HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	慢性骨髄性白血病の急性転化に関する研究 : 細胞遺伝学的ならびに分子生物学的検討
Author(s)	田中, 英二; 森本, 美恵; 岡部, 實裕 他
Citation	北海道大学医療技術短期大学部紀要, 2, 103-117
Issue Date	1989-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/37501
Type	departmental bulletin paper
File Information	2_103-118.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

慢性骨髄性白血病の急性転化に関する研究
——細胞遺伝学的ならびに分子生物学的検討——

田中　英二*・森本　美恵*・岡部　實裕**
老田　　誠**・森岡　正信**・宮崎　　保**

Studies of the Blastic Crisis of Chronic Myelogenous Leukemia
—Cytogenetic and Molecular Biological Findings—

Eiji Tanaka*, Mie Morimoto*, Mihiro Okabe**,
Makoto Oita**, Masanobu Morioka** and Tamotu Miyazaki**

Abstract

Chronic myelogenous leukemia (CML) is characterized by a reciprocal translocation between chromosome 9 and 22, producing the philadelphia (Ph^1) chromosome. The translocation involves a gene rearrangement of the breakpoint cluster region (bcr) gene located on chromosome 22 with the c-abl proto-oncogene on chromosome 9. The hybrid bcr/c-abl gene is transcribed into an abnormal messenger RNA that is translated into an abnormal protein of 210,000 molecular weight. Here, the first, we have performed cytogenetic studies on 42 Ph^1-positive CML patients, including 15 cases of blastic crisis (BC), in order to investigate pathophysiological condition of CML.

29 of 34 cases (85%) in chronic phase of CML showed a standard type of translocation of t(9q ; 22q), and 5 of others (15%) showed only a small additional chromosomal changes. On the other hand, in 15 cases of CML-BC, only 33% of cases showed standard type of translocation and 67% showed more additional karyotypic evolutions, showing both numerical and structural changes.

These chromosomal aberrations might be usefull diagnostic indications of the blastic crisis of CML, especially in a accelerated form of the BC.

The second, we have analyzed bcr-rearrangement and the expression of abl-related mRNA in Ph^1 positive CML patients (17 cases). In the DNA of all cases examined, rearrangement of bcr could be demonstrated. An analysis of the location of of bcr breakpoints indicate that 3' breakpoint were found in almost all the cases. These findings suggest that the activation of abl gene plays an important role in the leukemogenesis of Ph^1-positive CML.

＊北海道大学医療技術短期大学部衛生技術学科
＊＊北海道大学医学部内科学第三講座
＊ Department of Laboratory Technology, College of Medical Technology, Hokkaido University
＊＊ 3rd Department of Internal Medicine, School of Medicine, Hokkaido University

田中　英二・森本　美恵・岡部　実裕・老田　　誠・森岡　正信・宮崎　　保

要　　旨

ph[1]陽性慢性骨髄性白血病42症例，急性転化例15症例を含む男性32例，女性10例，年令17才～70才で平均40.2才について分染法による染色体分析の結果，慢性期では85.3%がt（9q[+]；22q[-]）の標準転座型ph[1]を示し，その他の付加的染色体異常例は15%に過ぎなかった。これに反し急性転化例では標準型は33%で，逆に付加的異常例が67%にみられ，その異常は異数性のみならず構造異常なども含み，病期の進行とともに極めて多彩な核型に進展した（karyotypic evolution)。つぎに慢性型10例，急性転化例7例についてSuothern　blot法によりbcr－再構成を検討したが，17例全例においてbcrの再構成を認め，しかもその切断点の多くが3[1]側に集中しておりbcr-region以外に切断点を有する例はなかった。急性転化例では慢性期に比しsignalの増強がみられdot hybridizationによるabl mRNAの検索結果も同様であった。

I．はじめに

慢性骨髄性白血病Chronic　Myelogenous Leukemia（以下CMLと略す）は多能性造血幹細胞の腫瘍化したクローン性の疾患であり，特徴的なフィラデルフィア染色体（ph[1]）は症例の95%以上に認められる。さらに近年，本症骨髄細胞の第22番染色体よりbreakpoint　cluster reageon (bcr)がクローニングされ，第9染色体9q34に位置するc-abl癌遺伝子がbcrに転位結合しbcr rearrangement（再構成）がおこることが本症の病因であることが明らかになってきた[1]。一方造血器悪性腫瘍の化学療法は著しい進歩を遂げ，悪性リンパ腫や急性白血病は今やcurableな疾患となりつゝある。これに対してCMLの治療は，多くの抗白血病剤が登場し寛解率の若干の向上は認められるものの遅々としており，survival timeでみる限り，この50年間の進歩は遅くほとんど低迷を続けているのが現状である。一方治療の新しいアプローチとして，腫瘍細胞の根絶を目指すClarksonらの強力な化学療法（L-15プロトコール）[2]やSchwarzenbergらの摘脾[3]，さらに根治が期待される骨髄移植[4]等が試みられるようになった。しかしCMLの治療理念の確立に関しては，今日なお試行錯誤の段階といわざるを得ない。それは本症のnatural historyにおいて最大の問題点である急性転化（Blastic crisis, BC）によってほとんどの症例が死の転帰をとるためである。したがってCML-BCをいかに予知，予防できるかが本症治療のポイントであると云っても過言ではない。われわれはCML-BCの病態を把握すべく，慢性期（Chronic phase；CP）および急性転化期（Blastic phase；BP）について細胞遺伝学的ならびに分子生物学的検索を行い，これらの臨床的意義について考察し本症治療への道を探ってみた。

II．対象ならびに方法

〔A〕　細胞遺伝学的検索

banding法による染色体分析をなし得たph[1]陽性CML 42例を対象とした。男性32例，女性10例で年令は17才から70才で平均40.2才である。臨床病期分類は鎌田ら[5]の分類に，BCの診断は喜多嶋らの診断基準[6]に従った。染色体分析は患者の骨髄血を直接またはovernight培養し，型の如く染色体標本を作製した。核型の決定にはトリプシン・ギムザによるG-band法で，また複雑な構造異常の分析には蛍光色素を用いるQ-band法にて正確に分析した。

〔B〕　分子生物学的検索（bcr再構成）

CML-CP 10例，CML-BP 7例を対象とし，それらの白血病細胞について検索した。すなわちPhenol抽出法によりDNAを抽出し，制限酵素Eco RI, Hind III, Bgl II, Bam HIのいづれかにより切断し，Southern blot法により検索した。

制限酵素切断DNAを0.75%agarose gel電気泳動し，ニトロセルロース膜に転写したのち，nick-translationにより^{32}p標識したbcr probeとhybridizationし，80℃にてオートラジオグラフィーを施行した。3'bcr genomic DNA probeとして1, 2-kb Hind III-Bgl II fragment (Oncogene Science社，Mineola, N. Y.) を用い，5'bcr genomic DNA proeはUlm大学Dr. G. Assumより供与された1，9-Kb Hind III-Bgl II fragmentを用いた。これらprobeの制限地図を図－1に示した。

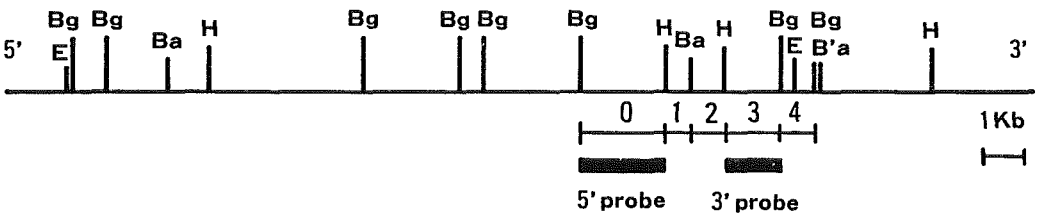
〔C〕 分子生物学的検索（abl mRNAの検索）

polyadenylated RNAのNorthern blot解析は既報の方法[7]で行った。cellular DNAはguanidine thiocyanate-cesium chloride法により抽出し，oligo (dT)セルロースカラムによりmRNAを回収した。検体を7%formaldehyde含有1%agarose gel電気泳動後，Biodyne膜（pall, Glen Cove, N. Y.）にblotし，nick-translationしたabl-specific probe (pAb3, 1.5Kb Bgl II fragment) とhybridization後オートラジオグラフィーを行った。

III. 結　　果

〔A〕 細胞遺伝学的所見

Ph^{1}陽性CML 42例の病像の一部と染色体分析の結果を一括して示した（表－1）。症例3はCP時標準型のPh^{1}のみであったがBP時には＋8，17 q isochromosomeの出現をみた。症例10，14はBP時（13；17）および（1；17）の転座がみられた。またtrisomyで注目されるのは症例15の＋6，症例18の＋7，+15などで，共にBP時のものである。症例23は初診時急転型で第5染色体のmonosomyのほか，＋8とmarker染色体を有していた。症例28はmissing Yの一例である。また症例34は（9，14，22）に転座を示す非標準complex型であった。つぎにCML-BC 15例の臨床病型と染色体異常の種類および出現頻度を表－2に示した。急性型7例，移行型5例，腫瘤形成型3例で，BP時にその他の染色体異常が付加されなかったno change例が3例あり全て急性型BC例であった。B群5番染色体のmonosomy例は



図－1　ヒトbcr遺伝子の制限酵素地図とbcr genomic probes E：Eco RI, Ba：Bam HI, H：Hind III Bg：Bgl II

表－1　Summarized information on the patients with Ph^1-positive CML.

No.	Name	Age	Sex	spleen (qfb)	survival (mo.)	BC* When karyotyped	Chronosomal changes	
							standard	further changes
1	F.M.	50	M	2.5	13	Yes	+	
2	S.M.	42	M	U**-4	39	No	+	Ph^1,+8
3	Y.K.	28	M	5	80	No	+	
						Yes	+	Ph^1,+8,i(17q)
								Ph^1,i(17q)
4	S.N.	25	M	U－3	28+	No	+	
5	J.M.	53	M	—	53	No	+	
6	H.K.	34	M	—	34	No	+	
7	T.K.	41	M	2	84+	No	+	
8	S.S.	34	M	3	40	Yes	+	Ph^1,+8,+17,+19
								Ph^1,+8,+19
								Ph^1,+8,+8,+19
9	Y.H.	52	M	U－2	72+	No	+	
10	S.Y.	43	M	5	35	No	+	
						Yes	+	Ph^1,t(13p；17q)
11	M.K.	39	M	5	40	No	+	
12	S.M.	23	F	U－2	28	No	+	
13	K.N.	45	M	—	18	No	+	
						Yes	+	
14	E.S.	40	F	U－3	89	Yes	+	Ph^1,t(1p；17q),+Ph^1
15	T.M.	27	M	U－3	43	No	+	
						Yes	+	Ph^1,+6,+8,+19,+21,+Ph^1
16	Y.S.	29	M	5	27	Yes	+	Ph^1,+7,+Ph
17	T.M.	61	M	2.5	49+	No	+	Ph,t(6q-；13q+)
18	H.S.	36	M	—	24	No	+	
						Yes	+	Ph^1,21q+
								Ph^1,+7,+8,+12,+15,21q+

*BC：Blastic Crisis,　　**U：below Umblicus,

表－1　(続)

No.	Name	Age	Sex	spleen (qfb)	survival (mo.)	BC* When karyotyped	Chronosomal changes	
							standard	further changes
19	J.S.	29	M	5	36	Yes	+	
20	Y.S.	56	M	1.5	41+	No	+	
21	H.N.	28	M	U－5	3	Yes	+	
22	M.M.	64	M	—	32+	No	+	
23	Y.H.	42	M	—	40	Yes	+	Ph^1, −5, +8, Mar,*
24	Y.T.	45	M	U－2	34+	No	+	
25	S.O.	55	F	U－2	18	No	+	Ph^1, 13q−
						Yes	+	Ph^1, 13q−, −19, Ph^1
26	M.M.	39	M	U－1	30	No	+	
						Yes	+	Ph^1, t(7p− ; 11p+)
								Ph^1, t(7p− ; 11p+), +
27	T.U.	17	M	—	27+	No	+	
28	S.A.	39	M	2	18	No	+	Ph^1, −Y
29	M.S.	26	F	4	17+	No	+	
30	Y.M.	17	F	2	2	Yes	+	
31	T.H.	32	F	U－3	23+	No	+	
32	T.Y.	33	M	U－3	48+	No	+	
33	H.O.	65	F	—	40+	No	+	
34	A.T.	22	M	2	13+	No	+	Ph^1, t(9q ; 14q ; 22q)
35	T.W.	70	M	—	9	No	+	
36	Y.H.	47	F	—	12+	No	+	
37	T.N.	50	M	5	6+	No		
38	N.N.	34	F	4	54	No	+	
39	T.N.	41	M	—	43	No	+	
40	Y.M.	33	M	—	22+	No	+	
41	Y.B.	50	F	4	8+	No	+	
42	Y.I.	53	M	2	41	No	+	Ph^1, t(3q− ; 3q+)

*Mar：Marker Chromosome

表－2　Chromosomal changes of CML in BP (15 cases)

type \ change	No.	−5, +6, +7,	+8	+12, +15, +17, +i(17q)	+19	+21	+Ph^1	mar,	other transloc.
急性型 7 (47%)	3	1	3	2	1		1	1	1
移行型 5 (33%)		1 1	2	1 1 1	1	1	2		1
腫瘤形成型 3 (20%)		1 1	1		1	1	2		
計	3	1 2 2	6	1 1 2 1	3	2	5	1	2

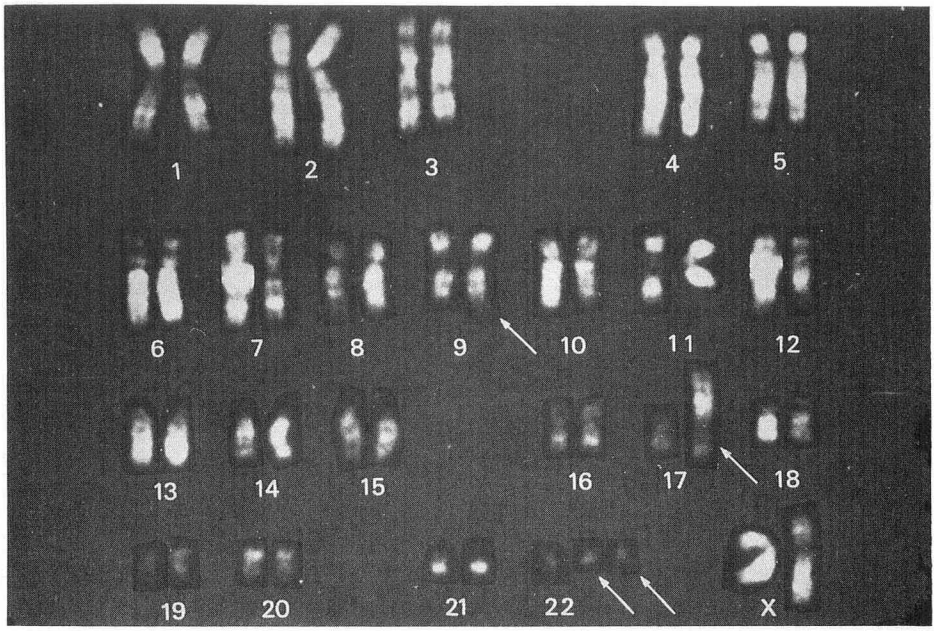
hypodiploidy を示した唯一の例であり，他は全て hyperdiploidy であった。すなわち急性型では＋18, ＋17 が多く，移行型ではその他の異常の種類が多く，＋8，＋17, ＋19, ＋Ph^1，＋17 qi など clonal evolution の major route とされる核型の進展を示した。腫瘤形成型では double Ph^1 の頻度がやゝ多くみられた。慢性期から急性転化期に進展した例で染色体の追跡調査をなし得た7例をみると（表－3），急性型 BP 2例のうち1例は no change 型，他の一例では標準転座は見られず，非標準単純転座と double Ph^1 の二つのクローンが認められた。移行型の4例では付加的染色体異常の種類も多くなり，特に＋7，＋12, ＋15, ＋19 などが注目され，一例（No. 3）には 17 q isochromosome がみられた。腫瘤形式型の一例も＋6，＋19 など additive な異常を示した。次にこれら異常核型を示した例の一部を提示する。写真－1は症例3のもので 17 q isochromosome と double Ph^1 がみられる。写真－2は症例 15 の腫瘤形成型の BC で＋6，＋8，＋19, ＋21，それに＋Ph^1 など多彩を極めた核型の進展がみられる。写真－3は症例 34 の CP の karyotype で（9 ; 14, 22）内で非標準 complex 型の転座を認めた。次に CML 42 例における 49 回の染色体分析結果を表－4に一括して示した。標準転座型のみの例

表－3　CP から BP への追跡調査例（7例）

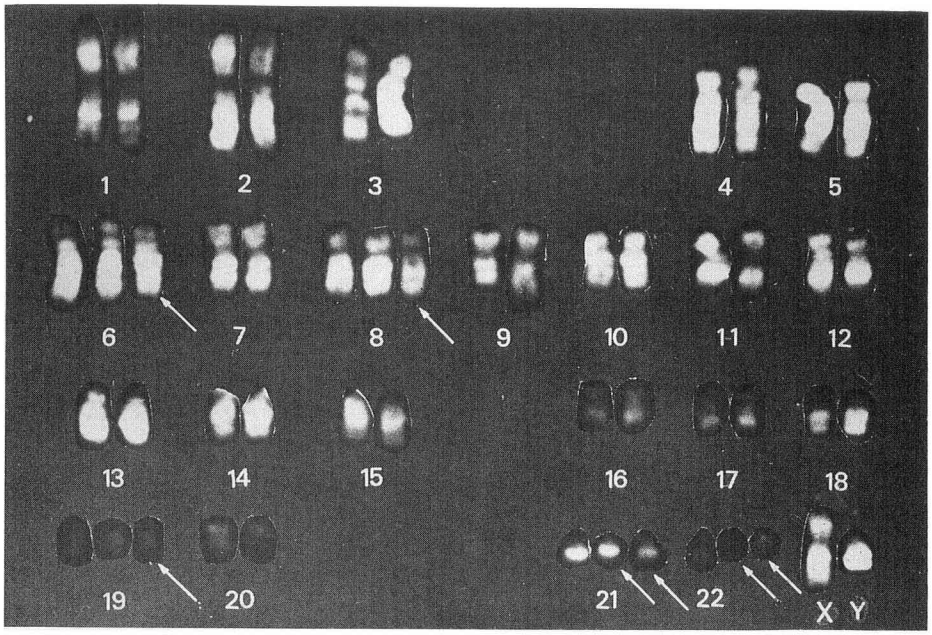
(A) 急性型 (2例)	No 13	Ph^1
	No 26	(−), Ph^1, t(7p− ; 11p+)/ Ph^1, t(7p− ; 11p+), +Ph^1
(B) 移行型 (4例)	No 3	Ph^1/Ph^1, +8, i(17q)
	No 10	Ph^1/Ph^1, t(13p ; 17q)
	No 18	Ph^1/Ph^1, +7, +8, +12, +15, $21q^+$
	No 25	Ph^1/Ph^1, $13q^-$, +19, +Ph^1
(C) 腫瘤形成型 (1例)	No 15	Ph^1/Ph^1, +6, +8, +19, +21, +Ph^1

表－4　Chromosomal changes of CML in CP and BP (49 specimens of 42 cases)

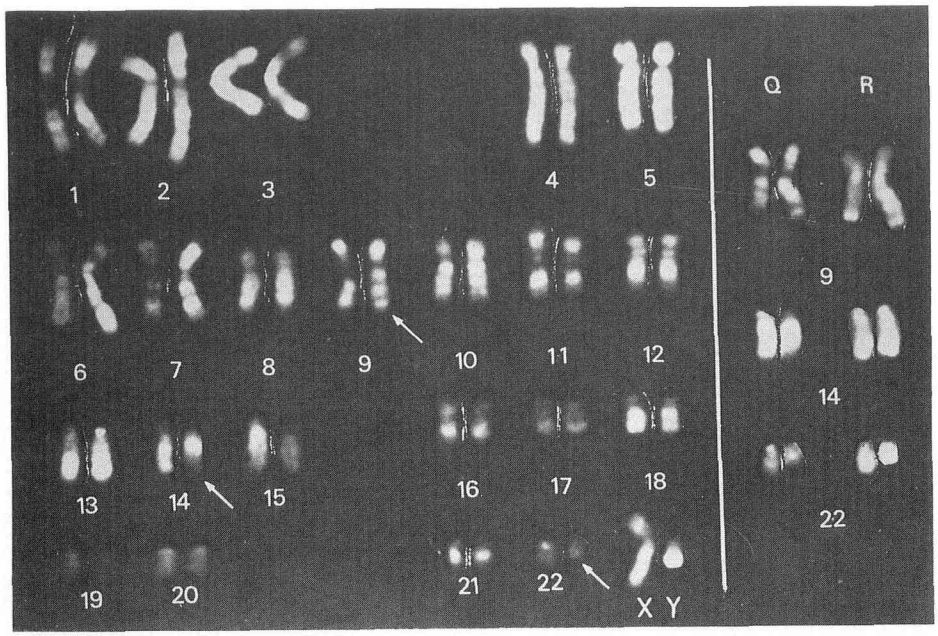
	standard Ph^1	plus additive changes
Chronic Phase	29/34 (85%)	5/34 (15%)
Blastic Phase	5/15 (33%)	10/15 (67%)
Total	34/49 (69%)	15/49 (31%)



写真－1　（症例3）標準転座型 Ph^1 と＋22 q および 17 q－isochromosome がみられる



写真－2　（症例15）腫瘤型成型 BC で＋6，＋8，＋19, ＋21, ＋22（double Ph^1）の核型を示す



写真－3　（症例 34）非標準 Complex 型転座 t（9 q；14 q；22 q）を示す

が 34 例（69%），標準転座型に付加的核型異常を伴った，いわゆる karyotypic evolution を示した例が 15 例（31%）であった。これをさらに慢性期（CP）と急性転化期（BP）に分けてみると，CP 34 例中標準転座型のみは 29 例（85%），その他の付加的異常を呈した例が 5 例（15%）であったのに比べ，BP で標準転座型のみを示す例は 5 例（33%）で，残りの 10 例（67%）は多彩な karyotypic evolution を示し，その傾向は移行型の crisis に著明であり major route 以外の多くの異常が認められた。

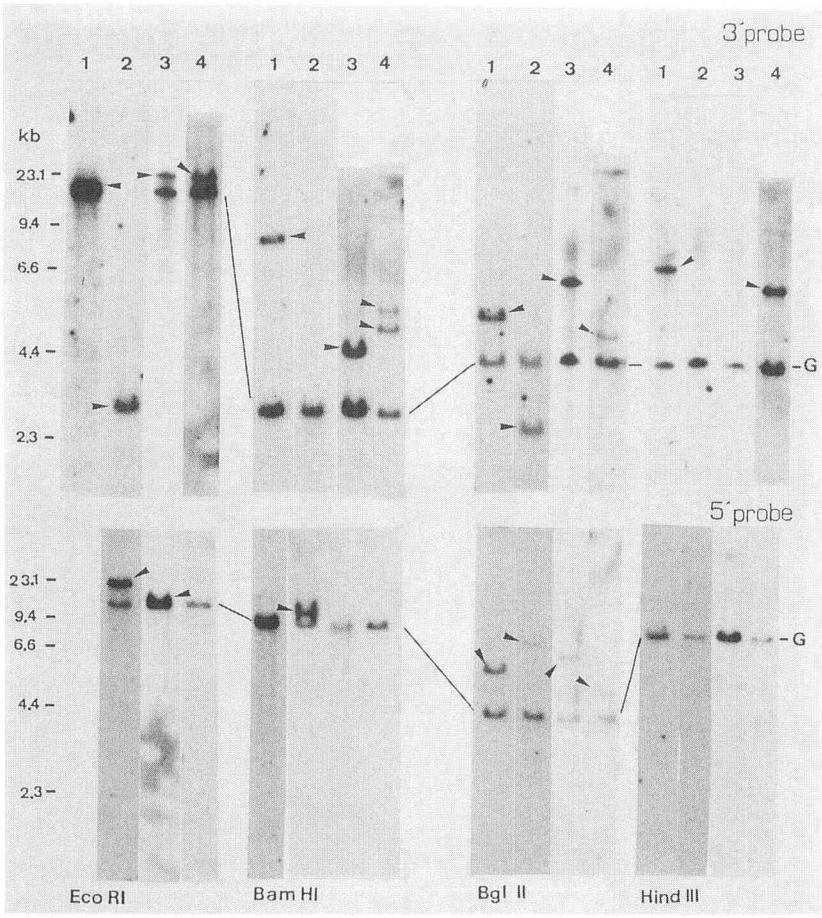
〔B〕　bcr 再構成の検討

検索した CML 17 症例の全例に bcr 再構成を認めた。しかも 3′，5′いづれの bcr probe を用いても Bgl II処理 DNA で正常の 22 番染色体に由来する 5.0 Kb の germ line のバンドの他に異常バンドがみられた。（図－2）

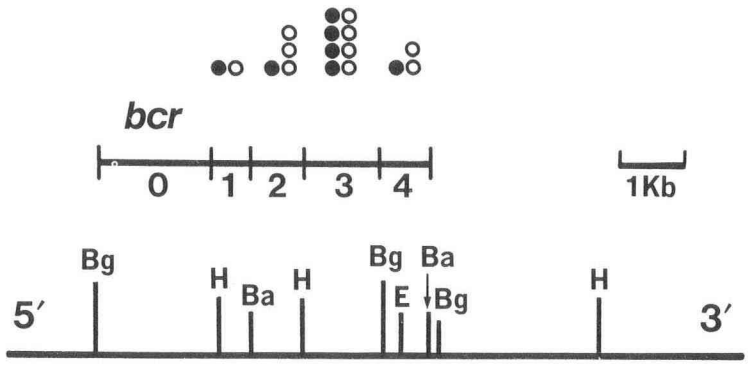
それぞれの症例における bcr sequence 内での切断点をみたところ，bcr II領域のエクソン "2" "3" "4" のいづれかの間のイントロンすなわち bcr の中央から 3′寄りの部分に切断点が集中しており，5′側の Bgl II／Hind III fragment (bcr II領域）および 3′側の Bgl II／Bam HI fragment に切断点を認めた例はなかった。また CP 症例（白丸）と BP 症例（黒丸）との間には bcr 内での切断点に一定の傾向は見られなかった。（図－3）

〔C〕　abl mRNA の検討

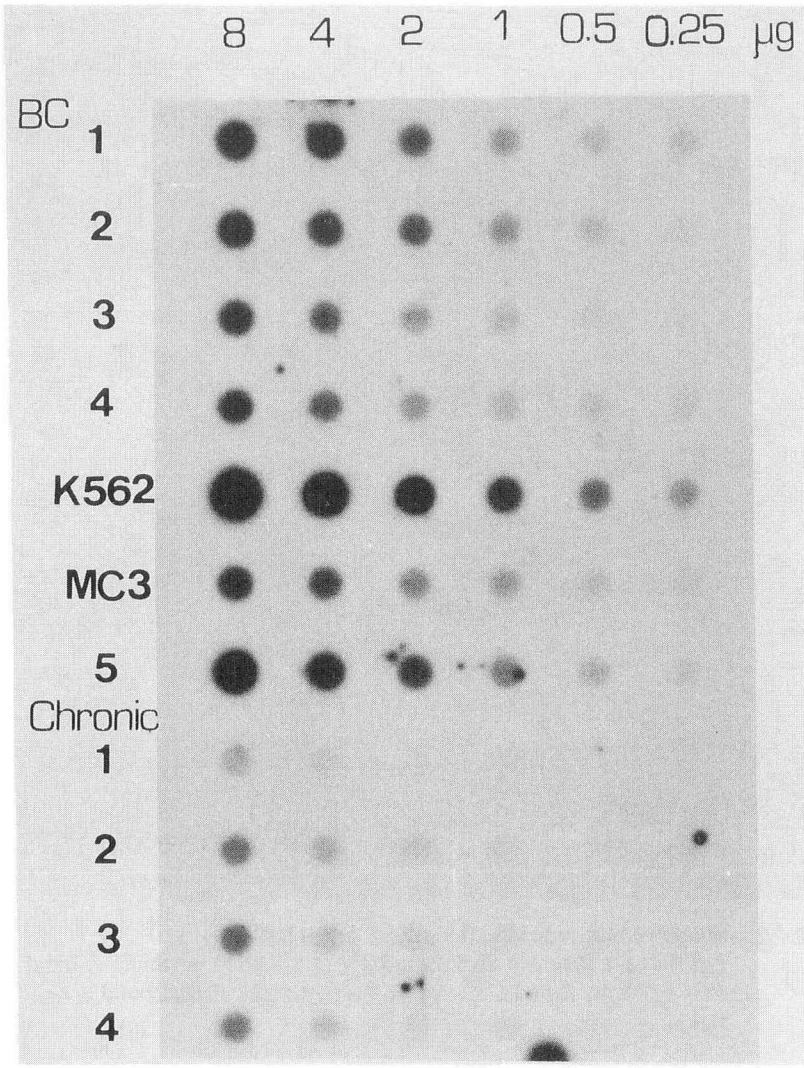
polyadenylated RNA の Northern blot 法による解析では，正常 abl-mRNA の message である 7.0 Kb の signal に加えて 8.5 Kb の部位に bcr-abl hybride mRNA による異常な signal が認められた[8]（data 未掲載）。CP 症例および BP 症例で bcr-abl mRNA の発現を比較すると，BP 症例ではその signal 発現が増幅している傾向がみられた[9]（data 未掲載）。また Dot Hybridization による abl 発現も検討したが Northern blot 法によると同様にその増幅が認められた。（図－4）



図－2　Southern blot hybridization による bcr－再構成
Bgl II による切断では 5Kb, Bam HI では 3.3 kb の germline の band がみられたが，症例 1，2，3，4 では矢印の部に再構成 band がみられる



図－3　CML症例における bcr 領域内切断点
○：CP 症例，●：BP 症例



図－4　dot hybridization による abl の発現
CML－BC 例では発現の増幅がみられる

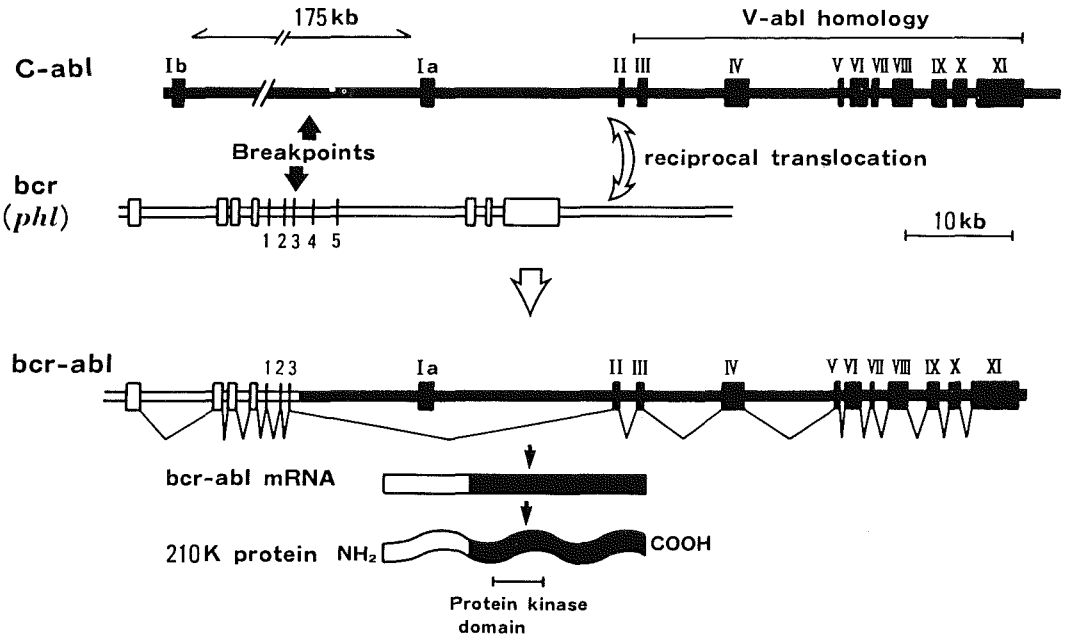
IV. 考　　擦

近年，急性白血病は新しい抗白血病剤の開発と補助療法の進歩により寛解率，生存期間は飛躍的に向上し，5年生存率も増加の一途をたどり，まさに cure の可能性が云々される時代になっている。しかるに従来比較的症状が軽く経過も長いと考えられていた CML は，種々の治療法の改善にもかかわらず，平均生存期間には大きな進歩が見られず，現在でも約3.5年であり有意の延長とはいい難く，そのほとんどは末期に発症する急性転化により死亡する。したがって CML-BC の病態に関する研究は本症の治療理念確立のためにも必須であり多くの研究報告がある[10)11)12)]。著者らは Ph^1 陽性 CML-BC の病態研究で，細胞遺伝学的検討の中から karyotypic evolution の多彩な進展を経験した。すなわち42例49回の染色体分析の結果

CPにおいては標準転座型 Ph^1 例は85%であり，その他の付加的異常染色体は15%に過ぎなかった。これに対してBPでの標準転座型は33%で，逆に付加的異常を示した例が67%と多数に認められた。このCML-BCでの付加的染色体異常は，通常特定の染色体の獲得による高二倍体(hyperdiplidy)を示すことが多いが，欠失や構造異常のこともある。Mittelmanら[13]はBPで80%以上の付加的異常を認め，+8，+19，+22q（double Ph^1），i（17q）などを観察報告している。また貞森ら[14]も26例中19例（73%）に認めている。これらの変化を経時的に観察すると，大多数の症例では核型の進展がstepwiseに認められることから，この核型の変化はclonal evolutionと呼ばれている。1970年染色体分析に分染法が導入され，個々の染色体の同定が容易に行われるようになり，特にBPにおける種々の異常が新しいクローンによるものであることが分かってきた。Ph^1 染色体の転座に関しては症例10，14のBP時に(13；17)および（1；17）がみられた。このような第9番染色体体外の染色体に転座する例はHayataら[15]が（2；22）転座を報告して以来，種々の転座例の報告が相次ぎ，Nos.1，7を除くすべての染色体が Ph^1 転座に関与することが知られている[16]。しかしこのようなvariant型は全体の2−10%といわれ[17]，そのほとんどが（9；22）の標準転座でありきわめてnon-randomなevolutionといえる。trisomyでは症例15，18のBPで+6および+7，+15などが注目されたが，頻度の多いものは諸家の報告[13][18]と一致して+8，+19，+22qであった。また構造異常ではi(17q)が症例3の一例にみられたが，これはCP時のもので，BP時にはi(17q)+αの型をとっていた。missing-Ẏ(Y染色体欠失)は症例28の一例のみであった。一般にY欠失現象は60才以上の健康な高齢者にも暫々みられるともいわれ[19]，CMLでのY欠失は当初，経過緩慢で急性転化しにくく長期生存例が多いといわれていた。しかし，三上らの集計[20]によるとY欠失CML 42例の平均生存期間は40.5ヶ月で，一般のCMLの42ヶ月[21]に比し差は認められなかったという。著者らの例では39才であった。なお症例34はCP時に標準転座型クローンの他にt（9q；14q；22q）のごとく22番染色体断片が9q以外に転座していた。このような例はvariant転座型の一つで複雑相互転座(complex型 Ph^1 転座)といわれ，Y染色体以外のすべての染色体を含むcomplex型 Ph^1 が報告されている[17]。阿部ら[22]は170例を集計し，その60%が9番，22番とさらに一つの染色体からなるcomplex-Ph^1 であったと報告している。これらのことからCMLの発症には22q11および9q34の変化が基本的に重要な意味を持つことが症例の染色体解析から想定される[23][24]。以上CML-BCにおける付加的染色体異常は，高二倍体などの数的異常やmarker染色体の出現など極めて多彩であったが，中でも+8+α，+19+α，+22+α（double Ph^1），i(17q)+αなどに異常が集中しており，これらの変化がat randomに起こっていることは考え難い[14]。特に著者らは近年その臨床診断が困難といわれている移行型急性転化例で10種類の付加的染色体異常を認めたので，頻回の染色体分析が本型BCの早期予知，発見に有用であろうと考えている。しかしCML-CPおよびBPの染色体分析による診断は9q34が染色体末端部であるため，22q11に転座している染色体断片は分染法を用いても光学顕微鏡で確認することは通常困難であり，自づと限界があった。近年CMLにおける Ph^1 転座は分子生物学的手法，すなわちDNAレベルで解析されるようになり，転座による癌遺伝子の転位がCML発症に重要な役割を演じていることが示唆されている。これにより従来の細胞遺伝学的解釈の再検討を余儀なくしている部分もあるが，それは Ph^1 染色体が発見当初21番染色体に存在すると信じられていたり，通常のギムザ

染色で Ph¹ 染色体が見られないにもかかわらず，分染法で 22 q 11 の変化が証明される例（masked Ph¹ 染色体）もある図式と同じで，科学技術の進歩とともに見えないものが見えてくるのは至極当然の経緯であったと思われる。

CML の診断は Ph¹ 染色体の存在は極めて有用ではあるが，これが CML の造血細胞の異常増殖とどのようにかかわっているのかは未だ充分明らかでない。しかし Ph¹ 染色体と関連して認められる bcr-abl 遺伝子の存在は，Ph¹ 染色体が CML 発症の要因の一つであるとの考えをかなり確かなものとしている[25]。染色体は図－5 に示すごとく，22 番染色体と 9 番染色体の間の相互転座（reciprocal translocation）によって起った異常であるが，その際 22 番染色体上の 5.8 Kb という非常に限られた領域（break point cluster region ; bcr region）に 9 番染色体の 9 q 34.1 に存在する発癌遺伝子 c-abl が結合して bcr-abl の新しい DNA が形成される。元来 c-abl 遺伝子は 7.0 Kb と 6.0 Kb の mRNA を転写しているが，CML で新しく作られた b-cr-abl の hybrid 遺伝子は両方の遺伝情報を有し，その転写産物は正常より大きい 8.5 Kb の bcr-abl のキメラ mRNA をも転写するようになる。この 8.5 Kb の mRNA は正常の p 145 蛋白とは異なり，p 210 蛋白に翻訳される。p 210 蛋白は p 145 蛋白が持っていない tyrosine　kinase 活性を有し，この活性蛋白が CML の発症に関与していることが想定されている[26]。Phl 陽性 CML の中には，bcr 領域内に切断点が存在することを示す bcr 再構成を認めない例もある[28]。これらを勘案の上 Groffen らは Ph¹ に関係の深い 22 番染色体上の DNA sequence を bcr を含めて Phl 遺伝子と名付け[29]，bcr は Phl の一部であるとしている。したがって bcr 再構成を認めない Ph（＋）CML で



図－5　c－abl 癌遺伝子と bcr との相互転座の模式図
下段は bcr－abl hybrid 遺伝子が新らしい異常たん白（p－210）を転写産生するところを示す

も Ph^1 内で切断が起こっている可能性があることになる。

22番染色体における Ph^1 の切断点は上述のごとくDNAの5.8 Kbのシークエンス内で生じるが，この中での切断点の相違と臨床病期に関する研究はShaefer-Rogoの報告[30]がある。それによるとCML-CPの大多数でその切断点はbcrの5′側領域（Ph^1 上のbcr sequenceに特異的）に存在するのに対してCML-BCでは3′側領域（9番染色体が転座するbcr sequenceに特異的）に存在することから，急性転化とbcrの3′側領域での切断との間に関連性があると述べている。しかし，それに対する反論[31]もある。著者らの成績ではCML 17例の全例にbcr再構成を認めたが，それぞれの症例におけるbcr sequence内での切断点と臨床病期の間には明らかな関連性を見出し得なかった。しかしabl-mRNAで検討すると，CML-BC症例はCP例に比し当該遺伝子が増幅している傾向を認めた。Collinsら[32]はCMLにおける芽球は成熟顆粒球に比しabl-mRNAの発現が強いと報告しており，CML-BCに伴なう本現象がCML-BCの原因となるのか，あるいは単なる結果なのかは現時点では断を下し得ない。またBPの中にもCPと同様にその発現が低値を示す例が報告されており，bcr-abl transcriptがCMLの細胞増殖に重要な役割を果たしていると思われるが，その増幅のみでBCを惹起する分子遺伝学的機序を説明するには未だ確証に乏しいというのが現状である。著者らの一人Okabe[32]はNIH3T3細胞を用いたin situ transfection assayにより，CML-BCではN-ras癌遺伝子が活性化されている症例のあることを明らかにした。またBishopらのgroupもin vitro transfection assayでras-遺伝子のpoint mutationalな活性化を証明している。これらの事実はCML-BCではabl-癌遺伝子と密接に関連したCML増殖に加えて，さらにras-遺伝子familyを含むtransforming遺伝子が関与する可能性を示唆している。CML-BCにともなう付加的染色体異常の分子遺伝学的機序の解析と，従来のcytogeneticsでは明らかにし得ない癌遺伝子のpoint mutationalな活性化の解析，さらにそれらとabl-遺伝子の絡み合い等の詳細な解析はCML-BCの機序解明は勿論，leukemiaのmulti-step processの解明にも貴重な示唆を与えるものと思われる。今後細胞遺伝学の分野では超精度分染法による染色体のより詳細な分析が，また分子生物学の分野ではPolymerase Chain Reaction (PCR)などの手法によりSouthern blot分析では認められないほど微量のbcr rearrangementを増幅することにより，わずかに残存しているキメラのbcr-abl転写産物の検出も可能になってくると思われるので，これらの科学技術の総合的進歩発展によりCMLの発症ならびにCML-BCの病態が近い将来一元的に解釈され，それが本症の診断あるいは治療に貢献することが期待される。

V．結　　語

1）Ph^1 陽性CML 42例の染色体分析の結果，慢性期34例中，標準転座型のみの例は29例（85%），その他の付加的異常例は5例（15%）であり，＋8，Y欠失，13 q^-，t(3 q^-；3 q^+)，t(6 q^-；13 q^+)，t(9 q；14 q；22 q) などがみられた。

2）急性転化15例中，標準転座型のみは5例（33%）であり，残りの10例（67%）は多彩なKaryotypic evolutionを示し，臨床病期の進行とともに核型も進展した。

3）Southern blot法によるbcrの再構成の検討では，17症例の全てにbcr再構成を認め，その切断点は3′側に集中していた。

4）abl mRNAのNorthern blot分析では，正常abl mRNAのsignalである7.5 Kbの他に8.5 Kbの位置にもbcr-abl hybrid mRNAによる異常なsignalを認めた。しかもこのsignalはCP時よりもBP時に増幅される傾向

にあった。

5）Dot Hybridization 法による abl 発現の検討でも Northern blot 法によると同様にその増幅が認められた。

（稿を終るに臨み，染色体分析の御協力をいただいた北海道大学理学部附属動物染色体研究施設佐々木本道教授ならびに元大学院生富安孝文先生に深謝いたします。なお本症例の一部は第43回日本血液学会総会ならびに第50回日本血液学会総会シンポジウムで報告した。）

Key Words : CML　Blastic Crisis　Complex ph[1]
Karyotypic Evolution　bcr gene　c-abl gene
bcr Rearrangement　bcr/c-abl Hybrid mRNA

文　献

1）Cananni E. et al. : Altered transcription of oncogene in chronic myeloid leukemia. Lancet 1 : 593－595, 1984
2）Goto T. et al. : Crowth characteristics of leukemic and normal hematopoietic cells in Ph[1](+)CML and effects of intensive treatment. Blood 59 : 793－808, 1982
3）Schwarzenberg L. et al. : Hydroxyurea, leucopheresis and sprenectomy in CML at the problastic phase. Brit. Med. J. 1 : 700－703, 1973
4）Champlin R. et al. : The role of bone marrow transplantation in the treatment of chronic myelogenous leukemia. Recent Advances in Bone Marrow Transplantation. ed. by Gale R. P., Alan R. Liss Inc. N. Y. 141－158, 1983
5）鎌田七男他：CML 急性転化時の染色体異常－とくに E 17 の異常例について．臨床血液 17：233－234, 1976
6）喜多島康一他：慢性骨髄性白血病の早期診断，早期治療に関する臨床的研究。臨床血液 13：560－568, 1972
7）Okabe M. et al. : Establishment and characterization of a cell line[1] TOM-1[1] derived from a patient with Ph[1]-positive ALL. Blood 69 : 990－1189, 1987
8）岡部実裕他：Ph[1]陽性 ALL における bcr 再構成と c-abl 遺伝子発現．医学のあゆみ 140：525－526, 1987
9）Okabe M. et al. : Ph[1] positive leukemia ; Molecular analysis of bcr and abl genes and transforming genes. Acta Haematol JPN. (in press)
10）八尾栄一他：慢性骨髄性白血病の急性転化後の予後に関する細胞遺伝学的研究。臨床血液 25：1183－1189, 1984
11）Boggs D. et al. : Hematopoietic stem cell theory in relation to possible lymphoblastic conversion of chronic myeloid leukemia. Blood 44 : 449－453, 1974
12）渡辺英二他：慢性骨髄性白血病の予後に関する統計的検討，日血会誌　51：582－586, 1988
13）Mittelman F. et al. : Non-random karyotypic evolution in chronic myeroid leukemia. Int J Cancer 18 : 24－30, 1976
14）貞森直樹他：慢性骨髄性白血病の急性転化指標に関する細胞遺伝学的研究。臨床血液　21：600－605, 1980
15）Hayata I.　et al. : New translocation related

to the Philadelphia chromosome. Lancet ii : 1385, 1973
16) Misawa S. et al. : Cytogenetic studies of chronic myelocytic leukemia.. I. Chromosome constitution of chronic myelocytic leukemia in the chronic phase and blastic phase. Kyoto Pref Univ Med 87 : 807−831, 1978
17) De Braekeleer M. et al. : Variant translocation in chronic myeloid leukemia. Cytogenet Cell Genet 44 : 215−222, 1987
18) 橋本哲男他：造血器腫瘍染色体異常における異常型相互関連性の解析．臨床血液 28：1990−1999, 1987
19) Pierre R. et al. : Age associated aneuploidy : Loss of chromosome from human bone marrow cells with aging. Cancer 30 : 889−894, 1972
20) 三上素子他：被爆者にみられた 45 X, −Y, CGL の一例とその文献的考察．臨床血液 19：139−146, 1978
21) 鎌田七男他：慢性骨髄性白血病 55 例における細胞遺伝学的研究−急性転化 17 例を含む．日内会誌 61：70−77, 1972
22) 安部達生他：細胞遺伝学, 慢性骨髄性白血病, 柴田昭編, 初版．西村書店, 29−89, 1986
23) Rowley J. D. et al. : Ph^1 positive leukemia, including chronic myelogenous leukemia. Clin Haematol 9 : 55−86, 1980
24) Sandberg A. A. et al. : The cytogenetics of chronic myelocytic leukemia : Chronic and blastic crisis. Cancer Genet Cytogenet 1 : 217−228, 1980
25) Heiterlamp N. et al. : Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph^1 translocation. Nature 315 : 758−761, 1985
26) Ben-Neriah Y. et al. : The chronic myelogenous leukemia specific p210 peotein is the product of the bcr／abl hybrid gene. Science 233 : 212−214, 1986
27) Seller L. et al. : Philadelphia positive chronic myeloid leukemia with a chromosome 22 breakpoint outside the breakpoint cluster region. Blood 70 : 1659−1664, 1987
28) Stam K. et al. : Evidence that the phl gene encode a 160,000-dalton phosphoprotein with associated kinase activity. Mol Cell Biol 7 : 1955−1960, 1987
29) Schaefer-Rego L. et al. : CML patients in blast crisis have breakpoints localised to a specific region of the bcr. Blood 70 : 448−455, 1987
30) Mills K. et al. : The site of the breakpoint within the bcr is a prognostic factor in Philadelphia-positive CML patients. Blood 72 : 1237−1241, 1988
31) Collins S. J. et al. : Chronic myelogenous leukemia : Amplification of a rearranged c-abl oncogene in both chronic phase and blast crisis. Blood 69 : 893−898, 1987