

難治性膠原病に対する 自己末梢血純化CD34陽性細胞移植

九州大学大学院病態修復内科学(第一内科)

長藤宏司、原田実根

Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Treatment of Autoimmune Diseases

- Consensus EULAR/EBMT (Br J Rheumatol 1997)
 - (not too) severe, progressive, refractory disease
 - autologous SCT (= rescue), not allo
 - guidelines on entry criteria and regimens
- Goal: longterm remission to prevent morbidity/mortality by re-establishing self-tolerance

一卵性双生児/二卵性双生児 自己免疫疾患の発症率

一卵性双生児における自己免疫疾患の発症率
遺伝背景完全一致+環境背景一致
二卵性双生児
+環境背景一致

SLEにおいて
一卵性双生児 24%
二卵性双生児 2%

多くの自己免疫疾患は、
遺伝要因を背景に環境要因が加わって発症

血液疾患に合併した自己免疫疾患

同種移植

自己免疫疾患	血液疾患	結果	観察期間	例数	予後
RA	AA	寛解	2年	4	生1死3
RA	AA	寛解、2年後再発	14年	1	生存
RA	AA	寛解	11、13年	2	生存
RA	AA	寛解、20ヶ月後再発	13年	1	生存
RA	AA	寛解	20年	1	生存
DLE	AA	寛解	13年	1	生存
SLE	AA	寛解	9年、15年	2	生存
血管炎	AML	寛解	7年	1	生存

AA: 再生不良性貧血 AML: 急性骨髄性白血病

血液疾患に合併した自己免疫疾患

自家移植

自己免疫疾患	血液疾患	結果	観察期間	予後
RA	NHL	不変	4ヶ月	生存
RA	IBL	寛解、20ヶ月後再発	20ヶ月	生存
RA	NHL	寛解	22ヶ月	生存
SLE	NHL	寛解、1年後再発	1年	生存
SLE	NHL	寛解、3年後再発	4年	生存
SLE	CML	寛解	30ヶ月	生存
SjS	MALTL	部分寛解	20ヶ月	死亡

NHL: 非ホジキン性リンパ腫

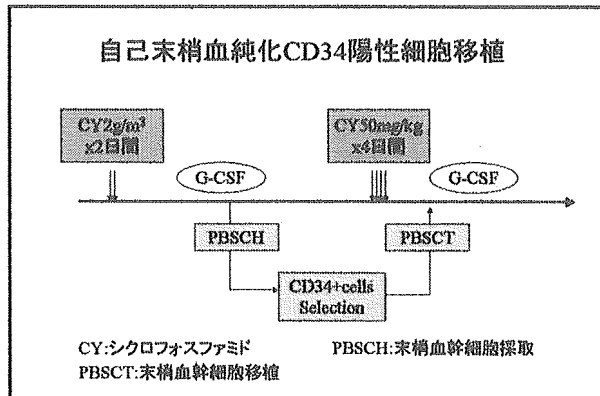
IBL: 免疫芽球形リンパ腫

CML: 慢性骨髄性白血病

MALTL: MALTLリンパ腫

はじめに

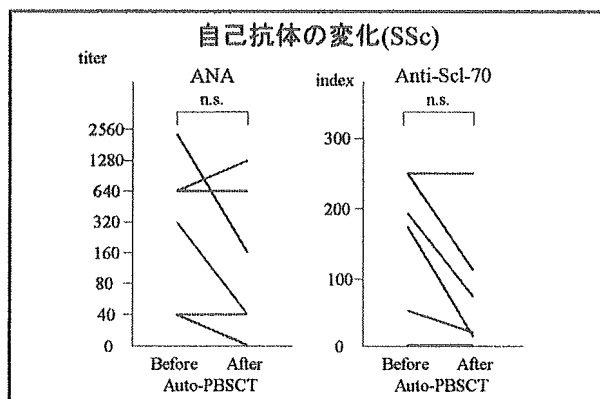
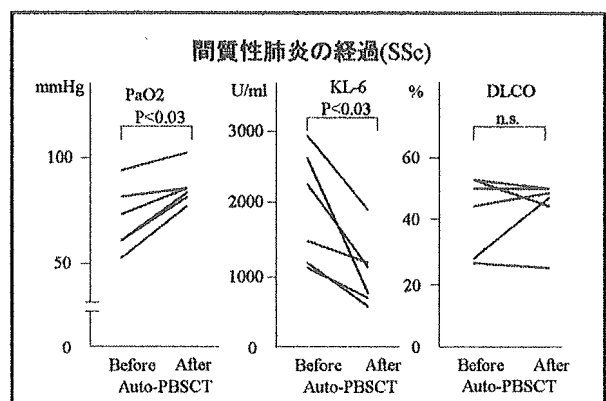
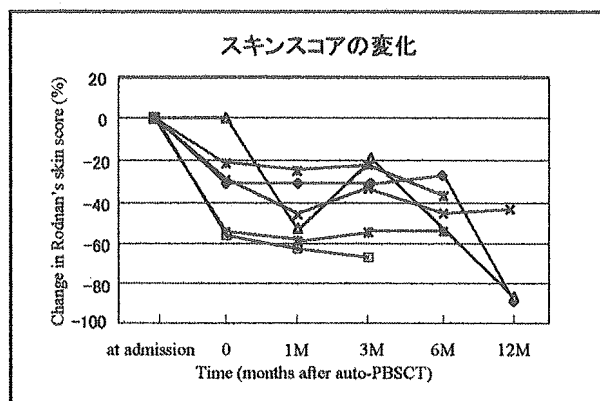
ヨーロッパを中心に1990年代半ばより、難治性自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植(Hematopoietic stem cell transplantation: HSCT)の臨床応用が開始され、当施設でも2002年より8例のHSCT施行例を経験した。今回は難治性膠原病にたいするHSCTの自験例について報告する。



SScに対する自己末梢血純化CD34陽性細胞移植のまとめ

	case 1	case 2	case 3	case 4	case 5	case 6
年齢/性	54/F	55/M	58/M	54/F	53/F	48/F
合併症	指尖潰瘍 IP	IP	IP	IP	IP	IP
投与CD34陽性細胞数 (x10 ⁶ /kg)	8.4	4.9	2.2	2.1	7.2	4.0
好中球>500/μl	Day 9	Day 9	Day 10	Day 11	Day 13	Day 11
血小板>5x10 ⁴ /μl	Day 20	Day 10	Day 12	Day 16	Day 9	Day 11
移植後合併症						
CMV抗原血症	+	-	+	+	-	+
ADV 膀胱炎	+	-	-	-	-	+
敗血症	-	-	-	-	-	+
観察期間 (月)	24	16	13	11	8	4

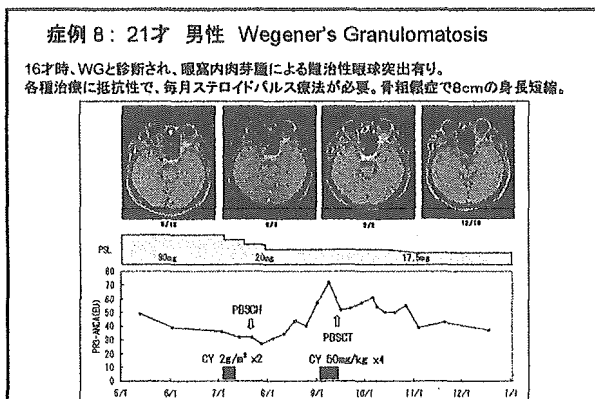
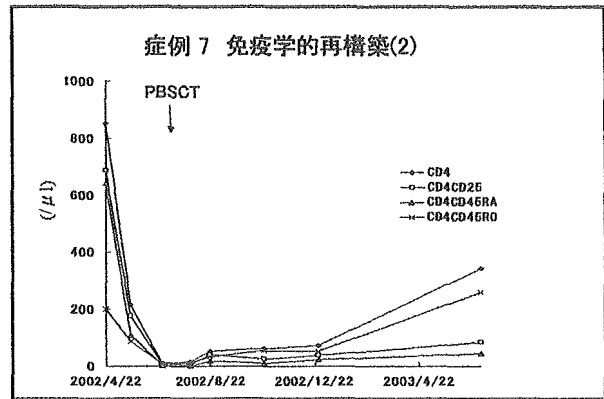
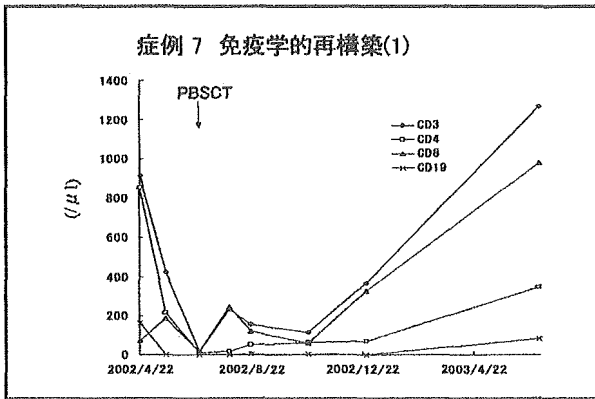
CMV: サイトメガロウイルス ADV: アデノウイルス



症例 7 Amyopathic Dermatomyositis(ADM)

進行性治療抵抗性のIPあり

症例 7		移植前
年齢/性	54/F	
合併症	IP	
輸注 CD34+ 細胞数	4.9x10 ⁶ /kg	
好中球>500/ml	Day 8	
血小板>5x10 ⁴ /ml	Day 10	
ANA(titer)	(-)	
PaO ₂ (mmHg)	86.2→93	
KL-6(U/ml)	3769→940	
移植後合併症	CMV抗原血症 リステリア敗血症	
観察期間	22ヶ月	

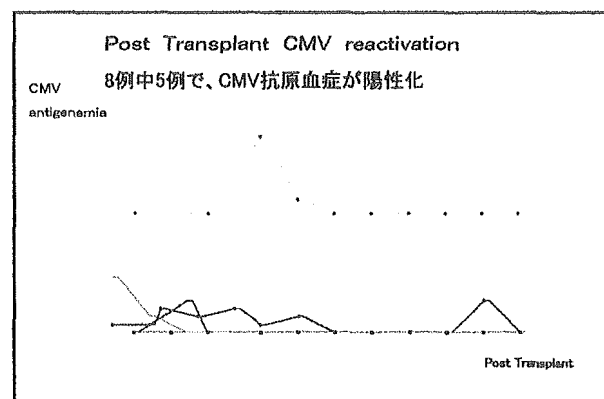


CD34 positive selection

年齢(歳)	49.4 ± 11.9
男女	2:6
Mobilization	CY+G-CSF
Apheresis装置	Cobe Spetra
Apheresis回数	1.88 ± 0.99
処理血液量(ml)	22251 ± 10768
総細胞数(前, ×10 ⁵)	32.8 ± 27.1
CD34陽性率(%)	2.59 ± 2.20
CD34+ selection装置	CliniMACS
総細胞数(後, ×10 ⁵)	35.8 ± 28.3 (6.87 ± 6.02 × 10 ⁵ /kg)
CD34+細胞数(×10 ⁵)	34.4 ± 26.5 (6.72 ± 6.08 × 10 ⁵ /kg)
CD3+細胞数(×10 ⁵)	6.37 ± 6.05 (1.17 ± 1.18 × 10 ⁵ /kg)
CD34+純度(%)	95.0 ± 6.0
CD34+回収率(%)	74.7 ± 17.5

mean ± SD

- ### 結果
- ・ 難治性自己免疫性疾患8例に対して
 - ・ 自己末梢血純化CD34陽性細胞移植を施行した
 - ・ PBSC動員および移植に使用する大量CYは、
 - ・ 原疾患に対して有効と考えられた
 - ・ ClinMACSによるCD34+細胞分離は、良好な回収率と極めて良好な純度を得た
 - ・ 移植後と種々の日和見感染症が発症した



Cidofovir (CDV) for the treatment of ADV Hemorrhagic Cystitis

week	1							2							3							4																												
day	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7													
CDV 1mg/kg /day	1	1	1					1	1	1					1	1	1								1	1	1											1	1	1										
PSS case 1																																																		
Clots																																																		
macroscopic																																																		
microscopic																																																		
occult blood																																																		
PSS Case 2																																																		
Clots																																																		
macroscopic																																																		
microscopic																																																		
occult blood (-)																																																		

「マイナー抗原を標的とした養子免疫療法の準備状況」

愛知県がんセンター研究所・腫瘍免疫学部 赤塚美樹 (yakatsuk@aichi-cc.jp)

1. マイナー抗原特異的 CTL を用いた養子免疫療法

同種移植後の GVHD と GVL 効果を引き出すには、レシピエントの抗原提示細胞が必要であり、GVL 効果のみを有効に引き出すためには抗原提示細胞が造血細胞に特異的に発現するマイナー抗原を提示する必要がある。これまでに我々は HLA-A*2402 および B44 によって提示される造血細胞特異的なマイナー抗原遺伝子 (*BCL2A1*) の同定とエピトープ (ACC-1、ACC-2) の決定と、その不適合が臨床に及ぼす成績について報告してきた。これに HA-1 を標的抗原として加え、CTL を誘導し、養子免疫療法を行う臨床試験を開始しているが、現在までに照会のあった患者・ドナーペア 5 組は全てこれらのマイナー抗原の不適合がなかった。

Fred Hutchinson 癌研究所で行われている方法(すなわちマイナー抗原は特定せず、造血系細胞のみを傷害する CTL を選別し体外増幅して再発時に投与する)と同様な方法が本年 3 月に当センターの倫理委員会にて承認されたため、ほぼ完成した細胞プロセッシングシステムの整備が終了次第、症例のリクルートを開始する。

2. 細胞プロセッシングシステムの整備

平成 16 年 6 月に愛知県がんセンター研究所の臨床研究室内にクラス 10,000 の培養室 1 室よりなる細胞プロセッシングシステム (モニター室を除く総面積 48m²) が竣工した。現在モニタリング関係の最終整備段階にある。ただし培養室が 1 室しかないため、単一の臨床研究のみを実施するが、最大 4 人の患者に対して CTL が相互汚染無く培養できるようなシステムとする予定である。

現在、基準書・手順書・記録書等の整備を進めつつあり、まず愛知県がんセンター内の施設基準として、本養子免疫療法の安全性の面からの倫理性を担保するための努力を行っている。

現状では CTL の樹立には限界希釈法によるクローニングが必須であり、完全閉鎖系でのプロセッシングは不可能である。そこでクローン樹立後からはバッグを用いた閉鎖培養系を用いるシステムを開発中である。予備的な試験のデータからは、従来のフラスコ法とほぼ同様な増幅率が得られることが分かってきた。また CTL をフィーダー細胞なしで培養することは現状では困難であるので、移植ドナーもしくは本人の細胞を用いて自家の系で実施するが、将来的には無血清培地の開発、人工抗原提示細胞の利用等も考慮する。

なお、対象はハイリスク造血器腫瘍の移植後再発であるが、再発率は 20~40% の範囲であるので、年間 15~25 例より CTL を準備し、数例に対して CTL の投与を実施できるものと試算される。

厚生科学研究、ヒトゲノム・再生医療等研究事業「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制の確立に関する研究」班（班長小寺良尚）

分担研究者塩原信太郎（金沢大学附属病院輸血部）平成 15 年 6 月 19 日

GVL 効果を惹起する mHa の研究-接着多型分子と HA-1 分子の重要性-

【はじめに】マイナー組織適合抗原（以下 mHa と略す）は HLA 以外の同種多型性を示す組織適合抗原で、HLA 適合ドナーからの移植例において生体内で同種免疫反応を惹起する抗原系の総称である。HLA 適合の移植例で mHa が抗白血病効果に関与しているとすると再発率について不適合と適合例で差異があると考えられる。HLA のクラス 1 分子は抗原ペプチドの選択的受容パターンから 4 種類の super family（以下 SF と略す）に大別できるので、アレルレベルで不適合と適合例の再発率を検討し、その後それぞれの SF 毎に 5 種類の同種多型分子の不適合群と適合群の再発率を解析した。

【対象】対象は全例骨髄破壊的な前処置を受けた後、HLA 適合ドナーから造血細胞移植を受けた患者で DNA による組織適合検査について口頭か文章で説明を受け、承諾の得られた 107 例である。内訳は血縁者移植例（R）61 例と非血縁者（UR）46 例、骨髄移植（BMT）は 89 例、末梢血幹細胞移植（PBSCT）14 例、移植時の病期は再発のスタンダードリスク 63 例、ハイリス 43 例である。移植後合併症は急性 GVHD 37 例、慢性 GVHD 54 例、再発 31 例であった。再発の有無は全例最低 2 年以上経過観察した後判定した。

【方法】佐治・丸屋らの方法に準じ、爪と末梢単核球から DNA を抽出し、それぞれを宿主由来、ドナー由来とした。PCR-RFLP 法で 5 種類の mHa を検査し多型性を同定した。解析はそれぞれの mHa 毎に GVH 方向の不一致（incompatible=IC）と一致（compatible=C）とを決定し、前者を不適合群、それ以外を適合群とし再発率を比較した。次いで症例を HLA クラス 1 抗原の SF 毎に分類し、それぞれの mHa ごとに不適合群と適合群の再発率を比較し HLA の拘束性を解析した。【結果】（1）検査で決定できる 5 種類の同種多型分子のアレル不適合は HA-1 は 32 例（32%）、

CD31exon3は32例(31%)、CD31exon8は32例(33%)、CD62Lは32例(31%)、CD49bは31例(30%)であった。(2)それぞれの同種多型分子のアレル不適合群と適合群の再発率はHA-1は16% vs 37% ($P=0.03$)、CD31は33% vs 30%、CD62Lは24% vs 34%、CD49bは14% vs 32% ($P=0.12$)でHA-1以外の接着多型分子のアレル不適合はいずれも有意な差は認めなかった。(3)クラス1分子のSF毎に細分類し、不適合群と適合群の再発率を比較しHLAの拘束性を決定したところ、不適合分子数と再発率低下は有意な関係が有り、不適合のない例の再発率は39%であったが1分子不適合は24%、2分子不適合は11%、3分子不適合は0%であった。(臨床血液学会誌印刷中)

(4)HA-1はスタンダードリスク群とハイリスク群に分けて解析した。スタンダードリスク群のHA-1不適合例の再発率は0%、適合例の再発率は44.7% ($P=0.003$)であった。Kaplan-Meier法によるHA-1不適合例の10年予測推定無病生存率は100%であったが適合例の10年推定無病生存率は48% ($P=0.01$)であった。(5)HA-1ペプチドのサブタイプのHLA結合性をin siliconで検討したところRとHを含むHA-1サブタイプはHLA*0201以外にB*4402, B2705, B8, A3と強固にA-24, B*2709, B*1510と中等度に結合することが推定された。【考察】本臨床データの後視的解析からHA-1不適合はスタンダードリスク群のGVLに最も関与することが確認された。興味深いことにこれまでの報告と異なりHLA-A*0201以外の症例でも再発が認められなかった。最近HA-1はB60にも結合することが報告されているので同じcomputer-softを用いて結合力を研究したところHLA-A*0201以外のHLAにも結合することが推定された。推定された結合が実際に出現するか又これらのHA-1サブタイプのImmunodominancyについて今後研究が必要であろう。新しい仮説がさらに確実なものか各施設の症例を集計させていただけると有り難いと考えている。(御協力をお願い致します。)MHaの臨床的な有用性として、再発しにくさを推定できることが予測される。複数いるドナーの中で、より相応しいドナー選択や再発した場合の免疫療法の標的抗原の一つとなるであろう。HLA適合の健常人ドナーからのDLIも可能になるであろう。

【参考文献】1)左藤英洋他、輸血学会誌49:749、2003 2)塩原信太郎他、臨床血液学会誌 印刷中、3) Mommaas et al, JI,169:3131, 2002

平成 16 年度厚生労働科学研究 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と臨床試験体制
の確立に関する研究」班 第一回会議

MHCテトラマーによるウイルス特異的細胞障害性T細胞 (CTL) のモニタリングの有用性と治療への応用

名古屋大学小児科

谷ヶ崎 博、工藤 寿子、小島 勢二

背景

ATGを含む前治療を用いた同種骨髄移植患者では、移植後 1-2 カ月目におこるCMV、EBVなどウイルスの再活性化が大きな課題となっている。Real time PCRなどにより攻撃側因子の評価法は確立されている。一方、防御能の評価法として、MHCテトラマー/ウイルスペプチド複合体を用いてウイルス特異的CTLをFACSで検出する方法が開発されており、治療への応用も期待されている。

前回の会議で我々は以下のように報告した。

- 1 HLA A-24 拘束性 EBV ペプチドを認識するテトラマーを用いて、患者(HLA A-24) 15 検体中 4 検体で EBV 特異的 CTL を検出した。
- 2 明らかな BLPD を発症した患者において 特異的CTLの経時的変化は、臨床症状およびEBV genome copy 数の変化とよく一致していた。
- 3 5 種類のテトラマーを用いての検討では、BRLF、BMLF、EBNA3Aに対する抗体の有用性が確認できた。
- 4 患者によりモニタリングに適した抗体は異なる可能性があり、複数の抗体を組み合わせる必要があるかもしれない。

現在の研究状況と課題

- ・ テトラマーによりCTLを検出できる感度が大きく異なることが判明した。
- ・ 移植後にCMV、EBV感染症を発症した場合でも特異的CTLが検出されると予後はよいことが確認できた。従って、CTLが検出されない患者においてin vitroでCTLを誘導、増幅する方法を検討している。
- ・ 移植後の免疫能の再構築にレシピエント由来のCTLが何らかの役割を果たしている可能性がある。従って、ウイルス特異的CTLの由来を明らかにするため、キメラリズム解析を進めている。また、TCR repertoireの解析により、特異的CTLの特徴を明らかにする予定である。

展望

現在、good manufacturing practice (GMP) 基準に従って CMV、EBV 特異的 CTL を in vitro で誘導・増幅させ、臨床応用するプロトコールを作成中である。

造血幹細胞移植後の難治性CMV感染症、 アデノウイルス感染症に対する ドナーCD4T細胞輸注療法プロトコル(案)

神戸先端医療センター再生医療研究部
伊藤仁也

東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センター
清水則夫、森尾友宏

血縁間造血幹細胞移植後難治性CMV感染症 に対するドナー活性化CD4T細胞輸注療法 に関する臨床第I-II相試験実施計画書

CMV感染症に対する 新規治療法開発の必要性

CMV感染症は同種造血幹細胞移植後もっとも頻度の高い疾患で、肺炎、肝炎、腸炎、脳炎、髄膜炎、網膜炎などを引き起こす。

1994年のSableらの報告では肺炎を起こした患者の死亡率は80-90%で、CMV感染症自体の死亡率は15-20%とされている。

Gancyclovirを長期間使用した患者の20%程度が薬剤抵抗性CMVであると報告されている(Blood, 2001)。

今までの治療成績 (移植後CMV感染症)

Number of Transfusion :
1 - 35 (1, 1, 1, 3, 6, 6, 10, 17, 35)

Number of T cells transfused:
 $5 \times 10^5 \sim 4.2 \times 10^7 / \text{kg}$ ($1 \times 10^7 / \text{kg}$)

CD4+ T cells: 9 cases
CD4+ T / CD8+ T cells: 1 case

Effective (undetectable CMV, decreased CMV antigenemia, or clinical improvement): 7/10

治療の流れ



2週間以上の良捗で寛息し、ドナー型抗原陽性。
4週間投与後寛息で寛息であれば、治療を開始する。

実施期間：
平成16年 月 日から平成17年3月31日

1) 目的:
造血幹細胞移植後の難治性(薬剤抵抗性)CMV感染症に対する治療としてのドナーCD4T細胞輸注療法の効果、安全性を評価する。
Primary endpointは治療終了2週後のリアルタイムPCRにおけるCMVの消失、Secondary endpointはCMV感染症臨床症状・所見の改善、副作用、治療終了4週・8週後のCMVコピー数とする。

2) 対象:
血縁者間造血幹細胞移植後の難治性(薬剤抵抗性)CMV感染症患者

今回の臨床研究では全症例の30%がCMVコピー数0となることを目標としている。造血幹細胞移植患者のうち10%がCMV感染症に罹患し、CMV感染症のうち約20-40%が薬剤抵抗性と試算すると、最低200の移植症例が必要となる。

造血幹細胞移植後CMV感染症

以下の3つの要件を満たすもの

- 1) CMVアンチゲネミアが10/50,000細胞以上および、あるいはCMVコピー数が3,000コピー/ml全血以上
- 2) 肺炎、胃腸炎、網膜炎、脳炎、あるいは肝炎の症状所見を呈するか、あるいは3日以上持続する発熱がある。
- 3) 2)の症状がCMV以外の病原体による感染症によることが否定的である。

適格基準

- ・血縁者間造血幹細胞移植後のCMV感染症*で:
 - (1)肺炎、胃腸炎、網膜炎、脳炎、あるいは肝炎の症状・所見を有し、PCRおよび・あるいはCMVアンチゲネミア(p65)でCMVが検出されるもの、あるいは
 - (2)持続する発熱があり、PCRあるいはCMVアンチゲネミア(p65)でCMVが検出され、その他の病原体による感染症が否定的であるもの
- ・上記感染症に対しDHPG (Gancyclovir)及び・またはFoscarnetにて4週間治療した時点で
 - (1)CMVコピー数が3,000コピー/ml全血以上
 - (2)CMV抗原血症が10 /50,000細胞以上、かつCMVコピー数が測定限界以上

ただし細胞調製に約2週間要するためDHPG及び・またはFoscarnetにて2週間治療し上記の基準を満たした時点でエントリーする。

前治療、合併疾患、併用療法の概要

・DHPG (Gancyclovir)及び・またはFoscarnetにてすでに24週間以上加療を受けている症例は対象外とする。

・CMV感染症以外の重篤なあるいはコントロール不能なウイルス感染症に罹患していないこと

・CMVに対する抗ウイルス剤(DHPG及び・あるいはFoscarnet)の継続使用を前提とする。登録時以降はCMVに対する新たな薬剤の追加は行わない。Cidofovirの使用も行わない。

・免疫抑制剤を使用している場合は可能な限り投与までに減量する。副腎皮質ステロイドは中止されていること。

登録前評価項目

- 1) 全身状態:PS (ECOG)、体重
- 2) 末梢血血算:白血球数、白血球分画、ヘモグロビン、血小板
- 3) 血液生化学:総蛋白、アルブミン、BUN、クレアチニン、Na、K、Cl、Ca、P、AST、ALT、LDH、 γ -GTP、T-bil、CRP、KL-6
- 4) 血液凝固検査:PT、APTT、Fibrinogen、FDP、D-dimer
- 5) 尿検査:タンパク、糖、潜血、ウロビリノーゲン、沈渣
- 6) 24時間クレアチンクリアランス (CCr)
- 7) ウイルス学的検査:CMVウイルスリアルタイムPCR、CMVアンチゲネミア(可能であればSRLに依頼する)
- 8) 免疫学的検査:免疫グロブリン(IgG、IgM、IgA、IgE)、リンパ球表面抗原分析(CD3、CD4、CD8、CD19 or CD20、CD16 or CD56)
- 9) 動脈血ガス:PaO₂、PaCO₂
- 10) 胸部X線写真(2方向)
- 11) 呼吸機能検査:%VC、FEV1
- 12) 安静時12誘導心電図
- 13) 超音波心臓検査
- 14) 眼底所見(写真裏)
- 15) その他、感染症の部位により、大腸内視鏡検査、脳MRI検査、髄液検査などを追加して行う。

登録決定後検査(治療前特殊検査)

- 1) 免疫学的検査
 - ① CD4、CD8分画4-color analysis (TMDU)
 - ② ナチュラルキラー(NK)活性 (SRL)
 - ③ 抗CMV抗体:抗CMV IgM (ELISA法) (SRL)
 - ④ 非球化反応 (PHA、ConA) (SRL)
 - ⑤ CMV specific killer細胞tetramer解析 (SRL)
 - ⑥ 血清保存
 - ⑦ 細胞保存
- 2) ウイルス学的検査
 - ① CMVリアルタイムPCR (TMDU)
 - ② 網羅的微生物検査:HSV1、HSV2、VZV、EBV、CMV、HHV8、HHV7、HHV8、ParvovirusB19、BK virus、Adenovirus、JC virus、HSV、HCV、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2 (TMDU)
- 3) ウイルス分離・培養・同定(各施設)

登録時までに分離・同定を試みる(咽頭、喀痰、尿など)。分離を行った施設に必ず保存を依頼する。分離された株については高解離抗体検査(U97、UL54領域)の遺伝子変異検索、分離CMVに対するDHPG、FCVのID50を行う予定である。
- 4) 任意検査
 - ① CMV(シエルバイアル同定:SRL)一任意検査一
 - ② ウイルスの病理組織における同定(各施設)

3) 治療方法:

ドナーの全血から調製したCD4陽性細胞(5 x 10⁶/kg)を2週間隔で2回使用する。投与終了後2週間後に効果判定を行う。

4) 主たる評価項目と方法:

治療後のCMVリアルタイムPCR定量、CMV抗原(アンチゲネミア)、臨床症状、臨床所見

5) 予定登録者数:

10症例

プライマリーエンドポイント
 治療終了2週後のCMVコピー数が0になったものを有効とする。
 治療終了2週後のCMVコピー数が1/100以下になったが検出できるものを有効とする。

セカンダリーエンドポイント
 治療終了4週後、8週後のCMVコピー数
 治療終了後2週後のCMVアンチゲネミアの消失
 CMV感染症の臨床症状の改善

CMV肺炎
 A: 低酸素血症の改善
 B: X線所見の改善
 C: KL-6値の改善

CMV網膜炎
 A: 眼底所見の改善
 B: 視力の改善

CMV脳炎
 A: 意識レベルの改善
 B: 髄液細胞数、生化学検査所見の改善
 C: CT, MRIにおける画像上の改善

CMV腸炎
 A: 下痢の頻度及び・あるいは量の低下
 B: 血便の消失
 C: 内視鏡所見の改善

CMV肝炎
 A: 腫瘍超音波検査での改善
 B: 肝機能検査(AST, ALT, ビリルビンなど)の改善
 など

治療の副作用

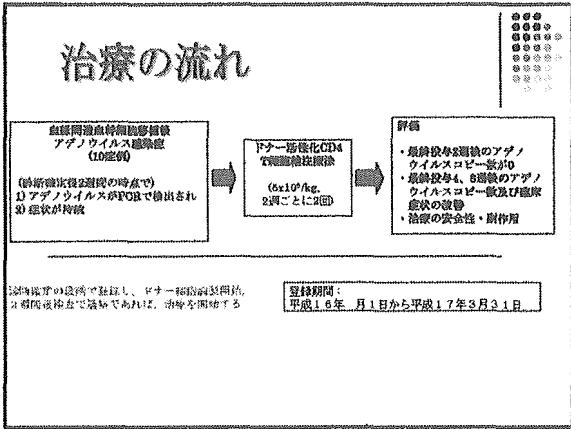
血縁間造血幹細胞移植後難治性ADV感染症 に対するドナー活性化CD4T細胞輸注療法 に関する臨床第I-II相試験実施計画書

アデノウイルス感染症に対する 新規治療法開発の必要性

アデノウイルス感染症は同種造血幹細胞移植後3~12%に認められる感染症で、罹患した場合の死亡率は26%程度と報告されている(La Rosa et al. Clin. Infect. Dis, 2001, Hale et al. Bone Marrow Transplant. 1999, Howard et al. Clin Infect Dis, 1999)。抗ウイルス薬としてRibavirinやCidofovirが用いられるが、その有効性は確立していない。

今までの治療成績 (移植後ADV感染症)

Disease	Transplantation	Number of the cells transfused	Effect	Side effect
1. AML	R-BMT(6/6)	5x10 ⁶ /kg	Adeno(+)->(-)	
2. ML	PBSCT(4/6)	5x10 ⁶ /kg	Adeno(+)->(-)	SIRS
3. T-ALL	URBMT(6/6)	1x10 ⁷ /kg	Macrohematuria(-)	
4. ALL	PBSCT(4/6)	1x10 ⁶ /kg, 10 ⁶ /kg	Adeno ↓ Hematuria ↓ (not eliminated)	



1) 目的:
 造血幹細胞移植後のアデノウイルス感染症に対する治療としてのドナーCD4T細胞輸注療法の効果、安全性を評価する。
 Primary endpointは治療終了2週後のリアルタイムPCRにおけるアデノウイルスの消失、Secondary endpointはアデノウイルス感染症臨床症状・所見の改善、治療終了4週・8週後のアデノウイルスコピー数、副作用とする。

2) 対象:
 血縁間造血幹細胞移植後のアデノウイルス感染症患者

対象疾患に対しての標準治療はないが、経口のRibavirin、あるいは静注薬のCidofovirが用いられることがある。移植後のアデノウイルス感染症では、症状の持続期間は、上気道炎で8日、肺炎で21日、腸炎で23日、出血性膀胱炎で26日、肺炎を合併しない全身感染症で40日、肺炎を合併する全身感染症で60日とされている。今回の治療計画では診断後細胞を調製し始め、細胞が調製できた2週間の時点から輸注を開始し、速やかなウイルスの消失と症状の改善を目指している。

今回の治療研究では症例では、全症例の30%がアデノウイルスウイルスコピー数0となることを目標としている。造血幹細胞移植患者のうち5%がアデノウイルス感染症に罹患すると試算すると、最低200の移植症例が必要となる。

造血幹細胞移植後のアデノウイルス感染症

以下の3つの要件を満たすもの

- 1) アデノウイルスウイルスが咽頭、血液、尿、髄液あるいは糞便を材料としたPCRで陽性。
- 2) 肺炎、腸炎、肝炎、膀胱炎の症状・所見を呈する。
- 3) 2)の症状がアデノウイルス以外の病原体による感染症によることが否定的である。

1)~3)に加えてアデノウイルスウイルスが咽頭、尿、糞便、髄液からのウイルス分離・培養、シェルバイアル法にて検出されることが望ましい。糞便からのアデノウイルス抗原検出も腸炎の補助的診断になる。
結核めぐり液のみからのアデノウイルスウイルス検出(精液)は対象としない。

適格基準

- ・血縁者間造血幹細胞移植後のアデノウイルス感染症*で:
- ・上記感染症に対し診断後2週間経過した時点で

- (1)アデノウイルスがPCR法で検量線範囲内に検出され、かつ
- (2)アデノウイルス感染症の症状・所見が存在する

細胞調製に約2週間要するためアデノウイルス感染症と診断された時点で登録を行なう。

前治療、合併疾患、併用療法の概要

- ・アデノウイルス感染症以外の重篤なあるいはコントロール不能なウイルス感染症に罹患していないこと
- ・出血性膀胱炎においてはBKウイルスが 10^3 copy/ml以上のレベルで検出されないこと。
- ・登録時以降はアデノウイルスに対する新たな薬剤の追加は行わない。
- ・免疫抑制剤を使用している場合は可能な限り投与までに減量する。副腎皮質ステロイドは中止されていること。

登録前評価項目

- 1) 全身状態:PS (ECOG)、体重
- 2) 末梢血象:白血球数、白血球分画、ヘモグロビン、血小板
- 3) 血液生化学:総蛋白、アルブミン、BUN、クレアチニン、Na、K、Cl、Ca、P、AST、ALT、LDH、 γ -GTP、T-bil、CRP、Kl-6
- 4) 血液凝固検査:PT、APTT、Fibrinogen、FDP、D-dimer
- 5) 尿検査:タンパク、糖、潜血、ウロビリノーゲン、沈渣
- 6) 24時間クレアチニンクリアランス (CCr)
- 7) ウイルス学的検査:アデノウイルスリアルタイムPCR(可能であればSRLに依頼)、アデノウイルス抗原(アデノチェックなど)、アデノウイルスシェルバイアル法同定
- 8) 免疫学的検査:免疫グロブリン(IgG、IgM、IgA、IgE)、リンパ球表面抗原分析(CD3、CD4、CD8、CD19 or CD20、CD16 or CD56)
- 9) 動脈血液ガス: PaO₂、PaCO₂
- 10) 胸部X線写真(2方向)
- 11) 呼吸機能検査: %VC、FEV1
- 12) 安静時12誘導心電図
- 13) 超音波心臓検査
- 14) その他、感染症の部位により、大腸内視鏡検査、脳MRI検査、髄液検査などを追加して行う。

登録決定後検査(治療前特殊検査)

- 1) 免疫学的検査
 - ① CD4、CD8分画4-color analysis (TMDU)
 - ② ナチュラルキラー (NK)活性 (SRL)
 - ③ 抗ADV抗体:抗ADV IgM (ELISA法) (SRL)
 - ④ 芽球化反応 (PHA, ConA) (SRL)
 - ⑤ 血清保存
 - ⑥ 細胞保存
- 2) ウイルス学的検査
 - ① アデノウイルスリアルタイムPCR (TMDU)
 - ② 網羅的微生物検査 :HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, ParvovirusB19, BK virus, Adenovirus, JC virus, HBV, HCV, HIV1, HIV2, HTLV1, HTLV2 (TMDU)
- 3) ウイルス分離・培養・同定(各施設)

登録時まで(に分離・同定を試みる(咽頭、喀痰、尿など)。分離を行った施設に必ず保存を依頼する。
- 4) 任意検査
 - ① ADV(シェルバイアル同定:SRL)一任室検査一
 - ② ウイルスの病理組織における同定(各施設)

3) 治療方法:
ドナーの全血から調製したCD4陽性細胞 ($5 \times 10^6/kg$) を2週
間隔で2回使用する。投与終了後2週間後に効果判定を行う。

4) 主たる評価項目と方法:
治療後のアデノウイルスリアルタイムPCR定量、
アデノウイルス抗原、臨床症状、臨床所見

5) 予定登録者数:
10症例

プライマリーエンドポイント
治療終了2週後のアデノウイルスコピー数が0になったものを有効とする。
治療終了2週後のアデノウイルスコピー数が1/100以下になったものを有効とする。

セカンダリーエンドポイント
治療終了4週後、8週後のアデノウイルスコピー数
治療終了後2週後のアデノウイルス抗原の消失
アデノウイルス感染症の臨床症状の改善

ADV肺炎 A: 低酸素血症の改善
B: X線所見の改善
C: KL-6値の改善

ADV膀胱炎 A: 血尿、核酸所見の改善
B: 疼痛の軽減

ADV腸炎 A: 下痢の頻度及びあるいは量の低下
B: 血便の消失
C: 内視鏡所見の改善

ADV肝炎 A: 腹部超音波検査での改善
B: 肝機能検査 (AST, ALT, ビリルビンなど) の改善

ADV全身感染症 A: 解熱
B: CRPの低下 など

治療の副作用
ADV抗体価 (ELISA IgM) は臨床症状における有効性が明確でない場合に参考項目とする。

非血縁者間造血幹細胞移植後の
難治性CMV感染症に対する
ドナー活性化CD4T細胞輸注療法

非血縁者間造血幹細胞移植後の
アデノウイルス感染症に対する
ドナー活性化CD4T細胞輸注療法

研究代表者
小寺良尚
名古屋第一赤十字病院 第四内科、骨髄移植センター
〒463-8511 名古屋市中村区道下町3-35
TEL: 052-483-5111
FAX: 052-483-3647
E-mail: ykoder@mb.kcom.ne.jp

研究事務局
森尾友宏
東京医科歯科大学医学部附属病院小児科
〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45
TEL: 03-5803-4583
FAX: 03-5803-4583
E-mail: cpc.ped@tmd.ac.jp

厚生労働科学研究ヒトゲノム・再生医療等研究事業
「骨髄等を利用した効率的な造血幹細胞移植の運用・登録と
臨床試験体制の確立に関する研究」班 主任研究者 小寺良尚
平成16年度第一回研究会議 6月19日

抑制性NK細胞受容体発現T細胞の GVHD/GVL制御への応用

北海道大学大学院医学研究科血液内科学分野
今村雅寛、田中淳司

Hematology & Oncology, Hokkaido University

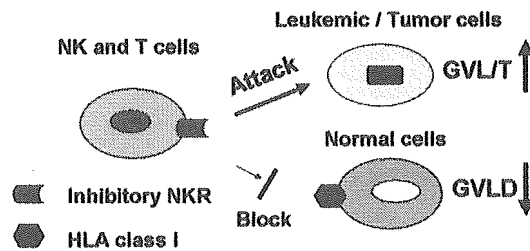
はじめに

抑制性NKレセプター陽性細胞の細胞障害特異性は自己のMHC class I分子の発現が減弱ないしは消失している白血病細胞などの腫瘍細胞を破壊するという GVL/T増強効果と自己のMHC class I分子を発現している正常細胞や組織の障害を抑制するGVHD抑制効果の両者を同時に発揮する可能性を有する。

我々は、抑制性NKレセプター (CD94/NKG2A) 発現細胞を健康人ドナーG-CSF動員末梢血幹細胞 (G-CSF mobilized peripheral blood mononuclear cells, G-PBMC)より増幅しその細胞障害特異性について検討したので報告する。

Hematology & Oncology, Hokkaido University

Inhibitory NKR



Hematology & Oncology, Hokkaido University

抑制性 NK細胞受容体- CD94/NKG2A-

* CD94/NKG2A のリガンドは HLA-Eである。
HLA-Eはほとんどの HLA-class I のsignal sequences と共に発現する。

* CD94/NKG2A は広く様々な HLA class I 分子の発現を監視することができる。

* 従ってCD94/NKG2A 発現細胞は様々な HLA class I を持った移植患者の GVHD / GVL 制御に関与している可能性がある。

Hematology & Oncology, Hokkaido University

Proportion of CD94/NKG2A-expressing cells in paired Pre-G and G-PBMC before and after stimulation by anti-CD3 monoclonal antibody

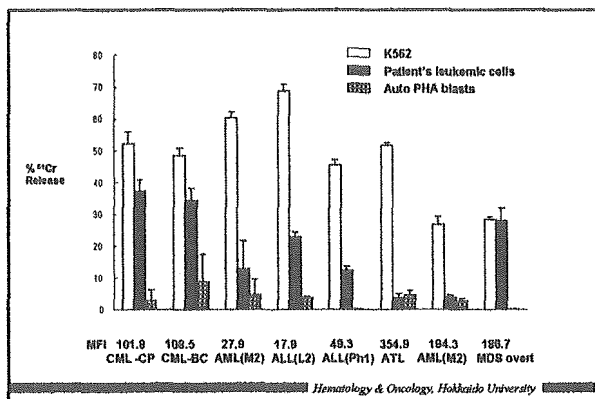
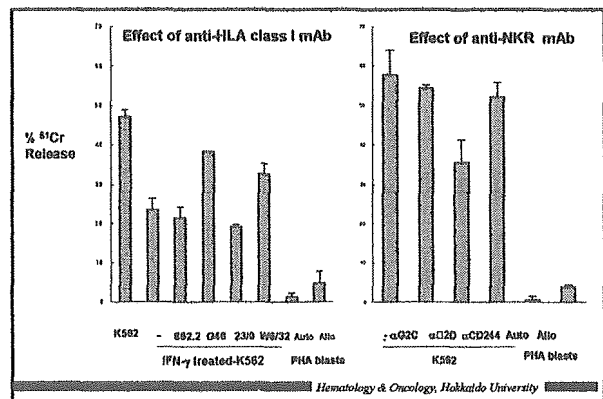
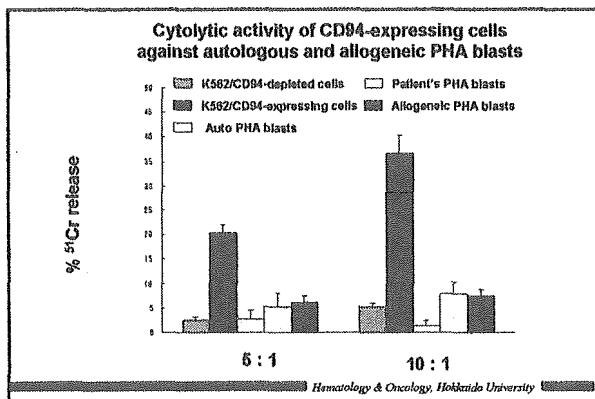
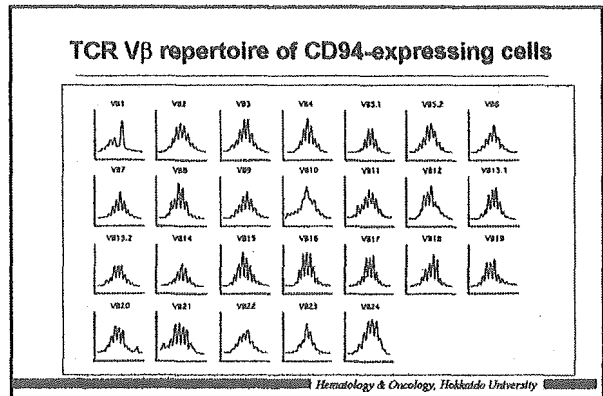
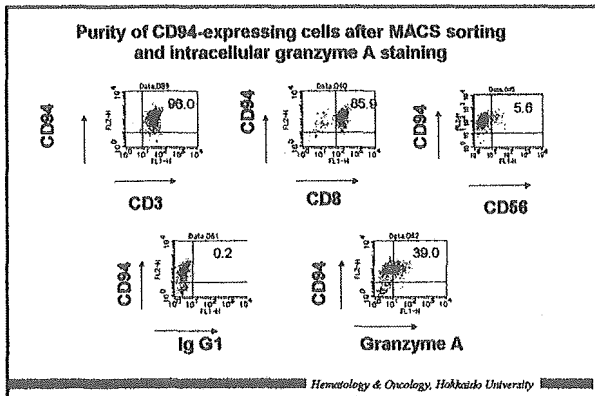
Surface marker	Before		After stimulation		Addition of IL-15	
	Pre-G	G-PBMC	Pre-G	G-PBMC	Pre-G	G-PBMC
CD94+/CD3+	5.8 ± 3.2	4.4 ± 2.1	9.7 ± 4.3	19.6 ± 9.3	29.2 ± 4.5	35.5 ± 8.0
CD94+/CD8+	2.1 ± 0.7	2.8 ± 1.1	8.7 ± 4.0	17.6 ± 8.7	22.9 ± 5.5	26.6 ± 4.4
NKG2A+/CD3+	1.9 ± 1.7	1.9 ± 0.8	3.0 ± 2.0	7.5 ± 5.3	14.1 ± 6.1	20.0 ± 6.0
NKG2A+/CD8+	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.5	2.2 ± 1.2	6.1 ± 4.8	10.5 ± 3.1	16.1 ± 5.9

Hematology & Oncology, Hokkaido University

Expansion of CD94/NKG2A-expressing cells from paired Pre-G and G-PBMC

Surface marker	Before		After stimulation	
	Pre-G	G-PBMC	Pre-G	G-PBMC
CD94+/CD3+	0.046 ± 0.026	0.041 ± 0.012	2.87 ± 1.39	5.51 ± 2.62 ^b
			(x59.9)	(x134.4)
CD94+/CD8+	0.020 ± 0.007	0.010 ± 0.004	2.63 ± 1.26	5.20 ± 2.36 ^a
			(x131.5)	(x620.0)
NKG2A+/CD3+	0.021 ± 0.012	0.019 ± 0.010	2.09 ± 1.10	4.20 ± 2.44 ^b
			(x98.6)	(x233.3)
NKG2A+/CD8+	0.0052 ± 0.0036	0.0038 ± 0.0012	1.90 ± 1.02	3.98 ± 2.21 ^b
			(x365.4)	(x1195.6)

Hematology & Oncology, Hokkaido University



まとめ

- * G-PBMCよりCD94発現細胞を100倍以上に増幅することができた。
- * この細胞はCD3,CD8,CD94,NKG2A,NKG2D陽性でかつCD56,CD158, CD161陰性であった。
- * 細胞障害活性はHLA class IIによって抑制され、一方でNKG2Dに依存していた。
- * K562だけではなく患者由来の白血病細胞を障害することができた。

Hematology & Oncology, Hokkaido University

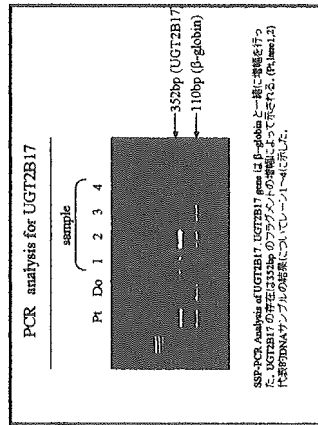
Introduction: hypothesis #1
 マイナー抗原 UGT2B17
 ・HLA-A*29.1 に発現されるマイナー抗原 AELLNIPPLY
 ・GVHD関連マイナー抗原
 ・抗原抗体 UGT2B17 運送子の欠損により、ドナー-レシピエント間で UGT2B17 タンパクの発現に差が生じる
 広範囲に渡る運送子欠損
 ⇒ HLA-A*29 以外の HLA 上に提示される抗原ペプチドが存在する可能性がある
 Hypothesis #1
 ドナー-レシピエント間で UGT2B17 の GVHD 方向のミスマッチがあると、GVHD の発症率が異なるのではないか

Introduction: hypothesis #2
 代謝酵素 UGT2B17
 ・アンドロゲン代謝において最も重要な代謝酵素のひとつ
 ・薬理・環境由来の薬物・食品由来の物質など生体分子の代謝にかかわる
 Hypothesis #2
 酵素が欠損することによって移植関連合併症の発症率や生存率などに影響を与えないだろうか

目的
 同種骨髄移植受者またはドナーにおける UGT2B17 運送子のホモヘミタイプと、GVHD 発症率、再発率、移植関連死亡、生存率などとの相関を検証する

解析対象患者: UR-BMT (運送子型別 HLA-A, B, C, DRB1 - 一致)

Number (male/female)	415 (240/75)
Median age, y (range)	24 (0-51)
Median follow up, month (range)	45 (0-111)
Status of malignant disease	
Standard	180
Advanced	203
Unknown	6
Preconditioning regimen	
Non-TBI-containing	333
Non-TBI-containing	82
GVHD prophylaxis	
CSA + aMTX (+ATG)	336 (46)
Tacrolimus + aMTX (+ATG)	32 (1)



統計学的解析
 22 検定
 カプランマイヤー法、log rank test により検定
 Cox 比例ハザードモデルにより多変量解析
 P values < 0.05 を有意として
 0.05-0.1 を傾向ありとした。

日本人における UGT2B17 欠損頻度

患者	338 / 415 (81.4%)	0.17
血液悪性疾患	319 / 389 (82.0%)	0.25
AML	92 / 107 (86.0%)	0.81
ALL	90 / 110 (81.8%)	0.41
CML	83 / 109 (76.1%)	0.028
MDS	26 / 29 (89.7%)	0.68
HD	11 / 13 (84.6%)	0.72
NHL	17 / 21 (81.0%)	0.84
SAAR	13 / 18 (72.2%)	0.178
ドナー	341 / 401 (85.0%)	-

*P values, 各グループとドナーとの間で比較

急性GVHDに対するリスク因子 単変量解析

Variables	Acute GVHD-H		Acute GVHD>H	
	RR	CI	RR	CI
Higher recipient age	1.00	[0.99-1.03] N.S.	1.01	[0.99-1.03] N.S.
Female recipient	0.94	[0.66-1.33] N.S.	0.91	[0.66-1.27] N.S.
Female donor	0.87	[0.66-1.13] N.S.	0.82	[0.42-1.59] N.S.
Female donor/female recipient	0.81	[0.55-1.15] N.S.	1.08	[0.50-2.19] N.S.
Advanced disease	1.37	[0.95-1.97] 0.09	0.90	[0.48-1.70] N.S.
TBI recipient	1.16	[0.72-1.90] N.S.	1.37	[0.54-3.51] N.S.
CyA-aMTX	2.75	[1.12-6.71] 0.03	4.29	[0.58-30.3] N.S.
UGT2B17 (+) in Donor	1.36	[0.83-2.17] N.S.	0.82	[0.32-2.14] N.S.
UGT2B17 (+) in Recipient	1.24	[0.81-1.91] N.S.	0.88	[0.37-2.11] N.S.
UGT2B17 mismatch in GVHD direction	1.01	[0.60-1.72] N.S.	1.94	[0.39-6.22] N.S.

急性GVHDに対するリスク因子 多変量解析

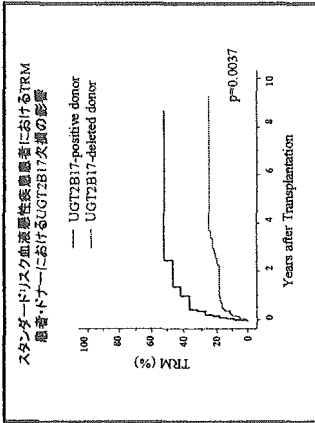
variables	Relative risk (RR)	Confidence interval (CI)	P value
Acute GVHD>H			
Cytosporine-aMTX	2.747	[1.123-6.711]	0.03

再発、TRMに対するリスク因子 単変量解析

Variables	Relative risk (RR)		p value
	CI	CI	
Higher recipient age	1.00 [0.96-1.02]	1.04 [1.02-1.05]	<0.001
Female recipient	1.00 [0.66-1.67]	1.09 [0.74-1.69]	N.S.
Female donor	0.87 [0.54-1.43]	1.12 [0.75-1.65]	N.S.
Female donor/donor recipient	0.69 [0.36-1.30]	1.16 [0.71-1.84]	N.S.
Advanced Disease	3.71 [2.02-6.85]	1.74 [1.15-2.64]	<0.001
TRM recipient	1.24 [0.68-2.41]	1.24 [0.71-2.18]	N.S.
CyA+MTX	1.58 [0.78-3.15]	0.84 [0.58-1.20]	N.S.
sGVHD (≥ GradeII)	0.94 [0.55-1.66]	1.62 [1.11-2.39]	0.01
sGVHD (≥ GradeIII)	0.91 [0.38-2.17]	2.35 [1.24-4.54]	<0.001
UGT2B17 (+) in Donor	1.31 [0.70-2.45]	1.88 [1.17-3.01]	0.009
UGT2B17 (+) in Patient	1.07 [0.55-1.89]	1.16 [0.72-1.86]	N.S.
UGT2B17 mismatch in GVHD direction	0.91 [0.46-1.89]	0.73 [0.40-1.43]	N.S.

再発、TRMに対するリスク因子 多変量解析

Variables	Relative risk (RR)	Confidence interval (CI)	p value
Relapse	3.717	[2.016-6.849]	<0.0001
Non-relapse mortality rate			
Higher recipient age	1.046	[1.027-1.064]	<0.0001
High risk at BMT	2.123	[1.350-3.333]	0.001
UGT2B17 positive expression in Donor	1.684	[1.028-2.755]	0.04
sGVHD (≥ GradeIII)	3.023	[1.840-4.965]	<0.0001

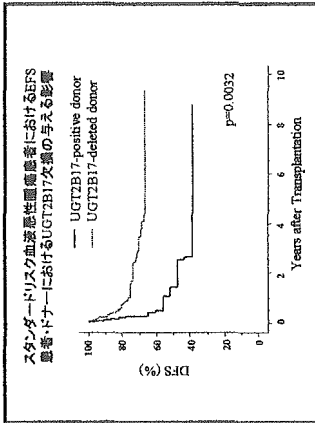


EFS, OSに対するリスク因子の単変量解析

Variables	Relative risk (RR)		p value
	CI	CI	
Higher recipient age	1.02 [1.01-1.03]	1.02 [1.01-1.04]	<0.001
Female recipient	1.09 [0.81-1.47]	1.09 [0.80-1.49]	N.S.
Female donor	1.47 [0.85-1.33]	1.17 [0.86-1.60]	N.S.
Female donor/donor recipient	1.04 [0.72-1.50]	1.08 [0.74-1.57]	N.S.
TRM risk at BMT	2.25 [1.68-3.17]	2.19 [1.45-3.13]	<0.001
TRM recipient	1.23 [0.80-1.89]	1.21 [0.78-1.88]	N.S.
CyA+MTX	0.99 [0.58-1.69]	1.04 [0.61-1.76]	N.S.
sGVHD (≥ GradeIII)	1.35 [1.08-1.67]	1.42 [1.04-1.91]	0.03
sGVHD (≥ GradeII)	2.22 [1.08-5.72]	2.60 [1.09-6.19]	<0.001
UGT2B17 (+) in Donor	1.62 [1.11-2.39]	1.71 [1.19-2.57]	N.S.
UGT2B17 (+) in Patient	1.11 [0.76-1.63]	1.15 [0.78-1.69]	N.S.
UGT2B17 mismatch in GVHD direction	0.86 [0.44-1.59]	0.86 [0.44-1.38]	N.S.

EFS, OSに対するリスク因子 多変量解析

Variables	Relative risk (RR)	Confidence interval (CI)	p value
Event free survival			
Higher recipient age	1.029	[1.015-1.043]	<0.0001
High risk at BMT	2.469	[1.706-3.571]	<0.0001
UGT2B17 positive expression in Donor	1.517	[1.011-2.273]	0.04
sGVHD (≥ GradeIII)	2.236	[1.454-3.439]	<0.01
Over all survival			
Higher recipient age	1.035	[1.020-1.050]	<0.0001
High risk at BMT	2.506	[1.709-3.676]	<0.0001
UGT2B17 positive expression in Donor	1.672	[1.109-2.519]	0.01
sGVHD (≥ GradeIII)	2.565	[1.658-3.969]	<0.0001



まとめと考察(1)

- 日本人においてはUGT2B17のホモの欠損は白人における約11%と比較して、約80%と非常に高頻度に見られる。
- UGT2B17欠損によるマイナー抗原のGVHD方向のミスマッチは急性GVHDおよび慢性GVHDの発症率に有意な影響がなかった。

→ UGT2B17のGVHD方向ミスマッチの与える重篤の影響を検討するためには血縁者間造血幹細胞移植における影響をさらに評価することの必要をEFS, OS, TRM assay, relapse assayなどで解析することが有用であると考えられる。

まとめと考察(2)

- UGT2B17をグルクロン酸結合酵素という面から見た場合には、ドナーにおけるホモの欠損は寄与に低いTRMおよび高いEFS, OSと関連することが示された。
- どのような形でこのような結果になっているのか明らかにするためには
 - ・同種移植に用いられるような異なる代謝に關与しているのか
 - ・血液細胞におけるUGT2B17の発現
 などについて明らかにする必要があると考えられる。
- 本邦別は代謝酵素の欠損が移植後の予後に影響を与えているかについての報告である。

他に欠損することが報告されている代謝酵素
: GSTT1, GSTM1 etc.

謝辞

日本骨髄移植推進財団 (JMDF) のみなさま、および各移植施設の主幹医の先生方、DNAの抽出・保存に關してご尽力いただいた若林先生はじめとする各研究施設の先生方、今回の研究にご許可いただきましたデータ、資料、管理委員会の皆様方に感謝いたします。

骨髄内骨髄移植の有用性

関西医科大学第一病理

同 移植センター

同 再生医学難病治療センター

同 癌治療センター

池原 進

演者らは、マウス、ラット、ウサギを用いた、これまでの実験結果から、従来の静脈内骨髄移植(IV-BMT)よりも門脈内骨髄移植(PV-BMT)の方が優れていること、骨髄内骨髄移植(IBM-BMT)の方がPV-BMTよりも、さらに優れていることを明らかにしてきた。

また、このIBM-BMTを用いることにより、donorのstromal cells (mesenchymal stem cells: MSCsを含む)が補充可能となるため、加齢に伴って発症するosteoporosis, emphysema, sensorineural hearing lossも、治療できることを発見した。このdonorのstromal cellsはHGFやTGF β を分泌するため、GvHDも予防することが明らかになった。従って、IBM-BMTにDLIを併用することにより、mildなconditioning regimenでもGvHDやHvGR(rejection)が予防できる。この方法を癌の免疫療法に応用して、固型悪性腫瘍の増殖を抑制する方法を開発したので紹介する。

さらに、抗癌剤の副作用を軽減するための新しい再生治療法についても言及したい。

ヒトへの応用を視野に入れて、カニクイザルのデータについても紹介する。

KG1a 細胞を用いた CD34 陽性細胞測定 of 精度管理

東京都立駒込病院 造血細胞移植チーム

比留間潔、奥山美樹、酒井美和、山下卓也、坂巻壽

【背景】同種末梢血幹細胞移植において、CD34 陽性細胞数の必要量を多く設定するとドナーへの負担が高まり、少なく設定すると生着不全の危険性が高まる。一般的に必要最少限の CD34 陽性細胞数として 2×10^6 /患者体重 (kg) が推奨されるが、目標数設定値 2×10^6 /患者体重 (kg) 前後ではアフェレシスの回数が異なり、特に採取後のドナー血小板減少の程度が異なりドナー安全性に影響を及ぼす可能性がある。したがって、同種末梢血幹細胞移植における至適 CD34 陽性細胞数の設定は、ドナーの安全性確保の観点から依然として重要な課題であると認識する。

【目的】以上の理由から我々は多施設で行われた同種末梢血幹細胞移植療法に関し、移植された CD34 陽性細胞数と造血回復やドナーへの負担などを解析し、至適 CD34 陽性細胞数あるいは必要最少限の CD34 陽性細胞数を検討することを計画しているところである。しかし、CD34 陽性細胞数の測定法が施設により異なるため、その同等性を評価する必要性が生じるものと思われる。

そこで、我々は、ヒト急性骨髄性白血病細胞株 KG1a 細胞 (CD34 陽性、CD45 陽性) を用いた基準試料を作製し、これを測定することによって多種類の CD34 陽性細胞測定法の評価を試みた。すなわち、一定量の KG1a 細胞を含む標準資料を作成し、それを測定することで各種測定法の精度管理を行える可能性がある。今回、基準検体 KG1a 細胞のフローサイトメトリー (FCM) 上の特徴を解析し、CD34 陽性細胞測定における精度管理のための細胞としての有用性を検討したので報告する。

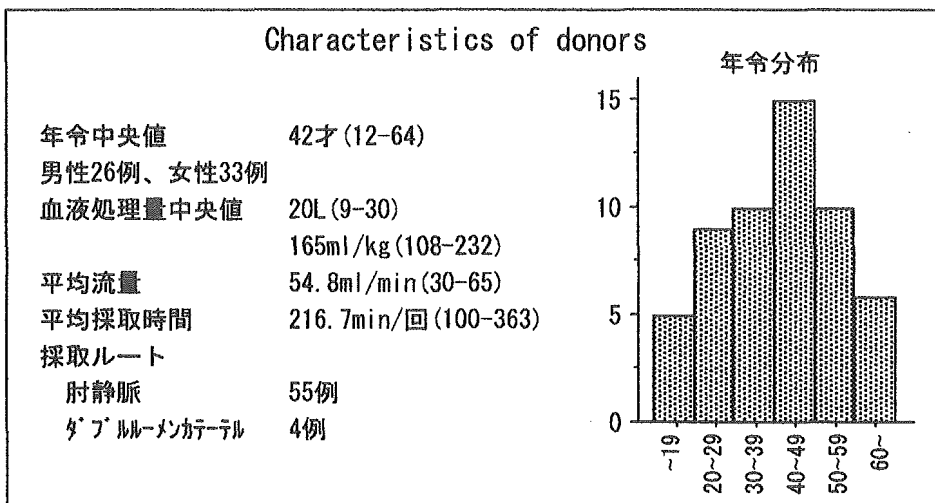
【材料・方法】KG1a 細胞 (Beckman Coulter) と正常人末梢血単核細胞を混合し、0 ~ 0.78% の KG1a 細胞を含む資料を作成した。FITC 標識抗 CD45 抗体、PE 標識抗 CD34 抗体を用いて反応させ。FCM (FACScan) で CD45 陽性細胞を SSC と PE 蛍光強度により展開し CD34 陽性細胞率を測定した。また、動員された通常の末梢血中の CD34 陽性細胞と KG1a 細胞の FCM 上の差異を検討した。

【結果】KG1a 細胞は動員された新鮮 CD34 陽性細胞と比較して、SSC、FSC とともに高値の細胞を含み、比較的広範囲に分布していた。一方、CD45、CD34 の蛍光強度はほぼ同様であった。作製検体の実際の測定値は予測値よりもやや低値の傾向があったが相関係数は $r^2=0.949$ と良好だった。

【結語】KG1a 細胞を用いることによって CD34 陽性細胞測定 of 精度管理 of 可能性が示された。ただし、動員された CD34 陽性細胞より SSC が高値であることを考慮する必要がある。

健常人ドナーアフェレーシスの安全性に関する検討

札幌北榆病院血液内科 小林直樹、笠井正晴



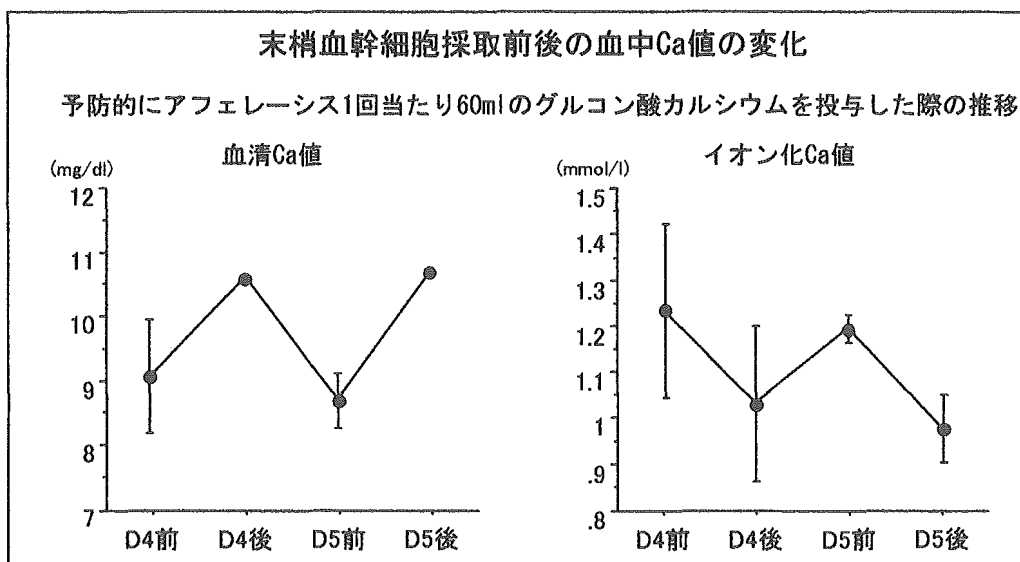
Adverse effects (自他覚症状)

Symptom	No.	(%)	Grade (NCI-CTC)			
			1	2	3	4
Bone pain	25	(42)	24	1	0	0
Paresthesia	22	(37)	22	0	0	0
General fatigue	16	(27)	16	0	0	0
Headache	1	(2)	1	0	0	0
Insomnia	1	(2)	1	0	0	0
Edema	1	(2)	1	0	0	0
Cough	1	(2)	1	0	0	0
Diarrhea	1	(2)	1	0	0	0

Laboratory abnormalities

	No.	(%)	Grade (NCI-CTC)			
			1	2	3	4
LDH	51	(86)	50	1	0	0
ALP	43	(73)	43	0	0	0
AST/ALT	0	(0)	0	0	0	0
Thrombocytopenia						
採取前	0	(0)	0	0	0	0
1回採取後	9	(16)	7	2	0	0
2回採取後	19	(32)	11	7	1	0

fever, VVR, pneumothorax, hematoma等は認めず



まとめ

- 幹細胞採取時の随伴症状として、骨痛、しびれ感、倦怠感の頻度が高かったがいずれもGrade 1-2で採取後は軽快し重症例は認めなかった。
- 臨床検査値の異常では、LDH、ALPのGrade 2までの可逆的な上昇を認めた。アフェレーシスによる血小板減少は1例でGrade 3を認めたが、出血症状は認めなかった。
- Ca製剤の投与を行いくエン酸中毒予防を図っているが、採取後イオン化Caの低下が認められる。しびれ感の出現は37%に認めており今後工夫が必要と考えられる。