

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
横手耐治	主査 教授 花房 俊昭 副査 教授 清水 章 副査 教授 森 浩志 副査 教授 玉井 浩 副査 教授 佐野 浩一
主論文題名 Flow cytometric immunophenotyping of adult T-cell leukemia/lymphoma using CD3 gating (フローサイトメトリーを用いた CD3gating 法による、成人 T 細胞性白血病細胞の表面抗原の解析)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の背景及び目的》</p> <p>従来から行われているフローサイトメトリーによるマーカー分析では、ゲーティングされた細胞集団は基本的に異常細胞であるという前提に基づいて結果が解釈されている。しかし、異常細胞比率が低い場合には、従来の方法では異常細胞と正常細胞を区別することが難しい。末梢性 T 細胞リンパ増殖性疾患の一種である成人 T 細胞性白血病 (ATL) に認められる ATL 細胞は、従来の方法では正常細胞との区別が困難であるとされていた。本研究は、ATL 症例において新たなゲーティング法である CD3ゲーティング法により、ATL 細胞の表面抗原の発現状態を明らかにすることを目的とした。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>1998年1月から2004年1月まで、当科にてサザンブロット法による HTLV-I provirus の取り込み、およびモノクローナルな増殖が認められ、ATLと確定診断した 26 人を対象とした。26 人の平均年齢は 60.3 歳、男性 14 人、女性 12 人であり、subtype は急性型 19 人、リンパ腫型 3 人、慢性型 1 人、くすぶり型 3 人であった。検体は、26 人の対象者から採取した末梢血 20、リンパ節 5、骨髓血 3、胸水 1、肺胞洗浄液 1 の計 30 検体である。コントロールには、平均年齢 41.5 歳の健常人 15 人の末梢血リンパ球を用いた。各々の検体から有核細胞を分離し、最終的に約 $2 \times 10^6/\mu\text{l}$ の PBS 浮遊液に調整した。細胞表面抗原の検出には、phycoerythrin-cyanine 5.1 (PC5) 標識 CD3 抗体、phycoerythrin (PE) 標識もしくは fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗体を用いた二重染色を行った。CD3/side scatter パラメータ表示上で CD3 の蛍光強度によって細胞が密集している領域をゲーティング (CD3 gating) し、T cell 系のマーカーである CD7、CD5、CD2、CD4、CD8、CD45RO、CD45RA、CD62L、活性化抗原である CD25、HLA-DR を測定した。陰性コントロールにはそれぞれの抗体と同じアイソタイプのアラビックス免疫グロブリンを用い、蛍光ヒストグラムで陽性領域が 30%以上認められるものを陽性とした。フローサイトメーターは EPICS XL、解析ソフトは system II software を用いた。また、各々の検体の病理標本を作製し、CD7、CD4、CD8 の免疫染色を施行した。統計学的手法として、CD3 low、CD3 medium 群に対する CD3 の蛍光強度の比較には Bonferroni 修正による Mann-Whitney U test を用い、$P < 0.017$ を有意とした。CD3 low、CD3 medium 群に対する表面抗原陽性率の差の検定には Fisher exact test を用い、$P < 0.05$ を有意とした。</p>	

《結果及び考察》

検体は、CD3/side scatter パラメータ表示上、4 集団に分かれる pattern (pattern 1)と 3 集団に分かれる pattern (pattern 2)を示すものに分類された。Pattern 1 の様式をとるものは 14 例、pattern 2 の様式をとるものは 16 例であった。ATL 細胞が存在していると考えられる集団の CD3 の蛍光強度は、pattern 1 では比較的 low (CD3 low 群)、pattern 2 では中等度 (CD3 medium 群)の細胞集塊が考えられた。CD3 蛍光強度に関しては、CD3 low 群の平均値はコントロールの平均値と比較して統計的に有意に低かったが、CD3 medium 群の平均値との間に有意差は認められなかった。表面マーカーに関しては、CD3 low 群と CD3 medium 群において、CD7、CD8、CD25 の陽性率に有意差が認められた。一方、CD2、CD5、CD4、CD28、CD62L、CD45RA、CD45RO、HLA-DR の陽性率には両群間で有意差は認められなかった。また、免疫染色法とフローサイトメトリー法による表面抗原の結果を比較すると、CD3 low 群においては全例で両法の結果が一致していたが、CD3 medium 群においては CD7、CD8 に関して全例で両法の結果が一致しなかった。

今回、新規の gating 法である CD3 gating 法により ATL の表面抗原の解析を試みた。その結果、30 例中 14 例の CD3 low 群においては、本法は正確な ATL 細胞の表面抗原を反映していると思われた。一方、16 例の CD3 medium 群においては、正常 T 細胞の混入が示唆された。今回の CD3gating 法で ATL の全例が解析可能になるわけではないが、これまで ATL はフローサイトメトリーによる通常の gating 法では表面抗原の解析が困難とされていた点を考慮すると、CD3 low の細胞集塊が認められるならば本法によって正確な表面抗原の検索が可能であると考えられた。ATL は造血器疾患のなかでも予後不良疾患の一つである。しかし、近年化学療法後に造血幹細胞移植を施行することにより、寛解後、微少残存病変が認められない例に長期生存の報告が見られるようになった。今回の CD3gating 法は、化学療法や造血幹細胞移植施行後の ATL 症例における微少残存病変の評価に有用な手段の 1 つとなる可能性が示唆された。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙 第 号	氏 名	横手耐治
論文審査担当者		主査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 清 水 章 副査 教授 森 浩 志 副査 教授 玉 井 浩 副査 教授 佐 野 浩 一	
主論文題名 Flow cytometric immunophenotyping of adult T-cell leukemia/lymphoma using CD3 gating (フローサイトメトリーを用いた CD3gating 法による、成人 T 細胞性白血病細胞の表面抗原の解析)			
論文審査結果の要旨			
<p>成人 T 細胞性白血病 (ATL) 患者における末梢血液中 ATL 細胞の解析は、本疾患の治療効果の判定や予後の予測に重要である。しかし、ATL 細胞は末梢血中に存在する細胞数が少ないため、従来のフローサイトメトリー法では必ずしも解析が容易ではなかった。これに対し申請者は、新規の CD3gating 法を利用したフローサイトメトリーにより、ATL 細胞の表面抗原を解析している。</p> <p>申請者は ATL と確定診断した 26 人の計 30 検体を用い、各々の検体から有核細胞を分離後、フローサイトメトリーを用いた新規の CD3gating 法により、ATL 細胞が存在している領域を同定している。その結果、14 例の CD3low 群と 16 例の CD3medium 群に分かれた。その領域の細胞について、一般的な T cell マーカーである CD7、CD5、CD2、CD4、CD8、CD45RO、CD45RA、CD62L、活性化 T 細胞抗原である CD25、HLA-DR の表面抗原の発現状況を解析している。その結果、CD3low 群では一般的に報告されている ATL 細胞の表面抗原と一致した結果を得ている。また各々の検体の病理標本を作製して CD7、CD4、CD8 の免疫染色を施行し、フローサイトメトリーによる表面抗原解析の結果との一致を検討したところ、CD3medium 群ではフローサイトメトリーの結果と一致しないことを確認している。</p> <p>本研究は、新規の gating 法である CD3 gating 法により、従来のフローサイトメトリー法では困難であった ATL 細胞の表面抗原の解析に関して新しい知見を見出しており、化学療法や造血幹細胞移植施行後の微少残存病変の評価に有用となる手段を提供している。</p> <p>以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) American Journal of Clinical Pathology 124(2): 199-204, 2005</p>			