

蛍光波長の異なる複数の蛍光標識抗体を用いた多重染色試料の測定では、2種類の蛍光を組み合わせた蛍光ドットプロット(図3b)で結果を表示することができる。例えば、FITC 標識抗体とPE 標識抗体の2カラー蛍光ドットプロットでは、FITC のみ陽性、PE のみ陽性、FITC とPE の両方陽性、FITC とPE の両方陰性、の4種類の細胞集団が得られる。この場合は、それぞれ右側もしくは上側にプロットされるほど抗原の発現が強く、ドットの密度や等高線で分布のピークを表現している。3種類以上の蛍光標識抗体による白血病細胞のマルチカラー測定も、分析機器や試薬の進歩に伴い急速に発展している。

3.2 測定対象となる細胞の絞込み(散乱光ゲーティング)

白血病細胞の測定を行うには、散乱光サイトグラム上で白血病細胞と他の細胞集団を識別して、白血病細胞に限定した蛍光の分析を行わねばならない。この操作が“ゲーティング”であり、FCM で正しい測定結果を得るにあたって最も重要な手順の一つである(図4)。

散乱光サイトグラム上の白血病細胞の分布が患者検体毎に異なるため、ゲーティングも患者検体毎に行う必要がある。実際には、白血病細胞の分布と正常リンパ球や単球の分布は重なることが多く、白血球中に占める白血病細胞の割合が少ない検体では白血病細胞のみのゲーティングは難しい。特に、散乱光サイトグラム上で白血病細胞の分布が不明瞭な場合は、白血球集団全体をゲーティングせざるを得ない。蛍光ヒストグラムやドットプロット上で、白血病細胞が正常白血球で“希釈”されてしまうので、結果の解釈には十分な注意が必要である(「分析結果の解釈」の項を参照)。

白血病細胞の形態学的特徴や白血球中の割合を血球分画検査などで確認しておく、ゲーティングを行う際の参考となる。例えば、急性リンパ性白血病(ALL)の場合は、測定対象から顆粒球を除外できる。急性骨髄性白血病(AML)でも、前骨髄球性(AML-M3)の場合を除いて、正常顆粒球領域に白血病細胞が分布することは稀である。リンパ節を検体とする場合にも、凍結切片やスタンプ標本から得られる形態学的情報がゲーティングを行う際の参考になりうる。

3.3 測定細胞数

測定細胞数は、試料中の細胞数、白血病細胞の割合、データの解析方法、保存データの容量などを勘案して決める。通常は、ゲーティングした領域内の細胞数(gated events)で設定する。全細胞数(total events)で測定細胞数を設定した場合、白血病細胞の割合が非常に少ない検体では、解析に十分な細胞数が得られないこともある。

3.4 蛍光ヒストグラムの解析(陽性率の測定)

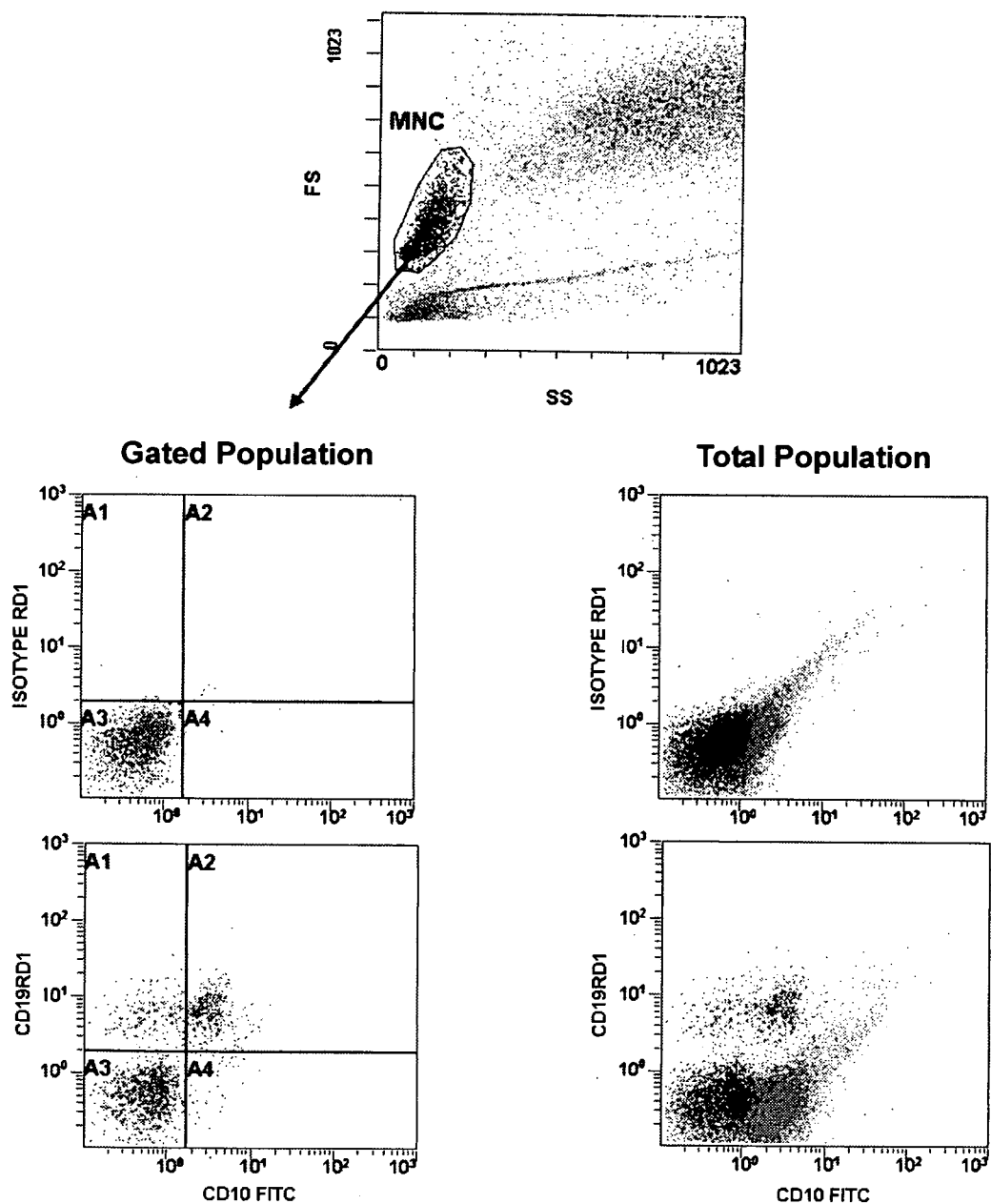
細胞表面抗原(または細胞内抗原)が陽性か陰性かを判定するために、通常は患者検体毎に適切な陰性対照試料を測定して蛍光ヒストグラム上で蛍光陽性領域を設定する。蛍光陽性領域にプロットされた細胞の割合が“陽性率”である。陰性対照として、ヒトの細胞や血漿成分には反応しない陰性コントロール抗体の蛍光強度を基準とするのが一般的である。白血病細胞の細胞内成分による自家蛍光は、抗体試薬で染色していない試料を測定することにより判断できる。薬剤などに起因する自家蛍光の場合は、特定の蛍光色素のみが影響を受けることが多い。ゲーティングされた細胞集団が全て白血病細胞である場合を除き、蛍光ヒストグラムは白血病細胞の蛍光と正常血液細胞の蛍光の両方を反映している。細胞の種類によって抗体試薬の非特異的反応や自家蛍光の強さが異なるので、白血病細胞の割合ができるだけ高くなるようにゲーティングした上で蛍光強度を分析する。

抗体試薬の非特異的反応の強さは抗体試薬の免疫グロブリンアイソタイプで異なり、通常マウスIgG2aはマウスIgG1より非特異的反応が顕著である。そのため、分析に用いるモノクローナル抗体試薬のアイソタイプ毎に陰性コントロール抗体を測定するのが望ましい。ただし、血液量が少ない場合などでは、便宜的に各アイソタイプの陰性コントロール抗体を混合したプール陰性コントロール抗体などで代用することもある。特定のアイソタイプに限って強い非特異的反応がみられる検体では、非特異的反応のみられないアイソタイプの抗体試薬や明らかに“陰性”と思われる測定項目の蛍光ヒストグラムに基づいて蛍光陽性領域を判断するとともに、強い非特異的反応を示したアイソタイプの抗体試薬の測定結果は「参考値」として扱うとよい。蛍光ヒストグラムでは、抗原の発現量が多い細胞ほど右側にプロットされる。白血病

細胞の抗原発現が弱く十分な蛍光強度が得られない検体や抗体試薬の非特異的反応が強い検体、単球や顆粒球の混入が顕著な検体では、結果を判定する際に陰性コントロール抗体で設定した蛍光陽性領域を変更せねばならないことがある(図5)。

図4. 散乱光ゲーティングの例

急性リンパ性白血病(ALL)患者末梢血の分析例。白血病細胞が分布する単核細胞領域(MNC)をゲーティングした蛍光ドットプロット(左側:Gated population)と、同じ試料でゲーティングを行っていない蛍光ドットプロット(右側:Total population)を示した。ゲーティングを行わないデータでも CD10 陽性 CD19 陽性の白血病細胞が認められるが、その一方で好中球によるものと思われる非特異的な蛍光の増強と CD10 陽性 CD19 陰性の細胞成分の存在が結果の判定を難しくしている(右下図)。



3.5 蛍光／散乱光サイトグラムの活用

散乱光サイトグラム上で白血病細胞の分布の一部が正常リンパ球と重なる場合、蛍光と前方散乱のドットプロット(蛍光／散乱光サイトグラム)を作成すると、蛍光陽性の細胞集団が、正常リンパ球と白血病細胞のどちらによって構成されているかを視覚的に判断しやすい(図6a)。また、蛍光／散乱光サイトグラムを有効に活用するためには、散乱光サイトグラム上で顆粒球や死細胞、赤血球残渣などをできるだけ含まないように細胞集団をゲーティングした上で、蛍光／散乱光サイトグラムを作る。また、白血病細胞

図5. 蛍光ヒストグラムにおける蛍光陽性領域

[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]

A 明らかに蛍光陽性の場合

この場合の陽性率には十分な信頼性がある。

B ピークが“ショルダー”もしくは“テールをひく”場合

ゲーティングが適切であるかどうかを必ず確認する。

カーブの変曲点が明らかな場合、カーソルを移動させて解析してもよい。

得られた陽性率には「一部陽性」等のコメントを付して報告する。

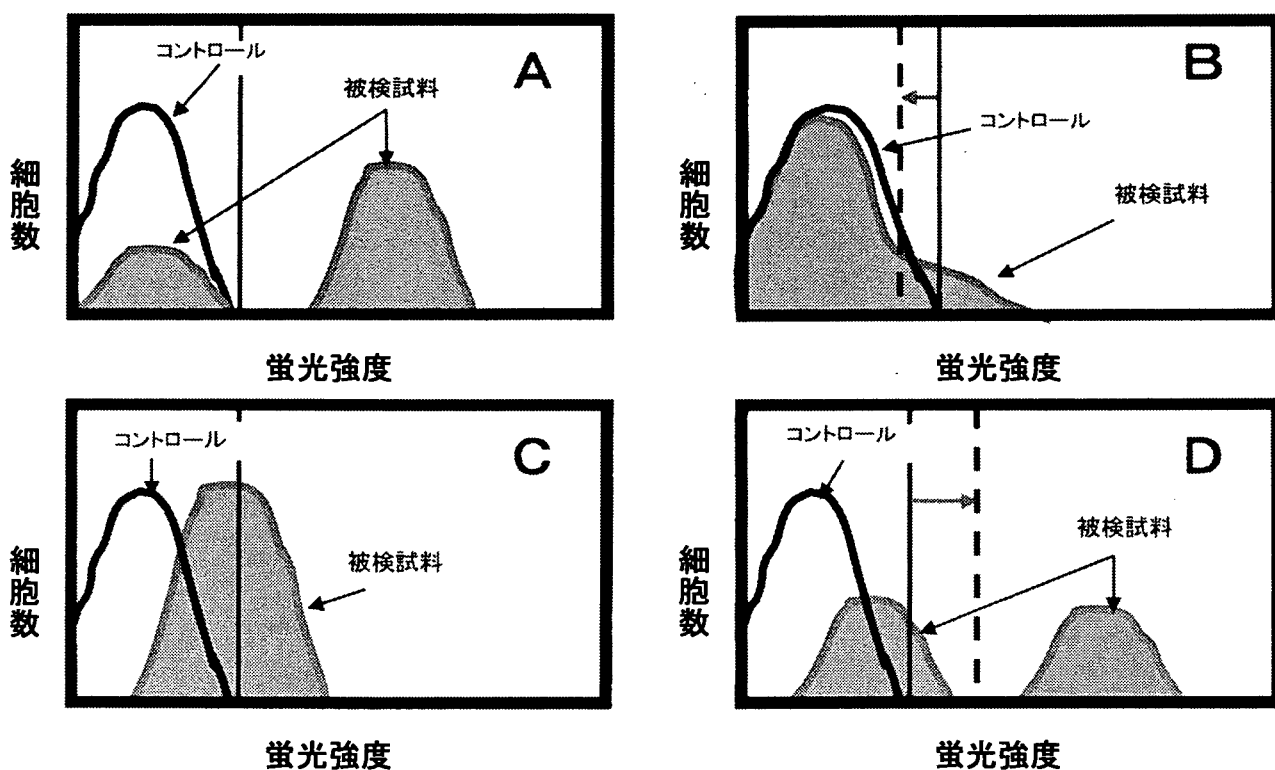
C ピークの蛍光強度が弱い場合

陽性率には「弱陽性」等のコメントを付して報告する。

D 蛍光強度が弱い集団と強蛍光の集団が混在する場合

ゲーティングが適切であるかどうかを必ず確認する。

強蛍光の細胞集団の陽性率を解析し、「他にも弱陽性の細胞集団が存在する」旨のコメントを付して報告する。

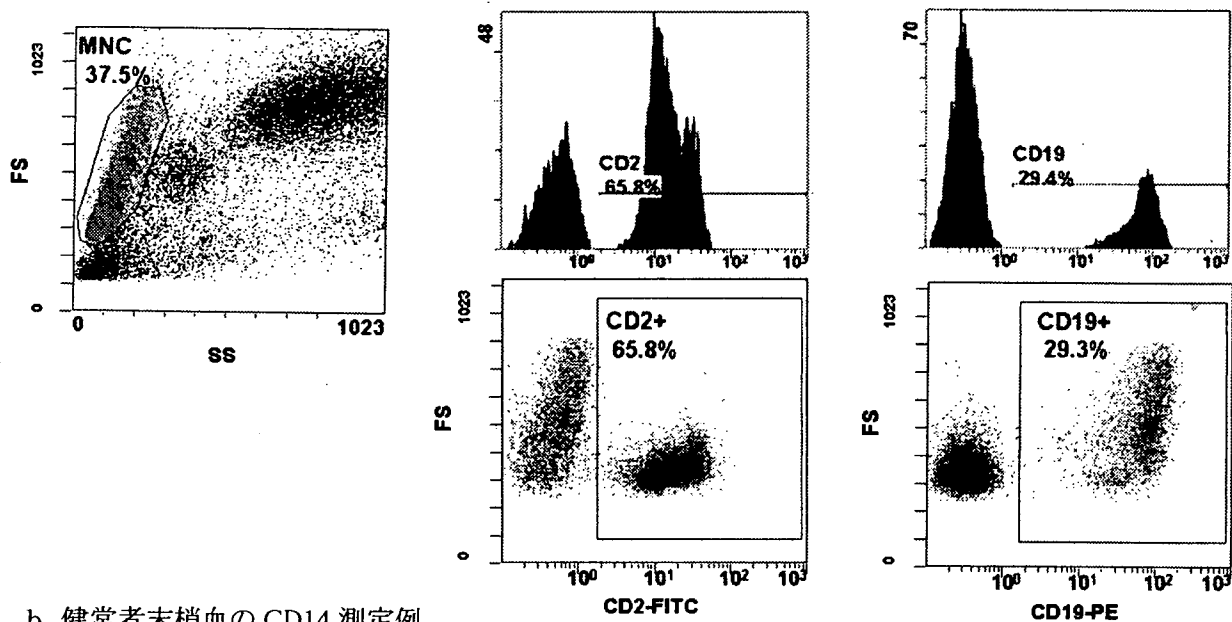


が散乱光サイトグラム上のどこに分布しているかわからない場合には、蛍光と側方散乱で蛍光／散乱光サイトグラムを作成するとよい(図6b)。

図6. 蛍光／散乱光サイトグラムの例

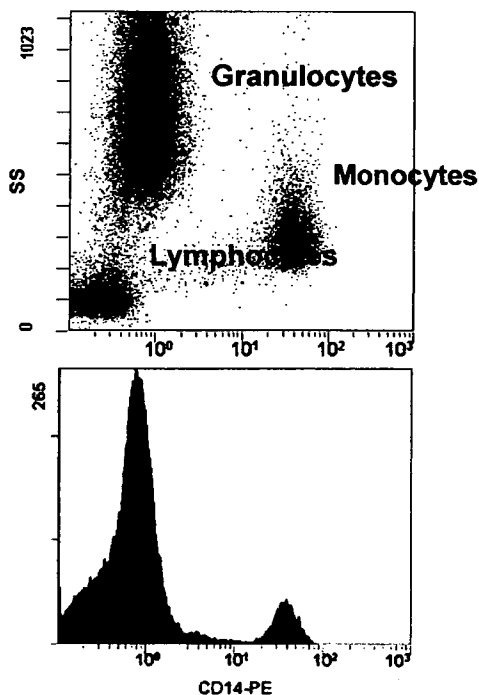
a. 健常者末梢血に Nalm-6 細胞 (CD2 陰性/CD19 陽性 Pre-B ALL 細胞) を添加した白血病モデル検体の測定例

蛍光／散乱光サイトグラムでは、CD2 は FS の小さい細胞集団 (正常リンパ球) のみ陽性だが、CD19 は FS の大きい細胞集団 (Nalm-6 細胞) も陽性であることが視覚的に判断できる。



b. 健常者末梢血の CD14 測定例

蛍光／側方散乱サイトグラムでは、リンパ球が CD14 陰性、単球が CD14 陽性、顆粒球が CD14 弱陽性であることが容易に判別できる。



3.6 蛍光ドットプロットの解析

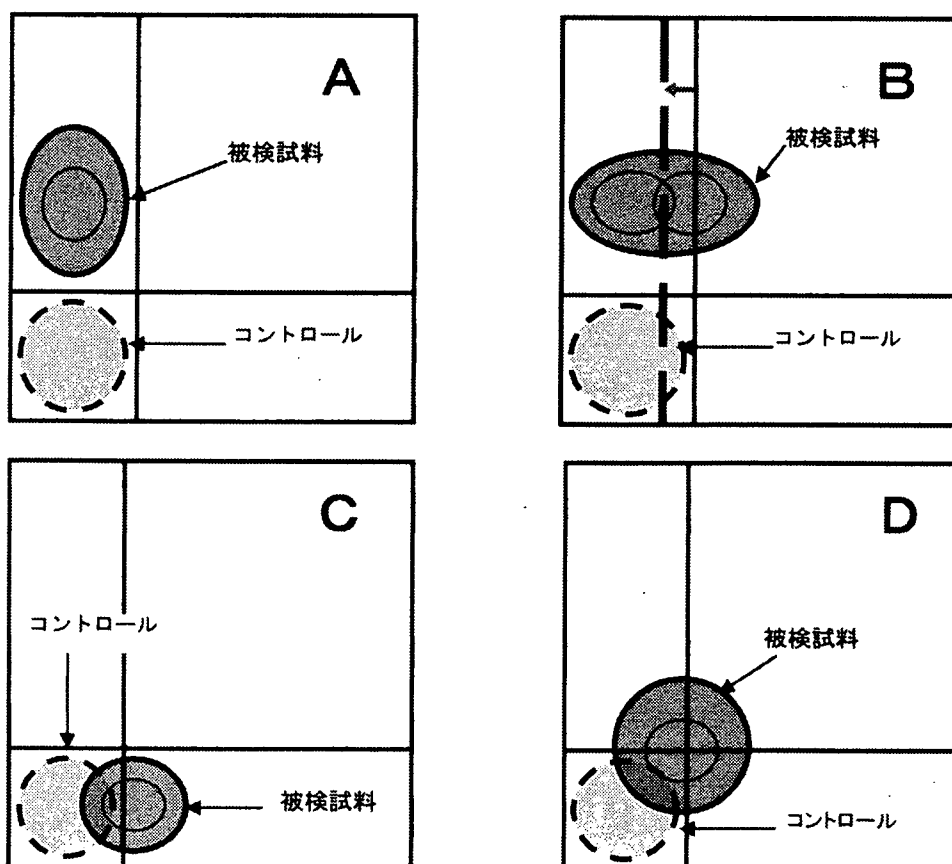
2カラー分析の場合も、患者検体毎に適切な陰性対照試料を測定して蛍光ドットプロット上で蛍光陽性領域を設定する。通常は、陰性コントロール抗体試料の蛍光強度分布に基づいてプロットを4分割する(図3b)。2カラー蛍光ドットプロットを正しく解析、判断するには、蛍光ヒストグラム解析時に留意すべき事項の他に、測定の際に蛍光コンペンセーション(蛍光色素間の蛍光スペクトル重複の補正)が正しく調整されていることが前提となる。とくに、組み合わせの片方の抗原発現量が非常に強く、もう片方の抗原発現量が非常に弱い場合は、コンペンセーション調整不良の影響が大きい。相対蛍光強度の強いPE標識抗体を発現量が低い抗原に用いると、解析がより容易になる。

蛍光ドットプロットでも、結果を判定する際に陰性コントロール抗体で設定した蛍光陽性領域を変更せねばならない場合がある(図7)。しかしながら、蛍光ドットプロットは、抗体試薬の組み合わせを工夫する

図7. 2カラー蛍光ドットプロットにおける蛍光陽性領域

[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]

- A 一方は明らかに蛍光陽性で、もう一方は蛍光陰性の場合
この場合の陽性率は十分な信頼性がある。
- B 一方は明らかに蛍光陽性だが、もう一方の蛍光強度が弱い場合
蛍光強度が弱い方のマーカーの陽性率は、「弱陽性」等のコメントを付して報告する。
ピークが明らかに2峰性を示す場合、谷間の部分にカーソルを移動させてもよい。
- C 一方は明らかに蛍光陰性で、もう一方の蛍光強度が弱い場合
- D 両方とも蛍光強度が弱い場合
いずれも、蛍光強度が弱い方のマーカーの陽性率は、「弱陽性」等のコメントを付して報告する。



ことにより、正常血液細胞と白血病細胞の判別が蛍光ヒストグラムより容易であることが多い。各々の蛍光の蛍光／散乱光サイトグラムを作成することにより、さらに分析結果の解釈が容易になる。

3.7 CD45 ゲーティング

散乱光サイトグラム上で白血病細胞の分布が明瞭でない場合、もしも白血病細胞の細胞表面抗原(または細胞内抗原)の発現がユニークであれば、その特徴を利用して白血病細胞をゲーティングできる。

“Leukocyte Common Antigen (LCA)”とも呼ばれる CD45 は、白血球に発現し、リンパ球と単球で発現が強く、好中球では比較的弱い。さらに、急性白血病細胞は CD45 の発現強度が正常リンパ球、単球に比べてしばしば低下している。このことを利用して、CD45 蛍光と側方散乱のドットプロット上で正常白血球と白血病細胞を区別する CD45 ゲーティング法が考案された。散乱光サイトグラムと同様に、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8a, b)。ただし、CD45 ゲーティング法は、測定する全ての試験管に蛍光標識 CD45 モノクローナル抗体試薬を添加する必要があるため、検査のコスト対効用の観点から全ての白血病検体のマーカー解析に必須とはなっていない。また、白血病患者検体が全て CD45 低発現とは限らないことにも留意する必要がある。例えば、成熟 T 細胞由来の白血病細胞などでは CD45 の発現が正常リンパ球とほとんど変わらないことが多い。しかしながら、少なくとも検体中の白血病細胞の割合が少ない場合には CD45 ゲーティング法が推奨できる。ただし、CD45 ゲーティングが有効であっても散乱光サイトグラムは必ず確認すべきである。

3.8 その他の蛍光ゲーティング

CD45 ゲーティング以外では、CD19 を用いた B 細胞のゲーティングなどがよく用いられている。また、7-Amino-actinomycin D (7-AAD)などの DNA に選択的に結合する蛍光色素を用いて生細胞のみをゲーティングする方法も用いられている。目的とする細胞の表現型や特徴が明らかな場合は、散乱光サイトグラムと複数の蛍光ドットプロットのそれぞれにゲートを設定し、段階的に測定対象を絞り込むことによって、検体中にごく少数存在する細胞を高感度に測定することができる。このような絞り込みゲーティングは、既に CD34 陽性細胞の精密測定などで実用化されており、急性白血病でも微小残存腫瘍検出への応用が期待されている。

小児急性白血病初発時の免疫学的診断のための CD45 ゲーティングによる標準的なマーカー解析パネルとして、細胞表面抗原28種類、細胞内抗原6種類を用いて作成したパネルを示した(表1)。小児急性白血病初発時の免疫学的診断のためのマーカー解析パネルに関しては、今後は、中央診断施設だけでなく、臨床検査会社においても、同じ解析パネルを用いることが望まれる。また、微小残存白血病細胞の検出、およびそのフォローアップに必要な抗原に関しては、この急性白血病初発時の免疫学的診断のためのマーカー解析パネルからは省いたが、重要な課題であり、今後さらに検討する必要がある。

4. 分析結果の報告とその解釈

4.1 分析結果の報告

分析結果を報告する際には、どの細胞集団をゲーティングしたかがわかるように、散乱光サイトグラムを添付するか、もしくは適切なコメントを付記する。CD45 ゲーティング法を用いた場合は、散乱光サイトグラムと CD45/SS ドットプロットの両方を添付するか、もしくはコメントを付記する。

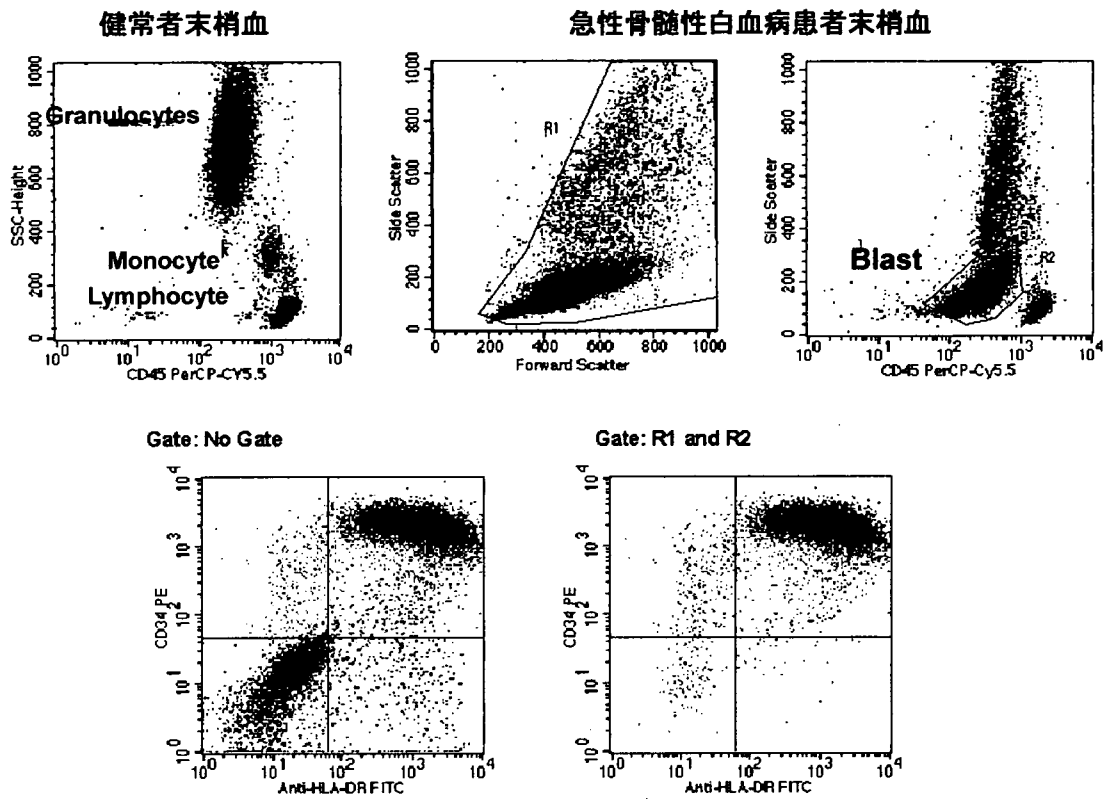
分析結果は各々の表面抗原の“陽性率”で報告するのが一般的だが、できるだけ蛍光ヒストグラムまたは蛍光ドットプロットを添付する。報告書には、蛍光陽性領域の設定方法の記載とともに、白血病細胞が陽性の場合、その蛍光強度の程度(dim, bright)や各測定項目の正常白血球に対する特異性なども加味した適切なコメントを付記するのが望ましい。また、後で別の細胞集団にゲーティングして再解析する場合に備えて、測定データをリストモードデータの形で保存しておくことが望ましい。とくに、測定を行う時点で形態学的情報が得られておらず、サイトグラム上で白血病細胞の分布が明瞭でない場合は、必要に応じて後で再解析を行うことができるように、全ての白血球集団を含むリストモードデータを保存しておく必要がある。

表1. 小児急性白血病初発時のマーカー解析パネル

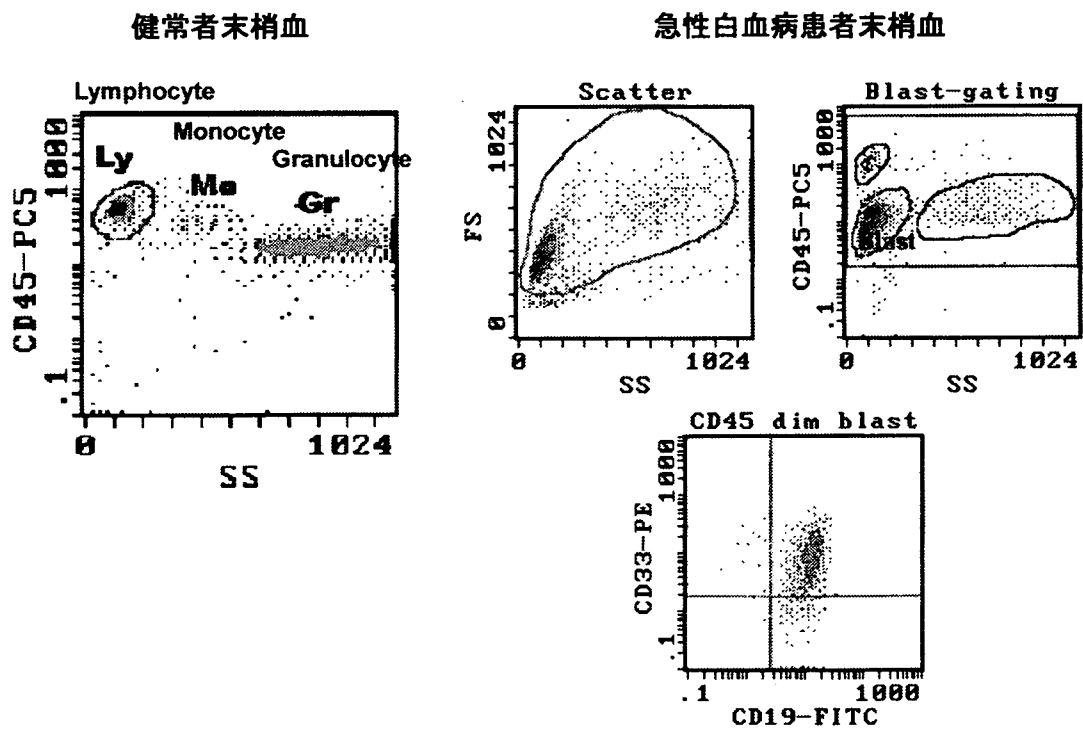
パネル	FL1 (FITC)	FL2 (PE)	FL3 (PerCP)
1	CD10	CD33	CD45
2	CD19	CD13	CD45
3	Ig- κ	Ig- λ	CD45
4	HLA-DR	CD34	CD45
5	CD20	CD56	CD45
6	CD2	CD7	CD45
7	CD15	Glycophorin-A	CD45
8	CD64	CD41	CD45
9	CD5	CD3	CD45
10	CD4	CD8	CD45
11	CD65	CD117	CD45
12	CD36	CD42b	CD45
13	CD61	CD14	CD45
14	TdT	MPO	CD45
15	cyCD3	cyCD79a	CD45
16	Ig- μ	CD22	CD45
17	Cyt- μ	cyCD22	CD45
参考	Ig- κ	Ig- λ	CD19

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%未満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。

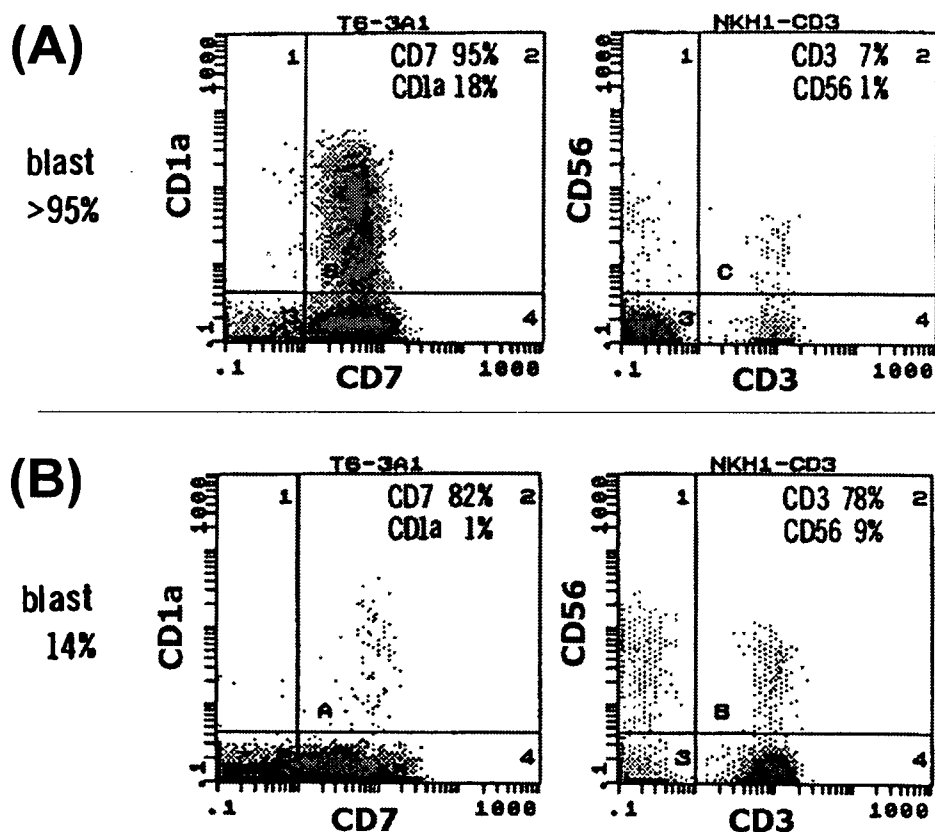
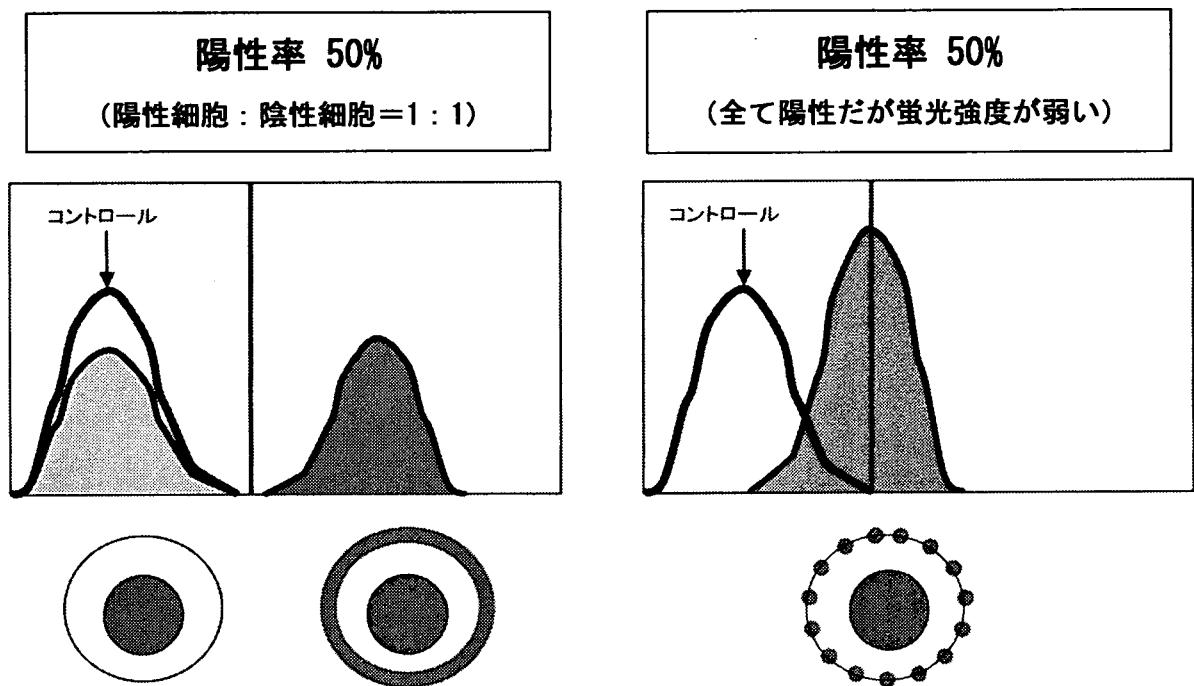


図10. 「陽性率」のもつ意味

〔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。



5. lineage 診断とその定義

免疫学的中央診断施設(愛知医科大学小児科、大阪大学医学部小児科、国立成育医療センター研究所発生・分化研究部、三重大学医学部小児科)において、フローサイトメトリー法によりマーカー検査が実施された小児急性白血病の解析データをもとに、それぞれの免疫学的診断分類別に、各造血細胞系統の抗原の発現パターンを明らかにすることが可能である。中央診断施設においてマーカー解析が実施された小児急性白血病症例は、B-precursor ALL:1451例、Pre-B ALL:165例、成熟B細胞 ALL:44例、T細胞 ALL:224例、AML:372例であり、それぞれの抗原発現の陽性率、および発現プロフィールを示した(表2-5)。そして、これらのマーカー解析結果をもとに、小児急性白血病の免疫学的診断基準は以下のように設定されている。

B-precursor ALL のマーカー解析データ(Pre-B ALL を含む)の検討結果より、B-precursor ALL の免疫学的診断基準は、「CD19、CD79a、CD20、CD22 抗原のうち2つ以上が陽性、かつ Ig κ と Ig λ が陰性」とされている。Pre-B ALL に関しては、「CD19、CD79a、CD20、CD22 抗原のうち2つ以上が陽性、Cyt-μ が陽性、かつ Ig κ と Ig λ がともに陰性」が、免疫学的診断基準である。成熟B細胞 ALL は、「CD19、CD79a、CD20、CD22 抗原のうち2つ以上が陽性、かつ Ig κ または Ig λ が陽性」が免疫学的診断基準となっている。なお、成熟B細胞 ALL における細胞表面 μ 鎖の発現に関しては、陰性例もまれではあるが認められることより、診断基準としては必須ではないが重要な参考所見とされている。また、細胞表面 μ 鎖のみ陽性で、Ig κ、Ig λ がともに陰性の症例には、CD179a/CD179b の発現が認められ、transitional B 細胞の形質を示す症例の可能性があると考えられている。

T細胞 ALL は、「CD3 陽性、かつ CD2、CD5、CD7、CD8 抗原のうち1つ以上が陽性」が免疫学的診断基準とされている。なお、CD3 抗原の発現に関しては、細胞表面、細胞質内は問わない。また、T細胞 ALL の症例の中には、B細胞抗原(CD79a、CD22)の発現を認める症例が存在しているが、いずれの症例も、B-precursor ALL の診断基準を満たさず、免疫学的な診断に支障となることはない。

急性骨髄性白血病(AML)に関しては、細胞形態学的分類(FAB分類)別に種々の骨髄系抗原の発現パターンを解析し、それぞれの分類に特徴的な抗原発現プロフィールを明らかにした(表6)。AML細胞は、細胞形態学的にも、また免疫学的にも、その表現型は多様であり、マーカー解析のみによる診断基準の作成は困難である。そのため、AMLのFAB分類に基づく診断においては、マーカー発現プロフィールの特徴を診断の一助とし、細胞形態学的な特徴と合わせて判定を行う。

異なる細胞系統の抗原を発現する白血病に関しては、中央診断施設に蓄積されたマーカー解析データの検討から、以下の4つのパターン:骨髄系抗原を発現するB細胞系 ALL、骨髄系抗原を発現するT細胞 ALL、リンパ系抗原を発現するAML、および True mixed-lineage leukemia が認められ、それぞれの免疫学的診断基準が示されている。即ち、骨髄系抗原を発現するB細胞系 ALL は、「CD19、CD79a、CD20、CD22 抗原のうち2つ以上が陽性、CD3 陰性、MPO 陰性、CD13、CD15、CD33、CD65 抗原のいずれかが陽性」、骨髄系抗原を発現するT細胞 ALL は「CD3 陽性、CD2、CD5、CD7、CD8 抗原のうち1つ以上が陽性、CD79a 陰性、MPO 陰性、CD13、CD15、CD33、CD65 抗原のいずれかが陽性」、リンパ系抗原を発現するAMLは「MPO 陽性、CD13、CD15、CD33、CD65 抗原のうち2つ以上が陽性、CD3 陰性、CD79a 陰性、CD2、CD5、CD7、CD19、CD22、CD56 抗原のいずれかが陽性」を免疫学的診断基準としている。また、非常にまれな True mixed-lineage leukemia については、その抗原発現パターンより、さらに3つのグループに細分類される。即ち、MPO 陽性であり、かつB細胞系 ALL の診断条件(CD19、CD79a、CD20、CD22 抗原のうち2つ以上が陽性)を満たす症例、MPO 陽性であり、かつT細胞 ALL の診断条件(CD3 陽性、CD2、CD5、CD7、CD8 抗原のうち1つ以上が陽性)を満たす症例、そしてB細胞系 ALL の診断条件とT細胞 ALL の診断条件を同時に満たす症例が認められる。

さらに、上記のいずれの分類にも当てはまらない症例も極めてまれではあるが認められ、分類不能症例(acute unclassified leukemia/AUL)とする。

以上のように、中央診断施設に蓄積されたマーカー解析データを用いて、我が国の小児急性白血病の免疫学的診断基準を作成した。診断基準作成にあたっては、欧米からの代表的な報告(小児急性白

血病のマーカー解析データ、および免疫学的診断基準に関連する論文報告等)も参考にしながら作業を行い、国際的にも認められるような免疫学的診断基準となるように配慮した。しかしながら、その有用性、妥当性に関しては、今後のさらなる検証が必要と思われる。

表2. B-precursor ALL の抗原発現

抗原	陽性率	症例数	陽性数	陰性数
CD19	99.4	1451	1443	8
cCD79a	99.9	742	741	1
Ig κ or Ig λ	0.0	1391	0	1391
HLADR	98.3	1384	1360	24
CD20	22.4	1421	319	1102
IgM	3.3	668	22	646
Cyt- μ	14.9	1425	212	1213
CD10	91.9	1449	1332	117
cCD22	89.8	597	536	61
CD22	74.3	1399	1039	360
TdT	95.4	758	723	35
CD13	37.3	1444	538	906
CD34	72.4	1385	1003	382
CD56	3.7	985	36	949
CD33	30.1	1447	436	1011
cCD3	0.0	665	0	665
MPO	0.0	715	0	715
CD2	4.0	1439	58	1381
CD7	4.2	1443	60	1383
CD14	0.7	1108	8	1100
CD4	1.1	1137	13	1124
CD8	1.4	980	14	966

表3. Pre-B ALL の抗原発現

抗原	陽性率	症例数	陽性数	陰性数
CD19	100.0	165	165	0
cCD79a	100.0	61	61	0
Ig κ or Ig λ	0	164	0	164
HLADR	100.0	163	163	0
CD20	24.5	163	40	123
Cyt- μ	100.0	165	165	0
CD10	94.5	165	156	9
cCD22	98.4	61	60	1
CD22	75.8	165	125	40
TdT	82.0	61	50	11
CD13	29.7	165	49	116
CD34	41.5	164	68	96
CD56	1.4	73	1	72
CD33	18.2	165	30	135
cCD3	0.0	61	0	61
MPO	1.5	67	0	66
CD2	0.0	165	0	165
CD7	3.0	165	5	160
CD14	0.6	163	1	162
CD4	0.0	87	0	87
CD8	1.1	87	1	86

表4. 成熟 B 細胞 ALL の抗原発現

抗原	陽性率	症例数	陽性数	陰性数
CD19	100.0	44	44	0
cCD79a	100.0	23	23	0
Ig κ or Ig λ	100.0	44	44	0
HLA-DR	97.6	42	41	1
CD20	88.6	44	39	5
IgM	86.4	44	38	6
CD10	79.5	44	35	9
cCD22	77.8	18	14	4
CD22	59.5	42	25	17
TdT	13.0	23	3	20
CD13	12.2	41	5	36
CD34	4.8	42	2	40
CD56	3.3	30	1	29
CD33	2.3	44	1	43
cCD3	0.0	23	0	23
MPO	0.0	25	0	25
CD2	0.0	44	0	44
CD7	0.0	44	0	44
CD14	0.0	36	0	36
CD4	0.0	32	0	32
CD8	0.0	32	0	32

表5. T細胞 ALLの抗原発現

抗原	陽性率	症例数	陽性数	陰性数
CD7	100.0	224	224	0
cCD3	100.0	141	141	0
CD5	94.5	219	207	12
TdT	84.4	141	119	22
CD2	83.4	223	186	37
CD8	68.9	222	153	69
CD1a	54.3	210	114	96
CD4	55.2	223	123	100
CD3	50.5	220	111	109
CD34	35.3	221	78	143
CD10	31.3	224	70	154
TCR $\alpha \beta$	30.4	207	63	144
HLA-DR	16.4	220	36	184
CD33	14.7	224	33	191
TCR $\gamma \delta$	15.2	223	34	189

抗原	陽性率	症例数	陽性数	陰性数
cCD79a	21.8	142	31	111
CD56	5.1	176	9	167
cCD22	2.9	103	3	100
CD22	0.9	220	2	218
IgM	0.5	191	0	191
Ig κ or Ig λ	0.0	204	0	204
CD20	0.0	221	0	221
MPO	0.0	134	0	134
Cyt- μ	0.0	131	0	131
CD19	0.0	224	0	224
CD14	0.0	211	0	211
CD36	0.0	25	0	25
CD42b	0.0	48	0	48
Gly A	0.0	33	0	33
CD41	0.0	88	0	88

表6. 急性骨髄性白血病の FAB 分類とマーカー表現プロフィール

FAB	CD34	CD117	HLA-DR	MPO	CD13	CD33	CD15	CD65	CD14	GPA	CD36	CD41	CD42b	CD7	CD19	CD56
M0	73	91	84	46	55	91	22	14	0	0	9	9	9	55	9	46
M1	85	100	85	100	93	98	64	76	5	0	19	10	0	51	7	20
M2	85	96	93	99	93	96	66	34	10	0	12	6	2	14	25	39
M3	14	76	5	97	93	98	19	60	5	3	6	0	11	2	2	7
M4	53	77	80	95	91	94	83	83	31	3	83	13	5	11	2	15
M5	26	42	83	66	67	100	81	94	45	3	67	7	2	4	2	61
M6	60	67	50	90	67	100	0	25	0	67	83	0	0	33	0	0
M7	45	80	50	0	81	95	10	6	2	41	80	73	62	70	0	52

<FCM による抗原発現パターンの特徴>

M0: MPO, CD15, CD65 陰性例を認める

M2: CD19 陽性例を認める

M3: CD34, HLA-DR の発現が低下する

M4, M5: CD14, CD36 の発現が見られる

M5: CD34 の発現が低下する

M6: CD65 の発現が低下し、GPA, CD36 の発現が見られる

M7: MPO 陰性で、CD36, CD41, CD42b, CD7 の発現が見られる

0%	
<30%	
30-50%	
50%>	

「臨床試験実施計画書ダイジェスト版」

Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG)

日本小児白血病リンパ腫研究グループ

AML 委員会

小児急性前骨髄球性白血病 (APL) に対する 多施設共同後期第Ⅱ相臨床試験実施計画書

AML-P05 ダイジェスト版

厚生労働科学研究費補助金 がん臨床研究事業
「小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立に関する研究」班

研究代表者 / 研究事務局

高橋 浩之

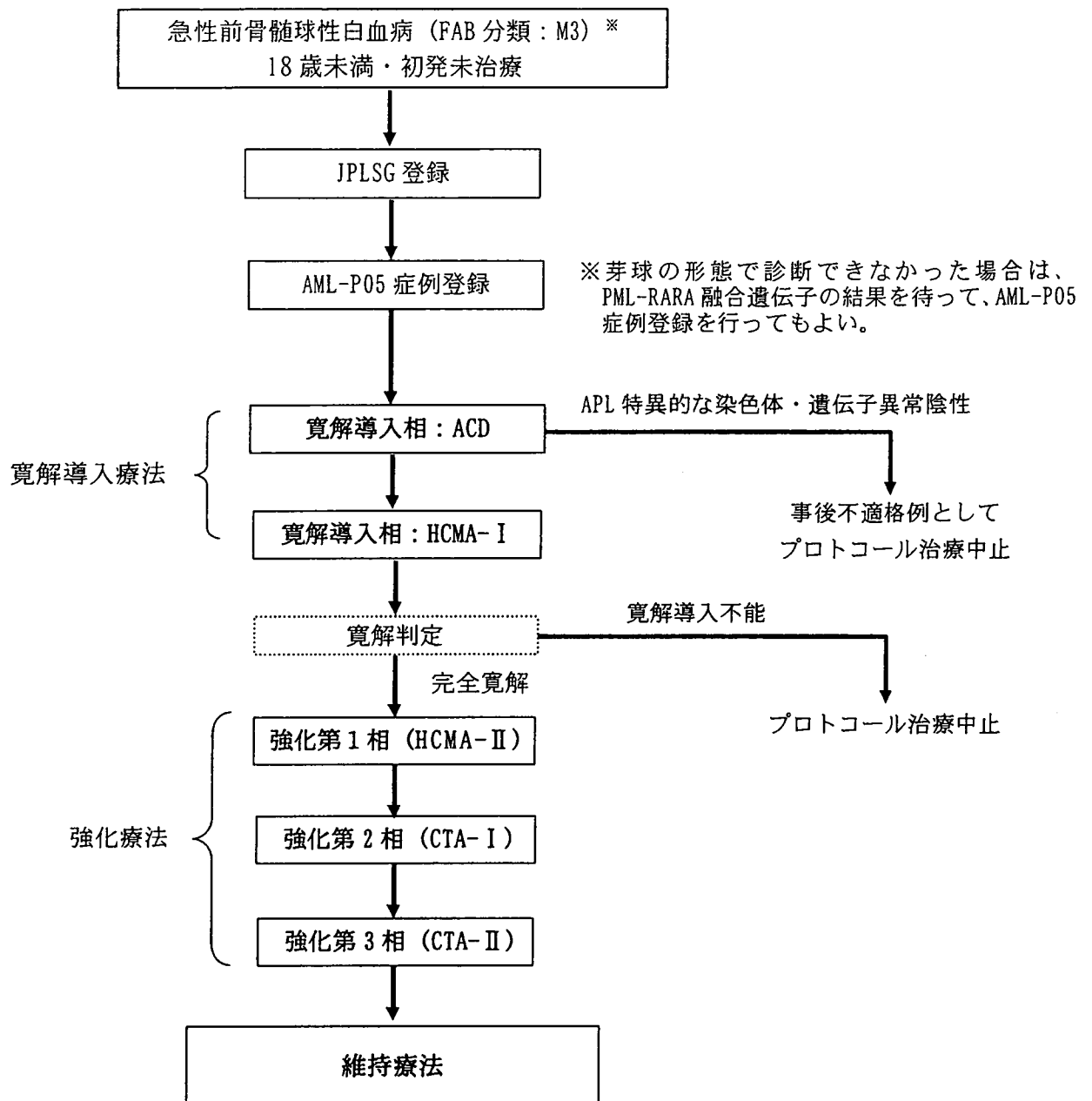
済生会横浜市南部病院小児科

2005年 4月 13日	計画書案第1版作成
2005年 6月 28日	計画書案第2版作成
2005年 9月 9日	日本小児血液学会臨床研究審査検討委員会第一次審査
2005年 10月 12日	計画書案第3版作成
2005年 11月 29日	日本小児血液学会臨床研究審査検討委員会承認

本ダイジェスト版による治療は行わないようお願い致します。
IRB または倫理委員会の審査には提出しないで下さい。

0. 概要

0.1. シェーマ



0.2. 目的とエンドポイント

<目的>

わが国における小児 (18 歳未満) の初発未治療の急性前骨髄球性白血病 (APL) の標準的治療の確立をめざし、ATRA (all-trans retinoic acid) の先行投与と白血球数に応じた抗がん剤投与開始基準を規定した寛解導入療法、アントラサイクリンを中心とした強化療法、および ATRA 間欠投与による維持療法からなる治療の有効性と安全性を検証する。

<エンドポイント>

プライマリーエンドポイント

3 年無イベント生存率 (EFS)