

主 論 文

Utility of a Fluorescence Microscopy Imaging System for Analyzing the DNA Ploidy of Pathological Megakaryocytes Including 5q- Syndrome (5q-症候群を含む異常巨核球における蛍光顕微鏡を用いた DNA 量解析法の有用性)

[緒言]

巨核球は特異な倍体化 (endomitosis) を経て巨大細胞になり、多量の血小板を産生する。通常の細胞では、細胞内の分子レベルで mitosis が調整されており、巨核球は細胞質分裂が行われることなく DNA の複製が行われるため、ときに 128N 以上の DNA 量を持つ大きな多核細胞となる。特に骨髓系腫瘍では、個々の巨核球の大きさや核の倍体化・分葉の程度と血小板産生能については病型による特徴が示唆されているが、その間の DNA 増量と核形態の変化や分葉の分子機構は未解明である。また、血液疾患と巨核球の DNA 量との関連性を何らかの方法で検索した報告はごくわずかである。

DNA 量の解析には、従来法の flow cytometry (FCM) 法があり、短時間で個々の DNA 量を測定できるが、特定細胞の形態とその DNA 量を追跡することができない。

今回我々は、蛍光顕微鏡と専用の画像解析処理プログラムを用いて、細胞像と DNA 量を対比させながら評価する系 (fluorescence microscopic image analysis; FMI 法) を設定し、従来法である FCM 法と比較し、FMI 法の有用性を検討した。また、FMI 法を用いて、骨髓系腫瘍を中心に過去の骨髓塗抹標本中における巨核球中の DNA 量を血小板数とあわせて評価を行った。

[方法]

1.対象検体

骨髓異形成症候群患者から樹立された芽球様細胞株である MDS-L を基礎的検討として用いた。また、May-Grünwald Giemsa (MGG) 染色を施している患者骨髓塗抹標本 42 例を本検討に用いた。骨髓塗抹標本のうち、機能・形態学的に正常と思われる 16 例を Control 群とみなし、血液疾患患者の 26 例を疾患群として用いた。

本研究は川崎医科大学倫理委員会の承認のもとに行った (No.517, 1478)。

2.FCM 法による DNA ploidy の測定

MDS-L をメタノール固定後、RNase 処理を施し、PI 染色を行った。染色後、直ちに FACS Calibur にて 10,000 個の細胞をカウントし、DNA 量の計測を行った。

3.FMI 法による DNA ploidy の定量

MDS-L のサイトスピン標本を作製し、ホルマリン/アセトンで固定後、RNase 処理を行い、核染色として propidium iodide (PI), もしくは 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を施した。なお、RNase 処理は PI による核染色時のみ行った。

MGG 染色を施している患者骨髄塗抹標本については、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8100 を用いて、巨核球を含む視野を 30 カ所撮影し、細胞の位置情報とあわせて画像データを保存した。染色標本を脱色後、核染色 (DAPI) を行い、脱色前に撮影した巨核球と同じ視野を再度撮影し、細胞像と対比させながら巨核球の DNA 量を計測した。

DNA 量の解析は BZ-II Analyzer を用いて行った。MDS-L の標本 1 視野あたり平均 330 個の細胞が見られ 20 視野カウントを行った。PI もしくは DAPI の蛍光強度と核の面積の積を蛍光輝度積算値(LSum)として、標本内の核内 DNA 量を数値化し、ヒストグラムに示した。

4.統計学的解析

疾患群の比較は Student の t 検定, もしくは Mann-Whitney 検定を用いた。有意水準は $p<0.05$ を有意差ありとして評価した。

[結果]

1.FMI 法による MDS-L の DNA ploidy は FCM 法と同等の結果が得られた

MDS-L において、DNA 量分布を FCM 法と FMI 法で比較した。FMI 法では個々の細胞の LSum をヒストグラムにすることで DNA 量分布とした。また、FMI 法においては核染色の違い (PI と DAPI) についてもあわせて比較した。

MDS-L は異常核分裂を起こすため、ごくまれに 3 核 (6N) の細胞が見られることがある。2N, 4N, 6N の平均分布割合は、FCM では $35.6\pm 1.0\%$, $12.3\pm 0.7\%$, $0.3\pm 0.1\%$, FMI (PI) では $37.6\pm 4.3\%$, $11.5\pm 2.0\%$, $0.3\pm 0.3\%$, FMI (DAPI) では $37.3\pm 3.3\%$, $11.6\pm 1.5\%$, $0.4\pm 0.3\%$ であった。DNA 量の分布を測定法の違い (FCM と FMI (PI)), もしくは核染色の違い (PI と DAPI) で比較したところ、どちらにおいても有意な違いは認められなかった。

2.FMI による巨核球中 DNA 量の評価

MGG 染色後の骨髄塗抹標本において、巨核球を含む視野を 30 カ所撮影後、脱染色を施し、DAPI による核染色を行った。MGG 染色像と同じ視野を再度撮影し、巨核球の DNA 量を計測した。

まず、2N とされる成熟好中球を 5~10 個選び、その LSum の平均値を求めることで 2N の基準値とした。次に、巨核球の LSum の値を基準となる 2N の値で除して 2 倍することによって巨核球の DNA 量を決定した。

3.血液疾患における DNA 量と血小板数の関係

患者骨髄塗抹標本 42 例について、巨核球の DNA ploidy を計測した。形態学的に健常と考えられる標本 16 例を Control 群として評価した。また、骨髄異形成症候群 (MDS) 14 例、慢性骨髄性白血病 (CML) 5 例、本態性血小板血症 (ET) 3 例と真性多血症 (PV) 4 例を合わせて骨髄増殖性腫瘍 (MPN) 7 例とし、合計 26 例を疾患群として評価した。なお、MDS 群は 5q-症候群 4 例と 5q-症候群以外 MDS 群の 10 例に分けて評価した。

骨髄増殖性腫瘍のうち CML を除く病型、すなわち MPN 群では DNA ploidy が高い傾向であったが、今回の検討症例数では有意差は得られなかった。

MDS 群については、Control 群に比べ MDS 群における巨核球の DNA 量は低値傾向であった。血小板数においても Control 群に比べ 5q-症候群を除く MDS 群は低く、MPN 群は高い結果となった。

DNA 量と血小板数の関連性をより明らかにするために、DNA 量と血小板数の比 (DNA/Plt ratio) と積 (DNA×Plt products) を求めた。Control 群に比べ 5q-症候群と MPN 群においては DNA/Plt ratio が有意な低下が見られた。また、DNA×Plt products では Control 群に比べ 5q-症候群は有意な低下が見られ、MPN 群では有意な上昇が見られた。

4.5q-症候群における異常巨核球の DNA 量について

Control 群に比べ 5q-症候群を除く MDS 群の巨核球は低分葉で細胞質が狭いものが多く、DNA 量も低くなっていた。しかし、5q-症候群の巨核球は低分葉であるが、DNA 量の低下は顕著であるにもかかわらず、MDS 群に比べ細胞質は広く、血小板数は Control 群と同等であった。

[考察]

DNA 量の解析法として、蛍光顕微鏡と専用の画像処理プログラムを用いて検討を行ったところ、骨髄塗抹標本中の巨核球において、細胞像と DNA 量を対比させながら評価する系を確立することができた。従来用いられていた laser-scanning cytometry 法や FCM 法に比べ操作も簡便であり、FMI 法の計測結果は従来法と同等であっただけでなく、長期保存されていた骨髄塗抹標本においても十分な結果が得られることが分かった。DNA 量を数値化することで、種々の血液疾患における巨核球の DNA ploidy を定量化することができた。

核分葉が進んだ巨核球ほど DNA 量が多いという報告もあるように、一般的に 8N 以上になると血小板を放出すると言われており、巨核球の分葉数と DNA 量はある程度相関しているように思われる。骨髄増殖性腫瘍では CML, ET, PV の病型によって巨核球の形態学的特徴が異なる。すなわち CML の巨核球は比較的小型で低分葉傾向、ET は

逆に大型で多倍体・高分葉, PVはその中間的な phenotype を示すことが知られている。今回の検討でもその見た目の傾向がある程度数字に表れていたと思われるが, 明確に示すためにはもっと多数例の解析が必要である。

一方, MDS 患者における巨核球の DNA 量は正常巨核球に比べ低いという報告があり, 本研究においても同様の結果が得られた。5q-症候群は MDS と比べ核は低分葉であるが, 細胞質が広く発達しており, 血小板数は Control 群と差が認められなかった。5q-症候群を見る限り, 倍体化や核分葉は血小板産生に必須ではないものと考ええる。5q-症候群の巨核球における低分葉核が比較的 low ploidy であることは通常染色標本から予想されることであるが, 実際にそれを計測したのは知る限りにおいて本研究が初めてと思われる。

巨核球の多倍体化については様々なメカニズムがあり, survivin や RhoA などによって Aurora B の活性や局在, 分裂溝の形成に影響を及ぼすことが知られているが, 未解明な部分も多く, 核分葉の状態と DNA 量についての関連性とあわせて今後さらに検討する意義がある。

[結論]

今回我々が検討を行った蛍光顕微鏡と専用画像プログラムを用いた DNA 量解析法 (FMI 法) は, 従来法である FCM 法とほぼ同等の結果が得られただけでなく, 細胞像と対比させながら DNA 量を計測することが出来るため, 非常に有用性が高い解析法であると言える。

また, 5q-症候群においては DNA 量の低下があるにもかかわらず, 血小板数の低下が認められなかったことから, 巨核球の倍体化や核の分葉が血小板産生に必ずしも必要でないことが新たな知見として得られた。