

C. 研究成果

C5 アプタマー：まず既知の C5 アプタマー f8/c11:TCTCATGCGCCGAGTGTGAGTTTACCTT CGT を作成し⁵⁾、補体溶血に対する阻止活性を確認した (図 3A)。

C8 アプタマー：SELEX 4 ラウンド後、1 nM の Kd を有し (図 4A)、C5 アプタマーと同等の溶血阻止活性を認めた (図 3B)。

C9 アプタマー：SELEX 10 ラウンド後、500 nM の Kd を有し (図 4B)、C5 アプタマーと同等の活性を認めた (図 3C)。

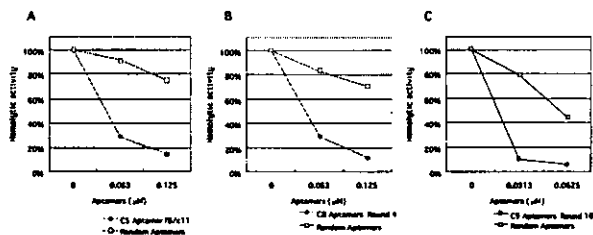


図 3. RNA アプタマーによる補体溶血抑制試験 (A) C5 アプタマー (B) C8 アプタマー (C) C9 アプタマー

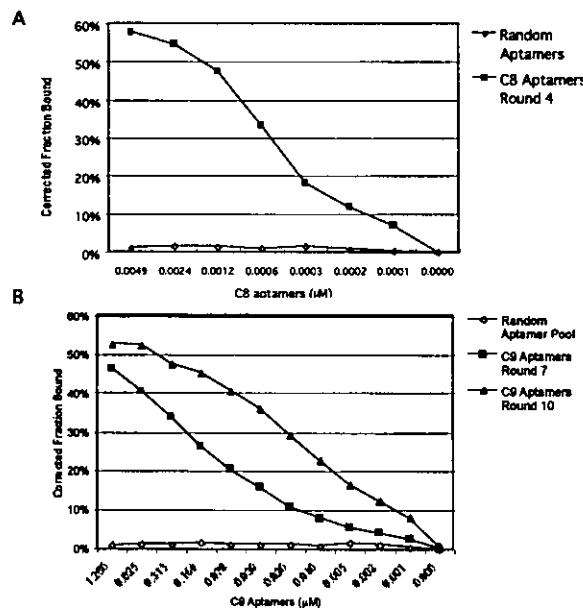


図 4. RNA アプタマー結合曲線 (A) C8 アプタマー (B) C9 アプタマー

D. 考 察

C5 アプタマー：既知の C5 アプタマーの溶血阻止活性を確認した。

C8 アプタマー：SELEX 7 ラウンド後、溶血阻止活性は維持されていたものの結合能が低下したので、4 および 7 ラウンド後のアプタマーをクローン化し、その結合能と溶血阻止活性をスクリーニング中である。

C9 アプタマー：SELEX 10 ラウンド後、溶血阻止活性は確認されたが、結合能を高めるためにさらなるラウンドが必要である。

E. 結 論

以上、補体に対する RNA アプタマーは PNH の補体溶血をコントロールすることが可能であることが確認され、今後治療法への応用が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

Nishimura J et al.: Blocking complement-mediated hemolysis of PNH erythrocytes by RNA aptamers to C5, and C8. *Blood*. 102: 510a, 2004.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

H. 参考文献

1. Nishimura J et al.: *Am J Hematol*. 62: 175-182, 1999.
2. Hillmen P et al.: *N Engl J Med*. 350: 552-559, 2004.
3. White RR et al.: *J Clin Invest*. 106: 929-934, 2000.
4. Sullenger BA et al.: *Nature*. 418: 252-258, 2002.
5. Biesecker G et al.: *Immunopharm*. 42: 219-230, 1999.

Ⅲ. 不応性貧血

不応性貧血症例の新規登録の報告

通山 薫¹、伊藤 満¹、内山 卓²、小峰 光博³

川崎医科大学検査診断学¹、京都大学血液病態学²、昭和大学藤が丘病院内科血液³

研究要旨 特発性造血障害に関する調査研究班では成人不応性貧血 (MDS) 症例の登録、データベース作成を行っている。1998 年以降に新たに把握・登録された症例は 362 例で、年齢中央値 64 歳、男女比 1.9:1 で、FAB 病型を一部 WHO 病型に再分類した。骨髄染色体異常の頻度、異形成の頻度、家族歴・合併症についても基本集計を行った。本邦における MDS の実態調査を行う上で有用なデータベースになると思われた。

A. 研究目的

本研究班における MDS 症例の登録は 2000 年度より再開され、1998 年以降に新たに把握された症例 (2004 年 3 月現在 19 施設 362 症例) の登録をいただいている。このデータベースを基にして、本邦における MDS の現状の解析を行った。

B. 研究方法

厚生労働省研究班登録データベースに登録されている MDS 362 症例を用いて、データ解析を行った。

C. 研究成果

1. 患者背景

全症例の内訳は、年齢 15 ~ 91 歳 (中央値 64 歳)、性別は男 239、女 123 (男女比 1.9:1)、FAB 分類による病型 (主治医診断) は RA 156 例 (43%)、RARS 18 例 (5%)、RAEB 105 例 (29%)、RAEB-t 52 例 (14%)、CMML 22 例 (6%)、不明・その他 9 例 (3%) であった。

2. 新 WHO 分類に基づく再分類

患者データを基に新 WHO 分類に照らして再分類を試みると、WHO-RA は 17 例 (全体の約 5%)、WHO-RARS は 6 例 (同約 1.7%) であった。また FAB-RA の中で貧血がなく好中球または血小板の減少が見られた症例は約 5 分の 1 (全体の約 9%) で、これらは WHO-MDS、unclassifiable に相当する可能性がある。WHO-RCMD は MDS 全体の約 3 割を占めることになるが、異形成の評価

基準の如何に依存する。

3. 染色体異常

分析可能であったのは 335 例、そのうち染色体異常なし 183 例 (55%)、異常あり 152 例 (45%) であった。異常核型として頻度の高いものは、-5/5q- 36 例 (11%)、-7/7q- 36 例 (11%) (-5/5q- かつ -7/7q- 18 例 (5%))、+8 34 例 (10%) 等であった。また 3 個以上の核型異常を有する症例は 59 例 (18%) であった。詳細を表 1 に示す。

表 1 MDS 登録症例に見られた染色体異常

t(1;7)	6例(2%)
inv(3)/t(3;3)	3 (1%)
-5/5q-	36 (11%)
-7/7q-	36 (11%)
-5/5q-かつ-7/7q-	18 (5%)
+8	34 (10%)
11q23異常	4 (1%)
12p異常	9 (3%)
13q-	5 (1%)
20q-	15 (4%)
3個以上の核型異常	59 (18%)

パーセンテージは分析可能335例中の割合を示す。

4. 異形成所見

顆粒球系、赤芽球系、巨核球系について主な異形成所見の頻度を表 2 に示す。回答例数が項目によってかなり異なっていた。

5. 家族歴、合併症

家族内発症 5 例、皮膚合併症 (感染症以外) 17

表2 MDS登録症例に見られた異形成所見

項目	回答例数	異常あり例数	比率%
(1) 顆粒球系			
核異常	76	51	67
顆粒異常	76	51	67
MPO陰性好中球	49	19	39
(2) 赤芽球系			
巨赤芽球様変化	315	185	59
核異常	98	55	56
PAS陽性赤芽球	28	3	11
(3) 巨核球系			
小型巨核球	321	183	57
単核巨核球	297	110	37
円形分離多核巨核球	71	21	30

例、肺合併症（感染症以外）23例、自己免疫疾患様臨床症状13例、既往歴としての他の悪性腫瘍30例、合併症としての他の悪性腫瘍10例であった。

6. 転帰

白血病化75例、死亡107例であった。

D. 考察

収集されたデータを基に、基本的な患者プロフィールの集計を行った。患者背景は以前に行われた1002例のアンケート結果（1997年以前）と大差無かった。MDS症例の半数近くに何らかの染色体異常が合併していた。異形成として、顆粒球系核異常及び顆粒異常、赤芽球系核異常及び巨赤芽球様変化、巨核球系小型巨核球等が50%以上の頻度で認められたが、回答例数の多い項目はそもそも異常の有無の評価が容易であると考えられる。また出現頻度がどのくらいから陽性と判定するかについて統一されていないのが難点である。なおMDS家族内発症例が5例あり、詳細な解析が望まれる。本データベースのさらなる集積は重要であるが、このデータを基にあらたな追加調査を展開することの必要性を感じる。

E. 結論

1998年以降に新たに把握・登録された症例は362例で、年齢中央値64歳、男女比1.9:1で、FAB病型を一部WHO病型に再分類した。骨髄染色体異常の頻度、異形成の頻度、家族歴・合併症についても基本集計を行った。本邦におけるMDSの実態調査を行う上で有用なデータベースになると思われた。

F. 研究発表

該当なし。

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

H. 参考文献

1. 吉田弥太郎 他: 1997年度不応性貧血全国実態調査. 平成9年度報告書 29, 1998.
2. 内山 卓 他: 不応性貧血症例登録の再開のための調査票の改訂. 平成11年度報告書 70, 2000.
3. 通山 薫 他: 不応性貧血症例の新規登録-予後解析に向けて. 平成14年度報告書 90, 2003.

小児骨髄異形成症候群の中央診断

中畑 龍俊¹、真部 淳²

京都大学・発達小児科学¹、東京大学医科学研究所小児科²、日本小児血液学会 MDS 委員会

研究要旨 小児血液学会の MDS 委員会では 1999 年から前方視的登録による中央診断を行っており、現在までに 200 例以上が登録されている。この事業により多くの先天性疾患の関与が明らかになってきた。また委員会では同時に基礎的な研究提案を募っており、現在までに 9 種のプロジェクトが承認されている。中央診断は、患者の治療方針の決定ならびに基礎的研究に対して大きな貢献をしていると考えられるが、今後は検体保存の中央化等の課題を解決する必要がある。

A. 研究目的

MDS 委員会の後方視的調査により、小児 MDS の予後が明らかになったが、その診断の妥当性の検証は困難であった。例として、MDS の診断に必須と考えられる骨髄生検の実施率はわずかに 10 %であった (Sasaki H, et al. *Leukemia* 2001; 15: 1713-20)。また小児 MDS は予後不良な疾患群であるが、新たな臨床試験を行うためには診断の標準化が要求される。以上より委員会では、診断の標準化を目指して患者発生時に病理セントラルレビューを開始した。

B. 研究方法

日本小児血液学会会員の属する施設で発症した MDS 疑い症例を対象とした。末梢血および骨髄の塗抹標本は 2 カ所 (茨城こどもと東大医科研) でレビューし、意見の一致がない場合にはさらにもう 1 カ所 (京都大学) で診断した。骨髄生検標本は昭和医大 (Dr. 増永) でレビューした。また会員から付随共同研究を募った。

C. 研究結果

1999 年 9 月から 2004 年 1 月までに 220 例が登録された。生検実施は 83 例 (38 %) であった。はじめの 150 例の内訳：一次性 MDS 48 例、JMML 35 例 (Noonan 症候群 4; Neurofibromatosis-1 3 含む)、二次性 MDS (治療関連性) 12 例、分類不能 MDS 1 例、MPD/MDS 3 例 (CMML 1; Ph+ essential thrombocythemia 1; atypical CML 1 含む)、オーバーラップ (再生不良性貧血/RA) 8 例

(Dyskeratosis congenita 1 含む)、他疾患 34 例、診断不能 6 例 (Down 症候群 1; Fragile X 症候群 1 含む)、不良標本 3 例。一次性 MDS 48 例の内訳：FAB 分類による RA 23 例、低形成性 MDS 2 例、RAEB 15 例 (Down 症候群 1 含む)、MDS with fibrosis 1 例、RAEB~AML-M6 6 例 (Schwachman-Diamond 症候群 1 含む)。他疾患 34 例の内訳：再生不良性貧血 (Fanconi 貧血 1 含む) 18 例、急性骨髄性白血病 (Low blast count 2 例含む) 10 例、Germline del (11q23) 1 例、Congenital dyserythropoietic anemia 1 例、自己免疫疾患 4 例 (May-Hegglin 疑い 1 含む)。

セントラルレビューを受けた 14 例の 2 年生存率は 69.8 %：一次性 MDS 13 例；二次性 MDS 1 例。

共同研究を公募し、委員会で承認されたものを一覧表に掲載し、前方視的登録に際して主治医に送付し、主治医が希望する場合に研究施設と個別に交渉を行った。現在承認を受けている研究は下記の 9 種である。1) JMML 疑い症例のコロニー検索 (信州大小児科、名大小児科、東大医科研小児科)、2) トランスジェニック SCID マウス移植系を用いた JMML の解析 (茨城こども病院小児科、筑波大学小児科)、3) RAS、FLT3、nm23 遺伝子の解析 (東大小児科)、4) Fanconi 貧血の遺伝子解析 (東大医科研ゲノム情報)、5) HUMARA 法によるクロナリテーターの検索 (阪大小児科)、6) JMML 疑い症例における MxA 蛋白の発現 (東大医科研小児科)、7) Severe Congenital Neutropenia における G-CSF 受容体の

遺伝子異常の検索（山形大学小児科）、8) 小児 MDS におけるメチレーションの検索（東大医科研小児科）、9) 小児 MDS における DNA 修復遺伝子異常の解析（東大医科研ゲノム情報）。

D. 考 案

日本小児血液学会 MDS 委員会が毎年行っている後方視的調査により、小児 MDS の予後が次第に明らかになったが、その診断の妥当性の検証は困難であった。例として、MDS の診断に必須と考えられる骨髓生検の実施率はわずかに 10 % であった。(Sasaki H, et al. *Leukemia* 2001; 15: 1713-20)

小児 MDS は予後不良な疾患群であるが、新たな臨床試験を行うためには診断の標準化が要求される。以上をふまえて、委員会では、患者発生時に病理セントラルレビューを行い、診断の標準化を目指すことになった。この研究では日本小児血液学会会員の属する施設で発症した MDS 疑い症例を対象とし、末梢血および骨髓の塗抹標本は 2 カ所でレビューし、意見の一致がない場合にはさらにもう 1 カ所で診断することにした。さらに小児での骨髓生検の実施をできるだけ行うようにする意味もあって、骨髓生検標本は病理専門医がレビューすることになった。本研究は 1999 年 9 月に開始し、2004 年 1 月までに 220 例が登録。(生検実施 83 例=38 %) この中央診断には国内発生小児 MDS 例の半数以上が登録されていると推計されるが今後さらに登録率を上昇させる必要がある。中央診断により、1999 年から開始されている小児 MDS 治療研究会における前方視的治療研究 (MDS99 プロトコル) の信頼性が高まることが期待される。今後は基礎的な研究をさらに推進するために発症時の検体を保存し、セルバンク・DNA バンク・RNA バンク等を構築することが課題である。

E. 結 論

小児科領域では診断時のセントラルレビューを実施することにより、診断の標準化が図られつつある。今後、WHO 分類も含め、小児 MDS の診

断基準を作成することが必要と考えられる。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Manabe A., Nakahata T.: Experiences on MDS and JMML from Japan. *Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children* (eds. Lopes L.F. & Hasle M) Tecmedd, pp. 317-324, 2003.
2. Manabe A, Ohtsuka Y: Third international symposium on myelodysplastic syndromes in childhood. *Int J Hematol* 78: 475-476, 2003
3. Mitsui T., Watanabe S., Hanada S., Ebihara Y., Sato T., Nakahata T., Tsuji K.: Impaired neutrophil maturation in truncated G-CSF receptor transgenic mice. *Blood* 101: 2990-2995, 2003.
4. Ishida D., Kometani K., Yang H., Kakugawa K., Masuda K., Iwai K., Suzuki M., Itohara S., Nakahata T., Hiai H., Kawamoto H., Hattori M., Minato N.: Myeloproliferative stem cell disorders by dysregulated Rap1 activation in SPA-1-deficient mice. *Cancer Cell* 4: 55-65, 2003.
5. Hiramatsu H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Katamura K., Nakahata T.: Complete reconstitution of human lymphocytes from cord blood CD34+ cells using NOD/SCID/?^{c^{ml}} mice model. *Blood* 102: 873-880, 2003.
6. Yoshimoto M., Shinohara T., Heike T., Shiota M., Kanatsu-Shinohara M., Nakahata T.: Direct visualization of transplanted hematopoietic cell reconstitution in intact mouse organs indicate the presence of a niche. *Exp. Hematol.* 31: 733-740, 2003.
7. Lin YW, Adachi S, Watanabe K, Umeda K, Nakahata T : Serial Granulocyte transfusions as a treatment for sepsis due to multidrug-resistant *pseudomonas aeruginosa* in a neutropenic patient.

- J Clin Microbiol. 41: 4892-4893, 2003.
8. Kambe N., Hiramatsu H., Shimonaka M., Fujino H., Nishikomori R., Heike T., Ito M., Kobayashi K., Ueyama Y., Matsuyoshi N., Miyachi Y., Nakahata T.: Development of both human connective tissue-type and mucosal-type mast cells in mice from hematopoietic stem cells with identical distribution pattern to human body. *Blood* 103: 860-867, 2004.
 9. Umeda K., Yoshimoto M., Heike T., Nakahata T.: Development of primitive and definitive hemayopoiesis from nonhuman primate embryonic stem cells in vitro. *Development* in press.
 10. Yagasaki H., Oda T., Adachi D., Nakajima T., Nakahata T., Asano S., Yamashita T.: Two common founder mutations of the Fanconi anemia group G gene FANCG/XRCC in the Japanese population. *Hum. Mutat.* 21: 555 (DOI: 10.1002/humu.9142), 2003
 11. Nishikomori R., Akutagawa H., Maruyama K., Nakata-Hizume M., Ohmori K., Mizuno K., Yachie A., Yasumi T., Kusunoki T., Heike T., Nakahata T.: X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival. *Blood* in press.
 12. Yagasaki H., Hamanoue S., Oda T., Adachi D., Nakahata T., Asano S., Yamashita T.: Identification and characterization of novel mutations of the major Fanconi anemia gene FANCA in the Japanese population. *Human Mutat.* In press.
 13. Tsurusawa M, Manabe A, Akiyama Y, Kojima S, Tsuchida M, Ikuta K, Hara J, Oda M, Ikushima A, Kato K, Masunaga A, Nakahata T: Therapy-related myelodysplastic syndrome in childhood: A retrospective study of 36 patients in Japan. *Blood* 102: 424a, 2003
 14. 在家裕司, 真部淳, 菅原幸子, 土田昌宏, 増永敦子, 小島勢二, 小田慈, 生田孝一郎, 加藤剛二, 菊地陽, 鶴澤正仁, 秋山祐一, 原純一, 生嶋聡, 中畑龍俊. 小児の RAEB-AML-M6 症候群についての検討. *臨床血液* 44: 695, 2003.
 15. 土田昌宏, 菅原幸子, 真部淳, 在家祐司, 増永敦子, 生田孝一郎, 中畑龍俊: MDS セントラルレビューのまとめ. *日小血会誌* 17: 433-437, 2003.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得 NOG マウスを用いたヒト造血幹細胞の測定
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

日独不応性貧血 (RA+RCMD) 比較研究

朝長万左男¹、対馬 秀樹¹、別所 正美²、陣内 逸郎²、松田 晃²

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科原爆後障害医療研究施設・附属病院血液内科¹、埼玉医科大学血液内科²

研究要旨 従来から、我が国の不応性貧血 (FAB:RA) 患者の年齢中央値は欧米に比し約 10 歳若いことが指摘されていた。その違いの原因を明らかにするため、日独 3 大学の (埼玉医大、長崎大学、Dusseldorf 大) の RA 症例 (日本 131 例、独 597 例) を比較した。共同鏡検で、RA の形態学的診断は日独ではほぼ完全に一致した。日独間で、年齢中央値は 57 歳と 71 歳、血液学的には血小板数が 6.6 万と 18 万、生存期間中央値が 129 ヶ月と 39 ヶ月で、両国間に顕著な差が見られた。形態異常が軽度の RA (WHO 分類) の割合は、FAB:RA 全体の 64 % (日) と 25 % (独) と大きな差があり、我が国の RA の特徴が明確になった。

A. 研究目的

従来からの本班の疫学的統計により、我が国の不応性貧血 (FAB 分類の RA) 患者の年齢中央値は 55 ~ 60 歳で、欧米の 65 ~ 75 歳とは大きな差のあることが指摘されていたが、その原因は不明であった。WHO 分類¹⁾ が新たに提唱され、形態学的異形成が比較的軽度で予後が良好な RA と、異形成が強度で予後も悪い RCMD (refractory cytopenia with multilineage dysplasia) に細分類されたことを受けて、日独の 3 大学 (埼玉医大血液内科、長崎大学血液内科、Dusseldorf 大学血液内科) の FAB:RA 症例 (日本 131 例 vs 独 597 例) を比較した。Dusseldorf 大はドイツで最も大きな MDS 登録体制を有している施設である²⁾。

B. 研究方法

両国間の RA の診断一致率を検証するため、60 例について共同鏡検を実施し、RA 診断の一致率と、形態学的異形成の判定基準の確認を行った。WHO 分類による RA の細分類については、minimal dysplasia と severe dysplasia の境界について、両国間で討議を行った。日独の RA 症例の差異を明らかにするために、年齢中央値、血液学所見 (Hb、WBC、血小板)、WHO:RA と WHO:RCMD、生存期間 (全例および 60 歳未満群) の比較を行い、統計学的有意差を検定した。

C. 研究成果

1. 診断一致率

RA と紛らわしい再生不良性貧血 10 例、FAB:RA 44 例、FAB:RARS 6 例を抽出して 3 大学それぞれ 2 名、合計 6 名により共同鏡検を Dusseldorf 大学で実施し (平成 14 年 2 月)、診断一致率を求めた。診断一致率は AA (100 %)、RA (97.7 %)、RARS (10 %)、全体で 98.3 % であった。異形成、骨髄低形成、環状鉄芽球の判定は両国間で大差がないことを確認できた。一方、WHO:RA と WHO:RCMD に関しては、前者の minimal dysplasia および後者の severe dysplasia の形態学的判定基準 (定量的基準) に関して、WHO 基準にもなお解決すべき曖昧さがあり、今後さらに詳細な検討を加えることとなった。

2. 血液学的所見

FAB:RA に関しては、表 (1) に示すように、年齢中央値、好中球数、Hb、血小板数、汎 ~ 2 血球減少症、染色体異常、生存期間中央値で顕著な差異が認められた。すなわち、日本の RA 症例は、独 RA 症例に比し、より年齢が若く、血小板減少を特徴とし、汎 ~ 2 血球減少を呈するものが多く、その生存期間はかなり長く、染色体異常の頻度も低いことが特徴と言える。ただし白血病転化率には差がなかった。

3. 生存期間

生存期間は日独 RA 間で、図 (1) の様に大差がある。60 歳未満群でも同様であった (図省略)

表1 FAB:RAの日独比較

	Japan	Germany	p value
Patients = n	131	597	
Median age, y (range)	57 (12-88)	71 (7-93)	p<0.0001
Neutrophils ($\times 10^9/l$)	1.8 ± 1.3	2.9 ± 2.9	p<0.0001
Hb (g/dl)	8.6 ± 2.9	9.4 ± 2.4	p=0.0016
PLT ($\times 10^9/l$)	66 ± 71	180 ± 175	p<0.0001
Pan- or bicytopenia (%)	68	37	p<0.0001
Abnormal Karyotype (%)	28	51	p=0.0002
Median survival (Months)	129	39	p<0.0001
Transition to AML (%)	8	9	p=0.7244

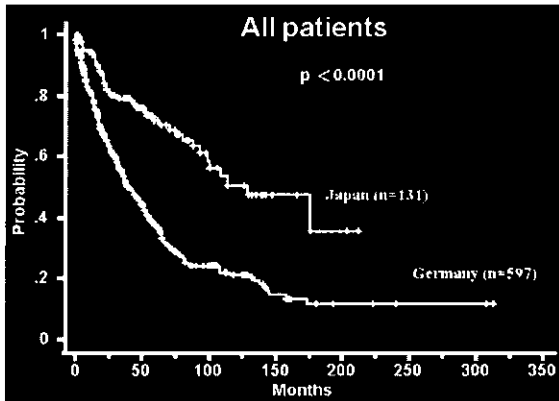


図1 FAB:RA (全体) 生存期間の日独比較

表2 WHO:RAとWHO:RCMDの日独比較

	Japan			Germany		
	RA	RCMD	p value	RA	RCMD	p value
Patients = n	84	38		142	416	
Median age, y (range)	54 (12-88)	66 (17-88)	p=0.0047	70 (7-91)	72 (16-93)	p=0.0900
Neutrophils ($\times 10^9/l$)	1.8 ± 1.0	1.7 ± 1.2	p=0.4439	2.9 ± 2.8	3.0 ± 3.1	p=0.8404
Hb (g/dl)	8.8 ± 2.8	8.3 ± 3.0	p=0.4757	9.8 ± 2.4	9.4 ± 2.4	p=0.0844
PLT ($\times 10^9/l$)	49 ± 55	98 ± 88	p=0.0004	163 ± 150	170 ± 160	p=0.9335
Pan- or bicytopenia (%)	69	68	p=0.7208	34	41	p=0.1617
Abnormal Karyotype (%)	19	36	p=0.0827	32	42	p=0.2524
Median survival (Months)	175	46	p=0.0002	66	33	p=0.0014
Transition to AML (%)	5	18	p=0.0147	6	11	p=0.1388

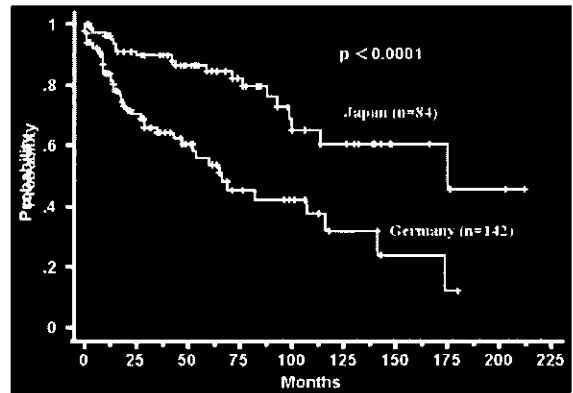


図2 WHO:RA (全体) 生存期間の日独比較

4. WHO分類RAおよびRCMD

表(2)に示すようにRAとRCMDの比率は、日独で逆転している。すなわち日本ではRAが多く(64%)、ドイツでは少ない(25%)。WHO:RAに於いては、日本例の年齢中央値は54歳で最も若い。血小板減少もこのグループにおいて強度である。一方、生存期間中央値は日本のRAで175ヶ月と最も長い。白血病転化率は日独WHO:RA間で差がない。日独いずれにおいても、白血病化率はRCMDがRAより約2~3倍高い。図(2)にWHO:RAの生存期間についての日独の予後比較を示した。明らかな有意差を持って日本のRA例がより良好である。なお日独両国に於いて共に、RA例がRCMD例より有意に予後が良いことも確認された。

D. 考察

日独血液専門医のMDS診断基準は基本的にはFABに準じて行われており、FAB:RAの診断に於いて、その一致率は極めて高かった。再生不良性貧血の診断一致率も高い。従って、両国間の症例比較検討は可能と考えられた。従来から我が国

のMDS症例の年齢中央値が比較的若いことが指摘されていたが、その原因は、我が国ではFAB:RA特にWHO:RAの症例の頻度が高く、この群がより若年であることによると考えられた。形態学的異形成が軽いWHO:RAと異形成が強いWHO:RCMDの診断基準については、WHOが出版したBlue Bookの基準において異形成の定量的表現の曖昧さがなお存在し、今後日独でこの点の検討を行うことが申し合わされた。我が国のFAB:RA例の免疫抑制療法の奏効率については、既報の60%台の奏効率からみて、WHO:RAはおそらく治療面でも免疫抑制療法がより奏功するグループの可能性が高い。一方欧米から報告されつつあるFAB:RAの奏効率は30~40%と明らかに低く、治療面でも両国間で差がある可能性が高い。我が国の成人再生不良性貧血においては免疫抑制療法の奏効率は70%程度であり、今後WHO:RAと再生不良性貧血の病態の共通性、染色体異常率、免疫抑制療法への反応性と反応持続性、白血病化率等についての比較研究もまた重要になって来ると思われる。

E. 結 論

日独の MDS 診断基準に大差はないことがわかった。両国の FAB:RA には年齢中央値、生存期間、血液所見に於いてかなりの差異が見られた。その差は、WHO 分類で細分類される RA と RCMD の比率が、日本では前者が圧倒的多く、独では後者が多いことに起因する。しかし WHO:RA においても、日本では血小板減少症が多いなど、独 WHO:RA とかなり病像が異なり、今後その原因が究明されなければならない。また我が国の WHO:RA と再生不良性貧血の比較研究も重要となる。これらの課題は治療の観点からも重要である。

F. 研究発表

現在国際 MDS シンポジウム (2005 年 5 月長崎) において発表できるよう準備中。
その成果は国際誌に投稿の予定。

G. 知的所有権の取得状況

予定はない。

H. 参考文献

1. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and genetics, Tumor of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Jaffe WS, et al. IARC Press, Lyon, 2001.
2. Germing U, et al: Validation of the WHO Proposals for the classification of primary myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.*, 12: 983-992, 2001.
3. Shimamoto T, et al: Cyclosporin A therapy for patients with myelodysplastic syndrome: multicenter pilot studies in Japan. *Leu.Res.*, 27:783-788, 2003.

小児特殊型 MDS にみられる分子異常

小島 勢二

名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学

研究要旨 小児期 MDS は遺伝的背景をもつ場合が多く、MDS の病因解明の手掛かりとなることが期待されている。今回、ダウン症に合併した MDS/AML (n=14) と TMD (n=4) について、GATA-1 遺伝子の変異を検討したところ、全例にエクソン 2 における変異が検出された。同時に検討した、FLT3、cKIT、N-Ras については、1 例も変異はみられず、P53 については 3 例に変異が確認された。JMML (n=15) についてもヌーナン症候群の原因遺伝子である PTPN11 遺伝子の変異を検索したところ、7 例に変異がみられた。

A. 研究目的

小児期 MDS は、成人にみられる MDS とは異なり、遺伝的背景がみられる場合が多い。今回、小児期 MDS を対象にダウン症やヌーナン症候群との関連が明らかとなった GATA-1 遺伝子や PTPN11 遺伝子の変異の有無について検討をおこなった。

B. 研究方法

ダウン症に合併した MDS/AML (n=14)、Transient myeloproliferative disorder (TMD、n=4) 患者の骨髄または末梢血からゲノム DNA を採取し、PCR 法で GATA-1 遺伝子のエクソン 2 を増幅後クローニングベクターに組み込み、プラスミド DNA を抽出し、オートシーケンサーで塩基配列を解析した。FLT3、cKIT、N-Ras、P53 遺伝子の変異についても既報の方法で検討した。同様の方法で非ヌーナン型 JMML (n=15) についても、PTPN11 遺伝子変異の有無を検討した。なお、今回は変異が集中してみられるエクソン 3 についてのみの検討である。

C. 研究結果

検討したダウン症患児の全例に、GATA-1 遺伝子の変異が確認された (Table 1)。FLT3、N-Ras、cKIT については変異はなかったが、P53 の変異が TMD の 1 例、MDS/AML の 2 例にみられた。³⁾ ヌーナン症候群の合併がない JMML についても 7/15 (47%) と高頻度に PTPN11 遺伝子のエ

クソン 3 部位の変異がみられた (Table 2)。³⁾

表 1 ダウン症に合併した MDS/AML/TMD における GATA1、P53 遺伝子の変異

症例	年齢	性	GATA1 変異	P53 変異
1	14 m	M	22 del 1 bp	None
2	22 m	M	90-91 ins 1 bp	None
3	20 m	F	31-32 ins 1 bp	None
4	25 m	F	104-105 ins 1 bp	ex6 199Gy→Arg
5	32 m	F	193-194 ins 20 bp	None
6	23 m	F	24-37 del 14 bp	None
7	21 m	M	128C→T(37Gly→stop)	None
8	N.A.	F	53T→C(12Ser→Pro)	None
9	23 m	M	208 del 1 bp	None
10	21 m	F	297-298 ins 22 bp	None
11	21 m	F	202-213 del 12 bp and ins 5 bp	None
12	21 m	M	94C→T(Ser→Phe)	None
13	24 m	F	62-63 ins 1 bp	ex6 200Asn del 1 bp(frame shift)
14	19 m	M	62-63 ins 1 bp	None
15	5 日	F	107T→C(30Ser→Pro)	None
16	7 日	F	22G→A(no start codon)	None
17	10 日	M	22G→A(no start codon)	None
18	3 日	M	29C→T(4Leu→Ser)	ex5 163Tyr→His

表 2 JMML 患児における PTPN11 遺伝子の変異

症例数	塩基置換	アミノ配置換
1	179G → T	G60V
1	181G → T	D61Y
2	182A → T	D61V
1	214G → A	A72T
1	215C → T	A72V
1	226G → A	E76K

D. 考 案

MDS/AML の発症には、¹⁾ 正常血球分化の阻害²⁾ 細胞増殖の促進が必要であるが、血液疾患をもつダウン症患児にみられた GATA-1 遺伝子の変異は³⁾ に関連していると考えられる。GATA-1 遺伝子は巨核球や赤血球の分化に関連する転写因子であり、ダウン症患児に合併する MDS/AML に

みられる芽球のほとんどが巨核球系や赤芽球系に帰属することに一致する。細胞増殖に関連する変異として、既知の遺伝子について検討したが、変異はみられなかった。P53 については、TMD の患児にもみられたことより、TMD から MDS/AML への進展に関与している可能性は低いと考えられた。JMML の発症機序としては、白血病細胞の GM-CSF に対する高感受性が想定されている。従来、この機序を説明する遺伝子変異として、N-Ras、NF-1 の変異が知られていたが、両変異をあわせても 50 %に満たず、関連する他の遺伝子変異の存在が予想されていた。今回、GM-CSF のシグナル伝達に関与する PTPN11 遺伝子の変異が半数の JMML 患児にみられたことより、ほとんどの患児におけるサイトカイン高感受性のメカニズムが分子生物学的に解明されたことになる。PTPN11 遺伝子を標的にした薬剤の開発は、本症の予後改善に寄与すると期待される。

E. 結 論

遺伝的背景をもつ小児期 MDS の発症メカニズムを分子生物学的に解明することにより、成人 MDS の発症機序の研究にも大きく寄与すると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Induction of complete remission of hypoplastic leukemia with antithymocyte globulin. Yoshimi A, Kojima S, et al. *Int J Hematol* 77, 277-281, 2003
2. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. Xu G, Kojima S, Ito E, et al. *Blood* 102, 2960-2968, 2003
3. Autoantibodies frequently detected in patients with aplastic anemia. Hirano N, Kojima S, Nadler LM, et al. *Blood* 102, 4567-4575, 2003
4. Comprehensive analysis of gene alternations in acute megakaryoblastic leukemia of Down's syndrome. Hirose Y, Kojima S, et al. *Leukemia*

17, 2250-2252, 2003

5. Twenty years' experience in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in the Nagoya Blood and Marrow Transplantation Group. Iida H, Kojima S, Morishita Y, et al. *Int J Hematol* 79, 79-84, 2004
6. Diamond-Blackfan anemia in Japan: clinical outcomes of prednisolone therapy and hematopoietic stem cell transplantation. Ohga S, Kojima S, Tsukimoto I, et al. *Int J Hematol* 79, 22-30, 2004
7. High-dose Busulfan is a major risk factor for ovarian dysfunction in girls after stem cell transplantation. Maeda N, Kato K, Matsuyama T, Kojima S, Ohyama K. *Clin Pediatr Endocrinol* 12, 13-18, 2003

2. 学会発表

1. Isomura M, et al. Somatic mutations in PTPN11 in the Japanese patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood* 2003, 102: 366a
2. Tsurusawa M, et al. Therapy-related myelodysplastic syndrome in childhood: A retrospective study of 36 patients in Japan. *Blood* 2003, 102: 424a
3. Ohara A, et al. Long-term outcome of acquired aplastic anemia children treated with antithymocyte globulin, cyclosporine with or without G-CSF. *Blood* 2003, 102: 510a

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

1. Yu G, et al. *Blood* 102: 2960, 2003
2. Hirose Y, et al. *Leukemia* 17: 2250, 2003
3. Isomura M, et al. *Blood* 102(Suppl.): 366a, 2003

低リスク骨髄異形成症候群に対するシクロスポリン療法-中間検討

内山 卓¹、通山 薫²、石川 隆之¹

京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科¹、川崎医科大学検査部²

研究要旨 「低リスク MDS に対する CSA 療法の有効性に関する研究」は平成 13 年 5 月以降 22 名の登録患者を得ているが、試験が終了し、調査票の回収された 9 例に関して臨床効果、安全性に関する検討を行った。24 週後の評価で血球三系統いずれかに改善を認めたものは 6 名で、すべての患者で 32 週までその効果は持続していた。1 名に重篤な感染症の併発が認められたが、白血病への進展患者は報告されていない。

A. 研究目的

従来補充療法や造血幹細胞移植以外に有効な治療のなかった International prognostic scoring system (IPSS) で Low または Int-1 に該当する低リスク群骨髄異形成症候群 (MDS) に対して近年免疫抑制療法が注目されている。なかでもシクロスポリン (CSA) 療法は、ATG 等の免疫抑制剤と異なり、外来治療が可能で、副作用も少ない利点を有する。当研究班では平成 13 年 5 月より CSA を用いた多施設共同の前向き臨床試験を施行しており、このたび有効性と安全性に関する中間検討を行った。

B. 研究方法

平成 13 年 5 月 1 日より、平成 16 年 2 月 28 日までに 22 名の患者登録がなされ、うち 15 名では予定治療期間を終了した。うち 9 名から調査票の回収がなされたが、主に回収された調査票をもとに検討した。

C. 研究結果

年齢中央値は 52 歳 (29-61)、男女比 4 : 5。FAB 分類では RA 8 名、RAEB 1 名。IPSS は 0.5 点が 7 名。骨髄は正形成または過形成で、低形成例はなし。染色体分析は 9 名すべてで正常核型であった。9 名すべてで 24 週間の CSA 内服治療を減量・休薬することなく終了し、うち 6 名でいずれかの血球に造血回復効果を認め、さらに 8 週間 CSA 治療を継続された。24 週目で認められた血

表 1 患者背景

UPN	age	sex	FAB	IPSS	karyotype	cellularity
1	61	F	RA	0.5	46, XX	normo
2	27	F	RA	0.5	46, XX	normo
3	31	M	RA	0.5	46, XY	hyper
4	52	M	RA	0.5	46, XY	hyper
5	51	M	RA	0	46, XY	hyper
6	55	F	RA	0.5	46, XX	hyper
7	50	M	RAEB	1	46, XY	hyper
8	55	F	RA	0.5	46, XX	normo
9	55	F	RA	0.5	46, XX	normo

表 2 シクロスポリンの臨床効果

UPN	好中球数 (/μl)				血小板数 (/μl)				Hb (g/dl)						
	投与前	24週後	HI	24 32週後 HI 32	投与前	24週後	HI	24 32週後 HI 32	投与前	24週後	HI	24 32週後 HI 32			
1	525	2992	major	2162	major	0.9	2.4	minor	2.1	minor	7.2	8.9	minor	8.7	minor
2	1390	1308	no	2525	no	2.4	5.3	minor	5.4	minor	11.2	11.7	no	10.4	no
3	988	1270	no	1815	no	4.6	8.5	major	10.6	major	4.4	8.7	major	10.2	major
4	2346	930	no			1.8	1.6	no			8.6	7.5	no		
5	2300	3700	no	2100	no	26.2	14.8	no	13.9	no	9	12.2	major	13.1	major
6	700	850	no			2.9	3.4	no			7.4	8.1	no		
7	18	30	no			3.8	1.6	no			5.9	5.1	no		
8	1290	999	no	1200	no	1.6	4.2	minor	4.9	major	8.5	9.9	minor	10.2	minor
9	1428	1040	no	2208	no	7.1	7.6	no	9.5	minor	7.1*	7.5	major	9.7	major

HI; hematological improv *輸血依存性

液学的改善が全例 32 週後にも持続していたことから、CSA の臨床効果は 6/9、67 %であった。

CSA の臨床効果を血球別に検討すると、好中球減少の改善効果は 1 名で major hematological improvement (major HI) が認められたのみであったが、血小板増加作用は 4 名 (minor HI 3 名、major HI 1 名) に、貧血改善効果は 5 名 (minor HI 2 名、major HI 3 名) に認められた。

CSA 療法に合併した有害事象の検討では、9 名全例で grade 1 以上の有害事象が報告され、臨床検査値異常では低 Mg 血症、ALP 上昇、Creat. 上昇は複数例で報告された。感染症の併発は 4 名で報告され、3 名は治療の遂行に支障が見られなかったが、高度の遷延性好中球減少のみ認められた 1 名の患者において治療開始 24 週後に CTC grade 4 の感染症を生じ、その 1 ヶ月後に死亡された。急性白血病への移行、病型の進行は調査票回収患者には認められず、その他の患者においても現在までそのような報告はない。

表 3 有害事象 (CTC grading)

UPN	腎臓	電解質	肝臓	感染症	その他
1			ALP (1)		
2		Mg (1)			
3		Mg (1)		CRP (1)	
4	Ceat (1)	Mg (1)	ALT (1)		食思不振 (1)
5			ALP (1)	毛嚢炎 (1)	
6	Ceat (1)		ALP (1)		
7	UA (1)	Mg (1)		肺炎 (4)	
8		Mg (1)	LDH (1)		多毛 (1)
9	BUN (1)			上気道炎 (2)	

D. 考 察

調査票回収において CSA に対する反応不良例が遅れている可能性もあるが、現在のところ CSA 療法により 67 %の血球改善率と予想以上の治療効果を認めている。血球別に見ると貧血、血小板減少の改善効果が高い一方で、好中球減少の改善効果は十分とは言えない。1 名 CSA 投与が感染症の難治化に寄与したことが否定できない死亡患者の報告が見られたことから、強い好中球減少の見られる患者に対する CSA 治療は慎重な経過観察が必要で、より早期の効果判定が望ましいのかも知れない。全例で多少なりとも有害事象

の認められたことから、治療効果の予測因子を明らかにすることが望まれるが、治療開始時汎血球減少 (好中球 < 1000、血小板 < 5 万、Hb < 8) を示した 3 名では 4 名中 2 名に、いずれかの血球が比較的保たれていた 5 名中 4 名に HI を認め、初診時末梢血所見からの効果予測は困難であった。

E. 結 論

低リスク MDS 患者に対する CSA 療法は、好中球減少患者において特に感染症の併発に留意が必要であるものの、一部の患者における貧血、血小板減少の改善が期待できる治療法である。今後 CSA による効果の見られた患者と見られなかった患者の臨床像の比較検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shimamoto T, Tohyama K, Okamoto T, Uchiyama T et al: Cyclosporin A therapy for patients with myelodysplastic syndrome: multicenter pilot studies in Japan. *Leukemia Res.* 27: 783-8, 2003.

2. 学会発表

平成 16 年日本血液学会総会にて報告予定

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

なし

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：中間解析

谷本 光音¹、池田 和真¹、藤井 伸治¹、豊嶋 崇徳¹

品川 克至¹、石丸 文彦¹、原田 実根²

岡山大学大学院・血液腫瘍呼吸器内科学¹、九州大学大学院・病態修復内科学²

研究要旨 「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」の中間解析を行った。7 例の登録があり、6 例に移植が行われ、3 例が完全キメラを達成して寛解生存を続けている。3 例では MDS クローンが残存または増殖した。MDS クローンの残存・増殖を広義の拒絶と考え、移植前治療における cyclophosphamide の 1 回投与量を 45 mg/kg に増量することとした。また、症例登録期間を 1 年間延長することとした。

A. 研究目的

「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」には、現在までに 7 例の登録があった。プロトコルの、「最初の 7 例で 2 例以上の拒絶がみられたら cyclophosphamide の 1 回投与量を 45 mg/kg に増量する。」という規定に基づいて、中間解析を行った。

B. 研究方法

平成 13 年 8 月から平成 15 年 12 月までに 7 名の患者登録があった。男性 5 例、女性 2 例、年齢中央値 63 (27 ~ 67) 歳、RAEB-t 6 例、CMMoL 1 例であった。HLA 一致同胞から末梢血幹細胞を採取し、移植前治療として Flu 25 mg/m²/day を 5 日間、Cy 30 mg/kg を 2 日間投与し、GVHD 予防としてシクロスポリン A とメソトレキセートを投与した。参加施設からの、症例登録票、採取票、day30 報告書、day100 報告書をもとに検討を行った。プロトコルの primary end point は安全性で、生着 (移植後 3 ヶ月後のキメリズム検査でドナータイプが 50 % 以上)、GVHD、day100 までの死亡、fludarabine/cyclophosphamide による前治療の有害事象、その他の有害事象が具体的項目である。

C. 研究結果

登録された 7 例のうち 1 例は、原病の悪化のため移植前に死亡し、残りの 6 例に対して移植が行われた。

移植された CD34 陽性細胞数の中央値は 3.7 (3.0 ~ 9.4) × 10⁶/kg、好中球 500 /μl までの回復に要した日数の中央値は 12.5 (9 ~ 16) 日であった。移植された 6 例のうち 3 例で、移植後 MDS クローンが残存または再増殖した。移植後に MDS クローンが残存または増殖した 3 例以外の 3 例では、いずれも完全キメラを達成し、平成 16 年 2 月末現在の観察期間は 293 日、657 日、796 日で、寛解を維持して生存している。移植後 100 日までの死亡は 2 例で、1 例 (day 98) は原病の悪化と GVHD が、もう 1 例 (day 69) が原病の悪化が原因であった。急性 GVHD は、移植された 6 例のうち 3 例に出現し、I 度が 1 例、III 度が 2 例であった。慢性 GVHD は、評価可能 4 例中 3 例に出現し、いずれも全身型であった。GVHD 以外の重篤な治療関連毒性は報告されていない。

D. 考 察

移植後の MDS クローンの残存または再増殖により完全キメラが達成されなかった症例を、広義の拒絶例と考え、プロトコルの「7-1 移植前治

療」の「最初の7例で2例以上の拒絶がみられたら、cyclophosphamideの1回投与量を45 mg/kgに増量する。また、cyclophosphamideの1回投与量を45 mg/kgにしても、7例中4例以上でfull chimerismが得られなければ、cyclophosphamideの1回投与量を60 mg/kgに増量する。」を適用して、今後の登録例では、移植前治療としてFlu 25 mg/m²/dayを5日間、Cy 45 mg/kgを2日間投与することとした。また、「症例登録期間を平成13年1月から3年間」を「症例登録期間を平成13年1月から4年間」に変更することとした。

E. 結 論

1. 移植後にMDSクローンの残存または再増殖により完全キメラに達し無かった症例を広義の拒絶例と考え、以後の登録例から、移植前治療のcyclophosphamideの1回投与量を45 mg/kgに増量することとした。
2. 症例登録期間を1年間延長することとした。

F. 研究発表

1. 佐古田幸美, 品川克至, 増田浩三, 藤井伸治, 豊嶋崇徳, 石丸文彦, 池田和真, 谷本光音, 宮本敏浩, 長藤宏司, 権藤久司, 原田実根: 前処置にFludarabineを用いたRISTの成績-九州大学第一内科および岡山大学第二内科の共同研究-, 第65回日本血液学会総会・第45回日本臨床血液学会総会・合同総会, 2003. 8. 29, 大阪
2. 小山幹子, 青山一利, 増成太郎, 近藤英生, 藤井伸治, 豊嶋崇徳, 品川克至, 池田和真, 石丸文彦, 谷本光音, 木村 宏: 成人 chronic active EBV infection (CAEBV) に対し, reduced intensity stem cell transplantation (RIST) を施行した一例, 第26回日本造血細胞移植学会, 2003. 12. 20, 横浜
3. 青山一利, 片岡 到, 近藤英生, 小山幹子, 増成太郎, 藤井伸治, 豊嶋崇徳, 品川克至, 石丸文彦, 池田和真, 津島知靖, 谷本光音: 転移性腎癌に対する RIST (reduced-intensity transplantation) を施行した2症例, 第26回日

本造血細胞移植学会, 2003. 12. 20, 横浜

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

H. 参考文献

なし

MDS の鑑別診断における P53 免疫染色の意義について WAVE System および Single Cell PCR を用いた検討

村手 隆¹、杉崎 千穂²、浅野 治彦²、木下 朝博²
直江 知樹²、伊藤 雅文³

名古屋大学医学部保健学科¹、名古屋大学医学部血液内科²、名古屋大学医学部附属病院病理部³

研究要旨 11 例の MDS 症例の骨髓由来 DNA で WAVE System を用いて p53 の遺伝子変異スクリーニングを施行し、さらに p53 免疫染色後、染色陽性細胞からの single cell PCR による p53 遺伝子変異の確認を行い、MDS における p53 の染色性と遺伝子異常について相関の有無を検討した。WAVE は p53 遺伝子変異の検出に簡便かつ有用であり、MDS における p53 染色陽性は遺伝子異常の頻度より高率に認められた。

A. 研究目的

MDS では、p53 遺伝子変異が 10 %前後に認められ¹⁾²⁾、免疫染色での p53 陽性率は 14-20 %で遺伝子変異頻度よりも高い⁴⁾⁵⁾。今回、MDS における p53 の染色性と遺伝子異常の相関の有無を検討した。

B. 研究方法

MDS 患者 11 例で、(1) WAVE System を用いて p53 遺伝子変異のスクリーニング、(2) p53 免疫染色、(3) 染色陽性細胞を採取し、single cell PCR による遺伝子変異の確認を試みた。

C. 研究成果

WAVE で解析したところ、2 例で遺伝子変異を確認した (Fig. 1)。染色結果では 5 例で p53 陽性細胞が 20 %以上存在した (Fig. 2-3)。Single cell PCR では変異が確認できなかった。

D. 考 察

K562 細胞では、細胞 1 個から p53 遺伝子変異が確認できたが、MDS 症例では確認できず、singlecell PCR の増幅効率を高めていく必要があると考えられた。

E. 結 論

MDS では p53 染色陽性率が高く、再生不良性貧血、de novo AML との鑑別に役立つ可能性がある。また WAVE は MDS における p53 遺伝子変

異の検出に簡便かつ有用であった。

F. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

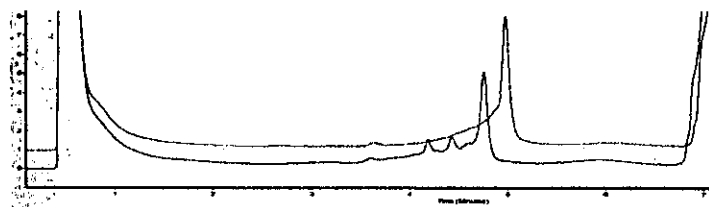
G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

H. 参考文献

1. Mori, N., Leukemia Res., 869-875, 1995
2. Mitani, K., Leukemia, 863-865, 1997
3. Padua, R.A., Leukemia, 887-892, 1998
4. Kitagawa, M., Am J Pathol, 338-344, 1994
5. Lapelley, P., Leukemia, 1342-1349, 1994

Figure 1 WAVE SYSTEM での解析 (症例 No.5)



WAVE System

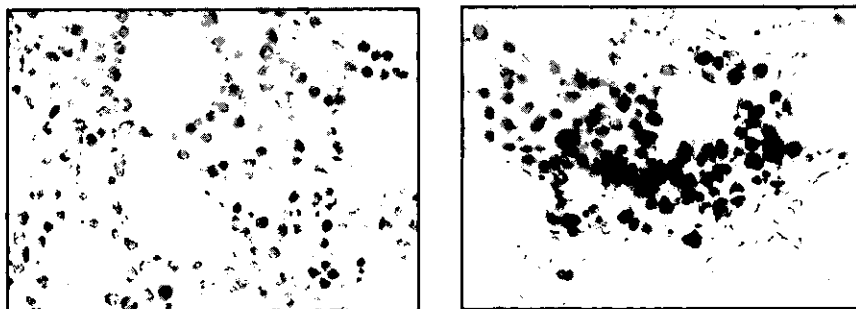
PCRで増幅後、wild type と MDS 症例検体の PCR 産物を混ぜてハイブリダイゼーション後、ヘテロ 2 本鎖とホモ 2 本鎖の混合物が形成、その溶出温度の差により変異の有無が検出できる。

Wild type (上) は 1 つのピークだが、変異があると 2 つ以上のピークが出る (下; MDS 症例)。

Figure 2

正常骨髄

MDS 患者骨髄



正常骨髄では p53 染色陽性細胞はほとんど観察されないが、MDS 患者では p53 染色陽性細胞が観察される。

Figure 3 MDS 患者 11 例の結果

Case	FAB分類	染色体異常	p53陽性細胞	p53 mutation
1	RA	trisomy 8	20%	-
2	RA	trisomy 8	20%	-
3	RAEB	monosomy 7	<1%	-
4	RAEB→AML	deletion 20	<1%	-
5	RAEB→AML	monosomy 7	50%	CTG →CGG (145)
6	RAEB→AML	異常なし	80%	CCC →TCC (151)
7	RAEB→AML	異常なし	30%	-
8	RAEB→AML	3個以上あり	5%	-
9	RAEB	異常なし	<1%	-
10	RA	異常なし	5%	-
11	RAEB→AML	3個以上あり	<1%	-

ハイリスク MDS における 5'-nucleotidase 発現の検討

石田 陽治、鈴木啓二郎、伊藤 薫樹、村井 一範

岩手医科大血液内科

研究要旨 ハイリスク MDS 症例のなかで Ara-C を含む多剤併用療法の治療を受けた 12 例の骨髄単核球細胞における 5'-NT mRNA を real-time PCR 法で測定した。5'-NT mRNA の発現量が < 0.3 の症例群では 5 例が CR、 ≥ 0.3 の症例群では CR 例はなく PR が 2 例、SD が 1 例であった。発症からの生存期間には差はなかった。また治療からの生存期間は < 0.3 の症例群が 19.0 ± 14.0 ヶ月、 ≥ 0.3 の症例群では 13.0 ± 5.0 ヶ月であった。発現量が低い群の方が治療からの生存期間が長い傾向があった。以上より 5'-NT mRNA を real-time PCR 法で測定することは、ハイリスク MDS 治療最適化を考慮するうえで重要で、予後因子としても有用であると考えられた。

A. 研究目的

Ara-C を含む多剤併用療法の導入によりハイリスク骨髄異形成症候群 (MDS) の治療成績は向上しつつあるが、その成績は十分なものとはいえない。急性骨髄性白血病 (AML) においては Ara-C の細胞内代謝関連酵素の発現が治療成績に関連するという報告がなされている (図 1)。更に Ara-C の代謝産物で抗腫瘍効果を示す Ara-CTP の代謝酵素である細胞内 5'-nucleotidase (5'-NT) の発現が急性骨髄性白血病の予後に関連するという報告がある^{1,2)}。これらのことより MDS においても細胞内 Ara-C 代謝の差異が治療成績に関連する可能性がある。今回我々はハイリスク MDS の新たな予後因子ならびに治療最適化を探索する一環として、ハイリスク MDS 症例の骨髄単核球細胞における 5'-NT mRNA を real-time PCR 法で測定した。

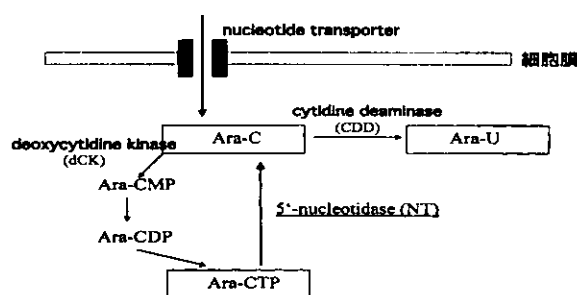


図 1 Ara-C の細胞内代謝

B. 研究方法

平成 10 年から平成 13 年までに岩手医科大学でハイリスク MDS (RAEB、RAEB-t) と診断された 10 例を対象とした。冷凍保存された各症例の骨髄単核球より Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて total RNA を抽出した。0.5 μ g の total RNA を用いて first strand cDNA synthesis kit (Roche) により cDNA を作成した。作成した cDNA を 1:5 に希釈し、hybridization probe 法により LightCycler で 5'-NT mRNA ならびに内部コントロールである β -actin mRNA の測定を行った。各症例における 5'-NT mRNA の発現量は β -actin mRNA との比で表した。またコントロールは保存されている 12 例の volunteer の骨髄単核球を用いて、同様に 5'-NT mRNA の発現量を測定した。

C. 研究成果

ハイリスク MDS と診断された 10 例の内訳を表 1 に記した。これらの症例のうち 8 例は化学療法を受け (Ara-C/VP16 6 例、Ara-C/VP16+CAG 2 例)、2 例は無治療で経過観察のみであった。発症からの生存期間は平均 32.4 ± 26.6 ヶ月、治療からの生存期間は平均 16.2 ± 11.4 ヶ月であった (表 2)。治療を受けた症例のうち完全寛解 (CR) に至ったのは 5 例、部分寛解 (PR) は 2 例、治療抵抗性を示した症例は 1 例であった。CR に至った症例が再発に至るまでの期間は平均 15.2 ± 5.7 ヶ月であった。ハイリスク MDS 10 例の 5'-NT

表1 ハイリスク MDS 患者の詳細

Case	年齢	性別	診断	Blast% (BM)	染色体	IPSS
1	72	M	RAEB-t	25.6	複雑	3.5
2	82	M	RAEB-t	20	47,XY,+8	2.5
3	74	M	RAEB	10.6	46,XY,del(7)	2.5
4	47	M	RAEB	20	46,XY	2.5
5	69	M	RAEB	13	46,XY	2
6	68	M	RAEB	11.6	46,XY	2
7	65	M	RAEB	13.2	47,XY,+X	2.5
8	61	M	RAEB-t	5.2	46,XY	1.5
9	72	F	RAEB-t	15.2	46,XY	2
10	73	M	RAEB-t	26.5	複雑	3.5

表2 治療成績

Case	治療	初回治療結果	発症からの 治療開始から		5NT mRNA
			生存期間	の生存期間	
1	AraC/VP16	CR	20	9	0.279
2	AraC/VP16	CR	72	12	0.360
3	No Tx	PD	14	14	0.151
4	AraC/VP16, CAG	CR	91	43	0.221
5	AraC/VP16	CR	23	8	0.085
6	AraC/VP16	PR	17	16	0.544
7	No Tx	SD	29	29	0.294
8	AraC/VP16	SD	22	6	0.585
9	AraC/VP16, CAG	PR	16	16	0.585
10	AraC/VP16	CR	20	9	0.282

CR: 完全寛解, PR: 部分寛解, SD: 変化なし, PD: 悪化あり

mRNA の発現量の平均は 0.320 ± 0.169 、コントロールは 0.0632 ± 0.019 であり (図 2)、ハイリスク MDS 症例が有意に発現量が高かった ($p < 0.01$)。上記の結果より 5'-NT mRNA の発現量の cutoff を 0.3 とし、各項目について検討した。治療反応性は 5'-NT mRNA の発現量が < 0.3 の症例群 5 例が CR、 ≥ 0.3 の症例群では CR 例はなく PR が 2 例、SD が 1 例であった。発症からの生存期間には差はなかった。また治療からの生存期間は < 0.3 の症例群が 19.0 ± 14.0 ケ月、 ≥ 0.3 の症例群では 13.0 ± 5.0 ケ月であった。統計学的な有意差はないものの、発現量が低い群の方が治療からの生存期間が長い傾向があった。

D. 考 察

近年、ハイリスク MDS に対し Ara-C を基本とする多剤併用療法が導入され、それらの有効性が示されている。しかし未だに多数の患者が早期に再発し、その後の治療も抵抗性を示すことが多く、化学療法による治癒率は満足すべきものでない。早期再発と治量抵抗性の克服のために、それらを的確に推定することができる新規の因子の同定が待たれている。近年、この可能性に応えるものとして個々の症例の腫瘍細胞における薬剤代謝の検討が行われてきている。AML においては、治療の key drug である Ara-C 代謝の差異が予後に関連することが報告されつつあるが、MDS においてはこれらを検討した報告は少ない。Ara-C は細胞膜にある nucleotide transporter を経て細胞内に至り、cytidine deaminase (CD) により不活性化を受け Ara-U となるが、一部は活性化酵素である deoxycytidine kinase (dCK) により、Ara-CMP となり、更にリン酸化を受け、抗腫瘍効果を示す活性型中間代謝物質である Ara-CTP となる。白血病細胞内における Ara-CTP の細胞内濃度と治療反応性の関連が示されているが、上記の機序のみではこれらを説明するには不十分であると考えられている。近年、細胞内 Ara-CTP を規定するものとして Ara-CTP を加水分解する細胞内 5'-NT が注目されつつある。これまでに AML 症例の初発時白血病細胞における 5'-NT の発現量が高い症例において、その予後が不良であるとする報告が見られたが、MDS 症例における検討はこれまでのところ報告がない。今回我々はハイリスク MDS 症例骨髄単核球細胞における 5'-NT mRNA の発現を Real-time PCR で検討した。ハイリスク MDS 症例群では 5'-NT mRNA の発現がコントロールに比べ有意に高いことが明らかとなった。さらに症例間における 5'-NT 発現の差異も認められた。検討数が少なく、更なる検討の余地はあるものの、今回の検討により 5'-NT 発現の差異が治療反応性ならびに治療後の生存に関連する可能性が示唆された。上記の Ara-C 代謝に関連する酵素とともに 5'-NT の発現を検討することは、ハイリスク MDS の治療抵抗性の推定、また十分な細胞内 Ara-CTP