

第1章4節 遺伝子検査

1. 遺伝子検査とは

1) 遺伝子検査の目的

遺伝子検査は、細菌やウイルスなどの病原体が持っている遺伝子を検出したり、遺伝病やがんの原因となる遺伝子に生じた異常の有無を調べるもので、診断、治療、予後の判定に用いられます。

2) 従来の検査との違い

生物のあらゆる生命現象は遺伝子の発現（タンパク質を作ること）によって調節されています。遺伝子の発現発現とは、細胞のDNAの情報がメッセンジャー（mRNA）に写し取られ（転写）、その情報が読み取られてタンパク質ができる（翻訳）ということです。従来から行われている生化学検査、免疫血清検査といった検査は、最終的に作られるタンパク質、つまり、酵素、ホルモン、抗体などを対象として検査を行っています。一方、遺伝子検査は、ヒトを対象とした場合には、タンパク質ができるまでの過程で生じる異常をDNA、RNAレベルで検査を行います。また、対象が細菌やウイルスなどの感染症の診断の場合には、細菌やウイルスが持つ固有のDNA、RNAを検出することで検査が行われます。

3) 遺伝子検査が必要な場合

(1) 従来の検査法では診断がつかない場合

この例として、遺伝性疾患の原因遺伝子の同定、培養困難な病原微生物の同定（特にウイルス）、また、集団食中毒や院内感染における感染源や感染経路を特定する検査をあげることができます。

(2) 病型の診断、治療効果のモニタリング

この例として、転座型白血病遺伝子の病型診断と化学療法後のモニタリング、また、C型肝炎ウイルスに対するインターフェロンの治療効果の判定および予後判定などの検査をあげることができます。

(3) 短時間で検査結果を必要とする場合

この例として、培養に長期間を要する抗酸菌（結核菌など）、レジオネラ菌感染症の診断などで行なわれる検査をあげることができます。特に抗酸菌検査では、結核菌か非結核菌かの診断にこれまで一ヶ月余りかかっていたのが、たった一日で判定が可能となりました。

(4) 過去にさかのぼって診断を確かめたい場合。

この例として、病理検査のパラフィン包埋切片や凍結生検材料から過去にさかのぼって確認検査や追加検査が可能です。

2. 遺伝子検査

1) 検査の分類

遺伝子検査には、正常な人が本来持っていない病原微生物や腫瘍化した細胞の遺伝子を検出する検査と、本来持っている遺伝子で、その変異や多型を解析する検査の2種類に分類されます。一方、検査の目的から感染症の遺伝子診断、先天異常の遺伝子診断、造血器腫瘍の遺伝子診断、固形腫瘍の遺伝子診断、遺伝子の多型解析などと分類することもあります。

2) 遺伝子検査の対象はDNAとRNA

遺伝子検査の対象としてDNAを用いた検査とRNAを用いた検査があり、検査目的によって表1のように使い分けます。核酸の種類により、検体の処理法や抽出法が異なるので、検査を受ける際は検査の対象がDNAなのかRNAなのかを良く知っておく必要があります。

表1 DNA検査とRNA検査

検査の対象 検査の目的	DNA 検査	RNA 検査
感染症	DNA ウイルスや細菌の検出	RNA ウイルスの検出
遺伝病	遺伝子変異の同定	タンパク質翻訳領域の遺伝子解析
白血病・リンパ腫	腫瘍細胞のモノクローナルな増殖の検出	遺伝子組換えによる、腫瘍細胞融合遺伝子の検出
固形腫瘍	遺伝子変異部位の同定	がん遺伝子の活性化測定
遺伝子の多型	多型部位の同定	まれ

3. 遺伝子検査の実際

1) 遺伝子検査の流れ

検査の概要を図1に示しました。まず、臨床検体から検査目的によりDNAあるいはRNAを選択して抽出します。続いて、核酸が十分量ある場合はそのまま、核酸が十分量ない場合にはPCR¹（ピーシーアール：詳細は後述）などにより核酸を増幅し、制限酵素処理後あるいはそのまま電気泳動を行い、ゲルを染色して標的の核酸を検出します。また、蛍光あるいは化学物質で標識し標的の遺伝子と特異的に結合する“プローブ”と呼ばれる短いDNA断片と反応させて検出します。これをハイブリダイゼーションと言います。

このように遺伝子検査は、検査の目的により方法が異なりますが、ほとんどの検査は、対象となる検体からの「核酸の抽出-核酸の増幅、-核酸の検出」という3つの工程で行われます。

¹ PCR

polymerase chain reaction の略。熱に強いDNA合成酵素を用いて、標的遺伝子の一部を連鎖反応的に増幅させる方法（詳細は後出の図5を参照）

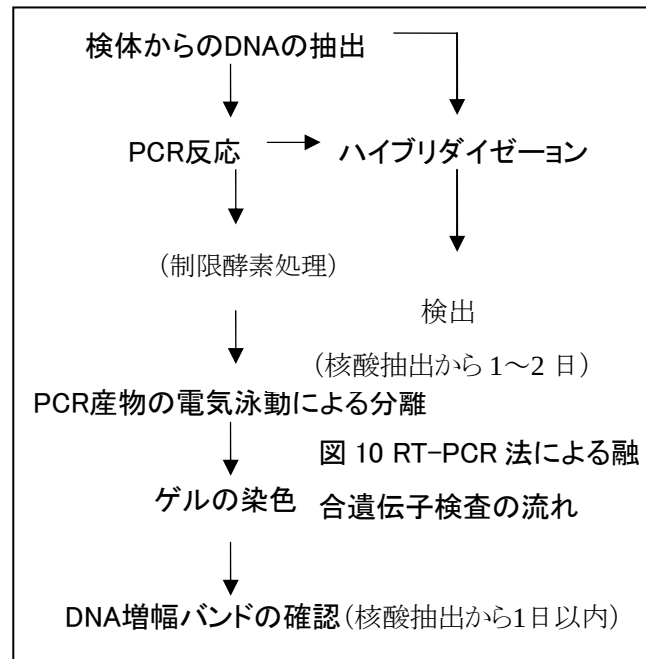


図 1 一般的な遺伝子検査の進め方

表 2 検体の採取及び保存法

検体	採取法	保存法
血液、血漿 骨髓、細胞	EDTA採血管 または クエン酸Na入りの採血管	遠心分離後、長期保存の場合には、 -80°C 以下で 保存し、短期保存の場合には -20°C 以下で保存
血清	プレーンの採血管	同上
胸水、腹水 胃液、髄液	無菌容器に無菌的に採取	遠心により細胞を集め、長期保存の場合には、 -80°C 以下で保存し、 短期保存の場合には -20°C 以下で保存
組織片	無菌的に採取し 必要分を細切し滅菌生食 水を垂らす(乾燥防止)	小分けにして、基本的には長期保存の場合には、 -80°C 以下で保存し、 短期保存の場合には -20°C 以下で保存

2) 検体の取り扱い

代表的な検体の採取法および保存法を表2に示しました。

3) 核酸の抽出

細胞の核からDNAまたはRNAを取り出すことを核酸の抽出と呼んでいます。遺伝子検査では、核酸の抽出方法が検査結果に大きく影響します。提出される検体も多様なので、材料に応じた抽出法を選択することが大切です。

(1) DNAの抽出

DNAの抽出法には、フェノール/クロロホルムを用いた方法、チオシアン酸グアニジンを用いた方法、核酸を特異的に吸着させる粒子を用いた方法があります。DNAの抽出は、細胞の溶解、除蛋白、精製といった工程からなります。ここではフェノール/クロロホルム法について簡単な工程を図2に示しました。

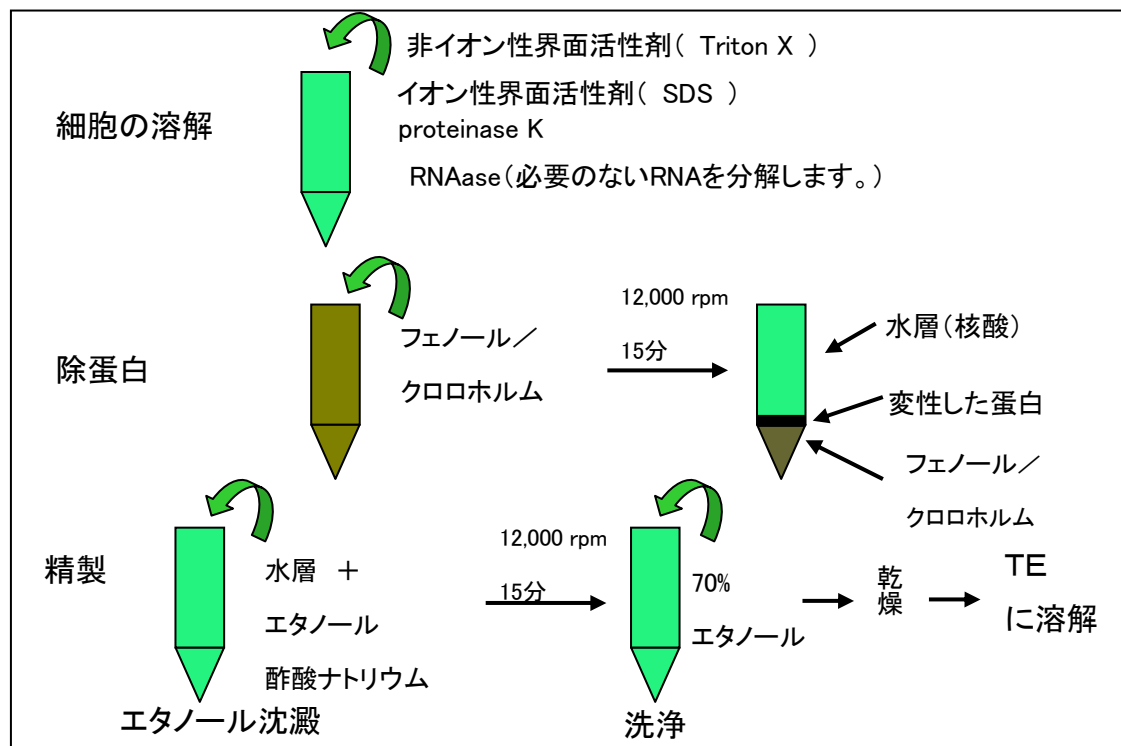


図 2 DNA抽出操作の流れ（フェノール/クロロホルム法）

(2) RNAの抽出

RNAの抽出法は、酸性下でチオシアン酸グアニジンとフェノール/クロロホルムで抽出する方法 (AGPC法)、核酸を特異的に吸着させる粒子を用いた方法などがありますが、AGPC法の操作の流れを図3に示しました。DNAの場合とほぼ同様ですが、RNAの抽出で一番大切なことは新鮮な材料を用いることです。採取後、直ちに抽出するか蛋白変性剤、あるいは-80℃以下で凍結させておきます。

- ① RNAは手や唾液に多く含まれるRNA分解酵素 (RNAase) の影響を受けやすいので、マスクや手袋をはめて操作を行います。はじめに、チオシアン酸グアニジンなどで細胞膜を可溶化させると同時に、RNAaseを失活させます (細胞の溶解)。
- ② 除蛋白の操作はDNAの時と同じですが、RNAの場合には酸性フェノールを用いると、遠心後に3層に分かれ、DNAは酸性下ではフェノール層に溶け込み、上層にはRNAだけが含まれます。
- ③ 次に、DNAと同様な方法でRNAの精製を行ないます。乾燥後はRNAaseを失活したジエチルカーボネート (DEPC) 水に溶解します。

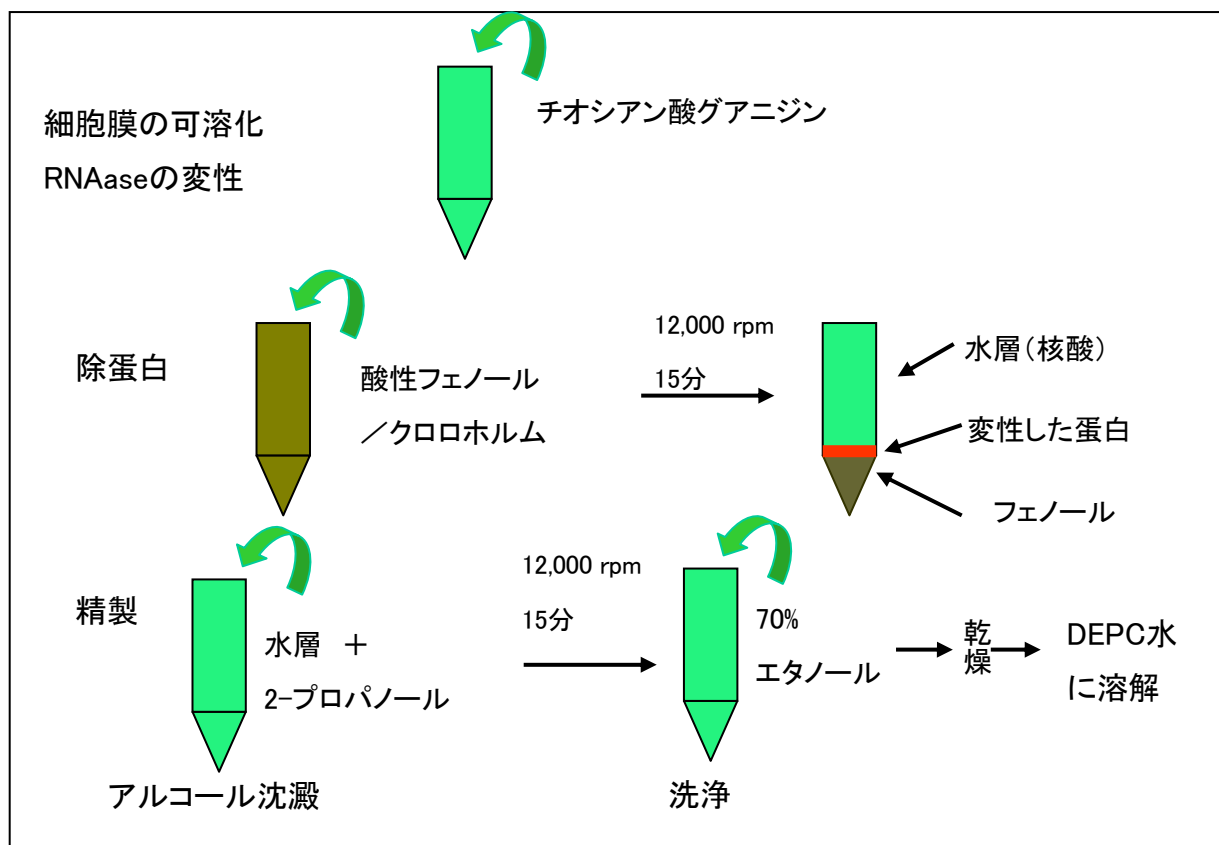


図3 RNA抽出の操作の流れ

4) 核酸の増幅

現在、遺伝子を増幅する技術にはさまざまな方法がありますが、ここでは臨床検査で最もよく用いられているPCR反応を取り上げます。

(1) PCR反応

ヒトの1細胞のDNAは伸ばすと長さが約2m位になりますが、PCR反応では全てのDNAを増幅するのではなく、目的とする遺伝子のある特定の領域だけを増幅します。そして最大の特徴は、ごく微量のDNAからでも増幅することができることです。理論的にはDNA鎖が1対（2本）あれば増幅は可能で、1回のPCR反応によって約10～100万倍以上に増幅することが可能です。この事からも分かるようにPCR反応は非常に高感度で優れた方法です。

(2) PCR反応の原理

およその反応原理を図4に示しました。反応は増幅したいDNA（鋳型という）とDNA合成酵素である耐熱性のDNAポリメラーゼ、DNA合成の起点となるプライマー、合成に使われる4種類のデオキシヌクレオチド三リン酸(dATP, dTTP, dGTP, dCTP)を1つの反応チューブに入れ、サーマルサイクラーと呼ばれる遺伝子増幅装置でDNAの増幅を行います。PCR反応は3つのステップからなります。まず、94℃位に加熱し2本鎖DNAを1本鎖に解離させます（熱変性：ステップ1）。次に50～60℃に温度を下げ、合成の起点となるプライマーを1本鎖DNAに結合させ（アニーリング：ステップ2）、72℃でDNAポリメラーゼによってDNAの合成を行います

(伸長：ステップ3)。このような一連の反応をサイクルと言い、1サイクル反応させると1対(2本)のDNAは2対(4本)となり2倍に増幅されます。PCR反応では、2対になったDNAが次のサイクルでは再び鋳型となるので、理論的にはnサイクル反応を行うと2のn乗 (2^n) 本となり、n 初めのDNAのおよ数十万倍程度にまでDNAを増幅することができます。

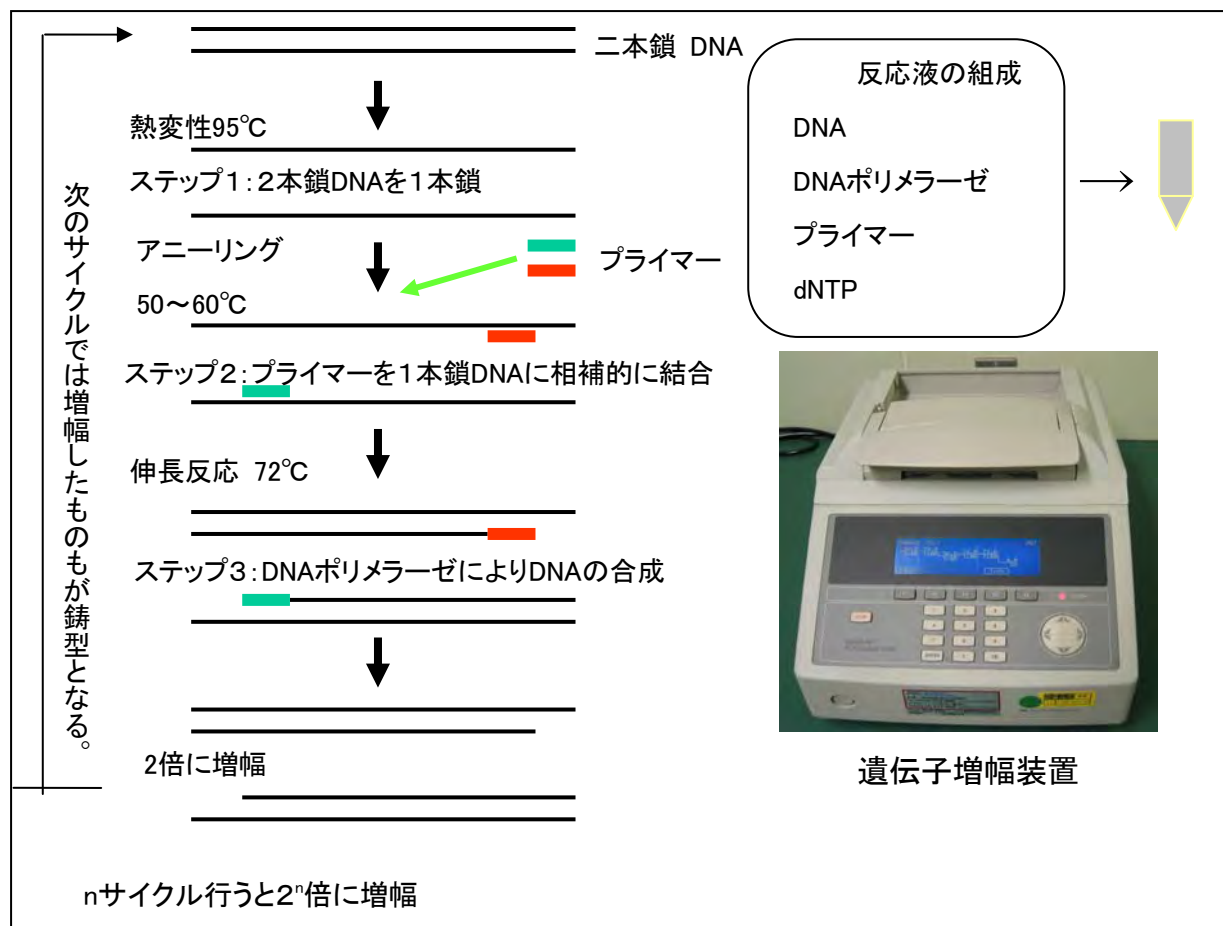


図4 PCR反応の原理

(3) RT(reverse transcription)反応

日本語で逆転写反応といいます。PCR反応はDNAを増幅するもので、RNAはPCR反応で増幅できません。そこで、RNAからPCRの鋳型となるDNA(cDNAと言う)に変換し、それからPCR反応で増幅させます。このようなRNAからcDNAを合成する反応をRT反応と呼びます。

5) 核酸の検出 (同定)

核酸の検出法には、PCRによる増幅産物を電気泳動で検出する方法のほかに、ハイブリダイゼーション法など多種多様な方法がありますが、ここでは、遺伝子検査の中で比較的頻繁に用いられるアガロース電気泳動による検出と、ハイブリダイゼーション法による検出について説明します。

(1) アガロース電気泳動法

核酸検出のもっとも簡便で一般的な方法です。DNA分子はリン酸基を持つため、水溶液中で

負に荷電しています。よって、DNAを電場に置くと陽極に向かって動きます。そして、ゲルの中を移動するDNAは分子量の小さいものほど早く移動しますので、分子量（分子の大きさ）の違いによりDNAを分離する事ができます。電気泳動によってゲル上に分離されたDNAを、エチジウムブロマイドで染色すると、エチジウムブロマイドは2本鎖DNAと結合しますので、紫外線照射装置をゲルに当てるとDNAが橙色の蛍光を発色し、DNAの存在を確認する事ができます(図5)。

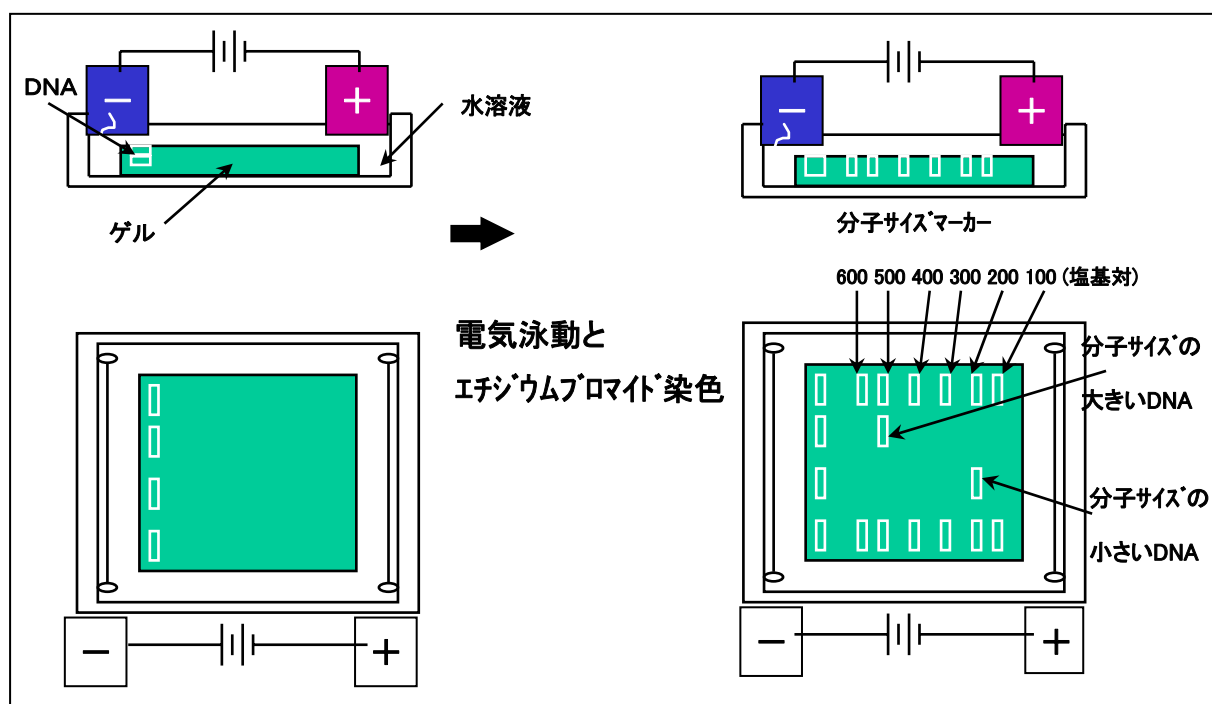


図5 アガロース電気泳動法の原理

(2) ハイブリダイゼーション法

2本鎖DNAの塩基同士が相補的(A-T, G-C)に結合し、かつ、その結合が可逆的である性質を利用しています。まず、検体の2本鎖DNAを熱またはアルカリで1本鎖にします。これを変性といいます。ここに、検出したい遺伝子配列に相補的な核酸配列で、蛍光などで標識した短い合成DNA（これをプローブと呼びます）を加えます。検体中に検出したい遺伝子が存在すると、相補性のあるDNA同士は結合してDNA-DNAのハイブリッド(雑種)の分子対を形成します。これをDNAハイブリダイゼーションと言います。ハイブリダイゼーションをしたDNA断片は蛍光を発するので、標的の遺伝子を検出することができます(図6)。

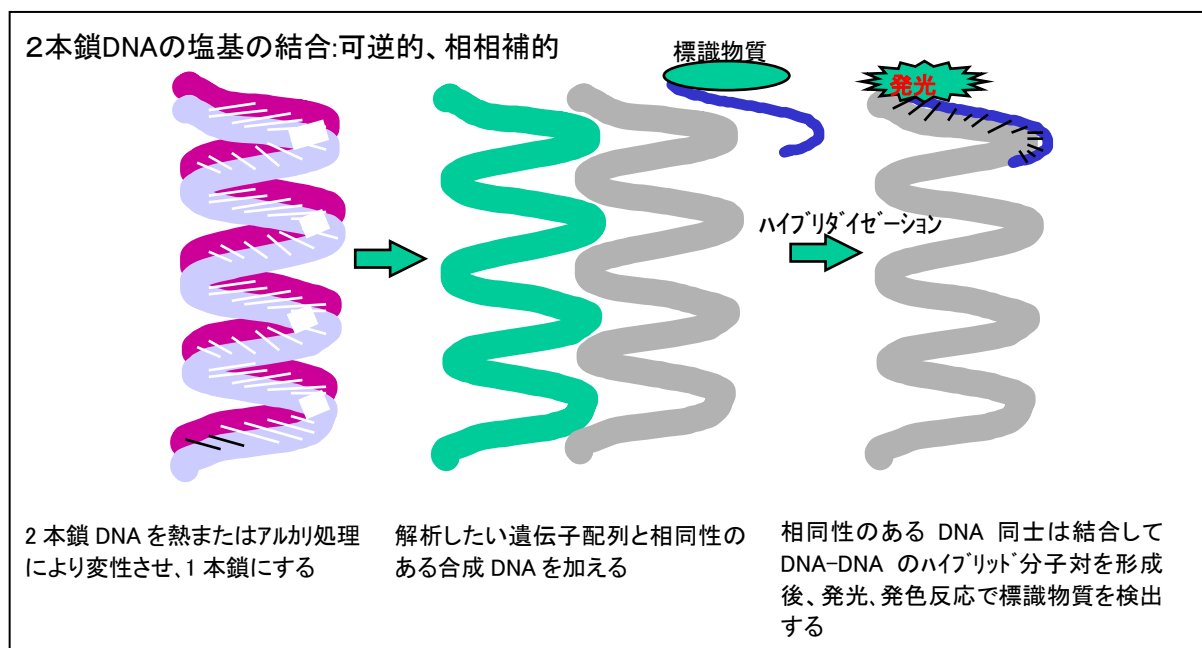


図6 ハイブリダイゼーションを用いた検出の原理

(3) 核酸の定量

① 定量PCR法

定量PCR法は、PCRの初期の増幅速度から検体中にあるウイルス遺伝子の量(ウイルス量)や、腫瘍などで特徴的に活性化するメッセンジャーRNA(mRNA)の量を測定し、感染の強さ、病態の進展度をリアルタイムに解析する方法です。病気の人や薬剤投与中の人があるような遺伝子(あるいはタンパク質)が活性化されているか調べるために、ルーチン検査や研究で広く用いられている方法です。

② 定量PCR法の原理

まず、既知量のDNAを標準液としてPCRを行います。これをもとに、増幅が指数関数的に起こる領域で一定の増幅量に達するPCRのサイクル数

(threshold cycle ; Ct 値)を横軸に、DNA標準液の量を縦軸にプロットし、検量線を作成します。検体についても、同じ条件下で反応を行い、Ct 値を求めます。この値とあらかじめ作成した検量線から、サンプル中の目的のDNAまたはRNA量を測定します(図7)。

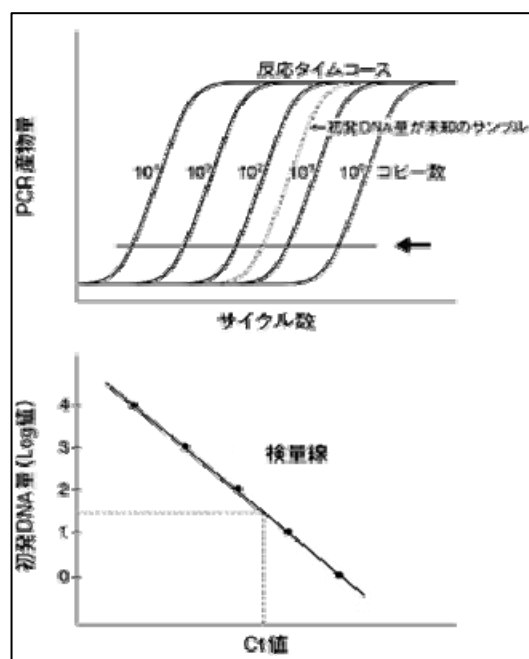


図7 定量PCRの原理

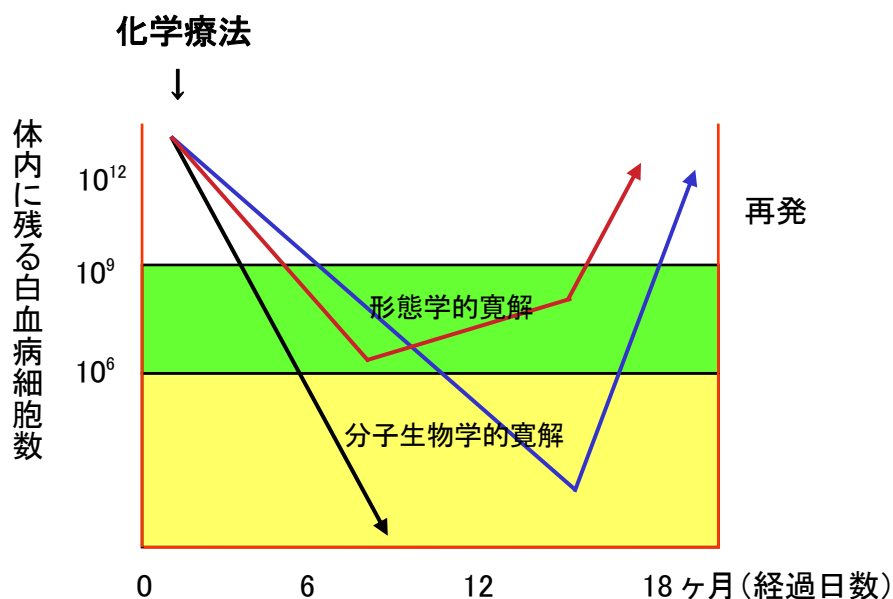


図8 白血病治療後の体内に残る白血病細胞数の推移

4. 造血器腫瘍の遺伝子検査

1) はじめに

近年、化学療法の進歩や造血幹細胞移植の導入により、白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍の生命予後は飛躍的に改善しています。白血病の初発時には体内には $10^{10} \sim 10^{12}$ 個の白血病細胞が存在し、化学療法によって顕微鏡下に白血病細胞が認められない状態（形態学的完全寛解:CR）になっても、なお 10^9 個程度の白血病細胞は残っていると考えられ、これを微小残存病変(MRD)と呼んでいます（図8）。化学療法により完治する場合がありますが、残存している白血病細胞はやがて増殖し、再発してしまう場合があります。このようなことから、化学療法の効果の判定や再発の早期発見には、体内に残っている白血病細胞を正確にモニタリングする事が重要で、そのためには検出感度の高い検出法が不可欠となります。

2) 検査の現状

造血器腫瘍に対する遺伝子検査は、転座型白血病で生じる融合遺伝子(後述)を検出する検査と(表3)、悪性リンパ腫でみられる免疫グロブリン(Ig)遺伝子やT細胞受容体(TCR)遺伝子の再構成(特定の細胞が、単一的に腫瘍化して増幅)を検出する検査が一般的に行なわれています。これらの検査は、白血病・悪性リンパ腫における確定診断、治療反応性の評価、治療後のモニタリングに有用とされています。現在ではRT-PCR法、PCR法、サザンブロット法などの方法を用いた検査が行われていますが、中でもPCR法を用いた遺伝子検査は、操作が簡単で検査に要する時間も短く、検出感度や特異性も高く、さらに検体量も少量で済むという利点があるため、臨床検査では比較的広く行われています。

表 3 主な白血病融合遺伝子検査

検査項目	染色体異常	対象
<i>DEK/CAN</i> 融合遺伝子	t(6;9) (p23;q34)	AML(M2,M4)
<i>AML1/MTG8(ETO)</i> 融合遺伝子	t(8;21) (q22;q22)	AML(M2)
<i>PML/RARα</i> 融合遺伝子	t(15;17)(q22;q21)	AML(M3)
<i>CBFβ/MYH11</i> 融合遺伝子	inv(16) (p13q22)	AML(M4)
Major- <i>BCR/ABL</i> 融合遺伝子	t(9;22) (q34.1;q11.2)	CML
Minor <i>BCR/ABL</i> 融合遺伝子	t(9;22) (q34.1;q11.2)	ALL
<i>MLL/LTG9</i> 融合遺伝子	t(9;11) (q22;q23)	AML(M5a)

AML : acute myelogenous leukemia CML : chronic myelogenous leukemia

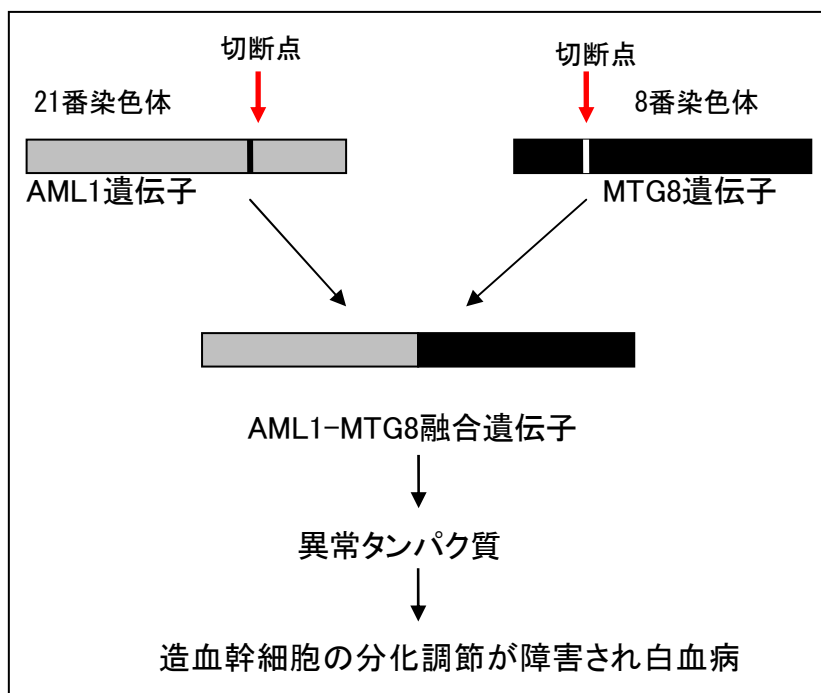
ALL : acute lymphoid leukemia

表 3 に現在実施されている白血病融合遺伝子の検査項目を示します。中でも、慢性骨髄性白血病で生じる *BCR/ABL* 融合遺伝子、急性骨髄性白血病（AML : M2）で生じる *AML1/MTG8(ETO)* 融合遺伝子、急性前骨髄球性白血病（AML : M3）で生じる *PML-RAR α* 融合遺伝子検査が多く実施されています。

(3) 融合遺伝子の検出

①融合遺伝子とは

白血病の特徴としては、それぞれの白血病に特異的な染色体の転座を生じることが知られています。この転座によって 2 種の異なる遺伝子に再構成が生じます。例えば、急性骨髄性白血病では第 8 番染色体と第 21 番染色体の転座により 21 番染色体に位置する *AML1* 遺伝子と 8 番に位置する *MTG8(ETO)* 遺伝子が融合して、*AML1/MTG8(ETO)* という融合遺伝子が生じます。その結果として、融合遺伝子で作る異常なタンパク質により造血幹細胞の分化調節が障害されて白血病が起こると考えられています。そして、この融合遺伝子は腫瘍細胞に特徴的であるため、この遺伝子の存在を検出することにより病型やそのMRDの存在を確認することができます。PCR法を用いた融合遺伝子の検出では、正常細胞 $10^4 \sim 10^5$ 個中に 1 個の白血病細胞を検出する事が可能です（図 9）。

図9 急性骨髄性白血病でみられる *AML1/MTG8(ETO)* 融合遺伝子

② 融合遺伝子検査の流れ (RT-PCR 法)

骨髄液、末梢血液に溶血剤を加え赤血球を溶血させ白血球のみを分離します。次に白血球より mRNA を抽出し、この RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成します。この cDNA を、目的とする融合遺伝子の特異的に増幅させるプライマーを用いて PCR 反応を行います。PCR 産物をアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで DNA を染色後、紫外線を照射し融合遺伝子の確認を行います (図10)。

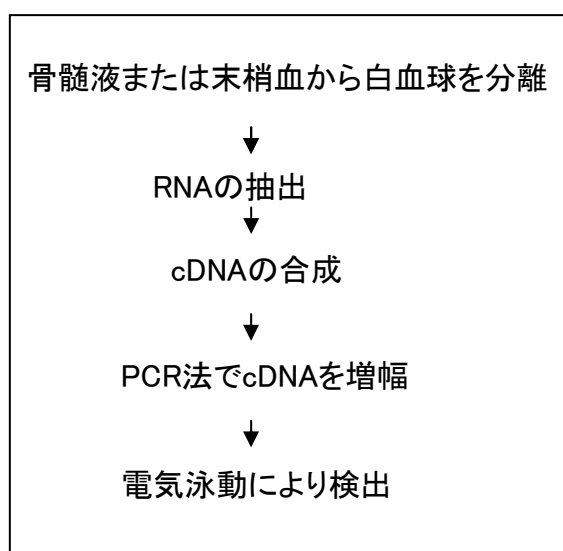


図10 RT-PCR 法による融合遺伝子検査の流れ

③ 結果の解釈

結果の判定は、目的の大きさの所にバンドが確認できれば陽性と判定します。この時、必ず陽性コントロールと陰性コントロールを同時に測定する事で精度管理を行います（図11）。

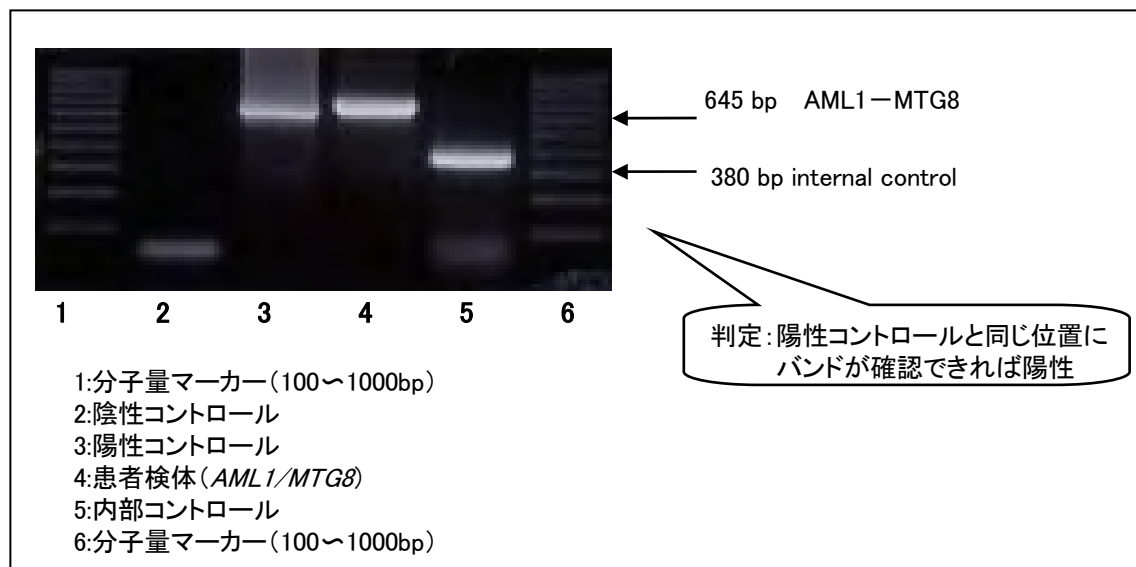


図11 RT-PCR法によるAML1/MTG8(ETO)融合遺伝子検査の結果の判定

5. 検査の問題点と今後の展望

今後、ヒトゲノム解析をはじめとする分子遺伝学の進歩により、得られた遺伝子情報が益々医療の場で生かされるのは間違いありません。そして、感染症や造血器腫瘍に対する遺伝子検査に加え、がん、糖尿病や高血圧などの生活習慣病における多因子遺伝病などに対する遺伝子検査の発展が期待されます。しかし、このような遺伝子検査には、種々の倫理的問題も伴うので慎重な取り組みが必要となっています。

第2章 1節 急性白血病

1.白血病とは

白血病とは、赤血球、白血球や血小板を産生する骨髄で、白血球の増殖・分化・成熟に障害がおこり、正常の白血球に成熟できない腫瘍性の幼若細胞（白血病細胞ともいいます）が異常に増殖する疾患です。早期に診断して治療を開始しないと、白血病細胞は無制限に増殖して正常な造血の場を占拠し、正常な血球（赤血球、白血球、血小板など）の産生が障害され、貧血、白血球減少、血小板減少が起こります。これにより、全身倦怠感、感染、発熱、出血傾向などの症状が出現します。白血病は大きく急性白血病と慢性白血病に分けられますが、急性肝炎が治癒せず慢性肝炎に移行するのとは異なり、それぞれ個別の病気と考えられています。

発生の原因は徐々に解明されつつありますが、まだ不明な点も多くあります。今のところわかっていることは、多くの白血病で染色体に欠失や転座などの異常が認められているということと放射線被爆やベンゼンなど一部の化学物質などが発症のリスクファクターになるということです。その他にウイルス感染（EBV, HHV8, HTLV-1 など）が原因の場合もあります。造血幹細胞からさまざまな細胞へと分化・成熟していく過程（図1）でがん化が起こるため、白血病にはたくさんの種類があります。まず、病状の経過から「急性白血病」と「慢性白血病」に分けられます。急性白血病は、血液細胞の成熟過程から未熟な骨髄系細胞ががん化して増える「急性骨髄性白血病(AML)」と未熟なリンパ系細胞ががん化して増える「急性リンパ性白血病(ALL)」に分けられます。

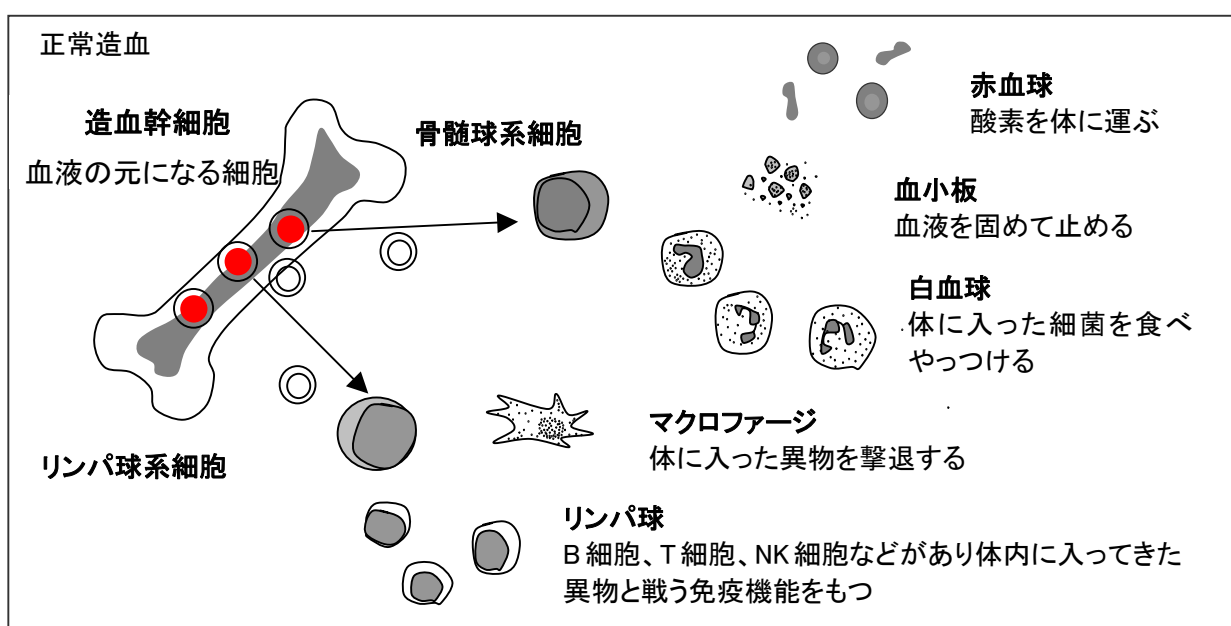


図1 造血のしくみ

2.白血病の検査

1) 理学的検査

患者さんが受ける一般的な検査に加えて、特に貧血の診察を行います。白血病の患者さんには、眼瞼結膜など粘膜の貧血様変化、出血斑、手足の浮腫、肝臓、脾臓、リンパ節の腫大がしばしば見られることがあります。

2) 血液検査

血液の状態を示す血液検査は、末梢血や骨髄中の白血球の数や異常な細胞が占める割合から異常を推測します(表1)。

表1 末梢血の参考値

項 目		参考値
赤血球数		男性 410 万～550 万/mm ³ 女性 380 万～480 万/mm ³
白血球数		3000～9000/mm ³
白血球分類	好中球	33～71%
	好酸球	0～6%
	好塩基球	0～2%
	リンパ球	15～53%
	単球	0～13%
血小板		16 万～36 万/mm ³



3) 骨髄検査

胸骨または骨盤部分の骨に針を刺して骨髄血を採取します。骨髄細胞の標本は染色後顕微鏡下で形態を分類します。

4) 細胞表面マーカー検査

各細胞の表面には、細胞の系統と成長段階によって特有の糖タンパク質があります。それに対応する抗体で染色後フローサイトメトリーにて検査します。

5) 髄液検査

白血病細胞が中枢神経に浸潤しているか否かをみる検査です。

6) 染色体検査

採取した末梢血液あるいは骨髄細胞を培養し特殊な染色を行った後、顕微鏡で観察することで細胞分裂期の染色体異常が明らかになります(図2)。

7) 遺伝子検査

白血病細胞中の DNA や RNA を用いて PCR 法や FISH 法(図3)で検査します。PCR 法は、目的とする病気の遺伝子を増幅さ

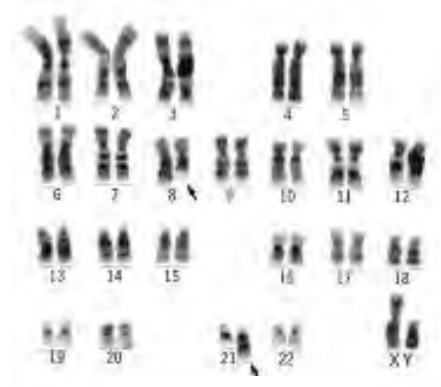
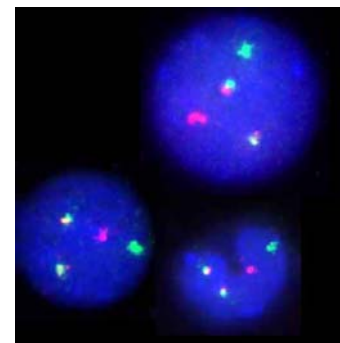


図2 染色体核型

図3 FISH 法
BCR/ABL DF プローブ

せ検出します。そのために、治療効果の確認や微小残存病変のモニタリングに適しています。FISH 法は白血病細胞の遺伝子異常が分かっている場合や、異性間移植など標的とする遺伝子がある場合に有用です。

8) 画像検査

白血病の患者さんには、肝臓・脾臓・リンパ節に腫大が見られたり、腫瘤を形成することがあります。そのために、CT（コンピュータ断層撮像法）や超音波検査で調べます。

3. 急性白血病とは

急性白血病は、骨髄の中でつくられる腫瘍性の未熟な血液細胞（芽球ともいう）が、がん化して成長せず無制限に増殖する病気です。そのため、正常な血球（赤血球・白血球・血小板など）が作られず、さまざまな症状が現れてきます。赤血球が減ることを貧血と言います。貧血が起これると全身に酸素を運ぶ働きが悪くなり息切れや動悸、めまい、頭痛が起こります。白血球が減ると体を細菌やウイルスから守る免疫の働きが弱くなり、発熱やさまざまな感染による症状がでます。血小板が減ると血液を止める働きが弱くなり出血しやすくなります。皮膚が赤や紫色になる紫斑や歯肉が腫れたり出血したりすることがあります。女性の場合、生理の出血が止まらないこともあります。



4. 急性白血病の病型分類

骨髄中から血液を取り出してきてスライドガラスの上に広げ、それをギムザ染色したものに細胞形態や細胞表面マーカーの解析を加えたFAB分類¹（表1）や特異的染色体・遺伝子変異を分類法に組み込んだWHO分類（表2）などがあります。

5. 染色体異常の種類

近年、がんの分子標的療法の開発研究が進み染色体遺伝子検査が重要な役割を持ってきました。急性骨髄性白血病や急性リンパ性白血病についても特定の染色体異常が関係することがわかってきました（表3）。染色体遺伝子変異群から急性骨髄性白血病の治療予後も推測しています（表4）。

6. 治療方法

白血病は他の多くのがんと異なり、病巣を外科的に取り除くことができません。そのため、いくつかの抗がん剤を組み合わせる化学療法が中心となります。しかし、がん細胞はもともと自分の細胞から発生しているため、強力な化学療法を行うとがん細胞だけでなく正常な骨髄細胞も殺してしまい、一時的に造血能力が失われます。そのため、

¹ FAB（French-American-British）分類

フランス、アメリカ、イギリスの血液学者が集まって白血病の血液を調べ形態的な特徴をもとに分類した方法です。急性骨髄性白血病は8つに急性リンパ性白血病は3つに分けられており、治療方針を決めるうえで大切な分類です。

無菌室使用や輸血などの支持療法が必要となります。

表 1 急性白血病の FAB 分類

急性骨髄性白血病 (AML)	
M0	最未分化型
M1	未分化型
M2	分化型
M3 (APL)	前骨髄球性
M4	骨髄単球性
M5	単球性
M6	赤白血病
M7	巨核芽球性
急性リンパ性白血病 (ALL)	
L1	小型リンパ芽球主体
L2	核小体明瞭で不均一不正な大型芽球
L3	核小体明瞭で不均一な大型の芽球・ 好塩基性胞体で空胞が目立つ

表 2 急性白血病の WHO 分類

急性骨髄性白血病 (AML)
1)特異的染色体相互転座を有する AML a)染色体 8;21 転座または融合遺伝子 AML1/CBF- α /ETO を有する AML b)染色体 15;17 転座または融合遺伝子 PML/RAR α を有する AML c)染色体 16 番逆位または 16;16 転座または融合遺伝子CBF β /MYH11 を有する骨髄中異常好酸球増多を伴う AML d)染色体 11q23 異常を有する AML 2)多血球系異形成を伴う AML 3)治療に関する AML と骨髄異形成症候群 4)上記以外の AML
急性リンパ性白血病 (ALL)
1)前駆 B 細胞性急性白血病 特異的染色体異常を有する病型 a)染色体 9;22 転座型または融合遺伝子 BCR/ABL を有する ALL b)11q23 異常型または遺伝子 MLL 変異を有する ALL c)染色体 1;19 転座型または融合遺伝子 E2A/PBX1 を有する ALL d)染色体 12;21 転座型または融合遺伝子 TEL/AML1 を有する ALL 2)前駆細胞性急性リンパ性白血病 3)バーキット型急性リンパ性白血病

(WHO 分類から改変一部抜粋)

表 3 急性白血病の染色体異常

急性骨髄性白血病		急性リンパ性白血病	
AML--M1	t(3;v)*	前駆 B-ALL	t(12;21)
--M2	t(8;21)		t(9;22)
--M3	t(15;17)		t(4;11)
--M4	inv(16)		t(1;19)
--M5a	t(11;v)		t(11;14)
--M6	del(20)	B - ALL	t(8;14)
その他			t(8;22)
t(9;22)	M1, biphentypic	T - ALL	t or del 14q11
t(6;9)	M2, M4		t(11;14)
+8	M1, M4, M5		

*v=他の多種の染色体 B=B細胞性 T=T細胞性

表 4 急性骨髄性白血病の予後

予後	染色体異常	再構成遺伝子	CR 率 (%)	5 年生存率 (%)
良好	t(8;21)	<i>AML1/ETO</i>	98	69
	t(15;17)	<i>PML/RAR α</i>	87	63
	inv(16)	<i>CBFβ/MYH11</i>	88	61
中等度	del(9q)	<i>MLL</i>	100	60
	+22		91	59
	+8		84	48
	+21		80	47
	t(11q23)		87	45
	normal		88	42
	del(7q)		75	23
不良	Comolex	<i>VL1, MDS1</i>	7	21
	del(3q) del(5q)		63	12
	-7		57	11
	-5		54	10
			42	4

CR=完全寛解

(Grimwade,D.et al.:1998 より改変)

6. 治療方法

白血病は他の多くのがんと異なり、病巣を外科的に取り除くことができません。そのため、いくつかの抗がん剤を組み合わせる化学療法が中心となります。しかし、がん細胞はもともと自分の細胞から発生しているため、強力な化学療法を行うとがん細胞だけでなく正常な骨髄細胞も殺してしまい、一時的に造血能力が失われます。そのため、無菌室使用や輸血などの支持療法が必要となります。

急性前骨髄球性白血病 (M3) では、特別にt(15;17)という染色体転座をもち細胞の分化が抑制されているため、活性型ビタミンAであるレチノイン酸 (all-trans retinoic

acid : ATRA) を投与する分化誘導療法が有効です。また、t(9;22) という染色体転座 (フィラデルフィア (Ph) 染色体陽性ともいう) をもつ白血病では、変異を起こしている部分で作る蛋白の酵素活性を選択的に阻害する分子標的治療薬²イマチニブが有用です。

最も強力な治療法としては、造血幹細胞移植療法があげられます。これは、大量の放射線や抗がん剤を用いた治療の後に、提供者 (ドナー) の骨髓、末梢血、臍帯血由来の造血幹細胞を移植することで造血を速やかに回復させるとともに白血病細胞をドナーのリンパ球の免疫学的な作用で根治を目指す治療法です。



7. 検査の問題点と今後の展望

急性白血病は乳児から高齢者まで広く発生しますが、進展が早いため早期に診断し、いち早く治療に望むことが大切です。そのために新 WHO 分類においても必須の検査となった染色体遺伝子の結果は、迅速かつ正確に報告されなければなりません。

ひと昔前までは、不治の病と言われた白血病も近年の目覚ましい診断、治療法の進歩により生存率は向上しています。そして、遺伝子の異常から発生したがん細胞だけを選択的に抑えようとする分子標的療法もすでに臨床の場に登場しています。近い将来、より患者さんへの負担が軽減された治療法の開発、研究が期待されます。



²分子標的治療薬

がんの原因となっている分子、あるいはがん細胞を増殖させる分子に対して行う治療薬で標的分子の立体構造をコンピュータにより解析し開発されています。

第2章2節 慢性白血病

1. 慢性白血病とは

白血病とは、赤血球、白血球や血小板を産生する骨髄で、白血球の分化成熟に障害がおこり、正常の白血球にまで成熟できない幼若細胞（白血病細胞ともいいます）が異常に増殖する疾患です。早期に診断して治療を開始しないと、白血病細胞は無制限に増殖し、体内の肝臓や脾臓などの諸臓器に広がり（これを浸潤といいます）障害を起こすとともに、赤血球、白血球、血小板などの正常血球の産生が障害され、貧血、正常の白血球の減少、血小板減少が起こります。これによって、全身倦怠感、易感染性、発熱、出血傾向などの症状が出現します。

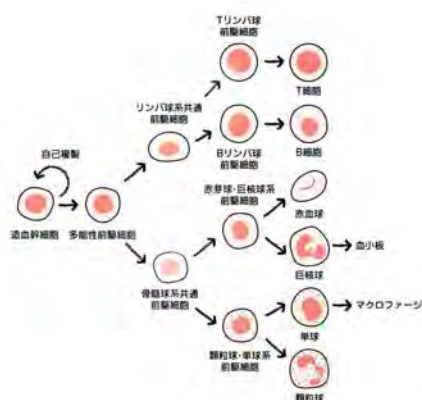
白血病は大きく慢性白血病と急性白血病に分けられますが、急性肝炎が治癒せず慢性肝炎に移行するのとは異なり、それぞれ別個の病気と考えられています。慢性白血病はさらに、骨髄系の細胞が増加する慢性骨髄性白血病と、リンパ球系の細胞が増加する慢性リンパ性白血病に分類されます。それぞれの英語の頭文字をとって、前者は CML、後者は CLL と略して呼ばれます。欧米では比較的 CLL が多く全白血病のうちの約 20～30% を占めるのに対して、我が国では CLL は全白血病の 2～3% と少なく、逆に CML が多い傾向にあります。

2. 慢性骨髄性白血病（CML）

慢性骨髄性白血病（CML）とは、多能性造血幹細胞¹の異常によって顆粒球系細胞²がクローン

¹多能性造血幹細胞

赤血球、白血球、血小板は、すべて骨髄で多能性幹細胞と呼ばれる細胞が分化・増殖して産生されます。白血病の治療などに用いられる骨髄移植は、正常の多能性造血幹細胞の移植にほかなりません。



²顆粒球系細胞

白血球のうち、好中球、好酸球、好塩基球をまとめて顆粒球系細胞と呼びます。好中球は体内に侵入した細菌などの異物を貪食して殺菌して生体を防御します。また、好酸球、好塩基球はアレルギー反応に関与しています。

性³の異常増殖を来す疾患です。年間発症率は人口 10 万人あたり約 1 人で男女差は明らかではありません。小児では少なく患者年齢の中央値は 50 歳位です。若年者 CML という疾患があり CML と類似していますが、独立した別個の疾患と考えられています。

1) 症状

貧血による全身倦怠感、易疲労感と、脾腫による腹部膨満感などの症状で発見されることが多く、稀に血小板減少などによる出血傾向が見られます。最近では、半数近くの患者が無症状で、検査で偶然に白血球増加を指摘され、精密検査で CML と診断される患者さんが増加しています。

2) 診察所見

身体所見としては脾腫が重要で、20 年位前までは進行して脾臓が腹腔内の 2/3 位を占める程大きくなってから CML と診断されることがあり、巨脾と呼ばれます (図 1)。しかし、最近では人間ドックなどで白血球増加が指摘され、早期に CML が発見されることが多くなったため、巨脾で診断がつくことはまれとなりました。

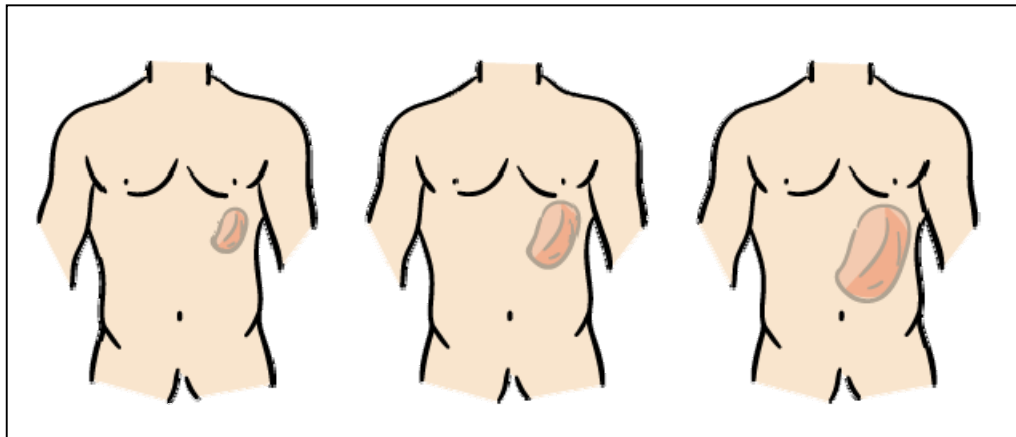


図 1 CML 患者でみられる脾腫および巨脾

3) 検査所見

CML では常に白血球は増加しており、進行すると数 10 万/ μ l (正常では 4,000~8,000/ μ l) にもおよぶことがあります。慢性期は白血球増加の主体は好中球で、通常では末梢血に出現しない後骨髄球、骨髄球や前骨髄球⁴も増加し、時には骨髄芽球⁴も末梢血に出現してきます (図 2)。好中球とともに顆粒球を構成する好酸球や好塩基球も増加します。増悪期あるいは急性転化期には骨髄芽球などの幼若細胞の増加が目立つようになります。

³ クローン性

クローンとは、遺伝的に単一の細胞の集団で、1 個の細胞の分裂によって増殖した集団がクローンと言うことになります。

⁴ 後骨髄球、骨髄球、前骨髄球、骨髄芽球

成熟好中球 (桿状核球、分葉核球) は、骨髄中で骨髄芽球→前骨髄球→骨髄球→後骨髄球→桿状核球→分葉核球の順に成熟し、桿状核球以降に末梢血に出現する。しかし、CML では図 2 のように通常みられない後骨髄球、骨髄球、前骨髄球、骨髄芽球などの幼若細胞が末梢血に出現する。

初期には著明ではありませんが、進行するとともに貧血があらわれてきます。血小板数は初期にはむしろ増加していることが多いのですが、進行とともにしだいに減少し、末期

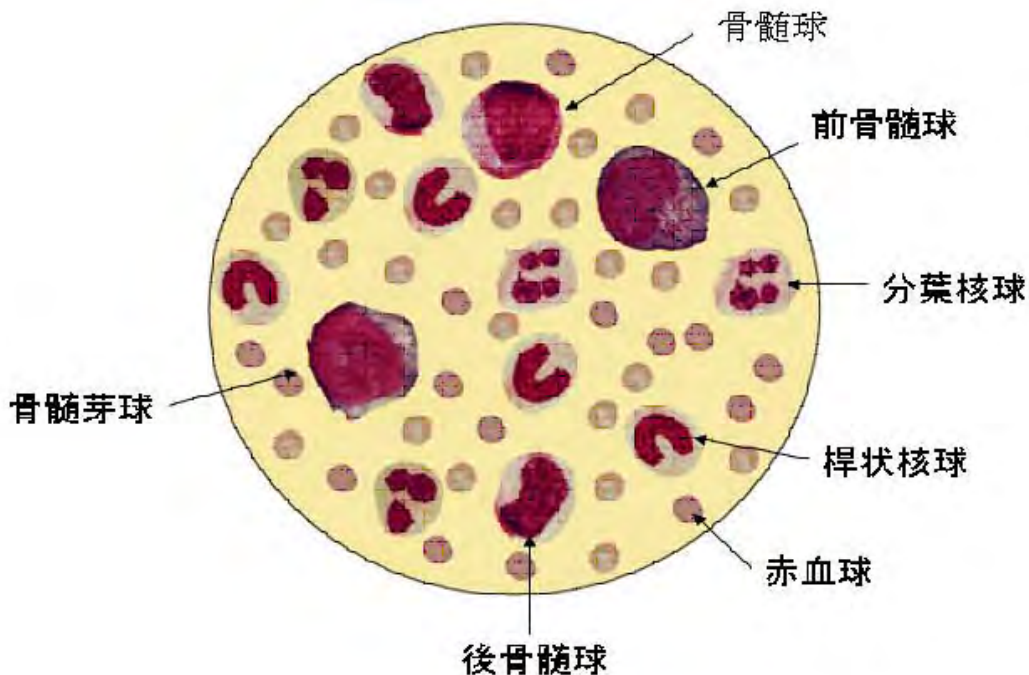


図2 CML患者の末梢血でみられる好中球系細胞の増加

になると血小板減少を呈します。診断のためには骨髄検査⁵が必要で、有核細胞が増加しており、特に好中球を中心とする顆粒球系細胞の増加が目立ちます。慢性期には比較的成熟した好中球の増加が主体なのに対して、急性転化期には骨髄芽球などの幼若細胞の増加が主体となることで、両者が鑑別されます。生化学的検査では、尿酸の高値、ビタミンB₁₂の高値などがみられます。末梢血を用いて好中球のもつアルカリホスファターゼ活性（NAP活性と呼びます）を検査すると、慢性期には正常に比べ低下しており、急性転化が迫ってくると高値をとるようになります。

末梢血や骨髄血を用いて染色体検査をすると、ほとんど（95%位）の患者でフィラデルフィア染色体（Ph 染色体）と呼ばれる異常な染色体が見つかります。また、遺伝子検査では Ph 染色体と関連する *BCR/ABL* 融合遺伝子が検出されます。この詳細については後述します。急性転化時には Ph 染色体に加えて、もう一つ Ph 染色体が出現する double Ph が出現したり、+8、i (17q)、+19、t (3 ; 21) (q26 ; q22) のような新たな染色体の異常が見られ、これを付加的染色体異常と呼びます。

⁵ 骨髄検査

末梢血液に異常がある場合、時に骨髄検査が必要になります。骨髄検査には骨髄吸引検査と骨髄生検検査とがあります。前者は胸骨ないし腸骨に針を穿刺し骨髄血液を吸引するもので、骨髄内に増加している細胞の詳細な構造を観察できるという利点があります。後者は、腸骨に少し太い針を穿刺し、骨の一部とともに骨髄組織を採取するもので、骨髄の構造など比較的広い範囲の観察に適しています。両者ともに局所麻酔下で、10～15 分くらいで安全に行われます。

4) 診断

好中球系の増加を主体とした白血球増加で CML が疑われ、NAP 活性の低下、骨髄検査での顆粒球系細胞の増加、Ph 染色体および *BCR/ABL* 融合遺伝子の検出で診断されます。

5) 治療

以前はブスルファンやハイドロキシウレアなどの抗白血病剤の投与によって治療されていましたが、3～4年後の急性転化を阻止したり遅らせたりすることは困難でした。一時期大きく腫大した脾臓を摘出する脾摘療法が行われましたが無効で、またインターフェロン療法の効果も限界がありました。しかし、最近積極的に骨髄移植⁶が行われるようになり、治癒も期待できるようになってきました。さらに、*BCR/ABL*融合遺伝子の存在の結果としておこるチロシンキナーゼ活性⁷の亢進を阻害する薬剤イマチニブ（グリベック）が開発され、これによる治癒の可能性も期待されています。

6) 予後

CML は、慢性期には症状も軽微であるため、外来通院による治療を続けながら日常生活を維持することが可能です。しかし、約3～4年後に発熱、種々の疼痛などの症状とともに、末梢血への幼若細胞の増加を伴う著明な白血球増加、貧血の進行、著明な血小板減少が出現し、これを急性転化と呼びます。骨髄検査では骨髄芽球などの幼若細胞が増加します。幼若細胞は多くが骨髄芽球ですが、時にリンパ芽球であったり、単芽球であったり多彩です。時にこれらの芽球が腫瘍を形成することもあります。染色体検査では Ph 染色体の他に付加的染色体異常が認められます。急性転化をおこすと、各種の抗白血病剤による強力な化学療法を行っても効果は限られているため、CML 治療の原則はできるだけ急性転化を起こさない、急性転化の時期を遅くすることにあるといえます。

3. フィラデルフィア染色体

フィラデルフィア染色体とは、9番と22番染色体の相互転座によって生じる異常染色体（図3）で、略して Ph 染色体と呼ばれます。Ph 染色体は、ほとんどの CML 患者および一部の急性リンパ性白血病（ALL）患者で認められます。

⁶ 骨髄移植

白血病や再生不良性貧血などの治療に用いられます。白血病では強い化学療法を行い、白血病細胞を消滅させた後、白血球の型である HLA のできるだけ合ったドナーから造血幹細胞を得て、患者に輸注します。体に入った幹細胞は患者の骨髄内の適当な場所に生着し増殖を始め、正常な赤血球、白血球、血小板が作られるようになります。ドナーから幹細胞を得る方法として、骨髄穿刺をして骨髄中の幹細胞を得る方法と、G-CSF の投与により末梢血液に出現した幹細胞を採取する方法、ならびに臍帯血から幹細胞を得る方法などがあります。

⁷ チロシンキナーゼ活性

ATP の γ-リン酸基が、蛋白の特定のチロシンのヒドロキシル基へ転移するのを触媒する酵素活性をチロシンキナーゼ活性と言い、細胞の増殖などに関わる情報伝達に関与しています。

1) Ph 染色体発見の歴史

1960 年に、米国フィラデルフィアのNowellとHungerfordは、2 例のCML患者で、通常では見られない微小の染色体を発見しました。次いで、同年エジンバラ学派のBaikieも、12 例のCML患者の血液を培養し、8 例に同様の微小染色体を認めました。そして、1961 年同じエジンバラ学派のToughは、CML患者 18 例全例に同様の異常染色体を認め、フィラデルフィア染色体（当時はPh¹染色体と略されました）と呼ぶことを提唱しました。

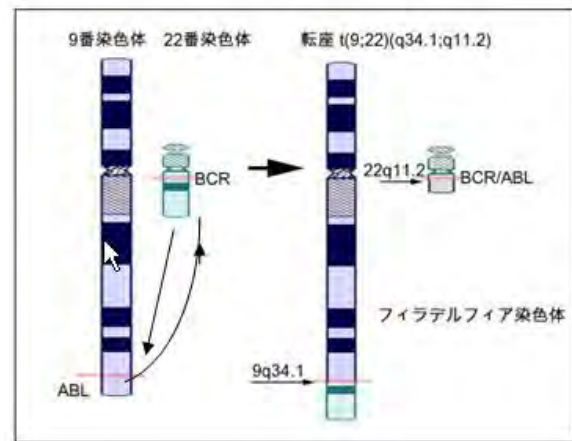


図3 フィラデルフィア染色体(Ph 染色体)

2) 染色体の分析

染色体分析法の進歩により、異常染色体の由来が明らかにされるようになり、1973 年にRowley はCML 患者のPh 染色体は、9 番染色体と22 番染色体が相互転座の結果生じたものであることを発見しました。この相互転座を現在はt (9 ; 22) と表記、さらに詳細な切断部位も明らかにになり、t (9 ; 22) (q34.1;q11.2) と表記されます。

3) 遺伝子の解析と治療の進歩

その後、分子生物学の進歩により、遺伝子の染色体上の位置が同定されるようになり、9 番染色体の切断部位にはABL 遺伝子、22 番染色体の切断部位にはBCR 遺伝子が存在することが明らかになりました。CML では、9 番と22 番染色体の相互転座により、通常は存在しないBCR/ABL 融合遺伝子が形成されます。この結果高いチロシンキナーゼ活性を持つBCR/ABL 蛋白が産生され、これがCML の発症に関わっていることが明らかになりました。このようにCML という病気にとって、以前、Ph 染色体は診断のマーカーに過ぎなかったのですが、現在では病気の発生原因に直接関わるものと考えられています。

さらに、BCR/ABL 融合遺伝子の形成の結果高まったチロシンキナーゼ活性を阻害する薬剤イマチニブ（商品名グリベック）がCML の治療に導入され、現在では目覚ましい効果をあげています。

4. 慢性リンパ性白血病（CLL）

成熟した一見正常に見えるリンパ球が異常に増殖する疾患です。リンパ球は、抗体を産生し液性免疫⁸を担当するB細胞と、細胞性免疫⁹を担当するT細胞、およびその他のリンパ球に分類されますが、多くのCLLはB細胞性で、特にことわりなくCLLといえばB細胞性CLL（B-CLL）を指

⁸液性免疫

抗体を産生して抗原を特異的に認識し排除する免疫機構で、体液性免疫とも呼ばれます。

⁹細胞性免疫

抗体を産生するのではなく、細胞が媒介する免疫反応を指し、ツベルクリン反応などはこれによるとされています

します。CLLは、50 歳以上の比較的高齢者に多く、患者の中央値は約 60 歳です。女性に比べ男性で 2 倍位多いとされています。

1) 症状

初期には無症状であることが多く、人間ドックなどによる検査でリンパ球増加を主体とする白血球増加により見つかることがほとんどです。進行すると貧血による全身倦怠感や易疲労感が出現します。

2) 診察所見

リンパ節腫脹を伴うことが多く、初期には頸部リンパ節腫脹のみで、進行すると全身のリンパ節腫脹を呈します (図 4)。

リンパ節は弾性硬で、可動性があり、通常自発痛、圧痛はありません。進行すると脾腫もあらわれますが、CML ほどの巨脾を呈することはありません。

3) 検査所見

ほとんどの患者は $1 \text{ 万}/\mu\text{l}$ 以上の白血球増加を呈しており、時に進行した例では数 $10 \text{ 万}/\mu\text{l}$ にもおよぶことがあります。主体は成熟したリンパ球で (図 5)、ほとんどは一見正常のリンパ球に見えますが、一部で幼若な形をしているリンパ球も混在します。

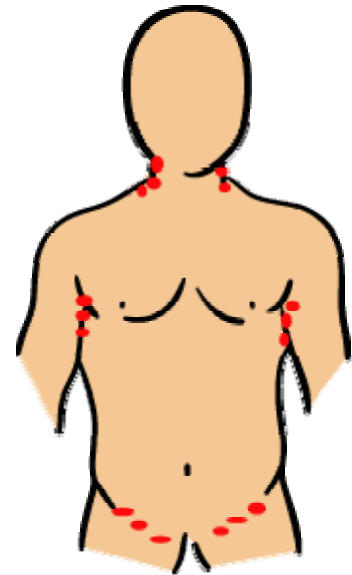


図 4 CLL 患者で見られるリンパ節腫脹

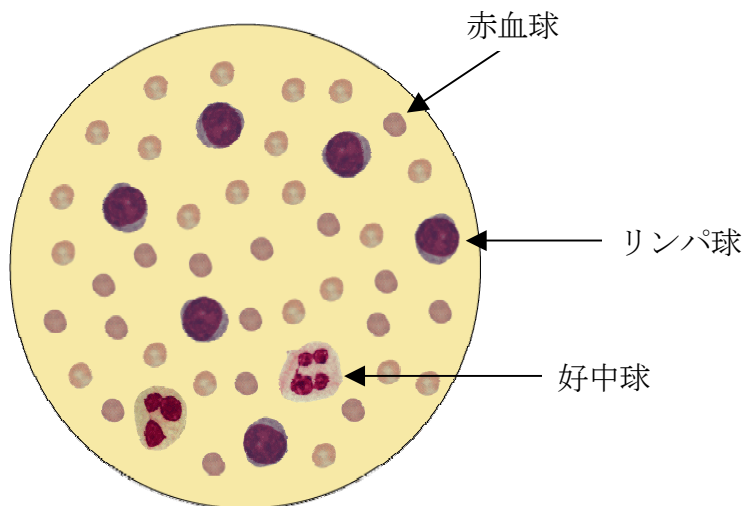


図 5 CLL 患者の末梢血でみられる成熟リンパ球の増加

フローサイトメトリー法¹⁰で増加しているリンパ球の表面形質を調べると、多くのCLLはCD19やCD20といったB細胞の形質を有しており、B-CLLと呼ばれます。ごく一部のCLLでは、増加す

¹⁰ フローサイトメトリー法

血球表面に特異的にある抗原に対するモノクローナル抗体を蛍光標識した試薬を用いて血球を処理し、血球が一行に流れた状態で蛍光をあて、血球の性格を簡単に同定する方法で、リンパ球をB細胞とT細胞に分類するなど用います。

リンパ球はCD2 とかCD3 などのT細胞としての形質を有しており、T細胞性CLL (T-CLL) と呼ばれます。B-CLLに比べT-CLLは一般に予後が悪いと考えられています。T-CLLの亜型として我が国で患者の多い成人T細胞白血病 (ATL) があります。

一般にCLLは初期にはほとんど貧血は見られず、血小板数も正常で、進行するとともに貧血が出現し、血小板数の減少も現れます。骨髓検査では成熟したリンパ球の増加が見られます。末梢血や骨髓血を用いた染色体検査では、CMLなどと比べて細胞分裂能が穏やかなため、種々の刺激物質を加えて分裂を促して検査を進めます。CMLにおけるPh染色体のような非常に病気に特異的な染色体異常はありませんが、del(13)(q14q23)¹¹などの異常が比較的多いとされています。

生化学的検査では、LDH (乳酸脱水素酵素) などの高値が知られています。抗体産生に関するB細胞性の腫瘍であるため、γ-グロブリンは低値を示します。また、抗赤血球抗体 (クームス抗体) や抗血小板抗体などの自己抗体が検出されることがあり、溶血性貧血や血小板減少症の原因となることがあります。

4) 診断

成熟したリンパ球の増加を主体とした白血球増加が持続した場合にCLLが疑われ、単クローン性の増加であることの証明およびフローサイトメトリー法による表面形質の検査で診断がつけられます。

5) 治療

白血球増加 (リンパ球増加) のみで、貧血、血小板減少が見られなければ、無治療にて経過観察とします。特に高齢となつてからの発症の場合は、強力な治療は副作用の問題などで避けた方が良い場合があります。貧血、血小板減少、リンパ節腫脹が明らかになった場合にはクロラムブシルなどの抗白血病剤で治療を開始します。

6) 予後

一般的に発症が遅いこと、病気の進行も緩徐であること、CMLのような急性転化が見られないことなどにより、CLL 特に B-CLL は白血病の中では比較的予後が良いと考えられており、白血病と無関係の原因で亡くなることもあります。

¹¹ del(13)(q14q23)

13 番染色体の長腕 (q) の 14 から 23 が欠失していることを表す。

2 章 3 節 小児白血病

1. 小児白血病とは

小児白血病は成人と異なり 95%以上が急性白血病です。急性白血病の約 70%は急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia: ALL)で、25%は急性骨髄性白血病(acute myelogenous leukemia: AML)、2%が混合型白血病(mixed lineage leukemia: MLL)で、慢性骨髄性白血病(chronic myelogenous leukemia: CML)は 3%くらいです。近年の治療法の進歩で、ALL では 60-80%が、AML では 40-50%が長期生存、治癒が期待できるようになりました。

2. 小児白血病の染色体異常の特徴

小児白血病細胞の染色体異常は成人よりも頻度が高く、ALL では 70-80%に、AML では 50-80%に染色体異常がみられ、それぞれの異常は病型に特異的です(表 1)。これらの異常の中で、ALL では t(9;22)、t(4;11)¹は予後不良で、t(12;21)、や高 2 倍体(染色体数 51 本以上)は予後良好とされ、AML では 7/7q-が予後不良で、t(8;21)、t(15;17)や inv(16)²は予後良好です。

表 1 小児白血病で見られる染色体異常と臨床像

染色体転座	頻度(%)	融合遺伝子	臨床病像
急性リンパ性白血病			
t(12;21)(p13;q22)	15~20	TEL/AML1	B 前駆細胞型, 予後良好
t(1;19)(q23;P13.3)	5	E2A/PBX1	Pre-B 細胞型, 白血球増多, CNS 浸潤
t(9;22)(q34.1;q11.2)	3	BCR/ABL	B 前駆細胞型(時に mixed lineage), 年長児, 白血球増多, 予後不良
t(4;11)(q21;q23)	2	MLL/AF4	CD10 陰性 B 前駆細胞型, 乳児, 白血球増多, 予後不良
t(8;14)(q24;q32.3)	1	IGH/MYC	B 細胞型, L3, 髄外腫瘍, 短期強力療法により予後改善
t(11;14)(p13;q11)	1	TCRD/TTG2	丁細胞型, 縦隔腫瘍, 白血球増多
高 2 倍体	20~25		B 前駆細胞型, 予後良好
急性骨髄性白血病			
t(8;21)(q22;q22)	10	AML1/MTG8	M2※, Auer 小体, 腫瘍形成, 予後良好
inv(16)(p13q22)	10	CBF/MYH11	好酸球増多, M4Eo, CNS 浸潤, 予後良好
t(9;11)(p22;q23)	7~9	MLL/AF9	M4※または M5※, 乳児, CNS 浸潤, 凝固異常
t(15;17)(q22;q21)	5		M3※, Auer 小体, 年長児, 白血球減少, ATRA で分化誘導
7q-/-7	5		MDS, M1※, M2※, M4※, 予後不良

※M1~M5 は FAB 分類より CNS: 中枢神経系(central nervous system)

¹ t(9;22)、t(4;11)

t は転座(translocation)のことです。t(9;22)は 9 番染色体と 22 番染色体の間で相互に転座が生じていることを示しています。すなわち 9 番染色体の一部が 22 番染色体に付着し、22 番染色体の一部が 9 番染色体に付着します。t(4;11)も同様に 4 番と 11 番染色体の転座を示します。

² inv(16)

inv は逆位(inversion)のことです。ひとつの染色体、この場合は 16 番染色体の 2 箇所で切断がおり、染色体が逆さに付着した場合に生じる異常です

白血病における染色体異常は予後とよく相関することが明らかになり、最近では、強力な化学療法や造血幹細胞移植³の適応のための重要な指標と考えられています。また、これらの染色体異常の切断部位に存在する遺伝子が、転座により新しく融合遺伝子を形成し、それが白血病の発症に関与していることが明らかになってきました。新しく形成された融合遺伝子⁴を用いて、化学療法の治療効果の判定や微小残存病変(minimal residual disease : MRD)の追跡が可能となり、臨床上よく利用されています。

3. 微小残存病変 (MRD) とは

骨髓標本を光学顕微鏡で肉眼的に見て骨髓中の白血病細胞が 5%以下になると臨床的には完全寛解といえます。しかしながらこの段階でも体内には 10^{10} 個の白血病細胞が存在するといわれています。この光学顕微鏡で検出困難な白血病細胞 MRD といえます。最近では、MRD の測定は遺伝子検査の 1 つである定量的ポリメラーゼ連鎖反応法 (polymerase chain reaction : PCR) で行われており、1 万から 100 万個の正常細胞に 1 個存在する異常細胞も検出可能となっています。再発の原因は主としてこのような残存腫瘍細胞の再増殖によるものと考えられています。

化学療法後も腫瘍細胞の根絶をめざして、強力な治療を継続し、より深い寛解すなわち分子生物学的寛解をめざします (図 1)。さらに、寛解後の残存病変の推移から予後が推定できます。ALL では治療開始後 MRD が速やかに減少する症例では予後良好であり、MRD 量が多い症例では再発のリスクが高くなります。MRD を測定することによって症例毎の治療に対する反応性を残存腫瘍量の変化として評価することは、治療方針の決定に際して非常に有用なデータとなります。たとえば MRD 強陽性では臨床的に再発する前に移植などさらに強力な治療を選択することができます。一方、早期に MRD が陰性化すれば、抗腫瘍剤の減量や治療期間の短縮が期待できます。

4. 小児白血病の染色体異常

小児白血病にみられる染色体異常で、代表的なものについて概説します。

1) 急性骨髄性白血病 (AML)

(1) 8 ; 21 転座 (*AML1/ETO* 融合異常)

小児 AML の 20~40%を占め、形態学的に分化型骨髓芽球性白血病 (M2) に分類されます。8 番染色体 q22 にある *AML1* 遺伝子と 21 番染色体 q22 にある *ETO* 遺伝子が染色体転座により *AML1/ETO* 融合遺伝子を形成します。その融合遺伝子から作られた異常なタンパク質が *AML1* 遺伝子から作られる正常なタンパク質の働きを阻害することによって白血病の発症に関与しているとされています。*AML1* 遺伝子から作られる正常タンパク質は造血において重要な役割を担っています。

³造血幹細胞移植

抗癌剤の治療で完全寛解にならなかった場合や、再発した場合などに行われる治療です。大量の抗癌剤や放射線治療を行って、白血病細胞を根絶した後に、元気な人の造血幹細胞を移植して、患者さんの体内で正常な血液細胞を作らせる方法です。骨髓移植が最も一般的ですが、その他に、臍帯血移植、末梢血幹細胞移植があります。

⁴融合遺伝子

キメラ遺伝子ともいいます。染色体転座によってそれぞれの染色体の切断点にある遺伝子どうしが融合し、正常に存在しない遺伝子を作ります。その新しくできた異常な遺伝子を融合遺伝子といい、これが白血病の原因となります。よく知られているのが、*bcr/abl* 融合遺伝子ですが、これから作られるタンパクは白血病細胞を作るという指令を絶え間なく出します。そのため体内で白血病細胞がどんどん作り続けられます。

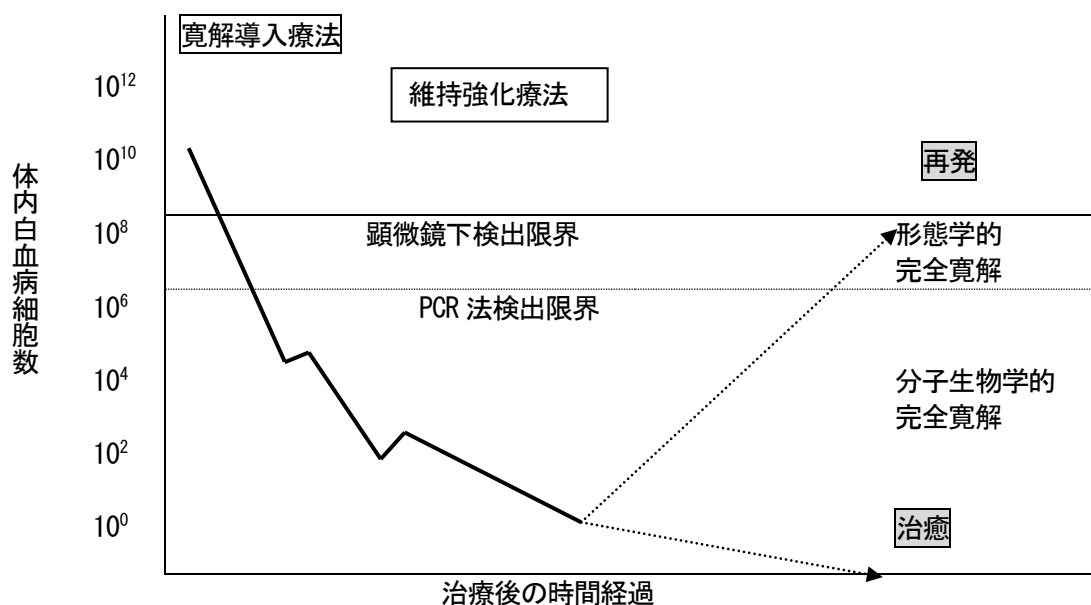


図1 体内白血病の治療効果

(2) 15 ; 17 転座 (*PML/RAR α* 融合異常)

小児 AML の 4～7% を占め、形態学的に急性前骨髄球性白血病 (M3) に分類されます。15q22 に存在する *PML* 遺伝子と 17q21 にあるレチノイン酸受容体 α 鎖 (*RAR α*) 遺伝子が融合遺伝子を形成します。融合遺伝子による白血病発症のメカニズムの解析から、レチノイン酸が急性前骨髄球性白血病 (acute promyelocytic leukemia: APL) の発症に関与していることが明らかとなりました。1990 年代に全トランス型レチノイン酸 (ATRA) による治療が確立され、予後は著しく改善しました。ATRA は白血病細胞を分化、成熟させ寛解へ導入するので、分化誘導療法といわれています。

(3) 11q23 転座 (*MLL* 融合異常)

小児 AML の 7～9% を占め、骨髄単球性白血病 (M4)、単球性白血病 (M5) に分類されますが、AML だけではなく ALL でもみられる染色体異常です。11q23 を切断点とする相互転座は転座相手が多様で、これまでに 30 種類以上が報告されていますが、t(9;11) が多いです。t(9;11) は予後良好ですが、転座相手によっては予後不良となります。11q23 には混合型白血病 (mixed lineage leukemia: *MLL*) 遺伝子が存在し、その異常が白血病発症に関与しています。乳児白血病でよくみられる異常です。

(4) 16 番腕間逆位、16;16 転座 (*CBF β /MYH11* 融合異常)

小児 AML の 10% を占め、形態学的には好酸球増多を伴う骨髄単球性白血病 (M4Eo) です。16 番染色体の短腕と長腕で切断がおり、その部位が逆になって再結合します。16q22 上の *CBF β* と 16p13 上の *MYH11* が融合遺伝子を形成することによって、*CBF β /MYH11* タンパク質は細胞質で AML1 タンパク質と結合して、その核内移行が阻害され白血病が発症します。

(5) 7 番欠失、7 番長腕部分欠失 (–7/7q–)

骨髄異型性症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) によくみられる染色体異常です。予後は不良で、造血幹細胞移植の適応です。

2) 急性リンパ性白血病 (ALL)

(1) 9 ; 22 転座 (*BCR/ABL* 融合異常) (Ph 陽性急性白血病) (図 2, 3)

小児 ALL の 3%ほどで、形態学的には B 前駆細胞型、時には混合性白血病型です。慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia : CML) と同じ Ph 染色体 (フィラデルフィア染色体) がみられ、Ph 陽性 ALL と呼ばれています。予後は不良で、早期の造血幹細胞移植が必要です。9q34 に存在する *ABL* 遺伝子と 22q11.2 に存在する *BCR* 遺伝子が *BCR-ABL* 融合遺伝子を形成します。この融合遺伝子から作られる BCR-ABL 融合タンパク質は強いチロシンキナーゼ活性を有しており、それが白血病の発症に関与しています。近年、チロシンキナーゼの阻害薬であるイマチニブが開発され、CML だけでなく Ph 陽性 ALL でも効果があり注目されています。

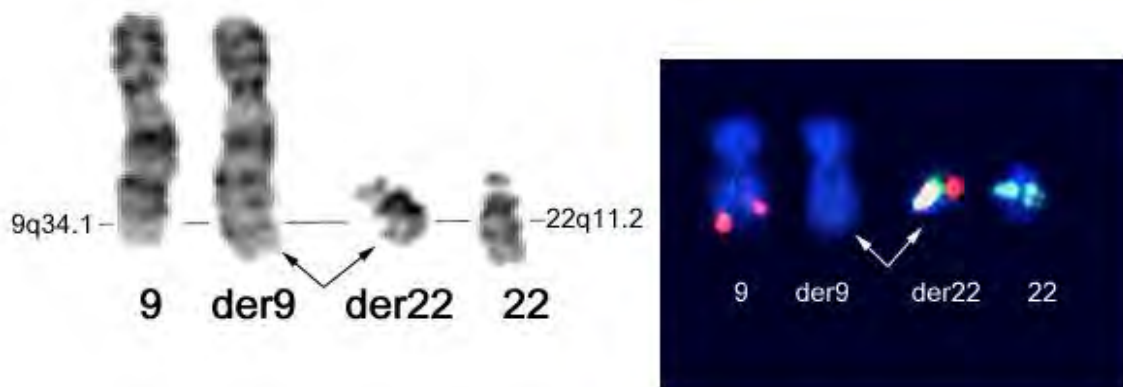
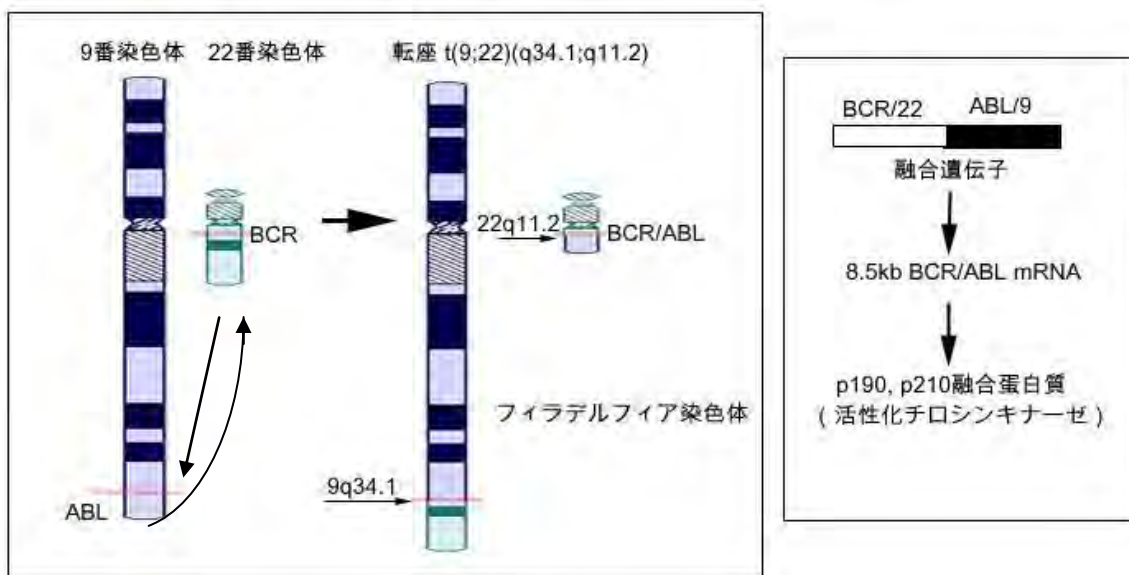


図 2 9 番染色体と 22 番染色体の相互転座、t(9;22)(q34.1;q11.2)

図 3 9;22 転座におけるフィラデルフィア染色体、*BCR/ABL* 融合遺伝子の形成と *BCR/ABL* 融合遺伝子から融合蛋白質の形成(2) 1 ; 19 転座 (*E2A/PBX1* 融合異常) (pre-B 細胞性白血病)

小児 ALL の 5%を占め、ほとんどが pre-B 細胞形質を示します。比較的治療抵抗性で、中枢神経浸潤の頻度が高いのが特徴です。19p13 より *E2A* 遺伝子が、1q23 より *PBX1* 遺伝子が見いだされ、*E2A/PBX1* 融合遺伝子がこの白血病の発症に重要です。

(3) 12 ; 21 転座 (*TEL/AML1* 融合異常) (B 前駆細胞性 ALL)

小児 ALL の中では頻度が高く 15~20%を占め、ほとんどが B 前駆細胞形質を示します。通常

の染色体分析では同定できず、FISH や RT-PCR で検出できます。12p13 にある *TEL* 遺伝子と 21q22 にある *AML1* 遺伝子が結合して *TEL/AML1* 融合遺伝子を形成しています。予後は良好です。

(4) 高 2 倍体白血病

小児 ALL の 20～25% を占め、染色体数が 50 本以上に増加します。ほとんどは B 前駆細胞形質を示し、予後は良好です。

(5) 8 ; 14 転座 (*MYC* 発現亢進異常) (B 細胞性 ALL)

頻度は低く 1% くらいです。B 細胞形質を示し、バーキットリンパ腫の白血化として知られています。8q24 には癌遺伝子 *MYC* があり、14q32 に存在する免疫グロブリンの遺伝子と結合することにより、*MYC* 遺伝子が活性化されて白血病が発症することがわかっています。最近では化学療法が進歩し、予後は著しく改善されています。

(6) 4 ; 11 転座 (T 細胞性 ALL)

頻度は低く 1% くらいです。T 細胞性 ALL にみられる代表的な異常です。14q11 にある T 細胞受容体に関与しています。この転座を有する白血病は年長児に多く、縦隔腫瘍や中枢神経浸潤をきたしやすいことが知られています。

3) 乳児白血病 (11q23 転座型白血病)

乳児白血病は小児白血病の 5～10% を占めます。乳児白血病では末梢白血球の増多、肝脾腫があり、形態学的にはリンパ性、骨髄性、混合性のすべてのタイプで発症します。ALL では B 前駆細胞型が多く、AML では急性骨髄単球性白血病 (M4)、急性単球性白血病 (M5) が多いです。11q23 には混合型白血病 (mixed lineage leukemia : *MLL*) 遺伝子があり、*MLL* 遺伝子再構成を高頻度に認めます。*MLL* 遺伝子と命名されていることから推測されるように、11q23 転座型白血病は白血病細胞が骨髄性とリンパ性の両方の正確を併せ持っている急性混合性白血病 (acute mixed lineage leukemia) と診断される頻度が高いようです。11q23 の転座は 4、6、9、11 番染色体など 30 種類以上が知られています。ALL で発症すると予後は不良で、早期に造血幹細胞移植が必要ですが、t(10;11) や t(9;11) は AML で発症することが多く、比較的予後が良いとされています。

5. 検査の問題点と今後の展望

小児白血病の治療成績は飛躍的に向上しました。その要因として予後因子の解析が大きく寄与しています。小児白血病の予後因子は以前より初発時の年齢と白血球数で、現在も最も重要な因子です。しかし、細胞遺伝学的な解析が進んだ結果、染色体異常や遺伝子変異が予後に大きく関与することがわかってきました。最近では、年齢、白血球数だけでなく、染色体遺伝子検査の結果も含めて予後を判定し、治療法を決定します。たとえば Ph 陽性白血病では白血球数が著増し、白血球数から予後不良と判定できることもありますが、白血球数があまり増えず、白血球数からは予後良好と判定される症例もあります。そのような症例では染色体、遺伝子検査が予後判定の重要な指標となります。

また、遺伝子検査の進歩により、MRD の測定が可能となりました。MRD の測定により治療への反応性を検討できるようになり、治療への反応が悪く、MRD 強陽性の症例では早期に造血幹細胞移植を選択することができます。初診時の予後因子に加え、治療への反応性も評価して治療法を決める試みが始まりつつあります。

さらに、染色体異常および、その切断点に存在する遺伝子の解析により、白血病発症のメカニズムが解析され、それに基づいた治療法が開発されています。Ph 陽性 ALL や CML においては

染色体転座により *BCR/ABL* 融合遺伝子が形成され、その遺伝子から作られる蛋白が強いチロシンキナーゼ活性を持つことがわかり、チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブが開発されました。イマチニブは Ph 陽性白血病細胞の増殖を選択的に抑制します。このような治療法は分子標的療法と呼ばれ、近年、その開発研究が加速しています。APL に対する ATRA、CML に対するイマチニブ、CD20 抗原陽性 B 細胞リンパ腫に対するリツキシマブが代表的で、それらの使用により治癒率が飛躍的に向上しています。今後、病型特異的な治療法の開発が進み、白血病治療のさらなる向上が期待されます。

第2章4節 悪性リンパ腫

1. 悪性リンパ腫とは

悪性リンパ腫とはリンパ球が腫瘍性に増生する病態をいい、リンパ節に発生するものと、節外性に食道、胃などの消化管や、皮膚などに発生するものとに分けられます。図1に体のリンパ節の分布を示しました。症状としては、リンパ節腫脹以外に発熱、体重減少、夜間盗汗、皮疹などが見られます。血液検査所見としては、貧血、乳酸脱水素酵素(LD)上昇、可溶性インターロイキン-2(IL-2)レセプター抗体の上昇などが認められます。悪性リンパ腫が発生する主な原因には、染色体転座、遺伝子異常、ウイルス染などがあります。遺伝子検査は、ウイルスを証明したり、現在までに分かっている悪性リンパ腫に特異的な染色体異常や遺伝子異常を見つける

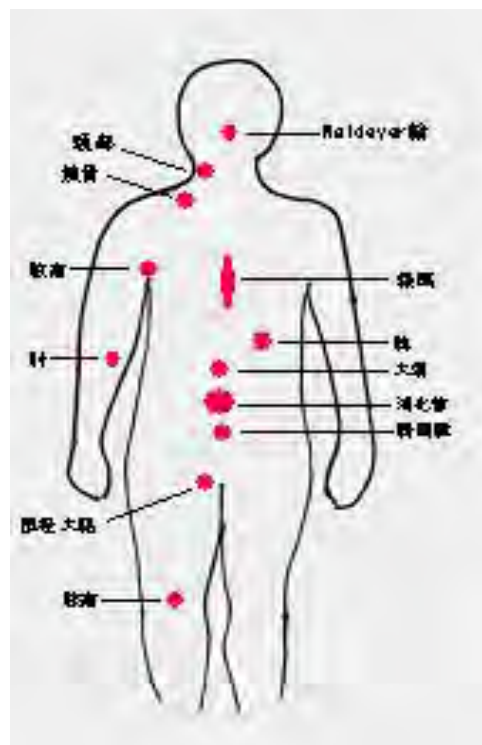


図1リンパ節の分布

ることで診断に役立てられています。

リンパ節は体表および体内に広く分布して存在し、悪性リンパ腫を発症すると皮下結節や皮疹、各所属リンパ節腫脹が見られます。

2. 悪性リンパ腫の診断

1) 悪性リンパ腫の検査

悪性リンパ腫の検査を図2に示しました。臨床症状、検査データ、画像診断などから悪性リンパ腫を疑ったら、必ず病変部の組織を採取し病理組織学的診断を行います。この時、採取した組織はホルマリンには入れず、生のまま病理組織、細胞表面形質(フローサイトメトリー)、染色体検査、さらに必要に応じて FISH 検査、サザンブロット (DNA の検出)、PCR 法 (DNA の検出)、RT-PCR (RNA の検出) などの検査に分けていきます。悪性リンパ腫を疑っていても、実際には良性の反応性変化や病原微生物によるリンパ節炎、あるいはリンパ節に転移した癌腫の可能性も否定できないからです。悪性リンパ腫の診断は、全ての結果を総括して判断されます。

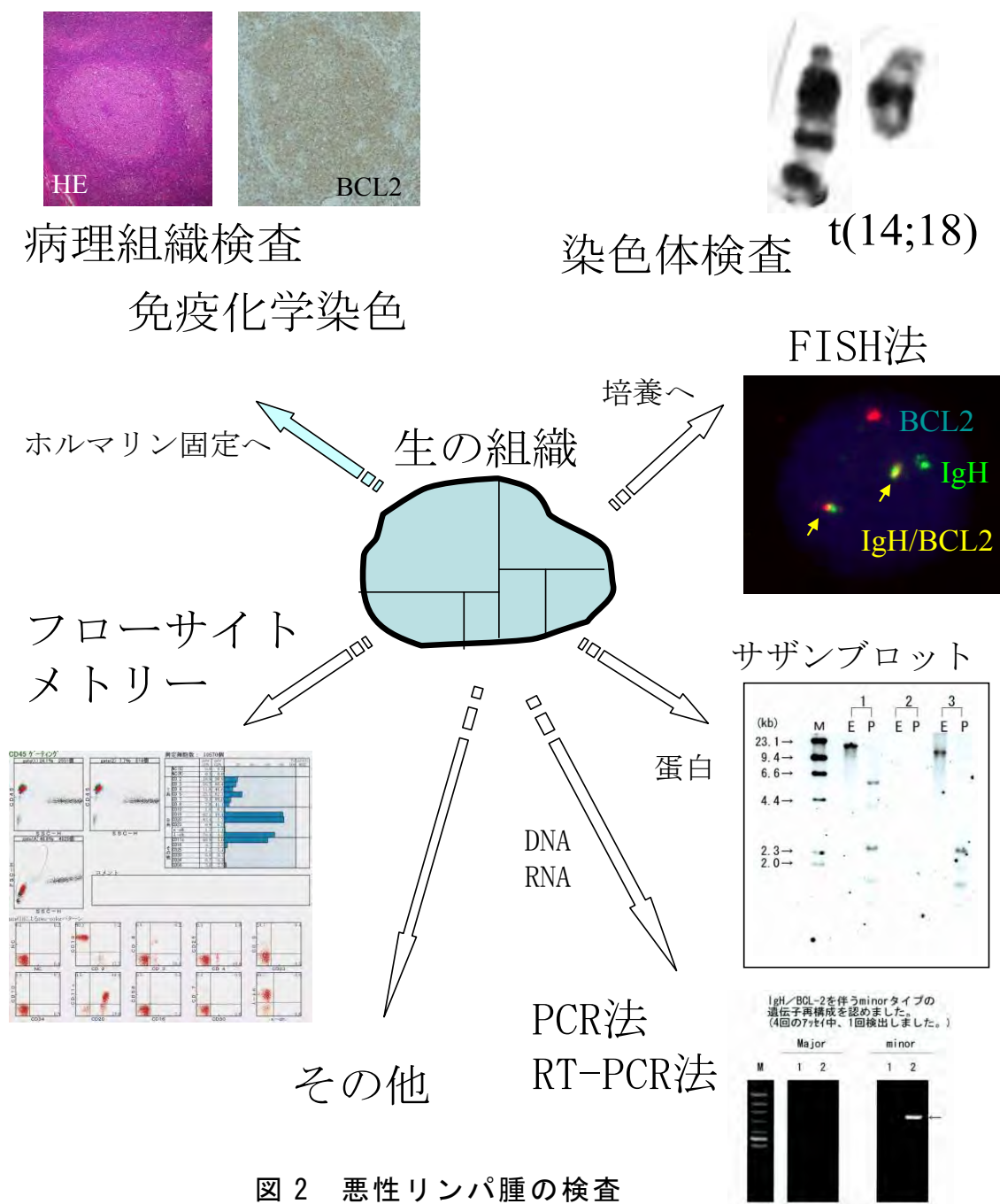


図2 悪性リンパ腫の検査

2) 悪性リンパ腫の分類

悪性リンパ腫には多くの種類があります。比較的予後の良いものもあれば、治療抵抗性で急速に症状が進行するものもあります。一般的には新 WHO 分類を基に診断され、悪性度、国際予後指標 (International Prognostic Index : IPI)、病期を参考にして治療が進められます (図 3)。悪性リンパ腫はまず、ホジキンリ

リンパ腫はホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫に分類され、さらに非ホジキンリンパ腫は B 細胞性リンパ腫（本邦の悪性リンパ腫の約 70%を占める）と T 細胞性リンパ腫、NK 細胞リンパ腫に分けられます。一般的に、T 細胞性リンパ腫は予後不良とされています。ホジキンリンパ腫は悪性リンパ腫全体の約 5%の頻度で発生し、現在治療法も確立されています。非ホジキンリンパ腫の場合は、B 細胞性なのか T 細胞性なのか、あるいは NK 細胞性なのかで治療法が異なり、予後の推測ができます。時に、早急に由来をつきとめ治療をしないと生命に危険を及ぼすバーキットリンパ腫などもあり、迅速な病型の分類が重要となります。

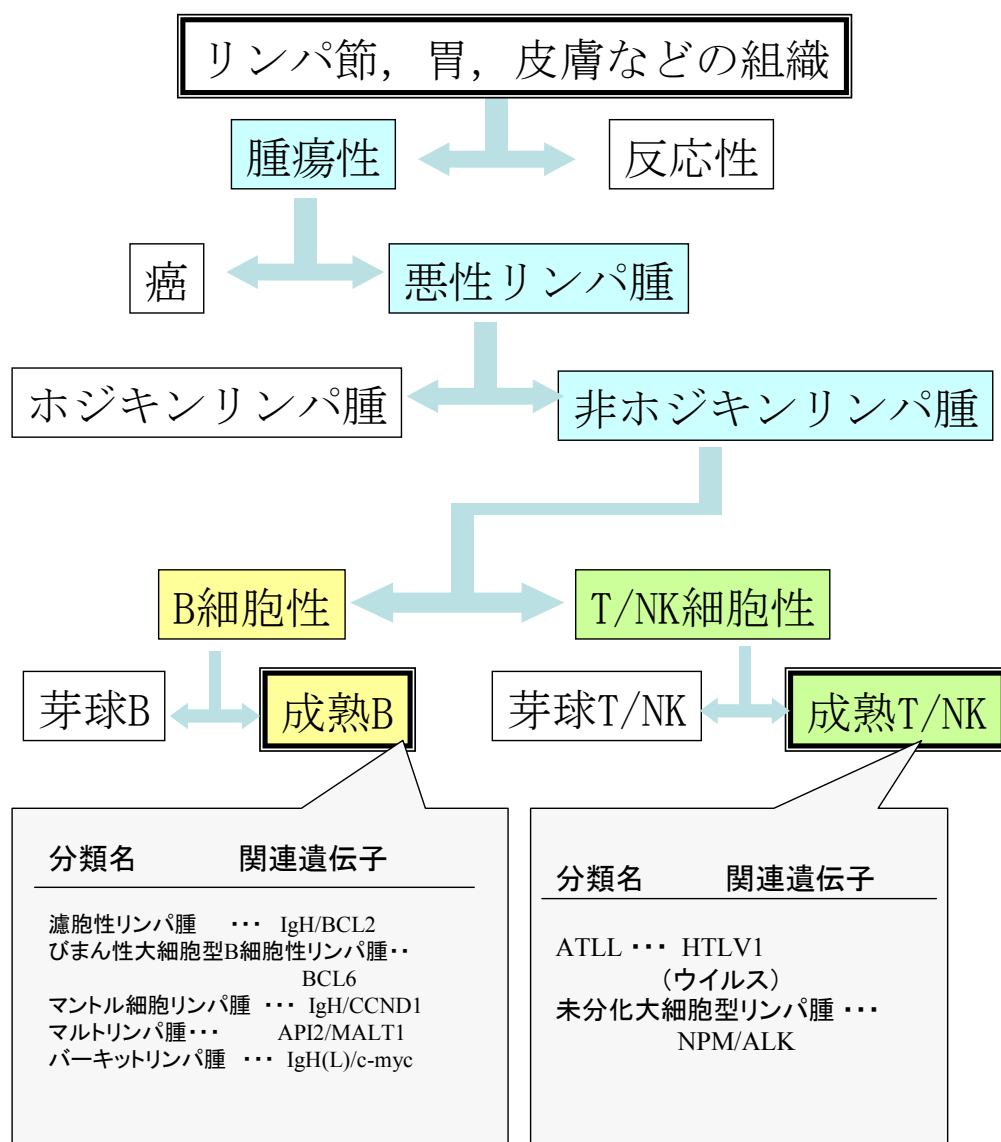


図 3 悪性リンパ腫の分類の進め方

3) 染色体遺伝子検査

悪性リンパ腫の初発時(治療前)にどのような染色体異常があるかを調べます。ホジキンリンパ腫や T 細胞性リンパ腫では特徴的な染色体異常を認めることは少ないのですが、B 細胞性リンパ腫には染色体検査が有用です。すなわち、B 細胞性の病型で既知の特異的な染色体転座を検出できれば、大いに病型決定に役立つこととなります。ただし、リンパ節組織は染色体検査が困難なこともあります。病型特異的な遺伝子異常の検出を必要とする場合には、簡便な FISH 検査が有用です。FISH 法は、未培養の細胞やパラフィン組織標本でも検出が可能な利用価値の高い検査法です。さらに、検出感度の高い PCR 法は遺伝子を数 10 万倍ほどに増幅して検出するため、微量の腫瘍細胞の遺伝子異常を見つけ出すことができます。これらの方法を駆使することで、遺伝子レベルでの治療効果判定や経過観察が可能になります。また、悪性リンパ腫は骨髄に浸潤する場合がありますが、その際にも FISH 法や PCR 法を用いることで病態を早期に知ることができます。

4) ウイルス検査

悪性リンパ腫に関連のあるウイルスには、少なくとも Epstein-Barr ウイルス (EBV)、ヒトヘルペスウイルス 8 (human herpes virus-8 : HHV8)、ヒト T 細胞向性ウイルス 1 型 (human T lymphotropic virus type 1 : HTLV-1) の 3 種類があります。サザンブロット法や PCR 法などでウイルスを証明します。またインサイチュハイブリダイゼーション (ISH) 法を用いて病理組織標本上で目的とする DNA や RNA を検出することも可能であり、とくに EBV の検出に有効です。

5) 免疫表現型検査

細胞の内外に存在する特異抗原を、それに対する既知の抗体で検出する方法です。いわゆる抗原抗体反応を利用した方法です。病変組織が腫瘍性か反応性か、また、腫瘍性であれば悪性リンパ腫なのかがん腫なのか、そして悪性リンパ腫であればその分類はホジキンリンパ腫か否か、B 細胞性か T 細胞性か NK 細胞性かなどについて主に検索します。悪性リンパ腫の場合、多くは cluster of differentiation (CD) 番号の付けられた抗体を用いて分類を行います。

(1) 免疫組織化学染色

ホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を対象とし、免疫組織化学的染色法を用いて検出します。

(2) フローサイトメトリー

生の腫瘍組織から細胞をばらばらにして取り出し、細胞浮遊液の状態で細胞の表面形質を分析します。腫瘍性を判断するポイントの一つに、B 細胞性であれば免疫グロブリン軽鎖である κ 鎖と λ 鎖のそれぞれの割合の偏りを検出すること

が診断に有用です。さらに、B 細胞性悪性リンパ腫で CD20 抗原が陽性を示す場合、抗 CD20 抗体薬剤であるリツキシマブが抗腫瘍効果をもたらします。

3. 悪性リンパ腫の染色体遺伝子異常

1) 成熟 B 細胞性腫瘍

病型特異的な染色体転座が知られている成熟 B 細胞性腫瘍について解説します。多くは 14 番染色体長腕の免疫グロブリン重鎖 (*IGH*) 遺伝子と特定のがん遺伝子が転座を起こします (14q32 転座型腫瘍)。転座相手のがん遺伝子によって病型やリンパ腫の種類が明らかになり、治療法が決定される場合があります (表 1)。

(1) 濾胞性リンパ腫 (follicular lymphoma : FL)

t(14;18) 転座は、濾胞性リンパ腫の 70~95% 程度にみられる異常です。18 番染色体の *BCL2* 遺伝子と *IGH* 遺伝子が転座により遺伝子の再構成を起こし、*BCL2* タンパク質が通常より過剰に作られて細胞が不死化 (アポトーシスを抑制) することで腫瘍が増殖するとされています。

(2) びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL)

本邦の B 細胞性悪性リンパ腫の中では最も頻度の高いリンパ腫です。濾胞性リンパ腫でみられる t(14;18) 転座は 20~30% に、*BCL6* 遺伝子 (3q27) 再構成 (転座相手は複数である) は約 30% に認められます。染色体検査で正常を示しても、FISH 法で *BCL6* 再構成を検出できることがあります。

(3) マントル細胞リンパ腫 (mantle cell lymphoma : MCL)

t(11;14) 転座は、マントル細胞リンパ腫の 70~75% に程度にみられる異常で予後不良とされるため、他の悪性リンパ腫との鑑別が重要となります。11 番染色体 q13 のサイクリン D1 は細胞周期に関連があり、結果的にこれが腫瘍の細胞増殖につながると考えられています。

(4) 粘膜関連濾胞辺縁帯リンパ腫 (extranodal marginal zone B-cell lymphoma : MALT lymphoma)

慢性炎症により胃、肺、甲状腺、唾液腺などに形成される、粘膜関連リンパ組織の低悪性度 B 細胞性のリンパ腫で、節外性の代表的リンパ腫です。t(11;18) 転座は MALT リンパ腫の約 30% に見られる異常で、11 番染色体 q21 の *API2* 遺伝子と 18 番染色体 q21.1 の *MALT1* 遺伝子の融合タンパク質 API2/MALT1 により腫瘍細胞が抗アポトーシス化されると考えられています。MALT リンパ腫では高率にヘリコバクターピロリ菌が陽性であるというデータがあり、除菌により大半は寛解に至ります。しかしながら、t(11;18) 転座を保有している場合は除菌抵抗性であるとされています。

(5) バーキットリンパ腫 (Burkitt lymphoma : BL)

高悪性度のリンパ腫で、8 番染色体 q24 の *MYC* 遺伝子再構成を認めることが本リンパ腫の確定診断に必須です。*MYC* 転座相手の約 80% は *IGH*(14q32) ですが、他に免疫グロブリン軽鎖の κ 鎖 (2p11) と λ 鎖 (22q11) との再構成も認められます。急激な経過をたどるため、早期にバーキットリンパ腫に有効な治療を行う必要があります。

表 1 悪性リンパ腫に見られる病型特異的染色体転座、遺伝子異常

病型	染色体転座	遺伝子異常	分類
濾胞性リンパ腫	t(14;18)(q32;q21.3)	<i>BCL2/IGH</i>	B 細胞性
びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫	t(14;18)(q32;q21.3) t(3;V)(q27;V)	<i>BCL2/IGH</i> <i>BCL6</i>	
マルトリンパ腫	t(11;18)(q21;q21.1)	<i>API2/MALT1</i>	
バーキットリンパ腫	t(8;14)(q24;q32)	<i>IGH/MYC</i>	
	t(2;8)(p11;q24)	<i>IGL/MYC</i>	
	t(8;22)(q24;q11)	<i>IGL/MYC</i>	
未分化大細胞型リンパ腫	t(2;5)(p23;q35)	<i>NPM/ALK</i>	T 細胞性

V:variable

2) 成熟 T 細胞性、NK 細胞腫瘍

(1) 成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/ lymphoma : ATLL)
ヒト T 細胞向性ウイルス 1 型 (human T lymphotropic virus type 1 : HTLV-1) を原因ウイルスとして発症する末梢性 T 細胞性リンパ腫です。ATLL の中で、急性型とリンパ腫型の 2 タイプは高悪性度に、慢性型とくすぶり型の 2 タイプは低悪性度に分けられ、これらは臨床病態が異なります。ATLL は末梢血、リンパ節、他には皮膚などに多く浸潤します。特異的な染色体異常は認められませんが、サザンブロット法、PCR 法などにより HTLV-1 を証明します。

(2) 未分化大細胞型リンパ腫 (anaplastic large cell lymphoma : ALCL)

発生原因と遺伝子異常の関係が明らかになっている数少ない T 細胞性悪性リンパ腫の一つです。陽性例では *ALK* 遺伝子 (2p23) のチロシンキナーゼの活性化により細胞増殖に関与していることが知られています。*ALK* 転座相手の約 70% は *NPM*(5q35) 遺伝子です。

4. 検査の問題点と今後の展望

現在、T 細胞性リンパ腫に関しては特異的な遺伝子異常が不明なものが多く、B 細胞性リンパ腫に比べて発生機序が複雑であると考えられています。今後、す

すべての悪性リンパ腫において原因遺伝子が解明され、リツキシマブのような抗体療法を含めた分子標的治療薬の開発が進めば、高悪性度の悪性リンパ腫でも治癒率が上がることが期待されます。

参考図書

- 1) 最新・悪性リンパ腫アトラス，第一版，菊池昌弘・森茂郎編，文光堂，東京，2004
- 2) 新 WHO 分類による白血病・リンパ系腫瘍の病態学，森茂郎監修，中外医学社，東京，2004
- 3) 血液・腫瘍科、第 49 巻特別増刊号、悪性リンパ腫のすべて，科学評論社，東京，2004