

情報を除外して分担研究者が収集処理し、倫理面での配慮を行うこととした。

統計学的検討には、t検定とFisherの直接確率計算法を用い、 $p<0.05$ を有意とした。

C. 研究結果

<調査Ⅰ>

アンケート調査を2010年11月に実施した。2011年2月末日の回収率は29.2%で、118施設中53施設から解答を得た。

施設の背景は、総合周産期施設19、地域周産期施設17、残りがその他であった(図1)。2006-2009年の4年間の、TAM症例は70例で、各施設でのダウン症の総数に対する割合は10.2%であった。

「貴施設で、TAM症例に遭遇したら相談できる小児血液専門医はいますか」との問いに対する回答では、「いる」が33施設と半分以上を占めた(図2)。が、日本小児血液学会に疾患登録されていたのは上記の70例中23例(31.2%)と多くはなかった。未登録のうち、2次調査票が得られたTAM35症例について、詳細に解析した。

<調査Ⅱ>

2010年2月に実施したアンケート調査で、2010年8月までに144施設から返答があり、回収率は42.2%であった。

2006-2008年の3年間の、TAM症例は42例で、各施設でのダウン症の総数に対する割合は8.0%であった。このうち、日本小児血液学会にすでに登録されていた6例を除くTAM36症例の詳細について、2次調査票を解析した。

<調査Ⅲ>

アンケート調査を2010年5月に実施した。2010年8月末日の回収率は44.3%で、346施設中151施設から解答を得た。

施設の背景は、総合周産期施設20、地域周産期施設71、残りがその他であった。サーベイランス参加施設2009年の1年間のTAM症例は19例で、各施設でのダウン症の総数に対する割合

は6.6%であった。

日本小児血液学会に疾患登録されていたのは上記の19例中6例であった。未登録のうち、2次調査票が得られたTAM12症例について、詳細に解析した。

<調査Ⅳ>

2006～2009年の新生児施設でのダウン症症例の中でTAM症例の割合は、サーベイランス参加施設で10.6%、非参加施設で7.1%、全体で8.6%であった。

i) 生存例と死亡例の比較

調査Ⅰ～Ⅲをまとめると、4年間でTAM症例は計136例あり、そのうち小児血液学会の疾患登録されていない、2次調査票の得られた症例は77例であった。77例中生後6ヶ月以内の早期死亡例は、19例で、死亡率は24.7%であった。遠隔期に死亡した症例は2例で、死因はRSウイルス感染症と慢性肺疾患であったため、TAMと直接の関連がないと判断し、生存例に含めて検討した。

生後6ヶ月の時の生存例(以下生存例)58例と同時期の死亡例(以下早期死亡例)19例を比較した。

単変量解析では、出血症状の有無、人工呼吸管理の有無、人工呼吸管理期間、全身浮腫、肝脾腫、初診時芽球数、初診時白血球数、AST値、ALT値、LDH値、APTT値、プロコラーゲンⅢペプチド(PⅢP)値が有意な差を認めた。

多変量解析では、出血症状と全身浮腫が、早期の死亡と強い関連があった。芽球数、白血球数、AST値、ALT値、LDH値は関連が疑われた。

ii) サーベイランス参加施設症例と非参加施設症例の比較

2006-2009年のTAM症例は、サーベイランス参加施設53施設から70症例、非参加施設のべ206施設から66症例あり、そのうちそれぞれ35、44症例の2次調査票が検討された。参加施設、非参加施設間では、どの項目についても差がなかったが、化学療法施行例は、サーベイランス参加施設10例と非参加施設4例で、参加施設の方

が多かった。

iii) 化学療法施行症例について

化学療法施行例 13 例について検討した。化学療法開始日令は中央値 9 (範囲 1-50)、AraC 投与量は平均 $1.03 \pm SD 0.53 \text{ mg/kg/日}$ で、投与日数は平均 6.2 ± 1.9 日であった。早期死亡例は 5 例であった。

有害事象の検討では、有害事象 grading 表に基づいて評価し、各項目における grade の中央値は、血液所見に関する項目 (Hb 値、白血球数、好中球数、Plt 値) では 3~4 であったが、そのほかはすべて 0~1 であった。

D. 考察

＜サーベイランス参加施設と非参加施設への調査＞

今年度より、日本未熟児新生児学会の新生児希有疾患前方視的サーベイランス事業で、ダウン症に合併した TAM 症例の登録が 3 年間の予定で開始しており、症例報告が、サーベイランス参加施設のモニター員よりなされている。これと並行して、同学会新生児希有疾患サーベイランス委員会の許可のもと、サーベイランス参加施設に対して、2006 から 2009 年までの TAM 症例に関する後方視的調査を計画、実施した。サーベイランス参加施設は、全国で 118 施設あり、施設背景を図 1 に示した。

この調査に先だって、本年度は、日本周産期新生児学会周産期 (新生児) 専門医研修施設に登録された 460 施設のうち、サーベイランス参加施設を除いた非参加施設に対して、昨年度の 2006~2008 年の症例についての調査に引き続き、2009 年の症例について同様の調査を行った。昨年度の調査結果と統合して検討を加えた。施設背景を、サーベイランス参加施設と比較した (図 1)。全国の総合周産期施設、地域周産期施設はそれぞれ 84 施設、342 施設 (2010 年 4 月 1 日現在) あり、今回の調査では、これらの施設の総数の中の、総合周産期施設の 56%、地域周産期施設

の 32% にあたる施設からの回答を得た。また、サーベイランス非参加施設の半数近くは、総合・地域周産期施設に含まれない施設であり、一部の国立病院の他、地域の基幹病院のうち、基準は満たさないが第一線で新生児医療を担う多くの中規模病院が含まれていると考えられ、実際のダウン症や TAM が様々の規模の病院で発見、治療されていることが伺われた。

同時に、小児血液専門医の有無を問う質問では、サーベイランス参加施設では 62% の施設で小児血液専門医がいるのに対し、サーベイランス非参加施設では 47% と、半分以上の施設では TAM やその他の血液疾患について治療できる小児血液専門医がいなかった。中には、昨年度の調査ではいると回答したが、本年度の調査でいないとの回答であった施設もあり、小児血液専門医の希少性が明らかとなった。さらに、TAM の疾患登録が行われているかという点では、サーベイランス施設で 33%、サーベイランス非参加施設で 25% と差は小さかった。

両施設群の 2 次調査を比較すると、臨床症状や検査所見、予後に差はなく、重症度や病態は各々の施設で経験される TAM の間に差はなかった。治療の面で、輸血、交換輸血、ステロイドといった補助療法は差がなかったが、化学療法施行例は、サーベイランス参加施設で多かった。2009 年までの症例では、施設群間で治療に差がみられたが、今後、非参加施設でも化学療法施行例がさらに増加し、差は縮小すると考えられた。

＜2 次調査票の検討から＞

今回の新生児施設の 2006~2009 年の 4 年間の後方視的検討で得られたデータからは、出血症状と全身浮腫が、早期死亡と強い関連があり、その他、芽球数や白血球数の増多といった白血病としての因子と、肝逸脱酵素や LDH などの肝障害を表す因子の関与が示唆された。これまでに行われた検討で、重症化に関与する因子として、村松らの報告¹⁾は 37 週未満の在胎週数と 10 万以上の初診時白血球数の 2 点が明らかとなった。

Klusmannらの報告²⁾では、白血球数増多、腹水、早産、出血性素因、自然緩解しなかったことが生後 6 ヶ月以内の早期死亡との間に、関連が見いだされた。また、COG study の報告³⁾では、白血球数増多、ビリルビンや肝酵素の増加、自然緩解しなかったことが、生後 9 ヶ月以内の早期死亡と関連があった。今回のデータから導き出された関連因子は、これらと共通するものが多く、妥当性が裏付けられた。また以上の因子から、ダウン症に見られるTAMは、一過性白血病としての性質と、肝繊維症、凝固異常や閉塞性黄疸といった肝機能障害で特徴づけられる面の片方または両方を有する可能性が推察された。

E. 結論

TAM 症例の全体像を明らかにし、治療を含む管理法を正しく評価する目的で、日本小児血液学会の疾患登録や前方視的観察研究、および日本未熟児新生児学会稀有疾患サーベイランス委員会の前方視的稀有疾患サーベイランスと並行して、サーベイランス参加施設と非参加施設に対して、TAM に関する後方視的アンケート調査を行った。この結果を解析することで、新生児施設で経験される TAM 症例の概要を推測することが可能となった。今後、このデータを日本小児血液学会の登録で得られた症例情報と統合し解析することで、全数登録調査をより実体に即したものとしていくことが重要と考えられた。さらに、今年度以降、前方視的に集積されるデータにより、より多くの症例での検討がなされ、化学療法の効果・安全性などが明らかにされることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

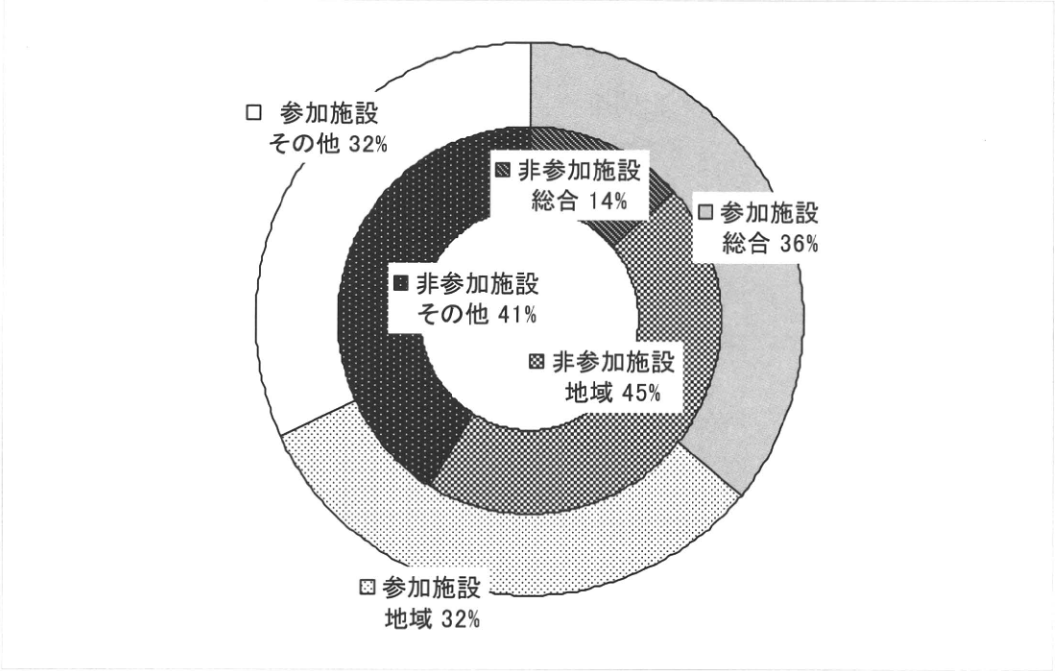
I. 研究協力者

なし

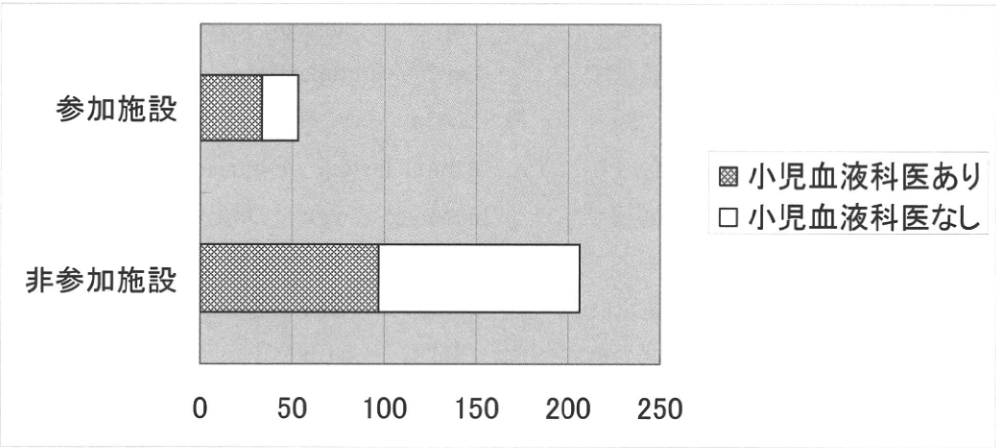
参考文献:

- 1) Muramatsu, H et al. Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukemia. Blood, 2008, 142(4): 610-5
- 2) Klusmann, JH et al. Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. Blood, 2008, 111(6): 2991-8
- 3) Massay, GV et al. A prospective study of natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. Blood, 2006, 107(12): 4606-13

(図 1)施設背景



(図 2)小児血液専門医はいますか？



(資料1)

2次調査票①-1

TAM 後方視的調査アンケート用紙①

性別：男・女	施設名：_____	生年月日：西暦_____
診断年月日：西暦_____	担当医師名：_____先生	

<初診時臨床所見>

※ 治療開始前の値をご記入ください。あてはまる項目の□にレ点をご記入ください。なお、空欄を残さないようにご記入ください。

在胎週数	_____週	出生体重	_____g
基礎疾患	☐ ダウン症候群 ☐ モザイクダウン症候群 ☐ 非ダウン症候群		
胎内診断	☐ なし ☐ あり⇒	詳細	
身体的特徴	☐ なし ☐ あり⇒ ☐ 特異顔貌 ☐ その他(詳細: _____)		
合併奇形	心奇形	☐ なし ☐ あり⇒	詳細 _____
	その他の合併奇形	☐ なし ☐ あり⇒	詳細 _____
出血症状	☐ なし ☐ あり⇒	出血部位	☐ 脳 ☐ 消化管 ☐ 肺 ☐ その他(_____)
呼吸障害	酸素投与	☐ なし ☐ あり⇒	投与日数 _____ 日間
	人工呼吸管理	☐ なし ☐ あり⇒	管理日数 _____ 日間
体液貯留	胸水	☐ なし ☐ あり⇒	出現日 20____年____月____日
	腹水	☐ なし ☐ あり⇒	出現日 20____年____月____日
	心嚢水	☐ なし ☐ あり⇒	出現日 20____年____月____日
	全身浮腫	☐ なし ☐ あり⇒	出現日 20____年____月____日
臓器腫大・浸潤	肝臓	☐ なし ☐ あり⇒	季節下 _____ cm
	脾臓	☐ なし ☐ あり⇒	季節下 _____ cm
	皮膚	☐ なし ☐ あり	
	精巣	☐ なし ☐ あり ☐ 女児	
	その他	☐ なし ☐ あり⇒	部位 _____ 詳細 _____
骨髄評価項目	骨髄穿刺	☐ なし ☐ あり⇒	検査日 _____ 月 _____ 日
	有核細胞数	_____ / μ L	腫瘍芽球 _____ % dry tap ☐ なし ☐ あり
	巨核球数	_____ / μ L	赤芽球系 _____ %
	顆粒球系	_____ %	リンパ球系 _____ %
	線維化	☐ なし ☐ あり	
	異型性	☐ なし ☐ あり⇒ ☐ 顆粒球系 ☐ 赤芽球系 ☐ 巨核球系	

2次調査票①-2

※ 検査を行っていない場合は「×」をご記入ください。

末梢血算	検査日	月	日	腫瘍芽球	%
	白血球数	/μL		赤血球数	万/μL
	好中球数	/μL		ヘモグロビン	g/dL
	リンパ球数	%		ヘマトクリット	%
	単球数	%		血小板数	万/μL
	好酸球数	%		網状赤血球数	‰
	好塩基球数	%		有核赤血球数	/μL
凝固	検査日	月	日	Fibrinogen	mg/dL
	PT	%		FDP	μg/mL
	APTT	秒		ATⅢ	%
	Protein C	%		D-dimer	μg/mL
血液生化学	検査日	月	日	UA	mg/dL
	T.bil	g/dL		LDH	IU/L
	D.Bil	g/dL		ヒアルロン酸	ng/mL
	AST	IU/L		4型コラーゲン	ng/mL
	ALT	IU/L		プロコラーゲンⅢペプチド	U/mL

各種検査	細胞表面マーカー	末梢血	☐ 未施行 ☐ 実施	☐ 結果（陽性抗原 （20%以上）を列記）			
		骨髄	☐ 未施行 ☐ 実施	☐ 結果（陽性抗原 （20%以上）を列記）			
	遺伝子検査	遺伝子異常	GATA1	☐ なし ☐ あり			
			その他	☐ なし ☐ あり（詳細：_____）			
	染色体検査	ダウン症候群の診断 生殖細胞の評価 (germline)	☐ PHA 添加 末梢血 ☐ 姉妹膜 ☐ 皮膚線維芽細胞 ☐ 爪	G-band 内容			☐ 未実施
			FISH 内容	+21 (_____) %		☐ 未実施	
	TAM細胞の評価 体細胞の評価 (somatic)	末梢血		骨髄			
		☐ PHA 未添加 ☐ 未実施	G-band 内容：		☐ PHA 未添加 ☐ 未実施	G-band 内容：	

記入年月日：西暦 _____ 年 _____ 月 _____ 日 記入者名： _____

2次調査票②-1

TAM 後方視的調査アンケート用紙②

性別：男・女	施設名：_____	生年月日：西暦_____
診断年月日：西暦_____	担当医師名：_____先生	

<治療介入>

※ 診断日から現在までの状態をご記入ください。あてはまる項目の□にレ点をご記入ください。

支持および化学療法	支持療法	□なし □あり⇒	交換輸血	□なし □あり(回数：_____回)
			ステロイド投与	□なし □あり⇒□mPSL □PSL □HDC □その他(_____)
			その他の支持療法	□なし □あり(詳細：_____)
	化学療法 (ステロイド含まない)		□なし □あり⇒2次調査票③、④をご記入のうえご提出ください	

<転帰>

※ 診断日から現在までの状態をご記入ください。

TAM 芽球の消失	□なし □あり⇒	芽球消失日	20 年 月 日
MDS の発症	□なし □あり⇒	発症日	20 年 月 日
		病型	
白血病の発症	□なし □あり⇒	発症日	20 年 月 日
		病型	
最終確認日	20 年 月 日		
生死	□生存 □死亡⇒	死亡日	20 年 月 日
		死因	

記入年月日：西暦_____年_____月_____日 記入者名：_____

③ IATAM 後方視的調査アンケート調査票 (化学療法施行中毎日の経過をご記入ください)

※もしも不足する場合にはコピーしてください

患者情報 記入氏名

[illegible]

治療期間 20 年 月 日 ~ 月 日までの間 身長: cm 体重: kg (測定日: 月 日)

Day			Date													
Day			Date													
高橋氏	要投与量	投与状況	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
シタリピン (AsC)	mg	500 (1時間経過)														
	mg	mg														
	mg	mg														
	mg	mg														
	mg	mg														
	mg	mg														
WBC(μL)	検査値を記入→															
PT-INR(N)	検査値を記入→															
特記事項																

●

[illegible]

2 次調査票④-2

TAM 後方視的調査アンケート調査票④:有害事象/入院治療中

(p.1/2)

患者情報

治療終了後 1 ヶ月間のデータをご記入下さい

末梢血所見および発熱の期間	発熱 38 度以上	日	白血球 1000 未満	日	好中球 500 未満	日
血液製剤の使用	赤血球輸血	回	血小板輸血	回		
DIC grade 2 以上の場合に ご記入ください	FFP 投与回数	回				
	その他の DIC 治療薬 使用の有無	☐ なし ☐ あり → ☐ フサン ☐ FOY ☐ ATIII 製剤 ☐ その他()				

<grading表> 上記期間での最重症の内容に○をご記入下さい。

有害事象	0	1	2	3	4	5
血液・骨髓	Hb	正常	< LLN-10.0g/dL	< 10.0-8.0g/dL	< 8.0-6.5g/dL	< 6.5g/dL
	白血球	正常	< LLN-3000/ μ L	< 3000-2000/ μ L	< 2000-1000/ μ L	< 1000/ μ L
	好中球	正常	< LLN-1500/ μ L	< 1500-1000/ μ L	< 1000-500/ μ L	< 500/ μ L
	血小板	正常	< LLN-7.5 万/ μ L	< 7.5 万-5.0 万/ μ L	< 5.0 万-2.5 万/ μ L	< 2.5 万/ μ L
心臓全般	左室収縮機能不全	なし	症状がなく、安静時の駆出率(EF)が <60-50%;左室収縮率(SF)<30-24%	症状がなく、安静時のEF: <50-40%;SF:<24-15%	症状があり、治療に反応するうっ血性心不全: EF:<40-20%;SF:<15%	治療に反応しないうっ血性心不全またはコントロールが不良;EF<20%;心室補助装置、心室縮小手術、または心臓移植などの処置を要する
凝固	DIC	なし	—	検査値異常はあるが出血症状なし	検査値異常および出血症状あり	検査値異常があり、かつ生命を脅かすまたは活動不能/動作不能(例:中枢神経出血、臓器障害、循環動態上重大な失血)
	フィブリノゲン	正常	<1.0-0.75×LLN またはベースラインの数値より <25%の減少	<0.75-0.5×LLN またはベースラインの数値より 25-<50%の減少	<0.5-0.25×LLN またはベースラインの数値より 50-<75%の減少	<0.25×LLN またはベースラインの数値より ≥75%の減少 または < 50mg/dL(絶対値)
全身症状	発熱	なし	38.0-39.0℃	>39.0-40.0℃	>40.0℃が ≤24 時間持続	>40.0℃が >24 時間持続
内分泌	SIADH	正常	症状がない	症状があるが日常生活に支障がない;治療を要する	症状があり、日常生活に支障あり	生命を脅かす
消化管	粘膜炎/口内炎(診察所見)	なし	粘膜の紅斑	底状潰瘍または偽膜	融合した潰瘍または偽膜; わずかな外傷で出血	組織の壊死; 顕著な自然出血; 生命を脅かす
	悪心	なし	摂食習慣に影響のない食欲低下	顕著な体重減少、脱水または栄養失調を伴わない経口摂取量の減少; <24 時間の静脈内輸液を要する	カロリーや水分の経口摂取が不十分; ≥24 時間の静脈内輸液/経管栄養/TPNを要する	生命を脅かす
	嘔吐	なし	24 時間に 1 エピソードの嘔吐	24 時間に 2-5 エピソードの嘔吐; <24 時間の静脈内輸液を要する	24 時間に ≥6 エピソードの嘔吐; ≥24 時間の静脈内輸液または TPN を要する	生命を脅かす
	イレウス(神経性便秘)	なし	症状がなく、画像所見のみ	症状がある;消化管機能に変化(例:摂食習慣の制約); <24 時間の静脈内輸液を要する	症状があり;消化管機能に高度の変化 ≥24 時間の静脈内輸液/を要する経管栄養/TPNを要する	生命を脅かす
	下痢	なし	ベースラインと比べて <4 回/日の排便回数増加;	ベースラインと比べて 4-6 回/日の排便回数増加; <24 時間の静脈内輸液を要する	ベースラインと比べて ≥7 回/日の排便回数増加; 便失禁; ≥24 時間の静脈内輸液を要する;入院を要する	生命を脅かす (循環動態の虚脱)
出血	泌尿生殖器出血-選択	なし	わずかな/顕微鏡的な出血;治療を要さない	肉眼的出血;内科的治療または尿路の洗浄を要する	輸血/IVR による処置/内視鏡的処置/外科的処置を要する;放射線照射(出血部位に対する止血目的)	生命を脅かす; 大がかりな(major)緊急処置を要する
肝胆臓	膵炎	なし	症状がなく、酵素の上昇および/または画像所見あり	症状があり、内科的治療を要する	IVR による処置/外科的処置を要する	生命を脅かす (例:循環器不全、出血、敗血症)

※ LLN:施設基準値下限 ULN:施設基準値上限(各年齢別施設基準値)

2次調査票④-2

TAM 後方視的調査アンケート調査票④:有害事象/入院治療中

(p.2/2)

患者情報

<grading表> 治療終了後1ヶ月間での最重症の内容に○を記入下さい。

有害事象	0	1	2	3	4	5
代謝/臨床検査値						
クレアチニン	正常	>ULN-1.5×ULN	>1.5×ULN-3.0×ULN	>3.0×ULN-6.0×ULN	>6.0×ULN	死亡
高血糖	正常	>ULN-160mg/dL	>160-250mg/dL	>250-500mg/dL	>500mg/dL	死亡
蛋白尿	正常	1+または 0.15-1.0g/24時間	2+~3+または >1.0-3.5g/24時間	4+または >3.5g/24時間	ネフローゼ症候群	死亡
AST,SGOT	正常	>ULN-2.5×ULN	>2.5-5.0×ULN	>5.0-20.0×ULN	>20.0×ULN	-
ALT,SGPT	正常	>ULN-2.5×ULN	>2.5-5.0×ULN	>5.0-20.0×ULN	>20.0×ULN	-
ビリルビン	正常	>ULN-1.5×ULN	>1.5-3.0×ULN	>3.0-10.0×ULN	>10.0×ULN	死亡
筋骨格						
骨壊死	なし	症状がなく、画像所見のみ	症状があり、機能障害があるが日常生活には支障がない;最小限の骨切除術を要する(すなわち腐骨切除術)	症状があり、日常生活には支障がある;外科的処置または高圧酸素療法を要する	活動不能/動作不能	死亡
アレルギー/免疫						
アレルギー反応/過敏症	なし	一過性の潮紅あるいは皮膚疹; <38℃の薬剤熱	皮膚疹;潮紅;蕁麻疹;呼吸困難; ≥38℃の薬剤熱	蕁麻疹の有無によらず症状のある気管支痙攣;非経口的治療を要する;アレルギーによる浮腫/血管性浮腫;血圧低下	アナフィラキシー	死亡
症候群						
腫瘍溶解症候群(TLS)	なし	-	-	あり	-	死亡
血管						
血栓症/塞栓症	なし	-	深部静脈血栓症または心内血栓;処置は要さない(例:抗凝固薬、血栓溶解剤、フィルター、侵襲的処置)	深部静脈血栓症または心内血栓;処置を要する(例:抗凝固薬、血栓溶解剤、フィルター、侵襲的処置)	肺塞栓症を含む塞栓症;生命を脅かす	死亡
有害事象(感染)						
発熱性好中球減少 (ANC < 1.0 × 10 ⁹ /L、発熱 ≥ 38.5℃)(臨床的または微生物学的に感染が確認されない感染原因不明の発熱)	なし	-	-	あり	生命を脅かす (例:敗血症性ショック、血圧低下、アシドーシス、壊死)	死亡
Grade3-4の好中球減少を伴う感染 (臨床的または微生物学的に確認)(ANC < 1.0 × 10 ⁹ /L)	なし	-	限局性、局所的処置を要する	抗生物質の静脈内投与/抗真菌剤/抗ウイルス剤による治療を要する;IVRによる処置/外科的処置を要する	生命を脅かす (例:敗血症性ショック、血圧低下、アシドーシス、壊死)	死亡
好中球数が正常またはgrade1-2の好中球減少を伴う感染	なし	-	限局性、局所的処置を要する	抗生物質/抗真菌剤/抗ウイルス剤の静脈内投与による治療を要する;IVRによる処置/外科的処置を要する	生命を脅かす (例:敗血症性ショック、血圧低下、アシドーシス、壊死)	死亡
好中球数が不明な感染	なし	-	限局性、局所的処置を要する	抗生物質/抗真菌剤/抗ウイルス剤の静脈内投与による治療を要する;IVRによる処置/外科的処置を要する	生命を脅かす (例:敗血症性ショック、血圧低下、アシドーシス、壊死)	死亡
血培	□未実施 □実施⇒ □陽性 □陰性					
CRP最高値	mg/dL					
38度以上の有熱期間(38度以上が1日に1回でも認められれば1日としてカウントする)	H					
その他の有害事象(grade3以上)有無 □なし □あり ⇒下記記入欄にご記入ください						
有害事象項目名(CTCAEv3.0に準ずる)	grade	有害事象項目名(CTCAEv3.0に準ずる)	grade			
予期される有害事象						
予期されない有害事象						
※LLN:施設基準値下限 ULN:施設基準値上限(各年齢別施設基準値)。						

記入年月日:20 年 月 日 記入医師名:

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang R, 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
林 泰秀.	ダウン症候群に発症した transient abnormal myelopoiesis (TAM) への対応	周産期医学	40	937-941	2010
川村眞智子, 菊地 陽	特集: 新 WHO 分類 - MDS 委員会/白血病委員会 ダウン症候群に関連した骨髄増殖症 -2008 WHO 分類より-	日本小児血液学会雑誌	24	168-174	2010
Shiba N, Kato M, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, Hayashi Y.	CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome.	Leukemia	24	1090-1092	2010
Shiba N, Taki T, Park MJ, Nagasawa M, Kanazawa T, Takita J, Ohnishi H, Sotomatsu M, Arakawa H, Hayashi Y.	CBL mutation in childhood therapy - related leukemia.	Leukemia			(in press)
Oki K, Takita J, Hiwatari M, Nishimura R, Sanada M, Okubo J, Adachi M, Sotomatsu M, Kikuchi A, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S.	IDH1 and IDH2 mutations are rare in pediatric myeloid malignancies.	Leukemia	25	382-384	2011

Kawamura M, Kaku H, Ito T, Funata N, Taki T, Shimada A, Hayashi Y.	FLT3-internal tandem duplication, CD56 expression, and obstructive jaundice due to granulocytic sarcoma at relapse in a pediatric patient with t(8;21) acute myeloid leukemia.	Cancer Genet Cytogenet	203	292-296	2010
Taketani T, Taki T, Nakamura T, Ohyashiki K, Kobayashi Y, Fukuda S, Yamaguchi S, Hayashi Y.	High frequencies of simultaneous FLT3-ITD and WT1 mutations in myeloid leukemia with NUP98-HOX fusion genes.	Leukemia	24	1975-1977	2010
Ogawa S, Takita J, Sanada M, Hayashi Y.	Oncogenic mutations of ALK in neuroblastoma.	Cancer Science	102	302-308	2011
Seki M, Kimura H, Mori A, Shimada A, Yamada Y, Maruyama K, Hayashi Y, Agematsu K, Morio T, Yachie A, Kato M.	Prominent eosinophilia but less eosinophil activation in a patient with Omenn syndrome.	Pediatr Int	52	e196-199	2010
Shiba N, Kanazawa T, Park MJ, Okuno H, Shiba N, Kanazawa T, Park MJ, Okuno H, Tamura K, Tsukada S, Hayashi Y, Arakawa H.	NOTCH1 mutation in a female with myeloid /NK cell precursor acute leukemia.	Pediatr Blood Cancer	55	1406-1409	2010
Minobe K, Ono R, Matsumine A, Shibata-Minoshima F, Izawa K, Oki T, Kitaura J, Iino T, Takita J, Iwamoto S, Hori H, Komada Y, Uchida A, Hayashi Y, Kitamura T, Nosaka T.	Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma.	Int J Oncol	37	569-581	2010

Mizushima Y, Taki T, Shimada A, Yui Y, Hiraumi Y, Matsubara H, Watanabe M, Watanabe K, Kamitsuji Y, Hayashi Y, Tsukimoto I, Kobayashi R, Horibe K, Tawa A, Nakahata T, Adachi S.	Prognostic significance of the BAALC isoform pattern and CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia with normal karyotype: a study by the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group.	Int J Hematol	91	831-837	2010
Komono Y, Kitaura J, Watanabe-Okochi N, Kato N, Oki T, Nakahara F, Harada Y, Harada H, Shinkura R, Nagaoka H, Hayashi Y, Honjo T, Kitamura T.	AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model.	Leukemia	24	1018-1024	2010
Tsuchida M, Ohara A, Manabe A, Kumagai M, Shimada H, Kikuchi A, Mori T, Saito M, Akiyama M, Fukushima T, Koike K, Shiobara M, Ogawa C, Kanazawa T, Noguchi Y, Oota S, Okimoto Y, Yabe H, Kajiwarra M, Tomizawa D, Ko K, Sugita K, Kaneko T, Maeda M, Inukai T, Goto H, Takahashi H, Isoyama K, Hayashi Y, Hosoya R, Hanada R; Tokyo Children's Cancer Study Group.	Long-term results of Tokyo Children's Cancer Study Group trials for childhood acute lymphoblastic leukemia,	Leukemia	24	383-396	2010
Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Hatura H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyora M, Tajima S, Iwama A, Mano H.	Array-based genomic resequencing of human leukemia.	Oncogene	29	3723-31	2010

Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley RE, 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	580-585	2010
Watanabe M, Nakahata S, Hamasaki M, Saito Y, Kawano Y, Hidaka T, Yamashita K, Umeki K, Taki T, Taniwaki M, Okayama A, Morishita K.	Down-regulation of CDKN1A in adult T cell leukemia/lymphoma despite overexpression of CDKN1A in HTLV-1-infected cell lines.	J Virol	84	6966-6977	2010
Onda K, Iijima K, Katagiri YU, Okita H, Saito M, Shimizu T, Kiyokawa N.	Differential effects of BAFF on B cell precursor acute lymphoblastic leukemia and Burkitt lymphoma.	Int J Hematol	91	808-19.	2010
Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, Weiss T, Nowak D, Koren-Michowitz M, Kato M, Sanada M, Shih LY, Nagler A, Raynaud SD, Muller-Tidow C, Mesa R, Haferlach T, Gilliland DG, Tefferi A, Ogawa S, Koeffler HP.	Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms.	Blood	115	2882-2890	2010
Ogawa S, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP, Sanada M.	Deregulated intracellular signaling by mutated c-CBL in myeloid neoplasms.	Clin Cancer Res	16	3825-3831	2010
Ogawa S, Sanada M, Shih LY, Suzuki T, Otsu M, Nakauchi H, Koeffler HP.	Gain-of-function c-CBL mutations associated with uniparental disomy of 11q in myeloid neoplasms.	Cell Cycle	9		2010
Isoyama K, Oda M, Kato K, Nagamura-Inoue T, Kai S, Kigasawa H, Kobayashi R, Mimaya J, Inoue M, Kikuchi A, Kato S	Long-term outcome of cord blood transplantation from unrelated donors as an initial transplantation procedure for children with AML in Japan.	Bone Marrow Transplant	45	69-77	2010

Matsuda K, Sakashita K, Taira C, Tanaka -Yanagisawa M, Yanagisawa R, Shiohara M, Kanegane H, Hasegawa D, Kawasaki K, Endo M, Yajima S, Sasaki S, Kato K, Koike K, Kikuchi A, Ogawa A, Watanabe A, Sotomatsu M, Nonoyama S, Koike K.	Quantitative assessment of PTPN11 or RAS mutations at the neonatal period and during the clinical course in patients with juvenile myelomonocytic leukaemia.	Br J Haematol	148	593-599,	2010
Muramatsu H, Makishima H, Jankowska AM, Cazzolli H, O'Keefe C, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP.	Mutations of E3 ubiquitin ligase Cbl family members but not TET2 mutations are pathogenic in Juvenile Myelomonocytic Leukemia.	Blood	115	1969-1975	2010
Asai E, Wada T, Sakakibara Y, Toga A, Toma T, Shimizu T, Nampoothiri S, Imai K, Nonoyama S, Morio T, Muramatsu H, Kamachi Y, Ohara O, Yachie A.	Analysis of mutations and recombination activity in RAG- deficient patients.	Clin Immunol	138	172-177	2011
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	15	161-166	2010
Sugimoto Y, Muramatsu H, Makishima H, Prince C, Jankowska AM, Yoshida N, Xu Y, Nishio N, Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Kato K, Manabe A, Kojima S, Maciejewski JP.	Spectrum of molecular defects in juvenile myelomonocytic leukaemia includes ASXL1 mutations.	Bri J Haemat	150	83-87	2010

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	117	2887-2890	2010
山内芳忠・近藤 裕一・長谷川久 弥平野慎也・藤 村正哲	新生児希有疾患（病態） 前方視的サーベイランス事業 趣旨、実施概略ならび 登録状況	日本未熟児新 生児学会雑誌	22巻1号		2010

IV. 研究成果の代表的論文

Down syndrome and *GATA1* mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia

*Rika Kanezaki,¹ *Tutomu Toki,¹ Kiminori Terui,¹ Gang Xu,¹ RuNan Wang,¹ Akira Shimada,² Asahito Hama,³ Hirokazu Kanegane,⁴ Kiyoshi Kawakami,⁵ Mikiya Endo,⁶ Daisuke Hasegawa,⁷ Kazuhiro Kogawa,⁸ Souichi Adachi,⁹ Yasuhiko Ikeda,¹⁰ Shotaro Iwamoto,¹¹ Takashi Taga,¹² Yoshiyuki Kosaka,¹³ Seiji Kojima,³ Yasuhide Hayashi,² and Etsuro Ito¹

¹Department of Pediatrics, Hiroasaki University Graduate School of Medicine, Hiroasaki, Japan; ²Department of Hematology/Oncology, Gunma Children's Medical Center, Gunma, Japan; ³Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan; ⁴Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, University of Toyama, Toyama, Japan; ⁵Department of Pediatrics, Kagoshima City Hospital, Kagoshima, Japan; ⁶Department of Pediatrics, Iwate Medical University, Morioka, Japan; ⁷Department of Pediatrics, St Luke's International Hospital, Tokyo, Japan; ⁸Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Tokorozawa, Japan; ⁹Department of Pediatrics, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan; ¹⁰Department of Pediatrics, Aomori City Hospital, Aomori, Japan; ¹¹Department of Pediatrics, Mie University Graduate School of Medicine, Tsu, Japan; ¹²Department of Pediatrics, Shiga University of Medical Science, Ohtsu, Japan; and ¹³Department of Hematology and Oncology, Hyogo Children Hospital, Kobe, Japan

Twenty percent to 30% of transient abnormal myelopoiesis (TAM) observed in newborns with Down syndrome (DS) develop myeloid leukemia of DS (ML-DS). Most cases of TAM carry somatic *GATA1* mutations resulting in the exclusive expression of a truncated protein (GATA1s). However, there are no reports on the expression levels of GATA1s in TAM blasts, and the risk factors for the progression to ML-DS are unidentified. To test whether the spectrum of transcripts

derived from the mutant *GATA1* genes affects the expression levels, we classified the mutations according to the types of transcripts, and investigated the modalities of expression by in vitro transfection experiments using *GATA1* expression constructs harboring mutations. We show here that the mutations affected the amount of mutant protein. Based on our estimates of GATA1s protein expression, the mutations were classified into GATA1s high and low groups. Phenotypic analy-

ses of 66 TAM patients with *GATA1* mutations revealed that GATA1s low mutations were significantly associated with a risk of progression to ML-DS ($P < .001$) and lower white blood cell counts ($P = .004$). Our study indicates that quantitative differences in mutant protein levels have significant effects on the phenotype of TAM and warrants further investigation in a prospective study. (*Blood*. 2010;116(22):4631-4638)

Introduction

In children with Down syndrome (DS), the risk of developing acute megakaryocytic leukemia (AMKL) is estimated at 500 times higher than in children without DS. Interestingly, neonates with DS are at a high risk of developing a hematologic disorder referred to as transient abnormal myelopoiesis (TAM). It has been estimated that 5% to 10% of infants with DS exhibit the disorder, and in most cases, it resolves spontaneously within 3 months. However, approximately 20% of the severe cases are still subject to fatal complications and 20% to 30% of patients who escape from early death develop AMKL referred to as myeloid leukemia of DS (ML-DS) within 4 years.¹⁻⁴

Recent studies found that high white blood cell (WBC) count, failure of spontaneous remission, early gestational age (EGA) and liver fibrosis or liver dysfunction are significantly associated with early death.⁵⁻⁷ Most of the same covariates were found in all of the reports. However, the risk factors for the progression to ML-DS remain elusive.

Blast cells in most patients with TAM and ML-DS have mutations in exon 2 of the gene coding the transcription factor *GATA1*,⁸⁻¹⁴ which is essential for normal development of erythroid and megakaryocytic cells.¹⁵⁻¹⁸ The mutations lead to exclusive expression of a truncated *GATA1* protein (referred to as GATA1s)

translated from the second methionine on exon 3. These findings strongly suggest that the qualitative deficit of *GATA1* contributes to the genesis of TAM and ML-DS. The analysis of megakaryocyte-specific knockdown of *GATA1* in vivo has revealed a critical role for this factor in megakaryocytic development. Reduced expression (or complete absence) of *GATA1* in megakaryocytes leads to increased proliferation and deficient maturation as well as a reduced number of circulating platelets.^{19,20} Mice harboring a heterozygous *GATA1* knockdown allele frequently develop erythroblastic leukemia.²¹ These observations indicate that the expression levels of *GATA1* are crucial for the proper development of erythroid and megakaryocytic cells and compromised *GATA1* expression is a causal factor in leukemia.²² Nevertheless, the impact of a quantitative deficit of the factor on the pathogenesis of TAM and ML-DS has not been examined.

In this study, we classified the *GATA1* mutations observed in TAM patients according to the types of transcripts, and investigated the modalities of gene expression by in vitro transfection assays using *GATA1* expression constructs. We report here that the spectrum of the transcripts derived from the mutant genes affects protein expression and the risk of progression from TAM to ML-DS.

Submitted April 30, 2010; accepted August 2, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, August 20, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-05-282426.

*R.K. and T.T. contributed equally to this work.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

Methods

Patients

This study was approved by the Ethics Committee of Hirosaki University Graduate School of Medicine, and all clinical samples were obtained with informed consent from the parents of all patients with TAM, in accordance with the Declaration of Helsinki. The following clinical data were collected: sex, gestational age, birth weight, time of diagnosis, symptom at diagnosis, and clinical presentation. The following laboratory data were obtained: a complete blood cell count at diagnosis including WBC and the percentage of blasts in the peripheral blood, coagulation parameters, liver enzymes (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase), and total bilirubin. The procedure for the detection of *GATA1* mutations was described previously.¹³ Genomic DNA was directly extracted from peripheral blood or bone marrow with the QIAamp blood mini kit (QIAGEN). Total RNA was extracted from white blood cells prepared by removal of erythrocytes by hypotonic buffer treatment of peripheral blood. Clinical features, outcomes, and characteristics of *GATA1* mutations are indicated in Table 1.

Construction of *GATA1* expression vectors

To construct *GATA1* minigene expression vectors, fragments of the normal human *GATA1* gene from a part of intron 1 to the stop codon located on exon 6 were amplified by polymerase chain reaction (PCR; Prime STAR HS; Takara Bio) and subcloned to mammalian expression vector pcDNA3.1 (+)/Neo (Invitrogen). To introduce mutations identical to those observed in TAM patients into the expression vector, the regions containing mutations were amplified by PCR from patient samples and inserted into the expression plasmid. To construct expression vectors carrying cDNA, we performed PCR using cDNA derived from baby hamster kidney 21 (BHK-21) cells transfected with *GATA1* minigene vectors. The PCR products were subcloned to pcDNA3.1(+)/Neo. Details of the sequence of each expression construct are described in Table 2.

Transfection

BHK-21, a baby hamster kidney fibroblast cell line, was cultured with Dulbecco modified Eagle medium supplemented 10% fetal bovine serum. *GATA1* expression vectors were transfected into BHK-21 cells using FuGENE HD transfection reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's methods. After 24 hours, protein and total RNA were extracted.

Western blot analysis

Lysates of transfected BHK-21 cells were transferred to Hybond-P (GE Healthcare) and processed for reaction with anti-*GATA1* antibody M-20 (Santa Cruz Biotechnology) or anti-neomycin phosphotransferase II (NeoR) antibody (Millipore) as described previously.²³

Northern blot analysis

Two micrograms of total RNA were transferred to Hybond-N+ (GE Healthcare) and hybridized with *GATA1* or *NeoR* DNA probe. Hybridization and detection were performed with the Gene Images AlkPhos Direct Labeling and Detection System (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions.

RT-PCR

To detect alternatively spliced transcripts derived from *GATA1* minigene constructs or from patients' peripheral blood mononuclear cells (obtained by Ficoll-Hypaque fractionation), we performed reverse transcription (RT)-PCR using primers T7: 5' AATACGACTCACTATAG 3' and *GATA1* AS1, and *GATA1* S1 and *GATA1* AS1, respectively.¹³ Densitometric analyses were performed by the Quantity-One software (Version 4.5.2; Bio-Rad Laboratories).

Statistical analysis

The cumulative incidence of the progression to ML-DS was analyzed with the Gray test. Differences in the distribution of individual parameters among patient subsets were analyzed using the Pearson χ^2 test or Fisher exact test for categorized variables and the Mann-Whitney *U* test for continuous variables. The univariate Cox proportional hazards model was used to obtain the estimates and the 95% confidence interval of the relative risk for prognostic factors.

Results

Patient characteristics and outcomes

From 2003 to 2008, we screened *GATA1* mutations in clinical samples obtained from 78 patients with TAM upon request from referring hospitals. Acquired *GATA1* mutations were detected in a total of 72 (92.3%) patients among them. Of the 72 patients, 6 harbored multiple *GATA1* mutant clones and were excluded from this study because we could not determine a dominant clone in these patients. Those 6 have not progressed to ML-DS. For the remaining 66 patients (32 male and 34 female), the clinical characteristics and laboratory data at diagnosis are described in Table 1 and summarized in Table 3. Early death within the first 6 months of life occurred in 16 patients (24.2%). The covariates correlated with early death were as follows: EGA, low birth weight, high WBC count at diagnosis, high percentage of peripheral blast cells, complication of effusions, and bleeding diatheses. These prognostic factors were identified in previous studies.⁵⁻⁷ Eleven (16.7%) cases subsequently developed ML-DS. The median age at diagnosis of ML-DS was 396 days (range 221-747 days). Univariate analysis revealed no covariates correlated with progression to ML-DS except the low total bilirubin level at diagnosis ($P = .023$).

GATA1 mutations affect expression levels of *GATA1*s protein

We first asked whether the spectrum of transcripts derived from the mutant *GATA1* genes affected the expression levels of the translation products. The transcripts coding *GATA1*s protein were categorized into 3 groups as follows: loss of the first methionine, splicing errors, and premature termination codon (PTC). Furthermore, the PTC group was divided into 2 subcategories by the location of introduced PTC. In this report, we refer to the mutation that causes PTC before the second methionine at codon 84 as PTC type 1, and after codon 84 as PTC type 2. We constructed cDNA expression vectors for each class of mutations observed in TAM patients, and transfected these constructs into BHK-21 cells (Figure 1). The details of the *GATA1* mutations are described in Table 2. Western blot analysis revealed that *GATA1*s proteins were most abundantly expressed in mutants with splicing errors. The transcripts from mutants that had lost the first methionine were also efficiently translated. In contrast, in the cells expressing PTC type 1 or type 2 constructs, *GATA1*s expression levels were uniformly low. Note that the translation efficiency of the PTC type 2 transcripts was lowest among them.

To test the possibility that mutations in *GATA1* have an effect on the quantity of the transcripts, we next prepared human *GATA1* minigene expression vectors, and assessed the expression levels. Consistent with the results using cDNA expression vectors, Western blot analysis showed that the expression levels of *GATA1*s were lower in cells expressing PTC type 2 mutations, whereas the expression levels of the proteins from PTC type 1 mutations were not uniformly low (Figure 2Ai). Northern blot analysis revealed that the lowest expression levels of *GATA1* mRNAs were observed