

201024128A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

先天性赤芽球癆（**Diamond Blackfan 貧血**）の

効果的診断法の確立に関する研究

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 23 (2011) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	1
伊藤 悦朗 (弘前大学大学院医学研究科・小児科学・教授)	
II. 分担研究報告書	
1. リボソームタンパクの遺伝子解析	15
照井 君典 (弘前大学医学部附属病院・小児科・講師)	
2. 中央診断、データ管理	17
小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科・小児科学・教授)	
3. 小児期造血障害疾患登録による先天性赤芽球癆の疫学 データベース構築	19
小原 明 (東邦大学医療センター大森病院・輸血部・教授)	
4. 遺伝子型と表現型に基づいた治療法確立に関する研究	21
大賀 正一 (九州大学大学院医学研究院・周産期・小児医療学・教授)	
5. DBA の診断法の開発 (マーカー探索)	23
浜口 功 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部・部長)	
森尾 友宏 (東京医科歯科大学大学院・発生発達病態学分野・准教授)	
倉光 球 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究院)	
6. DBA の診断に有用な新規バイオマーカーの同定	29
菅野 仁 (東京女子医科大学・遺伝子医療センター・准教授)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	31
IV. 研究成果の刊行物・別冊	35

I . 総括研究報告

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

研究代表者 伊藤 悦朗（弘前大学大学院医学研究科 小児科学 教授）

研究要旨： Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、乳児期に発症する赤血球造血のみが障害される先天性の赤芽球癆である。約 40%の例は種々の奇形を合併する。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約 40%存在する。難治例には造血幹細胞移植が行われている。これまでに原因遺伝子として、8 種類のリボソームタンパク (RP) 遺伝子が同定されている。海外では約 50%の DBA 患者に RP 遺伝子の変異が認められているが、本邦では原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなかった。平成 22 年度には新たに 19 例の遺伝子解析を行い、本研究で解析した症例は 68 例 (64 家系) となった。DBA で遺伝子変異が報告されている 8 遺伝子 (*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPS10*, *RPS26*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*) と 5q-症候群の原因遺伝子として最近同定された *RPS14* をダイレクト・シークエンス法で解析した。その結果、*RPS19* 遺伝子変異が 10 例 (8 家系) で検出され、その内の 2 つは新しい遺伝子変異であった。*RPL5* 変異は 6 例、*RPL11* 変異は 3 例、*RPS17*, *RPS10* および *RPS26* 変異はそれぞれ 1 例で検出され、すべて新規の変異であった。*RPS19*, *RPL5*, *RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ 12.5%、9.3%、4.7%であった。以上、本邦における DBA の発端者 64 例中 20 例 (31.3%) に RP 遺伝子の変異を認めた。欧米に比して本邦における RP 遺伝子の変異頻度は低く、70%の症例では原因遺伝子が不明であることが明らかになった。そこで、ダイレクト・シークエンス法では検出できない片アレルの欠失を定量的 PCR 法と SNP アレイ法を用いて解析した。その結果、変異が検出されなかった 28 例中 7 例に RP 遺伝子の欠失を見出した。驚いたことに、これまで世界で 3 例しか報告がなかった *RPS17* 遺伝子異常が 3 例も含まれていた。欠失を含めた RP 遺伝子の異常は、DBA 発端者 64 例中 27 例 (42.1%) にみられた。*RPS19* 変異をもつ DBA の 12 例中 10 例に身体的異常を合併し、その内の 6 例は拇指の異常を有していた。口蓋裂が 3 名にみられ、2 例で *RPL5* 変異、1 例は *RPL35a* 変異を有していた。赤血球還元型グルタチオン (GSH) の増加が DBA の 10 例中 7 例に見られ、バイオマーカーとして有用であることを見出した。注目すべきことに、解析した全ての DBA 症例で赤血球アデノシン・デアミナーゼ活性 (eADA) か GSH が高値であった。この結果を踏まえ、我々が作成した軽症例も含めた DBA 診断基準案の改定を進めている。我が国では、毎年約 10 例の DBA が新規に発症していると推定されているが、診断は各施設に任せられており血液標本の中央診断も施行されていなかった。平成 21 年より中央診断を伴う DBA の登録を開始した。これまでに 6 例の登録があり、その内 1 例で *RPL5* の遺伝子異常を認めた。平成 21 年度に行った一次疫学調査の結果、132 例の DBA 症例の報告があった。さらに遺伝子解析を含めた詳細な二次調査を行うため、準備を進めている。疫学調査について弘前大学の倫理委員会の審査を受け、承認が得られた。九州大学の倫理委員会の承認を待つて二次調査を開始する予定である。

【研究分担者】

照井君典：弘前大学医学部附属病院

講師

森尾友宏：東京医科歯科大学大学院

准教授

小島勢二：名古屋大学大学院医学系研究科

教授

菅野 仁：東京女子医科大学

准教授

小原 明：東邦大学医療センター大森病院

教授

【研究協力者】

大賀正一：九州大学大学院医学研究院

教授

土岐 力：弘前大学大学院医学研究科

講師

浜口 功：国立感染症研究所

部長

倉光 球：国立感染症研究所

研究員

A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、赤血球造血のみが障害される稀な先天性赤芽球癆である。治療は副腎皮質ステロイドが第一選択であるが、ステロイド依存や輸血依存症例が全体の約40%存在する。難治例には造血幹細胞移植(HSCT)が行われている。原因遺伝子として8種類のリボソームタンパク(RP)遺伝子が同定されている。海外では約50%のDBA患者にRP遺伝子の変異が認められている。家族内に発端者と同一の遺伝子異常をもつ貧血のない軽症例が存在する。本症が悪性疾患を合併しやすいことから、造血幹細胞移植のドナーを選択する上で軽症例の診断は重要課題になっている。しかし、本邦では、原因遺伝子が同定されている症例はほとんどなく、家族の解析もほとんど行われていなかった。軽症例も含めたDBAの診断基準の作成は海外でも検討が始まったばかりであり、我が国でも利用できるような診断基準は存在しない。本研究の目的は、DBAの診断基準を作成し、それに基づいた家族内の軽症例をも含む包括的な疾患登録を行い、本症の全貌を明らかにすることである。中央診断を伴う登録システムを確立することで、我が国における疫学を明らかにすることができると期待できる。さらに、原因遺伝子の解析と疾患特異的なバイオマーカーの検索を行い、病態解明とともに精度の高い診断を目指す。80個のRP遺伝子をすべて解析し、新規原因遺伝子を同定する。

また、平成21年度に行った一次調査で把握された症例を対象に二次調査、さらに遺伝子解析を行う。

B. 研究方法

1) 疾患登録システムの確立

日本小児血液学会の疾患登録システムの中でDBAの登録システムを立ち上げ、これを用いてオンラインによる登録ができるようにする。オンライン登録ができない場合は、FAXによる登録も受け付ける。中央診断は末梢血や骨髓塗抹標本を用いて主に名古屋大学で行い、遺伝子解析は弘前大学、国立感染研究所と東京女子医大で行う。

2) 遺伝子解析

本年度は19例の新規症例を加え、これまでに弘前大学小児科が全国から収集した68例(64家系)の臨床検体の遺伝子解析を行った。

a) 既知の遺伝子解析:末梢血からDNAを抽出し、昨年と同様にDBAで遺伝子変異が報告されている6遺伝子(*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*)と5q-症候群の原因遺伝子として最近同定された*RPS14*を解析した。本年度はさらに新たに報告されたDBA原因遺伝子である*RPS10*, *RPS26*を解析に加えた。最初に、High resolution melt analysis (HRM)法で遺伝子変異の有無をスクリーニングし、異常の検出された検体をダイレクト・シーケンス法で解析した。

b) DBA Gene Copy Number assay:それぞれのRP遺伝子に対するプライマーセットを準備し、他の遺伝子プライマーセットによる定量的PCR(Q-PCR)の増幅曲線のCt値との差が1サイクル以内になるようにプライマーセットを選定した。

c) 80個のRP遺伝子の網羅的解析: SureSelectターゲットエンリッチメントシステムによりRP遺伝子80種の領域を濃縮し、次世代シーケンサー(アプライドバイオシステム社ソリッドシステム)を用い、網羅的な解析を行う。

3) DBA診断のバイオマーカーの探索

既に*RPS19*ないし*RPS17*遺伝子変異が同定されている9例およびDBA診断基準により、古典的DBAと診断することが出来る2例を対象にして、インフォームド・コンセントを取得の上、赤血球アデノシン・デアミナーゼ活性(eADA)と赤血球還元型グルタチオン(GSH)の測定を実施した。

eADAは白血球・血小板・血漿を除去した精製赤血球から溶血液を作製し、アデノシンを基質として265nmにおける吸光度変化により、活性を測定した。

GSHの測定は以下の様に行った。20µlのヘパリン加全血に180µlの蒸留水を加えて溶血させたのち、メタリン酸により得られる除タンパク抽出液に、5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)を加え、412nmで定量した。

4) 血清 prohepcidin を測定

患児の輸血療法の問題点を明らかにするため新生児の血清 prohepcidin を測定し、鉄制御機構を解析した。鉄代謝解析については倫理委員会で承認を受け、同意書を取得して行った。

5) 診断基準の作成

上記の解析結果と臨床情報をもとに、診断基準を作成する。診断基準の立案には、日本小児血液学会再生不良性委員会の有力メンバーである小原と大賀が担当する。また、日本小児血液学会がこれまでに収集した DBA の疫学データも解析し、診断基準の立案に役立てる。

6) 小児血液学会疾患登録事業（全数把握）を一次調査とした疫学観察研究（小児血液再不貧 2005 研究・MDS2006 研究）

本研究班の研究では治療介入を行わない疫学観察研究として実施する。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。構築されるデータベースには小児期発症の造血障害全般を網羅し、DBA 症例に限定はしない。

7) 二次アンケート調査

全国の小児科専門医研修施設（520 施設）および小児血液学会評議員（150 名）を対象に、2000 年 1 月以降に把握された症例について一次疫学調査を行った。把握された症例についてさらに臨床症状、検査所見、治療、予後を含む二次アンケート調査を行う。

（倫理面への配慮）

本研究で行うゲノム解析は、政府の定める各種倫理指針に準拠し、弘前大学、東京女子医大、国立感染症研究所および東京医科歯科大学の倫理審査会の承認の得た上で患者の同意を得た場合に限り検体を研究に使用した。

中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患

者保護者の同意を取得した後に行った。

二次疫学調査は、中心となる弘前大学と九州大学の倫理委員会の審査・承認を受けた上で行う。

C. 研究結果

1) 疾患登録システムの確立

平成 21 年度は、中央診断を伴う日本小児血液学会の DBA 登録システムを確立し、登録を開始した。中央診断を開始してから 16 ヶ月間で 223 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 95 例、MDS が 20 例（CBFS3 例を含む）、JMML が 27 例、CBFS が 20 例、急性白血病が 16 例、その他 48 例であった（表 1）。CBFS 20 例の中に DBA が 6 例含まれていた。平成 22 年に DBA と新規診断された 2 例の詳細は以下のとおりである。

症例 1：2 歳カ 5 月女児。28 週、770 g 超低出生体重児として出生。外表奇形なし。WBC 6,000 / μ l、RBC 135 万/ μ l、Hb 3.6 g/dl、Ht 10.8%、MCV 80 fl、Ret 0%、Plt 23 万/ μ l。骨髓像：赤芽球は全体の 1.5%で好塩基性赤芽球までは観察された。

症例 2：生後 9 ヶ月女児。外表奇形なし。WBC 7,900 / μ l、Hb 3.0 g/dl、Ht 9.4%、MCV 76 fl、Ret 2%、Plt 18.8 万/ μ l。骨髓像：赤芽球は全く観察されなかった。

DBA と診断された症例については弘前大学小児科に遺伝子解析を依頼しているが、1 例で *RPL5* 変異が確認された。日本小児血液学会疾患登録や日本小児血液学会再生不良性貧血委員会による後方視的調査から、日本において臨床的に発見される DBA の発症数は年間 11 例であると推定された。しかし、これらの情報はいずれも後方視的調査によるものであり、診断の正確性や症例の把握率に関しては不十分なため、中央診断を行った上での前方視的登録による実態把握が不可欠であると考えられた。

2) 遺伝子解析

a) 既知の DBA 遺伝子の塩基配列の解析

平成 22 年度には新たに 19 例の遺伝子解析を行い、本研究で解析した症例は 68 例（64 家系）となった。DBA で遺伝子変異が報告されている 8 遺伝子（*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPS10*, *RPS26*,

RPL5, *RPL11*, *RPL35a*) と 5q-症候群の原因遺伝子として最近同定された *RPS14* をダイレクト・シーケンス法で解析した。その結果、*RPS19* 遺伝子変異が 10 例 (8 家系) で検出され、その内の 2 つは新しい遺伝子変異であった。*RPL5* 変異は 6 例、*RPL11* 変異は 3 例、*RPS17*, *RPS10* および *RPS26* 変異はそれぞれ 1 例で検出され、すべて新規の変異であった。*RPS19*, *RPL5* と *RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ 12.5%、9.3% および 4.7% であった。以上、本邦における DBA の発端者 64 例中 20 例 (31.3%) に RP 遺伝子の変異を認めた。欧米に比して本邦における RP 遺伝子の変異頻度は低く、70% の症例では原因遺伝子が不明であることが明らかになった。

b) 遺伝子変異未知 DBA 患者の遺伝子コピー数解析

DBA で高頻度に変異報告のある遺伝子として、*RPL5*, *L11*, *L35A*, *S7*, *S10*, *S17*, *S19*, *S24*, *S26* の 9 遺伝子、また DBA の原因としての重要度は未だ不明であるが論文や学会等において変異報告があった遺伝子、*RPL9*, *L19*, *L26*, *L28*, *L36*, *S15*, *S27A* の 7 遺伝子について遺伝子コピー数測定用の Q-PCR プライマーを設定した。弘前大学においてシーケンス解析の結果、変異が同定されなかった検体を用いて上記の遺伝子について Q-PCR で遺伝子コピー数を測定した。その結果、28 例中 7 例で特定の 1 遺伝子に対するプライマーセットすべてが他の遺伝子の増殖曲線の Ct 値から 1 サイクルの遅れを示した (図 1)。つまりこれら 1 サイクル遅れた遺伝子は、その他の遺伝子 (2N) のコピー数の半分 (N) であることを示しており、片アレルの欠失が起きていることが示された。7 例の内訳は、*RPS17* 欠失 (3 例)、*RPS19* 欠失 (2 例)、*RPL5* 欠失 (1 例)、*RPL35A* 欠失 (1 例) であった。

c) *RPS19* 遺伝子の遺伝子内相同組換え検体の検出

片アレル欠失を示した検体の内、#24 (*RPS19* の欠失) については、1 部の S19 のプライマーセットは、正常の遺伝子コピー数を示した。そこで *RPS19* に対する Q-PCR プライマーを、遺伝子全体をカバーするように 9 セット設定し、#24 検体

の *RPS19* の遺伝子コピー数を詳細に調べた (図 2A)。その結果、*RPS19* の 5'UTR 領域 (S19-57, -58) および intron 3 内部から 3'UTR 領域に設定したプライマー (S19-28, -62, -65) ではコピー数が正常値を示したのに対して、intron 3 の内部より上流に設定されたプライマー (S19-36, -24, -40, -44) では片アレルの欠失を示した (図 2B)。このことから *RPS19* 遺伝子の片方のアレルの intron 3 領域付近で小規模な欠失があることが考えられた。そこで、*RPS19* の 5'UTR と intron 3 にプライマーを設定し genomic PCR を行い欠失領域の同定を試みたところ、#24 検体では健常人とは異なり約 7k 塩基対の欠失が想定されるバンドが電気泳動上で認められた (図 2C)。Genomic PCR 産物をシーケンス解析した結果、5'UTR と intron3 にある 23 塩基対の相同配列 (CGGTGGCTCACACC TGTAATCCCAGCA, nt:-1400-1374 および nt:+5758-+5784) の間で分子内相同組換えが生じ、結果として 7157 塩基の欠失が起きたことが明らかになった (図 2D)。欠失した領域にはプロモーターおよび exon 1, 2, 3 が含まれることから、このアレルは正常な *RPS19* タンパク質をコードしないと考えられた。

d) SNP アレイによる片アレル欠失の解析

弘前大学においてシーケンス解析の結果、変異が同定されなかった 27 検体を用いて上記の遺伝子について SNP アレイ (Affymetrix Gene Chip) と CNAG プログラムで遺伝子コピー数を測定した。その結果、27 例中 6 例で RP 遺伝子の片アレル欠損を認めた。3 例に見られた *RPS17* 遺伝子の欠失を図 3 に示した。これらは、Q-PCR の結果と一致していたが、Q-PCR 法で検出された *RPS19* の大欠失 (#24) は検出されなかった。これは、SNP プローブが欠失領域に存在しないためであった。

e) 80 個の RP 遺伝子の網羅的解析

弘前大学においてシーケンス解析の結果、変異が同定されなかった 11 検体について解析を行った。その内の一例に *RPL28* の遺伝子変異が見出された。

3) DBA のバイオマーカーの検索

9 家系 11 例の DBA 症例、非罹患両親・同胞 11 名について、eADA と GSH を同時に測定し、平均を比較検討したところ、eADA は患者群で 3.57 ± 1.53 (IU/gHb, $M \pm SD$)、対照群で 1.02 ± 0.26 、GSH は患者群で 103 ± 18 (mg/dl RBC, $M \pm SD$)、対照群で 70.0 ± 9.7 と、どちらも有意に患者群で高値を示した。

患者 10 例において eADA は 9 例で基準値を超えて高く、また GSH は 8 例で基準値以上であったが、eADA・GSH の同時測定でどちらも基準値内の例は一例も認めないことから、この 2 つの生化学的バイオマーカーの同時測定は、DBA 診断に極めて有用であることが示唆された。

4) 新生児の鉄代謝マーカー (hepcidin) の生理的動態

新生児期から輸血を受ける患児の輸血開始時期を検討するため、血清 prohepcidin 値を測定し生理的動態を検討した。出生時には低く、生後 1 か月までに増加することを確認した。

5) 小児期造血障害疾患登録による先天性赤芽球癆の疫学データベース

DBA 症例は 4 年間で 55 例登録された (表 1)。これは、14 歳以下の小児人口 17294 千人から罹患率を推定すると、14 歳以下小児人口 10 万に対して 0.32 (95%CI; 0.27-0.37) と推定される。およそ日本全国で年間 11 例ほどの新規診断症例が発生していることが予想された。今後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。

6) 二次アンケート調査

平成 21 年度に行った一次疫学調査の結果、132 例の DBA 症例 (2000 年 1 月以降に把握された症例) の報告があった。さらに遺伝子解析を含めた詳細な二次調査を行うため、準備を進めている。弘前大学の倫理委員会の審査を受け、承認が得られた。九州大学の倫理委員会の承認を待って二次調査を開始する予定である。

D. 考察

DBA は、軽症例から最重症例まで広範囲な病像を示すことから、臨床所見のみで診断することは容易ではない。診断は各施設に任されていたが、必ずしも正確な診断が行われていなかった。平成 21 年度は、中央診断を伴う DBA 登録システムを立ち上げ、登録を開始した。これにより、本邦における新規発症例の正確な把握が可能となり、本症の全貌を明らかにするための大きな一歩となった。全国レベルでのスクリーニングから確定診断に至るシステムの整備が進んだことで、発症頻度をはじめ原因遺伝子、病型分布などの疫学事項を高い精度で把握することが可能となり、その社会的意義はきわめて高いと思われる。

近年 DBA でリボソームタンパク質遺伝子に変異が多数同定され、欧米では約半数で遺伝子変異が明らかにされるようになった。このことから、これまで DBA の診断は主に臨床像から判断されてきたが、遺伝子変異解析によって原因遺伝子を同定することが確定診断の 1 つの診断マーカーとなりつつある。しかしながら、日本では既知遺伝子変異の同定率は約 30% であることから、変異同定率の向上が期待された。DBA 遺伝子の片アレル欠失は遺伝子転座の解析や CGH アレイ解析などにより、これまで稀に報告があったものの、これらの解析方法は、操作性やコスト面において多検体を処理するには不向きであると考えられる。このため、これまで DBA で片アレル欠失のまとまった解析はされてこなかった。

我々が開発した片アレル欠失検出方法は、1 回の定量 PCR で多数の遺伝子についてのコピー数解析が出来る方法であることから、操作面の簡便・迅速性を達成しただけでなく、解析面においても Q-PCR の結果を目視するだけで遺伝子欠失を検出できるため、解析のステップが非常に簡便となっている利点がある。実際に我々は、本パイロットスタディーで迅速に 7 例の片アレル欠失を同定することができた。

我々が同定した 7 例の DBA の原因遺伝子の片アレル欠失は、その多くがこれまでに報告のないものであった (*RPL5* (1 例), *RPS17* (3 例))。また、今回の解析では *RPS17* の遺伝子異常が 3

例発見され、これまで欧米では少数派とされたが、興味深いことに日本ではむしろ高頻度で *RPS17* に変異があることが明らかになった。

本邦の DBA 患者の RP 遺伝子の頻度は、片アレルの欠失を含めると 64 家系中 7 例 (42.1%) となった。しかし、欧米の約 50% よりもまだ低い傾向がある。特に、本邦では *RPS19* 遺伝子変異の頻度は大欠失を加えても 15.6% と欧米の約 25% に比べて低く、このことが RP 遺伝子変異全体の頻度を下げている大きな要因と考えられた。一方、これまで世界で 3 例しか報告のなかった *RPS17* 異常が 4 例 (6.3%) も見られた。DBA の原因遺伝子の頻度に民族間の差がある可能性が示唆される。

我が国の DBA はまだ 60% が原因遺伝子不明である。これまで見られた平成 22 年から 2 年間で残りの 74 種類の RP 遺伝子をすべて解析する予定であるが、リボソームの機能にはさらに多くの遺伝子が関わっている。本年度 RP 遺伝子の網羅的解析を行ったが、即知の遺伝子異常が検出されない 6 例の中で、遺伝子変異が見つかったのは 1 例のみであった。80 種類の RP 遺伝子に変異の認められない DBA については、次世代シーケンサーを用い、全エクソンの網羅的な解析を行い、新規原因遺伝子を同定する必要があると考えられる。効率的に研究を行うために「遺伝性鉄芽球性貧血の診断分類と治療法の確立に関する研究班」(代表研究者 張替秀郎教授) と協力してエクソーム解析を行う予定である。

患者の約半数が何らかの身体的異常を合併しており、全体としてはこれまでの報告とほぼ同様の頻度であった。しかし、*RPS19* あるいは *RPL5* の変異をもつ患者の全例で何らかの身体的異常がみられ、身体的異常を高率に合併する変異であることが示唆された。拇指の異常を認めた 6 例全例が *RPS19* あるいは *RPL5* 変異、口蓋裂を認めた 3 例のうち 2 例が *RPL5* 変異で 1 例が *RPL35a* をもっていたことは、特定の遺伝子変異と臨床像との関連を示唆するものであった。これらの関連を明らかにするためには、さらに多数例を解析する必要がある。

DBA の確定診断には、リボソームタンパク遺伝子変異の同定が有用だが、原因遺伝子は多数ある

こと、遺伝子変異が同定される症例が未だ 40~50% であることが問題であった。生化学的バイオマーカーとして、eADA の上昇が知られているが、臨床像、血液学的所見で DBA が強く疑われる症例の 10~20% では eADA が基準値内であり、より高感度に DBA を診断出来る新規バイオマーカーが必要と考えられていた。今回、赤血球 GSH が DBA 患者で有意に高値であることを発見し、eADA と併用することで、検討した 9 家系 11 例の DBA 患者を 100% 診断し得た。このことから、GSH は DBA 診断における新規バイオマーカーとして、極めて有用と考えられた。しかし、GSH 濃度の上昇のメカニズムについて未だ不明である。赤血球にはグルタチオン合成系、還元系およびグルタチオン還元酵素の補酵素である NADPH の産生系の代謝が発達しており、それらの代謝系に属する、γグルタミルシステイン合成酵素、グルタチオン合成酵素、グルタチオン還元酵素、そしてグルコース-6-リン酸脱水素酵素などの活性が DBA 患者で亢進しているかどうか現在検討中である。

本年度施行した一次疫学調査の結果、2000 年 1 月以降に把握された DBA 症例 132 例が集計された。さらに、詳細な遺伝子診断を含む二次調査を行うことにより、本邦の DBA の全体像が把握されることが期待できる。弘前大学小児科では、既に遺伝子解析のために約 70 例の DBA の臨床検体を全国の小児科施設から収集した。これは、我が国における唯一・最大の DBA 検体バンクであるが、二次疫学調査によって臨床検体をさらに収集することにより、今後このバンクを欧米のレベルまで発展させることが期待できる。

最近、骨髄異形成症候群の 1 つである 5q 欠失症候群の原因が、*RPS14* 遺伝子の欠失であることが明らかになった。また、DBA 以外の天性骨髄不全症候群である Shwachman-Diamond 症候群や先天性角化異常症なども「リボソーム病」であることが明らかになってきた。本研究は、これらの難病の診断や治療法の開発に貢献する可能性がある。

E. 結論

欧米では DBA の登録制度が確立し、検体保存やそれを用いた疾患の研究が行われている。特に、

北米の DBA 登録制度は充実しており、米国とカナダの患者登録数は 600 名以上にのぼる。これに対して、日本ではこのような登録制度はなく、本疾患に対する研究は著しく遅れていた。本研究班が中心となり、永続的な制度としての「日本 DBA 登録制度」の確立を目指す。これは、DBA の患者の支援や、DBA の臨床および基礎研究を行うための基盤になり、国際貢献にも繋がると思われる。実際、インドやイランなど海外からの遺伝子解析の依頼があり、2 家系の遺伝子解析を行った。

本年度は、新たに 19 例の DBA 症例の遺伝子解析を行い、*RPS10* と *RPS26* 変異を本邦で初めて見出した。さらに、片アレル欠失解析のための Q-PCR 法を開発し、通常のシーケンス解析では検出することができなかったから RP 遺伝子の欠失を 28 例中 7 例で見出した。この内 1 例は、SNP アレイでは確認できない比較的小さな *RPS19* の欠失であったことから、Q-PCR 法の有用性が証明された。

DBA の新規バイオマーカーとして赤血球 GSH を同定した。eADA と GSH 濃度の同時測定により、検討した 11 例全ての DBA 症例を生化学的に診断可能であった。

F. 健康危険情報

今年度は登録システムを確立しているところであり、健康危険情報は無い。本研究は治療介入を伴わない観察研究であるが、有害事象に対して今後も注意を払う必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Int J Hematol.* 92(3):413-18,2010. Epub 2010 Oct 1.
- 2) Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang RN, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and *GATA1* mutations in transient abnormal

myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood.* 116:4631-4638,2010.

- 3) Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. *Oncogene.* 2010.29(25):3723-31.
- 4) Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG and Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of *M-CSFR* is critical for MOZ-leukemia stem cell potential. *Nature Medicine.* 16(5):580-585,2010.
- 5) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang RN, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, and Ito E. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica.* 95(8):1293-9,2010.
- 6) Shiba N, Kato NM, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, and Hayashi Y. *CBL* mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome. *Leukemia.* 24(5):1090-1092,2010.
- 7) Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T. Serum prohepcidin concentrations at birth and one month after birth in premature infants. *Pediatric Blood & Cancer.* 56(2):267-72, 2011.
- 8) Kusuda T, Hikino S, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Tokunaga S, Ihara K, Hata Y, Hara T. Genetic variation of vascular endothelial growth factor pathway does not correlate with the severity of retinopathy of prematurity. *J Perinatol.* 2011 (in press).
- 9) Ishimura M, Ohga S, Ichiyama M, Kusuhara

- K, Takada H, Hara T, Takahashi M, Okamoto H. Hepatitis-associated aplastic anemia during a primary infection of genotype 1a torque teno virus. *Eur J Pediatr*. 169(7):899-902, 2010.
- 10) Ohga S, Kudo K, Ishii E, Honjo S, Morimoto A, Osugi Y, Sawada A, Tabuchi T, Suzuki N, Ishida Y, Imashuku S, Kato S, Hara T. Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. *Pediatric Blood & Cancer*. 54(2):299-306, 2010.
- 11) Villalobos IB, Takahashi Y, Akatsuka Y, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Saji H, Kato M, Ogawa S, Kojima S. Relapse of leukemia with loss of mismatched HLA resulting from uniparental disomy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3158-61.
- 12) Nishio N, Kojima S. Recent progress in dyskeratosis congenita. *Int J Hematol*. 2010 Oct;92(3):419-24. Epub 2010 Oct 1.
- 13) Pulsipher MA, Young NS, Tolar J, Risitano AM, Deeg HJ, Anderlini P, Calado R, Kojima S, Eapen M, Harris R, Scheinberg P, Savage S, Maciejewski JP, Tiu RV, Difronzo N, Horowitz MM, Antin JH. Optimization of Therapy for Severe Aplastic Anemia Based on Clinical, Biological and Treatment Response Parameters: Conclusions of an International Working Group on Severe Aplastic Anemia Convened by the Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network, March 2010. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2010 Oct 26. [Epub ahead of print]
- 14) Takagi M, Shinoda K, Piao J, Mitsuiki N, Takagi M, Matsuda K, Muramatsu H, Doisaki S, Nagasawa M, Morio T, Kasahara Y, Koike K, Kojima S, Takao A, Mizutani S. Autoimmune lymphoproliferative syndrome-like disease with somatic KRAS mutation. *Blood*. 2010 Nov 9. [Epub ahead of print]
- 15) 菅野仁, 斎藤加代子. 電子カルテによる遺伝子情報管理の実際. *日本遺伝カウンセリング学会誌*. 31: 127-129, 2010.
- 16) Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Funase M, Murayama T, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y. Shared molecular targets in pediatric gliomas and ependymomas. *Pediatr Blood Cancer*. 2011. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21298772.
- 17) Aihara Y, Tsuruta T, Kawamata T, Kanno H, Maebayashi K, Sakauchi M, Wada E, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Hori T. Double high-dose chemotherapy followed by autologous peripheral blood stem cell transplantation for primary disseminated medullo-blastoma: a report of 3 cases. *J Pediatr Hematol Oncol*. 32:e70-4, 2010. PubMed PMID: 20168248.
- 18) 佐野弘純, 朴明子, 外松学, 今野友貴, 土岐力, 伊藤悦朗, 林泰秀. 典型例とは異なる緩徐な臨床経過を示し, リボソームタンパク遺伝子 *RPL11* の変異の検出により診断した Diamond-Blackfan 貧血の 1 例. *日本小児血液学会雑誌*. 24:225-228, 2010.
2. 学会発表
- 1) 伊藤悦朗, 照井君典, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁: 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業研究事業 小島班「DKC の効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班「DBA の効果的診断法の確立に関する研究」合同班会議, 名古屋, 2010.9.4.
- 2) 伊藤悦朗, 照井君典, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁: 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan 貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 先天性造血不全シンポジウム, 浦安市, 2011.2.4.
- 3) Ohga S: Hematopoietic stem cell

- transplantation for HLH/LCH, and a review of neonatal HLH in Japan. The 4th Seminar on Histiocytosis & Pediatric MDS. October 7, 2010 Seoul, Korea (invited speaker).
- 4) Ohga S: Hemophagocytic lymphohistiocytosis. Education Session IV ~ HSCT for pediatric malignant diseases ~. The 15th Congress of the Asia Pacific Blood and Marrow Transplantation. October 29-31, 2010 Phuket, Thailand (invited speaker).
- 5) 大賀正一, 工藤寿子, 足立壮一, 菊地陽: 小児血液疾患の基礎. 第3回研修医(初期・後期)のための血液学セミナー, 大津, 2010.7.9-11.
- 6) 菅野仁, 山本俊至, 大賀正一, 立石浩, 濱田貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 藤井寿一: Diamond Blackfan 貧血に関する新規の病因候補遺伝子同定. 第72回日本血液学会, 横浜, 2010.9.24-26.
- 7) 石村匡崇, 大賀正一, 宇都宮里奈, 牧村美佳, 土居岳彦, 井原健二, 原寿郎: ステロイドパルス療法が奏功した Graves 病合併再生不良性貧血の一例. 第52回日本小児血液学会, 大阪, 2010.12.17-19.
- 8) 大賀正一, 小原明, 小島勢二, 菅野仁, 伊藤悦朗: DBA 診療のガイドライン~現況と国際協力の可能性~. 平成22年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業研究事業小島班「DKCの効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班「DBAの効果的診断法の確立に関する研究」合同班会議, 名古屋, 2010.9.4.
- 9) 'A novel method to analyze genomic copy number of Diamond Blackfan anemia responsible genes.' Madoka Kuramitsu, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Michio Ozeki, Atsuko Masumi, Takuo Mizukami, Haruka Momose, Kazuya Takizawa, Ito Etsuro, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi. 第72回日本血液学会, 横浜, 2010.9.24-26.
- 10) New Determination Method for Extensive Gene Deletions in Diamond -Blackfan Anemia' Madoka Kuramitsu, Tomohiro Morio, Masatoshi Takagi, Tsutomu Toki, Kiminori Terui, RuNan Wang, Atsuko Masumi, Takuo Mizukami, Haruka Momose, Kazuya Takizawa, Kazunari Yamaguchi, Etsuro Ito, and Isao Hamaguchi. Poster III-1010. 第52回アメリカ血液学会, 米国・オーランド, 2010.12.4-7.
- 11) 菅野仁, 石谷健, 相崎潤子, 濱田貴子, 内山智貴, 浦野真理, 近藤恵里, 松井英雄, 藤井寿一, 太田博明, 斎藤加代子: 薬物トランスポーター遺伝子多型を用いた薬理遺伝学的検査~ドセタキセル投与における好中球減1法におけるドナー、レシピエント細胞キメリズム解析. 第58回日本輸血・細胞治療学会総会, 名古屋, 2010.5.30.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1. 本邦における Diamond-Blackfan 貧血の発症頻度

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
Schwachman-Diamond	0	1	0	1
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1

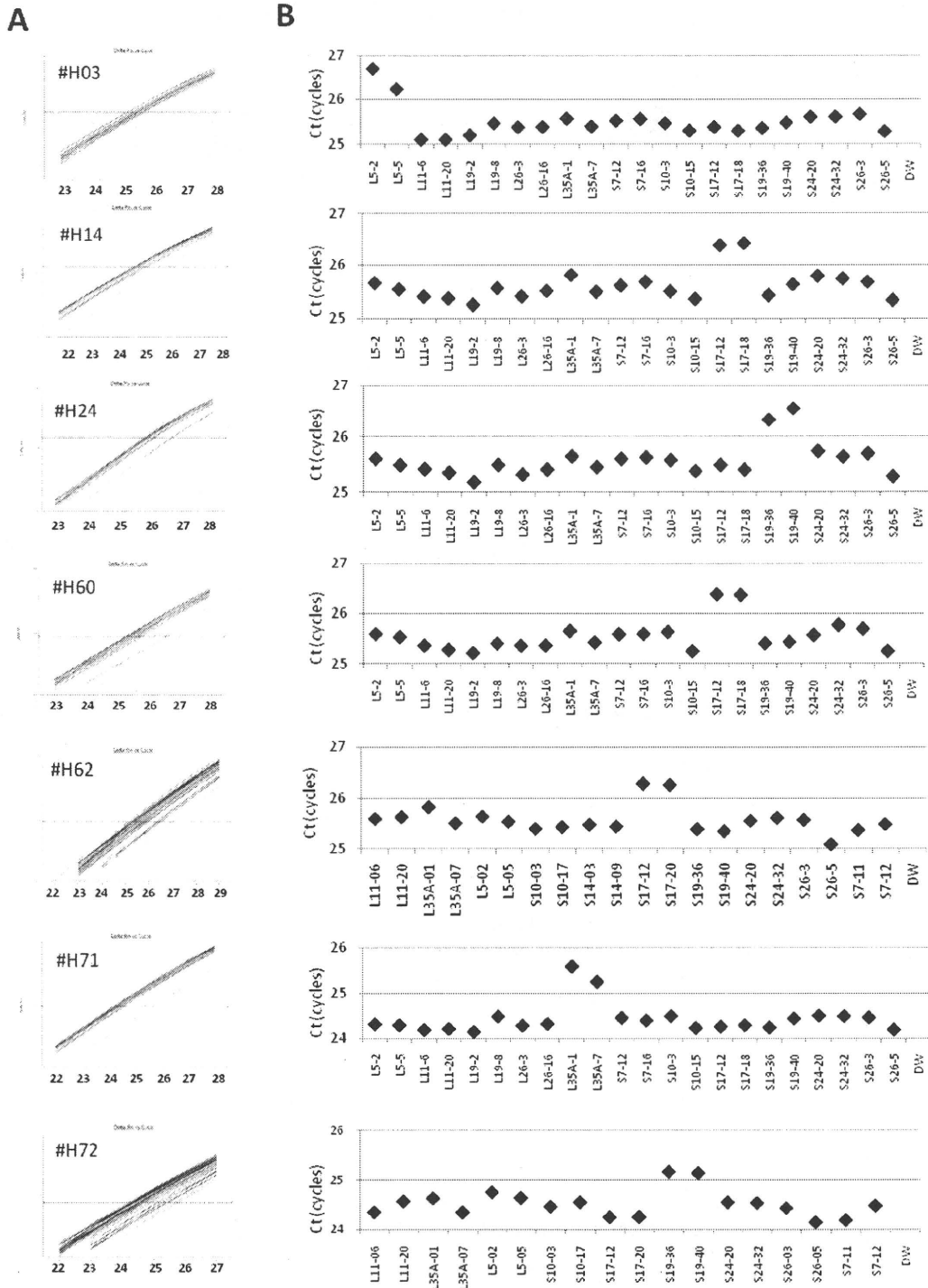


図1. Q-PCRによるDBAの遺伝子コピー数検査

A. Q-PCR増幅曲線像。B. Ct値のエクセル解析結果。7検体について他の遺伝子のプライマーセットより1サイクル遅れた遺伝子プライマーセットが認められた。

Patient #H24 with a deletion in RPS19 gene

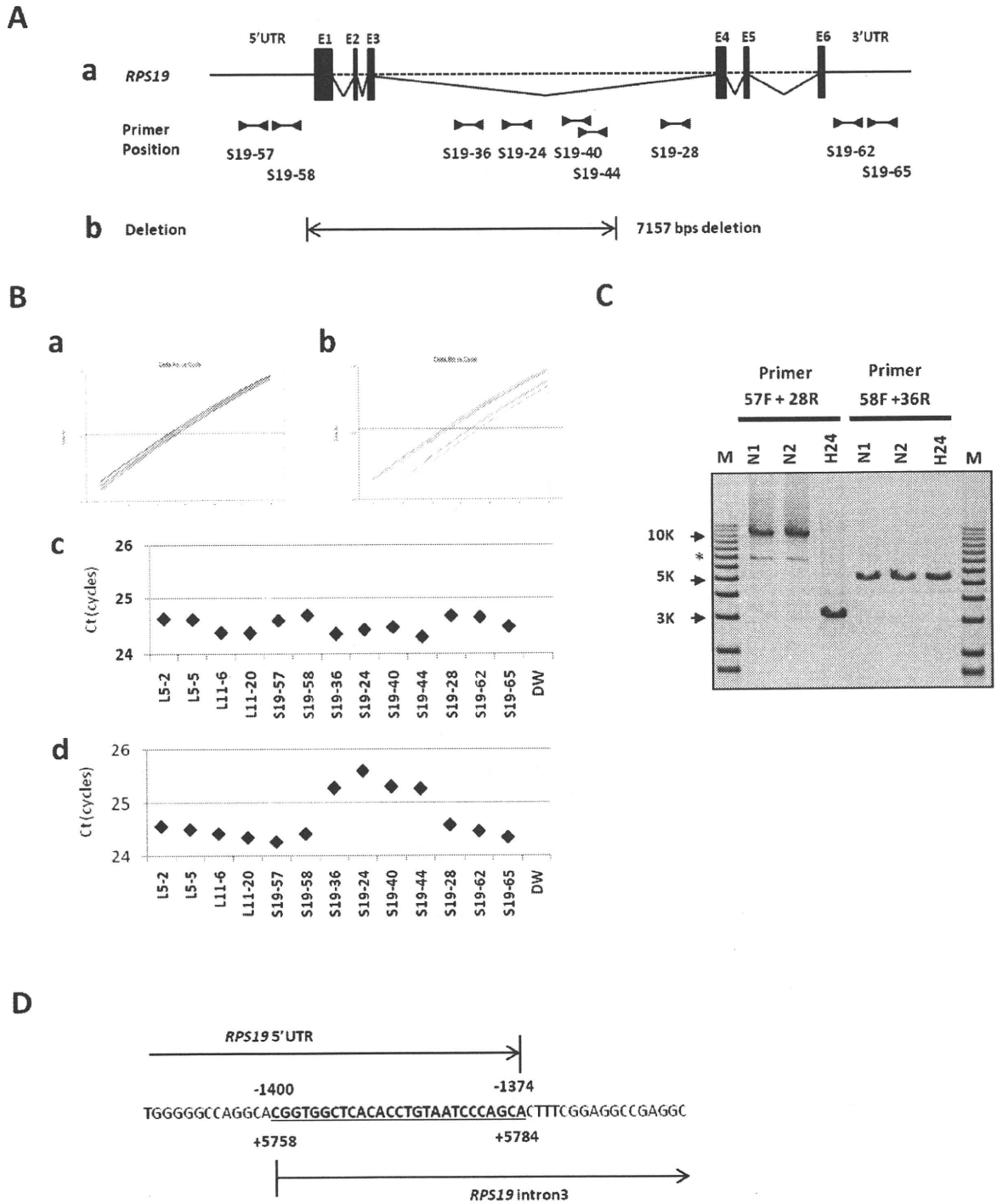
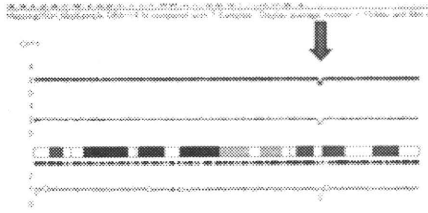


図 2. *RPS19* 遺伝子内相同組換えの検出

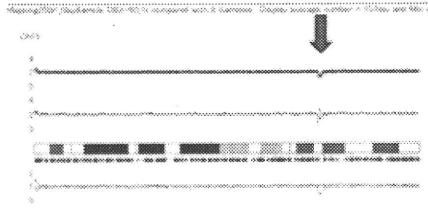
A. *RPS19* プライマーセットのゲノム上の位置 (a), 検出された欠失領域 (b)。 B. Q-PCR による遺伝子コピー数解析結果。 a, c: 健康人、b, d, DBA 患者#24 検体。 C. genomic PCR 産物の電気泳動結果。 N1, N2: 健康人検体、H24: DBA 患者#24 検体。 D. シーケンス解析によって明らかになった 23 塩基の *RPS19* の遺伝子内相同組換え領域。

Chr 15 欠失

Case 14



Case 60



Case 62

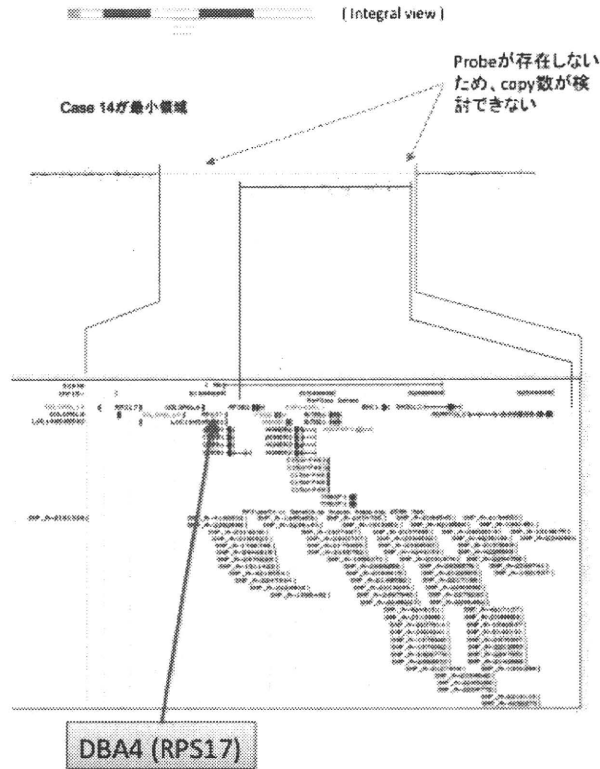
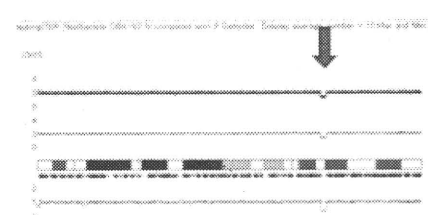


図3. SNPアレイによる片アレル欠失の解析

Q-PCR法で検出された *RPS17* 遺伝子の欠失が症例 14, 60, 62 で確認された。

II. 分担研究報告

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

リボソームタンパクの遺伝子解析

研究分担者 照井 君典（弘前大学医学部附属病院 小児科 講師）

研究要旨： Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、乳児期に発症する先天性の赤芽球癆であり、欧米ではDBA患者の約50%にリボソームタンパク（RP）の遺伝子変異がみられると報告されている。本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度と種類を明らかにするために、昨年度に引き続き7種類のRP遺伝子（*RPS19*、*RPS24*、*RPS17*、*RPL5*、*RPL11*、*RPL35a*、*RPS14*）の解析を行った。本年度は、新しく見つかったDBAの原因遺伝子*RPS10*、*RPS26*を解析に加え、新たに19例について遺伝子解析を行い、本研究で解析を行った症例は合計68例（64家系）となった。その結果、本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度は31.3%であり、欧米の約50%よりも低いことが明らかとなった。特定の遺伝子変異と臨床像との関連が示唆され、今後さらに症例数を増やして解析する予定である。

A. 研究目的

Diamond-Blackfan anemia (DBA) は、乳児期に発症する先天性の赤芽球癆である。DBA患者の約40%は種々の奇形を合併する。欧米からの報告によると、DBAの約50%にリボソームタンパク（RP）の遺伝子変異がみられるが、本邦での頻度は不明である。本研究の目的は、本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度ならびに変異の種類と臨床像の関係を明らかにすることである。

B. 研究方法

末梢血からDNAを抽出し、昨年と同様に、DBAで遺伝子変異が報告されている6遺伝子（*RPS19*、*RPS24*、*RPS17*、*RPL5*、*RPL11*、*RPL35a*）と5q-症候群の原因遺伝子*RPS14*を解析した。本年度は、新たに報告されたDBA原因遺伝子である*RPS10*と*RPS26*を解析に加えた。最初にhigh resolution melt analysis法で遺伝子変異の有無をスクリーニングし、異常の検出された検体をダイレクトシーケンシング法で解析した。

遺伝子解析は、弘前大学医学部の倫理委員会の承認を得て、本人あるいは両親の同意の上実施した。

C. 研究結果

平成22年度には新たに19例の遺伝子解析を行い、

本研究で解析した症例は68例（64家系）となった。その結果、*RPS19* 遺伝子変異が10例（8家系）で検出され、その内の2つは新しい遺伝子変異であった。*RPL5* 変異は6例、*RPL11* 変異は3例、*RPS17*、*RPS10*、*RPS26* 変異はそれぞれ1例で検出された。*RPS19*、*RPL5*、*RPL11* の遺伝子変異の頻度は、それぞれ12.5%、9.4%、4.7%であった。一方、*RPS24*、*RPL35a* および*RPS14* 遺伝子には変異を認めなかった。

奇形や成長障害などの身体的異常は約半数の患者にみられた。*RPS19* 変異をもつ患者の12例中10例に身体的異常を合併し、その内の6例は拇指の異常を有していた。口蓋裂が3名にみられ、2例で*RPL5* 変異、1例は*RPL35a* 変異を有していた。以上、本邦におけるDBA の発症者64例中20例（31.3%）にRP遺伝子の変異を認めた。

D. 考察

本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度は31.3%であり、欧米の約50%よりも低いことが明らかとなった。特に、本邦では*RPS19* 遺伝子変異の頻度が12.5%と欧米の約25%に比べて明らかに低く、このことがRP遺伝子変異全体の頻度を下げている大きな要因と考えられた。

患者の約半数が何らかの身体的異常を合併してお

り、欧米とほぼ同様の頻度であった。*RPS19* あるいは*RPL5* の変異をもつ患者の多くが身体的異常を有しており、身体的異常を高率に合併する変異であることが示唆された。拇指の異常を認めた症例の全例が*RPS19* あるいは*RPL5*、口蓋裂を認めた3例のうち2例が*RPL5* 変異をもっていたことは、特定の遺伝子変異と臨床像との関連を示唆するものであった。これらの関連を明らかにするためには、さらに多数例を解析する必要がある。

E. 結論

本邦のDBA患者におけるRP遺伝子変異の頻度は欧米よりも低いことが明らかとなった。特定の遺伝子変異と臨床像との関連が示唆され、今後さらに症例数を増やして解析する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang R, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, and Ito E. Mutation in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Haematologica* 2010; 95: 1293-1299.

2) Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Int J Hematol.* 2010; 92: 413-418.

2. 学会発表

1) 伊藤悦朗, 照井君典, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁: 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 平成22年度厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業研究事業 小島班「DKCの効果的診断方法の確立と治療ガイドラインの作成に関する研究」伊藤班「DBAの効果的診断法の確立に関する研究」合同班会議, 名古屋, 2010.9.4.

2) 伊藤悦朗, 照井君典, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁: 先天性赤芽球癆 (Diamond Blackfan貧血) の効果的診断法の確立に関する研究. 先天性造血不全シンポジウム, 浦安市, 2011.2.4.

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（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan貧血）の効果的診断法の確立に関する研究

中央診断、データ管理

研究分担者 小島 勢二（名古屋大学大学院医学系研究科 小児科学 教授）

研究要旨：日本小児血液学会は平成 21 年 2 月より再生不良性貧血（AA）、骨髄異形性症候群（MDS）および先天性造血不全症候群（CBFS）を対象とした中央診断を開始した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を 2 施設（名古屋大学、聖路加国際病院）で、骨髄病理標本を 1 施設（名古屋第一赤十字病院）で行っている。レビュー開始から 16 ヶ月間で 223 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 95 例、MDS が 20 例（CBFS3 例を含む）、若年性骨髄単球性白血病（JMML）が 27 例、CBFS が 20 例、急性白血病が 16 例、その他が 48 例であった。CBFS20 例のなかに Diamond-Blackfan 貧血（DBA）が 6 例含まれていた。AA、MDS および DBA を含む CBFS の診断は必ずしも容易ではなく、中央診断を行うことによりその診断の精度が上昇したと考えられる。

A. 研究目的

小児AA、MDSおよびDBAを含むCBFSは比較的まれな疾患で、その診断は必ずしも容易ではない。そこで日本小児血液学会においてAA、MDSおよびCBFSを対象とした中央診断を行うことになった。

B. 研究方法

中央診断事務局を名古屋大学小児科に設置した。AA、MDS、あるいはCBFSが疑われる症例が発生した場合は、各施設から事務局に連絡をもらい、登録番号を発行した。レビューは骨髄および末梢血塗抹標本を2施設（名古屋大学小児科、聖路加国際病院小児科）で、骨髄病理標本を1施設（名古屋第一赤十字病院病理部）で行った。

（倫理面への配慮）

中央診断およびそれに伴う検査については、名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得、患者及び患者保護者の同意を取得した後に行った。

C. 研究結果

レビュー開始から 16 ヶ月間で 223 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 95 例、MDS が 20 例（CBFS3 例を含む）、JMML が 27 例、CBFS が 20 例、急性白血病が 16 例、その他 48 例であった。CBFS20 例の中に DBA が 6 例含まれていた。2010

年に DBA と新規診断された 2 例の詳細は以下のとおりである。

症例1：2歳5ヵ月女児。28週、770 g超低出生体重児として出生。外表奇形なし。WBC 6,000/ μ l、RBC 135万/ μ l、Hb 3.6 g/dl、Ht 10.8%、MCV 80 fl、Ret 0%、Plt 23万/ μ l。骨髄像：赤芽球は全体の1.5%で好塩基性赤芽球までは観察された。

症例2：生後9ヵ月女児。外表奇形なし。WBC 7,900/ μ l、Hb 3.0 g/dl、Ht 9.4%、MCV 76 fl、Ret 2%、Plt 18.8万/ μ l。骨髄像：赤芽球は全く観察されなかった。

D. 考察

先天性AAは今回検討した症例の約10%を占め、Fanconi貧血、DC、SDD、CAMTなどが代表的な疾患である。そのうちDBAは6例みられた。外表奇形の合併が知られているが、実際に確認されているのは1例のみであった。骨髄ではいずれも赤芽球の著明な減少がみられた。2例を除いてわずかに赤芽球を認め、いずれも前赤芽球までの分化を認めた。骨髄像から類推するに、赤芽球が全く消失する物と前赤芽球レベルで成熟停止が起こるものの2つのタイプの存在が考えられる。DBAと診断された症例については弘前大学小児科に遺伝子解析を依頼しているが、1例でRPL5変異が確認された。