

(倫理面への配慮)

本研究は実際に際して「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に則り、その内容を本研究所倫理審査委員会に申請し、審査承認を受けている。研究に用いる臍帯血は本研究施設と資料譲渡契約と結んでいる採取医療機関 1 施設（東京臍帯血バンク採取医療機関）において、正常産の妊婦より提供目的と研究内容について説明と同意を得た上で分娩後に採取している。分娩後の採取のため、採取に際してドナーの安全性は完全に確保されている。また、研究に用いる臍帯血は東京臍帯血バンクより細胞数等の面から移植用としては適さない臍帯血について、ドナーの同意を得た上で提供を受けている。なお、提供を受けるにあたっては、東京臍帯血バンクの倫理委員会の審査承認を受けている。また、採取に際しては、東京臍帯血バンクにおいてドナーに対して問診および家族歴の調査を行っており、感染症等の既往歴のあるドナーからの臍帯血の採取は行わない。臍帯血は東京臍帯血バンクにおいて感染症検査を行っており、安全性の確認された臍帯血の提供を受けている。なお、問診および家族歴等の個人情報 は東京臍帯血バンクにおいて管理し、匿名化の処置を講じている。以上より、提供を受けた試料は個人のプライバシーが完全に保護されていると同時に研究従事者の安全性も確保されている。

### C. 研究結果

臍帯血量が >40g で、採取後から分離までの時間が 5 時間以内のサンプルにおいて、培養 10 日目ぐらいから線維芽様細胞形態をしたコロニーが観察された。そのコロニーから増幅させた細胞集団について FACS により細胞表面抗原を解析したところ、CD29、CD44、CD49e、CD73、CD90、CD105、CD166 が陽性および CD14、CD31、CD34、CD45 が陰性反応を示し、一般的に知られている間葉系幹細胞マーカーを発現している細胞集団であった。骨、軟骨、脂肪への分化誘導について検討したところ、他の組織由来である骨髄や脂肪組織由来に比べ、骨、軟骨には分化しやすいが脂肪には分化しにくい傾向がみられ、臍帯血サンプルによっては多分化能を保持していない細胞集団もあった。増殖能については臍帯血由来間葉系幹細胞が他の組織由来に比べ顕著に優れていた。セルソータにより臍帯血間葉系幹細胞集団からシングルセル由来のクローンの作製を試みたところ、増殖速度および細胞形態の異なるクローンを得たが、間葉系幹細胞マーカーについて FACS により解析

したところ、それらのクローンにおいて違いはみられなかった。分化能については検討中である。

臍帯血由来間葉系幹細胞から神経細胞への誘導の検討では、ラミニンコート上で EGF および bFGF または bFGF、BDNF、NGF を含む無血清培地で細胞処理した場合、神経細胞様形態は観察されなかった。細胞内 cAMP を増大させる試薬を添加したところ神経細胞様形態を示したが、その試薬を除去すると神経細胞様形態を維持することができなかった。また、臍帯血由来間葉系幹細胞は誘導前に神経系細胞マーカーを発現していた。臍帯血由来 CD34<sup>+</sup>細胞をヒト胎児由来アストロサイトの培養上清を用いた培養では、14 日目でごくわずかな細胞が培養皿に接着しはじめ、21 日目で突起様の細胞が観察されたが、ほとんどの細胞は浮遊し生存していた。対照として、ヒト胎児由来アストロサイトの基礎培地（コントロール）での培養では培養 14 日目でほとんどの細胞が死んでいた。

### D. 考察

臍帯血から間葉系幹細胞の分離には、臍帯血の採取量と採取から細胞分離するまでの時間が重要であることが考えられた。再生医療において、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に比べ、臍帯血由来間葉系幹細胞は増殖能に優れ、分化能についても骨、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として期待できることが示唆された。臍帯血由来間葉系幹細胞集団からシングルセル由来クローンの解析では、臍帯血由来間葉系幹細胞は増殖能の異なる細胞集団であることが明らかになり、どのような分裂様式で間葉系幹細胞が未分化維持しているのか、分化能とともに今後の課題である。

臍帯血由来間葉系幹細胞での神経細胞の誘導法において、検討したサイトカインや細胞内 cAMP を増大させる試薬での誘導では確実に神経細胞様の細胞形態を誘導することはできなかった。興味深いことに、臍帯血由来間葉系幹細胞は誘導前にすでに神経系細胞マーカーを発現していた。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞やヒト胎児肺由来線維芽細胞でも神経系細胞マーカーを発現していることが報告されているが ( Differentiation 72, 319-326, 2004; Differentiation 73, 474-483, 2005)、その生物学的な意義は明らかにされていない。こうしたことから、神経細胞への誘導法などの詳細な検討が必要である。臍帯血由来 CD34<sup>+</sup>細胞をヒト

胎児由来アストロサイトの培養上清を用いた培養では、細胞は生存していたが、ほとんどの細胞は培養皿に接着できず、接着し神経様の形態を示した細胞はごくわずかであった。神経細胞への誘導過程において培養皿に細胞が接着することが重要である。ヒト胎児由来アストロサイトの培養上清を用いたヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup>細胞の培養では培養 2 日目で培養皿に接着しはじめることが報告されている (Exp. Neurol. 197, 399-406, 2006)。この接着性の違いは以前に我々が報告した (Exp. Hematol. 31, 1237-1246, 2003) ヒト骨髄由来 CD34<sup>+</sup>細胞に比べ、臍帯血由来 CD34<sup>+</sup>細胞では CD49e および CD49f などの接着分子の発現が弱いことによると考えられた。また、我々はこれらの接着分子が SCF で前処理するにより up-regulation することも明らかにしている。このことから、臍帯血由来 CD34<sup>+</sup>細胞から神経細胞に誘導するためには SCF の関与が重要であると考えられた。

#### E. 結論

臍帯血には間葉系幹細胞が存在するが、その分離には臍帯血の採取量や採取から細胞分離までの時間が重要であることを示した。臍帯血由来間葉系幹細胞は、骨、軟骨細胞に分化能を有しているおり、臍帯血の利用が整形外科領域にも拡大できる可能性が考えられた。臍帯血由来細胞から神経細胞への誘導においては、他の分画の細胞での検討や培養条件、骨髄由来細胞との性質の違いなど詳細な検討が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### A. 論文発表

Zhang X, Soda Y, Takahashi K, Bai Y, Mitsuru A, Igura K, Satoh H, Yamaguchi S, Tani K, Tojo A & Takahashi TA. Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. Biochem Biophys Res Commun. 351, 853-859, 2006.

Zhang X, Mitsuru A, Igura K, Takahashi K, Ichinose S, Yamaguchi S & Takahashi TA. Mesenchymal progenitor cells derived from chorionic villi of human placenta for cartilage tissue engineering. Biochem Biophys Res Commun. 340, 944-952, 2006.

##### 2. 学会発表

なし

#### 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

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 日本さい帯血バンクネットワークを介して行われた非血縁者間臍帯血ミニ移植の解析

分担研究者 谷口 修一 国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液科 部長

研究要旨

難治性血液疾患に対する根治的治療である同種造血幹細胞移植の進歩は近年著しい。最近移植前処置を軽減したミニ移植が開発され、臓器障害を持つ症例や高齢者にも同種移植療法を提供できるようになった。またドナーに関しても臍帯血を用いることにより成人でも 90-95%の症例に移植医療を提供できる状況にある。臍帯血ミニ移植は、ドナーに危険を及ぼすことなく速やかに入手できる臍帯血と移植前処置の軽減による副作用軽減という 2 つの利点を持ち合わせている。対象は 1997 年 7 月から 2006 年 8 月まで日本さい帯血バンクネットワークを介して行われた臍帯血ミニ移植を行った 1088 症例のうち、初回同種移植例について移植細胞数や HLA 適合度と生着、生存との関連を検討した。全有核細胞数、CD34 陽性細胞数が、生着と正の相関を示した。2 年全生存率 25%と不良であった。GVHD 予防のメソトレキセートは移植早期の治療関連死を減らす、生存率には影響しなかった。

A. 研究目的

同種造血幹細胞移植術は、難治性血液疾患に対する根治的治療であるが、これまで骨髄破壊的移植術（フル移植）が主に若年者に対し施行されてきた。近年骨髄非破壊的移植術（ミニ移植）が、臓器障害を有する症例や高齢者にも安全に施行可能なことが示され、そのフル移植と変わらない有効性が報告されている。一方、造血幹細胞移植には基本的に HLA 一致ドナーが必要であるが、HLA 一致血縁者ドナーは 2/3 の症例で見つからず、骨髄バンクを介した移植は、登録から移植までに 3~6 ヶ月かかり、緊急の状況には対応できない事が多い。この場合、HLA 不適合血縁からの移植や HLA2 座不一致まで移植可能な臍帯血移植が考慮される。

臍帯血移植の一般的な生着率は 80-90%と報告され、移植片拒絶が最大の問題とされている。また感染症や治療関連毒性による移植後早期死亡が高いとされている。今回、日本さい帯血バンクネットワークを介して行われた非血縁者間臍帯血ミニ移植について、生着率や生存率を中心に検討した。

B. 研究方法

対象は 1997 年 7 月から 2006 年 8 月まで、本邦で施行された臍帯血移植症例のうち、1) 16 歳以上の成人例、2) 固形腫瘍を除く血液疾患、3) 骨髄破壊的移植を除外、を満たす 1088 症例。前回移植歴としては、臍帯血移植 122 例 (11%)、非血縁者間移植 77 例 (7%)、血縁者間移植 46 例 (4%)、自家移植 94 例 (9%)、移植歴なし

683 例 (63%) であった。このうち、初回同種移植の 777 症例について詳細な解析を進めた。

年齢中央値 56 才 (16-79)。性別は男性 474 例、女性 303 例。疾患別では、急性骨髄性白血病 190 例 (24%)、急性リンパ性白血病 66 例 (8%)、骨髄異形成症候群 172 例 (22%)、慢性骨髄性白血 22 例 (3%)、悪性リンパ腫 192 例 (25%)、成人 T 細胞白血病 68 例 (9%)、多発性骨髄腫 44 例 (6%)、再生不良性貧血 22 例 (3%)、慢性リンパ性白血病 1 例であった。

前処置は TBI +フルダラビン+アルキル化剤が 536 例 (70%)、フルダラビン+アルキル化剤 ±ATG が 111 例 (14%) であった。GVHD 予防はシクロスポリン (CsA) 単独 218 例 (28%)、CsA+メソトレキセート (MTX) 129 例 (17%)、タクロリムス (FK) 単独 213 例 (27%)、FK +MTX 77 例 (10%)、その他 140 例 (18%) であった。

ドナーは、凍結時全有核細胞数中央値  $2.54 \times 10^7/\text{kg}$  (1.10-6.42)、凍結時 CD34 細胞数中央値  $0.77 \times 10^5/\text{kg}$  (0.01-12.32)、血清学的 HLA 一致度は、HLA6/6 一致が 42 例 (5%)、5/6 一致 216 例 (28%)、4/6 一致 512 例 (66%)、3/6 一致 4 例であった。

倫理上の問題点に対する配慮

本研究は当院で行った臍帯血ミニ移植の後方視的コホート研究である。今回の研究を目的とした説明および同意取得は行っていない。ただし統計解析においては患者固有情報の匿名化を行い、個人情報漏洩の防止に努めた。

### C. 研究結果

28日以内の生着前早期死亡例を除く663例において、好中球生着 (day 90)は79%、血小板生着 (day 180, >20000/ $\mu$ l)は56%に認めた。移植全有核細胞数とCD34陽性細胞数は有意に好中球生着と相関し、全有核細胞数 >3x10<sup>7</sup>/kgでは85%の生着率、CD34陽性細胞 >1x10<sup>5</sup>/kgでは87%の生着率であった (Figure 1)。血清型HLA適合度が高いほど生着率が高い傾向は認められたが、統計学的有意差はなかった。またCD34陽性細胞数および血清型HLA適合度の高さは有意に血小板生着と相関した (CD34>1x10<sup>5</sup>/kgで61%、HLA6抗原一致で66%)。

初回同種移植777例について生存率の解析を行った。2年無イベント生存率 (EFS)は19%、2年全生存率 (OS)は25%であった。2回目以降同種移植例はさらに不良で、2年EFS11%であった。CD34陽性細胞数やHLA適合度はEFS、OSに寄与しなかった。急性白血病、骨髄異形成症候群についてはリスク別のOSを解析した。2年OSはスタンダードリスク (n=65)では39%、ハイリスク (n=307)では21%であった。GVHD予防のMTXが全生存率に及ぼす影響を解析したところ、MTXなし群ではMTXあり群に比べ1年以内の早期死亡が多いことが判明したが、長期生存には差がなかった (Figure 2)。100日治療関連死 (TRM)はMTXなし群で39.0%、MTXあり群で27.7%、カイ2乗検定でp=0.0052と有意差を認めた。

### D. 考察

好中球生着79%、血小板生着56%であり、生着不全率の高さは問題である。好中球・血小板生着共に全有核細胞数、CD34陽性細胞数と正の相関を示した。HLA適合度は一致度が高いほど生着しやすい傾向を認められたが、統計学的有意差を認めなかった。

初回移植例の2年OSは25%と不良であった。急性白血病・骨髄異形成症候群においてリスク別にみると、標準リスクの2年OSは39%であり今後改善の必要性がある。GVHD予防にMTXを併用することで、TRMは下がるがOSには影響はなかった。

臍帯血ミニ移植とはいえ、疾患背景、移植前処置、GVHD予防は多岐にわたる。今後は移植前処置やGVHD予防法を均しくしたサブグループでの解析や、多変量解析での詳細な検討が必要である。

### E. 結論

日本さい帯血バンクネットワークを介して行われた成人血液疾患に対する臍帯血ミニ移植1088例について解析した。初回同種移植例では、全有核細胞数、CD34陽性細胞数が、生着と正の相関を示した。生着不全率の高さ、生存率の低さは問題であり、生存率の改善につながる移植方法の確立が急がれる。

### F. 健康危険情報

該当なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Miura Y, Taniguchi S et al. Oral beclomethasone dipropionate as an initial treatment of gastrointestinal acute graft-versus-host disease after reduced-intensity cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006 38: 577-9
2. Narimatsu H, Taniguchi S. et al. Graft failure following reduced-intensity cord blood transplantation for adult patients. *Br J Haematol.* 2006 Jan;132(1):36-41.

#### 2. 学会発表

1. Matsuno N, Taniguchi S et al. Impact of Human Leukocyte Antigen Compatibility on Engraftment in Adult Patients Receiving Reduced-Intensity Umbilical Cord Blood Transplantation Using Calcineurin Inhibitor Alone for GVHD Prophylaxis. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2006; 108: 3147.
2. Yamamoto H, Uchida N, Taniguchi S et al. High Incidence of Cytomegalovirus Reactivation and Diseases Following Reduced-Intensity Cord Blood Transplantation for Adult Patients. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, Nov 2006; 108: 2846.

### H. 知的財産権の出願・登録状況

#### 1. 特許取得

なし

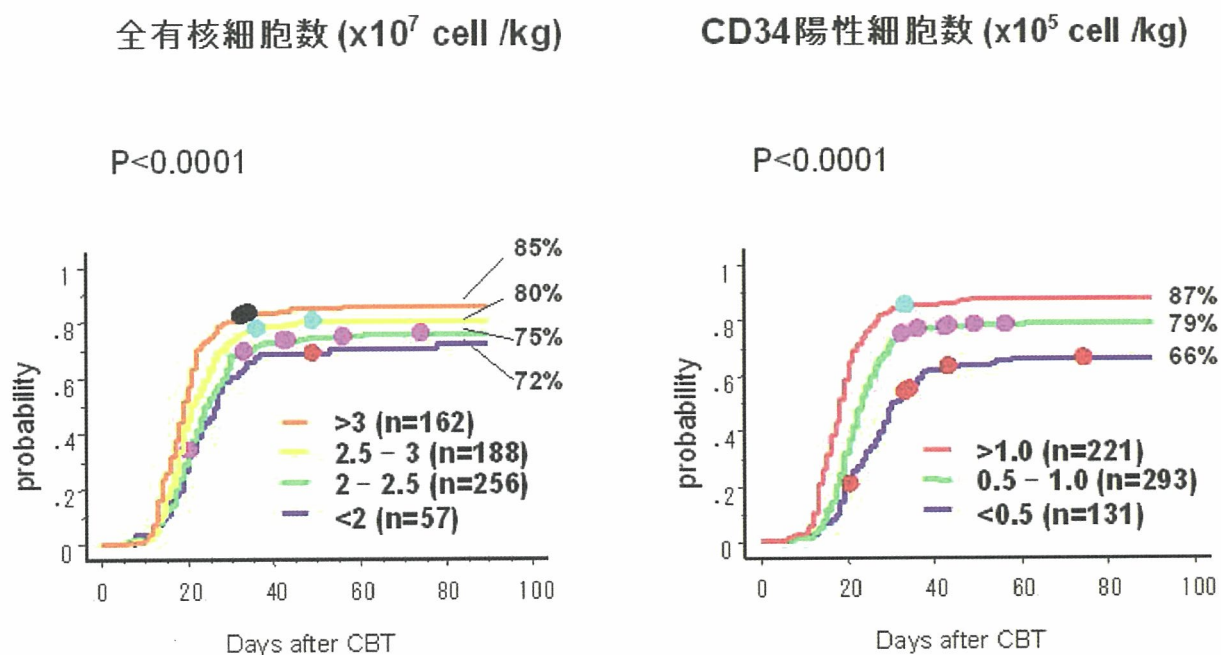
#### 2. 実用新案登録

なし

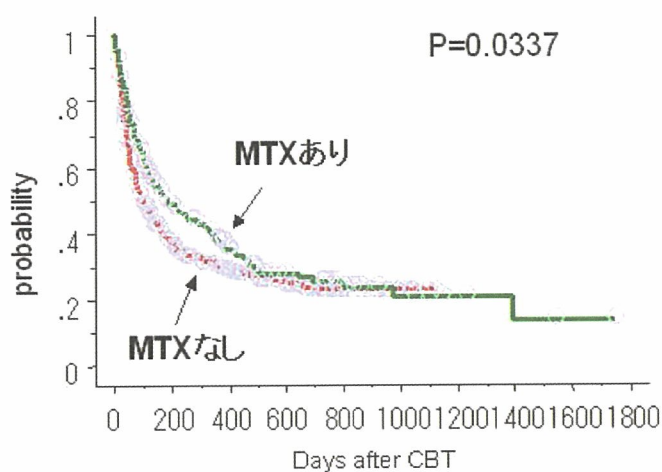
#### 3. その他

なし

## Figure 1. 移植細胞数と好中球生着



## Figure 2. MTXと全生存率およびTRM



	MTXなし (n=431)	MTXあり (n=206)	
TRMなし	263 (61.0%)	149 (72.3%)	
Day 100 TRM	168 (39.0%)	57 (27.7%)	P=0.0052

007.1.27

平成19年度第一回加藤研班会議

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 臍帯血採取方法の検討

分担研究者 中林 正雄 母子愛育会愛育病院 院長

**要旨**

平成 17 年度の研究において臍帯血の採取量を増加させるための方法としてカンガルーケアが有効であることを示し、具体的な手技を解説した DVD「より細胞数の多いさい帯血採取のために」を作成した。本年度はこの DVD を全国約 100 の産科臍帯血採取施設に配布し、さらにさい帯血バンク推進全国大会や第 47 回母性衛生学会などにおいて産科医や産科スタッフに対してこの DVD を中心として啓発講演を行った。このような活動を通じて全国の産科施設においてカンガルーケアへの理解を深め、母児の早期接触を図るためのカンガルーケアが新生児に対して副作用がなく、なおかつ臍帯血採取量の増加のために役立つことを周知啓発することができた。

**A. 研究目的**

臍帯血移植の成績向上および臍帯血移植の対象者増加のためには、可及的に多数の幹細胞(有核細胞)を得ることが求められている。

本研究では、臍帯血採取量の増加を目的として、前年度の研究成果に基づいて作成した「より細胞数の多いさい帯血採取のために」の DVD を、全国の臍帯血採取の関係者に配布し、啓発を行った。なお、本 DVD では、臍帯血の採取血液量と有核細胞数は正の相関関係があること、多くの採取血液量を得る分娩様式として、分娩直後に新生児を母体の腹部にのせるカンガルーケアが有効であること、細菌検査陽性率は、複数回数穿刺(11.4%)では1回穿刺(2.2%)に比べて有意( $p < 0.001$ )に高率であり、1回穿刺が勧められることを解説している。また、臍帯血採取量が多く、カンガルーケアをルーティンに行っている東京衛生病院の樋口泰彦産婦人科医長の臍帯血採取の様子が示されており、全国の臍帯血採取者が参考にしやすいように工夫がなされている。

**B. 研究方法**

1. 「より細胞数の多いさい帯血採取のために」の DVD を、全国 11 ヶ所の臍帯血バンクを介して、全国の約 100 の産科臍帯血採取施設に配布した。
2. 本 DVD の内容を各産科施設が確実に実施するためには、まず自院での分娩様式をカンガルーケアをルーティンにするように変更する必要がある。さらに、カンガルーケア実施から臍帯血採取までの時間的経過を助産師、産科医がともに映像で見て、その実際を理解し、納得

する必要がある。

そのため、さい帯血バンク推進全国大会などにおいて、カンガルーケアが母児の愛着形式に有効であり、また新生児には多血による高ビリルビン血症が減少するなどの利点があり、一方、成熟児であれば新生児の貧血なども発症せず、多数例の長年の経験からも副作用がない旨を、講演にて解説した。

**C. 研究結果**

全国の臍帯血採取施設において、カンガルーケアをルーティンの分娩様式とする施設が増加しつつある。しかし、分娩助産者がこの分娩様式に熟練するには、3~6 ヶ月を要するとの意見が多く寄せられた。

一方、臍帯血採取量の多い施設においては、すでにカンガルーケアを取り入れている施設もあることが明らかになった。(臍帯血採取施設の 16 施設の前年度の成績では、調整前有核細胞数が平均  $13 \times 10^6$  以上であった施設は 5 施設であった。一方、カンガルーケアをルーティンとしている施設は 2 施設あり、この 2 施設とも有核細胞数の多い 5 施設に含まれていた。)

そのため、今後は新たにカンガルーケアを採用した産科臍帯血採取施設に対して、カンガルーケア採用前と採用後の臍帯血採取量を比較する方法が良いことが判明した。

**D. 考察**

臍帯血採取方法は、現在のところ産科臍帯血採取施設の自主性に任されており、臍帯血採取量増加に関する工夫は各施設の努力に負うところが多かった。



前年度の研究成果より、これまでの各施設における工夫に加えて、カンガルーケアを採用することが臍帯血採取量増加につながる事が後方視的研究により示された。今後は、前方視的研究により、この成果を明確にし、さらに成熟児におけるカンガルーケアの利点および副作用の有無についても多施設で検討する必要がある。

カンガルーケアによる臍帯血採取量の増加に関しては、以下のように考察される。すなわち、子宮内では胎児と胎盤はほぼ同じ高さに位置しており、胎児・胎盤循環が維持されている。児の娩出後は、胎児・胎盤循環血液量の一部は、両者の位置の差、すなわち重力の差によって移行するのではないかと考えられている。一般的な分娩様式としては、経膣分娩においては、新生児は子宮内にある胎盤より 20~30 cm ほど位置が下になる。そのため、胎児・胎盤循環血液の一部が胎盤から児へ流入する。一方、帝王切開やカンガルーケアでは、新生児は子宮内にある胎盤より 10~20cm ほど位置が上になる。そのため、胎児・胎盤循環血液の一部が児から胎盤へ流入する。この両方法の差が臍帯血採取量の差となって現れていると考えられる。なお、胎児・胎盤循環血液量のうち、児と胎盤の位置の差によって移動可能な血液量は限られており、約 20~30ml と思われる。そのため、成熟児においては、カンガルーケアをルーティンに行っ

ても新生児に貧血などの副作用が発症しないと考えられる。ただし、早産児におけるカンガルーケアの安全性については、十分な成績は得られていない。カンガルーケアは、本来は早産児に対して、保温の目的で母親の肌と児の肌を密着させることにより、早産児の良好な生存成績が得られたとの報告にはじまったものであるが、最近では成熟児に対しても様々な利点があるといわれており、より広い意味でカンガルーケアという言葉が使用されるようになっている。

## E. 結論

臍帯血採取量を増加させるためには、これまで産科臍帯血採取施設が自主的に工夫してきたことに加えて、出生直後の新生児を母親の腹部に置き、母児の早期接触を図るカンガルーケアが良い方法であり、かつ、新生児に対して副作用がないことを、全国の産科臍帯血採取施設の関係者に周知し、啓発を行った。

## F. 研究発表

1. 中林 正雄：よりよいさい帯血採取のために - カンガルーケアのすすめ -、2006 年福岡発 さい帯血バンク推進全国大会、2006. 10. 22.
2. 臍帯血移植の現状と将来、第 47 回母性衛生学会ランチョンセミナー、2006. 11. 10.

### III. 研究協力報告



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 AML における臍帯血移植の成績

研究協力者 井関 徹 千葉大学医学部附属病院輸血部

山田 実名美 東北大学医学部附属病院血液内科  
長村 文孝 東京大学医科学研究所附属病院医療安全管理部

**研究要旨**

日本さい帯血バンクネットワークを介して行われた 591 例の成人急性骨髄性白血病に対する臍帯血移植の成績を後方視的に解析した。患者年齢、体重は広範囲に分布し、病型、移植病期、移植方法も多岐にわたっていた。非血縁者間骨髄移植に比較して、生着までの期間が長く、生着不全も高率であったが、GVHD の発症頻度は同等ないしは低率であり、骨髄非破壊的前処置による初回移植例では無病生存期間も非血縁者間骨髄移植と同等であった。欠損データ、疑義データの修正後、より詳細な検討を必要とするが、過去に欧米から報告された成人臍帯血移植の成績より良好であり、成人急性骨髄性白血病に対する臍帯血移植は有力な治療の選択肢であると考えられた。

**A. 研究目的**

本邦でこれまでに日本さい帯血バンクネットワークを介して行われた成人急性骨髄性白血病に対する臍帯血移植の成績を明らかにする。

**B. 研究方法**

1999 年 1 月～2006 年 8 月までに日本さい帯血バンクネットワークを介して臍帯血移植を施行され、報告書が回収された成人急性骨髄性白血病 591 例（男性 319 例、女性 272 例）を対象として後方視的に解析した。

**C. 研究結果**

**(1) 患者背景および臍帯血背景**

患者年齢の中央値は 44 歳（16-76 歳）、体重の中央値は 55.0kg（34.8-157.3kg）。移植病期は、第一もしくは第二寛解期が 225 例、非寛解期もしくは第三寛解期以降が 361 例、不明 5 例で、初回移植が 456 例、自家もしくは同種の移植歴がある症例は 135 例であった。移植に用いられた臍帯血の患者体重あたりの凍結前有核細胞数の中央値は、 $2.53 \times 10^7/\text{kg}$ 、同じく CD34 陽性細胞数は  $0.82 \times 10^5/\text{kg}$  であった。HLA disparity については、患者と臍帯血間の血清型での HLA 抗原不一致数が、0、1、2、3 抗原不一致であるものがそれぞれ 64 例（10.9%）、198 例（33.7%）、319 例（54.3%）、6 例（1.0%）であった。DNA タイピング結果の判明している 479 例では、2 抗原不一致までで 60%弱、3 抗原不一致までで約 90%を占めた。

**(2) 移植前処置及び GVHD 予防法**

多岐にわたる前処置が使用されているが、TBI12Gy/CY120mg に代表される骨髄破壊的前処置が 285 例、何らかの強度軽減がなされた前処置が 304 例、なし 1 例、不明 1 例であった。GVHD 予防法は、シクロスポリン（CyA）単独 108 例、CyA+MTX が 226 例、CyA+PSL が 9 例、タクロリムス（FK506）単独 110 例、FK506+MTX が 86 例、FK506+PSL が 4 例、なし 8 例、PSL 単独 1 例、その他 39 例であった。

**(3) 生着**

好中球生着は全体で 67%に認めた。前処置強度別に解析したところ、骨髄破壊的前処置と骨髄非破壊的前処置で好中球生着に有意差を認めた（図 1）。血小板生着（ $5 \text{ 万}/\mu\text{l}$  以上）は約 60%であった。さらに、CD34 陽性細胞数と生着について解析したところ、凍結時 CD34 陽性細胞  $0.8 \times 10^5/\text{患者体重 kg}$  以上及び未満で、好中球生着および血小板生着いずれにおいても有意差が認められた（図 2）。また HLA の一致度と生着について解析したが、血清型および DNA タイピングいずれでも HLA 不一致抗原数による生着の有意差は認めなかった。

**(4) GVHD**

評価可能 443 例中、283 例（63.9%）に急性 GVHD の発症を認め（図 3-1）、重症度分類では gradeI 91 例（20.5%）、gradeII 126 例（29.1%）、gradeIII 42 例（9.5%）、gradeIV 21 例（4.7%）であった。評価可能 391 例中、144 例に慢性 GVHD の発症を認め（図 3-2）、Limited type

が 90 例 (23.0%)、Extensive type が 54 例 (13.8%) であった。

#### (5) 最終転帰

生存 232 例 (39.3%)、死亡 333 例 (56.3%)、不明、その他 26 例 (4.4%) であり、死亡した 333 例の内訳では腫瘍死が 104 例 (17.6%)、移植関連死が 229 例 (38.7%) であった。移植関連死の内訳は生着不全 22 例、GVHD 関連死 24 例、感染症死 92 例、前処置関連毒性その他が 91 例であった。

#### (6) 生存率に影響を与える因子

骨髄破壊的前処置群と明らかな骨髄非破壊的と判断される前処置群の間、また初回移植群と自家もしくは同種の移植歴がある群の間には無イベント生存率に有意差を認めた (図 4-1、2)。その他に生存率に影響を与えた因子には HLA の一致度と移植時の白血病病期があった。

### D. 考察

移植年齢は広い範囲にわたり、日本人としては標準的な体型の成人に移植が実施された結果と考えられるが、欧米の臍帯血バンクから報告されている成人に対するさい帯血移植と比較すると移植細胞数はやや多かった。最終的に主治医により一次的生着不全と判断されたのは 591 例中 72 例 (12.2%) であり、欧米の成人さい帯血移植のそれより低率であったが、日本骨髄バンクを介した急性骨髄性白血病に対する非血縁者間骨髄移植のそれ (6.95%) より高率であった。移植細胞数に関しては患者体重あたりの輸注 CD34 細胞数が好中球、血小板の生着の速度に影響していたが、輸注 CD34 細胞数および有核細胞数は生存率には影響していなかった。逆に HLA の一致度は生着には影響していなかったが生存率には影響している結果となった。重症急性 GVHD の発症頻度は HLA 一致非血縁者間骨髄移植とほぼ同等、慢性 GVHD の発症頻度は非血縁者間骨髄移植と同等ないしはやや低率であった。また急性および慢性 GVHD の有無により生存率に差が見られたが、その意義に関しては今後より詳細な検討が必要である。

全体としての生存率は欧米の臍帯血バンクから報告されている (病名を問わない) 成人さい帯血移植の成績と比較するとより良好であり、生着不全と感染症による死亡率がより低いことがその原因として考えられたが、結論を得るためには、さらに詳細な検討を加える必要がある。また、第一および第二寛解期の無病生存率は比較的良好であったが、全体の成績には前処置の強度、自家ないしは同種の造血細胞移植歴の有無が大きく影響しており、これらの各群で層別

化した上でのより詳細な検討を加える必要もある。

### E. 結論

今回解析したデータには欠損データ、疑義のあるデータが少なからず含まれており、今後それらを修正した上で、前述のごとく前処置別、造血細胞移植歴の有無別、また移植時病期別のより詳細な検討を加える予定である。しかし現時点までの解析でも、特に骨髄破壊的前処置による初回移植例では十分な長期生存率が得られており、成人急性骨髄性白血病において、さい帯血移植は適応を考慮すべき有力な治療の選択肢であると考えられた。

図1.好中球の生着 (Cumulative incidence)

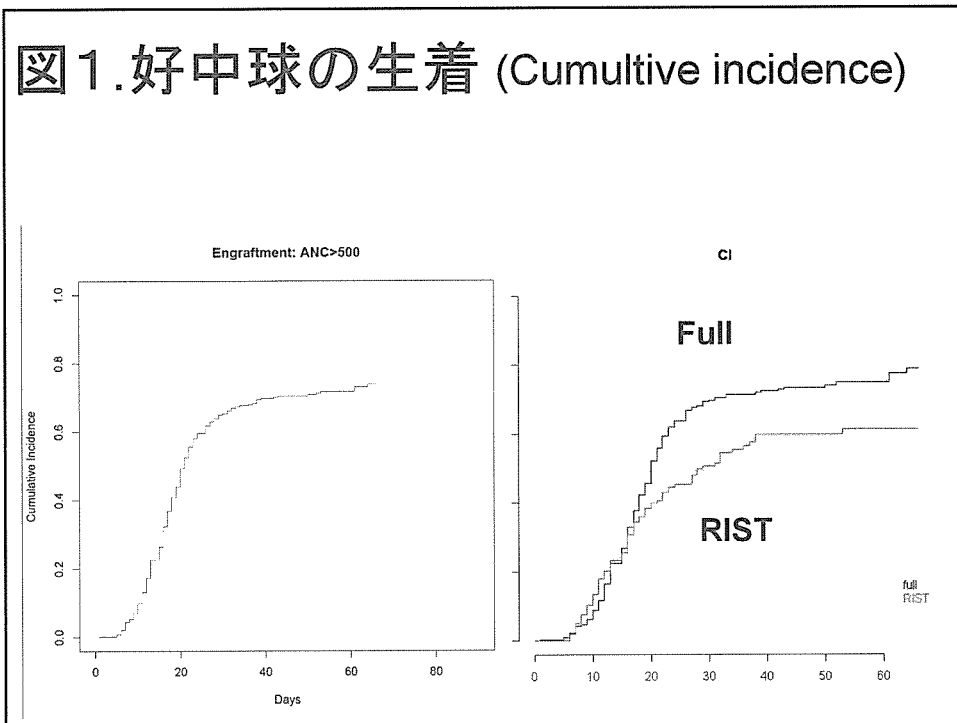
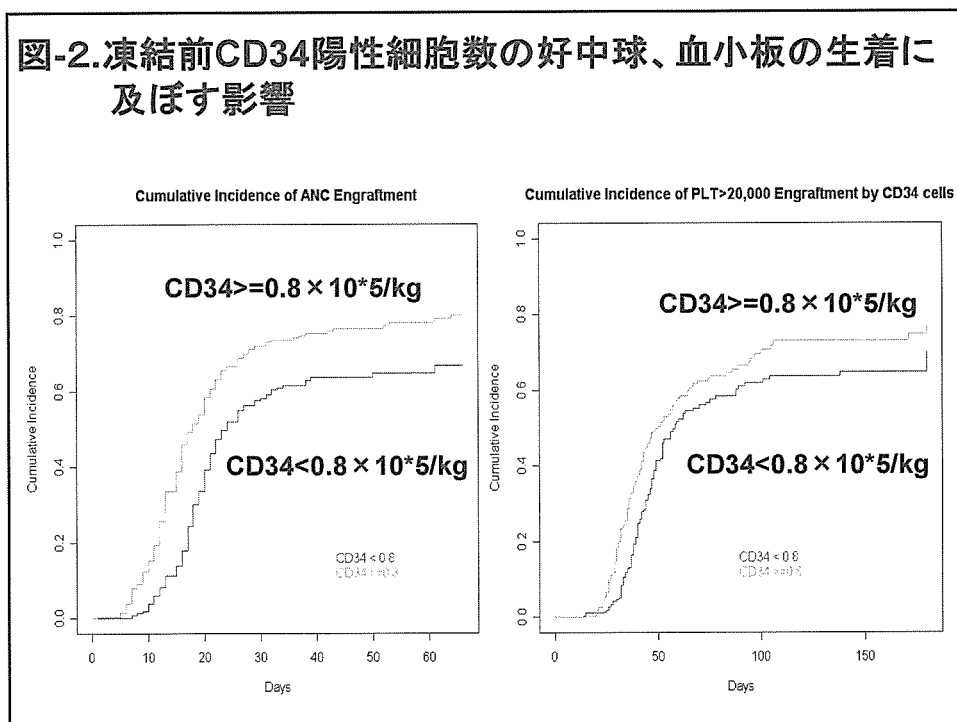


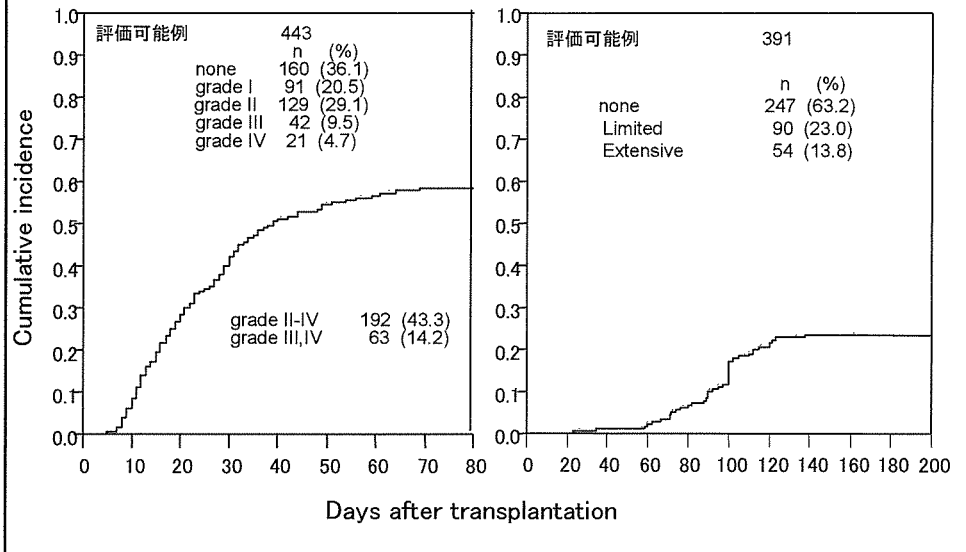
図-2.凍結前CD34陽性細胞数の好中球、血小板の生着に及ぼす影響



### 図-3. GVHD発症率

#### 3-1. 急性GVHD

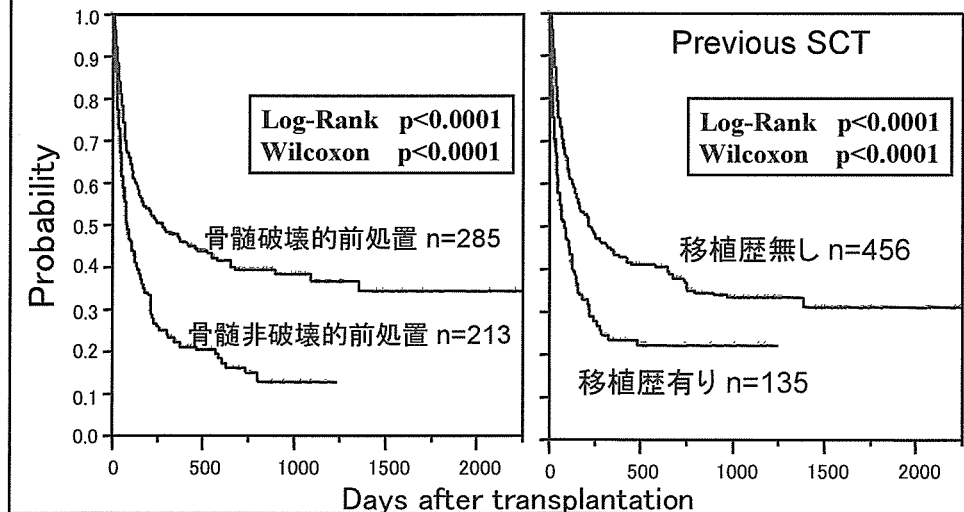
#### 3-2. 慢性GVHD



### 図4. 前処置強度と移植歴の有無による無イベント生存率

#### 4-1. 前処置強度

#### 4-2. 移植歴



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  
研究協力報告書

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 後天性再生不良性貧血に対する非血縁者臍帯血移植の治療成績に関する研究

研究協力者 小島 勢二 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学

吉見 礼美 名古屋大学医学部造血細胞移植情報管理学  
谷口 修一 国家公務員共済組合連合会虎の門病院血液科  
原 純一 大阪市立総合医療センター血液腫瘍科  
加藤 俊一 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

### 研究要旨

わが国において、これまで後天性再生不良性貧血（再不貧）に対して施行された非血縁者間臍帯血移植 31 例の治療成績を検討した。全体での 5 年生存率は 40%であったが、cyclophosphamide (CY), fludarabine (Flu) と全身放射線照射 (TBI) による前治療で移植された患者 (n=5) の生存率は 80%、melphalan (Mel)+Flu+TBI (n=14) では 46.7%、その他の前治療 (n=14) では 21.4%と移植前治療による生存率の違いがみられた (p=0.03)。

### A. 研究目的

HLA 一致同胞ドナーが得られない重症再不貧患者に対しては、抗胸腺細胞グロブリン (ATG) とシクロスポリンによる免疫抑制療法が選択される。免疫抑制療法の奏効率は 60-70%であり、免疫抑制療法不能例に対しては、HLA 一致非血縁ドナーからの同種骨髄移植がおこなわれ、良好な治療成績が報告されている<sup>1)</sup>。しかし、ドナーバンクの拡大にもかかわらず、HLA 完全一致非血縁ドナーが得られない患者は少なからず存在することや、またドナーの探索に数ヶ月を必要とすることから可及的すみやかな移植を必要とする最重症例においては、他の代替ドナーからの幹細胞移植が求められている。非血縁臍帯血は HLA 不適合ドナーからの移植も許容され、短期間に適合臍帯血の探索も可能である故、上記の目的にかなった代替ドナーであるが、これまでの報告からは生着不全の頻度が高く再不貧に対する幹細胞ソースとしては薦められていない<sup>2)</sup>。今回、わが国再不貧患者に施行された非血縁者間臍帯血移植 31 例を解析することで、重症再不貧の治療における非血縁者間臍帯血移植の位置付けを検討した。

### B. 研究方法

患者背景およびドナーとの HLA 適合度を表 1 に示す。血清学的 HLA の適合度は、GVHD 方向で 0, 1, 2 抗原不適合がそれぞれ 4, 18, 9 例、拒絶方向で 0, 1, 2 抗原不適合が 6, 17, 8

例であった。移植方法については表 2 に示す。移植前治療は 3 群に大別され、CY+Flu+TBI が 5 例、Mel+Flu+TBI が 12 例、その他が 14 例であった。GVHD 予防は、シクロスポリン (CsA), タクロリムス (FK506) の単剤がそれぞれ 6, 7 例、上記の 2 剤にメソトレキセート (MTX) を主に他剤を併用した例がそれぞれ 10 例, 8 例あった。輸注有核細胞数は全例が  $2.0 \times 10^7/\text{kg}$  以上であり、その中央値は  $3.0 \times 10^7/\text{kg}$  であった。

### C. 研究結果

生着に関する評価が可能な 24 例のうち 17 例 (71%) に生着が得られた。拒絶された 7 例のうち 1 例に自己造血能の回復がみられた。3 例に 2 回目の移植が試みられたが、全例死亡した。移植後好中球数が  $0.5 \times 10^9/\text{l}$ 、血小板数が  $2 \times 10^9/\text{l}$ 、網赤血球数が  $5 \times 10^9/\text{l}$  に達する中央値は、それぞれ 19, 49, 35 日であった。II-IV 度の急性 GVHD は、100 日以上生存した 14 例のうち 4 例 (26%) に発症した。他に移植後の主要な合併症として、細菌あるいは真菌敗血症 (n=12)、肝中心静脈閉塞症 (VOD, 3 例) がみられた。31 例のうち 13 例が生存中で、5 年生存率は 40%であった (図 1)。死因としては生着不全が 7 例、VOD 3 例、敗血症 3 例、急性 GVHD、ARDS、脳梗塞、脳症、前治療薬による心毒性がそれぞれ 1 例みられた。CY+Flu+TBI による前治療で移植された患者 (n=5) の生存率は 80%、Mel+Flu+TBI

(n=12) では 46.9%、TBI +CY+ATG などの非血縁者間同種骨髄移植においては、標準的な前治療を含むその他の前治療では 21.4%と、選択する前治療法で生存率に差がみられた (p=0.03, 図 2)。また ATG を投与した場合は、非投与と比較してかえって治療成績が劣っていた (p=0.01)。GVHD 予防法についても、統計学的な有意差はないものの、FK506 単剤投与が他の予防法と比較して優れていた (図 3)。

#### D. 考察

これまでの再不貧に対する非血縁者間臍帯血移植は、その生着不全が多いことから薦められていなかったが、今回の検討結果から HLA 完全一致骨髄ドナーが得られない場合や、可及的すみやかな移植を必要とする再不貧患者に対し、非血縁者間臍帯血移植を選択する余地があると考えられた。

#### E. 結論

今回の結果からは、 $2.0 \times 10^7/\text{kg}$  以上の有核細胞数、0 あるいは 1 抗原 HLA 不一致の条件を満たす臍帯血ソースを選択し、移植前治療としては Flu+CY+TBI、GVHD 予防としては FK506 を用いることで再不貧患者に対する非血縁者間臍帯血移植の治療成績の向上が期待できると思われる。

#### 参考文献

- 1) Kojima S. et al: Outcome of 154 patients with severe aplastic anemia who received transplants from unrelated donors: the Japan Marrow Donor Program. *Blood* 100: 799-803, 2002
- 2) Kojima S. et al: Consensus conference on treatment of aplastic anemia. *Int J Hematol* 72: 118-123, 2000

表1 Patient characteristics (n=31)

Age at SCT	(yrs)	28 (0.9-72.3)
Sex	Patient	M/ F
	Donor	11/ 20
		14/ 17
Cause	Idiopathic/ Hepatitis associate	30/ 1
Disease duration (n=26)	Median (range) (days)	337 (31-5063)
	<1yr/ 1-3yrs/ >3yrs	13/4/8
RBC transfusions (n=29)	< 20 times/ >20 times	8/21
PLT transfusions (n=29)	< 20 times/ >20 times	7/22
HLA mismatch	Serology GVHD:	0/1/2
	Serology Rejection:	0/1/2
	DNA typing GVHD (n=22):	0/1/2/3/4
	DNA typing Rejection (n=22):	0/1/2/3/4
		4/18/9
		6/17/8
		2/6/6/6
		1/5/12/3

表2 Transplant Procedures (n=31)

Conditioning regimen	TBI (4-5Gy)+ Mel (80-120 mg/kg) + Flu (120-175mg/m <sup>2</sup> )	12
	TBI (2-4Gy) + CY (50-120 mg/kg) + Flu (90-250mg/m <sup>2</sup> )	5
	others	14
ATG	Yes/No	6/25
GVHD prophylaxis	CSA	6
	CSA +others	10
	FK506	7
	FK506+others	8
MNCs	Med. 3.0 (2.2-11.2) x 10 <sup>7</sup> /kg	
CFU-GM (n=29)	Med. 21.7 (1.94-67.2) x 10 <sup>4</sup> /kg	
CD34 (n=25)	Med. 1.1 (0.23-4.35) x 10 <sup>5</sup> /kg	



图1

### Over all survival after UCBT

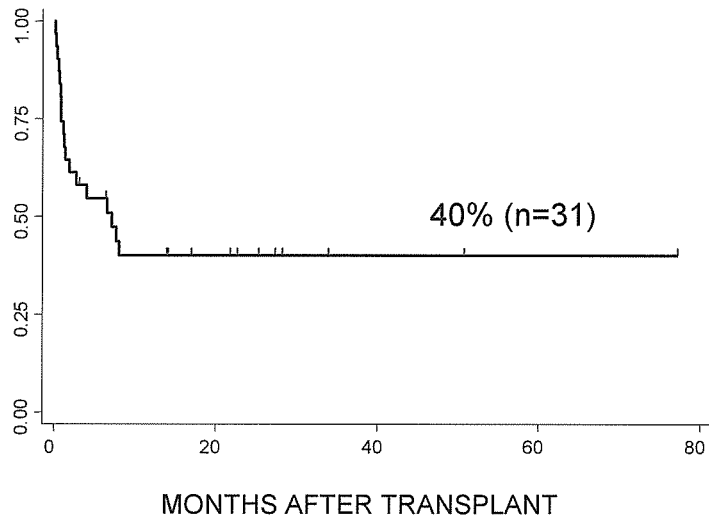
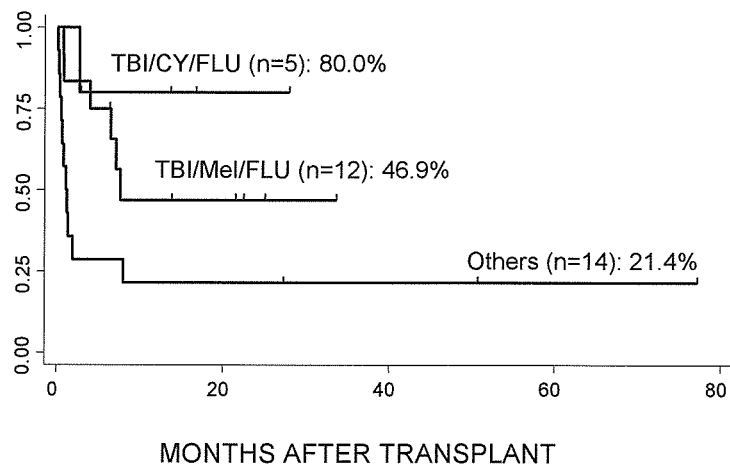


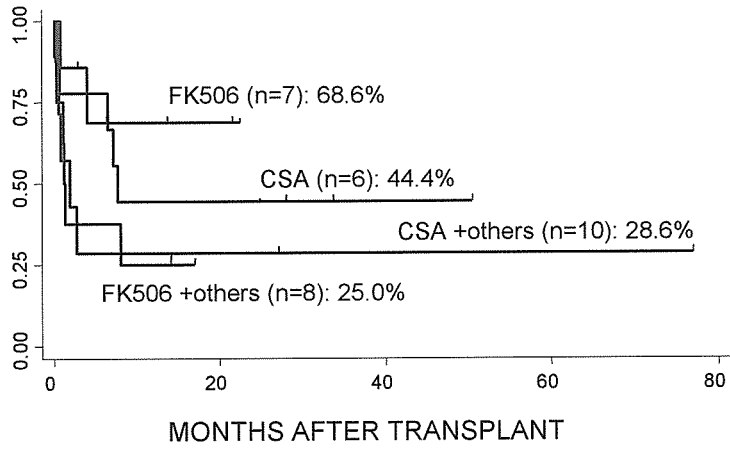
图2

### Over all survival after UCBT Conditioning regimen



3

### Over all survival after UCBT GVHD Prophylaxis



*P=N.S*

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 CML における臍帯血移植の成績

研究協力者 長村 登紀子 東京大学医科学研究所セルプロセッシング・輸血部

【背景】慢性骨髄性白血病(CML)はインターフェロン $\alpha$  (IFN)やグリベック(STI)等の登場により細胞遺伝・分子学的寛解が得られるようになり、基本的にはそれらの治療効果が得られない症例を対象に造血幹細胞移植が行われる傾向にある。こうした状況の中、臍帯血移植に関してのまとまった成績は報告されていない。今回日本さい帯血バンクネットワークを介した臍帯血移植例について解析したのでご報告する。

【患者・方法】1998年から2006年10月までに移植された臍帯血のうちCML調査表回収症例は109例。うち21例は2回目以降の移植症例。M:F 73:36, 各中央値(range)は 年齢 39才(1-67), BW 58kg(9-96.1kg), 採取時臍帯血量 100.6ml(46-167ml), NC( $\times 10^7/kg$ ) 2.5((1.1-11.6), GM ( $\times 10^4/kg$ ) 18.5(0.65-102.1)(n=96), CD34( $\times 10^5/kg$ ) 0.85(0.15-7.31) (n=99)。HLA 拒絶方向不一致 0:16例、1:37例、2:55例、3:1例である。診断から移植までの期間は 1.5年(range, 0.18-14.6 yrs), 診断時病期は慢性期(CP)49例(1<sup>st</sup> 15例、2<sup>nd</sup> 31例、3<sup>rd</sup> 3例), 移行期(AP)18例(1<sup>st</sup> 10例、2<sup>nd</sup> 5例、3<sup>rd</sup> 3例), 急性転化(BC)42例(1<sup>st</sup> 28例、2<sup>nd</sup> 13例、3<sup>rd</sup> 1例)であった。1回目移植における治療歴 IFN-based 22例、STI-based 29例、IFN+STI 18例、HU/BU/AraC等化学療法 16例 不明3例であった。血液学的寛解は36例、部分8例、非寛解36例。細胞遺伝学的完全寛解は18例であった。Myeloablative regimen 68例、RIST 18例、その他2例。移植後のG-CSF投与は 82例。

【結果】初回移植において骨髄系生着が得られたのは67.1%。NC:  $3.0 \times 10^7/kg$  以上の症例(n=23)では87.0%、NC $3.0 \times 10^7/kg$  以下(n=65)で58.3%( $P=0.0006$ )、CFU-GM:  $25 \times 10^3/kg$  以上(n=22) 81.8%、 $25 \times 10^3/kg$  未満(n=66)61.4%( $P=0.03$ )、CD34+: $0.8 \times 10^5/kg$  以上(n=43) 81.8%、 $0.8 \times 10^5/kg$  未満(n=36) 64.2%( $P=0.03$ )であった(図1-1, 2)。HLAや

診断から移植までの期間(1年以上)では有意差は認められなかった。

図1-1. Myeloid engraftment  
-by NC dose- in 1st CBT

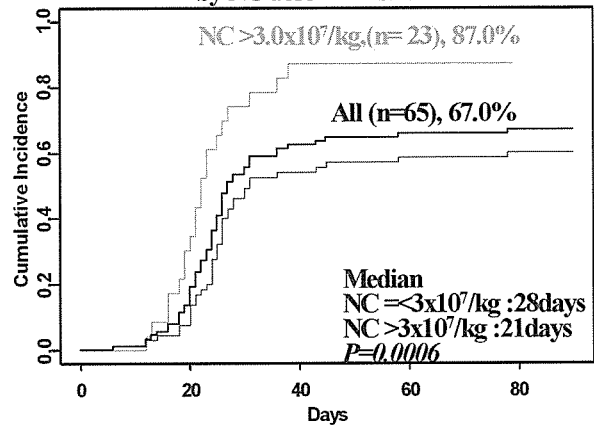
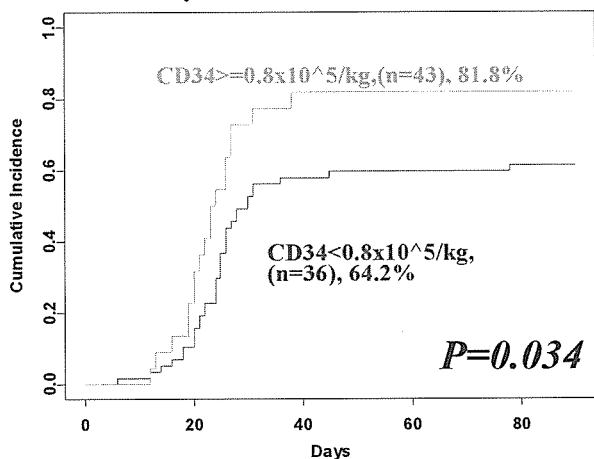


図1-2. Myeloid engraftment  
-by CD34+ dose- in 1st CBT



生着した72例についてaGVHD 0:25例(34.7%), I:17例(23.6%), II:23例(31.9%), III 4例(5.6%), IV 2例(2.8%) NE1例であった。初回移植における2年生存率 CP66.1%, AP67.1%, BC30.1%( $P=0.0007$ ) (図2)。移植歴あり症例においては CP53.3%, AP30.0%, BC0%であった。Cox modelによるEFSへの予後不良因子として移植細胞数(NC $<3.0 \times 10^7/kg$ )、移植時病期(AP/BC)が挙げられた(表1)。一方、診断から

移植までの期間、治療内容による有意差は認められなかった。

【結語】 CML に対する臍帯血移植においては移植時病期の選択と細胞数が十分に確保されることが重要であると考えられた。また診断から移植までの期間、治療方法の違いでは生着、生存率、EFS に有意差を認めなかったことは今後種々の治療過程において移植病期を逸しない時期に臍帯血移植を行いえる可能性が期待された。

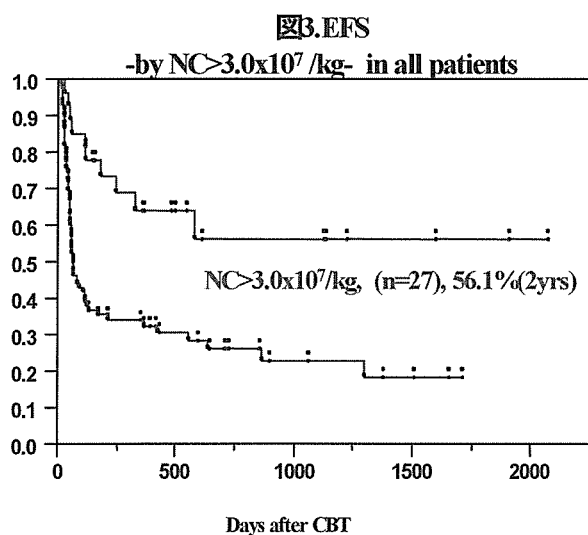
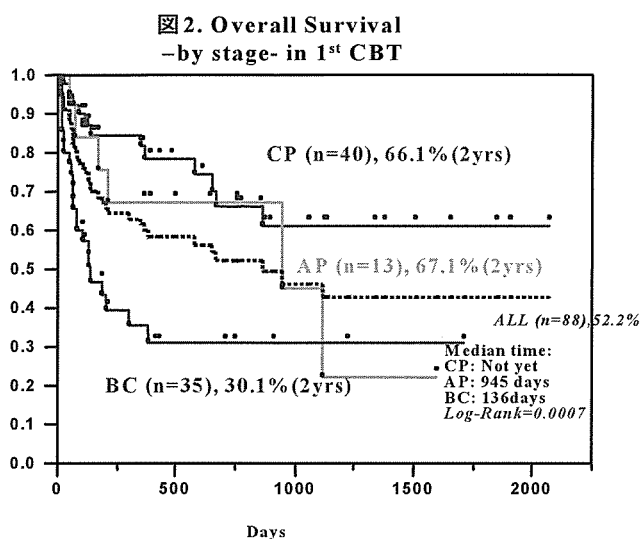


表1. Multivariate analysis for EFS by Cox models

Risk factor		HR	95% CI	P-value
NC	$< 3.0 \times 10^7 / \text{kg}$	1.66	1.1-2.7	0.023
GM	$< 25 \times 10^3 / \text{kg}$	1.47	1.03-2.17	0.03
CD34+	$< 0.8 \times 10^5 / \text{kg}$	0.82	0.57-1.17	0.28
Stage at CBT	CP	0.605	0.38-0.96	0.0004

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 成人急性リンパ性白血病に対する臍帯血移植の成績

研究研究者 松村 有子 東京大学医科学研究所探索医療ヒューマンネットワークシステム部門、血液腫瘍内科 助手

研究要旨

臍帯血移植はコーディネート期間が不要という大きな利点がある。しかし成人急性リンパ性白血病（以下 ALL）に対する臍帯血移植の成績について、まとまった報告はなく不明である。臍帯血バンクの報告データから、成人 ALL に対する非血縁臍帯血移植の成績を解析を行った。1 年生存率は 46.5%、3 年生存率は 35.6%（観察期間中央値 401.5 日（33 日－2591 日））であった。患者背景が異なるため単純な比較は不可能だが、骨髄バンクを介した非血縁骨髄移植の成績と比較しても遜色ない成績と考えられる。

成人急性リンパ性白血病のうち、化学療法単独では予後不良であることが知られている、Ph+染色体陽性症例、CR2 以降の寛解症例に対して、非血縁者間臍帯血移植施行後に長期生存が得られており、臍帯血移植の有効性が示された。

成人 ALL に対して、臍帯血移植が有用である理由を検討した。今回の解析では、急性移植片対宿主病（acuteGVHD）の有無と再発率に有意な相関は認めなかったため、効果は証明できず、多変量解析でも有意な関係を認めなかった。前処置の有効性について、骨髄破壊的前処置（フル移植）と骨髄非破壊的前処置（RIST、ミニ移植）について検討を行ったが、RIST の症例数が少ないこと、RIST 症例では移植前の全身状態不良例で施行されている可能性があることから、今回の解析では不明であり、今後の検討課題である。

A. 研究目的

成人 ALL は難治性疾患であり、強力な化学療法にかかわらず寛解導入不能な症例や高リスク症例は同種移植の適応となる。しかし病状の進行が急速なため、ドナーとのコーディネート期間に長時間要すると、適切な移植時期を逸してしまう可能性がある。臍帯血移植はコーディネート期間が不要であるという、大きな利点がある。また HLA が完全一致でなくても移植可能であり、ドナーへの負担が少ない。

しかし、本邦における成人 ALL に対する臍帯血移植についてのまとまった報告はなく、成績は不明である。成人 ALL に対する非血縁者間臍帯血移植の成績を、移植施設から臍帯血バンクに提出された報告データをもとに解析する。

B. 研究方法

臍帯血移植施設から臍帯血バンクに移植報告書として送付されたデータをもとに、患者背景、移植成績、移植合併症について、解析を行った。

（倫理面への配慮）

患者の臨床データは、非連結匿名化を行った。

C. 研究結果

【患者背景】

1998 年 3 月から 2006 年 7 月までに臍帯血バンクを通じて非血縁者間臍帯血移植を施行し、臍帯血バンクに報告された、成人 ALL に対する移植 424 例中、初回の同種移植である 348 例を解析対象とした。2 回目以降の同種移植の報告が 76 例含まれていたが、これらは、1 度目の移植後の再発または生着不全により、2 回目の移植を施行されており、初回移植の報告と比べ明白な差異があると考え、今回の解析対象からは除外した。

本研究では成人は 16 歳以上と定義されており、年齢中央値は 45（16－79）歳であった。染色体異常は、診断から移植までの時間を表 1 に示す。移植時病期は第 1 寛解期の症例が 147 例、第 2 寛解期以降の寛解期が 55 例、非寛解期が 137 例、寛解導入不能例が 70 例であった。

表 2 に、臍帯血とレシピエントの HLA 一致数を示す。輸注細胞数は TNC 2.55(1.39－5.34)×10<sup>6</sup>/kg、CD34+ 細胞 0.78(0.07－5.8)×10<sup>5</sup>/kg であった。

前処置を強度で分類し、フル移植（骨髄破壊的前処置：Cyclophosphamide+TBI 12 Gy な