

する部分である。最終的な匿名化処理のための検体ラベルは、連結可能であっても、連結不可能であっても、この段階で完了させなければならない。何故なら凍結してしまった検体には、それ以降新たなラベルの添付は実際的には無理だからである。

検体を連結可能匿名化で長期間保存したいという希望は、多くの研究者から寄せられた。その理由は、長期寛解後の再発や、二次癌発生要因の研究には、可能な限り連結可能な状態での検体保存が望ましいからである。しかし、連結可能匿名化処理には、子どもの成長に合わせた説明義務、拒否する権利、同意を撤回する権利、結果の報告責任などが連動しており、実際には実施が極めて困難である。そこで、検体は基本的には、臨床研究期間の間だけ連結可能匿名化処理を行い、検体保存を行うこととなった。

従って、資料1の⑥では、連結不可能匿名化に対応できる検体保存番号をラベルすることが必要とされる。すなわち、検体の検査が終了し凍結する際には、検査センターでは登録コードと年齢、施設情報を破棄し、新たな検体保存番号を記す。一方、データセンターでは、臨床研究期間終了まで登録コードと検体保存番号の対照表を保管しなければならない。研究期間終了後、患者の臨床データから個人情報削除され、検体保存番号のみとなる。また、登録番号と検体保存番号との対照表は破棄される。これによって、検体およびそれに付随する患者情報は、連結不可能匿名化による保存となる。

5. 説明と同意を得る時期

手順が煩雑になるので、診断用検体の送付と余剰検体の保存、研究目的での使用についての同意は、検体送付時に行い、その後最終診断が得られた時点で、再確認を行う予定であった。しかし、患者や患者家族にとっては病気発症後間もない時期であり、上記対応では余りに慌ただしすぎるという意見が提出された。固形腫瘍の検体保存との整合性をとる上からも、最初は検体の診断用検体の送付と余剰検体保存に関する同意のみを取得し、患者と家族が落ち着いたらなるべく早期に、検体

の研究用使用についての説明と同意をいただくこととした。

6. 包括的同意の内容

検体保存の同意を得るためには、保存目的について具体的に述べ、その事項に関する同意を取得する必要がある。実際的には研究計画が提出される前に検体の保存が必要なので、可能な限り目的を限定した包括同意を得る事とする。具体的な研究目的については、小児白血病・悪性リンパ腫に関する研究に限定し、(1)新しい診断法の開発、(2)発症機構の解析、(3)新しい治療法の開発、(4)新しい予後因子の同定、(5)再発や二次がん発症機序の研究等である旨を説明する。加えて、各々の研究計画に関しては、必ず研究者の属する施設の倫理委員会および日本小児白血病リンパ腫研究グループ(以下 JPLSG) 研究審査委員会に申請し、承認されなければ、検体の分譲は行われなことを約束する。

7. 体細胞系列と胚細胞系列に関する遺伝子研究の取り扱い

腫瘍細胞に特異的な遺伝子解析研究については包括同意の範疇で対応可能と考える。問題は胚細胞系列に関する遺伝子解析研究の取り扱いである。線維芽細胞や寛解時の末梢血に限らず、腫瘍細胞を使用しても、正確ではない可能性があるが、胚細胞系列の遺伝子解析研究は行うことができる。それらは主に薬剤感受性や遺伝子多型等に関する生殖細胞系列変化を検討する遺伝子解析研究となる。これらの解析から得られる情報への期待と、個々の研究計画について、検体提供者各人から同意を再取得する煩雑さを考えると、一部の胚細胞系列に関する研究については、包括同意の中に入れてはどうかという考え方が支配的であった。具体的にどのような胚細胞系列に関する研究は包括同意で良く、どのような研究では患者および代諾者から再同意を取得するかという画一的な判断基準を設定することは困難であり、結局、個々の研究施設の倫理委員会の判断に委ねられることとなった。本倫理ワーキンググループでは、再同意を取得しなければならない胚細胞系列の研究について

は、以下のように考えた。遺伝相談が必要な、単一遺伝子疾患等に結びつくような変異の解析研究については、必ず、代諾者および、必要とされるなら患者から新たに同意あるいはアセントを取得する。その際に、遺伝カウンセリングの機会も必要に応じて提供されることを説明する。

以上の原則は、検体が連結可能匿名化処理をされている期間にのみ適応される。

包括同意で可能な胚細胞系列の遺伝子解析研究の研究結果については、個別のデータの解釈は困難なので、個々の患者からの問い合わせには応じられないこと、しかし、研究終了後にその結果を、JPLSG ホームページ上に公開することを約束する。再同意の取得が必要な研究については、患者側からの要求があればその結果について、明確に説明する義務があることは言うまでもない。

8. 文書同意とアセント

検体保存と研究目的の使用に関する同意/アセントについては以下の基準で行うこととなった。

(1) 16歳以上20歳未満の患者は代諾者からの文書同意に加え、患者自身の文書による同意を取得する。(2) 患者が12歳から16歳未満の場合には、代諾者からの文書同意に加え、患者自身の文書によるアセントを取得することが望ましい。(3) 患者が7歳から12歳未満の場合には、代諾者からの文書同意に加え、患者自身の口答によるアセントを取得することが望ましい。(4) 連結可能匿名化が行われている研究期間内に患者が16歳に達した場合には、可能な限り改めて本人の意思を確認することが望ましい。

実際には、連結可能匿名化処理をされている期間中に、患者の年齢が次の段階の同意を必要とする年齢に達することは大いにあり得ることである。しかし、それに応じた再同意の取得は事実上極めて困難であることが予想されるので、再同意取得の厳密な適応は可及的に回避し、その必要性については、個々の研究計画を審査する研究施設の倫理委員会の判断に委ねることとなった。

9. 検体保存量/本数

検体保管施設の保管容量には限りがあるので、

各検査施設が保存する検体の数は、患者あたり1本から10本の範囲で行う事とする。また、検体保管施設は、連結可能匿名化の時期にある検体については、患者に対する新たな検査の可能性に備え、凍結細胞として検体を2本(最低1本)は保持しておくこととし、万一の場合の検体保存の利点を強調した。

10. 検体保存施設

この考え方については、当初はJPLSGは幾つかの研究グループのインターグループとして位置づけられるので、それぞれのグループは独自に検体を保管するとされた。しかし、実際に検体保存業務を遂行可能とする条件は厳しく、個人情報の散逸の予防と言う観点も重視され、結果的に成育医療センターの協力を得て検体保存を行うことで了解が成立した。成育医療センターは、このような事業に相応しい施設であるが、事業内容は高度かつ煩雑になることが予想され、我が国での小児悪性腫瘍全体の研究レベルの向上を視野に入れた、検体保存の研究事業化に向けた予算獲得等の努力の必要性については、全員の一致した認識が得られている。

11. 検体保存期間

検体保存期間については、大きな論議があった。晩期再発要因の解析や二次癌の発症要因の解析には、可能な限り長期の連結可能匿名化による保存が必要との認識が多く提出された。それは、疾患に罹患した小児の生命予後を考えると、当然の要求である。しかし、残念ながら、このような小児科側の事情に応える準備は、我が国の各施設の倫理委員会には出来ていないと思われた。また、実際の問題として、同意の再取得を必要とする研究にどう対応するかという問題も残る。

暫定的に、臨床プロトコールの研究期間の間は連結可能匿名化による検体保存を行い、その時期を過ぎた検体については、連結不可能匿名化処理を行い、20年間の検体保存期間を設定した。

12. 検体分譲の手順

(1) 研究申請者は、研究者の所属する施設の倫理審査委員会の審査を受け、承認を受けなければ

ばならない。(2) 研究申請者は、研究計画書に所属する施設の倫理審査委員会の研究計画承認書を添えて、JPLSG 運営委員長に検体分譲の申請を行う。JPLSG 運営委員長は、研究計画書の審査を JPLSG 研究審査委員会に委嘱する。JPLSG 運営委員長の委嘱を受けた JPLSG 研究審査委員会は、その研究計画が科学的・倫理的に妥当なものか否かの答申を行う。(3) JPLSG 運営委員長は、その答申について運営委員会の審議を経て分譲の可否を決定し、申請者に書面で通知する。(4) 申請者は研究計画書、研究機関倫理審査委員会承認書、JPLSG 研究審査委員会承認書および JPLSG 委員長の分譲許可書を添えて検体保管センターに分譲の申請を行い、検体の分譲を受ける。

13. 保存検体の公開

検体利用の公平性を維持するために、保存検体は検体保存番号と、疾患名、保存年、種類、量、可能な供給形態（組織・細胞・DNA・RNA 等）などの検体情報とともに、年に一度 JPLSG メンバーに公開する。

14. 研究審査委員会の設置

余剰検体の研究用分譲について、分譲の適否を判断する審査の迅速化を図るために、研究審査委員会を設置する。研究審査委員会の役割は、JPLSG 運営委員長の試問を受け、提出された研究計画が科学的・倫理的に妥当なものであるか否かを判断し、JPLSG 運営委員長に答申する事である。構成員としては、ゲノム解析研究に対応可能なもの、すなわち、男女両性からなり、文化系の委員、倫理・法律の専門家等の条件を満たす必要がある。しかし、審査の迅速化を図るために、原則として審査は電子メールで行うこととした。

15. 研究者の義務

研究計画の立案・申請と検体の分譲依頼は、JPLSG 構成員が共同研究者としてその研究に加わっていれば可能である。また、保存された余剰検体を使用して行われる研究は、その研究課題と概要および研究結果を、JPLSG ホームページ上に公開する。

D. 考察

今年度は、検体保存のための基本ルールの設定と、研究目的での使用に関する倫理的問題についての問題点を抽出し、その解決法を検討した。議論を重ねていきながら、大きな変化を経験したのは、検体保存施設をめぐる論議であった。各研究グループの枠を越えて、最終的には成育医療センターに悪性腫瘍の検体が、白血病・悪性腫瘍および固形腫瘍が、共に集約され保存される形で合意が得られた。恐らくこの展開は、小児悪性腫瘍細胞バンクに将来は結びつくものと予想され、今後の我が国での小児悪性腫瘍研究に果たす役割の重要性は、計り知れないものがある。今後、小児悪性腫瘍細胞バンクの基盤整備のための予算化は、重要な課題となるものと思われた。

小児をめぐる倫理的問題を考える上で困難な点は、小児の理解力の評価である。小児は連続的に成長過程にいたので、恐らくある断面での評価では足りず、時系列的な見方が必要とされている。しかも、成人に至る過程にあるので、必ず代諾者が必要とされる事が、根本的に大人と異なる点である。そのような視点と、一方で、実際的な運用上の実行可能性との調和が、議論を進めていく上で大きな問題点となった。小児医療をめぐる倫理的問題については、従来あまり注目されていなかった傾向がある。小児の悪性腫瘍の治療や、骨髄バンクドナーに関する倫理的諸問題は様々存在していると思われ、今後機会のある毎に、しっかりした論議が必要となるであろう。

E. 結論

小児造血器腫瘍臨床研究における倫理的事項の中で、特に小児患者の検体保存と、研究目的での使用にあたっての問題点を抽出した。検体および検体に附随する個人情報の保護、研究の科学的・倫理的水準の維持と言った観点から、匿名化、説明と同意の取得、検体保存施設、検体供給、検体保存期間、研究審査委員会等について検討し、それに対する原則的な対応法を定めた。資料 1 に

それらをまとめた「検体保存と分譲に関する規約(案)」を示した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

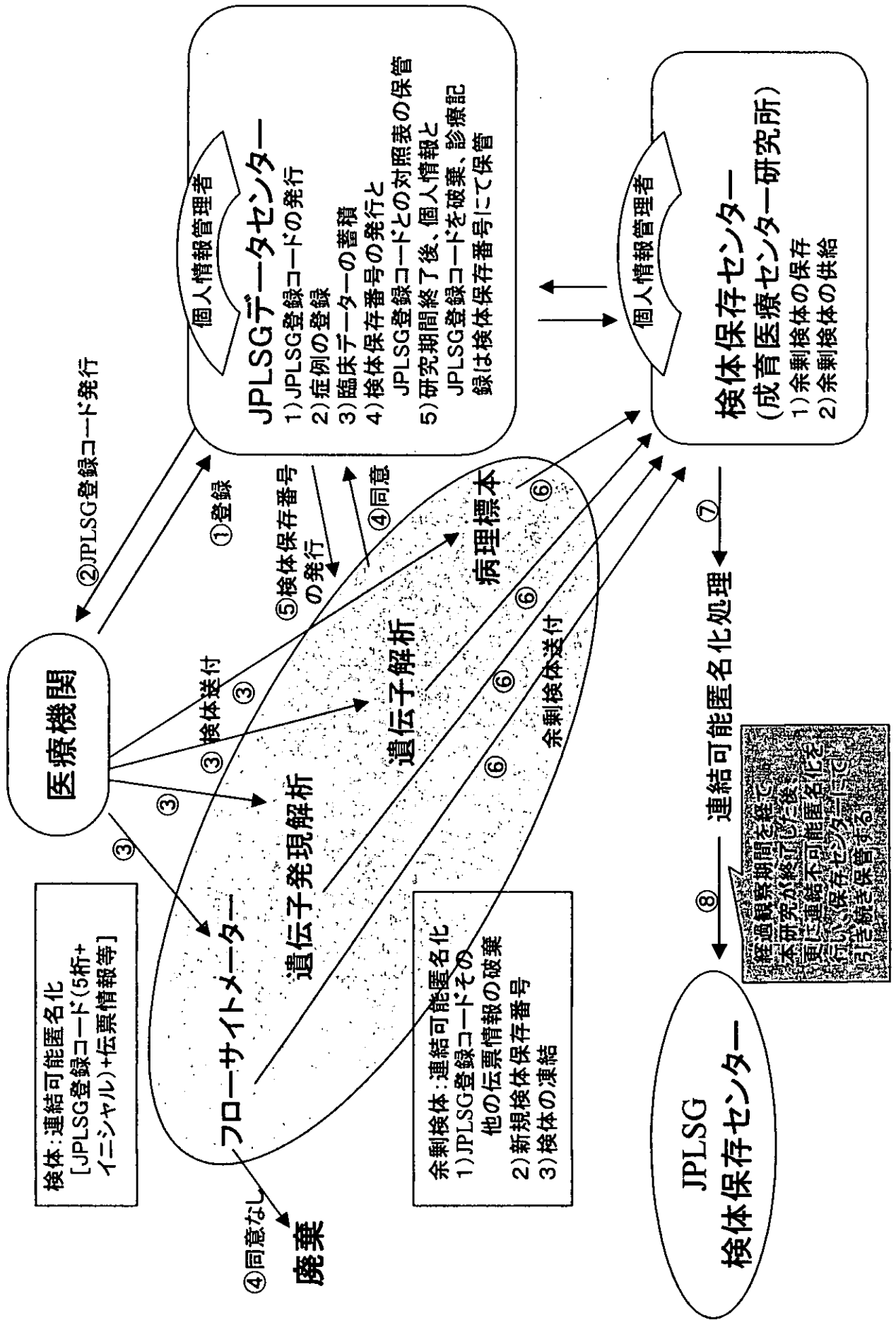
該当なし。

2. 実用新案

該当なし。

3. その他

該当なし。



(目的)

第1条 日本小児白血病リンパ腫研究グループ (Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group、以下 JPLSG)は患者の同意を得ている余剰検体を、特定の保管施設に搬送、一括保管し、小児白血病・悪性リンパ腫研究の検体として使用する。提供者のプライバシーを遵守し、ヒト検体を使用した臨床研究の科学的水準と倫理性を確保するために、検体保存と分譲に関する規約を定める。

(医療機関)

第2条 本規約に則って検体保存と分譲を行う医療機関(以下医療機関)は、JPLSG 施設会員の条件を満たした上で、JPLSG に登録されていなければならない。
2. 医療機関は、臨床研究プロトコルおよび、余剰検体の保存と研究目的の使用に関し、当該機関の倫理審査委員会の承認を受ける必要がある。

(JPLSG 登録コード)

第3条 全ての患者は、登録時に JPLSG データセンター個人情報管理者より連結可能匿名化番号 (JPLSG 登録コード) が割り当てられる。検体にも同じ JPLSG 登録コード (以下登録コード) が割り当てられる。
2. 登録コードは 5 桁の数字と患者イニシャルより構成される。患者個人情報と登録コード照合表は、JPLSG データセンターが責任を持って保管する。
3. 検査用検体送付時には、登録コード・年齢・施設・(採取部位)を明記し、中央診断過程における検体の取り違えを予防する。臨床研究プロトコル番号は記入しない。

(余剰検体の保存と研究用使用に関する説明と同意)

第4条 患者主治医は、中央診断用検体送付時に、患者と代諾者に検査の必要性を説明し、余剰検体保管に関する同意を取得する。
2. 主治医は、最終診断が得られた後退院までに、余剰検体の保存と研究用使用について説明し、患者と代諾者の同意を文書にて得る。
3. 研究目的については小児白血病・悪性リンパ腫に関する研究に限定し、可能な限り包括的に、すなわち、(1)新しい診断法の開発、(2)発症機構の解析、(3)新しい治療法の開発、(4)新しい予後因子の同定、(5)再発や二次がん発症機序の研究等で

ある旨を説明する。この際、薬剤感受性や遺伝子多型等生殖細胞系列変化を検討するゲノム遺伝子解析研究を施行する可能性があることを明確に述べる。

4. 研究結果については、個別のデータの解釈は困難なので問い合わせには応じられないこと、しかし、研究終了後に JPLSG ホームページ上に公開することを説明する。
5. 生殖細胞系列の中でも遺伝相談が必要な、単一遺伝子疾患に結びつくような変異の解析研究については、必ず、代諾者および、必要とされるなら患者から新たに同意を取得する。
6. 体細胞系列および生殖細胞系列の研究に関する同意を取得するときは、それぞれ別項目のチェックリストにより同意の有無を問う。
7. 同意書の内容は、その目的により「ヘルシンキ宣言」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」、「機関内倫理審査委員会の在り方について」、「臨床研究に関する倫理指針」等、国が定める指針に則ったものでなければならない。
8. 主治医は検体保存に関し、患者および代諾者に、拒否してもなんら不利益を被らないこと、また、連結可能匿名化の期間中はいつでも同意の撤回が可能であること、検体の無償提供と、得られた知的財産は提供者ではなく、研究者および JPLSG に属することを明確に説明する。

(文書同意あるいはアセントの適応年齢)

第5条 16歳以上20歳未満の患者は代諾者からの文書同意に加え、患者自身の文書による同意を取得する。

2. 患者が12歳から16歳未満の場合には、代諾者からの文書同意に加え、患者自身の文書によるアセントを取得することが望ましい。

3. 患者が7歳から12歳未満の場合には、代諾者からの文書同意に加え、患者自身の口答によるアセントを取得することが望ましい。

4. 連結可能匿名化が行われている研究期間内に患者が16歳に達した場合には、可能な限り改めて本人の意思を確認することが望ましい。

(検査施設と検体保存番号)

第6条 検査施設は契約のもとに JPLSG から検査事業を依頼され、定められたプロトコールに従って検体を検査し、余剰検体は一定期間保存後、全て検体保存

施設に搬送する。

2. 登録コードと年齢・施設・(採取部位)が記された情報は、余剰検体保存時に完全に抹消され、新たにデータセンターより交付された検体保存番号が記入され、凍結される。

3. 登録コードと検体保存番号の照合表はデータセンターの個人情報管理者によって保管され、観察期間が終了し、連結不可能匿名化が行われた時点で、データセンターにて廃棄される。

4. 各検査施設が保存する検体の数は、患者あたり1本から10本の範囲で行う。

5. 検査施設は、当該施設の倫理審査委員会の規定に従い審査を受け、承認された後に業務を遂行する。

(保存施設)

第7条 JPLSG は、余剰検体保存施設を、小児がん組織バンクとして稼働を始める成育医療センターに委託する。成育医療センターは、当該施設の倫理審査委員会の規定に従い審査を受け、承認された後に業務を遂行する。

2. JPLSG の検体保管センターは、検体を適正な品質管理の下に保管するが、不慮の災害・事故による検体の損失については、その責任を問われない。

(検体の保存期間と連結不可能匿名化处理)

第8条 連結可能匿名化による検体の保存は、プロトコールに定められた研究観察期間内とする。その時点を過ぎた検体については、連結不可能匿名化处理を行い、引き続き20年間の検体保存を行う。ただし、個人情報を除いた臨床及び検体情報は検体に属して保管される。

2. 保存の同意が得られなかった検体、保存の同意が撤回された検体、及び全研究期間を経過した検体については、特別な事情がない限り破棄される。

(保存検体の公開)

第9条 保存検体は検体保存番号と、疾患名、保存年、種類、量、可能な供給形態(組織・細胞・DNA・RNA等)などの検体情報とともに、年に一度JPLSGメンバーに公開する。

(検体保管の費用)

第10条 保管に関する費用は、JPLSGと保管施設が協議の上負担割合を決定し、支払うものとする。

(検体分譲の費用)

第11条 検体は無償で研究施設に分譲されるが、検体の分譲に関し発生する搬送料等の費用については、実費の全てを研究施設で負担する。

(保存検体分譲の手順)

第12条 研究申請者は、研究目的、使用検体の検体数、検体量を明記した研究計画書について、研究者の所属する施設の倫理審査委員会の審査を受け、承認を受けなければならない。

2. 研究申請者は、研究計画書に所属する施設の倫理審査委員会の研究計画承認書を添えてJPLSG運営委員長に検体分譲の申請を行う。

3. JPLSG運営委員長は、研究計画書の審査をJPLSG研究審査委員会に委嘱する。

4. JPLSG運営委員長の委嘱を受けたJPLSG研究審査委員会は、その研究計画が科学的・倫理的に妥当なものか否かの答申を行う。

5. JPLSG運営委員長は、その答申について運営委員会の審議を経て分譲の可否を決定し、申請者に書面で通知する。

6. 申請者は研究計画書、研究機関倫理審査委員会承認書、JPLSG研究審査委員会承認書およびJPLSG委員長の分譲許可書を添えて検体保管センターに分譲の申請を行い、検体の分譲を受ける。

7. 検体保管施設は、連結可能匿名化の時期にある検体については、患者に対する新たな検査の可能性に備え、凍結細胞として検体を2本(最低1本)は保存しておかなければならない。

(JPLSG研究審査委員会)

第13条 JPLSGは、余剰検体の研究用分譲について、分譲の適否を判断する審査の迅速化を図るために、研究審査委員会を設置する。

2. 研究審査委員会は、JPLSG運営委員長の試問を受け、提出された研究計画が科学的・倫理的に妥当なものであるか否かを判断し、JPLSG運営委員長に答申する。

3. 研究審査委員会は、白血病・悪性リンパ腫研究の専門家、法律や生命倫理の専門

家、一般の立場のもの、外部のもの、男女両性からなるものとし、委員の総数は 5 名とする。委員が当該審査に関係する時は、その委員は審査に加わることは出来ない。その場合、委員長は臨時にその審査に相応しい者を委員以外に委嘱する事が出来る。

4. 研究審査委員会は随時開催され、その審議は原則として電子メールによって行い、議決は過半数の委員の賛成をもって行う。その際重要な少数意見は、付記される。

(保存検体の分譲を受ける資格)

第 14 条 研究計画の立案・申請と検体の分譲依頼は、JPLSG 構成員が共同研究者としてその研究に加わっていれば可能である。その場合、研究の目的は、患者及び代諾者から包括同意が得られている範囲に限る。

2. 連結可能匿名化処理期間中胚細胞系列遺伝子の解析研究は、第 4 条第 4 項から第 6 項に従い倫理審査を受ける。

(研究者の義務)

第 15 条 保存された余剰検体を使用して行われる研究は、その研究課題と概要および研究結果を JPLSG ホームページ上に公開する。

2. 研究結果の報告のルールについては、JPLSG プロトコルマニュアルに準ずる。

分担研究報告書

小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化に関する研究

分担研究者 駒田美弘 三重大学医学部 小児科 教授

研究要旨

小児造血器腫瘍の免疫学的診断の現状に関するアンケート調査の結果、中央診断センターを持つ研究グループの参加施設では、その中央診断結果に基づいて免疫学的診断を決定していた。一方、中央診断センターを持たない研究グループの施設においては、臨床検査会社の利用頻度が高く、その結果を重視していることが明らかになった。最終的なマーカー解析の結果判定は、多くの施設において、フローサイトメトリーの経験を持つ医師が実施していたが、その検査方法、陰性・陽性の判定基準、検査報告書の記載内容に関しては、各施設間で相異が認められた。また、アンケート調査での、各施設において用いているマーカーを踏まえて、「小児急性白血病の免疫学的診断に有用なマーカー解析パネル(案)」を決め、マーカー解析に使用されている標識モノクローナル抗体の反応性の比較検討を、中央診断センターにおいて開始した。免疫学的診断の具体的手技・方法、精度管理等に関しては、日本臨床検査標準協議会血液検査標準化検討委員会フローサイトメトリーワーキンググループにより「フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関する標準化ガイドラインJCCLS H2-P V1.0」が作成され、検査材料、試薬、試薬調整、試料の測定、データ解析、分析結果の報告と解釈、試薬と機器の保守管理、精度管理に関するガイドラインが示された。今後、免疫学的診断のガイドラインの作成、それに準じたマーカー解析の実施により、小児造血器腫瘍の診断精度が向上し、正確な診断に基づいた最も効果的な治療法の選択・施行が可能となり、本研究班の課題である小児造血器腫瘍の標準的治療法が確立されると期待される。

A. 研究目的

小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立にあたっては、精度の高い標準的な診断法により、正確な診断を得ることができて初めて最も効果的な治療法を選択することが可能となる。そこで、①初発時における治療法の選択に必要な免疫学的診断の標

準化を行う、②免疫学的診断基準に加えて、検査の具体的手技・方法、精度管理等も検討する、③日本臨床検査標準協議会、諸外国における標準化との整合性を保つ、以上の基本的な考え方に基づいて、免疫学的診断法の標準化を行うことを本分担研究の目的とした。

B. 研究方法

本研究参加施設を対象に実施した免疫学的診断に関するアンケート調査結果を用いて、中央診断を実施している施設群と実施していない施設群の間での、免疫学的診断法の具体的な内容の差異について詳細に解析した。また、小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化ワーキンググループにおいて、小児急性白血病の免疫学的診断に有用なマーカー解析パネル(案)を検討した。さらに、解析パネルに含まれるいくつかのCD抗原に関しては、現在市販され、マーカー解析に使用されている標識モノクロナール抗体の反応性を、中央診断センターにおいて比較検討した。

C. 研究結果

小児造血器腫瘍の免疫学的診断の現状に関するアンケート調査の結果、中央診断センターを持っている研究グループの施設では、その中央診断結果に基づいて免疫学的診断を決定していた。一方、中央診断センターを持たない研究グループの施設においては、臨床検査会社の利用頻度が高く、かつ、その結果を重視していることが明らかになった。また、およそ8割の施設には、フローサイトメリーの経験を持つ医師がおり、最終的なマーカー解析の結果判定を各施設において実施していると考えられた。しかし、実際の検査方法、陰性・陽性の判定基準、検査報告書の記載内容に関しては、各施設間でかなりの相異が認められた。

アンケート調査での、各施設において用いているマーカーを踏まえて、「小児急性白血病の免疫学的診断に有用なマーカー解析パネル(案)」を決めた。

(primary panel) B細胞系: CD19・CD79a・ κ 鎖/ λ

鎖、T細胞系: 細胞表面 CD3・細胞質内 CD3・CD7
、骨髄系: MPO・CD13・CD33・CD41
、non-lineage: CD10・CD34・CD45・CD56・HLA-DR
・TdT

(secondary panel) B細胞系: CD20・CD22・細胞表面 IgM・細胞質内 μ 鎖、T細胞系: CD2・CD4・CD5
・CD8、骨髄系: CD14・CD15・CD36・CD42b・CD61
・CD64・CD65・CD117・Glycophorin A

(追加 panel) B細胞系: CD24・CD58、T細胞系
: CD1a・TCR α/β ・TCR α/δ

上記の解析パネルに含まれるCD抗原の中、CD10・CD22・CD61・CD64 に関しては、現在市販され、マーカー解析に使用されている標識モノクロナール抗体の反応性の比較検討を、中央診断センターにおいて開始した。

日本臨床検査標準協議会血液検査標準化検討委員会フローサイトメリーワーキンググループにより作成された「フローサイトメリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関する標準化ガイドラインJCCLS H2-P V1.0」の中では、検査材料、試薬、試薬調整、試料の測定、データ解析、分析結果の報告と解釈、試薬と機器の保守管理、精度管理に関するガイドラインが示された。(日本臨床検査標準協議会会誌第18巻2号、2003)

D. 考察

小児造血器腫瘍における免疫学的診断標準化の必要性が再確認されたことより、次年度においては、「小児急性白血病の免疫学的診断に有用なマーカー解析パネル(案)」に関して、臨床検査会社も含めた検討を行い、解析パネルの標準化実施に努力したい。また、小児造血器腫瘍の免疫学的診断基準、フローサイトメリーによる検査の具体的

手技の標準化に関するガイドラインを作成する予定である。その作業予定、および課題として以下のように考えている。

①「小児急性白血病の免疫学的診断に有用なマーカー解析パネル(案)」に関して、代表的な臨床検査会社の担当責任者を含めた小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化ワーキンググループにおいて検討する。

② フローサイトメトリーを用いた検査の具体的手技(機器調整、検体採取・保存、試薬調整、染色方法、保守管理、精度管理、等)に関しては、「フローサイトメトリーによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関する標準化ガイドライン JCCLS H2-P V1.0」に準じるかたちで標準化作業を進める。

③ 免疫学的診断に必要な CD 抗原の組み合わせ(CD45gating 法、2カラー、3カラー、4カラー染色)、用いるモノクローナル抗体の種類(蛍光標識、クローン)の標準化に関しては、中央診断センターにおける市販標識モノクローナル抗体(CD10・CD22・CD61・CD64)の反応性の比較検討結果を踏まえて、検討する。

④ 小児白血病の免疫学的診断基準に関しては、CD 抗原の陽性陰性の判定に関する標準化も含め、各種白血病の免疫学的診断基準の原案を作成し、ワーキンググループにてさらに検討を加える。

⑤ 倫理面への配慮として、免疫学的診断の実施に関するインフォームドコンセント、および個人情報としての解析データの管理に関して、免疫学的診断の標準化に関するガイドラインの中に明記する。

E. 結論

研究参加施設への小児造血器腫瘍の免疫学的診断の現状に関するアンケート調査結果等より、

小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化ワーキンググループでは、小児造血器腫瘍の免疫学的診断標準化の必要性が確認された。免疫学的診断のガイドラインの作成、およびそれに準じたマーカー解析の実施により、小児造血器腫瘍の診断精度が向上し、正確な診断に基づいた最も効果的な治療法の選択・施行が可能となり、本研究班の課題である小児造血器腫瘍の標準的治療法が確立されることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立に関する研究(堀部班)免疫ワーキンググループ:小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化. 第 45 回日本小児血液学会(平成 15 年 10 月 17 日、金沢)発表

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（効果的医療技術の確立推進臨床研究事業）
分担研究報告書

小児造血器腫瘍の病理学的診断の標準化に関する研究

分担研究者 藤本純一郎 国立成育医療センター研究所 副所長

研究要旨 小児悪性リンパ腫の治療研究推進の基盤となる病理中央診断を実施するための組織として病理中央診断事務局を設置したが、本年度はその活動を開始した。本研究で実施している未分化大細胞型リンパ腫プロトコールに登録された20例について病理中央診断を実施し、診断的的確性判定および問題点整理を行った。また、すでに作成した小児悪性リンパ腫各病型の診断基準の妥当性について検討を開始し、一定の見解をまとめた。希少疾患である小児悪性リンパ腫の克服には、検体保存とその利用を系統的に行う必要があるため、その具体的方法について倫理面での配慮も含め検討を開始し原案としてまとめた。

研究協力者

大島孝一 福岡大学医学部
田丸淳一 埼玉医科大学総合医療センター
中川温子 愛知医科大学医学部
中村栄男 愛知県がんセンター
中峯寛和 和歌山県立医科大学
北條 洋 福島県立医科大学医学部
吉野 正 岡山大学大学院医歯学総合研究科

（倫理面への配慮）これについては、研究結果の項に記載する。

A. 研究目的

小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立を行うにあたって、病理学的診断の標準化を目指す。また、検体保存による臨床研究ならびに基礎研究の推進のための体制確立を目指す。

B. 研究方法

小児造血器腫瘍の病理学的診断の標準化を行うための体制の整備、悪性リンパ腫を対象とした病型診断基準作成ならびに病理中央診断実施方法について、血液腫瘍を専門とする複数の病理医ならびに臨床医から構成されるワーキンググループを作成し討議を行った。また、検体保存については、他の分担研究者等の関係者と協議し取り扱い基準（案）ならびに保存体制（案）の作成を行った。

C. 研究結果

1. 病理中央事務局と病理判定委員会の活動

昨年度までに設置した病理中央事務局の活動を開始した。病理判定委員会の活動として病理中央診断（セントラルレビュー）を実施した。対象とした疾患は、未分化大細胞型リンパ腫（Anaplastic large cell lymphoma, ALCL）に対する治療研究プロトコール ALCL99 に登録された20症例である。全例について8名の血液腫瘍専門病理医によるレビューを行い、診断的的確性、診断上の問題点を討議した。概ねALCLの正しい診断がされていると判断したが、亜型分類の困難さ、ホジキンリンパ腫との異同等など従来から指摘されていた問題点が指摘された。ALCL99はヨーロッパの統一プロトコール研究へ参加する形態で実施されているが、病理中央診断の判定結果はヨーロッパでの病理中央診断会議へ報告した。

2. 小児悪性リンパ腫の診断基準とその妥当性検討

昨年度までに、ALCL、成熟B細胞性リンパ腫（バーキットリンパ腫およびびまん性大細胞

型リンパ腫)およびリンパ芽球性リンパ腫(前駆T細胞性および前駆B細胞性)についての診断基準を作成したが、本年度はその妥当性についての予備検討を実施した。本研究に参加する治療研究グループのうち、ひとつのグループに登録された50症例について上述の8名の病理医によるセントラルレビューを行った。その結果、ヘマトキシリン・エオジン染色標本のみでは、上記の病型の鑑別が難しい場合が多いことが判明した。特に、リンパ芽球性リンパ腫と成熟B細胞性リンパ腫の区別が難しい場合、バーキットリンパ腫およびびまん性大細胞型リンパ腫の区別が難しい場合がある。このような場合、前者の区別にはTdT染色が、後者の区別にはMIB-1染色が有効である可能性が考えられ、診断基準が十分有効であると判断された。今後、染色体転座などの情報を加味し最終的な評価を下す必要がある。

3. 小児悪性リンパ腫の検体保存システムの構築

わが国における小児悪性リンパ腫の症例発生数は年間約200例程度である。このような希少疾患については系統的な検体保存とその利用が、臨床研究ならびに基礎研究の推進に必須である。本年度は、小児悪性リンパ腫の検体保存に関するシステム構築について検討し、倫理面での配慮を十分に行うべきこと、一ヶ所に集積した保存システムにすべきこと、の基本方針を決定した。倫理面での配慮については、他の分担研究者等関係者と協議しガイドライン作成の準備を終了した。詳細は分担研究者の報告を参照されたい。また、保存場所として国立成育医療センター研究所が適当であることを答申した。

4. 倫理面への配慮

病理中央診断を目的とした患者検体の施設外搬送、検体保存、依頼書・報告書作成など様々な段階で患者情報を扱う場面が想定される。従って、すべての情報を患者あるいは代諾者に説明して同意を得ながら本事業を推進することが必要である。現在、成熟B細胞性リンパ腫プロ

トコールおよびリンパ芽球性リンパ腫プロトコール作成が最終段階になっている。病理中央診断施設ならびに検体保存施設では、上記プロトコールが完成した時点で速やかに施設の倫理委員会の承認を得る手続きに入る予定である。

D. 考察

昨年度までに、小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立を行うにあたっての病理学的診断の標準化を推進する基盤が完成した。本年度は、一部の病型について病理中央診断を実施し、診断の的確性、診断基準の妥当性について評価を行うことができた。今後、成熟B細胞性リンパ腫プロトコールおよびリンパ芽球性リンパ腫プロトコールが完成し、治療研究が開始されれば、より多くの症例について同様の検討が可能となり、高精度の病理中央診断システムが運用可能となる。希少疾患である小児悪性リンパ腫では、検体保存が研究推進に必須であるが、その基盤整備も整いつつある。倫理面での配慮を十分に行いつつ、来年度の整備のめどがついたと考えられる。

E. 結論

1. 小児悪性リンパ腫の治療研究における病理学的診断の標準化を推進するための病理中央事務局の活動を開始した。
2. ALCL症例についてセントラルレビューを行い、診断の的確性判定、問題点整理を行った。
3. 成熟B細胞性リンパ腫およびリンパ芽球性リンパ腫の診断基準の妥当性検討を開始し、一定の成果を得た。
4. 検体保存システム構築を開始した。

F. 健康危惧情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Taguchi T, Kiyokawa N, Mimori K, Suzuki T,

- Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Matsuo N, Matsuo Y, Karasuyama H and Fujimoto J. Pre-BCR-mediated signal inhibits CD24-induced apoptosis in human pre-B cells. *J-Immunol*, 2003; 170(1):252-260.
2. Mori T, Kiyokawa N, Shimada H, Miyauchi J and Fujimoto J. Anaplastic large cell lymphoma in Japanese children: Retrospective analysis of 34 patients diagnosed at the National Research Institute for Child Health and Development.. *Br-J-Haematol*, 2003 Apr;121(1):94-6.
 3. Mimori K, Kiyokawa N, Taguchi T, Suzuki T, Sekino T, Nakajima H, Saito M, Katagiri-U Y, Isoyama K, Yamada K, Matsuo Y and Fujimoto J. Co-stimulatory signals distinctively affect CD20- and B-cell-antigen-receptor-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma/leukemia cells. *Leukemia*, 2003 Jun;17(6):1164-74.
 4. Mori T, Sugita K, Kimura K, Fuke T, Miura T, Kiyokawa N and Fujimoto J. Isolated central nervous system relapse in a case of childhood systemic anaplastic large cell lymphoma without initial involvement. *J-Pediatr-Hematol-Oncol*, 2003 Dec;25(12):975-7.
 5. Kiyokawa N, Sekino T, Matsui T, Takenouchi H, Mimori K, Tang W, Matsui J, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Matsuo Y, Karasuyama H, Fujimoto J. Diagnostic Importance of CD179a/b as Markers of Precursor B-Cell Lymphoblastic Lymphoma. *Modern-Pathol*, 2004, in press.
2. 学会発表
1. 藤本純一郎, 堀部敬三. JPLSG における小児悪性リンパ腫の病理中央診断システム構築と診断基準作成. 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10 月 17-18 日 2003.
 2. 駒田美弘, 海老原康博史, 小川恵津子, 清河信敬, 高瀬浩造, 鶴沢正仁, 中原一彦, 永利義久, 橋本瓦, 原純一, 藤本純一郎, 宮崎年恭, 堀部敬三. 小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化. 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10 月 17-18 日 2003.
 3. 清河信敬, 田口智子, 三森謙一, 藤本純一郎. 副刺激受容体による CD20 誘導性アポトーシスの調節. 第 65 回日本血液学会総会・第 45 回日本臨床血液学会総会, 大阪, 8 月 28-31 日, 2003.
 4. 鈴木恭子, 清河信敬, 田口智子, 塩沢裕介, 斎藤正博, 中島敏治, 森 鉄也, 斎藤博久, 藤本純一郎. GeneChip を用いた小児 B 前駆細胞性急性リンパ芽球性白血病の特性の検討. 第 45 回日本小児血液学会, 石川, 10 月 17-18 日 2003.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし。

小児造血器腫瘍の分子・細胞遺伝学的診断の標準化に関する研究

分担研究者 林 泰秀 群馬県立小児医療センター 副院長

研究要旨 分子細胞遺伝学の進歩により、造血器腫瘍は形態のみならず、染色体・遺伝子異常が診断、治療法の決定や予後の推定に重要になっている。近年、根拠に基づく治療の実践の重要性が認識されつつあり、小児造血器腫瘍の多施設が参加する大規模治療研究においても、標準的分子・細胞遺伝学的診断の確立は重要かつ緊急の課題である。本邦の小児造血器腫瘍治療の各グループから9名の染色体・遺伝子解析を専門とする小児血液専門家によるワーキンググループを編成し、分子・細胞遺伝学的診断の基準の作成を目指した。まず各治療グループ、各施設の現状を検討したが、染色体、遺伝子解析等の実施はほとんど施設任せで統一されておらず、全国統一プロトコルの開始に先立って、その標準化が必要と思われた。さらに実際の検体の採取、保存、運搬等の標準化と、診断に必要な遺伝子解析を必要度に応じたランク付けを行うことにより、今後全国的規模で一定の基準で分子・細胞遺伝学的診断が行われることになり、小児造血器腫瘍の診断と治療の質の向上に貢献できると思われた。

A. 研究目的

分子細胞遺伝学の進歩により、造血器腫瘍は形態のみならず、染色体・遺伝子異常が診断、治療法の決定や予後の推定に重要になっている。近年、根拠に基づく治療の実践の重要性が認識されつつあり、小児造血器腫瘍の多施設が参加する大規模治療研究においても、標準的分子・細胞遺伝学的診断の確立は重要かつ緊急の課題である。昨年度から厚生労働科学研究費補助金「小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立に関する研究」班（堀部班）ができ、乳児白血病、急性骨髄性白血病、Ph1-急性リンパ性白血病（ALL）、非ホジキンリンパ腫について、統一プロトコルに基づいた治療が実施されようとしている。この中で、造血器腫瘍の正確な分子診断は、根拠に基づく治療を行うにあたっての基盤となる重要な作業である。

B. 研究方法

本邦の小児造血器腫瘍治療の各グループから9名の染色体・遺伝子解析を専門とする小児血液専門家によるワーキンググループ（WG）を編成し、分子・細胞遺伝学的診断の基準の作成を目指した。

C. 研究結果

第1回 WG 会議では、各治療グループ、各施設の現状を検討したが、染色体、FISH、遺伝子解析も統一されておらず、全国統一プロトコルの開始に先立って、その標準化が必要と思われた。第2回 WG 会議ではさらに実際の検体の採取、保存、運搬等の標準化と、診断に必要な遺伝子解析を必要度に応じたランク A（必須検査項目 例：BCR-ABL, MLL）、ランク B（推奨検査項目 例：TEL-AML1）、ランク C（参考検査項目 例：E2A-PBX1）、まだ十分な根拠には乏しいが今後重要になると思われる研究段階の

ものをランク S (研究検査項目 例: FLT3 異常) のランク付けを行った。また、確定診断項目 (例: Ph1-ALL では染色体または FISH とキメラ遺伝子) についても検討をしている。

D. 考察

実際の検体の採取、保存、運搬等の標準化と、診断に必要な遺伝子解析を必要度に応じたランク付けを行うことにより、これまでバラバラに行われたことが一定の基準で行われることになり、診断と治療の質の向上に貢献できると思われた。

今後の問題として、最近急速に技術的向上がみられた multiplex real-time PCR の重要性が認識されつつあり、今後 ALL では可能な限り初診時に multiplex real-time PCR を行う方向性が確認された。これについては各業者間のやり方や基準値が異なり、今後精度管理が必要と思われる。また、微小残存病変の検討が臨床上重要であるが、これも業者に任されている部分が多く、この WG での精度管理が必要と思われた。

E. 結論

本邦の小児造血器腫瘍治療の各グループから 9 名の染色体・遺伝子解析を専門とする小児血液専門家による WG を編成し、分子・細胞遺伝学的診断の基準の作成を行い、診断と治療の質の向上に貢献した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Echlin-Bell DR, Smith LL, Li L, Strissel PL, Strick R, Gupta V, Banerjee J, Larson R, Relling MV, Raimondi SC, Hayashi Y, Taki T, Zeleznik-Le N, Rowley JD. Polymorphisms in the MLL breakpoint cluster region (BCR). *Hum Genet* 113: 80-91, 2003
2. Hirose Y, Kudo K, Kiyoi H, Hayashi Y, Naoe T, Kojima S. Comprehensive analysis of gene alterations in acute megakaryoblastic leukemia of Down's syndrome. *Leukemia*. 17: 2250-2252, 2003
3. Hiwatari M, Taki T, Taketani T, Taniwaki M, Sugita K, Okuya M, Eguchi M, Ida K, Hayashi Y. Fusion of an AF4-related gene, LAF4, to MLL in childhood acute lymphoblastic leukemia with t(2;11) (q11; q23). *Oncogene*. 22: 2851-2855, 2003
4. Obana K, Yang HW, Piao HY, Taki T, Hashizume K, Hanada R, Yamamoto K, Tanaka Y, Toyoda Y, Takita J, Tsuchida Y, Hayashi Y. Aberrations of p16INK4A, p14ARF and p15INK4B genes in pediatric solid tumors. *Int J Oncol*. 23: 1151-1157, 2003
5. Taketani T, Taki T, Takita J, Tsuchida M, Hanada R, Hongo T, Kaneko T, Manabe A, Ida K, Hayashi Y. AML1/RUNX1 mutations are infrequent, but related to AML-M0, acquired trisomy 21, and leukemic transformation in pediatric hematologic malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*. 38: 1-7, 2003.
6. Terui K, Kitazawa J, Takahashi Y, Tohno C, Hayashi Y, Taketani T, Taki T, Ito E.

- Successful treatment of acute myelomonocytic leukaemia with NUP98-HOXD11 fusion transcripts and monitoring of minimal residual disease. *Br J Haematol.* 120: 274-276, 2003
7. Tsutsumi S, Taketani T, Nishimura K, Ge X, Taki T, Sugita K, Ishii E, Hanada R, Ohki M, Aburatani H, Hayashi Y. Two distinct gene expression signatures in pediatric acute lymphoblastic leukemia with MLL rearrangements. *Cancer Res.* 63: 4882-4887, 2003
8. Xinh PT, Tri NK, Nagao H, Nakazato H, Taketazu F, Fujisawa S, Yagasaki F, Chen YZ, Hayashi Y, Toyoda A, Hattori M, Y Sakaki Y, Tokunaga K, Sato Y. The breakpoints at 1p36.3 detected with BAC/PAC probes in three MDS/AML (M4) patients with t(1;3)(p36;q21) translocation: in the first intron and in the 5' region of MEL1, *Genes Chromosomes Cancer* 36: 313-317, 2003
9. Xu G, Nagano M, Kanezaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, Taki T, Mitui T, Koike K, Kato K, Imaizumi M, Sekine I, Ikeda Y, Hanada R, Sako M, Kudo K, Kojima S, Ohneda O, Yamamoto M, Ito E. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down's syndrome. *Blood.* 102: 2960-2968, 2003
10. Hayashi Y. Gene expression profiling in childhood acute leukemia: progress and perspectives. *Int J Hematol.* 78: 414-420, 2003
11. Taketani T, Taki T, Sugita K, Furuichi Y, Ishii E, Hanada R, Tsuchida M, Sugita K, Ida K, Hayashi Y. FLT3 mutations in the activation loop of tyrosine kinase domain are frequently found in infant acute lymphoblastic leukemia (ALL) with MLL rearrangement and pediatric ALL with hyperdiploidy. *Blood* 103: 1085-1088, 2004
12. Shimada A, Xu G, Toki T, Kimura H, Hayashi Y, Ito E. Fetal origin of the GATA1 mutation in identical twins with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Blood* 103 : 366, 2004
13. 林泰秀：小児白血病発症の分子機構。臨床血液 44: 272-282, 2003
14. 林泰秀：小児悪性腫瘍の分子診断の最近の進歩。癌と化学療法 30: 1211-1224, 2003
2. 学会発表
1. 林泰秀, 伊藤悦朗, 金子安比古, 高橋浩之, 滝智彦, 田代聡, 松崎彰信, 森本哲, 横田昇平, 堀部敬三：小児造血器腫瘍における分子・細胞遺伝学的診断の標準化の検討。第45回日本小児血液学会, 金沢市, 2003年10月17-18日
2. 林泰秀：小児がんにおける分子生物学の役割：マイクロアレイを中心に。第106回日本小児科学会学術集会、福岡、2003年4月25-27日
3. 竹谷健, 滝智彦, 石井榮一, 花田良二, 土田昌宏, 杉田完爾, 杉田憲一, 林泰秀：高2倍体および MLL 陽性急性リンパ性白血病に高頻度にみられた FLT3

- 遺伝子変異. 第45回日本小児血液学会、金沢、2003年10月17-18日
4. 樋渡光輝、滝智彦、杉田憲一、江口光興、迫正廣、林泰秀：11q23 転座型急性リンパ性白血病からの2種類の *MLL-AF4* ファミリー融合遺伝子の同定. 第45回日本小児血液学会、金沢、2003年10月17-18日
 5. 堤修一、竹谷健、滝智彦、杉田完爾、油谷浩幸、大木操、林泰秀：MLL 遺伝子再構成を有するリンパ球性白血病の遺伝子発現プロファイル解析. 第106回日本小児科学会学術集会、福岡、2003年4月25-27日
 6. 竹谷健、滝智彦、石井榮一、花田良二、土田昌宏、杉田完爾、杉田憲一、林泰秀：乳児および小児急性リンパ性白血病における *FLT3* 遺伝子変異. 第65回日本血液学会総会・第45回日本臨床血液学会総会、大阪、2003年8月28-31日
 7. 林泰秀。小児白血病における癌関連遺伝子の異常とその臨床的意義. 第41回日本癌治療学会総会、札幌、2003年10月22日-24日
 8. Hiwatari M, Taki T, Tsuchida M, Hanada R, Hongo T, Sako M, Hayashi Y : Mutations of *c-KIT* and *platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) α* genes in childhood acute myeloid leukemia and leukemic cell lines. 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 5-9, 2003
 9. Ono R, Nakajima H, Kumagai H, Ozaki K, Taki T, Kitamura T, Hayashi Y, Nosaka T: MLL-SEPT6 Requires Both a GTP-Binding Domain and a Coiled-Coil Region of SEPT6 to Transform Murine Primary Bone Marrow Cells in Concert with FLT3 Internal Tandem Duplication. 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego, December 5-9, 2003
- H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし