

ヘアリー細胞白血病における細胞学的検査の比較検討

佐藤 晶子

筑波大学医学系技術室

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

ヘアリー細胞白血病(HCL)および日本型 HCL (HCL-jv) について、HCL 細胞で特徴的な細胞質の突起、血液像、血算値、酸ホスファターゼ(ACP)活性、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)活性、好中球アルカリホスファターゼ(NAP)活性、細胞表面抗原について比較検討をした。

血液塗抹標本の検討では、HCL 細胞の核や細胞質の観察は通常風乾標本が優れ、細胞質辺縁の突起の観察は、自然乾燥標本が位相差顕微鏡像と類似の血球が数多く認められ有用な手法であると思われた。

特殊染色のACP 染色は、染色性の良い柴田方法や Janckila 方法を、TRAP 染色は、感度が高い Janckila 方法あるいは片山方法を選択すべきと思われた。

HCL 症例は、汎血球減少、単球減少、ACP 高活性、TRAP 高活性、TRAP 試験陽性、NAP 高活性、細胞表面抗原は概ね CD5⁻/CD10⁻/CD11c⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD22⁺/CD23⁻/CD24⁻/CD25⁺/CD38⁻/FMC7⁺/HLA-DR⁺/sIg⁺であり、HCL-jv 症例は、白血球増多、単球数正常、ACP 正常活性、TRAP 活性およびTRAP 試験は染色方法で異なり(〜+)、NAP 正常活性、細胞表面抗原は CD5⁻/CD10⁻/CD11c⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD22⁺/CD23⁺⁺/CD24⁻/CD25⁻/CD38⁻/FMC7⁺/HLA-DR⁺/sIg⁺をみとめ多様性に富んでいた。

キーワード:ヘアリー細胞白血病、日本型 HCL、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色、CD11c

1. はじめに

ヘアリー細胞白血病(Hairy cell leukemia : HCL)は、hairy cell という名の通り細胞表面の全周にわたる不規則で長い絨毛状突起が特徴的であり、欧米では全白血球の 2%程度の稀な腫瘍であると言われている^[1]。日本では、欧米よりもさらに数が少なく稀な疾患である。

わが国の HCL は、欧米の典型的な HCL 型のほかに、細胞所見や病態などの様相がやや異なる、いわゆる HCL の亜型を形作る病型別では日本型 HCL(HCL-Japanese variant : HCL-jv)が比較的多い^[2]。このため、HCL、HCL 亜型、HCL-jv^[3]、あるいは類縁の成熟 B 細胞腫瘍との鑑別は困難をきたすことがある。

HCL では、原因遺伝子の解明が進まれており^[4]、それに伴い検査方法も推移していくと思われるが、従来の HCL 鑑別診断のための検査には、末梢血液や骨髄の検査、血液像とくに位相差顕微鏡や電子顕微鏡によるHCL 細胞の細胞辺縁の絨毛状突起(hairy appearance)の確認、特殊染色、免疫細胞化学的検査、脾等の組織学的検査などがある。

今回、HCL および HCL-jv の血液所見を検討する機会に恵まれたため、3 方法で血液標本を作成し、

末梢血液像のとくに細胞表面の細胞突起を中心に比較検討を行った。特殊染色では、酸ホスファターゼ(acid phosphatase : ACP)および酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP)染色は、基質に naphthol AS-BI phosphoric acid (溶解しやすい naphthol AS-BI phosphate)を用い、ジアゾニウム塩に fast garnet GBC, fast red ITR, pararosaniline の 3 種類を用いて、その染色性や特異性について比較検討をした。

また、アルカリホスファターゼ(alkaline phosphatase)染色やモノクローナル抗体を用いた細胞表面マーカーについても測定をしたのでこれらについて報告をする。

2. 末梢血液塗抹標本の作成による影響と位相差顕微鏡観察

2.1 対象および目的

HCL-jv 2 症例 を対象とした。

末梢血液標本を作製し、その標本の乾燥法の違いによる血球形態への影響について、比較検討をする。とくに細胞表面の細胞突起(hairy appearance)については、位相差顕微鏡による観察とともに比較する。

2.2 末梢血液塗抹標本作成 (風乾標本)

- 1、新鮮血をウェッジ法(引きガラス法)で血液塗抹標本を作成する。
- 2、通常通りに、塗抹後は速やかにドライヤー等の冷風で乾燥させる。
- 3、普通染色(ライト染色)を行い、光学顕微鏡で血球の観察をする。

2.3 末梢血液塗抹標本作成 (自然乾燥標本)

- 1、新鮮血をもちいてウェッジ法(引きガラス法)で血液標本を作成する。
- 2、塗抹後は、そのまま放置、あるいは標本に蓋を被せて更にゆっくり乾燥をおこなう。
- 3、普通染色(ライト染色)を行い、光学顕微鏡で血球の観察をする。

2.4 位相差顕微鏡による観察 (自然沈下法)

- 1、ヘパリン血液を入れた細試験管を、強く傾斜させ、放置する。
- 2、赤血球の沈降後に、毛細管ピペットで上清の血漿成分を取り除き、赤血球をできるだけ混入させないようにして白血球層をとる。
- 3、スライドガラスにその 1 滴を落とし、カバーガラスをかける。かるくカバーガラスをおさえてから速やかに位相差顕微鏡で観察をする。

3. 普通染色および特殊染色 (酸ホスファターゼ染色、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色、アルカリホスファターゼ染色)

3.1 対象および目的

HCL 1 症例および HCL-jv 1 症例 を対象とした。血液塗抹標本を作製し、直ちに染色もしくは凍結保存し、その後できるだけ速やかに普通染色、3 染色方法による ACP 染色および 50mM 酒石酸添加の TRAP 染色、アルカリホスファターゼ染色を行い鏡検して比較検討をする。

3.2 普通染色 (ライト染色)

- 1、血液塗抹標本上に、ライト染色液(武藤化学株式会社) 1.5ml を滴下し、2 分間、染色固定。
- 2、その標本上に、リン酸緩衝液(1/150M, pH 6.5) 2 ml を追加し、室温で 5 分間染色。
- 3、水洗、乾燥、鏡検。

3.3 酸性ホスファターゼ染色 Janckila 方法 (fast garnet GBC) [5][6][7]

- 1、固定：固定液を作成し 4 °C, 30 秒間固定。
buffered methanol-acetone pH 5.4
 - ・クエン酸 0.63g
 - ・蒸留水 30ml
 - ・メタノール 10ml
 - ・アセトン 60ml
 - ・濃 NaOH で pH 5.4 に調整
- 2、水洗：蒸留水で 5~6 回水洗し風乾。
- 3、染色：反応液を作成濾過し 37 °C, 45 分間染色。

反応液

- ・基質液 1ml
- ・酢酸緩衝液 pH 5.2(ACP 用)(TRAP 用) 50ml
- ・(purified) Fast garnet GBC 8mg

* 基質液： Naphtol AS-BI phosphoric acid 10mg
N,N'-dimethylformamide 1ml

* 酢酸緩衝液 ACP 用： 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.2

* 酢酸緩衝液 TRAP 用：

50mM 酒石酸加 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.2
ACP 用緩衝液約 45ml に L(+)-酒石酸 375mg を加えて溶解。濃 NaOH で pH 5.2 に調整し、緩衝液を加え全量 50ml とする。

- 4、水洗：流水で 5~10 分間水洗。
- 5、後染色：ヘマトキシリン液で 10 分間核染色し、希釈アンモニア水で色出しをして乾燥。
- 6、グリセリン ゼリー で封入、鏡検。
- 7、染色態度
陽性像
赤褐色から暗赤色。散在性に顆粒状に染色される。

TRAP 活性

リンパ球, 好中球, 好酸球, 好塩基球, 単球, 巨核球はふつう陰性。時にリンパ球弱陽性。

Hairy 細胞は強陽性。

ACP 活性

全白血球が陽性。リンパ球, 好中球, 好酸球, 血小板, 赤芽球は弱陽性~陽性。単球, 組織球, 巨核球, Hairy 細胞は強陽性。

8、半定量化基準 (Mover による分類)

grade0	顆粒 なし	(0 点)
grade1	顆粒 1~5	(1 点)
grade2	顆粒 6~10	(2 点)
grade3	顆粒 11~20	(4 点)
grade4	顆粒 21~40	(8 点)
grade5	顆粒 41 以上	(16 点)

$$\text{Score} = 1 \times \text{grade1} + 2 \times \text{grade2} + 4 \times \text{grade3} + 8 \times \text{grade4} + 16 \times \text{grade5}$$

9、酒石酸抵抗性試験の判定基準

臨床的な意義を高めるために grade5 の細胞が 2 個以上認められる時に、酒石酸抵抗試験陽性とする。

3.4 酸ホスファターゼ染色 柴田方法

(fast red ITR) [8]

- 1、固定：固定液を作成し 11~12 °C, 20~25 秒間固定。

buffered acetone

- ・0.03M クエン酸 16.8ml
- ・0.03M クエン酸ナトリウム 3.2ml
- ・アセトン 30ml

- 2、水洗：流水で 30 秒間水洗。

- 3、染色：反応液を作成濾過し 37 °C, 5 時間染色。

反応液

- ・基質液 0.3ml
- ・酢酸緩衝液 pH 5.4(ACP 用)(TRAP 用) 50ml
- ・10%MnCl₂ 3 滴
- ・Fast red ITR salt 30mg

* 基質液： Naphtol AS-BI phosphate 20mg
N,N'-dimethylformamide 0.3ml

* 酢酸緩衝液 ACP 用： 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.4

* 酢酸緩衝液 TRAP 用：

50mM 酒石酸加 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.4

ACP 用緩衝液約 45ml に L(+)-酒石酸 375mg を加えて溶解。NaOH で pH 5.4 に調整し、緩衝液を加え全量 50ml とする。

- 4、水洗：流水で 30 秒間水洗。
- 5、後染色：ヘマトキシリン液で 10 分間核染色し、希釈アンモニア水で色出しをして乾燥。
- 6、グリセリン ゼリー で封入、鏡検。
- 7、染色態度

陽性像

濃紅色。大小の顆粒状に染色される。

TRAP 活性

正常血液細胞ではすべて陰性化する。抵抗性を示す疾患では濃紅色の顆粒が残る。

ACP 活性

単球, 組織球, 巨核球, 好酸球, 形質細胞は強陽性。好中球は全骨髄球の活性が最も高く成熟するに従って活性が弱くなる。リンパ球は

陰性から中等度陽性で、ときに T cell は粗大顆粒が限局性に認められ B cell ではきわめて弱い活性。血小板、赤芽球、好塩基球は陽性。

- 8、半定量化基準：本来は、顆粒の数と大きさで判定するが、顆粒の大きさを客観的な基準で判断することが難しく、今回は顆粒数のみで行う。
- | | | |
|--------|----------|-------|
| grade0 | 顆粒 なし | (0 点) |
| grade1 | 顆粒 1~5 | (1 点) |
| grade2 | 顆粒 6~8 | (2 点) |
| grade3 | 顆粒 9~16 | (3 点) |
| grade4 | 顆粒 17~32 | (4 点) |
| grade5 | 顆粒 33 以上 | (5 点) |
- Score = 1 × grade1 + 2 × grade2 + 3 × grade3 + 4 × grade4 + 5 × grade5

9、TRAP 判定基準

陽性顆粒が認められる時に、酒石酸抵抗試験陽性とする。

3.5 酸ホスファターゼ染色 片山方法

(pararosaniline) ^{[6][7][9]}

- 1、固定：固定液を作成し 4 °C, 30 秒間固定。

bufferd formalin-acetone pH 6.6

- Na₂HPO₄ 20mg
- KH₂PO₄ 100mg
- 蒸留水 30ml
- アセトン 45ml
- ホルマリン 25ml

- 2、水洗：蒸留水で 3 回水洗し風乾。

- 3、染色：反応液を作成濾過し 36 °C, 1 時間染色。

反応液(ACP 用)

- 基質液 2.0ml
- 0.1M 酢酸緩衝液 pH 5.0 35.6ml
- Hexazotized pararosanilin (染色時調整) 2.4ml
- NaOH で pH 5.1 に調整

* 基質液： Naphtol AS-BI phosphate 20mg
N,N-dimethylformido 2.0ml

* Hexazotized pararosanilin

染色時に A 液 1.2ml と B 液 1.2ml をとり、60 秒間振盪混和させる。直ちに使用。

- A 液: 4% pararosanilin hydrochloride 1.2ml
- pararosanilin hydrochloride 1g
 - 蒸留水 20ml
 - 濃塩酸液 5ml

溶解し遮光して室温に保存。

B 液: 4% 亜硝酸ナトリウム液(新鮮) 1.2ml

反応液(TRAP 用) : 50mM 酒石酸加反応液

上記の ACP 用反応液 40ml に、L(+)-酒石酸 300mg を加え、溶解し、濃 NaOH で pH 5.1 に調整して使用する。

- 4、水洗：2 回水洗。

- 5、後染色：1 %メチル緑で 2 分間核染色。または、ヘマトキシリン液で 10 分間核染色し、アンモニア水で色出しをして乾燥。

- 6、合成樹脂材で封入、鏡検。

- 7、染色態度

陽性像

赤紅色から赤色。顆粒状やびまん性に染色される。

TRAP 活性

酒石酸抵抗性を示す血球では赤色系に染色される。

ACP 活性

血液塗抹標本を作製し、数時間放置後染色をした方が染色性が高まる^[9]。単球は強陽性、好中球は弱陽性で染色されないこともある。Fast garnet GBC 方法などよりも感度が比較的低い、反応産物の拡散が生じにくく、組織切片の染色に適し、また合成樹脂材による封入のため永久標本にできる利点がある。

8、判定の基準

- “negative” 陰性
- “intermediate” 陰性と陽性の間
- “positive” 陽性顆粒が 20 以上あるいは細胞質全体が強くびまん性に染色される。

9、TRAP 判定基準

臨床的な意義を高めるために“positive”の細胞が 1 個以上認められた場合、酒石酸抵抗試験陽性とする。

3.6 アルカリホスファターゼ染色

(朝長法)^[7]

- 1、固定：アルホス染色キッド(武藤化学株式会社)を使用し、固定液で -5 °C, 5 秒間 固定。

- 2、水洗：15~30 秒間流水。

- 3、染色：反応液 (基質：Naphthol AS-MX phosphate、ジアゾニウム塩：Fast blue RR)を調整し 37 °C, 2 時間、湿潤箱中で染色。

- 4、水洗：流水で水洗。

- 5、後染色：サフラニン O 液で 2 分間核染色、水洗、乾燥、鏡検。

- 6、染色態度

陽性像および判定(score, rate)

青色。顆粒に染色される。

半定量化基準(0~5)をもとに陽性指数(score)陽性率(rate)を算出する。

7、半定量化基準

- | | | |
|--------|----------|-------|
| grade0 | 顆粒 なし | (0 点) |
| grade1 | 顆粒 1~5 | (1 点) |
| grade2 | 顆粒 30 まで | (2 点) |
| grade3 | 顆粒不平等に分布 | (3 点) |
| grade4 | 顆粒平等に分布 | (4 点) |
| grade5 | 顆粒密に分布 | (5 点) |

Score = 1 × grade1 + 2 × grade2 + 3 × grade3 + 4 × grade4 + 5 × grade5

4. フローサイトメトリーによる細胞表面抗原測定

4.1 対象

HCL 2 症例および HCL-jv 2 症例を対象とした。

4.2 方法

- 1、ヘパリン採血液を PBS で 2 倍に希釈し、しずかに Ficoll-Paque PLUS (d=1.077±0.001)(GE社)の上に重層する。
- 2、室温(18~20 °C), 400 × g, 30 分間遠心分離する。
- 3、上清を除き、慎重に単核球層をとり、staining medium (SM) : (0.1% BSA , 0.1% NaN₃ 含有 pH 7.2 PBS 溶液)に浮遊させ、2 回遠心洗浄して、細胞を 5 × 10⁶/ml に調整する。
- 4、細胞 50 μl にモノクローナル抗体を加えて、4 °C 30 分間 遮光して反応させる。

- 5、SM を加えて遠心洗浄し、再浮遊させ、フローサイトメトリーによる測定および解析を行う。

5. 結果

5.1 末梢血液塗抹標本の乾燥法の違いによる血球への影響と位相差顕微鏡像との比較

HCL-jv 2 症例の末梢血液を用いて塗抹標本を製作し、標本の乾燥の仕方(風乾および自然乾燥)による血球への影響を検討した(図 1)。

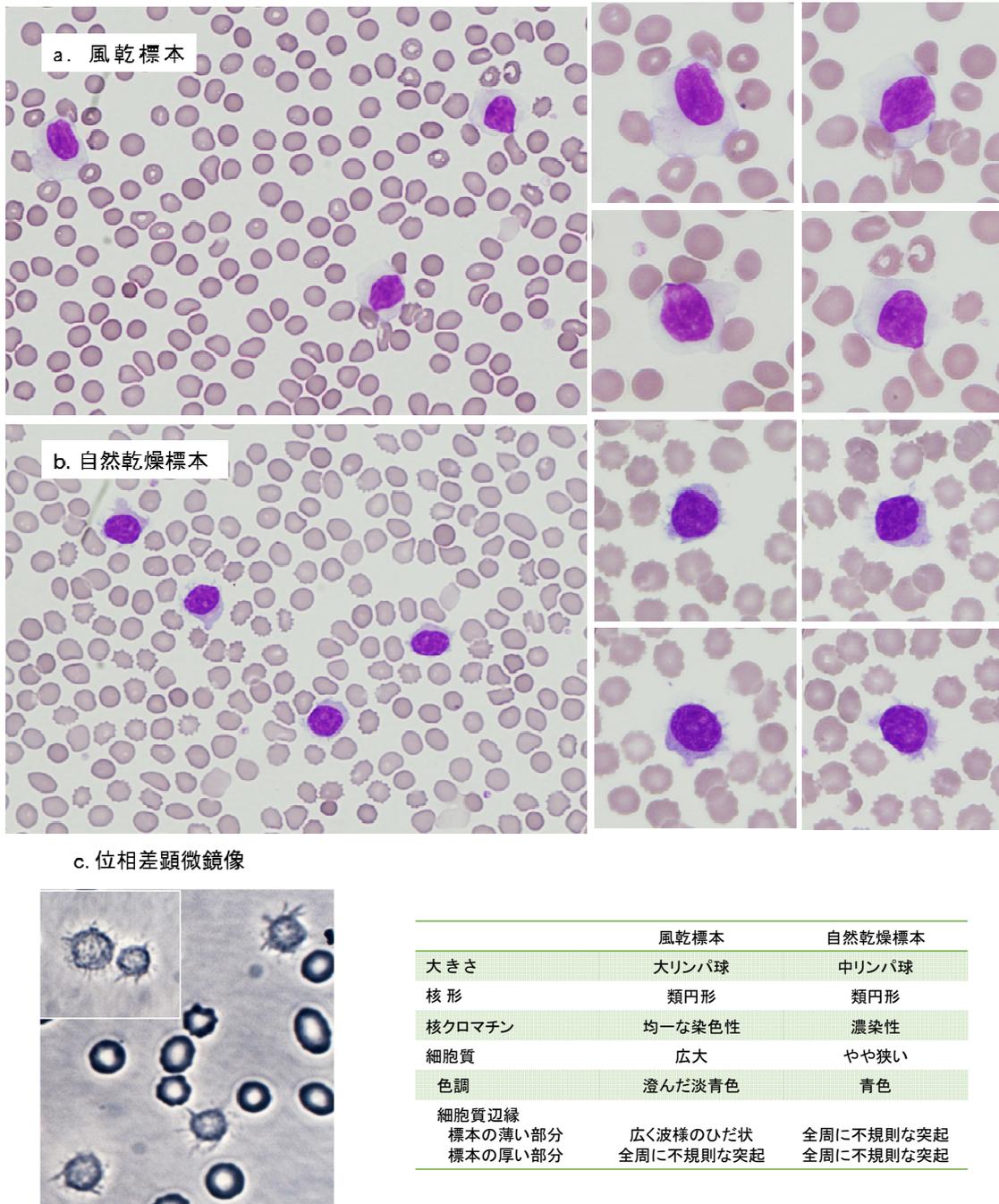


図 1. Hairy cell leukemia -Japanese variant の血液像。

位相差顕微鏡の観察では、HCL 細胞に特徴的な細胞全周にわたる不規則で長い細胞質突起が認められた。塗抹標本では、作成時の乾燥法の違いで HCL 細胞の形態に相違を認め、核や細胞質の観察には風乾標本が優れ、位相差顕微鏡像に類似した細胞質突起の観察には自然乾燥標本が有用であった。

表 1. Hairy cell leukemia 症例 と Hairy cell leukemia-Japanese variant 症例の検査値.

	白血球 (10 ⁹ /L)	赤血球 (10 ¹² /L)	血小板 (10 ¹⁰ /L)	N	末梢血 (%)			骨髄 (%)
					abLy	Ly	Mono	abLy
HCL	3.2	3.38	5.4	29	39	28	0	36
HCLjv	24.6	4.37	13.3	9	76	11	3	47

血液塗抹標本の観察では、核(クロマチン, 核小体)や細胞質(色調, 顆粒, 封入体)の観察には、ドライヤーなどの冷風による風乾標本の方が、自然乾燥標本よりも血球が広がり、より詳細な観察ができた。

また、自然乾燥標本では風乾標本に比較し、細胞がやや濃縮され、核クロマチンは濃染し細胞質が狭くなり顆粒の観察は難しかった。

細胞表面の細胞質突起(hairy appearance)については、位相差顕微鏡の観察では、HCL 細胞特有の細胞質全周にわたる長い絨毛状突起が、HCL-jv 2 症例においても比較的容易に確認することができた。

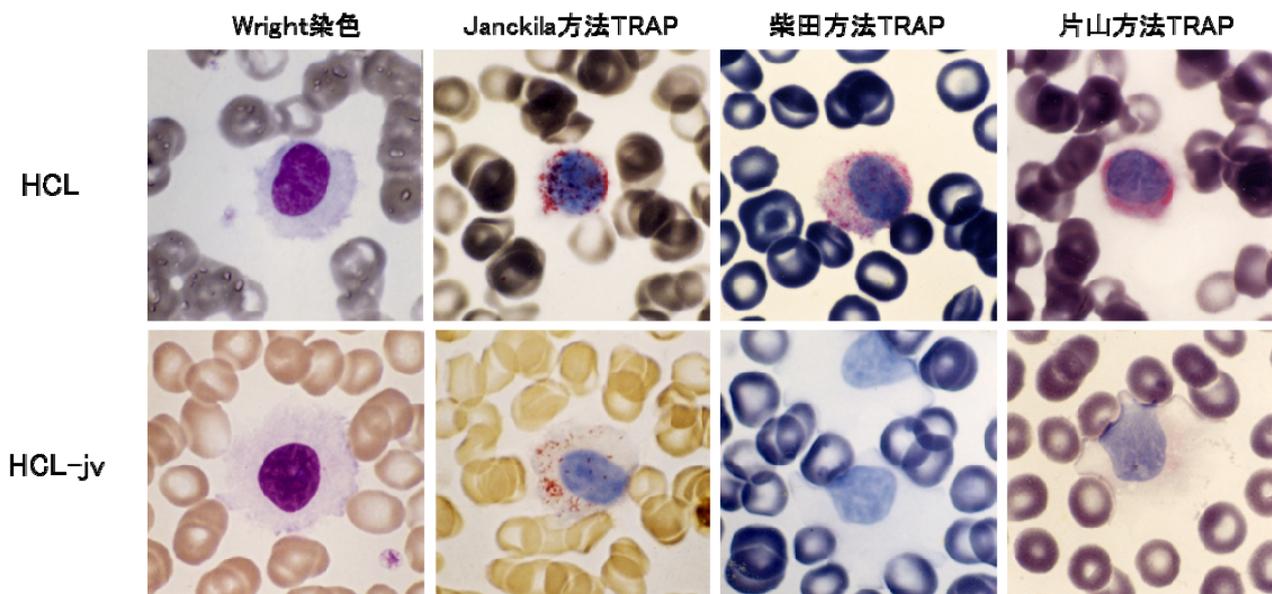
一方、塗抹標本の風乾標本では、通常血球を観察する標本の薄い部分では、HCL 細胞の細胞質は広く、辺縁は波打つような形態の血球が数多く観察され、より位相差顕微鏡像に似た細胞質辺縁の突起は、塗抹標本の引き始めや細胞の厚い部分にみられた。

自然乾燥標本では、通常血球を観察する比較的標本の薄い部分でも、位相差顕微鏡像に似た細胞質辺縁の突起を、十分に確認することができ、とくに塗抹血液標本に蓋を被せてゆっくり乾燥をさせた方が、より細胞質辺縁の突起が観察されやすかった。

5.2 普通染色および特殊染色 (酸ホスファターゼ染色、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色、アルカリホスファターゼ染色)

HCL 1 症例および HCL-jv 1 症例を用いて検討をした。

この 2 症例の血算値は、表 1 の通りである。HCL 症例では、汎血球減少および単球 0%と単球減少を認めた。一方、HCL-jv 症例では白血球増多を示し単球減少は認められなかった。



	50 mM 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色						酒石酸抵抗性試験 判定				
	Janckila方法			柴田方法			片山方法		Janckila方法	柴田方法	片山方法
	rate (%)	grade5 (%)	score	rate (%)	grade5 (%)	score	intermediate (%)	positive (%)			
HCL	56	11	300	60	14	194	30	0.3	陽性	陽性	陽性
HCL-jv	79	0.5	221	0	0	0	9.5	0	陽性	陰性	陰性

図 2. Hairy cell leukemia 症例 と Hairy cell leukemia-Japanese variant 症例の普通染色および 3 染色方法による酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ染色、酒石酸抵抗性試験の判定.

HCL 症例の TRAP は、Janckila 方法 grade5 +、柴田方法 grade5 +、片山方法 positive + を認め、酒石酸抵抗性試験は 3 方法とも陽性の結果であった。HCL-jv 症例の TRAP は、Janckila 方法 grade5 +、柴田方法 陰性、片山方法 intermediate + となり、酒石酸抵抗性試験は Janckila 方法のみ陽性と判定された。

普通染色(風乾標本)による HCL 細胞の観察では、HCL 症例は、中型から大型のリンパ球で、核はやや楕円形、核小体は不鮮明、クロマチン結節は通常の成熟リンパ球よりも単球のクロマチン網工に類似し、細胞質は豊かで灰青色を呈し、細胞質辺縁は不整で不規則な細胞質突起を全周に認めた(図 2)。

HCL-jv 症例は、大型のリンパ球の大きさで、核は円形から類円形、クロマチン結節は中等大、核小体を持つものも認められた。細胞質は広く、淡青色を呈し、細胞質辺縁は波打つような形態を示し、位相差顕微像に似た HCL 特有の細胞質突起については塗抹標本の血球の厚い方に散見できた(図 2)。

血液塗抹標本を作製し、特殊染色 ACP および TRAP による3 染色方法(Janckila 方法、柴田方法、片山方法)の染色性について比較検討をした。

HCL 症例および HCL-jv 症例のリンパ球における ACP および TRAP の陽性率(rate)、陽性指数(score) は、表 2 の通りの結果であった。TRAP の染色像は図 2 に示す。

HCL 症例は、健常人リンパ球(n=20)^[10] に比べ、ACP および TRAP とともに高活性を示し、Janckila 方法 ACP score 728, grade5 21%, rate 99%, TRAP score 300, grade5 11%, rate 56%、柴田方法 ACP score 405, rate 100%, TRAP score 194, rate 60%、片山方法 ACP positive 1%, rate 76%, TRAP positive 0.3%, rate 30.3%であった。また、酒石酸抵抗性試験の判定は、それぞれの染色方法の基準で判定し、Janckila 方法 grade5 +、柴田方法 陽性像 +、片山方法 positive + の結果であり、3 染色方法のすべて酒石酸抵抗性試験は陽性と判定された。

HCL-jv 症例は、ACP 活性は正常範囲内で、Janckila 方法 ACP score 465, grade5 5%, rate 99%、柴田方法 ACP score 278, rate 93%、片山方法 rate 69%, positive は認められなかった。また、TRAP 活性は、染色方法により異なった染色性を呈し、Janckila 法は高活性(score 221)を示し、grade5 は標本全体を観察すれば少数(7/1400= 0.5%)ではあるが確認された。柴田方法は、標本全体を観察したが酒石酸抵抗性の血球は認められなかった。片山方法は、高 TRAP 活性 positive は陰性であったが、intermediate を 9.5%認めた。その結果、TRAP 高活性血球で判定する酒石酸抵抗性試験は、Janckila 方法は陽性、柴田方法と片山方法は陰性と判定された。

血液塗抹標本を用いてアルカリホスファターゼ染色を行い好中球の活性を比較した。HCL 症例は高活性を有し(score 357, rare 95%)、HCL-jv 症例は正常範囲内であった(Score 270, rate 88%)。

5.3 細胞表面抗原測定

HCL 2 症例および HCL-jv 2 症例の細胞表面抗原については、表 3 に示す。

細胞表面マーカーは、HCL 症例と HCL-jv 症例では概ね CD5⁻/CD10⁻/CD11c⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD22⁺/CD24⁻/CD38⁻/FMC7⁺/HLA-DR⁺/sIg⁺ が共通して認められた。また、HCL 症例のCD25⁺/CD23⁻に比し、HCL-jv 症例は CD25⁻/CD23⁺⁺であった。

表 2. 酸ホスファターゼ(ACP) 染色および酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP) 染色.

(Hairy cell leukemia 症例, Hairy cell leukemia-Japanese variant 症例, 健常人リンパ球)

	HCL		HCL-jv		健常人n=20	
	ACP	TRAP	ACP	TRAP	ACP	TRAP
Janckila方法					M±SD	M±SD
score	728	300	465	221	516±87	25±12
rate (%)	99	56	99	79	97±3	18±7
grade 5	21	11	5	0(+)	9±5	0
grade 4	34	7	21	8	24±9	0.05±0.2
grade 3	21	8	41	22	30±6	1.3±1.1
grade 2	13	6	21	20	20±7	2.5±1.5
grade 1	10	24	11	29	14±4	14.6±5.3
grade 0	1	44	1	21	3±3	81.5±7.2
柴田方法						
score	405	194	278	0	325±43	0
rate (%)	100	60	93	0	99±1	0
grade 5	39	14	4	0	15±10	0
grade 4	36	14	29	0	30±11	0
grade 3	17	12	28	0	30±9	0
grade 2	7	12	26	0	14±7	0
grade 1	1	8	6	0	9±6	0
grade 0	0	40	7	100	1±2	100
片山方法						
rate (%)	76	30.3	69	9.5	75±8	1.7±1.0
positive	1	0.3	0	0	0.3±0.9	0
intermediate	75	30	69	9.5	74.8±7.4	1.7±1.0
negative	24	69.7	31	90.5	24.9±7.7	98.3±1.0

表 3. Hairy cell leukemia 症例 と Hairy cell leukemia-Japanese variant 症例の細胞表面抗原.

	HCL 1 PB	HCL 2 PB	HCL-jv 3 脾	HCL-jv 4 PB
CD5	-	-	-	-
CD10	-	-	-	-
CD11a	+	-	-	+
CD11c	+	+	+	+
CD13	-	±	-	-
CD14	±	-	-	+
CD19	+	+	+	+
CD20	+	+	+	+
CD21	-	+	-	+
CD22	ND	+	ND	+
CD23	-	-	-	+
CD24	ND	-	-	-
CD25	+	+	+	-
CD38	-	-	-	-
CD79b	ND	ND	ND	-
CD103	ND	ND	ND	-
HC2	+	ND	ND	ND
FMC7	ND	+	+	+
HLA-DR	+	+	+	+
H鎖	γ	γ+δ	δ	γ
L鎖	κ	κ	κ	λ

細胞表面免疫グロブリン(sIg)は、HCL 2 症例 L 鎖(κ)、HCL-jv 2 症例 L 鎖(λ)、複数の H 鎖を有する症例をそれぞれ認めた。HCL-jv の 1 症例の検索であるが CD79b⁻/CD103⁻であった。なお、HC2 は HCL 1 症例で陽性の結果であった(他大学測定)。

6. 考察

今回、HCL-jv 症例の血液塗抹標本を作成し、通常のドライヤー冷風の風乾による乾燥と自然乾燥を行い、その血球への影響を比較検討した。

風乾による標本では、自然乾燥標本よりも血球のサイズが大きく、血球の核や細胞質の詳細な観察に優れていると思われた。

また、HCL 細胞に特徴的な細胞表面突起の観察には、電子顕微鏡や位相差顕微鏡による観察が行われ、電顕では、microvilli 状や pseudopod 状に認められる^[9]。今回の相差顕微鏡による観察では、HCL 症例と同様に HCL-jv 症例でも、白血球増多を呈するために、比較的容易に細胞全周にわたる特徴的な長い絨毛状突起を多数確認することができた。

一方、血液塗抹標本は、HCL-jv 症例の風乾標本では、細胞質が豊かで細胞質辺縁が波打つような形態を示すリンパ球が数多く観察され、位相差顕微鏡に類似する細胞質突起の血球は、塗抹標本の引き始めや厚い部分などにみられたが、比較的数字は少なかった。自然乾燥標本は、血球観察に適している標本の薄い部分においても位相差顕微鏡像に類似のものが比較的数字多く観察され、細胞質辺縁の突起の観察には自然乾燥標本も有用な手法になると思われた。

ACP は、酸性下で非特異的にリン酸モノエステルを加水分解する酵素であり、ヒトでは赤血球、白血球、血小板や体内の臓器に広く分布し、細胞や臓器に特異的なアイソザイムが知られている。ヒト血球 ACP は、ゲル電気泳動によりアイソザイム 0 から 5 に分かれ、好中球は 1.2.4. 単球には 1.4. リンパ球や血小板には 3. 芽球は 3b. に富む。アイソザイム 5 は、酵素活性が酒石酸で阻害されないために、TRAP と呼ばれ、hairy cell や組織球の一部、破骨細胞に豊富に認められる^[11]。

TRAP 染色では、HCL とその類縁の慢性リンパ増殖性疾患との鑑別の特異性を高めるため、酒石酸抵抗性試験の判定を高活性 TRAP 血球の出現の有無をもとに判定し、Yam らの報告では HCL 200 症例中陰性は 2 例、非 HCL 800 症例中陽性は 3 例、片山らによる報告では非 HCL 37 症例中陽性は 1 例であるとの報告がある^{[6][11]}。しかし、HCL 症例では臨床的意義が高いものの、HCL-jv では APC 活性が正常範囲と高値ではなく、TRAP 活性も高活性の血球は少ないと思われるため、判定や報告の際には慎重な対応が必要と思われた。また、健常人でも TRAP 活性を持っている血球がわずかながら有り、我々の検討では、健常人末梢血液標本(n=20)を丹念に TRAP 高活性(Janckila 染色 grade5)の血球を検索すると、血液塗抹標本 1 枚中に、0~3 個とごく少数ではあるが認められた^[10]。ときに、TRAP 染色において、染色性の確認のために強陽性コントロールが必要な場合がある。健常人末梢血液から分離した単核球分画の細胞を培養し、数日後に TRAP 高活性の大型単核球が認められるのでこれを利用することができる^{[6][9]}。

今回の HCL 症例では、ACP 高活性、TRAP 高活性であり、高 TRAP 細胞による判定の TRAP 試験も、3 染色方法ともに陽性であったが、HCL-jv 症例では、ACP 活性は正常範囲で TRAP 活性は高値から陰性、TRAP 試験は Janckila 法のみ陽性であった。そのため、染色方法の選択は重要と思われた。TRAP 染色には、感度良く染色される Janckila 法や片山法を、ACP 染色には、染色がきれいな柴田法や Janckila 法が優れていると推察された。なお、Janckila 法は、感度が高い反面、色素が沈着しやすいことがあり注意を要する場合があった。

特殊染色によるアルカリホスファターゼ活性は、HCL 症例の好中球は高活性で、HCL-jv 症例の好中球では正常範囲と反応態度が異なっていた。また、今回詳細なデータは示していないが、リンパ球におけるアルカリホスファターゼ活性(難波方法による染色^[8])は、今回の HCL 症例および HCL-jv 症例は、ともに陰性であった。

モノクローナル抗体による細胞表面抗原検索では、HCL 症例と HCL-jv 症例は、おおむね CD5⁻/CD10⁻/CD11c⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD22⁺/CD24⁻/CD38⁻/FMC7⁺/HLA-DR⁺/sIg⁺であった。しかし、HCL 症例の CD25⁺/CD23⁻に比較し HCL-jv 症例では CD25⁻/CD23⁺⁺であり、また 2 症例とも sIg λ で、HCL 2 症例は sIg κ であった。今回、HCL と HCL-jv のそれぞれの特異性を確認することができた。

7. まとめ

- 1、HCL 細胞の塗抹標本による観察では、核や細胞質の観察には通常の風乾標本が優れており、自然乾燥標本の観察では、標本の薄い部分でも位相差顕微鏡に似た細胞表面の絨毛状突起が細胞質全周に認められ位相差顕微鏡とともに有用と思われた。
- 2、特殊染色による検討では、ACP 染色の 3 染色方法(Janckila 方法、柴田方法、片山方法)では、HCL 症例は 3 染色方法とも ACP 高活性、TRAP 高活性、TRAP 試験陽性であった。HCL-jv 症例では、ACP 活性は正常で、TRAP 活性は高値から低値、TRAP 試験は 3 染色方法の中で Janckila 法のみ陽性判定であった。また、NAP 活性は、HCL 症例高活性、HCL-jv 症例は正常であった。
- 3、特殊染色の ACP 染色は、染色性が高い柴田方法や Janckila 方法が良く、TRAP 染色では、感度が高い Janckila 方法あるいは片山方法を有用すべきと思われた。
- 4、血算値による比較では、HCL 症例は汎血球減少および単球減少を有していたが、HCL-jv 症例では単球減少は認められず白血球増多を呈していた。
- 5、細胞表面マーカーは HCL 症例と HCL-jv 症例ともに概ね CD5⁻/CD10⁻/CD11c⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD22⁺/CD24⁻/CD38⁻/FMC7⁺/HLA-DR⁺/sIg⁺であった。また、HCL 症例の CD25⁺/CD23⁻/sIg κ に比し、HCL-jv 症例では CD25⁻/CD23⁺⁺/sIg λ であり多様性に富んでいた。

参考文献

- [1] 片山勲ら, 造血器悪性疾患 9. hairy cell leukemia(HCL), 血液病学第 2 版, 文光堂, 東京 (1995) 1072-1077.
- [2] 中峰寛和ら, 成熟 B 細胞腫瘍 4. 有毛細胞白血病, WHO 血液腫瘍分類-WHO 分類 2008 をうまく活用するために-, 医薬ジャーナル社, 大阪 (2010) 272-276.
- [3] 小宮正文, Hairy 細胞白血病の標本, 図説血球のみかた, 南山堂, 東京 (1985) 158.
- [4] 森山一郎ら, リンパ球系 2. ヘアリー細胞白血病の原因遺伝子 BRAF, Annual Review 血液 2013, 中外医学社, 東京 (2013) 135-142.
- [5] Janckila AJ, et al, The cytochemistry of tartrate-resistant acid phosphatase. Technical consideration, Am L Clin Pathol, 70 (1978) 45-55.
- [6] 佐藤晶子ら, 血球化学検査 白血球酸性ホスファターゼ, 日本臨床 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査 (2) 62 巻増刊 12 (2004) 777-780.
- [7] 望野唯明ら, 血液検査酸ホスファターゼ染色, 染色方のすべて, MEDICAL TECHNOLOGY 別冊, 医歯薬出版株式会社 (1988) 218-221.
- [8] 古沢新平ら, ホスファターゼ染色, 臨床病理, 特集 48 号 (1982) 101-124.
- [9] 片山勲ら, 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ陽性の白血病, 臨床病理, XXXI : 7 (1983) 706-711.
- [10] 佐藤晶子ら, 白血球酸性ホスファターゼ活性の 3 染色法による検討, 医学検査, 41 (1992) 598.
- [11] 佐藤晶子ら, 血球化学検査 白血球酸性ホスファターゼ, 日本臨床 広範囲血液・尿化学検査, 免疫学的検査 (2) 57 巻増刊号 (1999) 801-804.

Comparative study of cytological examinations in hairy cell leukemia

Shoko Sato

Technical Service Office for Medical Sciences University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

A comparative study of hairy cell leukemia (HCL) and hairy cell leukemia - Japanese variant (HCL-jv) was conducted based on the distinctive hairy cell cytoplasmic projections or villi, morphological features, peripheral blood count, acid phosphatase (ACP) activity, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity, neutrophil alkaline phosphatase (NAP) activity, and immunological surface markers.

In the HCL case, the results were pancytopenia, monocytopenia, increased ACP activity, increased TRAP activity, positive TRAP test, increased NAP activity, and CD5⁻/CD10⁻/CD11c⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD22⁺/CD23⁻/CD24⁻/CD25⁺/CD38⁻/FMC7⁺/HLA-DR⁺/sIg⁺.

In the HCL-jv case, the results were leukocytosis, normal ACP activity, TRAP -/+ activity, TRAP test -/+, normal NAP activity, and CD5⁻/CD10⁻/CD11c⁺/CD19⁺/CD20⁺/CD22⁺/CD23^{-/+}/CD24⁻/CD25⁻/CD38⁻/FMC7⁺/HLA-DR⁺/sIg⁺.

Keywords: Hairy cell leukemia, Hairy cell leukemia -Japanese variant, tartrate-resistant acid phosphatase stain, CD11c