

中華醫事科技大學
機能性生醫產業研發碩士專班

碩士論文



聚合酶連鎖反應及流體細胞 TCR-V β 技術
運用於診斷 T 細胞顆粒性大淋巴球增生的
比較性研究

**A comparative clonality study using polymerase
chain reaction and flow cytometric V β
repertoire for T-cell large granular lymphocytic
lymphoproliferation**

研究生：謝炎娟

學號：D98010020

指導教授：姜泰安

中華民國 101 年 1 月

中華醫事科技大學
碩士班研究生

論文口試委員會審定書

機能性生醫產業研發碩士專班謝炎娟君所提之論文
聚合酶連鎖反應及流體細胞TCR-V β 技術運用於
診斷T細胞顆粒性大淋巴球增生的比較性研究
，經本委員會審議，符合碩士資格標準。

論文口試委員會 召集人 范世松 (簽章)
委員 李育賢 (簽章)
郭晉強 (簽章)
____ (簽章)
____ (簽章)
所長 _____ (簽章)

中華民國 100 年 12 月 23 日



中華醫事科技大學 碩士論文全文電子檔案上網授權書

本授權書所授權之論文全文電子檔案，為本人於中華醫事科技大學，撰寫之碩士學位論文。(以下請擇一勾選)

- 同意立即開放
- 同意一年後開放，原因是：_____
- 同意二年後開放，原因是：_____
- 同意三年後開放，原因是：準備論文發表

以非專屬、無償授權中華醫事科技大學圖書館和國家圖書館。基於推動「資源共享、互惠合作」之理念，於回饋本校與社會作為學術研究目的之用，得不限地域、時間與次數，以紙本、光碟、學位論文全文系統、網路或其他各種方法收錄、重製、與發行，或再授權他人以各種方法重製與利用，以提供讀者基於個人非營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印。

研究生：謝炎娟

論文名稱：聚合酶連鎖反應及流體細胞 TCR-V β 技術運用於診斷 T

細胞顆粒性大淋巴球增生的比較性研究

指導教授： 姜泰安

系所：機能性生醫產業研發碩士專班

學號：D98010020

日期：民國 101 年 1 月

備註：

1. 本授權書請填寫並以黑色筆親筆簽名後，裝訂於各紙本論文封面後之次頁。
2. 讀者基於非個人營利性質之線上檢索、閱覽、下載或列印上列論文，應依著作權法有關規定辦理。

中文摘要

顆粒性大淋巴球 (large granular lymphocyte; LGL) 佔周邊血液單核細胞 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) 的10-15%。這些細胞是中到大型的淋巴球，細胞核偏到一邊，細胞質內有藍色顆粒。PBMC的LGL中有85%是CD3表面抗原陰性的自然殺手細胞 (natural killer cell)，另外15%是具CD3表面抗原的cytotoxic T細胞。LGL數目升高可能是良性增生，也可能是白血病 (血癌)。藉由分析免疫表現型 (immunophenotype) 的異常表現 (aberrant immunophenotype) 和T細胞受器 (T-cell receptor; TCR) 的基因重組 (gene rearrangement) 可鑑別診斷良性T細胞 LGL細胞增生或T細胞 LGL白血病 (T-LGL leukemia)。在本研究中，我們收集25個LGL淋巴球增生 (LGL lymphoproliferation) 的病例，有17個病例是T細胞LGL白血病 (T-LGL leukemia)，8個病例是T細胞LGL淋巴球增生 (reactive LGL lymphoproliferation)。在本研究中，我們用聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 法來分析TCR基因重組及flow cytometry (FC) 定量TCR-V β chain基因重組 (FC-V β repertoire)的表現，並比較PCR及FC-V β repertoire 此二種技術的敏感度和特異性。分析結果顯示PCR技術的敏感度為94% (16/17)，特異性為75% (6/8)，陽性預測值(positive predictive value; PPV)為89%，陰性預測值 (negative predictive value; NPV)為86%。FC-V β repertoire技術的敏感度為 59% (10/17)，特異性為88% (7/8)，PPV為91%，NPV 為50%。這項研究發現PCR的敏感度優於FC-V β repertoire技術，但是FC-V β repertoire 的特異性優於PCR技術。此二種技術有互補作用,有助於臨床診斷LGL淋巴球增生 (LGL lymphoproliferation) 的病例。

關鍵詞：顆粒性大淋巴球, T細胞受器, 聚合酶連鎖反應, 白血病, 淋巴球增生,

英文摘要

Large granular lymphocytes (LGLs) are medium to large-sized lymphocytes with abundant cytoplasm, eccentric nuclei and presence of azurophilic cytoplasmic granules. These LGL cells account for 10-15% of peripheral blood mononuclear cells (PBMC); 85% of these cells are surface CD3-negative natural killer (NK) cells and 15% are surface CD3-positive cytotoxic T-cells. Increased LGL in peripheral blood might be reactive or neoplastic; and the differential diagnosis between benign and neoplastic could be achieved by determination of immunophenotypic aberrancy and/or polymerase chain reactive (PCR)-based clonality assay of the T-cell receptor (TCR) gene rearrangement. In this study, we collected the specimens from 25 patients with increased LGL count (or LGL lymphoproliferation) including 17 cases of T-cell LGL leukemia and 8 cases of reactive LGL lymphoproliferation. We compared the diagnostic sensitivity and specificity of PCR-based clonality study and flow cytometric immunophenotyping with TCR-V β repertoire (FC-V β repertoire). We found that PCR-based clonality assay had a high sensitivity for detecting T-LGL leukemia (16/17 cases; 94%) and a modest specificity (6/8 cases; 75%). The positive predictive value (PPV) was 89% and negative predictive value (NPV) was 86%. On the other hand, the sensitivity of FC-V β repertoire was lower at 59% (10/17 cases), but the specificity was relatively high at 88% (7/8 cases). The PPV and NPV of FC-V β repertoire were 91% and 50%, respectively. Our study showed that PCR-based clonality study was more sensitive but less specific than FC-V β repertoire for the diagnosis of T-cell LGL leukemia. These two techniques are supplemental to each other and are useful for diagnosis.

Key Words: clonality; immunophenotypic aberrancy, large granular lymphocytes, lymphoproliferation, polymerase chain reactive.

誌謝:

此論文的完成，首先要感謝兩位恩師姜泰安教授及莊世松副教授這二年竭盡心力的指導，才能讓我順利完成碩士班訓練過程，另則也相當感謝黃昭祥老師、楊堉麟老師及張文騰老師在多次進度報告中給予正向及重要建議，方使此次論文更加充實而有證據力。

我目前服務於奇美醫院病理部的醫檢師，二年前開始進修碩士班，除了臨床繁重壓力外，還要面對課業問題，體力上似乎有點吃力。但要感謝在這段時間前病理部楊義爵技術主任不時打氣及鼓勵，才能讓我有堅強的意志力，克服一切困難。再者也要感謝醫院德政，由於院方設置醫學研究部，才能讓我有幸申請到研究經費(計畫編號：CMFHR9958)，在我實驗過程中有充足的試劑耗材來完成一系列的實驗。

在病理部血液組實驗室，經常受到莊世松醫師的指導及解惑，更要感謝組內同事如心怡、倚君、雅雪、淑文、慧如等；在這段時間有她們的陪伴、支持及相互勉勵才能度過這艱難日子。也要感謝血液病理實驗室的思昕更是最大幫手，謝謝她在 PCR 技術上協助，讓我們順利完成實驗。

最後感謝我的家人；我的父母，他們是我從小到大整個求學過程中重要人，沒有他們就沒有今天的我，雖然父親已經不在了，我還是要將此榮耀完全歸功於我的雙親。三姐炎華更是我精神的支持者，而弟弟宜璋能將家裡照顧無微不至，讓我能夠將心思全部放在課業上，順利完成學業。最後要感謝曾經幫助過我的人，謝謝你們。

目 錄

口試委員會審定書

授權書

中文摘要.....iii

英文摘要.....iv

誌謝.....vi

第一章 緒論.....1

第一節 研究背景介紹1

第二節 血液學特徵(Hematologic features).....2

第三節 臨床表現(Clinical Presentation)3

第四節 細胞免疫分型(immunophenotype) 3

第五節 單源性(Clonality) 4

第六節 自體免疫疾病(Autoimmune Disorders) 5

第七節 相關疾病.....5

第八節 研究動機.....6

第二章 材料與方法8

第一節 檢體來源8

1-1 病患來源與檢體採檢.....8

1-2 細胞分離與配置細胞懸浮液8

第二節 實驗方法..... 9

2-1 流式細胞儀免疫分型(FC immunophenotype)及 TCR Vb repertoires
分析.....9

2-1.1 T 細胞免疫分型(T-cell immunophenotype)	9
2-1.2 TCR-V β repertoires 分析	10
2-1.3 流式細胞分析儀細胞圈選及分析	11
2-1.4 TCR-V β 表型分析	12
2-2 T 細胞受器 (T-cell receptor; TCR) 的基因重組 (gene rearrangement)分析.....	12
2-2.1 抽取 DNA 使用 QIAamp DNA Blood Mini Ki.....	12
2-2.2 TCR-G conventional PC	13
2-2.3 TCR BIOMED2 PCR	14
第三節 統計方法	14
第三章 結果	15
第一節 病患實驗室數據.....	15
第二節 T-LGL 免疫分型異常表現(immunophenotypic aberrancy)數據	16
第三節 流式細胞分析 TCR V β repertoires 及 T 細胞受器的基因重組分析數據	16
第四章 討論	18
第五章 結論	21
參考文獻.....	22
附錄	25

表目錄

表 1-1：顆粒大型淋巴球白血病疾病分類及臨床病理特徵

表 2-1：V β repertoire 抗體組合

表 3-1：顯示 17 個病例 T 細胞 LGL 白血病臨床特徵及 PCRPCR 和 flow cytometric V β repertoire 分析

表 3-2：顯示 T 細胞 LGL 白血病與 T 細胞 LGL 或 NK 細胞淋巴球增生的臨床的特徵

表 3-3：顯示 17 個病例 T 細胞 LGL 白血病免疫分型(immunophenotype)表現

表 3-4：顯示 T 細胞 LGL 白血病和 T 細胞 LGL 或 NK 細胞淋巴細胞增生的 T 細胞抗原表現

圖目錄

圖 1-1：週邊血液抹片顆粒性大淋巴細胞(large granular lymphocyte; LGL) 型態

圖 1-2：顆粒性大淋巴細胞(large granular lymphocyte; LGL)疾病分類根據細胞單源性及生物特性

圖 2-1：A 圖顯示正常健康人檢體流式細胞儀分析 $V\beta$ repertoire 結果的圖型

B 圖以直方圖顯示正常健康人檢體流式細胞儀分析 $V\beta$ repertoire 結果

圖 3-1：顯示 T 細胞 LGL 白血病 1 號患者流式細胞儀分析 $V\beta$ repertoire 結果的圖型

$V\beta$ repertoire 結果該病患表現 $V\beta 3$ 單源性(clonal)的腫瘤細胞

圖 3-2：以直方圖顯示 T 細胞 LGL 白血病 1 號患者流式細胞儀分析 $V\beta$ repertoire 結果，結果表現 $V\beta 3$ 單源性(clonal)腫瘤細胞

圖 3-3：顯示 PCR 檢測 T 淋巴球細胞受體 gamma 鏈之單源性結果

圖 3-4：顯示 T 細胞 LGL 白血病 16 號患者流式細胞儀分析 $V\beta$ repertoire 結果的圖型

圖 3-5：顯示 T 細胞 LGL 白血病 16 號患者流式細胞儀分析 $V\beta$ repertoire 結果的圖型

圖 3-6：顯示 T 細胞 LGL 白血病 1 號患者流式細胞儀分析免疫分型結果的圖型

第一章緒論

第一節 研究背景介紹

細胞質內具有顆粒的大型淋巴細胞 (large granular lymphocyte; LGL) 是中到大型的淋巴球，細胞核偏到一邊，細胞質內有嗜天藍色顆粒【圖 1-1】。這類白血球細胞佔週邊血液單核細胞的 10-15%。LGL 中有 85%是不表現 CD3 表面抗原的自然殺手細胞 (natural killer [NK] cell)，其毒殺細胞能力是屬於先天性的免疫系統。另外 15%是具 CD3 表面抗原的殺手型 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL)。(Lamy and Loughran, 2003) 週邊血液中具顆粒大型淋巴細胞(LGL)的數目升高可能是良性增生，也可能是白血病(血癌)。良性增生 LGL 細胞增生可包含病毒感染，類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis)和其他與自體免疫相關疾病，及幹細胞(stem cell)移植或器官移植造成的增生反應。(Rose and Berliner, 2004)

在 1985 年時具顆粒大型淋巴細胞血白血病 (LGL leukemia) 首次被確認是一種單源性 (monoclonal) 的疾病。在 1993 年時的研究確立這些顆粒大型淋巴細胞白血病 (LGL leukemia) 可分為自然殺手細胞 (NK-cell leukemia) 及 T 細胞白血病 (T-LGL leukemia)，並且其病程可能是低惡性度 (indolent) 或是高惡性度 (aggressive)【圖 1-2】。依照 2008 年第四版世界衛生組織(WHO)淋巴腫瘤分類，LGL leukemia 包含 T 細胞 LGL 白血病及高惡性度的 NK 細胞白血病 (NK-cell leukemia)【表 1-1】。但是仍有些罕見高惡性度變異型 T 細胞 LGL 血病案例被報告。(Gentile et al., 1994)這些變異亞型在世界衛生組織分類中是被獨立出來。

T 細胞大顆粒淋巴細胞白血病 (T-LGL leukemia)是一種罕見的成熟 T 細胞白血病。T 細胞 LGL 白血病的定義是 T 細胞大顆粒淋巴細胞(T-LGL)單源性的

增生。LGL 細胞增生數目可介於 $2.0-20 \times 10^9/L$ 。(Feng et al., 2010) 在週邊血液中 LGL 細胞數目需持續 6 個月是大於或等於 $2.0 \times 10^9/L$ 。(O'Malley, 2007) T-LGL 白血病好發於老年人，平均年齡為 60 歲。此疾病是屬於低惡性度，而且在早期是沒有任何症狀。在臨床常見的表現有發燒，反覆感染，體重減輕和中度脾臟腫大。(Herling et al., 2004) 大約有 60%-80% 的病患在早期診斷時就出現中性球細胞減少(neutropenia)。(Rose and Berliner, 2004) T-LGL leukemia 也會出現骨髓浸潤 (bone marrow infiltration)，但是在骨髓切片要辨識血球型態是非常困難，極少數的會出現淋巴結腫大的症狀。(Morice et al., 2002)

高惡性度的 NK 細胞白血病是屬於一種急性疾病，會出現 B 症狀，淋巴球增生，肝脾腫大，淋巴結腫大，嚴重貧血及血小板減少。(Ruskova et al., 2004) 慢性 NK 細胞淋巴球增生是屬於低惡性度且預後良好的疾病。只有少數的病例會有細胞減少，周圍神經病變及脾腫大的臨床表現。(Rabbani et al., 1999)

第二節 血液學特徵 (Hematologic features)

週邊血液 LGL 細胞數目正常值為 $0.2-0.4 \times 10^9/L$ 。週邊血液 LGL 計數是診斷 LGL 白血病重要的依據。先前的研究顯示有 90% 的 T 細胞 LGL 白血病患者 LGL 細胞計數都大於 $1.0 \times 10^9/L$ (Lamy Cancer Control 1998;5:25-33)。最早診斷 T 細胞 LGL 白血病 LGL 絕對數值計數需大於 $2.0 \times 10^9/L$ 。(Loughran, 1993) 超過 80% 的患者 LGL 細胞數介於 $2.0-10.0 \times 10^9/L$ ，所以需檢視週邊血液抹片正常淋巴球數目表現淋巴球減少症(Lymphocytopenia)。最近研究顯示有 25-30% T 細胞 LGL 白血病患者出現中性顆粒球細胞絕對數值計數小於 $0.5 \times 10^9/L$ 。(Rabbani et al., 1999)

雖然 LGL 細胞數目小於 500/uL 仍可使用新技術來偵測細胞單源性。(Semenzato et al., 1997) LGL 細胞由特殊形態及免疫分型來確認。當細

胞型態學有異常表現，如 LGL 細胞中細胞質缺少顆粒或核膜外形不規則，我們仍可利用免疫分型來確認 LGL 細胞。除此之外應注意是否與自體免疫疾病相關聯。大多數患者會有嗜中性球減少，而導致病患容易反覆感染。(Lamy and Loughran, 2003) 一般在 LGL 白血病的病患只會出現輕度血小板減少症。大約 19-36% 病患有血小板減少症但不需要輸注血小板。LGL 白血病病患很少會出現嚴重型血小減少症 ($20-30 \times 10^9/L$)。(Lamy and Loughran, 2003) 當原發性血小板紫癥症 (Idiopathic thrombocytopenic purpura; ITP) 發生在 T 細胞 LGL 白血病，其骨髓中血小板母細胞 (Megakaryocytes) 和血小板抗體都會增加，然而這些患者常伴隨有脾臟腫大。

第三節 臨床表現 (Clinical Presentation)

有三分之二的低惡性度 T-LGL 白血病患者會出現血球細胞減少，反覆的細菌性感染，自體免疫性疾病及脾臟腫大。由於中性球細胞減少 (neutropenia) 導致 20-40% 病患出現經常性感染。有 20-40% 患者會出現 B 症狀 (B symptoms) 包含發燒，盜汗及體重減低。20-50% 患者會出現輕度至中度的脾臟腫大。有 10-20% 患者出現肝腫大。(Osuji et al., 2005) 淋巴結腫大則是非常罕見。有 30% 病患會出現自體免疫疾病中最常見的類風濕性關節炎 (Rheumatoid arthritis)。(Lamy and Loughran, 2003)

第四節 細胞免疫分型 (Immunophenotype)

LGL 白血病會表現成熟 T 細胞或 NK 細胞的免疫型。LGL 白血病每一種疾病的免疫分型描述於【表 1-1】。在典型 T 細胞 LGL 白血病中 cytotoxic T 細胞的免疫分型是表現 CD3, CD5, CD8, CD16, CD57, TIA-1, granzyme M, granzyme B 及 TCR α/β 。有些罕見案例是表現 CD4 (Lima Am j Pathol 2003;163;763-71)。通常會有免疫分型異常表現 (immunophenotypic

aberrancy)。在 80%的病例中發現 CD5 及 CD7 有可能不表現或是表現減弱 (Lundell Am J Clin Pathol 2005; 124:937-46)。在 T 細胞 LGL 白血病有些罕見變異免疫分型(immunophenotypic aberrancy)如 CD3+ TCR α/β CD4+ CD8+，CD3+ TCR α/β CD4- CD8-，CD3+ TCR α/β CD4+ CD8- 及 CD3+ TCR γ/δ CD4- CD8-都是異常表現。(Sokol and Loughran, 2006)在高惡性度 NK 細胞白血病中 NK 細胞是表現 CD56。(Loughran, 1999)

第五節 單源性(Clonality)

LGL 白血病是成熟 T 細胞或 NK 細胞的疾病。T 細胞成熟的過程要經過 T 細胞受器 (T cell receptor; TCR) 基因重組 (gene rearrangement)。由於基因重組使得每個 T 細胞產生一個獨特的分子指紋(molecular fingerprint)。然而在 LGL 白血病，腫瘤 LGL 細胞是來自單一腫瘤細胞所以會具有相同的 TCR 基因重組，即這些腫瘤 LGL 細胞是單源性的 (monoclonal)。目前最常使用南方墨點法(Southern blotting)及聚合酶反應(polymerase chain reaction; PCR)兩種方法來檢測細胞單源性(Clonality)。(Ryan et al., 1997) 近年有學者發現一種確認細胞單株性(monoclonality)的分析法，就是利用 flow cytometry 定量 TCR V β -chain 基因重組 (FC-V β repertoire)的表現。定量 24 種不同的 TCR-V β 的特殊性，涵蓋約 70%的正常人 TCR-V β repertoire。(van den Beemd et al., 2000)

抗原受體基因的重組發生在 T 及 B 淋巴球的個體生成期。其抗原受體基因 (TCR gene 及 Immunoglobulin (Ig) gene)通過基因重組而形成有功能的基因。這種重組產物對於每各淋巴球皆具有獨特性，可以應用分子生物學的方式通過檢測抗原受體基因位點上獨特的 V-J 區域基因重排來鑑別不同來源的淋巴球。檢測 TCR 基因重組可以用傳統的引子 (primers)，其敏感性約 60-70%。(McCarthy et al., 1992) BIOMED-2 是一種新的檢測方法，是使用多

條引子針對 T 淋巴球細胞受體的 γ 及 δ 鏈以及 B 淋巴球細胞受體的重鏈 (Immunoglobulin heavy chain; *IGH*) 及輕鏈 (κ 及 λ ; *IGK* and *IGL*) 進行檢測分析。(van Dongen et al., 2003; van Krieken et al., 2007) 這個標準化的方法已經是全球公認最詳盡的 B 及 T 淋巴球細胞受體單源性的檢測法。但 BIOMED-2 的引子很貴。我們先前的研究發現在偵測 TCR 受器基因重組時，若使用傳統引子及 BIOMED-2 的 TCR- γ 引子可得到很高的偵測率，而且在費用上也較為便宜。(Kuo et al., 2011)

第六節 自體免疫疾病 (Autoimmune Disorders)

根據文獻報導 T 細胞 LGL 白血病的病患中，約 40-60% 的患者會合併表現出免疫異常。免疫異常疾病呈現出的血清學陽性檢驗項目包含類風濕性因子 (rheumatoid factor; RF)，抗核抗體 (antinuclear antibodies; ANAs)，多單源性丙種球蛋白血症 (polyclonal hypergammaglobulinemia)，免疫複合物 (circulating immune complexes) 及抗嗜中性顆粒抗體 (antineutrophil antibodies)。(Loughran, 1993) 由於 B 細胞功能失調結果而導致出現惡性毒殺性淋巴球(cytotoxic CD8+)的機轉尚未清楚。(Bassan et al., 1989) 在 T 細胞 LGL 白血病中，自體免疫性疾病最常見是類風濕關節(rheumatoid arthritis; RA)，大約出現於有 25-33% 病患。(Lamy and Loughran, 1998) 至於高惡性度的 NK 細胞白血病與自體免疫性疾病沒有關聯。(Lamy and Loughran, 2003)

第七節 相關疾病

文獻指出與 T 細胞 LGL 白血病相關疾病種類繁多，主要都是自體免疫性疾病。如類風性關節炎，紅斑性狼瘡 (Systemic lupus erythematosus)，紅血球再生不良(Pure red cell aplasia)，原發性血小板紫癥 (Immune

thrombocytopenic purpura) 等等都屬於自體免疫性疾病。而與血液相關疾病如多發性骨髓瘤，夜間陣發性血色素尿 (Paroxysmal nocturnal hemoglobinemia)，再生不良性貧血 (Aplastic anemia)，急性白血病，B 細胞淋巴球增生相關疾病等等。(Go et al., 2003; Lamy and Loughran, 2003) T 細胞 LGL 白血病會引起紅血球再生不良，其致病機轉可能和 T 淋巴球或是 NK 細胞的毒殺 (cytotoxicity) 有關。LGL 經由抗紅血球母細胞(erythroblast)導致細胞崩解途徑有下列三種: 1.藉由 T 細胞受器來辨識紅血球母細胞上的受器。2.靠抗紅血球母細胞抗體，而與 LGL 細胞上 CD16 結合。3.當正常細胞表現 HLA class I 給 NK 的受器時，可傳遞訊息用來抑制內部的溶解作用，而免於被 NK 細胞殺死。有問題的紅血球母細胞因為失去 HLA class I 的表現，所以無法傳遞訊息給 LGLs 的 NK 細胞上的受器，而遭受到破壞。(Sokol and Loughran, 2006)

第八節 研究動機

以提供單源性 (monoclonality) 的證據來確立診斷 T 細胞 LGL 白血病 (T-LGL leukemia)。目前確認細胞的單源性有多種技術，包含限制酶片段長度多型性 (restriction fragment length polymorphism; RFLP) 的 TCR V β 基因檢測與南方墨點法(Southern blot)，聚合酶鏈鎖反應 (PCR) 的 T 細胞受器基因重組 (TCR gene rearrangement)和反轉錄聚合酶鏈鎖反應 PCR (RT-PCR) 分析 V β repertoire 來作為診斷 T 細胞惡性腫瘤。最近也發現一個確認 T 細胞單株性(monoclonality)的分析，就是利用 flow cytometry 定量 TCR V β -chain 基因重組 (FC-V β repertoire)的表現。隨著醫療技術的與日俱進，流式細胞技術已經成為診斷白血病/淋巴瘤(leukemia/lymphoma)及骨髓異常增生不良症候群(myelodysplastic syndrome)不可或缺的重要工具，而流式細胞分析儀是臨床實驗室隨手可得的工具之一。本研究的目的是要探討能否將它應用於臨床鑑

別診斷 T 細胞 LGL 白血病 (T-LGL leukemia) 或良性細胞增生，並與 PCR 方法偵測 TCR 基因重組做比較。

第二章材料與方法

第一節 檢體來源

1-1 病患來源與檢體採檢

我們分析奇美醫學中心於 2009 年 7 月至 2011 年 10 月在病理血液實驗室中有 T 細胞大顆粒性淋巴球 (T-cell large granular lymphocyte; T-LGL) 增生的 25 例個案。T-LGL 增生定義是 LGL 細胞數目需大於 $0.5 \times 10^3/\text{ul}$ (LGL 細胞正常值 $0.3 \times 10^3/\text{ul}$)。檢體來源可用週邊血液及骨髓抽取液。週邊血液檢體是採集抽取 10ml 血液放入含有 EDTA 抗凝劑試管中混合均勻。骨髓液檢體是抽取 5-10ml 骨髓液放入含有 heparin 抗凝固劑試管中混合均勻。

1-2 細胞分離與配置細胞懸浮液

將週邊血液或骨髓液檢體以 Ficoll-Hypaque 比重梯度分離法，分離出單核細胞

- (1)將含有 Heparin 的 Bone marrow 檢體以 1 : 1 的比例和 RPMI (or DHEM) 混合，做成 suspension。
- (2)取一支乾淨的 tube，加入一份的 Ficoll-Hypaque。
- (3)將混合好的檢體混合液，沿試管壁緩慢加入含有 Ficoll-Hypaque 的 tube 中 (Sample : Ficoll-Hypaque 約 1 : 1)，若檢體混合液中含有小血塊 or fibrin 請先丟棄。
- (4)離心，2000rpm, 20-25 分鐘。
- (5)取 MNS 層至另一支 tube 中。
- (6)加入 PBS wash，離心，1500 rpm，10 分鐘。
- (7)倒掉上清液，再加入 PBS wash，離心，1500 rpm，5 分鐘。
- (8)重複 wash 步驟 3 次，直至上清液呈澄清狀。

(9)倒掉上清液，以 PBS 調細胞濃度，調至 $10\text{-}20 \times 10^3/\text{ul}$ ($1\text{-}2 \times 10^7/\text{ml}$)。

第二節 實驗方法

流體細胞技術是一個定量分析的技術。定量測量出一個細胞的群體,主要是依據細胞表面或細胞內的特殊標記物的數量。利用流液系統、光學系統、電子系統將複雜細胞的混合體中識別出某一個特定的細胞亞群。流式細胞儀基本組成是液流系統及光學系統電子系統。

- 1.液流系統 — 利用鞘液 (FACSFlow Sheath Fluid) 將細胞依序送至測量區受檢。
- 2.光學系統 — 利用雷射光源、透鏡、光柵、濾片與反射鏡等激發並收集細胞產生之螢光與散射光，並導至各探測器內。
- 3.電子系統 — (1)將探測器測到的光學訊號轉換為電子訊號。
(2)分析所輸出的電流訊號，以脈衝高度(H)、寬度(W)、積分面積(A)顯示。
(3)量化並放大訊號傳至電腦。

2-1 流式細胞儀免疫分型(flow cytometric [FC] immunophenotyping)及 TCR Vb repertoires 分析

2-1.1 T 細胞免疫分型(T-cell immunophenotype)

採用單株抗體為三色螢光抗體直接進行標記。以 CD45 (PerCP, BD 公司), 和傳統的 T 細胞和 NK 細胞相關抗原抗體如 CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD16, CD56, CD57, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$, CD25 (PE, FITC, BD 公司)。抗體組合如下：

- (1) IgG1-FITC + IgG1-PE + CD45- PerCP
- (2) CD7-FITC + CD2-PE + CD45- PerCP

- (3) CD3-FITC + CD4-PE + CD45- PerCP
- (4) CD8-FITC + CD3-PE + CD45- PerCP
- (5) CD16-FITC + CD3-PE + CD45- PerCP
- (6) CD56-FITC + CD3-PE + CD45-PerCP
- (7) CD57-FITC + CD3-PE + CD45- PerCP
- (8) TCR $\alpha\beta$ -FITC + CD3-PE + CD45- PerCP
- (9) TCR $\gamma\delta$ -FITC + CD3-PE + CD45- PerCP
- (10) CD3-FITC- CD25-PE + CD45- PerCP

染色步驟：取 50ul 細胞懸浮液(細胞濃度 $10-20 \times 10^3/\text{ul}$)加入 20ul 單株抗體混合均勻於室溫中避光染 15 分鐘，加入 PBS 清洗以轉速 1500rpm 離心 5 分鐘，倒掉上清液。再重覆以 PBS 清洗 2 次後上機分析。

2-1.2 TCR-V β repertoires 分析

利用四色螢光流式細胞分析 TCR V β repertoires，使用 IOtest Beta Mark TCR-V β Repertoire Kit (Beckman Coulter)。試劑套組包含 24 種已知單株抗體分裝成八瓶。每瓶包含了三種不同的抗體混合，抗體已事先用不同的螢光顏色(PE, FITC, PE+FITC)分別標示。抗體組合如表 2-1。本試劑是定量 24 種不同的 TCR V β 的特殊性，涵蓋約 70% 的正常人 TCR V β repertoire (圖 2-1)。所有分析均在 FACSCalibur 儀器操作 (BD 公司)。

染色步驟：

- (1) 取 10 支 Falcon tube，分別標上 Control 1、Control 2 和 A-H
- (2) 先將 Control 2 和 A-H 管各加入 $10 \mu\text{l}$ APC CD3
- (3) 從 Vial A 取 $20 \mu\text{l}$ 量 各加入 Control 1 和 A 管
- (4) 依序從 Vial B 取 $20 \mu\text{l}$ 量加入 B 管，從 Vial C 取 $20 \mu\text{l}$ 量加入 C

管，以此類推依序加到 H 管

- (5) 以上每加完 1 管後需更換新 Tip 以避免污染
- (6) 加入 100 μ l 已調好濃度的細胞至 Control 1、Control 2 和 A-H。每加完 1 管後需更換新 Tip 以避免污染
- (7) Mix，避光室溫下靜置 20 分鐘
- (8) 每管加入 3ml PBS Mix，1700rpm 離心、5 分鐘
- (9) 上清液丟棄，再加入 3ml PBS Mix，1700rpm 離心、5 分鐘
- (10) 上清液丟棄，加入 0.5ml 固定液 (0.5% formaldehyde)
- (11) 上機分析

(備註 Control 1 為 Negative Control、Control 2 為 Positive Control)

Tube	Reagent Mix
Control tube 1	20 μ L of vial A
Control tube 2	20 μ L of APC CD3
Test tube A	20 μ L of vial A + 10 μ L of APC CD3
Test tube B	20 μ L of vial B + 10 μ L of APC CD3
Test tube C	20 μ L of vial C + 10 μ L of APC CD3
Test tube D	20 μ L of vial D+ 10 μ L of APC CD3
Test tube E	20 μ L of vial E + 10 μ L of APC CD3
Test tube F	20 μ L of vial F+ 10 μ L of APC CD3
Test tube G	20 μ L of vial G+ 10 μ L of APC CD3
Test tube H	20 μ L of vial H+ 10 μ L of APC CD3

2-1.3 流式細胞分析儀細胞圈選及分析

淋巴球細胞表現抗原分析以 CD45 染色作為白血球細胞分型的依據,

配合側向散射光 (side scatter; SSC) 所表達的細胞顆粒亂度的特色, 區分 CD45 表現強及 SSC 表現低 (bright CD45 expressors/low SSC) 的淋巴球(R1). 再接著配合各式不同表面抗原的表現區別出不同的淋巴球次群。

2-1.4 TCR-V β 表型分析 (FC-V β repertoire)

配合四色表面抗原 CD3/CD4/CD8 的染色, 以及 TCRV β 表現型篩選試劑組染色作 T 細胞的表面受體的表型分析, 首先依據前向散射光(FSC) 所表達的細胞大小配合側向散射光 (SSC) 的特色, 區別出 FSC 較小且 SSC 表現低的淋巴球(R1), 接著, 在 CD3 vs. CD4 的二維點圖上呈現出淋巴球細胞資訊, 圈選出 CD3 及 CD4 或 CD8 雙染的右上角區域(R2), 此為 T 細胞, 接著在 TCR-V β 分型的圖型上呈現此 R2 區細胞, 並觀察各種表面受體的表型。

2-2 T 細胞受器(T-cell receptor; TCR) 的基因重組 (gene rearrangement)分析

2-2.1 抽取 DNA (使用 QIAamp DNA Blood Mini Kit)

- (1) 取 200 μ l 全血加入 20 μ l proteinase K+180 μ l AL 震盪及短暫離心 (spin down)
- (2) 靜置於 56°C 10 分鐘
- (3) 加入 200 μ l 的絕對酒精震盪及短暫離心 (spin down)
- (4) 將上述混合液體移置 Spin column。以 8,000 rpm 離心 1 min 後丟棄濾液收集管
- (5) 加入 500 μ l AW1。以 8,000 rpm 離心 1 分鐘後丟棄濾液收集管
- (6) 加入 500 μ l AW2。以 14,000 rpm 離心 3 分鐘後丟棄濾液收集管
- (7) 更換新的 1.5 mL 微量離心管加入 200 μ l Buffer AE, 置於室溫 1

分鐘，以 8,000 rpm 離心 1 min 後收集濾液 (DNA)

2-2.2 TCR- γ 鍊傳統 PCR 引子 (conventional PCR primers)

(1) 先配置 PCR 反應液，配置如下

H ₂ O	34.4 μ l
10x buffer	5 μ l
50mM MgCl ₂	1.5 μ l
10mM dNTP	4 μ l
Primer VrIII/IV	1 μ l
Primer VrI	1 μ l
Primer Jr1/2 or JPr1/2	2 μ l
Taq DNA polymerase (Invitrogen)	0.1 μ l
DNA	1 μ l

Primer 序列：

VrIII/IV : 5'-CTCACACTCYCACTTC-3'

VrI : 5'-TCTGGRGTCTATTACTGTGC-3'

JPr1/2 : 5'-GTTACTATGAGCYTAGTCC-3'

Jr1/2 : 5'-CAAGTGTTGTTCCACTGCC-3'

(2) 上述混合液混合均勻後，放入 PCR 反應槽進行反應。反應溫度為 95°C 45 秒，55°C 45 秒，72°C 90 秒。

(3) PCR 反應結束後進行 heteroduplex analysis；也就是 95°C 5 分鐘移至冰上(約 4°C)1 小時。

(4) 使用 10% PAGE 200V 1 小時進行電泳分析，利用 25bp marker (invitrogen) 進行比對分析。

2-2.3 TCR BIOMED2 PCR

(1) 置 PCR 混合液

BIOMED2 multiplex PCR master mixes buffer	2.5 μ l
Gold-Taq DNA polymerase (ABI)	0.13 μ l
DNA	1 μ l

(2) 將此混合液移置 PCR 反應槽進行反應

(3) PCR 反應結束後進行 heteroduplex analysis；也就是 95°C 5 分鐘移至冰上(約 4°C)1 小時。

(4) 電泳分析則是利用不同濃度的 PAGE，條件 200V 1 小時。利用 25bp marker (invitrogen) 進行比對分析。

第三節 統計方法

為了瞭解 T 細胞 LGL 白血病與 T 細胞 LGL 或 NK 細胞增生，於臨床特徵或實驗室數據，皆以平均值 \pm 標準誤差平均值(Mean \pm SEM)來表示之。本實驗以 Students *t*-test 作為資料分析之方法，比較不同疾病資料差異性，統計出之 *p* 值若小於 0.05 則表示有顯著差異。

第三章結果

第一節 病患實驗室數據

本研究收集 17 例 T 細胞 LGL 白血病和 8 例 T 細胞 LGL 或 NK 細胞增生。T 細胞 LGL 白血病的診斷包含週邊血液抹片細胞形態學，週邊循環血液內 T 細胞大顆粒性淋巴球(T-LGL)數量及免疫表現型，骨髓浸潤和單源性 T 細胞受器基因重組的分生證據外，還必須結合臨床症狀。

在 17 例 T 細胞 LGL 白血病中，在實驗室數據中發現有異常全套血球細胞計數 (complete blood count, CBC)，如血球細胞減少(cytopenia)，淋巴球增生(lymphocytosis)，中性顆粒球細胞減少(neutropenia)，血小板減少(thrombocytopenia)或貧血(anemia)【表 3-1】。在相關疾病中有 6 例(35%)是惡性腫瘤(包括 2 例慢性 B-細胞白血病，2 例直腸癌，皮膚癌及大腸癌各 1 例)，有 2 例是(12%)紅血球再生不良(pure red cell aplasia)，有 3 例自體免疫性疾病病史，其中有 1 例(6%)是類風濕性關節炎，EB 病毒感染有 2 例(12%)。實驗室數據顯示在 17 例 T 細胞 LGL 白血病患者有 9 例(53%)是明顯表現貧血(Hb < 10.5/g/dL)，有 7 例 (41%)表現嗜中性顆粒球細胞減少 (neutrophil < $1.5 \times 10^9/L$)，而且有 3 例(18%)是血小板減少(platelet < $100 \times 10^9/L$)，淋巴球增生(lymphocyte > $2.0 \times 10^9/L$)有 11 例(65%)，顆粒性淋巴球增生(large granular lymphocyte; LGL > $2.0 \times 10^9/L$)有 11 例(65%)，特別的是有 1 例淋巴球細胞數目小於 $1.0 \times 10^9/L$ 。

這兩大類疾病 (T 細胞大顆粒性淋巴球增生與 T 細胞大顆粒性淋巴球白血病) 在年齡層分佈(P=0.742)，白血球數目(P=0.204)，總淋巴球數目(P=0.742)與顆粒性淋巴球數目(P=0.194)方面沒有顯著差異。但是在血小板數目(P=0.001)則有顯著差異。T 細胞大顆粒性淋巴球白血病 (T-LGL leukemia) 患者較常有血小板低下【表 3-2】。

第二節 T-LGL 免疫分型異常表現(immunophenotypic aberrancy)數據

利用流式細胞分析儀執行所有病患血液檢體的免疫分型，在正常 T 細胞都會表現 CD2, CD3, CD4 或 CD8, CD5, CD7, TCR α/β 或 TCR γ/δ ，而 17 例 T-LGL 白血病患中有 14 例是表現 CD3+CD4-CD8+，有 2 例是表現 CD3+CD4+CD8-，另外 1 例的表現型是 CD3-CD4-CD8-【表 3-3】。所有 T-LGL 白血病的病患 TCR α/β 都表現陽性，而 TCR γ/δ 都是陰性。而在 T-LGL 白血病會有免疫分型異常的定義就是表現異常細胞標記或是遺失正常標記。最常表現免疫分型異常是遺失 CD5 的表現 (aberrant CD5 loss)。17 例 T 細胞 LGL 白血病中有 3 例遺失 CD5。第二種表現免疫分型異常是遺失 CD7 的表現 (aberrant CD7 loss)。17 例 T 細胞 LGL 白血病中有 2 例遺失 CD7。有 8 例表現 CD57, 有 3 例分別表現 CD56 及 CD16【表 3-4】。

第三節 流式細胞分析 FC-V β repertoires 及 T 細胞受器的基因重組分析數據

對 17 例 T 細胞 LGL 白血病血液檢體執行 TCR FC-V β repertoire 及 T 細胞受器的基因重組分析【表 3-1】。在 FC-V β repertoire 的分析若是只有一種抗體表現，而其他抗體量表現很低，則代表是單株性【圖 3-1】，以 Clonogram 來表示則如【圖 3-2】。PCR 偵測單株性的結果如【圖 3-3】。FC-V β repertoire 分析結果有 10 例是表現單株性 (monoclonal)，PCR 分析結果有 16 例是表現單株性(monoclonal)。分析結果顯示 PCR 技術的敏感度為 94% (16/17)，特異性為 75% (6/8)，陽性預測值(positive predictive value; PPV)為 89%，陰性預測值 (negative predictive value; NPV)為 86%。FC-V β repertoire 技術的敏感度為 59% (10/17)，特異性為 88% (7/8)，PPV 為 91%，NPV 為 50%。

本研究中第 16 號患者細胞免疫分型表現 C3+CD4+的異常表現，在 FC-V β repertoire 技術分析中需使用第 4 色(CD4-APC)將圈選表現 CD3+CD4+的細胞

分析 FC-V β repertoire 其結果顯示為單源性(clonal)腫瘤細胞【圖 3-4】。另外圈選 CD3+CD4-細胞分析 FC-V β repertoire 其結果顯示為非單源性 (Non-clonal)【圖 3-5】。一般 T 細胞 LGL 白血病在免疫分型都是表現 CD3+CD8+細胞，如此以來我們證實 CD3+CD4+細胞才是腫瘤細胞。因為表現 CD3+CD4+免疫分型的 T 細胞 LGL 白血病是非常罕見。

第四章討論

T-LGL 白血病是毒殺性 T 細胞單源性增生，這群腫瘤細胞可能也會表現 CD16，CD56 及 CD57。在 T-LGL 白血病的病例報告中無法使用細胞形態學診斷，因為絕大多數 T 細胞白血病的血癌細胞與正常的 LGL 在細胞型態上是一樣的沒有特別異常。需藉助免疫分型異常表現，而應用流式細胞儀可以用來辨識和定量 T-LGL 細胞中 CD16，CD56，CD57 的表現。所以突顯出流式細胞儀免疫分型在於 T-LGL 白血病診斷的重要性。(Lamy and Loughran, 2003) 在我們 T-LGL 白血病中大約有一半表現 CD57(8/14; 57%)，而這群腫瘤細胞只有部分表現 CD57 (partial expression)，與其他大規模的研究結果相似 (Morice Br J Haematol.2003;120:1026-1036)。由於在正常 T 細胞中，CD57 表現比 CD56 及 CD16 較高。(Morice et al., 2003) 當 CD57 陽性細胞升高時，不容易定義異常免疫分型，所以 CD16 和 CD56 做為 T-LGL 白血病標記可能較適當【圖 3-6】。本研究結果顯示表現 CD16 及 CD56 分別為 (3/14; 21% 及 3/16; 19%)，只有 CD56 表現與其他研究報告類似。(Lundell et al., 2005) 雖然只有少數會表現 CD56，只要表現 CD56 即可診斷為惡性疾病。在其他研究結果顯示也會有不表現 CD57 的 T-LGL 白血病，這也進一步證明評估 CD16 和 CD56 的重要性。(Nichols et al., 1994) T-LGL 白血病會表現出多種異常 T 細胞抗原可以利用流式細胞分析儀來發現異常。在我們研究顯示有 2 個或更多 T 細胞抗原異常表現有 76%。在這其中有不表現 CD3，CD5，CD7 分別為 12%，17% 與 12%。而表現 CD16，CD56 和 CD57 分別為 21%，19%與 57%。

我們利用流式細胞分析儀 FC-V β repertoire 分析 17 例 T 細胞 LGL 白血病 T 細胞單源性，同時結合免疫分型和 PCR 結果及臨床和血液學特徵，來評估流式細胞分析儀 FC-V β repertoire 技術。TCR V β repertoire 結果的判讀方法採用 Morice 等學者於 2004 年提出的定義。(Morice et al., 2004) 分析結果顯示

PCR 技術的敏感度為 94% (16/17)，特異性為 75% (6/8)，陽性預測值(positive predictive value; PPV)為 89%，陰性預測值 (negative predictive value; NPV)為 86%。FC-V β repertoire 技術的敏感度為 59% (10/17)，特異性為 88% (7/8)，PPV 為 91%，NPV 為 50%。所以評估結果 PCR 敏感度優於 FC-V β repertoire 技術，但是在特異性方面是 FC-V β repertoire 技術優於 PCR 的技術。

診斷 T-LGL 白血病除 T 細胞單源性檢測外，需結合臨床表現如骨髓浸潤和腫瘤體積評估。T 細胞單源性檢測都分析 T 細胞受器基因重組，目前大部分實驗室都採用定性 PCR 的方法。對於腫瘤體積檢測是計數淋巴球總數，然而流式細胞分析儀可定量淋巴細胞數量及分析 V β 技術，除此之外還能同時分析免疫分型。那麼與 PCR 比較之下，使用流式細胞分析儀可分析 T 細胞單源性，免疫分型及淋巴細胞計數。所以可以快速提供診斷 T-LGL 白血病患者。

T 細胞增生可分為良性增生或白血病。良性增生可包含病毒感染，類風濕性關節炎 (rheumatoid arthritis)和其他與自體免疫相關疾病，及幹細胞(stem cell)移植或器官移植造成的增生反應。(Rose and Berliner, 2004)而白血病包含 T prolymphocytic leukemia，肝脾性 T 細胞淋巴瘤 (hepatosplenic T cell lymphoma)，高惡性度的自然殺手細胞血病 (aggressive NK cell leukemia) 及一些成熟 T 細胞的淋巴瘤/白血病 (mature T cell lymphoma/leukemia)或 NK 細胞淋巴瘤 (NK cell lymphoma)。以上這些疾病的細胞型態與免疫表現型與 LGL 有所不同，可作為鑑別診斷的依據。

異常 T 細胞的免疫表現型或者是單源性 TCR 基因重組通常是表示單源性或是惡性的 T 細胞淋巴增生。但是炎症及感染之下，也有可能會出現單源性 T 細胞的反應必須靠其他的臨床病理特徵才能確認是增生性疾病或是白血

病。例如一個兒科病人在骨髓細胞中表現出單源性 T 淋巴增生以及 CD5(+), 在臨床診斷及其他檢查後發現是感染 EB 病毒而引起的單源性淋巴球增生, 不是白血病。(Lin et al., 2007) 單源性淋巴球的結果必須配合臨床症狀、形態學及免疫分型, 才能正確的診斷惡性疾病。在懷疑 T 細胞淋巴球增殖時, T 細胞接受器基因重組的評估是非常重要的。我們使用傳統的 TCR γ 引子, 是較便宜的試劑, 檢出率大約 60-70%。若是使用商業性的 BIOMED2 則是較昂貴價格的試劑; 檢出率大約為 85-90。(Kuo et al., 2011)

在本研究中我們使用市售 TCR FC-V β repertoire 試劑來評估 T 細胞惡性腫瘤。於流式細胞分析儀獲得 FC-V β repertoire 結果將與傳統 T 細胞相關抗原抗體, 分子遺傳學 PCR 分析 TCR 及細胞免疫分型結果進行比較。我們研究結果顯示, 建立流式細胞分析儀檢測週邊血液 FC-V β repertoire, 應用於臨床實驗室中隨手可得診斷 T 細胞惡性腫瘤的工具之一。這種方法證實單源性 T 細胞陽性預測值極高, 當流式細胞分析儀 FC-V β repertoire 無法檢測時, 才需進一步使用分子遺傳學的方法 (PCR, RFLP, Southern blot) 確認。如此一來可簡化實驗流程提高報告時效性, 並可省時及節省成本。由於 FC-V β repertoire 技術是屬於定量分析可作為日後監控疾病治療成效的指標。

第五章結論

由本研究發現 PCR 的敏感度優於 FC-V β repertoire 技術，但是 FC-V β repertoire 的特異性優於 PCR 技術，此二種技術有互補作用,有助於臨床診斷 LGL 淋巴球增生 (LGL lymphoproliferation) 的病例。FC-V β repertoire 技術是利用 flow cytometry 定量 TCR β -chain 基因重組，使用此技術可快速提供診斷 LGL 淋巴球增生 (LGL lymphoproliferation) 的病例。此技術是可定量白血病細胞，日後也可當做微殘留白血病(Minimal Residual Disease)的診斷，作為對白血病病患追蹤及治療的指標。FC-V β repertoire 技術操作及分析時間都比 PCR 來得簡易及快速，而且 FC-V β repertoire 技術比 PCR 技術的成本低，使用 FC-V β repertoire 技術可以節省成本及分析時間。

將來的的工作 (Future work)

從本文的研究結果可清楚看到 FC-V β repertoire 技術可運用於臨床篩檢 T 細胞單源性。FC-V β repertoire 技術的建立應可推廣至臨床實驗室，如此將可提高台灣對於 T 細胞 LGL 白血病的診斷。也希望日後能進一步研究有關 T 細胞腫瘤在治療過程藉助 FC-V β repertoire 技術來瞭解 T 細胞受器 (T cell receptor; TCR)基因重組(gene rearrangement)的變化。並且可以深入瞭解台灣 T 細胞 LGL 白血病病理組織型態與其他相關疾病的病理機轉。

參考文獻:

Bassan, R., Pronesti, M., Buzzetti, M., Allavena, P., Rambaldi, A., Mantovani, A., and Barbui, T. (1989). Autoimmunity and B-cell dysfunction in chronic proliferative disorders of large granular lymphocytes/natural killer cells. *Cancer* 63, 90-95.

Feng, B., Jorgensen, J.L., Hu, Y., Medeiros, L.J., and Wang, S.A. (2010). TCR-Vbeta flow cytometric analysis of peripheral blood for assessing clonality and disease burden in patients with T cell large granular lymphocyte leukaemia. *J. Clin. Pathol.* 63, 141-146.

Gentile, T.C., Uner, A.H., Hutchison, R.E., Wright, J., Ben-Ezra, J., Russell, E.C., and Loughran, T.P., Jr. (1994). CD3+, CD56+ aggressive variant of large granular lymphocyte leukemia. *Blood* 84, 2315-2321.

Go, R.S., Lust, J.A., and Phyliky, R.L. (2003). Aplastic anemia and pure red cell aplasia associated with large granular lymphocyte leukemia. *Semin. Hematol.* 40, 196-200.

Herling, M., Khoury, J.D., Washington, L.T., Duvic, M., Keating, M.J., and Jones, D. (2004). A systematic approach to diagnosis of mature T-cell leukemias reveals heterogeneity among WHO categories. *Blood* 104, 328-335.

Kuo, S.Y., Liu, H., Liao, Y.L., Chang, S.T., Hsieh, Y.C., Bandoh, B.A., Du, M.Q., and Chuang, S.S. (2011). A parallel comparison of T-cell clonality assessment between an in-house PCR assay and the BIOMED-2 assay leading to an efficient and cost-effective strategy. *J. Clin. Pathol.* 64, 536-542.

Lamy, T., and Loughran, T.P. (1998). Large Granular Lymphocyte Leukemia. *Cancer Control* 5, 25-33.

Lamy, T., and Loughran, T.P., Jr. (2003). Clinical features of large granular lymphocyte leukemia. *Semin Hematol.* 40, 185-195.

Lin, M.T., Chang, H.M., Huang, C.J., Chen, W.L., Lin, C.Y., Lin, C.Y., and Chuang, S.S. (2007). Massive expansion of EBV+ monoclonal T cells with CD5 down regulation in EBV-associated haemophagocytic lymphohistiocytosis. *J. Clin. Pathol.* 60, 101-103.

Loughran, T.P., Jr. (1993). Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 82,

1-14.

Loughran, T.P., Jr. (1999). CD56+ hematologic malignancies. *Leuk. Res.* 23, 675-676.

Lundell, R., Hartung, L., Hill, S., Perkins, S.L., and Bahler, D.W. (2005). T-cell large granular lymphocyte leukemias have multiple phenotypic abnormalities involving pan-T-cell antigens and receptors for MHC molecules. *Am. J. Clin. Pathol.* 124, 937-946.

McCarthy, K.P., Sloane, J.P., Kabarowski, J.H., Matutes, E., and Wiedemann, L.M. (1992). A simplified method of detection of clonal rearrangements of the T-cell receptor-gamma chain gene. *Diagn. Mol. Pathol.* 1, 173-179.

Morice, W.G., Kimlinger, T., Katzmann, J.A., Lust, J.A., Heimgartner, P.J., Halling, K.C., and Hanson, C.A. (2004). Flow cytometric assessment of TCR-Vbeta expression in the evaluation of peripheral blood involvement by T-cell lymphoproliferative disorders: a comparison with conventional T-cell immunophenotyping and molecular genetic techniques. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, 373-383.

Morice, W.G., Kurtin, P.J., Leibson, P.J., Tefferi, A., and Hanson, C.A. (2003). Demonstration of aberrant T-cell and natural killer-cell antigen expression in all cases of granular lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* 120, 1026-1036.

Morice, W.G., Kurtin, P.J., Tefferi, A., and Hanson, C.A. (2002). Distinct bone marrow findings in T-cell granular lymphocytic leukemia revealed by paraffin section immunoperoxidase stains for CD8, TIA-1, and granzyme B. *Blood* 99, 268-274.

Nichols, G.E., Normansell, D.E., and Williams, M.E. (1994). Lymphoproliferative disorder of granular lymphocytes: nine cases including one with features of CD56 (NKH1)-positive aggressive natural killer cell lymphoma. *Mod. Pathol.* 7, 819-824.

O'Malley, D.P. (2007). T-cell large granular leukemia and related proliferations. *Am. J. Clin. Pathol.* 127, 850-859.

Osuji, N., Matutes, E., Catovsky, D., Lampert, I., and Wotherspoon, A. (2005). Histopathology of the spleen in T-cell large granular lymphocyte leukemia and T-cell prolymphocytic leukemia: a comparative review. *Am. J. Surg. Pathol.* 29, 935-941.

Rabbani, G.R., Phyliky, R.L., and Tefferi, A. (1999). A long-term study of patients with

chronic natural killer cell lymphocytosis. *British journal of haematology* *106*, 960-966.

Rose, M.G., and Berliner, N. (2004). T-cell large granular lymphocyte leukemia and related disorders. *Oncologist* *9*, 247-258.

Ruskova, A., Thula, R., and Chan, G. (2004). Aggressive Natural Killer-Cell Leukemia: report of five cases and review of the literature. *Leuk. Lymphoma* *45*, 2427-2438.

Ryan, D.K., Alexander, H.D., and Morris, T.C. (1997). Routine diagnosis of large granular lymphocytic leukaemia by Southern blot and polymerase chain reaction analysis of clonal T cell receptor gene rearrangement. *Mol. Pathol.* *50*, 77-81.

Semenzato, G., Zambello, R., Starkebaum, G., Oshimi, K., and Loughran, T.P., Jr. (1997). The lymphoproliferative disease of granular lymphocytes: updated criteria for diagnosis. *Blood* *89*, 256-260.

Sokol, L., and Loughran, T.P., Jr. (2006). Large granular lymphocyte leukemia. *Oncologist* *11*, 263-273.

van den Beemd, R., Boor, P.P., van Lochem, E.G., Hop, W.C., Langerak, A.W., Wolvers-Tettero, I.L., Hooijkaas, H., and van Dongen, J.J. (2000). Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. *Cytometry* *40*, 336-345.

van Dongen, J.J., Langerak, A.W., Bruggemann, M., Evans, P.A., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., Garcia-Sanz, R., *et al.* (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukaemia* *17*, 2257-2317.

van Krieken, J.H., Langerak, A.W., Macintyre, E.A., Kneba, M., Hodges, E., Sanz, R.G., Morgan, G.J., Parreira, A., Molina, T.J., Cabecadas, J., *et al.* (2007). Improved reliability of lymphoma diagnostics via PCR-based clonality testing: report of the BIOMED-2 Concerted Action BHM4-CT98-3936. *Leukaemia* *21*, 201-206.

表附錄

表 1-1 顆粒大型淋巴白血病症分類及臨床病理特徵

	T-cell LGL leukemia, indolent	T-cell LGL leukemia, aggressive variant	Aggressive NK-cell leukemia	Chronic NK-cell lymphocytosis
Median age (yrs)	60	41	39	60.5
Male:female	1:1	2:1	1:1	7:1
Phenotype	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ CD8 ⁺ CD57 ⁺ CD16 ⁻	CD3 ⁺ TCR $\alpha\beta$ CD8 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁻	CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺	CD3-CD16 ⁺ CD56 ⁺
Clonality, TCR gene rearrangement	TCR- β/γ	TCR- β/γ	Germline	Germline
EBV	-	-	+	-
HTLV seroreactivity	+	-	-	+
Clinical presentation	One third asymptomatic; two thirds symptomatic—cytopenias, splenomegaly, rheumatoid arthritis	All patients—B symptoms, organomegaly, lymphadenopathy, cytopenias	All patients—B symptoms, organomegaly, lymphadenopathy, cytopenias	60% asymptomatic; 40% symptomatic—cytopenias, vasculitis, neuropathy, splenomegaly
Therapy	Watch and wait, immunosuppressive	ALL-like induction chemotherapy	ALL-like induction chemotherapy	Watch and wait, immunosuppressive
Prognosis	Good	Poor	Very poor	Good

Abbreviations: ALL, acute lymphoblastic leukemia; EBV, Epstein-Barr virus; HTLV, human T-cell leukemia/lymphoma virus; LGL, large granular lymphocyte; NK, natural killer; TCR, T-cell receptor.

資料來源【Lubomir ;2006】

表 2-1 V β repertoire 抗體組合

Tube	Vβ * (#) / Fluorochrome	Clone (Refs)	Isotype (species)
A	Vb 5.3 (TRBV5-5) PE	3D11 (35, 39)	IgG1 (mouse)
	Vb 7.1 (TRBV4-1, TRBV4-2, TRBV4-3) PE+FITC	ZOE (40)	IgG2a (mouse)
	Vb 3 (TRBV28) FITC	CH92 (35, 39, 41)	IgM(mouse)
B	Vb 9 (TRBV3-1) PE	FIN9 (35, 41)	IgG2a (mouse)
	Vb Vb 17 (TRBV19) PE+FITC	E17.5F3 (9, 35, 39, 43)	IgG1 (mouse)
	Vb 16 (TRBV14) FITC	TAMAYA1.2 (9, 35, 39)	IgG1 (mouse)
C	Vb 18 (TRBV18) PE	BA62.6 (35, 39)	IgG1 (mouse)
	Vb 5.1 (TRBV5-1) PE+FITC	IMMU157 (35, 44)	IgG2a (mouse)
	Vb 20 (TRBV30) FITC	ELL1.4 (35, 39)	IgG (mouse)
D	Vb 13.1 (TRBV6-5, TRBV6-6, TRBV6-9) PE	IMMU222 (35, 39)	IgG2b (mouse)
	Vb 13.6 (TRBV6-6) PE+FITC	JU74.3 (35, 39)	IgG1 (mouse)
	Vb 8 (TRBV12-3, TRBV12-4) FITC	56C5.2 (35, 39, 43)	IgG2a (mouse)
E	Vb 5.2 (TRBV5-6) PE	36213 (35, 39)	IgG1 (mouse)
	Vb 2 (TRBV20-1) PE+FITC	MPB2D5 (45, 46)	IgG1 (mouse)
	Vb 12 (TRBV10-3) FITC	VER2.32 (35, 45)	IgG2a (mouse)
F	Vb 23 (TRBV13) PE	AF23 (35, 39)	IgG1 (mouse)
	Vb 1 (TRBV9) PE+FITC	BL37.2 (39)	IgG1 (rat)
	Vb 21.3 (TRBV11-2) FITC	IG125 (14, 35, 39)	IgG2a (mouse)
G	Vb 11 (TRBV25-1) PE	C21 (35, 39, 42)	IgG2a (mouse)
	Vb 22 (TRBV2) PE+FITC	IMMU546 (35, 39, 42)	IgG1 (mouse)
	Vb 14 (TRBV27) FITC	CAS1.1.3 (35, 42, 45)	IgG1 (mouse)
H	Vb 13.2 (TRBV6-2) PE	H132 (35, 47)	IgG1 (mouse)
	Vb 4 (TRBV29-1) PE+FITC	WJF24 (not published)	IgM (rat)
	Vb 7.2 (TRBV4-3) FITC	ZIZOU4 (not published)	IgG2a (mouse)

表 3-1 顯示 17 個病例 T 細胞 LGL 白血病臨床特徵及 PCR 和 flow cytometric Vβ repertoire 分析

Patient No.	Sex/age (years)	Anemia (Hb)	Neutropenia (x10 ⁹ /L)	lymphocyte (x10 ⁹ /L)	LGL count (x10 ⁹ /L)	Auto-immune disease	TCR gene Rearrangement by PCR	Vβ by FC
1	M/46	Yes (6.5)	1.1	21.4	19.2	No	monoclonal	Vβ3
2	M/42	No (13.6)	3.2	17.0	12.455	No	monoclonal	Nonclonal
3	F/44	Yes (9.9)	1.4	6.3	2.075	No	monoclonal	Vβ16
4	M/58	No (14.6)	7.5	5.6	4.228	Yes	monoclonal	Vβ1, Vβ13.2
5	M/38	Yes (10.8)	5.1	4.5	3.920	No	monoclonal	Vβ8
6	F/72	Yes (11.6)	2.0	1.5	0.741	No	monoclonal	Nonclonal
7	F/73	Yes (9.3)	1.4	9.5	7.865	No	monoclonal	Vβ7.2
8	M/67	Yes (7.5)	2.7	4.0	2.448	No	monoclonal	Vβ4
9	M/48	No (15.0)	0.1	1.8	0.621	No	polyclonal	Vβ8
10	M/79	Yes (9.6)	6.1	1.6	1.380	No	monoclonal	Nonclonal
11	M/86	No (13.4)	4.1	6.2	4.440	No	monoclonal	Nonclonal
12	F/71	Yes (8.7)	0.9	21.8	6.737	No	monoclonal	Nonclonal
13	F/19	Yes (10.5)	2.6	8.6	6.136	No	monoclonal	Nonclonal
14	F/84	Yes (8.7)	0.75	0.6	0.225	Yes	monoclonal	Vβ1, Vβ8
15	M/38	Yes (12.9)	1.0	8.3	5.656	No	monoclonal	Nonclonal
16	M/75	Yes (12.0)	1.1	2.6	2.592	Yes	monoclonal	Vβ2
17	M/80	Yes (4.0)	2.2	1.5	1.10	No	monoclonal	Vβ2

Definition of neutropenia: mild: ANC (absolute neutrophil count): 1000-1500/uL; moderate: ANC 500-1000/uL; severe ANC <500/uL

Definition of anemia: male Hb <13.0g/dL; female <12.0g/dL

表 3-2 顯示 T 細胞 LGL 白血病與 T 細胞 LGL 或 NK 細胞淋巴瘤增生的臨床的特徵

	T-LGL leukemia (n=17)	T-LGL & NK LPD (n=8)	P Value
Age, years	67 (38-86)	57 (16-86)	0.742
Men/women	11/6	7/1	0.170
White blood cells ($\times 10^9/L$)	10.3 (1.5-26.5)	10.0 (2.4-14.3)	0.766
Lymphocyte, %	64 (17-55)	66 (30-77)	0.766
Absolute lymphocytes ($\times 10^9/L$)	5.6 (0.6-21.5)	7.2 (4.2-11.1)	0.742
LGL (%)	35 (15-85)	42 (15-85)	0.582
LGL count ($\times 10^9/L$)	3.9 (0.22-19.2)	4.0 (0.48-9.1)	0.194
Hb(g/dL)	10.5 (4.0-15.0)	13.6 (10.4-16.6)	0.126
Platelet ($\times 10^9/L$)	259 (48-418)	167 (3-327)	0.001*
Clonality by TCR PCR, n (%)	16/17 (94%)	6/8 (75%)	
Clonality by FC V β , n (%)	10/17 (59%)	7/8 (88%)	

所有臨床特徵表現只有 platelet 表現 $P < 0.05$

Abbreviations: LGL, large granular lymphocyte; NK, natural killer; LPD, lymphoproliferation discord; TCR, T-cell receptor; PCR, polymerase chain reaction

表 3-3 顯示 17 個病例 T 細胞 LGL 白血病免疫分型(immunophenotype)表現

Patient No.	CD2	CD3	CD4	CD5	CD7	CD8	CD16	CD56	CD57
1	+	+	-	+	-	+	+	-	-
2	+	+	-	+	+	-	ND	-	ND
3	+	+	-	+	-	+	ND	ND	ND
4	+	+	-	+	+	+	-	-	+
5	+	+	-	-	+	+	-	-	+
6	+	+	-	+	+	+	ND	-	ND
7	+	+	-	+	+	+	-	-	+
8	+	-	-	-	+	-	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	-	-	-
10	+	-	-	-	+	+	+	+	+
11	+	+	-	+	+	+	-	-	+
12	+	+	-	+	+	+	-	+	-
13	+	+	+/(20%)	+	+	+/(70%)	-	-	-
14	+	+	-	+	+	+	-	-	+
15	+	+	-	+	+	+	-	-	-
16	+	+	+	+	+	-	-	-	+
17	+	+	-	+	+	+	-	-	-
百分比(%)	100	88	11	82	88	88	21	18	57

T-LGL 白血病有表現標記以“+”表示，沒有表現標記以“-”表示。 ND:Not done
 13 號病例的 CD4 表現介於+/-之間有 20%細胞有表現

表 3-4 顯示 T 細胞 LGL 白血病和 T 細胞 LGL 或 NK 細胞淋巴瘤增生的 T 細胞抗原表現

	T-LGL leukemia	T-LGL & NK LPD	P Value
CD2	17/17	6/7	0.355
CD3	15/17	3/7	0.030
CD4	2/17	1/8	0.351
CD5	14/17	3/8	0.011
CD7	15/17	5/8	0.079
CD8	15/17	3/7	0.030
CD16	3/14	5/8	0.170
CD56	3/16	5/8	0.170
CD57	8/14	5/7	0.172
TCR V β	10/17	1/8	
PCR	16/17	1/3	

Abbreviations: LGL, large granular lymphocyte; NK, natural killer; LPD, lymphoproliferation discord; TCR, T-cell receptor; PCR, polymerase chain reaction

圖附錄

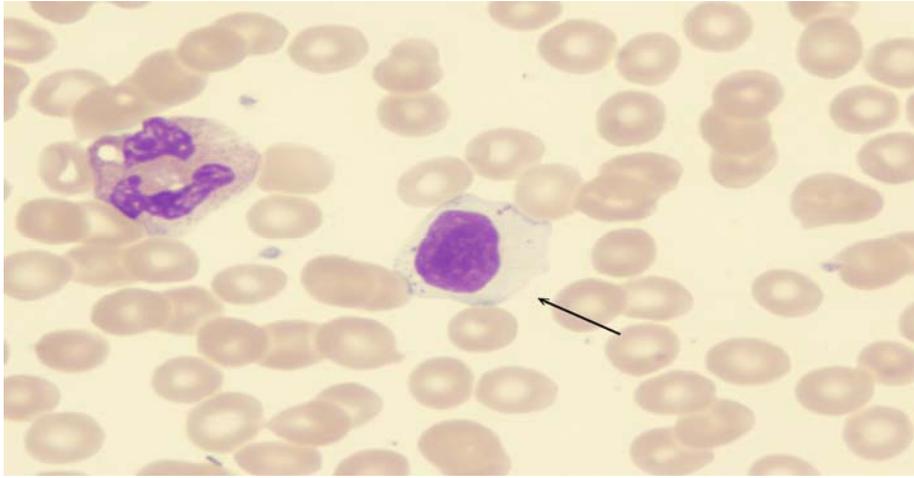
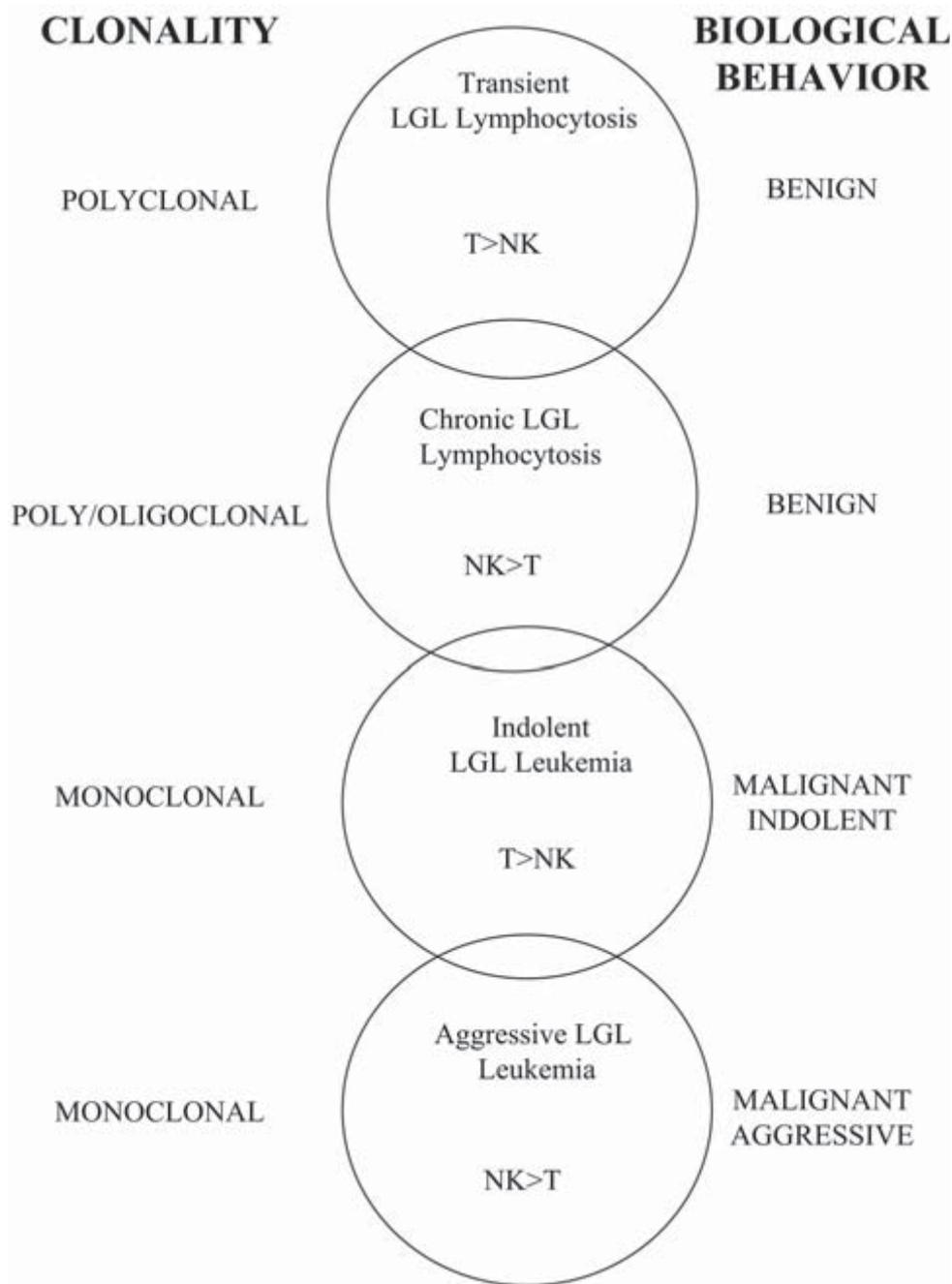
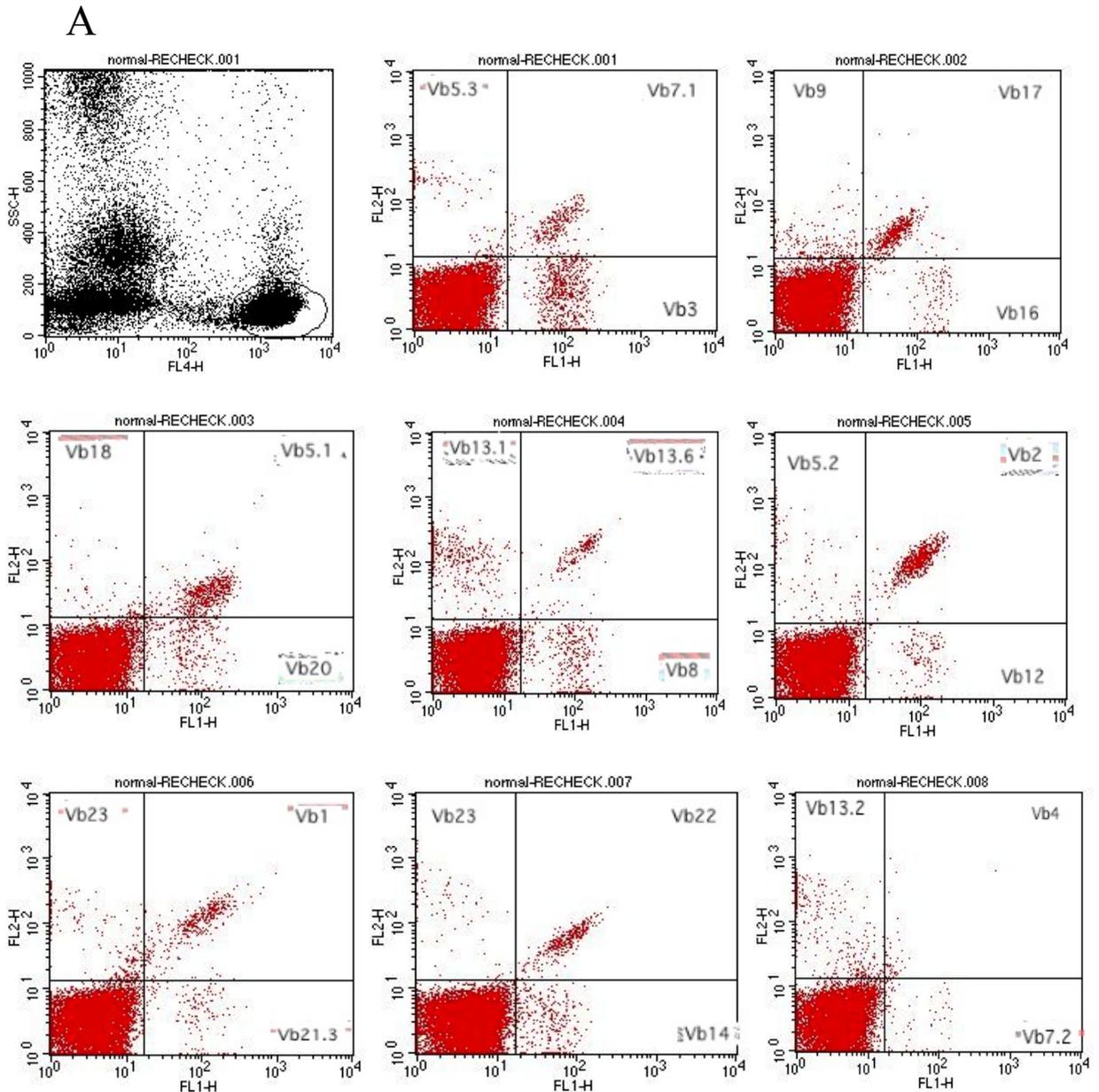


圖 1-1 週邊血液抹片顆粒性大淋巴細胞(large granular lymphocyte; LGL)型態
LGL 是中到大型的淋巴球，細胞核偏到一邊，細胞質內有藍色顆粒



資料來源【Thomas;2006】

圖 1-2 顆粒性大淋巴細胞(large granular lymphocyte; LGL)疾病分類根據細胞單源性及生物特性



B

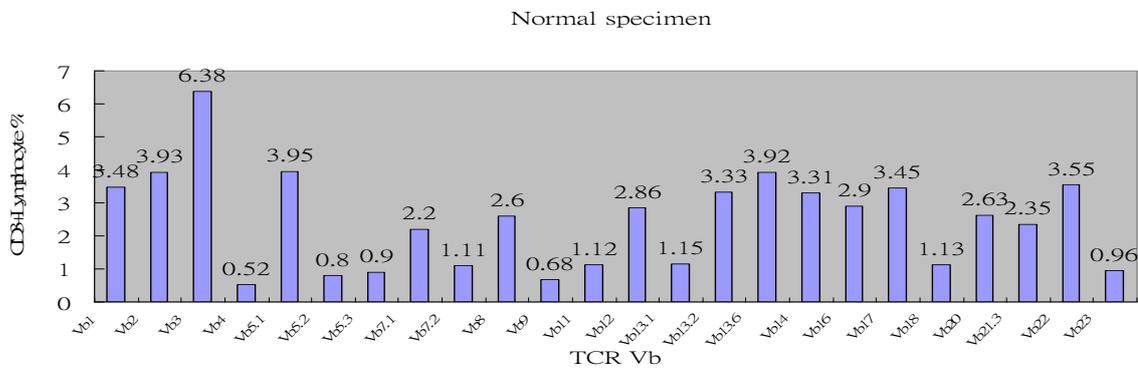


圖 2-1 A 圖顯示正常健康人檢體流式細胞儀分析 Vβ repertoire 結果的圖型
B 圖以直方圖顯示正常健康人檢體流式細胞儀分析 Vβ repertoire 結果

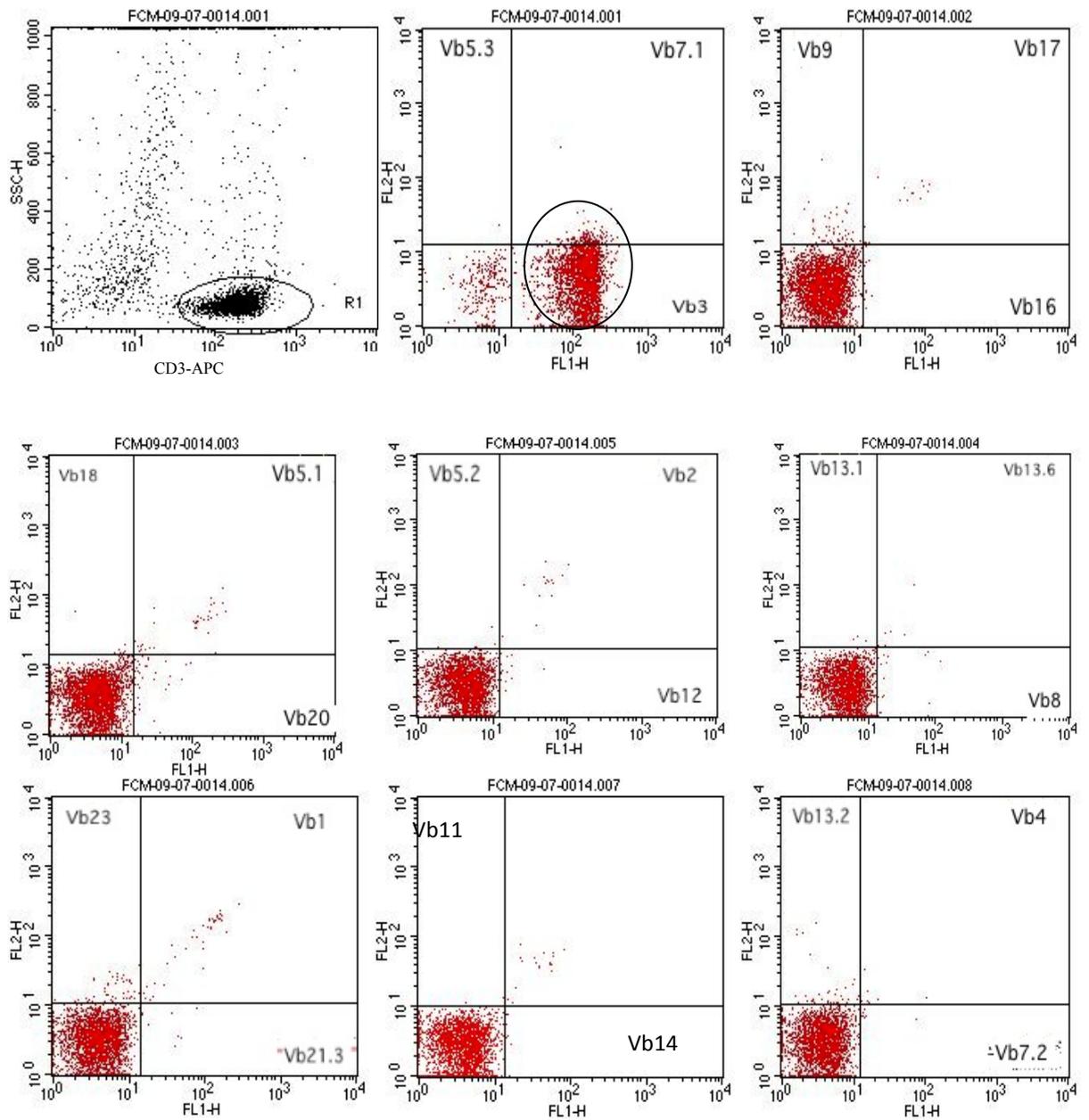


圖 3-1 顯示 T 細胞 LGL 白血病 1 號患者流式細胞儀分析 V β repertoire 結果的圖型
 V β repertoire 結果該病患表現 V β 3 單源性(clonal)的腫瘤細胞

Case 1

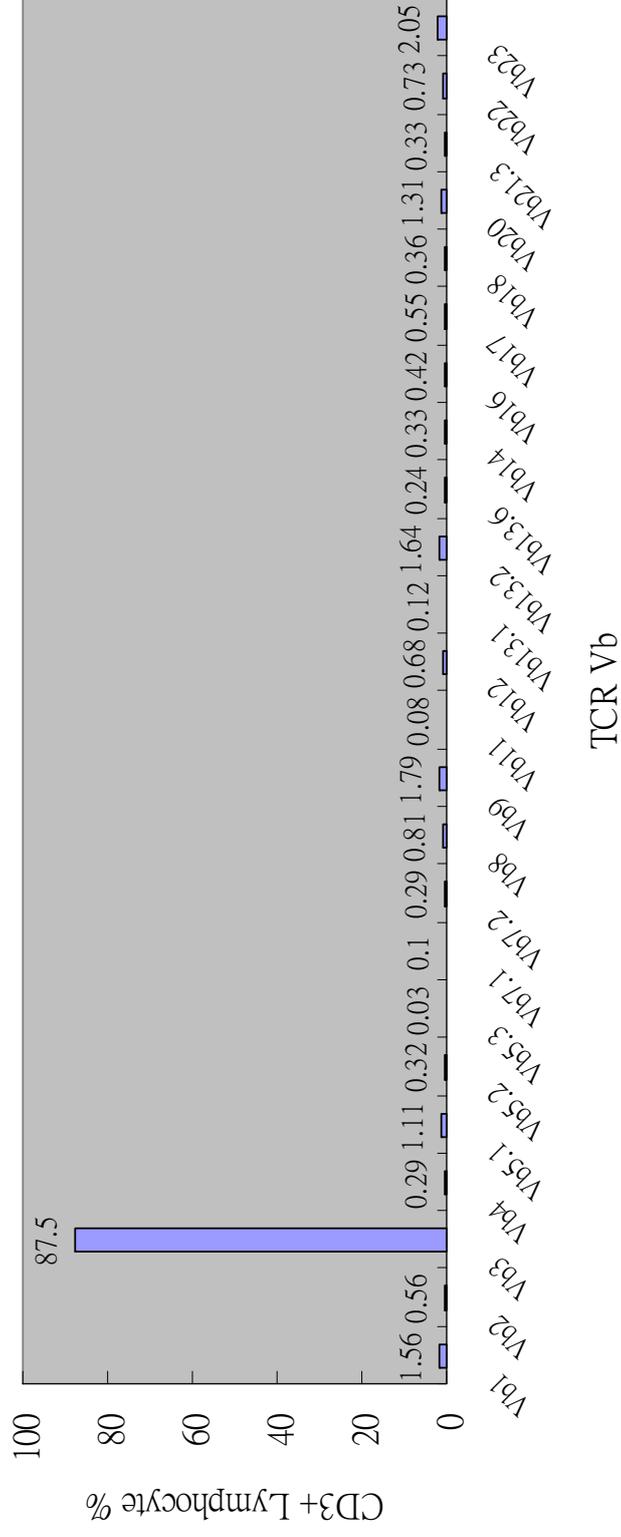


圖 3-2 以直方圖顯示 T 細胞 LGL 白血病 1 號患者流式細胞儀分析 Vβ repertoire 結果，結果表現 Vβ3 單源性(clonal)腫瘤細胞

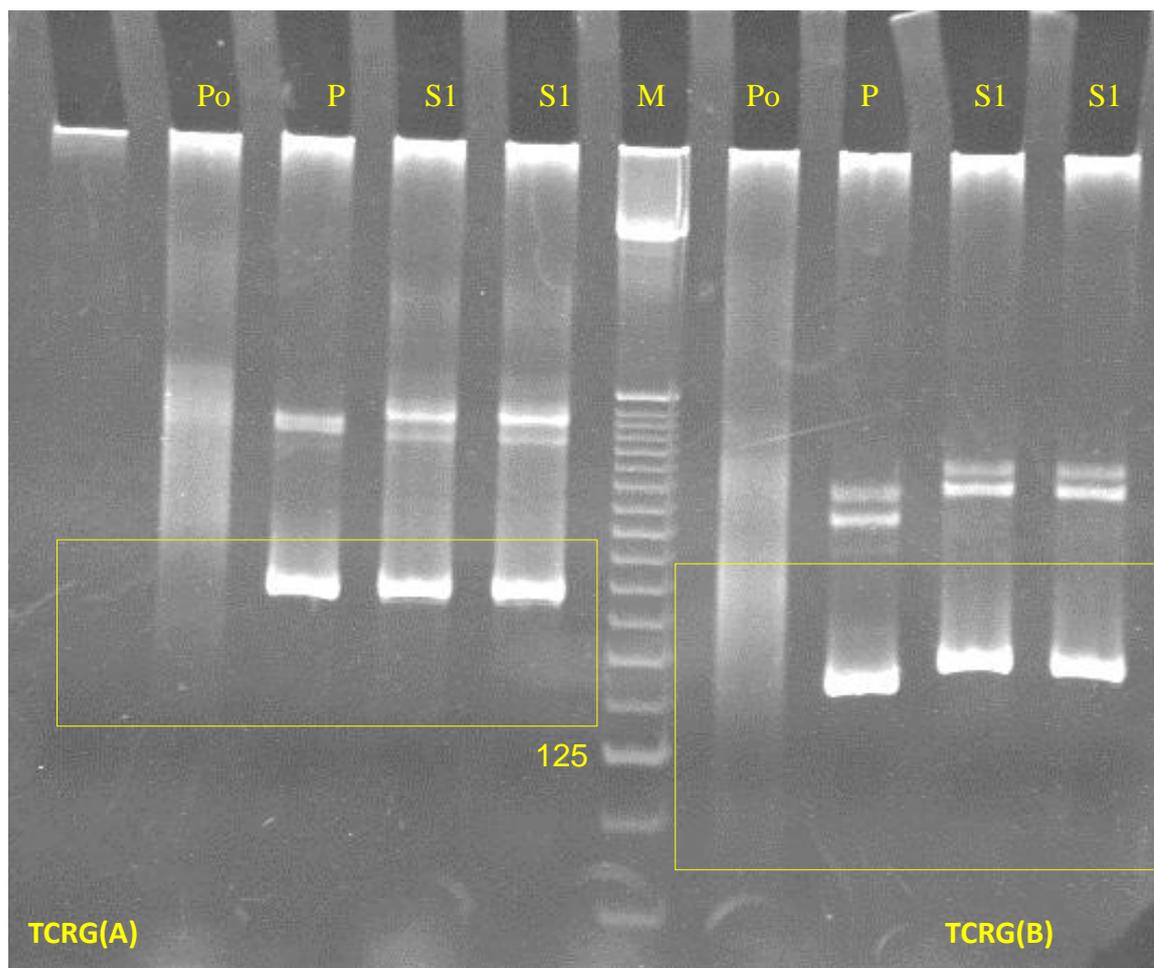


圖 3-3 顯示 PCR 檢測 T 淋巴球細胞受體 gamma 鏈之單源性結果；(TCRG(A) valid size : 145-255 bp ; TCRG(B) valid size : 80-220 bp ; Po : polyclonal , P : monoclonal , S1 : sample 1)

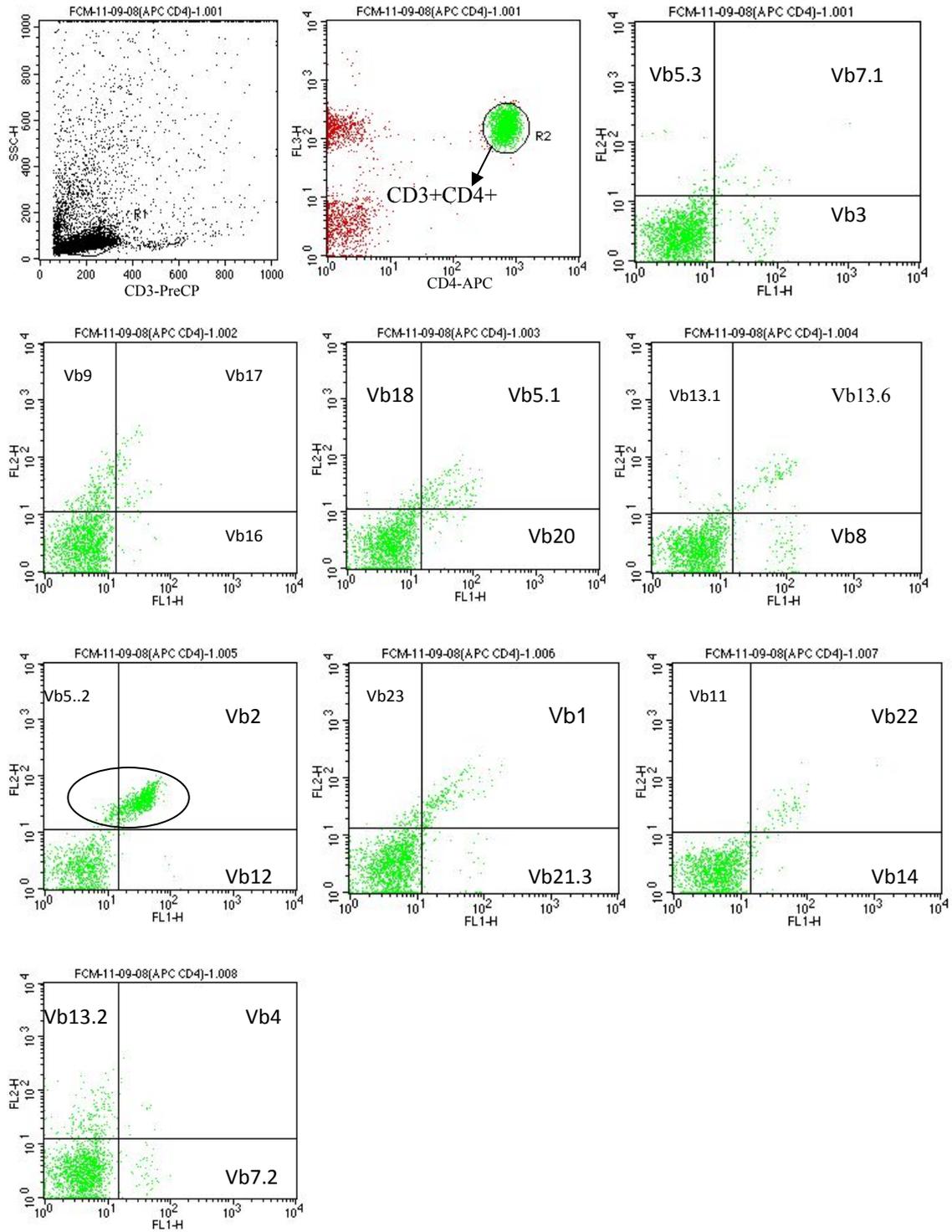


圖 3-4 顯示 T 細胞 LGL 白血病 16 號患者流式細胞儀分析 Vβ repertoire 結果的圖型
 使用第四色 APC 圈選 CD4+ 細胞分析 Vβ repertoire 結果表現 Vβ2 單源性(clonal)腫瘤
 細胞

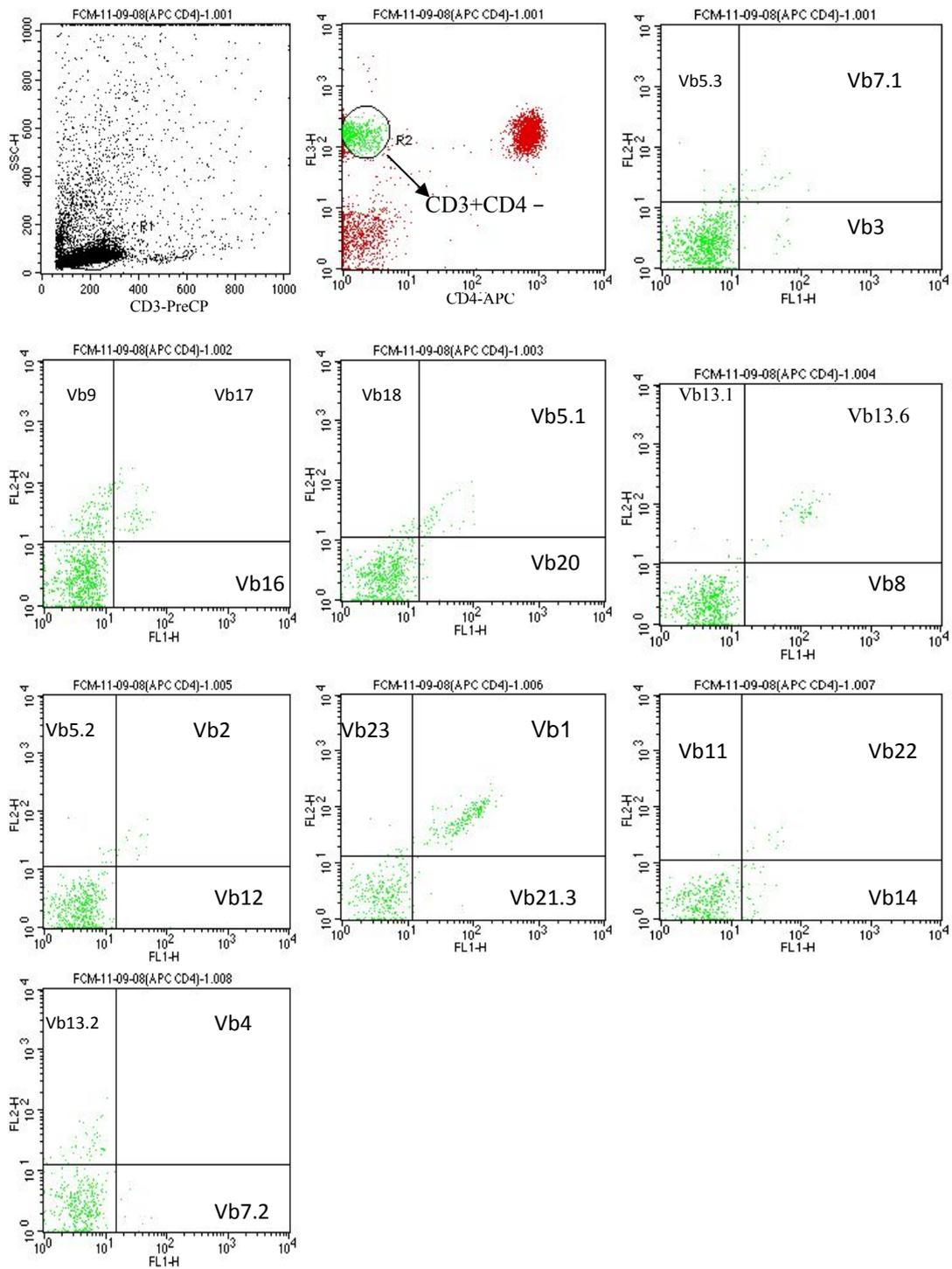


圖 3-5 顯示 T 細胞 LGL 白血病 16 號患者流式細胞儀分析 V β repertoire 結果的圖型
 使用第四色 APC 圈選 CD3+CD4-(CD8+)細胞分析 V β repertoire 結果表現非單源性
 (Non-clonal)細胞

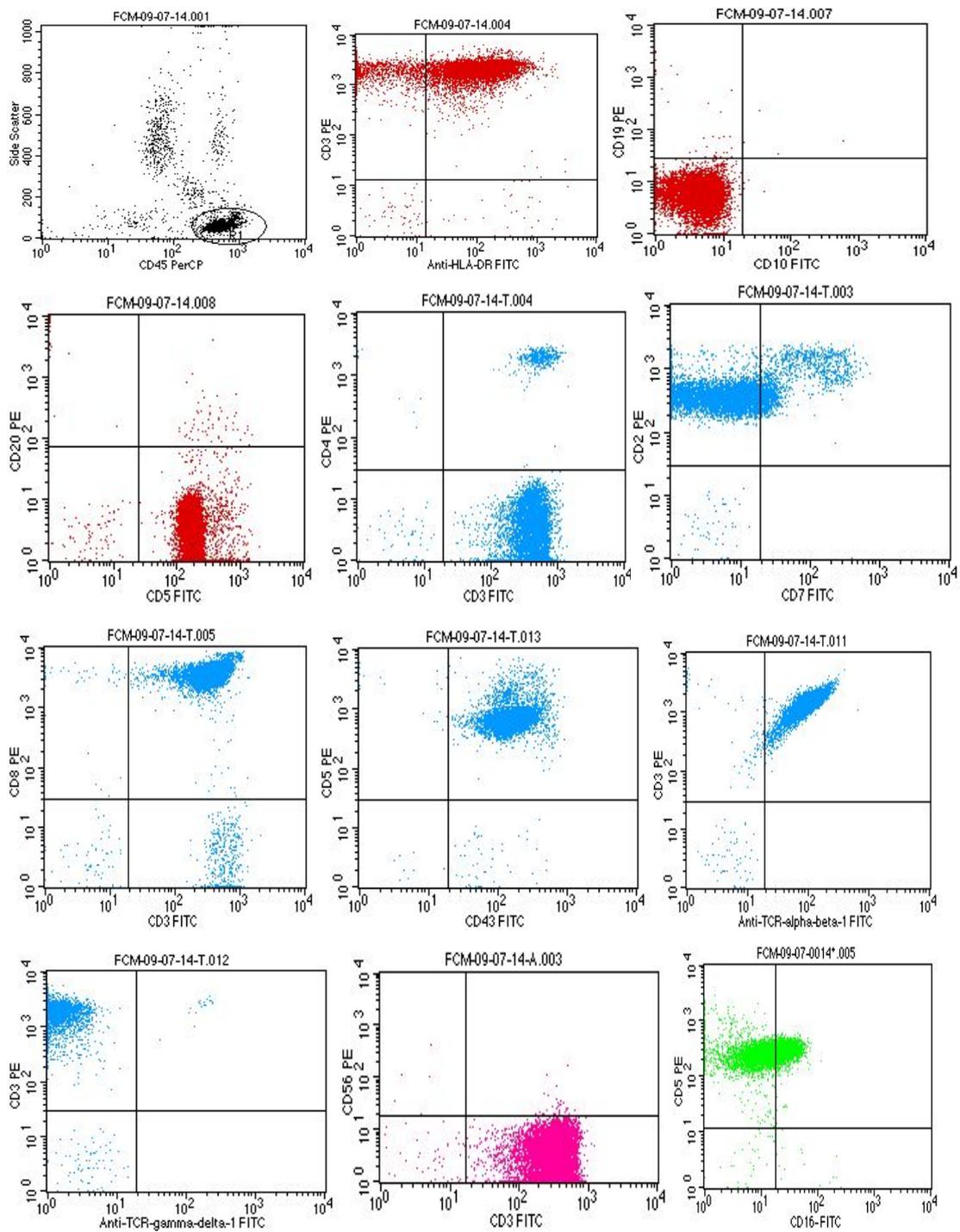


圖 3-6 顯示 T 細胞 LGL 白血病 1 號患者流式細胞儀分析免疫分型結果的圖型
 免疫分型結果顯示
 (CD2+/CD3+/CD4-/CD5+(dim)/CD7-/CD8+/CD16+(partial)/CD43+/CD56-/CDαβ+)
 此病患免疫異常分型部分表現 CD16 抗原，而遺漏 CD7 抗原