

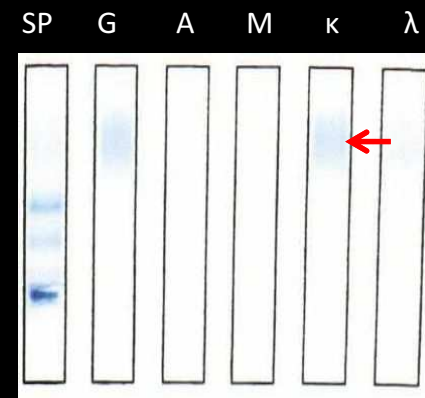
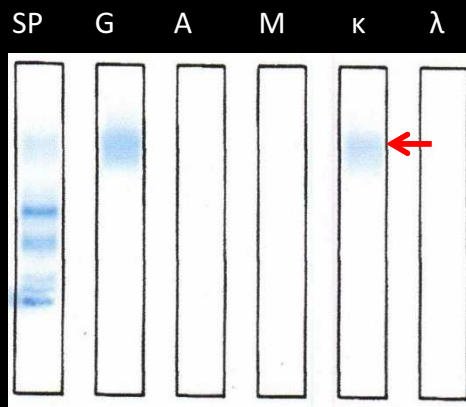
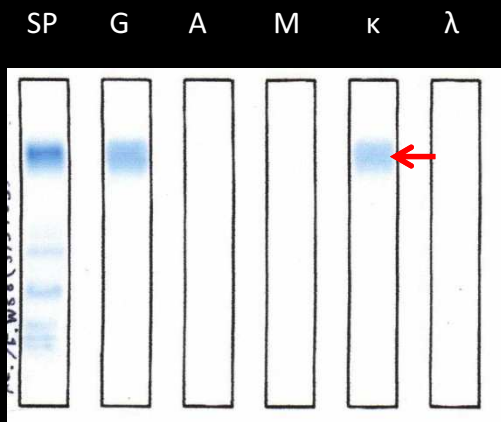
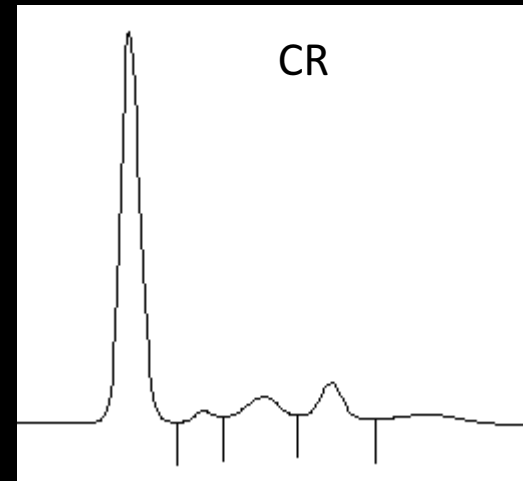
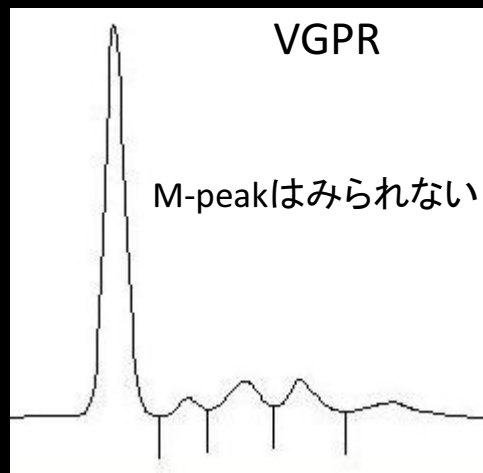
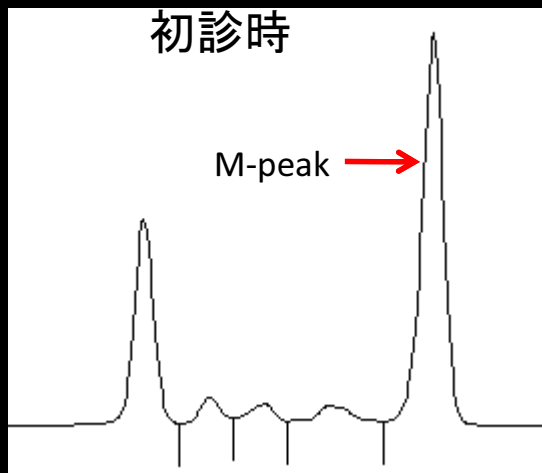
骨髓腫の検査 (6カラーフローサイトメトリーを中心に)

医療法人鉄蕉会 亀田総合病院
名塚 隆

骨髓腫の主な検査

- 蛋白電気泳動
- 免疫固定法
- FLC (free light chain)
- フローサイトメトリー
 - 1) 初診時、骨髓腫細胞の同定
 - 2) 治療効果判定の為の微小残存病変 (minimal residual disease, MRD)検査
- 染色体、遺伝子検査

血清蛋白電気泳動と免疫固定法



症例 62歳 女性 IgGκ 骨髄腫

マルチパラメーターフローサイトメトリー MRD解析の背景

- 多発性骨髄腫において免疫固定法による血清及び尿中のM-蛋白の消失は、complete response (CR)のための診断基準の一つとされており、治療目標とされている。
- 免疫固定法の陰性化に加えて血中のfree light chain κ/λ 比が正常化する事は、stringent CR(sCR)とされより深いCRと規定されている。
- しかしながらこれらの効果判定は、骨髄腫細胞の産生物であるM-蛋白量を測定する事で骨髄腫細胞の腫瘍量を間接的に推定しているものであり、残存腫瘍細胞量を直接に反映しているとは必ずしも言えない。
- Multiparameter flow-cytometry (MFC)による腫瘍性形質細胞の測定は、 10^{-4} 以下のレベルまでの骨髄中の形質細胞を定量的に測定できる事から、CRでの患者骨髄の微小残存病変 (minimum residual disease, MRD) の測定に有用であり予後に強く関連している事が指摘されている。

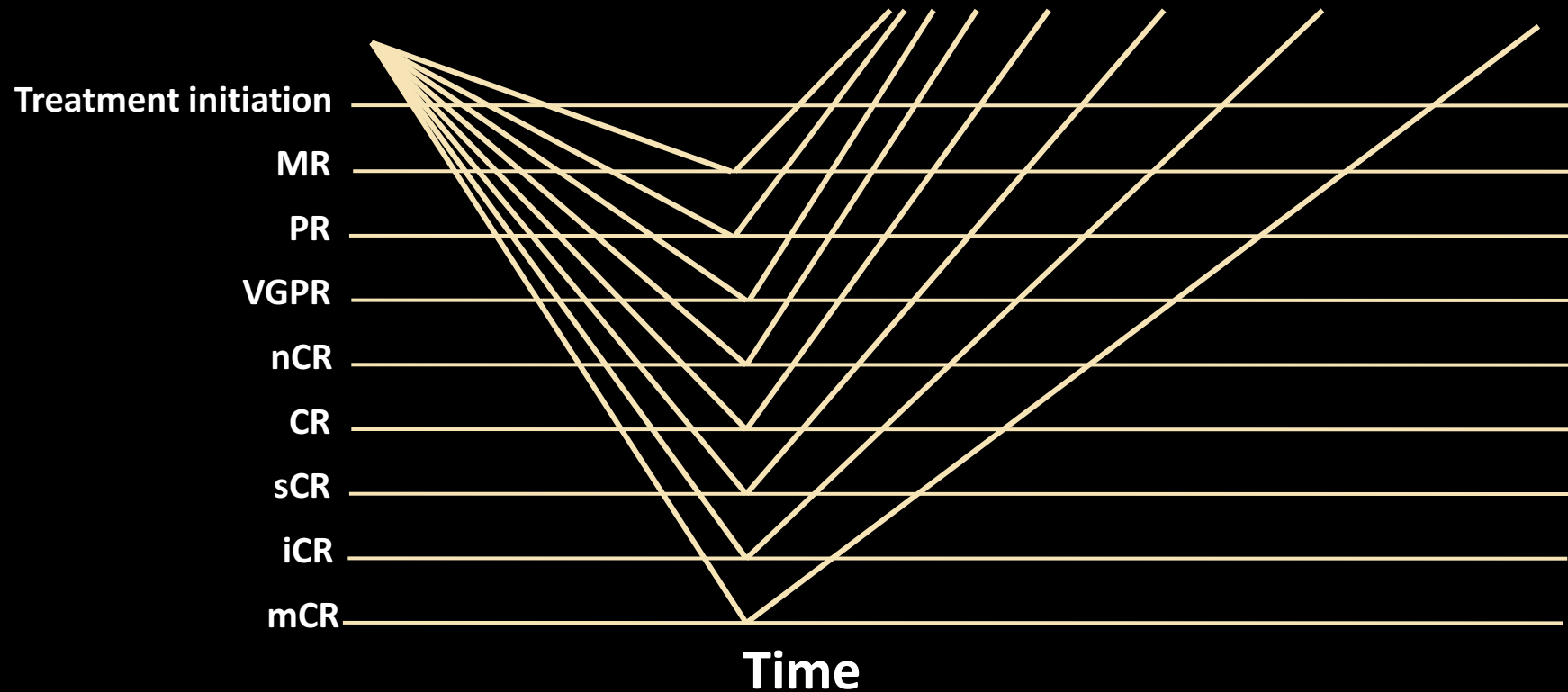
治療効果判定基準

- PR (Partial response)
- VGPR (very good Partial response)
- CR (complete response)
- sCR (stringent complete response)
- **iCR (immunophenotypic CR)**
マルチパラメーターフローサイトメトリー解析による 10^{-4} レベルの検出にて陰性
- mCR (molecular CR)
PCRによる 10^{-5} レベルの検出にて陰性

骨髓腫の治療反応

Depth of response

Time to progression



Depth of response is related to TTP

*Niesvizky et al. Br J Haematol 2008; 143(1): 46-53; Harousseau et al. Blood 2009; 114(15): 3139-3146
Chanan-Khan et al. J Clin Oncol 2010; 28(15): 2612-2624*

形質細胞の同定

- 正常形質細胞

CD45 + CD38 + CD19 + CD56 - CD81 +
cylg Kappa Lambda比正常

- 腫瘍性形質細胞

CD45 ± ~ + CD38 + or - CD19 - CD56 + or -
CD81 - ~ + cylg Kappa Lambda比異常(乖離)

Euro Flow MM MRD Panels

Tube	Pacific Blue	Pacific orange	FITC	PE	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Tube1	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	CD117	CD81
Tube2	CD138	CD27	CD38	CD56	CD45	CD19	cylg Kappa	cylg Lambda

6Color Flow MM MRD Panels

Tube	FITC	PE	ECD	PerCP-Cy5.5	PE-Cy7	APC
Tube1	CD81	CD19	CD45	CD56	CD38	CD138
Tube2	cylg Kappa	cylg Lambda	CD45	CD56	CD38	CD138

骨髓穿刺液測定方法

骨髓穿刺液溶血後細胞を濃縮

CD81-FITC、CD19-PE、CD56-PC5.5、CD45-ECD、
CD38-PC-7、CD138-APCでラベリング

PerFix-ncにより
細胞膜透過処理

Igκ-FITC、Igλ-PE、CD56-PC5.5、CD45-ECD、CD38-
PC-7、CD138-APCでラベリング

フローサイトメーターにより測定
MRD カウント細胞数は 1×10^6 個以上
(CD38+CD45±～+の細胞100個以上)

FMC解析手順

CD38+CD45±~+ゲート



CD138+形質細胞確認
CD19 CD56 確認



CD19-CD56+
CD19-CD56-
骨髄腫細胞



CD19+CD56-



cylgk/λ乖離確認



cylgk/λ乖離あり
骨髄腫細胞

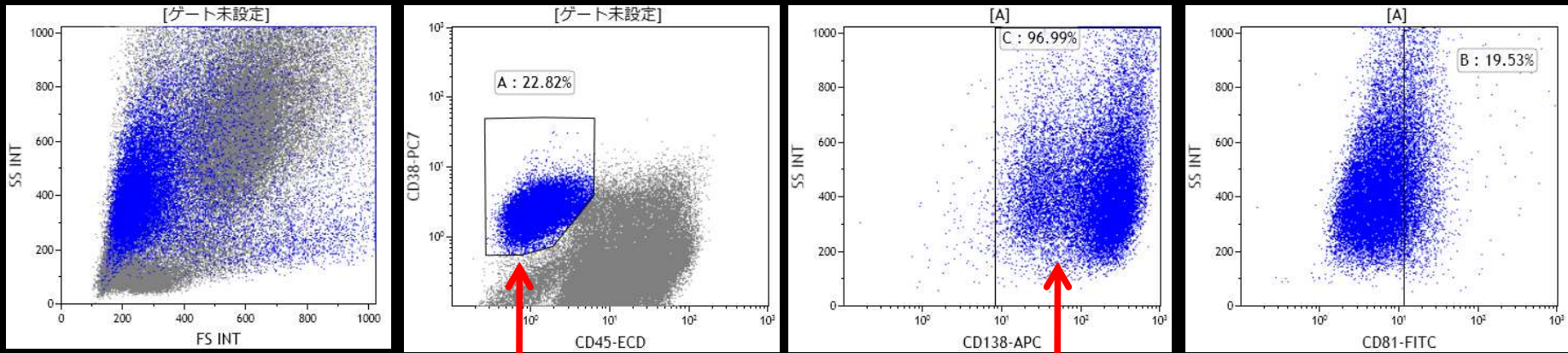


cylgk/λ乖離なし
正常形質細胞



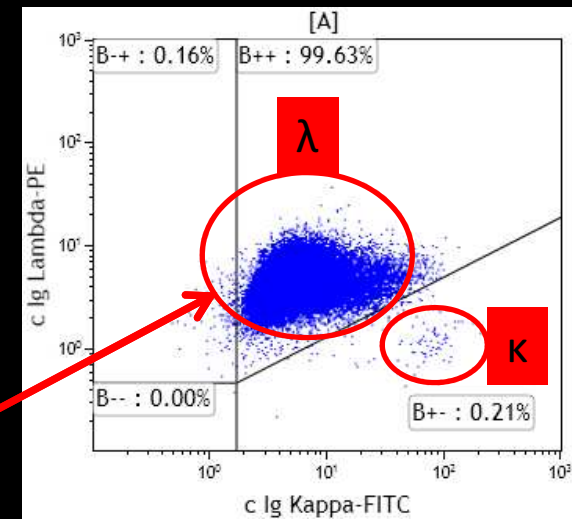
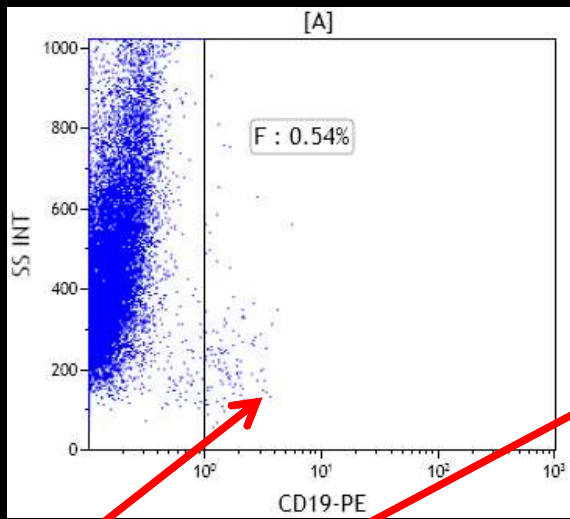
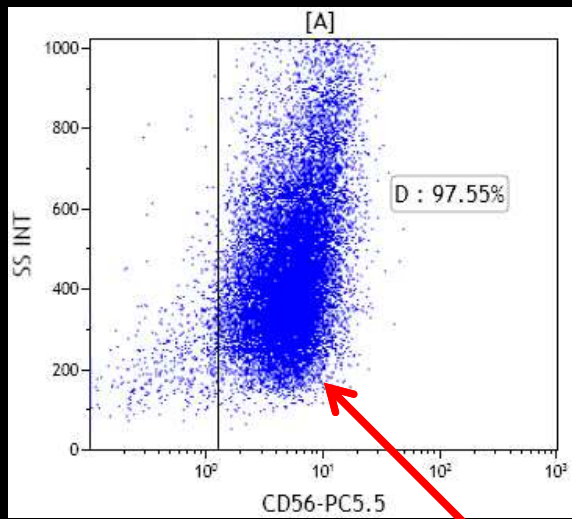
cylgk/λ乖離確認

初診時骨髄MFC腫瘍性形質細胞の同定



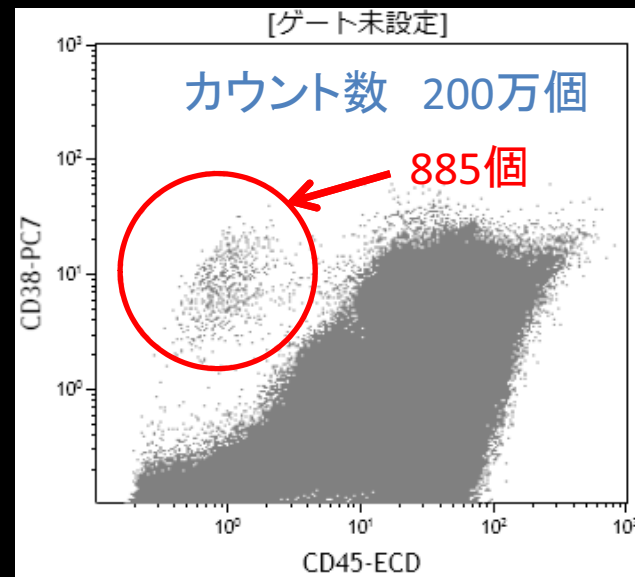
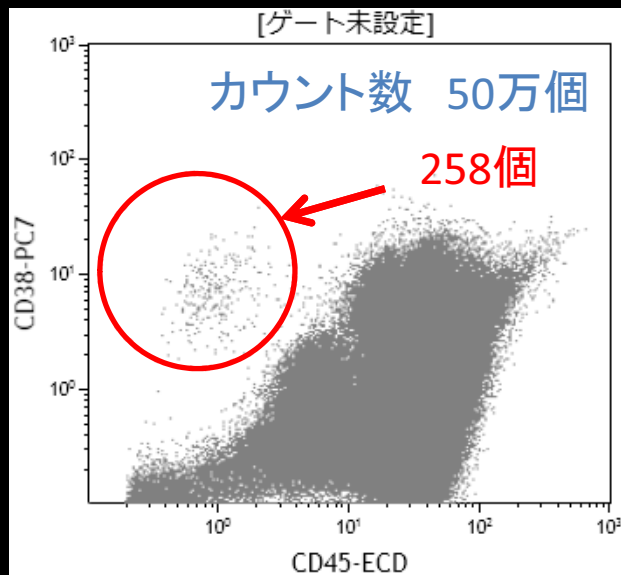
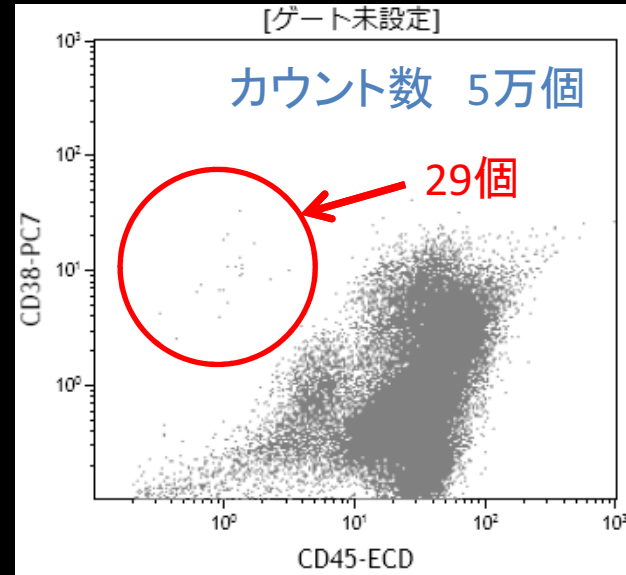
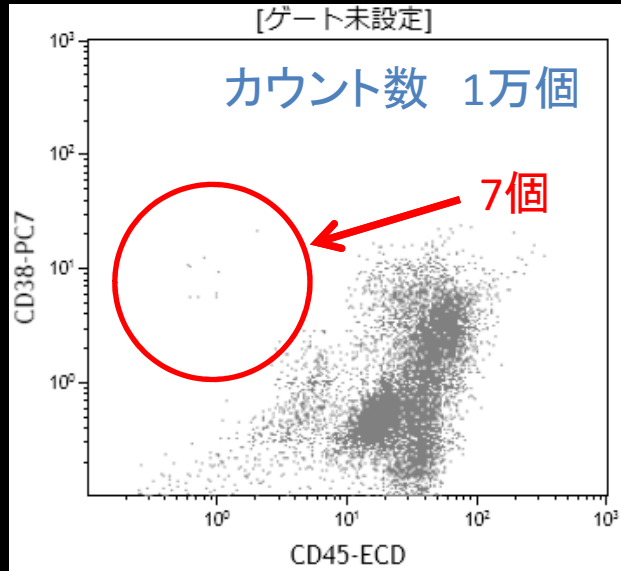
CD45± ~ + CD38 腫瘍性形質細胞？

CD138+形質細胞であることを確認



CD56+ CD19- cγlgκ/λ乖離確認 腫瘍性形質細胞であることを確認

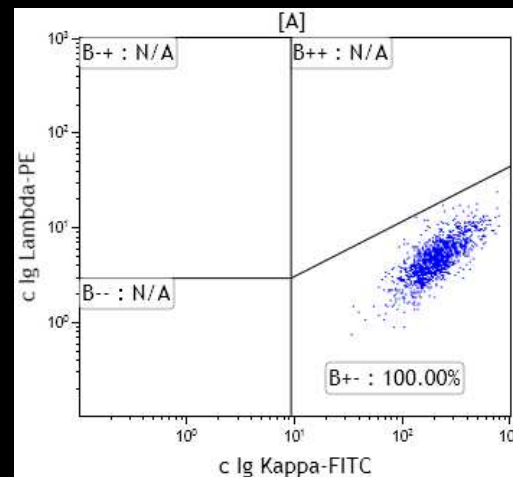
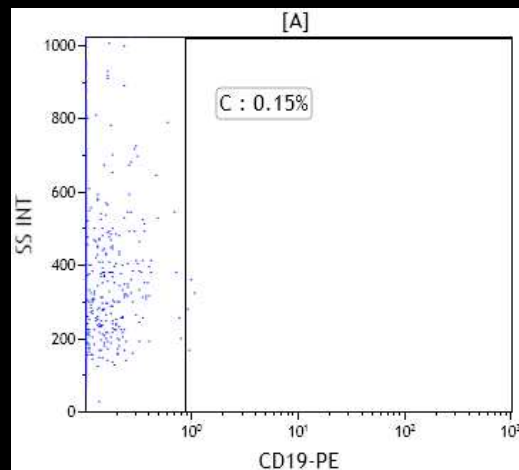
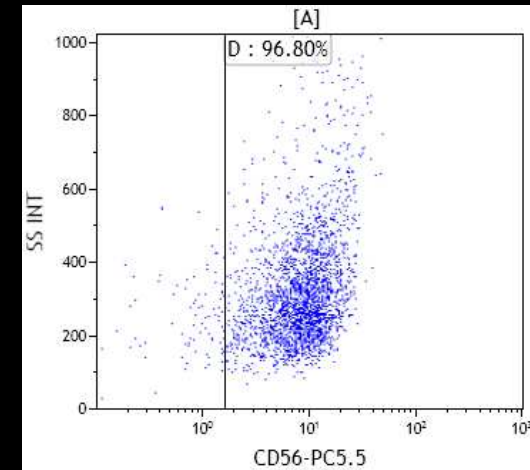
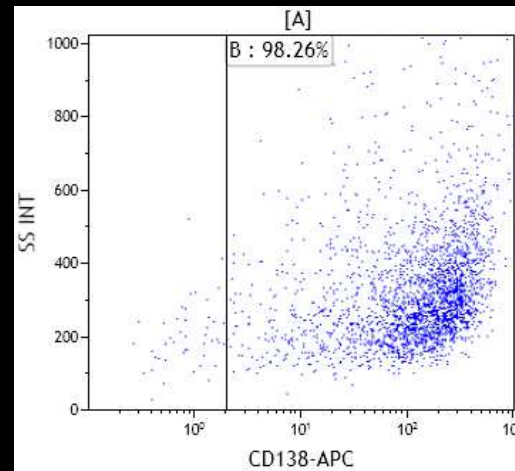
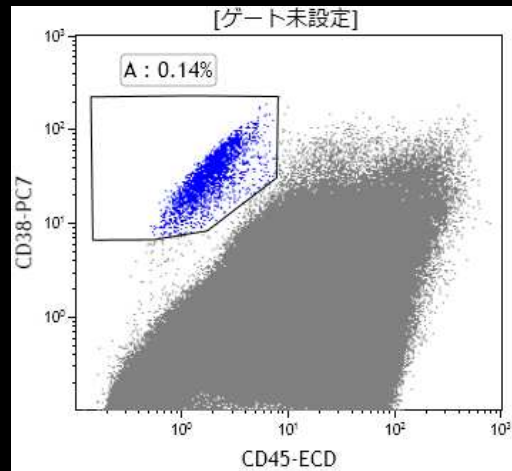
MFCによる MRD



CR MFC MRD陽性例

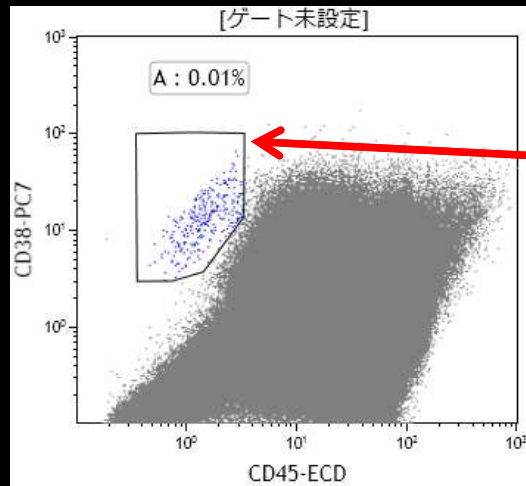
免疫固定法(一) FLC : Kappa

カウント細胞数
300万個

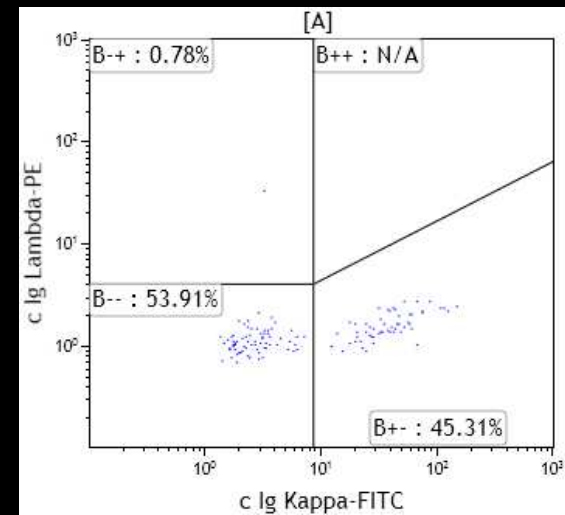
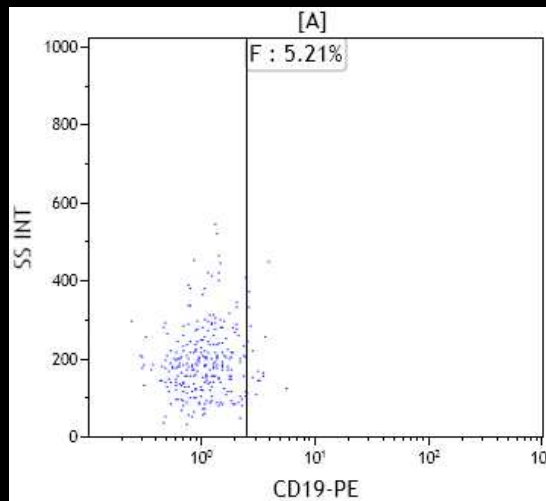
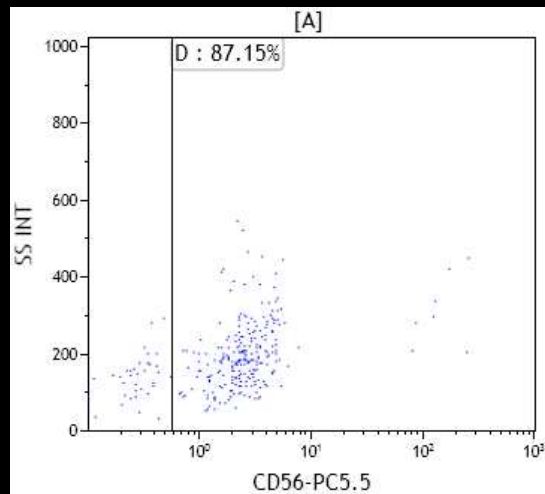
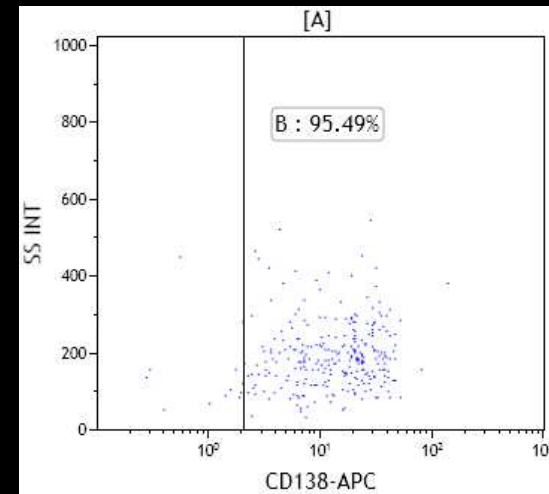


sCR MFC MRD陽性例

免疫固定法(一) FLC(一)

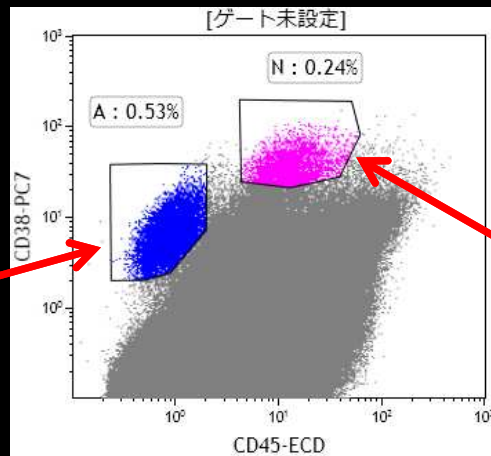


300万個カウント中288個
骨髓腫細胞

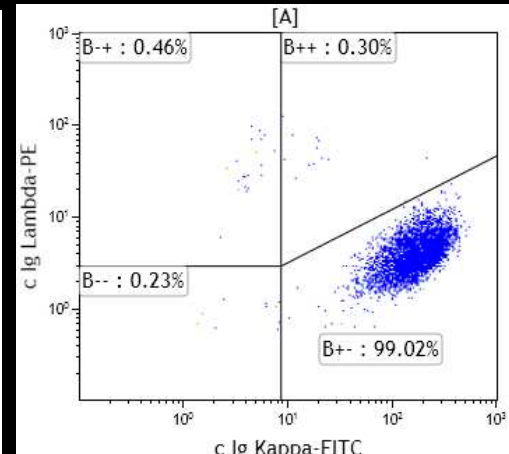
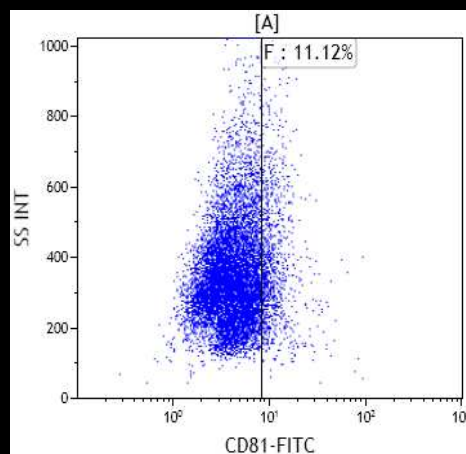
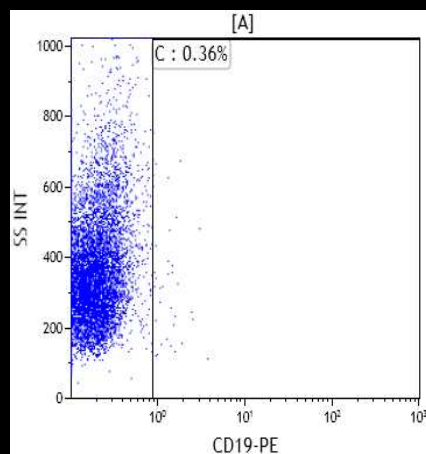
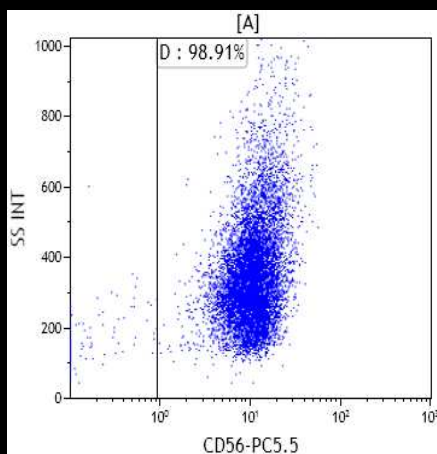
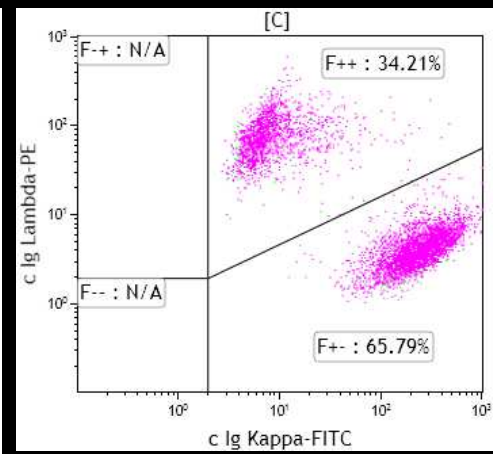
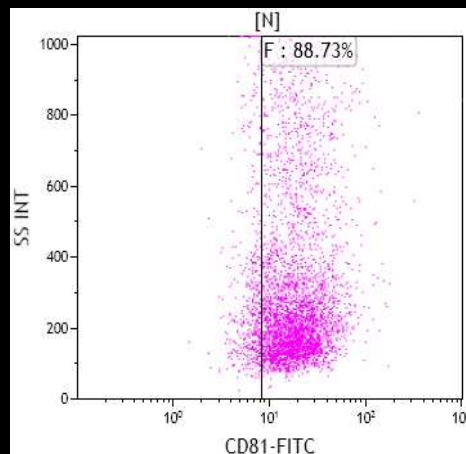
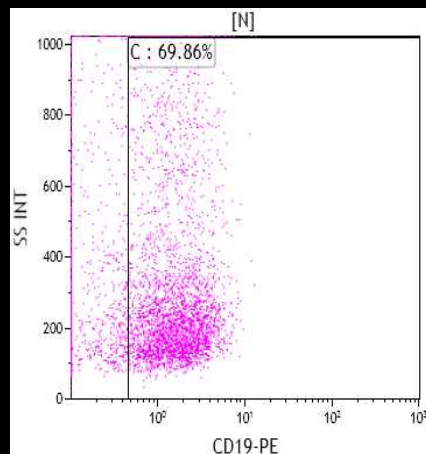
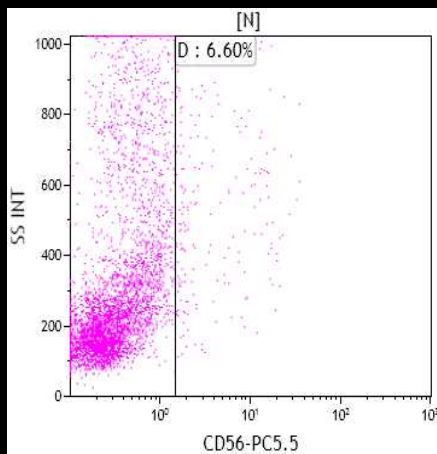


正常形質細胞と 腫瘍性形質細胞

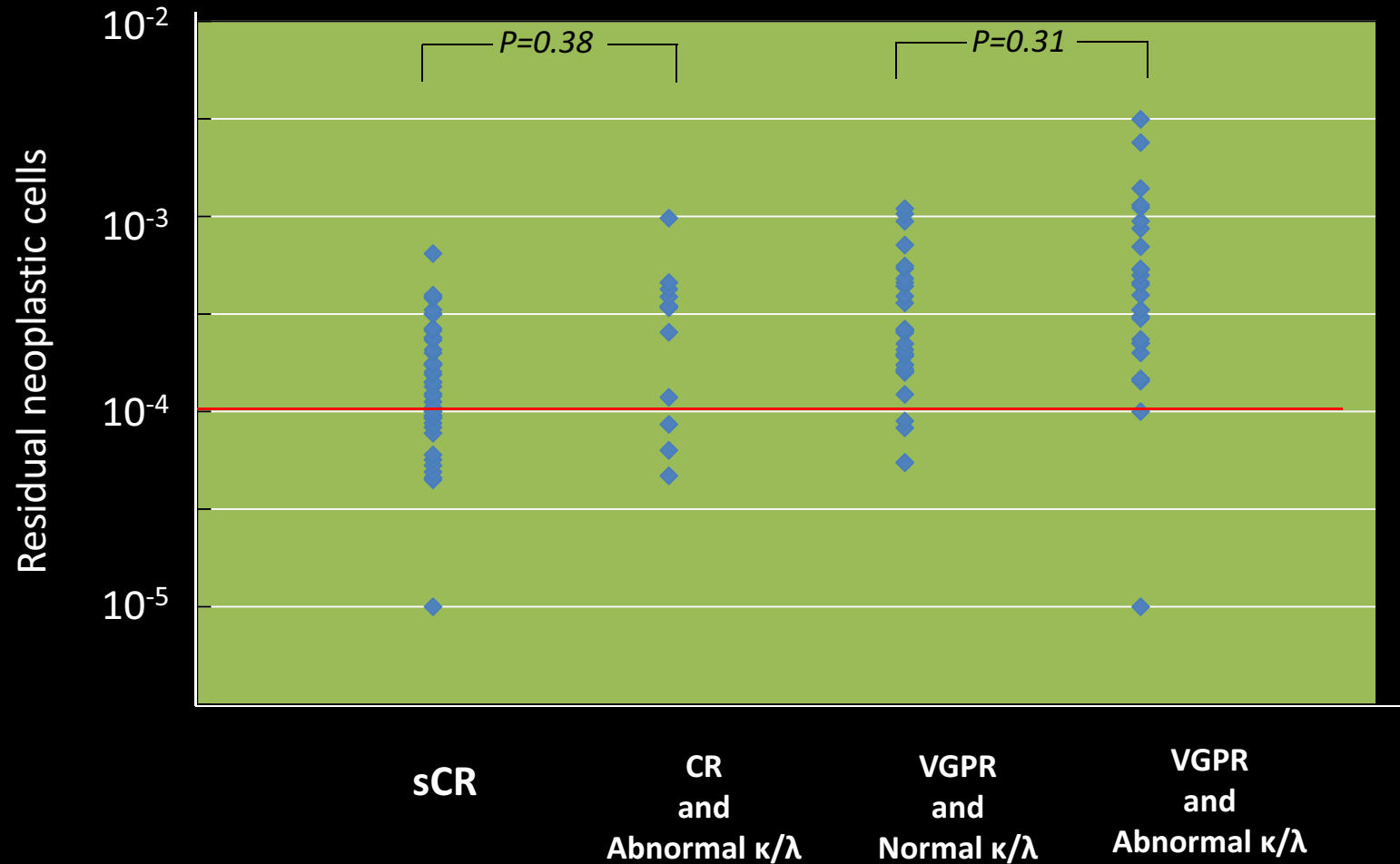
腫瘍性形質細胞



正常形質細胞



sCR CR VGPR MFC陽性率の比較 (FLC乖離別)



末梢血液染色方法

末梢血液 10mlを単核球分離

CD81-FITC、CD19-PE、CD56-PC5.5、CD45-ECD、
CD38-PC-7、CD138-APCでラベリング

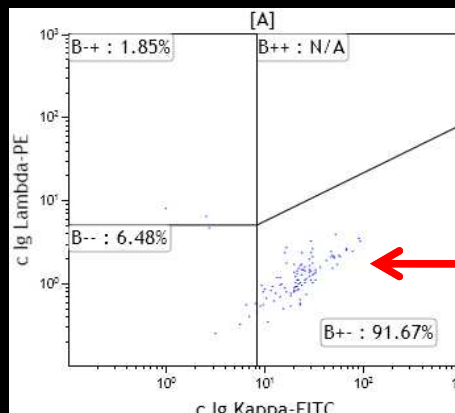
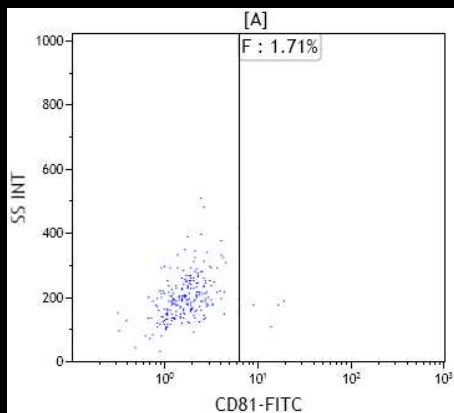
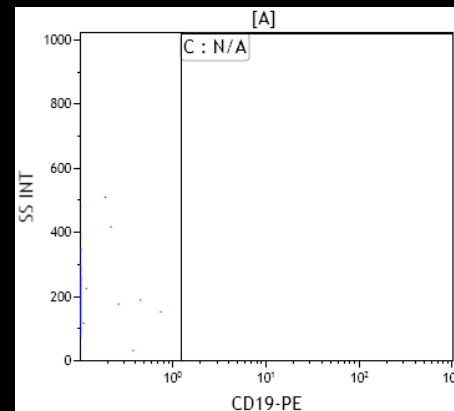
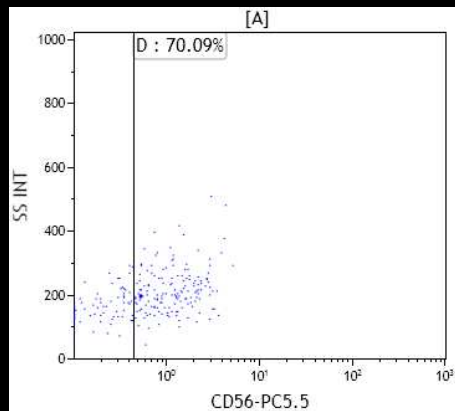
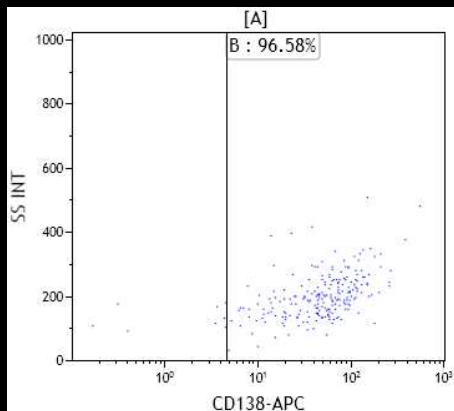
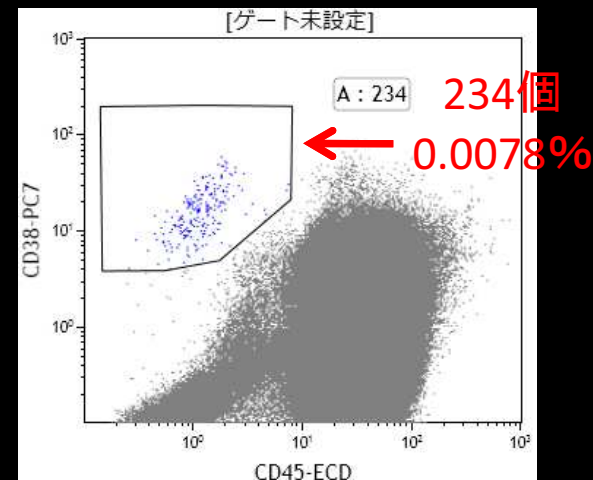
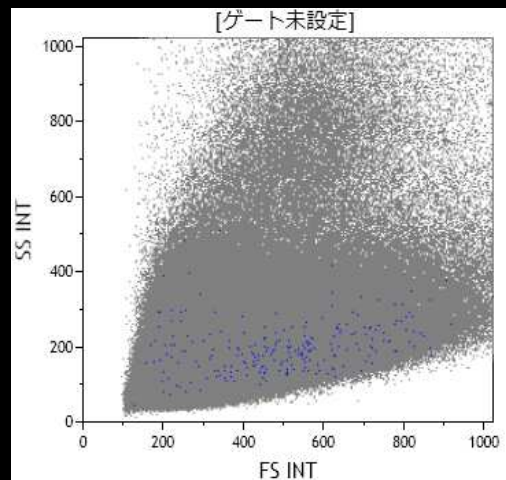
PerFix-ncにより
細胞膜透過処理

Igκ-FITC、Igλ-PE、CD56-PC5.5、CD45-ECD、CD38-
PC-7、CD138-APCでラベリング

フローサイトメーターにより測定
カウント細胞数は $1 \sim 3 \times 10^6$ 個以上
(CD38+CD45 ± ~ + の細胞100個以上)

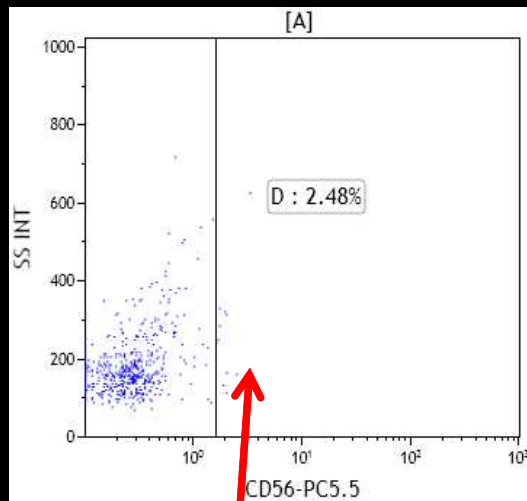
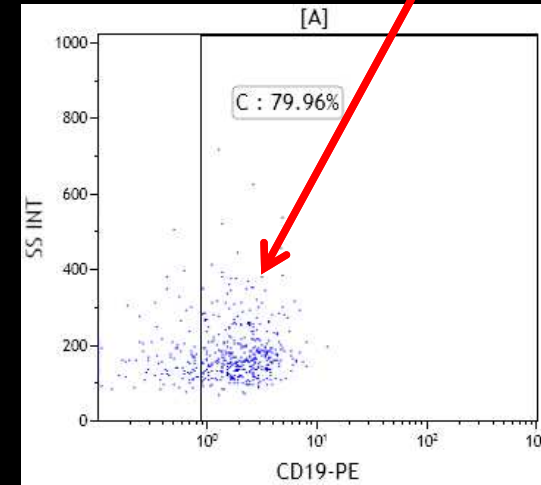
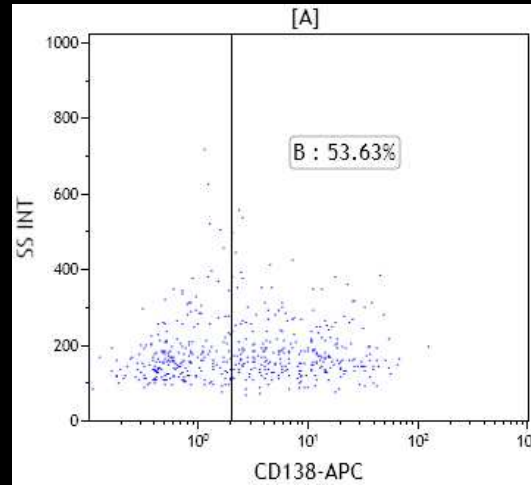
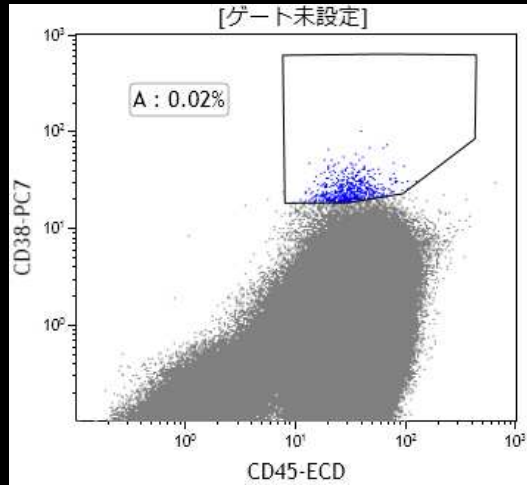
末梢血陽性例

カウント細胞数
300万個

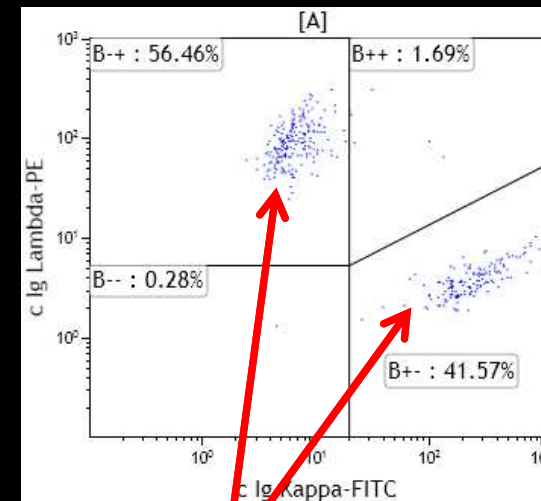
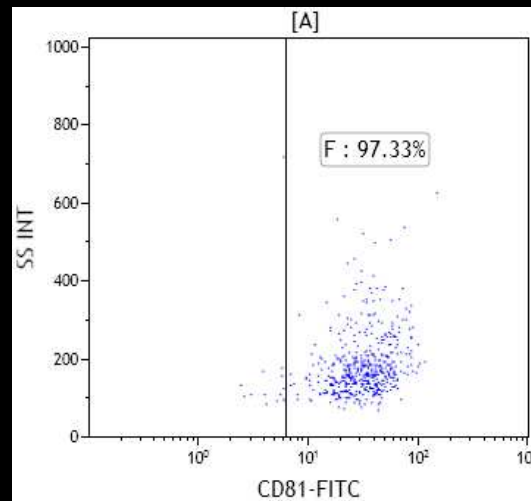


正常末梢血液

CD19(+)



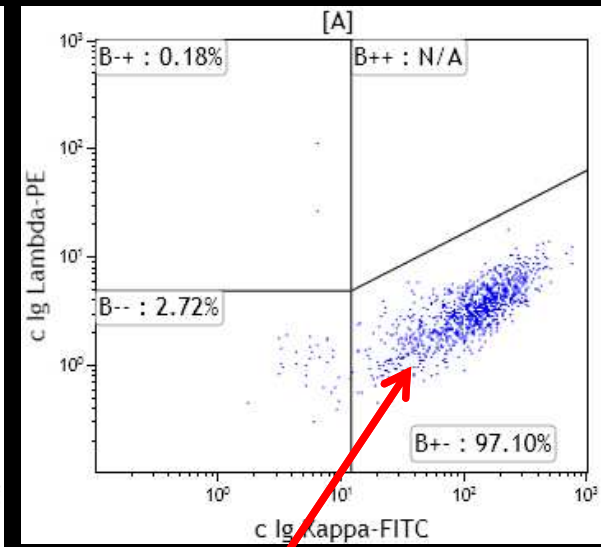
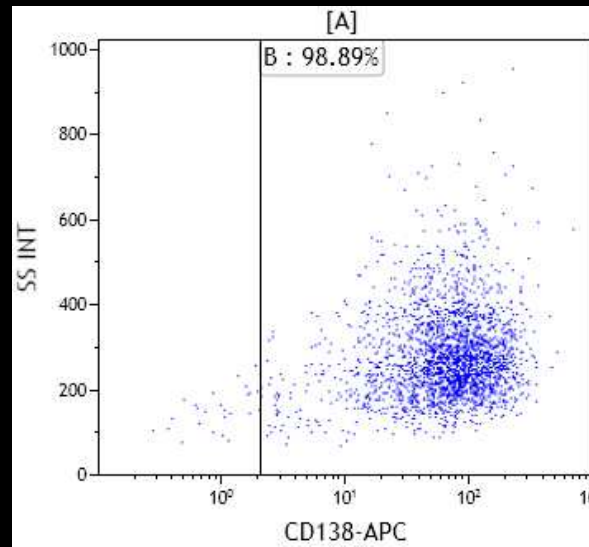
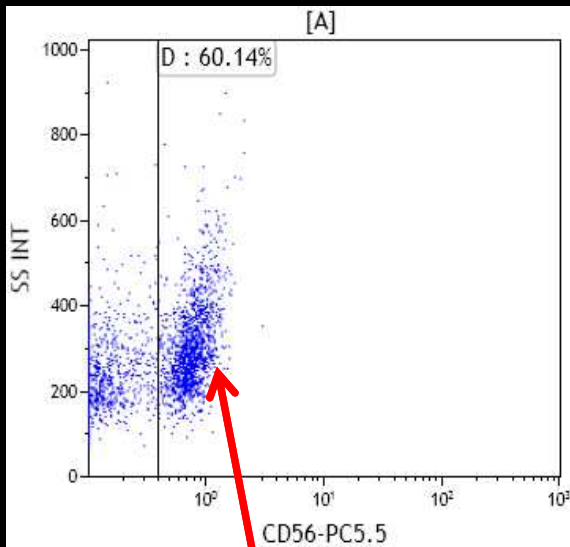
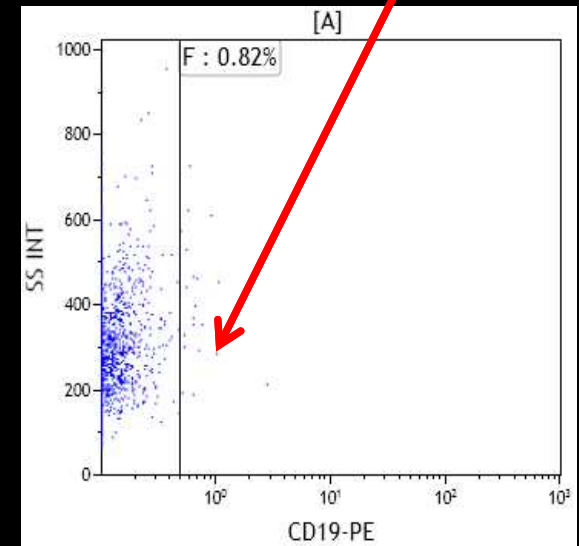
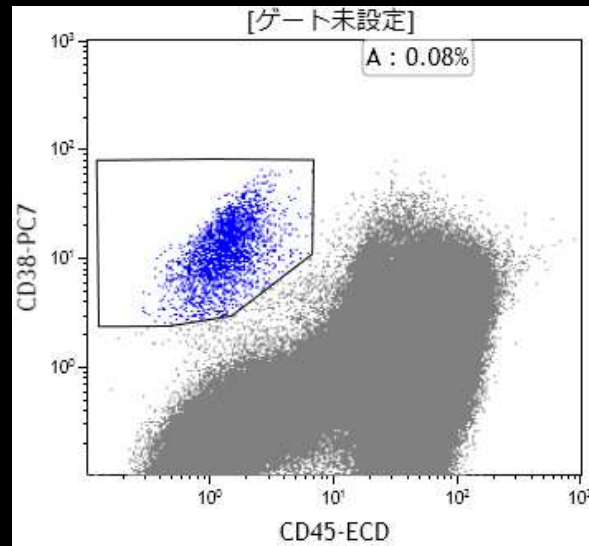
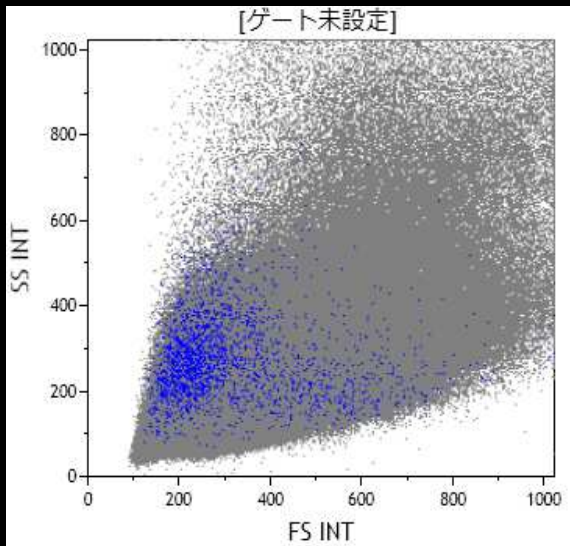
CD56(-)



乖離は見られない

末梢血陽性例

CD19(-)



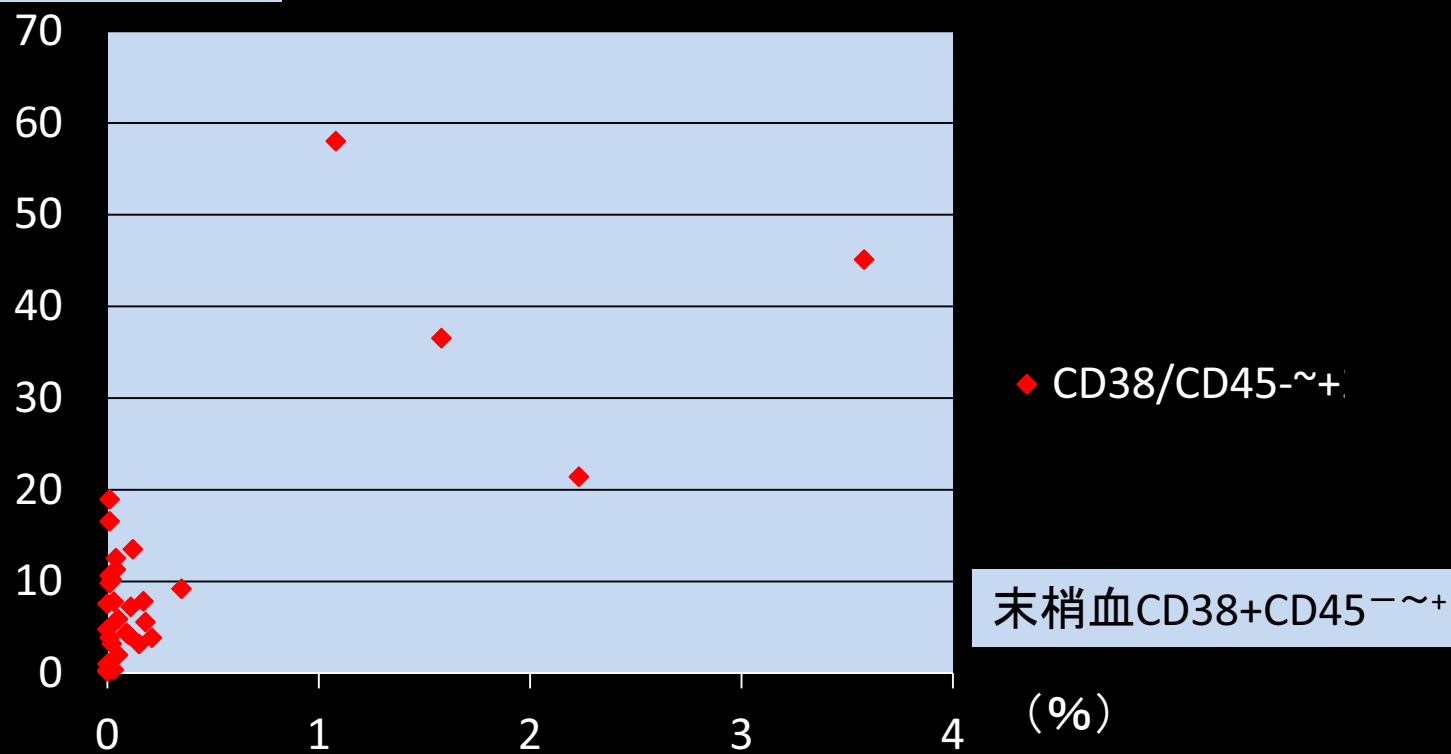
CD56(+)

IgG kappaに乖離

末梢血、骨髓穿刺液CD38+CD45^{~+} 相関図

骨髓CD38+CD45^{-~+}

CD38/CD45^{-~+}



相関係数: 0.737

まとめ

- 多発性骨髄腫の寛解の深さを知る上で、6-color MFCによるMRDの測定は 10^{-4} ~ 10^{-5} レベルの残存骨髄腫細胞を定量する事が可能であり治療効果の判定にとって有用であると考えられる。
- 6-color MFCを用いた多発性骨髄腫のMRD解析は寛解の深さを知る上で重要であり生存期間に深く関与している。
- 末梢血液中のMRD解析では、骨髄中の骨髄腫細胞の有無をはかる上で、有用であると考えられる。

御静聴ありがとうございました。