

当院における Fluorescence in situ hybridization 検査導入 に向けた基礎的検討と臨床応用

黒山 祥文 大棟 久美江 川口 貴子
大畑 雅彦 藤田 浩之¹⁾

静岡赤十字病院 検査部

1) 同 血液内科

要旨：今回、当院の Fluorescence in situ hybridization 検査導入にあたり検査材料、標本作製の基礎的な検討と臨床応用について報告した。対象とした検体は末梢血と骨髄で、末梢血は健常者を、骨髄は慢性骨髄性白血4例、急性リンパ性白血病2例、急性骨髄性白血病2例、慢性骨髄増殖性疾患2例、好酸球増多症1例と骨髄移植ドナー2例を用いた。今回、使用したプローブは、LSI bcr/abl Dual Fusion Probe (VYSIS 社) および CEP X- α sat/Y-sat III kit (VYSIS 社) を用い、カルノア固定標本および May-Giemza-Fluorescence in situ hybridization 標本を行った。検査材料としては、ethylenediaminetetraacetic acid 血を phosphate buffered saline で洗浄することにより明瞭なシグナルが得られた。そのため、血算測定後の検体で検査実施可能となった。カルノア固定標本および May-Giemza-Fluorescence in situ hybridization 標本とも、ペプシン処理1分間行うことで明瞭なシグナルが検出された。臨床例の検討では、当院の Fluorescence in situ hybridization 検査の結果は外注検査結果と染色体の結果とも一致していた。このことから、上記の染色手技を取り入れた染色方法に問題がないことが確認できた。さらに、異性間骨髄移植において、染色体検査ではレシピエント由来のクローンを検出できなかったが、異性間 Fluorescence in situ hybridization では blast の比率を上げることにより、レシピエント由来のクローンの検出率が上昇した。分裂中期細胞を必要としない間期核 Fluorescence in situ hybridization は、造血器腫瘍の診断や治療効果判定、さらに再発の早期発見に有用な検査項目であった。

Key words：Fluorescence in situ hybridization, ペプシン処理, 慢性骨髄性白血病, 異性間骨髄移植

I. はじめに

1999年に World Health Organization から提唱された造血器・リンパ組織悪性腫瘍の分類法¹⁾では、造血器腫瘍の診断に細胞形態や表面形質のほか染色体・遺伝子の情報も取り入れられている。そのため、染色体・遺伝子検査は重要な検査項目の一つとなっている。しかし、染色体検査の核型解析には時間と労力がかかり分裂中期細胞が必要であるが、常に分裂中期細胞が得られるとは限らない。そのため、すべての症例に普遍的に応用することは困難である。

ところが、Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は間期核や微量の検体で細胞数が少なくても検査可能であり、簡便で迅速に判定でき定量的な解析が可能である。そのため、病型特異的染色体異常を認める造血器腫瘍の診断や治療経過のモニタリングに使用されている^{2,3)}。

今回、当院に FISH 法が導入されるにあたり、FISH 染色における基礎的な検討を行った。また、BCR-ABL 遺伝子の臨床応用および異性間骨髄移植での有用性についても検討したので報告する。

II. 対象および方法

1. 対象

抗凝固剤の染色性およびペプシン処理時間の検討は、健常者の末梢血で行った。また、ドック受診者13名の末梢血液を用い、末梢血液細胞のBCR-ABL融合シグナルの検討を行った。臨床例は、骨髄穿刺を施行した慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia; CML) 4例、急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) 2例、急性骨髄性白血病2例、慢性骨髄増殖性疾患2例、好酸球増多症1例と骨髄移植 (bone marrow transplantation; BMT) ドナー2例を用いた。

2. 方法

今回の検討で使用したプローブは、LSI bcr/abl Dual Fusion Probe (VYSIS社) および CEP X- α sat/Y-sat III kit (VYSIS社) を用いた。FISHの染色手技は表1に示す方法にて実施し、カルノア固定標本および May-Giemza (MG)-FISH 標本の作製は表2に示す手順で行った。また臨床例の1例は、 -80°C に保存した骨髄塗抹標本を使用し、異性間骨髄移植例では Ficoll 遠心分離法にて単核球層を分離し塗抹標本を作製し FISH 標本とした。

表1 FISH染色方法

- (1) 標本のエージング
37°Cの2×SCC/0.1% NP-40に30分間静置
- (2) 脱水, 洗浄 (室温)
70%, 85%, 100%エタノールを各1分
- (3) 冷風乾燥 (5分間)
- (4) 標本変性
73°Cの2×SCC/70% Formamideに5分間静置
- (5) 脱水, 洗浄 (室温)
70%, 85%, 100%エタノールを各1分
- (6) 冷風乾燥 (5分間)
- (7) ハイブリダイゼーション
45°Cのホットプレートに標本2分間置き, プローブを10 μ lを滴下
- (8) カバーガラスをのせ, ペーパーボンドでシール
- (9) 湿潤箱にいれ, 遮光下37°C 4~16時間インキュベーション
- (10) 洗浄
シールを取り除き, 2×SCCに5分間
73°Cの0.4%×SCC/0.3% NP-40で2分間
2×SCC/0.1% NP-40 (室温) で1分間
2×SCCに5分間以上
- (11) 封入
10 μ lの対比染色液DAPI IIを滴下, カバーガラスをかけ
透明マニキュアでシール
- (12) 落射型蛍光顕微鏡 (OLYMPUS BX52) にて検鏡

<プローブ調整>

- (1) プローブミックス
プローブ1 μ l, Hybridization bufer 7 μ l, 精製水 2 μ l
をマイクロチューブ内に分注し混和
- (2) マイクロ遠心器に1秒
- (3) プローブ変性
73°Cの恒温槽に5分間浮かべ変性
- (4) プローブのDNAが二重鎖にもどらないように45°Cで加温

III. 結果

1. 抗凝固剤による FISH 染色性の検討

抗凝固剤の ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) およびヘパリンで採血した末梢血液検体を用い、FISH (bcr/abl プローブ) の染色性について検討した。また、phosphate buffered saline (PBS) で1回洗浄 (1500 rpm, 5分間) した EDTA 血も用いた。明瞭なシグナルが認められた出現頻度は、EDTA 血で 50/200 細胞 (25%), ヘパリン血では 24/200 細胞 (12%) と低く、図1 a および b に示すようなシグナルの断片化が多く認められた。一方、EDTA 血を PBS にて洗浄した検体では、明瞭なシグナルが 125/200 細胞 (62.5%) と EDTA 血やヘパリン血に比し多く観察された (図1 c)。

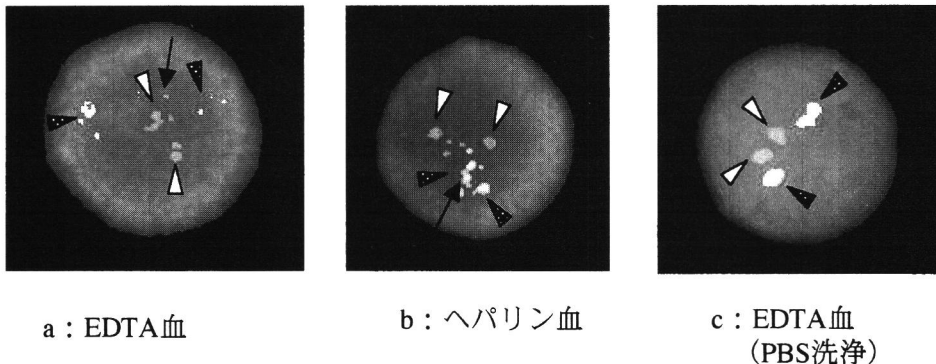
2. ペプシン処理時間の検討

1) カルノア固定標本 (図2)

ペプシン処理の時間は、0分、1分、3分および5分で検討を行った。MG染色では、ペプシン処理の時間経過とともに核の膨化傾向が認められ、FISH (bcr/abl プローブ) 染色ではシグナルの断片化が認められた。また、ペプシン処理を行わない標本に比し、1分および3分間のペプシン

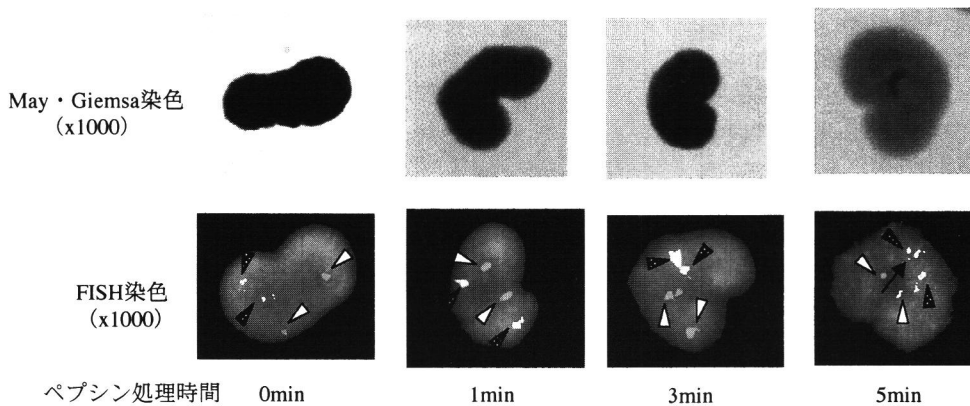
表2 カルノア標本およびMG-FISH標本作製方法

1. カルノア標本作製方法
 - (1) 抹消血液 (骨髄液) を30mlのPBSにて1500rpm, 5分間洗浄し上清除去
 - (2) 0.75mmol KClを30ml加え, 室温にて30分間静置
 - (3) カルノア固定液 (メタノール: 酢酸=3:1) を2ml重層し, 静かに混和
 - (4) さらにカルノア固定液10ml重層し静かに混和
 - (5) さらにカルノア固定液20ml重層し静かに混和
 - (6) 1500rpm, 5分間洗浄し上清除去
 - (7) カルノア固定液を10ml重層し, 静かに混和
 - (8) 1500rpm, 5分間洗浄し上清除去
 - (9) (7) と (8) の操作を4~5回繰り返す
 - (10) カルノア固定液で細胞浮遊液調整
 - (11) 展開
カルノア固定液に浸したスライドガラスに1滴落とし76°Cで10分間静置
 - (12) 冷風乾燥
2. MG-FISH標本作製
 - (1) May-Giemsa塗抹標本を70%エタノールで脱色・冷風乾燥
 - (2) 0.75mmol KClを重層し, 室温にて20分間
 - (3) カルノア固定液をそのまま混和し5分間
 - (4) スライドガラス上の液を捨て, カルノア固定液を重層し5分間
 - (5) 冷風乾燥
 - (6) ペプシン処理 (37°C)
ペプシン溶液: 10%ペプシン溶液 25 μ l, 蒸留水 49.5ml, 1NHCl 500 μ l
 - (7) PBSにて5分間, 2回洗浄
 - (8) 脱水 (70%, 85%, 100%エタノールを各1分) ・冷風乾燥



◀ 印は緑色22q11.2, ◁ 印は橙色9q34シグナルを示す (x100)
 (LSI bcr/abl Dual Fusion Probe)
 ← シグナルの断片化を示す

図1 bcr/ablプローブによる検体別の染色性の比較 (x 100)



◀ 印は緑色22q11.2, ◁ 印は橙色9q34シグナルを示す
 (LSI bcr/abl Dual Fusion Probe)
 ← シグナルの断片化を示す

図2 カルノア固定標本作製によるペプシン処理時間の染色性の比較

処理を行った標本でシグナルが明瞭であった。シグナルの断片化を認める頻度は、ペプシン処理を行わない標本では 91/200 細胞 (45.5%), 1 分間 29/200 細胞 (14.5%), 3 分 49/200 細胞 (24.5%), 5 分間では全細胞にシグナルの断片化が認められた。

2) MG-FISH 標本 (図3)

ペプシン処理の時間は、30 秒、1 分および 2 分

で検討を行った。MG 染色の比較では、ペプシン処理 30 秒の標本に比し 1 分および 2 分の標本で核の膨化や核縁の不整 (不鮮明) が認められ、経過時間とともに顕著に認められた。しかし、FISH (bcr/abl プローブ) 染色でシグナルが認められなかった細胞の出現頻度は、30 秒では 118/300 細胞 (39.3%), 1 分間 36/300 細胞 (12%), 2 分間 42/300 (14%) と 30 秒の標本で多く認めら

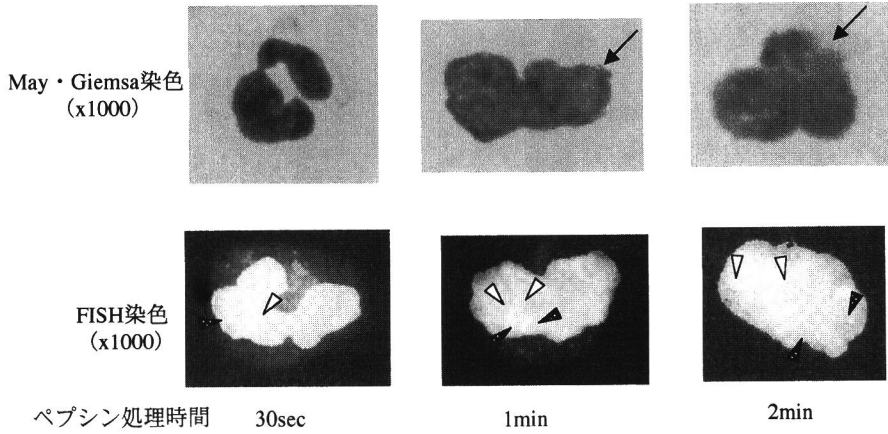
れた。また、カルノア固定標本に比し MG-FISH 標本でシグナルが小さい傾向であった。

3. 健常者の末梢血液細胞における BCR-ABL 融合シグナルの検討

健常者 13 名における、末梢血液細胞の BCR-ABL

融合シグナルの出現頻度を検討した。健常者の BCR-ABL 融合シグナルは 0~2.5% のレンジに認められ、mean±SD は 1.4±0.9% であった。

4. 臨床例における骨髄細胞の BCR-ABL 融合シグナルの出現頻度 (表 3)



◀ 印は緑色22q11.2, ◁印は橙色9q34シグナルを示す (LSI bcr/abl Dual Fusion Probe)

図 3 MG-FISH 標本製別によるペプシン処理時間の染色性の比較

表 3 各症例における骨髄細胞のbcr/abl融合シグナルの出現頻度

No	標本作製方法	FISH陽性率 (%)		臨床診断	染色体	
		当院	外注検査			
1	カルノア固定	14.5	19.0	CML INF療法	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	11/20cell
					46,XY	9/20cell
2	カルノア固定	89.5	NT	CML初診	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	19/20cell
					46,XY	1/20cell
3	MG-FISH	95.3	96.0	CML初診	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	18/20cell
					46,XY	2/20cell
4	MG-FISH	1.9	検出せず*	CML移植1年	46,XY	20/20cell
5	MG-FISH	83.6	81.0	CML初診	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	20/20cell
6	MG-FISH	0.8	NT	CML移植4年	46,XY	20/20cell
7	MG-FISH	60.1	NT	ALL初診	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	5/20cell
					46,idem,der(21)t(1;21)(q21;q22)	9/20cell
					46,idem,der(11)t(1;11)(q12;q23)	1/20cell
					46,XY	5/20cell
8	MG-FISH	2.9	検出せず*	ALL初診	54,XY,+4,+10,+12,+17, +18,+19,+21,+21	2/5cell
					46,XY	3/5cell
9	MG-FISH	3.1	3.3	AML初診	46,XY,-7	10/11cell
					46,XY	1/11cell
10	カルノア固定	2.2	NT	好酸球増多症	46,XY	20/20cell
11	カルノア固定	1.0	検出せず*	CMPD	46,XY	20/20cell
12	カルノア固定	2.0	検出せず*	ET	46,XX	20/20cell
13	カルノア固定	0.9	NT	BMTドナー	NT	
14	MG-FISH	0	NT	BMTドナー	NT	

CML; 慢性骨髄性白血病, ALL; 急性リンパ性白血病, AML; 急性骨髄性白血病, ET; 本態性血小板血症
CMPD; 骨髄増殖性疾患, BMT; 骨髄移植
MG-FISH; May-Giemsa FISH法, NT; not test

当院で行った FISH 陽性率と外注検査 (SRL) で行った陽性率とは、ほぼ一致した結果であった。臨床診断および染色体との関連では、CML 初診時では 80~95% と高率に陽性であり、骨髄移植により t (9 ; 22) (q 34 ; q 11) の核形の消失とともに陽性率は低下した。interferon 療法を行った No 1 では、t (9 ; 22) (q 34 ; q 11) の染色体異常が 11/20 細胞に認められ、FISH 検査でも 14.5% の陽性を示した。No 7 の ALL では、t (9 ; 22) (q 34 ; q 11) の染色体異常を認め FISH 検査でも 60.1% と高率に陽性であり、染色体と一致した結果であった。CML 症例を除く正常核形を示した症例と BMT ドナー症例の 7 検体の FISH 陽性率は、0~3.1% に認められ 1.7±1.1% であった。また、CML 症例で MG-FISH を行った No 3~6 症例で、単核球と多核球細胞の bcr/abl 融合シグナルの出現頻度の比較を行った。表 4 に示すように、単核球細胞と多核球細胞の陽性率に大きな違いはなかった。

5. 骨髄移植症例の BCR-ABL 融合シグナルの推移 (表 5)

血縁間ドナーより同種骨髄移植を行った、CML 症例 No 5 の BCR-ABL 融合シグナルの推移を検討した。初診時 BCR-ABL 融合シグナルが 83.6%、

t (9 ; 22) (q 34 ; q 11) の染色体異常が 20/20 細胞認められたが、ハイドキシウレアの治療により移植前では、BCR-ABL 融合シグナルが 63.0%、t (9 ; 22) (q 34 ; q 11) の染色体異常が 11/20 細胞まで減少した。移植後 15 日で BCR-ABL 融合シグナルが 0.7% と陰性化し、t (9 ; 22) (q 34 ; q 11) の染色体異常も認められなかった。以後、BCR-ABL 融合シグナルは低値を示し、t (9 ; 22) (q 34 ; q 11) の染色体異常も認められず、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 検査でも major-BCR は検出されなかった。以上の所見より、BCR-ABL の FISH 検査は染色体や RT-PCR と一致した結果で推移した。

6. 異性間骨髄移植による FISH の検討 (図 4)

非寛解時の AML-M2 症例 (男性) に臍帯血移植 (女性) を行い、移植後 100 日の骨髄塗抹標本および単核球塗抹標本を MG-FISH 法にて異性間 FISH を検討した。骨髄塗抹標本の blast の比率は 5.1% であったが、単核球塗抹標本では 14.2% と増加した。異性間 FISH でも、Y 染色体のシグナルの検出が骨髄塗抹標本で 2.4% であったが、単核球塗抹標本では 10.6% と約 5 倍検出が向上した。しかし、染色体検査では分析された 20 細胞すべてが女性核形で

表 4 骨髄中の単核球と多核球細胞の bcr/abl 融合シグナルの出現頻度の比較

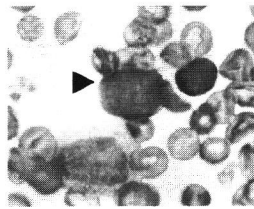
No	単核球	多核球
3	94.5% (189/200)	96.0% (192/200)
4	2.6% (5/204)	1.4% (3/213)
5	79.0% (158/200)	87.7% (193/220)
6	1.5% (3/200)	0% (0/200)

表 5 骨髄移植症例における bcr/abl 融合シグナルの推移

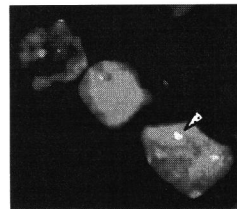
	FISH 陽性率 (%)	染色体		RT-PCR (Major-BCR)
初診時	83.6	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	20/20cell	(+)
移植前12日	63.0	46,XY,t(9;22)(q34;q11)	11/20cell	(+)
移植後15日	0.7	46,XY	20/20cell	NT
移植後21日	3.3	46,XY,idelic(18)(p11)	2/20cell	NT
		46,XY	18/20cell	
移植後28日	1.1	46,XY	20/20cell	(-)
移植後62日	0.6	46,XY	20/20cell	(-)
移植後100日	0.8	46,XY	20/20cell	NT
移植後4年	0.8	46,XY	20/20cell	NT

RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction, NT : no test

骨髓塗抹標本

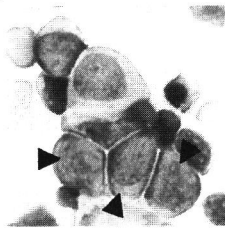


May・Giemsa (x1000)
Blast比率：5.1% (26/500)

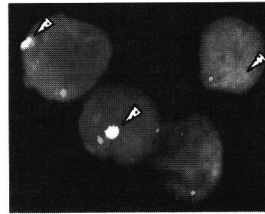


異性間FISH (x1000)
Y染色体シグナル：2.4% (12/500)

単核球塗抹標本



May・Giemsa (x1000)
Blast比率：14.2% (71/500)



異性間FISH (x1000)
Y染色体シグナル：10.6% (53/500)

◄ ; blast

◄印は緑色 ; Y染色体

図4 異性間骨髓移植症例におけるMay・Giemsa染色とFISH染色

あった。その後、末梢血にblastが出現し増加傾向を示し、約1カ月後の骨髓中のblast比率も69.4%と増加し再発をした。

IV. 考 察

当院でFISH検査を導入するにあたり、染色における技術的な基礎的検討として、1) 使用検体の種類、2) 標本作製について行った。末梢血でのFISH検査を行う際に使用する検体を、血算測定後のEDTA血検体を用いるのか、新たにヘパリンで採血した検体を使用するののかについて検討した。その結果、明瞭なシグナルが得られる頻度はEDTA血で25%、ヘパリン血12%と違いがなく低率でFISH検査実施には不向きであった。そのため、細胞の洗浄を目的としPBSにて洗浄操作を1回加えたところ、明瞭なシグナルが得られる頻度が62.5%と上昇した。以上の所見より、末梢血にてFISHを行う際には血算測定後のEDTA血を用い、PBSにて1回洗浄操作を行うこととした。このことにより、患者からの余分な採血は不要となり、苦痛の軽減につながる事ができた。

次に、FISH検査を行う標本作製について検討をした。FISH検査では、染色体解析のように分裂中期

細胞は必要とせず、間期核の細胞でも実施ができ、MG標本でもFISH検査は可能である^{2,3)}。そこで、染色体検査で標本作製するカルノア固定標本とMG標本でFISH検査を実施するMG-FISH標本について検討した。カルノア固定標本では、KClで細胞質を膨化させ標本作製時の滴下でその細胞質を崩壊させるが、全細胞の細胞質が崩壊するとは限らないことや、核の周りに蛋白質が残っている場合がある。そのため、蛋白分解酵素のペプシンにて細胞質や核の周りの蛋白質を分解させ、プローブを核DNAに浸透させやすくする目的でペプシン処理の時間設定を検討した。ペプシン処理を1分、3分、5分間行い、MG染色で核の染色性や形状を観察したところ、経過時間とともに核の膨化が認められた。また、FISH検査でも時間の経過とともにシグナルの断片化が増加したが、ペプシン処理1分間でもっともシグナルの断片化が少なく明瞭なシグナルが得られた。このことより、ペプシン処理の時間は1分が望ましく考えられた。MG-FISH標本では細胞質があるため、細胞質を分解する必要がある。また、MG-FISHの利点として、MG標本での細胞形態と対比しながら観察できることが上げられる。そこで、ペプシンによる細胞質の分解が個々の細胞の形態観察

に支障をきたさず、明瞭なシグナルが得られる時間の設定を目的とし、ペプシン処理時間を30秒、1分、2分間で検討した。MG染色標本では、カルノア固定標本と同様にペプシン処理の時間の経過とともに核の膨化が認められ、特に2分間のペプシン処理では核縁の不整（不鮮明性）が強く出現し、細胞質は完全に分解されて細胞の形態保持はできていなかった。一方、ペプシン処理30秒の標本では、細胞の形態保持は良かったが、シグナルが弱く、シグナルを認められなかった細胞を39.3%と多く認めた。ペプシン処理1分では、細胞の形態保持も良くシグナルも良好に認められることより、ペプシン処理1分が最適と思われた。以上の検討より、カルノア固定標本およびMG-FISH標本ともに、ペプシン処理で1分間行うこととした。

カルノア固定標本とMG-FISH標本の染色性を比較すると、カルノア固定標本がMG-FISH標本に比し明瞭なシグナルが得られていた。このことより、FISH標本作製にはカルノア固定標本を第一に作製することが望ましいと考えられた。しかし、骨髄穿刺時に細胞採取量が少ない場合やMG標本との細胞形態を対比しながら、分子学的な異常を検索したい場合はMG-FISHを用いる事が望ましいと思われ、FISH標本作製には使い分けが必要と考えられた。佐藤ら⁴⁾は、白血病の治療経過中の異常細胞の細胞起源についてMG-FISH法を用い検討し、異常細胞の細胞起源が同定できたとしMG-FISHの重要性を報告し、百名ら⁵⁾はtrisomy 8のクローンをもつAML-M2症例において、クローン解析や残存腫瘍の検出にMG-FISH法は有用であったと報告している。また、MG標本の保存期間でのMG-FISHの染色性については、今回検討に用いた標本では約1年間室温で保存された標本では良好なシグナルが得られたが、4年間室温で保存された標本ではシグナルが検出されなかった。しかし、同一症例の標本を未染色のまま-80°Cで保存されていた標本では良好なシグナルが得られたことより、重要な標本に関しては-80°Cで保存することが重要であると思われた。

今回の検討で使用したLSI bcr/abl Dual Fusion Probeは、CMLにおけるBCR-ABL融合遺伝子を証明するプローブであり、ABL遺伝子をSpectrum Orange（赤色）で標識、BCR遺伝子をSpectrum Green（緑色）で標識し、融合遺伝子は光の3原色の結果黄色で検出される。臨床例を用いた検討では、CMLに特異的な染色体異常であるt(9;22)

(q34;q11)のフィラデルフィア(Ph)染色体を有する症例に一致して陽性所見が認められ、外注検査との相関も良好であった。さらに、骨髄移植症例でもPh染色体やMajor-BCRの消失と一致してBCR-ABL融合遺伝子も陰性化していたことより、LSI bcr/abl Dual Fusion ProbeはCMLの診断や治療効果判定に有用であった。また、今回我々が検討した染色手技に問題がないことが確認できた。

MG-FISH標本で骨髄中のblastや幼若顆粒球、赤芽球などの単核細胞と成熟好中球の多核球細胞のBCR-ABL融合遺伝子の比率を検討したところ、ほぼ一致した結果が得られた。この結果は末梢血の好中球と骨髄細胞の陽性率が一致することを示唆していると思われた。Yanagiら⁶⁾は、末梢血と骨髄のBCR-ABL融合遺伝子の陽性率は相関しており、末梢血でのFISH検査はCMLの治療のモニタリングに有用であることを報告している。だが、末梢血を好中球とリンパ球で比較した場合に、好中球の陽性率がリンパ球に比し高かったと述べていることや、Takahashiら⁷⁾も骨髄と末梢血の細胞を系統別に分離しFISH法でPh染色体の有無を検討したところ、骨髄では多能性幹細胞からT前駆細胞を含むすべての血球系にPh染色体を認めるものの、末梢血では好中球および単球で95%の細胞がPh陽性であるのに対し、末梢Bリンパ球では48%しかPh染色体を持たず、T、NK細胞ではcut off値以下であったと報告している。このことから、今後末梢血でFISHの検査する際には、好中球分画のみにして検査することが望ましいと考えられ、Dextran SulfateやFicoll比重遠心法による好中球FISH⁸⁾の検討が必要であろう。

健常者における末梢血でのBCR-ABL融合遺伝子は、今回の検討では $1.4 \pm 0.9\%$ であり、骨髄ではCML症例を除く正常核型を示した症例の値が $1.7 \pm 1.1\%$ であった。Yanagiら⁶⁾も末梢血で $2.7 \pm 0.7\%$ 、骨髄 $2.3 \pm 0.7\%$ と報告しており、FISH陽性のcut off値を末梢血でmean+3SDの4.8%、骨髄で4.4と設定した。我々のデータからは、末梢血で4.1%、骨髄5.0%であった。このことから、FISH陽性のcut off値は5.0%が妥当な値と思われるが、今後データの蓄積が必要である。

異性間で骨髄移植を行われる場合には移植前後での性染色体の変化を利用することで、レシピエントのクローン細胞を検出することが可能であり、生着確認だけでなく再発の早期発見に有用である⁸⁾。

今回、異性間移植後 100 日の検体を用い検討したが、骨髄塗抹標本で blast 比率が 5.1%、単核球のみに分離することにより blast 比率が 14.2%まで増加し、それに伴い Y 染色体のシグナル数も 2.4%から 10.6%へと上昇した。本症例は約 1 カ月後に再発をしたことから、レシピエントの異常クローン細胞の回収の増加が、異性間 FISH での検出感度を高め再発の早期発見につながるものと考えられた。さらに、プラスチックトリバーを用い blast のみを回収することにより、更なる検出感度の向上が期待でき今後の検討課題である。一方、染色体検査では正常女性核型であり、FISH 検査との乖離が認められた。染色体検査では、必ずしもレシピエント由来の分裂中期細胞が得られるとは限らずこのような結果につながったものとする。分裂中期細胞を必要としない FISH 検査での異性間骨髄移植症例での微小残存クローンの検出感度は 0.1%であり⁸⁾、高感度、迅速、簡便で定量性、再現性がある異性間 FISH は異性間骨髄移植で有用な検査方法である。

FISH 検査は様々な有核細胞が検査の対象となり簡便に検査ができる一方で、偽陰性、偽陽性の問題が常に残っている。すなわち、シグナルの近傍や重なりによる偽陽性、ハイブリダイゼーションなどの実験効率による偽陰性、蛍光顕微鏡による観察であるため偽陽性などが起こりうるため、データの評価にはネガティブコントロールでのカットオフ値を参考にすることが必要である²⁾。また、特異的プローブを用いた場合は、決められた染色体異常しか検出できず、他の染色体異常がある場合には全染色体を解析する染色体検査に劣る。FISH 検査の長所と短所を見極めながら、FISH 検査を実施すべきと考える。

V. ま と め

- 1) FISH 検査の検査材料としては、EDTA 血を PBS で洗浄することで明瞭なシグナルの検出できた。また、血算測定後の検体で実施可能であり、患者の苦痛の軽減ができた。
- 2) カルノア固定標本および MG-FISH 標本とも、ペプシン処理 1 分間行うことで明瞭なシグナルが検出された。
- 3) 臨床例の検討では、当院の FISH 検査の結果は外注検査結果と相関しており、染色体の結果とも一致していた。このことから、上記の染色手技を取り入れた染色方法に問題がないことが確認された。

- 4) 異性間骨髄移植において、染色体検査ではレシピエント由来のクローンを検出できなかったが、異性間 FISH では blast の比率を上げることにより、レシピエント由来のクローンの増加が検出できた。このことは、再発の早期発見や微小残存クローンの検出に有用であると思われた。

文 献

- 1) Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 3835-49.
- 2) 上平憲, 塚崎邦弘. 遺伝子解析に必要な基本技術 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法. 臨床病理レビュー特集号 2004; 128: 162-169.
- 3) 宮西節子, 奥村敦子. 血液検査の最新の動向 血球検査 FISH 法, 染色体検査(解説/特集). 臨床病理レビュー特集号; 115: 30-36.
- 4) 佐藤悦子, 高井良美智代, 吉野誠二, ほか. der (1; 7) 転座を伴った AML および MDS における MG-FISH 法の有用. *医学検査* 2004; 53(8): 1028-1032.
- 5) 百名伸之, 成富研二, 知名耕一郎, ほか. FISH 法によりクローン解析を行った de novo AML with myelodysplasia. *臨床血液* 1997; 38(9): 776-781.
- 6) Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A, et al. imple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells. *Leukemia* 1999; 13: 542-552.
- 7) Takahashi N, Miura I, Saitoh K, et al. Lineage involvement of stem cells bearing the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia in the chronic phase as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence in situ hybridization. *Blood* 1998; 92: 4758-4763.
- 8) 有山武志, 稲沢譲治, 秋山祐一, ほか. 蛍光 in situ hybridization 法による異性間骨髄移植後の微小残存クローン検出への応用. *臨床血液* 1993; 34(8): 912-918.

A Basic Study and Clinical Application of Fluorescence in Situ Hybridizationsitu to be Introduced at Our Hospital

Yoshifumi kuroyama, Kumie Ohmune, Takako Kawaguchi,
Masahiko ohata, Hiroyuki fujita¹⁾

Department of Clinical Laboratory, Shizuoka Red Cross Hospital

1) Department of Hematology, Shizuoka Red Cross Hospital

Abstract : We report on the basic study of materials, sample preparation and clinical application in introducing Fluorescence in situ hybridization at our hospital. The subjects included normal individuals for peripheral blood as well as chronic myelogenous leukemia 4 cases, acute lymphoblastic leukemia 2 cases, acute myelogenous leukemia 2 cases, chronic myeloproliferative disease 2 cases, hypereosinophilic syndrom 1 case and bone marrow transplantation donor 2 cases for the bone marrow. LSI bcr/abl Dual Fusion Probe (VYSIS co. Ltd) and CEP X- α sat/Y-sat III kit (VYSIS co. Ltd) were used. As the probes to prepare Carnoy's fixed specimen and May-Giemsa-luorescence in situ hybridizationsitu specimen. For the material for examination, a clear single was obtained by washing ethylenediaminetetraacetic acid blood with phosphate buffered saline. This enabled us to make an examination with the samples after the counting of blood cells.

With both Carnoy's fixed specimen and May-Giemsa-Fluorescence in situ hybridization-situ specimen, a clear signal was detected by a 1-minute pepsin treatment. When clinical case were studied, the results of the Fluorescence in situ hybridizationsitu at our hospital were consistent with the results of the out-sourced examination. This has confirmed that there is no problem with the above-mentioned staining method. In the sex-mismatched bone marrow transplantation, clone from the recipients were not detected by the chromosome examination. In the sex-mismatched Fluorescence in situ hybridizationsitu, however, the detection rate of clones from the recipients was increased by raising the ratio of blast. Interphase Fluorescence in situ hybridizationsitu requiring no metaphase cell was an examination parameter usefull for the diagnosis of hemopoietic organ tumor, the evaluation of the clinical effect and early discovery of recurrence.

Key words : Fluorescence in situ hybridizationsitu, pepsin treatment, chronic myelogenous leukemia, sex-mismatched bone marrow transplantation



連絡先：黒山祥文；静岡赤十字病院 検査部

〒 420-0853 静岡市追手町 8-2 TEL (054)254-4311