marginal zone B-cell lymphoma; PLL, prolymphocytic leukemia; SMZL, splenic marginal zone B-cell lymphoma; AITL, angioimmunoblastic T-cell lymphoma; ALCL, anaplastic large cell lymphoma; EATCL, enteropathy-associated T-cell lymphoma; PTCL, peripheral T-cell lymphoma