原 著

急性白血病 FAB 分類の問題点

——特にリンパ球系白血病細胞と骨髄系白血病細胞の鑑別について——

金沢大学医学部第3内科

中村 忍 中西 二 吉田 喬 大竹 茂樹
伊藤 恵子 小林 和美 松田 保

急性白血病 FAB 分類の問題点の1つである, acute lymphoblastic leukemia (L) と acute myeloid leukemia (M) との鑑別について, その精度の向上を目的として, 組織化学的ならびに電子顕微鏡(電顕)的に検討を試みた。

対象症例は, 金沢大学第3内科および関連病院で, 急性白血病と診断された259例である。治療開始前に骨髄塗抹標本を作製し, May-Grünwald-Giemsa (M-G) 染色, Peroxidase (POX) 染色, Sudan black B (SBB) 染色, 3-3'-diaminobenzidine (DAB) 染色および esterase 二重染色を施すとともに, 電顕 POX 反応を行い観察し, 以下の結果を得た。

1. 各種染色法における芽球の陽性率を比較すると, SBB 染色および DAB 染色での陽性率は, POX 反応のそれとよく相関した。
2. SBB 染色では, POX 反応低陽性率例での芽球の陽性率の上昇が認められ, L と M との鑑別が容易になった。
3. DAB 染色による Phi body の出現率は, M-G 染色でのアウエル小体の出現率よりも高く, 本染色は, M の診断に有用と考えられた。
4. 電顕 POX 反応では, 陽性率のより正確な判定が可能であり, L と M との鑑別上有用であることが確認された。

Key words : Acute leukemia—FAB classification—Histochemistry—Electron microscopic peroxidase reaction

I. はじめに

1976年 Bennettら³⁾により提唱された急性白血病 FAB

Evaluation of the FAB classification of acute leukemia with special reference to differential diagnosis between acute lymphoblastic leukemia cells and acute myeloid leukemia cells

Shinobu NAKAMURA, M.D., Jin NAKANISHI, M.D., Takashi YOSHIDA, M.D., Shigeki OHTAKE, M.D., Keiko ITOH, M.D., Kazumi KOBAYASHI, M.D. and Tamotsu MATSUDA, M.D.

The Third Department of Medicine, Kanazawa University School of Medicine

論文別刷請求先 ☎920 金沢市宝町13の1 金沢大学医学部第3内科 中村 忍

昭和61年3月26日受付

昭和61年6月20日受理

分類 (FAB 分類) は, わが国でもしだいに普及し定着しつつある。FAB 分類の目的とするところは, 従来の慣用的分類に比べてより客観的で, しかも, 日常簡単に行うことのできる組織化学的方法を用いて, これらの所見を参考にしながら分類できる方法の確立である。

FAB 分類には, 何回かの改善が加えられてはいる^{4~7)}ものの, まだ, いくつかの問題がある。わが国でも, 種類の検討がなされているが, これまでの問題点のなかで, 特に重要で, 治療法と直接に関係するものは, acute lymphoblastic leukemia (L) と acute myeloid leukemia (M) との鑑別である。FAB 分類では, L と M との鑑別に, peroxidase 反応 (POX 反応) 所見を重視しているが, この鑑別法は, 一見簡便なようであるが, 実際に行ってみると, 判定の困難な例がかなり認められる。

表 1 電顕ペルオキシダーゼ反応法

1) 骨髓片を1.5% グルタルアルデヒド (pH 7.3) にて, 30分振とうし固定後, 細片にする
2) トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) で洗浄する
3) DAB 5mg を含んだ pH 7.6 トリス塩酸緩衝液中で 30分振とうする
4) DAB 5mg を含んだ 0.08% 過酸化水素, pH 7.6 トリス塩酸緩衝液で室温で1時間振とうする
5) 2% オスミウム酸で1時間 30分振とう固定する
6) 60% から 100% アルコール系列で3時間脱水する
7) エポキシ樹脂で包埋し, 超薄切片を作製し, 鉛染色を施し鏡検する

本研究では, L と M との鑑別の精度をより向上させる目的で, 各種染色方法を用いて検討したので, 成績を報告する.

II. 対象および方法

1. 対象症例

症例は, 昭和 55 年 9 月より昭和 60 年 10 月までに, 金沢大学医学部第 3 内科および関連病院で急性白血病と診断された 259 例で, 男性 146 例, 女性 113 例, 年齢は 3 歳から 95 歳までである. 症例は, すべて未治療例で, 骨髓は正形成か, あるいは過形成であるという FAB 分類の基準を満たすものである.

2. 方 法

全例で, 治療開始前に骨髓穿刺を施行し, 塗抹乾燥標本を作製するとともに, 一部の症例では, 電子顕微鏡 (電顕) 用の資料を採取した.

1) 形態学的観察

骨髓塗抹標本の形態学的観察には, FAB 分類で用いられている Romanovsky 染色の 1 つである May-Grünwald-Giemsa 染色 (M-G 染色) を, 型のごとく施した.

2) 組織化学的観察

(1) POX 反応

本反応は, 従来よりリンパ球系細胞と骨髓系細胞の鑑別に繁用されており, また, FAB 分類での L と M との鑑別の基礎となっている検査法である. 本研究では, 最も安定した染色結果の得られる, McJunkin 法を用いた.

(2) Sudan black B 染色 (SBB 染色)

本染色は, 元来脂肪染色法の一つであり, POX 反応とは本質的に異なるが, 両者は同様な所見を呈することから, しばしば白血球の鑑別に用いられている. 骨髓塗抹乾燥標本に型のごとく SBB 染色を施し, 黒色顆粒を有する芽球を陽性と判定した.

表 2 急性白血病 259 例を FAB 分類に従って分類した成績

FAB classification	No. of cases	%
L 1	44	16.9
L 2	24	9.3
L 3	1	0.4
M 1	62	23.9
M 2	47	18.1
M 3	31	12.0
M 4	27	10.4
M 5	18	6.9
M 6	5	1.9
Total	259	

(3) 3-3' diaminobenzidine 染色 (DAB 染色)

本染色は, POX 反応の一種であり, McJunkin 法におけるベンチジンの代わりに, 基質として 3-3' diaminobenzidine を使用する方法で, アウエル小体の前駆物質である Phi body を染色する際に用いられる^{8,10)}. DAB 染色陽性細胞および Phi body は, 褐色調に染まる. 染色方法は, Hanker ら¹⁰⁾の方法を用いた.

(4) Esterase 二重染色

顆粒球系細胞に強陽性を呈する naphthol-AS-D-chloroacetate esterase 染色 (N-AS-D-CI-A-E 染色) および単球系細胞に強く染まる α -naphthyl butyrate esterase 染色 (α -NB-E 染色) の二重染色を施した. なお, 単球系細胞の確認のために, NaF による阻害も行った. 染色方法は, Li ら¹³⁾の手技を用いた.

3) 電顕による観察

骨髓穿刺時に採取した骨髓片を表 1 に示す方法で処理した. つまり, グルタルアルデヒドで固定したのち, POX 反応を施し, 固定, 包埋した. この後, 超薄切片を作製し, 鉛染色を施し鏡検し, 形態学的観察と同時に, POX 反応陽性芽球の出現率を算定した.

III. 成 績

1. FAB 分類に従った分類結果

1976 年に提唱された FAB 分類⁹⁾に従って, 259 例を分類した結果を, 表 2 に示す. 分類は, M-G 染色, POX 反応 (McJunkin 法) および esterase 二重染色の所見に基づいて行った.

259 例中 L は 69 例 (26.6%) で, L1 44 例, L2 24 例, L3 1 例と, L1 が多数を占めていた. M は 190 例 (73.4%) で, M1 62 例, M2 47 例と多く, M5, M6 は比較的少なかった. なお, L と M との鑑別は, FAB 分類に沿い, M-G 染色および POX 反応所見を参考とし, POX

図1 POX反応(McJunkin法)とSBB染色における芽球の陽性率の比較

反応3%以上の例は、Mとして分類した。

芽球中に占めるPOX反応陽性芽球の%と症例数との関係を表3に示す。診断上問題となるPOX反応低陽性率(1~4%)を示した例は、259例中42例(16.2%)であった。

2. POX反応とSBB染色との比較

図1は、骨髄性白血病(M)と診断した症例について、POX反応とSBB染色での芽球の陽性率を比較したもので、同一症例での両者の陽性率を線で結んである。POX反応での陽性率が10%以下の例では、すべての例でSBB染色での陽性率が同じかあるいは高くなっているが、POX反応での陽性率が10%を超える例では、一定の傾向は認められなかった。なお、両者の陽性率の相関係数(r)は0.94となり、高い相関が認められた。

3. POX反応とDAB染色との比較

図2に示すように、POX反応低陽性率例でも、高陽性率例でも、DAB染色では、陽性率の上昇は認められず、むしろ、やや低下傾向を示した。しかし、両者の陽性率には、相関係数(r)0.83と有意な相関が認められた。

表3 芽球のペルオキシダーゼ反応陽性率と症例数との関係

POX positive blasts (%)	No. of cases
0	41+(1)
1	17
2	11+(3)
3	5
4	6
5	3
6~10	6
>10	166
Total	259

(): No. of cases with M5

M-G染色で認められるアウエル小体の陽性例と、DAB染色により認められるPhi bodyの陽性例の比較を、骨髄性白血病(M)72例について検討した結果を表4に示す。アウエル小体陽性例は、72例中38例(52.8%)であるが、Phi body陽性例は、57例(79.2%)と高率で、両者の間には有意な差が認められた。

図2 POX反応(McJunkin法)とDAB染色における芽球の陽性率の比較

表4 DAB染色におけるPhi bodyとM-G染色におけるAuer rodの陽性率の比較

Diagnosis (FAB classification)	No. of cases	DAB	May-Giemsa
		No. of cases with Phi bodies and rods (%)	No. of cases with Auer rods (%)
M1	22	17 (77.3)	12 (34.5)
M2	22	18 (81.8)	14 (63.6)
M3	12	12 (100.0)	11 (91.7)
M4	11	8 (72.7)	1 (9.1)
M5	3	1 (33.3)	0
M6	2	1 (50.0)	0
Total	72	57 (79.2)	38 (52.8)*

Paired t test, * $p < 0.05$

4. POX反応とesterase二重染色の比較

図3に示すように、一部のPOX反応低陽性例では、N-AS-D-CI-A-E染色で陽性率の上昇が認められたが、両陽性率群ともに、必ずしも一定した傾向はみられなかった。なお、両者の陽性率には、相関係数(r) 0.55と弱い相関がみられたのみであった。

5. 電顕POX反応の成績

芽球の電顕POX反応陽性率と、POX反応(McJunkin法)陽性率との比較を表5に示す。13例中4例に、電顕POX反応で陽性率の上昇がみられ、一方、1例(case 7)で逆に低下が認められた。

6. 診断が変更になった症例

上記の方法を用いて検討した結果、FAB分類に沿っ

図3 POX反応(McJunkin法)とN-AS-D-CL-A-E染色における芽球の陽性率の比較

表5 電顕ペルオキシダーゼ反応陽性率と光顕ペルオキシダーゼ反応陽性率との比較

Case	Diagnosis	Positive rate (%)	
		McJunkin	TEM-POX
1	L 1	0	0
2	L 1	2	2
3	L 1	0	1
4	L 1	0	2
5	L 1→M 1	2	14
6	M 1	4	23
7	M 1→L 1	3	2
8	M 1	6	24
9	M 1	96	98
10	M 1	75	92
11	M 3	90	98
12	M 4	24	28
13	M 5	2	2

て診断した症型(表2)から変更になった例が4例あった。表6にその内訳を示す。

case 1は、電顕POX反応陽性率2%と低率であり、芽球の細胞形態に合わせて、M1からL1に変更になった。case 2は、SBB染色の陽性率11%、電顕POX反応

表6 診断が変更になった症例

Case	Diagnosis	Positive blasts (%)		
		McJunkin	SBB	TEM-POX
1	M 1→L 1	3	3	2*
2	L 1→M 1	2	11*	14*
3	L 1→M 1	2	8*	ND
4	M 5→M 4	2	4*	ND

* : Reasons for which the diagnosis was changed
ND : Not done

表7 急性白血病259例の再分類後の成績

Diagnosis	No. of cases	%
L 1	43	16.6
L 2	24	9.3
L 3	1	0.4
M 1	63	24.3
M 2	47	18.1
M 3	31	12.0
M 4	28	10.8
M 5	17	6.6
M 6	5	1.9
Total	259	

の陽性率 14% であったために、また、case 3 も SBB 染色の陽性率が 8% になったために、それぞれ、L1 から M1 に変更になった。case 4 は、当初、 α -NB-E 染色が芽球の 24% に陽性であり、また、POX 反応では 2% と低陽性率であったために、M5 と診断されていた。しかし、SBB 染色で、4% の陽性率を示し、顆粒球系細胞の増加が考えられたため、細胞形態も考慮して M4 に変更になった。

以上の 4 例の変更例も含めて、再分類した結果を表 7 に示す。

IV. 考 察

FAB 分類³⁾が提唱されて以来、約 9 年が経過しているが、急性白血病的分類法としてしだいに定着しつつある。しかし、これまでいく度かの改正^{4,5,7)}ならびに追加⁶⁾が行われているものの、まだ、必ずしも完全な分類法とはなり得ていず、観察者間の診断一致率の向上を図ることに加えて、L と M との鑑別、M2 と M4, 5 との鑑別、L1 と L2 との鑑別などの細胞分類上の問題がある^{2,9,11,16,17)}。特に、L と M との鑑別は、両者の治療法が全く異なることから、きわめて重要な問題である¹⁵⁾。FAB 分類では、M-G 染色による形態学的な観察とともに、POX 反応を重視し、芽球の 3% 以上が POX 反応陽性であれば、M とすると規定している。しかし、今回検討した 259 例のなかでも、POX 反応が低陽性率である例が 16.2% とかなりの率を占めており、このような例では、しばしば診断に迷うこともある。本研究では、一般の施設で日常的な検査の 1 つとして行える簡便な検査法を用いることにより、L と M との鑑別の精度の向上が図れるか否かについて検討した。

まず、FAB 分類で用いられている POX 反応と、ほかの 3 種類の染色法での芽球の陽性率を比較した。SBB 染色は、前述のように、脂質染色法の 1 つであるが、POX 反応と類似の染色態度をとるために、ベンチジンが発癌性の問題から製造中止となった現在、POX 反応に代わるものとして注目されている¹⁾。SBB 染色は、陽性顆粒が黒色に染まるために、陽性、陰性の鑑別が容易であるとの長所を有しているが、POX そのものによる反応ではないために、判定には慎重でなければならない。今回の成績では、McJunkin 法による POX 反応の芽球の陽性率と、SBB 染色の陽性率の間に高い相関が認められ、しかも、ほとんどの POX 反応低陽性率例で SBB 染色の陽性率が上まわり、SBB 染色は、L と M との鑑別、特に、POX 反応が低陽性率であり、判定が困難な例で

は、きわめて有用な染色法となりうると考えられる。

3-3' diaminobenzidine を用いた DAB 染色は、POX 反応の一種で、血液学の分野では、POX と同時にアウエル小体の前駆物質である Phi body を染める方法¹⁰⁾として用いられていて、M-G 染色におけるアウエル小体の陽性率よりも感度がよいとされている⁸⁾。今回の検討では、DAB 染色での芽球の陽性率は、POX 反応のそれよりもむしろやや低下傾向を示し、McJunkin 法を凌駕する成績は得られなかった。しかし、Phi body の陽性率は、アウエル小体の陽性率を有意に上まわり、L と M との鑑別には十分参考になる検査法と考えられる。

Esterase 二重染色、特に、N-AS-D-Cl-A-E 染色は、顆粒球系に特異的に陽性を示すとされ、単球系に陽性を示す α -NB-E 染色との組み合わせにより、顆粒球系細胞と単球系細胞との鑑別に繁用されている。しかし、今回検討した POX 反応との比較では、両者の間に相関は認められず、また、POX 反応に比べて、L と M との鑑別に有用と考えられる成績は得られなかった。したがって、本染色は、L と M との鑑別上は、参考程度に留まるものと考えられる。

以上のような組織化学的検討に加えて、電顕 POX 反応を施行し、光顕 POX 反応との比較を試みた。L と M との鑑別、特に、光顕 POX 反応および SBB 染色低陽性率例における電顕 POX 反応の有用性については、すでにいくつかの報告がなされている^{12,14,15)}。今回の成績でも、光顕 POX 反応陽性率 10% 以下であった 9 例中 3 例に電顕 POX 反応で陽性率の上昇がみられた。また、1 例は、逆に陽性率が低下し、形態と合わせて M から L に変更になった。電顕 POX 反応は、手技が複雑で、結果を得るまでに時間を要するという欠点はあるものの、光顕 POX 反応あるいは SBB 染色が 3% 前後の低陽性率を示す例では、できるだけ実施することが望ましい。

FAB 分類には、まだ種々の問題点はあるが、従来の分類に比較するとかなり客観性をもった分類法といえる。今後、形態学および組織化学的検査に加えて、細胞表面マーカーなどの免疫学的な検査を追加することにより、よりいっそう正確で、細胞の本質に迫る分類が可能になるものと考えられる。

Summary

Although, the FAB classification of acute leukemia has been increasingly used in Japan, there have various problems which have to be resolved. One of the most

important problems of the classification is the difficulty of the differential diagnosis between acute lymphoblastic leukemia (L) and acute myeloid leukemia (M). In this study, in an attempt to increase the accuracy of the diagnosis, bone marrow smears obtained from 259 previously untreated patients with acute leukemia were examined by using histochemical stains—May-grünwald-Giemsa (M-G), peroxidase (POX), Sudan black B (SBB), 3-3' diaminobenzidine (DAB) and esterase. Furthermore, the peroxidase activity in leukemic cells in bone marrow fragments from some of the patients was observed electron microscopically.

Results are as follows:

1. The positive rates of leukemic cells stained by SBB and DAB respectively significantly correlated with that of POX.

2. Most cases with low positive rates of POX in leukemic cells revealed higher positive rates of leukemic cells stained by SBB. This finding made it possible to easily distinguish M from L.

3. Since a higher positive rate of Phi body than that of Auer rod in acute myeloid leukemia was observed, DAB stain is a useful tool for cytologic diagnosis of myeloid leukemia (M).

4. It was confirmed that ultrastructural demonstration of peroxidase activity in leukemic cells is of value in the differential diagnosis between L and M in cases with leukemic cells either negative or only weakly positive for POX and SBB.

文 献

- 1) 阿部和夫・他：Sudan Black B 染色による末梢白血球脂質の染色性と各種 Peroxidase 反応染色度の比較およびその意義，血液と脈管，8：497～502，1977.
- 2) Amaki, I., et al. : FAB classification of acute leukemias correlating with response to chemotherapy, *Acta Haematol. JPN.*, 47 : 206～238, 1984.
- 3) Bennett, J.M., et al. : Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) Co-operative Group, *Br. J. Haematol.*, 33 : 451～458, 1976.
- 4) Bennett, J.M., et al. : The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia : Concordance among observers and clinical correlations, *Br. J. Haematol.*, 47 : 553～561, 1981.
- 5) Bennett, J.M., et al. : Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes, *Br. J. Haematol.*, 51 : 189～199, 1982.
- 6) Bennett, J.M., et al. : Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group, *Ann. Intern. Med.*, 103 : 460～462, 1985.
- 7) Bennett, J.M., et al. : Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group, *Ann. Intern. Med.*, 103 : 626～629, 1985.
- 8) Cardullo, L.D.S., et al. : Significance of Phi bodies in acute leukaemia, *J. Clin. Pathol.*, 34 : 153～157, 1981.
- 9) Dick, F.R., et al. : Diagnostic concurrence in the subclassification of adult acute leukemia using French-American-British criteria, *Cancer*, 49 : 916～920, 1982.
- 10) Hanker, J.S., et al. : Facilitated light microscopic cytochemical diagnosis of acute myelogenous leukemia, *Cancer Res.*, 39 : 1635～1639, 1979.
- 11) 井野晶夫・他：急性白血症における FAB 分類の適用と問題点，臨床血液，25 : 1788～1795，1984.
- 12) Jansson, S.-E., et al. : Classification of acute leukaemia by light and electron microscope cytochemistry, *Scand. J. Haematol.*, 25 : 412～416, 1980.
- 13) Li, C.Y., et al. : Esterases in human leukocytes, *J. Histochem. Cytochem.*, 21 : 1～12, 1973.
- 14) 小川哲平，和田順世：急性白血症 FAB 分類の評価—急性白血症分類の電子顕微鏡による検討—超微細構造とペルオキシダーゼ活性について，臨床血液，23 : 1009～1018，1982.
- 15) Reiffers, J., et al. : Ultrastructural cytochemical prospective study of adult acute lymphoblastic leukemia : Detection of peroxidase activity in patients failing to respond to treatment, *Cancer*, 48 : 927～931, 1981.
- 16) Whittaker, J.A., et al. : Leukaemia classification : a study of the accuracy of diagnosis in 456 patients, *Br. J. Haematol.*, 41 : 177～184, 1979.
- 17) 吉田 喬：急性白血症 FAB 分類の評価—2. 光顕的立場より，臨床血液，23 : 990～1002，1982.