

201128034A

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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 伊藤 悦朗

平成 24 (2012) 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	1 1
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	1 3
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	1 5
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	1 7
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)	2 1
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・教授)	
倉光 球 (国立感染症研究所・血液・安全性研究部・研究員)	
6. DBA 患者赤血球における還元型グルタチオン濃度上昇のメカニズム	3 1
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	3 5
IV. 研究成果の刊行物・別冊	3 9

# I . 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

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  
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：先天性赤芽球癆（Diamond blackfan anemia (DBA)）の原因遺伝子として *RPS19* などのリボソームタンパク質 (RP) 遺伝子が知られる。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。我々は、これまでに 76 家系 (83 例) の DBA を解析し、21 家系 (23 例) (27.6%) に RP 遺伝子の変異を検出した。欧米に比して本邦における RP 遺伝子の変異頻度は低く、約 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・シーケンシング法では検出できない片アレルの欠失を迅速・簡便に検出することができる DBA の遺伝子コピー数解析法 (DBA 同期的 qPCR 法) を開発し、弘前大学 DBA ゲノムバンクを用い、変異同定を試みた。その結果、遺伝子変異未知の 31 例中 7 例で DBA の原因遺伝子の片アレル欠失を検出し、SNP アレイで欠失を確認した。これらの結果から、DBA 患者の確定診断のために DBA 原因遺伝子のゲノムコピー数の解析が有用な診断マーカーとなることが示された。我々は、DBA 症例において赤血球還元型グルタチオン (GSH) が有意に高値であることを発見し、DBA のバイオマーカーとして有用であることを見出した。さらに、そのメカニズムを明らかにする目的で、DBA 患者赤血球中の GSH 生合成系、還元系、五炭糖リン酸経路およびグルタチオンペルオキシダーゼなど 6 種の酵素活性を検討した。その結果、GSH の増加は生合成系の亢進ではなく、五炭糖リン酸経路の活性化によるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) 供給の増加がその要因であることが明らかになった。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。現在、一次調査で把握された症例を対象に二次調査と遺伝子解析が進行中である。

【研究分担者氏名】

照井君典 弘前大学医学部附属病院講師  
小島勢二 名古屋大学大学院医学系研究科教授  
小原 明 東邦大学医療センター大森病院教授  
大賀正一 九州大学大学院医学研究院教授  
浜口 功 国立感染症研究所部長  
森尾友宏 東京医科歯科大学准教授  
菅野 仁 東京女子医科大学准教授

【研究協力者氏名】

土岐 力 弘前大学大学院医学研究科講師  
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かと期待できる。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した。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た。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った。

### 2) 遺伝子解析

これまでに弘前大学小児科が全国から収集した 76 家系 (83 例) 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 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* を解析した。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、変異陽性と判定された検体をダイレクト・シーケンシング法で解析した。

b) DBA の遺伝子コピー数解析法 (DBA 同期的 qPCR 法)：遺伝子上の複数箇所に、同一条件で増幅反応ができる PCR プライマーを設定した。もし、大きな欠失が存在し、N の状態になっていると、正常の 2N に比べ DNA 量が半分になっているため、2N と同じ増幅を得るのに PCR の反応回数が 1 回多く必要になる。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) SNP アレイ解析：GeneChip Human Mapping 250K Nsp array (Affymetrix 社, Santa Clara, CA) を用いて標準プロトコルで解析した。マイクロアレイデータは、CNAG プログラムを使い解析した。

d) 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、網羅的な解析を行った。

### 3) DBA 診断のバイオマーカーの探索

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、以下のように赤血球 GSH 濃度および 7 種の酵素活性を測定した。

a) GSH 生合成系： $\gamma$  グルタミルシステイン合成酵素 (GCS)、グルタチオン合成酵素 (GSH-S)。反応系 A ではシステインとグルタミン、反応系 B では  $\gamma$  グルタミルシステインとグリシンを ATP 存在下で溶血液と 30 分間反応させた後、直ちに反応液をトリクロロ酢酸で除タンパクする。反応に用いられた ATP から遊離したリン酸が除タンパク液中に生じるため、Fiske-Subbarow 法で定量した。

b) GSH 還元系：グルタチオン還元酵素 (GR)。ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH)、酸化型グルタチオン (GSSG) 存在下で溶血液を加え、NADPH の消費による 340nm の吸光度減少を分光光度計で計測した。

c) 五炭糖リン酸経路：グルコース 6-リン酸脱水素酵素 (G6PD)、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素 (6PGD)。NADP 存在下で反応系 A にはグルコース-6-リン酸 (G6P) と 6-ホスホグルコン酸 (6PGA)、反応系 B には 6PGA のみを溶血液と反応させ、生じる NADPH による 340nm の吸光度増加を分光光度計で計測する。反応系 B で 6PGD 活性、反応系 A と B の吸光度変化の差で G6PD 活性を測定した。

d) 過酸化水素除去反応：グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX)。tert-ブチルヒドロペルオキシドを基質として GSH および NADPH 存在下で溶血液を反応させ、NADPH の消費による 340nm の

吸光度減少を分光光度計で計測した。

e) アデノシンデアミナーゼ (ADA) : アデノシンを基質として溶血液を加えて 265nm における吸光度減少により活性を測定した。

f) 還元型グルタチオン (GSH) : 溶血液にメタリン酸を加えて得られる除タンパク抽出液に、5,5'-di-thiobis (2-nitrobenzoic acid) を加え、412nm で定量した。

#### 4) 診断基準の作成

上記の解析結果と臨床情報をもとに、診断基準を作成した。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した。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。

#### 5) 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。

#### 6) 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。平成 23 年度には、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った。

##### (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、東京大学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った。

## 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。レビュー開始から 31 ヶ月間で 500 例がレビューされた。レビュー結果は AA が 246 例、MDS が 53 例 (先天性骨髄不全症候群 (CBFS) 4 例を含む)、JMML が 45 例、CBFS が 45 例、急性白血病が 23 例、その他 137 例であった。CBFS 45 例の中に DBA が 11 例含まれていた。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が依頼され、2 例で RP 遺伝子の変異が確認された。

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 13 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: 本研究で解析した症例は 76 家系 (83 例) 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 HRM 解析とダイレクト・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 4 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 10.5%、7.9%および 5.3%であった。以上、本邦における DBA の発端者 76 例中 21 例 (27.6%) 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、約 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 で高頻度に変異の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のあった遺伝子、*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、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、31 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 (Kuramitsu et al. *Blood* 2012)。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) 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 31 検体を用いて、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、31 例中 6 例で RP 遺伝子の片アレル欠損が確認された (図 2)。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* 遺伝子の欠失 (#24) は検出されなかった。これは、SNP プロンプが欠失領域に存在しないためであった。#24 については、PCR 法とシーケンス解析の結果、*RPS19* 遺伝子の欠失が確認された。

**d) 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

1 例に *RPL28* 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  $3.57 \pm 1.53$  (IU/gHb, M $\pm$ SD)、対照群で  $1.02 \pm 0.26$ 、GSH は患者群で  $103 \pm 18$  (mg/dl RBC, M $\pm$ SD)、対照群で  $70.0 \pm 9.7$  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 1 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。

GSH の de novo 生合成経路を触媒する 2 種の酵素である GCS および GSH-S 活性は DBA 症例と正常対照との間で有意差を認めなかった。一方、五炭糖リン酸経路を触媒する 2 種の酵素である G6PD と 6PGD、および過酸化水素除去反応を触媒する GPX の活性は有意に亢進していた。GSSG を GSH に還元する GR 活性に関しては有意な上昇を認めなかった。

### 4) 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 5 年間で 65 例登録された。これは、14 歳以下の小児人口 17,294 千人から罹患率を推定すると、14 歳以下小児人口 10 万人に対して 0.32 (95%CI; 0.27-0.37) と推定される。日本全国で年間 13 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る可能性がある。

### 5) 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。平成 23 年度には、弘前大学と九州大学の倫理委員会の承認が得られ、二次調査を開始した。

#### 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 RP 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ていたが、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 76 家系中 28 例 (36.8%) 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 13.2% 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 (5.3%) 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。遺伝子変異の検出できなかった 11 例の検体で、80 種類の RP 遺伝子をすべて次世代シーケンサーで解析したが、遺伝子変異が見つかったのは 1 例のみであった。今後、新規原因遺伝子を同定するためには、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う必要があると考えられる。効率的に研究を行うために、「稀少小児遺伝性血液疾患の迅速な原因究明及び診断・治療法の開発に関する研究」班 (小島班) と協力してエクソーム解析を行う計画予定である。

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ほとんど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、リボソーム蛋白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。さらに、GSH の増加は生合成系の亢進ではなく、五炭糖リン酸経路の活性化による NADPH 供給の増加がその要因であることを明らかにした。

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 76 家系 (83 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 以外の先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。

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 RP 遺伝子の欠失を 31 例中 7 例で見出した。このうち 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、我々の開発した DBA 同期的 qPCR 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 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. Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. **Blood** 2012;119(10):2376-2384.
2. Yokoyama T, Toki T, Aoki Y, Park MJ, Kanno Y, Tanaka T, Yamazaki Y, Ito E, Hayashi Y, Nakamura T. Identification of *TRIB1* R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. **Blood** 2012;119(11):2608-2611.
3. Kato K, Yoshimi A, Ito E, Oki K, Hara J, Nagatoshi Y, Kikuchi A, Kobayashi R, Nagamura-Inoue T, Kai S, Azuma H,

- Takanashi M, Isoyama K, Kato S; Japan Cord Blood Bank Network. Cord blood transplantation from unrelated donors for children with acute lymphoblastic leukemia in Japan: the impact of methotrexate on clinical outcomes. **Biol Blood Marrow Transplant.** 2011;17(12):1814-21.
4. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. **Haematologica** 2011;96(6):814-819.
  5. Kudo K, Terui K, Sasaki S, Kamio T, Sato T, Ito E. CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents. **Leuk Res.** 2011;35(9):e167-8.
  6. 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** 2011;56(2):267-72.
  7. 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).
  8. 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** 2011;117(10):2887-90.
  9. 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. **Pediatric Blood & Cancer** 2011;57:1117-23.
  10. 伊藤悦朗, 小島勢二, 大賀正一, 小原明「難治性貧血の診療ガイド」編集委員会: VII 先天性骨髄不全症 4. Diamond-Blackfan 貧血/診療の参照ガイド 難治性貧血の診療ガイド 特発性造血障害の病態・診断・治療の最新動向 pp. 220-227 南江堂 2011.
  11. 北島順子, 金城唯宗, 大賀正一, 落合正行, 井上普介, 楠田剛, 井原健二, 原寿郎. 新生児における鉄恒常性とヘプシジン. 産婦人科新生児血液学会雑誌 2011;20:103-111.
  12. 大賀正一. 血液・腫瘍性疾患 鉄欠乏性貧血. 今日の小児治療指針第 15 版 医学書院 2011 (印刷中).
  13. Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Kiyotani C, Maebayashi K, Sakauchi M, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y. High-dose chemotherapy followed by autologous and allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for recurrent disseminated trilateral retinoblastoma. **Childs Nerv Syst.** 2011;27:1019-24.
  14. Kanno H, Iribe Y, Aoki T, Ogura H, Fujii H. Pyruvate supplementation enhances Vascular endothelial growth factor Production of bone marrow-derived mononuclear cells. **Jpn J Transf Cell Ther.** 2012 (in press).
  15. 濱麻人, 小島勢二. 小児骨髄不全の診断と治療のポイント. 血液内科 2011;63(2):157-165.
- ## 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. 先天性造血不全シンポジウム. 2011年2月4日. 浦安.
  2. Hama A, Manabe A, Nozawa K, Sakaguchi H, Doisaki S, Muramatsu H, Shimada A,

- Takahashi Y, Ohara A, Ito M, and Kojima S. Central Review of the Morphology in Childhood Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14日. 名古屋.
3. 菅野仁, 入部雄司, 内山智貴, 青木貴子, 小倉浩美, 大賀正一, 伊藤悦朗, 藤井寿一. ダイヤモンド・ブラックファン貧血の新規バイオマーカー同定. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14日. 名古屋.
  4. 入部雄司, 青木貴子, 山本俊至, 古川徹, 三谷昌平, 土岐力, 大賀正一, 伊藤悦朗, 小倉浩美, 藤井寿一, 菅野仁. 次世代シーケンシングデータからのDiamond-Blackfan貧血関連遺伝子の探索. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14日. 名古屋.
  5. 菅野仁. 先天性溶血性貧血. 教育講演15. 第56回日本未熟児新生児学会学術集会. 2011年11月15日. 東京.
  6. 内山智貴, 菅野仁, 石谷健, 相崎潤子, 濱田貴子, 藤井寿一, 松井英雄, 斎藤加代子. ドセタキセルによる重症好中球減少症の発症に関わる遺伝子多型探索. 遺伝医学合同学術集会・第18回日本遺伝子診療学会大会. 2011年6月18日. 京都.
  7. 内山智貴, 菅野仁, 石谷健, 相崎潤子, 青木貴子, 藤井寿一, 松井英雄, 鎌谷直之, 斎藤加代子. ドセタキセルによる薬物動態と重症好中球減少症の発症に関わる遺伝子多型探索. 日本人類遺伝学会第56回大会. 2011年11月10日. 千葉.
  8. Kitajima J, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Takahata Y, Honjo S, Hara T. Serum prohepcidin levels during the neonatal period of term and preterm newborn. PAS/ASPR 2011 Joint Meeting, April 30-May3, 2011 Denver, Colorado, USA.
  9. 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4回研修医(初期・後期)のための血液学セミナー. 2011年7月8-10日. 大津.
  10. Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang R, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Ozeki M, Yamaguchi K, Kitoh T, Sugita K, Kudo T, Matsubayashi T, Mizue N, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese Patients with Diamond Blackfan anemia. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
  11. Iribe Y, Aoki T, Yamamoto T, Furukawa T, Mitani S, Toki T, Ohga S, Ito E, Ogura H, Fujii H, Kanno H: Mining novel Diamond-Blackfan anemia relevant genes from next generation sequencing data. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
  12. Kanno H, Iribe Y, Uchiyama T, Aoki T, Ogura H, Ohga S, Ito E, Fujii H: Elevation of red cell reduced glutathione is a novel biomarker for Diamond-Blackfan anemia. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14-16日. 名古屋.
  13. 伊藤悦朗, 照井君典, 土岐力, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁, 小川誠司, 佐藤亜以子. 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. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011年11月25-27日. 前橋.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

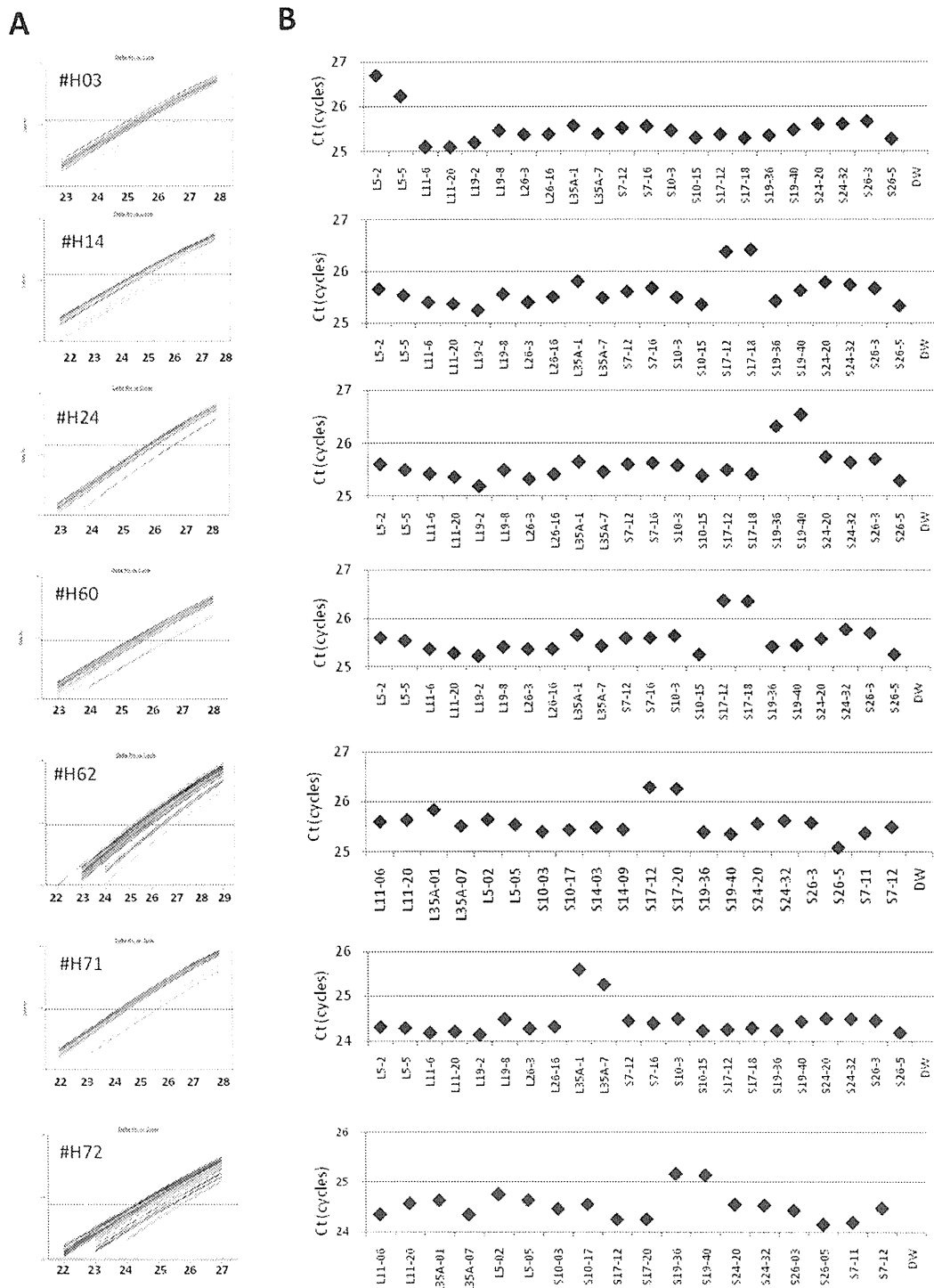


図1. Q-PCRによるDBAの遺伝子コピー数検査

A. Q-PCR増幅曲線像。B. Ct値のExcel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。

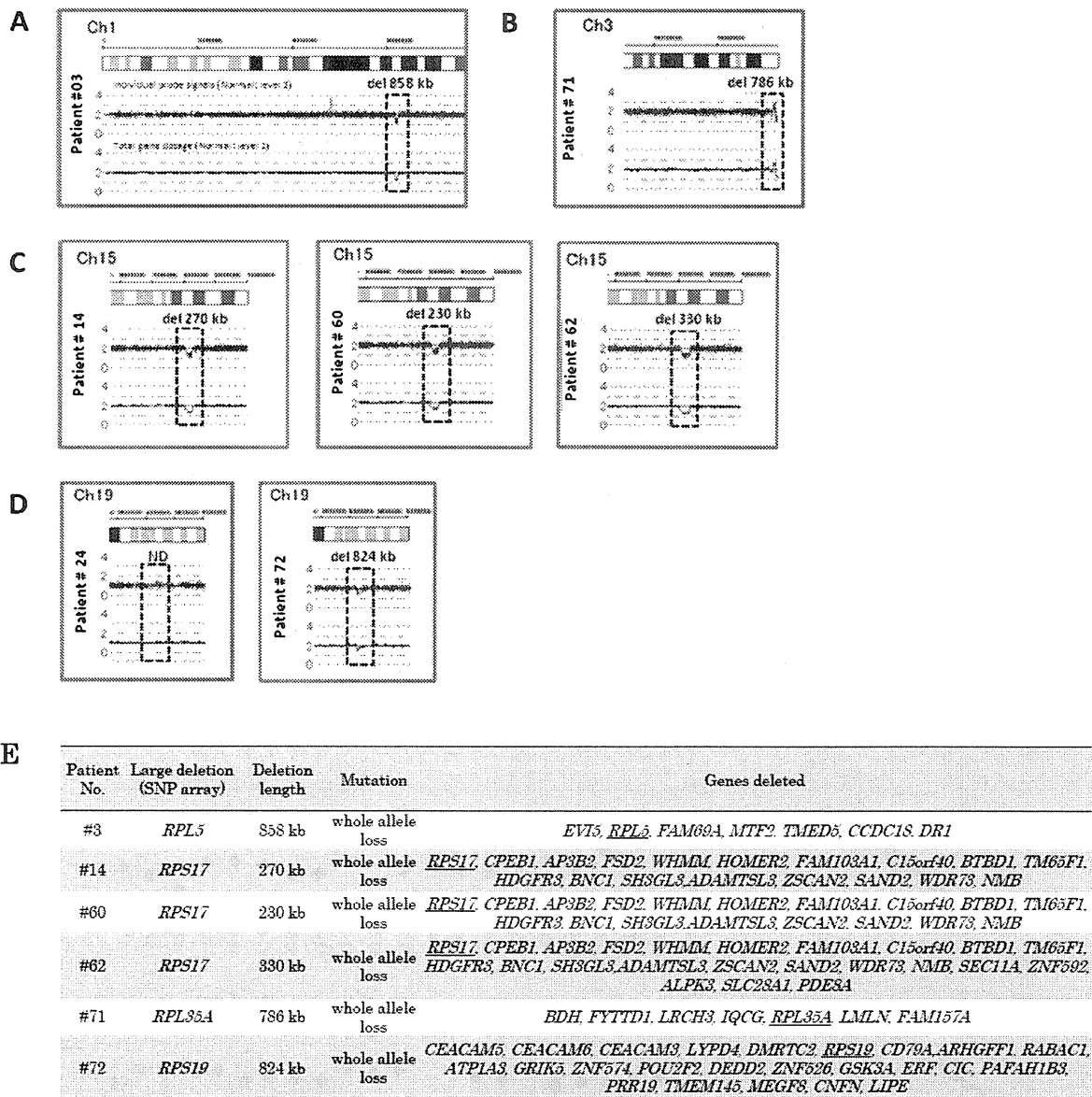


図2. SNP アレイによる片アレル欠失の解析

通常のシーケンス解析では、変異が同定されなかった 31 検体を用いて 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、31 例中 6 例で RP 遺伝子の片アレル欠損が確認された。(A) 症例#03. *RPL5* を含む一番染色体の大欠失 (B) 症例#71. *RPL35a* を含む 3 番染色体の大欠失 (C) 症例#14, #60, and #62. *RPS17* を含む 15 番染色体の大欠失 (D) 症例#72. *RPS19* を含む 9 番染色体の大欠失。(E) 6 症例の欠失部位に含まれる遺伝子。RP 遺伝子が欠失している。

## 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

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 9 種類の RP 遺伝子 (*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*, *RPS14*, *RPS10*, *RPS26*) の解析を行った。本年度は新たに 15 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 83 例 (76 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 27.6% 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 8 遺伝子 (*RPS19*, *RPS24*, *RPS17*, *RPL5*, *RPL11*, *RPL35a*, *RPS10*, *RPS26*) と 5q-症候群の原因遺伝子 *RPS14* を解析した。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ス法で解析した。

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 23 年度には新たに 15 例の遺伝子解析を行い、本研究で解析した症例は 83 例 (76 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 4 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 10.5%、7.9%、5.3% 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* あるいは *RPL5* の変異をもつ患者のほとんどで何らかの身体的異常がみられた。拇指の異常は 6 例でみられ、全例が *RPS19* あるいは *RPL5* の変異を有していた。口蓋裂は 3 名にみられ、2 例で *RPL5* 変異を有していた。以上、本邦における DBA の発端者 76 例中 21 例 (27.6%) 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 27.6% 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 10.5% 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ほとんど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、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) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. *Blood* 2012;119(10):2376-2384.
- 2) Kudo K, Terui K, Sasaki S, MD, Kamio T, Sato T, Ito E. CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents. *Leuk Res.* 2011; 35(9): e167-8.
- 3) Kudo K, Terui K, MD, Sasaki S, Kamio T, Sato T, and Ito E. Voriconazole for both successful treatment of disseminated *Trichosporon asahii* infection and subsequent cord blood transplantation in an infant with acute myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46(2): 310-1

##### 2. 学会発表

- 1) Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang RN, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T,

Takizawa K, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. 'Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond Blackfan anemia'. 第73回日本血液学会. 2011年10月14-16日. 名古屋.

- 2) 伊藤悦朗, 照井君典, 土岐力, 小島勢二, 小原明, 大賀正一, 森尾友宏, 浜口功, 倉光球, 菅野仁, 小川誠司, 佐藤亜以子. 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. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会. 2011年11月25-27日. 前橋.

#### 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



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）、骨髄異形成症候群（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31ヶ月間で500例がレビューされた。レビュー結果はAAが246例、MDSが53例（CBFS4例を含む）、若年性骨髄単球性白血病（JMML）が45例、CBFSが45例、急性白血病が23例、その他が137例であった。CBFS45例のなかにDiamond-Blackfan貧血（DBA）が11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は比較的にまれな疾患で、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31ヶ月間で500例がレビューされた。レビュー結果はAAが246例、MDSが53例（CBFS4例を含む）、JMMLが45例、CBFSが45例、急性白血病が23例、その他137例であった。CBFS45例の中にDBAが11例含まれていた。2011年にDBAと新規診断された3例の詳細は以下のと

おりである。

症例1：4歳女児。1歳頃から貧血を指摘され、鉄剤を投与されたが貧血は改善しなかった。低身長あり。WBC 5,900/ $\mu$ l、RBC 264万/ $\mu$ l、Hb 8.8g/dl、Ht 26.2%、MCV 99.2fl、Plt 40万/ $\mu$ l、eADA 6.17。骨髄像：赤芽球は全体の1%で多染性赤芽球までは観察された。

症例2：生後0日女児。右拇指多指症あり。WBC 6,700/ $\mu$ l、Neu 340/ $\mu$ l、Hb 8.2g/dl、Ht 37.7%、MCV 94fl、Ret 2‰、Plt 35万/ $\mu$ l。骨髄像：赤芽球は全く観察されなかった。顆粒球の骨髄球レベルでの成熟停止像がみられた。

症例3：9か月女児。外表奇形なし。WBC 7,300/ $\mu$ l、Neu 430/ $\mu$ l、Hb 4.9g/dl、Ht 14.6%、MCV 74fl、Ret 2‰、Plt 14万/ $\mu$ l。骨髄像：赤芽球は2%で好塩基性赤芽球まで観察された。顆粒球の桿状核球レベルでの成熟停止像がみられた。

D. 考察

CBFSは今回検討した症例の約10%を占め、Fanconi貧血、Dyskeratosis congenita、Shwachman症候群、先天性無巨核球性血小板減少症などが代表的な疾患である。そのうちDBAは11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2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。3例を除いてわずかに赤芽

球を認め、前赤芽球あるいは多染性赤芽球までの分化を認めた。骨髓像から類推するに、赤芽球が全く消失するものと前赤芽球レベル以降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。また、2例で好中球減少を合併しており、DBAの一つの亜集団を示している可能性が考えられる。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。

中央診断システムにおいては、DBAを含む先天性骨髓不全症候群の網羅的かつ系統的なスクリーニングや診断システムの構築に取り組んでいるところである。

## E. 結論

AA、MDSおよびCBFSを対象とした中央診断を行うことにより、必ずしも診断が容易ではないこれらの疾患の診断の精度があがったと考えられる。特にDBAのようなまれな疾患はこのような中央診断登録システムを通して確実に診断がつけられていくと考えられる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 濱 麻人, 小島勢二. 小児骨髓不全の診断と治療のポイント. 血液内科 63(2):157-165,2011.
- 2) Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. Blood 2012;119(10):2376-2384.

### 2. 学会発表

- 1) Asahito Hama, Atsushi Manabe, Kazue Nozawa, Hirotohi Sakaguchi, Sayoko Doiaski, Hideki Muramatsu, Akira Shimada, Yoshiyuki Takahashi,

Akira Ohara, Masafumi Ito, and Seiji Kojima. Central Review of the Morphology in Childhood Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome. 第 73 回日本血液学会学術集会. 2011 年 10 月 14-16 日. 名古屋.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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

研究分担者 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：先天性造血不全性貧血である Diamond-Blackfan 貧血 DBA は稀であり、診断法の確立や病態解明研究には疫学データベースの構築が必要である。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、DBA の症例把握に努めた結果、2006 から 2010 年に診断されて登録された 427 例の造血障害症例から、新規診断 DBA 症例は 65 例。全国で年間平均 11 例の発生と推定された。同じ時期、同じ調査対象施設の特発性再不貧は年間約 50 例、急性骨髄性白血病は約 160 例であり、およその相対的な疾患頻度が推定された。また、本研究班の活動は小児血液学会再不貧 MDS 形態中央診断事業と協力し、中央診断による新規診断症例の登録も増加している。診断の手引き、遺伝子診断の体制が整い更に潜在性の新規診断症例の増加が予想される。

A. 研究目的

【背景】

DBAは稀少疾患であり、診断法や治療法開発には疫学データベースの構築が欠かせない。これまでの小児血液学会の調査では小児期造血障害の約7%の頻度であった。そこで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、DBAの症例把握に努めた。

【目的】

本邦のDBA症例の悉皆性をもって収集する疫学データベース構築を目的に、小児血液学会疾患登録事業（全数把握）を一次調査とした疫学観察研究（小児血液再不貧2005研究・MDS2006研究）を実施した。質の高いデータベース構築により、これを基盤としたDBAの診断法・治療法開発を目指す。また一次調査を元にした二次調査を実施することによって、更に詳細な臨床病態解明を目指す。

B. 研究方法

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 239 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）が実施した。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。

（倫理面への配慮）

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。

C. 研究結果

2006, 2007, 2008, 2009, 2010 年診断登録症例数を表に示す（表）。

a. 疾患登録（一次調査）症例：小児血液学会会員 239 施設の 90%に相当する 216 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。表に挙げた造血障害疾患は総計 427 例で、そのうち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。

b. Diamond-Blackfan 貧血； DBA 症例は5年間で65例登録された。これは14歳以下の小児人口17,294千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。

c. 一次登録症例を対象にした二次調査を実施し、臨床症状、家族歴、治療歴を収集中であり、現在解析中である。

d. 小児血液学会再生不良性貧血・MDS委員会中央形態診断事業により、新規DBA症例が毎年診断され、多くは遺伝子診断へと繋がっている。

#### 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。また、小児血液学会形態中央診断事業は、診断困難な小児期の造血不全を対象にしており、この中からDBAが疑われる症例が毎年発見されている。さらに、二次調査を実施して詳細な臨床像、家族歴、治療歴を収集し始めている。これらを統合した疾患データベースを構築することは、本研究班の成果（遺伝子診断法）が裏打ちされ、精度の高い研究成果となる事が期待される。また診断の手引き、遺伝子診断の体制が整い更に潜在性の新規診断症例の増加が予想される。

#### E. 結論

悉皆性をもち、臨床情報で裏打ちされたDBA疫学データベースの構築された。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kuramitsu M, Sato-Otsubo A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, RuNan Wang, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Kojima S, Kitoh T, Goi K, Kudo K, Matsubayashi T, Mizue N, Ozeki M, Masumi A, Momose H, Takizawa K, Mizukami T, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. Blood 2012;119(10):2376-2384.

##### 2. 学会発表

Kuramitsu M, Matsubara A, Morio T, Takagi M, Toki T, Terui K, Wang RN, Kanno H, Ohga S, Ohara A, Masumi A, Momose H, Mizukami T, Takizawa K, Yamaguchi K, Ogawa S, Ito E, Hamaguchi I. 'Extensive gene deletions in Japanese patients with Diamond Blackfan anemia'. 第73回日本血液学会. 2011年10月14-16日. 名古屋.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

表

Diagnosis / Year	2006	2007	2008	2009	2010
Hospitals (registered/member)	184 / 223	204 / 231	212 / 235	213 / 236	216 / 239
(%)	83%	88%	90%	90%	90%
Idiopathic AA	58	57	59	51	48
Hepatitis AA	5	8	11	6	12
AA / PNH	2	1	1	0	1
Fanconi Anemia	5	4	4	1	4
<b>Diamond-Blackfan</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>14</b>	<b>18</b>	<b>9</b>
Svere Cong. Neutropenia	2	1	2	0	3
Cyclic Neutropenia	1	3	2	3	2
Schwachman-Diamond	0	1	0	1	0
Dyskeratosis congenita	1	0	0	1	1

As of June 2011