

特発性造血障害におけるウイルス感染

岩崎 琢也 (国立感染症・感染病理部)

佐藤 由子、片野 晴隆、安藤 靖恭

旭 泰子、谷口貴代美、倉田 毅

(国立感染症・感染病理部)

【はじめに】

特発性造血障害ならびに特発性血小板減少症の発症ならびにその臨床経過に關与するウイルスをあきらかにすることを目的として、臨床検体を対象として既知ならびに新規のウイルスについて検討を行っている。ウイルスに対する造血幹細胞の感受性として、赤芽球系には human parvovirus B19 (B19) が感染することが、臨床検体ならびに培養細胞系にて明らかにされ、さらに、骨髓・巨核球系にはヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒトヘルペスウイルス6 (HHV6) が感染しうることが末梢血由来の細胞で示しだされている。さらに、骨髓組織にはリンパ系細胞も存在するが、これらのリンパ系細胞には HTLV/ATL、HIV、麻疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス (VZV)、EBウイルス、HCMV、HHV6、ヒトヘルペスウイルス7 (HHV7)、ヒトヘルペスウイルス8 (HHV8) 等が感染することが、さらに、最近、骨髓間質細胞に HCMV が感染することも、培養細胞系の解析により明らかにされている。

今年度は既知のウイルスの關与について主として解析している。

【対象と方法】

臨床検体の収集：特発性造血障害の厚生省研究班 (主任：昭和大学小峰光博教授) に文書をもって、当該疾患の骨髓ならびに血液標本を依頼し、送付をうけた。また臨床医・病理医よりも依頼をうけた検体を解析対象とした。現在までに、再生不良性貧血 (17例)、pure red cell anemia (6例)、myelodysplastic syndrome (MDS) (46例)、溶血性貧血 (1例) 等の特発性骨髓障害ならびに特発性

血小板減少性紫斑病 (3例) の症例の骨髓あるいは末梢血を入手した。

核酸の抽出：いただいた骨髓組織あるいは末梢血からは有核あるいは単核細胞を分離し、DNAならびに RNA を抽出した。具体的には DNA はドデシル硫酸ナトリウムと Proteinase K を含む溶液中で細胞を溶解し、フェノールを用いた脱蛋白により精製した。RNA は Guanidium isothiocyanate とフェノールを含む溶液で細胞を溶解し、クロロフォルムにより有機溶媒層を取り除き、エタノール沈殿を経て精製した。

PCR あるいは RT-PCR による解析：HCMV、HHV6、EBV のヘルペス群ウイルスならびに B19 ウイルスのウイルスゲノムを検出する PCR 解析を行っている。さらに、ウイルスゲノムが陽性となった検体については LightCycler (Roche) を用いた real-time PCR を行い、そのゲノムのコピー数の算定も行った。この定量 PCR は現時点では PCR 産物が 2重鎖 DNA であることを利用し、溶液中に 2重鎖 DNA 結合色素 SybrGreen I を含ませることにより、溶液中の 2重鎖 DNA の量を経時的に解析し、既知濃度の鋳型の経時的増加と比較し、検体中のウイルスゲノムのコピー数を推定する。

免疫組織化学：B19ウイルス構造蛋白に対する抗体、HCMV の前初期遺伝子蛋白 IE1・IE2ならびに構造蛋白を認識する抗体、HHV6B の構造蛋白 P101蛋白を認識する抗体を使用して、提供をうけたホルマリン固定パラフィン包埋切片において、これらの抗原の有無ならびに組織切片上の局在を検討した。

in situ ハイブリダイゼーション：パラフィン切片上で、high あるいは low stringent の条件にて、B19ウイルスならびに EBV の EBER の有無について検討した。

ウイルス抗体価：片野が開発した4種類の HHV8 蛋白 (K8, 1, ORF59, ORF65, ORF73) を抗原として使用する ELISA 法を用いて、血清中の抗 HHV8抗体の測定を行った。

[結果]

1. B19ウイルス・CMV・HHV6

今年度の解析にはこれらのB19ウイルス・CMV・HHV6のゲノムあるいは抗原が骨髓・末梢血から抽出した核酸検体のPCRによる解析、パラフィン切片におけるin situ hybridizationによる解析により検出された例は認められなかった。

2. EBV

2例の再生不良性貧血ならびに1例のMDSの骨髓組織より抽出した核酸検体にEBVのウイルスゲノムをPCRにより確認した。この存在を確認するため、さらにEBVの違う領域をターゲットとしたPCRを行ったが、同様に増幅産物が確認された。このEBVのゲノムのコピー数を算定するためreal time PCRを行ったが、そのコピー数は定量感度(10 コピー数/ μ l)以下であった。同時に行った β -globinによる細胞数の定量では検体2 μ l中の宿主細胞数は 10^4 個前後であった。なお、その検量線の相関係数のerrorはEBVが 2.8×10^3 で、 β -globinが 1.7×10^3 であった。

3. HHV8

現在までに検索した範囲では抗HHV8の4種類の抗原に対する抗体(IgG)の上昇が認められた症例はない。なお、このELISAにより系Kaposi肉腫の患者ならびにmultiple Castleman病の患者血清中に有意の抗体価の上昇が確認されている。

4. 未知のウイルス

新規のウイルスはいまだに検出できていない。

[考察・結論]

特発性造血障害の原因は多岐に及ぶと考えられ、このなかにはウイルス感染が関与している可能性があるかと仮定し本研究を行っている。冒頭に記したように骨髓のウイルス感染に関する知見は乏しく、また、急性感染時期と血液症状の発症の時期には時差が想定されるため、見落とされている可能性が多い。

今年度解析した症例ではこれらの疾患と検出されたウイルスにはっきりした関連性を認めることはできていない。EBVのウイルスゲノムは現在までに解析した症例で再生不良性貧血の骨髓組織

において2例、MDSの症例において1例検出した。EBVは主としてB細胞に感染するが、最近上皮細胞、T細胞、NK細胞に感染していることが血液学的、病理学的に明らかにされ、それぞれの細胞系の感染でことなる臨床像を呈することが判明している。今回の解析では骨髓のどの細胞にEBVが感染していたかを確定しえていないが、今後、この点について明らかにする必要がある。また、EBVのウイルスゲノムの存在は確認し得たが、そのコピー数は定量感度以下であり、silent passengerの可能性もあり、この点も今後の検討がひつようである。

HHV8に対する血清抗体を有した例は認められず、このウイルスの関与は否定的である。

HHV8は最近発見されたウイルスであり、リンパ好性・血管内皮好性であるが、現在まで検索した症例では抗体陽性例は認められていない。基礎疾患のない再生不良性貧血あるいは特発性血小板減少性紫斑病の原因としてB19ウイルス以外に、EBウイルスも考慮する必要がある。

[参考文献]

1. Okano M, et al, Clin Microbiol Rev 1, 300-312, 1988
2. Sullivan JL, et al, Blood 65, 1097-1104, 1985

II 再生不良性貧血

再生不良性貧血に対する ATG 再投与に関する検討

浦部 晶夫、壹岐 聖子、白杵 憲祐

(NTT 関東病院 血液内科)

【はじめに】

重症または中等症の再生不良性貧血 (AA) に対し抗胸腺細胞グロブリン (ATG) を含む免疫抑制療法は有効な治療法である。しかし骨髄移植の適応がなく、ATG が無効であった難治性 AA に対する有効な治療法は明らかにされていない。このような難治性 AA に対し ATG の再投与が有効である可能性がある。ATG は異種蛋白製剤であることから、再投与することにより重篤な過敏反応や血清病が出現する可能性があるため、本邦ではその再投与は一般に禁止されている。今回我々は ATG 療法に無反応または一過性の反応を示したが再発した AA に対する ATG 再投与の安全性と有効性を明らかにすることを目的に検討した。

【対象】

1988年7月から1999年7月までの間に当科にて2回以上の ATG 療法を行った再生不良性貧血患者8例を対象とした。患者の特徴を表1に示す。年齢は平均49歳 (26~65歳) で、男女比は1対3であった。再生不良性貧血の重症度は6例が重症で2例が中等症であった。症例1は慢性関節リウマチ、症例6と症例8は輸血後の鉄沈着症、さらに症例8は

C型肝炎を合併していた。症例3には肺カルチノイド、症例4には卵巣嚢腫の手術歴があった。症例7は両側豊胸術後状態であった。1回目の ATG 療法に対する反応については、症例2、6、8が無反応であり、他の5例は一過性の反応を示したものの再発した症例であった。ATG の投与回数は症例6が4回であり、他の7例は2回であった。投与された血清製剤の種類は症例1、3、6が異種製剤 (ウマ・ウサギ) であり、他の5例は同種製剤 (ウマ・ウマ) であった。

【結果】

1. ATG 再投与の安全性：評価可能であった6例の ATG 投与初期の合併症と血清病について初回と再投与時を比較検討した。表2に ATG 投与初期 (day 1-14) に起こった合併症とその頻度を示す。投与初期に認められた症状として発熱、蕁麻疹、血圧低下、血圧上昇、喉頭浮腫・喘鳴などの過敏反応に関する症状と、血小板減少に起因する出血症状、肝障害、感染症の合併について比較検討した。その結果、初回投与時が合計27件に対し、再投与時が合計15件であり、再投与時の方がむしろ少ないという結果であった。ATG 投与初日から併用投与したメチルプレドニゾロンの総投与量を比較したところ、初回が平均1202mgであったのに対し再投与時が平均1880mgと多かった。再投与時の副腎皮質ステロイド療法の強化が過敏反応の軽減に結びついたと考えられた。表3は血清病について初回と再投与時を比較検討したものである。血清病の症状として、補体低下時に出現する発疹、発熱、

表1 患者の特徴

症例	年齢	性別	AAの原因	重症度	合併症	1st.ATGへの反応	投与回数	血清製剤の種類
1	62	F	薬剤性・NSAIDs	重症	慢性関節リウマチ	一過性反応あり	2回	ウマ, ウサギ
2	32	F	特発性	重症	—	反応なし	2回	ウマ, ウマ
3	60	M	特発性	中等症	肺カルチノイド	一過性反応あり	2回	ウサギ, ウマ
4	45	F	特発性	中等症	卵巣嚢腫	一過性反応あり	2回	ウマ, ウマ
5	48	M	薬剤性・NSAIDs	重症	—	一過性反応あり	2回	ウマ, ウマ
6	26	F	特発性	重症	鉄沈着症・C型肝炎	反応なし	4回	ウマ, ウサギ, ウマ, ウマ
7	65	F	特発性	重症	豊胸術後状態	一過性反応あり	2回	ウマ, ウマ
8	51	F	特発性	重症	鉄沈着症	反応なし	2回	ウマ, ウマ

表2 初回と再投与時の投与初期の合併症の比較 (上段)

ATG 投与初期 (day 1-14) に併用したステロイドの総投与量の比較 (下段)

評価可能であった6例を対象。

*Mann-Whitney U test

症状	1st. ATG	2nd. ATG	P value*
発熱	6	4	
蕁麻疹	4	3	
血圧低下	2	0	
血圧上昇	3	1	
喉頭浮腫・喘鳴	0	0	
出血症状	4	2	
肝障害	5	3	
感染症	3	2	
合計	27	15	0.0325
Day1-14 mPSL 総投与量(mg)	1202	1880	>0.2

表3 初回と再投与時の血清病の比較 (上段)

ウマ・ウマとウマ・ウサギ投与時の血清病の出現時期の比較 (下段)

評価可能であった6例を対象。

*Mann-Whitney U test

症状	1st. ATG	2nd. ATG	P value*
発疹	3	4	
発熱	4	3	
関節痛・筋肉痛	4	4	
リンパ節炎	1	1	
水様便	1	1	
胸痛	0	2	
呼吸苦・咳	1	1	
腎障害・乏尿・浮腫	2	4	
合計	16	20	>0.2
<平均出現日> ATG投与から何日目			
ウマ・ウマ	16	6	
ウマ・ウサギ	16	18	

関節痛や筋肉痛、リンパ節炎、水様便、胸痛、呼吸苦・咳、腎障害・乏尿・浮腫について比較検討した。その結果、初回投与時が合計16件に対し、再投与時が合計20件と、再投与時にやや増加した

が有意差はなかった。血清病の出現時期についてはウマ・ウサギと由来動物種が異なった場合、初回と再投与時で変化なかったのに対し、ウマ・ウマを用いた5例では血清病の出現時期が初回の平均16日目に対し、再投与時が平均6日目と明らかに短縮がみられた。

2. ATG 再投与の有効性：治療効果は8例中3例(38%)で認められた。表4に有効例と無効例を比較した。有効例は無効例に比べ、罹病期間が明らかに短い例であった。初回 ATG 療法に対する反応の違いや、ATG の由来動物種の変更と効果には明らかな関連性を認めなかった。

表4 有効例と無効例の比較

		有効例	無効例
n (症例)		3 (症例1,2,3)	5 (症例4,5,6,7,8)
平均年齢 (歳)		51 (32~62)	47 (26~65)
男女比		1対2	1対4
AAの原因	特異性 (n)	2	4
	薬剤性 (n)	1	1
重症度	重症 (n)	2	4
	中等症 (n)	1	1
罹病期間 (m)	1st.ATGまで	12 (0.7~36)	68 (3~180)
	2nd.ATGまで	28 (4~72)	81 (10~186)
1st.ATGへの反応	無反応 (n)	1	2
	一過性反応 (n)	2	3
製剤の種類	ウマ・ウマ (n)	1	4
	ウマ・ウサギ (n)	2	1
投与間隔 (m)		15 (3~36)	13 (6~36)

[考察・結論]

ATG とシクロスポリンを基本とする免疫抑制療法によって、骨髄移植の適応のない重症 AA または中等症 AA の治療成績は著しく向上している。しかし、患者の10-20%が初回治療に無反応であり、初回治療に反応した患者でも30-35%が再発する¹⁾。ATGの再投与の効果については1980年代から報告が散見されるが、Tichelli らはウマ由来 ATG の初回治療に失敗した43例の患者にウマ由来 ATG の再投与を行った結果を報告している²⁾。その報告によると再治療例の63%に反応がみられ、10年後の生存率は約52%であった。副作用については、投与初期の過敏反応が初回26%に対し再投与時が30%と軽度の増加を認めたのみで、血清病については初回と再投与時で変化はなかった。また、最近イタリアのグループよりウマ

由来 ATG を含んだ初回免疫抑制療法に失敗した患者30例にウサギ由来 ATG を含んだ免疫抑制療法を行った結果が報告されている³⁾。その報告によると再治療時に明らかな副作用の増加はみられなかったが、1例が再治療早期に敗血症で死亡している。反応は77%に認め、30%が完全寛解となっている。一般に、ATG の効果は AA の罹病期間が短い程期待できる。今回我々は、ATG の再投与についても同様の結果を得た。イタリアのグループ³⁾は再治療後の完全寛解群と部分寛解群で AA の罹病期間を比較しているが、完全寛解群のほうが罹病期間が短い傾向があった。副作用については由来動物種の変更による軽減が期待できると述べている。我々の検討では、投与初期の合併症のうち過敏反応に関連した症状については由来動物種の変更の有無に関わらず併用する副腎皮

質ステロイド療法を強化することで回避できると考えられた。また、血清病についても、再投与時に悪化することはなかった。ただ、同種製剤（ウマ・ウマ）を用いた場合、再投与時の血清病の出現時期が、明らかに早くなった。同様の現象は、Tichelliら²⁾によっても指摘されており、同種製剤の再投与の際、注意すべき点であると思われた。

以上、ATGの再投与は慎重に行えば安全であり、罹病期間の短い症例では効果が期待できると考えられた。

[参考文献]

1. Schrezenmeier H, et al, Br J Haematol 85, 371, 1993
2. Tichelli A, et al, Br J Haematol 100, 93, 1998
3. Di Bona E, et al, Br J Haematol 107, 330, 1999

小児再生不良性貧血の長期予後 同種骨髄移植と免疫抑制療法との比較

小島 勢二、堀部 敬三

(名古屋大学大学院医学研究科、
成長発達医学／小児科学)

松山 孝治、加藤 剛二

(名古屋第1赤十字病院、
小児医療センター、血液腫瘍科)

[はじめに]

同種骨髄移植 (BMT) や免疫抑制療法 (IST) の導入により、再生不良性貧血 (再不貧) 患者の長期生存例の増加は著しい。しかし、最近になって長期生存例からの骨髄異型性症候群 (MDS) や発作性夜間血色素尿症 (PNH) などの発症が新たな問題となっている。今回小児再不貧患者の長期予後について、BMT で治療された群と IST で治療された群との比較検討をおこなったので報告する。

[対象および方法]

1984年から1998年の15年間に、名古屋大学医学部付属病院および名古屋第1赤十字病院で治療された17歳以下の小児再不貧患者100例を対象とした (表1)。血縁者間にドナーが得られた37例は BMT を、残りの63例は IST が選択された。IST

に反応がみられなかった11例は、その後 HLA 一致非血縁ドナーからの BMT が施行された。IST 群63例のうち、初期の39例は抗リンパ球グロブリン (ALG, アールプリン; ミドリ十字社, リンホーザベルナ; スイス血清ワクチン社)、大量メチルプレドニゾロン、ダナゾールの併用療法で治療された。治療開始後3カ月たっても反応がみられない25例には、その後シクロスポリン (CSA) が投与された。1992年以降に治療された22例は、ALG (リンホグロブリン; メリュー社)、CSA の併用療法が行われ、うち16例にはダナゾールが投与された。なお2例は CSA とダナゾールのみで治療された。また44例は G-CSF の投与もうけた。

HLA 一致血縁者間 BMT に対する前治療は、初期はサイクロフォスファミド (CY) + 全身リンパ節照射 (TLI) であったが、1994年以降は CY+ALG に変更された²⁾。非血縁者間 BMT の前治療は CY+ALG+全身放射線照射 (TBI) でおこなわれた³⁾。GVHD 予防には、血縁者間、非血縁者間ともに短期メソトレキセート+CSA を投与した。

[結果]

同種骨髄移植: 1例が移植前治療で投与された CY による心筋障害で死亡したが、他は全例に生着が得られ、移植後6~166カ月 (中央値: 89カ月) 生存中である。中等~重症の急性 GVHD は2例に、慢性 GVHD は1例に発症したのみで二次性悪性腫

表1 症 例

	骨髄移植 (n=37)	免疫抑制療法 (n=63)
年齢	10(0-16)	9(1-17)
性 (男/女)	18/19	31/32
重症度 (中等症/重症/最重症)	7/20 /10	14/32/17
好中球数×10 ⁹ /L, 中央値 (範囲)	0.36(0-1.20)	0.42(0-1.55)
病因 (特発性/肝炎後)	33/4	58/5
診断から治療までの日数	38(20-2040)	24(12-2490)

瘍などもみられていない。

免疫抑制療法：治療開始6カ月の時点で32/63 (51%) に治療への反応がみられ、輸血不要となった。治療開始6~186カ月（中央値：82カ月）の経過で42例（67%）が生存中である。ALG+CSAの併用療法の導入前に治療された40例の7年生存率は65±8%であったが、1991年以降の23例の7年生存率は88±8%と改善傾向がみられた。死亡した21例の死因は、細菌および真菌感染症；8例、二次性 MDS；7例、鉄過剰症による心不全；4例、頭蓋内出血；2例、であった。MDS への移行例の予後は不良で、骨髄移植が施行された4例を含め、全例が死亡した（表2）。一方、PNH を発症した症例はみられなかった。

IST に反応がみられなかった11例に対し、非血縁ドナーからの同種 BMT が施行されたが、全例に生着がみられ、移植後8~83カ月生存中である。BMT 群の10年生存率は97±3%で、IST 群の55±8%と比較して、統計学的に有意に優れていた。（図1, p: 0.004）

[考案]

これまでの報告と同様に、小児再不貧患者に対する BMT の治療成績は、10年生存率が97±3%と良好で、慢性 GVHD を始めとする晩期障害も少なかった。一方、ALG と CSA の併用療法の導

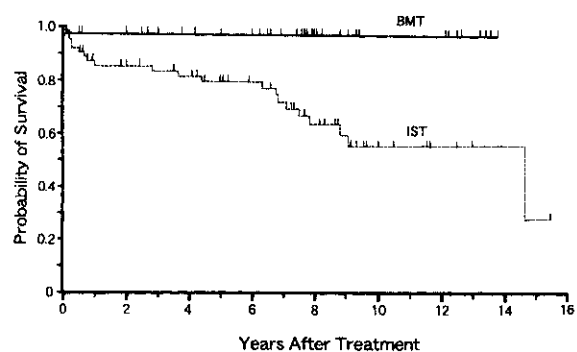


図 1

入により、小児再不貧に対する IST の治療成績は向上がみられるものの、IST 治療群の長期生存率は55±8%で改善の余地がみられる。特にMDS/白血病への10年累積移行率は20±7%と高く、また一旦移行した症例の予後は極めて不良であった。移行に関する危険因子を明らかにすることが重要課題である。

IST 症例に対する救済療法として非血縁者間 BMT は極めて有用であり、今後は、IST に反応なく、非血縁ドナーも得られない症例に対する治療法の開発が研究の焦点となるであろう。

[参考文献]

1. Ohara A, et al, Blood 90, 1009, 1997
2. Azuma E, et al, Bone Marrow Transplant 19, 1085, 1997
3. Kojima S, et al, Blood 85, 291, 1995

表 2 骨髄異形成症候群/急性白血病への病型移行がみられた小児再生不良性貧血の7例

症例	1	2	3	4	5	6	7
年齢/性	3/男	5/男	10/男	13/男	6/男	16/男	9/男
重症度	重症	重症	最重症	最重症	中等症	重症	最重症
治療	ALG, MP, DAN, G-CSF, CyA	ALG, MP, DAN, G-CSF, CyA	ALG, MP, DAN, G-CSF, CyA	ALG, MP, DAN, G-CSF, CyA	ALG, MP, DAN, G-CSF, CyA	ALG, MP, DAN, G-CSF, CyA	ALG, MP, DAN, G-CSF, CyA
G-CSFの投与期間(日)	31	225	345	716	188	277	575
MDS診断時のFAB分類	RAEB	RA	RA	RA	RAEB	RA	RAEB
染色体	-7	-7	-7	-7,+21	-7	-7	-7
再生不良性貧血からMDSへ移行するまでの期間(月)	61	17	61	74	104	21	63

ALG; antilymphocyte globulin, MP; methylprednisolone, DAN; danazol, rhG-CSF; recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, CyA; cyclosporin, RAEB; refractory anemia with an excess of blasts, RA; refractory anemia

診断時に染色体異常が検出される
小児特発性再生不良性貧血の研究

月本 一郎、小原 明
(東邦大学医学部第一小児科学教室)
小島 勢二 (名古屋大学成長発達医学)

【研究要旨】

小児特発性再生不良性貧血診断時に、すでに染色体異常を呈した10症例についてその臨床像を検討した。染色体異常は5,6,13,16番染色体の欠失、9番染色体付加、Robertson 異常などであった。中等症症例では MDS を疑わせる臨床像であったが、最重症型では MDS との鑑別は困難であった。骨髓生検と繰り返し染色体の観察が必要と思われた。

【研究目的】

診断時にすでに染色体異常が検出される特発性再生不良性貧血が報告されている¹⁾。小児期発症の特発性再生不良性貧血の中で、このような異常を呈する症例の臨床像、ことに骨髓異形性症候群との差異に焦点を絞り検討する。

【研究方法】

日本小児血液学会会員によって94年から98年の間に診断された16歳未満特発性再生不良性貧血217例は、同学会の再生不良性貧血委員会によって追跡調査されている。本研究分担研究者は同委員会の委員として活動している。診断時染色体分析が可能であった174例で、10例で染色体異常が確認された。これらの症例について、その臨床像を後方視的に質問紙法によって調査検討した。

【結果】

1. 小児期再生不良性貧血の診断時染色体分析実施率は94年以降85%以上であり、分析成功率も80%以上。
2. 174例中10例で診断時に染色体異常が検出された。

3. 診断時に検出された異常染色体を表1に示した。

表1 診断時の染色体異常

症例	染色体	分析細胞	解釈
1	46,XX,del(5)(q13q23)	[2/40]	
2	46,XY,del(6)(p21)	[19/20]	
3	46,XX,del(6)(p23)	[26/30]	
4	46,XX,-7	[1/20]	random loss
	46,XX,-18	[1/20]	random loss
5	46,XX,add(9)(p24)	[3/12]	
	46,XX,add(9)(p24),+16,+18	[1/12]	
6	46,XX,del(13)(q12q14)	[7/20]	
7	45,XX,der(14;15)(q10q10)	[18/18]	Robertson's 異常?
8	46,XX,del(16)	[16/16]	
9	46,XY,del(16)(q22)	[1/ 6]	random loss
10	46,XX,del(20)(q1?)	[5/20]	

4. 診断時血液所見を表2に示した。中等症症例には MDS を疑わせる症例 (症例1,3,10) が混入している。典型的な最重症症例 (症例5,6) は再生不良性貧血と鑑別が困難であった。

5. 10例中1例 (症例3) が無治療で、5例が再生不良性貧血に準じた免疫抑制療法が施行された。6例 (表3) はこれらの初期治療に反応して診断1年後には無治療に、その後1例を除き血液学的に寛解になった。逆に10例中4例 (表4) は初期治療に対する反応は不良であったが、309ないし782日後に非血縁者間骨髓移植が施行され全例生存している。

6. 観察期間561日から1731日で全例生存している。白血病移行や芽球の増加は観察されていない。

7. rG-CSF が10例中5例に使用されたが、これらの症例に特記すべき事象は観察されていない。

【考察】

再生不良性貧血と診断される症例にも染色体異常が検出される。

これらの症例と骨髓異形性症候群との差違の検討するためには、以下の要件が必要。

1. 骨髓細胞形態のセントラルレビューと骨髓生検が必要。
2. 染色体分析細胞数が少なく、1細胞のみの異常 random loss も混入している。染色体異常の追跡が必須

3. 免疫抑制剤の治療経過および G-CSF の安全性
に注目して経過観察必要。

[参考文献]

1. Appelbaum FR, et al, Exp Hematol 15, 1134, 1987
2. Mikhailova N, et al, Haematologica 81, 418, 1996.
3. Geary CG, et al, Br J Haematol 104, 271, 1999

[結論]

診断時に染色体異常を呈する再生不良性貧血の存在する。骨髓異形性症候群との差違につき観察する必要がある。その際に繰り返す染色体分析と骨髓生検は必須である。

表 2 染色体異常を呈した症例の診断時血液所見

症例	染色体	性別	年齢	重症度	診断時血液所見							
					Hb g/dl	MCV fL	Plt x10K	WBC /μl	Neut /μl	NCC x10K	BMLy% %	ME ratio
1	del(5)	女	14	中	7.7	108	2.6	2400	624	5	30.8	1.2
2	del(6)	男	11	中	9.9	104	2.5	2900	609	6	55.5	0.7
3	del(6)	女	13	中	11.9	97	7.1	3000	810	1.7	16.5	1.5
4	-7 / -18	女	7	中	6.9	92	1.9	3300	297	4.2	68.8	0.9
5	add(9)	女	11	重症	4	113	1.6	2200	792	6.6	59.2	0.8
6	del(13)	女	13	最重症	5.3	90	0.6	2300	92	1.55	93.6	2.2
7	der(14;15)	女	3	最重症	8.1	88	0.2	1800	0	1.2	82	0.0
8	del(16)	女	5	重症	7.9	95	3.3	4760	476	8.5		
9	del(16)	男	1	重症	5.1	96	1.1	4500	585	2.7	49.2	3.0
10	del(20)	女	5	中	9.3	104	3.5	3600	792	3.2	38	1.9

表 3 初期治療に反応した6症例の経過・予後

症例	染色体	重症度	診断後6ヶ月間の治療		診断1年後の 治療	観察期間 (日)	血液状態		
1	del(5)	中等症	ALG	CY-AmPLS	G-CSF	なし	713	寛解	
2	del(6)	中等症			G-CSF	なし	1649	軽症	
3	del(6)	中等症				なし	561	寛解	
4	-7 / -18	中等症	ALG	CY-AmPLS	Pred		1477	寛解	
5	add(9)	重症度	ALG	CY-A	Pred G-CSF	Danas.	なし	1507	寛解
8	del(16)	重症度		CY-AmPLS	Pred	Danas.	なし	1731	寛解

表 4 初期治療に反応しなかった症例の経過・予後

症例	染色体	重症度	診断後6ヶ月間の治療		初期治療に 対する反応	移植		観察日数	現在の		
						移植 診断から日数	ドナー		治療	血液状態	
6	del(13)	最重症	ALG	CY-A	Pred G-CSF	Danas.	なし	596	非血縁	675	移植関連
7	der(14;15)	最重症			G-CSF	あり → 再発 拒絶	309	非血縁	CD34	1511	なし 寛解
9	del(16)	重症度	ALG				なし	548	非血縁	779	移植関連
10	del(20)	中等症	ALG	CY-AmPLS	Pred	Danas.	なし	782	非血縁	1438	移植関連 寛解

MDSと再生不良性貧血の境界： 細胞病理学的検討

朝長万左男、森 弘行、陣内 逸郎

(長崎大学医学部原研内科)

松尾 辰樹 (長崎大学医学部付属病院輸血部)

[はじめに]

再生不良性貧血 (AA) のみならず骨髄異形成症候群 (MDS) の一部にも免疫抑制療法が有効な例があることなどから、AA と MDS の境界は近年やや曖昧なものになっている。細胞病理学的立場から AA と MDS を鑑別しようとする場合、赤芽球系の形態異常は典型的 AA においても比較的高頻度に認められること、MDS (RA) では巨核球が減少している例も少なくないことなどにより、顆粒球系の異常を評価することが最も重要と考えられる。そこで顆粒球系の形態異常を定量的に評価することで両疾患の鑑別にとって有用な指標となり得るか検討するとともに、両疾患を全く異なる病態群として形態学的に鑑別可能か、あるいは連続する病態と捉えるべきかを検討する。

[対象と方法]

当科において AA または MDS と診断され免疫抑制療法を行った33症例、および正常コントロール群10例を対象とした。治療開始時に AA と診断された症例は18例、年齢中央値58歳 (15~73)、性別は男性7例、女性11例。MDS と診断された症例は15例、年齢中央値59歳 (10~70)、性別は男性7例、女性8例である。コントロール群として、正常人ボランティア3例および全身症状を伴わない stage I または II の悪性リンパ腫患者7例の骨髄標本を用いた。各症例ごとに骨髄スメア標本を blind で再評価し、pseudo-Pelger Huet 異常の出現頻度とともに、以下に定義する核クロマチンの染色パターンによって成熟好中球を分類しその比率を求めた。AA と診断された症例のうち1例では著明な好中球減少のため評価が不可能であった。

本研究ではクロマチン染色パターンによる好中

球の分類を次のように定義した。

type I : 比較的均一な染色性を示すもの。

type II : 粗大な顆粒状に不均一な染色性を示すが、核の輪郭に不整がないもの。

type III : ブロック状に濃染し、核の輪郭が不整なもの。

治療効果は3ヶ月以上経過した後、輸血または造血因子によらない血球の増加として各血球毎に判定した。

なお対象患者についてはインフォームドコンセントを得たのち治療を開始した。

[結果と考察]

正常対照群10例に関しては、pseudo-Pelger Huet 異常は3例に認め、いずれも成熟好中球に占める頻度は1%以下であった。また、クロマチン凝集パターンの異常は、type III のみでは0~2% (中央値1%)、type II まで含めると8.5~17.5% (中央値13%) の好中球に認めた。

図1には AA/MDS 群におけるクロマチン凝集異常と pseudo-Pelger Huet 異常の出現頻度をそれぞれ症例毎に示した。異常顆粒球の出現頻度は MDS で高い傾向がみられたが、量的には AA と連続性がみられた。

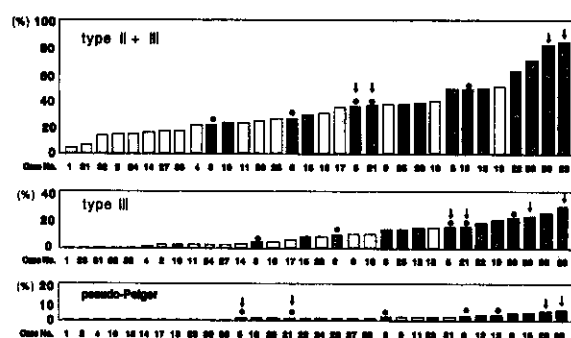


図1 骨髄内好中球における異形細胞の出現頻度と治療開始時診断

- 再生不良性貧血
- MDS
- : 染色体異常あり
- ↓ : 低形成 MDS

図2には MDS と診断された症例に関して、type III 好中球の頻度と末梢血中の好中球数の関連を示した。MDS ではクロマチン凝集が一般に強いが、

例外的にその程度が弱い症例では好中球数が比較的多い傾向を示した。

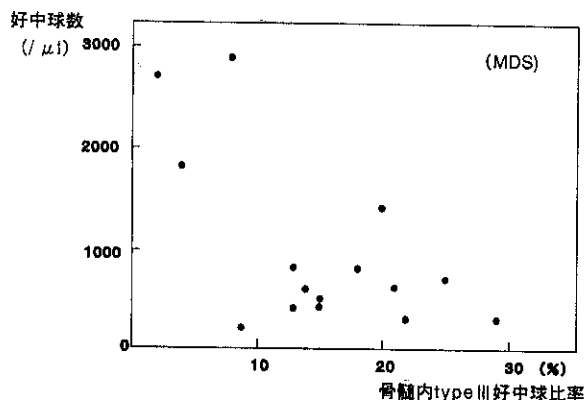


図2 MDSにおける type III 好中球の比率と末梢血好中球実数

type III好中球の比率が高い群 (>10%)、低値群 (<3%) とその中間群 (3~10%) に分けて免疫抑制療法に対する治療反応を比較した (図3)。高値群では、免疫抑制療法に対する顆粒球系の治療反応が不良であったが、低値群と中間群に差は見られなかった。

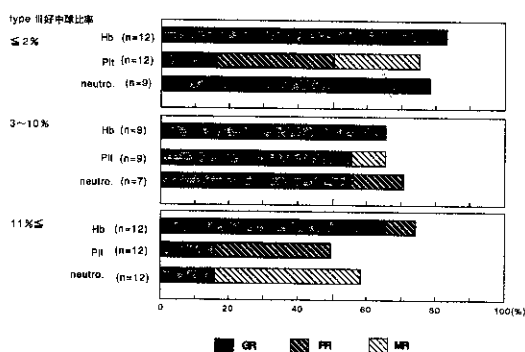


図3 骨髄内 type III 好中球の比率と免疫抑制療法に対する治療反応

[結論]

正常対照群や AA 症例でも、MDS と同様の形態異常を有する顆粒球が少数ながら存在することから、AA と MDS の鑑別には異形成の有無だけではなく、その量的評価の観点も必要であると考えられた。特に好中球のクロマチン染色パターンの異常は、pseudo-Pelger Huet 異常より一般的かつ高頻度に認められることから異形成の量的評価に有用であると考えられた。今回の検討では、type III好中球が10%を超える群は、ほぼ典型的な MDS 群と考えられたが、3-10%の群では、AA・MDS が混在しており、この群ではさらに病態の解析が必要である。

また、骨髄内における好中球のクロマチン凝集が強い例では、末梢血中の好中球数が少ないことから、核クロマチンの異常は骨髄内での細胞死との関連性が窺われた。

形態学的には AA と MDS は連続性を認めており、いずれにも分類困難な境界群が存在している。AA/MDS 境界群は治療反応の点からも明らかな MDS とは区別する必要があると思われたが、その診断基準についてはさらに検討が必要である。

[参考文献]

1. Anna Jonasova et al, Br J Haematol 100, 304-309, 1998

Fanconi 貧血の分子病態：
FANCA と BRG1 の結合

小澤 敬也、大月 哲也

(自治医科大学血液学講座)

[はじめに]

Fanconi 貧血の臨床上的特徴は、先天性奇形、高率におこる骨髓低形成、癌の合併（特に急性骨髓性白血病）である。Fanconi 貧血の細胞には、DNA 架橋剤（MMC 他）に高感受性を示すという特徴があり、DNA 架橋剤の存在下で染色体異常をおこすことや、cell cycle 上、G2 arrest をおこすことが知られている。Fanconi 貧血は heterogenous な症候群であり、多数のグループに分類される。その内、現在までに4つの原因遺伝子がクローニングされている（FANCA、-C、-A、-G and -F）が、その遺伝子産物の機能は明らかにはなっていない。我々は、FANCA 遺伝子産物の機能を解明する目的で FANCA 蛋白を bait とした yeast two-hybrid 実験を行い、FANCA に結合する蛋白として、chromatin remodeling factor の構成因子の一つであり、かつ G2/M 期移行に関連する cell cycle modulator でもある BRG1 を同定したので報告する。

[結果と考察]

FANCA の C 末端側のアミノ酸366残基を bait とした yeast two-hybrid 実験を行ったところ、FANCA に結合する蛋白として BRG1 をクローニングした (図1)。

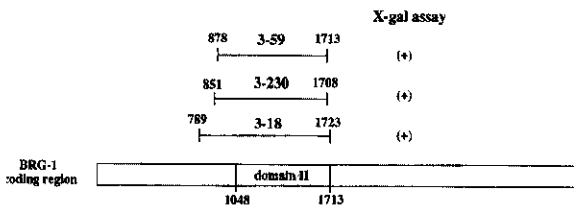


図1 Yeast two-hybrid 実験
bait : FANCA C 末端

FANCA と BRG1 の結合は Myc-tagged FANCA と HA-tagged BRG1 を co-transfection した系における免疫沈降実験によっても確認された (図2)。

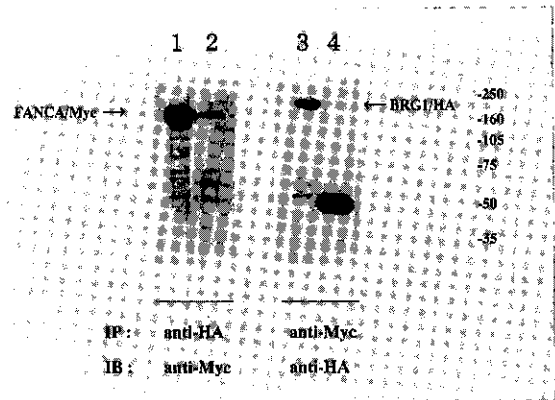


図2 Co-immunoprecipitation 実験

- lane 1 : cell lysate
- 2 : IP ; anti-HA, IB ; anti-Myc
- 3 : cell lysate
- 4 : IP ; anti-Myc, IB ; anti-HA

chromatin remodeling factorは少なくとも12個以上の構成因子から成る分子量2000 kDa 以上の巨大分子であるが、BRG1 はその重要な構成因子の一つである。BRG1 抗体により、ヒト T 細胞株の cell lysate より chromatin remodeling factor を免疫沈降し、FANCA 抗体により immunoblot を行ったところ、FANCA に相当するバンドが検出された (図3: preliminary data)。

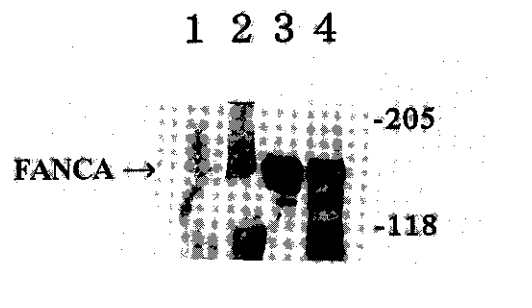


図3. Western blot for FANCA after BRG1 IP

- lane 1 : BRG1 IP from G0/G1 phase T cells
- 2 : BRG1 IP from G2/M phase T cells
- 3 : purified FANCA/Myc
- 4 : cell lysate

以上の結果から FANCA は chromatin remodeling factor の構成因子の一つである事が示唆された。Fanconi 貧血 type A 患者由来の細胞株をレトロウ

イルスを用いて正常 FANCA cDNA で complementation すると、BRG1 抗体で免疫沈降される chromatin remodeling factor の銀染色上の band pattern が変化する (data not shown)。これは、FANCA が chromatin remodeling factor の assembly に関与している可能性を示唆するものである。

[結論]

chromatin remodeling factor はクロマチン構造を変化させるのに必須な分子であり、転写の際などに重要な働きをする。FANCA が BRG1 との結合を介して chromatin remodeling factor の構成因子の一つとなっている可能性が示されたことは、Fanconi 貧血の分子病態を解明する上で重要な知見であると思われる。また、BRG1 は G2/M 期移

行に関連する cell cycle modulator でもあり、FANCA と BRG1 の interaction は、Fanconi 貧血の特徴である G2 arrest を説明しうる可能性がある。今後は FANCA が BRG1 の機能に与える影響を検討する予定である。

[参考文献]

1. Otsuki T, et al, J Cell Physiol 179, 79, 1999
2. Otsuki T, et al, Biochem Biophys Res Comm 265, 630, 1999

Fanconi 貧血の分子病態に関する研究

浅野 茂隆 (東大医科研・先端医療研究センター)

山下 孝之 (東大医科研・ゲノム情報応用診断部)

【はじめに】

Fanconi 貧血 (FA) は、小児期に発症する再生不良性貧血、骨髄異形成症候群・急性骨髄性白血病を始めとする悪性腫瘍の多発などを特徴とする常染色体性遺伝疾患である。患者細胞は染色体不安定性や mitomycin C (MMC) などの DNA 架橋剤に高感受性を示すという特徴を持つ。遺伝的に異なる8群(A~H群)に分類され、近年A群、C群、G群の遺伝子 (FANCA、FANCC、FANCG) が同定されたが、いずれも機能は不明である。これらの蛋白群の作用機構の解明は、再生不良性貧血や骨髄異形成症候群などの造血障害の病態を理解する上に極めて重要であると考えられる。最近、3つの蛋白が結合して核内へ移行することが報告された。私共は、FANCA 蛋白がリン酸化され、このリン酸化と FANCA/FANCC の結合およびその核内への移行がA群、C群ばかりでなくD群以外のすべての細胞で阻害されていることを見出した。したがって、これらの作用はFAの病態における中心的経路を形成すると考えられる。本研究では FANCA リン酸化の分子機構を解析した。

【対象と方法】

FANCA 蛋白の *in vivo* のリン酸化は、種々の培養細胞を ³²P で標識し、可溶化液より抗 FANCA 抗体による免疫沈降を行い、SDS-PAGE で解析後、オートラジオグラフィーで評価した。*in vitro* のリン酸化の測定は可溶化液からの抗 FANCA 抗体による免疫沈降物を [γ-³²P] ATP 存在下に15-20分インキュベートし、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーで評価した。

【結果】

1. FANCA は、内因性の FANCA(-) 線維芽細胞 6914 に野生型 FANCA を発現させたもの

(6914/wt-FANCA) だけでなく、HeLa 細胞、Jurkat 細胞、Mo-7e 細胞のいずれにおいてもリン酸化を受けていた。

2. *in vitro* におけるリン酸化 FANCA は *in vivo* におけるリン酸化蛋白と共通のペプチドマッピングを示し (図1)、生理的な FANCA リン酸化酵素 (FANCA-PK) が FANCA と結合していることが示唆された。

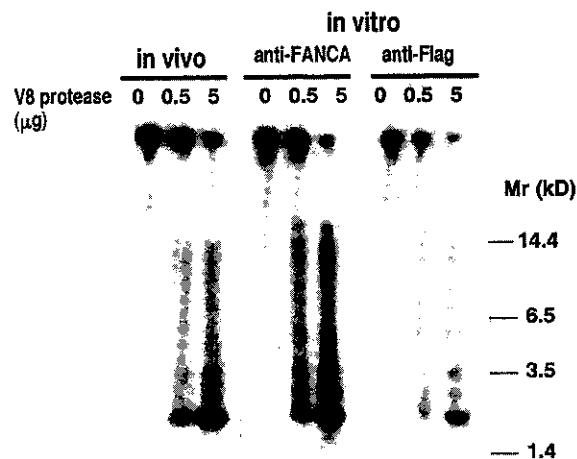


図1 FANCA の *in situ* phosphopeptide mapping : *in vivo* および *in vitro* リン酸化の比較

in vivo リン酸化 FANCA と *in vitro* リン酸化 FANCA (抗 FANCA ポリクローナル抗体で免疫沈降を行ったものと Flag で標識した FANCA を抗 Flag モノクローナル抗体で免疫沈降したものを V8 protease (0~5μg) で消化し、Tris/Tricine ゲルで分離し、autoradiography を得た。

3. リン酸化アミノ酸の解析でセリン残基のみがリン酸化を受けていることが判明した。

4. リン酸化 FANCA 蛋白および FANCA リン酸化酵素活性はいずれも主に細胞質に分布していた。また、N末端にある核局在シグナル部分を削除した FANCA も、6914細胞内で wt-FANCA と同様にリン酸化された。

5. *in vitro* および *in vivo* において PI キナーゼの阻害剤である wortmannin が FANCA-PK の作用を阻害した。

6. FANCA を非A群の細胞に過剰発現させたところ、FANCA のリン酸化は回復した。しかし、これらの細胞で MMC に対する感受性は回復しなかった。

7. 患者由来の1アミノ酸置換を持つ FANCA 蛋白 (H1110P、R1117G) を6914細胞に過剰発現させたところ、in vivo では両者ともリン酸化は著明に低下していたが、いずれの蛋白も in vitro 系では wt-FANCA と同様にリン酸化を受けた (図2)。

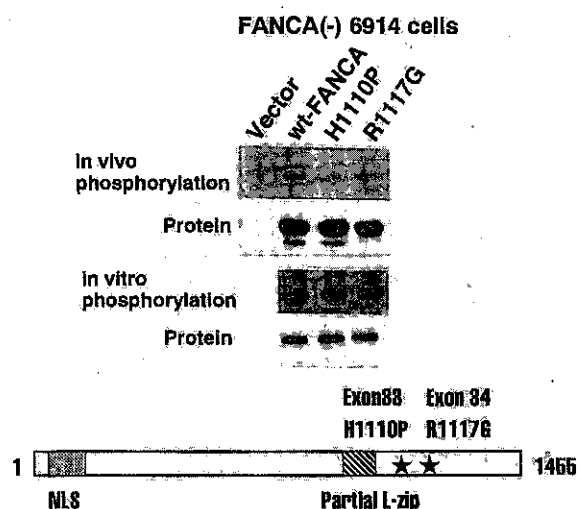


図2 FANCA の変異体の in vivo および in vitro におけるリン酸化

患者由来の1アミノ酸置換の変異を持つ変異体 FANCA (H1110P) と FANCA (R1117G) を6914細胞に発現させ、in vivo リン酸化と in vitro リン酸化を解析した。蛋白レベルは Western blot で測定した。

[考察]

以上の結果より次のことが示唆される。

1. FANCA は種々の異なる細胞においてリン酸化を受ける。
2. FANCA のリン酸化酵素 (FANCA-PK) は、FANCA 蛋白と複合体を形成し、抗 FANCA 抗体による免疫沈降で共沈する。

3. FANCA-PK は主に細胞質に存在し、リン酸化蛋白も細胞質に局在する。また、FANCA-PK はセリンキナーゼであり、wortmannin に阻害を受ける。したがって、FANCA-PK は PI キナーゼ・ファミリーに属する可能性がある。

4. 過剰発現された FANCA のリン酸化に他の FA 蛋白は必須ではない。また、FANCA リン酸化のみでは FA 分子経路が機能する上に十分ではない。

5. FANCA の患者由来の変異体 (H1110P、R1117G) を用いた結果から、FANCA の機能とリン酸化が密接に相關する。

6. これらの変異体の in vivo でのリン酸化は著明に減少するが、これは FANCA-PK の結合が阻害されるためではないと考えられる。in vivo での蛋白の構造変化がキナーゼの作用を受けにくくするか、リン酸化蛋白を不安定にする可能性が考えられる。

7. FANCA のリン酸化部位を決定し、FANCA-PK を同定することは、FA 分子経路を理解する上に重要であると考えられる。

[参考文献]

1. Kupfer G, et al, Exp Hematol 27, 587-593, 1999
2. Yamashita T, et al, Blood 94 (suppl 1), 409a, 1999
3. Futaki M, et al, Blood 95, 1493-1498, 2000

再生不良性貧血と骨髄異形成症候群疑診例 における顆粒球のクロナリティ

堀田 知光、福田 竜基

(東海大学血液・リウマチ内科)

【研究要旨】

【目的】 AA と MDS 疑診例でX染色体不活化法により顆粒球のクロナリティ解析し、両者の識別に利用可能か検討した。

【方法】 AA 26例と MDS 疑診例20例の対象とした。患者検体を多核好中球 (PMC) と T-cell を分離し、各 DNA を抽出し一部をメチル化感受性制限酵素で処理し、未処理のものとともに PCR で増幅を行った。PCR 産物は電気泳動後に染色し、内部コントロールとし2本のバンドが検出される T-cell と比較し、酵素処理後に PMC のみ一本の場合をクローン性と判定した。

【結果】 クローン性と判定した例は AA 2例 (7.6%)、MDS 疑診例 6例 (30%) で MDS 疑診例の方に頻度が高かったが、有意差は認めなかった。

【考察・結論】 クローン性を示す割合は AA に比して MDS 疑診例で高く、両疾患を区別する一つの診断情報に利用できるのではないかと考えた。

【研究目的】

以前、再生不良性貧血 (AA) は非クローン性の造血障害で骨髄異形成症候群 (MDS) はクローン性の造血障害と考えられていた。しかし最近 AA の一部は発作性夜間血色素尿症 (PNH) や MDS などのクローン性疾患へと病型移行すること、また MDS においても骨髄が低形成を示し AA と鑑別つかない疑診例や、AA と同様に免疫抑制療法に反応する例が存在するなど両者の境界に位置する患者が少なくないことがわかり、両者の区別は困難になりつつある。今後これら患者においてクローン性の病態が主体なのか非クローン性の病態なのかを見極めることは予後や治療方針を決定する上で重要な事項である。そこで、今回

我々は AA と MDS 疑診例で HUMARA 遺伝子を指標としたX染色体不活化法により顆粒球のクロナリティ解析し、両者の識別に利用可能か否か検討した。

【研究方法】

当施設および他施設から送付された AA 38例と MDS 疑診例25例の検体を解析対象とした。末梢血または骨髄より多核好中球 (PMC) と T-cell を分離し、それぞれより高分子 DNA を抽出した。得られた DNA の一部をメチル化感受性制限酵素 Hha I で処理し、未処理のものとともに PCR で増幅を行った。PCR 産物はポリアクリルアミドゲルで電気泳動後サイバークリーンで染色し、酵素未処理で目的とするバンドが二本検出されたものを HUMARA 遺伝子の CAG 繰り返し配列がヘテロの接合体と判定し、バンドが一本の場合をホモ接合体と判定した。ヘテロ接合体は PMC バンドを内部コントロールとした T-cell と比較し、酵素処理後に両バンドが二本のままであった場合を多クローン性、PMC のみ一本の場合をクローン性と判定した。また酵素処理後両バンドが一本になった場合を体質的偏りと判定した。

【研究結果】

AA と MDS 疑診例の年齢はそれぞれ平均±標準偏差は49±18才と50±18才で統計学的に有意差を認めなかった。ホモ接合体が AA で12例 (31%)、MDS 疑診例で5例 (10%) に認められ。最終的には AA 26例、MDS 疑診例20例が解析対象となった。クローン性と判定した例は AA 2例 (7.6%)、MDS 疑診例 6例 (30%) で MDS 疑診例の方に頻度が高かったが、 $P=0.06$ で有意差は認めなかった。一方多クローン性と判定した例は AA 24例、MDS 疑診例 11例で体質的偏りは MDS 疑診例でのみ6例 (30%) でいずれも統計的に有意差を認めなかった。(表1)

【考察】

AA と MDS の境界を従来の診断基準で識別するのは困難である。識別するためには多角的に病

	総数	クローン性	多クローン性	体質的偏り	ホモ接合体
AA	38	2	24	0	14
MDS	25	6	11	6	6

表 1

態を解析していく必要がある。今回の検討ではクローン性を示す割合に有意差は認めなかったが、AA に比して MDS 疑診例で高く、両疾患を区別する一つの診断情報として利用できるのではないかと考えた。今後症例を積み重ねることや、病型移行例において経時的変化の観察を加えることにより、より確実なものになるのではないかと思われた。

[結論]

HUMARA 遺伝子を用いたX染色体不活化法によるクロナリテイ解析は AA と MDS 疑診例を識別する一つの診断情報として利用可能である。

[文献]

1. Allen RC, et al, Am J Hum Genet 51, 1229, 1992
2. Raghavachar A, et al, Blood 86, 2938, 1995

キャピラリー電気泳動を用いた HUMARA 遺伝子によるクローン性の検討

唐沢 正光 (群馬大輸血部)

塚本 憲史、岡本 潔、田中 陽子、

前原 忠史、横濱 章彦、成清 卓二

(群馬大第3内科)

[はじめに]

X染色体上の遺伝子を指標に造血器疾患などのクローン性が判定されてきた。X染色体の不活化に伴う DNA のメチル化状態の変化と制限酵素切断に伴う断片長の多型 (RFLP) を組み合わせることによりクローン性の検討が可能となる (RFLP-methylation 法)。従来はサザンプロット法により解析されてきたが、近年は少量の試料からも検索可能で、より簡便な PCR 法を応用した方法が主体となっている。

さらに RFLP よりヘテロ接合となる頻度が高い tandem repeat を指標とする事で判定可能な症例も増加する。

これらの条件を考慮すると HUMARA 遺伝子はクローン性の判定に用いられる最も理想的な X染色体遺伝子の一つである。しかし GC rich な塩基配列よりなるため、PCR に bias がかかりやすく、また CAG の繰り返し配列による長さの差で母方または父方の遺伝子を識別するため、3塩基差を検出する必要がある。従来の PCR 法とゲル電気泳動を利用した方法は再現性や感度の点で必ずしも満足のいくものでは無かった。このため、GC rich 用の PCR 法とキャピラリー電気泳動装置 (ABI PRISM 310) を用いて健常女性の X染色体の不活化状態を解析した。

[対象と方法]

インフォームドコンセントにより同意の得られた健常人女性58名を対象とした。末梢血を LSM (Lymphocyte separation medium) を用いた比重遠心法で中間層にあるリンパ球主体の単核細胞と下層の顆粒球細胞に分離した。さらに下層を

hypotonic lysis 処理により赤血球を除き顆粒球分画を獲た。この顆粒球分画より通常の方法で DNA を抽出した。

等量の DNA 溶液を二つのチューブに入れ、一方はメチル感受性制限酵素 HpaII と RsaI で同時消化、残りは RsaI のみと一昼夜反応させた。FAM で5' 領域を蛍光標識した Forward primer (tcc aga atc tgt tcc aga gcg tgc) と未標識の Reverse primer (gct gtg aag gtt gct gtt cct cat) とで HUMARA 遺伝子の増幅を行った。PCR は GC-リッチ PCR システム (Roche) を用い、GC resolution solution を10 μ l加え、計40 μ lとした。試料を94 $^{\circ}$ C,5分加温後、94 $^{\circ}$ C,45"/55 $^{\circ}$ C,30"/72 $^{\circ}$ C,45"を30回くりかえし、最後に72 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。

市販のサイズマーカーでは塩基長が短く算出されるため、正確な塩基長を同定するには塩基組成のほぼ等しい既知の長さの HUMARA 遺伝子と比較する必要がある。

男性より抽出した DNA を用い上記の条件で PCR 法を行い、Big dye terminator cycle sequencing Kit により塩基配列を決定した。この結果、各々 255bp、276bp、282bp、291bp、300bp、および 309bp に増幅される男性の検体をサイズマーカー作製の対象とした。5名の DNA より ROX 標識したプライマー (上記 Forward primer と同一の配列) を用い PCR 増幅し、長さの異なる配列を混合し、サイズマーカーとして用いた。

一本鎖とした。HpaII(-)またはHpaII(+) 試料を ABI PRISM 310によりし POP4を充填したキャピラリーで電気泳動し、Genescan、Genotyper ソフトウェアにより解析した。

[結果]

ROX 標識したサイズマーカーと FAM で標識したプライマーにより増幅した試料を同一チューブに入れ、キャピラリー電気泳動した。CAG の繰り返しは21 (285 bp) を中心にほぼ正規分布していた (図1)。図2に両アレルの CAG repeat 回数の差を示した。0はホモ接合を示すため検討可能症例は51/58 (88.0%) であった。

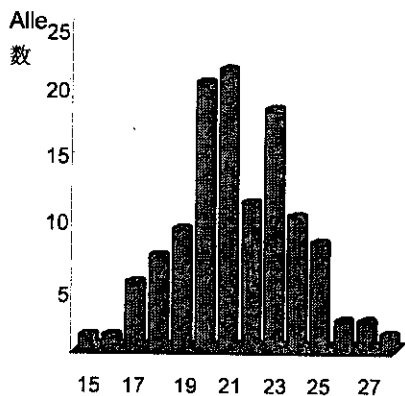


図1 CAG の繰り返しは11から33回まで均等に分布するわけではなく、21 (285bp) を中心にほぼ正規分布していた。

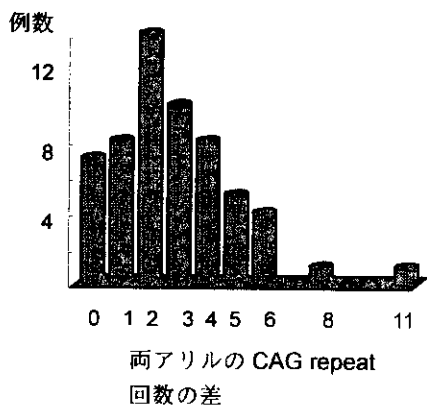


図2 0 はホモ接合を示すため検討可能症例は51/58 (88.0%) であった。

実際の検索例を図3に示した。上段が HpaII で消化した試料で下段が HpaII 処理なしの試料。左はX染色体に偏りのない例で上段の HpaII (+)で、両 HUMARA アリの蛍光強度がほぼ均等である。中央の例は短いアリの強度が弱く、偏りの強いことを示す。左端は (CAG) 繰り返しが1回だけ違う例であるが、明瞭に分離できた。

図4の上段のボックス内に両アリの蛍光強度が表示されている。smaller area/larger area の比で偏りを検討すると、ホモ接合例などを除く47例の平均は 0.656 ± 0.242 (mean \pm SD) で、0.2以下とした偏りの強い例数は1/47例 (2.1%) であった。

[考察・結論]

GC 含有率の高い HUMARA 遺伝子も GC rich 用の PCR により bias なく増幅が可能であった。正常人の HUMARA 遺伝子は $(CAG)^n / (CAG)^n$ であらわされ、短い CAG 繰り返しが6回と一定で

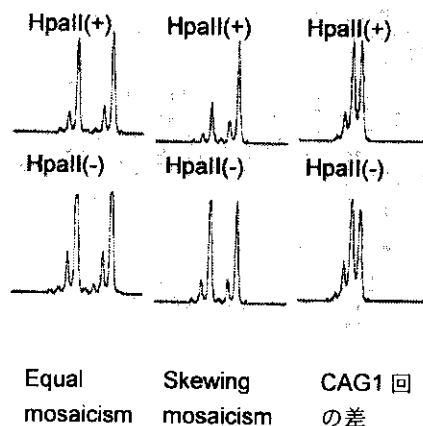
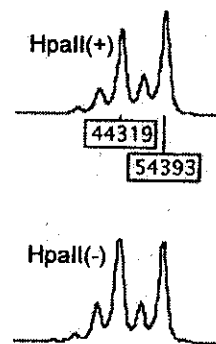


図3 上段が HpaII で消化した試料、下段が HpaII 表処理なしの試料。



X 染色体の偏りの検討

図4 上段に両アリの蛍光強度が表示されている。smaller area/larger area の比で偏りを検討した。

あるが、長い方は11から33までの個人差がある。塩基組成のほぼ等しい既知の長さの HUMARA 遺伝子と比較したことにより、正確な塩基長の判定が可能となり、CAG repeat 数は21回付近を頂点として分布することが明らかとなった。また、キャピラリー電気泳動により3塩基の差も明瞭に解析できた。X染色体不活化の極端な偏り (extreme skewing) の頻度が2%と従来の報告より低頻度であったが、この結果についてはさらなる検討が必要である。キャピラリー電気泳動法は塩基長の分離能力が高く、ゲルの代わりにポリマーを用いることにより、その充填から試料の吸引、結果の解析まで自動化されている。このため、再現性が高く、研究者による個人差が少ない有用な方法である。

[文献]

Busque L, et al, Blood 88, 59-65, 1996