

慢性骨髄性白血病並びに周辺疾患の分子生物学的解析

岡山大学医学部第二内科学教室 (指導: 木村郁郎教授)

関 藤 典 子

(平成6年2月4日受稿)

Key words : chronic myelocytic leukemia, variant Ph¹ chromosome, Ph¹-negative CML, *bcr* rearrangement, unclassified chronic myeloproliferative disorders

緒 言

フィラデルフィア (Ph¹) 染色体は慢性骨髄性白血病 (CML) の95%に認められ, 9番染色体と22番染色体との相互転座 t(9;22)(q34;q11)の結果生じたものである¹⁾. 22番染色体の breakpoint はわずか5.8kbの限局した部位に集中しており, breakpoint cluster region (*bcr*; Major-*bcr*, M-*bcr*)と名付けられた²⁾. この相互転座によって9q34上の*ABL* 遺伝子が22q11上の*BCR* 遺伝子と結合し, *BCR/ABL* キメラ遺伝子が形成され, さらに8kbの*BCR/ABL* mRNAに転写され³⁾, p210^{*BCR/ABL*}蛋白に翻訳される. この蛋白では, 正常の p145 *ABL* 蛋白よりも tyrosine kinase 活性が亢進しており, これがCMLの発症, 進展に重大な役割を果たしていると考えられている⁴⁾. またこれらCMLの発症, 進展に関する分子生物学的解析は, 本症の診断を形態学的解析, 細胞遺伝学的解析から分子生物学的解析へとすすみ, *bcr* 再構成の有無あるいは*BCR/ABL* mRNAの有無がCMLの分子診断法として一般化しつつある.

さて人口構成の高齢化とともに高齢者疾患の病像特異性あるいはまた疾患構成の再整理が検討されているが, このことは血液疾患においても例外ではなく, 臨床像や血液像はCMLに合致しながらもPh¹染色体の認められないPh¹陰性 (Ph¹-) CML⁵⁻⁷⁾, CML以外の慢性骨髄増殖性疾患 (CMPD), さらには従来の診断基準からは既存の疾患単位に位置づけることが困難でい

わゆる分類不能型 CMPD (unclassified CMPD; UCMPD) とせざるを得ない症例^{8,9)}が中高齢者を中心に増加しつつあり, これら報告はCMLを中心とした各種CMPDとその周辺疾患の相互関係あるいは病態の再整理を要求するものであろう. 本研究において著者はstandard Ph¹陽性 (Ph¹⁺) CML, これまでに報告をみない転座例 [t(9;22)(q21;q11)]を含むvariant Ph¹⁺CML, Ph¹-CML/UCMPD, 若年型CML (JCML), 慢性好中球性白血病 (CNL), CML以外のCMPDなどCMLとその周辺疾患における*bcr*再構成について検討し, これら疾患群の病態解析と臨床血液学的位置づけに対する一助とせんとした.

対象と方法

1. 対 象

Standard Ph¹⁺CML 54例, variant Ph¹⁺CML 3例, Ph¹-CML/UCMPD 5例, JCML 2例, CNL 3例, 慢性骨髄単球性白血病 (CMML) 9例, 真性多血症 (PV) 8例, 本態性血小板血症 (ET) 15例, 原発性骨髄線維症 (MF) 4例を対象とした.

2. 染色体分析

骨髄直接観察法ないし末梢血短期培養法で, 染色体標本を作成し, Qバンド法ないしGバンド法にて解析した.

3. *bcr* 再構成の検討

末梢血ないし骨髄液の白血球 (buffy coat) よ

り phenol-chloroform 法にて高分子 DNA を抽出し, DNA10 μ g をそれぞれ制限酵素, *Bgl* II, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind* III で消化した. その後 0.8% agarose gel (Sigma Type I) で電気泳動し, Hybond N (Amarsham) に Southern transfer した. そのフィルターを *bcr* probe と hybridization させた後, -70°C で 1~4 日, autoradiography をおこなった¹⁰⁾.

なお, probe としては 3' *bcr* probe (1.2kb *Hind* III-*Bgl* II, Pr-1) と TransProbe-1 (*Phl/bcr*-3) (Oncogene Science), 5' *bcr* probe (0.6 kb *Hind* III-*Bam*HI, 東京医科歯科大学広沢信作先生, 神山尚先生より供与) を用い, マルチプライマー法で比活性 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cpm/ μ g DNA に放射性ラベルした.

結 果

1. Standard Ph⁺CML における *bcr* 再構成の検討

3' *bcr* probe を用いた Southern blot analysis の結果, standard Ph⁺CML 54例中49例に *bcr* 再構成が認められた (*bcr*⁺). *bcr* 再構成が認められなかった5例について, 5' *bcr* probe, TransProbe-1 を用いて検討した結果, 3例では *bcr* 再構成を認めたが, 2例では *bcr* は germline であった (*bcr*⁻).

つぎに standard Ph⁺*bcr*⁺CML における *bcr* 内の切断部位と病期の関連を検討した. 3' *bcr* probe を用いた解析において *bcr*⁺であった49例の病期は, 慢性期38例, 急転期2例, 慢性期から急転をきたしたものの9例であったが, 図1に示すごとく *bcr* 内の切断部位の局在については,

表1 Variant Ph⁺CML の臨床・血液所見

症 例	症例 1 (E. I. 51歳,F)	症例 2 (M. F. 35歳,F)	症例 3 (K. T. 73歳,F)	
肝 腫	—	—	—	
脾 腫	—	3 cm	—	
末梢血 Hb (g/dl)	11.5	10.2	11.8	
Plt ($\times 10^4/\mu$ l)	29.8	85.3	18.9	
WBC ($/\mu$ l)	62,700	163,600	15,500	
N	Mybl (%)	2	2	
	Pro	2	19	
	My	12	16	8
	Mt	6	13	2
	St	32	23	10
	Sg	27	19	53
Eo	4	4		
Ba	12	1	4	
Mo		1	5	
Ly	5	2	18	
		(Erybl 3%)		
骨 髄	NCC $57 \times 10^4/\mu$ l Mybl 0.4%, Ba 5.2% G/E=38.8	NCC $65 \times 10^4/\mu$ l Mybl 1.6%, Ba 0.4% G/E=60.3	NCC $64 \times 10^4/\mu$ l Mybl 0.2%, Ba 1.8% G/E=20.4	
N A P score	23	7	30	
核 型	46, XX, t(9;22;13) (q34;q11;q22)	46, XX, t(9;22) (q21;q11)	46, XX, t(9;22)(q34;q11), inv(9)(9q22;22q13)	
<i>bcr</i> 再構成	+	+	+	
生存期間 (月)	38	66	63+	

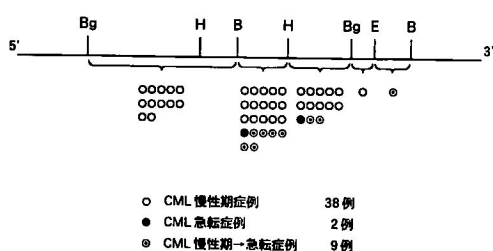


図1 Standard Ph¹+CML の22番染色体内 break-point

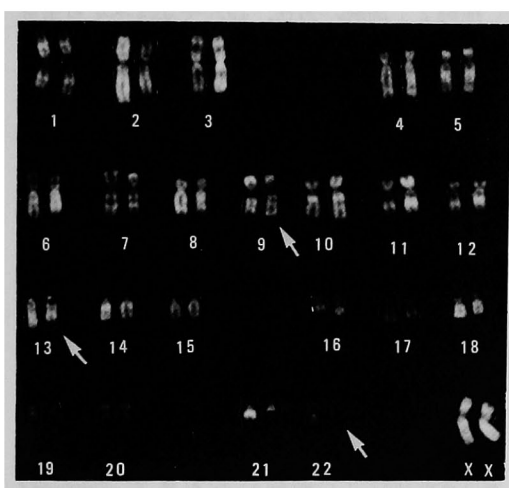


図2 Variant Ph¹+CML (症例1) における染色体分析: 46, XX, t(9; 22)(q34; q11; q22)

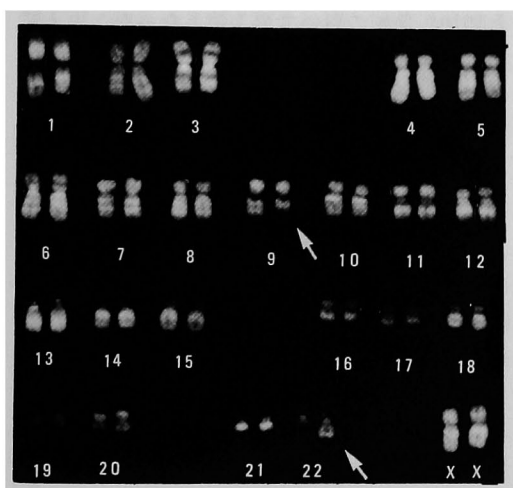


図3 Variant Ph¹+CML (症例2) における染色体分析: 46, XX, t(9; 22)(q21; q11)

病期による差は認められなかった。また慢性期および急転時の検索をおこない得た9例では、同一症例における *bcr* 再構成パターンは不変であった。なお、そのうちの1例は慢性期、急転期ともに double Ph¹を有していた。

2. Variant Ph¹+CML における *bcr* 再構成の検討

1) 症例呈示 (表1)

症例1: 51歳, 女性. 染色体分析は図2に示すごとく, 46, XX, t(9; 22; 13)(q34; q11; q22) の複合転座を示し, 9q34→9qter は22q11に転座しているものと思われる. CML 診断後14ヶ月で急転をきたし, その24ヶ月後に死亡した。

症例2: 35歳, 女性. 染色体分析は図3に示すごとく, 46, XX, t(9; 22)(q21; q11)を呈し, 9番と22番の相互転座ではあるが9番の切断点が標準型のq34とは異なるq21で, 22番がmasked Ph¹となっている. 初診から15ヶ月後に急転をきたし, 一旦完全寛解に到達したが, 再び急転をきたし初診から66ヶ月後に死亡した。

症例3: 73歳, 女性. 染色体分析は図4に示すごとく, 46, XX, t(9; 22)(q34; q11), inv(9)(9q22; 22q13)を呈し, Ph¹転座に加えて9番染色体の長腕内逆位が認められた. この症例は無治療で初診から63ヶ月の現在も慢性期のまま経過している。

なお, これら3例では全経過を通じて核型に変化はなく, 付加的染色体異常は認められていない。

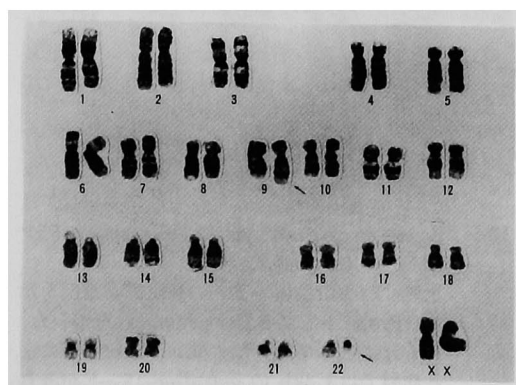


図4 Variant Ph¹+CML (症例3) における染色体分析: 46, XX, t(9; 22)(q34; q11), inv(9)(9q22; 22q13)

2) *bcr* 再構成の検討

bcr 再構成の検討結果は図5に示すごとくで variant Ph¹⁺CML 3例ともに standard Ph¹⁺CML と同様, *bcr* 再構成が認められた。

3. Ph¹⁺-CML/UCMPDにおける *bcr* 再構成の検討

Ph¹⁺-CML/UCMPD の診断は白血病裂孔 (hiatus leukemicus) を伴わない顆粒球系細胞増多を示し, CMML と PV, ET, CNL などの CMPD を除外し, さらに各種検査から類白血病反応を否定し得たものとした。

1) 症例呈示 (表2)

症例1: 54歳, 男性。1987年11月会社の検診で白血球増多 (10,000/ μ l) を指摘されたが, 自覚症状もなく放置していた。1988年11月検診で再び白血球増多 (29,000/ μ l) を指摘され, 12月精査目的で入院となった。入院時肝脾腫は認められず, 白血球数38,600/ μ lで幼若細胞の出現を

伴う顆粒球系細胞増多を認め, 貧血はなく, 血小板数は55.8 \times 10⁴/ μ lと増加, 骨髓有核細胞数 (NCC) は39 \times 10⁴/ μ lで, 成熟障害を伴わない顆粒球系細胞の増多を認め, 好中球アルカリホスファターゼ (NAP) 値は19と低値, 染色体分析では正常核型を示した。Ph¹⁺-CML の診断のもと, 無治療で経過観察していたが, 1989年11月白血球数83,200/ μ lと増加したため busulfan (BSF)内服治療を開始し, CML 慢性期の経過を辿っていたが, 1993年1月転勤のため転院した。

症例2: 20歳, 男性。1990年5月末から全身倦怠感が出現し, 6月初旬感冒様症状にて近医受診, 白血球数116,900/ μ lと著増し CML 疑いで紹介入院となった。入院時肝を2cm, 脾を5cm触知し, 左前腕と左大腿の筋肉内に母指頭大の硬結を認めた。Hb 11.2g/dl, 白血球数140,400/ μ l, 血小板数19.7 \times 10⁴/ μ l, 骨髓では NCC 96 \times 10⁴/ μ lで成熟障害を伴わない顆粒球系過形成を認め, NAP 値は32と低値, 染色体分析では正常核型を示した。Ph¹⁺-CML の診断のもと, 8月から BSF 内服治療を開始し, 肝脾腫は縮小し, 白血球数も10,000/ μ l前後でコントロールできたため9月に退院した。1991年5月白血球数が35,400/ μ lと増加したため 6-mercaptopurine (6MP), vindesine (VDS), prednisolone (PSL) に変更し, 再び白血球数は安定した。1993年4月骨髓で芽球11.6%, 前骨髓球37.8%と増加し急転の疑いで再入院となった。再入院時自覚症状はなく, 肝を3cm, 脾を5cm触知, 表在リンパ節腫大はなく, 神経学的所見に異常は認められなかった。白血球数5,000/ μ l (芽球1%, 前骨髓球+, 好塩基球38%), Hb 12.7g/dl, 血小板数25.1 \times 10⁴/ μ l, 染色体分析では46, XYに加えて+8, 4p+, 18p+の付加的異常が認められた。daunorubicin (DNR), vincristine (VCR), PSL, さらに etoposide (VP-16), behenoyl-cytosine arabinoside (BHAC) を投与したが慢性期には戻らず, 12月胸水貯留, 呼吸不全で死亡した。剖検は家族の同意が得られず施行できなかった。

症例3: 66歳, 男性。1987年4月全身倦怠感にて近医を受診した際, 白血球増多, 肝脾腫を

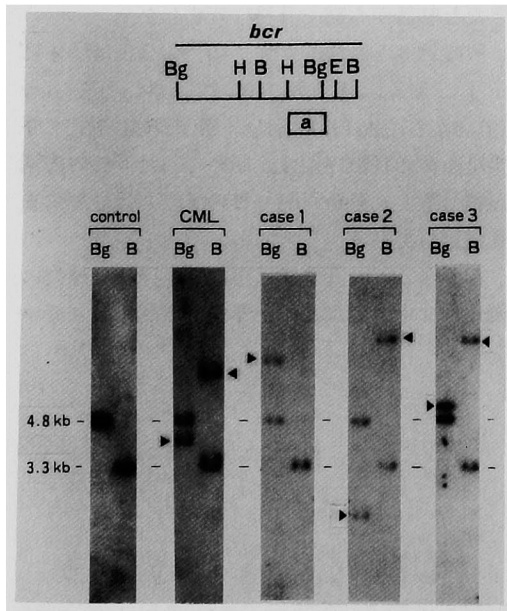


図5 Southern blot analysis による variant Ph¹⁺CML の *bcr* 再構成の検討

上段に22番染色体の *bcr* の制限酵素地図を示す。Probeとして3' *bcr* probe (a)を用いた。Bgl IIによる切断では4.8kb, BamHIによる切断では3.3kbのgermlineバンドがみられるが, 症例1, 2, 3では矢印で示すごとく, 再構成バンドが認められた。(B=BamHI, Bg=Bgl II, E=EcoRI, H=Hind III)

表2 Ph¹-CML の臨床・血液所見

症 例	症例 1 (Y. T. 54歳, M)	症例 2 (T. N. 20歳, M)	症例 3 (U. T. 66歳, M)	症例 4 (T. N. 63歳, F)	症例 5 (K. K. 48歳, M)	
肝 腫	(-)	2 cm	5 cm	2 cm	(-)	
脾 腫	(-)	5 cm	5 cm	5 cm	(-)	
末梢血 Hb (g/dl)	15.0	11.2	11.0	12.7	9.6	
Plt ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	55.8	19.7	30.1	55.4	21.1	
WBC ($/\mu\text{l}$)	38,600	140,400	110,700	96,800	20,000	
N	Mybl (%)		1	2	2	+
	Pro	6	13	4	1	+
	My	9	18	19	19	26
	Mt	8	15	8	7	1
	St	7	15	26	23	1
	Sg	54	26	35	34	64
Eo	1	2		3		
Ba	3	3	1	5		
Mo	3	4	1	3	2	
Ly	9	3	4	3	6	
骨 髄	NCC $39 \times 10^4/\mu\text{l}$	NCC $96 \times 10^4/\mu\text{l}$	NCC $54 \times 10^4/\mu\text{l}$	NCC $34 \times 10^4/\mu\text{l}$	NCC $55 \times 10^4/\mu\text{l}$	
	Mybl 1.4%	Mybl 2.0%	Mybl 2.0%	Mybl 2.4%	Mybl 1.8%	
	G/E=16.3	G/E=20.3	G/E=5.1	G/E=16.5	G/E=4.3	
N A P score	19	32	381	121	33	
核 型	46, XY	46, XY	46, XY	46, XX, i(17q)	47, XY, +8	
<i>bcr</i> 再構成	+	+	-	-	-	
生存期間 (月)	50+	42	13	14	48	

指摘され、7月某院を受診した。初診時肝を5 cm、脾を5 cm触知、Hb 11.0 g/dl、白血球数は110,700/ μl と著増しており、hiatusを伴わない幼若顆粒球が出現し、好塩基球増多はみられなかった。血小板数は $30.1 \times 10^4/\mu\text{l}$ と正常範囲内で、NAP値は381と軽度上昇、骨髄はNCC $54 \times 10^4/\mu\text{l}$ で顆粒球系の過形成を示し、染色体は正常核型であった。その後白血球数は200,000/ μl 以上となり、各種抗白血病剤にも不応性を示し、ranimustine (MCNU)でも細胞減少はみられなかった。髄膜炎、下痢などを合併し、1988年5月に死亡したが、最後まで急転像は認められなかった。

症例4：63歳、女性。1987年頃より近医で白血球増多を指摘されていたが放置していた。1988年6月全身倦怠感、微熱が出現し、某院を受診し、著明な白血球増多と脾腫を認め入院となった。家族歴として甥がCML急転で死亡している。入院時肝を2 cm、脾を5 cm触知し、白血球数96,800/ μl 、好塩基球5%、血小板数 $55.4 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、骨髄でも顆粒球系細胞の増多を認め、成

熟抑制はなく、好塩基球3.4%、NAP値121、染色体分析では46,XX,i(17q)を認めた。Ph¹-CMLの診断のもと、BSF内服で治療を開始し、自覚症状、血液所見ともに改善し外来通院していたが、1989年4月貧血と脾の急激な再腫大を認め再入院となった。再入院時肝を1 cm、脾を6 cm触知し、表在リンパ節腫大はなく、神経学的所見にも異常を認めなかった。赤血球数 $271 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb 7.4 g/dl、白血球数20,000/ μl (芽球3%、前骨髄球1%、骨髄球15%、好塩基球14%)で好塩基球増多がみられた。血小板数は $18.3 \times 10^4/\mu\text{l}$ と慢性期よりは減少し、骨髄NCC $70 \times 10^4/\mu\text{l}$ と著増、芽球4.2%、前骨髄球8.4%と成熟抑制傾向を伴う顆粒球系細胞増多を認めた。NAP値156、染色体分析では初回入院時と同様に46,XX,i(17q)が認められた。再入院後VP (VCR+PSL)療法を施行したが、6月頃より末梢血に芽球の増加を認め、急転像が成立、8月敗血症を併発し死亡した。

症例5：48歳、男性。1988年11月、発熱、白血球増多で近医に入院、PSLで軽快したが、貧

血と幼若細胞の出現を伴う白血球増多を認め、1989年4月某院に入院となった。入院時肝脾腫は認められず、赤血球数 $296 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、Hb 9.6 g/dlと軽度の貧血を認め、白血球数は $20,000/\mu\text{l}$ で、低率ながら芽球、前骨髄球の出現を認めた。血小板数 $21.1 \times 10^4/\mu\text{l}$ 、骨髄では $\text{NCC } 55 \times 10^4/\mu\text{l}$ で成熟抑制を伴わない顆粒球系細胞の増多を認めた。NAP値は33と低下し、染色体分析では8番染色体のトリソミーが認められた。同年6月退院し無治療で経過観察していたが、白血球増加傾向のため近医にてBSFの投与が開始された。さらに発熱エピソードを認めるようになり、1992年1月再入院となった。再入院時の骨髄検査では $\text{NCC } 107 \times 10^4/\mu\text{l}$ と著増し、分類では著明な顆粒球系細胞増多を認め、芽球5.2%とaccelerated phaseへの移行が疑われた。BSF、6MP、hydroxyurea (HU)などにて対応したが、貧血、血小板減少が進行して骨髄不全の状態となり、1992年11月呼吸不全のため死亡した。なお、1992年9月施行の骨髄検査では芽球18.8%、前骨髄球41.6%とhiatusの形成が認められ、急転像が成立した。また骨髄液の染色体検査で初診時の+8に加えて1992年8月にt(9;22)(q34;q11)が20細胞中17細胞に認められた。

2) *bcr* 再構成の検討 (図6)

症例1、2では Ph^+ CMLと同様に*bcr*再構成が認められたが、他の3例ではTransProbe-1を用いても*bcr*再構成は認められなかった。Late-appearing Ph^+ がみられた症例5では、 Ph^+ 出現後の検索においてもM-*bcr*領域での再構成は認められず、さらにminor-*bcr* (m-*bcr*)領域での切断についてRT-PCR法によりBCR/ABL mRNAの検索をおこなったが、chimeric mRNAの出現は認められなかった¹¹⁾。

4. JCML, CNL, CMMLにおける*bcr*再構成の検討

JCML 2例, CNL 3例, CMML 9例では全例で*bcr*再構成は認められなかった。

5. 慢性骨髄増殖性疾患(CMPD)における*bcr*再構成の検討

PV 8例, ET 15例, MF 4例では全例で*bcr*再構成は認められなかった。

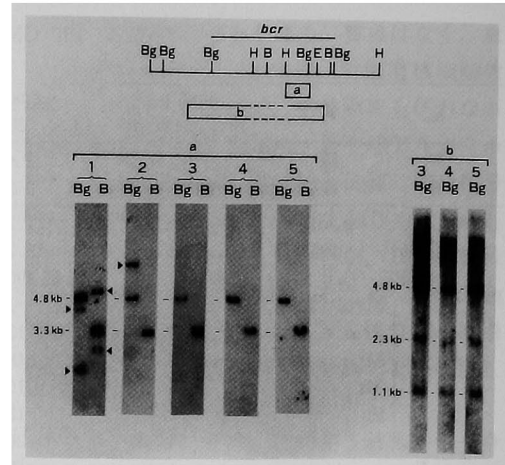


図6 Southern blot analysisによる Ph^+ -CMLの*bcr*再構成の検討

上段に22番染色体の*bcr*周辺の制限酵素地図を示す。Probeとして3' *bcr* probe (a)とTransProbe-1 (b)を用いた。Probe (a)では*Bgl* IIによる切断で3.3kbの、probe (b)では*Bgl* IIによる切断で4.8kb、2.3kb、1.1kbのgermlineバンドがみられる。症例1、2では再構成バンドが認められたが、症例3、4、5では認められなかった。(B=*Bam*HI, Bg=*Bgl* II, E=*Eco*RI, H=*Hind* III)

考 察

CMLでは Ph^+ 染色体が95%以上の症例に認められ¹⁾、これにより生じた*bcr*再構成とBCR/ABL融合型mRNAあるいはBCR/ABL蛋白の検討がその診断と病態解析に応用されつつある²⁻⁴⁾。今回著者は、 Ph^+ -CMLとvariant Ph^+ -CMLの*bcr*再構成について解析し、病期・病態との関連について検討すると同時に、 Ph^- -CML/UCMPD, JCML, CNL, CMML, CMPDなどCML周辺疾患の*bcr*再構成についても検討したわけであるが、standard Ph^+ -CML 54例中52例, variant Ph^+ -CML 3例, Ph^- -CML 5例中2例で*bcr*再構成が認められ、その他の疾患では認められなかった。3'側*bcr* probeで*bcr*再構成の認められなかったstandard Ph^+ -CML 5例のうち3例は他のprobeで再構成を認め、*bcr* 3'側の部分的な欠失^{12,13)}と考えられるが、残る2例はいずれのprobeを用いても*bcr*再構成を認めなかった。このように*bcr*に変化の

ない CML 症例もまれに報告されているが⁴⁻¹⁷⁾, CML では高率に *bcr* 再構成を認めており, その病因論的あるいは診断学的意義は極めて高いものといえよう. さらに著者は variant Ph⁺CML についても検討を加えたが, まず症例 1 は 46, XX, t(9; 22; 13)(q34; q11; q22) の複合転座で, 9q34 上の *ABL* は 22q11 に転座して *BCR/ABL* の近接が生じているものと, また症例 3 はまず 9 番と 22 番の standard Ph⁺転座を生じ, その後さらに 9 番で腕内逆位を起こしたものと思われ, 染色体レベルで *BCR/ABL* の融合が説明可能と考えられる. 一方, 症例 2 はこれまでに報告のない t(9; 22)(q21; q11) を呈し, 9 番の切断点は q21 で, q34 の *ABL* からはるかに離れたところにあり, この転座だけでは *BCR/ABL* の近接は証明しにくい. Ohyashiki ら¹⁸⁾は t(9; 22)(q22; q11) の CML について standard Ph⁺転座 t(9; 22)(q34; q11) が成立した後に 9q22 → q34 が Ph⁺染色体の長腕末端に転座したという複雑な転座の可能性を推定しているが, 本例でも同様の機転が生じた可能性が推定され, CML の病因論として分子レベルでの *BCR/ABL* 融合の重要性を強く示唆するものであろう.

また CML では多くの症例が数年の間に急性転化をきたすが, その機序については未だ解明されていない. *BCR/ABL* 遺伝子の量的増加(増幅)¹⁹⁾や, 質的変化²⁰⁾, 慢性期と急転時とでは *bcr* 内の切断部位の局在が異なるとの報告もみられるが²¹⁾, 今回の検討では慢性期と急転時とで *bcr* 内の切断部位の局在に差は認められず, 同一症例における慢性期と急転時の *bcr* 再構成パターンも不変であった. 急転の機序については最近, 癌抑制遺伝子 p53 の再構成や欠失, 点突然変異といった構造上の変化が骨髄性急性転化例で高頻度に認められたという報告や Rb 蛋白質が巨核芽球性急性転化症例では検出されなかったとの報告がなされ^{22,23)}, lineage 特異性からも注目されている. また Wetzler ら²⁴⁾は骨髄性あるいは分類不能型急転例 6 例の骨髄間質細胞を培養した結果, 5 例でインターロイキン-1β(IL-1β) と IL-6 mRNA の発現を認め, この発現はリンパ性急転例, 増悪期例, 慢性期例では認められなかったこと, さらに急転細胞と骨髄間質

細胞との混合培養で IL-1β と IL-6 の発現が認められたことから, トランスフォームした急転クローンから産生される IL-1β が骨髄間質細胞を刺激することによって各種造血因子が産生され, これが CML の進展に関係しているのではないかと推定している. このように CML の進展には多因子(癌抑制遺伝子の不活性化, 各種癌遺伝子の活性化あるいは増幅, 造血因子の量的・質的変調など)が多段階的に関与し, 急転像へと移行してゆくのではないかと考えられる.

さてこれまで臨床血液所見が CML に類似しながらも Ph⁺染色体が認められない症例が Ph⁻CML として報告されてきた⁵⁻⁷⁾. これら症例は Ph⁺CML と比較して高齢の男性に多く, 脾腫が軽度で, 好塩基球増多を認めず, 血小板数が少なく, かつ治療に抵抗性を示し, 生存期間が短い点などから CML とは別の疾患概念で把握されてきたこともある. また高齢化社会の出現を背景として従来の CMPD に該当しない症例, すなわち UCMPD とせざるを得ない症例に遭遇する機会が増え, Ph⁻CML を含めた病因と臨床的位置づけが注目される. Pugh ら²⁵⁾は Ph⁻CML とされる 25 例を形態学的に再検討した結果, 17 例は骨髄異形成症候群(Myelodysplastic syndromes; MDS), 7 例は CMPD あるいは reactive conditions であったとし, Ph⁻CML といえるものは 1 例のみであったとしている. Travis ら⁸⁾は Ph⁻CML とされる 22 例を再検討した結果, 13 例は CMML, 1 例は CMML-t, 3 例は preleukemic syndrome, 5 例は UCMPD に分類されたとし, Kato ら⁹⁾も ①Ph⁻, ②hiatus leukemicus を認めない骨髄球系細胞の永続的な増加 ($2 \times 10^{10}/l$ 以上), ③成熟障害を伴わない骨髄過形成, ④脾腫, ⑤診断後最低 1 年間生存する症例を Ph⁻CML とし, これら症例の *bcr* 再構成について検討した結果, 2 例に *bcr* 再構成を認め, *bcr* 再構成の認められなかった 6 例はおのおの UCMPD, CMML, CNL, CML 様症候群に分類されたとしている. 今回著者は, 臨床像ならびに血液所見から Ph⁻CML あるいは UCMPD とした 5 例について検討した結果, 2 例に *bcr* 再構成を認めた. Morris ら²⁶⁾は Ph⁻CML に *bcr* 再構成を認め, *ABL* の *bcr* 内へ

の挿入や、複雑な転座によって Ph^1 でも分子レベルでは *BCR/ABL* の近接を生じているものと述べており、 Ph^1 でも *bcr*⁺ の症例は、分子レベルでは Ph^1 +CML と同一に論じられるものと考えられる。それでは *bcr*⁻ の症例を如何に把握すればよいのか、*BCR/ABL* 融合の関与しない CML すなわち Ph^1 -*bcr*-CML が存在するのか、存在するとすれば Ph^1 +*bcr*+CML と比較し、何等かの特徴が臨床的に存在するのか。またその病像発現は如何なる機序によるのかといった問題が提起される。Kurzrock ら²⁷⁾は臨床・血液所見が CML に類似し、CML 以外の CMPD あるいは MDS が否定され、 Ph^1 、*bcr* 再構成とも陰性であった 11 例を Ph^1 -*bcr*-CML とし、その臨床像、血液学的所見を解析しているが、染色体分析では正常核型を示したものは 6 例で、他の 5 例は正常核型と異常核型とのモザイクを示し、+8、+19、+21, i(17q), 20q- などが認められている。また臨床像を *bcr*+CML と比較した結果、病初期には年齢層が高齢であること以外に差は認められていないが、病期が進行するにつれ両者の病像が異なってくる。すなわち *bcr*+CML が急激な幼若細胞の増加によって特徴づけられる急転像へと進展していくのに対し、*bcr*-CML では芽球の著明な増加を伴わず、白血球増多、臓器腫大、髄外浸潤を示し、最終的には貧血と血小板減少を伴う骨髓不全へと進展していく点が特徴的であったとしている。今回 *bcr* 再構成を認めなかった 3 症例についてその臨床・血液所見をみると、症例 5 を除き肝脾腫を認め、全例に幼若細胞の出現を伴う顆粒球増加と貧血を認め、血小板数は症例 4 を除き正常範囲内であった。骨髓検査では成熟抑制を伴わない顆粒球系細胞増加を認め、NAP は症例 3 を除き低値を示した。このように各症例についてみると、血小板増加、好塩基球増加あるいは NAP 低値などを欠くものがあり、典型的な CML とは若干その病像を異とするが、病像の主体は顆粒球系細胞の増殖病態にあり、 Ph^1 -*bcr*-CML の存在を強く示唆するものであろう。それではこのような病態は如何なる機序によって引き起こされるのか。症例 4 では初診時より i(17q) が認められたが、これは CML 急転時の付加的染色体

異常としてしばしばみられるもので、17番染色体の長腕には G-CSF 遺伝子が²⁸⁾、また短腕には癌抑制遺伝子である p53 遺伝子が位置しており、17番染色体の異常が病態になんらかの影響を及ぼした可能性も考えられる。また症例 5 では初診時の +8 に加えて発症から 45ヶ月後に Ph^1 が出現した。CML で Ph^1 が初診時には認められず、経過中に出現する late-appearing Ph^1 の存在^{29,30)}は、 Ph^1 が癌化の第一段階かどうかという疑問を投じている³¹⁾。これまでに報告された late-appearing Ph^1 の ANLL 症例 (M2, M6, M7) では各々 M-*bcr* 再構成も新たに出現しており³²⁻³⁴⁾、また M1, M4, M7 の症例で *BCR/ABL* 蛋白は p190 のものと p210 のものとが報告されているが³⁴⁻³⁶⁾、本例では検討した範囲内では M-*bcr*、m-*bcr* とともに切断点は確認されなかった。Saglio ら¹⁷⁾は従来の M-*bcr* から 20kb 下流で切断したと考えられる Ph^1 +CML 2 例を報告しているが、本例がこれらの症例に相当するのかどうか今後の課題と考えられる。その他 RAS 遺伝子の変異が Ph^1 -*bcr*-CML において高頻度にみられたとの報告³⁷⁾もあるが、未だ明確にはされていない。これら症例は比較的高齢者に多いことも特徴のひとつであり、今後老化の分子生物学的解明とあわせ、癌遺伝子の活性化・増幅、癌抑制遺伝子の変異、造血因子の変調などの検討が必要と考えられる。

CMPD は Dameshek により提唱された疾患概念であり³⁸⁾、臨床的には CML, PV, ET, MF などを包括したものであるが、各疾患における相互移行、あるいは病像の重複などが注目されている。今回 PV 8 例、ET 15 例、MF 4 例、CNL 3 例、JCML 2 例、CMML 9 例を対象に *bcr* 再構成について検討したが、対象症例では全例において *bcr* 再構成は認められず、CMPD における *bcr* 再構成の検討は CML を除外するために必須の検索といえよう。

また JCML は小児のなかでも比較的乳幼児に多く、 Ph^1 -、HbF 増加、末梢血の単球増加、血小板減少を伴い、予後不良の疾患である。末梢血の in vitro 培養でマクロファージコロニーが優位性を示すことなどから、CML とは別の疾患概念に入れるべきとの見方もある^{39,40)}。今回

JCML 2例について *bcr* 再構成は認められず、この点からも成人型 CML とは異なった病態を示し、その病因については多様性が推定されるが、成人における $\text{Ph}^1\text{-}bcr\text{-CML}$ の成因を検討する上で共通の領域を有するものではないかと考えられる。

今後ひろく慢性骨髄増殖病態で *bcr* 再構成の検討がなされることにより $\text{Ph}^1\text{-}bcr\text{-CML}$ /UCMPD 症例の集積がなされてゆくものと思われるが、その臨床像と血液学的所見のより詳細な解析のなかで、疾患の独立性が明確にされるとともに慢性骨髄増殖病態の再整理がなされてゆくものと思われる。

結 論

今回、CML とその周辺疾患の *bcr* 再構成について検討した結果、

1. Standard $\text{Ph}^1\text{+CML}$ 54例中52例、96%に *bcr* 再構成が認められた。

2. Standard $\text{Ph}^1\text{+}bcr\text{+CML}$ 49例(慢性期38例、急転期2例、慢性期→急転期9例)において *bcr* 内切断部位と病期・病態移行との関連について検討したが、両者に関連は認められなかった。

3. Variant $\text{Ph}^1\text{+CML}$ 3例 [症例1:46, XX,t(9;22;13)(q34;q11;q22), 症例2:46,XX,t(9;22)(q21;q11), 症例3:46,XX,

t(9;22)(q34;q11),inv(9)(9q22;22q13)] では *bcr* 再構成が認められた。なお、これまで報告のない転座様式を示す症例2では t(9;22)(q34;q11) が成立した後に9q21→q34が Ph^1 染色体の長腕末端に転座したものと推定された。

4. $\text{Ph}^1\text{-CML}$ では5例中2例に *bcr* 再構成が認められ、分子レベルで $\text{Ph}^1\text{+CML}$ と同様の変化が生じているものと考えられたが、3例では *bcr* 再構成は認められず、UCMPD あるいは $\text{Ph}^1\text{-}bcr\text{-CML}$ として位置づけられるものであった。

5. JCML 2例、CNL 3例、CMML 9例では *bcr* 再構成は認められなかった。

6. PV 8例、ET 15例、MF 4例では *bcr* 再構成は認められなかった。

以上の結果を得たが、*bcr* 再構成は CML に特異性が高く、今後その検討は $\text{Ph}^1\text{-CML}$ 、UCMPD の病態解析、なかでも $\text{Ph}^1\text{-}bcr\text{-CML}$ の疾患独立性の検討と、ひろく慢性骨髄増殖病態の再整理に重要な情報を提供するものと考えられる。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った木村郁郎教授ならびに高橋功講師に深甚なる謝意を表します。

(本研究の要旨は第49回日本血液学会総会、第29回日本臨床血液学会総会(シンポジウム)で発表した。)

文 献

- 1) Rowley JD: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* (1973) **243**, 290—293.
- 2) Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR and Grosveld G: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, *bcr*, on chromosome 22. *Cell* (1984) **36**, 93—99.
- 3) Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP and Canaani E: Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* (1985) **315**, 550—554.
- 4) Konopka JB, Watanabe SM and Witte ON: An alteration of the human *c-abl* protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* (1984) **37**, 1035—1042.
- 5) Ezdinli EZ, Sokal JE, Crosswhite L and Sandberg AA: Philadelphia-chromosome-positive and -negative chronic myelocytic leukemia. *Ann Intern Med* (1970) **72**, 175—182.
- 6) Kohno S, Abe S and Sandberg AA: The chromosomes and causation of human cancer and leuke-

- mia : XXXVIII Cytogenetic experience in Ph¹-negative chronic myelocytic leukemia (CML). *Am J Hematol* (1979) **7**, 281—291.
- 7) Kantarjian HM, Keating MJ, Walters RS, McCredie KB, Smith TL, Talpaz M, Beran M, Cork A, Trujillo JM and Freireich EJ : Clinical and prognostic features of Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. *Cancer* (1986) **58**, 2023—2030.
 - 8) Travis LB, Pierre RV and DeWald GW : Ph¹-negative chronic granulocytic leukemia : a nonentity. *Am J Clin Pathol* (1986) **85**, 186—193.
 - 9) Kato Y, Sawada H, Tashima M, Yumoto Y, Okuda T, Ueda T, Yamagishi M and Uchino H : Heterogeneous features of Ph-negative CML — possible existence of Ph-negative, bcr-rearrangement-negative CML. *Acta Haematol Jpn* (1989) **52**, 1004—1012.
 - 10) Southern EM : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* (1975) **98**, 503—517.
 - 11) 浦田知之, 河田一郎, 依光聖一, 岡 秀行, 井上敬太, 角南一貴, 岡本一徳, 夕部憲一, 植野克巳, 仲田浩之, 三宅 晋, 町田健一, 高橋 功 : Ph¹陰性/BCR 再構成陰性 CML として経過観察中に Ph¹染色体の出現を認めた 1 例. 第68回日本内科学会四国地方会報告(1993).
 - 12) De Klein A, Hagemeyer A, Bartram CR, Houwen R, Hoefsloot L, Carbonell F, Chan L, Barnett M, Greaves M, Kleihauer E, Heisterkamp N, Groffen J and Grosveld G : *bcr* Rearrangement and translocation of the *c-abl* oncogene in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* (1986) **68**, 1369—1375.
 - 13) Hirosawa S, Aoki N, Matsushime H and Shibuya M : Undetectable *bcr-abl* rearrangements in some CML patients are due to a deletion mutation in the *bcr* gene. *Am J Hematol* (1988) **28**, 33—36.
 - 14) Leibowitz D, Schaefer-Rego K, Popenoe DW, Mears JG and Bank A : Variable breakpoints on the Philadelphia chromosome in chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1985) **66**, 243—245.
 - 15) Selleri L, Narni F, Emilia G, Colo A, Zucchini P, Venturelli D, Donelli A, Torelli U and Torelli G : Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with a chromosome 22 breakpoint outside the breakpoint cluster region. *Blood* (1987) **70**, 1659—1664.
 - 16) Shtalrid M, Talpaz M, Kurzrock R, Kantarjian H, Trujillo J, Gutterman J, Yoffe G and Blick M : Analysis of breakpoints within the *bcr* gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1988) **72**, 485—490.
 - 17) Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, Rege-Cambrin G, Mazza U and Gavosto F : New type of *Bcr/Abl* junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1990) **76**, 1819—1824.
 - 18) Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Kinniburgh AJ, Rowe J, Miller KB, Raza A, Preisler HD and Sandberg AA : Transposition of breakpoint cluster region (3'*bcr*) in CML cells with variant Philadelphia translocations. *Cancer Genet Cytogenet* (1987) **26**, 105—115.
 - 19) Collins SJ and Groudine MT : Chronic myelogenous leukemia : amplification of a rearranged *c-abl* oncogene in both chronic phase and blast crisis. *Blood* (1987) **69**, 893—898.
 - 20) Bartram CR, de Klein A, Hagemeyer A, Carbonell F, Kleihauer E and Grosveld G : Additional *c-abl/bcr* rearrangements in a CML patient exhibiting two Ph¹ chromosomes during blast crisis. *Leuk Res* (1986) **10**, 221—225.
 - 21) Schaefer-Rego K, Dudek H, Popenoe D, Arlin Z, Mears JG, Bank A and Leibowitz D : CML patients in blast crisis have breakpoints localized to a specific region of the BCR. *Blood* (1987) **70**, 448—455.

- 22) Ahuja H, Bar-Eli M, Arlin Z, Advani S, Allen SL, Goldman J, Snyder D, Foti A and Cline M : The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia. *J Clin Invest* (1991) **87**, 2042—2047.
- 23) Towatari M, Adachi K, Kato H and Saito H : Absence of the human retinoblastoma gene product in the megakaryoblastic crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1991) **78**, 2178—2181.
- 24) Wetzler M, Kurzrock R, Lowe DG, Kantarjian H, Gutterman JU and Talpaz M : Alteration in bone marrow adherent layer growth factor expression : A novel mechanism of chronic myelogenous leukemia progression. *Blood* (1991) **78**, 2400—2406.
- 25) Pugh WC, Pearson M, Vardiman JW and Rowley JD : Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukaemia : a morphological reassessment. *Br J Haematol* (1985) **60**, 457—467.
- 26) Morris CM, Reeve AE, Fitzgerald PH, Hollings PE, Beard MEJ and Heaton DC : Genomic diversity correlates with clinical variation in Ph¹-negative chronic myeloid leukaemia. *Nature* (1986) **320**, 281—283.
- 27) Kurzrock R, Kantarjian HM, Shtalrid M, Gutterman JU and Talpaz M : Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without breakpoint cluster region rearrangement : a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood* (1990) **75**, 445—452.
- 28) Simmers RN, Smith J, Shannon MF, Wong G, Lopez AF, Baker E, Sutherland GR and Vadas MA : Localization of the human G-CSF gene to the region of a breakpoint in the translocation typical of acute promyelocytic leukemia. *Hum Genet* (1988) **78**, 134—136.
- 29) Hayata I, Sakurai M, Kakati S and Sandberg AA : Chromosomes and causation of human cancer and leukemia XVI. Banding studies of chronic myelocytic leukemia, including five unusual Ph¹ translocations. *Cancer* (1975) **36**, 1177—1191.
- 30) Lisker R, Casas L, Mutchinick O, Perez-Chavez F and Labardini J : Late-appearing Philadelphia chromosome in two patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1980) **56**, 812—814.
- 31) Fialkow PJ, Martin PJ, Najfeld V, Penfold GK, Jacobson RJ and Hansen JA : Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1981) **58**, 158—163.
- 32) 武地美保, 田中公夫, 重田千春, 小熊信夫, 鎌田七男, 許 泰一, 土肥博雄 : 正常核型から23ヵ月後に Ph¹, 5q-, *bcr* 再構成陽性の異常クローンで再発した AML-M2 の1例. *臨床血液* (1989) **30**, 2225—2229.
- 33) 市川澄子, 夏山真理子, 岡野創造, 橋田哲夫, 福持 裕, 松村隆文, 藤田克寿, 杉本 徹, 今宿晋作 : 再発時に Ph¹染色体が出現した赤白血病の12歳男児例. *臨床血液* (1989) **30**, 1853—1858.
- 34) Nakamura K, Inaba T, Nishimura J and Morgan GJ : Molecular analysis of *BCR/ABL* products in a case of myelodysplastic syndrome with late appearing Philadelphia chromosome. *Br J Haematol* (1991) **78**, 130—132.
- 35) Najfeld V, Cuttner J, Figur A, Kawasaki ES, Witte ON and Clark SS : P185^{BCR-ABL} in two patients with late appearing Philadelphia chromosome-positive acute nonlymphocytic leukemia. *Leukemia* (1989) **3**, 841—846.
- 36) Vandenberghe E, Martiat P, Baens M, Stul M, Ferrant A, Cuneo A, Cassiman JJ, Mecucci C and Vandenberghe H : Megakaryoblastic leukemia with an N-ras mutation and late acquisition of a Philadelphia chromosome. *Leukemia* (1991) **5**, 683—686.
- 37) Cogswell PC, Morgan R, Dunn M, Neubauer A, Nelson P, Poland-Johnston NK, Sandberg AA and Liu E : Mutations of the *ras* protooncogenes in chronic myelogenous leukemia : A high frequency of *ras* mutations in *bcr/abl* rearrangement-negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* (1989) **74**, 2629—2633.

- 38) Dameshek W : Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* (1951) **6**, 372—375.
- 39) Altman AJ, Palmer CG and Baehner RL : Juvenile “chronic granulocytic” leukemia : A pan-myelopathy with prominent monocytic involvement and circulating monocyte colony-forming cells. *Blood* (1974) **43**, 341—350.
- 40) Estrov Z, Grunberger T, Chan HSL and Freedman MH : Juvenile chronic myelogenous leukemia : Characterization of the disease using cell cultures. *Blood* (1986) **67**, 1382—1387.

Molecular analysis of chronic myelocytic leukemia and related diseases**Noriko SEKITO****Second Department of Internal Medicine,****Okayama University Medical School,****Okayama 700, Japan****(Director : Prof. I. Kimura)**

Chronic myelocytic leukemia (CML) is cytogenetically characterized by the Philadelphia chromosome (Ph¹) resulting from a reciprocal translocation t (9;22) (q34;q11). The breakpoints on chromosome 22 are clustered within a limited region of 5.8 kilobase (kb), termed the breakpoint cluster region (*bcr*). Herein the *bcr* rearrangement was examined to clarify the relationship between CML and related diseases. By Southern blot analysis of DNA, the *bcr* rearrangements were recognized (*bcr*⁺) in 52 of 54 standard Ph¹-positive (Ph¹⁺) CML and all 3 variant Ph¹⁺CML [46, XX, t (9;22;13) (q34;q11;q22), 46, XX, t (9;22) (q21;q11) and 46, XX, t (9;22) (q34;q11), inv (9) (9q22;22q13)] . The site of breakpoint within *bcr* was not a prognostic factor in Ph¹⁺CML. On the other hand *bcr* rearrangements were negative (*bcr*⁻) in 2 juvenile CML (JCML), 3 chronic neutrophilic leukemia (CNL), 9 chronic myelomonocytic leukemia (CMML), 8 polycythemia vera (PV), 15 essential thrombocythemia (ET) and 4 myelofibrosis (MF) patients. In 5 patients with Ph¹-negative (Ph¹⁻) CML/unclassified chronic myeloproliferative disorders (UCMPD), 2 were *bcr*⁺ and 3 were *bcr*⁻, which strongly suggested the existence of Ph¹⁻*bcr*⁻CML.