

造血器腫瘍における multiplex reverse transcription polymerase chain reaction 法の有用性

大畑 雅彦 大棟 久美江 黒山 祥文
藤田 浩之¹⁾

静岡赤十字病院 検査部

1) 同 血液内科

要旨：世界保健機構 (World Health Organization : WHO) 分類で提唱されている急性白血病の白血病特異的な遺伝子学的なサブグループを同定する目的で, multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) 法を用いて検討した. 急性白血病 16/25 例と慢性骨髄性白血病の 9/9 例では, 白血病特異的な再構成を multiplex RT-PCR 法で確認し, この結果は染色体核型の結果とも関連していた. 急性骨髄性白血病の中でも French-American-British (FAB) 分類-M2 t(8;21), M3, M4 Eo は形態所見と染色体核型および遺伝子所見が完全に一致した. 遺伝子学的な解析により, 染色体分析で不明確であった異常が明らかとなり, 残存白血病の検索においても不可欠な情報を得る事ができた.

Key words : polymerase chain reaction (PCR) 法, multiplex reverse transcription-PCR (multiplex RT-PCR) 法, 急性白血病, 慢性骨髄性白血病, 悪性リンパ腫, cyclin D1

I. 緒言

近年の分子生物学の進歩により, 臨床医学とりわけ臨床検査の領域にも遺伝子学的な手法を用いた検査法が導入されてきた. 中でも, 造血器腫瘍はサンプリングの容易さ, 遺伝子異常と特定病型との関連性が早くから明らかにされていたことより, 遺伝子学的検査の最も進んでいる領域といえる. 実際, 1998 年には, 造血器腫瘍核酸増幅同定検査が制限つきで保険承認された. 当院では, 昨年より準備してきた遺伝子検査室が本年初めに完成し, 機器の搬入がほぼ完了した 3 月より polymerase chain reaction (PCR) 法を中心に技術の習得と同時に, 染色体分析結果と遺伝子検査との対比を行ってきた. また, 形態学的所見とフローサイトメトリー (FCM) による表面形質の検索を合わせて, 遺伝子学的検査の最も効率的な造血器腫瘍の診断法を模索してきた. その中で, multiplex reverse transcription-PCR (multiplex RT-PCR) 法¹⁾を採用し, 白血病症例を用いて検証を行なった. さらに悪性リンパ腫におい

ても, 予後の不良なマントル細胞性リンパ腫 (MCL) の原因遺伝子である cyclin D1 (CCND1) を競合 RT-PCR 法²⁾で検討した. これらの結果を紹介し, 遺伝子学的な検索法の有用性を考察する.

II. 対象と方法

1) 対象: 当院で経験した造血器腫瘍の内, 遺伝子学的な検索が確立している慢性骨髄性白血病 (CML) 慢性期 7 例と急性転化 (CML-BC) 2 例に, FCM および染色体核型分析, FAB 分類で診断が確定した急性骨髄性白血病 (AML) 16 例, 急性リンパ性白血病 (ALL) 9 例, さらにリンパ節生検で病理診断がなされ FCM の検索ができた悪性リンパ腫 6 例を対象とした. これらの症例は, 全て染色体分析を施行した (外注 SRL).

2) 方法: 骨髄液またはリンパ節細切後の細胞浮遊液を QIAGEN 社キット QIAamp RNA Blood Mini キットを用いて総 RNA を抽出した. RT-PCR には, Amersham 社 Ready To Go RT-PCR Beads を使用した. RT 反応は PCR Thermal Cycler Ta-

KaRa を使用し、42°C30分、95°C5分反応させ cDNA を得た。白血病の multiplex RT-PCR 法の PCR 条件および primer の設計は、Pallisgaard ら¹⁾、Kim ら³⁾の方法に準じて行なった。Nested PCR は、Amersham 社 puRe Taq Ready To Go PCR Beads を用いて添付資料に準じて行なった。CCND1 の検索は、Uchimaru ら²⁾の方法に準じた。増幅した遺伝子産物は、Mupid ミニゲル泳動槽を用いて泳動後、SYBR Gold にて1時間染色後、ATTO プリントグラフにて可視化した。

リンパ腫細胞および急性白血病細胞の表面形質の検索は、COULTER EPICS XL を用いて CD45 gating 法にて分析を行なった。特に悪性リンパ腫においては、CD5、CD10、CD19、CD20 の発現を、急性リンパ性白血病においては CD10、CD25、KOR-SA 3544 の発現と遺伝子学的所見を対比した。

III. 結 果

1) CML 症例における nested RT-PCR

検出感度向上の目的で Kim ら³⁾の報告する nested RT-PCR 法にて、CML 症例の Major Bcr-Abl キメラ遺伝子 (M-BCR) の検出を行なった。図1のように case 29 は 368 bp に、case 28 は 443 bp にバンドが検出された。ここに示す primer を用いることで M-BCR キメラ遺伝子の成り立ち、即ち bcr 切断部位の同定が可能となった。368 bp は b2 a2、443 bp は b3 a2³⁾で、今回 bcr 切断部位の検索を行なった5例のうち b2 a2 は2例、b3 a2 は3例に認めら

れた (表2)。

2) 急性白血病における multiplex RT-PCR 法の実際

図2には MLL:11q23 を同定した (表1 case 12) 実際の泳動像を示す。MLL: R1, R2, R5 は mix primer で、そのうち R2 と R5 にバンドが検出された。図2下段には、MLL 遺伝子の split-out analysis を示す。R2 に含まれていた6コの遺伝子と R5 に含まれていた5コの遺伝子を個々に展開したところ、R5 C に単独のバンドが検出された。R5 C は t(9;11) (p22;q23) の転座を示すが、MLL 遺伝子のエクソン (ex) 6 から9に切断点があり、その切断部位に応じて、MLL ex6:321 bp, ex7:208 (453)bp, ex8:322 (567)bp, ex9:469 (714)

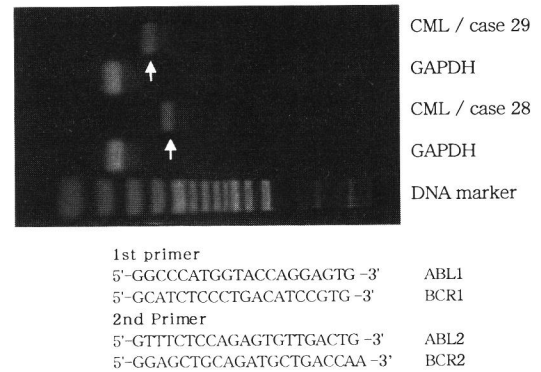


図1 CML症例におけるnested RT-PCR (bcr遺伝子の切断部位と泳動位置の違い)

表1 AML症例におけるmultiplex RT-PCR法と形態所見、染色体核型との対比

Case	diagnosis	age (sex) : sample	multiplex RT-PCR	karyotype
1	AML / M2	41 (F) : BM	AML1/ETO	46,XX,t(8;21)(q22;q22) 5/20 cell
2	AML / M2	70 (M) : BM	NAD	49,X,-Y,mar1×4 20/20 cell
3	AML / M2	69 (M) : BM	NAD	46,XY 20/20 cell
4	AML / M2	53 (M) : BM	MLL.ex7-8/AF9	46,XY 20/20 cell
5	AML / M3	22 (F) : BM	PML/RAR	46,XX,t(15;17)(q22;q12) 17/20 cell
6	AML / M3	77 (M) : BM	PML/RAR	46,XY,t(15;17)(q22;q12) 20/20 cell
7	AML / M3	58 (M) : BM	PML/RAR	46,XY,t(3;17)(p21;q25),t(15;17)(q22;q11~21) 15/20
8	AML / M4	45 (F) : BM	NAD	46,XY,t(15;16) 20/20 cell : 先天性核型
9	AML / M4EO	37 (M) : BM	CBF/MYH11	46,XY,inv(16)(p13q22) 20/20 cell
10	AML / M4EO	37 (M) : BM	CBF/MYH11	46,XY,inv(16)(p13q22) 18/18 cell / 付加的染色体 (+)
11	AML / M4EO	37 (M) : BM	CBF/MYH11	46,XY,inv(16)(p13q22) 20/20 cell
12	AML / M5b	42 (M) : BM	MLL.ex7-8/AF9	46,XY,t(9;11)(p22;q23;q11) 20/20 cell
13	AML / M5b	66 (M) : BM	MLL.ex6/AF10	45,XY,t(11;17)(q23;q12) or t(11;17)(q23;q21), der(12)t(12;13)(p11;q14)ins(12;?)p(11;?)-13 10/20 cell 52,Idem,+6,+8,+8,+add(12)(p11),-der(12)t(12;13) ins(12;?)+13,+19,+21,+21 2/20 cell 46,XX,t(4;11)(q25;p14) 2/20 cell
14	AML / M5b	32 (F) : BM	NAD	46,XX,add(12)(p11) 1/20 cell, 46,XX 19/20 cell
15	AML / M5b	69 (F) : BM	NAD	47,XY,+13 16/20 cell
16	AML / M5b	88 (M) : BM	NAD	

表2 ALLおよびCML症例におけるmultiplex RT-PCR法と形態所見, 染色体核型, 表面形質との対比

Case	diagnosis	age (sex) : sample	CD10/CD25/ KORSA*	multiplex RT-PCR	karyotype
17	ALL-L1	14 (M) : BM	99.9 %/1.4 %/87.9 %	NAD ^S	46,XY,+4,+10,+12,+17,+18,+19,+21,+21 2/5 cell
18	ALL-L1	11 (F) : BM	2.3 %/13.3 %/22.4 %	NAD	46,XX 20/20 cell
19	ALL-L1	3 (M) : BM	97.7 %/0.8 %/0.7 %	E2A/PBX1	46,XY,inv(9)(p11 q13), der(19)t(1:19)(q23;p13) [1] 46,XY,inv(9)(p11 q13) 19/20 cell
20	T-ALL	33 (M) : BM		TAL1/SIL	46,XY 20/20 cell
21	ALL-L2	37 (M) : BM	1.5 %/0.2 %/0.8 %	MLLex7/AF4	46,XY,t(4;11)(q21;q23),t(7)(q10) 10/20 cell
22	ALL-L1	11 (M) : BM	65.1 %/92.2 %/38.9 %	m-bcr	46,XY,t(9;22)(q34;q11) 3/20 cell
23	ALL-L2	58 (M) : BM	99.9 %/10.8 %/97.6 %	m-bcr	45,Y,-X,add(4)(p16),-7,t(9;22)(q34;q11),-10,-14,add(16)(q22),+3mar
24	ALL-L2	10 (M) : BM	97.6 %/1.9 %/94.3 %	m-bcr	46,XY 20/20 cell
25	ALL* (CD7+)	69 (M) : BM	95.2 %/98.7 %/12.2 %	NAD	45,XY,-7 18/20 cell
26	CML-BC**	29 (M) : BM	98.9 %/11.5 %/43.1 %	M-BCR b3a2	46,XY,t(9;22)(q34;q11) 5/20 cell 46,Idem,der(21)t(1:21)(q21;q22) 9/20 cell
27	CML-BC**	64 (F) : BM	89.1 %/32.8 %/N.T	M-BCR	46,XX,t(1;9;22)(p32;q34;q11) 20/20 cell
28	CML	49 (M) : BM		M-BCR b3a2	46,XY, t(9;22)(q34;q11) 20/20 cell
29	CML	51 (M) : BM		M-BCR b2a2	46,XY, t(9;22)(q34;q11) 18/20 cell
30	CML	57 (F) : BM		M-BCR	46,XX, t(9;22)(q34;q11) 20/20 cell
31	CML	60 (F) : BM		M-BCR	46,XX, t(9;22)(q34;q11) 6/20 cell
32	CML	65 (M) : BM		M-BCR b3a2	46,XY, t(9;22)(q34;q11) 20/20 cell
33	CML	48 (M) : B.M		M-BCR b2a2	46,XY, t(9;22)(q34;q11) 19/20 cell
34	CML	25 (M) : BM		M-BCR b3a2	46,XY, t(9;22)(q34;q11) 10/20 cell

* : POX(+)⁺芽球は2.3%で, 表面形質はmyeloidおよびlymphoid markerが陽性でさらにCD7(+)⁺であった.

** : CML-BC (lymphoid-BC), #: KOR-SA3544, NAD : no abnormality detected, S : M-BCR, m-bcrのみ検査しともに陰性

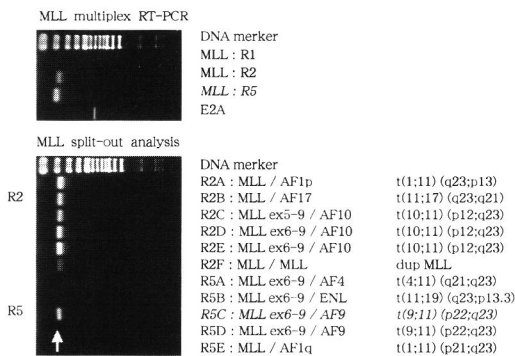


図2 Multiplex RT-PCR法の実際1. MLL遺伝子を同定し得た症例 (case 12)

bp に特異なバンド位置が出現する。本例の場合は, 200 bp 前後にバンドがあり, MLL の ex 7/AF 9 t (9;11) (p 22;q 23) と同定された。

図3には TAL 1/SIL を同定した (表2 case 20) 症例の泳動像を示す。本例の芽球の形態学形状は, 小型で核不整, 核クロマチンは凝集し, N/C 比が高く, ペルオキシダーゼ染色 (POX) 陰性, 酸性フォスファターゼはゴルジ野に局在性に陽性を示した。FCM では T 細胞性 マーカーが陽性で, さらに CD 4+CD 8+分画の存在もあり, 形態学的所見と表面形質から T-ALL と診断された。multiplex RT-

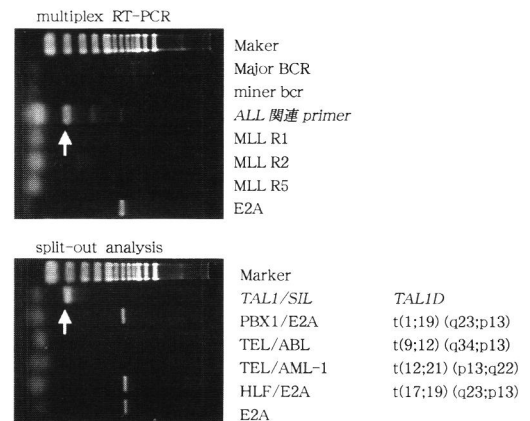


図3 Multiplex RT-PCR法の実際2. TAL 1/SIL 遺伝子を同定し得た症例 (case 20)

PCR 法では, ALL 関連 mix primer に明瞭なバンドが出現した。さらに5コの ALL 関連遺伝子を split-out analysis を行ったところ, レーンの上段から2段目に明瞭な TAL 1/SIL (183 bp) のバンドが検出された。

3) 残存白血病細胞の同定

図3で示した TAL 1/SIL 症例を, 同じ primer を用いて nested PCR 法で残存白血病細胞の検索を行った。治療後約1ヵ月後の骨髄では, 初診時に見

られた TAL 1/SIL の明瞭なバンドは検出されなかった (図 4 上)。

図 4 下には CML 症例で血縁ドナーからの同種造血幹細胞移植を施行した症例を提示する。移植後 28 日には nested PCR 法を用いて検索しても、M-BCR は検出できなかった。本例は、移植後 4 年を経過しているが、分子生物学的完全寛解を維持している。

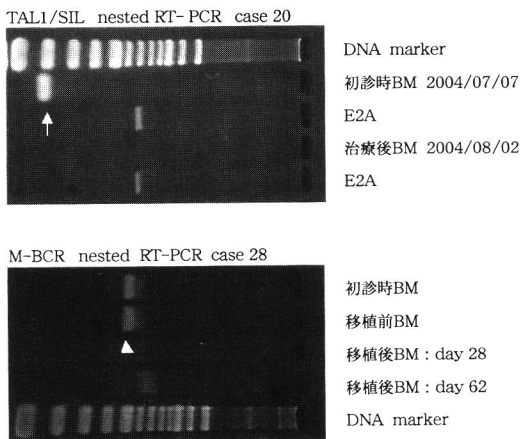


図 4 Nested RT-PCR法を用いた残存白血病細胞の検出

4) 遺伝子学的検索と細胞形態所見, 染色体核型および表面形質の対比

AML では検索した 14/16 例に異常核型を示した, 病型特異的な核型を示した症例は 9 例にみられ, multiplex RT-PCR 法との対比では 8/9 例で一致した。不一致であった case 13 は, 染色体分析では t(11;17)(q 23;q 12) or t(11;17)(q 23;q 21) を示したが, multiplex RT-PCR 法では MLL ex 6/AF 10 (MLL ex 6 と 10 番染色体との転座) を示唆する所見であった。また, 染色体分析では正常核型を示したが, multiplex RT-PCR 法では MLL ex 7-8/AF 9 で t(9;11) を示唆する所見が得られた症例も存在した (case 4)。

ALL では, 6/9 例が異常核型を示した。その内, 病型特異的な核型は 3 例に認められ, multiplex RT-PCR 法の結果とも完全に一致した。しかし, case 20, 24 は正常核型であったが, multiplex RT-PCR ではそれぞれ TAL 1/SIL と m-bcr が検出された。また, case 19 は der(19) ?t(1;19)(q 23;p 13) を 1/20 細胞観察しているが, multiplex RT-PCR では E 2 A/PBX 1 を検出した。

表面形質との関連では, multiplex RT-PCR 法で m-bcr を検出した症例は全例 KOR-SA 3544 が陽性であり, CD 25 の発現も認められる症例も存在した。CD 10 陰性の症例は今回の分析で 2 例存在したが, その内の 1 例には MLL の関与が認められた。KOR-SA 3544 が陰性で, CD 25 の発現や myeloid と lymphoid marker がともに陽性の症例には, multiplex RT-PCR 法で M-BCR が証明される比率が多い傾向があった。

CML では, 核型所見と multiplex RT-PCR 法の結果は完全に全例一致した。

5) cyclin D 1 の検出と臨床応用

リンパ節生検を施行し病理組織で ML と診断された症例で, FCM による表面形質の検索と染色体核型が分析された検体を用いて, cyclin D 1, D 2, D 3 を競合 RT-PCR 法で検索し cyclin D 1 の過剰発現の有無を検討した。図 5 は, CD 5+CD 19+分画が CD 20 の 8 割以上を占める症例の競合 RT-PCR 法の泳動像である。Cyclin D 1 483 bp, D 2 354 bp, D 3 247 bp²⁾に泳動されるが, case 1 は明らかな D 1 のバンドが観察される。一方, case 2,3 は D 1 にはバンドは検出されず, D 2 が過剰に発現していた。

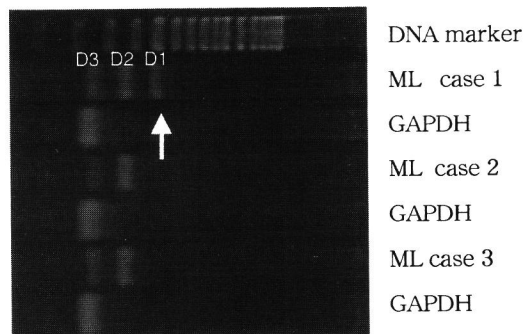


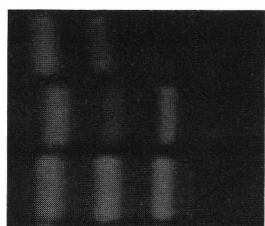
図 5 Cyclin D : Competitive-PCR

病理所見と FCM, 染色体分析および競合 RT-PCR 法の結果の異なった症例の検査所見と泳動像を表 3, 図 6 に示す。Case 4 は, FCM の表面形質で CD 5 の増多を示し病理診断でも MCL であったが, 競合 RT-PCR 法では cyclin D 1 の過剰発現はなく (図 6 の上段), 染色体分析でも MCL の特異的な核型 t(11;14)(q 13;q 32) は認められなかった。Case 5 は染色体分析で分裂像が得られなかったが, case 6 では MCL に特徴的な核型が観察され, とともに CD 5 の著増が観察される。競合 RT-PCR 法では cyclin

D1の過剰発現が観察されるが、病理診断はdiffuse mediam B cell lymphoma : DMBLとFollicular lymphoma : FLであった。

表3 Cyclin D1発現およびFCM所見と病理所見が異なった症例

Case (age/sex)	patho Dx	CD5	CD10	CD19	CD20	cyclin D1	karyotype
Case 4 (72/M)	MCL	63.5%	2.1%	89.1%	63.6%	(-)	46,XY,t(3;13)(q27;q14) 8/20
Case 5 (71/M)	DMBL	99.3%	4.9%	65.4%	70.2%	(+)	Failed
Case 6 (79/M)	FL	82.7%	0.4%	76.3%	75.3%	(-)	43,X,t(11;14)(q13;q32) 2/5



ML case 4

ML case 5

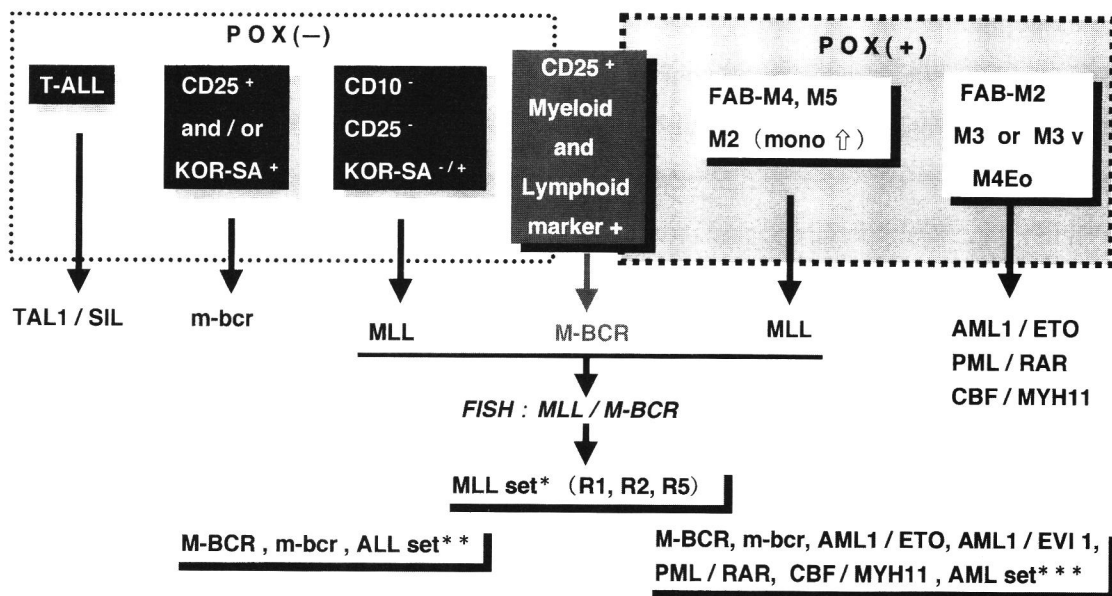
ML case 6

D3 D2 D1

図6 Cyclin D : Competitive-PCR

IV. 考 察

造血器腫瘍の診断は、従来からの形態学的な検査に加えFCMによる表面形質、さらに染色体分析、遺伝子学的な解析によりなされる。中でも染色体異常と遺伝子異常の解析は、白血病やリンパ腫の病型分類に重要な貢献をしてきた。最近報告された新WHO分類では、責任遺伝子の異常を亜型分類の基礎に置いた積極的な試みをしている。急性骨髄性白血病においては、特定の遺伝子異常を有するAMLとして、1) t(8;21)(q22;q22)あるいはAML1/ETOを有するAML、2) inv(16)(p13;q22)あるいはCBFβ/MYH11を有するAML、3) APL, t(15;17)(q22;q22)あるいはPML/RARαを有するAML、4) 11q23 (MLL)異常を伴うAMLを独立した病型としている。他にパーキットリンパ腫/白血病や5q-を伴うMDSも独立した病型として捉えられている。また、責任遺伝子の異常が高頻度であることが記載されているが、それを亜型定義上の要件としていない病型としてはCML、濾胞性リンパ腫：FL、MCLがあげられている⁴⁾。



M-BCR, m-bcr, ALL set**

M-BCR, m-bcr, AML1/ETO, AML1/EVI1, PML/RAR, CBF/MYH11, AML set***

KOR-SA : KOR-SA3544

* : MLL (11q23) / AFX (Xq13), MLL (11q23) / AF1q (1q21), MLL (11q23) / AF1p (1p32), MLL (11q23) / AF4 (4q21), MLL (11q23) / AF6 (6q27), MLL (11q23) / AF9 (9p22), MLL (11q23) / AF10 (10p12), MLL (11q23) / MLL (11q23), MLL (11q23) / AF17 (17q21), MLL (11q23) / ELL (19p13.1), MLL (11q23) / ENL (19p13.3)
 ** : SIL (1p34) / TAL1 (1p34), E2A (19p13) / PBX1 (1q23), TEL (12p13) / ABL (9q34), TEL (12p13) / AML1 (21q22), E2A (19p13) / HLF (17q22)
 *** : NPM (5q35) / MLF1 (3q25.1), TEL (12p13) / PDGFR (5q33), DEK (6p23) / CAN (9q34), SET (9q34) / CAN (9q34), TLS (16p11) / ERG (21q22)

図7 形態所見およびFCM結果からみたMultiplex RT-PCR法を用いた効率的な白血病診断のフローチャート

本邦では、1998年には造血器腫瘍核酸増幅同定検査が制限つきで保険承認された。当院でも遺伝子検査室が新設され、本年9月からは保険診療上での造血器腫瘍の遺伝子検査を実施している。我々は、前述した新WHO分類で責任遺伝子が明確にされた病型を対象に、測定系の確立と効率的な遺伝子診断システムを構築する準備をしてきた。測定系においては特異性と感度を高める目的でnested PCR法を採用した。また、いくつかのパートナー遺伝子と転座するMLL遺伝子の検出や初診時から効率的に複数個の遺伝子異常をスクリーニングすることを目的にmultiplex RT-PCR法を採用した。初診時に検出できたキメラ遺伝子は、同様のprimerを用いることで残存白血病の検索にも経時的に用いることができ有用である。また、効率的な遺伝子診断システムとして、当院で実施しているFCMや特殊染色、形態診断も合わせて図7のように目的の遺伝子異常を絞った検索も有用であろうと考えている。現在はまだ検討中であるが、FISH法を用いてMLL遺伝子やM-BCRを検索することで更に効率的な運用が可能と考えられる。MLL遺伝子を有した症例は予後不良例が多く、初診時からその有無を知ることは極めて重要である。また、Ph(+)の有無は、特にCMLの確定診断や予後不良群であるPh(+)ALLの診断にも不可欠である。従来からの染色体分析は、培養および核型分析に時間を有することから、PCR法の導入により確定診断までに要する時間短縮が可能となり利点の1つである。当院では以前からPh(+)ALLの鑑別にはKOR-SA 3544⁵⁾を用いてスクリーニングしている。今回の検討でも、m-bcr(+)ALL症例は全例KOR-SA 3544陽性で、その有用性が確認できた。さらにCD25の発現やmyeloidとlymphoid markerがともに陽性な所見を重視することで初診時急転のCML症例も考慮でき、遺伝子学的なアプローチを効率的に運用できると思われた。またALL症例のCD10の発現の有無も注目すべき所見の1つである。今回検討したcase 21は、表面形質ではCD10⁻、CD19⁺、HLA-DR⁺(Early B precursor ALL)で、multiplex RT-PCR法による遺伝子検査ではMLL ex 7/AF4を示し、MLL遺伝子の関与が示唆された症例であった。森ら⁵⁾の報告では、Early B precursor ALLでKOR-SA 3544陽性は1/21例であったが、その1例は11q23の転座を有していたと述べている。このように表面形質の検索も含めて目的とする遺伝子異常を推測し、効率

的に遺伝子検査を行うことはprimerの無駄を省く上からも重要である。

multiplex RT-PCR法で異常を示す頻度は文献的に39%~45%^{1,6,7)}とされている。当院での検討では、急性急性白血病全体で20/25例:80.0%(AML 14/16例:87.5%, ALL 6/9例:66.7%)と従来の報告に比し、高率であった。それは、今回の検討が、当初染色体核型で異常を示す症例を多く選択し、遺伝子学的検索を行なったことによると思われる。しかし、病型特異的な核型を示し、multiplex RT-PCR法でも異常を示した症例は、AMLでは8/9例にALLでは全例一致していた点は注目すべき所見である。特にAMLにおいては形態学的に診断が容易なFAB-M2 t(8;21), M3, M4 Eoは、全例染色体核型と遺伝子型が一致した。CMLにおいても同様に染色体核型と遺伝子型が一致し、遺伝子の異常が病型や亜型と完全に一致することが確かめられた。また、今回の検討では、正常核型であるにもかかわらず、遺伝子学的異常が観察された症例が3例に見られた。特にその傾向はALLに多く認められた。ALLでは、核型解析に必要な分裂像が得られないことをよく経験するが、採取されたRNA量が十分にあり、さらにキメラ遺伝子が明らかにされている症例ではmultiplex RT-PCR法にてスクリーニングすることは極めて有用であることを示す所見と思われた。また、case 19では、t(1;19)(q23;p13)の存在が不明確であったが、multiplex RT-PCRではE2A/PBX1を検出している。Case 13は染色体核型も遺伝子表現型とともにMLLの関与を示唆する所見であったが、転座先にて相違が見られた。このような相違は染色体分析においてクリプティックな異常と判断されるが、今後症例を増やし検討すべき課題である。

multiplex RT-PCR法で同定された遺伝子異常は、前述したように検出に使用したprimerを用いて残存白血病細胞のチェックが可能である。今回の検討でも、図4に代表例を示したが、有用性が確認できた。今後は、real time PCR法の導入により、現在の定性から定量へと検査技術の向上を図り、治療後のモニターリングをより精度の高いものにした。

悪性リンパ腫においては、今回MCLとの鑑別を有する症例を中心に検討した。MCL細胞の形態学的所見としてはリンパ芽球様の繊細な核クロマチンを示し、核不整(くびれ)を有した特徴ある細胞像

である。我々は、表面形質の CD 5(+)B 細胞集団の存在と CD 10-, CD 23- の所見も合わせて MCL の診断根拠の 1 つにしている。さらに CD 5(+)DLBL を考慮して、CCND 1 の有無を簡便な競合 RT-PCR 法を用いて検索した。今回の検討では、3 例に病理診断と遺伝子および表面形質の所見との解離が見いだされた。Primer の設定から PCR 条件のすべてを Uchimaru ら²⁾の方法に準じたが、CCND 1 の過剰発現の判定には D 1/D 3 比を用いてはならず、今回はあくまで cyclin D 1 (483 bp) のバンド位置と濃さで判断しているに過ぎない。病理所見との解離には、いくつかの要因も考えられる。まず病理側の要因として免疫組織学的な検索における固定不良や用いた CCND 1 モノクローナル抗体のクローン、切片作成後の放置時間などによっても染色性が異なる（私信）。また遺伝子検査においては、定性的判定法でなく、定量 PCR 法の導入がより客観的である。今後は、一致率の向上に努めるよう、個々の検査室の情報 のやり取りが大切であろう。

V. 結 語

- 1) 造血器腫瘍の遺伝子学的な検索を目的に nested RT-PCR 法とその応用である multiplex RT-PCR 法を導入し、その有用性を検討した。
- 2) AML では FAB-M 2 : t(8;21), M 3, M 4 Eo は、形態学的診断と染色体核型、遺伝子学的な所見が完全に一致した。また、CML においても同様であった。
- 3) multiplex RT-PCR 法の導入により MLL 遺伝子や Ph(+)ALL など予後不良な白血病症例をスクリーニング可能であった。効率的に遺伝子検査の primer の選択には、FCM による表面形質の検索や FAB の病型が参考になると考えられた。
- 4) リンパ節生検においては、FCM の表面形質所見と合わせて競合 RT-PCR 法で CCND 1 を検索することは MCL の診断において極めて有用であった。

文 献

- 1) Pallisgaard N, Hokland P, Riish DC, et al. Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for simultaneous screening of 29 translocations and chromosomal aberrations in Acute Leukemia. *Blood* 1998 ; 92 (2) : 574-588.
- 2) Uchimaru K, Taniguchi T, Yoshikawa M, et al. Detection of Cyclin D 1 (*bcl-1*, PRAD 1) Overexpression by a Simple Competitive Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assay in t(11; 14) (q 13; q 32)-Bearing B-Cell Malignancies and/or Mantle Cell Lymphoma. *Blood* 1997 ; 89 (3) : 965-974.
- 3) Kim Y.J, Kim D.W, Lee S, et al. Comprehensive comparison of FISH, RT-PCR, and RQ-PCR for monitoring the BCR-ABL gene after hematopoietic stem cell transplantation in CML. *Eur J Haematol* 2002 ; 68 : 272-280.
- 4) 森 茂郎, 新 WHO 分類による白血病・リンパ系腫瘍の病態学. 東京 : 中外医学社 ; 2004. P. 1-7.
- 5) Mori T, Sugita K, Suzuki T, et al. A novel monoclonal antibody, KOR-SA 3544 which reacts to philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells with high sensitivity. *Leukemia* 1995 ; 9 : 1233-1239.
- 6) Strehl S, Konig M, Mann G, et al. Multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction screening in childhood acute myeloblastic leukemia. *Blood* 2001 ; 97 : 805-808.
- 7) Eii L, Mancini M, Moleti L, et al. A multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2003 ; 88 (3) : 275-279.

Usefulness of Multiplex Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Method for Routine Molecular Diagnostic Hematopathology Practice

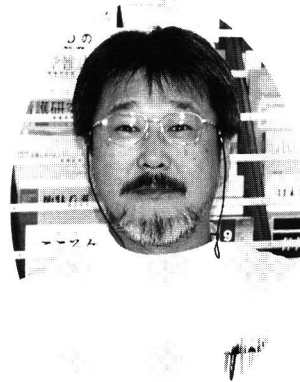
Masahiko Ohata, Kumie Ohmune, Yoshifumi Kuroyama,
Hiroyuki Fujita¹⁾

Department of Clinical Laboratory, Shizuoka Red Cross Hospital

1) Department of Hematology, Shizuoka Red Cross Hospital

Abstract : The purpose is to develop a multiplex reverse transcription polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) assay for detection and quantification of leukemia-specific chimeric transcripts that identify the genetic subgroups of acute leukemias proposed by the World Health Organization (WHO) classification. To determine the incidence of leukemia-specific rearrangements, 16/25 cases of acute leukemia and 9/9 cases of chronic myelogenous leukemia (CML) were screened with a novel multiplex RT-PCR assay, and the results were correlated with the cytogenetic findings. The views that a morphological diagnosis and chromosome karyotype, cytogenetic were completely agreed French-American-British (FAB) classification -M 2 t(8;21), M 3, M 4 Eo among acute myeloid leukemia, and similar in CML. Cytogenetic analysis reveals a much broader range of abnormalities, multiplex RT-PCR provides the essential information for minimal residual disease studies.

Key words : polymerase chain reaction (PCR) method, multiplex reverse transcription-PCR (multiplex RT-PCR) method, acute leukemia, chronic myelogenous leukemia, malignant lymphoma, cyclin D 1



連絡先：大畑雅彦；静岡赤十字病院 検査部

〒420-0853 静岡市追手町8-2 TEL (054)254-4311(2318) e-mail : m-ohata@qa2.so-net.ne.jp