

高齢者または臓器障害を有する high-risk 骨髄異形成症候群症例に対する骨髄非破壊的移植前治療を用いた同種末梢血幹細胞移植に関する臨床第 I/II 相試験プロトコール

厚生科学研究補助金（特定疾患対策事業）
特発性造血器障害に関する研究班（小峰班）

研究協力者 原田実根
岡山大学医学部第 2 内科
連絡先：700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1
TEL：086-235-7227
FAX：086-232-8226

作成：20000120
改訂：20000703
改訂：20000704
改訂：20000706
改訂：20000714
改訂：20000717
改訂：20000726
改訂：20000913
改訂：20001011
改訂：20001025
改訂：20001214

分 担 研 究

I 全 般

特発性造血障害における ウイルス感染の関与に関する研究

岩崎 琢也、片野 晴隆、谷口貴代美、
佐多徹太郎、倉田 毅

(国立感染症研・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多くは骨髄の障害に由来し、本研究ではその発症ならびにその臨床経過に関与するウイルスの解明を目的としている。具体的には、臨床検体を対象とし、特発性造血障害班に文書にて提案を行い、これらの疾患の罹患者の骨髄・末梢血について、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、骨髄・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) が感染することが末梢血由来の細胞で示だされている。さらに、骨髄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、骨髄間質細胞に 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。

今年度は主としてB19ウイルスと TTV の関与について主として解析した。

【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、当該疾患の骨髄ならびに血液標本を依頼し、送付をうけた、またその他の施設からの臨床医・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（4例）等の特発性骨髄障害ならびに特発性血小板減少性紫斑病（3例）の症例の骨髄あるいは末梢血を入手した。うち、今年度の解析は血液ならびに骨髄の生検体（パラフィン包埋組織を含まない）をいただいた例について検討した。

核酸の抽出：いただいた骨髄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 解析を行った。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 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 SybrGreenI 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。

抗 HHV8 ウイルス抗体価：4種類の HHV8 蛋白 (K8, 1, ORF59, ORF65, ORF73) を抗原として使用する ELISA 法 (Katano et al. 2000) 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

末梢血ならびに骨髄の検体より抽出した核酸検体においてB19ウイルスのウイルスゲノムの有無について PCR を用いて検索した。この結果、再生不良性貧血 (AA) の2例、pure red cell aplasia (PRCA) の1例、溶血性貧血 (HA) に aplastic

crisis (AC) を併発した4例にウイルスゲノムを検出することが出来た(表)。このうち、定量感度(103コピー数)以上のウイルスゲノムが検出されたのはHA with ACのみで、AA例では検出感度以下であった。

2. TTV

4例のAAならびに2例のPRCA、5例のMDSの末梢血・骨髄組織より抽出した核酸検体にTTVのウイルスゲノムをT801/T935のプライマーを使用し、検出した。このうち、5例において増幅産物の塩基配列をpGEM-Tに分子クローニングし、解析したところ、それぞれの塩基配列は異なり、一方、同一検体では1例を除き一様であった。のこりの1例では多様性が認められた。

さらに、LightCyclerを用いた定量を行ったところ、検出されたウイルスゲノムは大部分の例では定量感度以下であったが、1例において1細胞あたり100コピーと非常に高く、今後、そのウイルスゲノムを分子クローニングする予定である。

3. EBV & HHV6

今年度の解析では新たな陽性例は認められなかった。

4. HHV8

本研究においては最近、感染による骨髄抑制例が報告されているヒトヘルペスウイルス8 human herpesvirus 8 (HHV8) についての血清疫学的解析を行っている。現在までに検索した範囲では大腸菌で作製した4種類のHHV8抗原を利用したELISA解析において、抗HHV8抗体(IgG)の上昇が認められた症例は認められていない。なお、この解析により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。

5. 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。

[考案]

現在までに供与された特発性造血障害の罹患者の臨床検体38例において、B19ウイルスが7例、TTVが13例、EBが2例、HHV6が1例陽性となっている。このうち、B19ウイルス以外は宿主体内

で持続性あるいは潜伏感染することが知られており、ゲノムのみが陽性である場合、その病的意義は不明である。

B19ウイルスは骨髄造血細胞を標的とし、障害をもたらすことが明らかとされているウイルスであり、臨床的にHAの経過観察中にaplastic crisisと診断される場合に関与していることは明らかであるが、原因不明の貧血症状を呈してきた場合、その診断は疫学的背景あるいは骨髄標本中の特徴のある細胞 so-called giant proerythroblast を検出出来ない場合、困難であると考えられる。PRCA並びにAAの症例にB19ウイルスゲノムを検出している例があるが、B19ウイルスが造血機能障害をもたらしたことは確実であるが、PRCA並びにAAの発症の原因となっているかどうかについては不明である。

TTVは肝炎患者の血清中に発見されたウイルスであるが、非常に多様性に富み、かつ60%以上の成人がなんらかの型のTTVを有していることが明らかにされている。従って、骨髄あるいは末梢血に偶発的に検出されてもその疾病の成因と判断することは現時点では非常に危険であり、この遺伝子型を明らかにし、その転写産物を解析することにより疾病との関連性が明らかに出来ると考える。

[結論]

特発性造血障害の診断時には臨床的にaplastic crisisがはっきりしなくてもB19ウイルスの検索が必要である。

TTVは高頻度に検出されるが、その臨床的意義を明らかにするためには、検出されたTTVの遺伝子型、転写産物等の解析が必要である。

HHV8は最近骨髄抑制を来した例が報告されているが、現在までに解析した症例では証明されていない。

[文献]

1. Katano H, et al, J Virol 74, 3478, 2000

II 再生不良性貧血

特定疾患治療研究事業の臨床調査個人票
からみた我が国の再生不良性貧血の
疫学臨床像

小峰 光博、原田 浩史
(昭和大学藤が丘病院・内科血液)
浦部 晶夫 (NTT 関東病院・血液内科)
溝口 秀昭 (東京女子医大・血液内科)

[はじめに]

再生不良性貧血 (AA) は昭和47年に特定疾患治療研究事業の対象疾患とされ、毎年各症例の病態が各都道府県に報告されている。この疾患の疫学的特徴は未だ十分には解明されていない。全国から集められた調査票は、実質的には我が国の全国調査に近い資料と考えられるので、本症の疫学臨床病態の実像を把握するのに画期的な意義をもつといえる。

[対象と方法]

AA として平成11年度に登録・更新された患者の臨床調査個人票コピーが平成12年に各自治体から研究班宛に一括集中送付された。個人票取扱指針に沿って、患者個人情報をも暗号化し電算入力した。病型分類、重症度は主治医の判定に従い分類し、検査データ、主治医の意見なども読みとることが可能な限り入力した上で解析した。

[結果]

患者総数は6,662例で、特発性が約84%を占め、二次性が約2%、特殊型が約6.5%であった (表1)。病型の記載のないもの (空白) が約8%みられた。この多くは複合的な要因があり主治医が病型の判断を付けかねているものと思われた。男女比は、特殊型では男女がほぼ同数だったが、他の病型では女性が約6割を占めていた。

表1 病型別症例数

| 分類 | 男性 | 女性 | 不明 | 総数 |
|--------|------|------|----|------|
| (1)特発性 | 2282 | 3241 | 57 | 5580 |
| (2)二次性 | 44 | 88 | 2 | 134 |
| (3)特殊型 | 212 | 219 | 2 | 433 |
| 空白 | 204 | 305 | 6 | 515 |
| 合計 | 2742 | 3853 | 67 | 6662 |

地域分布は政令指定都市を持つ都道府県からの登録が多い傾向がみられた。調査時点での患者年齢は、0歳から90歳以上まで広範囲にわたっていた (図1)。

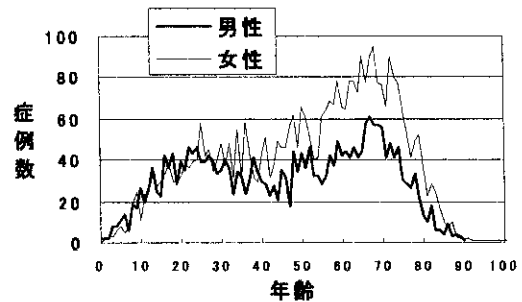


図1 年齢別症例数 (全病型)

小児期から青年期までは男女ほぼ同数だが、30歳以降は常に女性が男性を上回り女性患者のピークは60代後半であった。平成11年度の新規登録患者は337例 (男性147例、女性190例) であった。発症時の年齢は調査時の年齢分布と大差なく、やはり70歳前後にピークを認めた (図2)。

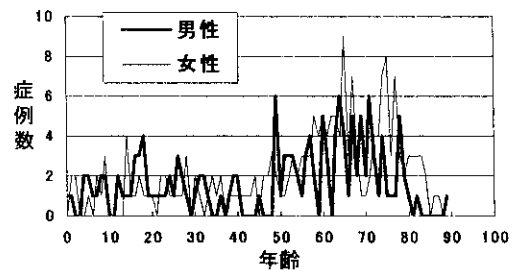


図2 平成11年度発症例の年齢分布 (全病型)

特発性について重症度別の割合と罹病期間を検討した (図3、4)。発症後1年未満では重症が主体で軽症はわずかだが、次第に中等症・軽症の割合が増加する。発症後5年以降では明らかに重症が少なくなり、中等症以下の割合が増加する。

特発性 AA におけるヘモグロビン値の分布 (図

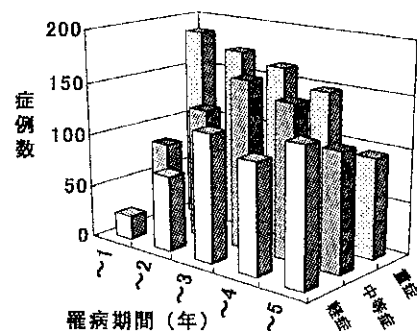


図3 罹病期間と重症度 (特発性)

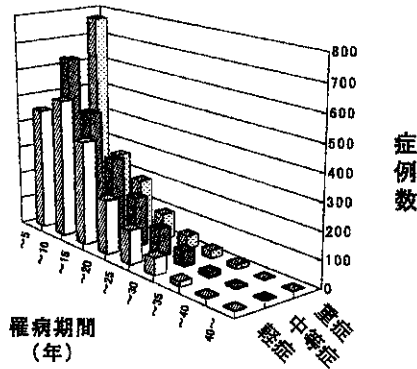


図4 罹病期間と重症度 (特発性)

5)、網赤血球数の分布(図6)は、全体としては重症度に応じた値を示したが、軽症に分類されながら高度の貧血を呈する例や重症でありながら高いヘモグロビン値を示すものもみられた。好中球数、血小板数もほぼ同様な結果であった。

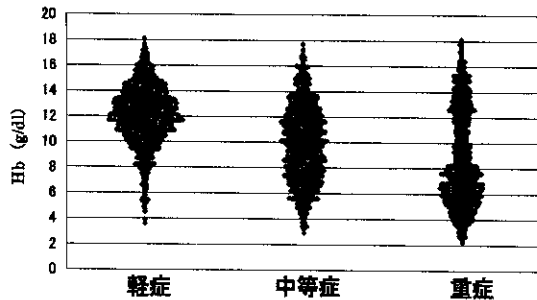


図5 ヘモグロビン値と重症度 (特発性)

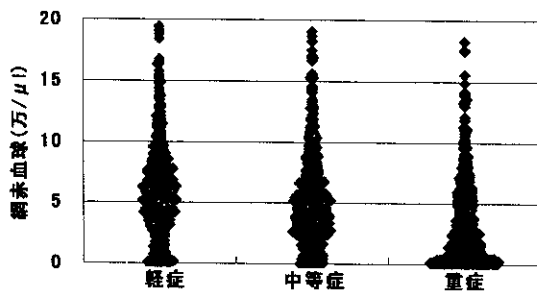


図6 網赤血球数と重症度 (特発性)

二次性再不貧は134例であった(図7)。原因は薬剤(疑いを含む)が過半数を占めた。原因薬剤は抗てんかん薬・抗リウマチ薬・抗癌剤・抗生剤などがあげられているが、明示されていない例が多く、集計するに至らなかった。次いで肝疾患、血液疾患、膠原病などであった。膠原病の多くは慢性関節リウマチで、薬剤の関与の可能性も否定できないと思われる。肝疾患の種類としては肝炎、肝硬変などがあげられており、その一部は肝炎後AAに分類すべき症例が混入している可能性がある。

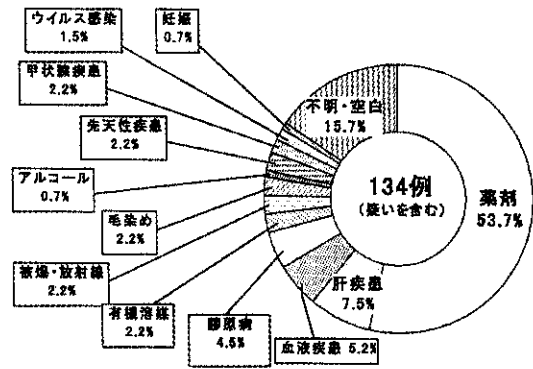


図7 二次性再不貧の原因

特殊型は433例報告された(図8)。PNH-AAが約50%を占め、約25%を肝炎後AAが、約13%をFanconi貧血が占めていた。PRCAは3.4%を占めるにすぎないが、一般臨床で経験する例数から考えても登録患者が少なく、多くの患者が認定されていないものと思われる。

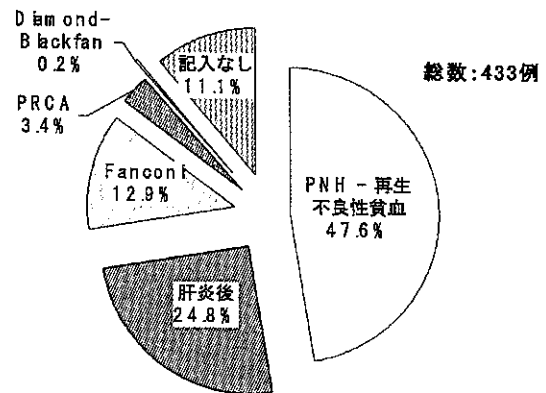


図8 特殊型再不貧

[考案]

平成11年度に再生不良性貧血と診断され特定疾患の調査対象として登録された6,662例について検討した。本調査は疾患を横断的に観察するには有用で、今後もデータの蓄積が重要と思われるが、個々の症例については信頼度の低いものも散見される。また、症例の追跡調査はされておらず、脱落の理由なども調査されていない。より有意義な調査を進めるために、今後は調査票の見直しや調査方法の再検討も必要であろう。

[謝辞]

調査票をご記入いただいた全国諸施設の関係各位に深謝する。

再生不良性貧血に対する ATG 再投与の全国調査

浦部 晶夫、壹岐 聖子、白杵 憲祐

(NTT 関東病院)

【はじめに】

骨髄移植の適応がなく、抗胸腺細胞グロブリン (ATG) を含む免疫抑制療法が無効であった再生不良性貧血 (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。本邦ではその再投与は一般に禁止されている。以前我々は ATG の再投与を試みた自験例 8 例について検討し、再投与の安全性に問題がないことを示唆し、有効率 38% を明らかにした。今回我々は、本邦における再投与の状況、安全性と有効性を更に明らかにするために全国調査を行った。

【対象】

本邦の血液専門科を有する 151 施設に対し、葉書調査によって AA に対する ATG 再投与の経験について問い合わせたところ、94 施設から回答が得られた。その中の 39 施設において ATG 再投与の経験があり、それらの施設に調査票を発送したところ、25 施設から調査票を受領した。対象患者は自験例 9 例を含め、計 52 例であった。患者の特

徴を表 1 に示す。患者の年齢分布をみると、0-19 歳が過半数を占めていた。投与回数は、殆どの症例が 2 回で、血清製剤の種類はウマとウマが多かった。ATG 再投与が骨髄移植の前処置として行われた症例が 5 例あった。

【結果】

1. ATG 再投与の安全性：評価可能であった 50 例の ATG 投与初期の合併症と血清病について 1 回目と 2 回目を比較検討した。図 1 に ATG 投与初期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、顔面紅潮、頭痛、胸部圧迫感、呼吸困難、嘔吐、血圧低下、血圧上昇、徐脈、出血、肝障害の出現頻度について比較検討した。その結果、いずれの症状も再投与時に明らかな増加はみられなかった。図 2 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、ATG 投与終了後に出現した発熱、皮疹、関節痛、筋肉痛、頭痛、浮腫、高血圧、腎障害・乏尿、呼吸困難、腹痛・下痢、リンパ節炎について比較検討した。その結果、浮腫と腎障害・乏尿が再投与時にやや増加した。ただし、これらの症例はシクロスポリン A 併用例であった。副腎皮質ホルモンの増量の有無についてのアンケート調査の結果では再投与時に増量した症例が 42% であった。ATG 再投与が安全に行えたか否かについては、安全が 87% を占めていた。安全ではないもしくはどちらとも言えないとの回答はそれぞれ 6% と 8% であり、表 2 にそれらの理由を示した。

表 1、患者の特徴

| | | | |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| 年齢 | ●0-9歳：29% | ●10-19歳：30% | ●20-29歳：10% |
| | ●30-39歳：10% | ●40-49歳：4% | ●50-59歳：13% |
| | ●60歳以上：4% | | |
| 性別 | ●男性：52% | ●女性：48% | |
| 投与回数 | ●2回：87% | ●3回：10% | ●4回：3% |
| 製剤の種類 | ●ウマ・ウマ：87% | ●ウマ・ウサギ：12% | ●ウサギ・ウサギ：1% |
| BMT前処置としての投与 | 5例 | | |

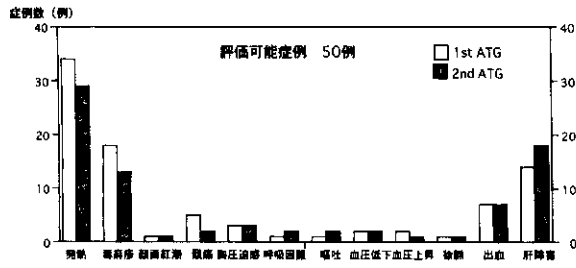


図1 投与初期の合併症

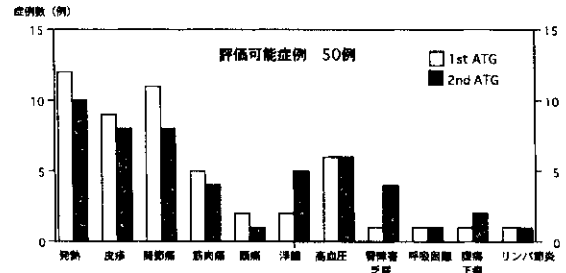


図2 血清病

表2 安全でなかった理由

| |
|---|
| <p>安全でないと思った理由</p> <ul style="list-style-type: none"> ○血清病症状が強く出現。 ○喉頭浮腫にて投与中止。 ○血圧低下にて投与中止。 <p>どちらともいえないと答えた理由</p> <ul style="list-style-type: none"> ○高度の腎障害出現 (Cr3.6)。 ○投与1ヶ月後にネフローゼ症候群を発症。 ○高度の肝障害出現 (GOT/GPT=249/720)。 ○胸痛や徐脈などの症状。 |
|---|

2. ATG 再投与の有効性：good response (GR) を示した症例が26%、partial response (PR) が11%であり、有効率 (GR+PR) は37%であった。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。年齢や ATG の投与間隔、併用療法と治療効果の間に明らかな関連性を認めなかった。

[考察・結論]

骨髄移植の適応外で初回の免疫抑制療法に無反応あるいは一過性の反応を示したが再発した AA に対する治療法として ATG の再治療が注目されている。ヨーロッパの報告¹⁾²⁾では 6-7 割に反応がみられ、寛解率は 3-5 割であり、再投与時の副作用の増強はみられなかった。今回の全国調査では、本邦における ATG 再投与の有効率は37%であった。過敏症状や血清病などの明らかな頻度の増加はなかったが、シクロスポリン併用例の腎障害には留意が必要と思われた。また個々の症例でみると、喉頭浮腫や血圧低下などの過敏症状で投与が中止されたものもあり、安全性については全く問題がないとは言えなかった。ただし、これらの副

作用は初回投与時にも起こり得るものであり、ATG 投与に際しては一般に慎重な配慮が必要なることを再確認させるものと考えられる。ATG の再投与は、今回の調査においては 8 割以上の症例で安全に行われており、37%の有効率を考えると、他に有効な治療法のない難治性 AA にとっては試みる価値のある治療法であると思われた。

[参考文献]

1. Tichelli A, et al, Br J Haematol 100, 93, 1998
2. Di Bona E, et al, Br J Haematol 107, 330, 1999

小児再生不良性貧血に対する免疫抑制療法

小島 勢二 (名古屋大学成長発達)

小原 明、月本 一郎

(東邦大学第一小児科)

日本小児再生不良性貧血治療研究会

[はじめに]

ドイツから報告された無作為割付臨床試験の結果、重症再生不良性貧血 (再不貧) に対する標準的な治療法として、抗胸腺リンパ球グロブリン (ATG) とシクロスポリンの併用療法が確立されたり。その後ヨーロッパグループから報告されたパイロット研究では、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) を併用することで、治療開始3カ月に おける有効率が82%、2年生存率が92%と極めて有望な治療成績が得られている¹⁾。G-CSFを免疫抑制療法に併用することで、有効率や生存率の向上、治療開始初期の重症感染症の罹患頻度を減少させることが可能かを明らかにすることを目的に、無作為割付臨床試験が企画された²⁾。

[対象および方法]

1992年7月から1997年11月までの期間に、小児再生不良性貧血治療研究会に登録された69例が研究対象である。全例が未治療で、診断から治療開始までの期間は180日以内、年齢は18歳以下であった。表1は両群の臨床的特徴を示すが、両群間に各特徴の偏りはみられなかった。表2には効果判定基準を示す。馬 ATG (リンホグロブリン) は、15mg/kg/日を5日間点滴静注し、シクロスポリン (6mg/kg/日) と、ダナゾール (5mg/kg/日) を経口で180日間投与した。ATGによるアレルギー症状の予防を目的にメチルプレドニゾン (2mg/kg/日) を7日間投与し、以後減量し30日間投与を中止した。

G-CSF (400 μ g/m²) は連日90日間投与した。好中球数が5000/ μ l以上となった場合は、G-CSFの投与回数を3回/週と減らした。

本研究への参加については患者あるいは患者家

族から文書による同意を得た。

表1 対象症例

| | G-CSF (+) 群 | G-CSF (-) 群 |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| 症例数 | 35 | 34 |
| 詳細可能な例数 | 33 | 31 |
| 性 (男/女) | 14/19 | 19/12 |
| 年齢: 中央値 (範囲) | 8(2-16) | 9(1-15) |
| 病型 | | |
| 特発性/肝炎/癌系 | 26/6/1 | 25/6/0 |
| 発症から治療までの期間 (日) | 38(3-180) | 26(4-166) |
| 好中球数 $\times 10^9/L$: 中央値 (範囲) | 0.48(0.21-1.40) | 0.46(0.21-1.40) |
| 血小板数 $\times 10^9/L$: 中央値 (範囲) | 13(1-56) | 14(3-41) |
| 網赤血球数 $\times 10^9/L$: 中央値 (範囲) | 32(3-75) | 29(6-117) |

表2 効果判定基準

| | 好中球数 | 血小板数 | ヘモグロビン |
|------------------------|-------------------|-----------------------------|------------------|
| 〔重症〕 | | | |
| Complete Response (CR) | $\geq 1500/\mu l$ | $\geq 10 \times 10^9/\mu l$ | $\geq 11.0 g/dl$ |
| Partial Response (PR) | $\geq 500/\mu l$ | $\geq 3 \times 10^9/\mu l$ | $\geq 8.0 g/dl$ |
| No Response (NR) | 上記以外のもの | | |
| 〔中等症〕 | | | |
| Complete Response (CR) | $\geq 1500/\mu l$ | $\geq 10 \times 10^9/\mu l$ | $\geq 11.0 g/dl$ |
| Partial Response (PR) | $\geq 1000/\mu l$ | $\geq 3 \times 10^9/\mu l$ | $\geq 8.0 g/dl$ |
| No Response (NR) | 上記以外のもの | | |

[結果]

表3は治療への反応を示すが、治療開始3カ月後、6カ月後におけるG-CSF投与群、G-CSF非投与群の有効率はそれぞれ39%対53%、55%対77%で両群間に統計学的な有意差はみられなかった。治療開始後90日以内にみられた38℃以上の発熱日数、および感染症の罹患頻度についても両群間に差はみられなかった (表4)。両群ともに重症感染症の罹患頻度は低く、有熱日数の中央値も両群ともに3日間であった。特記すべきは両群に1例づつ間質性肺炎の発症がみられたことで、末梢血単核球からサイトメガロウイルスが検出された。2例はともに肝炎後再不貧であり、特発性再不貧からは、1例も間質性肺炎の発症はみられていない。

表3 有効率

| | G-CSF (+) 群 | G-CSF (-) 群 |
|----------|-------------|-------------|
| 治療開始3カ月後 | | |
| 詳細可能な例数 | 33 | 31 |
| CR | 5 | 1 |
| PR | 8 | 16 |
| NR | 20 | 14 |
| 生存 | 19 | 14 |
| 死亡 | 1 | 0 |
| 治療開始6カ月後 | | |
| 詳細可能な例数 | 33 | 31 |
| CR | 8 | 10 |
| PR | 10 | 14 |
| NR | 15 | 7 |
| 生存 | 14 | 7 |
| 死亡 | 1 | 0 |

表 4 治療開始後90日間における感染症の
頻度および有熱日数

| | G-CSF(+)群 (n=33) | G-CSF(-)群 (n=31) |
|-------------|---------------------|---------------------|
| 重症感染症 | | |
| 敗血症 | 0 | 0 |
| 肺炎 | 1 | 0 |
| 肺膿瘍 | 0 | 0 |
| 間質性肺炎 | 1 | 1 |
| 軽症～中等症感染症 | | |
| 肺炎 | 0 | 0 |
| 尿路感染症 | 1 | 0 |
| 【門】腸胃腸炎 | 1 | 0 |
| 帯状疱疹 | 3 | 3 |
| 単純ヘルペス | 0 | 2 |
| ムンプス | 1 | 0 |
| 有熱日数 (≥38℃) | | |
| 中央値 (範囲) | 3(1-9) | 3(1-39) |

今回の治療研究の目的のひとつに、再不貧から骨髄異形性症候群 (MDS) / 急性骨髄性白血病 (AML) への移行に薬剤が関与しているかを明らかにすることが含まれるが、両群から 1 例ずつ MDS への移行がみられた。

初回の免疫抑制療法に反応がみられない、あるいは再発した15例を対象に救済療法として同種骨髄移植が施行された。移植ドナーは HLA 一致ドナー (3 例)、HLA 不一致血縁ドナー (3 例)、HLA 一致非血縁ドナー (9 例) が選択された。非血縁ドナーから移植された 1 例と、HLA 不一致血縁ドナーから移植された 1 例とが移植関連合併症で死亡したが、残りの13例は生存中である。

治療開始 5 年後の生存率は G-CSF 投与群が 91±5%、G-CSF 非投与群が93±6%で両群間に差はみられなかった。G-CSF 投与群 (3 例)、G-CSF 非投与群 (1 例) にみられた死亡の原因は、移植関連死が 2 例、間質性肺炎、頭蓋内出血がそれぞれ 1 例であった。

[考案・結論]

ATG、シクロスポリン、ダナゾール、による 3 者併用療法は、HLA 一致同胞が得られない小児再不貧患者の初回治療として、極めて有用と考えられた。また好中球数が 200/ μ l 以上ある場合には、免疫抑制剤に G-CSF を併用しても、3 血球系統の造血能の回復率や生存率の向上はみられなかった。また感染症の罹患頻度も減少しないことや医療経済のうえからも、G-CSF の投与は重症感染症の罹患時における治療的な投与のみに限定すべきであろう。今回の研究から、初回治療に反応がみられない患児に対する救済療法として、非血縁ドナーからの同種骨髄移植は有望であり、救済療法としてヨーロッパから報告されている免疫抑制剤の再投与⁹⁾との比較研究が必要であろう。

[参考文献]

1. Frickhofen N, et al, N Engl J Med 324, 1297, 1991
2. Bacigalupo A, et al, Blood 85, 1348, 1995
3. Kojima S, et al, Blood 96, 2049, 2000
4. Tichelli A, et al, Br J Haematol 100, 393, 1998

Diamond Blackfan 貧血52例の臨床像

月本 一郎、小原 明
 (東邦大学第一小児科)
 麦島 秀雄 (日本大学小児科)
 大賀 正一 (九州大学小児科)
 小島 勢二 (名古屋大学成長発達)

[はじめに]

Diamond Blackfan 貧血 DBA は小児期発症の代表的な先天性貧血疾患である。その一般頻度は欧米の報告に寄れば百万対5とされ、10数~30数%の症例は家族歴が明らかな遺伝性症例であると報告されている。一方、本邦に於ける DBA の臨床疫学調査はこれまで実施されたことはなく、日本人症例の特徴は明らかにされていない。

DBA はステロイド剤に対し良好な反応を示し貧血が改善するとされてきたが、赤血球輸血から離脱できない症例も存在し、近年これらの症例に対して造血細胞移植が実施されるようになっていく。本研究は本邦の DBA 症例の初めての全国調査であり、現在の日本の DBA の治療の問題点を明らかにした。

[研究方法]

【対象】1988-1998年に日本小児血液学会会員によって診断され、同学会再不貧委員会に登録された後、年次調査で追跡された52例を対象にした。

【方法】診断後1年間観察した後の初回登録調査票と、年次追跡調査票による後方視的調査を行った。移植と輸血療法に関しては追加質問調査票を発行して調査した。同期間内に特発性再生不良性貧血も同時に登録追跡調査が行われた。輸血離脱率は Kaplan Meier 法により求めた。

[結果]

1. 頻度：調査対象の11年間に診断された DBA は52症例であった。同時期に特発性再不貧は650症例診断されており、DAB は特発性再不貧の約8%であった。

2. 診断：男女比は25/27と性差はなかった。診断時年齢の中央値は35.5日で、69%の症例が生後6ヶ月以内に診断されている。診断時血液所見では Hb 値は2 g/dlから11g/dlに分布し、その中央値は5.0g/dlであった。網赤血球数は1.5万/ml未満の症例がほとんどであった。骨髓細胞の骨髓球系細胞/赤芽球系細胞比は45.6であった。10例が合併奇形(小奇形群5症例、先天性心疾患6症例)を有したが、胸腺腫や免疫不全、悪性腫瘍の合併は報告されていない。13例に低身長(-2SD以上)を認めている。3例で遺伝性が疑われた(表1)。経過中8例で好中球減少を、5例で血小板減少を呈した。

表1 遺伝性家族性の3症例

| UPN | 461 | 874 | 887 |
|----------------|-----|---------|-----|
| 診断時年齢 | 1 | 4 | 13 |
| 性別 | 女兒 | 男児 | 女兒 |
| Hb(g/dl)値 | 5.8 | 6.9 | 5.8 |
| MCV(fl)値 | 110 | 88 | 102 |
| 網赤血球(%) | 2.8 | 0.6 | 4.4 |
| 骨髓赤芽球比率(%) | 0 | 37.2 | 7.2 |
| 合併奇形 | 低身長 | 低身長 | 認めず |
| DBAの家族歴 | 母親 | 父親 姉 | 姉 |
| prednisolone治療 | | | |
| 反応性 | 良好 | 良好 | 良好 |
| 依存性 | あり | あり | あり |
| 輸血治療 | あり | あり | あり |
| 依存性 | なし | なし | なし |
| 造血細胞移植 | なし | なし | なし |
| 観察期間 | 6年 | 5年 | 2年 |
| 予後 | 生存 | 生存 | 生存 |

3. 治療(表2)：1例を除く51例が治療を受けた。51例でステロイド剤が投与され、その後10例でシクロスポリンが投与された。輸血は41例に行われ診断後5年で輸血非依存率は75%(KM法)になると予測された(図)。観察期間中23例は無治療

表2 DBA 52症例の治療

| 無治療 | 1 | | |
|--------------|----|----|----|
| 輸血 | 41 | | |
| Prednisolone | 51 | 単独 | 27 |
| CSA | 10 | 併用 | 10 |
| mPSL大量 | 10 | 併用 | 10 |
| 蛋白同化ステロイド | 7 | 併用 | 7 |
| ALG | 1 | 併用 | 1 |
| Epo | 1 | 併用 | 1 |
| 造血細胞移植 | 12 | | |

となったが、21例は中止できず12例が造血幹細胞移植 SCT が施行された。

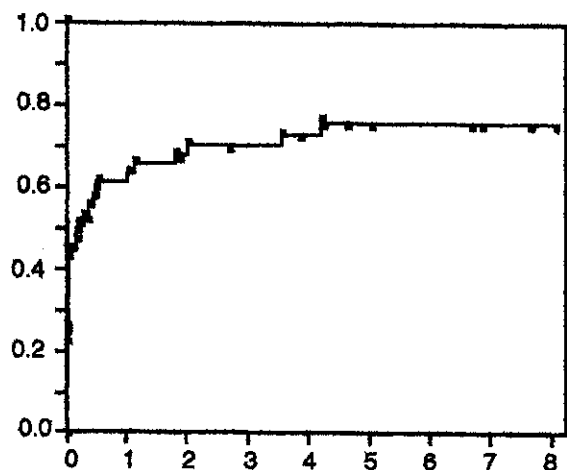


図 診断後年数による輸血離脱率

4. 移植：SCT は診断後1年3ヵ月から7年7ヵ月で行われ、ドナーは血縁 BM 4 例非血縁 BM 6 例血縁 CB 2 例非血縁 CB 1 例であった。その結果10例は無病生存となったが、拒絶1例（非血縁 BM）死亡1例（非血縁 CB；EBV-LPD）が報告されている。

5. 予後：52例の追跡期間中央値77か月で、死亡は1例（非血縁 CB）であった。5年以上経過観察している30例では15例が無治療に、9例が治療中であり、10例が SCT 治療を受けている。

[考察]

11年間の出生数を1300万出生と概算し、また再不貧委員会調査が全国症例の約70%を追跡していると仮定すれば、その頻度は100万出生対約6人と予測される。（*；特発性再不貧調査の実績からの仮定値）。この頻度は欧米の報告^{1,2)}と大きな違いはない。一方、合併奇形として欧米の教科書に示されている骨の奇形の報告は少ない。今回の調査では遺伝性家族性の明らかな症例は3症例5.8%にすぎなかった。

遺伝性家族性症例の臨床像は典型的 DBA の病像を呈する例と非典型例があることも欧米では知られている。従って本邦では原因不明の先天性貧血症例の中に家族性 DBA 症例が埋もれている可能性がある。また本邦の家族性 DBA 症例の詳細

な遺伝子解析を行い欧米^{3,4)}との比較が必要である。

DBA はステロイド剤に反応し予後良好と考えられてきたが、輸血離脱できない症例が存在する。今回の調査の KM 法による予測では、診断1年後までに60%の症例が輸血から離脱できるものの、1年の時点で輸血から離脱できていない症例はその後の4年間で15%しか離脱できる可能性が無いことが予測された。これらの輸血離脱不能症例は鉄過剰による臓器障害のリスクがあり予後不良と考えられている。

12例に対して造血細胞移植が行われ、移植成績は良好であった。臍帯血移植の DBA に対する適応に関しては未だ議論が多い。今回3例の臍帯血移植が行われたが、非血縁の1例は BPLD で死亡している。

[結論]

日本の DB 貧血は欧米と同等の頻度発生している。日本人の家族性 DB 症例は少数例の報告にすぎず、遺伝子解析で欧米との比較が必要である。また輸血離脱を指標とした治療ガイドラインを作成し、移植適応について議論することが必要である。

[文献]

1. Ramenghi U, et al, Br J Haematol 104, 841, 1999
2. Ladenstein R, et al, Klin Padiatr 209, 201, 1997
3. Draptchinskaia N, et al, Nature Genet 21, 169, 1999
4. Willig TN, et al, Blood 94, 4294, 1999

Two color FISH を用いた再生不良性貧血における-7 minor clone の検出

別所 正美、矢ヶ崎史治、伊藤 善啓、
松田 晃 (埼玉医科大学、第1内科)

【はじめに】

再生不良性貧血 (AA) に対して免疫抑制剤や G-CSF を併用した治療法の有用性が明らかにされている。しかし一部の症例が治療後に monosomy 7(-7) を有する急性骨髄性白血病 (AML) や骨髄異形性症候群 (MDS) に移行することが報告され、問題になっている^{1,2}。これらの -7 を有する AML/MDS 移行例では、AA の治療前に、すでに -7 minor clone が存在していたか否かは不明である。我々は従来のセントロメアに対する FISH 法による-7の検出感度は約7%以上と -7 minor clone の検出には不向きであると考え、7番染色体のセントロメアと長腕 (7q31) 両者を異なる蛍光標識された probe により検出することにより、より感度の高い-7 検出法を確立した。本研究では、AA 治療前の潜在的 -7 minor clone と clonal expansion

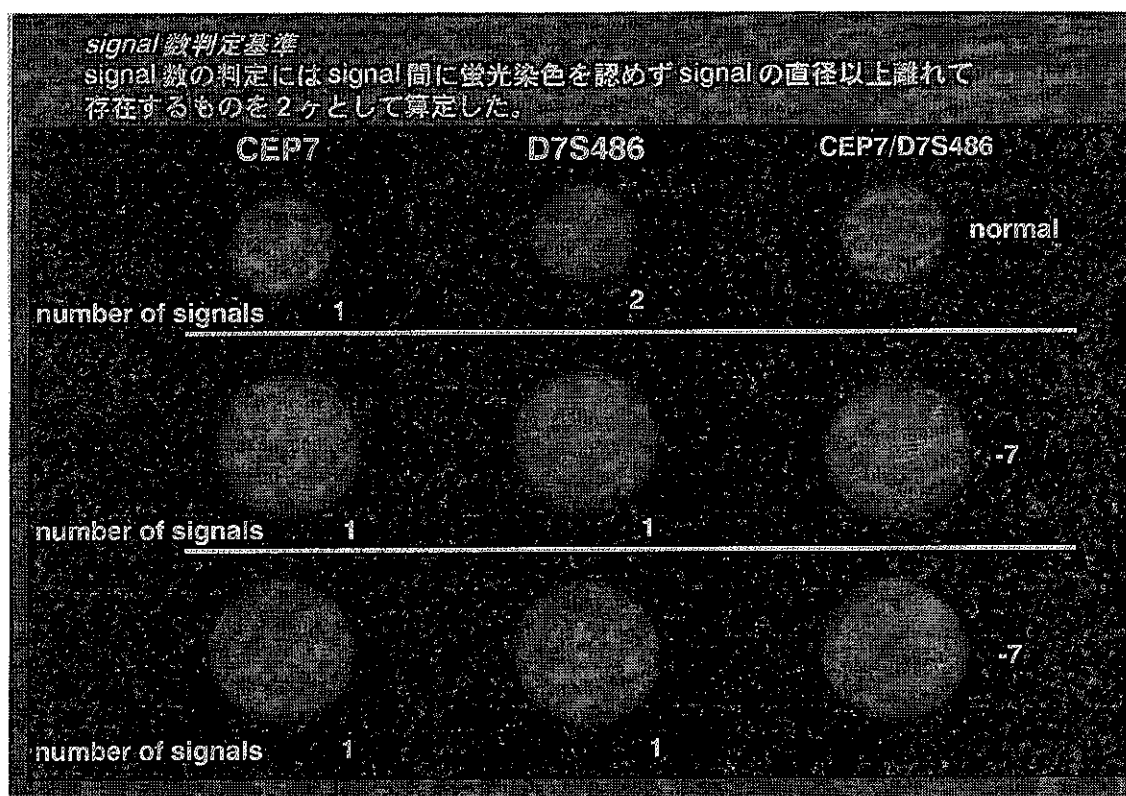
との関連性を two-color FISH 法を用いて -7 minor clone を経時的に検出し、検討する。

【対象と方法】

対象は健常者コントロール12例、AA 初診時9例、治療後4例 (他施設 MDS 移行例1例を含む)。MDS 移行例は2歳女児で sAA に対し、ALG+G-CSF+mPSL で治療された後、寛解に到達したが、3ヶ月後に染色体解析で -7 (2/20) が出現した。表1に対象患者の臨床的診断および治療法を示す。

-7 に対する Two color FISH 法は probe として CEP7/D7S486 (VYSIS, IL, USA) を用い、骨髄細胞に対して常法どおり FISH を行った。間期核におけるシグナルを最低500個、観察した。CEP7 (セントロメア) および D7S486 (7q31) のシグナルが1ヶのものを -7 と判定した。Signal 数の判定には single band pass filter を用いて観察し、signal 間に蛍光染色を認めず signal の直径以上離れて存在するものを2ヶとして算定した。

また -7 を51.8%の骨髄有核細胞に認めた MDS 患者骨髄細胞を健常者骨髄細胞で段階希釈し本法の検出感度を検討した。



[結果]

健常者骨髄細胞 (n=12) の -7 陽性率は CEP7 を用いた single color FISH 法で $4.18 \pm 2.45\%$ (mean \pm 2SD) であったが two color FISH 法では $0.43 \pm 0.48\%$ (mean \pm 2SD) であった。

また -7 陽性細胞の希釈検定では two color FISH では 0.8% まで測定値と予測値に相関が認められたが、CEP7 単独による single color FISH 法では 7% 以下より相関性が見られず、single color FISH 法では偽陽性比率が高いことが、その原因として考えられた。(図 1)

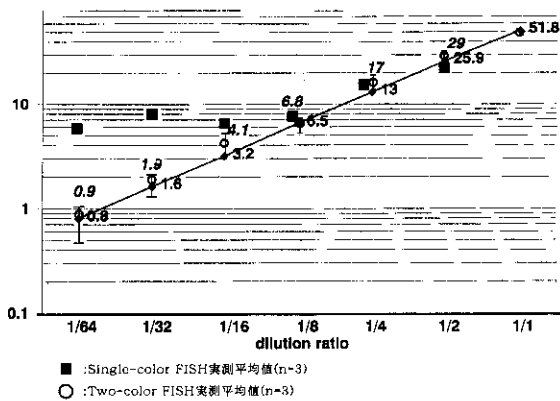


Fig. 1 monosomy 7MDS 骨髄細胞 (51.8%) を正常骨髄細胞 (0.2%) で段階希釈して Two color FISH と Single color FISH の検出感度を検討した (error bar は \pm SD を示す)

以上より two color FISH 法による -7 の検出感度は 1% 以上と考えられた。Two color FISH による解析結果を表 1 に示す。

AA 患者における初診時の検討では 9 例中 7 例で -7 は 1% 以下 [range 0-0.8%] で -7 陰性と考えられた。初診時より -7 陽性と考えられた 2 例 (1.3, 1.2%) は治療が奏功したが、1 例が治療後 3 ヶ月で -7 (33.5%) となり、1 例は寛解後に 0.4% と減少した。

[考察・結論]

1. Two color FISH は -7 clone の検出感度は 1% 以上であり、感度および特異性ともに優れている方法と考えられた。
2. Two color FISH 法により AA 初診時より -7 minor clone を有する症例の存在が示唆された。
3. AA 初診時より -7 minor clone が存在すると考えられた 2 例では、1 例 (初診時 1.2%) が治療奏効後 3 ヶ月という短い期間で -7 clonal expansion が認められ、1 例 (初診時 1.3%) では寛解到達後に -7 が 0.4% と感度以下に減少した。
4. 以上より、AA 初診時における潜在的 -7 minor clone の臨床的意義は現在不明であるが、今後さらに症例を蓄積し、臨床経過を注意深く観察して検討する必要があると考えられた。

[文献]

1. Kojima S, et al, N Engl J Med 326, 1294, 1992
2. Ohara A, et al, Blood. 90(3), 1009, 1997

Table 1. Characteristics and result of FISH analysis for -7 of patients with aplastic anemia

* FISH was performed during follow up period.

| CASE sex/age | diagnosis | karyotype at first diagnosis | positive rates of -7 at first diagnosis | therapy/response | positive rates of -7 after Tx |
|--------------|-----------|------------------------------|---|----------------------------|-------------------------------|
| F/2 | sAA | 46,XX[20] | 1.2% (6/500 cells) | ALG+G-CSF+mPSL Res | 33.5% (187/500 cells) |
| F/71 | mAA | 46,XX[22] | 0% (0/529 cells) | ALG+CyA+G-CSF Res | ND |
| F/87 | mAA | 46,XX[16] | 0% (0/508 cells) | ALG, CyA Res | ND |
| F/85 | sAA | 46,XX[20] | 0% (0/520 cells) | CyA+G-CSF NR | ND |
| F/78 | sAA | 46,XX[20] | 0.8% (3/500 cells) | CyA+G-CSF PR | ND |
| M/21 | sAA | 46,XY[40] | 1.3% (7/520 cells) | ALG+CyA Res | 0.4% (2/500 cells) |
| F/48 | sAA | 46,XX[20] | 0.2% (3/500 cells) | ALG+CyA+G-CSF Res | ND |
| F/82 | sAA | 46,XX[16] | 0.8% (4/500 cells) | ALG+CyA+G-CSF NR | 0.4% (2/500 cells) |
| F/72 | mAA | 46,XX[20] | 0.4% (2/500 cells) | CyA Res | ND |
| F/33 | sAA | 46,XX[20] | ND | anabolic steroid Res → CyA | 1.1% (6/540 cells)* |

* FISH was performed during follow up period.

HUMARA 遺伝子による 高感度キメリズム解析法

唐沢 正光 (群馬大学輸血部)
山根 有人、横濱 章彦、前原 忠史
塚本 憲史、野島 美久
(群馬大学第3内科)

[はじめに]

キメリズム解析には Short tandem repeat が頻用されるが、その感度は数%にすぎない。これは主にキメラのうちメジャーな配列がマイナーな配列と primer を競合するためと考えられる。このため、我々は HUMARA 遺伝子による高感度検出法を試みた。原理は HpaII により男性由来の X 染色体 (X) を完全消化し、残った女性 X を PCR 増幅する方法で、特に女性レシピエント (R) / 男性ドナー (D) で有用である。

[方法]

末梢血より白血球を分離し、DNA を抽出した後、試料にメチル感受性制限酵素 HpaI を一昼夜反応させた。感度を上げる目的で HUMARA (Genbank M21748) 遺伝子を nested PCR で増幅したり。Primer pair は AR : nt position 230-253/485-508, AR Nested: nt position 124-148/ 535-554. AR forward primer の 5' 末端を FAM で蛍光標識し ABI PRISM 310 で capillary electrophoresis した。

[結果]

1. 検出感度の検定。

A) Single PCR

正常女性 DNA を男性 DNA で段階希釈し、その感度を検定した。Single PCR (AR) では HpaII で切断する前は 10^{-1} の感度であったが、制限酵素切断後は 10^{-2} から 10^{-3} のレベルで女性 DNA を検出することが可能であった (図 1)。女性 DNA が低濃度では HpaII 切断後も男性由来の HUMARA が検出された。これは制限酵素の切断が不完全、または男性の同遺伝子 X 染色体の活

性化にともなう脱メチル化が 100%ではなかったため、消化を免れた極く少量の男性由来 HUMARA が検出されたためと考えられた。

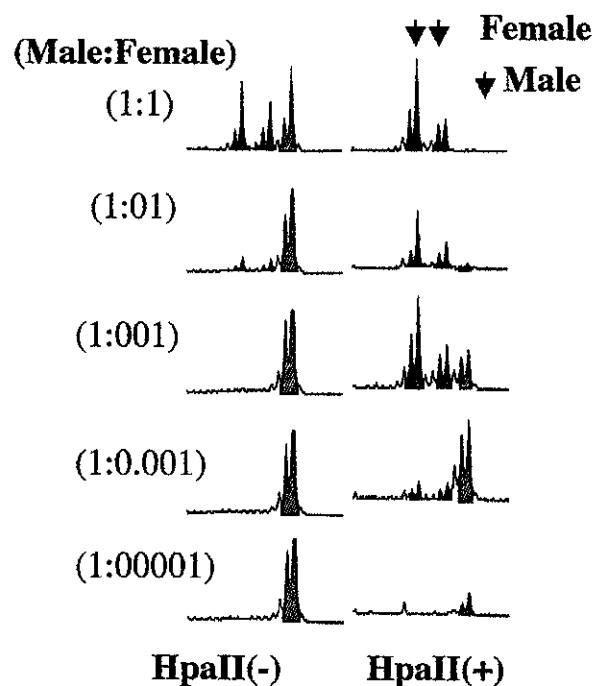


図 1 Single PCR

B) Nested PCR

Nested PCR (AR Nested プライマーで増幅した試料を、AR プライマーでさらに PCR) では HpaII 切断後の感度は 10^{-4} に向上した (図 2)。

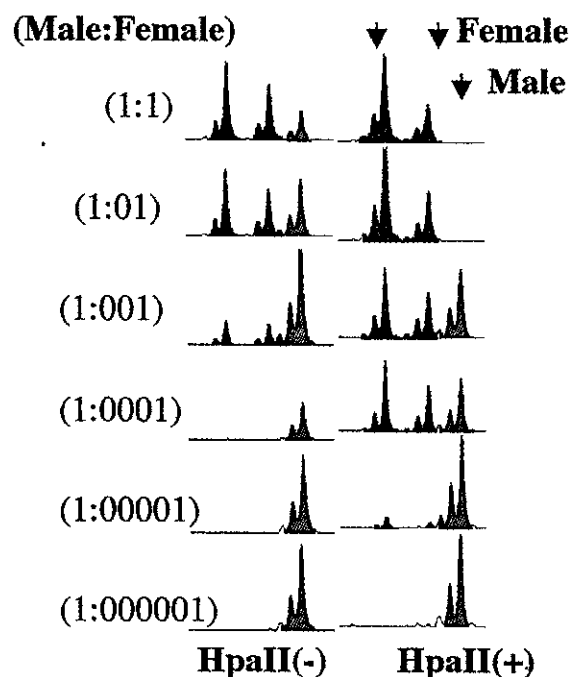


図 2 Nested PCR

2. 同種 PBSCT 施行例における早期キメリズム解析。

A) CML chronic phase 症例

21歳女性。移植前のレシピエントとドナーの DNA 希釈試験を行なったところ、Single PCR の感度は 10^{-3} 、nested PCR で 10^{-5} であった。1 locus mismatch のいとこの男性より同種 PBSCT を行ったが、grade IV の急性 GVHD および TMA を合併し day75 に死亡した。一般的には重症の急性 GVHD 後は、complete chimera を示す症例が多いとされるが、本例では全経過を通じて recipient 由来のバンドが検出された (図 3)。

B) M4Eo 2nd CR 症例

42歳女性。移植前の DNA 希釈試験では二つのアレルの位置が近いいためか (1 CAG repeat の差)、Nested PCR で 10^{-3} と若干低めの感度を示した。Grade I の aGVHD を発症したが、ステロイド投与により速やかに軽快した。この症例も day 86 までは全経過を通じて患者由来のバンドが検出された。

[考察]

女性 DNA を男性試料で希釈し感度検定した。HpaII(-) 試料では 10^{-1} の感度であったが、消化後は Single PCR で 10^{-2} から 10^{-3} 、Nested PCR で 10^{-4} ~ 10^{-5} に上昇した。また、2例の移植患者で早期キメリズムの解析が可能であった。男性 R と女性 D の組み合わせでは Y 特異配列により微量レシピエント細胞の検出が行われるが、今回の方法により女性 R と男性 D においても高感度なキメリズム解析が可能であった。また、造血幹細胞移植以外の micro chimerism の解析法としても有用と思われる。

[文献]

1. Allen RC, et al, Am J Hum Genet 51, 1229, 1992

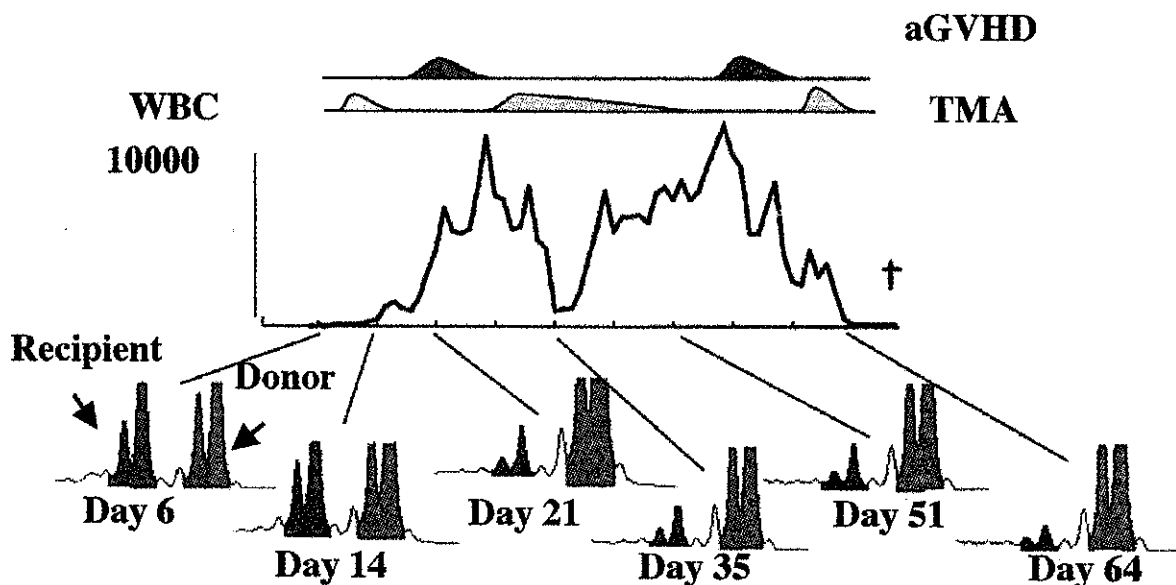


図 3 CML chronic phase 症例の臨床経過とキメリズム

再生不良性貧血におけるPNH顆粒球の増加： 免疫抑制療法後の推移とその意義

中尾 眞二、中条 達也、王 紅波

(金沢大学医学部第三内科)

寺村 正尚、溝口 秀昭

(東京女子医大血液内科)

【はじめに】

われわれは昨年度の本研究班の調査により、再不貧患者の50%以上にPNH顆粒球の増加が見られることを明らかにしたり。しかし、診断後もない未治療の症例が少数であったため、PNH顆粒球の増加の意義は不明であった。これを明らかにするため、「再不貧について治療薬の組合せを評価する多施設共同研究」に登録された新規の患者を対象として同様の解析を行うとともに、ATG+シクロスポリン療法後のPNH顆粒球の推移を検討した。さらに、PNH顆粒球の出現とゲノムの不安定性との関係を調べるため、glycophorin A (GPA) 蛋白の表現型がMNの再不貧症例についてNN・NO赤血球の出現頻度を決定した。

【対象と方法】

診断後間もない未治療の再不貧35例のヘパリン加血を塩化アンモニウム緩衝液で溶血後、PE標識抗CD11b抗体、およびFITC標識抗CD55抗体・CD59抗体とインキュベートした。顆粒球ゲート内のCD11b⁺細胞10万個についてCD55⁻CD59⁻細胞(PNH顆粒球)の割合を決定した。GPAがMN型の再不貧患者については、抗M抗体とFITC標識抗MN抗体を用いて、変異型のNN・NO赤血球の割合を決定した。

【結果】

PNH顆粒球の検出感度と特異性を決定するため、PNH患者の血液を健常者の血液で6千倍から5万倍に希釈したのちCD55⁻CD59⁻細胞の割合を決定したところ、理論値に近い割合の細胞が

検出された(図1)。また、1%のPNH顆粒球が検出された患者の顆粒球をaerolysin(大阪大学微研・西村純一先生より供与)で処理後heteroduplex analysisでPIG-A遺伝子の異常を検索したところ、exon 5にmutationを示す異常バンドが検出された。PNH顆粒球の増加($\geq 0.003\%$)を認めた患者の割合は、未治療の再不貧35例中31例(88.6%)であった。PNH顆粒球が増加していた未治療症例19例について、ATG+シクロスポリン療法後6~12カ月目にPNH顆粒球の割合を再検したところ、血液学的改善がみられた18例中15例では、PNH顆粒球の割合が前値の0.01~90%に減少していた(図2)。その他の3例と、治療が無効であった1例ではPNH顆粒球の割合が軽度に増加していた。

GPA遺伝子がMN型で、PNH顆粒球の増加がみられた再不貧9例についてNN・NO赤血球の出現頻度を調べたところ、それぞれ平均0.0078%、0.0076%であり、健常者の頻度(0.0021%、0.0014%)と比べて有意差はみられなかった($p=0.11$ 、 $p=0.57$)。

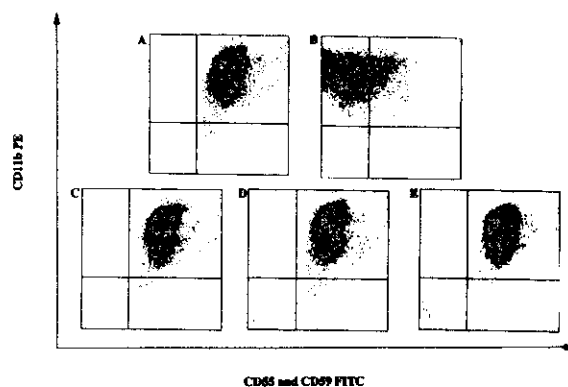


図1 PNH顆粒球の検出感度

A 健常者末梢血、B PNH患者末梢血、C PNH患者の末梢血(B)を健常者の血液(A)で5万倍(0.002%)に希釈(10万個の検索ではCD11b⁺CD55⁻CD59⁻細胞が計算上は2個検出される)、D 2万5千倍(0.004%)に希釈(CD11b⁺CD55⁻CD59⁻細胞が計算上は4個)、E 6千倍(0.018%)に希釈(CD11b⁺CD55⁻CD59⁻細胞が計算上は18個)。各理論値に近い数のドットがCD11b⁺CD55⁻CD59⁻分画にみられることが分かる。