

小児 Biphenotypic leukemia の分類の試み

中澤 眞平¹⁾・杉田 完爾¹⁾・犬飼 岳史¹⁾
齋藤 みどり²⁾・森 泰二郎²⁾・西野 和良²⁾
鈴木 敏雄²⁾・木下 明俊²⁾・高根 恵子³⁾
岡崎 敏子³⁾

¹⁾ 山梨医科大学 小児科

²⁾ 慶応義塾大学医学部 小児科

³⁾ 社会保険埼玉中央病院 免疫研究室

はじめに

近年、小児急性白血病の治療成績の向上はめざましく、化学療法の強化により従来予後不良と考えられていた白血病の治療成績も改善されてきた。しかしながら強力な化学療法にもかかわらず難治性の白血病が未だあり、治療に結びつく早期の診断、細胞生物学的特性の解析は治療を行なう上で重要である。Biphenotypic leukemia (BL と略す、リンパ球の形質と骨髓単球細胞の形質を同時に発現する白血病) は最近注目されている急性白血病で、分類法は確立されていない。また一部 BL サブタイプでは予後良好とされている¹⁾ が、症例が少ないサブタイプでは不明である。本論文では BL あるいは acute mixed lineage leukemia について自験例の解析を行い、分類を試みた。なお BL としての形質発現を示す頻度が高い Ph¹ 陽性急性白血病、乳児白血病は頻度のデータは示すが、今回の解析から除外した。

I. 研究方法

1. 対象症例

過去10年間に著者らの研究室で細胞膜抗原の解析ならびに cell lineage 診断を行った症例のうち、複数のモノクローナル抗体で検索が行われ、診断が確実となった745例の未治療小児急性白血病症例を解析の対象とした。

2. 細胞膜抗原解析

治療前患者へパリン加末梢血あるいは骨髓血より Ficoll-Hypaque 比重遠心法で単核球を分離し、検索を行なった。解析に用いた主なモノクローナル抗体は、Tリンパ球関連抗体として T6 (CD6), T11 (CD2), T3 (CD3), T4 (CD4), T1 (CD5), Tp40 (CD7), T8 (CD8), Bリンパ球関連抗体として J5 (CD10), B4 (CD19), B1 (CD20), Leu14 (CD22), 骨髓単球抗原として Leu15 (CD11), My7, MCS2 (CD13), My4 (CD14), My9 (CD33), OKM5 (CD36) を用いた。そのほかに、抗 HLA-DR (KOR-Ia17, anti-HLA-DR), Tp80 (CD41), AN51 (CD42), NKH1 (CD56), 抗血小板抗体 (KOR-P77)²⁾ 等を用いた (表1)。これらのモノクローナル抗体を用い、間接ロゼット法³⁾あるいはフローサイトメトリーで cell lineage 診断を行った。なお検索した単核球の20%以上に発現が認めら

1) 〒409-38 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110

2) 〒160 東京都新宿区信濃町35

3) 〒336 埼玉県浦和市北浦和4-9-3

受付：1993年5月7日

受理：1993年6月4日

表1. 使用したモノクローナル抗体

CD	モノクローナル 抗体の名称	認識する抗原, 細胞	
CD 1	T6	Cortical thymocytes	Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA
CD 2	T11	T-cells	
CD 3	T3	T-cells	
CD 4	T4	T-cell subset (helper/inducer)	
CD 5	T1	T-cells, B cell subset	
CD 7	Tp40	Major T-cell subset	Provided by Dr. R. Ueda, Aichi Cancer Center
CD 8	T8	T-cell subset (cytotoxic/suppressor)	Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA
CD10	J5	Lymphoid progenitor cells, common ALLs	
CD11	Leu15	Granulocytes, monocytes	Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA
CD13	MY7	Monocytes, granulocytes	Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA
CD14	MY4	Monocytes	
CD19	B4	T-cells	
CD20	B1	T-cells	
CD33	MY9	Monocytes, myeloid progenitor cells	
CD36	OKM5	Monocytes/macrophages, platelets	Ortho, Raritan, NJ, USA
CD41	TP80	GP II b/III a, platelets	Provided by Dr. H. Maeda, Saitama Medical College
CD42	AN51	GP I b, platelets, megakaryocytes	Dacopatts, Copenhagen, Denmark
	NKH1	NK cells	Coulter Corporation, Hialeah, FL, USA
	I2	HLA-DR	
	β F1	β chain of human T cell receptor	T Cell Sciences, Cambridge, MA, USA
	δ TCS1	β chain of human T cell receptor	

表2. モノクローナル抗体による小児白血病の診断, 分類

	高率に発現される抗原	一部に発現される抗原	その他のマーカー
急性リンパ性白血病 B型細胞			
Unclassified ALL	CD19, HLA-DR		
Common ALL (immature B, pre-B)	CD10, CD19, HLA-DR	CD20, CD21	EAC-ロゼット 細胞質内 μ 鎖 膜免疫グロブリン
B-ALL	CD19, CD20, HLA-DR	CD10, CD21	
T細胞型 T-ALL	CD2, CD5, CD7	CD1, CD3, CD4, CD6, CD8 HLA-DR	E-ロゼット EAC-ロゼット
急性非リンパ性白血病 急性骨髄性白血病 (M1, M2) 急性前骨髄球性白血病 (M3)	CD13, CD14, HLA-DR	[CD7]*	EA-, EAC-ロゼット
急性骨髄単球性白血病 (M4) 急性単球性白血病 (M5a, b)	CD11, CD12, CD13, CD14 HLA-DR	[CD2, CD7, CD19]*	EA-, EAC-ロゼット 細胞組織化学
赤白血病 (M6)		CD13, CD14,	glycophorin A 細胞組織化学
急性巨核球性白血病 (M7)	CD41, CD42b	[CD7]*	血小板関連抗原 PPO, EAC-ロゼット

[CD]* :一部の症例で cell lineage の異なる抗原の発現 PPO:血小板ペルオキシダーゼ反応

Eロゼット:ヒツジ赤血球ロゼット形成, EAロゼット:Fcリセプター, EACロゼット:補体リセプター

れた場合を陽性とした。Lineage 診断の著者らの簡単な分類基準は表 2 に示した。Biphenotypic leukemia の診断は Gale と Ben-Bassat の基準⁴⁾を基本的には用い、一部の症例では二重染色を行ない確認した。

3. 細胞膜免疫グロブリン

蛍光色素 (fluorescence isothiocyanate; FITC) 標識抗ヒト免疫グロブリン血清 (Hoechst, Behringwerke, Germany) を用いた直接蛍光抗体法により、 $\alpha, \mu, \gamma, \kappa, \lambda$ 鎖につき検索した。

II. 結 果

細胞組織化学等従来の分類方法に加え、膜抗原解析による診断がなされた小児急性白血病症例は745例であった (表 3)。そのうち522例が急性リンパ性白血病 (Acute lymphoblastic leukemia, ALL), 139例が急性非リンパ性白血病 (Acute non-lymphocytic leukemia, ANLL) であった。ALL のうち、77%は Common ALL, 15%は T-ALL であった。しばしば BL の形質を示す Ph¹ 陽性急性白血病, 乳児白血病はそれぞれ 8 例, 49例であった。従来の診断基準で BL と診断された症例は29例, 約 4%であった。これらの症例は膜抗原発現のパタンから暫定的に分類を試みた。

(1) Common ALL に骨髄単球抗原の発現が認められた症例 (表 4)

CD10, CD19に CD13等の骨髄単球抗原の発現が認められた症例は11例で、BL の中でも最も頻度の高いサブタイプであった。発症年齢は1歳から15歳に分布、初発時白血球数、臨時像等は骨髄単球抗原の発現をみない Common ALL 群と差を認めなかった。Pui らの報告¹⁾と同様、我々の検討でも Common ALL と比較して、予後に差は認められなかった⁵⁾。

(2) Unclassified ALL に骨髄単球抗原の発現が認められた症例 (表 5)

Unclassified ALL は CD10陰性, CD19陽性

表 3. The incidence of acute leukemia (N=745)

TYPE	Patient Number
ALL	522
Common ALL	404 (77.4%)
T-ALL	81 (15.5%)
B-ALL	21 (4.0%)
Unclassified ALL	16 (3.1%)
ANLL	139
Biphenotypic leukemia	29
Ph ¹ -positive acute leukemia	8
NK-leukemia	1
Infant leukemia	46

ALL : Acute lymphoblastic leukemia.
 ANLL : Acute non-lymphocytic leukemia.
 NK : Natural killer.

表 4. Group 1, Common aLL with positive myelomonocytic antigen(s) expression

Patient No.	Age (Yr)	WBC (/ μ l)	HLA-DR (I2)	CD10 (J5)	CD19 (B4)	CD20 (B1)	CD13 (MY7)	CD14 (MY4)	CD33 (MY9)	CD36 (OKM5)
1.	1	15600	86	87	nt	nt	90	nt	nt	nt
2.	2	50800	93	98	17	37	<10	<10	<10	<10
3.	4	3800	88	64	83	43	52	<10	<10	nt
4.	4	1600	96	96	95	53	71	<10	<10	nt
5.	5	7400	43	98	nt	nt	42	nt	nt	nt
6.	5	8800	92	92	96	<10	46	<10	24	nt
7.	8	3900	85	83	84	<10	71	<10	<10	20
8.	9	5900	97	80	nt	nt	33	nt	nt	nt
9.	11	32600	86	83	82	78	48	<10	<10	23
10.	12	1300	100	96	nt	nt	98	nt	nt	nt
11.	14	139900	87	80	91	25	<10	<10	16	70

In all patients, T antigens could not be detected on leukemic blasts.
 Ph¹ positive acute leukemias were excluded from this group.
 nt: Not tested.

で、形態的、細胞組織化学等でリンパ性白血病と考えられ、他のT-リンパ球関連抗原、骨髓単球系細胞の形質を発現していない未熟B細胞型白血病である。乳児白血病で高頻度に見られるサブタイプ⁶⁾で、乳児を除いた場合は頻度は低い。表5に示した5症例CD19に加え、CD13、CD33、CD36等の発現が見られた。この5例はすべて早期再発を示し、乳児期発症のUnclassified ALL同様予後不良なタイプの急性白血病と考えられる。

(3) ANLLにBリンパ球抗原の発現が認められた症例(表6)

この群の白血病は、形態、細胞組織化学等で明らかにANLLと診断され、膜抗原解析でCD10、CD19等のBリンパ球関連抗原の発現が認められたものである。このタイプは症例が少なく、生物学的特性や、予後について不明である。

(4) 骨髓単球抗原、T抗原の発現が見られた症例(表7、表8)

形質発現の様式はANLLにTリンパ球関連

抗原が発現されたタイプから、CD5、CD7陽性Tリンパ性白血病で骨髓単球抗原の発現が見られるタイプまで幅があった(表7)。細胞形態等かなり異なるにも関わらず、臨床的には共通点も見られる(表8)。年長児に多く、縦隔腫瘍の合併(4/9)、早期再発例が多く(7/9)、予後不良と考えられる。CD7陽性のこのカテゴリーに入る急性白血病は独立したBLのサブタイプと考えられる⁷⁾。

Ⅲ. 考 察

白血病は造血細胞の分化、成熟課程で細胞が腫瘍した単クローン性疾患とされ、その形質発現は、正常造血組織では少数で証明が困難ではあるが、分化、成熟課程にそのcounterpartが存在するとされてきた(lineage fidelity)。しかしながら、近年異なった分化の方向を示す形質を同時に示す急性白血病を報告され、biphenotypic leukemia (BL)、Acute mixed lineage leukemia等の名称で扱われるようになってき

表5. Group 2, unclassified aLL with positive myelomonocytic antigen(s) expression

Patient No.	Age (Yr)	WBC (/μl)	Pox	HLA-DR (I2)	CD10 (J5)	CD19 (B4)	CD20 (B1)	CD13 (MY7)	CD14 (MY4)	CD33 (MY9)	CD36 (OKM5)
1.	8	28000	—	69	<10	81	<10	<10	<10	31	35
2.	5	2400	—	73	<10	81	<10	45	<10	62	nt
3.	9	5500	—	74	<10	72	<10	37	<10	19	<10
4.	14	23000	—	89	18	93	<10	26	<10	<10	31
5.	14	10100	—	71	<10	87	<10	<10	<10	79	<10

Infant leukemias were excluded from this group.
nt: Not tested.

表6. Group 3, ANLL with positive B-lymphoid antigen(s)

Patient No.	Age (Yr)	WBC (/μl)	MPO	HLA-DR (I2)	CD10 (J5)	CD19 (B4)	CD20 (B1)	CD13 (MY7)	CD14 (MY4)	CD33 (MY9)	CD36 (OKM5)
1.	8	8000	84*	59 ^a	31	36	17	21	<10	<10	nt
2.	10	6900	58*	78	<10	77	<10	34	<10	12	16
3.	12	15100	72	76	<10	52	<10	40	<10	15	nt
4.	12	40800	82	62	<10	76	<10	44	19	<10	nt

Number^a: Percentage of positive cells.

*: Auer body(+), MPO: myeloperoxidase reaction.

The morphology of this group was FAB-M1.

nt: Not tested.

表 7. Group 4, acute leukemia with positive T-lymphoid and myeloid antigen(s)

	Patient No.								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Surface antigens									
CD1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD2	—	—	—	—	—	—	—	19	—
CD3	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD5	66	56	90	82	82	—	23	—	—
CD7	88	88	98	91	99	82	89	85	74
CD8	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD10	—	—	—	—	—	66	—	—	—
CD19	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD20	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD11	—	—	—	—	—	—	75	—	—
CD13	—	—	18	—	63	82	—	—	—
CD14	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD33	—	—	—	—	—	—	90	78	81
CD36	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD41	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD42	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CD56	—	—	—	—	—	—	—	48 ^a	68 ^a
HLA-DR	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Surface marker after short term culture									
CD13	89	52	80	92	83	87	69	82	31
Cytoplasmic antigens									
CD3	97	91	99	37	91	83	95	75	69
β F1	96	—	—	—	—	—	—	—	—
δ TCS1	—	—	50	—	—	—	—	—	—
CD13	90	50	89	49	94	84	74	92	35
DNAs									
TCR- β (C β)	R	R	R	G	nt	G	G	G	G
IgJ _H (J _H)	R	G	G	G	nt	G	G	G	R

(-): Positive cells under 10%.

^a: NK activity negative.

G: Germ line, R: Rearrangement, ND: Not tested.

た。BLとして報告されている症例をまとめると、同一細胞にリンパ球抗原と骨髄単球抗原の両方が同時に発現されている場合、異なる系統の白血病細胞が同時に存在する場合と経過中に形質が変化 (lineage switch) する場合がある⁸⁾。これらの形質発現の様式は同一症例でも変化する場合があり、厳密な分類は臨床上重要な意味を持たないと思われる。

BLあるいは acute mixed lineage leukemia

の頻度、診断基準、予後について不明な点が多く、疾患単位としてもまだ確定されていない。著者らは以前この白血病を染色体異常の観点から3群に分類した⁹⁾。I群は11q23に転移を有し、unclassified leukemiaのphenotypeを示す白血病で、乳児に多く、初発時白血球数高値で、しばしばlineage switchを起こす予後不良の急性白血病である。II群はt(9; 22)(q34; q11)、いわゆるPh¹陽性急性白血病で、phenotypeは

表 8. Group 4, Clinical Features of Acute Leukemia with Positive T-lymphoid and Myeloid Antigen(s)

Patient No.	Sex	Age	FAB	WBC (/ μ l)	Mediastinal mass	Prognosis
1	M	7	L2	82000	—	23Mo R(BM)
2	F	7	L2	6900	+	31Mo CCR
3	M	14	L1	1200	+	5Mo R(BM)
4	M	16	L1	1960	—	36Mo CCR
5	F	7	L1	6700	+	13Mo R(BM)
6	F	15	M1	45100	+	16Mo R(BM)
7	M	5	M7	600	—	29Mo (BM)
8	M	9	M1	400	—	11Mo BM Re1
9	F	12	M1	2600	—	6Mo BM Re1

FAB: French-American-British classification.

CCR: Continuous complete remission.

R(BM): Bone marrow relapse.

common ALL で、初発時白血球数高値、年長児に多く、予後不良の白血病である。このタイプの白血病でも I 群と同様しばしば lineage switch がみられる。III 群は特異的染色体異常はなく、発症年齢、初発時白血球数、phenotype は Common ALL で、比較的予後良好な急性白血病である。この III 群は今回の解析では 1 群に相当する。広い意味では Ph¹ 陽性急性白血病や乳児白血病は BL の範疇に入るが、この 2 つのサブタイプは強力な化学療法にもかかわらず極端に予後不良である。この 2 つのタイプの白血病については染色体の構造異常、DNA レベルでの解明も進み、多能性幹細胞由来の独立した白血病サブグループとされ、今回の検討から除外した。

今回の検討では、1 群は common ALL と比較的類似した臨床像も示し、予後も良好であり、他の報告とも一致した。2 群、3 群は予後不良の印象を受けたが、症例数が少なく、臨床像、予後についてはまだ確定的な見解は得られなかった。最近 t(8; 21) 転座を示す急性骨髄性白血病 (M2) の芽球では、骨髄単球抗原の発現に加え CD19 の発現が高頻度にもみられとする報告¹⁰⁾ もあり、3 群を BL の範疇に入れことには問題もある。4 群は T/M hybrid leukemia ともよばれ⁷⁾、予後不良な白血病であり、乳児白血病、Ph¹ 陽性急性白血病同様に経過中に明

らかな lineage switch を示す場合があり¹¹⁾、多能性幹細胞由来のサブタイプと考えられている。

Biphenotypic leukemia の細胞起源については従来は、細胞の腫瘍化に伴う分化課程での遺伝子の misprogramming が指摘されてきた (lineage infidelity)¹²⁾。それに対して Greaves ら¹³⁾ は正常の造血細胞の分化段階早期の造血前駆細胞では cell lineage は明確ではなく、リンパ性と骨髄性両方の形質を発現する混乱の時期があり (lineage promiscuity)、慢性骨髄性白血病や BL はその時期の細胞に由来すると考えている。Greaves らの考えに対しては反論もあり、現在までのところ結論は得られていない。

今回は治療と予後の関連について詳細な検討は出来なかったが、乳児白血病、Ph¹ 陽性急性白血病、第 2 群の Unclassified ALL に骨髄単球抗原の発現を認めた症例ならびに第 4 群の T/M hybrid leukemia は従来の化学療法では明らかに治療成績は不良であり、今後これらのタイプの白血病を正確に診断、抽出し、新しい観点からの治療を試みる必要がある。

文 献

- 1) Pui CH Behm FG Singh B, Rivera, Rivera GK, Schell MJ, Roberts WM, Crist WM, Mirro J.

- Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. *Blood* 1990; **75**: 198–202.
- 2) Nakazawa S, Sugita K. Establishment and characterization of a murine antiplatelet monoclonal antibody and its usefulness for the identification of megakaryocyte-lineage cells. *Keio J Med* 1987; **36(1)**: 52–55.
 - 3) 中澤眞平, 森泰二郎, 西野和良, 杉田完爾, 高根恵子. 間接ロゼット法による白血病細胞膜抗原の解析. 小児慢性疾患の診断, 治療, 管理に関する研究班. 小児白血病の治療に関する研究. 厚生省心身障害研究報告書, 1985; 133–140.
 - 4) Gale RP, Ben-Bassat I, Hybrid acute leukemia. Annotation. *Br J Haematol* 1987; **65**: 261–264.
 - 5) 齋藤みどり. 小児 common acute lymphoblastic leukemia における細胞質内 CD13 の意義. 1991; *日児誌* **95**: 2531–2542.
 - 6) 岡崎敏子, 中澤眞平, 杉田完爾, 森泰二郎, 西野和良, 安倍隆, 木下明俊, 鈴木敏雄, 齋藤みどり, 菊池英之, 高根恵子, 林泰秀, 稲葉俊哉. 乳児白血病の免疫学的, 細胞遺伝学的検討. *日小血会誌* 1990; **4**: 147–152.
 - 7) Cross AH, Goorha RM, Nuss R, Behm FG, Murphy SB, Kalwinsky DK, Raimondi S, Kitchingman GR, Mirro JJ, Acute myeloid leukemia with T-lymphoid features: A distinct biologic and clinical entity. *Blood* 1988; **72**: 579–587.
 - 8) 中澤眞平, 杉田完爾. Biphenotypic leukemia *日小血会誌* 1988; **2**: 109–118.
 - 9) 杉田完爾, 中澤眞平, 森泰二郎, 西野和良, 安倍隆, 木下明俊, 鈴木敏雄, 齋藤みどり, 菊池英之, 小佐野満, 岡崎敏子, 林泰秀. 小児 Biphenotypic leukemia 19例の検討. *臨床血液* 1990; **30**: 958–966.
 - 10) Hurwitz CA, Raimond SC, Head D, Krance R, Mirro JJ, Kalwinsky DK, Ayers GD, Behm FG. Distinctive immunophenotypic features of t(8; 21) (q22; q22) acute myeloblastic leukemia in children. *Blood* 1992; **80**: 3182–3188.
 - 11) 杉田完爾, 中澤眞平, 齋藤みどり, 権田隆明, 楠本裕, 綾美咲, 小佐野満, 清水節, 岡崎敏子, 稲葉俊哉, 水谷修紀. T細胞系から骨髄系に表現型の変化がみられた急性白血病の1例. *臨床血液* 1989; **30**: 2163–2168.
 - 12) Smith LJ, Curtis JE, Messner HA. Lineage infidelity in leukemia. *Blood* 1983; **61**: 2163–2168.
 - 13) Greaves MF, Chan LC, Furley AJW. Lineage promiscuity in hematopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 1986; **67**: 1–11.

Immunophenotypic Classification of Childhood Biphenotypic Leukemia

Shinpei Nakazawa¹, Kanji Sugita¹, Takeshi Inukai¹, Midori Saito², Taijiro Mori²,
Kazuyoshi Nishino², Toshio Suzuki², Akitoshi Kinoshita², Keiko Takane³, and Toshiko Okazaki³

¹ Department of Pediatrics, Yamanashi Medical College,

² Department of Pediatrics, School of Medicine Keio University, and

³ Immunology Research Laboratory, Social Insurance Saitama Central Hospital

Seven hundred and forty-five newly diagnosed patients with acute leukemias between 1978 and 1990 were classified on the basis of immunological phenotype. The incidence of subclassification of acute leukemias in this study was as follows: 522 patients with ALL (70%), 139 patients with ANLL (18%), 29 patients with biphenotypic leukemia, 8 patients with Ph¹-positive acute leukemia, and 46 patients with infantile leukemia. ALLs were classified into common ALL (77%), T-ALL (15%), B-ALL (4%), and unclassified ALL (3%). Biphenotypic leukemias were categorized into 4 groups as follows; 1) common ALL with positive myelomonocytic antigen(s) (N= 11), 2) unclassified ALL with positive myelomonocytic antigen(s) (N=5), 3) ANLL with positive B-lymphoid antigen(s) (N=4) and 4) acute leukemia with positive T-lymphoid and myeloid antigen(s). Among these 4 groups of biphenotypic leukemia, groups 2 and 4 disclosed a poor prognosis as was reported in infantile leukemia and Ph¹-positive acute leukemia. Many questions regarding the biological and clinical aspects of biphenotypic leukemias still remain to be solved, but the precise and detailed suited subclassifications of acute leukemias will establish an appropriate strategy of therapy.

Key words: biphenotypic leukemia, acute mixed lineage leukemia.