

## 4. 再発の診断

clonality

### 4-1. 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認められる場合や、初診時の異常に新たな異常が加わる場合がある。
- 初診時とは別の異常がみられた場合は再発ではなく、二次性(治療関連)腫瘍の可能性もある。
- 染色体分析結果に問題があると思われるときは、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、偽陽性となる可能性があるため、定量 RT-PCR 法などにより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。

### 4-2. 再発の早期診断と治療効果の判定

微小残存病変

- 急性白血病では臨床的な再発に先行して、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 法やフローサイトメトリーで検出することにより、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(④PCR による MRD 測定, ⑤フローサイトメトリーによる MRD 測定を参照, p47, 53)。
- ただし、このための再発基準は、定量 PCR 法やフローサイトメトリーによる数値を裏付ける過去のデータが必要である。同じレベルの数値であっても、検体の採取時期や治療内容によってその意義はまったく異なることを十分認識する必要がある。

## 5. その他の注意点

次世代超高速シーケンサー

- 細胞遺伝学的診断および分子生物学的診断は、病型診断のうえでともに非常に有用な方法であるが、適切に検体が扱われなかった場合や、検査項目の選択が不適切だった場合には、誤った結果を得ることがあり、注意が必要である。
- また、いずれの方法でも結果の解釈にあたっては、おのおの方法についての十分な知識が必要である。受け取った結果について少しでも疑問がある場合は、専門家へのコンサルトを是非していただきたい。
- 近年、次世代超高速シーケンサーの普及に伴い、あらゆる種類の造血器腫瘍において新規の遺伝子変異が次々と同定されている。そのうちのいくつかについては予後との関係も報告されている。しかし、これらの遺伝子異常が日本人において、また JPLSG プロトコールでも予後因子となるかどうかについては、今後の研究が必要である。
- 評価が定まっていない遺伝子異常を患者の治療方針の決定に用いることは、患者

にとって利益よりも不利益を与えてしまう可能性もあるので、慎重な対応が必要である。

- 患者にとって有用な新規の予後因子を適切な形で利用できるようにするためにも、適切な方法での遺伝子検査の実施と質の高い臨床研究のなかでのその評価が重要である。

#### 文 献

- 1) Kluin PM, Harris NL, Stein H, Leoncini L, Raphael M et al. : B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and Burkitt lymphoma. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (ed 4). IARC Lyon, France, 2008.
- 2) 金井正光 : 第 13 章 染色体検査・遺伝子関連検査. 臨床検査法提要. 金原出版, 2010, p1113~1215.
- 3) Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ : An International System of Human Cytogenetic Nomenclature. Basel, Karger, 2009.
- 4) 阿部達生 : 第 3 章 分子遺伝学の手技と遺伝子異常の解析. 3-a 分子生物学的診断技術. 3-b FISH 法. 造血器腫瘍アトラス. 日本医事新報社, 2009, p60~107.
- 5) 滝 智彦, 林 泰秀 : 染色体検査結果とキメラ遺伝子検査結果の食い違い症例の検討. 日本小児血液学会雑誌 23 : 310-314, 2009.
- 6) Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J et al. : New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. Leukemia 23 : 1490-1499, 2009.
- 7) Romana SP, Radford-Weiss I, Ben Abdelali R, Schluth C, Petit A et al. : Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. NUP98 rearrangements in hematopoietic malignancies : a study of the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique. Leukemia 20 : 696-706, 2006.
- 8) Pui CH, Carroll AJ, Raimondi SC, Land VJ, Crist WM et al. : Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid less than 45 line. Blood 75 : 1170-1177, 1990.
- 9) Fujino H, Fujita N, Hamamoto K, Oobu S, Kita M et al. : Ring/marker chromosome derived from chromosome 7 in childhood acute megakaryoblastic leukemia with monosomy 7. Int J Hematol 92 : 386-390, 2010.

#### 役に立つウェブサイト

- ・ FISH 解析に用いているプローブの詳細な情報を得たいとき : アボット社のホームページ <http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagents/fish/vysis-lsi-probes.html>
- ・ 未知の染色体異常を見つけたとき : Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer Searching the Database <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- ・ 代表的な染色体異常についての情報を集めたいとき : Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology <http://atlasgeneticsoncology.org/>

# 4

## PCRによるMRD測定

### 1. 検体の取り扱い

Ig/TCR 遺伝子再構成  
RQ-PCR

- 多くの場合、骨髄液 2~3 mL あるいは末梢血 5 mL (急性リンパ性白血病: ALL では芽球比率 60% 以上) を、ヘパリン加密封容器にて、常温または 4°C で速やかに送付することになるが、特に冬季は凍結しないよう留意する。
- DNA を用いる場合は、塗抹標本や単核球分離後の凍結検体から、後日でも定量が可能であるため、DNA の回収不良時に備えて残余検体を多めに保存しておくことが望ましい。
- 特に Ig/TCR 遺伝子の場合、初診時検体が再構成スクリーニングだけでなく、RQ (real time quantitative)-PCR の際にも定量の基準として必要となるため、初診時 DNA が少量の場合複数回の定量が困難になることがある。
- 髄液は 10 mL 以上をヘパリン加密封容器にて、組織の場合は 5 mm 角の検体を培養液で同様に送付されるが、腫瘍量にもよるため必要検体量に関してはこの限りではない。

### 2. Ig/TCR 遺伝子再構成のスクリーニング

multiplex PCR

- 初診時の患者骨髄液あるいは骨髄スミア (腫瘍細胞を 60% 以上含む場合は末梢血でも可) から標準的な方法<sup>1,2)</sup>、または市販のキット (QIAamp Mini Kit, QIAGEN 社) を用いて DNA を抽出し、TCR $\delta$ 、TCR $\gamma$ 、TCR $\beta$ 、IgH、Ig $\kappa$  鎖、および SIL-TAL 遺伝子の再構成について、すでに報告されているプライマー<sup>1-6)</sup> を用い、疾患の表面形質ごとに異なった組み合わせで PCR 法によるスクリーニングを行う (表 1)。
- TCR $\beta$  鎖遺伝子では標的遺伝子に対するプライマーセット (表 1) が複雑なため、multiplex PCR 法<sup>6)</sup> にてスクリーニングを行う。
- 検出頻度の低い IgH 鎖 JH-DH 遺伝子再構成<sup>6)</sup> については、以上のスクリーニングで再構成が検出できなかった場合に行っている。
- スクリーニングで行われる PCR は、基本的には 50 ng の患者 DNA、8 mM の dNTP、10 pmol の forward, reverse オリゴヌクレオチドプライマー、25 mM の

表 1 標的遺伝子に対するプライマーセット

	B-precursor-ALL	T-ALL
TCR $\gamma$	V $\gamma$ I-J $\gamma$ 1.1/2.1, V $\gamma$ II-J $\gamma$ 1.1/2.1 V $\gamma$ IV-J $\gamma$ 1.1/2.1, V $\gamma$ I-J $\gamma$ 1.3/2.3 V $\gamma$ II-J $\gamma$ 1.3/2.3, V $\gamma$ IV-J $\gamma$ 1.3/2.3	V $\gamma$ I-J $\gamma$ 1.1/2.1, V $\gamma$ I-J $\gamma$ 1.3/2.3 V $\gamma$ II-J $\gamma$ 1.3/2.3, V $\gamma$ III-J $\gamma$ 1.3/2.3 V $\gamma$ IV-J $\gamma$ 1.3/2.3
TCR $\delta$	V $\delta$ 2-D $\delta$ 3, D $\delta$ 2-D $\delta$ 3	V $\delta$ 2-D $\delta$ 3, D $\delta$ 2-D $\delta$ 3 V $\delta$ 1-J $\delta$ 1, V $\delta$ 2-J $\delta$ 1 V $\delta$ 3-J $\delta$ 1, D $\delta$ 2-J $\delta$ 1
Ig $\kappa$	V $\kappa$ I- $\kappa$ DE, V $\kappa$ II- $\kappa$ DE V $\kappa$ III- $\kappa$ DE, V $\kappa$ IV- $\kappa$ DE intron- $\kappa$ DE	
IgH(VH)	VH1/7-JH, VH2-JH VH3-JH, VH4/6-JH VH5-JH	
TCR $\beta$	BV I 23 $\times$ V $\beta$ -9 $\times$ J $\beta$ BV II 23 $\times$ V $\beta$ -9 $\times$ J $\beta$ BD 2 $\times$ D $\beta$ -13 $\times$ J $\beta$	BV I 23 $\times$ V $\beta$ -9 $\times$ J $\beta$ BV II 23 $\times$ V $\beta$ -9 $\times$ J $\beta$ BD 2 $\times$ D $\beta$ -13 $\times$ J $\beta$
SIL-TAL		Sil-Tal 1
IgH(DH)	DH1-JH, DH2-JH, DH3-JH, DH4-JH DH5-JH, DH6-JH, DH7-JH	DH1-JH, DH2-JH, DH3-JH, DH4-JH DH5-JH, DH6-JH, DH7-JH

MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U の TaqDNA ポリメラーゼ (Taq Gold : Applied Biosystems 社), PCR buffer II (Applied Biosystems 社), H<sub>2</sub>O, 20% Bovine Serum A からなる各チューブ 50  $\mu$ L の反応液を調整し, 陽性コントロール(アルブミン)とともにペルチェ素子型サーマルサイクラー (PCR Express, Thermo Hybaid 社など)で行われる。

- その反応プログラムは, 95 $^{\circ}$ C denature 7 分の後, 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 60 $^{\circ}$ C 45 秒, 72 $^{\circ}$ C 90 秒の amplification を 35 サイクル行い, 最終サイクルの後 72 $^{\circ}$ C 10 分間の extension を加えている。
- この PCR 産物は heteroduplex formation を誘導するため 94 $^{\circ}$ C 5 分の denature と 4 $^{\circ}$ C での 60 分間の静置を必要とする<sup>7)</sup>。
- その後, 1 $\times$  Tris-boric acid-EDTA バッファー中で 8% ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行い, 明瞭なバンドをもつものを再構成ありと判断する (図 1)。
- 再構成バンドが認められた場合, QIA quick PCR purification Kit (QUIAGEN 社) を用いて再構成遺伝子の DNA を精製し, シークエンス解析キット (BigDye : Applied Biosystems 社) を用いて, その切断点周辺の遺伝子配列をオートシーケンサーで解析する。
- 切断点近傍の塩基配列を決定し, Primer Express Software (Applied Biosystems 社) を用いて, 症例特異的な配列を含む ASO プライマーを設計, 作成する (図 2)<sup>8)</sup>。

### 3. Real-time quantitative PCR 法を用いた MRD 定量

MRD  
RQ-PCR

- 近年の技術開発と機器の普及により, Ig/TCR 遺伝子再構成を用いた MRD 定量法の世界基準は, 半定量から RQ (real-time quantitative)-PCR へと移行した。

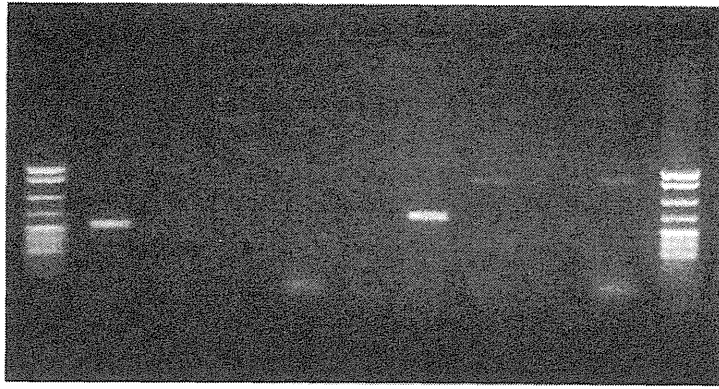


図1 TCR $\gamma/\delta$ , Ig $\kappa$  鎖遺伝子再構成のスクリーニング

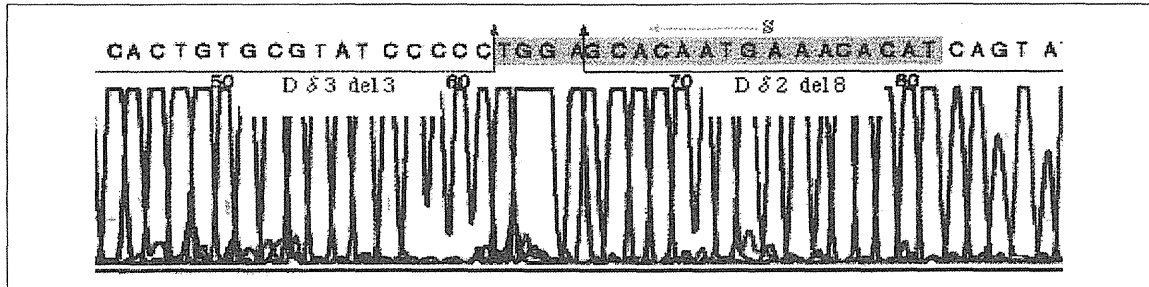


図2 TCR $\delta$  鎖遺伝子再構成の塩基配列と ASO プライマーの設計  
(五十嵐 隆・他編, 2009<sup>9)</sup>より改変)

#### TaqMan プローブ

- RQ-PCR は迅速性と定量性にすぐれ、段階希釈した既知量の DNA が一定の増幅産物量になるサイクル数から検量線を作成し、未知濃度のサンプルの増加曲線を検量線と比較することで目的の DNA 量を測定する方法である(図3)。
- BFM グループを中心に、ALL の治療研究に伴って行われている RQ-PCR は TaqMan プローブ法であり、5' 末端を蛍光物質で、3' 末端をクエンチャー物質で修飾した oligonucleotide (TaqMan プローブ) を用いる。
- この TaqMan プローブはアニーリングステップで鋳型 DNA に特異的にハイブリダイズし、クエンチャーの働きで蛍光の発生が抑制されているが、伸長反応ステップでのプローブの分解に伴ってその抑制が解除されて蛍光が発せられ、これをカウントすることで DNA のコピー数を定量している<sup>9)</sup>。
- 前述の ASO プライマーおよび、すでに塩基配列が報告されている各遺伝子再構成における TaqMan プローブ<sup>10)</sup> を用いて RQ-PCR の反応を行うが、この際ターゲット遺伝子と内部標準としてアルブミンの遺伝子について、同時に検量線を作成する<sup>8)</sup>。
- 実際の反応は、ターゲット遺伝子については、初診時 DNA をコントロール DNA (健康人末梢血 DNA 8~10 人分を混合) で段階希釈した検量線用サンプル ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) とコントロール DNA, No Template Control ( $H_2O$ ) と定量用検体、アルブミン遺伝子については、検量線用サンプルとして同様のコントロール DNA のみの希釈系列と No Template Control, 定量用検体と初診時検体を使用し、それぞれ再現性の確認のため 2 ないしは 3 個の replicate を用意する。

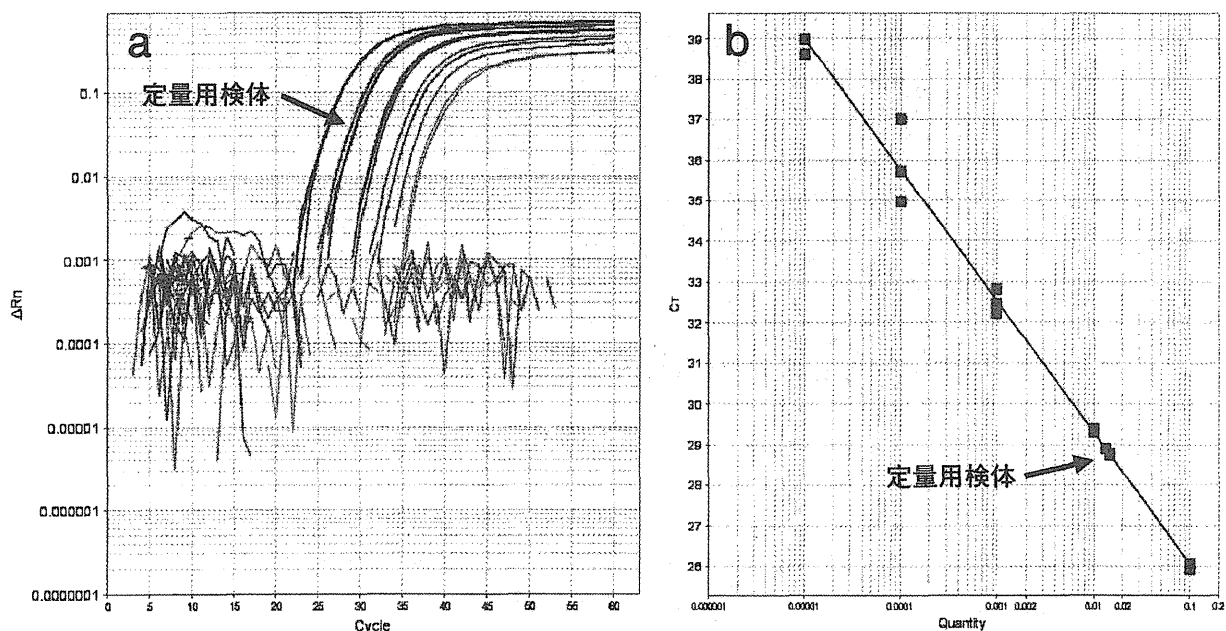


図3 Ig/TCR 遺伝子再構成を標的とした RQ-PCR, 増幅曲線(a)と検量線(b)  
(五十嵐 隆・他編, 2009<sup>9)</sup>より改変)

EuroMRD

RQ-PCR

- 各 DNA 10  $\mu$ L, 各 ASO プライマー 0.25  $\mu$ L, 各 TaqMan0.5 プローブ 0.5  $\mu$ L, TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems 社) 12.5  $\mu$ L を混合し, サーマルサイクラー (Step one Plus, Applied Biosystems 社など) で増幅後, 解析を行う。
- なお PCR の条件は 50°C 2 分, 95°C 10 分, 95°C 15 秒後 60°C 1 分を 50 サイクルで行っている<sup>10)</sup>。
- BFM グループでは MRD 解析の専門機関である EuroMRD において, リンパ系腫瘍の MRD の精度管理や技術開発とともに RQ-PCR の標準化が進められ, ガイドライン<sup>11)</sup>の作成によって多施設間におけるデータ解釈の統一を図っている。
- これは MRD 定量における RQ-PCR の Experimental set up, quantitative range と sensitivity の定義, フォローアップ検体における MRD 陽性と陰性の定義, フォローアップ検体における MRD 定量が詳細に記載され, 筆者らもこのガイドラインに基づいてデータの解釈を行っている。
- また, データ解釈の注意点として, 同じ RQ-PCR でもキメラ遺伝子などにおける RT-PCR と Ig/TCR 遺伝子などのゲノム DNA を用いた PCR とでは, MRD レベルの単位が異なるため注意を要する。
- RQ-PCR では段階希釈したスタンダードサンプルの増幅を基準として, 目的の検体の定量値を求めているが, 前者はこれに標的遺伝子を組み込んだプラスミド DNA などの既知量のサンプルを用い, 検体の定量値をコピー数であらわす (copy/ $\mu$ gRNA)。
- これに対して後者は, 未知量の初発時あるいは再発時の DNA を使うため, 定量値は初診時と比較した 10 の乗数で表現される ( $\times 10^{-N}$ )。
- MRD レベルは初発時との比較で評価されるため, Ig/TCR 遺伝子などの場合は定量結果をそのまま減衰の割合として捉えることができる。

## 文献

- 1) Yokota S et al. : Use of polymerase chain reactions to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia patients. *Blood* 77 : 331-339, 1991.
- 2) Grunewald K et al. : Molecular genetic analysis of DNA obtained from fixed, air dried or paraffin embedded sources. *Ann. Hematol* 62 : 108-114, 1991.
- 3) Pongers-Willemsse M J et al. : Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL1 deletions as PCR targets : report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION : investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 13 : 110-118, 1999.
- 4) Beishuizen A et al. : Heterogeneity in junctional regions of immunoglobulin kappa deleting element rearrangements in B cell leukemias : a new molecular target for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 11 : 2200-2207, 1997.
- 5) Seriu T et al. : Improved detection of minimal residual leukemia through modifications of polymerase chain reaction analysis based on clonospecific T cell receptor junctions. *Leukemia* 9 : 316-320, 1995.
- 6) van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M et al. : Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinants in suspect lymphoproliferations : report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17 : 2257-2317, 2003.
- 7) Langerak AW, Szczepanski T, Ban der Burg M et al. : Heteroduplex PCR analysis of rearranged T cell receptor genes for clonality assessment in suspect T cell proliferations. *Leukemia* 11 : 2192-2199, 1997.
- 8) 五十嵐 隆, 菊地 陽・編 : 小児科臨床ピクシス 10 小児白血病診療. 中山書店, 2009, p25-26.
- 9) Heid CA, Stevens J, Livak KJ et al. : Real-time quantitative PCR. *Genome Res* 6 : 986-994, 1996.
- 10) van der Velden VH et al. : MRD detection in acute lymphoblastic leukemia patients using Ig/TCR gene rearrangements as targets for real-time qPCR. *Methods Mol Biol* 538 : 115-150, 2009.
- 11) van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A et al. : analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements : guideline for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 21 : 604-611, 2007.

# 5

## フローサイトメトリーによるMRD測定

### 1. 検体の採取、運搬、保存

#### 1-1. 検体採取

- B-precursor ALL ● 一般的には骨髓液を用いた解析が基本である。とりわけB-precursor ALL では残存芽球の末梢血中への出現レベルが低く、骨髓での解析は必須である。
- T-ALL ● T-ALL では、骨髓と末梢血の間には MRD (minimal residual disease) 出現レベルに差がないとの報告もあり、末梢血を用いた解析で代用され得る可能性がある<sup>1)</sup>。
- I-BFM Study ● その他、末梢血を用いた解析は、International Berlin-Frankfurt-Münster (I-BFM) Study においては day 8 末梢血による PGR/PPR 判定にも利用されている。
- 検体の採取時期はおのこの治療プロトコルに合致したポイントを設定することが望ましく、通常は発症時、寛解導入療法中、寛解導入療法終了後、強化療法終了後などに解析が行なわれている。
- MRD ● ただし、それぞれの time point で定量される MRD の検出レベルは、おのこの治療プロトコルの強度に完全に依存するため、MRD 定量を risk adopted therapy へ応用するためには、分子学的 MRD 同様に MRD の検出レベルと臨床予後に関する基礎的データの事前収集が不可欠である。
- 以下、St. Jude 小児病院の Campana らと<sup>1-3)</sup>、I-BFM の Doworzak ら<sup>4-6)</sup>によって報告されている採取ポイントを例として示す。
- St. Jude (TT XIII) : Onset, day 19, end of induction, week 14, week 32  
BFM (AIEOP-BFM-ALL 2000) : Onset, day 15, day 33, day 52, day 78 (骨髓)  
Onset, day 8, day 15, day 22, day 33, day 52 (末梢血)
- 検体は、ヘパリン加骨髓もしくは末梢血を採取する。相対的比率のみでなく絶対数を定量するためには採取された骨髓・末梢血の有核細胞数を測定しておく必要がある<sup>6)</sup>。
- ただ、絶対数測定の臨床的意義は明らかではなく、通常は相対的比率が用いられている。



## 1-2. 検体の運搬

クール便

- 他施設共同研究で MRD 評価を行う場合、検査センターへ検体を搬送する必要がある。通常は常温(18~20℃)で送付するが、宅配便を用いた検体送付の際には、夏季における搬送中の高温環境が問題となることがあり、クール便の利用もやむをえない。
- 低温での検体運搬による細胞表面抗原の発現の変化についての検討は少ないが、多くの抗原においては軽微である場合が多いと考えられている。
- 採取からサンプル調製までの時間は 24 時間以内が望ましいが、36~48 時間でも多くの場合は解析可能である。

## 1-3. 検体の保存

- 解析は、基本的には新鮮検体を用いて行なわれるため、凍結保存された検体による MRD の測定は報告されていない。しかし保存状態がよい場合は、初発時のゲート設定に限っては使用できることがある。

## 2. 試料の調整方法

免疫学的 MRD

- 免疫学的 MRD を利用する治療研究グループからの試料調整についての詳細な報告はなく、したがって、統一された手法は存在していない。そのためおのおのの解析方法は各施設によって異なっているのが現状である。

St. Jude 小児病院  
I-BFM グループ

- サンプル調整の手法は、抗体の反応性に直接影響を与えるため、同じ CD 抗原をターゲットにしても、必ずしも同様の結果が得られるとは限らない。サンプル調整は St. Jude 小児病院では、あらかじめ比重遠心法によって分離された単核球を用いているが、I-BFM のグループでは、骨髓・末梢血ともに全血法を用いた調整法を用いていたことがある。

全血法

- MRD を相対的頻度として解析する場合には、どちらの方法でも、最終的な意義においては大した相違はないが、MRD の絶対頻度を解析に用いる場合には、全血法による解析が必須である。全血法による解析では、溶血試薬の使用が必須であるが、溶血試薬の種類は解析結果に影響を与え得るため、異なる調整方法を用いた結果の比較には、十分な注意が必要と考えられる。
- また、St. Jude 小児病院のグループでは、細胞表面抗原以外にもいくつかの細胞内抗原をも MRD 解析パネルに加えている<sup>2)</sup>ため(②-2-3 参照, p16)、細胞内抗原の染色も必要となる。
- 細胞内抗原を用いた免疫学的 MRD 解析は、細胞固定・浸透化試薬による細胞破壊、抗原性や蛍光発色の変化が生じるため、細胞表面抗原との結果の比較には注意が必要(②-2-3 参照, p16)である。そのため St. Jude 小児病院では、自家調製された細胞固定・浸透化試薬を用いることで FSC-SSC dot plot パターンに対する影響が少なくされているが、慎重なゲート設定と試薬選択を行えば、市販の細胞質内染色試薬も使用可能である。
- 細胞質内抗原の検出には、細胞表面抗原以上に抗体クローンの選択が重要である。

表 1 MRD-monoclonal antibody panels for ALL

St. Jude CRH <i>B-precursor</i>				I-BFM <i>B-precursor</i>			
CD58	CD10	CD34	CD19	CD20	CD10	CD34	CD19
CD38	CD10	CD34	CD19	CD58	CD10	CD34	CD19
CD45	CD10	CD34	CD19	CD10	CD34	CD45	CD19
CD22	CD10	CD34	CD19	CD10	CD11a	CD45	CD19
CD21	CD10	CD34	CD19	CD10	CD38	CD45	CD19
CD13	CD10	CD34	CD19	CD10+20	CD38	CD34	CD19
CD33	CD10	CD34	CD19	CD15	CD34	CD45	CD19
CD15	CD10	CD34	CD19	CD65	CD34	CD45	CD19
CD65	CD10	CD34	CD19	<i>T-lineage</i>			
CD66c	CD10	CD34	CD19	CD99	CD7	sCD3	CD5
IgM	CD10	CD34	CD19	CD99	CD7	sCD3	cCD3
7.1	CD10	CD34	CD19	TdT	CD7	sCD3	cCD3
TdT	CD10	CD34	CD19				
cμ	CD10	CD34	CD19				
<i>T-lineage</i>							
TdT	CD5	cCD3	CD19+33+DR				
CD34	CD5	cCD3	CD19+33+DR				

- サンプルチューブごとに必要な細胞数は MRD の解析レベルによって異なるが、一般的には  $1\sim 5 \times 10^6$ /tube での調整により  $10^{-4}$  レベルでの検出が可能である。
- 反応させる抗体量は、蛍光発色に影響を与えるため、抗体使用量は事前に十分なタイトレーションを用いて決定されるべきである。
- 以下、St. Jude 小児病院における検体調整の概略を示す。
  - ① 比重遠心法による単核球分離・再浮遊
  - ② primary panel を用いた解析抗原の決定
  - ③  $10^6$ /tube でのサンプル分注
  - ④ IgG を用いた Fc blocking
  - ⑤ 細胞表面抗原に対する抗体との反応
  - ⑥ 洗浄・パラホルムアルデヒド液による再浮遊・解析(細胞表面抗原解析の場合)  
洗浄・細胞固定・浸透化
  - ⑦ 細胞質内抗原に対する抗体との反応
  - ⑧ 洗浄・パラホルムアルデヒド液による再浮遊・解析(細胞質内抗原解析の場合)

St. Jude 小児病院の  
検体調整

### 3. 抗体パネルと定量の実際

- St. Jude 小児病院<sup>2)</sup>と I-BFM における解析パネル<sup>6)</sup>を示す(表 1)。いずれの場合も 4 カラー解析を用いており、triple-backbone と target antigen という組み合わせが基本である。
- Target antigen には aberrant phenotype (CD66c など)も存在するが、多くは over or under expression phenotype (CD58, CD38, CD45 など)が主体である。
- 近年は、FCM 機器の進歩により 6 カラー・8 カラーといった解析カラー数を増やしたパネルが提唱されてきているが、解析手法の基本は同様である。これまで正常細胞ゲートとの分離が十分得られなかった症例で、より良好な分離が得られることが期待される。また、T-ALL における治療中の TdT 陰性化といったフォロー

aberrant pheno-  
type

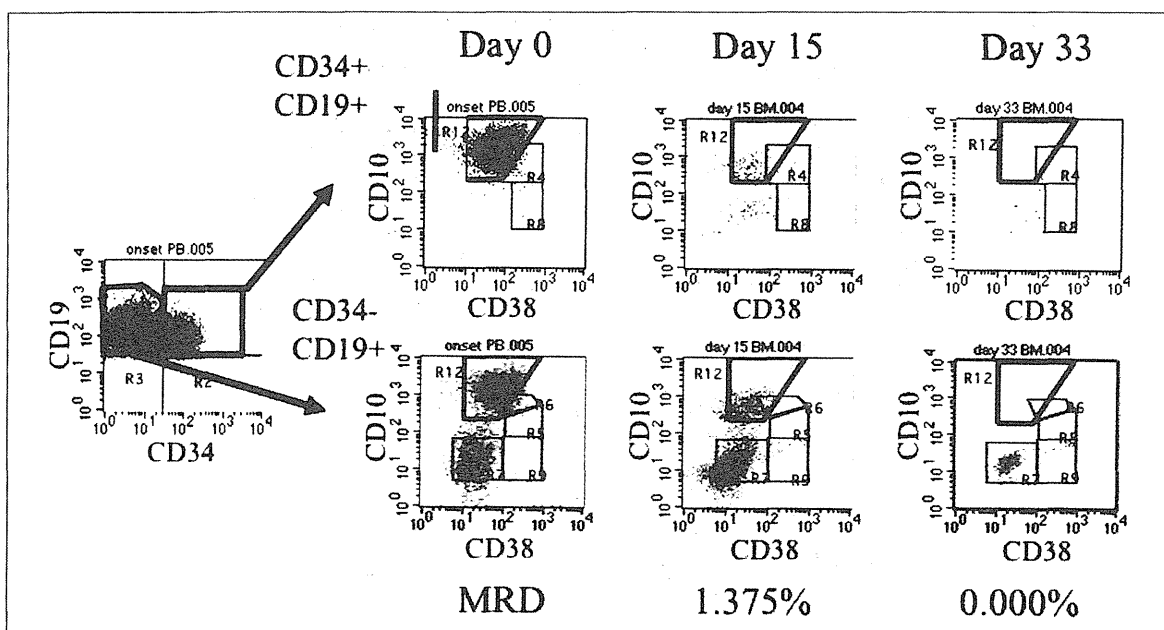


図 1 MRD monitoring with flowcytometric analysis

immunophenotypic shift

中の immunophenotypic shift にも対応できる可能性も期待される。

- 実際に解析・定量を行うには、原則として、まず初発時検体を用いての MRD target gate の設定が必要である。しかしながら、解析結果が蓄積されることでパターン分析が可能となり、初発時の解析なくしてもある程度の解析は可能になる。
  - フォローアップサンプルでの MRD target gate 中に存在する abnormal population をカウントすることで、MRD の定量が行なわれる。図 1 に解析を行なったサンプルとその結果を示す。
- フローサイトメトリー
- フローサイトメトリーによる MRD 解析は、その迅速性・サンプル調整の簡便性とは裏腹に、解析は複雑でありけっして容易ではない。多くのサンプル解析による経験が解析には必要となる。
  - 主たる原因の一つとして、フローサイトメーターそのものが相対的解析機器であることがあげられる。蛍光発色の検出には当然レーザー光による励起が必要であるが、レーザー光軸のずれやレーザーの劣化、フローセルへの蛋白付着などに伴い、おのおののチャンネルの蛍光強度には差違が生じてくる。すなわち日常におけるフローサイトメーターの維持管理や quality check のほか、正常骨髄やフォローアップ検体を用いた normal B-cell progenitor の表面抗原発現強度のチェックが必要となってくる。
  - 第二の原因として、抗体の選択による抗原への結合性・蛍光発色性が異なることであり、また抗体の劣化に伴う蛍光発色の減弱(とりわけ PerCP は顕著である)も大きな問題となってくる。
  - また、第三の原因として、immunophenotypic shift の存在があげられる。狭義の immunophenotypic shift は、再発時の表現形が初発時に異なることであり、フローサイトメトリーによる MRD 解析の重要な問題の一つである。そのため CD34 陽性・陰性両方の Blast を解析する必要性が考えられている。
  - また近年、治療に伴う leukemic blast の表面抗原発現性の変化も報告されている。実際、発症時 CD45 陰性の ALL において、ステロイド治療中に blast の CD45 発現

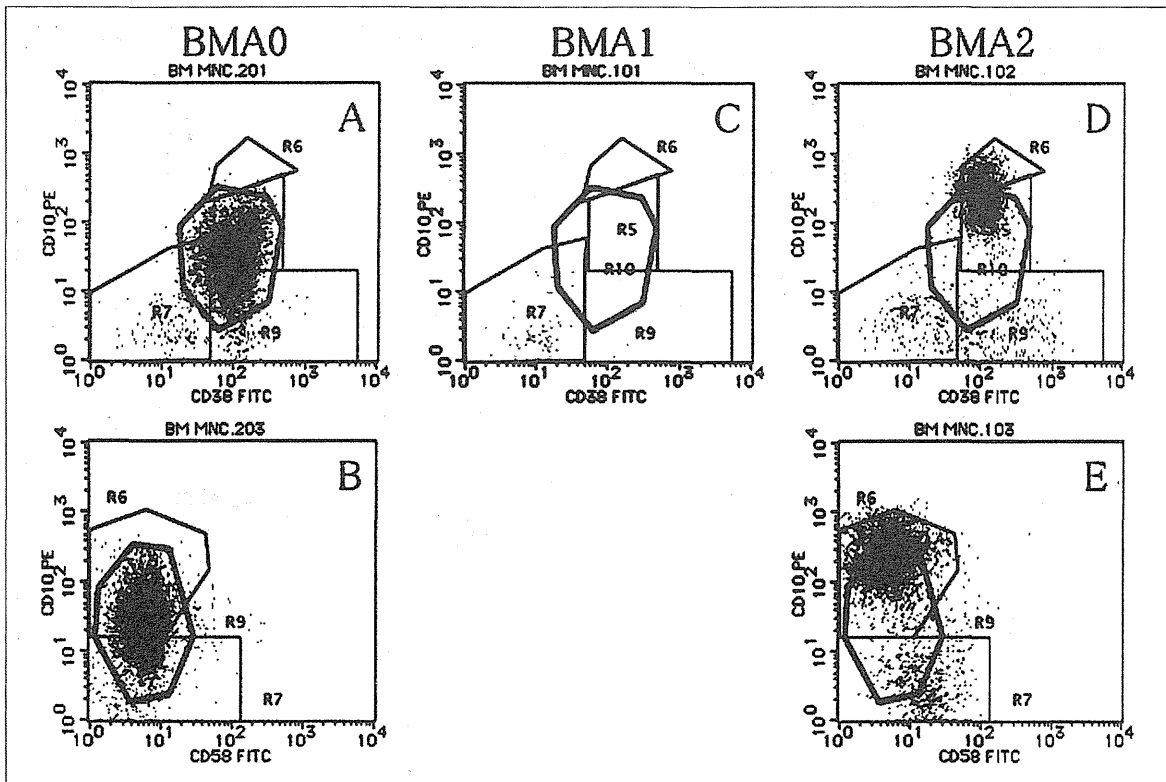


図2 【症例1】生後6カ月、t(9;11)陽性の乳児 ALL

upregulation

が upregulation されることはしばしば経験する<sup>4)</sup>。

- また、細胞表面抗原と細胞質内抗原の双方について同一のカットオフラインを使用する際には、細胞質内染色のための細胞固定・浸透化に伴って生じた細胞破壊による loss を補正する必要があるが生じる。

免疫学的 MRD

- わが国においては、免疫学的 MRD を用いて治療のリスク変更を行う試みは、いまだ実現されておらず、ようやく再発 ALL 研究(ALL-R08)で PCR based MRD とのデータ比較が進行中である。

ALL-R08 研究

- ALL-R08 研究においては、St. Jude 小児病院方式による MRD 測定が行われているが、わが国における多施設共同研究に適合したカスタマイズが実施されており、より少ない一次パネルの採用と、溶血試薬を用いた全血法でのサンプル調製の一部併用(発症時のみ)が行われている。

#### 4. 診断・測定困難例の実際とその解説

aberrant phenotype immunophenotypic shift

- FCM-MRD における診断困難例には、主に二つの原因が考えられる。まず、診断時に十分な aberrant phenotype を示さない場合【症例1】、およびフォローアップ中の immunophenotypic shift【症例2】である。

##### 4-1. 【症例1】生後6カ月の男児、t(9;11)陽性の乳児 ALL

- 症例は MLL-AF9 キメラ・t(9;11)(p22;q23)陽性を示した生後6カ月の乳児

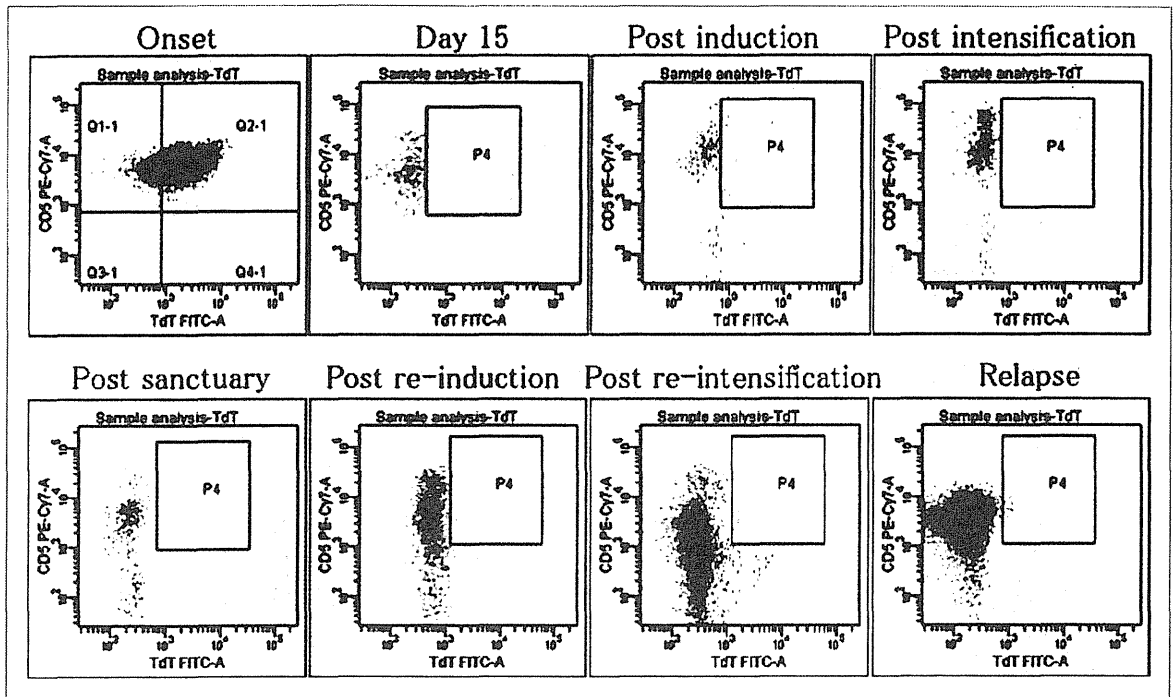


図 3 【症例 2】 14 歳男児, T-ALL

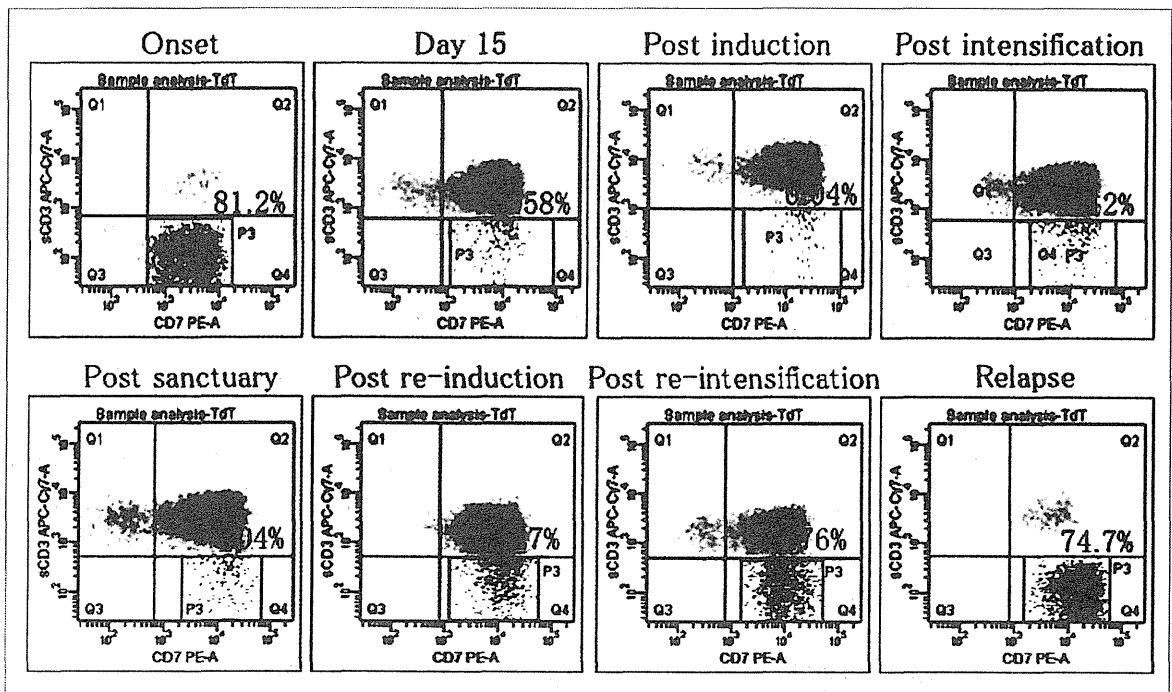


図 4 【症例 2】 14 歳, 男児, T-ALL

ALL. 表面マーカーでは CD19 陽性, CD10 陰性, CD34 陰性で, MRD スクリーニングにて CD38(図 2A)や CD58(図 2B)で示すように腫瘍細胞のゲート(赤線太枠)は正常細胞のゲート(黒線枠)と重なっており, 明らかな aberrant phenotype を認めなかった.

- 他にも CD45, 7.1, CD133 などでも明らかな aberrant phenotype が認められなかった.
- Day15 の MRD 検査(BMA1, 図 2C)では, MRD の細胞集団は正常前駆細胞とと

もに消失しており，MRDは陰性と判断することが可能であった。

- しかし，寛解導入療法終了後(BMA2, 図2D,E)の骨髄では，正常B前駆細胞の出現により判定不能となった。

#### ■ 4-2. 【症例2】14歳の男児，T-ALL

T-ALL

- 症例はT-ALLの14歳の男児。発症時の表面マーカーではCD2, cCD3, CD5, CD7, CD8, TdTが陽性であった。本例は6カラー法によるT-ALL MRDのパイロット症例としてフォローを行った。図3に以前より行われてきた4カラー法によるドットプロットを示す。
- ドットプロット上の細胞はcCD3陽性HLA-DR陰性細胞がTdT(X軸)とCD5(Y軸)に展開されている。
- 発症時(Onset)には芽球はCD5陽性TdT陽性の表現型を示したが，治療開始後は一貫してTdT陽性の細胞分画は認めず，従来の4カラー法ではMRDは陰性と判定されていた。
- 本例はこれら4カラー以外にsCD3やCD7を同時染色する6カラー法であったため，cCD3陽性HLA-DR陰性細胞を同様にCD7(X軸)とsCD3(Y軸)をプロットし直す(図4)ことで，cCD3陽性かつsCD3陰性という通常の末梢血や骨髄で出現することのない細胞集団が持続的に検出され，post re-intensificationでは明らかに再発を疑わせる集団となり，最終的に発症後およそ7カ月で再発を確認した(relapse)。
- 再発時のマーカー所見はCD2, cCD3, CD5, CD7, CD8陽性であったが，やはりTdTは陰性で，TdTが陰性化する(immunophenotypic shift)ことで従来の診断法では検出が不可能であった症例であった。

post re-intensification

relapse

immunophenotypic shift

#### 文 献

- 1) 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(7) : 2399-2402, 2002.
- 2) Coustan-Smith E et al. : Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 96(8) : 2691-2696, 2000.
- 3) Coustan-Smith E et al. : Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100(1) : 52-58, 2002.
- 4) Gaipa G et al. : Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL : implications for minimal residual disease detection. *Leukemia* 19(1) : 49-56, 2005.
- 5) Dworzak MN et al. : CD99 expression in T-lineage ALL : implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia* 18(4) : 703-708, 2004.
- 6) Dworzak MN et al. : Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 99(6) : 1952-1958, 2002.

厚生労働科学研究費補助金

がん臨床研究事業

「小児造血器腫瘍に対する標準治療と診断確立のための研究」

平成 24 年度

平成 25 年 5 月発行

発行者：堀部敬三（研究代表者）

事務局：独立行政法人国立病院機構

名古屋医療センター臨床研究センター内

〒460-0001 名古屋市中区三の丸 4 丁目 1 番 1 号

TEL:052-951-1111 FAX:052-963-5503

印刷所：サカイ印刷株式会社

