

## II. 溶血性貧血

## 抗 Rh 抗体 mimotope 同定へのアプローチ

梶井 英治<sup>1</sup>、亀崎 豊実<sup>1</sup>、小山田 隆<sup>1</sup>、熊田 真樹<sup>1</sup>、  
近江 俊徳<sup>1</sup>、奥田 浩<sup>1</sup>、岩本 禎彦<sup>1</sup>、小峰 光博<sup>2</sup>

自治医科大学 地域医療学センター 地域医療学部門・法医学部門<sup>1</sup>、昭和大学藤が丘病院 内科血液<sup>2</sup>

**研究要旨** AIHA の主要自己抗原である Rh ポリペプチドの抗原解析を目的に、ファージディスプレイランダムペプチドライブラリーにおいて、抗 D、抗 E の 2 種類のモノクローナル抗体によるバイオパンニングを行った。選択されたファージの挿入塩基配列の決定と capture ELISA 法および合成ペプチドを用いた inhibition ELISA を行い、抗体反応性のペプチド (Rh mimotope) を同定した。

### A. 研究目的

Rh 血液型は、新生児溶血性疾患や ABO 適合輸血時の溶血副反応などで重要な役割を担っており、自己免疫性溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia: AIHA) における主要な自己抗原であることが明らかになっている。Rh 血液型を担っている Rh ポリペプチドは、赤血球膜を 12 回貫通し、6 個の細胞外ペプチドループの 3 次元構造の組み合わせにより、Rh 血液型や AIHA 自己抗原を表現していると推測されている<sup>1</sup>。今回、Rh 血液型抗原 epitope の物理化学的性状を解析し、細胞外ペプチドループの 3 次構造上にマッピングすることを目指して、モノクローナル抗 Rh 抗体と反応する linear peptide (mimotope) 同定を試みた。

### B. 研究方法

ファージディスプレイペプチドライブラリーとバイオパンニング

7 アミノ酸ランダムペプチドライブラリー Ph.D.-7 Phage Display Peptide Library (New England Biolabs) をモノクローナル抗 Rh 抗体 (mAbs) によりバイオパンニングを行った。すなわち、ファージライブラリー  $10 \mu\text{l}$  ( $2 \times 10^{11}$  pfu) と mAb 300 ng を混合し、室温で反応後、プロテイン G 結合磁化ビーズ (Miltenyi Biotec)  $10 \mu\text{l}$  により抗体結合ファージを選択した。洗浄後、酸性条件下でファージを解離し、中和した後に再度磁化ビーズと反応させて、ネガティブセレクションを行った。得られたファージを増殖させた後、

$2 \times 10^{11}$  pfu を用いて、上記の方法により 2 回目のパンニングを行った。4 回のバイオパンニングの後、シングルコロニーより精製したファージを用いて、挿入塩基配列の決定と以下の capture ELISA を行った。

挿入塩基配列の決定は、-96gIII sequencing primer を用いて、マルチキャピラリー DNA 解析システム (CEQ2000、Beckman Coulter) による direct sequence 解析で行った。

### 抗体

抗 D (OSK3)、抗 E (OSK20-1) の 2 種類の IgG クラスの mAbs は、大阪府赤十字血液センター山野孟氏より提供いただいた。

### Capture ELISA

選択されたファージを capture ELISA 法により抗体との反応性を検討した。すなわち、ELISA プレートに各 mAbs  $1 \mu\text{g}/\text{well}$  でコーティングし、0.5 % BSA でブロッキングを行った。シングルコロニーより精製したファージの  $0.5 \times 10^{12}$  pfu から 4 倍希釈系列を作成し、各 well に加え、1 時間室温で反応後、洗浄した。マウス抗 M13 ファージ抗体を反応させた後、HRP 標識抗マウス抗体を用いて、結合ファージ量の検出を行った。挿入ペプチド配列のないファージ (M13KE) をバックグラウンドとして使用した。

### 合成ペプチドによる competition ELISA

Capture ELISA により選択された 2 種類の 7-mer ペプチド PD-01、PE-01 を合成し (Sawady Technology、東京)、精製ファージと混合した後、mAbs でコーティングした well に加えて反応させ

た。洗浄後、マウス抗 M13 ファージ抗体を反応させた後、HRP 標識抗マウス抗体を用いて、結合ファージ量の検出を行った。

### C. 研究結果

ファージディスプレイペプチドライブラリーからバイオパンニングされたクローン

抗 D、抗 E 抗体それぞれにおいてコンセンサス配列を持ったクローンが 12 クローン中 10、9 クローン得られた (図 1)。

バイオパンニングされたファージと抗体との反応性

主要なファージについて、M13KE ファージをコントロールとした capture ELISA 法により抗 D、抗 E 抗体との反応性が確認できた。

合成ペプチドによるファージ反応性の確認 (図 2)

合成ペプチドにより抗体とファージの反応性の阻害が認められた。すなわち、抗 D 抗体と D-01 ファージの反応は、PD-01 ペプチドで阻害が認められた。抗 E 抗体と D-01 ファージの反応は、PD-01、PE-01 ペプチドで阻害が認められた。抗 D 抗体と E-01 ファージの反応は、PD-01、PE-01 ペプチドで阻害が認められた。抗 E 抗体と E-01 ファージの反応は、PD-01 ペプチドで阻害が認められた。

### D. 考 察

Rh 血液型抗原は conformational 抗原であり、バリエーション解析や mutagenesis などによる培養細胞での発現抗原の解析によりエピトープマッピング

OSK3(anti-RhD)

塩基配列

D-01. TATCAGAGTTATCCTGGTCCT  
D-02. TATCAGTCGTATCCTGGGTAT  
D-03. TATCAGTCGTATCCTGGGTAT  
D-04. ATGCAGAGTTATCCTCCTCCG  
D-05. TATCAGAGTTATCCGCATCCT  
D-06. TATCAGTCGTATCCTGGGTAT  
D-07. TTTTCGCCGCCGCTTTTTAT  
D-08. TATCAGTCTTATCCGATGCGT  
D-09. TATCAGTCGTATCCTGGGTAT  
D-10. AGTTTGCTTGATCTTATTCAT  
D-11. TATCAGTCGTATCCTGGGTAT  
D-12. TATCAGTCGTATCCTGGGTAT

アミノ酸配列

D-01. YQSYPGP  
D-02. YQSYPGY  
D-03. YQSYPGY  
D-04. MQSYPPP  
D-05. YQSYPHP  
D-06. YQSYPGY  
D-07. FSPPRFY  
D-08. YQSYPMR  
D-09. YQSYPGY  
D-10. SLLDLIH  
D-11. YQSYPGY  
D-12. YQSYPGY

OSK20-1(anti-RhE)

塩基配列

E-01. TATCAGTCTTATCCGACGCCT  
E-02. TATCAGTCTTATCCGATGCGT  
E-03. AAGGTGTATATGACTCCTCCT  
E-04. TATCAGTCTTATCCGACGCCT  
E-05. TATCAGTCTTATCCGACGCCT  
E-06. TATCAGTCTTATCCGATGCGT  
E-07. TTTTCAGTCTTATCCGATTCCG  
E-08. ATTCAGTCTCCTCATTTTTTTT  
E-09. GGTCCGCCGTTCTTTTTTCAG  
E-10. TATCAGTCGTATCCGAATCAT  
E-11. TATCAGTCTTATCCGATGCGT  
E-12. TATCAGTCTTATCCGATGCGT

アミノ酸配列

E-01. YQSYPTP  
E-02. YQSYPMR  
E-03. KVYMTTP  
E-04. YQSYPTP  
E-05. YQSYPTP  
E-06. YQSYPMR  
E-07. FQSYPIP  
E-08. IQSPHFF  
E-09. GPPVLFQ  
E-10. YQSYPNH  
E-11. YQSYPMR  
E-12. YQSYPMR

図 1. ファージディスプレイペプチドライブラリーからバイオパンニングされたクローン (Rh mimotopes). QSYYP は共通配列

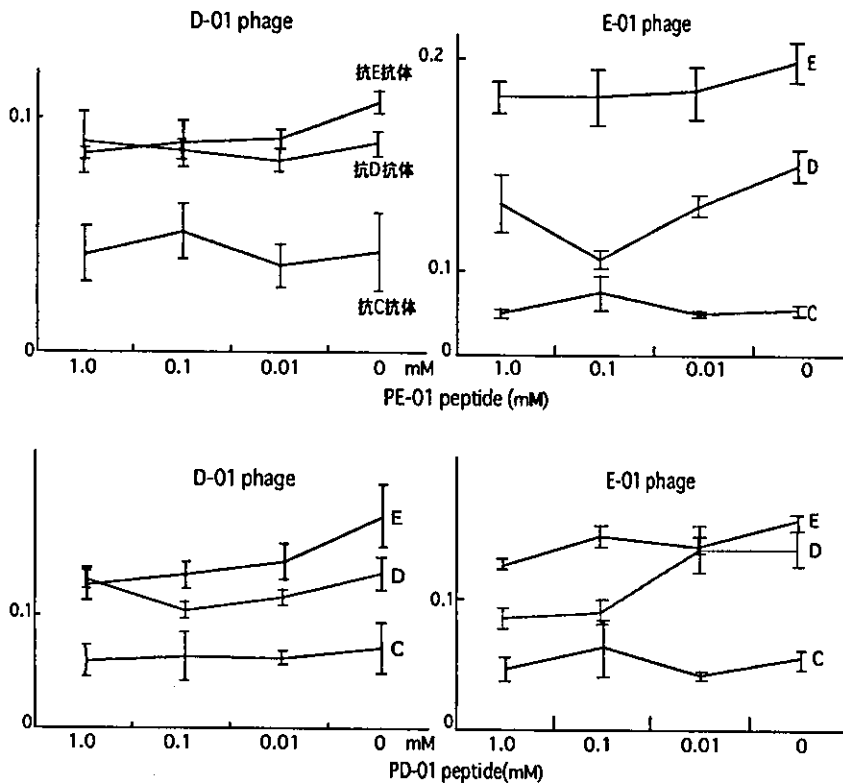


図2. 合成ペプチド (OPD-01,PE-01) によるinhibition ELISA

が行われている<sup>2)</sup>。抗体反応性の linear peptide、すなわち mimotope 同定によるエピトープマッピングへのアプローチは、エピトープの物理化学的性状を明らかにすることが期待されるだけでなく、臨床的にも、自己抗体やアロ抗体の抗体特異性の新たな同定法の開発に発展することが予想される。

今回、抗 RhD 抗体と抗 RhE 抗体と反応する linear peptide (mimotope) を 7-mer ランダムペプチドライブラリーより検索し、微弱な反応性ではあるが、抗体特異的で、抗 D、抗 E 抗体と交差反応するペプチドが同定できた。今後、他の抗体についても検索を進めることにより、より反応性の高い mimotope や多様な抗体反応性を示す mimotope の同定が期待される。現在、今回得られたペプチドと複数の自己抗体やアロ抗体との反応性の検討も行っている。

## E. 結 論

モノクローナル抗Rh抗体と反応する linear peptide (mimotope) 同定を試みところ、抗 D、抗

E 抗体共通に反応性を示すコンセンサス配列と各抗体特異的配列の存在。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Iwamoto S et al.: Reactivity of autoantibodies of autoimmune hemolytic anemia with recombinant rhesus blood group antigens or anion transporter band3. *Am J Hematol* 68: 106-114, 2001
2. Kamesaki T et al.: A novel mutation in the RHD gene in Japanese individuals with weak D, encoding an amino acid change in the 11th transmembranous domain of the RhD protein. *Vox Sang* 84: 141, 2003

### 2. 学会発表

1. 亀崎豊実 et al.: 抗 Rh 抗体の mimotope 同定へのアプローチ. *日本輸血学会雑誌* 49: 273, 2003
2. 亀崎豊実 et al.: 自己免疫性溶血性貧血の分子病態. *臨床血液* 45: 134, 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. 梶井英治 他: Rh 血液型システム. 梶井編. 最新血液型学: 12-33, 南山堂, 東京, 1998
2. Kamesaki T et al.: A novel mutation in the RHD gene in Japanese individuals with weak D, encoding an amino acid change in the 11th transmembranous domain of the RhD protein. Vox Sang 84: 141, 2003

# RNA アプタマーを用いた C8、C9 に対する補体阻害薬の開発とその補体溶血阻止効果

金倉 謙<sup>1</sup>、西村 純一<sup>2</sup>、Bruce Sullenger<sup>2</sup>、小峰 光博<sup>3</sup>

大阪大学医学部 血液・腫瘍内科<sup>1</sup>、Duke 大学医学部<sup>2</sup>、昭和薬大が丘病院 内科血液<sup>3</sup>

**研究要旨** 最近、補体の活性化を抑制することにより発作性夜間血色素尿症 (PNH) の溶血をコントロールすることが可能であることが示された。そこで、より安全にかつ有効に PNH の溶血をコントロールするために、RNA アプタマーを用いて補体後期成分 (C8、C9) に対する阻害薬を開発し、既知の C5 アプタマー阻害剤と溶血抑制効果を比較した。C8 アプタマーは SELEX 4 ラウンド後のクローンのうち 4-101 クローンが、C5 アプタマーと同等の活性を持ち、74 % の BMAX と 30nM の Kd を有していた。C9 アプタマーは SELEX 16 ラウンド後のクローンのうち 16-8 クローンが、強い溶血抑制活性を持ち、67 % の BMAX と 3nM の Kd を有していた。現在、in vivo study に向けてこれらのクローンの効率の最適化、安定化をはかっており、今後の臨床への応用が十分期待される。

## A. 研究目的

最近、ヒト化抗C5抗体による臨床治験の発作性夜間血色素尿症 (PNH) の溶血に対する劇的な有効性が報告され、補体の活性化を制御することにより PNH の溶血をコントロールする可能性が示された。しかし、補体は溶血のみならず様々な宿主免疫にも関与していることから、長期に渡るC5などの補体前期成分の抑制は、自己免疫病様症状や重症反復感染症などの危険性が高くなる。そこで RNAアプタマーのスクリーニングシステム (SELEX) を用いて (図 1)<sup>2,3)</sup>、C8、C9 を標的とした RNA アプタマーによる補体阻害薬の開発をめざし、PNH における補体溶血に対する抑制効果を検討した。

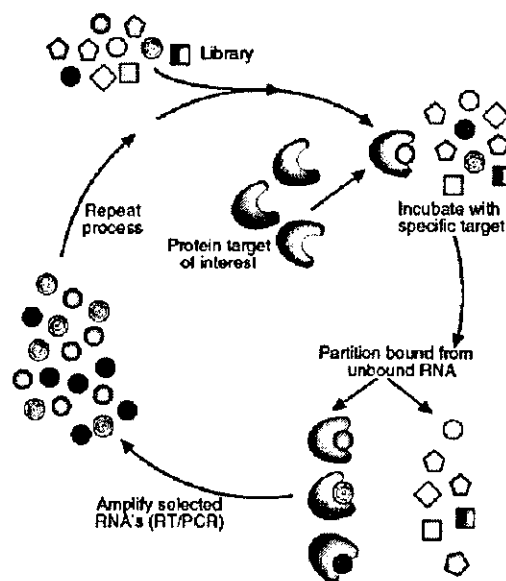


図 1. RNA Aptamer SELEX 法<sup>2)</sup>

## B. 研究方法

**SELEX (図 1)<sup>2,3)</sup>**: RNA アプタマーライブラリーと標的分子 (蛋白) を反応させ、標的蛋白と結合した分子のみを分離し、RT-PCR にて増幅した後、RNA に逆転写するというサイクルを繰り返す。数ラウンドの後 (通常 8-12)、選別された RNA リガンドをシーケンスし、標的蛋白に対する結合力と抑制活性を測定する。

**Binding Assay<sup>4,5)</sup>**: 標的蛋白と  $\gamma$ P<sup>32</sup> にて末端標識した RNA アプタマーを反応させた後、RNA 蛋白複合物をニトロセルロースとナイロンメンブラ

ンにプロットし、放射活性を測定し結合率を計算する。

**Hemolytic Assay<sup>6)</sup>**: EA (抗体付着ヒツジ赤血球) と標的補体成分除去血清に希釈系列標的補体成分を加えて、50-80 % 溶血を誘導する標的補体分量を決定する。上記の条件を 100 % 溶血活性とし、RNA アプタマーを加えその溶血抑制活性を算出する。

## 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、補体溶血に対する抑制活性を確認した (Effective inhibition (EI) (>70 % inhibition) at 63nM) (図2)。

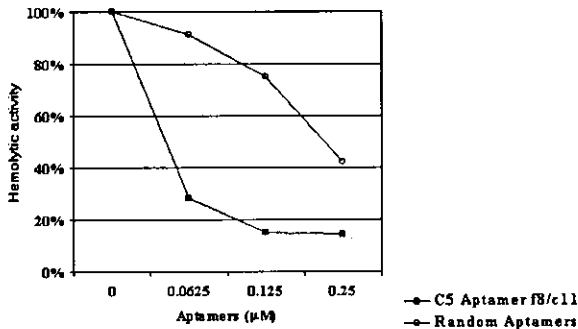


図2. C5 RNA Aptamer Clonesによる補体溶血抑制効果

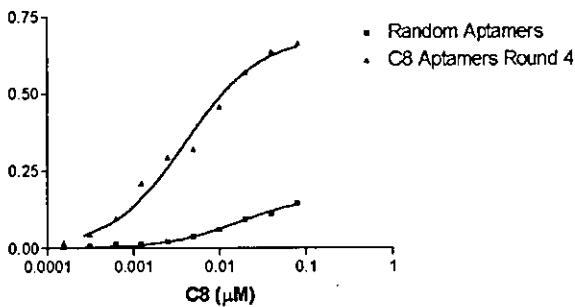


図3. C8 RNA Aptamers のC8に対する結合曲線

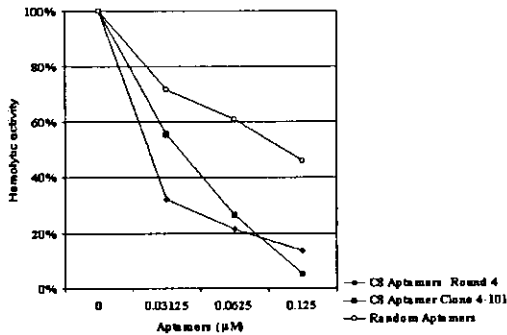


図4. C8 RNA Aptamers による補体溶血抑制効果

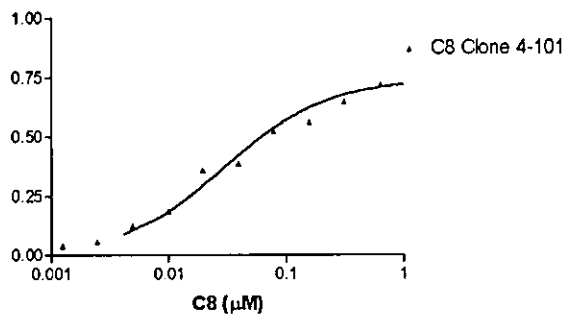


図5. C8 RNA Aptamer Clone のC8に対する結合曲線

C8 アプタマー：SELEX 4 ラウンド後、69 % の BMAX と 4nM の Kd を有し (図3)、C5 アプタマーと同等の抑制活性を認めた (EI at 63nM) (図4)。4 ラウンド後のクローンのうち 4-101 クローンは、C5 アプタマーと同等の抑制活性を認め (EI at 63nM) (図4)、74 % の BMAX と 30nM の Kd を有していた (図5)。

C9 アプタマー：SELEX 16 ラウンド後、58 % の BMAX と 12nM の Kd を有し (図6)、C5 アプタマーより強力な抑制活性を認めた (EI at 8nM) (図7)。16 ラウンド後のクローンのうち 16-8 クローンは、さらに強力な抑制活性を認め (EI at 4nM) (図7)、67 % の BMAX と 3nM の Kd を有していた (図8)。

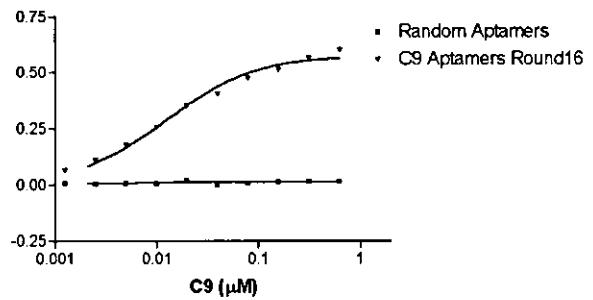


図6. C9 RNA Aptamers のC9に対する結合曲線

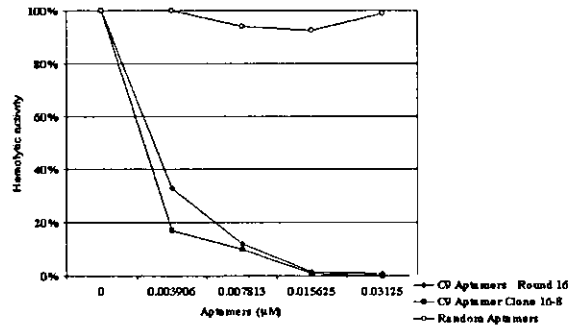


図7. C9 RNA Aptamers による補体溶血抑制効果

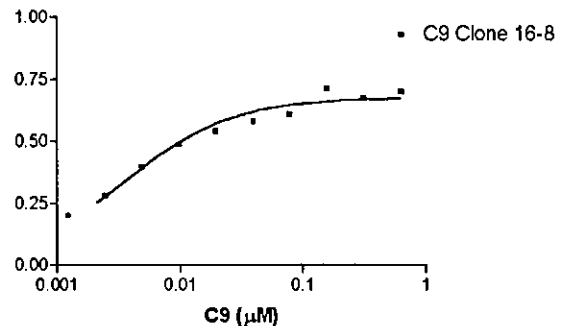


図8. C9 RNA Aptamer Clone のC9に対する結合曲線

#### D. 考 察

C5 アプタマー：既知の C5 アプタマーの溶血抑制活性を確認した。

C8 アプタマー：SELEX 4 ラウンド後のクローン 4-101 は、C5 アプタマーと同等の抑制活性を認め、現在クローンの効率の最適化、安定化をはかっている。

C9 アプタマー：SELEX 16 ラウンド後のクローン 16-8 は、C5 アプタマーより強力な抑制活性を認め、現在クローンの効率の最適化、安定化をはかっている。

#### E. 結 論

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たので、in vivo study に向けてそれぞれのクローンの効率の最適化、安定化をはかっており、今後の臨床への応用が十分期待される。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1. Nishimura J et al.: Complement-mediated hemolysis of erythrocytes is blocked by RNA aptamers to complement components C5 and C8. *Blood*. 102: 510a, 2003

2. Nishimura J et al.: Blocking complement-mediated hemolysis of PNH erythrocytes by RNA aptamers to C8 and C9. *Blood*. 104: 772a, 2004

#### H. 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

#### I. 参考文献

1. Hillmen P et al.: *N Engl J Med*. 350: 552-559, 2004

2. White RR et al.: *J Clin Invest*. 106: 929-934, 2000

3. Sullenger BA et al.: *Nature*. 418: 252-258, 2002

4. Rusconi CP et al.: *Nature*. 419: 90-94, 2002

5. Rusconi CP et al.: *Nature Biotech*. 22: 1423-1428, 2004

6. Jiang H et al.: *J Exp Med*. 194: 1609-1616, 2001

7. Biesecker G et al.: *Immunopharm*. 42: 219-230, 1999



## PNH 異常幹細胞のクローナルな拡大メカニズム

木下タロウ、井上 徳光、泉井 朋久、村上 良子、植田 康敬

大阪大学微生物病研究所免疫不全疾患研究分野

**研究要旨** 我々は、PNHにおいて、GPI欠損細胞が拡大する機序を解明するために、GPI欠損細胞のみが12番染色体異常をもつPNH症例の染色体切断部位からHMGA2を同定し、骨髄における異常発現を明らかにした。本年は、他のPNH症例において、HMGA2が関与しているかを明らかにするために、PNH症例におけるHMGA2の発現を調べ、2症例において、HMGA2の発現上昇があることを明らかにした。

### A. 研究目的

我々は、末梢血のほとんどが異常細胞で占められるようなPNHの発症には、3つのステップが必要であると考えている。造血幹細胞におけるPIG-Aの異常によるGPIアンカー欠損(ステップ1)、再生不良性貧血と同様の免疫学的機序によるGPI欠損細胞の選択(ステップ2)、その細胞にさらなる異常が起こる事による良性腫瘍的な増加(ステップ3)である。我々は、昨年度まで、ステップ3に関わるメカニズムを解明する目的で、GPI欠損細胞のみに12番染色体に異常を持つ症例J20の染色体異常を明らかにしてきた。その結果、患者J20の染色体異常は、一方の12番染色体のq12-q14領域の欠失、およびその領域の他方の12番染色体12q15領域への挿入であり、その挿入部位の切断領域から転写促進因子HMGA2を同定した。C末領域を欠失したHMGA2の異常発現が、脂肪腫や子宮筋腫などの間葉系良性腫瘍の発症に深く関与することが報告されていることから、本症例においても異常細胞の増殖に関与している可能性を考えられる。そこで、本症例の骨髄におけるHMGA2遺伝子の発現をリアルタイムPCR法により、発現している転写産物を3'RACE法により解析した結果、間葉系良性腫瘍ですでに報告のあるエクソン5を失った転写産物が正常より有意に発現上昇していることを明らかにした。そこで、我々は、HMGA2がJ20以外のPNH患者で発現上昇しているかを明らかにするために、今回、PNH末梢血を使って、発現を調べた。

### B. 研究方法

正常者6人、J20を含むPNH患者6人よりインフォームドコンセントを取得し、末梢血から多形核白血球分画(PMN)と単核球分画(MNC)を分離し、それぞれの細胞よりRNAを抽出、逆転写後、HMGA2遺伝子の発現をTaqMan probeを用いてリアルタイムPCR法により解析した。内部標準として、GAPDH遺伝子または、 $\beta$ Actin遺伝子を使用した。コピー数は、それぞれの遺伝子をクローニングしたプラスミドDNAの量を用いて算出した。

### C. 研究成果

染色体異常を持っていた患者J20では、骨髄では、HMGA2の発現上昇を認めたが、末梢血では、検出されなかった。6人の患者中、単核球RNAを検査できた5人のうち2人で明らかに高いHMGA2の発現上昇を認めた。これらの2症例では、PMNにおいても、高い傾向を示した(図で円で囲んだ2症例)。

### D. 考 察

HMGA2は、胎児期には高発現しているが、大人ではほとんど発現していない転写促進因子である。3'UTRは、HMGA2の転写産物の不安定性に深く関与することが報告されており、染色体転座を持つ間葉系腫瘍では、3'UTRを失うことにより安定化されHMGA2の発現が亢進していると考えられているが、染色体異常を持たない腫瘍でもHMGA2が異常発現していることが知られている。J20においては、3'UTRを失うことにより、

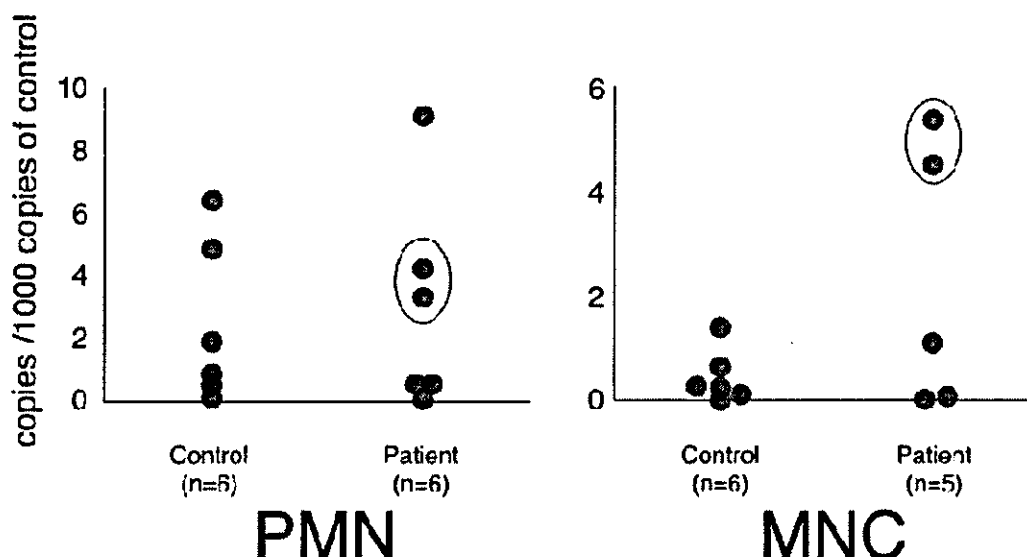


図 正常または患者末梢血におけるHMGA2遺伝子の発現量の比較

HMGA2 の発現が誘導され、この染色体異常を持つ異常造血幹細胞が良性腫瘍的に増加しているのではないかと考えられる。今回、2 症例の末梢血において、HMGA2 の異常発現を検出した。PNH においてEGR1<sup>1)</sup>や RhoA<sup>2)</sup> の発現の上昇が報告されている。また、RhoA により EGR1 と HMGA2 の発現が誘導されているという報告<sup>3)</sup>もされていることから、この pathway の異常が、PNH におけるクローナルな拡大に関与することが想像される。

#### E. 結 論

J20 の解析や今回の 2 症例の解析から末梢血のほとんどを異常細胞で占めるような PNH の発症には、PIG-A の異常による GPI の欠損、自己免疫的な機序による GPI アンカー欠損細胞の選択に加え、良性腫瘍的に増加するために HMGA2 などの発現を誘導するような異常の関与が示唆された<sup>4)</sup>。

#### F. 健康危惧情報

該当なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

1. 泉井朋久 他: 発作性夜間血色素尿症 (PNH) における異常クローン拡大に関わる候補遺伝子. 第 41 回 補体シンポジウム, 2004 年
2. 木下タロウ 他: 発作性夜間血色素尿症: クローン拡大の理解はどこまで進んだか. 第 66 回 日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 学会シンポジウム, 2004 年

#### H. 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

#### I. 参考文献

1. Lyakisheva A, et al, Exp Hematol 30: 18-25, 2002
  2. Heeney MM, et al, Mol Genet Metab 78: 291-294, 2003
  3. Teramoto H, et al, Oncogene 22: 2689-2697, 2003
  4. Inoue N, et al, Int J Hematology 77: 107-112, 2003
- 研究成果の刊行に関する一覧表、発表文献リストに関しては該当するものなし。

### Ⅲ. 不応性貧血（骨髓異形成症候群）

# 不応性貧血症例の新規登録とその解析

通山 薫<sup>1</sup>、伊藤 満<sup>1</sup>、内山 卓<sup>2</sup>、小峰 光博<sup>3</sup>

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

**研究要旨** 特発性造血障害に関する調査研究班では 1998 年以降あらたに把握された成人不応性貧血 (MDS) 症例の登録、データベース作成を行ってきた。登録症例は 388 例で、年齢中央値 65 歳、男女比 2.0 : 1 であった。骨髄染色体異常の頻度、異形成の頻度、治療内容と、一部染色体異常と生命予後の解析を行った。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であると考えている。

## 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 12 月現在 施設 388 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 388 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 ~ 96 歳 (中央値 65 歳)、性別は男 257、女 131 (男女比 2.0 : 1)、FAB 分類による病型 (主治医診断) は RA 166 例 (43%)、RARS 19 例 (5%)、RAEB 112 例 (29%)、RAEB-t 56 例 (14%)、CMML 24 例 (6%)、不明・その他 11 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 は全体の約 5%、WHO-RARS は約 2% 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) 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 1 に示す。

表 1 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	出現率%
(1) 顆粒球系			
核異常	340	222	65
顆粒異常	326	203	62
MPO陰性好中球	170	45	26
(2) 赤芽球系			
巨赤芽球様変化	325	186	57
核異常	336	205	61
PAS陽性赤芽球	130	15	12
(3) 巨核球系			
小型巨核球	336	193	57
単核巨核球	307	117	38
円形分離多核巨核球	82	28	34

### 4) 染色体異常

分析可能であったのは 368 例、そのうち染色体異常なし 207 例 (56%)、異常あり 161 例 (44%) であった。異常核型として頻度の高いものは、-5/5q- 38 例 (11%)、-7/7q- 40 例 (11%) (-5/5q- かつ -7/7q- 20 例 (6%))、+8 36 例 (10%) 等であった。また 3 個異常の核型異常を有する症例は 62 例 (17%) であった。詳細を表 2 に示す。また染色体異常の違いによる生存曲線を図 1、図 2、図 3 に示す。

### 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 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) 治療内容および予後

全症例についての治療内容は輸血 237 例 (63

表2 MDS登録症例に見られた染色体異常

染色体異常あり	161例(44%)
t(1;7)	6 (2%)
inv(3)/t(3;3)	3 (1%)
-5/5q-	38 (11%)
-7/7q-	40 (11%)
-5/5q-かつ-7/7q-	20 (6%)
+8	36 (10%)
11q23異常	5 (1%)
12p異常	10 (3%)
13q-	5 (1%)
20q-	15 (4%)
3個以上の核型異常	62 (17%)
染色体異常なし	207 (56%)

パーセンテージは分析可能368例中の割合を示す。

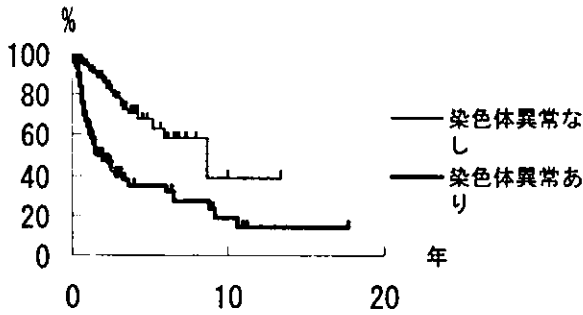


図1 染色体異常の有無と生存率

Wilcoxon検定 p<0.00001

5年生存率：染色体異常なし (n=205) 68.0%  
異常あり (n=160) 34.9%

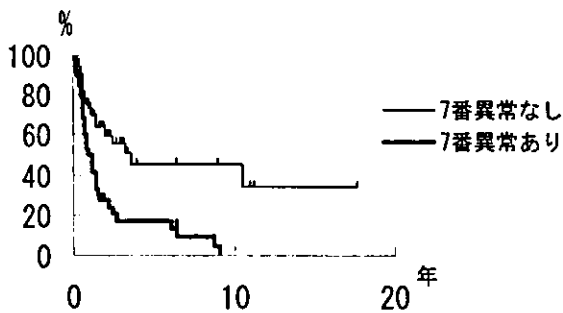


図2 7番染色体異常(-7または7q-)の有無と生存率

Wilcoxon検定 p=0.00097

5年生存率：7番染色体異常なし (n=112) 45.2%  
異常あり (n=40) 16.9%

%)、サイトカイン療法 72例 (19%)、ステロイド療法 123例 (33%)、ビタミン療法 (A、DまたはK) 119例 (32%)、抗腫瘍化学療法 97例

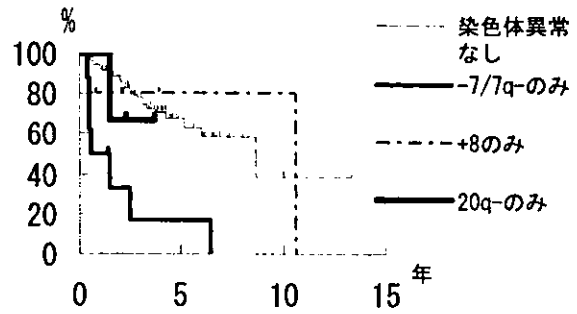


図3 単一染色体異常の有無と生存率

5年生存率：染色体異常なし (n=205) 68.0%

-7/7q- (n=8) 16.7%

+8 (n=11) 80.0%

20q- (n=8) 66.7% (3年生存率)

Wilcoxon検定：染色体異常なし群、+8群、20q-群間の有意差なし

表3 IPSSと治療内容

	症例数	輸血	サイトカイン	ステロイド	ビタミン	化学療法	移植
Low (Lowに占める%)	53 (28)	15 (28)	2 (4)	13 (25)	17 (32)	6 (11)	0 (0)
Int-1 (Int-1に占める%)	138 (57)	79 (57)	19 (14)	49 (36)	54 (39)	16 (12)	8 (6)
Int-2 (Int-2に占める%)	74 (66)	64 (86)	28 (38)	26 (35)	26 (35)	31 (42)	8 (11)
High (Highに占める%)	38 (67)	33 (87)	7 (18)	13 (34)	6 (16)	26 (68)	5 (13)
計 (全症例数に占める%)	303 (63)	191 (63)	56 (18)	101 (33)	103 (34)	79 (26)	21 (7)

(26%)、造血幹細胞移植 28例 (8%)であった。IPSSによるリスク群別の治療内容を表3に示す。

全症例の中で転帰として白血病化は91例、死亡116例、解析時点での生存日数中央値は420日(0~6447日)であった。

#### D. 考察

研究班参加施設から登録された患者データを基に、諸項目の集計・解析を行った。患者年齢中央値は65歳とわずかに高齢化したが、依然欧米に比して若年齢である。異形成所見はMDSと診断するための重要な根拠となるが、今回の集計では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、小型巨核球等が50%以上の頻度で認められており、着目度も高いものと考えられるが、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。WHO分類への読み替えはある程度可能と思

われるが、分類基準の標準化が課題であり、分類の妥当性や予後予測への有用性もそれに依存するであろう。

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のは従来の報告通りである。染色体別の予後解析の結果、7 番染色体異常の予後不良が再確認された。治療のレトロスペクティブな評価に関して、意味のある解析を行うためには、個々の症例の背景やより具体的な内容を把握する必要がある。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 388 例で、年齢中央値 65 歳、男女比 2.0 : 1 で、FAB 病型を一部 WHO 病型に再分類した。骨髓染色体異常の頻度、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. 健康危惧情報

該当なし。

#### G. 研究発表

該当なし。

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし。

#### I. 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
4. 通山 薫 他: 不応性貧血症例の新規登録の報告. 平成 15 年度報告書: 102, 2004

# 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

内山 卓<sup>1</sup>、通山 薫<sup>2</sup>、石川 隆之<sup>1</sup>

京都大学医学部附属病院血液・腫瘍内科<sup>1</sup>、川崎医科大学検査部<sup>2</sup>

**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 22 名の登録患者を得て終了した。脱落例を除く 19 名中 11 名に造血回復効果を認め、輸血依存性の 7 名中 4 名で輸血不要となるなど、貧血、血小板減少に対して高い改善効果が見られた。年齢、性別等の患者背景や、初診時末梢血、骨髄所見と治療反応性との明らかな相関は認めなかった。軽度のものを含めるとほぼ全例に有害事象を認め、CTC grade 3 以上のものも 3 名に見られた。

## A. 研究目的

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) は造血不全が生命予後を左右する。エリスロポイエチンは貧血の回復に一定の効果が示されているが、赤血球系以外の回復は望み難いこと、頻回の注射を要することなどの問題点が指摘されている。近年、免疫抑制療法の有効性が報告され、なかでも抗ヒト胸腺細胞グロブリン (ATG) は複数の前向き試験により有効性が確認されている。しかし、ATG の投与は serum sickness などによる重篤な副作用の発現率も高く、より安全な治療法が求められている。シクロスポリン (CSA) を用いた免疫抑制療法は、有効例の報告は見られるものの、前向き試験の報告はなく、その評価は定まっていない。当研究班で過去に行った CSA 療法のアンケート調査の結果をもとに、低リスク MDS に対する新たな治療法開発を目指して CSA 療法の臨床試験を行った。

## B. 研究方法

低リスク MDS に対する CSA 療法の患者登録は平成 13 年 5 月より開始され、平成 16 年 3 月に終了した。試験期間中に患者登録された 22 名の調査票をもとに、CSA 療法の短期的な安全性、有効性を検討した。

## C. 研究結果 図 1

患者背景；(表 1) 年齢中央値 52 歳 (18-67)、男女比 13 : 9。FAB 分類では RA 19 名、RAEB 2

名、RARS 1 名。IPSS は 0 点 3 名、0.5 点 16 名、1 点 2 名で、1 名は 1.5 点と判定された。染色体分析は正常核型 19 名。血球減少は 1 系統 4 名、2 系統 2 名、3 系統 16 名。8 名が赤血球輸血に、うち 1 名は血小板輸血にも依存性であった。

治療終了率；(表 1) 24 週間の CSA 治療期間を終了したものは 19 名で、残る 3 名は担当医の判断、患者の希望、および副作用により脱落となった。

治療効果；(表 1) International working group の hematologic improvement の基準に則った判定では、24 週の治療期間を終了し、いずれかの血球系統に反応を認めたものは 19 例中 11 例、57.8% であった。表 2 に血球別の反応性を示すが、貧血の改善を半数に認めたほか、血小板の回復も約 3 割に見られた一方で、好中球の回復は 1 例に認められたのみであった。造血回復効果は 6 週間以前の早期に認められる群と、12 週以降に遅れて見られる群に大別され、複数の血球系統にわたる造血回復効果は前者に限られていた (図 1)。登録例の大多数は FAB 分類で RA に該当し、RAEB、

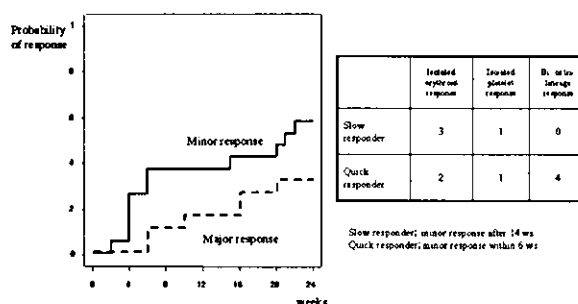


図 1 シクロスポリン効果発現の時間経過

表1 試験対象患者の臨床情報とシクロスポリン反応性

Patient characteristics								response to cyclosporin			
Age	sex	診断から 治療 (月)	BM blast (%)	FAB	Cytopenia	Karyotype	IPSS score	overall response	erythroid response	platelet response	neutrophil response
61	F	1	0.8	RA	E, P, N	46,XX	0.5	major	minor	minor	major
31	M	1	1	RA	E, P, N	46,XY	0.5	major	major	major	no
18	M	1	0	RA	E, P, N	46,XY	0.5	major	major	minor	no
51	M	8	1.4	RA	E	46,XY	0	major	major	N.E.	no
50	M	12	0.9	RA	E, P, N	47,XY+8	1	major	major	no	no
55	F	12	1.2	RA	E, P, N	46,XX	0.5	major	major	no	no
55	F	1	1.6	RA	E, P, N	46,XX	0.5	minor	minor	minor	no
44	M	168	2.6	RA	E	46,XY	0	minor	minor	N.E.	no
67	F	5	0.8	RA	E, P, N	46,XX	0.5	minor	minor	no	no
27	F	3	1.6	RA	P	46,XX	0	minor	N.E.	minor	N.E.
52	F	1	1.6	RA	E, P, N	46,XX	0.5	minor	no	minor	no
47	F	5	1.6	RA	E, P	46,XX	0.5	no	no	no	N.E.
52	M	8	0.6	RA	E, P, N	46,XY	0.5	no	no	no	no
							48XY,+Y,+9,add(9)(q13)x2				
64	M	5	1.6	RA	E, P, N	13)x2	1.5	no	no	no	no
55	F	1	2	RA	E, P, N	46,XX	0.5	no	no	no	no
60	M	27	1.6	RA	E, P, N	46,XX	0.5	no	no	no	no
50	M	14	5.8	RAEB	E, P, N	46,XX	1	no	no	no	no
31	M	14	1.8	RA	E, P	46,XY	0.5	no	no	no	no
40	F	12	0.6	RA	E, P, N	46,XX	0.5	no	no	no	no
35	M	2	5.4	RAEB	E	46,XY	0.5	N.E.	(drop out at 13ws, progressive anemia)		
52	M	1	1	RARS	E, P, N	46,XY	0.5	N.E.	(drop out at 16ws, elevating WT-1)		
63	M	2	1	RA	E, P, N	46,XY, del20q	0.5	N.E.	(drop out at 11w, toxicity)		

Cytopenia; E anemia, P thrombocytopenia, N neutropenia

表2 シクロスポリン反応性のまとめ

	major	minor	% of (major+minor)	no	N.E.
overall response	6	5	57.9	8	3
erythroid response	5	4	50.0	9	4
platelet response	1	5	31.3	10	6
neutrophil response	1	0	6.3	15	6

表3 FAB分類でRAと診断された患者における初診時所見とCSA反応性

	responder	non-responder	p value
age	46.4±15.1	49.9±11.5	0.62
sex (M/F)	5/6	4/3	0.65
diagnosis to enrollment (ms)	19.4±49.5	10.3±8.6	0.64
transfusion dependence (Y/N)	4/7	2/5	0.75
IPSS (0.5 vs other)	7/4	6/1	0.33
Hb (g/dL)	7.6±1.7	7.9±1.4	0.69
reticulocyte no (x10 <sup>7</sup> /μL)	4.8±3.2	4.9±1.9	0.91
Platelet (x10 <sup>7</sup> /μL)	6.7±8.8	4.2±2.0	0.47
Neutrophil	1514±1158	989±457	0.27
RA/RCMD	3/8	5/2	0.07
cellularity (Hyper/other)	7/4	4/3	0.42
Karyotype (normal/abnormal)	1/10	1/6	0.75

RARS あわせて3名の登録例中2名が早期に脱落したため、CSA 反応予測因子の検討は評価可能RA患者18名を対象として行った(表3)。年齢、性別等の主な患者背景や、IPSS、初診時血液所見、骨髄所見において、CSA 反応性と有意に相関する変数は見出せなかった。

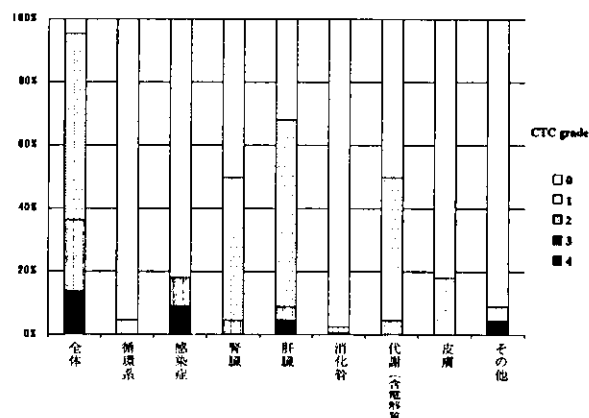


図2 有害事象

有害事象；脱落例を含めた22例の解析において、3例、14%にcommon toxicity criteriaでgrade 3以上の有害事象が見られた。臓器別の検討では、肝機能障害、腎機能障害、電解質異常といった臨床検査値の異常が高率に見られたが、これらは1例を除いてgrade 2以下であり、ほとんどはCSA投与を中断、もしくは投与量の減量を要するものではなかった。一方、感染症は4例に認められたのみであったが、うち2例で入院加療を要するものとなり、1例(grade 3)は脱落、治療終了直後に



肺炎を併発した残る1例は死亡に至った。その他にGrade 4の有害事象として、治療開始後約1年で多発性骨髄腫を発生した例が報告された。MDSそのものの病型移行は現在まで報告されていない。

#### D. 考 察

本試験における登録患者の大半がFAB分類でRAに該当する患者であり、RA以外の病型におけるCSAの有効性の評価はできないものの、RAに限定した時の有効率は61%に達した。この成績はGluckmanらが報告した重症再生不良性貧血に対するCSA単独投与の有効率(3ヶ月後で11.6%)を凌駕する。登録例の多くは汎血球減少を示し、染色体異常を伴うことなく、再生不良性貧血との異同が問題となるが、骨髄低形成を示したの4名のみで、骨髄標本の中央診断によっても全例MDSの診断が確認された。血球別に見ると貧血、血小板減少の改善効果が高く、治療開始時輸血依存性であった8名中4名(脱落例を除けば7名中4名)で輸血不要となったことは意義深い。一方で、好中球減少の改善効果は十分とは言えなかった。SauntharajahらはMDSに対する主にATGを用いた免疫抑制療法の反応予測因子として、HLA-DR15の存在、若年発症、赤血球輸血期間の短いことを挙げているが<sup>2)</sup>、今回のRA患者を対象とした検討では、年齢、輸血依存状態、診断から治療までの期間はいずれも反応性との相関が見られておらず、ATGとCSAの作用機序の違いを表している可能性がある。

Stadlerらは35名のMDS患者に対するATG療法時に、serum sicknessなどによりCTC grade 3以上の有害事象を23名に認め、4名はgrade 4であったと報告している<sup>3)</sup>。今回のCSA療法においても、grade 3以上の有害事象は3名、14%に認め、有害事象を全く認めなかったのは1名のみであった。強い好中球減少の見られる患者へのCSA療法は避けるべきであり、CSA投与中には潜在的悪性腫瘍の顕在化に対して十分な注意が必要である。

#### E. 結 論

血球減少を伴い、FAB分類でRAに診断される患者へのCSA療法は、貧血、血小板減少の改善効果が高い有効な治療法である。一方、副作用発現率も高く、時に重篤なものも見られることより、CSA投与の経験豊富な専門医により行われるべき治療である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文報告

1. 不応性貧血の免疫抑制療法 臨床血液 (in press)

##### 2. 学会発表

1. 通山薫、石川隆之: 不応性貧血の免疫抑制療法. 第66回日本血液学会, 第46回日本臨床血液学会同時期開催学会シンポジウム1

2. Ishikawa T. The result of clinical trial with cyclosporin in low-risk MDS in Japan. Bone marrow failure syndromes International Consensus Conference.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### H. 参考文献

1. Gluckman E. et al.: Multicenter randomized study comparing cyclosporin-A alone and antithymocyte globulin with predonisone for treatment of severe aplastic anemia. *Blood* 79: 2540-2546, 1992
2. Sauntharajah Y, et al.: A simple method to predict response to immunosuppressive therapy in patients with myelodysplastic syndrome. *Blood* 102: 3025-3027, 2003
3. Stadler M. et al.: A prospective, randomized, phase II study of horse antithymocyte globulin vs rabbit antithymocyte globulin as immune-modulating therapy in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 18: 460-480, 2004

# MDS 診断に有用な血球異形成の再評価

## (1) 好中球の Pelger-Huet 核異常

朝長万左男、対馬 秀樹、境 麻里、波多 智子

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分子治療分野（原研内科）、附属病院血液内科

**研究要旨** MDS の診断は依然として形態学的に行われるが、診断に有用な形態異常の種類とその判定基準についての研究を開始した。今回は家族性ペルゲル核異常の遺伝子（Lamin-B receptor）の変異が発見されたのを機会に、好中球において最も重要な偽ペルゲル核異常について、家族性、MDS、AML の 3 者間で比較を行い、それぞれの類似点と相違点を明らかにした。特に分葉異常と核クロマチン凝集粗大化の組み合わせが、家族性では 100 % 一致するのに対して、MDS では分葉異常は低率、粗大化は高率と一致しないことが明らかになった。今後 MDS における同遺伝子の変異解析が必要である。

### A. 研究目的

1928 年および 1932 年に Pelger と Huet により相次いで、家族性に見られる好中球の分節核の異常が報告された<sup>1,2)</sup>。その後、後天性の各種疾患でほぼ同じ形態学的特徴を示す好中球が pseudo-Pelger-Huet anomaly（偽ペルゲル核異常）と総称され、特に MDS の FAB 分類においてその重要性が指摘され、形態学的異形成のひとつに採用された経緯がある。

2002 年、この家族性ペルゲル核異常の責任遺伝子変異が、ドイツの Hoffmann らによって明らかにされた<sup>3)</sup>。染色体を構成する核クロマチンは細胞周期において、休止期には核膜（細胞膜と同様脂質の二重の膜構造となっている）上の蛋白に強く結合しており、その分子機構が次々に明らかになってきている。その中心的分子のひとつとしてクロマチン側にある Lamin B と細胞膜側にある Lamin B Receptor (LBR) がある。この LBR の globular (球部) I がもっとも相互の結合に重要な部分とされているが、家族性ペルゲル核異常ではこの部分に遺伝子変異がある。種々の変異が見いだされているが、いずれの変異においても、結果として LBR 蛋白の合成が障害され、クロマチンは核膜への結合がうまく行かず、ぶらぶらの不安定な状態になるものと推定されている。

今回 LBR 遺伝子異常の発見を機会に、家族性ペルゲル核異常と MDS および AML における偽ペルゲル核異常の形態学的比較を行い、ペルゲル

核異常の臨床的再評価を行った。

### B. 研究方法

家族性ペルゲル核異常の 2 家系、MDS 症例 36 例、AML (M2/M3) それぞれ 5 例計 10 例について、好中球を中心に、核形態の異常を (1) 分葉異常と (2) 核クロマチン凝集異常の 2 点から検討した。また (3) 好中球以外の血球系において核クロマチン凝集の異常が見られるか検討した。

### C. 研究成果 (表 1)

(1) 分葉異常と核クロマチン凝集粗大化の疾患別頻度および陽性率

#### a. 家族性ペルゲル核異常

すでに Pelger および Huet によって報告されていた通り、好中球の分葉が 2 分節で止まる異常と好中球の成熟に伴い核クロマチンの凝集が粗大となる異常を、2 家系の好中球のほぼ 100 % に認めた。この 2 家系は heterozygote 家系であり、homozygote 家系で報告されている単核のペルゲル核異常は全く認められなかった。

クロマチン凝集の粗大化もほぼ全ての好中球で認められたが、粗大化は後骨髄球段階から認めた。

各血球系別に分葉異常の有無と核クロマチン凝集粗大化の出現頻度を 2 家系で検討した。分葉異常は巨核球系のみで認められ、大きな 2 分葉を示す巨核球が約 50 % に認められた。この形態異常

表1. 好中球ペルゲル核異常の疾患別頻度および陽性率の比較

疾患	症例数	ペルゲル核	
		陽性症例数(%)	陽性症例に於ける陽性率(%)
			低分葉(2分葉)(平均) クロマチン粗大化(平均)
家族性	2	2(100)	100 100
MDS	55	19(34)	1.3 (0.5-22) 65
AML			
t(8;21)	5	5(100)	5 (1.0-12) 20
t(15;17)	5	2(40)	3 (0.5-6.0) 0
分化誘導	5	5(100)	75 (52-92) 6
正常人	10	2(20)	0.2 10

陽性率は全て骨髓メイギムザ染色標本に於ける観察

は MDS でよくみる 2 核の micromegakaryocyte / small megakaryocyte とは明らかに異なる。クロマチン凝集粗大化を示す血球は、リンパ球の約 50 %、形質細胞の約 50 %、赤芽球の約 30 %、単球の約 40 % に観察され、多血球系で認められることが分かった。

#### b. MDS

MDS 36 例に於ける偽ペルゲル核異常出現陽性例は 10 例 (約 30 %) であり、その陽性率は 0.2 ~ 22 % (平均 2.2 %) であった。MDS の偽ペルゲル核異常では、分葉異常の多くは 2 分節に止まり、めがね状を呈するものがほとんどであるが、36 例中、2 例において単核のペルゲル核異常が比較的高率 (3 %) に見られた。核クロマチン凝集粗大化は偽ペルゲル核異常をもつ好中球のほぼ全てにおいて認められた。しかし核クロマチン凝集粗大化を示す好中球はペルゲル核異常をもたない好中球においても認められ、その陽性率は 20-80 % (平均 50 %) ときわめて高率であった。家族性 2 症例で見られた多血球系のクロマチン凝集粗大化は全く認めなかった。

#### c. AML

AML では分化型の t(8;21) M2 と t(15;17) M3 をそれぞれ 5 例ずつ観察したが、前者では全例において偽ペルゲル核異常を認めその陽性率は 5-30 % (平均 7 %)、後者では 2 例において低率 (1.2 % および 1.5 %) に見られた。M3 の 5 例における ATRA 療法中に分化誘導が観察され、全例 (100 %) で多数 (25 % ~ 55 %、平均 35 %) の偽ペルゲル核異常が出現した。

核クロマチン凝集粗大化は M2/t(8;21) 5 例ではペルゲル核異常好中球の平均 30 % に認められたが、M3/t(15;17) 5 例ではさらに低率 (平均 15 %) であった。AML でも好中球系以外の血球系にはペルゲル核異常 (特に核クロマチン凝集粗大化) は認めなかった。

#### D. 考 察

家族性ペルゲル核異常の責任遺伝子 (LBR) 変異が発見され、核クロマチンの核膜への固定不全がその表現型であることが判明したことを前提に考察すると、まず、なぜこのようなクロマチン

の核膜結合が障害されると、好中球の分節（分葉）の進行がストップするのか？という興味深い問題が生じてくる。家族性異常で最も多いヘテロ接合体異常の場合は、好中球の大部分が2分節でストップし、めがね状となる。またきわめて希なホモ接合体異常では単核の丸い核を持つ好中球となる。LBRの異常（量的異常が中心と思われるが）と分葉異常の関係はまだ十分に解明されておらず、今後の課題である。今後この遺伝子変異の発見に続く形で、核形態と核クロマチン機能の統合的過程の解明が進むものと期待される。

MDSの偽ベルゲル核異常は、今回の検討ではAMLのそれと比較すると家族性異常にきわめ近似している。分葉異常とクロマチン凝集粗大化が必ず併存している。しかし家族性異常とMDSの間で最も大きな違いは、その頻度である。MDSでは1%をこえる偽ベルゲル核異常を保有する症例は約3分の1であり、その陽性率の平均も3%程度と低率である。クローン性疾患であるMDSでは好中球の大部分は異常クローン由来と考えられるが、ベルゲル核異常はなぜ低率に止まるのか？一方、偽ベルゲル核異常をもたない好中球においても核クロマチン凝集粗大化は高率かつ強度に見られる。すなわちMDSではクロマチン凝集粗大化の方がよりスペクトラムが広く、異常クローンを代表しているように見える。

また家族性では、多血球系にベルゲル核異常、すなわち分葉異常は巨核球系にも、またクロマチン凝集粗大化は全血球系に見られ、この家族性異常が造血幹細胞レベル、おそらくは体細胞全体において見られる可能性が示唆される。既に1960年代にスイスのStobbeらが光学（位相差）顕微鏡レベルと電子顕微鏡レベルの観察で多血球系に核クロマチンの粗大化が認められることを報告している。これらの論文はこれまであまり着目されてこなかったように思われる。

ベルゲル核異常は一般的には好中球の分葉異常ととらえられてきたが、これは好中球が成熟するとともに分葉（節）するという生理学的現象を土台にきわめて明瞭な形で観察できたことに由来すると思われる。やはり生理的に分葉する巨核球で

も、通常見られないような大きな2核（MDSで見られる分離した2核のものと異なり、二つの核はつながっている）のものを認めることは、核の分葉機構とクロマチン・核膜結合機構が、密接な相互関係を持っていることを強く示唆している。今回の観察では家族性にのみ多血球系に異常が認められた。しかしMDSやAMLの一部では巨核球系の異常として単核・2核の分葉異常を示す微小巨核球（micromegakaryocyte）の出現が特徴的であり、種々の分葉異常が存在する。

白血病化の観点からみると、MDSでは偽ベルゲル核異常が認められる例にはAMLに伸展する例が多いことがこれまでに知られてきたが、家族性ベルゲル核異常ではMDS/AMLの発症率の上昇はこれまで報告が全くない。したがって家族性ベルゲル核異常と偽ベルゲル核異常とは、その生物学的意義がかなり異なっていると思われる。遺伝子学的な観点からは、偽ベルゲル核異常を保有するMDS症例においてLBR遺伝子変異が存在するか否かをまず明らかにしていく必要があり、現在その検討を行っているところである。さらに家族性ベルゲル核異常では、クロマチンの核膜への結合不全がなぜ核クロマチン凝集粗大化につながるかという問題が今後解明されなければならないが、MDSにおいては核クロマチン凝集粗大化が分葉異常よりはるかに高頻度であり、家族性ベルゲル核異常とは一線を画した別個の遺伝子変異がより大きな意味を持つ可能性を想定できるかもしれない。

AMLでは、多くの例でMDS例の偽ベルゲル核ともやや異なり、核クロマチンの粗大化はそれほど強くないものが多い。特にM3の分化誘導で出てきたものでは粗大化がほとんどみられない。また核が丸い2核のベルゲル核も見られず、分節核は角張り、いびつであり、もともとのM3の前骨髄球に見られる、くびれた核の性格を引き継いでいるように見える。