

る組み換え部位への N-nucleotide の挿入は TdT によって行われるので、臍帯血由来細胞と動員末梢血由来細胞とで差があるか検討した (図 8)。

①3 週, 6 週における V_H -D 間の N-nucleotide の挿入数は、臍帯血由来細胞と比較し、末梢血由来細胞で有意に多かった ($P=0.016, P=0.015$)

②4 週目は、有意差はなかったが、末梢血由来細胞でより多くの N-nucleotide が挿入されている傾向が認められた。

D. 考察

CD34 陽性の臍帯血および動員末梢血を MS-5 上で培養した系で検討し、臍帯血由来 B 前駆細胞においては、末梢血由来細胞と比較して、CD10/19 陽性細胞の出現頻度は低い傾向にあり、IgH 遺伝子レパトアー解析において、non-productive な再構成を多く認め、TdT mRNA の発現をほとんど認めず、 V_H -D 間の N-nucleotide が少ない傾向にあった。これらのことより、*in vitro* における CD34 陽性細胞より B 前駆細胞への分化においては、臍帯血由来細胞は、末梢血由来細胞と比較して、幼弱な傾向を示し、このため、臍帯血移植後初期には、抗体産生可能な成熟 B 細胞の割合が少ないために、液性免疫の回復が遅延している可能性があると考えられた。

E. 結論

CD34 陽性の臍帯血および動員末梢血を、マウスストローマ細胞株 MS-5 上で SCF, G-CSF 存在下に培養した系で検討した結果、B 前駆細胞への分化が確認された。この培養系においては、臍帯血由来細胞は、末梢血由来細胞と比較して、幼弱な傾向を示し、このため、臍帯血移植後初期には、抗体産生可能な成熟 B 細胞の割合が少ないために、液性免疫の回復が遅延している可能性があると考えられた。

図 1 Usage of the D_H segments in Cord Blood

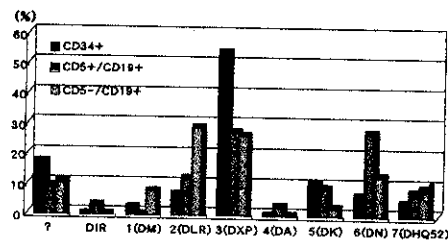


図 2 Usage of the J_H segments in Cord Blood

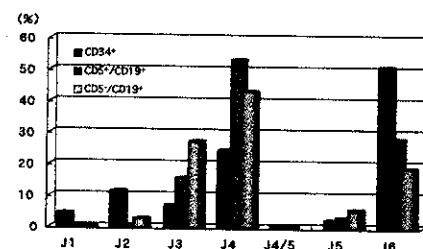


図 3 Comparison of the CDR3 length in Cord Blood

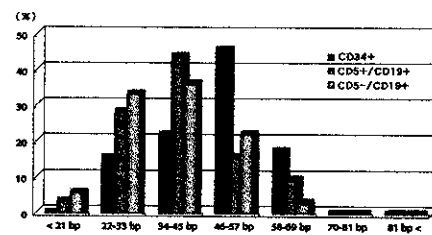


図 4 Expression of CD10 and CD19 antigens of the cultured CB cells on the MSS with SCF and G-CSF

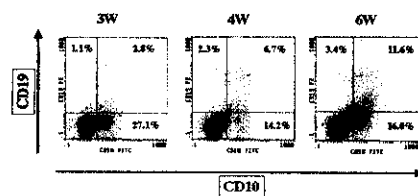


図 5 Emergence of the CD10 / CD19 (+) cells from CB and PB

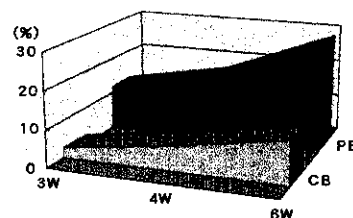


图6
Comparison of the in/out of frame ratio of the IGH gene rearrangement

	3W	4W	6W
CB	12 / 35	11 / 16	21 / 19
			p=0.014
PB	15 / 5	10 / 7	14 / 10
	p=0.0003		

P value is compared with the CB at 3w.

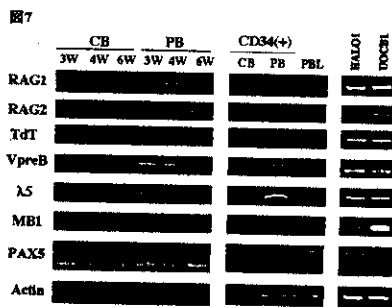
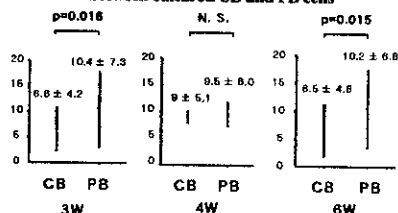


图8
Comparison of the N nucleotides at the V_H-D junction between cultured CB and PB cells



F. 研究発表

1. 論文発表

1). Y. Nakano, H. Kiyoi, S. Miyawaki, N. Asou, R. Ohno, H. Saito, and T. Naoe.

Molecular evolution of acute myeloid leukemia in relapse : unstable N-ras and FLT3 genes compared with p53 gene.

British Journal of Haematology. 104:659-664, 1999

2). H. Kiyoi, T. Naoe, Y. Nakano, S. Yokota, S. Minami, S. Miyawaki, N. Asou, K. Kuriyama, I. Jinnai, C. Shimazaki, H.

Akiyama, K. Saito, H. Oh, T. Motoji, E. Omoto, H. Saito, R. Ohno, and R. Ueda.

Prognostic Implication of FLT3 and N-RAS Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia. **Blood.** 93(9):3074-3080, 1999

3). Nagura E, Minami S, Nagata K, Morishita Y, Takeyama H, Sao H, Suzuki H, Naoe T, Yokomaku S, Mizuno H, Murase T, Hirabayashi N, Shirokawa Y, Tanimoto M, Kawashima K, and Saito H.

Analysis of elderly patients, aged 60 years old or over, with acute lymphoblastic leukemia]. [Japanese]

Nippon Ronen Igakkai Zasshi - Japanese Journal of Geriatrics. 36(1):52-8, 1999

4). Iida M, Towatari M, Nakao A, Iida H, Kiyoi H, Nakano Y, Tanimoto M, Saito H, and Naoe T.

Lack of constitutive activation of MAP kinase pathway in human acute myeloid leukemia cells with N-Ras mutation.

Leukemia. 13(4):585-9, 1999

5). Yanagi M, Shinjo K, Takeshita A, Tobita T, Yano K, Kobayashi M,

Terasaki H, Naoe T, Ohnishi K, and Ohno R. Simple and reliably sensitive diagnosis and monitoring of Philadelphia

chromosome-positive cells in chronic myeloid leukemia by interphase fluorescence in situ hybridization of peripheral blood cells.

Leukemia. 13(4):542-52, 1999

6). Mizuta S, Ito Y, Kohno A, Kiyoi H, Miyamura K, Tanimoto M, Takamatsu J, Naoe T, Morishima Y, Ueda R, and Saito H.

Accurate quantitation of residual tumor burden at bone marrow harvest predicts timing of subsequent relapse in patients with common ALL treated by autologous bone marrow transplantation.

Bone Marrow Transplant. 24(7):777-

784,1999

7). Naoe T, Kitamura K.

Relationship between degradation of PML-RARalpha and differentiation.

Blood. 15;94(4):1478-9, 1999

8). Kosugi H, Towatari M, Hatano S, Kitamura K, Kiyoi H, Kinoshita T, Tanimoto M, Murate T, Kawashima K, Saito H, Naoe T.

Histone deacetylase inhibitors are the potent inducer/enhancer of differentiation in acute myeloid leukemia: a new approach to anti-leukemia therapy.

Leukemia. 13(9):1316-24, 1999

9). Miyawaki S, Kobayashi T, Tanimoto M, Kuriyama K, Murakami H, Yoshida M, Minami S, Minato K, Tsubaki K, Omoto E, Oh H, Jinnai I, Sakamaki H, Hiraoka A, Kanamaru A, Takahashi I, Saito K, Naoe T, Yamada O, Asou N, Kageyama S, Emi N, Ueda T, Tomonaga M, Ohno R, et al.

Comparison of leukopenia between cytarabine and behenoyl cytarabine in JALSG AML-89 consolidation therapy. The Japan Adult Leukemia Study Group.

Int J Hematol. 70(1):56-7, 1999

10). Kosugi H, Naoe T.

[New approaches of differentiation-inducing therapy for leukemia].

Rinsho Ketsueki. 40(6):480-3, 1999

11). Nagura E, Minami S, Nagata K, Morishita Y, Takeyama H, Sao H, Suzuki H, Naoe T, Yokomaku S, Mizuno H, Murase T, Hirabayashi N, Takeo T, Tanimoto M, Kawashima K, Saito H.

Acute myeloid leukemia in the elderly:--159 Nagoya case studies--Nagoya Cooperative Study Group for Elderly Leukemia.

Nagoya J Med Sci. 62(3-4):135-44, 1999

12). Yoshida M, Tsubaki K, Kobayashi T,

Tanimoto M, Kuriyama K, Murakami H, Minami S, Hiraoka A, Takahashi I, Naoe T, Asou N, Kageyama S, Tomonaga M, Saito H, Ohno R.

Infectious complications during remission induction therapy in 577 patients with acute myeloid leukemia in the Japan Adult Leukemia Study Group studies between 1987 and 1991.

Int J Hematol. 70(4):261-7, 1999

13). Okamura K, Yuba H, Mizutani K, Gotoh M, Ono Y, Ohshima S, Naoe T.

[Clinical study of high-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell transplantation for poor-risk germ cell tumor].

Hinyokika Kyo. 45(11):793-8, 1999 Japanese.

2. 学会発表

1) 廣瀬由佳, 清井 仁, 直江知樹, 齋藤英彦: 臍帯血中 CD34 (+) 未熟 B 細胞における免疫グロブリン重鎖 CDR3 の構造解析. 第 4 1 回日本臨床血液学会総会, 1999

2) 清井 仁, 廣瀬 由佳, 直江知樹: ヒト臍帯血 B 細胞における免疫グロブリン遺伝子構造. 第一回厚生科学研究費補助金齋藤班班会議, 1999

3) 廣瀬由佳, 清井 仁, 伊藤克彦, 齋藤英彦, 直江知樹: 臍帯血、骨髄、末梢血幹細胞由来 B 前駆細胞の Ig-HCDR3 レパトアーの比較検討. 第 62 回日本血液学会総会, 2000

4) 廣瀬由佳, 清井 仁, 直江知樹: 臍帯血 CD34 陽性細胞より、B 前駆細胞への *in vitro* 分化における免疫グロブリン遺伝子レパトアー解析-末梢血 CD34 陽性細胞との比較検討-. 第二回厚生科学研究費補助金齋藤班班会議, 2000

分担研究報告書

小児臍帯血移植の成績向上のための要因に関する研究

分担研究者 加藤剛二 名古屋第一赤十字病院第4小児科副部長

研究協力者 松山孝治 名古屋第一赤十字病院第3小児科部長

研究要旨

東海臍帯血バンクにおける非血縁者間臍帯血幹細胞移植の成績を検討し臨床的問題点とりわけ移植後の感染症管理の重要性を指摘

A.研究目的

東海臍帯血バンクにおける臍帯血保存及び非血縁者間臍帯血幹細胞移植の成績を検討しとりわけ重症ウイルス感染症への対処を検討。

B.研究方法

1, 1996年8月より東海臍帯血バンクにて採取保存された臍帯血を検討。

2, 1997年より1999年11月末までに東海臍帯血バンクより供給された臍帯血を用いて移植された臨床的成績を検討。

3, 臍帯血移植の際に問題となる重症ウイルス感染症、特にRSウイルス感染症患者に対するRSウイルス高力価ガンマグロブリン療法の検討

(倫理面への配慮)

本研究を行うにあたっては臍帯血の提供者及び移植患者のプライバシーは固く守られるよう努力した。

C.研究結果

1, 東海臍帯血バンクにおける臍帯血保存

1996年8月27日より1999年8月30日までに東海臍帯血バンクにて保存された臍帯血件数は1000件でこれらは名古屋第一赤十字病院及び星ヶ丘マタニティ病院の両産婦人科にて採取された。その平均採取細胞数は 1.09×10^9 個で平均保存細胞数は 7.14×10^8 個であった。また、保存時の細胞数が 1×10^9 個以上の臍帯血は150件であり全体の15%であった。また、保存後に不適とされた臍帯血は79件ありその内訳はHLA検査困難、母親の輸血歴、既往歴、新生児の異常、臍帯血の細菌検査陽性等であった。またこの時点での東海臍帯血バンクへの予備検案件数は252件、正式登録件数は109件であった。さらに上記の2病院での臍帯血採取の比較では採取量、採取細胞数、保存細胞数、回収率等の比較では両者に大きな違いは認められなかった。

2, 東海臍帯血バンクにおける臍帯血移植結果

1997年9月より1999年11月末までに東海臍帯血バンクから供給された臍帯血を用いて30例の臍帯血移植が施行された。

- 1) 年齢及び性：0-39歳 (med. 7歳)
男/女=19/11
 - 2) 体重：8-65kg (med. 22kg)
 - 3) 病型：悪性疾患24例 (ALL 10例、AML 9例、MDS 3例、その他 2例) (急性白血病における寛解期別内訳は第1, 2寛解期：13例、その他 6例)
非悪性疾患 6例 (先天性疾患 4例、その他 2例)
 - 4) 血清学的HLA適合度
6/6 2例、5/6 26例、4/6 2例
 - 5) 移植細胞数
1.05-10.4x10⁷/kg (med. 3.26x10⁷)
 - 6) 生着及び生着不全
生着24例、生着不全 4例、移植後早期のため判定不能 2例
 - 7) GVHD
 - 1, 急性GVHD：なし 8例、I度 4例、II度 7例、III度 4例、評価不能 7例
 - 2, 慢性GVHD：なし 14例、あり 2例、評価不能 14例
 - 3, HLAの一致度とGVHD発症との間には相関が認めれなかった。
 - 8) 悪性疾患における再発：3例
 - 9) 生死
 - 1, 無病生存：13例 (悪性疾患 10例、非悪性疾患 3例)
 - 2, 拒絶生存：1例 (悪性疾患)
 - 3, 死亡：16例
(悪性疾患 13例、非悪性疾患 3例)
 - 4, 危険因子：HLA、移植細胞数、年齢等は生存率との間に相関が認められなかった。
 - 10) 死因：再発 4例。感染症 10例 (肺炎及び間質性肺炎 5例、敗血症 3例、真菌感染症 2例)、生着不全 1例
- 3, RSウイルス感染症に対するRSウイルス高力価ガンマグロブリン療法の検討
小児におけるRSウイルス感染症は冬季に流行しとりわけ一次性及び二次性免疫不全症においては重篤化する事が多く造血幹細胞移植施行時には嚴重な管理が必要となる。今回我々は2歳の急性骨髄性白血病の患児に臍帯血移植を施行したが移植前後に同ウイルス感染症を合併し同ウイルス高力価ガンマグロブリンを投与し軽快した症例を経験したのでその概要を記す。
 - 1) 症例：2歳、女兒
 - 2) 診断：急性骨髄性白血病(M7)初回再発期
 - 3) 移植前処置：L-PAM+TBI
 - 4) GVHD予防：MTX+FK506
 - 5) 移植臍帯血：血清学的1抗原不一致、移植時細胞数6.50x10⁷/kg、移植時CD34陽性細胞数8.55x10⁴/kg
 - 6) 血液学的回復：WBC ≥ 500はday32, Plt ≥ 20000はday87
 - 7) 急性GVHD：II度
 - 8) 移植前後の合併症：本症例は移植前より発熱、気管支炎症状及び鼻汁が認められ胸部X線所見と共に呼吸状態も次第に悪化した。蛍光抗体法による鼻汁のRSウイルス抗原が陽性のためRSウイルス感染症の合併が考えられた。このため臍帯血移植翌日にRSウイルス高力価ガンマグロブリン (RespiGam™)を投与した結果、一時的ではあるが解熱し呼吸状態はかなり安定した。しかしその後再び発熱し呼吸状態も悪化したためday14に再度RespiGam™を投与し呼吸状態は再び安定化した。そしてday34には同ウイルスは陰性化した。(図1)

D. 考察

1、東海臍帯血バンクにおける臍帯血保存：平成11年に日本さい帯血バンクネットワークが発足し日本全体で今後5年以内に目標である2万件を保存予定であるが東海臍帯血バンクでも今年度425件が保存され来年度は600件の保存を予定している。

2、東海臍帯血バンクにおける臍帯血移植：移植後の死因の16例中10例が感染症関連であり他の臍帯血バンク同様、非悪性疾患における生着不全と共に現時点での最大の問題点となっている。これには移植前及び移植後の支持療法のさらなる改善が必要であり細菌、真菌、ウイルスなどの個々の微生物に対する厳密な対応が重要であり従来の骨髄移植を上回る対策が必須と考えられる。

3、RSウイルス感染症：本ウイルスは成人より小児での罹患率が高くしかも重症化する傾向にある。本症例の治療には従来決定的な方法はなかったが近年同ウイルス高力価のガンマグロブリンとribavirinの併用が有効との報告がなされている。両薬剤共国内では認可されていないが臍帯血移植においては施行症例中小児が90%を占める事からも移植成績向上のために早急に国内に導入される事が望まれる。

E. 結論

臍帯血移植は臨床応用されてからの短時日しか経過していないが特に小児においてはalternative donorからの一移植方法として、さらに非血縁者からの移植においては年々その比重を増している。しかしGVHDが低頻度であるという利点に対して移植後の感染症が重篤化する傾向にありその管理には骨髄移植以上の

厳重さが要求される。

F. 研究発表

1、論文発表

1) 加藤剛二、小寺良尚
臍帯血幹細胞移植、Annual Review1999 中外医学社 1-9、1999

2) 加藤剛二
臍帯血幹細胞移植-現状と展望 Molecular Medicine 36, 770-775, 1999

2、学会発表

1) 加藤剛二
臍帯血バンクにおける血液センターと医療機関との連携
第23回日本血液事業学会総会 1999

2) 加藤剛二
臍帯血幹細胞移植の現況
第13回自己血輸血研修会1999

3) 加藤剛二、矢崎 信、東 英一、堀部敬三、磯貝光治、井上千加子、加藤 道、松山孝治
東海臍帯血バンクにおける臍帯血幹細胞移植成績
厚生科学研究「臍帯血移植に関する基礎的・臨床的研究」平成11年度第1回班会議、1999

4) 加藤剛二
臍帯血幹細胞移植の現況
第10回愛知血液疾患研究財団講演会 1999

5) 加藤剛二
研究班「臍帯血バンクネットワーク」の現状
平成10年度厚生科学研究「造血細胞移植と免疫応答に関する研究」班公開シンポジウム 1999

6) 加藤剛二

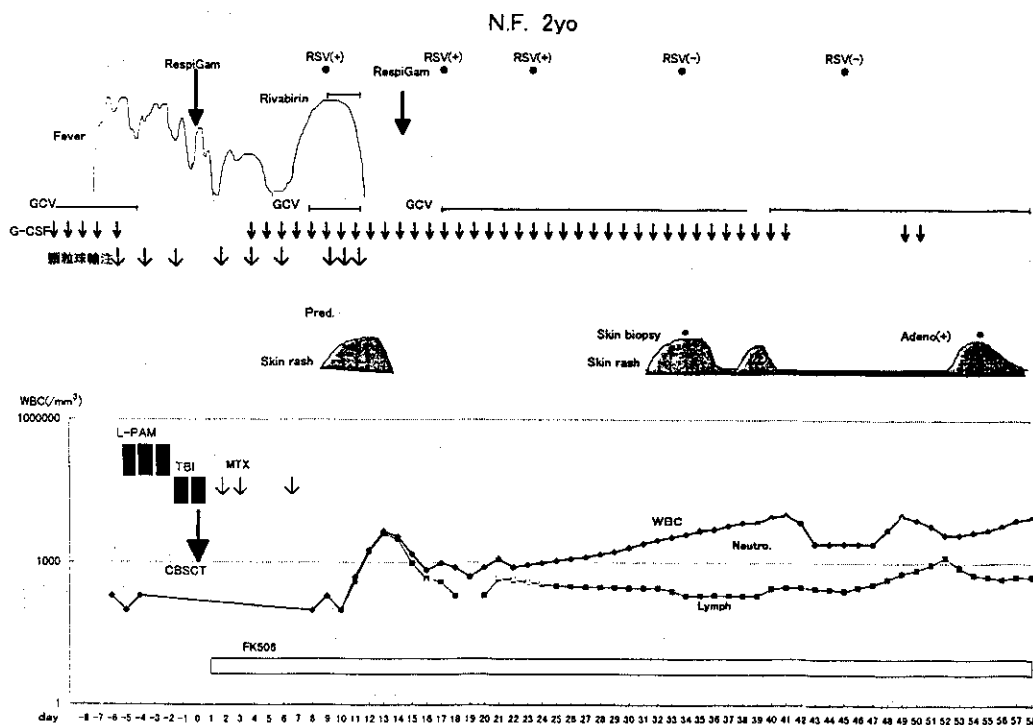
RSV感染症を合併した非血縁者間
臍帯血幹細胞移植症例に対して
RSV高力価ガンマグロブリンが
奏功したと考えられるAMLの1
例

平成11年度厚生科学研究「臍帯血
移植に関する基礎的・臨床的研究」
第二回班会議、2000

G. 知的所有権の取得状況

- 1、特許取得：なし
- 2、実用新案登録：なし

図1.



分担研究報告

研究課題 臍帯血移植に関する基礎的並びに臨床的研究

分担研究者 加藤 俊一 東海大学医学部小児科学教室 助教授

研究要旨 わが国において実施された非血縁者間臍帯血移植について詳細な解析を行い、移植結果に及ぼす諸因子を検討した。腫瘍性疾患においては移植時の病期が最大の予後決定因子で、年齢（5歳以下）移植細胞数（ $4 \times 10^7/\text{kg}$ 以上）も予後と相関したが、HLAの適合度はGVHD、生存のいずれとも相関しなかった。非腫瘍性疾患の中では免疫不全患者の生存は良好であったが、血液疾患と代謝異常疾患では生着不全が多く、とくに移植細胞数の少ない患者では低い無病生存率であった。

A. 研究目的

わが国において実施された非血縁者間臍帯血移植について詳細な解析を行い、今後の指針作成の一助とすることを目的とした。

B. 研究方法と対象

1999年11月末までに非血縁者間臍帯血移植を受けた165例における諸因子と移植結果について解析を行った。

159例においてのべ165回の非血縁者間臍帯血移植が行われた。患者年齢は3カ月から49歳までに分布し、85%は15歳以下の小児であったが、16歳以上の患者が25例含まれていた。移植時の体重は6～65kgに分布し、72%が30kg未満であった（表1）。疾患の内訳は腫瘍性疾患128例、非腫瘍性疾患37例で詳細は表2に示すとおりであった。

最近の移植のために移植後の経過が不明の症例を除外し、154例について解析を行った。

非血縁者間臍帯血移植の実施については施設毎に倫理委員会の許可をえて、十分な説明と同意に基づいて行われた。

C. 研究結果

a) 生存率

①粗生存率

154例全体の生存率、119例の腫瘍性疾患、35例の非腫瘍性疾患の生存率は図1に示すとおりである。

②HLA適合度別無病生存率

腫瘍性疾患、非腫瘍性疾患のそれぞれにつき、血清学的レベルでのHLAの一致度と無病生存率の関連を検討したが、6抗原のうち0～1抗原不一致群と2～3抗原不一致群との間に差は認められなかった（図2）。

③移植細胞数別無病生存率

患者体重あたりの移植細胞が多いほど無病生存率は高くなり、 $4 \times 10^7/\text{kg}$ 以上の細胞が移植された症例では50～65%の無病生存率であった（図3）。

④腫瘍性疾患における諸因子

年齢別、リスク別、HLA適合度別の移植細胞数の分布を図4に示した。5歳以下ではSR群（標準危険群；急性白血病の第1～2寛解期）がHR群（8高危険群；それ以上の進行例）よりもやや多い傾向があり、患者体重あた

りの移植細胞数も多かった。

⑤腫瘍性疾患におけるリスク毎生存率
SR群の方がHR群よりも有意に高い生存率と無病生存率がえられた(図5)。

⑥腫瘍性疾患での年齢別無病生存率
0～5歳が6歳以上よりも高い無病生存率を示していた(図6)。

⑦非腫瘍性疾患の疾患毎生存率
免疫不全患者では70%の生存率と56%の無病生存率がえられたが、血液疾患と代謝異常では生着不全率が高く、無病生存率はそれぞれ19%、32%であった(図7)。

⑧非腫瘍性疾患の移植細胞数別生存率
 $3.7 \times 10^7/\text{kg}$ 以上と未満の2群について生存率と無病生存率を比較したところ、細胞数が多い群の方が高い率を示した(図8)。

⑨急性GVHDとHLA適合度
血清学的なHLA抗原の不適合数と急性GVHDの重症度について全体、腫瘍性疾患、非腫瘍性疾患の各群で比較した。腫瘍性疾患では非腫瘍性疾患よりもやや重症の傾向があったが、いずれの群においてもHLAの適合度と急性GVHDの重症度との間には相関は認められなかった(表3)。

D. 結論と考察

①生着

移植された有核細胞数は生着率、生着速度のいずれとも相関し、とくに非腫瘍性疾患では移植細胞数が少ない症例ほど生着不全率が高かった。

非血縁者間臍帯血移植では可能な限り細胞数の多い臍帯血による移植が望ましいが、移植可能と判断される最少細胞数については今回の解析では確定できなかった。当面は $2 \times 10^7/\text{kg}$ を指標

とすることで良いものと考えられる。

②急性GVHD

非血縁者間骨髄移植と比較すると、HLAが1～3抗原不一致という条件にも関わらず重症GVHDの頻度は高くない。しかし、全体で15%ほどの症例がⅢ～Ⅳ度の最重症GVHDを合併していることを忘れてはならない。

③死因

移植後早期では感染症による死亡が多く、晩期には白血病などの再発が死因となっていた。

④生存率

腫瘍性疾患では移植時の病期が最大の要因で、スタンダードリスク群では高い無病生存率がえられるの対し、ハイリスク群では低い生存率であった。また、非腫瘍性疾患では免疫不全では良好な成績がえられたが、血液疾患や代謝異常では生着不全のために生存はしていても移植としては失敗の症例が多かった。

移植細胞数はいずれの疾患でも生存率と相関し、可能な限り細胞数の多い臍帯血を選択することが望ましい。

HLAの適合度は現時点では生存率とも相関は認められておらず、6抗原中2～3抗原の不一致は許容されるものと考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

Rocha V, Gluckman E, Kato S, et al : Comparison of graft-versus-host disease in children transplanted with HLA-identical sibling umbilical cord blood versus HLA-identical sibling bone marrow. New England Journal of Medicine, in press, 2000.

表 1

わが国における非血縁臍帯血移植 (1)			
1999年11月30日現在			
1. 患者数 (のべ)	165 例	2. 性別: 男 98 例, 女 66 例, 不明 1 例	
3. 年齢: 3 ヵ月~49 歳		4. 体重: 6~ 65kg	
0~ 5 歳	80 例	0~ 9.9kg	27 例
6~ 10 歳	42 例	10~ 19.9kg	57 例
11~ 15 歳	18 例	20~ 29.9kg	34 例
16~ 20 歳	6 例	30~ 39.9kg	13 例
21~ 30 歳	9 例	40~ 49.9kg	19 例
31~ 40 歳	5 例	50~ 59.9kg	8 例
41~ 50 歳	5 例	60kg ~	6 例
		不明	1 例

表 2

わが国における非血縁臍帯血移植 (2)			
1999年11月30日現在			
5. 疾患: () は再移植例数			
腫瘍性	128 例 (2)	非腫瘍性	37 例 (4)
AML	38 例 (1)	造血障害	12 例 (2)
ALL	62 例 (1)	免疫不全	11 例
CML	4 例	代謝異常	11 例 (2)
MDS	14 例	その他	3 例
NHL	7 例		
その他	3 例		

表 3

わが国における非血縁臍帯血移植 急性 GVHD						
HLA 不適合度	全 体		腫 瘍		非腫瘍	
	0~1	2~3	0~1	2~3	0~1	2~3
評価可能症例	99	26	76	20	23	6
0 度	37.4	30.8	34.2	25.0	47.8	50.0
I 度	24.2	30.8	27.6	30.0	13.0	33.3
II 度	22.2	23.1	22.4	25.0	21.7	16.7
III 度	12.1	15.4	13.2	20.0	8.7	0.0
IV 度	4.0	0.0	2.6	0.0	8.7	0.0

図 1

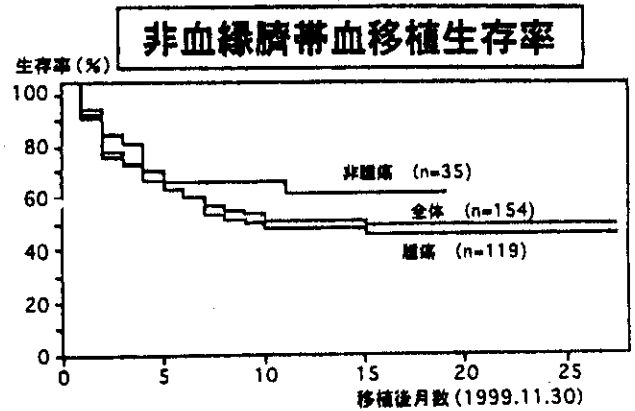


図 2

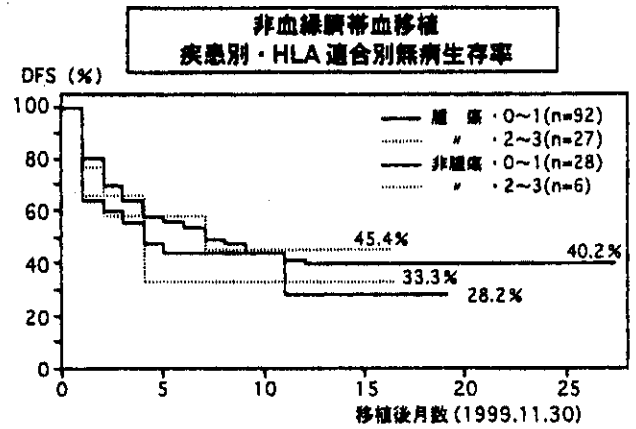


図 3

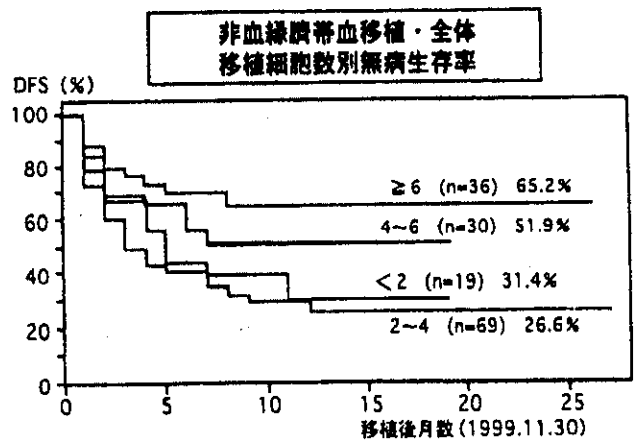


図 4

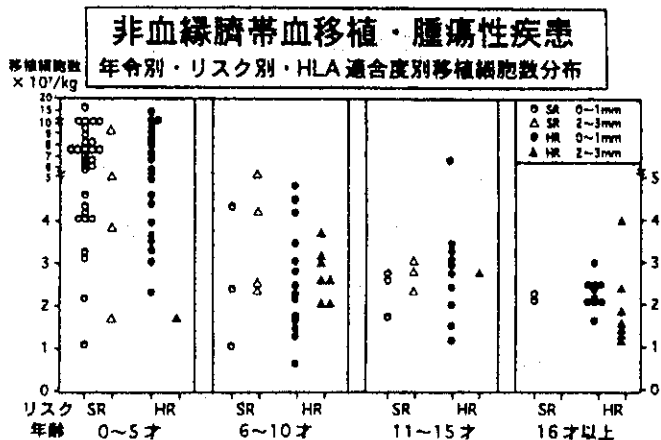


図 7

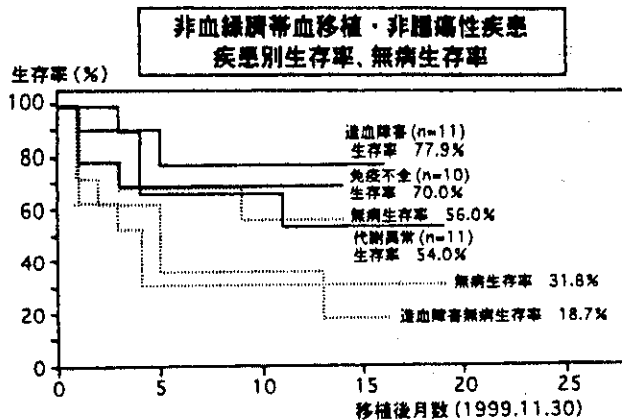


図 5

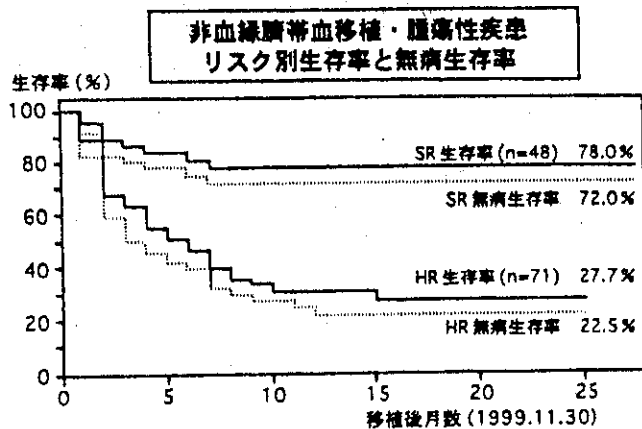


図 8

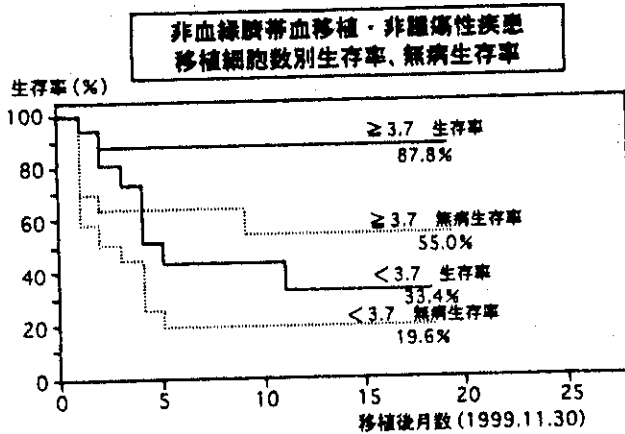
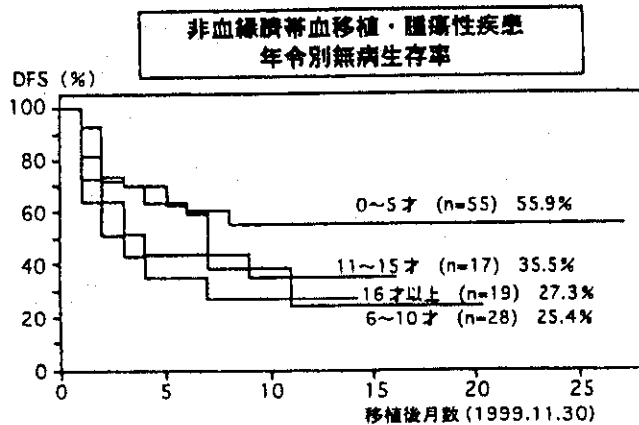


図 6



研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌の場合は論題、雑誌名、巻・頁数の順）	刊 行 年	刊 行 者 (書籍のみ)	執筆者氏名
Role of interleukin-12 in the development of acute graft-versus-host disease in bone marrow transplant patients. Bone Marrow Transplantation, 24:29-34.	1 9 9 9		Yabe M, Yabe H, Hattori K, <u>Kato S</u> , et al.
Rapid ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitors using a novel culture system. Exp Hematol, 27:904-915.	1 9 9 9		Kawada H, Ando K, <u>Kato S</u> , et al
The impact of HLA-A matching in corneal transplantation. Tokai J Exp Clin Med, 24:63-71.	1 9 9 9		Munkhbat B, <u>Kato S</u> , et al.
同種骨髄移植におけるシクロスポリンMEPCの効果および安全性に関する研究。今日の移植、12sup:87-98.	1 9 9 9		村田 誠、 林 真、 <u>加藤俊一</u> 、他
Ph1陽性小児急性リンパ性白血病に対する幹細胞移植：全国登録89症例の解析結果。日本小児血液学会雑誌、13:170-177.	1 9 9 9		岡村 純、 松山孝治、 <u>加藤俊一</u> 、他
臍帯血幹細胞移植。日本小児科医学会会報、18:67-70.	1 9 9 9		<u>加藤俊一</u>
ムコ多糖症に対する骨髄移植。小児科、40:1251-1259.	1 9 9 9		<u>加藤俊一</u>
わが国における同胞間臍帯血移植。日本輸血学会雑誌、45:553-556.	1 9 9 9		<u>加藤俊一</u>
臍帯血移植の現状と展望。臨床血液、40:455-458.	1 9 9 9		<u>加藤俊一</u> 堀田知光
東海大学病院における臍帯血バンクと臍帯血採取。日本産婦人科学会神奈川地方会誌、35:142-144.	1 9 9 9		岩崎克彦、 安井 功、 <u>加藤俊一</u> 、他
臍帯血移植におけるGVHDとGVL。血液フロンティア、9:1347-1351.	1 9 9 9		<u>加藤俊一</u>
臍帯血移植の現況と将来展望。治療、81:623-627.	1 9 9 9		<u>加藤俊一</u>
臍帯血移植の臨床成績。臨床病理、11041-47.	1 9 9 9		<u>加藤俊一</u>

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌の場合は論題、雑誌名、巻・頁数の順）	刊 行 年	刊 行 者 (書籍のみ)	執筆者氏名
An in vivo model of human skin acute graft-versus-host disease: transplantation of cultured human epidermal cells and dermal fibroblasts with human lymphocytes into SCID mice. <i>Exp Hematol</i> , 27:1815-1821.	1 9 9 9		Takakura I, Yabe M, <u>Kato S</u> , et al.
Ex vivo generation of CD34+ cells from CD34- hematopoietic cells. <i>Blood</i> , 94:4053-4059.	1 9 9 9		Nakamura Y, Ando K, <u>Kato S</u> , et al.
Peripheral blood stem cell mobilization and apheresis: analysis of adverse events in 94 normal donors. <i>Bone Marrow Transplantation</i> , 24:1065-1071.	1 9 9 9		Murata M, Harada M, <u>Kato S</u> , et al.
Analysis of 500 bone marrow transplants from unrelated donors (UR-BMT) facilitated by the Japan Marrow Donor Program: confirmation of UR-BMT as a standard therapy for patients with leukemia and aplastic anemia. <i>Bone Marrow Transplantation</i> , 24:995-1003.	1 9 9 9		Kodera Y, Morishima Y, <u>Kato S</u> , et al.
11p15 translocations involving the NUP98 gene in childhood therapy-related acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome. <i>Genes Chromosomes & Cancer</i> , 26:215-220.	1 9 9 9		Nishiyama M, Arai Y, Tsunematsu Y <u>Kato S</u> , et al
Altered expression of CD45 isoforms in differentiation of acute myeloid leukemia. <i>American Journal of Hematology</i> , 62:159-164.	1 9 9 9		Miyachi H, Tanaka Y, Gondo K, <u>Kato S</u> , et al
Ovarian function after bone marrow transplantation performed before menarch. <i>Archives of Diseases in Childhood</i> , 80:452-454.	1 9 9 9		Matsumoto M, Shinohara O, Ishiguro H, <u>Kato S</u> , et al
Severe complications in Japanese patients with type 1 Gaucher disease. <i>J Inher Metab Dis</i> , 22:63-73.	1 9 9 9		Ida H, Rennert M, <u>Kato S</u> , et al.
Umbilical cord blood T lymphocytes are induced to apoptosis after being allo-primed in vitro. <i>Bone Marrow Transplant</i> , 24:1229-1233.	1 9 9 9		Hagihara M, Chargui J, <u>Kato S</u> , et al.

分担研究報告書

研究課題 臍帯血バンクを利用した臍帯血移植の臨床的研究

分担研究者 西平浩一 神奈川県大和保健所所長(兼)昭和大学藤が丘病院客員教授
研究者協力者：磯山恵一 昭和大学藤が丘病院小児科助教授
大沼 圭 神奈川県立こども医療センター腫瘍科
豊田恭徳 神奈川県立こども医療センター小児科部長
生田孝一郎 横浜市大 輸血部 部長
中島文明 神奈川県赤十字血液センター検査3課

研究要旨 神奈川県臍帯血バンクでは52例の患者に臍帯血を提供し非血縁者間臍帯血移植が実施された。移植後3か月以上経過した41例について詳細に検討し、生存率及び予後に影響する因子を明らかにした。無病生存率は全症例で50%、白血病等の悪性疾患では51%、非悪性疾患では40%であった。無病生存率に影響する要因として次の因子が有意であった。①移植既往の有無の患者の生存率は21%、無しは74% ②白血病の生存率は第1寛解期では93%、第2以上寛解又は非寛解期では22%、③HLAの一致度別では0-1座不一致移植の生存は61%、2座以上不一致では24%であった。移植細胞数 3.7×10^7 /kg以上と未満では生存に有意差なく、HLA不一致度と重症GVHD発症に相関はなかった。臍帯血バンクによる臍帯血移植は非血縁骨髄移植と同等の成績が得られ、HLA不一致移植でも重症GVHDは少なく、保存臍帯血の移植への利用度はきわめて高く約10%は移植に利用できることを明らかにした。

A. 研究目的

臍帯血は造血幹細胞の豊富な供給源であり、臍帯血移植は骨髄移植と同様に造血幹細胞移植の分野で同等の役割を担うことが期待されている。

臍帯血を移植に有効利用するには臍帯血バンクを整備・拡充して、非血縁間でも臍帯血移植を可能にする体制が必須である。

わが国における骨髄移植等の造血幹細胞移植に関する厚生行政は骨髄バンク事業の推進施策をとおして支援してきた。

しかし、骨髄ドナー登録者数は未だ十分でなく、移植を希望する患者の要望に十分に答えられていないのが現状である。また、骨髄バンクのみでドナー数を充足させるには、かなりの年数（5年以上）を必要とすると思われる。

このような状況から、臍帯血バンクはドナー不足を解消するために重要な役割を果たすことが期待される。しかし、わが国の臍帯血バンクは組織体制や技術的課題等において整備は不十分であり、非血縁者間臍帯血移植に関する臨床研究も

極めて少ないのが現状である。

そこで、本研究では臍帯血バンクを利用した非血縁者間臍帯血移植の臨床的課題として移植細胞数、移植成功率、HLAの不適合度の許容範囲、GVHDの頻度、移植後の生存率等につき、神奈川臍帯血バンク組織を利用した移植症例につき詳細な検討を行った。

なお、本研究を実施するに当たり、倫理上の課題についても充分配慮した。すなわち、臍帯血を採取・保存する前に提供者に目的や方法について説明し、同意を得ている。また、非血縁者間臍帯血移植を実施することにつき、患者本人（未成年では親権者）に充分説明し同意を得ている。

B. 研究方法

組織を構成する要員は移植医、産科医検査技術者、法律専門家、看護職、事務員、ボランティアなどで構成される。

臍帯血採取は産科医が行うものとし、複数の採取医師が勤務しており、担当医師は採取に関して技術的に訓練を受けていることが条件である。

感染症に関する検査項目はHIV、CMV、HBV、HCVなどのウイルス、梅毒等の細菌、真菌などであり、厚生省臍帯血移植検討委員会技術専門部会で示された項目をすべて行った。臍帯血および患者のHLA検査はA、B、DRについて血清型及び遺伝子型を実施した。

保存前の臍帯血のプロセッシングの内赤血球除去はハイドロキシエチルスターチを使用した。分離した保存用の臍帯血細胞は最終濃度10% DMSOを添加して、プログラムフリーザーを使用して、 -80°C まで緩徐に冷却した後、液体窒素の入った保存容器に保管した。保存する臍帯血の細胞数は 3×10^8 以上の検

体とした。

臍帯血、母体、提供した児の健康状態等の情報管理は事務局で厳重に管理した。臍帯血移植を希望する患者は主治医を介して事務局へ所定の書式で申し込み、HLA検索は神奈川赤十字血液センターで実施した。

臍帯血提供の決定は移植審議委員会で判定した。

HLAの適合度は血清型で1座不一致までを原則とし、患者の病状によっては2座不一致の臍帯血も提供した。なお、移植実施前に患者および臍帯血のHLAは確認のため再度、血清型と遺伝子型を検査した。

臍帯血移植実施に際しては、患者（小児では親権者）の同意を書面で得た。

平成11年1月から12年1月までの1年間の採取保存数は約150検体である。採取・保存に要する費用は、1検体当たり約10万円が必要であった。

C. 研究結果

平成9年1月から12年1月までの期間に臍帯血HLA検索依頼件数は全国90の移植施設から合計450件であった。臍帯血を提供した児の健康調査が終了し異常なかった保存臍帯血390検体が検索対象であった。患者と保存臍帯血のHLA適合率は約30%であり、きわめて高率であった。

わが国における最初の非血縁者間臍帯血移植は平成9年2月に神奈川臍帯血バンクが提供した臍帯血によって実施された。神奈川臍帯血バンクではその後、平成12年1月までに52例の患者に臍帯血を提供し臍帯血移植が行われている。移植施設は関東地区のみでなく、九州から東北地区まで全国24医療施設であった。臍帯血の搬送は液体窒素を充填した

専用容器（ドライシッパー，株式会社荏原社製）を使用した。最近は航空機客室内に搬入可能となり，遠隔地でも利便性が良くなった。

1. 神奈川臍帯血バンクにおける臍帯血移植の臨床的評価成績

移植例52例の内，移植後3カ月以上経過した41例について生着率，生存率に及ぼす諸因子（HLAの血清型および遺伝子型の適合度，移植時の患者の状態造血幹細胞移植の既往の有無，疾患の種類，移植細胞数）などを検討した。

1) 移植症例の年齢，疾患，移植時の状態等の臨床的特徴

表1，2，に示すとおりである。

表1

年齢（中央値）	0,5-28歳(3.7歳)
体重（中央値）	6.5-55kg(15kg)
性別	男性25,女性16

表1に示すように，年齢の中央値は幼児期で，成人1例以外はすべて小児であり，6歳未満は28例，6-15歳12例，16歳以上1例であった。体重の中央値は15kgで，20kg未満28例，20-40kgは9例，40kg以上は4例であった。

表2には疾患別の内訳を示した。悪性腫瘍性疾患30例で，27例は急性白血病であった。先天性免疫不全症，先天性代謝異常症，貧血などの非腫瘍性疾患は11例であった。

表2 疾患別内訳

	例数		例数
悪性腫瘍	30	非腫瘍疾患	11
急性白血病	27	免疫不全	3
慢性白血病	1	代謝異常	6
JMML	1	(ALD, MPS)	
MDS	1	貧血	2

JMML:juvenile myelomonocytic leukemia

MDS:myelodysplastic syndrome

ALD:adrenoleukodystrophy 3例

MPS:mucopolysaccharidosis 3例

2) 白血病症例の移植時の状態(病期)

第1寛解期:12例，2-4寛解期:6例，非寛解期:10例であり，移植条件の悪い患者が60%を占めていた。

3) 臍帯血移植細胞数

中央値で 3.7×10^7 /kgであり，最小 1.4×10^7 /kg，最大は 10.6×10^7 /kgであった。

4) HLA一致度

患者と移植臍帯血のHLA血清型一致度は6/6は2例，5/6は26例，4/6は13例であり，完全一致は5%，1座不一致は63% 2座不一致は32%であった。遺伝子型では6/6は1例，5/6は16例，4/6は9例，3/6は9例，2/6は2例であった。

5) 生着率

全体では87%，悪性腫瘍では93%，非腫瘍性疾患では73%であった。

生着に要する日数のうち，好中球 $500/\mu\text{l}$ 到達日は中央値25日，最短14日，最長49日であり，血小板 $2\text{万}/\mu\text{l}$ 到達日は中央値56日，最短26日，最長121日であった。

6) GVHD発症率とHLA不一致度

1-2度GVHDの発症とHLA血清型および遺伝子型の不一致度との関係では0-1不適合では50%と53%，2不適合では44%と42%であり，いずれにも有意差はみられなかった。3度以上の重症GVHDの発症は10%，11%であり有意差はなかった(図1)。

6) 生存率と生存率に及ぼす因子の検討

生存率はKaplan-meier法による生存曲線で示した。

ア 全症例の生存率

41症例全体の生存率は図2に示したようにoverall survival rate(粗生存率は57%, disease free survival rate(無病生存率)49%であった。

イ 疾患別の生存率

白血病など悪性疾患と非腫瘍性疾患の粗生存率と無病生存率を図3, 4に示した。粗生存率と無病生存率は悪性疾患では各々53%, 51%であり, 非腫瘍性疾患では各々68%, 40%であった。悪性疾患で無病生存率は高い傾向がみられたが, 有意差はなかった。

ウ 患者の移植時の状態と生存率

移植時の患者の状態による差異について初回移植例と再移植例で比較した成績を図5に示した。初回移植例では74%, 再移植例では21%であり著しい有意差がみられた。また, 図6に示すように第1寛解期の移植では93%と第2以上の寛解期または非寛解期では22%と有意差がみられた。

エ H L A の適合度と生存率

H L A 血清型と遺伝子型の不適合度の差異と生存率について検討した結果を図7, 8に示した。血清型不一致数0-1と2不一致で有意差がみられ, 前者では61%, 後者では24%であった(図7)。遺伝子型でも同様に有意差がみられ, 0-1座不一致では64%, 2-4座不一致では37%であった(図8)。H L A の A, B 座と D R 座の適合度別に無病生存率を検討した。H L A の A, B 座の適合例では38%, 不適合例では51%で有意差はなかった。しかし, H L A の D R 座の適合度別の生存率は適合例では68%, 不一致例では34%で有意差がみられた(図9)。

オ 移植細胞数の生存率

移植細胞数別の生存率は 3.0×10^7 /kgと 3.7×10^7 /kgで検討した。細胞数の多い群に生存率は高い傾向がみられたが, 有意差はなかった。

カ 死亡原因の検討

41例中13例が次の原因で死亡した死因は悪性疾患の再発4例, 細菌感染4例, サイトメガロウイルス性肺炎, 重症GVHD2例, 多臓器不全1例, EBウイルス関連リンパ球増殖性疾患1例であった。

2. わが国の非血縁者間臍帯血移植の生存率

わが国の臍帯血移植症例につき, 当研究班で調査した非血縁者間臍帯血移植例163例につき, 検討した概要は次のとおりであった。年齢:6歳未満 80例, 6-15歳 61例, 16歳以上 22例。性別:男性 97, 女性 66例。疾患別:悪性腫瘍 129例, 非腫瘍性疾患 34例。

生着率:全症例では77%, 悪性腫瘍では81% 非腫瘍性疾患では60%。

粗生存率を図10に示した。経過の判明している133例では38%, 疾患別に悪性腫瘍では39%, 非腫瘍性疾患では26%であった(図10)。

D 考察

神奈川臍帯血バンクでは単独の地域バンクのみで52例の患者に臍帯血を提供し移植が行われた。わが国では平成11年11月現在で165例の非血縁者間臍帯血移植が集計されており, したがって当バンクの提供した臍帯血は全国の32%に相当した。神奈川臍帯血バンクの臍帯血保存数は約600検体に達している。しかし, 臍帯血採取保存に必要な費用等の問題が解決していないので, 保存件数の増加は小幅になっている。

HLA検索対象は臍帯血保存後6カ月以上経過し提供した児の健康状態が確認されたものに限っているので, 現在利用できる臍帯血は約400検体である。

バンク事務局では全国から450件のHLA検索依頼を受け付けた。HLA適合は1座不一致までを原則としており、150/450すなわち30%が適合していた。赤座、十字らの日本人におけるHLAの適合の推計図から計算すると検索母体が400検体であるので、HLA完全一致では1-2症例しか適合しないこととなります。すなわち、1座不一致では完全一致より100倍以上合致率が高くなることが判明した。しかし、実際には患者体重が大きいと臍帯血細胞数が不足してHLAが適合していても利用できないことがしばしばあり、われわれの場合HLA適合者のうち、提供したのは52例であった。それでも、保存臍帯血の10検体中1検体は移植に利用されているのできわめて高い利用率である。

臍帯血バンクの運営経費として1検体保存するのに必要な費用の10倍の公的保険料が認められることが望ましい。

今回の神奈川臍帯血バンクの臍帯血提供数はわが国の地域バンクとしてはもっとも多数例であった。

対象は1例を除いてすべて15歳以下の小児であった。これは先に述べたように、成人の体重では細胞数が不足することが最大の要因である。

HLA適合度は血清型では2例は完全一致であったが、その他39例は不一致であり、2座不一致も13例であった。遺伝子解析では完全一致は1例のみであり、4座不一致も2例あった。HLA不一致とGVHDの発症率は完全一致例が少ないため比較することは困難であるが、ほとんど例が不一致であったにもかかわらず重症GVHDは10%未満であった。これは骨髄移植のHLA完全一致の移植と比較してもきわめて低率であり、GVHDが直接死因であることも極めて稀であった。このことは臍帯血移植は1-2座不一致でも可能であることを示

している。

予後因子としてもっとも重要な事項は患者の移植時の状態であった。すなわち、第1寛解期で移植された患者の生存率は93%であり、きわめて良好な成績であり、第2以上の寛解期又は非寛解期では22%で両者間に大きな有意差がみられた。同様に造血幹細胞移植の既往歴の無い例では74%、有る場合は21%であった。

移植細胞数 $3.7 \times 10^7/\text{kg}$ 以上と未満、あるいは $3.0 \times 10^7/\text{kg}$ 以上と未満では細胞数の多い群に生存率が高い傾向がみられたが有意差はみられなかった。米国の562例の検討では移植細胞数の多いほど生存率は良好と報告している。これらの結果については症例数を増やすことや患者背景の詳細な分析が必要である。

なお、わが国全体の165例のうち転帰の判明している133例の粗生存率は38%であり、悪性疾患では39%、非悪性疾患では26%と必ずしも良い成績ではない。無病生存率は集計データが充分でないため正確な分析はできないが、30%以下と思われる。したがって、神奈川臍帯血バンクは現在のところもっとも良い成績である。これらの要因は明でないが保存方法など保存臍帯血の質の問題、患者背景等が影響していると思われる。いずれにしろ、神奈川臍帯血バンクの成績は非血縁者間骨髄移植に劣らない成績を得ており、現在のバンク組織体制を強化発展されることが重要であると思われる。

E 結論

神奈川臍帯血バンクを利用した臍帯血移植52症例のうち、移植後3カ月以上経過した41例の臨床成績を解析した。白血病等悪性疾患30例、非悪性疾患11例。全体の生着率は87%、非腫瘍性疾患では73%。生存率:無病生存率は全症例では49%、悪性疾患では51%、非悪性疾患は

40%であった。生存率に有意差をもって影響する因子として、

- ①HLAの0-1座不一致と2座以上の不一致(61%と21%)
- ②造血幹細胞移植の既往歴の有無(21%と74%)
- ③第1寛解状態か第2以上の寛解又は非寛解(93%と22%)であった。

GVHD3度以上の重症例は10%以下であり、GVHDの発症と生存率に相関はなかった。臍帯血バンクによる臍帯血移植は骨髄バンクによる骨髄移植と同等の成績が得られ、HLA不一致移植でも重症GVHDは少なく、保存臍帯血の移植への利用度はきわめて高く、約10%は移植に利用できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1)西平浩一：臍帯血バンクを利用した非血縁者間臍帯血移植。小児科 1999、40(5):469-478。
- 2)西平浩一：臍帯血バンクを利用した非血縁者間臍帯血移植の実際。日本輸血学会雑誌 1999、45(4): 557-560。
- 3)住江愛子、松崎彰信、西平浩一、他：乳児期に非血縁者間臍帯血移植を施行したムコ多糖症1型(Hurler症候群)の1例。日本小児血液学会雑誌 2000、14:23-28。
- 4)加藤啓輔、石田裕二、西平浩一、他：造血幹細胞移植が施行された小児急性リンパ性白血病38例における再発症例の検討。日本小児血液学会雑誌2000、14:13-18。

5)Nishihira H, et al. Unrelated umbilical cord-blood stem cell transplantation:a report from Kanagawa Cord Blood Bank, Japan. Intl J Hematol 68: 193-202,1998.

2. 学会発表

- 1)大沼 圭、西平浩一、他：造血幹細胞移植の再移植として非血縁者間臍帯血移植が施行された症例の検討。第22回日本造血細胞移植学会 広島市 1999、12、17。
- 2)生田孝一郎、西平浩一：HLA不一致非血縁者間臍帯血移植35例の検討。第22回日本造血細胞移植学会 広島市 1999、12、17
- 3)坪倉一二三、谷澤昭彦、西平浩一、他：臍帯血幹移植にて再移植を行ったHunter病の一例。第22回日本造血細胞移植学会 広島市 1999、12、17。
- 4)磯山恵一、生田孝一郎、西平浩一、他：非血縁者間臍帯血移植の神奈川臍帯血バンクにおける成績。第41回日本小児血液学会、東京、1999、9、11。
- 5)西平浩一：臍帯血移植の成績。第39回血液成分治療研究会。秋田市、1999、10、12
- 6)照井君典、佐藤秀子、西平浩一、他：HLA2座不一致非血縁臍帯血移植を行った乳児急性リンパ性白血病の一例。第41回日本臨床血液学会。秋田市、1999、10、13

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 無し
2. 実用新案登録 無し
3. その他 無し

