บทนำ

การแยกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน (acute leukemias) ในช่วงหลังปี ค.ศ. 1976 นิยมใช้เกณฑ์ของ French-American-British (FAB) Cooperative Group[1,2,3,4,5] โดยอาศัยรูปร่างลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจากการย้อมสีตระกูลโรมานอฟสกี (Romanovsky's stain) และจากการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ (cytochemistry) จากสเมียร์เลือด และ/หรือไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันตามเกณฑ์ FAB cooperative Group แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ 1) มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดลิมโฟบลาสทิก (acute lymphoblastic leukemia; ALL) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชนิดย่อยคือ L1, L2 และ L3 (ตารางที่ 1) 2) มะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันชนิดไมยีลอยด์ (acute myeloid leukemia; AML) ซึ่งแบ่งออกเป็น Mo, M1, M2, M3, M4, M5, M6 และ M7 (ตารางที่ 2) ในการแยกชนิดย่อยมะเร็งเม็ดเลือดขาวดังกล่าวมีประโยชน์ต่อการรักษาและพยากรณ์โรค แต่ในปัจจุบันมีการใช้เทคนิคทางอิมมูโนโลยีมาใช้แยกชนิดย่อยของมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน โดยใช้แอนติบอดีต่อแอนติเจนซึ่งเป็นฟีโนไทพ์ของเซลล์เม็ดเลือดต่าง ๆ หรือเรียกว่าการย้อมอิมมูโนฟีโนไทพ์ (immunophenotyping)[6] ดังตารางที่ 3 ดังนั้นในปัจจุบันจึงนิยมแยกชนิด ALL เป็น 2 กลุ่มใหญ่ตามชนิดของเซลล์ที่เป็นมะเร็ง คือ B-cell lineage ALL และ T-cell lineage ALL (ตารางที่ 4)[7] สำหรับ AML ยังคงนิยมแยกชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB แต่ใช้เทคนิคการย้อมอิมมูโนฟีโนไทพ์เพื่อช่วยในการวินิจฉัย

โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น มีผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเข้ารับการตรวจรักษาจำนวนมาก โดยผู้ป่วยส่วนใหญ่มาจากจังหวัดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาอุบัติการณ์เกิดชนิดย่อยของมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันในช่วงปี พ.ศ. 2535-2537 โดยแยกชนิดตามเกณฑ์ FAB และอิมมูโนฟีโนไทพ์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาหาอุบัติการณ์เกิดชนิดย่อยของมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันในผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวที่เข้ารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในช่วงปี พ.ศ. 2535-2537 โดย ALL แยกชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB Cooperative Group เป็น L1, L2 และ L3 และตามอิมมูโนฟีโนไทพ์ เป็น B-cell lineage ALL และ T-cell lineage ALL โดยย้อม CD10, CD19, CD3, CD4, CD8, Tdt (Terminal deoxynucleotidyl transferase) และ HLA-DR สำหรับ AML แยกชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB และศึกษาอิมมูโนฟีโนไทพ์ โดยย้อม CD13, CD14, CD34, CD61 (GpIIIa), MPO (myeloperoxidase) และ HLA-DR

ทบทวนเอกสาร

มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemias) เป็นโรคที่มีความผิดปกติของเม็ดเลือดขาวทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ เป็นเซลล์มะเร็งที่เพิ่มจำนวนอย่างควบคุมไม่ได้ในไขกระดูก แพร่กระจายออกนอกไขกระดูกเข้าสู่กระแสเลือด เนื้อเยื่อ และอวัยวะต่าง ๆ แต่เดิมการแยกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวแบ่งเป็นชนิดเฉียบพลัน (acute leukemia) และชนิดเรื้อรัง (chronic leukemia) และเรียกชื่อชนิดย่อยตามชนิดของเม็ดเลือดที่เป็นมะเร็ง โดยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน แบ่งเป็น acute lymphoblastic leukemia (ALL), acute myeloblastic leukemia (AML), acute promyelocytic leukemia (APL), acute myelomonocytic leukemia (AMMoL), acute monoblastic leukemia (AMoL), และ erythroleukemia (EL) ในปี ค.ศ. 1976 กลุ่มนักวิทยาศาสตร์ 7 ท่าน จากฝรั่งเศส อเมริกา และสหราชอาณาจักร รวมกลุ่มกันเรียกว่า French-American-British (FAB) Coopera-tive Group[1] ได้ร่วมกันศึกษาชนิดย่อย และเสนอเกณฑ์การแยกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน โดยอาศัยรูปร่างลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดจากการย้อมสีตระกูลโรมานอฟสกี เช่น Wright's stain ร่วมกับการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ ตามาในปี ค.ศ. 1981 FAB Cooperative Group ได้ปรับปรุงเกณฑ์การแยก ALL[2] และปรับปรุงเกณฑ์การแยกชนิดย่อยของ AML พร้อมทั้งเสนอเกณฑ์การแยก AML กับ myelodysplastic syndrome (รูปที่ 1)[3] โดยแยก AML เป็น M1, M2, M3, M4, M5 (M5a และ M5b) และ M6 ในปี ค.ศ. 1985 และได้เสนอเกณฑ์การวินิจฉัย AML-M7 (acute megakaryoblastic leukemia) ในปี ค.ศ. 1985[4] นอกจากนี้ยังเสนอเกณฑ์การวินิจฉัย AML-Mo (minimally differentiated AML หรือ acute undifferentiated leukemia)[5] ดังนั้นตามเกณฑ์ FAB Cooperative Group ALL จะประกอบด้วย 3 ชนิดย่อย ดังตารางที่ 1 ส่วน AML ประกอบ 8 ชนิดย่อยดังตารางที่ 2

ต่อมามีการใช้เทคนิคทางอิมมูโนโลยีมาประยุกต์ใช้แยกชนิดย่อยมะเร็งเม็ดเลือดขาว โดยมีการเตรียมโมโนโคลนอลแอนติบอดี (monoclonal antibody) ต่อแอนติเจน หรือฟีโนไทพ์ของเซลล์บนเยื่อหุ้มเซลล์ ไซโทพลาสซึม แกรนูล และในนิวเคลียสของเม็ดเลือดและระยะต่าง ๆ กลุ่มของ ALL แยกชนิดย่อยเป็น B-cell lineage ALL และ T-cell lineage ALL ซึ่งอาจแยกชนิดย่อยแตกต่างกันบ้างขึ้นอยู่กับแอนติบอดีที่ใช้ เช่น Erber กับคณะ[8] แยก ALL ออกเป็น 4 ชนิดย่อย คือ common ALL, pre-B ALL, B-ALL และ T-ALL ซึ่งมีอิมมูโนฟีโนไทพ์แตกต่างกันดังตารางที่ 5 Nedler กับคณะ ได้แบ่ง B-cell lineage ALL ออกเป็น 6 กลุ่ม คือ group I ถึง VI (ตารางที่ 6) และ Roper กับคณะ แบ่ง T-cell lineage ALL เป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 7)[9] ในปี ค.ศ. 1986 มีการประชุม First Morphologic, Immunologic, and Cytogenetic(MIC) Cooperative Study Group ได้ประชุมเชิงปฏิบัติการแยกชนิด ALL โดยใช้ความสัมพันธ์ของรูปร่างลักษณะตามเกณฑ์ FAB อิมมูโนฟีโนไทพ์ และคาริโอไทพ์ (karyotypes) โดยแบ่งเป็น 1) B-cell lineage ALL ซึ่งแยกเป็นชนิดย่อย 4 ชนิด คือ early B-precursor ALL, common ALL, pre-B ALL และ B-cell ALL 2) T-cell lineage ALL แบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อย คือ early T-precursor ALL และ T-cell ALL (ตารางที่ 4)[7]

AML ยังนิยมแยกชนิดตามเกณฑ์ FAB Cooperative Group ดังกล่าวแล้ว สำหรับอิมมูโนฟีโนไทพ์ที่พบ ได้แก่ CD13, CD14, CD33, CD41 (Gp IIb/IIIa), CD34, HLA-DR เป็นต้น ซึ่ง Traweek ได้ศึกษาอิมมูโนฟีโนไทพ์ไว้ดังตารางที่ 8[10]

เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาอิมมูโนฟีโนไทพ์ได้แก่ อิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ (immunofluorescence) ทั้งที่อ่านผลโดยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ (fluorescent microscope) หรือโดยเครื่องโฟลว์ไซโทเมตรี (flow cytometry) หรือเทคนิคอิมมูโนไซโทเคมี (immunocytochemistry) เช่น อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส/แอนติ-อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase/anti-alkaline phosphatase; APAAP) โดยแอนติบอดีต่อฟีโนไทพ์ของเซลล์เม็ดเลือดที่นิยมใช้ในการแยกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาว ได้แก่

1. กลุ่มแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของ T-cell lineage คือ แอนติบอดีต่อ :

   CD1 : anti Leu 6, OKT6, DAKO-CD1

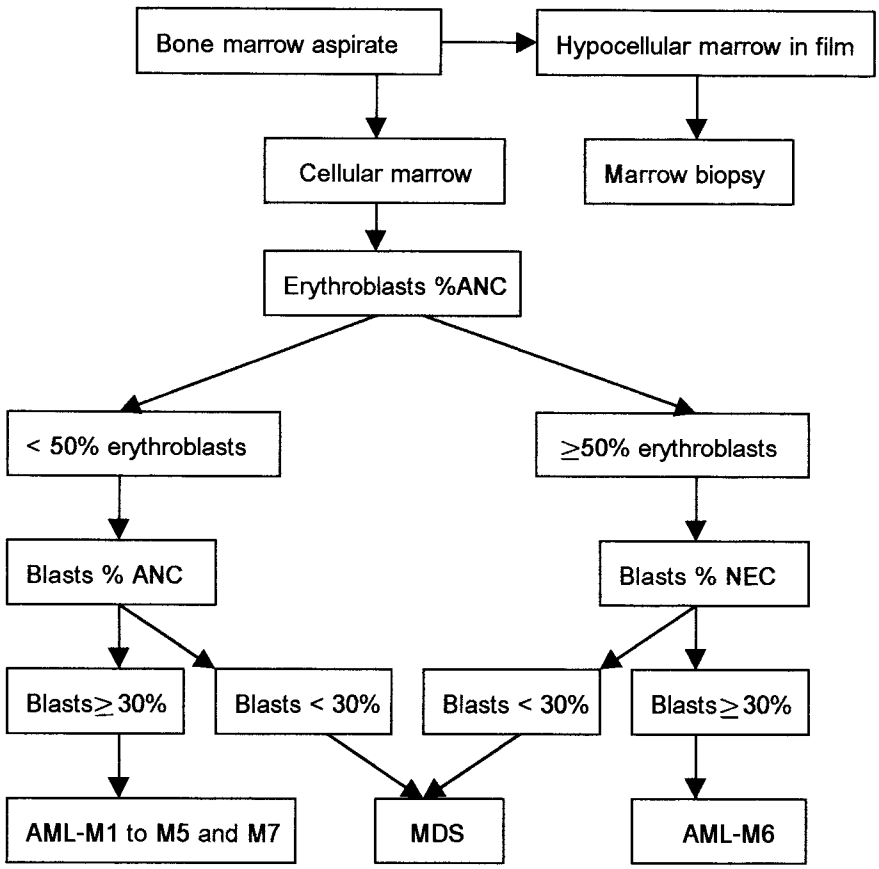
   CD2 : anti Leu5, OKT11, DAKO-CD2

   CD3 : anti Leu 4, OKT3, DAKO-CD3

   CD4 : anti Leu 3a, OKT4, DAKO-CD4

   CD5 : anti Leu1, DAKO-CD5

   CD7 : anti Leu9, DAKO-CD7



รูปที่ 1 แสดงแผนภูมิการวินิจฉัยแยก AML กับ MDS ตามเกณฑ์ FAB
ANC ; all nucleated cells, NEC ; nonerythroid cells, AML ; acute myeloid leukemia, MDS ; myelodysplastic syndrome.
(ที่มา : ประยุกต์จาก Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Granick HR, Sulton C. Proposal revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. Ann Intern Med 1985;103: 26-9.)

ตารางที่ 1 ชนิดย่อยและเกณฑ์การแยก ALL ตาม FAB Cooperative Group

Cell features	FAB Subtypes		
	L1	L2	L3
Cell size	Small cells predominant	Large, heterogeneous in size	Large and homogeneous
Chromatin	Homogeneous in any one case	Variable heterogeneous in any one case	Finely stippled and homogeneous
Nuclear feature	Regular occasional cleft and indentation	Irregular cleft and indentation	Regular oval to round
Nucleolus	Not visible, or small and inconspicuous	One or more present often large	Prominent, one or more vesicular
Cytoplasm	Scanty	Variable, often moderately abundant	Moderately abundant
Cytoplasmic color intensity (with Romanovsky'sstain)	Slightly or moderately, rarely intense	Variable, deep in some	Very deep
Vacuoles	Variable	Variable	Often prominent

(ที่มา : Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G Galton DAG, Granick HR, Sultan C. Proposal for classification of leukemia. Br J Haematol 1976;33:451-81.

ตารางที่ 2 ชนิดย่อยของ AML ตาม FAB Cooperative Group

M0	Early myeloblastic leukemia or minimally differentiated AML
M1	Acute myeloblastic leukemia without maturation
M2	Acute myeloblastic leukemia with maturation
M3	Acute promyelocytic leukemia M3 : acute promyelocytic leukemia hypergranular type M3m; acute promyelocytic leukemia microgranular type
M4	Acute myelomonocytic leukemia, M4Eo : M4 with eosinophilia
M5	Acute monoblastic leukemia, M5a : poorly differentiated acute monoblastic leukemia M5b : well differentiated acute monoblastic leukemia
M6	Erythroleukemia
M7	Acute megakaryoblastic leukemia

ตารางที่ 3 แสดงชุดโมโนโครนอล แอนติบอดี ที่นิยมใช้แยกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน

Antigen	Specificity	Source
T-cell markers		
CD1(T6)	Cortical thymocytes	Dako
CD2(T11)	Pan-T	Dako
CD3(T3)	Pan-T	Dako
CD4(T4)	T-helper cell	Dako
CD5(T1)	Pan-T	Dako
CD7	Pan-T	Dako
CD8(T8)	T-supressor cell	Dako
B-cell markers		
CD19(B4)	Pan-B	Dako
CD20(B1)	Peripheral-B	Coulter
CD22	Pan-B	Dako
Myeloid cell markers		
CD13	Myeloid/monocytic cells	Coulter
CD14	Monocytic cells	Coulter
CD33	Myeloid/monocytic cells	Coulter
CD41(Gp Iib/IIIa)	Megakaryocytic cells	Dako
MPO	Myeloid/monocytic cells	Dako
Miscellaneous		
HLA-DR	B-cell, monocytes, macrophages	Dako
CD10(CALLA)	Common ALL antigen	Dako
CD34	Hematopoietic precursor	Dako
Tdt	Hematopoietic precursor	Dako
Immunoglobulin	B-cells	Dako
μ-chain	B-cells	Dako

(ที่มา : Chanarin I. Laboratory Hematology: An Acount of Laboratory Techniques. 1st ed, Hong Kong : Longman Group (FE) Ltd, 1989:205.)

ตารางที่ 4 ชนิดย่อยของ ALL ตาม Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) Cooperative Group ค.ศ. 1986

Category	Karyotype	Cell markers						FAB morphology
		B4	Tdt	Ia	cALLA (CD10)	cIg	sIg	
B cell-lineage ALL								
-Early B-precursor[a]	t(4;11)[b] t(9;22)	+	+	+	-	-	-	L1, L2
-Common	6q- near haploid t or del 12(p) t(9;22)	+	+	+	+	-	-	L1, L2
-Pre-B	t(1;19) t(9;22)	+	+	+	+[c]	+	+	L1
-B-cell	t(8;14) t(2;8) 6q-	+	-	+	+/-	-/+	+[d]	L3

Category	Karyotype	Cell markers			FAB morphology
		CD7(Gp40)	CD2(E-receptor)	Tdt	
T-cell lineage ALL[e]					
-Early T-precursor	t or del(9p)	+	-	+	L1, L2
-T-cell[g]	t(11;14) 6q-	+	+[f]	+	L1, L2

Abbreviation : + ; over 10% of cells are positive over control, a : previously known as null ALL, c ; very rarely cALLA antigen may be present, d : single light chain, e : A minority of cases (6-10%) may express Ia and/or cALLA, f ; by MoAb(e.g. T11) or by E-rosettes, g ; some cases are also positive for cortical thymocyte marker (CD1 or T6)

(ที่มา : First MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemia. Cancer Cytogenet 1986;23:189-97).

ตารางที่ 5 ชนิดย่อยของ ALL ตามอิมมูโนฟีโนไทพ์จากการศึกษาโดย Erber และคณะ(ค.ศ. 1986)

ALL suptypes	Immunophenotypes					
	HLA-DR	CD22	μ-chain	CD10	Tdt	CD7
Common ALL	+	+/-	-	+	+/-	-
Pre-B ALL	+	+/-	cμ +	+	+/-	-
B-ALL	+	+	sIgM +	-	-	-
T-ALL	-/+	-	-	-/+	+	+

(ที่มา : Erber WN, Mynheer LC, Mason DY. APAAP labeling of blood and bone marrow samples for phenotyping leukemia. Lancet 1986;1:761-5.)

ตารางที่ 6 ชนิดย่อยของ B-cell lineage ALL ตามอิมมูโนฟีโนไทพ์ จากการศึกษาของ Nadler และคณะ

ALL subtypes	Immunophenotypes					
	HLA-Ia	CD19(B4)	CD10	CD20(B1)	cμ	sIg
Group I	+	-	-	-	-	-
Group II	+	+	-	-	-	-
Group III	+	+	+	-	-	-
Group IV	+	+	+	+	-	-
Group V	+	+	+	+	+	-
Group VI	+	+	+/-	+	-	+

(ที่มา : Foon KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 1986; 68:1-31.)

ตารางที่ 7 ชนิดย่อยของ T-cell lineage ALL ตามอิมมูโนฟีโนไทพ์ จากการศึกษาของ Roper และคณะ

ALL subtypes	Immunophenotypes						
	CD7(Leu9)	CD5(Leu1)	CD2(T11/Leu5)	CD3(T3/Leu4)	CD4(T4/Leu3)	CD8(T8/Leu2)	CD1(T6)
Group I	+	+(90%)	+(75%)	-	-	-	-
Group II	+	+	+	+(25%)	+(90%)	+(90%)	+
Group III	+	+	+	+	+/-	+/-	-

(ที่มา : Foon KA, Todd RF. Immunologic classification of leukemia and lymphoma. Blood 1986; 68:1-31.)

ตารางที่ 8 แสดงอิมมูโนฟีโนไทพ์ของ AML จากการศึกษาของ Traweek ค.ศ. 1993 @

Leukemia type	Phenotypes													
(no. of patients)*	CD45	CD2	CD3	CD5	CD7	CD19	CD20	CD13	CD14	CD15	CD33	CD10	HLA-DR	CD34
AML-M1	18/19	0/40	0/18	0/15	9/37	1/40	0/39	29/38	0/27	14/26	33/40	1/38	23/27	22/36
(n=40)	(95%)				(24%)	(3%)		(76%)		(54%)	(83%)	(3%)	(85%)	(61%)
AML-M2	22/22	0/68	0/49	0/43	7/6	4/67	1/68	44/68	4/67	18/36	54/69	1/64	54/67	34/53
(n=69)	(100%)				(11%)	(8%)	(1%)	(87%)	(8%)	(50%)	(78%)	(2%)	(81%)	(83%)
AML-M3	11/11	6/19	0/8	0/10	0/19	0/19	0/19	16/18	1/19	5/12	16/19	0/19	1/18	10/18
(n=19)	(100%)	(31%)						(89%)	(5%)	(42%)	(84%)		(6%)	(63%)
AML-M4	14/14	0/39	0/25	0/25	3/38	0/39	0/38	16/35	17/38	15/20	36/39	2/39	33/38	19/26
(n=39)	(100%)				(8%)			(46%)	(45%)	(75%)	(92%)	(5%)	(87%)	(73%)
AML-M5	5/5	0/18	0/13	0/13	8/18	0/17	0/18	12/17	8/18	5/8	15/18	1/18	15/18	8/13
(n=18)	(100%)				(44%)			(71%)	(44%)	(63%)	(83%)	(6%)	(83%)	(62%)
AML-M6	1/1	0/3	0/2	0/2	1/3	0/3	0/3	2/3	0/3	1/1	0/3	0/3	2/3	3/3
(n=3)														
AML-M7	1/1	0/2	0/1	0/1	1/2	0/2	0/2	1/2	0/2	0/1	1/2	0/2	0/1	1/2
(n=2)														
AML-Mo	3/3	0/8	0/7	0/5	3/7	0/9	0/9	7/9	1/9	2/6	5/9	0/9	9/9	9/9
(n=9)														
AML-NOS	3/3	0/8	0/3	0/2	0/4	0/7	0/7	6/7	0/8	3/6	7/8	0/6	7/7	5/7
(n=8)														
AML(total)	78/79	6/205	0/126	0/116	32/190	5/203	1/204	133/195	35/191	63/116	167/207	5/198	143/169	111/165
	(99%)	(3%)#			(17%)	(2%)	(<1%)	(68%)	(18%)	(54%)	(80%)	(3%)	(85%)**	(67%)

NOS; not otherwise specified, AML; acute myeloid leukemia, @ ; Results are expressed for each antigen as number of positive cases/number of cases studied, *; Total AML studied = 207, Three cases, all M2, failed to express myeloid lineage antigens this equals 3/69(4%) of M2 or 3/207(1.5%) of all AML studied, #; CD2 present only in M3, **; Ecludes M3 from total.

(ที่มา : TraweeK T. Immunophenotypic analysis of acute leukemia. Am J Clin Pathol 1993;99:504-12.)

CD8 : anti Leu2, DAKO-CD8

2. กลุ่มของแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของ B-cell lineage คือ แอนติบดีต่อ :

CD19 : anti-B4, DAKO-CD19

CD20 : anti-B1, DAKO-CD20

CD22 : HD-6, DAKO-CD22

CD24 : BA-1

CD10 : J5, anti-CALLA, DAKO-CD10

CD9 : BA-2

μ : anti- μ -chain

Ig : anti-immunoglobulin (เช่น IgG, IgM, IgA)

3. กลุ่มแอนติบอดีที่ทำปฏิกิริยากับแอนติเจนของ myeloid lineage คือ แอนติบอดีต่อ :

CD11 : Mo1, OKM1, Mo5

CD12 : 20.2

CD13 : anti-CD13, My7, DAKO-CD13

CD33 : anti-CD33, DAKO-CD33

CD41 : anti-Gp IIb/IIIa, DAKO-CD41

MPO : anti-MPO, DAKO-MPO

นอกจากนี้ยังมีแอนติบอดีต่อแอนติเจนของเม็ดเลือดที่ไม่จำเพาะต่อสายของเซลล์ ได้แก่ แอนติบอดีต่อ Tdt, HLA-DA, HLA-Ia และ CD34 เป็นต้น

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สิ่งส่งตรวจ

สิ่งส่งตรวจเป็นเลือด และ/หรือไขกระดูกจากผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ในช่วงปี พ.ศ. 2535-2537 โดยมีข้อบ่งชี้

1. เป็นผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยขั้นต้นว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน จากการตรวจร่างกาย และตรวจ complete blood count(CBC)
2. เป็นผู้ป่วยทั้งเพศชาย และหญิง ทุกช่วงอายุ
3. สิ่งส่งตรวจเป็นเลือด 2-3 มล. ใส่ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็ง และ/หรือไขกระดูก จากการเจาะดูด (aspirated marrow) ทำเป็นสเมียร์หรือสควาช

น้ำยาและสารเคมี

1. Wright-Giemsa stain
2. น้ำยาสำหรับย้อมเปอรอกซิเดส โดยวิธี Kaplow ปี ค.ศ. 1975
3. น้ำยาสำหรับย้อม PAS
4. น้ำยาสำหรับย้อม แอลฟา-แนฟทิล อาซิเตท เอสเตอเรส (α-naphthyl acetate esterase; (NAE) โดยวิธี Yam และคณะปี ค.ศ. 1971
5. น้ำยาสำหรับย้อม แอลฟา-แนฟทิล บิวไทเรท เอสเตอเรส (α-naphthyl butyrate esterase; NBE) โดยวิธี Li และคณะ ปี ค.ศ. 1973
6. น้ำยาสำหรับย้อมอิมมูโนฟีโนไทพ์ โดยวิธี อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส/แอนติ-อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส
   - 6.1 แอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibodies) เป็น mouse monoclonal antibodies ของ DAKO ได้แก่
     - DAKO-CD3 (M756)
     - DAKO-CD4 (M716)
     - DAKO-CD8 (M707)
     - DAKO-CD10 (M727)
     - DAKO-CD19 (M740)
     - DAKO-Tdt (M771)
     - DAKO-HLA-DR (M704)
     - DAKO-CD13 (M812)
     - DAKO-CD14 (M825)
     - DAKO-CD34 (M824)
     - DAKO-CD68 (M718)
     - DAKO-MPO (M748)
     - DAKO-CD61 (M753)
   - 6.2 แอนติบอดีทุติยภูมิ (secondary antibody) เป็น rabbit anti-mouse immunoglobulin(Z 259; DAKO)
   - 6.3 APAAP complex (D651; DAKO)
   - 6.4 0.5 M Tris/HCL ; pH7.6
   - 6.5 0.05 M Tris buffered saline (TBS); pH 7.6

6.6 0.1 M Tris buffer; pH 8.2

6.7 Stock substrate solution for alkaline phosphatase

6.8 Working substrate for alkaline phosphatase

6.9 Mayer's hematoxylin

ขั้นตอนการศึกษาวิจัย

1. นำเลือด และ/หรือไขกระดูกของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยขั้นต้นว่าเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน ย้อมสี Wright-Giemsa อย่างละ 1 แผ่น ทำการตรวจดูรูปร่างลักษณะของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

2. ศึกษาปฏิกิริยาเคมีเซลล์ โดยการย้อมเปอรอกซิเดส, PAS, แอลฟ่า-แนฟทิล อาซิเตท เอสเตอเรส และ แอลฟ่า-แนฟทิล บิวไทเรท เอสเตอเรส

3. ศึกษาลักษณะสเมียร์เลือด และไขกระดูกของผู้ป่วย ร่วมกับผลการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ (ข้อ 1 และ 2) แล้วแยกชนิดมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันตามเกณฑ์ FAB Cooperative Group โดย ALL แยกชนิดย่อยเป็น L1, L2 และ L3 ส่วน AML แยกชนิดย่อยเป็น M1, M2, M3, M4, M5a, M5b, M6 และ M7

4. ย้อมอิมมูโนฟีโนไทพ์ต่าง ๆ โดยวิธี APAAP

5. วิเคราะห์ผลการวิจัย

การย้อมเปอรอกซิเดส[11]

น้ำยาและสารเคมี

1. น้ำยาตรึงเซลล์ (fixative) : Buffered for maldehyde-acetone solution; pH 6.6
2. 0.2 mol/l acetate buffer; pH 5.0-5.2
3. Stock substrate solution (no H_2O_2)

3-amino-9-ethylcarbazole	..... 10 mg
Dimethylsulfoxide	..... 6 mg
0.2 mol/l acetate buffer; pH 5.0-5.2	.....50 ml

4. Working substrate solution

Stock substrate solution	.....5.6 ml
0.3% H_2O_2	.....0.04 ml

ผสมให้เข้ากัน ใช้งานทันที

5. Mayer's hematoxylin

วิธีการย้อม

1. นำสเมียร์เลือด หรือไขกระดูกที่แห้งสนิทมาจุ่มลงในน้ำยาตรึงเซลล์ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 15 วินาที
2. ล้างด้วยน้ำกลั่น
3. เทสารละลาย working substrate ลงบนสเมียร์จนท่วม ทิ้งไว้นาน 2 ½ นาที
4. ล้างออกด้วยน้ำ
5. ย้อมทับด้วย Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที
6. ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง จากนั้นหยด glycerine 1 หยดลงบนสเมียร์ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การอ่านผล

ผลบวก : มีเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเท่ากับหรือมากกว่า 3% ให้ผลบวก ซึ่งเห็นเป็นแกรนูลสีน้ำตาลแดง (red brown) ในไซโทพลาซึม

ผลลบ : มีเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า 3% ให้ผลบวก

การย้อม PAS[12]

น้ำยาและสารเคมี

1. น้ำยาตรึงเซลล์ : 10% formal ethanol
2. 1% periodic acid
3. Schiff's reagent
4. Mayer's hematoxylin

วิธีการย้อม

1. นำสเมียร์เลือดหรือไขกระดูกที่แห้งสนิท ตรึงด้วย 10% formal ethanol นาน 10 นาที
2. ล้างด้วยน้ำประปานาน 15 นาที
3. เติม 1% periodic acid ลงบนสเมียร์
4. ล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที
5. เติม Schiff's reagent ลงจนท่วมสเมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลานาน 20-30 นาที
6. ล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 10-15 นาที
7. ย้อมทับด้วย Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที
8. ล้างด้วยน้ำประปา ทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การอ่านผล

ผลบวก : PAS ให้ผลบวกเป็นแกรนูลสีบานเย็น โดยมีลักษณะได้หลายแบบ ดังนี้

ก. ผลบวกเป็นแกรนูลขนาดใหญ่เม็ดเดียว หรือ 2 เม็ด เรียกว่า "block like pattern"

ข. ผลบวกเป็นแกรนูลขนาดเล็ก หรือ/และใหญ่หลายเม็ดแยกกัน โดยที่พื้นไซโทพลาซึมไม่ติด เรียกว่า "discrete granular pattern without diffuse background"

ค. ผลบวกเป็นแกรนูลขนาดเล็ก และ/หรือใหญ่ โดยที่พื้นไซโทพลาซึมติดสีชมพู เรียกว่า " Coarse and/or fine granular pattern with diffuse background"

ผลลบ : ไม่ติดสี

การย้อมแอลฟา-แนฟทิล อาซิเตท เอสเตอเรส โดยวิธี Yam และคณะ ปี ค.ศ. 1971[13]

น้ำยาและสารเคมี

1. 1/15 mol/l phosphate buffer; pH 7.6
2. Pararosaniline solution
3. 4% sodium nitrite
4. Hexazotized pararosaniline solution

5. Substrate solution

α-naphthyl acetate	..... 50 mg
Ethylene glycol monoethyl ether	..... 2.5 ml
Hexazotized pararosaniline solution	..... 3.0 ml
1/15 mol/l phosphate buffer; pH 7.6	..... 44.5 ml

เตรียมสด กรองใส่ Coplin jar แล้วใช้งานทันที

วิธีการย้อม

1. นำสเมียร์เลือดหรือไขกระดูกที่แห้งสนิท ตรึงด้วย buffered formaldehyde-acetone นาน 15 วินาที
2. ล้างด้วยน้ำกลั่น
3. จุ่มสเมียร์ลงใน substrate solution ทิ้งไว้นาน 45 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด
4. เมื่อครบเวลาล้างด้วยน้ำ
5. ย้อมทับด้วย mayer's hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที
6. ล้างด้วยน้ำ ปล่อยให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การอ่านผล

ผลบวก : เห็นเป็นสีน้ำตาลในไซโทพลาซึม

ผลลบ : ไม่ติดสี

การย้อมแอลฟา-แนฟทิล บิวไทเรท เอสเตอเรส โดยวิธี Li กับคณะ ปี ค.ศ. 1973[13]

น้ำยาและสารเคมี

1. 1/15 mol/l phosphate buffer; pH 6.3
2. Pararosaniline solution
3. 4% sodium nitrite
4. Hexazotized pararosaniline solution
5. Substrate solution

α-naphthyl butyrate	.....50 mg (0.05 ml)
Ethylene glycol monoethyl ether	..... 2.5 ml
Hexazotized pararosaniline solution	..... 0.25 ml
1/15 mol/l phosphate buffer; pH 6.3	..... 47.5 ml

เตรียมสด กรองใส่ coplin jar ใช้งานทันที สำหรับ α-naphthyl butyrate ละลายเป็นของเหลวที่ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 0.01 ml คิดเป็นน้ำหนักโดยประมาณ 10 mg

วิธีการย้อม

1. นำสเมียร์เลือด หรือไขกระดูกที่แห้งสนิทมาตรึงด้วย buffered formaldehyde-acetone เป็นเวลา 15 วินาที
2. ล้างด้วยน้ำ
3. จุ่มสเมียร์ลงใน substrate solution ทิ้งไว้นาน 45 นาที ที่อุณหภูมิห้องในที่มืด
4. ล้างด้วยน้ำ

5. ย้อมทับด้วย Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที
6. ล้างด้วยน้ำ ปล่อยให้แห้ง นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การอ่านผล

ผลบวก : เห็นเป็นสีน้ำตาลแดงในไซโทพลาซึมของเซลล์

ผลลบ : ไม่ติดสี

การย้อมแอนติเจนของเซลล์เม็ดเลือดโดยวิธีอัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส/แอนติ-อัลคาไลน์ ฟอสฟาเทส โดยใช้ mouse monoclonal antibody **เป็นแอนติบอดีปฐมภูมิ** [8,14]

น้ำยาและสารเคมี

1. แอนติบอดีปฐมภูมิ เป็น mouse monoclonal antibodies (DAKO®) ได้แก่ แอนติบอดีต่อ CD3, CD4, CD8, CD10(CALLA), CD19, Tdt. HLA-DR, CD13, CD14, CD34, CD68, CD61 (Gp IIIa) และ MPO
2. แอนติบอดีทุติยภูมิ เป็น rabbit anti-mouse immunoglobulin (Z 259; DAKO®)
3. APAAP complex เป็น mouse monoclonal anti-alkaline phosphatase จับกับ alkaline phosphatase
4. 0.05 M Tris buffered satine (TBS); pH 7.6
5. Stock substrate solution

Naphthol AS-MX phosphate	..... 20 mg
N, N-dimethylformamide	..... 2 ml
0.1 M Tris buffer; pH 8.2	..... 98 ml

เก็บในขวดแก้วทึบแสงไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ.

6. Working substrate solution

Stock substrate solution	.....5 (หรือ 10) ml
1M Levamisole	.....5 (หรือ 10) µl
Fast Red TR salt	.....5(หรือ 10) mg

7. Mayer's hematoxylin

วิธีการย้อม

1. เตรียมสเมียร์เลือดหรือไขกระดูกเช่นเดียวกับที่ใช้ย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ ปล่อยให้แห้ง และกำหนดพื้นที่ที่จะย้อมโดยใช้ดินสอขีดเป็นสี่เหลี่ยมประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร
2. ตรึงสเมียร์เลือดหรือไขกระดูกดังนี้
   2.1 แผ่นที่มีการย้อม CD10(CALLA) ให้ตรึงด้วย acetone แช่เย็นเป็นเวลานาน 10 นาที ปล่อยให้แห้ง
   2.2 แผ่นที่มีการย้อม Tdt ให้ตรึงด้วยเมทานอล ซึ่งแช่เย็นเป็นเวลา 15 นาที
   2.3 แผ่นที่ต้องการย้อมแอนติเจนอื่น ๆ ให้ตรึงด้วย acetone methanol (อัตรส่วน 1:1) ซึ่งแช่เย็นเป็นเวลา 90 วินาที
3. ล้างสเมียร์เลือดหรือไขกระดูกที่ตรึงแล้วด้วย TBS ใช้กระดาษกรองเช็ดส่วนของ สเมียร์รอบ ๆ บริเวณที่จะย้อม เหลือพื้นที่ที่จะย้อมไว้ ต้องระวังไม่ให้สเมียร์แห้ง
4. เติมแอนติบอดีปฐมภูมิ (เช่น anti-CD3, anti-CD4, anti-CD19 เป็นต้น) ซึ่งเจือจาง ด้วย TBS ตามความเหมาะ

สมลงบนพื้นที่ที่จะย้อม (พื้นที่ 1 ช่อง ย้อมได้ 1 แอนติเจน) ประมาณ 10-20 ไมโครลิตร นำไปตั้งไว้ในภาชนะเก็บความชื้น(moist chamber) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

5. ล้างด้วย TBS เป็นเวลา 1-2 นาที สะบัดเบา ๆ ให้ TBS ออกจากสเมียร์มากที่สุดเหลือเปียกหมาด ๆ เช็ดพื้นที่ รอบๆบริเวณที่จะย้อมให้แห้ง ต้องระวังไม่ให้ส่วนที่ย้อมแห้งอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที
6. เติม anti –mouse Ig ซึ่งเจือจางเป็น 1:25 ด้วย TBS ประมาณ 10-20 ไมโครลิตร ตั้งไว้ในภาชนะเก็บความชื้น เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
7. ล้างด้วย TBS เป็นเวลา 1-2 นาที เช่นเดียวกับข้อ 3 เติม APAAP ที่เจืองจางเป็น 1:50 ด้วย TBS 10-20 ไมโครลิตร วางไว้ในภาชนะเก็บความชื้น เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
8. ล้างด้วย TBS เป็นเวลา 1-2 นาที เช่นเดียวกับข้อ 3
9. ย้อมขั้นตอนที่ 6-8 ซ้ำอีกรอบหนึ่งเพื่อเพิ่มความแรงของปฏิกิริยา(ยกเว้น Tdt ให้ย้อมรอบเดียว)
10. เติม Working substrate solution ให้ท่วมบริเวณที่ย้อม วางไว้ที่อุณหภูมิห้องในภาชนะเก็บความชื้น เป็นเวลา 15-20 นาที
11. ล้างด้วย TBS เป็นเวลา 1-2 นาที ตามด้วยน้ำประปา ย้อมทับด้วย Mayer's hematoxylin เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ปล่อยให้แห้ง หยด aqueous mounting media(Aquamount®, BDH) 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

การอ่านผล

ผลบวก : ติดสีแดงบานเย็น อาจให้ผลบวกที่เยื่อหุ้มเซลล์, ในไซโทพลาซึม, ในแกรนูล หรือในนิวเคลียส (เฉพาะ Tdt)

ผลลบ : ไม่ติดสีแดงบานเย็น

การแปลผล

การย้อมแอนติเจนให้ผลบวก เมื่อมีเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเท่ากับหรือมากกว่า10% ให้ผลบวก หากน้อย 10 % ให้เป็นผลลบ

ผลการวิจัย

1. ชนิดของมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันตามเกณฑ์ FAB และปฏิกิริยาเคมีเซลล์

การวิจัยครั้งนี้เก็บสิ่งส่งตรวจซึ่งเป็นเลือดและไขกระดูกของผู้ป่วยมะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลัน 80 ราย เป็น AML 40 ราย และ ALL 40 ราย สำหรับ AML ทั้ง 40 ราย เมื่อแยกชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB โดยศึกษาจากสเมียร์เลือดและไขกระดูกซึ่งย้อมสี Wright-Giemsa และย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ เปอรอกซิเดส, PAS, NAE และ NBE ได้ผลแสดงไว้ในตารางที่ 9 โดยพบเป็น M1 8 ราย (20.0%) M2 13 ราย (32.5%), M3 9 ราย (22.5%) M4 3 ราย (7.5%), M5b 2 ราย (5.0%) และ M7 5 ราย (12.5%) การย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์พบว่า AML ชนิด M1, M2, M3, M4 และ M5b ทุกราย (100%) ให้ผลบวกกับเปอรอกซิเดส ส่วน M7 ทุกรายให้ผลลบ M1 และ M2 ให้ผลบวกกับ PAS 87.5% และ 84.6% ตามลำดับ M3, M4, M5b และ M7 ให้ผลบวกกับ PAS แบบ "coarse and/or fine granular pattern with diffuse background" ทุกราย (100%) M1, M2 และ M3 ให้ผลบวกกับ NAE 62.5%, 38.5% และ 66.7% ส่วน M4, M5b และ M7 ให้ผลบวกกับ NAE ทุกราย (100%) M1, M2, M3 และ M7 ให้ผลบวกกับ NBE ทุกราย M4 ให้ผลบวกกับ NBE 20-79% ของ non-erythroid cells (NEC) ในไขกระดูก ส่วน M5b ให้ผลบวกมากกว่า 80% ของ NEC ในไขกระดูก

ALL 40 ราย แยกชนิดเป็น L1 29 ราย (72.5%), L2 9 ราย (22.5%) และ L3 2 ราย (5.0%) ALL ทุกรายให้ผลลบกับการย้อมเปอรอกซิเดส L1, L2 และ L3 ให้ผลบวกกับ PAS 75.86%, 100% และ 1 ใน 2 ราย ตามลำดับ L1 ให้ผลบวกกับ NAE และ NBE เป็นแบบ "dot-like" 13.75% และ 3.45% ส่วน L2 และ L3 ทุกรายให้ผลลบกับ NAE และ NBE (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 9 แสดงชนิดย่อยของ AML ตามเกณฑ์ FAB และผลการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ เปอรอกซิเดส, PAS, NAE และ NBE จากการศึกษาผู้ป่วย AML ทั้งหมด 40 ราย

FAB subtypes	No. of cases	percentage	Cytochemical reaction			
			Peroxidase	PAS	NAE	NBE
AML -M1	8	20.0	8/8(100.0)*	7/8(87.5)	5/8(62.5)	0/8(0.0)
AML -M2	13	32.5	13/13(100.0)	11/13(84.6)	5/13(38.5)	0/13(0.0)
AML -M3	9	22.5	9/9(100.0)	9/9(100.0)	6/9(66.7)	0/9(0.0)
AML -M4	3	7.5	3/3(100.0)	3/3(100.0)	3/3(100.0)	3/3(100.0)
AML -M5b	2	5.0	2/2(100.0)	2/2(100.0)	2/2(100.0)	2/2(100.0)
AML -M7	5	12.5	0/5(0.0)	5/5(100.0)	5/5(100.0)	0/5(0.0)
Total	40	100.0	35/40(87.5)	37/40(92.5)	26/40(65.0)	5/40(12.5)

* จำนวนผู้ป่วยที่ให้ผลบวก/จำนวนผู้ป่วย(% ผู้ป่วยที่ให้ผลบวก)

ตารางที่ 10 แสดงชนิดย่อยของ ALL ตามเกณฑ์ FAB และผลการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์จากการศึกษาผู้ป่วย ALL 40 ราย

FAB subtypes	No. of cases	percentage	Cytochemical reaction			
			Peroxidase	PAS	NAE	NBE
ALL - L1	29	72.5	0/29(0.00)*	22/29(75.86)	4/29(13.75)	1/29(3.45)
ALL - L2	9	22.5	0/9(0.00)	9/9(100.00)	0/9(0.00)	0/9(0.00)
ALL - L3	2	5.0	0/2(0.00)	1/2(50.00)	0/2(0.00)	0/2(0.00)
Total ALL	40	100.0	0/40(0.00)	32/40(80.00)	4/40(10.00)	1/40(2.50)

* จำนวนผู้ป่วยที่ให้ผลบวก/จำนวนผู้ป่วย(%ผู้ป่วยที่ให้ผลบวก)

ตารางที่ 11 แสดงผลการย้อมอิมมูโนฟีโนไทพ์ของผู้ป่วย AML 40 รายที่ทำการศึกษา เมื่อแยกชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB

FAB subtypes	No. of cases(%)	Immunophenotypes						
		MPO	CD13	CD14	CD34	CD68	HLA-DR	CD61
AML - M1	8	8[a]/8[b](100)[c]	5/8(62.5)	1/8(12.5)	5/8(62.5)	8/8(100)	7/8(87.5)	1/4(25)
	(20.0)	59-100[d]	48-83	13	12-91	78-100	20-100	14
AML - M2	13	12/12(100)	6/10(60)	4/13(30.77)	3/13(23.08)	13/13(100)	9/13(69.23)	1/3(33.33)*
	(32.5)	20-100	15-89	19-61	34-85	15-99	56-100	12
AML - M3	9	9/9(100)	3/4(75)	2/9(22.22)	0/9(0)	9/9(100)	7/9(77.76)	ND
	(22.5)	84-100	20-80	15-72	0-3	21-100	17-96	
AML - M4	3	3/3(100)	1/2(50)	3/3(100)	1/3(33.33)	3/3(100)	3/3(100)	0/1(0)
	(7.5)	63-100	83	12-34	27	56-100	50-99	2
AML - M5b	2	2/2(100)	2/2(100)	2/2(100)	1/2(50)	2/2(100)	2/2(100)	ND
	(5.0)	74-99	65-84	62-100	44	99-100	94-99	
AML - M7	5	3/5(60)	1/5(20)	2/5(40)	3/5(60)	4/5(80)	5/5(100)	5/5(100)
	12.5	95-100	64	24-82	57-92	77-100	15-100	11-93
Total AML	40	37/39	18/31	14/40	13/40	39/40	33/40	7/13
	(100)	(94.87)	(58.07)	(35.00)	(32.50)	(97.50)	(82.50)	(53.85)

a : จำนวนผู้ป่วยที่ให้ผลบวก

b : จำนวนผู้ป่วยที่ศึกษา

c : เปอร์เซ็นต์ผู้ป่วยที่ให้ผลบวก

* : M2 มีผลการย้อม CD61 เพียง 3 ราย

3. **ชนิดของ ALL สัมพันธ์กับเพศ อายุ และปฏิกิริยาเคมีเซลล์**

สำหรับผู้ป่วย ALL ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่เป็นเด็กซึ่งมีอายุน้อยกว่า 16 ปี จำนวน 20 ราย พบว่าเป็น L1 17 ราย (25% ของ ALL ที่เป็นเด็ก) เป็นเพศชาย 9 ราย (45%) และหญิง 8 ราย (40%) คิดเป็นอัตราส่วนชายต่อหญิง 1.125:1 ทุกรายให้ผลลบกับการย้อมเปอรอกซิเดส ให้ผลบวกกับ PAS 12 ใน 17 ราย (70.6%) NAE 3 ใน 17 ราย (17.6%) และ NBE 1/17 ราย (5.9%) เป็น L2 3 ราย (15%) เป็นเพศชายทุกราย ให้ผลลบกันการย้อมเปอรอกซิเดส, NAE และ NBE ทุกราย ให้ผลบวกกับ PAS ทุกราย ในช่วงที่ทำการศึกษาวิจัยไม่พบ L3 ในกลุ่มที่อายุน้อยกว่า 16 ปี และกลุ่มที่มีอายุเท่ากับหรือมากกว่า 16 ปี จำนวน 20 ราย พบเป็น L1 12 ราย (60% ของ ALL ในกลุ่มนี้) เป็นเพศชาย 7 ราย และหญิง 5 ราย คิดเป็นอัตราส่วนชายต่อหญิง 1.4:1 ทุกรายให้ผลบวกกับการย้อมเปอรอกซิเดส และ NBE ให้ผลบวกกับ PAS และ NAE 83.3% (10/12) และ 9.1% (1/12) ตามลำดับ เป็น L2 6 ราย (30%) เป็นชาย 5 ราย ตามลำดับ 1 รายคิดเป็นอัตราส่วนช่วยต่อหญิง 5:1 ทุกรายให้ผลลบกับ เปอรอกซิเดส NAE และ NBE ให้ผลบวกกับ PAS ทุกราย และเป็น L3 2 ราย (10%) เป็นเพศชายและเพศหญิงอย่างละ 1 ราย ทั้งสองรายให้ผลลบกับเปอรอกซิเดส, NAE และ NBE มี 1 ราย ให้ผลบวกกับ PAS เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้ว พบว่า ALL ทั้ง 40 รายเป็นเพศชาย 25 ราย (62.5%) เป็นเพศหญิง 15 ราย คิดเป็นอัตราส่วนชายต่อหญิง 5:3 ทุกรายให้ผลลบกับเปอรอกซิเดส ให้ผลบวกกับ PAS, NAE และ NBE 80, 10 และ 2.5% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 12 ส่วนตารางที่ 13 แสดงลักษณะของผลการย้อม PAS ในผู้ป่วย ALL ทั้ง 40 ราย โดยพบว่า กลุ่มที่มีอายุน้อยกว่า 16 ปี L1 17 รายให้ผลบวกกับ PAS เป็น block-like 2 ราย (11.8%) เป็น discrete granules 7 ราย (41.2%) และให้ผลบวกทั้งแบบ block-like ร่วมกับ discrete grnules ในรายเดียวกัน 3 ราย (17.6%) ให้ผลลบ 5 ราย (29.4%) L2 3 ราย ให้ผลบวกกับ PAS ทุกราย โดยมีลักษณะเป็น block-like, discrete granules และทั้งสองแบบ อย่างละ 1 ราย (33.3%) ในกลุ่มที่มีอายุเท่ากับหรือมากกว่า 16 ปี L1 12 ราย ให้ผลบวกกับ PAS แบบ block-like 1 ราย (8.3%) แบบ discrete granules 8 ราย (66.7%) ทั้งสองแบบร่วมกัน 1 ราย (8.3%) และให้ผลลบ 2 ราย (16.7%) L2 6 ราย ให้ผลบวกกับ PAS แบบ discrete granules ทุกราย (100%) ส่วน L3 2 ราย ให้ผลบวกแบบ block-like 1 ราย และให้ผลลบ 1 ราย

ตารางที่ 12 แสดงจำนวนผู้ป่วย เพศ และปฏิกิริยาเคมีเซลล์ของ ALL เมื่อแยกชนิดตามเกณฑ์ FAB

Age	FAB	No. of cases (%)	Male (%)	Female (%)	M:F ratio	Cytochemical reaction			
						Peroxidase	PAS	NAE	NBE
<16 ปี	L1	17 (85)	9 (45)	8 (40)	1.125:1	0/17 (0)	12/17 (70.6)	3/17 (17.6)	1/17 (5.9)
	L2	3 (15)	3 (15)	0 (0)	3:0	0/3 (0)	3/3 (100)	0/3 (0)	0/3 (0)
≥16 ปี	L1	12 (60)	7 (35)	5 (25)	1.4:1	0/12 (0)	10/12 (83.3)	1/12 (9.1)	0/12 (0)
	L2	6 (30)	5 (25)	1 (5)	5:1	0/6 (0)	6/6 (100)	0/6 (0)	0/6 (0)
	L3	2 (10)	1 (5)	1 (5)	1:1	0/2 (0)	1/2 (50)	0/2 (0)	0/2 (0)
Total	ALL	40 (100)	25 (62.5)	15 (37.5)	1.67:1	0/40 (0)	32/40 (80)	4/40* (10)	1/40* (2.5)

* : dot- like positive

ตารางที่ 13 แสดงลักษณะการติดสี PAS ในผู้ป่วย ALL ทั้ง 40 ราย

Age	FAB	No. of cases	PAS			
			block-like	discrete granules	block-like and discrete granules	negative
< 16 ปี	L1	17	2(11.8)	7(41.2)	3(17.6)	5(29.4)
	L2	3	1(33.3)	1(33.30	1(33.3)	0(0)
≥16 ปี	L1	12	1(8.3)	8(66.7)	1(8.3)	2(16.7)
	L2	6	0(0)	6(100)	0(0)	0(0)
	L3	2	1(50)	0(0)	0(0)	1(50)
	Total	40	5(12.5)	22(55.0)	5(12.5)	8(20.0)

ตารางที่ 14 แสดงชนิดย่อยของ ALL ตามอิมมูโนฟีโนไทพ์สัมพันธ์กับการจำแนกตามเกณฑ์ FAB

Age	Immunophenotypes	No. of cases (%)	Male (%)	Female (%)	M:F ratio	FAB Classification		
						L1	L2	L3
< 16 ปี	B-cell lineage	14	9	5	1.8 : 1	12/14	2/14	0/14
		(70)	(45)	(25)		(85.7)	(14.3)	(0)
	T-cell lineage	6	3	3	1 : 1	5/6	1/6	0/6
		(30)	(15)	(15)		(83.3)	(16.7)	(0)
≥16 ปี	B-cell lineage	16	11	5	2 : 2	8/16	6/16	2/16
		(80)	(55)	(25)		(50)	(37.5)	(12.5)
	T-cell lineage	3	2	1	2 : 1	3/3	0/3	0/3
		(15)	(10)	(5)		(100)	(0)	(0)
	Mixed B- and T-	1	0	1	0 : 1	1/1	0/1	0/1
		(5)	(0)	(5)		(100)	(0)	(0)
Total ALL		40	25	15	1.67 : 1	29/40	9/40	2/40
		(100)	(62.5)	(37.5)		(72.5)	(22.5)	(5)

4. อิมมูโนฟีโนไทพ์ของ ALL กับชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB

จากการศึกษาชนิดย่อยของ ALL ตามอิมมูโนฟีโนไทพ์กับชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB แสดงผลไว้ในตารางที่ 14 โดยทำการย้อม CD10 (CALLA), CD19, CD3, CD4, CD8, Tdt และ HLA-DR พบว่า กลุ่มที่มีอายุน้อยกว่า 16 ปี เป็น B-cell lineage All 14 ราย (70% ของ ALL) ในกลุ่มนี้) เป็นชาย 9 ราย และหญิง 5 ราย คิดเป็นอัตราส่วนชายต่อหญิง 1.8:1 โดยพบเป็น L1 85.7% (12/14) L2 14.3% (2/14) ไม่พบเป็น L3 และเป็น T-cell lineage ALL 6 ราย (30%) เป็นเพศชาย 3 ราย และหญิง 3 ราย คิดเป็นอัตราส่วน 1:1 มีรูปร่างลักษณะเป็น L1 83.3% (5/6) และ L2 16.7% (1/6) ไม่พบ L3 ส่วนในกลุ่มที่มีอายุเท่ากับหรือมากกว่า 16 ปี เป็น B-cell lineage ALL 16 ราย (80%) เป็นเพศชาย 11 ราย และหญิง 5 ราย คิดเป็นอัตราส่วน 2.2:1 โดยพบเป็น L1 50% (8/16), L2 37.5% (6/16) และ L3 12.5% (2/16) เป็น T-cell lineage ALL 3 ราย (15%) เป็นเพศชาย 2 ราย และหญิง 1 ราย คิดเป็นอัตราส่วนชายต่อหญิง 2:1 มีรูปร่างลักษณะเป็น L1 ทั้ง 3 ราย (100%) และเป็น mixed B and T-cell ALL 1 ราย เป็นเพศหญิงมีรูปร่างลักษณะเป็น L1 หากพิจารณาโดยรวมจากผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม พบว่า เป็น ALL ชนิด B-cell lineage All 30 ราย (75%) โดยเป็น L1 20 ราย (66.7%), L2 8 ราย (26.7%) และ L3 2 ราย (6.67%) เป็น T-cell linege ALL 9 ราย (22.5%) ซึ่งมีลักษณะเป็น L1 8 ราย (88.9%) และ L2 1 ราย (11.1%) และเป็น mixed B-and T-cell ALL 1 ราย (2.5%) ซึ่งมีรูปร่างลักษณะเป็น L1

ในการศึกษาครั้งนี้ได้แบ่งกลุ่ม ALL ตามอิมมูโนฟีโนไทพ์ที่พบ แสดงไว้ในตารางที่ 15 และ 16 ในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 16 ปี B-cell lineage ALL แบ่งออกเป็น 4 ชนิดย่อย คือ ชนิดที่ I พบ 6 ราย (30%) เป็นชาย 3 ราย และหญิง 3 ราย ให้ผลบวกกับ CD10, CD19, Tdt และ HLA-DR แต่ให้ผลลบกับ CD3, CD4 และ CD8 ทุกราย มีรูปร่างลักษณะเป็น L1 ชนิดที่ II พบ 2 ราย เป็นเพศชายทั้ง 2 ราย ให้ผลบวกกับ CD10, และ HLA-DR แต่ให้ผลลบกับ CD19, CD3, CD4, CD8 และ Tdt ทุกรายมีรูปร่างลักษณะเป็น L1 ชนิดที่ III พบ 3 ราย เป็นเพศชาย 2 ราย และเพศหญิง 1 ราย ให้ผลบวกกับ CD10, CD19 และ HLA-DR แต่ให้ผลลบกับ CD3, CD4, CD8 และ Tdt ทุกรายมีรูปร่างลักษณะเป็น L1 และชนิดที่ IV พบ 3 ราย เป็นเพศชาย 2 ราย และเพศหญิง 1 ราย เป็นชนิดที่ให้ผลบวกกับ CD19 และ HLA-DR แต่ให้ผลลบกับ CD10, CD3, CD4, CD8 และ Tdt มีรูปร่างลักษณะเป็น L1 1 ราย (33.3%) และ L2 2 ราย (66.7%) T-cell lineage ALL แบ่งได้เป็น 4 ชนิดย่อย คือ ชนิดที่ I พบ 1 ราย เป็นเพศชาย เป็นชนิดที่ให้ผลบวกกับ CD3, Tdt และ HLA-DR ให้ผลลบกับ CD10, CD19, CD4, CD8 มีรูปร่างลักษณะเป็น L2 ชนิดที่ II พบ 1 ราย เป็นเพศหญิง ให้ผลบวกกับ CD3 และ Tdt แต่ให้ผลลบกับ CD10, CD19, CD4, CD8 และ HLA-DR มีลักษณะเป็น L1 ชนิดที่ III พบ 2 ราย เป็นเพศหญิง 1 ราย และชาย 1 ราย ให้ผลบวกกับ CD3, CD4, CD8 และ Tdt แต่ให้ผลลบกับ CD10, CD19 และ HLA-DR มีลักษณะเป็น L2 ทั้งหมด ชนิดที่ IV พบ 1 ราย มีลักษณะของอิมมูโนฟีโนไทพ์คล้ายชนิด III แต่ให้ผลบวกกับ CD10 ด้วย มีลักษณะเป็น L1 และชนิดที่ V พบ 1 ราย เป็นเพศชายให้ผลบวกกับ CD8 และ Tdt แต่ให้ผลลบกับ CD10, CD19, CD3, CD4 และ HLA-DR มีลักษณะเป็น L1 สำหรับกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุเท่ากับหรือมากกว่า 16 ปี เมื่อแยกชนิดย่อยเหมือนกับกลุ่มที่มีอายุน้อยกว่า 16 ปีแล้ว พบว่า B-cell lineage ALL ชนิดที่ I (CD10+, CD19+, Tdt+, HLA-DR+) พบ 7 ราย (35% ของ ALL ในกลุ่มนี้) เป็นเพศชาย 5 ราย และเพศหญิง 2 ราย มีลักษณะเป็น L1 4 ราย (57%) และ L2 3 ราย (43%) ชนิดที่ II (CD10+, HLA-DR+) ไม่พบในกลุ่มผู้ป่วยที่มีอายุเท่ากับหรือมากกว่า 16 ปี ในระหว่างที่ทำการศึกษา ชนิดที่ III (CD10+, CD19+, HLA-DR+) พบ 5 ราย (25%) เป็นเพศชาย 4 ราย และหญิง 1 ราย มีลักษณะเป็น L1 2 ราย (40%) และ L2 3 ราย (60%) และชนิดที่ IV (CD19+, HLA-DR+) พบ 4 ราย (20%) เป็นเพศชาย 2 ราย และเพศหญิง 2 ราย มีลักษณะเป็น L1 2 ราย (50%) และ L3 2 ราย (50%) สำหรับ T-cell lineage ALL เมื่อแยกชนิดย่อยเหมือนกับผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 16 ปี พบชนิดที่ II (CD3+, Tdt+) 3 ราย (15%) เป็นเพศชาย 2 ราย และเพศหญิง 1 ราย มีลักษณะเป็น L1 ทุกราย (100%) โดยไม่พบชนิดที่ I (CD3+, Tdt+ และ HLA-DR+) ชนิดที่ III, IV และ V (CD10±, CD3±, CD4±, CD8+, Tdt+) ในช่วงที่ทำการศึกษา อย่างไรก็ตามพบ mixed B และ T-cell ALL ในกลุ่มนี้ 1 ราย (5%) เป็นเพศชาย โดยให้ผลบวกกับ CD10, CD19, CD3, CD4, CD8, Tdt และ HLA-DR มีลักษณะเป็น L1

เมื่อพิจารณาโดยรวมในผู้ป่วยทั้งสองกลุ่ม (40 ราย) ALL เมื่อแยกเป็นกลุ่มย่อยตามความแตกต่างของอิมมูโนฟีโน

ไทพ์ แสดงในตารางที่ 17 โดย B-cell lineage ALL กลุ่มที่ I (CD10+, CD19+, Tdt+, และ HLA-DR+) พบ 13 ราย (32.5% ของ ALL ทั้งหมด) เป็นเพศชาย 8 ราย และเพศหญิง 5 ราย คิดเป็นอัตราส่วน 1.6:1 มีลักษณะเป็น L1 10 ราย (76.9%) และ L2 3 ราย (23.1%) กลุ่มที่ II (CD10+, HLA-DR+) พบ 2 ราย (5%) เป็นเพศชายทั้ง 2 ราย และมีลักษณะเป็น L1 ทั้ง 2 ราย (100%) กลุ่มที่ III (CD10+, CD19+, HLA-DR+) พบ 8 ราย (20%) เป็นเพศชาย 6 ราย และเพศหญิง 2 ราย คิดเป็นอัตราส่วนชายต่อหญิง 3:1 มีลักษณะเป็น L1 5 ราย (62.5%) และ L2 3 ราย (37.5%) และกลุ่มที่ IV (CD19+, HLA-DR+) พบ 7 ราย (17.5%) เป็นเพศชาย 4 ราย และเพศหญิง 3 ราย คิดเป็นอัตราส่วนชายต่อหญิง 1.33:1 มีลักษณะเป็น L1 3 ราย (42.9%) L2 2 ราย (28.6%) และ L3 2 ราย (28.6%) T-cell lineage ALL กลุ่มที่ I (CD3+, Tdt+ และ HLA-DR+) พบ 1 ราย (2.5%) เป็นเพศชายมีลักษณะเป็น L2 กลุ่มที่ II (CD3+, Tdt+) พบ 4 ราย (10%) เป็นเพศชาย 2 ราย และเพศหญิง 2 ราย คิดเป็นอัตราส่วนชายต่อหญิง 1:1 มีลักษณะเป็น L1 ทั้ง 4 ราย (100%) กลุ่มที่ III (CD3+, CD4+, CD8+ และ Tdt+) พบ 2 ราย (5%) เป็นเพศชาย 1 ราย และเพศหญิง 1 ราย มีลักษณะเป็น L1 ทั้ง 2 ราย (100%) กลุ่มที่ IV (CD10+, CD3+, CD4+, CD8+ และ Tdt+) พบ 1 ราย (2.5%) เป็นเพศชาย มีลักษณะเป็น L1 กลุ่มที่ V (CD8+, Tdt+) พบ 1 ราย (2.5%) เป็นเพศหญิง มีลักษณะเป็น L1 และ mixed B และ T-cell ALL 1 ราย (2.5%) เป็นเพศหญิง มีลักษณะเป็น L1

ตารางที่ 15 แสดงชนิดย่อยของ ALL เมื่อแยกตามอิมมูโนฟีโนไทพ์สัมพันธ์กับ FAB ในผู้ป่วยอายุน้อยกว่า 16 ปี

Group	Immunophenotypes	No. of cases (%)	Male (%)	Female (%)	Cellular Markers							FAB Classification		
					CD10	CD19	CD3	CD4	CD8	Tdt	HLA-DR	L1	L2	L3
I	B-cell lineage	6 (30)	3 (15)	3 (15)	+	+	-	-	-	+	+	6/6 (100)	0/6 (0)	0/6 (0)
II	B-cell lineage	2 (10)	2 (10)	0 (0)	+	-	-	-	-	-	+	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)
III	B-cell lineage	3 (15)	2 (10)	1 (5)	+	+	-	-	-	-	+	3/3 (100)	0/3 (0)	0/3 (0)
IV	B-cell lineage	3 (15)	2 (10)	1 (5)	-	+	-	-	-	-	+	1/3 (33.3)	2/3 (66.7)	0/3 (0)
I	T-cell lineage	1 (5)	1 (5)	0 (5)	-	-	+	-	-	+	+	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)
II	T-cell lineage	1 (5)	0 (0)	1 (5)	-	-	+	-	-	+	-	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)
III	T-cell lineage	2 (10)	1 (5)	1 (5)	-	-	+	+	+	+	-	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)
IV	T-cell lineage	1 (5)	1 (5)	1 (5)	+	-	+	+	+	+	-	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)
V	T-cell lineage	1 (5)	0 (0)	1 (5)	-	-	-	-	+	+	-	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)

+ : เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้ผลบวกเท่ากับหรือมากกว่า 10% ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยมหิดล

77
Re
643
8881

ตารางที่ 16 แสดงชนิดย่อยของ ALL เมื่อแยกตามอิมมูโนฟีโนไทพ์สัมพันธ์กับ FAB ในผู้ป่วยอายุเท่ากับหรือมากกว่า 16 ปี

Group	Immunophenotypes	No. of cases (%)	Male (%)	Female (%)	Cellular Markers							FAB Classification		
					CD10	CD19	CD3	CD4	CD8	Tdt	HLA-DR	L1	L2	L3
I	B-cell lineage	7 (35)	5 (25)	2 (15)	+	+	-	-	-	+	+	4/7 (57)	3/7 (43)	0/7 (0)
II	B-cell lineage	0 (0)	0 (0)	0 (0)	+	-	-	-	-	-	+	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)
III	B-cell lineage	5 (25)	4 (20)	1 (5)	+	+	-	-	-	-	+	2/5 (40)	3/5 (60)	0/5 (0)
IV	B-cell lineage	4 (20)	2 (10)	2 (10)	-	+	-	-	-	-	+	2/4 (50)	0/4 (0)	2/4 (50)
I	T-cell lineage	0 (0)	0 (0)	0 (5)	-	-	+	-	-	+	+	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)
II	T-cell lineage	3 (15)	2 (10)	1 (5)	-	-	+	-	-	+	-	3/3 (100)	0/3 (0)	0/3 (0)
III, IV V	T-cell lineage	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-/+	-	+	+	+	+	-	0/0 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)
Other	Biophenotype B- and T	1 (5)	0 (0)	1 (5)	+	+	+	+	+	+	+	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)

+ : เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้ผลบวกเท่ากับหรือมากกว่า 10% ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

ตารางที่17 แสดงชนิดย่อยของ ALL เมื่อแยกตามอิมมูโนฟีโนไทพ์สัมพันธ์กับ FAB ในผู้ป่วยทั้ง 40 ราย

Group	Immunophenotypes	No. of cases (%)	Male (%)	Female (%)	Cellular Markers							FAB Classification		
					CD10	CD19	CD3	CD4	CD8	Tdt	HLA-DR	L1	L2	L3
I	B-cell lineage	13 (32.5)	8 (20)	5 (12.5)	+	+	-	-	-	+	+	10/13 (76.9)	3/13 (23.1)	0/13 (0)
II	B-cell lineage	2 (5)	2 (5)	0 (0)	+	-	-	-	-	-	+	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)
III	B-cell lineage	8 (20)	6 (15)	2 (5)	+	+	-	-	-	-	+	5/8 (62.5)	3/8 (37.5)	0/8 (0)
IV	B-cell lineage	7 (17.5)	4 (10)	3 (7.5)	-	+	-	-	-	-	+	3/7 (42.9)	2/7 (28.6)	2/7 (28.6)
I	T-cell lineage	1 (2.5)	1 (2.5)	0 (2.5)	-	-	+	-	-	+	+	0/1 (0)	1/1 (100)	0/1 (0)
II	T-cell lineage	4 (10)	2 (5)	2 (5)	-	-	+	-	-	+	-	4/4 (100)	0/4 (0)	0/4 (0)
III	T-cell lineage	2 (5)	1 (2.5)	1 (2.5)	-	-	+	+	+	+	-	2/2 (100)	0/2 (0)	0/2 (0)
IV	T-cell lineage	1 (2.5)	1 (2.5)	0 (0)	+	-	+	+	+	+	-	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)
V	T-cell lineage	1 (2.5)	0 (0)	1 (2.5)	-	-	-	-	+	+	-	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)
Other	Biphenotypic B- and T	1 (2.5)	0 (0)	1 (2.5)	+	+	+	+	+	+	+	1/1 (100)	0/1 (0)	0/1 (0)

+ : เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวให้ผลบวกเท่ากับหรือมากกว่า 10% ของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

บทวิจารณ์

จากการศึกษามะเร็งเม็ดเลือดขาวเฉียบพลันที่พบในผู้ป่วย 80 ราย ที่เข้ารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในช่วงปี พ.ศ. 2535-2537 AML 40 ราย เมื่อแยกชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB แล้วพบว่า M2 มีอุบัติการณ์สูงที่สุด คิดเป็น ประมาณ 32.5% ของ AML ที่พบรองลงมาคือ M3, M1, M4, M7 และ M5b ตามลำดับ อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะพบ M7 ค่อนข้างสูงในการศึกษาครั้งนี้ แต่ส่วนหนึ่งเป็นระยะเฉียบพลันของ CML (acute phase of CML) ซึ่งการศึกษาในต่างประเทศ[15,16] ก็พบว่า M2 มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในกลุ่ม AML ส่วนผลการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์พบว่า AML ให้ผลบวกกับเปอรอกซิเดส 87.5% โดยให้ผลบวกกับ M1, M2, M3, M4 และ M5b ทุกราย แต่ M7 ทุกรายให้ผลลบ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา สำหรับการย้อม PAS พบว่าให้ผลบวกกับ AML 92.5% โดยพบว่าให้ผลบวกใน M1 87.5%, M2 84.6% และ M3, M4, M5b, M7 ให้ผลบวกทุกราย ซึ่งให้ผลการศึกษาทำนองเดียวกับการศึกษาของ Hayhoe และคณะ[12,17] และจากการศึกษาลักษณะรูปแบบ การติดสี PAS ของ AML พบว่ามีลักษณะ 2 แบบ คือ แบบแรกเป็นแกรนูลละเอียดติดสีชมพูจาง ๆ (diffuse fine granular pattern) ซึ่งพบใน M1, M2, M3, M4, M5b และ M7 และแบบที่สองเป็นแกรนูลขนาดใหญ่และเล็กติดสีบานเย็นเข้มอยู่แยกกัน ร่วมกับมีแกรนูลละเอียดติดสีชมพูจาง ๆ กระจายทั่วไซโท พลาซึม (coarse granular pattern with diffuse background) ซึ่งพบใน M1, M2, M3, M4 และ M7 สำหรับ M5b 2 ราย ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการติดสี PAS แบบที่สอง ซึ่งอาจเนื่องจากมีผู้ป่วย M5 ที่พบในระหว่างการศึกษาครั้งนี้น้อยราย การย้อม NAE ให้ผลบวกใน M1 (62.5%), M2 (38.5%), M3 (66.7%), M4 (100%), M5b (100%) และ M7 (100%) โดย M1, M2, M3 ให้ผลบวกกับ NAE อย่างอ่อนและเป็นชนิดที่ทนต่อการยับยั้งด้วยโซเดียม ฟลูออไรด์ (sodium fluoride; NaF) ในขณะที่ M4 มีเซลล์ส่วนหนึ่งซึ่งเป็นสายโมโนไซท์ให้ผลบวกแรง (มากกว่า 20% ของ nonerythroid cells ในไขกระดูก แต่น้อยกว่า 80%) และอีกส่วนหนึ่งให้ผลบวกอ่อนเหมือนที่พบใน M1 และ M2 ส่วน M5b จะให้ผลบวกแรงเท่ากับหรือมากกว่า 80% ของ nonerythroid cells ในไขกระดูก และไวต่อ NaF สำหรับ M7 ให้ผลบวกกับ NAE ค่อนข้างแรง แต่เห็นเป็นหย่อม ๆ และเป็นชนิดที่ไวต่อการยับยั้งด้วย NaF ส่วน NBE ให้ผลลบกับ M1, M2, M3, และ M7 แต่ให้ผลบวกกับ M4 และ M5b ทำนองเดียวกับ NAE ซึ่งผลการย้อม NAE และ NBE ดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Hayhoe กับคณะ[12,17] Yam กับคณะ[18] และ Li กับคณะ[13] ดังนั้นจะเห็นว่า NBE มีความจำเพาะกับ monocytic leukemia (M4 และ M5) มากกว่า NAE แต่ก็ควรย้อมทั้งสองตัวเพื่อช่วยในการวินิจฉัย M7

ส่วน ALL 40 รายเมื่อแยกชนิดตามเกณฑ์ FAB แล้วพบว่า L1 มีอุบัติการณ์สูงสุด เท่ากับ 72.5% ของ ALL และเมื่อแยกตามกลุ่มอายุของผู้ป่วยพบว่า ในกลุ่มอายุต่ำกว่า 16 ปี พบเฉพาะ L1 และ L2 โดยพบ L1 มากกว่า L2 โดยมีอุบัติการณ์ 85% ต่อ 15% ของ ALL ในกลุ่มนี้ ส่วนในกลุ่มอายุเท่ากับหรือมากกว่า 16 ปี พบทั้ง L1, L2 และ L3 โดยมีอุบัติการณ์ 60%, 30% และ 10% ของ ALL ในกลุ่มนี้ และในทั้งสองกลุ่มพบว่าเป็นเพศชายมากกว่าเพศหญิง (1.67 ต่อ 1) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของต่างประเทศที่พบว่า ALL มีอุบัติการณ์ของ L1 มากกว่า L2 และ L3 น้อยที่สุด[19,20,21] และพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง[19,20] ผลการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ใน ALL พบว่า ทุกรายให้ผลลบกับเปอรอกซิเดส PAS ให้ผลบวกโดยเฉลี่ย 80% ส่วน NAE, NBE ให้ผลบวกโดยเฉลี่ย 10 และ 2.5% ตามลำดับ สำหรับ PAS มีรายงานพบว่าให้ผลบวกกับ ALL ได้ 59%, 61% ถึง 89%[22,23] ผลการย้อม NAE พบว่ามี 4 รายให้ผลบวกเป็น dot-like คือเป็นเม็ดแกรนูลขนาดใหญ่สีน้ำตาลในไซโทพลาซึม ซึ่งเป็นลักษณะของ T-cell lineage[17] และผลการย้อมอิมมูโนฟีโนไทพ์ก็ระบุว่าเป็น T-cell lineage ALL ดังนั้นจะเห็นว่าการย้อม NAE มีส่วนช่วยในการวินิจฉัย T-cell lineage ALL ได้ในบางราย ส่วน NBE ที่ให้ผลบวก 1 ราย ก็พบว่าเป็น T-cell lineage ALL เช่นเดียวกัน ซึ่งมีรายงานไว้ว่า T-cell lineage ALL อาจให้ผลบวกกับ NBE ได้แต่น้อยกว่า NAE[17] ส่วนการติดสี PAS ของ ALL รายที่ให้ผลบวก พบว่า มีลักษณะ 3 แบบ คือ ติดเป็นก้อนเดียว (block-like), แบบเป็นเม็ด ๆ หลายเม็ดในไซโทพลาซึม (discrete granules) และแบบที่พบทั้งสองแบบในรายเดียวกัน อย่างไรก็ตามพบว่าผลการย้อม PAS ไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB ทั้งสองกลุ่มอายุ

สำหรับผลการศึกษาอิมมูโนฟีโนไทพ์ในผู้ป่วย AML ทั้ง 40 ราย โดยย้อม MPO, CD13, CD14, CD34, CD61, CD68 และ HLA-DR ปรากฏว่า MPO ให้ผลบวก 94.9% ของ AML ทั้งหมด โดยให้ผลบวกทุกรายใน M1, M2, M3, M4 และ M5b ส่วนใหญ่ M7 ให้ผลบวก 60% ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการย้อมเปอรอกซิเดสที่อาศัยปฏิกิริยาเคมีเซลล์ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Van der Schoot กับคณะ (ค.ศ. 1990)[24] อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่า MPO ให้ผลบวกใน M7 3 ใน 5 ราย (60%) ได้ผลทำนองเดียวกันกับ Choate กับคณะ (ค.ศ. 1987)[25], Moscinski กับคณะ (ค.ศ. 1988)[26], และ Storr กับคณะ (ค.ศ. 1990)[27] ทั้งนี้เนื่องจาก anti-MPO มีปฏิกิริยาข้ามกัน (cross-reaction) กับ platelet peroxidase (PPO) แต่ Storr กับคณะพบว่าเป็นไมอีโลบลาสท์ที่ปนอยู่กับเมกาคาริโอบลาสท์ อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้พบว่า MPO ที่ให้ผลบวกกับ M7 เป็นผลบวกอ่อน (weak reaction) แต่ให้ผลบวกกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวจำนวนมาก (95-100%) จึงเชื่อว่าเป็นปฏิกิริยาข้ามกันระหว่าง anti-MPO กับ PPO มากกว่า Van der Schoot กับคณะ[24] ยังพบว่าการย้อม MPO โดยใช้ anti-MPO จะให้ผลบวกกับ AML มากกว่าการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ มีความไวและความจำเพาะกับ AML มากกว่า CD13 และ CD14 อย่างไรก็ตามพบว่าจำนวนเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวที่ให้ผลบวกและความแรงของผบวกของการย้อม MPO ไม่มีความพันธ์กับชนิดย่อยของ AML ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Storr กับคณะ[27] ซึ่งพบว่าการย้อม MPO โดย anti-MPO ให้ผลบวกกับ AML มากกว่าการย้อมเปอรอกซิเดส โดยปฏิกิริยาเคมีเซลล์ และ CD13 ในอัตราส่วน 94%, 84% และ 86% ตามลำดับ Buccheri กับคณะ พบว่าการย้อม MPO โดย anti-MPO, CD13 และ Cd14 ให้ผลบวกใน AML 80.5%, 79% และ 36% ตามลำดับ ส่วนการศึกษาครั้งนี้พบว่า การย้อม MPO ด้วย anti-MPO, CD13, CD14 ให้ผลบวกกับ AML 94.9%, 58.1% และ 35% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีรายงานที่ระบุว่า การย้อม MPO ด้วย anti-MPO ให้ผลบวกกับ AML-Mo 100% ซึ่งไม่สามารถตรวจพบได้โดยย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์[28,29] แสดงให้เห็นว่า การย้อม MPO ด้วย anti-MPO มีความไวและความจำเพาะต่อ AML สูงกว่าการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์

CD13 ให้ผลบวกกับ AML ชนิด M1, M2, M3, M4 และ M5b 17 ใน 27 ราย (63%) โดยเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วง 15%-89% ซึ่งต่ำกว่าที่มีรายงานไว้ว่า CD13 ให้ผลบวก 51 ราย จาก 57 ราย (89%)[28] แต่เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วง 18-89% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ ในรายงานดังกล่าวยังพบว่า CD13 ให้ผลบวกกับ M1-M4 มากกว่าให้ผลบวกกับ M5 คือ 97% ต่อ 76% ซึ่งผลตรงข้ามกับการศึกษาในครั้งนี้ ทั้งนี้เนื่องจากตัวอย่างที่เป็น M5 ที่พบเป็น M5b เพียง 2 รายเท่านั้น สำหรับ M7 ให้ผลบวกกับ CD13 เพียงรายเดียวจาก 5 ราย (20%) แต่จากรายงานของ Campos กับคณะ[31] Neame กับคณะ พบว่าให้ผลบวกต่อ CD13 (ตัวอย่าง 1 ราย) ซึ่งดูเหมือนขัดแย้งกับการศึกษาครั้งนี้ แต่อาจเนื่องจากจำนวนตัวอย่างของ M7 ที่ใช้ในการศึกษาในรายงานต่าง ๆ น้อยเกินไป CD14 ให้ผลบวกกับ AML ชนิด M1, M2, M3, M7 ค่อนข้างน้อย (25.7%) แต่ให้ผลบวกกับ M4 และ M5b ทุกราย ซึ่งตรงกับที่มีผู้ศึกษาไว้ CD34 ให้ผลบวกกับ M1, M2, M4, M5b, M7 ยกเว้น M3 ให้ผลลบทุกราย ซึ่งผลที่ได้ตรงกับการศึกษาของ Campos กับคณะ[31] ซึ่งพบว่า CD34 จะให้ผลบวกกับ Mo, M1, M5a มากกว่า M3 และ M5b และให้ผลลบกับ M7 1 ราย จากรายละเอียดที่ระบุมากับน้ำยา anti-CD34 (DAKO®) มีความจำเพาะกับเซลล์ในระยะ CFU-GM, CFU-GEMM, CFU-Meg, BFU-E และพบมากในเซลล์ระยะแรก ๆ (progenitor cells) จากนั้นลดลงเมื่อเซลล์แก่ขึ้น จึงมีความจำเพาะกับเซลล์ระยะบลาสท์มากกว่าเซลล์สายใดสายหนึ่ง ดังนั้นที่มีรายงานว่า CD34 ให้ผลบวกกับ AML-Mo ทุกราย และเมื่อประกอบกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า M3 ทุกรายให้ผลลบกับ CD34 และกลุ่มย่อยของ AML ที่มีการแก่ตัวของเซลล์มะเร็งให้ผลบวกกับ CD34 น้อยกว่ากลุ่มย่อยที่มีการแก่ตัวของมะเร็งน้อยมาก (ตารางที่ 11) จึงให้ผลสนับสนุน ส่วนในกรณีที่พบ CD34 ใน M2 และ M5b อาจเนื่องจากยังมีเซลล์ระยะบลาสท์ร่วมด้วย หรืออาจเนื่องจากเป็นการเจริญเติบโตผิดปกติ CD68 ให้ผลบวกกับ M1, M2, M3, M4 และ M5b ทุกราย (100%) มี M7 เพียง 1 รายที่ให้ผลลบ ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับการย้อม MPO โดยใช้ anti-MPO จากผลการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่า CD68 มีความจำเพาะต่อสายโมโนไซท์ น้อยกว่า CD14 ดังจะเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์ตัวอย่างที่ให้ผลบวกกับ CD68 ใน M1, M2, M3 มีมากกว่าเปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลบวกกับ CD14 คือ 100% ต่อ 22% จากข้อสังเกตของ Ispizua กับคณะ[28] ได้วิจารณ์ไว้ว่าถึงแม้ว่า CD14 และ CD68 จะไม่มีความจำเพาะต่อสายโมโนไซท์ก็ตาม แต่หากตรวจพบแอนติเจนทั้งสองตัวร่วมกัน จะช่วยยืนยันได้แน่นอนว่าเป็นสายโมโนไซท์ ซึ่งต่างจาก M1, M2 และ M3 อย่างไรก็ตามการศึกษา

ครั้งนี้ไม่ได้ข้อสรุปดังกล่าว HLA-DR ให้ผลบวกกับ M1, M2, M3 มากกว่า 50% และกับ M4, M5b, M7 100% สอดคล้องกับผู้ที่เคยศึกษาไว้ [32,33,34] พบว่า HLA-DR ให้ผลบวกกับ M4, M5 100% กับ M1, M2 เกือบ 100% แต่ให้ผลบวกกับ M3 น้อย และให้ผลลบกับ M7 อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวมีตัวอย่าง M7 เพียง 1 ราย ดังนั้นผลแตกต่างก็พบใน M7 จึงไม่อาจสรุปได้แน่นอน M3 ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า M3 ให้ผลบวกกับ HLA-DR 77.76% เป็นไปได้ที่ในกลุ่มผู้ป่วยที่นำมาศึกษาเป็น M3 ชนิดที่มี HLA-DR ให้ผลบวกเป็นส่วนใหญ่

สำหรับ CD61 (GpIIIa) พบว่าให้ผลบวกกับ M1 และ M2 ได้บ้างคือ 25% และ 33.33% แต่ให้ผลบวกกับ M7 ทุกราย (100%) ซึ่งสอดคล้องกับ Ispizoa กับคณะ[28] รายงานว่า GpIIb/IIIa จะให้ผลลบกับ M1, M2, M3, M5 แต่พบ M4 ให้ผลบวก 14% ส่วน M7 ไม่ได้ทำการศึกษา Hanson กับคณะ[32] พบ GpIIIa ให้ผลบวกกับ M7 (100%) ให้ผลลบกับ M1-M6 ดังนั้นจะเห็นว่า GpIIIa มีความจำเพาะต่อสายเมกาคาริโอไซท์ แต่การให้ผลบวกกับ M1, M2 ก็พบในจำนวนเซลล์ที่ต่ำ (14%, 12% ตามลำดับ) จึงเป็นไปได้ว่าอาจมีเมกาคาริโอไซท์ขนาดเล็ก (micromegakaryocytes) หรือเมกาคาริโอไซท์ปนอยู่ด้วย หรืออาจเป็นความผิดปกติของการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ดังนั้นการย้อม GpIIIa เมื่อนำมาใช้ร่วมกับการย้อมปฏิกิริยาเคมีเซลล์ คือ เปอรอกซิเดส, PAS, NAE และ NBE จะช่วยวินิจฉัย M7 ได้ถูกต้องยิ่งขึ้น

จากการศึกษาอิมมูโนฟีโนไทพ์ของ AML ดังกล่าวข้างต้น ประกอบกับข้อมูลจากการศึกษาต่าง ๆ ที่ผ่านมา จึงสรุปได้ว่า การย้อมอิมมูโนฟีโนไทพ์ของเซลล์สายไมอีลอยด์ใน AML ไม่สามารถแยกชนิดย่อยของ AML ได้ และไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB ยกเว้น CD61 (GpIIIa) มีความจำเพาะกับ M7 สูง

การศึกษาอิมมูโนฟีโนไทพ์ของ ALL โดยการย้อม CD10, CD19, CD3, CD4, CD8, Tdt และ HLA-DR พบว่า B-cell lineage ALL แยกตามความแตกต่างกันของอิมมูโนฟีโนไทพ์ที่พบเป็น 4 กลุ่ม (ตารางที่ 15,16 และ 17) คือ กลุ่ม I ในการศึกษาครั้งนี้น่าจะเข้าได้กับ early pre-B ALL กลุ่ม II และ III น่าจะเข้าได้กับ pre-B cell ALL ที่มีและไม่มี CD19 ส่วนกลุ่มที่ IV น่าจะเป็น B-cell ALL หรืออีกนัยหนึ่งกลุ่ม I, II, และ III ก็คือ common ALL (CALL) สำหรับ T-cell lineage ALL แบ่งเป็น 5 กลุ่ม (ตารางที่ 15,16,และ17) ซึ่งมี 1 กลุ่ม (กลุ่ม I) ให้ผลบวกกับ HLA-DR และ 1 กลุ่ม (กลุ่ม IV)ให้ผลบวกกับ CD10 ด้วย ในผู้ป่วยอายุต่ำกว่า 16 ปี พบว่ากลุ่มที่เป็น CALL (กลุ่ม I, II, III) มีลักษณะเป็น L1 มีเพียงอย่างเดียว กลุ่ม IV ซึ่งเป็น B-cell ALL จะมีลักษณะเป็น L2 ร่วมด้วย ในขณะที่กลุ่มอายุเท่ากับหรือมากกว่า 16 ปี พบว่า CALL มีทั้ง L1 และ L2 และ B-cell ALL มีลักษณะเป็น L1 และ L3 ส่วน T-cell lineage ALL มีเพียงรายเดียวที่เป็น L2 ในรายงานของต่างประเทศพบว่า กลุ่มย่อยของ B-cell lineage ALL (ยกเว้น B-cell ALL) ที่แบ่งตามอิมมูโนฟีโนไทพ์จะเป็น L1 มากกว่า L2 แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบว่าเป็น L2 ใน B-cell lineage ALL ในผู้ป่วยกลุ่มที่มีอายุต่ำกว่า 16 ปี ผู้ทำการศึกษาเข้าใจว่าน่าจะเป็นความบังเอิญที่พบเฉพาะในการศึกษาครั้งนี้ โดยสรุปแล้วจะเห็นว่าการแบ่งชนิดย่อยของ ALL ตามเกณฑ์ FAB และอิมมูโนฟีโนไทพ์ไม่มีความสัมพันธ์กัน ยกเว้น L3 และ B-cell ALL ซึ่งสอดคล้องกับที่มีผู้รายงานไว้[2,21]

การศึกษาครั้งนี้พบว่ามี T-cell lineage ALL 1 รายที่ให้ผลบวกกับ HLA-DR (16.7% ของ T-cell lineage ALL ในกลุ่มอายุต่ำกว่า 16 ปี) ก่อนหน้านี้เคยมีผู้รายงานไว้ในเปอร์เซ็นต์ที่ใกล้เคียงกัน[23,35] และมีรายงานในกลุ่มที่มีอายุมากกว่า 16 ปี ว่าให้ผลบวกสูงถึง 42%[36] และกล่าวว่าลักษณะดังกล่าวพบในผู้ใหญ่มากกว่าในเด็ก ขณะเดียวกันบางรายงานกล่าวว่าไม่พบ T-cell lineage ALL ที่ให้ผลบวกกับ HLA-DR อย่างไรก็ดีความสำคัญทางคลินิกของการพบ HLA-DR ยังไม่เป็นที่เข้าใจ นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มที่มีายุต่ำกว่า 16 ปี มี T-cell lineage ALL 1 ราย (16.7%) ซึ่งให้ผลบวกกับ CD10 เกี่ยวกับเรื่องนี้ในต่างประเทศมีรายงานไว้ค่อนข้างมาก เพราะคาดว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการพยากรณ์โรค37 และจำนวนที่พบก็แตกต่างกัน[10,36] ในการศึกษาครั้งนี้พบผู้ป่วย 1 ราย (5%) ที่แสดงลักษณะเป็น biphenotype คือให้ผลบวกทั้งกับ B- และ T-cell lineage antigen ซึ่งสูงกว่าที่ Uckan และคณะ[38] ในปี ค.ศ. 1989 เป็นกลุ่มแรกที่รายงาน biphenotypic lymphoid leukemia 5 ราย ในผู้ป่วย ALL 336 ราย (1.5%) นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 1993 Hanson และคณะ[39] ได้รายงานพบ ALL ที่มี B- และ T-cell lineage antigen 1 ราย จาก ALL ทั้งหมด 746 ราย (0.1%)

โดยสรุปการศึกษาครั้งนี้สำหรับ ALL ตามเกณฑ์ FAB และอิมมูโนฟีโนไทพ์จากผู้ป่วยอายุต่ำกว่า 16 ปี 20 ราย และอายุเท่ากับและมากกว่า 16 ปี 20 ราย โดยเฉลี่ยแล้วมีอุบัติการณ์ของ L1 มากกว่า L2 และ L3 และพบเป็น B-cell lineage ALL มากกว่า T-cell lineage ALL โดยพบในเพศชายมากกว่าเพศหญิง และยังพบว่ามี 1 ราย เป็น biphenotypic ALL ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความ

สัมพันธ์ระหว่างชนิดย่อยตามเกณฑ์ FAB กับอิมมูโนฟีโนไทพ์ ยกเว้น L3 ซึ่งเป็น B-cell ALL นอกจากนี้ยังพบว่าผลการย้อม PAS ให้ผลออกมาเป็น 4 ลักษณะ โดยผลดังกล่าวมีส่วนช่วยในการแยก ALL ออกจาก AML แต่ไม่สัมพันธ์กับชนิดย่อยของ ALL ตามเกณฑ์ FAB ส่วน NAE และ NBE ให้ผลบวกกับ T-cell lineage ALL บางรายเท่านั้น