

IV. 研究会議発表者報告書（資料）

平成 13 年度厚生科学研究
「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班会議
日時：2001 年 7 月 14 日（土）10：00～13：00
場所：東京大学医科学研究所 白金台キャンパス一号館 1F 講堂

■プログラム

10：00～10：10

1. はじめに 国立名古屋病院 齋藤 英彦

10：10～10：55

座長 堀田 知光

2. ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用に向けた基盤整備
(15分) 京都大学医学部小児科学

中畑 龍俊

3. 臍帯血中 TIE2 陽性細胞を用いた移植医療への可能性
(15分) 金沢大学がん研究所細胞分化研究分野

高倉 伸幸

4. 臍帯血・末梢血造血前駆細胞からの分化過程における表面マーカー発現の解析
(15分) 大阪大学微生物病研究所遺伝子動態研究分野

仲野 徹

10：55～11：40

座長 高橋 恒夫

5. 臍帯血 CD34 陰性幹細胞の表面マーカー
(15分) 東海大学医学部血液・リウマチ内科

安藤 潔

6. 臍帯血移植後の免疫能の検討
(15分) 東海大学医学部小児科

加藤 俊一

7. 臍帯血の Dendritic Cell
(15分) 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング部門

高橋 恒夫

11：40～12：25

座長 加藤 俊一

8. 非血縁者間臍帯血移植後にみられた重症溶血性貧血-B1 細胞の関与について-
(15分) 名古屋大学医学部小児科/成長発達医学

小島 勢二

9. 「フルダラビンを含む前処置による成人造血器悪性腫瘍に対する臍帯血移植」
(15分) 兵庫医科大学輸血部

甲斐 俊朗

10. 非血縁臍帯血移植の臨床的検討
(15分) 神奈川県厚木保健所

西平 浩一

12：25～13：00

司会 齋藤 英彦

11. 総合討論

平成13年度厚生科学研究
「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」第1回班会議

2. ex vivo 増幅造血幹細胞の臨床応用に向けた基盤整備
京都大学医学部小児科 中畑龍俊、伊藤仁也

臍帯血移植をより安全な治療法とするため、臍帯血中の造血幹細胞や造血前駆細胞をex vivoで増幅し移植に用いる研究が行われ、海外では増幅した細胞を用いた治験も開始されている。われわれはSCF, FL, TPO, IL-6/sIL-6Rを組み合わせることでヒト造血幹細胞を増殖させる方法を開発してきた。この方法では、臍帯血CD34+細胞を1週間培養することにより、NOD/SCIDマウスの系で測定される造血幹細胞を約4.2倍増加できることが明らかとなった。この増幅率は臍帯血移植を成人に応用するには十分であり、臨床応用を開始したいと考えている。近年、体外処理、加工した細胞も医療に応用する際には医薬品と同様に安全性が強く問われるようになってきた。今回、ex vivo 増幅臍帯血造血幹細胞の臨床応用に向けた基盤整備について検討した。

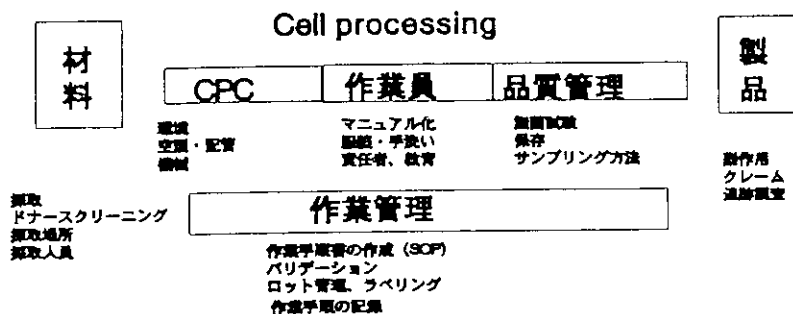
細胞プロセッシングにおけるガイドライン

- 1969 WHO: 国際貿易における製品のGMPに基づく証明制度の採用を勧告
- 1987 ISO 9000(国際品質管理規格)の制定
- 1996 厚生省研究班(浅野班): 臍帯血プロセッシングと移植の適応に関する自主ガイドライン
- 1998 FDA: Guidance for human somatic cell therapy and Gene therapy
- 2000 厚生省: 細胞治療および生物製剤に関するガイドライン
- 2001 FDA: GTP guideline for human cell therapy
- 2001 厚生省令: 薬事法一部改正 細胞治療用生物製剤の取り扱い

細胞療法とGTP

GTP(Good Tissue Practice)

ヒト細胞/組織に由来する製品の製造工程(採取-流通)において、伝染病物質の混入を防止するとともに、適切な作業工程と品質管理の基準を示すことにより、製品の機能(function)、完全性(integrity)が損なわれない、安全かつ有効な製品がつくられることを保証する基準



1. 原材料となる細胞・組織の起源・由来・選択理由
2. 原材料となる細胞・組織の特性と適格性
(ドナー選択基準、適格性、個体差の検証、トレーサーサビ
ティターの保証手段、細胞の純度、安定性及び確認方法
3. 細胞・組織の採取・保存・運搬について
4. 遺伝子改変細胞及び遺伝子改変動物を樹立しようとする
場合の原材料となる遺伝子・ベクター・ウイルスなど
5. 異種動物由来細胞・組織を製造しようとする場合の原材
となる動物について
6. 細胞・組織以外の原材料について
7. 製造工程、特に製造工程の適切な段階における感染性微
の検査方法、汚染防止のための管理体制及び採用した不
除去方法並びに工程評価
8. セルバンク作成、継代方法とその後の細胞の変化につい

1. 原材料 (ドナー)

ドナー情報の提供、HBV,HCV,HIV,HTLV-1,Palvo,梅毒

2. 試薬

培養液構成物を全て明らかにする。
異種動物由来血清は原則用いない。試薬は、医薬品グレード
のもの、あるいはGMP規格を受けた試薬を用いる。

3. 製造施設 (CPC)

細胞治療専用の機器を用いる。ドナー毎のインキュベーター
の設置、同一工程は同一作業フロアで行う。

4. 製造工程

標準作業手順書 (SOP)提出の義務化、バリデーションによる
変更手続き、細胞ロットの作成、ロット毎の工程記録、材料
の明記、ラベル化による検体取り違えを防ぐ、倫理委員会

Ex vivo expansion による臍帯血移植の前臨床試験

厚生省令で求められている項目

1. 安全性試験
2. 効力又は性能を裏づける試験
3. 体内動態

Ex vivo expandした臍帯血のNOD/SCID mouseへの移植

- 生着の検討
- 長期生着能
- 生存率
- ヒト血球の体内動態の検討

Ex vivo expansion 臍帯血移植の臨床試験
に向けての基盤整備

1) GTPに乗った細胞加工の整備

バリデーション,SOPの作成、CPCの整備、培養材料のGMP化、認可制度

2) 臍帯血バンクの対応

2 バッグによる保存

3) 細胞加工品投与における患者の追跡調査、副作用報告の弟
長期造血能の追跡調査

4) ドナースクリーニング、細胞保存などの倫理的問題

5) 培養細胞の品質管理、評価系の確立
効果判定 (生着日数?)、投与細胞数の設定、

6) 国際標準化

厚生省厚生科学研究費

(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)

「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」班会議

平成13年7月14日

3. 臍帯血中TIE2陽性細胞を用いた移植医療への可能性

高倉 伸幸 (金沢大学がん研究所・細胞分化研究分野)

抄録：我々は以前からマウスを用い、真なる造血幹細胞の表面抗原の同定と、その機能解析を行ってきた。マウスでは胎仔期初期の未分化造血幹細胞はレセプター型チロシンキナーゼであるTIE2を発現していることを観察しており、胎仔肝や成熟個体の骨髄中の分化抗原 (Lineage) 陰性でc-Kit陽性の造血前駆細胞の中では、TIE2陽性の細胞がより効率よく放射線照射したマウスの骨髄を再建する能力を有することが示されてきた。またマウスの造血幹細胞に発現する本TIE2の機能は、自らが分泌するTIE2のリガンドであるアンジオポエチン-1のオートクラインループによって、血管内皮細胞などの骨髄中ストロマ細胞のなかでも、幹細胞の自己複製にとっての生態学的適所 (ニッチ) を構成する細胞の分泌する細胞外マトリックスに強固に接着させることにより、未分化性を維持させることであることが明らかとなってきた。このような研究結果に立脚し、我々はヒト臍帯血中のTIE2陽性細胞の発現率、および試験管内における、その増殖性、多分化能などを解析した。臍帯血ではLineage marker 陰性でCD34陽性細胞に、多分化能、増殖能が観察され、我々の培養ではCD34陰性の細胞にはその増殖性が観察されなかった。またCD34陽性細胞の中では10%前後にTIE2陽性細胞が存在し、これらTIE2陽性、陰性の細胞を培養、比較した結果、1) TIE2陽性、陰性細胞間では、多分化能には顕著な差は観察されない。2) アンジオポエチン-1によるfibronectinへの接着はTIE2陽性細胞において観察される。3) TIE2陽性細胞は長期にストロマ細胞上でcobble-stoneを形成する、などが明らかとなってきた。現在これらTIE2陽性、陰性細胞のNOD/SCIDマウスにおける骨髄再建能を観察している。

一般的に骨髄中では造血幹細胞はストロマ細胞との強い接着により、細胞周期的にはG₀期など静止期にあると考えられている。しかし、臍帯血中の幹細胞が流血中に存在するにも関わらず、分化が抑制されているメカニズムを本TIE2の機能解析からアプローチするとともに、マトリックス、細胞接着、細胞周期をキーワードにして、TIE2の機能制御による、造血幹細胞の体外増幅にアプローチしたいと考えている。

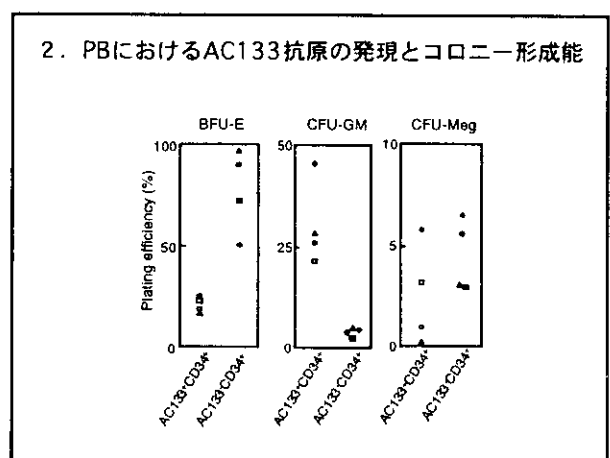
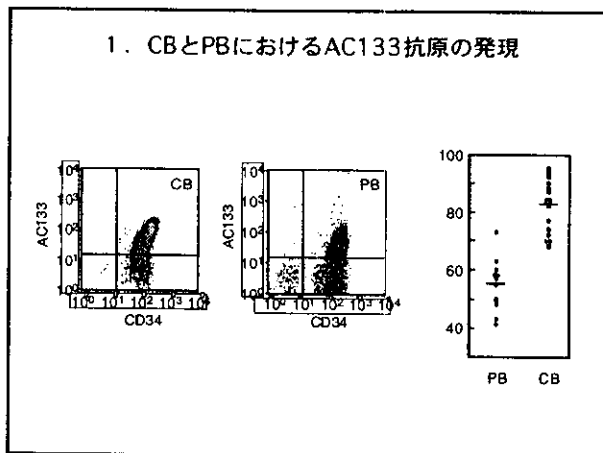
4. 臍帯血・末梢血造血前駆細胞からの分化過程における 表面マーカー発現の解析

大阪大学微生物病研究所
仲野 徹

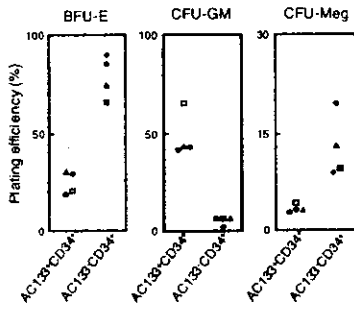
AC133 抗原は未分化な血液細胞に発現する表面マーカーである。臍帯血・末梢血の未分化な造血前駆細胞である AC133⁺CD34⁺細胞からの分化過程において、CD34、AC133 の発現動態と、コロニー形成能についての解析を行なった。

CD34 陽性細胞における AC133 陽性細胞の比率は、末梢血に比較して臍帯血で有意に高かった (1)。CFU-GM はほとんどが AC133 陽性分画に含まれていたが、BFU-E、CFU-Meg は AC133 陰性分画に多く含まれていた (2、3)。浮遊培養系における末梢血 AC133⁺CD34⁺細胞からの分化においては、AC133⁺CD34⁺の細胞が多く出現するのに対して、臍帯血の場合はほとんど出現しなかった (4)。CD61 陽性細胞においても同様の現象が認められたが (5)、CD13 陽性細胞においては、両者で有意な差が認められなかった (6)。また、臍帯血の浮遊培養 6 日目においては、AC133⁺CD34⁺の細胞が少ないのみでなく、その巨核球コロニー形成能も著しく低かった (7)。

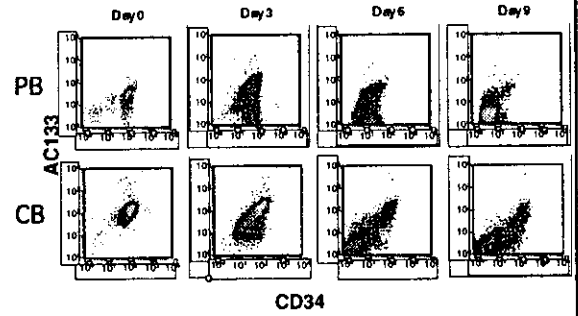
以上の結果から、赤血球・巨核球系は、AC133⁺CD34⁺から AC133⁻CD34⁺の細胞を経て分化するのに対して、顆粒球・マクロファージ系では経ずに分化することが明らかとなった (8)。このような分化動態の差異が臍帯血からの巨核球分化能が低いことの一つの説明になると考えている。



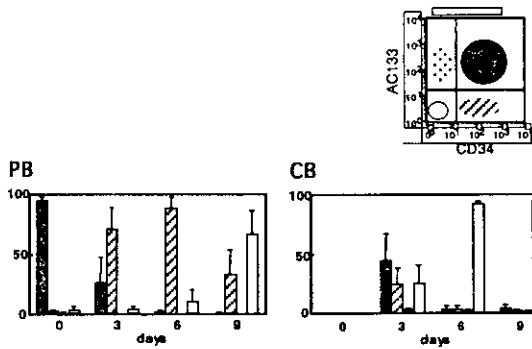
3. CBにおけるAC133抗原の発現とコロニー形成能



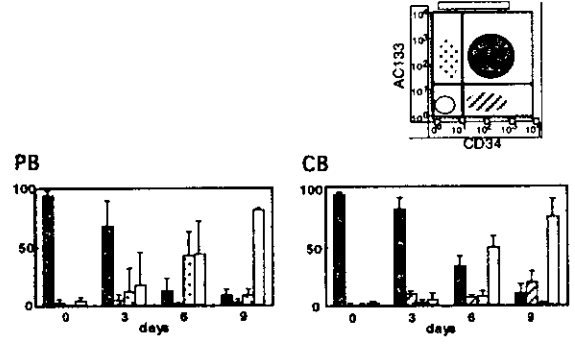
4. PB とCBの分化過程におけるCD34とAC133の発現



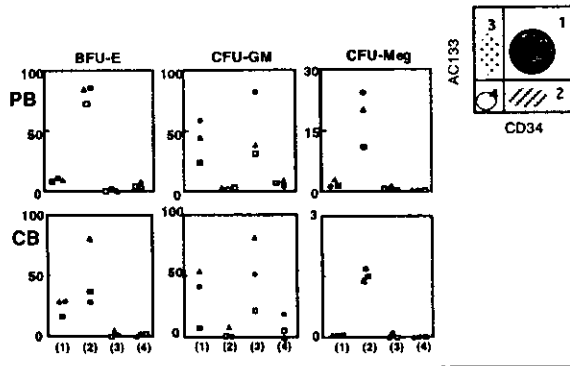
5. CD61陽性細胞におけるCD34とAC133の発現



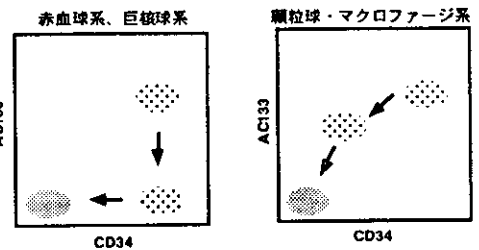
6. CD13陽性細胞におけるCD34とAC133の発現



7. CD34とAC133の発現とコロニー形成能



8. CD34とAC133の発現と細胞分化



平成13年度厚生科学研究

「臍帯血を用いた移植・再生医療の確立に関する研究」班会議

平成13年7月14日 於 東京大学医科学研究所 一号館1F講堂

5 臍帯血 CD34 陰性幹細胞の表面マーカーの解析

班員：東海大学医学部内科 堀田知光

協力者：

東海大学医学部細胞移植研究センター、細胞移植研究センター

安藤 潔、中村嘉彦、加藤俊一

【背景と目的】CD34 分子がヒト造血幹細胞の表面マーカーであることが明らかにされ造血幹細胞を純化する技術が進歩し、現在では90%以上の純度でこれらの細胞を得て移植・遺伝子治療に利用されている。さらに最近 CD34 陰性の新たな幹細胞の存在がヒトを含む哺乳類で報告されつつあるが、これらの細胞の血液学的意義はいまだ不明である。それらの細胞の存在頻度が低いことと培養が困難であることから細胞生物学的、分子生物学的解析が行えないためである。われわれはマウス骨髄ストローマ細胞を利用した培養系でヒト Lin⁻CD34⁻細胞を培養し長期間にわたって CD34 陽性幹細胞を誘導可能であることを報告した。最近マウス造血幹細胞マーカーである AA4.1 遺伝子が同定され、C1qRp であることが明らかにされた。今回は CD34 陰性の表面マーカーとして補体レセプターでもある CD11 ファミリーに関して詳細な解析を行ったので報告する。

【方法】ヒト臍帯血より得られた MNC を 12 種類の lineage markers (CD2, 3, 4, 7, 14, 16, 19, 20, 33, 41, 56, glycophorin A) と CD34 で標識し、cell sorter を用いて Lin⁻CD34⁻細胞を得た。これらの細胞の CD11a, 11b, 11c の発現を解析した。CD11c 陽性、陰性細胞について CD34 誘導率、増殖能、コロニー形成能、SRC アッセイを行った。

【結果】CD11 ファミリーの中で CD11c のみが Lin⁻CD34⁻細胞中 $65 \pm 26\%$ (n=6) で発現を認めた。培養後の CD34 陽性細胞誘導効率も CD11c 陽性群で $63 \pm 10\%$ 、CD11c 陰性群で $28 \pm 8\%$ (n=6) であった。さらにコロニー形成能は CD11c 陽性群で CFU-GM 93 ± 6 、BFU-E 33 ± 10 、CFU-Mix $37 \pm 4/1000$ 、CD11c 陰性群で CFU-GM 15 ± 4 、BFU-E 25 ± 7 、CFU-Mix $8 \pm 2/1000$ (n=6) であった。現在 SRC 活性について検討中である。今後これらの補体レセプター発現の意義について検討していく予定である。

厚生労働省ゲノム・再生医療研究班(班長:齊藤英彦教授)

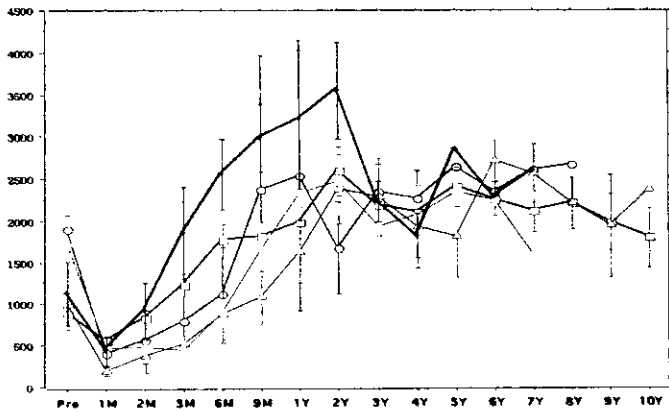
6. 臍帯血移植後の免疫能:骨髄移植、GD34移植との比較

分担研究者 加藤俊一

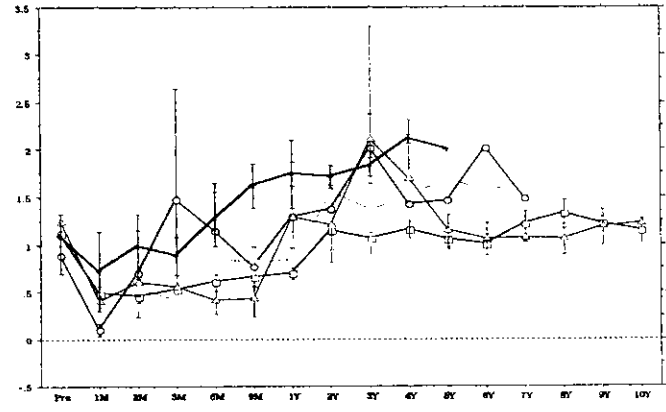
研究協力者 井上裕靖、矢部普正、矢部みはる、保田由喜治、清水崇史

- CD34 細胞
- 血縁骨髄移植
- △ 血縁不一致
- 非血縁骨髄移植
- 臍帯血移植

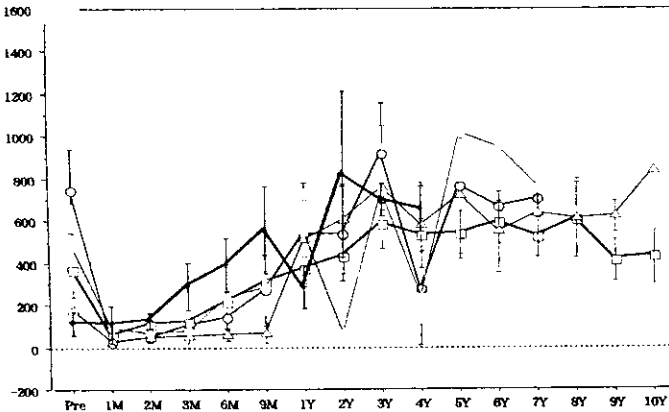
リンパ球総数の動き



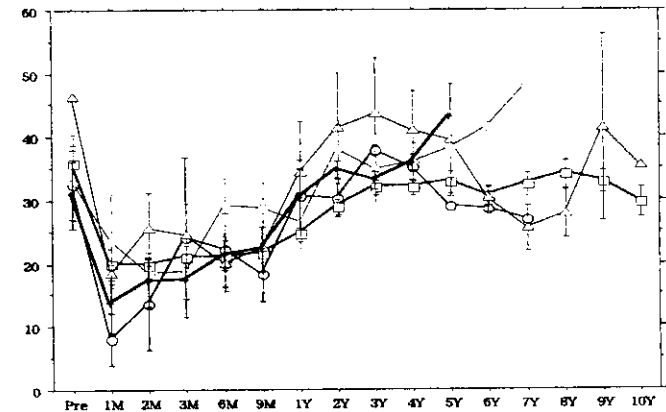
CD4/8



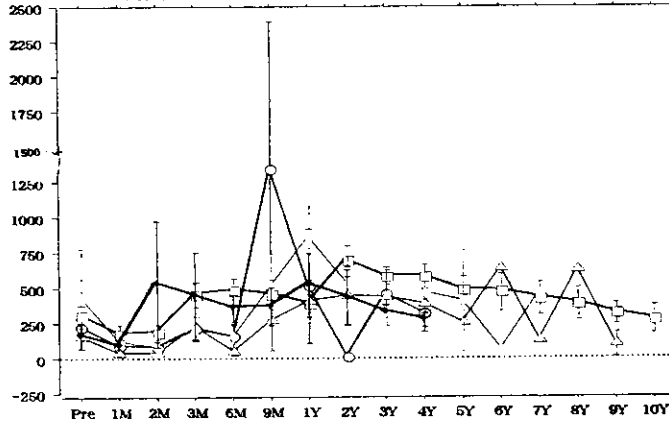
CD4絶対数



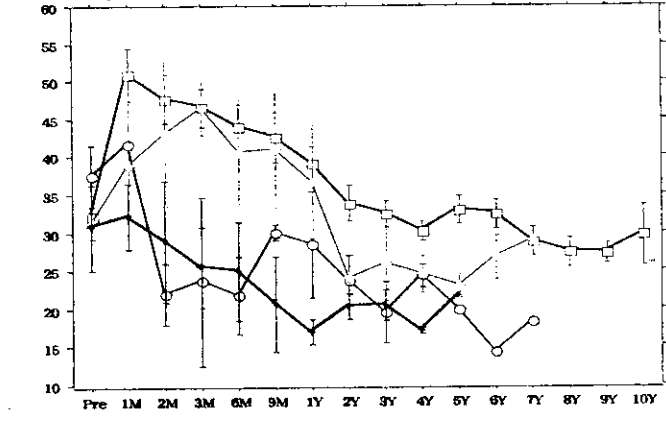
CD4%



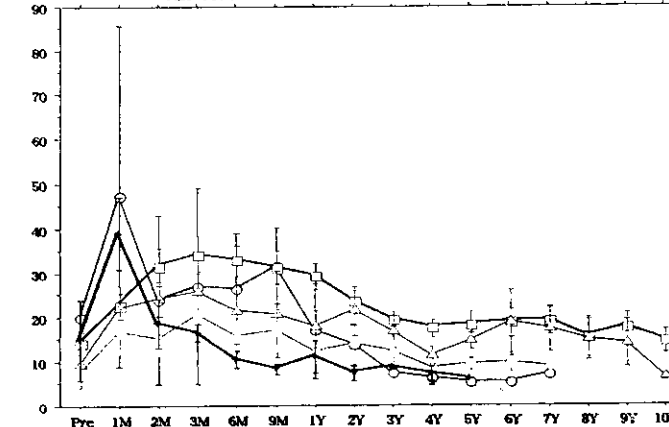
CD8絶対数



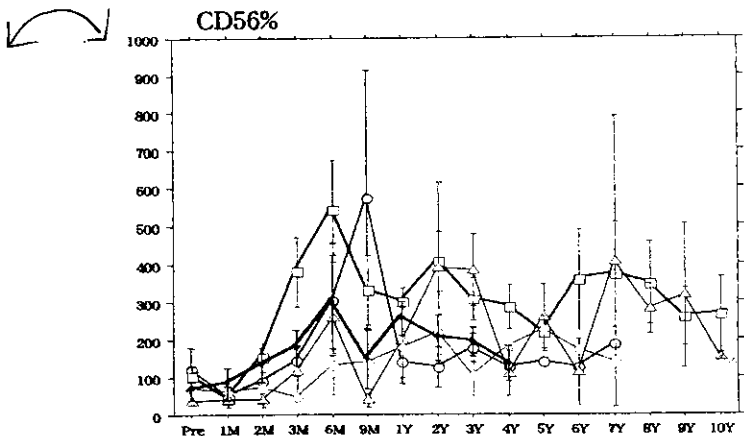
CD8%



CD56絶対数

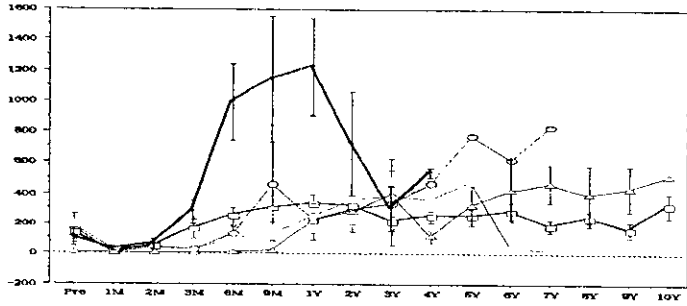


CD56%

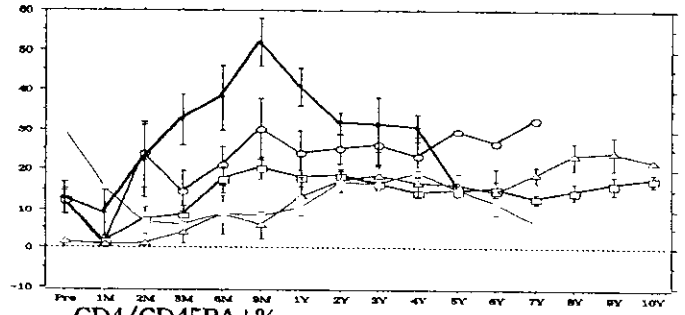


- CD34 細胞
- 血縁骨髓移植
- △ 血縁不一致
- - 非血縁骨髓移植
- 臍帯血移植

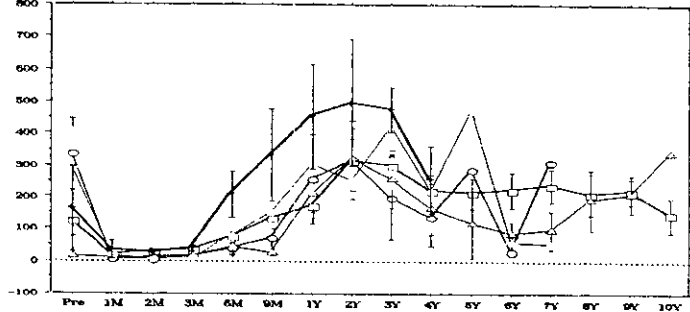
CD19絶対数



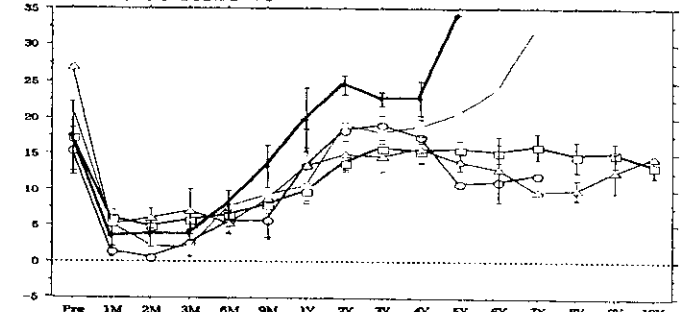
CD19%



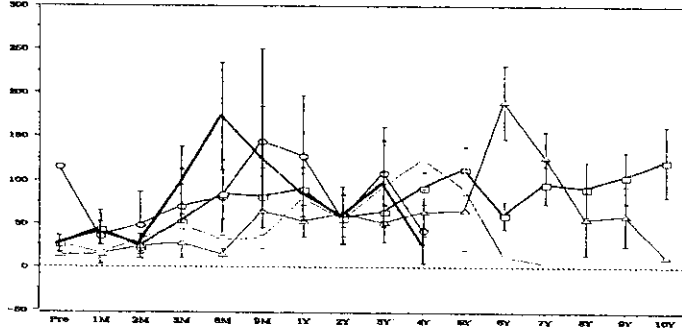
CD4/CD45RA+絶対数



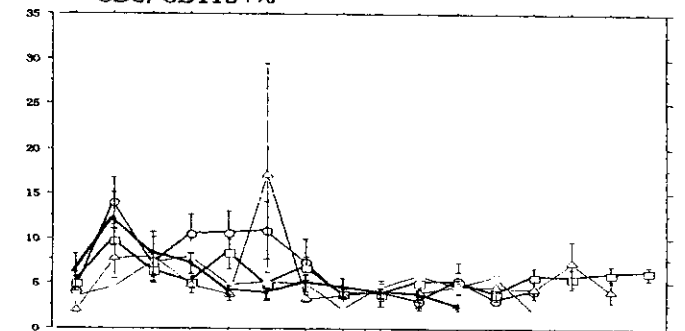
CD4/CD45RA+%



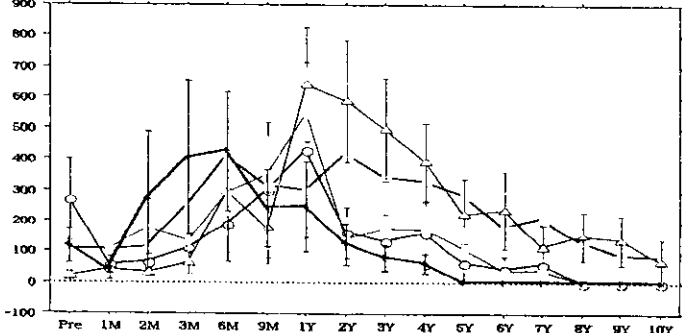
CD8/CD11b+絶対数



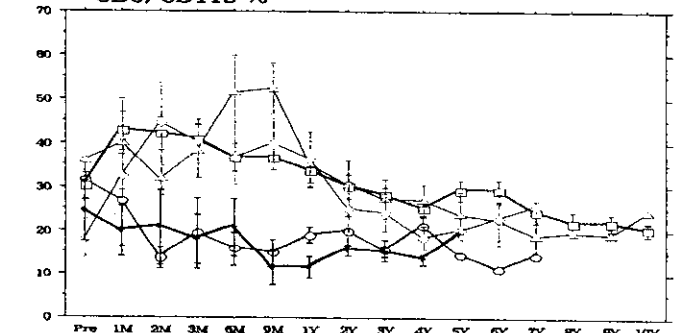
CD8/CD11b+%



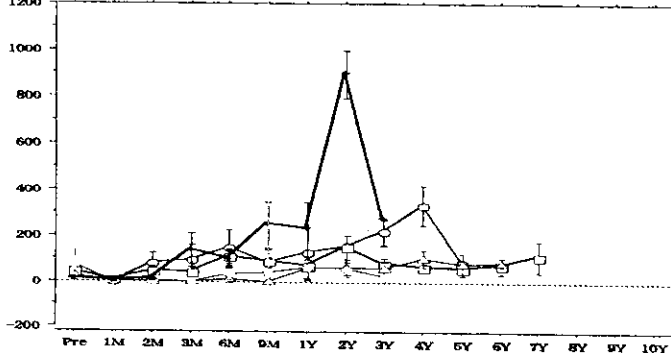
CD8/CD11b-絶対数



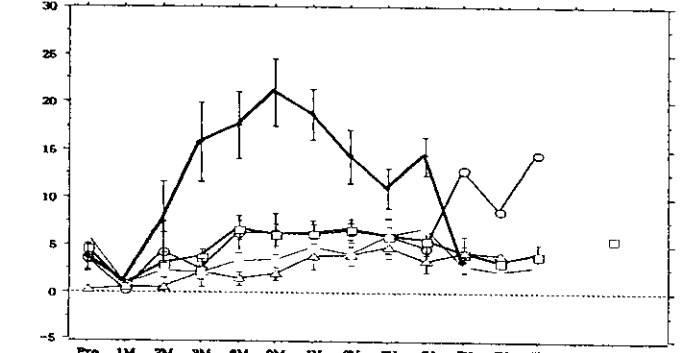
CD8/CD11b-%



CD19/5+絶対数



CD19/CD5+%



7. 臍帯血由来の造血幹細胞・前駆細胞と免疫担当細胞の細胞生物学的解析

班員：高橋 恒夫

研究協力者：渡辺 信和、長村 登紀子、赤川 栄二、榎本 誠、鄭 以州

目的：近年、我が国における臍帯血バンクの充実に伴い、臍帯血由来の造血幹細胞と免疫担当細胞を用いた血液疾患の治療がますます重要なものとなっている。今回我々は、造血幹細胞・前駆細胞のホーミング関連分子、および臍帯血単球由来樹状細胞の性状を解析した。

1. 臍帯血 CD34⁺細胞のホーミングに関する接着分子、およびケモカインレセプターの解析

臍帯血移植後の血液細胞再構成が、骨髄移植や末梢血幹細胞移植に比べ遅延することが知られている。その原因としては、移植される造血幹細胞数が他のソースに比べて少ないことがあげられている。一方、レシピエントに輸注された造血幹細胞のうち、骨髄に生着するのは少数であるとの指摘もあり、本来の造血の場である骨髄への造血幹細胞のターゲティング、すなわちホーミングの問題も注目されている。

我々はホーミングに重要な 2 種の細胞表面分子、すなわち骨髄からのシグナルを感知するためのケモカインレセプターと、骨髄内血流空間から骨髄内造血微少環境への移行に直接関与する接着分子の発現を、臍帯血、骨髄、および末梢血由来の CD34⁺細胞に関して 4 カラーのフローサイトメーターを用いて解析した。その結果、CXCR-4 や、VLA 分子群の発現に関して、これら異なるソース由来の CD34⁺細胞で異なるパターンがみられた。

2. 臍帯血単球由来樹状細胞の特性

現在、末梢血単球由来の樹状細胞 (PBDC) は、癌患者等の抗原特異的な免疫療法に使用されている。また、骨髄由来の造血幹細胞を増幅し、それから樹状細胞を誘導する試みも進められている。

我々は、もう一つの重要な樹状細胞のソースである臍帯血に注目し、臍帯血単球由来の樹状細胞 (CBDC) の細胞生物学的性状を、PBDC と比較検討した。その結果、CBDC には PBDC に劣らないすぐれた免疫機能を持つことが示された。

臍帯血移植後における溶血性貧血
—— B1cellの関与について ——

名古屋大学小児科/成長発達医学
 渡辺修大 高橋義行 中村陽一 吉見礼英
 工藤寿子 小島鈴二

症例

<患者> N.K 男児
 2歳 身長78cm 体重10.5kg 体表面積0.47m²
 <診断> hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH)
 <現病歴>
 平成11年1月末より発熱、肝脾腫を認め、近医受診したところ汎血球減少を認め当院に紹介され入院した。肝生検を施行し組織球の浸潤を認めHLHと診断した。化学療法を施行したが改善を行わず、H.11.12.2摘脾を行った。一時的に汎血球減少は改善したが、再び上記症状が出現しH.12.7.5非血縁者間臍帯血幹細胞移植を行った。

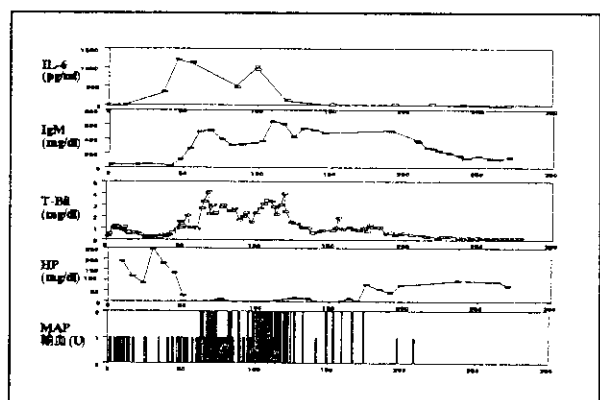
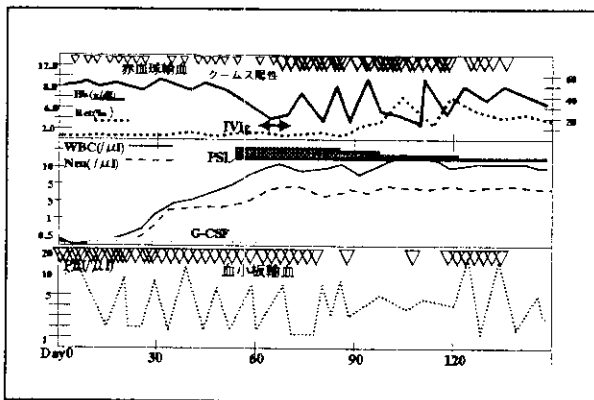
臍帯血移植

<HLA>
 Recipient B(+) A24,33 B44,52 DR2(1502),4(0405)
 Donor A(+) A24,33 B44,52 DR2(1502),4(0403)
 <臍帯血細胞数>
 保存時 9.5×10^7 /kg
 輸注時 4.0×10^7 /kg
 輸注CD34細胞数 1.6×10^6 /kg
 輸注CFU-GM数 2.3×10^6 /kg
 <前処置>
 ATG : 2.5mg/kg/day × 4days (day-5,-4,-3,-2)
 CY : 60mg/kg/day × 2days (day-4,-3)
 TBI : 2.5Gy × 4 (day-2,-1)
 <GVHD予防>
 FK506 0.02 mg/kg/day (day-1-)

血液学的回復

1.生着
 網状赤血球 >10% : day80
 好中球 >500/μl : day21
 WBC >1000/μl : day24
 血小板 >20000/μl : day212
 MAP最終輸血 : day262
 血小板最終輸血 : day262

2.キメラリズム解析
 day28,day88,day120,day263の末梢血、骨髄のマイクロサテライト多型性はドナータイプであり、complete chimeraは持続している。



Serologic test results and DTT-inactivation studies

		×2 ¹	×2 ²	×2 ³	×2 ⁴	×2 ⁵	×2 ⁶
Patient's plasma	37°C	1+s	1+	w+	±	0	0
	23°C	1+s	1+	w+	±	0	0
	5°C	2+	1+s	1+	1+	w+	0
	Ab-A hg	1+s	1+s	1+	w+	0	0
Patient's plasma (DTT treatment)	37°C	0	0	0	0	0	0
	23°C	0	0	0	0	0	0
	5°C	0	0	0	0	0	0
	Ab-A hg	w+	±	0	0	0	0

B1cellと溶血性貧血の関係

- 一部の自己抗原と反応し、抗体を産生する。
→自己免疫疾患との関係
- B-1cell IIが認識する抗原の一つにホスファチジルコリン(PtC)がある。

↓

このPtCに対する抗体はプロメリンで処理した自己の赤血球膜抗原に対して親和性を有している。
(Adv.Immunol 55;297,1994)

*マウスにて細菌などの環境要因により抗赤血球抗体を産生し貧血が生じる。(JEM 175;71,1992 180;111,1994)

B1cell	B2cell
CD19(+),CD5(+)	CD19(+),CD5(-)
<u>IgMの細胞表面の発現が高い</u>	
胸腔、腹腔に存在	脾臓、リンパ節、末梢血液中に存在
細菌細胞膜抗原などに対する低親和性で多反応性の抗体を産生	特異的な抗原に対する高親和性の抗体を産生→獲得免疫の主体
↓	
B1細胞は生体が生まれたときより高頻度に遭遇する抗原に対する抗体を産生し、原始的な生体防御に関与	
(Adv.Immunol 55;297,1994)	

ヒトにおける B1 cellの占める割合

胎児の最初のすべての B cell : 100%

胎児	脾臓血	: 60~80%
成人	血液	: 11~49%
	腹腔	: 19~76%
	脾臓	: 10%以下
	リンパ節	: 30%以下 (Immunol.Today,20;312,1999)

Immuno phenotyping

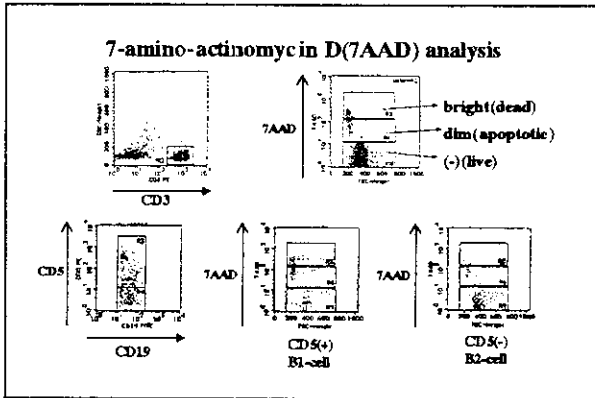
	Day-6	Day105	Day223
CD19(+)/CD5(+)/Cells(%)	37.6	1.2	21.5
CD19(+)/CD5(-)/Cells(%)	18.5	1.1	22.2
CD3(+)/Cells(%)	36.5	84.8	43.3

A transgenic model of autoimmune hemolytic anemia
(Okamoto M.et al.JEM 175;71,1992 180;111,1994)

マウスにて細菌などの環境要因により抗赤血球抗体を産生し貧血が生じる。

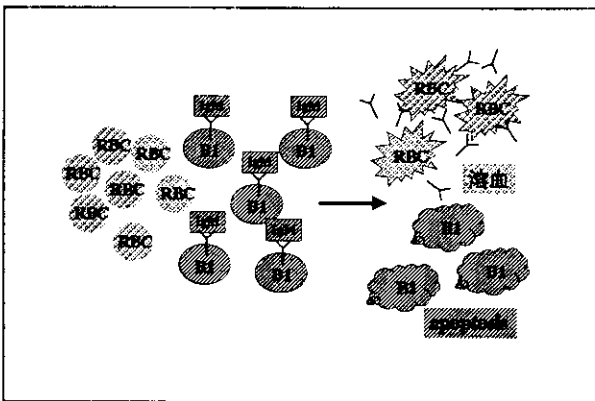
Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice
(Murakami M.et al.Nature,357;77,1992)

マウスにおいてこの自己反応性B1cellは自己抗原である赤血球を腹腔に注入するとアポトーシスを起こし除去される。



7AAD staining

B/T ratio of 7AAD ^{bright-dim}	Day-6	Day105	Day223
	0.67	<u>5.61</u>	0.76
Day105			
B-1 cells(%)		dead 30.5	apoptotic 27.2
B-2 cells(%)		4.2	16.7
			live 77.3



結語

- ・ 脾蒂血 幹細胞移植 後に 種々の 治療に 抵抗性を 示した 重度の 免疫性溶血性貧血の 一例を経験した。
- ・ AIHAのタイプは温式AIHAでIgM+IgG(IgM>IgG)と考えられた。
- ・ 病因としては脾蒂血由来のB1cellによる赤血球に対する自己抗体の産生が考えられた。

9. フルダラビンを含む前処置による成人造血器悪性腫瘍に対する臍帯血移植
班員; 兵庫医科大学細胞移植部・輸血部 原 宏

TBI/FLAGによる臍帯血移植

● Fludarabineの免疫抑制作用

non-myeloablative SCTの前処置への応用
頻回輸血歴(+)のSAA患者に対するHLA不一致血縁者および
HLA一致非血縁者間BMTの前処置にFludarabineの導入
Chan KW et. al. BMT 27; 125-8,2001
UR-CBT前処置にfludarabineを導入(TBI/Flu+L-PAM)
Chan KW et al. BMT 23; 849-851,1999

● 難治性白血病に対するFLAG療法の有用性

Fludarabine; 白血病細胞内のara-CTP
(ara-Cの活性化代謝産物)を上昇
G-SCF; 休止期白血病細胞を細胞周期に入れaraCに対する
感受性を高める

Conditioning Regimen

	day	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
TBI (3 Gy/d)		●	●	●	●							
Fludarabine (30mg/sqm/d)						▼	▼	▼	▼	▼		
ara-C (2g/sqm/d)						◆	◆	◆	◆	◆		
G-CSF (300 μg/sqm/d)						■	■	■	■	■		
CBT												★

Case 1. N. N 21 yr F. AML-M2

definite diagnosis; 1998.4.23

初診時 data

WBC 17300/ μl (blast 52%), RBC 103x10⁴/ μl, Hb 3.6g/dl, Plt 0.9x10⁴/ μl

BM: NCC 30.8x10⁴/ μl, MegK 15.6/ μl, blast 20.4%

CD34(+) HLA-DR(+)

karyotype; 45X,-X,t(8;21), AML1/MTG8 (+)

BHAC/DMP 1 courseにてCR1 (1998.5.21)

BHAC/DMP 1 course, 中等量 araC (1g/sqm x 2/d x 5)+anthracyclin 5 courseの寛解後療法を施行

(この間 AML1/MTG8-mRNA(RT-PCR)の消失を認めず)

2000.5.8; hematological relapse

IDA/araC/6MP/PSL 1 courseにてCR2 (2000.6.12)

地固め療法 2 course 施行

再発時 JMDP 登録(2000.5), UR-BMT 2001.1.26に予定

2000.10.20; 2nd relapse

IDA/araC/6MP/PSL(2000.10.23~)1 course; NR

CBB登録; 2000.11.29

CBT; 2000.12.21

前処置開始前 data

WBC 1000/ μl (blast 18%)

Case 2. N.Y 44yr F. RAEB-T

2.

definite diag 1999.9.3

初診時 data

PB; WBC 2200/ μ l, RBC 314x10⁴/ μ l, Plt 6.7x10⁴/ μ l
 BM; blast 11% (好中球顆粒出現不良, megaloblastoid cell, micro-megakaryocyte 等 3 系統の dysplasia)

karyotype; 46,XX

CAG, DNR/araC, IDA/araC の 3 courses の化学療法後に CR (1999.12)

以後 9 courses の化学療法施行、blast の増勢は認めないものの正常造血の回復を認めず

(各薬剤の総投与量; DNR 210mg, MIT 49mg, IDA 176mg, ACR 280mg)

JMDP 登録; donor (-)

CBB 登録; 2000.12.11 - CBT; 2001.2.15

CBT 前の BM: Mbl 9%, karyotype; t(9;22) 3/20, major and minor BCR/ABL(+)

CBC; 3400 / μ l, blast 18%

Case 3. M.K 44yr M. AML M2

definite diag 2000.9.21

初診時 data

PB; WBC 53500/ μ l (blast 52%), RBC 202x10⁴/ μ l, Plt 19.4x10⁴/ μ l

BM; NCC 5.1x10⁴/ μ l, blast 47.6%, Auer body(+), POD(+), CD33(+), CD13(+), HLA-DR(+)

karyotype; 46,XY

DCMP 1 course にて CR

以後 3 courses の化学療法施行し 2001.2.10 退院するも同年 3.12 再発。

再寛解導入療法 (IDA/araC, HD-araC/MIT) を行うも無効

JMDP 登録; donor (-)

CBB 登録; 2001.4.17 - CBT; 2001.6.5

CBT 前の BM: NCC 4.0x10⁴/ μ l, Mbl 90.6%,

karyotype; 48,XY,+4,+8,t(13;17)(q32;p11)

CBC; 4500 / μ l, blast 18%

WT-1(PB); 660,000 コピー / μ g RN

	Case 1, N.N	Case 2, NY	Case 3, MK
Age	21yr	44yr	44yr
Body weight	61.6kg	44kg	57kg
Diagnosis	AML M2	RAEB-T	AML M2
Status at CBT	REL2	REL1,refractory	REL1,refractory
HLA compatibility			
GVHD direction	5/6*(4/6)#	5/6(3/6)	4/6(3/6)
HVG direction	4/6(3/6)	5/6(3/6)	5/6(4/6)
AB0 (recipient/donor)	A/AB	A/B	O/A
sex (recipient/donor)	F/M	F/M	M/F
NCC (x10 ⁷ /kg)	2.11	2.8	1.99
CFU-GM (x10 ⁴ /kg)	0.6	3.66	1.40
CD34+ (10 ⁵ /kg)	0.58	4.07	0.78
NCI (x10 ⁷ /kg)	0.95	2.07	1.2
viability	70.7%	74%	?

*; HLA-A,B serology, DRB1 DNA high resolution typing

#; HLA-A,B,DRB1 DNA high resolution typing

NCC; nucleated cells collected, NCI; nucleated cells infused

HLA typing

HLA-	A	B	C	DRB1
Case 1, N.N				
Patient	*0206 24	54 60	1 4	*0405 *0405
Cord	*0207 24	54 46	1 1	*0405 *08032
Case 2, N.Y				
Patient	*0201 *2601	60 *1501	*07 *08,	*1201 *0901
Cord	*0206 *2602	46 *1501	*01 *0303	*1201 *0901
Case 3, M.K				
Patient	*0201 31	*4001 *4002/4006	10, -	*0803 *1501
Cord	*0206 31	*4001 *4001	10, -	*0803 *1405

Regimen-related toxicity of TBI/FLAG

Organ Site	Case 1	Case 2	Case 3
mucositis	1	0	1
GI tract	0	0	0
CNS	0	0	3*
lung	0	0	0
bladder	1	1	1
heart	0	0	0
liver	1	0	1
kidney	0	0	2**
overall	1	1	3

*: probably due to infection or drug(FK506)

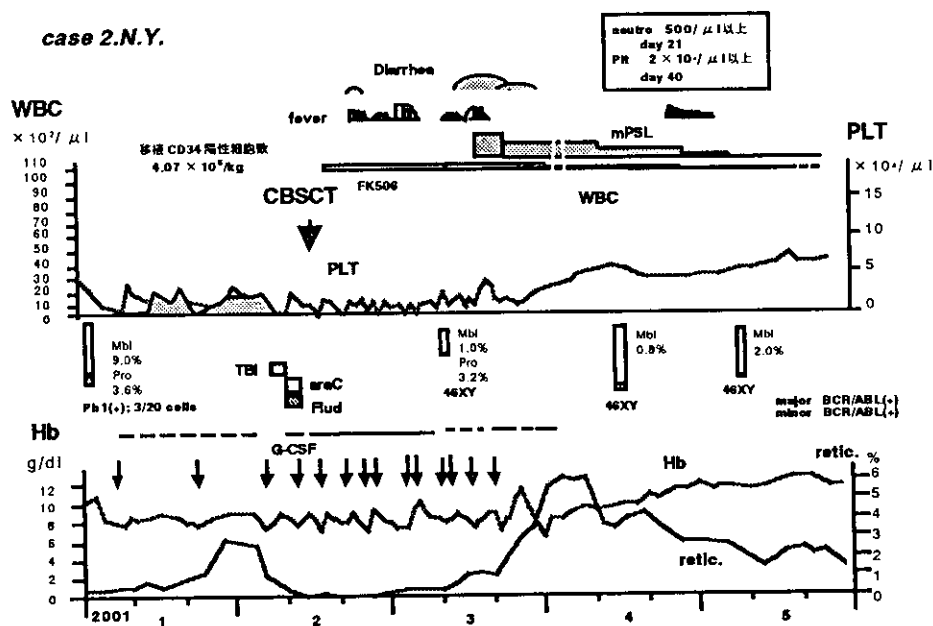
**: due to DIC

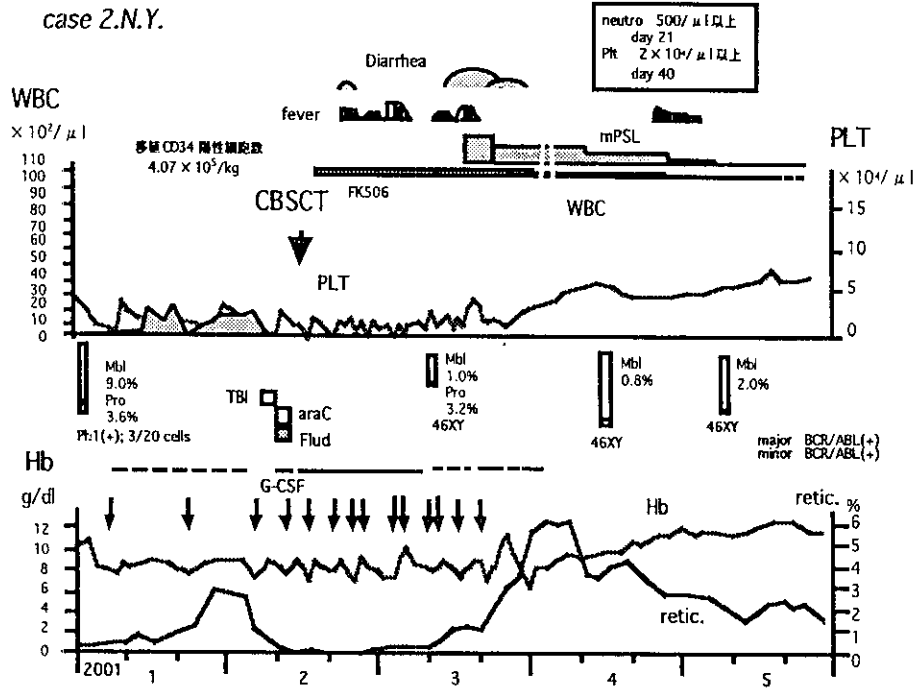
	N.N	N.Y	M.K
Conditioning regimen	TBI/FLAG(5)	TBI/FLAG(5)	TBI/FLAG(3)**
GVHD prophylaxis	FK506	FK506	FK506
engraftment			
neutrophil(500<)	35	21	16
ret 1%<	49	29	-
platelet(20000<)	138	40	-
platelet(50000<)	x	50	-
last PLT transf	60	34	
G-CSF	day5~53	day 5~51	day 0~21
CMV antigenemia	(-)	(+)	NT
AGVHD	grade *	(grade)*	NE
CGVHD	+ (localized)	+ (extensive)	NE
survival	alive	alive	dead
	in mol. rem	in cyto. rel.	(sepsis)
	day +201	day +145	day 21

*;after discontinuation of FK506, #; Histology is not obtained.

**; 3days of FLAG

(2001.7.10 現在)





まとめ

1. 成人造血器悪性腫瘍 3 症例に対し TBI (12Gy)/ FLAG の前処置を用いて臍帯血移植を施行した。
2. TBI/FLAG による重篤な臓器毒性は認めなかった。
3. 移植細胞数はそれぞれ 0.95, 2.07, 1.99 × 10⁷/kg であったが生着は全例に見られた。
4. HLA 不一致移植例であるが、acute GVHD の重症化を認めていない。
5. 1 例は移植直前に合併した敗血症により早期死亡した。
6. 観察期間は短いですが、2 例は血液学的再発なく順調に経過している。
7. 成人造血器悪性腫瘍に対し、前処置 TBI/FLAG を用いた臍帯血移植症例を蓄積し検討していく予定である。

平成 13 年度厚生科学研究
 「臍帯血を用いた移植・再生医療に関する研究」 班会議
 10. 非血縁臍帯血移植の臨床的検討 神奈川県厚木保健所 西平 浩一

血液腫瘍性疾患42例の概略

性別	男/女=24/18
年齢	5.5歳 (0.6-25歳)
体重	19.3kg (6.5-75kg)
移植細胞数	5.1×10^6 (1.4-19.5)
移植細胞数/kg	2.6×10^5 (2-3)
疾患	
ALL	24
AML	15
CML/AP	1
JMML	1
MDS	1
Risk group	
Standard risk (CR1+2)	25
High risk (>CR3-non CR)	17

非腫瘍性疾患14例の概略

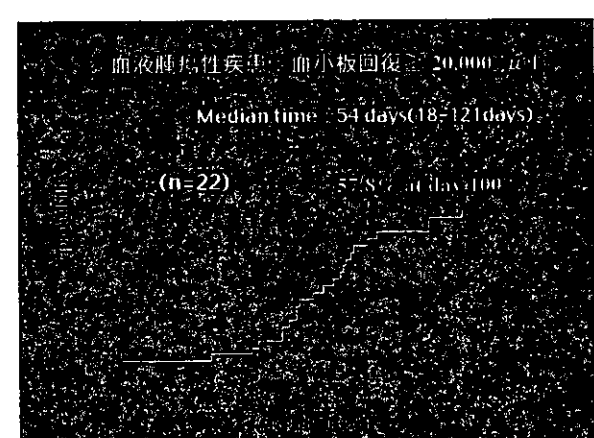
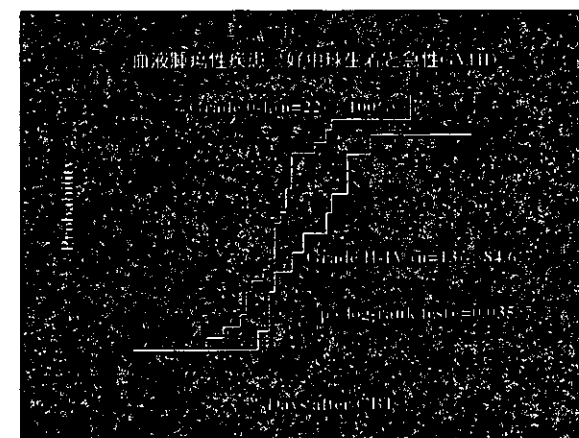
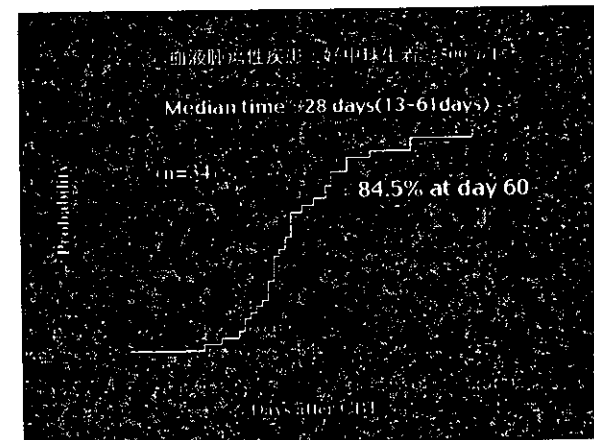
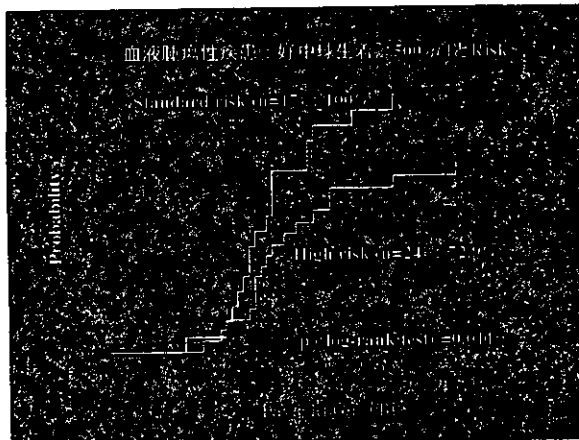
性別	男/女=14/0
年齢	4.1歳 (0.3-16歳)
体重	16.6kg (5.0-40kg)
移植細胞数	6.2×10^6 (2.1-13.1)
疾患	
Wiskott-Aldrich症候群	4
PNP欠損症	2
Adrenoleukodystrophy	2
Hunter症候群	2
Hunter症候群	2
重症先天性不良性白血病	1
PRCA	1

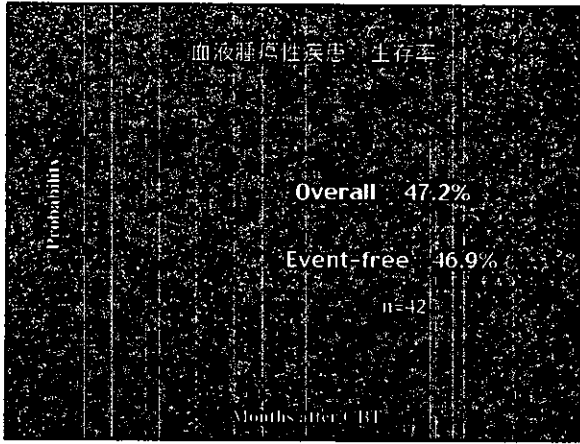
HLA一致率

血液腫瘍性疾患	血清型 (例)	遺伝子型 (例)
6	5	3
5	23	12
4	14	8
3	0	6
2	0	1
非腫瘍性疾患		
6	2	1
5	7	4
4	5	4
3	0	2
2	0	1

移植医療機関

横浜市立大学小児科	京都市立病院小児科
国立がんセンター中央病院小児科	大阪大学小児科
九州大学小児科	広島赤十字総合病院小児科
国立九州総合センター小児科	日本大学松谷病院小児科
広島大学小児科	東京大学小児科
若狭県立北上病院小児科	国立小児病院
福井医科大学小児科	岩手医科大学小児科
神奈川総合大学小児科	滋賀医科大学小児科
埼玉県立小児科センター	山梨医科大学小児科
名古屋大学医学部小児科	私立大学小児科
埼玉医科大学小児科	千葉大学小児科
茨城県立水戸市立病院小児科	岡山医科大学小児科
筑波大学小児科	東海大学小児科
徳島大学小児科	札幌医科大学内科
徳島大学小児科	

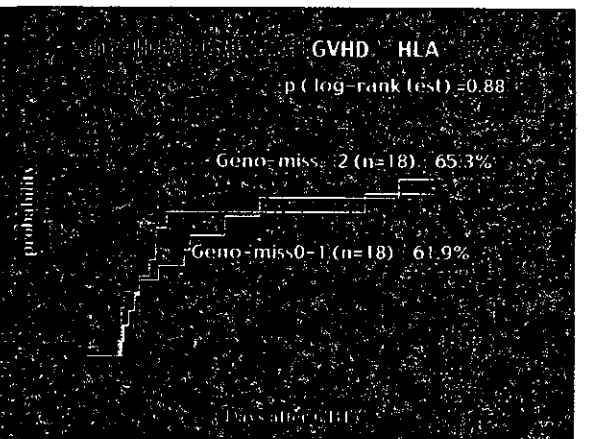
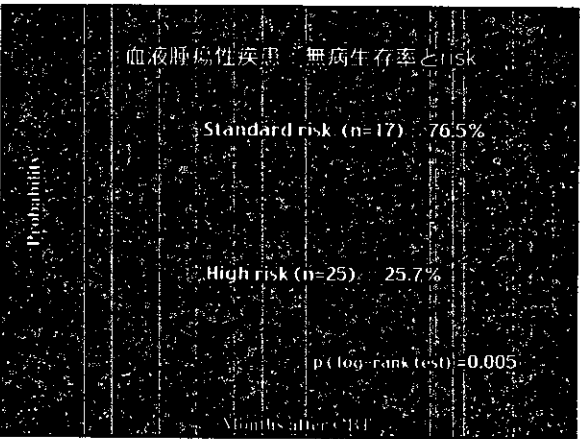
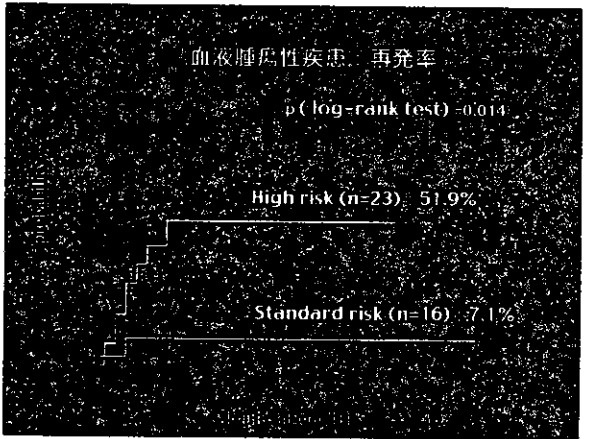
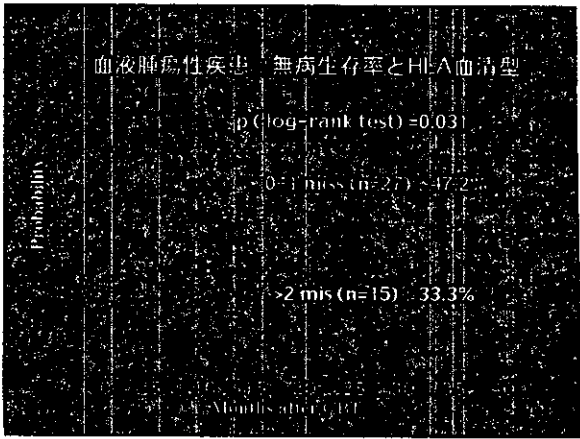




血液腫瘍性疾患 生存に影響する因子

対象数 500 / 61

因子	Low risk	High risk	100%	72.9%	p
Geno 0-1mis > 2-4mis	100%	70.0%			0.173
Sero 0-1mis > 2mis	95.9%	64.3%			0.076
aGVHD 0-I II-IV	100%	84.6%			
BW < 20kg ≥ 20kg	81.5%	85.5%			0.73
Age < 10yrs ≥ 10yrs	81.8%	85.3%			0.40



血液腫瘍性疾患 急性GVHD

Grade	発症数 (%)
0	9 (25)
I	14 (38)
II	8 (22)
III	5 (15)
IV	0 (0)

