

- [28] M. Matsumoto, K. Funami, M. Tanabe, et al., Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells, *J. Immunol.* 171 (2003) 3154-3162.
- [29] M. Matsumoto, S. Kikkawa, M. Kohase, K. Miyake, T. Seya, Establishment of monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 (2002) 1364-1369.
- [30] J.K. Bell, G.E. Mullen, C.A. Leifer, A. Mazzone, D.R. Davie, D.M. Segal, Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors, *Trend. Immunol.* 24 (2003) 528-533.
- [31] S. Sato, M. Sugiyama, M. Yamamoto, et al., Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF- κ B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling, *J. Immunol.* 171 (2003) 4304-4310.
- [32] R. Oseasohn, L. Adelson, M. Kaji, Clinicopathologic study of thirty-three cases of Asia Influenza, *N. Engl. J. Med.* 260 (1959) 509-518.
- [33] H. Yoshikawa, S. Yamazaki, T. Watanabe, et al., Study of influenza-associated encephalitis/encephalopathy in children during the 1997 to 2001 influenza seasons, *J. Child Neurol.* 16 (2001) 885-890.
- [34] N. Okabe, K. Yamashita, K. Taniguchi, et al., Influenza surveillance system of Japan and acute encephalitis and encephalopathy in the influenza season, *Pediatr. Int.* 42 (2000) 187-191.
- [35] T.A. Reichert, N. Sugaya, D.S. Fedson, W.P. Glezen, L. Simonsen, M. Tashiro, The Japanese experience with vaccinating schoolchildren against influenza, *N. Engl. J. Med.* 344 (2001) 889-896.
- [36] T. Morishima, T. Togashi, S. Yokota, et al., Encephalitis and encephalopathy associated with an influenza epidemic in Japan, *Clin. Infect. Dis.* 35 (2002) 512-517.
- [37] H. Nunoi, M.R. Mercado, T. Mizukami, et al., Apoptosis under hypercytokinemia is a possible pathogenesis in influenza-associated encephalopathy, *Pediatr. Int.* 47 (2005) 175-179.
- [38] P. Osterlund, V. Veckman, J. Siren, et al., Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells, *J. Virol.* 79 (2005) 9608-9617.
- [39] T. Morishima, Treatment of influenza-associated encephalopathy [in Japanese; English abstract], *Nippon Rinsho* 61 (2003) 2006-2012.
- [40] T. Muta, K. Takeshige, Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR) 2 as well as TLR4, *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 4580-4589.
- [41] M. Sato, H. Suemori, N. Hata, et al., Distinct and essential roles of transcription factor IRF-3 and IRF-7 in responses to viruses for IFN- α/β gene induction, *Immunity* 13 (2000) 539-548.
- [42] C. Chen, H. Okayama, High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA, *Mol. Cell. Biol.* 7 (1987) 2745-2752.
- [43] T. Ichiyama, T. Morishima, H. Isumi, H. Matsufuji, T. Matsubara, S. Furukawa, Analysis of cytokine levels and NF- κ B activation in peripheral blood mononuclear cells in influenza virus-associated encephalopathy, *Cytokine* 27 (2004) 31-37.
- [44] S.E. Girardin, I.G. Boneca, J. Viala, et al., Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 8869-8872.
- [45] S. Maeda, L.C. Hsu, H. Liu, et al., Nod2 mutation in Crohn's disease potentiates NF- κ B activity and IL-1 β processing, *Science* 307 (2005) 734-738.

Histopathological and Behavioral Improvement of Murine Mucopolysaccharidosis Type VII by Intracerebral Transplantation of Neural Stem Cells

Yasuyuki Fukuhara,^{1,2} Xiao-Kang Li,³ Yusuke Kitazawa,³ Masumi Inagaki,⁴ Kentaro Matsuoka,⁵ Motomichi Kosuga,¹ Rika Kosaki,^{1,2} Takuya Shimazaki,⁶ Hitoshi Endo,⁷ Akihiro Umezawa,⁸ Hideyuki Okano,⁶ Takao Takahashi,² and Torayuki Okuyama^{1,2,*}

¹Department of Clinical Genetics and Molecular Medicine, ³Department of Innovative Surgery, ⁸Department of Reproductive Biology, and

⁵Department of Pathology, National Center for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan

²Department of Pediatrics and ⁶Department of Physiology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

⁴National Center of Neurology and Psychiatry, 1-7-1 Kounodai, Ichikawa-shi, Chiba 272-8516, Japan

⁷Biochemistry of Experimental Medicine, Jichi Medical School, Minamikawachi-machi, Kawachi-gun, Tochigi 329-0498, Japan

*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: +81 3 3416 2222. E-mail: okuyama-t@ncchd.go.jp.

Available online 28 November 2005

The therapeutic efficacy of neural stem cell transplantation for central nervous system (CNS) lesions in lysosomal storage disorders was explored using a murine model of mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII). We used fetal neural stem cells derived from embryonic mouse striata and expanded *in vitro* by neurosphere formation as the source of graft materials. We transplanted neurospheres into the lateral ventricles of newborn MPS VII mice and found that donor cells migrated far beyond the site of injection within 24 h, and some of them could reach the olfactory bulb. A quantitative measurement indicated that the GUSB activity in the brain was 12.5 to 42.3% and 5.5 to 6.3% of normal activity at 24 h and 3 weeks after transplantation. In addition, histological analysis revealed a widespread decrease in lysosomal storage in the recipient's hippocampus, cortex, and ependyma. A functional assessment with novel-object recognition tests confirmed improvements in behavioral patterns. These results suggest that intracerebral transplantation of neural stem cells is feasible for treatment of CNS lesions associated with lysosomal storage disorders.

Key Words: neurosphere, mucopolysaccharidosis type VII, intracerebral transplantation

INTRODUCTION

Mucopolysaccharidosis type VII (MPS VII), or Sly syndrome, is a congenital lysosomal storage disorder (LSD) characterized by a systemic deficiency of β -glucuronidase (GUSB) activity [1]. This defect results in a progressive accumulation of undegraded glycosaminoglycans and subsequent lysosomal distension in multiple tissues, including the central nervous system (CNS). Enzyme replacement therapy and bone marrow transplantation are effective for correcting visceral manifestations of the disorder [2,3]. However, effective treatment of the CNS in patients with LSDs remains a major challenge.

With respect to cell therapy directed to the CNS in an MPS VII mouse, there are reports that the intracerebral transplantation of a genetically engineered neural pro-

genitor [4] and retrovirally transduced syngeneic fibroblasts [5] corrected the lysosomal storage of the recipient's brain tissues. We also previously reported that adenovirally transduced rat amniotic epithelial cells injected into adult MPSVII mouse brains survived at the injection point for more than 9 weeks and the subsequent supply of enzyme resulted in pathological improvement in multiple areas of the MPS VII mouse brains [6].

In this study, we used fetal neural stem cells derived from embryonic mouse striata and expanded *in vitro* by neurosphere formation [7,8] as the source of graft materials. Neural stem cells are considered to be good candidates for cell therapy to treat CNS dysfunction. In fact, fetal neural tissues have been successfully used in human Parkinson disease patients [9,10]; however, as many as four to eight fetuses were required to obtain a sufficient number of cells to treat a single patient. Expansion of neural stem cells *in vitro* may overcome the above practical

Abbreviations used: CNS, central nervous system; GUSB, β -glucuronidase; MPS VII, mucopolysaccharidosis type VII.

and ethical problems associated with fetal tissue transplantation and provide a source for graft material.

Here we describe improvements in the histopathology of the hippocampus, cortex, and ependyma and in non-spatial hippocampus-dependent learning and memory evaluated in a novel-object recognition test at 2 months after transplantation. These data suggest that early transplantation of neurospheres into the CNS may prevent or delay some of the progressive mental impairment associated with this LSD.

RESULTS AND DISCUSSION

Production and Secretion Capacity of GUSB Enzymes by Neurospheres

The neurosphere is a floating cell cluster containing plenty of neural stem cells and is generated from a fetal mouse brain by neurosphere formation [7,8]. Briefly, when we culture fetal corpus striatum containing neural stem cells in a serum-free medium with growth factors, only neural stem cells can survive and form floating cell clusters called neurospheres. We initially determined the endogenous GUSB activity of neurospheres obtained from normal C57BL/6 mice. The GUSB activity of the neurosphere and its culture medium proved significantly higher than that of bone marrow cells (Figs. 1A and 1B). We also evaluated the difference in GUSB activity before and after differentiation. Most neurospheres differentiate into neural cells *in vivo* according to their microenvironments after transplantation [8]. The GUSB activities in differentiated cells and their culture media were almost equivalent to those of bone marrow cells, suggesting that the GUSB activity of the neurospheres was reduced, although it was maintained to the extent necessary for a therapeutic effect even after differentiation.

Intercellular Transport of the GUSB Enzyme

It is well known that most lysosomal enzymes can be taken up into cells by M6P receptor-mediated endocytosis, and that this process is efficiently blocked in the presence of M6P [11]. When we transferred the culture medium of neurospheres generated from C57BL/6 fetal mouse brains to dishes of the primary culture of neurons generated from C3H mice, 21.9% of the heat-stable C57BL/6 mouse-derived GUSB in the culture medium was internalized into the neurons in the absence of M6P (Fig. 1C). In contrast, it was significantly reduced in the presence of 10 mM M6P (Fig. 1C). This suggests that endocytosis by M6P receptors leads to the internalization of the GUSB enzyme secreted from the neurospheres to the neurons.

Lysosomal Enzyme Activities of the Neurosphere

Many LSDs display CNS symptoms. Most lysosomal enzymes have common transport systems mediated by the M6P receptor, and therefore the same transplantation

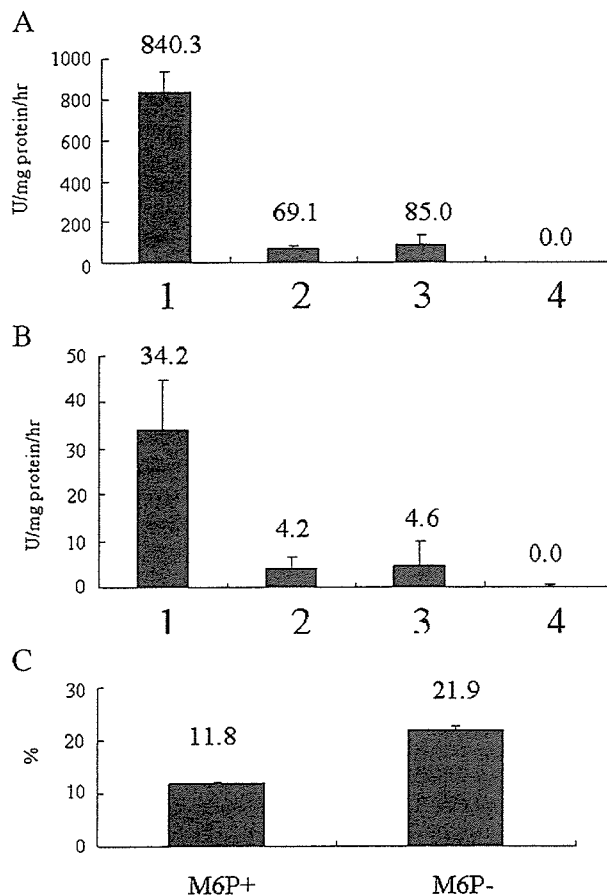


FIG. 1. Neurosphere GUSB activities and secretion via cell-to-cell transport. Lanes 1, neurospheres; 2, differentiated cells from neurospheres; 3, bone marrow cells; 4, 3521 cells (fibroblasts that originated from an MPS VII mouse). The GUSB activities of the neurosphere and its culture medium proved significantly higher than those of bone marrow cells. The GUSB activity in differentiated cells from neurospheres and that of its culture medium were almost equivalent to those of bone marrow cells. (A) GUSB activity in cell pellets of the neurosphere, bone marrow, and 3521 cells. (B) GUSB activity in a culture medium of the neurosphere, bone marrow, and 3521 cells at the time of the first passage. (C) Cell-to-cell transport of GUSB secreted from neurospheres. The ratio of the heat-stable GUSB activity in C3H mouse neural cells to the total heat-stable GUSB activity in the culture medium was calculated. The means \pm standard errors are provided.

strategy could be available if neurospheres can produce and secrete significant amounts of lysosomal enzymes. We determined the specific activities of several lysosomal enzymes in neurospheres and compared them with those in marrow stromal cells and human granulocytes. Similar or higher activities of lysosomal enzymes were identified in the neurosphere (Table 1).

Distribution of Donor Cells after Neonatal Transplantation

We performed a syngeneic transplantation experiment using neurospheres obtained from CAG-EGFP transgenic

TABLE 1: Activities of lysosomal enzymes in the neurosphere and their related diseases^a

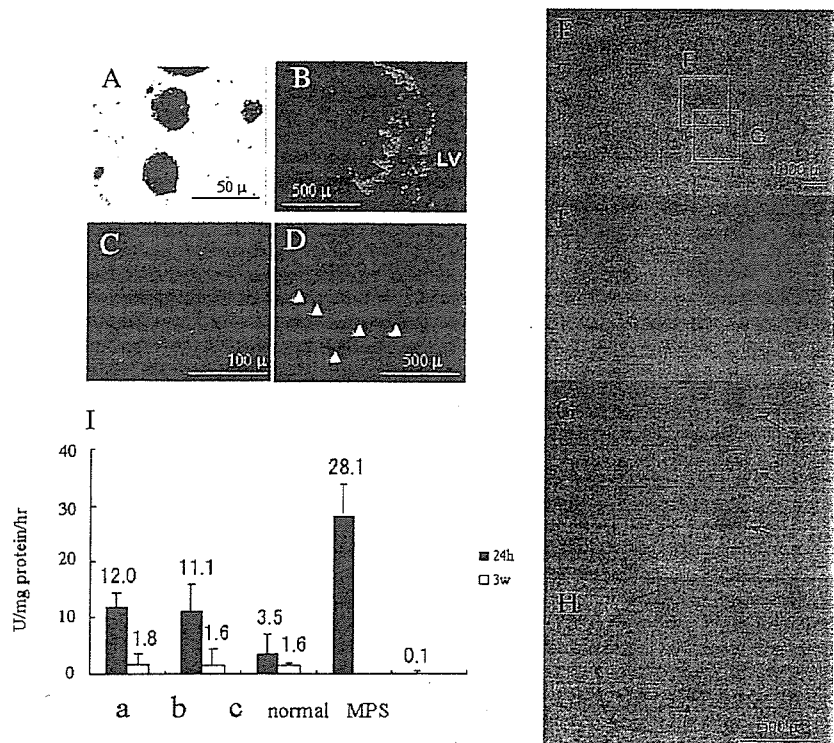
Lysosomal enzyme	Disease	Neurosphere	MSC ^b	Granulocytes
α-L-Iduronidase	MPS I	39.2	57.4	56–201 (n = 6)
Iduronate sulfatase	MPS II	40.5	20	12–26 (n = 5)
Heparan-N-sulfatase	MPS IIIA	1.1	4.3	0.2–3 (n = 4)
GalNAc-6-S-sulfatase	MPS IVA	5.3	15.2	8.1–20 (n = 5)
Arylsulfatase B	MPS VI	55.3	15.5	9–32 (n = 5)
β-Glucosidase	Gaucher disease	3.0	6.5	0.2–0.6 (n = 100)
α-Galactosidase A	Fabry disease	189	68.8	49.8–116.4 (n = 48)
β-Galactosidase	MPS IVB	501	309	37.6–230.1 (n = 100)
α-Mannosidase	α-Mannosidosis	61.0	48.0	121.1–345.1 (n = 100)
β-Hexosaminidase	Sandhoff disease	1024	3062	401.7–1426.0 (n = 100)
β-Hexosaminidase A	Tay–Sachs disease	527	481	251.1–607.4 (n = 48)
Arylsulfatase A	MLD	435	278	109.0–217.2 (n = 100)

^a We quantitatively assayed for a variety of lysosomal enzymes as well as GUSB. Several kinds of lysosomal enzymes were found to be high in the neurosphere. This result suggests that the neurosphere may be applied for the treatment of different types of congenital metabolic disorder. Data are given in nmol/mg protein/h. Enzyme activities in human granulocytes were measured as described elsewhere [27].
^b MSC, marrow stromal cell.

mice (C57BL/6 background) as donor cells and newborn MPS VII mice as recipients. We injected $2.5\text{--}5 \times 10^4$ neurospheres (Fig. 2A) into the lateral ventricles of neonatal MPS VII mice within 1 to 3 days after delivery. A large number of donor cells were located mainly in the periventricular area at the hippocampus level in the brain, but a small number of GFP-positive cells were observed at varying distances away from the periventricular area at 24 h (Fig. 2B). We identified some of the GFP-positive cells in a linear formation at the level of the olfactory bulb, indicating a specific manner of migration in this area that is referred to as chain migration [12] (Fig. 2C). The overall distribution of the donor cells throughout the brain was essentially identical in all mice examined histologically (n = 3), with findings similar to previous reports [4,13–15]. There was evidence of GUSB

activity in the recipient brain tissue. The recipient brain was stained red by GUSB staining in accordance with the GFP-positive area. (E–G) Coronal sections of the telencephalon at the caudal level. (H) Olfactory bulb. (I) Quantitative determination of the GUSB activity was performed at 24 h and 3 weeks after transplantation. The brains of the transplant recipients were divided coronally into three parts and quantitatively assayed for GUSB activity (n = 3). The regions used for evaluation at the designated times were defined by anatomical landmarks in the anterior-to-posterior plane: a, olfactory bulbs; b, caudal edge of the olfactory bulbs to the rostral edge of the hippocampus; c, hippocampus to the posterior colliculus. The cerebellum was dissected free and was not included in the assay.

FIG. 2. Distribution of the donor cells in a mouse brain following transplantation of neurospheres. (A) Neurospheres generated from GFP transgenic mice under a fluorescence microscope. (B) A slice at the hippocampus level in the brain at 24 h after transplantation under a fluorescence microscope. GFP-positive cells were located mainly in the periventricular area. (C) A slice at the olfactory bulb level in the brain at 24 h after transplantation. GFP-positive cells were also detected under a fluorescence microscope; some of them were found to form a line (a chain migration). (D) A slice at the hippocampus level in the brain under a fluorescence microscope at 3 weeks after transplantation. GFP-positive cells were found to be branched and to form a network with the recipient brain tissue. (E–H) The brain of an MPS VII mouse at 24 h after transplantation of neurospheres. The recipient brain was stained red by GUSB staining in accordance with the GFP-positive area. (E–G) Coronal sections of the telencephalon at the caudal level. (H) Olfactory bulb. (I) Quantitative determination of the GUSB activity was performed at 24 h and 3 weeks after transplantation. The brains of the transplant recipients were divided coronally into three parts and quantitatively assayed for GUSB activity (n = 3). The regions used for evaluation at the designated times were defined by anatomical landmarks in the anterior-to-posterior plane: a, olfactory bulbs; b, caudal edge of the olfactory bulbs to the rostral edge of the hippocampus; c, hippocampus to the posterior colliculus. The cerebellum was dissected free and was not included in the assay.



staining in accordance with the GFP-positive area, indicating a rise in GUSB activity (Figs. 2E–2H).

We previously reported that neurosphere-derived donor neurons extend their processes into the host tissues and form a synaptic structure [8]. The GFP-positive cells had extended their processes and formed synaptic structures as well 3 weeks after transplantation (Fig. 2D). These data suggest that the donor cells migrated from the periventricular area and some of them reached the olfactory bulb as early as 24 h after transplantation.

Quantitative Gusb Assay in Transplanted Mouse Brains

We divided the brains of the transplant recipients coronally into three parts and quantitatively assayed them for GUSB activity at 24 h ($n = 3$) and 3 weeks ($n = 3$) after transplantation (Fig. 2I). GUSB activity was 12.5 to 42.3% of normal activity at 24 h. There was 5.5 to 6.3% of normal activity at 3 weeks after transplantation. This is an amount at which that lysosomal distensions in the neuron and glia could also be reversed [16]. These

results imply that donor cells provided the recipient brain with GUSB activity to the extent that lysosomal storage in the recipient brain could be prevented for at least 3 weeks.

Histological Analysis and Tumorigenesis Assessment of the Treated Mice

We tested the treated MPS VII mice for reduction of lysosomal distensions in the neurons and glia at 2 months after transplantation ($n = 2$) (Figs. 3 and 4). We performed a histological analysis on hippocampus, cortex, and ependyma using an optical microscope (hippocampus, cortex, and ependyma) and an electron microscope (cortex). In the hippocampus of the untreated MPS VII mice, most of neurons contained marked cytoplasmic vacuolation (lysosomal storage) as well as astrocytes. In contrast, those of the treated hippocampuses were almost eliminated especially from neurons in this area. In the cortices, we also observed extensive neuronal and glial vacuolation, and the treatment reduced them remarkably as well. An electron microscope demonstrated that lysosomal storage in some neurons was completely eliminated in this area

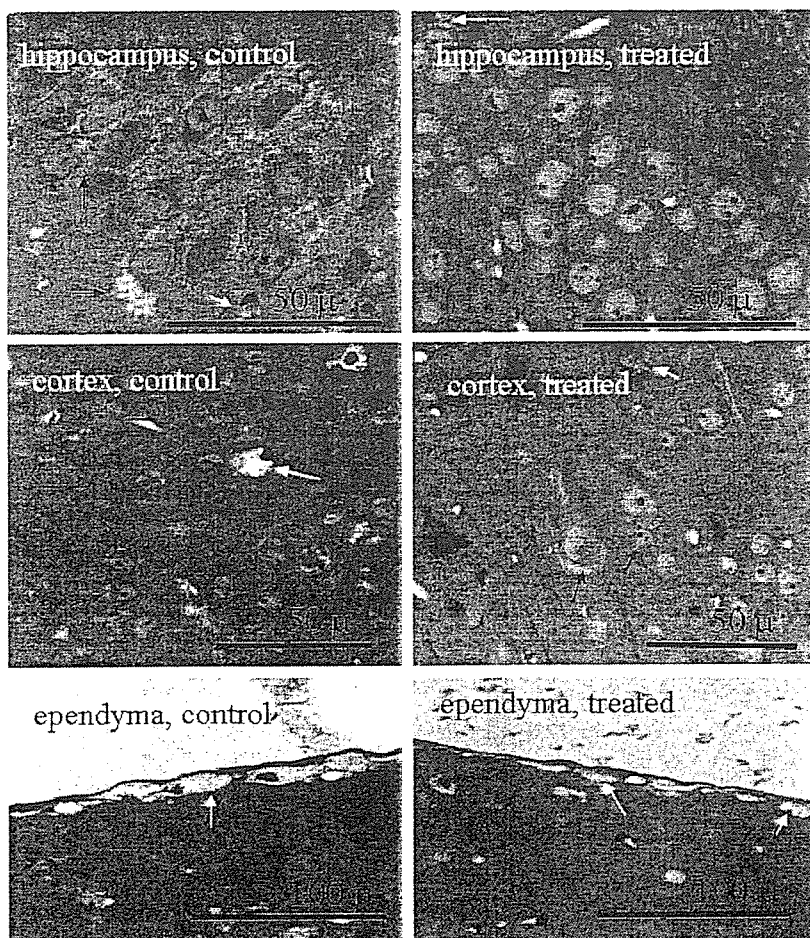
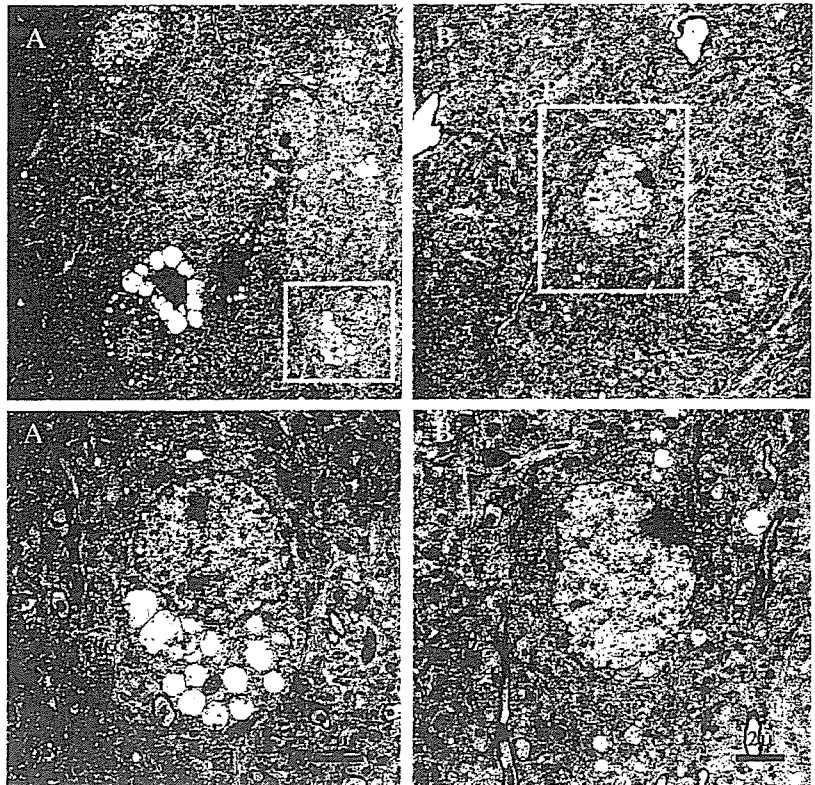


FIG. 3. Toluidine blue-stained, 0.5- μ m-thick sections from the hippocampus, cortex, and ependyma are from 2-month-old MPS VII mice ($n = 2$). Intraventricular injection of neurospheres decreases lysosomal storage in the hippocampus, cortex, and ependyma. Black arrows indicate distended vacuoles in neurons; white arrows indicate storage in glia.

FIG. 4. Electron microscopic analysis of lysosomal storage in a mouse brain following transplantation of neurospheres. (A) Cortex of a control untreated MPS VII mouse at 2 months after transplantation. Abundant white cytoplasmic vacuoles represent distended lysosomes. (B) Cortex of a MPS VII mouse at 2 months after transplantation. Lysosomal storage granules in this area were remarkably reduced in size and number, and those in some neurons were completely eliminated. (A' and B') Magnified photographs of the circumscribed areas in (A) and (B).



(Fig. 4). In the ependyma, the amount of storage appeared to be significantly reduced in the treated mice. To evaluate quantitatively the improvement of the pathology in the treated mice, we counted neurons and glia containing apparent vacuolation in each hippocampus and cortex of the treated and the untreated mice ($n = 2$, total 300 cells in each area) in the HPF ($\times 600$). In both areas, we observed a remarkable decrease in the number of neurons and glia with apparent lysosomal storage, and this finding was almost equal in two treated mice, indicating an improvement of the pathology in the treated mouse brains (Table 2). We carefully assessed all transplanted mice for the presence of tumorigenesis. We dissected the brains of the

TABLE 2: The percentage of cells with apparent vacuolization in the brain of MPS VII mice treated with intraventricular injection of neurospheres^a ($n = 2$)

	Untreated	Treated
Hippocampus		
Neuron	89.3%	17.3%
Glia	90%	18.4%
Cortex		
Neuron	92%	13.9%
Glia	42%	15.3%
Neuron	37.7%	11.7%
Glia	55.6%	30%

^a Toluidine blue sections of hippocampus and cortex were analyzed for lysosomal distention, and we counted neurons and glia containing much vacuolation in 300 cells in each of hippocampus and cortex in the HPF ($\times 600$).

dead mice during the course of the study and macroscopically analyzed them for tumor formation, but we could not identify any tumor formation among them.

Mouse Hearing Acuity Assessment

Measurements of the auditory brain-stem response (ABR) have been useful in assessing functional improvements after treatment [17]. We tested three treated MPS VII mice, three untreated MPS VII mice, and three C57BL/6 mice. There was no significant difference in the ABR thresholds among the treated and the untreated MPS VII mice (Fig. 5A). It is well known that malalignment and focal loss of stereocilia occur as the disease progresses, leading to a sensorineural hearing loss [18]. As the ABR was performed at 2 months, it may have been too early to assess the sensorineural hearing loss.

Behavioral Assessment

We used a novel-object recognition test, a tool for studying nonspatial hippocampus-dependent memory, to determine whether an improvement in mental status could be achieved by transplantation [19–21]. We carried out this test as described [19] with several modifications at 2 months after transplantation ($n = 3$). We used normal siblings of the treated MPS VII mice as the control mice. In summary, after the mice were habituated to an open field, two yellow objects (A, B) were placed diagonally in

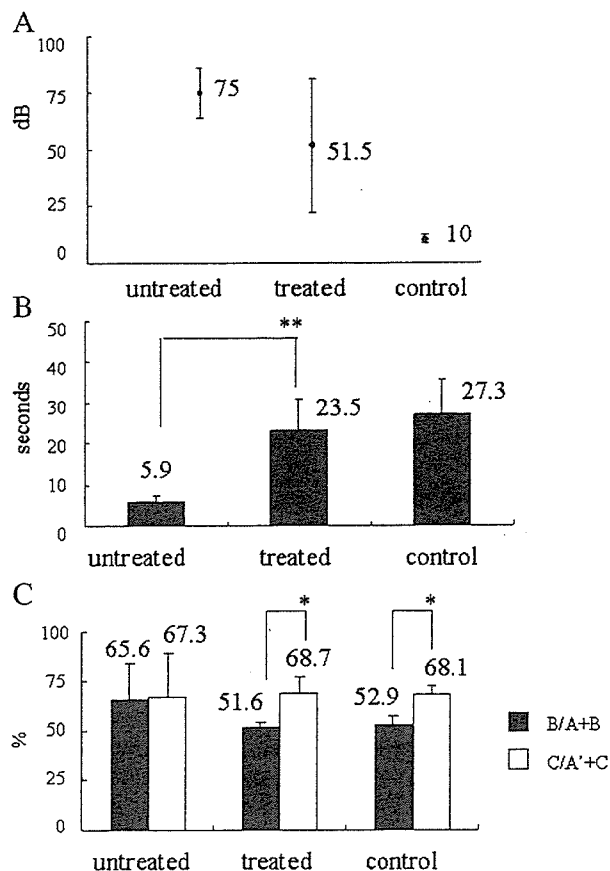


FIG. 5. Assessment of the functional recovery at 2 months after transplantation. (A) Auditory-evoked brain-stem responses. The decibels required to elicit ABR at the broadband (clicks) were evaluated among three normal mice, three treated MPS VII mice, and three untreated MPS VII mice at 2 months after transplantation. There was no significant difference in the ABR thresholds among the treated MPS VII mice and the untreated MPS VII mice. (B) The novel-object recognition test. The mice were assessed for an improvement in hippocampus-dependent nonspatial memory by a novel-object recognition test ($n = 3$). The total time spent exploring objects on day 4 ($=A + B$) in the treated mice was significantly longer than that for the untreated mice. (** $P < 0.01$). (C) The novel-object recognition test (retention test). The percentage of time spent in exploring B as a portion of the total object exploration time on day 4 [$B/(A + B)$] was compared with that of C (the novel object) on day 5 [$C/(A' + C)$]. $C/(A' + C)$ in the C57BL/6 and the treated mice was significantly greater than $B/(A + B)$. This suggests that the normal mice and the treated mice spent a significantly longer time exploring the novel object, revealing that both groups had a significant preference for exploring the novel object. The means \pm standard errors are provided.

the open field on day 4, and the mice were allowed to explore them for 10 min. Object B was replaced with a novel object (C) and the other object was replaced with a replica (A') on day 5, and the mice were again allowed to explore them for 10 min. Normal animals prefer to explore the novel object more than the familiar object. From the degree of preference for exploration of the new object, it can be inferred that they retained a memory of the familiar object. The total time spent exploring object

A or B on day 4 ($=A + B$) was 27.3 ± 8.4 s in the normal mice, 23.5 ± 7.4 s in the treated mice, and 5.9 ± 1.6 s in the untreated mice (Fig. 5B), indicating that the normal and the treated mice had the same levels of motivation, curiosity, and interest in exploring objects. Next, to evaluate preferential exploration of the novel object, we compared the percentage of time spent exploring object B as a portion of the total object-exploration time on day 4 [$=B/(A + B)$] with that of object C (the novel object) on day 5 [$=C/(A' + C)$] (Fig. 5C). $C/(A' + C)$ in the normal and the treated mice was significantly greater than $B/(A + B)$ [normal mice, $B/(A + B) = 52.9 \pm 3.9\%$, $C/(A' + C) = 68.1 \pm 4.4\%$; treated mice, $B/(A + B) = 51.6 \pm 2.8\%$, $C/(A' + C) = 68.7 \pm 8.4\%$ of the exploration time]. This indicates that the normal mice and the treated mice spent a significantly longer time exploring the novel object, revealing that both groups exhibited a significant preference for exploring it. These results indicate that the treated mice have the same level of nonspatial hippocampus-dependent memory as the normal mice. But we cannot completely deny the possibility that the vision had an influence on this improvement of a novel object test.

To date, there are reports demonstrating an improvement in behavior of treated MPS VII mice assessed by a Morris water maze test [22,23]. We used a novel-object test because it is very easy and less of a burden on the mice than the Water maze test. Consequently, it is easily applicable to mice with motility disturbance, and we thought we could maximize mouse performance associated with visual recognition memory. The long-term effects of this treatment have not been examined in detail. The treated mice lived to 7 months of age at most. Transplantation of neurospheres did not extend the life span of MPS VII mice. Life span may be dependent on systemic lysosomal storage other than the CNS.

In summary, our results demonstrated that after transplantation of *in vitro*-expanded neurospheres into the neonatal ventricle of MPS VII mice brains, the transplant donor cells migrated along established routes and integrated into the recipient's brain. The treated mice exhibited improved cognitive functions as measured by a novel-object recognition test, which was consistent with histological evidence of reduced lysosomal storage in the brain tissue.

MATERIALS AND METHODS

Animals. Syngeneic MPS VII (*m^{ps}/m^{ps}*) mice were obtained from a pedigree colony of B6.C-H-2^{bm1}/ByBir-gus^{m^{ps}}/+ mice maintained at our facility [6]. Normal C3H mice were purchased from Shizuoka Laboratory Animal Center (Shizuoka, Japan). CAG-EGFP transgenic mice were originally generated by Endo *et al.* [24,25]. All mice were maintained and treated in accordance with the guidelines of the animal committee of the facility.

Isolation, primary cultures, and passaging procedures of neurospheres. Embryos were removed from CAG-EGFP transgenic mice on day 14.5 of pregnancy. The corpus striatum was dissected and prepared as described

elsewhere [7]. Neurospheres were cultured in the medium described below at 37°C with 5% CO₂ at a concentration of 2×10^5 cells/ml in the primary culture. The culture medium was DMEM/F12 supplemented with the hormone mixture used by Reynolds and Weiss [7]. Passages were performed once per week. Neurospheres were used for the transplantation after the second to fifth passage.

Cell-to-cell transport of GUSB secreted from neurospheres. We evaluated *in vitro* the uptake ratio of the GUSB enzyme secreted from neurospheres of C57BL/6 mice into neural cells of C3H mice by using the difference in the heat stability of GUSB proteins between C57BL/6 mice and C3H mice. In brief, GUSB activity of C57BL/6 mice was reduced by only 30% after a 2-h incubation at 65°C [11]. In contrast, GUSB activity of C3H mice was decreased markedly after this procedure. We prepared a culture medium of neurospheres from C57BL/6 mice after 1 week incubation. We replaced the medium of primary neurons of C3H mice with the above medium, continued to culture in the presence or absence of M6P, and harvested 12 h later. Heat-stable GUSB activity in the homogenates of C3H mouse neurons was measured after a 2-h incubation at 65°C.

Quantitative analysis of GUSB activity. GUSB activity in tissues and cell homogenates was quantified using a fluorometric assay described previously [26]. Neurospheres were quantitatively analyzed after the second to fifth passage. Differentiated cells were obtained from neurospheres by converting the culture medium into DMEM +10% FBS. We had previously demonstrated that these cells differentiated into neurons, astrocytes, and oligodendrocytes by immunological staining (data not shown). Bone marrow was isolated from C57BL/6 mice and cultured in DMEM +10% FBS. Attached cells were collected after the second to fifth passage and analyzed for GUSB activity.

Histochemical detection of GUSB activity. The mice were perfused with physiological saline and subsequently with 4% paraformaldehyde before preparation of the brains. The brains were equilibrated in a 30% sucrose solution (4°C, overnight), frozen in M-1 embedding matrix (Shandon, Pittsburgh, PA, USA), and then sectioned on a cryostat. Histochemical analysis of GUSB activity was performed on 20- μ m-thick frozen sections using naphthol AS-BI β -D-glucuronide (Sigma) as a substrate [26].

Lysosomal enzyme activities of the neurosphere. Lysosomal enzyme activities in neurospheres, the marrow stromal cells, and human granulocytes were quantified using a fluorometric assay as described with some modification [27].

Histopathological analysis of lysosomal storage. Histopathology in neurons and glia was analyzed at 2 months after transplantation, corresponding to 2 months of age ($n = 2$). Tissues were isolated from the mice and immediately immersed in cold 2% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer, postfixed in 1% osmium tetroxide, dehydrated through a graded series of ethanol solutions, and embedded in Spurr's Medium (Polyscience, Warrington, PA, USA). Toluidine blue-stained, 0.5- μ m-thick sections were analyzed for evidence of lysosomal storage in hippocampus, cortex, and ependyma. Cytoplasmic lysosomal distensions in the cortex were also evaluated with an electron microscope.

Auditory brain-stem responses. ABR examination was performed 20 min after anesthesia in a quiet room, as described previously [28].

Novel-object recognition tests. Novel-object recognition tests evaluate nonspatial hippocampus-dependent learning and memory [19–21] and were performed as described [19] with several modifications. The mice were habituated in an open field over a 2-day preexposure (day 1 for 5 min and day 3 for 5 min). Two yellow objects (A and B) were placed diagonally in the open field (15 cm away from the walls) on day 4, and the mice were allowed to explore them for 10 min. Object B was replaced with the novel object (C), and the other object was replaced with a replica (A') on day 5, and the mice were again allowed to explore them for 10 min. Recognition of the familiar object was scored by preferential exploration of the novel object. A + B represents total time exploring on day 4. A' + C represents total time exploring on day 5. B/(A + B) represents the ratio of time exploring object B to total time exploring on

day 4. C/(A' + C) represents the ratio of time exploring object C to total time exploring on day 5.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Terumo Foundation Life Science Foundation to HO, and a grant from the 21st Century COE program of the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology Ministry to Keio University.

RECEIVED FOR PUBLICATION APRIL 27, 2005; REVISED SEPTEMBER 13, 2005; ACCEPTED SEPTEMBER 27, 2005.

REFERENCES

- Sly, W. S., Quinton, B. A., McAllister, W. H., and Rimoin, D. L. (1973). β -Glucuronidase deficiency: report of clinical, radiologic, and biochemical features of a new mucopolysaccharidosis. *J. Pediatr.* **82**: 249–257.
- Vogler, C., et al. (1993). Enzyme replacement with recombinant beta-glucuronidase in the newborn mucopolysaccharidosis type VII mouse. *Pediatr. Res.* **34**: 837–840.
- Birkenmeier, E. H., et al. (1991). Increased life span and correction of metabolic defects in murine mucopolysaccharidosis type VII after syngeneic bone marrow transplantation. *Blood* **78**: 3081–3092.
- Snyder, E. Y., Taylor, R. M., and Wolfe, J. H. (1995). Neural progenitor cell engraftment corrects lysosomal storage throughout the MPS VII mouse brain. *Nature* **374**: 367–370.
- Taylor, R. M., and Wolfe, J. H. (1997). Decreased lysosomal storage in the adult MPS VII mouse brain in the vicinity of grafts of retroviral vector-corrected fibroblasts secreting high levels of β -glucuronidase. *Nat. Med.* **3**: 771–775.
- Kosuga, M., et al. (2001). Engraftment of genetically engineered amniotic epithelial cells corrects lysosomal storage in multiple areas of the brain in mucopolysaccharidosis type VII mice. *Mol. Ther.* **3**: 139–148.
- Reynolds, B. A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of adult mammalian central nervous system. *Science* **255**: 1707–1710.
- Ogawa, Y., et al. (2002). Transplantation of *in vitro*-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.* **69**: 925–933.
- Lindvall, O., et al. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* **247**: 574–577.
- Freed, C. R., et al. (1992). Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* **327**: 1549–1555.
- Gwynn, B., Lueders, K., Sands, M., and Birkenmeier, E. H. (1998). Intracisternal A-particle element transposition into the murine β -glucuronidase gene correlates with loss of enzyme activity: a new model for β -glucuronidase deficiency in the C3H mouse. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6474–6481.
- Lois, C., and Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* **264**: 1145–1148.
- Ourednik, V., et al. (2001). Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain. *Science* **293**: 1820–1824.
- Meng, X. L., Shen, J. S., Ohashi, T., Maeda, H., Kim, S. U., and Eto, Y. (2003). Brain transplantation of genetically engineered human neural stem cells globally corrects brain lesions in the mucopolysaccharidosis type VII mouse. *J. Neurosci. Res.* **74**: 266–277.
- Tamaki, S., et al. (2002). Engraftment of sorted/expanded human central nervous system stem cells from fetal brain. *J. Neurosci. Res.* **69**: 976–986.
- Sferra, T. J., Backstrom, K., Wang, C., Rennard, R., Miller, M., and Hu, Y. (2004). Widespread correction of lysosomal storage following intrahepatic injection of a recombinant adeno-associated virus in the adult MPS VII mouse. *Mol. Ther.* **10**: 478–491.
- Kopen, G. C., Prockop, D. J., and Phinney, D. G. (1999). Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 10711–10716.
- Sands, M. S., Erway, L. C., Vogler, C., Sly, W. S., and Birkenmeier, E. H. (1995). Syngeneic bone marrow transplantation reduces the hearing loss associated with murine mucopolysaccharidosis type VII. *Blood* **86**: 2033–2040.
- Dulawa, S. C., Grandy, D. K., Low, M. J., Paulus, M. P., and Geyer, M. A. (1999). Dopamine D4 receptor-knock-out mice exhibit reduced exploration of novel stimuli. *J. Neurosci.* **19**: 9550–9556.
- Soderling, S. H., et al. (2003). Loss of Wave-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 1723–1728.
- Rompon, C., et al. (2000). Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR-knockout mice. *Nat. Neurosci.* **3**: 238–244.
- O'Connor, L. H., et al. (1998). Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII leads to improvements in behavior and auditory function. *J. Clin. Invest.* **101**: 1394–1400.

23. Brooks, A. I., et al. (2002). Functional correction of established central nervous system deficits in an animal model of lysosomal storage disease with feline immunodeficiency virus-based vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 6216–6221.
24. Hayakawa, M., et al. (2002). Muscle-specific exonic splicing silencer for exon exclusion in human ATP synthase gamma-subunit pre-mRNA. *J. Biol. Chem.* 277: 6974–6984.
25. Ichida, M., et al. (2000). Differential regulation of exonic regulatory elements for muscle-specific alternative splicing during myogenesis and cardiogenesis. *J. Biol. Chem.* 275: 15992–16001.
26. Wolfe, J. H., and Sands, M. S. (1996). Murine mucopolysaccharidosis type VII: a model system for somatic gene therapy of the central nervous system. In *Gene Transfer into Neurons: Towards Gene Therapy of Neurological Disorders* (P. Lowenstein and L. Enquist, Eds.), Wiley, Essex.
27. Den Tandt, W. R., and Scharpe, S. (1991). Characteristics of hexosaminidase A in homogenates of white blood cells using methylumbelliferyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide-6-sulphate as substrate. *Clin. Chim. Acta* 199: 231–236.
28. Willott, J. F., Turner, J. G., Carlson, S., Ding, D., Bross, L. S., and Falls, W. A. (1998). The BALB/c mouse as an animal model for progressive sensorineural hearing loss. *Hear. Res.* 115: 162–174.

特殊治療—輸血 造血幹細胞移植
臓器移植 遺伝子治療 再生医療—

Other specified therapies
— blood transfusion, hematopoietic stem cell
transplantation, organ transplantation, gene
therapy, regenerative medicine —

かとうしゅんいち
加藤 俊一
東海大学医学部基礎診療学系再生医療科学

輸 血

輸血は赤血球、血小板、凝固因子などの血漿成分の不足を補うための治療であるが、その適応にあたっては、臨床症状の有無と検査値異常によって必要最小限の使用にとどめることが望まれる。

平成 15 年に施行された「安全な血液製剤の安定供給の確保等に関する法律」に基づき、医療現場における血液製剤の適正使用のための指針（「輸血療法の実施に関する指針」および「血液製剤の使用指針」）が平成 17 年に改訂された。同指針においては小児における輸血について初めて言及され、未熟児早期貧血に対する赤血球濃厚液、新生児に対する血小板濃厚液と、新鮮凍結血漿の投与基準ならびに投与方法についての指針が策定されたが、小児一般に対する血液製剤の投与基準については、エビデンスとコンセンサスが十分ではないという理由で、当面は成人における基準に準じるものとされた。

1) 未熟児・新生児に対する輸血

①未熟児早期貧血に対する赤血球濃厚液の投与基準：生後 28 日以降 4 カ月までの期間における未熟児早期貧血が対象で、以下の指針に準拠しながら、個々の症例における病態に応じた配慮が必要であるとされている。

1) 呼吸障害が認められない未熟児

Hb 値が 8 g/dl 未満の場合：通常輸血の適応となるが、臨床症状によっては必ずしも輸血の必要はない。

Hb 値が 8 ~ 10 g/dl の場合：貧血による臨床症状（持続性頻脈、持続性多呼吸、無呼吸・周期性呼吸、不活発、哺乳時の易疲労、体重増加不良な

ど）が認められる場合には、輸血の適応となる。

2) 呼吸障害を合併している未熟児：障害の程度に応じて考慮する。

②投与方法：1) 採血後 2 週間以内の MAP 加赤血球濃厚液（MAP 加 RCC）を使用する。2) うっ血性心不全が認められない未熟児では、1 回の輸血量を 10 ~ 20 ml/kg とし、1 ~ 2 ml/kg/ 時間の速度で輸血する。3) うっ血性心不全が認められる未熟児では心不全の程度に応じて適宜輸血速度を遅くする。

②新生児への血小板濃厚液（PC）の投与基準

使用指針：出血症状がないか限局性の紫斑のみで、全身状態が良好な場合、血小板が 3 万 / μ l 未満のときに PC の投与を考慮する。広範な紫斑、紫斑以外にも明らかな出血（鼻出血、口腔内出血、消化管出血、頭蓋内出血など）が認められる場合には、血小板数を 5 万 / μ l 以上に維持する。肝臓の未熟性などにより凝固因子の著しい低下を伴う場合には、血小板数を 5 万 / μ l 以上に維持する。侵襲的処置を行う場合には、血小板数を 5 万 / μ l 以上に維持する。

③新生児への新鮮凍結血漿（FFP）

1) 使用指針：a. 凝固因子の補充。ビタミン K の投与にもかかわらず、PT および / あるいは APTT の著明な延長があり、出血症状を認めるか侵襲的処置を行う場合、b. 循環血液量の補充、c. 先天性血栓性血小板減少性紫斑病。

2) 投与方法：a. と b. に対しては 10 ~ 20 ml/kg 以上を必要に応じて 12 ~ 24 時間ごとに繰り返し投与する。c. に対しては 10 ml/kg 以上を 2 ~ 3 週間ごとに、繰り返し投与する。

2) 乳児期以降の小児への輸血

①赤血球濃厚液（RCC）

1) 使用指針：小児期の慢性貧血（遺伝性球状赤血球症、再生不良性貧血など）における RCC 輸血の目的は、貧血による症状を予防できるような Hb 値を維持することであり、Hb7 g/dl が目安とされるが、個々の症例ごとに、臨床症状を注意深く観察しながら設定していく必要がある。

2) 投与方法：RCC の投与によって改善される

Hb値は、以下の計算式から求めることができる。

予測増加 Hb 値 (g/dl) = 投与 Hb 量 (g) *¹ / 循環血液量 (dl) *²

*¹: 2 単位 RCC 1 バッグあたりの投与 Hb 量 (g) = 56 ~ 60g

*²: 循環血液量 (dL) = 体重 (kg) × 70/100

②血小板濃厚液 (PC)

1) 使用指針: 血小板輸血の適応は、血小板数、出血症状の程度、および合併症の有無により決定する。一般に、血小板数が 5 万 / μ l 以上では重篤な出血はなく、血小板輸血は必要ない。2 ~ 5 万 / μ l では、止血困難な出血症状があれば血小板輸血が必要となる。

1 ~ 2 万 / μ l では、時に出血症状を認めることがあり、血小板輸血が必要となる場合がある。1 万 / μ l 未満では、しばしば重篤な出血をみることがあるため、血小板輸血を必要とする。しかし、慢性に経過している血小板減少症 (再生不良性貧血など) では血小板数が 5 千 ~ 1 万 / μ l でも輸血なしでも出血症状がなければ極力血小板輸血を回避すべきである。

化学療法や造血幹細胞移植時のように、あらかじめ血小板減少の時期と期間が予測できる場合には、血小板数を 1 ~ 2 万 / μ l 以上に維持するように計画的に血小板輸血を行う。

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) では原則として血小板輸血の対象とならない。

2) 投与量: PC 5 単位 (1×10^{11} 以上の血小板を含む) または 10 単位を投与する。予測血小板増加数 (/ μ l) は以下の計算式により算出される。

予測血小板増加数 = (輸血血小板総数 / 循環血液量 *¹ (ml) × 10^3) × 2/3 *²

*¹: 循環血液量 = 70 ml × 体重 (kg)

*²: 輸血された血小板の 2/3 が脾臓に捕捉されるための係数

③新鮮凍結血漿 (FFP): 凝固因子の補充による治療的投与を主目的とする。重篤な肝障害、L-アスパラギナーゼ投与時、播種性血管内凝固 (DIC) などの際の複合型凝固障害に限定される。

④その他の血漿分画製剤 (アルブミン製剤、 γ -グロブリン製剤、凝固因子製剤など): これらの製剤も血液製剤であることを認識し、十分な説明と同意の上で使用することが必要である。

それぞれの詳細は疾患別の治療法を参考にされたい。

■造血幹細胞移植

1) 適 応

造血幹細胞移植は、化学療法などの薬剤のみによる治療では治癒を望めない難治性血液疾患などに対する根治療法として不可欠の治療法となっている。

①腫瘍性疾患: 白血病をはじめとする小児期悪性腫瘍における化学療法の成績は向上し、多くの症例で化学療法のみによる治癒が期待できるようになっている。しかし、一部の超ハイリスク患者では病初期から、また化学療法中に再発した症例では、再寛解に導入でき次第造血幹細胞移植を実施できるように計画すべきである。

疾患、病型ごとの造血幹細胞移植の適応はそれぞれの項目を参照されたい。

②非腫瘍性疾患

1) 再生不良性貧血: 再生不良性貧血においても免疫抑制療法などによる治療成績が向上し、造血幹細胞移植の適応は縮小されつつある。しかし、免疫抑制療法による治療効果が認められない場合や、免疫抑制療法中に骨髓異形成症候群を合併した場合には、造血幹細胞移植による治療が必要になる。

2) 先天性免疫不全症: 重症複合免疫不全 (SCID), Wiskott-Aldrich 症候群, 慢性肉芽腫症などの先天性免疫不全症において、重症の感染症を繰り返す場合には、早期の造血幹細胞移植が適応となる。

3) 先天性代謝異常疾患: 先天性代謝異常疾患の一部においては、欠損する酵素を造血系細胞が産生することがありうることから、造血幹細胞移植による治療が試みられている。病初期であれば造血幹細胞移植により症状の改善が認められる場合があるが、進行例での改善は期待できない。

ムコ多糖症、ムコリピドーシス、副腎白質ジストロフィーなどにおいて造血幹細胞移植が行われている。

2) 移植の種類

①ドナーによる分類：健康なドナーから移植する同種移植、患者自身の造血幹細胞を用いる自家（自己）移植がある。同種移植においてはHLAが一致するドナーからの移植が原則である。同胞間でHLAが一致する確率は4分の1であり、一致した同胞ドナーがない場合には骨髄バンクや臍帯血バンクで非血縁ドナーを探す必要がある。HLA適合ドナーを見出せない場合には、血縁者内のHLA部分一致ドナーからの移植を考慮することもあるが、確立された移植ではない。

②細胞源による分類：移植細胞源としては、骨髄幹細胞を用いる骨髄移植（BMT）、末梢血幹細胞を用いる末梢血幹細胞移植（PBSCT）、臍帯血幹細胞を用いる臍帯血移植（CBT）があり、従来の骨髄移植という表現では包含できなくなったため、造血幹細胞移植と総称されるようになった。

3) 移植前処置

同種造血幹細胞移植においては、拒絶予防として患者（レシピエント）側の免疫能を完全に抑制する必要がある。このような治療を前処置といい、従来免疫能と造血能を枯渇させる骨髄破壊的前処置が行われてきたが、近年、高齢者や臓器障害患者において、免疫抑制を主眼とした骨髄非破壊的前処置が普及するようになり、小児においても一部の患者で試みられるようになってきている。

■ 臓器移植

機能不全に陥った臓器を生体、あるいは死体ドナーからの移植によって、機能回復を図るのが臓器移植である。

腎臓、肝臓、膵臓、心臓、肺、小腸、角膜などの移植が行われているが、腎臓、心臓などの臓器においては、ドナーとレシピエントが同サイズである必要性があり、小児ドナーからの死体移植を認めていない現行のわが国の臓器移植法のもとでは、年少児における国内での移植は不可能な状況

にある。

肝臓においても国内での死体移植の実施はきわめて困難なために、血縁者間での生体移植が行われている。しかし、侵襲性の高い肝臓部分摘出については健康血縁ドナーの自由意思によってのみ行われるべきものであり、血縁者に臓器提供を強いることのないような配慮が必要である。

■ 遺伝子治療

単一遺伝子の欠損あるいは異常による遺伝病において、欠損する遺伝子を体外あるいは体内で導入して異常を修復しようというのが遺伝子治療である。いくつかの遺伝病において遺伝子治療が試みられてきたが、明確な治療効果がえられているのはX連鎖重症複合免疫不全（X-SCID）、ADA欠損症や慢性肉芽腫症などの一部の疾患の少数例のみである。また、遺伝子治療が成功したX-SCIDの症例において、白血病の発症が認められていることもあり、遺伝子治療は、まだ実験的治療の段階にあるといわざるをえない。

■ 再生医療

造血幹細胞移植により造血能が再建されるように、造血系の幹細胞あるいは造血系以外の幹細胞により、組織や臓器の再生を行おうというのが再生医療である。血管、心筋、骨・軟骨、筋肉、神経、肝臓、膵臓などにおいて多くの基礎研究が進められ、末梢血管や角膜などにおいては、少数ながら有効例が出てきている。

小児科領域における再生医療は研究的な段階にあり、臨床応用は今後の問題である。

文 献

- 1) 厚生労働省：輸血療法の実施に関する指針（改訂版）、血液製剤の使用指針（改訂版）、平成17年9月

著者連絡先

〒259-1193 神奈川県伊勢原望星台

東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

加藤俊一

特集「小児移植」

小児移植—造血幹細胞移植

加藤俊一

東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

はじめに

第二次世界大戦最中の原爆開発マンハッタン計画の過程で開始された骨髄移植の研究は戦後に臨床応用へと進み、最初の成功例は Robert Good らによる重症複合免疫不全の小児における同種骨髄移植であった¹⁾。以後、多くの先人の努力により骨髄移植の治療骨格が確立され、骨髄以外の造血幹細胞源として末梢血幹細胞や臍帯血幹細胞が加わり、造血幹細胞移植と総称されるようになった。

小児においては、適応となる疾患が難治性白血病や重症再生不良性貧血などの後天性血液疾患だけでなく、先天性免疫不全症、先天性代謝異常疾患などの遺伝性疾患をも含み、日常診療上不可欠の治療法となっている。

移植の原理

造血幹細胞移植は造血細胞と免疫担当細胞をすべてドナーのものに置き換える治療法であるため、臓器移植とは類似点もあるが多くの点で異なっている。

同種移植においては、レシピエントである患者の造血能と免疫能を完全に涸渇させないとドナーの造血細胞が生着をしないので、前処置として超致死量の放射線照射と化学療法を行った上で移植を行う。

ドナー由来の移植細胞に含まれるリンパ球はレシピエントを非自己と認識して移植片対宿主病 (graft-versus host disease, GVHD) という免疫反応を引き起こすので、計画的な免疫抑制剤の投与を行う。シクロスポリン (cyclosporine, CyA) あるいはタクロリムス (tacrolimus, FK) を単独またはメトトレキサート (methotrexate, MTX) を組み合わせて投与する。

表1 細胞源による移植の特徴 (骨髄移植を基準としての比較)

	骨髄移植	末梢血幹細胞移植	臍帯血移植
ドナーとの HLA 適合性	完全一致	完全一致	部分一致でも可能
採取方法	全身麻酔下 腸骨から頻回穿刺	ドナーに G-CSF 投与 成分採血器で採取	分娩直後 臍帯静脈より採取
移植細胞数	有核細胞で $3 \times 10^8/\text{kg}$	CD34 で $2 \times 10^6/\text{kg}$ 以上	有核細胞で $2 \times 10^7/\text{kg}$ 以上
生着速度	基準	速い	遅い
急性 GVHD	基準	同程度	やや軽度
慢性 GVHD	基準	多い	少ない
感染症	基準	同程度	多い

前処置に引き続いてドナー造血の生着までの期間は無顆粒球状態になり、また生着後も免疫能の低下が持続するため、細菌性、真菌性、ウイルス性の感染症が多発する。そのため、移植前後は無菌室での管理を行い、予防的もしくは早期の抗生剤あるいは抗ウイルス剤投与を行う必要がある。

■ 移植の多様化

1. 細胞源

1980年代前半までは移植し得る細胞源は骨髓のみであったが²⁾、1980年代後半になり末梢血幹細胞³⁾、1990年代より臍帯血幹細胞による移植が可能となった⁴⁾。骨髓移植と比較すると末梢血幹細胞移植、臍帯血移植にはそれぞれ表1のような特徴がある。

2. ドナー

最初に確立された移植はHLA抗原が一致する同胞からの同種移植であったが、同胞間でHLAが一致する確率は4分の1であるため、大多数の患者は同胞以外にドナーを求めなければならない。1990年代前半に骨髓バンクが設立され、非血縁者間でHLAが一致するドナーからの骨髓移植が可能となった。同胞間にも非血縁者間にもHLA適合ドナーを見いだせない患者においては90年代後半に臍帯血バンクが設立され、非血縁者間臍帯血移植が行えるようになった。また、実験的ながらHLA半一致の血縁者からの移植も行われている。

一部の疾患では患者自身の寛解期の造血幹細胞を冷凍保存して、後日に自家（自己）移植を行うことも可能である。

3. 前処置

前述のように、造血幹細胞移植においてはレシピエントの造血能と免疫能を涸渇しなければ移植が成立しないものと長い間考えられていたため、高齢者や臓器障害を有する患者においては造血幹細胞移植そのものが適応とはされていなかった。1990年代後半になり、前処置で最も重要なものは免疫抑制であり、骨髓抑制は必須ではないという考えから、骨髓非破壊的な前処置（reduced intensity stem cell transplantation, RIST）が導入されるようになった。臓器毒性が少ないことからミニ移植とも呼ばれ、高齢者を中心にして移植数が増加している。

小児においても先天性免疫不全症においてRISTが試みられ、徐々に実施数が増加し始めている。

■ 適応疾患と時期

同種造血幹細胞移植においては健常なドナーを必要とし、治療による合併症や死亡が少なからず存在することから、他に適切な治療法がない患者においてのみ適応とされるのは当然のことと言える。

1. 白血病

白血病における造血幹細胞移植の適応は化学療法の進歩とともに変化してきた。

(1) 急性リンパ性白血病（ALL）

小児の白血病／悪性リンパ腫の70%を占めるALLにおいては、化学療法のみで70～80%の患者が治癒を期待できる時代となり、造血幹細胞移植の適応は化学療法では治癒を期待できないような症例に限定されるようになってきている。

化学療法についても予後予測因子によって層別化（標準リスク群、高リスク群、超高リスク群）されており、標準リスク群、高リスク群においては初回寛解期から造血幹細胞移植が適応となることはない。

初回寛解期から造血幹細胞移植を積極的に考慮すべき病型としては、①MLL遺伝子再構成陽性乳児ALL、②Ph1（フィラデルフィア）染色体陽性ALL、③寛解導入療法に対する初期治療反応不良の高リスク群、などとなっている。

化学療法で初回寛解に入った症例で治療開始後18カ月以内に再発した場合の予後は不良であり、第2寛解期に導入でき次第、造血幹細胞移植を行うことが推奨されている。36カ月以降の再発例においては原則として化学療法でも十分な生存を期待できることから、造血幹細胞移植を絶対的適応とする考えは少なくなった。18～36カ月での再発例については、適切なドナーが見いだされる場合には造血幹細胞移植が適応となる。

(2) 急性骨髄性白血病（AML）

90年代まではAMLにおける化学療法の成績は全体として不良であり、初回寛解期から造血幹細胞移植の適応とする考え方が一般的であった。90年代後半から2000年代前半になり化学療法が強化され生存率が向上したことから、ALLと同様にリスク別に層別化した治療を行う方向となってきた。

初回寛解期から同種造血幹細胞移植が絶対的適応となると考えられている高リスク群は、①初回寛解に入るのに2コースの化学療法を必要とした症例、② monosomy 7、③ 5q-, ④ Ph1、⑤ FLT3-ITD 陽性、などである。

一方、化学療法で十分であるとされているのは、① t (8;21)、② inv 16 または t (16;16)、などの低リスク群であり、その他の中間リスク群では化学療法か造血幹細胞移植が選択されている。

(3) 慢性骨髄性白血病 (CML)

CML においては根治を目指す治療法は同種造血幹細胞移植しかなかったが、2000年代に導入されたイマチニブの登場により従来のインターフェロンによる治療よりも慢性期を延長できることが判明し、造血幹細胞移植の適応とその時期についての考え方が変わりつつある。イマチニブによる治療の評価が定まるまでは、細胞遺伝学的効果を見ながら症例ごとに判断していくことになるであろう。

(4) 骨髄異形成症候群 (MDS)

いずれの病型においても化学療法による根治は望めず、造血幹細胞移植が適応となる。

輸血を必要としない不応性貧血 (RA) で monosomy 7 を持たない症例では移植を急ぐ必要性はないものの、その他の MDS ではできるだけ早い時期に造血幹細胞移植を実施することが望ましい。

1999年に提案された新 WHO 分類では小児期のみ存在する特異な疾患である若年型骨髄単球性白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia, JMML) が MDS の 1 病型となったが、従来の MDS の他の病型と同様に化学療法では治癒が望めないため、造血幹細胞移植が適応となる。

2. 固形腫瘍

小児期の固形腫瘍で最も頻度の高い神経芽細胞腫では、Ⅲ期、Ⅳ期の進行例で自己造血幹細胞移植が適応となるが、同種造血幹細胞移植の優位性は示されていない。

その他の固形腫瘍でも通常の化学療法で治癒を望めない場合に、治療強度を高める目的で自己造血幹細胞移植が試みられることがあるが、一定のコンセンサスはない。横紋筋肉腫、脳腫瘍、胚細胞腫瘍、ユーイング肉腫、肝芽腫などにおいて自家 (自己) 移植が行われている。

3. 再生不良性貧血

小児期の再生不良性貧血には後天性の再生不良性貧血と先天性の Fanconi 貧血、赤芽球癆 (PRCA, Diamond-Blackfan 症候群) などがある。

後天性の再生不良性貧血は発症時の重症度と血縁者に適切なドナーがいるかどうかによって治療選択が異なっている。重症型あるいは最重症型で HLA 一致血縁ドナーがいる場合には直ちに造血幹細胞移植が適応となる。血縁ドナーがいない場合には免疫抑制療法をまず行い、治療に反応がないか再発した場合には HLA 一致非血縁者あるいは HLA1 抗原不一致血縁ドナーからの造血幹細胞移植の適応とする考え方が一般的となっている。

Fanconi 貧血においては、再生不良性貧血から MDS や AML へと進展することや扁平上皮癌などの二次癌を合併することが多く、適切なドナーが見いだされれば造血幹細胞移植が適応となる。

先天性 PRCA ではステロイド治療に不応であれば頻回の輸血が必要となるため、造血幹細胞移植が適応とされている。

4. 先天性免疫不全症

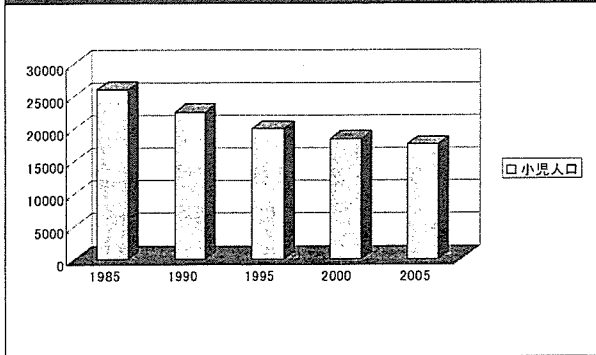
重症複合免疫不全 (SCID)、Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS)、Chediak-Higashi 症候群 (CHS)、重症型慢性肉芽腫症 (CGD)、先天性無顆粒球症 (Kostmann 病) などにおいては造血幹細胞移植以外に有効な根治療法がなく、感染症が重症化するか二次癌を合併することなどにより予後不良であることから、できるだけ早く適切なドナーからの造血幹細胞移植を実施すべきである。

5. 先天性代謝異常疾患

ムコ多糖症 (MPS)、異染性ロイコジストロフィー (MLD) などのライソゾーム病や副腎白質ジストロフィー (ALD) において同種造血幹細胞移植が行われている。これらの疾患では健全なドナーからの造血幹細胞移植によって欠損酵素をドナー血球から産生させることと、骨髄中の単球が組織マクロファージなどになって組織中の異常代謝産物を処理することによって治療効果を上げるものと理解されている。

最近一部の代謝疾患で遺伝子工学的に合成された酵素による補充療法が開始され、中枢神経系以外の症状に対しては造血幹細胞移植と同等の治療効果を上げていることから、造血幹細胞移植の適応はこれらの酵素

図1 わが国における小児人口の推移 (1985~2005年, 国勢調査⁷⁾より)



療法の開発とともに変化していくものと思われる。

■ 移植実施状況

日本小児血液学会では1983年から造血幹細胞移植登録を開始し、わが国の小児における造血幹細胞移植をほぼ100%近い捕捉率で掌握してきた⁵⁾。1991年からは成人領域においても日本造血細胞移植学会による全国登録が開始され、すべての年齢層における造血幹細胞移植の動向が年次報告書によって公表されている⁶⁾。

図1は国勢調査に基づく15歳未満の小児人口の推移を示したものであるが、最近における少子化傾向を示している⁷⁾。

1. 概況

図2は1991年以降における造血幹細胞移植の実施数の推移を、0~14歳の小児、15~49歳の若年成人、50歳以上の高齢成人に分けて示したものである。小児においては1996年までは増加傾向であったものが、2001年までほぼ同数で推移した後に減少傾向に転じていることが分かる。通常調査直近の1~2年には未報告の分が後の調査で追加されることから、実際の減少はこれほど急峻ではないものと思われる。

なお、成人における移植数を見てみると、2004年には50歳以上の高齢成人での移植数が15~49歳の若年成人における移植数とほぼ同数になり、2005年には逆転しているのではないかと推測されることも特筆される点である。

小児年齢層を0~4歳、5~9歳、10~14歳の5歳区切りで見たものが図3である。97年まではほぼ同数で推移していたものが、98年以降では0~4歳の乳幼

図2 わが国における造血幹細胞移植数の年齢区分別推移 (1991~2004年)

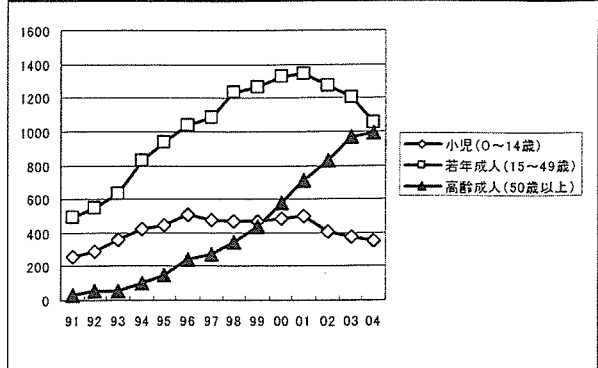


図3 小児年齢層別造血幹細胞移植数の推移 (1991~2004年)

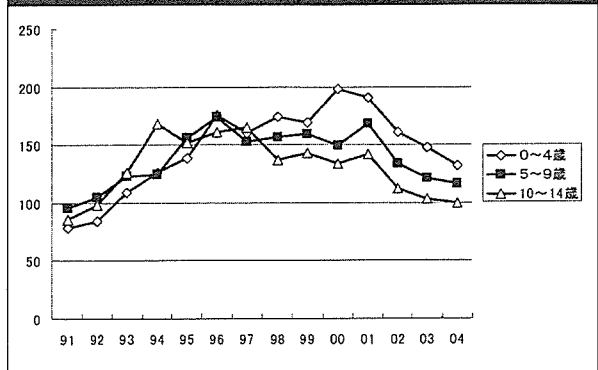
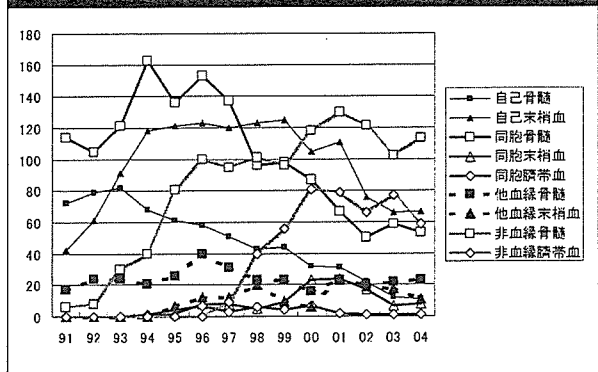


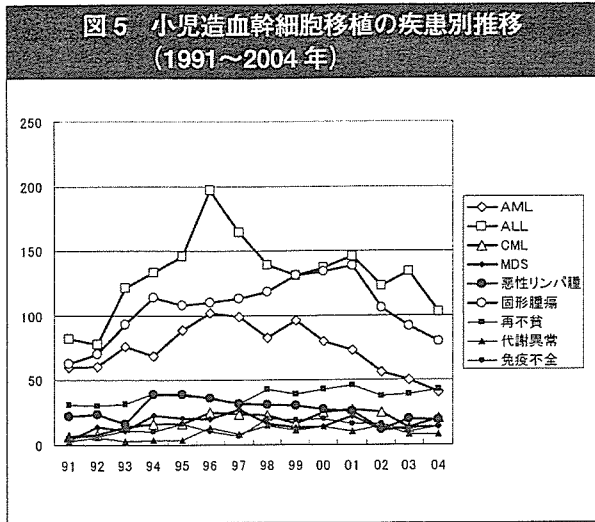
図4 小児造血幹細胞移植の移植種類別推移 (1991~2004年)



児の年齢層における移植数が年長児における移植数よりもやや上回っている。

2. 移植種類別

小児における造血幹細胞移植をドナーと細胞源の組合せによる移植種別に示したのが図4である。



90年代半ばまでは同胞間骨髄移植が最多であったものが、2000年以降は非血縁者間骨髄移植が最多となっている。また、97年から開始された非血縁者間臍帯血移植は2000年まで急速に増加したが、その後はほぼ同数で推移している。

なお、小児においては同胞間末梢血幹細胞移植が90年代後半から2000年ころに増加したが、その後は減少している。これは2000年に制定された日本造血細胞移植学会の同種末梢血幹細胞移植ガイドラインと、2002年に制定された日本小児血液学会の小児ドナーに関する倫理指針において小児ドナーへのG-CSFの投与と末梢血幹細胞採取について慎重な考え方を示したことによるものではないかと推測される。

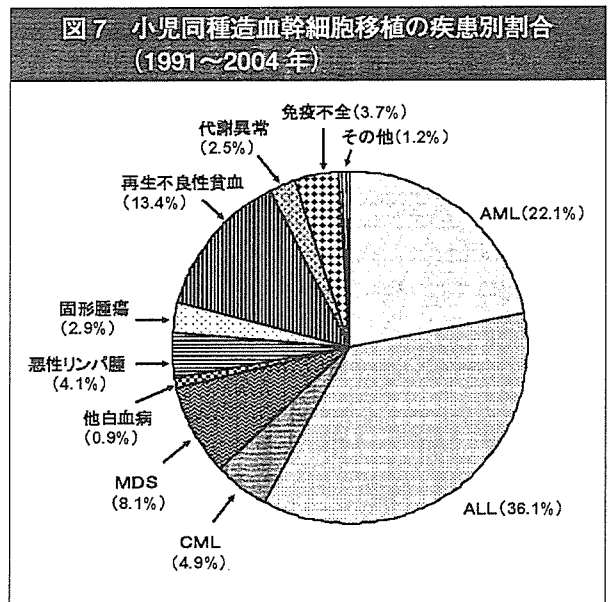
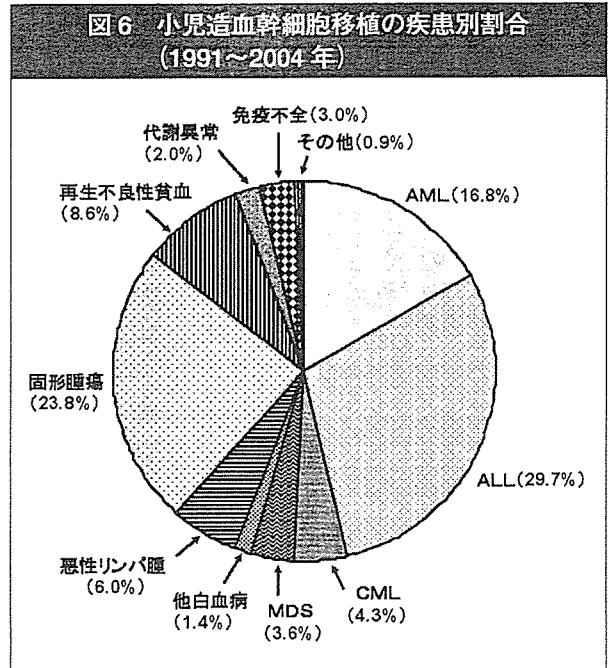
3. 疾患別

疾患別の移植数の推移を見ると、96年のALLにおける移植数が突出している点を除けばほぼ同じように変動している(図5)。全期間における疾患別の割合を全移植(図6)と同種移植(図7)に示した。

移植成績

1991年から2004年までに実施された初回移植成績について、日本小児血液学会と日本造血細胞移植学会が合同で解析した結果を疾患別に紹介する。

生存率としては粗生存率と無病生存率が用いられることが多いが、移植という治療法をより厳密に評価する意味で、ここでは無病生存率による評価で統一した。



1. 白血病

(1) ALL, AML

急性白血病を同種移植全体で移植病期ごとに見ると、ALL(図8)においてもAML(図9)においても第1寛解(1CR)、第2寛解(2CR)、第1-2寛解期以外(non 1-2CR)の順となっている。ドナー別に見てもこの順位は常に一定である。

(2) CML, MDS, JMML

これらの白血病における同種造血幹細胞移植の無病生存率は40～50%で、MDSの中のRAでは67%となっている(図10)。

2. 固形腫瘍

固形腫瘍における初回の自家(自己)造血幹細胞移植の10年後の無病生存率は神経芽細胞腫、肝芽腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、脳腫瘍、胚細胞腫瘍などの疾患でいずれも40～45%となっている。図11に神経芽細胞腫と肝芽腫の無病生存率を示す。

3. 再生不良性貧血

後天性再生不良性貧血、Fanconi 貧血、PRCAにおける同種造血幹細胞移植後の粗生存率を図12に示す。後天性再生不良性貧血においては移植時の年齢に関わらず良好な生存が得られている。Fanconi 貧血においては、移植時の状態が再生不良性貧血にとどまっていれば後天性再生不良性貧血と同等の生存率であり、MDSやAMLに進展していればそれぞれの疾患に準じた無病生存率となっている。

4. 先天性免疫不全症

SCIDにおいては診断時にすでに重症感染症を合併していることが多く、全身状態が不良な中で移植になるため移植直後の死亡が少なくない。しかし、ドナー細胞の生着により免疫能が回復するとその後は安定した生存が得られている(図13)。

WASにおいてはSCIDに比べれば良好な状態で移植を実施できることが多いため、移植直後の死亡が少なく、長期の生存率も高い結果となっている。

CGDやKostmann病においてはそれぞれ72%、86%の生存率であるのに対して無病生存率がいずれも60%前後であり、その差は移植時のリンパ球機能が正常であるために拒絶率がやや高いことによるものである。

5. 先天性代謝異常疾患

最も多く移植が行われているのはMPSとALDである。それぞれの生存率は88%と75%で、無病生存率は65%と56%となっている(図14)。先天性代謝異常疾患においては上記のCGDやKostmann病と同様にリンパ球機能は正常であるため、移植されたドナー造血幹細胞が拒絶されることが多い。

長期生存者における QOL

造血幹細胞移植を受ける患者は移植前、移植時、移植後の長期にわたって超致死量の抗癌剤や放射線照射、免疫抑制剤などの投与を受け、GVHDや種々の合併症を経験する。原疾患の根治を得ても、治療によるQOLの低下を来すことが少なくない。

成長障害(低身長)、不妊などの頻度は高く、内分泌障害、中枢神経障害、心筋障害、呼吸器障害、運動器障害、二次癌の合併などもめずらしくないので、長期にわたって定期的に診察と検査を行う必要がある。

小児ドナーにおける倫理的・

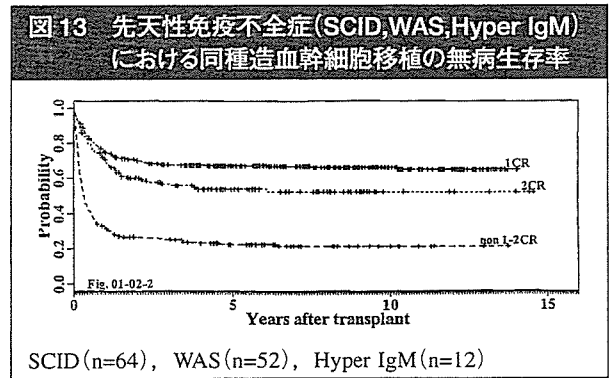
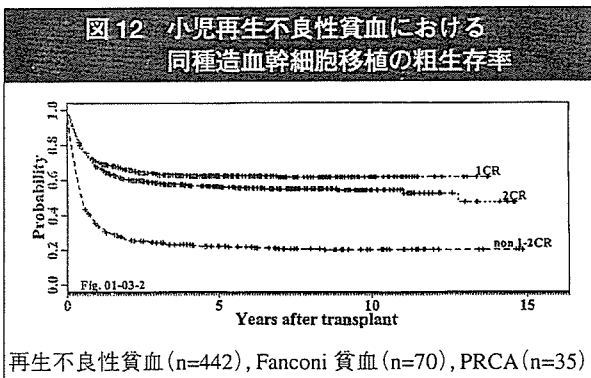
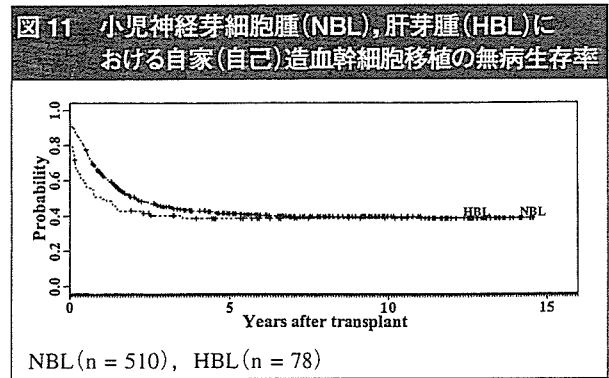
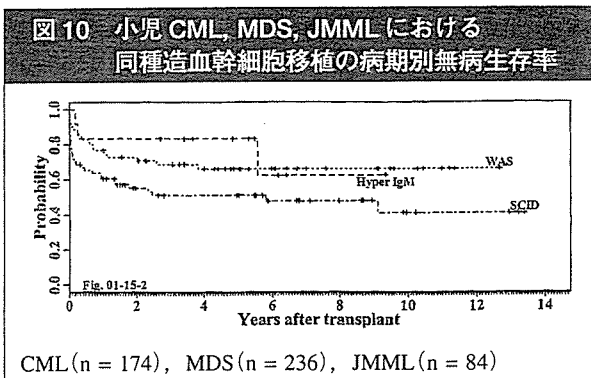
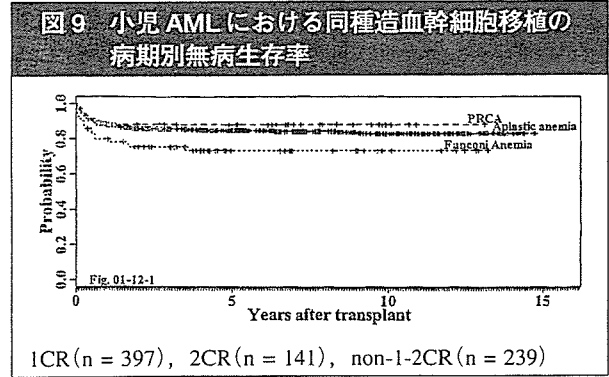
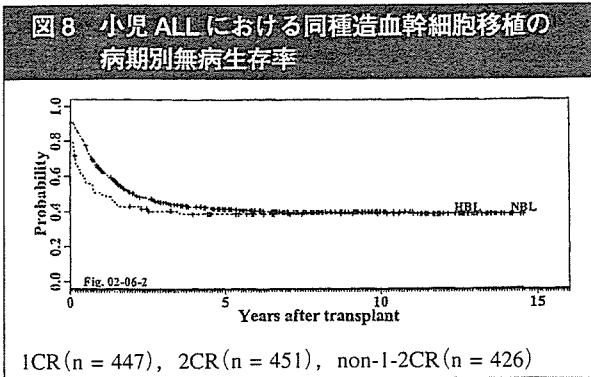
技術的問題点

同種造血幹細胞移植は健康なドナーから行われる移植であり、ドナーとレシピエントの間のHLAが適合していなければならない。そのため、移植が必要な患者においてはまず同胞あるいはその他の血縁者にHLA適合者がいるかどうかの検査から始められる。

小児患者においては同胞もまた小児であることがほとんどで、自らの自由意思でドナーとなることや拒否することが困難な状況の中でドナーとなっているのが現実である。予後不良の患児との関係だけでも大変な両親は、一人のわが子を救うためにもう一人のわが子に、全身麻酔下で行う骨髄採取やG-CSF投与後に行う末梢血幹細胞採取のリスクを負わせるべきかどうかという究極の悩みを抱えることになる。

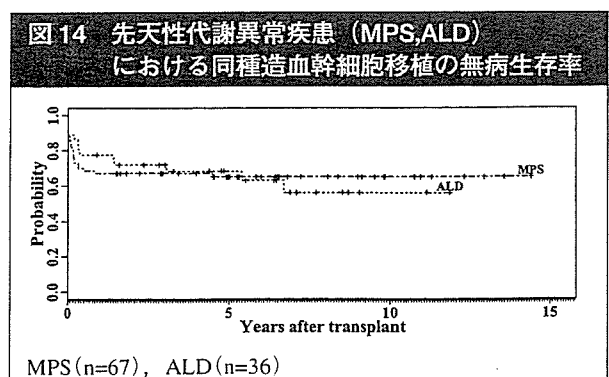
小児ドナーからの造血幹細胞移植は1970年代から行われていたが、国際的にも国内的にも小児ドナーにおける倫理的な面や技術的な面についての議論が十分であった訳ではない。日本小児血液学会では造血幹細胞移植委員会における2年間にわたる作業を経て、2002年に「健常小児ドナーからの造血幹細胞採取に関する倫理指針」と「小児における自己および同種造血幹細胞採取に関する技術指針」を制定した^{8,9)}。

倫理指針においては小児ドナーの人権擁護と安全性確保の観点から、①患者と同胞のHLA検査を行う前に両親のみならず同胞に対しても骨髄や末梢血幹細胞の採取方法とそのリスクを説明すること、②G-CSF投与による末梢血幹細胞採取は10歳以上に限定すること、③1歳未満の乳児や重度の心身障害のある同胞をドナーとすることの禁止、などを定めた。また、医療チームとは独立して小児ドナーの人権を擁護し、両親に対して意思決定の過程の援助を行えるような「小



児の心理専門家」(小児専門のソーシャルワーカー, 小児心理士, 児童精神科医師, 小児の権利擁護を専門とする弁護士など)が参画することを指針とした。

技術指針においては小児患者やドナーからの骨髄や末梢血幹細胞採取の安全性を確保するために, 自己血採取, 骨髄採取, 末梢血幹細胞採取などに関する技術的な事項を詳細に定めている。



■ ■ おわりに

造血幹細胞移植は予後絶対不良の疾患において根治をもたらすことを可能にし、同胞ドナーのいない患者に骨髄や臍帯血の移植の機会をひらく社会的システムとして骨髄バンクや臍帯血バンクが整備され、治療法として原理は確立されたと言ってよい。

今後はより洗練された治療法とするための努力が求められるとともに、造血系以外の臓器や組織の再生を目指した医療への発展が期待される場所である。

文 献

- 1) Gatti RA, Meuwissen HJ, Allen HD, *et al.* Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. *Lancet* 1968; 292 :1366-1369.
- 2) Thomas ED, Storb R, Clift RA, *et al.* Bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 1975; 292: 895-902.
- 3) Korbling M, Dorken B, Ho AD, *et al.* Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patients with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986; 67: 529-532.
- 4) Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989; 321: 1174-1178.
- 5) Bone Marrow Transplantation Committee. National registry of bone marrow transplantation in children (1984). *日本小児科学会雑誌* 1984; 89: 159-163.
- 6) 日本造血細胞移植学会平成 17 年度全国調査報告書. 2006.
- 7) 国勢調査. 総務省統計局. 平成 2 年, 7 年, 12 年, 17 年.
- 8) 加藤俊一. 小児ドナーの権利擁護と安全性確保のために. *日本小児血液学会雑誌* 2003; 17: 167.
- 9) 日本小児血液学会 (<http://www.med.hokudai.ac.jp/ped-w/JSPH-SCT.htm>)