

(69%)で skin score が 25%以上改善したと EBMT/EULAR から報告された。また、米国からは、19例中15例で skin score が 25%以上改善したと報告されている。本症例においては、CY を半量に減量した TT-CY 療法を移植前処置として用いたが、移植後3ヶ月の時点で25%の skin score と既報と同等の改善が認められた。

SSc において注意すべきことは、心臓が何らかの障害を受けていることが多く、心筋や伝導系に、微小血管の障害に基づく斑状の線維化を認めることである。しばしば無症状であるが多くの症例で死因となりうる。EBMT/EULAR では 59 例 (12%) の TRM が報告されている。うち SSc の症例は 19 例 (32%) で、死因を同定できた症例のうち、心臓関連死は 5 例 (SSc の TRM のなかで 26%) であった。このうち CY による毒性が疑われたのは 2 例である。これらの 2 例では、移植前の心機能のスクリーニング検査で異常は認められなかった。我々が経験した症例は、頻脈と BNP の軽度の上昇を認め、CY (2g/m²/日、2日間)による幹細胞動員時に心不全を発症した。そこで移植前処置では CY を従来(50mg/kg/日、4日間投与)の半量に減量し(50mg/kg/日、2日間投与)、心毒性の少ない thiothepa (TT: 5mg/kg、一日2回投与、1日間)を併用した TT-CY 療法を用いた。TT の dose limiting factor は神経毒性であり、心筋に対する毒性が少なく、一方で免疫抑制の効果は諸家によって確認されている。TT-CY 療法は、特に心予備能の低下が疑われる症例に対し心毒性の軽減、ひいては大量免疫抑制療法による TRM の減少に有望な方法であると考えられた。

E. 結論

Auto-HSCT 併用超大量免疫抑制療法は、自己免疫疾患の長期的寛解が期待される治療法であるが、無効例が存在することや治療関連死が依然 5-9%と高率であるなどの問題点がある。今後、適応基準と個々の疾患に対応した移植前処置の検討が必要である。さらに、長期間の経過観察や大規模臨床試験により、疾患改善度、強力な免疫抑制の副作用の評価、超大量化学療法の影響を明らかにし、本治療法の安全性向上と有用性の検証を行うことが必要と考えられる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukaya H, Xiao W, Inaba K, Suzuki Y, Hirokawa M, Kawabata Y, Komatsuda A, Endo T, Kishimoto H, Takada G, and Sawada K. Co-development of dendritic cells along with erythroid differentiation from human CD34+ cells by tumor necrosis factor- α . *Exp Hematol* 32:450-460, 2004
- 2) Koizumi K, Fujimoto K, Haseyama Y, Endo T, Nishio M, Yokota K, Itoh T, Sawada K, Koike T. Effective high-dose chemotherapy combined with CD34+ selected peripheral blood stem transplantation in a patient with cutaneous involvement of nasal NK/T-cell lymphoma. *Internal medicine* 43: 878-882, 2004
- 3) Bohgaki T, Amasaki Y, Nishimura N, Bohgaki M, Yamahita Y, Nishio M, Sawada K, Jodo S, Atsumi T, and Koike T. Upregulated expression of tumor necrosis factor- α converting enzyme in peripheral monocytes in patients with early systemic sclerosis. *Ann Rheumat Dis* (in press)
- 4) 小松田敦、澤田賢一. 「26. 末梢血幹細胞移植」リウマチ性疾患最新の治療. 内科: 南江堂. 93: 326-329, 2004
- 5) 澤田賢一、小松田敦、廣川誠. 特集・造血幹細胞移植の進歩: 「6. 自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植」. 医薬ジャーナル社. 14: 77-84, 2004
- 6) 澤田賢一. 森真由美編集: 高齢者の血液疾患、「幹細胞・造血因子」. 医薬ジャーナル社 (印刷中)

2. 学会発表

- 1) 川端良成, 廣川誠, 小澤政豊, 斉藤宏文, 茂木睦仁, 堀内高広, 小松田敦, 三浦偉久男, 澤田賢一. 心不全を合併した難治性全身性硬化症に対し減量 cyclophosphamide および thiothepa による前処置後に純化 CD34 陽性細胞移植を施行し

た 1 例. 第 27 回日本造血細胞移植学会総会.
岡山, 2004 年 12 月 17 日.

- 2) Fujishima M, Hirokawa M, Fujishima N, Saitoh H, Ichikawa Y, Kawabata Y, Miura I, Sawada K. Skewed TCR repertoire of $V\delta 1+\gamma\delta$ T cells in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell grafts possible involvement of Epstein-Barr virus in clonal expansion of $V\delta 1+$ T cells. 46th The American Society of Hematology, San Diego, California, USA, December 4-7, 2004
- 3) Fujishima N, Hirokawa M, Fujishima M, Ishikawa Y, Horiuchi T, Miura I, Sawada K. Expression of human enhancer of invasion 10(HEI10) in human

myeloid leukemias and downregulation during differentiation of hematopoietic stem cells. 46th The American Society of Hematology, San Diego, California, USA, December 4-7, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

「免疫抑制薬の感受性に関わる遺伝子多型の検討」

分担研究者 河野 修興 広島大学大学院・分子内科学 教授

研究要旨：アザチオプリンによる副作用発現に関わる tpmt 遺伝子において a719g 変異と高頻度に相関する新たな intron 領域での繰り返し塩基の存在が判明した。また、日本人リウマチ関連疾患 209 名を対象にメトトレキサートの効果・副作用発現に関わることが示唆される 2 つの tyms 遺伝子多型（プロモーター領域 tandem repeat 多型、3'非翻訳領域 6base pair 欠失多型）の頻度を解析した。同種幹細胞移植における免疫抑制療法に際して、薬剤感受性遺伝子の検討は、薬物選択・投与量決定に有用であり、個別化医療として考慮すべきである。

A. 研究目的

アザチオプリン（以下 aza）は、同種幹細胞移植を含むさまざまな自己免疫疾患臓器移植後の拒絶反応の抑制に、必要不可欠な薬剤の一つであるが、その副作用として重篤かつ致命的な骨髄抑制を伴うことが知られている。aza は、生体内において purine pathway により代謝され、その免疫抑制効果は代謝産物である thioguanine nucleotides により発現すると考えられている。aza の代謝過程で xanthin oxidase、hgppt、thiopurine methyltransferase などの細胞内酵素群が関与し、これらは aza の臨床効果に大きな影響を及ぼしていると考えられている。特に thiopurine methyltransferase（以下 tpmt）には遺伝的 polymorphism が存在し、aza の副作用との関連が報告されている。

我々は、以前、リウマチ関連疾患患者、大久野島毒ガス傷害者、健常成人を対象に日本人の tpmt 遺伝子多型頻度を解析し、さらに aza の副作用と tpmt 遺伝子型との関連を検討した結果、日本人において aza による骨髄抑制の予知に a719g 一塩基置換を有する tpmt*3c 変異の検索が有用である可能性を報告した。しかし、一方で、tpmt*3c 変異を認めず aza による副作用を生じることも判明し、未知の tpmt 遺伝子変異の存在も示唆された。そこで、aza により副作用を生じた患者を対象に tpmt の全 exon におけるシークエンス解析を行ったところ、tpmt 遺伝子の 2 カ所の intron 領域において多反復配列の存在と a719g 変異との関連が示唆されたため、その解析を行った。

また、免疫抑制剤として使用されるメトトレキサート（以下 mtz）の代謝酵素の一つである thymidylate synthase（以下 tyms）における 2 つの遺伝子多型、すなわちプロモーター領域の tandem repeat 多型、および 3'非翻訳領域の 6base pair 欠失多型が、mtz の効果・副作用発現に関与することを示し治療前至適投与量を決定するオーダーメイド治療につながる可能性についても報告してきたが、今回、日本人のリウマチ関連疾患患者 209 名を対象に tyms におけるこれら 2 つの遺伝子多型の頻度を解析した。

B. 研究方法

tpmt a719g 変異の有無が明らかとなっているリウマチ関連疾患患者、大久野島毒ガス傷害者、健常成人で tpmt a719g 変異をもつ 16 名、および a719g 変異を持たない 16 名の計 32 名を対象とした。それぞれにおいて多反復配列の存在が示唆された tpmt 遺伝子の intron5 および intron8 における塩基配列を検討した。対象者の末梢血単核球より dna を抽出し、その抽出した genomic dna を、pcr 法により増幅し、オートシーケンサーにより解析した。使用したプライマーは以下で、一部は我々が独自にデザインした。intron5 sense, 5'-ctttgcttggccctcttcc-3'; intron5 antisense, 5'-agaagacactgtcttactcac-3'、intron8 sense, 5'-tccttccctgcctttgtcc-3'; intron8 antisense, 5'-atcaagaactaggcaactg-3'。塩基配列を決定した後、tpmt a719g genotype と多反復配列の関連について検

討し、さらに、a719g 変異をもち、かつ aza を使用し副作用を認めた群 3 名 (aza-*vv*)、a719g 変異は無いが、aza を使用し副作用を認めた群 4 名 (aza-*ww*)、a719g 変異を持つが aza 使用既往のない群 13 名 (*vv* および *vv*)、a719g 変異もなく、aza 使用既往もない群 12 名 (*ww*) の 4 群間において、多反復配列との関連について検討した。

また、関節リウマチ患者 167 名と全身性エリテマトーデス、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎などで関節リウマチを除くリウマチ関連疾患 42 名の計 209 名を対象として、*tyms* プロモーター領域 tandem repeat 多型、*tyms*3′非翻訳領域 6base pair 欠失多型について遺伝子多型を解析するとともに、2 群間での多型頻度を比較した。対象者の末梢血単核球より dna を抽出し、その抽出した genomic dna を、*tyms* プロモーター領域 tandem repeat 多型はアレル特異的 pcr 法により、*tyms*3′非翻訳領域 6base pair 欠失多型については pcr-rflp 法を用い解析した。

本研究における遺伝子解析は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）を遵守すると共に、広島大学医学部倫理審査委員会による承認を得た後、対象者への遺伝子的検索を含めたインフォームド・コンセントを実施し同意を得て行った。

C. 研究結果

tpmt intron5 におけるアデニン (a) とチミン (t) の反復配列を genotype 別に検討した結果を表 1 に示す。野生型アレル(wild)と変異型アレル(varient)では、反復配列数が異なり、変異型アレルにおいてはアデニン(a) とチミン (t) の反復配列数が a が 10 個、t が 9 個のものとはプロタイプを形成していた。さらに、aza による副作用の有無により分類したのが表 2 である。aza により副作用を生じたが a719g 変異を認めなかった群 (aza-*ww*) とコントロール群 (*ww*) の 2 群において有意な差は認めなかった。同様に *tpmt* intron8 におけるグアニン (g) とチミン (t) の反復配列を genotype 別に検討した結果を表 3 に示す。野生型アレル(wild)と変異型アレル(varient)では明らかに反復配列数が異なり、変異型アレルにおいてはグアニン (g) とチミン (t)

の反復配列数が g が 3 個、t が 13 個のものとハプロタイプを形成していた。同様に、aza による副作用の有無により検討すると、aza により副作用を生じたが a719g 変異を認めなかった群 (aza-*ww*) とコントロール群 (*ww*) の 2 群において有意な差は認めなかった (表 4)。

tyms プロモーター領域、および *tyms*3′非翻訳領域における関節リウマチとこれを除いた sle などのリウマチ関連疾患における genotype と各アレルの分布を表 5 に示す。両者における genotype、およびアレル頻度には差を認めず、リウマチ関連疾患全体における *tyms* プロモーター領域の genotype 頻度は 2r/2r、2r/3r、3r/3r がそれぞれ 4%、25%、71% であり、*tyms*3′非翻訳領域の genotype 頻度は 6bp/6bp、6bp/0bp、0bp/0bp がそれぞれ 4%、47%、49% であった。

D. 考察

本研究により、*tpmt* の intron 領域において多反復配列による新たな多型の存在が明らかとなった。*tpmt* には、さまざまな variant が存在し、現在少なくとも 9 つの変異型アレルの存在が確認されており、多くの変異型アレルは活性度も半減期も野生型のそれよりも劣っていることが明らかにされている。*tpmt* 活性の低下は、aza の細胞毒性としての副作用発現をより容易にすると考えられ、事前の *tpmt* の変異型アレルの検索は aza による骨髄抑制の発現の予知と投与量の設定に有用である可能性が示唆されている。しかし、我々が以前報告したように、実際に aza により骨髄抑制を認めた患者の約 50% にしか *tpmt* の変異を認めず、他は変異が存在しなかった。すなわち、aza による骨髄抑制は *tpmt* の変異のみではなく、他にも骨髄抑制の発現に影響する遺伝子が存在することを示唆する。本研究において示された intron 領域での *tpmt* の多反復配列多型と aza の副作用に有意な関連は見いだせなかったが、この多型は酵素活性に影響する exon 領域の多型とハプロタイプを形成することが判明した。したがって、このような未知の多型が *tpmt* の phenotype に影響している可能性は否定できないと考える。

また、我々は *tyms*3′非翻訳領域における多型頻度が

人種間で大きく異なることを以前報告し、本研究では日本人リウマチ関連疾患患者でのこれらの遺伝子多型頻度を解析した。免疫抑制剤としての aza や mtx の必要性とその副作用・効果発現の重大性、さらには人種間における相違は、日本人独自のアリル頻度や酵素活性に影響を与える未知のアリルについてさらなる検索が必要であると考ええる。

E. 結論

thiopurine methyltransferase 遺伝子多型において、tpmt a719g 変異とハプロタイプを形成する新たな intron 領域の反復配列多型の存在を証明した。この 2 つの intron 領域における反復配列多型と aza の副作用発現との間に関連は認めなかった。また、関節リウマチと他のリウマチ関連疾患の 2 群間において thymidylate synthase のプロモーター領域、および 3' 非翻訳領域における genotype、およびアリル頻度はいずれも差は認めなかった。日本人におけるリウマチ関連疾患患者 209 名の thymidylate synthase プロモーター領

域の genotype 頻度は 2r/2r, 2r/3r, 3r/3r がそれぞれ 4%、25%、71% であり、thymidylate synthase 3' 非翻訳領域の genotype 頻度は 6bp/6bp, 6bp/0bp, 0bp/0bp がそれぞれ 4%、47%、49% であった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) kumagai k, hiyama k, oyama t, maeda h, kohno n. polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis. int. j. mol. med 11(5) : 593-600, 2003.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

表 1. Number of A & T Repeats in Intron 5

A719G Genotype(N)	(A)n				(T)n	
	10/10	10/12	12/12	8/8	8/9	9/9
WW (16)	0	0	16	12	3	1
VV (2)	2	0	0	0	0	2
WV (14)	0	11	3	2	11	1

W : wild V : variant

表 2. Number of A & T Repeats in Intron 5

A719G Genotype(N)	(A)n				(T)n	
	10/10	10/12	12/12	8/8	8/9	9/9
AZA-wv (3)	0	3	0	0	3	0
AZA-ww (4)	0	0	4	3	1	0
WW (12)	0	0	12	9	2	1
WV, vv (13)	2	8	3	2	8	3

W : wild V : variant

表 3. Number of G & T Repeats in Intron 8

A719G Genotype(N)	(G)n			(T)n		
	2/2	2/3	3/3	13/13	13/12or14	12or14
WW (15)	9	5	1	0	0	12*
VV (2)	0	0	2	2	0	0
WV (14)	2	9	3	0	11	2**

not determined for 3*&1**

W : wild V : variant

表 4. Number of G & T Repeats in Intron 8

A719G Genotype(N)	(G)n			(T)n		
	2/2	2/3	3/3	13/13	13/12or14	12or14
AZA-wv (3)	0	3	0	0	3	0
AZA-ww (4)	2	2	0	0	0	2*
WW (12)	7	3	1*	0	0	10*
WV, vv (13)	2	6	5	2	8	2**

not determined for 2*&1**

W : wild V : variant

表 5. Frequencies of genotypes and alleles of the polymorphisms in the TYMS

	n	Genotype			Allelotype	
<i>TYMS</i> promoter		2R/2R	2R/3R	3R/3R	2R	3R
RA	167	3%	26%	70%	0.16	0.84
RD	42	5%	21%	74%	0.16	0.84
<i>TYMS</i> 3'UTR		6bp/6bp	6bp/0bp	0bp/0bp	6bp	0bp
RA	167	5%	44%	51%	0.27	0.73
RD	42	2%	38%	60%	0.32	0.68

RA: rheumatoid arthritis RD: rheumatic diseases. 2R/2R = homozygous for the double-repeat allele. 2R/3R = heterozygous with the double- and triple-repeats. 3R/3R = homozygous for the triple-repeat. 6 bp/6 bp = homozygous for the wild allele. 6 bp/0 bp = heterozygous for the wild and 6-bp deletion alleles. 0 bp/0 bp = homozygous for the 6-bp deletion allele. n = number of subjects analyzed.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

「膠原病に対する造血幹細胞移植の作用機序、および移植後の免疫回復の解析」

平家 勇司 国立がんセンター研究所／薬効試験部 主任研究官

研究要旨：自己免疫疾患に対する骨髄非破壊的前処置を用いた同種造血幹細胞移植（ミニ移植）実施に備えて、各種疾患に対するミニ移植後の免疫回復解析を行った。

A. 研究目的

自己免疫疾患に対する同種造血幹細胞移植療法を行う場合、GVHD や移植後感染症など移植関連合併症の発現を極力抑えることが重要である。この移植関連合併症は移植後免疫が深く関わっており、それゆえ移植後免疫回復の解析は極めて重要である。本研究の目的は、移植後の重大な副作用の一つであるサイトメガロウイルス（CMV）に対する特異的免疫能の回復を解析し、移植後 CMV 再活性化に対する予測並びに治療法開発につなげることである。

B. 研究方法

研究背景・研究目的・研究方法（患者検体の採取、詳細な解析方法を含む）を記載した研究計画書を作成し、国立がんセンター内の倫理審査委員会にて承認を得て研究を開始した。具体的な研究方法は以下の通りである。

国立がんセンター中央病院・血液幹細胞療法科並びに国家公務員共済組合虎の門病院・血液科にて、各種疾患に対する骨髄非破壊的前処置を用いた末梢血幹細胞移植（ミニ移植）を受けた患者さんの、移植前、移植後 30 日目、60 日目、90 日目、120 日目、180 日目、240 日目、360 日目に 20ml の末梢血採血を行った。検体は直ちに国立がんセンター中央病院・血液幹細胞移植療法科・支援施設に搬送し、単核球を分離した上で以下の検討を行った。

・各種細胞表面マーカーの解析：

CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD20, CD25, CD34, CD45, CD45RA, CD45RO, CD56, CD161, V α 24 の解析を行う。

・CMV 抗原特異的 CTL の解析：

全例を対象に、CMV Lysate 刺激後の細胞内サイトカイン産生を測定した。HLA-A02 を持つ末梢血幹細胞移植症例で可能な症例に関しては、結合ペプチド NLVPMATV を用いた Tetramer 解析とペプチド刺激による細胞内解析を追加した。さらに、HLA-A02 の Genotype を解析し、A0201 で見つかった A0206 や A0207 で反応するかを検討した。

<倫理面への配慮>

研究計画書を作成し、国立がんセンターの倫理審査会の承認を得て研究を行った。採血に際しては、当日の患者状態を診察し、患者に臨床上的不利益を与えないよう配慮を行った。

C. 研究結果

- 1) 表面マーカーの解析によって、移植後 CD4T 細胞の回復は他の細胞の回復より遅れる例が多いことが明らかとなった。
- 2) 急性 GVHD の発症時には、NKT 細胞ならびに CD4+CD25+T 細胞が減少している傾向が見られた。
- 3) HLA-A02 症例において、移植後に CMV に対する抗原特異的 CD8T 細胞が検出された。同様の方法にて、HLA-A24 例では CMV 特異的 CD8T 細胞は検出されないか、きわめて低い値であった。この傾向は ELISPOT でも Tetramer でも認められた。
- 4) CMV Lysate 刺激後の CD4T 細胞内 IFN 産生能は、HLA-A02 症例、A24 症例ともに見られ、2 群間で差が認められなかった。

- 5) HLA-A02 症例内での解析によって、抗 CMV 抗体陽性ドナーから移植した例で、移植後早期から CMV に対する CD4T 並びに CD8T 細胞の回復が観察された。抗体陽性 HLA-A24 症例では、CD8T での観察はできなかったが、CD4T 細胞では同様に回復が見られた。
- 6) HLA-A02 症例での観察にて、ELISPOT での解析結果と Tetramer での解析結果に相関が見られるが、ステロイド使用例において乖離がみられた。
- 7) ステロイド使用例では、Tetramer 陽性細胞が多く見られても CMV 血漿が遷延する傾向が見られるが、このような症例では CMV Lysate や peptide に反応し産生する IFN が低下している例が見られた。これら症例では、CMV 血漿からの回復に伴い、IFN 産生量は回復した。
- 8) CMV に対する CTL と GVHD の発症とは関連性は認められなかった。

D. 考察

本年度は、移植後の CMV 特異的免疫回復を、CMV Lysate 並びに CMV 抗原ペプチドを用いた細胞内サイトカイン産生解析、ELISPOT 解析並びに Tetramer 解析法を用いて行った。この結果、CMV 抗体陽性ドナーからの移植において、移植後早期から CMV 特異的 CD8T 細胞が回復することが明らかとなった。この回復時期が移植後 30 日以内で見られること、CD4T 細胞の回復がそれより遅れること、CMV 抗体陰性ドナーからの移植では CMV 特異的 CD8T 細胞の回復が遅れることから、この CMV 特異的 CD8T 細胞はドナーから持ち込まれた特異的 CD8T が末梢性に増殖したものと考えられる。

HLA-A02 症例と HLA-A24 症例を比較検討したところ、CMV 特異的 CD8T 細胞の解析は HLA-A02 症例でのみ可能であった。HLA-A24 症例では、CMV 特異的 CD8T 細胞は検出できないか、あっても極めて少なく、移植後モニタリングとして使用するのには困難と判断した。両者間で CMV 再活性化・重傷度の頻度、CMV Lysate に対する CD4T 細胞の反応性に違いはないことから、A02 関連ペプチドに比して、A24 関連 CMV 抗原ペプチドの活性が低く検出限界を下回っているもの

と考えられた。

今後、CMV Lysate や蛋白を用いた CMV 反応性 CD4T 細胞の解析の臨床的意味づけを行うと共に、新たな HLA-A24 関連抗原ペプチドの検索が必要と考えられる。その際、細胞内 IFN 産生解析法や ELISPOT 法などの活性化の指標との組み合わせが必要かもしれない。また、CMV 反応性 CD4T 細胞を用いた免疫療法の開発も目指していきたいと考えている。

E. 結論

HLA-A02、HLA-A24 を問わず、CMV 抗体陽性ドナーからの末梢血幹細胞移植例では、CMV Lysate に対し反応し IFN を産生する CD4T 細胞群が見られた。

ELISPOT 法並びに Tetramer 法にて、HLA-A02 症例では、移植後早期から CMV 抗原ペプチド特異的 CTL が検出された。一方、HLA-A24 では検出できないかできて頻度は極めて低かった。

HLA-A02 症例を対象とした解析の結果、抗 CMV 抗体陽性ドナーからの末梢血幹細胞の移植後早期に、CMV 特異的 CD8T 細胞が検出された。一方、抗 CMV 抗体陰性ドナーからの移植では、CMV 特異的 CD8T 細胞の回復が遅れる傾向がみられた。

HLA-A02 症例を対象とした解析で、ステロイド使用中の CMV 血漿遷延例で、Tetramer 陽性細胞が高率であるにもかかわらず、CMV Lysate や CMV 抗原ペプチド刺激後の IFN 産生が低下している例が見られた。

以上のことから、HLA-A24 の頻度が高いわが国においては、HLA に拘束されない CMV-Lysate や蛋白を用いた免疫回復解析と、抗 CMV 免疫療法の開発が必要と考えられた。その際には、HLA-A02 症例を対象に CD8T を含めモニタリングしながら、HLA-A24 に関連する新たな抗原ペプチド検索をあわせ行う必要性が考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kami M, Makimoto A, Heike Y, and Takaue Y.

Reduced-intensity Hematopoietic Stem Cell Transplantation (RIST) for Solid Malignancies. Jpn J Clin Oncol, 34:707-716, 2004.

- 2) Kojima R, Kami M, Hori A, Murashige N, Ohnishi M, Kim S. W, Hamaki T, Kishi Y, Tsutsumi Y, Masauzi N, Heike Y, Mori S, Kobayashi K, Masuo S, Tanosaki R, and Takaue Y. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation as an immunotherapy for metastatic colorectal cancer. Transplantation, 78:1740-1746, 2004.
 - 3) Harada Y, Imataki O, Heike Y, Kawai H, Shimosaka A, Mori S, Kami M, Tanosaki R, Ikarashi Y, Iizuka A, Yoshida M, Wakasugi H, Saito S, Takaue Y, Takei M. and Kakizoe T. Expansion of α -Galactosylceramide-Stimulated $V\alpha 24^{+}$ NKT Cells Cultured in the Absence of Animal Materials. Journal of Immunotherapy. In press
2. 学会発表
- 1) 五十嵐美徳、飯塚明、金田知詞、平家勇司、若杉尋、体外で増殖・活性化した $V\alpha 14i$ NKT 細胞の抗腫瘍活性：第 1 回日本癌学会カンファレンス、2004 年
 - 2) 今滝修、平家勇司、五十嵐美徳、飯塚明、桑谷将城、原田ゆきえ、高上洋一、若杉尋、PBSCT donor における $V\alpha 24$ NKT 細胞増殖の効率化 G-CSF mobilization の役割：第 8 回基盤的癌免疫研究会総会 2004 年
 - 3) 五十嵐美徳、飯塚明、桑谷将城、今滝修、平家勇司、若杉尋、体外で α -galactosylceramide で増殖・活性化したマウス脾細胞の抗腫瘍活性：第 8 回基盤的癌免疫研究会総会 2004 年
 - 4) 五十嵐美徳、飯塚明、平家勇司、吉田光二、若杉尋、 α -galactosylceramide によって体外で誘導される NK 細胞の抗腫瘍活性：第 63 回日本癌学会学術総会 2004 年
 - 5) 今滝修、平家勇司、原田ゆきえ、飯塚明、五十嵐美徳、白川一男、石田秀行、高上洋一、若杉尋、ヒト $V\alpha 24$ 陽性 NKT 細胞体外増殖の効率化を目指した細胞分離操作：第 63 回日本癌学会学術総会 2004 年
 - 6) 今滝修、平家勇司、桑谷将城、五十嵐美徳、高上洋一、若杉尋、健康人ドナーおよびがん患者における $V\alpha 24$ 陽性 NKT 細胞増殖効率の比較と培養液中の G-CSF が与える影響：第 34 回日本免疫学会総会、2004 年
 - 7) α -galactosylceramide 投与後の $V\alpha 14i$ NKT 細胞の増殖期におけるサイトカイン産生の増強：五十嵐美徳、飯塚明、平家勇司、若杉尋、第 34 回日本免疫学会総会、2004 年
 - 8) 大西康、田野崎隆二、山田実奈美、宮村耕一、井上泰宏、岡本真一郎、金成元、上昌広、森慎一郎、平家勇司、峯石真、高上洋一、急性白血病・リンパ腫の同種造血幹細胞移植後の腫瘍形成・再発に対する放射線療法の検討：第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年
 - 9) 楠本茂、森慎一郎、野坂生郷、片山雄太、大西康、白渕規子、岸友紀子、村重直子、田野崎隆二、上昌広、平家勇司、渡辺隆、飛内賢正、高上洋一、2 回の臍帯血移植施行後に $\gamma\delta$ 型 LGL 白血病を発症した急性骨髄性白血病の 1 例：第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年
 - 10) 平家勇司、ミニ移植効果の臨床的・基礎的解析：第 66 回日本血液学会総会・第 46 回日本臨床血液学会総会、2004 年
 - 11) Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Kanda Y, Takaue Y, Mizoguchi H, Kawakami Y: Measurement of functional cytomegalovirus (CMV)-specific T cells by Interferon-gamma-Enzyme-Linked Immunospot (IFN- γ ELISPOT) assay specific for a single immunodominant epitope enables the sensitive evaluation of immune recovery for CMV in patients after allogeneic stem cell transplantation (HSCT) with a reduced-intensity regimen (RIST). The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, 2004 (abstr #3157).
 - 12) Imataki O, Heike Y, Iizuka A, Kuwatani M, Ikarashi Y, Takaue Y, Wakasugi H: Efficient *ex vivo* expansion of $V\alpha 24^{+}$ NKT cells from

G-CSF-mobilized PBMC. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, 2004 (abstr #2865).

- 13) Morita M, Hosokawa M, Heike Y, Sasaki T, Ebisawa M, Mori S, Tanosaki R, Kami M, Nosaka K, Ohnishi M, Tobinai K, Takaue Y: Evaluation of cytomegalovirus (CMV)-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) monitoring procedures with tetramer and intracellular IFN- γ assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, 2004 (abstr #3161).
- 14) Morita M, Hosokawa M, Heike Y, Mori S, Tanosaki R, Kami M, Nosaka K, Ohnishi M, Takaue Y: Follow-up of WT1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) with tetramer-based analysis after allogeneic stem cell transplantation (SCT) in patients with renal cell carcinoma (RCC). The 46th American Society of Hematology Annual Meeting, 2004 (abstr #2122).
- 15) 平家勇司, 森田百合子, 細川麻美, 高上洋一, ミニ移植における CMV 特異的免疫再構築: 第 17 回日本バイオセラピー学会集会総会, 2004 年
- 16) 細川麻美, 森田百合子, 大西康, 田野崎隆二, 森慎一郎, 上昌広, 金成元, 飛内賢正, 高上洋一, 平家勇司, サイトメガロウイルス (CMV) 特異的 CD4 陽性 T 細胞誘導法の確立: 第 27 回

日本造血細胞移植学会総会, 2004 年

- 17) 森田百合子, 細川麻美, 梶田紀明, 海老原知子, 田野崎隆二, 森慎一郎, 上昌広, 三浦修, 高上洋一, 平家勇司, 同種造血幹細胞移植における CMV 特異的免疫の解析: 第 27 回日本造血細胞移植学会総会, 2004 年
- 18) 大西康, 上野真由美, 楠本茂, 金成元, 上昌広, 平家勇司, 森慎一郎, 高上洋一, 田野崎隆二, 飛内賢正, フルダラビン (Flu) + ブスルファン (Bu) + 全身放射線照射 (TBI) 4Gy を前処置として用いた非血縁者間骨髄ミニ移植 17 例の後方視的検討: 第 27 回日本造血細胞移植学会総会, 2004 年
- 19) 大西康, 森慎一郎, 楠本茂, 金成元, 上昌広, 平家勇司, 高上洋一, 飛内賢正, 田野崎隆二, フルダラビン (Flu) + ブスルファン (Bu) + 全身放射線照射 (TBI) 4Gy を前処置として用いた臍帯血移植 14 例の後方視的検討: 第 27 回日本造血細胞移植学会総会, 2004 年

H. 産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyakoshi S, <u>Taniguchi S</u> , et al	Successful engraftment after reduced-intensity umbilical cord blood transplantation for adult patients with advanced hematological diseases.	Clin Cancer Res	10 (11)	3586-3592	2004
Kishi Y, <u>Taniguchi S</u> , et al.	Early central nervous system complications after reduced-intensity stem cell transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant	10 (8)	561-568	2004
Maeda T, <u>Taniguchi S</u> , et al.	Disseminated tuberculosis following reduced-intensity cord blood transplantation for adult patients with hematological diseases.	Bone Marrow Transplant	35	321	2005
Haro T, <u>Harada M</u> , et al.	Tyrosine kinase 2 interacts with and phosphorylates receptor for activated C kinase-1, a WD motif-containing protein.	J Immunol	173	1151-1157	2004
Imataki O, <u>Takaue Y</u> , et al.	A nationwide survey of deep fungal infections and fungal prophylaxis after hematopoietic stem cell transplantation.	Bone Marrow Transplant	33	1173-1179	2004
Kimura H, <u>Mimori A</u> , et al.	Rapidly progressed secondary amyloidosis in a patient with mixed connective tissue disease.	Int Med	43	878-882	2004
Matsui T, <u>Tohma S</u> , et al.	Clinical utility of the quantitative measurements of CD64 on neutrophils to distinguish infection from a flare of rheumatoid arthritis.	Arthritis & Rheumatism	50 (9)	S163	2004
Nakayama H, <u>Tohma S</u> , et al.	Bone Mineral Density and Frequency of Osteoporosis and Vertebral Fractures in Japanese Patients with Rheumatoid Arthritis.	Arthritis & Rheumatism	50 (9)	S498	2004
<u>神田善伸</u>	内科診療の controversy HLA 一致ドナーがない場合の臍帯血移植/HLA ミスマッチ移植(HLA ミスマッチ移植の立場から)	内科	94	1173-1178	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kyo K, <u>Sawada T</u> , et al.	Case report; Rectal cancer associated with chronic lymphocytic leukemia.	J. Gastro- enterology	39	479-483	2004
Iida M, <u>Sawada T</u> , et al.	Alteration of the AT moti binding factor-1 expression in α -fetoprotein producing gastric cancer: Is it an event for differentiation and proliferation of the tumor?	Oncology Reports	11	3-7	2004
Fukuda Y, <u>Takazoe M</u> , et al.	Adsorptive granulocyte and monocyte apheresis for refractory Crohn's disease: an open multicenter prospective study.	J Gastroenterol	39	1158-1164	2004
Yamazaki K, <u>Takazoe M</u> , et al.	Association analysis of SLC22A4, SLC22A5 and DLG5 in Japanese patients with Crohn disease.	J Hum Genet	12	664-668	2004
Ito H, <u>Takazoe M</u> , et al.	A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease.	Gastroenterology	126	989-996	2004
Takemoto F, <u>Hara S</u> , et al.	Autoantibodies against carbonic anhydrase II are increased in renal tubular acidosis associated with Sjogrens syndrome.	Am J Med	118 (2)	181-184	2005
Morita S, <u>Ohashi Y</u> , et al.	Influence of Clinical Parameters on Quality of Life During Chemotherapy in Patients with Advanced Non-small Cell Lung Cancer: Application of a General Linear Model.	Japan Journal of Clinical Oncology	33 (9)	470-476	2003
Yamamoto S, <u>Koike T</u> , et al.	Unexpected role of TNF- α in graft versus host reaction (GVHR): donor-derived TNF- α suppresses GVHR via inhibition of IFN- γ -dependent donor type-1 immunity.	Int Immunol	16	811-817	2004
<u>澤田賢一</u> 他	特集・造血幹細胞移植の進歩: 「6. 自己免疫疾患に対する造血幹細胞移植」	医薬ジャーナル社	14	77-84	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kumagai K, <u>Kohno N</u> , et al.	Polymorphisms in the thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase genes and sensitivity to the low-dose methotrexate therapy in patients with rheumatoid arthritis.	Int. J. Mol. Med	11 (5)	593-600	2003
Kami M, <u>Heike Y</u> , et al.	Reduced-intensity Hematopoietic Stem Cell Transplantation (RIST) for Solid Malignancies.	Jpn J Clin Oncol	34	707-716	2004

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Featured Article

Successful Engraftment After Reduced-Intensity Umbilical Cord Blood Transplantation for Adult Patients with Advanced Hematological Diseases

Shigesaburo Miyakoshi,¹ Koichiro Yuji,¹ Masahiro Kami,² Eiji Kusumi,¹ Yukiko Kishi,² Kazuhiko Kobayashi,² Naoko Murashige,² Tamae Hamaki,² Sung-Won Kim,² Jun-ichi Ueyama,¹ Shin-ichiro Mori,² Shin-ichi Morinaga,¹ Yoshitomo Muto,¹ Shigeru Masuo,³ Mineo Kanemaru,⁴ Tatsuyuki Hayashi,⁵ Yoichi Takae,² and Shuichi Taniguchi¹

¹Department of Hematology, Toranomon Hospital; ²Hematopoietic Stem-cell Transplantation Unit, National Cancer Center Hospital; ³Department of Hematology and Rheumatology, JR Tokyo General Hospital; ⁴Department of Internal Medicine, Higashijuyjo Hospital; and ⁵Department of Internal Medicine, Tokyo Metropolitan Police Hospital, Tokyo, Japan

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this research was to evaluate the feasibility of reduced-intensity unrelated cord-blood transplantation (RI-UCBT) in adult patients with advanced hematological diseases.

Experimental Design: Thirty patients (median age, 58.5 years; range, 20–70 years) with advanced hematological diseases underwent RI-UCBT at Toranomon Hospital between September 2002 and August 2003. Preparative regimen composed of fludarabine 25 mg/m² on days –7 to –3, melphalan 80 mg/m² on day –2, and 4 Gy total body irradiation on day –1. Graft-versus-host disease prophylaxis was composed of cyclosporin alone.

Results: Twenty-six patients achieved primary neutrophil engraftment after a median of 17.5 days. Median infused total cell dose was 3.1 × 10⁷/kg (range, 2.0–4.3 × 10⁷/kg). Two transplant-related mortalities occurred within 28 days of transplant, and another 2 patients displayed primary graft failure. Cumulative incidence of complete donor chimerism at day 60 was 93%. Grade II-IV acute graft-versus-host disease occurred in 27% of patients, with median onset 36 days. Primary disease recurred in 3 patients, and transplant-related mortality within 100 days was

27%. Estimated 1-year overall survival was 32.7%. Excluding 7 patients with documented infection, 19 patients displayed noninfectious fever before engraftment (median onset, day 9). Manifestations included high-grade fever, eruption, and diarrhea. The symptoms responded well to corticosteroid treatments in 7 of 13 treated patients.

Conclusion: This study demonstrated the feasibility of RI-UCBT in adults.

INTRODUCTION

Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation (allo-HSCT) is a curative treatment for refractory hematological malignancies. The therapeutic benefits are attributable to myeloablative radiochemotherapy and graft-versus-leukemia effects (1), whereas the severe regimen-related toxicity (RRT; Ref. 2) limited allo-HSCT to young patients without comorbidities.

Reduced-intensity stem-cell transplantation (RIST) using a nonmyeloablative preparative regimen has been developed to decrease RRT, whereas preserving adequate antitumor effects (3–5). Different pioneering conditioning regimens for RIST have been investigated, such as those including purine analogs (3–6) and total body irradiation (TBI). Although RIST has been attempted in various diseases (5, 6), suitable preparative regimens with adequate immunosuppression have yet to be established.

Although allo-HSCT from an HLA-identical sibling is promising, only 30% of the patients have an HLA-identical sibling donor. The value of unrelated cord-blood transplantation (UCBT) was confirmed for pediatric patients (7, 8). It has seen recent application in adult patients (9). Whereas the potential graft-versus-leukemia effects by cord-blood (CB) without severe graft-versus-host disease (GVHD; Ref. 10) has been reported, current questions include whether CB provides a sufficient number of stem cells for adults and suitable graft-versus-leukemia effects.

Reduced-intensity (RI)-UCBT (11, 12) represents a promising treatment for advanced hematological malignancies. Wagner *et al.* (12) reported recently the feasibility of RI-UCBT for pediatric patients. However, the feasibility in adult patients remains unclear. We report 30 adult patients with advanced hematological diseases who underwent RI-UCBT after fludarabine, melphalan, and 4 Gy TBI since October 2003 at our institution.

PATIENTS AND METHODS

Study Patients and Donors. Thirty patients with hematological diseases underwent RI-UCBT at Toranomon Hospital between September 2002 and August 2003. All of the patients had hematological disorders that were incurable with conventional treatments and were considered inappropriate for conven-

Received 12/17/03; revised 2/10/04; accepted 2/23/04.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Masahiro Kami, Hematopoietic Stem Cell Transplant Unit, the National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan. Phone: 81-3-3542-2511; Fax: 81-3-3542-3815; E-mail: mkami@ncc.go.jp.

tional allo-HSCT due to the lack of an HLA-identical sibling or a suitable unrelated donor, age >50 years old and/or organ dysfunction (generally attributable to previous intense chemo- and/or radiotherapy).

All of the patients provided written informed consent in accordance with the requirements of the Institutional Review Board.

HLA Typing and Donor Matching. An unrelated donor was searched through the Japan Marrow Donation Program (13) for patients without an HLA-identical sibling donor. When no appropriate donor was identified, the Japan Cord Blood Bank Network (14) was searched. CB units, which were ≥ 4 of 6 HLA-antigen matched and contained at least 2×10^7 nucleated cells/kg of recipient body weight before freezing were used. CB units were not depleted of T lymphocytes.

Preparative Regimen. The preparative regimen was composed of fludarabine 25 mg/m² on days -7 to -3, melphalan 80 mg/m² on day -2, and 4 Gy TBI in 2 fractions on day -1.

Supportive Cares. All of the patients were managed in reverse isolation in laminar airflow-equipped rooms and received trimethoprim/sulfamethoxazole for *Pneumocystis carinii* prophylaxis. Fluoroquinolone and fluconazole were administered for prophylaxis of bacterial and fungal infections, respectively. Prophylaxis of herpes virus infection with acyclovir was also given (15). Neutropenic fever was managed according to the guidelines (16, 17). Cytomegalovirus (CMV) pp65 antigenemia was monitored once a week. If positive results were identified, preemptive therapy with foscarnet was initiated. Hemoglobin and platelet counts were maintained at >7 g/dl and >10 $\times 10^9$ /liter, respectively, with in-line filtered and irradiated blood transfusions.

Management of GVHD. GVHD was clinically diagnosed in combination with skin or gut biopsies after engraftment or attainment of 100% donor chimerism. Acute and chronic GVHD were graded according to the established criteria (18, 19).

GVHD prophylaxis was a continuous infusion of cyclosporin 3 mg/kg from day -1 until the patients tolerated oral administration. It was tapered off from day 100 until day 150. If grade II-IV acute GVHD developed, 1 mg/kg/day of prednisolone was added to cyclosporin and tapered from the beginning of clinical response.

Chimerism Analysis. Chimerism was assessed using fluorescent *in situ* hybridization in sex-mismatched donor-recipient pairs. In sex-matched pairs, PCR for variable numbers of tandem repeats was used with donor cells detected at a sensitivity of 10% (20).

Whole blood and CD3-positive cell chimerism was assessed at the time of granulocyte engraftment. When engraftment was delayed, chimerism was assessed on day 30. For those who died before engraftment, chimerism was assessed at least once during life.

Engraftment. Engraftment was defined as WBC counts > 1.0 $\times 10^9$ /liter or absolute neutrophil counts > 0.5 $\times 10^9$ /liter for 2 consecutive days. Granulocyte colony stimulating factor (Filgrastim) 300 μ g/m²/day was administered i.v. from day 1 until neutrophil engraftment.

Graft failure was defined as peripheral cytopenia and mar-

Table 1 Patient characteristics (n = 30)

Age (y), median (range)	58.5 (20-70)
Weight (kg), median (range)	52 (38-75)
Male/female	16/14
Diagnosis	
Malignancy	
Acute myeloid leukemia	14
Myelodysplastic syndrome	1
Acute lymphoblastic leukemia	3
Adult T-cell leukemia	5
Plasma cell leukemia	1
Chronic myeloid leukemia	1
Malignant lymphoma	1
Benign	
Severe aplastic anemia	4
Disease status at transplantation (malignancy)	
Remission	1
Refractory to previous chemotherapy	25

row hypoplasia occurring later than day 60, without detection of donor markers by cytogenetic and/or molecular techniques.

RRT and Transplantation-Related Mortality (TRM). RRT was defined as any nonhematological organ dysfunction from day 0 to day 28 and was graded according to the Bearman's criteria (2). TRM was defined as death without the primary disease progression.

Endpoints and Statistical Analysis. Primary end points were composed of the rates of durable engraftment and TRM within day 100. Secondary end points were the rates of RRT, acute and chronic GVHD, infections, event-free survival (EFS), and overall survival (OS).

Acute GVHD was analyzed for engrafted patients. Chronic GVHD was analyzed for patients who survived ≥ 100 days.

EFS was defined as the duration of survival after transplantation without disease progression, relapse, graft failure, or death. The probabilities of OS and EFS were shown by the Kaplan-Meier method as of January 31, 2004. Surviving patients were censored on the last day of follow-up. Cox regression analysis was used to determine the effect of various variables on OS.

RESULTS

Patient Characteristics. Median age was 58.5 years (range, 20-70 years), and median weight was 52 kg (range, 38-75 kg; Table 1). All of the patients were CMV-seropositive.

The malignancies of 25 patients were refractory to cytotoxic chemotherapies except acute myeloblastic leukemia (n = 1) in first CR. The remaining 4 patients had transfusion-dependent severe aplastic anemia.

CB Characteristics. Twenty-four and 6 patients received 4 of 6 and 5 of 6 HLA-antigen-matched CB, respectively. Twenty-one patient CB pairs were sex-mismatched. Median infused total nucleated cell dose and CD34-positive cell dose before freezing were 3.1×10^7 /kg (range, 2.0-4.3 $\times 10^7$ /kg) and 0.74×10^5 /kg (range, 0.17-2.5 $\times 10^5$ /kg), respectively.

Engraftment. Twenty-six patients [87%; 95% confidence interval (95% CI), 75-99%] achieved primary neutrophil engraftment, among whom median day of engraftment was 17.5 days (range, 10-54 days; Fig. 1). Their engraftment was durable

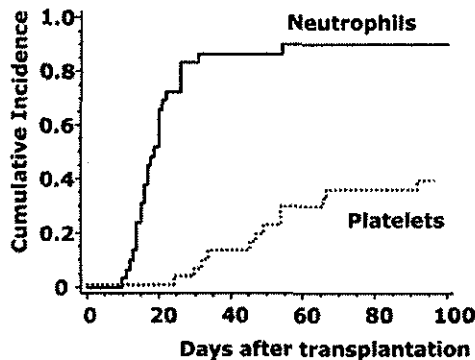


Fig. 1 Engraftment of neutrophils and platelets. Twenty-six (87%; 95% confidence interval, 75–99%) and 16 patients (40%; 95% confidence interval, 25–57%) achieved primary neutrophil and platelet engraftment, respectively.

Table 2 Neutrophil engraftment, chimerism, and overall survival

Neutrophil engraftment Variable	n	% (95% CI) ^a	P
Total cell dose			
≥3 × 10 ⁷ /kg	16	94% (82–100%)	0.25
<3 × 10 ⁷ /kg	14	79% (57–100%)	
HLA disparities			
HLA 5/6 match	6	67% (29–100%)	0.24
HLA 4/6 match	24	92% (81–100%)	
100% Donor chimerism			
Total cell dose			
≥3 × 10 ⁷ /kg	16	100%	0.63
<3 × 10 ⁷ /kg	14	86% (67–100%)	
HLA disparity			
HLA 5/6 match	6	83% (54–100%)	0.31
HLA 4/6 match	24	96% (88–100%)	
Overall survival			
Total cell dose			
≥3 × 10 ⁷ /kg	16	54% (24–83%)	0.70
<3 × 10 ⁷ /kg	14	52% (6.6–87%)	
HLA disparities			
HLA 5/6 match	6	63% (20–100%)	0.60
HLA 4/6 match	24	51% (20–81%)	

^a CI, confidence interval.

without requiring readministration of Filgrastim. Two patients died of TRM within 28 days of transplant. Primary graft failure occurred in the remaining 2 patients, who underwent second RI-UCBT with the same preparative regimen and GVHD prophylaxis and achieved neutrophil engraftment and complete donor chimerism. No patients experienced a decrease in neutrophil $0.5 \times 10^9/\text{liter}$ during the follow-up.

Platelet counts >math>20 \times 10^9/\text{liter}</math> were achieved by 16 patients (40%; 95% CI, 25–57%) on a median day of 39 days (range, 25–95 days). No other patient achieved platelet recovery until the last day of follow-up.

No significant association was found between neutrophil engraftment and either infused cell dose or HLA disparity (Table 2).

Chimerism Analysis. Chimerism data were obtained from all of the 30 patients. Cumulative incidence of complete

donor chimerism at day 60 was 93% (95% CI, 84–100%), and median time to complete donor chimerism was 22 days (range, 13–56 days; Fig. 2). The 2 patients who died of TRM within 28 days had complete donor chimerism before neutrophil engraftment. All of the surviving patients were monitored for chimerism every 3 months, followed the cyclosporine tapering schedule from day 100 to day 150, and maintained complete donor chimerism during the follow-up even after the discontinuation of immunosuppressants.

No significant association was identified between complete donor chimerism and either infused cell dose or HLA disparity (Table 2).

RRT and TRM. Four patients (13%) developed grade III RRT. No patient had grade IV RRT. The most commonly involved organs were the gut and kidney (Table 3).

TRM within 100 days of RI-UCBT was 27%. Primary causes of death were interstitial pneumonitis ($n = 2$), acute GVHD ($n = 2$), gastrointestinal bleeding ($n = 1$), acute heart failure ($n = 1$), limbic encephalopathy ($n = 1$), and sepsis ($n = 1$).

GVHD. Grade II–IV and III–IV acute GVHD occurred in 27% (95% CI, 11–43%) and 23% (95% CI, 7.4–39%) of the patients, respectively. Median onset of grade II–IV acute GVHD was day 36 (range, day 17–66; Fig. 3).

Of the 13 patients who survived >100 days, 3 (23%) developed chronic GVHD.

Infection. Twelve patients developed infections: bacteremia ($n = 8$), invasive aspergillosis ($n = 3$), and pulmonary tuberculosis ($n = 1$). Nine of them had been treated with

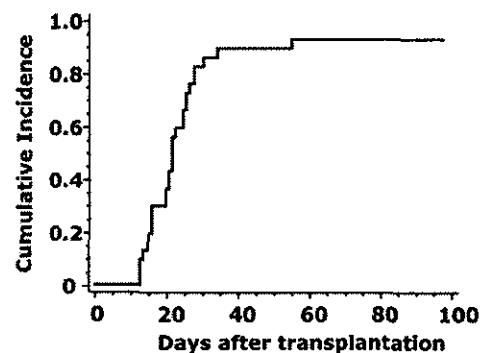


Fig. 2 Achievement of complete donor chimerism. Cumulative incidence of complete donor chimerism at day 60 after reduced-intensity unrelated cord-blood transplantation (RI-UCBT) was 93% (95% confidence interval, 84–100%), and median time to complete donor chimerism was day 22 (range, day 13–56).

Table 3 Regimen-related toxicity within 28 days (Bearman's score)

Score	Diarrhea	Kidney	CNS ^a	Liver	Lung
Grade 0	18	18	26	22	27
Grade 1	8	5	0	3	2
Grade 2	4	6	1	4	0
Grade 3	0	1	3	1	1
Grade 4	0	0	0	0	0

^a CNS, central nervous system.

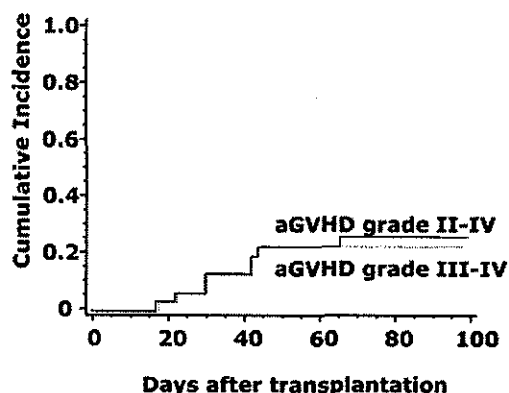


Fig. 3 Development of acute graft-versus-host disease (GVHD). Grade II-IV and III-IV acute GVHD developed in 27% (95% confidence interval, 11–43%) and 23% (95% confidence interval, 7.4–39%) of the patients, respectively. Median onsets of grade II-IV and III-IV acute GVHD were day 36 (range, day 17–66) and day 30 (range, day 17–44), respectively.

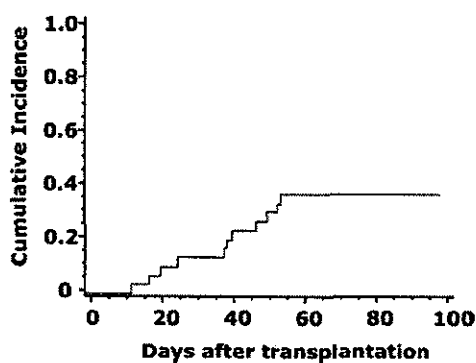


Fig. 4 Development of cytomegalovirus reactivation. Reactivation of cytomegalovirus was documented in 11 patients (37%) on a median of day 40 (range, day 13–55).

corticosteroids at the onset of infections. Reactivation of CMV was documented in 11 patients (37%) on a median of day 40 (range, day 13–55; Fig. 4). Eight of them had been treated with corticosteroids at the onset of CMV antigenemia. None of them developed CMV-related diseases. One patient developed hemorrhagic cystitis with adenovirus and BK virus infection.

Pre-Engraftment Noninfectious Fever. Seven patients with documented infection before engraftment were excluded from the analysis of pre-enugraftment reaction (Table 4). Eighteen patients developed noninfectious fever before neutrophil engraftment (Fig. 5). Noninfectious high-grade fever often coexisted with eruption, diarrhea, and weight gain, starting on a median of day 9. Pathological examination of eruption from 8 patients revealed nonspecific inflammatory reactions and was not compatible with GVHD.

Survival. As of January 2004, a total of 11 patients remained alive. Median follow-up of the survivors and all of the enrolled patients were 238 days (range, 169–485) and 125 days (range, 26–485), respectively. Primary diseases recurred in 3 patients. Estimated 1-year OS and EFS were 32.7% (95% CI,

14.3–51.1%; Fig. 6) and 22.2% (95% CI, 5.9–38.5%; Fig. 7), respectively. Neither cell dose nor HLA disparity was associated with OS (Table 2).

DISCUSSION

Because CB contains a small amount of hematopoietic stem cells and stem cell boost or donor lymphocyte infusion is not available after UCBT, graft failure has been a major concern in adult UCBT. The present study demonstrated the feasibility of RI-UCBT for adult patients, in addition to pediatric patients (21). In this study, 26 of the 30 patients (87%) achieved durable engraftment, and 28 patients achieved complete donor chimerism by day 60, including 2 patients who died before engraftment. Interestingly, 4 patients with severe aplastic anemia, which has been associated with a high incidence of graft rejection (22), achieved complete chimerism after our reduced-intensity regimen. These findings suggest that the combination of fludarabine, melphalan, and low-dose TBI might be more immunosuppressive than conventional myeloablative regimens, creating niche for CB to engraft. Alternatively, CB may exert a strong graft-versus-host effect, making room for stable engraftment of stem cells.

Delayed hematopoietic recovery and infection during neutropenia are the significant concerns in adult UCBT. Laughlin *et*

Table 4 Characteristics of pre-enugraftment reaction ($n = 23$)

Temperature	
38.0–38.9°C	2
39.0–39.9°C	10
$\geq 40.0^\circ\text{C}$	7
Day of peak body temperature	9 (5–12)
Serum levels of CRP ^a (mg/dl)	13.8 (0.5–18.9)
Day of peak serum levels of CRP	10 (8–16)
Diarrhea	11
Eruption	10
Jaundice	5
Use of corticosteroid	13
Good response to corticosteroid	7

^a CRP, C-reactive protein.

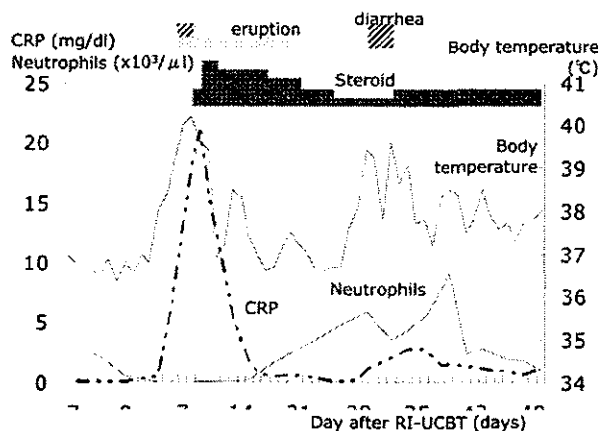


Fig. 5 Clinical course of a patient who developed pre-enugraftment fever. Immune-reactions display two peaks, at around day 9 and day 18.

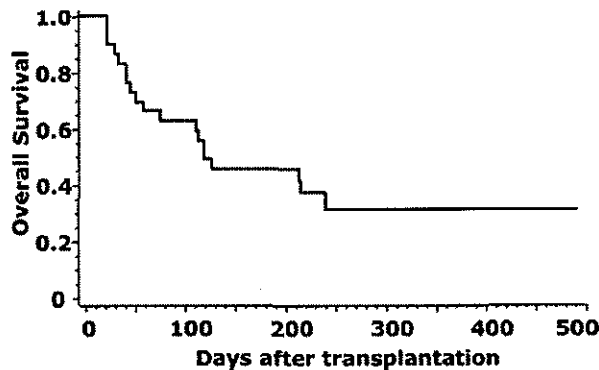


Fig. 6 Probability of overall survival after reduced-intensity unrelated cord-blood transplantation. Estimated 1-year overall survival was 32.7% (95% confidence interval, 14.3–51.1%).

al. (23) reported neutrophil recovery in 90% of patients by a median of 27 days after UCBT, which was significantly delayed compared with allo-HSCT. The delay has been attributed to the limited cell dose in the reports on myeloablative UCBT. The median nucleated cell dose in our study ($3.1 \times 10^7/\text{kg}$) was greater than those in some reports from Western countries ($2.1 \times 10^7/\text{kg}$; Ref. 9). The low median body weight (52 kg) in the Japanese population may favor neutrophil engraftment, whereas our results showed no association between the cell dose and engraftment in the small sample size. In the present study, median time to engraftment was 17.5 days (range, 10–54 days), which was much faster than that reported in previous studies on myeloablative UCBT (7–9). Our results were comparable with the report on adult RI-UCBT by Barker *et al.* (21). Their results showed neutrophil engraftment on a median of 26 days after busulfan/fludarabine/TBI 2 Gy and 9.5 days after cyclophosphamide/fludarabine/TBI 2 Gy. Whereas the reason for the difference remains unclear, these findings suggest that fludarabine-based reduced-intensity regimens enable rapid and stable engraftment.

TRM within 100 days was 27% in this study, which is lower than those reported on myeloablative UCBT (Refs. 7, 9, 24; 32–51% in pediatric patients and 56–63% in adults). Given the relatively old age (median, 58.5 years) and advanced stages of the primary diseases, our reduced-intensity preparative regimen probably decreased TRM. Our TRM within 100 days is comparable with that of 28% in adult RI-UCBT by Barker *et al.* (21).

All of the patients tolerated our preparative regimen without grade IV RRT (Bearman's criteria; Ref. 2). Four patients developed grade III RRT with common involvements of the gut, kidney, and liver (Table 3). We used melphalan, which has dose-limiting toxicities of the gut and liver (25). These remained mild without hepatic veno-occlusive disease. Because renal toxicities of fludarabine, busulfan, and TBI 4 Gy are reportedly minimal, the high incidence of renal toxicity might be attributable to concomitant administration of nephrotoxic agents such as cyclosporin and antibiotics. Elderly patients might be susceptible to RRT. We plan to investigate optimal dosages of cyclosporin in RIST for elderly patients. Because TBI, even at a low

dose, sometimes causes significant late toxicities in the lung (22), long-term follow-up is required.

Little information on GVHD after RI-UCBT is available. In the present study, the incidences of grade II–IV and III–IV acute GVHD and chronic GVHD were 27%, 23%, and 23%, respectively, whereas some reported those to be 33–44%, 11–22%, and 0–25%, respectively, in myeloablative UCBT (7, 8, 26). There are no significant differences in the incidences of GVHD between myeloablative UCBT and RI-UCBT. This is similar to the GVHD incidences in myeloablative allo-HSCT and RIST (27). Median onset of acute GVHD was 36 days (range, 17–66 days) in the present study, which was comparable with that of myeloablative UCBT (7, 8, 26). In contrast, the achievement of complete donor chimerism and the onset of acute GVHD are delayed in RIST compared with myeloablative allo-HSCT (27, 28). CB might have a potential of intense graft-versus-host effect, allowing niche for early engraftment. The characteristics of GVHD after RI-UCBT remain to be investigated, including different organ involvements and response to immunosuppressive treatment.

Interestingly, 20 patients developed inflammatory reactions before engraftment (Table 4). These reactions included noninfectious high-grade fever, eruption, diarrhea, and jaundice, starting on a median of day 9. Because the reactions preceded engraftment (median, day 17.5), we speculated that some form of immune reaction that is not categorized as acute GVHD occurs after RI-UCBT without achieving engraftment. The pre-engraftment fever has been reported on rare occasions in previous reports of UCBT and might be similar to those observed after haploidentical transplantations. Antithymocyte globulin and corticosteroids, which have strong immunosuppressive properties, were commonly used in previous studies on UCBT (9), whereas neither was used in the present study. Immunosuppressive treatment with corticosteroids was effective for the pre-engraftment fever. These findings support that immune-mediated reactions after UCBT might manifest easily with the present regimen. The doubling time of cultured CB CD34⁺ cells is 7–10 days, which is several hundred-fold faster than that of cultured adult marrow cells (29). Mononuclear cells from CB display a unique cytokine profile such as comparable levels of

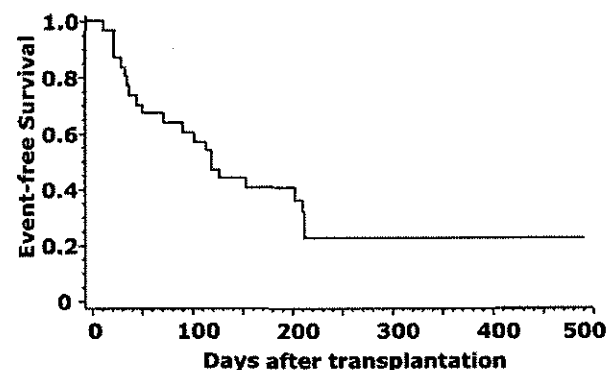


Fig. 7 Probability of event-free survival after reduced-intensity unrelated cord-blood transplantation. Estimated 1-year event-free survival was 22.2% (95% confidence interval, 5.9–38.5%).