

が海外渡航移植を行っている。日本小児循環器学会臓器移植委員会の報告では、2003年夏までに成人および小児合わせて70例の渡航移植がなさ

れている。なお、その成績は、1年生存率95.7%、10年生存率65.8%と国際レジストリーより良好な結果を示している。

## まとめ

心臓移植は末期心不全に対する治療手段として良好な成績を示しており、わが国においても、心

臓移植を組み込んだ重症心不全の治療体系を確立する必要がある。

## (参考文献)

- 1) Matsuda H, Fukushima N, Sawa Y, et al : First brain dead donor heart transplantation under new legislation in Japan. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 47 : 499-505, 1999.
- 2) Kitamura S, Nakatani T, Yagihara T, et al : Cardiac transplantation under new legislation for organ transplantation in Japan. Jpn Circ J, 64 : 333-339, 2000.
- 3) 中谷武嗣, 北村惣一郎 : 日本の心臓移植の現状. 移植, 38 : 253-257, 2003.
- 4) 中谷武嗣 : レシピエント管理 (待機から移植へ) 外科管理. 循環器病専門医, 10 : 307-312, 2003.
- 5) 慢性心不全治療ガイドライン. Jpn Circ J, 64 suppl 4 : 1023-1079, 2000.
- 6) Taylor DO, Edwards LB, Mohacsi PJ, et al : The registry of the International Society for heart and Lung Transplantation : Twentieth official adult heart transplant report-2003. J Heart Lung Transplant, 22 : 616-624, 2003.
- 7) 日本臓器移植ネットワーク HP. <http://www.jotnw.or.jp/>
- 8) UNOS Annual Report. <http://www.optn.org/data/annualReportI.asp>
- 9) 北村惣一郎, 中谷武嗣, 花谷彰久 : 本邦における心臓移植と問題点. Annual Review 循環器 2003, 263-271, 2003.

## バージャー病の難治性潰瘍に対する骨髄細胞移植の治療効果

知久 正明 西上 和宏 林 富貴雄 萩野 均<sup>1</sup> 松田 均<sup>1</sup> 湊谷 謙司<sup>1</sup>  
佐々木啓明<sup>1</sup> 中谷 武嗣<sup>1</sup> 田口 明彦<sup>2</sup> 宮田 茂樹<sup>3</sup> 亀井 政孝<sup>4</sup>  
田中 良一<sup>5</sup> 盛 英三<sup>6</sup> 宮武 邦夫 友池 仁暢

要 旨：難治性の重症末梢動脈閉塞症に対し、骨髄細胞移植治療による血管再生療法が本邦を中心に開始されている。安静時疼痛や間歇性跛行に対しては、良好な効果が認められているが、虚血性潰瘍に対しての効果は不十分とされている。今回、3例のバージャー病の難治性潰瘍に対し、骨髄細胞移植治療を施行し、著明な改善を認めた。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 191-197)

Key words: Autologous bone marrow mononuclear cell implantation, Therapeutic angiogenesis, Buerger's disease

### 序 言

血管再生は、一般に既存の血管から血管内皮細胞が増殖、リモデリングし、新しい娘血管枝が形成される狭義の血管新生(angiogenesis)と主に胎生期に行われる血管内皮前駆細胞である血管芽細胞が集合、分化して血管が形成される血管発生(vasculogenesis)の2つが考えられている。近年、成人の末梢血液にも血管内皮細胞に分化しうる血管内皮前駆細胞の存在が明らかにされた。成人末梢血中のCD34陽性単核球の分画から血管内皮細胞へと分化しうる一群の細胞が得られることが証明された<sup>1)</sup>。すなわち、成人においてもvasculogenesisによる血管再生が起こりうることを示された。CD34陽性の単核球は末梢血液より骨髄液に多く含まれるため、動物実験において、虚血肢に対する骨髄単核球移植治療が施行され、良好な効果が報告された<sup>2)</sup>。これに基づき、本邦ではTACT studyを始めとして、臨床においても重症下肢虚血患者に対し自己骨髄

細胞移植や末梢血幹細胞移植が開始された<sup>3,4)</sup>。しかし、安静時疼痛や間歇性跛行に対しては、良好な効果が認められているが、閉塞性動脈硬化症に対する虚血性の皮膚潰瘍に対しての効果は不十分とされている。今回、バージャー病の難治性潰瘍に対する骨髄細胞移植治療の効果を検討した。

### 対 象

対象患者は、日常生活が著しく障害されている重症末梢動脈閉塞症で、他のいかなる治療にも反応せず今後回復が期待できなかった3症例。倫理審査委員会の審査のもと、詳細な説明文書にて十分に自己骨髄細胞移植治療で発生する合併症・効能・不利益・利益を説明し、患者みずからの意思および家族の理解と承諾に基づいて、骨髄細胞移植治療を希望する場合のみ施行するとした。治療前に、悪性腫瘍と網膜症のチェックを行い、これらの疾患を有する場合は対象から除外した(Table 1)。

### 方 法

薬物治療は試験期間を通じて継続し、易出血性を来す薬物は、手術前後一旦中止した。また、可能であれば、手術に先立ち自己末梢血を採取貯蔵し、手術中に返血した。

国立循環器病センター心臓血管内科

<sup>1</sup>同心臓血管外科

<sup>2</sup>同脳血管内科

<sup>3</sup>同輸管理室

<sup>4</sup>同麻酔科

<sup>5</sup>同放射線科

<sup>6</sup>同心臓生理部

2004年1月22日受付 2004年4月23日受理

**Table 1** Indication of BM MNCs (bone marrow mononuclear cells) transplantation to peripheral artery disease in our hospital

Indication
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ ASO or TAO</li> <li>・ Fontaine grade III or IV</li> <li>・ Sub-optimal indication to intervention because of peripheral and diffuse lesion</li> <li>・ age: 20 to 80 years old</li> </ul>
Exclusion
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ Severe retinopathy by diabetes mellitus or current malignancy</li> <li>・ Life expectancy is considered less than one year due to complications</li> <li>・ High-risk of general anesthesia operation</li> <li>・ Informed consent was not obtained</li> <li>・ The patient was considered unsuitable</li> </ul>

ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans

自己骨髄細胞移植は、全身麻酔下にて腸骨より800 ml 前後の骨髄液採取を行い、比重遠心分離法にて骨髄単核球を分離し、約50 mlの骨髄単核球液を得た。骨髄単核球液は、1 mlの注射器に分注し、23G針を用いて、虚血下肢骨格筋(前脛骨筋、後脛骨、腓腹筋部)に0.5 mlずつ約80カ所に筋肉内注射を行った。

### 結 果

症例1は31歳の男性。2001年1月頃から下肢の安静時疼痛を認め、右足4趾に皮膚潰瘍が出現した。2002年1月に右足3趾にも潰瘍が出現し、近医から当院に紹介され、2002年3月に精査加療目的で入院となる。喫煙歴は1日20本10年間、1年前より禁煙。Ankle brachial pressure index (ABPI)は右0.38、左0.56と両側肢とも低下し、血管造影にて両側下腿三分枝以下が閉塞し、末梢は発達した側副血行路で造影され、バージャー病と診断された。皮膚潰瘍は内科的治療で改善しないため、5月28日に自己骨髄細胞移植を施行した。末梢血管エコーにて、あらかじめ前脛骨動脈、後脛骨動脈、腓骨動脈に血管走行をマーキングし、それに沿って0.5 mlずつ、さらに、足底にも筋肉内注射した。投与された単核球数は $4.7 \times 10^9$ 個( $CD34^+ : 13.8 \times 10^7$ )であった (Table 2)。結果、ABPIは術後1週間で0.49まで改善したが、1カ月後には0.39まで低下し、さらにレーザードブラ、サーモグラフィー、arterial inflowでも改善しなかった (Fig. 1)。下肢血管造影でも、移植前後で明らかな変化は見られなかった (Fig. 2)。しかし

**Table 2** The number of injection cells

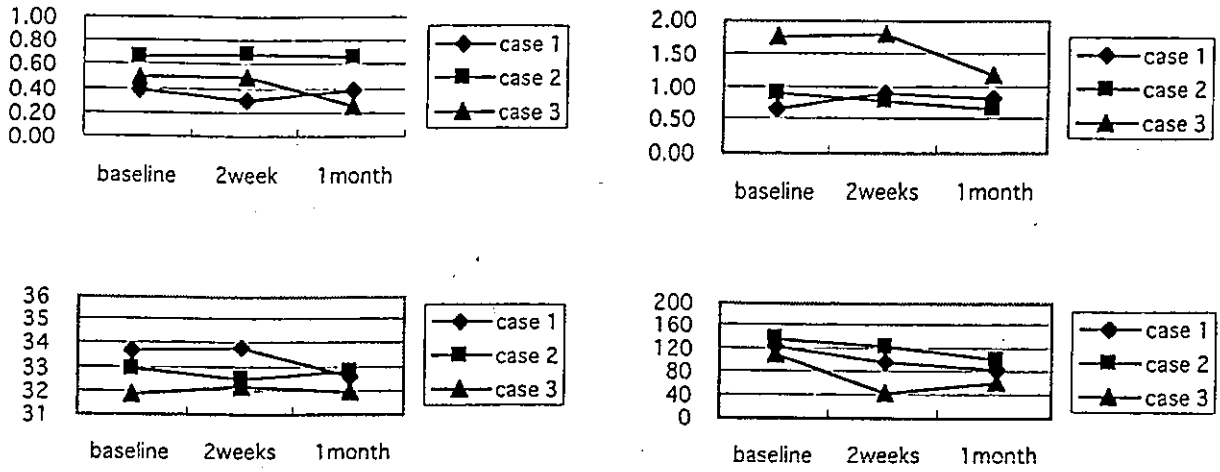
	MNCs	CD34 <sup>+</sup>
Case 1	$4.7 \times 10^9$	$13.8 \times 10^7$
Case 2	$4.1 \times 10^9$	$8.6 \times 10^7$
Case 3	$2.0 \times 10^9$	$6.8 \times 10^7$

MNCs: mononuclear cells

ながら、術後1週で安静時疼痛が改善し、2週間で皮膚潰瘍が改善した (Fig. 3)。1年後の現在も経過良好である。

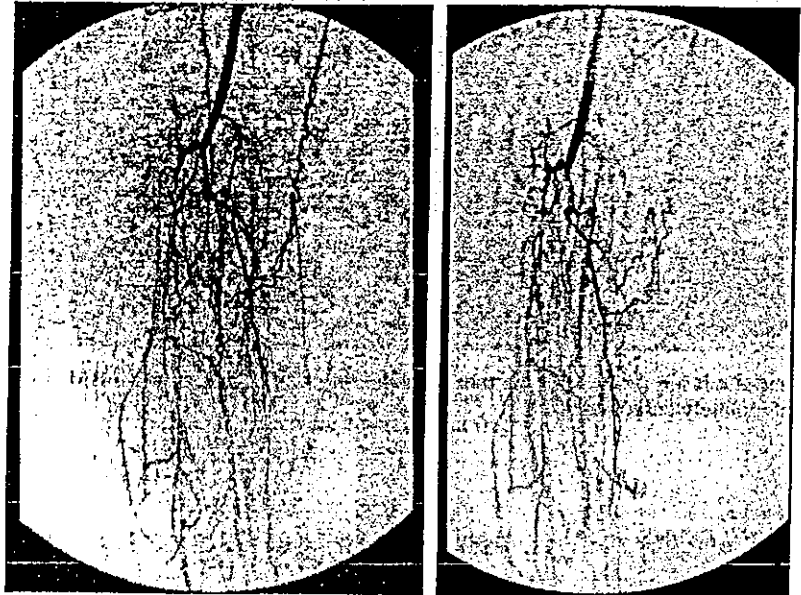
症例2は52歳の男性。1991年に当院にてバージャー病と診断された。2001年、左下肢の疼痛と第1~3趾に潰瘍を形成し、その後自然脱落した。潰瘍部の治癒傾向なく2002年10月加療目的で入院となる。喫煙歴は1日20本30年間、2年前から禁煙。ABPIは右1.18、左0.68。2002年11月25日に自己骨髄細胞移植を施行した。症例1と同様に、下腿筋および足底筋に投与された単核球数は $4.1 \times 10^9$ 個( $CD34^+ : 8.6 \times 10^7$ )であった (Table 2)。ABPIは術後1週間で0.70、1カ月後は0.67と変化しなかった (Fig. 1)。下肢血管造影でも有意な改善は見られなかった (Fig. 4)。術後2週頃から徐々に潰瘍が縮小し始め、全潰瘍部が上皮で覆われるのには3カ月かかった (Fig. 5)。

症例3は27歳の男性。2002年8月頃から左母趾痛を認めたが放置していた。同年10月に巻き爪による炎症と診断され、左母趾の爪先端部の一部を剥離・排膿さ



**Figure 1**  
 A: Ankle brachial pressure index  
 B: Laser Doppler (ml/min/100g)  
 C: Thermograph (°C)  
 D: Arterial inflow (ml/min)

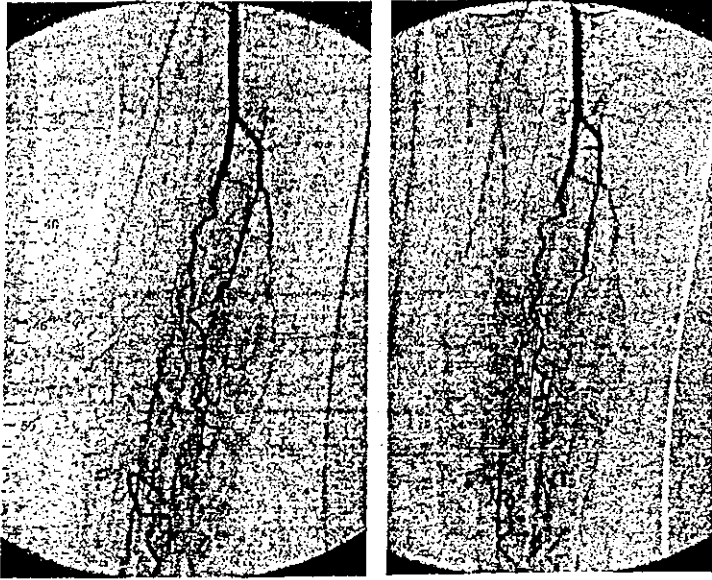
A	B
C	D



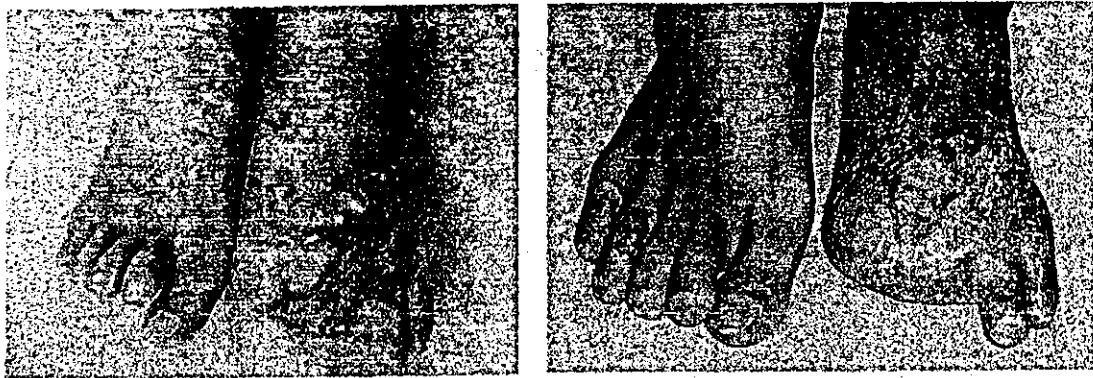
**Figure 2** Angiography.  
 There were no significant changes between vessels condition in baseline (left) and those in one month after bone marrow implantation (right) in limb angiography.



**Figure 3** Skin ulcer.  
 Ischemic skin ulcers were located on right 3rd and 4th toes in the first case (left). One month after the BM MNCs (bone marrow mononuclear cells) implantation, the ischemic skin ulcer improved (right).



**Figure 4** Angiography. There were no significant changes between vessels condition in baseline (left) and those in one month after bone marrow implantation (right) in limb angiography.

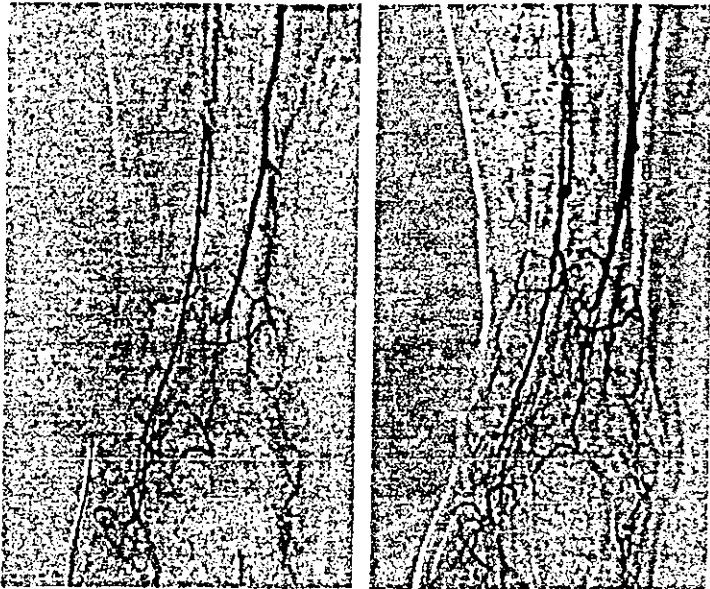


**Figure 5** Skin ulcer. Serious skin ulcers were observed in the left leg (left), with the toes disappearing. Three months after BM MNCs implantation, skin was ulcer completely cured (right).

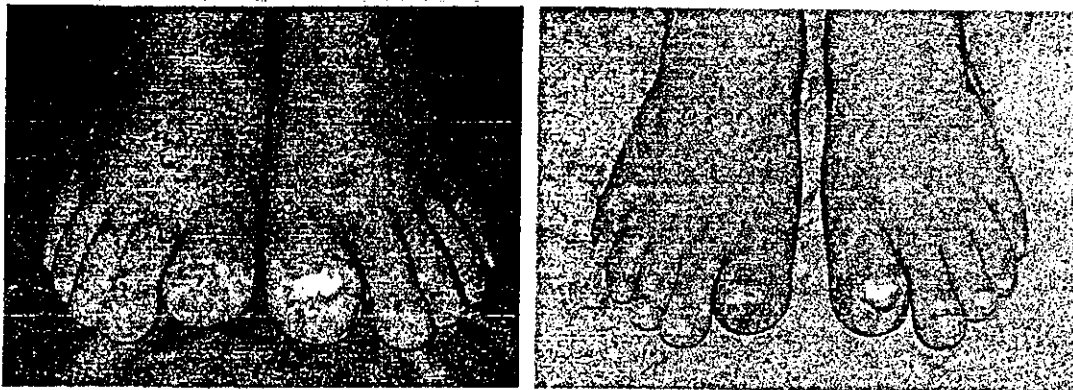
れた。難治性潰瘍のためバージャー病が疑われ、血管造影が施行された。下腿三分枝以下の血管の閉塞を認めバージャー病と診断され当院紹介となる。喫煙は1日20本13年間、1年半前から禁煙。ABPIは右0.80、左0.50。2003年7月31日に自己骨髄細胞移植を施行し、症例1、2と同様に、下腿筋および足底筋に単核球数は $2.0 \times 10^9$ 個( $CD34^+ : 6.8 \times 10^7$ )であった(Table 2)。ABPIは術後1週間で0.50、1カ月後は0.26と低下した(Fig. 1)。下肢血管造影でも、有意な改善は見られなかった(Fig. 6)。しかし、皮膚潰瘍は術後1週頃から徐々に縮小し、1カ月で上皮に覆われ、安静時疼痛も消失した(Fig. 7)。

## 考 案

末梢動脈閉塞症は、閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans : ASO)とバージャー病の2つの疾患でほとんど占められる。これらに対する治療選択は①薬物治療、②カテーテル治療、③外科的バイパス術、④交感神経切除術が主な治療法である。当院における治療戦略として、比較的軽症例(Fontaine分類I~II度)に対しては経皮的血管形成術を含めた内科的治療が主体となり、下腿切断となる症例は少ない。しかし、重症例(Fontaine分類III~IV度)では内科的、外科的治療では解決しきれず、約13%の症例に下腿切断が施行されている(Table 3)。このように、血行再建が困難な重症例で



**Figure 6** Angiography. The number of vessels appeared to have increased in the angiographic image after the treatment (right) rather than baseline (left), but new vessels cannot be evaluated clearly in the images.



**Figure 7** Skin ulcer. There were skin ulcers in bilateral 1st toes (left). Right skin ulcer was completely cured and left skin ulcer also improved one month after the treatment (right).

は既存の治療法では限界があり、新しい治療戦略として血管再生治療が期待されている。Asaharaらは成人末梢血中の単核球分画に血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞の存在を報告した<sup>1)</sup>。単核球は主に骨髓に存在するため、骨髓単核球細胞移植をすることにより、血管新生や側副血行路が発達し、動物実験の虚血モデルで下肢血流量増加作用や心機能が改善することが確認された。これらの基礎および臨床結果に基づき、カテーテル治療や外科的バイパス術による血行再建が困難な重症末梢性動脈疾患に骨髓単核球細胞移植が臨床導入され、安静時疼痛の改善や歩行距離の増加など良好な効果が報告されている。近年、ASO症例は増加し、バージャー病は減少している (Table 4)。このた

**Table 3** The trend of the patient with peripheral artery disease in our hospital (Jan. 2002~Sep. 2003)

Fontaine	I & II (n = 114)	III & IV (n = 45)
age (y/o)	70.4	71.2
CAD	33 (29%)	19 (42%)
DM	47 (41%)	23 (51%)
HD	3 (3%)	5 (11%)
Treatment		
Medication	29 (25%)	17 (38%)
PTA	70 (62%)	10 (22%)
Operation	15 (13%)	18 (40%)
Amputation	0 (0%)	6 (13%)

CAD: coronary artery disease, DM: diabetes mellitus, HD: hemodialysis, PTA: percutaneous transluminal angioplasty

**Table 4** The trend of the patient with critical peripheral artery disease (Fontaine III or IV) in our hospital (Jan. 2002 ~ Sep. 2003)

	ASO (n = 45)	TAO (n = 7)
age (y/n)	71.2	58.4
CAD	19 (42%)	1 (14%)
DM	23 (51%)	0 (0%)
HD	5 (11%)	0 (0%)
Treatment		
Medication	17 (38%)	3 (43%)
PTA	10 (22%)	0 (0%)
Operation	18 (40%)	0 (0%)
Amputation	6 (13%)	0 (0%)

ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans, CAD: coronary artery disease, DM: diabetes mellitus, HD: hemodialysis, PTA: percutaneous transluminal angioplasty

め、骨髄細胞移植治療の多くは、ASO症例に対して施行されている。しかしながら、ASO患者は冠動脈疾患や脳血管疾患の合併が多く、全身麻酔下で大量の骨髄液を採取する骨髄細胞移植治療の侵襲性のため、骨髄細胞移植治療が困難な症例が少なくない (Table 5)。よって、ASO症例に対する骨髄細胞移植治療の適応は慎重に考慮すべきであり、より侵襲の少ない末梢血幹細胞移植<sup>5)</sup>、遺伝子治療、サイトカイン治療に期待される。

当院では骨髄細胞移植治療の対象にASOを含めていたが、実際に施行可能であったのは、今回提示したバージャー病の3例であった。高度の虚血性潰瘍が全例において、骨髄細胞移植治療により、皮膚潰瘍の改善が認められた。一般に、広範囲の潰瘍に対しては、骨髄細胞移植治療に加えて皮膚移植が併せて施行される場合が多いが、骨髄細胞移植単独で改善することができた。このことは、バージャー病の病態として中枢側の動脈は比較的正常であるため細胞移植をうける下腿の血流の改善のみで、ASO症例より治療効果が高くなると考えられた。また、バージャー病はASOに比し若年で、心血管や脳血管の合併症が少なく、侵襲性の高い骨髄細胞移植治療も比較的容易に施行することができた。

また、虚血性潰瘍に対する細胞移植の治療効果は、TACTの報告でも治療効果は60%と報告されている<sup>3,4)</sup>。TACTでは骨髄細胞と末梢血幹細胞移植の前向き研究

**Table 5** Results of progress in consideration to bone marrow transplantation in our hospital (Jan. 2002 ~ Sep. 2003)

ASO	n = 15
BM-MNCs	0 (0%)
CAD	11 (73%)
Malignancy	3 (20%)
Infection	1 (7%)
TAO	
	n = 6
BM-MNCs	4 (66%)
Malignancy	1 (16%)
Reject	1 (16%)

BM MNCs: bone marrow mononuclear cells, ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: thromboangiitis obliterans

をしているが、正確に治療効果を判定するには二重盲比較試験が必要である。しかし、骨髄細胞を採取するので、プラセボを投与することは倫理的に困難であり、現段階では他治療と比較して判断している。よって、当院では最低1カ月内科的治療を施行してから、安静時疼痛や皮膚潰瘍が治癒しない症例のみを対象としている。

## 結 論

今回の検討では症例が3例と少数であるが、バージャー病の難治性皮膚潰瘍に対しての骨髄細胞移植治療は、良好な治療効果が期待できると考えられた。

本治療の問題点として、ABPIや血管造影などの一般検査では、皮膚潰瘍の改善にもかかわらず、有意な変化は見られなかった。一般検査所見と臨床症状との間に乖離が認められた理由として、血管再生治療で再生される血管は微小血管と推測され、一般の血管造影では描出できないためと考えられた。今後、微小血管造影法<sup>6)</sup>など、血管再生治療を適切に評価する方法の確立が望まれる。

## 文 献

- 1) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, 275: 964-966.
- 2) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, 103: 897-903.
- 3) Inaba S, Egashira K, Komori K: Peripheral-blood or bone-

- marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis?  
Lancet, 2002, 360: 2083.
- 4) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. Lancet, 2002, 360: 427-435.
- 5) Iba O, Matsubara H, Nozawa Y et al: Angiogenesis by implantation of peripheral blood mononuclear cells and platelets into ischemic limbs. Circulation, 2002, 106: 2019-2025.
- 6) Mori H, Hyodo K, Tobita K et al: Visualization of penetrating transmural arteries in situ by monochromatic synchrotron radiation. Circulation, 1994, 89: 863-871.

## Effects of Therapeutic Angiogenesis Using Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Implantation to the Incurable Skin Ulcer with Buerger's Disease

Masaaki Chiku, Kazuhiro Nishigami, Tokio Hayashi, Hitoshi Ogino,<sup>\*1</sup> Hitoshi Matsuda,<sup>\*1</sup> Kenji Minatoya,<sup>\*1</sup> Hiroaki Sasaki,<sup>\*1</sup> Takeshi Nakatani,<sup>\*1</sup> Akihiko Taguchi,<sup>\*2</sup> Shigeki Miyata,<sup>\*3</sup> Masataka Kamei,<sup>\*4</sup> Ryouichi Tanaka,<sup>\*5</sup> Hidezo Mori,<sup>\*6</sup> Kunio Miyatake, and Hitonobu Tomoike

Division of Cardiovascular Medicine, National Cardiovascular Center

<sup>\*1</sup>Division of Cardiovascular Surgery, National Cardiovascular Center

<sup>\*2</sup>Division of Cerebrovascular Medicine, National Cardiovascular Center

<sup>\*3</sup>Division of Transfusion Medicine, National Cardiovascular Center

<sup>\*4</sup>Division of Anesthesia, National Cardiovascular Center

<sup>\*5</sup>Division of Radiology, National Cardiovascular Center

<sup>\*6</sup>Division of Cardiac Physiology, National Cardiovascular Center

**Key words:** Autologous bone marrow mononuclear cell implantation, Therapeutic angiogenesis, Buerger's disease

The therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow mononuclear cell implantation has been implemented for cases with critical peripheral artery disease (PAD), for which conventional treatments proved ineffective. The results of those studies showed that the improvements of intermittent claudication or rest pain were significant, but ischemic skin ulcer in those patients failed to be cured fully. We treated three cases with ischemic skin ulcers by Buerger's disease using bone marrow mononuclear cell implantation. Consequently, skin ulcers in three patients improved completely. The present study suggested that the therapeutic angiogenesis using bone marrow mononuclear cell implantation was a good solution to Buerger's disease, still with skin ulcers.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004, 44: 191-197)





## 骨髄幹細胞の心筋細胞への分化

中谷 武嗣 富田 伸司

心筋障害が高度な心不全に対して、心臓移植は有力な治療手段でその治療成績も良好であるが、ドナー心の不足が問題である。心補助手段の一つとして、骨格筋を心臓周囲にまきトレーニングを行うことで心補助を行う心筋形成術が試みられた<sup>1)</sup>。しかし、手術侵襲が大きい割にその補助効果が遅発性で、かつ限定的であるため、現在では行われなくなった。その研究の中で、骨格筋を細胞レベルに細分し心筋へ移植することで、移植細胞の心筋化を伴い、心機能改善効果を得られるのではないかと、心臓への細胞移植の研究がスタートした<sup>2)</sup>。その後、移植する細胞種について種々の研究がなされたが、本稿では、細胞源としての骨髄幹細胞を中心に概説する。

### ① 外因性幹細胞移植

骨髄細胞は細胞移植に用いる細胞種として種々の利点を持っている。まず、細胞の採取法としての骨髄穿刺は臨床的な手技として確立している。また、自己組織を用いるため、免疫抑制の必要がなく、倫理的にも問題とならない。骨髄細胞の多くは造血幹細胞であるが、間葉系の幹細胞が存在し、条件により骨、軟骨、脂肪細胞へ分化誘導が可能である。骨髄細胞を経代培養すると、接着能の弱い造血幹細胞は除去され、線維芽細胞に似た“間葉系幹細胞”を含む集団となるが、この間葉系幹細胞を同定する方法が確立されていない。このため、間葉系幹細胞の研究が遅れている。

心筋細胞が5-azacytidine 処理を行った骨髄細

胞から分化誘導されるとする報告が1999年に行われた<sup>3,4)</sup>。さらに、経静脈的に移植された骨髄細胞も心筋細胞へ分化し得ることが報告され<sup>5)</sup>、心筋細胞移植の細胞源として骨髄が注目されるようになった。

多くの研究グループが心筋細胞、内皮細胞、平滑筋細胞などの表現型(phenotype)を示す成人幹細胞の分離を試みてきた。OrlicらはLin-C-kit<sup>+</sup>細胞が梗塞心筋細胞を再生すること<sup>6)</sup>を、またJacksonらはSP(side population)細胞が虚血心筋を再生すること<sup>7)</sup>を報告した。最近では、Beltramiらが、Lin-C-kit<sup>+</sup>細胞を虚血心に注入すると、新生血管や心筋細胞を含む心筋を再構築されることから、Lin-C-kit<sup>+</sup>細胞が心幹細胞であると報告している<sup>8)</sup>。これに対して、Murryら<sup>9)</sup>やBalsamら<sup>10)</sup>は、造血幹細胞(Lin-c-kit<sup>+</sup>細胞, Lin-c-kit<sup>+</sup>Scar<sup>+</sup>)は、心筋梗塞において心筋細胞に分化しないことを示した。多くの研究者が幹細胞を*in vitro*や*in vivo*で操作することを試みているが、現状では、ヒト心筋細胞や心筋芽細胞を効率よく臨床応用に十分な量を培養する技術は確立されていない。

細胞移植においては、ホスト細胞とドナー細胞が電氣的結合を行い同期して収縮することにより心臓ポンプ機能を改善することを目指している。しかし、この電氣的結合が不完全であると不整脈の誘引となることが問題視されている。2000年にフランスのMenascheらは、自己骨格筋芽細胞を虚血心筋へ細胞移植を行う第1相の臨床試験を

### Differentiation of bone marrow derived stem cells to cardiac cells

Takeshi Nakatani [著者連絡先] 国立循環器病センター 臓器移植部(〒565-8565 大阪府吹田市藤白台5-7-1)  
Shinji Tomita: オークランドシティー病院 心臓血管外科(オークランド市, ニューージーランド)

行ったが、10 例中 4 例において心室頻拍のため埋め込み型除細動器(AICD)の装着を行ったと報告している<sup>11)</sup>。しかし、その後これらの AICD が不整脈による作動はみられなかった。われわれの動物実験での検討では、致死的な不整脈の発生を認めなかった<sup>12)</sup>。この不整脈の問題に関しては、今後さらに検討が必要である。

また、骨髄細胞による心臓血管系の再生に関して、Asahara らは、末梢血に骨髄からの血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cells : EPC)が存在し、虚血心筋において脈管新生(vasculogenesis)や血管新生(angiogenesis)に貢献していることを報告した<sup>13)</sup>。また、Shintani らは、骨髄単核球細胞(bone marrow mononuclear cell : BM-MNC)による虚血肢における血管新生を報告し<sup>14)</sup>、わが国において臨床応用が行われている。BMMNC の利用は、培養する必要がなく用いやすい。また、骨髄細胞からのサイトカインが血管新生に大きな役割を果たしていると考えられている<sup>15)</sup>。さらに、虚血心筋に対しても外科的に注入する方法が試みられている<sup>16)</sup>。これらは、骨髄細胞による vasculogenesis や angiogenesis により、虚血心臓を再生させようとするものである。

骨髄細胞を用いることの容易さもあり、種々の臨床研究が進められている<sup>17,18)</sup>が、これらは、血管新生と心筋細胞の新生の二つを合わせようとするものである。骨髄細胞移植による心機能改善のメカニズムについては、未だ詳細は不明であり、今後の研究が必要である。

## ② 内因性幹細胞移植

これまで成人の心筋細胞は増殖再生しないとされてきた。1998 年頃から Anversa らのグループは、成人心筋細胞も分裂増殖することができ、体内に存在する幹細胞(内因性幹細胞)による病的心臓の自己再生能を報告した<sup>19)</sup>。外因性の細胞と異なり、外科的手術や増殖を行う必要がないため、汎用性は高いと考えられる。さらに、内因性幹細胞の働きを人為的に賦活化できれば、外部からの細胞移植は不要になる。

Olic らは、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)と幹細胞因子(SCF)をマウス急性心筋梗塞モデル

に投与したところ、心機能の改善、生存率の改善を得られたと報告し、G-CSF と SCF による幹細胞の賦活化が示された<sup>20)</sup>。しかし、再生された心筋がホストの心筋由来か骨髄由来かについては不明である。

そこで、著者らは、この内因性幹細胞は骨髄由来かどうかを確認するために、GFP 遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)を放射線照射後の C57b6 マウスに移植し、キメラマウスを作製した。心筋梗塞モデルにおいて、心筋梗塞 1 ヶ月後には、G-CSF 投与群において生存率の改善傾向を認めた<sup>21)</sup>。また、心筋梗塞境界部では、G-CSF 群において、GFP-BMC 数がコントロール群より有意に増加した。さらに、その GFP-BMC のうち約 20%がトロポニン I 陽性細胞で、ネスチン陽性細胞も多数認めた。同様の結果は doxorubicin による心不全モデルにおいても確認された<sup>22)</sup>。この結果から、再生心筋の細胞源のひとつは骨髄であり、G-CSF によりその効果が増強されることが示唆された。しかし、骨髄由来の心筋細胞数は少なく、心臓ポンプ機能の改善効果には限界があることが示されている<sup>23)</sup>。また、G-CSF はさまざまな生理学的な役割を持っており、われわれは、G-CSF が病的な心筋に直接働き、G-CSF レセプターを介してトロポニン-I 陽性細胞の増殖を増強することを確認している<sup>24)</sup>。最近 Beltrami らは、心臓幹細胞が心臓内に存在することを報告している<sup>8)</sup>。

2002 年に Sata らは、造血幹細胞が動脈硬化に寄与することと報告した<sup>25)</sup>。また、韓国のグループが、急性心筋梗塞後に冠動脈内ステント挿入術が行われた患者に対して G-CSF 治療を行ったところ、高率でステント内再狭窄を認めたと報告している<sup>26)</sup>。内因性幹細胞は、障害された心筋とともに動脈硬化巣にも遊走する可能性があることを警鐘している。今後、内因性幹細胞遊走の生理学的メカニズムが解明することができれば、心筋障害に対する内因性幹細胞を用いた治療を効果的に行うことが可能となる。

## ③ 心臓内環境因子

幹細胞の心筋への分化に環境因子(cardiac

milieu)が重要とされている<sup>27,28)</sup>が、その詳細は不明である。

著者らは、細胞同士の直接接触が環境因子のひとつであるとして以下の実験を行った<sup>29)</sup>。ラット新生児心筋細胞をホスト心筋(CM)とし、GFP 遺伝子組み換えマウス由来骨髄細胞(GFP-BMC)を移植細胞とし、共培養実験系を作製した。GFP-BMC と CM との間に隔壁をおいた double chamber 培養では、GFP-BMC に特に変化を認めなかった。これに対し、GFP-BMC と CM を混合した共培養系では、ある GFP-BMC は、2 日後から CM と同期収縮を開始するものが現れた。また、免疫組織染色では、myosin heavy chain-slow(1 日後から)、コネキシン 43 と心房性ナトリウム利尿ペプチド(ANP)(2 日後から)、トロポニン I(4 日後から)が経時的に発現し漸増した。5 日後には myosin heavy chain-slow 陽性細胞はおよそ 2.5% になった。この結果、幹細胞の心筋分化には、ホストの心筋細胞との直接接触が重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、循環血液中のヒト骨髄細胞が心筋細胞に分化することが報告されている<sup>30)</sup>。2002 年に、細胞融合(cell fusion)の問題が報告された<sup>31)</sup>。この報告は、ES 細胞と GFP マウス由来骨髄細胞との共培養により、一見 GFP を発現した細胞が分化増殖するように見えるが、その細胞の核内には ES 細胞由来の DNA も含んでいたとしている。しかし、細胞融合の割合が低いため、この現象は十分には解明されていない。Oh らは、成人心臓からの幹細胞抗原-1 を発現する心臓前駆細胞が、ホスト細胞との融合があってもなくても、ほぼ同等に心筋へ分化することを報告した<sup>32)</sup>。融合が生理的過程として起こっているのであれば、今後の研究が必要となるであろう。

#### おわりに

心臓への細胞移植について種々の研究がなされており、その中で用いる細胞種の一つとして骨髄幹細胞がある。また、従来からの外因性細胞移植のみならず内因性細胞移植による心筋再生も注目されている。さらに、心筋への分化における環境因子に関しても検討されている。骨髄幹細胞は、

倫理的側面を含み臨床応用が行いやすい細胞種であり、今後さらに検討が進むものと考えられる。

#### ●文 献

- 1) 中谷武嗣, 高野久輝: Cardiomyoplasty. 心臓血管外科, 川島康生(編), pp 846-850, 朝倉書店, 東京, 2000
- 2) Marelli D et al: *Cell Transplant* 1: 383-390, 1992
- 3) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al: *J Clin Invest* 103: 697-705, 1999
- 4) Tomita S, Li RK, Weisel RD et al: *Circulation* 100(19 Suppl): II 247-II 256, 1999
- 5) Bittner RE, Schofer C, Weipoltshammer K et al: *Anat Embryol (Berl)* 199: 391-396, 1999
- 6) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al: *Nature* 410: 701-705, 2001
- 7) Jackson KA, Majka SM, Wang H et al: *J Clin Invest* 107: 1395-1402, 2001
- 8) Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D et al: *Cell* 114: 763-776, 2003
- 9) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al: *Nature* 428: 664-668, 2004
- 10) Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL et al: *Nature* 428: 668-673, 2004
- 11) Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT et al: *J Am Coll Cardiol* 41: 1078-1083, 2003
- 12) Fujii H, Tomita S, Nakatani T et al: *J Am Coll Cardiol* 43: 1299-1305, 2004
- 13) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: *Science* 275: 964-967, 1997
- 14) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: *Circulation* 103: 897-903, 2001
- 15) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: *Lancet* 360: 427, 2002
- 16) Hamano K, Li TS, Kobayashi T et al: *Ann Thorac Surg* 73: 1210-1215, 2002
- 17) Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al: *Circulation* 106: 1913-1918, 2002
- 18) Assmus B, Schachinger V, Teupe C et al: *Circulation* 106: 3009-3017, 2002
- 19) Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J et al: *N Engl J Med* 344: 1750-1757, 2001
- 20) Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al: *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10344-10349, 2001
- 21) Fukuhara S, Tomita S, Ohtsu Y et al: *Circulation* 106(suppl II): A 1870, 2002
- 22) Tomita S, Ishida M, Nakatani T et al: *J Heart Lung Transplant* 23: 577-584, 2004
- 23) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T et al: *J Heart Lung Transplant* (in press)
- 24) Hamamoto M, Tomita S, Nakatani T et al: *J Heart Lung Transplant* (in press)
- 25) Sata M, Saiura A, Kunisato A et al: *Nat Med* 8: 403-409, 2002
- 26) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al: *Lancet* 363: 751-756, 2004

- 27) Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J et al : *J Thorac Cardiovasc Surg* **120** : 999-1006, 2000
- 28) Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF et al : *Nat Med* **6** : 1282-1286, 2000
- 29) Fukuhara S, Tomita S, Nakatani T et al : *J Thorac Cardiovasc Surg* **125** : 1470-1480, 2003
- 30) Badorff C, Brandes RP, Popp R et al : *Circulation* **107** : 1024-1032, 2003
- 31) Terada N, Hamazaki T, Oka M et al : *Nature* **416** : 542-545, 2002
- 32) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD et al : *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 12313-12318, 2003
-

## 巻頭言

# 重症心不全治療における心臓移植について

中 谷 武 嗣\*

心臓病の治療成績は向上してきたが、重症心不全治療においてはいまだ難渋することが多く、臓器機能置換としての心臓移植や人工心臓を考慮せざるを得ない。心臓移植は、国際レジストリーではこれまでに6万例以上施行され、1年生存率が80%強、半数がほぼ10年生存している。また、植え込み型左心補助人工心臓(LVAS)のHeartMateおよびNovacorは、4700例以上に適応され、外来管理が積極的に行われている。

わが国では、1997年の臓器移植法施行後、現在までに19例の心臓移植が施行され、最長5年経過するが全例生存している。しかし、待機数に比し施行数が非常に少ないため、その待機期間が極端に長くなり、最近では2年以上となっている。このため、19例中13例がLVAS装着にて待機となっている。当院においても、これまでに83例を日本臓器移植ネットワークへ登録してきたが、内52例はLVAS装着例で、その90%以上が体外設置型である。当初体外設置型LVASでの補助期間は一年程度と想定されていたが、待機を続けざるを得ず、心不全・移植病棟を開設し管理を一元化したところ、その平均補助期間は500日を越えるようになった。本年2月には800日を越えた体外設置型LVAS例および900日を越えるHeartMate例の同時心臓移植手術が行われたが、ともに50日後に退院し現在自宅にてリハビリを行っている。しかし、現在も30例が移植待機中で、内13例がLVAS装着、3例が強心薬投与中である。米国ではLVAS装着例では2ヵ月以内に移植が行われており、中には渡航移植を希望される方がおられるのが現状である。

心臓移植のドナー不足は欧米を含め世界的な問題

であり、心臓移植の代替手段として、薬物治療、外科手術、LVASに加え、両心室ペーシング、さらには細胞療法などの再生医療などの開発が行われている。また、LVAS補助例の一部では著明に心機能が回復しLVASから離脱する例もあり、我々も移植登録取消しに至った症例を既に3例経験している。さらに、心臓移植が対象とならない症例に対して欧米ではLVASがdestination therapyとして適応されるようになってきている。しかし、これらの効果には限界があり、現状では心臓移植へのつなぎとして位置付けられており、欧米では心臓移植を受け皿とした治療体系で臨床例での検討が積極的に進められている。これに対し、心臓移植が受け皿として現実的でないわが国での状況では、これらの新しい治療法の導入においてわが国で開発されたものであっても困難があり、諸外国での検討およびその評価を待たざるをえない。今後わが国が貢献すべき分野として期待される人工臓器や再生医療を、世界にリードして推進するためにも、グローバルスタンダードである心臓移植治療を組み込んだ重症心不全治療体系を持つことが必要であり、今一度わが国として心臓移植医療を考える時期と考える。

\*国立循環器病センター臓器移植部

myocardial infiltration by tumor. A cardiac mass seen on echocardiography or magnetic resonance imaging suggests the diagnosis of cardiac lymphoma, and positive pericardial effusion cytology, endomyocardial biopsy, or direct biopsy via thoracotomy confirms the diagnosis.

Michael A. Thompson, Amy Harker-Murray,  
Adam J. Locketz, and Panithaya Chareonthaitawee  
Mayo Clinic, Rochester, MN

© 2004 by American Society of Clinical Oncology

#### Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest

The authors indicated no potential conflicts of interest.

#### REFERENCES

1. Addis BJ, Isaacson PG: Large cell lymphoma of the mediastinum: A B-cell tumour of probable thymic origin. *Histopathology* 10:379-390, 1986
  2. Lamarre L, Jacobson JO, Aisenberg AC, et al: Primary large cell lymphoma of the mediastinum: A histologic and immunophenotypic study of 29 cases. *Am J Surg Pathol* 13:730-739, 1989
  3. Boring CC, Squires TS, Tong T, et al: Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin* 44:7-26, 1994
  4. Lam KY, Dickens P, Chan AC: Tumors of the heart: A 20-year experience with a review of 12,485 consecutive autopsies. *Arch Pathol Lab Med* 117:1027-1031, 1993
  5. Chim CS, Chan AC, Kwong YL, et al: Primary cardiac lymphoma. *Am J Hematol* 54:79-83, 1997
  6. Chalabreysse L, Berger F, Loire R, et al: Primary cardiac lymphoma in immunocompetent patients: A report of three cases and review of the literature. *Virchows Arch* 441:456-461, 2002
- DOI: 10.1200/JCO.2004.12.100

### CASE 3. CD8<sup>+</sup> T-Cell Prolymphocytic Leukemia

A 33-year-old Japanese woman was referred because of leukocytosis with increased abnormal lymphocytes on a routine blood test. She was completely asymptomatic. Physical examination was essentially normal with no lymphadenopathy, hepatosplenomegaly, or skin lesions. CBC showed WBC  $24.5 \times 10^9/L$  with segmented neutrophils 10%, lymphocytes 5%, monocytes 2%, eosinophils 1%, basophils 1%, abnormal lymphocytes 81%, hemoglobin 12.0 g/dL, and platelets  $210 \times 10^9/L$ . Blood chemistry including lactate dehydrogenase and calcium were normal. Immunoglobulin M was slightly elevated at 360 mg/dL, but other immunoglobulin classes were normal. Serum protein electrophoresis showed no monoclonal protein. Her hepatitis serology, including hepatitis B antigen and hepatitis C antibodies, was negative. Human T-cell lymphotropic virus-1 and HIV antibodies were also negative. Peripheral blood smear (Fig 1) showed abnormal lymphocytes that were small and had indented and irregular nuclei with

condensed chromatin and no apparent nucleolus. Cytoplasm was basophilic and lacked granulations. Bone marrow was hypercellular with diffuse infiltration by these same abnormal lymphocytes (Fig 2). Immunophenotype analysis (Fig 3) of peripheral blood revealed the abnormal lymphocytes were CD1<sup>-</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD7<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD10<sup>-</sup>, CD16<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, CD20<sup>-</sup>, CD22<sup>-</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD25<sup>-</sup>, CD30<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD38<sup>dim</sup>, CD45<sup>+</sup>, CD56<sup>-</sup>, CD57<sup>-</sup>, sIg<sup>-</sup>, TCR $\alpha\beta$ <sup>+</sup>, TCR $\delta\gamma$ <sup>-</sup>, and TdT<sup>-</sup>. Southern blot analysis for TCR-C $\beta$ 1 showed rearranged bands, suggesting a clonal process of disease (Fig 4). No metaphase cells for cytogenetic analysis were obtained in unstimulated culture of peripheral blood. Cytogenetic study with phytohemagglutinin stimulation showed 42, X, -X, add(6)(p25), add(7)(q36), I(8)(q10), -11, add(12)(p13), +13, -14, -15, -15, -17, add(19)(q13.4), add(20)(q13.3), -22, +mar2 in all nine cells analyzed (Fig 5). A diagnosis of CD8<sup>+</sup> T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL) was made. She developed progressive abnormal lymphocytosis, liver function test abnormalities, cervical lymphadenopathy, and erythematous skin lesions 3 months after diagnosis. She was

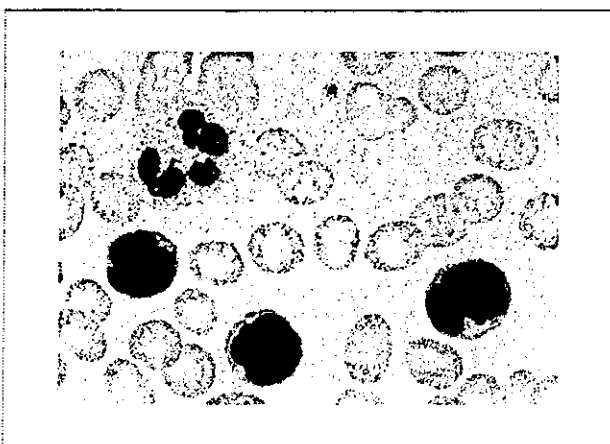


Fig 1.

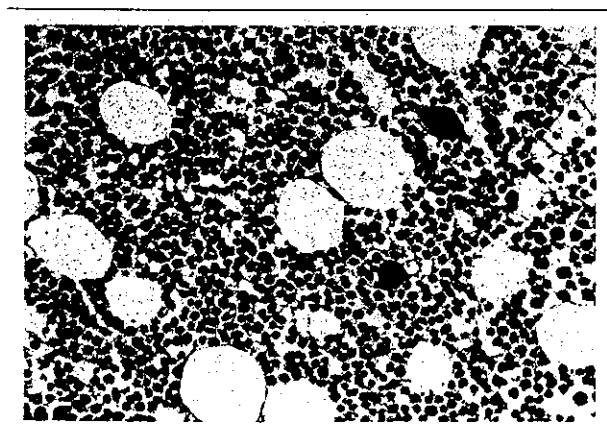


Fig 2.

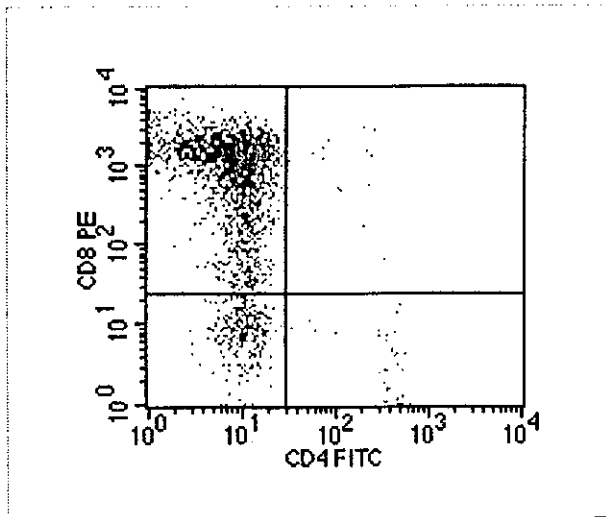


Fig 3.

treated with two courses of deoxycoformycin without any response. Therapy was changed to cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone, resulting in resolution of liver function test abnormalities, decreased lymphadenopathy, and stable peripheral abnormal lymphocyte counts.

She is awaiting an unrelated allogeneic bone marrow transplantation.

The differential diagnosis of increased abnormal T cells in the peripheral blood includes adult T-cell leukemia (ATL), leukemic phase of cutaneous T-cell lymphoma, large granular lymphocyte (T-LGL) leukemia and T-PLL. ATL was ruled out because of the negative serology for human T-cell lymphotropic virus-1 and the fact that most ATL are CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>. Cutaneous T-cell lymphoma was highly unlikely because of absence preceding cutaneous lesions. CD3<sup>+</sup> T-LGL leukemia is ruled out by lack of increased large granular lymphocytes with CD16<sup>+</sup> CD57<sup>+</sup> phenotype [1]. Additionally, patients with CD3<sup>+</sup> T-LGL leukemia present with neutropenia, anemia, and splenomegaly.

A new variant of T-cell chronic lymphocytic leukemia with CD8<sup>+</sup> phenotype was described in 1987 [2]. T-cell chronic lymphocytic leukemia is now reclassified as T-PLL according to the WHO/revised form of European-American Classification of lymphoid neoplasms classification for lymphoid malignancies because of aggressive clinical behavior [3]. It represents approximately 30% of T-cell leukemias with a mature phenotype. Clinical features of T-PLL include occurrence in older patients, hepatosplenomegaly, lymphadenopathy, skin lesions, leukocytosis, anemia, and thrombocytopenia [4]. The majority of cases are CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup>; however, approximately 10% of T-PLL are CD4<sup>-</sup>

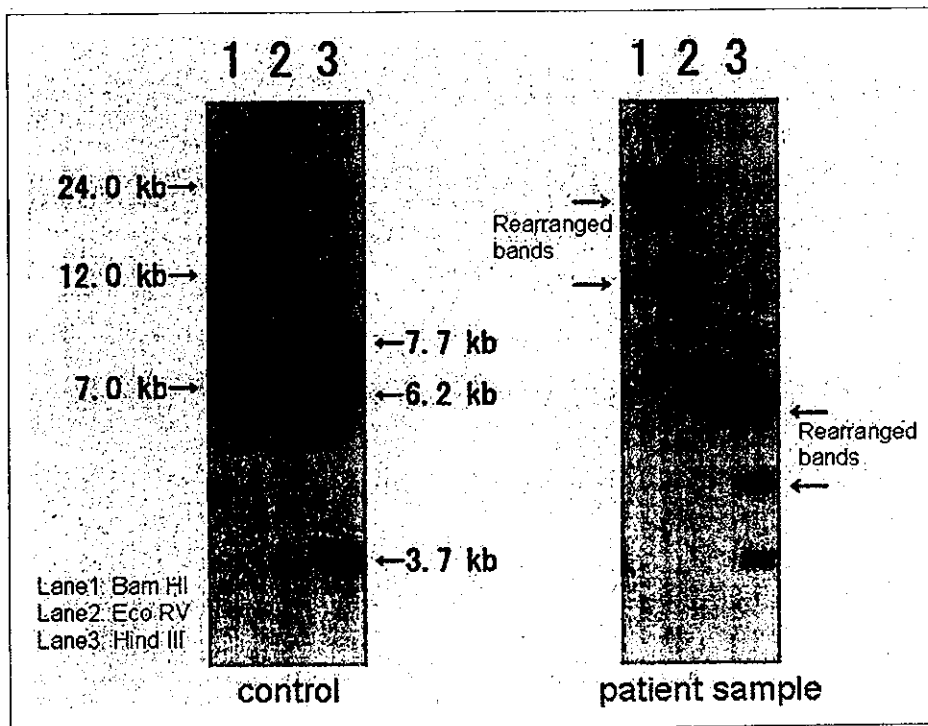


Fig 4.

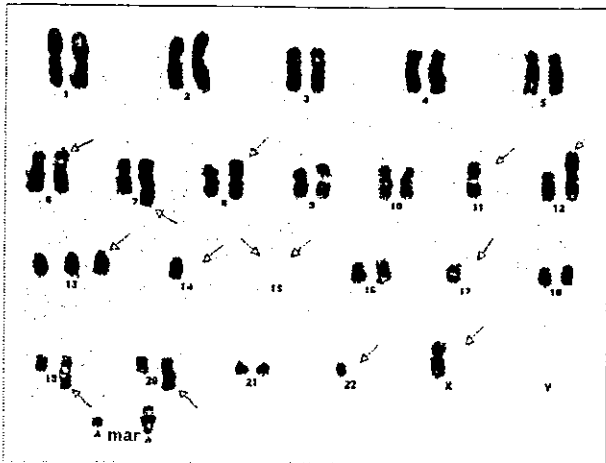


Fig 5.

CD8<sup>+</sup> [4,5]. Although no pathognomonic cytogenetic abnormalities have been identified, many cases show abnormalities involving chromosome 14 at bands q11 and q32 [4-8]. The clinical course is aggressive and tends to be resistant to chemotherapy. Median survival is approximately 1 year. Our case fulfills the clinical, morphologic, and immunophenotypic criteria for CD8<sup>+</sup> T-PLL with unusual cytogenetic abnormalities. It is important to recognize T-PLL because it has a more aggressive clinical course than mature T-cell leukemias.

Hikaru Nakajima, Masayuki Oki, and Kiyoshi Ando

Division of Hematology/Medical Oncology, Departments of Medicine  
Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

© 2004 by American Society of Clinical Oncology

### Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest

The authors indicated no potential conflicts of interest.

### REFERENCES

1. Loughran TP Jr: Clonal diseases of large granular lymphocytes. *Blood* 82:1-14, 1993
2. Hui PK, Feller AC, Pileri S, et al: New aggressive variant of suppressor/cytotoxic T-CLL. *Am J Clin Pathol* 87:55-59, 1987
3. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84:1361-1392, 1994
4. Matutes E, Brito-Babapulle V, Swansbury J, et al: Clinical and laboratory features of 78 cases of T-prolymphocytic leukemia. *Blood* 78:3269-3274, 1991
5. Matutes E, Catovsky D: Mature T-cell leukemias and leukemia/lymphoma syndromes. Review of our experience in 175 cases. *Leuk Lymphoma* 4:81-91, 1991
6. Heinonen K, Mahlamaki E, Hamalainen E, et al: Multiple karyotypic abnormalities in three cases of small cell variant of T-cell prolymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 78:28-35, 1994
7. Brito-Babapulle V, Maljaie SH, Matutes E, et al: Relationship of T leukaemias with cerebriform nuclei to T-prolymphocytic leukaemia: A cytogenetic analysis with in situ hybridization. *Br J Haematol* 96:724-732, 1997
8. Brito-Babapulle V, Pomfret M, Matutes E, et al: Cytogenetic studies on prolymphocytic leukemia. II. T cell prolymphocytic leukemia. *Blood* 70:926-931, 1987

DOI: 10.1200/JCO.2004.03.060



## Germ Cell Tumors

### CASE 1. Intraocular Metastases From Testicular Cancer

A 23-year-old Japanese man came to the emergency department with headache, vomiting, and visual disturbance in the left eye of 5 days duration. He also had noticed a painless growing right testicular mass 8 months earlier. Physical examination revealed a large mass in the right testis. Neurologic exam was normal except for decreased visual acuity in the left eye. Computed tomography scan of thorax, abdomen, and pelvis showed multiple pulmonary nodules, a large testicular mass, and absence of retroperitoneal lymph node enlargement. Multiple brain lesions as well as a left intraocular mass were seen on magnetic resonance imaging (Fig 1A, 1B). Blood tests showed lactate dehydrogenase 3,094 U/L (normal range, 210 to 410 U/L), human chorionic gonadotropin (HCG) 472,312 U/L and normal alpha-fetoprotein. Inguinal orchiectomy was performed for a testicular tumor measuring 11.0 × 8.5 × 8.0 cm. Pathologic examination revealed mostly seminoma (Fig 2A) with focal choriocarcinoma and embryonal carcinoma components (Fig 2B, anti-HCG antibody). Ophthalmologic exam-

ination showed a large mass at the posterior pole in the left eye. Subretinal hemorrhage and serous retinal detachment were also seen (Fig 3). Diagnosis of stage III nonseminomatous germ cell tumor of testis with lung, brain, and intraocular metastases was made. The patient was categorized as having a poor prognosis because of the nonpulmonary visceral metastases and extremely high HCG level. He was treated with bleomycin, etoposide, and cisplatin with concurrent radiotherapy to whole skull and left eye, resulting in complete resolution of cerebral and intraocular lesions, gross residual lung masses, and positive marker. After four courses of bleomycin, etoposide, and cisplatin, he received four courses of salvage chemotherapy with vinblastine, ifosfamide, and cisplatin, resulting in incomplete resolution of bilateral residual lung nodules and negative marker. He subsequently received high-dose chemotherapy consisting of cyclophosphamide, carboplatin, and etoposide followed by autologous peripheral-blood stem-cell rescue.

Testicular germ cell tumor is the most common solid tumor in men between the age of 20 and 35 years. It tends to metastasize to retroperitoneal lymph nodes below renal vessels first, because of the anatomy of lymphatic flow from

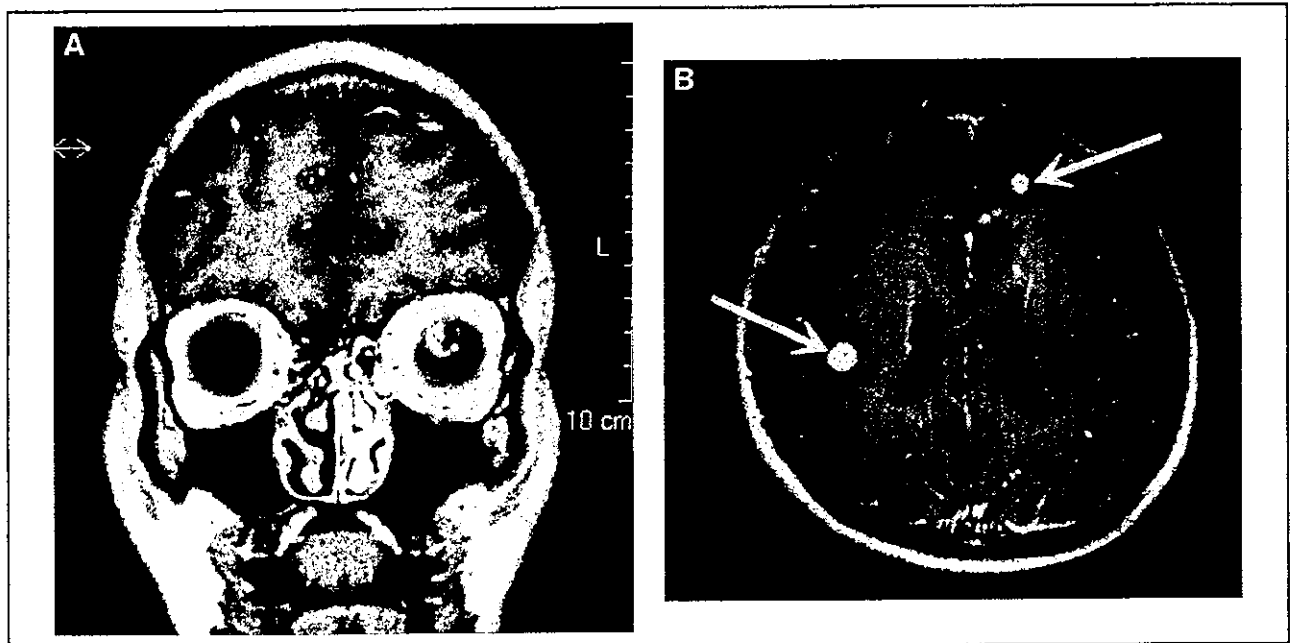


Fig 1.

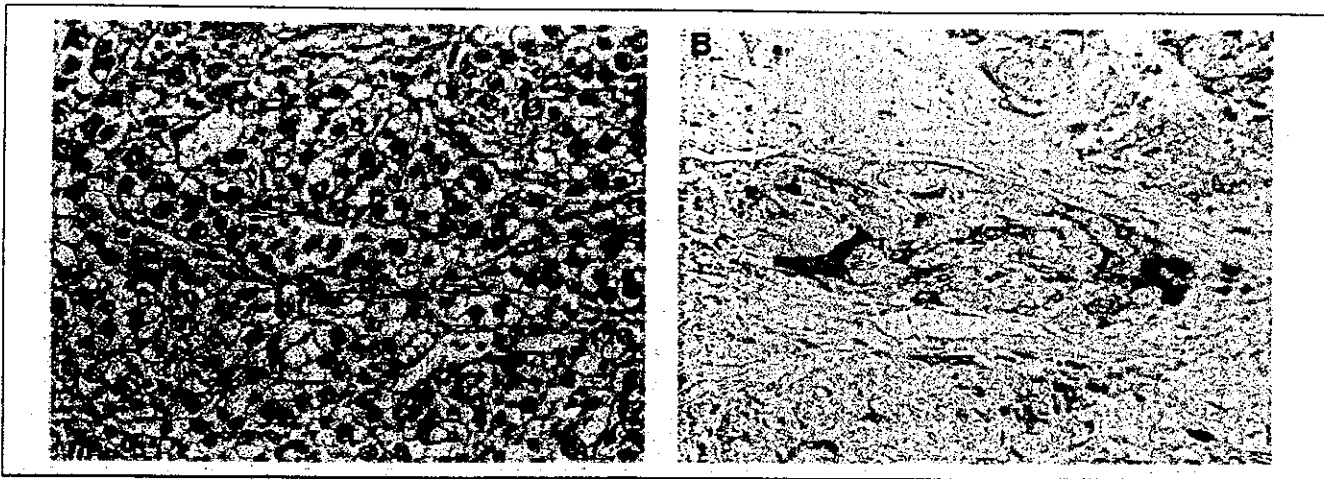


Fig 2.



Fig 3.

testis. It also frequently causes hematogenous spread. Most common visceral site of hematogenous metastasis is lung, followed by liver, brain, and bone. Germ cell tumor is a highly curable disease even with widespread metastases. To standardize the risk stratification of metastatic germ cell tumor, an international germ cell consensus classification was established. High level of tumor marker, mediastinal origin of germ cell tumor, and presence of nonpulmonary visceral metastases are important prognostic factors.<sup>1</sup> Metastatic cancer to the eye was considered to be a rare disease, historically. Approximately 300 patient cases of intraocular metastases from various types of cancer were reported by 1950.<sup>2</sup> Since then, the number of patient cases with intraocular metastases has progressively increased as a result of the improved detection and prolongation of life in patients with widespread metastatic cancer. It is now believed that metastatic cancer to the uvea is the most common form of intraocular malignancy. The proportion of patients with

intraocular metastasis among dying patients of all types of cancer was estimated to be 4%.<sup>3</sup> This estimate translates that more than 20,000 patients who would die from cancer would have ocular metastasis annually in the United States. Most intraocular metastases are carcinoma.<sup>4</sup> Breast cancer accounts for the majority, followed by lung cancer<sup>5</sup>, and then gastrointestinal cancer.

There have been only a few reports describing intraocular metastases from testicular cancer or germ cell tumor. One is a 4-year-old boy with adenocarcinoma of the testis.<sup>6</sup> Two patient cases of placental and mediastinal choriocarcinoma were reported.<sup>7,8</sup> Recently, a patient with intraocular metastasis from testicular choriocarcinoma was treated successfully with chemotherapy and radiation with cure.<sup>9</sup> Review of the literature suggests that choriocarcinoma accounts for most of intraocular metastases from the germ cell tumor.<sup>7-9</sup> Our patient had a component of choriocarcinoma in the resected specimen. With his high HCG level and propensity of hematogenous spread of choriocarcinoma, his intraocular mass might have shown mostly choriocarcinoma.

*Hikaru Nakajima, Masayuki Oki, Shuji Matsukura, Masato Nakamura, Masatoshi Tokunaga, and Kiyoshi Ando*

Division of Hematology/Medical Oncology, Departments of Medicine, Ophthalmology, Pathology, and Urology, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

© 2004 by American Society of Clinical Oncology

#### **Authors' Disclosures of Potential Conflicts of Interest**

The authors indicated no potential conflicts of interest.

#### **REFERENCES**

1. International Germ Cell Consensus Classification: A prognostic factor-based staging system for metastatic germ cell cancers: International Germ Cell Cancer Collaborative Group. *J Clin Oncol* 15:594-603, 1997
2. Greear JN: Metastatic carcinoma of the eye. *Am J Ophthalmol* 33:1015-1025, 1950

3. Nelson CC, Hertzberg BS, Klintworth GK: A histopathologic study of 716 unselected eyes in patients with cancer at the time of death. *Am J Ophthalmol* 95:788-793, 1983
4. Ferry AP, Font RL: Carcinoma metastatic to the eye and orbit: I. A clinicopathologic study of 227 cases. *Arch Ophthalmol* 92:276-286, 1974
5. Shields CL, Shields JA, Gross NE, et al: Survey of 520 eyes with uveal metastases. *Ophthalmology* 104:1265-1276, 1997
6. Goldstein I, Wexler D: Metastasis in the choroid from adenocarcinoma of testis. *Arch Ophthalmol* 13:207-211, 1935

7. Lahav M, Berkowitz S, Albert DM: Primary mediastinal choriocarcinoma in a male metastatic to the choroid. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 206:191-197, 1978

8. Barondes MJ, Hamilton AM, Hungerford J, et al: Treatment of choroidal metastasis from choriocarcinoma: Case report. *Arch Ophthalmol* 107:796-798, 1989

9. Zech JC, Subiger L, Chiquet C, et al: Testicular choriocarcinoma metastatic to the choroid. *Retina* 19:164-165, 1999

DOI: 10.1200/JCO.2004.07.187

## CASE 2. Unusual Course of Pure Testicular Seminoma

A 33-year-old white man sought medical advice concerning abdominal pain that had lasted a month. He had no significant other medical history. Physical and laboratory evaluation was unremarkable. Ultrasound evaluation showed an enlarged abdominal lymph node. Computed tomography (CT) scan confirmed a 10-mm intraaortocaval lymph node without any other abnormal image. Symptoms resolved within hours of treatment with analgesics. The patient was seen 1 month later with recurrent abdominal pain. His new CT scan showed an enlargement of the lymph node to 25 mm. Testicular ultrasound depicted a heterogeneous right testicle, consistent with a testicular tumor. Alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotrophin (HCG), free beta-HCG, and lactate dehydrogenase (LDH) levels were normal. A right orchidectomy was performed. The histopathologic diagnosis was a typical pure seminoma. He was then treated with four cycles of chemotherapy with etoposide 100 mg/m<sup>2</sup> and cisplatin 20 mg/m<sup>2</sup>, days 1 to 5, because of the unusual growth pattern of the involved lymph node. A partial remission was attained, with shrinkage of the lymph node to 12.5 mm. Close clinical and radiologic follow-up was initiated. Six months later, the lymph node image had enlarged to 30 mm. Excision of the involved retroperitoneal lymph node was performed and pathologic results revealed only necrosis with no viable tumor.

The patient missed follow-up appointments and presented 7 months later with painful abdominal swelling, anorexia, and fatigue. Physical examination revealed massive hepatomegaly. The alkaline phosphatase level was 363 U/L (normal < 135 U/L), gamma-glutamyltransferase level was 361 U/L (normal < 64 U/L), AST level was 223 U/L (normal < 42 U/L), and total bilirubin was 31 μmol/L (normal < 17 μmol/L). The serum LDH level was 10,000 U/L (normal < 600 U/L). Alpha-fetoprotein as well as HCG and free beta-HCG levels were normal. An abdominal CT scan (Fig 1) showed numerous liver metastases as well as portal and celiac lymph node involvement. Thoracic and cerebral CT scans were normal. Ultrasound-guided liver biopsy revealed a typical pure seminoma. Salvage chemotherapy consisting of three cycles of vinblastine, ifosfamide,



Fig 1.

and cisplatin<sup>1</sup> led to the normalization of serum LDH, but only a partial response was obtained on the liver and the lymph node metastases. The patient then was treated with two consecutive cycles of high-dose chemotherapy according to the regimen with ifosfamide 12 g/m<sup>2</sup>, carboplatin 1,500 mg/m<sup>2</sup>, and etoposide 1,500 mg/m<sup>2</sup>,<sup>2</sup> followed by autologous stem-cell transplantation. Consecutive abdominal CT scans showed progressive shrinkage of the liver and lymph node metastases. Additional surgery, including retroperitoneal lymph node dissection and partial hepatectomy, were discussed but not performed because the positron emission tomography scan was normal. At present, the patient is well, with no evidence of disease on CT scan (Fig 2), 24 months after the end of salvage chemotherapy.

Poor-prognosis early-stage seminoma is unusual. Radiotherapy remains the standard treatment for early-stage (stage I and IIA-B, American Joint Committee on Cancer and International Union Against Cancer 1997 classification<sup>3</sup>) pure seminoma. However, this patient's management with chemotherapy according to the advanced seminoma reference protocol<sup>4</sup> was a result of the rapid tumor growth pattern. Retroperitoneal lymph node dissection was not performed after initial chemotherapy in accordance with guidelines regarding the treatment of advanced seminoma.<sup>5</sup> Unlike nonseminomatous germ cell tumors, semi-

# Competitive Repopulation Assay of Two Gene-Marked Cord Blood Units in NOD/SCID/ $\gamma$ c<sup>null</sup> Mice

Takashi Yahata,<sup>1,2</sup> Kiyoshi Ando,<sup>1,2,\*</sup> Hiroko Miyatake,<sup>1</sup> Tomoko Uno,<sup>1</sup>  
Tadayuki Sato,<sup>1</sup> Mamoru Ito,<sup>3</sup> Shunichi Kato,<sup>1,4</sup> and Tomomitsu Hotta<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Division of Hematopoiesis, Research Center for Regenerative Medicine, <sup>2</sup>Department of Hematology, and  
<sup>4</sup>Department of Cell Transplantation & Regenerative Medicine, Tokai University School of Medicine,  
Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan

<sup>3</sup>Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Kanagawa 216-0001, Japan

\*To whom correspondence and reprint requests should be addressed at the Department of Hematology,  
Tokai University School of Medicine Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193, Japan. Fax: +81 463 92 4511. E-mail: andok@keyaki.cc.u-tokai.ac.jp.

Available online 2 September 2004

In multiunit cord blood transplantation, hematopoietic stem cells from each unrelated cord blood (UCB) unit competitively reconstitute the hematopoietic system in a recipient. To evaluate the fate of the progeny of each UCB unit and to determine the effects of graft-versus-graft reaction, we established a novel competitive repopulation assay using NOD/SCID/ $\gamma$ c<sup>null</sup> mice in which human T lymphocytes develop from CD34<sup>+</sup> cells. CD34<sup>+</sup> cells from each UCB unit were labeled with recombinant lentivirus vectors carrying genes encoding either enhanced green fluorescent protein (EGFP) or enhanced yellow fluorescent protein (EYFP). Hematopoietic chimerism composed of both EGFP<sup>+</sup> and EYFP<sup>+</sup> cells was stably maintained up to 6 months after transplantation with purified CD34<sup>+</sup> cells; the ratio of EGFP<sup>+</sup> to EYFP<sup>+</sup> cells in peripheral blood and bone marrow posttransplantation was equivalent to the ratio of these cells at transplantation. However, when mononuclear cells from two UCB units were cotransplanted with CD34<sup>+</sup> cells, engraftment was highly competitive, with cells from only one or the other of the two UCB units surviving. Further subfractionations of mononuclear cells indicate that the skewed chimerism that is often observed in clinical multiunit cord blood transplantation may be mediated by the cooperation of both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. The assay established here will be a useful tool for analyzing hematopoietic reconstitution in clinical multiunit cord blood transplantation.

**Key Words:** gene marking, lentivirus, hematopoietic stem cell, SCID mouse-repopulating cell assay, multiunit cord blood transplantation, NOG mouse, competitive repopulation assay

## INTRODUCTION

Cord blood (CB) is a potentially rich alternate source of hematopoietic stem cells (HSCs) and progenitors for clinical allogeneic transplantation [1,2]. Despite some promising outcomes with unrelated cord blood transplantation (UCBT) in pediatric recipients, the low cell content of the graft relative to recipient size may adversely affect both the time to hematopoietic recovery and survival [3–6]. Therefore, the major limitation to the widespread use of unrelated CB (UCB) as a source of HSC for transplantation, particularly in adults, is the low yield of stem cells. To overcome this, several centers have initiated multiunit UCBT (m-UCBT) in which two or more units of closely HLA-matched UCB are transplanted [7–9].

In clinical m-UCBT, HSCs from multiple UCB units competitively reconstitute the hematopoietic and

immune systems, raising the possibility of a graft-versus-graft reaction or of multiple graft-versus-host reactions. Although an *in vivo* competitive repopulation assay has been widely used in mice [10–12], dogs [13], and nonhuman primates [14,15] to evaluate the potency of HSCs for hematopoietic reconstitution, there is currently no practical assay system for competitive repopulation by human HSCs, which might help to predict the results of graft-versus-graft reactions and immune reconstitution by multiple UCBs.

Xenogeneic transplantation models, in particular the severe combined immunodeficient (SCID) mouse-repopulating cell assay, have been used to evaluate *in vivo* human HSC activity, such as self-renewal and multilineage differentiation [16–19]. The nonobese diabetic (NOD)/SCID mice and related strains have