

対象163例の特徴(1)

表 1. 診断時の概要	
年齢, median (range)	2.8y (0-15.2y)
性別(M/F)	86/77
病型	
(評価可能症例)	139/163
de novo	134
二次性	5
中枢神経浸潤	11
染色体異常	
(評価可能症例)	107/163
Abnormal	80
Favable risk[t(8;21), t(15;17) or inv(16)]	14
Intermediate risk	48
Poor risk[-7, 11q23,t(9;22), -5, del(5q), t(6;9)]	29
正常核型	27
FAB 分類	
M0/M1/M2/M3	6/15/23/2
M4/M5/M6/M7	16/29/6/26

対象症例の特徴(2)

表 2. 移植時の特徴	
移植時年齢 median (range)	4.23y
患者体重 median (range)	14.8kg (5-65kg)
CMV 抗体	
No. evaluable	76/159
Negative/Positive	25/51
疾患病期	
Standard risk	78
High risk	84
前処置	
TBI-containing *	76
Bu-containing *	20
Miscellaneous *	45

図1 小児急性骨髄性白血病
好中球生着($\geq 500/\mu\text{L}$)

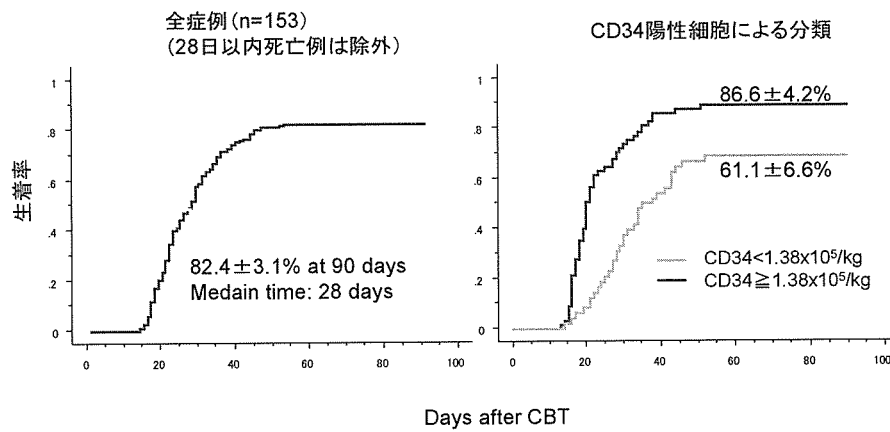


図2 小児急性骨髄性白血病
血小板生着($\geq 20,000/\mu\text{L}$)

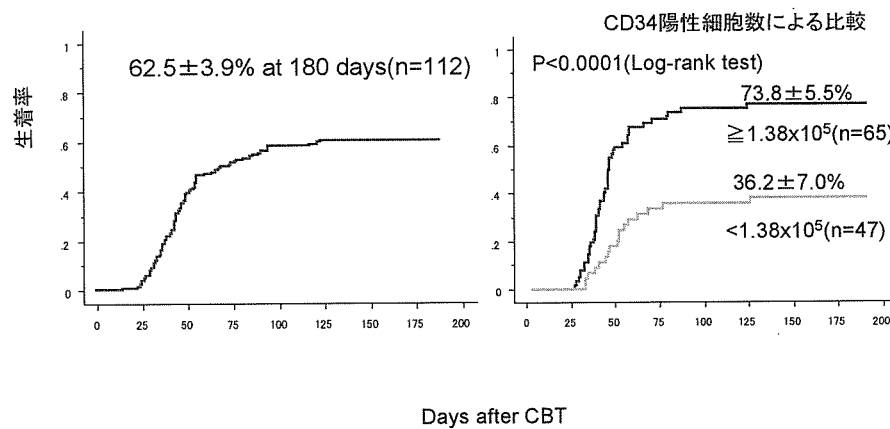


図3 小児急性骨髄性白血病

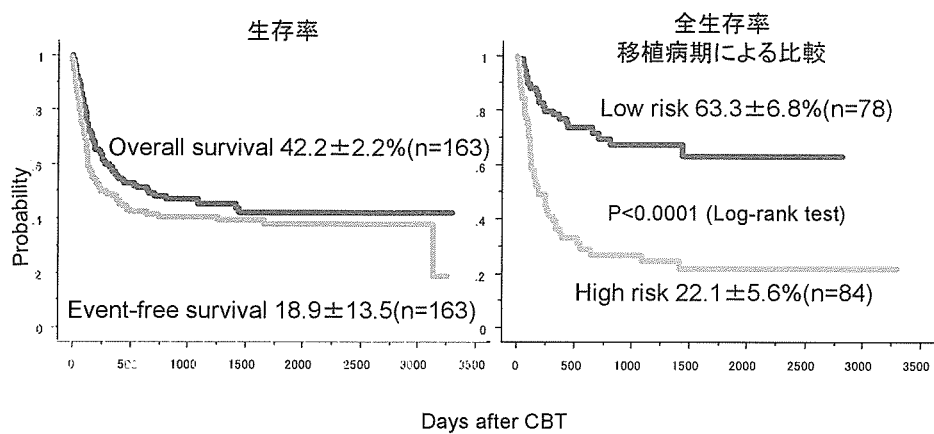
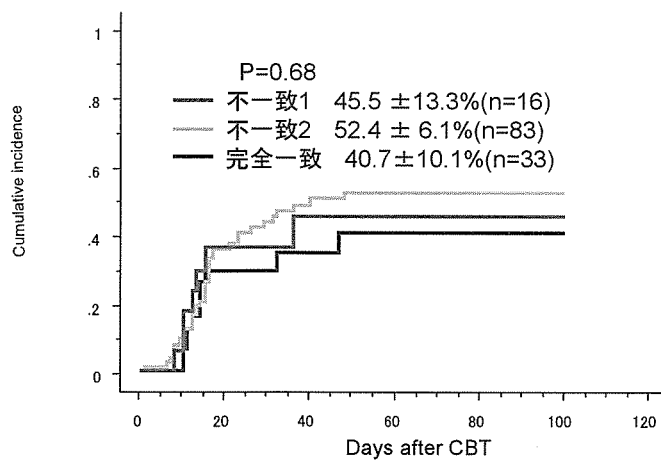
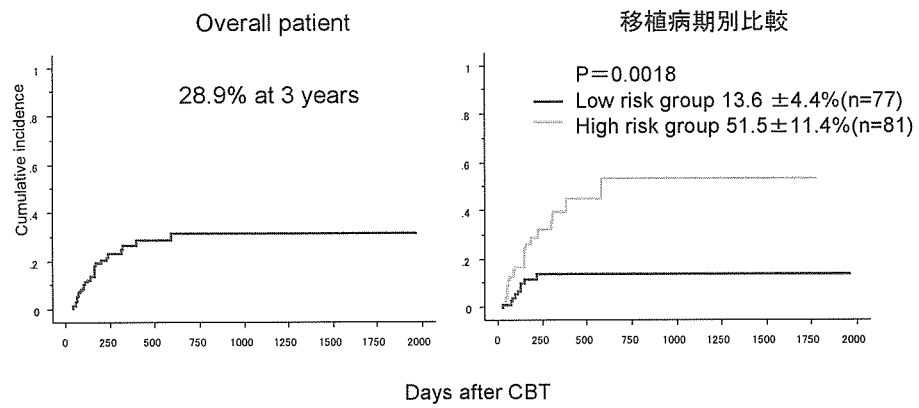


図4 小児急性骨髄性白血病
Grade2-4急性GVHD発生率



全症例の発生率 $50.3 \pm 4.9\%$ at 100 days

図5 小児急性骨髄性白血病
移植関連死亡



厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 HLAおよび細胞数と臍帯血移植の成績

分担研究者 甲斐 俊朗 兵庫医科大学輸血部 教授

研究協力者 神前 昌敏 大阪府赤十字血液センター
高梨 美乃子 東京都赤十字血液センター
東 寛 北海道赤十字血液センター

研究要旨

2700 例の臍帯血移植例の解析から、臍帯血移植の選択に際しては有核細胞数よりも CD34+細胞や CFU-GM を基準に選択する方が良いとの結果が得られた。

HLA に関しては、HLA 不一致数が多い程、急性 GVHD の発症頻度が高くなり、また、TRM の頻度が高くなる。また、多変量解析では EFS に有意な影響を及ぼしてはいないものの、成人白血病では HLA 一致症例の EFS は低く再発率が高いことが、また、小児非腫瘍性疾患では、HLA 不一致例よりも一致症例の EFS が良好である結果が得られ、臍帯血選択にあたっては、疾患により HLA 一致度を考慮する必要があることが明らかになった。

A. 研究目的

臍帯血の凍結時保存有核細胞数(NCC)、CFU-GM 数、CD34 陽性細胞数およびレシピエントとの HLA 不一致数が移植成績に及ぼす影響を検討した。

B. 対象および方法

1997 年 7 月から 2006 年 8 月までに移植が実施され各臍帯血バンクに臨床経過調査票が回収された 2713 例（成人 1905 例、小児 808 例）。悪性疾患、非悪性疾患、各 2489 例、224 例、移植歴が有る症例が 622 例、初回移植例が 2091 例、HLA 不一致数は、HLA-A,B,DR 血清学的で GVH および HVG 方向 0 mismatch(mm), 1mm, 2mm, 3mm が各々 398, 1170, 1116, 13 例および 407, 1130, 1146, 14 例、また、HLA-A,B,血清学的、DRB1, DNA(high)タイピングで GVH および HVG 方向 0mm, 1mm, 2mm, 3mm, 4mm が各 230, 732, 1037, 383, 34 例、および 235, 741, 1012, 399, 29 例であった。移植細胞数は凍結時の NCC、CFU-GM、CD34+細胞数が中央値（範囲）で、 $2.75 \times 10^7/\text{kg}$ （0.06 - 31.11）、 $23.36 \times 10^3/\text{kg}$ （0.11 - 473.22）および $0.87 \times 10^5/\text{kg}$ （0.01 - 38.31）であった。移植前処置は、骨髄破壊の前処置が 1401 例、8Gy-10Gy の TBI を含む前処置が 74 例、RIST が 1113 例、FLU/ATG や FLU、ATG

単独あるいは 2Gy TBI/FLU のミニ移植が 87 例、前処置なしが 27 例であった。

NCC、CFU-GM 数、CD34+細胞数および HLA 不一致数と好中球、血小板生着、2 度以上の AGVHD 発症率、移植後 1 年の移植関連死亡率 (TRM)、無イベント生存率(EFS)の関連を単変量および多変量解析で解析した。有意差検定は log-rank test で行い、log-rank test で $p < 0.1$ 未満の因子については Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析を行った。

C. 結果

1) NCC、CFU-GM、CD34+細胞数

NCC、CFU-GM、CD34+細胞数は、好中球および血小板生着、EFS、TRM(1 年)と単変量解析で有意な関連を認めた（いずれも $p < 0.0001$ ）。CFU-GM、CD34+細胞は多変量解析でも好中球、血小板生着に有意な影響を及ぼしていた（図 1a, b）が、EFS、TRM(1 年)には有意な影響を与えていなかった。EFS に関しては、CD34+細胞が $1 \times 10^5/\text{kg}$ 以上あればその成績には差を認めなかった（図 2）。

急性 GVHD(II= $\leq$)の発症とは単変量、多変量解析においても、ともに関連は認めなかった。

2) HLA

HLA は、血清学的タイピングおよび HLA-AB; 血清学的、DRB1;DNA high resolution タイピングとともに、HVG, GVH 両方向において、その不一致数と EFS、TRM、AGVHD II=<の発症に関連を認めた(単変量解析)。多変量解析では血清学的小および HLA-A, B;血清学的、DRB1;high とともに GVHD 方向の不一致が AGVHD II=<発症に有意な影響を及ぼしていた(図 3) が、EFS, TRM には HLA 不一致数は有意な影響を及ぼしてはいなかった。

また、HLA 不一致は、多変量解析では好中球および血小板生着には影響を及ぼしてはいなかったが、単変量解析で、A,B, DR 血清学的 (GVH 方向)、AB;血清学的、DRB1;DNA high (両方向) 不一致と好中球、血小板生着との関連が認められた。

3) 小児および成人急性白血病に対する初回フル移植例における解析

対象を初回移植として臍帯血移植を受けた小児(n=373) および成人急性白血病フル移植症例(n=488)に限り、移植細胞数(NCC, CFU-GM, および CD34+細胞数)、HLA と生着や EFS, TRM との関連を検討した。

- a. 成人急性白血病では CFU-GM、CD34+細胞数と好中球、血小板生着の間に、また、小児急性白血病では CD34+細胞数と好中球生着の間に有意な関連(多変量解析)を認めたが NCC、CFU-GM、CD34+細胞数はいずれの群においても EFS や TRM に有意な影響を及ぼしてはいなかった。
- b. 小児においては、HLA の HVG 方向の不一致と好中球や血小板生着、TRM の間に有意な関連が認められた(単変量解析)。TRM に関しては多変量解析でも HLA 不一致は有意な影響を与えていた。成人移植例においては、HLA 0mm 症例の再発率が有意に高く(log-rank test; $p=0.0341$)、また、HLA 2 抗原不一致例の EFS が 0 mm 症例に比し有意に良好($p=0.0005$)であった(図 4a) が、多変量解析ではいずれも有意な関与を認めなかった。

4) 小児非腫瘍性疾患における解析

小児非腫瘍性疾患では移植細胞数(NCC、CFU-GM、CD34+細胞数)と生着の間に有意な関連は認めなかった。HLA HVG 方向不一致数が多い程、移植後 180 日の血小板生着率が有意

に低く($p=0.0224$)、また、不一致数が少ない程 EFS が有意に良好であった(図 4b)。

D. 考察

移植有核細胞数や CFU-GM 数、CD34 陽性細胞数、HLA 適合度は、臍帯血移植後の好中球生着速度や生着率あるいは移植関連死亡や生存率など移植成績に影響を及ぼす重要な因子であるとの報告がみられる。今回、わが国における 2700 例の臍帯血移植症例を対象として移植細胞数および HLA 適合度が生着や生存、移植関連死亡、再発にどのように関与しているかを解析した。その結果、好中球生着や血小板生着には有核細胞数よりも CD34 陽性細胞数や CFU-GM 数が有意な影響を及ぼしていることが明らかとなった。対象を成人と小児に分けて解析しても多くの CD34+細胞数が移植する程、好中球生着に好影響を及ぼしていた。EFS に関しては、CD34+細胞が $1 \times 10^5/\text{kg}$ 以上あればその成績には差がないことが明らかになった。

HLA 不一致数は急性 GVHD の発症に有意な影響を及ぼし、小児においては不一致数が多い程、移植関連死亡率も有意に高くなっていた。一方、EFS に関しては、単変量解析ではあるものの疾患により異なり、成人白血病症例では HLA 2 mm 例の EFS が 0mm 症例よりも良好であり、小児非腫瘍性疾患では 0mm 症例が最も良好な EFS が得られている。白血病症例では 0mm 症例の再発率が高く、不一致例では GVHD の発症頻度が高いことから臍帯血移植例においても GVL 効果が有ると考えられる。但し、小児白血病症例では HLA 不一致数と再発や EFS に有意な関連は認めていない。

E. 結論

臍帯血の選択に際し、細胞数は NCC よりも CD34+細胞や CFU-GM を基準に選択する方が良いと考えられる。

HLA 不一致数が多い程、急性 GVHD の発症頻度が高くなり、また、TRM の頻度が高くなる。

HLA は、多変量解析では EFS に有意な影響を及ぼしてはいなかったが、成人白血病では 0mm 症例の EFS が低く再発率が高かった。小児非腫瘍性疾患では、HLA 不一致例よりも一致症例の EFS が良好である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 著書

- 1) 甲斐俊朗、三澤真人（分担執筆）；臍帯血移植とその成績 3. 成人臍帯血移植の成績臍帯血移植 p 100-109、(『臍帯血移植』原 宏 編著、新興医学出版社 2006.3 東京)
 - 2) 甲斐俊朗（分担執筆）；造血幹細胞移植と輸血 p 232-243、(『スタンダード輸血検査テキスト』認定輸血検査技師制度協議会カリキュラム委員会、医師薬出版、2007.3 東京)
 - 3) Shunro KAI ; Banco de Sangre del Cordon Umbilical y Transplante de Sangre del Cordon Umbilical en Japon, p 84-88 (『Fisiologica Celular de las Celulas Madre』Dr. Orlando M.Morales, UCIMED, 2006, San Jose)
- ### 2. 論文発表
- 1) M.Misawa, S.Kai, M.Okada, T.Nakajima, K.Nomura, T.Wakae, A. Toda, I. Itoi, H. Takatsuka, T. Itsukuma, K. Nishioka, Y. Fujimori, H. Ogawa and H.Hara: Reduced-intensity conditioning followed by unrelated umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies: Rapid engraftment in bone marrow. Int J Hematol. 2006 Jan; 83(1):74-9.
 - 2) 甲斐俊朗；成人への臍帯血移植、今日の移植 VOL19(3); 250-255, 2006
- ### 3. 学会発表
- 1) 荒木延夫、河村久美子、稲葉洋行、能勢義介、井本しおん、三戸 壽、甲斐俊朗、原 宏：KIR リガンド HLA-C の日本人遺伝子頻度とそのタイピングの重要性、第 4 回日本組織適合性学会近畿地方会、2006.2.4 (大阪)
 - 2) 甲斐俊朗、三澤真人、高橋隆幸、小阪嘉之、大塚欣敏、村山 徹、原 宏：悪性疾患に対する臍帯血ミニ移植の成績-兵庫さい帯血バンクからの報告-、第 28 回日本造血細胞移植学会（ワークショップ）(2006.2.24, 東京)
 - 3) 荒木延夫、河村久美子、稲葉洋行、能勢義介、井本しおん、三戸壽、甲斐俊朗：Luminex 法を用いた KIR リガンドである HLA-C の日本人遺伝子頻度、第 28 回日本造血細胞移植学会（ワークショップ）(2006.2.24, 東京)
 - 4) 甲斐俊朗：造血幹細胞移植-ミニ移植と臍帯血

移植-、第 54 回日本輸血・細胞治療学会総会（教育講演）(2006.6.11、大阪)

- 5) 甲斐俊朗、高橋隆幸、村山 徹、小阪嘉之、大塚欣敏、原 宏、荒木延夫、能勢義介；成人臍帯血移植生着症例の予後因子の検討、第 29 回日本造血細胞移植学会 (2007.2.16, 福岡)
- 6) 荒木延夫、西村千恵、稲葉洋行、能勢義介、井本しおん、三戸壽、甲斐俊朗、原 宏；HLA 抗体陽性レシピエントの抗体産生能と臍帯血移植の適応、第 29 回日本造血細胞移植学会 (2007.2.16, 福岡)

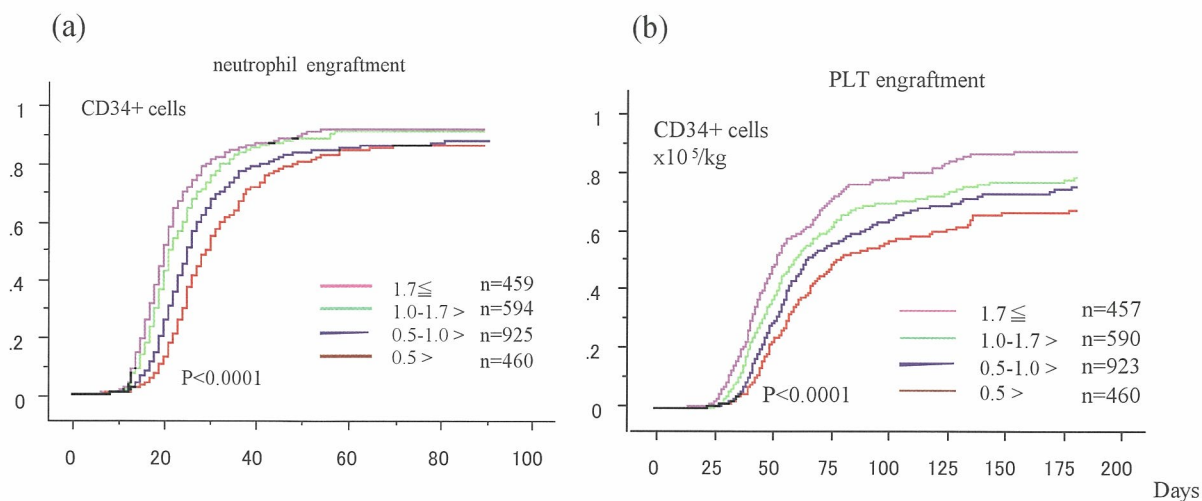


図 1 CD34 陽性細胞数と好中球(a)および血小板生着(b)

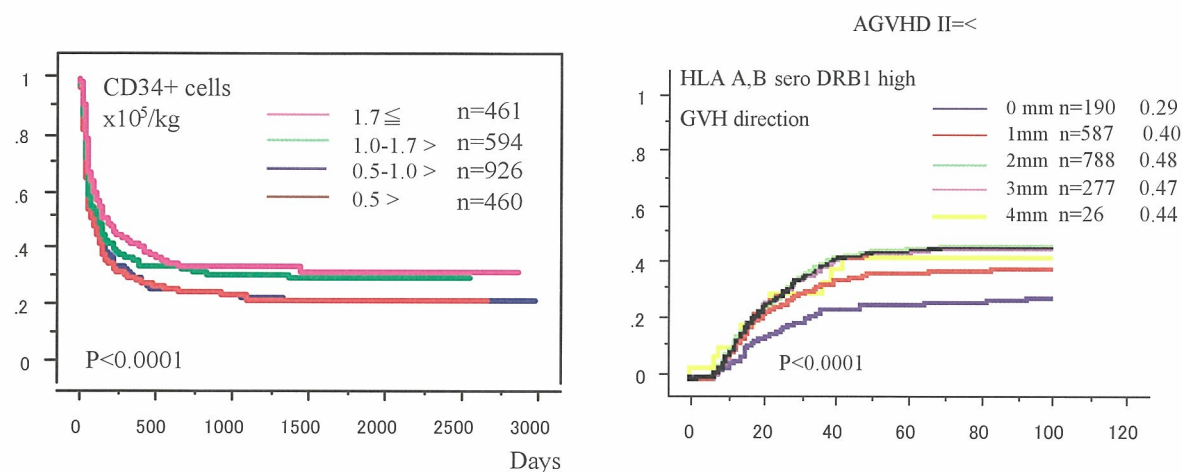


図 2 CD34 陽性細胞数と EFS

図 3 HLA と急性 GVHD

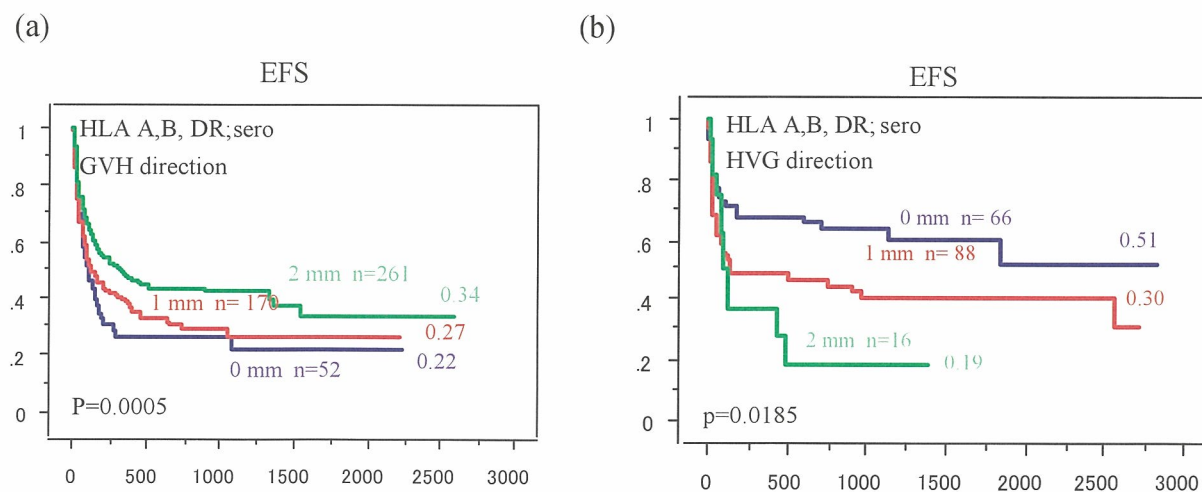


図 4 HLA 適合度と EFS (a)成人急性白血病フル移植、 (b)小児非腫瘍性疾患

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 小児急性リンパ性白血病に対する非血縁者間臍帯血移植に関する研究

分担研究者 加藤 剛二 名古屋第一赤十字病院小児医療センター血液腫瘍科 部長

研究要旨

小児急性リンパ性白血病に対する非血縁者間臍帯血移植の成績を日本臍帯血バンクネットワークに集積されたデータを用いて解析した結果、好中球回復速度は HLA 適合度が高く、また CD34 陽性細胞数が多いほど早く、また急性 GVHD は HLA6/6 一致症例において最も低く、無イベント生存率は移植時病期が早期であるほどよい結果が得られた。今後さらに症例数を重ねて検討すべきと考えられる。

A. 研究目的

同種造血細胞移植が必要にもかかわらず HLA 適合血縁者が得られない場合の alternative donor からの移植としては非血縁者間骨髓移植、HLA 不一致血縁者間移植、および非血縁者間臍帯血移植がある。この中で迅速な移植が可能で HLA 不適合でも GVHD が軽度な臍帯血移植の実施数が増加している。今回小児の血液腫瘍性疾患として最も多い急性リンパ性白血病 (ALL) に対す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を通じて移植された症例について検討したので報告する。

B. 研究方法 (倫理面の配慮)

日本さい帯血バンクネットワークを通じて 1997 年から 2006 年までに移植された小児 ALL332 例につきその生着率、再発率、無イベント生存率、生存率につき検討した。その症例登録にあたっては各臍帯血バンクにおいてそれぞれの症例に関して移植成績の報告を行うことが患者との間で了解されており、かつ各症例の氏名を含む個人情報は匿名化されているため個人への倫理面での配慮はなされていると考えられる。

C. 研究結果

1. 対象症例

1997 年から 2006 年までに 332 例の小児 ALL 症例に対して非血縁者間臍帯血移植が実施された。年齢中央値は 5 歳 (0 歳から 15 歳)、性別は男 193 例、女 139 例、患者体重は中央値 17.4kg (4-60) であった。臍帯血移植実施前に移植歴のある症例は 62 例、ない症例は 270 例であった。

1) 病期および病型:移植時の病期は寛解導入不

能 8 例、第一寛解期 126 例、第二寛解期 89 例、第三寛解期以降の寛解期 31 例、非寛解期 74 例 (第一再発 34 例、第二再発 40 例)、不明 4 例であり、難治性で特殊病型としてのフィラデルフィア染色体(Ph)陽性症例は 37 例、MLL 遺伝子再構成症例は 94 例であった。

- 2) HLA 適合度:患者と臍帯血との血清学的 HLA 適合度は GVHD 方向の 6/6、5/6、4/6 一致はそれぞれ 66 例、199 例、65 例であり、同拒絶方向はそれぞれ 71 例、195 例、64 例であった。
- 3) 移植前処置:臍帯血移植に用いられた前処置はその頻度の多い順に VP16+CY+TBI 73 例、BU+CY+VP16 51 例、CA+CY+TBI 43 例、CY+TBI 19 例、L-PAM+TBI 17 例、その他 129 例であった。

2. 移植後結果

- 1) 好中球数の回復:全症例での好中球数 500 以上の回復は 89.7%にみられ、その到達日数の中央値は 23 日であった。また臍帯血保存時の有核細胞数および CD34 陽性細胞数のそれぞれの中央値以上の症例ではそれ未満の症例と比較して有意に回復が早かった (図 1)。
- 2) 急性 GVHD:II 度以上の急性 GVHD の発症頻度は血清学的 HLA6/6 一致で 25.1%、5/6 一致で 50.9%、4/6 一致で 41.9%であり、6/6 一致症例において有意に低い発症率であった ($p=0.001$)。また HLA の DNA typing においても 6/6 一致症例では 11.5%であり、不一致症例と比較して有意に発症率が低かった ($p=0.001$)。
- 3) 再発率:全症例の再発率は 45.1%であり、移植時病期別では第一寛解期で 35.2%、第

二寛解期で 36.8%、非寛解期では 71.4%と後者で有意に高い再発率であった ($p<0.001$) (図 2)。また HLA 適合度との関係では血清学的および DNA typing とも有意差は認められなかった。

- 4) 無イベント生存率:移植歴の有無による無イベント (生着あり再発なく生存中) 生存率は移植歴有りで 38.1%、同なしで 13.6%と前者で有意に高く ($p<0.001$)、HLA 適合度との関係では有意差は認められないが血清学的および DNA typing とともに 6/6 一致症例では他症例と比較して最も良好な成績であった (図 3)。また初回移植例に限った場合の病期別無イベント生存率は第一寛解期で 51.3%、第二寛解期で 52.1%、非寛解期 13.3%であり ($p<0.001$)、同生存率はそれぞれ 61.9%、58.2%、16.9%であった ($p<0.001$) (図 4)。
- 5) 特殊病型における移植成績:小児 ALL の中でも難治性とされる Ph 陽性 ALL の初回移植における無イベント生存率は第一寛解期 30.7%、第二寛解期 33.3%、非寛解期 28.6%であり、MLL 遺伝子再構成 ALL ではそれぞれ 49.3%、40.0%、34.1%であった。
- 6) 死因:この 322 例においてこれまで 165 例が死亡したと報告されており、その死因として原病死が 69 例、非再発死亡が 89 例、その他・不明が 16 例であった。

D. 考察

臍帯血移植は近年非血縁者間造血細胞移植において骨髓移植に匹敵する症例数が実施されており、特に成人における増加が著しい。小児においては毎年 100 例前後が実施されており、その中で ALL は最も多い対象疾患である。小児においては近年の少子化によって HLA 適合ドナーを得ることが困難になっており、臍帯血移植の普及は小児 ALL の成績向上に貢献している。これまでの成績からは骨髓移植と比較して好中球数の回復遅延、感染症の増加等の短所も認められるが緊急的移植が可能であり、かつ体重が少ない小児においては移植細胞の重要な選択肢となっている。

E. 結論

小児 ALL に対する非血縁者間臍帯血移植の成績は向上しており、HLA 適合血縁者の得られない患者においては造血細胞移植の重要な選択肢であり、今後さらに移植症例数を増加させてその成績を検討することが肝要と考えられる。

F. 健康危険情報

本研究における健康危険情報はない。

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1. CD34 陽性細胞数と好中球数回復

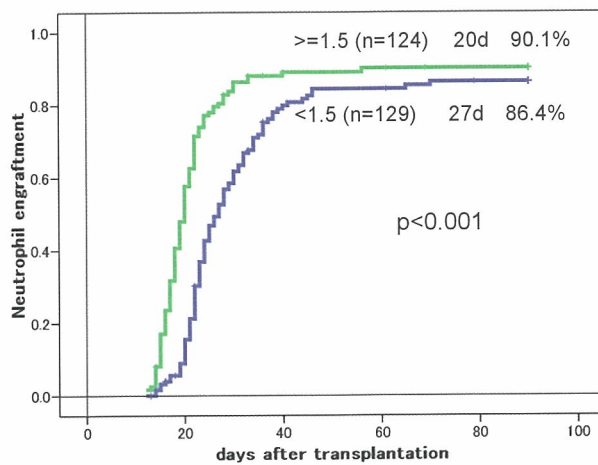


図 2. 移植時病期別再発率

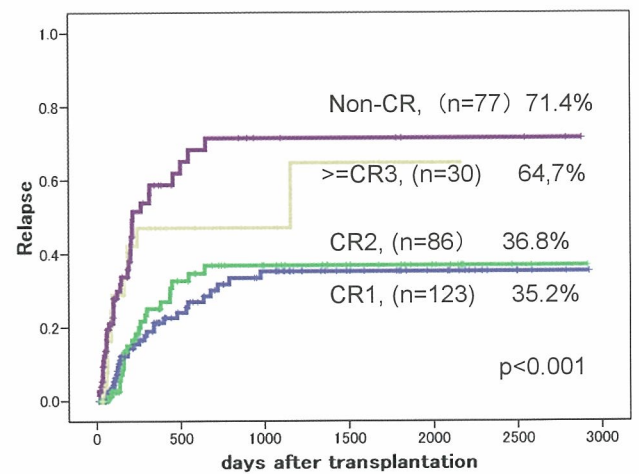
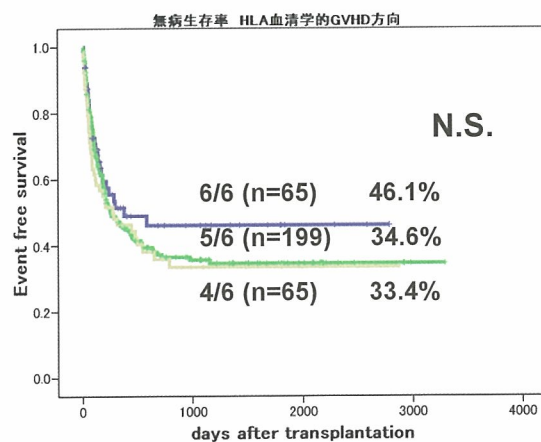


図 3. HLA 適合度別無イベント生存率
血清学的タイピング



DNA typing

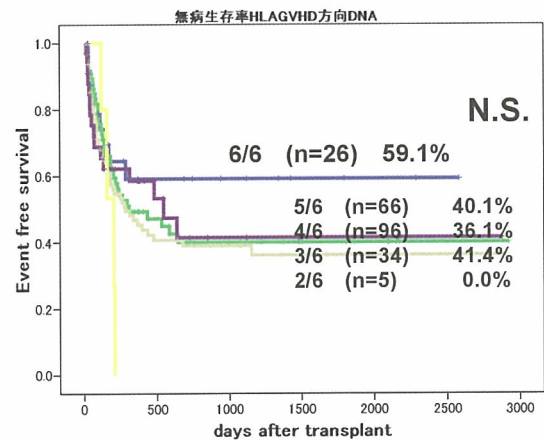


図 4. 移植時病期別無イベント生存率

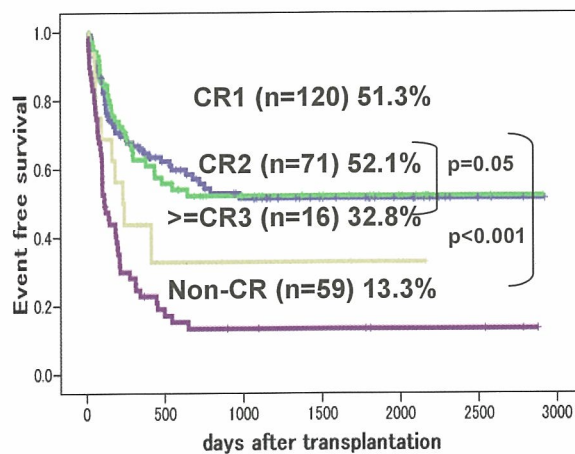
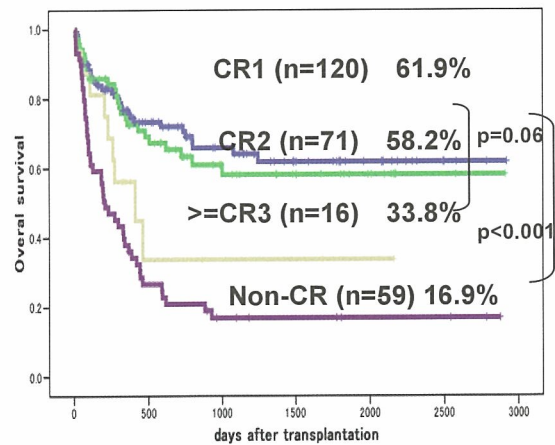


図 5. 移植時病期生存率



臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 成人における臍帯血移植の固形腫瘍への適応拡大に関する研究

分担研究者 坂巻 壽 都立駒込病院血液内科 部長

研究要旨

固形腫瘍に対する臍帯血移植の適応拡大を検討するために、現在まで本邦で施行された固形腫瘍に対する同種移植に関する全国調査を実施した。また、固形腫瘍に対する同種移植の治療成績を解析し問題点を検討したうえで、固形腫瘍に対する臍帯血移植の安全性および有効性を評価することを目的とした臨床第 I 相試験を計画した。

A. 研究目的

固形腫瘍に対する臍帯血移植の適応拡大を検討するために、現在まで本邦で施行された固形腫瘍に対する同種移植の実態を把握する。また、固形腫瘍に対する同種移植の治療成績を解析し、問題点を検討する。その解析をふまえて、固形腫瘍に対する臍帯血移植の安全性および有効性を評価することを目的とし臨床第 I 相試験を計画、実施する。

B. 研究方法

1. 固形腫瘍に対する同種移植に関する全国調査

全国の同種移植を施行している主な施設に調査協力を依頼し、以下の調査項目についてアンケート調査を実施した。

- a. 患者背景：がん腫、病期、転移臓器、前治療
- b. 移植方法：ドナー、幹細胞ソース、前処置、GVHD 予防

2. 固形腫瘍に対する臍帯血移植の臨床第 I 相試験

固形腫瘍に対する同種移植に関する全国調査の結果をふまえて、プロトコルを作成し、安全性および有効性を評価することを目的とし臨床第 I 相試験を計画、実施する。

3. 倫理面への配慮

固形腫瘍に対する同種移植に関する全国調査の実施にあたっては、まず駒込病院倫理委員会の承認を得たうえで施行している。アンケート調査にあたっては、個人情報特定されないように厳格な配慮をおこない、その情報管理は厳密に取り扱うものとした。また、各施設において必要に応じ倫理委員会の承認を得るものとした。固形腫瘍に対する臍帯血移植の臨床第 I 相試験の実施にあたっては、プロトコルを各施設倫理委員会で承認を得たうえでこれを施行することとしている。

C. 研究結果

1. 全国 439 施設にアンケート調査依頼をし、このうち 236 施設より回答を得た。成人固形腫瘍の同種移植実績があるのは 43 施設 50 診療科で、移植症例数は合計 174 例だった。施設毎の移植実績は 50 例以上が 1 施設、10-19 例が 3 施設、7 例 2 施設、4 例 3 施設、3 例 5 施設、2 例 8 施設、1 例 28 施設だった。移植細胞ソースは骨髄 16 例 (10.7%)、末梢血 130 例 (86.7%)、臍帯血 4 例 (2.7%) だった。固形腫瘍の種類の内訳は腎がん 49 例、膀胱がん 19 例、乳がん、横紋筋肉腫、Ewing 肉腫各 9 例、胚細胞腫 8 例、大腸がん、肺がん各 5 例、胃がん 4 例、神経鞘腫、胆管がん各 2 例、卵巣がん、骨肉腫、胆嚢がん各 1 例だった。

2. 固形腫瘍に対する臍帯血移植の臨床第 I 相試験のプロトコルを作成した。対象は標準的治療が無効となった年齢 20 歳以上 55 歳未満、PS0-1、組織学的確定診断の得られた固形腫瘍患者である。主要評価項目は、移植後 100 日の生存率で、副次的評価項目は生着率、GVHD 発症率、前処置毒性、キメリズム解析、抗腫瘍効果 (GVT 効果) である。移植前処置は

fludarabine	25mg/m ²	day-7-day-3
melphalan	40mg/m ²	day-2, -1
TBI	4 Gy	day-1
臍帯血移植		day 0
cyclosporine	3mg/kg	day-1-
methotrexate	10mg/m ²	day 1
	7mg/m ²	SDday3, 6

である。目標症例数は 26 例で登録期間は 2 年の計画である。

D. 考察

これまで本邦における成人固形腫瘍に対する同種移植の全国的な実態調査は行われておらず、本研究によって初めて本邦 174 例の同種移植実績が明らかになった。対象のがん腫は腎がん、膵がんが多いが、腎がんはミニ移植の有効性が報告されて以降多く試みられたこと、膵がんは難治がんであり、移植治療研究の対象疾患になったことが背景にあると思われる。本研究で計画している固形腫瘍に対する臍帯血移植の臨床第 I 相試験においては、これらのがん腫が対象となる可能性が高い。

都立駒込病院においては、2001 年 3 月倫理委員会の承認を得て、固形腫瘍に対する骨髓非破壊的同種造血幹細胞移植の臨床第 II 相試験を施行し、安全性と有効性の検討をしてきた。現在までに難治性消化器がん 11 例に実施した。内訳は膵がん 6 例、胃がん 2 例、大腸がん 1 例、胆のうがん 1 例、胆管がん 1 例だった。このうち、腫瘍マーカーの低下が 6 例で、明らかな腫瘍縮小が 2 例で確認され、同種免疫反応による Graft versus tumor (GVT)effect と判断された。移植

後生存期間は 52-568 日、中央値 155.5 日であり、全身状態が良く、比較的若い、腫瘍量の少ない患者であれば、標準的化学療法が無効となった状況においても、GVT 効果による抗腫瘍効果が期待できることが示された。一方で gradeII 以上の急性 GVHD が 50%で認められ、移植関連合併症への対処が重要であり、また、慢性 GVHD にともなう QOL の低下をいかに管理するかという移植補助療法の重要性が認識されている。

また、固形腫瘍患者は比較的高齢であり、同胞と HLA が一致しない例、あるいは一致しても提供に至らない例も多く、同種移植に必要なドナーの確保が困難という現実の壁がある。このドナーの問題に関しては、臍帯血移植を行うことによって大きな進展が期待されている。

E. 結論

固形腫瘍に対する臍帯血移植は、化学療法無効の難治性固形腫瘍に対する新たな治療戦略として期待されている。本研究において、その安全性と有効性を科学的に示すことが重要である。

今年度は本研究の固形腫瘍に対する臍帯血移植の臨床第 I 相試験の研究計画書を作成し、実施にむけた準備を進めている。

成人固形腫瘍の同種移植に関する全国調査

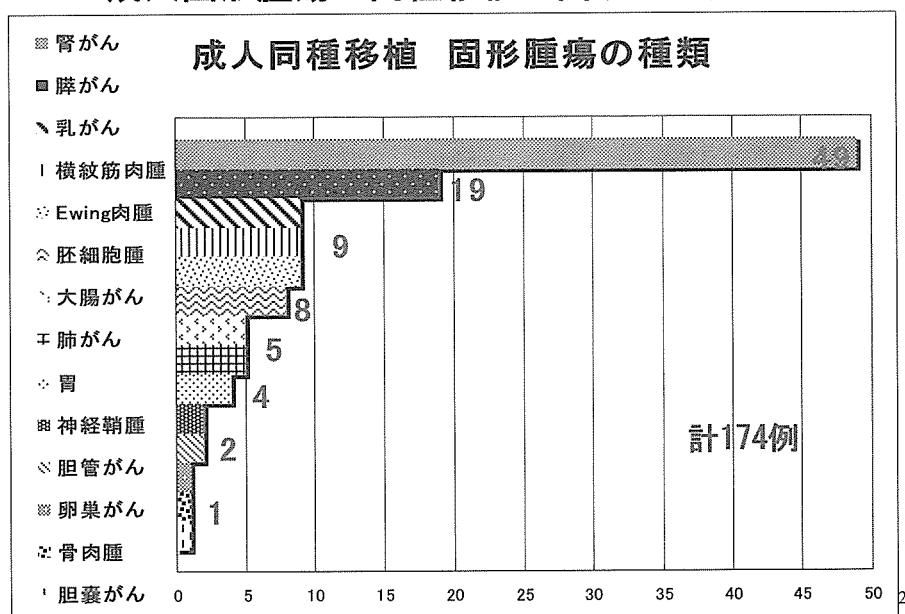
2006年2月

- 全国 439施設(科)のうち、236施設(科)より回答
- 成人固形腫瘍の同種移植実績 43施設 50科
- 移植症例数 計 174 例
- 移植細胞

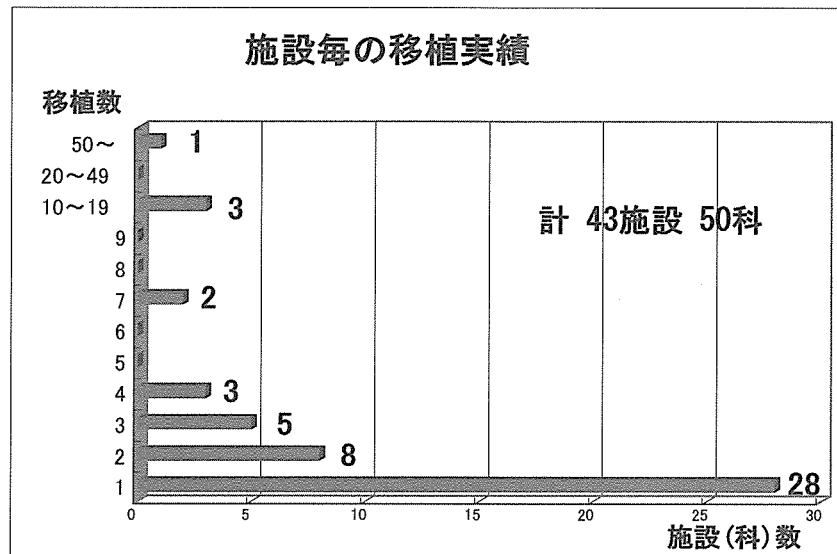
骨髓	16 例	10.7 %
末梢血	130 例	86.7 %
臍帯血	4 例	2.7 %

1

成人固形腫瘍の同種移植に関する全国調査



成人固形腫瘍の同種移植に関する全国調査



3

厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 臍帯血の品質管理に関する研究

分担研究者 高梨 美乃子 東京都赤十字血液センター製剤部 部長

研究要旨

本邦には 11 の臍帯血バンクがあり、15 カ所の調製保存施設にて活動している。臍帯血の品質の指標となる検査についての手技はすべての施設で同一ではない。各施設にて再現性試験を行い技術の安定性を確認の上、同一の凍結検体を用いて多施設比較試験を行った。同一機種による白血球数、数種類の手技による生細胞率、死細胞除去 gating をいれた標準法による CD34+細胞数について施設間差は期待される範囲内であった。コロニー形成数は 30-40% も変動した。抗 HLA 抗体の移植結果に及ぼす意義について 5 バンクの協力を得て解析した。無菌検査の実情調査と検査感度検討の準備を行った。

A. 研究目的

臍帯血の品質を示唆する検査について再現性と多施設比較試験を行い、臍帯血バンクのデータに対する信頼を得る。また臍帯血移植の安全性向上の為にレシピエント抗 HLA 抗体と移植結果について後方視的検討を行いその意義を明らかにする。

CV(%)	凍結前検体	凍結後検体
白血球数	2.2	2.7
有核赤血球率	22.3	53.7
生細胞率	1.1	2.9
CD34+細胞数	9.6	11.4
総 CFU	15.6	12.4
CFU-GM	21.4	17.9

B. 研究方法

(1) 再現性試験：本邦 11 臍帯血バンクの 15 調製施設にて、2 検体それぞれの凍結前後について白血球数、有核赤血球率、生細胞率、CD34+細胞数、および CFU 数を 5 回ずつ測定し変動係数 (CV) を求めた。(2) 凍結検体による多施設比較試験：同一凍結臍帯血検体を各調製保存施設へ送付し、白血球数、有核赤血球率、生細胞率、CD34+細胞数、および CFU 数を算定した。(3) レシピエント抗 HLA 抗体が移植結果に及ぼす影響について、臍帯血バンクにて保管している患者血漿を用いて後方視的検討を行った。抗 HLA class I および class II 抗体を間接蛍光抗体法にて測定し、その特異性と臍帯血 HLA 抗原との交差反応性までを判定し移植結果を解析した。(4) 無菌検査の方法と陽性率について各バンクにアンケート調査を行った。

C. 研究結果

(1) 再現性試験：各測定項目の検体毎 CV 値が期待される範囲内であり、技術的に安定している事が推察された。有核赤血球率は元来の値が小さい為、見かけ上の変動が大きくなると考えられた。

(2) 凍結検体による多施設比較試験：コロニーアッセイ用培地を製造する会社による MNDP との同時試験を 4 月に行ったが 41 施設中 17 施設 (41.5%) でコロニー形成を認めず、7 月の再試験でも本邦の 15 施設中 9 施設にてコロニー形成を認めなかった。12 月に国内バンク独自で凍結検体を配布し 1 施設を除いてコロニー形成を認めた。CV 値は白血球数 6.6%、生細胞率の TB 法 7.4%、AO/EB 法 8.2%、7AAD 法 12.7%、CD34+細胞数は通常の CD34+/45+分画に加え標準ビーズから測定容量を算出し、かつ死細胞除去 gating をかける方法であれば CV 値が 14.8% であった。総コロニー形成細胞は 31.8%、CFU-GM は 42.3% であった。

(3) 抗 HLA 抗体の生着に及ぼす影響：北海道、京阪、福岡県および東京都赤十字血液センター臍帯血バンクにて保管した移植患者血清を用いてレシピエント抗 HLA class I または class II 抗体の有無とその特異性を判定した。東海大学および兵庫臍帯血バンクよりは検査データを送付頂き、移植後 21 日以内早期死亡は除外し、初回単一臍帯血移植、計 592 例の好中球の回復 (生着) を解析した。抗 HLA 抗体陰性 (・) は 488 例、陽性 (+) (抗 class I and/or 抗 class II) 104 例、陽性例中臍帯血抗原との交差反応性あり 11 例であった。抗体の有無、抗体の種類 (抗 class I

または class II) による生着への影響は認められなかった。腫瘍性疾患 548 例のうち HLA 不適合移植において、抗 HLA 抗体特異性と臍帯血抗原とが交差反応性のある 11 例では、その他の群との間に統計的有意差は認められなかったが、生着中央値が抗体(-)群 24 日、抗体(+)交差(-)群 21 日に対して交差(+)群 41 日であった。

(4) 無菌検査の方法と陽性率について各バンクにアンケート調査を行った結果、培地、検体容量、温度等に数種類あることから、国立感染症研究所の協力により標準菌を配布し、検出感度評価を行うこととした。代表的な 4 方法の評価する為、4 施設にて BSL2 設定を行うべく準備中である。実際の評価は次年度になる。

D. 考察

臍帯血バンクの検査手技は施設によって異なる場合がある。再現性試験については、今年度、同一機種 of 自動血球算定装置が各バンクに整備された為に 2 年ぶりに行った。同一検体を配布する多施設比較試験は先年度までに臍帯血全血（凍結前）を用いて 3 回行っており、今年度は凍結検体を配布した。

臍帯血の検索に使われる公開データは凍結前の検査結果である。細胞数算定と CD34+数は機器管理用の標準血球測定と同様の精度で安定していると考えられる。ただし凍結融解後の CD34+数測定には CD34, CD45 に死細胞除去を加え適正な gating を行うべきであると考えられた。コロニー形成細胞数測定は凍結の有無に関わらず施設間では 3 割から 4 割ほど変動する。生細胞率については数種類の方法が使われているが、各施設とも習熟していると考えられた。

レシピエント抗 HLA 抗体については、他バンクの協力を得て症例数を集積し、抗体の存在のみでは移植後の好中球の回復（生着）に有意差を認めなかった。抗体特異性と臍帯血抗原との交差については、有意差は認められないものの交差反応性がある場合には生着に不利であることが疑われた。

無菌検査には日本薬局方収載のものから多数検体自動判定システムまで多くの方法があり、各バンクによって異なる。臍帯血バンクでは検査に使用する最終検体の容量に限界があるため、検査感度が危惧される。一部施設では検体種類を変え容量を増やすなど検出率を上げる工夫を凝らしている。国立感染症研究所より標準菌を配布して頂くために代表的な方法を用いている 4 施設に BSL2 設定をすべく準備中である。

E. 結論

白血球数、凍結前 CD34+数測定の精度は許容範囲と考えられた。凍結融解後の CD34+数測定は死細胞除去を含む標準的な方法を用いる事が重要である。無菌検査の感度評価試験は次年度の課題である。移植成績に及ぼすレシピエント抗 HLA 抗体の意義については、抗体の存在のみでは生着への影響を認めなかった。抗体特異性と臍帯血抗原との交差反応性がある場合には生着に不利であることが疑われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的所有権の出願・取得情報

なし

厚生労働科学研究費補助金 ヒトゲノム・再生医療等研究事業
分担研究報告書

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 成人における臍帯血移植（骨髄破壊的前処置法の標準化）

分担研究者 高橋 聡 東京大学医科学研究所先端医療研究センター・血液腫瘍内科 助教授

研究要旨

東京大学医科学研究所附属病院での成人患者に対する臍帯血移植について解析した。今後は、この結果を基に多施設での前方視的臨床試験を計画・実行し、同種移植療法の中における臍帯血移植の位置づけを検討する予定である。

A. 研究目的

東大医科研では、成人患者に対する臍帯血移植に積極的に取り組んでおり、良好な成績が得られている。多施設での前方視的臨床試験を計画するうえでの基礎資料とするために、医科研における臨床経験を解析する。特に、成人を対象とした臍帯血移植では移植細胞数が少ないことが生着不全・造血回復の遅延、および臨床成績の低下に強く影響していると考えられており、一般に最低細胞数としては $1.5 \times 10^7/\text{kg}$ が必要で、 $2.0 \times 10^7/\text{kg}$ 以上が望ましいとされている。本臨床検討は少ない移植細胞数を用いた場合の臍帯血移植の安全性と生着動態の確認を目的とする。

B. 研究方法

1998年8月から2006年5月までに東大医科研で施行した142例の臍帯血移植の中で成人患者にTBI 12Gyを含む標準的前処置を用いた初

回移植111例を対象とし、2006年9月に解析を行った。このうち移植細胞数が $2.0 \times 10^7/\text{kg}$ 未満の9例（L群）における生着および生存状況について、残りの102例（nL群）と比較した。

C. 研究結果

L群9例中2例が多臓器不全により移植後27日、28日で死亡したが、残りの7例は生着を認め、この群の中における好中球500までの回復中央日数は24(23-41)日、nL群では22(16-46)日であった。血小板5万にはL群4例が回復し、移植後中央日数は53日(34-106)日であった。一方、nL群で回復した80例の中央値は移植後46(25-263)日であった。生着したL群のうち249日で再発した1例を除き6例が生存中である（観察期間：4年7ヶ月、3年、2年1ヶ月、1年3ヶ月、7ヶ月、3ヶ月）。L群についての詳細を以下に示す。

症例	年齢/性別	体重(kg)	疾患/移植時病期	HLA 不一致数1)	移植細胞数 ($\times 10^7/\text{kg}$)	CD34細胞数 ($\times 10^5/\text{kg}$)	好中球 回復2)	血小板 回復3)	移植後経過
292	44/F	55	AML/Relapse	1	1.63	0.31	NE4)	NE	Day27 多臓器不全で死亡
296	26/M	56	AML/Relapse	2	1.16	0.15	41	NE	Day249 再発
394	16/F	55	CML/BC	2	1.10	1.22	24	53	Day1660 寛解で生存
438	27/M	57	NHL/CR2	3	1.81	0.54	25	106	Day1072 寛解で生存
462	35/M	75	MDS/RAEB-t	2	1.82	0.70	24	62	Day736 寛解で生存
476	26/M	57	MDS/RAEB	2	1.65	0.86	NE	NE	Day28VODで死亡
479	49/M	69	AML/CR2	3	1.77	0.65	23	48	Day442 寛解で生存
494	52/M	66	AML/CR2	2	1.95	0.81	19	53	Day204 寛解で生存
500	40/M	68	MDS/RAEB	2	1.73	1.30	20	34	Day99 寛解で生存

D. 考察

以上の経験をふまえて当施設では、移植細胞数が少ない ($2.0 \times 10^7/\text{kg}$ 未満) 場合は、造血回復遅延の傾向が認められたが、 $1.5 \times 10^7/\text{kg}$ 以上であれば一定の安全性は確保される可能性が示唆されたため、臨床検討を進める予定である。

E. 結論

東大医科研における成人に対する臍帯血移植の経験によって、生着、GVHD、非再発死亡、生存率において、安全かつ有効な治療法である可能性が示唆された。当科で実施中の臍帯血移植プロトコルを用いて、多施設での前方視的臨床試験を計画し、さらに安全性と有効性について確認されることが標準的治療法としての位置づけが得ることができるのか、検討が必要で

ある。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tukada N, Tojo A, Ymaguchi T, Asano S. Post-transplant engraftment and safety of cord blood transplantation with grafts containing relatively low cell doses in adults. Int J Hematol, 84: 359-362, 2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

臍帯血を用いる造血幹細胞移植技術の高度化と安全性確保に関する研究
研究課題 ヒト胎盤・臍帯血を用いた再生医療に関する研究

分担研究者 高橋 恒夫 東京大学医科学研究所細胞プロセッシング寄付研究部門 客員教授

研究協力者 張曉紅、伊倉宏一（東京大学医科学研究所細胞プロセッシング寄付研究部門）

研究要旨

臍帯血は白血病等の血液疾患にすでに利用されており、再生医療として大きく貢献している。我々はさらなる医療としての臍帯血の利用拡大を図るために、骨、軟骨、脂肪に分化できる間葉系幹細胞の分離と神経系疾患のための細胞ソースとしての可能性について検討した。臍帯血から間葉系幹細胞を分離するためには、臍帯血の採取量と採取から細胞分離操作までに要する時間が関連していることが考えられた。臍帯血由来間葉系幹細胞は間葉系幹細胞のソースとして注目されている骨髄や脂肪組織由来に比べ増殖能に優れ、骨、軟骨への分化能が高かった。このことから、臍帯血由来間葉系幹細胞は骨・軟骨再生の細胞ソースの一つとして期待できることが示唆された。神経細胞に誘導できる可能性のある細胞として、間葉系幹細胞と造血系の未熟な細胞である CD34⁺細胞に着目し、培養系での神経細胞への誘導について試みた。間葉系幹細胞においては種々のサイトカインや細胞内 cAMP を増大させる試薬での作用では神経様の細胞形態にはならなかった。CD34⁺細胞はヒト胎児由来アストロサイトの培養上清を用い培養したが、神経細胞様の細胞を確認することはごくわずかであった。このことから、培養条件や他の分画の細胞での検討を必要とすることが考えられた。

A. 研究目的

臍帯血には骨、軟骨、脂肪に分化できる間葉系幹細胞が存在することがいわれている。しかしながら、我々は臍帯血から間葉系幹細胞の分離に成功しているが、確実に分離することができなかった。これは臨床応用において問題である。まず、我々は臍帯血由来間葉系幹細胞の分離について、採取量および採取から分離までに要した時間の影響について検討し、分化能について他の組織由来の間葉系幹細胞と比較した。臍帯血由来間葉系幹細胞はヘテロな細胞集団でもあることから、セルソータによりシングルセル由来のクローンの作製を試みた。

次に臍帯血には神経細胞に誘導できる細胞の存在が示唆されているが、ヘテロの細胞集団から成る臍帯血中のどの細胞から誘導されるのか明らかにされていない。とりわけ注目されている細胞として間葉系幹細胞が注目されている。我々は培養系での CBMSC から神経細胞様形態への誘導について検討した。間葉系幹細胞以外で神経細胞に誘導できる細胞の可能性として、造血幹・前駆細胞の CD34⁺細胞にも着目した。

B. 研究方法

臍帯血由来間葉系幹細胞の分離は、異なる量および異なる採取時間の臍帯血から

Ficoll-Paque™ を用いた遠心分離法により単核細胞を分離し、 $>2 \times 10^6$ cells/cm² で通常の組織培養皿に播種し、DMEM（低グルコース）+ 20% FBS + 0.1 μM デキサメサゾンにより培養した。ヒト成人骨髄由来間葉系幹細胞の分離は、市販の骨髄細胞を通常の組織培養皿に播種し DMEM（低グルコース）+ 20% FBS で培養し得た。ヒト成人脂肪由来間葉系幹細胞は脂肪組織をコラゲナーゼ処理により、細胞に分離し、0.1%ゼラチンコートした培養皿にそれを播種し、M199 + 10% FBS + 2 ng/ml aFGF + 5 ng/ml ヘパリンにより培養し得た。分化能は Pittenger ら（Science 284, 143-147, 1999）の方法により骨、軟骨、脂肪に分化誘導を行った。シングルセル由来のクローンの作製は、増幅した臍帯血由来間葉系幹細胞をセルソータにより、96 well マルチプレートの 1 well に 1 cell 播種し、DMEM（低グルコース）+ 20% FBS で培養した。臍帯血由来間葉系幹細胞から神経細胞への誘導はラミニン上で、EGF と bFGF または bFGF、BDNF、NGF などサイトカインを含む無血清培地、細胞内 cAMP を増大させる試薬を含む無血清培地により培養した。臍帯血由来 CD34⁺細胞から神経細胞への誘導は、臍帯血由来 CD34⁺細胞をヒト胎児由来アストロサイトの培養上清を用い培養した。神経系マーカーの発現を RT-PCR、蛍光免疫染色により調べた。