

- ・末梢血検体の収集・保存
- ・保存施設運用規定の作成
- ・研究者から請求された末梢血検体の分譲
- ・JPLSG データセンター(以下、データセンター)と研究者を仲介し、研究計画書に記載された患者診療情報を研究者に提供

2. 末梢血保存施設は、検体を適正な品質管理の下に保存するが、不慮の災害や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。
3. 保存された末梢血検体は、あくまで JPLSG 内部の研究者に供されるものであり、外部に一般提供はしない。
4. 末梢血保存施設の運用規定には末梢血保存施設への移送、末梢血からの白血球分離法、末梢血検体凍結保存の方法、検体保存番号、末梢血検体の在庫管理と公開等を定める。

(末梢血検体の匿名化)

- 第5条 治療後患者の追跡調査には、疾患名、治療内容、治療反応性、予後、晩期障害、二次がん等と、長期に渡る患者の診療情報を必要としており、連結可能匿名化処理による検体保存が不可欠である。患者追跡調査の方法の詳細は、長期フォローアップ委員会が別に定める。
2. JPLSG 登録コードと末梢血検体保存番号の対照表は、末梢血保存施設で管理する。末梢血検体保存番号の付与は、末梢血保存施設の定める運用規定に従う。
 3. 連結可能匿名化末梢血検体を使用した検査および研究結果の開示、非開示の判断は3省合同ヒトゲノム/遺伝子解析研究に関する倫理審査指針に準じることとする。
 4. 文書による同意撤回は、いつでも可能である。また、保存の同意が撤回された末梢血検体は、速やかに廃棄する。
 5. 本規約に定められた研究期間の間は、患者の個人情報外部に漏れないように連結可能匿名化のもとに保存し、患者あるいはプロトコール研究に有益な情報をもたらす研究に限定して使用する。
 6. 連結可能匿名化処理を行うにあたり、参加施設、末梢血保存施設には、個人情報管理者を置く。

(末梢血検体の解析対象)

- 第6条 小児の白血病・リンパ腫の病態解析と治療法の向上に資するために、生殖細胞系列の遺伝子解析研究を行う。

2. 解析対象候補となるヒト遺伝子やその多型は数も膨大で、かつ内外の研究の進展に伴って今後次々に追加されていくと思われるので、事実上全てを特定することは困難である。解析候補遺伝子についての研究の妥当性については、JPLSG 研究審査委員会(以下、研究審査委員会)、JPLSG 運営委員会(以下、運営委員会)、研究実施施設倫理審査委員会で厳重に審査する。
3. 参加施設の長は、生殖細胞系列の遺伝子解析研究を行った場合は、必要に応じて適切な遺伝カウンセリング体制の整備又は適切な施設の紹介等により、提供者及び家族、又は血縁者が遺伝カウンセリングを受けられる様配慮する。

(末梢血検体の保存に関する文書による説明と同意)

第7条 主治医は、患者が寛解状態に入った事を確認し、末梢血検体の採取、保存施設への搬送、保存と研究用使用に関する説明を行い、文書による同意を得る。

<説明文書の記載に関する細則>

患者あるいは代諾者に対する説明文書には、以下のことが含まれていること。

- ・ 末梢血提供の依頼を受けた患者は、提供に同意しないことにより不利益な対応を受けないこと。
- ・ 患者または代諾者等は、自らが与えた同意文書について、いつでも不利益を受けることなく文書により撤回出来ること。
- ・ 患者または代諾者等は、同意文書の撤回があった場合には、原則として、当該提供者に係わる検体および研究結果を匿名化して廃棄し、その旨を患者または代諾者に文書により通知しなければならないこと。
- ・ 検体の提供は無償であること。
- ・ 一度提供された検体は患者には返却されないこと。
- ・ 研究により得られた知的財産権の帰属のこと。
- ・ 遺伝カウンセリングのこと。

2. 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」、「臨床研究に関する倫理指針」「個人情報保護に関する法律」等、国が定める指針や法に則ったものでなければならない。

(文書同意あるいはアセントの適応年齢)

第8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

同意を取得することが望ましい。

2. 患者が 12 歳以上 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 歳以上 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頭によるアセントを取得することが望ましい。
4. 患者が 20 歳に達した場合には、改めて本人の意思を文書にて確認することとする。

(末梢血検体の公開)

第 9 条 末梢血検体の検体保存番号と、疾患名、保存年、種類、量、可能な供給形態（細胞あるいは DNA）などの検体に関する情報は、JPLSG 会員に公開される。

2. 末梢血検体の情報公開は、検体保存施設が行う。

(末梢血検体の収集・保存期間)

第 10 条 検体保存施設は、5 年ごとに検体保存、供給実績等を研究審査委員会に報告し、さらに運営委員会、保存施設倫理委員会の承認を経て、検体保存期間の更新を行う。研究期間は、検体収集後、その検体を使い切るまでとする。

2. 治療後患者の追跡調査は、JPLSG に設置された長期フォローアップ委員会による、QOL、晩期障害、二次がん発生等についての診療情報として蓄積される。生殖細胞系列の遺伝子解析研究を行う研究施設の研究者は、研究計画書の内容に従い検体保存施設経由でデータセンターに診療情報を請求し、資料の提供を受ける。
3. データセンターは、研究計画書に記載された診療情報以外の情報を、研究者に提供してはならない。

(末梢血保存の費用)

第 11 条 検体の搬送・保存に関する費用は、運営委員会と末梢血保存施設が協議の上負担割合を決定し、支払うものとする。

(末梢血検体分譲の手順)

第 12 条 末梢血検体利用を計画する研究の申請者は、自身の所属する研究機関の倫理審査委員会に先立ち、運営委員会に研究計画書を提出し、承認を得なければならない。

2. 運営委員会委員長（以下、運営委員長）は、研究計画書の審査を研究審査委員会に諮問する。
3. 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審査を行い、

その結果を運営委員長に答申する。

4. 運営委員長は、その答申に基づき、運営委員会の審議を経た後に分譲の可否を決定し、研究申請者に書面で通知する。
5. 研究申請者は、所属する各研究機関の倫理審査委員会において承認を受けた後、研究計画書、研究審査委員会承認書、研究機関倫理審査委員会承認書、運営委員長による分譲承認書を添えて、末梢血保存施設に分譲の申請を行い、検体の分譲を受ける。

(末梢血検体の分譲を受ける資格)

第 13 条 研究計画の立案・申請と検体の分譲依頼は、JPLSG 会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。その場合研究内容は、小児白血病・リンパ腫に関するものに限る。

(末梢血検体分譲の費用)

第 14 条 末梢血検体は無償で研究機関に分譲されるが、検体の分譲に関し発生する搬送料、DNA 抽出に関わる費用等については、実費の全てを研究者が負担する。

(研究者の義務)

- 第 15 条 保存された末梢血検体を使用して行われる研究は、その研究課題と研究概要および研究結果について運営委員会の審査を受けた後に、JPLSG ホームページ上に公開する。その場合、研究者の属する部門のホームページにリンクする形でも良い。
2. 研究結果報告の規定については、JPLSG 規約に準じる。

(規約の改定等)

第 16 条 本規約は、JPLSG 運営委員会の審議を経て、改定することができる。

附則

この規約は、平成 18 年 月 日から実施する。

日本小児白血病リンパ腫研究グループ研究審査委員会規約 ver. 3.4

制定 平成 16 年 10 月 30 日

改定 平成 17 年 1 月 10 日

改定 平成 17 年 12 月 2 日

(目的・設置)

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、JPLSG 構成員が行い、かつ、患者に直接介入する事のない臨床及び基礎研究計画に対し、「医の倫理に関するヘルシンキ宣言」の趣旨に沿う倫理上の指針を与えるために、JPLSG 研究審査委員会(以下、研究審査委員会という)を置く。

(責務)

第 2 条 研究審査委員会は、JPLSG 運営委員長から依頼があった場合には、新たな検体採取を伴うプロトコール付随研究(治療に直接介入しない研究)、および保存された余剰腫瘍検体あるいは寛解期末梢血検体を利用した研究の審査を行う。

2. データ利用の研究は、原則として本研究審査委員会の審査対象外であり、治療研究委員会および運営委員会で審査する。

(審議の方針)

第 3 条 研究審査委員会は、第 1 条の趣旨に基づき、前条に掲げる事項に関して医学的、倫理的、社会的な面から調査、検討し審議する。審議に際しては、日本小児血液学会臨床研究審査委員会規約第 6 条に従い、以下の諸点に留意する。

- 1) 臨床研究の目的、計画および方法が妥当なものであること
- 2) 臨床研究の実施施設基準が決められていること
- 3) 臨床研究の研究代表者が決められていること
- 4) 個人の人権が擁護されていること
- 5) 個人またはその代諾者の理解を求め、同意を取得するに際しての方法、同意文書および説明文書の内容が適切であること

(組織)

第 4 条 研究審査委員会は、次の各号に掲げる委員をもって組織する。

- (1) CCLSG、JACLS、TCCSG、KYCCSG から各 1 名
- (2) その他、人文・社会科学の有識者、一般の立場を代表する者、JPLSG 外部委員の条件を

満たす者等の外部委員 2 名

(3) 研究審査委員会委員長 1 名

2. 委員長は運営委員会委員の中から選任される。また、委員は運営委員会において推薦され、かつ承認を得て選出される。
3. 委員は男女両性からなる構成とする。
4. 治療研究委員会委員長は、研究審査委員会委員長および委員を兼任しない。

(任期)

第 5 条 委員および委員長の任期は 2 年とする。

2. 委員に欠員が出来たときは、その都度補充する。補充による委員の任期は前任者の残任期間とする。
3. 委員長 1 回のみ再任可とするが、他の委員の再任は回数を問わず妨げない。

(会議)

第 6 条 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う。必ず返信メールにて、申請書類受理の確認を行う。

2. 審査を行う場合は、外部委員 2 名を含む 7 名全員の参加を原則とする。
3. 審査対象となる臨床研究に携わる委員は、当該臨床研究に関する審議または採決に参加してはならない。
4. 研究に関わる検体分譲の優先順位に関しては、相対的な評価を付記し、運営委員会に提出する。

(審査の申請)

第 7 条 JPLSG 構成員が、白血病・悪性リンパ腫臨床試験の遂行に密接に関連した検体採取を伴う付随研究、および JPLSG により保存された余剰検体を用いた研究を行う時は、JPLSG 運営委員長(以下運営委員長という)に申請し、運営委員長の諮問を受けた研究審査委員会の審議を経て、運営委員会の承認を得なければならない。

(審査結果)

第 8 条 研究審査委員会委員長は、審査の結果を運営委員会に報告する。

2. 運営委員長は、研究審査委員会の答申を参考にし、運営委員会の議事を経た後に、研究計画の可否を判定し、申請者に文書にて連絡する。
3. 研究計画が承認された課題については、JPLSG ホームページ上に公開する。

(秘密の保持)

第9条 研究審査委員は、その職務に基づき知り得た秘密、特に個人のプライバシーに関する事項について秘密を守らなければならない。

(庶務)

第10条 研究審査委員会の庶務は、研究審査委員会事務局が行う。ただし、この業務はJPLSG事務局が代行するものとする。

(規約の改正等)

第11条 この規約は、JPLSG運営委員会の審議を経て、改正することができる。

(雑則)

第12条 この規約の定めるもののほか、研究審査委員会の運営等に関し必要な事項は、研究審査委員会が別に定める。

付則

この規約は、平成16年10月30日から施行する。

日本小児白血病リンパ腫研究グループ研究審査委員会運営細則 3.8

制定 平成 17 年 12 月 2 日

(趣旨)

第1条 この細則は、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) 研究審査委員会規約 (以下規約という) 第 12 条の規定に基づき、JPLSG 研究審査委員会 (以下、研究審査委員会という) の運営等に関し必要な事項を定めるものとする。

(申請)

第2条 規約第 7 条の規定に基づき研究審査委員会に審査を求める場合には、研究等 (規約第 1 条に定める研究をいう。) の研究代表者 (以下、「申請者」という) は、研究審査申請書を JPLSG 運営委員長 (以下、運営委員長という) に提出しなければならない。

2. 申請課題については、あらかじめその課題が提出される J P L S G 治療研究委員会で十分審議が行われ、課題の重要性、検体の有効利用等の観点から 1 あるいは 2 課題程度に整理されたものであること。
3. 運営委員長は、運営委員会に諮った後、審査委員会に審査を依頼する。
4. 申請書および資料については、原則として電子媒体を介して添付できる種類のものに限る。
5. 検体採取を伴うプロトコールに附随した研究、あるいは保存検体利用を計画する研究の申請者は、自身の所属する研究機関の倫理委員会に先立ち、本研究審査委員会に研究計画書を提出し、承認を得ていなければならない。

(審査)

第3条 審査委員会は運営委員長から諮問のあった研究申請書は随時受け付ける。審査期間は 3 ヶ月を目安とし、運営委員長への審査結果報告書の提出は、運営委員会の開催の 1 週間前までに行う。

2. 同一の治療研究委員会からの申請については、原則として 1 年以上の間隔を置く。
3. 研究審査委員会は、必要に応じ申請者または共同研究者の意見を求め、申請の内容の説明を聴取することができる。
4. 審査の判定は、審議に参加した委員全員合意によるものとする。

(判定)

第4条 判定は、次の表示による

「承認」

「修正の上、再審議」

「却下」

2. 審査委員会は、いったん承認した事項を、理由を附記した上で取り消すことが出来る。
3. 余剰腫瘍検体は有限であり、観察期間が長期に亙るほど患者の基礎情報が添付された検体となり、その重要性は増す。JPLSG では、公平性・公益性の観点から構成員の合意のもとに、在庫管理、保存検体の公開、検体の分譲形態 (細胞、蛋白、DNA、RNA など)、分譲後の検体の取り扱い等を含んだ分譲に関する規約を別に定める。
4. 余剰検体分譲に関する優先順位は、規約第 3 条を満たした申請について、科学的水準 4 項目 20 点及び倫理水準について評価し、別紙 1 により運営委員会に報告する。分譲の有無は、それら評価を参考にし、運営委員会の審議を経て決定される。
5. 科学的水準 20 点は以下の内容による。
 - (1) 科学性 5 点
 - (2) 予備的研究データの有無 5 点

- (3) 独創性 5点
- (4) 研究の有益性・公益性 5点

6. 附随研究の審査についても、第4条4項、5項と同様の基準により評価を行う。

(結果の通知)

第5条 審査結果の通知は、所定の様式により、申請後3カ月を目安に申請者に交付する。

(異議の申立て)

第6条 研究審査委員会の判定結果に対して異議のある場合には、申請者は、異議申立書を作成し運営委員会に提出し、再審査を1回に限り申請することが出来る。この場合においては、異議申立書に、異議の根拠となる資料を添付しなければならない。

- 2. 異議の申し立てが運営委員会で受理され、運営委員会から再審査が指示されたときは、研究審査委員会は速やかに再審査を行い、その結果は運営委員長を介して申請者に通知する。

(研究結果報告の義務)

第7条 保存された余剰検体を使用して行われた研究は、その研究結果について運営委員会に報告し、承認を受けた後に、学会、学術雑誌、JPLSG ホームページ上等に公開する。ホームページに公開する場合、研究者の属する部門のホームページにリンクする形でも良い。

(細則の改正等)

第8条 本細則は、研究審査委員会の議決、及び運営委員会の承認により改正することが出来る。

付則

この細則は、平成17年12月2日から実施する。

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 三重大学大学院医学系研究科 小児発達医学 教授

研究要旨 小児造血器腫瘍の免疫学的診断に関して、マーカー解析を実施している中央診断施設4施設と臨床検査会社3社を対象に、外部精度管理を開始した。方法としては、CD45 Gating法による3カラー解析パネルを作成し、統一された標識抗体クローンを用い、白血病患児末梢血（症例：MW-1?5）を検体とした。染色方法、および解析方法（検体の細胞数、反応時間、反応温度、溶血試薬、溶血のタイミング、最終浮遊液、解析機器、解析方法）については、各検査施設より資料として提出していただいたが、通常行っている検体処理法、および解析方法は施設によって異なっていた。また、各検査施設より報告されたCD3、CD10、CD13、CD19、細胞質内CD79各抗原の陽性率の比較検討では、CD3、CD19の陽性率に関しては、各施設の解析結果に大きな差異は認められなかった。しかし、検体MW-2のCD10陽性率（0.3%?68.9%）、検体MW-4のCD13陽性率（15.1%?67.1%）、および検体MW-2の細胞質内CD79陽性率（0.4%?42.8%）においては、明らかな差異が認められた。今後は、検体数を増やすとともに、各施設のデータ（リストモードデータ）を集積し、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委員により統一した方法での解析を行い、各施設での解析結果と比較検討する予定である。さらに、その結果を踏まえて、わが国における小児造血器腫瘍の免疫学的診断（マーカー解析）のための検査・データ解析法を統一化したいと考えている。

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効果的な治療法を選択することが可能となる。本分担研究（小児造血器腫瘍の免疫学的診断の標準化に関する研究）では、初発時における治療法の選択に必要な小児造血器腫瘍の免疫学的診断の制度の向上とその標準化を行う

ことを最終的な研究目的としている。平成17年度においては、免疫学的診断検査の外部精度管理を開始し、その結果の一部を解析した。

B. 研究方法

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て、造血器腫瘍のマーカー解析の外部精度管理方法を以下のように決めた。

(対象施設) 外部精度管理実施対象施設としては、造血器腫瘍のマーカー解析を実施している中央診断施設4施設(愛知医科大学小児科、大阪大学医学部小児科、国立成育医療センター研究所発生・分化研究部、三重大学医学部小児科)、および臨床検査会社3社(エスアールエル/SRL、ビー・エム・エル/BML、三菱化学ビーシーエル)の計7施設とした。

(解析パネル) CD45 Gating法による3カラー解析パネル(表1)を作成し、統一された標識抗体クローン(ロット番号も統一)を用いて、外部精度管理を実施する。

表1. 外部精度管理に使用する3カラー解析パネル

細胞表面抗原		
FL1	FL2	FL3
CD10	CD33	CD45
CD19	CD13	CD45
κ	λ	CD45
CD34	HLA-DR	CD45
CD41	GlyA	CD45
CD7	CD56	CD45
CD3	CD20	CD45
細胞質内抗原		
FL1	FL2	FL3
TdT	MPO	CD45
CD3	CD79a	CD45

(解析検体) 外部精度管理に用いる解析検体には初発時の白血病患児末梢血(芽球陽性)を用い、検体採取協力施設において採取された検体を上記の外部精度管理実施対象7施設へ時間指定宅配便で送付していただくこととした。実施にあたっては、必要に応じて各検体採取協力施設の倫理委員会の承認を受けた。

(解析方法) 染色方法、および解析方法は各

検査実施施設の通常の方法を用いるが、その詳細(検体の細胞数、反応時間、反応温度、溶血試薬、溶血のタイミング、最終浮遊液、解析機器、各施設での解析方法による解析データ等)を資料として提出していただき、比較検討する。また、各施設のデータ(リストモードデータ)を集積し、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委員により統一した方法での解析も同時に行い、各施設での解析結果との比較検討も実施することとした。

C. 研究結果

平成17年度においては、5検体(MW-1からMW-5)が外部精度管理用検体として、7つの対象施設に送付され、免疫学的診断が行われた。

① 検体処理方法について

外部精度管理実施時の検体処理方法の詳細を比較検討するために、検体の細胞数、反応時間、反応温度、溶血試薬、溶血のタイミング、最終浮遊液、解析機器について、各検査施設より資料を提出していただいた。表2に示すように、通常行っている解析方法は各施設によって異なっていた。

表2. 各検査施設における解析方法

施設	サンプル量	反応温度時間
A	細胞数で 5×10^5 個	4℃・15分
B	-	-
C	希釈100 μ l	氷上・30分
D	100 μ l	20℃・15分

E	希釈50 μ l	4 $^{\circ}$ C・30分
F	80 μ l	4 $^{\circ}$ C・30分
G	50 μ l	22 $^{\circ}$ C・30分

において、明らかな差異が認められた。

表3. 各検査施設の解析結果（検査施設より報告された各抗原の陽性パーセントを示す）
(CD3)

施設	溶血試薬	溶血タイミング
A	NH ₄ Cl系自家製	反応前
B	-	-
C	不明自家製	反応後
D	NH ₄ Cl系自家製	反応前
E	不明自家製	反応前
F	NH ₄ Cl系自家製	反応前
G	BD社Lysing sol	反応後

施設	MW-1	MW-2	MW-3	MW-4	MW-5
A	5.5	93.4	0.8	1.8	2.6
B	4.1	90.0	0.6	1.4	0.9
C	1.2	92.5	0.2	0.2	0.0
D	0.9	68.0	0.4	0.4	0.1
E	2.0	96.7	0.1	1.9	0.2
F	0.1	90.6	0.0	0.3	0.5
G	1.0	94.5	0.1	1.3	0.7

施設	最終浮遊液	解析機器
A	1%パラホルム アルデヒドPBS	FACS Calibur
B	-	-
C	アイソフロー	FC-500
D	PBS	FACS Calibur
E	PBS	FACS Calibur
F	Cell Fix	FACS Calibur
G	FACSフロー	FACSscan

(CD10)

施設	MW-1	MW-2	MW-3	MW-4	MW-5
A	98.0	22.7	0.4	1.9	99.6
B	95.4	39.9	0.1	10.7	99.3
C	96.2	18.6	0.0	16.9	99.4
D	92.2	18.4	0.0	8.2	99.6
E	98.7	2.9	0.1	2.6	98.2
F	99.4	0.3	0.0	17.6	99.0
G	96.3	68.9	0.1	14.3	98.6

② 各検査施設における解析結果の比較検討

各検査施設より報告されたCD3、CD10、CD13、CD19、細胞質内CD79各抗原の陽性率を比較した。表3に示すように、CD3、CD19の陽性率に関しては、各施設の解析結果に大きな差異は認められなかった。しかし、検体MW-2のCD10陽性率（0.3%?68.9%）、検体MW-4のCD13陽性率（15.1%?67.1%）、および検体MW-2の細胞質内CD79陽性率（0.4%?42.8%）に

(CD13)

施設	MW-1	MW-2	MW-3	MW-4	MW-5
A	9.3	10.1	3.9	63.7	27.7
B	13.1	11.4	1.8	63.0	20.9
C	1.1	0.8	0.1	15.1	0.1
D	6.2	27.4	0.4	35.3	3.1
E	5.3	1.3	0.7	60.8	6.1
F	1.5	0.0	0.6	28.9	2.0
G	2.0	4.2	3.0	67.1	19.7

(CD19)

施設	MW-1	MW-2	MW-3	MW-4	MW-5
A	92.7	1.8	99.6	96.6	99.0
B	75.8	1.2	99.4	99.7	98.8
C	92.1	0.3	99.7	98.7	99.1
D	74.4	1.5	99.5	86.2	97.7
E	95.7	1.3	99.8	97.1	93.9
F	76.1	0.6	99.5	95.0	95.7
G	90.3	0.6	99.7	96.9	93.0

(細胞質内CD79)

施設	MW-1	MW-2	MW-3	MW-4	MW-5
A	99.7	42.8	97.7	92.8	100.0
B	93.3	21.5	98.3	88.3	98.9
C	93.5	30.1	95.4	86.4	95.1
D	94.1	1.2	96.2	93.8	98.8
E	99.8	12.3	99.6	97.0	99.2
F	96.0	3.5	83.1	57.8	92.1
G	93.5	0.4	95.6	81.9	97.9

D. 考察

小児造血器腫瘍における免疫学的診断標準化にむけて、主な免疫学的診断実施施設を対象として、平成17年度により外部精度管理を開始した。現在までに5検体の解析が実施されたが、検体の処理方法、および施設より報告された解析データの一部に差異が認められた。平成18年度にかけて、さらに5検体（合計10検体）の解析を行い、精度管理の最終結果とする予定にしている。

データ解析に関しては、フローサイト

メーター用リストモードデータとして各検体の解析データを回収し、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委員により、統一した解析方法により解析を行いたい。各検査施設における解析方法、あるいは各検査施設より報告されたデータとの差異の有無を検証し、データ解析方法の標準化を実施するにあたっての資料にしたいと考える。

検体の処理方法については、統一することが望まれるが、各検査施設の事情も考慮する必要がある。しかし、今回の外部精度管理結果の検討を進める中で、特に解析データに大きな影響を与える項目に関しては統一する必要があると思われる。

E. 結論

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、平成17年度より外部精度管理を開始した。その結果を踏まえて、わが国における小児造血器腫瘍の免疫学的診断（マーカー解析）のための検査・データ解析法を統一化する方向で今後とも努力していきたい。さらに、免疫学的診断基準に関しては、各CD抗原の陽性陰性の判定の標準化、および各種白血病の免疫学的診断基準の作成を今後実施したいと考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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

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 院長

研究趣旨 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、標準的分子・細胞遺伝学的診断の確立は重要な課題である。これまでに染色体・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行ってきた。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った。今年度は、昨年度立ち上げた微小残存病変(minimal residual disease, MRD)の専門家によるMRD 小ワーキンググループにより、MRD の造血器腫瘍の診療と治療への応用について検討を行い、ガイドラインを作成した。また、これからはじまる急性骨髄性白血病(AML)のAML06プロトコールでは初診時のキメラ遺伝子等の中央診断を予定している。

研究協力者(MRD 小ワーキンググループ)

横田昇平(京都府立医科大学)

滝 智彦(京都府立医科大学)

前澤千早(岩手医科大学)

高橋浩之(済生会横浜市南部病院)

堀 寿成(愛知医科大学)

宮村耕一(名古屋第一赤十字病院)

出口隆生(三重大学医学部)

清河信敬(国立成育医療センター研究所)

研究協力者

横澤敏也(国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センター)

断の基準を検討し、ガイドラインの作成を行ってきた。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。今年度は、昨年立ち上がった微小残存病変(minimal residual disease, MRD)の専門家によりMRD 小ワーキンググループによるMRD の造血器腫瘍の診療と治療への応用について検討を行い、ガイドラインを作成する。また、次に始まるAML06プロトコールのキメラ遺伝子等の中央診断のための整備を行う。

B. 研究方法

本邦の実際にMRDの研究に携わっている専門家9名によりMRD 小ワーキンググループを編成し、MRD の診療と治療への応用について検討を行い、MRD のガイドラインの作成を行った。また、AML06プロトコールのキメラ遺伝子の中央診断の整備を行った。

C. 研究結果

MRD 小ワーキンググループ会議ではIgH,

A. 研究目的

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予測に重要であり、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な課題である。これまでに染色体・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

kappa, lambda, T細胞受容体(TCR)等の遺伝子解析によるMRDについて成功率、MRD陽性による層別化の意義等につき検討が行われた。免疫学的方法(flow cytometry, FCM)による解析では、実際に本邦ではどうするかを検討を行った。また、これらにつきガイドラインの作成を行った。

これから始まるAML06において、キメラ遺伝子の中央診断のため、キメラ陽性のコントロールcDNAを集め、プライマーを作成し、整備を行った。層別化に用いるFLT3 internal tandem duplication 検索の準備も行っている。

D. 考察

欧米ではMRDが白血病の治療上重要な位置を占めており、本邦でもJPLSGにおいてAMLのプロトコールが近々開始されるので、キメラ遺伝子を用いたMRDの実用化の検討が必要である。急性リンパ性白血病(ALL)はしばらくは各グループで治療が行われるが、症例の少ないT-ALLについては合同で行う話も出ており、ALLにおいてもMRDの実用化に向けて検討する必要がある。

遺伝子を用いたMRDでは、検索をする施設、用いるプローブの決定、費用をどうするか等いくつかの問題の検討が必要がある。

免疫学的方法による解析では、費用が安価である利点があるが、検体の送付方法、用いる抗体の選択、ゲーティングの仕方、感度の問題等の検討が必要である。

AMLでmultiplex real-time PCRを可能な限り初診時に中央で行う方向で検討を開始し、国立病院機構名古屋医療センター臨床研究センターで行う予定である。キメラ遺伝子を用いたMRDについても検討中である。さらに業者も含めた精度管理の検討も必要と思われる。

る。

E. 結論

MRD 小ワーキンググループを立ち上げ、MRDの診療と治療への応用について検討を開始し、ガイドラインの作成を行った。これからはじまるAML06プロトコールでは初診時のキメラ遺伝子および染色体分析結果の中央診断を予定している。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taki T, Akiyama M, Saito S, Ono R, Taniwaki M, Kato Y, Yuza Y, Eto Y, Hayashi Y. The MYO1F, unconventional myosin type 1F, gene is fused to MLL in infant acute monocytic leukemia with a complex translocation involving chromosomes 7, 11, 19 and 22. *Oncogene* 24:5191-5197, 2005
- 2) Ono R, Nakajima H, Ozaki K, Kumagai H, Kawashima T, Taki T, Kitamura T, Hayashi Y, Nosaka T. Dimerization of MLL fusion proteins and FLT3 activation synergize to induce multiple-lineage leukemogenesis. *J Clin Invest* 115:919-29, 2005
- 3) Lee SY, Kumano K, Masuda S, Hangaishi A, Takita J, Nakazaki K, Kurokawa M, Hayashi Y, Ogawa S, Chiba S. Mutations of the Notch1 gene in T-cell acute lymphoblastic leukemia: analysis in adults and children. *Leukemia* 19:1841-1843, 2005
- 4) Wada T, Toma T, Okamoto H, Kasahara Y, Koizumi S, Agematsu K, Kimura H,

- Shimada A, Hayashi Y, Kato M, Yachie A. Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with AG1-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 106: 2099-2101, 2005
- 5) Igarashi S, Manabe A, Ohara A, Kumagai M, Saito T, Okimoto Y, Kamijo T, Isoyama K, Kajiwara M, Sotomatsu M, Sugita K, Sugita K, Maeda M, Yabe H, Kinoshita A, Kaneko T, Hayashi Y, Ikuta K, Hanada R, Tsuchida M. No advantage of dexamethasone over prednisolone for the outcome of standard- and intermediate-risk childhood acute lymphoblastic leukemia in the Tokyo Children's Cancer Study Group L95-14 protocol. *J Clin Oncol* 23:6489-6498, 2005
- 6) Kawaguchi H, Taketani T, Hongo T, Park MJ, Koh K, Ida K, Kobayashi M, Takita J, Taki T, Yoshino H, Bessho F, Hayashi Y. In vitro drug resistance to imatinib and mutation of ABL gene in childhood Ph+ acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Lymphoma* 46:273-276, 2005
- 7) Hiwatari M, Taki T, Tsuchida M, Hanada R, Hongo T, Sako M, Hayashi Y. Novel missense mutations in the tyrosine kinase domain of the platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFRA) gene in childhood acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22) or inv(16)(p13q22). *Leukemia* 19: 476-477, 2005
- 8) Ono R, Ihara M, Nakajima H, Ozaki K, Kataoka-Fujiwara Y, Taki T, Nagata K, Inagaki M, Yoshida N, Kitamura T, Hayashi Y, Kinoshita M, Nosaka T. Disruption of Sept6, a fusion partner gene of Mixed Lineage Leukemia (MLL), does not affect the ontogeny, leukemogenesis induced by MLL-SEPT6, or the phenotype induced by the loss of Sept4. *Mol Cell Biol* 25: 10965-1078, 2005
- 9) Urano A, Endoh M, Wada T, Morikawa Y, Itoh M, Kataoka Y, Taki T, Akazawa H, Nakajima H, Komuro I, Yoshida N, Hayashi Y, Handa H, Kitamura T, Nosaka T. Infertility with defective spermiogenesis in mice lacking AF5q31, the target of chromosomal translocation in human infant leukemia. *Mol Cell Biol* 25:6834-6845, 2005
- 10) Kuroiwa M, Hiwatari M, Hirato J, Suzuki N, Tsuchida Y, Shimada A, Shitara T, Taki T, Hayashi Y. Advanced-stage gastrointestinal stromal tumor treated with imatinib in a 12-year-old girl with a unique mutation of PDGFRA. *J Pediatr Surg* 40:1798-1801, 2005
- 11) Tsurusawa M, Manabe A, Hayashi Y, Akiyama Y, Kigasawa H, Inada H, Noguchi Y, Sawai N, Kobayashi R, Nagatoshi Y, Kawakami K, Kojima S, Nakahata T; MDS committee of the Japanese Society of Pediatric Hematology. Therapy-related myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 36 patients in Japan. *Leuk Res* 29: 625-32, 2005
- 12) Ono R, Nosaka T, Hayashi Y. Roles of a trithorax group gene, MLL, in hematopoiesis. *Int J Hematol.* 81:288-293, 2005
- 13) Chen YY, Takita J, Tanaka K, Ida K, Koh K, Igarashi T, Hanada R, Kikuchi A, Tanaka

- Y, Toyoda Y, Hayashi Y. Aberrations of the *CHK2* gene are rare in pediatric solid tumors. *Int J Mol Med* 16: 85-91, 2005
- 14) Kato M, Yamaguchi T, Tachibana A, Suzuki M, Izumi T, Maruyama K, Hayashi Y, Kimura H. An atypical protein kinase C, PKC zeta, regulates human eosinophil effector functions. *Immunology*. 116:193-202, 2005
- 15) Shimada A, Taki T, Tabuchi K, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I, Hayashi Y. *KIT* mutations, and not *FLT3* internal tandem duplication, are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia with t(8;21): a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Blood* 107:1806-9, 2006
- 16) Chen Y, Takita J, Hiwatari M, Igarashi T, Hanada R, Kikuchi A, Hongo T, Taki T, Ogasawara M, Shimada A, Hayashi Y. Mutations of the *PTPN11* and *RAS* genes in rhabdomyosarcoma and pediatric hematological malignancies. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006 (in press)
2. 学会発表
- 1)高橋浩之、生田孝一郎、小原明、真部 淳、外松学、熊谷昌明、菊池陽、磯山恵一、上條岳彦、梶原道子、杉田憲一、金子隆、前田美穂、木下明俊、杉田完爾、林 泰秀、花田良二、土田昌宏: 小児 ALL の TCR, IgH 再構成をターゲットとした MRD の検出と予後—TCCSG・L99-15 研究における後方視的検討—。第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会・合同総会。横浜、2005 年 9 月 19 日
- 2)滝智彦、林泰秀、竹谷健、迫正廣、谷脇雅史:t(12;13)(q13;q14)を有する myeloid/NK 前駆細胞型急性白血病における *ETV6-TTL* 融合遺伝子の解析。第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会・合同総会。横浜、2005 年 9 月 19 日
- 3)嶋田明、林 泰秀、滝智彦、田淵健、花田良二、多和昭雄、土田昌弘、堀部敬三、月本一郎: *FLT3* 遺伝子と *MLL* 遺伝子の tandem duplication は小児急性骨髄性白血病の独立した予後因子である。第 67 回日本血液学会総会・第 47 回日本臨床血液学会総会・合同総会。横浜、2005 年 9 月 19 日
- 4)Akira Shimada, Tomohiko Taki, Ichiro Tsukimoto, Ken Tabuchi, Ryoji Hanada, Akio Tawa, Masahiro Tsuchida, Keizo Horibe, Souichi Adachi, Yasuhide Hayashi. C-KIT mutation may be a novel prognostic factor in t(8;21)-acute myeloid leukemia in children. The 96th Annual Meeting of American Association Cancer Research (AACR). Los Angeles, CA, USA. 4 月 16 日~19 日、2005
- 5)Akira Shimada, Tomohiko Taki, Ken Tabuchi, Takeshi Taketani, Ryoji Hanada, Akio Tawa, Masahiro Tsuchida, Keizo Horibe, Ichiro Tsukimoto, Yasuhide Hayashi. Tandem duplications of the *FLT3* and *MLL* are independent poor prognostic factors in pediatric acute myeloid leukemia. AML99 Study in Japan. The 47th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH) Atlanta, USA 12 月 10 日~13 日、2005
- 6)Masahiro Saito, Yasuhide Hayashi, Katsuyoshi Koh, Hiroyuki Takahashi, Takashi Fukushima, Setuo Ohta, Atsushi Manabe, Kenichi Sugita, Kanji Sugita,

Hiromasa Yabe, Akira Kikuchi, Yasushi Noguchi, Koichirou Ikuta, Akira Ohara, Ryoji Hanada, Masahiro Tsuchida. Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) ALL committee, Tokyo, Japan. Improvement of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) with 11q23 translocation or MLL rearrangements by stem cell transplantation: a report from the Tokyo Children's Cancer Study Group. The 47th Annual Meeting of American Society of Hematology (ASH). Atlanta, USA. 12月10日～13日、2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得
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（がん臨床研究事業）

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臨床研究推進の基盤となる病理中央診断を本年度から本格的に実施した。本年度は成熟 B 細胞型リンパ腫（バーキットリンパ腫およびびまん性大細胞型 B リンパ腫等）、リンパ芽球型リンパ腫（T 細胞性および B 細胞性）ならびに未分化大細胞型リンパ腫の 4 種類の臨床試験が稼動したため、登録症例も昨年度に比較すると大幅に増加した。平成 17 年 4 月から平成 18 年 2 月までの 11 ヶ月に中央診断依頼があった症例数は 97 例であった。うち 96 例について病理判定委員会で検討し、2 例（判定不能 1 例、要再検討 1 例）を除き最終診断を確定した。バーキットリンパ腫とびまん性大細胞型 B リンパ腫の鑑別は病理判定委員の間で意見が分かれることもあるが、FISH による MYC 遺伝子転座確認の情報が有用な場合もあった。本研究では余剰検体の保存も重要と位置付けているものの、研究推進に有用な凍結検体の保存は十分とは言えない状況であり、より積極的な取り組みが求められる。

研究協力者

大島孝一 久留米大学医学部
 田丸淳一 埼玉医科大学総合医療センター
 中川温子 国立成育医療センター
 中村栄男 名古屋大学医学部
 中峯寛和 奈良県立医科大学
 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

た基準を採用した（表 1）。

表 1 鑑別診断のための免疫染色項目

病型	必須マーカー	追加マーカー
Mature B BL DLBCL	CD20 CD79a CD3 TdT MIB1	CD10 BCL2 BCL6 Mum1 (IRF4) EBER1 (ISH)
LBL T-LBL B-LBL	CD20 CD79a CD3 CD43 TdT MPO	CD56
ALCL	CD30 ALK1 and/or ALKc CD2,3,5 CD43 EMA Perforin and/or Granzyme B	CD15 CD79a, CD20 CD45RO CD56 LMP-1 BCL-2 EBER1(ISH)

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

1) 病理診断基準

小児悪性リンパ腫の各病型についての診断基準は WHO 分類に準拠することを基本とした。ただし、ALCL についてはヨーロッパの研究グループ内での中央病理医会議での検討結果をふまえ

なお、免疫染色項目は昨年度までの決定に従った。なお、臨床試験の対象となる病型は、バーキットリンパ腫(Burkitt lymphoma, BL)、びまん性大細胞型 B リンパ腫(Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)、縦隔びまん性大細胞