

(検体保存施設)

第5条 JPLSG は、末梢血検体保存を国立成育医療センター研究所に委託する(以下、保存施設)。保存施設は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い業務を遂行する。

<委託業務の内容に関する細則>

- ・検体の収集・保存
- ・保存施設運用規定(別途作成)
- ・研究者から請求された検体の分譲
- ・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. 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。

(匿名化处理)

第6条 本規約に定められた研究期間の間は、疾患名、治療内容、治療反応性、予後、晩期障害、二次がん発生の有無など、長期に渡る患者の診療情報と保存検体の照合を必要としており、連結可能匿名化处理による検体保存が行われる。

2. 氏名、生年月日、カルテ番号その他特定の個人を識別できる患者個人情報と登録コード対照表は、患者主治医が属する参加施設が保管する。
3. 検体保存番号は、保存施設にて管理される。
4. 提供施設、保存施設には、個人情報管理者を置く。

(解析対象候補遺伝子)

第7条 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、現時点で全てを特定することは困難である。研究期間の更新にあたり新たに判明した解析対象候補遺伝子は、その都度報告し、審査を受ける。

(検体の保存に関する書面による説明と同意)

第8条 主治医は、患者が寛解状態に入った時点で、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、書面による同意を得る。

2. 治療開始後1ヶ月から2ヶ月の時点で寛解に入らない場合は、その時点の検体を、腫瘍細胞の混入率を明記した上で、患者の年齢に応じたアセントと代諾者の同意を取得後、保存する。
3. 書面による同意撤回は、いつでも可能である。また、保存の同意が撤回された検体は、速やかに廃棄する。

<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書面による説明には、以下のことが含まれていること。

- ・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。

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。

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

(アセントあるいは書面による同意の適応年齢)

第9条 12歳以上20歳未満の患者は代諾者からの書面による同意に加え、原則として患者自身の書面によるアセントを取得するよう努める。

2. 患者が7歳以上12歳未満の場合には、代諾者からの書面による同意に加え、原則として患者自身の口頭によるアセントを取得するよう努める。
3. 連結可能匿名化が行われている研究期間内に患者が16歳に達した場合には、可能な限り改めて本人の意思を確認するよう努める。

(保存検体の情報)

第10条 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. 保存検体の情報公開を、定期的に行う。

(検体の収集・保存期間の更新)

第11条 研究計画は、検体保存実績・供給実績、新たに判明した解析候補遺伝子等を付け加え、定期的に更新する必要がある。

2. 検体提出施設は、5年毎に検体採取・保存期間の更新を行う。

3. 検体保存施設は、5年ごとに検体採取・保存期間の更新を行う。

(保存の費用)

第12条 検体の搬送・保存に関する費用は、運営委員会と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。

(検体分譲の手順)

第13条 検体は、患者あるいはJPLSG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分譲される。

2. 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。

3. 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。

4. 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。

5. 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。

6. 研究申請者は、所属する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、保存施設に分譲の申請を行い、検体の分譲を受ける。

7. データセンター・保存施設は、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。

(検体の分譲を受ける資格)

第14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。

(検体分譲の費用)

第15条 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16条 連結可能匿名化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「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に準じておこなう。

2. 研究課題と研究概要および研究結果が公開される場合は、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、研究者の属する研究機関のホームページにリンクする形でも良い。

3. 研究結果報告の規定については、JPLSG 規約に準じる。

(内規の改正等)

第17条 本規約は、JPLSG 運営委員会の審議を経て、改正することができる。

附則

この規約は、平成19年 月 日から実施する。

資料 3.

研究課題: 日本小児白血病リンパ腫研究グループ登録患者における生殖細胞系列の遺伝子解析用検体の収集・保存と分譲(案) ver.2.7

【研究責任者】

堀部敬三: 日本小児白血病リンパ腫グループ運営委員長

独立行政法人国立病院機構 名古屋医療センター

臨床研究センター・センター長

【背景】

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、白血病・リンパ腫の診断精度、治療成績の向上を図るために組織された、小児がんの治療研究専門医を構成員とする全国規模の研究グループである(資料:組織図等)。JPLSG は先に「日本小児白血病リンパ腫研究グループ腫瘍検体保管・保存と分譲に関する規約」を作成し、患者の余剰腫瘍検体を保存し、研究用に使用する際の原則を提示した。その際、がん細胞に特異的な遺伝子や蛋白質の研究のみでは、がんを担う個体の全体像を把握するには不十分であり、生殖細胞系列の遺伝子解析研究用に患者検体を保存し、将来の小児がん研究に使用できるように準備する事の重要性が指摘された。小児がんは稀少な疾患であることから、検体の蓄積には時間を要するので、同意の得られた小児白血病リンパ腫患者寛解期末梢血等の検体保存を早期に実施すべきとの共通認識を持つに至り、「日本小児白血病リンパ腫研究グループ登録患者における生殖細胞系列の遺伝子解析用検体の収集・保存と分譲に関する規約」を作成し、検体の保存を行うこととした(規約添付)。

外国では既に National Cancer Institute の支援で、Childhood Cancer Survivor Study (CCSS)が行われている。これは 1970 年から 1986 年までに発症した 20 歳以下のがん患者のうち、5 年以上生存している患者 14,000 人分と患者の同胞 3,500 人分を QOL の観点から解析する研究計画である。この研究計画に、患者の頬粘膜細胞の DNA 収集と、二次がん経験者からのリンパ芽球様細胞株樹立の計画が含まれている。その成果はまだ公開されていないが、CCSS の 21 世紀の方向性の 1 つに、小児がん感受性遺伝子の同定のための生物材料の収集の継続(Journal of Pediatric Oncology Nursing 21: 160-134, 2004)と腫瘍および血液標本の組織バンク(http://cis.nci.nih.gov/fact/6_40.htm)をあげている。

【生殖細胞系列の遺伝子解析研究のために、小児がん患者検体を保存する目的】

以下の3点を目的とし、小児白血病リンパ腫患者(以下、患者)の寛解期末梢血、骨髄血、症例により、口腔粘膜、腫瘍組織、白血病細胞、リンパ芽球様細胞株、線維芽細胞(以下、検体)の保存を行う。

1) 小児がんは、遺伝的要因と環境要因が複雑に絡み合って発症すると思われるが、成人発症がん

に比較し、環境因子の影響はより少ないと推測される。また、成人に比し遺伝因子がより重要としても、いくつかの遺伝子が複雑に絡み合って発症に至る場合が大部分と考えられる。この多遺伝因子を明らかにするために、がん細胞を用いた研究のみではなく、患者検体を用いた生殖細胞系列の遺伝子解析研究が不可欠である。発生頻度の少ない小児がん患者の検体を患者から同意を得て保存することにより、最先端の生殖細胞系列の遺伝子解析研究に使用可能な検体の蓄積を行う。

- 2) 成人ではあまり考慮されない小児がんの大きな特徴の一つに、成長するに連れて明らかになる成長障害、臓器障害、生殖障害などの晩期障害の存在と、二次がん発生の問題があげられる。晩期障害や二次がん発生に関連し、薬物代謝に影響を与える遺伝子多型として、thiopurine S-methyltransferase (TPMT)、NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1)、Glutathione S-transferase (GSTs)や CYP3A 等が既に明らかにされているが、この他にも多くの候補遺伝子が存在するものと思われる。晩期障害や二次がん発生に関与する遺伝因子を明らかにするための検体を蓄積する。
- 3) (1)小児がん経験者は、一般健常者に比較し 3-6 倍高い二次がん発生率を持つ、(2)ホジキンリンパ腫や軟部組織肉腫のようなある特定のがんに二次がん発生が多い、(3)診断時の年齢が若ければ若いほど、二次がんの発生率が高くなる(age effects)、(4)放射線照射に対し女性は男性よりがん発生に対する感受性が高い、(5)遺伝因子と環境因子の相互作用による発がんなど、知られていながらまだ原因を明らかに説明が出来ない現象を明らかにするために検体を保存する。

【解析候補となる遺伝子】

実際には、ここに掲げた遺伝子以外に、がんと関連が疑われる遺伝子の多型を中心に、ゲノム網羅的な解析を行う必要がある。これら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、現時点では事実上特定は困難である。以下に現在までに知られている遺伝子多型や変異遺伝子を列挙し、その特徴について表にまとめた。

(遺伝子多型)

Solute carrier (SCL19A1)80G/A、 γ -glutamyl hydrolase(GGH)452C/T、CGH401C/T、dihydrofolate reductase (DHFR)、folypolyglutamate synthase(PPGS)、thymidine synthase (TYMS)、methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)、thiopurine S-methyltransferase (TPMT)、glutathione S-transferase (GST)T1、ABCB1 3435C>T、glucocorticoid receptor (NR3C1)、vitamine D receptor(VDR)、NAD(P)H dehydrogenase quinone1 (NQO1)。

(単一遺伝子変異)

P53、ATM、SAP、NF1、Chk2、Artemis、hRAS、kRAS、PTPN11、hMunc13-4、Perfolin、Lyst、ミオシン 5a、Btk。

【研究対象と人数】

JPLSG 登録コードが割り当てられ、同意の得られた患者全てを対象とする。患者数は年間約350人から400人が見込まれる。

【保存対象となる検体】

患者の寛解期末梢血、骨髄血が主たる保存対象である。寛解に入らない症例においては、口腔粘膜や白血病細胞が混在する末梢血、骨髄血も保存の対象とする。必要な症例については、リンパ芽球様細胞株や線維芽細胞も保存の対象とする。

【検体採取施設】

検体を採取・提供する医療機関は、JPLSG 施設会員（以下、施設会員）でなければならない。施設会員は、検体の研究等を目的とした提供と保存に先立って、提供施設の長の承認を受ける。また、施設会員は、同意を取得した患者からの問い合わせ、苦情、同意撤回の申し出があった場合は、速やかに対応しなければならない。

【検体の採取時期】

検体の採取時期は、治療開始後1ヶ月から2ヶ月の間を目安とする。未だ寛解に入っていない場合は、その時点での検体を、腫瘍細胞の混入率を明記した上で採取し、保存する。検体保存時期は、保存検体の母集団から、難治症例が逸脱することを防ぐこと、および化学療法による造血幹細胞遺伝子への障害を極力避けることの2点を考慮して決められた。

【匿名化处理】

本研究の研究期間の間は、疾患名、治療内容、治療反応性、予後、晩期障害、二次がん発生の有無など、長期に渡る患者の診療情報と保存検体の照合を必要としており、連結可能匿名化处理による検体保存が行われる。氏名、生年月日、カルテ番号その他特定の個人を識別できる患者個人情報と登録コード対照表は、患者主治医が属する参加施設が保管する。検体保存番号は、保存施設にて管理される。また、提供施設、保存施設には、個人情報管理者を置く。

【検体の送付と分譲】

検体は、国立成育医療センター研究所発生分化研究部に送付する。送付された検体は、保存施設運用規定に従い保存される(資料添付)。これらの検体は、基本的には「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」のA群試料とみなされ、JPLSGの研究審査委員会およびJPLSG運営委員会の承認を

得た研究計画のうち、研究者の所属する研究機関の倫理審査委員会で承認を受けた研究計画に対してのみ提供される。データセンター・保存施設は、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。なお、研究計画には、必ずJPLS会員が共同研究者として加わっていないなければならない。

【研究期間】

検体保存期間は、平成 19 年倫理委員会承認日より平成 25 年 3 月 31 日までとし、以降 5 年毎に検体採取施設倫理委員会、JPLSG 研究審査委員会、JPLSG 運営委員会、保存施設倫理委員会に諮り更新する。検体は貴重であり、特に患者および保護者から書面により廃棄の申し出がない限り、使い切るまで保存する。

【検体送付・保存施設】

検体送付・保存施設は、国立成育医療センター研究所発生分化研究部とする。(担当者氏名:清河信敬、住所:〒157-8535 東京都世田谷区大蔵2-10-1、連絡先: 電話 03-3416-0180、FAX: 03-3416-2222、e-mail:nkiyokawa@nch.go.jp)。送付・保存にあたっての注意事項は、保存施設の運用規定に記す。

【保存施設責任者・情報管理者】

保存施設責任者は、国立成育医療センター研究所副所長 藤本純一郎、個人情報管理者は、国立成育医療センター研究所成育保健政策科学研究室長、掛江直子とする。

【検体の公開】

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 会員に定期的に公開される。

【共同研究機関】

JPLSG 参加施設 (JPLSG 参加施設リスト)

国立成育医療センター研究所

研究計画が、JPLSG 研究審査委員会および運営委員会、当該機関倫理審査委員会で承認された研究施設。

【期待される成果】

検体保存により生殖細胞系列の遺伝子解析研究を行うことから、小児がんの特性、特定の小児がんの

治療に伴う副作用などに関連する遺伝子、およびその多型・変異を推定することが出来る。その知見は、小児がんの本態に関わる遺伝子とその多型の同定、およびそれら遺伝子の機能解明につながり、新しい診断・治療法の開発や、個々人に最適な治療計画の策定、また晩期障害や二次がん発生に関する予防法の開発、さらには発病予防に関する提言の作制等に重要な基礎的情報となる。

【書面によるアセントあるいは同意の適応年齢】

12歳以上20歳未満の患者は代諾者からの書面による同意に加え、原則として、患者自身の書面によるアセントを取得するよう努める。患者が7歳以上12歳未満の場合には、代諾者からの書面による同意に加え、原則として患者自身の口頭によるアセントを取得するよう努める。連結可能匿名化が行われている研究期間内に患者が16歳に達した場合には、可能な限り改めて本人の意思を確認するよう努める。

【説明と同意】

書面による説明と同意には以下の内容を含むものとする。

- ・ 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、自らが与えた同意について、いつでも不利益を受けることなく書面により撤回出来ること。
- ・ 同意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。

【個人情報保護その他遵守事項】

この計画に含まれる個人情報については、「個人情報の保護に関する法律」を遵守し、厳重に管理する。また、本研究計画は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、「臨床研究に関する倫理指針」等の指針に従う。患者検体は連結可能匿名化処理を行うが、その方法については、JPLSGにより定められた方法に従う(資料)。したがって患者の個人情報は、患者が所属する医療施設から外には出ない。さらに保存施設において、JPLSG登録番号と保存番号の対照表を作成する。

【保存検体を用いた研究の結果について】

研究成果の医学的意義が確立され、患者にとって知ることが有益と判断される場合を除いて、基本的に

個人に対する結果の報告はしない。結果の通知に対する有益性の判断は、研究計画毎に研究施設の倫理審査委員会での検討を経て判断するものとする。

研究全体の結果の報告は、ホームページやニュースレターなどを利用し公開する。個別に結果を知りたい場合は、遺伝カウンセリングを受けた上で、あらたに検査を行う。

【遺伝カウンセリング】

遺伝カウンセリングの提供が望ましい場合、各施設にて提供することが求められるが、遺伝カウンセリングを受けられない施設に対する JPLSG としてのバックアップ体制を設ける。

【研究資金】

検体保存に必要な経費は、JPLSG および厚生労働省科学研究費補助金による。患者は、保存に関する費用を負担することはない。

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、外部精度管理を実施した。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を用い、白血病患児末梢血（症例：MW-1～8）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、各検査施設の方法をそのまま用いた。今回は、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した。その結果、標準ビーズによる蛍光強度の比較からは、検査機器（フローサイトメーター）の施設間の差は僅かであった。各項減の発現プロフィールの比較検討では、抗原の発現量の多い場合には、施設間における検査結果の差はごく僅かであった。しかし、抗原の発現量の少ない場合には、検査結果に差異を認める場合があった。また、検体の処理方法、溶血の手順、あるいは抗体を反応させるタイミングが、検査結果に影響を与える場合が認められた。これらの結果より、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）の標準化には、解析パネル、抗体クローンの統一だけでなく、検査手技、溶血方法等の統一も必要と考えられた。

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18年度においては、外部精度管理を実施し、リストモード

データをワーキンググループ委員により統一した方法で解析し、検査施設間の差異の有無を検討した。

B. 研究方法

造血器腫瘍のマーカー解析の外部精度管理は以下のように実施した。

（対象施設）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)を用いた。

表1. 外部精度管理用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8症例の末梢血(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対象施設へ送付した。

(検査・解析方法) 検体の処理、染色、および溶血方法等は、各施設において通常用いら

れている方法を用い、各施設で解析した結果を資料として提出していただいた。また、各施設のリストモードデータを集積し、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した。

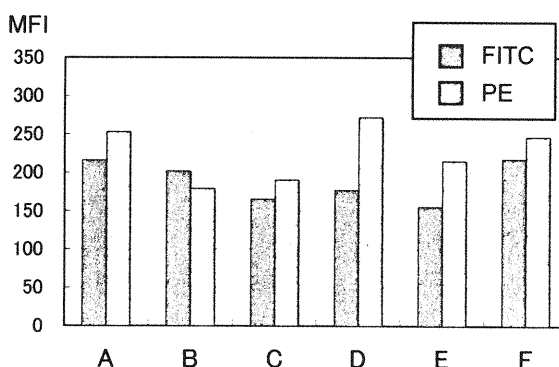
C. 研究結果

今回の外部精度管理では、8検体(MW-1~8)が対象施設(A~F)に送付された。

① フローサイトメーターの安定性について

各施設において用いたフローサイトメーターの検査機器としての安定度等の状態を、標準蛍光ビーズ(CaliBRITE beads)を使用して検討した。各施設において精度管理用検体を解析した後、そのままの解析条件でCaliBRITE beadsのデータを取り込み、その平均蛍光強度(MFI)を比較した(図1)。

図1. CaliBRITE beadsによる蛍光強度の比較(検査施設A~Fのフローサイトメーター)

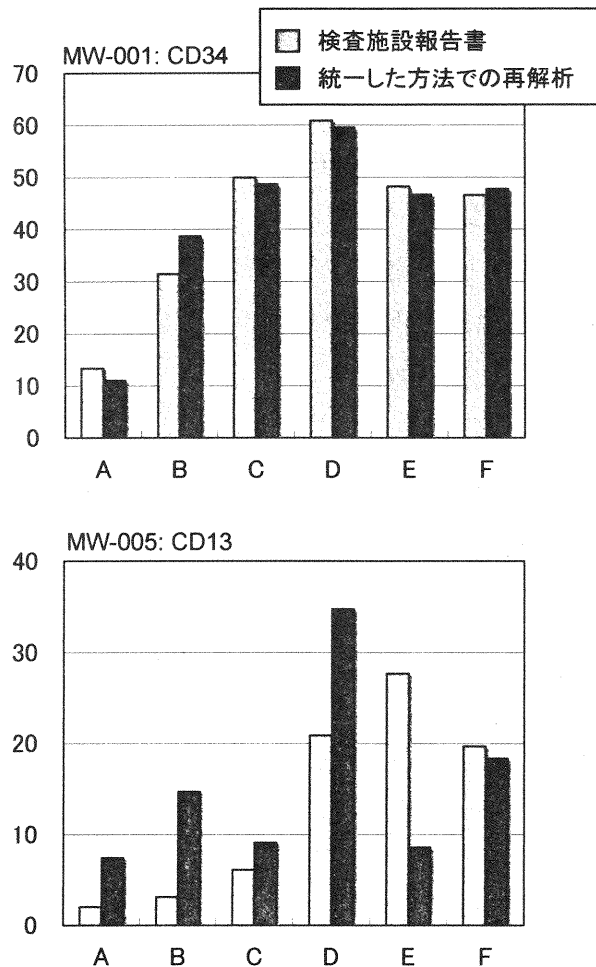


CaliBRITE beadsのMFIは、検査機器の状態を反映すると考えられるが、差異はわずかであり、各施設において用いられているフロ

一サイトメーターはいずれも安定した機器の状態にあると考えられた。

② 各検査施設における解析結果の比較検討
各施設のリストモードデータを用いて、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した（図2）。

図2. 検査施設報告と再解析結果との相関（各抗原の陽性パーセントを示す）

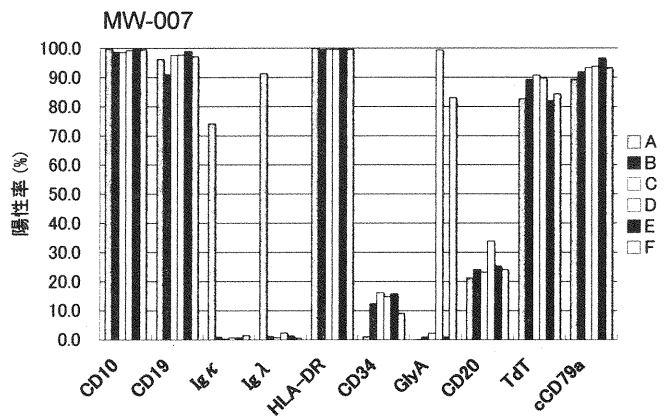


各検査施設より報告された解析結果とワーキンググループ委員による統一した方法で

の解析結果を、各抗原の陽性率から比較検討したが、MW-001:CD34の結果のように、多くの場合ほぼ同様の結果であった。しかし、MW-006:CD13のように、特に発現が弱い抗原の中に、各検査施設より報告された解析結果とワーキンググループ委員による統一した方法での解析結果との間に差異が認められる場合が存在していた。

また、各検査施設のリストモードデータを用いたワーキンググループ委員による解析結果を比較検討した（図3）。各抗原の陽性率の比較では、多くの抗原では、各施設のデータはほぼ一致していた。しかし、一部の抗原（CD10、Igκ/λ、Glycophorin A）では解析結果が異なっていた。

図3. 各検査施設の解析結果（各施設A-Fのリストモードデータを用いて、ワーキンググループ委員により解析された各抗原の陽性パーセントを示す）



解析結果が異なっていた抗原に関しては、さらに詳しく解析し、異なった解析結果が得られた原因についての検討を加えた（図4、5）。

図4. 解析結果に差異を求めた例

(MW-002:CD10/CD33)

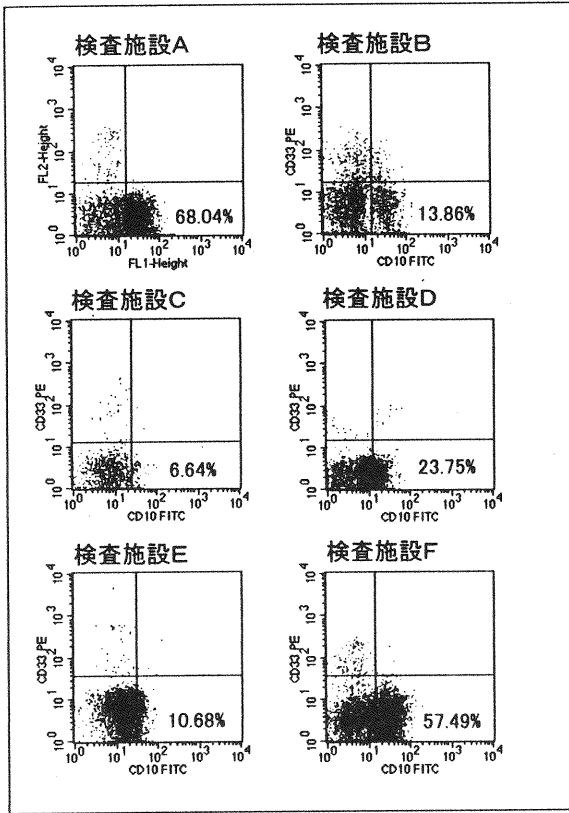


図4に示すCD10の発現においては、各検査施設のデータの死細胞割合に大きな違いが認められたことより、検体の処理方法の違いによる死細胞割合の差が検査データの差異の原因ではないかと考えられた。また、図5に示すGlycophorin Aの発現においては、検査施設DとFの解析結果に非特異的反応が認められた。この2施設においては、抗体との反応後に溶血操作を行っていたことが、非特異的反応の原因と考えられた。

D. 考察

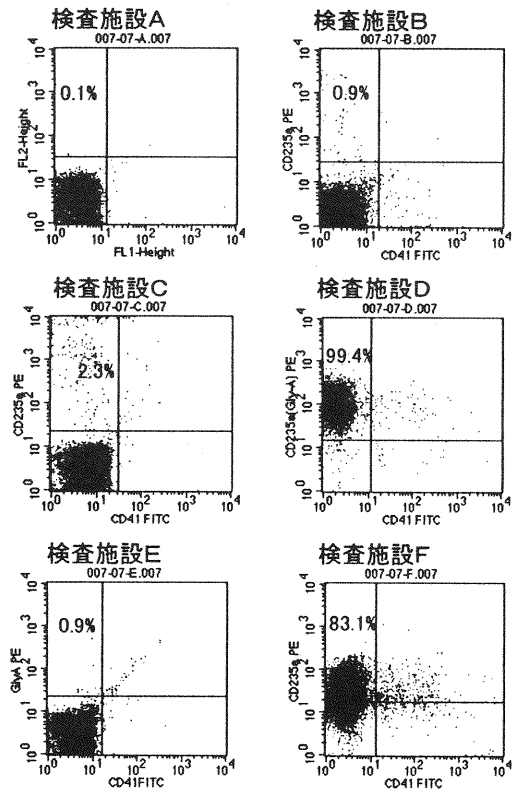
造血器腫瘍のマーカー解析の外部精度管理を実施した。まず、標準蛍光ビーズを使用

したフローサイトメーターの安定性等は、各施設ともに問題はなく、適切に管理されているものと思われた。

今回の精度管理では、8検体の解析が実施されたが、各検査施設より報告された解析結果とワーキンググループ委員による統一した方法での解析結果（抗原の陽性率）との比較では、多くの場合ほぼ同様の結果であった。しかし、発現が弱い抗原では、各検査施設より報告された解析結果とワーキンググループ委員による統一した方法での解析結果との間に差異が認められた。その原因としては、検体の処理方法の違いによる死細胞の割合の差、溶血操作のタイミングの差に起因していた。

図5. 解析結果に差異を求めた例 (MW-007)

(Glycophorin A・CD235/CD41)



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、および臨床検査会社を対象とした精度管理の結果、検査方法、解析方法が多少は異なっているとしても、発現の強い抗原に関しては、陽性率の差は見られず、大きな問題点はないものと考えられた。しかし、発現の弱い抗原に関しては、CD45 Gating 法による3カラー解析パネル、および標識抗体クローンを統一しても、検査結果に差が認められ、検体の処理方法、溶血操作のタイミング等も統一する必要があるものと思われた。

今後の方針としては、「フローサイトメトリによる造血器腫瘍細胞表面抗原検査に関する標準化ガイドライン」に準拠して、検査手技においても標準化を試みる必要があると考えられる。また、急性骨髄性白血病の免疫学的診断に関しては、解析パネルを統一し、さらには検査手順書を作成した上で、中央検査診断を行なう予定にしているが、検査会社も含めた検査体制をとる可能性に関して、今後協議を行なう予定である。

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、外部精度管理を実施した。その結果、小児造血器腫瘍の免疫学的診断（マーカー解析）のためには、解析パネルの統一とあわせて、検査手技、データ解析法の標準化も必要と考えられる。中央診断施設、臨床検査会社間で、検討を加えていく予定である。

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。これまでに分子・細胞遺伝学的診断標準化の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。今年度は、微小残存病変（minimal residual disease, MRD）にたずさわっている研究者を中心に、公募により JPLSG 分子・細胞遺伝学的診断委員会を立ち上げた。急性骨髄性白血病（AML）の AML-05 プロトコールに向けて、初診時のキメラ遺伝子と FLT3 の中央診断とキメラ遺伝子を用いた MRD の検討は名古屋医療センター臨床研究センターで行うことになった。また染色体/遺伝子解析結果の中央診断をすることが提案され、まずはデータセンターで判断に迷う染色体検査結果について中央診断を行う方向性が確認された。再発急性リンパ性白血病（ALL）と T-ALL の表面マーカーを用いた MRD と免疫受容体遺伝子を用いた MRD もプロトコール開始に向けて検討を開始している。

研究協力者

太田秀明（大阪大学医学部）
清河信敬（国立成育医療センター研究所）
滝 智彦（京都府立医科大学）
出口隆生（三重大学医学部）
照井君典（弘前大学医学部）
林 泰秀（群馬県立小児医療センター）
堀 寿成（愛知医科大学）
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）
横田昇平（京都府立医科大学）
林 英蔚（天理よろず相談所病院）

A. 研究目的

小児造血器腫瘍の大規模治療研究においては、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る。これまでに分子・細胞遺伝学的診断標準化の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、JPLSG 分子・細胞遺伝学的診断委員会（以下分子診断委員会）を立ち上げ、AML-05 プロトコールに向けてキメラ遺伝子等の中央診断や微小残存病変（minimal residual disease, MRD）の実際の取り組みを開始した。

B. 研究方法

本邦の実際に MRD の研究に携わっている研究者に加え全国公募で委員の希望者を募り、JPLSG 分子診断委員会を立ち上げた。また、AML-05 プロトコールのキメラ遺伝子の中央診断と MRD の整備を行った。

C. 研究結果

第 1 回分子診断委員会

平成 18 年 6 月 3 日に名古屋で開催し、

以下のことを決めた。

1) AML の初診時中央診断

(1) Multiplex-RQ-RT-PCR

各施設から BML に検体を送り RNA を抽出してもらおう。BML からその RNA と全血のまま凍結した残り半分の検体を一緒に名古屋医療センターに送る。名古屋医療センターで Multiplex-RQ-RT-PCR を施行し、残りの RNA、cDNA を附随研究用に保存する。

AML-05 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 (ITD) 検索の準備も行った。

(2) 初診時マーカー

4 施設（愛知医大、大阪大学小児科、三重大学小児科、国立成育医療センター研究所）で行なう。残った細胞を凍結し、まとめて国立成育医療センター研究所に送り、附随研究用として保存してもらおう。

2) MRD

(1) 急性リンパ性白血病 (ALL)

Igh, *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。

(a) Flow Cytometry (FCM)

3 施設（大阪大学小児科、三重大学小児科、国立成育医療センター研究所）で行なう。今後、手技の標準化を行う。

(b) *Ig* と *TCR* の再構成

現在 2 施設で施行中（愛知医大、岩手医大）であり、今後、再発 ALL と T-ALL で愛知医大を中心にパイロット的に実施し、FCM での MRD と比較検討しながら標準的な方法の確立を目指す。

(2) 急性骨髄性白血病 (AML)

名古屋医療センターで初診時キメラ融合遺伝子が同定された症例につき MRD を行う。

第 2 回分子診断委員会

平成 19 年 2 月 24 日に大阪で開催し、以下のことを決めた。

1) 染色体/遺伝子解析結果の中央診断 (central review) および不一致例の相談

担当：滝 智彦、林 泰秀

乳児 ALL の *MLL* 遺伝子を中心に染色体遺伝子解析不一致例が報告され、t(4;11)にはさまざまな転写産物があり、t(11;19)も 4 種類の異なるキメラがあること、t(16;21)も切断点の異なる 2 つのキメラ遺伝子があることが報告された。以上より染色体/遺伝子解析結果の中央診断をすることが提案され、まずはデータセンターで判断に迷う染色体検査結果について中央診断を行う方向性が確認された。

2) 各プロトコールにおける MRD の推進と解析

A) マーカー 担当：

清河信敬、出口隆生、太田秀明、堀寿成
AML-05 のマーカー中央診断は TCCSG と KYCCSG は順調に進行中であり、T-ALL のマーカーと MRD もパイロットを行っている。再発 ALL と T-ALL の MRD を実施する場合は測定機器により異なるため標準化の検討が必要である。

AML のマーカーの MRD は現時点では施行する予定はなく、今後の検討課題とすることが了承された。

B) 遺伝子解析

a) RT-PCR 担当：横澤敏也

AML-05 のキメラ遺伝子スクリーニングの現状についての報告があり、AML-05 はこれまで 18 例 (19 検体) が検索され、PML-RARA 1 例、*AML1-MTG8* 2 例、*CBFβ-MYH11* 2 例、*MLL-AF9* 1 例であった。

FLT3-ITD は 18 例中 7 例 (39%) と高率にみられた。検体は全例で規定の RNA 量が得られている。AML-P05 は 4 検体が届き、全例で *PML-RARA* が陽性であった。*t(8;21)/AML1-MTG8* の症例で検討を要した症例があった。

b) Ig/TCR 担当：横田昇平、堀寿成

2005 年に CCLSG で 157 例の Ig/TCR を用いた MRD を行なった。最近 MRD 検索は年 2 回までは保険でカバーされるようになった。再発 S2 では *Ig/TCR* の MRD が必要であるので、来年度には委員会を開いて、早急に対応する必要がある。

3) 最近の分子診断の情報の集約と JPLSG への還元 (必要な検査があれば推奨する)
担当：滝智彦、林泰秀、照井君典、林英蔚
t(7;12)/HXLB9-ETV6 はオランダのグループの論文では乳児 AML の 30% を占め、予後不良なので FISH、RT-PCR での検索の必要性の提唱があった。

4) その他 (附随研究などのチェック等)

担当：林泰秀、他

各プロトコール治療委員会と連携を強め、当委員会の委員の担当を割り当てる必要があるとの提言があり了承された。

D. 考察

MRD は欧米では白血病の治療上重要な位置を占めており、JPLSG においても AML-05 プロトコールが開始されるので、AML で multiplex real-time PCR を初診時に国立

病院機構名古屋医療センター臨床研究センターで行い、キメラ遺伝子を用いた MRD についても検討中である。

ALL においてはマーカーによる MRD 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。しばらくは各グループ毎に治療が行われるが、プロトコールが来年度に予定されている再発 ALL や T-ALL については早急に MRD の実用化を検討する必要がある、抗体の統一も含め 3 施設で検討中である。

遺伝子を用いた ALL の 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の問題の検討が必要があり、業者も含めた精度管理の検討も必要と思われる。

E. 結論

今年度 JPLSG 分子診断委員会を立ち上げ、中央診断と MRD の実用化について検討を行った。AML-05 プロトコールでは初診時のキメラ遺伝子とそれによる MRD 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) 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
- 2) 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*. 45: 583-591, 2006
- 3) Park MJ, Shimada A, Asada H, Koike K, Tsuchida M, Hayashi Y. JAK2 mutation in a boy with polycythemia vera, but not in other pediatric hematologic disorders. *Leukemia*. 20:1453-1454. 2006
- 4) Kato M, Kimura H, Seki M, Shimada A, Hayashi Y, Morio T, Kumaki S, Ishida Y, Kamachi Y, Yachie A. Omenn syndrome--review of several phenotypes of Omenn syndrome and RAG1/RAG2 mutations in Japan. *Allergol Int*. 55:115-119, 2006
- 5) Ichikawa H, Tanabe K, Mizushima H, Hayashi Y, Mizutani S, Ishii E, Hongo T, Kikuchi A, Satake M. Common gene expression signatures in t(8;21)- and inv(16)-acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*: 135 :336-47, 2006
- 6) Chen Y, Takita J, Mizuguchi M, Tanaka K, Ida K, Koh K, Igarashi T, Hanada R, Tanaka Y, Park MJ, Hayashi Y. Mutation and expression analyses of the MET and CDKN2A genes in rhabdomyosarcoma with emphasis on MET overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 46:348-358, 2007
- 7) Shimada A, Hayashi Y, Ogasawara M, Park MJ, Katoh M, Minakami H, Kitoh T, Kojima S, Kawa K, Kimura H. Pro-inflammatory cytokinemia is frequently found in Down syndrome patients with hematological disorders. *Leuk Res.* (印刷中)
- 8) Shimada A, Taki T, Kubota C, Tawa A, Horibe K, Tsuchida M, Hanada R, Tsukimoto I and Hayashi Y. No nucleophosmin mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study of the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *Leukemia* (印刷中)
2. 学会発表
- 1) 朴明子、嶋田明、設楽利二、土田昌宏、滝田順子、五十嵐隆、林泰秀：小児造血器疾患における JAK2 の遺伝子の検討。第 109 回日本小児科学会学術集会 2006. 4.21-23 金沢
- 2) Shimada A. Taki T. Tabuchi K. Hanada R. Tawa A. Tsuchida M. Horibe K. Tsukimoto I. Hayashi Y: FLT3, MLL and KIT gene alterations are strongly associated with a prognosis of pediatric acute myeloid leukemia, A report from Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. 第三回国際小児白血病シンポジウム 2006. 4.28-5.3 オランダ
- 3) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚

- 行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉：MLL 融合蛋白による多段階発癌モデルマウス：MAP キナーゼの重要性。第 65 回日本癌学会学術総会 2006.9.28-30 横浜
- 4) 朴明子、嶋田明、滝田順子、花田良二、林泰秀：小児 T-ALL における *NOTCH1* と *FLT3* 遺伝子の解析。第 65 回日本癌学会学術総会 2006.9.28-30 横浜
- 5) 嶋田明、滝智彦、花田良二、堀部敬三、林泰秀：11q23 転座型 AML における MLL-partial tandem duplication の意義。第 65 回日本癌学会学術総会 2006.9.28-30 横浜
- 6) 加藤元博、真田昌、滝田順子、山本豪、南谷泰仁、陳玉彦、細谷紀子、半下石明、五十嵐隆、小川誠司、林泰秀：超高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた若年性骨髄単球性白血病 (JMML) の解析。第 65 回日本癌学会学術総会 2006.9.28-30 横浜
- 7) 小埜良一、熊谷英敏、中島秀明、殿塚行雄、菱谷愛、滝智彦、林泰秀、北村俊雄、野阪哲哉：MLL 融合蛋白による多段階発癌には MAP キナーゼ系の活性化が重要である。第 68 回血液学会、第 48 回日本臨床血液学会 2006.10.6-8 福岡
- 8) 滝智彦、樋渡光輝、澤田明久、河敬世、村松秀城、加藤剛二、堀越泰雄、清水大介、奥田隆史、吉田直久、林泰秀、谷脇雅史：別のキメラ遺伝子を検出する目的のプライマーセットにより偶然に検出された *MLL* 関連キメラ遺伝子。第 68 回血液学会、第 48 回日本臨床血液学会 2006.10.6-8 福岡
- 8) 小笠原水穂、嶋田明、朴明子、外松学、林泰秀：新規 *KIT* 変異を有するも寛解を維持している t(8;21) AML の小児例。第 68 回血液学会、第 48 回日本臨床血液学会 2006.10.6-8 福岡
- 10) 朴明子、嶋田明、小笠原水穂、外松学、滝田順子、菊地陽、花田良二、林泰秀：小児 T-ALL における *NOTCH1* 遺伝子の変異と臨床像についての解析。第 68 回血液学会、第 48 回日本臨床血液学会 2006.10.6-8 福岡
- 11) 加藤元博、滝田順子、真田昌、山本豪、南谷泰仁、陳玉彦、細谷紀子、滝智彦、半下石明、五十嵐隆、小川誠司、林泰秀：超高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いた乳児白血病の解析。第 68 回血液学会、第 48 回日本臨床血液学会 2006.10.6-8 福岡
- 12) 城青衣、月本一郎、石井榮一、麻生範雄、五十嵐隆、林泰秀、市川仁：網羅的遺伝子発現解析により明らかとなった単球系 AML (FAB M4/M5) における乳児例と小児例の違い。第 22 回小児がん学会、第 48 回日本小児血液学会 2006.11.24-26 大阪
- 13) 嶋田明、滝智彦、田渕健、多和昭雄、花田良二、堀部敬三、土田昌宏、月本一郎、林泰秀：小児 AML における遺伝子異常の解析、AML99 解析からわかったこと。第 22 回小児がん学会、第 48 回日本小児血液学会 2006.11.24-26 大阪
- 14) Park MJ, Taki T, Shimada A, Hayashi Y, Kikuchi A, Hanada R, Takita J, Igarashi T. Mutation of *NOTCH1* gene in pediatric T-cell acute