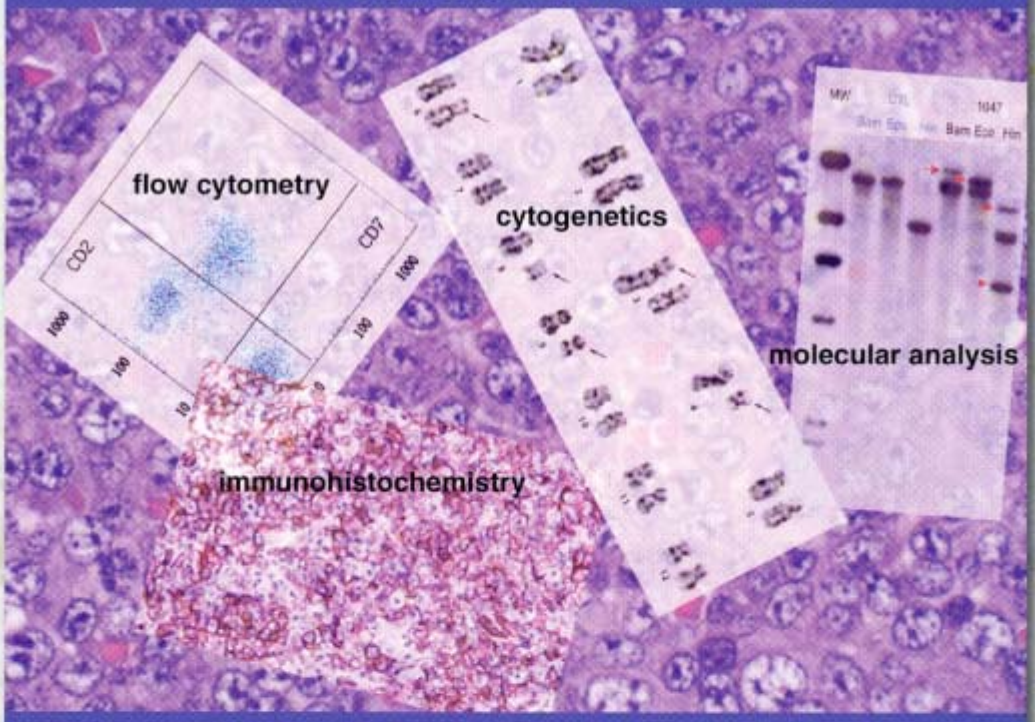
悪性リンパ腫疑い症例のための診断システム

READ system®

Registration→**E**xmaination & **A**nalyses→**D**escription

登録病院のみを対象とした受託検査

HE標本での形態学的観察が診断の基盤です。



上記の観察・解析の結果は病理医によって総合的に判断されます。

監修／東北大学 大学院　歯学研究科　助教授　一　迫　　玲　　Ryo Ichinohasama, MD, PhD

BML　株式会社ビー・エム・エル

悪性リンパ腫疑い症例のための診断システム

R 事務登録 Registration

本システムへの新規登録にあたっては以下の事項が必須条件です。

A. 事前の打ち合わせ

（1）臨床医・貴院の事務
（2）臨床医・貴院担当の病理医
（3）臨床医・弊社
（4）臨床医・本システムを担当する病理医

B. 申し合わせ書の取り交わし。（貴院・弊社間）。

※検体の提出前に「専用依頼書」をよくお読みください（右参照）

EA 観察と解析 Examination & Analyses

以下の4項目（4Ms）が基本セットです（右参照）。

Morphological **E**xamination〔病理組織学的観察〕
HE標本による形態学

Marker **A**nalysis〔immunophenotyping〕
フローサイトメトリーと免疫組織化学

Metaphase **A**nalysis〔染色体分析〕
Gバンド分染法（好条件でも分析率は60～70%程度です）

Molecular **A**nalysis〔遺伝子解析〕
サザン法

D 記載 Description

診断名と所見を記載して報告します。（右参照）

悪性リンパ腫症例のフローサイトメトリー：dUCP法による効果的なアプローチ

悪性リンパ腫疑い症例で生検された組織のフローサイトメトリーは、白血病検体と異なり、百分率表示の結果のみでは完全ではなく、あくまでも病理組織学的所見とともに評価される必要があります[文献1-4]。具体的に悪性リンパ腫疑い症例のフローサイトメトリーでは下記のdUCP法（detection of UCP）によるimmunophenotypingが効果的であり、下に腫瘍性病変におけるdUCPの基本的な進め方を示します（詳細については文献3をご覧ください）。

Step1：HE標本を観察して腫瘍性病変の存在を確認する。

Step2：フローサイトメトリーのscattergram（二次元展開図）上で、dot分布をパターン認識することによって異常細胞群（unusual cell population=UCP）を探し出す。

Step3：Step1の腫瘍性病変（組織亜型や細胞形態）とStep2のUCP（その抗原発現）に矛盾が生じなければ、そのUCPを腫瘍細胞のimmunophenotypeとする。

そのような背景から本システムでは病理組織学的観察とフローサイトメトリーのデータ解釈を同時に施行しています。その結果、非ホジキンリンパ腫の約70～80%の症例（かなり小さい検体や壊死、線維化組織などを除いた場合）においてimmunophenotypingが可能であり、その結果が病理診断名に附記されます。

しかし、フローサイトメトリーの感度ではimmunophenotypeがわからないこともあります。そのような病変はホジキン病と一部の未分化大細胞性リンパ腫等が主ですが、その場合は免疫組織化学（パラフィン切片で検索可能な抗原について）を施行します。またフローサイトメトリーでimmunophenotypingができたとしても、必要があれば躊躇せず免疫組織化学を実施します。

病理診断 Malignant lymphoma, follicular, grade 1[WHO], with a CD10⁻ B-cell lineage phenotype（IgG/κ）, lymph node

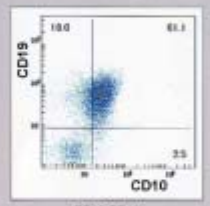
所　見

組織学的にリンパ節の基本構造は一部の辺縁洞を残す以外は概ね消失し、全体は概ね均一の大きさを示す濾胞様構造で占められています。個々の濾胞様構造において増殖している細胞は小型でcleaved nucleusを有するN/C比大のatypical lymphoid cellがほとんど（大型芽球は強拡大一視野あたり1～2個程度）であり、時に小さめの核小体がみとめられます。

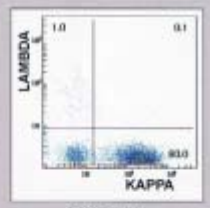
フローサイトメトリー上はCD45⁻ CD5⁻ CD10⁺ CD19⁺ CD20⁺ IgG⁺ kappa⁺という、免疫グロブリンのlight chain restrictionが明瞭でCD10が陽性を示すBリンパ球系のunusual cell populationをみとめます（UCP）（註：一部のデータを下に示します）。そのUCPはHLA-DR陽性ですが、IL-2 receptor, NK細胞やmyelo-monocyte系の抗原は陰性でした。

以上、形態学的所見とフローサイトメトリーでのUCPの所見から、上記と判断します。

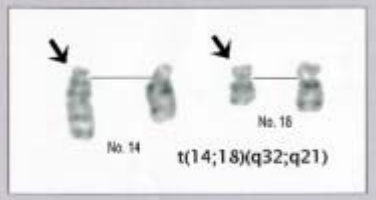
なお、染色体分析とサザン解析の結果は後日報告しますが、本例は濾胞性リンパ腫のため*BLC2*遺伝子のサザン解析を追加検索します（註：その一部を右下に示します）。



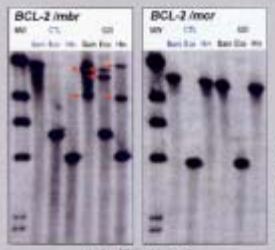
CD10-CD19



kappa-lambda



染色体分析



サザン解析（BCL-2）

註：通常はmbrとmcrのプローブを混合し、1つの検査として実施しています。また、別法にて別プローブでの解析を追加することも可能です。

病理診断 Hodgkin's disease, mixed cellularity, lymph node

所　見

一次報告

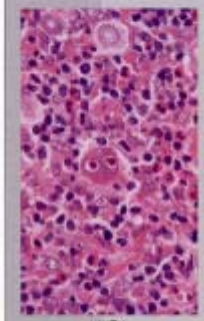
組織学的にはリンパ節の基本構造はみられず、全体に多彩な炎症性細胞の浸潤と血管の増生が目立ちます。それを背景として多数のHodgkin cellないしdiagnostic Reed-Sternberg cellがみとめられることなどから形態学的に上記と診断しますが、確認のため免疫組織化学とEBERのin situ hybridizationを施し、追って報告します。

二次報告

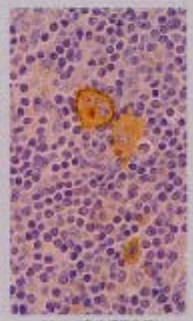
パラフィン切片で免疫組織化学を施し、以下の結果が得られました。大型の腫瘍細胞の反応性を示します。

CD45⁻ CD10⁻ CD20⁻ CD79a⁻ CD3⁻ CD5⁻ CD56⁻
CD30⁻ EMA⁻ CD15⁺ LMP1⁺ fascin⁻⁺ ALK1

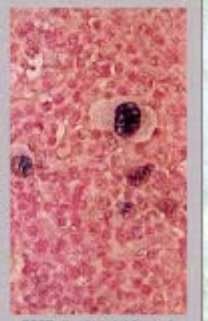
以上はホジキン病に定型的な抗原発現のパターンであり、上記診断が裏付けられました。なお、EBERも陽性でした。



HE標本



CD30（免疫組織化学）

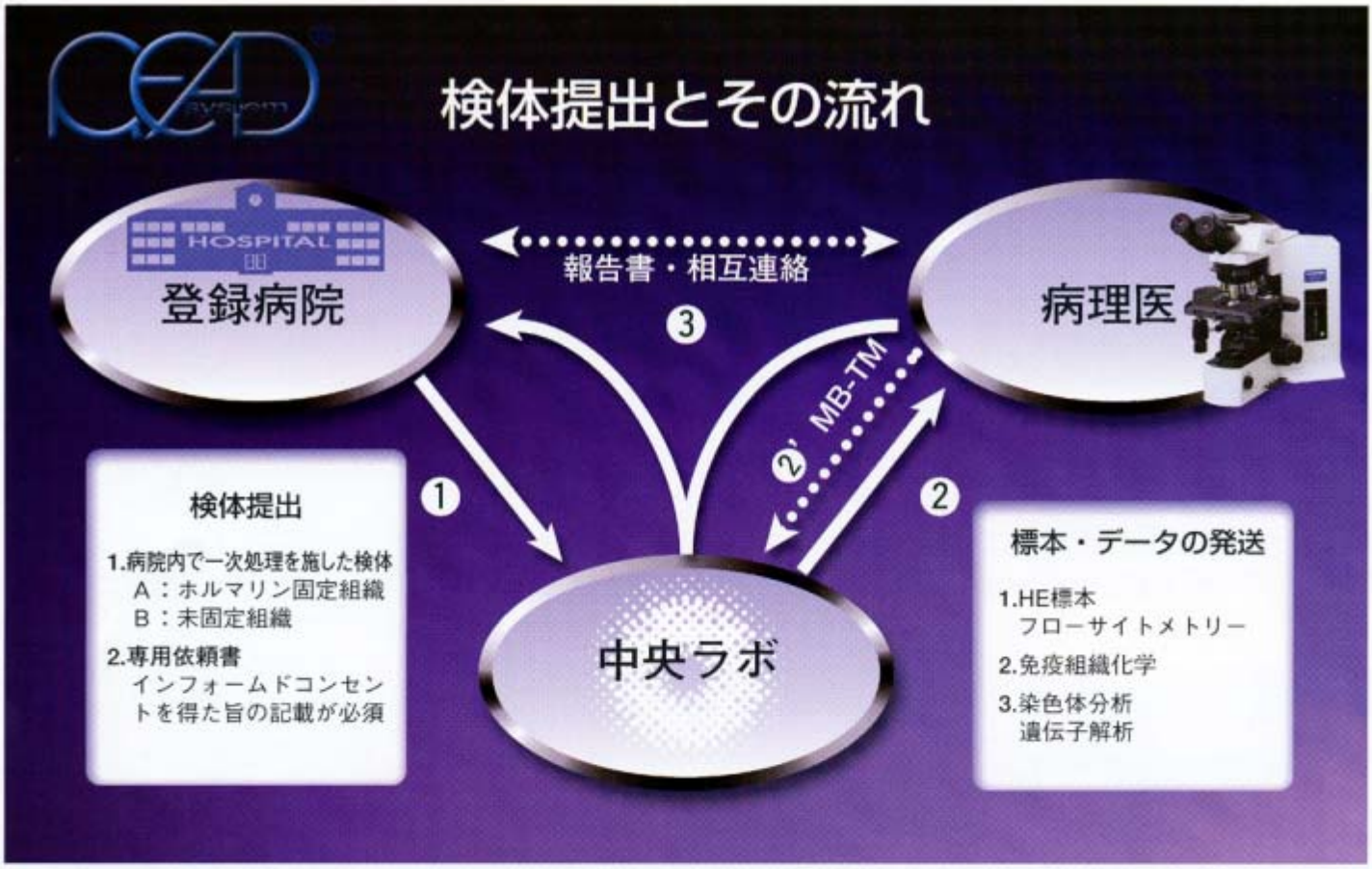


EBER（in situ hybridization）

（担当する登録病理医によって記載方法等が異なることがあります）

病理組織学的観察と多角的なデータに基づく病変の総合的な判断

形態学的観察やフローサイトメトリー・免疫組織化学にても診断を確定できない症例については、染色体分析やサザン解析の結果を総合して判断します。かかる症例でも何らかの結論を出すように努力いたしますが、このような場合は断定的な確定診断に至らない可能性もあり得ますので、予めご了承いただきたいと存じます。



Morphology-Based Test Modification（MB-TM：上図の②'）

MB-TMとは、診断の確定・亜型分類・精度管理のために、病理医が形態学的な観察に基づいて検索項目の追加・変更・削除などを行なうことです。READ systemではそのために必要な以下のオプションを選択できます（註参照）。

起こり得る状況や疑われる病態など	区分	区分に従った検索項目［その対応方法］
1. リンパ芽球性リンパ腫	追加	核抗原（TdT）［免疫組織化学］
2. ATLL（高抗体価の場合も含む）	追加	HTLV-I［サザン解析］
3. 濾胞性リンパ腫	追加	*BCL2*遺伝子［サザン解析／PCR解析］
4. 節外性のmarginal zone lymphoma	追加	*API2/MALT1*遺伝子［RT-PCR解析］
5. CD5⁺びまん性大細胞性リンパ腫	追加	cyclinD1［免疫組織化学］
6. Burkittリンパ腫	追加	*c-MYC*遺伝子［サザン解析］、Ki-67［免疫組織化学］
7. primary effusion lymphoma	追加	HHV8［PCR解析］、*c-MYC*遺伝子［サザン解析］
8. ホジキン病・NK細胞性腫瘍など	追加	EBV［サザン解析／in situ hybridization］
9. 顆粒球肉腫	追加	細胞質抗原（MPO）［膜処理FCM／免疫組織化学］
10. CML患者のリンパ球系腫瘍	追加	*BCR/ABL*遺伝子［FISH／サザン解析／RT-PCR］
11. 特殊な造血器系腫瘍	追加	［細胞診や電顕（基本セットとの別の検体処理が必要）］
12. 結核を疑う病変	追加 変更	結核菌［Ziehl-Neelsen染色・Auramine染色］ サザン解析中止→結核菌［PCR解析］
13. 癌の転移／非造血器系腫瘍	追加 削除	各種の抗原［免疫組織化学／特殊染色］ サザン解析削除
14. フローサイトメトリーでimmunophenotype不明	追加	各種の抗原［免疫組織化学（パラフィン切片のみ）］
15. B細胞性リンパ腫でのT系抗原の発現	確認	［（例）CD19とCD7の2重染色フローサイトメトリー］
16. 3q27や9p13などの転座	確認	それぞれ*BCL-6*遺伝子や*PAX5*遺伝子［サザン解析］
17. かなり複雑な染色体異常	追加	転座様式の確認［SKY法など］
18. T・B系腫瘍のサザン解析で再構成バンドなし	再検	［別の制限酵素によるサザン解析／PCR解析］

註1）上記にはすべて別途の実施料金が必要であり、実施するかどうかについては病院の登録時に打ち合わせます。
註2）検体量が少ない場合などは実施できないことがあります。

READ systemの特徴

1. 登録病院の症例のみを対象。
2. 登録病院における「検体の一次処理」が必要。
3. 基本4項目(形態学的観察・表現型解析・染色体分析・サザン解析)の実施が原則。
4. 病理医が形態学的観察と解析データの解釈を担当。
5. Morphology-Based Test Modification(MB-TM)による対応。
6. 確定した診断名の記載（報告書作成）。

READ systemにご理解いただいている先生方

（五十音・ABC順：掲載に関する御了承済み）

福島県立医科大学第一病理	教　授	阿部　正文 先生
順天堂大学医学部血液内科	教　授	押味　和夫 先生
福岡大学医学部第一病理	教　授	菊池　昌弘 先生
埼玉医科大学総合医療センター病理部	助教授	田丸　淳一 先生
愛知県がんセンター遺伝子・病理診断部	部　長	中村　栄男 先生
奈良県立医科大学病態検査医学	教　授	中村　忍 先生
広島大学総合科学部	教　授	難波　紘二 先生
和歌山県立医科大学臨床検査医学	講　師	中峯　寛和 先生
秋田大学医学部第三内科	講　師	三浦偉久男 先生
千葉大学医学部	名誉教授	三方　淳男 先生
東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野	教　授	森　茂郎 先生
岡山大学医学部第二病理	講　師	吉野　正 先生

University of Florida, USA
Dr. Raul C. Braylan

University of Saskatchwan, Canada
Dr. John F. DeCoteau

Beth Israel Hospital, Harvard Medical School, USA
Dr. Marshall E. Kadin

University of Würzburg, Germany
Dr. Hans K. Müller-Hermelink

参考文献

1. Three-color flow cytometry in the diagnosis of malignant lymphoma based on the comparative cell morphology of lymphoma cells and reactive lymphocytes. Leukemia vol.11:1891-1903, 1997
2. 悪性リンパ腫《正しい診断を得るために》生検組織でどのような検査を行うか 内科 86巻3号（2000年9月号）：101-107
3. 第2章フローサイトメトリー　Ⅲ．応用　9.リンパ節．応用サイトメトリー：121-126,2000
4. 悪性リンパ腫update：READ systemによる新WHO分類の一般化 臨床放射線 46巻臨時増刊号2001年9月刊行予定

株式会社ビー・エム・エル
BML

URL:http://www.bml.co.jp/

本　　社：〒151-0051　東京都渋谷区千駄ヶ谷5-21-3
TEL. 03-3350-5655　FAX. 03-3350-6329

総合研究所：〒350-1101　埼玉県川越市的場1361-1
TEL. 0492-32-3131　FAX. 0492-32-3132

Information

BML

READ system®関連研究検査

末梢血中t(14;18)転座細胞の検出

bcl-2遺伝子MBRに異常を有する濾胞性リンパ腫の亜群に対して

解析の進め方

Step 1 Long Distance(LD)-PCRによる定性検査

t(14;18)転座の確定、およびMBR/mcrの鑑別

検体：新鮮生検リンパ節組織

必要に応じ、5' bcl-2プローブを用いたサザンブロット法による追加検査も可能

Step 2 リアルタイムPCR定量検査

MBR陽性の症例に対して、t(14;18)細胞を定量的に検出

【 ライトサイクラー t(14;18)定量キット(ロシュ)を使用 】

検体：末梢血(治療開始 前または後)

感度：末梢血細胞10^3～10^4個に1個のt(14;18)細胞を検出

定量値：基準細胞株DOHH2に対する相対定量値(‰ index)で表記

定義：　定量値 1,000 ‰ indexとは、被験末梢血白血球の全てにt(14;18)が存在することを表します。

Step 3 Nested-PCR定性検査

残存腫瘍クローンの有無の確認

検体：治療後 末梢血

感度：末梢血細胞10^5～10^6個に1個のt(14;18)細胞を検出

- 本研究検査は、弊社READ system®(悪性リンパ腫疑い症例のための診断システム)の中で進められます。ご依頼に際しましては、別途READ system®への出検の手引きをご参照の上、専用容器、専用依頼書を用いて規定の検体のご提出をお願い申し上げます。
- 既にリンパ節生検を終えている症例に対しましては、パラフィンブロックからの未染スライドを用いてbcl-2 MBRの再構成を解析し、本定性および定量検査の適格性を確認することも可能です。未染スライド10枚をREAD system®にご提出下さい。

検査の技術的内容についてのお問い合わせは、下記までお願い申し上げます。

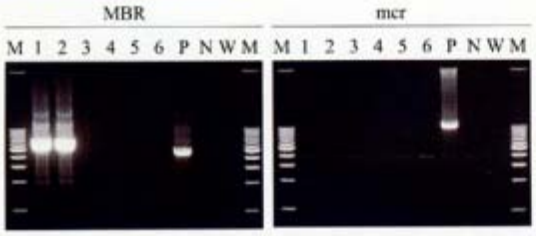
検査担当 連絡先：株式会社ビー・エム・エル　総合研究所　研究開発本部
担当：山口敏和、鈴木 誠
TEL：049(232)0440　FAX：049(232)5480

株式会社 ビー・エム・エル
本 社：〒151-0051東京都渋谷区千駄ヶ谷5-21-3　総合研究所：〒350-1101埼玉県川越市的場1361-1
URL：http://www.bml.co.jp/　☎ 0492(32)3131 FAX 0492(32)3132

資料、お問い合わせは担当者または最寄りの営業所までお願い致します。

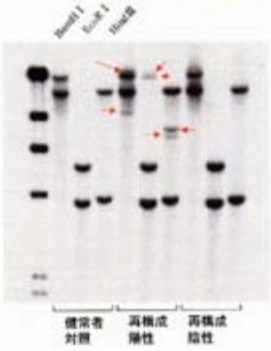
解析結果の実例

bcl-2 LD-PCR定性検査[1)~3)]



1~6 ：検体DNA(duplicate)
P ：Positive Control
N ：Negative Control
W ：DW
M ：1kbp DNA ladder marker

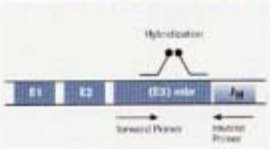
bcl-2 MBR/mcr 混合プローブを用いたサザンブロット検査



濾胞性リンパ腫症例におけるサザンブロット検査と
LD-PCR検査との結果比較

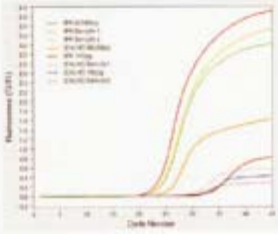
		LD-PCR			計
		MBR陽性	mcr陽性	陰性	
サザンブロット	陽性	9	3	0	12
	陰性	1	1	3	5
計		10	4	3	17

bcl-2遺伝子増幅のターゲット領域



ライトサイクラー

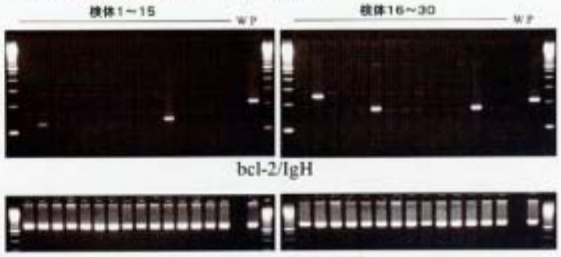
リアルタイムに描
かれる増幅曲線



リアルタイムPCR定量検査結果の一例

解析サンプル	相対定量値	
	指数表記	‰ index表記
DOHH2細胞株	1.0E+00	1000.0
濾胞性リンパ腫患者(未治療時末梢血)白血球DNA	1.6E-01	160.3
同上DNAを健常者白血球DNAで10倍希釈	1.2E-02	12.4
同上 100倍希釈	1.6E-03	1.6
同上 1000倍希釈	5.0E-04	0.5

bcl-2 MBR Nested-PCR定性検査[4)]



lane 1~30 ：末梢血DNA検体 30例
W ：DW
P ：Positive control($1/10^{-5}$)
M ：100bp DNA ladder marker

参考文献

1) Akasaka,T. et al.:*Genes Chromosomes Cancer* **21**(1):17-29,1998.
2) 赤坂尚司,大野仁嗣：分子細胞治療 **1**(4):61-65,2000.
3) 植田知代子,大野仁嗣：臨床血液 **43**(5):323-326,2001.
4) Yasukawa,M. et al.:*Blood* **15**:486-488,2001.