

名化保存期間が終了後、連結不可能匿名化処理を行い保存を継続する。連結不可能匿名化保存期間は 20 年間とする。

4. 生殖細胞系列の遺伝子解析研究

提供者の白血球等の組織を用いて、DNAまたはmRNAから作られた相補DNAの塩基配列等の構造または機能を解析するものであり、その主たるものとして、いわゆる生殖細胞系列変異又は多型を解析する研究がある。

子孫に受け継がれ得るゲノム又は遺伝子に関する情報を明らかにする目的で研究が実施される場合には、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象とする。

(ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針14(3))

5. 生殖細胞系列の遺伝子解析研究以外の研究

がん等の疾病において、病変部位にのみ後天的に出現し、次世代には受け継がれないゲノムまたは遺伝子の変異を対象とする研究(いわゆる体細胞変異を解析する研究をいい、変異の確認のために正常組織を解析する場合を含む)、遺伝子発現に関する研究及びたんぱく質の構造又は機能に関する研究。

(ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 14(3))

この場合でも、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する以下の基本方針に沿った研究が行われる必要がある。

- 1) 人間の尊厳の尊重
- 2) 事前の十分な説明と自由意志による同意
- 3) 個人情報の保護の徹底
- 4) 人類の知的基盤、健康及び福祉に貢献する社会的に有益な研究の実施
- 5) 個人の人権の保障の科学的又は社会的利益に対する優先
- 6) 本指針に基づく研究計画の作成及び遵守並びに独立の立場に立った倫理審査委員会による事前の審査及び研究の適正性の確保
- 7) 研究の実施状況の第三者による実地調査と研究結果の公表を通じた研究の透明性の確保

(ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針1)

日本小児白血病リンパ腫研究グループ研究審査委員会規約 ver. 3.4

制定 平成 16 年 10 月 30 日

改定 平成 17 年 1 月 10 日

改定 平成 17 年 12 月 2 日

(目的・設置)

第 1 条 日本小児白血病・リンパ腫研究グループ(Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group、以下 JPLSG)は、JPLSG 構成員が行い、かつ、患者に直接介入する事のない臨床及び基礎研究計画に対し、「医の倫理に関するヘルシンキ宣言」の趣旨に沿う倫理上の指針を与えるために、JPLSG 研究審査委員会(以下、研究審査委員会という)を置く。

(責務)

第 2 条 研究審査委員会は、JPLSG 運営委員長から依頼があった場合には、新たな検体採取を伴うプロトコール付随研究(治療に直接介入しない研究)、および保存された余剰腫瘍検体あるいは寛解期末梢血検体を利用した研究の審査を行う。

2. データ利用の研究は、原則として本研究審査委員会の審査対象外であり、治療研究委員会および運営委員会で審査する。

(審議の方針)

第 3 条 研究審査委員会は、第 1 条の趣旨に基づき、前条に掲げる事項に関して医学的、倫理的、社会的な面から調査、検討し審議する。審議に際しては、日本小児血液学会臨床研究審査委員会規約第 6 条に従い、以下の諸点に留意する。

- 1) 臨床研究の目的、計画および方法が妥当なものであること
- 2) 臨床研究の実施施設基準が決められていること
- 3) 臨床研究の研究代表者が決められていること
- 4) 個人の人権が擁護されていること
- 5) 個人またはその代諾者の理解を求め、同意を取得するに際しての方法、同意文書および説明文書の内容が適切であること

(組織)

第 4 条 研究審査委員会は、次の各号に掲げる委員をもって組織する。

- (1) CCLSG、JACLS、TCCSG、KYCCSG から各 1 名
- (2) その他、人文・社会科学の有識者、一般の立場を代表する者、JPLSG 外部委員の条件を

満たす者等の外部委員 2 名

(3) 研究審査委員会委員長 1 名

2. 委員長は運営委員会委員の中から選任される。また、委員は運営委員会において推薦され、かつ承認を得て選出される。
3. 委員は男女両性からなる構成とする。
4. 治療研究委員会委員長は、研究審査委員会委員長および委員を兼任しない。

(任期)

第 5 条 委員および委員長の任期は 2 年とする。

2. 委員に欠員が出来たときは、その都度補充する。補充による委員の任期は前任者の残任期間とする。
3. 委員長 1 回のみ再任可とするが、他の委員の再任は回数を問わず妨げない。

(会議)

第 6 条 研究審査委員会は随時開催され、その審議は原則として電子メールによって行う。

必ず返信メールにて、申請書類受理の確認を行う。

2. 審査を行う場合は、外部委員 2 名を含む 7 名全員の参加を原則とする。
3. 審査対象となる臨床研究に携わる委員は、当該臨床研究に関する審議または採決に参加してはならない。
4. 研究に関わる検体分譲の優先順位に関しては、相対的な評価を付記し、運営委員会に提出する。

(審査の申請)

第 7 条 JPLSG 構成員が、白血病・悪性リンパ腫臨床試験の遂行に密接に関連した検体採取を伴う付随研究、および JPLSG により保存された余剰検体を用いた研究を行う時は、JPLSG 運営委員長(以下運営委員長という)に申請し、運営委員長の諮問を受けた研究審査委員会の審議を経て、運営委員会の承認を得なければならない。

(審査結果)

第 8 条 研究審査委員会委員長は、審査の結果を運営委員会に報告する。

2. 運営委員長は、研究審査委員会の答申を参考にし、運営委員会の議事を経た後に、研究計画の可否を判定し、申請者に文書にて連絡する。
3. 研究計画が承認された課題については、JPLSG ホームページ上に公開する。

(秘密の保持)

第9条 研究審査委員は、その職務に基づき知り得た秘密、特に個人のプライバシーに関する事項について秘密を守らなければならない。

(庶務)

第10条 研究審査委員会の庶務は、研究審査委員会事務局が行う。ただし、この業務はJPLSG事務局が代行するものとする。

(規約の改正等)

第11条 この規約は、JPLSG運営委員会の審議を経て、改正することができる。

(雑則)

第12条 この規約の定めるもののほか、研究審査委員会の運営等に関し必要な事項は、研究審査委員会が別に定める。

付則

この規約は、平成16年10月30日から施行する。

(趣旨)

第1条 この細則は、日本小児白血病リンパ腫研究グループ(Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group、以下 JPLSG)研究審査委員会規約(以下規約という)第 12 条の規定に基づき、JPLSG 研究審査委員会(以下、研究審査委員会という)の運営等に関し必要な事項を定めるものとする。

(申請)

第2条 規約第 7 条の規定に基づき研究審査委員会に審査を求める場合には、研究等(規約第1条に定める研究をいう。)の研究代表者(以下、「申請者」という)は、研究審査申請書を JPLSG 運営委員長(以下、運営委員長という)に提出しなければならない。

2. 申請課題については、あらかじめその課題が提出されるJPLSG治療研究委員会で十分審議が行われ、課題の重要性、検体の有効利用等の観点から1あるいは2課題程度に整理されたものであること。

3. 運営委員長は、運営委員会に諮った後、審査委員会に審査を依頼する。

4. 申請書および資料については、原則として電子媒体を介して添付できる種類のものに限る。

5. 検体採取を伴うプロトコールに附随した研究、あるいは保存検体利用を計画する研究の申請者は、自身の所属する研究機関の倫理委員会に先立ち、本研究審査委員会に研究計画書を提出し、承認を得ていなければならない。

(審査)

第3条 審査委員会は運営委員長から諮問のあった研究申請書は随時受け付ける。審査期間は 3 ヶ月を目安とし、運営委員長への審査結果報告書の提出は、運営委員会の開催の 1 週間前までに行う。

2. 同一の治療研究委員会からの申請については、原則として1年以上の間隔を置く。

3. 研究審査委員会は、必要に応じ申請者または共同研究者の意見を求め、申請の内容の説明を聴取することができる。

4. 審査の判定は、審議に参加した委員全員合意によるものとする。

(判定)

第 4 条 判定は、次の表示による

「承認」

「修正の上、再審議」

「却下」

2. 審査委員会は、いったん承認した事項を、理由を附記した上で取り消すことができる。

3. 余剰腫瘍検体は有限であり、観察期間が長期に亙るほど患者の基礎情報が添付さ

れた検体となり、その重要性は増す。JPLSG では、公平性・公益性の観点から構成員の合意のもとに、在庫管理、保存検体の公開、検体の分譲形態(細胞、蛋白、DNA、RNA など)、分譲後の検体の取り扱い等を含んだ分譲に関する規約を別に定める。

4. 余剰検体分譲に関する優先順位は、規約第3条を満たした申請について、科学的水準4項目20点及び倫理水準について評価し、別紙1により運営委員会に報告する。分譲の有無は、それら評価を参考にし、運営委員会の審議を経て決定される。

5. 科学的水準20点は以下の内容による。

- (1) 科学性 5点
- (2) 予備的研究データの有無 5点
- (3) 独創性 5点
- (4) 研究の有益性・公益性 5点

6. 附随研究の審査についても、第4条4項、5項と同様の基準により評価を行う。

(結果の通知)

第5条 審査結果の通知は、所定の様式により、申請後3カ月を目安に申請者に交付する。

(異議の申立て)

第6条 研究審査委員会の判定結果に対して異議のある場合には、申請者は、異議申立書を作成し運営委員会に提出し、再審査を1回に限り申請することが出来る。この場合においては、異議申立書に、異議の根拠となる資料を添付しなければならない。

2. 異議の申し立てが運営委員会で受理され、運営委員会から再審査が指示されたときは、研究審査委員会は速やかに再審査を行い、その結果は運営委員長を介して申請者に通知する。

(研究結果報告の義務)

第7条 保存された余剰検体を使用して行われた研究は、その研究結果について運営委員会に報告し、承認を受けた後に、学会、学術雑誌、JPLSG ホームページ上等に公開する。ホームページに公開する場合、研究者の属する部門のホームページにリンクする形でも良い。

(細則の改正等)

第8条 本細則は、研究審査委員会の議決、及び運営委員会の承認により改正することが出来る。

付則

この細則は、平成17年12月2日から実施する。

日本小児白血病リンパ腫研究グループ登録患者における生殖細胞系列遺伝子解析用検体の収集・保存と分譲に関する規約(案) ver.2.1

平成 19年 4月 8日

(目的)

第1条 日本小児白血病リンパ腫研究グループ(Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group、以下 JPLSG)は、小児白血病・リンパ腫患者の薬理遺伝学的解析、ゲノムワイドな生殖細胞系列の遺伝子解析研究(注1)を行い、その病態解明、治療法の向上、および晩期障害予防のための研究推進に資することを目的として、検体を保存する。

2. 患者および家族の人権を守りつつ、わが国の小児白血病・リンパ腫研究を展開するために、「日本小児白血病リンパ腫研究グループ登録患者における生殖細胞系列遺伝子解析用検体の収集・保存と分譲に関する規約」を作成する。

注 1:「言葉の定義」を参照。

(検体)

第 2 条 生殖細胞系列の遺伝子解析研究用検体(以下、検体という)とは、末梢血、骨髓血、口腔粘膜、腫瘍組織、白血病細胞、リンパ芽球様細胞株、線維芽細胞を指す。

(対象症例)

第 3 条 JPLSG の研究対象となっている疾患を有し、JPLSG に登録され、かつ生殖細胞系列の遺伝子解析研究に対する同意が得られた患者を対象とする。

(解析候補遺伝子)

第 4 条 解析候補となるヒト遺伝子やその多型は数も膨大で、かつ内外の研究の進展に伴って今後次々に追加されていくと思われ、現時点で全てを特定することは困難である。研究期間の更新にあたり、新たに判明した解析候補遺伝子は、研究計画書に追加する。

(検体採取施設)

第 5 条 規約に則って検体を提供する医療機関は、JPLSG 施設および個人会員(以下、JPLSG 会員)でなければならない。

2. JPLSG 会員は、検体の研究等を目的とした採取と保存に先立って、採取施設の長の承認を受ける必要がある。

(検体保存施設)

第6条 JPLSGは、検体保存を国立成育医療センター研究所に委託する(以下、保存施設)。保存施設は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い業務を遂行する。

<委託業務の内容に関する細則>

- ・検体の収集・保存
- ・保存施設運用規定(別に定める)
- ・研究者から請求された検体の分譲
 - ・ JPLSG データセンター(以下、データセンター)と研究者を仲介し、研究計画書に記載された患者診療情報を研究者に提供

2. 保存施設は、検体を適正な品質管理の下に保存するが、採取や運搬に伴う質の低下、不慮の災害や事故による検体の損失については、その責任を問われない。

(個人情報の保護)

第7条 研究計画書に定められた研究期間は、疾患名、治療内容、治療反応性、予後、晩期障害、二次がん発生の有無など、長期に渡る患者の診療情報を必要としており、検体は患者の個人情報が外部に漏れないように連結可能匿名化処理を行い、患者あるいはプロトコール研究に有益な情報をもたらす研究に限定して使用する。

2. 氏名、生年月日、カルテ番号その他特定の個人を識別できる患者個人情報と登録コード対照表は、患者主治医が属する参加施設が保管する。
3. 検体保存番号は、保存施設にて管理する。
4. 採取施設、保存施設には、個人情報管理者を置く。

(患者の権利の保護)

第8条 検体保存に当たっては、患者に十分な説明を行い、同意を取得する。

2. 患者は、いつでも不利益を受けることなく同意を撤回できる。
3. 患者からの問い合わせ、苦情には、迅速かつ適格に対応しなければならない。
4. 参加施設の長は、必要に応じて適切な遺伝カウンセリング体制の整備又は適切な施設の紹介等により、提供者及び家族、又は血縁者が遺伝カウンセリングを受けられる様配慮する。
5. 連結可能匿名化検体を使用した検査および研究結果の患者に対する開示、非開示の判断は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準じて運営委員会が行う。

(検体の保存に関する書面による説明と同意)

第9条 主治医は、原則として患者が寛解状態に入った時点で、検体の採取、保存施設への搬送、

保存と研究用使用に関する説明を行い、書面による同意を得る。

2. 治療開始後1ヶ月から2ヶ月の時点で寛解に入らない場合は、その時点の検体を、腫瘍細胞の混入率を明記した上で、患者の年齢に応じたアセントと代諾者の同意を取得後、保存する。

3. 患者による同意撤回は、いつでも可能である。同意撤回の意思は書面にて確認し、同意が撤回された検体は、速やかに廃棄する。

<説明文書の記載に関する細則>

患者あるいは代諾者に対する書面による説明には、以下のことが含まれていること。

- ・提供の依頼を受けた患者は、提供に同意しないことにより不利益を受けないこと。
- ・患者または代諾者等は、自らが与えた同意について、いつでも不利益を受けることなく文書により撤回出来ること。
- ・患者または代諾者等は、同意文書の撤回があった場合には、原則として、当該提供者に係わる検体および研究結果を匿名化して廃棄し、その旨を患者または代諾者に文書により通知しなければならないこと。
- ・検体の提供は無償であること。
- ・一度提供された検体は患者には返却されないこと。
- ・研究により得られた知的財産権の帰属のこと。
- ・遺伝カウンセリングのこと。

2. 同意書の内容は、その目的により「ヘルシンキ宣言」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」「個人情報保護に関する法律」等、国が定める指針に則ったものでなければならない。

(アセントあるいは書面による同意の適応年齢)

第10条 対象とする患者は未成年者であるため、それぞれの理解力に応じた説明を行い、患者自身のアセントを取得するように努めなければならない。

2. 12歳以上20歳未満の患者は代諾者からの書面による同意に加え、原則として患者自身の書面によるアセントを取得するよう努める。

3. 患者が7歳以上12歳未満の場合には、代諾者からの書面による同意に加え、原則として患者自身の口頭によるアセントを取得するよう努める。

4. 連結可能匿名化が行われている研究期間内に患者が20歳に達した場合には、可能な限り改めて本人の同意を得る。

(保存検体の情報)

第11条 保存された検体の疾患名、保存年、種類、量、可能な供給形態(細胞あるいはDNA)な

どの情報は、JPLSG 会員に公開される。

2. 保存検体の情報公開を、定期的に行う。
3. データセンター・保存施設は、研究計画書に記載された診療情報以外の情報を、研究者に提供してはならない。

(検体の収集・保存期間の更新)

第11条 JPLSG は、新たに判明した解析候補遺伝子等を付け加え、定期的に研究計画を更新する。

2. 検体採取施設は、定期的に検体採取・保存期間の延長に関する施設長の承認を得る。
3. 検体保存施設は、定期的に検体採取・保存期間の延長に関する施設長の承認を得る。

(費用の負担)

第12条 当研究計画における患者の費用の患者負担はない。

2. 検体の採取・搬送・保存に関する費用は、JPLSG と保存施設が協議の上負担割合を決定し、支払うものとする。

(検体分譲の手順)

第13条 検体は、小児白血病・リンパ腫の病態解明、治療法の向上、および晩期障害の予防のための研究に限定して分譲される。

2. 検体利用を計画する研究の申請者は、運営委員会に研究計画書を提出し、承認を得なければならない。
3. 検体は無償で研究者に分譲される。検体の分譲に関し発生する搬送料、DNA 抽出に関わる費用等は、全てを研究者が負担する。

(検体の分譲を受ける資格)

第14条 検体の分譲依頼を行うものは、JPLSG 会員でなければならない。

2. 研究計画は、研究者の所属する機関の倫理審査を受け、施設長の承認を受けているものでなければならない。

(結果の取り扱い)

第15条 連結可能匿名化検体を使用した検査および研究結果の開示、非開示の判断は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準じておこなう。

2. 研究者は、研究成果を運営委員会に報告しなければならない。

3. 研究成果を論文や学会で発表する場合は、事前に運営委員会にて審査を受けなければならない。共著者の基準については別に定める。
4. 運営委員会は、研究結果の知的財産権が問題となる場合、公開に先立ち、的確かつ公正にその帰属を判断しなければならない。
5. 研究成果の公開に当たっては、JPLSGの研究であることを明記する。
6. 発表担当者は、既に公表された研究成果、治療成績については、問い合わせに応じる義務がある。

(内規の改正等)

第17条 本規約は、JPLSG 運営委員会の審議を経て、改正することができる。

附則

この規約は、平成19年 月 日から実施する。

「言葉の定義」

生殖細胞系列の遺伝子解析研究とは、子孫に受け継がれる生殖細胞系列変異、遺伝子多型などのヒトゲノム・遺伝子解析研究を指す。

日本小児白血病リンパ腫研究グループ病理委員会規約

日本小児白血病リンパ腫研究グループ規約第2章第1条に規定する日本小児白血病リンパ腫研究グループ病理委員会（以下、病理委員会）の規約を次の通り定める。

（目的）

第1条 病理委員会は、日本小児白血病リンパ腫研究グループ（以下、JPLSG）が行う事業のうち、診断委員会のひとつとして活動し、主として病理診断に係る役割を担うことを目的として設置する。

（役割）

第2条 病理委員会は、JPLSGが行う事業のうち次に掲げる事項について検討する。

- （1）悪性リンパ腫等の中央診断に係る事項
- （2）悪性リンパ腫等の診断の標準化に係る事項
- （3）悪性リンパ腫等の研究に係る事項
- （4）その他、JPLSGが行う事業の推進に必要な事項

（委員会の構成）

第3条 病理委員は以下の要件をすべて満たすJPLSG会員の中からJPLSG運営委員長が推薦し、運営委員会の承認を経るものとする。

- （1）社団法人・日本病理学会が定める認定病理医であること。
- （2）悪性リンパ腫等の診断あるいは研究を専門としていること。
- 2 病理委員の数は10名以内とする。
- 3 病理委員の任期は2年とし、再任は妨げない。
- 4 委員長は病理委員の中から互選により選出する。委員長の任期は2年で、再任は妨げない。
- 5 委員の定年は満65歳の3月末とする。

（事務局の設置）

第4条 病理委員会の事務局は国立成育医療センター研究所内に設置する。

（委員会の開催）

第5条 病理委員会は年1回以上開催する。

- 2 委員長は必要の都度あるいは病理委員の求めに応じ、病理委員会を開催することができる。
- 3 委員長は、必要があると認めたときは、委員以外の専門家を出席させることができる。

（病理判定会）

第6条 病理委員会は、中央病理診断での最終診断を下すため病理判定会を開催する。

- 2 病理判定会の進行は委員長が行い、判定は病理委員全員があたることを原則とする。
- 3 病理判定会は年1回以上開催する。
- 4 病理判定会には委員以外の者も参加可能とする。JPLSG会員には事前に開催要領を通知し、委員

長の許可を得て傍聴できるものとする。

5 病理判定の手順は、病理標本の同時観察による意見交換と合意形成、あるいは病理標本の持ち回り閲覧と診断名収集とし、最終診断は合意に基づいて病理委員長がコンセンサス診断として決める。

6 診断基準については別途定める。

(小委員会等)

第7条 委員長は、必要に応じ、小委員会を置くことができる。

(細則)

第8条 病理委員会の運営に必要な規則等は別途定めることができる。

附則

1 この規約は、平成18年6月17日から施行する。

「小児造血器腫瘍の診断の手引き」
改訂版

IV. 免疫学的診断の実際

はじめに

小児造血器腫瘍の標準的な治療方法の確立にあたっては、精度の高い標準的な診断法により、正確な診断を得ることができて初めて最も効果的な治療法を選択することができる。腫瘍細胞の細胞表面抗原の解析(マーカー検査)による免疫学的診断は、細胞形態学的診断、染色体あるいは遺伝子解析診断とともに、造血器腫瘍の臨床診断には必須のものとなっている。また、細胞表面抗原の解析により、腫瘍細胞の起源や分化段階を推定することや、細胞形態からだけでは幼若な正常細胞との区別が困難な腫瘍細胞を正確に同定することが可能となり、さらには、治療法の選択、予後の判定にも有用と考えられる。

1. 検査材料(末梢血、骨髓血、CSF、リンパ節等)の採取方法、および送付方法

1.1 検体取り扱いの注意

いかなる検体も既知および未知の病原体を含む可能性が常に存在するため、手袋を着用するなど、その取り扱いには十分な注意が必要である。また、検体の取り違えを避けるため、検体に適切なIDを明記することが重要である。

1.2 検体の種類と量

白血病のマーカー検査に用いる検体としては、骨髓液が最も一般的である。しかし、末梢血も、芽球が確実に含まれていることがわかっている場合には、十分に検査可能である。特に、白血球数が多くて芽球の割合が非常に高い末梢血の場合、検体が凝固する危険性を考えると、むしろ骨髓液よりも好ましい検体と言える。CSF中に著しい芽球の増多を認める場合には、CSFを検査に用いることも可能である。また、悪性リンパ腫の症例では、リンパ節からマーカー検査用に細胞を分離することも可能であり、場合によっては腫瘍細胞を多く含む胸水、腹水も検査の対象となり得る。

小児の場合には、いずれの検体でも多量に採取することが困難な場合が多いが、マーカー検査には他の検査よりも大量の細胞が必要となるため、極力多くの検体をマーカー検査に回すことが望ましい。ただし骨髓液の場合には、多量に吸引するとより多くの末梢血が混入する危険性があるため、その点に配慮が必要である。

1.3 抗凝固剤と検体の採取方法

抗凝固剤としては、多少検体安定性が異なるものの、日常的に用いられているEDTA、ヘパリンが使用可能である。末梢血の場合には、ヘパリン採血の他、採血後に抗凝固剤入りの容器に移すことも可能である。骨髓液の場合、末梢血よりも凝固しやすいため、あらかじめヘパリンを入れた注射器で採取するか、採取後すみやかにヘパリン加培養液を入れた容器に移すことが推奨される。特に骨髓液の場合には、採取時には凝固していないように見えても、輸送の過程でフィブリンが析出してきて凝固してしまい、検査が困難になる場合が多く、採取後ただちに、十分に、かつていねいに、抗凝固剤と混和することが非常に重要である。髄液、胸水、腹水の場合にも、ヘパリン等の抗凝固剤を添加することが推奨される。

リンパ節の場合には、輸送中の乾燥を避ける必要がある。検体をOCTブロックや、パラフィン標本と共有する場合で、短時間の内に処理可能な場合には、生理食塩水で湿らせたガーゼにくるんだ状態で輸送することが望ましいが、翌日に処理する場合には、培養液(なければ生理食塩水)で十分満たした容器に入れて冷蔵で輸送する方が安全と考えられる。

1.4 検体の送付

採取した検体は、可及的すみやかに検査することが推奨される。しかし、本邦における現状では、採取翌日に検査される場合が多いと考えられるが、可能かぎり24時間以内に検査されることが望ましい。末梢血、あるいは骨髄血に関しては、腫瘍細胞の生存率の観点から室温(18-22℃)での搬送の方が良いというデータも示されており、夏期を除いては常温での輸送で差し支えないと考えられる。しかし、夏期の場合には、輸送中の過度の温度上昇の可能性や、万一微生物が混入した場合のその繁殖の可能性を考慮して、クール便を使用し、冷蔵での搬送が望ましい。

2. 解析パネルの紹介と解説(図1)

2.1 Primary panel

2.1.1 B細胞系

CD19: B細胞に特異的な刺激伝達分子で、ほとんどの B-precursor ALL および mature B-ALL にその発現が見られ。時に B-precursor ALL で発現の弱い症例がある。B細胞系に特異性が高い抗原であるが、一部の AML も陽性を示す。

CD79a: B細胞抗原受容体関連の刺激伝達分子で、ほとんどの B細胞性腫瘍で陽性を示し。B-precursor ALL では基本的に細胞質のみに発現する。T-ALL や AML でも陽性例の報告がある。

κ/λ : 免疫グロブリンの軽鎖で、mature B-ALL にのみ陽性を示す。ただし、非成熟 B細胞に対する血清中免疫グロブリンの吸着による非特異的反応に注意が必要である。

2.1.2 T細胞系

CD3: T細胞抗原受容体関連の刺激伝達分子で、T-ALL の最も信頼性の高いマーカーであるが、小児 T-ALL では細胞質内のみの発現が多い。

CD7: 免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、T-ALL で最も高頻度に陽性となる。M7を含む一部の AML や NK細胞性腫瘍でも陽性を示す。

2.1.3 骨髄系

MPO(ミエロペルオキシダーゼ): AML M1, 2, 3, 4 で陽性を示す。使用する抗体によっては非特異反応が強く、染色条件の至適化が必要である。

CD13: 膜結合型酵素(アミノペプチダーゼ N)で、多くの AML で陽性を示すが、しばしば ALL にも発現が認められる。

CD33: 免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、大部分の AML で陽性を示す。しばしば ALL にも発現が認められる。

CD41: 血小板膜糖蛋白 IIb(α IIb インテグリン)で、AML M7 の特異的なマーカーである。

2.1.4 Non-lineage

CD10: 膜結合型酵素(中性エンドペプチダーゼ)で、Common-ALL 抗原として同定され、大部分の B-precursor ALL で陽性を示す。大部分の mature B-ALL(L3)、一部の T-ALL でも陽性で、成熟好中球や一部の神経芽細胞腫にも発現が見られる。

CD34: ムチン様の膜蛋白で、ヒト造血幹細胞の最も重要な細胞表面マーカーである。AML、B-precursor ALL、T-ALL のそれぞれ一部で陽性を示す。

CD45: 白血球に特異的な蛋白質チロシン脱リン酸化酵素で、B-precursor ALL 等では陰性-弱陽性の場合が多く、白血病細胞のゲーティングに用いられる。

CD56: 神経細胞接着分子(N-CAM)で、最も代表的な NK細胞マーカーとして有用である。神経芽細胞腫も陽性を示す。

HLA-DR: MHC Class II 分子で、B 細胞、単球、活性化 T 細胞に発現する。ほとんどの B 細胞系 ALL、多くの AML、一部の T-ALL において陽性を示す。ごくまれにはあるが、B-precursor ALL でも HLA-DR 陰性の場合がある。

TdT: 遺伝子断片に核酸を付加する酵素で、遺伝子再構成が進行中の未熟リンパ球に発現するため、T-ALL、B-precursor ALL の特異的なマーカーとして有用である。ただし、水溶性が強く、染色には注意が必要となる。また、AML でも陽性となる場合がある。

2. 2 Secondary panel

2. 2. 1 B 細胞系

CD20: B 細胞特異的なカルシウムイオンチャンネル分子で、CD19 に比較してやや成熟した段階から発現する。大部分の mature B-ALL で強陽性。一部の B-precursor ALL でも陽性を示す。抗 CD20 抗体は B リンパ腫の治療薬として臨床応用されている。

CD22: B 細胞特異的な免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、B 細胞性腫瘍で陽性。細胞質により強く発現する。

μ : 免疫グロブリン重鎖で、大部分の mature B-ALL で細胞表面に発現する(基本的に軽鎖も同時に発現する)。B-precursor ALL でも Pre-B タイプでは陽性(軽鎖は陰性)を示すが、ほとんどは細胞質内に限定した発現であり、ごくまれに細胞表面にも発現する場合もある。

2. 2. 2 T 細胞系

CD2: T 細胞特異的な免疫グロブリンスーパーファミリー分子(LFA-2)で、多くの T-ALL に陽性を示す。

CD4: MHC Class II 認識にかかわる免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、T 細胞と単球に発現。T-ALL の一部に陽性。AML M4,5の一部でも陽性を示す。CD4、CD8 両者陽性細胞は、正常の場合胸腺以外ではほとんど存在しないため、CD4、CD8 両者陽性所見は、腫瘍性を示す根拠となり得る。

CD5: 膜蛋白で、多くの T-ALL に陽性で、一部の成人型 B 細胞性腫瘍でも発現を認める。

CD8: MHC Class I 認識にかかわる免疫グロブリンスーパーファミリー分子で、正常 T 細胞と NK 細胞に発現し、T-ALL の一部に陽性を示す。

2. 2. 3 骨髄系

CD14: 単球、顆粒球に発現する膜蛋白(GPI 結合型)で、単球系への分化傾向を示す。AML で陽性を示す。

CD65: 顆粒球に発現するガングリオシドで、一部の AML で陽性を示す。B-precursor ALL でもまれに発現が認められる。

CD117: SCF 受容体で、一部の AML で発現する。ALL でも時に弱陽性を示す。

CD235a (Glycophorin A): 赤血球、赤芽球特異的なシアロ糖タンパクで、AML M6 の有用なマーカーである。

CD15: Lewis X 糖鎖抗原決定基で、血球では顆粒球に発現し、分化傾向を示す AML で陽性を示す。ホジキン病の RS 細胞にも陽性である。

CD36: 単球、赤芽球、巨核球・血小板に発現する細胞膜蛋白で、AML のうち M4, M5, M6, M7 で陽性を示す。

CD42b: 血小板膜糖蛋白 Ib α (von Willebrand 因子受容体構成分子)で、巨核芽球性白血病の特異的なマーカーである。巨核球においては、CD41、CD61 に比較してより成熟した段階で発現する。

CD61: 血小板膜糖蛋白 IIIa (β III インテグリン)で、CD41 と同様に AML M7 の特異的なマーカーである。

CD64:高親和性 IgG-Fc 受容体で、単球系への分化傾向を示す AML でしばしば陽性を示す。

2. 3 追加パネル

2. 3. 1 B 細胞系

CD24:刺激伝達分子(GPI結合蛋白)で、ほとんどの B-precursor ALL、一部の mature B-ALL で陽性を示す。正常成熟顆粒球や、非血液腫瘍でも発現する。

CD58:細胞膜蛋白 LFA-3 で、白血球に広範に陽性となり、発現の特異性としては低い、B-precursor ALL でより強く発現することから、正常の B 前駆細胞との鑑別に有用である。

2. 3. 2 T 細胞系

CD1a:胸腺皮質の T 細胞に特異的な膜糖蛋白で、胸腺以外で陽性の場合には T-ALL 診断の根拠になり得る。ランゲルハンス細胞にも発現し、ランゲルハンス細胞組織球症の最も信頼性の高いマーカーである。

TCR α/β :T 細胞抗原受容体で、T-ALL に特異的である。

TCR γ/δ :T 細胞抗原受容体で、T-ALL に特異的である。

3. FCM データの解析方法

3. 1 FCM 測定で得られる情報

フローサイトメトリー (FCM) は、フローセル中を高速で流れる血液細胞などの細胞浮遊液にレーザー光などの励起光を照射し、細胞が通過する際に生じる励起光の散乱 (散乱光; Scatter) や蛍光

図1. 急性白血病の免疫学的診断に有用なマーカー解析パネル

| Primary panel | | | |
|------------------|---------|------|-------------|
| B細胞系 | T細胞系 | 骨髄系 | non-lineage |
| CD19 | 細胞表面CD3 | MPO | CD10 |
| CD79a | 細胞質内CD3 | CD13 | CD34 |
| κ/λ | CD7 | CD33 | CD45 |
| | | CD41 | CD56 |
| | | | HLA-DR |
| | | | TdT |
| (16種類) | | | |

| Secondary panel | | | |
|-----------------|------|---------------|-------|
| B細胞系 | T細胞系 | 骨髄系 | |
| CD20 | CD2 | CD14 | CD15 |
| CD22 | CD4 | CD65 | CD36 |
| 細胞表面IgM | CD5 | CD117 | CD42b |
| 細胞質内 μ 鎖 | CD8 | Glycophorin A | CD61 |
| | | | CD64 |
| (17種類) | | | |

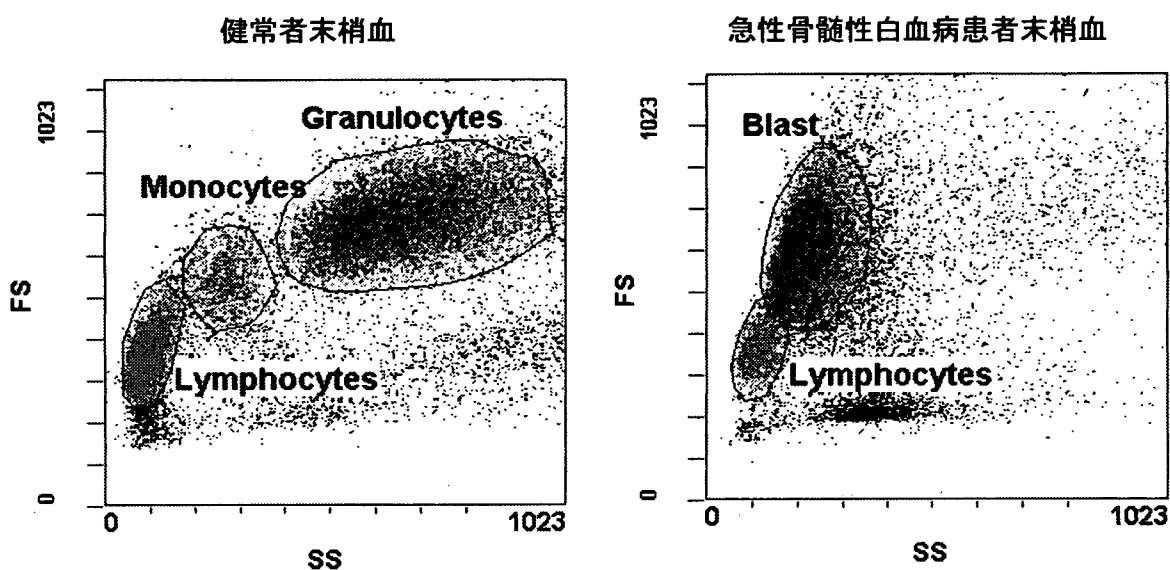
| 追加パネル | |
|-------|---------------------|
| B細胞系 | T細胞系 |
| CD24 | CD1a |
| CD58 | TCR α/β |
| | TCR γ/δ |
| (5種類) | |

(Fluorescence; FL)を細胞毎に検出して、その強さを解析する。

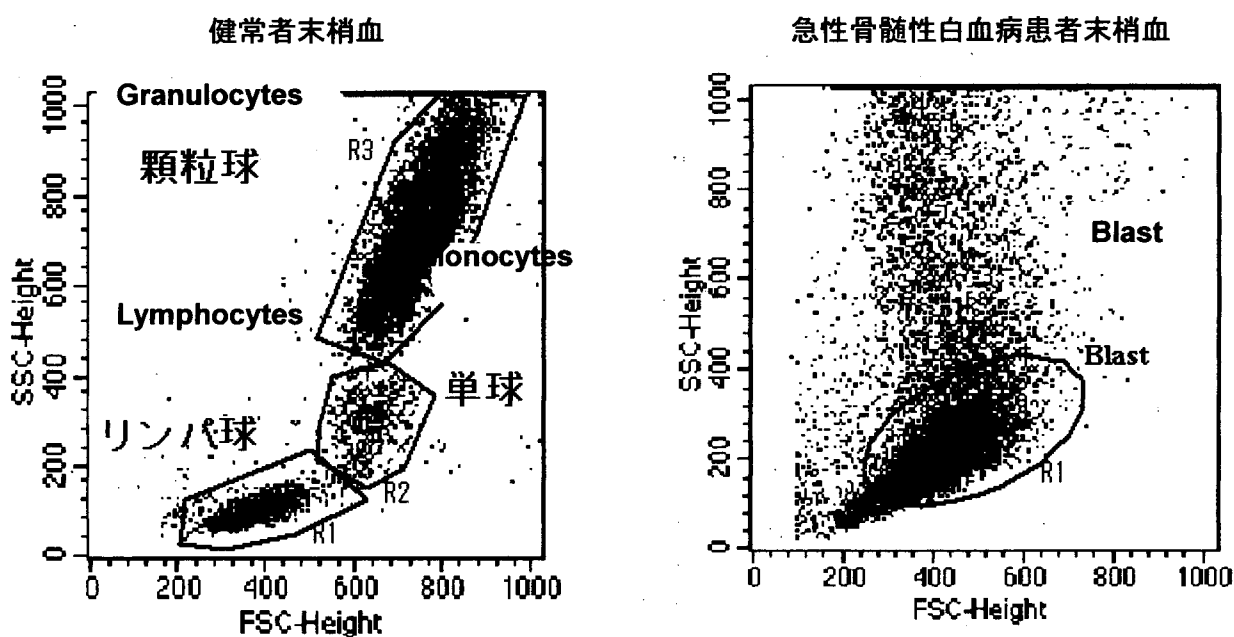
散乱光は、散乱する方向によって異なる情報を含んでいる。励起光の進行方向に生じる前方散乱(Forward Scatter; FS または FSC)は、細胞の大きさと相関性が強い。一方、励起光の進行方向と直角方向に生じる側方散乱(Side Scatter; SS または SSC)は、主に顆粒などの細胞内成分によって生じるため、細胞の“内部構造”の指標とされる。したがって、末梢血の白血球をFCMで測定すると、前方散乱と側方散乱のドットプロット(散乱光サイトグラム)上で、リンパ球、単球、顆粒球の3分画に分別できる。プロットの表示の仕方は測定機種の違いや測定施設の考えで異なるが、目的や得られる情報は同じである(図2a, b)。

図2. 散乱光サイトグラム

a. 測定例1(縦軸=前方散乱, 横軸=側方散乱)



b. 測定例2(縦軸=側方散乱, 横軸=前方散乱)

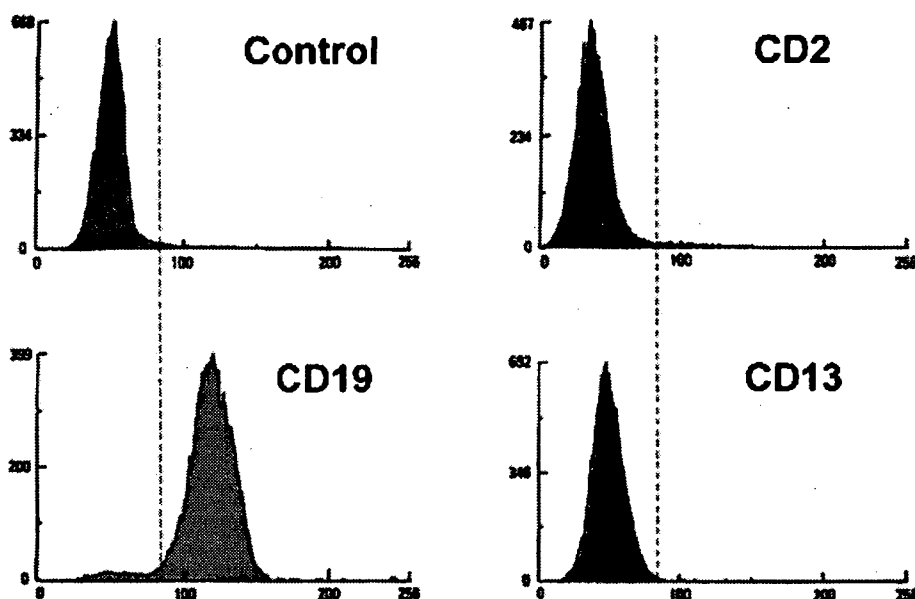


細胞を適当な蛍光標識抗体で免疫染色しておくことで、細胞の発する蛍光の強さから細胞表面抗原や細胞内抗原の発現の有無を測定できる。蛍光強度は、蛍光強度チャンネルを横軸にした蛍光ヒストグラム(図3a)で表示される。蛍光強度チャンネルは、細胞に結合したモノクローナル抗体の量、すなわち抗原の発現量の指標で、蛍光陰性の細胞はヒストグラムの左側に、蛍光陽性の細胞はヒストグラムの右側に、それぞれプロットされる。右にプロットされるほど抗原の発現が強い細胞であることを意味している。

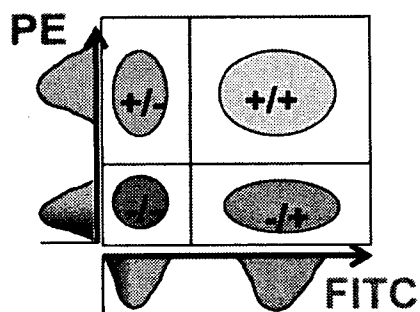
図3. 蛍光ヒストグラムと蛍光ドットプロットの例

a. 蛍光ヒストグラムの例

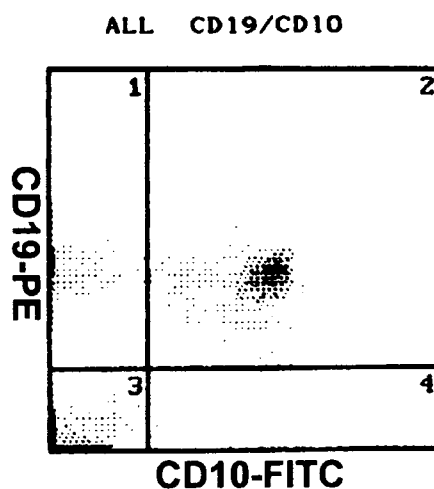
急性リンパ性白血病測定例



b. 蛍光ドットプロットの例



急性リンパ性白血病検体測定例



健常者末梢血リンパ球測定例

