

## 網赤血球検出のための蛍光試薬の比較検討

佐藤 晶子、櫻井 秀子  
筑波大学人間総合科学等支援室（医学支援室）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

### 概要

末梢血液中の網赤血球を識別するために蛍光色素の CD4K530 試薬と Thiazole orange 試薬を用いて、フローサイトメトリー測定による検出を試みた。また、その活用法として発作性夜間ヘモグロビン尿症（PNH）の形質を持つ網赤血球の分析を行いその有用性について比較検討した。

両蛍光試薬による基礎的検討では、血球との反応速度および染色後の赤血球の蛍光強度に相違が認められたが、同時再現性はともに良好であった。両蛍光試薬による CD59 陰性の PNH の形質を持つ網赤血球の検出率は、高い正の相関性 ( $r > 0.99$ ) を認め、両者の間に有意差は認められなかった。

これらのことにより、両蛍光試薬とも幅広く網赤血球分析に有用と推察されたが、測定の際には蛍光色素の特性を考慮しながら分析を行うことが必要と思われた。

**キーワード:** 網赤血球、RNA 染色蛍光色素、CD4K530、チアゾールオレンジ

### 1. はじめに

血液中の網赤血球測定は、赤血球の産生能を把握する上で、有効な指標になることが知られている。ヒト赤血球は末梢血液中で約 120 日間の寿命を持ち、体内では、血球の崩壊と新しい血球の産生が行われ恒常性が維持されている。そのため末梢血液中には産生されてから様々な日数の赤血球が混在していることになる。網赤血球は、骨髄から放出されて間もない赤血球であり、網赤血球を対象にした測定では全血による測定と比較し、より体内循環の影響が少ない状態で赤血球を分析することができる利点がある。特に、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH) の赤血球のように体内循環中に補体による影響で溶血されやすい異常赤血球の造血病態検索には、フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM) による網赤血球分析は優れた手法となる<sup>[1-3]</sup>。

網赤血球は、成熟赤血球と比較し RNA 量の含有量が高く、RNA に結合し蛍光を発するような蛍光色素で処理を行えば、RNA の量に比例した蛍光強度が得られ、FCM による蛍光検出を用いて網赤血球と成熟赤血球との識別が可能となる。FCM による測定で

は、機器に備えられたレーザー光に合わせて、励起される蛍光色素を選択する必要がある。

### 2. 目的および方法

今回、核酸に結合する蛍光色素の中で CD4K530 試薬 (Cell Dyn 4000 System, Abbott Laboratories) と Thiazole orange (TO) 試薬 (Retic-COUNT, BD Biosciences) を網赤血球検出試薬として選択し、両蛍光試薬の網赤血球測定の実験条件について FCM による測定を行い比較した。また、その活用法として両蛍光試薬を用いて PNH の形質を持つ網赤血球を解析し、両蛍光試薬の有用性について比較検討した。

PNH 血球は、表面抗原 CD59 の発現が欠損および低下していることが知られており<sup>[1-3]</sup>、両蛍光試薬と抗ヒト CD59PE 標識抗体 (clone: p282[H19]) (BD Pharmingen) とによる FCM の 2 カラー分析を行い、正常網赤血球と PNH の形質を持つ網赤血球を解析した<sup>[2]</sup>。測定には、FACSsort (BD Biosciences) を用いて計測 (488 nm レーザー, FL1 検出器: BP 530/30 nm, FL2 検出器: BP 585/42 nm) を行い、Cell Quest で解析をした。

#### 2.1 対象

蛍光試薬の基礎的検討 (経時変化、赤血球平均蛍光強度、同時再現性) については、網赤血球数の高値試料 (網赤血球数 9.4%, Cell Dyn 4000 測定) を対象とした。

両蛍光試薬の相関性については、健常人 (網赤血球数 1.2~2.2%,  $n = 6$ ) および PNH 疾患を含む網赤血球高値試料 (網赤血球数 5.3~19.7%,  $n = 6$ ) を対象として、PNH の形質 (= CD59 陰性) を持つ網赤血球を検出し検討を行った。また有意差については、PNH 疾患を含む網赤血球高値試料を対象とした。

#### 2.2 網赤血球比率の経時変化

両蛍光試薬の室温反応における経時的変化を比較するために、CD4K530 試薬は添加後 75 秒間、TO 試薬は 30 分間まで、各時間ごとに赤血球  $1 \times 10^4$  個を FCM で計測し、網赤血球の検出率 (%) を分析した。

## 2.3 赤血球の平均蛍光強度の比較

赤血球をリン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline, PBS）に浮遊させた試料を基準にして、CD4K530 試薬は 15 秒間反応後の試料、TO 試薬は 15 分間反応後における赤血球平均蛍光強度を比較した。

各試料は赤血球  $1 \times 10^4$  個を FCM で計測し、成熟赤血球および網赤血球のゲート解析を行い、それぞれの平均蛍光強度の分析をした。

## 2.4 網赤血球比率の同時再現性

CD4K530 試薬は、15 秒間および 30 秒間反応後の試料、TO 試薬は 15 分間反応後の試料を用いた。

各試料ごとに、それぞれ 10 検体を用意し FCM で 1 検体あたり赤血球  $1 \times 10^4$  個を測定して網赤血球比率（%）を解析した。平均値および変動係数（CV）を算定し同時再現性について検討した。

## 2.5 PNH の形質（= CD59 陰性）を持つ網赤血球の検出

健常人および PNH 疾患を含む網赤血球高値試料を用いて両蛍光試薬の相関性について検討した。抗ヒト CD59PE 標識抗体を反応させた末梢血液に、CD4K530 試薬は 15 秒間反応後の試料、TO 試薬は 15 分間反応後の試料について、FCM で赤血球  $1 \times 10^5$  個を計測し 2 カラー分析による CD59 陰性網赤血球の解析を行い、相関性について算定した。

また、網赤血球高値試料の測定値を用いて両蛍光試薬の有意差検定を行った。

## 3. 結果

### 3.1 網赤血球比率の経時変化

CD4K530 試薬と TO 試薬は、赤血球との反応速度に違いが認められた。

CD4K530 試薬では、加えてから約 15 秒間までは急激に網赤血球の増加が計測されたが、その後 75 秒間までは緩慢な変化であった（図 1 (a)）。

TO 試薬は、添加後約 12 分間までは急激に網赤血球の増加が認められたが、その後の変化は少なかった（図 1 (b)）。

### 3.2 赤血球の平均蛍光強度の比較

両蛍光試薬の成熟赤血球の平均蛍光強度は、ともに PBS に浮遊させた赤血球の蛍光量よりも増加を示したが、TO 試薬に比較し CD4K530 試薬の方が高値であった（図 2）。

網赤血球の平均蛍光強度についても成熟赤血球と同様な傾向が認められ、CD4K530 試薬の方が高値を示した（図 2）。

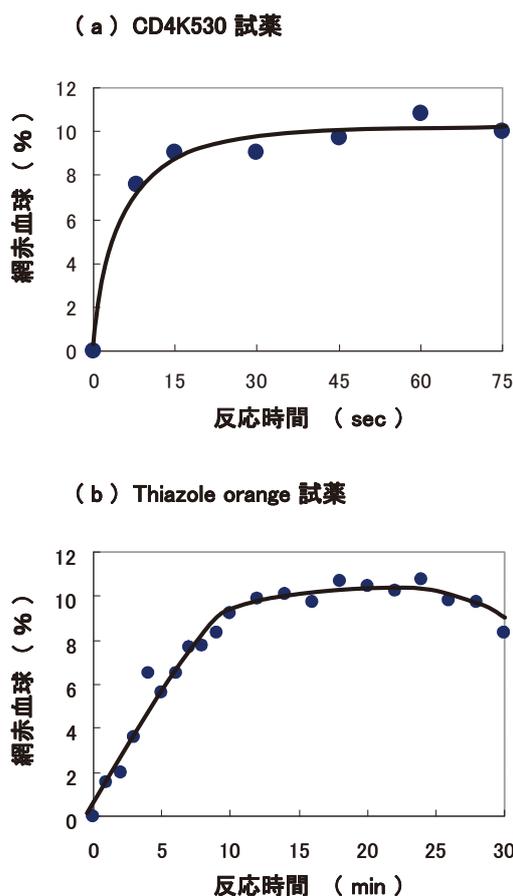


図1. フローサイトメトリー測定による網赤血球比率の経時変化。

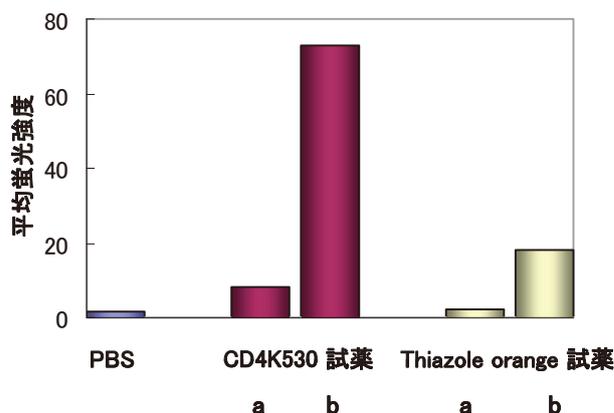


図2. フローサイトメトリー測定による赤血球の平均蛍光強度の比較。  
a, 成熟赤血球 b, 網赤血球

### 3.3 網赤血球数の同時再現性

同一検体を 10 回連続測定し同時再現性について検討をした。

CD4K530 試薬の 15 秒間反応の試料は、CV = 1.2%、 $9.73 \pm 0.12$  (mean $\pm$ SD)、30 秒間反応の試料は、CV = 1.1%、 $9.97 \pm 0.11$  (mean $\pm$ SD) であった。

TO 試薬の 15 分間反応の試料は、CV = 2.4%、 $9.71 \pm 0.23$  (mean $\pm$ SD) であった。

### 3.4 PNH の形質 (= CD59 陰性) を持つ網赤血球の検出

健常人および PNH 疾患を含む網赤血球高値試料による PNH の形質を持つ CD59 陰性の網赤血球の検出率は、CD4K530 試薬では 0.01~83.3%、TO 試薬は 0.04~81.3% であった。この結果による両蛍光試薬の相関性は  $r = 0.9997$ ,  $y = 0.955x - 0.017$  ( $n = 12$ ) となり、高い正の相関が認められた (図 3)。

また、網赤血球高値試料 ( $n = 6$ ) を用いた網赤血球の CD59 陰性血球の検出率について、両蛍光試薬の有意差について検討した。この両蛍光試薬に関して有意差は認められなかった (Mann-Whitney's U test)。

## 4. 考察

FCM による核酸 (RNA, DNA) を検出する蛍光色素としては、pyronine Y, acridine orange, propidium iodide, CD4K530, TO 等がある。測定の際には 1 本鎖 RNA か、2 本鎖 RNA か、DNA かにより特異性が異なることがあり、分析する時には用途に合わせて蛍光色素、励起波長、検出波長を選択する必要がある。

今回、網赤血球を検出するために CD4K530 試薬と TO 試薬を用いて FCM による測定を行った。両蛍光試薬では、網赤血球検出の再現性に関してはともに良好であったが、赤血球との反応速度および染色後の蛍光強度に違いが認められた。測定には、迅速性、簡便性、正確性、精密性が求められ、また網赤血球の検出には成熟赤血球と網赤血球の蛍光強度の差が大きいものの方が良く分離され、解析をする上で信頼性が高いものになると思われる。CD4K530 試薬は、極めて短い反応時間で良好な測定ができ、蛍光強度も高い特徴が認められたが、網赤血球だけでなく成熟赤血球の蛍光強度も増加するため 2 カラー以上の分析時には機器の蛍光補正 (compensation) のかけ方が重要になると思われた。一方 TO 試薬は、反応後の成熟赤血球の蛍光強度は CD4K530 試薬と

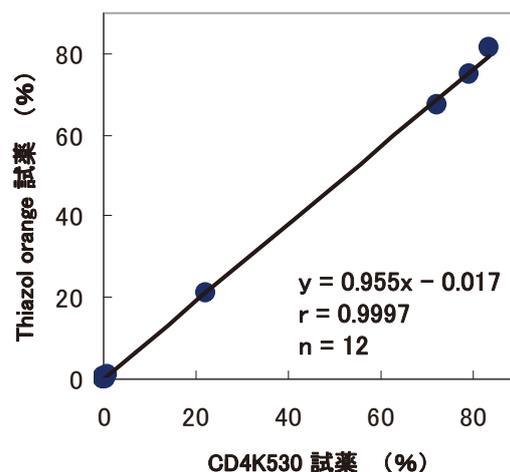


図3. フローサイトメトリー測定による CD59 陰性網赤血球比率の相関性。

比較し低く新鮮血球と比較的同等であったが、やや長い反応時間を要する特性があった。

PNH では赤血球および白血球においても細胞表面の CD59 発現の低下および欠損が認められ<sup>[1,3]</sup>、網赤血球による検出は異常血球の検出率が全血法よりも高感度に行える利点がある<sup>[2]</sup>。今回、末梢血の網赤血球における PNH の形質を持つ CD59 陰性血球の検出について、両蛍光試薬を用いて比較検討を行った。両蛍光試薬の測定値は高い相関性が認められた。また、異常赤血球の検出率に対する有意差も認められなかった。

これらのことにより、両蛍光試薬とも幅広く網赤血球分析に有用と推察されたが、測定の際には両蛍光色素の特性を考慮しながら分析を行うことが必要と思われた。

## 参考文献

- [1] 佐藤晶子, 長澤俊郎, 二宮治彦, 赤血球膜蛋白異常の検出法としてのフローサイトメトリー: 発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) の病態解析の基礎と応用, 日本膜学会誌 32 (2007) 147-154.
- [2] Sato S, Hasegawa Y, Nagasawa T, Ninomiya H, Reticulocyte-gated flow cytometric analysis of red blood cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Lab Hematol. 12 (2006) 82-85.
- [3] 佐藤晶子, 櫻井秀子, ヒト赤血球および白血球の補体制御膜蛋白発現のフローサイトメトリーによる検討, 第 3 回筑波大学技術職員技術発表会報告集 (2004) 10-14.

# Comparative study of fluorescent reagents for reticulocyte detection

Shoko Sato, Hideko Sakurai

Medical Branch, Academic Service Office for Comprehensive Human Sciences,  
University of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

Detection of peripheral blood reticulocytes by flow cytometry using CD4K530 fluorescent dye and thiazole orange was attempted. Reproducibility of reticulocyte count was good for the both fluorescent dyes, but the reaction rate and fluorescence intensity of red blood cells differed. The detection rate of CD59-negative PNH-reticulocytes was also compared using the both fluorescent reagents. As a result, no significant difference was observed; high relativity was observed ( $r > 0.99$ ) and the two fluorescent dyes were found to be useful.

**Keywords:** reticulocytes; RNA-stained fluorescent dye; CD4K530; thiazole orange