

CLL (Chronic lymphocytic leukemia)

和泉 堯己*1 久島 公夫*2 山下美佐子*3 田中 公夫*4

Takaki IZUMI*1 Kimio KUSHIMA*2 Misako YAMASHITA*3 and Kimio TANAKA*4

- *1 比治山大学現代文化学部コミュニケーション学科
- *2 敬和学園大学
- *3 広島文教女子大学
- *4 広島大学原爆放射能医学研究所

Abstract

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is very rare of leukemia in Japan and accounts for less than 3% of all leukemia cases.

Prognosis has been related to age, sex and Binet, Rai stage.

CLL have chromosomal abnormalities as detected by cytogenetic analysis.

Trisomy 12 is common abnormality 10% of patients as determined by conventional techniques but as many as 20% when analyzed by FISH detecting abnormalities in previously normal karyotypes. Also we studied micronucleus in erythroblast cell with CLL.

I Abstract (はじめに)

慢性リンパ球性白血病 chronic lymphocytic leukemia (CLL) リンパ球様の白血病細胞が増殖する疾患で、リンパ球は形態的に成熟しているように見られるが細胞遺伝的には異常がみられ分子生物学的には未熟である。欧米では全白血病の約30%と最も頻度の高い白血病であるが、本邦での発症率は約3%と非常に稀である。発症の年齢は平均60歳台で比較的高齢者に多く見られる。欧米に於ける発症もやはり平均60歳位であるが日本よりやや若い。CLLの細胞表面マーカーによる分類によると殆どがB細胞性 (B-CLL) であり、T細胞性 (T-CLL) は約5%といわれている。⁹⁾

今回は形態学的、細胞遺伝学的検索を試みた。特に細胞遺伝学的にはCLLの異常細胞のFISH法による検索を行ったので報告する。

II Introduction (CLLについて)

CLLは多様な病型がみられることが近年明らかになったがAbstractで述べた様にCLL症例の95%以上はB細胞性 (B-CELL) の小型リンパ球形態の細胞の増加を示す。ゆえに、本邦ではCLLという時にはB細胞性を指す事が多い。ここでは分類の参考に表(1)に示す様にFAB分類を付記した。

表1 慢性リンパ系白血病のFAB分類

B cell type

- 1) chronic lymphocytic leukemia (CLL)
- 2) CLL of mixed cell type (CLL/PL and others)
- 3) prolymphocytic leukemia (PLL)
- 4) hairy cell leukemia (HCL)
- 5) HCL variant (HCL-V)
- 6) splenic lymphoma with circulating villous lymphocytes (SLVL)
- 7) leukemic phase of non-Hodgkin's lymphoma (NHL)
- 8) plasma cell leukemia (PCL)

T cell type

- 1) T chronic lymphocytic leukemia (TCLL)
- 2) T prolymphocytic leukemia (TPLL)
- 3) adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL)
- 4) Sezary's syndrome

また診断基準として用いたものを表(2)示した。1, 2, 3)

表2 B細胞慢性リンパ性白血病の診断基準(NCI-WG,1996)

(1) 末梢血	$5 \times 10^9 / \mu\text{l}$ 以上の末梢血中リンパ球の増加しているリンパ球は成熟小型リンパ球prolymphocyte(前リンパ球), 異型リンパ球は末梢血の55%以下あるいは $15 \times 10^9 / \mu\text{l}$ 以下
(2) 骨髄血	リンパ球系細胞の30%以上
(3) 細胞表面抗原	B細胞表面抗原が陽性(CD19, CD20, CD23) sIg(surface immunoglobulin)は陽性であるが弱いCD5抗原が陽性, その他のT細胞性抗原は陰性

ついでこれまで文献例からCLLの染色体分析で認められたものを表(3)に示した。4, 5, 6)

表3 慢性リンパ性白血病において認められる染色体異常

	染色体異常	癌遺伝子・癌抑制遺伝子	頻度(%)
B-CLL	+12	unknown	30
	del/t(13q)	RBを含む欠損	20
	14q+/t(14q)		20
	t(11;14)(q13;q32)	BCL 1 /IGH	
	t(14;18)(q32;q21)	IGH/BCL 2	
	t(2;14)(p13;q32)	?/IGH	
	t(14;19)(q32;q13)	IGH/BCL 3	
	del(6q)	unknown	10
TCLL	inv(14)(q11q32)	TCR α /TCL- 1	40
	t(14;14)(q11;q32)	TCR α /TCL- 1	
	del/t(14)(q11)	unknown	

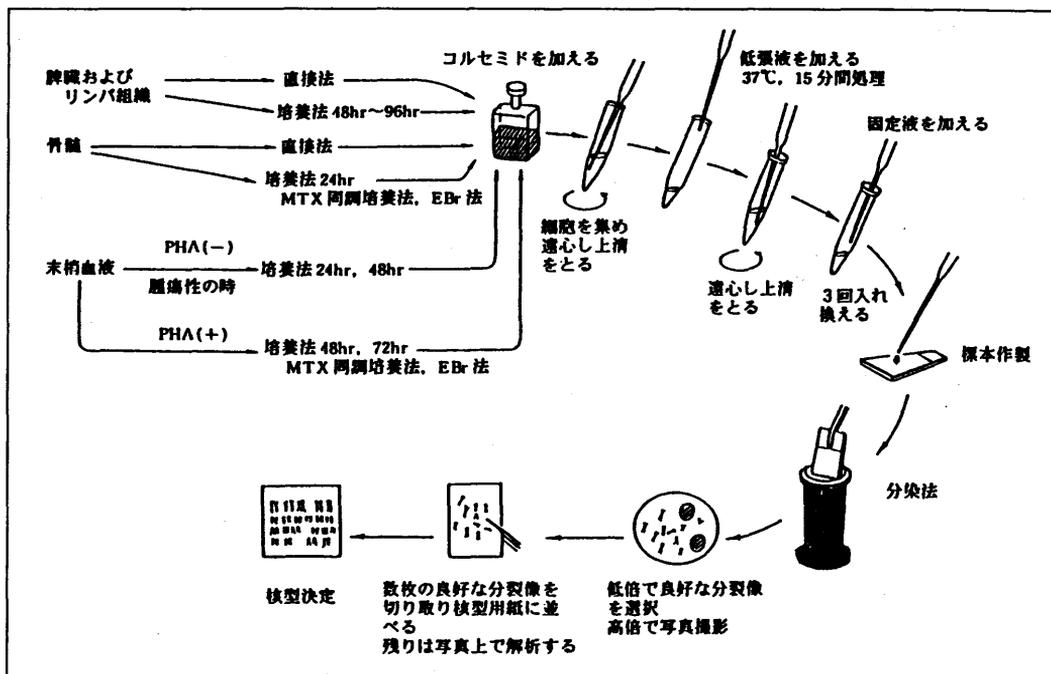


図1 血液細胞の染色体観察の作業行程

表4 染色体異常の記載に用いるおもな記号

記号	意味	例
+	染色体の付加	+ 8, +12
-	染色体の欠失	- 7, -Y
t	転座 translocation	t (9; 22)(q34; 11)
inv	逆位 inversion	inv (16)(p13q22)
del	欠失 deletion	del (3)(p13), del (5)(q15q33)
dup	重複 duplication	dup (12)(q13→q22)
ins	挿入 insertion	ins (3; 3)(q26; q21q26)
i	同腕染色体 isochromosome	i (17q), i (1q)
der	派生染色体 derivative chromosome	der (3) t (3; ?)(q31; ?)
dic	二動原体染色体 dicentric chromosome	dic (3; 5)(q21; q13)
r	環状染色体 ring chromosome	r (8)(p22q24)
mar	マーカー染色体 marker chromosome	+ mar
/	モザイク	46, XY, t (9; 22)(q34; q11)/46, XY

(short system での記載例)

47, XY, +21, t (9; 22)(q34; q11), del(11)(q31)

染色体数 性染色体 数的異常 構造異常 構造異常に関与する染色体 その染色体の切断の生じているバンド

○ 形態学的検索 (micronucleus)

骨髓標本におけるリンパ球細胞のいわゆるmicronucleus (小核) を有する細胞をカウントし、更にリンパ球のその他の形態異常を検索した。

○ 細胞遺伝学的検索 (chromosome analysis) 染色体分析は (図1) で示した。

同調培養法を用い (表4) として染色体異常の記載に用いる主な記号を示し、染色体分析を極めて簡便に行なえるFISH法を用いたのでそのFISH法を解説する。

FISH法プロトコールの解説

1. FISH法の標本作製

図2にFISH法の概略を示す。FISH法に用いるサンプルは通常の方法で作製した染色体標本や血液の塗抹標本である。サンプル入手後できるだけ早くカルノア液 (メタノール：酢酸の3：1混合液) などで固定し、 -20°C 以下に保存することが重要である。治療後など、得られる細胞数が少なく染色体解析が困難な場合には骨髓細胞からデキストラン処理やKClを含む低張液で赤血球を除去し、カルノア固定を行い、 -20°C 以下に保存しておく。標本は空気乾燥法で作製する。作製した標本は室温中で1晩放置、または 65°C 恒温槽中で3時間処理し細胞の脱落を防ぐ。実体顕微鏡下で観察し、ハイ

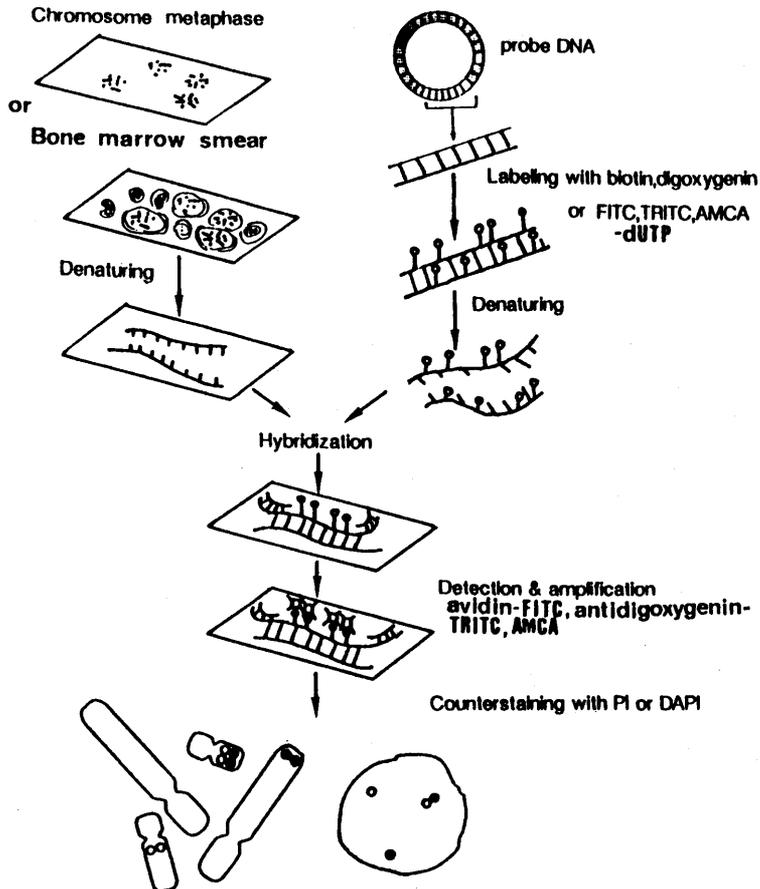


図2 FISH法の概略

ブリダイズしたい領域をダイヤモンドペンで軽くマークしておく。通常9mm×9mmの小さい領域内でも500個以上の細胞核や数個以上の染色体分裂像が観察可能である。

2. プローブの標識

ハイブリダイズに用いるプローブの標識をビオチンd-UTPやデオキシゲニンd-ATPを用いニックトランスレーション法で行う。BRL社とベーリンガーマンハイム社の標識キットを用い、15℃で1.5時間処理、この状態で変性し、このまま熱処理したスライド上の染色体DNAや核内DNAとハイブリダイズさせる。このとき、図1の上から3段目の絵にあるようにプローブ上の単鎖で残っている部分がスライド上の相補的DNAとハイブリダイズする。

病期分類

病期分類には現在Rai分類とBinet分類の二つが併用されている。

表5 慢性リンパ性白血病の病期分類

Rai分類 (Rai,1975)		
3段階評価	5段階評価	臨床症状
低危険度群 low risk	0	末梢、骨髄のリンパ球増多
中間危険度群 intermediate risk	I II	リンパ節腫大 肝腫大and/or脾腫大
高危険度群 high risk	III IV	貧血 血小板減少

Binet分類 (Binet,1977)		
病期	検査所見・浸潤範囲	平均生存期間 (年)
Stage A	Hb \geq 10g/dl and血小板数 \geq 100 \times 10 ⁹ /l	46.0
Stage B	Hb \geq 10g/dl and血小板数 \geq 100 \times 10 ⁹ /l	46.0
Stage C	Hb $<$ 10g/dl and/or血小板数 $<$ 100 \times 10 ⁹ /l	2.5
浸潤範囲 (1) 頭頸部リンパ節 (Waldeyer輪も含む) (2) 腋窩リンパ節 (片側/両側) (3) 鼠径リンパ節 (片側/両側) (4) 脾腫大 (5) 肝腫大		

IV Results and Discussion (結果とまとめ)

Table 1にStaging (病期分類), Karyotype (染色体異常), Lymphocyte (形態異常, 小核;micronucleus) の結果を示した。7, 8, 9)

症例数は42例で形態学的にはTable 1に示したLymphocyte (micronucleus) で11症例を検索した。

全症例で小型のリンパ球やmicronucleusも高い頻度で見られ、Table 1に示した様にKaryotypeの異常と相関が見られた。図3に今回CLL細胞にみられた形態異常を示す。図3a, b, cは小型リンパ球を示す3b, 3cには核に切れ込みのあるリンパ球を示す。図3dは大きい核の崩壊したバスケット (basket cell) 細胞ないしグンプレヒトGumprechtの核影と呼ぶリンパ球系の細胞が増殖するときによくみられる。この細胞は今回観察したCLL症例に多くみられた。

細胞遺伝学的検索も Table 1 に見られる様に高頻度に認められる染色体異常は12番染色体のトリソミー (trisomy12) で続いて13番染色体長腕の欠失・転座 (del/t (13q)), 14番染色体長腕 (14q32) の転座および6番染色体長腕の欠失等の異常が認められた。図4 a, にトリソミー12の異常の染色体異常を, 図4 b)に13番染色体異常の欠失を示す。

FISH法 (fluorescence in situ hybridization) により染色体異常の検出率はさらに改善した。12番染色体トリソミーに関しては12番染色体セントロメアプローブを, 13番染色体の欠失に関しては欠失部位に含まれるRB (retinoblastoma) 遺伝子プローブを用いることにより十分な染色体分裂像が得られない症例でも, これらの染色体異常の有無について検討することが可能である。図4 a' FISH法による間核上でのトリソミー12の検出を, 図4 b' は13番染色体の欠失に伴いRB遺伝子が落ちており, 核内に1個のシグナルしかみられない。

G分染法による12番トリソミーの検出率に比較してFISH法による検出率は12番染色体セントロメアプローブを使用で検出率は約2倍, RB遺伝子プローブを使用で約3倍であった。

元来分裂しにくいCLL細胞の培養状態, 分裂指数の影響を受けないFISH法はCLLに特異的な染色体異常の検出に有用であり, 特に12番染色体トリソミーに関してはこの異常の有無によって予後に差があると考えられておりCLLの予後判定にFISH法は極めて有用であると考えられる。

文献

- 1) Bennett JM, et al: Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). *Ann Intern Med* 103: 460-462, 1985
- 2) Bennett JM, et al: Proposals for the recognition of minimally differentiated acute leukemia (AML - MO). *Brit J Haematol* 78: 325-329, 1991
- 3) Cheson, B. D., Bennett, J.M., Grever, M. et al.: National Cancer Institute - Sponsored Working Group Guidelines for Chronic Lymphocytic Leukemia: Revised guidelines for diagnosis and treatment, *Blood* 87: 4990-4997, 1996
- 4) Juliusson, G., Oscier, D.G., Fitchett, M. et al.: Prognostic subgroup in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 323: 720-724, 1990
- 5) Asou, H., Takechi, M., K. Tanaka, Kamada, N. et al.: Japanese B cell chronic lymphocytic leukemia: a cytogenetic and molecular biological study. *Brit J Haematol* 85: 492-497, 1993
- 6) 鎌田七男: 白血病の染色体異常, 井村裕夫, 尾形悦郎, 高久史磨, 垂井清一郎 (編): 最新内科学大系白血病, pp86-105, 中山書店, 1992
- 7) Arif M, K. Tanaka, N. Kamada et al: Hidden monosomy 7 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Leukemia Res* 20: 709-716, 1996
- 8) Arif, M., Tanaka, K., Kamada, N. et al.: Independent clones of trisomy 12 and retinoblastoma gene deletion in Japanese B cell chronic lymphocytic leukemia, detected by fluorescence in situ hybridization. *Leukemia* 9: 1822-1827, 1995
- 9) 鈴木憲史ほか: B細胞性慢性リンパ性白血病75例の全経過および死因—特に二次発癌について—。 *臨床血液* 38: 740-743, 1997

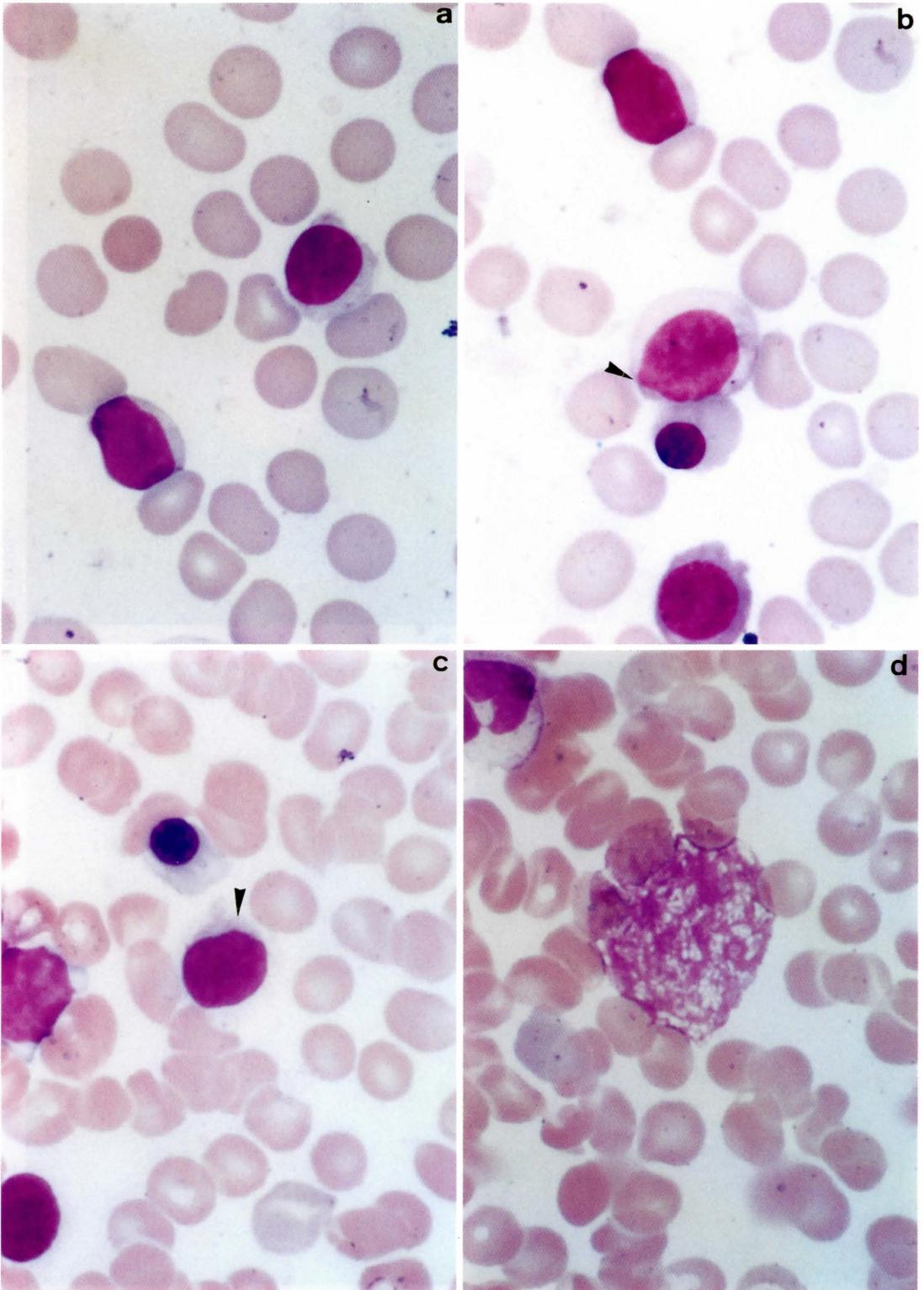


図3 CLLの細胞形態

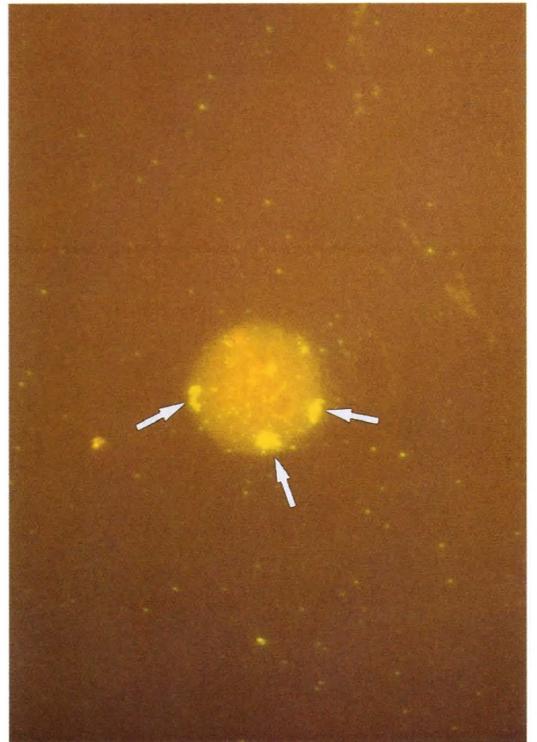
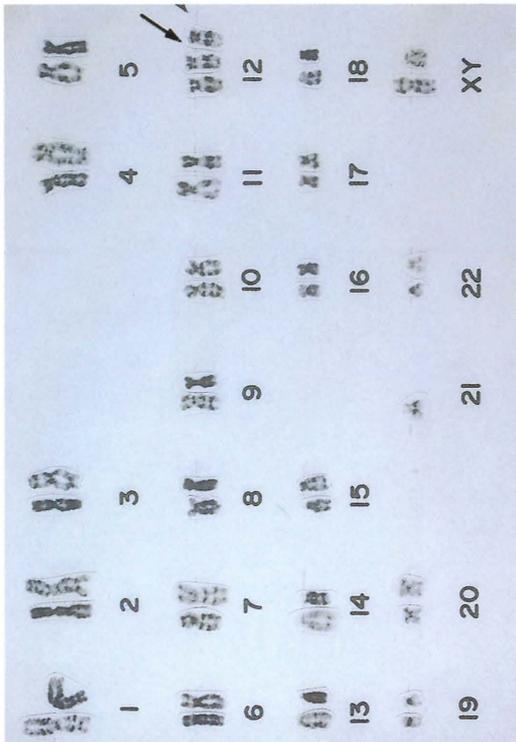
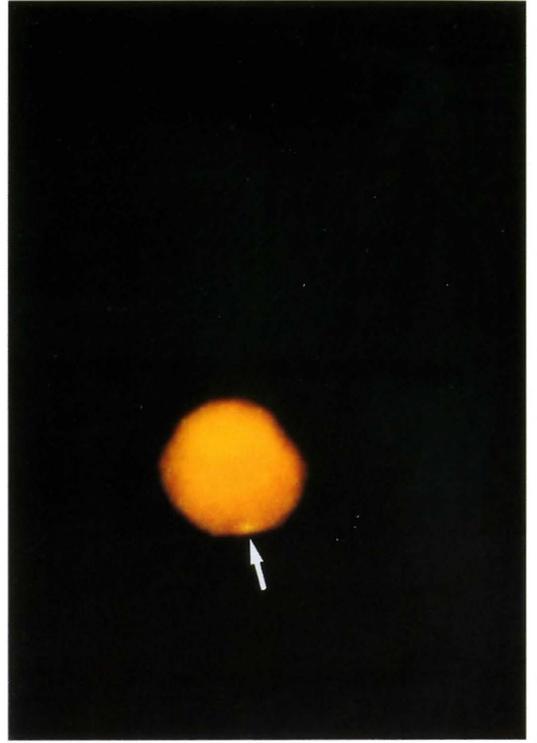
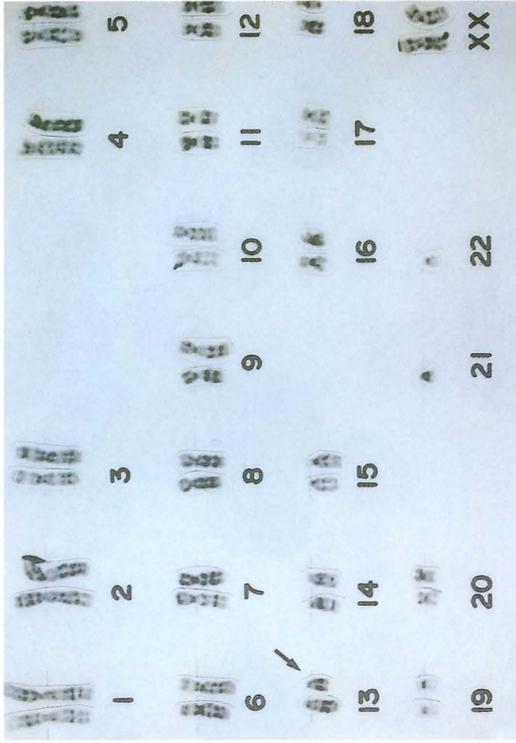


図4 CLLの染色体及びFISH

Table 1 Clinical stage and karyotypes of 42 patients with B-CLL

Nos.	Sex	Age	Staging		Karyotype	Lymphocyte (micronucleus. %/100)
			Rai	Binet		
1	M	86	I	A	46,XY	ND
2	M	70	0	A	45,X,-Y[7/44]47,XY,+12,de(6)(q32) [3/44]47,XY,+21[2/44]46,XY[32/44]	31
3	M	83	0	A	46,XY	ND
4	F	50	II	B	No mitosis	ND
5	M	91	IV	O	47,XY,+12[6/23]46,XY[17/23]	29
6	M	68	II	A	47,XY,+12[34/35]46,XY[1/35]*	ND
7	F	51	II	B	47,XX,+12[1/33]*/46,XY[32/33]	ND
8	M	64	I	A	46,XY	ND
9	F	74	II	B	46,XX	ND
10	M	75	II	A	46,XY,+3,-22[3/21]/47,XY,3[7/21] /46,XY[11/21]	ND
11	M	64	0	A	46,XY	ND
12	F	61	0	A	No mitosis	ND
13	M	63	0	A	46,XY	ND
14	M	58	IV	O	46,XY[42/44]/47,XY,-9,+13,+mar[1/46]* /46,XY,t(2:1)(p12;q25)[1/44]*	35
15	M	64	II	B	46,XY,de(13)(q14;q22)[11/46]/46,XY [35/46]	32
16	F	74	III	O	46,XX,t(9;11)(q34;q13),de(13)(q12;q21) [34/36]/46,XX[2/36]	37
17	M	67	I	A	46,XY,+7,-18[4/38]46,XY,t(3;5)(p17;q375) [1/38]*/47,XY,+8,-9,+14[1/38]*/46,XY[32/38]	41
18	M	40	0	A	46,XY,de(13)(q12;q22),add(18)(q11)[3/21]/47, XY,+X[1/21]*/46,XY,dup(10)(q24-q26)[1/21]* /46,XY[16/21]	38
19	F	70	0	A	46,XX[17/18]/46,XX,inv(5)(p175q371)[1/18]*	ND
20	F	56	I	A	46,XX	ND
21	F	77	0	A	46,XX	ND
22	M	63	II	B	46,XY	ND
23	F	47	I	A	46,XX	ND
24	M	53	0	A	46,XY	ND
25	F	77	0	A	46,XX	ND
26	F	65	II	B	46,XX	ND
27	F	83	0	A	No mitosis	ND
28	M	65	0	A	46,XY	19
29	M	67	II	B	46,XY	ND
30	F	79	IV	O	47,XX,+X[18/23]/46,XX,-1,+15[5/23]	ND
31	F	48	IV	O	46,XX	ND
32	M	60	I	A	46,XY,add(2)(q11)[1/27]*/46,XY[26/27]	ND
33	M	57	0	A	46,XY	ND
34	M	80	0	A	46,XY,de(14)(q13)(3/20)/46,XY,de(14)(q13),add(14)(q32) [1/20]*/45,XY,-6,de(14)(q13)[1/20]/46,XY[15/20]	42
35	F	73	0	A	46,XX	20
36	F	70	III	O	46,XX	ND
37	M	72	0	A	No mitosis	ND
38	M	65	II	B	46,XY	18
39	F	59	I	A	46,XX	ND
40	M	72	0	A	No mitosis	ND
41	M	56	0	A	46,XY	ND
42	F	34	II	B	46,XX	ND

ND: Not done.
*: Non clonal