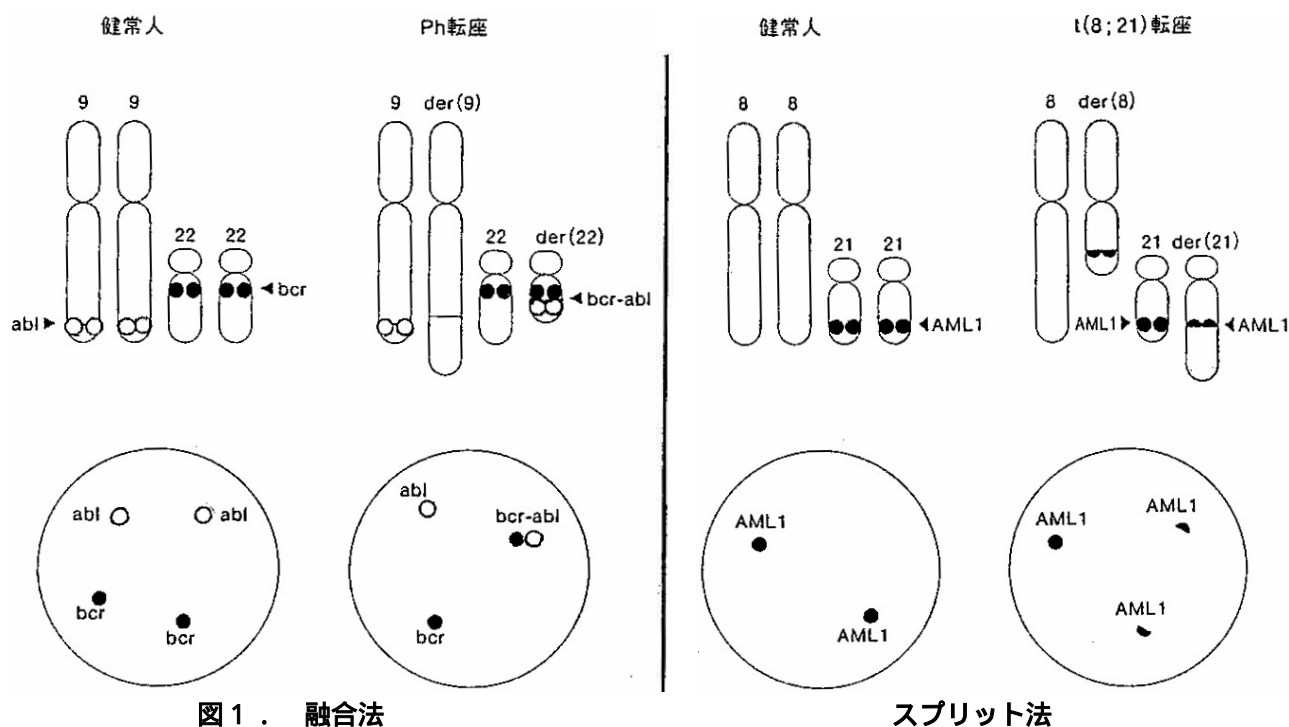


白血病の間期核 FISH



骨髓細胞染色体のG-バンド分析は、核型全体を見渡して白血病の引き金となる染色体異常と付加的な異常の双方を見つけることができる利点があります。しかし分裂細胞がなければ分析できず、分裂細胞があっても染色体の形が悪いこともあり、正常細胞の分裂が混じっていても区別できません。(正常細胞は染色体の形が良く、白血病細胞は形が悪いので区別できることがあります。)手間がかかるので、分析できる細胞の数も限られます。

間期核 FISH 分析は、白血病細胞の全部または大部分に認められる特定の転座・逆位・欠失・数の異常を検出します。分裂細胞がなくても分析でき、比較的多数の細胞(100~200細胞)を短時間に分析できる利点があります。染色体分染法で異常を検出できず、間期核 FISH 法で検出できることもあります。他方、核型全般を見渡すことはできず、白血病細胞と正常細胞を区別できません。

初回の検査ではG-バンド分析をし、そこで見出した白血病の引き金となる特定の転座・構造異常・頻度の多い数の異常・欠失を指標として間期核 FISH 分析で経過を追うのが効率的です。これと併行して、

適当な間隔を置いてG-バンド分析をします。完全寛解後の再燃では核型が変わっている可能性があるため、G-バンド分析をすべきです。小児 pre-B ALL の20%~30%は t(12;21)(p13;q22) 転座を持ちますが、末端部の淡染するバンド同士の転座なのでG-バンド分析で検出することが難しく、はじめからG-バンド分析と間期核 FISH を併用するのが賢明です。

1. 相互転座

白血病の引き金となる転座(逆位)は150種以上、転座に関与する染色体切断点は50種以上が知られていて、その代表的なものは切断点に関する領域をプローブとして間期核 FISH 法で検出できます(表2)。検出法は融合法とスプリット法に分けることができます。

1) 融合法

相互転座のふたつの切断点に隣接するDNA領域をプローブとして異なる色(緑と赤)の蛍光色素で標識し、転座により2種の蛍光が融合して生ずるシグナル(黄色)を観察します(表1)。

Single FISH (S-FISH) (図1左)

片方のプローブを相互転座切断点より上流に、他方のプローブを転座相手の染色体切断点より下流に置くと、転座により2種のプローブが隣接して融合シグナル(黄色)ができます。このほかに、転座に関係しない相同染色体による緑のシグナル、赤のシグナルを各1個認めます。図1左では *bcr* (*BCR*) の上流部分、*abl* (*ABL*) の下流部分をプローブとして用いています。この方法は、二つのプローブが偶然近くにあると偽陽性になる問題があります。

Double FISH (D-FISH) (図2)

一方のシグナルを切断点の片側に、他方のシグ

ナルを切断点をまたがるように設定すると、転座による融合シグナルに加えて融合しないシグナルを生じます。転座しない染色体のシグナルを加えると、融合シグナル(黄色)が1個、融合しないシグナルが3個(緑と赤)になります。この方法は本当の融合シグナルとプローブの偶然の重なりとを区別でき、偽陽性率を低くできます。

二重融合 FISH

2種のプローブをどちらも転座切断点をまたぐようにすると、転座によって2個の融合シグナル、転座しない染色体による緑のシグナルが1個、赤のシグナルが1個できます。

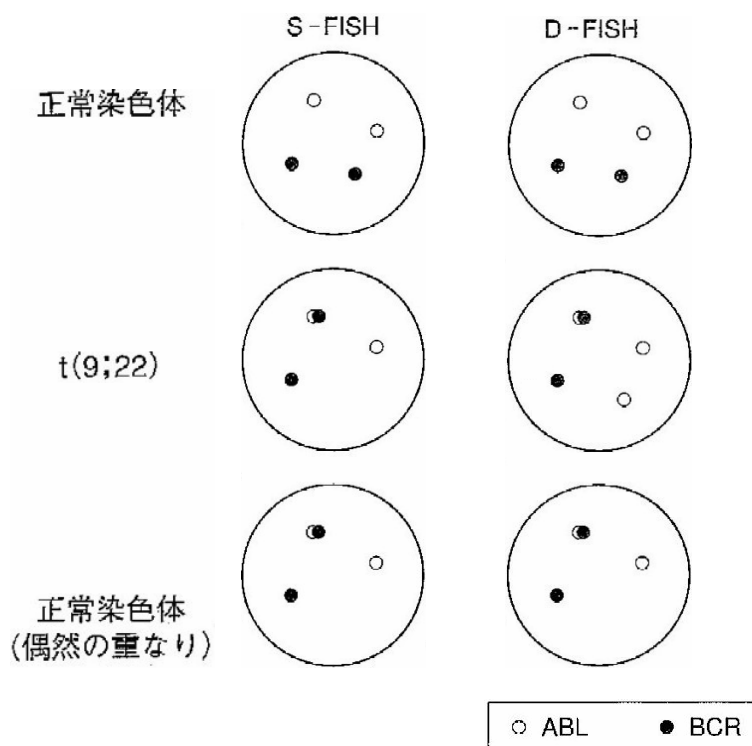


図2 . CMLのPh転座—t(9;22)—のD-FISH分析

M-BCR と *m-BCR* : CMLのPh転座では22qの切断点(*M-BCR*)は*BCR*遺伝子のエクソン10~12にあります。ALLのPh転座の半数は*M-BCR*領域に切断点を持ちますが、残りの半数は*BCR*遺伝子のエクソン1~2に切断点(*m-BCR*)を持ちます。両者を検出または区別するために種々のプローブがあり、上記の ~ が使われています。

好中球 FISH : CMLのPh転座を末梢血好中球の間期核 FISH を使って検出する方法が最近導入されました。CMLでは早期から好中球はPh陽性細胞に置き替わっていて、リンパ球と区別でき、患者の負担が少ない利点があります。

2) スプリット法(図1右)

相互転座に関与する二本の染色体の片方の切断点をまたぐように蛍光プローブを設定し、それが転

座により分離することを証明します。原理を説明するために t(8:21)(q22;q22) 転座の *AML1* スプリット FISH を図 1 右に示します。(今はこの転座ではスプリット法は使わず、二重融合法を使います。)

2. トリソミー・モノソミー・欠失

トリソミー・モノソミーは白血病の引き金となる異常ではありませんが、高頻度のときは間期核 FISH 法でその消長を追うことができます。セントロメア近くの サテライト反復配列をプローブとして、間期核 FISH により検出します。プローブを含む領域がセントロメアから遠いと、正常細胞核でも複製を終えて染色分体が二本になりトリソミー偽陽性になることがあります。逆にプローブが重なるか片方が染まらなければ、モノソミーの偽陽性になります。

5q-, 7q- などでは欠失領域のプローブを用いて間期核 FISH をします。

3. カットオフ値

表 1. カットオフ値の計算

最大測定値 (%/200 細胞)	最大測定値の信頼限界 (%)
1	2.5
5	8
7	10.5
8	12
13	17.5

間期核 FISH 法のカットオフ値は対象となる染色体異常の種類(転座・逆位・欠失・数の異常)、FISH プローブの領域、正常値の上限の計算法によって 1%以下から 10%前後までの違いがあります。計算法は次の種類があります。正常検体の平均値+2 SD、平均値+3 SD、正常値の分布の最大値、正常の最大測定値の 95%信頼限界上限。を表 1 に示します。

観察する間期核細胞は病初期で白血病細胞が多いときは 100 細胞で充分です。寛解期に入り、カットオフ値に近くなったら、200 細胞スクリーンします。それ以上スクリーンしてもカットオフ値は殆ど変わらないので、無駄です。

白血病の初期で白血病か否かを判定するときは、正常を白血病と誤認しないためにカットオフ値を大きめにとるのが安全です。これとは逆に寛解期に入って白血病細胞が残存しているか否かを問題にするときは、カットオフ値を低めにとるのが適当です。この理由で病初期の検査では+3 SD、寛解期には+2 SDをとることを提唱している研究者もいます。寛解期に入りカットオフ値以下で白血病細胞の有無を問題にするなら、RT-PCR 法(10⁻⁵まで検出するが、定量性がない)、real time PCR 法(定量性がある)などを用います。どちらも、敏感過ぎて臨床経過と平行しない場合があることに注意すべきです。

梶井 [2004 年 5 月 10 日]

表 2 . 代表的転座・逆位・欠失・増幅・数の異常の間期核 FISH 分析

染色体領域	プローブ	疾患 (頻度)
相互転座 (t)		
der(1;7)(q10;p10)	7q31	MDS の 10%; AML の 4%
t(2;5)(p23;q35)	<i>ALK</i>	ML-NHL (小児 NHL の 8%)
t(7;11)(p15;p15)	<i>NUP98</i>	AML
t(8;14)(q24;q32)	<i>IgH/c-myc</i>	ML-NHL
t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1/ETO</i>	AML(M2)の 18~40%
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>bcr/abl</i>	CML の >90% ; ALL の 20%
t(11;14)(q13;q32)	<i>IgH/CCND1</i>	CLL; ML-NHL; MM
t(11;18)(q21;q21)	<i>API2/MLT</i>	MALT リンパ腫の 20~50%
t(11;V)(q23;V)	<i>MLL</i>	ALL, AML の 5~10%. 1 歳以下 ALL の 50~60%
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL/AML1</i>	小児 pre-B ALL の 20~30%
t(14;18)(q32;q21)	<i>IgH/BCL2</i>	B 細胞系リンパ腫
t(15;17)(q22;q11-12)	<i>PML/RAR</i>	APL の 70%
t(16;16)(p13;q22)	<i>CBF /MYH11</i>	AML M4Eo の大部分
inv(16)(p13q22)		
t(16;21)(q24;q22)	<i>AML1</i>	二次性 AML (AML の 1%)
逆位 (inv)		
inv(16)(p13q22)	<i>CBF /MYH11</i>	AML M4Eo の大部分
欠失 (del)		
5q31-	<i>CSF1R</i>	MDS; AML の 3%
7q-	7q31	MDS の 10%; AML の 4%
9p21-	<i>p16</i>	ALL の 7~16%; AML; NHL; ATL
13q14-	<i>RB1</i>	網膜芽細胞種; MDS; AML
	D13S319	MM
17p13.1-	<i>p53</i>	
20q-	20q13.1	MDS; AML; 真性多血症
増幅		
2p24.1	<i>N-myc</i>	神経芽細胞種 (III 期、IV 期)
11q13	<i>CCND1</i>	リンパ腫その他の腫瘍
数の異常		
-5		
-7; +7	D7Z1	
-8; +8	D8Z2	
-12; +12	D12Z3	CLL の 35%
X/Y	DXZ1/DYZ1	異性間骨髄移植