นิพนธ์ต้นฉบับ

การย้อม Cytochemical Stain ด้วย Acid Phosphatase เปรียบเทียบกับการใช้ T cell Monoclonal Antibodies โดย Flow Cytometry เพื่อการวินิจฉัย T cell Leukemia ในเด็ก

กวิวัณณ์ วีรกุล, กัลยา เตชะวณิช, ยอดสวาสดิ์ เทพธราดล และ กลีบสไบ สรรพกิจ

สาขาวิชาโลหิตวิทยา ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล

บทคัดย่อ: *การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ cytochemical staining ด้วย acid phosphatase ในการวินิจฉัยแยกโรค T cell leukemia ในเด็ก เปรียบเทียบกับการใช้ monoclonal antibodies จำเพาะของ T cell* ***ผลการศึกษา:*** *พบว่า การย้อม acid phosphatase มีความสามารถในการวินิจฉัยโรค T cell leukemia ดังนี้; ความไวในการตรวจ 0.909 (95% CI 0.764, 0.969) และความจำเพาะ 0.942, (95%CI 0.906, 0.965) ส่วนการใช้ T cell monoclonal antibodies จำนวน 4 ตัว คือ CD7, CD2, CD3, และ CD5 พบว่า CD7 มีความไวในการวินิจฉัยมากที่สุด 1.000 (95%CI 0.906, 1.000) และ CD5 มีความจำเพาะมากที่สุด เท่ากับ 0.997 (95%CI 0.977, 0.999)* ***สรุป:*** *acid phosphatase สามารถนำไปใช้ในการตรวจแยกโรค T cell ALL ในเด็กได้พอสมควร ในที่ที่ไม่สามารถทำ immunophenotype ได้ แต่การใช้ immunophenotype ในการวินิจฉัยแยกโรคจะได้ผลที่แน่นอนกว่า โดยเฉพาะ CD7 และ CD5*

Key Words : ● *Acid phosphatase* ● *T cell leukemia* ● *Immunophenotype*

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2545;12:287-94.

ในการวินิจฉัยแยกชนิดของ โรคมะเร็งเม็ดเลือดขาว นอกจาก การดูลักษณะของ blast ด้วย wright stain เพื่อแยกชนิดของ blast ตาม FAB classification[1] แล้ว ยังต้องอาศัยการตรวจวิธีอื่นๆ ได้แก่ cytochemistry, immunophenotyping, cytogenetics[2] และ molecular genetics เพื่อแบ่งแยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวให้ละเอียดลงไป การแบ่งชนิดนี้ มีผลต่อการวางแผนการรักษา และการพยากรณ์โรคในผู้ป่วยเด็กเป็นอย่างมาก การรักษาผู้ป่วยที่เป็น T cell leukemia และ B cell leukemia แตกต่างกัน และผู้ป่วยที่เป็น T cell leukemia จะมีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดี และมีโอกาสมีโรคในอวัยวะนอกระบบเลือด ได้มากกว่า B cell leukemia เช่น โอกาสมีการกระจายของโรคเข้าสู่ระบบประสาท ทำให้ต้องใช้ยาในขนาดที่สูงกว่าปกติ หรือต้องมีวิธีการป้องกันโรคไปที่ระบบประสาทมากกว่า

ได้รับต้นฉบับ 16 กันยายน 2545 และให้ตีพิมพ์ 25 กันยายน 2545
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ พญ.กวิวัณณ์ วีรกุล ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล เขตบางกอกน้อย กรุงเทพฯ 10700

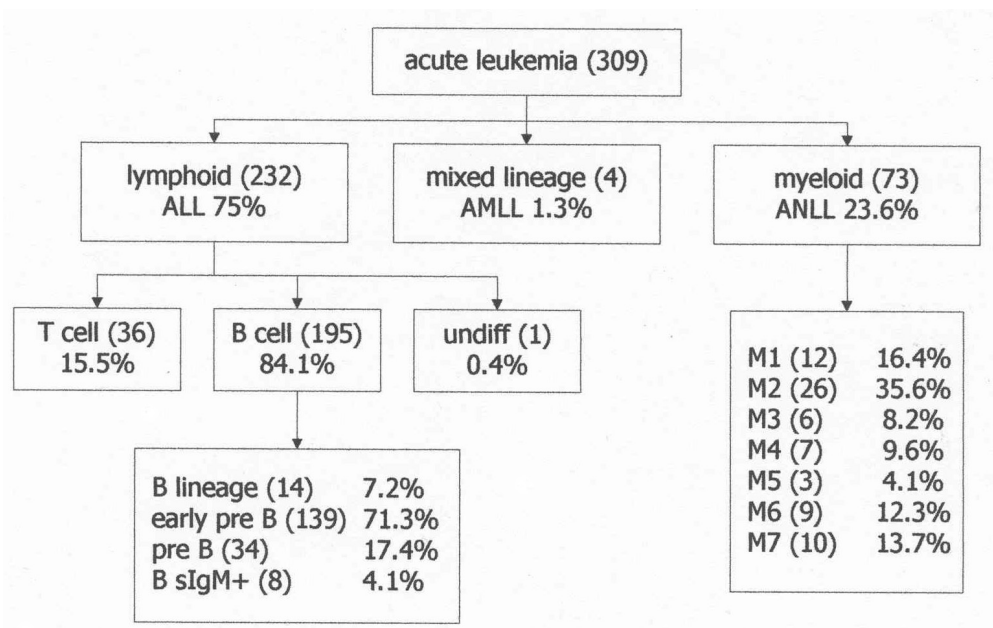
ในประเทศไทยและประเทศที่กำลังพัฒนา การตรวจ immunophenotype และ cytogenetics ตลอดจน molecular technique อื่นๆ มีข้อจำกัดทางด้านงบประมาณและบุคลากร ทำให้ไม่สามารถทำได้ทั่วถึงทั้งประเทศ แต่การย้อม cytochemistry มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย การศึกษานี้จึงวิเคราะห์ ประสิทธิภาพของการใช้ cytochemical stain ด้วย acid phosphatase ในการวินิจฉัยแยกโรค T cell leukemia[3] ออกจาก acute leukemia ชนิดอื่น

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความไว และความจำเพาะของการย้อม cytochemical stain ด้วย acid phosphatase ในการวินิจฉัย T cell leukemiaโดยเปรียบเทียบกับการใช้ monoclonal antibodies จำเพาะของ T cell โดยวิธี flow cytometry[4] เพื่อตรวจ T cell markers

ผู้ป่วยที่ศึกษา

ผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดเฉียบพลัน จำนวน 309 ราย อายุ 0-13 ปี ที่มารับการรักษาที่ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล ตั้งแต่ พ.ศ. 2540-2544 และสามารถตรวจวินิจฉัยแยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวจากการเจาะไขกระดูกได้ ผลการตรวจแยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว แสดงในแผนภูมิที่ 1



แผนภูมิที่ 1 สัดส่วนชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว ในผู้ป่วยเด็กที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลศิริราช พ.ศ. 2540-2544 จำนวน 309 ราย ตังเลขในวงเล็บคือจำนวนผู้ป่วย : ALL. acute lymphoblastic leukemia; ANLL, acute non-lymphoblastic leukemia; AMLL, acute mixed lineage leukemia; M1, acute myeloid leukemia without maturation; M2, acute myeloid leukemia with maturation; M3, acute promyelocytic leukemia; M4, acute myelomonoblastic leukemia; M5, acute monoblastic leukemia; M6, acute erythroleukemia; M7, acute megakaryoblastic leukemia.

วิธีการศึกษา

ผู้ป่วยทุกรายที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น มะเร็งเม็ดเลือดขาว จะได้รับการตรวจไขกระดูก เพื่อแยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวดังนี้; ย้อม wright stain เพื่อดู FAB morphology; ย้อม cytochemistry ได้แก่ periodic acid Schiff (PAS)[5], myeloperoxidase(MPO)[6], combined esterase (chloroacetate esterase and non-specific esterase)[7] และ acid phosphatase (AP)[8,9]; ย้อม immunophenotyping จาก mononuclear cell ที่แยกได้จากไขกระดูกจำนวน 5 mL โดยใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็ง หลังจากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย flow cytometry[4,10] โดยใช้ monoclonal antibody ตามตารางที่ 1

การแยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นไปตาม FAB classification ผู้ป่วยที่ได้รับการจำแนกว่าเป็น T cell leukemia ได้แก่ผู้ป่วยที่มี T cell markers (CD7, CD2, CD3, CD5) ให้ผลบวกมากกว่าร้อยละ 30

การแปลผล ผลบวกสำหรับ acid phosphatase คือมีเซลล์ล์ล์ตัวอ่อนที่ติดสีแดงในซัยโตปลาสม โดยมีลักษณะเป็น block-like positivity มากกว่าร้อยละ 20 ของเซลล์ล์ล์ตัวอ่อนทั้งหมด

การวิเคราะห์ผลการตรวจด้วย acid phosphatase และการตรวจด้วย monoclonal antibodies จำเพาะของ T cells (CD7, CD2, CD3, CD5) ด้วยวิธีทางสถิติ โดยใช้ Chi-square test เพื่อหา sensitivity, specificity, positive และ negative predictive value และหาค่า 95% confidence interval ของแต่ละค่าที่ได้

ผลการศึกษา

ผู้ป่วยจำนวน 276 รายจากผู้ป่วย acute leukemia ทั้งหมด 309 ราย ได้รับการตรวจ acid phosphatase ในจำนวนนี้ พบว่า acid phasphatase ให้ผลบวกจำนวน 44 ราย และให้ผลลบ 232 ราย ในกลุ่มนี้ มีผู้ป่วย T cell leukemia 33 ราย และผู้ป่วยที่ไม่ใช่ T cell 229 ราย (ตารางที่ 2) กลุ่มผู้ป่วยที่มีผลการตรวจAP เป็นบวก แต่ไม่ได้เป็น T cell leukemia (false positive) มีจำนวน 14 ราย ในจำนวนนี้ ได้แก่ ผู้ป่วย B lineage ALL 5 ราย ผู้ป่วย ANLL 9 ราย เมื่อดูตารางความสัมพันธ์ของการตรวจ และการวินิจฉัย T cell leukemia พบว่า การตรวจ AP มีความไวในการวินิจฉัย

ตารางที่ 1 Monoclonal antibodies ที่ใช้แยกชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวในเด็ก ที่ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ รพ.ศิริราช

Markers	Antibodies
General markers	HLA-DR, CD34
Myeloid markers	
Myeloid	CD13-33
Monocytic	CD15
Erythroid	GP-A
Megakaryocytic	CD 41 (gp IIB/IIIA)
Lymphoid markers	
Early pre B	CD19, CD20, CD10 (CALLA)
Pre B	cIgM
B	sIgM
T	CD7, CD2, CD3, CD5

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาผลของการใช้ acid phosphatase staining เพื่อการวินิจฉัย T cell leukemia ผู้ป่วยกลุ่ม (A) เป็น T cell leukemia และผล AP ให้ผลบวก; ผู้ป่วยกลุ่ม (D) ไม่เป็น T cell ALL และผลการตรวจ AP ให้ผลลบ; ผู้ป่วยกลุ่ม (C) เป็นผู้ป่วยที่ผลการตรวจ AP เป็น false negative (9.1%); ผู้ป่วยกลุ่ม (B) เป็นผู้ป่วยที่ผลการตรวจ AP เป็น false positive (5.8 %) ในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ประกอบด้วยผู้ป่วย B cell ALL 5 ราย และ ANLL 9 ราย (M7 3 ราย, M6 2 ราย, M2 2 ราย, M1 และ M3 อย่างละ 1 ราย)

		T cell +	T cell -
AP	+	30 (A)	14 (B)
	-	3 (C)	229 (D)

0.909 (95%CI และมีความจำเพาะ 0.942 (ตารางที่ 3)

ส่วนการตรวจโดยใช้ T cell markers นั้น พบว่า CD7 มีความไวต่อ T cell leukemia ในเด็กมากที่สุด โดยมี sensitivity เท่ากับ 1.000 (95% CI = 0.906, 1.000) แต่ CD5 จะมีความจำเพาะต่อ T cell มากที่สุด โดยมี specificity = 0.996 (95%CI = 0.977, 0.999) (ตารางที่ 4)

วิจารณ์

ในปี ค.ศ. 1976 กลุ่มแพทย์ทางโลหิตวิทยา จากประเทศฝรั่งเศส อเมริกา และอังกฤษ ได้ร่วมกันจัดระบบการแบ่งชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวขึ้น โดยเรียกว่า การแบ่งแบบ FAB (French-American-British classification) ซึ่งในตอนแรกจะแบ่งมะเร็งเม็ดเลือดขาวออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ acute lymphoblastic leukemia (ALL) และ acute myeloid leukemia (AML) โดยใช้การดูรูปร่างลักษณะของเซลล์เป็นหลัก ซึ่งต่อมามีการประชุมและขยายความเพิ่มเติม โดยมีการใช้ cytochemical stain มาช่วยให้การแบ่งชนิดของ leukemia ให้ถูกต้องมากขึ้น โดยถือว่า หากเซลล์ตัวอ่อนย้อมติดสี myeloperoxidase หรือ sudan black B มากกว่าร้อยละ 3 ของเซลล์ตัวอ่อนทั้งหมด จะถือว่าเป็น AML และหากผลการย้อมให้ผลลบ จะเป็น ALL นอกจากนี้ยังมีการใช้ PAS (Periodic-Acid-Schiff) เพื่อการวินิจฉัย ALL โดยถือค่าการติดสี มากกว่าร้อยละ 3 ของตัวอ่อน เป็นผลบวก

การแบ่งชนิดของ leukemia ด้วยระบบดังกล่าว ถึงแม้จะใช้ได้ดีในกลุ่มผู้ป่วยโรค acute myeloid leukemia แต่ในโรค ALL ซึ่งถูกแบ่งเป็น 3 ชนิดตามรูปร่างของเซลล์ตัวอ่อน ได้แก่ L1, L2 และ L3 ไม่สามารถนำมาใช้ในการบอกการพยากรณ์โรคที่แน่นอนได้ มีกลุ่มผู้ป่วยบางคนที่มีลักษณะของเซลล์เป็น L1 แต่การพยากรณ์โรคไม่ดี ในผู้ป่วยเหล่านี้ พบว่ามีปัจจัยที่สำคัญอื่นๆ เช่น เป็น T cell leukemia หรือมีความผิดปกติของโครโมโซมเช่น t(9;22) หรือ philadelphia chro-

ตารางที่ 3 การวิเคราะห์ผลของการใช้ acid phosphatase staining เพื่อการวินิจฉัย T cell leukemia

Acid phosphatase staining for T cell leukemia		95% confidence interval
Sensitivity	0.909	*0.764, 0.969*
Specificity	0.942	*0.906, 0.965*
Positive predictive value	0.682	*0.534, 0.800*
Negative predictive value	0.987	*0.963, 0.996*

ตารางที่ 4 แสดงค่าความไว (sensitivity) และความจำเพาะ (specificity) ของ monoclonal antibodies; CD7, CD2, CD3 และ CD5 ในการวินิจฉัย T cell ALL

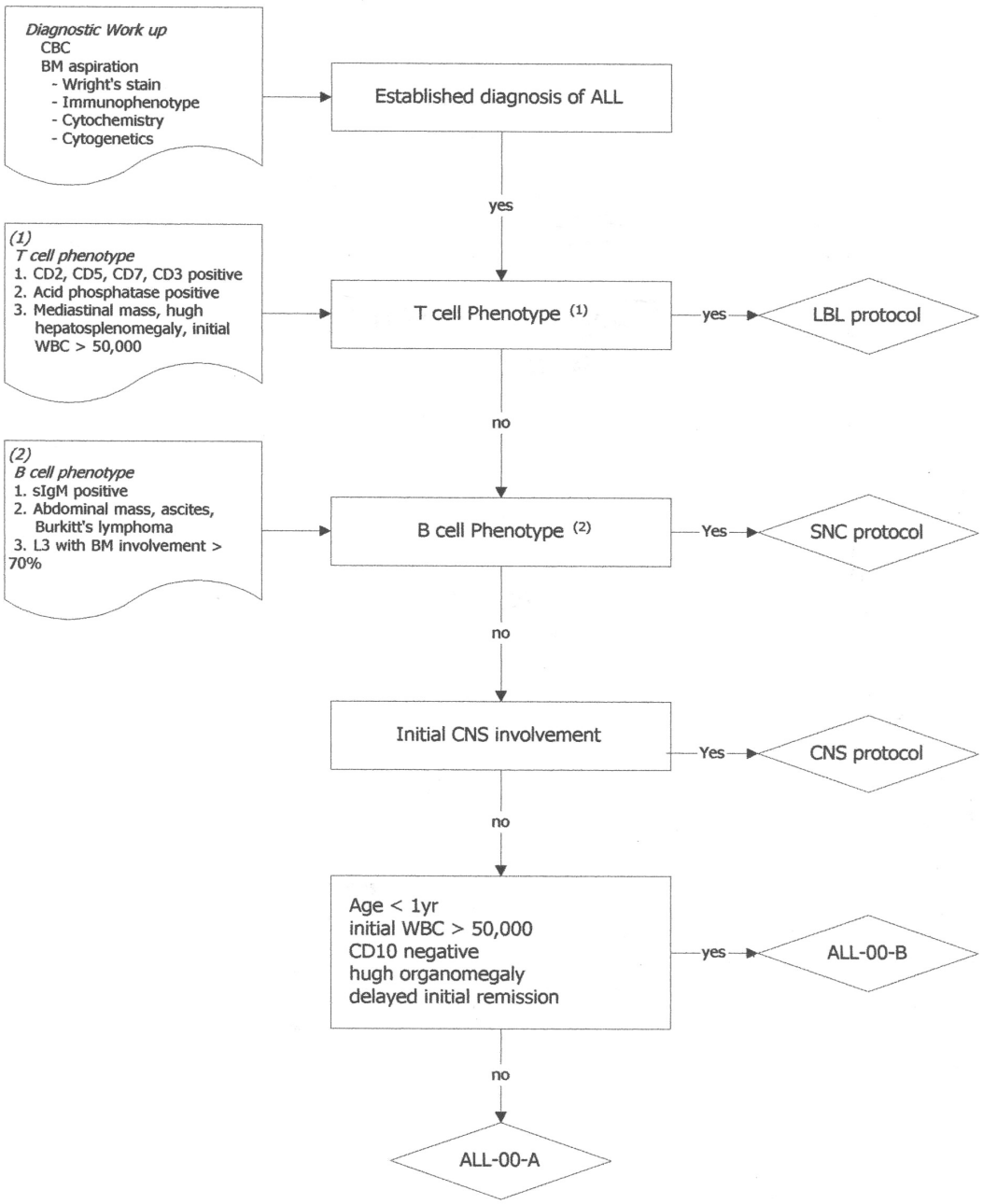
	sensitivity	**specificity**	**+ predictive value**	**- predictive value**
	95% CI	*95% CI*	*95% CI*	*95% CI*
CD7	1.000	0.963	0.787	1.000
	0.906, 1.000	*0.933, 0.980*	*0.651, 0.880*	*0.985, 1.000*
CD2	0.706	0.978	0.685	0.905
	0.538, 0.832	*0.945, 0.991*	*0.685, 0.943*	*0.905, 0.971*
CD3	0.639	0.988	0.885	0.949
	0.476, 0.775	*0.965, 0.996*	*0.710, 0.960*	*0.915, 0.970*
CD5	0.912	0.996	0.969	0.988
	0.770, 0.970	*0.977, 0.999*	*0.843, 0.994*	*0.965, 0.996*

95% CI = 95% confidence interval แสดงค่าไว้ใต้ตัวเลขของค่าต่างๆ

mosome เป็นตัวกำหนดการพยากรณ์โรค ดังนั้น จึงมีความพยายามที่จะหาวิธีการตรวจเพื่อแบ่งชนิดของ ALL ด้วยระบบอื่น เช่นการแบ่งตาม immunophenotype ของเซลล์ ในระยะแรกใช้เทคนิคการดูเม็ดเลือดรวมกลุ่ม (rosetting technique) เพื่อแบ่ง ALL ออกเป็น T cell คือกลุ่มที่ formrosette กับเม็ดเลือดแดงของแกะ (sheep erythrocytes; ERFC) และ B cell คือกลุ่มที่ form rosette กับเม็ดเลือดแดงของหนู (mouse erythrocytes; MRFC)โดยพบว่า กลุ่มที่เป็น T cell มีการพยากรณ์โรคที่ไม่ดีต่อมาจึงมีการใช้ monoclonal antibodies มาใช้เพื่อตรวจดู surface markers ของเซลล์ตัวอ่อน และสามารถแบ่งเซลล์ออกตามการเจริญพัฒนาของเซลล์ (stage ofdifferentiation) พบว่า B cell lineage จะแบ่งออกเป็นearly pre B (CD10 หรือ common ALL antigen-CALLA negative และ positive), pre B (cytoplasmic Ig positive) และ B cell (surface Ig positive)ส่วน T cell ALL มี markers คือ CD7, CD2, CD3 และ CD5 เป็นตัวกำหนด lineage ปัจจุบันนี้จึงเป็นที่ยอมรับกันทั่วโลกว่า การวินิจฉัย และการแบ่งชนิดของacute leukemia ให้ถูกต้องแม่นยำนั้น อย่างน้อยควรต้องใช้ระบบของ MIC classification (Morphology, immunophenotype and cytogenetics classification)[2]

ผู้ป่วยที่มารับการรักษาที่ภาควิชากุมารเวชศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช จะได้รับการตรวจแยกชนิดของ leukemia ตามขั้นตอนที่กล่าวแล้วข้างต้น พบว่ามีผู้ป่วยเป็น T cell ALL ร้อยละ 25 ของผู้ป่วย ALL ทั้งหมด ผู้ป่วยกลุ่มนี้จะได้รับการรักษาต่างจากกลุ่มที่เป็น B cell ALL (แผนภูมิที่ 2)

ใน T-cell leukemia การย้อม acid phosphatase จะพบ activity อยู่บริเวณ golgi เมื่อดูในกล้องจุลทรรศน์จะเห็นสีแดงเป็นก้อนชัดเจนก้อนเดียวหรือหลายก้อน ดังนั้นจึงสามารถใช้ acid phosphatase เป็น marker ของ T-lymphoblast[8,9] แต่เนื่องจากเซลล์ชนิดอื่น เช่น erythroblast และ myeloblast ก็สามารถให้ผลบวกต่อ acid phosphatase ได้ในลักษณะเดียวกัน จึงควรใช้การทดสอบอื่นๆ ประกอบด้วย เช่น กลุ่ม AML จะมี MPO และ sudan black B stain ให้ผลบวก กลุ่ม erythroblast (M6) อาจจะมีผล MPO และ sudan black B เป็นผลลบ แต่เซลล์มักจะมีลักษณะ



แผนภูมิที่ 2 แนวทางการรักษามะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด acute lymphoblastic leukemia (ALL) ในเด็ก โดยแบ่งผู้ป่วยตามกลุ่มความเสี่ยง (risk factors) สำหรับผู้ป่วย T cell ALL จะได้รับการรักษาด้วย Siriraj Protocol LBL โดยดัดแปลงจาก BFM protocol

ทาง morphology จำเพาะชัดเจน ยกเว้น megakaryoblast (M7) ซึ่งถึงแม้เซลล์อาจจะมีลักษณะเฉพาะ คือมักมีขอบเซลล์ไม่เรียบ หรือที่เรียกว่ามี cytoplasmic bleb แต่บางครั้ง เซลล์ก็มีลักษณะเหมือนตัวอ่อนทั่วไปได้ และ M7 มักจะมี acid phosphatase ให้ผลบวกด้วย การวินิจฉัยแยก M7 กับ T cell leukemia จึงมักเป็นปัญหา และจะต้องใช้ immunophenotype มาช่วย

สรุป

การใช้ acid phosphatase เพื่อวินิจฉัยแยกผู้ป่วย T cell ALL มีความไวในการวินิจฉัย ร้อยละ 90.9 และมีความจำเพาะ ร้อยละ 94.2 แต่ acid phosphatase จะให้ผลบวกปลอมได้ โดยเฉพาะกลุ่มผู้ป่วย acute megakaryocytic leukemia (M7) และ acute erythroid leukemia (M6) รวมทั้ง ALL precursor B จึงควรใช้การย้อม cytochemical stain อื่นๆ รวมทั้งการดู morphology มาช่วย และในที่ที่สามารถทำ Immunophenotype ได้นั้น ยังควรจะใช้ immunophenotype มาช่วยในการวินิจฉัยแยกโรคด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. *Bennett JM, Catovsky D, Danial MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukemias (FAB cooperate group). British J Hematol 1976;33:451-8.*
2. *First MIC Cooperative study group Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemia. Cancer genetics and cytogenetics 1986;23:189-97.*
3. *Goldberg AF, Barka T. Acid phosphatase activity in human blood cell. Nature 1962;195:195-297.*
4. *Parks DR, Lanier LL, Herzenberg LA. Flow Cytometry and Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). In: Handbook of Experimental Immunology, Capter 29, eds. Weir DM, Herzenberg LA, Blackwell C (Blackwell Scientific Publication, Oxford)*
5. *Graham RC, Lundholm U, Karnovsky MJ. Cytochemical demonstration of perxidase activity with 3-amino-9 ethyl carbazole. J Histochem Cytochem 1965;13:150-2.*
6. *Thompson SW, Hunt RD. Selected histochemical and histopathological method. Springfield : Thomas, 1966.*
7. *Lam KW, Li CY, Yam LT. Simultaneous demonstrating of nonspecific esterase and chloroacetate esterase in human blood cells. Stains Technology 1985;60:169-72.*
8. *Cotovsky D, Greaves MF, Dain C, et al. Acid phosphatase reaction in acute lymphoblastic leukemia. Lancet 1978;1:749-51.*
9. *Stein H, Petersen N, Gaedicke G, et al. Lymphoblastic lymphoma of covoluted or acid phophatase type A tumor of T precursor cells. Int J Cancer 1976;17:292-5.*
10. *Jackson AL, Warner NL.(1986) Preparation, Staining and Analysis by Flow Cytometry of Peripheral Blood Leucocytes. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology, Third Edition, p.226-35, eds. Rose NR, Friedman M, Fahey JL. (American Society for Microbiology, Washington, D.C.)*
11. *Reiter A, Schrappe M, Parwaresch R, et al. Non-Hodgkin's lymphomas of childhood and adolescence: results of a treatment stratified for biologic subtypes and stage - a report of Berlin-Frankfurt-Munster Group. JCO 1995;13:359-72.*

The Use of Acid Phosphatase Cytochemical Staining for Detection of T cell Leukemia in Children; Compare to Immunophenotyping by Monoclonal Antibodies Using Flow Cytometry

Gavivann Veerakul, Kalaya Techawanich,

Yodsaward Theptaradol, and Kleebsabai Sanpakit.

Division of Hematology/Oncology, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine Siriraj Hospital. Bangkok, Thailand

---

Abstract: *The use of cytochemical staining with Acid Phosphatase for diagnosis of T cell leukemia in children were statistically analysed, and compared to the results from immunophenotypic study, using T cell monoclonal antibodies by flow cytometry.* ***Results:*** *The use of acid phosphatase staining for T cell leukemia showed 0.909 sensitivity (95%CI 0.764, 0.969) and 0.942 specificity (95%CI 0.906, 0.965). Among the 4 monoclonal antibodies (CD7, CD2, CD3, CD5) used for T cell leukemia, the CD7 had the highest sensitivity of 1.000 (95%CI 0.906, 1.000) and CD5 had the highest specificity of 0.997 (95%CI 0.977, 0.999).* ***Conclusion:*** *Acid phosphatase staining can be used to differentiate T cell leukemia from other types of leukemia in places where immunophenotypic and cytogenetic studies were unavailable. Immunophenotyping was still the standard investigation, recommended in classification of childhood leukemias,and the diagnosis of T cell leukemia especially CD7 and CD5.*

Key Words : ● *Acid phosphatase* ● *T cell leukemia* ● *Immunophenotype*

Thai J Hematol Transf Med 2002;12:287-94.