

V. 移植前処置

移植前処置は移植施設に委ねる。

VI. 移植片対宿主病予防

以下の2法の内いづれかを選択する。但し1)を選択した場合は前処置に抗ヒト胸腺細胞ウマ免疫グロブリン(ATG) (リンフォグロブリン; ローヌ・プーランローラー)を追加する。

ATG 10mg/kg/day IV; day -4,-3,-2,-1 の4日間

1) CSA + sMTX(+ methyl-PSL)

CSA; 3mg/kg/day conti.iv day -1～ 血中濃度を調整、経口投与が可能になり次第経口投与に変更、約1年間継続投与し、CGVHDが無ければ中止

MTX; day 1,3,6 に7.5mg/sqm を静注

(methyl-PSL; 0.5mg/kg/day day 7~13、1.0mg/kg/day day 14~27、以後漸次減量)

2) FK-506 + MTX (+ methyl-PSL)

FK-506; 0.03mg/kg/day conti.iv day-1～ 血中濃度を調整、経口投与が可能になり次第経口投与に変更(点滴投与量の3倍量)、約1年間継続投与し、CGVHDが無ければ中止

MTX; day 1,3,6 に7.5mg/sqm を静注

(methyl-PSL; 0.5mg/kg/day day 7~13、1.0mg/kg/day day 14~27、以後漸次減量)

VII. その他の治療・支持療法

全ての症例は、移植前後の骨髄無形成の期間無菌室(LAF room)で管理する。腸内殺菌は、同種骨髄移植に準じて行う。その方法は移植施設に委ねる。移植後は全例 G-CSF を投与する。

単純性ヘルペスウイルス感染に対する acyclovir の予防投与、サイトメガロウイルス感染に対する ganciclovir の preemptive therapy(CMV 抗原血症、ウイルス血症を参考) は行う。

pneumocystis carinii の予防として好中球が $1000/\mu\text{L}$ くに回復すれば速やかにバクターを投与する。

GVHD の治療法の選択は移植施設に委ねる。

細菌および真菌感染症に対する予防・治療は移植施設に委ねる。

VIII. 移植

移植前にドナーおよびレシピエントの細胞・DNA および血清が保存されているかどうかを確認すること。

臍帯血標本の融解は移植施設に於いて、37℃の恒温そうで行う。洗浄を行うかどうかは移植施設が決定する。

IX. 観察項目ならびに評価の基準

1) データの収集

2 抗原不一致非血縁臍帯血移植における、生着・移植片対宿主病・生存率を評価する。

患者登録・調査用紙は移植時に近畿臍帯血バンクから移植施設の主治医に郵送する。移植施設の主治医は移植終了後1ヶ月の時点で初回の報告を行わねばならない。その後は、3、6、9、12ヶ月目、以後1年毎の報告を行うものとする。

2) 生着

— 好中球数 $500/\mu\text{l}$ が3日間連続して続いた最初の日をもって生着 (engraftment) とする。

— 移植後45日を経過しても好中球数が $500/\mu\text{l}$ くに達しないものを生着不全 (no engraftment) とする。

— 網状赤血球数 1% <、血小板数 $20000/\mu\text{l}$ <、 $50000/\mu\text{l}$ くに達した日、最終血小板輸血・赤血球輸血日を記載する。

生着は以下の検査でモニターする。

血算 (白血球分類を含む) ; 連日

輸血回数

キメリズムの検査 (性染色体、個体識別など)

骨髄穿刺

3) 免疫学的回復

免疫再構築の検査を行う。最低限、リンパ球絶対数およびリンパ球サブセット (CD3, CD4, CD8, CD57, CD20) の回復過程を記載する。

感染症の合併を記載する。

4) 毒性

移植前処置による臓器毒性 (regimen related toxicity;RRT) は、Bearmanらの基準に準じて記載する#。

肝静脈閉塞症の診断は、McDonald あるいはJones の診断基準®による。

間質性肺炎、ARDS(acute respiratory distress syndrome)、HUS(hemolytic and uremic syndrome)については、胸部レントゲン撮影、酸素飽和度、動脈血酸素分圧、腎機能検査などにより注意深く観察されねばならない。

Bearman SI et al. J Clin Oncol 6;1562-1568,1988.

@ McDonald の診断基準；移植後 30 日以内に、黄疸、肝腫大と右上腹部痛、腹水貯留の内、2つ以上の所見を認める。

Jones の診断基準；移植後 3 週以内に 2mg/dl 以上の高ビリルビン血症の他に肝腫大、腹水貯留、5%以上の体重増加の内、2つ以上の所見を認める。

5) 移植片対宿主病

急性移植片対宿主病の診断は、Glucksberg H#らの基準によって判定する。

; Transplantation 18; 295-304,1974.

X. データの解析ならびに発表

近畿臍帯血バンク臨床評価委員会においてデータの収集・解析を行いその臨床データを発表する。発表前には移植施設に発表内容を報告し承諾を得るものとする。

厚生科学研究費補助金 (感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業)
分担研究報告書

研究課題 造血幹細胞のex vivo増幅と臨床応用に関する研究

分担研究者 中畑龍俊 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨 わが国で開発されたNOD/Shi/SCIDマウスを用いたヒト造血幹細胞の測定法の開発に成功した。臍帯血CD34⁺細胞を10,000個以上移植したマウスにおいては、末梢血、骨髄、脾臓中に骨髓系細胞、Bリンパ球が検出可能で、多数のCD34⁺細胞を移植したマウスにおいては、ヒト赤芽球、血小板、NK細胞が検出可能であった。sIL-6/RIL-6複合体とSCF, TPO, FLを組み合わせることにより、未分化ヒト造血前駆細胞が著明に増幅できることが明らかとなった。この系でヒト造血幹細胞が増幅できるか否かNOD/SCIDマウスを用いて検討中である。Ex vivo増幅造血幹細胞の臨床応用に向けたガイドラインを検討した。

A. 研究目的

最近、わが国においても臍帯血を用いた造血幹細胞移植が盛んに行なわれているが、その基礎となる造血幹細胞の基礎的な研究は余り進んでいない。本研究の目的は、臍帯血中の造血幹細胞や造血前駆細胞の特徴を明らかにするとともに、造血幹細胞のin vivo測定法の確立、造血幹細胞のex vivo増幅法を開発することである。とくに造血幹細胞のex vivo増幅法の確立は、現在小児に限られている臍帯血移植の適応を成人にまで広げるための緊急の課題と考えられる。また、造血前駆細胞の増幅であっても、これを併用することにより臍帯血移植で問題となっている移植後血球回復の遅延を改善することが期待され、臨床的な貢献度は極めて大きいと考えられる。このような観点から研究を行なった。

B. 研究方法

1. ヒト造血幹細胞のin vivo測定法の開発

NOD/SCIDマウスを用いたヒト造血幹細胞の測定法を開発するため、欧米で用いられているNOD/SCIDマウスとstrainの異なるわが国で開発されたNOD/Shi/SCIDマウスを用いて検討した。我々の用いたNOD/SCIDマウスおよび他の免疫不全マウスで見られる免疫不

全の特徴を表1に示した。

表1. 免疫不全マウスの特徴

Mouse Strain	Immunodeficiency
C.B-17-scid	T, B cell deficient
NOD/Shi-scid	T, B cell deficient macrophage 機能低下 補体活性低下
NOD/LtSz-scid	T, B cell deficient macrophage 機能低下 補体活性低下 NK cell 活性低下

NOD/Shi/SCIDマウスに種々の量の全身放射線照射後、ヒト臍帯血よりイムノビーズあるいはFACSを用いて分離されたCD34⁺細胞を尾静脈より移植した。

移植後経時的にマウスを殺し、末梢血、骨髄、脾臓、胸腺中のヒト細胞の存在をフローサイトメトリーで解析した。フローサイトメトリーには抗ヒトCD45抗体および抗ヒトCD34抗体、抗ヒトCD33抗体、抗ヒトCD13抗体、抗ヒトCD3抗体、抗ヒトCD4抗体、抗ヒトCD8抗体、

抗ヒトCD10抗体,抗ヒトCD19抗体,抗ヒトCD41b抗体,抗ヒトGPA抗体,抗ヒトIgM抗体,抗ヒトCD56抗体を用いた。また、移植後一定の間隔で抗アジアロGM1抗体をマウスに投与しその効果を検討した。

2. 臍帯血造血幹細胞のex vivo増幅法の検討

ヒト臍帯血よりイムノビーズあるいはFACSを用いて分離されたCD34⁺細胞を各種サイトカイン、可溶性IL-6受容体(sIL-6R)存在下に液体培養後、経時的に培養細胞の一部を取り出し、その中に含まれる各種造血前駆細胞数をメチルセルロース法で測定した。培養前に一定のCD34⁺細胞中に含まれていた造血前駆細胞数と比較することにより、各種造血前駆細胞の増幅を計算した。一部の実験では増幅前と培養後のCD34⁺細胞をNOD/Shi/SCIDマウスに移植し、3カ月経過後のマウス骨髄、末梢血中の各種ヒト細胞の比率をフローサイトメトリーを用いて測定し、ヒト造血幹細胞のex vivo増幅について検討した。

3. ex vivo増幅造血幹細胞・造血前駆細胞の臨床応用に向けたガイドラインについて検討した。

C. 研究結果

1. ヒト造血幹細胞のin vivo測定法の開発

NOD/Shi/SCIDマウスに対する移植前処置としての全身放射線照射についての検討では、250-280 radsが至適であると判断された。ヒト臍帯血CD34⁺細胞を10,000個以上移植したマウスにおいては、ヒト細胞がフローサイトメトリーで検出可能であった。移植後3カ月の時点でヒト細胞が末梢血中に検出できたマウスにおいては、その後も安定してヒト細胞が検出可能であった。末梢血、骨髄、脾臓、胸腺中のヒト細胞の解析では、ヒトCD45陽性かつCD34陽性細胞、CD33、CD13陽性骨髄系の細胞、CD10、CD19、IgM陽性な各種段階のBリンパ球が検出できた。また、多数の

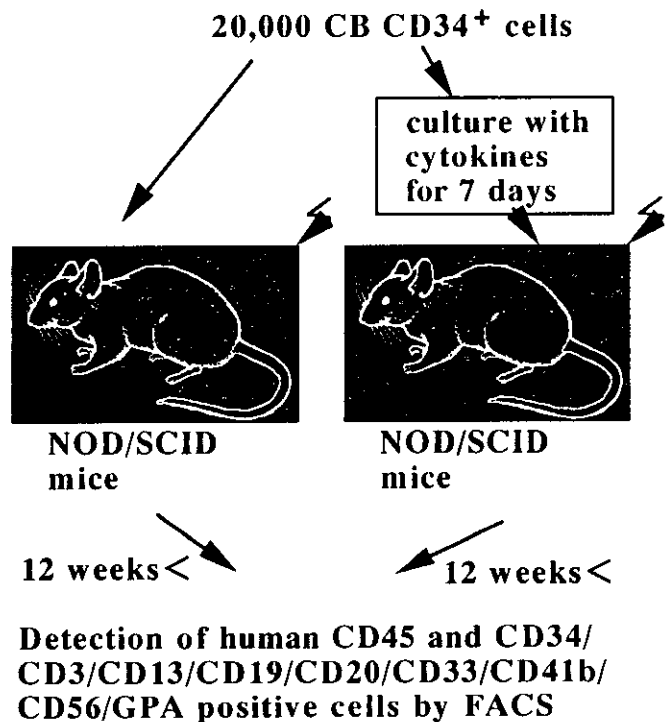
ヒト臍帯血CD34⁺細胞を移植したマウスにおいては、さらにGPA陽性の赤芽球、ヒトCD41b陽性の巨核球、血小板やCD56陽性のNK細胞が検出可能であった。

2. 臍帯血造血幹細胞のex vivo増幅法の検討

昨年、われわれはIL-6,可溶性IL-6受容体(sIL-6R), stem cell factor (SCF)存在下にヒトCD34⁺細胞を液体培養すると、様々な造血前駆細胞の著明な増幅が得られることを報告した。さらに、Flk2/Flt3リガンド(FL)がIL-6+sIL-6Rと著明な相乗効果を示し、種々の造血前駆細胞のex vivo増幅を刺激することが明らかとなった。またSCF, IL-6, sIL-6Rの系にTPOを添加するとさらに著明な造血前駆細胞の増幅が得られた。

以上のようにsIL-6/RIL-6複合体とSCF, TPO, FLを組み合わせるにより、未分化ヒト造血前駆細胞が著明に増幅できることが明らかとなった。この系でヒト造血幹細胞が増幅できるか否かNOD/SCIDマウスを用いて検討中である(図1)。

図1. SCID repopulating cells (SRC) assay



まだ、確定的なことは言えないが、sIL-6/RIL-6複合体とSCF, TPO, FLを組み合わせて1週間培養した後移植したマウスの方が、培養せずに移植したマウスよりも多くのヒト細胞が検出できる傾向が見られている。

3. ex vivo増幅造血前駆細胞の臨床応用に向けたガイドラインについて検討

体外で増幅した造血幹細胞/造血前駆細胞を実際の臨床に用いるにあたっては、その安全性、有効性に細心の注意を払わねばならない。安全性確保のためには4つの基本原則が考えられる。実際問題として処理施設、設備、用いる資材、試薬(培養液、サイトカインなど)操作手順などについて今後詳細に検討していく必要がある。また品質管理試験の内容についても検討していく必要がある。システム管理を含む一定の基準を検討し、体外増幅造血幹細胞/造血前駆細胞の臨床応用のためのガイドライン作成を目指す予定である。

[考察]

造血幹細胞は自己複製能と多分化能を合わせ持った細胞であり、特に前者は臍帯血移植などの造血幹細胞移植の治療根拠となっている。造血幹細胞の自己複製能はマウスでは実験的骨髄移植による長期骨髄再建能により評価されてきた。しかしヒトではin vivoの骨髄再構築実験を行なうことができなかったため、もっぱらin vitroのコロニー法を用いてCFU-GM, CFU-Mix、芽球コロニー形成細胞: CFU-Blast、LTC-IC(long-term culture-initiating cell)などの造血前駆細胞を測定して造血幹細胞の数を類推してきた。本研究の主題であるヒト造血幹細胞のex vivo増幅を評価し、臨床に結びつけるためにはヒト造血幹細胞の評価系の確立が急務となってきている。従来よりさまざまな動物を用いてヒト造血幹細胞の長期骨髄再構築能を検証する試みがなされてきた。我々もSCID(重症免疫不全)マウスに様々なヒトサイトカイン遺伝子を導入したトランスジェニックSCIDマウスを作成し、

このマウスにヒト臍帯血や骨髄細胞を移植する実験を行ったがうまく行かなかった。最近、NOD/SCIDマウスにヒト造血幹細胞が定着し、マウスの骨髄中でヒト細胞が産生されることが明らかとなった。この方法により測定される細胞は(SCID-repopulating cells:SRC)と呼ばれ、現時点で測定可能な最も造血幹細胞に近い細胞と考えられている。NOD/SCIDマウスは糖尿病マウスと免疫不全マウスを掛け合わせて作られたマウスで、T細胞、B細胞の異常に加え補体活性の低下、マクロファージ機能やNK活性に障害を持つマウスである。われわれはNOD/Shi/SCIDマウスを用いてヒト造血幹細胞のin vivo測定法を検討し、比較的安定した評価系が確立された。現在では、5万個のヒト臍帯血CD34⁺細胞を移植すると数カ月以上経っても、マウス骨髄、末梢血の一部をヒト型に置き換えることが出来るようになってきている(投稿中)。成熟T細胞を除き全てのヒト型の血球が見られ、マウス骨髄中でヒトCD34⁺細胞が著明に増加していることから、移植されたCD34⁺細胞はマウス体内で自己複製していると考えられる。この実験から少なくともヒト臍帯血中の造血幹細胞はCD34⁺細胞分画中にも存在することが確認できたと言えよう。NOD/SCIDマウスは寿命が約1年と短い、このマウスからヒト細胞を取り出し別のマウスへ移植を繰り返すことにより、数年にわたる観察も可能である。このようにNOD/SCIDマウスはヒト造血幹細胞の測定系になりうるということが明らかとなってきた。今後、この系を用いてヒト造血幹細胞の定量的な測定法が開発され、ex vivo増幅造血幹細胞の評価系となることが期待されている。

近年、ex vivoで造血幹細胞や造血前駆細胞を増幅する研究が盛んに行われている。本研究の成果は現在小児に限定されている臍帯血移植の成人への適応拡大、血球回復の遅い臍帯血移植の安全性向上につながる技術として期待されている。現在までに種々のサイトカ

インを組み合わせた試みが世界中でなされているが、未だ成功したとは言い難い。一般に標的細胞として臍帯血より分離したCD34⁺細胞またはその亜分画を用い、種々のサイトカインを組み合わせて培養している。様々な組み合わせが用いられているが、いずれが最もよいか解っていない。IL-3, IL-6, SCFを基本とする報告が多いが、未分化な細胞にはIL-6Rは発現していないことからこの組み合わせでIL-6が有効に機能しているとは思われない。全く予備的な検討ではあるが、ex vivo増幅HPCを用いた移植も開始されている。今年度の我々の検討では、IL-6, sIL-6Rによるgp130の活性化とSCFあるいはFLにTPOを加えることにより、臍帯血CD34⁺細胞から様々な造血前駆細胞の著明な増幅が得られ、特にCFU-Mixの増幅は従来の他のサイトカインの組み合わせを用いた報告と比べ顕著であった。この培養系では未分化な造血前駆細胞に加えて、長期に骨髄再構築能を持った造血幹細胞の自己複製が得られるか否かNOD/SCIDマウスを用いて検討中である。sIL-6/RIL-6複合体, SCF, TPO, FLを組み合わせて1週間培養した後移植したマウスの方が、培養せずに移植したマウスよりも多くのヒト細胞が検出できる傾向が見られており、この培養系で造血幹細胞の増幅が得られる可能性が示唆された。最近、通常造血幹細胞表面には発現していない、しかも細胞の増殖は促すが分化は刺激しない受容体遺伝子を造血幹細胞に導入し、対応するリガンドを用いて造血幹細胞を増幅する試みが行われている。われわれはアデノウイルスベクターを用いて一過性にEGF (epidermal growth factor)受容体遺伝子をヒトCD34⁺細胞に導入し、EGF存在下で短期培養することによりLTCICの増幅に成功している。今後、このような試みも造血幹細胞のex vivo増幅のための一つの方向になっていく可能性も考えられる。以上のように本研究により造血幹細胞のex vivo増幅が得られる可能性

が示唆されることから、造血前駆細胞の臨床応用に向けたガイドラインの策定が急務と考えられる。

E. 結論

NOD/Shi/SCIDマウスを用いたヒト造血幹細胞の測定法を開発に成功した。sIL-6/RIL-6複合体とSCF, TPO, FLを組み合わせることで、ヒトが増幅できる可能性が示唆された。Ex vivo増幅造血幹細胞の臨床応用に向けたガイドラインを検討した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Manabe A., Mori T., Ebihara Y., Koyama T., Okuyama I., Hosoya R., Kaneko M., Ishimoto K., Nakahata T., Nakazawa S.: Characterization of leukemic cells in CD2/CD19 double positive acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Hematol.* 67:45-52,1998.
- 2) Mukouyama Y., Hara T., Xu M., Tamura K., Donovan P.J., Kim H., Kogo H., Tsuji K., Nakahata T., Miyajima A.: Induction of hematopoiesis by oncostatin M in the AGM region. *Immunity* 8:105-114,1998.
- 3) Toru H., Eguchi M., Matsumoto R., Yanagida M., Yata J., Nakahata T.: IL-4 promotes the development of tryptase and chymase double positive human mast cells accompanied with cell maturation. *Blood* 91:187-195,1998.
- 4) Nakahata T.: Characteristics of hemopoietic stem/progenitor cells in bone marrow, peripheral blood and cord blood. *Int. J. Pediatr. Hematol. Oncology* 5:60-61,1998.
- 5) Takahashi T., Yamada K., Tanaka T., Kumano K., Kurokawa M., Takahashi

- T., Hirano N., Honda H., Chiba S., Tsuji K., Yazaki Y., Nakahata T., Hirai H.: A novel molecular approach to ex vivo hematopoietic expansion with recombinant EGFR-expressing adenovirus vector. *Blood* 91:4509-4515,1998.
- 6) Nishihara M., Wada Y., Ogami K., Tsuji K., Mori K., Ueno H., Asano S., Nakahata T., Maekawa T.: A combination of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor enhances the growth of human progenitor B cells supported by murine stromal cell line MS-5. *Eur. J. Immunol.* 28: 855-864, 1998.
- 7) Tsuji K., Muraoka K., Nakahata T.: Interferon-g and human megakaryopoiesis. *Leukemia and Lymphoma* 31:107-113,1998..
- 8) Tajika K., Ikebuchi K., Inokuchi K., Hasegawa S., Dan K., Sekiguchi S., Nakahata T., Asano S.: IL-6 and SCF exert different effects on megakaryocyte maturation. *Brit. J. Haematol.* 100:105-111,1998.
- 9) Ishiguro A., Ishikita T., Shimbo T., Matsubara K., Baba K., Hayashi Y., Naritake S., Nakahata T.: Elevation of serum thrombopoietin precedes thrombocytopoiesis in Kawasaki disease. *Thromb. Haemostasis* 79:1096-1100, 1998.
- 10) Yoshida K., Taga T., Saito M., Kumanogoh A., Tanaka T., Ozono K., Nakayama M., Nakahata T., Yoshida N., Kishimoto T.: Myocardial, hematological, and placental disorders caused by targeted disruption of gp130, a common signal transducer for IL-6 family of cytokines. *Contemporary Immunology: Cytokine Knockouts* (Durum S.K. & Muegge K. eds), Humana Press Inc. Totowa, NJ, pp259-289,1998.
- 11) Suzuki H., Takei M., Nakahata T., Fukamachi H.: Inhibitory effect of adenosine on degranulation of human cultured mast cells upon cross-linking of FcεRI. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 242:697-702,1998.
- 12) Sato T., Watanabe S., Ishii E., Tsuji K., Nakahata T.: Induction of the erythropoietin receptor gene and acquisition of responsiveness to erythropoietin by stem cell factor in HML/SE, a human leukemic cell line. *J. Biol. Chem.* 273:16921-16926,1998.
- 13) Maruyama K., Tsuji K., Tanaka R., Yamada K., Kodera Y., Nakahata T.: Characterization of peripheral blood progenitor cells mobilized by Nartograstim (N-terminal replaced granulocyte colony-stimulating factor) in normal volunteers. *Bone Marrow Transplant.* 22:313-320,1998.
- 14) Xu M., Tsuji K., Mukoyama Y., Hara T., Nishihara M., Ebihara Y., Kaneko A., Ueda T., Matsuoka S., Yang F., Manabe A., Kikuchi A., Miyajima A., Nakahata T.: Stimulation of mouse and human primitive hematopoiesis by murine embryonic aorta-gonad-mesonephros-derived stromal cells. *Blood* 192:2032-2040,1998.
- 15) Shichijo M., Inagaki N., Nakai N., Kimata M., Nakahata T., Serizawa I., Iikura Y., Saito H., Nagai H.: The effect of anti-asthma drugs on mediator release from cultured human mast cells. *Clin. Exp. Allergy* 28:1229-1236,1998.
- 16) Sako M., Ogawa H., Okamura J.,

- Tamaki H., Nakahata T., Kishimoto T., Sugiyama H.: Abnormal expression of Wilms' tumor gene WT1 in juvenile chronic myeloid leukemia and infantile monosomy 7 syndrome. *Leukemia Res.* 22:965-967,1998.
- 17) Toru H., Pawankar R., Ra C., Yata J., Nakahata T.: Human mast cells produce interleukin-13 by high affinity IgE receptor cross-linking: enhanced IL-13 production by IL-4 primed human mast cells. *J. Allergy and Clin. Immunol.* 102:491-502,1998.
- 18) Yang FC, Watanabe S., Tsuji K., Xu MJ, Kaneko A., Ebihara Y., Nakahata T.: Human G-CSF stimulates the development of primitive multipotential progenitors of human G-CSF receptor-transgenic mice, but does not affect their commitment in vitro and in vivo. *Blood* 92:1632-1640,1998.
- 19) Nakahata T., Sui X., Tajima S., Tsuji K., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T.: Ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitors. *Stem Cells.* in press.
- 20) Sui X., Tsuji K., Ebihara Y., Tanaka R., Muraoka K., Yoshida M., Yamada K., Yasukawa K., Taga T., Kishimoto T., Nakahata T.: Soluble IL-6 receptor with IL-6 stimulates megakaryopoiesis from human CD34+ cells through gp130 signaling. *Blood* in press.
- 21) Yang FC., Tsuji K., Oda A., Xu MJ., Ebihara Y., Kaneko A., Hanada S., Mitsui T., Kikuchi A., Manabe A., Watanabe S., Ikeda Y., Nakahata T.: Effects of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) on megakaryopoiesis and platelet function in hG-CSF receptor-transgenic mice. *Blood* in press.
- 22) Taniguchi T., Endo H., Chikatsu N., Uchamaru K., Asano S., Fujita T., Nakahata T., Motokura T.: Expression of p21Cip1/Waf1/Sdi1 and p27 Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. *Blood* in press.
- 23) Duraisamy K., Saito H., Kaneko A., Fukagawa K., Nakayama M., Tomikawa M., Tachimoto H., Ebisawa M., Akasawa A., Miyagi T., Kimura H., Nakajima T., Tsuji K., Nakahata T.: Characterization of mast-cell-committed progenitors present in human cord blood. *Blood* in press.
- 24) Nakahata T., Toru H.: Development of human mast cells. *Adv. Immunol.* in press.
- 25) Hasegawa S., Pawankar R., Suzuki K., Nakahata T., Furukawa S., Okumura K., Ra C.: Functional expression of the high affinity receptor for IgE (Fc epsilon RI) in human platelets and its intracellular expression in human megakaryocytes. *Blood* in press.
- 26) Hibino H., Tani K., Ikebuchi K., Wu M-S., Sugiyama H., Nakazaki Y., Tanabe T., Takahashi S., Tojo A., Suzuki S., Tanioka Y., Sugimoto Y., Nakahata T., Asano S.: Common Mamoset as a target preclinical primate for cytokine and gene therapy studies. *Blood* in press.
- 27) Matsumoto T., Seki Y., Kubo M., Ohtsuka1S., Suzuki1A., Hayashi I., Tsuji K., Nakahata T., Okabe M., Yamada S., Yoshimura A.: Defective STAT5 function and altered T cell development in the cytokine-inducible

- SH2 protein-1 (CIS1)-transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* in press.
- 28) Kobayashi M., Ueda K., Kojima S., Ishiguro A., Shimbo T., Nishihira H., Nakahata T.: Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in patients with chronic neutropenia of childhood: Modulation of G-CSF levels by myeloid precursor cell mass. *Brit. J. Haematol.* in press.
- 29) 中畑龍俊：造血幹細胞のin vitro増幅。特集 造血幹細胞移植の基礎と臨床。最新医学53:56-64, 1998.
- 30) 甲斐丈士、村岡健司、野村明彦、住江愛子、岩本彰太郎、武弘道、二木真琴、中畑龍俊：同年齢時に汎血球減少で発症したFanconi貧血の同胞例。小児科臨床51:2098-2102, 1998.
- 31) 中畑龍俊：造血幹細胞の試験管内増幅。臨床科学34:1162-1170, 1998.
- 32) 中畑龍俊：造血幹細胞のカイネテイクス。総合臨床47:2645-265, 1998.
- 33) 中畑龍俊：造血幹細胞の純化とex vivo増幅。カレントセラピー16:98-10, 1998.
- 34) 梅本有美、中畑龍俊：レプチンと造血。高久史磨、宮崎澄雄、斎藤英彦、溝口秀昭、坂田洋一（編）、Annual Review 血液1998、pp 1-7、中外医学社、1998.
- 36) 中畑龍俊：造血幹細胞。三輪史朗（監修）、赤血球、pp1-15、医学書院、1998.
- 37) 中畑龍俊 他：分子細胞生物学辞典、村松正実（編）、東京化学同人、1998.
- 38) 中畑龍俊、二木真琴：Fanconi貧血。日本遺伝子治療学会編、遺伝子治療開発研究ハンドブック、印刷中
2. 学会発表
- 1) 中畑龍俊：造血幹細胞移植法の現状と将来への展望。第11回 自己血輸血学術総会 サテライトシンポジウム、埼玉、1998.
- 2) 融葉乃、中畑龍俊：サイトカインによるヒト肥満細胞分化の調節。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
- 3) 本田浩章、鈴木隆浩、稲葉俊也、辻浩一郎、中畑龍俊、Thomas Look、矢崎義雄、平井久丸：E2A-HLF発現マウスにおけるリンパ球の発達異常及び白血病の発症。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
- 4) 二木真琴、岩尾宏、宮島篤、中畑龍俊、浅野茂隆、山下孝之：レチノイン酸(RA)によるJAK2/STAT5の持続的活性化と赤芽球系分化。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
- 5) 真部淳、海老原康博、菊地陽、辻浩一郎、中畑龍俊：ビーズを用いたフローサイトメトリー(FCM)による少数細胞の解析法の開発。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
- 6) 前川平、西原政道、石井武文、和田結花、尾上和夫、中畑龍俊、浅野茂隆：キメラ骨格を有するBcl-2アンチセンス核酸による白血病細胞の増殖制御に関する検討。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
- 7) 谷口俊恭、千勝紀生、本倉徹、藤田敏郎、浅野茂隆、中畑龍俊：ヒト造血コロニーにおけるp21,p27発現の解析。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
- 8) 西原政道、石井武文、海老原康博、和田結花、尾上和夫、辻浩一郎、上野均、浅野茂隆、中畑龍俊、前川平：臍帯血をもちいたヒトBリンパ球造血前駆細胞培養系の開発と分化増殖動態の解析。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
- 9) 許明江、植田高弘、海老原康博、辻浩一郎、宮島篤、中畑龍俊：マウスGM領域由来ストローマ細胞株、AGM-S3細胞のヒト及びマウス造血支持能の解析。第60回

- 日本血液学会総会、大阪、1998.
- 10) 辻村秀樹、東條有伸、長山人三、谷憲三朗、海老原康博、中畑龍俊、浅野茂隆：CMLにおける末梢血樹状細胞の解析—健康者との比較。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
 - 11) 山田薫、日比野仁、辻浩一郎、谷憲三朗、杉本芳一、中畑龍俊：可溶性IL-6受容体を用いたヒト造血幹細胞への遺伝子導入の試み。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
 - 12) 向山洋介、原孝彦、中畑龍俊、宮島篤：AGM(aorta-gonad-mesonephros)領域初代培養系における未分化造血細胞・血管内皮細胞の増幅。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
 - 13) 楊逢春、渡辺すみ子、辻浩一郎、中畑龍俊：hG-CSFR-Tgマウス造血に対するhG-CSFのin vivo効果。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
 - 14) 佐藤剛、辻浩一郎、中畑龍俊：ヒト白血病細胞株におけるSCF刺激によるEPOR発現誘導とEPO感受性獲得。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
 - 15) 大野伸広、東條有伸、谷憲三朗、海老原康博、中畑龍俊、浅野茂隆：IgG-Fcフラグメント融合サイトカイン/接着分子の作製とその応用。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
 - 16) 植田高弘、吉野浩、海老原康博、真部淳、菊地陽、辻浩一郎、中畑龍俊：NOD-SCIDマウスを用いたヒト臍帯血造血幹細胞の造血再構築能の検討。第60回 日本血液学会総会、大阪、1998.
 - 17) 前川平、西原政道、石井武文、和田結花、尾上和夫、高橋恒夫、浅野茂隆、中畑龍俊：臍帯血をもちいたヒトBリンパ球造血前駆細胞培養系の開発。第46回 日本輸血学会総会、京都、1998.
 - 18) 小原明、小島勢二、今宿晋作、大賀正一、小池健一、小西省三郎、土田昌宏、別所文雄、花田良二、中畑龍俊、月本一郎：小児期の肝炎後再生不良性貧血全国調査。第101回小児科学会学術集会、鳥取、1998.
 - 19) 辻浩一郎、菊地陽、高橋恒夫、浅野茂隆、中畑龍俊：東京臍帯血バンクの現状。第101回小児科学会学術集会、鳥取、1998.
 - 20) 吉野浩、植田高弘、吉田真、海老原康博、菊地陽、真部淳、辻浩一郎、中畑龍俊：ヒト臍帯血造血幹細胞の造血能の検討。第101回小児科学会学術集会、鳥取、1998.
 - 21) Tada H., Ogawa Y., Kawano T., Goto A., Shirahata A., Horiuchi T., Ishikawa A., Nakahata T.: Long-term outcome of premature infants after erythropoietin treatment. International congress of pediatrics. Amsterdam, 1998.
 - 22) Shirahara A., Tada H., Ogawa Y., Kawano A., Goto A., Horiuchi T., Ishikawa A., Nakahata T.: The timing of the start of erythropoietin treatment for premature infants. International congress of pediatrics. Amsterdam, 1998.
 - 23) 中畑龍俊：教育講演 造血幹細胞移植の将来展望。第18回日本アフェシス学会学術大会、東京、1998.
 - 24) 白幡聡、多田裕、小川雄之亮、河野寿夫、後藤彰子、堀内勁、石川昭、中畑龍俊：未熟児貧血に対するエリスロポエチン製剤の投与時期に関する検討。第34回日本新生児学会学術集会、福岡、1998.
 - 25) 中畑龍俊：造血幹細胞の増殖・分化機構とその臨床応用。第21回シスメックス血液学セミナー—東京、神戸、1998.
 - 26) 中畑龍俊：臍帯血移植の現状と将来。がんの子供を守る会・平成10年度定期総会。

- 東京、1998.
- 27) 中畑龍俊：特別講演 小児MDSの診断と治療. 第4回日本小児がんセミナー、岡山県、1998.
- 28) K.Misawa, S.Morita, T.Nosaka, A.Kaneko, T.Nakahata, T.Kitamura, : A novel expression cloning method FL-Rex that is designed to screen cDNA libraries based on the localization of the cDNA.: 27Th ISEH , Vancouver,1998.
- 29) Taniguchi T., Chikatsu N., Uchiyama K., Asano S, Fujita T, Nakahata T., Motokura T.: Expression of p21CIP1/WAF1/SDI1 and p27/KIP1 cycline-dependent kinase inhibitors during human hematopoiesis. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
- 30) Sato T., Maekawa T., Watanabe S., Tsuji K., Nakahata T.: Erythroid progenitors differentiate and mature by self-produced erythropoietin. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
- 31) Ebihara Y.,Tsuji K., Xu M.J., Manabe A., Kikuchi A., Kato S., Nakahata T.: Exclusive expression of G-CSF receptor on myeloid progenitors in bone marrow CD34+ cells. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
- 32) Ishii T., Nishihara M., Ma F., Ebihara Y., Tsuji K., Asano S., Nakahata T., Maekawa T.: Expression of CXCR4 (fusin) on human CD34+ bonemarrow cells results in loss of the potential for myeloid, erythroid, megakaryocytic and mixed colony formations. Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
- 33) Ohara a., Kojima S., Hibi S., Inada H., Kigasawa H., Okamura J., Ohga S., Toyoda Y., Bessyo F., Koike K., Konishi S., Tsuchida M., Hanada R., Imashuku S., Nakahata T., Tsukimoto I.: Development of MDS/AML in children with hepatitis associaten aplastic anemia following treatment with ALG, cyclosporine and rhG-CSF. Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
- 34) Xu M.J., Tsuji K., Matsuoka S., Yang F.C., Ebihara Y., Eguchi M., Nakahata T.: Evidence for the presence of murine primitive megakaryopoiesis in the early yolk sac. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
- 35) Yamada K., Futaki M., Miyake K., Suzuki N., Yamashita T., Shimada T., Nakahata T.: Rapid complementation analysis of Fanconi anemia (FA) using bicistronic retrovirus vector expressing FA typeA gene and green fluorescent protein. 40th Annual Meeting of the American Society of Hematology , Miami Beach, U.S.A.,1998.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし
 3. その他
特になし

IV. テーマー4

同種末梢血幹細胞移植

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
分担研究報告書

研究課題 新規リボザイムを用いた難治性白血病に対する遺伝子治療

分担研究者 浅野 茂隆 東京大学医科学研究所・病態薬理研究部・教授
研究協力者 田邊 剛 東京大学医科学研究所病態薬理学研究部・研究員
谷 憲三郎 東京大学医科学研究所病態薬理学研究部・助教授
多比良和誠 筑波大学応用生物科学系・工業技術院産業技術領域研究所・教授

研究要旨： 難治性白血病に対する新規遺伝子治療として、従来型のリボザイム法を改良したダイマー型ミニザイム法を開発した。ダイマー構造をとって作用するミニザイムの基質結合部位に **bcr-abl** 融合遺伝子配列を認識させ、他方で近傍の切断遺伝子配列を認識させ、融合遺伝子特異的な切断を試みた。これまで特異的な切断が不可能であった **b2a2** タイプの **bcr-abl mRNA** を、正常型 **mRNA** に影響せず切断できた。ダイマー型ミニザイムを導入した **bcr-abl** 発現細胞では、導入後約 10 日で 80 % 以上にアポトーシスが誘導されたが、非発現細胞には影響がなかった。NOD SCID マウスを用いた検討で、*in vivo* においても腫瘍増殖抑制効果が確認された。

A. 研究目的

難治性白血病に対して化学療法などの既存の治療法には限界があるため、他の革新的な治療法を開発していく必要がある。遺伝子治療はその候補の一つであり、中でもリボザイム法は標的細胞への特異性が高く、副作用も少ないことが予想されることから、癌やエイズの治療法として有望視されている。しかし、従来型のリボザイムでは病因となる融合遺伝子 **mRNA** のみを特異的に切断することが出来ないため、適応疾患が制限される。今回慢性骨髄性白血病 (**CML**) をモデルに新規リボザイムを作製し、細胞及び *in vivo* レベルでその有効性の検討を試みた。

B. 研究方法

従来のハンマーヘッド型リボザイムでは、切断部位に **GUC** の配列を必要とする。**CML** の、**bcr exon 2** と **abl exon 2** が融合するタイプにリボザイムを用いた場合、融合部位に **GUC** が存在せず、近傍がリボザイムの標的となり、正常型 **abl mRNA** も切断されることが問題だった。

今回ハンマーヘッド型リボザイムの直接切断に必要な領域を除去して小型化し、ダイマー構造をとらせることで同時に 2 つの基質に作用できるミニザイムを設計した。一方の基質結合部位で融合遺伝子部位を認識させ、他方で近傍の切断部位を認識させることにより、異常型 **mRNA** だけを特異的に切断することを試みた。

細胞レベルでの効果を (i) **b2a2** 型 **bcr-abl** 遺伝子を導入して **IL-3** 非依存性とした **Ba/F3** 細胞、(ii) **CML** 患者細胞由来の細胞株 **BV173**、(iii) **CML** 患者由来の芽球、の三種の細胞に対して、レトロウイルスベクターを用いてダイマー型ミニザイムを導入して検討した。

また、*in vivo* での効果を判定するために、**BV173** と患者由来の芽球にダイマー型ミニザイムを導入した後 **NOD SCID** マウスに注入し、腫瘍増殖抑制効果を検討した。

C. 研究結果

標的部位特異的な **bcr-abl mRNA** の切断が起こった。検討したそれぞれの細胞で導入後約 10 日で、80 % 以上にアポトーシスが誘導された。一方、**bcr-abl mRNA** を発現していない細胞ではアポトーシスは誘導されなかった。**NOD SCID** マウスでは、腫瘍細胞

を注入された場合には平均 10 週までに約 80% が腫瘍死したが、ダイマー型ミニザイムを導入した腫瘍細胞を注入された場合には、10 週を過ぎても腫瘍死したものはなかった。

D. 考案

bcr-abl mRNA の切断は予測された部位で起こり、**abl mRNA** は切断されないことから、極めて標的特異的な作用が示された。また、単に細胞に対してだけでなく、動物レベルでも明確な腫瘍増殖抑制効果が示された。

E. 結論

従来型のリボザイムでは特異的な切断が不可能であった **mRNA** に対しても作用可能なダイマー型ミニザイムが構築でき、あらゆる種類の **mRNA** を特異的に切断できる方法が確立できた。本治療法は正常細胞には副作用が無く安全に実施できるため、白血病・リンパ腫における *Ex vivo* パージングにも応用可能な新しくかつ選択的な治療法となり得るものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koseki S, Tanabe T, Tani K, Asano S, Shioda T, Nagai Y, Shimada T, Ohkawa J, Taira K: Factors governing the activity *in vivo* of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J Virol.* 1999 Mar;73(3): 1868-77.
- 2) Kuwabara T, Warashina M, Tanabe T, Tani K, Asano S, Taira K: A novel allosterically trans-activated ribozyme, the maxizyme, with exceptional specificity *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell.* 1998 Nov;2(5):617-27.

2. 学会発表

- 1) 第 61 回日本血液学会総会ワークショップ
BCR-ABL mRNA 発現細胞特異的にアポトーシスを誘導する新規リボザイムを用いた遺伝子治療
- 2) The 5th Annual Meeting 1999 The Japan Society of Gene Therapy : A novel ribozyme, the Maxizyme, that induce apoptosis to CML cells

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

分担研究報告書

研究課題	同種末梢血幹細胞移植に関する臨床的研究		
分担研究者	原 田 実 根	岡山大学医学部第二内科教授	
研究協力者	品 川 克 至	"	助手
	竹 中 克 斗	"	助手

研究要旨 同種末梢血幹細胞移植 (allogeneic-Peripheral Blood Stem Cell Transplantation;allo-PBSCT)の確立を目的に臨床的検討を行った。健常人ドナーに対する G-CSF(Granulocyte colony-stimulating factor)投与による PBSC 採取は安全に実施可能であるが、数%の頻度で採取不十分例がみられた。Allo-PBSCT では、移植後の造血回復は速やかで移植関連死亡は少なく、優れた移植後生存率が得られた。同種骨髄移植との比較では急性 GVHD (Ⅱ~Ⅳ度)の頻度は同程度であるが、慢性 GVHD の頻度は有意に増加することが明らかとなった。今後は、GVL 効果の点から長期成績の観察が必要である。Allo-PBSCT の利点から、非血縁者間骨髄移植でのドナーリクルート拡大への発展および 60 歳以上の高齢者への移植適応の拡大が期待される。

A. 研究目的

同種骨髄移植に代わる新しい造血幹細胞移植法として、同種末梢血幹細胞移植 (allogeneic-Peripheral Blood Stem Cell Transplantation;allo-PBSCT)の確立を目的とする。本研究では、健常人同胞ドナーからの PBSC の至適採取法および、PBSC を用いる同種移植術式を確立し、従来の同種骨髄移植(allo-BMT)との比較検討を行い、allo-PBSCT の特徴を明らかにする。さらに allo-PBSCT の利点を用いた新しい展開として、非血縁者間 PBSCT への可能性および高齢者への同種移植の適応拡大に関して検討する。

B. 研究方法

①1994 年 12 月~97 年 11 月に実施された allo-PBSCT 症例に関してアンケート形式の全国調査を実施し、解答が得られた 103 例について解析した。ドナーは HLA 一致同胞の他、HLA 不適合移植 13 例が含まれていた。レシピエントは年齢中央値 37 歳(5~61)、疾患は急性骨髄性

白血病(AML) 43 例、急性リンパ性白血病(ALL) 14 例、慢性骨髄性白血病(CML) 19 例、骨髄異形性症候群(MDS) 14 例、その他 13 例であった。白血病に関しては、スタンダードリスク症例が 41 例、ハイリスク症例が 53 例であった。移植前処置は、主に busulfan/cyclophosphamide (BU/CY)が 36 例、および total body irradiation(TBI)を含む regimen が 57 例であった。GVHD 予防は大多数の症例で cyclosporin(CSP)/short term methotrexate (sMTX)であった。②岡山大学医学部第二内科において、1995 年 4 月~1999 年 2 月の間に、ドナーに関しては 23 例が、移植施行症例では 18 例が解析可能であった。ドナーは年齢中央値 33 歳(15~64)、全例 HLA 一致同胞であった。レシピエントは年齢中央値 27 歳(16~49)、疾患は AML 10 例、ALL 1、CML 4 例、MDS 1 例、その他 2 例であり再発進行病期の症例が 18 例中 7 例であった。移植前処置は BU/CY または CA(cytosine-arabinoside) /TBI が行われ、GVHD 予防法は CSP/sMTX

または methyl-prednisolone(mPDN)が用いられた。③PBSCT 研究会 allo-PBSCT 分科会により多施設共同研究が行われ、1996年1月～1997年6月の間にスタンダードリスク白血病を対象に30例が登録され、26例が評価可能であった。ドナーは年齢中央値34歳(18～53)、全例HLA一致同胞であった。レシピエントは年齢中央値35.5歳(16～45)、疾患はAML11例、ALL3例、CML12例であった。移植前処置はBU/CYまたはCY/TBIを中心とした標準的方法が用いられ、GVHD予防法はCSP/sMTXが用いられた。④スタンダードリスク白血病に対するallo-PBSCTとallo-BMTとの比較研究を目的として、retrospectiveなmatched-pair analysisをおこなった。対象は、allo-PBSCT群はPBSCT研究会での26例、allo-BMT群は日本造血細胞移植学会全国集計データから、HLA一致同胞間移植で、年齢46歳以下、疾患はAMLの第1および第2寛解期、ALLの第1寛解期、CMLの第1慢性期、GVHD予防はCSP/sMTXのみによる、条件を満たす100例を抽出した。⑤岡山大学医学部第二内科において、高齢者へのallo-PBSCTの適応拡大を目的として55歳以上のドナーに対するPBSC採取を検討した。

C. 研究結果

①全国調査：レシピエントに移植されたCD34+細胞数は中央値5.3(1.0～30.4)×10⁶/kgであり、移植後の造血回復は好中球500/μl以上に中央値13日(7～49)、血小板20,000/μl以上に13日(7～40)であった。急性GVHDは評価可能99例中gradeⅡ～Ⅳが37例(37.4%)、gradeⅢ～Ⅳが16例(16.2%)であった。慢性GVHDは評価可能86例中、limitedが12例(14%)、extensiveが44例(51.2%)にみられた。②

岡山大学医学部第二内科；ドナーへのG-CSF投与は10μg/kg/dayの5日間であり、投与開始4または5日後に採取を行い、得られたCD34+細胞数は6.88(2.0～23.7)×10⁶/kgであった。採取不十分と考えられるCD34+細胞数3×10⁶/kg以下の例は22例中4例(17%)に見られた。採取のためのアフエレーシス回数は中央値2回であった。G-CSF投与に伴う副作用は骨痛が23例中21例(91%)、白血球増加(50,000/μl以上)が23例中7例(30%)にみられ、最高値は投与開始後5日目で中央値41,000/μl(22,200～90,700)であった。また血小板減少(100,000/μl以下)が23例中9例(39%)にみられ、最低値は投与開始後7日目で中央値122,000/μl(41,000～213,000)であった。いずれの副作用もG-CSF投与終了後一週以内に回復した。移植されたCD34+細胞数は中央値6.35(2.20～19.7)×10⁶/kgであり、移植後好中球500/μl以上の回復は中央値11(9～35)日、血小板20,000/μl以上の回復は14(12～25)日と速やかな造血回復を示し、全例遺伝子レベルで生着が確認された。急性GVHDはGradeⅡ～Ⅳが15例中3例(20%)、Ⅲ～Ⅳが15例中1例(7%)であり、慢性GVHDはextensive typeが15例中4例(27%)に見られた。③PBSCT研究会；ドナーへのG-CSF投与は10μg/kg/dayの5日間であり、得られたCD34+細胞数は6.4(0.4～26.5)×10⁶/kgであった。採取のためのアフエレーシス回数は2回以内が25例中22例(88%)であった。採取不十分と考えられるCD34+細胞数3×10⁶/kg以下の例が25例中2例(8%)に見られた。G-CSF投与に伴う副作用は、骨痛が25例中17例(68%)、白血球増加(50,000/μl以上)が25例中8例(32%)にみられ、最高値は投与開始後5日目で中央値43,300/μl(24,200～66,300)であっ

た。また血小板減少 ($100,000/\mu\text{l}$ 以下) が 25 例中 19 例 (76%) にみられ、最低値は投与開始後 6 日目で中央値 $79,000/\mu\text{l}$ ($43,000\sim 212,000$) であった。いずれの副作用も G-CSF 投与終了後一週以内に回復した。移植された CD34+細胞数は中央値 $7.3(2.0\sim 26.5)\times 10^6/\text{kg}$ であり、移植後好中球 $500/\mu\text{l}$ 以上の回復は中央値 12.5(9~20)日、血小板 $20,000/\mu\text{l}$ 以上の回復は 13(9~27)日と速やかな造血回復を示し、遺伝子レベルでも全例に生着が確認された。急性 GVHD は、Grade II~IV が 25 例中 9 例 (36%)、III~IV が 25 例中 2 例 (8%) であり、慢性 GVHD は limited type が 25 例中 3 例 (12%)、extensive type が 25 例中 16 例 (64%) に見られた。④スタンダードリスク白血病に対する allo-PBSCT と allo-BMT の比較検討により、両群の GVHD の頻度をロジスティック解析により年齢、性別、疾患、病期で補正したオッズ比 (Odds ratio) を求めて解析した。Grade II 以上の急性 GVHD は、allo-PBSCT 群で 36%、allo-BMT 群で 31% であり、ロジスティック解析から求めたオッズ比では Grade II 以上の急性 GVHD は allo-PBSCT 群で 1.26 倍多いという結果が得られたが、有意差は認めなかった。慢性 GVHD は allo-PBSCT 群で 76%、allo-BMT 群で 51% であり、同様の解析で allo-PBSCT 群で 2.98 倍多く有意差が認められた。⑤岡山大学医学部第二内科において、55 歳以上のドナー 4 例に対して PBSC 採取を検討した。年齢は平均 60 歳、白血球最高値は平均 $38,300/\mu\text{l}$ 、血小板最低値は平均 $98,000/\mu\text{l}$ であり、骨痛などの副作用も若年者と同様であった。採取された CD34+細胞数は、平均 $5.0(1.3\sim 10.0)\times 10^6/\text{kg}$ と良好であったが、1 例において血管の脆弱性によるブラッドアクセスの問題からアフエレーシスが不十

分であった。

D. 考 察

Allo-PBSCT において骨髄移植より有利な点は、①ドナーに関して全身麻酔や骨髄採取に伴うリスクがなく、骨髄移植に比しより安全に造血幹細胞が採取可能である、②好中球、血小板の早期生着により、感染症や輸血量の減少による移植安全性が向上する、③骨髄採取に比し多量の造血幹細胞及びリンパ球が得られるため、これを用いた免疫療法及び遺伝子治療などの細胞療法への応用が考えられる、等があげられる。これらの利点から、非血縁者間骨髄移植におけるドナーリクルート拡大への発展や高齢者への移植適応の拡大が期待される。一方解決すべき課題として、ドナー側では①PBSC 採取不能例に対する対策の確立、②ドナーの安全性確保のための短期的及び長期的副作用の追跡調査を目的としたドナー登録システムの確立、が重要であり、レシピエント側では③長期の造血能並びに免疫能の維持の確認、④慢性 GVHD に関して重症度と治療反応性及び予後に関する検討、⑤疾患および病期別の長期的な抗白血病効果、に関してさらに症例を集積し検討する必要がある。

E. 結 論

①健常人ドナーに対する G-CSF による PBSC 動員法により、移植に必要な CD34+細胞を十分採取可能であることが示されたが、少数例で動員不十分例がみられた。②G-CSF による PBSC 動員は、血小板減少が高率にみられるが、いずれも一時的であり他の副作用も可逆的で、安全に施行可能と考えられた。③移植後の好中球及び血小板の回復は速やかであった。④HLA 一致同胞間の allo-PBSCT

では、骨髄移植に比し急性 GVHD(Grade II~IV)の頻度には有意差は認められなかったが、慢性 GVHD の頻度は骨髄移植に比し有意に増加した。

以上の成績から、allo-PBSCT の非血縁者間移植への応用が考えられる。米国では NMDP 規約において、再移植が必要な場合にはドナーの意志によって骨髄採取または PBSC 採取の選択が可能になっている。欧州では、約 50 例の非血縁ドナーからの allo-PBSCT が報告されているが、血縁者の場合と同様に好中球の回復は速やかで、急性 GVHD(Grade II~IV)の頻度は従来の非血縁者間移植と同等であるとしている。慢性 GVHD に関してはさらに検討が必要である。非血縁者間 allo-PBSCT において予想される有利な点は、①ドナーに関しては、全身麻酔や骨髄採取に伴うリスクがなく、より快適で安全な造血幹細胞採取法と考えられるため、骨髄バンクのドナーリクルート拡大が期待できる、②移植後の速やかな造血回復により、感染症や輸血量が減少し、移植成績の向上が期待される、ことが特筆されよう。

また、allo-PBSCT の高齢者への移植適応の拡大が期待される。従来、同種骨髄移植の適応年齢の上限は約 50 歳であったが、移植後の生着が迅速で早期死亡の少ない allo-PBSCT ではより高齢者への実施が可能と思われる。G-CSF 投与による PBSC 採取は 55 歳以上のドナーにおいても、若年者と同様に実施可能であったが、高齢者の身体的特性に留意しながら今後さらに検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) M Harada, et al: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation is coming of age. *Int J Hematol.*

62:1-5, 1995

2) M Harada, et al: G-CSF-induced mobilization of peripheral blood stem cells from healthy adults for allogeneic transplantation. *J Hematotherapy* 5(1):63-72, 1996

3) M Harada, et al: Mobilization of peripheral blood stem cells for autologous and allogeneic transplantation. *Vox Sang* 70(suppl.3):71-73, 1996

4) M Harada, et al: Clinical results of allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: Japanese survey 1995. *Bone Marrow Transplant* 17(suppl. 29):S47-S50, 1996

5) T Yano, et al: G-CSF-induced mobilization of peripheral blood stem cells for allografting: comparative study of daily single versus double dose of G-CSF. *Int J Hematol* 66:169-178, 1997

6) T Teshima, et al: Mobilization of peripheral blood progenitor cells for allogeneic transplantation. *Cytokines, Cellular and Molecular Therapy* 3:101-104, 1997

7) Y Nawa, et al: Responses of G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells to alloantigen stimulation. *Blood* 90:1716-1718, 1997

8) Y Katayama, et al: Bone marrow necrosis in a patient with acute myeloblastic leukemia during administration of G-CSF and rapid hematologic recovery after allotransplantation of peripheral blood stem cells. *Am J Hematol* 57:238-240, 1998

9) M Harada, et al: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for standard-risk leukemia. A multicenter pilot study: Japanese experience. *Bone Marrow Transplant* 21(suppl 3):S54-S56, 1998

10) M Naira, et al: Analysis of circulating hematopoietic progenitor cells after peripheral blood stem cell Transplantation. *Int J Hematol* 69:36-42, 1998

11) Y Katayama, et al: Hematopoietic progenitor cells from allogeneic bone marrow transplant donors circulate in the very early post-transplant period. *Bone Marrow Transplant* 23, 1999 in press

12) Y Maeda, et al: Monitoring of human herpesviruses after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation and bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 105, 1999 in press

2. 学会発表

- 1) 豊嶋崇徳、品川克至：G-CSFによる末梢血幹細胞移植の現状と問題点. 第38回日本床血液学会シンポジウム. 臨床血液 37(10), 1996
- 2) 品川克至、原田実根：同種末梢血幹細胞移植の現状と非血縁者間末梢血幹細胞移植への可能性. 第39回日本臨床血液学会シンポジウム. 臨床血液 38(10), 1997
- 3) 竹中克斗、原田実根：同種末梢血幹細胞移植の現状と問題点. 第40回日本臨床血液学会シンポジウム. 臨床血液 39(10), 1998
- 3) K Shinagawa, M Harada: Syngeneic and allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for hematologic malignancy: Okayama experience. 4th Japan-China Symposium on Hematology under the

cooperation of Two Societies, 1996

- 4) M Harada, et al: Primary allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for treatment of standard-risk leukemia: A pilot study. 2nd Japan-Korea Hematology Symposium, 1997
- 5) K Shinagawa, M Harada: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for hematologic malignancy. 2nd Japan-Korea Hematology Symposium, 1997
- 6) M Harada, et al: Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for standard-risk leukemia: Japanese experience. Abstract from 2nd International Symposium on Allogeneic Peripheral Blood and Cord Blood Transplantation. 17, 1997

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

V. 研究班会議発表者報告書

第一回研究班会議：

平成10年 7月17日, 7月18日

第二回研究班会議：

平成11年 2月 6日