

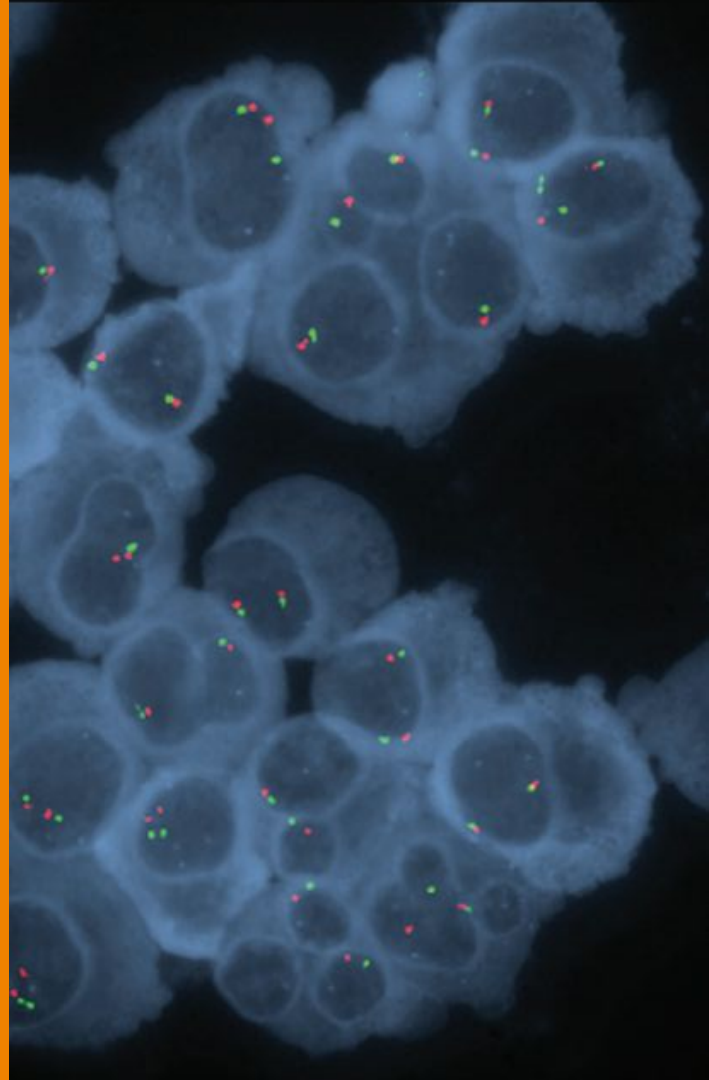
多発性骨髄腫 - 形質細胞分離

米国ガイドラインについて

絵葉・ジャーディ

フィールド アプリケーション スペシャリスト

2022-08-01



背景: 精製 CD138 形質細胞による多発性骨髄腫検査感度の向上

- 多発性骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています
- 非悪性細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞検出が難しい場合があります
- CD138のポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、サンプルにおけるゲノム異常の検出が容易となります
- 多発性骨髄腫検査のための蛍光in situ ハイブリダイゼーション(FISH)、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、**米国では骨髄穿刺での採取後に形質細胞を濃縮することを推奨しています**

精製 CD138 形質細胞による多発性骨髄腫検査感度の向上

多発性骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています。非悪性細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 ポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、ゲノム異常の検出が容易になります。本報では、多発性骨髄腫検査感度の向上を目的とした CD138 形質細胞の精製、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、形質細胞濃縮プロトコルを説明します。

目的

多発性骨髄腫

多発性骨髄腫はがんの一種で、骨髄の腫瘍細胞により骨質の形成を阻害する CD138 形質細胞を特徴とし、免疫系の正常な機能を低下させます。骨髄腫は、悪性骨髄腫の一種であり、骨髄腫細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 ポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、ゲノム異常の検出が容易になります。本報では、多発性骨髄腫検査感度の向上を目的とした CD138 形質細胞の精製、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、形質細胞濃縮プロトコルを説明します。

多発性骨髄腫サンプルのゲノム異常検出

骨髄腫の CD138 形質細胞の濃縮は、多発性骨髄腫の診断、治療、および患者の経過を追跡するための重要なツールです。多発性骨髄腫は、骨髄腫細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 ポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、ゲノム異常の検出が容易になります。本報では、多発性骨髄腫検査感度の向上を目的とした CD138 形質細胞の精製、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、形質細胞濃縮プロトコルを説明します。

CD138 形質細胞の濃縮による感度の向上

多発性骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています。非悪性細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 ポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、ゲノム異常の検出が容易になります。本報では、多発性骨髄腫検査感度の向上を目的とした CD138 形質細胞の精製、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、形質細胞濃縮プロトコルを説明します。

National Comprehensive Cancer Network® (NCCN) Guidelines Version 2.2020 Multiple Myeloma 1d, FISH 検査による多発性骨髄腫検査感度の向上

骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています。非悪性細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 ポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、ゲノム異常の検出が容易になります。本報では、多発性骨髄腫検査感度の向上を目的とした CD138 形質細胞の精製、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、形質細胞濃縮プロトコルを説明します。

カラムフリーによる悪性骨髄腫細胞濃縮

骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています。非悪性細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 ポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、ゲノム異常の検出が容易になります。本報では、多発性骨髄腫検査感度の向上を目的とした CD138 形質細胞の精製、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、形質細胞濃縮プロトコルを説明します。

KeyTag™ による CD138 形質細胞の濃縮

骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています。非悪性細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 ポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、ゲノム異常の検出が容易になります。本報では、多発性骨髄腫検査感度の向上を目的とした CD138 形質細胞の精製、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、形質細胞濃縮プロトコルを説明します。

KeyTag™ による CD138 形質細胞の濃縮

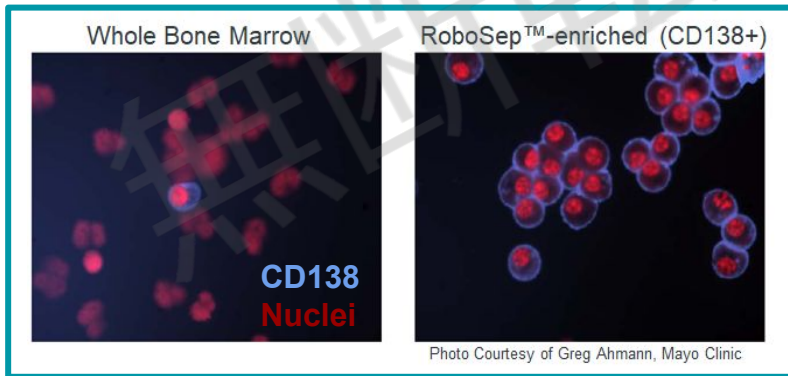
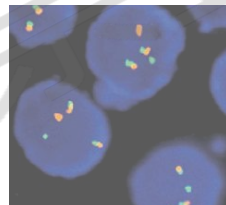
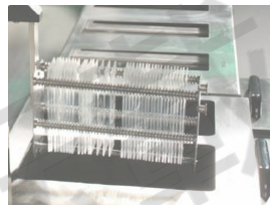
骨髄腫の骨髄サンプルには非悪性細胞と悪性細胞が混在しています。非悪性細胞が大量に存在するサンプルの解析では、少量の悪性骨髄腫細胞の検出が難しい場合があります。CD138 ポジティブセレクションで形質細胞を精製し、分析サンプル中の悪性骨髄腫細胞の割合を高めることにより、ゲノム異常の検出が容易になります。本報では、多発性骨髄腫検査感度の向上を目的とした CD138 形質細胞の精製、マイクロアレイベースアッセイ、ゲノムシーケンス、遺伝子発現プロファイリングなどの後続の解析における感度を高めるために、形質細胞濃縮プロトコルを説明します。

STEMCELL TECHNOLOGIES
Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

**技術資料 PDF
無料ダウンロード**



CD138+ 形質細胞分離 → FISH法検査 ワークフロー



分離前

分離後



RoboSep™-S

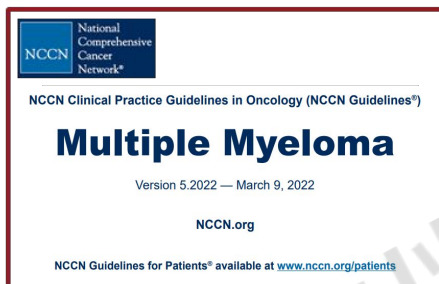
米国ガイドライン

● NCCN Guidelines (Version 5.2022) for Multiple Myeloma

- [National Comprehensive Cancer Network](#) → 米国にある31軒のがんセンターの同盟
- “CD138 positive selected sample is strongly recommended for optimized yield” for plasma cell FISH on bone marrow sample



National
Comprehensive
Cancer
Network®



INITIAL DIAGNOSTIC WORKUP
• History and physical exam
• CBC, differential, platelet count
• Exam of peripheral blood smear
• Serum BUN/creatinine, electrolytes, albumin,* and calcium
• Creatinine clearance (calculated or measured directly)
• Serum uric acid
• Serum LDH* and beta-2 microglobulin*
• Serum quantitative immunoglobulins, serum protein electrophoresis (SPEP), serum immunofixation electrophoresis (SIFE)
• 24-h urine for total protein, urine protein electrophoresis (UPEP), urine immunofixation electrophoresis (UIFE)
• Serum free light chain (FLC) assay
• Skeletal survey or whole body low-dose CT scan**
• Unilateral bone marrow aspirate + biopsy, including bone marrow immunohistochemistry and/or bone marrow flow cytometry
• Metaphase cytogenetics, osteoside marrow
• Plasma cell FISH* [del 13, del 17p13, t(4;14), t(11;14), t(14;16), t(14;20), 1q21 amplification], 1p abnormality

The National Comprehensive Cancer Network recommends plasma cell enrichment for multiple myeloma FISH

Cytogenetic Studies: Although MM may be morphologically similar, several subtypes of the disease have been identified at the genetic and molecular level. Bone marrow studies at initial diagnosis should include chromosome analysis by metaphase cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH) performed with the plasma cells obtained from bone marrow aspiration. Specific chromosomal abnormalities have been identified in patients with MM involving translocations, deletions, or amplifications.

● American College of Medical Genetics Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories (2021 Revision, Section E)

- “A bone marrow specimen is required for Multiple Myeloma. For FISH and/or CMA analyses, plasma cell separation is recommended to enrich for the CD138+ plasma cell fraction in bone marrow samples with low plasma cell percentages”



ACMG®

American College of Medical
Genetics and Genomics



米国の現状

● Cancer Genomics Consortium Report (2018)

- [Cancer Genomics Consortium](#) → 臨床細胞遺伝学者、分子遺伝学者、および分子病理学者のグループ
- “To assess the current state of clinical molecular testing for myeloma, a 9-question survey of the Cancer Genomics Consortium membership and the American Cytogenetics Forum List was conducted from March to April 2017. There were 66 responses from respondents who self-identified as a cytogeneticist, molecular geneticist or pathologist (91%), laboratory technician (6%), or laboratory supervisor (3%).”
- “Plasma cell enrichment prior to testing is widespread with > 85% of labs using CD138 + cell enrichment by a magnetic bead system (49% RoboSep-S, 29% Miltenyi, 10% EasySep, 3% epiSep). Laboratories that never use plasma cell enrichment were in the minority (15%) and several such groups stated the intention to establish enrichment as a standard protocol.”

Cancer Genomics Consortium Report

Assessing Genome-wide Copy Number Aberrations and Copy-Neutral Loss-of-Heterozygosity as Best Practice: An Evidence-Based Review from the Cancer Genomics Consortium Working Group for Plasma Cell Disorders

Trevor J. Pugh, James M. Fink, Xinyan Lu, Susan Mathew, Joyce Murata-Collins, Pascale Willem, Min Fang, on behalf of the Cancer Genomics Consortium Plasma Cell Disorders Working Group

PII: S2210-7762(18)30076-0
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2018.07.002>
Reference: CGEN 8480

To appear in: *Cancer Genetics*

Received date: 13 March 2018
Revised date: 16 July 2018
Accepted date: 30 July 2018



In a bone marrow aspirate, what is the tumour cell content required to trigger plasma cell enrichment for array or FISH analysis? (n=66)

<100% - we always perform enrichment	48	73%
<50%	1	1.5%
<40%	1	1.5%
<30%	0	0%
<20%	5	8%
<10%	0	0%
<5%	1	1.5%
0% - we never perform enrichment	10	15%

Enrichment performed by 85% of respondents

What methods do you use for plasma cell enrichment? (n=59)

RoboSep-S magnetic bead purification	29	49%
Miltenyi magnetic bead purification	17	29%
EasySep	6	10%
EpiSep by Wavesense	2	3%

60% of respondents who perform enrichment use EasySep or RoboSep-S

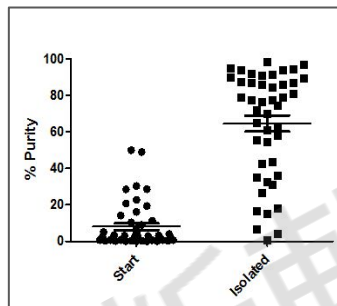


CD138+ 形質細胞分離 (多発性骨髄腫)

- 骨髄サンプル中のCD138陽性細胞の頻度は、疾患の進行度合いにより大きく異なる (0.1% → 60%)
- 少しでも濃縮することによって、FISH法検査の遺伝子異常の検出感度が上がる



RoboSep™-S



Multiple Myeloma FISH: Sample Data

Table 2. Linearity/AMR Verification

Parameter	Upper Limit	Lower Limit
% CD138+ plasma cells in unsorted sample	60.8	0.29
Yield (CD138+ sorted plasma cell count)	3.3×10^6	8500
CD138+ absolute cell count in sorted fraction/ μ L	4752	25
% Recovery (yield/starting plasma cell count)	59.1	57.2
% Purity	99.7	41.2

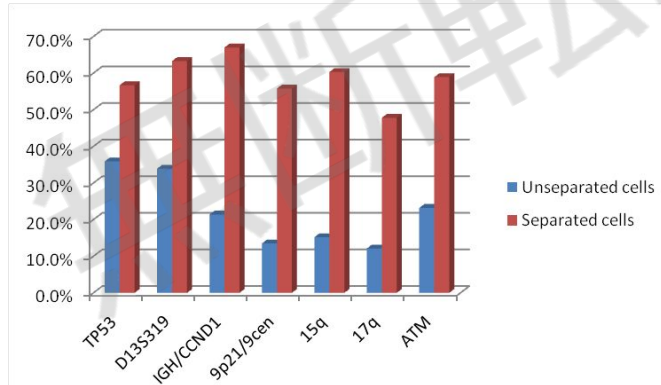
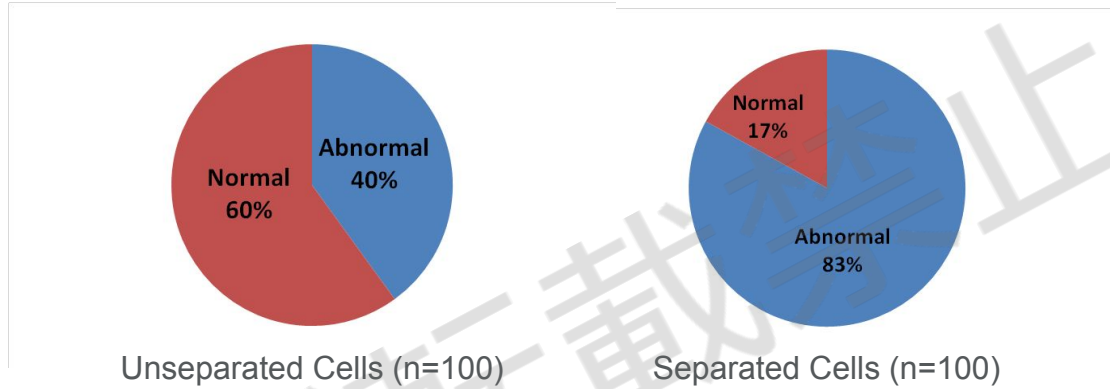
Analytical Measurement Ranges (AMR) was defined for RoboSep sorter using serial dilutions of U266B1 plasma cell line spiked into CD Chex Plus control blood to obtain plasma cell concentrations ranging from <1% to 60% PCs. Duplicate 1 mL samples at each serial dilution were sorted on the RoboSep sorter. The unsorted and sorted fractions were analyzed by flow cytometry to determine absolute plasma cell counts and percent. Linear regression analysis of the dilution study gave an R value of 0.99 indicating the CD138+ sort protocol was linear.

Table 1. FISH Results for Unsorted MM-Bone Marrow vs CD138+ Sorted Plasma Cells from the Same Bone Marrow

Sample	Sample Age (Days)	Sample Type	% of Cells Positive by FISH		
			13q Deletion	p53 Deletion	IgH Rearrangement
1	2	Unsorted	21	12	33
		Sorted	94	24	93
2	3	Unsorted	83	85	84
		Sorted	97	97	90
3	3	Unsorted	–	–	46
		Sorted	55 ^a	–	52
4	3	Unsorted	–	–	25
		Sorted	94	–	87 ^b
5	3	Unsorted	–	–	32
		Sorted	–	–	78 ^b
6	3	Unsorted	–	–	39
		Sorted	–	12	39
7	5	Unsorted	22	–	28
		Sorted	91	–	93
8	5	Unsorted	18	–	32
		Sorted	14	–	93
9	6	Unsorted	23	–	34
		Sorted	92	10	99
10	6	Unsorted	23	29 ^c	48
		Sorted	42	34 ^c	84
11	7	Unsorted	23 ^d	–	48
		Sorted	63 ^d	–	84
12	7	Unsorted	–	–	26
		Sorted	8	–	15
13	8	Unsorted	–	–	29
		Sorted	–	–	90

Source: Targeted Cell-Sorting in Global FISH Studies: An Improved Method for Evaluating Multiple Myeloma. Marikar – Coplin et al. Quest Diagnostics Clinical Trials

CD138+ 形質細胞分離(多發性骨髓腫)



Increased detection of genetic aberrations in separated vs unseparated sample cohorts

製品紹介: EasySep™ CD138+ 形質細胞分離製品



Silver Magnet



EasyEights™ Magnet



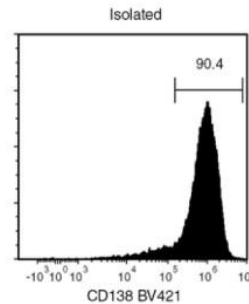
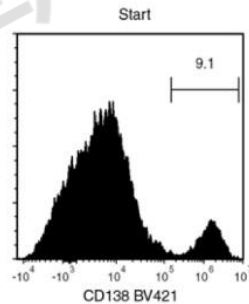
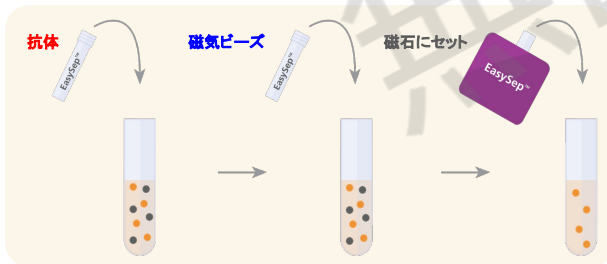
RoboSep™-S
(自動化装置)

17887 - EasySep™ Human Whole Blood and Bone Marrow CD138 Positive Selection Kit II

全血・骨髄 60mL

分離作業時間: 25 minutes

カラムフリー免疫磁気細胞分離



製品情報



マニュアル

参考資料: オンデマンド ウェビナー



WEBINAR

Increasing the Sensitivity of Cytogenetic Analysis of Hematologic Malignancies Through Cell Enrichment

Presented by Murty Vundavalli, Ph.D.
Farzad Nooraie, MD

STEMCELL TECHNOLOGIES

The image shows a webinar title card with an orange background on the left and a blue background with a microscopic image of cells on the right. A QR code is located on the right side of the card.

In hematologic cancers, including B cell lymphomas and multiple myeloma, malignant and non-malignant cells are mixed in the bone marrow or peripheral blood at variable frequencies. **Enrichment of lymphoid cells prior to further analysis using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) can enhance the sensitivity of this technique by increasing the presence of malignant cells.** This improves the resolution of FISH in detecting chromosomal abnormalities in patient samples, particularly in cases where disease burden is low. This webinar is sponsored by STEMCELL Technologies and Molecular at Abbott.

<https://www.stemcell.com/technical-resources/educational-materials/videos-and-webinars/increasing-the-sensitivity-of-cytogetic-analysis-of-hematologic-malignancies-through-cell-enrichment.html>