

出國報告（出國類別：進修）

多色系統流式細胞儀於血液惡性疾 病之分析與應用

服務機關：台中榮民總醫院

姓名職稱：韓紹民 主治醫師

派赴國家：西班牙

出國期間：102 年 01 月 01 日至 102 年 06 月 27 日

報告日期：102 年 07 月 29 日

摘要

流式細胞技術是指在流體狀態下分析單一細胞的技術，此技術具有快速、定量及同時偵測多種細胞條件等優點。目前利用此技術開發出許多應用，包含細胞表面抗原及細胞內蛋白質分析、細胞凋亡、細胞週期及細胞氧化壓力分析等。

世界衛生組織在 2008 年整合了形態學、免疫分型及分子生物學的資料將血液惡性疾病重新分類。在血液惡性疾病的免疫分型上可利用流式細胞技術來輔助診斷。但在流式細胞技術領域中，對於疾病的診斷及追蹤的抗體選擇並沒有共識，大部分都由各個實驗室自行決定疾病的抗體組合。因此，相同的疾病在各個實驗室之間存在著差異。Euroflow 組織整合 12 個國家的實驗室，針對血液惡性疾病的診斷及追蹤開發出共同的儀器條件設定、抗體組合及資料分析。有鑑於此，在醫院的支持下前往 Euroflow 的發源地，西班牙的薩拉曼卡大學(University of Salamanca)學習 Euroflow 對於血液惡性疾病的分析技術。期望藉由習得此套血液惡性疾病的診斷技術，提高本科的診斷水準。

目次	
摘要.....	1
目次.....	2
本文.....	3
目的.....	3
過程.....	4
心得.....	11
建議事項.....	12

本文

一.目的

流式細胞儀是在 1950 年代由 Coulter Principle 開發出來，1960 年代開發出多色系統的流式細胞儀。在此期間，流式細胞技術並未有所發展，直到 1970 年代單株抗體開發出來之後，擴展了流式細胞技術的應用層面。70 年代到 80 年代奠定了白血病的主要免疫分型，也成為日後世界衛生組織對於血液惡性疾病分類的依據。

本科於 90 年代就擁有流式細胞儀，主要用來分析白血病免疫分型多年，但主要以 2 色分析為主。於 2010 年，獲得醫院支持，將原本 FACS cytometer 更換成 FACSCanto II。FACSCanto II 擁有數位化的電子系統、較高的靈敏度及最多可分析 8 種顏色的訊號。本科也於 2010 年底獲得國立台灣大學台成幹細胞治療中心及美國 Hematologics 實驗室的幫忙，協助本科建立起 3 至 4 色的分析系統。歐洲 Euroflow 組織於 2012 年在期刊 Leukemia 發表利用多色系統流式細胞儀於血液惡性疾病之分析與應用，正好是科內目前發展的需求。因此，在許惠恒副院長及黃文豐主任的鼓勵下並獲得西班牙薩拉曼卡大學 Orfao 教授的同意之下到 Euroflow 的發源地學習多色系統的分析方式。

二、 過程

西班牙薩拉曼卡大學

薩拉曼卡大學創建於 1218 年，是西班牙最古老的大學，也是世界上歷史最悠久的幾所高等學府之一。其所在地－薩拉曼卡地處西國中部偏西北，風景優美，建築雄偉，是歷史文化重鎮，1988 年被聯合國教科文組織列為世界遺產。薩拉曼卡大學以傳統的人文學科著稱。

Alberto Orfao 教授

是位內科及外科醫師，同時也是薩拉曼卡大學教授及癌症細胞和分子生物學研究中心研究員(IMBCC, Institute for Cellular and Molecular Biology of Cancer Research Center)，專精於癌症免疫學。至 2013 年，發表了超過 525 篇原創論文，其論文被引述超過 10,000 次以上，Hirsch index 為 49。

Euroflow

在 2005 年之前，全世界並沒有一個組織將流式細胞操作技術標準化、對於抗體的選擇沒有準則、缺乏新的抗體、抗體組合缺乏 oncoproteins、3 至 4 色的敏感度不佳以及資料分析耗時。因此，Euroflow 的目標為建立起流式細胞技術多色分析的標準化，其中包含了儀器的設定、抗體的選擇及開發新的分析軟體。對於血液惡性疾病的診斷及追蹤開發出 screen(4 管)及 full(6 類共 29 管)的抗體組合。利用這些組合來回答臨床所遇到的問題。

流式細胞儀機器條件設定及檢體處理之標準化文件可參閱 Euroflow(<http://www.euroflow.org/>)網站。

Screen Tube

包含了 A LOT (Acute Leukemia Oriented Tube)、LST (Lymphocyte Screen Tube)、PCST(Plasma Cell Screen Tube)及(SST (Small Sample Tube)。

A LOT

Pac Blue	Pac Orange	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PE Cy7	APC	APC H7
cyCD3	CD45	cyMPO	cyCD79a	CD34	CD19	CD7	smCD3

臨床上主要用來回答疑似白血病、無法解釋的血球低下、單核球持續增多以及無法解釋的嗜伊紅性白血球增多。對白血病來說，可藉由 A LOT 來區別急性骨髓性白血病、急性淋巴性白血病或是混和型急性白血病。

LST

Pac Blue	Pac Orange	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PE Cy7	APC	APC H7
CD20-CD4	CD45	CD8-Smlg λ	CD56-Smlg κ	CD5	CD19-TCR γ δ	SmCD3	CD38

臨床上主要用來回答無法解釋的血球低下、無法解釋的嗜伊紅性白血球增多及出現非典型淋巴球、脾臟或淋巴結腫大及 monoclonal。此管加入 12 種抗體，可由單一管抗體組合獲得 B 細胞分型、T 細胞分型、自然殺手細胞、漿細胞以及非血液來源之細胞資訊。

PCST

Pac Blue	Pac Orange	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PE Cy7	APC	APC H7
CD45	CD138	CD38	CD56	CD27	CD19	CyIg κ	CyIg λ

臨床上主要用來回答出現單一免疫抗體增多、骨髓漿細胞增多及 B 細胞出現 clone 問題。

SST

Pac Blue	Pac Orange	FITC	PE	PerCP Cy5.5	PE Cy7	APC	APC H7
CD20	CD45	CD8-Smlg λ	CD56-Smlg κ	CD4	CD19	CD3-CD14	CD38

臨床上主要用來處理少量檢體的情形，包括腦脊髓液、淋巴抽吸及腫瘤抽吸。

AML/MDS

Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	HLADR	CD45	CD16	CD13	CD34	CD117	CD11b	CD10
2	HLADR	CD45	CD35	CD64	CD34	CD117	CD300e	CD14
3	HLADR	CD45	CD36	CD105	CD34	CD117	CD33	CD71
4	HLADR	CD45	NuTdT	CD56	CD34	CD117	CD7	CD19
5	HLADR	CD45	CD15	NG2	CD34	CD117	CD22	CD38
6	HLADR	CD45	CD42a and CD61	CD203c	CD34	CD117	CD123	CD4
7	HLADR	CD45	CD41	CD25	CD34	CD117	CD42b	CD9

Tube1：用來鑑定顆粒球分化

Tube2：用來鑑定單核球分化

Tube3：用來鑑定紅血球分化

Tube4 及 Tube5：用來看抗原跳脫表現及預後

Tube6：用來鑑定血小板分化及區分嗜鹼性白血球及樹突細胞

Tube7：用來鑑定血小板分化

BCP-ALL

Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CD20	CD45	CD58	CD66c	CD34	CD19	CD10	CD38
								APCC750
2	Smlgk	CD45	Cylgμ	CD33	CD34	CD19	SmlgM and CD117	Smlgλ
								APCH7
3	CD9	CD45	NuTdT	CD13	CD34	CD19	CD22	CD24
4	CD21	CD45	CD15 and CD65	NG2	CD34	CD19	CD123	CD81

Tube1：用來診斷及急性 B 細胞白血病的分類、偵測血癌細胞相關抗原表現以及與分子生物學相關之抗原。

Tube2：用來診斷及急性 B 細胞白血病的分類。

Tube3：用來診斷及急性 B 細胞白血病的分類、偵測血癌細胞相關抗原表現以及與分子生物學相關之抗原。

Tube4：用來分類急性 B 細胞白血病、偵測血癌細胞相關抗原表現以及與分子生物學相關之抗原。

T-ALL

Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CyCD3	CD45	NuTdT	CD99	CD5	CD10	CD1a	SmCD3
2	CyCD3	CD45	CD2	CD117	CD4	CD8	CD7	SmCD3
3	CyCD3	CD45	TCR $\gamma\delta$	TCR $\alpha\beta$	CD33	CD56	CyTCR β	SmCD3
4	CyCD3	CD45	CD44	CD13	HLADR	CD45RA	CD123	SmCD3

Tube1：用來診斷並分類急性 T 細胞白血病、T 細胞分化成熟過程以及血癌相關抗原表現。

Tube2：用來診斷並分類急性 T 細胞白血病、T 細胞分化成熟過程以及血癌相關抗原表現。

Tube3：用來診斷並分類急性 T 細胞白血病、T 細胞分化成熟過程以及血癌相關抗原表現。

Tube4：用來分類急性 T 細胞白血病。

B-CLPD

Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CD20 and CD4	CD45	CD8 and Smlg λ	CD56 and Smlg κ	CD5	CD19 and TCR $\gamma\delta$	SmCD3	CD38
2	CD20	CD45	CD23	CD10	CD79b	CD19	CD200	CD43
3	CD20	CD45	CD31	CD305	CD11c	CD19	SmlgM	CD81
4	CD20	CD45	CD103	CD95	CD22	CD19	CD185	CD49d
5	CD20	CD45	CD62L	CD39	HLADR	CD19	CD27	

Tube1：篩選管，用來診斷慢性淋巴增生疾病。

Tube2：用來區分慢性淋巴性白血病及其他 B 細胞慢性淋巴增生疾病。

Tube3-tube5：用來加以區分非-慢性淋巴性白血病，如：Hairy Cell Leukemia, Mantle Cell Leukemia, Follicular Lymphoma, Marginal Zone Lymphoma, Lymphoplasmacytic lymphoma 及 Diffuse Large B-cell Lymphoma.

T-CLPD

Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPCy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CD4	CD45	CD7	CD26	SmCD3	CD2	CD28	CD8
2	CD4	CD45	CD27	CD197	SmCD3	CD45RO	CD45RA	CD8
3	CD4	CD45	CD5	CD25	SmCD3	HLADR	CyTcL1	CD8
4	CD4	CD45	CD57	CD30	SmCD3		CD11c	CD8
5	CD4	CD45	CyPerforin	CyGranzyme B	SmCD3	CD16	CD94	CD8
6	CD4	CD45		CD279	SmCD3			CD8

- Tube1：用來診斷 Sézary syndrome。
- Tube2：用來鑑別 T 細胞成熟分化。
- Tube3：用來診斷前 T 細胞慢性淋巴性白血病。
- Tube4：用來診斷 Anaplastic T-cell Lymphoma。
- Tube5：用來診斷 T-Large Granulated Lymphoma。
- Tube6：用來診斷 Angioimmunoblastic T-cell lymphoma。

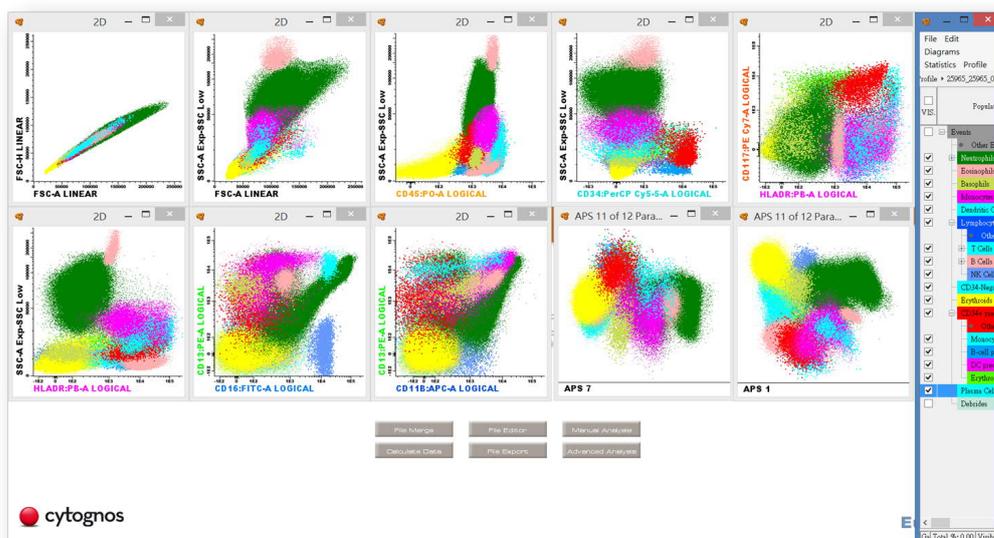
NK-CLPD

Tube	PacB	PacO	FITC	PE	PerCPy5.5	PECy7	APC	APCH7
1	CD2	CD45	CD7	CD26	SmCD3	CD56	CD5	CD19
2	CD16	CD45	CD57	CD25	SmCD3	CD56	CD11c	CD19
3	HLADR	CD45	CyPerforin	CyGranzyme B	SmCD3	CD56	CD94	CD19

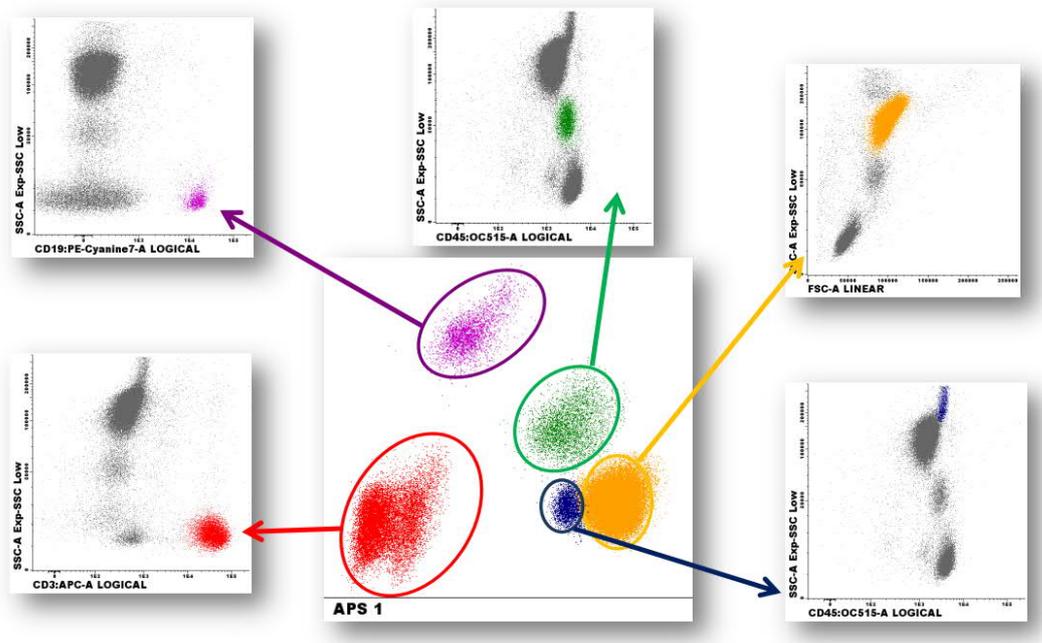
Tube1-tube3：偵測自然殺手細胞跳脫表現之抗原。

分析軟體 Infinicyt 具有下列特色：

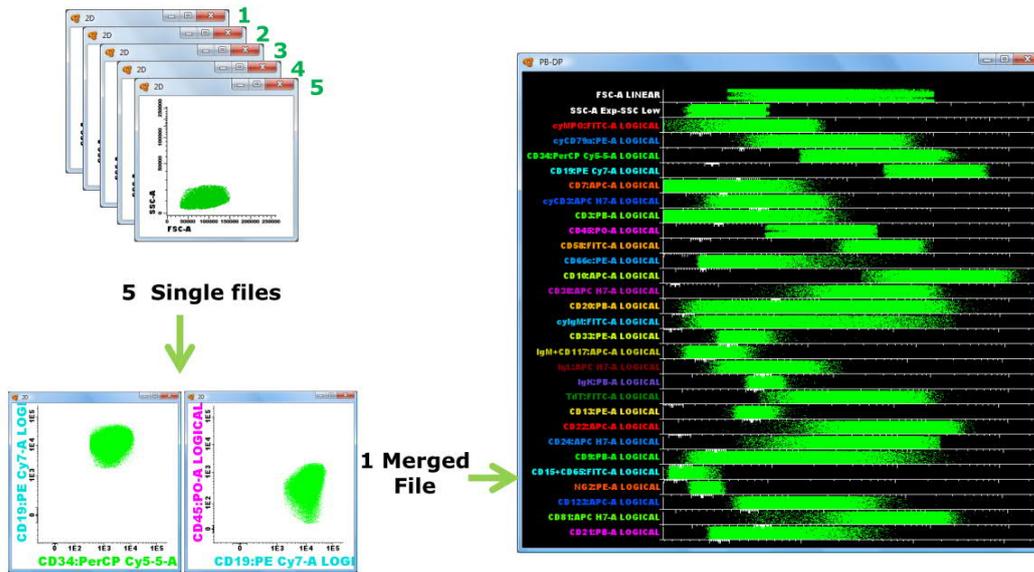
1. 簡潔的分析畫面



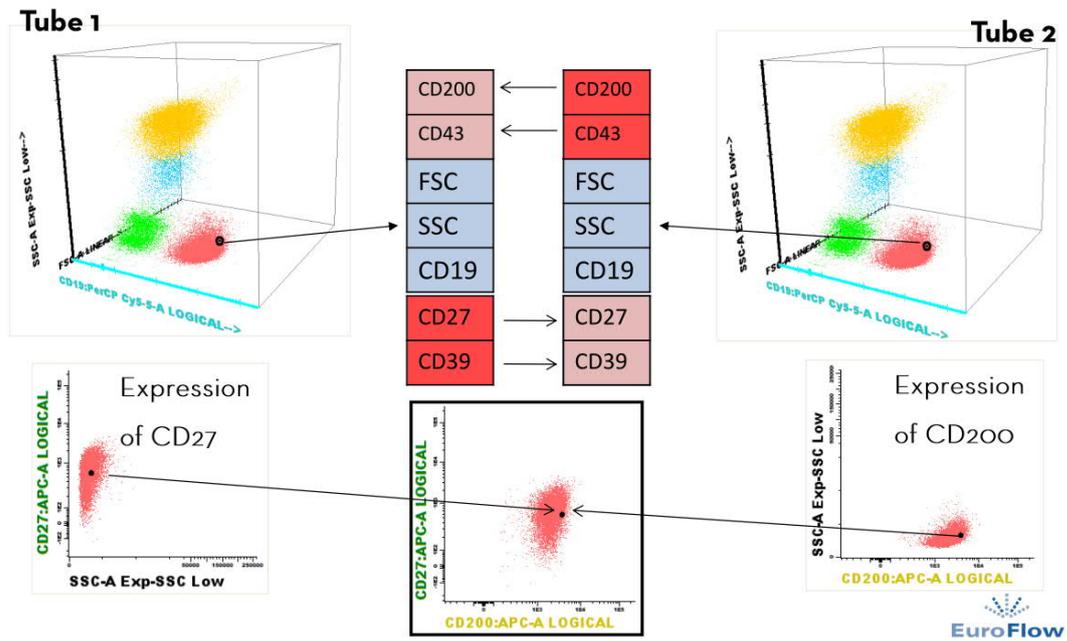
2. 自動分群系統



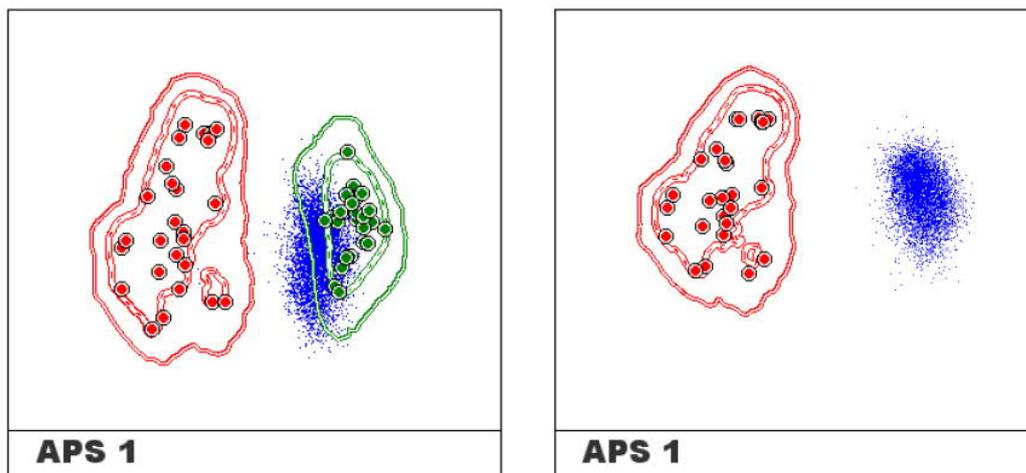
3. 檔案融合功能



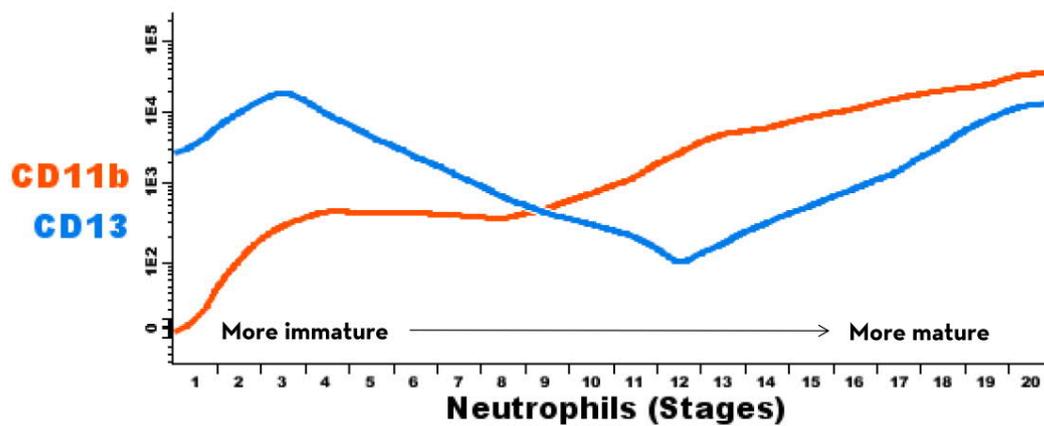
4. 計算資料功能



5. 資料庫比較功能



6. 血球成熟工具



三、心得

在還沒到西班牙進修前，原先以為課程約只需三個月即可。但在 Prof. Orfao 及實驗室的研究員安排一系列流式細胞技術課程之後，完全改觀。Prof. Orfao 實驗室包含了基礎研究的抗體研發及測試，以及臨床應用，無隔閡的將基礎研究推至臨床。Prof. Orfao 實驗室成員 40 人，每一位研究員專精於 1 到 2 種疾病或致力於抗體之開發，採團隊運作，每個研究員互相分享資訊，為達成目標共同努力著。在教學部分，Prof. Orfao 實驗室接納來自世界各國的人員，無償及無私的分享研究成果。在進修的 6 個月當中，就有來自南非的教授，南美洲的阿根廷、哥倫比亞及委瑞內拉，北美的加拿大，及歐洲的葡萄牙、希臘及克羅埃西亞等來此進修。所有的教學過程中，老師們一定先從血球正常分化開始介紹起，在進到疾病部分。在研讀 Prof. Orfao 實驗室發表的論文也發現到，實驗室所做的領域並非僅限於血液腫瘤，而是利用流式細胞技術的平台跨科合作，如與免疫風濕科合作探討自體免疫疾病與 T 細胞間的關係。也因為我是第一位亞洲國家到此實驗室進修，而且不會講西班牙語，老師們也都能體諒，所有的教學課程幾乎都使用英語溝通。在西班牙的 6 個月中，除了專業知識的學習外，在這裡也看到了西班牙的生活態度，工作時努力工作，非工作時間必定將工作放下；頂尖實驗室的運作，強調分工合作、資訊交流及開放的心胸。

四、建議事項

1. 將現有儀器升級

科內目前 FACSCanto II 僅擁有 2 支雷射，做多分析 6 色，現行以 3 至 4 色的抗體組合居多。若將儀器升級為 3 支雷射，便可分析 8 色。因現行流式細胞的分析是由臨床醫師開立採用何種抗體組合，常常整組抗體組合做完後才發現到是另一疾病，如，原先懷疑是急性骨髓型白血病，做完急性骨髓型白血病的抗體組合後才發現到是急性淋巴型白血病，此時又得要再做一次淋巴型的抗體組合。藉由更換成 Euroflow 的抗體組合，本科可在單一篩選管便可知道疾病的分型，之後再決定做何種抗體組合，可縮短臨床醫師診斷的時間及降低抗體成本。

2. 購買分析軟體

因多色系統資訊遠比 3 至 4 色系統多，需有功能強大且操作簡易地分析軟體。Infinicyt 是薩拉曼卡大學產官學的產物，Infinicyt 是由 Euroflow 組織與 Cytognos 公司共同開發出來的產物，完全是依照臨床醫師分析資料的需求設計。其精準度比現行科內的分析軟體來的敏感精準。

3. 跨部科合作

將 Euroflow 抗體組合介紹給相關部科，利用流式細胞技術的平台來做臨床的研究。