

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-221323  
(P2005-221323A)

(43) 公開日 平成17年8月18日(2005.8.18)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	M	2 GO 4 5
C 1 2 N 5/06	C 1 2 Q 1/02		4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	GO 1 N 33/53	Y	4 B O 6 5
GO 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	E	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2004-28266 (P2004-28266)	(71) 出願人	803000034 学校法人日本医科大学 東京都文京区千駄木1丁目1番5号
(22) 出願日	平成16年2月4日(2004.2.4)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
		(74) 代理人	100076691 弁理士 増井 忠式
		(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137 弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行
		(74) 代理人	100091638 弁理士 江尻 ひろ子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨髄異形成症候群の検出方法

(57) 【要約】

【課題】これまでの種々の検査手段では確実な検出が困難であった骨髄異形成症候群(MDS)あるいは白血病化MDSを確実に検出し、真正の急性骨髄性白血病(de novo AML)と白血病化MDSとの鑑別法を提供すること。

【解決手段】MDSに特異的な細胞集団であるCD45陰性芽球の存在を検出することによって、MDS又は白血病化MDSを診断し、de novo AMLと鑑別する。

MDSに特異的な細胞集団は、CD45が陰性であり、CD13とCD33の陽性率が同一検体中のCD45陽性の骨髄芽球集団と比較して明らかに低下しているCD45陰性芽球である。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

検体中の CD 4 5 陰性芽球の存在を検出することを特徴とする、骨髄異形成症候群 ( M D S ) 又は白血病化 M D S の検出方法。

## 【請求項 2】

検体が、M D S に罹患していることが疑われる患者の末梢血又は骨髄細胞である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

免疫学的方法を用いて、CD 4 5 陰性芽球の存在を検出することを特徴とする、請求項 1 乃至 2 のいずれかに記載の方法。

10

## 【請求項 4】

CD 4 5 陰性芽球が以下のものである、請求項 3 に記載の方法：

CD 1 3 陽性率が同一検体中に見られる CD 4 5 陽性の骨髄芽球集団中の CD 1 3 陽性率と比較して低下しており、更に

CD 3 3 陽性率が同一検体中に見られる CD 4 5 陽性の骨髄芽球集団中の CD 3 3 陽性率と比較して低下している CD 4 5 陰性芽球。

## 【請求項 5】

CD 4 5 陰性芽球が、さらに G P A 陰性かつ CD 3 8 陰性である CD 4 5 陰性芽球である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

フローサイトメトリーを用いることを特徴とする、請求項 3 乃至 5 のいずれかに記載の方法。

20

## 【請求項 7】

以下の (ア) から (エ) の工程を含む、急性骨髄性白血病 ( de novo A M L ) と白血病化 M D S との鑑別法：

(ア) CD 4 5 陰性を検出する工程

(イ) 赤芽球、血小板、形質細胞の混入を判定する工程

(ウ) CD 4 5 陽性の骨髄芽球集団中の CD 1 3 陽性率と比較した CD 1 3 陽性率の低下を検出する工程

(エ) CD 4 5 陽性の骨髄芽球集団中の CD 3 3 陽性率と比較した CD 3 3 陽性率の低下を検出する工程。

30

## 【請求項 8】

CD 4 5 陰性芽球に特異的な抗体を含む M D S 又は白血病化 M D S と de novo A M L の鑑別用キット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、骨髄異形成症候群 ( Myelodysplastic syndromes: M D S ) の診断方法に関し、詳しくは M D S に特異的な細胞集団の検出方法、これらの細胞集団を検出することを特徴とする M D S の検出方法、真正 ( de novo ) の急性骨髄性白血病 ( acute myeloid leukemia; A M L ) と白血病化した M D S との鑑別法、及び前記方法に用いる鑑別用キットに関する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

骨髄異形成症候群 ( M D S ) は、造血幹細胞のクローン性異常による骨髄の機能異常を伴った骨髄異形成と血球減少によって特徴づけられる症候群である。血球減少 ( 貧血、白血球減少、血小板減少等 ) を示す症例があれば、各血球系の形態異常 ( 異形成 ) を確認し、骨髄または末梢血における芽球比率によって判断することが出来る。しかし、しばしば芽球比率が増加し、臨床検査では真正の急性骨髄性白血病 ( de novo A M L ) と区別がつかない白血病化 M D S へと移行する。

50

## 【0003】

de novo AML及び白血病化MDSは、骨髄の造血幹細胞より前駆細胞にかけての未分化なクローン性腫瘍細胞の増殖が起こる白血病である。白血病細胞は正常な前駆細胞としての分化が止まっていたり、異常な分化を示したりする。これらは、腫瘍の増殖速度が速く、週日単位で臨床症状や検査結果等が変化する。そのため、臨床所見からは白血病化MDSかde novo AMLか判別がつかないが、白血病MDSとは異なりde novo AMLは薬剤に対する感受性が高く、速やかな治療が望まれている。

## 【0004】

MDSは貧血等の症状をきっかけに発見(診断)される場合もあるが、症状に乏しい場合も多く、白血病化の後に初めて発見されることも多い。白血病化の後に初めて発見された場合、それがMDSより移行した白血病化MDSなのか、そうでないde novo AMLなのかを鑑別することは困難であり、現状では患者の過去の医療記録等で原因不明の血球減少等があれば白血病化MDSであろうと推測しているに過ぎない(非特許文献1参照)。

10

## 【0005】

最近の疫学調査の結果によれば、MDSの発症頻度は骨髄系腫瘍の中で最多である(非特許文献2参照)。しかしながら、多くの研究にもかかわらず、未だ有用な治療法は確立されておらず、白血病化MDSは治療に不応性のことが多い。一方de novo AMLでは治療に良く反応することが多い。したがって、白血病化MDSであるか、de novo AMLであるかを早期に鑑別することは、その患者の予後推定、治療方針の決定等に重要である。

## 【0006】

de novo AMLとMDSの鑑別を行う方法として、MDSに特異的な遺伝子D1kの発現を検出することによる分子診断法(特許文献1参照)が開示されている。しかし、この方法は、遺伝子発現又は発現産物のレベルを指標とし、DNAマイクロアレイや二次元電気泳動を使用する複雑な方法であり、感度も低い。

20

## 【0007】

近年、ヒト細胞表面抗原に対する多数のモノクローナル抗体の開発と、これらを用いたフローサイトメトリー(flow cytometry: FCM)により、造血器腫瘍細胞の検出、特に白血病の診断が可能となった。

## 【0008】

FCMとは、個々に遊離した細胞を蛍光色素で染色した後に細い管を通過させる際、レーザー光線を当ててその細胞から発生する蛍光の強弱及び散乱光等の情報により、細胞の大きさ、相対的なタンパク量、抗原量、DNA量等を測定する方法である。コンピュータを組み合わせることにより、細胞の数と蛍光の強弱等の2つのパラメータによるヒストグラム、スキャッターグラム、3つのパラメータによる三次元表示等も行われる。浮遊細胞を測定するため、一度に多数の細胞の解析が可能である。

30

## 【0009】

FCMで白血病細胞を分析する場合、白血病細胞が他の細胞とはっきり区別が出来る場合は問題が無いが、他の細胞のサイトグラムとオーバーラップして何処をゲーティングしてよいかわからない場合や、白血病細胞の数が減少している場合等は、白血球共通抗原であるCD45抗原の発現が弱いという特徴を利用した、CD45-SSCパラメーターdot-plotを用いたゲート設定法(CD45 blast gating法)が普及してきている。CD45 blast gating法は、CD45抗原が弱発現である分化レベルの未熟な急性白血病細胞と、CD45抗原が強発現である正常成熟細胞とを明確に分離することができるため、精度の高い白血病細胞表面抗原解析を行うことができる(非特許文献3参照)が、このときCD45抗原に注目したのは、あくまでも白血病細胞を特定するために過ぎなかった。

40

## 【0010】

さらに、CD45以外の細胞表面抗原の発現パターンによって白血病細胞を検出する方法(特許文献2参照)も報告されている。

【特許文献1】特開2001-269174号公報

【特許文献2】特開2000-241427号

50

【非特許文献1】Smith MT, Linet MS, Morgan GJ. Causative agents in the etiology of myelodysplastic syndromes and the acute myeloid leukemias. In "The Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management" edited by Bennett JM. Publisher: Marcel Dekker, Inc., 2002 pp29-63

【非特許文献2】Aul C, Giagounidis A, Germing U. Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. Int J Hematol. 2001; 73(4): 405-10

【非特許文献3】Borowitzら, Am. J. Clin. Pathol 100, 534-540, 1993

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0011】

本発明の課題は、これまでの種々の検査手段では検出することができなかつたか、確実な検出が困難であったMDSあるいは白血病化MDSを確実に検出し、de novo AMLと白血病化MDSとの鑑別法を提供することである。更に、前記鑑別方法に使用するキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明者らは上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、MDSに特異的な細胞集団であるCD45陰性芽球の存在を見出し、この細胞集団を検出することで、de novo AMLと白血病化MDSを鑑別できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

20

【0013】

即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

(1) 検体中のCD45陰性芽球の存在を検出することを特徴とする、骨髄異形成症候群(MDS)又は白血病化MDSの検出方法。

(2) 検体が、MDSに罹患していることが疑われる患者の末梢血又は骨髄細胞である、(1)に記載の方法。

(3) 免疫学的方法を用いて、CD45陰性芽球の存在を検出することを特徴とする、(1)乃至(2)のいずれかに記載の方法。

(4) CD45陰性芽球が以下のものである、(3)に記載の方法：

CD13陽性率が同一検体中に見られるCD45陽性の骨髄芽球集団中のCD13陽性率と比較して低下しており、更に

30

CD33陽性率が同一検体中に見られるCD45陽性の骨髄芽球集団中のCD33陽性率と比較して低下しているCD45陰性芽球。

(5) CD45陰性芽球が、さらにGPA陰性かつCD38陰性であるCD45陰性芽球である、(4)に記載の方法。

(6) フローサイトメトリーを用いることを特徴とする、(3)乃至(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 以下の(ア)から(エ)の工程を含む、急性骨髄性白血病(de novo AML)と白血病化MDSとの鑑別法：

(ア) CD45陰性を検出する工程

40

(イ) 赤芽球、血小板、形質細胞の混入を判定する工程

(ウ) CD45陽性の骨髄芽球集団中のCD13陽性率と比較したCD13陽性率の低下を検出する工程

(エ) CD45陽性の骨髄芽球集団中のCD33陽性率と比較したCD33陽性率の低下を検出する工程。

(8) CD45陰性芽球に特異的な抗体を含むMDS又は白血病化MDSとde novo AMLの鑑別用キット。

【発明の効果】

【0014】

本発明を用いれば、白血病化MDSとde novo AMLの鑑別を速やかに行うことができる。白

50

血病化MDSとde novo AMLとでは治療方針が異なるため、両者の鑑別が速やかに行えれば、患者の予後推定、治療方針の決定等に非常に重要である。

【0015】

以下、本発明を詳細に説明する。

【発明の実施の形態】

【0016】

本発明においてMDSとは、造血幹細胞のクローン性異常による骨髄の機能異常を伴った骨髄異形成と血球減少によって特徴づけられる症候群である。血球減少（貧血、白血球減少、血小板減少等）を示す症例があれば、各血球系の形態異常（異形成）を確認し、骨髄または末梢血における芽球比率によって判断することが出来る。しかし、しばしば芽球比率が増加し、臨床検査では真正の急性骨髄性白血病（de novo AML）と区別がつかない白血病化MDSへと移行する。

10

【0017】

一方、de novo AML及び白血病化MDSは、骨髄の造血幹細胞より前駆細胞にかけての未分化なクローン性腫瘍細胞の増殖が起こる白血病である。白血病細胞は正常な前駆細胞としての分化が止まっていたり、異常な分化を示したりする。これらは、腫瘍の増殖速度が速く、週日単位で臨床症状や検査結果等が変化する。そのため、臨床所見からは白血病化MDSかde novo AMLか判別がつかないが、白血病MDSとは異なりde novo AMLは薬剤に対する感受性が高く、速やかな治療が望まれている。

【0018】

本発明において、MDSに罹患していることが疑われるとは、MDS（白血病化MDSを含む）あるいはde novo AMLのいずれかに罹患しているが、そのいずれに罹患しているのかは不明の状態であることをいう。

20

【0019】

MDSを検出するのに用いられる試料として好適なものは、MDSに罹患していることが疑われる患者から採取した検体であって芽球に富むものであり、例えば、末梢血もしくは骨髄細胞等が挙げられる。

【0020】

骨髄細胞、または末梢血の採取方法としては、患者への侵襲度の低い方法であればいかなる方法でも良い。例えば骨髄細胞の場合、局所麻酔の後、背中側の腸骨（骨盤骨）から骨盤穿刺針を用いて注射器で吸引する等、一般的な方法が用いられる。

30

【0021】

検体採取時にはヘパリン等の抗凝固剤を加え、採取後速やかに用いることが好ましい。しかし、末梢血はそのまま、骨髄穿刺液は10% FCS加RPMI-1640に浮遊させ、4以下にて24時間まで保存しておくことができる。また、4～80、好ましくは-20から-70の低温条件下で24時間以上保存しておくこともできる。保存に際しては、変性等を抑制するような保存剤や、腐敗を防止するための防腐剤等を必要に応じて添加しても良い。

【0022】

採取した検体はそのまま用いることもできるが、検体中の芽球比率が低い場合には、適切な試薬を用いて芽球比率を高めてから、解析に用いることができる。芽球比率を高めるための適当な試薬としては、例えば、本願発明者らが開発した芽球精製法に基づき商品化されたBlastretriever（登録商標）試薬（日本抗体研究所、高崎）等が挙げられる。検体中の芽球比率はサイトスピン標本を顕微鏡下に観察する等の方法によって測定することができる。芽球比率が低いとは、検体中の芽球の比率が一定以下、例えば全血球に対して芽球が30%以下であることをいう。芽球比率が一定以上ある検体について、定法により、混入赤血球の溶血作業をおこなう。

40

【0023】

上記検体を用いてMDSに特異的な細胞集団を検出する。MDSに特異的な細胞集団は、検体に含まれる特定の芽球の集団であり、MDSとしての特異性はその芽球集団の抗原

50

発現により特徴付けられる。具体的には、MDSに特異的な細胞集団は、CD45陰性の芽球（本明細書中でCD45陰性芽球と称する）である。

【0024】

さらに、MDSに特異的な細胞集団は、CD13陽性率が同一検体中に見られるCD45陽性の骨髄芽球集団中のCD13陽性率と比較して低下しており、更にCD33陽性率が同一検体中に見られるCD45陽性の骨髄芽球集団中のCD33陽性率と比較して低下している。本発明において、CD13陽性率とは、解析対象の芽球集団中でCD13陽性芽球の占める比率をいう。CD33陽性率についても同様である。すなわち、MDSに特異的な細胞集団であるCD45陰性芽球の集団では、同一検体中のCD45陽性の骨髄芽球集団と比較して、CD13陽性芽球及びCD45陽性芽球の占める比率がそれぞれ低下している。この比率がCD45陰性芽球の集団においてCD45陽性の骨髄芽球集団よりも低い数値となっていれば低下していると判断されるが、好ましくは30%以上、更に好ましくは50%以上、更に好ましくは70%以上低下していればより確実である。

10

【0025】

赤芽球、血小板、形質細胞等の混入がない検体の場合においては、このようにCD45が陰性であり、さらにCD13陽性率とCD33陽性率がCD45陽性の骨髄芽球集団におけるものと比較して低下しているということが、MDSに特異的な細胞集団として必要にして十分な特徴である。

【0026】

CD45陰性の細胞集団には、赤芽球、血小板、形質細胞が混入していることがあるため、確実な検出のためにはこれらの混入細胞の存在を確認しなければならない。そのためには、末梢血等赤芽球や形質細胞のほとんど含まれない検体を解析するか、以下の方法により、MDSに特異的な細胞をこれらの混入細胞と区別して解析するのがよい。

20

【0027】

赤芽球や血小板はいずれもCD45陰性または弱陽性であるが、細胞の大きさや特徴的な抗原の相違を利用してMDSに特異的な細胞と区別することができる。例えば、血小板は通常の細胞よりも小さいこと、特徴的な抗原として赤芽球に発現するGPA（Glycophorin A）や形質細胞に発現するCD38に着目することにより、MDSに特異的な細胞とこれらの混入細胞を区別することができる。具体的には、例えば、上述の、CD45陰性かつCD13陽性率及びCD33陽性率がCD45陽性の骨髄芽球集団と比較して低下しているという特徴に加えてさらにGPAとCD38が陰性であることをもって、MDSに特異的な細胞集団の特徴とすることができる。

30

【0028】

このような抗原発現の特徴により、MDSに特異的な細胞集団を検出することができる。検出の方法としては、抗原の発現および細胞の大きさを判別することのできる方法である必要があるため、上述したCD45、CD13、CD33、GPA、CD38等のヒト造血系抗原に特異的な抗体を用いた免疫学的方法を用いるのがよい。

【0029】

免疫学的方法としては、細胞を用いて抗原の存在を検出することのできる方法であれば特に限定はされないが、実際の臨床現場において、簡便にかつ迅速に多量の試料を同時に測定できるという利点から、好適にはFCMを用いて複数の蛍光標識抗体を組合わせて検査を行うのが好ましい。

40

【0030】

FCMの操作方法は公知の方法（例えば、野村和弘ら編「フローサイトメトリー～手技と実際～」1984年，蟹書房、河本圭司ら編「フローサイトメトリー入門」1989年，医学書院、河本圭司ら編「応用サイトメトリー」2000年，医学書院）に準じて行うことができる。

【0031】

また、FCMで用いる蛍光標識には、FITC（Fluorescein isothiocyanate）やPE（phycoerythrin）、APC（Allophycocyanin）、PerCP（peridinin chlorophyll）、

50

E C D (phycoerythrin-Texas Red)、P C 5 (phycoerythrin-cyanin5.1)、P C 7 (phycoerythrin-cyanin7) 等一般的に市販されている蛍光標識を用いることが出来、これらの組み合わせは自由に行うことができる。

【0032】

また、FCMは3カラー又は4カラー解析法によって行うことができるが、4カラー解析法によればより効率よく解析を行うことができる。

FCMを用いた場合、本発明において、CD45陰性芽球とは以下のように同定した細胞をさす。すなわち、まず側方散乱 (side scatter:SSC) と前方散乱 (forward scatter:FSC) で展開したプロットにおいて、血小板や破砕細胞等を除外した所謂生細胞にゲートをかける (図1-1で言えばR1にあたる)。

10

【0033】

これと平行して、CD45に対する陰性コントロール抗体 (Mouse IgG) でのみ染色した細胞検体を、CD45とSSCで展開した際に、少なくとも95%以上、より好ましくは97%以上の細胞がおさまるCD45の蛍光強度の範囲をCD45陰性と判定し、基準線を設定する。本発明においてCD45陰性 (CD45<sup>-</sup>) とはこの基準線より左側に位置することを意味し、CD45陽性 (CD45<sup>+</sup>) とは右側に位置することを意味する。またCD45弱陽性 (CD45<sup>±</sup>) とはこの基準線上にまたがることを意味する。

【0034】

次にR1ゲート内の細胞をPerCP標識CD45抗体 (CD45-PerCP) とSSCで展開した際に検出される、SSCが低くかつCD45陰性 (CD45<sup>-</sup>) の細胞集団が、CD45陰性芽球である。

20

【0035】

MDS患者から採取した検体におけるCD45陰性芽球のゲーティング例を図4-1に示す。SSCとFSCで展開したプロットにおいてゲーティングされた解析対象の細胞集団がR1と表示されたクラスターである。R1に含まれる細胞を展開して同定されたR3と表示されたクラスターを、CD45<sup>-</sup>またはCD45<sup>-/±</sup>の細胞集団として、さらに分離する。FCMで得た情報からR1およびR3を満たす情報をコンピューター上で抽出し解析することにより、MDSに特異的な細胞集団であるCD45陰性芽球の集団を同定できる。なお、R1およびR2を満たす情報がCD45陽性の骨髄芽球集団の情報である。

【0036】

このように、MDSに罹患していることが疑われる患者から採取した末梢血又は骨髄細胞を処理し、FCMを用いて適当な蛍光標識抗体を組合わせた検査を行い、同一症例の骨髄芽球の造血系抗原の発現と比較して判定することにより、MDSとde novo AMLを鑑別することができる。

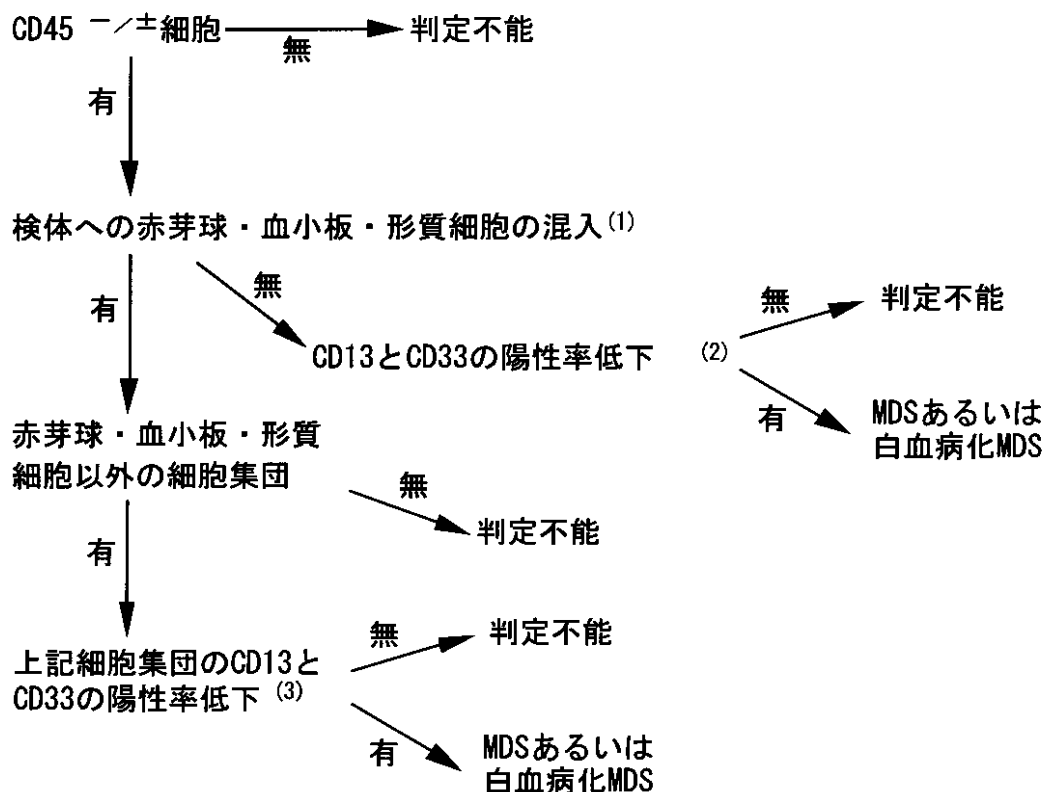
30

【0037】

この判定は、以下のフローチャートに従って行うことができる。

【0038】

【化1】



10

20

- (1) GPA, CD38、細胞の大きさなどで判定。なお赤芽球・血小板・形質細胞の混入が無い軽度な検体が利用可能であれば解析を単純にできる。
- (2) 同一症例の骨髓芽球のCD13, CD33の発現と比較し判定する。通常CD38の陽性率低下を伴う。
- (3) 例えば、細胞にGPA-FITC, CD38-FITC, CD13-PEの3抗体を加え、FITC陰性細胞のCD13の発現を評価する。同様にCD13-PEの代わりにCD33-PEを使用しCD33の発現を評価する。

30

【0039】

R1のCD45とSSCで展開した図において、CD45<sup>-</sup>またはCD45<sup>+/±</sup>の細胞集団を認めた場合、MDSあるいは白血病化MDSの可能性ありとして、次に赤芽球、血小板、形質細胞の混入をGPA、CD38の発現や細胞の大きさ等により調べる。赤血球、血小板、形質細胞の混入が無い軽度な検体であれば、そのままCD13とCD33のそれぞれの陽性率低下を同一症例のCD45陽性の骨髓芽球集団のCD13とCD33の発現と比較し、MDSあるいは白血病化MDSの可能性があると判定することができる。CD13陽性率とCD33陽性率の低下は、通常CD38陽性率の低下を伴う。CD13陽性率低下とCD33陽性率低下が見られた場合は、MDSあるいは白血病化MDSの可能性ありとする。赤芽球、血小板、形質細胞の混入のある場合は、赤芽球、血小板、形質細胞以外の細胞集団について、CD13とCD33の陽性率低下を調べる。例えば、CD45抗体としてCD45-PerCPを用いた場合では、さらに細胞にGPA-FITC、CD38-FITC、CD13-PEの3抗体を加え、FITC陰性細胞のCD13の発現を評価する。同様にCD13-PEの代わりにCD33-PEを使用し、CD33の発現を評価する。

40

【0040】

上述のように、本発明の方法によりMDSを検出するのに用いられる試料として好適なのは、MDSに罹患していることが疑われる患者から採取した検体である。しかしながら

50

、実際の臨床現場においてはMDS（白血病化MDSを含む）あるいはde novo AMLのいずれかであろうと判断される以前の検体を扱う必要も生ずることがある。また、検体の採取状態によって、FCM解析の邪魔をする物質が混入することもある。このような検体を用いた場合であっても、MDSに特異的な細胞集団を確実に検出するために、上記の抗体に加えて、CD34、CD11b、CD15、CD2、CD3、CD10、CD19、CD20、CD44、CD7、CD56、CD117、CD133、CD41a、CD123、HLA-DR等の一般的なマーカーを用いて解析を行ってもよい。これらの抗体を使用することにより、検出の精度を高め、より確実な診断をすることが可能となる。

#### 【0041】

例えば、誤って急性リンパ性白血病の検体を検査した場合、CD2、CD3、CD10、CD20等が陽性となり、MDSに罹患していることが疑われる患者ではないことが判明する。また、骨髓芽球のゲーティングが困難な試料においてもCD34を使用することで骨髓芽球を明確にゲーティングができる。また、血小板は色々な細胞に対して付着しやすい性質があるため、MDSに特異的な細胞に血小板が付着し、見かけ上血小板抗原（CD41a等）陽性を示すことがある。この場合、さらに細胞の大きさ、CD44の発現（血小板は陰性または弱陽性、MDS特異的細胞は陽性を示す場合がある）等で、MDS特異的細胞の存在を確認してもよい。

#### 【0042】

本発明はさらに、CD45陰性芽球に特異的な抗体を含むMDS又は白血病化MDSとde novo AMLの鑑別用キットを提供する。CD45陰性芽球に特異的な抗体としては、上述のように、CD45、CD13、CD33、GPA、CD38、CD44等のヒト抗原に対するモノクローナル抗体を用いることができる。

#### 【0043】

検出法において標識剤として酵素を用いる場合には、本発明のキットは下記の構成試薬を含むことができる。

- (1) 酵素標識化モノクローナル抗体
- (2) 基質溶液

また、上記キットの変形としてサンドイッチELISA法を用いる場合には、本発明のキットは下記の試薬を含むことができる。

#### 【0044】

- (1) モノクローナル抗体
- (2) 酵素標識化モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体
- (3) 基質溶液

また、上記キットの変形としてビオチン-アビジン法を用いる場合には、本発明のキットは下記の試薬を含むことができる。

#### 【0045】

- (1) ビオチン化モノクローナル抗体
- (2) 酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン
- (3) 基質溶液

また、上記キットの変形としてサンドイッチELISA法及びビオチン-アビジン法を用いる場合には、本発明のキットは下記の試薬を含むことができる。

- (1) モノクローナル抗体
- (2) ビオチン化モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体
- (3) 酵素標識化アビジン又はストレプトアビジン
- (4) 基質溶液

本発明に使用するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体の詳しい作製方法については公知の方法（例えば、富山朔二ら編「単クローン抗体実験マニュアル」1987年，講談社、右田俊介ら翻訳「免疫化学実験法」1992年，西村書店）に準じて行うことができる。

#### 【0046】

以下本発明を実施例により更に詳細に説明するが、本発明の範囲はこれら実施例に何等

限定されるものではない。

【実施例】

【0047】

1. 検体の採取

検体としては、ヒトの骨髄液または末梢血を用いた。これらの検体は、MDSまたはde novo AMLが疑われる患者に採取及び研究目的の使用について十分に説明を行い、同意を得られたあとに用いた。検体採取の際には抗凝固剤としてヘパリンを添加した。

【0048】

2. 検体の調製

末梢血はそのまま使用し、骨髄穿刺液は10% FCS添加RPMI-1640で2~3倍に希釈する。このとき、検体中の芽球比率が低い場合は、Blastretriever(登録商標)試薬を用いて芽球比率を高めた。

【0049】

Blastretriever(登録商標)試薬を用いて芽球比率を高める方法は、試薬の使用説明書に準じて行う。すなわち、ガラス試験管にBlastretriever(登録商標)試薬を入れ、ヘパリン加末梢血あるいは3~5倍に希釈したヘパリン加骨髄穿刺液を重ね、これを10分間(550xg、室温)遠心分離し、中間層に残った細胞を回収した。

【0050】

3. 染色及び測定

検体を溶血剤(NH<sub>4</sub>Cl 8.26g、KHCO<sub>3</sub> 1.00g、EDTA-4NA/LWD 0.04g)を用いて室温にて5分間インキュベーションを行い、混入赤血球の溶血操作を行った後、リン酸緩衝生理食塩水(PBS: 0.1% BSA、0.1% アジ化ナトリウム)にて細胞濃度を1×10<sup>6</sup>/mlに調製した。調製した検体を100μlずつFCM用チューブに分注し、以下の蛍光標識抗体の組合わせに準じ染色後、FCMでデータを収集した。

【0051】

抗CD45抗体に2種の抗体を組合わせ3カラー解析法で解析する場合、分注した検体をそれぞれ異なる標識で染色を行う。今回は、peridin chlorophyll(PerCP)で標識した抗CD45抗体(Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いたため、その他の抗体をfluorescein isothiocyanate(FITC)標識抗体とphycoerythrin(PE)標識抗体で染色した。用いるFITC標識抗体とPE標識抗体は、CD3、CD5、CD8、CD15、CD16、CD19、CD25、CD34、HLA-DR、CD4、CD11b、CD13、CD14、CD34、CD2、CD7、CD20、CD33、CD56、CD10、CD117、GPA等3種の抗体を、例えばCD45/CD34/CD38、CD45/GPA/CD13、CD45/CD15/CD33、CD45/HLA-A, B, C/CD41a、CD45/CD44/CD41a等適宜組み合わせて測定を行った。

【0052】

抗CD45抗体に他の3種の抗体を組合わせ4カラーFCMで解析する場合、抗CD45抗体および検体の使用量をそれぞれ節約しつつ、同時に診断を行うことができる。

FCMによる測定は、FACScan(Becton Dickinson)を用いて定法に従って3カラー解析法で施行した。

【0053】

4. フローサイトメトリーによるCD45陰性芽球の同定に基づくde novo AMLと白血病化MDSの鑑別

次に、収集したFCMデータをCD45発現とSSCで展開し、以下の手順に従って、骨髄芽球の細胞集団の他にMDSに特異的な細胞集団があるかどうかを判定した。

(1) CD45とSSCで展開したプロットにおいて、骨髄芽球の細胞集団とは別に、よりCD45発現の弱い(通常CD45陰性であるが、一部ごくわずかに陽性の場合もある)細胞集団(以降この細胞をCD45<sup>-</sup>±細胞と称する)を確認する。

(2) CD45<sup>-</sup>±細胞集団は同一症例の骨髄芽球に比べ、必ずCD13とCD33の陽性率が低下している。また、通常CD38の陽性率も低下している。

10

20

30

40

50

(3) CD45<sup>+</sup>±細胞集団はT細胞マーカー(CD2、CD3等)陰性、B細胞マーカー(CD10、CD19等)陰性である。

(4) CD45<sup>+</sup>±細胞集団には赤芽球、血小板、形質細胞が混入していることがあるため、CD45<sup>+</sup>±細胞集団にこれら以外に造血系抗原陰性芽球が存在することを確認する必要がある。そのためには、(A)末梢血等赤芽球、形質細胞のほとんど含まれない検体を解析する、(B)GPA(赤芽球に発現)、CD38(形質細胞に発現)等に対する抗体に対する反応や細胞の大きさ(血小板は通常の細胞より小さい)をフローサイトメトリーで評価する、等が必要である。

#### 【0054】

De novo AMLではこの特異的細胞集団は存在しないか、あっても1%以下であることから、de novo AMLと白血病化MDSの鑑別を行うことができる。

5. フローサイトメトリーにより、MDSとde novo AMLを鑑別した結果  
実際の症例において解析した例を図1～図6に示す。

#### 【0055】

図1はde novo AMLの症例番号1のFCMパターンである。図1-1がサイトグラムであり、図1-2がCD45陰性コントロールの図である。図1-3は、R1をCD45とSSCで展開した図であり、図1-2の陰性コントロールによってCD45基準線を設定した。この基準線より右に位置するのがCD45陽性細胞となる。de novo AMLにおいては、CD45陰性細胞集団は殆ど認められないが、MDSと比較するためにあえてR3としてターゲティングを行った。図2はde novo AMLにおけるCD45陽性骨髄芽球の抗原解析であり、図2-1が陰性コントロールの図である。この陰性コントロールによって、各抗原解析図の基準線を決定した。CD13、CD33、GPA、CD38のそれぞれの陽性率を図の下に表わした。また、図3は同様にde novo AMLにおけるCD45陰性領域細胞の抗原解析である。

#### 【0056】

図4はMDSの症例番号7のFCMパターンである。図1と同様に、図4-1がサイトグラムであり、図4-2がCD45陰性コントロールの図である。図4-3は、R1をCD45とSSCで展開した図であり、図4-2の陰性コントロールによってCD45基準線を上記と同様に設定した。MDSにおいては、de novo AMLとは異なり、CD45陰性細胞集団が認められる。図5はMDSにおけるCD45陽性骨髄芽球の抗原解析であり、図5-1が陰性コントロールの図である。図2と同様にこの陰性コントロールによって、各抗原解析図の基準線を決定した。CD13、CD33、GPA、CD38のそれぞれの陽性率を図の下に表わした。また、図6は同様にMDSにおけるCD45陰性芽球の抗原解析である。

#### 【0057】

同じように臨床症状によってde novo AMLと診断された症例を5件、MDSと診断された症例6件においても同様にFCMパターンを展開し、CD45陰性芽球の検出を行った。これらの症例においては、CD34、CD11b、CD15、CD2、CD3、CD10、CD19、CD7、CD56、CD117、CD133、CD41a、CD123、HLA-DR等のヒト抗原に対する抗体による解析も行い、de novo AMLあるいは骨髄異形成症候群(MDS)又は白血病化MDSとしての特徴的な形質の存在を確認した。

#### 【0058】

各症例におけるCD45とSSCプロットでのCD45陰性細胞集団の有無とそれぞれの抗体に対する判定結果及びそれらのデータより導かれるCD45陰性芽球の有無の判定結果を表1に示した。

#### 【0059】

10

20

30

40

【表 1】

表 1

試料名	CD45とSSC プロット でのCD45 陰性集団	骨髄芽球との比較		GPA	CD38	CD45陰性 芽球の有 無の判定	
		CD13	CD33				
de novo AML	1	×	+	-	+	×	
	2	×	-	-	+	×	
	3	×	-	+	-	×	
	4	×	-	±	-	×	
	5	×	±	-	-	×	
	6	×	+	+	-	+	×
MDS	1	○	-	-	-	○	
	2	○	-	-	-	○	
	3	○	-	-	-	○	
	4	○	-	-	-	+	○
	5	○	-	-	-	-	○
	6	○	-	±	-	-	○
	7	○	-	-	-	-	○

10

20

## 【0060】

表 1 は de novo AML と臨床症状から診断された症例 6 例と、MDS または白血病化 MDS と臨床症状から診断された症例 7 例を示す。CD45 と SSC プロットにおいて CD45 陰性細胞集団の存在を確認したときは ○ を、存在しなかったときは × を記載した。

## 【0061】

また、表中の CD13 及び CD33 欄は CD45 陽性骨髄芽球に比べて CD45 陰性骨髄芽球のそれぞれの抗体に対する陽性率が高かったとき + を、あまり変わらなかったときは ± を、明らかに低かったときは - を記載した。

30

## 【0062】

GPA 及び CD38 はそれぞれ陽性であったときは + を、境界上にあつたときは ± を、陰性であったときは - を記載した。

これらの測定結果から、CD45 陰性芽球の存在を確認できたときは ○ を、確認できなかったときは × を記載した。

## 【0063】

de novo AML では CD45 と SSC で展開したプロットにおいて CD45 陰性細胞集団が確認できなかったのに加え、あえて解析した CD45 陰性領域の細胞は CD45 陽性骨髄芽球に比べて CD13 および CD33 の発現低下を示さなかった。

40

## 【0064】

MDS では CD45 と SSC で展開したプロットにおいて CD45 陰性細胞集団が確認でき、CD13 及び CD38 の陽性率が CD45 陽性骨髄芽球集団の陽性率と比較して低下していた。症例 6 において ± と記載しているのは、CD33 の陽性率が CD45 陽性骨髄芽球及び CD45 陰性芽球の双方とも 5 以下ととても低く比較が難しかったためであり、細胞の表面形質は明らかに陰性であった。

## 【0065】

以上の結果から、臨床症状等から明らかに de novo AML と診断された症例においては CD45 陰性芽球は検出されず、MDS または白血病化 MDS と診断された症例からは CD45 陰性芽球を検出することが出来た。

50

【産業上の利用可能性】

【0066】

本発明の細胞集団はMDSに特異的に現れることから、これを検出することで白血病化MDSとde novo AMLを鑑別することができる。白血病化MDSは治療に不応性であるが、de novo AMLでは治療に良く反応するため、この両者を鑑別することは患者の予後推定、治療方針の決定等に重要である。本発明の鑑別方法を用いることにより、診断の初期に白血病化MDSとde novo AMLを鑑別し、適切な治療戦略の構築が可能となる。本発明の鑑別方法をその他の診断方法と組み合わせると鑑別をさらに確実なものとする事ができる。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】フローサイトメトリにより、de novo AMLを展開した図を示す。(症例番号：de novo AML 1)

【図2】de novo AMLにおけるCD45陽性の骨髄芽球の抗原解析図を示す。(症例番号：de novo AML 1)

【図3】de novo AMLにおけるCD45陰性領域細胞集団の抗原解析図を示す。(症例番号：de novo AML 1)

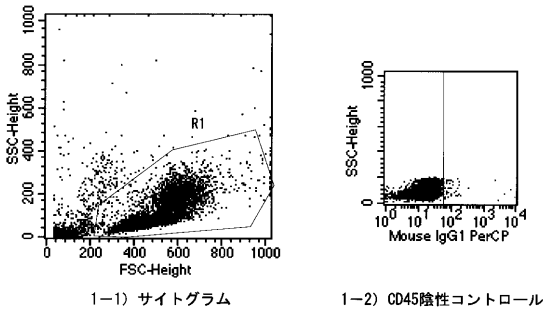
【図4】フローサイトメトリにより、MDSを展開した図を示す(症例番号：MDS 7)。

【図5】MDSにおけるCD45陽性の骨髄芽球の抗原解析図を示す。(症例番号：MDS 7)

【図6】MDSにおけるCD45陰性芽球の抗原解析図を示す。(症例番号：MDS 7)

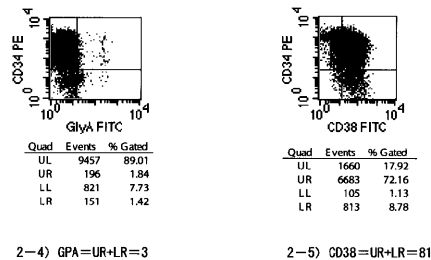
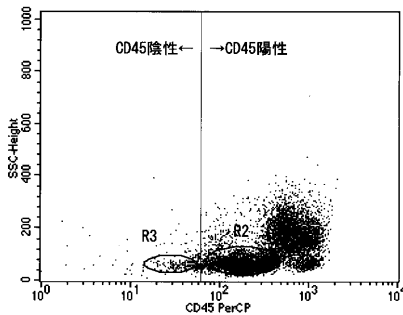
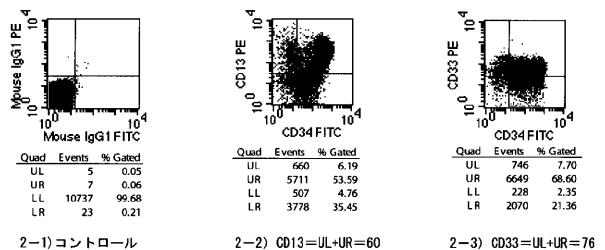
【図1】

de novo AML



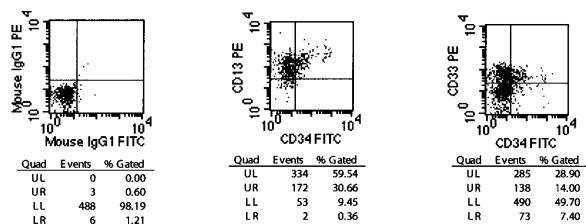
【図2】

de novo AML CD45陽性芽球 (R1 & R2)

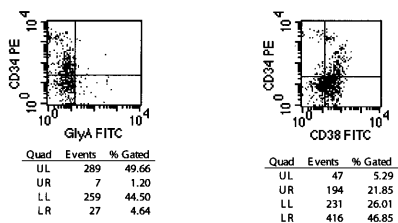


【 図 3 】

de novo AML CD45陰性芽球 (R1 & R3)



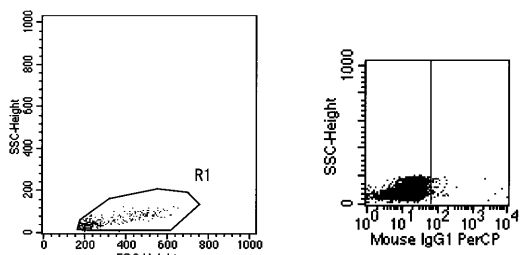
3-1) コントロール      3-2) CD13=UL+UR=90      3-3) CD33=UL+UR=43



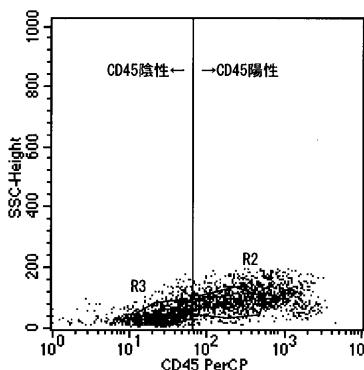
3-4) GPA=UR+LR=6      3-5) CD38=UR+LR=85

【 図 4 】

MDS



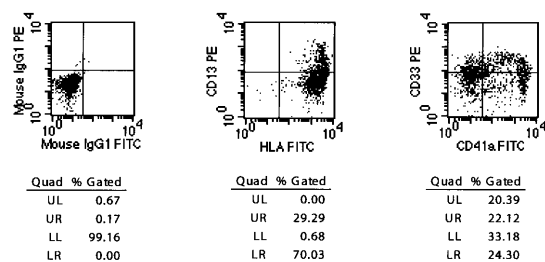
4-1) サイトグラム      4-2) CD45陰性コントロール



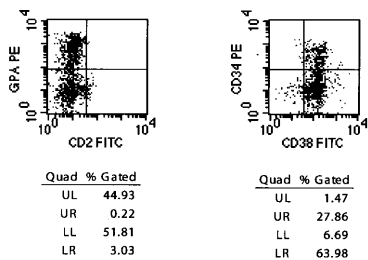
4-3) R1をCD45とSSCで展開した図

【 図 5 】

MDS CD45陽性骨髓芽球 (R1&R2)



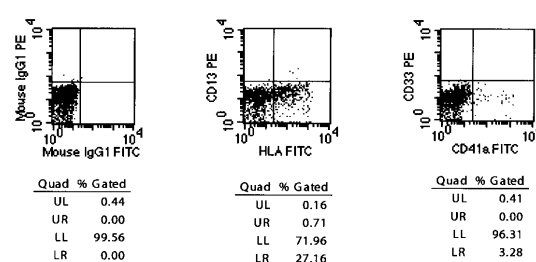
5-1) コントロール      5-2) CD13=UL+UR=29      5-3) CD33=UL+UR=43



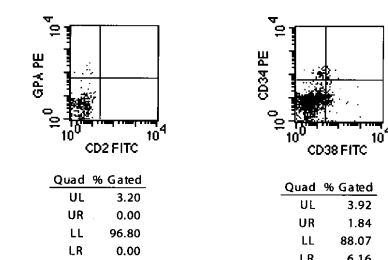
5-4) GPA=UL+UR=45      5-5) CD38=UR+LR=92

【 図 6 】

MDS CD45陰性芽球 (R1&R3)



6-1) コントロール      6-2) CD13=UL+UR=1      6-3) CD33=UL+UR=0.4



6-4) GPA=UL+UR=3      6-5) CD38=UR+LR=8

---

フロントページの続き

(72)発明者 緒方 清行

東京都文京区千駄木1丁目1番5号 日本医科大学内

Fターム(参考) 2G045 CA01 FB03 FB07 JA01

4B063 QA06 QA18 QQ08 QQ79 QR48 QR77 QS33

4B065 AA94X BA21 CA44 CA46

专利名称(译)	检测骨髓增生异常综合征的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005221323A</a>	公开(公告)日	2005-08-18
申请号	JP2004028266	申请日	2004-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	学校法人日本医科大学		
申请(专利权)人(译)	学校法人日本医科大学		
[标]发明人	緒方清行		
发明人	緒方 清行		
IPC分类号	G01N33/48 C12N5/07 C12N5/077 C12Q1/02 G01N33/53 C12N5/06		
FI分类号	G01N33/48.M C12Q1/02 G01N33/53.Y C12N5/00.E C12N5/00.202.G C12N5/077		
F-TERM分类号	2G045/CA01 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/JA01 4B063/QA06 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B065/AA94X 4B065/BA21 4B065/CA44 4B065/CA46		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

需要解决的问题：可靠地检测骨髓增生异常综合征（MDS）或白血病介导的MDS，这是迄今为止用各种检查方法难以可靠检测的，用于检测真正的急性髓性白血病（de novo AML）提供一种歧视MDS的方法。 解决方案：MDS或白血病MDS通过检测CD45阴性母细胞的存在来诊断，CD45阴性母细胞是MDS特异性细胞群，并且区别于从头AML。 MDS特异性细胞群是CD45阴性细胞，其中CD45为阴性，CD13和CD33的阳性率与同一标本中的CD45阳性成髓细胞群相比明显减少。 【选择图】无

試料名	CD45とSSC プロット でのCD45 陰性集団	骨髓芽球との比較		GPA	CD38	CD45陰性 芽球の有 無の判定	
		CD13	CD33				
de novo AML	1	X	+	-	+	X	
	2	X	-	+	-	X	
	3	X	-	+	-	X	
	4	X	-	±	-	X	
	5	X	±	-	-	X	
	6	X	+	+	-	+	X
MDS	1	○	-	-	-	○	
	2	○	-	-	-	○	
	3	○	-	-	-	○	
	4	○	-	-	-	+	○
	5	○	-	-	-	-	○
	6	○	-	±	-	-	○
	7	○	-	-	-	-	○