

表2に男女別病型分布を示す。男女ともに約9割が特発性であるが、男性の方が特殊型の割合が多い。

表3に男女別特殊型病型分布を示す。男女ともに半数以上がPNH（発作性夜間血色素尿症）合併であるが、男性では肝炎後も多く、3割を占める。

表4に男女別重症度分布を示す。男女ともに半数以上がStage1であるが、男性の方がStage3以上の割合が多い。

D. 結論

再生不良性貧血について、平成13年度から平成18年度までの医療受給者証所持者数および登録者証所持者数、臨床調査個人票のデータ数を入手し、まず入力率を求めた。次に、入力率が最も高い平成15年度のデータを解析して、その特徴を概観した。今後は、より詳細な解析および複数年のデータを連結した経年的な解析を行う予定である。

なお、過去の報告として、難病情報センターHPの特定疾患情報を参照した。
(<http://www.nanbyou.or.jp/sikkan/042.htm>)

E. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

● 島田直樹, 中尾眞二, 小澤敬也, 永井正規, 杉田稔. 臨床調査個人票からみた再生不良性貧血の特徴. 第78回日本衛生学会総会, 2008年3月(熊本)

F. 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

表1 再生不良性貧血の臨床調査個人票データ数と入力率など

年度	臨床調査個人票データ数				入力都道府県数				特定疾患医療受給者証		特定疾患登録者証	
	様式1		様式2		様式1		様式2		所持者数	入力率	所持者数	合計数
平成13	140	166			7	3			10,572	2.9%		10,572
平成14	444	1,230			22	13			10,619	15.8%		10,619
平成15	59	14	449	6,539	11	1	33	41	9,680	72.9%	823	10,503
平成16			724	4,806			35	36	9,173	60.3%	1,336	10,509
平成17			726	4,508			33	36	8,997	58.2%	1,825	10,822
平成18			502	3,037			30	28	9,010	39.3%	2,149	11,159

注1) 様式1:平成15年度までの記載様式。新規と更新の区別はない(同一内容)。

様式2:平成15年度からの記載様式。新規と更新の内容は一部異なっている。

注2) 所持者数 平成13年度~平成15年度:地域保健・老人保健事業報告(地域保健編)
平成16年度~平成18年度:保健・衛生行政業務報告(衛生行政報告例)

図1 再生不良性貧血患者の男女別年齢分布

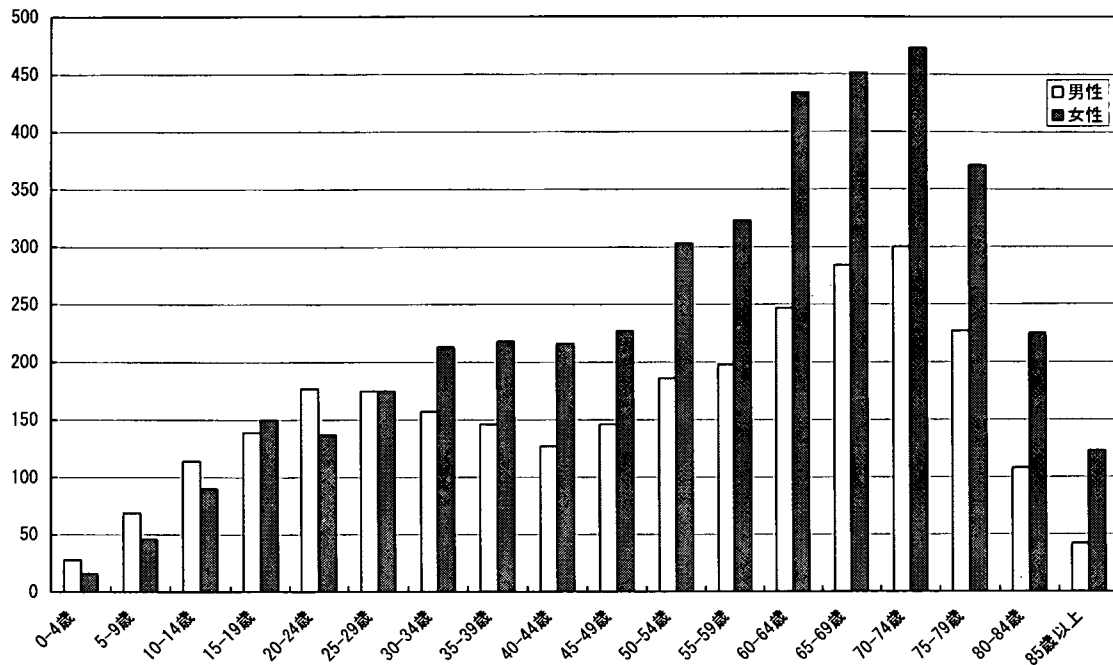


図2 再生不良性貧血患者の男女別発病年齢分布

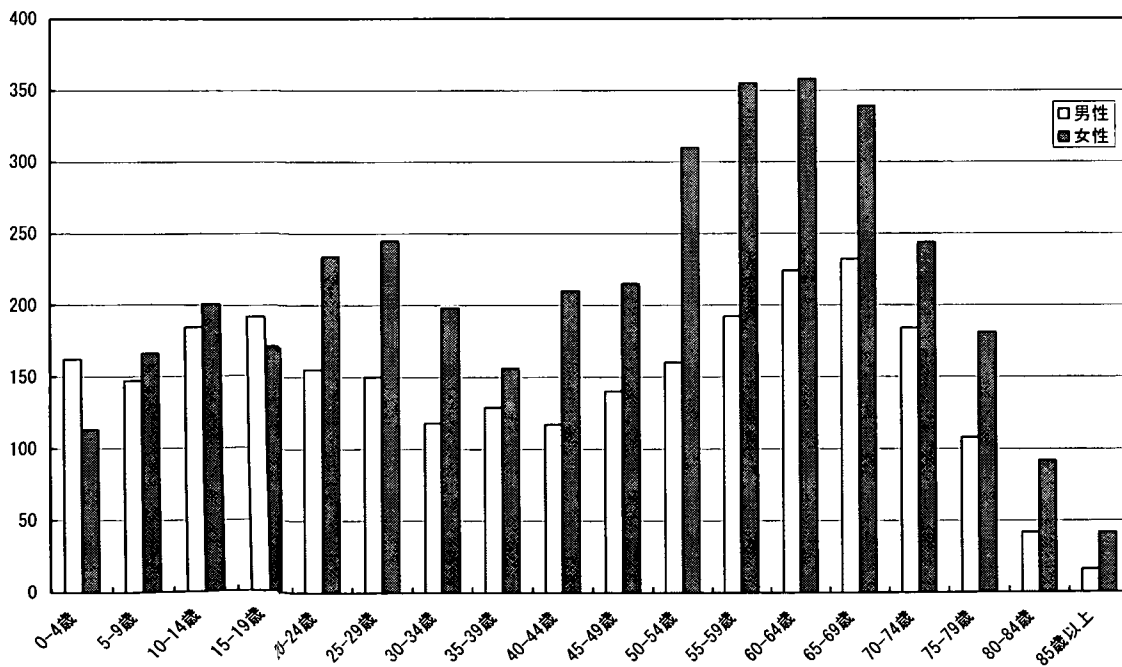


表2 男女別病型分布

	特発性	二次性	特殊型	小計
男性	2,519 89.5%	43 1.5%	253 9.0%	2,815
女性	3,762 91.5%	69 1.7%	282 6.9%	4,113
小計	6,281	112	535	6,928

χ^2 test でp=0.0045

表3 男女別特殊型病型分布

	肝炎後 PNH (発作性夜間 血色素尿症) 合併	Fanconi貧血	その他	小計	
男性	74 30.6%	123 50.8%	29 12.0%	16 6.6%	242
女性	34 12.7%	179 66.8%	32 11.9%	23 8.6%	268
小計	108	302	61	39	510

χ^2 test でp<0.0001

表4 男女別重症度分布

年齢	Stage1	Stage2	Stage3	Stage4	Stage5	小計
男性	1,556 55.6%	586 20.9%	256 9.1%	307 11.0%	96 3.4%	2,801
女性	2,462 60.1%	855 20.9%	356 8.7%	330 8.1%	96 2.3%	4,099
小計	4,019	1,441	612	637	192	6,900

χ^2 test でp<0.0001

Ⅲ. 研究協力者報告書

ヒト骨髄 CD34 陰性造血幹細胞に対する Angiopoietin-1 の作用

研究協力者 安藤 潔 (東海大学医学部 教授)

研究要旨

本年度はヒト骨髄 CD34 陰性造血幹細胞の維持、増殖がストローマ細胞に由来する Angiopoietin-1 に依存することを示した。本知見を用いて再生不良性貧血、骨髄異形成症候群などの造血障害の成因における骨髄微少環境の役割を明らかにすることが期待される。

A. 研究目的

再生不良性貧血、骨髄異形成症候群などの造血障害における造血幹細胞の動態は不明な点が多い。成体マウス造血幹細胞は CD34 陰性であることが示されているが、ヒト骨髄 CD34 陰性造血幹細胞の動態は不明な点が多い。これは骨髄 CD34 陰性造血幹細胞の培養が困難であること、従って細胞表面マーカーが同定できていないことに由来している。従って、骨髄 CD34 陰性造血幹細胞を *in vitro* で維持する条件が明らかになれば、再生不良性貧血、骨髄異形成症候群などの造血障害における骨髄 CD34 陰性造血幹細胞の意義を明らかにできることが期待される。そこでわれわれはヒト骨髄 CD34 陰性造血幹細胞の培養条件の検討を行った

B. 研究方法

同意の得られた健常人骨髄単核球細胞を解析に用いた。マウス骨髄ストローマ細胞株 HESS-5 にヒト Angiopoietin-1 の cDNA をレトロウィルスベクターを用いて導入し(AHESS-5)、発現をウェスタンブロットにより検出した。また培養上清中の Angiopoietin-1 は ELISA により測定した。SRC アッセイは NOD/SCID/γcKO(NOG)マウスを用いた。

C/D. 研究結果と考察

骨髄単核球細胞の Lineage 陰性 CD34 陰性分画では Tie-2 が弱陽性であり、その維持には Angiopoietin-1 が用量依存的に有効であった。そこで、AHESS-5 と共培養することにより、CD34 陰性細胞から CD34 陽性細胞を効率良く誘導することが可能となった。これらの細胞の幹細胞活性を確認するために、SRC アッセイを行ったところ骨髄系およびリンパ系の造血再構築能を確認することができた。

E. 結論

Angiopoietin-1 はヒト骨髄 CD34 陰性造血幹細胞の維持、増殖に必須の因子である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Nakamura Y, Ando K, et al.. Angiopoietin-1 induces SRC activity of human CD34- bone marrow cells. *Exp Hematol* 35, 1872-1883, 2007
- Suzuki R, Ando K, et al.. Preferential hypermethylation of the DKK-1 promoter in core-binding factor leukemia. *Br J Haematol.*, 138, 624-631, 2007

2. 学会発表

なし

同種造血幹細胞移植後の早期ドナー型キメリズムにおよぼす移植前処置と 造血細胞源の影響

研究協力者 今村 雅寛 (北海道大学大学院医学研究科 内科学講座血液内科学分野 教授)

研究要旨

同種造血幹細胞後早期のキメリズム解析は、生着不全、拒絶、移植片対宿主病の予知に重要である。本研究では、移植前処置の強度と造血幹細胞源別にドナー型キメリズムに与える影響を検討した。その結果、骨髄非破壊的前処置には低用量全身放射線照射を加えた方が、ドナー型キメリズムの上昇が早く、生着不全や拒絶を回避できることが明らかとなった。また、末梢血幹細胞、骨髄血、臍帯血の順にドナー型キメリズムの上昇が早く、臍帯血の RIST では低用量全身放射線照射の併用が生着を促進するために重要であることも明らかにした。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植後早期のキメリズム解析を移植前処置別および造血細胞源別に行うことで、生着不全や拒絶の有無を迅速に判定し、それに対する適切な処置法の開発を目的とする。

B. 研究方法

2001年5月から2007年9月までに当科で同種造血幹細胞移植を受け、少なくとも1か月以上生存した59症例(男性30例、女性29例、年齢中央値46歳)を後方視的に解析した。骨髄移植36例、末梢血幹細胞移植12例、臍帯血移植11例で、骨髄破壊的前処置(conventional stem cell transplantation, CST: etoposide 15mg/kg x 2 + cyclophosphamide 60mg/kg x 1 + total body irradiation (TBI) 12 Gy) 31例、骨髄非破壊的前処置(reduced-intensity stem cell transplantation, RIST: fludarabine 30mg/m² x 6 + 経口 busulfan 4mg/kg x 2 あるいは静注用 busulfan 3.2 mg/kg x 2 +/- 2 Gy か 4 Gy の TBI) 28例。TBIを受けなかった RIST 症例は4例であった。GVHD 予防の免疫抑制剤は cyclosporine(CyA)+ 短期 methotrexate(MTX)31例、

FK506+短期 MTX27例、CyA 単独1例であった。当大学の倫理委員会の承認を得て、各症例およびドナーの末梢血を移植前後で定期的に採取後、DNA を抽出し、4種類のマイクロサテライトプライマー(D3S1359, D6S89, ACTBP2, HGH)を用いて、RT-PCR法にて、キメリズム解析を行った。この方法により、3%のレベルで混在するキメリズムを検出することができ、90%以上を完全キメラとした。

C. 研究結果

低線量 TBI を併用した RIST ではそうでない RIST に比較して、移植後 21 日目と 28 日目で有意にドナー型キメリズムの比率が上昇した(98.8%対 87.5%、99.3%対 84.3%)。造血幹細胞源別にみると、移植後7日目の末梢血幹細胞、骨髄血、臍帯血のドナー型キメリズムの比率は、各々81.5%、43.1%、26.7%、移植後14日目の末梢血幹細胞、骨髄血、臍帯血のドナー型キメリズムの比率は、各々95.8%、84.8%、55.8%であったが、移植後21日目で3者の間に差(いずれも90%以上)はみられなかった。末梢血幹細胞移植では移植後7日目のドナー型キメリズムが81.5%以

上、骨髄移植では移植後 14 日目のそれが 84.8%以上、臍帯血移植では移植後 14 日目のそれが 55.8%以上で生着が得られる可能性が高まる。

D. 考察

私たちは、既に移植後 14 日目の CD3+T 細胞、移植後 28 日目の CD56+細胞、移植後 14 日目と 20 日目の CD14・15+細胞のドナー型キメリズムと予後の関連性を示唆する報告をしてきたが、今回は移植後早期の移植前処置別および造血幹細胞源別ドナー型キメリズムの検討を行い、RIST では低線量 TBI を併用するのが拒絶を防ぐ観点で望ましく、特に移植後 21 日目以降になっても 90%以上のドナー型キメリズムを示さない、生着の遅い臍帯血ではその意義が高まることを明らかにした。今回は症例が少なく、別々の検討はできなかったが、RIST における低線量 TBI の有無で臍帯血移植のドナー型キメリズムの推移に差がみられるかどうかを確認されるべき課題として残されている。予想としては、低線量の TBI を加えた方が、臍帯血移植後のドナー型キメリズムの達成が早いと思われる。また、移植後早期のキメリズム解析では、回収量の問題で従来私たちが行ってきた種々の細胞に分画して検討することはできなかったが、将来より微量の細胞で解析する方法が開発されれば、どの細胞の増加あるいは減少が、生着不全や拒絶、さらには急性 GVHD の発症のより重要な指標となり得るかが明らかになる。

E. 結論

RIST ではドナー型キメリズムの上昇が遅く、低線量 TBI により、CST と同等となった。造血幹細胞源別では、末梢血幹細胞、骨髄血、臍帯血の順にドナー型キメリズムの上昇が遅かったが、移植後 21 日目にはほぼ同等となった。臍帯血を用いた RIST では、の生着不全や拒絶が多く、それを防ぐためには低線

量 TBI が効果的である。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表 なし

「JAK2 または MPL 遺伝子変異を有する MPD 症例の造血コロニーの検討」に関する研究

研究協力者 大橋 春彦 独立行政法人国立病院国立病院機構名古屋医療センター
臨床研究センター 部長

研究要旨

骨髄増殖性疾患 (MPD) の原因として JAK2 遺伝子および MPL 遺伝子の変異が同定されているが、これらの遺伝子変異のみで MPD が発症するかは明らかでない。これらの変異の獲得が MPD 発症における late event である可能性を検討する目的で、造血コロニーを対象とする検討を行った。JAK2/V617F 変異を有する 4 症例と MPL/W515K 変異を有する 1 症例より多数の造血コロニーを作製し、個々の造血コロニーについて JAK2/MPL 遺伝子の genotype (野生型、ホモ変異型、ヘテロ変異型) と他のクローン性の指標 (X 染色体の不活化パターンおよび 20 番染色体長腕の欠失) の比較を行った。少なくとも一部の症例では、これらの遺伝子変異の獲得以前にクローン性造血が成立している可能性が示唆された。

A. 研究目的

2005 年に骨髄増殖性疾患 (MPD) の多くの症例の血液細胞が JAK2 遺伝子変異 (JAK2/V617F) を有することが報告され、MPD の病因と考えられている。その後 JAK2 遺伝子の他の領域 (Exon12) の変異および MPL 遺伝子の変異も同定された。しかし、これらの遺伝子変異が重複して検出される症例があること、特に ET で JAK2/V617F を有する細胞の比率が低い症例が少なくないこと、JAK2/V617F 変異陽性の MPD 症例から発症した急性白血病で見られる芽球がしばしば変異陰性であることなどの所見より、これらの遺伝子変異獲得が MPD の発症における late event である可能性も考えられている。この可能性を検証するために、これらの遺伝子変異を有する MPD 症例の造血コロニーを対象としてこれらの遺伝子の genotype と他のクローン性マーカーの比較を行った。

B. 研究方法

JAK2/V617F 変異を有する 4 症例 (ET 3 例、PV から進展した MF 1 例) および MPL/W515K 変異を有

する 1 症例 (ET から進展した AML) の末梢血または骨髄細胞を用いてサイトカイン存在下でメチルセルロース法による造血コロニー形成を行った。個々の造血コロニーを用手的に回収し (1 症例あたり 39 ~192 個)、DNA を抽出した。それぞれの DNA 検体の一部を用いて ARMS 法により JAK2 遺伝子の、PCR-SSCP 法により MPL 遺伝子の genotype を決定した。野生型アレルのみを検出したコロニーを「野生型」、変異型アレルのみを検出したコロニーを「ホモ変異型」、両方のアレルを検出したコロニーを「ヘテロ変異型」と判定した。

上記の造血コロニーを対象として、HUMARA 遺伝子の STR 多型に関してヘテロである女性症例 (4 例) については X 染色体の不活化パターン (XCIP) 解析を、また 20 番染色体長腕の欠失を認める症例 (2 例) については STR マーカーを用いた LOH 解析を行った。また、末梢血 T リンパ球について XCIP 解析を行い、偏りの有無について検討した。

(倫理面への配慮)

MPD 患者を対象とした遺伝子解析に関しては当

施設のヒトゲノム・遺伝子解析研究審査委員会の承認を受けており、また検体採取に当たっては同意を得ている。

C. 研究結果

JAK2/V617F 変異を有する 4 症例の造血コロニーにおける JAK2 の genotype と XCIP の関係を表 1 に示す。これらの症例では変異型（ホモ変異型またはヘテロ変異型）コロニーと野生型のコロニーが認められた。

表 1. JAK2/V617F 変異陰性コロニーの XCI タイプ

症例	変異陽性コロニーと		Tリンパ球の XCIP の偏り
	同じタイプ	異なるタイプ	
ET-1	9	1	あり
ET-2	5	29	なし
ET-3	31	0	なし
PV-MF	34	0	あり

20 番染色体長腕の欠失を認める 2 症例の造血コロニーにおける JAK2/MPL 遺伝子の genotype と 20q の LOH の関係を表 2 に示す。解析した 2 症例で異なる結果が得られた。

表 2. 20q-LOH と JAK2/MPL 遺伝子の genotype の相関

症例	遺伝子変異	20q-LOH	JAK2/MPL 遺伝子の genotype		
			野生型	ヘテロ変異型	ホモ変異型
PV-MF	JAK2/V617F	-	34	0	0
		+	0	0	19
ET-AML	MPL/W515K	-	0	0	0
		+	2	10	40

D. 考察

JAK2/V617F 変異を有する 4 症例の XCIP 解析では、ET-3 症例と PV-MF 症例ではすべての野生型コロニーが変異型コロニーと同じタイプを示し、ET-1 症例では大部分の野生型コロニーが変異型コロニーと同じタイプを示した。しかし、ET-2 症例では野生型コロニーの多くは変異型コロニーとは異なるタイプ

であった。

JAK2 遺伝子が野生型である造血コロニーの大部分が変異型コロニーと共通の XCIP を有するという結果は、その症例の野生型造血細胞が既にクローン性を有しており、変異型細胞がそのサブクローンであることを示唆する所見である。ただし、ET-1 症例と PV-MF 症例では末梢血 T リンパ球の XCIP に偏りが認められるため、JAK2 が野生型の造血細胞のクローン性の判定は困難である。それに対して ET-3 症例の T リンパ球はポリクローナルであり、この症例においては JAK2/V617F 変異を有しない細胞によるクローン性造血が成立した後に変異を獲得したサブクローンが出現した可能性が考えられる。

ET-2 症例では JAK2/V617F 変異を有する造血細胞と有しない造血細胞の間にクローン/サブクローンの関係は認められなかった。

ET-AML 症例の造血コロニーはすべて 20q-LOH 陽性であったが、その中には MPL/W515K について野生型、ヘテロ変異型、ホモ変異型のものが含まれていた。従って、この症例における MPL/W515K 変異の獲得は、20 番染色体の欠失以後に起こった late event であると考えられる。

PV-MF 症例では JAK2/V617F に関しては野生型のコロニーとホモ変異型のコロニーの両方が認められたが、JAK2 が野生型のコロニーはすべて 20q-LOH 陰性であり、JAK2 が変異型のコロニーはすべて 20q-LOH 陽性であった。この症例においては JAK2/V617F 変異の有無と 20q-LOH の有無が完全に一致しており、どちらの変化が先に生じたかは判定できなかった。XCIP 解析の結果（上記）からは、JAK2/V617F 変異および 20q-LOH の獲得以前に既にクローン性造血が成立していた可能性も否定できない。

E. 結論

JAK2/V617F 変異または MPL/W515K 変異を有す

る症例の一部では、これらの遺伝子変異の獲得以前にクローン性造血が成立している可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Yagasaki H, Takahashi Y, Kudo K, Ohashi H, Hama A, Yamamoto T, Tanaka M, Yoshida N, Hidaka H, Nishio N, Kojima S: Feasibility and Result of Bone Marrow Transplantation from an HLA-Mismatched Unrelated Donor for Children and Young Adults with Acquired Severe Aplastic Anemia. *Int. J. Hematol.* 85:437-442, 2007.
- Hagiwara K, Nagai H, Li Y, Ohashi H, Hotta T, Saito H: Frequent DNA methylation but not mutation of the ID4 gene in malignant lymphoma. *J. Clin. Exp. Hematopathol.* 47:15-18,2007.
- Tokunaga M, Miyamura K, Ohashi H, Ishiwada N, Terakura S, Ikeguchi M, Kuwatsuka Y, Inamoto Y, Oba T, Tsuchiya S, Kodera Y: Successful nonmyeloablative bone marrow transplantation for leukocyte adhesion deficiency type I from an unrelated donor. *Int. J. Hematol.* 86:91-95, 2007.
- Hattori M, Terasawa T, Tsushita K, Utsumi M, Kawano F, Saito H, Shimoyama M, Ohashi H: The Status of Antithymocyte Globulin (ATG) Therapy for Adult Patients in Japan: Retrospective Analysis of a Nationwide Survey. *Int. J. Hematol.* (in press).

2. 学会発表

- 大橋春彦, 深見晶子, 小栗佳代子, 永井宏和, 横澤敏也, 濱口元洋, 堀田知光: 骨髄増殖性疾患患者の造血コロニーを対象とした JAK2/V617F 変異と X 染色体の不活化パターンの検討. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 2007 年 10 月 10 日～13 日, 横浜.

- 鈴木康裕, 横澤敏也, 萩原彰人, 寺澤晃彦, 青木恵津子, 加藤千明, 大橋春彦, 永井宏和, 堀田知光, 濱口元洋: 当施設における高齢者急性骨髄性白血病の臨床的検討: 単一施設での治療成績. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 2007 年 10 月 10 日～13 日, 横浜.

小児期造血障害疫学調査；日本小児血液学会登録症例 1,411 例（1988-2005 年）解析

研究協力者 小原 明（東邦大学医療センター大森病院 小児科・輸血部 教授）

研究要旨

1994 年から開始した疫学観察研究の、1,411 例（1988-2005 年診断）について報告する。特発性再生不良性貧血 1,002 例、肝炎後 129 例、二次性 8 例、Diamond-Blackfan 貧血 98 例、Fanconi 貧血 89 例、先天性重症好中球減少症 36 例、その他の先天性造血障害 49 例。特発性再生不良性貧血の 10 年生存率は、1994 年-2000 年診断の 414 例で 86.7%（95%信頼区間 82.6-90.8%）であり、診断時重症度分類による予後の差は消失している。診断後長期経過した症例の死因は移植関連死亡が多い。1994 年以後診断症例では、肝炎後再生不良性貧血、Fanconi 貧血ともに予後が改善し、それぞれの 10 年生存率は 92.7%、83.8%であった。MDS 白血病移行症例は 1994 年以後減少し、年間 1 例ほどである。2006 年以後診断症例は小児血液学会疾患登録事業により一元的に登録される。今後の小児造血障害データベースはより精度の高いものになることが期待される。

A. 研究目的

小児期発症造血障害疾患の症例データベース構築。再生不良性貧血に代表される造血障害性疾患の頻度は低く、主要な小児診療施設でも新規診断症例は年間 1-2 例である。この様な稀少疾患の現状を全国的に疫学調査してデータベースを構築し、診療情報とつきあわせて解析し、新規診断法、治療法の開発や、行政の施策に反映させる。

B. 研究方法

本研究は既存病歴を元にした症例登録と、登録症例の年次追跡調査による予後観察により構成した。本疫学調査研究開始初年度にあたる 1994 年に、1988 年から 1993 年の 5 年間に診断された症例を、一度に後方視的に収集して登録を開始し、翌年からは郵送による一次調査（年度毎の新規診断症例数を病型別に質問）を実施した後、二次調査票を送付して逐次登録を行った。今回の解析対象は 1988 年から 2005 年診断症例である。

（倫理面への配慮）

2005 年疫学研究倫理指針に則った「再生不良性貧血 2005 研究」を新たに企画し、学会の臨床研究審査検討委員会の審査承認を受けた。

C. 研究結果

1.登録症例数（1988-2005 年診断）

総数 1,411 例、特発性 1,002 例、肝炎後 129 例、二次性 8 例、Diamond-Blackfan 貧血 98 例、Fanconi 貧血 89 例、先天性重症好中球減少症 36 例、その他の先天性造血障害 49 例（Amegakaryocytic thrombocytopenia 7 例、Congenital Dyserythrocytic anemia 2 例、Dyskeratosis congenita 6 例、Pearson 症候群 3 例、Schwachman-Diamond 症候群 3 例）。

2.特発性再不貧

総数 1,411 例。重症と最重症を合わせた症例割合は全体の 54%、診断時 1 歳未満の症例は全体で 42 例（4.2%）。診断時染色体分析実施率は 2001-2005 年群で 95%と極めて高く、標準的な検査として普及した。2001-2005 年診断群の診断時染色体検査で異常核型を呈した症例は、trisomy 8、monosomy 7 それぞれ 1

例であった。1988年から2005年の間に診断された特発性再不貧1,002症例で、生存例850例の観察期間中央値は2,991日(8年2か月)であり、診断後226例に同胞間同種骨髄移植が、124例に非血縁者間同種骨髄移植が行われた。この結果5年、8年、10年生存率(KM法)は88.1%、84.0%、81.7%と推計された。診断5年以後長期経過した症例でも死亡例が観察されており、生存曲線はplateauにならない。生存率は1988-1993年診断群(5年83.9%、10年76.6%)に比べて、その後の2群(1994-2000, 2001-2005年)は有意に改善している(5年90.4%、92.6%、10年86.7%、92.6%)($p=0.0001$)。1994年以後診断症例では重症度別生存率に群間の有意差は認めていない。診断初年度には感染症や出血死亡が目立つが、その後減少し、診断5年以後は造血細胞移植に関連した死亡が主となる。診断10年以後に死亡した41症例の死因は、感染症3例、出血2例、移植関連11例、MDS白血病移行9例、その他2例、情報無し14例であった。軽症症例であっても長期観察の内にeventが生じる可能性が示されている。

同胞間同種骨髄移植は131例に実施され、死亡9例、移植後5年生存率は94.9%(生存例移植後観察期間中央値2,023日)、非血縁者間同種骨髄移植は85例に実施され、死亡17例、移植後5年生存率は79.0%(生存例移植後観察期間中央値1,875日)であった。

3. 肝炎後再不貧

肝炎後再不貧の予後は、診断年度1988-1993年に比べて、1994年診断以後の症例は明らかに予後が改善しているKM生存率10年92.7%。

4. Diamond-Blackfan 貧血

98症例が登録されている。生命予後が良好な疾患であるが、非血縁者骨髄移植12例を含めて21例の同種移植が報告されている。

5. Fanconi 貧血

Fanconi 貧血の予後は診断年度1988-1993年に比べ

て、1994年診断以後の症例は明らかに予後が改善している。1988-1993年群症例の死因は感染症と移植関連死亡である。2001-2005年診断症例15例中8例が同種移植を受けているが全員生存しており、非移植例にも未だ死亡症例がないため、この群の生存率は100%となっている。

6. 先天性重症好中球減少 SCN

SCNの調査は1990年診断症例から本格的に開始した経緯があり、症例登録に偏りが生じている可能性があるものの、年間2-5例ほどの新規症例登録がある。多くはrhG-CSF発売以後の診断症例であり、生存率は95%以上と良好である。また登録症例にMDS移行は報告されていない。

7. MDS 白血病移行、染色体異常症例

診断年度1988-2005年の期間に、特発性再不貧、肝炎後再不貧総計1,131症例から38症例のMDS白血病、染色体異常症例が報告された(特発性から33例、肝炎後から5例)。移行症例は1994年以後減少し、年間1例ほどである。再不貧診断からMDS移行診断までの期間は1年から3年であり、MDS病型はRAEB等明らかな芽球増加症例が、染色体異常はmonosomy7が多い。病型移行診断後6例に同種造血細胞移植が実施され、4例が生きている。

D. 考察

小児血液学会再生不良性貧血委員会の13年間の活動により、1988年から2005年の診断症例1,411症例のデータベースが構築され、臨床状況の観察、予後観察が可能となった。この13年間には免疫抑制療法の開発、非血縁者間同種骨髄移植などの新規治療法が導入され、再不貧の予後は明らかに改善したことが、今回の検討により明らかになった。また長期観察により、診断後長期経過した症例の血液状態悪化に対する移植と、その移植関連死亡が克服すべき問題として明らかになった。また重症例に限らず、軽

症、中等症症例の長期予後が必ずしも良くないことも同時に示している。

稀な造血障害である肝炎後再不貧、D-B 貧血、Fanconi 貧血の予後についても明らかにされ、Fanconi 貧血の治療成績が著しく改善している事が示された。これは有効かつ安全な移植治療の開発が貢献している。

MDS 移行症例は 1994 年以後、著しく減少している。再不貧診断時の骨髄生検の実施率は依然低いものの、染色体分析の実施率は高く、標準化された。

疫学研究倫理指針に則った新規疫学研究「小児再生不良性貧血 2005」が既に開始され、さらに小児血液学会疾患登録事業（Web 登録）も同時に開始されたことにより、より精度の高い全国的なデータベース構築が可能となり、今後の発展が期待される。

E. 結論

小児血液学会再不貧委員会により 1988 年から 2005 年の診断症例 1,411 症例のデータベースが構築され、稀な造血障害の頻度が明らかになると共に、1994 年以後の診断症例の予後が、それ以前の症例に比べて有意に改善していることが明かとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 小原明.免疫抑制療法で治療された小児再生不良性貧血の長期予後, Annual Review 2007 血液 (高久史麿, 溝口秀昭, 坂田洋一, 金倉謙, 小島勢二編)p55-61. 中外医学社, 東京, 2007
- 小原明.血液製剤の適応と管理・供給 A-輸血用血液 3.顆粒球輸血, スタンダード輸血検査テキスト 第 2 版 (認定輸血検査技師制度協議会カリキュラム委員会 編)p171-175. 医師薬出版株式会社, 東京, 2007
- 小原明.小児再生不良性貧血に対する免疫抑制療

法. 血液・腫瘍科 55:587-592, 2007

- 鈴木徹臣, 真々田容子, 甲田恭子, 村田敬寛, 小原明, 小島勢二, 石黒精: 再生不良性貧血への免疫抑制療法から約 1 年後に発症した急性リンパ性白血病の 1 例. 日本小児血液学会雑誌 21:247-251, 2007
- 小原明.日本における小児再生不良性貧血など造血障害疾患の現状.日本小児血液学会再生不良性貧血委員会疫学調査 1988-2005 年. 日本小児血液学会雑誌 22: 2008 (印刷中)
- Kosaka Y, Yagasaki H, Sano K, Kobayashi R, Ayukawa H, Kaneko T, Yabe H, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Morimoto A, Otsuka Y, Ohga S, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, and Kojima S, on behalf of the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group.Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem-cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia.Blood 111:1054-1059,2008

2. 学会発表

- 小原明, 小坂嘉之, 土田昌宏, 麦島秀雄, 矢部普正, 森本哲, 大賀正一, 月本一郎, 別所文雄, 中畑龍俊: 後天性再生不良性貧血に対する免疫抑制療法後の再発例の検討. 第 69 回日本血液学会第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 横浜, 2007.10
- 小原明: 再生不良性貧血委員会疫学調査事業報告. 第 49 回日本小児血液学会総会, 仙台, 2007.12

Coombs 試験陰性自己免疫性溶血性貧血における赤血球結合 IgG 量の診断特性と治療効果に関する研究

研究協力者 ○梶井 英治 (自治医科大学地域医療学センター 教授)
 亀崎 豊実 (自治医科大学地域医療学センター)
 小山田 隆 (自治医科大学地域医療学センター)

研究要旨

2003 年から 2005 年の 3 年間に、当教室に精査依頼のあった溶血性貧血症例 201 例について、依頼から約 1 年後に主治医へアンケート調査を行った。回答のあった 149 例(74%)中、臨床的に AIHA と診断された症例は 87 例(Coombs 陽性 38 例、Coombs 陰性 49 例、寒冷凝集素症 2 例)であった。Coombs 陽性 AIHA と Coombs 陰性 AIHA の間に病型の明かな差は認められなかった。副腎皮質ステロイド治療に対する反応性は、Coombs 陰性・陽性でステロイド治療に対する反応性がほぼ同程度であったことから、診断困難な Coombs 陰性溶血性貧血に対しては赤血球結合 IgG 定量などによる積極的な診断を行うことが必要と思われる。また、Coombs 陰性 AIHA 診断における赤血球結合 IgG 量の感度、特異度については、赤血球 1 個当たり IgG 90 分子以上で、感度 72%、特異度 64%であり、良好な尤度比が得られた。

A. 研究目的

温式 AIHA 症例の数%に Coombs 試験陰性例が含まれ、赤血球結合 IgG (RBCIgG) 定量検査が診断に有用とされている。まれな病態であるため、患者背景や治療反応性についてまとまった報告はない。Coombs 陰性 AIHA 症例の臨床的背景・治療反応性と RBCIgG 定量検査の感度・特異度を明らかにする事を目的に、AIHA 症例の前向き研究を行った。

B. 研究方法

2003 年から 2005 年の 3 年間に、当教室に RBCIgG 定量依頼のあった溶血性貧血症例 201 例について、immunoradiometric assay 法で RBCIgG 定量を行った。依頼から約 1 年後に主治医へ臨床診断に関するアンケート調査を行った。アンケート結果より Coombs 陽性 AIHA と Coombs 陰性 AIHA の臨床背景・治療反応性の比較を行った。また、Coombs 陰性溶血性貧血患者で RBCIgG 定量検査の AIHA 診断における感

度・特異度を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究については、自治医科大学生命倫理委員会ならびに臨床研究倫理委員会の承認を受けており、検体と臨床データの個人情報 は主治医の医療機関で匿名化された後、研究に用いた。

C. 研究結果

溶血性貧血症例 201 例について、RBC 定量検査から約 1 年後に主治医に対して行ったアンケート調査への回答は 149 例(74%)であった。臨床的に AIHA と診断された症例は 87 例で、その内訳は Coombs 陽性 38 例、Coombs 陰性 49 例、寒冷凝集素症 2 例であった。Coombs 陽性 AIHA の内訳は温式 36 例、混合型 0 例、Evans10 例であり、Coombs 陰性例では温式 28 例、混合型 1 例、Evans7 例、寒冷凝集素症 3 例であった。病型に明かな差は認められなかった(図 1)。性別・年齢については、Coombs 陰性 AIHA 例において

若年層が比較的多く認められた。Coombs 陰性溶血性貧血の約 40%に Coombs 陰性 AIHA を認めた。副腎皮質ステロイド治療に対する反応性は、特発性温式 Coombs 陽性 AIHA24 例中有効は 23 例、無効は 1 例であった。一方、Coombs 陰性特発性 AIHA32 例中有効は 30 例、無効は 2 例であった(図 2)。

D. 考察

Coombs 陰性・陽性でステロイド治療に対する反応性が同程度であったことから、診断困難な Coombs 陰性溶血性貧血に対しては赤血球結合 IgG 定量などによる積極的な診断を行うことが必要と思われた。

また、Coombs 陰性 AIHA 診断における赤血球結合 IgG 量の感度、特異度については、赤血球 1 個当たり IgG 90 分子以上で、感度 72%、特異度 64%であり、良好な尤度比が得られた(図 3、表 1)。Coombs 陰性溶血性貧血患者の経過を前方視的に追跡した成績はほとんどなく、Coombs 陰性 AIHA の臨床背景・治療反応性についての比較解析データもみられないことから、本研究の結果は学術的にも臨床的にも意義がある。また、赤血球結合 IgG 定量検査の感度・特異度についての報告は本研究が初めてであり、検査の信頼性向上に寄与するものである。

E. 結論

溶血性貧血患者 201 症例のフォローアップ研究を行い、Coombs 陰性 AIHA の臨床背景、治療反応性についてのデータと RBCIgG 定量検査の信頼性に関するデータが得られた

AIHA 集団の前向き研究により、赤血球結合 IgG 検査のクームス陰性 AIHA 診断における感度・特異度を明らかにした。クームス陰性 AIHA の治療反応性について一般的な AIHA と差のないことを明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 小峰光博, 梶井英治, 亀崎豊実, 唐沢正光. 自己免疫性溶血性貧血診療の参照ガイド. 臨床血液 47; 116-136, 2006.

2. 学会発表

- 亀崎豊実, 小山田隆, 梶井英治. Coombs 陰性自己免疫性溶血性貧血の治療反応性に関する研究. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 2007 年 10 月 11 日~13 日, 横浜.

表1. Coombs陰性溶血性貧血の診断における RBCIgG検査の感度・特異度

RBCIgG(/RBC)	感度	特異度	陽性尤度比
50以上	87%	46%	1.7
60以上	83%	63%	2.2
70以上	78%	71%	2.7
80以上	74%	79%	3.5
90以上	72%	84%	4.5
100以上	63%	84%	3.9
110以上	57%	88%	4.1
120以上	52%	90%	5.4
130以上	48%	92%	6.0
140以上	39%	92%	4.9
150以上	35%	92%	4.1
160以上	33%	92%	4.1
170以上	33%	94%	5.5
180以上	26%	95%	5.2
190以上	24%	95%	4.8
200以上	22%	95%	4.4

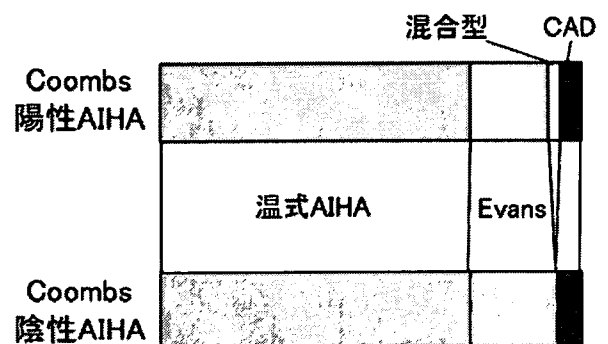


図1 AIHA病型

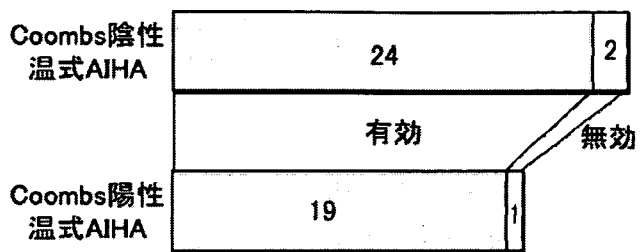


図2 特発性温式AIHAの副腎皮質ステロイド治療反応性

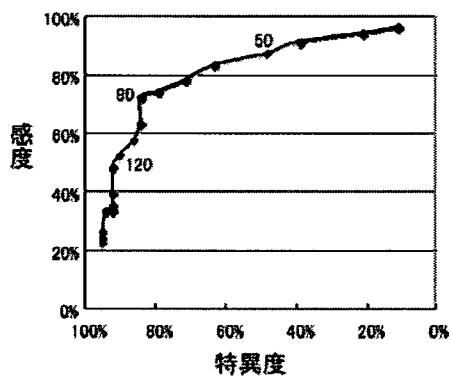


図3 Coombs陰性溶血性貧血の診断におけるRBCIgG検査の感度・特異度: ROC曲線

細胞周期プロファイリング(C2P)技術を用いた骨髄異形成症候群(MDS/AML)と
de novo AML の生物学的差異に関する検討

研究協力者 金丸 昭久 (近畿大学医学部血液内科 教授)

研究要旨

骨髄異形成症候群(MDS)は RA など「貧血」色の強い疾患から、急性白血病(AML)との区別が芽球%の差に過ぎない RAEB や CMMoL など「白血病」色の強い疾患までを含む、きわめて広い疾患概念で捉えられる。一般的に AML へと進展した MDS においては化学療法に抵抗性を示し、その治療成績は十分であるとはいえない。AML に進展しやすいとされる High-risk MDS における臨床的に有用な進展マーカーや予後マーカーを同定することは、臨床的にも重要な課題である。今回、我々は de novo AML、MDS/AML 症例において細胞周期関連タンパクに着目した技術を用い、新たな進展因子・予後因子の同定を試みたので報告する。

A. 研究目的

MDS は、「不応性貧血」と「前白血病状態」という二つの臨床的特徴を持つ。白血病に移行しやすい High-risk MDS 症例においても、これまでにいくつかの病勢進展マーカーや予後マーカーが報告されているが、臨床応用という点では、現状でも十分とはいえず、新たなマーカーが必要とされている。「細胞周期プロファイリング (C2P) 技術」は、2005 年シスメックス株式会社により開発され、早期乳がん患者術後の再発リスクの判定を可能にした技術であるが、シスメックス社が開発したタンパクチップを使用するため従来のタンパク質定量方法に比べ、短時間・低コストで解析が可能である。現在我々は、この技術を造血器腫瘍に応用し、造血器腫瘍の新たな病勢進展マーカーや予後マーカーの同定を試みている。今回、我々は C2P 技術により de novo AML、MDS/AML 患者における細胞周期関連タンパクの発現パターンと臨床的アウトカムとの相関を検討した。

B. 研究方法

同意を得た患者から採取した検体を比重遠心法

により効率的に芽球分画を分離する「Blast retriever」にて処理した後、(シスメックス社にて)可溶化し各細胞周期関連タンパク質が固層化されたタンパク質チップ上に添加、Kinase activity (mIU/ug lysate) および Protein Expression (U/ug lysate) を測定・解析した。G1/S 期と G2/M 期に關与する細胞周期関連タンパクとして、各々 CDK 1,2,4,6 およびサイクリン B1, D, E, p16, p21, p27 に着目して測定した。また分離された芽球はサイトスピン標本にした後、ギムザ染色し目視にて確認した。Kinase activity が高値を示した症例については、臨床的パラメーター(寛解率、寛解期間、再発率など)との相関を検討する。

C. 研究結果

13 症例の患者の骨髄検体を用いて解析を行った。このうち、de novo AML 症例は 8 例、MDS/AML 症例は 5 例であった。今回測定した細胞周期関連タンパク質の中から CDK2/1 比に着目したところ、MDS/AML 症例ではカットラインにより A グループ(CDK2>CDK1)と B グループ(CDK2<CDK1)に層別化できる可能性が示唆された。de novo AML 症例で

は、CDK2 と CDK1 の双方の activity が高い症例が多く認められた。臨床的パラメーターとの相関を解析中である。

D. 考察

今回は高リスク MDS ないし白血病へ移行の症例を対象に、細胞周期関連蛋白の発現と機能を定型的 AML と比較で網羅的に解析して、幾らかの知見を得たが、乳癌症例では、CDK2/1 比の高い症例は化学療法後の再発率が高い傾向が報告されている。MDS/AML 症例は、乳癌症例と同様に、CDK2/1 比の高い症例と低い症例で層別化できる可能性があり、今後化学療法への反応性を含む臨床的背景を検討する予定である。また一方、治療の最終標的は白血病幹細胞であるとする認識が高まりつつある。現時点では技術的に微小の細胞集団の解析は困難であるが、方法論の改良をはかり、分画した幹細胞集団と増殖プールの分裂周期蛋白の動態を検討したいと考えている。その技術改良が実現できれば、低リスク MDS の芽球分画と芽球量の多い高リスク例のそれとの比較も容易に定量できるものと想定でき、MDS の進展機構の一端を細胞周期関連蛋白の発現パターンから解明できることが期待される。

E. 結論

MDS/AML 症例は、CDK2/1 比によって患者を層別化できる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

該当無し

原発性骨髄線維症の血小板における JAK2-V617F 遺伝子変異に関する研究

研究協力者 唐沢 正光 (群馬大学輸血部 准教授)

研究要旨

BCR/ABL 陰性慢性骨髄増殖性疾患(CMPD)には真性多血症(PV)、本態性血小板血症(ET)および原発性骨髄線維症 (PMF) などが含まれるが、共通した遺伝子変異として Janus kinase 2(JAK2)遺伝子の point mutation(JAK2-V617F 変異)が注目されている。JAK2-V617F 変異は顆粒球においては詳細に検討されているが、血小板などの他の血球系で検討した報告は極めて限られる。我々はすでに ET において血小板における JAK2-V617F 遺伝子変異を検索し、顆粒球は陰性で、血小板のみ変異を有する症例が存在することを報告した。今回、6 例の PMF において JAK2 遺伝子変異の検討を行った。6 例中 2 症例の顆粒球に変異を認め、顆粒球に変異を認めなかった 4 例のうち 1 症例では血小板で V617F 変異が検出された。PMF においても ET と同様、血小板における JAK2 遺伝子 V617F 変異の検索が有用であることが示唆された。

A. 研究目的

JAK2 遺伝子 V617F 変異は BCR/ABL 陰性慢性骨髄増殖性疾患に見出された異常で、この変異によりサイトカイン受容体の下流にある JAK-STAT 経路が恒常的に活性化される。真性多血症(PV)で高率に検出される一方、本態性血小板血症(ET)、原発性骨髄線維症 (PMF) の約半数が陽性を示す。我々は既に、ET において血小板における JAK2-V617F 遺伝子変異の検索が有用であることを報告した。今回、PMF 症例の血小板、顆粒球における JAK2 遺伝子変異の有無を検索した。

B. 研究方法

PMF6 症例の末梢血から顆粒球、T 細胞を分離し DNA を抽出、direct-Sequence 法を用い JAK2 遺伝子の塩基配列を決定した。このうち 4 症例においては、顆粒球 DNA に加え、分離した血小板より RNA を抽出し変異の有無を検討した。女性症例 1 例の顆粒球については、HUMARA 遺伝子を用いた clonality assay

を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は当大学の倫理委員会において承認され、対象者に文書による説明・同意を得たうえで行われた。

C. 研究結果

顆粒球では、6 例中 2 症例で変異を認めた。血小板の検討が可能であった 4 症例は前例が顆粒球に変異を認めなかったが、このうち 1 症例については血小板に変異を認めた。この症例の顆粒球は JAK2 遺伝子変異が陰性であるにもかかわらず、X 染色体不活化現象を用いた clonality assay にて単クローン性パターンを呈した。

D. 考察

血小板における JAK2-V617F 遺伝子変異の検索により、血小板にのみ変異を有する症例を検出できた。この患者の顆粒球は JAK2 遺伝子の変異が陰性であ

ったにもかかわらず、クローン性であることが明らかとなった。現時点では不明な遺伝子変異により腫瘍化がおこり、ついで JAK2 遺伝子の変異により病態が完成する可能性を示唆する所見とも解されるが、さらに症例を重ねて詳細に検討する必要がある。

E. 結論

PMF においても ET と同様、顆粒球陰性例中に血小板にのみ JAK2 遺伝子 V617F 変異を有する症例が存在することが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Toyama K, Karasawa M, Yamane A, Irisawa H, Yokohama A, Saitoh T, Handa H, Matsushima T, Sawamura M, Miyawaki S, Murakami H, Nojima Y, Tsukamoto N: JAK2-V617F mutation analysis of granulocytes and platelets from patients with chronic myeloproliferative disorders: advantage of studying platelets. *Br. J Haematol.* 139:64-69, 2007.

2. 学会発表

- 外山耕太郎, 橋本陽子, 山根有人, 入沢寛之, 斉藤貴之, 半田寛, 松島孝文, 塚本憲史, 唐沢正光, 村上博和, 野島美久: BCR/ABL 陰性慢性骨髄増殖性疾患の顆粒球および血小板における JAK2 遺伝子変異と X 染色体遺伝子によるクローン性の解析. 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会, 2006 年 10 月 6 日～8 日, 福岡.
- 外山耕太郎, 塚本憲史, 斉藤明生, 横濱章彦, 内海英貴, 斉藤貴之, 半田寛, 松島孝文, 唐沢正光, 村上博和, 野島美久: 本態性血小板血症の血小板における JAK2 遺伝子変異の検討とその優位性. 第 69 回日本血液学会・第 49 回日本臨床血液学会合同総会, 2007 年 10 月 11 日～13 日, 横浜.