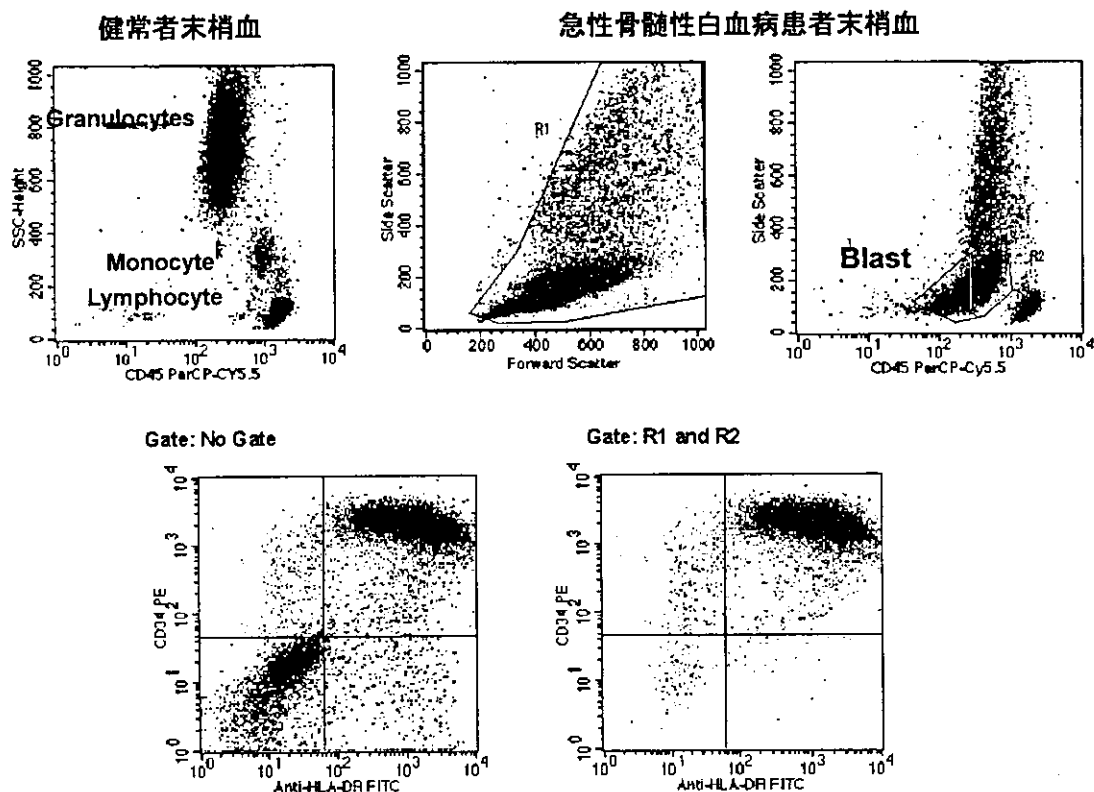
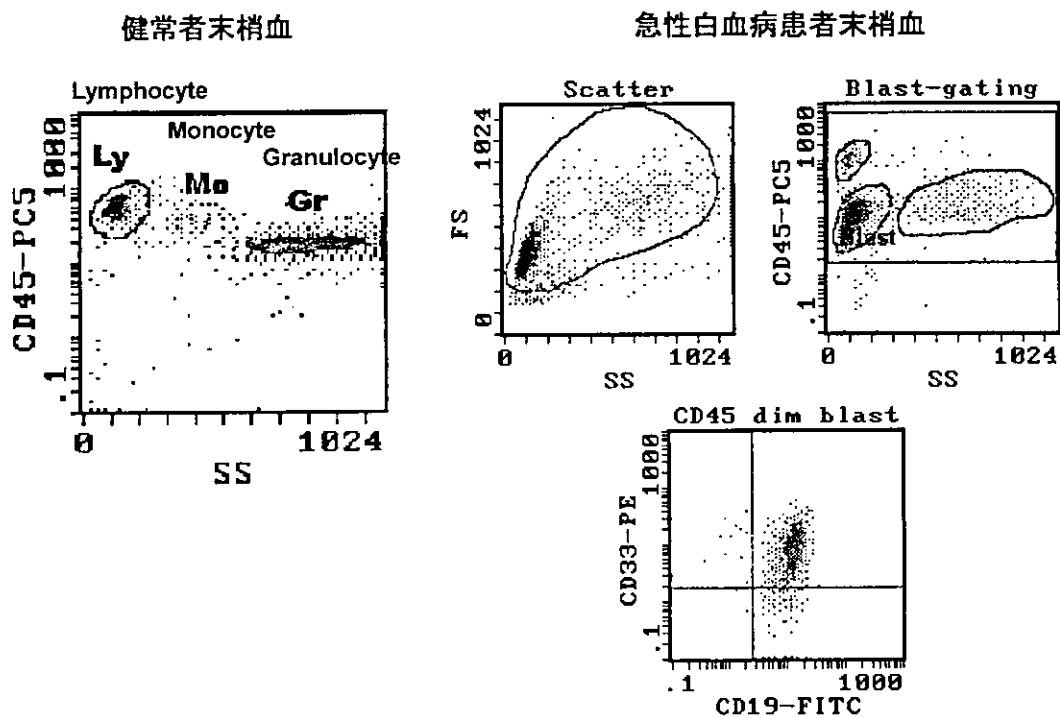


図8. CD45 ゲーティング

a. 測定例1



b. 測定例2



4.2 分析結果の解釈

FCM の検査結果は、単に“陽性率”の数字のみでは判断できない。測定結果を正しく解釈するには、血球分画など他の検査の情報も加味するのは勿論のこと、以下の諸点にも考慮すべきである。

1) 検体中の白血病細胞の割合とゲーティングの適否(白血病細胞の純度)

検体中には白血病細胞以外に正常な血液細胞も存在しており、白血病細胞が正確にゲーティングされているか否かで測定結果の解釈が大きく異なる。最初に散乱光サイトグラムや CD45/SS ドットプロット上で白血病細胞が適切にゲーティングされているかどうかを確認した上で、個々の蛍光ヒストグラムやドットプロットの結果を見るように心掛ける。

2) 各測定項目の正常血液細胞に対する特異性(マーカーの抗原分布)

白血病細胞の測定では、ゲーティングした細胞が全て白血病細胞であるとは限らず、混入した正常血液細胞が“陽性率”に大きく影響する。すなわち、ゲート内の細胞集団が 100%白血病細胞でない限り、報告された“陽性率”は白血病細胞の陽性率に正常血液細胞の陽性率が加算または相殺されている。例えば、正常リンパ球の 65~85%程度を T 細胞が占めているので、ゲーティングされた白血病細胞の割合が 40%未滿で残りが正常リンパ球である場合は、pan-T 細胞マーカーの陽性率が 50%以上でも正常リンパ球を反映している可能性を考慮せねばならない(図9)。また、測定結果を正しく解釈するには、各測定項目がどのような正常血液細胞に陽性であるかを理解している必要がある。例えば、CD2 や CD7 が NK 細胞にも発現していることや、CD10 が成熟好中球にも発現していることを知らないと結果の解釈を誤る恐れがある。一方、CD41/CD61 (gp II b/IIIa) などの血小板マーカーや CD235a (Glycophorin-A) のように赤血球が陽性となるマーカーは、血小板や溶血残渣の付着によって白血球が偽陽性を示すことがある。このため巨核球系や赤芽球系の判定では、他の測定項目や検査結果も勘案して判断せねばならない。

3) 陽性細胞の抗原発現強度(蛍光ヒストグラム/ドットプロットのパターン)

白血病細胞は表面抗原の発現量が正常血液細胞と異なっていることが多い。蛍光強度の違いは、正常白血球と白血病細胞の鑑別に役立つ反面、結果判定を難しくする原因でもある。とくに、白血病細胞が抗原陽性であっても発現量が非常に少ない場合は、得られる“陽性率”が白血病細胞の割合から予想される数値よりも低くなる。このような場合には、標識蛍光色素の違いで“陽性率”が大きく異なることもあり、FCM の測定結果に施設間差が生じる原因の一つとされている。

以上のように、FCM の検査結果は“陽性率”の数字のみで判定することができない。例えば、「陽性率 50%」という情報のみでは、「白血病細胞は抗原弱陽性(半数が偽陰性)」なのか、それとも「解析ゲート内のそれぞれ半数を占める白血病細胞と正常細胞のいずれかが陽性」なのかを見分けることはできず、蛍光ヒストグラムまたはドットプロットの確認が必要である(図10)。全ての検体および測定項目に対して一律にカットオフ値を決め、“陽性率”がそれを上回った場合に陽性と判定するのは、一見客観的のように思えるが適切な判定方法とは言いがたく、サイトグラムや蛍光ヒストグラムもしくはドットプロットを見た上で最終的に判断することが望ましい。

図9. 白血病細胞ゲート内に混入する正常細胞の影響

〔日本臨床検査標準化協議会「フローサイトメリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関するガイドライン(JCCLS H2-P V1.0)」より引用〕

急性リンパ性白血病例について治療前後で表面マーカー分析結果を比較した結果を示す。形態学的分類で末梢血中の白血病細胞が95%以上を占めた初診時(A)には、散乱光サイトグラム上で白血病細胞を単一の集団として同定でき(データは示していない)、この白血病細胞がCD7陽性CD3陰性で、一部がCD1a陽性であることが容易に判断できた。一方、治療に伴い白血病細胞の割合が減少した後(B)では、正常T細胞(CD7陽性CD3陽性CD1a陰性)が散乱光サイトグラム上の解析ゲート内に多量に混入したため、散乱光サイトグラムでのゲートングで白血病細胞がCD7陽性CD3陰性であることを判断するのは困難だった。

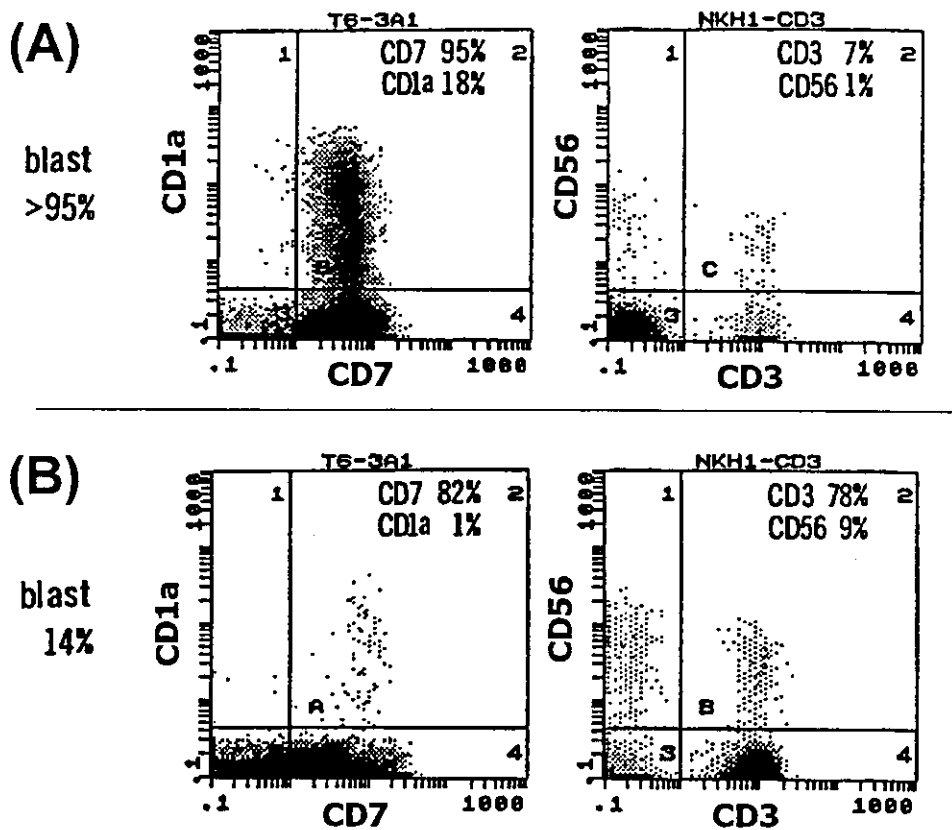
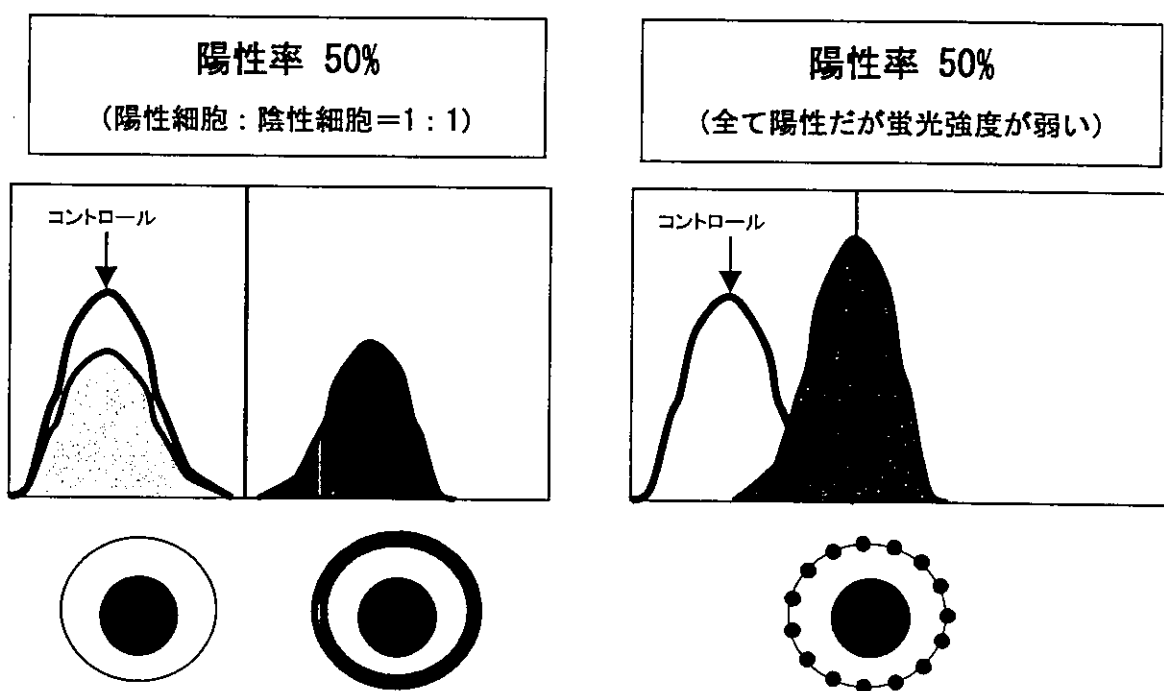


図10. 「陽性率」のもつ意味

[日本臨床検査標準化協議会「フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関するガイドライン(JCCLS H2-P V1.0)」より引用]

白血病細胞の測定では、ゲーティングした細胞が全て白血病細胞であるとは限らず、混入した正常白血球が“陽性率”に大きく影響する。また、白血病細胞が抗原陽性であっても発現量が非常に少ない場合も、得られる“陽性率”が白血病細胞の割合から想定される数値よりも低くなる。例えば、「陽性率 50%」という結果は、陽性の細胞と陰性の細胞が半々である場合(左図)と、全て(弱)陽性だが半分が偽陰性となってしまった場合(右図)の両方の場合が考えられる。前者が図5の A に、後者が図5のCに、それぞれ相当し、この両方の要因が複合すると図5のBやDのような結果となる。また、右図の場合、ピークの位置が蛍光標識抗体の蛍光強度や測定系の蛍光感度に依存して変動するので、見た目の“陽性率”もそれに伴い変動する。



V. 細胞遺伝学および分子生物学的診断の実際

細胞遺伝学および分子生物学的診断は、造血器腫瘍の病型診断だけでなく、予後因子を検出する方法としても重要であり、正確な結果を得るためには適切な検査方法の選択と検体の取り扱いを適切に行うことが重要である(図1)。また、染色体分析や遺伝子解析の結果を正しく解釈するためには、他の臨床検査と同様、臨床医が染色体異常に対する基礎知識を持つことが必要であることを強調したい。

1. 検査法について

1) 検体採取、送付と保存

染色体および遺伝子検査を適切に実施するためには、ここに述べた検体の採取方法、送付方法および保存方法に従うことが非常に重要である。

検体採取、送付と保存の原則

- ・ 検査会社の指定チューブ
- ・ 4℃に保ち、4℃で送付
- ・ 細胞保存は液体窒素が原則
 - 液体窒素がない場合-80℃冷凍庫
- ・ 染色体カルノア固定液:検査会社
 - 各グループの指定施設に保存
- ・ 細胞保存
 - 各グループの指定施設

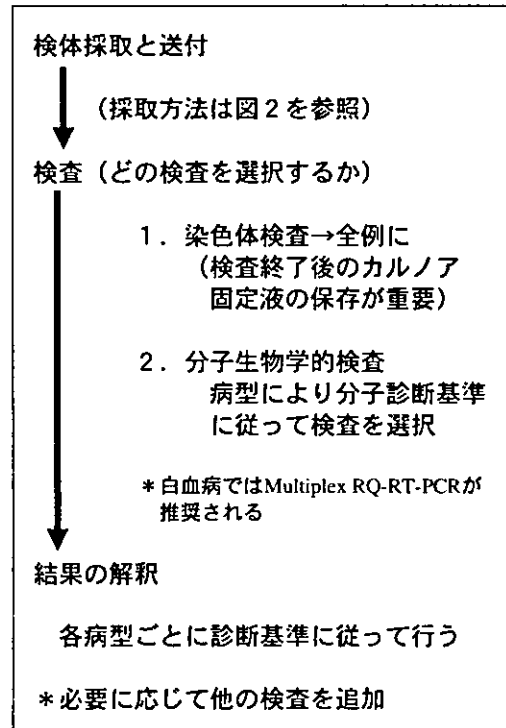


図1 検体採取から結果の解釈までの概要

(1) 検体の採取と送付

- ① 骨髓液については、まず1 ml ディスポーザブルシリンジ(抗凝固剤は加えない)を用いて約1 mlの骨髓液をゆっくり採取し、0.2mlを塗抹標本作成用にスライドガラスに落とし、0.8mlを培養液入りの検体容器に注入して染色体分析用にわかる(図2)。次いで抗凝固剤加(ヘパリン0.5ml等)5~10 mlのディスポーザブルシリンジで合計10~20mlの骨髓液を吸引し、免疫学的解析(マーカー)、遺伝子解析、保存用とする。この際、採取後直ちに(吸引に時間がかかるときは採取途中でも)よく混和して凝固を防ぐ。
 - ② 末梢血については、白血病細胞を25%以上含んでいれば、適当な抗凝固剤(EDTA、ヘパリンなど)を入れて凝固を防ぎ、解析や保存用に使用できる。
 - ③ リンパ節等については、骨髓染色体検査用の培養液入りチューブに検体を入れる。採取後24時間以内に到着するように、4℃で保管し、可能な限り4℃で送付する。
- * 外注で検査をする項目については、外注検査会社により定められた検体の取り扱い基準に従う。

(2) 検体の保存

- ① 末梢血、骨髓液:フィコールで単核球を分離し、DMSO等の凍結保存液を用い液体窒素用チューブ(セラムチューブ等)に入れ、液体窒素タンクで凍結保存する。
- ② リンパ節等:メスでミンシ細胞にばらした後にDMSO等の凍結保存液を用い液体窒素用チューブに

入れ、液体窒素タンクで凍結保存する。この検体により後にマーカー解析も可能である。ばらさなかった残りはマイクロチューブに入れ、核酸抽出用として-80℃で凍結保存する。

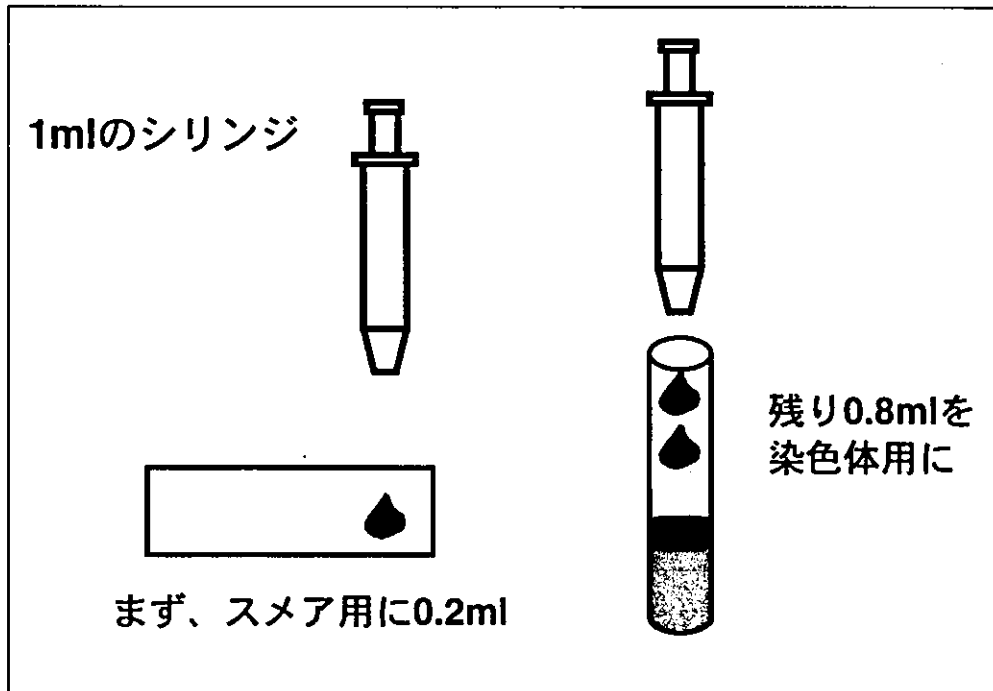


図2 初診時の検体の採取方法

2) サザンプロット解析

サザンプロット解析は、*MLL*遺伝子の再構成(特に乳児白血病)、*IgH*遺伝子、*T*細胞受容体(*TCR*)遺伝子の再構成(特に分類不能の白血病)、*MYC*遺伝子の再構成(特にB細胞型腫瘍)などの検出のために有用である。

(1) *MLL* 遺伝子再構成

プローブは、0.859kb、*Bam*HI cDNA断片(エクソン8-14、エクソンの番号は新しいnomenclatureに従った)を用いる。

制限酵素は、*Bam*HI と *Hind*III の 2 種類を用いる。Germ line のバンドのサイズはそれぞれ、*Bam*HI (8.3kb)、*Hind*III (14kb)である。*Bam*HI のみの場合、*MLL* 遺伝子再構成の検出感度は90~95%、*Bam*HI と *Hind*III の両者を用いた場合、検出感度はほぼ100%となる。

(2) *IgH* 遺伝子再構成

分類不能の白血病のリンパ系への分化を検討するためには *JH*遺伝子再構成を調べる。

プローブは、*JH* genomic DNA断片を用いる。

制限酵素は、*Hind*III と *Bam*HI/*Hind*III の 2 種類を用いる。Germ line のバンドのサイズはそれぞれ、*Hind*III (11kb)、*Bam*HI/*Hind*III (5.6kb)である。

(3) *TCR* 遺伝子再構成

分類不能の白血病のリンパ系への分化を検討するためには *C*・遺伝子再構成、*J*・遺伝子再構成を調べる。

① C-遺伝子再構成

プローブは、C-1 genomic DNA 断片を用いる。

制限酵素は、*Bam*HI と *Eco*RI と *Hind*III の 3 種類を用いる。Germ line のバンドのサイズはそれぞれ、*Bam*HI (24kb)、*Eco*RI (11, 4.2, 8.4kb)、*Hind*III (3.7, 6.2, 7.2kb)である。

② J-遺伝子再構成

プローブは、J-1 *Bgl*II/*Eco*RI genomic DNA 断片を用いる。

制限酵素は、*Bgl*II と *Hind*III の 2 種類を用いる。Germ line のバンドのサイズはそれぞれ、*Bgl*II (5.2kb)、*Hind*III (6.4kb)である。

(4) MYC 遺伝子再構成

成熟 B 細胞性腫瘍の Burkitt 型の確定のため MYC 遺伝子の再構成を調べる。

プローブは、MYC *Pvu*II/*Pvu*II genomic DNA 断片(第1エクソン)を用いる。

制限酵素は、*Eco*RI と *Hind*III の 2 種類を用いる。Germ line のバンドのサイズはそれぞれ、*Eco*RI (12.8kb)、*Hind*III (11.6kb)である。

3) 染色体分析と FISH 解析

(1) 染色体分析

① 意義

染色体異常は小児白血病と悪性リンパ腫において最も重要な予後因子であるため、染色体分析は全症例で必須の検査項目である。

② 解析に当たっての注意点

染色体異常の検出率は、検体の質により大きく左右される。特に、良好な分裂像を得にくい小児 ALL では、検体の採取法および取り扱いに細心の注意が必要である。＜検体の採取と送付＞で述べたように、1 ml ディスポーザブルシリンジ(抗凝固剤は加えない)を用いて約 1 ml の骨髓血をゆっくり採取し、塗抹標本作成に用いた残りの 0.8ml を培養液入りの検体容器に注入して染色体分析用にわけ。一度凍結した検体やステロイドなどを投与した後の検体では検出率が低下するため、できるだけ初診時に検体を速やかに検査施設に送付できるタイミングで検体の採取を行う。検体としては骨髓液の方が適しているが、骨髓液の採取が困難な場合は 25%以上の白血病細胞を含んでいれば末梢血でも検査が可能である。

③ 解析方法と判定基準

染色体分析は、白血病細胞を無刺激で短期間培養した後、分裂期にある細胞を G-banding 法(もしくは Q-banding 法)により染色して行う。染色体分析では、一般に 20 程度の核板を解析して核型を決定し、ISCN(1995)(An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (1995))に従って記載する。

クローン性(clonal)染色体異常の基準

同一検体で、

- (a) 2 細胞以上に同一染色体の過剰か構造異常(数的増加、相互転座:t(4;11)など)がみられた場合
 - (b) 3 細胞以上に同一染色体の不足(数的減少: monosomy 7 など)がみられた場合
- のみクローン性染色体異常と判定する。

次の場合は、染色体分析の再検、もしくは FISH 解析、RT-PCR 法によりクローン性染色体異常の確認を行う必要がある。

- (a) 過剰か構造異常が 1 細胞の場合
- (b) 同一染色体の不足が 2 細胞以下の場合

* 初診時の染色体分析で残ったカルノア固定検体は、解析終了後も -20℃-80℃で保存する必要がある。

(2) FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 解析

FISH 解析は分子細胞遺伝学的診断法であり、染色体解析を補うものとして位置づけられる。このため初診時の必須検査項目ではないが、次の場合には必須の検査項目となることもある。

- (a) 病型から予想されるクローン性染色体異常が染色体解析で検出されなかった場合
- (b) Real-time quantitative (RQ)-RT-PCRなどで、特定の染色体転座により形成されるキメラ mRNA が検出され、染色体解析でクローン性染色体異常が検出されなかった場合

* 個々の疾患については、疾患別分子生物学的診断を参考にすること。

4) PCR 法と RT-PCR 法

通常の PCR 法 (定性または半定量遺伝子増幅法) は、少量の陽性細胞の存在 (微小残存病変) を証明するには有用であるが、主病変を反映しているとは限らないことや偽陽性の可能性があるため病型診断には適さない。初診時の病型診断では今後は次に述べる real-time quantitative PCR による定量的な検査が推奨される。

5) Multiplex real-time quantitative (RQ)-RT-PCR

Multiplex RQ-RT-PCR 法は検体提出より 2 日後には結果が得られるため、患者の層別化を迅速に行うことができ、白血病キメラ遺伝子のスクリーニング法として優れている。しかし結果の解釈には「染色体解析」や「FISH 解析」の結果を参考にすることが必須である。また、単項目の RQ-RT-PCR 法を用いれば MRD の測定も行うことで可能である。

(問題点) コピー数が少ない場合に偽陰性となる可能性がある。何コピー以上を陽性とするかの明確な基準もまだ存在しない。また、採取から時間が経過した検体や、凍結保存した検体を使用すると、劣化 (mRNA の変性) により結果 (定量値) の信頼性は低下する。

2. 分子・細胞遺伝学的診断基準

Multiplex RQ-RT-PCR 法を利用することができる場合は分子診断基準にあげたほとんどのキメラ遺伝子は同時に検出することが可能であるが、様々な事情から単項目での検査しか利用できない場合は、病型によって次のランク付けに沿って検査を行うことが推奨される。

1) ALL

(1) 分子診断基準

ランク A (必須検査項目: *BCR-ABL*, *MLL*) → 予後因子としての意義が大きい

ランク B (推奨検査項目: *TEL-AML1*, hyperdiploidy)

ランク C (参考検査項目: *E2A-PBX1*, *SIL-TAL1*)

ランク S (研究検査項目: *FLT3* 異常)

ALL では予後不良因子として既に多くの治療プロトコールで層別化の材料として採用されている *BCR-ABL* と *MLL* は必須検査項目と考えられる。

(2) 分子診断の流れ

初診時必須検査項目

Multiplex RQ-RT-PCR 法

染色体分析

* 染色体検査は今後も従来通り必須と考えられるが、ALL では異常検出率が低いため、染色体検査のみでは予後因子となる異常を確実に検出することができない。そのため、今後は最近確立してきた multiplex RQ-RT-PCR が予後因子の迅速なスクリーニングのために推奨される。

補助検査項目(対象によって異なる)

FISH 解析

サザンプロット解析

(3) 確定診断

原則として、染色体分析と multiplex RQ-RT-PCR(または単独の RT-PCR)の結果が一致した場合に確定診断とする。両者の結果が一致しない場合は、確認のために FISH またはサザンプロット解析を追加する必要がある。特に、*BCR-ABL*と *MLL*は予後因子として重要であるので、次に従って検査を追加し診断を確定することが必要である。

① フィラデルフィア(Ph)染色体/*BCR-ABL* キメラ遺伝子:t(9;22)(q34;q11)

(a) Multiplex RQ-RT-PCR 法(または RT-PCR 法)陽性でも、染色体分析によりフィラデルフィア染色体が検出されない場合は、FISH 法を用いて微小染色体転座などでマスクされた *BCR-ABL* 遺伝子再構成を検出することにより診断を確定する。

(b) Multiplex RQ-RT-PCR 法(または RT-PCR 法)陽性、染色体分析でフィラデルフィア染色体陰性、FISH 法で *BCR-ABL* 遺伝子再構成陰性の場合は、サザンプロット法による *BCR-ABL* ゲノム DNA 再構成の検出により診断を確定する。

② *MLL* 遺伝子再構成:t(4;11)(q21;q23), t(11;19)(q23;p13)など、11q23 転座

Multiplex RQ-RT-PCR による *MLL* キメラ遺伝子(*MLL-AF4*, *MLL-AF9*, *MLL-ENL*など)の検出と染色体分析による 11q23 転座のどちらか一方のみしか検出できなかった場合は、サザンプロット解析により *MLL* 遺伝子再構成を検出できれば診断を確定できる。FISH 法を追加する場合は、用いるプローブによっては *MLL* 以外の場所に切断が存在する場合でも *MLL* の split と判定される場合があり、注意が必要である。

また、サザンプロット解析のみで再構成が検出された場合は偽再構成の場合があるので注意が必要である。

③ *TEL-AML1*:t(12;21)(p13;q22)

染色体分析では多くは正常核型と判定され、t(12;21)を検出するのは困難である。RQ-RT-PCR で *TEL-AML1* のコピー数が十分検出され、染色体分析で他の病型特異的な核型が検出されなければ、RQ-RT-PCR の結果のみで確定と考えて通常は問題ない。可能であれば FISH 解析を追加することを推奨する。

④ *E2A-PBX1*:t(1;19)(q23;p13)

可能であれば FISH またはサザンプロット解析を追加して診断を確定する。

⑤ *SIL-TALI*:

可能であれば FISH またはサザンプロット解析を追加して診断を確定する。

⑥ hyperdiploid

「フローサイトメリーによる血液細胞の DNA aneuploidy 検索」を参照

(4) その他

ALL か AML の診断が困難な時には、サザンプロット解析によって *IgH* または *TCR* の再構成を確認できれば ALL と診断する補助になる場合がある。

2) AML

(1) 分子診断基準

ランク A(必須検査項目: *FLT3* 異常、*PML-RAR*、*BCR-ABL*, *DEK-CAN*, -7/7q-, -5/5q-)

ランク B(推奨検査項目: *AML1-MTG8 (ETO)*, *CBF α -MYH11*)

ランク C(参考検査項目: *MLL*)

ランク S(研究検査項目: *c-KIT* 異常)

(2) 分子診断の流れ

初診時必須検査項目

Multiplex RQ-RT-PCR 法

染色体分析

AML では、染色体異常の検出率が高いので染色体検査は非常に重要である。

ALL と同様で、原則として染色体分析と multiplex RQ-RT-PCR(または単独の RT-PCR)の結果が一致した場合に確定診断とする。両者の結果が一致しない場合は、確認のために FISH またはサザンブロット解析を追加する必要がある。

尚、次期 AML プロトコールから *FLT3* internal tandem duplication (ITD)は治療の層別化に用いられる予定である。

① 病型と染色体、遺伝子異常の関係

(a) M1), M2:	<i>AML1-MTG8 (ETO)</i> :	t(8;21)(q22;q22)
(b) M3:	<i>PML-RARα</i> :	t(15;17)(q22;q11-21)
(c) M4Eo:	<i>CBFα-MYH11</i> :	inv(16)(p13q22)
(d) M4, 5:	<i>MLL</i> :	11q23
(e) M2, M4:	<i>DEK-CAN</i> :	t(6;9)(p23;q34)

② 病型との関連はないが予後因子として重要な染色体異常

(a) -7/7q-

(b) -5/5q-

(c) t(9;22)(q34;q11): *BCR-ABL*

(d) t(16;21)(p11;q22): *TLS/FUS-ERG*

* 同じ AML でみられる t(16;21)(q24;q22): *AML1-MTG16*とは全く異なるので注意が必要

3) 悪性リンパ腫

成人非ホジキンリンパ腫には、濾胞性リンパ腫、mantle cell リンパ腫、MALT リンパ腫など、特異的な染色体転座を有する病型が知られているが、これらは小児にはみられない。小児非ホジキンリンパ腫のほとんどは、Burkitt lymphoma、lymphoblastic lymphoma、anaplastic large cell lymphoma、diffuse large cell lymphoma のどれかに分類される。

(1) Burkitt lymphoma (Burkitt-like lymphoma)

t(8;14)(q24;q32), t(8;22)(q24;q11), t(2;8)(p12;q24)

染色体分析の検出率は条件により 25-80%である。

間期核 FISH (*IgH* と *MYC*をプローブにする)による t(8;14)の検出率は約 90%である。

サザンブロット (*MYC*をプローブにする)による *MYC*再構成の検出率は約 80%である。

(2) Lymphoblastic lymphoma

T cell type では染色体分析により t(10;14)(q24;q11), t(11;14)(p13;q11), t(7;11)(q35;p13), t(1;14)(p32;q11)等が検出できる。

Pre-B cell type でみられる t(1;19)(q23;p13) は染色体分析、RT-PCR、FISH で検出できる。

(3) Anaplastic large cell lymphoma

t(2;5)(p23;q35), t(1;2)(q25;p23), inv(2)(p23;q25), t(2;3)(p23;p21), t(2;22)(p23;q11.2)は染色体分析、RT-PCR、FISH で検出できる。また転座型は検出できないが、2p23 転座の有無は ALK プロブを用いた FISH で検出できる。Anaplastic large cell lymphoma では、2p23 転座により通常 ALK が活性化しているが、これは抗 ALK 抗体による免疫染色で検出できる。

(4) Diffuse large cell lymphoma

染色体分析でいくつかの転座が検出でき、臨床像との関係を検討できる。

(5) Hodgkin リンパ腫

病理組織像、免疫染色により診断する。Hodgkin リンパ腫では分裂細胞を得ることが困難であり、特定の染色体異常は知られていない。

* 悪性リンパ腫では、病理組織像と免疫染色、フローサイトメトリー(表面マーカー)により病型が決定される。染色体、遺伝子解析は病理診断の確定や、病理診断困難例の補助診断として役立つ。以上より、悪性リンパ腫では染色体分析を全例に行い、残ったカルノア固定液を保存することを推奨する。

3. 再発の診断

1) 再発時の clonality 診断

再発の診断は、初診時にみられた分子生物学的マーカーを検出することでより確かなものになる。再発時においても、染色体分析は必須である。初診時にみられた核型異常がみられる場合や、初診時の異常に新たな異常が加わる場合がある。初診時とは別な異常がみられた場合は再発ではなく、二次性白血病の可能性もある。染色体分析結果に問題がある時は、初診時と同様に FISH 法あるいは PCR 法で clonality の確認を行うことが望ましい。ただし、定性的な RT-PCR 法では高感度のため、疑陽性となる可能性があるため、RQ-RT-PCR 等で定量し、形態観察でみられた細胞量と見合うことを確認する必要がある。また、マーカーの種類によっては、再発時に消失するものもあるので注意が必要である。

2) 再発の早期診断と治療効果の判定

急性白血病では臨時的な再発に先駆けて骨髄で白血病細胞の増加がみられることが多い。したがって、微小残存病変(minimal residual disease, MRD)を PCR 法で検出することで早期に再発を予知し、治療法を変更するなどの選択肢を設けることも可能である(詳細は「微小残存病変の評価法とその実際」を参照されたい)。

ただし、このための再発基準は、定量的 PCR による数値を裏付ける過去のデータが必要である。また、検体採取の時期も考慮しなければならない。慢性骨髄性白血病においては、BCR-ABL をプローブにした FISH 法により、イマチニブ(グリベック)の治療効果が判定される。

4. 精度管理

細胞遺伝学的診断法、分子生物学的診断法とも病型診断のうえで非常に有用な方法であるが、適切な検体の扱い方や検査項目の選択をしなかった場合は誤った結果を得ることがあるので注意が必要である。また、

いずれの方法も結果の解釈についてはしばしば各々の方法についての十分な知識が必要であり、受け取った結果について少しでも疑問がある場合は、専門家の判断を仰ぐことが必要である(将来的には中央診断による検査の精度管理が必要)。

【文献】

- (1) 金子安比古: 白血病とその類縁疾患、固形腫瘍の染色体検査・遺伝子検査。臨床検査法提要、金井正光編、13章 染色体・遺伝子検査。金原出版。2005年、p1215～p1231。
- (2) Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, Ihara K, Nakayama H, Hara T: High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in blast cells from patients with Down syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis. *Br J Haematol*, 115: 472-475, 2001.
- (3) Hayashi Y. The molecular genetics of recurring chromosome abnormalities in acute myeloid leukemia. *Semin Hematol* 37: 368-380, 2000
- (4) Chessells JM. Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge. *Br J Haematol* 102: 423-438, 1998
- (5) Kaneko Y. Cytogenetics in malignant lymphomas. *Curr Opin Oncol* 2: 816-821, 1990
- (6) Goldsby RE, Carroll WL. The molecular biology of pediatric lymphomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 20: 282-296, 1998

(付記)フローサイトメリーによる血液細胞の DNA aneuploidy 検索

1. DNA Index と DNA aneuploidy

DNA index は、DNA ploidy とも呼ばれ、細胞の染色体の倍数性の目安となる。DNA index は、Propidium Iodide(PI)溶液などで核染色された血液細胞サンプルをフローサイトメーターで測定し、得られた DNA ヒストグラム上の G0/G1 ピークのチャンネルと、正常である二倍体細胞の G0/G1 ピークのチャンネルとの比で表わす。

$$\text{DNA Index(DI)} = \frac{\text{(サンプル細胞の G0/G1 ピークのチャンネル値)}}{\text{(正常二倍体細胞の G0/G1 ピークのチャンネル値)}}$$

DNA index が、1.0 ということは、細胞が、各染色体を2対(ヒトなら 46 本)ずつ持つと思われる細胞であり、DNA diploid と定義される。この比が 1.0 でない場合は、DNA aneuploid (abnormal DNA stemline) と定義され、1.0 以上のものを、DNA hyperdiploid、1.0 以下のものを DNA hypodiploid と定義する⁽¹⁾。

2. DNA 染色方法

ヘパリン採血した末梢血又は骨髄血から比重遠心法にて単核球細胞を分離する。内部標準細胞には検体と性別の一致した未固定の正常ヒト単核球と冷凍保存したニジマス赤血球(Trout RBC:ヒト細胞の約 80%の DNA 量を有す)を用いる⁽²⁾。これらが入手出来ないときには脾臓摘出手術にて得られた脾臓細胞や市販のニワトリ赤血球(CRBC)で代用する。基本的には細胞を固定せずに、低張 PI 溶液で当日中に染色/測定する方が最良の CV が得られる。当日細胞を測定できない時には70%エタノールで固定後-20℃で冷凍保存する。

3. フロートサイトメリーによる DNA 量測定上の注意

FCM での DNA 量測定は、1)サンプル調製、2)フローサイトメーター、3)染色の影響を受けやすい。

測定パラメーターには、様々な要素が影響するが、測定結果の安定性、再現性のために、適切なコントロールを用いた、日頃からの機器管理が必要である。特に測定結果の信頼性のために、機器の直線性と CV (Coefficient of Variation : DNA 分布変動係数)などの精度管理は必要不可欠である。

付表1 FCM による DNA 量測定ガイドライン一覧

- (1)Hiddeman et al. : Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry(1984) 5:445
国際サイトメリー学会 (International Society for Analytical Cytology, ISAC)による最初の DNA 量測定の用語と DNA aneuploidy の定義のガイドライン。
- (2)Takamoto et al. : DNA aneuploidy (DA) 検索のガイドライン
日本サイトメリー学会 DA 検討委員会 於:第2回日本フローサイトメリー学会総会(1992、大阪)
日本サイトメリー学会 (Japan Cytometry Society、JCS)が実施した DNA 量測定の施設間格差調査結果に基づき(1)に補則したガイドライン。
- (3)Hedley et al. : DNA cytometry consensus conference. Cytometry(1993) 14:471
北米の研究者グループが固形腫瘍中心に作成した DNA 量測定・解析の詳細なガイドライン
- (4)Omerod et al. : Consensus report of the task force on standardisation of
DNA flow cytometry in clinical pathology. Analytical Cellular Pathology (1998) 17:103
Haroske et al. : Fourth updated ESACP Consensus report of diagnostic DNA image cytometry.
Analytical Cellular Pathology (2001) 23:89
欧州の研究者グループ (European Society for Analytical Cellular Pathology, ESAPC)
が作成した DNA 量測定・解析の詳細なガイドライン

【文献】

- (1) Hiddeman W et al. : Convention on nomenclature for DNA cytometry. Cytometry 5:445-446, 1984
- (2) Vindel LL et al. : Long-term storage of samples for flowcytometric DNA analysis. Cytometry 3:317-322, 1982

VI. 微小残存病変の評価法と実際

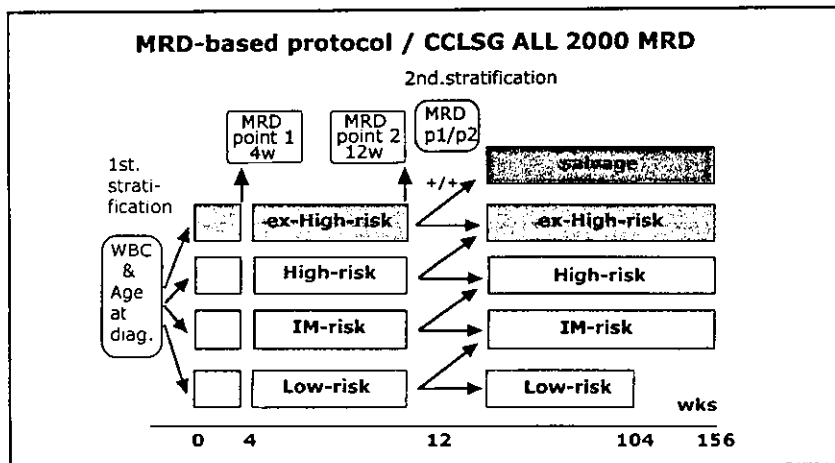
1. 疾患別にみた微小残存病変(MRD)定量とその臨床的意義について

1.1 急性リンパ性白血病

急性リンパ性白血病(ALL)では1990年頃からTCRやIg遺伝子再構成をPCRで増幅したり、複数のモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリ(FCM)によるMRD定量の技術が確立されてきた。1998年、ヨーロッパのBFMグループは小児ALL240人を対象にした、治療開始後、5、12、22(一部は25)、28(一部は33)、70、80週、2年目、3年目に骨髄MRD定量を行った。検出に用いたマーカーはTCR γ 、 δ 鎖、Ig κ 遺伝子再構成、もしくはTAL-1遺伝子の再構成である¹⁾。

その結果、定量を行ったすべての時点で、MRDは独立した予後因子であることが証明された。また、最初の2点、即ち5週目(寛解導入直後)と3ヶ月目(地固め療法直前)がともに陽性の患者を高リスク群(3年再発率75%)、ともに陰性の患者を低リスク群(同2%)、どちらかが陰性を中間リスク群(同23%)と定義し、MRD結果で患者のリスクの層別化できることを示した。私たちも同様のデータをCCLSG911治療研究で確認している²⁾。これらのデータから早期の治療反応性が予後と密接に関わることが示されたが、さらに早期であるday15のMRD量が5年生存率に相関することをBFMグループのPanzer-Grumayerらは報告している³⁾。

これらをもとにBFMグループでは、MRD結果に基づく層別化を組み入れた新たな治療プロトコルを作成している。わが国でも、小児癌白血病研究グループ(CCLSG、愛知医大小児科、鶴澤正仁教授主宰)でMRDに基づく層別化治療研究をすでに開始している(図1)。



一方、Coustan-Smithらは小児ALL95例を対象に寛解導入直後とその後3点でmulti-colorフローサイトメトリを用いたMRDの定量を行い、いずれのポイントでもMRDが0.1%以上存在すれば、予後不良であることを証明した⁴⁾。また、110例の小児ALLで寛解導入治療中のday19の骨髄MRDが0.01%未満の51症例と0.01%以上の59症例で予後を比較すると、day19のMRDがより強くrelapse-free survivalに相関することを明らかにした⁵⁾。

また、WillemeseらはTCR/Ig遺伝子再構成をマーカーとして、71例のT-ALLと210例のprecursor B-ALLを比較し、前者でMRDの残存量が多いことを示した。これらの患者の予後(relapse-free survival)とMRDの相関を調べると、MRD陰性者の予後はT-ALLにおいてprecursor B-ALLより良好であることが明らかになった⁶⁾。

Coustan-Smithらは、骨髄と末梢血のMRDの意義をT-ALLとprecursor B-ALLに分けて分析した。T-ALLでは骨髄MRD陽性であった35例全例で末梢血MRDも陽性であったのに対し、precursor B-ALLでMRD陽性であった104例の内、末梢血もMRD陽性であったのは37例に過ぎず、両群には大きな差が

あった⁷⁾。

小児ALLのMRDマーカーとしてPCR法とFCMはほぼ同等の感度を持ち、対象となる症例の比率はFCMがやや多い。予後との相関をみたとき、両者の間に差はないと考えるべきであろう。

【文献】

- 1) van Dongen JJ, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet*. 352:1731-8, 1998
- 2) Okamoto T, et al. Minimal residual disease in early phase of chemotherapy reflects poor outcome in children with acute lymphoblastic leukemia—a retrospective study by the Children’s Cancer and Leukemia Study Group in Japan. *Leuk Lymphoma*. 43:1001-6, 2002
- 3) Panzer-Grumayer ER, et al. Rapid molecular response during early induction chemotherapy predicts a good outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 95:790-4, 2000
- 4) Coustan-Smith E, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 96:2691-6, 2000
- 5) Coustan-Smith E, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 100:52-8, 2002
- 6) Willemse MJ, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood*. 99:4386-93, 2002
- 7) Coustan-Smith E, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 100:2399-402, 2002

1.2 急性骨髄性白血病

小児急性骨髄性白血病(AML)では初発時の検査で特定の染色体転座や融合遺伝子¹⁾²⁾が検出された場合には、微小残存病変(minimal residual disease, MRD)を fluorescence *in situ* hybridization (FISH)法やPCR法で検出することで早期に再発を予知し、治療の層別化や治療法の変更用に用いられている。各転座型によりMRDが予後の指標になるかどうかの評価が異なり、これはそれぞれの治療法とMRD検出の感度により異なるものと思われる。FISH法により染色体の数の異常やt(8;21)などの転座を有する症例でMRDの検索が可能であるが、検出感度は 10^{-2} 程度であり、鋭敏な検査法ではないので、他に方法がない時に用いられる事が多い。Flow cytometry (FCM)法はAML細胞に特異的な表現型によりMRDが定量され、そのMRD量は再発を予測する独立した因子であると報告されている³⁾⁴⁾。FCM法は簡便であり、短時間に比較的正確なMRDの定量ができるので、検出感度がよければ臨床上有用である。

AMLではRT-PCR法やreal-time RT-PCR法によりMRDが検索される事が多い。以下各染色体転座につき述べる。

1) t(8;21)(q22;q22)

この転座はほとんどM2に認められ、*AML1-MTG8*キメラ遺伝子をRT-PCR法により検出することでMRDとして同定される。当初、t(8;21)-AMLの長期寛解例や、自家移植後や同種移植後もMRDが残存していることが報告された⁵⁾⁶⁾。しかしその後、成人例や小児例で同種移植後や化学療法後にMRDが消失することが報告され⁷⁾⁸⁾、検出感度が 10^{-6} から 10^{-5} レベルの報告で、長期寛解例14例でMRDが陰性で、寛解導入療法後にMRDが陰性化した症例は寛解の持続期間が有意に長く、MRD陽性群との間で再発率に有意差が認められると報告されている⁹⁾。

2) inv(16)(p13q22)

M4Eoに多くみられる転座で¹⁰⁾、*CBFB-MYH11*融合遺伝子を用いてMRDの検索が行われ、予後との相関が報告されている¹¹⁾¹²⁾。

3) t(15;17)(q22;q21)

M3 に高頻度に認められる転座で *PML-RARA* 融合遺伝子を用いて MRD の検索が行われている¹³⁾¹⁴⁾。
t(15;17)-APL における MRD 検出の臨床的意義はほぼ確立されており、治療により寛解維持している症例では MRD は検出されず(感度 10^{-4})、一度陰性になったキメラ mRNA が検出された場合は、高率に臨床的再発につながると考えられている¹³⁾¹⁴⁾。最近、real-time RT-PCR で詳細な検討が行われている¹⁵⁾¹⁶⁾

4) 11q23 転座型

M4 と M5 に多くみられる転座で、*t(9;11)(p22;q23)*と*t(11;19)(q23;p13)*では *MLL-AF9* と *MLL-ENL* または *MLL-ELL* 融合遺伝子がみられ、MRD の検索が行われている¹⁷⁾。

5) *t(16;21)(p11;q22)*

AML の1%前後と頻度が低く、比較的若年者に多く、M3 と M6 を除くすべての病型にみられ、19 例中 18 例が死亡している¹⁸⁾(図1)。この転座は *TLS/FUS-ERG* 融合遺伝子を用いた RT-PCR による MRD の検出でもバンドは消失せず(図2)、予後不良で、第一寛解期に幹細胞移植の適応とされている¹⁸⁾。

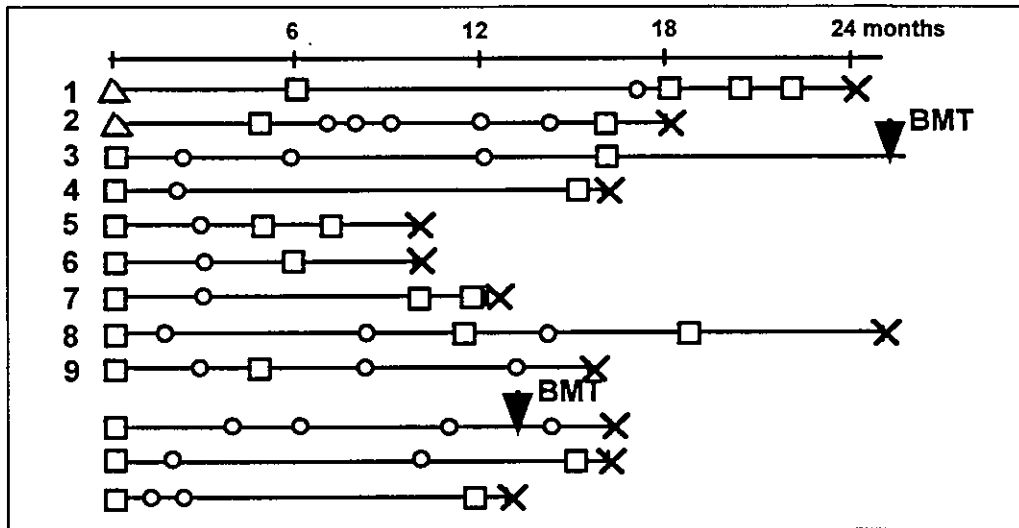


図1 *t(16;21)*の MRD BMT, 骨髄移植; X, 死亡; □, 再発; ○, 寛解;

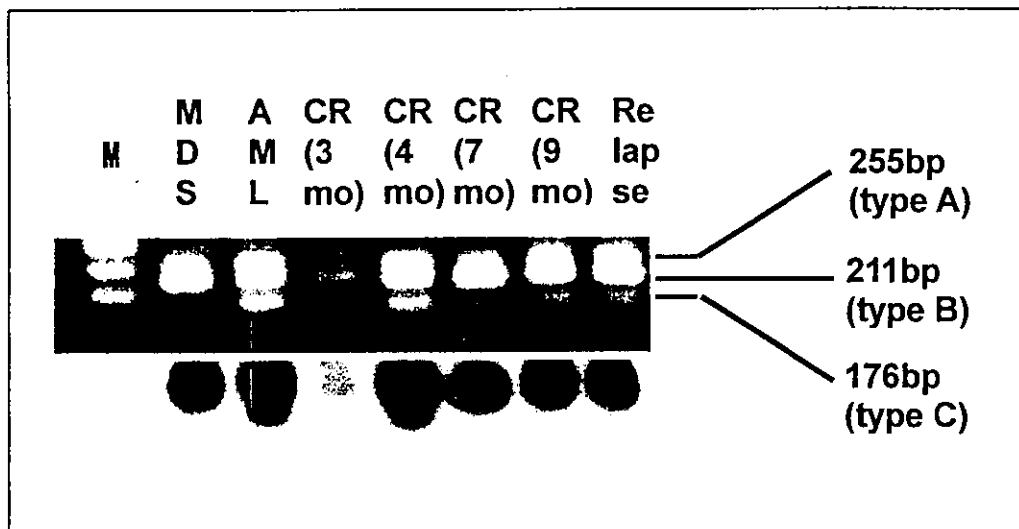


図2 *t(16;21)*の RT-PCR
 細胞学的 CR(完全寛解)でも分子生物学的には残存白血病(+)であった。

6) t(6;9)(p23;q34)

M2, M4 で認められるが頻度は低く、好塩基球増加を伴うことが多くて予後不良とされている²⁾。症例が少ないため *DEK-CAN (NUP218)* 融合遺伝子を用いた MRD の報告は少ない。

7) t(10;11)(p13;q22)

M0, M1 に多くみられ、ときに T-ALL や悪性リンパ腫の病型をとることもある。若年者に多く、予後不良例が多い。この転座より *CALM-AF10* 融合遺伝子が同定され¹⁹⁾、MRD の検索が可能であるが、多数例の報告はまだない。

8) t(7;11)(p15;p15)

M3 と M6 を除くすべての病型にみられ²⁾、*NUP98-HOXA9* 融合遺伝子を用いた MRD の報告がみられる。

9) t(1;22)(p13; q13)

乳児の急性巨核芽球性白血病(M7)に多いが²⁰⁾、症例が少ないため *OTT-MAL* 融合遺伝子による MRD の報告はまだみられない。

<その他の MRD の検索>

1) *WT1* 遺伝子

WT1 遺伝子は Wilms 腫瘍の原因となる癌抑制遺伝子であるが、ほとんどの悪性造血器腫瘍で高発現していることより、正常細胞との発現の差により MRD 解析が可能で、MRD の指標として有用であると考えられている²¹⁾²²⁾。小児 AML においても MRD の指標として臨床的にも有用であることが報告されているが²³⁾、多数例の報告はまだ少ない。

2) *FLT3* と *RAS* 遺伝子の変異

初診時に *FLT3* や *RAS* 遺伝子変異がみいだされれば、それを用いて MRD の検索が可能であるが、初診時に見られた変異が再発時に消失することがあるので注意を要する。

【文献】

- 1) Rowley JD: The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Ann Rev Genet* 32:495-519, 1998
- 2) Hayashi Y: Molecular genetics of recurring chromosome abnormalities in acute myeloid leukemia. *Semin Hematol* 37:368-380, 2000
- 3) Venditti A, et al: Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukemia. *Blood* 96: 3948-52, 2000
- 4) San Miguel JF, et al: Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 98:1746-51, 2001
- 5) Kusec R, et al: AML1/ETO fusion mRNA can be detected in remission blood samples of all patients with t(8;21) acute myeloid leukemia after chemotherapy or autologous bone marrow transplantation. *Leukemia* 8:735-9, 1994
- 6) Jurlander J, et al: Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 88:2183-91, 1996
- 7) Satake N et al: Disappearance of AML1-MTG8(ETO) fusion transcript in acute myeloid leukaemia patients with t(8;21) in long-term remission. *Br J Haematol* 91:892-8, 1995
- 8) Sakata N, et al: Rapid disappearance of AML1/ETO fusion transcripts in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia following bone marrow transplantation and chemotherapy. *Leuk Lymphoma*. 26:141-52, 1997
- 9) Morschhauser F, et al: Evaluation of minimal residual disease using reverse-transcription polymerase chain reaction in t(8;21) acute myeloid leukemia: a multicenter study of 51 patients. *J Clin Oncol* 18:788-94, 2000
- 10) Poirel H, et al: Detection of the chromosome 16 CBF beta-MYH11 fusion transcript in myelomonocytic leukemias. *Blood*. 85:1313-22, 1995
- 11) Costello R, et al: Prognosis value of residual disease monitoring by polymerase chain reaction in patients with

- CBF beta/MYH11-positive acute myeloblastic leukemia. *Blood*. 89: 2222-3, 1997
- 12) Buonamici, S, et al: Real-time quantitation of minimal residual disease in inv(16)-positive acute myeloid leukemia may indicate risk for clinical relapse and may identify patients in a curable state. *Blood* 99: 443- 449, 2002
 - 13) Diverio D, et al: Early detection of relapse by prospective reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of the PML/RARalpha fusion gene in patients with acute promyelocytic leukemia enrolled in the GIMEMA-AIEOP multicenter "AIDA" trial. GIMEMA-AIEOP Multicenter "AIDA" Trial. *Blood* 92:784-9,1998
 - 14) Tobal K, et al: Monitoring minimal residual disease and predicting relapse in APL by quantitating PML-RARalpha transcripts with a sensitive competitive RT-PCR method. *Leukemia*. 2001 15:1060-5,2001
 - 15) Jurcic JG, et al: Prognostic significance of minimal residual disease detection and PML/RAR-alpha isoform type: long-term follow-up in acute promyelocytic leukemia. *Blood* 98:2651-6,2001
 - 16) Gallagher RE, et al: Quantitative real-time RT-PCR analysis of PML-RAR alpha mRNA in acute promyelocytic leukemia: assessment of prognostic significance in adult patients from intergroup protocol 0129. *Blood*101:2521-8. 2003
 - 17) Ida K, et al: Detection of chimeric mRNAs by reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring of acute leukemias with 11q23 abnormalities. *Med Pediatr Oncol* 28: 325-332,1997
 - 18) Kong XT, et al.: Consistent detection of TLS/FUS-ERG chimeric transcripts in acute myeloid leukemia with t(16;21)(p11;q22) and identification of a novel transcript. *Blood* 90:1192-1199,1997
 - 19) Narita M, et al : Consistent detection of CALM-AF10 chimaeric transcripts in haematological malignancies with t(10;11)(p13;q14) and identification of novel transcripts. *Br J Haematol* 105:928-937, 1999
 - 20) Mercher T, et al: Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t(1;22) translocation of acute megakaryocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 :5776-5779, 2001
 - 21) Inoue K, et al: Long-term follow-up of minimal residual disease in leukemia patients by monitoring WT1 (Wilms tumor gene) expression levels. *Blood*. 1996 88:2267-78,1996
 - 22) Inoue K, et al: WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood* 84:3071-9,1994
 - 23) Niegemann E, et al: wt1 gene expression in childhood leukemias. *Acta Haematol* 102:72-6,1999

1.3 乳児白血病

乳児白血病のうち、AMLについてはMRDについての日本の data、文献的 Evidence ともにほとんど存在しない。従って本稿では、乳児 ALL における MRD について述べる。

乳児 ALL についてもまとまった報告はない。Cimino 等は、成人を含む t(4;11)型 ALL25 例において、nested PCR 法による *MLL/AF4* mRNA の評価を行い、臨床的な予後との相関を報告した¹⁾が、このうち乳児 ALL は 3 例のみであり、臨床的意義は明らかではない。

ヨーロッパのグループと米国の数施設が参加して進行中の Interfant99 においては Ig/TCR の rearrange を target とした PCR 法による MRD 研究が行われているが、未だ Interfant99 本体が進行中であり、結果が得られるのは数年後である。既に終了した米国の CCG-1953 と POG-9407 研究では化学療法による治療成績の向上が得られており、MRD 研究も行われたが、その結果は現時点では得られていない。CCG と POG の合併した COG では、乳児 ALL に対する次期治療研究において MRD を移植適応の判定に利用する方針であるが、この根拠は乳児 ALL における evidence ではなく、年長児 ALL における evidence の援用である。

日本においては、乳児白血病共同研究会の治療研究において MRD の検討が行われた。MLL96 研究においては、RT-PCR 法を用いて *MLL* 遺伝子関連キメラ mRNA による MRD の定性的評価を行ったが、キメラ mRNA は化学療法のみでは陰性化せず、移植後に始めて陰性化する傾向が認められた²⁾。MLL98 研究においては、real-time PCR 法による *MLL/AF4*, *MLL/AF9* キメラ mRNA の定量的評価を行った³⁾。この結果、寛解確認時の MRD の data が得られた 9 例のうち、MRD が陰性化した 4 例中 3 例が無再発生存していたのに対し、MRD が陽性であった 5 例中 4 例が再発していた。また、移植直前の MRD の data が得られた 8 例のうち、MRD が陰性であった 7 例中 5 例が無再発生存、2 例が合併症死していたのに対し、MRD が陽性であった 1 例は移植後再発した。症例数が少なく明確な結論は得られていないが、寛解確認時の MRD が予後と関連する可能性が示唆された。

ただし、評価した t(4;11) ALL 12 例中 3 例で初診時の *MLL/AF4* キメラが陰性であったことは問題であった。これは検体の保存状況(保存検体で評価した)および real-time PCR の probe の問題と考えられた。また、検体の提出率もやや悪かった。MLL98 研究においては、合わせて *WT1* 遺伝子の発現の定量も行った。t(4;11) および t(9;11) ALL では 14 例中 13 例で *WT1* 遺伝子発現量の増加がみられていた。予後との相関はやはり症例数が少なく明らかではないが、キメラのタイプにかかわらず大部分の症例で評価可能なことから、MRD の候補となる可能性があると考えられた。現在進行中の MLL03 研究においても、real-time PCR 法によるキメラ mRNA (*MLL/AF4*, *MLL/AF6*, *MLL/AF9*, *MLL/ENL*) と *WT1* 遺伝子の定量を行い、予後との相関を評価する附随研究が開始された。MLL03 では評価するキメラ遺伝子の増加、probe の改良を図るとともに、エントリーした全例で新鮮検体での評価を行う方針である。

MLL 再構成陰性 ALL においては MRD に関する data はないが、日本における予後はきわめて良好 (EFS は MLL96 で 92%、MLL98 で 100%) であり、現時点では MRD の必要性はないと考えられる。

以上のように乳児 ALL においては MRD の臨床的意義は未だ明らかではない。現時点で MRD の結果を基に個別の患者の治療方針を決定することは時期尚早であると考えられる。今後、MRD と予後との相関が明らかになれば、移植を行わず化学療法のみを行う予後良好群の同定や、移植を行っても予後不良であり実験的治療の適応となる予後絶対不良群の同定が可能となることが期待される。

【文献】

- 1) Cimino G, et al. A prospective study of residual-disease monitoring of the ALL1/AF4 transcript in patients with t(4;11) acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 95:96-101, 2000.
- 2) Okamura T. personal communication.
- 3) 康勝好、平成 15 年度厚生労働省水谷班、堀部班合同班会議にて発表

1. 4 悪性リンパ腫、その他

1) 悪性リンパ腫

悪性リンパ腫における MRD 解析の報告は国際的にも少なく、まだその意義は定まっていない¹⁻³⁾。特に小児での同一プロトコールによる多数例を解析した報告はほとんどない。

悪性リンパ腫での MRD の検索は、ALL と同様に免疫グロブリン遺伝子および T 細胞受容体 (*TCR*) 遺伝子の再構成を用いた方法やキメラ遺伝子を用いた方法を利用することが可能である。B 細胞性非ホジキンリンパ腫 (B-NHL) では大部分に免疫グロブリン重鎖 (*IgH*) 遺伝子の再構成が検出され、さらに 75-80% に *TCR* 再構成も検出される。一方 T-NHL では一般的に *IgH* 再構成は検出されないが、*TCR* 再構成は 90% 以上で検出され、ALL と同様の MRD 解析が可能である。また Burkitt リンパ腫では t(8;14)(q24;q32) による *c-MYC* 遺伝子と *IgH* 遺伝子の再構成を long-distance PCR を用いて検出し、MRD に用いる試みがなされている⁴⁾。Mussolin らは 78 例の Burkitt リンパ腫を LD-PCR により検討し、52 例が PCR 陽性で、このうち腫瘍と骨髄の両方を解析できた 33 例のうち、骨髄で PCR 産物が検出できた 10 例で MRD を検討した⁵⁾。10 例中経過中 MRD が消失しなかった 2 例のみが死亡し、MRD を検出することの意義が示唆された。そのほかには未分化大細胞性リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma; ALCL) でみられる t(2;5) によって形成される *NPM-ALK* 融合遺伝子などが MRD 解析の対象になりうるが、これらを用いた MRD 解析の報告はない。

(1) 自家造血幹細胞移植における MRD の意義

成人では、自家移植(骨髄または末梢血幹細胞)における骨髄または末梢血幹細胞中の MRD の有無、および移植後の骨髄中の MRD の有無と予後の検討が行われており、MRD が移植後の予後予測因子として利用できる可能性が示唆されている⁶⁾。

2) 骨髄異形成症候群(MDS)

MDS ではリンパ系腫瘍で用いることができる免疫グロブリン遺伝子や T 細胞受容体遺伝子を MRD の指標として用いることができず、また、特異的なキメラ遺伝子の頻度も少ないため MRD 解析はあまり行われていない。これまでフローサイトメトリーを用いた解析と *WT1* を用いた少数での報告があるが、大規模な解析は行わ

れていない^{7,8)}。

【文献】

- 1)Bruggemann M, et al. Significance of minimal residual disease in lymphoid malignancies. *ActaHaematol* 112: 111-9, 2004
- 2)Sharp JG, et al. Detection and relevance of minimal disease in lymphomas. *Cancer Metastasis Rev* 18: 127-42, 1999
- 3)Galimberti S, et al. Clinical relevance of minimal residual disease monitoring in non-Hodgkin's lymphomas: a critical reappraisal of molecular strategies. *Leukemia* 13: 1691-5, 1999
- 4)Busch K, et al. Combined polymerase chain reaction methods to detect c-myc/IgH rearrangement in childhood Burkitt's lymphoma for minimal residual disease analysis. *Haematologica* 89: 818-25, 2004
- 5)Mussolin L, et al. Prospective analysis of minimal bone marrow infiltration in pediatric Burkitt's lymphomas by long-distance polymerase chain reaction for t(8;14)(q24;q32). *Leukemia* 17: 585-9, 2003
- 6)Oliva E, et al. The role of molecular monitoring in autotransplantation for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 29: 581-7, 2002
- 7)Ito S, et al. Flow cytometric analysis of aberrant antigen expression of blasts using CD45 blast gating for minimal residual disease in acute leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 25: 205-11, 2001
- 8)Cilloni D, et al. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol* 112: 79-84, 2004

2. MRD 定量の実際

2.1 PCRを用いた分子生物学的定量法

2.1.1 検体の採取、運搬、保存、調整について

遺伝子関連の検査では、対象が遺伝子 DNA か RNA かにより、検体の取り扱いが大きく異なる。RNA は唾液などに多く含まれる RNase などにより分解されやすく、RNase に対する酵素阻害剤も強力なものはない。従って、RNA を用いた検査を行う場合、検体の処理は迅速かつ、汗などが混入しないよう慎重に取り扱わなければならない。ヘパリンなどの抗凝固剤をシリンジに加えて採取した骨髄や末梢血は必要な検査に応じて、ただちに専用のチューブに分注する。採取後は4℃に保ち、mRNA の劣化予防に留意する。なお標準的な骨髄の採取法については、分子診断ワーキンググループから「分子診断のガイドライン」が発行される予定なのでそちらを参照されたい。

核酸抽出用の数々のキットや自動化された DNA 抽出装置もあるが、収量が多いのは赤血球を溶血させたあと buffy coat をグアニジンチオシアン酸(GIT)に溶解する方法で、小分けにして-80℃で凍結保存し、必要に応じて溶かして DNA、RNA を抽出して検査に用いることができる。

血液・骨髄細胞を GIT 溶液内へ保存

1. 検体に Lysis buffer*を加え、赤血球を溶砕させる。
2. 白血球層を遠沈し、GIT 液**を加え細胞を融解。
3. 2メルカプトエタノール添加後、小分けにし-80℃で保存。

GIT 保存液からの DNA 抽出

1. 凍結 GIT 保存液を溶解し、1 容のイソプロパノールを加える。
2. 析出した DNA を遠沈後乾燥させ、TEN に溶解する。
3. 1/10 容の 20%SDS、RNase(終濃度 20 μg/ml)を加え、55℃で 30 分間おく。
4. proteinaseK を加え(終濃度 100 μg/ml)、37℃で一晩解置する。
5. 2/5 容の 5M NaCl を加え遠沈する。
6. 上澄みに 1 容のイソプロパノールを加え DNA を析出させる。
7. DNA を遠沈後乾燥させ、TE に溶解する。