

癌抑制遺伝子 (p15, p16, DAP kinase, RAR β , E-cadherin) のメチル化を解析したところ、11人中8名(72.7%)において1つ以上の遺伝子にメチル化の亢進が検出された。非MDS群の7名中4名(57.1%)に対して、MDS群4名全例にメチル化亢進が見られ、特にRAEB1例では3遺伝子にわたるメチル化が見られた。

D. 考察

1. 我々の症例研究は、FAにおいて復帰変異を持つ細胞の増殖が骨髄系細胞に選択的に起こる場合があることを世界で初めて示した。このような体細胞モザイクの診断は、これまでのようなPBLの解析だけでは見逃される。したがって、疑わしい症例では、直接に骨髄系細胞の遺伝子解析を行うことが必要である。

2. 我々の結果は、がん抑制遺伝子のメチル化異常がFAの骨髄細胞で高頻度に見られることを明らかにした。これがFAにおける骨髄異形成症候群や白血病の発症に関与する可能性が考えられ、さらに検討する価値があると考えられる。FAにおいてなぜメチル化異常が起きるのか、その機構は今後解明の必要がある。

E. 結論

FAの骨髄不全の軽症化や悪性化に、体細胞モザイクやがん抑制遺伝子のメチル化異常が関与すると考えられる。これらの解析は、FA症

例の予後判定や治療方針の決定に重要な指針を与える可能性があり、さらなる研究が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hamanoue S, Yagasaki H, Tsuruta T, Oda T, Yabe H, Yabe M, Yamashita T: Myeloid lineage-selective growth of revertant cells in Fanconi anemia. *Br J Haematol* 132:630-635, 2006

2. 学会発表

1. 小田司、早野俊哉、高橋信弘、山下孝之: HSP90/HSP70/CHIP シャペロン・ユビキチンリガーゼ系によるFanconi貧血分子経路の制御. 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会、2005年9月17日、横浜(臨床血液46:739, 2005)

2. 浜之上聡、矢部普正、矢部みはる、山下孝之: ファンconi貧血における癌抑制遺伝子のメチル化の亢進. 第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会・合同総会、2005年9月19日、横浜(臨床血液46:814, 2005)

輸血後鉄過剰症の全国実態調査（一次調査）
および医師の意識アンケート調査

研究協力者 高德 正昭（自治医科大学・内科学講座血液学部門・講師）

研究要旨

特発性造血障害を基礎疾患とする輸血後鉄過剰症の患者は少なくないが、その実態は十分に知られていない。今回本研究班を中心とした全国の主要医療機関 173 施設に対し、輸血後鉄過剰症一次調査を依頼し、72 施設から輸血依存症 716 例の報告を受けた。現在、二次調査を行い 290 例のデータを回収し、解析・データベース作成を行っているところである。一次調査と同時に行った医師の意識調査では、大多数が血清フェリチン値で鉄過剰症の診断やモニタリングを行っていた。デスフェラル用いての除鉄療法は 2/3 施設で行っており、対象疾患は再生不良性貧血、慢性赤芽球癆、不応性貧血、骨髄線維症のすべてが対象となっていた。しかしどの施設においても除鉄効果を上げるほどのデスフェラル頻回投与は実施されておらず、経口除鉄剤の登場を期待する声が多く寄せられていた。

A.研究目的

輸血による鉄過剰症に対する全国規模の調査はこれまで実施されることがなく、その実態は不明である。今回大規模な実態調査を実施し、診断の統一（診断基準の確立）や、治除鉄療法の標準化、さらに今後登場する経口鉄キレート剤の使用指針作成などの基になるデータベース作成を目的とした。

剰症の評価など。

調査期間：一次調査 平成 17 年 7 月～9 月 30 日、二次調査 平成 17 年 10 月 1 日～12 月 31 日（現在期間延長して回収中）。
（倫理面への配慮）

患者個人情報と切り離れた連結不能の疫学調査として、アンケートを実施した。

また、本学生命倫理審査委員会にて本研究計画は承認後実施した。

B.研究方法

調査対象：再生不良性貧血、慢性赤芽球癆、不応性貧血、特発性骨髄線維症などの基礎疾患で、赤血球輸血が月に 2 単位以上の輸血が 6 ヶ月以上継続した症例。

調査施設：全国の主要血液内科 173 施設。

調査内容：一次調査（鉄過剰症患者の有無）、および意識調査アンケート。二次調査（患者個別調査）：基礎疾患、輸血回数、血清フェリチン値、除鉄薬の使用の有無、鉄過

C.研究結果

一次調査の結果：173 施設に依頼し、72 施設から回答があった（回収率 41.6%）。輸血依存患者総数は 716 例（0-38 例/施設）で、うち 398 例は二次調査可能と報告があった。意識アンケート調査の結果（施設代表 83 名）：質問 1 鉄過剰症の診断に何をを用いる？血清フェリチン値 80 名（96.4%）、輸血の累積単位数 37 名（44.6）、肝 MRI 32 名（38.6%）。質問 2 鉄過剰症のモニターとし

て何を？ 血清フェリチン値 79名(97.5%)、肝MRI 16名(38.6%)。質問3 鉄過剰症患者へのデスフェラル治療をする？ はい 55名(66.3%)、いいえ 28名(33.7%)。質問4 除鉄療法を開始する時期は？ 血清フェリチン値 2500ng/ml以上 38名(73.1%)、赤血球輸血累積30単位以上 16名(30.8%)、長期輸血が見込まれる例は最初から 8名(15.4%)。質問5 デスフェラルを使う基礎疾患？ 再生不良性貧血 51名(92.7%)、低リスクMDS 42名(76.4%)、慢性赤芽球癆 26名(47.3%)、骨髄線維症 26名(47.3%)、中等度リスクMDS 25名(45.5%)、高リスクMDS 12名(21.8%)。質問6 デスフェラルを用いる年齢は？ 70歳まで 6名(11.1%)、80歳まで 8名(14.8%)、年齢制限無し 40名(74.1%)。質問7 デスフェラルの投与間隔は？ 輸血のたびに 28名(50.9%)、月に2回程度 20名(36.4%)、月に1回程度 9名(16.4%)。質問8 デスフェラルの投与方法？ 点滴静注 44名(80%)、皮下注 10名(18.2%)、ワンショット静注 5名(16.4%)。質問9 長期的な輸血の場合に維持するヘモグロビン値は？ 6g/dl程度 44名(53.7%)、7g/dl程度 31名(37.8%)、8-10g/dl程度 1名(1.2%)。

D. 考察

今回、輸血後鉄過剰症を対象にした全国

調査を初めて実施しが、全国の主要血液内科の協力を得ることが出来た。医療機関の規模にもよるが、ほとんどの施設で複数の患者をみている。アンケートから、鉄過剰症の診断やモニタリングには、血清フェリチン値や肝MRIを用いている。一方で教科書的な肝生検を行っているとした施設はなかった。デスフェラルの使用は2/3の施設で使用しているが、その使用法は輸血のたびに行う程度で、除鉄の有効性は疑問点が残った。これは注射製剤で頻回投与が困難である点が上げられる。今後経口除鉄剤の登場が期待される。

E. 結論

全国規模の輸血後鉄過剰症の実態調査を開始し、1都2府39県の医療機関から輸血依存症716例の報告を得た。現在そのうちの398例に対し、二次調査を実施、解析している。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|---------------------|-----|---------|------|
| 小澤敬也 | 難治性貧血の病態と治療 -最新のシンポ- | 最新医学 | 61 | 353-360 | 2006 |
| Nagashima, T., Muroi, K., Kawano- Yamamoto, C., Miyoshi, T., Ohmine, K., Toshima, M., Miyazato, A., Takatoku, M., Nagai, T., Mori, M., Komatsu, N., and <u>Ozawa, K.</u> | Autologous gamete cryopreservation before hemopoietic stem cell transplantation. | Med. Sci. Monit | 11 | CR91-94 | 2005 |
| Sasaki, K., Nagao, Y., Kitano, Y., Hasegawa, H., Shibata, H., Takatoku, M., Hayashi, H., <u>Ozawa,</u> <u>K.</u> , and Hanazono, Y | Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. | Transplantation | 79 | 32-37 | 2005 |
| Sasaki, K., Inoue, M., Shibata, H., Ueda, Y., Muramatsu, S., Okada, T., Hasegawa, M., <u>Ozawa,</u> <u>K.</u> , and Hanazono, Y. | Efficient and stable Sendai virus-mediated gene transfer into primate embryonic stem cells with pluripotency preserved. | Gene Ther. | 12 | 203-210 | 2005 |
| Ito, Y., Ohyashiki, K., Hirai, H., Ogawa, S., Mitani, K., Hotta, T., Bessho, M., Naoe, T., Mizoguchi, H., <u>Uchiyama, T.</u> , Omine, M. | Assessment of the international prognostic scoring system for determining chemotherapeutic indications in myelodysplastic syndrome: Japanese retrospective multicenter study. | Int. J. Hematol. | 82 | 236-242 | 2005 |
| Aisa, Y., Mori, T., Kudo, M., Yashima, T., Kondo, S., Yokkoyama, A., Ikeda, Y., and <u>Okamoto, S.</u> | Oral cryotherapy for the prevention of high-dose melphalan-induced stomatitis in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. | Support Care Cancer | 13 | 266-269 | 2005 |
| Matsushita, M., Yamazaki, R., Ikeda, H., Mori, T., Sumimoto, H., Fujita, T., <u>Okamoto,</u> <u>S.</u> , Ikeda, Y., and Kawakami, Y. | Possible involvement of allogeneic antigens recognised by donor-derived CD4+ cytotoxic T cells in selective GVL effects after stem cell | Br. J. Haematol. | 132 | 56-65 | 2006 |

| | | | | | |
|--|---|---------------------|--------|-----------|------|
| | transplantation of patients with haematological malignancy. | | | | |
| Kashiwagi, H., Shiraga, M., Kato, H., Kamae, T., Yamamoto, N., Tadokoro, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y., and <u>Kanakura, Y.</u> | Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphorin 3A. | Blood | 106 | 913-921 | 2005 |
| Shiraga, M., Miyata, S., Kato, H., Kashiwagi, H., Honda, S., Kurata, Y., Tomiyama, Y., and <u>Kanakura, Y.</u> | Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. | J. Thromb. Haemost. | 3 | 2315-2323 | 2005 |
| Ishida, N., Oritani, K., Shiraga, M., Yoshida, H., Kawamoto, S., Ujiie, H., Masaie, H., Ichii, M., Tomiyama, Y., and <u>Kanakura, Y.</u> | Differential effects of a novel IFN-zeta/limitin and IFN-alpha on signals for Daxx induction and Crk phosphorylation that couple with growth control of megakaryocytes. | Exp. Hematol. | 33 | 495-503 | 2005 |
| Tanaka, H., Matsumura, I., and <u>Kanakura, Y.</u> | Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. | J. Biol. Sci. | 5 | 50-60 | 2005 |
| Iwanaga, M., Soda, M., Koba, T., Yamamura, M., Atogami, S., Momita, S., Joh, T., Yoshida, Y., and <u>Tomonaga, M.</u> | Myelodysplastic Syndromes in Atomic Bomb Survivors in Nagasaki : A Preliminary Analysis. | Acta Med. Nagasaki | 50(3) | 97-100 | 2005 |
| Matsuda, A., Ulrich Germing, Jinnai, I., Misumi, M., Andrea Kuendgen, Sabine Knipp, Manuel Aivado, Iwanaga, M., Miyazaki, Y., Tsushima, H., Sakai, M., Bessho, M., and <u>Tomonaga, M.</u> | Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. | Blood | 106(8) | 2633-2640 | 2005 |
| <u>Nakao, S.</u> , Feng, X., and Sugimori, C. | Immune pathophysiology of aplastic anemia. | Int. J. Hematol. | 82 | 196-200 | 2005 |
| Takami, A., Asakura, H., Takamatsu, H., Yamazaki, H., Arahata, M., Hayashi, T., Shibayama, M., Orito, M., Yoshida, | Isolated hyperkalemia associated with cyclosporine administration in allogeneic stem cell transplantation for renal cell carcinoma. | Int. J. Hematol. | 81 | 159-161 | 2005 |

| | | | | | |
|--|---|------------------------|------|------------|------|
| T., Namiki, M., and Nakao, S. | | | | | |
| Sugimori, C., Chuhjo, T., Feng, X., Yamazaki, H., Takami, A., Teramura, M., Mizoguchi, H., Omine, M., and Nakao, S. | Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. | Blood | 107 | 1308-1314 | 2006 |
| Yoshimoto, M., Heike, T., Shiota, M., Kobayashi, H., Umeda, K., and Nakahata, T. | Two different role of purified Cd45+ hematopoietic stem cells after transplantation in muscles. | Stem Cells | 23 | 610-618 | 2005 |
| Ishikawa, F., Yasukawa, M., Lyons, B., Yoshida, S., Miyamoto, T., Yoshimoto, G., Watanabe, T., Akashi, K., Shultz, LD., and Harada, M. | Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ hain ^{nuj} mice. | Blood | 106 | 1565-15732 | 2005 |
| Kakumitsu, H., Kamezaki, K., Shimoda, K., Karube, K., Haro, T., Numata, A., Shide, K., Matsuda, T., Oshima, K., and Harada, M. | Transgenic mice overexpressing murine thrombopoietin develop myelofibrosis and osteosclerosis. | Leuk. Res. | 29 | 761-769 | 2005 |
| Koda, M., Murate, T., Wang, S., Ohguchi, K., Sobue, S., Ikeda, M., Koizumi-T, K., Igarashi, Y., Nozawa, Y., and Banno, Y. | Sphingosine kinase 1 is involved in dibutyryl cyclic AMP-induced granulocytic differentiation through the upregulation of extracellllular signal-regulated kinase, but not p38 kinase, in HL60 cells. | Biochim. Biophys. Acta | 1733 | 101-110 | 2005 |
| Mitsuma, A., Asano, H., Kinoshita, T., Murate, T., Saito, H., Stamatoyannopoulos, G., and Naoe, T. | Transcriptional regulation of FKLf-2 (KLF13) gene in erythroid cells | Biochim. Biophys. Acta | 1727 | 125-133 | 2005 |

V. 研究成果の刊行物・別刷

アプローチ

難治性貧血の病態と治療

—最近の進歩—

小澤 敬也*

要 旨

本特集への導入部分として、骨髄不全症候群の病態と治療に関する最近の話題を紹介した。特に、再生不良性貧血と不応性貧血 (MDS-RA) の境界領域の病態、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) におけるクローン性造血の拡大機序、特発性骨髄線維症での JAK2 の V617F 変異について述べた。新規治療薬としては、骨髄異形成症候群 (MDS) に対する lenalidomide やメチル化阻害薬、PNH に対する抗体医薬 (eculizumab)、輸血後鉄過剰症に対する経口鉄キレート剤などを取り上げた。

はじめに

難治性貧血としての特発性造血障害疾患の中には、骨髄不全症候群 (bone marrow failure syndromes) や慢性溶血性貧血などが含まれる。前者の骨髄不全症候群の中には、再生不良性貧血、慢性赤芽球癆 (PRCA)、不応性貧血 (RA) を含む骨髄異形成症候群 (MDS)、発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH)、特発性骨髄線維症などが含まれる (図1)。慢性的後天性溶血性貧血としては、自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) があり、PNH はこちらの範疇にも入ってくる。

クローン性造血による骨髄過形成を認める MDS-RA 以外は、サンプルの得られにくさから分子生物学的研究が比較的難しく、アプローチしにくい疾患である。しかしながら、それぞれの分子病態が次第に明らかにされつつあり、新規治療薬の登場もこのところ大きな話題となってきている。

そこで本稿 (アプローチ) では、特発性造血障害疾患に関する最近の研究の動向と新規治療薬の開発状況を簡単に紹介することとする。

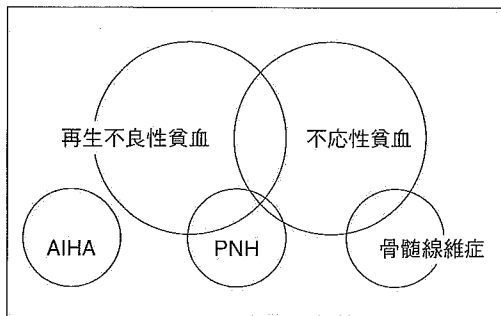
再生不良性貧血の病態

再生不良性貧血は代表的な骨髄不全症候群の1つであり、骨髄低形成を伴った汎血球減少を示す疾患で、教科書的には「造血幹細胞の疾患」(stem cell disorder) として位置づけられている。ただし、慢性的にゆっくり進行するケースから急激に重症の再生不良性貧

* 自治医科大学医学部 内科学講座血液学部門、
輸血・細胞移植部、分子病態治療研究センター
遺伝子治療研究部 教授

キーワード：骨髄不全症候群、再生不良性貧血、
不応性貧血、
発作性夜間ヘモグロビン尿症
特発性骨髄線維症

図1 特発性造血障害疾患の相互関係の模式図



AIHA：自己免疫性溶血性貧血

PNH：発作性夜間ヘモグロビン尿症

血を発症するものまでさまざまであり、実際は幅の広い症候群である。したがって、単一の考え方で疾患をとらえるよりも、不均一な分子病態に基づく疾患群であると考えるのが妥当である。また、後述のように MDS-RA との鑑別が困難な境界領域の患者も多い。概念的には、造血幹細胞自体の異常に基づくもの、造血微小環境の異常に基づくもの（造血支持能の低下：まれ）、造血の免疫学的抑制によるものに発症機序を大きく分けることができる。しかし、造血幹細胞の異常と免疫学的機序の両者が関与しているケースが多いと思われる。また、ファンconi貧血に代表される遺伝性のものと、より一般的な後天性のものという分け方もある。発症原因という観点からは、原因を特定できない特発性のものと、薬剤やウイルスなどによる2次性のものに大きく分けられる。

大部分の再生不良性貧血患者は特発性であり、その多くが免疫学的機序によって惹起される。そのような発想に至った発端は、同種骨髄移植で生着不全を起こしたものの、患者自身の造血の回復が見られ、前処置の免疫抑制が有効に作用したのではないかと考えたことに始まる。その後、シクロホスファミドや抗胸腺細胞グロブリン（ATG）療法、シクロスポリン療法などの免疫抑制療法の有効性

が明らかにされ、再生不良性貧血の大部分に免疫機構が関与しているという考え方がほぼ定着している。なお、微少 PNH タイプ血球（CD55 や CD59 が陰性）が検出される症例のほうが、免疫抑制療法が効きやすいと報告されている。

血液学的には、幹細胞レベルから成熟血球に至るまで量的減少が認められる。また、再生不良性貧血患者の末梢血顆粒球におけるテロメア長を調べると、健常人に比べて短縮していることが明らかにされている¹⁾。このことは、残存する造血幹細胞が頻回の細胞分裂を強いられているストレス状態を反映したものであると想定されている。

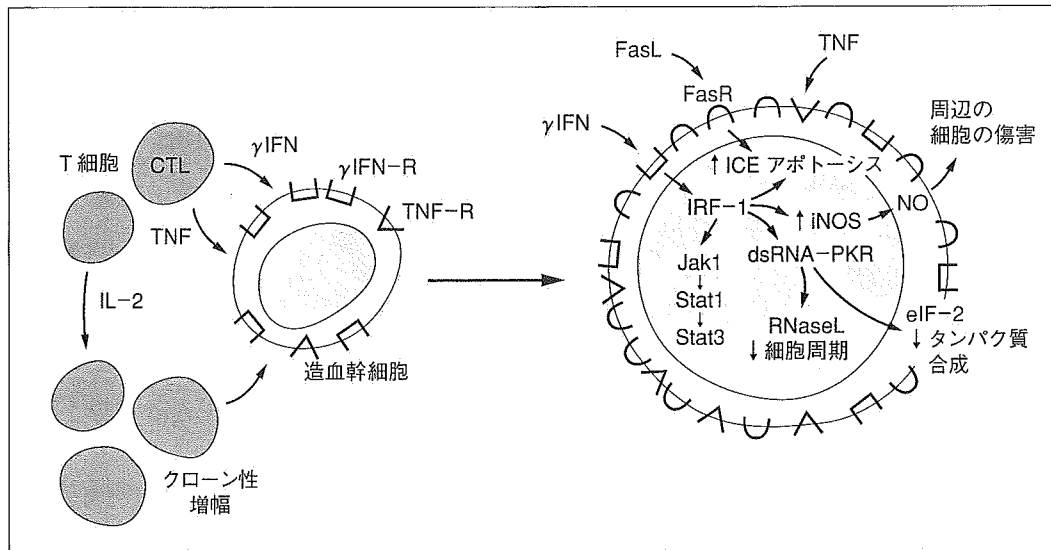
免疫学的側面としては、T細胞が造血系コロニー形成を抑制する現象が観察されており、単に輸血後の感作によるものだけではないことが示されている。T細胞による造血抑制の機序に関しては、造血抑制作用のあるサイトカインに関する報告が多い。すなわち、患者単核細胞による IFN γ などの産生亢進（特に骨髄中）が報告されている。また、IFN γ や TNF α は CD34 陽性細胞上に Fas 受容体を発現させる作用を有するため、細胞増殖を抑えるだけでなく、アポトーシスの誘導にも関与していると考えられている（図2）²⁾。その他、再生不良性貧血患者の骨髄では NKT 細胞が激減しており、そのことが免疫異常と関係している可能性についても議論されている³⁾。

最近では、再生不良性貧血患者の CD34 細胞における包括的遺伝子発現プロファイルの解析も行われ始めている。その結果、予想どおり、アポトーシスや細胞死に関係する遺伝子、増殖抑制関連遺伝子、ストレス応答遺伝子、免疫応答遺伝子などの発現が亢進していることが示された⁴⁾。

一方、外因性の発症機序に基づくものとしては、例えばベンゼンに代表される化学物質

図2 免疫学的機序による骨髄不全の分子機構

－細胞傷害性T細胞の活性化とそれによる造血幹細胞の傷害メカニズム－ (文献²⁾より改変引用)



略語：巻末の「今月の略語」参照

や種々の薬剤，また造血幹細胞へのウイルス感染が契機になることもある。これらの場合も，造血幹細胞に対する直接的傷害作用により汎血球減少が起こることもあれば，薬剤やウイルス感染が造血幹細胞に対する自己免疫反応を引き起こす誘因になることもありうると思われる（図3）²⁾。なお，ウイルスが関係するものの中では肝炎後の再生不良性貧血が有名であるが，非A非B非C非E非G型肝炎ウイルスによるものであり，その実態は依然として不明である。ただし，造血障害には免疫学的機序が関与しているものと考えられている⁵⁾。

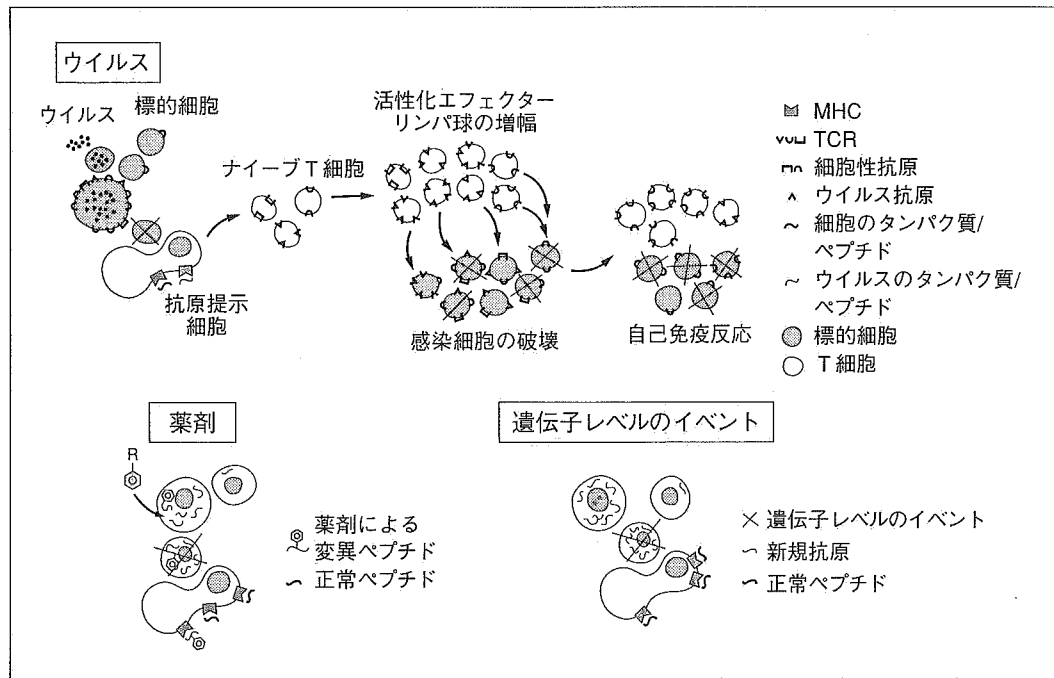
遺伝性の再生不良性貧血に関してはファンconi貧血が代表的であり，遺伝子レベルの知見もますます蓄積されてきている。その他，先天性角化不全症（DKC）や Shwachman-Diamond 症候群（好中球減少を伴った膵機能不全症）なども，再生不良性貧血を来すことが知られている。DKCでは，DKC1 遺伝子の異常（X連鎖型）だけでなく，その遺伝子産物である dyskerin が結合する telomer-

ase RNA gene（TERC）の変異の場合（常染色体性優性遺伝）も報告されている。興味深いことに，この TERC や telomerase reverse transcriptase gene（TERT）に変異が見られる後天性の再生不良性貧血が，まれではあるが報告されている⁶⁾。このような観点からの再生不良性貧血の分子病態へのアプローチも，新しい研究の方向性の1つとなっている。

再生不良性貧血と不応性貧血の境界領域

再生不良性貧血も MDS-RA も末梢血所見で汎血球減少が認められる疾患であるが，教科書的には，再生不良性貧血では骨髄低形成があり，RA では無効造血を反映する骨髄過形成と骨髄異形成像が特徴的である。しかしながら，再生不良性貧血でも骨髄の細胞密度がかなり保たれているケースがあり（採取部位による影響もある），一方で，RA でも骨髄異形成像があまり目立たない場合や骨髄低形成の場合がある。したがって，両者の鑑別に苦慮するケースを少なからず経験する。さ

図3 免疫学的機序による骨髄不全の分子機構 (文献²⁾より改変引用)



ウイルス感染, 薬剤, 遺伝子レベルでの傷害が引き金となり, 造血幹細胞を自己免疫的に攻撃する細胞傷害性 T細胞が活性化される。

略語: 巻末の「今月の略語」参照

らにまた, RA と診断された症例でも免疫抑制療法がしばしば有効であり, 病態自体にも共通するメカニズムが存在する可能性がある。再生不良性貧血も RA もおそらくはさまざまな機序に基づく不均一な疾患群と考えられ, 両者がオーバーラップする境界領域に含まれる症例も存在し, 現在の疾患概念と診断技術ではクリアカットに分けられないのが実情である。

再生不良性貧血の中には, 長期間の観察により PNH や MDS, さらに白血病に移行していく場合があること, 分子生物学的解析によりクローン性造血を証明できるケースがあることなどは, 幹細胞自体に遺伝子レベルで異常が生じている場合があることを示唆している。このようなケースは, 本質的には MDS-RA の範疇に入るものと考えたほうが妥当かもしれないが (それぞれの疾患概念の

定義の仕方による), 実際の診療現場では論理的な思考に基づいて診断が行われるのではない。また, 再生不良性貧血の本態が完全に解明されていない以上は, 論理的思考といったものも机上の空論になりかねない。

このような境界領域のケースで幹細胞自体に遺伝子レベルの異常がある場合, その遺伝子異常によって直接的に造血障害が起こる場合もあれば, 異常遺伝子産物に対して免疫反応が起こり, T細胞による造血幹細胞の傷害が引き起こされるといった機序も想定される (図2)。前者の場合は, 造血幹細胞/前駆細胞レベルでは正常細胞と比べて増殖優位性を持ち, 正常造血を抑制していく一方, 無効造血のために肉眼的に同定できる血液細胞は骨髓および末梢血において減少し, 骨髓低形成像を呈するものと考えられる。ただし, このような分化段階特異的な増殖優位性という現

象が実在するかどうかは明らかでない。後者の免疫学的機序の場合は、異常造血幹細胞によって活性化された細胞傷害性T細胞が、正常造血幹細胞に対しても傷害活性を示すことにより全体的に造血抑制が引き起こされるものと考えられる。

現在、MDSにおいても網羅的ゲノム解析が進められており、新しい角度から分子病態に迫ることが可能になることが期待される。

その他、遺伝性再生不良性貧血のファンconi貧血の病態解析が進み、後天的な再生不良性貧血やMDS-RAの症例の中には類似のメカニズムによって発症しているものもあるのではないかとこの考え方が提出されている。テロメアに関連した後天的遺伝子異常の探索も含め、遺伝性造血異常疾患の分子機構をヒントに、骨髄不全症候群の分子病態の一端が明らかになることが期待される。

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH)の病態

PNHは慢性後天性溶血性貧血の一病型で、ホスファチジルイノシトールグリカン-クラスA (PIG-A) 遺伝子に後天的変異が認められ、赤血球の補体感受性亢進に基づく血管内溶血を主徴とする疾患である。また、再生不良性貧血との合併や移行など(再生不良性貧血-PNH症候群)もよく知られており、その本質的病態については骨髄不全を来すクローン性幹細胞異常としてとらえていく必要がある。

この疾患では、PIG-A 遺伝子の異常のためにさまざまなグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型膜タンパク質の欠損が見られ、PNH タイプ血球が出現する。なお、血管内溶血を伴わない微少 PNH タイプ血球については、再生不良性貧血以外にMDSや骨髄線維症でも検出されることがある。また、CD55やCD59といった補体制

御因子以外に、好中球アルカリホスファターゼや赤血球アセチルコリンエステラーゼなどの GPI アンカー型膜タンパク質の欠損も認められる。

この疾患の一番の謎は、PNH クローンが拡大していく機序である。造血不全が進行していく疾患であり、PNH クローンの増殖力が正常細胞よりも弱いものと考えるのであれば、単純なストーリーでは理解し難い現象である。実際に、PIG-A 遺伝子に相当するマウスの遺伝子をノックアウトした PNH モデルマウスでは PNH クローンの拡大は観察されず、PNH の責任遺伝子とされている PIG-A 遺伝子の変異だけでは PNH の病態を説明することができない。現在想定されている機序は、2段階を経て発症するというものである。すなわち、PIG-A 遺伝子の変異により PNH タイプ血球が体内に出現し、そこに正常造血幹細胞上の GPI アンカー型膜タンパク質に対する異常免疫反応が加わった場合、PNH タイプ血球がたとえ増殖力に優位性がなくても選択され、相対的にドミナントになっていくのが第1段階である。さらに、第2段階として何らかの遺伝子異常が加わり、良性腫瘍のようなかたちで PNH クローン主体の造血に置き換わっていくというものである。このプラス α のステップの解明が、現在の大きな研究課題となっている。

その他、PNH に特徴的な血栓症の発症機序についても、不明な点が多く残されている。

特発性骨髄線維症の分子病態

特発性骨髄線維症は、慢性骨髄性白血病、真性赤血球増加症、原発性血小板血症とともに、慢性骨髄増殖性疾患に属する。骨髄の線維化は反応性のものであり、線維芽細胞自体が悪性化した病態ではない。造血幹細胞レベルの異常があり、悪性化した巨核球系細胞などから産生されるサイトカインに反応して線

維芽細胞が増殖した病態と考えられている。骨髄の広範な線維化により造血スペースが物理的に狭められる結果、髄外造血が目立つようになり、脾腫や特徴的な血液像（涙滴赤血球、白赤芽球症など）が認められるようになる。

慢性骨髄増殖性疾患の分子病態に関する最近の大きなトピックスは、非受容体型チロシンキナーゼの JAK2 の活性化変異 (V617F) がかなりの頻度で見つかったことである⁷⁾。真性赤血球増加症のほとんどの症例で検出され、特発性骨髄線維症や原発性血小板血症の約半数の症例で認められている。617 番目のバリン残基がフェニルアラニン残基に替わることにより、JAK2 における JH2 ドメインの自己抑制活性が失われ、その経路の異常活性化が生じるものと考えられている。ただし、JAK2 (V617F) が異常細胞増殖につながることは理解できても、さまざまなタイプの病型が出現する機序を説明することはできないため、それぞれの病像を規定する何らかの遺伝子異常がさらに別に存在するものと思われる。なお、特発性骨髄線維症では、JAK2 に V617F 変異が存在する症例は変異のない症例よりも白血球数が多く、予後不良な傾向があると報告されている⁸⁾。

新しい治療薬の開発

1. MDS に対する新規治療薬

骨髄不全症候群の中でも治療に難渋することが多いのが MDS-RA である。一部の症例では再生不良性貧血と同様にシクロスポリンなどによる免疫抑制療法（保険適応外）が奏効するが、不応例に対する有効性の高い治療法は移植療法を除いて存在しないのが実情である。また、高齢者に多い MDS-RA の場合は、造血幹細胞移植の適応にならないケースが多い。そこで新規治療薬の登場が期待されるわけであるが、欧米では MDS に対する治

療薬の臨床試験が活発に実施されている。例えば、サリドマイド誘導体とされる lenalidomide (Revlimid) は免疫調節薬と称されており、多発性骨髄腫とならんで MDS-RA に対しても治療効果が期待されている。その作用機序は多岐にわたり、実際はサリドマイドとは異なっているようである。興味深いことに、5q⁻ 症候群あるいは 5q⁻ の絡んだ染色体異常を有する患者で奏効率が高く⁹⁾、米国では 2005 年暮れにそのような症例に対する治療薬として食品医薬品局 (FDA) で認可された。一時的に造血抑制が見られるため血小板減少の強い患者では使いにくい。奏効例では染色体異常が消失し、貧血の改善も著しく、大変期待の持てる新薬である。低リスク群の MDS に対する治療薬として、我が国への早期導入が待たれる。

DNA メチル化阻害薬も異常細胞に対する効果が期待され、米国では 2004 年に azacitidine (Aza C) がすべての病型の MDS に対する治療薬として承認されている（オーファン指定）。生存期間が著しく延長するわけではないが、高リスク群の MDS に対しても治療効果を期待できる点は魅力的である¹⁰⁾¹¹⁾。その他、類似薬の decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) の臨床開発も進んでいる¹²⁾。今後は、外来治療が容易な経口メチル化阻害薬の開発が待たれる。

MDS-RA における貧血に対してはエリスロポエチン (EPO) の効果が、特に血清 EPO 濃度が低いケースで認められる。最近、半減期の長い EPO 製剤 (darbepoetin alpha) が開発されており¹³⁾、なるべく早くその使用が可能になってほしいものである。

2. PNH に対する抗体医薬

補体成分の C9 を欠損する PNH 患者では溶血症状が見られない。そこで、補体活性化経路を遮断することにより溶血を抑えること

ができると考えられ、補体第5成分 (C5) に対するヒト化モノクローナル抗体の eculizumab の臨床試験が国際的規模で実施されている。これまでの結果では、血管内溶血が著明に抑制され、輸血頻度の有意の減少が得られている¹⁴⁾¹⁵⁾。現在、我が国への導入に向けた検討が行われている。なお、この抗体医薬は炎症惹起性メディエーターの C5a (アナフィラトキシン) の放出を抑制する作用があり、もともとは関節リウマチや腎炎などの慢性炎症性疾患の治療薬として開発された経緯を持つものである。PNH の場合に C5 が最適のターゲットであるかどうかは、さらに検討を要する。

3. 輸血後鉄過剰症に対する経口鉄キレート剤

再生不良性貧血や MDS などの骨髄不全症候群で治療が奏効せず、頻回の赤血球輸血が必要となった患者では、輸血後鉄過剰症が問題となる。例えば、さまざまな臓器・組織への鉄沈着により、糖尿病や視床下部・下垂体・副腎系の機能低下、また心機能低下 (心不全) や不整脈、肝機能障害などが認められる。鉄過剰症に対する治療薬としては deferoxamine (Desferal) が一般的であるが、注射薬であり、連日投与をしないと効果が得られにくいことから、外来患者への投与には向いていない。最近、経口の鉄キレート剤である deferasirox (ICL670) の臨床試験が進んでおり、一般に用いることが可能となれば頻回輸血が必要な患者にとっては大きな福音となる。サラセミア患者での有効性はすでに確認されている¹⁶⁾。なお興味深いことに、鉄の過剰沈着がなくなると造血状態が改善するケースがあると指摘されている。

我が国では、鉄過剰症の問題だけでなく、輸血に伴う感染症のリスクをできる限り低減するため、慢性疾患ではヘモグロビン濃度を

低く維持するのが一般的である (Hb 7g/dl 程度)。これは世界的に見てかなり低いレベルであり、欧米ではヘモグロビン濃度をもう少し高めに設定して QOL を重視するようである。経口鉄キレート剤が導入されれば、日本でももう少し積極的に輸血をするという選択肢もありうると思われる。

今後の動向

RA などの MDS に対しては、最近になってさまざまな治療薬の開発が活発となってきている。一般に、我が国では臨床試験を実施するのが困難であり、新規医薬品の導入が欧米に比べて遅れる傾向にある。世界水準の医療レベルを維持するうえで、新薬の申請に対する審査体制の強化が望まれている。

再生不良性貧血の場合は相変わらず ATG 療法が行われているが、これはウマやウサギの抗血清を用いる治療法であり、残念ながら 21 世紀にふさわしいとは言い難い。同程度の治療効果が得られるヒト化モノクローナル抗体に早く移行してほしいものである。米国では、T 細胞に対するヒト化モノクローナル抗体の alemtuzumab (Campath-1H) や IL-2 受容体に対するヒト化抗体の daclizumab の臨床試験が再生不良性貧血患者において実施されており、その成り行きが注目される。

骨髄不全症候群の中で最も治療に苦慮しているのが特発性骨髄線維症である。その点、最近の JAK2 変異 (V617F) の発見は新たな分子標的薬の開発を期待させるものである。いずれの疾患にせよ、分子病態を解明し、その知見に基づいた分子標的薬の開発は、癌の領域だけでなく、これからのゲノム創薬一般の大きな流れとなっている。

文 献

- 1) Brummendorf TH, et al: Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplas-

- tic anemia. *Blood* 97: 895-900, 2001.
- 2) Young NS: Acquired aplastic anemia. *In: Bone Marrow Failure Syndromes* (Young N, ed), p1-46. WB Saunders Co, Philadelphia, 2000.
 - 3) Zeng W, et al: Selective reduction of natural killer T cells in the bone marrow of aplastic anaemia. *Br J Haematol* 119: 803-809, 2002.
 - 4) Zeng W, et al: Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. *Blood* 103: 325-332, 2004.
 - 5) Lu J, et al: Analysis of T-cell repertoire in hepatitis-associated aplastic anemia. *Blood* 103: 4588-4593, 2004.
 - 6) Yamaguchi H, et al: Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med* 352: 1413-1424, 2005.
 - 7) Kralovics R, et al: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779-1790, 2005.
 - 8) Campbell P J, et al: The V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood*: 2005. (in press)
 - 9) List A, et al: Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 352: 549-557, 2005.
 - 10) Silverman LR, et al: Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 20: 2429-2440, 2002.
 - 11) Kornblith A B, et al: Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 20: 2441-2452, 2002.
 - 12) Saba H I, et al: Decitabine in myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol* 42 (Suppl 2): S23-31, 2005.
 - 13) Musto P, et al: Darbepoetin alpha for the treatment of anaemia in low-intermediate risk myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 128: 204-209, 2005.
 - 14) Hillmen P, et al: Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 350: 552-559, 2004.
 - 15) Hill A, et al: Sustained response and long-term safety of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 106: 2559-2565, 2005.
 - 16) Cappellini M D, et al: A Phase III study of deferasirox (ICL670), a once-daily oral iron chelator, in patients with β -thalassemia. *Blood*: 2005. (in press)

Pathophysiology and Treatment of Intractable Anemias: Recent Progress

Keiya Ozawa

Division of Hematology, Department of Medicine,
Division of Cell Transplantation and Transfusion,
Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine,
Jichi Medical School

Received: 2004.09.07
Accepted: 2004.11.08
Published: 2005.03.01

Autologous gamete cryopreservation before hemopoietic stem cell transplantation

Authors' Contribution:

- A** Study Design
- B** Data Collection
- C** Statistical Analysis
- D** Data Interpretation
- E** Manuscript Preparation
- F** Literature Search
- G** Funds Collection

Takahiro Nagashima^{1, 2}^{ABCEDE}, Kazuo Muroi^{1, 2}^{ABDEE}, Chizuru Kawano-Yamamoto^{1, 2}^{ABD},
Takuji Miyoshi²^{BD}, Ken Ohmine²^{BD}, Masaki Toshima²^{BD}, Akira Miyazato²^{BD},
Masaaki Takatoku²^{BD}, Tadashi Nagai²^{BD}, Masaki Mori^{1, 2}^{BD}, Norio Komatsu²^{BD},
Keiya Ozawa^{1, 2}^{ABDE}

¹ Division of Cell Transplantation and Transfusion, Jichi Medical School, Minamikawachi, Japan

² Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical School, Minamikawachi, Japan

Source of support: Departmental source

| | |
|--------------------------|--|
| Background: | Infertility after hemopoietic stem cell transplantation (HST) is a serious problem for young patients. Autologous gamete collection before HST may be a promising strategy to overcome infertility. |
| Material/Methods: | From October 1988 to December 2003, six male and nine female patients with hematological malignancies had autologous gametes collected before HST. The data on autologous gamete collection were analyzed. |
| Results: | Sperm could be collected from three patients. However, in two of the three, the numbers and motility of the sperm were severely depleted because they received chemotherapy for one and 11 cycles, respectively. Normal sperm was only collected from one patient with myelodysplastic syndrome who had no history of receiving chemotherapy. One or more oocytes could be collected in five of nine female patients, although the five received multiple cycles of chemotherapy. The successful oocyte collection was associated with an ovulation stimulant. |
| Conclusions: | Autologous oocyte collection before HST may be possible, even if patients receive multiple cycles of chemotherapy. In contrast, autologous sperm collection before HST may be difficult after patients receive chemotherapy. Successful pregnancy using autologous gametes after HST remains extremely difficult, especially in female patients; however, it is important to give information on infertility and autologous gamete collection to patients scheduled for HST. |
| key words: | hemopoietic stem cell transplantation • infertility • autologous gamete collection • unfertilized oocyte |
| Abbreviations: | HST - hemopoietic stem cell transplantation; IVF - <i>in vitro</i> fertilization; RIST - reduced intensity hemopoietic stem cell transplantation |
| Full-text PDF: | http://www.MedSciMonit.com/pub/vol_11/no_3/6362.pdf |
| Word count: | 1397 |
| Tables: | 2 |
| Figures: | — |
| References: | 20 |
| Author's address: | Kazuo Muroi, M.D, Division of Cell Transplantation and Transfusion, Jichi Medical School, Minamikawachi, Tochigi 329-0498, Japan, e-mail: muroi-kz@jichi.ac.jp |



BACKGROUND

HST is an established therapeutic strategy for patients with hematological malignancies and non-malignant disorders. However, patients usually develop severe gonadal dysfunction and subsequent infertility after HST, which are caused by high-dose chemotherapy and/or total body irradiation used as conditioning [1,2]. Infertility is an important problem for patients treated with HST, especially for female patients young enough to become pregnant and hoping to bear a child in the future. In male patients, artificial insemination using frozen autologous semen is easy to perform if a sufficient number of autologous sperm is obtained. If autologous sperms are not available, artificial insemination using donor semen is also possible. In female patients, *in vitro* fertilization (IVF) using frozen autologous fertilized or even unfertilized oocytes has been developed [3-5], although it is difficult to become pregnant for patients with severe gonadal dysfunction caused by high-dose chemotherapy and/or total body irradiation. Another possible approach to create a genetic child is to transfer autologous fertilized oocytes or embryos into the uterus of a related or unrelated healthy woman (surrogate mother) [6]. The Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan approves pregnancy of patients with severe ovarian dysfunction using donated oocytes from unrelated women, but not from related women. The office never approves surrogacy.

Previously, several female patients who had undergone HST in our hospital returned to productive lives, but complained of infertility. Since then, we have been clearly informing patients scheduled for HST to expect infertility following conditioning. Those patients were mainly referred to special clinics for collection and cryopreservation of autologous gametes if they wished to undergo that process. We analyzed factors associated with gamete collection in patients scheduled for HST.

MATERIAL AND METHODS

All patients with hematological malignancies and non-malignant disorders planned for HST at Jichi Medical School Hospital from October 1988 to December 2003 were retrospectively analyzed. They were informed of infertility caused by conditioning for HST. After detailed discussion of HST-related infertility, a possible alternative approach to autologous gamete collection and the risks associated with the alternative, patients gave informed consent for autologous gamete collection. Prepubertal patients were not included, but unmarried patients were included. P values below 0.05 were considered significant on student's *t* test and χ^2 test.

RESULTS

During this period, 48 patients received HST at our institution. Eighteen of 48 patients had cryopreserve autologous gametes collected before HST. Of these, three patients were excluded because of incomplete medical records. As shown in Tables 1 and 2, the patients consisted of six males and nine females and the median age was 24 years (16 to 38 years). Diagnosis included acute myeloblastic leukemia (6 patients), acute lymphoblastic leukemia (3), non-Hodgkin's lymphoma (2), Hodgkin's lymphoma (1), myelodysplastic syndrome (2), and Fanconi anemia (1). Eleven patients had

received conventional chemotherapy for their hematological disorders at a frequency of one to 22 cycles before autologous gamete collection. To collect and cryopreserve autologous sperm, all six male patients were referred to one clinic. In females, eight unmarried patients referred to another clinic to collect and cryopreserve autologous unfertilized oocytes using the vitrification method [3,4]. Fertilized oocytes from one married patient were collected and cryopreserved at the Department of Obstetrics and Gynecology, Jichi Medical School Hospital.

Table 1 shows a summary of male patients' profiles and the nature of their collected sperm. In only one patient with myelodysplastic syndrome, normal number and motility sperm were obtained, because he had not received chemotherapy. In the others who had received one or more cycles of chemotherapy, sperm was severely deteriorated or completely absent. Table 2 shows the female patients' profiles and numbers of collected oocytes. In five of nine female patients, one to five oocytes were collected. Of the five, one patient with myelodysplastic syndrome and one with Fanconi anemia had not received chemotherapy before oocyte collection. The other three included two patients with acute myeloblastic leukemia and one with Hodgkin's lymphoma had received multiple cycles of chemotherapy at a frequency of 6 to 15 cycles. All patients who successfully had one or more autologous oocytes received an ovulation stimulant before oocyte collection. There were no significant differences between patients in whom autologous gametes were collected and not collected in terms of age, gender, use of alkylating agents and chemotherapy cycles.

DISCUSSION

We showed that autologous gamete collection before HST may be possible in both male and female patients scheduled for HST. In male patients, the less chemotherapy that had been given, the better the sperm count collected. In female patients, oocyte collection was successfully performed using an ovulation stimulant even if they received multiple cycles of chemotherapy. Although the numbers of pretransplant chemotherapy cycles were not associated with gamete collection statistically, it is recommended that autologous gametes should be collected as soon as possible after achieving complete remission in patients with leukemia or lymphoma.

Pregnancy after HST has been reported in a few patients, in whom gonadal damage has naturally recovered or medical alternatives have been attempted [7-9]. The European Group for Blood and Marrow Transplantation reported that 113 female patients among 37,362 patients receiving HST became pregnant, and 10 of the 113 patients underwent IVF [10]. Three medical approaches are possible to promote pregnancy in female patients after HST: First is IVF using autologous embryos or fertilized oocytes cryopreserved before HST. There are at least two reports of successful pregnancy and live birth using this method [11,12]. This method is clinically available but impractical in very young and single females. It is difficult for patients with malignant hematological disorders to interrupt chemotherapy for autologous oocyte collection. Additionally, it is possible that there will be malignant cell contamination during harvesting of oocytes. Second is IVF using allogeneic donated oocytes af-

Table 1. Sperm collection.

| Case | Age (years) | Disease | Chemotherapy numbers | Duration between chemotherapy and collection (months) | Pre- medication | Collected sperm |
|------|-------------|---------|----------------------|---|-----------------|--------------------|
| 1 | 29 | AML | 11 | 3 | – | Severely disturbed |
| 2 | 18 | NHL | 11 | 3 | – | Absent |
| 3 | 24 | MDS | 0 | 0 | – | Normal |
| 4 | 18 | ALL | 12 | 0.3 | – | Absent |
| 5 | 16 | ALL | 1 | 0.7 | – | Severely disturbed |
| 6 | 38 | AML | 22 | 2 | – | Absent |

AML – acute myeloblastic leukemia; NHL – non-Hodgkin's lymphoma; MDS – myelodysplastic syndrome; ALL – acute lymphoblastic leukemia.

Table 2. Oocyte collection.

| Case | Age (years) | Disease | Chemotherapy numbers | Duration between chemotherapy and collection (months) | Pre- medication* | Collected oocyte numbers |
|------|-------------|---------|----------------------|---|------------------|--------------------------|
| 7 | 27 | HD | 6 | 12 | + | 1 |
| 8 | 35 | MDS | 0 | 0 | + | 4 |
| 9 | 23 | NHL | 8 | 0.3 | – | 0 |
| 10 | 22 | AML | 13 | 2 | + | 5 |
| 11 | 29 | FA | 0 | 0 | + | 2 |
| 12 | 17 | ALL | 6 | 2 | + | 0 |
| 13 | 18 | AML | 0 | 0 | – | 0 |
| 14 | 26 | AML | 12 | 0** | – | 0 |
| 15 | 24 | AML | 15 | 2 | + | 4 |

HD – Hodgkin's lymphoma; FA – Fanconi anemia;

* ovulation stimulant;

** on therapy with all-trans retinoic acid.

ter HST [13–15]. Although the absence of malignant cell contamination risk during harvesting of the oocytes is a clinical benefit, it is difficult to obtain donated oocytes. In Japan, oocyte donation only from unrelated, but not related, women to patients with gonadal dysfunction is approved. Gestational surrogacy is a treatment option available to women with certain medical problems including severe gonadal dysfunction [6]. Gestational surrogacy arrangements are carried out in a few European countries and in the USA. However, ethical or legal problems remain unresolved and gestational surrogacy is not approved in Japan. Third is cryopreservation of autologous unfertilized oocytes before HST. This method could be applied to female patients with or without husbands, and could be a good option from the perspective of medical ethics, although cryopreservation of unfertilized oocytes is thought to be difficult. Recently, a new technique, called vitrification, has been developed, which does not cause intracellular ice formation in oocytes during cryopreservation [3,4]. There are three reports of

successful pregnancy and live birth after implantation of autologous or donated unfertilized oocytes using the vitrification method [4,16,17]. Very recently, it has been reported that follicle development and estrogen production of a breast cancer patient return to normal following cryopreserved autologous ovarian tissue transplantation [18]. In patients with hematological malignancies, ovarian tissue cryopreservation may be difficult, since there will be malignant cell contamination.

We do not know whether reduced intensity hemopoietic stem cell transplantation (RIST) preserves gonadal function at a normal level. Recently, Kyriacou et al. reported that a reduced intensity regimen of fludarabine, melphalan and CAMPATH-1H induced damage to germ cells and Leydig cells [19]. If RIST using other regimens does not impair gonadal function and shows the same clinical outcomes as conventional intensity hemopoietic stem cell transplantation for young patients with standard-risk leukemias or lympho-



mas, such RIST may be a better strategy for patients hoping to have their own children in the future.

Although approaches to becoming pregnant after HST may differ country by country based on medical ethics [20], we should provide the correct information on autologous gamete collection to patients scheduled for HST. Such information, along with autologous gamete cryopreservation, increases the fighting spirit of young patients scheduled for HST, even though successful pregnancy using autologous gametes after HST remains extremely difficult.

CONCLUSIONS

1. Autologous gamete collection is possible in both male and female patients before HST.
2. Information on autologous gamete collection should be given to patients scheduled for HST.

Acknowledgements

We would like to thank nurses of the hemopoietic stem cell transplantation team at Jichi Medical School Hospital for their excellent contribution regarding information on infertility.

REFERENCES:

1. Anserini P, Chiodi S, Spinelli S et al: Semen analysis following allogeneic bone marrow transplantation. Additional data for evidence-based counselling. *Bone Marrow Transplant*, 2002; 30: 447-51
2. Sanders JE, Buckner CD, Amos D et al: Ovarian function following marrow transplantation for aplastic anemia or leukemia. *J Clin Oncol*, 1988; 6: 813-18
3. Arav A, Yavin S, Zeron Y et al: New trends in gamete's cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol*, 2002; 187: 77-81
4. Kuleshova L, Gianaroli L, Magli C et al: Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Hum Reprod*, 1999; 14: 3077-79
5. Zollner U, Zollner K-P, Schneider M et al: Comparison of two media for sequential culture after IVF and ICSI shows no differences in pregnancy rates: a randomized trial. *Med Sci Monit*, 2004; 10(1): CR1-CR7
6. Brinsden PR: Gestational surrogacy. *Human Reproduction Update*, 2003; 9: 483-91
7. Bierman PJ, Bagin RG, Jagannath S et al: High dose chemotherapy followed by autologous hematopoietic rescue in Hodgkin's disease: long-term follow-up in 128 patients. *Ann Oncol*, 1993; 4: 767-73
8. Spinelli S, Chiodi S, Bacigalupo A et al: Ovarian recovery after total body irradiation and allogeneic bone marrow transplantation: long-term follow up of 79 females. *Bone Marrow Transplant*, 1994; 14: 373-80
9. Gulati SC, Van Poznak C: Pregnancy after bone marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 1998; 16: 1978-85
10. Salooja N, Szydlo RM, Socie G et al: Late Effects Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Pregnancy outcomes after peripheral blood or bone marrow transplantation: a retrospective survey. *Lancet*, 2001; 358: 271-76
11. Atkinson HG, Apperley JF, Dawson K et al: Successful pregnancy after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Lancet*, 1994; 344: 199
12. Lipton JH, Virro M, Solow H: Successful pregnancy after allogeneic bone marrow transplant with embryos isolated before transplant. *J Clin Oncol*, 1997; 15: 3347-49
13. Rio B, Letur-Konirsch H, Ajchenbaum-Cymbalista F et al: Full-term pregnancy with embryos from donated oocytes in a 36-year-old woman allografted for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 1994; 13: 487-88
14. Lee S, Ghalie R, Kaizer H, Sauer MV: Successful pregnancy in a bone marrow transplant recipient following oocyte donation. *J Assist Reprod Genet*, 1995; 12: 294-96
15. Larsen EC, Loft A, Holm K et al: Oocyte donation in women cured of cancer with bone marrow transplantation including total body irradiation in adolescence. *Hum Reprod*, 2000; 15: 1505-8
16. Yoon TK, Chung HM, Lim JM et al: Pregnancy and delivery of healthy infants developed from vitrified oocytes in a stimulated *in vitro* fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril*, 2000; 74: 180-81
17. Katayama KP, Stehlik J, Kuwayama M et al: High survival rate of vitrified human oocytes results in clinical pregnancy. *Fertil Steril*, 2003; 80: 223-24
18. Oktay K, Buyuk E, Veeck L: Embryo development after heterotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 2004; 363: 837-40
19. Kyriacou C, Kottaridis PD, Eliahoo J et al: Germ cell damage and Leydig cell insufficiency in recipients of nonmyeloablative transplantation for haematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 2003; 31: 45-50
20. Bhardwaj M, Macer DRJ: Policy and ethical issues in applying medical biotechnology in developing countries. *Med Sci Monit*, 2003; 9(2): RA49-RA54