

新規申請患者、継続申請患者の各々における各種治療法の選択状況を表 2 に示す。継続申請患者では新規申請患者に比較して、経過観察、アンドロゲン療法、造血細胞移植療法が増加していた一方で、免疫抑制療法、成分輸血、サイトカイン類が減少していた。

男女別にみた治療状況を表 3-1、3-2 に示す。新規申請患者、継続申請患者ともに男女で各種治療法の選択に大きな違いは認められなかった。

年齢別にみた治療状況を表 4-1、4-2 に示す。新規申請患者、継続申請患者ともに、経過観察および造血細胞移植療法は若い年齢群ほど多かったのに対して、アンドロゲン療法、免疫抑制療法、成分輸血、サイトカイン類は若い年齢群ほど少ない傾向が認められた。特に造血細胞移植療法は 40 歳以上ではほとんど選択されていなかった。

病型別にみた治療状況を表 5-1、5-2 に示す。新規申請患者については、特発型ではアンドロゲン療法、免疫抑制療法が多く、二次性では成分輸血、サイトカイン類が多く、特殊型では経過観察、造血細胞移植療法が多かった。継続申請患者については、特発型ではアンドロゲン療法、免疫抑制療法、サイトカイン類が多く、二次性では経過観察が多く、特殊型では造血細胞移植療法、成分輸血が多かった。

重症度別にみた治療状況を表 6-1、6-2 に示す。重症例 (Stage3~5) では軽症例 (Stage1~2) に比較して経過観察が減少して、各種治療法が増加していたが、特に免疫抑制療法、成分輸血、サイトカイン類の増加が著しかった。

#### D. 考察

図 1、図 2 に再生不良性貧血の一般的な治療方針を示す。図における ATG (抗ヒト胸腺細胞グロブリン)、リンフォグロブリン、cyclosporin、ゼットブリンは免疫抑制剤、酢酸 metenolone は男性ホルモン(蛋

白同化ステロイド、アンドロゲン) である。図から分かる通り、性別および病型には関係なく、重症度、年齢、治療への反応などを参考にしながら治療方針が決定されている。

ここで治療方針の観点から、今回の結果について考察する。まず新規申請患者と継続申請患者との比較であるが、最近では治療の発達に伴い、再生不良性貧血患者の約 7 割が輸血不要となるまで改善し、9 割近くに長期生存が期待できるとされており、それが継続申請患者における経過観察の増加、成分輸血の減少に関係していると思われる。但し、2003 年度から軽快者における登録者証制度が開始されていることから、年次推移をみると変化がみられる可能性がある。

次に、治療方針に関係ないとされる性別および病型との関連であるが、今回の結果においても、男女では治療法の選択に大きな違いは認められなかった。一方、病型では治療法の選択に違いが認められ、特に特殊型 (肝炎後、再生不良性貧血 - PNH (発作性夜間ヘモグロビン尿症) 症候群、Fanconi 貧血など) において造血細胞移植療法が多く選択されていた。この点については、さらなる検討が必要と思われる。

次に、治療方針の決定において重要な年齢および重症度との関連では、ほぼ治療方針に沿って治療法が選択されていると考えられた。特に造血細胞移植療法の選択は、年齢に基づいて厳密に判断されていると考えられた。

臨床調査個人票における治療状況の調査は、前述した通り、新規申請患者においては「現在の治療状況 (今後 6 ヶ月以内の予定の治療も含む)」、更新申請患者においては「現在の治療状況 (最近 1 年間の状況)」として、複数選択で調査されていることから、明確な傾向が得られない可能性も考えられたが、本研究では有用な情報を得ることができた。今後は年次推移、治療効果についても検討したいと考える。

E. 結論

今回の研究により、わが国の再生不良性貧血患者の治療状況を概観することができ、おおむね一般的な治療方針に基づいた治療が行われていることが確認できた。今後は年次推移、治療効果についても検討したいと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 島田直樹、大津忠弘、白澤貴子、落合裕隆、星野祐美、小風暁、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治療状況；第 81 回日本衛生学会学術総会、2011 年 3 月 25 日～28 日、東京。

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

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

表1 再生不良性貧血の臨床調査個人票の入力状況など

年度	臨床調査個人票				医療受給者証 所持者数	登録者証 所持者数	総患者数
	新規	更新	合計	入力率			
2003	449	6,539	6,988	72.2%	9,680	823	10,503
2004	724	5,540	6,264	68.3%	9,173	1,336	10,509
2005	853	5,163	6,016	66.9%	8,997	1,825	10,822
2006	668	4,529	5,197	57.7%	9,010	2,149	11,159
2007	664	3,229	3,893	42.5%	9,162	2,568	11,730
2008	795	4,183	4,978	53.5%	9,301	2,714	12,015
2009	460	2,578	3,038				

表2 再生不良性貧血患者の治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
新規申請 患者	656 14.2%	1,052 22.8%	2,806 60.8%	126 2.7%	1,974 42.8%	841 18.2%	284 6.2%	4,613
継続申請 患者	6,360 20.0%	10,103 31.8%	15,982 50.3%	1,673 5.3%	5,149 16.2%	2,443 7.7%	2,444 7.7%	31,761

表3-1 新規申請患者における男女別にみた治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
男性	270 12.8%	505 23.9%	1,292 61.2%	76 3.6%	910 43.1%	383 18.1%	141 6.7%	2,111
女性	386 15.4%	547 21.9%	1,514 60.5%	50 2.0%	1,064 42.5%	458 18.3%	143 5.7%	2,502

表3-2 継続申請患者における男女別にみた治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
男性	2,384 18.5%	4,215 32.7%	6,794 52.6%	916 7.1%	2,229 17.3%	1,077 8.3%	915 7.1%	12,907
女性	3,976 21.1%	5,888 31.2%	9,188 48.7%	757 4.0%	2,920 15.5%	1,366 7.2%	1,529 8.1%	18,854

表4-1 新規申請患者における年齢別にみた治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
19歳以下	144 27.2%	32 6.0%	295 55.7%	65 12.3%	163 30.8%	76 14.3%	24 4.5%	530
20歳以上 39歳以下	150 22.7%	93 14.1%	376 57.0%	45 6.8%	227 34.4%	106 16.1%	40 6.1%	660
40歳以上	362 10.6%	927 27.1%	2,135 62.4%	16 0.5%	1,584 46.3%	659 19.3%	220 6.4%	3,423

表4-2 継続申請患者における年齢別にみた治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
19歳以下	943 37.6%	214 8.5%	992 39.6%	553 22.1%	327 13.1%	134 5.3%	132 5.3%	2,505
20歳以上 39歳以下	1,638 28.0%	1,369 23.4%	2,642 45.2%	685 11.7%	769 13.2%	402 6.9%	416 7.1%	5,847
40歳以上	3,779 16.1%	8,520 36.4%	12,348 52.7%	435 1.9%	4,053 17.3%	1,907 8.1%	1,896 8.1%	23,409

表5-1 新規申請患者における病型別にみた治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
特発型	591 14.2%	979 23.5%	2,592 62.3%	103 2.5%	1,802 43.3%	773 18.6%	240 5.8%	4,162
二次性	12 11.0%	23 21.1%	55 50.5%	0 0.0%	56 51.4%	35 32.1%	16 14.7%	109
特殊型	45 18.1%	34 13.7%	133 53.4%	18 7.2%	103 41.4%	24 9.6%	24 9.6%	249

表5-2 継続申請患者における病型別にみた治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
特発型	5,673 20.0%	9,269 32.7%	14,429 50.9%	1,433 5.1%	4,464 15.7%	2,267 8.0%	2,043 7.2%	28,364
二次性	133 27.4%	94 19.4%	238 49.1%	16 3.3%	74 15.3%	30 6.2%	45 9.3%	485
特殊型	467 19.3%	606 25.0%	1,131 46.7%	202 8.3%	519 21.4%	115 4.7%	305 12.6%	2,424

表6-1 新規申請患者における重症度別にみた治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
Stage 1~2	461 29.0%	407 25.6%	727 45.7%	14 0.9%	268 16.9%	80 5.0%	73 4.6%	1,590
Stage 3~5	181 6.3%	622 21.5%	2,026 70.1%	109 3.8%	1,674 57.9%	749 25.9%	203 7.0%	2,892

表6-2 継続申請患者における重症度別にみた治療状況（複数選択）

	無治療で 経過観察	アンドロ ゲン療法	免疫抑制 療法	造血細胞 移植療法	成分輸血	サイトカ イン類	上記以外 の治療	患者数
Stage 1~2	5,888 23.4%	7,785 30.9%	12,156 48.2%	1,245 4.9%	1,766 7.0%	1,182 4.7%	1,909 7.6%	25,214
Stage 3~5	319 5.6%	2,086 36.6%	3,472 60.9%	295 5.2%	3,284 57.6%	1,214 21.3%	468 8.2%	5,697

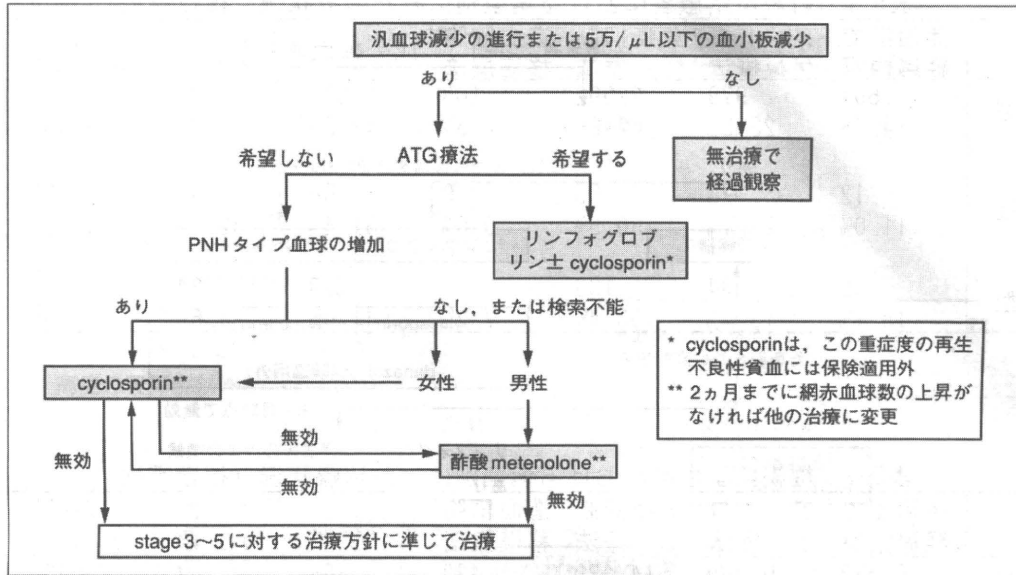


図1 Stage1~2の再生不良性貧血に対する治療方針（三輪血液病学 第3版より P.915 図II-A-11）

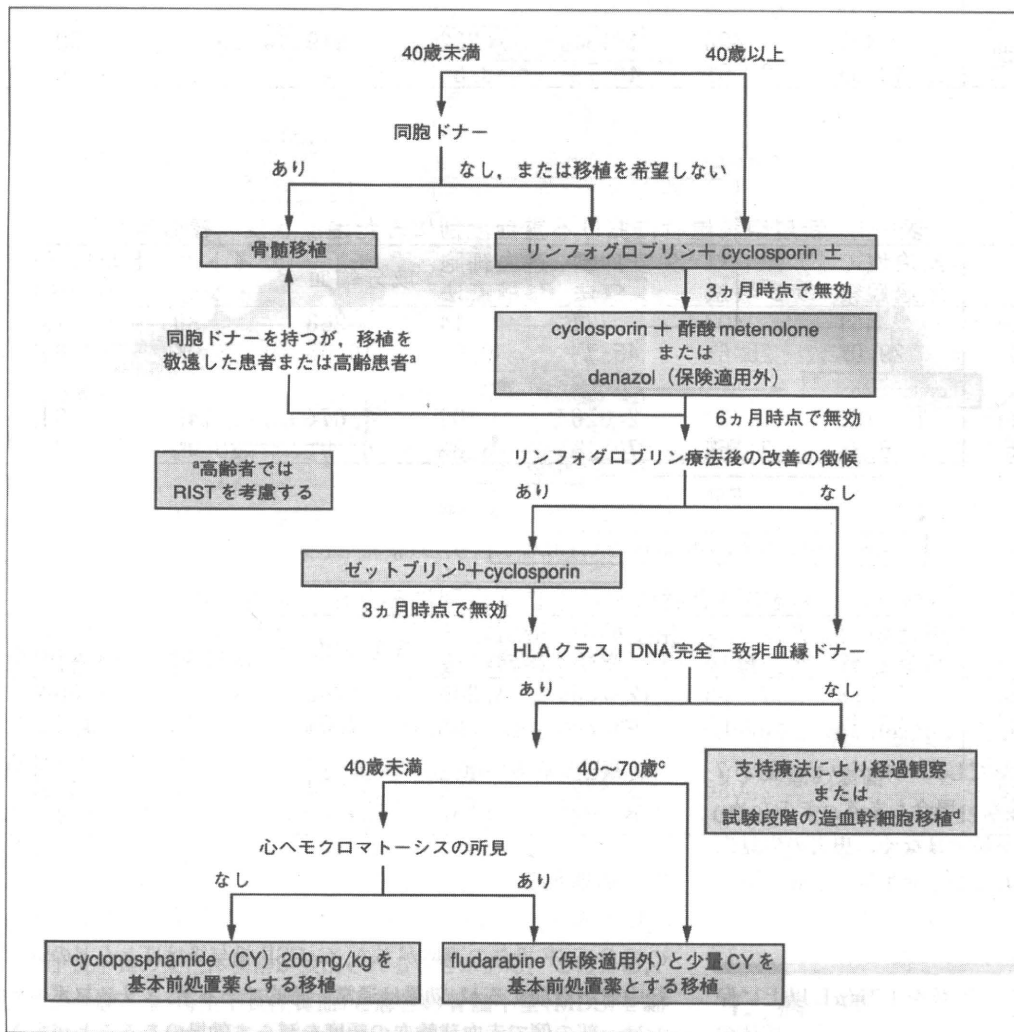


図2 Stage3~5の再生不良性貧血に対する治療方針（三輪血液病学 第3版より P.916 図II-A-12）

### III. 研究協力者報告書

## ヒト骨髄を標的とする移植片対宿主病に関する研究

研究協力者 今村 雅寛（北海道大学大学院医学研究科 教授）  
庄野 雄介（北海道大学病院血液内科 医員）  
松野 吉宏（北海道大学病院病理部 教授）

### 研究要旨

同種造血細胞移植後に汎血球減少をきたす原因のひとつとして、移植片対宿主病（GVHD）がある。その機序として、GVHDに関連した骨芽細胞障害があるか否かを検討するため、ヒト同種造血細胞移植症例で骨髄生検を施行した。現在までに移植前後で生検を行った症例は10例、造血不全を呈し移植後の生検のみを行った症例は3例、移植前の生検を終了した症例は6例であり、そのうち慢性GVHDで汎血球減少を認めた1例で、骨芽細胞の消失を認めた。また、移植後骨髄抑制を認めた1例で、骨芽細胞の低下を認めた。今後、さらなる症例の蓄積と長期経過観察が必要であるが、ヒト同種造血細胞移植後GVHDに関連した造血不全に骨芽細胞障害の介在が示唆された。

### A. 研究目的

私たちはマウス同種造血細胞移植後の急性移植片対宿主病において、汎血球減少ならびに遷延化するB細胞の分化・成熟障害が起こり、その大きな原因として、CD4陽性T細胞による間接的な骨芽細胞障害の関与が重要であることを明らかにしてきた。本研究では、ヒト同種造血細胞移植後の移植片対宿主病（GVHD）でも同様の現象を認めるか否かを検討することを目的とした。

### B. 研究方法

北海道大学病院において同種造血細胞移植を行う血液疾患症例で、下記の臨床研究に協力することに同意が得られた症例から、骨髄生検を施行し、H-E染色および免疫染色で骨芽細胞障害の有無を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は「移植片対宿主反応が骨髄における造血およびその微小環境に及ぼす影響の検討」として、

2010年1月に北海道大学病院倫理委員会で承認済みの臨床研究を基盤にして行うものであり、生命倫理、安全対策に関する配慮を十二分に行っている。

### C. 研究結果

移植後汎血球減少を認めた3例中1例（Ph陽性ALL症例、44歳男性、非血縁者間同種骨髄移植）で移植後200日目頃より慢性GVHDを発症し、284日目より汎血球減少を呈し、移植後300日目の骨髄生検で骨芽細胞の消失を認めた。その他、移植前後で骨髄生検を施行中の10例中1例（重症再生不良性貧血、21歳男性、非血縁者間同種骨髄移植）で明らかな急性GVHDはなかったが、移植後84日目から白血球減少と血小板減少がみられ、移植後97日目の骨髄生検で骨芽細胞の減少を認めた。

### D. 考察

ヒトにおいてもマウスの急性GVHDで認められたと同様の骨髄における骨芽細胞障害と汎血球減少

を特徴とする造血不全の誘導が示唆された。しかし、今回は慢性 GVHD の 1 例のみで明らかな結果を認めることができた。他の 1 例で、明瞭な急性 GVHD は認められなかったが、骨芽細胞の減少のほかに白血球減少と血小板減少が見られており、臨床的な GVHD はなくとも GVH 反応があるためか、あるいは他の原因が関連しているかを明らかにするため、さらに症例を増やしての検討が必要である。また、B 細胞の分化・成熟障害も起こるのか否か、CD4 陽性 T 細胞の関与はあるのか否かも今後の検討課題である。

#### E. 結論

マウス同種造血細胞移植におけると同様に、ヒト同種造血細胞移植後の造血不全のひとつの機序として GVHD の関与が示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Shono Y, Ueha, S, Wang Y, Abe J, Kurachi M, Matsuno Y, Sugiyama T, Nagasawa T, Imamura M, Matsushima K.; Bone marrow graft-versus-host disease: early destruction of hematopoietic niche after MHC-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 2010 July; 115(26): 5401-11.

##### 2. 学会発表

- Shono Y, Ueha S, Matsushima K, Imamura M. : Bone marrow GVHD: destruction of bone marrow osteoblastic niche mediated by donor CD4<sup>+</sup> T cells. 第 72 回日本血液学会学術集会, 2010 年 9 月 24 日~26 日, 横浜

## MPN 症例における TET2 遺伝子の変異解析

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

原発性骨髄線維症 (PMF) を含めて骨髄増殖性腫瘍 (MPN) においては JAK2 および MPL 遺伝子の機能獲得型変異に加えて TET2 遺伝子の機能喪失型の変異も高率に認められる。20 例の MPN 症例を対象としてこれらの遺伝子の変異解析を行ったところ、JAK2 変異を 14 例に、MPL 変異を 3 例に、TET2 変異を 8 例に認めた。JAK2 変異と MPL 変異の両方を有する症例は認めなかった。JAK2 変異または MPL 変異のいずれかと TET2 変異を有する症例を 7 例認め、このうちの 3 例について造血コロニーを対象とした変異解析を行った。これらの症例においては JAK2/MPL 変異と TET2 変異は sequential に獲得されること、変異の獲得は TET2 変異が先の場合と後の場合があることが確認された。

### A. 研究目的

原発性骨髄線維症 (PMF) を含めて骨髄増殖性腫瘍 (MPN) の多くの症例においては機能活性化型の変異である JAK2-V817F (以下「JAK2 変異」) あるいは MPL コドン 515 変異 (以下「MPL 変異」) が認められる。一方、TET2 遺伝子の機能喪失型の変異が MPN において高頻度に認められることが 2009 年に報告された。これらの変異の相互の関係について検討するために、MPN 症例の末梢血・骨髄細胞および造血コロニー (HC) を用いた検討を行った。

### B. 研究方法

当院および他施設で MPN と診断された 20 症例を対象とし、末梢血顆粒球および T リンパ球から DNA を抽出した。またメチルセルコース法により HC を作製し、個々の HC から DNA を抽出した。

顆粒球の DNA を用いて TET2 遺伝子の全コーディング領域、JAK2 遺伝子のエクソン 14、MPL 遺伝子のエクソン 10 についてダイレクトシーケンシング法による変異解析を行った。変異が認められた症例については T リンパ球の DNA についても解析し、変異が

後天性であるか否かを確認した。一部の症例については HC の DNA を対象とした変異解析を行った。

(倫理面への配慮)

骨髄増殖性腫瘍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取得している。

### C. 研究結果

TET2 遺伝子の後天的な変異を 8 例に認めた。内訳は nonsense 変異が 2 例、frameshift 変異が 4 例、missense 変異が 1 例、silent 変異が 1 例であった。JAK2 変異は 14 例に、MPL 変異は 3 例に認められた。TET2 変異と JAK2 変異を有するものが 6 例、TET2 変異と MPL 変異を有するものが 1 例認められたが、JAK2 変異と MPL 変異を有する症例は認めなかった。

TET2 変異と JAK2 変異を有する 2 例と TET2 変異と MPL 変異を有する 1 例についてそれぞれ 34~58 個の HC を対象とした変異解析を行った。JAK2 変異陽性の 1 例では JAK2 変異陽性の HC はすべて TET2

変異陽性であり、JAK2 変異(-)/TET2 変異(+) HC を認めた。もう 1 例の JAK2 変異陽性症例では TET2 変異陽性 HC はすべて JAK2 変異陽性であり、JAK2 変異(+)/TET2 変異(-)HC を認めた。MPL 変異陽性症例では MPL 変異陽性 HC はすべて TET2 変異陽性であり、MPL 変異(-)/TET2 変異(+)HC を認めた。

#### D. 考察

本邦の MPN 患者においても後天性の TET2 変異は高頻度に認められた。JAK2 変異または MPL 変異のいずれかと TET2 変異を有する症例を 7 例認めたが、JAK2 変異と MPL 変異の両方を有する症例は認めなかった。

JAK2 変異または MPL 変異のいずれかと TET2 変異を有する 3 症例の HC を対象とした解析では、JAK2/MPL 変異の獲得が先行したと考えられる症例と、TET2 変異の獲得が先行したと考えられる症例が認められた。

#### E. 結論

TET2 変異と、JAK2 変異または MPL 変異のいずれかを有する症例の解析により、このような症例では JAK2/MPL 変異と TET2 変異は sequential に獲得され得ること、変異獲得の順番は TET2 変異が先の場合と後の場合があることが確認された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Imahashi N, Ohashi H, Arita K, Kitamura K, Takahashi T, Ozawa Y, Miyamura K. Acute Lymphoblastic Leukemia of Male-Recipient Origin Demonstrating Female Karyotype After Cord Blood Transplantation. J Clin Oncol 2010 Dec;28:e750-2.
- Terakura S, Atsuta Y, Sawa M, Ohashi H, Kato T,

Nishiwaki S, Imahashi N, Yasuda T, Murata M, Miyamura K, Suzuki R, Naoe T, Ito T, Morishita Y. Optimization of fludarabine plus melphalan conditioning for marrow transplantation from unrelated donors for patients with hematopoietic malignancies: a prospective dose-finding trial using a modified continual reassessment method. Ann Oncol (in press).

- Nishio N, Takahashi Y, Ohashi H, Doisaki S, Muramatsu H, Hama A, Shimada A, Yagasaki H, Kojima S. Reduced-intensity conditioning for alternative donor hematopoietic stem cell transplantation in patients with dyskeratosis congenita. Pediatr Transplant (in press).

##### 2. 学会発表

- Saito H, Tomita A, Ohashi H, Maeda H, Naoe T. Storage iron metabolism in iron overload as observed by serum ferritin kinetics. 第 72 日本血液学会学術集会 2010 月 24 日～26 日, 横浜.

## 日本小児血液学会疾患登録事業を一次登録とする再生不良性貧血など造血障害の疫学データベース構築

研究協力者 小原 明 (東邦大学医療センター大森病院輸血部 教授)

### 研究要旨

小児血液学会疾患登録事業を一次調査とする小児期発症の造血障害疾患のデータベースを構築した。登録施設は小児血液学会会員 236 施設の 90%に相当する 213 施設であり、対象疾患は小児期の造血障害(特発性再不貧、肝炎後再不貧、二次性再不貧、Fanconi 貧血、DiamondBlackfan 貧血、先天性重症好中球減少症、Dyskeratosis congenita 等)である。2006 年から 2009 年診断の特発性再不貧はそれぞれ 58、57、59、51 症例登録され、二次調査・予後追跡対象となった。また 2009 年 2 月から再生不良性貧血の中央診断事業を名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科、名古屋第 1 日赤病理で開始し、2010 年 7 月時点で 104 例の再不貧・不応性貧血(RCC)の診断がされた。以上の結果、登録証例数から推計される 14 歳以下小児人口 10 万に対する 4 年間の特発性再不貧累積罹患率は 1.19 (年間 0.30) であった。学会調査による悉皆性と、中央診断による診断精度の保証により質の高いデータベースが構築可能となった。

### A. 研究目的

本邦小児の造血障害疾患診療の質向上に貢献する事を目的に、小児血液学会疾患登録事業(全数把握)を一次調査としたデータベースを構築し、疫学観察研究(小児血液再不貧 2005 研究・MDS2006 研究)を実施する。中央診断事業を 2009 年 2 月から開始し、診断精度を高めることにより、疫学データベース・臨床試験の質を保証する。質の高いデータベース構築は、これを基盤とした臨床試験実施を可能にする。

### B. 研究方法

治療介入を行わない、疫学観察研究として実施する。研究計画は、疾患登録事業、小児血液再不貧 2005 研究・MDS2006 研究により構成され、いずれも小児血液学会臨床研究審査委員会の科学倫理審査承認を得た(2006 年)。小児血液学会会員 236 施設を対象にした全例登録(疾患登録事業)は、前年診断症例を対象に Web 登録にて実施され、およそ診断から 1 年

経過した段階で二次調査(再不貧 2005 研究・MDS2006 研究)を実施した。MDS 症例に対する中央診断事業は、これとは別に症例発生時に施設から MDS 委員会(小児血液学会)に検体が送付されて実施された。

(倫理面への配慮)

研究代表者小原の所属する東邦大学医学部倫理委員会、ならびに日本小児血液学会臨床研究審査委員会において、承認された。

### C. 研究結果

2006, 2007, 2008, 2009 年診断登録症例数を表 1 に示す(表)。

a.疾患登録(一次調査)症例:小児血液学会会員 236 施設の 90%に相当する 213 施設が登録した。非腫瘍性血液疾患は毎年 1,200 から 1,300 症例であり、血小板異常症が最多。特発性再不貧は毎年 50-56 例とほぼ一定した症例数であった。同じ時期(2006、2007 年)の MDS (RA, RCMD)症例数は 12, 11 例。

AML 165, 162 例、ALL 443, 490 例であった。

b. その他の造血障害；Dyskeratosis congenita が 4 年間で 2 例、Diamond-Blackfan 貧血は年間 11-14 例登録された。いずれも小児血液学会会員への診断基準啓発や遺伝子診断の開発により症例が掘り起こされている可能性がある。好中球減少症では先天性重症好中球減少は少なく、多くが慢性良性好中球減少で同種抗好中球抗体が検索されて証明された例は 20-30 症例であった。

c. 推定される累積罹患率

特発性再不貧の年間診断症例数はほぼ 50-60 症例であり、4 年間に診断された症例数は 225 症例。その内 14 歳以下症例は 205 例であった。日本の 14 歳以下の小児人口 17,294 千人（2008 年）を基にすると、4 年間の累積罹患率は 14 歳以下小児人口 10 万人当たり点推定 1.19、年間 0.30。区間推定(95%CI) 1.02 – 1.35 と推定された。

D. 考察

小児血液学会疾患登録事業は 2006 年に開始され、会員施設において診断された全ての血液疾患を対象にした、全数把握疫学研究事業である。小児血液学会会員施設の 90%が参加し、登録症例数はほぼ従来の疫学調査で収集された症例数に見合う登録が得られている。また 2009 年 2 月から実施している形態中央診断により、診断精度が向上している。以上のことから質の高い疫学データベースが構築されている。

この 4 年間の登録症例から推計される 14 歳以下小児の特発性再不貧の 4 年累積罹患率が人口 10 万対 1.19 と推定されたことは、以後の疫学研究の基本データとなった。

E. 結論

小児血液学会疾患登録事業を一次調査とする、質の高い小児造血障害疾患のデータベースが構築され

た。

F. 研究発表

1. 論文発表

● Ohsaka A, Kikuta A, Ohto H, Ohara A, Ishida A, Osada K, Tasaki T, Kamitamari A, Iwai A, Kai S, Maekawa T, Hoshi Y: Guidelines for safety management of granulocyte transfusion in Japan. Int J Hematol 91:201-208, 2010

2. 学会発表

- 小嶋靖子, 三井賢一, 小原明, 岡本則彦, 関根孝司, 舘野昭彦, 佐地勉: 18 年間経過観察した幼児期発症の巨赤芽球性貧血の 1 例. 第 113 回日本小児科学会学術集会 2010 年 4 月盛岡.
- 小嶋靖子, 徳山美香, 澤友歌, 羽賀洋一, 三井賢一, 小原明, 近藤康介, 周郷延雄: 同種造血細胞移植 7 年後に自己免疫性溶血性貧血の溶血発作を契機に診断されたもやもや病の 1 男児例. 第 52 回日本小児血液学会総会 2010 年 12 月大阪.

表

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236
(%)	83%	88%	90%	90%
Idiopathic AA	58	57	59	51
Hepatitis AA	5	8	11	6
AA / PNH	2	1	1	0
Fanconi Anemia	5	4	4	1
Diamond-Blackfan	11	14	12	13
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3
Chr. Benigen Neutropenia	70	65	83	58
Schwachman-Diamond	0	1	0	1
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1

## Coombs 陰性自己免疫性溶血性貧血の免疫動態の検討

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)、豊辻智則、亀崎豊実

### 研究要旨

自己免疫性溶血性貧血(AIHA)における自己抗体産生には、Th2 細胞/Th1 細胞の関与が想定されているが、AIHA の約 5～10%存在する Coombs 陰性 AIHA の病態・病因については未だ明らかにはなっていない。今回、自己抗体産生に関与するサイトカインの血中濃度を Coombs 陰性 AIHA と Coombs 陽性 AIHA において比較することにより、Coombs 陰性 AIHA の免疫学的背景について検討した。IL4 血中濃度は Coombs 陰性 AIHA 群で Coombs 陽性 AIHA 群と比較して高い傾向にあった。逆に、IL12 は Coombs 陽性 AIHA 群で Coombs 陰性 AIHA 群と比較して高い傾向にあった。IL10 については Coombs 試験陽性・陰性に関わらず、AIHA 群で非 AIHA 群より高い傾向にあった。ST2 は非 AIHA、Coombs 陰性 AIHA 群、Coombs 陽性 AIHA 群の順に有意に高く、IL33 も同様な傾向を示した。Th2 活性化をきたす IL4 と Th1 活性化・Th2 抑制をきたす IL12 において Coombs 陽性 AIHA と Coombs 陰性 AIHA で逆の傾向を示したことから、Coombs 陰性 AIHA 特異的な病態の存在が予想された。

### A. 研究目的

自己免疫性溶血性貧血(autoimmune hemolytic anemia: AIHA)は、赤血球に対する自己抗体産生が中心病態と考えられている。自己抗体産生機序としては、T helper 2 細胞(Th2)が優位な病態が想定されているが、疾患モデルマウスの解析からは、T helper 1 細胞(Th1)優位な病態も指摘されており、議論が分かれている。

AIHA の約 5～10%に Coombs 試験が陰性を示す場合が知られており、Coombs 陰性 AIHA と呼ばれ、赤血球結合 IgG 定量による Coombs 試験感度以下の結合 IgG 量の証明が診断に有用である。Coombs 試験感度以下の結合 IgG 量により溶血を来す機序としては、単なる Coombs 試験感度の問題であるのか、自己抗体の IgG サブクラスによるものか、あるいは自己抗原に違いがあるのか、未だ明らかにはなっていない。

今回、Coombs 陰性 AIHA と Coombs 陽性 AIHA の免疫学的背景について検討することを目的に、それ

ぞれの症例群において、自己抗体産生に関与するサイトカインの血中濃度を検討した。

### B. 研究方法

当院に赤血球結合 IgG 定量依頼され、1 年後の主治医へのアンケートにより溶血性貧血患者と診断された症例(20 歳以上、かつステロイド治療前)から、Coombs 陽性 AIHA 群 10 例、Coombs 陰性 AIHA 群 20 例、非 AIHA 群 10 例を抽出し、IL4、IL10、IL12、IL33、ST2 の血中濃度を ELISA 法により測定し、3 群間で比較検討した。

(倫理面への配慮) 本研究は、自治医科大学臨床研究倫理審査委員会および生命倫理委員会で承認されている(臨 A07-63 号)。

### C. 研究結果(図)

IL4 は Coombs 陰性 AIHA 群で Coombs 陽性 AIHA 群と比較して高い傾向にあった。逆に、IL12 は Coombs 陽性 AIHA 群で Coombs 陰性 AIHA 群と比較して高い傾向にあった。IL10 については Coombs 試

陽性・陰性に関わらず、AIHA 群で非 AIHA 群より高い傾向にあった。ST2 は非 AIHA、Coombs 陰性 AIHA 群、Coombs 陽性 AIHA 群の順に有意に高く、IL33 も同様な傾向を示したが、ST2 と IL33 の間に正の相関は認められなかった。

#### D. 考察

IL10、IL33、ST2 の血中濃度は Coombs 陽性・陰性ともに AIHA 群で非 AIHA より高い傾向を示したことは、AIHA で想定されている Th2 優位な免疫病態と一致していた。しかしながら、Th2 活性化をきたす IL4 と Th1 活性化・Th2 抑制をきたす IL12 では Coombs 陽性 AIHA と Coombs 陰性 AIHA で異なる傾向を示していることから、Coombs 陰性 AIHA が単なる赤血球結合 IgG の差異による Coombs 陽性 AIHA のアナログではなく、異なる免疫学的な病態が背景にあることが予想された。今後、自己抗原の違いも含めてさらに解析を進めたいと考えている。

#### E. 結論

Coombs 陰性 AIHA は陽性 AIHA と免疫学的背景が異なる可能性が示唆された。

#### F. 研究発表

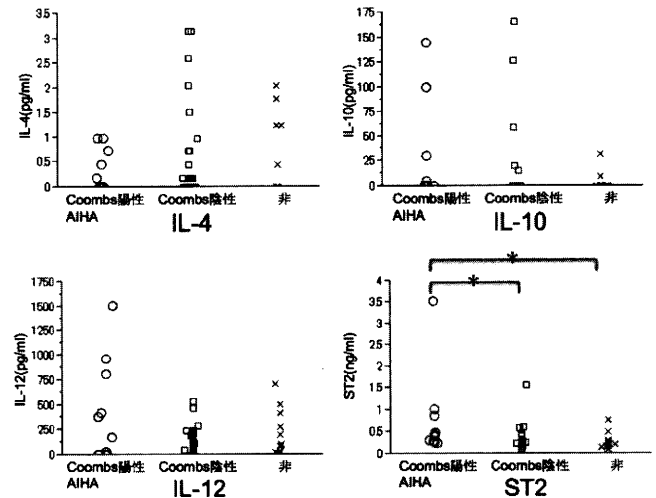
##### 1. 論文発表

- Shichishima T, Ikeda K, Takahashi N, Kameoka J, Tajima K, Murai K, Tamai Y, Shichishima-Nakamura A, Akutsu K, Noji H, Okamoto M, Kimura H, Harigae H, Oyamada T, Kamesaki T, Takeishi Y, Sawada K. Low concentration of serum haptoglobin has impact on understanding complex pathophysiology in patients with acquired bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol.* 91:602-610, 2010.

##### 2. 学会発表

- Hirosaki Yuri, Yamada Mami, Katsuki Masato, Aoki Ken-ichi, Ogawa Ryosuke, Gotoh Hiroshi, Kamesaki Toyomi, Higuchi Masakazu. A case of

MGUS associated with low titer cold agglutinin disease during PSL treatment for ITP. ; 第 72 回日本血液学会総会, 2010 年 9 月 24 日～26 日, 横浜.



## フローサイトメトリーによるテロメラーゼ逆転写酵素の造血細胞における発現の検討

研究協力者 唐澤 正光 (群馬大学医学部附属病院輸血部 准教授)

### 研究要旨

テロメラーゼ活性はほとんどの癌細胞に認められ、テロメラーゼを検出することは癌診断の上で有用であると考えられる。従来は TRAP 法や RT-PCR によるテロメラーゼやそれに関連した遺伝子の発現によりテロメラーゼ活性が測定されてきた。しかしこれらの方法では細胞種類ごとの情報が得られない。われわれは、同時に細胞表面抗原と hTERT を細胞化学的に染色しフローサイトメトリーで、細胞ごとのテロメラーゼを検出する方法を開発した。この方法により、骨髄中造血細胞のようなヘテロな集団における特定の細胞のテロメラーゼを検出できる。MDS や AML における CD34 陽性の造血前駆細胞集団の hTERT を測定した。CD34 陽性細胞は、CD34 陰性細胞よりはるかに高く hTERT を発現しており、また MDS においては CD34 陽性、CD38 陰性のより未熟な幹細胞分画において、hTERT の発現量が多いことが、またその発現量も RAEB-1,2 のような high risk MDS のほうが、de novo の AML よりも高いことが判明した。

### A. 研究目的

テロメラーゼ活性はほとんどの癌細胞に認められ、テロメラーゼを検出することは癌診断の上で有用であると考えられる。従来は TRAP 法や RT-PCR によるテロメラーゼやそれに関連した遺伝子の発現によりテロメラーゼ活性が測定されてきた。しかしこれらの方法では個々の細胞レベルにおけるテロメラーゼ活性に関する情報は得られない。細胞種類ごとの情報を得るためには手のかかる方法によって細胞を分離しないと、種々の細胞レベルにおけるテロメラーゼ活性に関する情報は得られない。テロメラーゼ活性はテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の発現量と相関関係にあることが示されている。そこで我々は、細胞表面抗原と細胞核内タンパクである hTERT を同時に染色し、フローサイトメトリーを用いることによって、細胞ごとのテロメラーゼ活性を知る方法を開発し、骨髄異形成症候群 MDS のようなヘテロな細胞集団におけるテロメラーゼ活性を知ることを目的に研究を行った。

### B. 研究方法

白血病細胞株 Jurkat, 骨髄腫細胞株 RPMI8226、および同意を得た健常人からヘパリン加血、文書による同意を得た MDS、白血病患者のヘパリン加骨髄穿刺液からフィコールを用いて単核球を分離し、本研究に使用した。本研究は群馬大学医学部附属病院の臨床研究倫理審査委員会の承認を得て行った。テロメラーゼ活性を測定するために、TRAP 法を用いた Roche Diagnostics 社の Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA kit を使用した。単核球を CD34-PE, CD45-PC5 あるは CD34-PC5、CD38-PE によって表面抗原を染色した後、2%のパラホルムアルデヒドで固定した。固定後、0.5% Triton-X100 によって細胞透過処理を行い、一次抗体抗 hTERT 抗体と FITC で標識した二次抗体を用いて、細胞核内の hTERT を染色した。同時染色された細胞をフローサイトメトリーで検出し、それぞれの細胞表面抗原を持つ細胞ごとの hTERT 発現を測定した。細胞核内が染色されているかを確認

するため、サイトスピン標本を免疫細胞化学的方法によって、hTERT を染色し、顕微鏡にて染色部位の確認を行った。

### C. 研究結果

hTERT は成熟好中球には全く見られず、この結果は TRAP 法によって検出されたテロメラーゼ活性の結果と一致した。TRAP 法によるテロメラーゼ活性とフローサイトメトリーhTERT 染色の蛍光強度には正相関が認められた。MDS-RAEB の患者骨髄においては CD34 陽性細胞で 90%以上に hTERT 発現が認められた。急性白血病においても同様の結果が得られた。50 人の MDS 患者と 19 人の AML 患者の骨髄検体を検討した。MDS 患者のうち 36 人は RCUD, RCMD, MDS-U の low risk MDS、14 人は RAEB 以上の High risk MDS であった。High risk MDS 患者骨髄中の CD34 陽性細胞における hTERT 発現量は、low risk MDS のそれより高値であり、さらに de novo AML 患者のそれよりも高値であった。CD34 陽性細胞中では、CD38 陰性の分画すなわち未熟な造血幹細胞を含む造血前駆細胞において、hTERT はより高値であった。

### D. 考察

我々の開発した、フローサイトメトリーを用いた hTERT 発現の定量方法は、これまでのテロメラーゼ活性測定法である TRAP 法の結果と一致したので、有用な方法と考えられた。細胞表面抗原と hTERT 蛋白を同時染色し、フローサイトメトリーにて測定する方法をもちいて、多種多様な細胞が存在する MDS 患者骨髄中の造血幹細胞分画の hTERT 発現を細胞を分離純化することなく測定する方法を開発した。この方法により判明した MDS の CD34 陽性の造血前駆細胞における hTERT 発現量が high risk MDS でより高値である事実は、MDS の病期進行に hTERT 発現が関わっていることを示唆している。hTERT 発現量

が増加することはすなわちテロメラーゼ活性の増加を意味しており、MDS においてテロメラーゼ活性増加が白血病への移行に関与しているか、白血病への移行に伴いテロメラーゼ活性が増加していることが示唆された。また de novo AML の hTERT 発現量より、high risk MDS の hTERT 発現量が高かったことは、両者の発症メカニズムの違いに関与していることが示唆され興味深い。MDS から移行した白血病の治療抵抗性難治性にもこの因子が関わっている可能性も考えられる。

### E. 結論

フローサイトメトリーと免疫細胞化学的方法を用いた細胞核内タンパク hTERT 染色によりテロメラーゼ活性を測定する方法は有用であることが示された。MDS 患者の造血幹細胞においては、High risk になると hTERT の発現量が増加すること、さらにそれは de novo AML より高値となることが判明した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- Hiroshi Handa, Takafumi Matsushima, Natsumi Nisimoto, Madoka Inoue, Takayuki Saitoh, Akihiko Yokohama, Norifumi Tsukamoto, Takeki Mitsui, Hirotaka Nakahashi, Kotaro Toyama, Masamitsu Karasawa, Hatsue Ogawara, Yoshihisa Nojima and Hirokazu Murakami. Flow cytometric detection of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in a subpopulation of bone marrow cells. *Leukemia Res.* 2010; 34: 177-183

#### 2. 学会発表

- Hiroshi Handa, Hirokazu Murakami, Takafumi Matsushima, Natsumi Nisimoto, Madoka Inoue, Takayuki Saitoh, Akihiko Yokohama, Hiromi Koiso, Takeki Mitsui, Norifumi Tsukamoto, Hatsue Ogawara, Masamitsu Karasawa, Yoshihisa Nojima: Human

telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression  
detected by flow cytometry in CD34 positive  
progenitor fraction in myelodysplastic syndrome and  
acute myeloid leukemia.: Poster Session, Board #0902  
The 15th Congress of the European Hematology  
Association, June 10-13 , 2010. Barcelona Spain

## GPIアンカー欠損症の解析

研究協力者 木下 タロウ (大阪大学微生物病研究所・教授)

### 研究要旨

昨年度我々は一般のPNH患者において、患者の末梢血、骨髄におけるHMGA2の発現を解析し、患者の末梢血においてHMGA2の発現が有意に高いことを報告したが、今回マウスを使った実験でHMGA2を高発現した造血幹細胞がクローナルに増殖することを明らかにした。

一方Mabry症候群として複数家系報告されている、高アルカリフォスファターゼ・重度精神運動発達遅滞を特徴とする先天性疾患がGPIアンカー合成に必須なPIGVの異常に起因する新たな先天性GPI欠損症であることがドイツの研究者との共同研究で明らかになった。

### A. 研究目的

我々はPNHにおけるGPI欠損細胞の拡大機序の解明を目指している。昨年度一般のPNH患者の末梢血において転写制御因子HMGAの3'UTRを欠く短いsplice variantの発現が有意に亢進していることを報告した。今年度は実際にHMGA2の発現亢進が造血幹細胞のクローナルな増殖を来すか、動物実験によって検証することを目的とした。また新たに発見された先天性PIGV欠損症はGPIの2つめのマンノースを付加する酵素PIGVの遺伝子異常で起こる疾患であるが、その発症機序を明らかにすることを合わせて目的とした。

### B. 研究方法

マウスの骨髄にレトロウィルスベクターを使ってエクソン1-3のみからなるtruncated formのHMGA2(pMY-HMGA2-IRES-EGFP)とコントロールとしてEGFPのみを含む空ベクター(pMY-IRES-EGFP)を発現させ致死レベルの放射線を当てたレシピエントマウスに骨髄移植し経時的に末梢血のGFP<sup>+</sup>細胞の割合をFACSにより解析した。一方ドイツの研究者がMabry症候群の患者の全エクソンシーケンスにより、複数の患者でPIGVにアミノ酸変異があることを見いだした。この変異によるGPI生合成の異常を

PIGV欠損CHO細胞を使って検証した。またGPIアンカー型蛋白である胎盤型アルカリフォスファターゼ(PLAP)をレポーターとしてPIGV欠損CHO細胞に発現させ活性測定により、培養液中の遊離を解析した。(倫理面への配慮) マウス実験は、学内動物実験委員会の承認を受けている。

### C. 研究結果

HMGA2を高発現させた骨髄をマウスに移植した2回の実験で、1回目は3匹中2匹が、2回目は4匹中3匹が移植後8週から20週で顆粒球、単球、T、Bリンパ球、赤血球においてGFP<sup>+</sup>細胞の割合が増加し50%~80%に拡大したが、コントロールマウスでは20%以下であった。このことよりHMGA2を高発現した造血幹細胞がクローナルに増殖することが明らかになった。

PIGV欠損症については、患者で見つかった5種類のアミノ酸変異のすべてが、PIGV蛋白の発現を著しく低下させることにより部分的なGPI欠損症を起こしていることが明らかになった。またPIGV欠損細胞ではPLAPの蛋白部分がGPIトランスアミダーゼによって切断され培養液中に遊離されることが明らかになり、これは患者の高アルカリフォスファターゼ血症の発症機序を示唆するものである。

#### D. 考察

HMGA2 は、良性の間葉系腫瘍の発症に関わることが知られている。PNH 患者の末梢血で HMGA2 の発現が亢進していること、マウスの骨髄移植の実験から、異常クローンが良性腫瘍様増殖を起こし、PNH 発症に関与する可能性が示唆された。HMGA2 の発現亢進を来す上流の遺伝子を今後検索する予定である。

高アルカリフォスファターゼ血症が、PIGA 欠損症である PNH や PIGM 欠損症では見られないことから GPI トランスアミダーゼはマンノースの付加されていない GPI 中間体は認識できず、蛋白質の GPI 付加シグナルを切断できないと考えられる。

#### E. 結論

HMGA2 を高発現させた造血幹細胞はクローナルな増殖を起こすことがわかった。このことと、多くの PNH 患者の末梢血で HMGA2 の発現亢進がみられることは、HMGA2 が PNH 発症に関与していることを示唆する。

Mabry syndrome は PIGV のアミノ酸変異による部分的な GPI 欠損によっておこる遺伝性疾患で、その高アルカリフォスファターゼ血症は GPI アンカー型蛋白であるアルカリフォスファターゼが GPI トランスアミダーゼによって切断され血清中に遊離されて起こる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Krawitz P.M., Schweiger, M.R., Rodelsperger, C., Marcelis, C., Kinoshita, T., Murakami, Y. et al: Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome Nat. Genet. 2010 vol 42 827-9.

##### 2. 学会発表

- Murakami, Y., Krawitz, P.M., Robinson, P.N.,

Mundlos, S., Maeda Y., and Kinoshita, T.: Release of alkaline phosphatase caused by PIGV mutations in patients with Hyperphosphatasia-Mental Retardation syndrome (HPMR), recently found second inherited GPI anchor deficiency.: 第 83 回日本生化学会大会、2010 12 月 神戸

- Murakami, Y., Inoue, N., Noji, H., Shichishima, T., Nishimura, J., Kanakura, Y., Kinoshita, T.: Expression of HMGA2 in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: 52st ASH Annual Meeting, Orlando, 2010.
- Murakami, Y., Krawitz, P.M., Robinson, P.N., Mundlos, S., Maeda Y., and Kinoshita, T.: Release of alkaline phosphatase caused by PIGV mutations in patients with Hyperphosphatasia-Mental Retardation syndrome (HPMR), recently found second inherited GPI anchor deficiency.: 52st ASH Annual Meeting, Orlando, 2010

## 治療関連骨髄系腫瘍の病因としての *RUNX1* 点突然変異の意義

研究協力者 木村 昭郎 (広島大学原爆放射線医科学研究所血液・腫瘍内科 教授)

原田 浩徳 (広島大学原爆放射線医科学研究所血液・腫瘍内科 講師)

### 研究要旨

*RUNX1* 点突然変異は様々な骨髄系造血器腫瘍に認められる。特に治療関連骨髄性腫瘍 (t-MN) では高頻度で、APL 治療後に発症した t-MN では 9 例中 4 例に認められた。APL 治療により幹細胞に *RUNX1* 点突然変異が生じ、t-MN を発症すると考えられた。

#### A. 研究目的

*RUNX1* 点突然変異は、高率に白血病に移行する家族性血小板異常症 (FPD/AML) の責任遺伝子として同定され、様々な骨髄系造血器腫瘍に認められることが明らかになっている。われわれは *de novo* MDS や放射線・治療関連の MDS および AML で *RUNX1* 点突然変異が高頻度であることを報告し、骨髄増殖性腫瘍からの白血病移行に際しては高率に *RUNX1* 点突然変異を獲得することを明らかにした。*RUNX1* 変異は急性前骨髄球性白血病 (APL) 治療後に発症した治療関連骨髄性腫瘍 (t-MN) にも認められたことから、今回 APL 治療後症例の解析を行い、t-MN 発症に関する *RUNX1* 点突然変異の意義を検討した。

#### B. 研究方法

広島大学と関連病院で 1996-2008 年に診断した全新規 APL124 例を平均 8.6 年観察し、再発・t-MN・死亡を調査した。APL や t-MN を発症した際の DNA・RNA を精製し、*RUNX1* 遺伝子変異を解析して変異例の塩基配列を決定し、臨床病態との関連を検討した。

(倫理面への配慮)

広島大学医学部倫理委員会承認済みであり、同委員会の定めるヒトゲノム遺伝子解析研究の指針に従

って実施した。検体提供者にはインフォームドコンセントを行い、個人情報保護のため個々の試料情報は連結可能匿名化した。

#### C. 研究結果

全 APL124 例を ATRA+化学療法で治療した結果、CR 率 94.4%であった。地固め療法を完了した 108 例中、観察期間内に 10 例 (9.3%) が再発し、11 例 (10.2%) が t-MN を発症した。再発症例では全例が CD34<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>の APL 細胞であったのに対し、t-MN では CD34<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>かつ *PML/RARA* 陰性で、APL 細胞とは異なる未分化な細胞由来であった。t-MN 症例のうち 9 例が白血病化し、うち 4 例に *RUNX1* 点突然変異、1 例に *RUNX1* 関連転座を認めた。白血病化 t-MN 例の予後は再発例に比し、有意に予後不良であった ( $P=0.022$ )。

#### D. 考察

APL は、正常幹細胞から生じたレセプティブな幹細胞に *PML/RARA* が加わって APL 幹細胞が発生し、他のヒットが付加されて発症する。この APL 細胞をターゲットとして ATRA+化学療法を行うことで治療に至るが、この治療の影響により正常あるいはレセプティブな幹細胞に *RUNX1* 変異が生じて t-MN へ