

先天性骨髄不全症の登録システムの構築と診断ガイドラインの作成に関する研究

先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血）患者赤血球における eADA と GSH の バイオマーカーとしての有用性

研究分担者 菅野 仁（東京女子医科大学輸血・細胞プロセッシング部 教授）

研究要旨：先天性赤芽球癆（Diamond Blackfan 貧血）患者におけるバイオマーカーとして赤血球 ADA（eADA）活性と還元型グルタチオン（GSH）が有用であることが明らかになり、判別式を用いて診断することが可能となった。今年度は新たに DBA 疑い 3 症例を検討し、臨床診断および従来の診断基準との相関について検討を加えた。

A．研究目的

DBA はリボゾーム機能不全によって発症する先天性赤芽球癆である。我々は H22 年度から始まった研究班において赤芽球系細胞における最も重要な抗酸化物質である赤血球還元型グルタチオン（GSH）が DBA の新規バイオマーカーであることを同定した。赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）と GSH を同時に検討することで、遺伝子検査により確定診断し得た DBA 症例と同一家系内非罹患者の識別を可能とする判別式を得た。今年度は更に症例数を積み重ねることで判別式の有用性を再検討したので報告する。

B．研究方法

全国の医療機関において臨床的に DBA と診断された症例についてインフォームド・コンセントを取得の上、末梢血を得た。血漿、白血球、血小板を除去した洗浄赤血球より溶血液を作成し、eADA を測定した。eADA はアデノシンを基質として溶血液を加え 265 nm における吸光度減少により、活性を測定した。また GSH は溶血後の全血にメタリン酸を加えて得られた除蛋白抽出液に 5,5'-di-thiobis（2-nitrobenzoic acid）を加え、412 nm で定量した。

C．研究結果

【症例 1】4 ヶ月、男児
身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（生後 3 ヶ月目より）その後の輸血頻度は不明であった。

赤血球数 88 万/ μ L、Hb 2.6g/dL、Ht 7.5%、MCV 85.2、Retic 0.5%、白血球数 9210/ μ L、血小板数 51.4 万/ μ L、末梢血の赤血球形態は大小不同、奇形を認めた。骨髄検査は著明な赤芽球系低形成を認めた（Myeloid 52.0%、Erythroid 1.8%、Lymphoid 41.8%、Blast 2.2%）。染色体核型は 46XY で異常は認められなかった。

eADA 活性：2.54 IU/gHb、GSH：106.8

判別式 $0.937 * eADA + 0.0702 * GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 2】3 歳 4 ヶ月、男児

身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（2 歳 8 ヶ月時より）その後 2 週間に 1 回輸血施行。

赤血球数 106 万/ μ L、Hb 2.5g/dL、Ht 8.2%、MCV 77.4、Retic 0.02%、白血球数 9600/ μ L、血小板数 18.9 万/ μ L、赤血球形態異常なし。

骨髄検査では M、染色体核型 46XY

eADA 活性：1.47 IU/gHb、GSH：94.8

判別式 $0.937 * eADA + 0.0702 * GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【症例 3】5 ヶ月男児

身体的所見：特記することなし

輸血歴：あり（生後 2 ヶ月目より）その後 2 回輸血施行

赤血球数 233 万/ μ L、Hb 6.9 g/dL、Ht 20.6%、MCV 88.4、Retics 0.45%、白血球数 10960/ μ L、血小板数 59 万/ μ L、赤血球形態では球状赤血球を認めたが、赤血球浸透圧抵抗の低下は認めなかった。

骨髓検査正形成、Mgk140、（Myeloid 46.8%、Erythroid 4.8%、Ly 36.4%、Blast 9.2%）染色体核型 46XY

eADA 活性：2.74 IU/gHb、GSH：104

判別式 $0.937 * eADA + 0.0702 * GSH - 7.9044 > 0$ の時 DBA とする場合、DBA と判別された。

【診断基準】

| A：診断基準 | |
|--------|-------------------------|
| 1 | 1 歳未満 |
| 2 | 大球性貧血で他の血球系に減少を認めない |
| 3 | 網赤血球数低下 |
| 4 | 骨髓所見は正形成だが赤芽球前駆細胞の減少を伴う |

| B：診断を支持する基準 | |
|-------------|--------------------------|
| 大基準 1 | 古典的 DBA に見られた遺伝子変異の同定 |
| 大基準 2 | 家族歴の存在 |
| 小基準 1 | 赤血球アデノシンデアミナーゼ活性（eADA）高値 |
| 小基準 2 | 古典的 DBA に見られる先天奇形の存在 |
| 小基準 3 | HbF 上昇 |
| 小基準 4 | 他の先天性骨髓不全症候群が否定できる |

【判定】

| | |
|----------|--------------------------------|
| 古典的 DBA | A の 4 個すべて |
| 非古典的 DBA | A 3 個 + B 大基準 1 個 or B 小基準 2 個 |
| | A 2 個 + B 大基準 2 個 or B 小基準 3 個 |
| | B 大基準 2 個 |

| | A：診断基準 | | | | B：診断を支持する基準 | | | | | |
|------|--------|---|---|---|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 大基準 1 | 大基準 2 | 小基準 1 | 小基準 2 | 小基準 3 | 小基準 4 |
| 症例 1 | ○ | × | ○ | × | △ | × | ○ | × | △ | ○ |
| 症例 2 | × | × | ○ | ○ | △ | × | × | × | △ | ○ |
| 症例 3 | ○ | × | ○ | ○ | △ | × | ○ | × | △ | ○ |

△：不明・未検査

D．考察

以上のように従来の診断基準では、症例 1 は A 2 個 + B 小基準 2 個で非古典的 DBA、症例 2 は A 2 個 + B 小基準 1 個で非 DBA、症例 3 は A 3 個 + B 小基準 2 個で非古典的 DBA と判定された。いずれも家族歴が無く、先天奇形の存在も無いことから、eADA 活性が診断に重要な症例と考えられる。症例 2 のように eADA 活性単独では診断基準により DBA が否定されたケースにおいて、新規バイオマーカーである GSH を併用した判別式は DBA の診断に極めて有用と考えられる。

この結果が新規バイオマーカーによる偽陽性結果で無いことを明らかにするためには、網羅的な遺伝子検査結果を用いた DBA の診断および他の骨髓不全症候群の否定が極めて重要と考えられた。

E．結論

eADA / GSH を用いた判別式結果は、eADA 単独の評価に比して、家族歴・先天奇形を伴わない DBA 症例の診断率を向上することが明らかになった。

F．研究発表

1. 論文発表

- 1) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolveang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause

- transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. **Blood** 2014;123(10):1586-95.
- 2) Hikosaka K, Ikutani M, Shito M, Kazuma K, Gulshan M, Nagai Y, Takatsu K, Konno K, Tobe K, Kanno H, Nakagawa T. Deficiency of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 3 (nmnat3) causes hemolytic anemia by altering the glycolytic flow in mature erythrocytes. **J Biol Chem.** 2014;89(21):14796-811.
 - 3) Kobayashi Y, Hatta Y, Ishiwatari Y, Kanno H, Takei M. Human parvovirus B19-induced aplastic crisis in an adult patient with hereditary spherocytosis: a case report and review of the literature. **BMC Res Notes.** 2014;11(7):137.
 - 4) 守屋友美 (東京女子医科大学 輸血・細胞プロセシング部), 岡本好雄, 小林博人, 松田和樹, 久保田友晶, 緒方康貴, 及川美幸, 李舞香, 木下明美, 青木貴子, 千野峰子, 岡田真一, 高源ゆみ, 青木正弘, 中林恭子, 今野マユミ, 槍澤大樹, 小倉浩美, 菅野仁. ABO 血液型不適合腎移植におけるアルブミン製剤の必要性. **日本輸血細胞治療学会誌** 2014;60(4):521-526.
 - 5) Wang R, Yoshida K, Toki T, Sawada T, Uechi T, Sato-Otubo A, Kudo K, Kamimaki I, Kanezaki R, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Terui K, Sato T, Iribe Y, Ohga S, Kuramitsu M, Hamaguchi I, Ohara A, Hara J, Goi K, Matsubara K, Koike K, Ishiguro A, Okamoto Y, Watanabe K, Kanno H, Kojima S, Miyano S, Kenmochi N, Ogawa S, Ito E. Loss of function mutation in RPL27 and RPS27 identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. **Br J Haematol.** 2015;168(6):854-864.
 - 6) 岡本好雄, 槍澤大樹, 小林博人, 小倉浩美, 菅野仁. 自己血漿製剤という観点から見た CART. **日本アフェレシス学会** 2014;33(3):178-184.
 2. 学会発表
 - 1) 青木貴子, 市東正幸, 小倉浩美, 高橋秀弘, 岩井朝幸, 濱端隆行, 渡邊健一郎, 常松健一郎, 奥野友介, 村松秀城, 吉田健一, 宮野悟, 大賀正一, 小川誠司, 小島勢二, 菅野仁. 病因未確定の先天性溶血性貧血に対する全エクソーム解析. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 2) 尾上佳子, 石谷健, 内山智貴, 青木貴子, 市東正幸, 川上和之, 松井英雄, 林和彦, 斎藤加代子, 菅野仁. イリノテカンによる重症下痢症を予測する PGx バイオマーカーとしての CYP2F1 遺伝子多型. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 3) 神尾英則, 神尾孝子, 尾上佳子, 市東正幸, 青木貴子, 内山智貴, 亀岡信悟, 斎藤加代子, 菅野仁. テガフル・ウラシル投与による肝機能障害を予測する新規 PGx バイオマーカーの探索. **日本人類遺伝学会第 59 回大会** (2014 年 11 月 20 日, 東京).
 - 4) Utsugisawa T, Uchiyama T, Ogura H, Aoki T, Ohara A, Ishiguro A, Kojima S, Ohga S, Ito E, Kanno H. Elevated red cell reduced glutathione is a novel biomarker of Diamond-Blackfan anemia. 56th ASH Annual Meeting & Exposition (2014 年 12 月 6 日, San Francisco, USA).
 - 5) 市東正幸, 青木貴子, 槍澤大樹, 小倉浩美, 大賀正一, 岩井朝幸, 未延聡一, 伊藤悦朗, 奥野友介, 小島勢二, 小川誠司, 菅野仁. 原因不明先天性溶血性貧血症例の全エクソーム解析による膜骨格蛋白遺伝子変異の同定. **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
 - 6) 菅野仁, 青木貴子, 市東正幸, 槍澤大樹, 小倉浩美. わが国における G6PD 異常症の現状. **第 76 回日本血液学会学術集会** (2014 年 10 月 31 日, 大阪).
 - 7) 菅野仁. 新生児・乳児期に発症する先天性溶血性貧血の病因と診断. **第 24 回日本産婦人科・新生児血液学会学術集会** (2014 年 6 月 13 日, 横浜).
 - 8) 槍澤大樹, 岡本好雄, 松田和樹, 久保田友晶,

守屋友美，及川美幸，李舞香，木下明美，千野峰子，岡田真一，高源ゆみ，青木正弘，中林恭子，今野マユミ，小林博人，小倉浩美，菅野仁．安全な CART の運用と適応拡大への新たな試み．**第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会**（2014 年 5 月 15 日，奈良）．

- 9) 岡本好雄，松田和樹，久保田友晶，守屋友美，及川美幸，李舞香，木下明美，千野峰子，岡田真一，高源ゆみ，青木正弘，中林恭子，今野マユミ，槍澤大樹，小林博人，小倉浩美，菅野仁．クリオプレシピテート製剤の院内調製と心臓血管外科手術への応用．**第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会**（2014 年 5 月 15 日，奈良）．
- 10) 久保田友晶，松田和樹，守屋友美，及川美幸，李舞香，木下明美，千野峰子，岡田真一，高源ゆみ，青木正弘，中林恭子，岡本好雄，今野マユミ，槍澤大樹，小林博人，小倉浩美，菅野仁．非溶血性輸血副作用発生状況と副作用報告回収率改善への取り組み．**第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会**（2014 年 5 月 15 日，奈良）．
- 11) 松田和樹，久保田友晶，守屋友美，及川美幸，李舞香，木下明美，千野峰子，岡田真一，高源ゆみ，青木正弘，中林恭子，岡本好雄，今野マユミ，槍澤大樹，小林博人，小倉浩美，菅野仁．当院における静注用免疫グロブリン（IVIG）の使用状況について．**第 62 回日本輸血・細胞治療学会総会**（2014 年 5 月 15 日，奈良）．
- 12) 槍澤大樹，岡本好雄，菅野仁．安全な CART の運用と低温保存腹水を用いた適応拡大への新たな試み **第 35 回日本アフェレシス学会学術集会ワークショップ**（2014 年 9 月 27 日，東京）．

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし