

率、コロニー形成能とも優れており、この培地を選択した。この培地を用いてガス透過性バッグによる臍帯血 CD34 陽性細胞増幅率を検討した。12日間で約30倍の増幅が得られ、成人においても生着に十分な細胞を得ることが可能となった。洗浄過程においても無菌濃縮遠心方式による閉鎖系洗浄システムを開発し、90%以上の回収率が得られることを確認した。

2. 増幅臍帯血移植の臨床研究に向けた取り組み

現在、臍帯血移植においては、McNiece (ASBMT 8 (1),2002) ,Kurtzberg (Blood 101(12) 2003)の2グループがサイトカインを用いた体外増幅臍帯血移植の臨床研究を行なった。

Group	McNiece	Kurtzberg
Method of CB expansion	SCF+G-CSF+TPO	PIXY 321+FL+EPO
Culture period	10 days	12days
Fold of expanded TNC	56 X(1.3-278)	2.05 X(0.06-10.19)
Fold of CD34	4 X(0.1-20)	0.5 X(0.09-2.45)
Infused TNC(x 10 ⁷ /kg)	0.99(0.28-8.5)	2.4(1.0-8.5)
Infused CD34(x 10 ⁴ /kg)	1.04(0.97-31.1)	0.22(0.001-2.59)
Patient No	37	28
Engraft		
Neutro>500	Day 28 (15-49)	Day 22 (13-40)
Plt >20,000	Day 106 (28-345)	Day 94(41-370)
Graft failure	0/30	3/24
aGVHD (>III)	40%	36%

ASBMT 8(1) 2002
Blood first edition paper 2003

McNiece らは SCF,G-CSF,TPO を用いて 10 日間の培養を行ない、総細胞数で 56 倍、CD34 陽性細胞数で 4 倍の増幅が得られている。Kurtzberg らは、PIXY 321(GM-CSF+IL-3) FL, EPO を用い、12日間の培養を行ない、総細胞数で、2.05 倍、CD34 陽性細胞数で 0.5 倍の増幅が得られている。

しかし、移植成績においては、好中球の生着はそれぞれ、Day 28, Day 22 に得られたが、表で示すように血小板の回復

は遅延しており、必ずしも増幅臍帯血移植の優位性は証明されなかった。我々はこれら2報の培養法の追試を行ない、我々の方法と比較した。総細胞数の増幅率は McNice 法が優れていたが、CD34 陽性細胞率、CD34 陽性細胞増幅率は我々の方法が最も優れており、14日目の表面抗原解析において、CD34⁺/CD38⁻, CD34⁺/HLA-DR細胞の割合も最も多かった。このことは、我々の方法では、前者2法に比べてより未熟な造血前駆細胞を増幅していると考えられる。

FDA (GTP guideline) ,およびわが国においても薬事法の改定が行なわれ、細胞治療の法的基盤が整備されつつある。そういった中で、細胞治療製剤の安全性を評価し、evidence に基づいた治療効果を評価するためには、GCP に基づいた臨床研究が必要である。我々は細胞の品質管理基準を設けるとともに、臍帯血バンク制度を利用した臨床研究体制の確立を目指している。

先端医療センターでは、データセンターを利用した臨床効果評価システムの構築、副作用モニタリングを行なう体制を整え、プロトコルの作成に着手している。また、増幅臍帯血移植を行なうためには、臍帯血バンクネットワークの協力が不可欠であり、倫理審査に向けた安全性データの蓄積を行なっている。

厚生労働省科学研究齋藤班
平成15年度第1回班会議

7. 臍帯血ミニ移植の試み



虎の門病院
TORANOMON HOSPITAL

虎の門病院 血液科 宮腰 重三郎

2003年6月28日

Mismatched Unrelated Cord Blood
Transplantation Following Reduced-Intensity
Conditioning Regimen (RICBT)
In Adults With Hematological Diseases

Shigesaburo Miyakoshi, Koichiro Yuji, Eiji Kusumi,
Junichi Ueyama, Shinichi Morinaga, Yoshitomo Muto,
and Shuichi Taniguchi

Toranomon Hospital, Minato-ku TOKYO JAPAN

June 21, 2003.

Background

- Allogeneic stem cell transplantation can be curative for selected hematological malignant and nonmalignant diseases such as aplastic anemia.
- Reduced-intensity stem cell transplantation (RIST) is a curative treatment for various hematological malignancies among elder patients and those with organ dysfunction.
- Among patients who require allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, only one third have HLA-matched related donors.
- Regarding umbilical cord blood, it has been possible even in cases in which two HLA loci do not match.
- Cord blood may serve as an effective source of stem cells, thereby broadening the scope of patients who may benefit from RIST.

Objective

- To investigate reduced-intensity cord blood transplantation (RICBT) in a phase I/II study
- Primary endpoints
 - Recipient Engraftment and Survival
- Secondary endpoints
 - Toxicity and TRM (Treatment-related Mortality)

Patients and Methods

- Between March 2002 and May 2003, 24 patients (median age 54.5 years, range 20-70) with advanced hematological diseases received RICBT.
- Patients were not eligible for conventional high dose therapy because of age > 45 years (n=19); extensive prior therapy (n=3); and poor performance status (n=2).
- Median number of cryopreserved nucleated cells infused was 3.0 (range 2.6-4.3) x 10⁷ cells/kg.
- Median number of CD34 positive cells infused was 0.85 (range 0.0050-1.8) x 10⁵/kg.
- The number of HLA disparities was : 1/6 in 4 cases, and 2/6 in 20 cases.
- Conditioning regimen was almost consisted of fludarabine 25 mg/m² for five days, melphalan 80 to 140 mg/m² for one day, and with TBI.
- GVHD prophylaxis was intravenous cyclosporine 3mg/kg (n=21) or 1mg/kg (n=3) alone.
- G-CSF was continued until neutrophil engraftment.
- T cell chimerism was determined by either FISH using sex chromosomes or the STR-PCR method.

Patient Characteristics (1)

Age	median (range)	54.5 (20-70)
Weight	median (range)	51 (38-59)
Disease	myeloid malignancy	11
	(CR1 n=1, CR3 n=1, RAEB n=1, RAEB in T n=1, On Disease n=7)	
	malignant lymphoma (CR1 n=1)	3
	adult T-cell leukemia (On Disease n=4)	4
	severe aplastic anemia	4
	multiple myeloma / plasma cell leukemia (On Disease n=2)	2
Risk	standard	6
	high	18

Cord Blood Unit Characteristics (2)

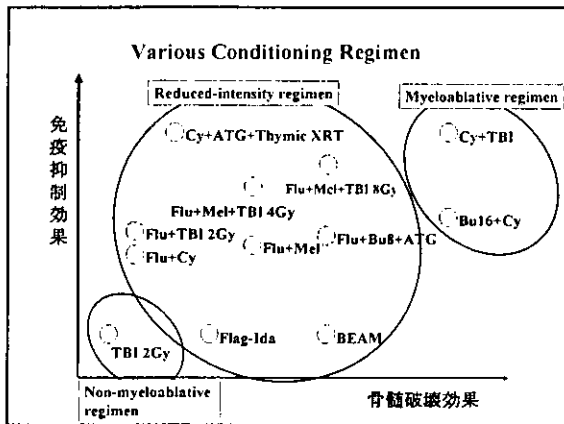
Total cell dose, median, $\times 10^7$ cells/kg (range)	3.0 (2.6-4.3)
CD34+ cell dose, median, $\times 10^5$ cells/kg (range)	0.85 (0.01-1.8)
HLA disparities	5/6 4 4/6 20
Sex	match 9 mismatch 15

Conditioning Regimen

Flu 125 / Mel 140 / TBI 8	3
Flu 125 / Mel 140 / TBI 4	3
Flu 125 / Mel 100 / TBI 4	1
Flu 125 / Mel 80 / TBI 4	17

GVHD Prophylaxis

Cyclosporine 3mg/kg alone	21
Cyclosporine 1mg/kg alone	3



Conditioning Regimen

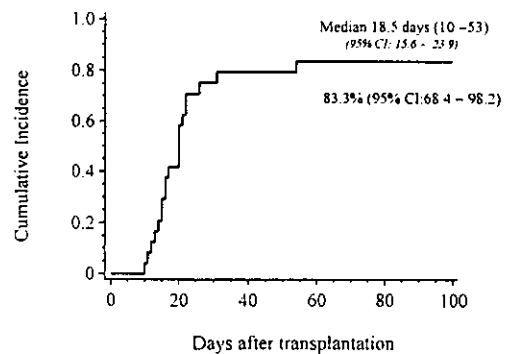
Day	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
fludarabine 25mg/m ²	↓	↓	↓	↓	↓			
melphalan 80-140mg/m ²								↓
TBI 4-8 Gy								↓
G-CSF								↓
Chimerism								↓
								CBT
								melphalan 40mg/m ² × 2
								CSP 3mg/kg

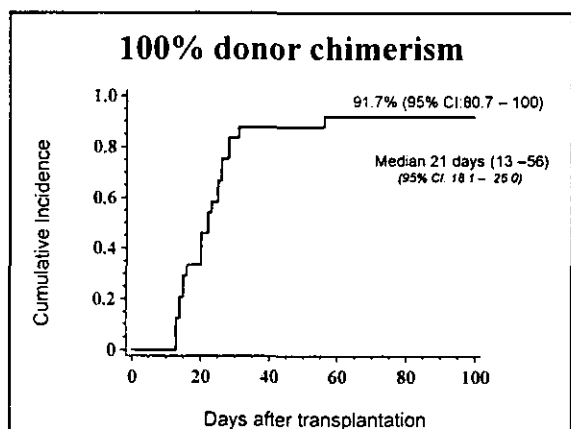
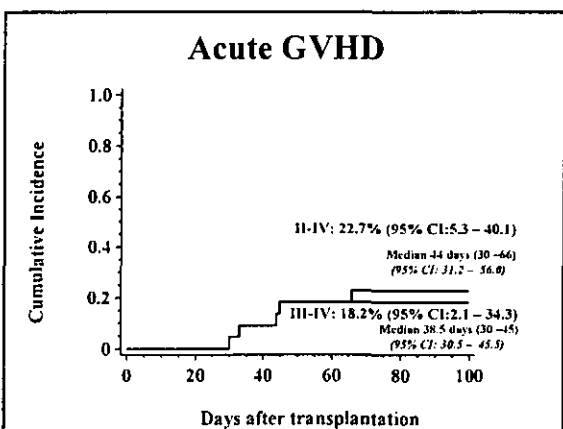
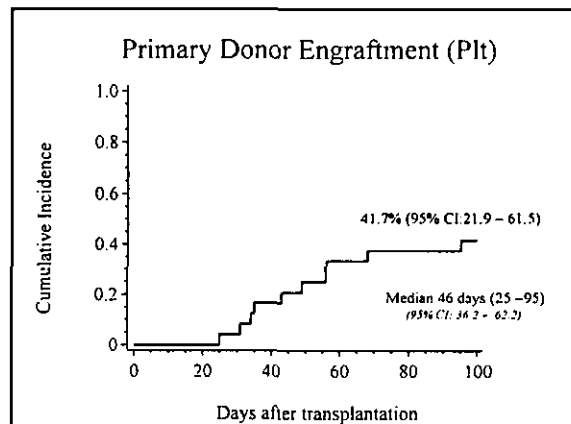
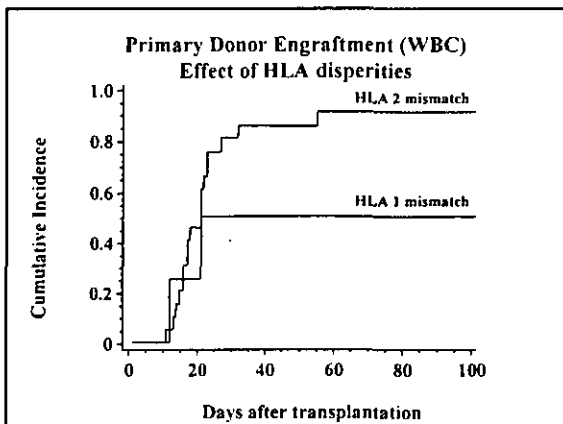
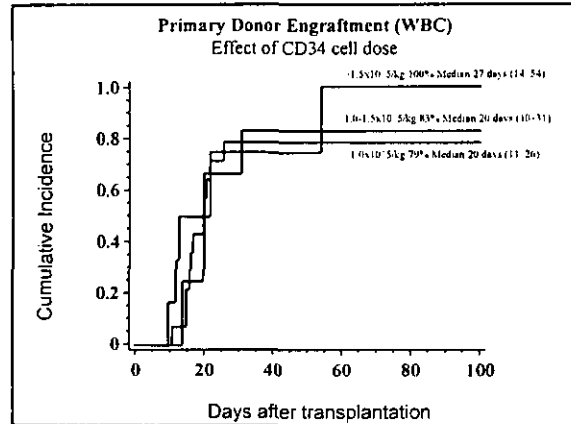
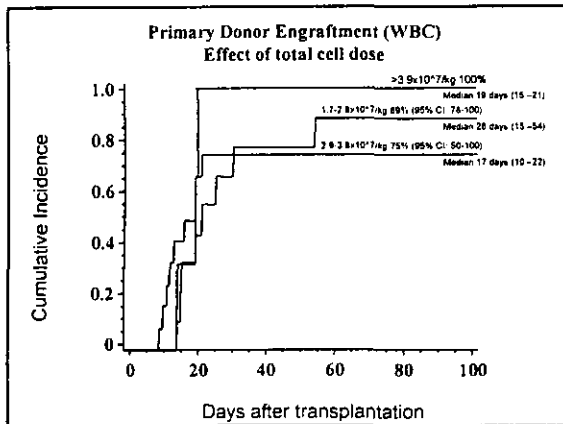
G-CSF : from day 1 until engraftment
Chimerism : sex chromosome FISH or STR-PCR

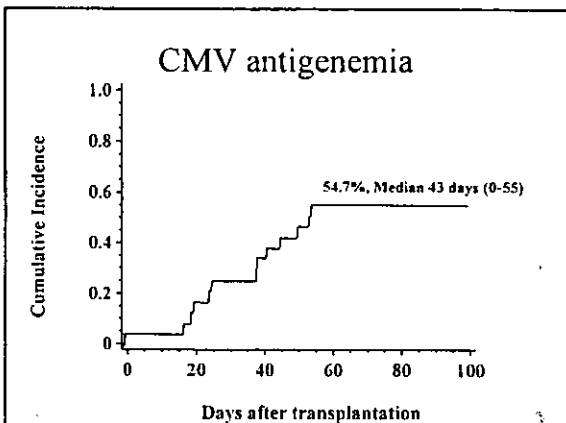
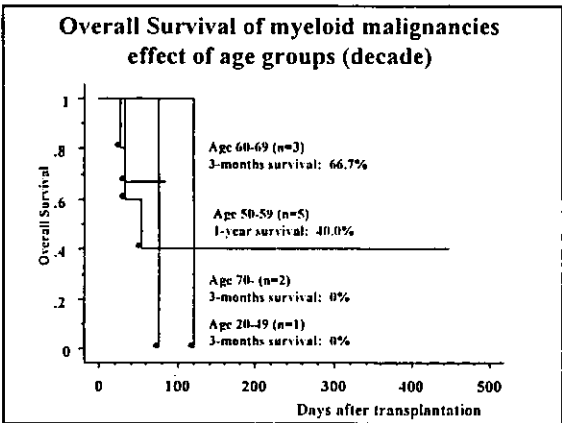
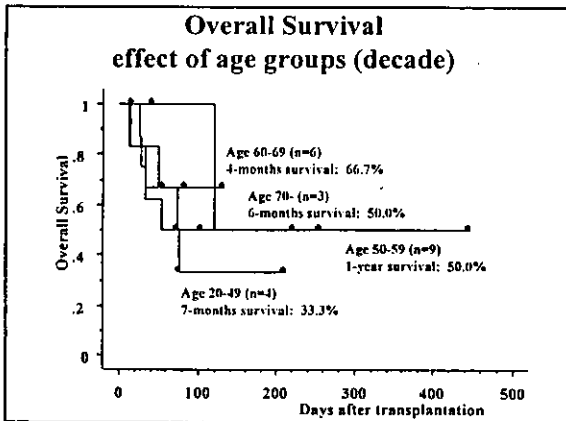
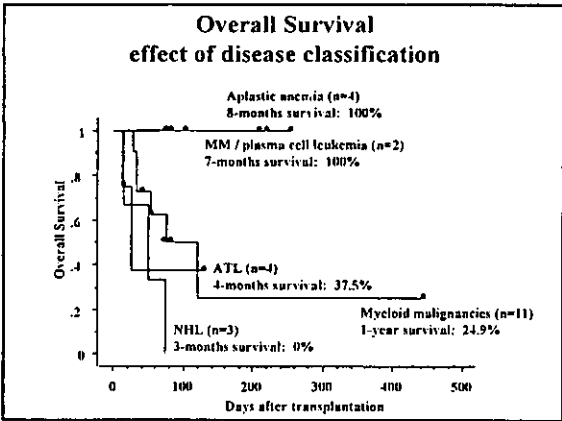
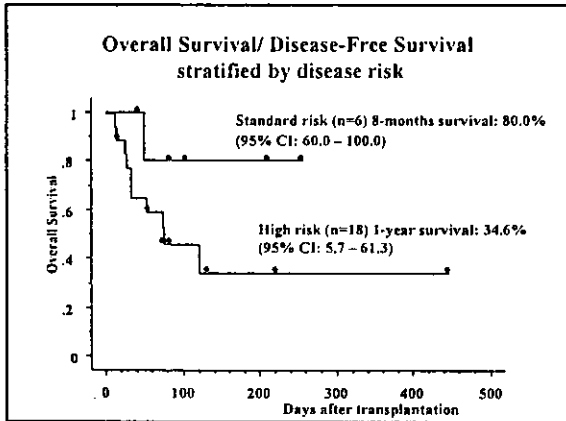
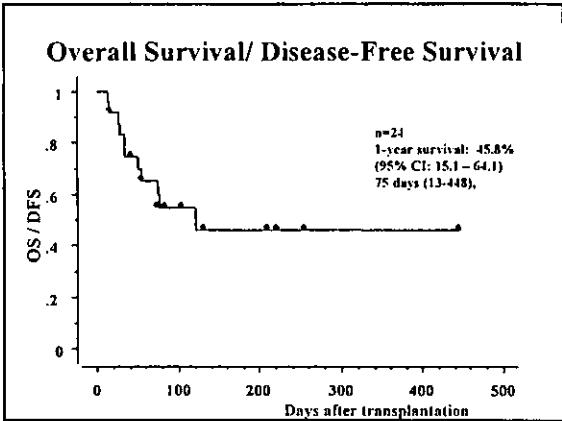
Supportive Care

- Hematopoietic Growth Factor (Day 1 Until Engraftment)
 - G-CSF 5 μ g/m² div
- Bacterial Prophylaxis (Day -14 to Until Engraftment)
 - tosufloxacin tosilate 150mg tid
- Fungal Prophylaxis (Day -14 to Day +100)
 - Fluconazole 200mg qd
- Viral Prophylaxis (Day -7 to Day +100)
 - Acyclovir 200mg tid
- CMV prophylaxis (Day 0 to Day +100)
 - CMV high titer IgIV 5g / week
- PCP prophylaxis (from Engraftment)
 - 5mg/kg/ three times a week

Primary Donor Engraftment (WBC)







Grade II-III Non-hematological Toxicity (Bearman score) within day+28

- 9 patients – grade II GI toxicity
- 6 patients – grade II Renal toxicity
- 2 patients – grade III Renal toxicity
 - grade II GI Toxicity
 - TBI 8Gy+Mel 140mg/m² (3/3)
 - TBI 4Gy+Mel 140mg/m² (2/3)
 - TBI 4Gy+Mel 80mg/m² (4/17)

Serious Infectious Complication

- 5 patients – septicemia (Death 4/5)
- 5 patients – aspergillosis (Death 3/5)

Treatment-related mortality within day100 and cause of death

41.6% (10/24)

Sepsis	3
GI Bleeding	2
Pulmonary Bleeding	1
SAH	1
MOF	1
Interstitial Pneumonia	1
Acute Heart Failure	1
Other cause of death	
Relapse	1
GVHD (day 122)	1

Factors potentially associated with neutrophil engraftment and survival

- Neutrophil engraftment

CD34 dose <1.0x10 ⁵ :	relative risk 0.89 (0.43-1.77)
CD34 dose >1.5x10 ⁵ :	relative risk 0.93 (0.37-2.06)
total cell dose <1.7x10 ⁷ :	relative risk 0.58 (0.24-1.26)
total cell dose 1.7-2.8x10 ⁷ :	relative risk 1.13 (0.56-2.35)
HLA disparities 4/6:	relative risk 1.93 (0.91-5.25) p=0.08
- Survival

CD34 dose <1.0x10 ⁵ :	relative risk 0.89 (0.43-1.77)
CD34 dose >1.5x10 ⁵ :	relative risk 0.93 (0.37-2.06)
HLA disparities 4/6:	relative risk 1.00 (0.52-2.19)
age group (decade):	relative risk 1.01 (0.97-1.05)

Cox regression analyses

Results (1)

- The median day of neutrophil recovery of > 0.5 x 10⁹/l was 18.5 days (10-53).
- The median day of platelets recovery of > 50 x 10⁹/l was 46 days (25-95).
- Cumulative incidence of primary donor chimerism at day 30 and day 60 were 85% and 91.7%.
- Acquisition of donor chimerism (myeloid and T-cell) was rapid in all engrafting patients, and was complete (ie > 90% donor) in all but two patients.

Results (2)

- The cumulative incidence of grades II-IV and grades III-IV acute GVHD were 22.7% (95% CI: 8.7-45.9) and 18.2% (95% CI: 3-43), respectively.
- Chronic GVHD developed in one of seven evaluable patients.
- With a median follow-up of 75 days (13-448), the probability of overall survival/ disease-free survival is 45.8% (95% CI: 15.1 – 64.1) at 1 year.
- Causes of death have been sepsis (n=3), bleeding (n=2), MOF (n=1), relapse (n=1), GVHD (n=1), interstitial pneumonia (n=1), acute heart failure (n=1), SAH (n=1), and systemic aspergillosis (n=1).
- Treatment-related mortality (TRM) was 41.6% (10/24).
- In Cox regression analyses, no factors were identified as significantly associated with rate of engraftment and survival.

Discussion

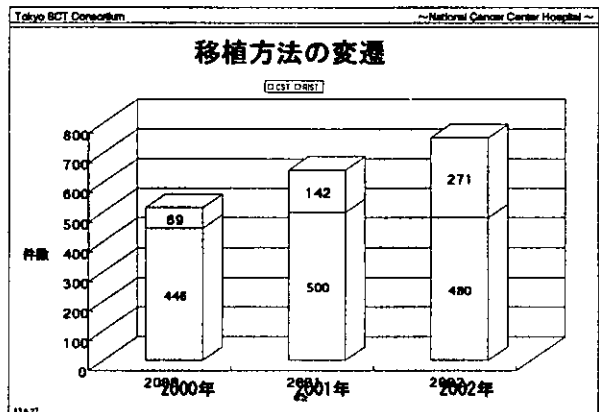
- RICBT using the Flu/Mel/TBI regimen is associated with rapid neutrophil recovery, sustained and complete engraftment, and achievement of 100% donor chimerism.
- Although this high RRT-related mortality may have been attributable to the condition of the patients at the time of transplantation, further verification of feasibility of RICBT is necessary.
- The potency of the anti-tumor effect requires further investigation, currently underway at the Toranomon Hospital.

Telco BCT Consortium ~National Cancer Center Hospital~

8・9.

**齋藤班・高上班共同研究
非血縁者間臍帯血移植
臨床第I相試験の準備状況**

国立がんセンター中央病院
幹細胞移植科
高上 洋一、金 成元



Telco BCT Consortium ~National Cancer Center Hospital~

ミニ移植に関する厚生労働班研究

ヒトゲノム・再生医療等研究事業
高上班: 50歳以上の白血病、悪性リンパ腫
齋藤・高上班: 非血縁者間臍帯血ミニ移植
効果的医療技術の確立推進臨床研究事業
高上班: 固形がんに対するミニ移植
谷口班: 50歳以下の白血病例を対象とした
通常移植との第III相比較試験
難治性疾患克服研究事業 (申請中)
増尾班: 難治性自己免疫疾患に対する
造血幹細胞移植



Telco BCT Consortium ~National Cancer Center Hospital~

医療機関・医師主導の治験について

これまでは、企業が依頼した治験においてのみ、企業が未承認薬物を医療機関に提供することが認められており、企業が依頼した治験以外で、医療機関が未承認薬物を企業から提供をうけることは薬事法上認められていませんでした。

↓

今日の薬事法改正により、医療機関・医師が主体となって行う治験ができるようになります。

これにより以下のような臨床試験が可能となります。

- ・未承認薬物の提供を受けて行う臨床試験
- ・未承認薬物を外部に製造委託し、行う臨床試験 など

Telco BCT Consortium ~National Cancer Center Hospital~

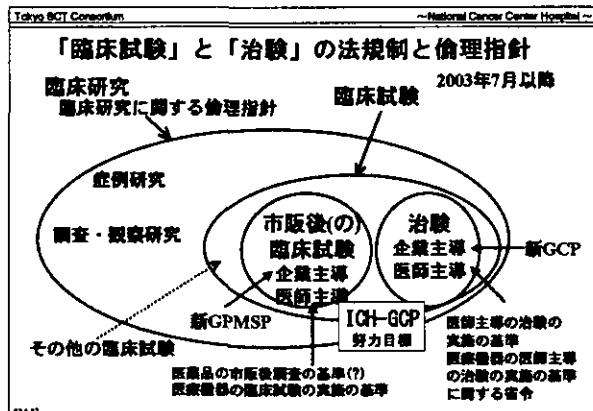
医療機関・医師主導の治験を行うに当たって

前提として、本制度は医薬品の承認申請の資料とする目的で行うものであることに留意下さい。

↓

治験の実施には、治験責任医師が、いままでの治験の実施と同様に、

- ①治験計画を作成し、
- ②院内の治験審査委員会に諮り、
- ③治験届を提出し、
- ④被験者の安全性及びデータの信頼性の確保のため、「医薬品の臨床試験の実施の基準」を遵守しなければなりません。

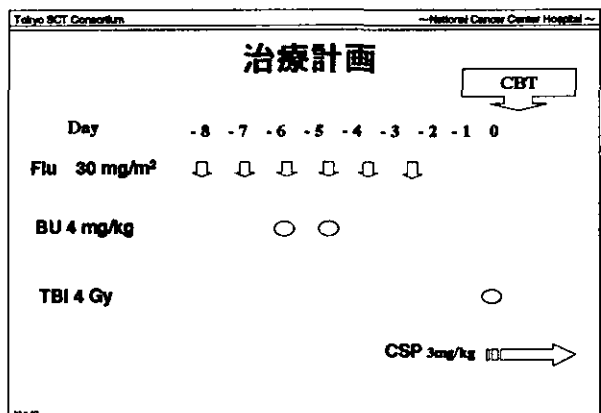


- Tokyo BCT Consortium ~National Cancer Center Hospital~
- ### 研究組織
- ・ 班長 齋藤英彦、高上洋一
 - ・ 研究代表者 齋藤英彦
 - ・ プロトコル作成委員長 加藤俊一
 - ・ データ管理・解析担当者
中央移植データセンター 田島絹子
 - ・ 研究事務局 上 昌広、金 成元、高上洋一
 - ・ 効果・安全性評価委員会
田淵 健、谷本哲也、寺倉精太郎
(敬称略)

- Tokyo BCT Consortium ~National Cancer Center Hospital~
- ### 参加施設
- ・ 岡山大学医学部附属病院
 - ・ 慶應義塾大学医学部附属病院
 - ・ 国立がんセンター中央病院
 - ・ 札幌北楡病院
 - ・ 慈愛会今村病院分院
 - ・ 東海大学医学部附属病院
 - ・ 虎の門病院
(アイウエオ順)

- Tokyo BCT Consortium ~National Cancer Center Hospital~
- ### 本研究の目的
- ・ 臍帯血移植の場合、ドナーに関する倫理的問題がクリアされる。
 - ・ 従来の臍帯血移植の最大の問題点は生着不全である。
 - ・ 骨髄・臓器毒性を軽減し免疫抑制を十分に行うことによって、前処置関連毒性が軽減し、臍帯血移植後の生着不全の頻度が同等あるいは減少することが分かってきた。
- ⇒ 前向き臨床研究によって実施可能性を検証する

- Tokyo BCT Consortium ~National Cancer Center Hospital~
- ### Endpoint
- Primary:
day 60以内の生着達成率
- Secondary :
- (1) day 365の無増悪生存率
 - (2) 移植前処置関連毒性
 - (3) 感染症発症率
 - (4) day 365の全生存率



厚生労働省 厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）

斎藤班「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」

分担研究者：高橋 恒夫 東京大学医科学研究所，細胞プロセッシング研究部門，

研究協力者：長村（井上）登紀子，渡辺 信和

10. タイトル：臍帯血移植における凍結臍帯血の洗浄効果

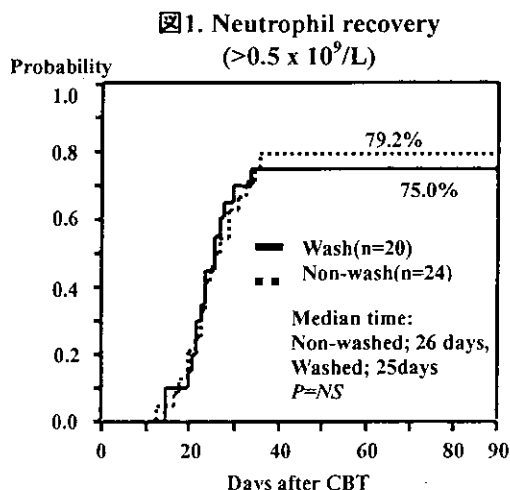
目的：臍帯血移植において、New York Blood Center によって好中球の回復を早めるとのことで提唱推進された解凍臍帯血の DMSO 段階希釈洗浄法について、これまで臨床的効果の十分な解析は行われていなかったのが現実である。われわれは今回 疾患等のバックグラウンドの比較的均一な成人臍帯血移植において 生着における洗浄効果について検討した。さらに 臍帯血移植の予後因子について細胞数、CFC、CD34+細胞数、GVHD 予防法（MTX の有無）についても検討したので報告する。

対象および方法：2002 年 3 月までに東京臍帯血バンクから移植された成人 46 例を後方視的に洗浄群、非洗浄群に分けて解析した。洗浄は解凍臍帯血を洗浄液 2.5% albumin/5%Dextran 溶液を等量(1vol)混合したのち 400G 10 分、10°Cにて遠心し上清(1vol)を除いた後に再度等量の上記洗浄液を 2 回に分けて加え(final 3vol)、速やかに患者へ輸注した。生着および好中球回復速度 (Neutro $>0.5 \times 10^9/L$) および血小板 (plt $>20 \times 10^9/L$) 回復速度、生存率、Event free survival (EFS) について JUMP (SAS CO.) を用いて K-M 法にて解析を行った。

結果：非洗浄群 24 例、洗浄群 22 例 各々の平均年齢 32.3 ± 13.3 、 36.2 ± 11.4 才、体重 52.0 ± 8.3 kg、 52.6 ± 10.4 kg、NC 2.6 ± 0.71 、 $2.7 \pm 0.52 \times 10^7/kg$ 、CF 5.35 ± 3.0 、 $5.16 \pm 2.2 \times 10^4/kg$ 、CD34+ 0.93 ± 0.6 、 $0.86 \pm 0.5 \times 10^5/kg$ であった。しかし好中球の回復速度（図 1）および血小板の回復速度ならびに生存率において両者に有意差は認めなかった。細胞数については NC $2.5 \times 10^7/kg$ 以上の群において 好中球回復速度 Median time 24 日、未満にて 27 日であったが有意差は認められなかった。一方、CFC が $5.0 \times 10^4/kg$ 以上、または CD34+細胞数が $0.8 \times 10^5/kg$ 以上において好中球および血小板の回復速度が有意に速かった。CFC $5.0 \times 10^4/kg$ 以上にて好中球回復の Median time 22 日、未満にて 30 日 ($P < 0.002$)、CD34+ $0.8 \times 10^5/kg$ 以上にて 21 日、未満にて 29 日 ($P < 0.01$) であった。これらはしかし長期予後には影響せず、長期の EFS は白血病の Standard 群は high risk 群よりも有意に良好で ($P < 0.02$)、さらに aGVHD 予防のための MTX 投与群において有意に EFS が良好 ($P < 0.05$) であった。HLA の不一致度は血清学的レベルでは 生着速度に特に影響しなかった。

結語：臍帯血移植における生着速度に解凍後の洗浄の効果は認められなかった。生着速度の予後因子として CFC、CD34+細胞数が重要であり、臍帯血選択の 1 指標と考えられた。

GVHD 予防のための MTX 投与群において EFS が良好であったことは背景が血液悪性疾患であることと関係するかもしれない。今後さらに検討を要すると思われた。



11. 複数さい帯血同時移植を施行した急性骨髄性白血病の1例

三澤真人¹⁾、戸田暁成¹⁾、若江 武¹⁾、田畑雅彦¹⁾、高塚広行¹⁾、藤盛好啓²⁾、甲斐俊朗³⁾、
原 宏^{1) 2) 3)}、加藤俊一⁴⁾

1) 兵庫医科大学 総合内科学血液・腫瘍科 2) 同 左 先端医学研究所 細胞移植部門
3) 同 上 輸血部 4) 東海大学 総合医学研究所

1) 成人に対する複数臍帯血同時移植の臨床研究 — 臨床第Ⅰ/Ⅱ相試験 —

目的：さい帯血移植が適応となるが、単一さい帯血では移植に必要な細胞数が不足する成人造血器悪性腫瘍患者を対象として、2つのさい帯血を同時移植し、その治療法の安全性をと有効性を検討する。

対象：1) 従来の治療法では治癒が望めない造血器悪性疾患
2) 16歳以上、55歳未満の成人
3) 重篤な臓器障害を有さない(別項 除外規定)
4) 前処置会自然に明らかな活動性感染症を有していない
5) HIV陰性
6) 血縁者にHLA一致および1抗原不一致ドナーが得られない
7) 非血縁者にHLA一致ドナーが得られない、あるいはHLA一致ドナーがいても患者の状態から早急に移植を必要とする
8) 患者体重当たり 3.0×10^7 /kg以上の細胞数を含むHLA 2抗原不一致までの単一さい帯血が臍帯血バンクに見つからない
9) 前処置療法に用いる薬剤、ならびに急性GVHD予防に用いる薬剤に対して過敏症がない
10) informed consent が得られている

Endpoint: Primary - 2さい帯血同時投与時の有害事象状況および生着
Secondary- GVHDの発症状況、overall survival、disease free survival、免疫能の回復、移植後100日以内の移植片拒絶・移植関連死亡・重症GVHDの発症状況により移植後早期の総括的な安全性を評価する

目標症例：10例

試験期間：平成14年7月1日から平成17年6月30日まで

試験総括責任者 兵庫医科大学総合内科学血液・腫瘍科 原 宏

参加施設および代表者

東京大学医科学研究所内科 井関 徹
東海大学医学部血液腫瘍リウマチ内科 岸 賢治
大阪府立成人病センター第5内科 平岡 諦
兵庫医科大学輸血部 甲斐俊朗

効果・安全性評価委員

北海道大学大学院医学研究科癌制御医学講座(血液内科) 今村雅寛
名古屋第一赤十字病院小児科 加藤剛二

移植さい帯血の選択基準

- (ア) 日本さい帯血バンクネットワークに参加しているさい帯血バンクに保存・登録されている臍帯血を用いる
- (イ) 患者体重当たり 3.0×10^7 /kg 以上の細胞数を含む、血清学的にHLA 2抗原不一致までの単一さい帯血が臍帯血バンクで見いだせない場合に、移植総有核細胞数が 2.5×10^7 /kg 以上になるように2つのさい帯血を選択する。細胞数の少ない方のさい帯血の選択は、細胞数が 2.0×10^7 /kg 未満のものを用いる
- (ウ) 最低 1.5×10^7 /kg 以上の細胞数を含むさい帯血を1つ組み入れる
- (エ) 患者とさい帯血間のHLA適合度は可能な限り近いものを選択する
- (オ) 2つのさい帯血間のHLA適合度は可能な限り近いものを選択する
- (カ) HLA確認検査時にHLA-A, B(A2, 26, B39, 61, 62, 75のいずれかの抗原を有しているか、HLA-B座がB60,- の場合；非血縁者間骨髄移植の場合に準ずる)およびDRB1のDNA typingを行う

移植前処置

1) 骨髄系造血器悪性腫瘍 (TBI + G-CSF combined CA + CY)

- Day -7 (or-8) TBI 6Gy (3Gy×2) * 1
- 6 (or-7) TBI 6Gy (3Gy×2)
- 5 CA 6g/m²/日 (3 g/m² × 2) G-CSF 5μg/kg/24h * 2
- 4 CA 6g/m²/日 (3 g/m² × 2) G-CSF 5μg/kg/24h
- 3 CY 60mg/kg * 3
- 2 CY 60mg/kg

2) リンパ系造血器悪性腫瘍 (TBI + CY)

- Day -5 TBI 6Gy (3Gy×2) * 1
- 4 TBI 6Gy (3Gy×2)
- 3 CY 60mg/kg * 3
- 2 CY 60mg/kg

- * 1 Total 12Gy 4分割または6分割、4分割の時3Gy/day×4でも可
- * 2 CYは点滴 (2時間) × 2回/日 (12時間毎)
G-CSFは24時間持続点滴 (最初のCA開始12時間前から最後のCA終了時までのため
実際には50時間持続点滴)
- * 3 CYは点滴 (2時間) × 1回/日
施設の事情によりCYはTBIより先行させても良い

2) 症例

症例: 26歳 女性

診断名: AML (M4)

現病歴: 平成13年5月 左頰部痛、発熱を主訴とし発症。白血球増多 85200/μl (Blast 88%)、貧血、血小板減少を指摘され県立病院紹介となる。AML (M4)と診断され JALSG 95 プロトコルにて治療。初回寛解導入療法により寛解となる。地固め療法3回、強化療法2回施行後、平成14年3月当科紹介となる。当科にて AraC 中等量療法施行。平成14年11月再発。IDR+AraC 療法にて再寛解となる。本患者には血縁ドナーはなく、骨髄バンクにもドナーが見られないことより臍帯血移植を予定した。

既往歴: 平成14年3月左下咽頭梨状瘻孔・甲状腺嚢胞摘出術

理学所見: 特記すべきことなし

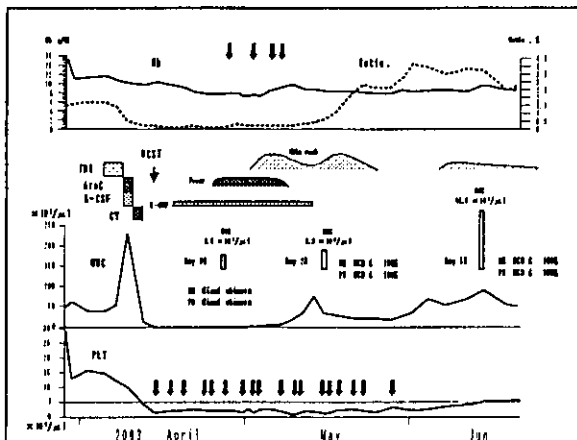
さい帯血および HLA disparity

	UCB A	UCB B	
HLA compatibility			
GVHD direction	5/6 (2/6) *	5/6 (3/6) *	
MVG direction	6/6 (4/6)	5/6 (3/6)	
ABI mismatch	minor (0/6)	major (0/6)	
sex	match (F/F)	match (F/F)	Total
WBC /μg	2.37 ×10 ⁷	1.49 ×10 ⁷	3.86 ×10 ⁷
CFU-GM /kg	1.7 ×10 ⁴	0.8 ×10 ⁴	2.5 ×10 ⁴
CD34+ /kg	0.31 ×10 ⁴	0.58 ×10 ⁴	0.89 ×10 ⁴
RCT /kg	1.78 ×10 ⁷	1.12 ×10 ⁷	2.91 ×10 ⁷
viability	72.4%	68.8%	

*: HLA-A,B,DR, DQ high resolution typing
#: HLA-A,B,DR, DQ low resolution typing
GG: selected cells collected; GC: selected cells release

HLA-disparity					
	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	
患者 (血縁学的)	24 26	35 61	9 -	4 11	
(さい帯子型)	2602	4006		0405 1101	
供体血 (A)	24 26	35 61	9 10	4 -	
(さい帯子型)	2603	4002		0405 -	
供体血 (B)	24 26	35 60	9 10	4 11	
(さい帯子型)	2601			0410 1101	

臨床経過およびキメリズムの推移



キメリズムの推移					
Day		%			
		BM	PC	WBC ×10 ³ /μg	CD34 ⁺ ×10 ³ /μg
14	UCB A	70.5	86.0	2.37	0.31
	UCB B	11.5	0.0	1.49	0.58
	recipient	17.9	6.4		
21	UCB A	-	100		
28	UCB A	100	100		
56	UCB A	100	100		

症例のまとめ

Conditioning regimen	TBI/ AraC /CY/G -CSF
GVHD prophylaxis	CSA/MTX
Engraftment	
neutrophil (500<)	Day 22
rat ISC	Day 30
platelet (20000<)	Day 44
platelet (50000<)	Day 57
last PLT transf	Day 30
G-CSF	Day 5 + 25
AGVHD	Skin (stage 2)
	Grade 1
Infection	bacterial / resp.)
Fever up (38°C<)	3 days
CMV antigenemia	(-)

当科および兵庫臍帯血バンク提供例の移植細胞数と造血能回復の比 (到達日数)

	本例	当科例 (n=17)	兵庫提供成人例 (n=31)
BCC $\times 10^6 / kg$	3.85	2.34 [2.00 ? 3.46]	2.54 [1.79 ? 4.57]
CFU-GM $\times 10^6 / kg$	2.51	1.57 [0.75 ? 7.05]	1.35 [0.25 ? 6.46]
CD34 ⁺ $\times 10^6 / kg$	4.91	4.88 [0.22 ? 4.14]	4.98 [0.22 ? 2.87]

	本例	当科例	兵庫提供成人例
neutrophil (500<)	22	21 18 - 25 (n=15)	24 14 - 42
rat ISC	30	29 25 - 33 (n=12)	BT
platelet (50000<)	57	46 32 - 125 (n=15)	55 49 - 112
last PLT transf	30	34 29 - 37 (n=11)	BT

本症例の現時点での評価

1. 輸注(移植)時の問題なし
2. 重篤な感染症の合併なし
3. 造血能の回復(生着)は少なくとも遅延なし
4. 急性GVHDはGrade 1のみ

まとめ

- 予後不良なAML(M4)に対し複数さい帯血同時移植を施行した。
- 明かな有害事象は認めなかった
- 移植後2週目では3者の混合キメラであったが、3週目には一つのさい帯血による完全キメラとなった
- 本症例では造血能回復(生着)の短縮は見られなかった
- 複数のさい帯血を選ぶときは何を基準にすればよいか?
有核細胞数、CD34細胞数、HLA disparity、血液型など
- 複数さい帯血移植を評価検討するため症例の蓄積が望まれる

平成15年度厚生労働科学研究費補助金
「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」班第2回班会議

日 時：2004年2月28日（土）9:30-12:20

場 所：東京慈恵会医科大学3F講堂

TEL:03-3433-1111

*発表原稿はA4用紙で80部ご用意願います。発表時間は発表8分、質疑応答3分の計11分です。

(9:30-9:40)

はじめに

国立名古屋病院 齋藤英彦

ご挨拶

厚生労働省疾病対策課臓器移植対策室 井内 努

(9:40-10:30)

【座長：高橋恒夫】

1. 胎盤間葉系細胞の不死化と分化能 東京大学医科学研究所 高橋恒夫、張 暁江
2. 試験管内における臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持 金沢大学がん研究所 高倉伸幸
3. 転写コファクターFOG1の巨核球分化における機能 大阪大学微生物病研究所 仲野 徹
4. 間葉系幹細胞との共培養によるさい帯血巨核球前駆細胞の体外増幅

兵庫医科大学 藤盛好啓、陳 明修、甲斐俊朗、原 宏

(10:30-11:30)

【座長：堀田知光】

5. 臍帯血に含まれる血管内皮前駆細胞の量的・質的評価

名古屋大学医学部附属病院 山本晃士、高松純樹、恵美宣彦、
直江知樹、近藤隆久、室原豊明

6. 競合的 SRC アッセイを用いた臍帯血移植片対移植片反応の解析

東海大学医学部 安藤 潔

7. さい帯血移植と HLA 適合性

兵庫医科大学 甲斐俊朗、三澤真人、原 宏

8. 臍帯血移植患者における HLA 抗体の有無と生着の関係についての検討

東海大学医学部 中塩屋千絵、佐藤 薫、加藤俊一

9. Ex vivo 増幅臍帯血幹細胞移植へ向けての基盤整備

京都大学大学院 中畑龍俊

(11:30-12:20)

【座長：原 宏】

10. 非血縁臍帯血移植を施行した小児 440 例の移植成績－齋藤班「詳細データ報告」の得られた症例について－

神奈川県厚木保健所 西平浩一、昭和大学藤が丘病院 磯山恵一

11. TBI/FLAG を前処置に用いた成人さい帯血移植 22 例の治療成績

兵庫医科大学 三澤真人、戸田暁成、若江 武、糸井久幸、岡田昌也、高塚広行、

原 宏、甲斐俊朗、藤盛好啓

12. 臍帯血ミニ移植臨床試験の進捗状況

国立がんセンター中央病院 金 成元

13. 臍帯血移植の安全性に関する作業委員会について

自治医科大学 小澤敬也

1. ヒト胎盤間葉系細胞の不死化と分化能

研究担当者：高橋恒夫（東大医科研細胞プロセッシング研究部門）

協力者：張曉紅、高橋賢次、伊倉宏一、森有加、三鶴亜矢子、
長村登紀子

〔目的〕 臍帯血採取後の胎盤は、現在医療廃棄物として廃棄されている。しかし、臍帯血バンクに登録された臍帯血は、感染症やHLAなどの詳細が登録されており、臍帯血採取後の胎盤を再生医療の細胞ソースとして用いることが可能であれば、高い利用価値があると考えられる。我々はこれまで胎盤胎児側の絨毛に神経、骨、軟骨細胞へ分化する間葉細胞が存在することを明らかにした。しかし胎盤由来間葉系細胞は、一定の分裂回数を経ると細胞老化がおこり、増殖が停止してしまう傾向があり、クローナル解析の障害となっている。本研究では、胎盤由来間葉系細胞にテロメラーゼ及び Bmi-1 遺伝子を導入することにより不死化を試み、クローナル分化能及び臍帯血由来造血幹細胞の支持能について検討した。

〔方法〕 レンチウイルスベクターを用いて、Bmi-1 遺伝子およびテロメラーゼ遺伝子 Tert を、単独あるいは両方を胎盤由来間葉系細胞に導入した。遺伝子導入後細胞の分裂増殖能、テロメラーゼ活性、テロメア長を観察し、Real-time PCR で P16 および P14 遺伝子の発現を定量した。また、Tert/Bmi-1 導入細胞を限界希釈法にてサブクローニングして得られた細胞の分化能を調べた。造血支持能の評価はTert/Bmi-1 導入細胞を feeder cell として、臍帯血から分離したCD34陽性細胞と共培養し、SCF、TPO、Flt3L、IL3 存在下にて、共培養5日後の総細胞数、CD34陽性細胞数を測定した。

〔結果と考察〕 胎盤由来間葉系細胞はテロメラーゼ遺伝子単独導入では不死化せず、Tert 及び Bmi-1 両方また Bmi-1 単独導入によりPD30以上の長期培養が可能であった。これらの細胞にテロメラーゼ活性が検出され、テロメア長が維持された。また、P16 遺伝子の発現は抑制されたが、P14 遺伝子の発現は影響されなかった。クローナル多分化能の解析では、神経細胞への誘導で神経様細胞が誘導された。造血幹細胞支持能に関しては stroma free における CD34 陽性細胞の増幅率は 1.8 倍であったのに対してTert/Bmi-1導入した細胞と共培養では5.5倍であった。

現在、遺伝子導入細胞の骨および軟骨細胞への分化能について、in vivo 分化誘導も含め検討中である。

平成15年度厚生労働科学研究費補助金

「臍帯血を用いた造血幹細胞移植の確立に関する研究」班第2回班会議

2004年2月28日

2. 試験管内における臍帯血造血幹細胞の未分化性の維持

金沢大学がん研究所

高倉伸幸

抄録

(目的)

試験管内で造血幹細胞を増殖する技術が確立されれば、これら幹細胞を用いて骨髄再建術はもとより、幹細胞の可塑性を利用した種々の再生医療に応用が可能である。そこで我々は造血幹細胞の自己複製が実際どのような領域で営まれるのかを詳細にし、本領域の造血幹細胞およびそれを支持するニッチ構成細胞との細胞間相互作用につき検討してきた。

(本年度の研究成果と考察)

1. マウス造血幹細胞の未分化性維持に関わる TIE2 遺伝子の機能解析

従来より、TIE2 は血管内皮細胞と造血幹細胞に発現し、造血幹細胞が分泌する TIE2 のリガンド、アンジオポエチン-1 (Ang1) がパラクライン、オートクラインループにより TIE2 を活性化し、この両者の細胞が接着することが幹細胞の未分化性維持機構に重要であることを示してきた。また幹細胞における TIE2 の発現維持が幹細胞性 (未分化性維持) に重要であることを解明してきた。そこで、実際幹細胞が接着する血管内皮細胞が幹細胞の TIE2 の発現調節に関わるかいなかを検討するため、マウス骨髄由来内皮細胞と TIE2 プロモーター制御下に GFP を発現するマウス由来造血幹細胞の共培養にて TIE2 遺伝子のプロモーター制御を解析したところ、一部の血管内皮細胞は TIE2 プロモーター活性を維持し、幹細胞の分裂 (自己複製) を誘導することが確認された。このことより、血管内皮細胞は幹細胞の TIE2 の発現を維持させる外来性分子を分泌していることが予想され、このような骨髄内血管内皮細胞の表現型を明らかにするとともに、単離、細胞株化することで新たな幹細胞因子が同定されると考えられる。

2. ヒト臍帯血幹細胞の未分化性の誘導

マウスでえられた実験結果に立脚して、ヒト臍帯血由来造血幹細胞の未分化性につき、マウス脾臓由来血管内皮細胞株 MSS31 および本細胞株に恒常的活性型 TIE2 遺伝子を導入した細胞 (MSS31/CA-TIE2) を用い、臍帯血由来造血幹細胞と共培養して幹細胞の未分化性維持について検討した。ヒト臍帯血由来 Lin^{-c}-Kit⁺CD34⁺細胞を PKH にて蛍光ラベルし、MSS31 および MSS31/CA-TIE2 上で培養したところ、MSS31 上では内皮細胞上で造血幹細胞が分裂、分化したが、MSS31/CA-TIE2 上では幹細胞は内皮細胞下に潜伏して分裂した。これら内皮細胞を用いた共培養では長期培養が困難であり、明確な造血幹細胞の分化の程度を評価できなかったが、マウスと同様ヒト造血幹細胞も TIE2 の活性化で未分化性の維持が可能と推測される。今後ヒト造血幹細胞の未分化性を比較的長期に維持可能な血管内皮細胞を、HUVEC や HUAEC を用いて TERT 遺伝子、恒常的活性型 TIE2 遺伝子導入により作成し、幹細胞の未分化性維持機構につき検討する。

3. 転写コファクターFOG-1の巨核球分化における機能

大阪大学微生物病研究所 : 仲野 徹

<序論>

血液細胞の発生・分化は、転写調節によってコントロールされており、非常に多くの転写因子やそのコファクターが機能していることが、遺伝子ターゲティング実験などから示されている。Zinc finger 型の転写因子 GATA-1 は赤血球・巨核球の発生、分化に関与すること、そして、その機能は FOG-1 を転写のコファクターとして発揮されることが知られている。また、FOG-1 のノックアウトマウスは巨核球産生が全く認められないことが報告されている。巨核球の増殖・分化を促進させる目的で、マウス ES 細胞からの分化誘導法を用いて、FOG-1 の機能解析をおこなった。

<方法ならびに結果>

マウス胚性幹細胞からの分化誘導法と、テトラサイクリンによるコンディショナルな遺伝子発現制御法を用いて、種々の分化段階において FOG-1 の強制発現をおこなった。そして、その結果産生される巨核球の数、形態、ploidy などについての検討をおこなった。

多能性造血前駆細胞から巨核球系前駆細胞への段階において FOG-1 を発現させたところ、前駆細胞の増殖が著しく抑制された。しかし、巨核球系前駆細胞から巨核球への分化段階において FOG-1 を発現させたところ、巨核球数は二倍以上に増加した。その際に、巨核球への分化は阻害され、コントロールで認められた proplatelet 形成は全く認められなかった。また、ploidy の増加も抑制されており、巨核球系への分化が阻害されていることがわかった。

FOG-1 がどのような分子機構によって、巨核球の増殖・分化に影響を与えるのかを明らかにするために、GATA-1 ノックアウトの ES 細胞を用いて同様の実験をおこなった。その結果、巨核球数の増加以外はコントロール ES 細胞と同じ結果が得られた。また、FOG-1 は転写のレプレッサーである CtBP (c terminal binding protein) と結合して転写を抑制することが知られている。そこで、CtBP と結合できない FOG-1 (Δ CtBP-FOG-1) を作製して、その機能を解析したところ、FOG-1 と同様の結果を示した。

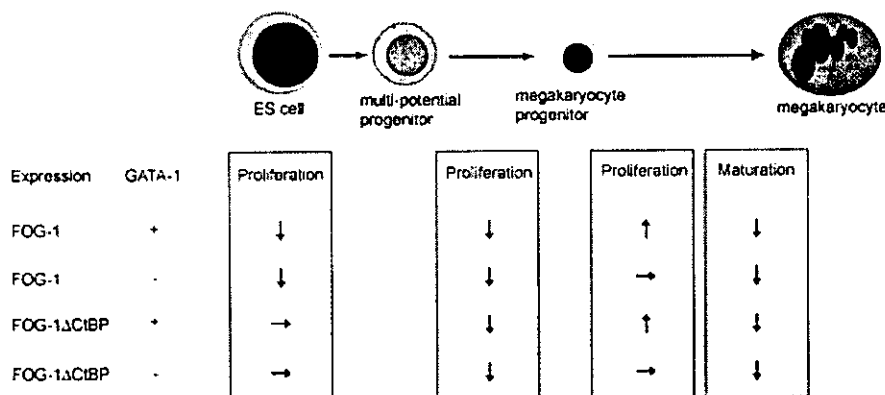


図: 結果のまとめ それぞれの分化段階における FOG-1 の機能を示してある。

<結語>

FOG-1 は細胞の分化段階によって異なった機能を示すことが明らかとなった。また、その機能は、従来、細胞株を用いて解析されていた結果とは異なるものであった。遺伝子ターゲティングやレトロウイルスを用いた強制発現だけでは解明できない機能を、ES 細胞からの分化誘導法を用いて明らかにすることができた。

4. 間葉系幹細胞との共培養による臍帯血巨核球系前駆細胞の体外増幅に関する研究

兵庫医科大学 藤盛 好啓, 陳 明修, 甲斐 俊朗, 原 宏

A. 研究目的

臍帯血移植では, 骨髄移植等に対し造血回復の遅延が認められている. 血小板の回復の促進を目的として, 臍帯血巨核球系前駆細胞の体外増幅を検討した.

B. 研究方法

ヒト骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSC)を feeder layer とし, ヒト臍帯血 CD34 陽性細胞(CD34⁺細胞)を Flt3 ligand, stem cell factor, thrombopoietin の存在下に無血清で共培養し, 巨核球系コロニー形成細胞(colony-forming units-megakaryocyte: CFU-MK)の体外増幅を検討した.

C. 研究結果

CD34⁺細胞を MSC 存在(+)と MSC 非存在(-)条件下で培養した場合, 総細胞数は Fig.1 のように MSC(+)で有意に多かった.

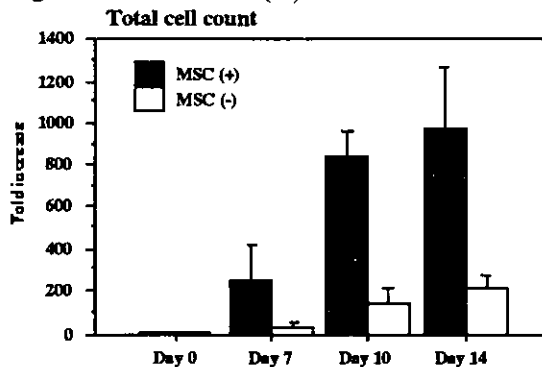


Fig 1

巨核球系コロニー形成細胞で検討すると増幅率はすべてにおいてその MSC 存在下で有意に高かった(Fig. 2)。培養開始後 7 日目では Mixed CFU-MK, BFU-MK などの未熟な巨核球系前駆細胞の増幅がみられ, 10 日目では成熟した巨核球系前駆細胞 CFU-MK(21-49), CFU-MK(3-20)の増幅を認めた. 14 日目では成熟した CFU-MK(3-20)の有意な増幅がみられた(Fig. 2).

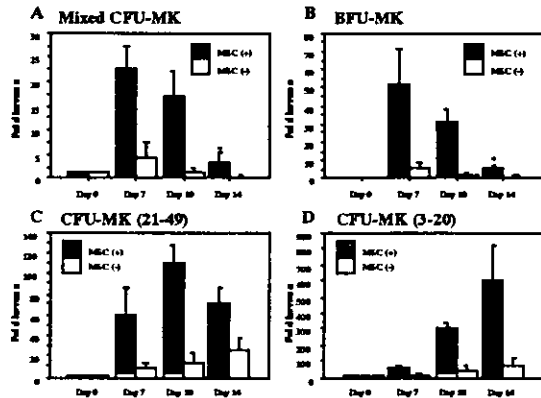


Fig. 2

これらの巨核球系前駆細胞数の総和は 10 日目にピークを示した (Fig. 3)

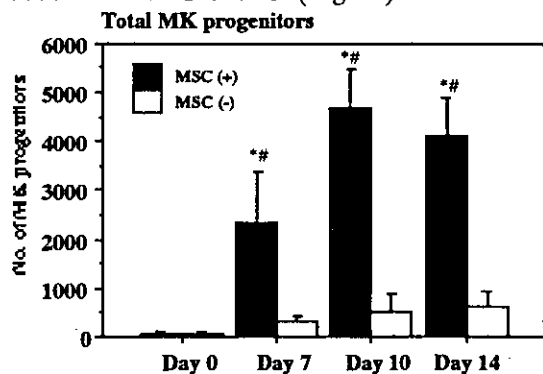


Fig. 3

D. 考察

MSC との共培養により, 培養前期には未熟巨核球系前駆細胞が増加し, 培養後期には成熟した巨核球系前駆細胞の著明な増幅がみられた.

E. 結論

ヒト MSC との共培養により, ヒト臍帯血 CD34⁺細胞から巨核球系前駆細胞を効果的に増幅することができた. 本法で増幅した巨核球系前駆細胞は血小板回復促進に有用な可能性がある.

5. 「臍帯血に含まれる血管内皮前駆細胞の量的・質的評価」

名古屋大学医学部附属病院	輸血部	○山本	晃士、高松	純樹
同	血液内科	恵美	宣彦、直江	知樹
同	循環器内科	近藤	隆久、室原	豊明

<目的>

血液幹細胞による血管再生治療が注目されるなか、そのメカニズムの解明とともに、臨床的にもっとも有効かつ安全な血管再生治療を実現するためにどのような幹細胞ソースを用いるべきかを検討することは重要な課題である。本研究は、臍帯血中に存在する血管内皮前駆細胞の質的・量的な評価を分子細胞学的な手法を用いて行い、骨髄幹細胞や末梢血単核球分画と比較検討した上で、血管再生細胞治療のための幹細胞ソースとしての可能性を追究することを目的とする。

<方法>

インフォームド・コンセント取得後に得られた臍帯血 数 ml から単核球を分離し、total cellular RNA を抽出した。一方、臍帯血の一部を培養し、血管内皮細胞に分化すると考えられる紡錘型の付着細胞の増殖を確認して分離後、cellular RNA を抽出した。それぞれの RNA および基準となる standard cRNA を用いて血管内皮細胞およびその前駆細胞マーカー分子につき real time RT-PCR を行い、各分子の mRNA 発現量を定量した。同時に FACS によって細胞表面における各マーカー分子の発現パターンを解析し、臍帯血に含まれる血管内皮前駆細胞の質的・量的な評価を行った。

<結果と考察>

臍帯血 (n=8) 数 ml から約 2×10^7 個の単核球が得られ、10~30 μ g の RNA を回収できた。0.1 μ g RNA あたりの血管内皮前駆細胞マーカーの mRNA 発現量を定量した結果、臍帯血単核球では Flk-1 および CD133 の発現が比較的高く、骨髄由来単核球には及ばないものの、未分化な血管内皮前駆細胞を多く含んでいると考えられた。FACS による表面マーカーの解析結果もほぼ同様の傾向を示した。また、臍帯血単核球の培養後に得た付着細胞においては上記マーカー分子の mRNA 発現量が増加し、血管内皮前駆細胞を高密度に含んでいると考えられた。

以上より、臍帯血は血管新生ポテンシャルの高い血管内皮前駆細胞を比較的多く含んでいると考えられ、それを *ex vivo expansion* するなどの方法により、血管再生細胞治療のための幹細胞ソースとして利用できる可能性が示唆された。

平成 15 年度厚生科学研究補助金

「臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究」 班会議

平成 16 年 2 月 28 日 於 東京慈恵会医科大学 大学本館 3 階講堂

6 競合的 SRC アッセイを用いた臍帯血移植片対移植片反応の解析

班員：東海大学医学部血液腫瘍内科 堀田知光

協力者：東海大学医学部再生医学センター 安藤 潔、八幡 崇

【目的】

ヒト造血幹細胞の適切なアッセイは体外増幅幹細胞や複数臍帯血移植を評価する上でますます重要性が高まっている。近年、造血幹細胞の培養条件や細胞周期により移植後のホーミング能が影響を受けることが知られている。また、複数臍帯血移植の臨床においては最終的に単一ドナー由来の造血系が優勢になることが観察されているがその機序は不明である。更に、再構築された免疫能がどのような MHC 拘束性を持つようになるのかという問題も今後の課題である。

われわれは以前の本会議において新たに開発された NOG マウスを用いることにより従来マウスでは評価が困難であった T 細胞系の再構築が可能になることを報告した。(J Immunol 169, 204-209, 2002) また、異種移植の障害となるホーミング能を回避できる骨髄直接注入法による SRC アッセイについて報告した。

(Blood, 101, 2905-2913, 2003) 今回は前回報告した競合的 SRC アッセイを用いて複数臍帯血移植における移植片対移植片反応について解析した。

【方法と結果】

臍帯血より純化した CD34 陽性細胞をドナー毎に GFP あるいは YFP 遺伝子でマーキングし、生後 7 週齢から 9 週齢の NOG マウスに 250 cGy の X 線を照射後、尾静脈より移植した。移植に用いた CD34 陽性細胞は 99% 以上の純度であり、臍帯血中に含まれる T 細胞の混入は FACS での検出限界以下である。移植後 6, 9, 12, および 15 週目に採血し、ヒト造血細胞の再構築の経時的変化を解析した。9 週目以降から GFP および YFP 陽性の T 細胞の出現も検出されたにもかかわらず最長移植後 24 週まで GFP および YFP 陽性細胞の存在比率は安定して維持され、移植細胞数比 (GFP/YFP) と生着細胞数比の間には $r=0.623$ の有意の相関が認められた。

次に CD34 陽性細胞とともに CD34 陰性単核球細胞を移植すると GFP、YFP いずれかの細胞のみが生着した。さらにこの移植片対移植片反応の担当細胞を明ら

7, 臍帯血移植とHLA適合性

分担研究者 兵庫医科大学総合内科血液・腫瘍科

原 宏

研究協力者 同 輸血部、血液・腫瘍科

甲斐俊朗、三澤真人

Patient's characteristics

No. of Patients	n= 91		
Median age(range)	21 yr (4 Mo - 60 yr)		
Body weight	45kg (4.4 - 80.8 kg)		
Gender (male/ female)	53/38		
Diagnosis			
ALL	30	AML	30
CML	17	Malignant lymphoma	5
others	9		
Disease staus at CBT			
Standard risk	36		
High risk	55		
Cell dose (before freezing)			
NCC (x10 ⁷ /kg)	3.01 (range;1.69 - 19.93)		
CFU-GM (x10 ⁴ /kg)	1.89 (range;0.41 - 12.18)		
CD34+ cells (x10 ⁵ /kg)	1.360 (range;0.234 - 38.313)		

Patient's characteristics

ABO compatibility		
Matched	26	
Minor mismatched	19	
Major mismatched	44	
Not reported	2	
HLA compatibility (A,B; serology, DRB1; DNA high resolution)		
	GVH vector	HVG vector
3/6 match	14 (15%)	14 (15%)
(I-1,II-2)	8	6
(I-2,II-1)	6	8
4/6 match	38 (42%)	38 (42%)
(I-2)	4	4
(II-2)	6	5
(I, II)	28	29
5/6 match	31 (34%)	28 (31%)
(I)	19	17
(II)	12	11
6/6 match	8 (9%)	11 (12%)

CBT as first SCT, myeloablative conditioning regimen,
single unit cord blood

(Hyogo Cord Blood Bank, as of 31/Dec, 2003)

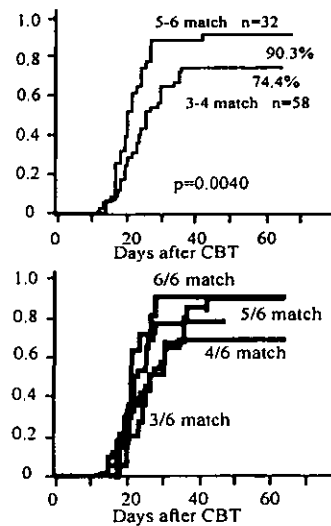
Neutrophil engraftment

uni-variate analysis				
CD34+ (x10 ⁷ /kg)	1.0=<	n=57	81.7%	0.0354
	1.0>	n=32	77.6%	
HLA	5-6 match	n=32	90.3%	0.0040
	3-4 match	n=58	74.4%	
multi-variate analysis				
HLA		HR 1.857 (95%CI: 1.119-3.082)		p=0.0166

Platelet engraftment

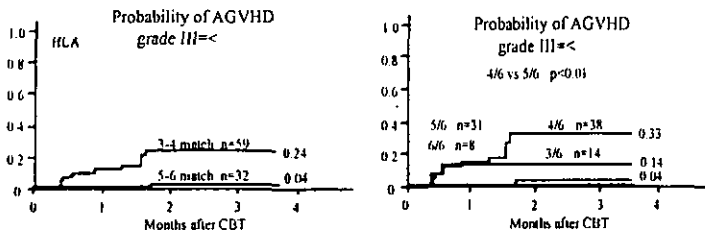
uni-variate analysis				
NCC (x10 ⁷ /kg)	3=<	n=46	100%	0.0202
	3>	n=44	65.3%	
CD34+ (x10 ⁵ /kg)	1.0=<	n=57	89.8%	0.0159
	1.0>	n=32	78.0%	
CFU-GM (x10 ⁴ /kg)	1.7=<	n=50	100%	0.0100
	1.7>	n=40	66.3%	
Disease status at CBT	High risk	n=54	75.4%	0.0172
	Standard risk	n=36	100%	
GVHD prophylaxis	MTX(-)	n=30	68.7%	0.0342
	MTX(+)	n=57	100%	

Neutrophil engraftment
HLA compatibility (HvG direction)



AGVHD III=<

HLA	5-6 match	n=32	3.6%	0.0150
	3-4 match	n=59	23.9%	
			HR 0.120 (95% CI: 0.015-0.936)	p=0.0431



HLA compatibility (HvG vector)	No. of Pt	Early death	Graft failure Autorecovery	Survivor without disease
3/6	14	1 (7%)	2 (14%)	2
(I-1,II-2)	8	0	0	1
(I-2,II-1)	6	1	2	1
4/6	38	5 (13%)	10 (26%)	12
(I-2)	4	0	1	1
(II-2)	5	0	3	1
(I-1,II-1)	29	5	6	10
5/6	28	1 (4%)	1 (4%)	16
(I-1)	17	0	1	8
(II-1)	11	1	0	8
6/6	11	0	1 (9%)	7
Total	91	7 (8%)	14 (15%)	37

HLA compatibility and AGVHD

HLA compatibility (GVH vector)	No. of evaluable Pt	AGVHD II=<	III=<
3/6	10	8 (80%)	2 (20%)
(I-1,II-2)	7	5	2
(I-2,II-1)	3	3	0
4/6	28	15 (54%)	9 (32%)
(I-2)	3	1	1
(II-2)	6	5	4
(I-1,II-1)	19	9	4
5/6	25	7 (28%)	1 (4%)
(I-1)	14	4	0
(II-1)	11	3	1
6/6	8	2 (25%)	0 (0%)

Relapse

Disease status	High risk	n=55	65.3%	0.0251
	Standard risk	n=36	36.1%	
			HR 2.518 (95% CI: 1.093 - 5.801)	p=0.0301