

さらに高く、既治療例の41%よりも有意に高値であった。一方 MDS 例では、PNH 顆粒球の増加が検出されたのは13% (4例) のみであり、陽性例はいずれも形態異常の軽い RA 例であった。これらの4例はいずれも経過は良好であった。

PNH 顆粒球が増加していた未治療症例6例について、ATG+シクロスポリン療法後2~12カ月目に PNH 顆粒球の割合を再検したところ、治療前に比べて未反応の1例では軽度の増加がみられたが、改善しつつある5例では減少傾向が認められた。

[考察]

健常者における PNH 顆粒球の割合は、CD11b 陽性細胞中の0.003%未満であり、Luzzatto らの報告と同様であった。一方、再生不良性貧血例における陽性症例 ($\geq 0.003\%$) の割合 (53%) は過去の報告と比べて高値であった。とくに、未治療症例での陽性症例率が高値であったことから、PNH 顆粒球の増加は、免疫抑制療法などの治療の結果として起こった二次的現象ではなく、発症のメカニズムそのものに関連したものと考えられた。これらの患者の発症時に検出された PNH 顆粒球は、免疫学的な抑制機序を免れて相対的に残ったものであり、免疫抑制療法後に正常顆粒球が増えるに連れて、相対的に割合が減少した可能性が考えられる。

一方、MDS 患者では、NIH のグループが報告したほどの PNH 顆粒球の増加症例はみられなかった。また、PNH 顆粒球の増加が認められた RA の4症例はいずれも形態異常が軽度であり、治療に対する反応性も良好であった。逆に、形態異常の強い明らかな RA 例や RAEB 例では PNH 顆粒球はほとんどみられず、むしろ CD55、CD59 の発現が強い傾向がみられた。したがって、MDS-RA 症例における PNH 顆粒球の増加は、造血幹細胞の質的異常とは無関係であり、むしろ免疫学的機序のような外的造血抑制機序の存在を示唆している可能性がある。再生不良性貧血と MDS との鑑別が難しい症例に対しては PNH 顆粒球の有無を検索し、陽性例に対しては再生不良性貧血としての治療を積極的に行うべきと思われる。

[文献]

1. Azenishi Y, et al, Br J Haematol, 104, 523-529, 1999
2. Araten DJ, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 96, 5209-5214, 1999
3. Dunn DE, et al, Ann Intern Med, 131, 401-408, 1999
4. Takami A, et al, Br J Haematol, 107, 791-796, 1999

【結果】

Rh 抗原エピトープ群の解析

梶井 英治、近江 俊徳、亀崎 豊実、
小山田 隆、奥田 浩、岩本 禎彦

(自治医科大学、法医学・人類遺伝学)

小峰 光博 (昭和大学藤が丘病院、内科血液)

【はじめに】

Rh 血液型は、自己免疫性溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia; AIHA) の主要抗原の1つとして知られており、私たちもリコンビナントRhポリペプチド発現細胞や AIHA 疾患からのモノクローナルファージ抗体の作製などによる Rh ポリペプチド上の自己抗原解析を行っている。一方、Rh 血液型は、特に輸血領域において高率にアロ抗体を生じることから、重要な抗原とされており、様々な Rh 変異型の分子遺伝学的解析から抗原エピトープの推測がなされている。今回我々は、種々ある Rh 抗原エピトープ群の一部を欠く RhD 変異型である partial D 表現型の解析を行い、そのエピトープの同定を試みた。

【対象と方法】

試料は、D^{va}(Kou.) 型、D^{va}-like 型および S.M. 検体、H.K. 検体 (未分類) の血液を用いた。血清学的検査は、ポリクローナル抗 Rh 23抗体および種々のモノクローナル抗 RhD 抗体を用い、抗体の特性により生食法、抗グロブリン試験、酵素処理法などにより実施した。また、エピトープマップの作成は、国際輸血学会 (ISBT) で決定された各 RhD に対するモノクローナル抗体を準備し、その反応性を確認した。これらのモノクローナル抗 RhD 抗体には、大阪府赤十字血液センター、日本赤十字社中央血液センター、Dr. Fraser (Glasgow and West of Scotland Blood Transfusion Service, Scotland) より供与された抗体および市販の D-Screen kit (Diagast, France) を使用した。また、抗 Rh 23抗体は、M.K. Moulds, MT (Gamma Biologicals, U.S.A.) より供与された。

RhD ポリペプチドの第4ドメインにアミノ酸変異を有する partial D 赤血球と各種モノクローナル抗 RhD 抗体との反応性を調べ、現在提唱されている9エピトープモデルの作成を試みた (表1)。まず、RhCE ポリペプチドに相当するアミノ酸への置換が認められた、D^{va}(Kou.) 型 (Phe223Val, Glu233Gln)、D^{va}-like 型 (Phe223Val, Glu233Gln, Val238Met, Val245Leu)、S.M. 検体 (Glu233Gln) について検討した結果、D^{va}(Kou.) 型は LHM169/81 (epD1 1a)、LHM70/45 (epD1 1b)、LM74/1029 (epD1 1b) およびP3X241 (epD5)、P3X35 (epD5 5d) 抗体に陰性を示した。これは、既に報告されている D^{va} 表現型の9エピトープモデルの結果と合致した。D^{va}-like 型は、LHM169/81 (epD1 1a)、LHM70/45 (epD1 1b)、LM74/1029 (epD1 1b) およびP3X241 (epD5)、DHIRO-6 (epD5 5a)、P3X35 (epD5 5d) 抗体に陰性を示した。S.M.は LHM169/81 (epD1 1a)、LHM70/45 (epD1 1b)、LM74/1029 (epD1 1b) および P3X35抗体で陰性であった。D^{va}-like 型と S.M.は、D^{va}(Kou.) 型同様 epD2、epD3、epD4、epD6/7、epD8、epD9が陽性となったが、epD1と epD5に陰性を示したことから、遺伝子型の異なる新しい D^{va} 表現型の可能性が強く示唆された。そこで、次に D^{va}(Kou.) 型、D^{va}-like 型、S.M.について、D^{va} 表現型赤血球に特異的な Rh23抗原の発現を確認した。その結果、いずれの赤血球も抗 Rh23抗体に陽性を示し、Rh23抗原の発現が認められた (表2)。これらの結果から、D^{va}-like 型と S.M.は新しい D^{va} 表現型であると考えられ、D^{va}-like 型は D^{va}(Jpn)、D^{va}(S.M.) とあらたに分類した。なお、これらの表現型を有する検体数は D^{va}(Jpn) 6例、D^{va}(S.M.) 1例であった。

次に、Rh ポリペプチドの第4ドメインに位置する233番目のアミノ酸が Glu から Lys へ変異していた H.K. 赤血球について、各種モノクローナル抗 RhD 抗体および抗 Rh23抗体との反応性を調べた。その結果、LHM169/81 (epD1 1a)、LHM70/45 (epD1 1b)、LM74/1029 (epD1 1b)、OSK3-3 (epD4,)、P3X241 (epD5)、DHIRO-6

(epD5 5a)、P3X35 (epD5 5d)、OSK3-2 (epD6/7 6/7a)、RUM-1 (epD6/7 6/7a)、LHM169/80 (epD6/7 6/7d)、OSK3 (epD6/7 6/7d)、LHM59/20 (epD6/7 6/7g)、LHM77/64 (epD9 9a) に陰性を示した (表1)。H.K. 赤血球の Rh 抗原は、epD1、epD4、epD5、epD6/7 および epD9 に異常が認められたが従来の報告に合致するものはなかった。そこで、Glu233Lys の変異を伴う H.K. を新たな partial D として DHK と分類した。また、最近我々は、M.I. 検体を DHK と同定し、DHK 型は計 2 例となった。

[考察・結論]

RhD ポリペプチドは、N 末端と C 末端を共に細胞内に有し、12 個の膜貫通ドメインと 6 個の細胞外ドメインで構成されている。また、6 個の細胞外ドメインは、相互に関係を持ちながら複雑な抗原決定基群を形成していると考えられている。D^{va} 赤血球に特異的に発現している Rh23 抗原のエピトープは、これまで細胞外の第 4 ドメインに共

通している 223Val と 233Gln と推測されていた。今回、Glu233Gln の 1 アミノ酸変異を伴う D^{va} (SM) に Rh23 抗原の発現を認め、さらに Glu233Lys の 1 アミノ酸変異を伴う DHK が抗 Rh23 抗体に陰性であったことから、Rh23 抗原のエピトープには 233 番目のグルタミン (Gln) が関与している可能性が示唆された。いわゆる partial D 抗原の中には、重篤な新生児溶血性貧血を惹起するものもあり、今回得られた Rh23 抗原のエピトープに関する成績は、Rh23 抗原の臨床的な意義を考える上に重要な情報を提供するものと考えられている。

[参考文献]

1. 梶井英治編：最新血液型学, (南山堂), 1998
2. Omi T, et al, Biochem Biophys Res Commun, 254, 786, 1999
3. Omi T, et al, Transfusion 40, 256, 2000
4. 近江俊徳、他: D^{va} (partial D) 表現型のエピトープマッピング. DNA 多型 (in press)

表 1 各種 partial D 赤血球の 9 エピトープモデルによるエピトープマップ

| RhD Epitope | MoAbs | D ^{va} (Jpn) n=4 | D ^{va} (Kou.) n=2 | D ^{va} (SM) n=1 | DHK n=2 |
|-------------|-------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------|
| epD1 | 1a | LHM169/81 | - | - | - |
| | 1b | LHM70/45, LM74/102 | - | - | - |
| epD2 | | P3X249, P3X290 | + | + | + |
| epD3 | | LHM76/55 | + | + | + |
| epD4 | | OSK3-3 | + | + | + |
| | | P3X241 | - | - | - |
| epD5 | 5a | HIRO-6 | - | + | + |
| | 5d | P3X35 | - | - | - |
| epD6/7 | | P3X61 | + | + | + |
| | 6/7a | OSK3-2 | + | + | + |
| | | RUM-1 | + | + | + |
| | 6/7b | OSK3-1 | + | + | + |
| epD6/7 | 6/7d | LHM169/80, OSK3 | + | + | + |
| | | BS221 | + | + | + |
| | 6/7f | HM16 | + | + | + |
| | 6/7g | HM10, HIRO-5 | + | + | + |
| epD8 | | LHM59/20 | + | + | + |
| | 6/7j | HIRO-2 | + | + | + |
| epD9 | | LHM59/19, P3X212, IIF1 | + | + | + |
| | 9a | HIRO-4, P3X212, 23 B10 | + | + | + |
| | | LHM77/64 | + | + | - |

表 2 各種 partial D 赤血球における RhD ポリペプチドアミノ酸配列と Rh23 抗原の発現

| Subjects | Type | ABO | Rh | amino acid sequences | | | | | | Rh23 | |
|----------|------------------------|-----|------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|
| | | | | 223 | 226 | 233 | 238 | 245 | 248 | | 263 |
| Y.H. | | O | CCee | Val | Ala | Gln | Met | Leu | Ser | Gly | 3+ |
| K.S. | | B | CCeE | Val | Ala | Gln | Met | Leu | Ser | Gly | 3+ |
| N.N. | | O | CcEe | Val | Ala | Gln | Met | Leu | Ser | Gly | 3+ |
| T.H. | D ^{va} (Jpn) | A | CcEe | Val | Ala | Gln | Met | Leu | Ser | Gly | 3+ |
| M.K. | | O | Ccee | Val | Ala | Gln | Met | Leu | Ser | Gly | 3+ |
| H.N. | | A | Ccee | Val | Ala | Gln | Met | Leu | Ser | Gly | 3+ |
| A.K. | | O | Ccee | Val | Ala | Gln | Val | Val | Ser | Gly | 1+ |
| H.B. | D ^{va} (Kou.) | B | CcEe | Val | Ala | Gln | Val | Val | Ser | Gly | 3+ |
| H.O. | | B | Ccee | Val | Ala | Gln | Val | Val | Ser | Gly | 2+ |
| S.M. | D ^{va} (SM) | O | Ccee | Phe | Ala | Gln | Val | Val | Ser | Gly | 3+ |
| H.K. | DHK | O | Ccee | Phe | Ala | Lys | Val | Val | Ser | Gly | - |
| M.I. | | A | ccee | Phe | Ala | Lys | Val | Val | Ser | Gly | - |
| Control | | B | CcEe | Phe | Ala | Glu | Val | Val | Ser | Gly | - |

わが国における遺伝性球状赤血球症 (HS) の病因としての Ankyrin 遺伝子変異の解析

八幡 義人、神崎 暁郎、中西 秀和
八幡 愛弓、山田 治

(川崎医科大学、血液内科)

[はじめに]

わが国における遺伝性球状赤血球症 (HS) は、欧米症例と比較して、1. 全般的に軽症例が多く、2. また典型的な常染色体優性遺伝 (AD) 形式をとる古典的HS症例に加えて、非 AD 型 HS が少なからず存在していること、3. 膜蛋白生化学からの成績では、ankyrin 減少症例が欧米症例に比較して、可成り少ない点などの特徴がある。昨年度までに我々は、わが国の HS の病因として、band 3 遺伝子 (AE-1) を解析し、frameshift 変異3種、missense 変異8種、計11種を同定した。そこで今年度は、ankyrin 遺伝子 (ANK-1) を主体に病因としての遺伝子変異の検索を行った。

[対象と方法]

AD 型 HS 15家系18症例、非 AD 型 HS 29家系29症例、計44家系47症例について、その末梢血単核細胞から得られた genomic DNA を用いて、SSCP 法にて遺伝子変異の可能性を screening し、

異常例については direct sequence 法にて確認・同定した。

[結果]

1. 病因としての ankyrin 遺伝子変異：

以上の症例について検索した結果、病因遺伝子変異13種、すなわち nonsense 変異4種、frameshift 変異6種、splicing 変異3種を同定し得た (表1)。このうち、AD 型 HS に合併した変異は4種であり、他の9種は非 AD 型 HS に認められた。この場合、AD 型 HS では、その ankyrin 遺伝子変異はN末端側の exon 1に2種と、C末端側に近い exon 31と38に認められ、その他の変異 (exon 5~exon 31) は、全て非 AD 型 HS に認められた。ところで、以上の ankyrin 遺伝子変異は、現在までの世界報告例には全く含まれておらず、たまたま今回同定し得た全ての変異が新種であることから、日本人固有の変異である可能性が高い。

2. Ankyrin 遺伝子の polymorphism：

次に、正常日本人164 alleles、HS 日本人症例116 alleles について、missense 変異2種、silent 変異15種、計17種が同定された。この成績をドイツ人白人 HS 症例246 allele と比較すると、上記の日本人 polymorphism のうち、7種は日本人固有と考えられた。この両者間に、allele frequency の著しい相違は認められなかった。また、これらの polymorphism について、正常 (82例164 alleles)

表1 わが国の HS 症例の病因としての ankyrin 遺伝子変異

| 遺伝形式 | 変異 | 局在 |
|----------------------------|---|-----------|
| <u>Nonsense mutation</u> | | |
| Sp | 612: CAG → TAG (Gln → stop) | Exon 17 |
| AD | 1252: CGA → TGA (Arg → stop) | Exon 31 |
| Sp | 1230: TAC → TAG (Tyr → stop) | Exon 31 |
| AD | 1640: CAG → TAG (Gln → stop) (expressed abnormal ankyrin?) | Exon 38 |
| <u>Frameshift mutation</u> | | |
| AD | 2-4: 10nts. del. "CCCTATTCTG" | Exon 1 |
| Sp | 112: 1nt. del. "T" | Exon 5 |
| Sp | 187-190: 10nts. del. "CACGGCTGCG" | Exon 6 |
| Sp | 637: 1nt. ins. "C" | Exon 17 |
| Sp | 798-799: 4nts. del. "CAGT" | Exon 22 |
| Sp | 798-799: 4nts. del. "CAGT" | Exon 22 |
| Sp | 951-953: 7nt del. "GCCGCT" & 4nt ins. "TCTG" | Exon 26 |
| <u>Abnormal splicing</u> | | |
| AD | g → c, 5nt after the end of exon 1 | Intron 1 |
| Sp | 1nt. ins. "A", 3-4nt after the end of exon 5 | Intron 5 |
| Sp | gt → ct, 1nt after the end of exon 28 | Intron 28 |

AD: 常染色体優性遺伝, Sp: 非AD型

表2 日本人正常者82例および本邦遺伝性球状赤血球症 (HS) 55家系58症例における ankyrin 遺伝子 (Ank-1) の遺伝子多型

| | 所在 | 遺伝子多型 | 名称 | 頻度 | | | |
|--------------------------|------------|--|-----------------|-----------|-----------|-------------|----------|
| | | | | 正常 (n=82) | HS (n=58) | | |
| <u>Missense mutation</u> | Exon 2 | codon 11: GAT → GTC (Asp → Ala) | D11A | 0.01 | 0.02 | Ank Brügger | |
| | Exon 17 | codon 619: CGT → CAT (Arg → His) | R619H | 0.01 | 0.05 | | |
| <u>Silent mutation</u> | Exon 4 | codon 105: AAC → AAT | 399C → T | 0.12 | 0.12 | Ank Okayama | |
| | Exon 6 | codon 199: CCG → CCA | 681G → A | 0.01 | 0.19 | | |
| | Intron 7* | C → T, 32nt before the start of exon 8 | 796 (-32C → T) | 0.02 | 0.12 | | |
| | Exon 18 | codon 691: GGC → GGT | 2157C → T | 0.06 | 0.10 | | |
| | Exon 20* | codon 737: CCC → CCG | 2295C → G | 0.00 | 0.03 | | |
| | Exon 21 | codon 783: ACC → ACT | 2433C → T | 0.06 | 0.10 | | |
| | Intron 22* | T → C, 13nt after the end of exon 22 | 2545(+13T → C) | 0.00 | 0.02 | | |
| | Exon 26 | codon 971: CTC → CTG | 2997C → G | 0.49 | 0.41 | | |
| | Intron 26* | C → T, 46nt after the end of exon 26 | 3044(+46C → T) | 0.06 | 0.19 | | |
| | Exon 28* | codon 1046: CTA → CCA | L1046P | 0.02 | 0.02 | | Ank Nara |
| | Intron 28* | C → G, 21nt after the end of exon 28 | 3411(+21C → G) | 0.01 | 0.02 | | |
| | Exon 33 | codon 1367: GCC → GCT | 4185C → T | 0.01 | 0.05 | | |
| | Exon 39 | codon 1755: GTG → GTA | 5439G → A | 0.17 | 0.12 | | |
| | Exon 41 | CGT → CAT (Arg → His) | 5703(+71G → A) | 0.02 | 0.03 | | |
| | Intron 41* | C → T, 364nt after the end of exon 41 | 5703(+364C → T) | 0.00 | 0.05 | | |

*わが国固有型

とHS (58症例116 alleles) とにおける allele frequency を検索したところ、この両者間には著差は認められなかった。

[考察・結論]

わが国における HS の臨床病型については、常染色体優性遺伝 (AD) 形式による HS 以外に、従来から孤発例と呼ばれている非 AD 型 HS 症例が少なからず存在することが知られていたが、我々の系統的な臨床血液学的、膜生化学的研究によって、わが国の HS 103家系のうち、典型的 AD 型 HS は33家系、非 AD 型 HS は70家系と判明した。したがって、両親に HS の確認出来ない家系は、典型的な家族歴の判明している AD 型 HS 家系と較べ、その頻度は少なくとも低くはないものと推定される。

次に、HS の病因解明については、従来から我々が行って来た SDS-PAGE 法による膜蛋白検索の成績から、B3減少群約25~30%、P4.2減少群約30%、ankyrin 減少群約10%、膜蛋白非減少群約30%と推測されていた。このうち、B3減少群については、本膜蛋白の減少症例では、ほとんど例外なしにB3遺伝子に病因と推定される遺伝子変異が発見されており、この両者の整合性は高いと考えられる。

これに対して、ankyrin では、溶血亢進に伴う網赤血球増加症の場合には、容易に ankyrin 蛋白量が相対的に増加することが知られている。した

がって、本来の病変としての ankyrin 減少が存在する群では、この本質的な減少と、反応性幼若赤血球増加症に伴う ankyrin 量の増大とが同時に存在することとなり、膜蛋白としての定量的な評価が困難なことが多い。事実、今回検索を行った AD 型 HS 15家系18症例では、ankyrin 減少群は僅か3家系のみであり、さらに非 AD 型 HS でも、ankyrin の減少群は皆無であった。Ankyrin 遺伝子解析では、この非 AD 型 HS 家系から ankyrin の病因としての変異が9種同定されるに至っている。このため、膜蛋白としての ankyrin 量からのみでは、ankyrin 遺伝子変異の有無を推測することは不可能であることが実証された。

ところで、この ankyrin 遺伝子変異の種別は、圧倒的に nonsense 変異、frameshift 変異、splicing 変異などの、いわゆる重篤な病変から成ることが判明した。しかも、今回、同定し得たこれらの ankyrin 遺伝子変異は、欧米諸国による既報成績には全く含まれておらず、わが国に固有である可能性が極めて高い。これらの重篤な ankyrin 異常は、B3遺伝子異常が frameshift 変異の他、多くは missense 変異から成ること、さらにP4.2変異に至っては、圧倒的に missense 変異の homozygote (あるいはcompound heterozygote) から成ることを考え合わせると、特徴的といえる。また、ankyrin 遺伝子では、非常に多彩な polymorphism の存在することも、特有な所見である。

V 骨髓纖維症

CD34⁻CD38⁻細胞の in vitro における 造血能の検討

仁保 喜之、藤崎 智明、大塚 輝久、
下田 和哉、浅野 嘉延、権藤 久司、
岡村 孝

(九州大学大学院医学研究院病態修復内
科学、第一内科)

[はじめに]

従来、人においては CD34 が唯一の信頼に足る造血幹細胞抗原として確立され、既に臨床においても造血幹細胞の純化に応用されている。純化 CD34 陽性細胞が造血幹細胞として機能し、レシピエントにおいて造血を再構築できることが明らかにされている¹⁾。マウスにおいても CD34 は幹細胞抗原の1つではあるが、一方で CD34 陰性造血幹細胞の存在とその CD34 陽性幹細胞に対する造血維持という点での質的優位性が示されている²⁾。最近、人においても CD34 陰性造血幹細胞の存在が示唆されているが³⁻⁵⁾、異種移植という実験系の制約から十分に検討されているとは言いがたい。我々は、CD34 陰性幹細胞の造血活性について in vitro を中心に検討した。

[対象]

人胎児肝組織中の造血細胞 (FL)、正常分娩で得られた臍帯血単核球 (CB)、骨髄移植ドナーから得られた成人骨髄単核球 (BM)、化学療法後 G-CSF で動員・採取された末梢血単核球 (PB) でいずれも施設の使用基準に則り取得・使用した。

[方法]

あらかじめ凍結保存していた単核球を解凍・洗浄し、StemSep™ を用いて分化抗原 (CD2, 3, 14, 19, 24, 56, 66b, GlyA) 陽性細胞を除去し分化抗原陰性 (Lin⁻) 細胞を得た。次に、CD34-FITC および CD38-PE で染色、PI を用いて死細胞を除去し、FACStar® で各幹細胞源に関して CD34、CD38 抗原の発現を検討した。その後、Lin⁻CD34⁻または Lin⁻CD34⁺CD38⁻および Lin⁻CD34⁻CD38⁺分画の

細胞をソートした。CD34⁻分画に関してはソート後、その純度を確認するとともに、ほとんどの例では再度ソートを行い潜在的な CD34⁺細胞の混入を排除した。得られた細胞は Lin⁻CD34⁻分画に関してはメチルセルロース法 (MethoCult) で顆粒球・赤芽球系のコロニー形成能を、コラーゲンをういた半固形培地 (MegaCult) で巨核球系のコロニー形成能を検討した。Lin⁻CD34⁺CD38⁻および Lin⁻CD34⁻CD38⁺分画の細胞に関しては、メチルセルロース法でコロニー形成能を検討し、長期培養系にて Long-term culture-initiating cell (LTC-IC) についても検討した。また、無血清液体培養系に各種サイトカインを添加し、両者のサイトカイン要求性を比較し10日間培養後の細胞に関してはメチルセルロース法およびコラーゲン法で3系統のコロニー形成能と前述の方法で CD34 の発現についても検討した。この際サイトカインとして Steel Factor (SF: 100ng/mL)、flt-3 ligand (FL: 100ng/mL)、Thrombopoietin (TPO: 100ng/mL)、IL-6 と可溶性 IL-6 受容体を人工的に結合させ、高い gp130 刺激効果を有する hyper IL-6 (H-IL-6: 10ng/mL)、IL-3 (20ng/mL) を用いた。Lin⁻CD34⁻CD38⁻分画の細胞については、液体培養系を確立した後、限界希釈法によりサイトカインに反応し増殖するクローンの頻度と当初はコロニー形成能を持たず10日間の培養後にコロニー形成能を獲得する前駆細胞 (Pre-CFC) の頻度を算定した。また、Lin⁻CD34⁻細胞を従来、人造造血幹細胞の移植モデルとして有用な NOD/SCID マウスに $\beta 2$ マクログロブリン遺伝子のノックアウトを掛け合わせ、更に生着率を向上させた NOD/SCID/ $\beta 2^{-/-}$ マウス (6ないし8週齢) に低用量放射線照射 (350cGy) を加え、尾静脈より移植した。マウスは、6ないし8週後に屠殺し、下肢の長管骨から骨髄を採取し、FACS にて生着の有無を検討した⁶⁾。

[結果]

1. 各造血幹細胞源における Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞の頻度および Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞の頻度の比較: Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞の頻度は CB で最も高く、FL がこれに次いだ。BM、PB では1%前後で有意差はないが、PB の方がやや高い傾向であっ

た (図1)。BM と PB について Lin⁻CD34⁺CD38⁻ と Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞の頻度を比較したところほぼ同程度であったが (表1)、同一検体での両者の頻度には相関は見られなかった。

2. Lin⁻CD34⁻分画の造血活性：この分画にも CD34⁺分画に比べ低頻度ではあるがコロニー活性が認められた。特に CB においてはコロニー形成細胞の平均頻度は2%近くに達し、形成されたコロニーは多能性 (CFU-Mix) が主体であった (表2)。これに対して Lin⁻CD34⁻CD38⁻分画にはコロニー形成細胞はほとんど認められなかった。また、この分画の細胞を長期培養系で培養したが、1例を除き6週後の細胞にコロニー活性は認められなかった (表3)。陽性の1例では、Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞1,000個当り1,600個のコロニーが6週後に形成されたが、この例では同時に検討した

Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞の同様のコロニー形成率は低く、CD34⁺細胞の混入に基づく結果ではないと考えられた。

3. Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞の液体培養：無血清液体培養系に各種サイトカインを添加し、同一検体由来の Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞と Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞を平行して培養したところ、予想通り前者はほとんどのサイトカインの組み合わせに反応して増殖し、培養10日目の細胞はコロニー形成能を有していた。後者のサイトカイン要求性は厳密で、SF、FL、TPO、H-IL-6、IL-3 のすべてを必要とした (表3)。これら5種のサイトカイン存在下では、培養開始後4ないし5日目には明らかな細胞増殖が観察されるようになり、10日目の細胞は約30倍に増加し、約5%の細胞が CD34 抗原を発現し、その約半数はコロニー形成能を獲得していた。コロ

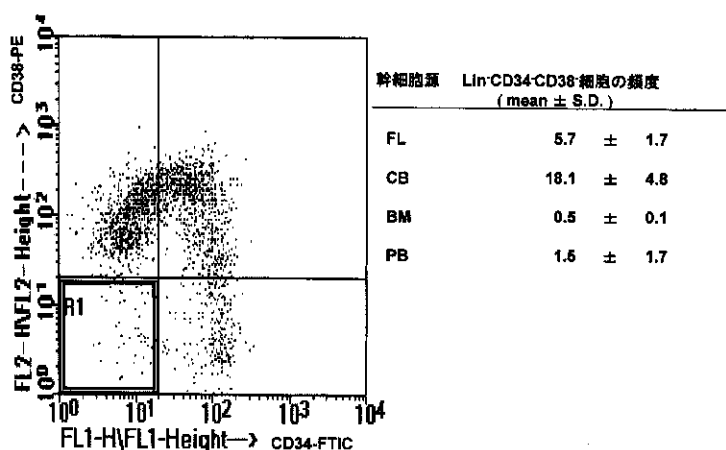


図1 各造血幹細胞源における Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞の頻度

各造血幹細胞源単核球の分化抗原陽性細胞を除去 (Lin⁻) し、CD34-FITC および CD38-PE で染色し Lin⁻CD34⁻CD38⁻分画の細胞の頻度を検討した。

CB で最も高頻度で FL がそれに次いだ。

表1 Lin⁻分画における CD34⁺CD38⁻ と CD34⁻CD38⁻細胞との頻度の比較

| 幹細胞源 | 検体数 | CD34 ⁺ CD38 ⁻ 細胞頻度 | CD34 ⁻ CD38 ⁻ 細胞頻度 |
|------|-----|--|--|
| BM | 5 | 2.4 ± 0.8 | 3.6 ± 1.3 |
| PB | 7 | 3.2 ± 1.3 | 6.0 ± 2.0 |

表2. 臍帯血 Lin⁻CD34⁻細胞のコロニー形成能

| 検体 | CFU-E | BFU-E | CFU-Mix | CFU-GM | total |
|-----|-------|-------|---------|--------|-------|
| CB1 | 2 | 5 | 19 | 3 | 29 |
| CB2 | 1 | 1 | 10 | 1 | 13 |
| CB3 | 1 | 3 | 8 | 1 | 13 |
| CB5 | 1 | 2 | 11 | 1 | 15 |

表3 Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞のin vitroでの造血活性

| 培養条件 | 検体 | 培養細胞数 | コロニー総数 | コロニー数/1,000細胞 |
|--------------|-----|-------|--------|---------------|
| メチル セルコース | PB1 | 500 | 0 | <1 |
| | PB2 | 5,000 | 4 | <1 |
| | BM1 | 500 | 0 | <1 |
| | BM2 | 1,000 | 0 | <1 |
| | BM3 | 500 | 0 | <1 |
| | BM4 | 5,000 | 3 | <1 |
| 長期培養 | PB1 | 500 | 0 | <1 |
| | PB2 | 5,000 | 0 | <0.1 |
| | BM1 | 500 | 0 | <1 |
| | BM2 | 1,000 | 0 | <0.5 |
| | BM3 | 500 | 0 | <1 |
| | BM4 | 5,000 | 790 | 1,600 |

ニー形成細胞は顆粒球・単球系が主体であったが、赤芽球系も見られ、巨核球系も観察された。これらの増殖クローンの頻度は Lin⁻CD34⁻CD38⁻分画の平均約1%で pre-CFC の頻度はクローンの約半分であった (表4)。

4. マウスへの移植実験：マウスを用いた移植の系としては最も高感度と考えられる NOD/SCID/ β 2^{-/-}マウスの系を使用した。使用した幹細胞源にかかわらず高純化 Lin⁻CD34⁻分画の細胞には生着例が観察されなかった。

[考察]

従来、人においては CD34 は造血幹・前駆細胞抗原とされ、CD34⁻細胞は分化・成熟した細胞と考えられてきた。しかし、今回の検討から、少なくとも CB においては Lin⁻CD34⁻分画には多能性の前駆細胞がある程度存在することが示された。また、胎生期から成人にいたるまですべての発達段階の主要な造血幹細胞源で Lin⁻CD34⁻CD38⁻分画には、増殖に多種・大量のサイトカインを必要とする希な細胞群が存在することが判明した。これらの細胞は分離直後にはコロニー形成能を示さず、サイトカイン刺激により分化・増殖しコロニー形成能を獲得すると考えられた。この点は counterpart である Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞と類似した性質を有すると推測された⁷⁾。しかし、サイトカインの要求性はより厳密であった。また、我々の検討では過去の報告から生着可能と考えられる細胞数を移植したにもかかわらず、造血活性が高いと信じられている FL、CB でも Lin⁻CD34⁻細胞

による生着は観察されなかった。マウスにおける Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞の動態が Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞と必ずしも類似しない可能性があるが、方法としては既報³⁾と大きく異なる点はなかった。我々の用いた細胞は2度ソートされ高度に純化されており、その点が既報と異なる結果につながった可能性がある。現に既報通りにソートを1回のみ行った Lin⁻CD34⁻細胞を移植した場合は生着が認めている。サイトカイン反応性の Lin⁻CD34⁻CD38⁻細胞が Lin⁻CD34⁺CD38⁻細胞と同様に in vivo でも幹細胞としての機能を有するか否かは興味深い問題であり、既報³⁾との相違は純度の問題か、ソート過程における細胞障害が原因か今後究明する必要がある。

[結語]

今回の検討から CD34 抗原が全ての造血前駆・幹細胞に発現されているわけではないと考えられた。今後、CD34⁻幹細胞の最適な培養・増殖条件の究明が必要である。

[文献]

1. Krause DS, et al, Blood, 87, 1-13, 1996
2. Osawa M, et al, Science, 273, 242-5, 1996
3. Bhatia M, et al, Nat Med 4, 1038-45, 1998
4. Zanjani ED, et al, Exp Hematol 26, 353-60, 1998
5. Goodell MA, et al, Nat Med 3, 1337-45, 1997
6. Fujisaki T, et al, Blood 94, 1926-32, 1999
7. Petzer AL, et al, Proc Natl Acad Sci U S A 93, 1470-4, 1996

骨髓巨核球での Smad4 発現減弱が 本態性血小板血症の血小板増加に関与する

新津洋司郎 (札幌医科大学第四内科)

[はじめに]

我々はこれまで主要な血小板造血因子である thrombopoietin (TPO) が骨髓ストローマ細胞から産生されることを見だし、また、血小板中に大量に含まれる TGF- β 1が骨髓ストローマ細胞からの TPO 産生を促進し、産生された TPO が巨核球の TGF- β 1レセプターの発現を高めることで結果的に血小板造血を抑制するという負の調節因子であることを明らかにした。しかしながら、本態性血小板血症 (ET) 患者では血小板数増加とその破壊により骨髓 TGF- β 1濃度が高いにも関わらず巨核球造血は抑制されることなく過剰に認められる。そこで本研究では ET における巨核球過増殖の原因解明のため、本症の巨核球造血が TGF- β 1の抑制から逸脱しているか否か、また逸脱していればその機序をあきらかにすることを目的とする。

[対象と方法]

1. 正常人およびET患者骨髓より単核球を採取。トロンボポイエチン (TPO) (100 ng/mL)、G-CSF (100 ng/mL)、エリスロポイエチン (EPO) (2 U/mL) 存在下にそれぞれ培養し巨核球 (CFU-Meg)、顆粒球 (CFU-GM)、赤芽球コロニー (BFU-E) 形成数を算定する。また TGF- β (0-1.0 ng/mL) を添加培養しそのコロニー形成抑制効果を検討する
2. 上記培養 day14にコロニーを回収し total RNA を抽出。TaqMan real time RT-PCR 法で Smad2,3,4,5mRNA の発現を定量的に解析する。
3. Smad4遺伝子発現レトロウイルスベクターでファイブロネクチンを用いてET患者骨髓単核球に遺伝子導入し CFU-Meg コロニー形成に対する TGF- β の抑制効果を検討する。

[結果]

正常者の巨核球コロニーは TGF- β 1.0 ng/mL 添加により完全に抑制されたが ET 患者の抑制率は 45~65%程度であった (図1)。CFU-GM、BFU-E

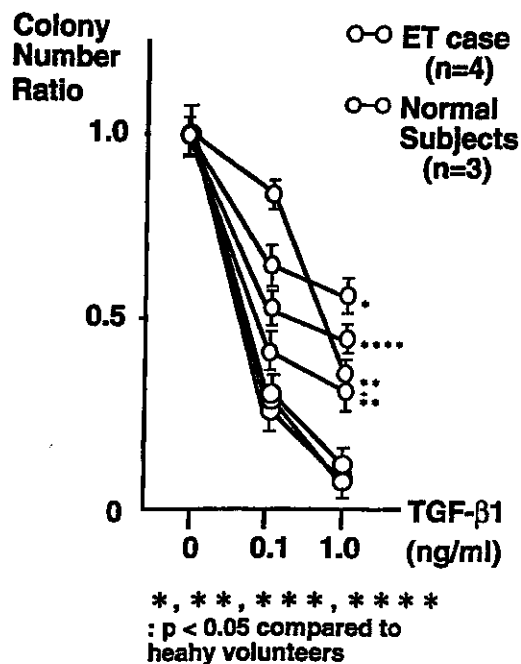


図1 CFU-Meg colony 形成に対する TGF- β の抑制作用

正常人および本態性血小板血症 (ET) 患者の CFU-Meg colony assay 系に TGF- β を添加培養した。正常人 CFU-Meg colony は TGF- β (1.0ng/mL) で98%抑制されたが ET 患者では抑制率は45-65%であった。

コロニー形成抑制率は正常者、ET患者ともにそれぞれ平均30%、40%であった (既報)。正常者の Smad4 mRNA 発現は CFU-Meg で最も高く認められた。また ET 患者 CFU-Meg において Smad4 発現は正常者のそれに比較し有意に低下していた (図2)。また、ET 患者骨髓単核球に Smad4発現レトロウイルスベクターを用いて Smad4遺伝子を導入すると CFU-Meg コロニー形成は TGF- β により抑制された (図3)。

[考察・結論]

Smad4が正常者の CFU-Meg に多く発現していたことは、巨核球造血が生理的に TGF- β の調節を受けていることを裏付けるものと考えられた。また CFU-GM、BFU-E においても発現低下があり幹細胞レベルでの異常と考えられた。Smad4遺

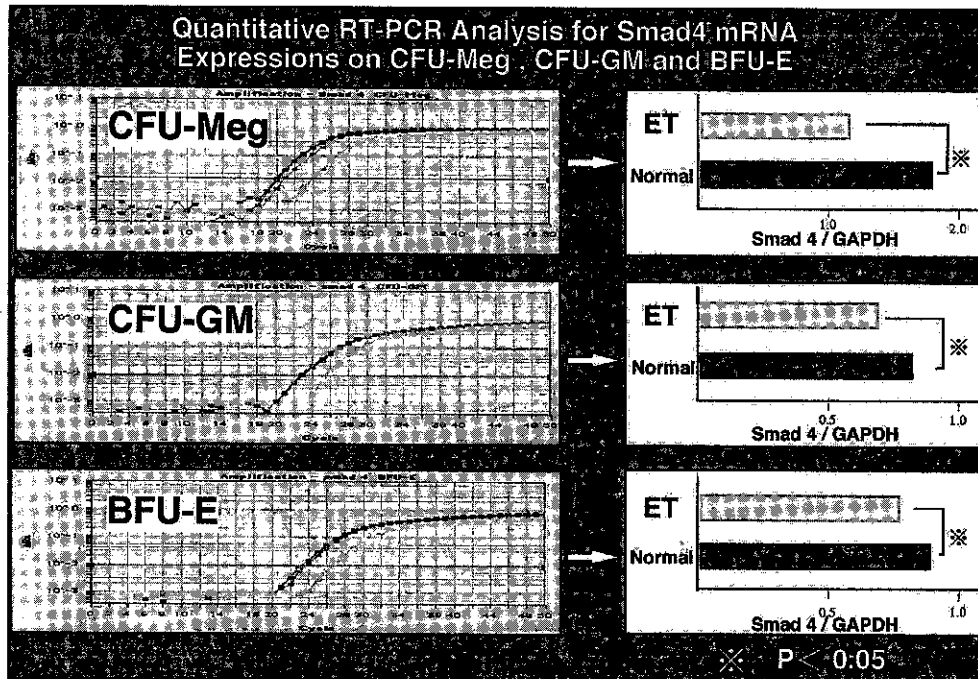


図2 健常者および本能性血小板血症患者 CFU-Meg、CFU-GM、BFU-E における Smad4 発現
Smad4 mRNA 発現は健常者では CFU-Meg に最も強く認められた。ET 患者 CFU-Meg の Smad4 は健常者のそれに比較し有意に低下し、健常者の CFU-GM および BFU-E 程度であった。ET 患者の CFU-GM および BFU-E においても Smad4 mRNA 発現低下は認められた。

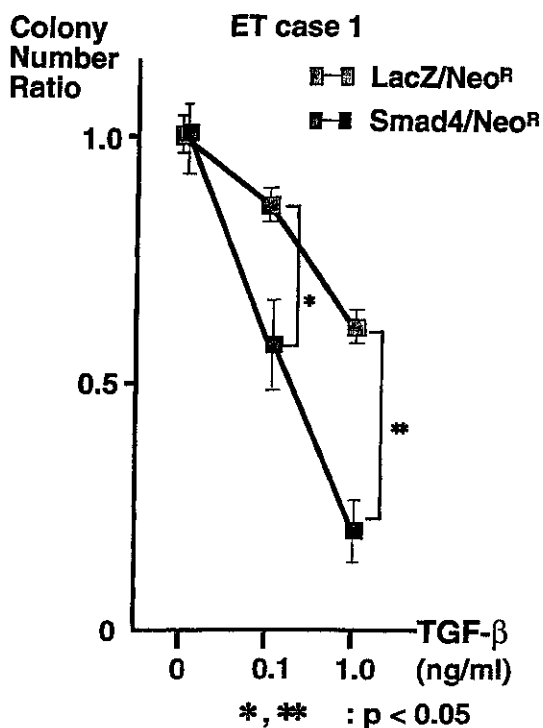


図3 Smad4 遺伝子導入骨髄単核球に由来する CFU-Meg colony の TGF- β 感受性

本能性血小板血症患者骨髄単核球に Smad4 遺伝子を導入し CFU-Meg コロニーアッセイを行ったところ TGF- β による抑制感受性が回復した。

伝子導入により TGF- β に対する感受性が回復したことから、ET 患者 CFU-Meg では Smad4 発現低下のため TGF- β の増殖抑制から逸脱していると考えられた。

以上から ET における巨核球過増殖は Smad4 発現低下による TGF- β 1 のシグナル伝達異常によると考えられた。

[参考文献]

1. Hirayama Y, et al, Blood 92, 46-52, 1998
2. Sakamaki S, et al, Blood 94, 1961-1970, 1999

発表文献リスト

発表文献リスト

国際・国内学会雑誌への発表文献リスト

平成11年度の本研究に当たってなされた研究業績のうち既発表または印刷中の原著論文、学会発表抄録、単行本を関連分野別に区分し、原則として、英文、和文の順序で、それぞれを原著、抄録に整理し、班構成員名簿の記載順に配列した。

著者名のアンダーラインは本研究班の構成員を示し、通し番号の肩につけた*印は抄録を示す。

1. 再生不良性貧血に関する研究業績

1. Otskil T, Kajigaya S, Ozawa K, Liu J M : SNX5, a new member of the sorting nexin family, binds to the Fanconi anemia complementation group A(FANCA) protein. *Biochem Biophys Res Comm* 265 : 630 - 635, 1999
2. Kanda Y, Chiba S, Tanaka Y, Kami M, Saito T, Asai T, Izutsu K, Yuji K, Ogawa S, Honda H, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H : TT virus in frequently-transfused patients. *Am J Med* 106 : 116 - 117, 1999
3. Asano Y, Shibata S, Kobayashi S, Okamura S, Niho Y : Effect of interleukin 10 on the hematopoietic progenitor cells from patients with aplastic anemia. *Stem Cells* 17 : 147 - 151, 1999
4. Tauchi T, Iwama H, Kaku H, Kimura Y, Ohyashiki K, et al : Remission of pure red cell aplasia associated with operative cure of lung cancer. *Am J Hematol* 61 : 157 -158, 1999
5. Ito, Y, Kuriyama Y, Tauchi, T, Ohyashiki JH, Toyama K, Ohyashiki K : A patient with pure red cell aplasia and Good's syndrome. *Haematologica* 84 : 1048 - 1049, 1999
6. Otawa M, Kawanishi Y, Shoji N, Miyazawa K, Ohyashiki K : Comparative multi-color flow cytometric analysis of cell surface antigens in bone marrow hematopoietic progenitors between refractory anemia and aplastic anemia. *Leukemia Research* : (in press)
7. Kawaguchi K, Wada H, Mori A, Takemoto Y, Kakishita E, Kanamaru A : Detection of GPI-anchored protein-deficient cells in patients with aplastic anaemia and evidence for clonal expansion during the clinical course. *Br J Haematol* 105 : 80 - 84, 1999
8. Kojima S : Cytokine abnormalities in aplastic anemia. *Aplastic Anemia: Pathophysiology and Treatment* (Ed. Schrenzenmeier H, Bacigalupo A), Cambridge University Press (Cambridge, UK) : 21 - 40, 2000
9. Kojima S : Use of granulocyte colony-stimulating factor for treatment of aplastic anemia. *Nagoya J Med Sci*

62 : 77 - 82, 1999

10. Ueda H, Tashiro S, Kojima S, Tanaka K, Eguchi M, Ueda K, Kamada N : Instability of chromosome 7 in colony forming cells of patients with aplastic anemia. *Int J Hematol* 70 : 13 - 19,1999
- 11.* Ohara A, Kojima S, Bessho F, Konishi S, Tsuchida M, Ohga S, Toyoda Y, Koike K, Hanada R, Imashuku T, Nakahata T, Tsukimoto I : Changes in the cause of death in pediatric acquired aplastic anemia in Japan: Comparison of 425 patients registered during 88-95 and 118 patients registered during 65-75. *Blood* 94(suppl, 1) : 193a, 1999
- 12.* Kojima S, Yoshimi A, Inaba J, Horibe K, Kudo K, Maeda N, Kato K, Matsuyama T : Comparison of long-term outcome in 100 children with severe aplastic anemia(SAA) treated with immunosuppressive therapy(IST) versus bone marrow transplantation(BMT). *Blood* 94(suppl, 1) : 409a, 1999
13. Nakamura Y, Suzuki H, Ohashi H, Hatano S, Tomita A, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Hotta T : Clonality analysis of granulocytes and T lymphocytes in healthy females by the PCR-based HUMARA method. *Int J Hematol* 69 : 237 - 243, 1999
14. Zeng W, Nakao S, Takamatsu H, Yachie A, Takami A, Kondo Y, Sugimori N, Yamazaki H, Miura Y, Shiobara S, Matsuda T : Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 93 : 3008 - 3016, 1999
15. Takami A, Zeng W, Wang H, Matsuda T, Nakao S : Cytotoxicity against lymphoblastoid cells mediated by a T-cell clone from an aplastic anaemia patient: role of CD59 on target cells. *Br J Haematol* 107 : 791 - 796, 1999
16. Takami A, Nakao S, Tatsumi Y, Wang H, Zeng W, Yamazaki H, Yasue S, Shiobara S, Matsuda T, Mizoguchi H : High inducibility of heat shock protein 72(hsp72) in peripheral blood mononuclear cells of aplastic anaemia patients: a reliable marker of immune-mediated aplastic anaemia responsive to cyclosporine therapy. *Br J Haematol* 106 : 377 - 384, 1999
17. Nakao S : Role of T-lymphocytes in the pathophysiology of aplastic anemia. *Aplastic anemia - pathophysiology, epidemiology, clinical presentation and treatment*(Editors: Schrezenmeier H, Bacigalupo A), Cambridge University Press, London : 41 - 57, 2000
18. Futaki M, Yamashita T, Yagasaki H, Toda T, Yabe M, Kato S, Asano S, Nakahata T : The IVS4+4 A T mutation of the Fanconi anemia gene FANCC is not associated with severe phenotype in Japanese patients. *Blood* (in press) 1999
19. 壹岐聖子、白杵憲祐、浦部晶夫 : 再生不良性貧血の ATG 療法. *診断と治療* 87 : 1347 - 1351, 1999

20. 浅野嘉延、仁保喜之：先天異常に伴う貧血 (Fanconi 貧血)。アポトーシスと疾患血液疾患編 (吉田彌太郎編集)、医薬ジャーナル社、大阪、57 - 64, 1999
21. 伊藤薫樹、厨信一郎：無顆粒球症 (agranulocytosis)。症例に学ぶ G-CSFの臨床 (池田康夫編)、医薬ジャーナル社、東京：86 - 91, 1999
22. 小島勢二：小児再生不良性貧血における最近の治療の進歩。現代医学 47：33 - 39, 1999
23. 小島勢二：小児再生不良性貧血に対する治療の進歩。日本小児科学会雑誌 103：705 - 708, 1999
- 24.* 吉見礼美、稲葉淳、近藤勝、工藤寿子、前田尚子、仲本千佳子、加藤剛二、堀部敬三、松山孝治、小島勢二：小児後天性再生不良性貧血の長期予後。Int J Hematol 69(Suppl, 1)：65, 1999
- 25.* 宮島雄二、小島勢二、加藤剛二、松山孝治：染色体異常を認めた再生不良性貧血患者の体細胞染色体の検討。Int J Hematol 69(Suppl, 1)：191, 1999
26. 吉野谷友香、川上善、岡本則彦、小原明、月本一郎：生後 1 ヶ月で診断された Fanconi 貧血の男児例。日小血会誌 13：209 - 212, 1999
27. 月本一郎：小児貧血の診断と治療。診断と治療 87：1378 - 1382, 1999
28. 寺村正尚、溝口秀昭：再生不良性貧血。アポトーシスと疾患、血液疾患編 (吉田彌太郎)、医薬ジャーナル社、大阪：44 - 56, 1999
29. 寺村正尚：再生不良性貧血。血液内科診療ハンドブック (溝口秀昭編)、南江堂、東京：231 - 240, 1999
30. 寺村正尚：赤芽球癆。血液内科診療ハンドブック (溝口秀昭編)、南江堂、東京：241 - 245, 1999
- 31.* 寺村正尚、風間啓二、伊藤慶子、岩部弘治、小林祥子、溝口秀昭：再生不良性貧血における Th1/Th2 細胞の検討。臨床血液 40：940, 1999
- 32.* 通山薫、吉田彌太郎：再生不良性貧血と不応性貧血のはざま。再生不良性貧血から MDS、白血病への移行について—厚生省特発性造血障害調査研究班・多施設共同研究より。第 41 回日本臨床血液学会総会シンポジウム、臨床血液 40(9)：857, 1999
33. 別所正美：汎血球減少症へのアプローチ。内科学 (黒川清、松澤佑次編)、文光堂、東京：1369 - 1370, 1999
34. 八幡義人、神崎暁郎：各種貧血における造血薬の選択と実際的な使い方。治療薬ガイド 1999 ~ 2000、文光堂、東京：494 - 499, 1999

35. 三谷組子：骨髄の異常（再生不良性貧血）。薬物障害ガイド（藤田敏郎編）、南山堂：172 - 175, 1999
- 36.* 大庭礼美、島本健至、中川陽子、北詰浩一、高橋直樹、多田淳一、樋口敬和、原田浩史、新倉春男、小峰光博、藤田和博：再生不良性貧血に対する免疫抑制療法の検討。Int J Hematol 69(Suppl)：191, 1999
- 37.* 森 啓、島本健至、中川陽子、大庭礼美、北詰浩一、高橋直樹、多田淳一、樋口敬和、原田浩史、新倉春男、小峰光博、藤田和博：シクロスポリン投与中著明な脱毛をきたした胸腺腫合併赤芽球癆の1例。第135回日本臨床血液学会例会, 1999

2. 不応性貧血に関する研究業績

38. Hirai H, Ogawa S, Kurokawa M, Yazaki Y, Mitani K : Molecular characterization of the genomic breakpoints in a case of t(3;21)(q26;q22). Genes Chromosomes Cancer 26 : 92 - 96, 1999
39. Nakahara Y, Suzuki H, Murate T : Clonality analysis of granulocytes and T lymphocytes in healthy females by the PCR-based HUMARA method. Int J Hematol 69 : 237 - 243, 1999
40. Suzuki H, Ohashi H, Murate T : Clonality analysis of refractory anemia with ring sideroblasts. Leukemia 13 : 130 - 134, 1999
41. Nagata C, Shimizu H, Hirashima K, Kakishita E, Fujimura K, Niho Y, Karasawa M, Oguma S, Yoshida Y, Mizoguchi H : Hair dye use and occupational exposure to organic solvents as risk factors for myelodysplastic syndrome. Leukemia Research 23 : 57 - 62, 1999
42. Kishi S, Goto N, Nakamura T, Ueda T : Evaluation of cell-killing effects of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine and daunorubicin by a new computer-controlled in vitro pharmacokinetic simulation system. Cancer Res 59 : 2629 - 2637, 1999
43. Fukushima T, Yamashita T, Yoshio N, Misaki H, Yamauchi T, Imamura S, Urasaki Y, Ueda T : Effect of PSC 833 on the cytotoxicity of idarubicin and idarubicinol in multidrug-resistant K562 cells. Leukemia Res 23 : 37 - 42, 1999
44. Kishi S, Wano Y, Misaki H, Imamura S, Kawai Y, Nakayama T, Fukushima T, Tsutani H, Ueda T : Peripheral blood stem cell collection and transplantation using the haemonetics multicomponent system. Transfusion Science 20 : 21 - 27, 1999
45. Nakayama T, Tohyama K, Imamura S, Yoshida A, Fukushima T, Tsutani H, Nakamura T, Wano Y, Ohno Y, Ueda T : A novel Philadelphia chromosome-positive cell line with multipotential properties. Anticancer Res

69 : 256 - 259, 1999

46. Yamauchi T, Amaya N, Yoshio N, Yoshida A, Tsutani H, Ueda T : Successful salvage treatment with irinotecan(CPT-11) of recurrent malignant lymphoma in an aged patient and CPT-11pharmacokinetics. Int J Hematol 69 : 165 - 169, 1999
47. Tsutani H, Inai K, Kishi S, Morinaga K, Naiki H, Ueda T : Hepatic tumor rupture following effectual treatment with irinotecan in a patient with highly refractory malignant lymphoma. Int J Hematol 70 : 178 - 180, 1999
48. Kawai Y, Kawai R, Nakayama T, Tanizawa A, Urasaki Y, Fukushima T, Yoshida A, Yamauchi T, Tsutani H, Wano Y, Akagi Y, Ueda T : Successful treatment of cytomegalovirus retinitis in a patient with malignant lymphoma: a case report and review of the literature. Int J Hematol 69 : 256 - 259, 1999
49. Nemoto Y, Tsutani H, Imamura S, Ishizawa T, Urasaki Y, Fukushima T, Ueda T : Successful treatment of acquired myelofibrosis with pure red cell aplasia by cyclosporine. Br J Haematol 104 : 422 - 424, 1999
50. Fukushima T, Takemura H, Yamashita T, Ishisaka T, Inai K, Imamura S, Urasaki Y, Ueda T : Multidrug resistance due to impaired DNA cleavage in a VP-16-resistant human leukemia cell line. Anticancer Res 19 : 5111 - 5116, 1999
51. Inai K, Wano Y, Yamamoto S, Ikebata Y, Iwasaki H, Tsutani H, Naiki H, Ueda T : Molecular remission induced by fractionated dose-escalating donor leukocyte infusion without graft-versus-host disease in a patient with chronic myelogenous leukemia relapsed after allogeneic bone marrow transplantation. Anticancer Res 19 : 5631 - 5634, 1999
52. Ohyashiki JH, Iwama H, Yahata N, Ando K, Hayashi S, Shay JW, Ohyashiki K : Telomere stability is frequently impaired in high-risk groups of patients with myelodysplastic syndromes. Clinical Cancer Research 5 : 1155 - 1160, 1999
53. Ohyashiki K : Molecular genetic significance of myelodysplastic syndromes. Asia Medical Journal 42 : 72 - 76, 1999
54. Yagasaki F, Jinnai I, Yoshida S, Yokoyama Y, Matsuda A, Kusumoto S, Kobayashi H, Terasaki H, Ohyashiki K, et al : Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q13;p13). Genes Chromosomes Cancer 26 : 192 - 202, 1999
55. Tamaki H, Ogawa H, Ohyashiki K, et al : The Wilms' tumor gene WT1 as a good marker for the diagnosis of the disease progression of myelodysplastic syndromes. Leukemia 13 : 393 -399, 1999
56. Nishimaki J, Miyazawa K, Yaguchi M, Katagiri T, Kawanishi Y, Toyama K, Ohyashiki K, et al : Vitamin K2

induces apoptosis of a novel cell line established from a patient with myelodysplastic syndrome in blastic transformation. *Leukemia* 13 : 1399 - 1405, 1999

57. Iwase O, Iwama H, Okabe S, Ando K, Yaguchi M, Miyazawa K, Kimura Y, Kodama A, Fukutake K, Ohyashiki K : Refractory anemia with ringed sideroblasts with a low IPSS score progressed rapidly with de novo appearance of multiple karyotypic abnormalities and acute erythroleukemia (AML-M6). *Leukemia Research* : (in press)
58. Sashida G, Tauchi T, Katagiri T, Kuriya S, Ohyashiki K : Transformation of severe aplastic anaemia into myelodysplastic syndrome with monosomy 7: Monoclonal origin detected by the HUMARA gene analysis at the aplastic anaemia phase. *Haematologica* : (in press)
59. Miyazawa K, Nishimaki J, Ohyashiki K, Enomoto S, Kuriya S, Fukuda R, Hotta T, Teramura M, Mizoguchi H, Uchiyama T, Omine M : Vitamin K2 therapy for myelodysplastic syndromes(MDS) and post-MDS acute myeloid leukemia : Information through a questionnaire survey of multi-center pilot studies in Japan. *Leukemia* : (in press)
60. Matsuda M, Maeda Y, Sumimoto Y, Nawata H, Sano T, Higashishiba M, Haga H, Tatsumi Y, Horiuchi F, Irimajiri K, Kanamaru A : Establishment of a myelodysplastic syndrome(MDS)/secondary AML-derived T lymphoid cell line K2-MDS. *Leukemia Res* 24 : 103 -108, 1999
61. Karasawa M, Tsukamoto N, Sakai H, Okamoto K, Maehara T, Naruse T, Morita K, Sato S : Clinical outcome in patients with myelodysplastic syndrome showing polyclonal hematopoiesis. *Acta Haematol* 101 : 46 - 49, 1999
62. Nagata C, Shimizu H, Hirashima K, Kakishita E, Fujimura K, Niho Y, Karasawa M, Oguma S, Yashida Y, Mizoguchi H : Hair dye and occupational exposure to organic solvent as risk factor for myelodysplastic syndrome. *Leukemia Res* 23 : 57 - 62, 1999
63. Saitoh T, Murakami H, Uchiumi H, Moridaira K, Maehara T, Matsushima T, Tsukamoto N, Tamura J, Karasawa M, Naruse T, Tsuchiya J : Myelodysplastic syndromes with nephrotic syndrome. *Am J Hematol* 60 : 200 - 204, 1999
- 64.* Harigae H, Furuyama K, Kimura A, Neriishi K, Tahara N, Kondo M, Hayashi N, Yamamoto M, Sassa S, Sakai T : A novel mutation of the erythroid-specific δ -aminolaevulinate synthase gene in a patient with X-linked sideroblastic anaemia. *Br J Haematol* 106 : 175 - 177, 1999
65. Imamura N, Kimura A : Neutropenia among survivors of atomic bomb explosion. *Lancet* 355 : 177, 2000
66. Kuramoto K, Uesaka T, Kimura A, Kobayashi M, Watanabe H, Katoh O : ZK7, a novel zinc finger gene, is induced by vascular endothelial growth factor and inhibits apoptotic death in hematopoietic cells. *Cancer Res*

- 67.* Harigae H, Furuyama K, Kudo K, Kimura A, Sasaki T, Kaku M, Hayashi N, Yamamoto Y, Sassa S : Two novel mutations of the δ -aminolevulinic synthase-2 gene in inherited and non-inherited sideroblastic anemia. *Blood* 94(Suppl. 1-part 1) : 191a, 1999
68. Miyauchi J, Asada M, Tsunematsu Y, Kaneko Y, Kojima S, Mizutani S : Abnormalities of the p53 gene in juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 106 : 980 - 986, 1999
69. Kojima S, Sako M, Kato K, Hosoi G, Sato T, Ohara A, Koike K, Okimoto Y, Nishimura S, Akiyama Y, Yoshikawa T, Ishii E, Okamura J, Yazaki M, Hayashi Y, Eguchi M, Tsukimoto I, Ueda K : An effective chemotherapeutic regimen for acute myeloid syndrome in children with Down's syndrome. *Leukemia* (in press)
- 70.* Manabe A, Kojima S, Tsuchida M, Hayashi Y, Ikuta K, Okamura J, Koike K, Ohara A, Ishii E, Komada Y, Hibi S, Sasaki H, Nakahata T : Childhood myelodysplastic syndrome (MDS) in Japan. *Int J Hematol* 69(Suppl, 1) : 269, 1999
- 71.* Matsumoto K, Kojima S : Cyclic chemotherapy for MDS and AML in children with Down's syndrome. *Int J Hematol* 69(Suppl, 1) : 271, 1999
72. Sawada K, Koizumi K, Tarumi T, Takano H, Ieko M, Katagiri E, Nishio M, Fukada Y, Yasukouchi T, Yamaguchi M, Koike T : Role of physiological concentrations of stem cell factor in leukemic type growth of myelodysplastic CD34⁺ cells. *Leukemia Res* 23 : 1- 11, 1999
73. Nishio H, Suda T, Sawada K, Miyamoto T, Koike T, Yamaguchi Y : Molecular cloning of cDNA encoding human Rab3D whose expression is upregulated with myeloid differentiation. *Biochimica Biophysica Acta* 1444 : 283 - 290, 1999
74. Haseyama Y, Sawada K, Oda A, Koizumi K, Takano H, Tarumi T, Nishio M, Handa M, Ikeda Y, Koike T : Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the protection of primary cultured human erythroid precursor cells from apoptosis. *Blood* 94 : 1568 - 1577, 1999
75. Namba Y, Koizumi H, Nakamura H, Tarumi T, Sawada K, Ohkawara A : Specific cutaneous lesions of the scalp in myelodysplastic syndrome with deletion of 20q. *J Dermatol* 26 : 220 - 224, 1999
- 76.* Nishio M, Oda A, Koizumi K, Satoh I, Haseyama Y, Endo T, Takashima H, Hashimoto T, Fujihara M, Ikebuchi K, Ikeda H, Koike T, Sawada K : Stem cell factor prevents Fas-mediated apoptosis of primary cultured human erythroid precursor cells. *Blood*(abs) 94 : 1173, 1999
77. Oda A, Sawada K : Signal transduction in primary cultured human erythroid cells. *J Hematotherapy Stem*

Cell Res (in press)

78. Yagasaki F, Jinnai I, Yoshida S, Yokoyama Y, Matsuda A, Kusumoto S, Kobayashi H, Terasaki H, Ohyashiki K, Asou N, Murohshi I, Bessho M, Hirashima K : Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13). *Genes, Chromosomes Cancer* 26 : 192 - 202, 1999
79. Matsuda A, Jinnai I, Yagasaki F, Kusumoto S, Murohashi I, Bessho M, Hirashima K, Honda S, Minamihisamatsu M, Fuchigami K, Matsuo T, Kuriyama K, Tomonaga M : New system for assessing the prognosis of refractory anemia patients. *Leukemia* 13 : 1727- 1734, 1999
80. Suzuki H, Asano H, Ohashi H, Kinoshita T, Murate T, Saito H, Hotta T : Clonality analysis of refractory anemia with ring sideroblasts: simultaneous study of clonality and cytochemistry of bone marrow progenitors. *Leukemia* 13 : 130 - 134, 1999
81. Miyagawa K, Hayashi Y, Fukuda T, Mitani K, Hirai H, Kamiya K : Mutations of the WT1 genes in childhood non-lymphoid hematological malignancies. *Genes, Chromosomes Cancer* 25 : 176 - 1833, 1999
82. Maki K, Mitani K, Yamagata T, Kurokawa M, Kanda Y, Yazaki Y, Hirai H : Transcriptional inhibition of p53 by the MLL/MEN chimeric protein found in myeloid leukemia. *Blood* 93 : 3216 - 3224, 1999
83. Hirai H, Ogawa S, Kurokawa M, Yazaki Y, Mitani K : Molecular characterization of the genomic breakpoints in a case of t(3;21)(q26;q22). *Genes, Chromosomes & Cancer* 26 : 92 -96, 1999
84. Okamoto S, Takahashi S, Wakui M, Ishida A, Tanosaki R, Ikeda Y, Asano S : Treatment of advanced myelodysplastic syndrome with a regimen including recombinant human granulocyte colony-stimulating factor preceding allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 104 : 569 - 573, 1999
85. Kobayashi Y, Nakayama M, Uemura N, Takayama K, Tobinai K, Takanaka T, Choi SH, Satoh H, Mori S, Asano S : Analysis of myelodysplastic syndrome clones arising after multiple myeloma: A case study by correlative interphase cytogenetic analysis. *Jpn J Clin Oncol* 29 : 374 - 377, 1999
86. Matsuda A, Bessho M, Tomonaga M, et al : New system for assessing the prognosis of refractory anemia patients. *Leukemia* 13 : 1727 - 1734, 1999
87. Tamaki H, Ohyashiki K, Tomonaga M, et al : The Wilm's tumor gene WT1 is a good marker for diagnosis of disease progression of myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 13 : 393 - 399, 1999
88. 村松理子、臼杵憲祐、伊豆津宏二、山口祐子、壹岐聖子、古山和道、近藤雅雄、浦部晶夫 : X 染色体連鎖鉄芽球性貧血. *臨床血液* 40 : 593 - 598, 1999