

研究

CLL 症例における Ag-NORs 染色の有用性

須藤敬文, 高崎将一, 関根久実, 山口孝一, 大畑雅彦

静岡赤十字病院 検査部

Usefulness of Ag-NORs Staining in Chronic lymphocytic leukemia

要旨

本研究では慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia : CLL) の末梢血及び骨髓塗抹標本にて Ag-NORs 染色を施行し, その臨床的有用性について検討を行った. CLL 症例の Ag-NORs 染色像は, ドットの数や形状において多様性があった. 得られたドットの数や形状により Ag-NORs 染色でパターン化すると, ギムザ染色で典型的な CLL の細胞像を示す症例では散在するドット状の I 型比率が高かった. 一方非典型例では核小体に一致して微細ドットを示すものや極めて不整形な大型ドットの II, III 型比率が増加していた. また, それらのパターンは表面形質との関連において CLL score とよく相応していた. Ag-NORs 染色は簡便で安価であり, ギムザ染色の形態所見や表面形質の結果をよく反映することから臨床的有用性が高く, 日常検査にも十分導入可能であると思われた.

Takafumi Sutou, et al : ISSN 1343-2311 Nisseki Kensa 49 : 32—35, 2016(2015.10.27 受理)

KEYWORDS

慢性リンパ性白血病 (CLL), Ag-NORs 染色, ギムザ染色, FCM

はじめに

NORs (Nucleolar organizer regions) は核小体形成に関わる DNA のループで, リボゾーム RNA の前駆体に関与している¹⁾. NORs はヒトは第 13, 14, 15, 21, 22 染色体に局在し²⁾, これらに関与するタンパクは強い銀親和性を有することから, コロイド銀液により細胞核内にドット状に染色することができ, Ag-NORs と称される³⁾. Ag-NORs 染色は細胞の増殖性を表す簡便な方法であり, その染色で得られるドットの数や形状は種々の悪性腫瘍にて悪性度に応じて変化することから血液学的領域でも応用がなされてきた^{1), 4)~6)}. 中でも悪性リンパ腫 (malignant lymphoma : ML)¹⁾, 多発性骨髄腫 (multiple myeloma : MM)^{4), 5)}, 急性白血病 (acute leukemia : AL)⁶⁾において既に報告されているが, 本研究で注目した

CLL での Ag-NORs 染色についての報告はなされていない. CLL 症例では形態学的特徴や表面形質の多様性について様々な報告があり⁷⁾, 我々は Ag-NORs 染色パターンについても多様性を反映すると考え, 臨床的有用性を検討した.

【対象および方法】

1. 対象

2014 年から 2015 年までに当院にて, 診断された CLL 症例 2 例を対象とした. CLL の診断は WHO 第 4 版に基づいて行った.

2. 方法

Ag-NORs 染色は Crocker ら¹⁾の方法に準じて行った. 染色は以下の 2 通りの方法で行った. ①未固定標本を用いる場合は, エタノールにて 30~60 秒固定した後, 流水水洗を行

い、Ag-NORs 染色を施行した。②ギムザ標本を用いる場合には、エタノールにて脱色した後水洗し、Ag-NORs 染色を施行した。Ag-NORs 染色施行後、油浸系強拡大（1000倍）で検鏡し、CLL 細胞を 200 カウント行い、それぞれのドット数とパターンにより分類を行った。またギムザ染色と Ag-NORs 染色の対比については、ギムザ染色標本上の細胞についてイングラッドファインダーを用いて番地を控え Ag-NORs 染色を施行し、個々の細胞を観察し評価した。FCM による表面形質の検索には BECKMAN COULTER 社「NAVIOS」を用いて行った。CLL のスコアは、Immunophenotype in the diagnosis of CLL に基づいて行った。

【結果】

1) ギムザ染色と Ag-NORs 染色の対比(図1)

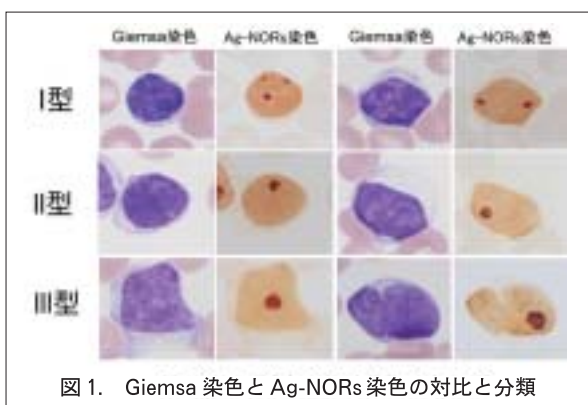


図1. Giemsa 染色と Ag-NORs 染色の対比と分類

ギムザ染色と Ag-NORs 染色との対比を行った。ギムザ染色にて N/C 比大の小型でクロマチンが濃縮しているリンパ球は核内に散在したドット状に、中等大のリンパ球では核小体内に微細なドット状に染色された。また核小体が明瞭なリンパ球の Ag-NORs 染色パターンは、核小体に一致し、均一または不整形で大型な形状を示した。

2) CLL 症例における Ag-NORs 染色パターン (図2)

図1で示す Ag-NORs 染色パターンをもとに以下の3つに分類した。①核内に散在し明瞭なドット状に染色されるものをI型(ドット型)。②核小体内に微細なドット状に染色されるものをII型(核小体型)。③2個以上の核小体を有し大型ドット、核小体に一致して微細ドットを示すもの、または、極めて不整形な大型ドットはIII型とした。

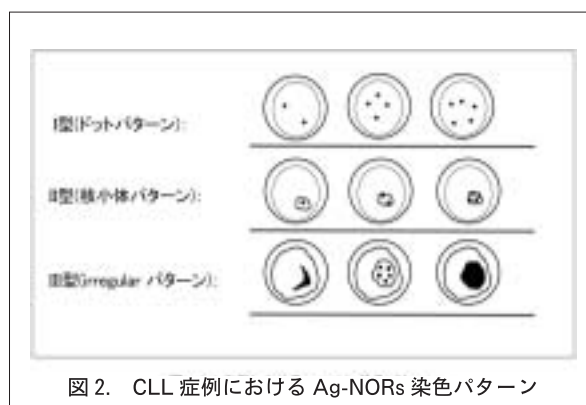


図2. CLL 症例における Ag-NORs 染色パターン

3) 2 症例の血液学的所見と表面形質の発現との関連 (表1)

Case1 では、白血球数 26,980 / μ l, リンパ球絶対数 20,940 / μ l であり、表面形質における CLL スコアでは PB で 3 点 (CLL 疑い), BM で 4 点 (典型的) であった。一方, Case2 では、白血球数 11,820 / μ l, リンパ球絶対数 9,800 / μ l であり、表面形質の検索では CD5 が陽性ではあるが, CD23 を欠くなどにより CLL スコアは PB, BM 共に 1 点であり, Case1 とは明らかに異なっていた。

表1. 血液学的所見と表面形質の発現

	Case1		Case2	
	PB	BM	PB	BM
WBC(/ μ l)	26,980		11,820	
Lympho(/ μ l)	20,940		9,800	
Lympho (%)	81.0	24.9	83.0	45.7
FCM				
CD5	96.8	90.9	95.2	94.7
CD19	85.6	72.1	80.0	88.3
CD20	28.0	20.3	83.1	72.0
19/20	3.1	3.6	0.96	0.95
CD22	3.1	4.2	79.1	63.4
CD23	21.1	3.1	16.9	0.6
CD38	8.3	18.3	5.3	20.8
FMC-T	27.6	7.9	77.5	34.3
slg*	M+++A-G-	M+A-G-	M+A-G++	M+A-G++
L鎖	λ	λ	κ	κ
CLL score	3	4	1	1

* : 30%未満 + : 30~50% ++ : 50~70% +++ : 70%以上

4) 症例間での Ag-NORs 染色におけるパターン分類

Case1 のギムザ染色像は、N/C 比大で、クロマチンが濃縮し核小体が目立たない小型成熟リンパ球が増加していた。Ag-NORs 染色では、ドットが散在性に染色される細胞が目立つ傾向であった。一方 Case2 のギムザ染色像は、細胞径が大きく、N/C 比はやや小で、典型的な CLL とは異なり核クロマチンが比較的繊細な印象であった。核の不整や切れ込み等の異型性を有する細胞も散見された。Ag-NORs 染色は、核小体に一致して染色されるものが多く、Case1 とは明らかに染色性の差異が認められた (図 3)。

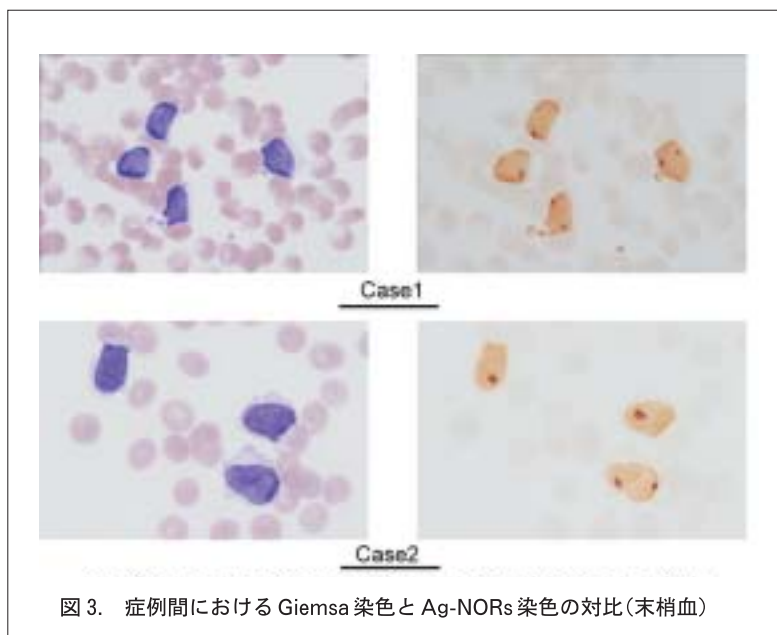


図 3. 症例間における Giemsa 染色と Ag-NORs 染色の対比(末梢血)

染色パターンは Case1 では I 型比率 37.5%, II 型比率 60.0%, III 型比率 2.5% であり, Case2 では I 型比率 4.0%, II 型比率 77%, III 型比率 19.0% であり, I 型及び III 型比率において差異が見られた。また骨髓液と末梢血の対比でも同様の傾向が認められた (図 4)。

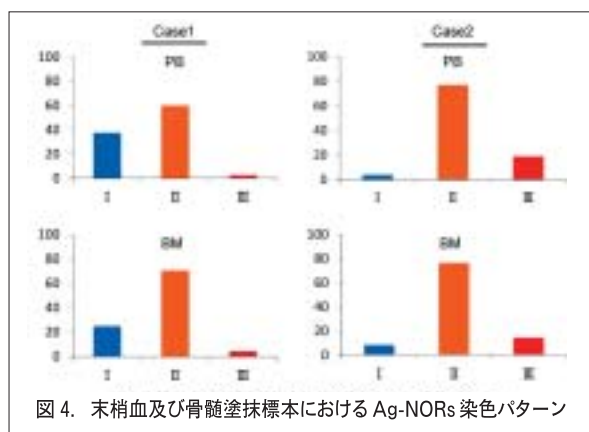


図 4. 末梢血及び骨髓塗抹標本における Ag-NORs 染色パターン

【考察】

CLL は、成熟リンパ球様の細胞がクローン性に増殖し、末梢血、骨髓、リンパ節、脾臓などに浸潤する腫瘍性疾患である。末梢血及び骨髓にみられる典型的な CLL 細胞は、赤血球の 2 倍程度の小型～中型の成熟リンパ球で、核は濃縮し、ブロック状(亀甲状)の核クロマチンをもつ細胞がみられる。通常核小体は目立たず、また核の切れ込みや異型性も少ない。細胞質は狭く、軽度の塩基性を示

すのが特徴である^{8,9)}。しかし、実際には細胞の形態像や表面形質など個々の症例において非常に多様性がありヘテロな疾患と考えられ、その背景には細胞の帰属(細胞の分化/成熟段階による差異)や増殖能も含めた疾患の活動性も関連すると思われる。細胞増殖を検索する手法は種々存在するが、簡便な方法として Ag-NORs 染色があり、実際様々な造血器腫瘍、中でも悪性リンパ腫(ML)¹⁾、多発性骨髄腫(MM)^{4,5)}、急性白血病(AL)⁶⁾で検討がなされている。

Ag-NORs 染色のドットの数や形状は、細胞の増殖や機能の状態に応じて変化することも報告されている。重田らは¹⁰⁾リンパ球に刺激を加えることにより、幼若化現象を起し、PHA 刺激によって Ag-NORs の核小体個数や核小体の面積の増加することを報告している。これらの所見は細胞の増殖、分化により Ag-NORs 染色パターンが変化することを示す知見である。実際 CLL 症例の末梢血及び骨髓塗抹標本の Ag-NORs 染色を施行すると、核小体の形状、ドットの数是个々の症例で様々であった。我々はその Ag-NORs 染色パターンを詳細に観察することで CLL 症例の多様性との関連や、臨床的有用性の検討を行った。

本研究で対象とした 2 症例は、末梢血標本にて特徴的な形態像を示していた CLL 症例

を選択した。ギムザ染色において Case1 は、N/C 比大のクロマチンが粗剛化した小型成熟リンパ球であり、いわゆる典型的な CLL 細胞の形状を示していた。一方 Case2 は N/C 比小で、クロマチンは比較的繊細で軽度の核異型性を示す非典型的な形態像であった。Ag-NORs 染色像をパターン化すると、典型的な Case1 では I 型比率の増加が認められ、非典型的な Case2 では I 型はほとんど見られず、II, III 型比率の増加が認められた。症例間では明らかな差異が認められ、Ag-NORs 染色パターンはギムザ染色における形態学的特徴とよく相応することが確認できた。このような知見は、大畑らの検討による MM 症例の報告でも形態分類において分化型から未分化型になるに従い II, III 型の増加が認められることを報告しており^{4, 5)}、細胞学的異形成と III 型比率の増加は関連していると考えられる。

今回対象とした 2 例は、CLL を考慮し FCM による検索を行っている。Matutes E. らは CLL scoring を用い CLL の表面形質からみた性状により典型例、非典型例を診断すると報告している¹¹⁾。ギムザ染色における形態像にて典型的であった Case1 では、FCM での CLL スコアは 3~4 点であり、表面形質の点からも典型的であった。形態的に非典型

的な Case2 では、CLL スコアは 1 点であり、それぞれの症例間で形態学的特徴と表面形質における CLL スコアはよく相応していることが確認できた。

CLL スコアと Ag-NORs 染色パターンとの関連では、Case1 の Ag-NORs パターンは I 型が増加し、非典型的な Case2 の Ag-NORs パターンは II, III 型が主であり、表面形質での CLL スコアと Ag-NORs パターンはよく一致していた。成熟リンパ球の増多した疾患における客観的な指標とされる CLL スコアにおいて、Ag-NORs 染色パターンが相関していることから、間接的に Ag-NORs 染色の有用性を示す所見として重要であると思われる。

このような CLL 症例における Ag-NORs 染色パターンの違いを報告した論文はなく、極めて興味深い知見であると考えられる。今後、さらに症例数を増やし、検討を深めていきたい。また Ag-NORs 染色パターンは、CLL 症例をはじめとする類縁疾患を含めたリンパ球増多症例の多様性を示す所見とも考えられ、臨床的有用性は高いと考えている。Ag-NORs 染色は安価で、簡便であり臨床上有用な情報を得る手段として日常検査への応用も十分に可能であり、価値の高い染色法であると思われる。

【文献】

- 1) Croker, J., Nar, P.: Nucleolar organizer regions in lymphoma. *J. Pathol.* 151: 111~118, 1987.
- 2) Ferguson-Smith, M. A., Handmaker, S. D.: Observations on the satellited human chromosomes. *Lancet* 1: 638~640, 1961.
- 3) Ploton, D., et al: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochemical J.* 18: 5~14, 1986.
- 4) 大畑雅彦, 他: 多発性骨髄腫における Ag-NORs 染色の臨床的意義. *日臨細胞誌* 33: 27~35, 1994.
- 5) 大畑雅彦, 他: 多発性骨髄腫における Ag-NORs 染色の有用性 (新しい Ag-NORs scoring system と細胞増殖マーカーとの関係について). *医学の歩み* 161: 883~884, 1992.
- 6) 中村忍, 他: Nucleolar organizer regions (NOR) 銀染色血液塗抹乾燥標本への応用. *日血会誌* 53: 559~566, 1990.
- 7) 青木定夫: CLL の形態観察における乾燥法の違いについて. *日血会誌* 15: 396~403, 2014.
- 8) 高山信之, 他: 成熟 B 細胞腫瘍 1) 慢性リンパ性白血病/小リンパ球性リンパ腫, 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(株) 中外医学社: 113-118, 2004.
- 9) 奈良信雄 訳: 56 慢性リンパ性白血病 ウィリアムズ 血液学マニュアル: 343-355, 2003.
- 10) 重田英夫, 他: リンパ球系細胞の Ag-NORs 所見. *日臨細胞誌* 31: 277, 1992.
- 11) Estella Matutes et al: Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Best Practice & Research Clinical Haematology* 23: 3~20, 2010.