

G-CSF併用で末梢血中へ血液幹細胞を動員、採取し、磁気細胞分離システム (AM9802) を用いてCD34 positive selectionを行い純化し、また未純化back up用細胞を別に確保し凍結保存した。移植前処置はCY 200mg/kgを4日間投与とし、その後純化凍結保存しておいた自己末梢血CD34陽性細胞あるいは自己末梢血幹細胞を輸注した。G-CSF投与を併用し造血能の回復を促すとともに、化学療法における各種の標準的補助療法を行った。

C. 研究結果

(1)臨床症状：平成14年までに3症例につき自家末梢血純化CD34陽性細胞移植療法を実施し、また平成15年から16年にかけて自家末梢血純化CD34陽性細胞移植療法2例、自家末梢血非純化CD34陽性細胞移植療法1例を実施した。さらに本年に入り3例が自家末梢血非純化CD34陽性細胞移植療法の適応症例となった。化学療法期間中の一過性感染症以外はともに大きな合併症をきたさなかった。皮膚所見については、初期の4症例（すべて純化例）はともにmodified Rodnan total thickness skin score (mRodnan TSS) で25%以上の改善を認め、modified Health Assessment Questionnaire (mHAQ) についても一時的に全身状態の悪化した症例3を除いて著明な改善を認めた。さらに初期3症例については皮膚症状の改善は持続している。症例5は、移植療法に抵抗性であったが、現在までのところ治療反応性に関連する因子は明らかになっていない。呼吸機能、腎機能は移植後一過性に低下し、いずれも移植後約12ヶ月の時点で移植前値に回復した。非純化症例については、移植後の観察期間が短く臨床効果の判定は十分には出来ないが、短期的には治療効果を認めている。

(2)安全性に関する検討：全症例で十分量のCD34陽性細胞が採取され、移植後の造血能回復は速やかであった。移植後、CD34陽性細胞移植群全症例でサイトメガロウイルス抗原血症を認め、ガンシクロビルによる加療を行った。一方非純化CD34細胞移植群ではサイトメガロウイルス感染症は認められなかった。症例2については、移植後に血球貪食症候群の合併を認めた。4年後にループス腎炎、抗リン脂質抗体症候群に

よる脳梗塞を併発し、ステロイド、シクロスポリン、抗血栓療法が必要となった。症例3については、移植後、出血性膀胱炎、心膜炎等の合併症を呈し、長期入院加療を要した。症例6は、末梢血幹細胞採取時にcapillary leak syndromeの合併を認め、検討の結果、移植そのものは見送ることとした。症例9（非純化例）は生着後にcapillary leak syndromeの合併の合併を認めたがステロイド投与により改善した。現在はいずれの症例も外来通院中であり、定期的全身精査で重篤な異常を認めていない。

D. 考察

難治性自己免疫疾患では、背景に免疫システムの異常が存在する点から理論的には同種造血幹細胞移植が望ましいと考えられるが、安全性が優先される点から主に自家末梢血幹細胞移植が多く症例で選択されている。これまで、SScに対する同療法の治療効果、安全性についていくつかの第I、II相試験の結果が欧米より報告されている。治療反応性はこれまでの報告、当科経験症例と同様に約2/3の症例に認められている。長期的には、移植後3年の時点で、治療効果範囲内ではあるものの皮膚病変の悪化傾向が報告されている。SLE症例においては、ステロイド剤の減量効果やステロイド剤への反応性の回復を含め何らかの治療効果が移植後約2/3の症例において報告されている。これまでのところ、難治性自己免疫疾患に対する移植療法の治療反応性の差異の原因は不明であるが、今後、長期経過の報告とともに移植適応症例の層別化が可能か否か、今後の報告が待たれる。造血器疾患に比して高い移植関連死亡については、強皮症においては、放射線照射を含む移植前処置において肺野を遮蔽することで移植関連死亡率の低下が報告されている。一方、SLEにおいては末梢血幹細胞動員・採取時および移植前処置にCYを用いる場合、移植前処置にanti-thymocyte globulinを併用する場合は、CY投与量を減ずること等が改善点として挙げられている。

近年、関節リウマチ等の一部の難治性自己免疫疾患に対して、ミニ移植を利用した同種造血幹細胞移植の試みも報告されており、安全性、治療効果および自家造血幹細胞移植を含む他の治療法との比較検討が望まれ

る。

現在、適応評価中の症例も含めて当科SSc症例の経過を検討し、SLEを含めた他の難治性自己免疫疾患への適応も視野に入れた移植適応基準、移植プロトコルの再評価が必要と考えられる。

E. 結論

自家末梢血純化CD34陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法の適応症例9例の内、5症例に同療法を施行し、非純化CD34陽性細胞移植併用超大量免疫抑制療法を3症例に施行した。移植8例中6例（純化5例中4例、非純化3例中2例）で皮膚病変の改善を認め、その効果は持続性であった。しかしながら非純化例は移植後12ヶ月以上を経た症例が1例であり、これまでのところ移植片の差による移植後早期の治療反応性の差は認めておらず、長期的な観察が必要と考えられる。また治療抵抗性症例については、これまでのところ特定の傾向は認められていないが、今後症例の蓄積による層別化が必要である。さらに適応除外基準、移植方法のさらなる適性化が必要であり、同時に病態の解明とSLEを含めた他の難治性自己免疫疾患への応用も視野に入れた臨床試験の検討が望まれる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yasuda,S., Atsumi,T., Matsuura,E., Kaihara.K., Yamamoto,D., Ichikawa,K., Koike,T. Significance of valine/leucine²⁴⁷ polymorphism of β 2-glycoprotein I in antiphospholipid syndrome : increased reactivity of anti- β 2-glycoprotein I autoantibodies to the valine²⁴⁷ β 2-glycoprotein I variant. Arthritis Rheum 52(1) 212-218.2005
- 2) Nishio,S., Hatano,M., Nagata,M., Horie,S., Koike,T., Tokuhisa,T., Mochizuki,T. Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation. J Clin Invest 115(4) 910-918.2005
- 3) Fukae,J., Amasaki,Y., Yamashita,Y., Bohgaki,T., Yasuda,S., Jodo,S., Atsumi,T., Koike,T. Butyrate suppresses tumor necrosis factor α production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a cis-acting AU-rich element. Arthritis Rheum. 52 (9) 2697-2707.2005

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

特になし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

「樹状細胞による造血制御に関する研究」

分担研究者 澤田 賢一 秋田大学医学部内科学講座 血液・腎臓内科学分野 教授

研究要旨：ヒト純化造血幹・前駆細胞（CD34+細胞）は、造血刺激と炎症刺激（tumor necrosis facto-*a*, TNF-*a*）の共存下で自己造血前駆細胞を貪食する樹状細胞（dendritic cells, DCs）を発生することを証明した。DCsの発生は3～5日以内と迅速であり、自己Tリンパ球を活性化させた。サイトカイン産生様式からその生理的意義は免疫寛容の誘導であることが示唆された。DCsによる自己血球の貪食は、血球貪食症候群においても認められる現象であり、骨髄を“場”とする免疫寛容や自己免疫の誘導に関与していると推定される。

A. 研究目的

樹状細胞（dendritic cells, DCs）は、T細胞を活性化あるいは制御することによって免疫系のホメオスタシスを維持しており、その破綻は自己免疫疾患や免疫異常を惹起すると推定されている。造血幹・前駆細胞（CD34+細胞）由来DCsの特徴は、造血刺激と炎症性刺激の共存下で造血前駆細胞と同時に発生することである。一方で、炎症性サイトカインの多くは造血前駆細胞のアポトーシスを誘導する。本研究開始の契機は、CD34+細胞由来DCsが骨髄を“場”として、同時に発生する自己造血前駆細胞とどのように関わり、どのような生理的・病態的意義を担うのかという疑問であった。我々はこれまでに、ヒトCD34+細胞由来DCsは、赤血球造血において、①炎症刺激と造血刺激の共存下で発生し、②同時に発生する自己造血前駆細胞を貪食することを明らかにしてきた（Exp Hematol 2002, 2004）。本研究では、炎症刺激と造血刺激の共存下におけるDCsの発生と自己血球の貪食が、他の血球系列にも認められる普遍的現象であるか否かを検証するとともに、自己血球を貪食するDCsの生理的・病態的意義についてアプローチすることを目的とした。

B. 研究方法

1) CliniMACSを用いてヒトCD34+細胞を純化した。純化CD34+細胞をTPO存在下で浮遊培養し、巨核球系への系特異的分化誘導を行ない、TNF-*a*

によるDCsの誘導とDCsによる自己巨核球系前駆細胞の貪食を、May-Grunward-Giemsa (MG) 染色、FACS, 酵素抗体染色、共焦点顕微鏡を用いて検討した。CD34+細胞純化時に同時に保存したCD34細胞から、ナイロン・ファイバークラムを用いてT細胞を純化した。リンパ球混合反応（mixed lymphocyte reaction, MLR）は、DCsと自己Tリンパ球を用いて行なった。DCsのサイトカイン産生能はcytometric bead array systemを用いて測定した。

2) 血球貪食症候群（hemophagocytic syndrome, HPS）患者の骨髄標本を凍結保存した。貪食細胞の性状を、MG染色、酵素抗体染色、*a*-naphthyl butylate（*a*-NB）染色を用いて検討した。

〈倫理面への配慮〉

実施にあたっては申請者らが所属する研究機関（秋田大学医学部）の倫理委員会の規定を厳守して研究を遂行した。ヒト細胞の採取にあたっては秋田大学医学部倫理委員会の審査・承認を得ており文書で同意を得た。

C. 研究結果

1. 樹状細胞による自己血球の貪食

TPOによって巨核球系前駆細胞が誘導された。CD41+細胞、CD61+細胞の純度は約90%であった。TNF-*a*は濃度依存性に巨核球前駆細胞のアポトーシ

スを誘導し、非巨核球系細胞を増加させた。非巨核球系細胞はCD 4 + CD11c+ CD123+のDCsからなっていた。DCsの発生は3～5日以内と迅速であった。DCsによる自己巨核球系細胞の接着と貪食を認めた(貪食DCs)。貪食DCsは自己リンパ球の増殖を誘導した。DCsはIL-8と微量のIL-6を産生したが、IL-10やL-12の産生を認めなかった。

2. 生体における血球貪食細胞の同定

HPS症例 (n-3) において、DC11c+細胞の62.2～84.4%が貪食細胞であった。α-NBによる顆粒染色性はin vitroで誘導したDCsに類似していた。

D. 考察

DCsのみがT細胞を活性化さらには制御できることから、免疫学的記憶の維持や免疫寛容の誘導(以下、免疫系ホメオスタシス)におけるDCの重要性が予測される。1997年、NS Young (N Engl J Med) によって、自然免疫系による自己・非自己の識別の破綻が、造血幹・前駆細胞を攻撃対象とする臓器特異的自己免疫疾患の発症につながるという概念が提唱された。本研究によって、その起点である「自己造血前駆細胞のDCsによる貪食」を証明した(図1)。

さらに、造血刺激と炎症刺激の共存は造血幹細胞からDCsを誘導し、DCsによる自己造血前駆細胞の貪食を誘導する普遍的現象であることを明らかにした。DCsの自己血球貪食の生理的・病態的意義については不明にとどまる。しかし、DCsによるサイトカイン産生能が乏しいことから、一般の炎症に関しては免疫寛容の誘導によって免疫系ホメオスタシスの維持に関

図1 自己造血前駆細胞のDCsによる貪食

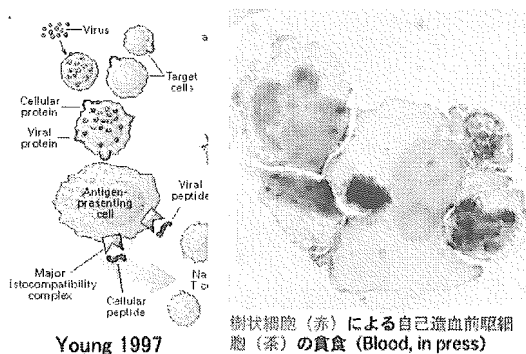
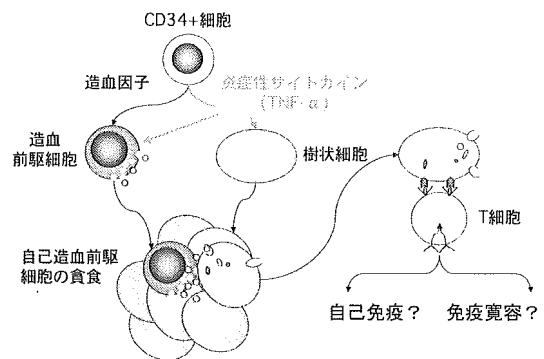


図2 DCsの発生と自己血球の貪食



与していると推定される(図2)。現時点で免疫学的記憶の維持や免疫寛容の誘導がどのような機転で制御されているのかは不明である。これまでに、アポトーシス細胞を貪食したDCsは免疫寛容の誘導に働くこと、また、壊死細胞を貪食したDCsは重症の自己免疫疾患を誘導し得ることが報告されている。

貪食細胞は従来から単球・マクロファージ由来の細胞、もしくは組織球とされていた。我々はこれらの貪食細胞の形態がDCsに極めて類似していることから、血球貪食症候群を対象として貪食細胞の細胞学的性状を解析した。その結果、貪食細胞の少なくとも一部はDCsであることを証明した。このことはDCsによる自己血球の貪食が、in vitroのみではなく、in vivoにおいても病態成立に関与していることを示唆している(1)。骨髄の“場”を起点とする自己免疫疾患の成立機構の存在を強く示唆するものであり、DCsの異常活性化や機能低下に基づく新たな疾患概念の存在が疑われる(図2)。

E. 結論

造血幹・前駆細胞は、造血刺激と炎症刺激の共存下で自己造血前駆細胞を貪食するDCsを発生することを証明した。また、血球貪食症候群における貪食細胞の少なくとも一部はDCsであることを示した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito K, Hirokawa M, Inaba K, Fukaya H, Kawabata Y, Komatsuda A, Yamashita J, Sawada K. Phagocytosis of co-developing megakaryocytic progenitors by dendritic cells in culture with thrombopoietin and tumor necrosis factor- α and its possible role in hemophagocytic syndrome. Blood [Epub ahead of print], 2005
 - 2) Fujishima M, Hirokawa M, Fujishima N, Sawada K. TCR $\alpha\beta$ repertoire diversity of human naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. Immunol Lett. 99 : 193-197, 2005
 - 3) Okuyama S, Komatsuda A, Wakui H, Aiba N, Fujishima N, Iwamoto K, Ohtani H, Sawada K. Up-regulation of TRAIL mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal-change nephrotic syndrome. Nephrol Dial Transplant 20 : 539-544, 2005
 - 4) Wakui H, Masai R, Okuyama S, Ohtani H, Komatsuda A, Toyoshima I, Watanabe S, Sawada K. Development of lupus nephritis in a patient with human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy. American J Kidney diseases 46(2)e25-e29, 2005
2. 学会発表
 - 1) 藤島直仁、廣川誠、藤島眞澄、齊藤宏文、茂木睦仁、三浦偉久男、澤田賢一：胸腺腫合併赤芽球癆でみられたV δ 1+ $\gamma\delta$ T細胞のoligoclonal expansion、第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会、横浜、2005. 9. 17-19
 - 2) 藤島眞澄、廣川誠、藤島直仁、齊藤宏文、川端良成、三浦偉久男、澤田賢一：ヒトCD4+CD25+制御性T細胞におけるTCRBVレパトアの多様性について、第67回日本血液学会・第47回日本臨床血液学会合同総会、横浜、2005. 9. 17-19
 - 3) Sawada K, Hirokawa M, Inaba K, Fukaya H, Kawabata Y, Komatsuda A, Yamashita J, Saito K. Phagocytosis of co-developing megakaryocytic progenitors by dendritic cells in the culture with thrombopoietin and tumor necrosis factor- α : Possible role in hemophagocytic syndrome. Poster Session 333-III. Monday, December 12, Atlanta, 2005
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）
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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

「間質性肺炎を伴うリウマチ関連疾患における LTA 遺伝子多型と TYMS 遺伝子多型の解析」

分担研究者 河野 修興 広島大学大学院・分子内科学 教授

研究要旨：日本人リウマチ性疾患患者を対象に、LTAのintron 1領域の252A/G遺伝子多型と間質性肺炎との関連について検討し、またTYMSプロモーター領域tandem repeat内のG/C一塩基置換多型頻度を解析した。その結果、LTA遺伝子多型と間質性肺炎の間に関連は認められなかった。TYMS遺伝子型は3G/3Cが最多（38.9%）で、2R/2Rが最少（3.1%）であり、白人、ラテン系およびアフリカ系アメリカ人、中国人での頻度のいずれとも異なっていたが、日本人大腸癌を対象とした多型頻度に合致していた。TYMSプロモーター領域tandem repeat遺伝子多型は人種と性別により異なることが示唆された。

A. 研究目的

難治性リウマチ性疾患に対する新たな治療法として造血幹細胞移植が試みられている。欧米を中心に、強皮症、全身性エリテマトーデス、関節リウマチなどの自己免疫疾患に対し臨床試験が実施され、その有効性が報告されているが、その問題点のひとつは、治療関連死が10%前後と造血器悪性疾患のそれと比較して高いことで、その背景には種々の難治性臓器合併症や先行する免疫抑制療法の影響などが考えられている。難治性臓器合併症の一つである間質性肺炎は、発症頻度、発症様式、治療反応性、生命予後が疾患ごとに、また症例ごとに大きく異なる。関節リウマチは基本的には全身性疾患で間質性肺炎は全身性病態（関節外病変）の一つであり、その病態は肺胞隔壁の炎症、すなわち肺胞隔壁への肺胞マクロファージ、好中球、リンパ球などの炎症細胞浸潤である。

このような生体の炎症反応や免疫応答の調節に関与するサイトカインの一つがtumor necrosis factor α (TNF α) やlymphotoxin α (LTAまたはTNF β) であり、これらはTNFファミリーと呼ばれている。ヒトにおいては第6染色体に存在し、様々なサイトカイン、ケモカイン、接着因子、蛋白分解酵素などの発現を誘導する。LTAは自己免疫や炎症の進展と発現に関与すると考えられ、LTA遺伝子は気管支喘息、慢性副鼻腔炎や関節リウマチなど様々な炎症性疾患との

関連が報告されている。近年の遺伝子解析研究により、LTAタンパク質の発現量に関わるLTA intron 1領域内の252A/G遺伝子多型が報告された。本研究では、リウマチ性疾患に伴う炎症性病態としての間質性肺炎とLTA遺伝子多型との関連について解析した。

また、我々はこれまで免疫抑制剤として広く使用されているメトトレキサート (MTX) の代謝酵素の一つであるthymidylate synthase (TYMS) の遺伝子プロモーター領域tandem repeat多型とMTX感受性との関連を報告してきたが、TYMSプロモーター領域tandem repeat領域において、新たに酵素活性に影響する一塩基置換多型が報告されたことより、日本人関節リウマチ患者における、新たに報告されたTYMS遺伝子多型の頻度を解析した。

B. 研究方法

間質性肺炎を合併したりウマチ性疾患患者26名（関節リウマチ21名、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎などの関節リウマチ以外のリウマチ性疾患5名）と間質性肺炎を認めないリウマチ性疾患患者85名（関節リウマチ68名、全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎などの関節リウマチ以外のリウマチ性疾患17名）の計111名を対象として、LTAのintron 1領域における252A/G遺伝子多型を解析した。関節リウマチ群、および関節リウマチ以外のリウ

マチ性疾患群の2群間、また各群での間質性肺炎合併の有無に関してLTA 252A/G遺伝子多型との関連を比較検討した。対象者の末梢血単核球よりDNAを抽出し、その抽出したgenomic DNAを、PCR法により増幅し、制限酵素Nco Iを用いたPCR-RFLP法により解析した。使用したプライマーは以下である。Sense, 5'-CCGTGCTTCGTGCTTTGGACTA-3'; Antisense, 5'-AGAGCTGGTGGGGACATGTCTG-3'。

また、関節リウマチ患者95名(男性16名、女性79名)を対象として、TYMSプロモーター領域tandem repeat内G/C一塩基置換多型頻度を解析した。対象者の末梢血単核球よりgenomicDNAを抽出し、PCR法および制限酵素Hae IIIで処理したPCR-RFLP法により解析した。使用したプライマーは以下である。Sense, 5'-GTGGCTCCTGCGTTTCCCC-3'; Antisense, 5'-TCCAGCCGCCACAGGCAT-3'。

本研究における遺伝子解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)を遵守すると共に、広島大学医学部倫理審査委員会による承認を得た後、対象者への遺伝子的検索を含めたインフォームド・コンセントを実施し同意を得て行った。

C. 研究結果

関節リウマチ群およびリウマチ性疾患群におけるLTAのintron 1領域252A/G遺伝子多型解析の結果を表1に示す。関節リウマチ群において、間質性肺炎合

表1 Frequencies of genotypes and alleles of the polymorphisms in the LTA

LTA intron 1 252 A→G	n	Genotype			Allelotype	
		AA (%)	AG (%)	GG (%)	A	G
RA with interstitial pneumonia	21	10 (47.6)	10 (47.6)	1 (4.8)	0.71	0.29
RA without interstitial pneumonia	68	32 (47.0)	32 (47.0)	4 (6.0)	0.71	0.29
RD with interstitial pneumonia	5	2 (40.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	0.70	0.30
RD without interstitial pneumonia	17	7 (41.2)	7 (41.2)	3 (17.6)	0.62	0.38
Total	111	51 (45.9)	52 (46.8)	8 (7.3)	0.69	0.31

RA: patients with rheumatoid arthritis RD: patients with rheumatic diseases except for RA n = number of subjects analyzed

表2 Association between LTA polymorphism and interstitial pneumonia

LTA polymorphism	With IP
AA	12
AG / GG	14

P = 0.9806

併群と非合併群の2群間における野生型(AA)と変異型アリルを含む型(AGまたはGG)との比較では両群間での差は認めなかった(P=0.9641)。また、関節リウマチ以外のリウマチ性疾患群における間質性肺炎合併群と非合併群の比較でも両群間での差は認めず(P=0.9625)、関節リウマチ群をも含めたりウマチ性疾患群全体では、間質性肺炎合併群と非合併群との間に差を認めなかった(表2)。関節リウマチ群とこれを除くリウマチ性疾患群の両群間における多型頻度には差を認めず、関節リウマチを含む日本人リウマチ関連疾患全体におけるLTAのintron 1領域252A/G遺伝子多型のGenotype頻度はAA、AG、GGがそれぞれ45.9%、46.8%、7.3%であった。

TYMSプロモーター領域tandem repeat内におけるG/C一塩基置換多型における関節リウマチ患者におけるGenotypeとアリル頻度をそれぞれ示す(表3)。日本人関節リウマチ患者におけるGenotype頻度は2R/2R、2R/3G、2R/3C、3G/3G、3G/3C、3C/3Cがそれぞれ3.1%、12.6%、13.7%、14.7%、38.9%、15.8%であり、2R、3G、3Cの各アリル頻度は、それぞれ16.3%、40.5%、42.1%であった。

表3 Genotype and Allele frequency of the TYMS polymorphism in 95 patients with RA

Population (n)	2R/3R			3R/3R		
	2R/2R	2R/3G	2R/3C	3G/3G	3G/3C	3C/3C
RA (95)	3	12	13	14	37	15

Population (n)	Frequency of Allele		
	2R (%)	3G (%)	3C (%)
RA (95)	31 (16.3)	77 (40.5)	80 (42.1)

RA: patients with rheumatoid arthritis n = number of subjects analyzed One patient had a 3R/5R genotype.

D. 考察

日本人におけるLTAのintron 1領域252A/G遺伝子多型と関節リウマチを主としたリウマチ性疾患に伴う間質性肺炎との関連は認めなかった。関節リウマチの病態形成には種々の炎症性サイトカインが関与し、腫瘍壊死因子 (TNF α) は中心的な役割を担っている。近年、抗TNF α モノクローナル抗体と可溶性TNFレセプター製剤が臨床応用され、その有効性が確認されている。可溶性TNFレセプター製剤はTNF α のみならずTNF β (LTA) にも結合し、その効果を発現する。

最近、転写活性を増強するLTA遺伝子多型の存在が示され、LTA遺伝子多型は心筋梗塞の発症危険因子の一つである可能性が報告された。LTAは関節リウマチの病態形成に関与しているため、その遺伝子多型は関節リウマチの関節外病態形成に関与している可能性がある。しかし、本研究においてはLTA遺伝子多型と関節外病変としての間質性肺炎との関連は認められなかった。LTAはこれまで血管の炎症との関連が示唆されていることから、今後、血管炎病態を伴う関節リウマチを対象としてLTA遺伝子多型との関連を検討する必要がある。さらに、LTAの細胞外分泌に関与するガレクチン2の発現量に影響する遺伝子多型の存在が明らかにされたことより、炎症性病態としての間質性肺炎はLTAのみならずガレクチン2をも含めた検討が必要である。

また、TYMSプロモーター領域tandem repeat遺伝子型は3G/3Cが38.9%と最多で、2R/2Rが3.1%と最も少なかった。この結果は、これまでに報告されている白人、ラテン系アメリカ人、アフリカ系アメリカ人、中国人における頻度のいずれとも異なっている。しかし、日本人大腸癌を対象とした遺伝子多型解析で性別による頻度の差が報告されており、本研究はこれに合致していた。今後、本多型とMTX感受性との関連についても検討する必要がある。

E. 結論

日本人リウマチ性疾患に伴う間質性肺炎と炎症性サイトカインであるLTAのintron 1領域252A/G遺伝子多型との間に有意な相関は認められなかった。しかし、LTAは血管炎症との関連が示唆されていることより

血管炎病態を伴うリウマチ性疾患の病態形成との関連についても今後検討すべきである。また、LTAのみならずLTA結合蛋白であるガレクチン2をも含め、炎症性サイトカインと間質性肺炎以外のリウマチ性疾患に伴う難治性病態との関わりについても検討する必要がある。

また、日本人における関節リウマチ患者におけるTYMSプロモーター領域tandem repeat内におけるG/C一塩基置換多型のGenotype頻度は2R/2R、2R/3G、2R/3C、3G/3G、3G/3C、3C/3Cがそれぞれ3.1%、12.6%、13.7%、14.7%、38.9%、15.8%であり、2R、3G、3Cの各アリル頻度は、それぞれ16.3%、40.5%、42.1%であった。TYMSプロモーター領域tandem repeat遺伝子型で3Gアリルを有する多型は、有しないものと比べより効率的に発現することが報告されているため、本多型とMTX感受性についても検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kumagai K, Hiyama K, Oyama T, Maeda H, Kohno N. Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. *Int. J. Mol. Med* 11(5) : 593-600, 2003.
- 2) Ohshimo S, Yokoyama A, Hattori N, Ishikawa N, Hirasawa Y, Kohno N. KL-6, a human MUC 1 mucin, promotes proliferation and survival of lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 338(4) : 1845-1852, 2005.
- 3) Mitsuta K, Yokoyama A, Kondo K, Nakajima M, Arita K, Kohno N. Polymorphism of the MUC 1 mucin gene is associated with susceptibility to lung adenocarcinoma and poor prognosis. *Oncology Reports*. 14(1) : 185-189, 2005.

2. 学会発表

- 1) 熊谷和彦、檜山桂子、前田裕行、粟屋幸一、小

- 山徹、河野修興。関節リウマチ患者における代謝酵素遺伝子多型とメトトレキサートの効果および副作用発現についての検討。第47回日本リウマチ学会総会・学術集会 2003.4.24-26 東京。
- 2) Kohno N, Yokoyama A, Hamada H, Higaki J, Nakajima M. Prognostic value of circulating KL- 6 in idiopathic pulmonary fibrosis. The 14th European Respiratory Society Annual Congress. 2004. 9. 4-8 Glasgow, Scotland.
- 3) Inata J, Yokoyama A, Mitsuta K, Nakashima T, Shohda H, Ohnishi H, Miyazaki M, Kohno N. Prognostic value of circulating MUC1/KL-6 with selectin ligands in patients with lung adenocarcinoma. The 15th European Respiratory Society Annual Congress. 2005. 9. 16-22 Copenhagen.

G. 知的財産権の出願・登録状況

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

「膠原病に対する造血幹細胞移植の作用機序、および移植後の免疫回復の解析」

分担研究者 平家 勇司 国立がんセンター研究所／薬効試験部 主任研究官

研究要旨：制御性T細胞（Regulatory T細胞）と、同種造血幹細胞移植後のGvHD並びにGvL効果、並びに前処置との関連性を検討した。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植の重大な治療関連合併症であるGvHDと制御性T細胞（Regulatory T細胞：Treg）が関連しているとの報告がある。また、腫瘍が宿主免疫から逃れて増殖する際にもTregが大きな働きをしていることの報告がある。がん患者に対する免疫療法の前に、エンドキサン等を使用すればTregによる免疫寛容が解除され、その後の免疫治療の効果を高めることができるとの報告が見られている。

そこで、国立がんセンター中央病院にて行われた同種造血幹細胞移植症例を対象として、移植後GvHDとTregとの関連性、移植前処置のTregに与える影響を検討した。

B. 研究方法

研究背景・研究目的・研究方法（患者検体の採取、詳細な解析方法を含む）を記載した研究計画書を作成し、国立がんセンター内の倫理審査委員会にて承認を得て研究を行った。具体的な研究方法は以下の通りである。

国立がんセンター中央病院・血液幹細胞療法科にて、各種疾患に対する骨髄非破壊的前処置を用いた末梢血幹細胞移植（ミニ移植）を受けた患者さんを対象に、移植前ならびに移植後定期的に末梢血採血を行った。さらに、GvHD出現時にも採血を行った。検体は直ちに中央病院12階支援研究施設に搬送し、単核球を分離した上で以下の検討を行った。

・各種細胞表面マーカーの解析：

CD3, CD4, CD8, CD25, CD45, CD45RA, CD45RO,

ITGRの発現解析を行った。併せて、細胞内FoxP3の発現をRT-PCR並びに細胞内蛋白定量染色法にて検討した。

〈倫理面への配慮〉

研究計画書を作成し、国立がんセンターの倫理審査会の承認を得て研究を行った。採血に際しては、当日の患者状態を診察し、患者に臨床上的不利益を与えないよう配慮を行った。

C. 研究結果

- 1) 我々の検討では、末梢血液中のCD4⁺CD25⁺T細胞分画（Treg）とGvHDとが連動して動く症例はあるものの、総合してみた場合その明確な関連性は明らかとはならなかった。
- 2) NKT細胞ならびにCD4⁺CD25⁺T細胞が連動して変化する傾向が見られた。
- 3) 移植前処置によってTregの絶対数は減少するものの、リンパ球全体に占める割合は変化せず、特異的な現象とは結論付けられなかった。
- 4) 通常移植の前処置並びにATGを用いた骨髄非破壊的前処置では、前処置によりほとんどすべての細胞が消失していたため解析が困難であった。

D. 考察

本年度は、同種造血幹細胞移植の各ステップにおけるTregの役割を解析した。Tregは当初CD4⁺CD25⁺T細胞として同定され、その分画を用いてGvHDを制御する試みが行われている。我々は、

CD4⁺CD25⁺T細胞群の減少がGvHD発症・増悪に関連しているか否かを検討するため、移植後定期的並びにGvHD発症時に同細胞の定量解析を行った。幾つかの症例ではGvHD発症時に減少していることが確認されたが、関連性を見出せない症例も多数存在しており、総合的に見た場合CD4⁺CD25⁺T細胞とGvHDとの関連性は明確にはならなかった。その原因として、移植に用いる他の薬剤の影響や、CD4⁺CD25⁺という括りではTregが正確に把握できていない可能性が考えられた。最近では、TregをCD4⁺CD25⁺細胞として括るのではなく、細胞表面のGITR分子の発現や、細胞内におけるFoxP3の発現解析を併せ検討することが必要との報告も多数なされており、今後の症例ではこれらの解析を併せ行う必要があると考えている。

移植前処置によるTregへの影響に関しては、通常移植、ATGを用いるミニ移植、ATGを用いないミニ移植に大きく分けて検討すべきと考えた。前処置前と前処置終了後でCD4⁺CD25⁺GITR⁺T細胞の割合並びに絶対数を比較したところ、通常移植並びにATGを使用した例ではリンパ球そのものが消失し絶対数の測定並びにその比較は意味を持たなかった。ATGを用いないミニ移植は、症例数に限りがあるため、今回の検討では方向性を示唆するデータも得られなかった。前処置による影響を検討する際にも、細胞内FoxP3の解析を行うべきであるが、前処置後はリンパ球数が少ないため、細胞内FoxP3の解析は不可能であった。今後、前処置の影響の解析に関しては、ATGを用いないミニ移植に症例を絞って継続していく予定である。

E. 結論

今回の解析では、CD4⁺CD25⁺T細胞として解析したTregと、GvHDとの関係は明確にはならなかった。移植前処置とTregとの関係も、通常移植並びにATGを用いる前処置ではリンパ球そのものが消失するため解析不能であり、ATGを用いないミニ移植は症例が少ないため明確な結論を得ることができなかった。これらの結論に基づいて、今後以下のような研究が必要と考えている。1) CD4⁺CD25⁺GITR⁺FoxP3⁺T細胞とGvHDとの関連性の解析、2) ATGを用いないミニ移植症例を対象として、CD4⁺CD25⁺GITR⁺FoxP3⁺T細胞

の変動を解析する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Heike, Y., Hosokawa, M., Osumi, S., Fujii, D., Aogi, K., Takigawa, N., Ida, M., Tajiri, H., Eguchi, K., Shiwa, M., Wakatabe, R., Arikuni, H., Takaue, Y. and Takashima, S. Identification of Serum Protein Related to Adverse Effects Induced by Docetaxel Infusion from Protein Expression Profiles of Serum Using SELDI ProteinChip System. *AntiCancer Res*, 25 : 1197-1204, 2005.
- 2) Harada, Y., Imataki O., Heike, Y., Kawai, H., Shimsaka, A., Mori, S., Kami, M., Tanosaki, R., Ikarashi, Y., Iizuka, A., Yoshida, M., Wakasugi, H., Saito, S., Takaue, Y., Takei, M. and Kakizoe, T. Expansion of α -Galactosylceramide-Stimulated V α 24⁺ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials. *Journal of Immunotherapy*, 28 : 314-321, 2005.
- 3) Hosokawa, M., Kadota, R., Shichijyo, S., Itoh, K., Dmitriev, I., Krasnykh, V., Curiel, D.T., Takaue, Y., Wakasugi, H., Takashima S. and Heike, Y. Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by SART-1 Gene Transduction. *AntiCancer Res*, 25 : 1983-1990, 2005.
- 4) Ohama, Y., Heike, Y., Sugahara, T., Sakata, K., Yoshimura, N., Hisaeda, Y., Hosokawa, M., Takashima, S. and Kato, K. Gene transfection into HeLa cells by vesicles containing cationic peptide lipid, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69:1453-1458, 2005.
- 5) Ikarashi, Y., Iizuka, A., Koshidaka, Y., Heike, Y., Takaue, Y., Yoshida, M., Kronenberg, M., and Wakasugi, H. Phenotypical and functional alterations during the expansion phase of

- invariant Valpha14 natural killer T (Valpha14i NKT) cells in mice primed with alpha-galactosylceramide. *Immunology*, 116 : 30-37, 2005.
- 6) Ikarashi, Y., Iizuka, A., Heike, Y., Yoshida, M., Takaue, Y., and Wakasugi, H. Cytokine production and migration of in vitro-expanded NK1.1(-) invariant Valpha14 natural killer T (Valpha14i NKT) cells using alpha-galactosylceramide and IL-2. *Immunol Lett.*, 101 : 160-167, 2005.
- 7) Morita, Y., Hosokawa, M., Ebisawa, M., Sugita, T., Miura, O., Takaue, Y. and Heike, Y. Evaluation of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-lymphocytes in patients with the HLA-A(*)02 or HLA-A(*)24 phenotype undergoing hematopoietic stem cell transplantation, *Bone Marrow Transplant*, 36 : 803-811, 2005.
- 8) Ohnishi, M., Sakurai, T., Heike, Y., Yamazaki, R., Kanda, Y., Takaue, Y., Mizoguchi, Y. and Kawakami, Y. Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon-enzyme-linked immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope, *British J. Hematol*, *in press*,
- 9) Imataki, O., Heike, Y., Oshida, T., Takaue, Y., Ikarashi, Y., Yoshida, M., Wakasugi, H. and Kakizoe, T. Efficient *ex vivo* expansion of V α 24⁺ NKT cells derived from G-CSF-mobilized blood cells, *Journal of Immunotherapy*, *in press*,
- 10) Morita, Y., Heike, Y., Kawakami, M., Miura, O., Nakatsuka, S., Ebisawa, M., Mori, S., Tanosaki, R., Fukuda, T., Kim, SW., Tobinai, K. and Takaue, Y. Monitoring of WT1-Specific Cytotoxic T Lymphocyte after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *International Journal of Cancer*, *in press*,
2. 学会発表
- 1) Morita Y, Heike Y, Hosokawa M, Tanosaki R, Mori S, Kim SW, Kami M, Miura O, Tobinai K, Takaue Y : Evaluation of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-lymphocytes in patients with HLA-A*24 phenotype undergoing haematological stem cell transplantation. The 31st Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. 2005
- 2) Heike Y, Hosokawa M, Morita Y, Tobinai K, Takaue Y : Ex vivo expansion of CMV lysate stimulated CD4⁺ T cells for adoptive immunotherapy. The 34th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology. 2005
- 3) Onishi K, Katayama N, Yamamura K, Heike Y, Takaue Y, Shiku H : Divergent Roles of Histone Deacetylases in Human Adult Erythropoiesis. The 47th American Society of Hematology Annual Meeting, 2005 (abstr #130)
- 4) Imataki O, Heike Y, Takaue Y, Wakasugi H: Insufficient Ex Vivo Expansion of Va24+ Natural Killer T Cells in Cancer Patients May Be Related to the Suppressed Expression of CD 1 d Molecules on CD14+ Cells. The 47th American Society of Hematology Annual Meeting, 2005 (abstr #1066)
- 5) Maruyama D, Fukuda T, Kato R, Yamasaki S, Usui E, Morita Y, Kim SW, Mori S, Tanosaki R, Tajima K, Heike Y, Makimoto A, Tobinai K, Takaue Y : Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for the Treatment of Hematologic Malignancies Not in Remission : The Anti-Tumor Effect of Reduced-Intensity Conditioning Is Comparable to That of Conventional Myeloablative Conditioning. The 47th American Society of Hematology Annual Meeting, 2005 (abstr #1142)

6) Kato R, Fukuda T, Usui E, Yamasaki S, Maruyama D, Morita Y, Kim SW, Mori S, Tanosaki R, Tajima K, Heike Y, Makimoto A, Tobinai K, Takaue Y : Hematopoietic Cell Transplantation-Specific Comorbidity Index To Predict Non-Relapse Mortality and Survival after Allografting. The 47th American Society of Hematology Annual Meeting, 2005 (abstr #2731)

H. 産権の出願・登録状況

1. 特許出願状況

「培養用トレイ」特願2005-150523

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Ⅲ. 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

書籍

発表者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Sawada K.</u>	Acquired aplastic anemia and pure red cell aplasia.	Motoyoshi K, Ohno R	Educational program book.	Japanese Society of Hematology and Japanese Society of Clinical Hematology.	Japan	2005	30 - 38
澤田賢一, 茂木睦仁, 廣川 誠, 間宮繁夫, 浦部晶夫, 中尾真二, 小峰光博	赤芽球癆診療の参照ガイド「PRCA の診断基準と診療の参照ガイド作成のためのワーキンググループ」	小峰光博	平成16年度研究業績報告書	厚生労働省特定疾患特発性造血障害調査研究班	日本	2005	58 - 74

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, Tsukamoto H, Harashima S, Kikuchi Y, Otsuka J, Okamura S, Fujita S, <u>Harada M</u>	Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF- α .	Gastroenterology	128	376 - 392	2005
Okamura J, Utsunomiya A, Tanosaki R, Uike N, Sonoda S, Kannagi M, Tomonaga M, <u>Harada M</u> , Kimura N, Masuda M, Kawano F, Yufu Y, Hattori H, Kikuchi H, Saburi Y	Allogeneic stem-cell transplantation with reduced conditioning intensity as a novel immunotherapy and antiviral therapy for adult T-cell leukemia/lymphoma.	Blood	105 (10)	4143 - 4145	2005
Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, Watanabe T, Akashi K, Shultz LD, <u>Harada M</u>	Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor γ chain ^{null} mice.	Blood	106 (5)	1565 - 1573	2005
Takama H, Tanaka H, Nakashima D, Ueda R, <u>Takaue Y</u>	Population pharmacokinetics of intravenous busulfan in patients undergoing hematopoietic stem cell plantation.	Bone Marrow Transplant	37	345 - 351	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
<u>Kanda Y</u> , Komatsu Y, Akahane M, Kojima S, Asano-Mori Y, Tada M, Oshima K, Isayama H, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Ohtomo K, Omata M, Hirai H.	Graft-versus-tumor effect against advanced pancreatic cancer after allogeneic reduced-intensity stem cell transplantation.	Transplantation	79 (7)	821 - 827	2005
<u>Kanda Y</u> , Oshima K, Asano-Mori Y, Kandabashi K, Nakagawa M, Sakata-Yanagimoto M, Izutsu K, Hangaishi A, Tsujino S, Ogawa S, Motokura T, Chiba S, Hirai H.	In vivo alemtuzumab enables haploidentical HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation without ex vivo graft manipulation.	Transplantation	79 (10)	1351 - 1357	2005
<u>Kanda Y</u> , Sakamaki H, Sao H, Okamoto S, Koderia Y, Tanosaki R, Kasai M, Hiraoka A, Takahashi S, Miyawaki S, Kawase T, Morishima Y, Kato S. for the Japan Marrow Donor Program	Effect of conditioning regimen on the outcome of bone marrow transplantation from an unrelated donor.	Biology of Blood and Marrow Transplantation	11	881 - 889	2005
石岡大成、加藤政彦、山口貴史、吉住正和、小澤邦壽、鮫島伸一、澤田俊夫、星野洪郎、木村博一	気道上皮細胞に対する好酸球顆粒蛋白および Respiratory Syncytial ウイルスの障害性	Cytometry Research	15 (2)	1 - 5	2005
Machii T, Chou T, Suzuki M, <u>Ohashi Y</u> . et al	Phase II Clinical Study of Cladribine in the treatment of Hairy Cell Leukemia.	International Journal of Hematology	83	230 - 235	2005
Matsuda T, Yakayama T, Tashiro M, <u>Ohashi Y</u> . et al	Mild Cognitive Impairment after Adjuvant Chemotherapy in Breast Cancer patients-Evaluation of Appropriate Research Design and Methodology to Measure Symptoms.	Breast Cancer	12 (4)	279 - 287	2005
Kobayashi K, Green J, Shimonagayoshi M, <u>Ohashi Y</u> . et al	Validation of the Care Notebook for Measuring Physical, Mental and Life Well-being of Patients with Cancer.	Quality of Life Research	14	1035 - 1043	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yasuda,S., Atsumi,T., Matsuura,E., Kaihara,K., Yamamoto,D., Ichikawa, K., <u>Koike,T.</u>	Significance of valine/leucine ²⁴⁷ polymorphism of β_2 -glycoprotein I in antiphospholipid syndrome: increased reactivity of anti- β_2 -glycoprotein I autoantibodies to the valine ²⁴⁷ β_2 -glycoprotein I variant	Arthritis Rheum	52 (1)	212 – 218	2005
Nishio,S., Hatano,M., Nagata,M., Horie,S., <u>Koike,T.</u> , Tokuhisa,T., Mochizuki,T.	Pkd1 regulates immortalized proliferation of renal tubular epithelial cells through p53 induction and JNK activation.	J Clin Invest	115 (4)	910 – 918	2005
Fukae,J., Amasaki,Y., Yamashita,Y., Bohgaki,T., Yasuda,S., Jodo,S., Atsumi,T., <u>Koike,T.</u>	Butyrate suppresses tumor necrosis factor α production by regulating specific messenger RNA degradation mediated through a <i>cis</i> -acting AU-rich element	Arthritis Rheum	52 (9)	2697 – 2707	2005
Fujishima M, Hirokawa M, Fujishima N, <u>Sawada K.</u>	TCR $\alpha\beta$ repertoire diversity of human naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells.	Immunol Lett	99	193 – 197	2005
Okuyama S, Komatsuda A, Wakui H, Aiba N, Fujishima N, Iwamoto K, Ohtani H, <u>Sawada K.</u>	Up-regulation of <i>TRAIL</i> mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with minimal-change nephrotic syndrome.	Nephrol Dial Transplant	20	539 – 544	2005
Wakui H, Masai R, Okuyama S, Ohtani H, Komatsuda A, Toyoshima I, Watanabe S, <u>Sawada K.</u>	Development of lupus nephritis in a patient with human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy.	American Journal of Kidney diseases	46 (2)	e25 – e29	2005
Ohshimo S, Yokoyama A, Hattori N, Ishikawa N, Hirasawa Y, <u>Kohno N.</u>	KL-6, a human MUC1 mucin, promotes proliferation and survival of lung fibroblasts	Biochem Biophys Res Commun	338	1845 – 1852	2005
Heike, Y., Hosokawa, M., Osumi, S., Fujii, D., Aogi, K., Takigawa, N., Ida, M., Tajiri, H., Eguchi, K., Shiwa, M., Wakatabe, R., Arikuni, H., Takaue, Y. and Takashima, S.	Identification of Serum Protein Related to Adverse Effects Induced by Docetaxel Infusion from Protein Expression Profiles of Serum Using SELDI ProteinChip System.	AntiCancer Res	25	1197 – 1204	2005

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Harada, Y., Imataki O., <u>Heike, Y.</u> , Kawai, H., Shimsaka, A., Mori, S., Kami, M., Tanosaki, R., Ikarashi, Y., Iizuka, A., Yoshida, M., Wakasugi, H., Saito, S., Takaue, Y., Takei, M. and Kakizoe, T.	Expansion of α -Galactosylceramide-Stimulated Va24 ⁺ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials.	Journal of Immunotherapy	28	314-321	2005
Morita, Y., Hosokawa, M., Ebisawa, M., Sugita, T., Miura, O., Takaue, Y. and <u>Heike, Y.</u>	Evaluation of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-lymphocytes in patients with the HLA-A*02 or HLA-A*24 phenotype undergoing hematopoietic stem cell transplantation.	Bone Marrow Transplant	36	803-811	2005

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Acquired Aplastic Anemia and Pure Red Cell Aplasia

Kenichi Sawada

Department of Internal Medicine III, Akita University School of Medicine

Aplastic anemia (AA) is a disorder characterized by the presence of pancytopenia and a hypocellular bone marrow. Acquired pure red cell aplasia (PRCA), a part of a unique form of AA, is a rare condition of profound anemia characterized by the absence of reticulocytes and the virtual absence of erythroid precursors in the bone marrow. AA can be effectively

treated by either stem cell transplantation or immunosuppressive therapy. However, PRCA has so far been treated by several different regimens which are largely empirically selected since so little control data are available. This seminar focuses on the current progress in the diagnosis and treatment of acquired AA and PRCA.

Acquired aplastic anemia

1. Diagnosis

1) Clinical presentation

Aplastic anaemia (AA) can develop either suddenly or insidiously over weeks to months. The clinical manifestations are proportional to the degree of peripheral blood cytopenia and can include dyspnoea on exertion, fatigue, easy bruising, petechiae, epistaxis, gingival bleeding, heavy menses, headache, and fever. In children and young adults, signs of congenital AA should be looked for, including a short stature, skeletal anomalies and skin changes, as seen in Fanconi anemia, or leukoplakia, nail dystrophy and skin pigmentation which is characteristic of dyskeratosis congenita. A previous history of jaundice, usually 1-3 months before onset, may indicate post-hepatic AA. A careful drug (and chemical) history should also be obtained¹.

2) Investigations required for Diagnosis

To confirm the diagnosis of AA, the following signs and investigations have been proposed by the Idiopathic Disorders of Hematopoietic Organs Research Committee (IDHORC) (Director; Mitsufumi Omine, M.D.) of the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan² regarding the (1) clinical presentation (2) criteria of pancytopenia (3) investigations in order to rule out any other possible causes of pancytopenia (4) findings helped to make the diagnosis of AA more definite: neutropenia

$<1.5 \times 10^9/L$ without an increase of reticulocytes, a decrease of nuclear cells by a bone marrow aspirate (including clot section), hypocellular marrow by a bone marrow biopsy, an increase in the serum iron and a decrease in the unsaturated iron binding capacity, and a decrease in the amount of hematopoietic tissue and an increase in the amount of fatty tissue based on the magnetic resonance imaging (MRI) findings. At diagnosis, the presence of the above points (1) and (2) suggest AA, while the presence of (3) rule out any other causes of cytopenia, while the presence of (4) makes the diagnosis of AA more definite. The diagnosis of AA, in principal, thus depends on the exclusion of other entities. In some cases it is difficult to differentiate from myelodysplastic syndrome (MDS) with refractory anemia. See Table 1 for a summary of the investigations required to correctly diagnose AA.

A complete blood count, differential count of leukocytes, reticulocyte count, and a bone marrow aspirate evaluation and biopsy can help to make an accurate diagnosis. Peripheral-blood flow cytometry to rule out paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) while bone marrow karyotyping to rule out hypoplastic MDS should be done for all patients. Patients younger than 40 years of age should be screened for Fanconi's anaemia using either clastogenic agents diepoxybutane or mitomycin, which identify the increased chromosomal breakage often seen

Address correspondence to Kenichi Sawada, MD, Hondo 1-1-1, Akita 010-8543, Japan.
Tel: +81-18-884-6111 Fax: +81-18-836-2613 E-mail: ksawada@doc.med.akita-u.ac.jp