

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)

分担研究報告書

小児がん患者の長期フォローアップシステム確立のための研究

研究分担者 石田也寸志 聖路加国際病院小児科 医長

研究要旨 長期フォローアップ(FU)委員会では、①長期FUガイドライン作成WG、②ホームページ作成WG、③教育WG、④治療サマリーWG、⑤長期FU手帳WGという5つのワーキンググループ(WG)に分かれて活動している。欧米のネットワークを通じた情報交換と連携、治療サマリー作成のフォーマットのホームページ公開、その普及と活用のための支援、長期FU健康手帳の開発に取り組んだ。今年度から最も力を入れているのが、構造化抄録によるevidenceの蓄積と標準化されたケアを行うためevidenceに基づいた長期FUガイドラインを作成することである。小児内分泌学会専門委員会、小児血液学会造血細胞移植委員会、教育関係者との連携を進展させ、今後は教育や広報に関して、小児がん経験者の晩期合併症や長期FU上での問題点に関する情報を提供する計画である。

共同研究者(50音順)

浅見恵子(新潟県立がんセンター小児科)
有瀧健太郎(箕面市立病院小児科)
大園秀一(久留米大学小児科)
沖本由理(千葉県立こども病院)
栗山貴久子(名古屋大学精神科)
徳山美香(東邦大学佐倉病院小児科)
堀浩樹(三重大学医学部小児科)
前田尚子(名古屋医療センター小児科)
前田美穂(日本医科大学小児科)
山口悦子(大阪市立大学小児科)
力石 健(東北大学小児腫瘍科)

A.研究目的

日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)の長期フォローアップ(FU)委員会を中心に、JPLSG治療研究に登録された患児の晩期合併症について長期FUを可能にするシステム作りを検討する。今後は血液がんのみならず、小児がん全体において長期FU体制整備に必要な問題を整理して、問題解決の方法を探る。

B.研究方法

1. 欧米の長期FU体制や晩期合併症に関する情報を収集し、共有する。
2. 診断・治療・今後のFU計画などのサマリー作成のフォーマットを活用できるように入力支援する。また小児がん経験者・家族が長期FUの際に使用可能な健康手帳の開発を行う。
3. 標準化されたケアを行うためのevidenceに基づいた長期FUガイドラインを作成する。
4. 小児内分泌学会、小児血液学会造血細胞移植委員会、産婦人科・泌尿器科医・教育関係者などとの連携の基盤作りを行う。
5. 教育・広報に対する対策を行う。

C.研究結果

- 2009年度は下記4回の長期FU委員会を開催した(委員会議事の詳細は別添資料参照)。
- 1) 第19回 6月6日(聖路加国際病院2号館大会議室)
 - 2) 第20回 6月19日(名古屋医療センター)
 - 3) 第21回 9月20日(聖路加国際病院2号館大

会議室)

4)第22回2010年1月11日(聖路加国際病院2号館大会議室)

現在5つのワーキンググループ(WG)に分かれて活動している。①長期フォローアップガイドライン作成 WG: 前田美穂、堀浩樹、徳山美香、前田尚子、②ホームページ作成 WG: 前田尚子、力石健、③教育 WG: 山口悦子、沖本由理、栗山貴久子、④治療サマリーWG: 大園秀一、石田也寸志、⑤長期フォローアップ手帳 WG: 有瀧健太郎、浅見恵子(下線リーダー)

1. 欧米の情報収集・提供

I-BFM (International Berlin-Frankfurt-Munich)の Early and Late Toxicity Education Committee(ELTEC)と連携し、長期FU情報を委員の間で共有し、班会議でも情報提供を行った。Children's Oncology Group(COG)の長期FUガイドラインについて St. Jude 小児病院の Hudson 博士を招き、11月7日の中外血液フォーラムで「COGガイドライン」に関して講演していただくとともに、11月6日の Meet the Expert でガイドライン作成の具体的な内容に関して、長期FU委員と情報を交換した。BCCSS(British Childhood Cancer Survivor Study)については、日本小児がん学会で特別講演で来日された英国 Birmingham 大学 Hawkins 教授とBCCSSの情報を交換した。

2. サマリーと長期FU健康手帳の開発

サマリーは、アンストラサイクリンの換算式を自動化するとともに、今後治療プロトコルのシエーマをPDFでホームページ上からダウンロード可能にしていく。

長期FU手帳は、A5版、手帳形式で試作版を完成して印刷した。日本小児がん学会のQOLシンポジウムで発表した。今後は藤本班と協力し、アンケート調査を計画する。

3. 長期FUガイドライン作成

分担して構造化抄録を作成し、晩期合併症に関するevidenceを収集する。またWGを中心

に、治療内容や強度などにより大まかにgradingして、藤本班のモデル病院でグレード分類を試行した。輸血・予防接種などは原案が完成したため、JPLSG 会員ホームページに掲載して、パブリックコメントを募集する。今後ALL、AML、NHLに関して原案を完成する予定である。以上のコンセプトの元にガイドラインを作成し、早期に原案完成を目指す。

4. 他分野との連携

東大形成外科三原誠先生による小児がん・若年女性がん患者の妊孕性温存に関する研究を紹介していただいた。またがん罹患後の就労に関して、東京大学医学系研究科福井郁子先生とNPO法人HOPE project 代表桜井なおみさんから癌患者の就労・雇用支援に関して情報を交換した。

5. 教育・広報

教育WGは心理面とボランティア、学校関係を分担し、Power Point を使用して、治療終了時に長期フォローアップの重要性を小児に説明するツールを開発中である。

ホームページ作成WGでは、まず委員・会員向けのHPを充実し、各WGでの成果を会員に公開し、その後内容の確認を行ってから一般向けへ公開する計画である。

D. 考察

ELTECではEUの資金援助を受け、全ヨーロッパの小児がん長期FUネットワーク構想があり、今後そのネットワークとの情報交換と連携を考えていく予定である。サマリー作成のフォーマットを公開したが、広く普及するには至っていないと思われ、今後普及と活用のための入力支援を充実する必要がある。

また小児がん経験者・家族のための長期FU健康手帳は試作版が完成し、今後JPLSG長期FU委員所属施設および藤本班一長期FUモデル拠点病院で、手帳配布時に医療従事者、小児がん経験者およびそのご家族に対して、手帳

の仕様や内容に関するアンケートを行う計画である。目標アンケート回収数は 400 として、その結果により改訂版を作成する。

今年度も WG を中心に引き続き標準化された長期 FU ガイドライン作成を行った。構造化抄録による evidence の蓄積とともに、本邦の保険システムも考慮した実用的なもので成人診療科との連携にも役立つものを考えている。小児内分泌学会、小児血液学会造血細胞移植委員会のガイドラインの摺り合わせの後に、公開予定である。教育と広報についても、各 WG を中心に活動し、小児がんの晩期合併症や長期 FU 上での問題点に関する情報を提供していく。

E. 結論

5 つの WG を中心に 4 回の委員会を開催し、サマリー、長期 FU 手帳、ガイドライン、他分野連携、教育・広報に関する活動を行った。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohga S, Kudo K, Ishida Y et al: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 54: 299-306, 2009
2. Morimoto A, Ishida Y et al: Nationwide Survey of Single-System Single Site Langerhans Cell Histiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer* 54: 98-102, 2009
3. Kudo K, Ohga S, Ishida Y et al.: Improved outcome of refractory Langerhans cell histiocytosis in children with hematopoietic stem cell transplantation in Japan. *Bone Marrow Transplantation* (in Press)

4. Suzuki N, Morimoto A, Ishida Y et al.: Characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis in neonates: a nationwide survey in Japan. *J Pediatr* 155: 235-238, 2009
5. K Kamibeppu, I Sato, M Honda, S Ozono, N Sakamoto, T Iwai, J Okamura, K Asami, N Maeda, H Inada, N Kakee, K Horibe, and Y Ishida: Mental health among young adult survivors of childhood cancer and their siblings including posttraumatic growth *Journal of Cancer Survivorship* (in press, 2010)
6. I Sato, A Higuchi, T Yanagisawa, Y Ishida, K Kamibeppu: Development of the Japanese version of the Pediatric Quality of Life Inventory™ Brain Tumor Module, Health & Quality of Life Outcomes. (in press, 2010)
7. 石田也寸志、本田美里、上別府圭子他: 小児がん経験者の晩期合併症およびQOLの実態に関する横断的調査研究 第1報. *日本小児科学会雑誌* 2009 (印刷中)
8. 石田也寸志、大園秀一、本田美里他: 小児がん経験者の晩期合併症およびQOLの実態に関する横断的調査研究 第2報. *日本小児科学会雑誌* 2009 (印刷中)
9. 石田也寸志: 小児脳腫瘍の晩期合併症—長期フォローアップの重要性—。小児がん、2010 (印刷中)
10. 石田也寸志: 小児白血病・悪性リンパ腫後期合併症と長期フォローアップ. *小児科診療*、2010 (印刷中)
11. 石田也寸志: 長期的な小児がん患者ケアのあり方—長期フォローアップの重要性. 学術動向、2010 (印刷中)
12. 石田也寸志: 小児白血病の長期フォローアップの重要性. in 五十嵐隆、菊池陽 (編): *小児白血病診療*. 東京、中山書店 2009, pp 180-183

13. 石田也寸志:小児がん経験者の長期フォローアップと看護. 丸・石田監修:ココからは始める小児がん看護. 東京、へるす出版 2009 pp.308-318
14. 石田也寸志:小児がんーおもな疾患『小児看護』東京、医学書院、2010(印刷中)
15. 石田也寸志、細谷亮太悪性腫瘍(診断と治療、ターミナルケア)『教育現場における「病弱・障害児の生理病理心理」』京都、ミネルヴァ書房 2010(印刷中)
16. 石田也寸志:血液・腫瘍性疾患患児への告知とターミナルケア『今日の小児治療指針 第15版』東京、医学書院、2010(印刷中)

2. 学会発表

- 1) 石田也寸志:小児がん経験者の晩期合併症およびQOLの横断的調査研究ー造血幹細胞移植の影響. 第112回小児科学会学術集会 4月19日 奈良商工会議所
- 2) Yasusshi Ishida: Present health status of childhood cancer survivors in Japan:Need for communication between pediatric oncologists and primary care physicians to promote survivor's health. The First Asia-Pacific Conference on Health Promotion and Education (APHPE) 7月19-20日 千葉幕張メッセ
- 3) 石田也寸志:小児がん治療の進歩ーこれからの大きな問題ー. 日本プライマリ・ケア学会ワークショップ 8月23日 京都国際会館
- 4) Yasusshi Ishida et al: LATE EFFECTS AND HEALTH-RELATED QUALITY OF LIFE OF CHILDHOOD CANCER SURVIVORS AFTER STEM CELL TRANSPLANTATION. SIOP2009 10月5日-12日 サンパウロ
- 5) Kiyoko Kamibeppu, and Yasusshi Ishida et al: POSTTRAUMATIC GROWTH AMONG SURVIVORS OF CHILDHOOD CANCER. SIOP2009 10月5日-12日 サンパウロ
- 6) Misato Honda, Yasusshi Ishida et al: Quality of Life among Long-Term Adolescent and Adult

Survivors of Childhood Cancer in Japan.

ESLCCC2009 10月28日-30日 エジンバラ

- 7) Yasusshi Ishida et al: Social Outcomes and Medical Visits of Childhood Cancer Survivors in Japan: Marriage, Education, Employment and Medical Visits ESLCCC2009 10月28日-30日 エジンバラ
- 8) 石田也寸志:脳腫瘍の晩期合併症のリスク因子ー長期フォローアップの重要性ー日本小児血液・がん学会 11月27日-29日 千葉
- 9) 石田也寸志:QOL シンポジウム「小児がん経験者の成人医療への移行について」日本小児血液・がん学会 11月27日-29日 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

長期フォローアップ委員会議事録(要点のみ)

<委員会メンバー>※委員長

・石田也寸志※	TCCSG グループ 公募	聖路加国際病院小児科	総括、サマリーWG
・浅見恵子	CCLSG グループ	新潟県立がんセンター新潟病院小児科	手帳WG
・堀 浩樹	JACLS グループ	三重大学医学部小児科	ガイドラインWG
・力石 健	JACLS グループ	東北大学医学部小児科	ホームページWG
・山口悦子	JACLS グループ	大阪市立大学医学部小児科	教育WG
・大園秀一	KYCCSG グループ	久留米大学医学部小児科	サマリーWG
・前田美穂	TCCSG グループ	日本医科大学小児科	ガイドラインWG
・徳山美香	TCCSG グループ	東邦大学医療センター佐倉病院小児科	ガイドラインWG
・前田尚子	JACLS 公募	国立病院機構名古屋医療センター小児科	ホームページWG
・有瀧健太郎	個人会員公募	箕面市立病院小児科	手帳WG
・沖本由理	TCCSG 公募	千葉県こども病院血液腫瘍科	教育WG
・栗山貴久子	個人会員公募	名古屋大学医学部親と子どもの診療部	教育WG

<本年度に開催した委員会>

1. 第 19 回委員会

日時：2009年6月6日(土) 10:30~16:00 場所：聖路加国際病院2号館大会議室

1. 特別講演：東大形成外科 三原誠先生「小児癌・若年女性がん患者の妊孕性温存(卵巣凍結)」
2. 小児がん経験者のQOLに関する研究の提案 目白大学教授 小池真規子先生
3. JPLSG運営委員会に提出された「JPLSG疫学研究」について 石田也寸志
4. 各ワーキンググループから
1) 治療サマリーWG(大園) 2) 教育WG(山口) 3) ホームページ作成WG(前田尚子) 4) 長期フォローアップ手帳WG(有瀧) 5) 長期フォローアップガイドライン作成WG(前田美穂)

2. 第 20 回委員会

日時：2009年6月19日(金) 18:30~21:00 場所：国立病院機構名古屋医療センター

テーマ：構造化抄録の発表

1. 成長・内分泌・肥満・脂質糖代謝—有瀧
2. 心血管系—前田美穂
3. 消化器・肝臓—徳山
4. 骨・筋肉—堀
5. 二次がん—沖本
6. 全般的な健康・QOL—山口
7. 生活習慣・喫煙—浅見
8. 社会・心理面—栗山

3. 第 21 回委員会

日時：2009年9月20日(日曜日) 10:30~16:00 場所：聖路加国際病院2号館大会議室

1. 特別講演：東京大学医学系研究科福井郁子先生「小児がん経験者が仕事を続けるための戦略(工夫)」
追加発言：NPO法人HOPE project代表桜井なおみさん「Cancer Survivor Recruiting Project(仮題)」
2. 各ワーキンググループから
1) 治療サマリーWG(大園) 2) 教育WG(山口代理) 3) ホームページ作成WG(前田尚子) 4) 長期フォローアップ手帳WG—がん患者必携の状況(情報提供) 5) 海外の長期フォローアップ状況(トロント坂口先生からの情報—真部班)
3. 中外フォーラムの内容の相談

4. 第 22 回委員会

日時：2009年1月11日(月曜日) 9:00~12:00 場所：聖路加国際病院2号館大会議室

1. 長期FU手帳に関するアンケート調査研究：JPLSG長期FU委員所属施設および藤本班—長期FUモデル拠点病院で、手帳配布時に医療従事者、小児がん経験者およびそのご家族に対して、手帳の仕様や内容に関する自記式のアンケートを行う。目標アンケート回収数は400として、その結果により改訂版を作成する。研究計画書を改訂し、アンケート内容を修正する。
2. フォローアップレベルに関して—修正点を中心に議論

<各WGの進捗状況>

1. サマリーWG リーダー：大園秀一

「治療のまとめ」—今後の方向性・普及活動に重点

- ・作成中のガイドラインに合わせアンスラサイクリン契約剤の自動計算かを組み込んだ
- ・論文の発表—「小児がん」
- ・治療送料の事前入力
- ・健康手帳との連携
- ・治療プロトコルの掲載
- ・自動入力支援ソフトの開発

2. 手帳WG リーダー：有瀧健太郎

原案が完成し、小児がん学会シンポジウムで公開予定

今後試用してみて、感想・アンケートをとり改訂して完成版を作成する予定

3. ガイドラインWG リーダー：前田美穂

- 1) フォローアップレベル5段階
- 2) 疾患別ガイドライン：ALL, AML, NHL については原案がほぼ完成
- 3) 治療法別ガイド：予防接種と輸血について原案がほぼ完成
- 4) 各臓器・症状別の注意点

4. 教育WG リーダー：山口悦子

治療終了時に、病気の説明と長期フォローアップが必要な理由を説明できるツールを開発中

PowerPoint でスライドショーの形で使用できるもの

キャンプやセミナーで感想・アンケートを集めて完成版に持っていく

5. ホームページWG リーダー：前田尚子

「治療のまとめ」と注意事項の掲載

ガイドラインの掲載—予防接種、輸血など

委員会の議事録など

6. その他

1) CML に対するグリベック治療の長期毒性の検討

2) ガイドラインの基礎資料とすべく構造化抄録を作成中（分担は下記）

1. 成長・内分泌、肥満・脂質糖代謝—有瀧、2. 心血管系—前田美穂、3. 消化器・肝臓—徳山、4. 骨・筋肉—堀、5. 二次がん—沖本、6. 全般的な健康・QOL・予防接種・免疫—山口、7. 生活習慣・喫煙—浅見、8. 社会・心理面—栗山、9. 長期フォローアップ体制（移行）—石田、10. 神経・認知・感覚器—大園、11. 呼吸・腎・泌尿器—力石、12. 不妊関係—前田尚子、13. 造血細胞移植—石田、14. 歯牙—前田美穂

小児造血器腫瘍微小残存病変の分子診断システム確立ための研究

分担研究者 鶴澤正仁 愛知医科大学医学部小児科 教授

研究趣旨

本研究の目的は、わが国の小児造血器腫瘍、特にリンパ系腫瘍における免疫受容体遺伝子再構成を用いた微小残存病変(MRD)定量法を標準化することにより、各疾患の治療研究における診断・治療に必要な質の高い情報を供給出来得る分子生物学的診断システムを確立することにある。本年度われわれは、免疫受容体遺伝子再構成を用いた MRD 定量において、その検出率向上のため、昨年度より取り組んできた TCR β 鎖遺伝子に加え、IgH 鎖遺伝子 DH-JH 再構成、SIL-TAL 遺伝子再構成をターゲットに加えた。また RQ-PCR による MRD 定量技術の標準化と確実な精度管理の実現のため欧州BFMグループと連携し、その MRD 専門研究機関である ESG-ALL-MRD への正式参加を試みるとともに、改良を加えつつ解析症例数を重ねて定量精度の向上を図った。

研究協力者氏名

堀 壽成 愛知医科大学医学部小児科講師

A.研究目的

本研究の目的は、わが国の小児造血器腫瘍、特にリンパ系腫瘍における免疫受容体遺伝子再構成を用いた微小残存病変(MRD)定量法を標準化することにより、各疾患の治療研究における診断・治療に必要な質の高い情報を供給出来得る分子生物学的診断システムを確立することにある。

B.研究方法

従来わが国における免疫受容体遺伝子再構成を用いた微小残存病変定量は、小児癌白血病研究グループ(CCLSG)により実施されてきた。これらの測定方法は欧州の国際共同研究BIOMED-1での再構成ターゲットをベースに、nested PCRを用いた希釈法による半定量で行われてきたが、現在BIOMED-2を経て標準化された欧州BFM

グループと比較して、その再構成検出率、定量の精度には隔たりがあり、今後全国規模の治療研究を行うにあたって、これを世界標準まで引き上げることが必要と考えられる。そのために我々は、BFMグループにおける分子診断施設であるエラスムスMC免疫学教室の協力の下、再構成スクリーニングにおけるターゲットの拡大とRQ-PCR法の導入を行った。具体的な研究活動方法を以下に示す。

- (1) 従来スクリーニングに用いてきたIg κ 鎖、Ig H鎖、TCR γ 鎖、TCR δ 鎖と、昨年より取り組んできたTCR β 鎖に加え、新たにIgH鎖におけるDH-JH、さらにSIL-TALの遺伝子再構成の検出を行った。具体的には、CCLSG ALL 研究登録例、JPLSG 再発 ALL 研究登録例、その他の登録外 ALL 症例を対象として、それぞれの遺伝子上に設定された複数のプライマー (V β family primers 23 種類、D β primer 2 種類、J

β primer: $J\beta_1$ 6種類, $J\beta_2$ 7種類、DHfamily primers 7種類、JH primer 1種類、sil-db, tal-db primer 各1種類)を用いて、 $V\beta$ - $J\beta$ 、 $D\beta$ - $J\beta$ 、DH-JH、SIL-TALの再構成のスクリーニングPCRを施行、heteroduplex analysisを施行してクロナリティを確認し、得られたPCR産物についてその塩基配列を解析した。

- (2) Taqmanプローブ法によるRQ-PCRを導入し、CCLSG ALL 研究登録例および登録外のALL症例を対象としてMRD定量を施行、その結果に関するエラスムスMC免疫学教室の評価に基づいて、定量法を改良して追加症例の定量を行った。さらに同教室より提供された定量済みの検体について定量を行い、当科の定量精度を確認するとともに、BFMグループのALL-MRD専門研究機関(ESG-ALL-MRD)への参加資格取得を試みた。

C. 研究結果

- (1) ALL症例計26例のうち3例でTCR β 鎖遺伝子再構成スクリーニングPCRにおける陽性バンドを検出し、切断点近傍のシークエンス解析の結果、症例特異的プライマーの設計が可能であった。また1例でIgH遺伝子DH-JH遺伝子再構成を検出し、同様に症例特異的プライマーを設計した。検出不能例は3例あり、2例は検体の不良、1例はスクリーニングにて陽性バンドなしであった。SIL-TAL遺伝子についてはわれわれの症例では再構成を検出できなかったが、前述のエラスムスMC免疫学教室提供のテストサンプル5検体のうち1例でこれを検出し、症例特異的プライマーが設計であった。
- (2) ALL症例計26例についてRQ-PCRによるMRD定量を行い、全症例で 10^{-4} 以上の感度を得た。しかし12例で定量域が 10^{-3} であったため、エラスムスMCより定量法改良の助言を受け、希釈段階に $10^{-3.5}$ 設定して再検を行った。その結果再検3例の全例で定量域の改善がみられ、また追加で行った11

例でも定量域 10^{-3} 以下は1例のみであった。この結果を受けてエラスムスMCより提供されたテストサンプル(5検体、10再構成)の定量結果の比較では、定量域が 10^{-3} 以下の再構成が3例みられたものの、総合的な定量精度に関してESG-ALL-MRDの参加条件を満たし、同委員会への正式参加を承認された。

D. 考察

TCR β 鎖、IgHDH-JH、SIL-TAL 遺伝子再構成はBFMグループでも全ての国でMRD定量に採用されているわけではないが、われわれの現行の手法では、再構成検出率は約80%に留まっているため、これらの再構成をターゲットに加えることは現状を打開する選択肢の1つと考えられる。今回それらの検出が可能となったことでその改善が期待され、JPLSGの今後の治療研究により貢献できると考えられた。またTCR β 鎖、SIL-TALはT-ALLにおいては高い検出率を示すとされ、JPLSGのT-ALL研究には不可欠と考えられるため、その検出技術の充実が今後の課題と考える。

またRQ-PCRによるMRD定量に関しては早急な技術の刷新による世界標準化が課題であったが、今回のBFMグループによる定量精度の評価により、われわれの定量技術が一定水準に達したことが確認され、目標であったESG-MRD-ALLへの正式参加を達成した。BFMグループとのより緊密な連携による定量精度の向上と安定化が今後の新たな目標になると考えられる。

E. 結論

本年度われわれは、免疫受容体遺伝子再構成を用いた微小残存病変定量において、その検出率向上のためTCR β 鎖、IgH鎖DH-JH、SIL-TAL遺伝子再構成の検出を可能にした。またRQ-PCRによるMRD定量については、その精度が必要な水準に到達したことをBFMグループによって承認され、ESG-MRD-ALLへの正式参加を達成

した。

prophylactic cranial irradiation. Jpn J
Pediatr Hematol 23:244-250, 2009

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1、原著論文

- 1) Retrospective analysis of nonanaplastic peripheral T-cell lymphoma in pediatric patients in Japan. Kobayashi R, Tsurusawa M, Horibe K et al. Pediatr Blood Cancer 54:212-215, 2010
- 2) Long-term results of the Japanese childhood cancer and leukemia study group studies 811, 841, 874, and 911 on childhood acute lymphoblastic leukemia. Tsurusawa M et al. Leukemia 24:335-344, 2010
- 3) A study of rasburicase for the management of hyperuricemia in pediatric patients with newly diagnosed hematologic malignancies at high risk for tumor lysis syndrome. Kikuchi A, Tsurusawa M, Horibe K et al. Int J Hematol 90:492-500, 2009
- 4) Detection of submicroscopic disease in the bone marrow and unaffected testis of a child with T-cell acute lymphoblastic leukemia who experienced "isolated" testicular relapse. Arima K, Hori T, Tsurusawa M et al. Int J Hematol 90:370-373, 2009
- 5) 小児再発 ALL における分子生物学的微小残存病変 (MRD) 定量の臨床的意義。堀壽成、鶴澤正仁、横田昇平他 日小血会誌 23:20-26. 2009
- 6) Retrospective analysis of relapsed or primary refractory childhood lymphoblastic lymphoma in Japan. Mitsui T, Horibe K, Tsurusawa M et al. Pediatr Blood Cancer 52:591-595, 2009
- 7) Outcomes of 59 children with lymphoblastic lymphoma receiving an intensive ALL-type therapy without

小児造血器腫瘍微小残存病変の免疫学的診断システム確立ための研究

研究分担者 出口隆生 三重大学医学部附属病院小児科 助教

研究要旨 小児急性リンパ性白血病(ALL)における免疫学的微小残存病変(FCM-MRD)検出システムを確立するため、平成20年10月から平成21年6月までに三重大学小児科で再発診断した症例を対象にパイロット研究を行った。内訳は、骨髄(BM)単独再発が8例、BM+中枢神経(CNS)複合再発が1例の計9例。ドイツのBFMグループによる分類ではS2 6例、S3 3例であった。BFM-REZ 2002で治療され、各々の治療前のポイントで採取されたBMをセントジュード小児病院から報告された4カラーFCM-MRD測定法を用い、最大3種類の抗原で測定した。治療早期では免疫学的表現型が正常に近くても比較的容易に検出されたが、9例中1例でBMA3以降のフォローが困難であった。BFM-REZ2002で治療介入に用いられるポイントであるBMA3では、2例を除き複数のフォロー項目サンプル数を確保できた。再発までの期間は再発後の化学療法への反応性との相関が示唆され、またCNS+BM複合の早期再発ではBMA3のMRDは低値で、S2への分類の妥当性が示唆された。これらの結果は平成21年11月27日に日本小児血液学会・小児がん学会合同学術総会において発表した。平成22年度中に小児血液学会誌に投稿・発表される予定である。

尚、平成21年6月以降は小児ALL再発例に対する全国共同治療研究ALL-R08が開始され、BFM分類でS2となる症例について、これらの検討を元に前方視的にFCM-MRDの測定を開始した。平成22年3月の時点で10例が登録され、検査が実施されている。

A.研究目的

小児急性リンパ性白血病(ALL)治療における微小残存病変(MRD)検出の果たす役割は、初発症例・再発症例ともに、ドイツのBFMグループやSt. Jude小児病院をはじめ、すでに多くの研究グループからその有用性が示されている。しかしながら我が国においては、分子生物学的手法が一部のグループで臨床応用されているに過ぎず、全国的レベルでの実用化にはほど遠いのが現状であった。

近年ようやく日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)を母体とした全国的規模での臨床研究が実施され、非ホジキンリンパ腫・急性骨髄性白血病などでは診断や治療の統一的検討が実施されている。今後も乳児ALL、小児・青年T-ALL、小児B前駆細胞性ALLの全国共同研究を企画中であるが、これら臨床試験での

MRD実用化は不可避のテーマであり、今回の分担研究が計画・実施されることとなった。

MRD測定には大きく分けて2つの方法があり、本分担研究においては、フローサイトメトリー(FCM)によって検出される免疫学的手法の確立することを目的に研究を行う。分担研究者らはすでに平成14年度からFCM-MRD研究の第一人者であるSt. Jude小児病院のDr. Campanaらの援助のもと、予備的検討を行ってきた。昨年度までにB前駆細胞性初発例・再発例を中心に基礎的検討を行ったが、今年度は目前に控えた小児再発ALL治療研究(ALL-R08)の開始を控え、小児ALL再発例に焦点を絞って免疫学的MRDの検討を行い、臨床経過との関連を調査するとともに、予後と比較を行うためのデータ解析・報告体制の整備を進める。

B.研究方法

平成 20 年 10 月から平成 21 年 6 月までの間に、三重大学医学部小児科・JPLSG/日本小児白血病研究会 (JACLS) マーカー解析センターにて再発診断を行った症例、合計 9 例につき、パイロット研究を行った。

1. 検体送付施設は再発診断時の検体送付時に「MRD 検索依頼状」を検査施設に送付した上で、ヘパリン加骨髄(もしくは末梢血)を、年齢・性別・再発までの期間など、基本的なデータとともに宅配便で送付した。

2. 送付された骨髄は比重遠心法を用いて単核球分離し、細胞数を調整した上で、各チューブに 10 の 6 乗個ずつ分注され、すでに報告された MRD 診断パネルに従って蛍光染色する。

3. MRD がフォロー可能であった場合はフォロー可能である旨を施設へ報告し、以後の検体送付をお願いした。

4. 各々の症例は、ドイツの BFM グループの再発 ALL 治療プロトコルであり、また ALL-R08 でも基本骨格としての採用される BFM-REZ 2002 で基本的には治療された。各々の治療前のポイントで採取された BM を MRD 測定のため送付した。

5. 送付された BM は、セントジュード小児病院から報告された 4 カラー FCM-MRD 測定法を用い、最大 3 種類の抗原でサンプル調整を行った。

6. 調整されたサンプルは BD Bioscience 社の FACS Calibur もしくは FACS Canto II FCM にてデータ収集を行い、MRD を解析した。

7. 解析された MRD の結果はデータベースに保存され、検体受領後 1 週間以内にファックスで報告するとともに、ドットプロットを含む詳細データを後日郵送で報告した。

8. MRD の減衰率と基本的データとの間の相関を調べた。

C.研究結果

今回検討した小児 ALL 再発症例の内訳は、男 5 名、女 4 名で、年齢は 2 歳～10 歳であった。再発様式では、BM 単独再発が 8 例、BM+CNS 複合再発が 1 例、計 9 例で、ドイツの BFM グル

ープにより提案された再発症例のリスク分類では S2 6 例(1 例は早期再発でも BM+CNS であるため S2 に分類)、S3 3 例であった。

MRD の測定は各症例ともに、治療早期(BMA2, BMA3)では免疫学的表現型が正常に近くても比較的容易に検出されたが、9 例中 1 例で正常の B 前駆細胞の再生と考えられる細胞集団との重なりが大きく、BMA3 以降のフォローが困難であった。残る 8 例では BMA3 での MRD 測定は問題なく行えた。また、実際に解析された項目数(最大で 3 本)は、BMA2 では 1 例、BMA3 では 2 例を除き、複数のフォロー項目サンプル数を確保できた。

MRD の測定結果では、BFM-REZ2002 で移植群・化学療法群を振り分けるポイントとなる BMA3 で MRD<0.1%(10E-3)以下となった症例は 4 例であった。3 例は BM 単独再発例で、診断から再発までの期間は各々 72, 62, 54 ヶ月であった。1 例は S2 に分類される BM+CNS 再発例で、診断から再発までの期間は 28 ヶ月であった。すなわち S2 の 6 例のうち、4 例で良好な再発治療に対する反応性を認めた。他の 2 例は診断から再発までの期間は 43, 41 ヶ月で、MRD は各々 2.86%, 2.04%であった。S3 の 3 例中 2 例は化学療法に対する反応が不良であり(診断から再発までの期間: 29, 25 ヶ月、BMA3 の MRD: 75.96, 71.36%)、唯一比較的良好的な反応を示した S3 症例は診断から再発までの期間が 29 ヶ月、BMA3 の MRD が 1.01%であり、治療経過中に MRD は一旦陰性となったが、造血細胞移植後 6 ヶ月で骨髄再々発を認めた。

D.考察

(1)今回検討した 9 例は、再発診断時に正常 B リンパ球前駆細胞に近い表現型の白血病も含まれていたが、治療早期(BMA2～BMA3)では免疫学的表現型が正常に近くても比較的容易に検出された。唯一 9 例中 1 例で BMA3 以降のフォローが困難であった。

(2)BMA3 では 2 例を除き、複数のフォロー項目サンプル数を確保できた。

(3)再発までの期間は再発後の化学療法への反応性との相関が示唆された。

(4) CNS+BM 複合の早期再発では BMA3 の MRD は低値で、S2 分類の妥当性が示唆された。

(5) ALL-REZ BFM 95/96 における 8 年 EFS は、S2 が 48%、S3 が 19%と報告されている。今回の検討では S2 は 6 例中 4 例で良好な治療初期反応を示し、S2 の成績を支持する所見であった。

(6) 初期反応不良例で一旦 MRD 陰性となった後の再発例があった。BMA4 以降の継続的フォローの意義については検討が必要。

(7) ALL-R08 で臨床予後や PCR-MRD との相関を明らかにすることで有用性を検討する予定であり、平成 21 年 6 月より FCM-MRD の前向き検討が開始され、平成 22 年 3 月の時点で 10 例が登録され、検査が実施されている。

E. 結論

1. FCM を用いた MRD は、治療選択への評価ポイントである BMA3 において 9 例中 1 例を除いて十分な MRD の評価が可能であった。

2. 再発 ALL における BFM 分類の妥当性が、我が国の再発例においても示唆された。

3. 今後は再発 ALL 治療研究 (ALL-R08) など観察を行うことにより、予後との関連・分子学的 MRD との相関を調べる必要がある。

4. 研究体制については今後も検討を行うが、質の良い臨床研究を行う上で、財政面を含めたインフラ体制の整備を切に期待する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 著書

(1) 出口隆生

小児科臨床ピクシス 10 小児白血病診療. 1 章 急性リンパ性白血病 診断・予後因子 微小残存病変 フローサイトメリーによる方法. P28-32 五十嵐隆総編集 中山書店 東京 2009.

2. 論文発表

(1) 出口隆生

特集1 混合型白血病

3. 混合型白血病 ―診断の現状と問題点― 血液フロンティア 20(3):343-349, 2010

(2) 栗原康輔, 堀 浩樹, 小早川雄介, 坪谷尚季, 岡村 聡, 世古口さやか, 出口隆生, 駒田美弘.

地域にある社会資源を活用した小児がんサマーキャンプの実施とその効果.

小児がん 47(1):68-72, 2010.

3. 学会発表

(1) 出口隆生, 岩本彰太郎, 駒田美弘

小児ALL再発例におけるフローサイトメリーを用いたMRD解析の試み

平成21年11月27日 第51回日本小児血液学会・第25回小児がん学会合同学術集会

日本小児血液学会誌 プログラム・総会号 p227, 2009

(2) 天野敬史郎, 松田和之, 岩本彰太郎, 熊本忠史, 出口隆生, 堀 浩樹, 東 英一, 駒田美弘, 瀧本哲也, 堀部敬三

ネララビン単剤反復投与にて再寛解を得た再発 T-ALLの一例

平成21年11月27日 第51回日本小児血液学会・第25回小児がん学会合同総会

日本小児血液学会誌 プログラム・総会号 p342, 2009

(3) Hiroki Hori, Takashi Sato, Takao Deguchi, Yoshihiro Komada, Kaname Nakatani, Tsutomu Nobori

Macrocytic anemia suddenly progressing during maintenance therapy for childhood ALL

平成21年10月25日 第71回日本血液学会学術集会

臨床血液 50(9):1270, 2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)

研究分担報告書

小児造血器腫瘍の病理中央診断システム確立のための研究

研究分担者 中川 温子 国立成育医療センター病理診断科 医長

研究要旨 小児悪性リンパ腫の臨床研究推進の基盤となる病理中央診断を 2009 年は 132 例実施した。JPLSG 悪性リンパ腫臨床試験が開始されて以来 4 年余の間に中央診断された症例は 607 例となった。病理中央診断システムは、臨床試験参加症例の適格性を確認するための Rapid Review と最終的な病理診断を決定する Group Review により構築され、H&E 染色標本だけでなく、中央診断施設で免疫組織化学染色、in situ hybridization 法による EBV 検索、FISH 法を用いた c-myc, BCL-2 遺伝子検索を行う、総合的な診断システムである。中央病理診断中間報告と最終報告で、プロトコル変更となる診断変更例は無かった。c-myc, BCL-2 遺伝子検索は診断精度の向上に有用であるだけでなく、小児悪性リンパ腫の生物学的特性を明らかにする上でも重要と考えられた。ホジキンリンパ腫の臨床研究開始に備え、診断に必要な抗体パネルを決定した。また nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma の診断についての研究を行い、T-cell/histiocyte-rich diffuse large B-cell lymphoma との鑑別について検討した。今年度は国際シンポジウムで日本の小児リンパ腫の特徴と 2008 年改訂 WHO 分類における診断の問題点について報告した。さらにヨーロッパとの国際共同研究 ALCL99 の成果として anaplastic large cell lymphoma の病理学的予後因子が明らかとなった。

研究協力者(病理判定委員)

大島孝一 久留米大学医学部
田丸淳一 埼玉医科大学総合医療センター
中峯寛和 奈良県立医科大学
中村栄男 名古屋大学医学部
藤本純一郎 国立成育医療センター
北條 洋 福島県立医科大学医学部
松野吉宏 北海道大学医学部附属病院
吉野 正 岡山大学大学院医歯学総合研究科

A.研究目的

小児造血器腫瘍の標準的治療法の確立を行うにあたって、病理学的診断の標準化を目指す。また、治療反応性などの予後を左右する病理所見や生物学的特性の解明を目指す。

B.研究方法

1)中央病理診断

小児悪性リンパ腫の各病型についての診断基準は WHO 分類(2008)に準拠した。Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)についてはヨーロッパとの共同研究(ALCL99)における国際中央病理医会議での検討結果をふまえた基準を採用した。ALK 陰性 ALCL 症例は、ALK1, ALKc, p-80 の ALK 抗体カクテルを用いて再検し、EBER を probe とした in situ hybridization 法 (EBV-ISH) による EBV 検索を追加した。免疫染色は 2 ヶ所(国立成育医療センターと久留米大学)の中央診断施設で昨年までの本研究で決定した抗体パネルを用いて行った。また、捺印標本、ホルマリン固定パラフィン切片を用いた FISH 法により c-myc 遺伝子、BCL-2 遺伝子転座を検索した。鑑別診断上必要な場合には EWS 遺伝子、FKHR 遺伝子転座についても検

討した。

2) 中央診断手順

病理中央診断の手順は以下のごとくとした。すなわち、複数存在する小児血液腫瘍研究グループの各々に病理中央診断医(久留米大学・大島、国立成育医療センター・中川および国立成育医療センター研究所・藤本の合計 3 名)を配置し、当該病理医の診断 Rapid Review(中間報告)でプロトコール適合性を決定する方針とした。また、年に複数回の病理判定委員会を開催し、9 名の血液病理医による Group Review にてコンセンサス診断を下し、最終診断(最終報告)とする方針とした。ALCL については ALK が陰性となる場合に限り、上記 3 名のコンセンサス診断を決定しそれに基づいてプロトコール適合性を決定する方針とした。

3) ホジキンリンパ腫の病理診断

ホジキンリンパ腫が疑われた症例について、CD3, CD20, CD15, CD30, EMA に対する抗体を用いた免疫染色を行った。追加抗体として、Oct2, BOB.1, PAX5, Mum1, CD57, CD21, IgD の各種抗体を用いた。EBER-ISH による EBV 検索も必須とした。

2005 年 4 月から 2009 年 6 月に診断された 12 例の小児 nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma (NLPHL) を対象とし、病理組織像の検討を行った。

4) ALCL99国際共同研究

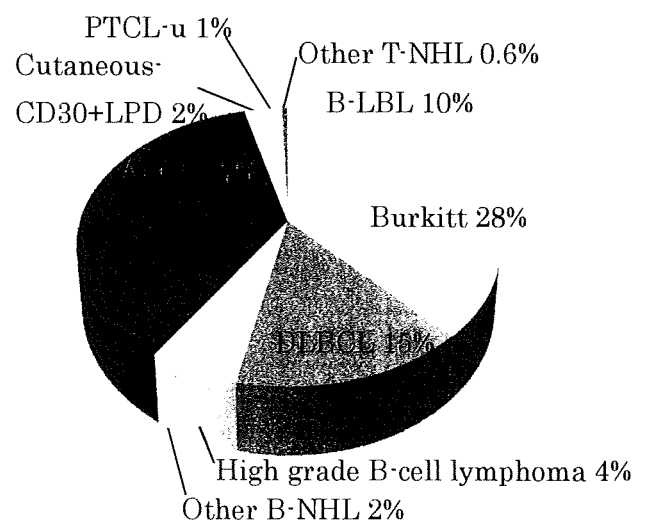
国内での group review の結果(病理診断名、亜型分類、CD2, CD3, CD5, CD7, CD20, CD30, CD56, ALK1, EMA, granzymeB/TIA-1, EBER-ISH 染色結果)をフランスの研究事務局に報告し、これらの染色標本を各国代表病理医とともに review した。

C. 研究結果

1) リンパ腫中央病理診断

2004 年 11 月から 2009 年 2 月までに、JPLSG 登録された 391 例を中央診断した。胸水、腹水、骨髄などの液状検体や検体微小で提出不能な例を除いた中央診断率は 95% であった。

非ホジキンリンパ腫(NHL)と診断された 333 例に B-ALL 29 例を Burkitt lymphoma/leukemia に加えた 362 例について亜型分類を行い、ヨーロッパの症例と比較した。主な亜型分類は B-lymphoblastic lymphoma (LBL) 38 例(10%)、T-LBL 74 例(20%)、Burkitt lymphoma/leukemia (71+29) 100 例(28%)、ALCL 60 例(17%)、DLBCL 55 例(15%)であった。High grade B-NHL=Mature B-cell lymphoma 15 例のうち 4 例は消化管生検あるいは検体微小のため組織診断できなかったが、残りの 11 例(3%)は Burkitt リンパ腫と DLBCL との鑑別が困難でコンセンサス診断できなかった。病理組織学的には典型的な Burkitt リンパ腫にも DLBCL にも相当しない像で、全例 CD10, BCL6 陽性、BCL2 陰性の germinal center B-cell type immunophenotype であった。C-myc 転座は 7 例中 4 例に認められた。Ki-67 陽性率はすべて 70%以上で、9 例は 95%以上と Burkitt リンパ腫と同様であった。全例 EBER-ISH 陰性であった。Cutaneous CD30-positive lymphoproliferative disorder 8 例には、primary cutaneous ALCL, lymphomatoid papulosis が含まれ、Peripheral T-cell lymphoma, unspecified (PTCL-u) 4 例とともに、すべて EBER-ISH 陰性であった。



2008 年改訂 WHO 分類では分類不能な non B, non T neoplasm が認められ、unclassifiable hematolymphoid malignancy として報告した。CD7 あるいは CD34 陽性で、myeloperoxidase,

TdT 陰性、しばしば CD13, CD33, CD43 の発現が認められた。

2) ホジキンリンパ腫の病理診断

Classical Hodgkin lymphoma (CHL) 31 例の亜型分類は lymphocyte rich 3 (10%)、mixed cellularity 10 (32%)、nodular sclerosis 18 (58%)で、EBER-ISH 陽性例は 18 例 (58%)であった。

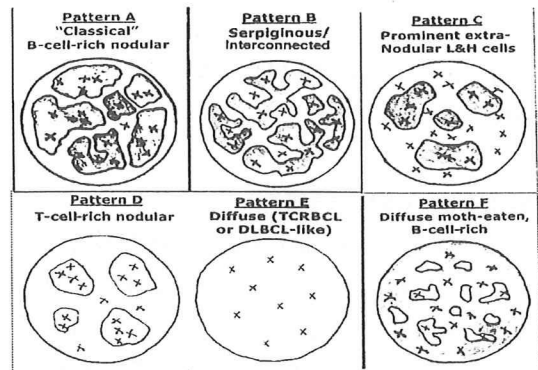
NLPHL は小児ホジキンリンパ腫の 5~10%を占め、lymphocytic and/or histiocytic (L&H) cell あるいは popcorn cell と呼ばれる腫瘍細胞が、多数の小型Bリンパ球を背景に、結節性に増殖するが、ときにびまん性増殖を伴う。結節内には CD21 陽性濾胞樹状細胞のメッシュワークが認められ、診断の根拠となる。小児 NLPHL 12 例について臨床病理学的検討を行った。年齢は 2~17 歳 (中央値 10 歳)、男女比=11:1、stage I 8 例、II 3 例、III 1 例であった。病変部位としては、頸部リンパ節 7 例、顎下リンパ節 4 例で、stage III の症例は脾および多発性肺病変が認められた。

CHL と NLPHL との鑑別には、免疫染色、EBER-ISH が有用であった。NLPHL では、通常 CHL で陽性となる CD15, CD30 は陰性で、CD20, CD45, BCL6, Oct2, BOB.1 が陽性、EMA は約 50%の症例で陽性であるとされている。EBER-ISH は CHL では 20-70%の症例で陽性であるが、NLPHL では陰性である。自験例では、腫瘍細胞は、CD15 陰性、CD20 陽性、CD30 は 3/4 の症例で陰性、EMA は 2/3 の症例で陰性、Oct2, BOB1 は検索した 8 例全例陽性であった。1 例を除いて全例にびまん性増殖が少なくとも一部に認められ、T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma との鑑別を要した。このような反応性 T-cell を背景に腫瘍細胞がびまん性の増殖パターンを呈する領域は、12 症例すべてに認められた。CD21 陽性の FDC meshwork は、不完全なものも含めると全例に認められ、CD4+CD57+T-cell が L&H 細胞を取り囲むロゼ

ット形成も全ての症例で認められた。IgD は、検索した 7 症例のうち 6 例で L&H 細胞に陽性となった。EBER-ISH も検索した 9 例全例陰性であった。

1	-	-	+	+	+	-
2	-	-	+	-	+	-
3	-	-	+	-	ND	-
4	-	-	+	-	ND	-
5	-	+	+	-	+	-
6	-	-	+	-	+	-
7	-	+	+	-	ND	ND
8	-	-	+	+	+	ND
9	-	+/-	+	+	+	-
10	-	-	+	-	+	-
11	-	-	+	+/-	ND	ND
12	-	-	+	-	+	-

組織学的なパターンは classical B-cell-rich nodular (pattern A) を示した症例はなく、10 例は prominent extra-nodular L&H cells (pattern C) と diffuse TCRBCL/DLBCL-like pattern (pattern E) が混在し、1 例は全て diffuse pattern を示した。



3) FISH法による遺伝子解析

a) Mature B-cell neoplasm における c-myc 転座
DLBCL 28 例、Burkitt lymphoma (BL) 68 例、BL と DLBCL の鑑別が困難な例 11 例、B-ALL 8 例について、Vysis LSI MYC Dual Color Break Apart Rearrangement Probe (Vysis) を用いて c-myc 遺伝子転座を検索した。DLBCL 24 例、BL 55 例、BL/DLBCL 7 例、B-ALL 5 例が判定

可能であった。C-myc 転座は、DLBCL 3 例 (12.5%)、BL 44 例 (80%)、BL/DLBCL 4 例 (57%)、B-ALL 5 例 (100%)に認められた。

b) DLBCL における BCL2 転座

DLBCLと診断された 21 例に BCL2 遺伝子転座を検索したが、BCL2 遺伝子の転座は1例も認められなかった。

c) EWS, FKHR 転座

リンパ腫が疑われた症例の中に Ewing sarcoma, alveolar rhabdomyosarcoma と中央診断された症例が各 1 例あった。これらの症例では、それぞれ、EWS, FKHR 遺伝子の転座が FISH 法にて確認された。

4) ALCL99国際共同研究

ALCL99 国際共同研究に登録された ALK-positive ALCL499 例のうち 359 例を review した。355 例が ALK-positive ALCL と診断され、4 例は ALK-positive B-cell lymphoma であった。218 例 (61%) が common pattern、23 例が small-cell pattern (SC)、9 例が lymphohistiocytic pattern (LH)、9 例が Hodgkin-like pattern、88 例が mixed pattern でこの中に SC pattern が 75 例、LH pattern が 11 例含まれていた。8 例は亜型分類困難 unclassifiable であった。ALK 染色では 91% に nuclear and cytoplasmic staining pattern が認められた。血管周囲に腫瘍細胞が並んで配列する perivascular pattern は 205/351 例 (42%) に認められた。SC-LH と perivascular pattern では皮膚、縦隔、および臓器浸潤が高率にみられた。臨床所見と ALK 染色パターン (cytoplasmic+nuclear vs. cytoplasmic)との間に相関はみられなかった。多変量解析にて、再発リスクと SC-LH (HR=1.9, p=.004)、perivascular pattern (HR=2.1, p=.001)との間に有意な相関が認められた。CD3 陽性所見は単変量解析では有意な再発リスク因子であった。

D. 考察

小児リンパ腫臨床試験登録症例の 95% が病

理中央診断されており、病理中央診断システムは、臨床試験適格性についての判断基準(診断の確認)として十分に機能している。また、ヨーロッパの研究グループ BFM study non-infant NHL(Br J Haematol 139:443-449, 2007)では B-LBL4%, T-LBL16%, Burkitt49%, ALCL10%, DLBCL8%, PMLBL2%, Other11%であることから、日本では、Burkitt lymphoma/leukemia が少なく、DLBCL, ALCL の比率が高いことが判明した。小児の DLBCL は、germinal center B-cell immunophenotype(GCB type)が多いとされるが、成人との違いや分子生物学的特性は明確にされていない。今回の検討では、ほとんどが GCB type で、c-myc 転座が 12.5%認められたが、BCL2 転座は認められず、成人 DLBCL とは counterpart となるリンパ球や分子生物学的特性が異なることが示唆された。2008 年 WHO 分類では、Burkitt リンパ腫との中間型として B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and Burkitt lymphoma が挙げられ、両者の鑑別については混沌としたままである。JPLSG では B-NHL として同じプロトコールでの治療研究が行われており、治療反応性についての検討が待たれる。

ホジキンリンパ腫の診断においては、CD15, CD30, CD20, Oct2/BOB.1, EMA が抗体パネルとして有用と考えられた。CD30 陽性細胞が少ない場合には、PAX5, Mum1 が参考になると考えられた。NLPHL と T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma との鑑別には、CD4+CD57+T-cell によるロゼット形成や CD21 陽性 FDC メッシュワークが有用で、IgD 陽性所見も参考になると思われた。小児ホジキンリンパ腫における EBV 陽性率はアジアでは 100%近くと高いことが報告されているが、今回の EBER-ISH による検討では 58%と欧米並みであった。

E. 結論

小児リンパ腫における中央病理診断システムは確立し、臨床試験における基盤として十分に機能している。さらに遺伝子転座などの遺伝子検

索を取り入れた、より総合的な病理診断を試みた。小児の DLBCL は GCB type が大部分で成人と生物学的特性が異なることが示唆された。ALCL99 国際共同研究では 351 例の ALK-positive ALCL の解析により病理学的予後因子が確立された。ホジキンリンパ腫の臨床研究の開始に向けて、病理診断基準となる抗体パネルを決定した。

F.健康危険情報
なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) Kusuki S, Hashii Y, Fukushima N, Takizawa S, Tokimasa S, Kogaki S, Ohta H, Tsuda E, Nakagawa A, Ozono K. Pediatric post-transplant diffuse large B cell lymphoma after cardiac transplantation. *Int J Hematol* 89:209-213, 2009
- 2) Kobayashi R, Yamato K, Tanaka F, Takashima Y, Inada H, Kikuchi A, Kumagai MA, Sunami S, Nakagawa A, Fukano R, Fujita N, Mitsui T, Tsurusawa M, Mori T.; Lymphoma Committee, Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group. Retrospective analysis of non-anaplastic peripheral T-cell lymphoma in pediatric patients in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 54(2):212-5, 2010
- 3) 杉本貴昭、山中潤一、麻野泰包、中川温子、藤本治朗 「生体肝移植後6年目に発症したバーキットリンパ腫の1例」*移植* 45(1), 54-59, 2010
- 4) 中川温子 小児節性濾胞辺縁帯リンパ腫 小児濾胞性リンパ腫 原発性免疫不全に伴うリンパ増殖性疾患 「WHO 血液腫瘍分類-WHO 分類 2008 をうまく活用するために」*医薬ジャーナル社* 351-352, 358-360, 530-533, 2010

2. 学会発表

- 1) 3rd International Symposium on Childhood, Adolescent and Young Adult Non-Hodgkin's

Lymphoma 「Pediatric non-Hodgkin lymphoma in Japan: WHO classification and diagnostic problems.」2009年6月12日 Frankfurt, Germany

2) 中川温子、松岡健太郎、大喜多肇 「ヒト造血幹細胞移植マウスを用いたEBウイルス関連リンパ増殖性疾患の検討」第98回日本病理学会総会 2009年5月1日 京都

3) 中川温子 「小児がんの遺伝子病理診断」第82回京滋小児悪性腫瘍懇話会 2009年5月29日 京都

4) 中川温子、大島孝一、吉野正、中峯寛和、中村栄男、藤本純一郎、田丸淳一、北條洋、松野宏、角南勝介、鶴澤正仁、森鉄也「小児NHLの病理組織型とWHO分類における問題点ーJPLSG病理中央診断報告ー」第25回日本小児がん学会 2009年11月27日 千葉

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(がん臨床研究事業)

分担研究報告書

小児造血器腫瘍の分子・細胞遺伝学的中央診断システム確立のための研究

研究分担者 林泰秀 群馬県立小児医療センター 院長

研究要旨 JPLSG の分子・細胞遺伝学的診断委員会は、分子診断と微小残存病変(minimal residual disease, MRD)の 2 つを大きな課題として取り組んできた。今年度は、急性骨髄性白血病(AML)の AML-05 プロトコールでは、初診時のキメラ遺伝子と *FLT3* 遺伝子の検索は順調に行われ、形態、マーカーと染色体/遺伝子解析結果の中央診断が順調に動いて診断の精度の向上に貢献している。キメラ遺伝子を用いた MRD は提出検体が少ないことが問題となっている。急性リンパ性白血病(ALL)では、再発 ALL のフローサイトメリー(FCM)を用いた MRD と免疫グロブリン遺伝子および T 細胞受容体遺伝子を用いた MRD は開始、施行されており、T-ALL と B 前駆型-ALL はプロトコール開始に向けて準備中である。

研究協力者

岩本彰太郎(三重大学医学部)

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)

堀 壽成(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)

(キメラ MRD)は施行されているが、提出検体が少ないことが問題となっている。さらにプロトコールが立ち上がった再発急性リンパ性白血病(ALL)の MRD 検索システムが立ち上がり、T-ALL、B 前駆型-ALL ではプロトコール開始に向けて準備を行っている。

B.研究方法

今年度は AML-05 プロトコールのキメラ遺伝子の中央診断を継続し、キメラ MRD も施行されている。全登録症例の形態、マーカー、染色体、キメラ遺伝子、*FLT3* - internal tandem duplication (ITD)の結果について、それぞれの専門の委員からなる診断小委員会による最終診断およびリスク分類に関与する予後因子の確認を行い、診断の精度を高めている。

MRD については、再発 ALL のフローサイトメリー(FCM)による MRD (FCM-MRD)と、免疫グロブリン(*Ig*)と T 細胞受容体(*TCR*)遺伝子による MRD (分子 MRD)が開始、施行され、T-ALL、B 前駆型 ALL の MRD はプロトコール開始に向け

A.研究目的

小児造血器腫瘍の大規模治療研究では、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。JPLSG 分子・細胞遺伝学的診断委員会(以下分子診断委員会)では、今年度は、AML-05 プロトコールの形態、マーカー、キメラ遺伝子等の結果の中央診断は順調に行われ、診断の精度を高めている。キメラによる微小残存病変(minimal residual disease, MRD)

て準備を行っている。

C. 研究結果

平成 21 年度分子診断委員会(6 月 20 日)にて以下の検討を行った。

(1) MRD

1. FCM(出口隆生委員)

再発 ALL についての基礎的検討を行ない、検出は可能と考えられた。Day 14 の検体では細胞数が少なく、検査イベント数、検査項目数が少なくなる場合が多い。症例数が少ない再発 ALL であれば現在の態勢で検査は可能であるが、今後 T-ALL や B 前駆型 ALL が開始された場合は困難となる。診断検体をどこで検査するかなど、他にも検討事項がある。ALL 委員会と免疫診断委員会内でも検討を進めていく。

2. PCR(堀壽成委員)

再発 ALL については JPLSG・堀部班会議で詳細を発表した。RQ-PCR 法を用いることにより、定量の精度を上げる試みを実施し、現在 BFM のセンターラボから QC 用の検体を待っているところである。T-ALL は検出率を向上させるためプライマーセットを増やした。乳児 ALL においても観察研究で分子 MRD を実施の予定である。

国立病院機構名古屋医療センターから研究補助員が愛知医科大学に来て技術を習得している。名古屋医療センターに機器は揃っているので、技術を覚えてもらって将来的には 2 つのラボで実施出来るよう体制を整備する。観察研究の検体などで慣れてもらいながら質を検証していく。

(2) AML(横澤敏也委員)

キメラ遺伝子とその MRD では、詳細は班会議で報告済みである。AML-P05 症例については、t(11;17)など核型からキメラを予想して、追加で詳細な検査をしてキメラ遺伝子の診断を行って

いる。キメラ MRD 検体提出率が低いのが問題となっている。

診断小 WG に免疫診断施設のメンバーも加わってもらい、中央診断レビューを行っている。キメラ陰性症例であっても、核型からキメラ検出の可能性が示唆される症例については追加検査として行っている。実際には、*MLL-AF10* などが対象となっている。

JAK1, 2, 3 や *IKAROS* についても将来的に検討できるか考えていく。

(3) 悪性リンパ腫

ヨーロッパの I-BFM 等と国際共同研究という形で *NPM-ALK* のキメラ MRD を骨髄でみている。

(4) 検体保存について

検体についての取り決めが十分検討されていなかった乳児 ALL と非ホジキンリンパ種(NHL)のプロトコルの検体が、JPLSG ではなく、各研究グループ内で保存されている。特に B-ALL の検体が多い。これらも JPLSG として利用できるよう考えていくが、現状の AML などで行っている検体保存システムを利用していないので、ラベルや保存番号などが統一されておらず、どのような形とするか検討も必要である。今回検体返還依頼で問題となった AML 症例のように、当初 ALL として診断検体が送付された後、AML に診断が変わった場合、保存検体は各グループの検体として保存されている。このような場合もどのように扱うか検討が必要である。今後各施設からの検体返還依頼については、取り扱い規約通りに返還しない方向で対処する。

(5) 乳児 ALL(滝智彦委員)

作成中の新規プロトコルは寛解導入療法の変更があり、作成が遅れていたが、*MLL-10* として現在研究計画書の作成が大詰めを迎えている。観察研究として行う予定の MRD については、これまでの計画通り FCM、*IgH/TCR*、*MLL* キメラ