

3 節 FISH 検査

曾根美智子 国立病院機構香川小児病院研究検査科病理主任

1. FISH 検査とは

FISH は、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (fluorescence *in situ* hybridization) の頭文字をとった略語です。特定の遺伝子座を、染色体や間期核の上でじかに見る方法です。FISH はゲノムマッピングの技術であり、染色体異常症候群や腫瘍の染色体異常を検査するために導入され、広く使用されています。FISH 検査は間期核においても特定の遺伝子座を明瞭に検出できるのが特徴です。病型特異的染色体異常が知られている白血病やリンパ腫、固形腫瘍において遺伝子異常を検出し、これを指標にした診断と治療が行われています。分裂中期に見えているそれぞれの染色体を紐解いていくとクロマチン (DNA-蛋白質複合体) を構成しており、DNA は 2 重鎖構造をしていて、相補的に水素結合しています。この DNA 特定の遺伝子座をじかに見ているわけです (図 1)。じかに見るために、特定の遺伝子座の DNA 断片 (プローブ¹⁴) を検査対象の DNA に相補的に結合させます。これは DNA が相補的であることと、切られてもすぐに元の二重鎖に戻ろうとする性質を利用しています。

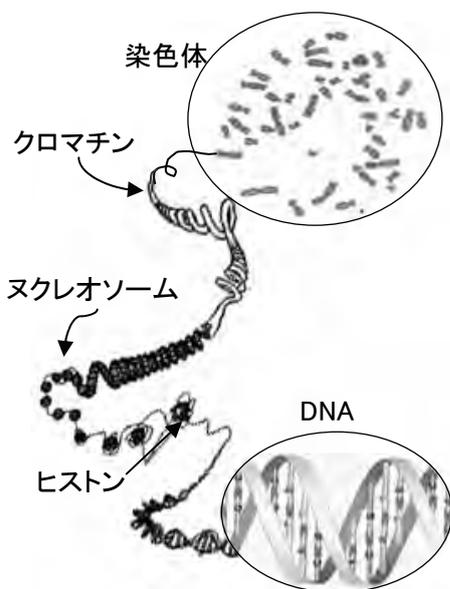


図1 染色体はクロマチンからなり、クロマチンはヌクレオソームと呼ばれる基本単位の繰り返しからなっている。ヌクレオソームはヒストンに DNA が巻きついた構造をしている。DNA 二重鎖は相補的 (核酸の塩基 A(アデニン)は T(チミン)に、G(グアニン)は C(シトシン)に決まって結合すること) に水素結合で結ばれている。

¹⁴ プローブ: 蛍光などで標識された標的 DNA に相補的なある一定の長さの DNA。長さは目的によってさまざまであるが、その長さの範囲内では、標的 DNA に完全に相補的でなければならない。

2. 測定原理

プローブは特定の遺伝子座の DNA を酵素反応によって標識し、さらに免疫化学反応で蛍光をつけています。DNA の 2 重鎖は高温に置くと水素結合が解離して 1 本鎖になります (熱変性)。1 本鎖になった染色体や間期核の中の DNA と、プローブ DNA を混ぜておくと、検査対象の DNA に相補的なプローブ DNA が結合し雑種ができます。この結合をハイブリダイゼーション¹⁵と呼びます。これを蛍光顕微鏡で観察すると、染色体や間期核の上で特定の遺伝子座をじかに見ることができます (図 2)。

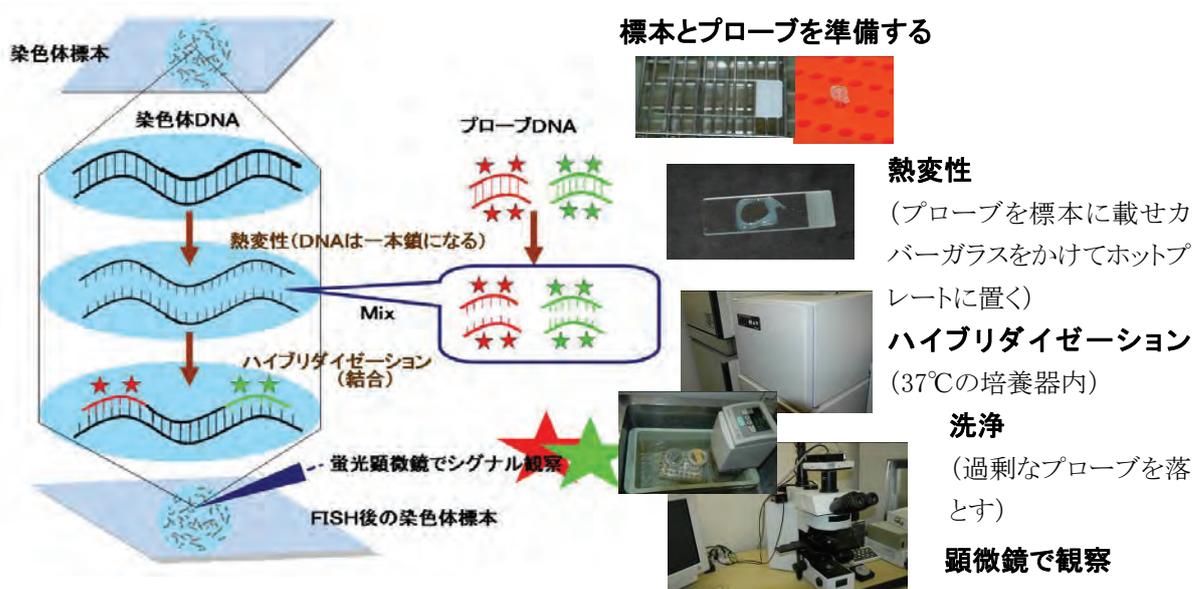


図 2 左: FISH 法の原理 (イメージ) 右: FISH 検査の手順

3. FISH 検査の実際

標準的な方法の概略は次の通りです。

1) 標本の作製

- (1) 血液の場合は、そのままか、培養後に低張処理¹⁶をして細胞を膨張させ、カルノア液で徐々に固定します。固定した細胞液をスライドガラス上に滴下して、標本を作製します。
- (2) 羊水の場合は、培養方法は異なりますが、標本の作製方法は血液とほぼ同じです。

¹⁵ ハイブリダイゼーション (hybridization): 変性によって 1 本鎖になった DNA 同士は、温度を徐々に下げると相補的に水素結合して 2 本鎖を形成しようとする性質がある。これを利用して、変性前とは異なる相補的な標識プローブ DNA と結合させて、標的 DNA の存在の有無や存在場所を探す。

¹⁶ 低調処理: 0.075MKCl などの低い浸透圧の液中で細胞を膨張させる操作。

(3) 組織の場合は、直ちに凍結し凍結標本を作製します。

2) ハイブリダイゼーション

(1) ハイブリダイゼーションをやすくするために、細胞膜を処理した後に脱水し、乾燥します。

(2) DNA を変性¹⁷するためにプローブを標本に載せ、カバーガラスをかけて 75°C 程度のホットプレート上に置きます。

(3) ハイブリダイゼーションを行うために 37°C の湿潤箱に 1 晩程度置きます。

(4) 洗浄は 75°C 程度の低塩溶液で行い、結合しなかった過剰なプローブを洗い落とします。

(5) 標識した蛍光色素が見やすいように核を DAPI で対比染色¹⁸して、蛍光顕微鏡で観察します。

3) 検査に要する日数

FISH 検査は 1~2 日間です。染色体上で FISH を行う場合には、培養の日数が余分に掛かります。

4. プローブの種類と用途

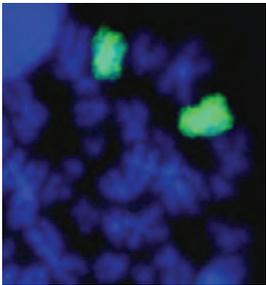
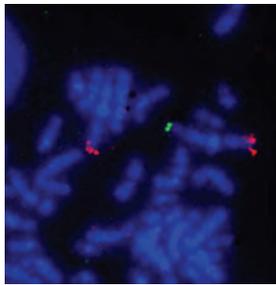
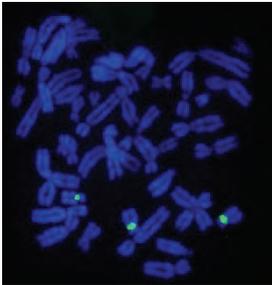
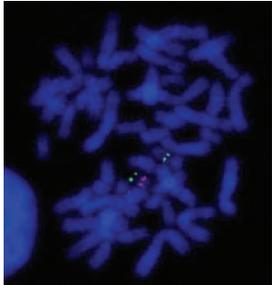
FISH に用いるプローブは、特定の遺伝子座に相補的な塩基配列をした、数十万塩基対ぐらいの DNA 断片で作られています。ですから遺伝子変異を検出する方法としては、大きな変異の検出方法ということができます。あらかじめ蛍光標識されたものが市販されています。プローブの種類は大きく四つに分けられ、目的に応じて使い分けることにより、シグナルの数や蛍光パターンから疾患の有無や状態を判定することができます(表 1)。全染色体ペインティングプローブは単一染色体の特異的配列のプローブであり、マーカー染色体や転座後の染色体などを検査するために用います。FISH の中に M-FISH という方法がありますが、これは個々の染色体を、蛍光の組み合わせにより 24 色に識別して解析する方法です。5 種類の蛍光色素を標識した全染色体ペインティングプローブが使用されており、染色体を種々の組み合わせで多重標識し、専用システムで処理することによって 24 色に識別しています。各染色体の由来を短時間で正確に同定できるため、G 分染法では同定困難な構造異常染色体、マーカー染色体および複雑な転座などの解析が可能です。セントロメアプローブはセントロメアの α サテライト配列のプローブであり、染色体同定と異数性の検出に用いられます。テロメアプローブは染色体特異的なテロメア付近の配列のプローブであり、構造異常染色体の同定とテロメアの検索に用いられます。遺伝子座特異的プロ

¹⁷変性(denaturation): DNA に熱やアルカリなどを加えて、2 本鎖間の水素結合を切り離し、1 本鎖にすること。

¹⁸対比染色:FISH の蛍光を観察しやすくするために、核・核酸に親和性の蛍光色素を用いて着色する。蛍光の退色を防止するための退色防止剤を含む。

ープは特定の遺伝子座配列を含むプローブです。微細欠失症候群や腫瘍の病型特異的染色体異常の検出に用いられます。

表 1 プローブの種類と特徴および診断目的

種類	全染色体プローブ	テロメア ¹⁹ プローブ	セントロメア ²⁰ プローブ	遺伝子座特異的プローブ
特徴	個々の染色体に特徴的な配列の DNA ばかりを集め染色体全体を着色する	テロメア領域の特徴的な配列の DNA を着色する	セントロメア領域の特徴的な繰り返し配列の DNA を着色する	遺伝子・DNA断片を含むユニーク配列だけを着色する
目的	構造異常の同定	染色体末端部を含む構造異常の同定	染色体数の検出	微細欠失症候群の同定 転座型異常の同定 構造異常の同定
疾患名	転座・挿入・欠失・などの構造異常 マーカー染色体 他	転座・逆位・欠失・などの構造異常 他	トリソミー症候群 性染色体の異常 骨髄移植後の定着確認 白血病 他	染色体微細欠失症候群 白血病 他
顕微鏡像				

5. FISH 検査の適応

FISH 検査は先天異常の検索や羊水検査, 白血病や悪性リンパ腫, 固形腫瘍において用いられます。それぞれの適応を図 3 に示しました。

¹⁹ テロメア (Telomere): 染色体の末端小粒。染色体の長腕と短腕の末端にあり, 染色体を保護していると考えられている。特徴的な反復配列からなる。

²⁰ セントロメア (Centromere): 染色体の長腕と短腕が交差するくびれの部分。細胞分裂する際にはここに紡錘糸が結合して 2 極に分かれる。特徴的な繰り返し配列 (α -satellite) からなる。

1) 先天異常の検査

染色体のごく僅かな欠失が原因で起こる先天異常において、微小な欠失を診断するために用いられます。Prader-Willi 症候群, DiGeorge 症候群や Williams 症候群などの染色体微細欠失症候群では、染色体上の小さな欠失を判定することにより診断が可能です。これらの微小欠失は通常の染色体検査では分かりませんから、特に FISH による判定が重要です。微小欠失の判定は、血液を培養して得られた染色体の上で、特定の遺伝子座の有無を判定します。他に、染色体検査で検出された転座などの構造異常染色体やマーカー染色体を詳しく調べるためにも用いられます。また染色体分析に比較して簡単に多数の細胞を検査できるため、間期核を用いてモザイク判定が行われます。しかし FISH 検査では、検査している特定の遺伝子座以外については分からないので、一般的に前述の染色体検査が実施され、染色体検査を補完する目的で実施されます。ただし、迅速に染色体の数だけを検査したい症例では、先に間期核で FISH 検査が実施され、後ほど染色体検査で確認する場合があります。

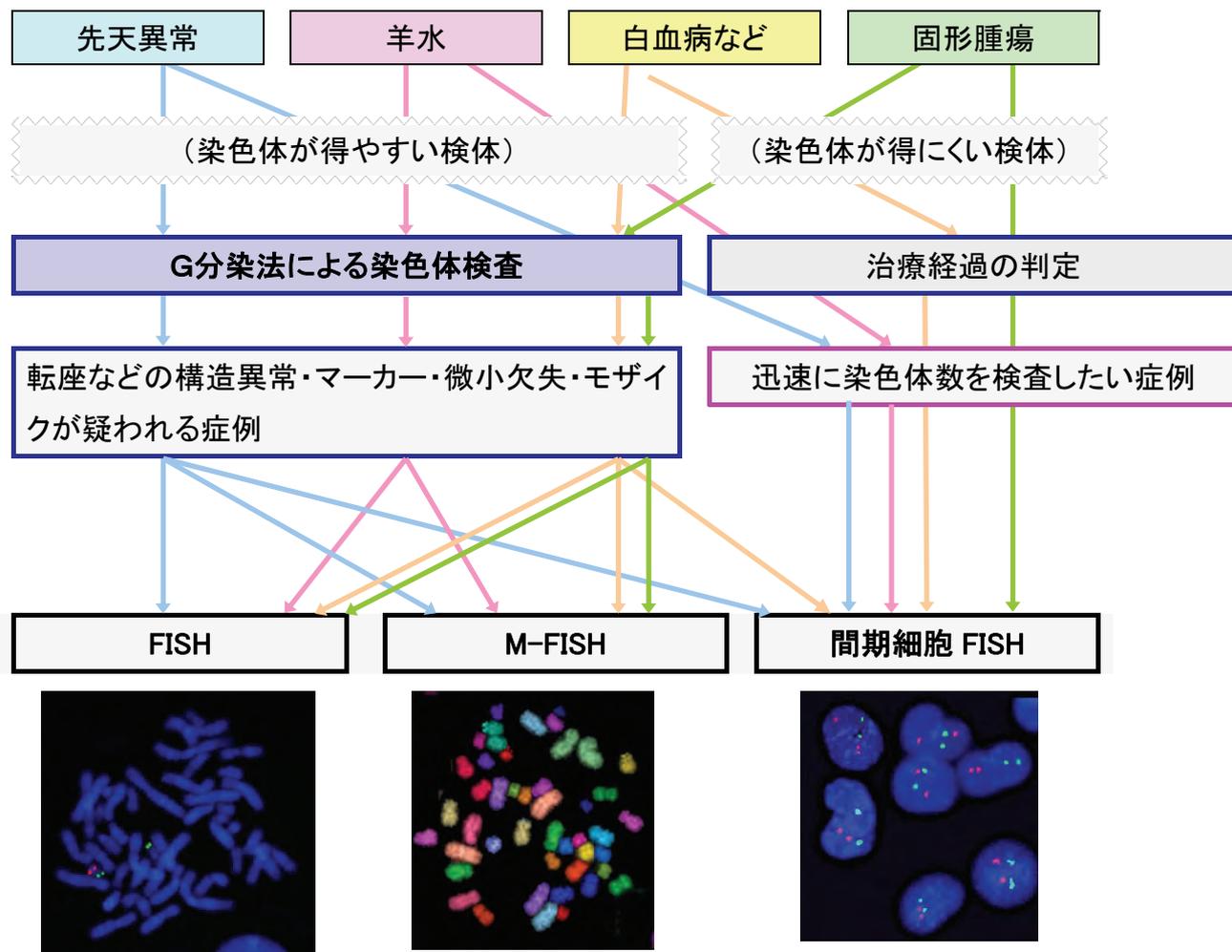


図 3 FISH 検査の適応

2) 羊水検査

特定の染色体異常(21トリソミー, 18トリソミー, 13トリソミー, X および Y 染色体の異常)では, FISH 法による迅速検査が可能ですが, 調べている領域に限った判定であることと, 用いている α サテライト領域には正常変異が認められ, シグナル数の誤判定があることなどの理由で, あくまで染色体検査の補助として用います.

3) 白血病や悪性リンパ腫の検査

一般的には染色体検査を補うために, FISH 検査が実施されます. 白血病や悪性リンパ腫の FISH 検査は間期核で行うのが特徴です. 白血病やリンパ腫, 固形腫瘍などにおいては染色体が得にくいいため, 間期核においても特定の遺伝子座が明瞭に検出できる FISH 検査が利用されます. 染色体検査よりも早く確実に結果が得られるので, 早期の診断が可能です. また染色体検査では分析に適した腫瘍の染色体が得られなかったために正常核型判定であった場合や, 遺伝子検査と染色体検査の結果が食い違った場合などには, 特に重要です. 異常細胞の陽性率は, 蛍光顕微鏡下で 1,000 個近い多数の細胞上のシグナルを観察して算定しますので, 定量的にも優れた検査法です. ただ可視的な非特異要因が避けられないことから, 微小残存病変(MRD)検出能力については定量 PCR よりも劣ります. 染色体転座による融合遺伝子を, それぞれの遺伝子に対する 2 色の蛍光プローブを用いることで, 融合シグナルを検出して判定します. 11q23 異常(*MLL* 遺伝子変異)のように転座相手が多彩な異常の場合には, 融合シグナルが離れたら陽性となるようにデザインされたプローブを使用します. さらに骨髄移植を異性間で行った場合には, 移植した骨髄の生着を確認するために性染色体のプローブを用いて検査します.

4) 固形腫瘍の検査

疾患特異的な遺伝子異常が分かっている一部の固形腫瘍では, 染色体検査とともに FISH が用いられます. 特に染色体が得にくい固形腫瘍において, FISH の役割は重要です. また迅速に結果が得られることから, 早期診断の必要がある悪性腫瘍で用いられることもあります. 最近では乳がんの診断と治療に FISH 検査が保険適応の検査として用いられるようになりました(後述).

6. 検査の問題点と今後の展望

FISH 検査によって同定できることが分かっている病気では, 早期に正確な診断を受けることが可能です. 染色体微細欠失症候群では, FISH 検査により生後数日で診断が確定される場合もあります. 白血病や乳がんの一部では, 分子標的治療薬の適応を決めるために FISH 検査が必

要です。FISH は染色体検査に比べて迅速かつ再現性の高い検査であるために、迅速な遺伝子診断と治療に大きな役割を担っています。今後市販されるプローブの数が増えれば、同定できる病気の数も増加するでしょう。FISH 検査の手法と判定基準については、全国的な標準化作業も始まっており、精度と再現性の高い検査として、FISH 検査の臨床応用が、ますます広がることが予想されます。

4 節 遺伝子検査

南木 融 筑波大学附属病院検査部技師長

1. 遺伝子検査とは

1) 遺伝子検査の目的と従来の検査との違い

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の検出や、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。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。

2) 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 PCR²¹(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

²¹ 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動的に増幅させる方法(詳細は後出の図 5 を参照)

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。

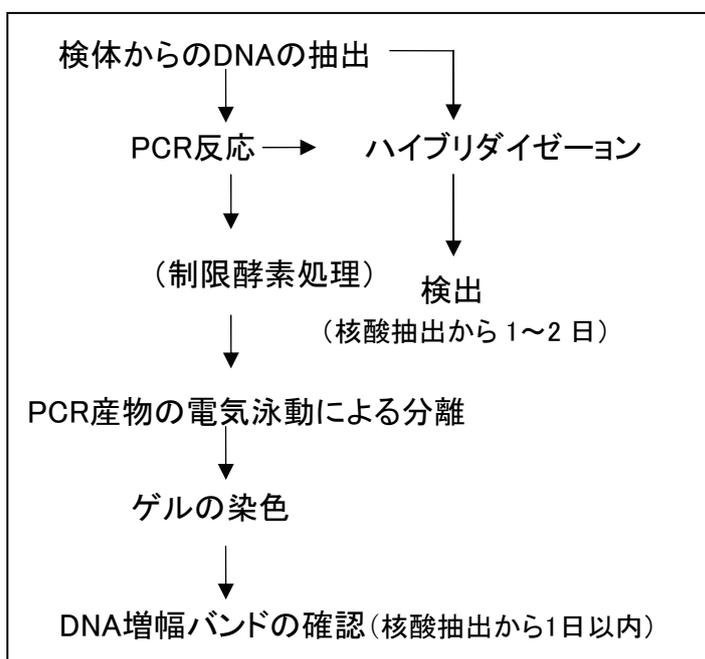


図1 一般的な遺伝子検査の進め方

表2 検体の採取法及び保存法

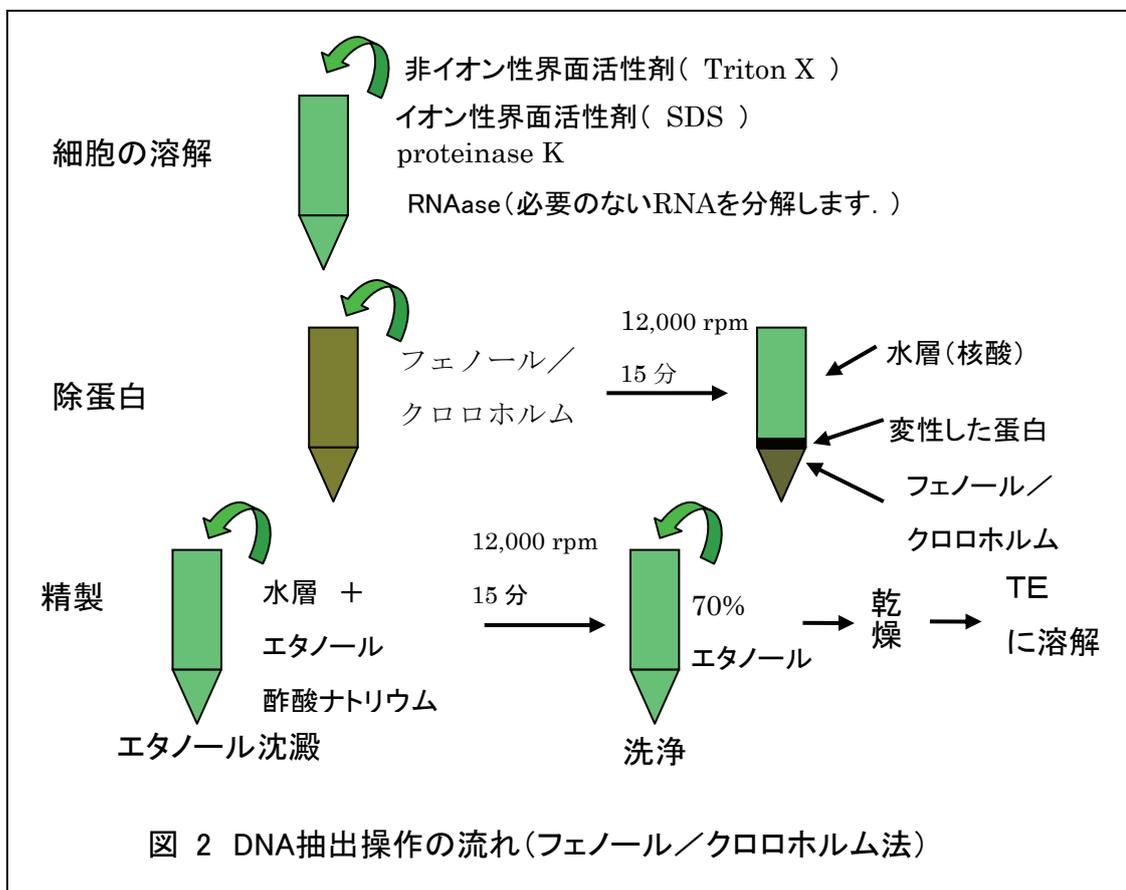
	採取法	保存法
血液, 血漿 骨髄, 細胞	EDTA 採血管 または クエン酸 Na 入りの採血管	遠心分離後, 長期保存の場合には, -80°C 以下で 保存し, 短期保存の場合には -20°C 以下で保存
血清	プレーンの採血管	同上
胸水, 腹水, 胃液, 髄液	無菌容器に無菌的に採取	遠心により細胞を集め, 長期保存の場合には, -80°C 以下で保存し, 短期保存の場合には -20°C 以下で保存
組織片	無菌的に採取し 必要分を細切し滅菌生食 水を垂らす(乾燥防止)	小分けにして, 基本的には長期保存の場合には, -80°C 以下で保存し, 短期保存の場合には -20°C 以下で保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

4) 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。

5) 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。

(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°C 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.

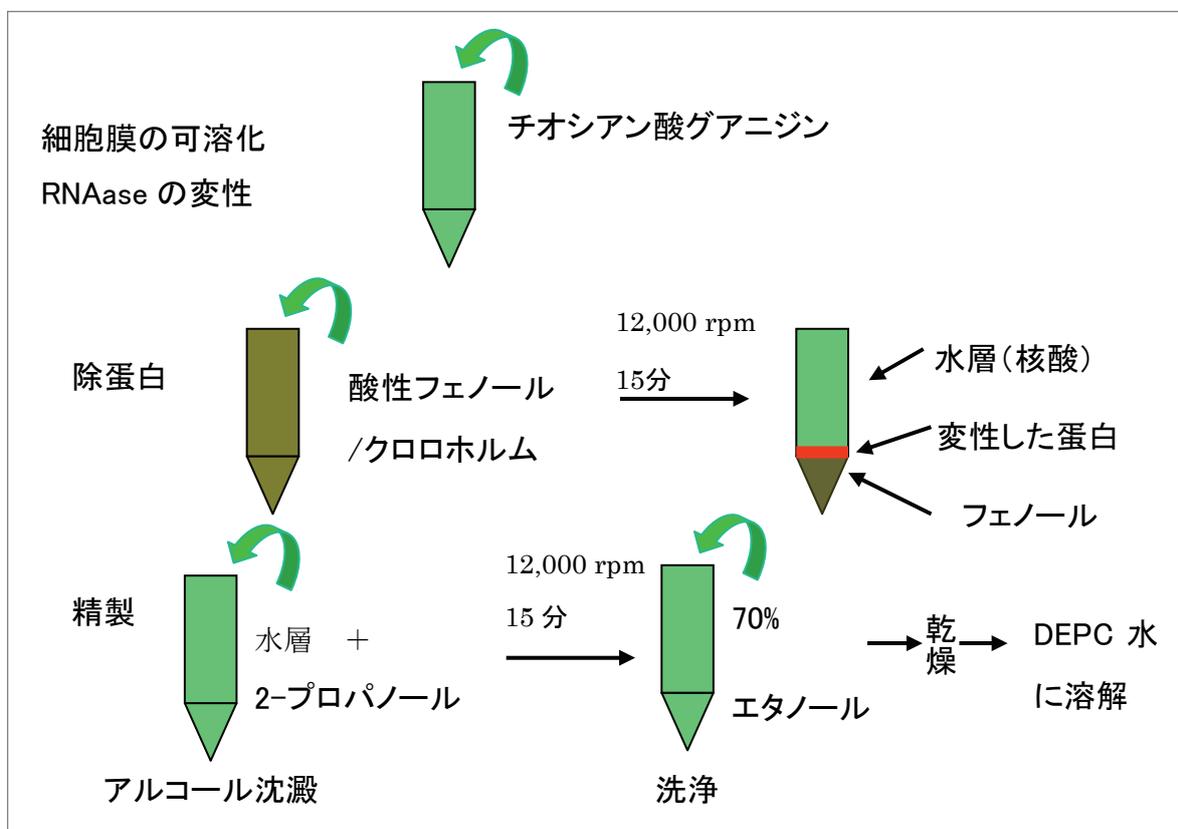


図3 RNA抽出の操作の流れ

6) 核酸の増幅

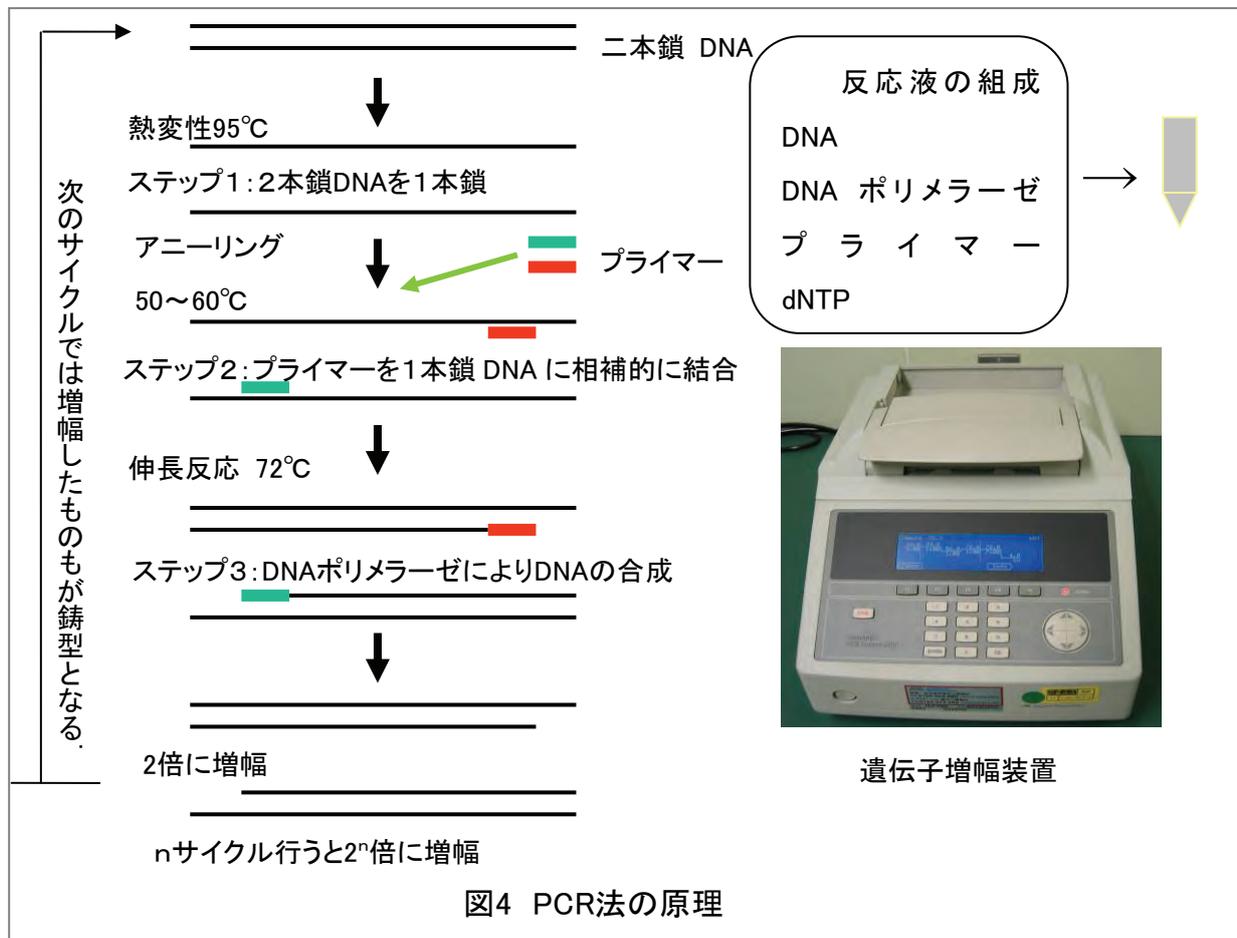
現在, 遺伝子を増幅する技術にはさまざまな方法がありますが, ここでは臨床検査で最もよく用いられている PCR 反応を取り上げます.

(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のおよそ数十万倍程度にまでDNAを増幅することができます。



(2) 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。

7) 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法による検出と、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)。

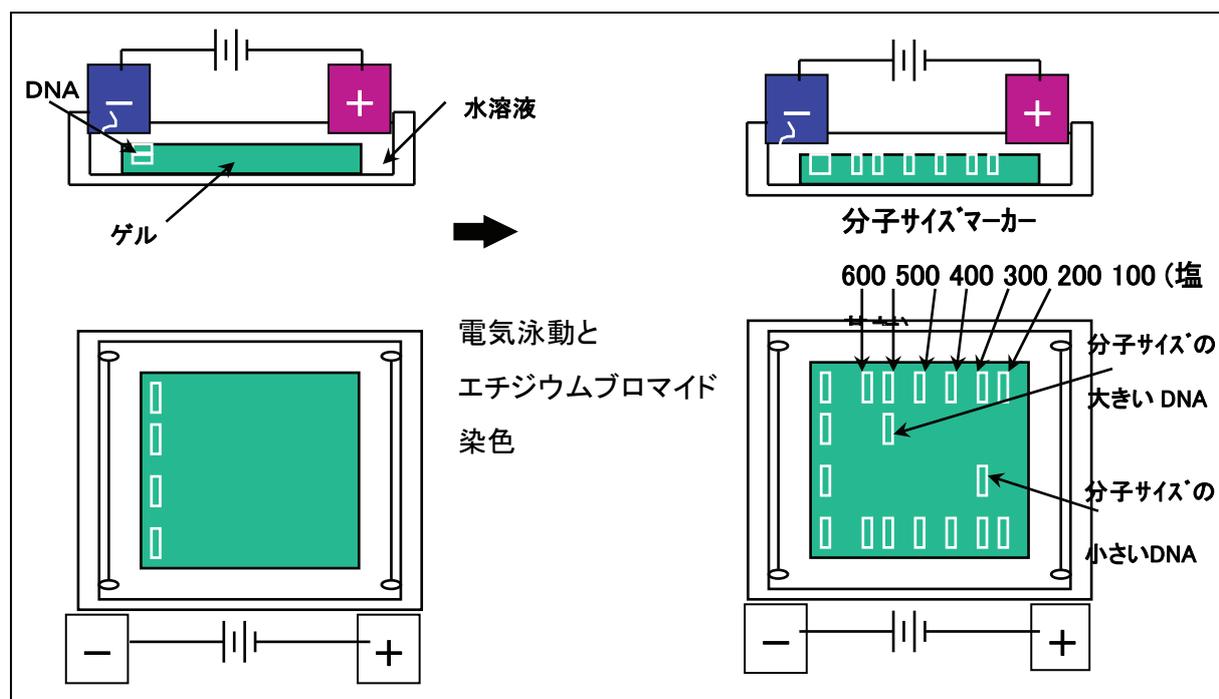


図5 アガロース電気泳動法の原理

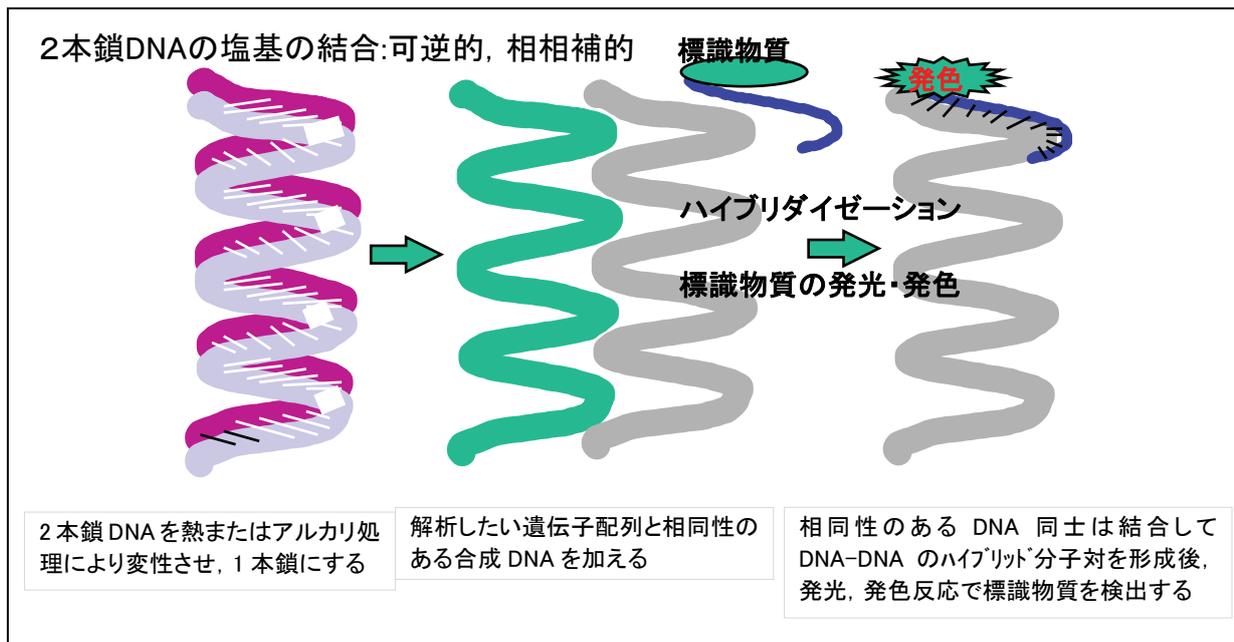


図6 ハイブリダイゼーションを用いた検出の原理

(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).

(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されるメッセンジャー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などがどのような遺伝子(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)。

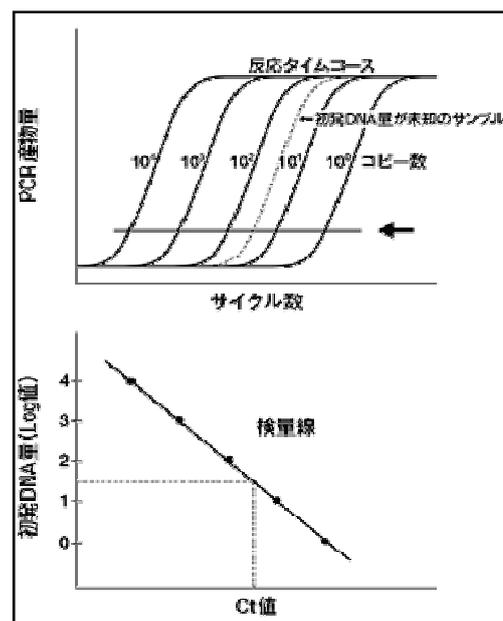


図 7 定量 PCR の原理

3. 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もあります。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。

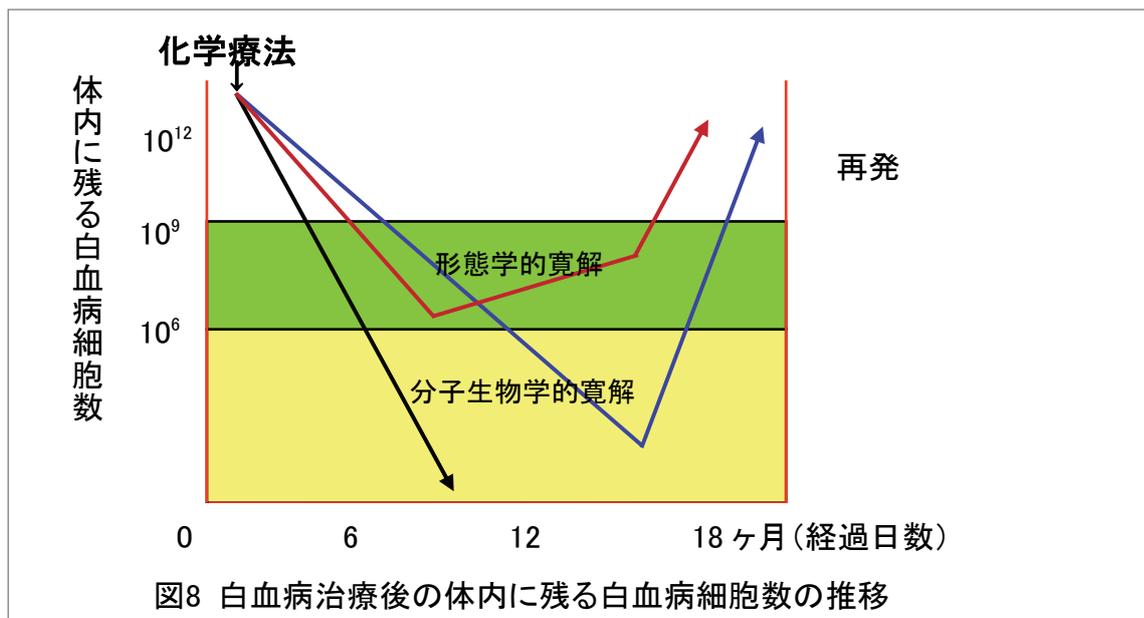


表 3 主な白血病融合遺伝子

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

ML1/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.

(1) 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, 融合遺伝子が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).

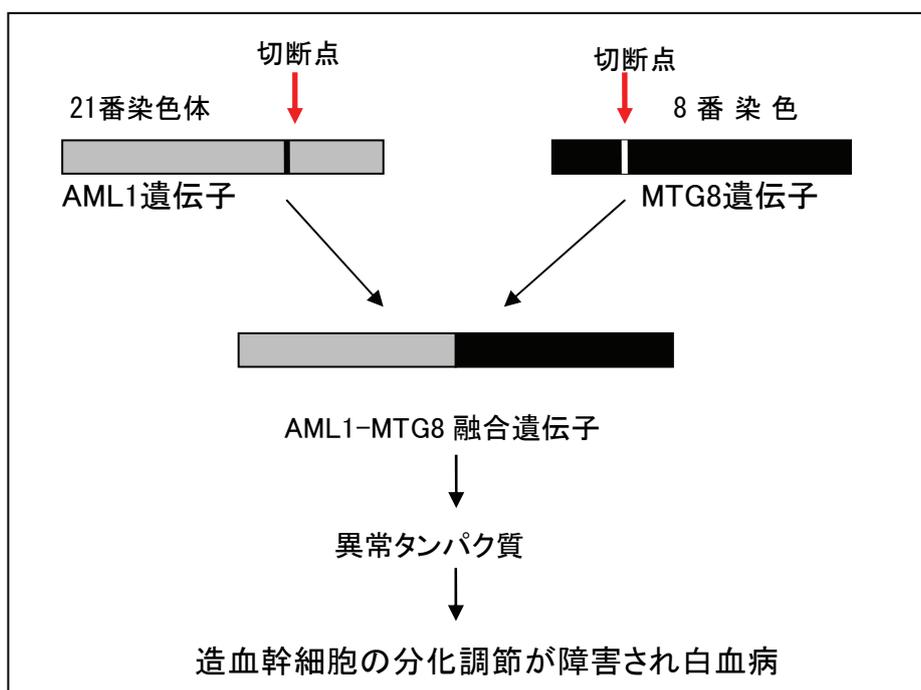


図9 急性骨髄性白血病でみられる *AML1/MTG8(ETO)* 融合遺伝子

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(図11). 次に白血球より mRNA を抽出し(図3), この RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を合成します(図

12). 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.

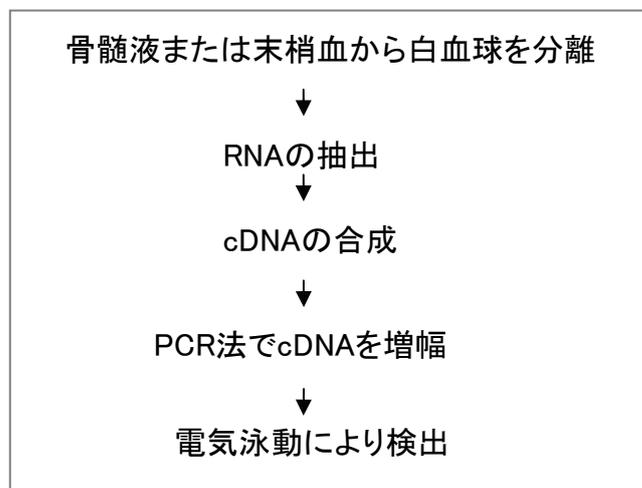


図 10 RT-PCR 法による融合遺伝子検査の流れ

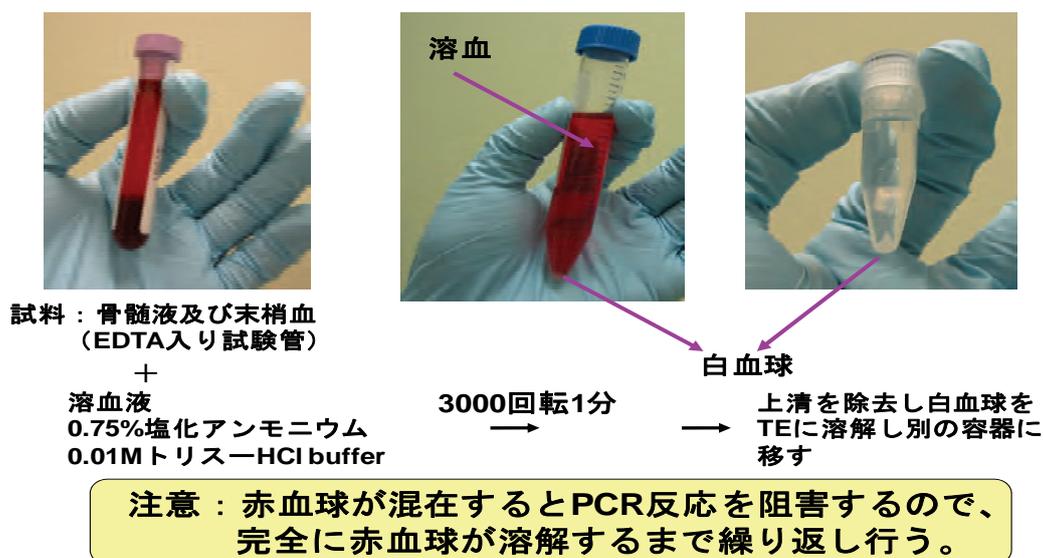
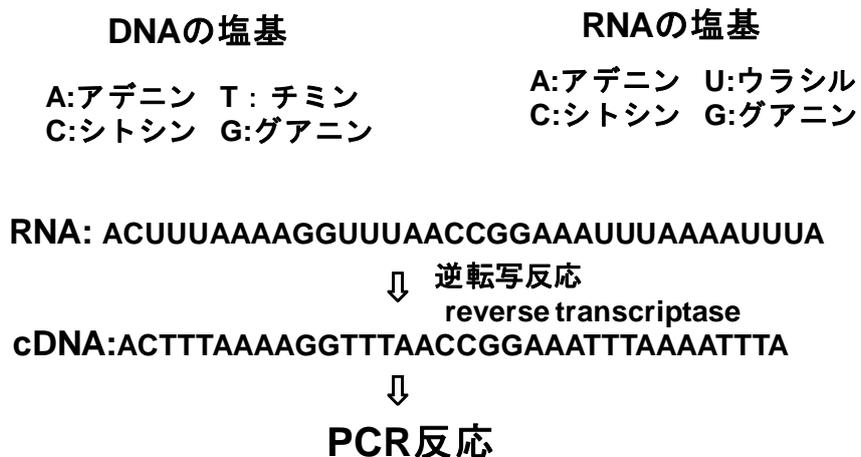


図 11 骨髓液及び末梢血液から白血球の分離

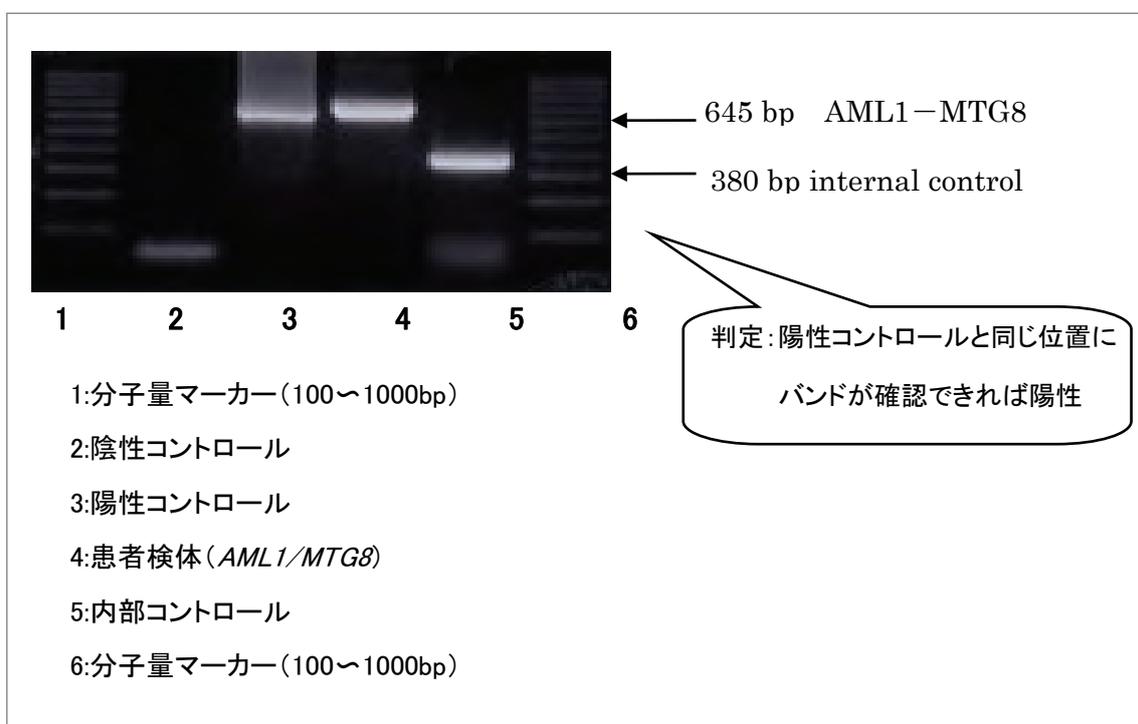
③結果の解釈

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 13)



RNAは直接PCR反応の鋳型にならないため、まずmRNAから逆転写酵素によってPCRの鋳型となるcDNA（相補的DNA）を合成する必要があります。このcDNAを合成する反応を逆転写反応（TR反応）という。

図 12 cDNA の合成

図13 -PCR法による*AML1/MTG8(ETO)*融合遺伝子検査の結果の判定

4. 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、種々の倫理的な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3章 腫瘍の染色体遺伝子検査

1 節 急性白血病

清水 雅代 財団法人倉敷中央病院臨床検査科

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(白血病細胞とも言います)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曝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

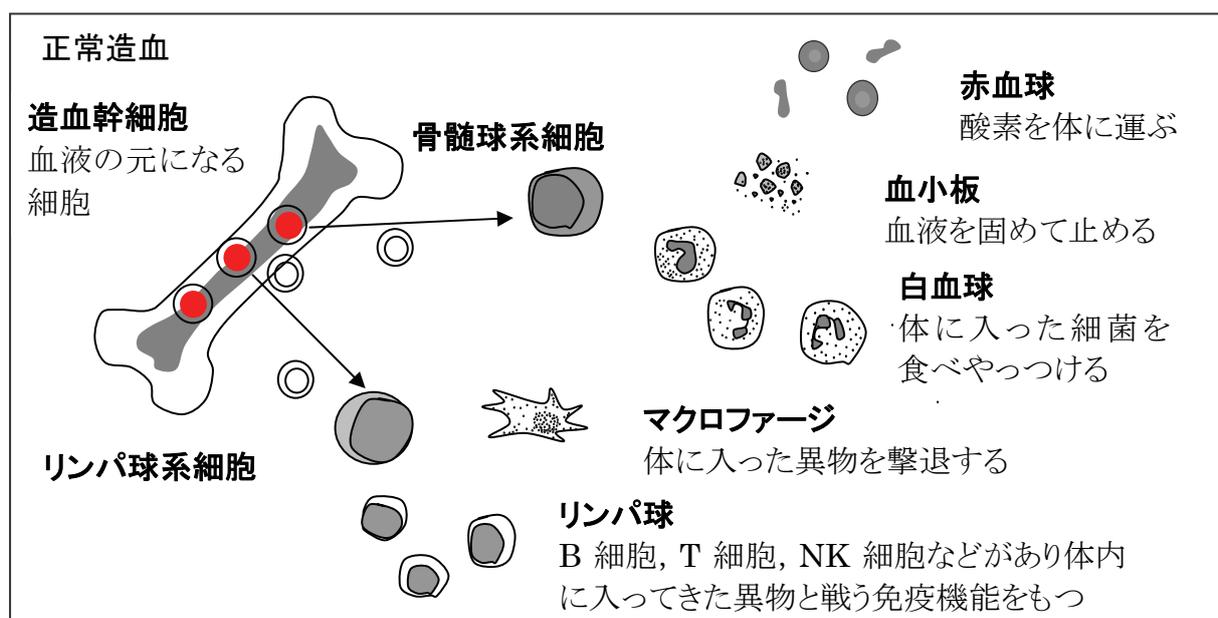


図1 造血のしくみ

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。

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)。

(1) 末梢血の検査

表 1 末梢血の参考値

項目		参考値
赤血球数		男性 410～550 万/mm ³ 女性 380～480 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		16～36 万/mm ³



(2) 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。

(3) 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リーにて検査します。

(4) 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見る検査です。

(5) 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)。



図2 染色体核型

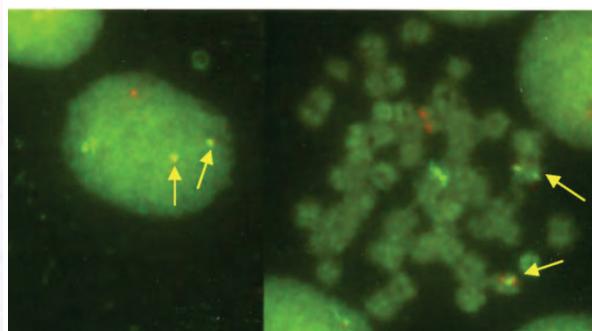


図3 FISH 検査

(6) 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。

(7) 画像検査

白血病の患者さんには、肝臓・脾臓・リンパ節の腫大や、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。貧血が起これば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²²(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. 急性白血病の染色体異常

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つてきました。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. 急性白血病の治療方法

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。

²² 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。

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 <ul style="list-style-type: none"> 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 C B F β/MYH11 を有する骨髄中異常好酸球増多を伴う AML d) 染色体 11 q 23 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 <ul style="list-style-type: none"> 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) 11 q 23 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,biphenotypic	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/RARα</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
不良	del(7q)	<i>VL1, MDS1</i>	75	23
	Comolex		7	21
	del(3q)		63	12
	del(5q)		57	11
	-7		54	10
	-5		42	4

CR=完全寛解

(Grimwade,D.et al.:1998 より改変)

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²³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)の骨髄、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。

²³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。