

HLA 1 座または 2 座不適合の細胞に対する allo-reaction についても MLC や細胞刺激試験を用いて評価する予定である。

(2) 作成された activated CD4 は大半が CD25 陽性細胞であり、また約半数の細胞は、CD154 (CD40L) 陽性で、CD45RA 細胞はごくわずかに残るのみであった。対して CBMNC には CD4/CD25 陽性細胞はごくわずかに存在するのみであり、CD4 陽性細胞のほとんどは CD45RA 陽性であった。また、CD154 陽性細胞は認めなかった。

移植後 6 週の CBMNC 単独移植マウスでは、骨髄、脾臓ともに生着ヒト血液細胞の 90% 以上は CD3 陽性 T 細胞で占められ、CD19 陽性 B 細胞はほとんど認めなかった。免疫組織学的検討では、脾臓においては濾胞構造の欠如した無秩序な CD3 陽性 T 細胞の浸潤増殖を示し、少数の CD20 陽性 B 細胞が散在性に認めるのみで、形質細胞は認めなかった。骨髄においても、B 細胞の存在はわずかであり、形質細胞は認めなかった。一方、CBMNC+activated CD4 リンパ球移植マウスにおいては、骨髄、脾臓ともに生着ヒト血液細胞に占める CD3 陽性 T 細胞の割合は 70% 程度に減少し、CD19 陽性 B 細胞のみならず、CD38、CD138 陽性形質細胞の存在が確認された。また、脾臓では、ほぼ正常な T 細胞及び B 細胞からなるリンパ球分布と濾胞構造の構築が認められ、免疫組織学的に CD38 強陽性形質細胞が骨髄、脾臓両者に確認された。activated CD4 リンパ球単独移植

マウスではヒト血液細胞の生着は確認されなかった。

移植マウスより得られたヒト CD19 陽性細胞上の CD40 発現や、CD4 陽性細胞上の CD25 発現の程度には有為な違いを認めなかった。

これらのマウスにヒト血清アルブミンを免疫したところ、CBMNC 単独移植群では、抗ヒト血清アルブミン IgM 抗体のみの産生が認められ、IgG 抗体は認められなかったが、CBMNC+activated CD4 リンパ球移植マウスでは、抗原接種後の一過性の抗ヒト血清アルブミン IgM 抗体上昇とその後の減少に引き続き、抗ヒト血清アルブミン IgG 抗体の産生を認めた。

(3) 臍帯血 (n=8) 数 ml から約 2×10^7 個の単核球が得られ、10~30mg の total cellular RNA を回収できた。単核球 0.1 mg RNA あたりの血管内皮前駆細胞マーカーの mRNA 分子数は、平均で Flk-1: 6.9×10^5 、CD133: 5.5×10^5 、VE-cadherin: 2.0×10^5 であり、骨髄由来単核球には及ばないものの、臍帯血は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。

D. 考察

(1) 臍帯血移植における生着不全の問

題を解決すべく臍帯血中のCD34陽性幹細胞の体外増幅法が研究され、既に海外からは臨床試験の結果が報告されている。しかし、期待に反して生着促進の効果は確認されなかった。真の造血幹細胞増幅は可能なのか、あるいは造血幹細胞を増幅・輸注することが本当に生着促進につながるのだろうか。近年、同種造血幹細胞移植における生着には、移植片中のCD8陽性リンパ球が重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。また生着促進に作用するCD8陽性リンパ球に細胞傷害活性は不要であるという。従って、臍帯血中のCD8陽性リンパ球はnaïveで非活性状態のものが多いものの、それらを分離・増幅し、臍帯血幹細胞とともに移植することで、移植片の生着および血液回復を促進する可能性がある。

(2) NOG マウスへのCBMNC移植においては、T細胞の浸潤性増殖をきたすのみで、脾臓における濾胞形成も認められず、免疫系再構築は不可能であった。しかし、CBMNCにactivated CD4リンパ球を同時に移植すると、移植後早期から、脾臓への正常なリンパ球分布が生じ、抗原接種に対しても正常な抗原特異的抗体産生の反応が生じたことは、細胞療法の有効性を示唆するものである。この現象は、移植したactivated CD4リンパ球とCBMNCにおけるCD40L発現の違いから、通常のCBMNCあるいはCBCD34陽性細胞移植では、CD40Lの発現あるいは機能が障害されており、CD40-CD40L

interactionが生じていない可能性が考えられる。しかし、activated CD4リンパ球単独移植では、移植後6週時点で生着細胞を確認できないことより、抗原特異的IgG産生に直接関与している可能性は低いことが予想される。むしろ、活性化されたregulatory T細胞が移植時点で存在することによって、過剰なT細胞の増殖が抑制され、個々の免疫担当細胞が正常に生着、分化できる環境が整うことが重要かもしれない。これらの検討を進めることで、個々の免疫担当細胞が果たす役割や分化過程を明らかにし、移植後GVHD、感染症コントロール、細胞・免疫療法への応用が期待される。

(3) 臍帯血中の単核球には、Flk-1やCD133等の分子を高発現する血管内皮前駆細胞が多く含まれていると考えられた。また、臍帯血単核球の培養後に得られる付着細胞群は、血管内皮前駆細胞を含む分画としてより純度が高いと推測された。今後、ストローマ細胞との共培養による変化などにつき、検討したい。

E. 結論

(1) 臍帯血中CD4陽性リンパ球、CD8陽性リンパ球の高効率な分離・増幅の可能性が示された。

(2) 活性化CD4リンパ球による液性免疫能の再構成促進が図られうる可能性が示された。

(3) 臍帯血の血管再生医療における幹細胞ソースとして利用できる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Murata M, Emi N, Izumisawa Y, Inaki A, Saitoh M and Naoe T. Identification and frequency of a new HLA-A allele, A*030104. *Tissue Antigens*, in press.
2. Terakura S, Murata M, Nishida T, Emi N, Akatsuka Y, Riddell SR, Morishima Y, Kodera Y and Naoe T. A UGT2B17-positive donor is a risk factor for higher transplant-related mortality and lower survival after bone marrow transplantation. *Br J Haematol*, in press.
3. Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izawa H, Kobayashi M, Emi N, Komori K, Naoe T, Takamatsu J, Murohara T. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs: therapeutic effect by stem cell transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (12):e192-6.2004.
4. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Takahashi S, Hirabayashi N, Hiraoka A, Kanda Y, Tanosaki R, Okamoto S, Iwato

K, Atsuta Y, Hamajima N, Tanimoto M, Kato S. Tacrolimus instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft-versus-host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, but not from HLA-identical sibling donors: a nationwide survey conducted in Japan. *Bone Marrow Transplant* 34:331-7.2004.

5. Yanada M, Emi N, Naoe T, Sakamaki H, Iseki T, Hirabayashi N, Karasuno T, Chiba S, Atsuta Y, Hamajima N, Takahashi S, Kato S. Allogeneic myeloablative transplantation for patients aged 50 years and over. *Bone Marrow Transplant* 34(1):29-35.2004.

2. 学会発表

1. 寺倉精太郎、村田 誠、西田徹也、恵美宣彦、赤塚美樹、森島泰雄、高久史麿、小寺良尚、直江知樹。同種骨髄移植における *UGT2B17* 遺伝子欠損の影響。第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会 平成 16 年 9 月 於：京都
2. 寺倉精太郎、村田 誠、西田徹

也、恵美宣彦、Warren E.H.、
Riddell S.R.、直江知樹、
UGT2B17 遺 伝 子 は
HLA-B*4403 上に提示されるマ
イナー抗原をコードする。第 27
回日本造血細胞移植学会総会
於：岡山

- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定
を含む）
なし

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 原 宏 兵庫医科大学 内科学 血液・腫瘍科教授

2003年度・2004年度分担研究報告書

研究要旨 臍帯血移植の安全性を向上させるために、マウスを用いた動物実験において基礎的検討を行うと共に、臍帯血中の血液幹細胞を体外増幅する手段と複数臍帯血同時移植および兵庫さい帯血バンクを介する移植成績を解析してHLA不一致移植の移植成績を後方視的な解析により、その影響を単変量および多変量解析により検討した。

A, 研究目的

臍帯血バンクを介する臍帯血移植は既に保存している臍帯血を用いるため、骨髄バンクと異なり、患者の病状に応じて、移植できる利点がある。一方、臍帯血に含まれる血液幹細胞の量には限りがあり、その結果、移植後の造血回復が遅延し、重篤な感染症を合併し、それが死因となる場合も少なくない。そこで、基礎的にはマウスを用いて細菌およびウイルスのレセプターである toll-like receptor(TLR)の発現の検討を開始した(2004年度)。さらに、マウスを用いて、ヒト肝細胞増殖因子(HGF)の遺伝子治療により、急性の移植片対宿主病(aGVHD)を抑制し、移植片対腫瘍効果(GVL)の有無について検討した(2004年度)。また、造血回復を促進する手段の一つとして血液幹細胞の体外増幅を検討する(2003年度)と共に複数臍帯血同時移植による臨床効果を検討した(2004年度)。更に、臍帯血バンク発足時にはHLA一座不適合以下で実施する予定であったが成人の臍帯血移植では、移植に適した臍帯血が見つからず、HLA2座不適合の

臍帯血移植が常態化しており、HLA不適合の状況と臨床症状および予後との関連を後方視的に検討した(2003年度および2004年度)。

B, 研究方法

1、マウスを用いた基礎的検討

2003年度の研究

(1)SV40T 抗原の遺伝子導入により間葉系幹細胞(MSC)の不死化に成功し、これを用いて臍帯血由来のヒト血液幹細胞との共培養による体外増幅を行い、マウスを用いてその増幅効果を検討した。また、ヒト MSC と臍帯血 CD34+細胞と共培養によるヒト巨核球系前駆細胞の体外増幅をも試みた。

2、臨床的検討

(1)複数さい帯血同時移植に関する検討

複数臍帯血同時移植は日本帯血バンクネットワーク(ネットワーク)の協力を得て実施された。適応症例はHLA一致血縁ドナーおよびHLA一致非血縁骨髄ドナーを見出せず、さらに、HLA4/6 以上適合の 3×10^7 /kg の細胞数を含む単一臍帯血を見出せない患者とした。移植前処置は、骨髄系腫瘍には、TBI(全身放

射線照射) 12Gy(4~6分割)、シクロfosファミド(CY)60mg/kg/日 x 2日間、サイトシンアラビノシド(araC)3gr/m²/日 x 2日間、G-C SF 5 μg/kg/日 x 2日間、リンパ系腫瘍には、TBI12Gy(4~6分割)、シクロfosファミド(CY)60mg/kg/日 x 2日間とした。AGVHDの予防法として sMTX(短期メソトレキセート)及びシクロスポリン(CSA)3mg/kg/日を採用した

2004年3月までに、9例の移植が行われた。更に、10例になるまで症例を集積し、検討する。

2004年度の研究

1、マウスを用いた基礎的検討

(1) 臍帯血 CD34(+)細胞の Toll-like receptor(TLR)に関する検討

臍帯血移植後にはしばしば各種の重篤な感染症を合併し、死因となることも稀ではない。そこで、細菌・ウイルスのレセプターであるTLRの発現について検討した。臍帯血のCD14陽性細胞はTLR1、2、4、5、6、8を発現していた。移植の状況を考え、臍帯血より auto-MACS を用いてCD34(+)細胞を分離しTLRの発現をTLR1~10の mRNA の発現を検討した。

(2) ヒトHGF遺伝子治療による aGVHDの克服と GVL による効果についての検討

既に、ヒトHGFの遺伝子治療について、動脈硬化性血流障害およびBurger病における治験が開始されているが同じ遺伝子を用いて、BDF1 マウスにおける効果を検討した。即ち、GVHDマウスにおいて、骨髄細胞と脾細胞をと共にヒトHGF遺伝子を含むリポソームをマウス筋肉内に投与し、その後の生存率および腸管上皮の状況を観察した。更に、マウスの mastocytoma 由来 P-815 細胞を移植し、その生存率を検討するとともに、recipient のT細胞の P-815 に対するCTL活性を検討した。

2、臨床的検討

(1)、複数同時臍帯血移植について

2003年度に作ったプロトコールに基づき、移植症例を追加した。最終症例は2例の同時登録と判定され、合計11症例について移植後早期の合併症のリスクについて検討した。

(2)、HLAと臍帯血移植成績について

NPO法人兵庫さい帯血バンクが提供した症例の移植後報告が得られた117例のHLA適合度と移植後の臨床経過の関連を検討した。即ち、重症 aGVHD、再発、TRM(治療関連死亡)、EFS(無イベント生存率等について、Kaplan-Meier 法、Cox ハザード法を用いて検討した。

(倫理面への配慮)

(1) 実験動物への配慮

動物実験においては、実験方法から動物死体の処理に至るまで十分に手技等を記載し、兵庫医科大学動物実験委員会において、審議の上、承認を得た方法で動物実験を行った。猶、本学においては毎年実験動物慰霊祭を催して、その霊の感謝の意を表している。

(2) 研究用臍帯血への配慮

移植用に提供された臍帯血の中で有核細胞数の不足で移植用臍帯血に基準を満足しなかった臍帯血をNPO法人標語さい帯血バンクより提供を受けた。提供に際して、当初はバンクにおいて、連結可能匿名化して提供を受け、感染症検査を終了後、感染性病原の無いことを確認した後はバンクにおいて連結不可能匿名化している。従って、本学において連結することは無く、提供者のプライバシーは保護された。

(3)、複数臍帯血移植について:複数臍帯血同時移植が実験的治療法であり、移植後早期の副作用およびリスクを確認する目的で実施

施設を限定して(大阪成人病センター、東海大学、東京大学医科学研究所、兵庫医科大学)、計10症例に行われる治療法であり、臨床成績は不明であることの説明文書およびプロトコールを説明した後に、同意を得て実施するプロトコールを作成した。その後、日本造血細胞移植学会における承認を得て、複数臍帯血同時移植の第1相研究を日本臍帯血バンクネットワークの承認を得て、実施された。

(4)HLA適合度と移植成績について:臍帯血移植については日本さい帯血バンクネットワークの基準に則った移植同意書およびその後の経過報告を頂く同意書を得られた患者に臍帯血移植を実施し、その後の成績を追跡し、移植施設に資料提供を求めた。

研究成果

2003年度

1、マウスを用いた基礎的検討

(1)ヒト帯血血液幹細胞のMSCとの共培養による体外増幅の成績をみると共培養により、血液幹細胞は維持されるものの2週間の短期体外培養では増幅を支持する成績が得られなかった。一方、ヒト骨髓由来のMSCと臍帯血CD34+細胞との10日間の共培養により、巨核球系前駆細胞は10倍以上に増幅された。従って、MSCとの共培養により臍帯血移植後に見られる巨核球系の造血回復の遅れを回復する手段として有用であると考え得る成績が得られた。

2、臨床的検討

(2)複数臍帯血同時移植について

9例の複数臍帯血同時移植が行われ、早期死亡は1例にとどまっていた。

2004年度

1、マウスを用いた基礎的検討

(1)臍帯血CD34(+)細胞のToll-like recept

or(TLR)に関する検討

臍帯血のCD14(+)細胞はTLR1, 2, 5, 6, 8等のmRNAを発現しフローサイトメトリーでもTLR1, 2, 4の発現を認めた。しかし、CD34(+)細胞のTLRのmRNAの発現は非常に弱く、細胞表面においてもその発現は僅かであった。

(2)GVHDの克服とGVLによる効果についての検討

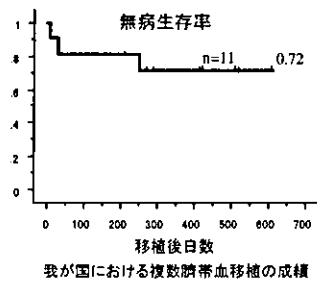
aGVHDマウスは移植後60日ではほぼ80%のマウスがaGVHDにより死亡した。これに対してヒトHGF遺伝子治療を実施したマウスは移植80日後においても100%生存していた。腸管の組織学的検討においてもヒトHGF遺伝子治療マウスではaGVHDによる変化は殆ど認められなかった。また骨髓移植と同時に、P-815細胞を投与すると投与20日後には全例腫瘍死したがaGVHDマウスでは60日後でも20%のマウスが生存していた。これは、aGVHDがGVL効果のあることを示していた。一方、P-815細胞を投与、aGVHDマウスにヒトHGF遺伝子治療マウスは全例移植80日後にも生存していた。また、P-815細胞に対するCTL効果もin vitroにおいて確認できた。

2、臨床的検討

(1)複数臍帯血同時移植について

複数臍帯血移植が行われた11症例を検討した結果、複数同時臍帯血輸注による重篤な副作用は認めなかった。28日以内の早期死亡2例を除く、全例に持続性生着を認めた。重症のaGVHDは9例中の1例に認めた(Ⅲ度)。現在の所1年生存率は72%と良好な成績が得られた。

図1



(2) HLA適合度と移植成績について

HLA 不一致度と aGVHD, TRM, 再発, EFS の関連について検討した結果、多変量解析ではHLA両者の間に有意の関連を認めることは出来なかった。しかし、単変量解析ではEFSに有意な影響を認め、GVHD方向よりもHVG方向の不一致が関連していた。

D、考察

成人の臍帯血移植には感染症の発症リスクが高いことが分かっている。これら感染症における臍帯血TLRの関与については今後の研究を進めねばならない。マウスにおけるヒトHGF遺伝子治療を施すことにより、aGVHDの発症を予防し、GVL効果を残して悪性腫瘍細胞を排除できる成績が得られた。これらの成果はrecombinantHGFを用いて確認する必要があるがヒトにおいても同様の成果が期待される。

複数臍帯血同時移植の第1相治験では米国等の成績と同じく、移植後早期の副作用は認められず、早期の安全性は確認された。成人単一臍帯血移植に比して生着率/生存率共に劣ることはなかった。一方、移植後の造血回復は単一移植の成績に比較して劣ることはなかった。しかし、明らかな早期の回復は認めなかった。今後、更に移植施設および症例を増やして検討する必要がある。

臍帯血のHLA不一致度と移植後の臨床成

績の検討では、多変量解析では有意差を認めなかった。単変量解析ではHVG方向の不一致があれば、EFSにおいてその成績が有意に劣る成績が得られた。

F、結論

今猶、臍帯血移植を危険視する原因の一つに移植後早期の重篤な感染症の合併がある。この合併症は第一に、臍帯血特有の性質であり、病原体に暴露されたことのない細胞である、第2に造血の回復遅延がある。この両面から検討を加えるために、臍帯血特有の性質の有無をTLRの面から検討したが本研究は今後も継続する必要がある。一方、aGVHDによって、患者の免疫能は低下するが、GVL効果を残しながらaGVHDを克服する方法をヒトHGF遺伝子治療により、HGFの効果を検討した。その結果、マウスの実験ではヒトHGFにそのような効果のあることが確認された。造血の早期回復を求めて、複数臍帯血同時移植の臨床成績を検討する前段階として、移植に伴う早期副作用を検討したがそのようなリスクの無いことが判明した。さらに、症例数は少ないながらも単一臍帯血移植に比して良好なEFSが得られた。従って、移植施設数、症例数を増やして、その効果を検討する必要がある。HLAの不一致度と臨床成績の検討では、単変量解析ではHVG方向の不一致があれば、EFSにおいてその成績が有意に劣る成績が得られた。従って、現時点では、十分な細胞数を有する臍帯血が複数あればHLAのHVG方向の少ない臍帯血を選択するのが望ましい。

F、健康危険情報

該当なし。

G、研究発表

2003年度

論文発表

- (1) 富士原将之、上紺屋憲彦、坪井慶太、入江美和、三澤真人、原宏、甲斐俊朗、中尾宣夫、「Compu-Former を用いた TBI 用三次元補償フィルターの作成と臨床的研究、日本医学放射線学会雑誌、8: 399-404, 2003.
- (2) Qiu H, Fujimori Y, Kai S, Fujibayashi Y, Nishioka K, Hara H, : Establishment of Mouse Embryonic Fibroblast Cell Lines that promote Ex Vivo Expansion of human cord Blood CD34+ Hematopoietic Progenitors. *J Hematotherapy & Stem Cell Research*, 12:39-46, 2003.
- (3) Tanaka H, Kai S, Yamaguchi M, Misawa M, Fujimori Y, Yamamoto M, Hara H : Analysis of Natural Killer (NK) Cell Activity and Adhesion Molecules on NK cells from Umbilical Cord Blood. *Eur J Haematol*, 71: 29-38, 2003.
- (4) Nishioka K, Fujimori Y, Hashimoto-Tamaki T, Kai S, Qiu H, Kobayashi N, Tanaka N, Westerman KA, Leboulch P, Hara H, : Immortalization of Bone Marrow-derived Human Mesenchymal Stem Cells by Removable Simian Virus 40T Antigen Gene: Analysis of Ability to Support Expansion of Cord Blood Hematopoietic Progenitors. *Int J Oncology*, 23: 925- 932, 2003
- (5) Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio H, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H, : Hybrid Cell-Gene Therapy for Primary Pulmonary Hypertension Based on Phagocytosing Action of Endothelial Progenitor Cells. *Circulation*, 108: 889-895, 2003.
- 総説
- (1) 高塚広行:造血幹細胞移植 TMA、血液フロンティア、13(6):59~68、2003.
- 学会発表
- (1)三澤真人, 戸田暁成, 若江 武, 五熊丈義, 西岡啓介, 岡田昌也, 山口雅生, 高塚広行, 甲斐俊朗, 原 宏 : 当科における臍帯血移植の治療成績. 第 100 回日本内科学会講演会, 4.2, 福岡.(日本内科学会雑誌, 92, 198, 2003.)
- (2)甲斐俊朗, 三澤真人, 山本益嗣, 小阪嘉之, 高橋隆幸, 小泉民雄, 園田 隆, 山口雅生, 原 宏 : 造血器悪性腫瘍に対する非血縁さい帯血移植:兵庫さい帯血バンクからの報告.(ワークショップ)第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会, 8.28-31, 大阪.(第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 157, 2003.)
- (3)藤盛好啓, 仇 恵英, 西岡啓介, 玉置知子, 寺田信行, 永谷憲歳, 神田宗武, 原 宏 : ヒト臍帯血由来血管内皮前駆細胞株の樹立とその細胞移植による血管新生.(ワークショップ)第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会, 8.28-31, 大阪.(第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 163, 2003.)
- (4)粕本育代, 藤盛好啓, 藤林由佳, 原宏 : ヒト造血幹細胞の分化における Toll-like receptor の発現. 第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会, 8.28-31, 大阪.(第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会プ

ログラム・抄録集, 230, 2003.)

(5) 陳 明修, 藤盛好啓, 藤林由佳, 大倉伸彦, 西岡啓介, 甲斐俊朗, 原 宏: ヒト間質性幹細胞との共培養によるヒト臍帯血由来巨核球系前駆細胞の体外増幅. 第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会, 8.28-31, 大阪.(第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 232, 2003.)

(6) 今戸健人, 黒岩孝則, 岩崎 剛, 佐野統, 原 宏: FK506 のドナー T 細胞制御機構: GVHD/GVL 効果に及ぼす影響. 第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会, 8.28-31, 大阪.(第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 222, 2003.)

(7) 大倉伸彦, 藤盛好啓, 西岡啓介, 甲斐俊朗, 原 宏: ヒト血清を用いて誘導したヒト間質性幹細胞との無血清共培養による臍帯血造血幹細胞の体外増幅. 第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会, 8.28-31, 大阪.(第 65 回日本血液学会・第 45 回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 215, 2003.)

(8) 今戸健人, 岩崎 剛, 黒岩孝則, 原宏, 佐野 統: 造血幹細胞移植後 T 細胞免疫能回復に及ぼす HGF の効果. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会, 12.8, 福岡.(日本免疫学会総会・学術集会記録, 33, 54, 2003.)

(9) 岩崎 剛, 今戸健人, 黒岩孝則, 原宏, 佐野 統: HGF の Th1/Th2 免疫応答に及ぼす効果. 第 33 回日本免疫学会総会・学術集会, 12.8, 福岡.(日本免疫学会総会・学術集会記録, 33, 211, 2003.)

海外での学会発表

(1) Kai S: Special Lecture, Double units cord blood transplantation. The 8th annual meeting of Korean Society of hematopoietic stem cell transplantation. Feb. 6, 2004. Muju, Korea.

2004 年度

論文発表

(1) 陳明修、藤盛好啓、大倉伸彦、甲斐俊朗、原宏: ヒト間葉系細胞との共培養によるヒト臍帯血由来巨核球系前駆細胞の体外増幅. 兵医大医会誌. 29:29-38. 2004.

(2) Imado T, Iwasaki T, Kuroiwa T, Sano H, Hara H: Effect of FK506 on donor T-cell functions that are responsible for graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. Transplantation, 77: 391-398, 2004.

(3) Itoi H, Fujimori Y, Tsutsui H, Matsui K, Hada T, Kakishita E, Okamura H, Hara H, Nakanishi K.: Differential upregulation of interleukin-18 receptor α chain between CD4⁺ and CD8⁺ T cells during acute graft-versus-host disease in mice. J Interferon & Cytokine Research, 24: 291-296, 2004.

(4) Imado T, Iwasai T, Kataoka Y, Kuroiwa T, Hara H, Fujimoto J, Sano H, : Hepatocyte growth factor preserves graft-versus-leukemia effect and T-cell reconstitution after marrow transplantation. Blood, 104(5): 1542-1549, 2004.

(5) Imoto S, Murayama T, Nagai K, Hirabayashi N, Misawa M, Kawasaki K, Mizuno I, Koizumi T, Kajimoto K, Takahashi T, Hara H, Kumagai S, Saigo

K. : Usefulness sequential automatic analysis of fragmented red blood cells for the differential diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Laboratory Hematology*, 11: 1-6, 2005.

- (6) Yamaguchi N, Fujimori Y, Fujibayashi Y, Kasumoto I, Okamura K, Hara H : Interferon-gamma produced by human cord blood monocyte-derived dendritic cells. *Annals of Hematology*. (in press)

総説

(1)三澤真人:移植前にメシル酸イマチニブを投与し臍帯血移植を施行した慢性骨髄性白血病症例、慢性骨髄性白血病治療症例集、医薬ジャーナル社、2004年。

(2)甲斐俊朗:成人のための臍帯血バンク-成人の臍帯血移植の試み、血液成分治療、細胞療法の夜明けから臨床医療への応用、廣田豊、原宏編、P108~126、医薬ジャーナル社、2004。

(3)甲斐俊朗:成人のための臍帯血バンク-成人の臍帯血移植の試み、分担執筆 p108-115、血液成分治療、細胞療法の夜明けから臨床医療への応用(廣田豊、原宏編)、医薬ジャーナル社、大阪、2004.10.25。

(4)斐俊朗:非血縁者間の臍帯血移植、日本医事新報、No.4167, p105, 2004。

学会発表

- (1)岡田昌也, 中島利幸, 野村香織, 戸田曉成, 若江武, 糸井久幸, 高塚広行, 三澤真人, 藤盛好啓, 甲斐俊朗, 原宏 : 当科における Reduced intensity

regimen を使用した成人臍帯血移植の検討. 第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会, 9.17-19, 京都.(第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 308, 2004.)

- (2)若江武, 中島利幸, 野村香織, 戸田曉成, 糸井久幸, 田畑雅彦, 岡田昌也, 高塚広行, 三澤真人, 藤盛好啓, 甲斐俊朗, 原宏 : 同種造血幹細胞移植後のHHV-6脳炎. 第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会, 9.17-19, 京都.(第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 249, 2004.)

- (3)大倉伸彦, 藤盛好啓, 山口薫子, 西岡啓介, 甲斐俊朗, 原宏 :

ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞系への分化の造血幹細胞増幅支持能への影響.

第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会, 9.17-19, 京都.(第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 347, 2004.)

- (4)今戸健人, 黒岩孝則, 岩崎剛, 佐野統, 原宏 : HGFはGVL効果を維持し移植後T細胞を免疫を促進する. 第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会, 9.17-19, 京都.(第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会プログラム・抄録集, 206, 2004.)

- (5)粕本育代, 藤盛好啓, 大倉伸彦, 原宏 : ヒト間葉系幹細胞とその脂肪分化におけるToll-like receptorの発現. 第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会, 9.17-19, 京都.(第66回日本血液学会・第46回日本臨床血液学会合同総会

プログラム・抄録集, 305, 2004.)

- (6)池本純子, 前田和宏, 国分寺 晃, 村田理恵, 松下恵子, 郡谷哲男, 甲斐俊朗, 三澤真人, 原 宏 : 7-ADD を用いた CD34 陽性造血前駆細胞測定方法の検討. 第 48 回日本輸血学会近畿支部総会, 11.13, 京都.(第 48 回日本輸血学会近畿支部総会プログラム・抄録集, 29, 2004.

海外での学会発表

- (1)Kai, S., Misawa, M., Iseki, T., Takahashi, S., Kishi, K., Kato, S., Hiraoka, A. and Hara, H. : Double-unit cord blood transplantation in Japan. American Society of Hematology 46th annual meeting and exposition, 12.4-7, USA. (Blood, 104, 11, 376b, 2004.)
- (2)Imado T, Iwasaki T, Kuroiwa T, Okamoto T,

Hara H, Sano H : Hepatocyte growth factor ameliorates chronic graft- versus- host disease. in American Society of Hematology, Dec. 3, 2004, San Diego, USA.

- (3)Kokubunji, A., Kai, S., Imaizumi, R., Ikemoto, J., Taniwaki, K., Misawa, M., Natsuaki, M. and Hara, H.:Two cases of adverse reaction due to leukocyte-reduction filter. The 28th Congress of the International Society of Blood Transfusion, 7.11-15, UK. (Vox Sanguinis Abstracts, 87(Suppl. 3), 32, 2004.)

臍帯血を用いた造血細胞移植の確立に関する研究

（主任又は分担）研究者 堀田 知光 東海大学医学部・教授

研究要旨

臍帯血幹細胞増幅のための基盤的研究を行った。すなわち、増幅された造血幹細胞(SRC)測定のための骨髄内移植法を開発し、複数臍帯血幹細胞移植のマウスモデルを作成した。さらにこれらの技術を用いて体外増幅培養により、実際に 15%程度のクローンが体外増幅可能であることを示し、さらにこれらのクローンが多分化能と自己複製能を併せ持つことを示した。

A. 研究目的

臍帯血の体外増幅法を開発し、その有効性、安全性について検討する。そのために1) 検出感度の高いヒト造血幹細胞アッセイ法の確立、2) ヒト造血幹細胞の競合的造血再構築能の評価モデルの確立、3) クローンレベルでの幹細胞体外増幅の証明を行う。

B. 研究方法

1. 臍帯血 CD34 陽性細胞を NOD/SCID マウス骨髄内に移植して定量的 SRC アッセイを行った。
2. 臍帯血 CD34 陽性細胞をウイルスにて遺伝子マーキングし、NOD/SCID マウス内で動態を追跡する。
3. 臍帯血 CD34 陽性細胞をウイルスにて遺伝子マーキングした後、増幅培養し NOD/SCID マウス内で動態を追跡する。

C. 研究結果

1. 骨髄内移植法は従来の経静脈的投与と比較して 15 倍の SRC 検出感度があり、増幅幹細胞にも応用可能であることを見いだした。
2. YFP, GFP でマーキングされた 2 個体由来の臍帯血をそれぞれ追跡し、競合的造血再構築を行っていることを確認した。造血キメラリズムは移植細胞数と相関した。またこのモデルを用いて、CD4 および CD8 陽性 T 細胞がこれらの拒絶に関わることを示した。
3. 増幅培養後に解析したクローンの 15% 程度が複数マウス間で同一クローンを検出可能であった。さらにこれらのクローンが多系統に渡る分化能を示すことを明らかにした。

さらに二次移植した結果、一部のクローンでは二次移植可能なクローンであることが判明した。

D. 考察

上記の基礎的研究の成果を用いて臍帯血幹細胞移植のより有効な臨床応用が可能となる。

E. 結論

マウス骨髄ストローマ細胞 HESS-5 とヒトサイトカイン TPO, FLK-2 ligand, SCF を利用した体外増幅培養系では体外で幹細胞を増幅可能である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

- 1) Blood, 101, 2905-2913, 2003
- 2) Bone Marrow Transplant. 32, 391-398, 2003
- 3) Exp Hematol. 31, 789-797, 2003
- 4) Exp Hematol. 31, 1323-1330, 2003
- 5) Spine 29, 1515-1523, 2004
- 6) Mol Ther 10(5):882-891, 2004
- 7) Blood 104, 3581-3587, 2004
- 8) Leukemia Res, in press, 2004
- 9) Cardiovascular Research, 65, 334-344, 2005
- 10) Chest, in press, 2005
- 11) 臨床血液、45, 1048-1052,

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究補助金ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

研究課題 わが国における非血縁者間臍帯血移植成績

分担研究者 加藤 俊一 東海大学医学部・教授

研究協力者 齊藤英彦（国立病院機構名古屋医療センター・病院長）、
鎌田薫（早稲田大学大学院・教授、日本さい帯血バンクネットワーク会長）、
中林正雄（愛育病院・病院長）、東 寛（北海道臍帯血バンク）、長村登紀子
（東京臍帯血バンク）、高梨美乃子（東京都赤十字血液センター臍帯血バンク）、
磯山恵一（神奈川臍帯血バンク）、加藤剛二（東海臍帯血バンク）、甲斐俊朗
（兵庫さい帯血バンク）、神前昌敏（京阪さい帯血バンク）、谷口修一
（虎の門病院）、森山弘子（東京都看護協会）

研究要旨：

わが国における非血縁者間臍帯血移植の成績を日本さい帯血バンクネットワークと本研究班の合同で解析した。1997年に最初の非血縁者間臍帯血移植が行われてから2004年までに2000例を超える移植が実施されている。当初は小児を中心とした移植であったが、2003年から成人、とくに50歳を超える高齢者におけるミニ移植が急速に増加している。

移植後の生着と最も相関がみられたのは移植されたCD34陽性細胞数であり、有核細胞より強い相関が認められた。急性GVHDとHLA一致度との間には有意の相関は認められなかった。移植後の無イベント生存率と相関したのは、移植時の病期、患者年齢、疾患の種類などであった。近年移植数が増加しているミニ移植の評価については今後の経過観察に待つべきものと思われた。

A. 研究目的

臍帯血移植は造血幹細胞移植が必要な症例に迅速に移植機会を提供できるという利点があり、近年実施例数が急速に増加している。

しかし、臍帯血移植では生着不全率が高く、移植後の感染症などの移植関連死亡も高いことなどが懸念されており、移植法としての科学的な検証が求められている。

本研究では、わが国において実施された非血縁者間臍帯血移植について解析を行い、今後のガイドライン策定の資料とすることを目的とした。

B. 研究方法

日本さい帯血バンクネットワークに参加する11の臍帯血バンクから提供を受けて実施され

た非血縁者間臍帯血移植について、当該臍帯血バンクにより移植結果調査票が回収された。

調査票は各臍帯血バンク事務局によってチェックされた後に、日本さい帯血バンクネットワークデータ管理小委員会の委員によって再確認され、最終データとして確定された。

調査票は患者名を匿名化して収集した。

C. 研究結果

1. 年次別移植数の推移

1997年に最初の非血縁者間臍帯血移植が実施されてから2004年までの8年間に2000例で移植が行われた（図1）。

2. 年齢構成

前半の4年間は移植患者のほとんどは小児であったが、2000年以降になると成人の比率が高

まり、最近2年間では80%以上を成人が占めるようになっている。とくに50歳以上の高齢者における移植の増加が著しい。

3. 解析症例の概要

今回解析の対象となった症例は1304例で、15歳以下の小児が553例、16歳以上の成人が751例であった。

小児例においては腫瘍性疾患が434例、非腫瘍性疾患が119例で、成人例では腫瘍性疾患が730例、非腫瘍性疾患が21例であった。それぞれの疾患別症例数を表1に示す。

腫瘍性疾患については、移植時の病期によりスタンダードリスク(SR)群とハイリスク(HR)群に分けて解析を行った。

小児急性白血病(ALL、AML)においては第1ならびに第2寛解期をSR群、それ以外の症例をHR群とし、成人急性白血病においては第1寛解期のみをSR群、それ以外をHR群とし、ATLにおいてはすべてをHR群とした。

また年齢を問わず、CMLについては第1慢性期をSR群、MDSにおいてはRAのみをSR群とし、それ以外をHR群とした。有核細胞数では $2 \times 10^7/\text{kg}$ 以上あること、CD34陽性細胞数では $5 \times 10^5/\text{kg}$ 以上あることが必要であった。

4. 生着

小児急性白血病について、移植有核細胞数と好中球回復速度との相関(図2)と移植CD34細胞数と好中球回復速度との相関(図3)をみたところ、有核細胞よりもCD34陽性細胞との間に強い相関が認められた。

同様の傾向は成人白血病においても認められた(図4、5)。

5. GVHD

急性GVHDの重症度は日本造血細胞移植学会の基準により判定し、Ⅱ度以上を重症、Ⅲ～Ⅳ度を最重症と表記し、皮疹の出現日をGVHDのonsetとした。

急性GVHDと血清学的HLA抗原の一致度との間には有意の相関は認められなかったが、HLAのミスマッチがない移植では1～2抗原不一致移植よりもⅡ度以上の中等症～重症GVHDがやや少ない傾向があった(図6)。

GVHD予防法の中で最も多く行われているシクロスポリン+短期メソトレキセート(CYA+MTX)とタクロリムス+短期メソトレキセート(FK+MTX)のⅡ度以上のGVHDの発症率はほぼ同

程度であった(図7)。

6. 生存率

(1) 移植歴の有無による解析

以前に何らかの造血幹細胞移植の既往のある症例と初めての移植例とを比較すると、小児においても成人においても著明な差が認められた(図8～11)。そのため、以下の解析は初回移植例に限定して行った。

(2) 生存率表記法別による解析

造血幹細胞移植における移植後の生存率の評価方法としては、生死のみによる「粗生存率(overall survival: OS)」、原病の再発の有無を加味した「無病生存率(disease free survival: DFS)」、DFSに移植細胞の生着などのイベントの有無を加味した「無イベント生存率(event free survival: EFS)」などが用いられている。

臍帯血移植においては移植された造血細胞が生着をしない生着不全の比率が高いため、移植方法として科学的に評価するためにはEFSが最も適切と考えられている。本研究ではEFSにより生存率を表現することとした。

3つの生存率の違いの1例として、小児急性白血病のSR群とHR群におけるそれぞれの生存率を示した(図12、図13)。

(3) 小児白血病

SR群を疾患別のEFSでみると、ALLで $46.3 \pm 5.2\%$ 、AMLで $53.8 \pm 7.6\%$ で比較的良好な生存率であった(図14)。CMLとMDSにおいては症例数が少なく、今回の解析での評価は困難であった。

HR群における疾患別のEFSを図15に示した。ALLやAMLでのEFSは15%前後であったが、CMLやMDSでは症例数は少ないものの30%をやや上回る結果であった。

小児ALLにおいて化学療法の成績が極めて不良な病型である乳児白血病とフィラデルフィア染色体(Ph)陽性ALLにおけるEFSを図16と図17に示した。

乳児白血病においては $41.4 \pm 8.4\%$ のEFSが得られており、臍帯血移植の利点が活かされた結果と考えられる。

Ph陽性ALLでは第1～2寛解期で $34.3 \pm 15.9\%$ であった。

移植された有核細胞数とCD34陽性細胞数とEFSの関係を図18～図21に示した。

HLA 抗原の不一致数毎の EFS では、S R 群、H R 群とも有意差ではないものの、2 抗原不一致の移植例の方が 0～1 抗原不一致移植例よりもやや上回っていた (図 2 2, 2 3)。

移植時期を 2000 年までの前期と、2001 年以降の後期に分けて ALL、AML の S R 群と H R 群で比較すると、ALL では前後期に差はないのに対して、AML では S R 群では後期に著明な向上が認められる一方で H R 群ではむしろ後期で EFS が低下していた (図 2 4～2 7)。

(4) 成人白血病

S R 群における 3 年 EFS を疾患別にみると、ALL で $23.0 \pm 9.8\%$ 、AML で $41.2 \pm 8.0\%$ 、MDS で $62.5 \pm 14.6\%$ であった (図 2 8)。CML では 3 例中 2 例が無イベント生存中であった。S R 群のフル移植のみを疾患別の EFS をみたものが図 2 9 である。

H R 群における疾患別の EFS、フル移植に限定した EFS を図 3 0 と図 3 1 に示す。

次に急性白血病について、50 歳未満のフル移植をリスク別に比較したのが図 3 2 である。50 歳以上についてはフル移植とミニ移植のそれぞれについてリスク別に比較したものが図 3 3 と図 3 4 であるが、まだ観察期間が短いため、今後の経過観察が必要と考える。

成人における Ph 陽性 ALL の EFS を図 3 5 に示すが、必ずしも良好な成績とはいえない。

移植された有核細胞数、CD34 陽性細胞数により EFS を解析したのが図 3 6～3 9 である。

成人においては HLA の一致度と EFS との間に明確な関係は認められなかった (図 4 0)。

E. 結論

日本さい帯血バンクネットワークを介して実施された非血縁者間臍帯血移植の成績を解析し以下の結果をえた。

- (1) 2003 年以降に移植実施数の急速な増加が認められた。
- (2) 小児白血病においては非血縁者間臍帯血移植は日常診療の中で一定の役割を果たしている。
- (3) 成人白血病においては観察期間が短く、まだ一定の評価を下す時期にはいたっていないように思われる。

- (4) 全体として、移植結果に影響を与える因子としては、移植時期、疾患の種類、移植細胞数 (とくに CD34 陽性細胞数) などが重要で、HLA の一致度については一定の傾向は認められなかった。

F. 健康危害情報

本疫学研究そのものによる健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tazume K, Kato S, et al.: Induction of cytomegalovirus-specific CD4+ cytotoxic T lymphocytes from seropositive or negative healthy subjects or stem cell transplant recipients. *Exp Hematol*, 2004;32:95-103.
- 2) Hagihara M, Kato S, et al.: Platelets, after exposure to a high shear stress, induce IL-10-producing, mature dendritic cells in vitro. *Journal of Immunology*, 2004;172:5297-5303.
- 3) Yanada M, Kato S, et al.: Tacrolimus instead of cyclosporine used for prophylaxis against graft-versus-host disease improves outcome after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors, but not from HLA-identical sibling donors: a national survey conducted in Japan. *Bone Marrow Transpl*, 2004;34:331-337.
- 4) Matsumoto M, Kato S, et al.: Changes in thyroid function after bone marrow transplant in young patients. *Pediatrics Int*, 2004;46:291-295.
- 5) Peters C, Kato S, ETA AL.: Cerebral

X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. Blood, 2004;104:881-888.

- 6) Yabe H, **Kato S**, et al.: Unmanipulated HLA-haploidentical bone marrow transplantation for the treatment of fatal, nonmalignant diseases in children and adolescents. Int J Hematol, 2004;80:78-82.
- 7) Sakata N, **Kato S**. et al.: Unrelated donor marrow transplantation for congenital immunodeficiency and metabolic disease: an update of the experience of the Japan Marrow Donor Program. International Journal of Hematology 2004; 80:174-182.
- 8) Yahata T, **Kato S**, et al.: Competitive repopulation assay of two gene-marked cord blood units in NOD/SCID/gammac(null) mice. Blood, 2004;105:882-891.
- 9) Ishiguro H, **Kato S**, et al.: Long-term follow-up of thyroid function in patients who received bone marrow transplantation during childhood and adolescence. J Clin Endocrinol Metab, 2004;89:5981~5986.
- 10) Tsuboi K, **Kato S**, et al. Tsuboi K, **Kato S**, et al.: Potential and origin of the hematopoietic population in human skeletal muscle. Leuk Res, 2005;29:317-324.
- 11) **加藤俊一**: わが国における造血幹細胞移植の最近の動向. 移植, 2004;39:1-5.
- 12) 沖 将行、**加藤俊一**他: 転移性乳癌に合併した骨髄異形成症候群症例に対し施行した体外増幅を併用した臍帯血移植. 臨床血液,

2004;45:1048-1052.

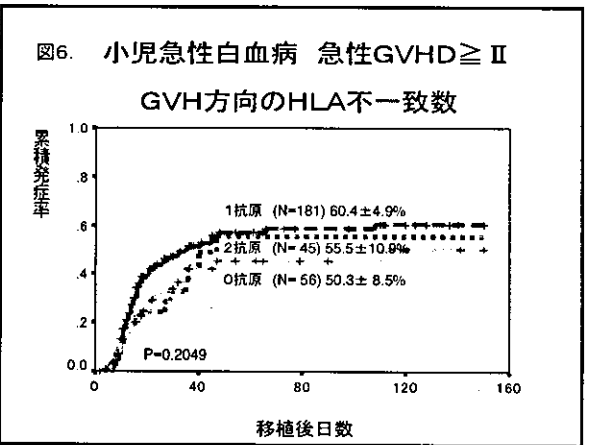
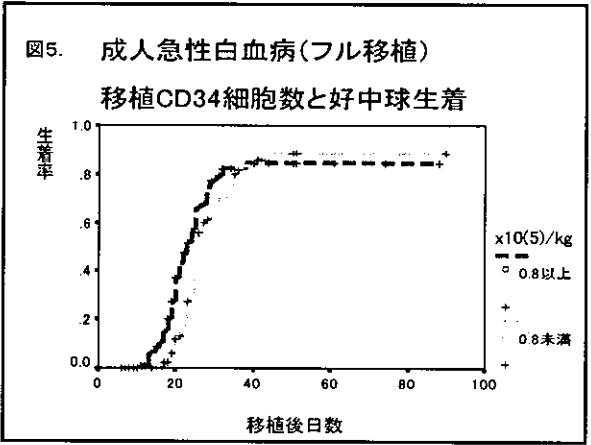
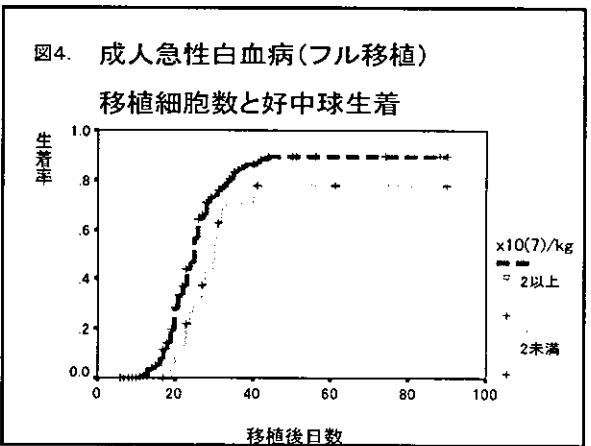
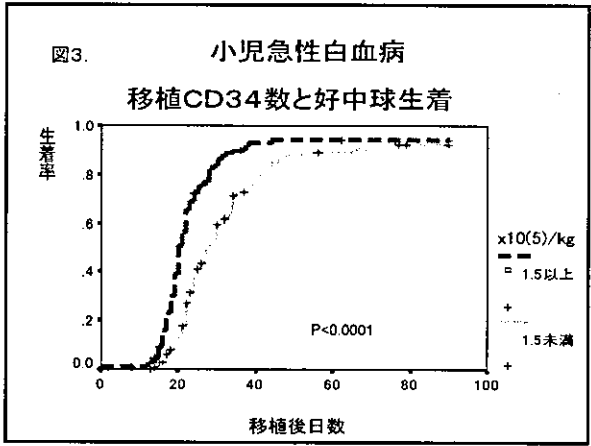
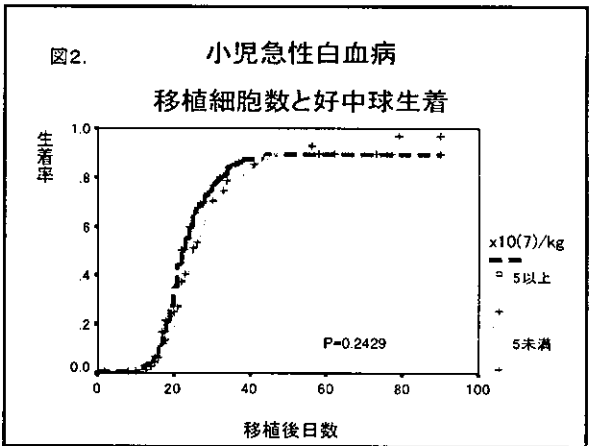
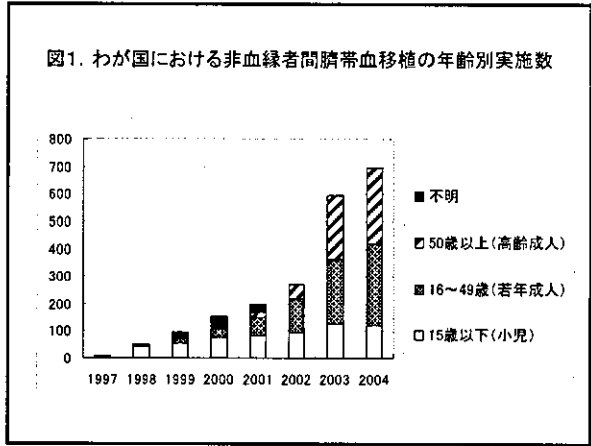
- 12) 吉場史朗、**加藤俊一**他: マイクロサテライトDNA (STR)を用いた造血幹細胞移植後のキメリズム解析の有用性に関する研究. 移植, 2004;39:556-563.
- 13) 保田由喜治、**加藤俊一**他: 造血幹細胞移植後のサイトメガロウイルス (CMV) 感染症診断における real-time PCR の有用性の検討. 2005;39:668-673.
- 14) **加藤俊一**: 小児の臍帯血移植の適応と成績. 「血液成分治療」(廣田 豊、原 宏 編集)、医薬ジャーナル、102-107, 2004.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

表1. 疾患別症例数

	小児	成人
1. 急性リンパ性白血病	229	134
2. 急性骨髄性白血病	111	237
3. 成人T細胞白血病	0	37
4. 骨髄異形成症候群	45	133
5. 慢性骨髄性白血病	7	54
6. 慢性リンパ性白血病	0	3
7. 非ホジキンリンパ腫	22	103
8. Hodgkin病	0	10
9. 多発性骨髄種	0	15
10. 固形癌	20	4
11. 再生不良性貧血	14	16
12. 血色素異常症	2	0
13. 先天性免疫不全	38	0
14. 先天性代謝異常	22	0
15. その他	43	5
合 計	553	751



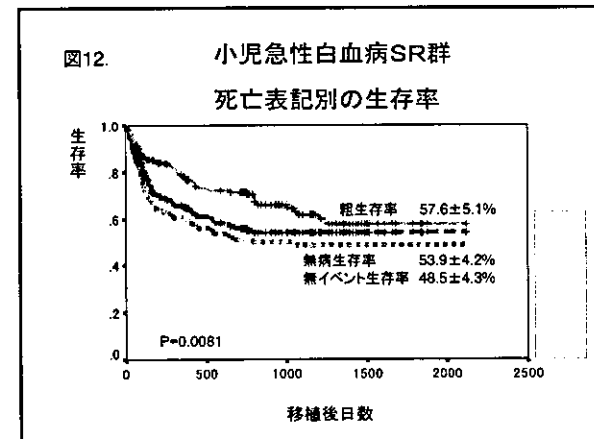
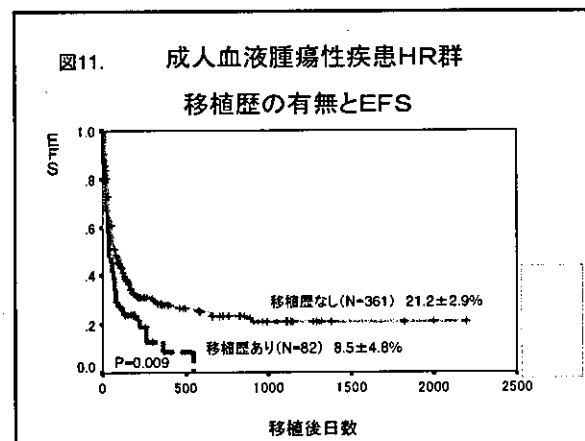
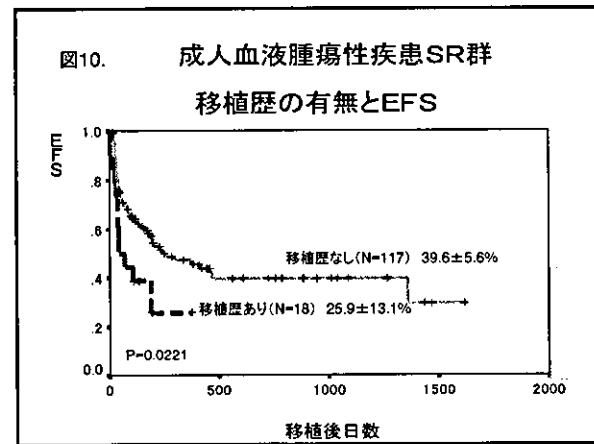
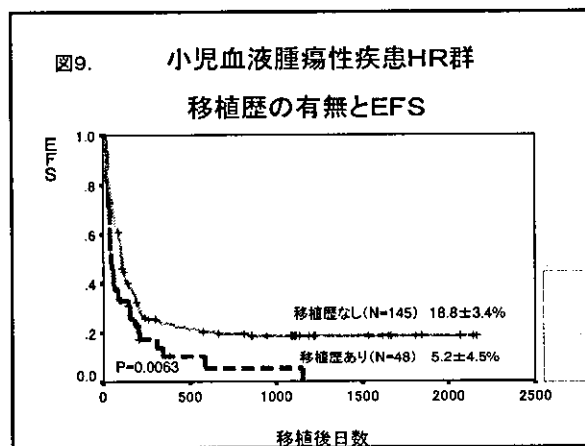
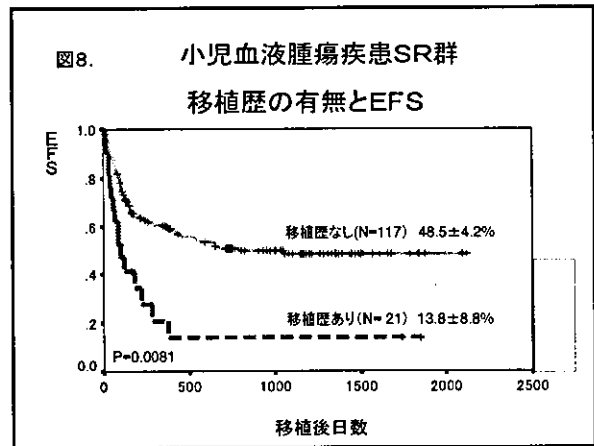
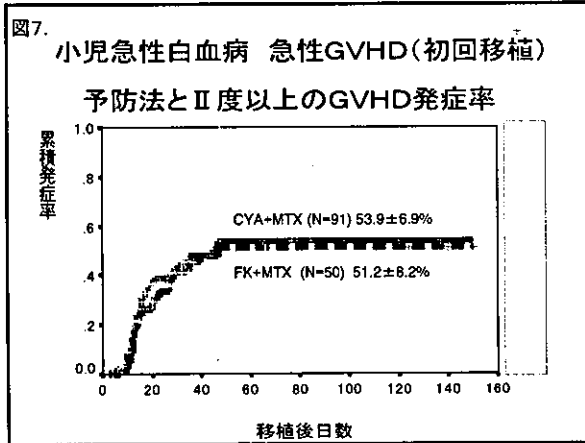


図13. 小児急性白血病HR群
死亡表記別の生存率

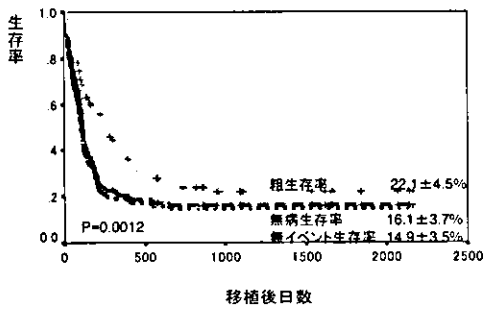


図14. 小児白血病SR群(初回移植)
疾患別のEFS

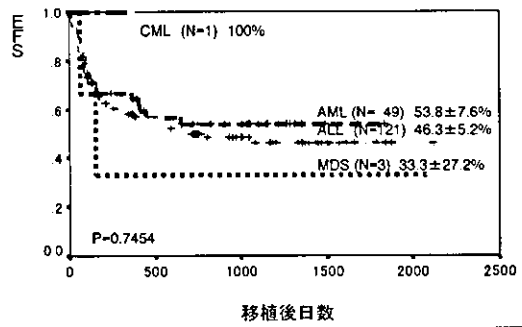


図15. 小児白血病HR群(初回移植)
疾患別EFS

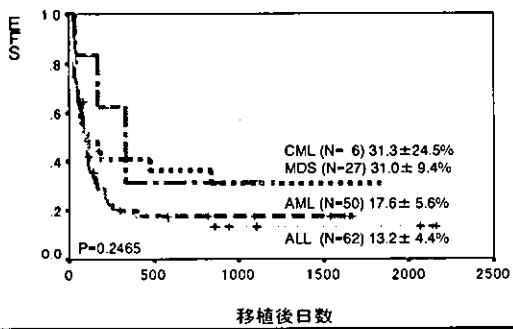


図16. 乳児白血病(4/11転座、MLL+)

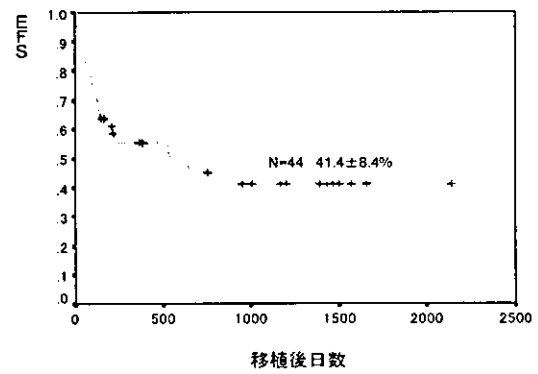


図17. 小児Ph陽性ALL

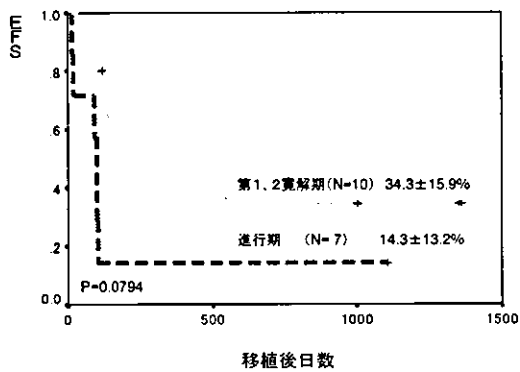


図18. 小児急性白血病SR群
移植有核細胞数とEFS

